

# miR-340对乳腺癌MDA-MB231细胞 增殖和凋亡的影响

欧阳倩雯 曹亚丽

江西省南昌市第三医院乳腺科, 江西 南昌 330009

**[摘要]** **背景与目的:** 既往研究表明, 微小RNA-340(miR-340)能负性调控多种肿瘤的进展, 但其在乳腺癌细胞增殖和凋亡中的研究较少, 本研究旨在探讨miR-340对乳腺癌MDA-MB231细胞增殖和凋亡的作用。**方法:** 利用脂质体Lipofectamine™2000将pre-miR-340或anti-miR-340瞬时转染至乳腺癌MDA-MB231细胞, 通过RT-PCR检测miR-340 mRNA的水平, 蛋白质印迹法(Western blot)检测cleaved-caspase-3蛋白的表达, MTT比色法检测细胞增殖的抑制情况, 流式细胞仪检测细胞凋亡。**结果:** Pre-miR-340增加了MDA-MB231细胞中miR-340表达, 同时增加cleaved-caspase-3蛋白表达、抑制MDA-MB231细胞增殖并促进其凋亡。而anti-miR-340抑制了MDA-MB231细胞中miR-340表达, 并且抑制cleaved-caspase-3蛋白表达, 促进了MDA-MB231细胞增殖, 抑制了MDA-MB231细胞的凋亡。**结论:** miR-340转染后能上调MDA-MB231细胞中cleaved-caspase-3蛋白的表达从而抑制细胞增殖, 促进其凋亡。

**[关键词]** 乳腺癌MDA-MB231细胞; miR-340; 增殖; 凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2014.07.007

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2014)07-0517-04

**The effect of miR-340 on proliferation and apoptosis of breast cancer cell MDA-MB231** OUYANG Qian-wen, CAO Ya-li (Department of Breast Surgery, the Third Hospital of Nanchang, Nanchang Jiangxi 330009, China)

Correspondence to: CAO Ya-li E-mail: 364590189@qq.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** MicroRNA-340 (miR-340) has been demonstrated to play a role of negative regulation in many kinds of tumor, however, there are few reports about the relationship between miR-340 in proliferation and apoptosis of breast cancer cell. This study was aimed to explore the effect of miR-340 on proliferation and apoptosis of breast cancer cell MDA-MB231. **Methods:** The pre-miR-340 or anti-miR-340 were transiently transfected into breast cancer cell MDA-MB231 with Lipofectamine™2000. miR-340 level was detected by RT-PCR. The Western blot was performed to detect the protein level of cleaved-caspase-3. The inhibition rate of cell proliferation was evaluated by MTT assay. The cell apoptosis was studied by flow cytometry. **Results:** The pre-miR-340 facilitated the expression of miR-340 in MDA-MB231 cells. The pre-miR-340 enhanced the protein level of cleaved-caspase-3, inhibited the proliferation of MDA-MB231 cells and increased its apoptosis. On the contrary, the expression of miR-340 was inhibited by anti-miR-340 in MDA-MB231 cells. The protein level of cleaved-caspase-3 was reduced after the anti-miR-340-transfected MDA-MB231 cells. Anti-miR-340 promoted the proliferation of MDA-MB231 cells. Decreased apoptosis of MDA-MB231 cells was observed by flow cytometry. **Conclusion:** The overexpression of miR-340 can effectively inhibit the proliferation and increase the apoptosis of MDA-MB231 cells, which may be explained by up-regulating of protein cleaved-caspase-3 level.

**[Key words]** Breast cancer cell MDA-MB231; miR-340; Proliferation; Apoptosis

乳腺癌的高侵袭和转移能力是导致乳腺癌患者死亡的主要原因, 而癌细胞增殖快和凋亡减少是其侵袭和转移的基础。微小RNA(microRNA,

miRNA, miR)是一类广泛存在于真核细胞中长约22个核苷酸(nt)的单链、非蛋白编码RNA, 通过与靶基因互补位点结合在转录后水平而调控靶基因的表达和翻译, 在细胞生理活动中

