

· 论著 · 肺癌 ·

基于 miR-320/E2F 转录因子 1 轴探讨天南星提取物对肺癌细胞顺铂耐药的影响及相关机制

扫描二维码
查看原文刘雪娇¹, 张雪云¹, 张勇²

【摘要】 目的 基于miR-320/E2F转录因子1(E2F1)轴探讨天南星提取物对肺癌细胞顺铂耐药的影响及相关机制。方法 本实验时间为2020年9月至2021年6月。取对数期A549/DDP细胞分为空白组和天南星组,空白组置于RPMI 1640培养基中常规培养,天南星组置于加入天南星提取物的RPMI 1640培养基中常规培养。另取对数期A549/DDP细胞,转染miR-320抑制质粒后随机分为转染组、转染联合天南星组,转染组置于RPMI 1640培养基中常规培养,转染联合天南星组置于加入天南星提取物的RPMI 1640培养基中常规培养。培养48 h后进行后续实验。采用qRT-PCR检测不同细胞系及四组miR-320相对表达量,采用MTT法检测四组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率,并计算半数抑制浓度(IC₅₀);采用流式细胞术检测细胞凋亡率,采用双荧光素酶实验验证miR-320与E2F1的靶向关系,采用Western blotting法检测E2F1蛋白相对表达量。结果 16HBE细胞系miR-320相对表达量高于A549/DDP细胞系(P<0.001)。与空白组比较,天南星组miR-320相对表达量、不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率、细胞凋亡率升高,IC₅₀、E2F1蛋白相对表达量降低,转染组miR-320相对表达量、不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率、细胞凋亡率降低,IC₅₀、E2F1蛋白相对表达量升高(P<0.05);与天南星组比较,转染联合天南星组miR-320相对表达量、不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率、细胞凋亡率降低,IC₅₀、E2F1蛋白相对表达量升高(P<0.05);与转染组比较,转染联合天南星组miR-320相对表达量、不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率、细胞凋亡率升高,IC₅₀、E2F1蛋白相对表达量降低(P<0.05)。双荧光素酶实验结果显示,E2F1是miR-320的一个靶基因,两者结合位点是E2F1的3'-UTR片段。结论 天南星提取物可逆转肺癌细胞顺铂耐药,促进肺癌细胞凋亡,其机制可能与调控miR-320,进而靶向下调E2F1表达有关。

【关键词】 肺癌;顺铂;天南星提取物;微小RNA-320;E2F转录因子1;药理作用分子作用机制(中药)

【中图分类号】 R 734.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2022.00.172

刘雪娇,张雪云,张勇.基于miR-320/E2F转录因子1轴探讨天南星提取物对肺癌细胞顺铂耐药的影响及相关机制[J].实用心脑血管病杂志,2022,30(8):19-23.[www.syxnf.net]

LIU X J, ZHANG X Y, ZHANG Y. Impact and mechanism of araceae extract against cisplatin resistance on lung cancer cells based on miR-320/E2F transcription factor 1 axis [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2022, 30(8): 19-23.

Impact and Mechanism of Araceae Extract Against Cisplatin Resistance on Lung Cancer Cells Based on miR-320/E2F Transcription Factor 1 Axis

LIU Xuejiao¹, ZHANG Xueyun¹, ZHANG Yong²

1. Department of Respiratory and Critical Care, Liaoning Provincial People's Hospital, Shenyang 110000, China

2. Department of Pathology, Liaoning Cancer Hospital, Shenyang 110801, China

Corresponding author: ZHANG Xueyun, E-mail: lj0pgm@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the impact and mechanism of araceae extract against cisplatin resistance on lung cancer cells based on miR-320/E2F transcription factor 1 axis. **Methods** The experiment time was from September 2020 to June 2021. The logarithmic A549/DDP cells were selected and divided into blank group (group A) and araceae extract group (group B). The group A was routinely cultured in RPMI 1640 medium, and the group B was routinely cultured in RPMI 1640 medium added with araceae extract. In addition, the logarithmic A549/DDP cells were transfected with miR-320 inhibitor plasmid and then randomly divided into transfection group (group C) and transfection combined with araceae extract group (group D). The group C was routinely cultured in RPMI 1640 medium, and the group D was routinely cultured in RPMI 1640 medium added with araceae

