

引用本文: 韩林. 微小RNA-34a在紫草素抑制肺癌H1299细胞增殖和侵袭中的作用及其机制[J]. 安徽医药, 2023, 27(1): 83-87. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2023.01.018.



◇ 药学研究 ◇

## 微小RNA-34a在紫草素抑制肺癌H1299细胞增殖和侵袭中的作用及其机制

韩林

作者单位: 成都市第七人民医院中医科, 四川 成都 610000

**摘要:** **目的** 探讨微小RNA-34a(miRNA-34a, miR-34a)在紫草素抑制肺癌H1299细胞增殖和侵袭中的作用及其机制。**方法** 2019年9月至2020年3月,采用1、2.5和5 mg/L紫草素处理体外培养的肺癌H1299细胞后,采用噻唑蓝(MTT)法检测细胞的存活率;平板克隆实验和Transwell实验分别检测细胞克隆形成能力和侵袭能力;RT-PCR检测细胞中miR-34a的表达情况。采用生物信息软件预测、双萤光素酶报告基因实验检测miR-34a与Yin Yang-1(YY1)的靶向关系。采用脂质体法转染miR-34a抑制剂和pcDNA3.1-YY1-GFP过表达质粒后,RT-PCR检测细胞中miR-34a的表达情况,蛋白质印迹法(western blotting)检测细胞YY1蛋白的表达,MTT法、平板克隆实验和Transwell小室实验观察下调miR-34a和上调YY1表达对紫草素处理的H1299细胞增殖和侵袭的影响。**结果** 与0 mg/L紫草素相比,1、2.5和5 mg/L紫草素能够呈浓度依赖性抑制H1299细胞存活率、克隆细胞数[(127.63±7.38)、(108.85±6.34)、(91.72±6.15)比(156.55±9.06)]和侵袭细胞数[(93.12±5.56)、(75.25±4.68)、(59.85±3.20)比(116.00±7.85)],并促进miR-34a表达。生物信息软件预测到miR-34a与YY1存在互补的结合位点,双萤光素酶报告基因实验证实YY1是miR-34a的靶基因。下调miR-34a可逆转紫草素对H1299细胞增殖和侵袭的抑制作用,并促进YY1蛋白的表达,同时上调YY1表达可逆转紫草素对H1299细胞增殖和侵袭的抑制作用。**结论** miR-34a在紫草素抑制肺癌H1299细胞增殖和侵袭过程中发挥着积极作用,其作用机制可能与靶向调控YY1表达有关。

**关键词:** 肺肿瘤; 紫草素; 微小RNA-34a; 增殖; 侵袭; YY1转录因子

### Role and mechanism of miR-34a in shikonin inhibiting the proliferation and invasion of lung cancer H1299 cells

HAN Lin

Author Affiliation: Department of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Seventh People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610000, China

**Abstract:** **Objective** To explore the role of miR-34a in the inhibition of shikonin on the proliferation and invasion of lung cancer H1299 cells and its mechanism. **Methods** Lung cancer H1299 cells in vitro were treated with 1, 2.5 and 5 mg/L shikonin from September 2019 to March 2020, and the cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. Formation and invasion of cell cloning were detected by plate cloning assay and Transwell assay; RT-PCR was used to detect the expression of miR-34a. The targeting relationship between miR-34a and Yin Yang-1 (YY1) was detected by bioinformation software prediction and dual luciferase reporter gene assay. After transfection of miR-34a inhibitor and pcDNA3.1-YY1-GFP overexpression plasmid by liposome method, the expression of miR-34a was detected by RT-PCR, and the expression of YY1 protein was detected by Western blotting. MTT assay, plate cloning experiments and Transwell chamber experiments were performed to observe the effects of down-regulated miR-34a and up-regulated YY1 expression on the proliferation and invasion of shikonin-treated H1299 cells. **Results** Compared with 0 mg/L shikonin, 1, 2.5 and 5 mg/L shikonin could inhibit the survival rate of H1299 cells, the number of cloned cells [(127.63±7.38), (108.85±6.34), (91.72±6.15) vs. (156.55±9.06)] and the number of invasive cells [(93.12±5.56), (75.25±4.68), (59.85±3.20) vs. (116.00±7.85)] in a concentration-dependent manner, and promoted the expression of miR-34a. The bioinformation software predicted the presence of a complementary binding site for miR-34a and YY1, and the dual luciferase reporter gene assay confirmed that YY1 was the target gene of miR-34a. Down-regulation of miR-34a reversed the inhibitory effect of shikonin on proliferation and invasion of H1299 cells, and promoted the expression of YY1 protein. Up-regulation of YY1 expression reversed the inhibitory effect of shikonin on the proliferation and invasion of H1299 cells. **Conclusions** miR-34a plays an active role in the inhibition of proliferation and invasion of lung cancer H1299 cells by shikonin. The mechanism may be related to the targeted regulation of YY1 expression.