有重要作用<sup>[1]</sup>。在肿瘤研究中发现, miR发挥类似于癌基因或抑癌基因的作用, 参与肿瘤细胞的增殖、分化和细胞凋亡过程<sup>[2-3]</sup>。研究表明, 微小RNA-340(miR-340)在乳腺癌组织中表达减少<sup>[4]</sup>, 并且能够抑制MDA-MB231的侵袭和转移<sup>[5]</sup>。本研究进一步探索miR-340在MDA-MB231细胞凋亡中的调节作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人乳腺癌细胞系MDA-MB231为本室保存。pre-miR-340或anti-miR-340及无关序列由上海吉玛公司合成。Hairpin-it<sup>TM</sup> miRNAs real-time PCR Quantization Kit购自上海吉玛公司。转染试剂脂质体Lipofectamine<sup>TM</sup>2000、凋亡检测试剂盒购自美国Invitrogen公司; MTT购自美国Sigma公司; 新生小牛血清购自杭州赛乐生物科技; caspase-3(ab49822)、 $\beta$ -actin(ab8226)抗体购自美国abcam公司; 山羊抗兔二抗(sc-2040)、山羊抗鼠二抗(sc-2039)购自美国Santa cruz公司。

### 1.2 细胞培养和转染

MDA-MB-231细胞用含10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养基, 在37℃、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的饱和湿度条件下培养。将人乳腺癌MDA-MB-231细胞分别以每孔 $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 接种到96、12、6孔板上。待细胞生长70%~80%时, 按照转染试剂盒说明书, 加入pre-miR-340或anti-miR-340进行转染, 以无关序列作为空白对照。

### 1.3 Real-time PCR检测法检测miR-340的表达水平

转染后6 h收集细胞, 抽提纯化总RNA, 按照Hairpin-it<sup>TM</sup> miRNAs real-time PCR Quantization Kit提供的说明书合成cDNA及进行real-time PCR, 应用标准曲线法对结果进行分析, 利用已知浓度的标准品制作标准曲线, 由标准曲线

计算出检测样本miR-340 ct值。

### 1.4 蛋白质印迹法(Western blot)检测caspase-3蛋白表达

转染后24 h收集细胞, 采用RIPA(美国Roche公司)裂解细胞, 采用Bradford法对于蛋白质进行定量。10% SDS-PAGE胶电泳分离蛋白质, 转膜, 用5% BSA封闭1 h, 一抗(caspase-3、 $\beta$ -actin抗体1:1 000) 4℃温育过夜, TBST漂洗, 二抗(抗鼠和抗兔1:10 000)室温温育1 h, TBST洗膜, 采用美国Millipore公司荧光试剂盒显色。

### 1.5 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞生长能力

每12 h检测1个实验组细胞的存活率。具体方法如下: 加5 mg/mL的MTT 20  $\mu$ L于各孔中, 培养4 h后小心吸去板中的培养液, 各孔加150  $\mu$ L DMSO, 振动10 min后用酶标仪(波长490 nm)测定各孔的A值, 代表细胞的存活率, 检测2 d。

### 1.6 流式细胞技术检测细胞凋亡变化

采用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒, 对经转染24 h后的细胞消化、预冷PBS清洗, 先后用Annexin V-FITC结合和PI染色后, 用流式细胞仪进行分析。

### 1.7 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件对数据进行分析, 采用One-way ANOVA方差分析法, 首先利用Levene方法进行方差齐性检验, 确定方差齐性且整体比较组间差异有统计学意义后进一步作多重比较, 多重比较采用LSD法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Real-time PCR检测法检测miR-340的表达水平

Real-time PCR检测结果显示, 转染pre-miR-340到MDA-MB231细胞6 h后, miR-340表达水平明显升高; 而转染anti-miR-340到MDA-MB231细胞6 h后, miR-340表达水平受到明显抑制(图1)。

## 2.2 Western blot检测caspase-3蛋白表达

Western blot检测结果显示, 转染pre-miR-340到MDA-MB231细胞24 h后, cleaved-caspase-3蛋白表达水平明显升高; 而转染anti-miR-340到MDA-MB231细胞24 h后, cleaved-caspase-3蛋白表达水平受到明显抑制(图2)。

## 2.3 MTT法检测细胞生长能力

细胞活力检测结果显示, 转染了pre-miR-340到MDA-MB231细胞后, 细胞生长受到明显抑制; 而转染了anti-miR-340到MDA-MB231细胞后, 细胞生长增快(图3)。

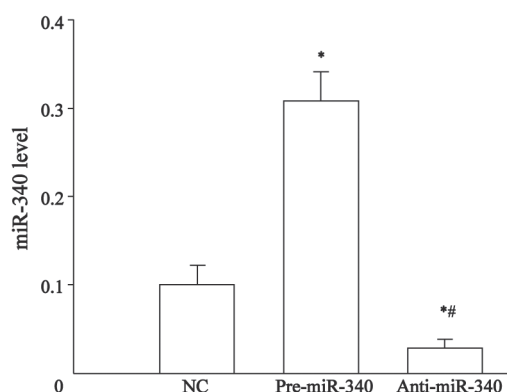


图1 MDA-MB231细胞中miR-340表达水平

Fig. 1 The expression of miR-340 in MDA-MB231 cells

\*: Compared with NC group,  $P < 0.05$ . #: Compared with pre-miR-340 group,  $P < 0.05$ .

