

乌索酸通过抑制 miR-21 表达诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的机制

刘昆梅^{1,2}, 郭乐^{1*}, 奚涛²

(¹宁夏医科大学颅脑疾病重点实验室, 银川 750004; ²中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要 探讨乌索酸通过调控 miR-21 表达从而诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用机制。采用 MTT 方法检测乌索酸对肝癌细胞增殖的抑制作用; qPCR 检测肝癌细胞中 miR-21 的表达水平及乌索酸对 HepG2 细胞中 miR-21 表达的调控作用; 转染 miR-21 mimics 进 HepG2 细胞中上调 miR-21 的表达后, MTT、流式细胞检测法、RT-PCR 方法分别分析 miR-21 在乌索酸对细胞的增殖、凋亡以及对凋亡相关基因的调控过程中的作用。结果显示, 与肝正常细胞 L-02 以及肝癌 SMCC-7721、Bel-7402 细胞相比较, 乌索酸对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制效果最强, 且 HepG2 细胞中 miR-21 的表达水平最高。乌索酸可下调 HepG2 细胞中 miR-21 的表达, 且在 24 h 的下调作用最强。miR-21 的表达上调可以部分抵消乌索酸对 HepG2 细胞的抑制增殖及促进凋亡, 部分抵消下调凋亡抑制基因 Bcl-2、survivin 表达和上调促凋亡基因 Bax 表达的作用。结果提示, 乌索酸通过抑制 miR-21 的表达诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡。

关键词 乌索酸; 肝癌细胞; miR-21; 增殖; 凋亡

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)06-0745-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150619

Mechanism study on apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells induced by ursolic acid through inhibiting the expression of miR-21

LIU Kunmei^{1,2}, GUO Le^{1*}, XI Tao²

¹Ningxia Provincial Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004;

²School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract This study aimed at investigating the effect of miR-21 on the apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells induced by ursolic acid (UA). MTT assay was used to determine the inhibition effect of ursolic acid on proliferation of hepatocellular carcinoma cells. The expression level of miR-21 in hepatocellular carcinoma cells and the regulation effect of ursolic acid on the expression of miR-21 in HepG2 cells were determined by qPCR. To up-regulate the expression of miR-21, miR-21 mimics were transfected into HepG2 cells. Then MTT assay, flowcytometry (Annexin V-FITC staining), and RT-PCR were used to detect the regulation effects of ursolic acid on the proliferation, apoptosis, and the expression of apoptosis-related genes after miR-21 over-expression. The results showed that the proliferation inhibition effect of ursolic acid on HepG2 cells and the expression level of miR-21 in HepG2 cells were higher than in hepatic cell L-02 and hepatocellular carcinoma SMCC-7721, Bel-7402 cells. So further study was performed in the HepG2 cells. Ursolic acid inhibited the expression of miR-21 in HepG2 cells. And the greatest inhibition effect was at 24 h after treatment with UA. Over-expression of miR-21 partially offset the effects of ursolic acid on the proliferation, apoptosis, and the expression of apoptosis-related genes such as Bcl-2, survivin and Bax after 24 h. The results suggested that apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells could be induced by ursolic acid by down-regulating the expression of miR-21.

Key words ursolic acid; hepatocellular carcinoma cells; miR-21; proliferation; apoptosis

This study was supported by Ningxia Natural Science Foundation (No. NZ14077)

恶性肿瘤是威胁人类健康的第二大杀手,仅次于心血管疾病。从全球范围内来看,肝癌是最常见的五大恶性肿瘤之一,每年约有90万人群受到其影响,70万患者被肝癌夺去生命,其肿瘤致死率在全类癌症中高居第3位^[1]。早期预防和治疗是防治肝癌的关键,而化学治疗仍然是治疗的主要手段。