**Key words:** Lung neoplasms; Shikonin; miR-34a; Proliferation; Invasion; YY1 transcription factor

紫草素是传统中药紫草的主要活性成分之一,除了具有抗炎、抗菌和促进伤口愈合等药理活性外,还在结肠癌、食管癌和肺癌等肿瘤中表现出较好的抗肿瘤活性<sup>[1-3]</sup>。微小RNAs(miRNAs)是一类与肿瘤发生发展关系密切的非编码RNA,可通过与靶基因mRNA的3'非编码区(3'UTR)结合在转录后水平促进靶基因mRNA降解或抑制其翻译,影响肿瘤细胞增殖、侵袭和凋亡等细胞功能<sup>[4]</sup>。越来越多的研究显示,miRNAs如miR-106b和miR-143等在紫草素抗肿瘤过程中发挥着重要作用<sup>[5-6]</sup>。miR-34a是miR-34家族成员,位于11q23染色体上,被证实肺癌组织中异常低表达,而上调其表达具有抑制癌细胞增殖和侵袭的作用<sup>[7]</sup>。近年来,有报道指出,miR-34a表达上调是紫草素抑制视网膜母细胞瘤增殖的重要机制,但miR-34a是否参与紫草素抗肺癌增殖和侵袭的过程尚不清楚<sup>[8]</sup>。因此,本研究于2019年9月至2020年3月,通过开展体外细胞实验,观察miR-34a在紫草素抑制肺癌H1299细胞增殖和侵袭中的作用,并探讨其可能的分子机制,以期在临床上为紫草素治疗肺癌提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 主要试剂** RPMI1640培养液购于美国Gibco公司;Yin Yang-1(YY1)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗,辣根过氧化物酶标记的二抗均购于美国Abcam公司;pcDNA 3.1-YY1-GFP过表达质粒及其对照pcDNA3.1-GFP空载体质粒购于百奥迈科生物技术有限公司;脂质体2000转染试剂和Trizol试剂盒购于美国Invitrogen公司;反转录试剂盒购于北京天根生化公司;二辛可宁酸(BCA)蛋白定量试剂盒购于美国Thermo公司;紫草素、胰蛋白酶和噻唑蓝(MTT)试剂购于美国Sigma公司;Matrigel胶购于美国BD公司;miR-34a模拟物、miR-34a抑制剂及其相应对照购于上海吉玛生物公司;双萤光素酶报告基因检测试剂盒购于美国Promega公司。

**1.1.2 主要仪器** 细胞培养箱购于美国Thermo Forma公司,凝胶成像分析系统、转染系统和酶标仪购于美国Bio-Rad公司,倒置显微镜购于日本Nikon公司,Transwell小室购于美国Corning公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养和紫草素处理** 将来自中科院上海细胞库的H1299细胞解冻复苏后,接种至含10%胎牛血清(FBS)的RPMI1640培养液中置于细胞培养箱中常规培养。待细胞融合度达80%左右时按1:3比例进行传代。将细胞分为对照组(0 μmol/L),1 μmol/L、2.5 μmol/L和5 μmol/L的紫草素处理组,分

