

赵汴霞, 任红, 晋佳路, 等. 冬凌草甲素调控 miR-200c/*EZH2* 轴抑制黑色素瘤细胞上皮-间质转化的机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 67-76.

Zhao BX, Ren H, Jin JL, et al. Mechanism by which oridonin regulates miR-200c/*EZH2* axis to inhibit epithelial-mesenchymal transition of melanoma cells [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 67-76.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 010

冬凌草甲素调控 miR-200c/*EZH2* 轴抑制黑色素瘤细胞上皮-间质转化的机制研究

赵汴霞¹, 任红², 晋佳路¹, 曹杰^{2*}

(1.河南医学高等专科学校药理学教研室, 郑州 451191; 2.山东省青岛市市立医院药剂科, 山东 青岛 266000)

【摘要】 目的 探究冬凌草甲素调控微小 RNA200c (miR-200c)/组蛋白甲基化转移酶果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2 (*EZH2*) 轴抑制黑色素瘤细胞 (A375 细胞) 上皮-间质转化 (EMT) 的影响机制。方法 MTT 法检测冬凌草甲素对 A375 细胞活力的影响; 将 A375 细胞分为对照组、冬凌草甲素组、mimic control 组、miR-200c mimics 组、冬凌草甲素+inhibitor control 组、冬凌草甲素+miR-200c inhibitor 组, qRT-PCR 检测 miR-200c、*EZH2* mRNA 表达情况; 免疫印迹法检测 *EZH2* 及 EMT 相关蛋白表达情况; 黏附实验检测 A375 细胞黏附能力; Transwell 实验检测 A375 细胞侵袭及迁移能力; 荧光素酶报告基因实验检测 miR-200c 与 *EZH2* 的靶向关系; 构建移植瘤裸鼠模型, 检测肿瘤质量; 免疫组化法分析 EMT 相关蛋白表达情况。结果 A375 细胞存活率随冬凌草甲素浓度的增加以剂量依赖性显著降低 ($P<0.05$), 由于 40 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素接近半数抑制浓度, 因此选取 40 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素进行后续实验; 与对照组相比, 冬凌草甲素组、miR-200c mimics 组 A375 细胞中 miR-200c、钙粘附蛋白 E (E-cadherin) 表达水平显著增加, *EZH2* mRNA 及蛋白表达水平、神经型钙黏附蛋白 (N-cadherin) 及波形蛋白 (Vimentin) 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数显著降低 ($P<0.05$); 与对照组、mimic control 组相比, miR-200c mimics 组 *EZH2* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); miR-200c 沉默可逆转冬凌草甲素对 A375 细胞的作用; 与对照组相比, 冬凌草甲素组肿瘤质量、*EZH2* mRNA、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平显著降低, miR-200c、E-cadherin 蛋白表达水平显著增加 ($P<0.05$); 与冬凌草甲素组相比, 冬凌草甲素+miR-200c inhibitor 组肿瘤质量、*EZH2* mRNA、N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平显著增加, miR-200c、E-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。结论 冬凌草甲素可能通过促进 miR-200c/*EZH2* 轴来抑制 A375 细胞的 EMT 及肿瘤生长。

【关键词】 黑色素瘤细胞; 冬凌草甲素; 微小 RNA200c; 组蛋白甲基化转移酶果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2; 上皮-间质转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0067-10

Mechanism by which oridonin regulates miR-200c/*EZH2* axis to inhibit epithelial-mesenchymal transition of melanoma cells

ZHAO Bianxia¹, REN Hong², JIN Jialu¹, CAO Jie^{2*}

(1. Department of Pharmacology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China.

2. Department of Pharmacy, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266000)

【基金项目】 2021 年度河南省重点研发与推广专项 (科技攻关) (212102310684)。

【作者简介】 赵汴霞 (1983—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 心血管药理学、肿瘤药理学。E-mail: zhaobxyl83@163.com

【通信作者】 曹杰 (1985—), 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 药学。E-mail: 1016160703@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism by which oridonin regulates the microRNA200c (miR-200c)/enhancer of *zeste* homolog 2 (*EZH2*) axis to inhibit the epithelial-mesenchymal transition (EMT) of melanoma cells (A375 cells). **Methods** The MTT method was used to detect the effect of Rubescensine A on the viability of A375 cells. A375 cells were divided into a control group, oridonin group, mimic control group, miR-200c mimic group, oridonin+inhibitor control group, and oridonin+miR-200c inhibitor group. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-200c and *EZH2* mRNA, Western blot was used to detect the expression of *EZH2* and EMT-related proteins, adhesion test was used to detect the adhesiveness of A375 cells, Transwell test was used to detect the invasiveness and migration abilities of A375 cells, while a luciferase reporter gene experiment was used to detect the targeting relationship between miR-200c and *EZH2*, construct a nude mouse model of transplanted tumor to detect tumor quality. Finally, the expression of EMT-related proteins was analyzed immunohistochemically. **Results** The survival rate of A375 cells decreased significantly with increasing oridonin concentration in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Since 40 $\mu\text{mol/L}$ oridonin was close to the half inhibitory concentration, 40 $\mu\text{mol/L}$ oridonin was selected for follow-up experiments. Compared with those in the control group, the expression levels of miR-200c and E-cadherin in A375 cells in the oridonin group and miR-200c mimic group increased significantly, while the expression levels of *EZH2* mRNA and protein, neural cadherin (N-cadherin), and Vimentin, number of migrating cells, number of invading cells, and number of adhering cells decreased significantly ($P<0.05$). Compared with the control group and the mimic control group, the expression level of *EZH2* protein in the miR-200c mimics group was significantly decreased ($P<0.05$), and the silencing of miR-200c could reverse the effect of oridonin on A375 cells. Compared with the levels in the control group, the tumor quality and expression levels of *EZH2* mRNA, N-cadherin, and Vimentin were significantly decreased in the oridonin group, while the expression levels of miR-200c and E-cadherin were significantly increased ($P<0.05$). Moreover, compared with those in the oridonin group, the tumor quality and expression levels of *EZH2* mRNA, N-cadherin and Vimentin in the oridonin+miR-200c inhibitor group were significantly increased, while the expression levels of miR-200c and E-cadherin were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusions** Oridonin may inhibit the EMT of A375 cells and tumor growth by promoting the miR-200c/*EZH2* axis.

