

用富含miR-30a的牛初乳组分抑制癌细胞的自噬可促进顺铂化疗的肿瘤消亡*

邹珍友^{1,2)}*, 汪洋^{1,2)}*, 丁寒莹^{1,2)}, 吴临平^{1,2)}, 陈淑美^{1,2)}, 蒋挺^{1,2)}, 国芳^{1,2)},

张鹤云^{1,2)}, 陈熹^{1,2)}, 张骑鹏^{1,2)}, 张辰宇^{1,2)}**, 曾科^{1,2)}**

(江苏小分子核糖核酸工程研究中心, 南京, 210093; 南京大学生命科学学院医药生物技术国家重点实验室, 南京, 210093)

摘要 本实验首次发现牛初乳中富含miR-30a。取牛初乳中富含miR-30a的组分处理用顺铂化疗的癌细胞,能显著地抑制癌细胞自噬,促进癌细胞凋亡:单独使用顺铂化疗18小时的癌细胞凋亡率为12.5%,而化疗的同时施加富含miR-30a的牛初乳组分18小时后癌细胞凋亡率为56.5%。用这种富含miR-30a的牛初乳组分饲喂顺铂化疗的荷瘤小鼠,能更有效地抑制肿瘤生长:化疗小鼠饲喂牛初乳组分后,肿瘤直径自6mm缩小为4.5mm,而单独用顺铂化疗的肿瘤直径约8mm。因此富含miR-30a的牛初乳组分能增进化疗药物的疗效。施用牛初乳组分,还可减少化疗药物的用量:单独用顺铂处理细胞18小时需20 μ g/ml剂量,加牛初乳组分后10 μ g/ml即可取得明显凋亡效果;单独用顺铂化疗荷瘤小鼠10天每次需500 μ g,而添加富含miR-30a的牛初乳组分后,顺铂剂量减半即可明显缩小肿瘤。

关键词 miR-30a, 自噬, 细胞凋亡, 牛初乳, 顺铂

中图分类号 Q279, Q74, R730.53, R730.54

1. 简介

癌是一种细胞生长失控的疾病,对人体危害极大。世界上每年死于癌症的人计以千万,是导致死亡人数最多的疾病之一^[1]。全世界的医生和科学家一直在尝试各种方法战胜癌症这个困扰人类健康的恶魔,如手术切除法、放射疗法、药物化疗法、免疫疗法、激素疗法、基因疗法等。

化疗是治疗癌症的一种有效方法。常用的化疗药物,如铂,可抑制环磷腺苷(CAMP)磷酸二酯酶的活性影响癌细胞DNA、RNA和蛋白质的合成,从而限制肿瘤细胞增殖;丝裂霉素与阿霉素能与癌细胞DNA结合,阻碍DNA和RNA合成,抑制肿瘤细胞分裂增生;顺铂(cis-dichloride diamine platinum, cis-DDP, $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$)则可通过螯合DNA,使之聚缩,影响其复制与转录,促使细胞凋亡^[2-7]。但在化疗时,癌细胞可产生耐药性,造成药物难以及时彻底地消灭癌细胞^[8]。在药物撤除后,那些未被杀死的癌细胞可能继续增殖形成肿瘤。人们不得不加大药量,这对患者造成了很大副作用,如脱发,恶心,疲劳,呕吐等症状,使患

* 国家基础科学研究973计划: 2012CB517603, 2011CB504803863; 国家自然科学基金: 90813035 资助项目。

+ 对本工作有同等贡献。

** 通讯联系人。

曾 科: Tel: 025-83592306, E-mail: kzen@nju.edu.cn

张辰宇: Tel: 025-83592306, E-mail: cyzhang@nju.edu.cn

收稿日期: 2012-02-08, 接受日期: 2012-03-20

者免疫力降低,病情进一步恶化^[9];额外增加的药量也会增加医疗费用,给患者家庭带来严重的经济负担.

自噬是癌细胞的一种耐药机制^[8].研究表明,在药理环境下,细胞内会生成一种膜结构的囊泡,将胞质内的部分细胞器和胞浆包围,呈递给溶酶体降解并再利用,以维持细胞基本的新陈代谢,细胞得以继续存活^[10].若能消除癌细胞在化疗期间的自噬,剥夺其依赖自噬的存活机会,则可能更有效地消灭癌细胞、抑制肿瘤,提高药物的疗效.已有实验证实,利用氯喹提高溶酶体内的pH值,干扰自噬体内的物质分解,可抑制细胞自噬,增加阿霉素诱导的淋巴瘤对化疗药物环磷酰胺的敏感性^[11].用3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)阻断自噬信号通路中的PI3K激酶,也可以抑制药物诱发的自噬,增加细胞凋亡^[12-13].

自噬泡的形成与Beclin-1以及微管相关蛋白轻链3(LC3)的剪切和酯化有关^[14].研究表明,细胞自噬相关基因*Beclin-1*的表达受miR-30a调控.miR-30a可结合到*Beclin-1* mRNA的3'非编码端互补序列(3'-UTR),抑制其表达,影响自噬泡生成,从而消除细胞的自噬^[15-16].因此,若能将外部的miR-30a引入癌细胞,下调受化疗药物诱导而增加的Beclin-1,则可能阻止自噬泡生成,抑制自噬,加速细胞死亡,促进化疗效果.

牛初乳是母牛初次产仔后一周内分泌的乳汁,含丰富的营养和生物活性物质.我们发现,牛初乳还富含miR-30a,比常乳和多种癌细胞中高多倍.目前牛乳核酸在医疗保健方面的应用尚未开展.本实验拟提取牛初乳中富含miR-30a的组分并引入癌细胞,用其中所含的miR-30a抑制化疗时发生的自噬,以图达到更有效地杀灭癌细胞、消除肿瘤、增进药物疗效.加之牛初乳来源丰富,价格低廉,若对治疗肿瘤有效,可望开发成一种大众化的辅助药物.

2. 方法与材料

2.1 试剂与材料

人宫颈癌细胞株HeLa、小鼠宫颈癌细胞株U4和其他细胞购于中国科学院细胞库(上海);各抗体购自Abcam公司;PCR探针、引物和合成miR-30a及其反义序列购自Ambion公司;顺铂(cis-Dichlorodiammine platinum, cis-DDP)、自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)购自Sigma公司;C57小鼠购自中国医学科学院实验动物研究所.

