

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.12.007

· 基础研究 ·

甘草酸通过调控 miR-142/ZEB1 分子轴影响非小细胞肺癌 HCC827 和 A549 细胞的恶性生物学行为

赵润杨, 孟泳, 王艳梅, 侯从岭(河南中医药大学第二附属医院暨河南省中医院 呼吸科, 河南 郑州 450003)

[摘要] **目的:**探讨甘草酸(GA)通过调控 miR-142/锌指 E 盒结合的同源盒蛋白 1(ZEB1)分子轴对非小细胞肺癌(NSCLC) HCC827 和 A549 细胞增殖、侵袭和迁移的影响。**方法:**HCC827 和 A549 细胞培养和转染完成后,分成 4 组:NC 组(未经转染+3 mmol/L GA)、miR-142 inhibitor 组(敲降 miR-142+3 mmol/L GA)、pcDNA3.1-ZEB1 组(过表达 ZEB1+3 mmol/L GA)和 pcDNA3.1-ZEB1+miR-142 mimic 组(过表达 ZEB1 及 miR-142+3 mmol/L GA)。采用 qPCR 检测不同浓度 GA 处理后 HCC827 和 A549 细胞中 miR-142 的表达水平, WB 实验检测 HCC827 和 A549 细胞中 ZEB1 蛋白的表达水平,采用 MTT 和 Transwell 检测 HCC827 和 A549 细胞的增殖、侵袭和迁移能力,采用双荧光素酶报告基因检测 miR-142 与 ZEB1 的靶向关系。**结果:**GA 显著抑制 HCC827 和 A549 细胞的增殖、侵袭和迁移,且显著上调 miR-142 的表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$);miR-142 通过靶向结合 ZEB1 的 3'-UTR 区域下调 ZEB1 的表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$);进一步实验证实,GA 通过上调 miR-142 抑制 ZEB1 的表达水平,进而抑制 HCC827 和 A549 细胞增殖、侵袭和迁移($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**GA 能够抑制 NSCLC HCC827 和 A549 细胞增殖、侵袭和迁移,其机制为 GA 通过上调 miR-142 对 ZEB1 的抑制作用,从而抑制 HCC827 和 A549 细胞的恶性生物学行为。

[关键词] 甘草酸;miR-142;锌指 E 盒结合的同源盒蛋白 1;非小细胞肺癌;HCC827 细胞;A549 细胞;增殖;迁移;侵袭

[中图分类号] R392.12; R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)12-1337-08

Glycyrrhizin affects malignant biological behaviors of non-small cell lung cancer HCC827 and A549 cells via regulating miR-142/ZEB1 axis

ZHAO Runyang, MENG Yong, WANG Yanmei, HOU Congling (Department of Respiratory, the Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine & Henan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of glycyrrhizin (GA) on the proliferation, invasion and migration of non-small cell lung cancer HCC827 and A549 cells via regulating miR-142/ZEB1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1) axis. **Methods:** After being cultured and transfected, HCC827 and A549 cells were divided into 4 groups: NC group (untransfected+3 mmol/L GA), miR-142 inhibitor group (miR-142 knockdown+3 mmol/L GA), pcDNA3.1-ZEB1 group (ZEB1 over-expression+3 mmol/L GA) and pcDNA3.1-ZEB1+miR-142 mimic group (ZEB1 over-expression+miR-142+3 mmol/L GA). qPCR was used to detect the expression level of miR-142 in HCC827 and A549 cells treated with different concentrations of GA. MTT and Transwell assays were used to examine the proliferation, invasion and migration of HCC827 and A549 cells. WB was used to detect the expression level of ZEB1 protein in HCC827 and A549 cells. Dual-luciferase reporter gene assay was used to explore the relationship between miR-142 and ZEB1. **Results:** GA significantly inhibited the proliferation, invasion and migration of HCC827 and A549 cells, and up-regulated the expression level of miR-142 ($P<0.05$ or $P<0.01$). Dual-luciferase reporter gene assay showed that miR-142 could targetedly combine with 3'-UTR of ZEB1 and down-regulate the expression of ZEB1 ($P<0.05$ or $P<0.01$). Further experiment validated that GA inhibited ZEB1 expression via up-regulating miR-142, thus suppressed proliferation, invasion and migration of HCC827 and A549 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** GA inhibits the proliferation, invasion and migration of NSCLC HCC827 and A549 cells, the mechanism of which is that GA inhibits the malignant biological behavior of NSCLC HCC827 and A549 cells via up-regulating the inhibition effect of miR-142 on ZEB1.

[Key words] glycyrrhizin (GA); miR-142; Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1); non-small cell lung cancer (NSCLC); HCC827 cell; A549 cell; proliferation; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(12): 1337-1344. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.12.007]

[作者简介] 赵润杨(1981-),女,硕士,主治医师,主要从事呼吸系统疾病临床及基础的研究, E-mail:lyz77889@126.com

[通信作者] 孟泳(MENG Yong, corresponding author),硕士,主任医师,硕士生导师,主要从事中西医结合治疗呼吸系统疾病的研究, E-mail:15890005257@163.com