【Keywords】 melanoma cell; oridonin; miR200c; enhancer of *zeste* homolog 2; epithelial-mesenchymal transition

黑色素瘤主要发端于皮肤中称为黑色素细胞的含色素细胞,其发生率和死亡率逐年增加^[1]。尽管多数早期黑色素瘤患者通过外科手术的方式得到治愈,但由于其高转移性,晚期恶性患者的5年生生存率仅在5%左右,已知上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在恶性肿瘤转移中具有关键作用,因此,阐明黑色素瘤的EMT机制对有效控制肿瘤的发展及治疗十分重要^[2-3]。冬凌草甲素是从红景天中分离出来的活性成分,具抗炎、抗菌和抗肿瘤的作用,一些研究称其在皮肤黑色素瘤中显示出有效的抗癌活性^[4]。多项研究表明微小RNA(miRNA)以癌基因或抑癌基因的作用参与调控恶性肿瘤的发生和发展,促进或抑制肿瘤的EMT过程^[2-3,5]。miR-200c作为miRNA家族的成员,已被发现其在黑色素瘤细胞中过表达可抑制细胞增殖、迁移能力以及耐药性^[6]。组蛋白甲基化转移酶果蝇 *zeste* 基因增强子同源物 2(enhancer of *zeste* homolog 2, *EZH2*) 在黑色素瘤中表达异常增加,还可作为重要的EMT诱导剂,参与癌症的转移^[7-8]。有研究表明,miR-200c能通过抑制 *EZH2* 表达来抑制肾细胞癌的进展^[9]。因此,本研究旨在探究冬凌草

甲素通过调控 miR-200c/*EZH2* 轴对黑色素瘤 EMT 的影响机制,以期为黑色素瘤治疗机制研究及治疗靶点的寻找提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

24 只 SPF 级 7~8 周龄 BALB/C 裸鼠(22~24 g)购买于河南省实验动物中心[SCXK(豫)2017-0001],于河南省中医药研究院[SYXK(豫)2019-0001]进行为期 1 周的适应性饲养(自由饮水、采食、12 h 明暗周期、(24±2)℃)。实验经河南医学高等专科学校实验动物福利伦理审查委员会批准通过(20190012),符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

冬凌草甲素(上海宝曼生物科技有限公司,货号:D0348-20 mg, HPLC ≥98% 标准品); A375 细胞系(武汉益普生物科技有限公司,货号:YCL-0014); Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent(北京百瑞极生物科技有限公司,货号:BN17003); BCA 蛋白含量检测试剂盒、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(武汉纯度生物科技有限公司,货号:CDLG-5055、

CDLG-4997);HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗抗体 (Invitrogen Antibodies,货号:A-11001);兔抗 β -actin 抗体 (Abcam,货号:ab8227);兔抗 *EZH2*、神经型钙黏附蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、钙粘附蛋白 E (E-cadherin) 抗体 (Cell Signaling Technology,货号:5246、13116、5741、3195);MTT 检测试剂盒(上海泽叶生物科技有限公司,货号:ZY111105-500)。BioSpectrum-美国 UVP 凝胶成像系统购自上海天放实验仪器有限公司;实时荧光定量 PCR 仪购自赛默飞世尔。

1.3 实验方法

1.3.1 A375 细胞培养

将黑色素瘤细胞(A375 细胞)培养于 RPMI 1640 培养基中(含双抗和胎牛血清),放入恒温培养箱中培养(5% CO₂、37℃)至细胞融合度约为 80% 时进行传代培养。

1.3.2 MTT 法检测 A375 细胞活力

取对数生长期 A375 细胞以每毫升 1×10⁵ 个浓度接种于 96 孔板中(每孔 100 μL)培养 24 h 后,分别添加 0、5、10、20、40、80 μmol/L 冬凌草甲素^[10](按每毫升培养基添加 29.16 μg 冬凌草甲素配置成 80 μmol/L 浓度,依次梯度稀释为 40、20、10、5 μmol/L,设置 5 个复孔)培养 48 h,弃培养基后添加 20 μL MTT(5 μg/L)培养 4 h,添加二甲基亚砷(200 μL)并震荡使结晶溶解,置于酶标仪 490 nm 处检测吸光度(A₄₉₀)值,计算细胞活力(%)=处理组 A₄₉₀/对照组 A₄₉₀×100%。

1.3.3 实验分组

设置对照组、冬凌草甲素组(40 μmol/L 冬凌草甲素)、mimic control 组、miR-200c mimics 组、冬凌草甲素 + inhibitor control 组、冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组;将对数生长期 A375 细胞接种于 6 孔板中培养至细胞融合度约为 80%后按照试剂盒说明书操作,将 miR-200c 模拟物、抑制剂及其相应阴性对照分别转至 A375 细胞中,再按照分组情况添加 40 μmol/L 冬凌草甲素进行培养 48 h。

