

网络出版时间: 2021-05-15 16:08 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1448.004.html>

异泽兰黄素通过抑制 miR-188-5p 的表达 抑制视网膜母细胞瘤的侵袭并诱导凋亡

夏玉, 王维, 邓铂林, 高玉英, 李静

摘要 目的 研究异泽兰黄素对 miR-188-5p 过表达的调节及对视网膜母细胞瘤(Rb)的增殖、侵袭和凋亡的影响。方法 选择 Rb 系中 Y79 细胞进行研究。不同浓度异泽兰黄素(1、2.5、5、10、20、40、100、200、300 $\mu\text{mol/L}$)处理 Y79 细胞并采用 MTT 法检测其细胞活性; Control 组、异泽兰黄素(低、中、高剂量)组 Y79 细胞分别用终浓度含有异泽兰黄素 0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 培养基培养并检测异泽兰黄素对 Y79 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。建立 Control 组、mimic-NC 组、miR-188-5p mimic 转染组, 建立好转染模型后并用浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素处理各组细胞, 检测异泽兰黄素对 miR-188-5p 表达量的影响及对 Y79 细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。采用 RT-qPCR 检测 miR-188-5p 的表达量; 采用克隆形成试验、流式细胞术和 Transwell 试验检测细胞增殖、凋亡及侵袭力; 采用 Western blot 检测 E-cadherin、N-cadherin、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达量。结果 miR-188-5p 过表达促进 Rb Y79 细胞增殖, 减轻细胞凋亡, 促进细胞侵袭。而异泽兰黄素能抑制 miR-188-5p 过表达, 从而抑制 Rb Y79 细胞增殖、侵袭, 诱导细胞凋亡。结论 异泽兰黄素通过抑制 miR-188-5p 的表达抑制 Rb 细胞侵袭, 并诱导细胞凋亡。

关键词 异泽兰黄素; miR-188-5p; 视网膜母细胞瘤; 增殖; 凋亡; 侵袭

中图分类号 R 276.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0856-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.004

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, Rb)是儿童最常见的原发性眼内恶性肿瘤, 典型表现为白眼或斜视。Rb 的治疗是多模式的, 包括化疗(静脉内化疗和动脉内化疗)、放射治疗、手术治疗及病灶治疗包括经瞳孔热疗、冷冻治疗和激光光凝等^[1-3]。越来越多的证据^[4-5]表明, 微小 RNA(MicroRNA, miRNA)在肿瘤发生过程中起着抑癌基因或致癌基因的作用。研究^[6-7]表明 miR-30、miR-let-7e、miR-21 和

miR-320 在 Rb 中表达失调, 是诊断 Rb 的生物标志物。miR-188-5p 在 Rb 组织中表达量上调, 并抑制 DNA 结合抑制因子(DNA binding 4, ID4)的表达, 从而加快 Rb 的发展进程^[8]。该文主要通过检测异泽兰黄素对 miR-188-5p 的表达影响及对 Rb 的细胞侵袭、细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与处理 Rb Y79 细胞购自中国科学院的细胞库, 并用含 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)进行培养于 37 $^{\circ}\text{C}$ 生长。miR-188-5p mimic 和 miR-NC 根据制造商的说明, 使用 Lipofectamine 2000 试剂(Invitrogen, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)转染到 SU-DHL-4 细胞。

1.2 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物比色 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]法检测细胞活性 在 96 孔板中, 将 Rb Y79 细胞分别用不同浓度异泽兰黄素(1、2.5、5、10、20、40、100、200、300 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h 时, 再用 10 μl MTT 染料处理细胞, 然后与 100 μl 二甲基亚砷孵育 15 min, 用酶免疫分析仪在 490 nm 处测量吸光度。用各浓度处理组细胞吸光度值与 1 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞吸光度值的比值表示细胞活性。