非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC) 是最常见的肺癌之一, 约占所有肺癌的 85%, 且发病率及病死率均居所有恶性肿瘤首位, 其高侵袭性是导致患者预后极差的主要原因^[1]。甘草酸 (glycyrrhizin, GA) 是甘草中最主要的活性成分, 具有抗炎^[2]、抗病毒^[3]及免疫调节^[4]等作用。近年来研究发现, GA 能有效抑制乳腺癌^[5]、肝癌^[6]、胃癌^[7]等多种恶性肿瘤的发生发展。MicroRNA (miRNA) 是一类长度为 22~24 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子, miRNA 能够引起靶 mRNA 降解或者抑制其翻译, 从而调控基因转录后的表达^[8]。研究^[9]发现, miRNA 参与调控 NSCLC 的发生发展。SAKAI-SUGINO 等^[10]研究发现, GA 可通过调控 miRNA 的表达水平影响癌症的发展进程。研究^[11-14]发现, miR-142 在肺癌中作为抑癌因子, 抑制肺癌细胞的恶性生物学行为。但目前尚无文献报道 GA 通过 miR-142 对 NSCLC 增殖、侵袭和迁移的影响。锌指 E 盒结合的同源盒蛋白 1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1, ZEB1) 是由 TCF8 基因编码的转录因子, 是锌指蛋白 ZFH 基因家族的同源物。研究^[15]发现, ZEB1 参与调控胰腺癌细胞的增殖和迁移。LI 等^[16]研究发现, miR-142 和 ZEB1 在乳腺癌中存在相互作用, 并且调控乳腺癌的发生发展, 但无文献报道 miR-142/ZEB1 分子轴对 NSCLC 恶性生物学行为的作用机制。本研究从细胞水平探讨 GA 通过调控 miR-142/ZEB1 分子轴对 NSCLC 细胞增殖、侵袭和迁移的影响, 旨在为 GA 对 NSCLC 临床治疗提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂及仪器

人 NSCLC 细胞株 A549 (货号: TCHu150)、NCI-H358 (货号: TCHu151)、NCI-H1650 (货号: TCHu152)、HCC827 (货号: TCHu153) 均购于中国科学院上海细胞库。GA 购自日本米诺发源制药株式会社 (药品批号: 00808), RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自美国 Biological Industries 公司, qPCR 引物购自上海吉玛公司, TRIzol 试剂盒、SYBR Green Real-Time PCR Master Mix 试剂盒、RAPI 蛋白裂解、双荧光素酶报告基因试剂盒和报告基因载体购于 Promega 公司, Lipofectamine 2000、逆转录试剂盒购于 TaKaRa 公司, MTT 试剂盒购于武汉华美生物工程有限公司, Transwell 小室购于美国 Corning Incorporated 公司, miR-142 inhibitor、miR-142 mimic 和 pcDNA3.1-ZEB1 购于山东维真生物科技有限公司。酶标仪、qPCR 仪、电泳仪、凝胶成像系统、超速冷冻离心机和电泳槽均购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 细胞培养

取 NSCLC 细胞株 A549、NCI-H358、NCI-H1650 及 HCC827 进行细胞复苏, 当细胞汇合度达 80%~90% 时, 将细胞培养于含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml 和 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱培养。

1.3 细胞转染

用 0.25% 胰酶消化细胞后, 将 HCC827 和 A549 细胞接种到 96 孔板, 调整细胞密度为 2×10^3 个/孔, 过夜培养。将 96 孔中细胞培养液更换成含 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基暂时放入培养箱进行培养。取 miR-142 inhibitor、miR-142 mimic 和 pcDNA3.1-ZEB1、miR-NC 各 0.5 μ l, 向其中分别加入无血清 RPMI 1640 培养基 50 μ l 稀释为终浓度 50 nmol/L, 然后分别加入 0.75 μ l 转染试剂并迅速涡旋混匀形成转染混合物, 放于室温 10 min。从培养箱中取出 96 孔板, 向细胞悬液内逐滴缓慢加入上述转染复合物并轻轻混匀。将 96 孔板放回培养箱培养, 转染 48 h 后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。实验分为 4 组: NC 组 (未经转染+3 mmol/L GA)、miR-142 inhibitor 组 (敲降 miR-142+3 mmol/L GA)、pcDNA3.1-ZEB1 组 (过表达 ZEB1+3 mmol/L GA) 和 pcDNA3.1-ZEB1+miR-142 mimic 组 (过表达 ZEB1 及 miR-142+3 mmol/L GA)。

1.4 qPCR 检测转染前后 HCC827 和 A549 细胞中 miR-142 的表达水平

应用 TRIzol 试剂盒提取 HCC827 和 A549 细胞中的总 RNA, 提取的总 RNA 运用紫外吸收法检测 RNA 的浓度。采用一步法按照逆转录试剂盒合成 cDNA, 然后运用 Primer Premier 5.0 软件进行引物设计, 以 U6 为内参, 进行 PCR 扩增。反应体系 (20 μ l) 为: 2 μ l 逆转录产物、10 μ l SYBR Green Mix、上下游引物各 0.5 μ l。PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 进行 45 个循环。引物序列 U6: F 为 ATTGGAAC-GATACAGAGA, R 为 GGAACGCTTCACGAATTCG; miR-142 F 为 GTCACCTGTAGTGTTC, R 为 TATG-GTTGTTCTGCTCTCTG。检测结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行计算。

1.5 WB 实验检测 HCC827 和 A549 细胞中 ZEB1 蛋白的表达水平

取生长良好的转染前后细胞, 加入预冷的 PBS, 2 ml/孔, 清洗 3 次; 加入 RIPA 裂解液, 每孔 100 μ l, 置于冰上 20 min; 将贴壁细胞刮下, 加入适量的细胞裂解液, 并移入预冷的 1.5 ml EP 管中, 4 $^{\circ}$ C 超微震荡 30 min; 4 $^{\circ}$ C 12 000 \times g 离心 20 min。随后进行 SDS-PAGE 电泳, 事先准备好滤纸和转膜液, 将胶块、