别加入终浓度为0、1、2.5和5 μmol/L紫草素处理。

**1.2.2 MTT法检测细胞存活率** 将各组H1299细胞按照 $10^4$ 个/孔种植于96孔细胞板上,常规培养48 h,另以不含细胞的培养液作为空白组。待紫草素作用48 h后,弃培养液,加入20 μL 5 g/L的MTT溶液继续培养4 h。弃去MTT液后,每孔加入150 μL二甲基亚砜孵育20 min,采用酶标仪在570 nm处检测吸光度值并计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(药物组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)×100%。

**1.2.3 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力** 各组H1299细胞经紫草素处理48 h后制成单细胞悬液。将细胞以800个/孔接种至6孔板,于细胞培养箱内常规培养10~12 d,待有肉眼可见集落形成时终止培养。弃上清,加入4%多聚甲醛固定15 min,应用结晶紫染液染色20 min。洗去染液,通过倒置显微镜观察并计数各组大于15个细胞的集落形成数量。

**1.2.4 Transwell小室检测细胞侵袭能力** 将Matrigel基质胶与无血清培养液按照1:4比例混合后,取混合液25 μL平铺于Transwell小室上室,并置于37℃培养箱中至充分融合。将不同浓度的紫草素处理48 h的H1299细胞制成浓度为 $10^5$ 个/毫升,在Transwell小室上室中加入200 μL细胞悬液,小室下室中加入500 μL含10% FBS的RPMI1640细胞培养液,置于细胞培养箱内培养24 h。取出小室,弃上室内培养液后,使用棉签拭去小室膜表面细胞,加入4%多聚甲醛固定15 min后,加入结晶紫染液染色20 min。于倒置显微镜下每组随机选取5个视野观察穿膜细胞数,取平均值。

**1.2.5 RT-PCR检测miR-34a表达水平** 收集紫草素处理48 h后的各组细胞,加胰酶消化后加入Trizol试剂提取细胞总RNA。将RNA逆转录互补DNA(cDNA),以cDNA为模板,根据上海生工生物合成的PCR引物按照94℃、5 min预变性;94℃、30 s变性,60℃、30 s退火,72℃、30 s延伸,共循环38次的反应条件以U6为内参进行PCR扩增。miR-34a正向引物序列为5'-GTGCAGTGGCAGTGTCTTAGC-3',反向引物序列为5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6正向引物序列为5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3',反向引物序列为5'-GCTTCGGCAGCACATATAC-TAAAT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测各组细胞中miR-34a的表达水平。

**1.2.6 细胞转染** 将对数生长期H1299细胞按照 $10^5$ 个/孔的密度接种于6孔板,常规条件下孵育过夜。通过脂质体2000转染试剂盒将miR-34a抑制剂

及其阴性对照或者 pcDNA 3.1- YY1-GFP 过表达质粒及 pcDNA 3.1-GFP 空载体质粒分别转至 H1299 细胞中,转染 48 h 后给予浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  紫草素处理 48 h,并分别标记为紫草素+anti-miR-34a 组和紫草素+anti-miR-NC 组或紫草素+pcDNA 3.1-YY1 组和紫草素+pcDNA3.1 组。另以正常培养的 H1299 细胞作为正常组,以不做转染只给予 5  $\mu\text{mol/L}$  紫草素处理的 H1299 细胞作为紫草素组。待处理结束后,收集各组细胞,分别采用 MTT 法、平板克隆实验、Transwell 小室实验检测各组细胞的存活率、克隆形成和侵袭能力。

**1.2.7 蛋白质印迹法检测 YY1 蛋白表达** 收集紫草素处理 48 h 的各组 H1299 细胞提取细胞总蛋白,BCA 法检测蛋白的浓度。将蛋白样品与 5 $\times$ 十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液以 4:1 比例混合均匀,沸水浴变性。按照每孔 60  $\mu\text{g}$  将蛋白样品电泳分离后,采用湿转法将蛋白样品转至 PVDF 膜上。经含 5% 脱脂奶粉的封闭液封膜处理 1.5 h 后,加入 YY1 抗体和 GAPDH 抗体(稀释比 1:1 000)4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 24 h。次日加入二抗(稀释比 1:2 000)工作液室温孵育 1 h 后,滴加化学发光剂显影。以 GAPDH 为管家基因,采用凝胶成像系统分析 YY1 蛋白的表达水平。

