

miR-29a 介导双氢青蒿素对肺腺癌 B7H3 分子调控

朱亚玉¹, 凌惠娟¹, 牛可¹, 唐静¹, 陈礼文²

(安徽医科大学第二附属医院¹ 检验科、² 输血科, 合肥 230601)

摘要 目的 探究 microRNA-29a (miR-29a) 介导双氢青蒿素 (DHA) 对肺腺癌 (LUAD) 免疫检查点分子 B7H3 的调控机制。方法 利用公共数据库分析 B7H3 在肺腺癌中的表达水平和预后意义。采用小干扰 RNA (siRNA) 敲减肺腺癌细胞株 A549 和 HCC827 中 B7H3 分子, CCK-8 法检测细胞增殖。将梯度浓度的 DHA (0、5、10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 A549 与 HCC827 细胞 48 h, 计算半数抑制浓度 (IC_{50}), 以 IC_{50} 浓度 DHA 处理 A549 和 HCC827 细胞 1、2、3 d, CCK-8 法检测细胞增殖。采用 miR-29a inhibitor 转染 A549、HCC827 细胞, DHA 处理后 RT-qPCR 检测 miR-29a 表达水平, Western blot 检测 B7H3 表达水平。结果 B7H3 在肺腺癌中过度表达, 与预后不良相关。敲低 B7H3 后 A549、HCC827 细胞增殖能力显著降低 (均 $P < 0.001$)。DHA 以剂量和时间依赖形式抑制 A549、HCC827 细胞增殖, IC_{50} 分别是 30.16 $\mu\text{mol/L}$ 和 7.50 $\mu\text{mol/L}$ 。DHA 上调 A549、HCC827 细胞 miR-29a 表达 ($P < 0.001$, $P < 0.01$), 同时下调 B7H3 表达 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。A549、HCC827 细胞转染 miR-29a inhibitor 后, B7H3 表达上调, 并且部分逆转 DHA 对 B7H3 的下调作用。结论 miR-29a 介导双氢青蒿素对肺腺癌 B7H3 分子调控。

关键词 肺腺癌; 双氢青蒿素; B7H3; miR-29a; 细胞增殖

中图分类号 R 393.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0604-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.003

肺癌约占全球癌症总死亡病例的 18%, 是与癌症相关的死亡的主要原因, 其中肺腺癌占比约 40%^[1]。近年来治疗肺腺癌的方法如放化疗、靶向治疗等取得了一定成效, 但其病死率仍居高不下, 仍需探索新的治疗方法。中药作为肿瘤的辅助治疗手段, 近年来备受关注。其中, 抗疟药物双氢青蒿素 (dihydroartemisinin, DHA) 对包括肺癌在内的多种癌症具有抑制作用, 但具体机制仍不明确^[2]。B7H3 作为 B7 配体家族的成员之一, 是重要肿瘤相关抗原和肿瘤免疫治疗的靶点^[3]。该课题组前期研究^[4]表明 DHA 通过下调 B7H3 抑制肺腺癌的转移和侵袭, 但调控机制不明。微小 RNA (microRNA, miRNA) 作为一类非编码 RNA, 是潜在的基因表达调控因子。研究^[5]表明, miR-29a 能够靶向 B7H3 的 3'-UTR 区, 抑制其表达。该研究旨在探讨 DHA 是否通过 miR-29a/B7H3 轴发挥抑癌作用, 为肺腺癌的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 数据来源 通过 UALCAN 数据库 (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 基于 TCGA 公开数据分析 B7H3 mRNA 表达以及 CPTAC 公开数据分析 B7H3 蛋白表达; 通过 HPA (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 数据库获得 B7H3 免疫组化图谱, 从以上几个方面比较正常肺组织与肺腺癌中 B7H3 的表达差异, 采用 Kaplan-Meier Plotter (<https://kmplot.com/analysis/>) 数据库评估肺腺癌中 B7H3 分子的预后价值。

1.2 主要材料 A549、HCC827 细胞系购自上海富衡生物技术有限公司; RPMI-1640 培养基 (货号: L210KJ) 购自上海源培生物科技股份有限公司; 胎牛血清 (货号: 0025) 购自美国 ScienCell 公司; CCK-8 试剂盒、0.25% 胰酶消化液、1% 青-链霉素、二甲亚砜 DMSO、RIPA 裂解液 (货号: C0037、C0201、ST488S、ST038、P0013B) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 双氢青蒿素 DHA (货号: S2290) 购自美国 Selleck 公司; TRIzol 提取试剂 (货号: B511311-0100) 购自上海生工生物工程有限公司; Jet Prime 转染试剂 (101000046) 购自美国 Thermo 公司; B7H3 抗体 (货号: ab227670) 购自美国 Abcam 公司; GAPDH 抗体 (货号: T0004) 购自美国 Affinity Biosciences