2.2 牛奶样品制备

牛初、常乳取自健康乳牛;人初、末乳取自健康产妇.取10 ml牛初乳与常乳,按试剂说明书所述提取RNA,所得RNA一部分用Solexa测序,对比初、常乳中各种microRNA含量的差异.另一部分用实时反相定量PCR方法(rt-QPCR)测miR-30a、miR-27a、miR-26b的含量.另取等量牛初、常乳,分别以5000×g、12000×g、30000×g、70000×g、110000×g依次离心,将每次离心得到的上、下层组分保存,中层液进入下一离心,直到最后用110000×g分离得到上、中、下层.将各组分冷冻干燥提取RNA,用rt-QPCR测各组分miR-30a的含量;用于处理癌细胞和喂饲小鼠的牛乳110000×g离心沉淀另制.

2.3 电镜观察牛初乳 110000×g 离心沉淀中的微囊泡

实验测得牛初乳110000×g离心沉淀富含miR-30a,故取此组分用PBS重悬涂抹于玻片上,干燥镀金后用扫描电镜(SEM, S-3000N, Hitachi, Japan)观察.另取上述沉淀,先后用2.5%戊二醛和2%锇酸固定1h,然后

用梯度浓度酒精和丙酮脱水, 然后用梯度浓度酒精和丙酮脱水, 用梯度浓度丙酮和树脂混合液各浸渍 2h, 纯树脂 40°C 包埋 12h, 60°C 硬化. 切片 (80nm) 用 1%醋酸铀和 1%柠檬酸铅各染色 1min, 干燥后用透射电镜(TEM, H7650, Hitachi, Japan)观察.

2.4 化疗癌细胞的处理

2.4.1 用牛乳 $110000\times g$ 离心沉淀、合成的miR-30a和3-MA抑制癌细胞自噬. 提取多种癌细胞 (HeLa, U937, THP-1, 231B, U4, SH-sy5y, MCF-7, 293T) 的RNA, rt-QPCR测各细胞miR-30a含量. 选miR-30a含量最低的HeLa细胞, 在实验前均用1ml含血清DMEM培养液培养, 然后按 表.1 所列方式分成14组加入相应试剂培养6h后提取蛋白质、RNA、用免疫荧光标记自噬泡. 另取各组细胞继续培养12h后测凋亡率.

Table.1 Cell treating methods

分组(Group)	处理方法(METHOD)	分组(Group)	处理方法(METHOD)
Control	对照组用含血清 DMEM 培养	MatF	50 μ g 牛常乳组分
DDP	20 μ g DDP	miR-30a	10 μ g miR-30a mimic
DDP+ColF	20 μ gDDP+50 μ g 牛初乳组分	DDP+miR-30a	20 μ g DDP+10 μ g miR-30a mimic
DDP+MatF	20 μ gDDP+50 μ g 牛常乳组分	MatF+miR-30a	10 μ g miR-30a mimic+50 μ g 牛常乳组分
DDP+ColF+anti	20 μ gDDP+50 μ g 牛初乳组分 +200pM miR-30a 反义序列	DDP+MatF+miR-30a	10 μ g miR-30a mimic+50 μ g 牛常乳组分
DDP+MatF+anti	20 μ gDDP+50 μ g 牛常乳组分 + 200pM miR-30a 反义序列	DDP+3-MA	20 μ gDDP+10 mmol/L 3-MA
ColF	50 μ g 牛初乳组分	3-MA	10 mmol/L 3-MA

Note: ColF:colostrum factor; MatF: matured milk factor; anti: antisense sequence of miR-30a.

牛初乳组分增强化疗效果测试: 取两组正常培养的HeLa细胞, 第一组各孔内分别加0、5、10、20 μ g/ml DDP, 第二组在加入上述梯度浓度的DDP同时, 每孔内加入50 μ g牛初乳离心沉淀, 18h后测凋亡率.

化疗条件下癌细胞对富含miR-30a的牛初乳组分和合成的miR-30a敏感剂量的测定: 取两组正常培养的HeLa细胞, 加入20 μ g/ml DDP后, 一组按0、12.5、25、50 μ g/ml梯度浓度加入富含miR-30a的牛初乳组分, 另一组按0、50、100、200ng/ml的梯度浓度加入合成的miR-30a, 18h后测凋亡率.

2.4.2 细胞凋亡检测. 各组细胞脱壁离心重悬后, 加缓冲液、FITC-Annexin V、PI(BD公司, USA)避光孵育15min, 用流式细胞仪(BD Biosciences)测凋亡率.

2.4.3 自噬泡免疫荧光检测. 各孔细胞用4% 多聚甲醛固定2h, 用0.3% Triton X-100 (PBS稀释) 穿孔1h, 0.1% BSA-PBS封闭1h后加5 μ g/ml的LC3抗体室温孵育2h, 清洗后加入FITC-二抗 (1:200) 室温孵育2h, 再用PBS清洗, 置显微镜下观察, 数自噬泡.

2.5 用牛初乳组分促进荷瘤小鼠化疗

取6周龄C57小鼠, 皮下注射U4瘤细胞 (浓度 $10^7/200\mu$ l). 待肿瘤长到约6mm, 选40只肿瘤大小相近的小鼠, 分8组, 每组5只. 按表2所列方式分组处理, 10天后处死小鼠取瘤测大小并拍照; 每组切取部分肿瘤组织做Beclin-1和LC3蛋白的免疫定量标记; 另提取RNA用rt-QPCR测miR-30a含量.

Table.2 Tumor-bearing mice treating methods

分组(Group)	处理方法(METHOD)	分组(Group)	处理方法(METHOD)
Control	隔日自尾静脉注射 200 μ l 生理盐水	DDP+ColF+anti	隔日轮换以 DDP-生理盐水注射小鼠尾静脉、用 PEI 溶解的反义 miR-30a (20 μ g/ml) 100 μ l 注入肿瘤, 以牛初乳沉淀灌胃
DDP	隔日注射含 300 μ g/ml DDP 的生理盐水 200 μ l	DDP+MatF+anti	隔日轮换以 DDP-生理盐水注射小鼠尾静脉、用 PEI 溶解的反义 miR-30a 注入肿瘤, 以牛常乳沉淀灌胃
DDP+ColF	隔日轮流以 DDP-生理盐水注射尾静脉, 以 500 μ g 牛初乳组分灌胃	ColF	隔日以牛初乳沉淀灌胃
DDP+MatF	隔日轮流以 DDP-生理盐水注射尾静脉, 以 500 μ g 牛常乳组分灌胃	MatF	隔日以牛常乳沉淀灌胃

富含miR-30a的牛初乳组分促进肿瘤对DDP化疗敏感性测试: 取肿瘤大小约6mm的荷瘤小鼠分两批, 一组按0、7、15、30、60 μ g/次的梯度剂量分组隔日注射DDP; 另一批按同样浓度梯度剂量分组隔日注射DDP, 并隔日给每组小鼠饲喂富含miR-30a的牛初乳组分500 μ g, 共5次, 最后处死取瘤测量。