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(20170540559)

1.110000辽宁省沈阳市,辽宁省人民医院呼吸与危重症内一科 2.110801辽宁省沈阳市,辽宁省肿瘤医院病理科

通信作者:张雪云, E-mail: lj0pgm@163.com

extract extract. The follow-up experiment was carried out after 48 hours of culture. qRT-PCR was used to detect the relative expression of miR-320 in different cell series and four groups, respectively. MTT method was used to detect the inhibition rate of cell proliferation after different concentrations of cisplatin treatment in four groups, and the half inhibition concentration (IC_{50}) was calculated; the apoptosis rate was detected by flow cytometry, the targeting relationship between miR-320 and E2F1 was verified by double luciferase assay, and the relative expression of E2F1 protein was detected by Western blotting. **Results** The relative expression of miR-320 in 16HBE cell series was higher than that in A549/DDP cell series ($P < 0.001$). Compared with the group A, the relative expression of miR-320, cell proliferation after different concentrations of cisplatin treatment and apoptosis rate in the group B were higher, and the IC_{50} and relative expression of E2F1 protein in the group B were lower, the relative expression of miR-320, cell proliferation after different concentrations of cisplatin treatment and apoptosis rate in the group C were lower, and the IC_{50} and relative expression of E2F1 protein in the group C were higher ($P < 0.05$). Compared with the group B, the relative expression of miR-320, cell proliferation after different concentrations of cisplatin treatment and apoptosis rate in the group D were lower, and the IC_{50} and relative expression of E2F1 protein in the group D were higher ($P < 0.05$). Compared with the group C, the relative expression of miR-320, cell proliferation after different concentrations of cisplatin treatment and apoptosis rate in the group D were higher, and the IC_{50} and relative expression of E2F1 protein in the group D were lower ($P < 0.05$). The results of dual luciferase show that E2F1 was a target gene of miR-320, and the binding site of the two was the 3'-UTR fragment of E2F1.

Conclusion Araceae extract can reverse the cisplatin resistance of lung cancer cells and promote lung cancer cell apoptosis. Its mechanism may be related to the regulation of miR-320 to further target down-regulation of E2F1 expression.

【Key words】 Lung cancer; Cisplatin; Araceae extract; microRNA-320; E2F transcription factor 1; Molecular mechanisms of pharmacological action (TCD)

肺癌是临床常见的癌症类型，其好发于40岁及以上人群，以恶性程度高、侵袭及转移性强为主要特征^[1]。相关数据显示，全球超过1/3的肺癌患者在我国，且近年我国肺癌发病率有持续增长趋势，每年因肺癌死亡人数超过60万，其已成为我国癌症发病及死亡的首要原因^[2]。肺癌早期常以手术切除为主要治疗方案，手术切除原发病灶可达到临床治愈或缩小肿瘤体积的目的；肺癌中晚期及转移患者标准治疗方案则是以顺铂为基础的两种联合化疗方案，其可明显延长患者生存期，但长期使用顺铂会引发肿瘤耐药，进而影响化疗效果^[3]。天南星提取物是中药天南星的主要活性成分集合物，具有抗惊厥、镇静、止痛、抗氧化等多重药理活性，近年其被发现有一定抗肿瘤活性^[4]。有研究发现，天南星提取物可抑制胃癌细胞增殖，促进胃癌细胞凋亡，从而对胃癌大鼠发挥治疗作用^[5]。但目前关于天南星提取物对肺癌细胞顺铂耐药的影响及相关机制鲜有报道。本研究采用天南星提取物干预肺癌细胞，观察其对顺铂耐药的影响，并探讨相关机制。