2024-12-23 接收

基金项目: 安徽省高校自然科学基金研究重点项目 (编号: 2023AH05-3170); 安徽省临床医学研究转化项目 (编号: 202304295107020019)

作者简介: 朱亚玉, 女, 硕士研究生;

陈礼文, 男, 副教授, 主任技师, 博士生导师, 通信作者, E-mail: chenliwen@ahmu.cn

公司;miRNA 反转录试剂盒、miRNA PCR 试剂盒购自南京诺唯赞有限公司;PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 主要仪器 细胞培养箱(HF90/HF240)购自上海力康生物医疗科技有限公司;RT-qPCR 仪器(A33185)购自美国 Thermo 公司;酶标仪(ST-960)购自济南爱来宝仪器设备公司,Western blot 显影仪(JS-1070P EV)购自上海天能科技有限公司。

1.4 方法

1.4.1 药物配置 DHA 用 DMSO 充分溶解并配置成 50 mmol/L 的母液, -20 °C 保存。

1.4.2 细胞培养 A549、HCC827 细胞使用含 10% 的胎牛血清和 1% 青 - 链霉素的 RPMI-1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 待到细胞密度长至 80% ~ 90% 左右进行传代, 培养 2 ~ 3 代进行后续实验。

1.4.3 细胞转染 取对数生长期的 A549、HCC827 细胞消化、离心后铺入 6 孔板中。使用 Jet Prime 转染试剂, 按照其说明书将由上海吉玛有限公司合成的 miR-29a inhibitor 及其 NC 和由上海生工生物工程股份有限公司合成的 si-Control、si-B7H3 转入细胞中。转染 48 h 后进行后续实验, 干扰序列见表 1。

表 1 miR-29a 及 B7H3 的干扰序列

Tab. 1 Interference sequences of miR-29a and B7H3

Name	Interference sequences(5'-3')
miR-NC	UUGUACUACACAAAAGUACUG
miR-29a inhibitor	UAACCGAUUUCAGAUGGUGCUA
si-Control	F:UUCUCCGAACGUGACGUTT R:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
si-B7H3	F:CUGAAACACUCUGACAGCAAATT R:UUUGCUGUCAGAGUUUCAGTT

1.4.4 CCK-8 实验检测细胞活力 ① DHA 处理: 将 A549、HCC827 细胞以每孔 5 000 个细胞铺入 96 孔板中, 加入梯度浓度的 DHA (0.5、10、25、50、100 μmol/L) 连续培养 3 d; ② B7H3 敲减: 将转染 48 h 后的 si-Control 和 si-B7H3 的 A549、HCC827 细胞以每孔 3 000 个细胞铺入 96 孔板中, 连续培养 3 d; 然后根据 CCK-8 试剂盒说明书, 每孔加入 10 μl 的 CCK-8 试剂, 继续孵育 1 ~ 2 h, 使用酶标仪测量每个孔在 450 nm 处的吸光度值。

1.4.5 RT-qPCR 检测 miR-29a 的表达 使用 TR-Izol 试剂按照说明书从细胞或分离总 RNA, 按照说明书, 使用 miRNA 反转录试剂盒将其逆转录为 cDNA, 然后使用 miRNA PCR 试剂盒进行检测。以 U6 作

为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算表达量。引物序列如下表 2。

表 2 PCR 引物序列

Tab. 2 PCR primer sequences

Name	Primer sequences(5'-3')
U6	F:CTCGCTTCGGGAGCACA R:AACCGCTTCACGAATTTGCGT
miR-29a-3p	F:AGCGAGGCTAGCACCATCTGA R:ATCCAGTGCAGGTCGGAGG RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACTAACCG

1.4.6 Western blot 检测 B7H3 蛋白表达 使用含 PMSF(体积比 1 : 100) 的 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞以提取总蛋白, 并使用 BCA 法进行蛋白定量。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质, 将其转移到 PVDF 膜(0.45 μm), 使用蛋白封闭液封闭 1 h, 随后与 B7H3 抗体(1 : 500 稀释)、GAPDH 抗体(1 : 5 000 稀释)4 °C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。将膜置于二抗之中, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜后于显影仪中显影, 使用 Image J 软件进行灰度分析。

1.5 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.5 进行数据分析及绘图, Image J 软件对实验结果图像进行量化分析, 以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 *t* 检验进行两组之间的比较。多组之间的差异用单因素方差分析进行比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 公共数据库分析肺腺癌中 B7H3 的表达及预后情况 从 UALCAN 数据库中获得肺腺癌 TCGA 数据及 CPTAC 数据, TCGA 数据分析显示 B7H3 mRNA 水平在肺腺癌中的表达明显高于正常组织 ($P < 10^{-12}$), 见图 1A; CPTAC 数据库分析进一步表明 B7H3 蛋白水平在肺腺癌中亦呈高表达 ($P < 10^{-6}$), 见图 1B; 并且 HPA 数据库获得的 B7H3 在正常组织与肺腺癌的免疫组化图谱也证明了这一点(图 1C)。Kaplan-Meier Plotter 数据库显示肺腺癌中 B7H3 表达水平越高, 总生存期(OS) 越低 ($P = 0.004$)(图 1D)。以上公共数据库结果分析表明 B7H3 在肺腺癌中高表达, 且与预后不良相关。

