

## 白藜芦醇调控 miR-212-3p 逆转肝癌细胞对顺铂的耐药性研究\*

卢雪梅<sup>1</sup>, 陈文虎<sup>2</sup>, 胡立强<sup>1,3△</sup>

(1. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2. 杭州医学院基础医学与法医学院, 杭州 310048; 3. 浙江省中医药研究院, 杭州 310012)

**[摘要]** **目的** 探究白藜芦醇(RES)调控 miR-212-3p 逆转人肝癌顺铂(DDP)耐药细胞株(Huh-7/DDP)对 DDP 耐药的可能分子机制。**方法** 将 0、2.5、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的 RES 处理 Huh-7/DDP 细胞,采用 CCK-8 法检测 Huh-7/DDP 细胞的增殖能力;RES 处理 Huh-7/DDP 细胞后,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 miR-212-3p 的表达水平;将 Huh-7/DDP 细胞分为未处理组,DDP 组,RES+DDP 组,NC mimic+DDP 组,miR-212-3p mimic+DDP 组,NC inhibitor+DDP 组,NC inhibitor+RES+DDP 组,miR-212-3p inhibitor+DDP 组,miR-212-3p inhibitor+RES+DDP 组,采用 CCK-8 法检测 Huh-7/DDP 细胞的 DDP 半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )值;采用流式细胞术检测 Huh-7/DDP 细胞凋亡比例。采用 Western blot 法检测 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、Bax 蛋白的表达水平。**结果** 单用 RES 终浓度 5  $\mu\text{mol/L}$  对 Huh-7/DDP 细胞生长无明显抑制作用( $P>0.05$ ),为最大无毒剂量。RES+DDP 组的 DDP  $\text{IC}_{50}$  明显低于 DDP 组( $P<0.05$ )。DDP 组和 RES+DDP 组 Huh-7/DDP 细胞凋亡比例高于未处理组( $P<0.05$ ),且 RES+DDP 组明显高于 DDP 组( $P<0.05$ )。RES 处理的 Huh-7/DDP 细胞中 miR-212-3p 的表达水平明显高于未处理组( $P<0.05$ )。miR-212-3p mimic+DDP 组中的 DDP  $\text{IC}_{50}$  值低于 NC mimic+DDP 组,miR-212-3p mimic+DDP 组中的细胞凋亡比例高于 NC mimic+DDP 组( $P<0.05$ )。miR-212-3p inhibitor+DDP 组的 DDP  $\text{IC}_{50}$  明显高于 NC inhibitor+DDP 组,NC inhibitor+RES+DDP 组 DDP  $\text{IC}_{50}$  明显低于 NC inhibitor+DDP 组,而 miR-212-3p inhibitor+RES+DDP 组中的 DDP  $\text{IC}_{50}$  值高于 NC inhibitor+RES+DDP 组。miR-212-3p inhibitor+DDP 组的细胞凋亡率明显低于 NC inhibitor+DDP 组,NC inhibitor+RES+DDP 组的细胞凋亡率高于 NC inhibitor+DDP 组,而 miR-212-3p inhibitor+RES+DDP 组的细胞凋亡率低于 NC inhibitor+RES+DDP 组( $P<0.05$ )。DDP 组、RES+DDP 组中的 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平低于未处理组( $P<0.05$ ),Bax 蛋白水平高于未处理组( $P<0.05$ ),其中 RES+DDP 组中的 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平低于 DDP 组( $P<0.05$ );RES+DDP 组中的 Bax 蛋白水平高于 DDP 组( $P<0.05$ )。**结论** RES 可能通过提高 Huh-7/DDP 细胞中 miR-212-3p 的表达水平,抑制 PI3K/Akt 通路蛋白的磷酸化,发挥逆转肝癌 DDP 耐药的作用。

**[关键词]** 白藜芦醇;miR-212-3p;肝癌;耐药**[中图分类号]** R735.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)22-3384-07

## Resveratrol regulates miR-212-3p to reverse resistance of hepatoma cells to cisplatin\*

LU Xuemei<sup>1</sup>, CHEN Wenhui<sup>2</sup>, HU Liqiang<sup>1,3△</sup>

(1. School of Pharmacy, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310053, China; 2. School of Basic Medicine and Forensics, Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310048, China; 3. Zhejiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the possible molecular mechanism of resveratrol (RES) regulating miR-212-3p to reverse the resistance of human hepatoma drug-resistance cell line (Huh-7/DDP) to cisplatin (DDP). **Methods** The Huh-7/DDP cells were treated with different concentrations (0, 2.5, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) of RES. The Huh-7/DDP cell proliferation ability was detected by the CCK-8 assay. After treating the Huh-7/DDP cells by RES, the expression level of miR-212-3p was measured by RT-qPCR. The Huh-7/DDP cells were divided into the non-treatment group, DDP group, RES+DDP group, NC mimic+DDP group, miR-