**1.2.8 双萤光素酶报告基因实验验证 miR-34a 与 YY1 靶向关系** 运用生物信息学软件 TargetScan (<https://www.targetscan.org>)、miRBase (<https://microrna.sanger.ac.uk>) 和 MiRanda (<https://www.microrna.org>) 对 miR-34a 潜在靶基因进行预测,最终将 YY1 作为研究对象。将 YY1 3' UTR 片段克隆并重组于 psiCHECK2 质粒上,构建 psiCHECK2-YY1 野生型(YY1-WT)报告基因质粒;同时,利用 Takara 点突变试剂盒将 YY1 3' UTR 与 miR-34a 结合位点“ACUGCCA”进行突变为“UGACGGU”后,克隆到 psiCHECK2 质粒上,构建 psiCHECK2-YY1 野生型(YY1-MUT)报告基因质粒。将质粒分别与 miR-34a 模拟物、miR-34a 抑制剂及其阴性对照参照脂质体 2000 说明书步骤共转染至 H1299 细胞中,48 h 后根据双萤光素酶报告基因检测试剂盒说明书检测各组细胞萤光素酶活性。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 22.0 进行统计学分析。实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK- $q$ ;两组间比较采用独立样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 紫草素以浓度依赖性抑制肺癌 H1299 细胞增殖和侵袭** 以 1、2.5 和 5  $\mu\text{mol/L}$  紫草素处理后发现,肺癌 H1299 细胞存活率、克隆细胞数和侵袭细胞数呈浓度依赖性降低,且与对照(0  $\mu\text{mol/L}$ )组比较,均

差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1,表 1。

表 1 不同浓度紫草素对 H1299 细胞增殖、侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 浓度                    | 重复次数 | 细胞存活率/%                         | 克隆细胞数                           | 侵袭细胞数                           |
|-----------------------|------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 0 $\mu\text{mol/L}$   | 3    | 100                             | 156.55 $\pm$ 9.06               | 116.00 $\pm$ 7.85               |
| 1 $\mu\text{mol/L}$   | 3    | 82.15 $\pm$ 5.02 <sup>①</sup>   | 127.63 $\pm$ 7.38 <sup>①</sup>  | 93.12 $\pm$ 5.56 <sup>①</sup>   |
| 2.5 $\mu\text{mol/L}$ | 3    | 71.64 $\pm$ 4.28 <sup>①②</sup>  | 108.85 $\pm$ 6.34 <sup>①②</sup> | 75.25 $\pm$ 4.68 <sup>①②</sup>  |
| 5 $\mu\text{mol/L}$   | 3    | 58.37 $\pm$ 2.53 <sup>①②③</sup> | 91.72 $\pm$ 6.15 <sup>①②③</sup> | 59.85 $\pm$ 3.20 <sup>①②③</sup> |
| $F$ 值                 |      | 33.93                           | 43.11                           | 56.15                           |
| $P$ 值                 |      | <0.001                          | <0.001                          | <0.001                          |

注:①与 0  $\mu\text{mol/L}$  比较, $P < 0.05$ 。②与 1  $\mu\text{mol/L}$  比较, $P < 0.05$ 。③与 2.5  $\mu\text{mol/L}$  比较, $P < 0.05$ 。

**2.2 紫草素以浓度依赖性上调肺癌 H1299 细胞中 miR-34a 表达** 0、1、2.5 和 5  $\mu\text{mol/L}$  紫草素处理后 H1299 细胞中 miR-34a 的表达水平分别为 1.03 $\pm$ 0.08、1.65 $\pm$ 0.12、1.65 $\pm$ 0.12、5.12 $\pm$ 0.50,组间比较差异有统计学意义( $F = 99.27$ ,  $P < 0.001$ )。与对照(0  $\mu\text{mol/L}$ )组比较,1、2.5 和 5  $\mu\text{mol/L}$  紫草素处理后 H1299 细胞中 miR-34a 的表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),且呈浓度依赖性。

