

## 白藜芦醇抑制 H460 肺癌细胞的增殖作用研究

韩志远<sup>1</sup>, 张慧<sup>2</sup>, 杨巧媛<sup>3\*</sup>

1. 广州医科大学免疫研究所, 广东 广州 510182; 2. 广州医科大学附属广州市第一人民医院功能检查科, 广东 广州 510180; 3. 广州医科大学化学致癌研究所, 广东 广州 510182

**摘要:**目的 探讨白藜芦醇对肺癌细胞 H460 增殖的影响, 以探索小分子核酸 miR-622 在白藜芦醇抗癌中的作用。方法 用不同浓度的白藜芦醇处理肺癌细胞 H460, 利用 CCK8 试剂盒检测细胞增殖, 以 miRNA 定量试剂盒检测 miR-622 的表达水平。利用 Lipofectamine 2000 将 miR-622 模拟物、miR-622 抑制剂及其相应对照转染进入 H460 细胞内。结果 50  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇处理 48 h 即可使 H460 的细胞增殖明显降低至  $(49.77 \pm 1.33)\%$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。50  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇处理 48 h 后, miR-622 的表达增高  $(13.48 \pm 2.16)$  倍, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。转染 miR-622 模拟物可显著提高 miR-622 的表达, 明显使 H460 细胞的增殖率降低至  $(60.27 \pm 5.93)\%$ ,  $P < 0.01$ 。在白藜芦醇处理组中, 转染 miR-622 抑制剂可明显降低 miR-622 的表达; 与 miR-622 抑制剂对照组  $(51.67\% \pm 4.22\%)$  相比, 继而使 H460 细胞的增殖率增高恢复至  $(86.67 \pm 1.11)\%$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。结论 白藜芦醇可抑制 H460 细胞的生长, 且这种作用与 miR-622 的表达上调密切相关。

**关键词:** mi-622; 白藜芦醇; 肺癌; 增殖

中图分类号: R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2014)1-12-04

Inhibition effect of resveratrol on proliferation of lung cancer cells H460 by up-regulating expression of miR-622

HAN Zhi-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, YANG Qiao-yuan<sup>3</sup>

1 Institute of Immunology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong; 2 Guangzhou Municipal First People's Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, Guangdong; 3 Institute for Chemical Carcinogenesis, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, Guangdong, P.R. China

Corresponding author: YANG Qiao-yuan, E-mail: jiangyiguo@vip.163.com

**Abstract; Subject** To investigate the inhibition effect of resveratrol on proliferation of lung cancer cell H460 by up-regulating the expression of miR-622. **Methods** H460 cells were treated with resveratrol with different concentrations. CCK-8 assay was used for checking the proliferation in the H460 cells. The miRNA taqman assay was employed to analyze the expression of miR-622. The oligos miR-622 simulant, miR-622 inhibitor and their control were transfected into in H460 cells with aid of Lipofectamine 2000. **Results** The proliferation rate of H460 cells 48 hours after treated with 50  $\mu\text{mol/L}$  resveratrol was significantly dropped to  $(49.77 \pm 1.33)\%$  ( $p < 0.01$ ). The miR-622 was highly expressed by  $(13.48 \pm 2.16)$  folds in cells 48 hours after treated with resveratrol ( $p < 0.01$ ). Expression level of miR-622 could be significantly enhanced after transfection of miR-622 simulant and the proliferation rate of H460 cells would significantly reduced to  $(60.27 \pm 5.93)\%$  ( $p < 0.01$ ). Transfection of miR-622 inhibitor could reduce the expression of miR-622 and the proliferation rate of H460 cells in resveratrol treated group would increase to  $(86.67 \pm 1.11)\%$ , significantly higher than the miR-622 inhibitor control group  $(51.67\% \pm 4.22\%)$ , showing significant difference ( $p < 0.01$ ). **Conclusion** Resveratrol can inhibit the proliferation of H460 lung cancer cells and the inhibition effect might be closely related to up-regulation of expression of miR-622.