乌索酸(ursolic acid, UA)又名熊果酸,属于五环三萜类化合物,广泛存在于自然界多种植物中,如山楂、熊果、陆英等。研究证明其具有多种生物学活性,包括抗菌、抗氧化、免疫调节等作用。近年来发现乌索酸可通过诱导肿瘤细胞的凋亡而抑制其增殖,包括肝癌、乳腺癌、前列腺癌、肺癌、黑色素瘤和子宫内膜癌等^[2-3]。值得注意的是,乌索酸同时被证明具有良好的肝保护作用^[4],因此乌索酸这类既能诱导肝癌细胞凋亡,并能有效保护正常肝细胞的化合物,是抗肝癌药物研究的热点。

miR-21是目前研究较为深入的一种miRNA,研究表明,其与肿瘤相关的细胞增殖、凋亡、侵袭和转移都有联系,在多种肿瘤细胞中过表达,试验敲除miR-21可以减少癌变^[5],因此,miR-21作为一个潜在的抗凋亡因子受到广泛的关注。有文献报道,miR-21参与调控的信号通路与乌索酸凋亡机制有交叉点^[6],为研究miR-21在乌索酸的凋亡机制中的调控作用提供了理论基础。本课题组前期研究表明乌索酸可促进HepG2细胞的凋亡^[7],本研究针对乌索酸对肝癌细胞的促凋亡作用和miR-21对肿瘤细胞的抗凋亡作用,研究两者之间的联系,深入研究乌索酸的抗肿瘤作用机制,为后续研究抗肿瘤药物靶点提供理论基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

乌索酸(UA,纯度大于99.8%,受赠于宜春学院陈武教授);胎牛血清、RPMI-1640和DMEM(美国Gibco公司);胰酶(美国Amersco公司);噻唑兰MTT和二甲基亚砷DMSO(美国Sigma公司);总RNA提取试剂Trizol、转染试剂Lipofectamine 2000、凋亡检测试剂盒(上海Invitrogen公司);miR-21 qPCR引物试剂盒、EzOmic SYBR qPCR

kits、miR-21 mimics(南通百奥生物技术公司);实验中所用的各引物DNA均合成于上海生工生物工程有限公司,其序列见表1。

Table 1 Primer sequences used for RT-qPCR

Gene	Sequences(5'→3')	Annealing temperature/°C	Length/bp
Survivin	CGACCTTGCCCCCTGCCTG AAGGAAAGCGCAACCGGACGA	58	250
Bel-2	TGTGTGTGGAGACGCTCAACC TTCAGAGACAGCCAGGAGAAATC	58	184
Bax	TCAGGATGCGTCCACCAAGAA TCCCGGAGGAAGTCCAATGTC	58	285
GAPDH	AAGGTCGGAGTCAACCGATT CTGGAAGATCGTGATGGGATT	58	222

1.2 细胞株

人肝细胞L-02、肝癌细胞株HepG2、人肝癌细胞株SMCC-7721和人肝癌细胞株Bel-7402(中国药科大学郭青龙教授惠赠,本实验室继以保存),所有细胞均培养于含10% FBS的RPMI-1640培养基中。

1.3 仪器

Power Wave XS2全波长酶标仪(美国Bio-Tek公司);CFX96荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司);FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司)。

2 方法

2.1 MTT法测定UA对人肝癌细胞的增殖抑制率

将细胞(活细胞率超过95%)接种于96孔培养板,每孔 7.5×10^3 个细胞,空白孔不接种细胞。待细胞培养24 h证实贴壁后去掉培养基,加入不同浓度(10,20,40,60 $\mu\text{mol/L}$)的UA,阴性孔加入含0.3% DMSO的无血清培养基作为溶剂对照,空白孔则加入无血清培养基作为对照,每孔200 μL ,细胞分别培养48 h后吸去培养基,每孔加入5 mg/mL MTT 20 μL ,孵育4 h。弃上清液,每孔加入DMSO 150 μL ,酶标仪测定490 nm处的吸收度,按计算细胞生长抑制率并作图计算 IC_{50} 。每个剂量浓度设3个平行孔。