化疗癌细胞对牛初乳组分敏感剂量测定: 取植瘤小鼠分5组, 隔日注射60 μ g DDP, 然后按0、200、300、400、500 μ g剂量梯度隔日喂食牛初乳组分, 5次后处死取瘤测量。

2.6 miRNA含量测定

按试剂(invitrogen公司, USA)说明书提取各细胞和牛乳、人乳及各组分RNA, 测浓度。取牛初、常乳RNA各1 μ g, 按文献^[5]的方法对各种miRNA进行solexa 测序, 以读数值表示microRNA含量。取各乳样及其各组分和各细胞的总RNA 1 μ g 用DEPC水稀释成5 μ l。按以下步骤配好试剂, 分别用2720 thermal cycler PCR仪和7300 realtime PCR仪(AB公司, USA)做逆转录和定量PCR。细胞中pri-miR30a 的测量步骤同miR-30a, 但加入染料和引物代替探针引物。

逆转录反应体系与步骤: AMV 5 $\times$ buffer 2 μ l; AMV 0.5 μ l; dNTPs mixture (10mmol) 1 μ l; RT-Primer 1 μ l; RNA 5 μ l; DEPC水 5.5 μ l。反应程序: 16 $^{\circ}$ C 30min; 42 $^{\circ}$ C 30min; 85 $^{\circ}$ C 5min; 4 $^{\circ}$ C forever。

实时定量PCR反应体系与步骤: 10 $\times$ buffer 2 μ l; dNTPs mixture(10mmol) 0.4 μ l; MgCl₂ 1.2 μ l; rTaq 0.3 μ l; TaqMan 探针引物 0.33 μ l; 水 14.77 μ l; cDNA 1 μ l。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预热5min; 变性、复性与扩增95 $^{\circ}$ C 15s; 60 $^{\circ}$ C 荧光检测1min; 第二步和第三步交替循环40次。

引物正向序列: 5-GACGGTACCTGGTGGAGAACA ACTTCG-3;

反向序列: 5-CAGAAGCTTCATCAAACCTTCAATCCC-3。

2.7 Western blot定量标记自噬相关蛋白Beclin-1和LC3

各组细胞和肿瘤组织裂解后, 12000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C离心10 min弃沉淀, 测上清中蛋白的浓度, 加上样液煮沸5min。每组各取80 μ g蛋白作SDS-PAGE电泳, 转膜后封闭1h, 孵一抗4 $^{\circ}$ C过夜, TBST清洗, 二抗孵育1h, 用TBST洗膜5遍, 滴加H₂O₂和鲁米若发光液, 暗室曝光5min~1h, 显影、定影各2min。

2.8 统计分析

用SPSS 13.0 软件处理实验数据。组间比较用单因素方差分析, 组间差异用 q 检验, $P < 0.05$ 差异显著。

3 结果

3.1 牛初乳内含有丰富的miR-30a

Solexa 测序结果表明,牛初乳富含miR-30a,每毫升原乳含4.8ng,是牛常乳的9倍(图1-A). rt-QPCR测得为常乳的6倍(图1-B);牛初、常乳中的miR-26b、miR-27a差异也与Solexa 测序结果一致(图1-E). 人初乳中的miR-30a 是末乳的1.6倍,差异不如牛乳显著(图1-B). 实验还发现牛初乳的所有离心组分中,110000×g 离心沉淀所含miR-30a最多,占全乳miR-30a的46%(图1-F),是等质量牛常乳相应组分miR-30a的18倍(图1-C),同时也远高于所有实验细胞. HeLa细胞所含miR-30a是所有实验细胞中最低的,仅为牛初乳110000×g离心沉淀的14%. 小鼠宫颈癌细胞U4中的miR-30a含量与HeLa细胞相近. 牛常乳的110000×g 离心沉淀所含miR-30a仅为HeLa细胞的60%(图1-D).

研究表明,miR-30a可抑制*Beclin-1*的表达,影响细胞自噬^[15]. 本实验拟将牛初乳中富含的miR-30a引入化疗中的HeLa细胞和荷瘤小鼠,以图抑制自噬、促进癌细胞凋亡、消除肿瘤. 我们观察到,初乳110000×g离心沉淀中的主要有形物质为约80nm的囊泡,内含一些链状着色成分(图1-G、H),对各组分中的miR-30a含量测定结果表明,以这种囊泡为主体的沉淀部分含有牛乳中的大部分miR-30a(图1-F). 张玉婧等指出,miRNA可通过这种囊泡形式被细胞分泌到胞外,这种脂质膜囊泡很容易与被转染细胞的外膜融合,将所含miRNA转染到目的细胞^[17-19].