1 材料与方 法

1.1 一般材料 本实验时间为2020年9月至2021年6月。人肺癌顺铂耐药株A549/DDP细胞系、人支气管上皮16HBE细胞系购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要药物、试剂及仪器 天南星提取物（兰州沃特莱斯生物科技有限公司），qRT-PCR试剂盒、Lipofectamine™3000试剂盒、miR-320抑制质粒、双荧光素酶检测试剂盒、MTT试剂盒购自上海群己生物科技有限公司，兔抗人E2F转录因子1（E2F transcription factor 1, E2F1）—抗购自美国CST公司，7300 qRT-PCR仪购自美国ABI公司，Spark酶标仪购自瑞士Tecan公司，FACS Aria流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 细胞培养 分别将A549/DDP细胞、16HBE细胞置于RPMI 1640培养基（含10% FBS、1%青链霉素）中，在培养箱

标准条件下（37℃，5% CO₂）培养，A549/DDP细胞额外加入顺铂（终浓度为1 mg/L），隔天换液，待细胞融合至80%，胰酶消化后传代培养，取对数期细胞用于后续实验。

1.4 转染及分组^[6] 取对数期A549/DDP细胞分为空白组和天南星组，空白组置于RPMI 1640培养基中常规培养，天南星组置于加入天南星提取物（终浓度为8 mg/ml）的RPMI 1640培养基中常规培养。另取对数期A549/DDP细胞，PBS洗涤，胰酶消化重悬，调整细胞密度为 1×10^6 个/ml，接种至6孔板，待细胞融合至80%，根据Lipofectamine™3000试剂盒说明书操作转染步骤，将miR-320抑制质粒转染至A549/DDP细胞，随机分为转染组、转染联合天南星组，转染组置于RPMI 1640培养基中常规培养，转染联合天南星组置于加入天南星提取物（终浓度为8 mg/ml）的RPMI 1640培养基中常规培养。培养48 h后进行后续实验，每组细胞设置5个复孔。

1.5 qRT-PCR检测miR-320相对表达量 分别取对数期A549/DDP细胞、16HBE细胞，经Trizol法提取总RNA，采用Promega试剂盒反转录为cDNA，以U6为内参，定量后按照qRT-PCR试剂盒说明书要求设定反应体系：双倍核酸染料12 μl，上、下游引物（10 μmol/L）各1 μl，cDNA 1 μl，加双蒸水至总体积为20 μl。反应条件：94℃预变性4 min；94℃变性50 s，40℃退火1 min，72℃延伸5 min，重复35个循环。采用2^{-ΔΔCt}法计算miR-320相对表达量。miR-320上游引物：5'-TCCTTTTTCGCCCTCTCAAC-3'，下游引物：5'-CTCCCCTCCGCCTTCTCTT-3'；U6上游引物：5'-GAATCGGGCCTGCTCAAGT-3'，下游引物：5'-CGAAACGGAGACCCAGGAAA-3'。培养48 h后，分别取空白组、天南星组、转染组、转染联合天南星组细胞，检测miR-320相对表达量，方法同上。

1.6 MTT法检测细胞增殖抑制率、细胞半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC_{50}) 培养48 h后,分别取空白组、天南星组、转染组、转染联合天南星组细胞, PBS洗涤, 胰酶消化重悬, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 接种至6孔板, 待细胞融合至80%, 分别加入不同浓度(2、4、8、16、32 μ g/ml)顺铂至RPMI 1640培养基中, 干预48 h后加入MTT溶液(20 μ l/孔, 5.00 g/L), 静置2 h, 吸去上清液, 加入二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 150 μ l/孔, 振荡至结晶溶解, 采用酶标仪检测各孔490 nm位置吸光度值, 计算细胞增殖抑制率, 细胞增殖抑制率=(1-观察孔吸光度值/对照孔吸光度值) \times 100%。绘制折线图以计算顺铂对各组细胞 IC_{50} 。实验重复3次取平均值。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡率 培养48 h后, 分别取空白组、天南星组、转染组、转染联合天南星组细胞, PBS洗涤, 胰酶消化重悬, 低温离心10 min(3 000 r/min, 离心半径8 cm), 吸去上清, 根据Annexin V-APC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书操作实验步骤, 采用binding buffer缓冲液重悬细胞, 加入Annexin V-FITC、PI各5 μ l并混匀, 避光孵育10 min, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。实验重复3次取平均值。

