

缺氧对人乳腺癌 MCF-7 细胞 *miRNA-21* 表达的影响及与细胞增殖和凋亡的关系

张 博,张雪鹏,胡宝山,张 艳,张媛媛,赵光明

(河北联合大学附属医院,河北 唐山 063000)

摘 要:[目的] 观察缺氧环境下人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及凋亡的情况,初步探讨缺氧对 *miRNA-21* 表达的影响及其与细胞增殖、凋亡的关系。[方法] CoCl_2 人工模拟缺氧环境,四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT)检测缺氧环境下细胞增殖状况,流式细胞仪检测细胞的凋亡率,实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)测定不同缺氧程度下 *HIF-1 α* 和 *miRNA-21* 表达水平的变化。[结果] 与常氧对照组相比较, CoCl_2 处理组的细胞明显受到抑制,但 100、200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理组的细胞在一定时间内仍增殖,抑制率随缺氧时间和药物浓度增加而上升。流式细胞仪检测结果显示, CoCl_2 处理组细胞凋亡率高于对照组 ($P<0.05$)。RT-PCR 检测显示,200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的 CoCl_2 处理组培养 24h 后细胞的 *HIF-1 α* 和 *miRNA-21* 表达高于对照组 ($P<0.05$)。[结论] 人乳腺癌 MCF-7 细胞可在一定缺氧程度和时间内生长,缺氧诱导细胞凋亡率增加,缺氧能上调 *HIF-1 α* 、*miRNA-21* 的表达,使之进一步耐受缺氧,其机制可能是上调的 *miRNA-21* 通过多个信号通路调控靶基因进而影响癌细胞的增殖及凋亡。

主题词:乳腺癌;缺氧微环境;微小 RNA-21;缺氧诱导因子-1 α

中图分类号:R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2014)04-0265-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2014.04.B001

Influence of Hypoxia on the Expression of *miRNA-21* in Human Breast Cancer MCF-7 Cell and Its Relationship with Cell Proliferation and Apoptosis in Vitro

ZHANG Bo,ZHANG Xue-peng,HU Bao-shan,et al.

(The Affiliated Hospital of Hebei United University,Tangshan 063000,China)

Abstract:[Purpose] To investigate the effects of hypoxia microenvironment on the proliferation and apoptosis of human breast cancer MCF-7 cell line,and preliminarily explore the effects of hypoxia on the cellular expression of microRNA-21 (*miRNA-21*) and the cell proliferation and apoptosis. [Methods] Hypoxia environment of breast cancer line MCF-7 was induced by CoCl_2 . MTT assay was used to monitor the situation of CoCl_2 -induced hypoxia on proliferation of human breast MCF-7 cell in vitro. The cell apoptotic ratio was detected by flow cytometry. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to examine the expression of *HIF-1 α* mRNA in different hypoxia level,and the expression of *miRNA-21* was assessed by stem-loop RT-PCR. [Results] Compared with the cells without CoCl_2 treatment,the cells with CoCl_2 exposure exhibited obvious growth inhibition which increased with CoCl_2 concentration and exposure time,but 100,200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 treatment group still had proliferation of cells in a certain period of time. According to the flow cytometry results,apoptosis rate in CoCl_2 treatment group was higher than that in control group. The mRNA expressions of *HIF-1 α* and *miRNA-21* were higher in 200,400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 treatment group than those in control group ($P<0.05$). [Conclusions] Human breast cancer MCF-7 cell are grown in a certain degree of hypoxia and time. The increase of cell apoptosis is induced by hypoxia. Hypoxia condition can up-regulate the expression of *HIF-1 α* and *miRNA-21*,lead to hypoxia tolerance of MCF-7. The mechanism may be *miRNA-21* up-regulated through multiple signaling pathways regulating target genes to affect cancer cell proliferation and apoptosis.

