

基于 miR-208a-3p 探究萝卜硫素对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响

梅孝臣¹, 王磊², 王娟³, 张理想¹, 陆莹¹, 张娟¹, 孙万日^{1*}

1. 郑州大学附属南阳市中心医院 普外科, 河南 南阳 473000

2. 郑州大学第一附属医院 小儿外科, 河南 郑州 450000

3. 南阳市宛城区第一人民医院 普外科, 河南 南阳 473000

摘要:目的 探讨萝卜硫素对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响及其作用机制。方法 用 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 萝卜硫素处理人正常肝细胞 L02、肝癌 HepG2 细胞 48 h, 通过 CCK-8 法筛选合适的萝卜硫素浓度用于后续实验; 将 HepG2 细胞分为对照组和萝卜硫素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 组, CCK-8 法检测细胞增殖; Transwell 测定细胞迁移与侵袭。设置对照组、miR-208a-3p 模拟物 (miR-208a-3p mimic) 组及其阴性对照 (mimic NC) 组、miR-208a-3p 抑制物 (miR-208a-3p inhibitor) 组及其阴性对照 (inhibitor NC) 组、真核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, EIF4E3) 过表达物 (pcDNA-EIF4E3) 组及其阴性对照 (pcDNA) 组、EIF4E3 小干扰 RNA (si-EIF4E3) 组及其阴性对照 (si-NC) 组、pcDNA-EIF4E3 + mimic NC 组和 pcDNA-EIF4E3 + miR-208a-3p mimic 组, 利用 LipofectamineTM 2000 转染试剂盒对 HepG2 细胞进行转染, 转染 48 h 后, 各组分别加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 萝卜硫素处理 24 h, qRT-PCR 检测 HepG2 细胞中 miR-208a-3p 表达; CCK-8 法检测细胞增殖; Transwell 测定细胞迁移与侵袭; 双荧光素酶报告基因检测实验验证 miR-208a-3p 与 EIF4E3 靶向关系; Western blotting 检测细胞中 EIF4E3 蛋白表达。结果 与对照组比较, 萝卜硫素组 HepG2 细胞在 24、48 h 的 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目显著降低 ($P < 0.05$); HepG2 细胞中 miR-208a-3p 呈高表达, EIF4E3 蛋白呈低表达; miR-208a-3p 靶向负调控 EIF4E3 的表达; 下调 miR-208a-3p 或过表达 EIF4E3 可增强萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用, 而过表达 miR-208a-3p 或沉默 EIF4E3 则呈相反趋势; 同时过表达 miR-208a-3p 和 EIF4E3 不会影响萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用。结论 萝卜硫素可能通过下调 miR-208a-3p 而上调 EIF4E3 的表达来抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移。

关键词: 肝癌; miR-208a-3p; 萝卜硫素; 真核翻译起始因子 4E; 增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)05-1450-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.020

Effect of sulforaphane on proliferation, invasion and migration of liver cancer cells based on miR-208a-3p

MEI Xiao-chen¹, WANG Lei², WANG Juan³, ZHANG Li-xiang¹, LU Ying¹, ZHANG Juan¹, SUN Wan-ri¹

1. Department of General Surgery, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang 473000, China

2. Department of Pediatric Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

3. Department of General Surgery, The First People's Hospital of Wancheng District, Nanyang 473000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of sulforaphane on proliferation, invasion and migration of liver cancer cells. **Methods** Human normal liver cells L02 and hepatocarcinoma HepG2 cells were treated with 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ sulforaphane for 48 h, and the appropriate sulforaphane concentration was screened by CCK-8 method for subsequent experimental studies; HepG2 cells were divided into control group and sulforaphane (20 $\mu\text{mol/L}$) group, CCK-8 method was used to detect cell proliferation; Transwell was used to measure cell migration and invasion. HepG2 cells were divided into control group, miR-208a-3p mimic group, mimic group, miR-208a-3p inhibitor group, inhibitor NC group, pcDNA-eukaryotic translation initiation factor 4E (EIF4E3) group, pcDNA group, si-EIF4E3 group, si-NC group, pcDNA-EIF4E3 + mimic NC group and pcDNA-EIF4E3 + miR-208a-3p mimic group, HepG2 cells were transfected with LipofectamineTM 2000 transfection kit, after 48 h of transfection, each group was treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ sulforaphane for 24 h. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-208a-3p in HepG2 cells; CCK-8 method was used

收稿日期: 2021-11-04

作者简介: 梅孝臣 (1981—) 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事肝胆外科方面研究。E-mail: mx1981c@163.com Tel: 18538976966