\* 基金项目:浙江省中医药科技计划科研基金项目(2021ZB078)。 作者简介:卢雪梅(1989-),在读硕士研究生,主要从事肿瘤基础研究。

△ 通信作者, E-mail: hlqiang0220@163.com。

212-3p mimic+DDP group, NC inhibitor+DDP group, miR-212-3p inhibitor+DDP group, NC inhibitor+RES+DDP group and miR-212-3p inhibitor+RES+DDP group. The IC<sub>50</sub> value of Huh-7/DDP cells was detected by the CCK-8 assay. The flow cytometry was employed to detect the apoptosis rate of Huh-7/DDP cells. The expression levels of p-PI3K, p-Akt, Bcl-2 and Bax proteins were examined by the Western blot method. **Results** Singly using the final concentration of 5 μmol/L RES had no significantly inhibiting effect on the growth of Huh-7/DDP cells ( $P>0.05$ ), which was the maximum non-toxic dose. IC<sub>50</sub> of the RES+DDP group was significantly lower than that of the DDP group ( $P<0.05$ ). The apoptosis rates of Huh-7/DDP cells in the DDP group and RES+DDP group were higher than that of the non-treatment group ( $P<0.05$ ), moreover the RES+DDP group was significantly higher than the DDP group ( $P<0.05$ ). The expression level of miR-212-3p in the RES-treated Huh-7/DDP cells was significantly higher than that of the non-treatment group ( $P<0.05$ ). The IC<sub>50</sub> value of the miR-212-3p mimic+DDP group was lower than that of the NC mimic+DDP group. The apoptosis ratio of the miR-212-3p mimic+DDP group was higher than that of the NC mimic+DDP group ( $P<0.05$ ). The IC<sub>50</sub> value of the miR-212-3p inhibitor+DDP group was significantly higher than that in the NC inhibitor+DDP group, while the IC<sub>50</sub> value of the NC inhibitor+RES+DDP group was significantly lower than the NC inhibitor+DDP group. Whereas the IC<sub>50</sub> value of the miR-212-3p inhibitor+RES+DDP group was lower than the NC inhibitor+RES+DDP group. The apoptosis rate in the miR-212-3p inhibitor+DDP group was significantly lower than the NC inhibitor+DDP group, while the apoptosis rate in the NC inhibitor+RES+DDP group was higher than the NC inhibitor+DDP group. However, the apoptosis rate in the miR-212-3p inhibitor+RES+DDP group was lower than the NC inhibitor+RES+DDP group ( $P<0.05$ ). The protein levels of p-PI3K, p-Akt, Bcl-2 in the DDP and RES+DDP groups were lower than that of the non-treatment group ( $P<0.05$ ), while the Bax protein level was higher than that of the non-treatment group ( $P<0.05$ ), in which the p-PI3K, p-Akt and Bcl-2 protein levels in the RES+DDP group were lower than those in the DDP group ( $P<0.05$ ), while the Bax protein level was higher than that in the DDP group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** RES may play a role in reversing the DDP resistance of liver cancer by increasing the level of miR-212-3p in Huh-7/DDP cells and inhibiting the phosphorylation of PI3K/Akt pathway proteins.

**[Key words]** resveratrol; miR-212-3p; liver cancer; drug resistance

肝癌致死率在所有癌症中排名第 2<sup>[1]</sup>。原发性肝癌始于肝组织,其中最常见为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),占肝癌的 90%<sup>[2]</sup>。HCC 是一种最常见的且在全球发病率不断增长的肿瘤。顺铂(cisplatin, DDP)是用于治疗 HCC 最有效的化疗药物之一,但耐药性的产生是限制其疗效的重要原因<sup>[3]</sup>。因此,目前迫切需要寻找可以增强 DDP 抗肿瘤活性的其他药物。白藜芦醇(resveratrol, RES)是一种天然非黄酮类多酚化合物,可从膳食食物和植物中广泛获得<sup>[4]</sup>。有研究报道,RES 具有诸多药理作用,如抗氧化、抗炎、抗病毒、抗高血脂活性等<sup>[5]</sup>。与 DDP 结合,RES 具有协同作用,可以逆转肿瘤细胞对 DDP 的化学耐药<sup>[6]</sup>。然而,RES 增加 DDP 化学敏感性的分子机制仍需进一步探索。

微 RNA(microRNA, miRNA)作为一类高度保守的非编码单链小 RNA,长度为 19~24 bp,它们在动植物中参与转录后基因表达调控,并影响着许多生理和病理进程<sup>[7-8]</sup>。有报道显示,微 RNA-326(miRNA-326, miR-326)直接参与了 RES 诱导的乳腺癌和宫颈癌的细胞凋亡<sup>[9]</sup>。此外,RES 可通过促进 miR-663 表达来抑制结肠癌的生长和侵袭<sup>[10]</sup>。研究发现,miRNA 在肿瘤细胞的耐药性方面也发挥了重

要作用,且药物抗性的分子靶点和机制也被逐渐阐明,但关于 RES 调控 miR-212-39 逆转肝癌 DDP 耐药研究鲜有报道。本研究拟在体外验证 RES 逆转人肝癌耐药株 Huh-7/DDP 细胞的 DDP 耐药性,并探讨其可能的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和主要试剂

人肝癌细胞 Huh-7 购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清 FBS 和 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;RES、DDP 购自北京索莱宝科技有限公司;miR-212-3p mimic 和 inhibitor 相关试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司;CCK-8 试剂和磷脂结合蛋白 V(Annexin-V)/碘化丙啶(PI)凋亡试剂均购自日本 Dojindo 公司;TRIzol、miRNA 逆转录试剂盒、TB 绿色荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司;所有抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 耐药 Huh-7/DDP 细胞株构建