**Key words:** miR-622; Resveratrol; Lung cancer; Proliferation

MicroRNA (miRNA) 是一类非编码的小 RNA 分子, 能够与其下游靶基因的 3' 端非翻译区结合而发挥癌基因或抑癌基因的作用。近十年研究显示 miRNA 可参与调节包括细胞分化、细胞增殖、细胞凋亡或坏死以及发育等多种生物生命活动过程。miRNA 是与人类癌症的发生发展, 癌症的治疗及其预后等密切

相关的。化学预防和抗癌的天然药物白藜芦醇具有抑癌、抗癌的作用。既往研究表明 miRNA 在白藜芦醇的抗癌活性中具有重要作用。我们课题组以白藜芦醇作为抗癌药物进行体外治疗的研究时发现一个具有抑癌基因的 miRNA miR-622。因此, 本研究探讨了 miR-622 在白藜芦醇抗癌活性中的作用, 以揭示

**基金项目:** 国家自然科学基金项目资助 (No. 81202235); 广州医学院博士启动基金资助 (No. 2011C22); 广州市科信局应用基础项目资助 (No. 2013J100034)

**作者简介:** 韩志远 (1981~), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 肺癌治疗的分子机制。

**\*通讯作者:** 杨巧媛, E-mail: yqy1208@126.com

其在癌症治疗中的重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 白藜芦醇(Resveratrol, Resv)和二甲基亚砜(DMSO)购于德国Sigma公司。RPMI 1640培养基、Trizol试剂和转染试剂Lipofectamine 2000购自于美国Life Tech公司。CCK-8试剂购买于日本DOJINDO公司。胎牛血清(FBS)购于杭州四季青生物材料研究所。miRNA定量试剂盒是美国AB公司产品。miR-622模拟物(miR-622-M)、模拟物对照(miR-622-NC)、抑制剂(anti-miR-622)和抑制剂对照(anti-miR-NC)购自于上海吉玛制药技术有限公司。

1.1.2 实验细胞 肺癌细胞株NCI-H460(H460)购买自中国科学院细胞库。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养和传代 将肺癌细胞株H460置于37℃、5%CO<sub>2</sub>恒温培养箱中以含10%FBS的RPMI 1640培养基进行培养,每3 d换一次培养基。当细胞生长至80%融合时用0.25%胰蛋白酶消化、传代和收集细胞。

1.2.2 细胞增殖测定 以2000个/孔的细胞密度将H460细胞种于96孔板中,分别加入10、25、50和100 μmol/L白藜芦醇,设一组空白对照,一组以等浓度DMSO作为溶剂对照。加入白藜芦醇48 h和72 h后用CCK-8试剂检测细胞增殖,读取450 nm波长的吸光度值(即A<sub>450</sub>)以反映细胞的增殖。细胞增殖率按各组A<sub>450</sub>/空白对照组A<sub>450</sub>计算。细胞增殖抑制率以(1-处理组A<sub>450</sub>/空白对照组A<sub>450</sub>)来计算。将细胞增殖抑制率按浓度梯度的对数进行曲线拟合,计算白藜芦醇的IC<sub>50</sub>。

1.2.3 RNA提取 按照Trizol试剂说明书提取总RNA。每1.0 ml Trizol试剂加0.4 ml氯仿,离心(4℃, 12 000 g, 15 min)以分离RNA。取上层水相,加入0.5 ml异丙醇离心(4℃, 7 500 g, 5 min)以沉淀RNA。弃上清,加75%乙醇1 ml离心(4℃, 7 500 g, 5 min)以洗涤RNA。风干后的RNA沉淀以50 μl 4℃预冷的TE缓冲液(pH 8.0)溶解。使用紫外/可见分光光度计测RNA的浓度;使用1.2%琼脂糖电泳检测总RNA的完整性。

1.2.4 miRNA荧光实时定量 以Taqman miRNA assay的说明书定量miR-622的表达水平。以miR-622和内参U6b的特异性茎环引物逆转录各自的cDNA,具体过程:16℃ 30 min, 42℃ 30 min, 85℃ 5 min, 4℃。再以逆转录的cDNA为模板,以各自的正反向引物来扩增定量各自的表达量,具体过程:95℃ 10