2.2 敲减 B7H3 对 A549、HCC827 细胞增殖的影响 将 si-B7H3 及其 si-Control 干扰片段转染 A549、HCC827 细胞中, 48 h 后采用 Western blot 检测

B7H3 蛋白表达验证敲减效率,结果显示(图 2A、2B),转染 si-B7H3 后显著抑制 A549 和 HCC827 细胞 B7H3 蛋白的表达($t = 17.59, P < 0.001; t = 18.42, P < 0.001$)。后续 CCK-8 实验显示 B7H3 敲

低后 A549、HCC827 细胞增殖能力显著降低($t = 12.47, P < 0.001; t = 15.85, P < 0.001$) (图 2C、2D)。这些结果进一步提示了作为免疫检查点分子的 B7H3 在肺腺癌中的促癌作用。

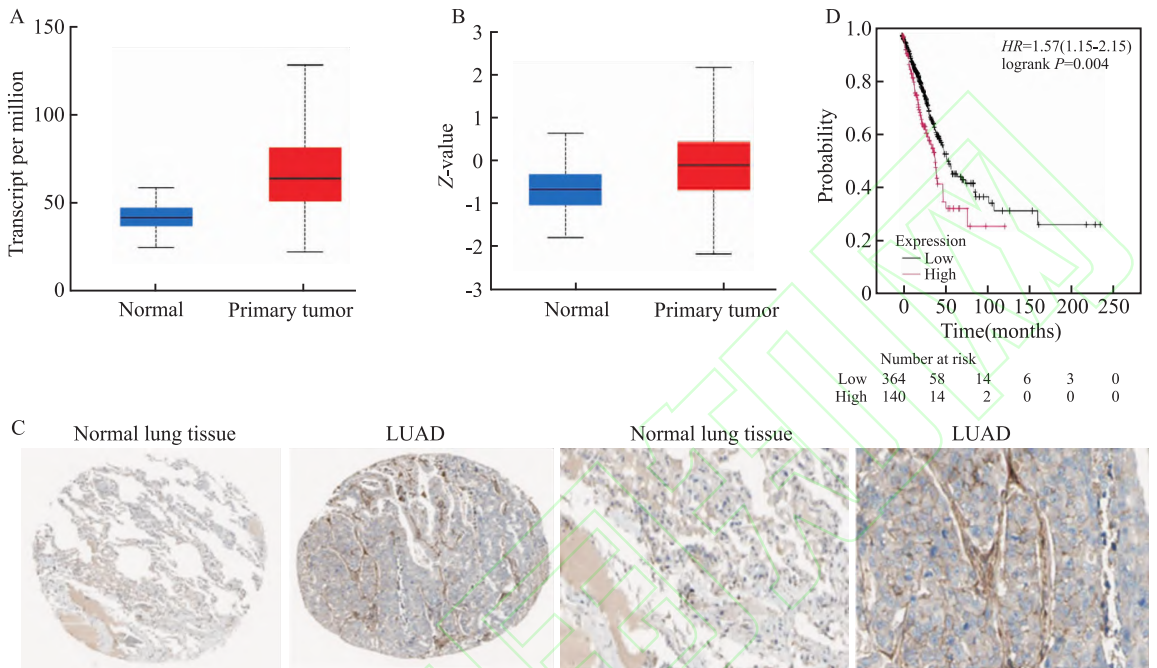


图 1 公共数据库分析肺腺癌中 B7H3 的表达及预后情况
Fig. 1 Public database analysis of B7H3 expression and prognosis in LUAD

A:TCGA data to compare B7H3 mRNA levels in normal tissues and lung adenocarcinoma; B: CPTAC data to compare B7H3 protein levels in normal tissues and lung adenocarcinoma; C: HPA database to obtain B7H3 in normal tissues and lung adenocarcinoma immunohistochemical map $\times 200$; D: Kaplan-Meier Plotter database to obtain the survival curve of lung adenocarcinoma B7H3.

