

miR-199a-3p在乳腺癌中的表达及其作用

马大昌, 陈 诚, 吴多明, 王红磊, 武 力
兰州大学第一医院乳腺病科, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 背景与目的: 多种微小RNA(microRNA, miRNA)在乳腺癌中异常表达, 在乳腺癌的发生、发展中起重要作用。miRNA可能是治疗乳腺癌的新靶点。该研究旨在探讨miR-199a-3p在乳腺癌中的表达水平, 及其对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响。方法: 运用实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, QRT-PCR)检测乳腺癌患者癌组织、癌旁正常组织、人乳腺癌细胞和人乳腺细胞中miRNA-199a-3p的表达水平, miR-199a-3p mimic(或inhibitor)转染乳腺癌细胞MDA-MB-231过表达(或沉默)miR-199a-3p的表达后, 通过MTT法检测细胞增殖能力, Hoechst染色法和caspase-3活力测试检测细胞凋亡情况。结果: 相对癌旁正常组织和人正常乳腺细胞, miR-199a-3p在乳腺癌患者癌组织和人乳腺癌细胞中表达下调。在MDA-MB-231中转染miR-199a-3p mimic过表达miR-199a-3p可抑制细胞增殖, 促进其凋亡; 在MDA-MB-231中转染miR-199a-3p inhibitor沉默miR-199a-3p可促进细胞增殖, 抑制其凋亡。结论: miR-199a-3p在乳腺癌中表达下调, 并通过调节乳腺癌细胞增殖和凋亡发挥抑癌作用。

[关键词] 乳腺癌; miR-199a-3p; MDA-MB-231; 增殖; 凋亡

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.06.001

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)06-0481-06

The expression of miR-199a-3p in breast cancer and its effect MA Dachang, CHEN Cheng, WU Duoming, WANG Honglei, WU Li (Department of Breast Diseases, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China)

Correspondence to: Wu Li E-mail: lzuwuli2015@sina.com

[Abstract] **Background and purpose:** Multiple microRNAs (miRNAs) are abnormally expressed in breast cancer and play an important role in the regulation of breast cancer. miRNAs may be a new target for the treatment of breast cancer. This study aimed to investigate the expression of miR-199a-3p in breast cancer and the effect of miR-199a-3p on proliferation and apoptosis of breast cancer. **Methods:** Real-time PCR was used to test the expression of miR-199a-3p in breast cancer tissues, normal breast tissues, breast cancer cells and normal breast cells. Overexpression (or silencing the expression) of miR-199a-3p was conducted by transfecting MDA-MB-231 with miR-199a-3p mimics (or inhibitors). The proliferation of MDA-MB-231 was detected by MTT method. The apoptosis of MDA-MB-231 was investigated by Hoechst staining and caspase-3 activity assay kit. **Results:** Compared to corresponding non-tumor breast tissues (or normal breast cell HBL-100), lower levels of miR-199a-3p were expressed in breast cancer tissues or breast cancer cells. Overexpression of miR-199a-3p induced by miR-199a-3p mimic inhibited the proliferation and promoted the apoptosis of MDA-MB-231, while silencing the expression of miR-199a-3p induced by miR-199a-3p inhibitor increased the proliferation and suppressed the apoptosis of MDA-MB-231. **Conclusion:** The expression of miR-199a-3p is lower in breast cancer, which shows its tumor suppression effect by regulating the proliferation and apoptosis of breast cancer cells.

[Key words] Breast cancer; miR-199a-3p; MDA-MB-231; Proliferation; Apoptosis

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤。我国的乳腺癌发病率居女性恶性肿瘤的首位, 占全身其他恶性肿瘤的7%~10%, 是严重威胁我国女性

通信作者: 武力 E-mail: lzuwuli2015@sina.com

身体健康的主要疾病。随着治疗手段的发展, 乳腺癌的治疗效果有了长足的提高^[1]。近年来, 肿瘤的基因治疗也逐渐成为研究的热点, 探寻与乳腺癌相关的原癌基因和抑癌基因也为

诊断和治疗乳腺癌提供了新的研究方向^[2]。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类真核细胞中由21~23个核苷酸组成的非编码RNA^[3]。miRNA通过抑癌或促癌作用参与癌细胞的增殖、分化和凋亡^[4]。最近研究发现, 乳腺癌中多种miRNA表达异常并参与调节乳腺癌功能, 如miR-21、miR-210和miR-200等^[5]。因此, miRNA可能是治疗乳腺癌的新靶点。miR-199a-3p是重要的抑癌基因, 参与调节多种癌症的发生、发展, 包括胃癌^[6]、肝癌^[7]、子宫内膜癌^[8]、睾丸癌^[9]和骨肉瘤^[10]等, 但miR-199a-3p是否也参与调节乳腺癌的发生、发展未见报道。本研究旨在研究miR-199a-3p在乳腺癌发生、发展中的作用, 将通过以下两个方面进行研究: ① 乳腺癌患者癌组织与癌旁正常组织miR-199a-3p的表达是否有差异; ② miR-199a-3p是否参与调控乳腺癌细胞的增殖和凋亡。已有研究发现, 与miR-199a-3p同家族的miR-199a-5p参与调节乳腺癌细胞功能^[11], 并在乳腺癌患者的血浆中循环miR-199a-3p表达明显下降^[12], 因此我们推测miR-199a-3p可能参与调节乳腺癌的发生、发展。

1 材料和方法

1.1 材料与主要试剂

人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-7和SK-BR-3)和正常的人乳腺细胞HBL-100均购自美国模式培养物保藏所。培养基和胎牛血清购自美国Hyclone公司。Trizol购自上海碧云天生物技术有限公司。RNA提取试剂盒和反转录试剂购自宝生物工程(大连)有限公司。miRNA引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。miR-199a-3p mimic、miR-199a-3p inhibitor、NC mimic、NC inhibitor和LipofectamineTM2000购自广州锐博生物科技有限公司。MTT、Hoechst 33258和Caspase-3活性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 样本收集

