

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.18.009

文章编号: 1005-8982(2017)18-0047-04

微小核糖核酸 101 异常表达与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的关系

刘平贤,张浩,李鹏鹏

(河南省南阳市中心医院 乳腺外科,河南 南阳 473009)

摘要:目的 探讨微小核糖核酸 101(miRNA-101)在人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的表达及其对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 中 miRNA-101 的表达。采用 Lipofectamine™ 2000 将 miRNA-101-mimic/inhibitor/NC 分别转染至 MDA-MB-231 细胞中,通过 qRT-PCR 检测 miRNA-101 的转染效率,CCK-8 实验检测 MDA-MB-231 细胞的增殖。**结果** miRNA-101 在 MDA-MB-231 细胞中的表达水平低于正常乳腺细胞 MCF-10a($P < 0.01$)。转染 miRNA-101 mimic 后 MDA-MB-231 细胞的增殖能力减弱($P < 0.05$),而转染 miRNA-101 inhibitor 后细胞的增殖能力增强($P < 0.05$)。**结论** miRNA-101 在乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中低表达,转染 miRNA-101 mimic 后乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖减弱。

关键词: 乳腺癌;MDA-MB-231;miRNA-101;增殖

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Preliminary study of correlation between abnormally expressed miRNA-101 and proliferation of breast cancer MDA-MB-231 cells

Ping-xian Liu, Hao Zhang, Kun-peng Li

(Department of Breast Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473009, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of miRNA-101 and its effect on the proliferation ability in breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of miRNA-101 in breast cancer MDA-MB-231 cells and normal mammary epithelial MCF-10A cells. miRNA-101-mimic/inhibitor/NC were transfected into MDA-MB-231 cells by Lipofectamine™ 2000. qRT-PCR was used to detect the transfection efficiency. CCK-8 assay was used to evaluate the proliferation ability of MDA-MB-231 cells after the transfection. **Results** The expression of miRNA-101 in MDA-MB-231 cells was significantly lower than that in MCF-10a cells ($P < 0.05$). The proliferation ability of MDA-MB-231 cells was significantly decreased after transfection with miRNA-101 mimic ($P < 0.05$), while the proliferation ability was significantly increased after transfection with miRNA-101 inhibitor ($P < 0.05$). **Conclusions** miRNA-101 is down-regulated in MDA-MB-231 cells. The proliferation ability of breast cancer MDA-MB-231 cells is inhibited after transfection with miRNA-101-mimic.

Keywords: breast cancer; MDA-MB-231; miRNA-101; proliferation

微小核糖核酸(micro ribonucleic acid, miRNA)是内源性非编码短链 RNA,在转录后水平调节血管生成、细胞周期、细胞凋亡、细胞侵袭和迁移等肿瘤

相关基因的表达,进而影响肿瘤的增殖、侵袭和转移,最终可导致肿瘤的发生^[1-4]。有研究表明,miRNA-101 在前列腺癌、膀胱癌等多种癌症中表达下调并与肿瘤

发生发展密切相关^[3]。研究报道,miRNA-101 可通过调控 COX-2 的表达从而抑制肺癌和宫颈癌细胞的增殖和侵袭^[4-5]。在乳腺癌中也发现多种 miRNA 表达异常,但 miRNA-101 在乳腺癌中的表达及其在乳腺癌发生、发展中的机制研究尚少^[6]。本研究拟采用乳腺癌 MDA-MB-231、正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞,观察 miRNA-101 在两者中表达的差异并探讨其对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 MDA-MB-231 为人乳腺癌细胞株, MCF-10A 为人正常乳腺上皮细胞,作为正常组^[7],两细胞株均由本实验室购于美国模式培养物储存库(ATCC),用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37℃、5%二氧化碳 CO₂ 的培养箱中培养。