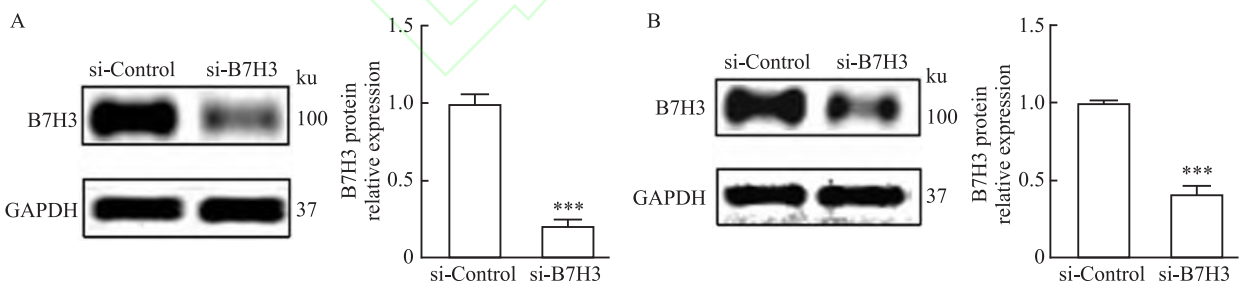
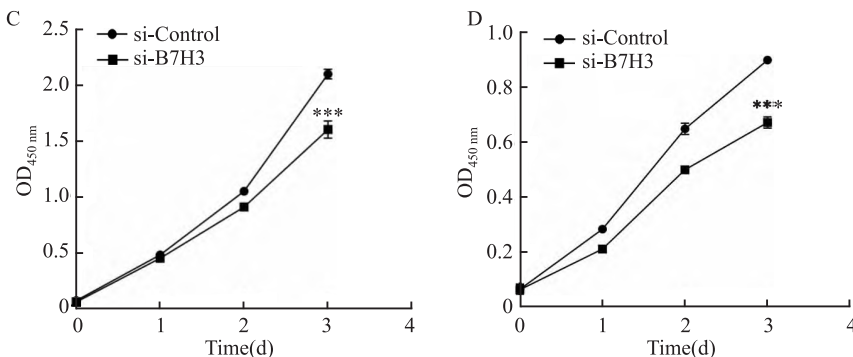


图 2 敲减 B7H3 对 A549、HCC827 细胞增殖的影响
Fig. 2 The effect of B7H3 knockdown on the proliferation of A549 and HCC827 cells

A, B: To verify the knockdown efficiency of si-B7H3 in A549 and HCC827 cells; C, D: To compare the effects of si-B7H3 on the proliferation of A549 and HCC827 cells; *** $P < 0.001$ vs si-Control group.



2.3 DHA 对 A549、HCC827 细胞增殖的影响

A549、HCC827 细胞中加入梯度浓度的 DHA (0、5、10、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 后, 以上各个处理组与对照组 (DHA 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, A549 细胞平均抑制率分别为 14.3%、20.9%、30.9%、76.1%、86.8%, HCC827 细胞平均抑制率分别为 41.7%、54.8%、77.1%、93.3%、98.1%, DHA 呈剂量依赖方式抑制细胞增殖, 见图 3A、3B。DHA 处理 A549 和 HCC827 细胞 48 h 的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentrate, IC_{50}) 分别为 30.16 $\mu\text{mol/L}$ 和 7.50 $\mu\text{mol/L}$, 选取 30 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 作为 IC_{50} 浓度处理 A549 和 HCC827 细胞, 比较 DHA 处理不同时间的细胞存活率。结果显示在 DHA 处理的 1、2、3 d 内, A549 细胞平均抑制率分别为 49.10%、73.30%、76.72%, HCC827 细胞平均抑制率分别为 44.20%、62.70%、77.80%, 表明 DHA 以时间依赖方式抑制细胞增殖, 见图 3C、3D。以上结果表明 DHA 对肺腺癌具有抑癌作用, 以剂量和时间依赖方式抑制 A549、HCC827 细胞增殖。

2.4 DHA 对 miR-29a、B7H3 的调控效果

DHA 处理细胞 48 h 后, 采用 RT-qPCR 技术检测 miR-29a 的表达。结果 (图 4A、4B) 显示实验组和对照组 (DHA 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, DHA 显著上调 A549 和 HCC827 细胞 miR-29a 的表达 ($t = 4.662, P = 0.0096$; $t = 17.23, P < 0.001$)。以两类细胞的 IC_{50} 作为参考, 进一步采用梯度浓度的 DHA 分别处理 A549 细胞 (0、5、25、50 $\mu\text{mol/L}$) 和 HCC827 细胞 (0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$), 48 h 后通过 Western blot 检测

B7H3 蛋白表达。结果显示与对照组 (DHA 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, DHA 以浓度依赖方式下调 A549 和 HCC827 细胞 B7H3 蛋白表达, 见图 4C、4D。