Huh-7 细胞培养于含有 125 nmol/L DDP 培养基中,以 80% 的密度传代。2 周后,将细胞接种到新的 6 孔板中,并在含有增加浓度(先前浓度的 1.5 倍) DDP 的培养基中培养。重复该过程,直到细胞在 8

$\mu\text{mol/L}$  DDP 培养基中表现出稳定的生长和增殖。

### 1.2.2 CCK-8 实验法检测单用 RES 对细胞的杀伤效应

取对数生长期 Huh-7/DDP 细胞,以 4 000/孔接种于 96 孔板,置于培养箱中过夜培养,加入浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的 RES,并设空白组对照,6 孔平行,继续培养 48 h。每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 h,用酶标仪检测各孔 450 nm 波长处吸光度(A)值,实验重复 3 次。按照下列公式计算药物对细胞活力的杀伤效应:细胞活力(%)=(试验组 A 值-空白组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值) $\times$ 100%。

### 1.2.3 细胞转染

按照公司提供的使用说明书。将 Huh-7/DDP 细胞以  $5 \times 10^5/\text{L}$  的密度接种在 6 孔板中,用 Lipofectamine 2000 进行转染。转染 6 h 后,用 PBS 洗涤细胞 3 次,换成普通培养基,继续培养 48 h。通过实时荧光定量 PCR(real time quantitative PCR, RT-qPCR)检测转染效率。细胞转染稳定后,与 DDP、RES 等各组联用,细胞分为未处理组、RES 组、DDP 组、RES+DDP 组、NC mimic+DDP 组、miR-212-3p mimic+DDP 组、NC inhibitor+DDP 组、NC inhibitor+Res+DDP 组、miR-212-3p inhibitor+DDP 组、miR-212-3p inhibitor+Res+DDP 组。

### 1.2.4 CCK-8 法检测 RES 对细胞增殖的影响

取对数生长期 Huh-7/DDP 细胞,以 4 000/孔接种于 96 孔板,置于培养箱中过夜培养,加入 DDP 浓度分别为 8、16、32、64、128  $\mu\text{mol/L}$ 。其中联用组 RES 终浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ ,并设空白组对照,6 孔平行,继续培养 48 h。每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 h,用酶标仪检测各孔 450 nm 波长处 A 值,实验重复 3 次。使用 GraphPad 软件计算 DDP 半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。

### 1.2.5 流式细胞术检测 RES 对细胞凋亡的影响

取对数生长期 Huh-7/DDP 细胞,以  $6 \times 10^5/\text{孔}$  接种于 6 孔板。其中 DDP 终浓度为 40  $\mu\text{mol/L}$ ,RES 终浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$ 。置于培养箱中培养 48 h 后,无 EDTA 胰酶消化后收集各组细胞,PBS 洗涤 2 次,加入 200  $\mu\text{L}$  缓冲液重悬细胞,再加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin-V 和 10  $\mu\text{L}$  PI 染色液,轻轻混匀,室温避光反应 15 min,流式细胞术检测各组细胞凋亡率。

### 1.2.6 RT-qPCR 检测 miR-212-3p 表达水平

利用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并按照逆转录试剂盒步骤逆转录为 cDNA。随后在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h,然后在 85  $^{\circ}\text{C}$  下进行酶失活 5 min。使用 TB 绿色荧光试剂盒进行 RT-qPCR 检测。按以下参数进行:95  $^{\circ}\text{C}$  10 s;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  20 s,40 个循环。miR-212-3p 以 U6 为内参对照,反应结束后以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法量化 miR-212-3p 表达水平。miR-212-3p 的上游引物序

列为 5'-AGC ATC CAC GAG CAA GAG AC-3',下游引物序列为 5'-GAT GCT ACT AGT GTG GCG GG-3'; U6 的上游引物序列为 5'-CGC TTC GGC AGC ACA TAT AC-3',下游引物序列为 5'-AAA ATA TGG AAC GCT TCA CGA-3'。

### 1.2.7 Western blot 法检测相关蛋白水平

提取各组实验的细胞总蛋白。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,然后转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用含有 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐水(TBST)缓冲液室温封闭 2 h。洗涤后,将膜与以下一抗以 1:1 000 的稀释度在 4  $^{\circ}\text{C}$  下孵育过夜:p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax、GAPDH。随后,将膜与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h,通过 ECL 化学发光显色。

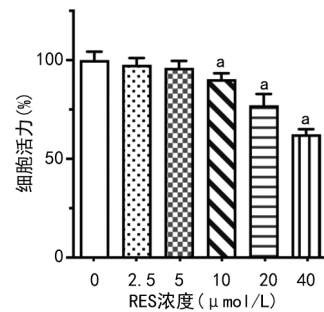
### 1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件对从实验中获得的所有数据进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 单用 RES 对 Huh-7/DDP 细胞的杀伤效应

通过 CCK-8 实验检测 RES 对 Huh-7/DDP 细胞的最大无毒剂量,结果显示,当 RES 终浓度为 5  $\mu\text{mol/L}$  时,对 Huh-7/DDP 细胞生长无明显抑制作用( $P > 0.05$ ),见图 1。因此,本研究后续实验选用 5  $\mu\text{mol/L}$  浓度为 RES 的联用剂量。



