



· 论 著 ·

GRM4正向别构调节剂抑制乳腺癌细胞的增殖并促进细胞凋亡

李林海¹, 肖 斌¹, 郭梓璇², 赖斯华³, 古丽米热·安外尔³,

符玉文¹, 陈建芸¹, 孙朝晖¹

1. 中国人民解放军广州总医院检验科, 广东 广州 510000;

2. 嘉应学院检验系, 广东 梅州 514000;

3. 广州医科大学检验系, 广东 广州 510000

[摘要] 背景与目的: 代谢型谷氨酸受体4 (glutamate metabotropic receptor 4, GRM4) 在多种恶性肿瘤中高表达并与肿瘤患者的预后相关, 但GRM4在乳腺癌中的生物学作用仍不清楚。本研究拟探讨GRM4的两种正向别构调节剂VU0364439及VU0364770对乳腺癌细胞的增殖及凋亡的影响, 进而为乳腺癌的靶向治疗提供思路。方法: 在体外培养的乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MCF-7和SK-BR-3中分别单独加入VU0364439、VU0364770以及联合使用两种试剂, 利用CellTiter-Glo[®]发光细胞活力测定法定量检测各组乳腺癌细胞系的增殖活性; 利用Annexin V-PI双染法检测各组乳腺癌细胞系的凋亡水平; 通过实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 技术测定GRM4基因在6种乳腺癌细胞系中的表达情况, 在GRM4表达水平最高的细胞中单独加入或联合使用VU0364439及VU0364770, 用RTFQ-PCR检测GRM4基因表达的改变。结果: 与对照组相比, 单独使用及联合使用VU0364439及VU0364770显著抑制乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231和SK-BR-3的增殖水平, 并促进MCF-7细胞凋亡现象的发生; 联合使用与单独使用VU0364439及VU0364770对乳腺癌细胞增殖及凋亡的作用差异无统计学意义 ($P>0.05$); RTFQ-PCR实验表明GRM4在MCF-7细胞中的表达水平最高; 在MCF-7细胞中分别单独使用或联合使用VU0364439及VU0364770均能激活GRM4的表达。结论: GRM4的正向别构调节剂能够抑制乳腺癌细胞增殖并促进细胞凋亡, 其作用可能是通过激活GRM4基因的表达引起的, 本研究为探索GRM4在乳腺癌中的作用机制以及开发新的乳腺癌靶向治疗方法奠定了基础。

[关键词] 代谢型谷氨酸受体4; 正向别构调节剂; 乳腺癌; 靶向治疗

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.08.001

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)08-0561-06

GRM4 positive allosteric modulators inhibit breast cancer cell proliferation and promote cell apoptosis LI Linhai¹, XIAO Bin¹, GUO Zixuan², LAI Sihua³, GULIMIRE·An Waier³, FU Yuwen¹, CHEN Jianyun¹, SUN Zhaohui¹

(1. Department of Clinical Laboratory Medicine, Guangzhou General Hospital of PLA, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China; 2. Department of Medical Laboratory, Jiaying University, Meizhou 514000, Guangdong Province, China; 3. Department of Medical Laboratory, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China)

Correspondence to: LI Linhai E-mail: mature303@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Glutamate metabotropic receptor 4 (GRM4) is highly expressed in many tumors, and its expression is associated with the prognosis of patients. However, the function of GRM4 in breast cancer is still not clear. This study aimed to investigate the effects of positive allosteric modulators VU0364439 and VU0364770 on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells, and then provide novel strategies for breast cancer

targeted therapy. **Methods:** VU0364439 and VU0364770 were added solely or in combination into breast cancer cell lines MDA-MB-231, MCF-7 and SK-BR-3. The proliferation activities of these cells were detected using CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay. Annexin V-PI double staining was used to detect the apoptosis of breast cancer cells. The expressions of *GRM4* gene in six breast cancer cell lines were detected using real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR). After VU0364439 and VU0364770 were used solely or in combination, the expression of *GRM4* gene was detected in the cell line with the highest GRM4 expression. **Results:** Compared with the control group, the proliferations of breast cancer cells MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 were significantly inhibited after VU0364439 and VU0364770 were added solely or in combination. VU0364439 and VU0364770 also promoted the cell apoptosis of these breast cancer cell lines. The inhibitory effect of VU0364439 and VU0364770 on the proliferation of breast cancer cells was not significantly different when they were used in combination ($P>0.05$). RTFQ-PCR assay showed that the expression of GRM4 was higher in MCF-7 cells. The GRM4 expression could be activated when VU0364439 and VU0364770 were used solely or in combination. **Conclusion:** GRM4 positive allosteric modulators could inhibit breast cancer cell proliferation and promote cell apoptosis. This biological effect might function by activating GRM4 expression. This study lays the foundation for exploring the effect of GRM4 in breast cancer and developing novel strategies for breast cancer targeted therapy.