*通信作者: 孙万日 (1971—) 男, 硕士研究生, 主任医师, 主要从事肝胆外科方面研究。E-mail: 15890879873@163.com Tel: 15890879873

to detect cell proliferation; Transwell method was used to measure cell migration and invasion; Dual luciferase reporter gene detection experiment was used to verify the targeting relationship between miR-208a-3p and EIF4E3; Western blotting was used to detect the EIF4E3 protein expression in cells. **Results** Compared with control group, A_{450} value, number of invasion and migration cells of HepG2 cells in sulforaphane group were significantly reduced ($P < 0.05$); miR-208a-3p in HepG2 cells was highly expressed and EIF4E3 protein was low expressed; miR-208a-3p targeted and negatively regulated the expression of EIF4E3; Down-regulation of miR-208a-3p or over-expression of EIF4E3 could enhance the inhibitory effects of sulforaphane on HepG2 cell proliferation, invasion and migration, while overexpression of miR-208a-3p or silence of EIF4E3 showed the opposite trend; Overexpression of miR-208a-3p and EIF4E3 at the same time would not affect the inhibitory effects of sulforaphane on HepG2 cell proliferation, invasion and migration. **Conclusion** Sulforaphane may down-regulate miR-208a-3p to up-regulate the expression of EIF4E3, thereby inhibiting the proliferation, invasion and migration of HepG2 cells.

Key words: liver cancer; miR-208a-3p; sulforaphane; eukaryotic translation initiation factor 4E; proliferation

肝癌是世界范围内的主要癌症,其发病率不断升高,且存活率低于 10%^[1]。尽管在医学、局部治疗和手术治疗方面取得了进展,但肝癌转移率高且易产生耐药性,导致其治愈率仍然较低^[2]。因此,开发有效的治疗药物至关重要。萝卜硫素是一种异硫氰酸酯,广泛存在于西兰花和其他十字花科植物中^[3]。研究表明,萝卜硫素可抑制肝癌细胞增殖,促进细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤作用^[4];萝卜硫素可抑制人肺腺癌 A549 细胞的侵袭和迁移^[5]。而关于萝卜硫素对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响鲜有报道。miRNA 在肿瘤的发生与发展中发挥着重要的调控作用,下调 miR-208-3p 表达可抑制肝癌细胞的增殖和侵袭^[6]。生物信息学分析发现真核翻译起始因子 4E (eukaryotic translation initiation factor 4E, EIF4E3) 为 miR-208-3p 的靶基因,且 EIF4E3 可调控肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭^[7]。而萝卜硫素对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响是否与 miR-208-3p/EIF4E3 轴有关尚不明确。因此本研究以 miR-208-3p/EIF4E3 轴为切入点,探究萝卜硫素对肝癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响,以期为肝癌的临床治疗提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌 HepG2 细胞及人正常肝细胞 L02 均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

萝卜硫素(质量分数 $\geq 98\%$,批号 4478-93-7)购自青岛捷世康生物科技有限公司;阿霉素(质量分数 99%,批号 23214-92-8)购自武汉华玖医药科技有限公司;miR-208a-3p 模拟物(miR-208a-3p mimic)及其阴性对照(mimic NC)、miR-208a-3p 抑制物(miR-208a-3p inhibitor)及其阴性对照(inhibitor

NC)、EIF4E3 过表达物(pcDNA-EIF4E3)及其阴性对照(pcDNA)、EIF4E3 小干扰 RNA (si-EIF4E3)及其阴性对照(si-NC)均购自广州基迪奥生物科技有限公司;逆转录试剂盒(批号 205111)购自上海玉博生物科技有限公司;ECL 发光检测试剂盒(批号 36222ES60)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 P0010)、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(批号 RG027)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒(批号 190521)购自美国 Invitrogen 公司;EIF4E3 兔多克隆抗体(批号 201103)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)兔多克隆抗体(批号 200908)及 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(批号 201007)购自北京索莱宝生物科技有限公司。

1.3 仪器

Elx800 型酶标仪购自美国伯乐公司;CX23 型光学显微镜购自日本 OLYMPUS 公司;EPICS-ALTRA 型流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司;ImageMaster 型凝胶成像分析仪购自美国应用生物系统公司;7700 型 qRT-PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞及 L02 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱培养。

2.2 CCK-8 法检测萝卜硫素对 L02 细胞和 HepG2 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 HepG2 细胞及 L02 细胞,以 4×10^3 个/孔接种至 96 孔板中,设置对照组及萝卜硫素低、中、高剂量(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)组和阿霉素(2.5 $\mu\text{mol/L}$)组,待细胞贴壁后,分别加入

相应药物进行处理,对照组加入不含药物的 DMEM 培养基,另设置空白孔(无细胞),处理 48 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 细胞分组

取处于对数生长期的 HepG2 细胞,设置对照组(正常培养的 HepG2 细胞)和萝卜硫素组(20 μ mol/L 萝卜硫素处理的 HepG2 细胞),处理 48 h 后,用于检测萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移的影响。