1.3 miR-188-5p mimic 转染及分组 将 Y79 细胞分为 3 组: ① Control 组: Y79 细胞不做任何处理; ② mimic-NC 组: 通过 Lipofectamine[®] 2000 将 mimic-NC 转染到 Y79 细胞; ③ miR-188-5p mimic 组(mimic 转染组): 通过 Lipofectamine[®] 2000 将 miR-188-5p mimic 转染到 Y79 细胞。转染 48 h 后, RT-qPCR 检测 miR-188-5p 转染效率。然后将 Y79 细胞分为 4 组, ① Control 组: Y79 细胞不做任何处理; ② 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组: Y79 细胞用 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的异泽兰黄素处理 24 h 时; ③ mimic 转染组: 通过 Lipofectamine[®] 2000 将 miR-188-5p mimic 转染到 Y79 细胞; ④ mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素

2020-10-20 接收

基金项目: 四川省人民医院青年人才基金(编号: 2017QN02); 电子科技大学中央高校基金项目(编号: 2672018ZYGX2018J098)

作者地址: 四川省医学科学院·四川省人民医院眼科, 成都 610000

作者简介: 夏玉, 女, 本科;

王维, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: 544789232@qq.com

组:通过 Lipofectamine® 2000 将 miR-188-5p mimic 转染到 Y79 细胞,然后用 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的异泽兰黄素处理 24 h 时。

1.4 Western blot 用异泽兰黄素 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理 Y79 细胞后,将细胞用裂解缓冲液裂解在 4 $^{\circ}\text{C}$ 并以 14 000 r/min 离心 15 min 浓缩蛋白质。然后用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物有限公司)测定蛋白质浓度。取 20 μg 总蛋白经 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。将膜在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用 1 h 封闭 5% 的牛血清白蛋白,然后与抗 E-cadherin、N-cadherin、Bax 和 Bcl-2 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用 TBS 缓冲液(含 Tween-20 的 Tris 缓冲盐溶液)洗涤后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(二抗)37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h;洗膜后 ECL 曝光成像并应用 quantity one 软件分析蛋白条带的灰度值。

1.5 总 RNA 提取、反转录和荧光定量 使用 TRIzol 从 Y79 细胞提取总 RNA,提取的总 RNA 首先去除基因组中的 DNA,然后进行反转录,以上步骤根据产品说明书进行操作。荧光定量检测反应体系:5 μl 的 SYBR Premix,各 0.5 μl 的上游引物和下游引物 3 μl 的 RNase Free dH_2O ,1 μl 的 cDNA。程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 40 个循环。扩增完成后进行熔解曲线分析:95 $^{\circ}\text{C}$ 维持 10 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 处理 1 s,此后从 65 $^{\circ}\text{C}$ 开始,每个循环温度增加 0.5 $^{\circ}\text{C}$,时间为 1 s。miR-188-5p 引物是 5'-CCCTCTCTCACATCCCTTG-CAT-3' (上游)和 5'-ATCCTGCAAACCCTGCATGTG-3' (下游)。

1.6 克隆形成试验 将 Y79 细胞转染 miR-188-5p mimic 和 miR-NC 进行处理,在无毒培养基中培养大约 14 d。并用 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素处理转染 miR-188-5p mimic Y79 细胞 24 h 时用冷的甲醇-冰醋酸固定细胞,然后用结晶紫染色。

1.7 流式细胞术 采用 Annexin V-荧光素(AV) 和碘化丙啶(PI) 细胞凋亡检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司)流式细胞术检测不同处理组 Y79 细胞的凋亡率。刺激后,用 PBS 洗涤细胞 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI 在室温、黑暗中孵育 15 min。使用 FACSscan 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)进行流式分析,使用 FlowJo 软件(美国 Tree Star 公司)进行数据分析。

1.8 Transwell 实验 用不含血清的 DMEM 将接种 $5 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ Y79 细胞在 Transwell 室上部,下

室充满 500 μl 10% FBS DMEM。孵育 24 h 后,将下室中的细胞固定在 95% 乙醇中,然后用苏木精染色。在倒置显微镜下计算进入下室的细胞数量。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异泽兰黄素对 Rb Y79 细胞存活率的影响