## 2.4 细胞流式技术检测MDA-MB231细胞凋亡

细胞流式技术凋亡检测结果显示, 转染了pre-miR-340到MDA-MB231细胞24 h后, 细胞凋亡明显增加; 而转染了anti-miR-340到MDA-MB231细胞24 h后, 细胞凋亡减少(图4)。

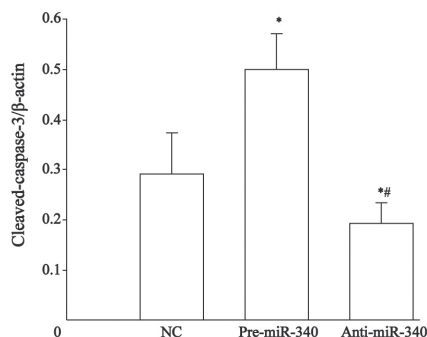
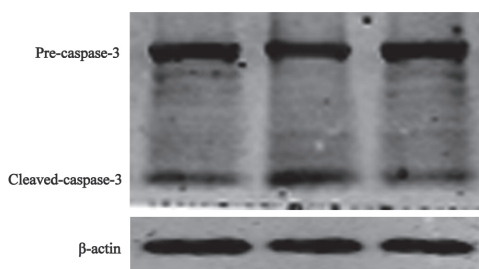


图2 各组MDA-MB231细胞中cleaved-caspase-3蛋白表达水平

Fig. 2 The expression of cleaved-caspase-3 protein in MDA-MB231 cells

\*: Compared with NC group,  $P < 0.05$ . #: Compared with pre-miR-340 group,  $P < 0.05$ .

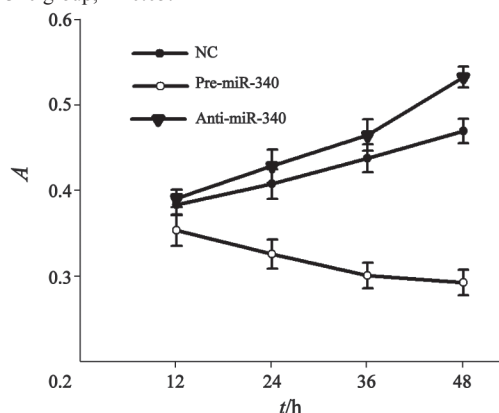


图3 MTT法检测各组细胞生长能力

Fig. 3 MTT assays showed the cell proliferation abilities of MDA-MB231 cells in various groups

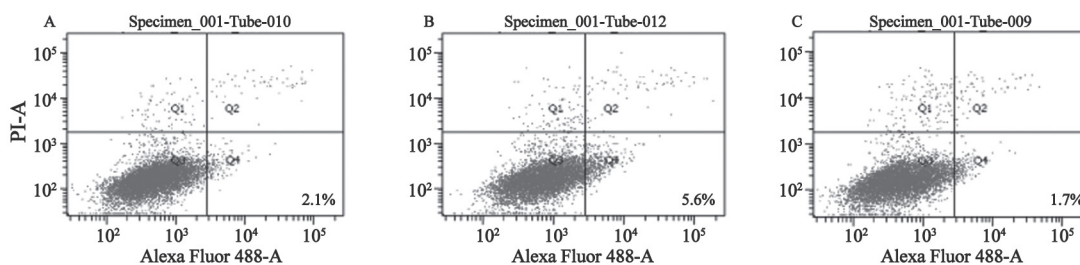


图4 细胞流式技术检测各组细胞凋亡情况

Fig. 4 The apoptotic percentages of MDA-MB231 cells in various groups

A: NC group, 2.1%; B: Pre-miR-340 group, 5.6%; C: Anti-miR-340 group, 1.7%.