1.1.2 主要试剂与仪器 RPMI 1640 培养基(购自美国 Gibco 公司),胎牛血清(购自上海依科赛公司),Trizol 试剂、总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒(购自日本 TaKaRa 公司),miRNA-101 引物(上海生工生物工程公司合成),转染试剂 Lipofectamine™ 2000、Opti-MEM(购自美国 Invitrogen 公司),miRNA-101 mimic、miRNA-101 inhibitor 及 miRNA NC(合成自美国 Invitrogen 公司),CCK-8 试剂盒(购自碧云天生物技术研究所),6 孔板、96 孔板和细胞培养皿(购自美国 Corning 公司),细胞培养箱(购自美国 Thermo 公司),PCR 仪 (BS97MyCycler)(购自美国 BIO-RAD 公司),qRT-PCR (ABI-7500) 仪(购自美国 ABI 公司),倒置显微镜 (TS100-F)(购自日本尼康公司),酶标仪 (Multiskan Ascent)(购自美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 检测 miRNA-101 在正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 和乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的表达 将 MCF-10A 和 MDA-MB-231 细胞分别按照 $1.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ 个/孔细胞浓度接种 6 孔板,48 h 后分别收集细胞,PBS 洗涤,12 000 r/min 离心 5 min 后,加入 0.5 ml Trizol。按照 miRNA 分离提取试剂盒所提供的步骤提取 miRNA。用紫外分光光度计测定所提取 RNA 的浓度及纯度,之后将其逆转录为 cDNA,反应条件:25℃ 保持 30 min,再 42℃

保持 30 min,最后 85℃ 保持 5 min。以 cDNA 为模板,按照 qRT-PCR 试剂盒提供的步骤加入相关试剂及 miRNA-101 引物(见表 1),以 U6 为内参(见表 1),在 ABI-7500 实时荧光定量仪上进行 PCR 扩增。反应条件:先 95℃ 下保持 3 min,然后做 40 次循环;每次循环为 95℃ 保持 12 s,再 62℃ 保持 40 s。

表 1 qRT-PCR 的引物

引物名称	引物序列
miRNA-101	正向:5'-ACGGGCGAGCTACAGTACTGTG-3'
	反向:5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'
U6	正向:5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3'
	反向:5'-GGAACGCTTCCAGCAATTTG-3'

1.2.2 miRNA 转染 MDA-MB-231 细胞按照 $1.0 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ 个/孔细胞浓度接种 6 孔板,置于 37℃、5% CO₂ 孵箱培养 24 h,细胞融合率为 30%~50% 时进行转染。分别转染 miRNA-101 mimic、miRNA-101 inhibitor 及 miRNA NC,序列分别如下:miRNA-101 mimic:5'-UACAGUACUGUGAUAAACUGAA-3', miRNA-101 inhibitor:5'-UUCAGUUAUCACAGUACUGUA-3', miRNA NC:5'-UCACAACCUCCUAGAAA GAGUAGA-3'。按照 Lipofectamine™ 2000 使用说明书瞬时转染。转染 24h 后,分别收集细胞,qRT-PCR 检测转染后细胞内 miRNA-101 的表达水平,操作方法按照 1.2.1。

1.2.3 CCK-8 法检测 miRNA-101 过表达对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 活力的影响 将 MDA-MB-231 细胞以 2×10^3 个/孔细胞,加入 96 孔培养板中,培养 24 h 后分别转染 miRNA-101 mimic、miRNA-101 inhibitor 及 miRNA NC,并设置 MDA-MB-231 空白转染组,每组 6 个复孔。分别在转染后 24、48、72 及 96 h 加入 10 μl CCK-8 溶液,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中孵育 1 h。选择 450 nm 波长,用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度值(OD),另设单孔只加入培养基不加入 MDA-MB-231 细胞作为空白对照。细胞活力 $\times (\%) = [A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})] \times 100\%$,其中 A(加药)为具有细胞、CCK 溶液和药物溶液孔的吸光度,A(空白)为具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞孔的吸光度,A(0 加药)为具有细胞、CCK 溶液而没有药物溶液孔的吸光度。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述,均行正态性检验。多组间