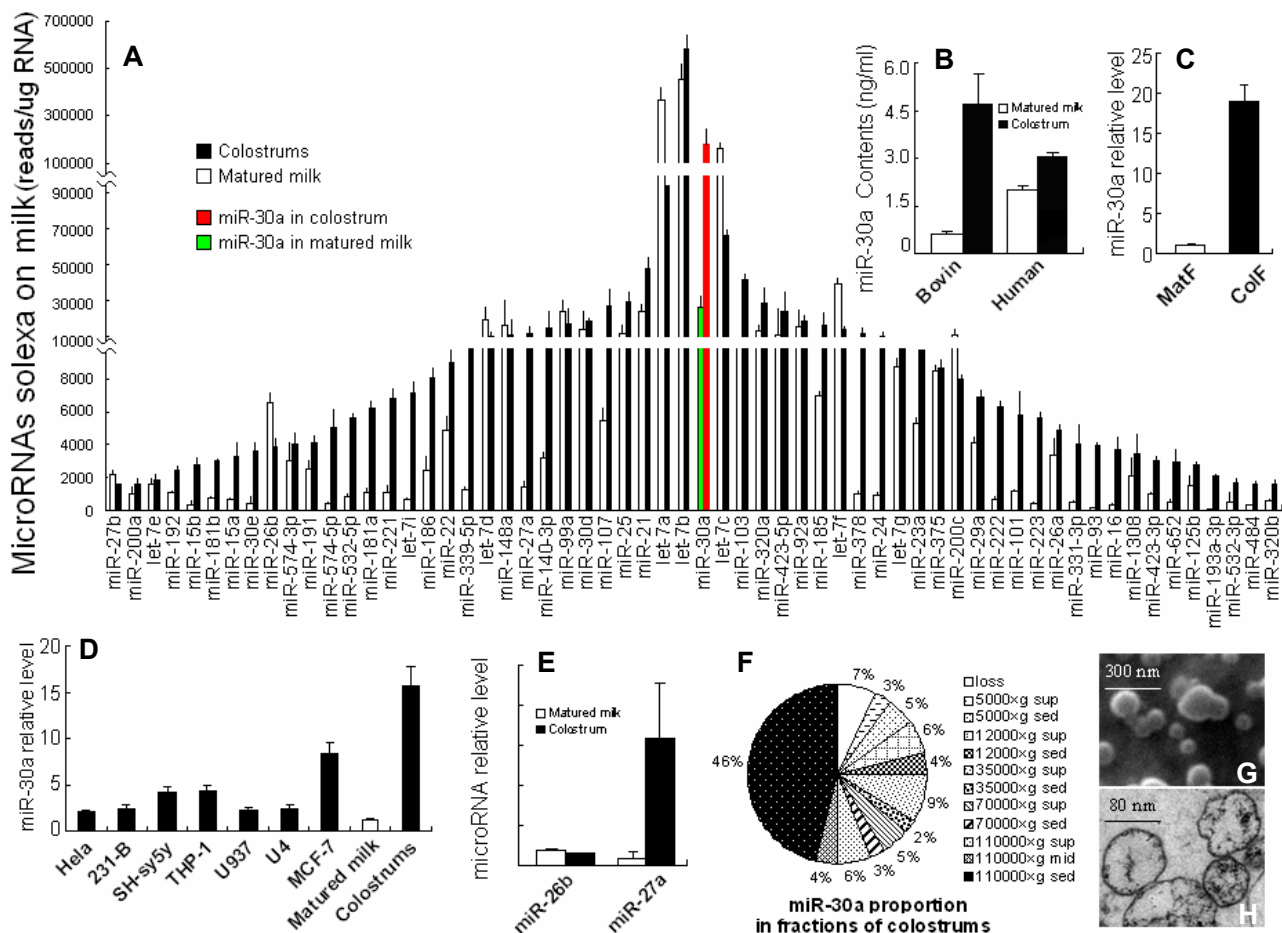


Fig.1 miR-30a levels in colostrums and matured latex

A) Solexa sequence assay indicate miR-30a is second high microRNA in colostrums, 9 times much as that in the matured milk; **(B)** miR-30a level in bovine milk and human latex measured by rt-QPCR. The miR-30a content in bovine colostrums is 6 times much as that in matured milk; for human, the miR-30a in colostrums is 1.6 times as that of the matured latex; **(C)** In the sediment of 110000×g centrifuged colostrums, miR-30a levels is 18 times much as that of the matured milk; **(D)** miR-30a level in the sediment of 110000×g centrifuged colostrums is higher than that of all tested cells. In detail, in the same RNA mass, the content of miR-30a in colostrums is 6 times more than that of the HeLa cell. In the same sediment of matured milk, the miR-30a levels is less than that of HeLa cell; **(E)** In milk, the levels of miR-26b and miR-27a measured by rt-QPCR coincide with that of the Solexa sequencing; **(F)** miR-30a mainly concentrates in the sediment of 110000×g centrifuged colostrums, 46% is occupied in the fraction; **(G), (H)** SEM and TEM image of Micro vesicles in the 110000×g centrifuged sediment.

3.2 牛初乳miR-30a、合成的miR-30a和3-MA可抑制DDP诱导的癌细胞自噬

如图2-A所示, DDP可降低细胞内的miR-30a含量。化疗细胞加富含miR-30a的牛初乳沉淀和人工合成的miR-30a 培养后, 可检测到胞内miR-30a 比单用DDP的细胞升高20余倍。而加常乳组分培养的细胞, 其miR-30a含量变化不明显。在牛常乳组分中补充了miR-30a后, 胞内的miR-30a含量也升高约20倍。尽管DDP能降低细胞内的miR-30a, 外源导入的miR-30a能提高细胞内的miR-30a含量, 但加入miR-30a 反义序列, 仅将pri-miR-30a 降低少许, 而各种处理的细胞内pri-miR-30a总体差异并不大(图2-B), 提示细胞内升高的miR-30a来自胞外。

DDP可诱导HeLa细胞自噬。如图2-C、D显示，用DDP处理后，每10个细胞中有自噬泡约45个。受DDP诱导，自噬相关基因*Beclin-1*表达以及自噬泡相关蛋白LC3-II生成均增加（图2-E、F、G）；但加入牛初乳组分和人工合成的miR-30a以及自噬抑制剂3-MA后，胞内自噬泡减少（每10个细胞内分别有4、4、3个自噬泡）、*Beclin-1*和LC3-II生成下降；牛常乳沉淀不能抑制化疗诱导的细胞自噬，每10个细胞内的自噬泡数目高达28个，*Beclin-1*和LC3-II也维持较高水平。但在牛常乳组分中补充miR-30a，自噬可得到有效抑制，*Beclin-1*和LC3-II的生成均降低（图2）。化疗时，加入miR-30a反义序列拮抗牛乳中的miR-30a，可解除牛初乳miR-30a对自噬的抑制，自噬得以继续发生，可检测到每10个细胞内约生成34个自噬泡（图2-E、F、G）。