1.3.4 qRT-PCR 检测 miR-200c、*EZH2* mRNA 表达

用 TRIzol 法提取转染后 A375 细胞及肿瘤组织中总 RNA 并检测浓度及纯度,后按反转录试剂盒说明书进行操作将 RNA 反转录成 cDNA,根据 qRT-PCR 试剂盒说明书进行扩增(重复 3 次),通过 *GAPDH* 及 *U6* 作为内参分别对 *EZH2* 和 miR-200c 基因标准化后使用 2^{-ΔΔCt} 计算两基因表达情况(表 1)。

1.3.5 免疫印迹法检测 EZH2 及 EMT 相关蛋白表达情况

添加 RIPA 裂解液(500 μL)于冰上将 A375 细胞裂解提取总蛋白,并使用 BCA 法定量蛋白后经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳将各蛋白分离,所得分离蛋白低温转膜后脱脂奶粉封闭(1 h),添加兔抗 β -actin、*EZH2*、N-cadherin、Vimentin 及 E-cadherin(1:1000)一抗并 4℃ 过夜,于次日添加已经过稀释的二抗(1:5000)1 h 孵育后 ECL 试剂显影,于蛋白凝胶成像仪中观察条带,并使用 Image J 分析条带灰度值,计算各个蛋白含量(重复 3 次)。

1.3.6 黏附实验检测 A375 细胞黏附能力

使用纤维粘连蛋白(fibronectin)5 μg/mL 包被盖玻片风干后放置到 35 mm 培养皿中,添加 1.5 mL 各组 A375 细胞悬液(每毫升 3×10⁵ 个)1 h 后弃培养基,添加 200 μL 表皮细胞生长因子(10 ng/mL)30 min 后使用 PBS 终止反应,多聚甲醛(4%)固定后于倒置显微镜下随机选取 5 个视野观察细胞黏附数(每组重复 3 个)。

1.3.7 Transwell 实验检测 A375 细胞侵袭及迁移能力

迁移能力检测:将使用 RPMI-1640 无血清培养基所制成的 A375 细胞悬液(每毫升 1×10⁵ 个)接种到 Transwell 上室中(100 μL),在下室中加入 RPMI-1640 含血清培养基(600 μL),于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 24 h,使用棉球将上室未穿膜的残余细胞擦去,选取 5 个视野对穿膜细胞计数;侵袭能力检测:使用经胶所包被的 Matrigel Transwell 小室上室,其余步骤与上述迁移步骤相同(每组重复 3 个)。

表 1 miR-200c、*EZH2* 所用 qRT-PCR 引物
Table 1 qRT-PCR primers for miR-200c and *EZH2*

基因 Gene	上游引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
miR-200c	GGTAATACTGCCGGGTAAT	CAGTCCGTGTCGTGGAGT
<i>U6</i>	CTCGCTTCGGCAGCAC	AACGCTTCACGAATTTGCGT
<i>EZH2</i>	GTGAGAGATTATTCTCAAGATG	CCGACATACTTCAGGGCATCAGCC
<i>GAPDH</i>	GCCAAAAGGGTCATCATCTC	GTAGAGGCAGGGATGATGTTT

1.3.8 荧光素酶报告基因实验检测 miR-200c 与 EZH2 的靶向关系

首先通过生物信息学 TargetScan 网址确定 miR-200c 与 EZH2 结合位点后构建野生型 pmirGLO-EZH2-wt 载体及突变型 pmirGLO-EZH2-mut 载体,将二者分别与 miR-200c mimics、miR-NC 进行相应转染,分为: pmirGLO-EZH2-wt + miR-200c mimics 组、pmirGLO-EZH2-wt + miR-NC 组、pmirGLO-EZH2-mut + miR-200c mimics 组、pmirGLO-EZH2-mut + miR-NC 组,48 h 后弃培养基,并经过 PBS 清洗后加入细胞裂解液(200 μ L),离心取上清转移至新 EP 管中后根据双荧光素酶试剂盒说明书进行染色,检测荧光素酶相对活性。

1.3.9 构建移植瘤裸鼠模型及处理

将所购买的 24 只 BALB/C 裸鼠以 6 只/组随机分为 4 组,分为对照组、冬凌草甲素组、冬凌草甲素 + inhibitor control 组、冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组,在裸鼠左侧腋窝外侧皮下注射 0.2 mL 1.3.2 中对照组、冬凌草甲素组、冬凌草甲素 + inhibitor control 组、冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组细胞悬液(2×10^6 个),饲养 30 d 后将其处死,取出肿瘤组织并称取肿瘤质量(每组重复 6 个),取 3 只裸鼠体内肿瘤组织,通过 qRT-PCR 检测肿瘤组织中 miR-200c、EZH2 表达情况,取其余 3 只裸鼠体内肿瘤组织,免疫组化法分析 EMT 相关蛋白表达情况。

1.3.10 免疫组化法分析 EMT 相关蛋白表达情况

将所得各组肿瘤组织进行多聚甲醛固定,制作常规组织石蜡切片,二甲苯浸泡 5 min 后脱蜡水化,EDTA 缓冲液修复抗原后添加兔抗 N-cadherin、Vimentin 及 E-cadherin 一抗,过夜孵育后添加二抗孵育 0.5 h,DAB 显色、苏木精复染、封片、显微镜观察(每组重复 3 个)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 分析数据,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述计量资料,两组间比较行 t 检验,多组间比较行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 冬凌草甲素对 A375 细胞活力的影响