随着异泽兰黄素浓度的增加, Rb Y79 细胞活性明显下降。当异泽兰黄素浓度为 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 时, Rb Y79 细胞活性 $> 70\%$, 毒性较低。因此,本研究选择异泽兰黄素 10 $\mu\text{mol/L}$ (低剂量组)、20 $\mu\text{mol/L}$ (中剂量组)、40 $\mu\text{mol/L}$ (高剂量组)作后续研究。见图 1。

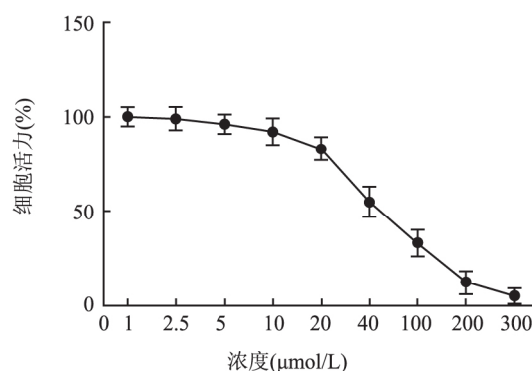


图1 MTT 法检测 Rb Y79 细胞活性

2.2 异泽兰黄素对 Rb Y79 细胞凋亡和迁移的影响

通过 Western blot 检测 Bax、Bcl-2、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的含量,结果显示,与 Control 组比较, Bax/Bcl-2 的比值在异泽兰黄素中剂量组($t = 9.653$, $P < 0.05$) 和高剂量组($t = 15.730$, $P < 0.01$) 中上调,差异有统计学意义;与 Control 组比较, E-cadherin 蛋白的表达量在异泽兰黄素中剂量组($t = 4.750$, $P < 0.05$) 和高剂量组($t = 10.922$, $P < 0.01$) 中上调,差异有统计学意义;与 Control 组比较, N-cadherin 蛋白的表达量在异泽兰黄素中剂量组($t = 9.894$, $P < 0.05$) 和高剂量组($t = 13.649$, $P < 0.01$) 中下调,差异有统计学意义;尤其在异泽兰黄素高剂量组中蛋白表达量的变化差异更大。见图 2。

2.3 异泽兰黄素对 Rb miR-188-5p 表达量的影响

Y79 细胞分别转染 mimic-NC 和 miR-188-5p mimic,通过 RT-qPCR 检测 miR-188-5p 的表达量,结果

显示,与 Control 组比较,转染 miR-188-5p mimic 组中 miR-188-5p 的表达量上调,差异有统计学意义($t = 12.516, P < 0.01$)。与 Control 组比较,异泽兰黄素中剂量组($t = 12.413, P < 0.05$)和高剂量组($t = 38.634, P < 0.01$)中 Y79 细胞内 miR-188-5p 的表达量下调,差异有统计学意义。用 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度异泽兰黄素处理转染后的 Y79 细胞,检测结果显示,与 mimic 转染组比较, mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$

异泽兰黄素组 miR-188-5p 的表达量下调,差异有统计学意义($t = 12.603, P < 0.01$)。见图 3。

2.4 异泽兰黄素抑制 miR-188-5p 表达量对 Y79 细胞增殖和凋亡影响 克隆形成试验结果显示,与 Control 组比较,40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组中异泽兰黄素能抑制 Y79 细胞,差异有统计学意义($t = 7.925, P < 0.01$);与 mimic 转染组比较,在 mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组中异泽兰黄素也抑