2.5 抑制 miR-29a 表达对 DHA 调控 B7H3 的影响

将 miR-29a inhibitor 及其对照 nc-inhibitor 以浓度 50 nmol/L 转染至 A549、HCC827 细胞, 48 h 后采用 RT-qPCR 检测转染效率, 结果显示, 与 nc-inhibitor 相比, miR-29a 的表达被 miR-29a inhibitor 显著抑制 ($t = 10.44, P < 0.001$; $t = 48.64, P < 0.0001$), 见图 5A、5B。实验分为 4 组: nc-inhibitor 组、miR-29a inhibitor 组、nc-inhibitor + DHA 组和 miR-29a inhibitor + DHA 组, 其中处理 A549 细胞 DHA 浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$, HCC827 细胞 DHA 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 48 h 后, Western blot 检测 B7H3 蛋白表达。结果显示, 抑制 miR-29a 能够上调 B7H3 表达, 并且能够部分逆转 DHA 对 B7H3 的抑制, 见图 5C、5D。以上结果表明 DHA 可通过上调 miR-29a 抑制 B7H3 表达。

3 讨论

B7H3, 也称为 CD276, 是 B7 家族的共信号分子, 在正常组织中低表达, 但在多种恶性肿瘤中作为肿瘤相关抗原过表达。有研究^[6]表明 B7H3 参与促进多种恶性肿瘤的发生和转移并且调节多种与肿瘤免疫逃逸和代谢失调相关的信号转导途径, 从而发挥促癌作用。因此, B7H3 是重要的免疫治疗靶点。该研究首先通过生物信息学验证了 B7H3 在肺腺癌中过表达, 并与预后不良相关; 后续 CCK-8 实验显示敲减 B7H3 抑制了肺腺癌细胞株的增殖, 进一步

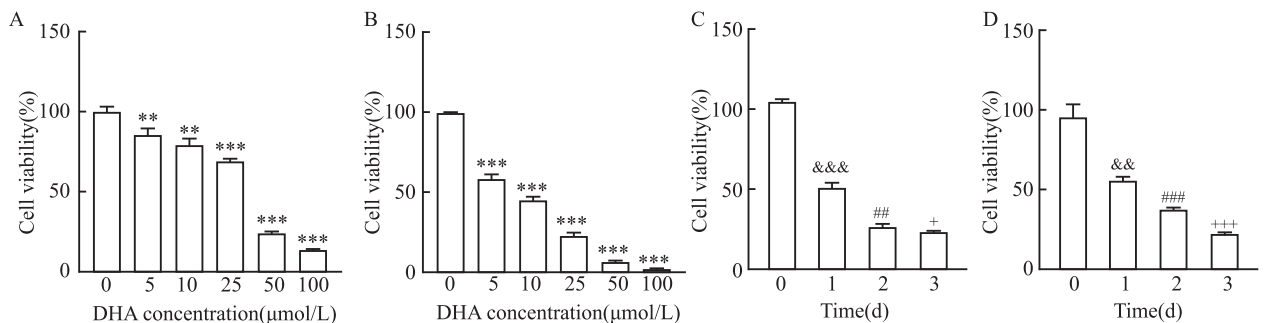


图3 DHA 对 A549、HCC827 细胞增殖的影响

Fig. 3 The effect of DHA on the proliferation of A549 and HCC827 cells

A: The survival of A549 cells treated with different concentrations of DHA; B: The survival of HCC827 cells treated with different concentrations of DHA; C: The survival of A549 cells treated with DHA at a concentration of 30 $\mu\text{mol/L}$ for 3 days; D: The survival of HCC827 treated with DHA at a concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ for 3 days; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ group; && $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$ vs 0 d group; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs 1 d group; + $P < 0.05$, +++ $P < 0.001$ vs 2 d group.

