论著

文章编号:1000-5404(2012)02-0158-03

3,6-二羟黄酮对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 移植瘤生长和 miRNAs 表达谱的影响

谢 艳,常 徽,舒芙蓉,赵长君,糜漫天 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与食品安全重点实验室)

[摘要] **目的** 观察3,6-二羟黄酮对 HER-2/neu 高表达人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 移植瘤生长和 miRNA 表达谱的影响。**方法** 以 18 只雌性 BALB/c 裸鼠建立乳腺癌 MDA-MB-453 细胞移植瘤模型,按照完全随机设计原则平均分入对照组和高、低剂量作用组,移植后 72 h 开始给予各处理因素,低、高剂量组分别以 10、20 mg/(kg·d)的 3,6-二羟黄酮灌胃,对照组以等量的生理盐水灌胃。每 4 天测量 1 次肿瘤体积和裸鼠体质量,处理 28 d 后取材,提取肿瘤组织总 RNA 并分离 miRNA,样品采用 PolyA Polymerase 加尾后利用 T_4RNA 连接酶将带有生物素标记的信号分子与之连接,进而与微阵列杂交,通过芯片扫描和数据分析获得 miRNAs 表达谱。**结果** 高、低剂量组移植瘤生长速度低于对照组,肿瘤体积分别在处理 12 d 和 16 d 后显著低于对照组($P<0.05$);处理 24 d 后高、低剂量组移植瘤质量均显著低于对照组($P<0.01$)。miRNAs 表达谱分析显示,高剂量组瘤组织 miRNAs 表达与对照组相比显著上调的有 12 个,显著下降的有 15 个。**结论** 3,6-二羟黄酮可显著抑制人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 移植瘤的生长并影响其 miRNAs 表达谱。

[关键词] 3,6-二羟黄酮;乳腺癌;移植瘤;microRNAs

[中图法分类号] R151.2;R730.23;R737.9 [文献标志码] A

Effects of 3,6-dihydroxyflavone on growth and microRNAs expression profile in transplanted tumor of breast cancer MDA-MB-453 cells

Xie Yan, Chang Wei, Shu Furong, Zhao Changjun, Mi Mantian (Department of Nutrition and Food Hygiene, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of 3,6-dihydroxyflavone on the growth and microRNAs expression profile in transplanted tumor of human breast cancer MDA-MB-453 cells with over-expressed HER-2/neu. **Methods** Eighteen female BALB/c nude mice were injected with MDA-MB-453 cells to establish transplanted tumor models. The mice were equally randomized into 3 groups including control group, low dose and high dose treatment groups. Oral administration of 3,6-dihydroxyflavone [0, 10 and 20 mg/(kg·d) respectively] were given to the corresponding mice in 72 h after transplantation. Tumor volumes and weights were measured every 4 d. Mice were sacrificed after 28 days' treatment. Total RNA was extracted and miRNAs were isolated. Samples were then linked with biotin-labeled signaling molecules, and were hybridized with miRNAs microarrays. **Results** The growth of transplanted tumors was significantly suppressed in treatment groups. Tumors volume were significantly smaller in high dose group and low dose group than in the control after 12 days' ($P<0.05$) and 24 days' treatment ($P<0.01$). The microarray assay showed 12 miRNAs expression in tumors of high dose group were significantly up-regulated, and 15 miRNAs expression were markedly decreased. **Conclusion** 3,6-dihydroxyflavone significantly suppresses the growth of transplanted tumor of human breast cancer MDA-MB-453 cells, and affect microRNAs expression profile.