取处于对数生长期的 HepG2 细胞,设置对照组、mimic NC 组、miR-208a-3p mimic 组、inhibitor NC 组、miR-208a-3p inhibitor 组、pcDNA 组、pcDNA-EIF4E3 组、si-NC 组、si-EIF4E3 组、pcDNA-EIF4E3+mimic NC 组、pcDNA-EIF4E3+miR-208a-3p mimic 组,将 LipofectamineTM 2000 转染试剂与对应的转染物进行转染,转染 48 h 后,采用 qRT-PCR 检测 miR-208a-3p mRNA 表达,或采用 Western blotting 检测 EIF4E3 蛋白表达以验证转染效率。转染成功后,将上述对应各组细胞分别加入 20 μ mol/L 萝卜硫素处理 24 h,分别标记为萝卜硫素组、mimic NC+萝卜硫素组、miR-208a-3p mimic+萝卜硫素组、inhibitor NC+萝卜硫素组、miR-208a-3p inhibitor+萝卜硫素组、pcDNA+萝卜硫素组、pcDNA-EIF4E3+萝卜硫素组、si-NC+萝卜硫素组、si-EIF4E3+萝卜硫素组、pcDNA-EIF4E3+mimic NC+萝卜硫素组、pcDNA-EIF4E3+miR-208a-3p mimic+萝卜硫素组用于后续实验。

2.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖情况

按“2.2”项下方法进行细胞增殖测定,采用酶标仪测定 450 nm 处的 A 值来评价细胞增殖能力。

2.5 Transwell 检测细胞侵袭与迁移情况

2.5.1 侵袭实验 用不含胎牛血清的培养基将各组细胞稀释至 6×10^4 个/mL,取 200 μ L 各组细胞接种到包被有 Matrigel 的 Transwell 上室,再向 Transwell 下室加入 500 μ L 含 20%胎牛血清的培养基。培养 48 h 后,取出 Transwell 小室,弃去孔内培养基,用棉签轻轻擦去上部未迁移的细胞,然后将细胞用甲醇固定 30 min,0.1%结晶紫染色 20 min,于光学显微镜下随机选取 5 个视野进行观察并计数。

2.5.2 迁移实验 用不含胎牛血清的培养基将各组细胞稀释至 6×10^4 个/mL,取 200 μ L 各组细胞接

种到 Transwell 上室,再向 Transwell 下室加入 500 μ L 含 20%胎牛血清的培养基。培养 48 h 后,按“2.5.1”项下方法处理。

2.6 qRT-PCR 检测 HepG2 细胞 miR-208a-3p mRNA 表达

按照试剂盒说明书提取各组细胞总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。以 U6 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 miR-208a-3p 的相对表达量。引物序列:miR-208a-3p 上游引物 5'-ATAAGACGAG-CAAAAAGCTTGT-3',下游引物 5'-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-3';U6 上游引物 5'-TGCGGGTGCTCGCTTCGCAGC-3',下游引物 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'。

2.7 双荧光素酶报告基因实验

分别构建 EIF4E3 的野生型(WT)和突变型(MUT)3'-UTR 区质粒,标记为 WT-EIF4E3、MUT-EIF4E3。利用 LipofectamineTM 2000 转染试剂盒将 WT-EIF4E3 和 MUT-EIF4E3 分别与 mimic NC 或 miR-208a-3p mimic 共转染于 HepG2 细胞,转染 48 h 后,通过双荧光素酶测定系统检测相对荧光素酶活性。

2.8 Western blotting 检测 HepG2 细胞 EIF4E3 蛋白表达情况

各组细胞加入 RIPA 裂解液,提取蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量,蛋白样品经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入 EIF4E3 和 GAPDH 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;用 TBST 洗膜 3 次后,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,室温孵育 2 h,采用 ECL 发光检测试剂盒显影,Image 软件分析条带灰度值。

2.9 统计分析

使用 GraphPad Prism 5 软件进行统计分析,数据表示为 $\bar{x} \pm s$, t 检验用于两组间的比较,单因素方差分析用于多组间的比较,两组之间比较采用 SNK- q 检验。

3 结果

3.1 萝卜硫素对 L02 和 HepG2 细胞存活率的影响

如表 1 所示,与对照组相比,萝卜硫素(20、40 μ mol/L)组 L02 及 HepG2 细胞存活率均显著降低($P < 0.05$),且萝卜硫素浓度为 20 μ mol/L 时,L02 细胞存活率为 96.33%,HepG2 细胞存活率为 50%,并高于阿霉素组,因此选用 20 μ mol/L 萝卜硫素用于后续研究。

表 1 萝卜硫素对 L02 和 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of sulforaphane on survival rate of L02 and HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	L02 细胞		HepG2 细胞	
		A_{450}	细胞存活率/%	A_{450}	细胞存活率/%
对照	—	0.220 ± 0.004	100.00 ± 0.00	0.340 ± 0.008	100.00 ± 0.00
萝卜硫素	10	0.219 ± 0.005	98.75 ± 1.03	0.298 ± 0.004*	82.52 ± 2.62*
	20	0.216 ± 0.004*#	96.33 ± 1.31*#	0.223 ± 0.003*#	51.32 ± 2.24*#
	40	0.192 ± 0.003*#&	76.25 ± 1.27*#&	0.185 ± 0.002*#&	35.22 ± 1.82*#&
阿霉素	2.5	0.207 ± 0.002*#&%	89.22 ± 2.16*#&%	0.203 ± 0.002*#&%	43.13 ± 1.25*#&%