1.8 双荧光素酶实验验证miR-320与E2F1的靶向关系 经靶基因预测数据库TargetScan预测, E2F1 3'UTR可能存在与miR-320结合的位点, 鉴定工作在上海群己生物科技有限公司进行。分别构建E2F1野生型和突变型3'UTR, 并将其命名为E2F1 3'-UTR-WT、E2F1 3'-UTR-MT, 分别插入至双荧光素酶载体, 与miR-320质粒(miR-320 mimic-NC、miR-320 mimic)共转染至293T细胞, 分为作为E2F1 3'-UTR-WT+miR-320 mimic-NC组、E2F1 3'-UTR-WT+miR-320 mimic组、E2F1 3'-UTR-MT+miR-320 mimic-NC组、E2F1 3'-UTR-MT+miR-320 mimic组。转染24 h后收集细胞, 经双荧光素酶检测试剂盒测定各组荧光素酶活性, 计算相对荧光素酶活性, 相对荧光素酶活性=萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性。实验重复3次取平均值。

1.9 Western blotting法检测E2F1蛋白相对表达量 培养48 h后, 分别取空白组、天南星组、转染组、转染联合天南星组细胞, 采用RIPA液裂解细胞, 低温离心15 min(10 000 r/min, 离心半径10 cm), 经BCA试剂盒测定总蛋白。取40 μ g样本蛋白, 与上样缓冲液等比例混合, 沸水浴变性蛋白, 同参数离心取上清液, 行凝胶电泳分离、湿法转膜, 采用BSA液封闭2 h, 加入兔抗人E2F1一抗(1:500), 4 $^{\circ}$ C冰箱冷藏过夜, TBST洗膜, 加入二抗(1:2 000), 室温孵育2 h, TBST洗膜, 浸入ECL发光液发光, 置于暗室显色, 经凝胶成像仪拍照分析, 并计算E2F1蛋白相对表达量, E2F1蛋白相对表达量=E2F1蛋白条带灰度值/内参GAPDH灰度值。实验重复3次取平均值。

1.10 统计学方法 应用SPSS 22.0统计学软件进行数据处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同细胞系miR-320相对表达量比较 16HBE细胞系

miR-320相对表达量为(0.93 ± 0.10), 高于A549/DDP细胞系的(0.28 ± 0.03), 差异有统计学意义($t=13.921$, $P < 0.001$)。

2.2 四组miR-320相对表达量比较 空白组miR-320相对表达量为(0.27 ± 0.02), 天南星组为(1.57 ± 0.09), 转染组为(0.11 ± 0.01), 转染联合天南星组为(0.49 ± 0.06)。四组miR-320相对表达量比较, 差异有统计学意义($F=711.257$, $P < 0.001$)。与空白组比较, 天南星组miR-320相对表达量升高, 转染组降低, 差异有统计学意义(t 值分别为31.530、16.000, P 值均 < 0.001); 与天南星组比较, 转染联合天南星组miR-320相对表达量降低, 差异有统计学意义($t=22.326$, $P < 0.001$); 与转染组比较, 转染联合天南星组miR-320相对表达量升高, 差异有统计学意义($t=13.969$, $P < 0.001$)。

2.3 四组细胞增殖抑制率、 IC_{50} 及细胞凋亡率比较 四组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率、 IC_{50} 及细胞凋亡率比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与空白组比较, 天南星组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率和细胞凋亡率升高、 IC_{50} 降低, 转染组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率和细胞凋亡率降低、 IC_{50} 升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与天南星组比较, 转染联合天南星组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率和细胞凋亡率降低, IC_{50} 升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与转染组比较, 转染联合天南星组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率和细胞凋亡率升高, IC_{50} 降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表1、图1~2。