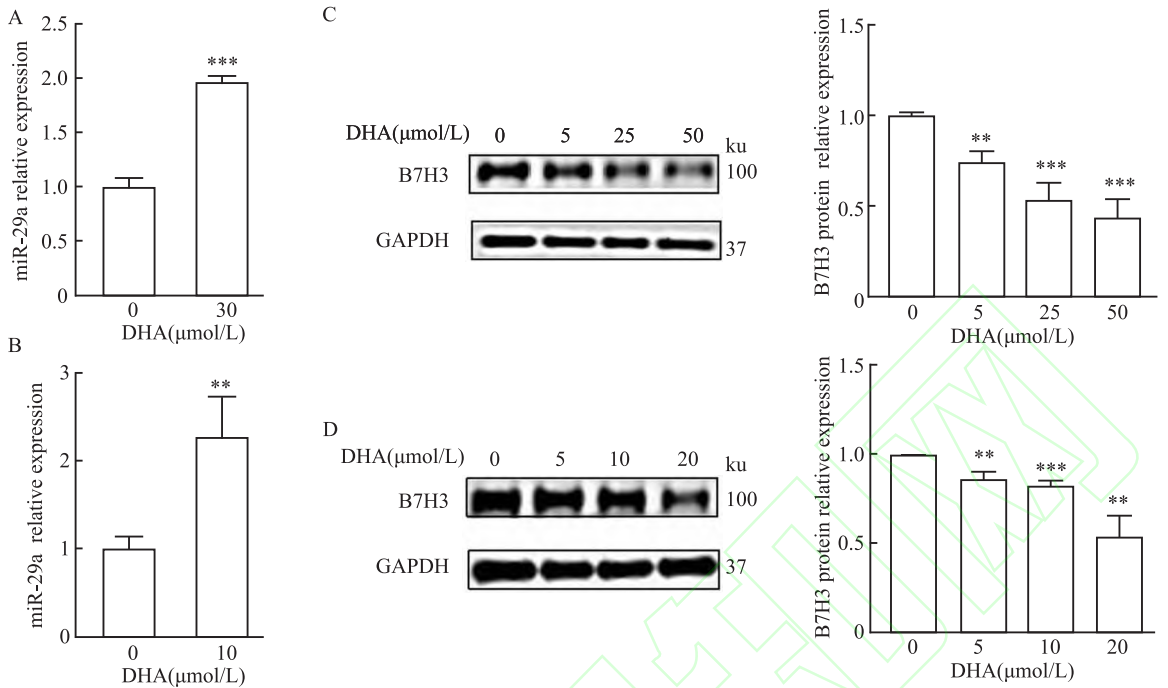


图4 DHA对miR-29a、B7H3的调控效果

Fig. 4 The regulation effect of DHA on miR-29a and B7H3

A, B: The relative expression level of miR-29a by RT-qPCR; C, D: The relative protein level by Western blot and quantitative results of B7H3; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 μmol/L group.

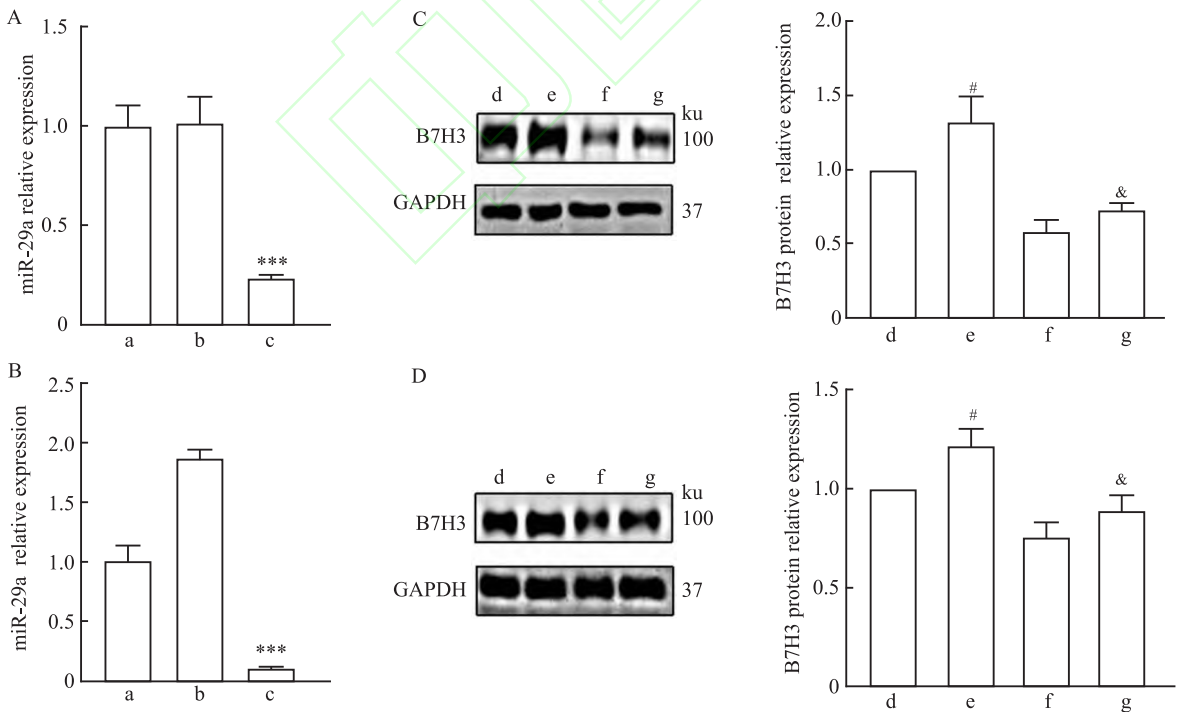


图5 抑制miR-29a表达对DHA调控B7H3的影响

Fig. 5 The effect of inhibition of miR-29a expression on DHA regulation of B7H3

A, B: Transfection efficiency of miR-29a inhibitor in A549 and HCC827 cells; C, D: The expression and quantitative results of B7H3 protein in A549 and HCC827 cells treated with each group; a: control group; b: nc-inhibitor group; c: miR-29a inhibitor group; d: nc-inhibitor group; e: miR-29a inhibitor group; f: nc-inhibitor + DHA group; g: miR-29a inhibitor + DHA group; *** $P < 0.001$ vs nc-inhibitor group; # $P < 0.05$ vs nc-inhibitor group; & $P < 0.05$ vs nc-inhibitor + DHA group.