[**Key words**] 3,6-dihydroxyflavone; breast cancer; transplanted tumor; microRNAs

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901194) and the Innovative Foundation for Young Talents of Third Military Medical University (2009XQN14). Corresponding author: Mi Mantian, Tel: 86-23-68752292, E-mail: mimt2007@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30901194);第三军医大学青年创新基金(2009XQN14)

[通信作者] 糜漫天,电话:(023)68752292,E-mail: mimt2007@126.com

微 RNA(microRNAs,miRNAs)是小 RNA 的一种,可与其靶 RNA3'端非特异区结合,引起靶 mRNA 的翻译抑制或降解,在细胞的生长、分化等过程中发挥癌基因或抑癌基因的作用。miRNAs 的发现与研究为乳腺癌的防治提供了新的途径[1]。前期研究发现 3,6-二羟黄酮具有很强的抗肿瘤作用,并对乳腺癌 MCF-7 等具有显著细胞毒性,诱导乳腺癌细胞凋亡[2-6],但其体内抗肿瘤作用尚缺乏研究。但植物黄酮抗肿瘤机制是否涉及对 miRNAs 表达和功能的影响,尚少见报道。本研究观察 3,6-二羟黄酮对 HER-2/neu 高表达人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 移植瘤生长的影响,同时利用基因芯片技术检测 3,6-二羟黄酮对移植瘤 miRNA 表达谱的影响,筛选得到差异表达的 miRNAs,为进一步研究黄酮的抗肿瘤机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

6~8 周龄健康雌性 BALB/c 裸鼠,体质量 15~20 g,由第三军医大学实验动物中心提供[scxk(军)2007015],饲养于 SPF 动物实验室。人乳腺癌细胞株 MBA-MD-453 购自中科院上海细胞所,改良型 RPMI1640 培养基购自 HyClone 公司,标准胎牛血清购自天津 TBD 公司,3,6-二羟黄酮购自 Sigma 公司,Trizol 为 Invitrogen 公司产品,GeneChip® miRNA 芯片及相关试剂盒均为美国 Affymetrix 公司产品,本芯片覆盖了 71 个物种的 miRNA,针对 7 815 个 miRNA 设计了共计 46 228 个探针,数据来自 Sanger miRBase miRNA database V11 (http://microrna.sanger.uk)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 实验裸鼠依照完全随机设计原则均分为 3 组:空白对照组、低剂量作用组和高剂量作用组,每组 6 只动物。收集对数生长期的 MDA-MB-453 细胞,PBS 漂洗 2 次,以不含血清的 RPMI1640 培养基重悬细胞,调整细胞数至 1×10^7/ml,每只 0.6 ml 右肩胛皮下注射,制造移植瘤动物模型。细胞移植后 72 h,各组开始给予各处理因素,低、高剂量组分别以 10、20 mg/(kg·d)的 3,6-二羟黄酮给予灌胃,对照组以等质量的生理盐水灌胃,每 4 天测量 1 次肿瘤体积和裸鼠体质量,共处理 28 d 取材。

1.2.2 肿瘤体积检测 使用游标卡尺测量肿瘤的最长径(a)和最短径(b),按公式求出肿瘤体积:$V(cm^3)=ab^2/2$。

1.2.3 肿瘤组织总 RNA 的提取 每组取 3 只,然后将 3 只标本混合,剪取肿瘤组织 0.1 g,制备组织匀浆,利用 Trizol 试剂抽提数次,通过相分离,RNA 沉淀,RNA 洗涤,RNA 再溶解,得到总 RNA。每个样品取 1 μl,ddH_2O 稀释 200 倍后用核酸蛋白定量仪测定 RNA 含量与纯度。整个过程使用的器械及液体均经 0.1% DEPC 水处理,戴消毒手套操作,防止 RNA 酶污染。

1.2.4 miRNAs 表达谱的检测 取 50~100 μg 总 RNA,利用 miRNA Isolation Kit 分离小 RNA,采用 PolyA Polymerase 加尾,利用 T_4 RNA 连接酶将带有生物素标记的信号分子与之连接,进行标记,然后将生物素标记的小分子 RNA 溶于 16 μl 杂交液中(15% 甲酰胺;0.2% SDS;3×SSC;50×Denhardts)。于 42 ℃与微阵列杂交过夜。杂交结束后,微阵列玻片于 42 ℃下在含 0.2% SDS 的 2×SSC 漂洗 4 min,再在 0.2×SSC 室温漂洗 4 min。玻片甩干后,用 LuxScan 10K/A 双通道激光扫描仪进行扫描,采用 Significance Analysis of Microarrays (SAM, version 2.1)软件分析有统计学意义的差异表达位点。表达谱检测由博奥生物有限公司完成。