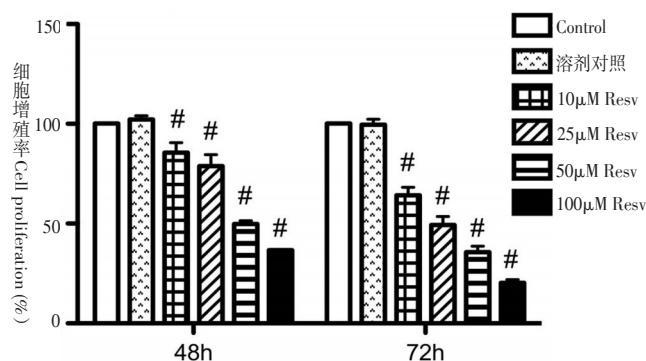
min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 45个循环。

1.2.5 miRNA模拟物或抑制剂的瞬时转染 以4000个/孔的细胞密度将H460细胞种于96孔板,隔日按Lipofectamine 2000说明书进行转染。50 μmol/L miR-622模拟物(miR-622-M)和模拟物对照(miR-NC)以及100 μmol/L抑制剂(anti-miR-622)和抑制剂对照(anti-miR-NC)转染6 h后更换培养基,48 h后以CCK-8检测细胞增殖。转染100 μmol/L anti-miR-622和anti-miR-NC对照12 h后给予50 μmol/L白藜芦醇处理48 h,设DMSO处理为溶剂对照组,CCK-8检测细胞增殖。

1.3 统计学方法 使用IBM SPSS Statistics Base 20统计软件,计量资料两组间比较采用t检验。多组间比较,且方差齐,采用方差分析;若方差不齐采用非参数检验。

## 2 结果

2.1 白藜芦醇对肺癌细胞H460增殖的影响 10、25、50和100 μmol/L的白藜芦醇处理48和72 h后均能显著抑制H460细胞的增殖,尤其是50 μmol/L白藜芦醇处理48 h即可使细胞增殖率降低至(49.77±1.33)%,100 μmol/L甚至降低至(36.66±0.26)%(见图1)。48 h和72 h 50%细胞增殖抑制率时白藜芦醇的浓度(IC<sub>50</sub>)分别为(52.02~66.18)和(20.11~24.68) μmol/L,相关系数R<sup>2</sup>值为0.93和0.96,说明曲线拟合良好。



注:白藜芦醇处理48和72 h后H460细胞增殖率的变化。#,与溶剂对照组比较,  $P < 0.01$

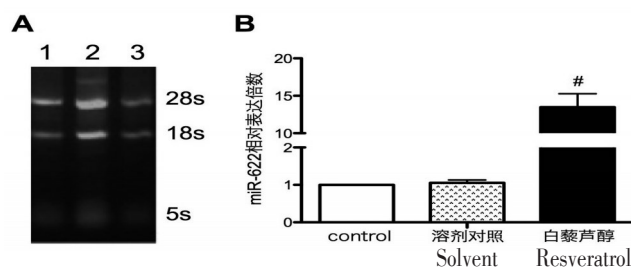
The cell proliferation rate of cells treated with different concentration of resveratrol at 48 and 72 h. #, compared with the solvent control group,  $P < 0.01$ .

图1 白藜芦醇对H460细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of resveratrol on cell proliferation in H460 cells

2.2 白藜芦醇对H460细胞中miR-622的表达水平的影响 提取细胞总RNA的质量良好。RNA的OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>均在1.8~2.1之间,说明RNA纯度高。RNA样品经过1.2%琼脂糖凝胶电泳(图2-A),可见清晰的28S、18S和5S三条带,28S条带亮度与18S条带亮度比约为2:1,说明RNA完整性良好,可用于下游实验

(图2-B), 50  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇处理后, 与溶剂对照组比较, miR-622 的表达上调了 ( $13.48 \pm 2.16$ ) 倍,  $P < 0.01$ 。说明白藜芦醇可引起 miR-622 的表达上调。



注: A 1, control; 2, 溶剂对照; 3, 白藜芦醇处理; BH460 细胞经 50  $\mu\text{mol/L}$  白藜芦醇处理前后 miR-622 的表达。#, 与溶剂对照组相比,  $P < 0.01$ 。

A: 1, control; 2, the solvent control; 3, 50 mmol/L resveratrol treated group. B miR-622 expression level of 50 mmol/L resveratrol treated H460 cell was measured. #, compared with the solvent control group,  $P < 0.01$ .

