

· 论 著 ·

## 3,6-二羟黄酮抗乳腺癌发生过程中 miRNA 表达谱的变化\*

常 徽, 王 湛, 谢 艳, 糜漫天<sup>△</sup>

(第三军医大学营养与食品安全研究中心/重庆市营养与食品安全重点实验室, 重庆 400038)

**摘要:**目的 观察 N-甲基-N-亚硝脒(MNU)诱导大鼠乳腺癌发生过程中 miRNA 表达谱的变化及 3,6-二羟黄酮膳食干预的影响。方法 雌性 SD 大鼠分为自然对照组、模型对照组和实验组, 实验组给予 3,6-二羟黄酮灌胃(20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 两对照组给予生理盐水灌胃, 实验组和模型对照组一次注射 MNU 50 mg/kg, 诱发乳腺癌, 各组分组喂养 18 周, 观察肿瘤发生率。另取雌性 SD 大鼠以前述方法分组和处理, 分别于 MNU 注射 0、4、8、18 周取材, 提取乳腺组织总 RNA 并分离 miRNA, 利用微阵列杂交, 通过芯片扫描和数据分析获得 miRNA 表达谱。结果 实验组乳腺癌发生率显著低于模型对照组。miRNA 表达谱分析结果表明, MNU 注射 4、8、18 周时分别检测到 11、12 和 17 个 miRNA 表达显著上调, 18、17 和 18 个 miRNA 表达显著下降; 与模型对照组相比, 实验组在 4、8、18 周时分别检测到 10、15 和 11 个 miRNA 表达显著上调, 9、10 和 12 个 miRNA 表达显著下降。结论 3,6-二羟黄酮可显著抑制 MNU 诱导的大鼠乳腺癌发生, 并影响 miRNA 表达谱变化。

**关键词:** 3,6-二羟黄酮; 乳腺肿瘤; 微 RNAs

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.31.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)31-3243-03

**Effects of 3,6-dihydroxyflavone on the miRNA expression profile in breast carcinogenesis\***Chang Hui, Wang Zhan, Xie Yan, Mi Mantian<sup>△</sup>

(Research Center of Nutrition and Food Hygiene, Third Military University/Chongqing

Key Laboratory of Nutrition and Food Safety, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of 3,6-dihydroxyflavone on the miRNA expression profile in 1-methyl-1-nitrosourea(MNU)-induced breast carcinogenesis of rats. **Methods** Female SD rats were equally randomized into 3 groups including normal control, model control and treatment groups. Rats in treatment groups were fed orally with 20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> of 3,6-dihydroxyflavone; rats in the normal and model control groups were fed orally with vehicle alone(normal saline). Except the normal control group, all the rats were given a single intraperitoneal injection of MNU(50 mg/kg). 18 weeks later, we calculated the tumor incidence in each group. In the same way as mentioned above, the total RNA in breast tissue of rats was extracted at 0, 4, 8, 18 weeks after MNU injection, and miRNA were isolated and hybridized with miRNA microarrays. **Results** Oral administration of 3,6-dihydroxyflavone significantly decreased the cancer incidence of MNU-induced breast carcinogenesis. MiRNA array analysis revealed that after MNU injection for 4, 8, 18 weeks, 11, 12 and 17 miRNA were up-regulated respectively, whereas 18, 17 and 18 miRNA were down-regulated. In comparison to the control, 10, 15, 11 miRNA were up-regulated in treatment group at 4, 8, 18 weeks respectively, while 9, 10, 12 were down-regulated. **Conclusion** Oral administration of 3,6-dihydroxyflavone effectively suppressed MNU-induced carcinogenesis in rats, and affected the miRNA microarrays.