2.2 qPCR检测miR-21在人肝细胞L-02和人肝癌细胞中的表达水平

采用Trizol试剂,按照说明书的方法提取各细胞总RNA,取总RNA 1 μg 以miRNA RT primer逆

转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,选用 U6 RNA 作为内参照,使用 EzOmics SYBR qPCR kits 扩增 miR-30a,通过 Real-time PCR 法对 miR-30a 进行相对定量。反应条件为:95 ℃ 5 min,95 ℃ 30 s,61 ℃ 30 s (30 次),72 ℃ 10 min。

2.3 qPCR 检测 UA 对 miR-21 在人肝癌 HepG2 细胞中表达水平的影响

加药组加入 30 $\mu\text{mol/L}$ UA,对照组加入 0.3% DMSO,分别培养 24 和 48 h 后收集细胞,提取 RNA 后 qPCR 检测 miR-21 的表达水平差异。qPCR 步骤同“2.2”项。

2.4 MTT 方法检测 miR-21 过表达对 UA 抑制肝癌 HepG2 细胞增殖作用的影响

将 HepG2 细胞(活细胞率超过 95%)接种于 6 孔培养板,每孔含 5×10^5 个细胞,待细胞培养 24 h 证实贴壁后用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒将 50 nmol/L miR-21-mimics 和阴性对照 RNA (NC RNA)转染入肝癌 HepG2 细胞上调 miR-21 表达水平。qPCR 检测 miR-21-mimics 在人肝癌 HepG 细胞中转染效率。转染 24 h 后消化细胞重新铺 96 孔板 MTT 方法检测抑制率,MTT 具体步骤见“2.1”项。

2.5 流式细胞仪检测 miR-21 过表达对 UA 抑制肝癌 HepG2 细胞凋亡作用的影响

将 HepG2 细胞(活细胞率超过 95%)接种于 6 孔培养板,每孔含 5×10^5 个细胞,待细胞培养 24 h 证实贴壁后用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒将 50 nmol/L miR-21-mimics 和 NC 转染入肝癌 HepG2 细胞上调 miR-21 表达水平,NC RNA 作为阴性对照。转染 24 h 后加入 20 和 30 $\mu\text{mol/L}$ UA 处理 24 h,按照凋亡检测试剂盒步骤处理细胞后上流式细胞仪检测。

2.6 RT-PCR 检测 miR-21 过表达对 UA 抑制凋亡相关基因表达作用的影响

用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒将 50 nmol/L miR-21-mimics 和 NC 转染入肝癌 HepG2 细胞,转染 24 h 后加入 10,20,30,40 $\mu\text{mol/L}$ UA 处理 24 h,采用 Trizol 试剂,按照说明书的方法提取总 RNA,取总 RNA 1 μg 以 Oligo dT18 逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板,选用 GAPDH 作为内参,用 survivin 和 Bel-2 验证引物进行平行 PCR 扩增。PCR 条件如下:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退

火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,循环 30 次;72 ℃ 再延伸 7 min。反应产物进行琼脂糖电泳检测。

2.7 统计学分析

结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 标准差表示,用 SPSS 统计软件进行数据分析,分析用 t 检验, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

3 结 果

3.1 UA 对人肝癌 HepG2, SMMC-7721, Bel-7402 细胞的增殖抑制作用

为了检测 UA 对人肝癌细胞生长增殖情况的影响,通过 MTT 法检测了细胞在经 UA 处理之后的存活情况。结果(图 1)显示,48 h 处理后,随着剂量的增加,UA 对肝癌 HepG2、Bel-7402、SMCC-7721 细胞生长的抑制作用呈浓度依赖性的增加,且 UA 对 HepG2 细胞的增殖抑制作用最为显著,当药物浓度高于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时 HepG2 细胞的存活率与阴性对照相比有极其显著性差异($P < 0.01$)。加权回归法计算半数生长抑制浓度(IC_{50})显示,HepG2、Bel-7402、SMCC-7721 细胞在 48 h 的 IC_{50} 分别为 (28.8 ± 2.12) , (35.8 ± 1.73) 和 (39.6 ± 3.13) $\mu\text{mol/L}$,证明 UA 对 HepG2 细胞的细胞增殖抑制作用最强。