**2.3 miR-34a 与 YY1 靶向关系验证** 生物信息学软件预测显示,YY1 与 miR-34a 之间存在互补结合位点,见表 2。同时,miR-34a 与 YY1 3' UTR 野生型质粒(YY1-WT)共转染后细胞的萤光素酶活性较对照 miR-NC 明显降低( $P < 0.05$ ),而 anti-miR-34a 与 YY1-WT 共转染后细胞的萤光素酶活性较对照 anti-miR-NC 明显升高( $P < 0.05$ )。但是,miR-34a 或者 anti-miR-34a 与 YY1 3' UTR 突变型质粒(YY1-MUT)共转染后细胞的萤光素酶活性与相应对照比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 2 YY1 3' UTR 与 miR-34a 的结合位点

| 基因      | 互补核苷酸序列                      | 结合位点       |
|---------|------------------------------|------------|
| YY1     | 5'-UUUUUCCAAAAAUACUGCCAG-3'  | 720-726 of |
| miR-34a | 3'-UGUUGGUCGAUUCUGUGACGGU-5' | YY13' UTR  |

表 3 各组细胞萤光素酶活性的对比/ $\bar{x} \pm s$

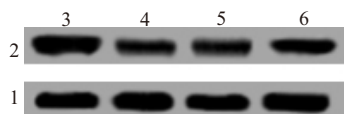
| 组别           | 重复次数 | 萤光素酶活性                       |                 |
|--------------|------|------------------------------|-----------------|
|              |      | YY1-WT                       | YY1-MUT         |
| miR-NC       | 3    | 0.96 $\pm$ 0.05              | 1.02 $\pm$ 0.07 |
| miR-34a      | 3    | 0.32 $\pm$ 0.03 <sup>①</sup> | 0.97 $\pm$ 0.06 |
| anti-miR-NC  | 3    | 1.01 $\pm$ 0.07              | 0.96 $\pm$ 0.06 |
| anti-miR-34a | 3    | 3.56 $\pm$ 0.21 <sup>②</sup> | 1.00 $\pm$ 0.08 |
| $F$ 值        |      | 470.39                       | 0.49            |
| $P$ 值        |      | <0.001                       | 0.698           |

注:YY1-WT 为 psiCHECK2-YY1 野生型报告基因质粒,YY1-MUT 为 psiCHECK2-YY1 突变型报告基因质粒。

①与 miR-NC 组比较, $P < 0.05$ 。②与 anti-miR-NC 组比较, $P < 0.05$ 。



**2.4 下调 miR-34a 逆转紫草素对肺癌 H1299 细胞增殖、侵袭的抑制作用并促进 YY1 蛋白表达** 与正常组比较,紫草素处理后 H1299 细胞中 miR-34a 的表达水平明显升高,而 YY1 蛋白的表达水平、细胞存活率、克隆细胞数和侵袭细胞数均明显降低( $P<0.05$ );与紫草素组比较,转染 anti-miR-34a 后紫草素对 H1299 细胞的上述作用得到部分逆转( $P<0.05$ );而转染 anti-miR-NC 后紫草素对 H1299 细胞的上述作用未有显著改变( $P>0.05$ )。见图 2,表 4。



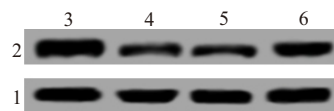
注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—Yin Yang-1(YY1);3—正常组;4—紫草素组;5—紫草素+抑制剂阴性对照组;6—紫草素+miR-34a 抑制剂组。

图2 下调 miR-34a 对紫草素处理的肺癌 H1299 细胞中 YY1 蛋白表达的影响

**2.5 上调 YY1 表达逆转紫草素对肺癌 H1299 细胞增殖和侵袭的抑制作用** 与正常组比较,紫草素处理后 H1299 细胞中 YY1 蛋白的表达水平、细胞存活率、克隆细胞数和侵袭细胞数均明显降低( $P<0.05$ );与紫草素组比较,转染 YY1-pcDNA3.1 过表达质粒后紫草素对 H1299 细胞的上述作用明显减弱( $P<0.05$ );而转染 pcDNA3.1 空载体质粒后显著未影响紫草素对 H1299 细胞的上述作用( $P>0.05$ )。见图 3,表 5。

