

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.04.008

· 基础研究 ·

黄芪多糖通过调控 miR-20a/TGFBR2 分子轴降低结直肠癌 HT-29/DDP 细胞的顺铂耐药性

招志辉, 丘振文, 招远明(广州中医药大学 第一附属医院, 广东 广州 510405)

[摘要] **目的:** 探讨黄芪多糖(APS)通过调控 miR-20a/TGFBR2 分子轴对结直肠癌(CRC)顺铂耐药细胞 HT-29/DDP 增殖、侵袭、凋亡和耐药性的影响及其机制。**方法:** 以人 CRC HT-29 细胞、HT-29/DDP 细胞为亲本和耐药细胞模型, 将 HT-29/DDP 细胞随机分为 4 组: 对照组、APS 处理组、过表达 miR-20a + APS 组、沉默 TGFBR2 + APS 组。用不同质量浓度的 APS(0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml)处理 HT-29/DDP 细胞后, 以 qPCR 和 Wb 实验检测细胞中 miR-20a 和 TGFBR2 的表达水平; 用 CCK-8、Transwell 和 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测对 HT-29/DDP 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响; 用双荧光素酶报告基因验证 miR-20a 与 TGFBR2 的靶向作用关系。构建裸鼠皮下 CRC HT-29/DDP 细胞移植瘤模型, 观察 APS 对移植瘤生长的影响及其机制。**结果:** APS 显著抑制 HT-29/DDP 细胞的增殖 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。miR-20a 在经 APS 处理后的 HT-29/DDP 细胞中低表达 ($P < 0.01$)、TGFBR2 的表达水平显著上调 ($P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因证实 miR-20a 靶向作用 TGFBR2 并下调其表达水平。体内外实验证实 APS 通过靶向下调 miR-20a 对 TGFBR2 的抑制作用, 提高 HT-29/DDP 细胞的药物敏感性, 进而抑制该细胞增殖、侵袭和促进凋亡 (均 $P < 0.01$); 同时发现, 该作用与抑制 PCNA、Bcl-2 蛋白而促进 Bax、Caspase-3 蛋白表达有关联。**结论:** APS 通过下调 miR-20a 对 TGFBR2 表达的抑制作用, 从而逆转 HT-29/DDP 细胞对顺铂的耐药性。

[关键词] 黄芪多糖; 结直肠癌; HT-29 细胞; HT-29/DDP 细胞; 顺铂; miR-20a/TGFBR2 分子轴
[中图分类号] R735.3³5; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)04-0417-09

Astragalus polysaccharides suppressed cisplatin-resistance of colorectal cancer TH-29/DDP cells via regulating miR-20a/TGFBR2 axis

ZHAO Zhihui, QIU Zhenwen, ZHAO Yuanming (The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of astragalus polysaccharides (APS) on proliferation, invasion, apoptosis and drug-resistance of cisplatin-resistant colorectal cancer (CRC) HT-29/DDP cells through regulating miR-20a/TGFBR2 axis, and to explore the possible mechanism. **Methods:** Human CRC HT-29 cells and HT-29/DDP cells were used as non-drug resistant and resistant cell models, respectively; HT-29/DDP cells were randomly divided into four groups, including untreated (HT-29/DDP) group, APS treatment group, miR-20a mimics + APS group, and si-TGFBR2 + APS group. qPCR and Western blotting were applied to detect the expressions of miR-20a and TGFBR2 in HT-29/DDP cells treated with different concentrations of APS (0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/ml). Subsequently, dual luciferase reporter gene assay was used to verify whether TGFBR2 was a target gene of miR-20a. In addition, CCK-8, Transwell and Annexin V-FITC/PI double staining were applied to examine the effect of APS on proliferation, invasion and apoptosis of HT-29/DDP cells. Furthermore, subcutaneous HT-29/DDP cell xenograft model was established on nude mice, and the effect of APS on the growth of transplanted tumor was observed. **Results:** APS significantly inhibited the proliferation of HT-29/DDP cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Meanwhile, the expression of miR-20a was down-regulated in HT-29/DDP cells treated with APS, while the expression of TGFBR2 was significantly up-regulated (all $P < 0.01$). Additionally, dual luciferase reporter gene assay result showed that TGFBR2 was a direct target of miR-20a in HT-29/DDP cells and its expression was suppressed. Furthermore, APS could enhance the drug sensitivity of HT-29/DDP cells through downregulating the inhibitory effect of miR-20a on TGFBR2 expression, thereby suppressed proliferation and invasion, and induced apoptosis of HT-29/DDP cells *in vitro* and *in vivo*. It was also found that this effect was related with the suppression of PCNA and Bcl-2 proteins and promotion of Bax and Caspase-3 proteins. **Conclusion:** APS reverses the resistance of HT-29/DDP cells to cisplatin by down-regulating the inhibitory effect of miR-20a on TGFBR2 expression.

[作者简介] 招志辉(1985-),男,本科,主管中药师,主要从事抗肿瘤中药的研究,E-mail:tuzhihui123@yeah.net

[通信作者] 招远明(ZHAO Yuanming, corresponding author),本科,主管中药师,主要从事中药学的研究,E-mail:84101201@qq.com

[Key words] astragalus polysaccharides; colorectal cancer; HT-29 cell; HT-29/DDP cell; cisplatin; miR-20a/TGFBR2 axis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(4): 417-425. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.04.008]

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是消化道常见的恶性肿瘤之一,其发病率仅次于胃癌和食管癌,位居全球恶性肿瘤的第4位。化疗是CRC目前主要的治疗手段,但是对化疗药物产生耐药性一直是困扰CRC治疗的难题^[1]。因此,明确产生化疗耐性的潜在机制,对成功治疗CRC具有重要的临床意义。研究^[2-4]发现,黄芪多糖(astragalus polysaccharides, APS)为中草药黄芪中提取的主要活性成分,具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒等多种药理及生物学功能。APS可上调卵巢癌细胞对顺铂(cisplatin, DDP)的敏感性^[5],对肺癌、肝癌和胃癌等具有抗肿瘤活性^[6-7],但在CRC辅助治疗中APS抑制CRC细胞耐药性的分子机制尚无相关研究报道。研究^[8-9]表明,微小RNA(microRNA, miRNA)的异常表达与恶性肿瘤的发生发展及化疗耐药性等密切相关。APS通过调控miRNA的表达缓解癌症发生及产生耐药的机制也未见报道。为此,本研究探讨APS对CRC顺铂耐药(HT-29/DDP)细胞耐药性的影响,进一步通过构建动物模型验证APS调控CRC HT-29/DDP细胞耐药性的作用及其机制,旨在为提高CRC疗效提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 细胞系、实验动物及主要试剂

