

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.18.005

格列美脲下调 miRNA-214 表达抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖作用的研究*

方志华¹, 梁君伟², 吕喜英^{2△}

(1. 河北省承德市第三医院, 河北 承德 067000; 2. 承德医学院附属医院, 河北 承德 067000)

摘要:目的 探讨格列美脲通过下调 miRNA-214 表达抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的作用机制。方法 体外培养人乳腺癌细胞 MCF-7, 分为空白对照组和格列美脲低、中、高剂量组, 在不同剂量格列美脲染毒 48 h 后, 用噻唑蓝(MTT)法测定格列美脲对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖的影响; 实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 miRNA-214, Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 相对表达量; 流式细胞术检测 MCF-7 细胞凋亡率。结果 随着格列美脲剂量的增加, MCF-7 细胞增殖率降低, 在 20 $\mu\text{g/mL}$ 时降到 54.22%, 与 0 $\mu\text{g/mL}$ 比较, 差异有统计学意义($F=8.52, P<0.05$); 与空白对照组比较, 格列美脲各剂量组 MCF-7 细胞中 miRNA-214 mRNA 相对表达量均降低, Caspase-3, Bax, Bcl-2 mRNA 相对表达量均增加, Bax/Bcl-2 均增高, 差异均有统计学意义($F=12.20, 20.41, 6.31, 4.42, 6.12, P<0.05$); 与空白对照组比较, 格列美脲各剂量组 MCF-7 细胞凋亡率均增高, 其中格列美脲中、高剂量组比较, 差异有统计学意义($F=8.35, P<0.05$)。结论 格列美脲能抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖, 且呈浓度依赖性; 格列美脲通过下调 miRNA-214 的水平, 启动细胞凋亡程序, 诱导了 MCF-7 细胞的凋亡。

关键词: 格列美脲; miRNA-214; 人乳腺癌 MCF-7 细胞; 细胞凋亡; 作用机制

中图分类号: R965; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)18-0014-04

Effect of Glimepiride on Inhibiting the Proliferation of Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 by Down-Regulating the Expression of miRNA-214

Fang Zhihua¹, Liang Junwei², Lü Xiyi²

(1. Chengde No. 3 Hospital, Chengde, Hebei, China 067000; 2. Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei, China 067000)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of glimepiride in inhibiting the proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 by down-regulating the expression of miRNA-214. **Methods** The human breast cancer cell line MCF-7 was cultured *in vitro* and divided into the blank control group and glimepiride group with low, medium and high dose. The effects of glimepiride on the proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 cells were measured by MTT after 48 h of exposure to different doses of glimepiride. The relative expression of miRNA-214, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA was detected by RT-PCR. The apoptosis rate of MCF-7 cells was detected by flow cytometry. **Results** With the increase of glimepiride dose, the proliferation rate of MCF-7 cells was decreased, and which was 54.22% at 20 $\mu\text{g/mL}$, the difference was statistically significant compared with 0 $\mu\text{g/mL}$ of glimepiride ($F=8.52, P<0.05$). Compared with the blank control group, the relative expression levels of miRNA-214 mRNA of MCF-7 cells in glimepiride-treated group were decreased, while the relative expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl-2 mRNA and the ratio of Bax/Bcl-2 were significantly increased, the differences were statistically significant ($F=12.20, 20.41, 6.31, 4.42, 6.12, P<0.05$). Compared with the blank control group, the apoptosis rates of MCF-7 cells in the glimepiride-treated group were increased, and the statistic difference was found in high and medium dose of glimepiride group ($F=8.35, P<0.05$). **Conclusion** Glimepiride can inhibit the proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 with a concentration-dependent effect. Glimepiride initiates the apoptosis program and induces the apoptosis of MCF-7 cells by down regulating the level of miRNA-214.

