

· 基础研究 ·

木犀草素抑制 microRNA-21 的表达诱导乳腺癌细胞凋亡

王丽娟¹, 王 静²

(1. 济南军区联勤部干休一所, 济南 250002; 2. 郑州解放军 153 医院心肾一科, 郑州 450042)

摘要:目的 研究植物黄酮化合物木犀草素(luteolin)对乳腺癌细胞的凋亡诱导效应,并探讨 microRNA-21(miR-21)在其中的作用。方法 以 MTT 法检测细胞活力变化;Annexin V/PI 双染流式细胞仪分析细胞凋亡;Western blot 法检测胞内细胞色素 C(Cyt C)的水平;定量 RT-PCR 检测 miR-21 的表达水平;通过构建 miR-21 质粒表达载体并转染乳腺癌细胞上调 miR-21 的表达。结果 细胞活力检测结果表明,木犀草素可显著降低乳腺癌细胞 MDA-MB-453 的增殖活力;流式细胞凋亡分析和 Western blot 检测结果表明,木犀草素可显著诱导乳腺癌细胞凋亡,并呈现剂量-效应关系;进一步研究显示,木犀草素可显著降低乳腺癌细胞 miR-21 的表达,而胞内 miR-21 表达水平的上调可显著降低木犀草素对乳腺癌细胞的凋亡诱导作用和细胞毒性。结论 木犀草素可显著抑制乳腺癌细胞增殖并诱导凋亡,其机制涉及对 miR-21 表达的抑制。

关键词:木犀草素;乳腺肿瘤;microRNA-21;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.021

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)12-1374-03

Luteolin induced apoptosis in breast cancer cell by decreasing the expression of microRNA-21

Wang Lijuan¹, Wang Jing²

(1. First Retired Cadres Health Center, Joint Logistics Department of the Jinan Military Area Command, Jinan, Shandong 250002, China; 2. First Department of Cardiovascular and Nephrology, 153th Hospital of PLA, Zhengzhou, Henan 450042, China)

Abstract: Objective To observe the anticancer activity of luteolin on breast cancer cells, and investigate the role of microRNA-21(miR-21) in the effect. Methods Cells viability was assessed by MTT method. Cell apoptosis was analyzed by using Annexin V/PI dyeing by flow cytometry. The level of Cyt C was tested by Western blot. MiR-21 was evaluated by real time quantitative reverse transcription PCR(RT-PCR). The plasmids expressing miR-21 was constructed to up-regulate the expression of miR-21 in breast cancer cells. Results Luteolin significantly inhibited the proliferation of breast cancer cell MDA-MB-453. The cytometry analysis and Western blot detection showed luteolin markedly induced apoptosis in breast cancer cells through increasing the level of Cyt C. Further studies indicated that luteolin decreased the expression of miR-21, and the up-regulation of miR-21 could significantly reduce the pro-apoptosis effect of luteolin on breast cancer cells. Conclusion Luteolin could significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis in breast cancer cells, which could inhibit the expression of miR-21.

Key words: luteolin; breast neoplasms; microRNA-21; apoptosis

植物黄酮是一大类天然植物多酚化合物,广泛分布于蔬菜、水果等植物性食物中,其抗癌作用一直备受关注^[1]。日常膳食中的黄酮化合物主要包括:槲皮素、芹菜苷、木犀草素、儿茶素、杨梅素、山奈酚等,其中木犀草素在各种蔬菜、水果中广泛分布,特别是在甘蓝、菜花、甜菜、辣椒等食物中含量较高,有研究表明木犀草素具有抗肿瘤作用,但其作用机制尚不清楚^[2-3]。微 RNA(microRNAs, miRNAs)是小 RNA 的一种,可与其靶 mRNA 的 3'端非特异区结合,引起靶 mRNA 的翻译抑制或降解,在肿瘤的发生、发展过程中扮演重要角色^[4-5]。miR-21 在多种肿瘤组织特别是乳腺癌细胞中过表达,被认为是一种重要的癌基因^[6]。本实验研究木犀草素对乳腺癌细胞的凋亡诱导效应,并探讨 miR-21 在其中的作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 木犀草素、四唑盐(MTT)和二甲亚砜(DMSO)均为 Sigma 公司产品,Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于晶美生物工程公司,细胞色素 C(Cyt C)抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司,Trizol 试剂、pcDNA6.2-GW/EmGFP 质粒和 lipofectamine 2000 转染试剂盒购于 Invitrogen 公司,BioEasy SYBR green I real-time PCR 检测试剂盒购于杭州博日科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-453 细胞购于中国科学院生物化学与细胞生物学研究所,培养于含 10% 标准胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,于 37℃、5%CO₂ 条件下常规培养传代。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力 将对数生长期细胞以 5×10⁴/mL 密度接种于 24 孔培养板中,加入处理因素,培养 24 h,收获细胞前 4 h,每孔加入 40 μL MTT(5 mg/mL),去除培养液,每孔加入 200 μL DMSO,避光、室温震荡 10 min,用酶联仪在 490 nm 处测定各组吸光度(OD₄₉₀)值。