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与萝卜硫素 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较: # $P < 0.05$; 与萝卜硫素 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 比较: & $P < 0.05$; 与萝卜硫素 ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较: % $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs sulforaphane ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group; compared with SFN-20 group; & $P < 0.05$ vs sulforaphane ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group; % $P < 0.05$ vs sulforaphane ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) group

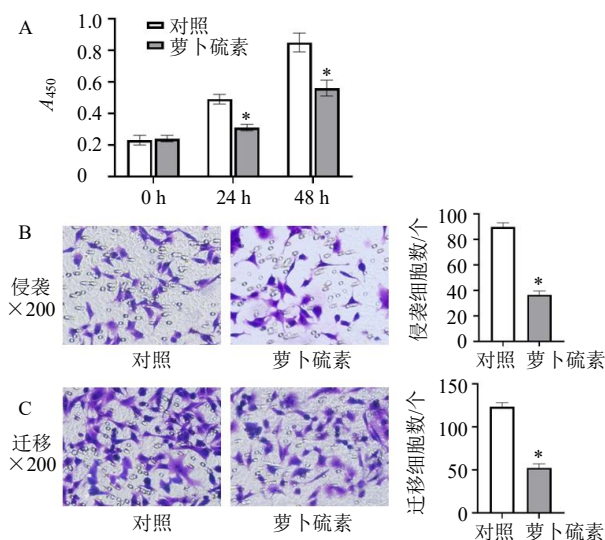
3.2 萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 萝卜硫素组细胞的 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目显著降低 ($P < 0.05$)。

3.3 miR-208a-3p 在 L02、HepG2 细胞中的表达情况及其对萝卜硫素处理后的 HepG2 细胞增殖、侵袭和迁移的影响

如表 2 所示, 与 L02 细胞比较, HepG2 细胞中 miR-208a-3p 的表达显著升高 ($P < 0.05$); 与 HepG2 细胞比较, $20 \mu\text{mol/L}$ 萝卜硫素处理后的 HepG2 细胞中 miR-208a-3p 的表达显著降低 ($P < 0.05$)。

如表 3 所示, 与对照组、mimic NC 组比较,



与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

图 1 萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖 (A)、侵袭 (B) 和迁移 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of sulforaphane on proliferation (A), invasion (B) and migration (C) of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 2 miR-208a-3p 在 L02、HepG2 细胞中的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Expression of miR-208a-3p in L02 and HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	miR-208a-3p mRNA 相对表达量
L02	—	1.00 ± 0.00
HepG2	—	2.85 ± 0.13*
萝卜硫素+HepG2	20	1.35 ± 0.11#

与 L02 细胞比较: * $P < 0.05$; 与 HepG2 细胞比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs L02 cells; # $P < 0.05$ vs HepG2 cells

表 3 miR-208a-3p 在各转染组细胞中的表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Expression of miR-208a-3p in cells of each transfection group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	miR-208a-3p mRNA 相对表达量
对照	1.00 ± 0.00
mimic NC	1.08 ± 0.07
miR-208a-3p mimic	2.12 ± 0.15*#
inhibitor NC	1.06 ± 0.05
miR-208a-3p inhibitor	0.36 ± 0.02*#&

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 mimic NC 组比较: # $P < 0.05$; 与 inhibitor NC 组比较: & $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs mimic NC group; & $P < 0.05$ vs inhibitor NC group

miR-208a-3p mimic 组 HepG2 细胞中 miR-208a-3p 表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与对照组、inhibitor NC 组比较, miR-208a-3p inhibitor 组 HepG2 细胞中 miR-208a-3p 表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

如图 2 所示, 与萝卜硫素组、mimic NC+萝卜硫素组比较, miR-208a-3p mimic+萝卜硫素组 HepG2 细胞 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目显著升高 ($P < 0.05$); 与萝卜硫素组、inhibitor NC+萝卜硫素组比较, miR-208a-3p inhibitor+萝卜硫素组细胞 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目显著降低 ($P < 0.05$)。