[**Key words**] Glutamate metabotropic receptor 4; Positive allosteric modulators; Breast cancer; Targeted therapy

谷氨酸受体是介导谷氨酸生物学作用的重要门控开关, 是多种中枢神经系统疾病的治疗靶点。谷氨酸受体分为离子型谷氨酸受体和代谢型谷氨酸受体, 其中代谢型谷氨酸受体4 (glutamate metabotropic receptor4, GRM4) 属于G蛋白偶联受体家族, 可通过G蛋白介导直接与离子通道偶联, 抑制 K^+ 和 Ca^{2+} 通道开放, K^+ 电导降低, 引起缓慢的去极化, 增加细胞的兴奋性^[1], 激活第二信使及下游信号转导系统。*GRM4*基因已被定位在EJM1区域内, 并代表高级候选基因^[2], 是GRM的一员, 在离子通道调节、神经元兴奋与神经递质释放等方面发挥重要作用。近年来, GRM4在肿瘤生物学中的机制研究逐渐被人们关注。研究表明GRM4在结肠癌^[3]、前列腺癌^[4]及骨肉瘤^[5]等多种肿瘤中高表达并与肿瘤患者的预后相关, 并且激活GRM4能够抑制成神经管细胞瘤的增殖能力^[6]。但GRM4在乳腺癌中的生物学作用尚不清楚。

正向别构调节剂 (positive allosteric modulators, PAM) 是结合在别构酶的调节部位并激活该酶催化活性的生物分子, 也是研究候选靶蛋白生物学功能的重要工具。近期, Selleck公司推出了两款GRM4的正向别构调节剂: VU0364439 (分子式: $C_{18}H_{13}C_{12}N_3O_3S$, 相对分子质量: 422.29) 和VU0364770 ($C_{12}H_9ClN_2O$,

相对分子质量: 232.67), 作为治疗帕金森病、焦虑和疼痛的候选药物。VU0364439的半最大有效浓度 (concentration for 50% of maximal effect, EC_{50}) 为19.8 nmol/L, 是目前为止最强的GRM4正性变构调节剂^[7]。VU0364770是一种新研发的特异性的GRM4正向别构调节剂 ($EC_{50}=1.1 \mu\text{mol/L}$); 经测试VU0364770对68种细胞膜受体, 包括其他代谢性谷氨酸受体亚型均没有作用活性^[8]。两种正向别构调节剂均对GRM4有较强的别构激活作用, 且具有较好的特异性。

本研究拟分析VU0364439和VU0364770对多种乳腺癌细胞系增殖及凋亡的影响, 为探索以GRM4为靶点的新的乳腺癌治疗方案提供思路。

1 材料和方法

1.1 细胞培养与实验试剂

人乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-231、SK-BR-3、BT474、HCC1937、MDA-MB-453和人正常乳腺癌上皮细胞MCF-10A均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库; 细胞用DMEM培养基培养, 在37 °C、 CO_2 体积分数为5%的培养温箱中生长。VU0364439 (Cat: S8035, CAS: 1246086-78-1, 10 mmol/L溶于1 mL DMSO) 和VU0364770 (Cat: S2862, CAS: 61350-00-3, 10 mmol/L溶于1 mL DMSO) 购自美

国Selleck公司(图1); CellTiter-Glo[®]细胞活性检测试剂购自美国Promega公司(Cat: G7570); 总RNA提取试剂盒(Cat: ER101-01)、逆转录试剂盒(AH341-01)、实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)试剂盒(Cat: AQ131-01)和细胞凋亡试剂盒(Cat: FA101-01)购自北京全式金生物技术有限公司。