人CRC HT-29/DDP细胞、HT-29细胞购自中科院上海细胞研究所。雄性、4~5周龄、体质量(15±3)g的SD小鼠[SPF级,实验动物合格证号:SYXK(滇)K2017-0009]购自中国科学院昆明动物研究所。

APS标准品(纯度>90%)购于北京索莱宝科技有限公司,DMEM和胎牛血清购自美国Biological Industries公司,miR-20a模拟物、miR-20a抑制剂和II型转化生长因子受体(TGFBR2)siRNA均由上海吉玛制药技术有限公司提供,CCK-8试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,Transwell小室购自美国Corning公司,Annexin V-FITC双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物有限公司,双荧光素酶检测试剂盒购自Promega公司,RNA提取试剂盒和定量PCR试剂盒SYBR premix Ex Taq™购自日本TaKaRa公司,抗TGFBR2抗体、抗PCNA抗体、抗Bax抗体、抗Caspase-3抗体、抗Bcl-2抗体、抗GAPDH抗体、HRP标记的山羊抗兔二抗均购自美国CST公司。

1.2 细胞培养与转染

在试验开始前48 h,将HT-29/DDP细胞以密度 1×10^4 个/孔接种于24孔板中,分别加入含10%胎牛血清、青霉素100 U/ml和链霉素100 μg/ml及含有

2 μg/ml的DDP及不含DDP的DMEM培养基,并在37 °C、5%CO₂培养箱中常规培养。选取对数生长期的HT-29/DDP细胞,胰酶消化后,将用DMEM培养基调整密度为 1×10^5 个/ml的细胞接种到6孔板(2 ml/孔),于37 °C、5%CO₂培养箱中培养24 h。按照TurboFect Transfection Regent操作说明书进行miR-20a模拟物、miR-20a抑制剂和TGFBR2 siRNA转染,转染48 h后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

1.3 qPCR实验检测HT-29/DDP细胞及裸鼠肿瘤组织中miR-20a和TGFBR2 mRNA的表达水平

用RNA提取试剂盒提取细胞和组织中总RNA后逆转录成cDNA,反应条件为40 °C变性60 min,25 °C 5 min,85 °C 5 min。然后,取2 μl逆转录产物进行PCR检测,采用U6和GAPDH作为内参,反应条件为95 °C变性15 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸10 s,进行35个循环。引物序列:miR-20a F为5'-TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG-3',R为5'-CTACCTGCACTATAAGCACTTTA-3';TGFBR2 F为5'-AACGCGTGACAGAGAGCGTCCTATGC-3',R为5'-AAGCTTCAAAGACACATGGGAGATCC-3';U6 F为5'-GATTTCTCCCTCATCGCTTACAG-3',R为5'-CTGCTTCATGATCGTTGTTGCTTG-3';GAPDH F为5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3',R为5'-CAAAGTTGTCATGGATGHACC-3'。随后,按照SYBR Primix Ex Taq™说明书进行qPCR,采用2^{-ΔΔCt}法进行计算miR-20a和TGFBR2 mRNA的表达水平。

1.4 Wb实验检测HT-29/DDP细胞及裸鼠肿瘤组织中TGFBR2蛋白的表达水平

提取各组经处理的细胞和裸鼠肿瘤组织后,加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取总蛋白,依据BCA试剂盒的操作要求检测蛋白浓度。100 °C变性5 min后,将等量蛋白进行SDS-PAGE分离并转至PVDF膜,经5%的BSA封闭1 h后加入抗TGFBR2(1:1 000)、抗PCNA抗体(1:2 000)、抗Bax抗体(1:1 000)、抗Bcl-2抗体(1:2 000)和抗Caspase-3抗体(1:1 000),4 °C过夜孵育。次日,加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1:1 000),室温孵育1.5 h后,加入发光液后于凝胶成像仪进行曝光、拍照,统计灰度值,计算相关蛋白的相对表达量。

1.5 双荧光素酶基因报告实验验证miR-20a与TGFBR2的靶向结合

将miR-20a模拟物分别转入TGFBR2野生型和突变型293T细胞中,并设置空质粒载体,48 h后移去细胞培养板中的培养液,用洗涤液进行洗涤,弃去洗

涂液后在孔中加入 1×细胞裂解液裂解细胞。室温下振荡器上振荡 5~10 min,移入离心管中 3 000×g 离心 5 min,弃上清。按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书,用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值,并以海肾荧光值作为内参。

1.6 MTT 法检测 HT-29/DDP 细胞的增殖能力

取对数生长期 HT-29/DDP 细胞并经消化后,将密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞接种于 96 孔板,于 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养过夜。待细胞汇合度达 60% 时,分别加入不同质量浓度的 APS (0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml) 干预 48 h 后,每孔加入 100 μl 0.5 mg/ml MTT 液,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养 4 h 后,吸弃旧的培养液,加入 100 μl 孔甲臞溶解液,用枪充分混匀后放入 37 °C 培养箱孵育 4 h,孵育结束后于酶标仪测定波长 490 nm 处的光密度 (*D* 值)。细胞增殖率 (%) = (实验组 *D* / 对照组 *D* 值) × 100%。