**Key words:** 3,6-dihydroxyflavone; breast neoplasms; microRNAs

微 RNA(microRNA, miRNA) 是小 RNA 的一种, 可与其靶 RNA 的 3' 端非特异位结合, 引起靶信使 RNA(mRNA) 的翻译抑制或降解。研究发现, 某些 miRNA 在肿瘤的发生和发展过程中扮演非常重要的角色, 起到癌基因或抑癌基因的作用<sup>[1-3]</sup>。miRNA 的发现与研究为乳腺癌的防治提供了新的途径<sup>[4-6]</sup>。植物黄酮抗肿瘤作用研究一直受到关注, 但其抗肿瘤机制是否涉及对 miRNA 表达和功能的影响, 国内外尚少见报道。本研究前期药效学筛选试验发现 3,6-二羟黄酮具有很强的抗肿瘤作用<sup>[7-9]</sup>, 但其体内抗肿瘤发生效应尚缺乏研究。本研究观察 3,6-二羟黄酮对 N-甲基-N-亚硝脒(MNU) 诱导大鼠乳腺癌发生的抑制作用, 同时利用基因芯片技术检测大鼠乳腺组织 miRNA 表达谱的变化, 现报道如下。

**1 材料与方****1.1 材料** 6~7 周龄健康雌性 SD 大鼠, 体质量 145~165 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。雌性 SD 大鼠依照完全随机设计原则均分为自然对照、模型对照和实验组, 自然对照组 8 只, 模型对照和实验组各 14 只。MNU 和 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 动物处理** 实验组给予 3,6-二羟黄酮灌胃(20 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), 两对照组给予生理盐水灌胃, 实验组和模型对照组一次注射 MNU 50 mg/kg, 制造乳腺癌动物模型, 自然对照组注射生理盐水, 分组喂养 18 周, 观察各组肿瘤发生率。另取

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901194); 第三军医大学青年创新基金资助项目(2009XQN14)。△ 通讯作者, Tel:(023) 68752291; E-mail:mimt2007@126.com。

雌性 SD 大鼠,以前述方法分组和处理,每组 12 只,分别于 MNU 注射 0、4、8、18 周取材,提取乳腺组织总 RNA 并分离 miRNA,通过芯片扫描和数据分析获得 miRNA 表达谱。

**1.2.2 乳腺组织总 RNA 的提取** 剪取大鼠乳腺组织 0.1 g,制备组织匀浆,利用 Trizol 试剂抽提数次,常规提取总 RNA。每个样品取 1  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 稀释 200 倍后用核酸蛋白定量仪测定 RNA 含量与纯度。整个过程所有使用的器械及液体均经 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 水处理,戴消毒手套操作,防止 RNA 酶污染。

**1.2.3 miRNA 表达谱的检测** 取 50~100  $\mu$ g 总 RNA,利用 miRNA Isolation Kit 分离小 RNA,采用 PolyA Polymerase 加尾,利用 T4 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  $\mu$ L 杂交液中[15% 甲酰胺,0.2% 聚丙烯酰胺 (SDS),3 $\times$  柠檬酸钠缓冲液 (SSC),50 $\times$  纯化试剂 (Denhardt's)]。于 42  $^{\circ}$ C 与微阵列杂交过夜。杂交结束后,微阵列玻片于 42  $^{\circ}$ C 下用含 0.2% SDS 的 2 $\times$ SSC 漂洗 4 min,再在 0.2 $\times$ 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,采用微阵列显著点分析 (SAM) 2.1 版软件分析有统计学意义的差异表达位点。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析,肿瘤发生率的比较采用  $\chi^2$  检验,两组间差异比较采用 *t* 检验,所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 3,6-二羟黄酮膳食干预对乳腺癌发生的抑制作用 实验

结束时,3 组大鼠之间体质量差异无统计学意义,表明 3,6-二羟黄酮膳食处理对大鼠无明显毒副作用。自然对照组大鼠无乳腺肿瘤发生。与模型对照组相比,实验组乳腺肿瘤发生率降低了 35.8%,显著低于模型对照组,表明 3,6-二羟黄酮膳食处理能够显著抑制化学致癌剂 MNU 诱导的大鼠乳腺肿瘤发生,见表 1。

表 1 3 组膳食干预对 MNU 诱导大鼠乳腺肿瘤发生率及体质量的影响

组别	<i>n</i>	肿瘤发生率 (%)	大鼠体质量 ( $\bar{x} \pm s, g$ )
自然对照组	8	0.0	291 $\pm$ 5
模型对照组	14	92.9	281 $\pm$ 4
实验组	14	57.1*	278 $\pm$ 5