PVDF膜、海绵垫、滤纸依次放入转膜液中充分浸泡;将黑转膜夹放置在托盘下,按照顺序放置并夹紧转膜夹,正极对着PVDF膜,凝胶对着负极;加入转膜液,接通电源,90 V电压,90 min,随后放入4 °C冰箱;转膜结束,用TBST洗膜3次,每次3 min。最后用ECL化学发光液进行显色,拍照记录,并用Image J对蛋白条带进行定量分析。

1.6 MTT法检测HCC827和A549细胞的增殖能力

观察转染后HCC827和A549细胞的生长状态,待细胞长至对数生长期后,用常规胰酶处理细胞后,配成单细胞悬液接种到96孔板(3×10^3 个/孔),加入单细胞悬液体积100 μ l,并置于培养箱培养4 d。转染前丢弃每孔旧的培养液,加入RPMI 1640培养基。转染72 h后,每孔依次加入MTT溶液20 μ l,放回培养箱静置4 h,然后吸弃每孔内培养上清液,加入200 μ l DMSO,混匀后振荡15 min。最后在酶标仪上测定各孔570 nm处的光密度(D)值。细胞增殖率=(实验组 D 值/对照组 D 值) $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell检测HCC827和A549细胞侵袭及迁移能力

侵袭实验:在冰上,用镊子将Transwell小室放入24孔板内,将基质胶和无血清培养基按照10:1稀释,然后放入细胞培养箱内静置放置2 h。将800 μ l完全培养基缓慢加入到24孔板内,转染后各组细胞用PBS清洗2次,然后常规胰酶消化收集细胞,再用培养基清洗细胞1次并制成单细胞悬液,细胞接种于24孔板内,每孔 3×10^5 个细胞。最后放回细胞培养箱内培养20 h。取出24孔培养板,用镊子取出小室,然后用甲醇固定15 min,用结晶紫染色15 min,用去离子水清洗2次,静置干燥,同时将小室内残留的细胞轻擦掉,最后在显微镜下照相。显微镜下拍照,使用Image-Pro Plus软件进行细胞计数。

迁移实验:常规胰酶消化转染后各组细胞,每个样品准备 1×10^6 个/ml,1 200 $\times g$ 离心5 min,加入无血清培养基1 ml重悬细胞,将无血清培养基预热,然后加入到小室中,室内静置2 h,将小室内无血清培养基吸出丢弃,然后在没有小室的24孔板中加入500 μ l培养基。在预先加好培养基的孔中放入小室,每个小室加入样品300 μ l,培养箱中培养24 h后,从培养箱中取出小室,将旧的培养液吸弃,在小室的24孔板孔中加入500 μ l结晶紫染色液。在预先加好染色液的24孔板孔中放入小室,镊子轻拿轻放小室,常温放置20 min,进行染色。显微镜下拍照,使用Image-Pro Plus软件进行细胞计数。

1.8 双荧光素酶报告基因实验验证miR-142与ZEB1的靶向关系

构建分别命名pmirGLO-ZEB1-3'-UTR wild type和pmirGLO-ZEB1-3'-UTR mutant的质粒,其分别插入野生型和突变型ZEB1-3'-UTR的双荧光素酶。将293T细胞接种到48孔板,将报告子质粒和miRNA-142 mimic或miR-NC共转染。每孔加入1 \times Passive Lysis Buffer 100 μ l,然后将培养板放在摇床15 min。将细胞裂解液加入到EP管内,4 °C 12 000 $\times g$ 离心10 min,将EP管内的上清液转移至新的EP管中。48孔板中加入Luciferase Assay Reagent II 100 μ l,加入细胞裂解液20 μ l,测定内参值。加入stop&GLO® Reagent 100 μ l,测定报告基因发光值。

1.9 统计学处理

qPCR、WB、MTT、Transwell、双荧光素酶报告基因等实验均重复3次。采用SPSS 20.0软件进行统计数据分析,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