2.4 四组双荧光素酶实验结果比较 双荧光素酶实验结果显示, E2F1 3'-UTR-WT+miR-320 mimic-NC组、E2F1 3'-UTR-WT+miR-320 mimic组、E2F1 3'-UTR-MT+miR-320 mimic-NC组、E2F1 3'-UTR-MT+miR-320 mimic组相对荧光素酶活性分别为(1.30 ± 0.14)、(1.29 ± 0.15)、(1.30 ± 0.15)、(0.92 ± 0.11)。与E2F1 3'-UTR-MT+miR-320 mimic组比较, E2F1 3'-UTR-WT+miR-320 mimic-NC组、E2F1 3'-UTR-WT+miR-320 mimic组、E2F1 3'-UTR-MT+miR-320 mimic-NC组相对荧光素酶活性升高, 差异有统计学意义(t 值分别为4.772、4.448、4.568, P 值均 < 0.05)。E2F1是miR-320的一个靶基因, 两者结合位点为E2F1的3'-UTR片段, 见图3。

2.5 四组E2F1蛋白相对表达量比较 空白组、天南星组、转染组及转染联合天南星组E2F1蛋白相对表达量分别为(0.27 ± 0.04)、(0.13 ± 0.01)、(0.88 ± 0.10)、(0.72 ± 0.07)。四组E2F1蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义($F=153.655$, $P < 0.001$); 与空白组比较, 天南星组E2F1蛋白相对表达量降低, 转染组升高, 差异有统计学意义(t 值分别为7.593、13.664, P 值均 < 0.001); 与天南星组比较, 转染联合天南星组E2F1蛋白相对表达量升高, 差异有统计学意义($t=18.657$, $P < 0.001$); 与转染组比较, 转染联合天南星组E2F1蛋白相对表达量降低, 差异有统计学意义($t=2.931$, $P=0.019$), 见图4。

3 讨论

肺癌是发源于支气管黏膜上皮组织的肺原发性恶性肿瘤, 起初沿支气管壁或段支气管壁浸润生长, 后向周围肺

表1 四组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率、IC₅₀及细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Comparison of inhibition rate of cell proliferation after different concentrations of cisplatin treatment, IC₅₀ and apoptosis rate among the four groups

组别	细胞增殖抑制率 (%)					IC ₅₀ (μ g/ml)	细胞凋亡率 (%)
	2 μ g/ml顺铂处理	4 μ g/ml顺铂处理	8 μ g/ml顺铂处理	16 μ g/ml顺铂处理	32 μ g/ml顺铂处理		
空白组	16.45 ± 2.02	33.47 ± 3.40	46.64 ± 4.66	52.38 ± 7.26	65.16 ± 7.09	12.05 ± 2.61	4.01 ± 0.26
天南星组	36.14 ± 3.65 ^a	58.02 ± 6.69 ^a	69.90 ± 8.39 ^a	79.58 ± 8.36 ^a	88.53 ± 7.63 ^a	3.38 ± 0.48 ^a	37.56 ± 5.05 ^a
转染组	8.78 ± 1.05 ^a	19.23 ± 2.66 ^a	28.98 ± 3.55 ^a	39.84 ± 4.86 ^a	53.62 ± 6.23 ^a	29.54 ± 4.02 ^a	1.77 ± 0.18 ^a
转染联合天南星组	20.20 ± 2.57 ^{bc}	44.64 ± 3.33 ^{bc}	53.61 ± 6.42 ^{bc}	64.45 ± 3.04 ^{bc}	76.96 ± 7.67 ^{bc}	6.47 ± 0.80 ^{bc}	12.91 ± 1.88 ^{bc}
F值	105.777	72.941	39.380	37.058	21.960	144.522	184.330
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: IC₅₀=半数抑制浓度; ^a表示与空白组比较, P<0.05; ^b表示与天南星组比较, P<0.05; ^c表示与转染组比较, P<0.05