Subject words:breast neoplasms;hypoxia microenvironment;microRNA-21;hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)

缺氧是恶性实体肿瘤的重要生物学特征之一,

与肿瘤的生长、侵袭、凋亡密切相关^[1]。缺氧的肿瘤细胞易发生基因突变及选择压力,对放化疗更加耐受^[2]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是真核生物中存在的一类最小的非编码、单链 RNA, 它的长度约

通讯作者:张雪鹏,主任医师,硕士生导师,博士;河北联合大学附属医院肿瘤外科,河北省唐山市建设南路 73 号(063000);
E-mail: zolbeau@sina.com

收稿日期:2013-12-04; **修回日期:**2014-02-21

为 22 个核苷酸左右,参与转录后基因调控,与细胞分化、临床分期及预后有密切关系^[3]。其中 miRNA-21 在大多数实体肿瘤中高表达^[4],但关于 miRNA-21 在缺氧微环境下的研究甚少,本研究利用 CoCl₂ 缺氧诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞,观察细胞的生长情况,检测 *HIF-1α*、*miRNA-21* 的表达情况。初步探讨 *miRNA-21* 在缺氧微环境下对肿瘤细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人乳腺癌 MCF-7 细胞由河北联合大学医学实验中心馈赠,DMEM 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司,MTT 购自 Amresco 公司,二甲基亚砷(DMSO)购自 J&K 公司,氯化钴(CoCl₂) 购自 Sigma 公司,Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒购自联科生物公司、Trizol、PCR 引物、RT-PCR 逆转录试剂盒及 SYBR Green qPCR 试剂盒购自 Invitrogen 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养及缺氧处理

人乳腺癌 MCF-7 细胞培养于含 10%胎牛血清、青霉素(100U/ml)、链霉素(100U/ml)的 DMEM 培养基中,在 5%CO₂、37℃条件下常规培养、传代,待细胞长至 60%~70%融合度,分别用含有 0、100、200、400μmol/L CoCl₂ 的胎牛血清培养液,培养 24、48、72h 后进行后续试验。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖

培养人乳腺癌 MCF-7 细胞至对数生长期,制备单细胞悬液,以 2×10⁴ 个/ml 接种于 96 孔板,每组细胞设 6 个复孔,100μl/孔,待细胞贴壁后,使用无血清培养基培养细胞 16~24h,使细胞同步化,空白对照组加入空培养液,加样孔周边以磷酸盐缓冲液(PBS)封闭,实验组各组 CoCl₂(终浓度)分别为 0、100、200、

400μmol/L,培养 24、48、72h 后加入 MTT(5mg/ml) 10μl/孔,继续 37℃培养 4h,弃上清,加入 DMSO 150μl/孔,充分震荡 10min,用空白对照调零,酶标仪 490nm 处测定各孔光吸收值(OD)。细胞抑制率(%)=(1-实验组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 双染检测凋亡

不同浓度 CoCl₂ 处理细胞 24h 后消化离心收集细胞(1 000r/min,5min),预冷的 PBS 洗 2 次,离心收集细胞,1×稀释缓冲液重悬细胞,调节细胞悬液浓度为 1×10⁶/ml,取 195μl 细胞悬液,加入 5μl Annexin V-FITC 混匀,避光 4℃孵育 10min,离心去上清,沉淀的细胞重悬于 190μl 稀释缓冲液中,加入 10μl 碘化丙啶(20μl/ml),避光 4℃孵育 5min 后,用流式细胞仪检测。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测 *miRNA-21* 和 *HIF-1α* 表达

将对数生长期的人乳腺癌 MCF-7 细胞按照前述的缺氧诱导条件处理细胞后,采用 Trizol 法提取细胞总 RNA,用紫外线分光光度法测定纯度,反转录后进行 RT-PCR。其中 miRNA 按照逆转录说明书分别加入反应所需试剂、miRNA-21 茎环特异性引物(Table 1),逆转录制备 cDNA。反应条件为:37℃ 10min,42℃ 50min,70℃ 10min。PCR 反应条件:95℃ 10min,95℃ 15s,62℃ 20s,循环 40 次。*U6 RNA* 和 *β-actin* 分别为定量检测 *miRNA-21* 和 *HIF-1α* 的内参基因,用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,多组计量资料比较使用单因素方差分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