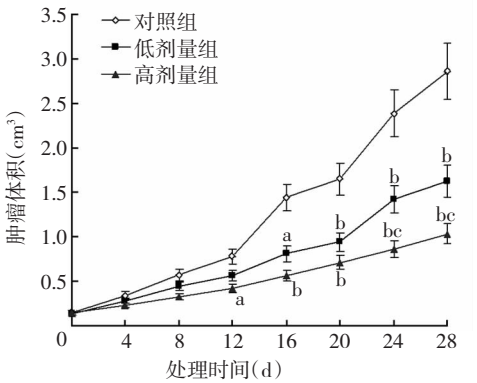
1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析,2 组间差异比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 3,6-二羟黄酮对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

各组裸鼠移植瘤成瘤率均为 100%,饲养期间动物生长状态良好,各组之间动物质量无显著差异。3,6-二羟黄酮膳食干预 2 组移植瘤生长速度均低于对照组,高、低剂量组肿瘤体积分别在处理 12 d 和 16 d 后显著低于对照组;高剂量组移植瘤生长速度低于低剂量组,并在作用 24 d 后出现显著性差异($P<0.05$)。见图 1。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,与低剂量组比较

图 1 3,6-二羟黄酮对裸鼠移植瘤生长的抑制作用

2.2 3,6-二羟黄酮对乳腺癌移植瘤 miRNA 表达谱的影响

对提取的总 RNA 进行质检,结果显示,RNA 电泳条带清晰,28S 比 18S rRNA 条带亮度接近 2:1,样品量足够,质量合格,可以进行后续实验。对高剂量组和对照组移植瘤组织进行 miRNAs 表达谱的基因芯片检测分析,结果表明 2 组之间表达水平具有显著差异的 miRNAs 有 27 个,相对对照组显著上调的有 12 个,显著下调的有 15 个。见表 1。

表1 3,6-二羟黄酮膳食干预对移植瘤组织 miRNAs 表达谱的影响

表达上调的 miRNAs			表达下降的 miRNAs		
编号	名称	比值	编号	名称	比值
1	miR-335	5.52	1	miR-27a	0.22
2	miR-125a	4.23	2	miR-155	0.28
3	miR-200c	4.07	3	miR-193b	0.31
4	let-7a	3.46	4	miR-10b	0.32
5	miR-31	3.17	5	miR-21	0.35
6	miR-125b	2.56	6	miR-181b	0.36
7	let-7b	2.45	7	miR-24	0.37
8	miR-337	2.28	8	miR-98	0.37
9	miR-34a	2.24	9	miR-29c	0.39
10	miR-127	2.15	10	miR-204	0.41
11	miR-205	2.11	11	miR-154	0.43
12	miR-126	2.09	12	miR-301	0.45
			13	miR-165	0.48
			14	miR-339	0.49
			15	miR-185	0.49

3 讨论

植物黄酮为一类天然植物多酚化合物,广泛存在于水果、蔬菜等植物性食物中。流行病学调查和实验研究发现,植物黄酮具有抗氧化、抗炎症、抗肿瘤等广泛、优良的生物学效应,特别是对于肿瘤的发生、增殖、迁移、侵袭等阶段都具有显著的抑制作用,植物黄酮抗肿瘤活性以其天然、低毒、高效而备受关注[7-8]。