证明了 B7H3 的促癌作用。该研究结果与前期关于 B7H3 在其他肿瘤中的作用结果一致^[7], 也与 Wu et al^[8]关于 B7H3 在肺腺癌中的结果一致, 并且该团队表明 B7H3 也促进肺腺癌的迁移以及通过 PI3K/AKT 信号通路发挥促癌作用。该课题组前期也对 B7H3 的促癌作用进行了一系列研究, 通过实验表明 B7H3 促进肺癌的增殖、转移和上皮间质化过程等方面^[4]以及 B7H3 通过 PI3K/AKT 信号通路促进肺癌血管拟态形成^[9]从而发挥促癌作用。尽管对 B7H3 的促癌作用有了一定的研究结果, 但 B7H3 介导的信号调控机制仍不明确。进一步探究 B7H3 的信号调控机制, 提高对 B7H3 介导的调控肿瘤发生的分子过程的理解有利于开发人类癌症的新的治疗策略。

青蒿素是从中药黄花蒿中提取的活性成分, 作为首选抗疟疾药被广泛关注。DHA 是其衍生物, 抗疟活性更强, 且具有在体内代谢速度快、水溶性好、毒性低等优点。除了高效的抗疟疾作用, DHA 还具有显著的抗癌效果^[2]。该课题组前期^[4]研究表明在非小细胞肺癌中 DHA 通过调控 B7H3 影响其增殖、转移、凋亡等方面发挥抗肿瘤作用。在该研究中进一步验证了 DHA 对肺腺癌细胞株增殖的抑制作用及其对 B7H3 表达调控作用。此外, Zhang et al^[10]研究表明 DHA 可能通过 ROS 介导的线粒体破坏诱导细胞凋亡, 并且诱导 ROS 依赖性的铁死亡从而抑制肺癌细胞。Zhang et al^[11]研究结果显示 DHA 通过抑制 ERK/c-Myc 信号通路导致葡萄糖摄取降低和糖酵解通路关键酶类表达下调从而调节肺癌的有氧糖酵解途径发挥抑癌作用。综上所述, DHA 作为一种潜在的抗癌药物, 展现出多途径、多靶点的抗肿瘤作用, 对肺癌抑制效果显著。深入探究 DHA 对免疫治疗靶点 B7H3 的调控机制可能为肺癌的治疗提供新思路。

miRNA 作为一类重要调节因子, 通过与 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-UTR)互补结合而发挥作用, 导致靶蛋白降解或者翻译抑制, 从而参与基因调控^[12], 在肿瘤中发挥着潜在的作用, 因此, 作为肿瘤潜在的治疗靶点被广泛研究。miR-29a 属于 miR-29 家族成员(miR-29a、miR-29b、miR-29c)之一, 已被文献^[13]报道在多种癌症中失调, 有证据^[14]表明 miR-29a 在细胞增殖、凋亡、血管生成、侵袭转移、耐药等多种细胞过程中发挥重要作用, 可见 miR-29a 在癌症的发生发展过程中发挥着重要的作用。已有研究^[5]表明 miR-29 家族与 B7H3 分子在多数实体肿