Table 1 Sequence of the primers

Gene		Primer sequence (5'→3')
<i>miRNA-21</i>	RT	CTCAACTGGTGTCTGCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCAACATC
	F	GGGCTAGCTTATCAGACTG
	R	AGTGCGTGTCTGCTGGAGTC
<i>U6 RNA</i>	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAAATATG
	F	GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	R	CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT
<i>HIF-1α</i>	F	CGTTCCTTCGATCAGTTGTC
	R	TCACTGGTGGCAGTGCTAGT
<i>β-actin</i>	F	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
	R	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA

2 结果

2.1 缺氧对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

各浓度 CoCl_2 处理组的细胞增殖力 24、48、72h 显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。但 100、200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理组的细胞 48h 较 24h 仍有增殖($P<0.05$)。各时间点随着 CoCl_2 浓度增加,OD 值逐渐下降,对细胞增殖影响成浓度依赖性(Table 2, Figure 1)。

2.2 缺氧对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测细胞凋亡的结果显示,0、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理组培养细胞 24h 后凋亡率分别为 (2.62 $\pm$ 0.13)%、(3.31 $\pm$ 0.12)%、(7.43 $\pm$ 0.16)%、(11.73 $\pm$ 0.15)%。经统计学分析,处理组细胞的凋亡率与对照组相比有统计学差异($P<0.05$) (Figure 2)。

2.3 缺氧对 $\text{HIF-1}\alpha$ 、miRNA-21 表达的影响

不同浓度 CoCl_2 培养人乳腺癌 MCF-7 细胞 24h 后,实时定量 PCR 检测 $\text{HIF-1}\alpha$ 、miRNA-21

Table 2 The optical density of various concentration of CoCl_2 on MCF-7 cell in different time($\bar{x}\pm s$)

Time (h)	CoCl ₂ Concentration ($\mu\text{mol/L}$)			
	0	100	200	400
24	0.44 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.02*	0.40 $\pm$ 0.03*	0.39 $\pm$ 0.04*
48	0.51 $\pm$ 0.06	0.45 $\pm$ 0.02**	0.43 $\pm$ 0.02**	0.34 $\pm$ 0.05*
72	0.34 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.04*	0.28 $\pm$ 0.06*	0.22 $\pm$ 0.03*

Note: *: vs normal group, $P<0.05$; #: 24h vs 48h, $P<0.05$.