### 3 讨 论

本研究运用化学合成的非编码miR-340前体pre-miR-340或干扰RNA anti-miR-340转染MDA-MB231细胞, 成功使MDA-MB231细胞中miR-340过表达或沉默, 从而对MDA-MB231细胞凋亡产生影响。结果显示, 细胞中miR-340过表达, 细胞凋亡增加; 而抑制miR-340表达, 细胞凋亡减少。

miR是一类含量丰富的非编码蛋白小RNA。一般成熟miR的长度为21~24 nt, 是由长度约为70 nt的具有发夹结构的miR前体(pre-miR)经过Dicer酶剪切后生成。miR能够与靶向mRNA的3'-非翻译区(3'-UTR)互补配对, 调节蛋白质合成或mRNA降解, 从而实现在转录后水平上对目的基因或蛋白表达进行调控, 进而调节细胞的代谢、增殖、分化和凋亡等基本的生理过程<sup>[1]</sup>。研究表明, 在肿瘤组织中miR的表达水平表达存在异常<sup>[6-7]</sup>。而进一步的研究发现miR可能发挥类似癌基因或抑癌基因的作用, 参与肿瘤的发生、发展, 如miR-17-92可以促进肿瘤的发生, 被称为“癌基因”<sup>[2]</sup>; Let-17可通过抑制癌基因或控制细胞分化和凋亡基因抑制肿瘤的发生、发展, 被称为“抑癌基因”<sup>[8]</sup>。

乳腺癌的研究中发现, miR的表达水平失调可能是影响乳腺癌进展的重要因素<sup>[9-11]</sup>。Wu等<sup>[4]</sup>研究表明, miR-340能够抑制MDA-MB231细胞的侵袭和转移, 并且乳腺癌患者组织中miR-340的表达水平是明显下降的。在成神经细胞瘤的研究中发现, miR-340可以诱导成神经细胞瘤凋亡<sup>[12]</sup>。本研究中, 通过上调miR-340能够明显抑制MDA-MB231细胞增殖, 并促进其凋亡; 而抑制MDA-MB231细胞中miR-340的水平后, 细胞增殖加速, 凋亡水平明显下调。进一步的研究发现, miR-340可以调节凋亡蛋白酶caspase-3的活性。当上调MDA-MB231细胞中miR-340的水平后, caspase-3的活性成分cleaved-caspase-3表达增加, 细胞凋亡也增

加; 相反, 当用anti-miR-340抑制miR-340表达后, cleaved-caspase-3表达减少, 细胞凋亡也相应的降低。由此可以推测, miR-340通过调节caspase-3的活性来调控细胞凋亡的, 这与Zhu等<sup>[12]</sup>的发现是一致的。总之, miR-340可以抑制MDA-MB231细胞增殖并促进其凋亡。

### [参 考 文 献]

- [1] RUVKUN G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 797-799.
- [2] HAYASHITA Y, OSADA H, TATEMATSU Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(21): 9628-9632.
- [3] 蔡飏, 陶莉, 谭越, 等. miR-125a增强多西他赛对乳腺癌生长的抑制作用 [J]. *中国癌症杂志*, 2011, 21(10): 748-753.
- [4] 周鹏, 吴正升. miR-340在乳腺癌组织中的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(6): 708-710.
- [5] WU Z S, WU Q, WANG C Q, et al. miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met [J]. *Cancer*, 2011, 117(13): 2842-2852.
- [6] SETHI S, ALI S, SETHI S, et al. MicroRNAs in personalized cancer therapy [J]. *Clin Genet*, 2014, 86(1): 68-73.
- [7] CHDENG Q, YI B, WANG A, et al. Exploring and exploiting the fundamental role of microRNAs in tumor pathogenesis [J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6: 1675-1684.
- [8] TAKAMIZAWA J, KONISHI H, YANAGISAWA K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(11): 3753-3756.
- [9] IORIO M V, FERACIN M, LIU C G, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7065-7070.
- [10] YAN L X, HUANG X F, SHAO Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis [J]. *RNA*, 2008, 14(11): 2348-2360.
- [11] KONDO N, TOYAMA T, SUGIURA H, et al. miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive network of epigenetically regulated microRNAs [J]. *Oncogene*, 2013, 32(24): 2927-2936.
- [12] ZHU X, WANG H, LIU F, et al. Identification of microRNA networks in end-stage heart failure because of dilated cardiomyopathy [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(9): 1173-1187.

(收稿日期: 2014-03-28 修回日期: 2014-06-03)