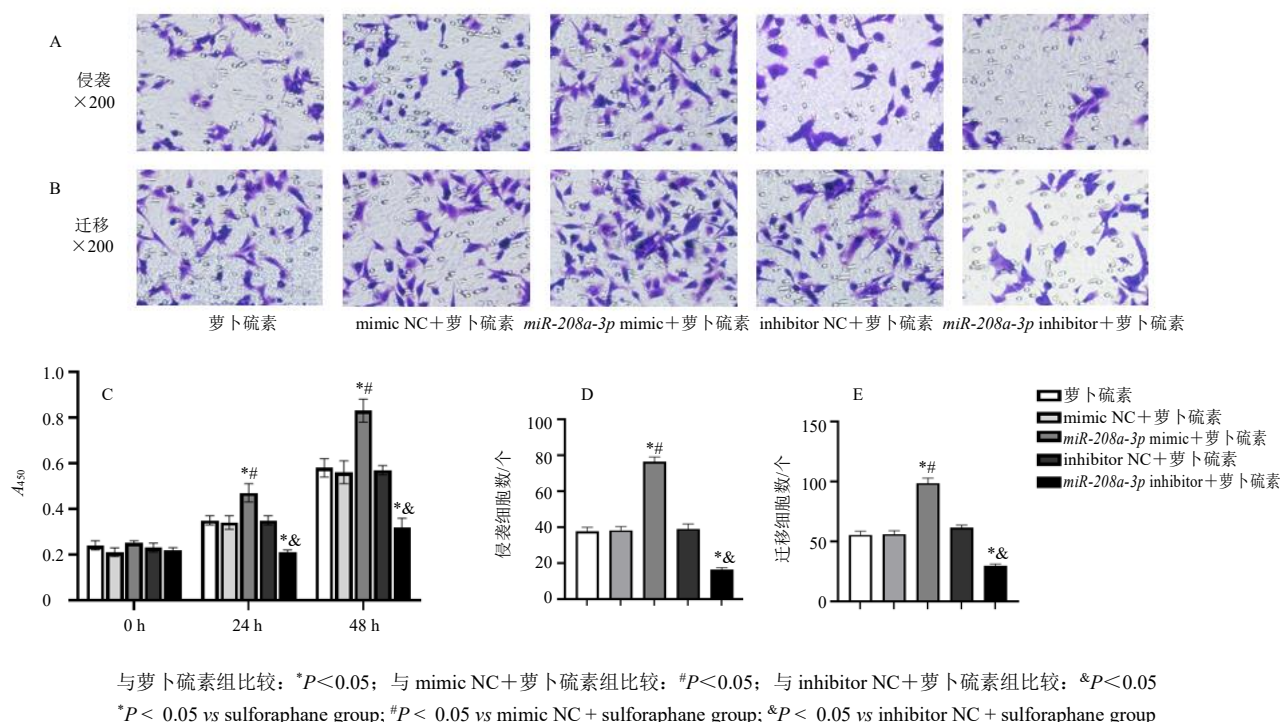


图2 过表达或抑制 *miR-208a-3p* 对萝卜硫素处理的 HepG2 细胞侵袭 (A、D) 及迁移 (B、E) 和增殖 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 2 Effect of overexpression or inhibition of *miR-208a-3p* on invasion (A, D), migration (B, E) and proliferation (C) of HepG2 cells treated with sulforaphane ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.4 miR-208a-3p 靶向调控 EIF4E3 的表达

Targetscan 网站预测发现 *miR-208a-3p* 与 EIF4E3 存在结合位点, 见图 3。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 与 mimic NC 和 WT-EIF4E3 共转染组比较, *miR-208a-3p* mimic 和 WT-EIF4E3 共转染组 HepG2 细胞的荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$); 与 mimic NC 和 MUT-EIF4E3 共转染组比较, *miR-208a-3p* mimic 和 MUT-EIF4E3 共转染组 HepG2 细胞的荧光素酶活性变化无统计学意义, 见表 4。

Western blotting 结果 (图 4) 显示, 与对照组、mimic NC 组比较, *miR-208a-3p* mimic 组 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与对照组、inhibitor NC 组比较, *miR-208a-3p* inhibitor 组 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

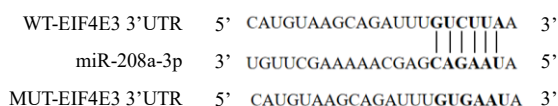


图3 Targetscan 网站预测 *miR-208a-3p* 与 EIF4E3 的结合位点
Fig. 3 Binding site of *miR-208a-3p* and EIF4E3 predicted by Targetscan website

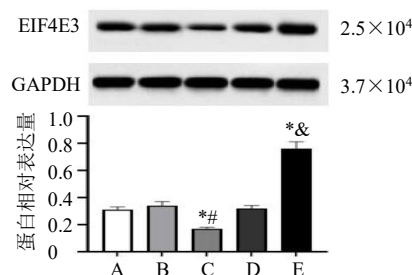
表4 各组荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of luciferase activity in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	荧光素酶活性	
	WT-EIF4E3	MUT-EIF4E3
mimic NC	1.07 ± 0.14	1.28 ± 0.15
<i>miR-208a-3p</i> mimics	0.33 ± 0.02*	1.21 ± 0.13