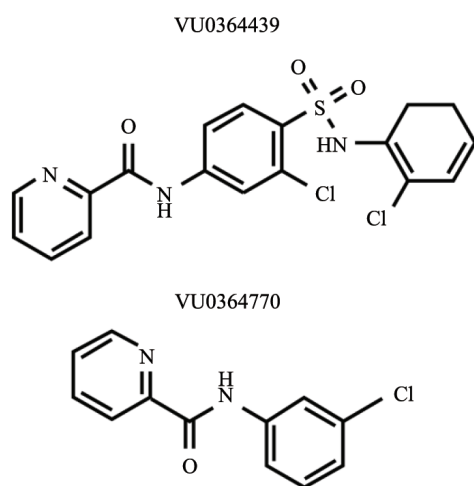


图1 VU0364439和VU0364770的分子结构

Fig. 1 The molecular structures of VU0364439 and VU0364770

1.2 化学发光法测定细胞增殖活性

将乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MCF-7和SK-BR-3铺于96孔板中,每孔约1万个细胞,在各孔中分别单独加入不同浓度的VU0364439和VU0364770(4、20和100 μmol/L)及联合加入VU0364439和VU0364770(4、20和100 μmol/L),以相应浓度的DMSO溶液作为阴性对照组并准备无细胞培养基的对照孔,以获得背景发光值。48 h后,每孔加入100 μL CellTiter-Glo[®]试剂,震荡混匀2 min使得细胞裂解,室温温育10 min后,用分光光度计记录荧光信号。

1.3 流式细胞术测定细胞凋亡

将乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MCF-7和SK-BR-3铺于6孔板中,每孔约40万个细胞,在各孔中分别单独加入不同浓度的VU0364439和VU0364770(4、20和100 μmol/L)及联合加入VU0364439和VU0364770(4、20和100 μmol/L),以相应浓度的DMSO溶液作为阴性对照组,48 h后,使用不含EDTA的胰酶消化收集细胞;用预冷的PBS洗涤细胞2次,500 × g,

4 °C离心5 min,收集细胞;加入100 μL预冷的1 × Annexin V结合缓冲液,重悬细胞;加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI,轻轻混匀;室温避光反应15 min;加入400 μL预冷的1 × Annexin V结合缓冲液,轻轻混匀,将样品于冰上避光放置,1 h内用流式细胞仪检测。

1.4 RTFQ-PCR检测

1.4.1 RNA的提取

1.4.1.1 样品处理

使用胰蛋白酶处理6孔板中培养的乳腺癌细胞(约4 × 10⁵个),4 °C 12 000 × g离心5 min;轻弹离心管底部,使细胞沉淀松散,加入相应体积的裂解液BB4(每1 mL BB4,加10 μL β-巯基乙醇,现用现配)。剧烈旋涡震荡,直至细胞沉淀分散均匀;用RNase-Free的针管反复吹吸5~10次,使溶液均质化;室温下12 000 × g离心5 min,吸上清液于RNase-Free的离心管中。

1.4.1.2 RNA提取

向上清液中加入1倍体积70%乙醇,漩涡振荡,分散沉淀;将得到的溶液和沉淀一起加入离心柱中,12 000 × g离心30 s,弃掉流出液;向离心柱中加入500 μL CB4,室温12 000 × g离心30 s,弃掉流出液;加入500 μL WB4,室温12 000 × g离心30 s,弃掉流出液;室温12 000 × g离心2 min,彻底去除残留的乙醇;将离心柱转入一个新1.5 mL RNase-Free的离心管中,并向离心柱中央加50 μL RNase-Free Water,室温静置1 min;室温12 000 × g离心2 min,洗脱RNA;将RNA置于-80 °C保存。

1.4.2 逆转录与RTFQ-PCR反应

逆转录反应体系:总RNA 50 ng,5 × SuperMix 4 μL,gDNA去除剂1 μL,加RNase-Free Water至20 μL。轻轻混匀体系,50 °C温育15 min,85 °C加热5 s失活逆转录酶及gDNA去除剂。

RTFQ-PCR反应体系:cDNA模板 2 μL,正向引物0.2 μmol/L,反向引物0.2 μmol/L,2 × RTFQ-PCR SuperMix 10 μL,加ddH₂O至20 μL反应体系。

RTFQ-PCR反应条件:94 °C 30 s;94 °C 5 s,60 °C 30 s,40~45个循环,溶解曲线。GRM4上游引物为5'-TGAGGGTGCTGTCACGATCC-3',GRM4