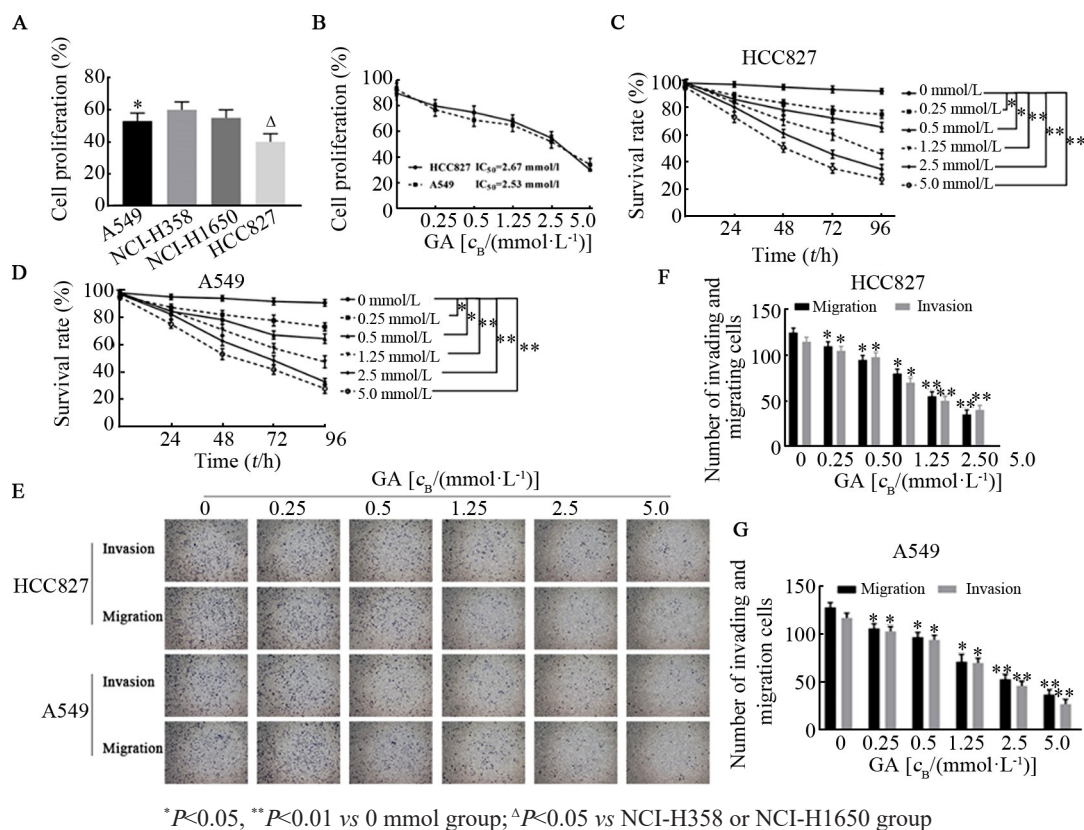
2.1 GA显著抑制HCC827和A549细胞增殖、侵袭和迁移能力

首先采用3.0 mmol/L GA处理NSCLC细胞系,MTT结果显示,HCC827和A549细胞的增殖活力显著低于其他2组细胞($P < 0.05$,图1A),并选取HCC827和A549细胞进行后续实验。随后,采用0、0.25、0.5、1.25、2.5、5.0 mmol/l的GA处理HCC827和A549细胞72 h,MTT检测结果显示,GA对两株细胞增殖活力的抑制作用均呈剂量依耐性($P < 0.05$,图1B),且 IC_{50} 值分别为2.67 mmol/L和2.53 mmol/L;且随着作用时间增加,HCC827和A549细胞的存活率显著降低($P < 0.01$,图1C、D)。Transwell检测结果显示,GA可显著抑制HCC827和A549细胞的侵袭和迁移($P < 0.01$,图1E-G)。上述结果表明,GA能显著抑制HCC827和A549细胞增殖、侵袭和迁移能力。

2.2 GA通过miR-142调控HCC827和A549细胞的增殖、侵袭和迁移

qPCR检测结果显示,HCC827和A549细胞中miR-142的表达水平都随GA浓度的升高而显著上升($P < 0.01$,图2A、B)。敲降miR-142后,HCC827和A549细胞中miR-142的表达水平显著低于对照组($P < 0.05$,图2C)。采用3 mmol/L GA处理细胞后,MTT检测结果显示,相比于NC组,敲降miR-142可以显著促进细胞增殖活力($P < 0.01$,图2D);Transwell检测结果显示,敲降miR-142后,HCC827和A549细胞侵袭和迁移能力显著高于NC组($P < 0.01$,图2E-H)。上述

结果表明,GA通过上调NSCLC细胞中miR-142的表达水平,从而抑制HCC827和A549细胞增殖、侵袭和迁移。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 mmol group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs NCI-H358 or NCI-H1650 group

A: Cell viability of non-small cell lung cancer cell lines measured by MTT assay; B-D: Cell viability and IC_{50} value of HCC827 and A549 cells measured by MTT assay; E-G: The invasion and migration of HCC827 and A549 cells detected by Transwell assay

图1 GA对HCC827和A549细胞增殖、侵袭和迁移的影响

Fig.1 Effect of GA on proliferation, invasion and migration of HCC827 and A549 cells

2.3 miR-142通过靶向结合ZEB1的3'-UTR区域下调ZEB1的表达水平

Starbase V2.0数据库预测结果(图3A)显示,miR-142能够结合ZEB1的3'-UTR区域。双荧光素酶报告基因实验结果显示,miR-142 mimic、ZEB1 3'-UTR野生型及突变型载体共转染后,miR-142 mimic明显抑制了转染ZEB1 3'-UTR野生型载体的细胞荧光素酶活性($P < 0.01$,图3B),而对ZEB1 3'-UTR突变型载体的荧光素酶活性无明显作用,表明miR-142直接靶向ZEB1。WB检测结果显示,与miR-NC组相比,过表达miR-142后,两株细胞中ZEB1的表达水平均显著下降($P < 0.01$,图3C);相比较于miR-NC组,经3.0 mmol/L GA处理可显著下调HCC827和A549细胞中ZEB1的表达水平($P < 0.01$,图3D)。上述结果表明,miR-142能够靶向ZEB1,且负调控ZEB1的表达水平,GA可明显抑制ZEB1的表达。