3.2 miR-21 在肝癌 HepG2, SMMC-7721, Bel-7402 细胞中高表达

qPCR 方法检测 miR-21 在肝细胞 L-02 和肝癌细胞中的表达水平,结果(图 2)显示:与 L-02 相比,miR-21 在不同肝癌细胞中都有不同程度的表达上调,其中,HepG2、Bel-7402、SMCC-7721 细胞中 miR-21 的表达量分别是 L-02 的 4.9、2.8 和 1.5 倍,结果表明 HepG2 细胞中 miR-21 表达水平最高。

3.3 UA 下调 HepG2 细胞中 miR-21 的表达水平

在 3 种肝癌细胞中,UA 对 HepG2 细胞的增殖抑制作用最强,且 miR-21 在 HepG2 中的表达量最高,所以利用 HepG2 细胞作为后续实验对象。采用 UA 对 HepG2 细胞的 IC_{50} 浓度 30 $\mu\text{mol/L}$ 作为加药浓度,处理 24 和 48 h 后检测 miR-21 的表达水平变化。qPCR 结果(图 3)显示:在有效浓度 30 $\mu\text{mol/L}$ UA 的作用下,miR-21 的表达下调,但是表达变化不呈时间依赖性,24 h 表达下调 50%,48 h 表达下调 30%,结果表明 UA 在 24 h 对 miR-21 的表达抑制效果最强。

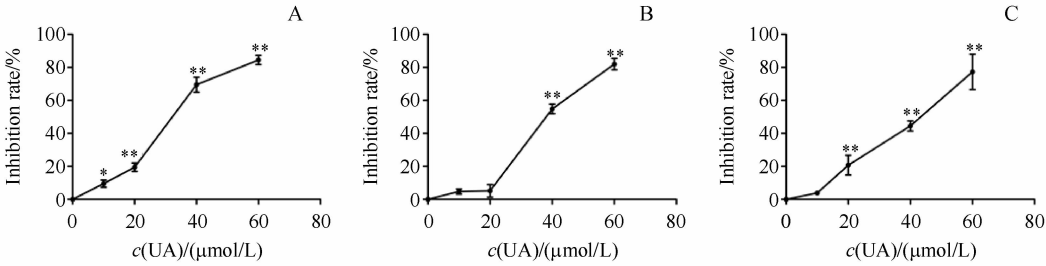


Figure 1 Inhibition effect of ursolic acid (UA) on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells such as HepG2 (A), Bel-7402 (B) and SMCC-7721 (C) were determined by the methyl thiazolyl tetrazolium assay. Cell viability was expressed as the percentage of cells untreated with ursolic acid (UA), which served as the control group and was designated as 100%. The inhibition ratio was calculated from the loss of cell viability in cultures. Each point of the concentration response curve is the average of six wells ($\bar{x} \pm s, n = 3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

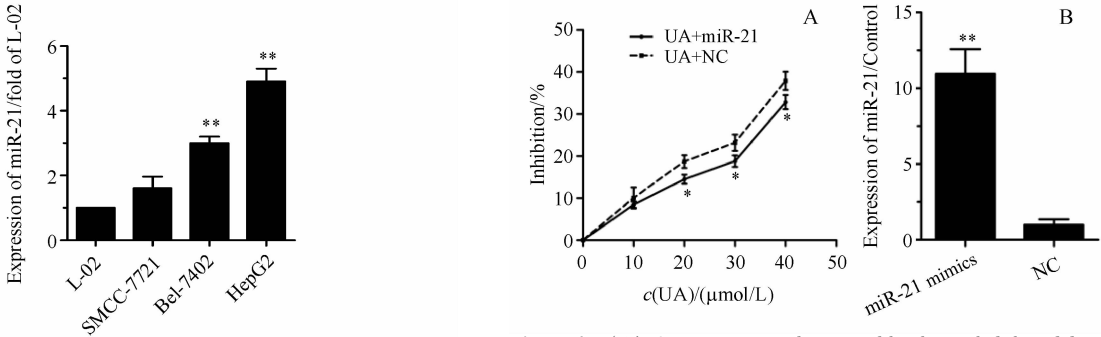


Figure 2 Expression levels of miR-21 in hepatocellular carcinoma cells measured by real-time RT-PCR. The normalized miR-21 expression for L-02 was set 1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$). ** $P < 0.01$ vs L-02 group