1.7 Transwell 实验检测 HT-29/DDP 细胞的侵袭能力

分别将各处理组细胞用胰酶消化处理后,接种于 Transwell 小室 24 孔板内,上室加 100 μl (密度为 1×10^5 个/ml) 细胞悬液,下室加入 250 μl 含 10% 胎牛血清的培养基,37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,取出小室,棉签擦去微孔膜上室的细胞,PBS 小心冲洗小室上下面 2 遍,4% 多聚甲醛固定侵袭并黏附到小室微孔膜下面的细胞 15 min,0.1% 结晶紫染色 15 min,PBS 冲洗小室,干燥后置于倒置显微镜 (×100) 下观察,计数穿膜细胞数。

1.8 Annexin-V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 HT-29/DDP 细胞的凋亡水平

HT-29/DDP 细胞以 2×10^5 个/瓶接种 25 cm² 细胞培养瓶后,于 37 °C、5%CO₂ 培养箱培养过夜,待细胞生长至对数期,分别经不同浓度的 APS (0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml) 干预 48 h。吸去上清,消化后取 2×10^5 细胞加入另一离心管离心,弃上清。根据 Annexin V/PI 试剂盒说明均匀地混合细胞与 500 μl 预冷的 1×结合缓冲液和 5 μl Annexin-V-FITC 液,室温避光孵育 15 min,在上机前 5 min 再加入 2.5 μl 的 PI 液染色 15 min,流式细胞仪检测 APS 对 HT-29/DDP 细胞凋亡的影响。

1.9 裸鼠皮下 CRC HT-29/DDP 细胞移植瘤模型的建立、治疗及观察

裸鼠饲养在恒温 (20~26 °C) 和恒湿 (50%~56%) 的环境中,按照随机数字表法分为 5 组: HT-29 组、HT-29 顺铂组、HT-29/DDP 组、HT-29/DDP APS 组和 APS+顺铂组,每组各 10 只。

将培养至对数生长期 HT-29 或 HT-29/DDP 细胞密度调整为 $5 \times 10^7/\text{ml}$,按照每只裸鼠 5×10^6 个细胞/

0.1 ml 接种于小鼠左腋下。肿瘤长至 0.25 cm 大小时给药,HT-29、HT-29/DDP 组各给予生理盐水 0.1 ml/10 g,HT-29/DD PAPS 组给予 APS 50 mg/kg,APS+顺铂组给予 APS 50 mg/kg、顺铂 20 mg/kg,连续给药 21 d,每次给药间隔 24 h。每隔 3 d 用游标卡尺测量肿瘤最大直径和最小直径,并绘制肿瘤体积生长曲线。干预结束后脱臼处死小鼠,分离皮下肿瘤,进行后续的 qPCR 及 Wb 实验。

1.10 统计学处理

qPCR、Wb、MTT、Transwell 等实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,用 GraphPad Prism 7 软件绘制图片。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APS 增强 HT-29/DDP 细胞对顺铂的敏感性

MTT 法检测结果 (图 1) 显示,不同浓度 (0、100、200、500 和 1 000 $\mu\text{mol/l}$) 的顺铂对 HT-29 细胞增殖能力的抑制作用呈剂量依赖性 ($t = 2.68, P < 0.01$; 图 1A),对 HT-29/DDP 细胞增殖能力无明显影响。与单独顺铂作用相比较,经不同质量浓度 (0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml) APS 预处理 12 h 后,显著增强了 HT-29/DDP 细胞对顺铂的敏感性 ($F = 0.22, P < 0.01$; 图 1B)。结果表明,APS 能够显著逆转 HT-29/DDP 细胞对顺铂的耐药性。

2.2 APS 抑制 HT-29/DDP 细胞的增殖和侵袭并促进其凋亡

MTT 法检测结果 (图 2A) 显示,HT-29/DDP 细胞经不同浓度 (0、0.5、1.0、1.5 和 2.0 mg/ml) APS 分别处理 48 h 后,对细胞增殖能力的抑制作用与 APS 浓度呈剂量依赖性 ($t = 6.20、8.12、9.48$, 均 $P < 0.01$),但 1.5 mg/ml 与 2.0 mg/ml APS 处理组细胞增殖能力比较差异无统计学意义 ($t = 1.51, P > 0.05$)。结果提示,APS 能够显著抑制 HT-29/DDP 细胞的增殖能力。

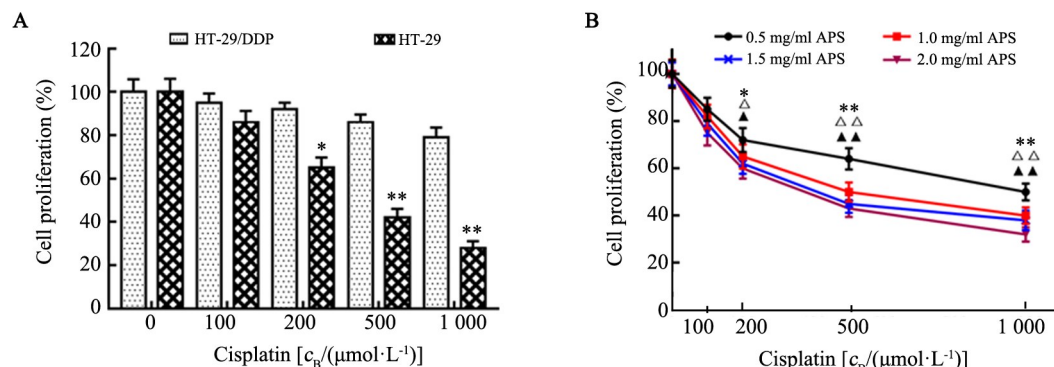
Transwell 实验结果 (图 2B、D) 显示,与对照组相比,APS 能明显抑制 HT-29/DDP 细胞侵袭能力,随着 APS 浓度的递增对细胞侵袭能力的抑制作用逐渐增强,且呈明显的剂量依赖性 ($t = 4.64、8.28、8.40$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。但 1.5 mg/ml 与 2.0 mg/ml APS 处理组细胞侵袭能力比较差异无统计学意义 ($t = 1.06, P > 0.05$)。

Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测结果 (图 2C、E) 表明,APS 作用后可显著促进 HT-29/DDP 细胞凋亡水平,且对细胞凋亡的促进作用呈剂量依赖性 ($t = 4.47、8.35、7.80, P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但 1.5 mg/

ml与2.0 mg/ml的APS处理组细胞的凋亡水平比较差异无统计学意义($t=0.21, P>0.05$)。

上述结果表明,APS可显著抑制HT-29/DDP细

胞增殖和侵袭能力并促进细胞凋亡,因此,选择1.5 mg/ml APS进行后续实验。

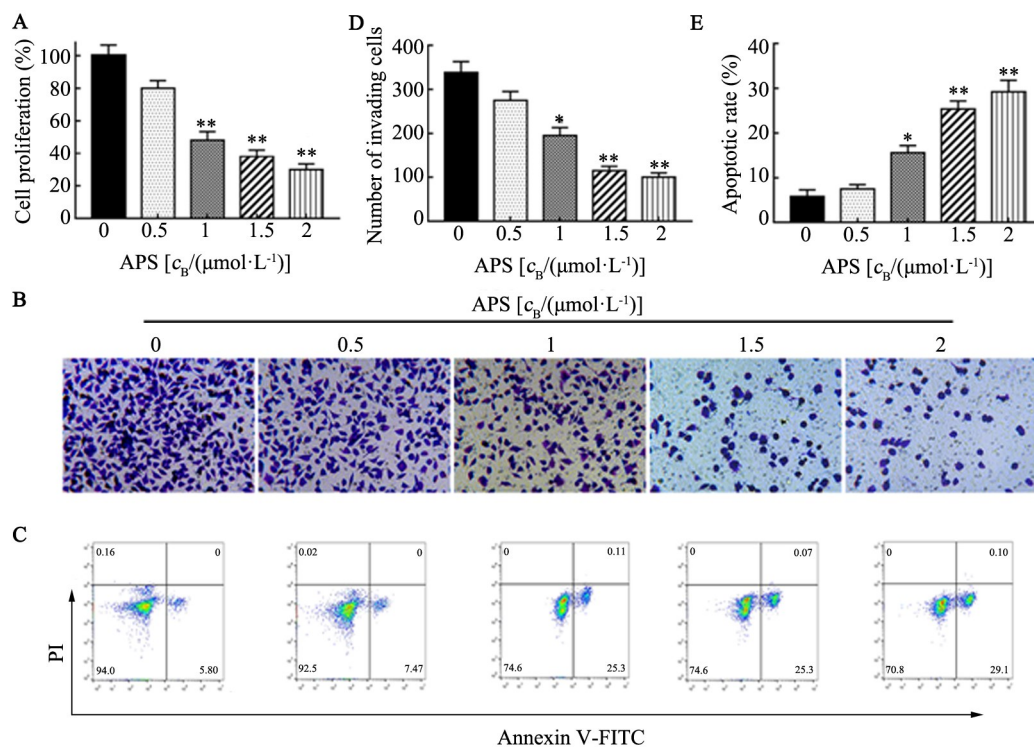


* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs HT-29/DDP cells or 1.0 mg/ml APS group; $\blacktriangle P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P<0.01$ vs 1.5 mg/ml APS group; $\triangle P<0.05$; $\triangle\triangle P<0.01$ vs 2.0 mg/ml APS group

A: MTT assay was used to detect the cell proliferation; B: CCK-8 was applied to detect the cell proliferation

图1 APS对HT-29/DDP细胞耐药性的影响

Fig. 1 Effect of APS on drug resistance of HT-29/DDP cells



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0 mg/ml APS group

A: MTT assay was used to detect the proliferation of HT-29/DDP cells; B and D: Transwell assay was used to evaluate the invasion of HT-29/DDP cells (Crystal violet staining, $\times 100$); C and E: Flow cytometry was applied to detect the apoptosis of HT-29/DDP cells

图2 APS对HT-29/DDP细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Fig. 2 Effect of APS on proliferation, invasion and apoptosis of HT-29/DDP cells

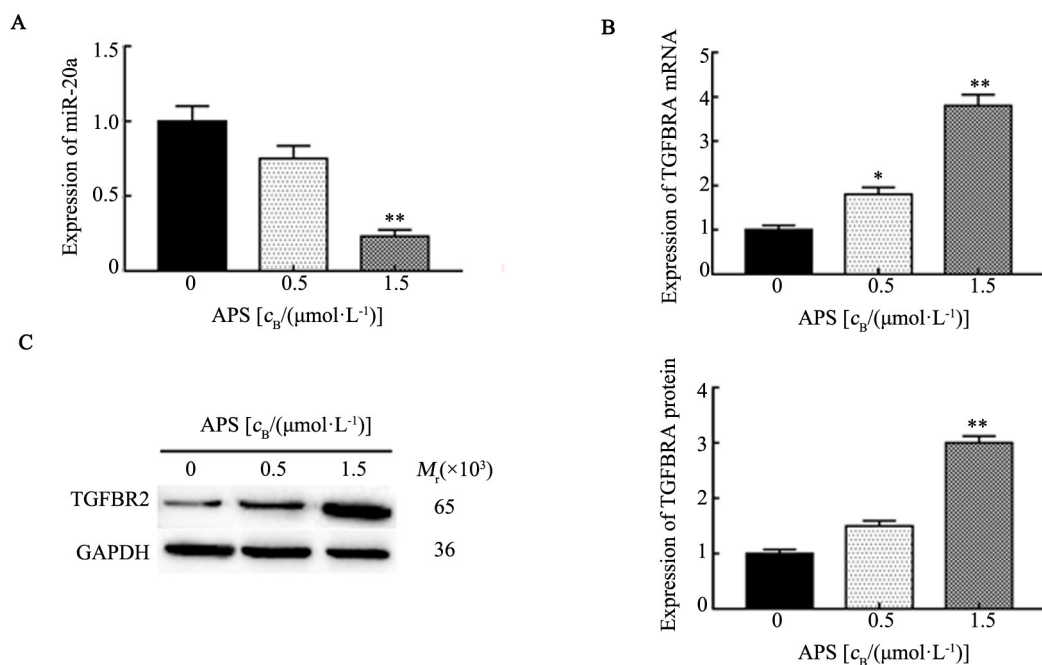
2.3 APS在HT-29/DDP细胞中下调miR-20a、上调TGFBR2 mRNA表达水平

qPCR检测结果证实,与对照组比较,1.5 mg/ml

的APS处理后可显著抑制HT-29/DDP细胞miR-20a的表达水平($t=7.02, P<0.01$;图3A),明显上调TGFBR2 mRNA的表达水平($t=4.24、10.40, P<0.05$ 和

