

灯盏乙素对乳腺癌细胞中环状 RNA OXNAD1 与 SMARCA5 的影响*

倪广惠^{1,2}, 刘加美¹, 赵正波¹, 何越峰^{3△}

(1. 云南中医学院中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南中医学院云南省民族特色养生理论与健康产品工程实验室, 云南 昆明 650500; 3. 昆明医科大学公共卫生学院, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 检测灯盏乙素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的环状 RNA (Circular RNA, circRNA) 的相对表达量的影响, 进一步探索灯盏乙素对肿瘤的作用机制。 **方法** 采用实时荧光定量 PCR 的方法, 检测对照组与不同剂量组的灯盏乙素处理后的乳腺癌细胞中 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的相对表达量。 **结果** 灯盏乙素在低剂量 (1、10、25 μm) 的情况下, 使得乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 circRNA OXNAD1 的表达量显著降低 ($P < 0.05$), 在高剂量 (100 μm) 时显著升高 ($P < 0.05$)。灯盏乙素在低剂量 (1、10、25、50 μm) 的情况下, 使得乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中环状 RNA SMARCA5 的表达量显著降低 ($P < 0.05$), 在高剂量 (100 μm) 时显著升高 ($P < 0.05$)。 **结论** 灯盏乙素影响 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的表达, 并且存在剂量反应关系, 低剂量与高剂量呈现出相反的表达量变化。

关键词: 灯盏乙素; 乳腺癌; circRNA; OXNAD1; SMARCA5

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2017)02-0024-03

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2017.02.005

灯盏乙素 (Scutellarin) 是灯盏细辛 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz 中主要的黄酮类有效成分^[1], 具有多种药理学作用, 现已应用于临床^[2]。研究发现, 灯盏乙素具有治疗恶性肿瘤性疾病的潜在用途^[3], 但是其对肿瘤细胞的作用机制目前尚不明确。CircRNA 是一类具有闭合环状结构的非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA)^[4], 近来被认为是癌症诊断与治疗的生物标志物而广受关注^[5], 成为一类新的药物研究靶点^[6]。目前, 尚无灯盏乙素对细胞中 circRNA 的影响的报道。本研究通过测定灯盏乙素对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的基因表达的影响, 探索灯盏乙素对肿瘤细胞的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂、仪器

灯盏乙素 (云南红河千山生物工程有限公司, 批号: 20150216); RPMI-1640 培养液 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (兰州百灵生物技术有限公司); 青霉素混合液 (北京索莱宝科技有限公司); RNAiso 试剂盒 (宝生物工程 (大连) 有限公司); Transcriptor First

Strand cDNA Synthesis Kit (瑞士 Roche 公司); CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司); LightCycler[®] 96 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

1.2 细胞培养

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞购自于中国科学院昆明动物研究所。细胞用 RPMI-1640 培养液培养, 加入 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素。细胞于 37°C、5% CO₂ 进行培养。

1.3 实验方法

取对数生长期的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板, 每孔 7.5×10^4 个细胞, 置 CO₂ 培养箱 37°C 中孵育, 接种 24h 后加入灯盏乙素。用药组受试物溶液终浓度分别为 1、10、25、50、100 μmol·L⁻¹。对照组加入等量 PBS 溶液; 每组设 3 复孔, 放入 37°C CO₂ 培养箱中。每个实验分别重复 3 次。

细胞培养 5d 后, 按照说明书使用 RNAiso 试剂盒对细胞进行总 RNA 提取。利用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 将总 RNA 进行 cDNA 合成, 使用罗氏 LightCycler[®] 96 进行荧光定量检测,

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2015Y314)