2.4 GA通过miR-142/ZEB1分子轴调控HCC827和A549细胞增殖、侵袭和迁移

WB检测结果显示,过表达ZEB1能显著上调

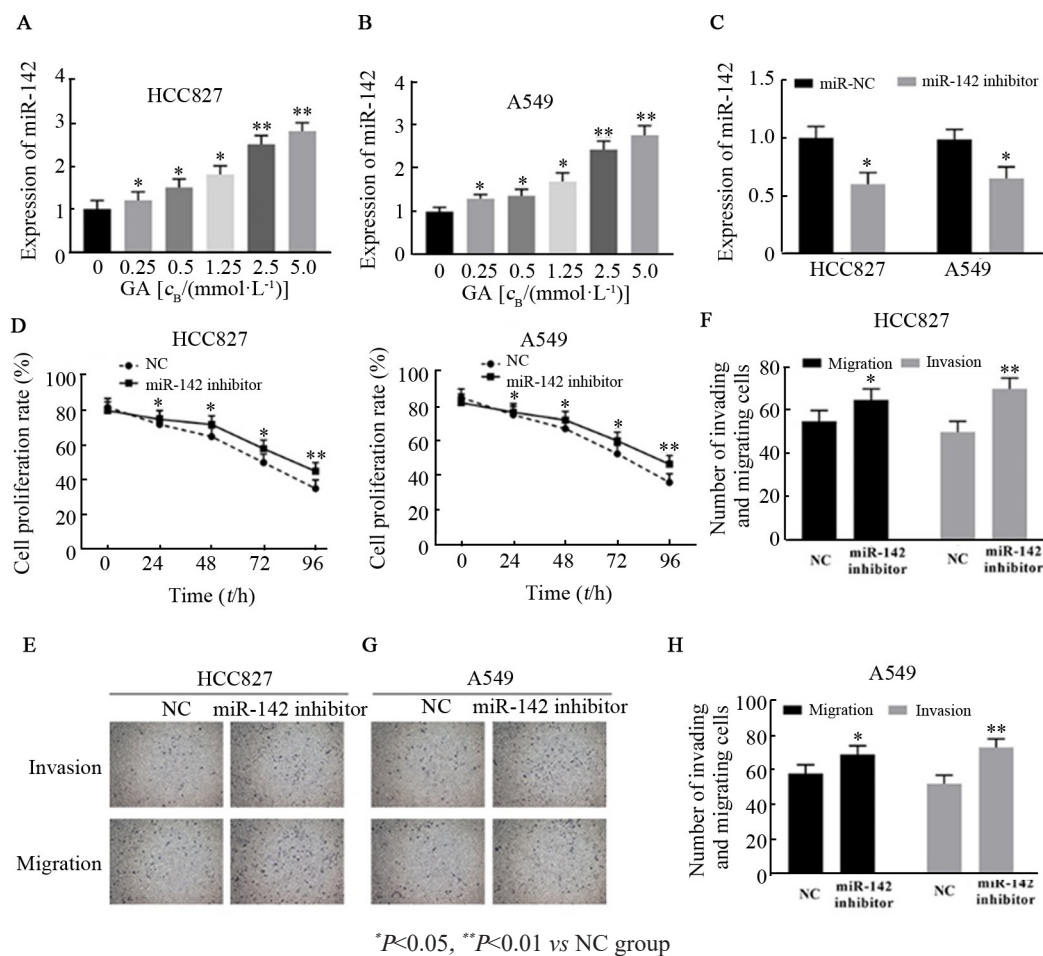
ZEB1的表达水平($P < 0.01$,图4A、B),同时过表达miR-142和ZEB1时ZEB1的表达水平与NC组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。采用3 mmol/L GA处理HCC827和A549细胞后,MTT及Transwell检测结果显示,过表达ZEB1能显著促进HCC827和A549细胞的增殖、侵袭及迁移($P < 0.01$,图4C-G),而同时过表达miR-142和ZEB1时细胞的增殖、侵袭和迁移能力与NC组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述结果表明,GA通过上调miR-142的表达水平抑制ZEB1的表达,进而抑制HCC827和A549细胞的增殖、侵袭和迁移能力。

3 讨论

NSCLC是发病率和病死率增长较快的恶性肿瘤之一,对人群的健康和生命带了巨大的威胁^[17-19]。GA是甘草中提取出的一种三萜皂苷类物质,具有抗炎、抗菌、解毒以及抗癌等重要作用^[20]。研究^[21-23]发现,GA通过调控多种癌细胞恶性生物学行为,从而抑制癌症的发生发展。如GA通过ROS线粒体诱导

人乳腺癌细胞凋亡和自噬^[24]; GA 通过抑制 NF- κ B 活性, 进而抑制人成胶质瘤细胞的增殖并诱导细胞调

亡^[25]。本研究发现, GA 对 HCC827 和 A549 细胞的增殖、侵袭及迁移具有显著的抑制作用。



A-C: The expression level of miR-142 detected by qPCR; D: The proliferation viability of HCC827 and A549 cells measured by MTT assay; E-H: The invasion and migration of HCC827 and A549 cells detected by Transwell assay ($\times 100$)

图2 GA通过调控miR-142对HCC827和A549细胞增殖、侵袭和迁移的影响

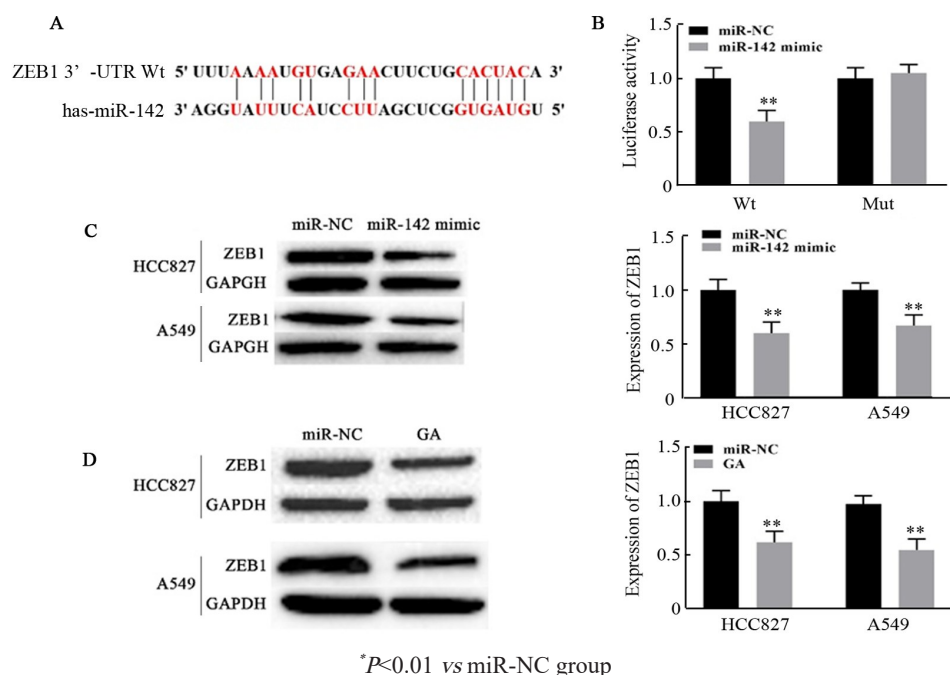
Fig.2 Effect of GA on proliferation, invasion and migration of HCC827 and A549 cells *via* regulating miR-142