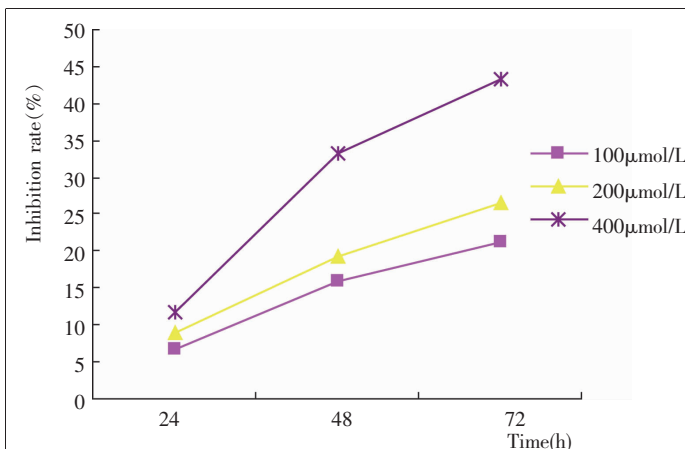


Figure 1 Inhibition rate of MCF-7 cell following CoCl_2 treatment

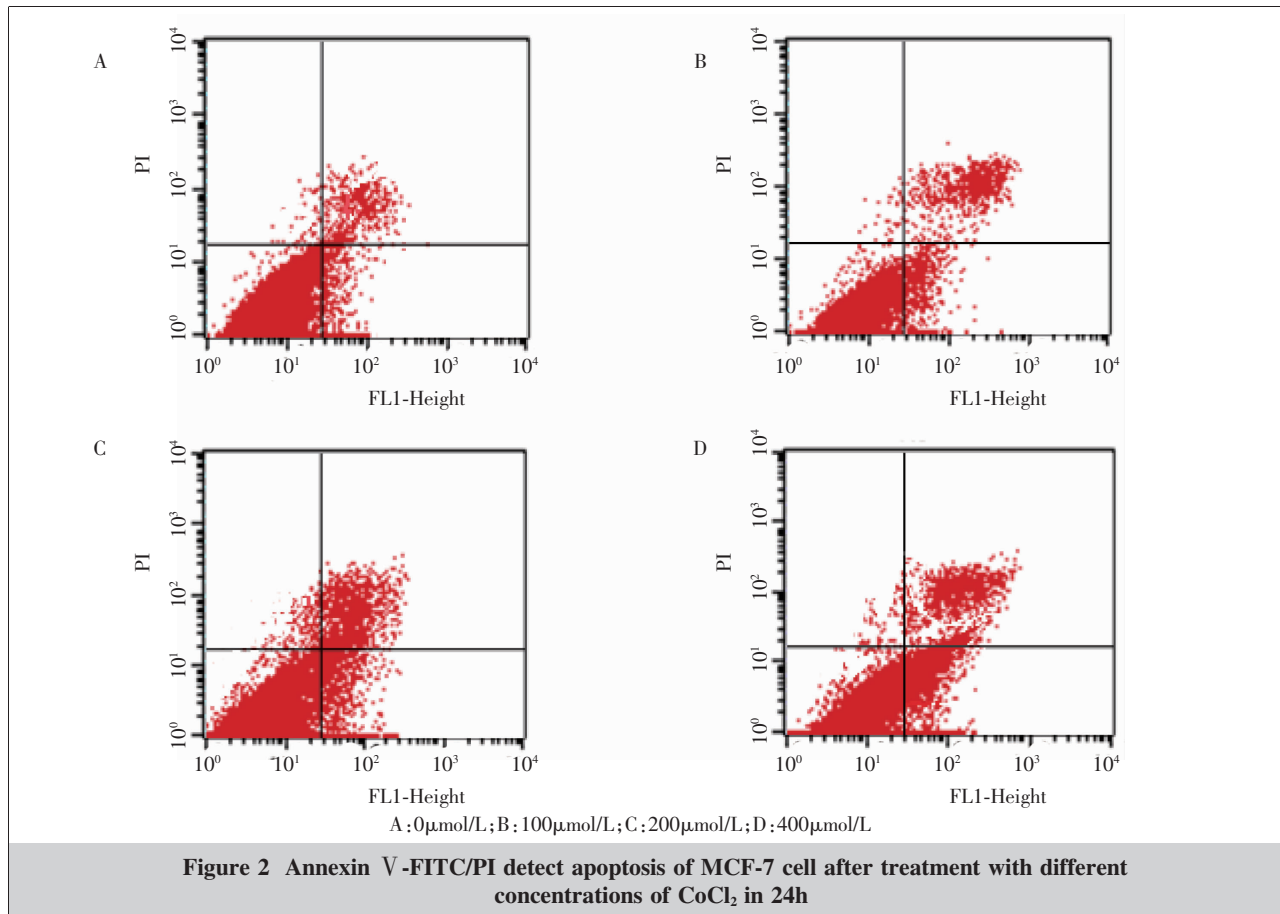
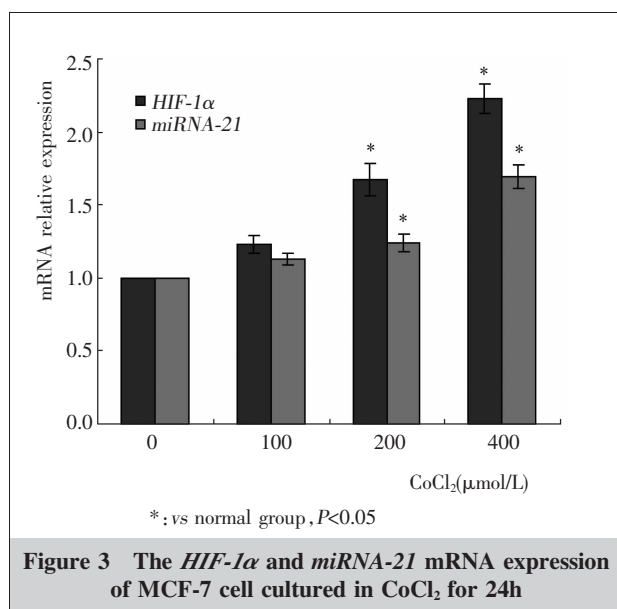