与 mimic NC 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs mimic NC group



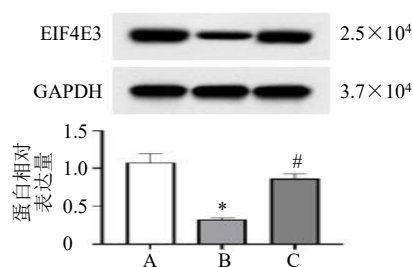
A-对照组 B-mimic NC 组 C-*miR-208a-3p* mimic 组 D-inhibitor NC 组 E-*miR-208a-3p* inhibitor 组 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 mimic NC 组比较: # $P < 0.05$; 与 inhibitor NC 组比较: & $P < 0.05$
A-control group B-mimic NC group C-*miR-208a-3p* mimic group D-inhibitor NC group E-*miR-208a-3p* inhibitor group * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs mimic NC group; & $P < 0.05$ vs inhibitor NC group

图4 各组 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 4 EIF4E3 protein expression in HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.5 萝卜硫素通过调控 miR-208a-3p/EIF4E3 抑制 HepG2 细胞的增殖、迁移与侵袭

如图 5 所示,与 L02 细胞比较,HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$);与 HepG2 细胞比较,萝卜硫素处理后的 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

如图 6 所示,与对照组、pcDNA 组比较,pcDNA-

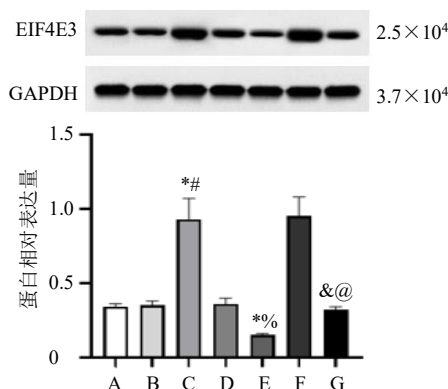


A-L02 细胞 B-HepG2 细胞 C-萝卜硫素+HepG2 细胞 与 L02 细胞比较: * $P<0.05$; 与 HepG2 细胞比较: # $P<0.05$

A-L02 cells B-HepG2 cells C-sulforaphane + HepG2 cells * $P<0.05$ vs L02 cells; # $P<0.05$ vs HepG2 cells

图 5 L02 细胞和 HepG2 细胞 EIF4E3 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 EIF4E3 protein expression in L02 cells and HEPG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)



A-对照组 B-pcDNA 组 C-pcDNA-EIF4E3 组 D-si-NC 组 E-si-EIF4E3 组 F-pcDNA-EIF4E3 + mimic NC 组 G-pcDNA-EIF4E3 + miR-208a-3p mimic 组 与对照组比较: * $P<0.05$; 与 pcDNA 组比较: # $P<0.05$; 与 pcDNA-EIF4E3 组比较: & $P<0.05$; 与 si-NC 组比较: % $P<0.05$; 与 pcDNA-EIF4E3 + mimic NC 组比较: @ $P<0.05$

A-control group B-pcDNA group C-pcDNA-EIF4E3 group D-si-NC group E-si-EIF4E3 group F-pcDNA- EIF4E3 + mimic NC group G-pcDNA-EIF4E3 + miR-208a-3p mimic group * $P<0.05$ vs control group; # $P<0.05$ vs pcDNA group; & $P<0.05$ vs pcDNA-EIF4E3 group; % $P<0.05$ vs si-NC group; @ $P<0.05$ vs pcDNA-EIF4E3 + mimic NC group

图 6 各组 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 EIF4E3 protein expression in HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

EIF4E3 组 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$); 与对照组、si-NC 组比较, si-EIF4E3 组 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与 pcDNA-EIF4E3 组、pcDNA-EIF4E3+mimic NC 组比较, pcDNA-EIF4E3+miR-208a-3p mimic 组 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$); 与对照组比较, pcDNA-EIF4E3 + miR-208a-3p mimic 组 HepG2 细胞中 EIF4E3 蛋白表达水平无显著性差异。

如图 7 所示,与萝卜硫素组、pcDNA+萝卜硫素组比较, pcDNA-EIF4E3+萝卜硫素组 HepG2 细胞 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目显著降低 ($P<0.05$); 与萝卜硫素组、si-NC+萝卜硫素组比较, si-EIF4E3+萝卜硫素组 HepG2 细胞 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目显著升高 ($P<0.05$); 与 pcDNA-EIF4E3+萝卜硫素组、pcDNA-EIF4E3+mimic NC+萝卜硫素组比较, pcDNA-EIF4E3+miR-208a-3p mimic+萝卜硫素组 HepG2 细胞 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目显著升高 ($P<0.05$); 与萝卜硫素组比较, pcDNA-EIF4E3+miR-208a-3p mimic+萝卜硫素组 HepG2 细胞 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目无显著差异。