下游引物为5'-ACGTGGCTGCCCTTCTTGAG-3'; β -actin上游引物为5'-ACAGAGCCTCGCC TTTGCCGAT-3', β -actin下游引物为5'-CTTG CACATGCCGGAGCCGTT-3'。

2 结 果

2.1 GRM4正向别构调节剂抑制乳腺癌细胞增殖

在3种乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MCF-7、SK-BR-3中, VU0364439和VU0364770在浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对3种乳腺癌细胞的增殖均有显著的抑制作用, 而浓度为4和20 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制

作用不明显。VU0364439和VU0364770联合使用时, 也能够抑制3种乳腺癌细胞的增殖, 但抑制效果与单独使用VU0364439和VU0364770基本一致(图2)。

2.2 GRM4正向别构调节剂促进乳腺癌细胞凋亡

在MCF-7细胞中, DMSO处理组的平均细胞凋亡百分比(Q2+Q3)为16.36%, 而加入VU0364439和VU0364770后, 细胞凋亡百分比分别达到了32.47%和42.71%; 与对照组相比, 联合使用VU0364439和VU0364770也显著促进MCF-7细胞凋亡, 但联合使用与单独使用相比差异无统计学意义(图3)。

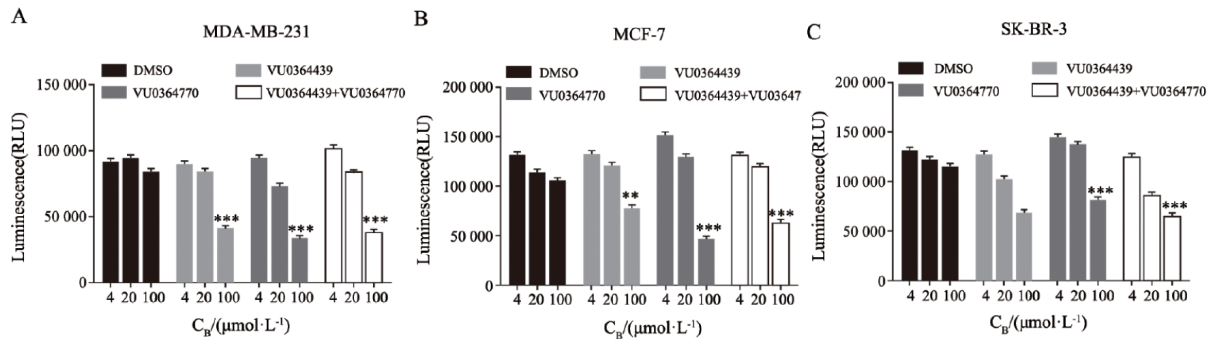


图2 化学发光法测定VU0364439和VU0364770的单独使用和联合使用对3种乳腺癌细胞增殖能力的影响

Fig. 2 Chemiluminescence assay showed the effect of VU0364439 and VU0364770, which were used alone or in combination on the proliferation of three breast cancer cell lines

A: MDA-MB-231; B: MCF-7; C: SK-BR-3; ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$