1.2.3 细胞凋亡检测 细胞用 4℃ 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞 2 次,用 250 μL 稀释的混合缓冲液重新悬浮细胞,并使其浓度为 1×10⁶/mL,取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 流式管中,加 5 μL Annexin V/FITC 溶液和 10 μL 的碘化丙啶(PI)溶液(20 μg/mL),混匀后于室温避光放置 15 min,在反应管中加 400 μL 磷酸盐缓冲液(PBS),流式细胞仪上机检测。

1.2.4 Cyt C 水平检测 细胞裂解液 200 μL 充分裂解细胞,12 000 r/min,离心 5 min,分离胞浆溶液,常规提取蛋白并检测浓度,以 12.5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移蛋白至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(1:200)4℃ 封闭过夜,辣根过氧化物酶标记,二抗(1:4 000)孵育 1 h,显色曝光。

1.2.5 miR-21 表达的检测 利用 Trizol 试剂提取细胞总

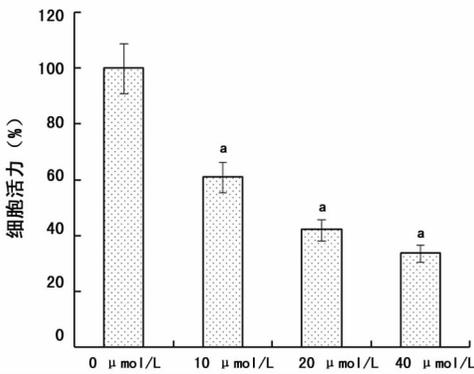
RNA,采用 BioEasy SYBR green I real-time PCR 试剂盒行 qPCR 检测,以 U6 RNA 为内参。miR-21 的 RT 引物序列为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACT CAA CA-3',PCR 引物序列为上游:5'-GCC CGC TAG CTT ATC AGA CTG ATG-3',下游:5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3';U6 的 RT 引物序列为 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAA ATA TG-3',PCR 引物序列为上游:5'-GCG CGT CGT GAA GCG TTC-3',下游:5'-GTG CAG GGT CCG AGG T-3'。

1.2.6 miR-21 质粒表达载体的构建及转染 参照文献[7]所述,利用 PCR 扩增 MDA-MB-453 细胞基因组 miR-21 基因,PCR 引物序列为上游:5'-GAA TTC CGA TCT TAA CAG GCC AGA AAT GC-3',下游:5'-AGA TCT CCA CCA GAC AGA AGG ACC AGA GT-3'。扩增产物插入 pcDNA6.2-GW/EmGFP 质粒载体,构建 pcDNA6.2-GW/miR-21 表达质粒,常规转化大肠杆菌并扩增。提取质粒,利用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒将质粒转染乳腺癌细胞,转染 48 h 后进行实验,以荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达,确定转染成功。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

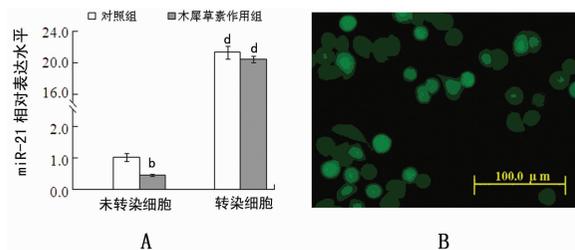
2 结果

2.1 木犀草素抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-453 增殖并诱导凋亡 细胞活力检测结果表明,10 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素作用乳腺癌细胞 MDA-MB-453 24 h 可显著降低其细胞活力,抑制乳腺癌细胞的增值,并显示出剂量-效应关系(图 1)。同时,流式细胞凋亡分析结果表明(图 2),木犀草素作用乳腺癌细胞 24 h 可显著升高凋亡率,并呈现剂量-效应关系;进一步研究证实,木犀草素作用乳腺癌细胞后,凋亡启动因子 Cyt C 的水平在 12 h 后显著升高(图 3)。以上结果表明,木犀草素可显著抑制乳腺癌细胞的增殖,同时诱导胞内 Cyt C 的释放,引起凋亡发生。



a: $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较。

图 1 不同浓度木犀草素作用 24 h 对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 细胞活力的影响