研究^[26-27]发现, miRNAs 通过靶向其下游 mRNA 参与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭等生物学过程。miR-142 在宫颈癌^[28]、膀胱癌^[29]、胰腺癌^[30]等多种肿瘤中作为抑癌基因, 如 miR-142 的下调与胃癌预后不良和复发显著相关, 且 miR-142 在体外和体内抑制肿瘤细胞迁移和侵袭^[31]; miR-142 通过靶向 SIRT1 抑制卵巢癌的增殖及化疗耐药^[32]; miR-142 通过抑制 ESR1 的表达水平, 从而抑制乳腺癌细胞的恶性生物学行为^[33]。本研究发现, 敲降 miR-142 能够促进 HCC827 细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 而 GA 能够上调 miR-142 的表达水平, 进而逆转敲降 miR-142 对 HCC827 细胞生物学行为的促进作用。

ZEB1 被证明是多种肿瘤发展进程中的重要调控因子, 是肿瘤细胞侵袭、转移和化疗耐药的重要诱导剂^[34]。ZHANG 等^[35]研究发现, miR-5702 通过抑制 ZEB1 的表达水平, 从而抑制肺癌细胞的增殖和侵

袭; 此外, WANG 等^[36]研究发现, ZEB1 在 NSCLC 细胞中高表达, 且促进 NSCLC 细胞的侵袭和迁移。本研究发现, 过表达 ZEB1 显著促进 HCC827 和 A549 细胞的增殖、侵袭和迁移, 该结果与上述结果相一致, 但是关于 ZEB1 的下游调控机制尚待研究。此外, 有文献^[37-39]报道, ZEB1 作为 EMT 关键的转换分子, 调控 E-cadherin 及 β -catenin 的表达水平, 进而促进着肿瘤的发生发展, 因此推测在 HCC827 和 A549 细胞中, ZEB1 可能通过调控 E-cadherin 及 β -catenin 的表达水平, 从而促进 HCC827 和 A549 细胞 EMT, 进而促进其迁移、侵袭和抗凋亡。

综上所述, GA 可明显抑制 HCC827 和 A549 细胞增殖、侵袭和迁移, 其分子机制为 GA 能够上调 miR-142 的表达水平, 从而抑制 ZEB1 的表达水平, 进而抑制 HCC827 细胞和 A549 细胞的恶性生物学行为。

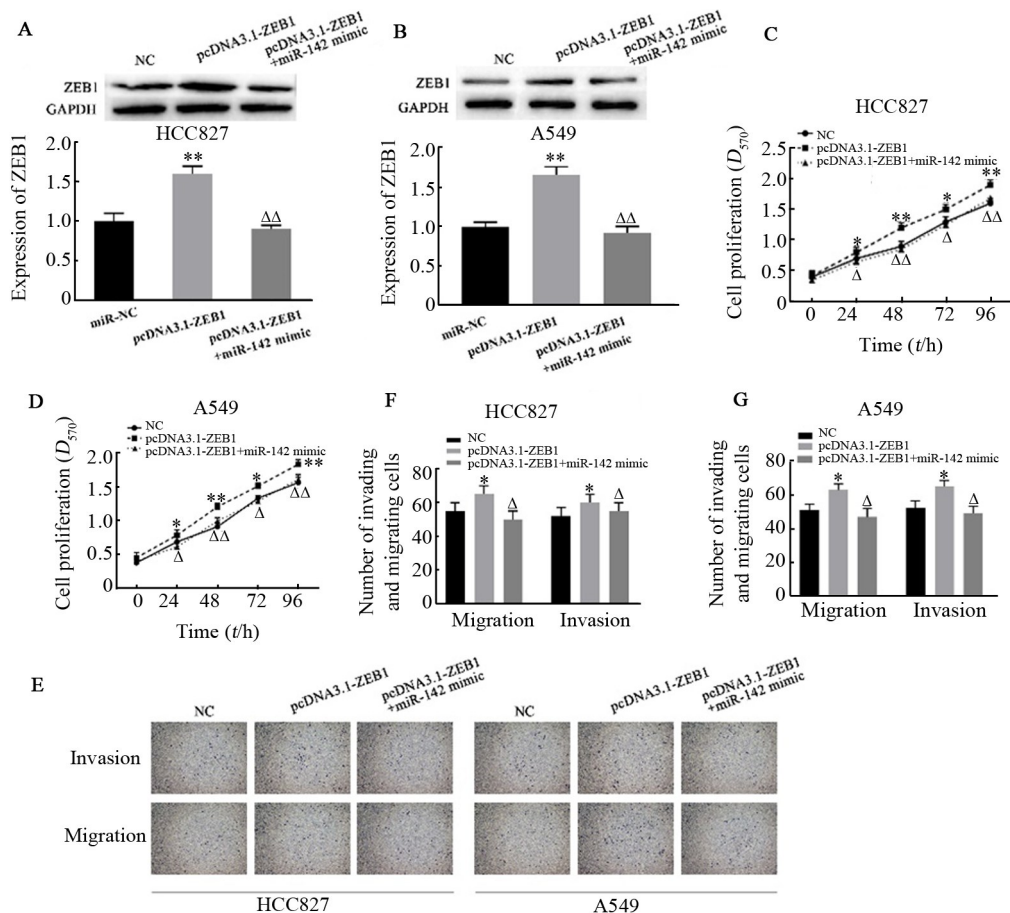


* $P < 0.01$ vs miR-NC group

A: Starbase database was used to predict the interaction between miR-142 with ZEB1; B: Dual-luciferase reporter gene assay was applied to detect interaction between miR-142 and ZEB1; C and D: WB was used to detect the expression level of ZEB1