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  RES 组比较。

图 1 RES 对 Huh-7/DDP 细胞的杀伤效应

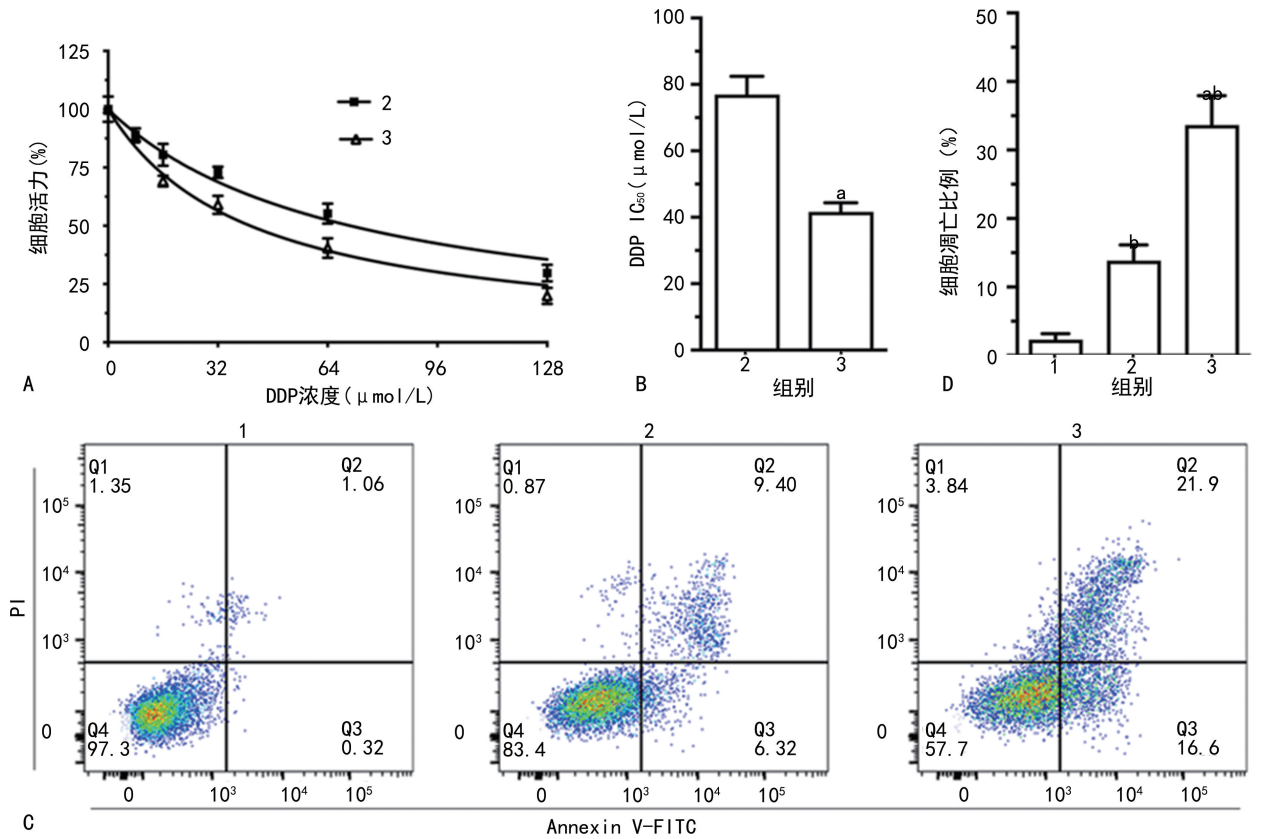
### 2.2 RES 可以促进 Huh-7/DDP 细胞对 DDP 的敏感性并诱导凋亡

通过 CCK-8 实验检测 DDP 组和 RES+DDP 组 Huh-7/DDP 细胞的 DDP  $\text{IC}_{50}$ ,结果显示 RES+DDP 组的 DDP  $\text{IC}_{50}$  明显低于 DDP 组( $P < 0.05$ ),见图 2A、B。流式细胞术检测结果显示,与未处理组比较,DDP 组、RES+DDP 组的细胞凋亡率均明显升高( $P < 0.05$ ),其中,RES+DDP 组的细胞凋亡率明显高于 DDP 组( $P < 0.05$ ),见图 2C、D。

### 2.3 RES 对 Huh-7/DDP 细胞中 miR-212-3p 表达的影响

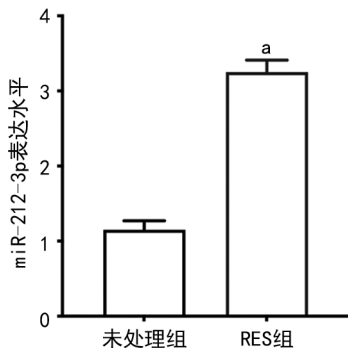
采用 RT-qPCR 检测 miR-212-3p 在 RES 处理后 Huh-7/DDP 细胞中的表达。结果显示,与未处理组

比较, RES 组 miR-212-3p 的表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。



A, B: CCK-8 实验法检测 Huh-7/DDP 细胞的 DDP IC<sub>50</sub> 值; C, D: 流式细胞术检测 Huh-7/DDP 细胞的凋亡率; 1: 未处理组; 2: DDP 组; 3: RES+DDP 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 DDP 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与未处理组比较。