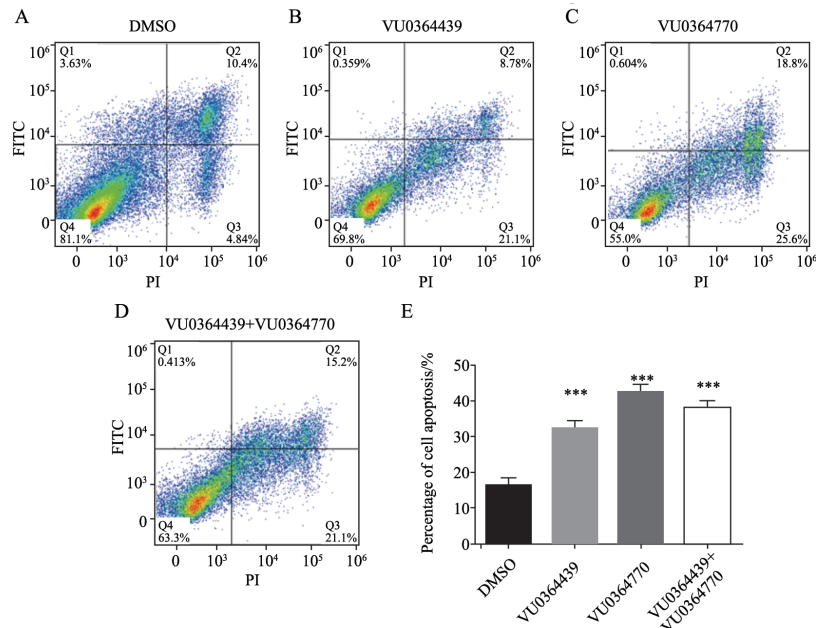


图3 流式细胞术检测单独使用或联合使用VU0364439和VU0364770对乳腺癌细胞系MCF-7凋亡的影响

Fig. 3 Flow cytometry assay showed the effect of VU0364439 and VU0364770, which were used alone or in combination on the apoptosis of breast cancer cell line MCF-7

A: DMSO; B: VU0364439; C: VU0364770; D: VU0364439+VU0364770; E: Percentage of cell apoptosis; ***: $P < 0.001$

2.3 GRM4正向别构调节剂促进GRM4基因的表达

RTFQ-PCR检测GRM4在6种不同的乳腺癌细胞系及正常乳腺上皮细胞MCF-10A中的表达,如图4A所示,GRM4在多数乳腺癌细胞及对照细胞中表达较低,而在MCF-7中表达水平最高。在MCF-7细胞中,单独或联合使用VU0364439和VU0364770均能促进GRM4的表达,而联合使用VU0364439和VU0364770与单独使用对GRM4基因表达的促进作用差异无统计学意义(图4B)。

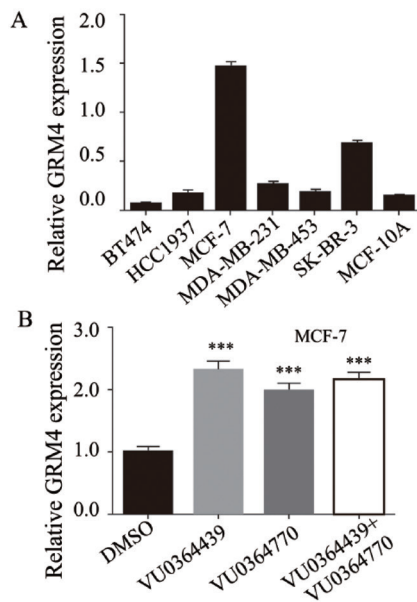


图4 VU0364439和VU0364770促进GRM4的表达

Fig. 4 VU0364439 and VU0364770 promoted the expression of GRM4

A: RTFQ-PCR detection of *GRM4* gene expression in 6 breast cancer cells and normal breast cell MCF-10A; B: The effect of VU0364439 and VU0364770, which were used alone or in combination, on *GRM4* gene expression examined by RTFQ-PCR; ***: $P < 0.001$

3 讨论

GRM4是代谢型谷氨酸受体的一种亚型,是G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)家族C组的成员。GRM4在肿瘤生物学中的研究报道较少,原因之一就是缺乏选择性配体,特别是通过正位作用位点以外的区域起作用的别构调节剂^[9]。本研究以体外培养的乳腺

癌细胞系为研究对象,初步探讨了VU0364439和VU0364770对乳腺癌细胞系增殖和凋亡的影响。研究发现,当两种别构调节剂达到一定使用浓度时,均能够抑制多种乳腺癌细胞的增殖,并且促进乳腺癌细胞凋亡;两种别构调节剂联合使用时,并没有起到叠加效应。两种别构调节剂均能够促进GRM4基因的表达,但联合使用与单独使用相比差异无统计学意义。以上结果表明,GRM4可能是乳腺癌的抑癌基因。

别构调节剂是结合在别构酶的调节部位调节该酶催化活性的生物分子。别构调节剂可以是激活剂(正向),也可以是抑制剂(反向)。正向别构调节剂与GRM4的结合与调控作用机制极为复杂,可能涉及到蛋白构象的重组或相互作用蛋白及下游信号通路的改变,还可能通过正反馈通路促进GRM4基因的表达。事实上,一些正向别构调节剂已在肿瘤的治疗中体现出了其潜在的临床应用价值,如A型氨基丁酸受体GABAAR的正向别构调节剂3 α -diol可以影响前列腺癌细胞的增殖^[10]; MRS1477是TRPV1通道的正向别构调节剂,其与辣椒素的联合使用能够协同发挥抑制乳腺癌增殖的作用^[11]。