图2 白藜芦醇处理后 miR-622 的表达

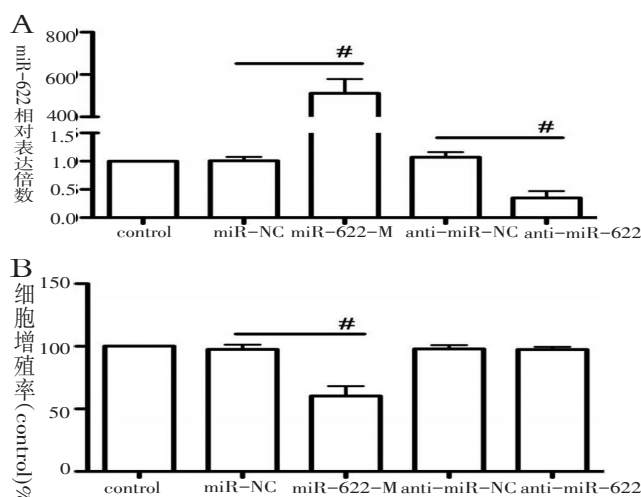
Fig. 2 miR-622 expression level of H460 cells treated with resveratrol

2.3 提高 miR-622 表达可抑制 H460 细胞的增殖与 miR-NC 组比较, miR-622-M 组中 miR-622 的表达水平提高了 ( $511.49 \pm 77.87$ ) 倍, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 3-A); miR-622-M 组中 H460 细胞增殖率降低至 ( $60.27 \pm 5.93$ )%, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 3-B)。这说明高表达的 miR-622 可抑制 H460 细胞的增殖。与 anti-miR-NC 组比较, anti-miR-622 组中 miR-622 的表达水平降低了 ( $0.35 \pm 0.09$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 3-A)。但与 anti-miR-NC 组 ( $97.99\% \pm 1.63\%$ ) 比较, anti-miR-622 组 ( $97.43\% \pm 1.34\%$ ) 中 H460 细胞增殖率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

2.4 抑制 miR-622 表达可逆转白藜芦醇的作用白藜芦醇可抑制 H460 细胞增殖, 也可增加 miR-622 的表达; miR-622 可抑制 H460 细胞的增殖。这提示白藜芦醇的抗增殖作用与 miR-622 密切相关。图 4-A 显示, 与 (anti-miR-NC+白藜芦醇) 组比较, (anti-miR-622+白藜芦醇) 组中 miR-622 表达水平降低了 ( $0.11 \pm 0.01$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与 (anti-miR-NC+白藜芦醇) 组中细胞的增殖率 ( $51.67\% \pm 4.22\%$ ) 比较, (anti-miR-622+白藜芦醇) 组中细胞的增殖率提高到 ( $86.67 \pm 1.11$ )%, 差异有统计学意义  $P < 0.01$  (图 4-B)。这说明白藜芦醇的抗增殖作用与 miR-622 密切相关。

### 3 讨论

白藜芦醇是一类具有预防肿瘤作用的天然多酚类物质, 广泛存在于日本虎杖、葡萄 (或者红葡萄酒)、花生、桑椹等植物中。1997 年, John Pezzuto 等发现白



注: A 瞬时转染 miR-622 模拟物或抑制剂 48h 后 miR-622 的表达水平。#, miR-622-M 与 miR-NC 相比较; anti-miR-622 与 anti-miR-NC 相比较,  $P$  均  $< 0.01$ 。B H460 细胞转染 miR-622 模拟物或抑制剂 48h 后细胞增殖率的变化。#, 与 miR-NC 相比较,  $P < 0.01$ 。

A, The miR-622 levels in cells transfected with miR-622 mimic or inhibitor were checked by miRNA taqman assay. #, miR-622-M vs miR-NC, or anti-miR-622 vs anti-miR-NC, all  $P < 0.01$ . B, The cell proliferation in cells transfected with miR-622 mimic or inhibitor was measured by CCK-8 assay. #, compared with the miR-NC group,  $P < 0.01$