Key words: glimepiride; miRNA-214; human breast cancer cell line MCF-7 cells; apoptosis; mechanism

目前, 乳腺癌占恶性肿瘤的 7%~10%, 已成为威胁人类健康的恶性疾病, 且发病率还在不断攀升^[1-2]。有研究显示, 糖尿病能增加患乳腺癌的风险, 且与其预后相关^[3-4]。临床研究发现, 糖尿病经常与癌症同时存在, 如合并乳腺癌^[5]。在治疗乳腺癌的同时控制好血糖可获得较好的预后。流行病学研究表明, 临床常用的一线降糖药物二甲双胍可降低乳腺癌发病率, 并对改善乳

腺癌患者的预后有一定作用^[6-7]。Bruderer 等^[8]研究发现, 长期使用二甲双胍治疗糖尿病的女性患者患乳腺癌的风险会降低。体外研究发现, 二甲双胍可减少荷瘤裸鼠肿瘤的体积和抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖^[9]。格列美脲为临床常用的第 3 代磺酰脲类抗糖尿病药物, 常用于治疗 2 型糖尿病, 但其是否也像二甲双胍一样具有治疗乳腺癌的作用, 目前研究较少。降糖药物治疗癌症

*基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划项目[ZL20140246]。

第一作者: 方志华, 男, 大学本科, 主治医师, 研究方向为胸腹外科疾病的治疗, (电子信箱)1624227800@qq.com。

[△]通信作者: 吕喜英, 女, 硕士研究生, 主任医师, 研究方向为胸部肿瘤的治疗, (电子信箱)22334269@qq.com。

的机制目前并不清楚,研究发现,微小核糖核酸(miRNA, miRNA)是一类调控蛋白质编码基因的内源性非编码 RNAs,在真核生物中存在,参与细胞分化、细胞增殖和凋亡等各种过程,与肿瘤密切相关,参与肿瘤发生、发展过程^[10]。miRNA-214 是新近发现的一种 miRNA,也具有调节细胞生长、分化和凋亡的作用,在乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌等癌组织中表达上调^[11]。因此,本研究中通过研究格列美脲对人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响,检测 miRNA-214 的表达情况,从 miRNA 水平探讨格列美脲治疗乳腺癌可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株、试剂与仪器

细胞株与试剂:人乳腺癌细胞 MCF-7(西安赛拓博泰生物公司,编号 CM-1250)。格列美脲分散片(石药集团欧意药业有限公司,国药准字 H20100182,规格为每片 2 mg),用无血清 RPMI-1640 培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,规格为每瓶 500 mL,货号 11965-092)配制质量浓度为 1 g/L 的贮备液,过滤除菌,分装, -20℃ 保存备用,使用培养基稀释到所需质量浓度。

试剂:胎牛血清(江苏汇达医疗器械有限公司,规格为每瓶 100 mL,货号 10099-141); PrimeScript RT reagent Kit(Perfect Real Time)RNA 反转录试剂盒(上海碧云天公司,货号 DRR037A,可用 200 次); SYBR Premix Ex Taq TM II 荧光定量 PCR 试剂盒(上海碧云天公司,货号 HZ-F360,可用 100 次); ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(上海碧云天公司,货号 CA1020,可用 50 次); miRNA-214, Bax, Bcl-2, Caspase-3 引物(大连 TaKaRa<中国>公司); Trizol Reagent RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司,规格为 100 mL,货号 15596-026); MTT(美国 Amresco 公司,货号 M5655,可用 50 次)。

仪器: BIO-RAD 型垂直电泳仪(美国 BD 公司); 倒置显微镜(特瑞欧奥林巴斯公司); 高速低温离心机(上海浦东天本离心机公司); 二氧化碳细胞培养箱(苏达实验仪器有限公司); 电泳仪、电转移槽及电源、凝胶成像分析系统(北京六一仪器厂); 流式细胞仪(美国 BD FACS Calibur 公司); 逆转录仪(杭州博日科技有限公司); Real Time PCR 仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组

用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 37℃, 5% CO₂, 饱和湿度的环境中培养人乳腺癌细胞 MCF-7。当 MCF-7 细胞处于对数生长期时进行试验,分为空白对照组及格列美脲低、中、高剂量组。空白对照

组在接种后待细胞生长到融合状态,正常培养 48 h,格列美脲低、中、高剂量组接种后待细胞生长到融合状态,分别给予终质量浓度为 10, 20, 40 μg/mL 的格列美脲,继续培养 48 h 后收获细胞,进行相关检测。

1.2.2 MTT 法检测细胞存活率

选择对数生长期 MCF-7 细胞,消化后调整细胞浓度,以 5 × 10³/孔接种于 96 孔板, 200 μL/孔,待细胞融合后,弃培养基,依次加入终质量浓度分别为 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 μg/mL 的格列美脲 RPMI-1640 培养基, 200 μL/孔,培养 48 h,加入 MTT, 50 μL/孔。培养 4 h,弃上清液,加入二甲基亚砷(DMSO), 200 μL/孔,振荡 10 min,用检测的吸光度(OD)值,计算 MCF-7 细胞的存活率。每个剂量组设 6 个平行样。