A375 细胞存活率随冬凌草甲素浓度的增加(0、5、10、20、40、80 μ mol/L)而显著降低,其分为 100%, (85.15 ± 8.22)%, (70.35 ± 6.63)%, (60.82 ± 6.74)%, (47.26 ± 5.70)%, (30.49 ± 4.82)% ($P <$

0.05),存在剂量依赖性,并选取 40 μ mol/L 冬凌草甲素进行后续实验。

2.2 冬凌草甲素对 A375 细胞 miR-200c、EZH2 mRNA 及 EZH2 蛋白表达的影响

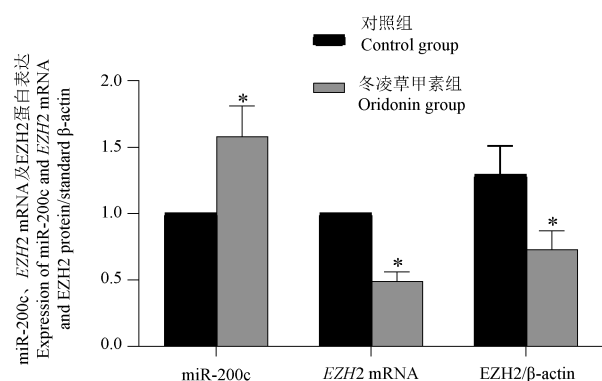
与对照组相比,冬凌草甲素组 A375 细胞中 miR-200c 表达水平显著增加,EZH2 mRNA 及 EZH2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$),见图 1、2。

2.3 冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 的影响

与对照组相比,冬凌草甲素组 A375 细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数显著降低,E-cadherin 表达水平显著增加($P < 0.05$),见图 3、4、5。

2.4 miR-200c 靶向调控 EZH2 的表达

TargetScan 网址预测显示:miR-200c 与 EZH2 存在靶向结合位点(见图 6);荧光素酶报告基因检测显示,与 pmirGLO-EZH2-wt + miR-NC 组(0.91 ± 0.12)相比,pmirGLO-EZH2-wt + miR-200c mimics 组荧光素酶活性(0.47 ± 0.08)显著降低($P < 0.05$),而其余两组荧光素酶活性无显著性差异(0.89 ± 0.11



注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

图 1 冬凌草甲素对 A375 细胞 miR-200c、EZH2 mRNA 及 EZH2 蛋白表达的影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 1 Effect of oridonin on the expression of miR-200c, EZH2 mRNA, EZH2 protein in A375 cells

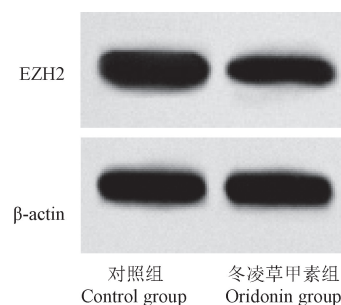


图 2 冬凌草甲素对 A375 细胞 EZH2 蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of oridonin on EZH2 protein expression in A375 cells

vs 0.90 ± 0.13 , $P > 0.05$); 与对照组 (1.30 ± 0.24)、mimic control 组 (1.29 ± 0.22) 相比, miR-200c mimics 组 *EZH2* 蛋白表达水平 (0.68 ± 0.10) 显著降低 ($P < 0.05$), 见图 7。

2.5 miR-200c 过表达对 A375 细胞 EMT 的影响

与对照组相比, mimic control 组各指标无显著性差异 ($P > 0.05$), miR-200c mimics 组 A375 细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数显著降低, E-cadherin 表达水平显著增加 ($P < 0.05$), 见图 8、9、10。

2.6 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对 EMT 的影响

与对照组相比, 冬凌草甲素组 A375 细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数显著降低, E-cadherin 表达水平显著增加 ($P < 0.05$); 与冬凌草甲素组相比, 冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数黏附细胞数显著

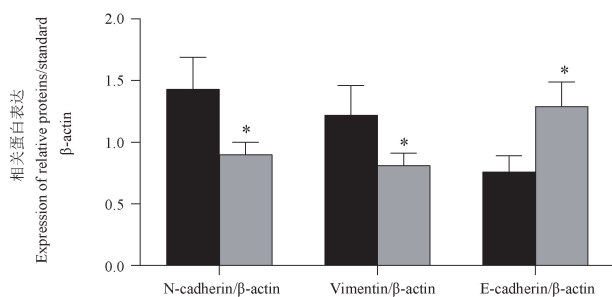
增加, E-cadherin 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 11、12、13。

2.7 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对肿瘤质量的影响

与对照组 (0.54 ± 0.10) 相比, 冬凌草甲素组 (0.15 ± 0.03) 肿瘤质量显著降低 ($P < 0.05$); 与冬凌草甲素组相比, 冬凌草甲素 + inhibitor control 组 (0.16 ± 0.05) 无显著变化, 冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组 (0.48 ± 0.12) 肿瘤质量显著增加 ($P < 0.05$), 见图 14。

2.8 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对体内肿瘤中 EMT 相关蛋白表达的影响

与对照组相比, 冬凌草甲素组 N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平显著降低, E-cadherin 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$); 与冬凌草甲素组相比, 冬凌草甲素 + miR-200c inhibitor 组 N-cadherin 及 Vimentin 蛋白表达水平显著增加, E-cadherin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 见图 15。



注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

图 3 冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 的影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Effect of oridonin on EMT of A375 cells