### 3 讨论

肺癌是最常见的肺原发性恶性肿瘤,也是导致人类癌症相关死亡的首因。目前手术切除和化疗



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—Yin Yang-1(YY1);3—正常组;4—紫草素组;5—紫草素+pcDNA3.1 空载体质粒组;6—紫草素+YY1-pcDNA3.1 过表达质粒组。

图3 上调 YY1 对紫草素处理的肺癌 H1299 细胞中 YY1 蛋白表达的影响

是肺癌的主要治疗手段,但治疗效果并不理想。随着中药抗肿瘤热度的增加,越来越多的抗肿瘤药物被发现。紫草素是一种从中草药紫草中提取的萘醌类化合物,主要用于静脉炎、肝炎、烧伤和血管性紫癜等疾病的治疗<sup>[9]</sup>,此外,紫草素还在多种肿瘤中表现出较好的抗肿瘤作用。Guo 等<sup>[10]</sup>报道,紫草素可通过 CD147 抑制胶质瘤细胞的增殖并诱导其凋亡,被认为是一种很有前途的肿瘤治疗药物。Zhang 等<sup>[11]</sup>研究证实,紫草素可通过下调 DNMT1 表达抑制甲状腺癌 TPC-1 细胞侵袭和迁移。Shilnikova 等<sup>[12]</sup>研究指出,紫草素可通过诱导耐药的人卵巢癌 A2780-CR 细胞线粒体介导的凋亡和减弱上皮间充质转化增强顺铂的抗肿瘤作用。本研究 1、2.5 和 5  $\mu\text{mol/L}$  紫草素处理后发现,紫草素可呈浓度依赖性抑制肺癌 H1299 细胞增殖和侵袭。该结果与王媛等<sup>[13]</sup>得到的紫草素抑制肺腺癌 H1975 细胞增殖以及 Hsieh 等<sup>[14]</sup>得到的紫草素可抑制肺癌 HCC827 细胞侵袭的结果相吻合。

此外,本研究还发现紫草素可呈剂量依赖性上调 miR-34a 的表达。这提示,miR-34a 可能在紫草素抗肺癌 H1299 细胞增殖和侵袭过程中发挥着重要

表4 下调 miR-34a 对肺癌 H1299 细胞中 Yin Yang-1(YY1)蛋白表达及细胞增殖、侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别                 | 重复次数 | miR-34a                 | YY1 蛋白                  | 细胞存活率/%                  | 克隆细胞数                     | 侵袭细胞数                    |
|--------------------|------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 正常组                | 3    | 1.00±0.06               | 1.32±0.13               | 100                      | 161.35±11.26              | 123.48±8.21              |
| 紫草素组               | 3    | 4.68±0.35 <sup>①</sup>  | 0.35±0.03 <sup>①</sup>  | 60.15±3.23 <sup>①</sup>  | 82.48±5.35 <sup>①</sup>   | 57.82±3.52 <sup>①</sup>  |
| 紫草素+anti-miR-NC 组  | 3    | 4.56±0.37 <sup>①</sup>  | 0.38±0.03 <sup>①</sup>  | 61.08±3.35 <sup>①</sup>  | 80.72±5.28 <sup>①</sup>   | 55.65±3.17 <sup>①</sup>  |
| 紫草素+anti-miR-34a 组 | 3    | 1.25±0.13 <sup>①②</sup> | 0.76±0.05 <sup>①②</sup> | 82.42±5.21 <sup>①②</sup> | 126.51±9.36 <sup>①②</sup> | 90.35±4.05 <sup>①②</sup> |
| F 值                |      | 175.11                  | 115.64                  | 41.43                    | 66.35                     | 115.55                   |
| P 值                |      | <0.001                  | <0.001                  | <0.001                   | <0.001                    | <0.001                   |