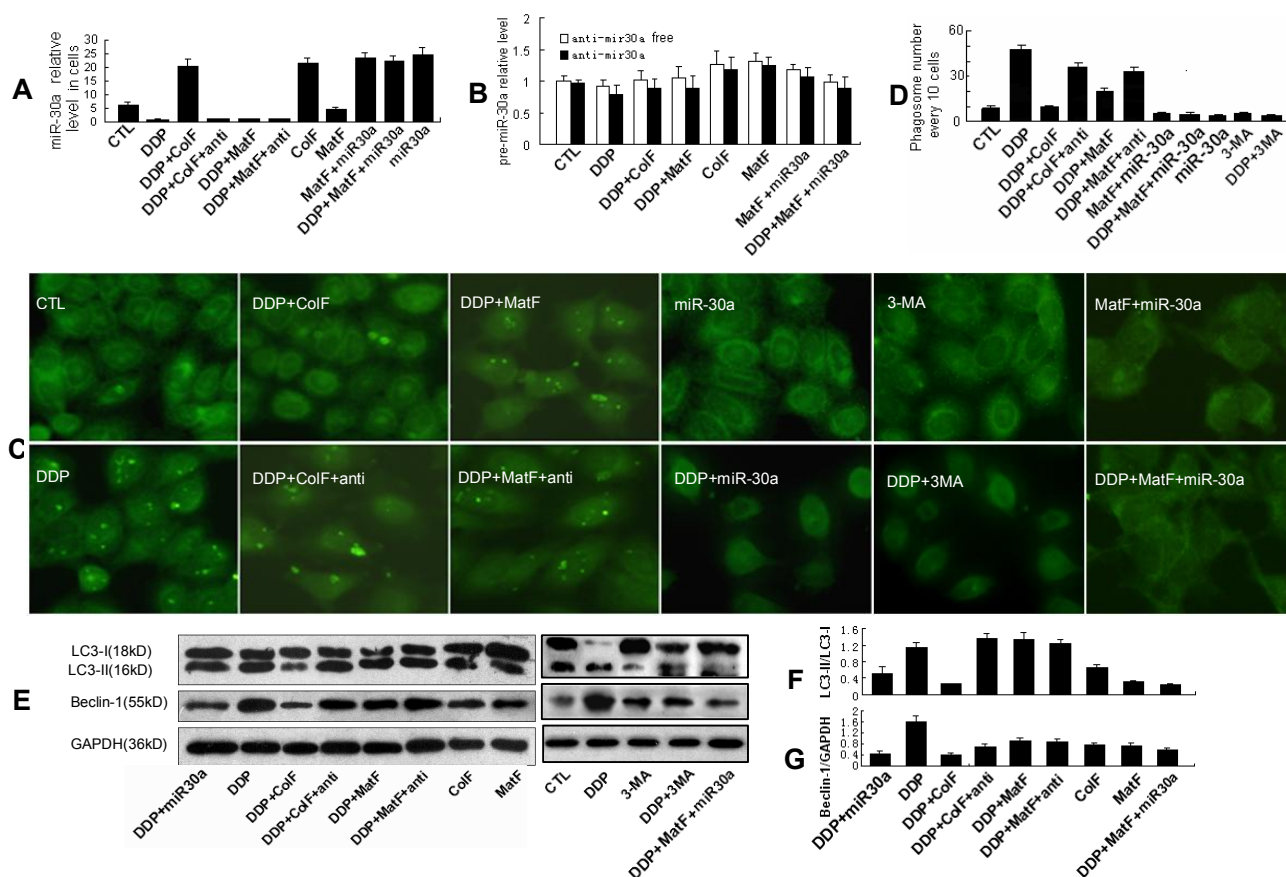


Fig.2 The introduction of miR-30a rich fraction of colostrums restrained the DDP-induced cell autophagy

A) DDP decreased the miR-30a level in HeLa cells; the introduction of miR-30a-rich colostrums sediment increased miR-30a level 18times in HeLa cells, which was pre-down-regulated by DDP; however, there was no the same effect for the corresponding fraction of matured milk; miR-30a mimic transfection increased the content of miR-30a in cells. If cultured with miR-30a-replenished matured milk fraction, the miR-30a level in the cells will be resumed after DDP-treated; antisense sequence of miR-30a inhibited the miR-30a in cells; **B**) pri-miR-30a level were slightly decreased in DDP treated cells, but not altered significantly in all tested cell groups; **C, D**) DDP induced HeLa cells autophagy. In detail, there are 45 autophagosomes per 10 cells; the introduction of miR-30a-rich colostrums fraction or 3-MA or miR-30a mimic restrained the autophagy of DDP treated HeLa cells, only 4, 4 and 3 autophagosomes were found respectively in every 10 cells; the corresponding fraction of matured milk did not depress the DDP-induced cell autophagy, 28 autophagosomes were found in 10 cells; but adding miR-30a mimic in the matured milk fraction, the autophagy was depressed; complimentary sequence of miR-30a can relive the blocked autophagy incurred by colostrums fraction; **E, F, G**) After DDP induced, the expression of Beclin-1 and LC3-II were both increased in HeLa cells; the introduction of colostrums fraction, 3-MA or miR-30a mimic offset their growth; matured milk fraction did not bring about the same effect; however, if miR-30a was replenished in, it can cut down their contents in cells. Blocking the colostrums contained miR-30a with antisense of miR-30a eliminated the autophagy restraining, for Beclin-1 and LC3-II kept higher expression.

CTL: control; ColF: 110000×g centrifugal sediment of colostrums; MatF:110000×g centrifugal sediment of matured milk; anti: antisense sequence of miR-30a;3-MA: 3-

Methyladenine. The meaning is same in the following figures.

3.3 用富含miR-30a的牛初乳组分抑制化疗诱导的自噬可促进癌细胞凋亡

由图3-A、B可知,施用DDP18h后,HeLa细胞凋亡率约12.55%。在施用DDP的同时,用3-MA抑制化疗诱导的自噬,细胞凋亡可增加至61.32%;加入富含miR-30a的牛初乳110000×g离心沉淀培养,化疗细胞凋亡率达56.52%,与化疗时加入合成miR-30a的效果接近(58.08%)。而牛常乳的离心组分加入化疗细胞培养液中,凋亡效果不显著,为21.08%。但在牛常乳组分中补充miR-30a后,化疗的癌细胞凋亡可增至63.25%。若用miR-30a反义序列抑制牛初乳miR-30a,则牛初乳促化疗癌细胞凋亡效率降低。因此用牛初乳中富含的miR-30a抑制化疗细胞的自噬,可增加癌细胞凋亡。

用不同剂量的DDP处理HeLa细胞发现,在不加牛初乳组分时,要获得12%的凋亡率,DDP浓度需20μg/ml;而加入富含miR-30a的牛初乳沉淀后,仅需10μg/ml(图3-C)。因此富含miR-30a的牛初乳沉淀可促进药物的疗效,减少用药量。在等剂量DDP作用下(20μg/ml),细胞的凋亡率随牛初乳沉淀和合成miR-30a施用量增加而增加,当培养液中牛初乳沉淀施用量超过25ug/ml或合成miR-30a浓度超过200ng/ml时,DDP处理的HeLa细胞凋亡率可超20%(图3-D)。