组织扩张, 继续冲击脏层胸膜并扩散到胸壁、膈肌, 最终通过肺部各淋巴结及上腔静脉转移至脑、肝、肾等全身各处器官^[7]。吸烟是肺癌的主要危险因素之一, 此外, 职业环境、电离辐射、肺部疾病及遗传等也是其重要影响因素^[8]。肺癌早期常表现为呼吸系统症状, 以咳嗽、低热、胸痛为主, 后发展为咯血、面部水肿、声嘶、消瘦, 并随着病灶远端转移部位不同而伴有颅内压增高、肝肿大、腰痛等临床表现^[9]。

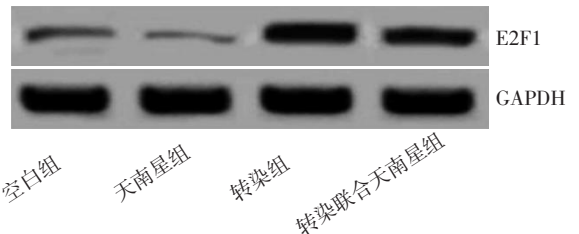


图4 Western blotting法检测四组E2F1蛋白相对表达量的凝胶电泳图
Figure 4 Gel electrophoresis map of the relative expression of E2F1 protein among the four groups detected by Western blotting

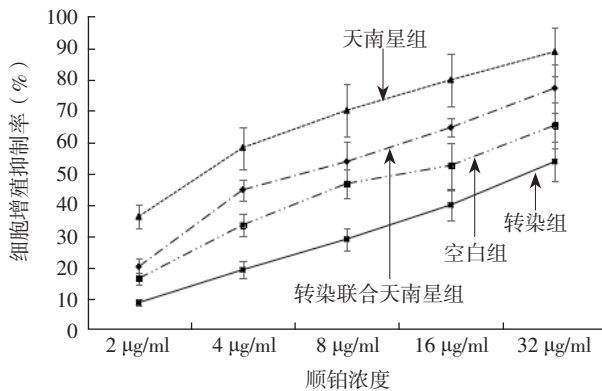


图1 四组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率变化的折线图

Figure 1 Broken line diagram of inhibition rate of cell proliferation after different concentrations of cisplatin treatment among the four groups

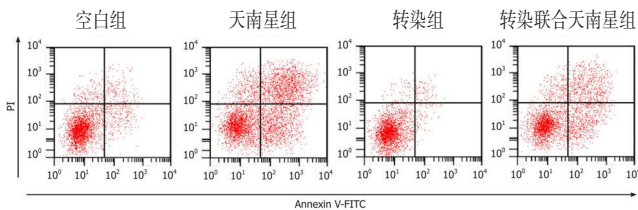


图2 四组流式细胞术检测的细胞凋亡情况

Figure 2 Apoptosis detected by flow cytometry among the four groups

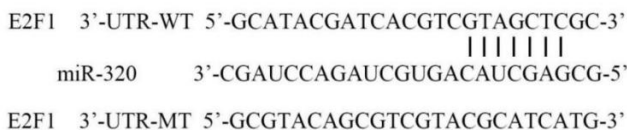


图3 生物信息学分析结果

Figure 3 Bioinformatics analysis results

肺癌多因症状不明而未能早期发现, 多数患者确诊时已出现远端转移, 此时化疗是最有效的治疗手段, 其中顺铂是肺癌的一线化疗药物, 其释放的铂离子可与细胞DNA链内交联, 形成复合体, 影响DNA复制, 从而抑制癌细胞增殖, 但癌细胞可降低顺铂吸收率、修复自身损伤DNA, 从而产生耐药性, 影响化疗效果^[10]。因此, 寻找可逆转肺癌细胞顺铂耐药的药物或手段对改善患者预后、降低病死率意义重大。