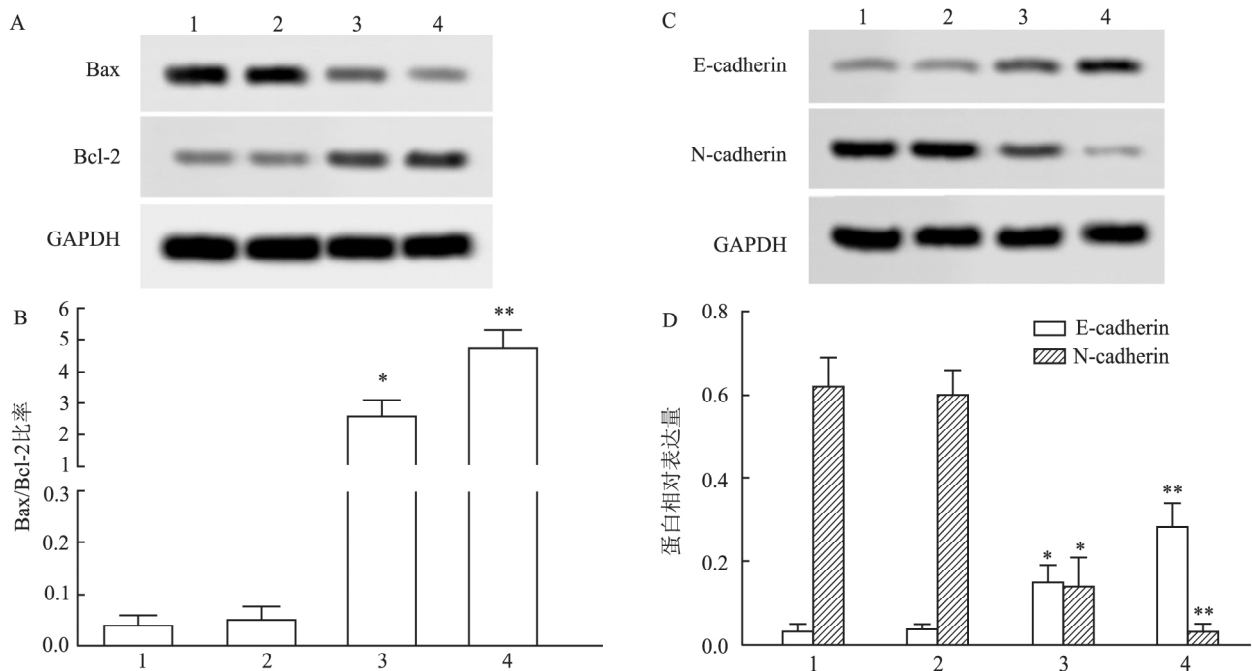


图2 Western blot 检测 Bax、Bcl-2、E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的变化

A: Western blot 检测 Y79 细胞内 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平; B: Y79 细胞中 Bax/Bcl-2 条带灰度分析; C: Western blot 检测 Y79 细胞 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达水平; D: Y79 细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 条带灰度分析; 1: Control 组; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

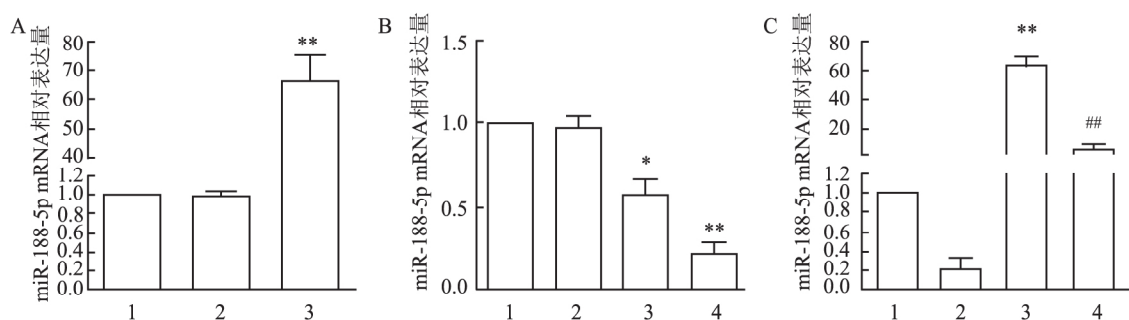


图3 miR-188-5p mRNA 相对表达量

A: RT-qPCR 检测转染 mimic-NC 和 miR-188-5p mimic 的 Y79 细胞后 miR-188-5p mRNA 相对表达量; 1: Control 组; 2: mimic-NC 组; 3: miR-188-5p mimic; B: RT-qPCR 检测不同浓度处理 Y79 细胞后 miR-188-5p mRNA 相对表达量; 1: Control 组; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 3: 20 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 4: 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; C: 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理转染的 Y79 细胞后, miR-188-5p mRNA 相对表达量; 1: Control 组; 2: 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 3: mimic 转染组; 4: mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 mimic 转染组比较: ## $P < 0.01$