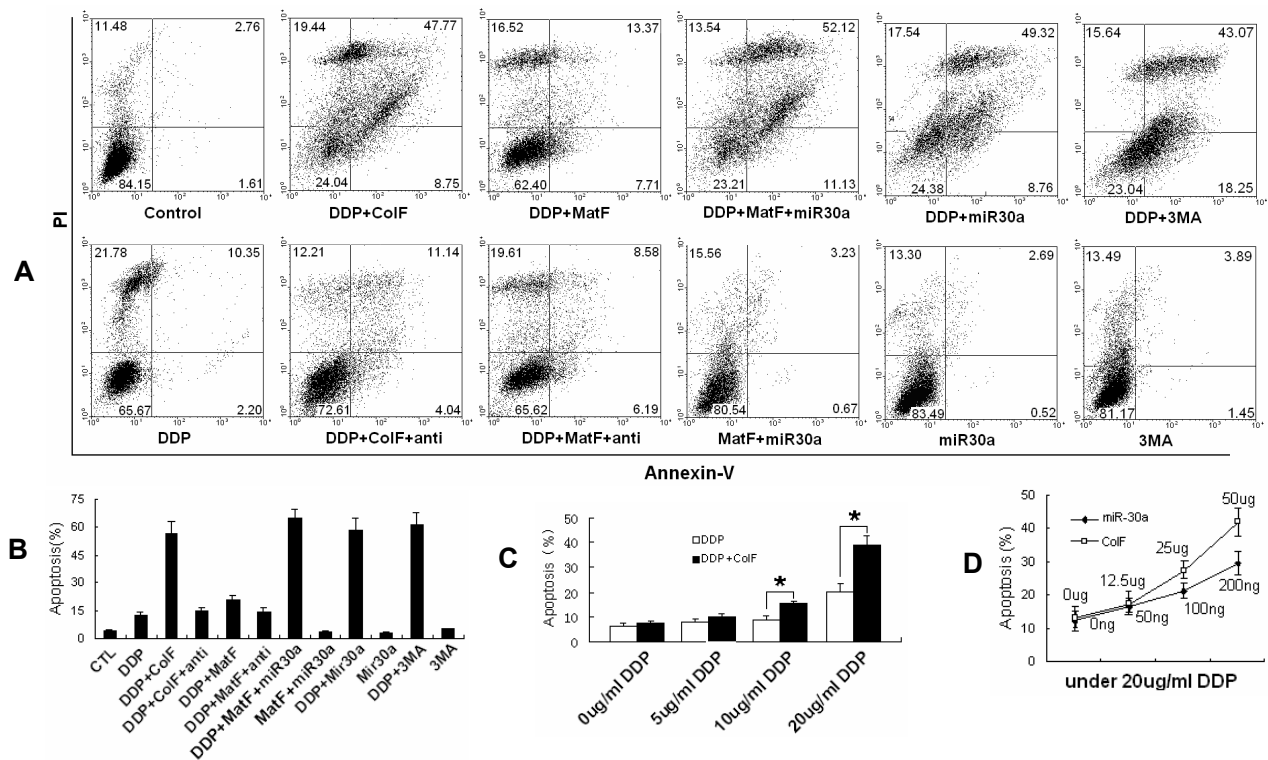


Fig.3 miR-30a-rich colostrums fraction increased the apoptosis of DDP-chemotherapy undergoing cells

A, B) Apoptosis flow cytometry on colostrums-sediment added DDP-treated HeLa cells; the apoptosis of DDP-only treated HeLa cell is 12.55%; cultured with colostrums-sediment or miR-30a mimic or 3-MA added medium, the apoptosis increased to 56.52%, 58.08% and 61.32% respectively; the matured-milk-sediment, only brought about 21.08% apoptosis on DDP-treated HeLa cells. However, when replenished with miR-30a mimic, the matured-milk-fraction promoted the apoptosis to 63.25%; antisense RNA of miR-30a inhibited the apoptosis of DDP-treated cells caused by the milk-sediment, down-regulated to 15.18% for colostrums-fraction treated cells and 14.77% for matured-milk-fraction incubated cells; **C)** Colostrums-sediment sensitized the HeLa cell to chemotherapy-drug DDP. After added the sediment for 18h, more than 15% apoptosis could be obtained even deducted half DDP dose; **D)** Under 20μg/ml DDP dose incubation, the cell apoptosis reached to 25% after 25μg of colostrums-fraction or 200ng of miR-30a mimic added in the 1ml medium.

3.4 富含miR-30a的牛初乳离心组分促进DDP对荷瘤小鼠的化疗效果

由图4-A、B可知, DDP对肿瘤有抑制作用。未施药的肿瘤初始时直径约6mm, 10天后长到约18mm; 注射DDP10天后肿瘤仅增至约8mm; 仅饲喂牛初乳和常乳 $110000\times g$ 离心沉淀但不注射DDP, 10天后肿瘤增至16mm。若隔日轮换注射DDP和喂饲 $500\mu g$ 牛初乳离心沉淀, 肿瘤由用药前的6mm缩至4.5mm, 消瘤效果明显(图4-A、B)。常乳相应组分无明显增强化疗的作用, 与仅用DDP的效果接近; 用反义miR-30a序列抑制牛乳组分中的miR-30a, 牛初乳组分促进DDP化疗的作用丧失, 肿瘤大小与仅用DDP的相近, 直径在7~11mm。

饲喂富含miR-30a的牛初乳组分可降低DDP用药量。在取得同等肿瘤消除效果条件下, 用药量降低一半($30\mu g$)(图4-C)。隔日轮换注射 $60\mu g$ DDP和饲喂超过 $300\mu g$ 初乳组分, 10日后肿瘤显著缩小(图4-D)。

DDP同样能降低肿瘤组织中miR-30a的含量(图4-H)。而饲喂牛初乳离心沉淀可恢复甚至远超肿瘤中的miR-30a原有水平; 常乳相应组分对肿瘤miR-30a的提高作用不明显。注射miR-30a反义序列可抑制牛初乳导致的肿瘤miR-30a升高。

对肿瘤中的Beclin-1和LC3-II免疫标记定量检测表明, DDP诱导了肿瘤组织中的Beclin-1和LC3-II升高(图4-E、F、G), 提示肿瘤内的细胞被诱发了自噬; 而仅用富含miR-30a的牛奶离心组分, Beclin-1和LC3-II的生成均比单用DDP处理的肿瘤下降; 在DDP化疗的同时饲喂牛初乳组分, Beclin-1和LC3-II均降低; 注射miR-30a反义序列则可消除miR-30a对自噬的抑制作用, Beclin-1和LC3-II的表达水平均较高(图4-E、F、G)。