Figure 2 Annexin V-FITC/PI detect apoptosis of MCF-7 cell after treatment with different concentrations of CoCl_2 in 24h

的相对表达量。结果显示,随着缺氧程度的增加,*HIF-1α*及*miRNA-21*表达不断增加,200、400 μmol/L CoCl_2 处理组与常氧组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (Figure 3)。相关性分析可知,*HIF-1α*的表达与*miRNA-21*表达存在明显的正相关($r=0.967, P < 0.05$)。



3 讨论

在实体肿瘤组织中广泛存在的缺氧微环境是其基本特征之一。这主要是由于肿瘤细胞快速增长超过了肿瘤内新生血管的速度,造成血管未达到的组织区域出现缺氧。在缺氧环境下,*HIF-1*被激活并调控一系列缺氧诱导基因的表达,从而产生一系列的缺氧自适应反应。*HIF-1*是由*HIF-1α*和*HIF-1β*亚单位组成的异源二聚体,其中*HIF-1α*是主要的氧调节亚基。大量实验证明*HIF-1α*与肿瘤的增殖、凋亡、侵袭、转移及预后密切相关^[5]。并且发现恶性肿瘤中的*HIF-1α*表达较良性肿瘤高,而转移肿瘤中*HIF-1α*表达则更高^[6]。*miRNA-21*作为较早发现的*miRNAs*之一,现已证实在胶质瘤、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、肺癌等中高表达,并与癌细胞的增殖、凋亡及侵袭转移密切相关^[7]。

模拟缺氧环境有两种方式:一种是物理缺氧,另一种为化学缺氧,包括氯化钴、铁的螯合剂等,模拟缺氧信号转导。本实验选用氯化钴作为缺氧诱导剂,钴离子(Co^{2+})是铁螯合酶的底物, Co^{2+} 可以取代作为

氧感受器的人血红蛋白卟啉环中的铁离子,使得血红蛋白不能与其结合故而保持还原态,从而模拟缺氧。国内外已有学者在实验中使用氯化钴(CoCl_2)体外模拟缺氧环境,本实验采用不同浓度的 CoCl_2 模拟不同缺氧程度对人乳腺癌 MCF-7 细胞的影响。

我们使用不同浓度的 CoCl_2 培养液不同时间处理 MCF-7 细胞并用 MTT 法测定细胞生长曲线,实验结果显示, CoCl_2 处理组较对照组均出现明显生长抑制,且增殖抑制率呈时间依赖性,但 100、200 μmol/L CoCl_2 处理组的细胞 48h 内仍增殖,表明一定缺氧程度和时间内缺氧可刺激细胞生长。江敬红等^[8]对宫颈癌 HeLa 细胞缺氧实验中发现缺氧促进细胞增殖。有研究显示 *HIF-1α* 在急性缺氧时能调节抗凋亡蛋白 IAP-2 的表达,抑制凋亡促进增殖^[9]。而处理 72h 后,由于细胞增殖代谢使培养基内的营养相对不足,代谢产物堆积,乳酸增加,pH 降低,造成活细胞比例较 48h 下降。本研究发现随着缺氧程度的增加癌细胞的凋亡率升高。研究发现 *HIF-1α* 在缺氧诱导的凋亡中起重要作用,过表达的 *HIF-1α* 可激活促凋亡基因 *HGTD-P*,进而激活促凋亡蛋白 Bax 和 Bak,导致线粒体释放大量细胞色素 C 进入胞浆蛋白酶激活因子(Apaf-1)和 caspase-9 形成凋亡复合物,引发细胞凋亡反应。Lee 等^[10]证实 *HIF-1α* 介导 p53 的表达,增加 p53 的稳定性,进而促进细胞凋亡。由于 *HIF-1α* 对凋亡信号通路的研究还未完全清楚,所以现在普遍认为 *HIF-1α* 对凋亡的调控具有双重作用。在本实验中发现 *miRNA-21* 随着缺氧程度增加其表达量也增加,并和 *HIF-1α* 的表达正相关。*miRNA-21* 作为在多数实体肿瘤组织中过量表达的 HRMs,并且发现 *HIF-1α* 的结合位点在 pri-*miRNA-21* 转录起始点上游大约 2kb 的位置^[11],Mace 等^[12]研究发现过表达的 *HIF-1α* 可上调 *miRNA-21* 的表达,由此推断 *HIF-1α* 是促进缺氧条件下 *miRNA-21* 表达的调节因子之一。邱芳等^[13]通过抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞 *miRNA-21* 表达发现可降低细胞增殖活性并促进凋亡。Sarkar 等^[14]研究发现缺氧条件下高表达的 *miRNA-21* 可促进细胞增殖和迁移。说明 *miRNA-21* 在肿瘤细胞的增殖、凋亡及转移过程中发挥着重要的作用。由此可认为 *HIF-1α* 介导 *miRNA-21* 的表达,进而激活一系列靶基因如 *PTEN*、*PDCD4*、*SPRY1*、*SPRY2*、*BCL2* 等的抑