图3 miR-142 靶向结合 ZEB1 的 3'-UTR 区域

Fig.3 miR-142 targetedly bond to the 3'-UTR of ZEB1



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs pcDNA3.1-ZEB1 group

A and B: The expression of ZEB1 detected by WB; C and D: MTT assay was applied to detect cell viability of HCC827 and A549 cells;

E-G: The invasion and migration of HCC827 and A549 cells detected by Transwell assay

图4 GA 通过 miR-142/ZEB1 分子轴调控 HCC827 和 A549 细胞增殖、侵袭和迁移

Fig.4 GA regulated proliferation, invasion and migration of HCC827 and A549 cells via miR-142/ZEB1 molecular axis

[参考文献]

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [2] SHAH S L, WAHID F, KHAN N, et al. Inhibitory effects of Glycyrrhiza glabra and its major constituent glycyrrhizin on inflammation-associated corneal neovascularization[J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 8438101[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5937553/>. DOI: 10.1155/2018/8438101.
- [3] FAROOQUI A, KHAN F, KHAN I, et al. Glycyrrhizin induces reactive oxygen species-dependent apoptosis and cell cycle arrest at G0/G1 in HPV18+ human cervical cancer HeLa cell line[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 752-764. DOI:10.1016/j.biopha.2017.10.147.
- [4] AYEKA P A, BIAN Y H, GITHAIGA P M, et al. The immunomodulatory activities of licorice polysaccharides (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) in CT 26 tumor-bearing mice[J/OL]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 536[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5732493/>. DOI:10.1186/s12906-017-2030-7.
- [5] GAO Y H, CHEN J, CAI Y. Effects of glycyrrhizin on the growth of human breast cancer cells of MDA-MB-231[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2016, 32(13): 1210-1213. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2016.13.017.(in Chinese).
- [6] ARASE Y, IKEDA K, MURASHIMA N, et al. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients[J]. *Cancer*, 1997, 79(8): 1494-1500. DOI: 10.1002/(sici)1097-0142(19970415)79:8<1494::aid-cnrc8>3.0.co;2-b.
- [7] WANG H F, ZHU Z F, GAO Y, et al. Effect of glycyrrhizin on gastric cancer BGC-823 cell proliferation[J]. *World Chin J Dig*, 2015, 23(18): 2868. DOI:10.11569/wjcd.v23.i18.2868.
- [8] DE PLANELL-SAGUER M, RODICIO M C. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 699(2): 134-152. DOI:10.1016/j.aca.2011.05.025.
- [9] BABU N, ADVANI J, SOLANKI H S, et al. MiRNA and proteomic dysregulation in non-small cell lung cancer in response to cigarette smoke[J]. *Microna*, 2018, 7(1): 38-53. DOI: 10.2174/2211536607666180103165343.
- [10] SAKAI-SUGINO K, UEMATSU J, KAMADA M, et al. Glycyrrhizin inhibits human parainfluenza virus type 2 replication by the inhibition of genome RNA, mRNA and protein syntheses[J]. *Drug Discov Ther*, 2017, 11(5): 246-252. DOI:10.5582/ddt.2017.01048.
- [11] CHEN Y, ZHOU X, QIAO J, et al. MiR-142-3p Overexpression increases chemo-sensitivity of NSCLC by inhibiting HMGB1-mediated autophagy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1370-1382. DOI: 10.1159/000467896.
- [12] WAN J, LING X A, PENG B, et al. MiR-142-5p regulates CD4+ T cells in human non-small cell lung cancer through PD-L1 expression via the PTEN pathway[J/OL]. *Oncol Rep*, 2018, 40(1): 272-282 [2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6059749/>. DOI:10.3892/or.2018.6439.
- [13] WANG Z, LIU Z M, FANG X J, et al. MiR-142-5p suppresses tumorigenesis by targeting PIK3CA in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(6): 2505-2515. DOI: 10.1159/000484459.
- [14] LIU J Y, TIAN W W, ZHANG W B, et al. MicroRNA-142-3p/MALAT1 inhibits lung cancer progression through repressing β -catenin expression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114: 108847. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108847.
- [15] LIN Z B, CHEN Y, LIN Z X, et al. Overexpressing PRMT1 inhibits proliferation and invasion in pancreatic cancer by inverse correlation of ZEB1[J]. *IUBMB Life*, 2018, 70(10): 1032-1039. DOI: 10.1002/iub.1917.
- [16] LI Y, LV M, SONG Z Y, et al. Long non-coding RNA NNT-AS1 affects progression of breast cancer through miR-142-3p/ZEB1 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 939-946. DOI:10.1016/j.biopha.2018.04.087.
- [17] LIN S C, CHU P Y, LIAO W T, et al. Glycyrrhizic acid induces human MDA-MB-231 breast cancer cell death and autophagy via the ROS-mitochondrial pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2): 703-710. DOI:10.3892/or.2017.6123.
- [18] LI M, ZHANG X, XU X Q, et al. Clinicopathological and prognostic significance of Twist overexpression in NSCLC[J/OL]. *Oncotarget*, 2018, 9(18): 14642-14651[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5865696/>. DOI:10.18632/oncotarget.24489.
- [19] KUMAR S S, MCGARRY R C. Management of local recurrences and regional failure in early stage non-small cell lung cancer after stereotactic body radiation therapy[J/OL]. *Transl Lung Cancer Res*, 2019, 8(Suppl 2): S213-S221[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6795579/>. DOI:10.21037/tlcr.2019.09.06.
- [20] BENTZ G L, LOWREY A J, HORNE D C, et al. Using glycyrrhizic acid to target sumoylation processes during Epstein-Barr virus latency[J/OL]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0217578[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6534330/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0217578.
- [21] WU X J, WANG W T, CHEN Y Y, et al. Glycyrrhizin suppresses the growth of human NSCLC cell line HCC827 by downregulating HMGB1 level[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 6916797[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5820661/>. DOI:10.1155/2018/6916797.
- [22] CHANG H Y, CHEN S Y, WU C H, et al. Glycyrrhizin attenuates the process of epithelial-to-mesenchymal transition by modulating HMGB1 initiated novel signaling pathway in prostate cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(12): 3323-3332. DOI:10.1021/acs.jafc.9b00251.
- [23] KANG R, XIE Y C, ZHANG Q H, et al. Intracellular HMGB1 as a novel tumor suppressor of pancreatic cancer[J/OL]. *Cell Res*, 2017, 27(7): 916-932[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5518983/>. DOI:10.1038/cr.2017.51.
- [24] LIN S C, CHU P Y, LIAO W T, et al. Glycyrrhizic acid induces human MDA-MB-231 breast cancer cell death and autophagy via the ROS-mitochondrial pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(2): 703-710. DOI:10.3892/or.2017.6123.
- [25] LI S, ZHU J H, CAO L P, et al. Growth inhibitory in vitro effects of glycyrrhizic acid in U251 glioblastoma cell line[J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(7): 1115-1120. DOI: 10.1007/s10072-014-1661-4.
- [26] HASHEMI Z S, KHALILI S, FOROUZANDEH MOGHADAM M, et al. Lung cancer and miRNAs: a possible remedy for anti-metastatic, therapeutic and diagnostic applications[J]. *Exp Rev Res Med*, 2017, 11