中医治疗肺癌具有独特优势, 肺癌归于中医学“肺积”“息贲”“肺萎”“咯血”等范畴, 为五积之一, 其主要病机为禀赋不足、情志失调、邪毒侵入、伤于肌表、由表入里、血行不畅、瘀血阻滞, 以致脾胃失职、聚湿生痰、痰聚于肺、肺行水失职, 终因毒聚邪留、气机紊乱、发为肺积, 故治疗应以祛湿化痰、清肺健脾为主^[11]。中药天南星取自天南星科植物天南星、异叶天南星、东北天南星等块茎, 性温, 味苦、辛, 归肺、肝、脾经, 可化痰、散结、燥湿、消肿^[12]。《本经逢原》^[13]中记载, 天南星可治寒热、结气、利胸膈, 治积聚伏梁、破坚积。天南星提取物含有植物多糖、生物碱类、黄酮类、脂肪酸类等多种天然化合物, 有研究表明其与半夏配伍可抑制肿瘤血管生成、降低肺癌细胞耐药性、诱导肺癌细胞周期停滞, 进而发挥抗肿瘤效应, 提示其对肺癌具有潜在治疗作用^[14]。本研究结果显示, 与空白组比较, 天南星组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率和细胞凋亡率升高、IC₅₀降低, 转染组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率和细胞凋亡率降低、IC₅₀升高; 与天南星组比较, 转染联合天南星组不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率和细胞凋亡率降低, IC₅₀升高; 与转染组比较, 转染联合天南星不同浓度顺铂处理后细胞增殖抑制率和细胞凋亡率升高, IC₅₀降

低,提示天南星提取物可逆转肺癌细胞顺铂耐药,促进肺癌细胞凋亡,其机制可能与天南星提取物调控miR-320有关。

miRNA是细胞内重要的非编码调控因子,可调控众多基因表达转录,范围涉及机体的整个生命过程,且因数量及分子量少,常被作为肿瘤耐药及预后评估的特异性分子标志物。miR-320是新发现的保守型miRNA,其在乳腺癌、结直肠癌、胃癌、膀胱癌等多种恶性肿瘤中呈异常表达,作为一种抑癌因子在肿瘤的发生与发展过程中扮演着重要角色^[15]。E2F1是E2F家族转录因子家族成员,具有额外细胞周期蛋白结合域,可改变细胞周期,调控细胞凋亡过程,诱导细胞上皮间质转化,提高细胞侵袭、迁移能力,具有一定促癌作用^[16]。刘延锋等^[17]研究表明,过表达miR-320可抑制E2F1基因表达,从而抑制结直肠癌肿瘤细胞糖代谢,提示miR-320-E2F1轴在恶性肿瘤中具有一定作用。本研究结果显示,与16HBE细胞系比较,A549/DDP细胞系miR-320相对表达量降低,提示miR-320在肺癌细胞中呈低表达;双荧光素酶实验结果显示,miR-320与E2F1存在结合位点,E2F1是其靶向调控基因之一。本研究结果还显示,与空白组比较,天南星组E2F1蛋白相对表达量降低,转染组升高;与天南星组比较,转染联合天南星组E2F1蛋白相对表达量升高;与转染组比较,转染联合天南星组E2F1蛋白相对表达量降低,提示天南星提取物逆转肺癌细胞顺铂耐药可能与调控miR-320,进而调控下游靶基因E2F1表达有关。