图 2 RES 和 DDP 对 Huh-7/DDP 细胞增殖和凋亡的影响



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与未处理组比较。

图 3 RES 对 Huh-7/DDP 细胞中 miR-212-3p 表达的影响

#### 2.4 过表达 miR-212-3p 可以逆转 Huh-7/DDP 细胞的 DDP 耐药性

利用 NC mimic 和 miR-212-3p mimic 分别转染 Huh-7/DDP 细胞, 通过 RT-qPCR 证实转染 miR-212-3p mimic 的 Huh-7/DDP 细胞 miR-212-3p 的表达水平较转染 NC mimic 的 Huh-7/DDP 细胞明显上调 ( $P < 0.05$ ), 见图 4A。CCK-8 实验法检测 NC mimic+DDP 组和 miR-212-3p mimic+DDP 组 Huh-7/DDP 细胞的 DDP IC<sub>50</sub>, 结果显示, miR-212-3p mimic+DDP 组的 DDP IC<sub>50</sub> 明显低于 NC mimic+DDP 组, 见图 4B、C。流式细胞术检测结果显示, 与未

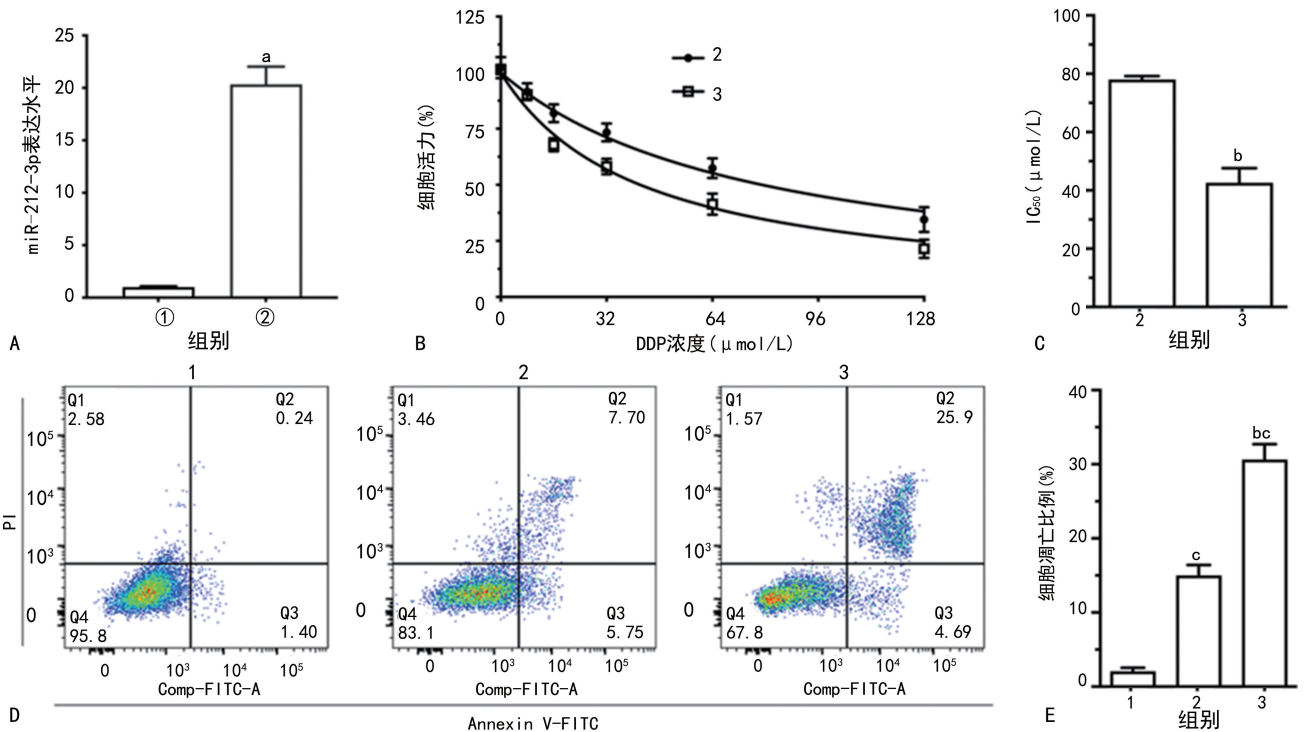
处理组比较, NC mimic+DDP 组和 miR-212-3p mimic+DDP 组的细胞凋亡率均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 其中, miR-212-3p mimic+DDP 组的细胞凋亡率明显高于 NC mimic+DDP 组 ( $P < 0.05$ )。

#### 2.5 RES 通过 miR-212-3p 逆转 Huh-7/DDP 细胞的 DDP 耐药性

将 NC inhibitor 和 miR-212-3p inhibitor 分别转染 Huh-7/DDP 细胞, 通过 RT-qPCR 证实转染 miR-212-3p inhibitor 的 Huh-7/DDP 细胞 miR-212-3p 表达水平较转染 NC inhibitor 的 Huh-7/DDP 细胞明显下调, 见图 5A。CCK-8 实验法检测 NC inhibitor+DDP 组、miR-212-3p inhibitor+DDP 组、NC inhibitor+RES+DDP 组、miR-212-3p inhibitor+RES+DDP 组 Huh-7/DDP 细胞的 DDP IC<sub>50</sub>, 结果显示, miR-212-3p inhibitor+DDP 组的 DDP IC<sub>50</sub> 明显高于 NC inhibitor+DDP 组, NC inhibitor+RES+DDP 组 DDP IC<sub>50</sub> 明显低于 NC inhibitor+DDP 组, 而 miR-212-3p inhibitor+RES+DDP 组的 DDP IC<sub>50</sub> 明显高于 NC inhibitor+RES+DDP 组, 见图 5B。流式细胞术检测结果显示, miR-212-3p inhibitor+DDP 组的细胞凋亡率明显低于 NC inhibitor+DDP 组, NC inhibitor+RES+DDP 组的细胞凋亡率高于 NC inhibitor+DDP 组, 而 miR-