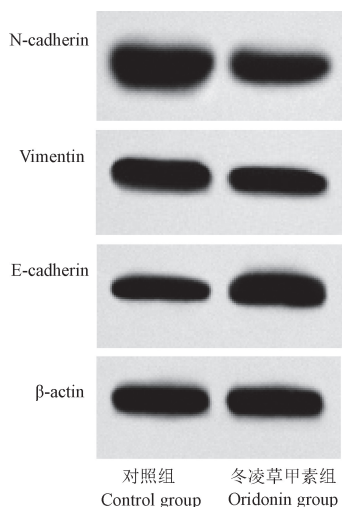


图 4 冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of oridonin on EMT related protein expression in A375 cells

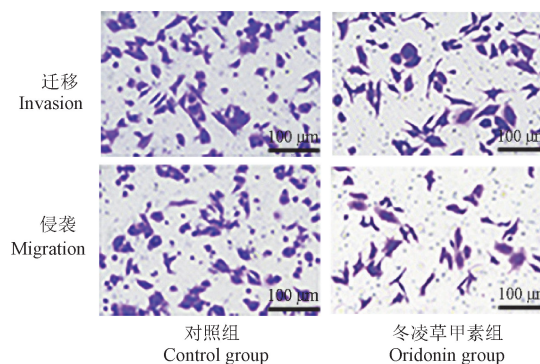
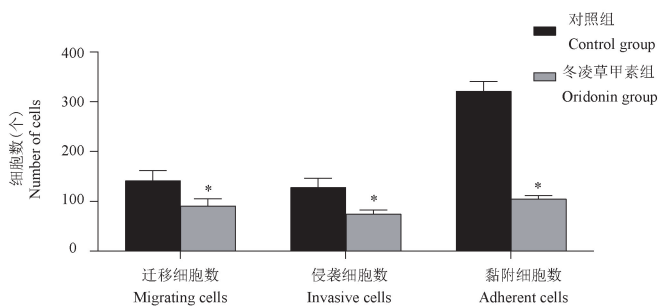
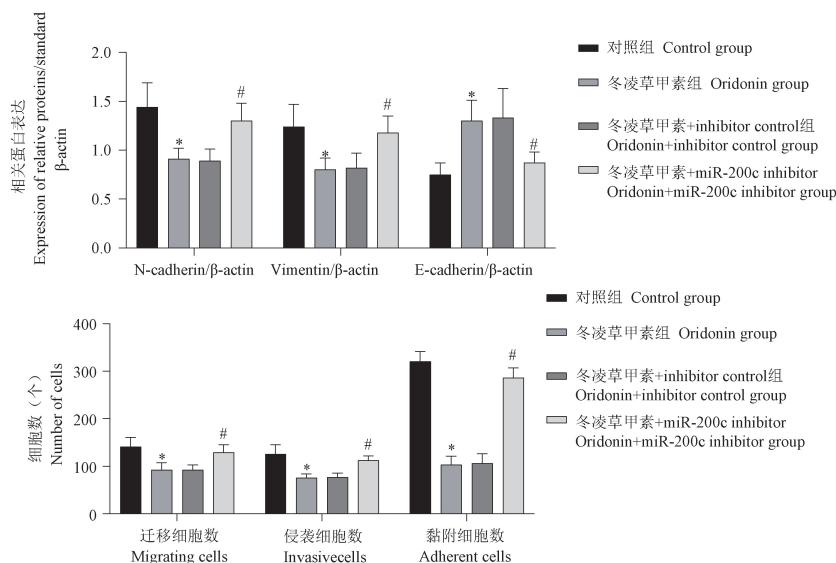


图 5 冬凌草甲素对 A375 细胞侵袭及迁移的影响

Figure 5 Effect of oridonin on invasion and migration of A375 cells



注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与冬凌草甲素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 11 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对 EMT 的影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with oridonin group, # $P < 0.05$.

Figure 11 miR-200c silencing reverses the effect of oridonin on EMT

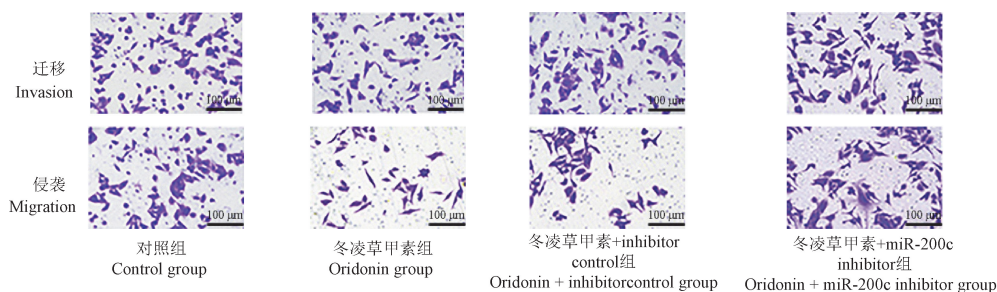
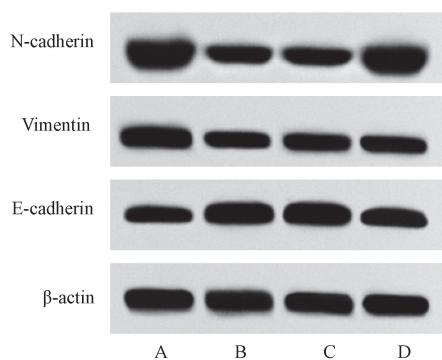


图 12 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对 A375 细胞侵袭及迁移的影响

Figure 12 miR-200c silencing reverses the effect of oridonin on invasion and migration of A375 cells



注:A:对照组;B:冬凌草甲素组;C:冬凌草甲素+inhibitor control组;D:冬凌草甲素+miR-200c inhibitor组。

图 13 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对 EMT 相关蛋白表达的影响

Note. A, Control group. B, Oridonin group. C, Oridonin+inhibitor control group. D, Oridonin+miR-200c inhibitor group.