注:①与正常组比较, $P<0.05$ 。②与紫草素组比较, $P<0.05$ 。

表5 上调 Yin Yang-1(YY1)表达对肺癌 H1299 细胞增殖和侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

| 组别                 | 重复次数 | YY1 蛋白                  | 细胞存活率/%                  | 克隆细胞数                     | 侵袭细胞数                    |
|--------------------|------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 正常组                | 3    | 1.41±0.22               | 100                      | 158.46±10.35              | 118.85±7.62              |
| 紫草素组               | 3    | 0.32±0.03 <sup>①</sup>  | 62.38±3.16 <sup>①</sup>  | 81.72±6.18 <sup>①</sup>   | 56.46±3.28 <sup>①</sup>  |
| 紫草素+pcDNA3.1 组     | 3    | 0.36±0.03 <sup>①</sup>  | 64.15±3.32 <sup>①</sup>  | 83.05±5.96 <sup>①</sup>   | 58.23±3.36 <sup>①</sup>  |
| 紫草素+pcDNA3.1-YY1 组 | 3    | 0.88±0.06 <sup>①②</sup> | 79.46±5.85 <sup>①②</sup> | 118.54±8.05 <sup>①②</sup> | 85.26±5.02 <sup>①②</sup> |
| F 值                |      | 58.68                   | 31.40                    | 64.27                     | 97.41                    |
| P 值                |      | <0.001                  | <0.001                   | <0.001                    | <0.001                   |

注:①与正常组比较, $P<0.05$ 。②与紫草素组比较, $P<0.05$ 。

作用。miR-34a属于miR-34a家族,最早是在秀丽隐杆线虫中被发现的;其上游区域中含有能够与抑癌因子p53结合的位点,受p53的直接调控<sup>[15]</sup>。多个研究显示,miR-34a异常低表达于肝癌、乳腺癌和前列腺癌等多种恶性肿瘤,可抑制肿瘤细胞增殖和侵袭<sup>[16-18]</sup>。Wang等<sup>[7]</sup>研究得出miR-34a具有抑制肺癌细胞增殖和侵袭的作用。本研究通过转染miR-34a抑制剂成功下调miR-34a表达后发现,miR-34a低表达可通过促进肺癌H1299细胞增殖和侵袭,逆转紫草素抗H1299细胞增殖和侵袭的作用。结果提示,紫草素可通过上调miR-34a表达抑制肺癌H1299细胞增殖和侵袭。

为了进一步探讨miR-34a参与紫草素抗肺癌细胞增殖和侵袭的分子机制,本研究运用生物信息学软件对miR-34a的潜在靶基因进行预测发现在YY1与miR-34a之间存在互补的结合位点,最终选用YY1作为研究对象。YY1是锌指类转录因子G11-Kruppel家族成员,定位于人类14号染色体端粒区,可通过调控不同的蛋白辅助因子影响肿瘤相关基因表达,参与肿瘤的发生、发展<sup>[19]</sup>。双荧光素酶报告基因实验证实,miR-34a可靶向结合YY1降低细胞的荧光素酶活性;同时,下调miR-34a表达可促进YY1蛋白的表达。这一系列结果显示,YY1是miR-34a的靶基因。Huang等<sup>[20]</sup>研究证实,YY1异常高表达于肺癌组织和细胞中,通过促进肿瘤细胞的增殖和侵袭过程参与肿瘤的发生、发展。本研究通过转染pcDNA3.1-YY1-GFP过表达质粒成功上调YY1表达后发现,紫草素对肺癌H1299细胞增殖和侵袭的抑制作用明显减弱。结果提示,紫草素可能通过介导miR-34a靶向调控YY1抑制肺癌H1299细胞增殖和侵袭。

综上所述,miR-34a在紫草素抑制肺癌H1299细胞增殖和侵袭过程中发挥着积极作用,其作用机制可能与靶向调控YY1表达有关。

(本文图1见插图1-4)