4 讨论

萝卜硫素是一种在十字花科蔬菜中发现的植物化学物质,可靶向参与癌症发展的多种途径^[8]。研究表明,萝卜硫素可通过阻断 Notch 通路活化,下调 Hes1 表达,从而抑制结肠癌 SW480 细胞增殖、迁移和侵袭^[9];萝卜硫素与索拉菲尼联用对 HepG2 细胞具有协同抗肿瘤作用,其机制可能与诱导细胞凋亡有关^[10];萝卜硫素可通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路活化进而降低胃癌 SGC7901 细胞增殖、迁移及侵袭能力^[11]。本研究结果显示,萝卜硫素可抑制 HepG2 细胞存活率,呈剂量相关性,且萝卜硫素浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率接近 50%,因此选用 20 $\mu\text{mol/L}$ 萝卜硫素用于后续研究;本研究还发现,与对照组比较,萝卜硫素组 HepG2 细胞在 24、48 h 的 A_{450} 值、侵袭及迁移细胞数目显著降低,提示萝卜硫素可抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移。

miRNA 是长度为 22~25 nt 的非编码 RNA,其在转录后或翻译水平负调控基因表达,可参与许多细胞过程的调节,如细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭

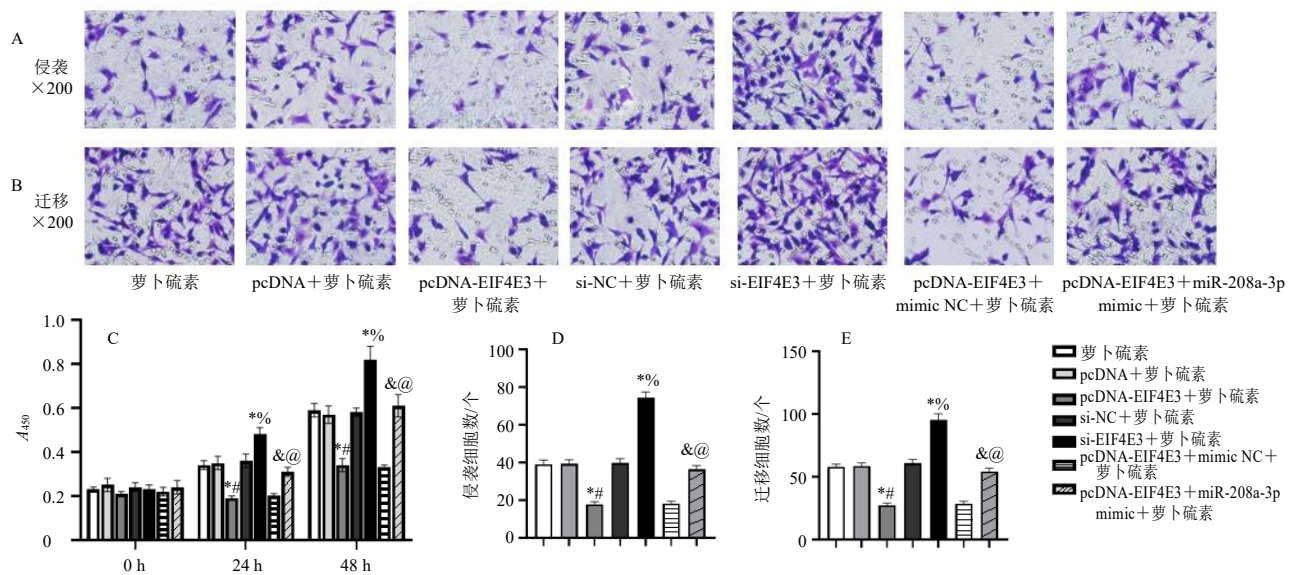


图 7 过表达或抑制 EIF4E3 对萝卜硫素处理的 HepG2 细胞侵袭 (A、D) 及迁移 (B、E) 和增殖 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
 Fig. 7 Effect of overexpression or inhibition of EIF4E3 on invasion (A, D), migration (B, E) and proliferation (C) of HepG2 cells treated with sulforaphane ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

等^[12]。越来越多的证据表明,多种 miRNA 在肝癌等人类恶性肿瘤中异常表达,miRNA 的失调表达与癌症的发病机制密切相关^[13]。miR-208a-3p 作为 miRNA 家族的一员,已有研究报道 miR-208a-3p 在宫颈癌中高表达,抑制 miR-208a-3p 可抑制宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[14];过表达 miR-208a-3p 能够促进骨肉瘤细胞的增殖和转移能力^[15];抑制 miR-208-3p 可减弱肝癌细胞的增殖和侵袭能力^[6];miR-208a-3p 通过靶向程序性细胞死亡因子 4 (programmed cell death 4, PDCD4) 在结直肠癌中发挥致癌基因的作用^[16]。本研究结果显示,miR-208a-3p 在 HepG2 细胞中高表达,过表达 miR-208a-3p 可减弱萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用,下调 miR-208a-3p 可增强萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用,提示 miR-208a-3p 参与了 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移过程,萝卜硫素可能通过下调 miR-208a-3p 表达抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移。