我们前期药效学筛选实验发现,3,6-二羟黄酮具有很强的体外抗肿瘤活性,对乳腺癌细胞、结肠癌细胞、前列腺癌细胞、白血病细胞均表现出强细胞毒性和凋亡诱导作用,其 IC_{50} 值基本为化疗常用药物紫杉醇的 1/40 ~ 1/30,因此提示 3,6-二羟黄酮具有作为先导化合物而进一步开发为药效更强的临床抗肿瘤药物的潜力[2-6]。而 3,6-二羟黄酮的抗肿瘤作用国内外尚少见报道,特别是其体内抗肿瘤效应如何尚不清楚。本课题利用裸鼠移植瘤动物模型观察了的 3,6-二羟黄酮体内抗乳腺癌作用,结果表明,3,6-二羟黄酮膳食干预可显著抑制乳腺癌移植瘤的生长,显示出较强的体内抗乳腺癌作用。

miRNAs 是 1993 年在线虫中发现的抑制性小 RNA 分子,广泛分布在复杂动物中,是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子。miRNAs 是通过对基因表达过程中翻译过程的抑制来实现调控的,它可以抑制蛋白质翻译,剪切 mRNA,调节靶基因的表达,在动植物中参与转录后基因表达调控。越来越多的研究表明,miRNAs 参与包括肝癌、肺癌、乳腺癌、结肠癌及白血病在内的多种肿瘤的发生、发展[9-10]。乳腺癌是女性最常患的一种肿瘤,男性由于缺乏对乳腺癌的免疫能力,同样容易罹患此病。科研人员近期发现了一批作为抑癌基因和原癌基因的乳腺癌特异性 miRNAs[11-12],研究 miRNAs 在乳腺癌发生、发展中的作用对于防治乳腺癌具有重要意义。

植物黄酮抗乳腺癌作用机制中是否涉及对 miRNAs表达和功能的影响尚少见报道。本实验研究发现,3,6-二羟黄酮体内抗乳腺癌作用过程中,伴随着 miRNAs 表达谱的改变,这提示某些 miRNAs 可能在 3,6-二羟黄酮抗乳腺癌作用机制中扮演重要角色,黄酮化合物可能通过调节 miRNAs 的表达进而影响某些关键靶蛋白的活性。本研究结果对深入探讨 miRNAs 在植物黄酮抗肿瘤机制中的作用提供了参考。

参考文献:

[1] 孙晓飞. miRNA 与乳腺癌[J]. 医学信息, 2009, 1(9): 269 - 270.

[2] 王湛, 付钰洁, 常徽, 等. 桑葚花色苷的提取及对人乳腺癌细胞株 MDA-MB-453 生长的抑制[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 988 - 990.

[3] 常徽, 糜漫天, 顾艳艳, 等. 3,6-二羟基黄酮对多种肿瘤细胞的增殖抑制及凋亡诱导作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16): 1566 - 1568.

[4] Chang H, Lin H, Yi L, *et al*. 3, 6-Dihydroxyflavone induces apoptosis in leukemia HL-60 cell *via* reactive oxygen species-mediated p38 MAPK/JNK pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 648(1/3): 31 - 38.

[5] Chang H, Mi M, Ling W, *et al*. Structurally related anticancer activity of flavonoids: involvement of reactive oxygen species generation[J]. J Food Biochem, 2010, 34(s1): 1 - 14.

[6] Chang H, Mi M, Ling W, *et al*. Structurally related cytotoxic effects of flavonoids on human cancer cells *in vitro*[J]. Arch Pharm Res, 2008, 31(9): 1137 - 1144.

[7] Hui C, Bin Y, Xiaoping Y, *et al*. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Nutr Cancer, 2010, 62(8): 1128 - 1136.

[8] Theodoratou E, Kyle J, Cetnarskyj R, *et al*. Dietary flavonoids and the risk of colorectal cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(4): 684 - 693.

[9] Kim Y K, Kim V N. Processing of intronic microRNAs[J]. EMBO J, 2007, 26(3): 775 - 783.

[10] Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?[J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(2): 102 - 114.

[11] 孙建国, 廖荣霞, 周度金, 等. 基于基因芯片的乳腺癌干细胞 miRNAs 检测分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(13): 1280 - 1282.

[12] 黄秀芳, 邵建永, 颜黎栩, 等. 乳腺癌差异表达的 MicroRNA 的筛选研究[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2009, 30(1): 69-73, 77.

(**收稿**:2011-07-01;**修回**:2011-08-29)

(编辑 张 维)