GRM4作为抑癌基因的作用仅在神经管细胞瘤中有报道,而研究表明GRM家族的其他成员在多种肿瘤中发挥重要作用。GRM3主要表达于小鼠骨髓瘤细胞系SP2/0的细胞凋亡中期,敲低GRM3能显著抑制细胞凋亡^[12]; GRM5与肝癌细胞的发生、发展关系密切,其抑制剂MPEP能够促进肝癌细胞凋亡,抑制肝癌细胞迁移^[13]。GRM1是报道最多的GRM家族成员,其可作为乳腺癌抗血管生成治疗方案的药物作用靶点^[14],也是软骨黏液样纤维瘤中重要的致癌驱动基因^[15]。由此可见,GRM家族的不同成员在各种恶性肿瘤中发挥不同作用。

综上所述,本研究初步对GRM4的两种正向别构调节剂对乳腺癌细胞增殖和凋亡的作用进行了探讨,进一步配合一些常规化疗药物进行辅助治疗验证是我们下一步的研究目标,本研究为探索以GRM4为靶点的乳腺癌治疗方案奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 王 昊, 戴双双, 许民辉. 代谢型谷氨酸受体调节剂在颅脑损伤后应用研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2014, 11(19): 2758-2760, 2763.
- [2] MUHLE H, VON SPICZAK S, GAUS V, et al. Role of GRM4 in idiopathic generalized epilepsies analysed by genetic association and sequence analysis [J]. *Epilepsy Res*, 2010, 89(2-3): 319-326.
- [3] CHANG H J, YOO B C, LIM S B, et al. Metabotropic glutamate receptor 4 expression in colorectal carcinoma and its prognostic significance [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(9): 3288-3295.
- [4] PISSIMISSIS N, PAPAGEORGIOU E, LEMBESSIS P, et al. The glutamatergic system expression in human PC-3 and LNCaP prostate cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(1): 371-377.
- [5] YANG W, MAOLIN H, JINMIN Z, et al. High expression of metabotropic glutamate receptor 4: correlation with clinicopathologic characteristics and prognosis of osteosarcoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(3): 419-426.
- [6] IACOVELLI L, ARCELLA A, BATTAGLIA G, et al. Pharmacological activation of mGlu4 metabotropic glutamate receptors inhibits the growth of medulloblastomas [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(32): 8388-8397.
- [7] ENGERS D W, GENTRY P R, WILLIAMS R, et al. Synthesis and SAR of novel, 4-(phenylsulfamoyl)phenylacetamide mGlu4 positive allosteric modulators (PAMs) identified by functional high-throughput screening (HTS) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(17): 5175-5178.
- [8] JONES C K, BUBSER M, THOMPSON A D, et al. The metabotropic glutamate receptor 4-positive allosteric modulator VU0364770 produces efficacy alone and in combination with L-DOPA or an adenosine 2A antagonist in preclinical rodent models of Parkinson's disease [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 340(2): 404-421.
- [9] 乔 松. 探讨代谢型谷氨酸受体4对树突状细胞内环磷酸腺苷水平的影响 [D]. 大连: 大连医科大学, 2016.
- [10] XIA D, LAI D V, WU W, et al. Transition from androgenic to neurosteroidal action of 5α -androstane- 3α , 17β -diol through the type A γ -aminobutyric acid receptor in prostate cancer progression [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 178: 89-98.
- [11] NAZIROĞLU M, ÇIĞ B, BLUM W, et al. Targeting breast cancer cells by MRS1477, a positive allosteric modulator of TRPV1 channels [J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): 0179950.
- [12] 刘晓玲. 代谢型谷氨酸受体3(Grm3)在系统性红斑狼疮和骨髓瘤B细胞中的功能研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [13] 袁记方, 张晨光, 王舒婷, 等. MPEP阻断mGlu5抑制肝癌细胞HepG2增殖 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013(4): 338-346.
- [14] SPEYER C L, HACHEM A H, ASSI A A, et al. Metabotropic glutamate receptor-1 as a novel target for the antiangiogenic treatment of breast cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): 88830.
- [15] NORD K H, LILLJEBJÖRN H, VEZZI F, et al. GRM1 is upregulated through gene fusion and promoter swapping in chondromyxoid fibroma [J]. *Nat Genet*, 2014, 46(5): 474-477.

(收稿日期: 2018-03-15 修回日期: 2018-06-21)