$P < 0.01$; 图 3B)。Wb 实验结果(图 3C)证实, 经 1.5 mg/ml 的 APS 处理的 HT-29/DDP 细胞中 TGFBR2 蛋

白表达水平显著升高($t = 14.39, P < 0.01$; 图 3C)。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 or 0.5 mg/ml APS

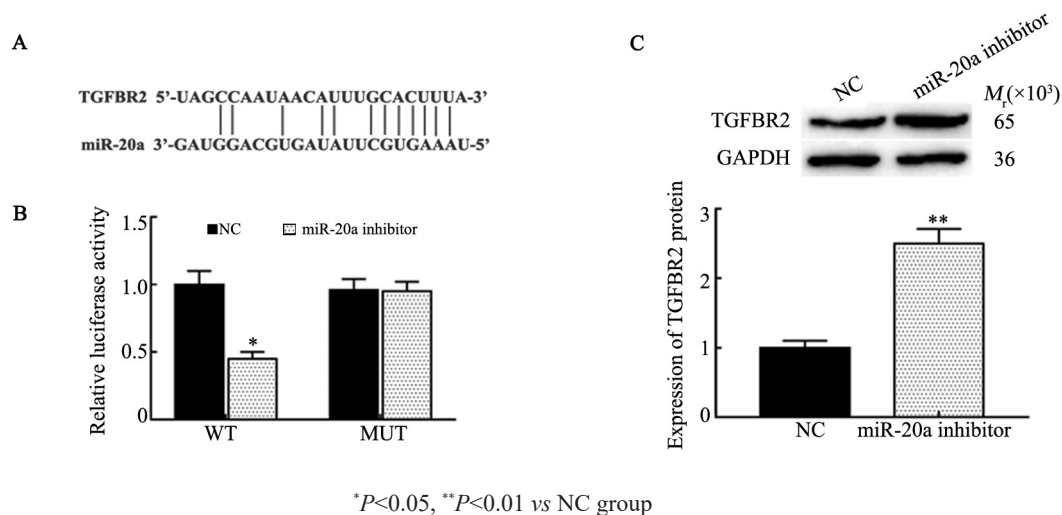
A and B: The expressions of miR-20a and TGFBR2 were measured by qPCR; C: Wb was used to detect the expression of TGFBR2 protein

图 3 APS 对 miR-20a 和 TGFBR2 表达的影响

Fig. 3 Effect of APS on the expression of miR-20a and TGFBR2

2.4 miR-20a 调控 HT-29/DDP 细胞 TGFBR2 的表达
借助生物信息学数据库 TargetScan 和 miRnada 对 miR-20a 的靶基因预测结果发现, TGFBR2 是 miR-20a 的候选靶基因(图 4A)。荧光素酶报告基因验证实验结果(图 4B)发现, miR-20a 可以结合 TGFBR2 的 3' UTR, 并且 miR-20a 可以负调控 TGFBR2 的表达

($t = 4.88, P < 0.05$)。Wb 法检测结果(图 4C)显示, miR-20a 敲降后, HT-29/DDP 细胞中 TGFBR2 表达水平显著升高($t = 6.45, P < 0.01$)。结果表明, TGFBR2 是 miR-20a 的靶基因, miR-20a 可负调控 TGFBR2 的表达。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group

A: TGFBR2 was predicted to be a target of miR-20a by TargetScan and miRnada; B: Dual-luciferase reporter gene assay was used to verify the relationship between miR-20a and TGFBR2; C: Wb was used to detect the expression of TGFBR2

图 4 miR-20a 对 TGFBR2 表达的调控作用

Fig. 4 The regulatory effect of miR-20a on TGFBR2 expression

2.5 APS 通过 miR-20a/TGFBR2 分子轴调控 HT-29/DDP 细胞增殖、侵袭及凋亡

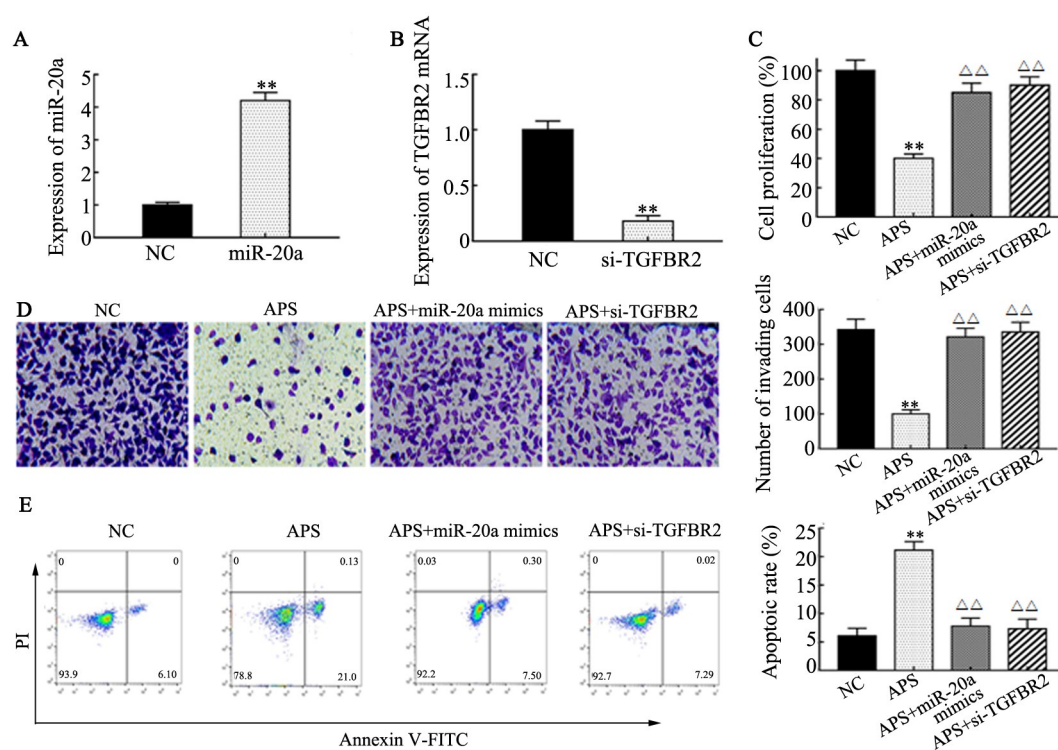
HT-29/DDP 细胞中分别转染 miR-20a 模拟物和 TGFBR2 siRNA 后再经 1.5 mg/ml 的 APS 干预 48 h, qPCR 法检测结果证实, 过表达 miR-20a 可显著上调 HT-29/DDP 细胞中 miR-20a 的表达水平 ($t=12.19, P<0.01$; 图 5A), 同时敲降 TGFBR2 可显著抑制 HT-29/DDP 细胞中 TGFBR2 mRNA 的表达水平 ($t=8.69, P<0.01$; 图 5B)。