\*:  $P < 0.05$ ; 与模型对照组比较。

**2.2 大鼠乳腺肿瘤发生过程中 miRNA 表达谱的变化及 3,6-二羟黄酮膳食干预的影响** miRNA 芯片检测结果表明,致癌剂 MNU 注射后,大鼠乳腺组织 miRNA 表达谱发生显著变化,其中 MNU 注射 4 周时,模型对照组检测到 11 个 miRNA 表达显著上调,18 个 miRNA 表达显著下降;8 周时 12 个 miRNA 表达显著上调,17 个显著下降;18 周时 17 个显著上调,18 个显著下降,见表 2。与模型对照组相比,实验组 4 周时检测到 10 个 miRNA 表达显著上调,9 个 miRNA 表达显著下降;8 周时 15 个 miRNA 表达显著上调,10 个显著下降;18 周时 11 个显著上调,12 个显著下降,见表 3。这些 miRNA 可能在 3,6-二羟黄酮抗乳腺癌发生过程中发挥作用。

表 2 MNU 诱导大鼠乳腺肿瘤发生过程中 miRNA 表达谱的变化

表达变化	4 周	8 周	18 周
显著上调	mir-21, mir-7a, mir-193, mir-27a, mir-10b, mir-181b, mir-293, mir-301a, mir-379, mir-199a, mir-128	mir-301a, mir-181b, mir-128, mir-144, mir-374, mir-291b, mir-193, mir-181d, mir-27a, mir-191, mir-25, mir-21	mir-29c, mir-193, mir-21, mir-10b, mir-25, mir-365, mir-374, mir-128, mir-154, mir-361, mir-185, mir-203, mir-339, mir-301a, mir-98, mir-191, mir-27a
显著降低	mir-206, mir-31, mir-24, mir-494, mir-126, mir-125a, let-7a, mir-100, mir-132, mir-30a, mir-632, mir-141, mir-29a, mir-423, mir-34a, mir-200c, mir-497, mir-1224	mir-17, mir-206, mir-24, mir-125a, mir-200c, mir-100, mir-143, let-7a, mir-20b, mir-125b, mir-18a, mir-99a, let-7b, mir-145, mir-497, mir-34a, mir-30a	mir-17, mir-320, mir-210, let-7a, mir-100, mir-132, mir-200c, mir-99a, mir-497, mir-125a, mir-34a, mir-494, let-7b, mir-145, mir-26a, mir-130a, mir-126, mir-19b

表 3 与模型对照组相比实验组大鼠 miRNA 表达谱的变化

表达变化	4 周	8 周	18 周
显著上调	mir-31, mir-34a, mir-24, mir-494, let-7a, mir-339, mir-632, mir-98, mir-141, mir-423,	mir-18a, mir-34a, mir-125a, mir-206, mir-93, mir-342, mir-423, mir-205, mir-125b, let-7a, mir-221, mir-145, mir-10a, mir-16, mir-15b	mir-34a, mir-320, mir-210, mir-125a, mir-429, mir-99a, mir-17, mir-497, mir-18a, mir-130a, mir-26a
显著降低	mir-21, mir-7a, mir-193, mir-27a, mir-181b, mir-22, mir-26a, mir-301a, mir-379	mir-181b, mir-128, mir-301a, mir-144, mir-22, mir-191, mir-193, mir-181d, mir-21, mir-132	mir-21, mir-31, mir-29c, mir-185, mir-361, mir-365, mir-191, mir-200b, mir-22, mir-339, mir-30a, mir-206

## 3 讨 论

植物黄酮为一类天然植物多酚化合物,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生物学效应,特别是其抗肿瘤活性以其天然、低毒、高效而备受关注<sup>[10-11]</sup>。本研究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<sup>[7-9]</sup>。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。MNU 诱导大鼠乳腺肿瘤发生是研究乳腺癌发生的经典动物模型,本课题利用此动物模型观察了 3,6-二羟黄酮抗乳腺癌发生的效应,结果表

明,3,6-二羟黄酮膳食干预可显著抑制致癌剂诱导的大鼠乳腺肿瘤发生,显示出较强的乳腺癌化学预防作用。

miRNA 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,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,miRNA 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<sup>[12-13]</sup>。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力,同样容易罹患此病。有研究发现作为抑癌基因和原癌基因的乳腺癌特异性 miRNA,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<sup>[14-15]</sup>。