瘤中的表达水平呈负相关, 并且在多个实体肿瘤细胞系如 HeLa、NB1691 细胞系中验证了 miR-29a 对 B7H3 的靶向调控效果, 说明 miR-29a 可能通过靶向调控 B7H3 参与对人类实体肿瘤的调控。该研究表明 DHA 通过上调 miR-29a 抑制 B7H3 表达, 进一步阐明了 DHA 对肺腺癌的抑制作用分子机制。这一发现可能补充了 DHA 的抑癌机制, 为肺腺癌的治疗提供了新的靶点和策略。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209–49. doi:10.3322/caac.21660.
- [2] Dai X, Zhang X, Chen W, et al. Dihydroartemisinin: a potential natural anticancer drug[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(2): 603–22. doi:10.7150/ijbs.50364.
- [3] Yang S, Wei W, Zhao Q. B7-H3, a checkpoint molecule, as a target for cancer immunotherapy[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(11): 1767–73. doi:10.7150/ijbs.41105.
- [4] Hu B Q, Huang J F, Niu K, et al. B7-H3 but not PD-L1 is involved in the antitumor effects of Dihydroartemisinin in non-small cell lung cancer[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 950: 175746. doi:10.1016/j.ejphar.2023.175746.
- [5] Xu H, Cheung I Y, Guo H F, et al. microRNA miR-29 modulates expression of immunoinhibitory molecule B7-H3: potential implications for immune based therapy of human solid tumors[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(15): 6275–81. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4517.
- [6] Dong P, Xiong Y, Yue J, et al. B7H3 as a promoter of metastasis and promising therapeutic target[J]. *Front Oncol*, 2018, 8: 264. doi:10.3389/fonc.2018.00264.
- [7] Mortezaee K. B7-H3 immunoregulatory roles in cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 163: 114890. doi:10.1016/j.biopha.2023.114890.
- [8] Wu X, Ding C, Liu Y, et al. B7-H3 promotes proliferation and migration of lung cancer cells by modulating PI3K/AKT pathway via ENO1 activity[J]. *Transl Cancer Res*, 2024, 13(2): 833–46. doi:10.21037/ter-23-1537.
- [9] Fan X, Huang J, Hu B, et al. Tumor-expressed B7-H3 promotes vasculogenic mimicry formation rather than angiogenesis in non-small cell lung cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023, 149(11): 8729–41. doi:10.1007/s00432-023-04790-3.
- [10] Zhang Q, Yi H, Yao H, et al. Artemisinin derivatives inhibit non-small cell lung cancer cells through induction of ROS-dependent apoptosis/ferroptosis[J]. *J Cancer*, 2021, 12(13): 4075–85. doi:10.7150/jca.57054.
- [11] Zhang Y, Wang Y, Li Y, et al. Dihydroartemisinin and artesunate inhibit aerobic glycolysis via suppressing c-Myc signaling in non-small cell lung cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 198:

114941. doi:10.1016/j.bcp.2022.114941.
- [12] Saliminejad K, Khorshid H R K, Fard S S, et al. An overview of microRNAs: biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(5): 5451 – 65. doi:10.1002/jcp.27486.
- [13] Kwon J J, Factora T D, Dey S, et al. A systematic review of miR-29 in cancer[J]. *Mol Ther Oncolytics*, 2018, 12: 173 – 94. doi:10.1016/j.omto.2018.12.011.
- [14] Wang J Y, Zhang Q, Wang D D, et al. MiR-29a: a potential therapeutic target and promising biomarker in tumors[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(1): BSR20171265. doi:10.1042/BSR20171265.

miR-29a mediates the molecular regulation of dihydroartemisinin on B7H3 in lung adenocarcinoma

Zhu Yayu¹, Ling Huijuan¹, Niu Ke¹, Tang Jing¹, Chen Liwen²

(¹Dept of Clinical Laboratory, ²Dept of Blood Transfusion, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effects of microRNA-29a (miR-29a) in mediating the regulation of dihydroartemisinin (DHA) on the immune checkpoint molecule B7H3 in lung adenocarcinoma (LUAD). **Methods** The expression level and prognostic significance of B7H3 in LUAD were analyzed by public database. Small interfering RNA (siRNA) was used to knock down B7H3 in LUAD cell lines A549 and HCC827, and cell proliferation was detected by CCK-8 method. A549 and HCC827 cells were treated with gradient concentrations of DHA (0, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 48 h, and the half maximal inhibitory concentrate (IC_{50}) was calculated. A549 and HCC827 cells were treated with IC_{50} concentration of DHA for 1, 2 and 3 days, and the cell proliferation was detected by CCK-8 method. A549 and HCC827 cells were transfected with miR-29a inhibitor. After DHA treatment, the expression level of miR-29a was detected by RT-qPCR, and the expression level of B7H3 was detected by Western blot. **Results** B7H3 was overexpressed in LUAD and associated with poor prognosis. After knocking down of B7H3, the proliferation ability of A549 and HCC827 cells significantly decreased (all $P < 0.001$). DHA inhibited the proliferation of A549 and HCC827 cells in both dose- and time-dependent manners, with IC_{50} values of 30.16 $\mu\text{mol/L}$ and 7.50 $\mu\text{mol/L}$, respectively. DHA up-regulated the expression of miR-29a in A549 and HCC827 cells ($P < 0.001$, $P < 0.01$), and down-regulated the expression of B7H3 in both cell lines ($P < 0.01$, $P < 0.001$). After transfection of miR-29a inhibitor into A549 and HCC827 cells, the expression of B7H3 was up-regulated, and the down-regulation of B7H3 by DHA was partially reversed. **Conclusion** miR-29a mediates the molecular regulation of dihydroartemisinin on B7H3 in LUAD.

Key words lung adenocarcinoma; dihydroartemisinin; B7H3; miR-29a; cell proliferation

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH053170); Clinical Medical Research Translational Project of Anhui Province (No. 202304295107020019)

Corresponding author Chen Liwen, E-mail: chenliwen@ahmu.cn