MTT 法(图 5C)和 Transwell 法(图 5D)检测结果共同证实, 过表达 miR-20a 或敲降 TGFBR2 后再经 APS 处理组 HT-29/DDP 细胞的增殖和侵袭能力显著

低于 APS 单独处理组 ($t=6.25, 7.60, 7.97, 7.71$, 均 $P<0.01$), 而 APS 单独干预可显著抑制 HT-29/DDP 细胞增殖和侵袭能力 ($t=7.65, 7.49$, 均 $P<0.01$)。

流式细胞术检测结果(图 5E)证实, APS 显著促进了 HT-29/DDP 细胞凋亡水平 ($t=7.57, P<0.01$), 但转染 miR-20a 模拟物或沉默 TGFBR2 显著下调 APS 对 HT-29/DDP 细胞凋亡的促进作用 ($t=5.28, 5.12$, 均 $P<0.01$)。

上述结果表明, APS 通过下调 miR-20a 并上调 TGFBR2 进而抑制 HT-29/DDP 细胞增殖、侵袭和促进细胞凋亡, 从而逆转 HT-29/DDP 细胞对顺铂的耐药性。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs NC group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs APS group

A and B: qPCR was used to detect the mRNA expressions of miR-20a and TGFBR2; C: MTT assay was used to detect the proliferation of HT-29/DDP cells; D: Transwell assay was used to evaluate the invasion of HT-29/DDP cells ($\times 100$); E: Flow cytometry was applied to detect the apoptosis of HT-29/DDP cells

图5 APS通过 miR-20a/TGFBR2 分子轴对 HT-29/DDP 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

Fig. 5 Effect of APS on proliferation, invasion and apoptosis of HT-29/DDP via miR-20a/TGFBR2 axis

2.6 APS 抑制裸鼠 HT-29/DDP 细胞移植瘤的生长并降低顺铂的耐药性及其作用机制

裸鼠 HT-29/DDP 细胞移植瘤实验结果(图 6A)发现, 与对照组比较, 顺铂对非耐药 HT-29 细胞移植瘤生长具有显著的抑制作用 ($t=9.13, P<0.01$), 而对 HT-29/DDP 细胞移植瘤生长无显著的抑制作用 ($t=0.78, P>0.05$), 提示成功构建了 CRC 顺铂耐药裸鼠模型。

随后, 经 APS、APS+顺铂干预治疗后, 测定移植

瘤大小的结果(图 6B)表明, 与对照组比较, APS 或 APS+顺铂治疗均可显著抑制移植瘤的生长 ($t=6.00, 11.22, P<0.05$ 和 $P<0.01$; $t=7.75, 12.29, P<0.05$ 和 $P<0.01$), 且 APS+顺铂治疗对移植瘤生长的抑制作用要强于 APS 单独作用组 ($t=4.72, P<0.05$; $t=4.33, P<0.05$)。

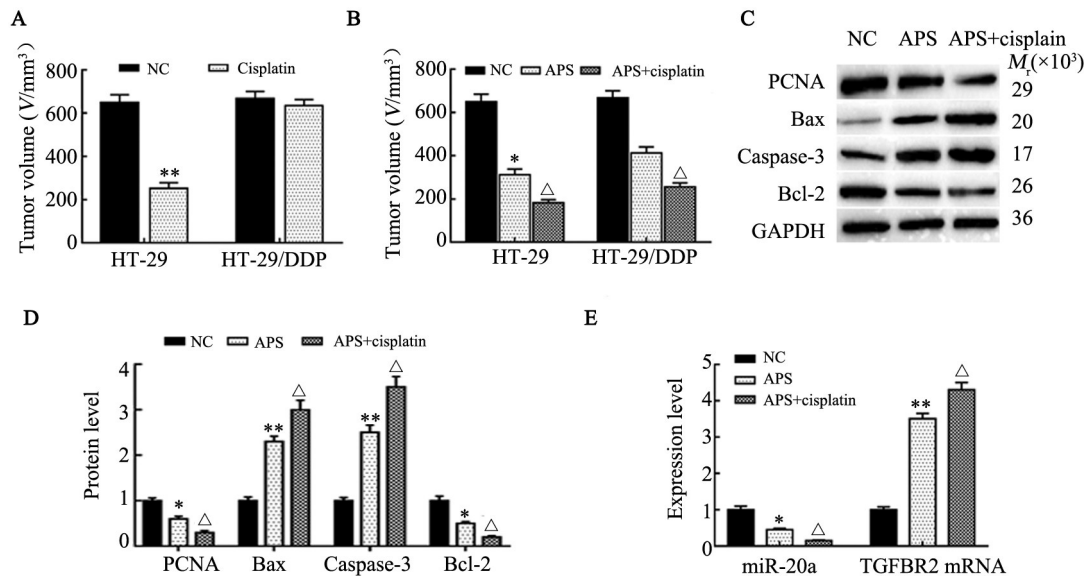
Wb 实验检测结果(图 6C、D)证实, APS 或 APS+顺铂治疗后可显著抑制移植瘤组织中 PCNA 和 Bcl-2