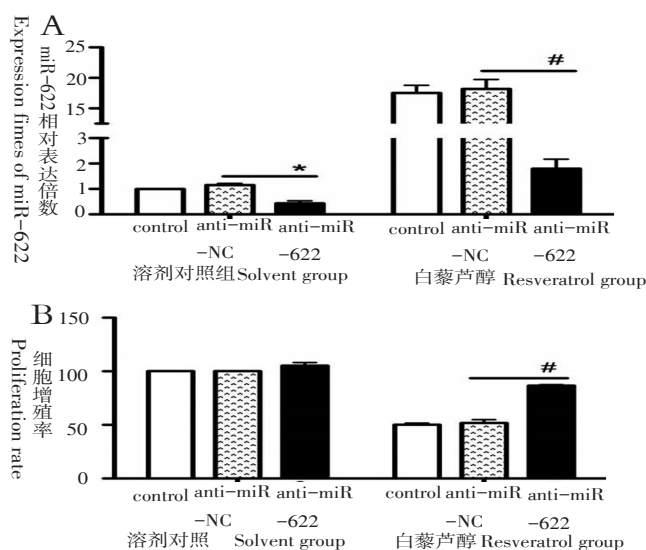
图3 转染 miR-622 模拟物或抑制剂后细胞增殖的变化

Fig. 3 Cell proliferation of cells transfected with miR-622 mimic or inhibitor

藜芦醇具有抗癌活性, 引起研究白藜芦醇的热潮。目前, 白藜芦醇的抗癌活性主要体现在: 白藜芦醇可抑制乳腺癌<sup>[1]</sup>、胃癌<sup>[2]</sup>、结肠癌<sup>[3]</sup>、前列腺癌<sup>[4]</sup>、白血病<sup>[5]</sup>、卵巢癌<sup>[6]</sup>、皮肤癌<sup>[7]</sup>等多种恶性肿瘤细胞的生长的作用; 也可抑制动物癌症模型癌症的发生和进展<sup>[8]</sup>; 临床前期研究结果显示其预防和治疗癌症的作用<sup>[9]</sup>。本研究也证实了白藜芦醇可抑制肺癌细胞的增殖, 这与既往研究<sup>[10]</sup>的结论是一致的。目前, 白藜芦醇的抗癌作用的机制涉及到对细胞周期和细胞凋亡的相关基因的调控。有学者报道 miRNA 参与了白藜芦醇的抗癌作用<sup>[11]</sup>, 这促使我们进一步探讨和研究 miRNA 在白藜芦醇抗癌中的作用。

MicroRNA 是一类能够与其下游靶基因的 3' 端非翻译区相结合的非编码小 RNA 分子。miRNA 数据库登记注册的人类的 miRNA 已超过 2 000 个。近 10 年研究显示人癌细胞和癌组织中 miRNA 表达出现差异<sup>[12]</sup>, 且 miRNA 可作为癌基因或抑癌基因参与癌症的整个过程<sup>[13]</sup>。既往研究主要关注于高表达的 miRNA。近年来, 有关具有抑癌活性且低表达的 miRNA 的研究逐渐成为热点。这类 miRNA 还被开发利用在小鼠癌症模型的治疗研究中<sup>[14,15]</sup>, 为其在临床上治疗癌症提供依据。本研究也是着手于具有抗癌作用的低表





注: A H460细胞转染anti-miR-622 12 h后再给予50  $\mu$ mol/L白藜芦醇处理48 h后miR-622的表达改变。\*,与溶剂对照组中anti-miR-NC相比较,  $P < 0.05$ ; #,与白藜芦醇处理组中anti-miR-NC相比较,  $P < 0.01$ 。B H460细胞转染miR-622抑制剂(anti-miR-622)后12 h再给予50  $\mu$ mol/L的白藜芦醇处理48 h后细胞增殖率的改变。#,与白藜芦醇处理组中anti-miR-NC相比较,  $P < 0.01$ 。

A, miR-622 expression level in cells treated with 50  $\mu$ mol/L resveratrol for 48 h, 12 h before transfection with anti-miR-622 was determined by miRNA taqman assay. \*, compared with anti-miR-NC group in solvent control treatment group,  $P < 0.05$ . #, compared with anti-miR-NC group in the resveratrol treatment group,  $P < 0.01$ . B, cell proliferation of cells transfected with anti-miR-622 and treated with 50  $\mu$ mol/L resveratrol 48h after transfection was determined by CCK-8 assay. #, compared with anti-miR-NC group in resveratrol-treated group,  $P < 0.01$ .