制 Y79 细胞克隆率, 差异有统计学意义 ($t = 7.159$, $P < 0.01$); 然而, 与 Control 组比较, mimic 转染组, 差异有统计学意义 ($t = 6.001$, $P < 0.01$)。见图 4A、B。流式细胞术结果表明, 与 Control 组比较, 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组异泽兰黄素能促进 Y79 细胞凋亡, 差异有统计学意义 ($t = 8.831$, $P < 0.01$); 与 mimic 转染组比较, mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组中异泽兰黄素也促进 Y79 细胞凋亡, 差异有统计学意义 ($t = 10.142$, $P < 0.01$); 然而, 与 Control 组比较, mimic 转染组 miR-188-5p 过表达抑制 Y79 细胞凋亡, 差异有统计学意义 ($t = 3.163$, $P < 0.05$)。见图 4C、D。

2.5 异泽兰黄素抑制 miR-188-5p 表达量对 Y79 细胞侵袭的影响 Transwell 检测细胞侵袭力, 结果显示, 与 Control 组比较, 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄

素组异泽兰黄素能抑制 Y79 细胞侵袭力, 差异有统计学意义 ($t = 7.977$, $P < 0.01$); 与 mimic 转染组比较, mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组异泽兰黄素也抑制 Y79 细胞侵袭力, 差异有统计学意义 ($t = 6.246$, $P < 0.01$)。然而, 与 Control 组比较, 在 mimic 转染组 miR-188-5p 过表达促进 Y79 细胞侵袭力, 差异有统计学意义 ($t = 7.844$, $P < 0.01$)。见图 5A、B。Western blot 检测 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白的含量, 结果显示, 与 mimic 组比较, mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组 E-cadherin 蛋白的表达量上调, 差异有统计学意义 ($t = 9.827$, $P < 0.05$), 而与 mimic 组比较, mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组 N-cadherin 蛋白的表达量下调, 差异有统计学意义 ($t = 20.940$, $P < 0.01$)。见图 5C、D。