1.2.3 实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 miRNA-214, Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达

按照细胞培养项下方法处理细胞,消化后根据 RNA 提取试剂盒操作说明书进行总 RNA 提取,并根据反转录试剂盒说明合成 cDNA,根据 SYBR Premix Ex Taq TM II 荧光定量 PCR 试剂盒说明,制备 20 μL 反应体系,在 CFX-96 PCR 扩增仪中进行扩增。反应条件为预变性 95℃ 30 s,变性 95℃ 5 s, 60℃ 44 s, 40 个循环,采集数据分析结果。

1.2.4 细胞凋亡检测

按照细胞培养项下方法处理细胞,消化后测定 MCF-7 细胞凋亡率。每孔 5 × 10⁵ 个细胞,每个剂量组设 5 个平行样。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。试验结果采用 $\bar{X} \pm s$ 表示,行方差齐性检验后,采用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

结果见表 1 至表 4、图 1 和图 2。

表 1 格列美脲对 MCF-7 细胞增殖的影响($\bar{X} \pm s$)

质量浓度(μg/mL)	作用时间(h)	细胞增殖率(%)
0	48	96.42 ± 9.73
5	48	89.45 ± 4.50
10	48	72.34 ± 6.47 ^a
20	48	54.22 ± 5.41 ^a
40	48	46.28 ± 12.84 ^a
60	48	36.54 ± 6.28 ^a
80	48	21.27 ± 11.67 ^a

注:与 0 μg/mL 比较, $F = 8.52$, $^a P < 0.05$ 。

3 讨论

miRNA 是一种非编码单链小分子 RNA,能以碱基

表2 格列美脲对人乳腺癌细胞 MCF-7 miRNA-214 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响($\bar{X} \pm s$)

组别	作用时间(h)	总 RNA (ng/ μ L)	miRNA-214	Caspase-3
空白对照组	48	31.24 $\pm$ 2.48	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.10
低剂量组	48	35.12 $\pm$ 5.71	0.91 $\pm$ 0.17	1.15 $\pm$ 0.21
中剂量组	48	32.70 $\pm$ 4.75	0.64 $\pm$ 0.16 ^a	1.61 $\pm$ 0.24 ^b
高剂量组	48	30.78 $\pm$ 5.74	0.49 $\pm$ 0.13 ^a	1.89 $\pm$ 0.15 ^b

注:与空白对照组比较, $F=12.20, 20.41$, ^a $P<0.05$, ^b $P<0.05$ 。

表3 格列美脲对人乳腺癌细胞 MCF-7 Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响($\bar{X} \pm s$)

组别	作用时间(h)	Bax	Bcl-2	Bax/Bcl-2
空白对照组	48	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.12	1.03 $\pm$ 0.14
低剂量组	48	1.43 $\pm$ 0.11 ^a	1.08 $\pm$ 0.10	1.36 $\pm$ 0.22
中剂量组	48	1.82 $\pm$ 0.17 ^a	1.27 $\pm$ 0.03 ^a	1.47 $\pm$ 0.09 ^a
高剂量组	48	2.05 $\pm$ 0.14 ^a	1.29 $\pm$ 0.27 ^a	1.60 $\pm$ 0.14 ^a

注:与空白对照组比较, ^a $P<0.05$ 。

表4 格列美脲对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞凋亡的影响

组别	作用时间(h)	细胞凋亡($\bar{X} \pm s$)
空白对照组	48	4.62 $\pm$ 1.40
低剂量组	48	6.02 $\pm$ 0.81
中剂量组	48	15.41 $\pm$ 3.54 ^a
高剂量组	48	21.33 $\pm$ 4.47 ^a

注:与空白对照组比较, $F=8.35$, ^a $P<0.05$ 。

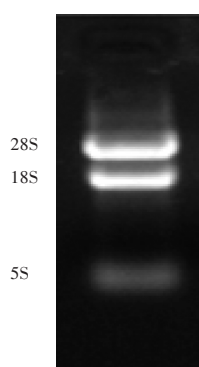
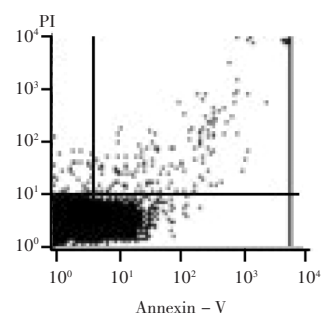
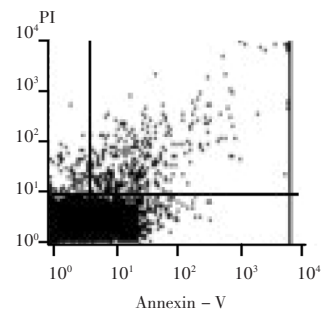