- (2): 147-157. DOI:10.1080/17476348.2017.1279403.
- [27] LI H, YANG T, SHANG D, et al. MiR-1254 promotes lung cancer cell proliferation by targeting SFRP1[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 92: 913-918. DOI:10.1016/j.biopha.2017.05.116.
- [28] JIANG D Q, WANG H Y, LI Z Y, et al. MiR-142 inhibits the development of cervical cancer by targeting HMGB1[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(3): 4001-4007[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354809/>. DOI:10.18632/oncotarget.13136.
- [29] LIU Q, LIU H, CHENG H P, et al. Downregulation of long noncoding RNA TUG1 inhibits proliferation and induces apoptosis through the TUG1/miR-142/ZEB2 axis in bladder cancer cells[J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10: 2461-2471[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5426477/>. DOI:10.2147/OTT.S124595.
- [30] LIU X J, LI S L, LI J S, et al. Long non-coding RNA ZEB1-AS1 is associated with poor prognosis in gastric cancer and promotes cancer cell metastasis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(9): 2624-2630. DOI:10.26355/eurrev_201805_14956.
- [31] YAN J, YANG B, LIN S Y, et al. Downregulation of miR-142-5p promotes tumor metastasis through directly regulating CYR61 expression in gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2019, 22(2): 302-313. DOI:10.1007/s10120-018-0872-4.
- [32] GAO J L, WU N, LIU X H, et al. MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation and chemoresistance in ovarian cancer via targeting sirtuin 1[J/OL]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(6): 5205-5214[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5996707/>. DOI:10.3892/etm.2018.6107.
- [33] MANSOORI B, MOHAMMADI A, GJERSTORFF M F, et al. MiR-142-3p is a tumor suppressor that inhibits estrogen receptor expression in ER-positive breast cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2019; 10(22): 28263. DOI:10.1002/jcp.28263.
- [34] BANGHAM C R, TOULZA F. Adult T cell leukemia/lymphoma: FoxP3(+) cells and the cell-mediated immune response to HTLV-1[J]. *Adv Cancer Res*, 2011, 111: 163-182. DOI:10.1016/B978-0-12-385524-4.00004-0.
- [35] ZHANG C, XUE Q D, XU Z L, et al. MiR-5702 suppresses proliferation and invasion in non-small-cell lung cancer cells via posttranscriptional suppression of ZEB1[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2018: e22163. DOI:10.1002/jbt.22163.
- [36] WANG J, ZHOU F C, YIN L, et al. MicroRNA-199b targets the regulation of ZEB1 expression to inhibit cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 5007-5014. DOI:10.3892/mmr.2017.7195.
- [37] CAMEL J, LIGIER M, PUISIEUX A J C R. Pleiotropic roles for ZEB1 in cancer[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(1): 30-35. DOI: 10.1158/0008-5472.Can-17-2476.
- [38] LIU Y Q, EL-NAGGAR S, DARLING D S, et al. Zeb1 links epithelial-mesenchymal transition and cellular senescence[J/OL]. *Development*, 2008, 135(3): 579-588[2019-09-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2507753/>. DOI:10.1242/dev.007047.
- [39] SCHMALHOFER O, BRABLETZ S, BRABLETZ T J C, et al. E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2009, 28(1/2): 151-166. DOI: 10.1007/s10555-008-9179-y.

[收稿日期] 2019-09-18

[修回日期] 2019-11-29

[本文编辑] 王映红