蛋白水平 ($t_{PCNA}=4.71、9.56, P<0.05$ 和 $P<0.01$; $t_{Bcl-2}=4.64、7.66, P<0.05$ 和 $P<0.01$) 和明显提高 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平 ($t_{Bax}=-9.01、8.90, P<0.05$ 和 $P<0.01$; $t_{Caspase-3}=8.59、10.40, 均 P<0.01$)。

qPCR 检测结果(图 6E)证实, APS 或 APS+顺铂治疗后可显著抑制 miR-20a 的表达($t=5.11、8.33,$

$P<0.05$ 和 $P<0.01$), 显著促进 TGFBR2 mRNA 的表达($t=13.87、14.76, 均 P<0.01$)。

上述结果表明, APS 在体内对 CRC 顺铂耐药移植瘤的生长具有显著的抑制作用和一定的逆转耐药作用。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs NC group; $\Delta P<0.05$ vs APS group

A and B: The tumor volume was measured with caliper; C and D: Wb was used to detect the protein expressions of PCNA, Bax, Caspase-3 and Bcl-2 proteins; E: qPCR was used to detect the mRNA expressions of miR-20a and TGFBR2

图 6 APS 对 CRC HT-29/DDP 裸鼠移植瘤生长的影响

Fig. 6 Effect of APS on the growth of CRC TH-29 /DDP xenograft in nude mice

3 讨论

CRC 是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率居所有肿瘤的第 3 位,每年约增加 1~2 百万个新发病例;每年病死的 CRC 患者约 70 万人,居癌症相关死亡人数的第 4 位,仅次于肺癌、肝癌和胃癌。目前,临床上着重于应用早期诊断和辅助化疗(如顺铂、卡铂、长春花碱和紫杉醇)来延长 CRC 患者的生存期。然而,由于 CRC 细胞对化疗药物存在耐受性,所以预期疗效无法达到^[1,10]。因此,迫切需要寻找 CRC 中缓解耐药性的相关基因的上游关键分子或药物,并深入研究其作用机制,进一步为 CRC 临床治疗耐药性提供更多的依据。

据报道^[11], APS 在调控肿瘤细胞增殖、侵袭和凋亡中具有重要作用,并在临床中用于患者后期辅助治疗。研究^[12]证实, APS 通过调控 miRNA 或信号通路介导肿瘤的发生发展。例如, APS 通过阻断 Notch1 通路诱导肝癌细胞凋亡进而缓解肝癌的发展进程^[7]; APS 通过阻断 TLR4/NF- κ B 通路在慢性阻塞

性肺炎中发挥抗炎作用^[13]; APS 通过上调 miR-203a-3p 抑制内质网应激反应,进而缓解胰岛素抵抗患者 2 型糖尿病的发病进程^[14]。本研究结果证实, APS 通过下调 miR-20a 进而逆转 CRC 细胞顺铂耐药性。

近年来研究发现, miRNA 的异常调控被认为是包括 CRC 在内的多种疾病发生、发展的关键因素。例如, miR-20a 作为促癌基因,在胰腺导管腺癌^[15]、肺癌^[16]和 CRC^[17]等肿瘤中异常表达。此外, miR-20a 通过调控下游蛋白介导肿瘤细胞耐药性。例如, miR-20a 通过靶向下游蛋白促进胃癌^[18]和骨肉瘤^[19]多药耐药性。同时,敲降 miR-20a 通过靶向上调下游蛋白提高 CRC^[20]、宫颈癌^[21]、胃癌^[22]对顺铂治疗的敏感性。本研究同样证实, APS 通过下调 miR-20a 并促进 TGFBR2 缓解 CRC 顺铂的耐药性。同时,体内实验证实 APS 或 APS+顺铂通过下调细胞增殖相关蛋白 PCNA 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平和明显提高促凋亡相关蛋白 Bax 和 Caspase-3 的表达水平。

此外,根据生物信息工具预测 TGFBR2 是 miR-20a 的可能靶基因。TGFBR2 作为 TGF- β 1 信号通路

中的重要组成部分,其异常表达可能与肿瘤细胞增殖、侵袭和凋亡密切相关^[23-24]。研究^[25-27]发现,TGFBR2在CRC、胰腺癌和乳腺癌组织中低表达。同时,AZAD等^[28]发现,TGFBR2的异常表达与乳腺癌耐药性密切相关。上述研究结果提示,TGFBR2参与肿瘤细胞耐药性的调控作用。

综上,本研究结果表明APS通过下调miR-20a并上调TGFBR2的表达提高CRC HT-29/DDP细胞对DDP的敏感性,从而抑制细胞增殖和侵袭能力并促进细胞凋亡,提示APS可能作为CRC化疗药物的辅助药物,调控耐药细胞对化疗药物的敏感性。

[参考文献]