### 参考文献

- [1] ANDÚJAR I, MARTÍ-RODRIGO A, GINER RM, et al. Shikonin prevents early phase inflammation associated with azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon cancer and induces apoptosis in human colon cancer cells[J]. *Planta Med*, 2018, 84(9/10): 674-683.
- [2] TANG JC, ZHAO J, LONG F, et al. Efficacy of shikonin against esophageal cancer cells and its possible mechanisms in vitro and in vivo[J]. *J Cancer*, 2018, 9(1): 32-40.
- [3] 沈东, 王维. 紫草素对HGF诱导的人肺癌细胞上皮-间充质转化的逆转作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(9): 1622-1626.
- [4] VAN BEIJNUM JR, GIOVANNETTI E, Poel D, et al. miRNAs: micro-managers of anticancer combination therapies [J]. *Angiogenesis*, 2017, 20(2): 269-285.
- [5] HUANG C, HU G. Shikonin suppresses proliferation and induces apoptosis in endometrioid endometrial cancer cells via modulating miR-106b/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Bioscience reports*, 2018, 38(2): BSR20171546. DOI: 10.1042/BSR20171546.
- [6] LIU J, QU CB, XUE YX, et al. MiR-143 enhances the antitumor activity of shikonin by targeting BAG3 expression in human glioblastoma stem cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015, 468(1/2): 105-112.
- [7] WANG F, LI Z, XU L, et al. LIMD2 targeted by miR-34a promotes the proliferation and invasion of non-small cell lung cancer cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 18(5): 4760-4766.
- [8] SU Y, LU S, LI J, et al. Shikonin-mediated up-regulation of miR-34a and miR-202 inhibits retinoblastoma proliferation [J]. *Toxicology Research*, 2018, 7(5): 907-912.
- [9] 李晓瑾, 王国福, 贾晓光. 新疆紫草规范化生产标准操作规程 [J]. *中国现代中药*, 2005, 7(4): 31-33.
- [10] GUO N, MIAO R, GAO X, et al. Shikonin inhibits proliferation and induces apoptosis in glioma cells via down-regulation of CD147 [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19(5): 4335-4343.
- [11] ZHANG Y, SUN B, HUANG Z, et al. Shikonin inhibits migration and invasion of thyroid cancer cells by down-regulating DNMT1 [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 661-670.
- [12] SHILNIKOVA K, PIAO MJ, KANG KA, et al. Shikonin induces mitochondria-mediated apoptosis and attenuates epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells [J]. *Oncology Letters*, 2018, 15(4): 5417-5424.
- [13] 王媛, 陆远, 李发凯, 等. 紫草素对肺腺癌H1975细胞作用的实验研究[J]. *国际呼吸杂志*, 2017, 37(11): 801-805.
- [14] HSIEH YS, LIAO CH, CHEN WS, et al. Shikonin inhibited migration and invasion of human lung cancer cells via suppression of c-Met-mediated epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 118(12): 4639-4651.
- [15] 闫康. miR-34a在骨肉瘤转移中的作用及其机制的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2010.
- [16] REN FH, YANG H, HE R, et al. Analysis of microarrays of miR-34a and its identification of prospective target gene signature in hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 12.
- [17] WANG Y, ZHANG X, CHAO Z, et al. MiR-34a modulates ErbB2 in breast cancer [J]. *Cell Biology International*, 2017, 41(1): 93-101.
- [18] BVSCHAKRAVARTHI, CHANDRASHEKAR DS, AGARWAL S, et al. miR-34a regulates expression of the stathmin-1 oncoprotein and prostate cancer progression [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(7): 1125-1137.
- [19] 杨潇, 王艳清, 鲜舒, 等. 转录因子YY1在妇科肿瘤和妊娠疾病中的作用[J]. *医学分子生物学杂志*, 2017, 14(4): 239-245.
- [20] HUANG T, WANG G, YANG L, et al. Transcription factor YY1 modulates lung cancer progression by activating lncRNA-PVT1 [J]. *DNA and Cell Biology*, 2017, 36(11): 947-958.

(收稿日期: 2020-07-06, 修回日期: 2020-08-16)