植物黄酮抗乳腺癌作用机制中是否涉及对 miRNA 表达和功能的影响,尚少见报道,本实验研究发现,3,6-二羟黄酮抗乳腺癌发生过程中,伴随着 miRNA 表达谱的改变,提示某些 miRNA 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 miRNA 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 miRNA 在植物黄酮抗肿瘤机制中的作用提供了参考。

#### 参考文献:

- [1] 刘展,张明亮,李毅妮,等. siRNA 抑制 p63 基因表达对胆管癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012,32(2):207-210.
- [2] 姜昌丽,王惠莹. 微小 RNA 在结直肠癌中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(3):355-357.
- [3] Hui C, Yujie F, Lijia Y, et al. MicroRNA-34a and microRNA-21 play roles in the chemopreventive effects of 3, 6-dihydroxyflavone on 1-methyl-1-nitrosourea-induced breast carcinogenesis[J]. Breast Cancer Res, 2012,14(3):R80.
- [4] 孙晓飞. miRNA 与乳腺癌[J]. 医学信息:下旬版, 2009, 22(9):269-270.
- [5] 李川,马纪,张越,等. 慢病毒介导的 shRNA 靶向干扰 nestin 鼻咽癌稳定细胞株的建立[J]. 南方医科大学学报,

2011,31(4):604-609.

- [6] 梁艳,李涛,周克元. 慢病毒载体在 RNA 干扰中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010,31(11):1282-1284.
- [7] 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):31-38.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Chang H, Yu B, Yu X, et al. Anti-cancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. Nutr Cancer, 2010,62(8):1-9.
- [11] 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.
- [12] Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs[J]. EMBO J, 2007,26(3):775-783.
- [13] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers insight? [J]. Nat Rev, 2008,9(2):102-114.
- [14] 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.
- [15] 黄秀芳,邵建永,颜黎栩,等. 乳腺癌差异表达的 miRNA 的筛选研究[J]. 中山大学学报, 2009,30(1):69-73.

(收稿日期:2012-03-16 修回日期:2012-07-29)

(上接第 3242 页)

- [5] 张雨平,黄其林,赵聪敏,等. 大鼠不同发育期脑神经元核抗原的表达研究[J]. 重庆医学, 2010,39(21):2901-2903.
- [6] Peng IF, Wu CF. Differential contributions of Shaker and Shab K<sup>+</sup> currents to neuronal firing patterns in Drosophila[J]. J Neurophysiol, 2007,97(1):780-794.
- [7] Kim SH, Lu HF, Alano CC. Neuronal Sirt3 protects against excitotoxic injury in mouse cortical neuron culture[J]. PLoS One, 2011,6(3):e14731.
- [8] 王英,车宇,苗建亭,等. 新生大鼠海马神经元原代培养方法的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2003,19(2):197-199.
- [9] Lesuisse C, Martin LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death[J]. J Neurobiol, 2002,51(1):9-23.
- [10] Vergun O, Sobolevsky AI, Yelshansky MV, et al. Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture[J]. J Physiol, 2001,531(Pt 1):147-163.

- [11] 陈秀,陈丽芬,吴万福,等. 缺氧对离体培养的海马神经元兴奋性的影响[J]. 重庆医学, 2011,40(13):1267-1262.
- [12] 徐祖才,刘华,陈阳美. 海马神经元癫痫样放电后 ERK1/2 信号通路与 C-fos 的相关性[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(23):1639-1642.
- [13] Xu ZC, Chen YM, Xu P, et al. Epileptiform discharge up-regulates p-ERK1/2, growth-associated protein 43 and synaptophysin in cultured rat hippocampal neurons[J]. Seizure, 2009,18(10):680-685.
- [14] 徐祖才,徐平,陈阳美,等. 无镁损伤海马神经元后 ERK1/2 核转移的动态变化[J]. 中华创伤杂志, 2009, 25(8):735-738.
- [15] Arthur JL, Scarpini CG, Connor V, et al. Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro[J]. J Virol, 2001,75(8):3885-3895.

(收稿日期:2012-04-24 修回日期:2012-07-25)