图4 降低miR-622表达对白藜芦醇处理后H460细胞增殖的影响

Fig. 4 Effect of decreased miR-622 expression on proliferation of cells treated with resveratrol

达miRNA的研究。虽然白藜芦醇的抗癌机制比较复杂,目前仍没有完全弄清楚。白藜芦醇提供了一个制造体外抗癌模型的工具。Tili等<sup>[16]</sup>的研究发现白藜芦醇的抗癌作用中,miR-633是非常关键的一个调节因素。我们课题组<sup>[17]</sup>利用miRNA芯片发现miR-622等miRNA在白藜芦醇处理后出现表达升高。本研究首次揭示了miR-622可抑制肺癌细胞H460的增殖,且初步证实了白藜芦醇的抗癌作用是依赖于miR-622这个抑癌因子来发挥作用的。由于H460细胞中miR-622的表达水平比较低<sup>[22]</sup>,所以转染miR-622抑制剂使miR-622表达水平进一步降低,但仍不能使细胞的增殖发生改变。

总之,白藜芦醇可抑制肺癌细胞H460的增殖,且这种作用可能依赖于miR-622的表达。本研究初步探讨了白藜芦醇抗肺癌的作用及其与miRNA相关的机制,这为白藜芦醇治疗癌症提供了新的理论依据。

- [1] Jeong, S.H., I.S. Song, H.K. Kim, et al. An analogue of resveratrol HS-1793 exhibits anticancer activity against MCF-7 cells via inhibition of mitochondrial biogenesis gene expression [J]. *Mol Cells*, 2012, 34(4): 357 - 365.
- [2] Wang, Z., W. Li, X. Meng, et al. Resveratrol induces gastric cancer cell apoptosis via reactive oxygen species, but independent of sirtuin1 [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3): 227 - 232.
- [3] Duessel, S.R.M. Heuertz, and U.R. Ezekiel Growth inhibition of human colon cancer cells by plant compounds [J]. *Clin Lab Sci*, 2008, 21(3): 151 - 157.
- [4] Sheth, S, S. Jajoo, T. Kaur, et al. Resveratrol reduces prostate cancer growth and metastasis by inhibiting the Akt/MicroRNA-21 pathway [J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e51655.
- [5] Can, G., Z. Cakir, M. Kartal, et al. Apoptotic effects of resveratrol, a grape polyphenol, on imatinib-sensitive and resistant K562 chronic myeloid leukemia cells [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(7): 2673 - 2678.
- [6] Lee, M.H., B.Y. Choi, J.K. Kundu, et al. Resveratrol suppresses growth of human ovarian cancer cells in culture and in a murine xenograft model: eukaryotic elongation factor 1A2 as a potential target [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(18): 7449 - 7458.
- [7] Ndiaye, M., C. Philippe, H. Mukhtar, et al. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 508(2): 164 - 170.
- [8] Bishayee, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009, 2(5): 409 - 418.
- [9] Aggarwal, B.B., A. Bhardwaj, R.S. Aggarwal, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(5A): 2783 - 2840.
- [10] Liu, P.L., J.R. Tsai, A.L. Charles, et al. Resveratrol inhibits human lung adenocarcinoma cell metastasis by suppressing heme oxygenase 1-mediated nuclear factor-kappaB pathway and subsequently down-regulating expression of matrix metalloproteinases [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54 Suppl 2: S196 - 204.
- [11] Tili, E., J.J. Michaille, H. Alder, et al. Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor-suppressors and effectors of TGFbeta signaling pathway in SW480 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(12): 2057 - 2065.
- [12] Calin, G.A. and C.M. Croce. MicroRNA signatures in human cancers [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(11): 857 - 866.
- [13] Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259 - 269.
- [14] Kumar, M.S., S.J. Erkeland, R.E. Pester, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(10): 3903 - 3908.
- [15] Kota, J., R.R. Chivukula, K.A. O'Donnell, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1005 - 1017.
- [16] Tili, E., J.J. Michaille, B. Adair, et al. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(9): 1561 - 1566.
- [17] Han, Z., Q. Yang, B. Liu, et al. MicroRNA-622 functions as a tumor suppressor by targeting K-Ras and enhancing the anticarcinogenic effect of resveratrol [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(1): 131 - 139.