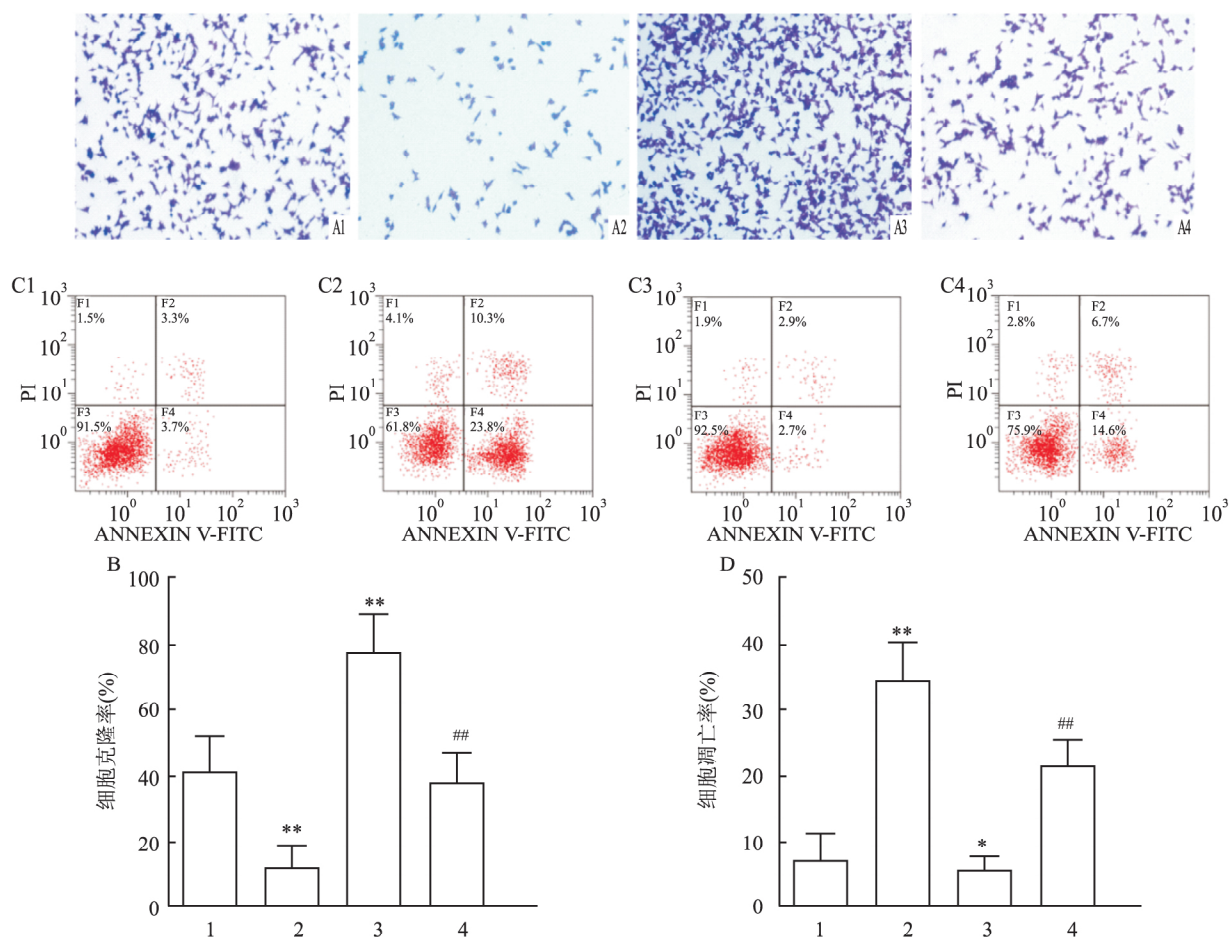


图 4 Y79 细胞增殖和凋亡的测定

A: 克隆形成试验检测 Y79 细胞增殖 结晶紫染色 $\times 40$; B: Y79 细胞克隆率柱状图; C: 流式细胞术检测 Y79 细胞凋亡; D: Y79 细胞凋亡率柱状图; 1: Control 组; 2: 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 3: mimic 转染组; 4: mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 mimic 转染组比较: ### $P < 0.01$