采用单因素方差分析(one way ANOVA),多时点观测资料则行重复测量设计的方差分析;两组间的比较用 t 检验(Student's t test)或 LSD- t 检验,时间比较为调整显著性水准后的差值 t 检验;此外相关性分析用非参数相关性 Spearman 检验;时间比较的显著性水准 α' 按 Bonferroni 校正法调整, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-101 在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的表达

miRNA-101 在乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中的表达相对值为 (0.61 ± 0.09) ,正常乳腺上皮细胞 MCF-10a 中的相对表达值为 (1.00 ± 0.01) ,经 t 检验,差异有统计学意义($t=10.550, P=0.000$)。

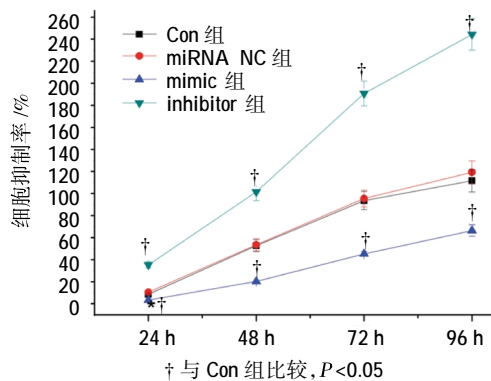
2.2 miRNA-101 mimic 及 miRNA-101 inhibitor 成功转染 MDA-MB-231 细胞

miRNA-101 转染后,各组 miRNA-101 的表达相对值比较,差异有统计学意义($F=1\ 746.649, P=0.000$)。mimic 组细胞内 miRNA-101 的表达相对值为 (6.03 ± 0.31) ,与 miRNA NC 组细胞内 miRNA-101 的表达相对值 (1.00 ± 0.00) 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);miRNA-101 inhibitor 转染后,细胞内 miRNA-101 的表达相对值为 (0.45 ± 0.05) ,与 miRNA NC 组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 miRNA-101 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的抑制作用

在 miRNA-101-mimic/inhibitor/NC 转染 MDA-MB-231 细胞后,分别于 24、48、72 及 96 h 时检测细胞增殖活力。经多因素重复测量设计的方差分析,结果发现:①不同时间的细胞活力有差异($F=2193.131, P=0.000$);②组间细胞活力有差异($F=449.528, P=0.000$),过表达 miRNA-101 后,MDA-MB-231 的细胞增殖活力低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而沉默 miRNA-101 后,MDA-MB-231 的细胞

增殖活力高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 miRNA NC 与空白对照组(Con 组)差异无统计学意义($P > 0.05$);③实验组与对照组的细胞活力变化趋势有差异($F=150.024, P=0.000$),miRNA-101 可以抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖。见表 2 和附图。



附图 表达 miRNA-101 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞体外增殖能力

3 讨论

乳腺癌是目前女性最常见的恶性肿瘤,在我国发病率呈逐年上升趋势,是常见的女性恶性肿瘤患者第 6 位死亡原因^[6]。分子靶向治疗是近年来新兴的治疗手段,寻找有效的治疗靶点是其研究的热点,而 miRNA 的出现为研究乳腺癌的诊断和治疗提供新的靶点^[3,9]。

miRNA-101 是哺乳动物常见序列之一,在多种细胞中检测到 miRNA-101 存在。人类 miRNA-101 包含 2 种前体 RNA:miRNA-101-1 和 miRNA-101-2;其长度分别为 75 和 79 bp,成熟 miRNA-101 含 21 个碱基对。miRNA 库中(<http://mirbase.org>)显示其可与 EZH2 及 MYCN 基因特异性结合发挥调节作用,与前者结合力较强。大量研究表明,在肿瘤的发生与发展过程中,miRNA-101 可抑制细胞分裂增殖,并在凋亡调控中起重要作用,其在功能上表现为抑癌基因特性^[10-12]。

目前在前列腺癌、肝细胞癌等多种肿瘤中发现 miRNA-101 表达下调,对 EZH2 基因具有负调控作用^[13];在大肠癌细胞中,miRNA-101 通过下调 SphK1 的表达从而抑制大肠癌细胞的生长^[14],说明 miRNA-101 与体外肿瘤细胞迁移、浸润、克隆形成和发生肿瘤密切相关。本实验 miRNA-101 在 MDA-MB-231 细胞中低表达。采用 CKK-8 法测定细胞增殖活性,结果显示,上调 miRNA-101 表达,随时间推移,呈抑制