综上所述,天南星提取物可逆转肺癌细胞顺铂耐药,促进肺癌细胞凋亡,其机制可能与通过调控miR-320,进而靶向下调E2F1表达有关。

作者贡献:刘雪娇进行文章的构思与设计;刘雪娇、张雪云进行研究的实施与可行性分析,负责撰写、修订论文;刘雪娇、张雪云、张勇进行数据收集、整理、分析;刘雪娇、张勇进行结果分析与解释;张雪云负责文章的质量控制及审校,对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] LIU D C, HE B Z, LIN L D, et al. Potential of curcumin and resveratrol as biochemical and biophysical modulators during lung cancer in rats [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2019, 42 (3): 328-334. DOI: 10.1080/01480545.2018.1523921.
- [2] 杨振宇, 韦诗友, 夏梁, 等. 手术切除的N2期非小细胞肺癌预后影响因素探究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2020, 23 (1): 15-20. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2020.01.03.
- [3] KENMOTSU H, YAMAMOTO N, YAMANAKA T, et al. Randomized phase III study of pemetrexed plus cisplatin versus vinorelbine plus cisplatin for completely resected stage II to IIIA nonsquamous non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38 (19): 2187-2196. DOI: 10.1200/JCO.19.02674.
- [4] 董微, 张博, 邵超. 鲜天南星水提取物对小鼠子宫纤维瘤的抑制作用和对小鼠雌激素的影响 [J]. *西部医学*, 2019, 31 (5): 679-682, 688. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2019.05.005.
- [5] 李凤, 孔建飞. 天南星水提取物对胃癌大鼠细胞中PKM2、mTOR

基因表达的影响 [J]. *现代食品科技*, 2019, 35 (12): 41-46. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.006.

- [6] 杨宗辉, 尹建元, 魏征人, 等. 天南星提取物诱导人肝癌SMMC-7721细胞凋亡及其机制的实验研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27 (2): 142-144. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2007.02.020.
- [7] ZHANG J, XUE Z Q, WANG B, et al. Inhibition of miR-22 enhanced the efficacy of icotinib plus pemetrexed in a rat model of non-small cell lung cancer [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23 (3): 329-336. DOI: 10.22038/IJBMS.2019.39291.9320.
- [8] FUJIMOTO T, NAKAGAWA S, MOROFUJI Y, et al. Pericytes suppress brain metastasis from lung cancer in vitro [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40 (1): 113-121. DOI: 10.1007/s10571-019-00725-0.
- [9] BOZORGMEHR F, HOMMERTGEN A, KRISAM J, et al. Fostering efficacy of anti-PD-1-treatment: nivolumab plus radiotherapy in advanced non-small cell lung cancer -study protocol of the FORCE trial [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19 (1): 1074. DOI: 10.1186/s12885-019-6205-0.
- [10] RADWAN E, ALI M, FAIED S M A, et al. Novel therapeutic regimens for urethane-induced early lung cancer in rats: combined cisplatin nanoparticles with vitamin-D3 [J]. *IUBMB Life*, 2021, 73 (2): 362-374. DOI: 10.1002/iub.2432.
- [11] 陈锦团, 骆云丰, 朱龙, 等. 微观参数在肺癌中医健康状态评估中的价值 [J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35 (2): 801-804.
- [12] 赵重博, 王晶, 吴博, 等. 基于PB设计和BBD响应面法优化制天南星多糖超声辅助提取工艺及抗肿瘤活性研究 [J]. *中国新药杂志*, 2019, 28 (9): 1139-1144.
- [13] 张璐述. 本经逢原 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959: 105-106.
- [14] 任小瑞, 张恩欣, 曾佳昕. 半夏-天南星治疗肺癌机制的网络药理学研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31 (10): 1198-1206. DOI: 10.19378/j.issn.1003-9783.2020.10.010.
- [15] ZHANG Z Q, ZHANG J K, LI J M, et al. miR-320/ELF3 axis inhibits the progression of breast cancer via the PI3K/AKT pathway [J]. *Oncol Lett*, 2020, 19 (4): 3239-3248. DOI: 10.3892/ol.2020.11440.
- [16] ZHENG X Y, HUANG M G, XING L, et al. The circRNA circSEPT9 mediated by E2F1 and EIF4A3 facilitates the carcinogenesis and development of triple-negative breast cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19 (1): 73. DOI: 10.1186/s12943-020-01183-9.
- [17] 刘延锋, 王铎, 张华洲, 等. miR-320通过靶向E2F1基因抑制结直肠癌细胞的糖代谢 [J]. *国际肿瘤学杂志*, 2017, 44 (11): 819-823. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2017.11.004.

(收稿日期: 2022-03-16; 修回日期: 2022-05-27)

(本文编辑: 谢武英)