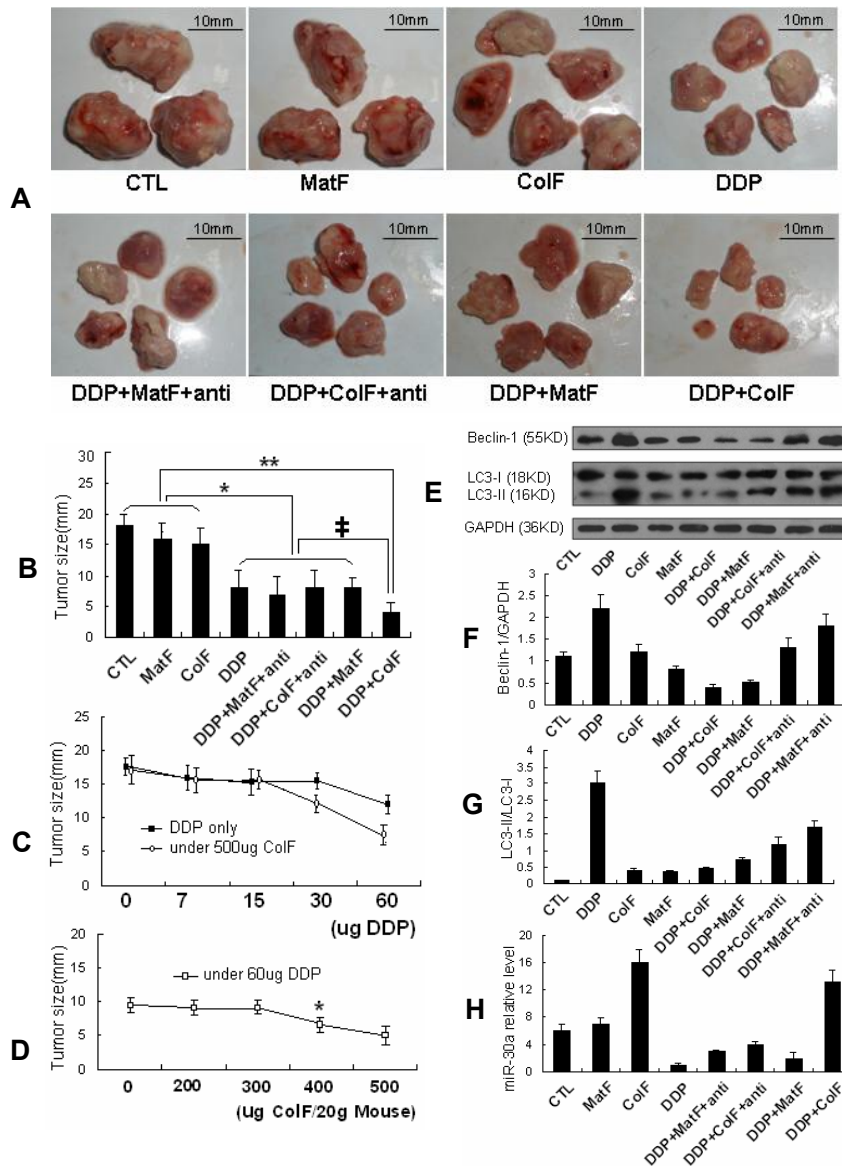


Fig.4 miR-30a rich colostrums-fraction promote the chemotherapy effect of DDP on tumor

A, B) In DDP injected mice, the tumors were restrained to 8mm around; after colostrum-sediment added, the tumors were further depressed to 4.5m; no the same effect was obtained for the matured-milk-sediment; miR-30a inhibitor offset the role of colostrums-sediment on tumor-eliminating; **C)** Fed miR-30a-rich colostrums fraction, the curative effect of DDP on tumor-bearing mouse was enhanced. DDP-dose was reduced to 30 μ g from 60 μ g after colostrums fraction administrated for obtaining significant tumor shrink; **D)** curative effect could be obtained when the undergoing 60 μ g DDP-therapy tumor-bearing mouse was intragastric administrated with 300 μ g of colostrum; **E, F, G)** Western blotting of Beclin-1 and LC3. DDP induced the autophagy in tumor cells; colostrums-fraction eliminated the DDP-induced autophagy; matured-milk fraction has no obvious effect on restraining the autophagy; miR-30a inhibitor blocked the role of miR-30a on eliminating the DDP-incurred autophagy; **H)** miR-30a level in different treated mice-tumors. The miR-30a in tumor was down-regulated by DDP; fed with colostrums sediment, tumor miR-30a increased; matured-milk-sediment did not increase miR-30a level in tumor. antisense miR-30a sequence inhibited tumor miR-30a enhance. ($P < 0.05$)

4. 讨论

4.1 引入牛初乳中富含的miR-30a, 可抑制化疗癌细胞的自噬, 增进癌细胞和肿瘤消亡

顺铂(DDP)作为抗癌药物,在临床中已被广泛使用。但在用它毒杀癌细胞的过程中,癌细胞会通过自噬而继续存活一段时间(图2-C),这导致药效受到影响。因此抑制化疗时癌细胞的自噬,剥夺癌细胞依赖自噬存活的机会是人们解除肿瘤耐药的一个努力方向。用3-MA抑制癌细胞在化疗时自噬,可增进癌细胞的凋亡(图3),因为它能阻断PI3K与Beclin-1结合,阻止自噬泡的生成^[12-13]。自噬受Beclin-1调控,DDP可整合细胞内的DNA而致聚缩,导致RNA转录受阻,生成的miR-30a减少,消除对Beclin-1生成的抑制,自噬得以发生(图2-A)。本实验将牛初乳中丰富的miR-30a以及人工合成的miR-30a引入癌细胞,补充了细胞内因受DDP化疗而生成减少的miR-30a,接续其调控细胞内Beclin-1 mRNA的表达,可抑制化疗引发的自噬(图2-C、D),癌细胞丧失了将自身物质分解获取养料维持生存的渠道,在DDP持续毒害下,细胞死亡加剧,肿瘤发展得到了控制(图3、4)。牛常乳的相应组分因其所含miR-30a少,不足以补偿癌细胞在化疗过程中减少的miR-30a量,因而不能有效地抑制癌细胞的自噬,细胞可依靠自噬继续存活,肿瘤消减速度缓慢。若在常乳中补充miR-30a处理癌细胞,则能与初乳组分一样促进对癌细胞的化疗。

实验还发现,对癌细胞和荷瘤小鼠仅饲喂牛乳110000×g离心沉淀而不注射DDP,细胞凋亡改变不显著,肿瘤也未见明显消除(图3-A、图4-A)。因为不加DDP,未诱发自噬,Beclin-1基因表达不显著(图3-E、图4-E)。即使此时牛初乳miR-30a进入了细胞,但大多没有与自噬相关靶基因mRNA结合的机会,miR-30a对细胞也无明显毒性(图2、3),因此细胞无显著凋亡。

肿瘤细胞在体内生长过快可造成此区域供血不足而缺氧或缺营养引起自噬^[20-21]。若缺氧或营养不足引起的自噬也受Beclin-1调控,则miR-30a仍可对此时发生的自噬起抑制作用,加速这些发生自噬的癌细胞死亡,使肿瘤缩小。实验确实发现,加了牛初乳组分的肿瘤比对照组的肿瘤小一些。但这还不能完全归功于牛乳中的miR-30a,因为牛奶离心沉淀中其他成分,如肿瘤抑制因子和乳铁蛋白等,对肿瘤的抑制作用不能排除。不过这些因素的作用不是本实验研究的重点,不详述。