表 2 miRNA-101 对 MDA-MB-231 细胞活力的影响 ($n=6, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
Con 组	8.49 ± 0.88	52.79 ± 5.34	93.57 ± 8.16	111.85 ± 10.18
miRNA NC 组	10.43 ± 0.77	53.50 ± 5.59	95.53 ± 7.47	119.47 ± 10.27
mimic 组	3.24 ± 0.25	20.22 ± 0.57	45.15 ± 2.25	66.21 ± 5.31
inhibitor 组	35.18 ± 2.77	101.45 ± 8.00	190.33 ± 11.20	244.13 ± 14.31

乳腺癌细胞增殖趋势,下调 miRNA-101 表达,随时间推移,乳腺癌细胞增殖能力增强。表明 miRNA-101 可抑制乳腺癌细胞分裂增殖,在功能上表现为抑癌基因特性。

在前列腺癌、乳腺癌及膀胱癌等肿瘤中,miRNA-101 通常靶向作用于 EZH2 基因的 3'-端非翻译区。miRNA 通常在转录后水平对靶基因调控,与靶基因的 mRNA 的 3'-端的非翻译区以碱基配对的方式来执行对靶基因的切割或者翻译的抑制功能,从而实现自身的功能。然而在乳腺癌中,miRNA-101 的靶基因的确需要进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] NEGRINI M, CALIN G A. Breast cancer metastasis: a microRNA story[J]. *Breast Cancer Res*, 2008, 10(2): 203.
- [2] 方蕾, 金艺凤. miRNA 与肺癌的关系[J]. *辽宁医学院学报*, 2016, 37(1): 109-112.
- [3] GUI T, SHEN K. miRNA-101: a potential target for tumor therapy[J]. *Cancer Epidemiol*, 2012, 36(6): 537-540.
- [4] LV P, ZHANG P, LI X, et al. Micro ribonucleic acid (RNA)-101 inhibits cell proliferation and invasion of lung cancer by regulating cyclooxygenase-2[J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(6): 778-784.
- [5] HUANG F, LIN C, SHI Y H, et al. MicroRNA-101 inhibits cell proliferation, invasion, and promotes apoptosis by regulating cyclooxygenase-2 in HeLa cervical carcinoma cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(10): 5915-5920.
- [6] YAHYA S M, ELSAYED G H. A summary for molecular regulations of miRNAs in breast cancer[J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(6): 388-396.
- [7] GRIEVE S, GAO Y, HALL C, et al. Calpain genetic disruption and HSP90 inhibition combine to attenuate mammary tumorigenesis[J]. *Mol Cell Biol*, 2016, 36(15): 2078-2088.
- [8] 郑莹, 吴春晓, 吴凡, 等. 中国女性乳腺癌死亡现况和发展趋势[J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(2): 150-154.
- [9] CORCORAN C, FRIEL A M, DUFFY M J, et al. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer[J]. *Clin Chem*, 2011, 57(1): 18-32.
- [10] HWANG C, GIRI V N, WILKINSON J C, et al. EZH2 regulates the transcription of estrogen-responsive genes through association with REA, an estrogen receptor corepressor[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 107(2): 235-242.
- [11] YOON K A, GIL H J, HAN J, et al. Genetic polymorphisms in the polycomb group gene EZH2 and the risk of lung cancer[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(1): 10-16.
- [12] FU L L, WEN X, BAO J K, et al. MicroRNA-modulated autophagic signaling networks in cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(5): 733-736.
- [13] LIU J X, ZHANG Q F, TIAN C H, et al. miRNA-101 inhibits the expression of the enhancer of zeste homolog 2 in androgen-independent prostate cancer LNCaP cell line[J]. *National Journal of Andrology*, 2015, 21(6): 500-503.
- [14] CHEN M B, YANG L, LU P H, et al. MicroRNA-101 down-regulates sphingosine kinase 1 in colorectal cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(4): 954-960.