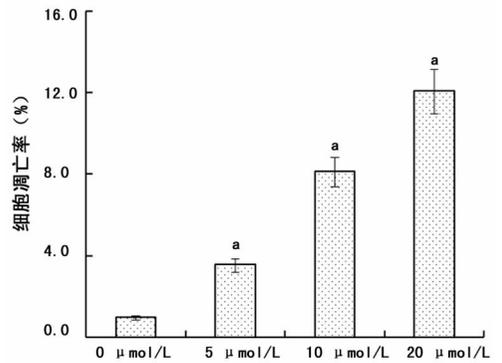


A: miR-21 的表达; B: miR-21 荧光显微镜结果; C: 细胞活力; D: 凋亡率。a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ 与对照组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与未转染细胞组相比。

图 4 10 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 及其 pcDNA6.2/miR-21 转染细胞

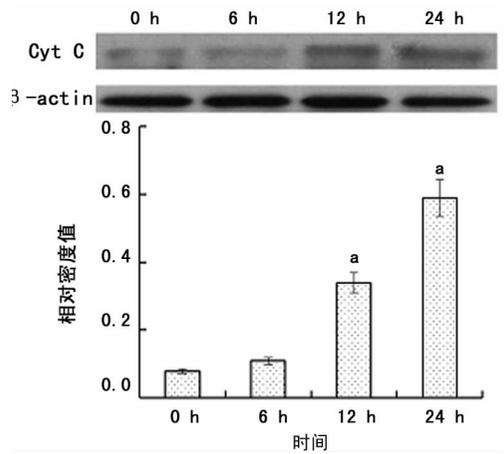
2.2 木犀草素抑制乳腺癌细胞 miR-21 的表达 利用定量 RT-PCR 检测乳腺癌细胞 MDA-MB-453 胞内 miR-21 表达水平的变化,结果显示,10 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素作用乳腺癌细胞 24 h,细胞胞内 miR-21 的表达水平显著降低,表明木犀草素能够显著抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-453 miR-21 的表达,见图 4A。

2.3 miR-21 表达的上调对木犀草素抗乳腺癌效应的影响 构建 miR-21 质粒表达载体 (pcDNA6.2-GW/miR-21) 并转染乳腺癌细胞 MDA-MB-453,荧光显微镜观察结果(图 B)可见,质粒转染后胞内绿色荧光蛋白表达并发出绿色荧光;miR-21 检测结果(图 4A)显示,质粒转染细胞胞内 miR-21 表达水平显著升高,可有效阻断木犀草素对乳腺癌细胞 miR-21 表达的降低作用。细胞活力检测和凋亡分析结果(图 4C、D)显示,miR-21 表达的上调可显著降低木犀草素对乳腺癌细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用,这表明 miR-21 在木犀草素抗乳腺癌机制中发挥重要作用。



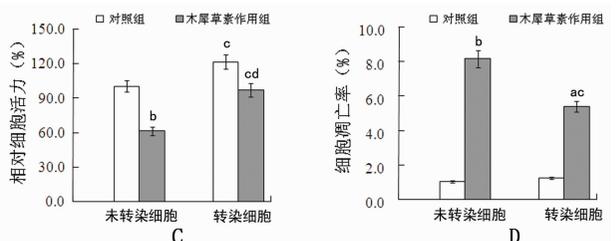
a: $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较。

图 2 不同浓度木犀草素作用 24 h 对乳腺癌细胞 MDA-MB-453 凋亡的影响



a: $P < 0.01$, 与 0 h 比较。

图 3 10 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素作用乳腺癌细胞 MDA-MB-453 后胞内 Cyt C 水平的变化



3 讨 论

流行病学调查和实验研究证实,蔬菜、水果等植物性食物的摄入量与许多慢性病特别是肿瘤的发病率呈负相关,这使得人们认识到,存在于这些食物中的某些活性成分对于人类健康极为重要^[8],植物类黄酮就是这些重要活性化合物中的一类。植物类黄酮为一大类天然植物多酚化合物,种类繁多,但这些化合物分子结构中都具有 C6-C3-C6 碳架的基本结构特征^[9]。乳腺癌是世界范围内导致女性死亡的主要癌症,探讨如何通过膳食营养途径有效防治乳腺癌,对于维护女性生命健康具有积极意义。