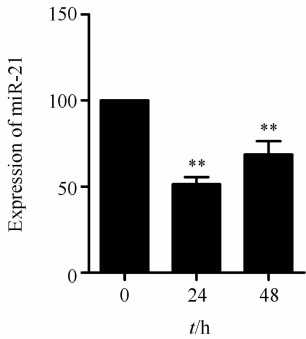


Figure 3 Expression levels of miR-21 in HepG2 cells treated with 30 μmol/L UA for 24 h and 48 h measured by real-time RT-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 3$). ** $P < 0.01$ vs control group

3.4 miR-21 过表达部分消除了 UA 抑制肝癌 HepG2 细胞增殖的作用

为了证实 miR-21 对 UA 抑制 HepG2 细胞增殖作用的影响,把 miR-21-mimics 转染入细胞提高 miR-21 的表达水平(图 4-B),NC RNA 作为阴性对照,由于 UA 在 24 h 对 miR-21 表达下调作用最强,所以 MTT 方法检测 24 h 时 UA 对两组细胞的增殖抑制率。结果显示(图 4-A),当药物浓度高于 20 μmol/L 时,UA 对转染 miR-21 细胞的增殖抑制率与阴性对照相比显著性降低。

Figure 4 (A) Cytotoxicity was determined by the methyl thiazolyl tetrazolium assay. MiR-21 and NC (negative control) were transfected into HepG2 cells. After 24 h, the cells were treated with UA. Cell viability was expressed as the percentage of cells untreated with UA, which served as the control group and was designated as 100%. The inhibition ratio was calculated from the loss of cell viability in cultures. * $P < 0.05$. (B) Real-time PCR analysis of the expression of miR-21 with transfected by miR-21-mimics, or NC in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$). ** $P < 0.01$ vs NC group

3.5 miR-21 过表达部分消除了 UA 促进肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用

为了证实 miR-21 对 UA 促进 HepG2 细胞凋亡作用的影响,把 miR-21 转染入细胞提高 miR-21 的表达水平,NC RNA 作为阴性对照,由于 UA 在 24 h 对 miR-21 表达下调作用最强,所以流式细胞仪方法检测 24 h 时 UA 对两组细胞的凋亡率。结果如图 5 所示,20 与 30 μmol/L UA 处理两组细胞 24 h 后,转染 miR-21 细胞的细胞凋亡率(UR 为晚期凋亡,LR 为早期凋亡,凋亡率为两者之和)分别是 17.93% 和 40.33%,与阴性对照组细胞相比显著性降低。

3.6 miR-21 过表达部分消除了 UA 抑制凋亡相关基因 survivin, Bcl-2 和 Bax 表达的作用

为了进一步证实 miR-21 对 UA 促进 HepG2 细胞凋亡作用的影响,转染 miR-21 后用不同浓度的 UA 处理 24 h,RT-PCR 检测凋亡抑制基因 survivin

和 bcl-2 和促凋亡基因 Bax 的 mRNA 表达水平变化。结果如图 6 所示,UA 处理未转染 miR-21 的 HepG2 细胞后, survivin 和 Bcl-2 呈浓度依赖性下