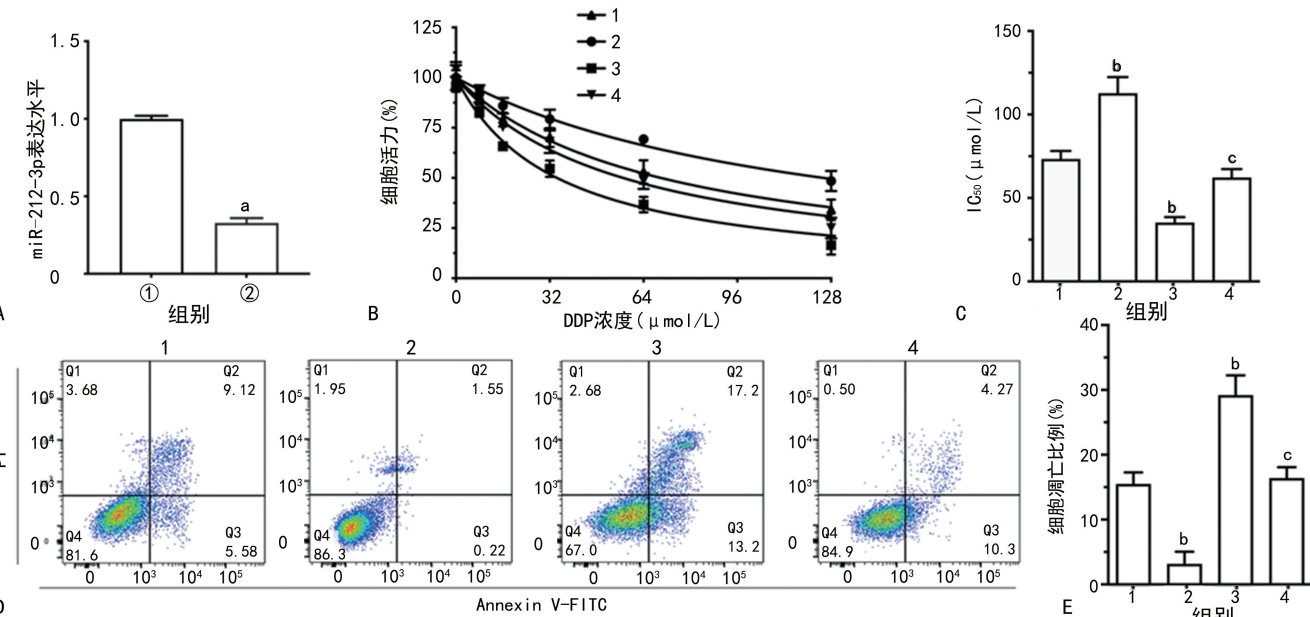


212-3p inhibitor+RES+DDP 组的细胞凋亡率低于 NC inhibitor+RES+DDP 组,见图 5C、D。



A: RT-qPCR 检测 miR-212-3p 表达水平; B、C: CCK-8 实验法检测 Huh-7/DDP 细胞的 DDP IC<sub>50</sub> 值; D、E: 流式细胞术检测 Huh-7/DDP 细胞的凋亡率; ①: NC mimic 组; ②: miR-212-3p mimic 组; 1: 未处理组; 2: NC mimic+DDP 组; 3: miR-212-3p mimic+DDP 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 NC mimic 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 NC mimic+DDP 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与未处理组比较。

图 4 过表达 miR-212-3p 对 Huh-7/DDP 细胞增殖和凋亡的影响



A: RT-qPCR 检测 miR-212-3p 相对表达水平; B、C: CCK-8 实验法检测 Huh-7/DDP 的 IC<sub>50</sub> 值; D、E: 流式细胞术检测 Huh-7/DDP 的凋亡比例; ①: NC inhibitor 组; ②: miR-212-3p inhibitor 组; 1: NC inhibitor+DDP 组; 2: miR-212-3p inhibitor+DDP 组; 3: NC inhibitor+RES+DDP 组; 4: miR-212-3p inhibitor+RES+DDP 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 NC inhibitor 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 NC inhibitor+DDP 组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 NC inhibitor+RES+DDP 组比较。