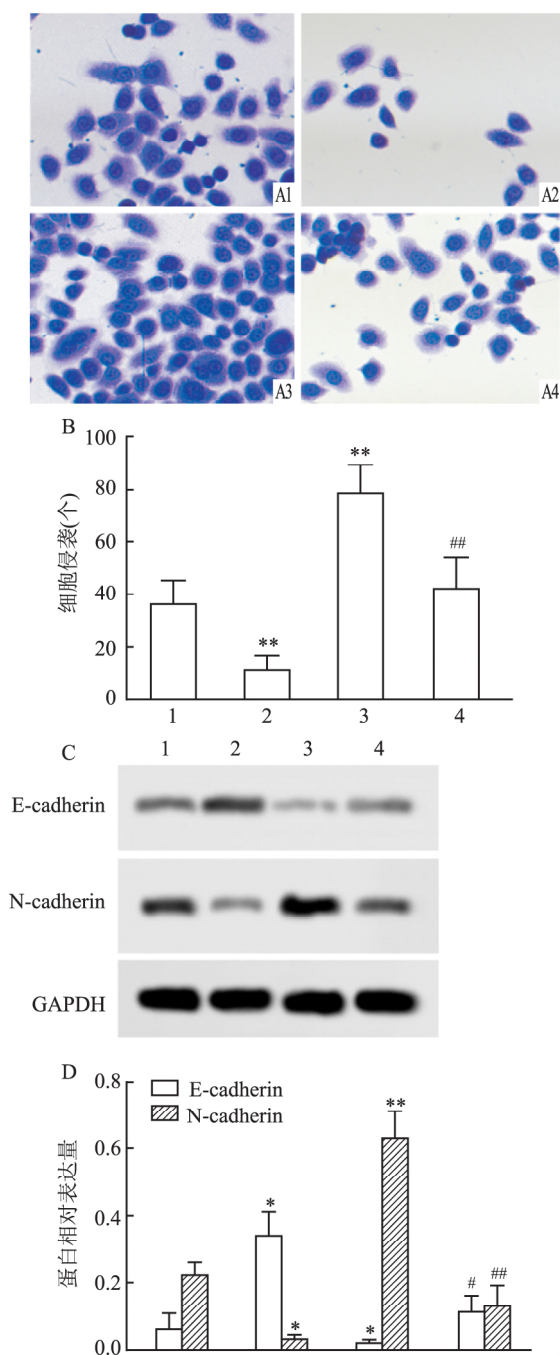


图5 细胞侵袭力及相应蛋白的测定

A: Transwell 实验检测 Y79 细胞侵袭力 苏木精染色 $\times 200$; B: Y79 细胞侵袭力柱状图; C: Western blot 检测 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达量; D: Y79 细胞 E-cadherin 和 N-cadherin 条带灰度分析; 1: Control 组; 2: 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 3: mimic 转染组; 4: mimic 转染 + 40 $\mu\text{mol/L}$ 异泽兰黄素组; 与 Control 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 mimic 转染组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

异泽兰黄素 (5,7-二羟基-3,4,6-三甲氧基黄

酮) 是一种从青蒿中提取的黄酮类化合物,具有多种药理活性,包括抗氧化、抗炎、抗动脉粥样硬化和抗癌作用^[9]。异泽兰黄素能够抑制食管癌 TE1 细胞的增殖,同时还能诱导 TE1 细胞在 G_0/G_1 期细胞周期阻滞^[10]。异泽兰黄素诱导骨肉瘤 U-2OS 细胞 G_2/M 期的阻滞和凋亡,同时能够触发线粒体凋亡通路,抑制癌细胞的增殖^[11]。该研究显示在异泽兰黄素处理 Rb Y79 细胞后, Bax/Bcl-2 的比值增加,同时流式细胞术检测显示细胞凋亡率增加;克隆形成试验中 Y79 细胞增殖下调; Transwell 实验表明 Y79 细胞的侵袭力下调, E-cadherin 蛋白的表达量上调,而 N-cadherin 蛋白的表达量下调。以上研究表明,异泽兰黄素能抑制 Rb Y79 细胞增殖、侵袭并诱导细胞凋亡。

Rb 是儿童最常见的眼内癌,在亚洲和非洲,近 40% ~ 70% 的儿童死于 Rb,而在欧洲和美国,这一比例仅为 3%^[12]。miRNA 的异常调节也参与着 Rb 的发展。有研究^[13]表明 miR-221/222 的过表达促进了 Rb Y79 细胞的增殖、迁移和侵袭。miR-188-5p 在 Rb 组织中表达量上调,而 miR-188-5p 的过表达抑制 ID4 的表达,从而加快 Rb 的发展进程^[8]。并且已经有研究^[14]表明异泽兰黄素抑制 miR-21 的表达量,而 miR-21 通过抑制 YAP1 蛋白的表达促肾癌细胞凋亡和增强抗氧化作用。也有研究^[15]表明异泽兰黄素通过促进宫颈癌细胞系 HeLa 和 Caski 细胞的凋亡和细胞周期阻滞,从而发挥抑制癌细胞增殖的作用。本研究显示异泽兰黄素抑制 miR-188-5p 的转录表达量,同时促进转染 miR-188-5p 的 Y79 细胞凋亡,抑制细胞增殖和侵袭。以上研究表明异泽兰黄素通过抑制 miR-188-5p 的表达抑制 Rb 的增殖和侵袭,并诱导细胞凋亡。

该研究仅为体外细胞试验和机制的初步探讨,体内试验有待进一步进行研究;该研究仅仅表明异泽兰黄素抑制 miR-188-5p 过表达,但通过什么机制,或者靶向作用何种蛋白还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Rao R, Honavar S G. Retinoblastoma [J]. Indian J Pediatr, 2017, 84(12): 937-44.
- [2] Ortiz M V, Dunkel I J. Retinoblastoma [J]. J Child Neurol, 2016, 31(2): 227-36.
- [3] 周琦, 廖荣丰. 奥沙利铂体外对人视网膜母细胞瘤 Y79 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(7): 756-9.
- [4] Voorhoeve P M. MicroRNAs: oncogenes, tumor suppressors or