图1 人乳腺癌细胞 MCF-7 mRNA 电泳图

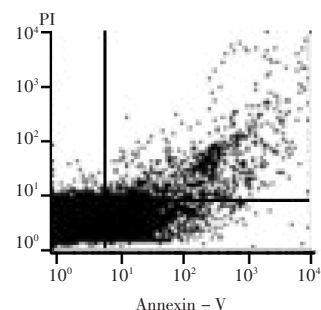
互补的形式结合到靶基因的非编码区,转录后对基因进行负调控。其存在于人体外周血,且在血液中稳定而持续地表达,结果具有可重复性,参与了多种细胞的进程(细胞增殖、分化、凋亡等)^[12]。在人类肿瘤发生的变异区域内约 50% 检测到 miRNA 基因,提示 miRNA 可能与肿瘤发生、发展密切相关^[13]。近年来研究发现,由 miRNA 表达谱异常引起的



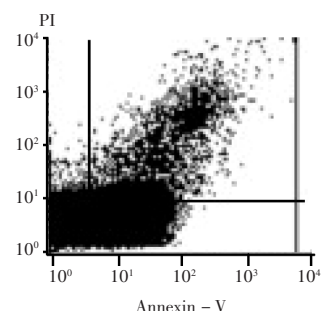
A



B



C



D

A. 空白对照组 B. 格列美脲低剂量组
C. 格列美脲中剂量组 D. 格列美脲高剂量组

图2 格列美脲诱导 MCF-7 细胞凋亡图

基因转录后调控与许多肿瘤发生、发展、侵袭和转移密切相关,如乳腺癌、胃癌、小细胞肺癌和肝癌等^[14]。在癌组织中,一些 miRNA 会特异表达增高或降低,如 miRNA-155, miRNA-10b, miRNA-21 等常过度表达,而 miRNA-214, miRNA-518b, miRNA-17p, miRNA-126, miRNA-335, miRNA-205 等则表达下调,从而促进肿瘤细胞的发生、发展、侵袭和转移^[15]。miRNA 在细

本栏自由
重庆赢英康医疗器械有限公司
协办

胞或组织中具有特异性,故 miRNA 在疾病的诊断和治疗中有广阔前景。

miRNA-214 在多种肿瘤疾病中表达异常,通过调控不同靶基因,调节细胞增殖和凋亡^[16]。miRNA-214 在乳腺癌、肝癌、宫颈癌、骨髓瘤等疾病中表达降低^[17]。研究发现,在胰腺癌细胞凋亡受到抑制时,miRNA-214 的表达增加,可通过抑制抑癌基因 PTEN 的表达而抑制肿瘤细胞的凋亡^[18]。细胞凋亡为程序性细胞死亡,在机体间维持动态平衡。当机体间这种平衡被打破,就会引发多种疾病,细胞增殖失控与细胞凋亡失常,从而导致肿瘤。同时,诱导肿瘤细胞凋亡也为肿瘤的治疗提供了一个新的方向^[19]。B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族参与了细胞凋亡的调控,主要分为促进细胞凋亡(Bax, Bad)、抑制细胞凋亡(Bcl-2, Bcl-xl)和 BH3-only 蛋白(Bim, Bid, DP5)3 个家族^[20]。Bcl-2 家族相关蛋白主要分布于细胞器膜上。当受到促进凋亡的药物作用时, Bcl-2 表达则受到抑制, Bax 表达升高,使线粒体膜电位发生改变,使膜通道开放,细胞色素 C 释放到细胞质中,诱导凋亡小体形成,从而激活 Caspase 家族,最终导致细胞凋亡。Bax/Bcl-2 是一个较灵敏的指标,其增高决定了细胞进入凋亡的执行期。Caspase 家族是细胞凋亡执行者,被激活后将引发 Caspase 级联反应,凋亡启动因子(Caspase-2, Caspase-9 等)发生活化,并激活下游凋亡执行因子(Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7 等),尤其是 Caspase-3 的激活,表示细胞凋亡进入不可逆阶段,最终导致细胞进入凋亡阶段^[21]。