图 5 RES 通过 miR-212-3p 逆转 Huh-7/DDP 细胞的 DDP 耐药

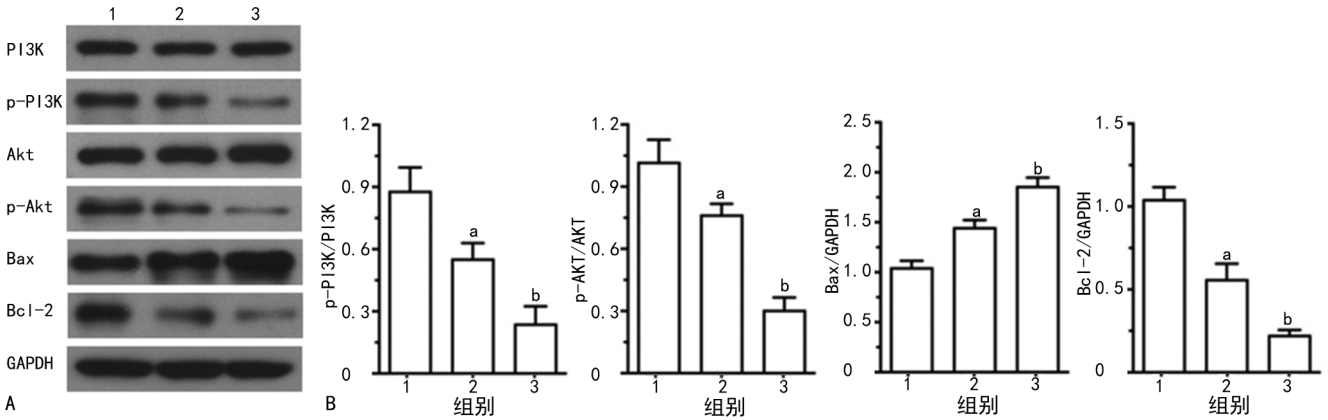
### 2.6 RES 与 DDP 对 Huh-7/DDP 细胞中 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、Bax 蛋白的影响

采用 Western blot 法检测 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、

Bax 蛋白的水平,结果发现,与未处理组比较,DDP 组、RES+DDP 组的 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平明显下调( $P < 0.05$ ),其中 RES+DDP 组比 DDP 组

下调更为明显 ( $P < 0.05$ ); 而 Bax 蛋白水平明显上调 ( $P < 0.05$ ), 其中 RES+DDP 组比 DDP 组上调更为

明显 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。



A: Western blot; B: Western blot 定量分析; 1: 未处理组; 2: DDP 组; 3: RES+DDP 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与未处理组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 DDP 组比较。

图 6 RES 和 DDP 对 Huh-7/DDP 细胞 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2、Bax 蛋白水平的影响

### 3 讨论

HCC 是最常见的原发性肝癌, 其在全球的发病率呈上升趋势<sup>[11]</sup>。HCC 大多在疾病晚期才能被诊断出来, 而化疗药物 DDP 是治疗晚期 HCC 患者的重要手段。然而, DDP 耐药性的产生大大降低了治疗晚期或复发性 HCC 的疗效<sup>[12]</sup>。因此, 寻求全新治疗手段或克服 DDP 在 HCC 中的耐药性是肿瘤治疗领域需解决的关键问题之一。

RES 是一种多酚化合物, 在肿瘤发展和进展的多个阶段均具有抗癌活性, 并且对正常细胞的毒性较小<sup>[4,13]</sup>。研究表明, RES 可增强柔红霉素和多柔比星等化疗药物对肿瘤的生长抑制和细胞毒活性<sup>[14]</sup>。此外, RES 与 DDP 具有协同作用, 可促进线粒体中细胞色素 c 的释放从而增加肿瘤细胞凋亡, 以及调控 Bcl-2 和 Bax 凋亡蛋白的异常表达<sup>[15]</sup>。本研究通过 CCK-8 实验发现 RES 联用 DDP 可以明显降低 Huh-7/DDP 细胞的 DDP IC<sub>50</sub> 值。流式细胞术结果显示 RES 联用 DDP 的细胞凋亡率明显高于单用 DDP。提示 RES 具有明显逆转 Huh-7/DDP 细胞 DDP 耐药的作用及良好的潜在应用前景。

MiRNAs 是一种小型非编码 RNA, 它的主要功能是在翻译水平上调节基因表达。目前的研究报道, 一些 miRNAs 可以调节 DDP 在多种癌症中的敏感性, 包括 HCC 在内<sup>[16-17]</sup>。例如, Let-7 通过 IL-6/STAT3 通路影响食管癌中 DDP 的敏感性<sup>[18]</sup>。而 miR-214 通过靶向卵巢癌中的 PTEN 导致 DDP 耐药和抑制细胞凋亡<sup>[18]</sup>。此外, miR-27a 的上调通过抑制肺癌细胞中的 RKIP 表达来促进 DDP 的化学抗性<sup>[19]</sup>。而在 HCC 中, 一些研究证实了几种特定的 miRNA 会影响 HCC 对 DDP 的化学敏感性, 其中包

括 miR-610、miR-3168、miR-27a-3p 等<sup>[20-22]</sup>。然而, miR-212-3p 在 HCC 中与 DDP 敏感性间的关系尚不明确。本研究对 RES 处理的 Huh-7/DDP 细胞中 miR-212-3p 表达水平进行检测, 发现 RES 能够上调 miR-212-3p 的表达水平。在 Huh-7/DDP 细胞中过表达 miR-212-3p 可以明显降低 DDP IC<sub>50</sub> 值, 并增加 DDP 诱导的细胞凋亡。而在转染 miR-212-3p inhibitor 的 Huh-7/DDP 细胞中, RES 逆转 DDP 耐药的作用被明显抑制。提示 miR-212-3p 可能是 RES 逆转 Huh-7/DDP 细胞耐药的潜在靶标。

PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要信号转导通路之一, 它的激活可能与肿瘤细胞对 DDP 耐药性有关<sup>[23]</sup>。有研究显示抑制 PI3K/Akt 信号降低非小细胞肺癌癌症化疗耐药性<sup>[24]</sup>。Akt 信号的激活增加乳腺癌和卵巢癌的耐药性<sup>[25]</sup>。此外, LY294002 抑制剂对 PI3K/Akt 活化的抑制使肿瘤细胞对 DDP 明显敏感<sup>[26]</sup>。为初步探究 RES 与 DDP 协同逆转 Huh-7/DDP 细胞 DDP 耐药的分子机制, 本研究采用 Western blot 法检测了 PI3K/Akt 信号通路和凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 的表达水平。结果显示, RES 联用 DDP 可协同下调 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平, 抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活。同时可增强对 Bcl-2、Bax 蛋白水平的调控。初步揭示了 RES 逆转 DDP 对 Huh-7/DDP 细胞耐药的分子机制。

综上所述, miR-212-3p 参与了 Huh-7/DDP 细胞 DDP 耐药, RES 可能通过调控 miR-212-3p 表达水平, 抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化, 发挥逆转肝癌细胞 DDP 耐药的作用, 为 RES 改善肝癌临床治疗困境提供了有力支持。

## 参考文献

- [1] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肝癌诊疗指南(2022 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(2): 288-303.
- [2] KIM D W, TALATI C, KIM R. Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy[J]. J Gastrointest Oncol, 2017, 8(2): 256-265.
- [3] ZHONG C, QIU S, LI J, et al. Ellagic acid synergistically potentiates inhibitory activities of chemotherapeutic agents to human hepatocellular carcinoma [J]. Phytomedicine, 2019, 59: 152921.
- [4] 杨艳丽, 蔡昌兰, 顾苡铭. 白藜芦醇抗癌的生物学机制研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(2): 338.
- [5] RAUF A, IMRAN M, BUTT M S, et al. Resveratrol as an anti-cancer agent: a review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018, 58(9): 1428-1447.
- [6] 张文政, 毛许庆, 孙雪妮, 等. 中西医结合分子配伍治疗肿瘤协同增效及逆转耐药的研究进展[J]. 中国肿瘤临床, 2021, 48(11): 566-570.
- [7] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [8] KABEKKODU S P, SHUKLA V, VARGHESE V K, et al. Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases[J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2018, 93(4): 1955-1986.
- [9] FAROOQI A A, KHALID S, AHMAD A. Regulation of cell signaling pathways and miRNAs by resveratrol in different cancers[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(3): 652.
- [10] MICHAILLE J J, PIUROWSKI V, RIGOT B, et al. MiR-663, a microrna linked with inflammation and cancer that is under the influence of resveratrol[J]. Medicines, 2018, 5(3): 74.
- [11] RASHED W M, KANDEIL M A M, MAHMOUD M O, et al. Hepatocellular carcinoma (HCC) in egypt: a comprehensive overview [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2020, 32(1): 1-11.
- [12] XU X F, YANG X K, SONG Y, et al. Dysregulation of non-coding RNAs mediates cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma and therapeutic strategies [J]. Pharmacol Res, 2022, 176: 105906.
- [13] VERVANDIER-FASSEUR D, LATRUFFE N. The potential use of resveratrol for cancer prevention[J]. Molecules, 2019, 24(24): 4506.
- [14] COCETTA V, QUAGLIARIELLO V, FIORICA F, et al. Resveratrol as chemosensitizer agent: state of art and future perspectives[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(4): 2049.
- [15] PATRA S, PRADHAN B, NAYAK R, et al. Chemotherapeutic efficacy of curcumin and resveratrol against cancer: chemoprevention, chemoprotection, drug synergism and clinical pharmacokinetics[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 73: 310-320.
- [16] SI W, SHEN J, ZHENG H, et al. The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance [J]. Clin Epigenetics, 2019, 11(1): 1-24.
- [17] LIANG Y, LIANG Q, QIAO L, et al. MicroRNAs modulate drug resistance-related mechanisms in hepatocellular carcinoma [J]. Front Oncol, 2020, 10: 920.
- [18] HIRANO T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer[J]. Int Immunol, 2021, 33(3): 127-148.
- [19] ZHANG J, CAO Z, YANG G, et al. MicroRNA-27a (miR-27a) in solid tumors: a review based on mechanisms and clinical observations [J]. Front Oncol, 2019, 9: 893.
- [20] LU T, HAN T, ZHAO M. miR-3168 promotes hepatocellular carcinoma progression via down-regulating p53 [J]. Carcinogenesis, 2022, 43(10): 956-968.
- [21] YANG Y, YANG Z, ZHANG R, et al. MiR-27a-3p enhances the cisplatin sensitivity in hepatocellular carcinoma cells through inhibiting PI3K/Akt pathway [J]. Biosci Rep, 2021, 41(12): BSR20192007.
- [22] XU Y, WANG H, GAO W. MiRNA-610 acts as a tumour suppressor to depress the cisplatin resistance in hepatocellular carcinoma through targeted silencing of hepatoma-derived growth factor [J]. Arch Med Sci, 2020, 16(6): 1394-1401.