- [1] JEONG W J, CHA P H, CHOI K Y. Strategies to overcome resistance to epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy in metastatic colorectal cancer[J/OL]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(29): 9862-9871[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4123368/>. DOI:10.3748/wjg.v20.i29.9862.
- [2] JIAO R, LIU Y X, GAO H, et al. The anti-oxidant and antitumor properties of plant polysaccharides[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(3): 463-488. DOI:10.1142/S0192415X16500269.
- [3] AUYEUNG K K, HAN Q B, KO J K. Astragalus membranaceus: a review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(1): 1-22. DOI: 10.1142/S0192415X16500014.
- [4] FU J, WANG Z, HUANG L, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of astragalus membranaceus (Huangqi)[J]. *Phytother Res*, 2014, 28(9): 1275-1283. DOI: 10.1002/ptr.5188.
- [5] LI C H, HONG L, LIU C, et al. Astragalus polysaccharides increase the sensitivity of SKOV3 cells to cisplatin[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 297(2): 381-386. DOI:10.1007/s00404-017-4580-9.
- [6] ZHOU X, LIU Z, LONG T, et al. Immunomodulatory effects of herbal formula of astragalus polysaccharide (APS) and polysaccharopeptide (PSP) in mice with lung cancer[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 106: 596-601. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.054.
- [7] HUANG W H, LIAO W R, SUN R X. Astragalus polysaccharide induces the apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells by decreasing the expression of Notch1[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 551-557. DOI:10.3892/ijmm.2016.2632.
- [8] XIE T, HUANG M X, WANG Y, et al. MicroRNAs as regulators, biomarkers and therapeutic targets in the drug resistance of colorectal cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(1/2): 62-76. DOI: 10.1159/000452525.
- [9] ZHANG Y, WANG J. MicroRNAs are important regulators of drug resistance in colorectal cancer[J/OL]. *Biol Chem*, 2017, 398(8): 929-938[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5911396/>. DOI:10.1515/hsz-2016-0308.
- [10] PANCZYK M. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years[J/OL]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(29): 9775-9827[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4123365/>. DOI: 10.3748/wjg.v20.i29.9775.
- [11] ZHOU Z, MENG M H, NI H F. Chemosensitizing effect of astragalus polysaccharides on nasopharyngeal carcinoma cells by inducing apoptosis and modulating expression of Bax/Bcl-2 ratio and caspases[J/OL]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 462-469[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5291085/>.
- [12] REN Q, ZHAO S J, REN C J, et al. Astragalus polysaccharide alleviates LPS-induced inflammation injury by regulating miR-127 in H9c2 cardiomyoblasts[J/OL]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2018, 32: 2058738418759180[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5849246/>. DOI:10.1177/2058738418759180.
- [13] 吴佳, 尧雪洲. 在慢阻肺炎症反应中黄芪多糖的抗炎作用及抑制TLR4/NF-κB通路的机制[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(5): 760-764.
- [14] WEI Z T, WENG S Y, WANG L, et al. Mechanism of Astragalus polysaccharides in attenuating insulin resistance in Rats with type 2 diabetes mellitus via the regulation of liver microRNA-203a-3p[J/OL]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 1617-1624[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5780102/>. DOI:10.3892/mmr.2017.8084.
- [15] HUANG F T, CHEN W Y, PENG J F, et al. LncRNA PVT1 triggers Cyto-protective autophagy and promotes pancreatic ductal adenocarcinoma development via the miR-20a-5p/ULK1 Axis[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 98[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6043995/>. DOI: 10.1186/s12943-018-0845-6.
- [16] YANG Y Z, HUANG G X, ZHOU Z C, et al. Mir-20a regulates FAS expression in osteosarcoma cells by modulating FAS promoter activity and can be therapeutically targeted to inhibit lung metastases[J/OL]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(1): 130-139[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5752589/>. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0042.
- [17] ESLAMIZADEH S, HEIDARI M, AGAH S, et al. The role of MicroRNA signature as diagnostic biomarkers in different clinical stages of colorectal cancer[J/OL]. *Cell J*, 2018, 20(2): 220-230[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5893294/>. DOI:10.22074/cellj.2018.5366.
- [18] ZHOU L, LI X W, ZHOU F, et al. Downregulation of leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1 by microRNA-20a modulates gastric cancer multidrug resistance[J/OL]. *Cancer Sci*, 2018, 109(4): 1044-1054[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5891193/>. DOI:10.1111/cas.13538.
- [19] ZHAO F F, PU Y G, CUI M D, et al. MiR-20a-5p represses the multi-drug resistance of osteosarcoma by targeting the SDC2 gene[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17: 100[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5668954/>. DOI:10.1186/s12935-017-0470-2.
- [20] ZHANG L, HE L, ZHANG H, et al. Knockdown of miR-20a enhances sensitivity of colorectal cancer cells to cisplatin by increasing ASK1 expression[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(4): 1432-1441. DOI:10.1159/000490834.
- [21] XIONG Y, SUN F, DONG P X, et al. IASPP induces EMT and cisplatin resistance in human cervical cancer through miR-20a-FBXL5/BTG3 signaling[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 48[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5387376/>. DOI:10.1186/s13046-017-0520-6.

- [22] ZHU M X, ZHOU X, DU Y P, et al. MiR-20a induces cisplatin resistance of a human gastric cancer cell line via targeting CYLD[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1742-1750. DOI: 10.3892 / mmr. 2016.5413.
- [23] HUANG Y S, ZHONG Y, YU L, et al. Association between the TGFBR2 G-875A polymorphism and cancer risk: evidence from a meta-analysis[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(20): 8705-8708.
- [24] BELLAM N, PASCHE B. Tgf-beta signaling alterations and colon cancer[J]. *Cancer Treat Res*, 2010, 155: 85-103. DOI:10.1007/978-1-4419-6033-7_5.
- [25] LEE J, KATZENMAIER E M, KOPITZ J, et al. Reconstitution of TGFBR2 in HCT116 colorectal cancer cells causes increased LF-NG expression and enhanced N-acetyl-d-glucosamine incorporation into Notch1[J]. *Cell Signal*, 2016, 28(8): 1105-1113. DOI:10.1016/j. cellsig.2016.04.012.
- [26] MODY H R, HUNG S W, PATHAK R K, et al. MiR-202 diminishes TGF β receptors and attenuates TGF β 1-induced EMT in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(8): 1029-1039. DOI:10.1158/1541-7786.mcr-16-0327.
- [27] WEI C Y, TAN Q X, ZHU X, et al. Expression of CDKN1A/p21 and TGFBR2 in breast cancer and their prognostic significance[J/OL]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 14619-14629[2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4713571/>.
- [28] AZAD A K, LAWEN A, KEITH J M. Bayesian model of signal rewiring reveals mechanisms of gene dysregulation in acquired drug resistance in breast cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173331 [2018-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5348014/>. OI:10.1371/journal.pone.0173331.

[收稿日期] 2018-11-24

[修回日期] 2019-03-04

[本文编辑] 党瑞山