Figure 13 miR-200c silencing reverses the effect of oridonin on EMT related protein expression



注:A:对照组;B:冬凌草甲素组;C:冬凌草甲素+inhibitor control组;D:冬凌草甲素+miR-200c inhibitor组。

图 14 肿瘤形态观察

Note. A, Control group. B, Oridonin group. C, Oridonin + inhibitor control group. D, Oridonin + miR-200c inhibitor group.

Figure 14 Tumor morphology observation

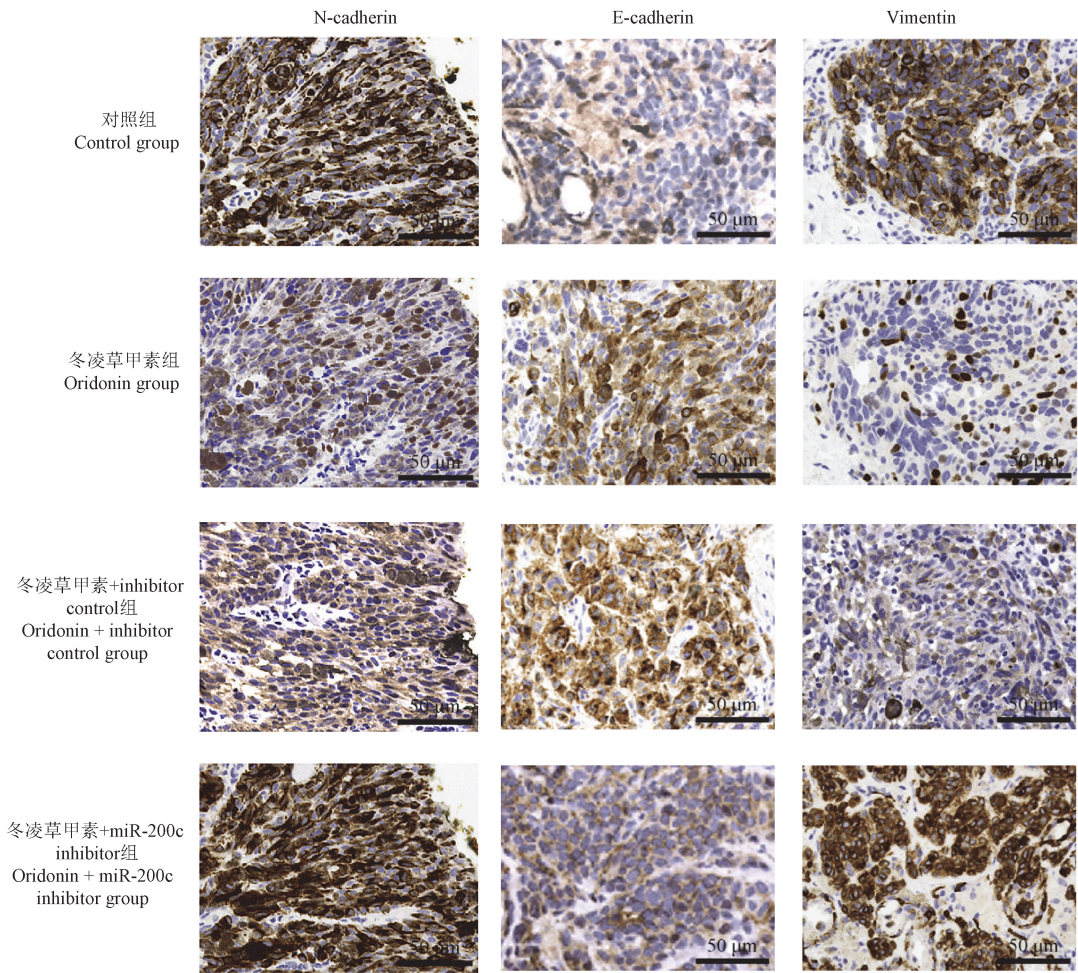
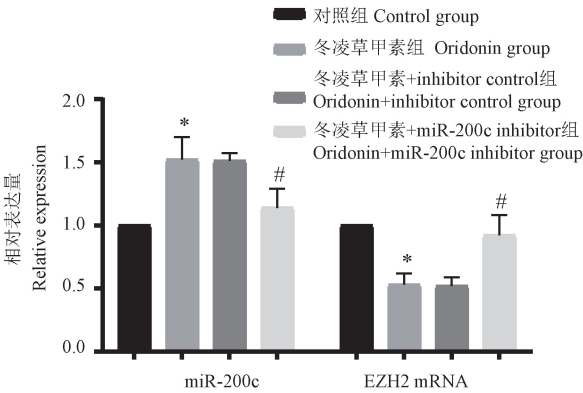


图 15 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对肿瘤组织中 EMT 相关蛋白表达的影响
Figure 15 miR-200c expression silencing reverses the effect of oridonin on the expression of EMT-related proteins in tumor tissues



注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与冬凌草甲素组相比, # $P < 0.05$ 。

图 16 miR-200c 表达沉默逆转冬凌草甲素对肿瘤组织中 miR-200c、EZH2 mRNA 表达的影响

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with oridonin group, # $P < 0.05$.