- master regulators of cancer heterogeneity? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1805(1): 72–86.
- [5] 郭亮, 肖峻, 陶陶. miR-9-5p 对前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(7): 1052–7.
- [6] Zhao J J, Yang J, Lin J, et al. Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis [J]. *Childs Nerv Syst*, 2009, 25(1): 13–20.
- [7] Liu S S, Wang Y S, Sun Y F, et al. Plasma microRNA-320, microRNA-let-7e and microRNA-21 as novel potential biomarkers for the detection of retinoblastoma [J]. *Biomed Rep*, 2014, 2(3): 424–8.
- [8] Yang M, Li Y, Wei W. MicroRNA-188-5p promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting ID4 through Wnt/ β -catenin signaling in retinoblastoma [J]. *OncoTargets and therapy*, 2019, 12(1): 10251–62.
- [9] Jegal K H, Ko H L, Park S M, et al. Eupatilin induces Sestrin2-dependent autophagy to prevent oxidative stress [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(5): 642–56.
- [10] Wang X, Zhu Y, Zhu L, et al. Eupatilin inhibits the proliferation of human esophageal cancer TE1 cells by targeting the Akt-GSK3 β and MAPK/ERK signaling cascades [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(6): 2942–50.
- [11] Li Y Y, Wu H, Dong Y G, et al. Application of eupatilin in the treatment of osteosarcoma [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(4): 2505–10.
- [12] Dimaras H, Kimani K, Dimba E A O, et al. Retinoblastoma [J]. *Lancet*, 2012, 379(9824): 1436–46.
- [13] Liu H, Cao B, Zhao Y, et al. Upregulated miR-221/222 promotes cell proliferation and invasion and is associated with invasive features in retinoblastoma [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(4): 621–9.
- [14] Zhong W, Wu Z, Chen N, et al. Eupatilin inhibits renal cancer growth by downregulating MicroRNA-21 through the activation of YAP1 [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 5016483.
- [15] Wu Z, Zou B, Zhang X, et al. Eupatilin regulates proliferation and cell cycle of cervical cancer by regulating hedgehog signalling pathway [J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(4): 428–35.

Eupatilin inhibits invasion and induces apoptosis of retinoblastoma by inhibiting the expression of miR-188-5p

Xia Yu, Wang Wei, Deng Bolin, et al

(Dept of Ophthalmology, Sichuan Academy of Medical Sciences
& Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610000)

Abstract Objective To study the effect of eupatilin on miR-188-5p overexpression and its effect on the proliferation, invasion and apoptosis of retinoblastoma. **Methods** Y79 cells were selected for research in retinoblastoma lines. Different concentrations of eupatilin (1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 100, 200, 300 $\mu\text{mol/L}$) were used to treat Y79 cells and MTT assay was used to detect cell viability. Y79 cells were cultured with 0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ eupatilin, and the effects of eupatilin on proliferation, apoptosis and invasion of Y79 cells were tested. Control group, mimic-NC transfection group, miR-188-5p mimic transfection group were established, then the cells were treated with concentration of 40 $\mu\text{mol/L}$ eupatilin each group to detect the effect of eupatilin on the expression of miR-188-5p, the proliferation, apoptosis and invasion of Y79 cells. RT-qPCR was used to detect the expression of miR-188-5p, colony formation test, flow cytometry and Transwell test were used to detect cell proliferation, apoptosis and invasion. Western blot was used to detect the protein expression of E-cadherin, N-cadherin, Bax and Bcl-2. **Results**

MiR-188-5p overexpression promoted the Y79 cells proliferation, reduced cell apoptosis and increased cell invasion. Eupatilin could inhibit miR-188-5p overexpression, thereby inhibiting retinoblastoma Y79 cell proliferation, inducing apoptosis. **Conclusion** Eupatilin inhibits the cell invasion and induces apoptosis of retinoblastoma by inhibiting the expression of miR-188-5p.

Key words eupatilin; miR-188-5p; retinoblastoma; proliferation; apoptosis; invasion