收稿日期: 2017-03-20

作者简介: 倪广惠 (1983-), 女, 江西萍乡人, 博士, 讲师, 主要从事天然产物的有机合成及活性研究。

△通信作者: 何越峰, E-mail: heyuefeng@kmmu.edu.cn

PCR 引物如下: β -actin 为 ATTGCCGACAGGAT-GCAGAA 和 GCTGATCCACATCTGCTGGAA; circRNA OXNAD1 为 GAGGCAGACAAAGGCAGAAA 和 GCAGGAGGGTGGTTCGTAT; circRNA SMARCA5 为 CTCCAAGATGGGCGAAAG 和 TGTGTTGCTCCATGTCTAATCA。条件为 1、95℃ 120s, 2、95℃ 10s, 3、60℃ 10s, 4、72℃ 10 秒, 2 至 4 步骤一共 45 个循环, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示基因相对表达量, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的计算方法 $\Delta C_t = C_{t_{\text{目的}}} - C_{t_{\text{内参}}}$, $-\Delta\Delta C_t = -(\Delta C_{t_{\text{处理}}} - \Delta C_{t_{\text{对照}}})$ 。

1.4 统计学方法

使用统计学软件 SPSS12.0 版, 多组比较采用方差

分析, 两独立样本间比较采用独立样本 t 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

本研究结果显示(表 1), 灯盏乙素在低剂量(1、10、25 μm)的情况下, 使得乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 circRNA OXNAD1 的表达量显著降低 ($P < 0.05$), 在高剂量(100 μm)时显著升高 ($P < 0.05$)。灯盏乙素在低剂量(1、10、25、50 μm)的情况下, 使得乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 circRNA SMARCA5 的表达量显著降低 ($P < 0.05$), 在高剂量(100 μm)时显著升高 ($P < 0.05$)。

表 1 灯盏乙素对 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的基因表达的影响

	对照组	1 μm	10 μm	25 μm	50 μm	100 μm
OXNAD1	1.00 $\pm$ 0.10	0.69 $\pm$ 0.21*	0.78 $\pm$ 0.18*	0.69 $\pm$ 0.07*	0.99 $\pm$ 0.28	3.89 $\pm$ 1.11**
SMARCA5	1.00 $\pm$ 0.11	0.53 $\pm$ 0.10**	0.62 $\pm$ 0.19*	0.61 $\pm$ 0.12**	0.65 $\pm$ 0.05**	8.01 $\pm$ 2.91**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, ** $P < 0.01$

3 讨论

非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA) 与肿瘤的发生密切相关^[7], 是一类新的潜在的肿瘤治疗药物靶点^[6,8]。ncRNA 是一个数量庞大的家庭, 它们是如何发生改变, 并且如何影响肿瘤的机制正在进一步深入研究中^[9-10], 将 ncRNA 作为肿瘤药物的靶点的研究存在着挑战与机遇。

circRNA 是一类具有闭合环状结构的 ncRNAs, 近来研究发现 circRNA 与各种疾病密切相关^[11-12], 特别是癌症^[5]。在人上皮间质细胞转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程中, circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 在 RNA 结合蛋白 Quaking (QKI) 的调节下表达升高^[13]。EMT 与肿瘤细胞的侵袭和转移密切相关^[14]。据报道, 灯盏乙素可以抑制肿瘤的侵袭^[15], 对细胞的 EMT 有抑制作用^[16]。灯盏乙素对肿瘤侵袭的抑制作用与 EMT 存在一定的关联。本研究测定与 EMT 相关的 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 基因相对表达量, 结果显示, 在低剂量的情况下, 灯盏乙素使得 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的相对表达量显著降低; 而在高剂量灯盏乙素的作用下 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的相对表达量显著增加。这意味着灯盏乙素在 EMT 过程中调节 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的表达, 可能与 QKI 有关。另外, 灯盏乙素对 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的相对表达

量存在剂量反应关系, 低剂量与高剂量呈现出相反的表达式变化。具体的机制需要进一步研究。

本研究显示灯盏乙素对 circRNA OXNAD1 与 SMARCA5 的相对表达量有影响, 为进一步深入探索 circRNA 的作用机制提供了研究工具, 并且为进一步利用灯盏乙素提供理论依据, 有助于阐明灯盏乙素对肿瘤的作用机制。

参考文献:

- [1] 郭晓, 王萌, 任晓亮, 等. 野黄芩苷及其在灯盏花素注射液降解动力学研究 [J]. 中草药, 2016, 47 (11): 1861-1866.
- [2] 李丽, 刘东阳, 江骥, 等. 灯盏乙素药理学研究进展 [J]. 中草药, 2006, 37 (8): 10009-10011.
- [3] Hsiao W L W, Liu L. The role of traditional Chinese herbal medicines in cancer therapy—from TCM theory to mechanistic insights. [J]. Planta Medica, 2010, 76 (11): 1118-1131.
- [4] Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB. Circular RNAs: identification, biogenesis and function [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 2015, 1859 (1): 163-168.
- [5] Wang F, Nazarali AJ, Ji S. Circular RNAs as potential biomarkers for cancer diagnosis and therapy. [J]. American journal of cancer research, 2016, 6 (6): 1167-1176.
- [6] Matsui M, Corey DR. Non-coding RNAs as drug targets [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2017; 16 (3): 167-

- 179.
- [7] Schmitz SU, Phillip G, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2016, 73 (13): 2491–2509.
- [8] Qin M, Liu G, Huo X, et al. Hsa_circ_0001649: A circular RNA and potential novel biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biomark, 2016, 16 (1): 161–169.
- [9] Guarnerio J, Bezzi M, Jeong JC, et al. Oncogenic Role of Fusion–circRNAs Derived from Cancer–Associated Chromosomal Translocations [J]. Cell, 2016, 165 (2): 289–302.
- [10] Xia W, Qiu M, Chen R, et al. Circular RNA has_circ_0067934 is upregulated in esophageal squamous cell carcinoma and promoted proliferation [J]. Sci Rep, 2016, 18 (6): 35576.
- [11] Floris G, Zhang L, Follesa P, et al. Regulatory role of circular RNAs and neurological disorders [J]. Molecular Neurobiology, 2016: 1–10.
- [12] Lyu D, Huang S. The emerging role and clinical implication of human exonic circular RNA [J]. RNA biology, 2016, 2 (1): 1–7.
- [13] Conn S, Pillman K, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs [J]. Cell, 2015, 160 (6): 1125–1134.
- [14] He X, Wang L, Riedel H, et al. Mesothelin promotes epithelial–to–mesenchymal transition and tumorigenicity of human lung cancer and mesothelioma cells [J]. Mol Cancer, 2017, 16 (1): 63–65.
- [15] Li H, Huang D, Gao Z, et al. Scutellarin inhibits the growth and invasion of human tongue squamous carcinoma through the inhibition of matrix metalloproteinase–2 and –9 and $\alpha\text{v}\beta 6$ integrin [J]. International Journal of Oncology, 2013, 42 (5): 1674–1681.
- [16] Zhou H, Chen X, Chen L, et al. Anti–Fibrosis effect of scutellarin via Inhibition of endothelial–mesenchymal transition on isoprenaline–induced myocardial fibrosis in rats [J]. Molecules, 2014, 19 (10): 15611–15623.
- (编辑:徐建平)

Effects of Scutellarin on CircRNA OXNAD1 and SMARCA5 of Breast Cancer Cells

NI Guanghui^{1,2}, LIU Jiamei¹, ZHAO Zhengbo¹, HE Yuefeng³

(1. College of Pharmaceutical Science, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, 650500, China;

2. Engineering Laboratory for National Healthcare Theories and Products of Yunnan Province, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming, 650500, China; 3. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming, 650500, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of scutellarin on the relative expression of circRNA in breast cancer MDA–MB–231 cells, and to further explore the mechanism of scutellarin on tumor. **Methods** The relative expression of circRNAs OXNAD1 and SMARCA5 in breast cancer cells treated with scutellarin was detected by real–time quantitative PCR in the control group and the different dose groups. **Results** The relative expression of circRNA OXNAD1 in breast cancer MDA–MB–231 cells was significantly decreased ($P<0.05$) at low dose (1, 10 and 25 μm), and significantly increased at high dose (100 μm) ($P<0.05$). The expression of circRNA SMARCA5 in breast cancer MDA–MB–231 cells was significantly decreased ($P<0.05$) at the low dose (1, 10, 25, 50 μm), and significant at high dose (100 μm) ($P<0.05$). **Conclusion** Scutellarin has an effect on the expression of circRNA OXNAD 1 and SMARCA5 with a dose–response relationship, the low doses and high dose showed opposite expression changes.

KEY WORDS: scutellarin; breast cancer; circRNA; OXNAD1; SMARCA5