调,Bax 呈浓度依赖性上升,而转染了 miR-21 后, UA 对 survivin 和 Bcl-2 的下调作用和对 Bax 的上调作用明显下降。

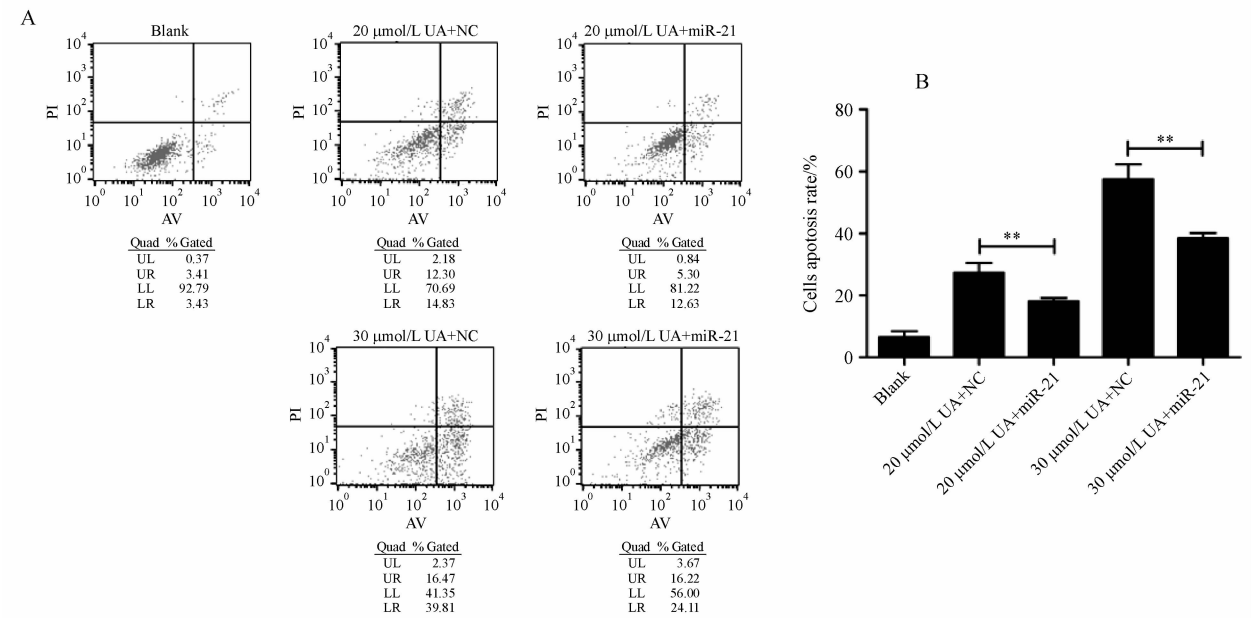


Figure 5 (A) Extent of apoptosis assessed by flow cytometry analysis; (B) quantification of the flow cytometry analysis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
** $P < 0.01$ vs NC group

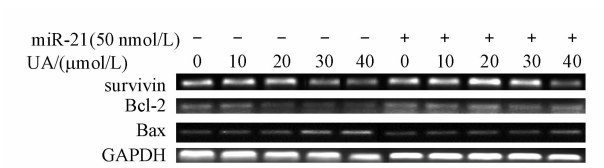


Figure 6 UA suppresses the mRNA expression of bcl-2, survivin and bax in a concentration-dependent manner. HepG2 cells which were transfected with miR-21 mimics or NC were treated with or without UA (10, 20, 30, 40 μmol/L) for 24 h, and total RNA was extracted and examined by reverse-transcriptase PCR

4 讨论

目前认为,肝肿瘤细胞的发生演化是一个多基因、多因素、多阶段的过程^[1]。当细胞凋亡被认定为肿瘤细胞恶变的一个重要原因后,越来越多的研究开始集中在诱导肿瘤细胞凋亡的层面。目前很多天然的化合物被发现能有效诱导肿瘤细胞的凋亡,这其中也包括 UA^[8]。研究认为 UA 能诱导多种体外培养的肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤增殖,但其具体机制尚未明确。miRNA 是近几年抗肿瘤研究热点之一,研究发现 miRNA 在肿瘤的发生发展中起着重要作用,如参与肿瘤转移、凋亡、血管生成以及耐药性等^[9]。miR-21 是最早研究与肿瘤凋亡相

关的 miRNA, miR-21 在多种肿瘤中过表达,与肿瘤细胞抗凋亡作用密切相关^[10]。本课题研究证实了 miR-21 在多种肝癌细胞中高表达。UA 处理 24 h 后, miR-21 的表达水平降低。并且,增加细胞中 miR-21 的表达可以部分消除 UA 对细胞增殖的抑制作用、对细胞凋亡的促进作用以及对抗凋亡基因表达的下调作用,说明 miR-21 参与了 UA 的抗肿瘤作用机制,为后续抗肿瘤药物靶点研究提供理论基础。