MicroRNAs 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小 RNA 分子,它可以与其靶 mRNA 的 3' 端非特异区结合,并招募相关活性蛋白质,进而引起靶 mRNA 降解,抑制靶基因的蛋白质翻译,发挥转录后基因表达调控作用。越来越多的研究显示,miRNAs 在众多细胞生命过程中发挥重要作用,对于细胞周期调控、细胞增殖、分化、凋亡以及干细胞特性等都具有显著影响,而 microRNA 的异常表达和调控在很多疾病特别是肿瘤的发生、发展过程中发挥明显作用,因此成为近期肿瘤研究中的一个热点。某些 microRNAs 在多种肿瘤组织中显著高表达,发挥癌基因作用,目前对于 miR-21 的研究广受关注,miR-21 在乳腺癌、肺癌、直肠癌等多种癌组织细胞中高表达,特别是在乳腺癌发生、发展过程中,miR-21 的过量表达发挥着显著癌基因效应^[10-11],但其详细作用机制尚需要深入研究。植物黄酮化合物抗肿瘤研究一直备受关注,但其作用机制是否涉及对关键 microRNA 的影响研究较少。本研究结果表明,miR-21 在木犀草素诱导乳腺癌细胞凋亡过程中发挥重要作用,木犀草素至少部分是通过抑制 miR-21 的表达水平发挥促凋亡作用的。木犀草素是如何抑制 miR-21 的表达,其抗肿瘤作用机制是否还涉及对其他关键 microRNAs 的影响等,尚需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Kyle JA, Sharp L, Little J, et al. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study[J]. *Br J Nutr*, 2010, 103(3): 429-436.
 - [2] Rao PS, Satelli A, Moridani M, et al. Luteolin induces apoptosis in multidrug resistant cancer cells without affecting the drug transporter function; Involvement of cell line-specific apoptotic mechanisms[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(11): 2703-2714.
 - [3] Zhao Y, Yang G, Ren D, et al. Luteolin suppresses growth and migration of human lung cancer cells[J]. *Mol Biol Reports*, 2011, 38(2): 1115-1119.
 - [4] Huang S, Guo W, Tang Y, et al. miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells[J]. *Oncology Reports*, 2012, 28(5): 1831-1837.
 - [5] Tang F, Zhang R, He Y, et al. MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *PloS one*, 2012, 7(5): e35435.
 - [6] 陈卫群, 孔德勇, 王卉, 等. 淋巴瘤患者循环 microRNA-21 的检测及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(6): 535-536.
 - [7] Chen Y, Liu W, Chao T, et al. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G[J]. *Cancer Lett*, 2008, 272(2): 197-205.
 - [8] Wang L, Lee IM, Zhang SM, et al. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89(3): 905-912.
 - [9] Fink BN, Steck SE, Wolff MS, et al. Dietary flavonoid intake and breast cancer risk among women on Long Island[J]. *Am J Epidemiol*, 2007, 165(5): 514-523.
 - [10] Vicinus B, Rubie C, Faust SK, et al. MiR-21 functionally interacts with the 3'UTR of chemokine CCL20 and down-regulates CCL20 expression in miR-21 transfected colorectal cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2012, 316(1): 105-112.
 - [11] Yao Q, Xu H, Zhang QQ, et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4(PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(3): 539-542.
- (上接第 1373 页)
- gene expression profiles of radioresistant non-small-cell lung cancer cell lines established by fractionated irradiation; tumor protein p53-inducible protein 3 confers sensitivity to ionizing radiation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 77(3): 858-866.
- [9] 王艳, 吴清明, 童强, 等. 食管癌放射抗拒细胞 P-gp 和 GST- π 表达的研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(8): 825-827.
 - [10] 苏芳, 朱小东, 曲颂, 等. 人鼻咽癌放射抗拒细胞株建立及其细胞周期的观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(16): 1221-1224.

- [11] Kuntz K, O'Connell MJ. The G(2) DNA damage checkpoint; could this ancient regulator be the Achilles heel of cancer? [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(15): 1433-1439.
- [12] Limsirichaikul S, Niimi A, Fawcett H, et al. A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(4): e31.

(收稿日期: 2012-12-02 修回日期: 2013-02-19)

(收稿日期: 2012-10-28 修回日期: 2013-02-23)