本研究结果发现,格列美脲能抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖,通过下调 MCF-7 细胞中 miRNA-214 mRNA 的表达,启动细胞凋亡程序,使 Caspase-3, Bax, Bcl-2 mRNA 表达增加, Bax/Bcl-2 增高,从而促进 MCF-7 细胞凋亡,为格列美脲抑制乳腺癌细胞生长提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 陈万青,郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. 中国肿瘤临床,2015,42(13):668-674.
- [2] Ellis MJ, Ding L, Shen D, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition[J]. Nature, 2015, 46(3):353-360.
- [3] 刘子琪,刘爱萍,王培玉. 中国糖尿病患病率的流行病学调查研究状况[J]. 中华老年多器官疾病杂志,2015,14(7):547-550.
- [4] 肖新华,齐翠娟. 糖尿病治疗与肿瘤风险的关系[J]. 医学研究杂志,2015,44(8):1-3.
- [5] Joung KH, Jeong JW, Ku BJ. The association between type 2 diabetes mellitus and women cancer: the epidemiological evidences and putative mechanisms[J]. Biomed Research International, 2015, 2015(18):920-928.
- [6] 王琦,刘玉林,翟爱华,等. 二甲双胍治疗多种类型肿瘤的研究进展[J]. 肿瘤研究与临床,2016,28(1):68-72.
- [7] Sha JW, Obstetrics DO. Analysis of Effectiveness and Safety of Melbine in Treatment of Pregnancy Combined with Stein-Leventhal Syndrome and Gestational Diabetes[J]. Diabetes New World, 2016, 24(1):20-28.
- [8] Bruderer SG, Bodmer M, Jick SS, et al. Poorly controlled type 2 diabetes mellitus is associated with a decreased risk of incident gout: a population-based case-control study[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2015, 74(9):1651-1658.
- [9] 张晓会. miR-27a 介导二甲双胍抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖作用的机制研究[D]. 天津:天津医科大学,2015.
- [10] Chou CH, Chang NW, Shrestha S, et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database[J]. Nucleic Acids Research, 2016, 44(1):239-247.
- [11] Long H, Wang Z, Chen J, et al. microRNA-214 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in lung adenocarcinoma by targeting the suppressor of fused protein (Sufu)[J]. Oncotarget, 2015, 6(36):38705-38718.
- [12] 王斌,姜雷,王冰冰,等. miRNA-21 表达水平与结直肠癌患者预后关系的 Meta 分析[J]. 肿瘤,2015,35(1):84-91.
- [13] Vlachos IS, Paraskevopoulou MD, Karagkouni D, et al. DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions[J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(Database issue):153-159.
- [14] 梅颖,刘朝奇. miRNA 调控肿瘤相关基因 c-met 的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学,2017,22(2):204-209.
- [15] 祝辉,宋鑫. miRNA 与 lncRNA 的相互调控作用在肿瘤中的研究进展[J]. 基础医学与临床,2015,35(11):1554-1558.
- [16] Wang J, Xin Z, Wang L, et al. MicroRNA-214 Suppresses Oncogenesis and Exerts Impact on Prognosis by Targeting PDRG1 in Bladder Cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(2):118-126.
- [17] 周明玉,岳双磊,何文杰,等. microRNA-214 在恶性肿瘤中的表达及相关性的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2017, 17(4):787-790.
- [18] Peng W, Jie QC, Liu C, et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy[J]. Cancer Discovery, 2016, 6(2):202-218.
- [19] 庞若宇,关美萍,郑宗基,等. 二甲双胍对糖基化终末产物诱导的成纤维细胞凋亡及相关蛋白 Caspase-3、Bax 及 Bcl-2 表达的影响[J]. 南方医科大学学报,2015,35(6):898-902.
- [20] 庞雪利,李矿发,魏兰,等. IL-8 通过上调 Bcl-2 的表达和下调 Caspase-3 的表达抑制 MCF-7 乳腺癌细胞凋亡[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015,31(3):307-311.
- [21] D'Mello SR, Kuan CY, Flavell RA, et al. Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium[J]. Journal of Neuroscience Research, 2015, 99(1):24-31.

(收稿日期:2018-01-10;修回日期:2018-05-02)