Figure 16 miR-200c expression silence reverses the effect of oridonin on the expression of miR-200c and EZH2 mRNA in tumor tissues

3 讨论

黑色素瘤近年来发病率不断增加,尽管采用标准疗法和新疗法在疾病治疗中取得了很大的进展,但患者预后仍不理想^[11-13]。上皮细胞转化为间质细胞的 EMT 过程在肿瘤侵袭和转移中具有关键作用,是肿瘤进展必要事件之一^[4]。因此,需要迫切寻找用于抑制黑色素瘤 EMT 过程的新的治疗手段,而目前低毒性新的治疗药物是研究重点^[11]。

冬凌草甲素是从红景天中提取的一种重要的中药活性成分之一,至今,其抗癌活性已得到了广泛研究,一些报告称其在黑色素瘤中通过诱导癌细胞凋亡抑制来损害黑素瘤细胞的存活和增殖能力^[4,12,14]。冬凌草甲素可通过抑制 EMT 及基质金属蛋白酶表达来有效抑制 A375 细胞的侵袭及转移能力^[10]。冬凌草甲素可通过抑制粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)-细胞外调节蛋白激酶

(extracellular regulated protein kinases, *ERK1/2*) 信号通路激活达到抑制小细胞肺癌细胞(H1688)的迁移和 EMT 的目的^[15]。冬凌草甲素可通过抑制蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)/信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路来抑制 EMT^[16]。本研究发现,冬凌草甲素以剂量依赖性的方式显著降低 A375 细胞存活率,与前人研究结果相一致,该结果表明冬凌草甲素对黑色素瘤具有有效抑癌作用。肿瘤在侵袭、转移过程中可对宿主的组织成分产生黏附作用,因此其黏附能力与癌细胞转移具有密切联系^[10]。在 EMT 过程中 E-cadherin 表达异常降低,而 Vimentin 和 N-cadherin 表达异常增加^[17]。本研究还发现,冬凌草甲素可显著增加 E-cadherin 表达水平,显著降低 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数,该结果与前人研究结果相一致,这表明冬凌草甲素能通过增加 E-cadherin 表达,降低 N-cadherin 及 Vimentin 表达来抑制 A375 细胞的 EMT,以此达到抑制肿瘤转移的目的,提示冬凌草甲素有作为黑色素瘤靶向治疗药物的潜能。

miRNA 通过与靶 mRNA 的 3' UTR 结合来诱导 mRNA 的翻译抑制或降解,已成为各种真核生物中基因表达的有效调节剂,并且已被证实是黑色素瘤发生发展的关键调节因子,参与调控肿瘤的 EMT 过程^[18]。原发性皮肤黑色素瘤中 miR-200c 表达下调预示患者预后不良^[19]。上调 miR-200c 的表达可通过抑制 E 盒结合锌指蛋白 1 和 Vimentin 表达来抑制乳腺癌 MDA231 细胞迁移及 EMT^[20]。本研究发现,*EZH2* 是 miR-200c 的潜在靶基因。已有研究表明,*EZH2* 在黑色素瘤中表达异常上调,促使肿瘤的生长方式更具侵略性、恶性程度更高、预后更差^[21]。miR-200c 表达沉默可促进 *EZH2* 的表达,从而促进 HCC 细胞的致癌性^[22]。本研究发现,冬凌草甲素可显著增加 miR-200c 表达水平,降低 *EZH2* 表达水平;miR-200c 过表达可显著降低 A375 细胞中 N-cadherin 及 Vimentin 表达水平、迁移细胞数、侵袭细胞数、黏附细胞数,增加 E-cadherin 表达水平,与前人研究结果相似,该结果表明 miR-200c 过表达可显著抑制 A375 细胞 EMT 发生,提示,miR-200c/*EZH2* 轴有作为黑色素瘤潜在治疗靶点的可能。除此之外本研究还发现,miR-200c 表达沉默则可逆转冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 的抑制,上述结果表明,冬凌草甲素能够增加 E-cadherin 表达,降

低 N-cadherin 及 Vimentin 表达,以此对 A375 细胞 EMT 起到抑制作用,该机制可能与其促进 miR-200c 表达、降低 *EZH2* 表达有关。

综上,冬凌草甲素可能通过促进 miR-200c/*EZH2* 轴来增加 E-cadherin 表达,降低 N-cadherin 及 Vimentin 表达,以此抑制 A375 细胞的 EMT 过程,从而达到抑制肿瘤侵袭和转移的目的。本研究不仅为黑色素瘤治疗靶点的寻找提供依据,还为冬凌草甲素在裸鼠体内抑制 A375 肿瘤侵袭和转移或小鼠体内对抑制黑色素瘤侵袭和转移的研究提供基础。

参考文献:

- [1] Li F, Li X, Qiao L, et al. MALAT1 regulates miR-34a expression in melanoma cells [J]. Cell Death Dis, 2019, 10 (6): 389.
- [2] 李璟蓉, 赵瑞, 方锐华, 等. miR-122-5p 通过靶向 NOP14 抑制黑色素瘤的细胞增殖 [J]. 南方医科大学学报, 2018, 38 (11): 1360-1365.
- [3] Wang SJ, Li WW, Wen CJ, et al. MicroRNA214 promotes the EMT process in melanoma by downregulating CADM1 expression [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(5): 3795-3803.
- [4] Li CY, Wang Q, Shen S, et al. Oridonin inhibits migration, invasion, adhesion and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of melanoma cells by inhibiting the activity of PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway [J]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 1362-1372.
- [5] Han Y, Li X, Ma C, et al. Seed targeting with tiny anti-miR-1297 inhibits EMT in melanoma cells [J]. J Drug Target, 2019, 27(1): 75-81.
- [6] Liu S, Tetzlaff MT, Cui R, et al. miR-200c inhibits melanoma progression and drug resistance through down-regulation of BMI-1 [J]. Am J Pathol, 2012, 181(5): 1823-1835.
- [7] Zingg D, Debbache J, Peña-Hernández R, et al. *EZH2*-mediated primary cilium deconstruction drives metastatic melanoma formation [J]. Cancer Cell, 2018, 34(1): 69-84.
- [8] Li Z, Hou P, Fan D, et al. The degradation of *EZH2* mediated by lncRNA ANCR attenuated the invasion and metastasis of breast cancer [J]. Cell Death Differ, 2017, 24(1): 59-71.
- [9] Ding J, Yeh CR, Sun Y, et al. Estrogen receptor β promotes renal cell carcinoma progression via regulating lncRNA HOTAIR-miR-138/200c/204/217 associated CeRNA network [J]. Oncogene, 2018, 37(37): 5037-5053.
- [10] 李春雨, 王琪, 申坤, 等. 冬凌草甲素对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭和转移的影响及机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49 (3): 658-662.
- [11] Zhou WJ, Wang HY, Zhang J, et al. NEAT1/miR-200b-3p/SMAD2 axis promotes progression of melanoma [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(22): 22759-22775.
- [12] Liu F, Hu L, Pei Y, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1

- accelerates the progression of melanoma by targeting miR-653-5p/RAI14 axis [J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 258.
- [13] Wang B, Shen C, Li Y, et al. Oridonin overcomes the gemcitabine resistant PANC-1/Gem cells by regulating GST pi and LRP/1 ERK/JNK signalling [J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 5751-5765.
- [14] Yang J, Ren X, Zhang L, et al. Oridonin inhibits oral cancer growth and PI3K/Akt signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 100: 226-232.
- [15] Xu L, Bi Y, Xu Y, et al. Oridonin inhibits the migration and epithelial-to-mesenchymal transition of small cell lung cancer cells by suppressing FAK-ERK1/2 signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(8): 4480-4493.
- [16] Liu W, Huang G, Yang Y, et al. Oridonin inhibits epithelial-mesenchymal transition of human nasopharyngeal carcinoma cells by negatively regulating AKT/STAT3 signaling pathway [J]. Int J Med Sci, 2021, 18(1): 81-87.
- [17] 孟小琴, 李云峰, 周毅, 等. 过表达 OTUD1 对结肠癌细胞 HCT116 增殖和侵袭的影响及机制研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(5): 687-691.
- [18] Noori J, Sharifi M, Haghjooy Javanmard S. miR-30a inhibits melanoma tumor metastasis by targeting the *E-cadherin* and zinc finger E-box binding homeobox 2 [J]. Adv Biomed Res, 2018, 7: 143.
- [19] Sánchez-Sendra B, Martínez-Ciarpaglini C, González-Muñoz JF, et al. Downregulation of intratumoral expression of miR-205, miR-200c and miR-125b in primary human cutaneous melanomas predicts shorter survival [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 17076.
- [20] Shi D, Guo L, Sun X, et al. UTMD inhibit EMT of breast cancer through the ROS/miR-200c/ZEB1 axis [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 6657.
- [21] Xu Y, Wang H, Li F, et al. Long Non-coding RNA LINC-PINT suppresses cell proliferation and migration of melanoma via recruiting *EZH2* [J]. Front Cell Dev Biol, 2019, 7: 350.
- [22] Xu L, Lin J, Deng W, et al. *EZH2* facilitates BMI1-dependent hepatocarcinogenesis through epigenetically silencing microRNA-200c [J]. Oncogenesis, 2020, 9(11): 101.

[收稿日期]2021-06-22

(上接第 52 页)

- [8] Jing N, Fang B, Li Z, et al. Exogenous activation of cannabinoid-2 receptor modulates TLR4/MMP9 expression in a spinal cord ischemia reperfusion rat model [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 101.
- [9] Wu MY, Gao F, Yang XM, et al. Matrix metalloproteinase-9 regulates the blood brain barrier via the hedgehog pathway in a rat model of traumatic brain injury [J]. Brain Res, 2020, 1727: 146553.
- [10] Ma GD, Pan ZR, Kong LL, et al. Neuroinflammation in hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator thrombolysis: potential mechanisms, targets, therapeutic drugs and biomarkers [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 90: 107216.
- [11] Han L, Jiang C. Evolution of blood-brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain-targeting drug delivery strategies [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(8): 2306-2325.
- [12] Zhang Y, Li XF, Qiao SS, et al. Occludin degradation makes brain microvascular endothelial cells more vulnerable to reperfusion injury *in vitro* [J]. J Neurochem, 2021, 156(3): 352-366.
- [13] Yang ZG, Lin PP, Chen B, et al. Autophagy alleviates hypoxia-induced blood-brain barrier injury via regulation of CLDN5 (claudin 5) [J]. Autophagy, 2020, 17(10): 3048-3067.
- [14] Jickling GC, Liu D, Stamova B, et al. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2014, 34(2): 185-199.
- [15] 朱玉岩, 常大伟, 聂恒浩. 急性缺血性脑卒中患者血清 Occludin 表达水平及其临床意义 [J]. 标记免疫分析与临床, 2021, 28(9): 1479-1484.

[收稿日期]2021-11-15