4.2 牛初乳辅助抗癌应用开发前景

牛奶是日常生活中营养最丰富的食物之一。牛初乳更以其富含特殊营养成分和生物活性物质,对增强机体免疫力、促进身体康复与生长、延长寿命、延缓衰老有明显作用^[26]。有研究指出^[22-23]常饮牛乳可降低乳腺癌的发病率;小鼠用酪蛋白和脱脂乳粉喂养,患结肠癌和乳腺肿瘤机会变少。牛初乳中富含的乳铁蛋白还能预防胰腺癌^[24]。但用牛奶中所含的miRNA预防肿瘤的研究尚未报道。本实验首次发现牛初乳中含有丰富的miR-30a,通过对化疗中的癌细胞和荷瘤小鼠实验,表明牛初乳富含miR-30a的组分可通过下调Beclin-1基因的表达而抑制癌细胞被化疗药物引发自噬,有效地阻断了癌细胞的存活和肿瘤的发展,提高了药物的疗效,降低了用药量,进而可减轻药物的副作用对患者造成的损害和痛苦,促进身体康复。牛初乳来源较为丰富,若能对其中的miR-30a与其它活性物质加以提取和开发利用,无疑能造福人类。

参 考 文 献

- [1] Adwaith, About Cancer, its causes and dangerous symptoms, 2011[29-Jun-2011].
<http://www.indiastudychannel.com/resources/142425-About-Cancer-its-causes-dangerous-symptoms.aspx>
- [2] Chaney S G, Campbell S L, Temple B, *et al.* Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2004(98):1881–1559
- [3] Hou X M, Zhang X H, Wei K J, *et al.* Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(5): 1400–1410
- [4] Lyer V N, Szabalski W. A molecular mechanism of mitomycin action: linking of complementary DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1963, 50:355-362
- [5] 周自水, 王世祥. 新编常用药物手册. 第2版. 北京: 金盾出版社. 1992, 311
- [6] 刘 耳, 朱忠斌, 吴 燕. 亚硒酸钠和丝裂霉素抑制人肝癌细胞生长的协同效应. *天津医药*, 1993,21(1): 678
- [7] 徐庚达, 周顺泉, 高敏 等. 人体肿瘤体外药物敏感性预测及其应用. *肿瘤*. 1992, 12(4):175
- [8] O'Donovan T R, O'Sullivan G C, McKenna S L. Induction of autophagy by drug-resistant esophageal cancer cells promotes their survival and recovery following treatment with chemotherapeutics. *Autophagy*. 2011, 7(5):509-524
- [9] Gottesman M M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*. 2002, 53:615-627
- [10] Sun W L, Chen J, Wang Y P, *et al.* Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development. 2011, 7(9)
- [11] Amaravadi R K, Yu D, Lum J J, *et al.* Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007, 117:326-336
- [12] 孔晓霞, 张宏宇, 陈兆琴, 范小芳, 龚永生. 抑制Beclin 1促进H₂O₂诱导的神经胶质瘤U251细胞凋亡, *生理学报*, 2011, 63(3): 238–244
- [13] 肖涵, 自吞噬途径在polyQ扩展突变型Ataxin-3降解及SCA3/MJD发病机制中的作用Ataxin-3多克隆抗体的制备. *湘雅医院*, 2010: 23
- [14] Kang R, Zeh H J, Lotze M T, *et al.* The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*. 2011, 18:571–580
- [15] Zhu H, Wu H, Liu X P, *et al.* Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy* 2009, 5(6): 816-823
- [16] http://www.nanotools.de/flyer/Flyer_LC-3.pdf
- [17] Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, *et al.* Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 2008,10:1470–1476
- [18] Valadi H, Ekstro M K, Bossios A., *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 2007, 9: 654–659
- [19] Zhang Y J, Liu DQ, Chen X, *et al.* Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell*, 2010, 39: 133–144
- [20] Sutherland R M. Tumor hypoxia and gene expression. *ACTA Oncologica*, 1998, 37: 567-574

- [21] 马秀文, 超声诊断子宫肌瘤132 例分析. 中国误诊学杂志, 2009, 9(13):3179-3180
- [22] Gill H S, Cross M L. Anticancer properties of bovine milk, British Journal of Nutrition, 2000, 84, Suppl. 1, S161-S166
- [23] Lactoferrin-Extremely strong antiviral and antibacterial ingredient,
<http://www.body-mania.com/Supplements/008Lactoferrin.html>
- [24] 韩刚. 浅谈牛奶的营养价值. 中国奶牛, 1997, 3: 46-48

miR-30a enriched colostrum-fraction can inhibit the DDP-induced autophagy of HeLa cells and promote the tumor shrink*

ZOU Zhenyou^{1,2)+}, WANG Yang^{1,2)+}, DING Hanying^{1,2)}, WU Linping^{1,2)}, CHEN Shumei^{1,2)}, JIANG Ting^{1,2)}, GUO Fang^{1,2)}, ZHANG Heyun^{1,2)}, CHEN Xi^{1,2)}, ZHANG Qipeng^{1,2)}, ZHANG Chenyu^{1,2)} **, ZEN Ke^{1,2)} **

(¹)Jiangsu Engineering Research Center for microRNA Biology and Biotechnology;

²)State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: Here we firstly report that colostrum contains a high level of miR-30a. Using the miR-30a rich fraction extracted from colostrum, we successfully restrained the autophagy activity of HeLa cells induced by DDP, and promoted their apoptosis from 12.5% to 56.5% in 8 h post-treatment of DDP. By feeding the tumor-bearing mice undergoing DDP-chemotherapy with miR-30a- rich fraction from colostrum for 10 days, we reduced tumors size more effective than treating mice with DDP alone. In particular, the diameter of tumors was diminished to 4.5 mm after miR-30a-rich colostrum fraction administration during DDP chemotherapy, while the tumors treated with DDP only grown to 9.0 mm in diameter. In conclusion, the miR-30a-rich fraction of colostrum can sensitize the cancer cells to anti-cancer drugs, thus enhance the effect of chemotherapy drug on tumor treatment.

Keywords: miR-30a, Autophagy, Apoptosis, Colostrum, cis-Dichloride diamine platinum

*This work was supported by a grant from the Foundation of 973 National Science Program (2012CB517603, 2011CB504803863), National Natural Basic Research Foundation of China (90813035).

+ Contributed equally to the work.

**Corresponding author.

Zen Ke: Tel: 025-83592306, E-mail: kzen@nju.edu.cn; Zhang Chenyu: Tel: 025-83592306, E-mail: cyzhang@nju.edu.cn

Received: February 8, 2012

Accepted: March 20, 2012

Available online: March 22, 2012