为了进一步探究萝卜硫素通过下调 miR-208a-3p 表达抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的作用机制,本研究通过双荧光素酶报告基因实验证实 EIF4E3 为 miR-208a-3p 的靶基因。EIF4E3 是真核

细胞翻译起始和调控的核心成分,能够选择性地控制肿瘤基因的翻译和表达^[17]。研究表明,过表达 EIF4E3 通过下调周期蛋白 B1 蛋白表达,抑制细胞周期的 G₂/M 期,从而抑制宫颈癌细胞的增殖及克隆形成能力^[18];敲低 EIF4E3 可显著增强胃癌 BGC-823 和 MGC-803 细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[7]。本研究结果显示,EIF4E3 蛋白在 HepG2 细胞中低表达,miR-208a-3p 可靶向负调控 EIF4E3,沉默 EIF4E3 可减弱萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用,过表达 EIF4E3 可增强 SFN 对 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用,同时过表达 miR-208a-3p 和 EIF4E3 不会影响萝卜硫素对 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用,提示萝卜硫素可能通过调控 miR-208a-3p/EIF4E3 抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移。

综上所述,萝卜硫素可能通过下调 miR-208a-3p 进而上调 EIF4E3 的表达来抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang H B, Lu Z M, Zhao X X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer [J]. J

- Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 133.
- [2] Nwosu Z C, Piorońska W, Battello N, *et al.* Severe metabolic alterations in liver cancer lead to ERK pathway activation and drug resistance [J]. *EBioMedicine*, 2020, 54: 102699.
 - [3] Nandini D B, Rao R S, Deepak B S, *et al.* Sulforaphane in broccoli: The green chemoprevention!! Role in cancer prevention and therapy [J]. *J Oral Maxillofac Pathol*, 2020, 24(2): 405.
 - [4] Wu G T, Yan Y L, Zhou Y Y, *et al.* Sulforaphane: Expected to become a novel antitumor compound [J]. *Oncol Res*, 2020, 28(4): 439-446.
 - [5] 邵松军, 段玲弟, 张湘燕, 等. 萝卜硫素对肺腺癌 A549 细胞侵袭迁移的抑制作用及其机制 [J]. *山东医药*, 2021, 61(15): 41-44.
 - [6] 余鹏. *miR-208-3p* 抑制 ARID2 表达并促进肝细胞肝癌 (HCC) 增生和侵袭 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2015.
 - [7] 黄金丽. *circPEX6* 调控 miR-501/eIF4E3 轴抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭能力 [D]. 大连: 大连医科大学, 2020.
 - [8] Calcabrini C, Maffei F, Turrini E, *et al.* Sulforaphane potentiates anticancer effects of doxorubicin and cisplatin and mitigates their toxic effects [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 567.
 - [9] 刘洋, 孟祥彩, 王益民, 等. 萝卜硫素对结肠癌 SW480 细胞增殖、侵袭及 Notch 通路的影响 [J]. *中华普通外科学文献: 电子版*, 2020, 14(6): 434-438.
 - [10] 黄建峰, 魏小栋, 翟东升. 萝卜硫素联合索拉菲尼对肝癌 HepG2 细胞生长抑制和凋亡的影响 [J]. *天津中医药*, 2019, 36(12): 1222-1226.
 - [11] 杨艳华, 梁丽琴. 萝卜硫素对胃癌细胞生物学特征的影响及其机制研究 [J]. *中国药师*, 2019, 22(5): 840-844.
 - [12] Zhang X, Xu X Y, Ge G H, *et al.* miR-498 inhibits the growth and metastasis of liver cancer by targeting ZEB2 [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(3): 1638-1648.
 - [13] Balacescu O, Sur D, Cainap C, *et al.* The impact of miRNA in colorectal cancer progression and its liver metastases [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12): 3711.
 - [14] 李利玲, 王少帅, 汪向红, 等. *miR-208a-3p* 靶向 LZTFL1 调控宫颈癌细胞的增殖和侵袭转移及其分子机制 [J]. *西部医学*, 2020, 32(9): 1292-1297.
 - [15] Fu Y T, Wang Y, Bi K, *et al.* microRNA-208a-3p promotes osteosarcoma progression via targeting PTEN [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(6): 255.
 - [16] Wu H L, Xu L L, Chen Y O, *et al.* *miR-208a-3p* functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting *PDCD4* [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(4): BSR20181598.
 - [17] 姚运红, 袁炜, 熊敏涵, 等. 潜在抑癌基因 eIF4E3 野生型和突变体质粒的构建 [J]. *黑龙江医学*, 2020, 44(4): 472-474.
 - [18] 孙丽萍, 姚运红, 庞天云, 等. 潜在抑癌基因 eIF4E3 对宫颈癌细胞分裂增殖的影响 [J]. *广东医学*, 2016, 37(11): 1602-1606.

[责任编辑 李亚楠]