MicroRNA (miRNA) 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,其作用机制是与靶 mRNA 不完全互补结合,在蛋白质翻译水平上抑制其表达。本研究表明 miR-21 在 UA 的促凋亡过程中的作用可能与上调抗凋亡基因 Bcl-2 和 survivin 有关。细胞凋亡可依赖于线粒体和死亡受体信号传导通路。绝大多数细胞凋亡是通过线粒体信号通路来实现的,并受到一系列基因的调控, Bcl-2 家族是该途径的主要调节者, bcl-2 属于 Bcl-2 家族中的抗凋亡基因。Bcl-2 能阻断引起细胞凋亡的最后通路,通过防止受损 DNA 翻译成参与细胞凋亡基因的信号,或者通过阻止这些基因产物的活动,起到保护这些细胞的作用^[11]。

survivin 基因一个凋亡抑制基因, 作为 IAP 家族的一个成员, *survivin* 是目前发现的抗凋亡作用最强的分子之一^[12]。有研究表明 *Bcl-2* 是 miR-21 的直接靶基因, miR-21 的过表达可上调 *Bcl-2* 的表达^[13]。而 *survivin* 基因是否是 miR-21 的直接靶基因还需进一步的探讨。

实验结果表明, miR-21 的过表达可以部分消除 UA 对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制作用、促凋亡作用以及对凋亡抑制基因的下调作用。但是, 并没有完全消除 UA 的促细胞凋亡作用, 说明在 UA 促肝癌 HepG2 细胞凋亡过程中还存在其他的分子机制和作用靶点, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] Cristina B, Federica T, Carlo LV. Hepatocellular carcinoma epidemiology[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2014, **28**(1): 753–770.
- [2] Gao Y, Li Z, Xie X, et al. Dendrimeric anticancer prodrugs for targeted delivery of ursolic acid to folate receptor-expressing cancer cells; synthesis and biological evaluation[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2015, **70**: 55–63.
- [3] Wang JS, Shen J, Zhang T, et al. Ursolic acid downregulates COX-2 expression by suppressing the activation of ERK in A549 cells[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2011, **42**(1): 68–72.
- [4] Saravanan R, Viswanathan P, Pugalandi KV. Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats[J]. *Life Sci*, 2006, **78**(7): 713–718.
- [5] Wang Y, Gao X, Wei F, et al. Diagnostic and prognostic value of circulating miR-21 for cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Gene*, 2014, **533**(1): 389–397.
- [6] Han Z, Chen F, Ge X, et al. miR-21 alleviated apoptosis of cortical neurons through promoting PTEN-Akt signaling pathway *in vitro* after experimental traumatic brain injury[J]. *Brain Res*, 2014, **1582**(1): 12–20.
- [7] Tang C, Lu YH, Xie JH, et al. Downregulation of survivin and activation of caspase-3 through the PI3K/Akt pathway in ursolic acid-induced HepG2 cell apoptosis[J]. *Anticancer Drugs*, 2009, **20**(4): 249–258.
- [8] Voiculescu M, Winkler RE, Moscovici M, et al. Chemotherapies and targeted therapies in advanced hepatocellular carcinoma: from laboratory to clinic[J]. *J Gastrointest Liver Dis*, 2008, **17**(3): 315–322.
- [9] Hata A, Lieberman J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer[J]. *Sci Signal*, 2015, **8**(368): re3.
- [10] Buscaglia LE, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21[J]. *Chin J Cancer* (癌症), 2011, **30**(6): 371–380.
- [11] Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: mitochondria versus endoplasmic reticulum[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, **1843**(10): 2240–2252.
- [12] Altieri DC. Survivin—the inconvenient IAP[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, **39**(1): 91–96.
- [13] Xu LF, Wu ZP, Chen Y, et al. MicroRNA-21 (miR-21) regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in lung squamous carcinoma[J]. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e103698.