制凋亡^[15],促进细胞增殖。本文初步研究了缺氧条件下乳腺癌细胞的增殖、凋亡及 *miRNA-21* 与 *HIF-1 α* 的表达情况,有关 *miRNA-21* 与 *HIF-1 α* 的相互作用机制有待进一步研究。相信随着不断对缺氧及缺氧相关因子的深入研究,将有助于人们解开肿瘤细胞和缺氧微环境之间的关系机制,为肿瘤的基础研究和临床靶向治疗提供新的思路和方法。

参考文献:

- [1] Ruan K, Song G, Ouyang GL. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer[J]. J Cell Biochem, 2009, 107(6): 1053–1062.
- [2] Bristow RG, Hill RP. Hypoxia and metabolism: hypoxia, DNA repair and genetic instability[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(3): 180–192.
- [3] Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer[J]. Mol Oncol, 2012, 6(6): 590–610.
- [4] Huang Y, Yang YB, Zhang XH, et al. MicroRNA-21 gene and cancer[J]. Med Oncol, 2013, 30(1): 376–384.
- [5] Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2004, 30(5): 465–468.
- [6] Sun WZ, Yu LB, Zhang QY. Expression and role of HIF-1 α in carcinogenesis and progression of breast cancer[J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2007, 28(2): 163–165. [孙文洲, 于丽波, 张清媛. HIF-1 α 蛋白在乳腺癌发生、发展不同阶段的表达及意义[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(2): 163–165.]
- [7] Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(1): 39–53.
- [8] Jiang JH, Cheng YX. Biological behavior influence of cervical cancer hela cells in hypoxia induced environment[J]. Journal of Chinese Oncology, 2009, 15(11): 980–984. [江敬红, 程艳香. 缺氧诱导宫颈癌 HeLa 细胞的生物学行为改变[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 15(11): 980–984.]
- [9] Greijer AE, Wall der van E. The role of hypoxia inducible factor 1(HIF-1) in hypoxia induced apoptosis[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(10): 1009–1014.
- [10] Lee M, Kang H, Jang SW. CoCl₂ induces PC12 cells apoptosis through p53 stability and regulating UNC5B[J]. Brain Res Bull, 2013, 96: 19–27.
- [11] Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, et al. A microRNA signature of hypoxia[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(5): 1859–1867.
- [12] Mace TA, Collins AL, Wojcik SE, et al. Hypoxia induces the overexpression of microRNA-21 in pancreatic cancer cells [J]. J Surg Res, 2013, 184(2): 855–860.
- [13] Qiu F, Li J. Effect of miR-21 inhibition on survival and apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. Journal of the Second Military Medical University, 2011, 32(6): 691–693. [邱芳, 李晶. 抑制 miR-21 表达对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 生存和凋亡的影响[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(6): 691–693.]
- [14] Sarkar J, Gou D, Turaka P, et al. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration[J]. Am J Physiol, 2010, 299(6): L861–L871.
- [15] Buscaglia LE, Li Y. Apoptosis and the target genes of microRNA-21[J]. Chin J Cancer, 2011, 30(6): 371–380.