收集2013年在兰州大学第一医院进行乳腺癌切除手术的26例乳腺癌患者, 所有患者均

已经过病理学确诊。经患者同意, 于术后摘取微量乳腺癌组织及癌旁正常乳腺组织用于本研究。所取组织均冻于-80℃用于实时定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, QRT-PCR)。

1.2.2 细胞培养

MCF-7细胞用含10%胎牛血清的RPML1640培养基培养, MDA-MB-231、MDA-MB-468和SK-BR-3乳腺癌细胞系及正常乳腺细胞HBL-100均用含10%胎牛血清的高糖细胞培养基培养, 于37℃、CO₂体积分数为5%的饱和湿度细胞培养箱中培养。

1.2.3 细胞转染

将细胞接种于12孔或96孔培养板上, 待细胞汇合密度达到60%~70%时, 利用LipofectamineTM2000运载miRNA mimic或miRNA inhibitor转染至细胞内。QRT-PCR检测其转染效率。

1.2.4 细胞增殖和凋亡实验

细胞转染后, 采用MTT法检测0、24、48和72 h时的细胞增殖, 采用Hoechst 33258和Caspase-3活性检测试剂盒检测24 h时的细胞凋亡。具体操作参照试剂说明书进行。

1.2.5 miRNA的提取、逆转和QRT-PCR

Trizol法提取总RNA, 取2 μg总RNA反转录得到cDNA。在cDNA中加入PCR荧光试剂和引物于ABI-7300 PCR仪进行扩增和检测。ABI-7300系统分析得到miRNA表达量。具体操作参照试剂说明书进行。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0对数据进行分析。人组织和细胞数据表示采用 $\bar{x} \pm s$ 。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-199a-3p在乳腺癌患者癌组织中表达下调

QRT-PCR检测乳腺癌患者癌组织和癌旁正常组织发现, 相对癌旁正常组织, 乳腺癌组织中miR-199a-3p表达显著下调(图1)。

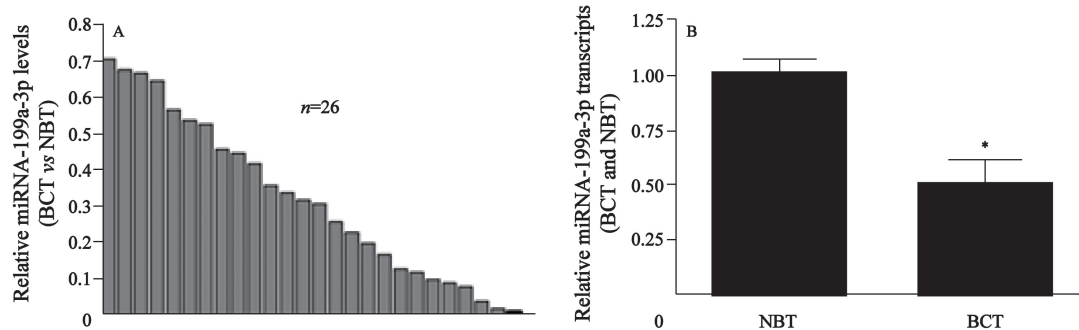


图1 miR-199a-3p在乳腺癌患者癌组织中的表达

Fig. 1 Expression of miR-199a-3p in cancer tissues of breast cancer patients

A: Expression of miR-199a-3p was down-regulated in breast cancer tissues as compared with normal breast tissues. B: Statistical result of figure A; $n=26$; $*P<0.05$, as compared with normal breast tissues

2.2 miR-199a-3p在乳腺癌细胞株中表达下调

QRT-PCR检测4种人乳腺癌细胞株(MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-7和SK-BR-3)和人乳腺细胞株HBL-100发现, 相对人乳腺细胞株HBL-100, 4种人乳腺癌细胞株中miR-199a-3p表达均显著下调(图2)。

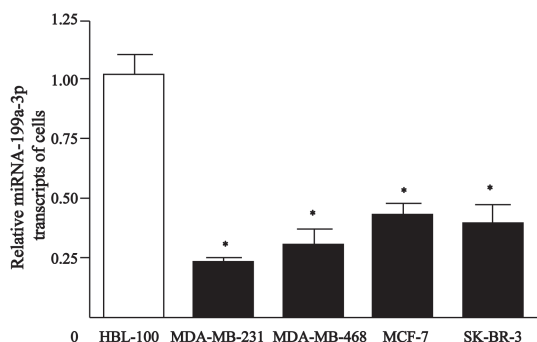


图2 miR-199a-3p在乳腺癌细胞株中的表达

Fig. 2 Expression of miR-199a-3p in breast cancer cell lines

Expression of miR-199a-3p was down-regulated in 4 breast cancer cell lines as compared with normal breast cell line HBL-100. $n=3$; $*: P<0.05$, as compared with HBL-100

2.3 miR-199a-3p mimic抑制MDA-MB-231增殖促进其凋亡

转染miR-199a-3p mimic 24 h后, QRT-PCR检测miR-199a-3p表达发现, miR-199a-3p表达显著上调, 过表达成功(图3A)。转染miR-199a-3p mimic, 分别于0、24、48和72 h运用MTT法检测细胞活力发现, 过表达miR-199a-3p明显抑制MDA-MB-231的增殖, 48和72 h的差异均有统计学意义($P<0.05$, 图3B)。

转染miR-199a-3p mimic 24 h后, Hoechst染色法检测细胞凋亡情况发现, 过表达miR-199a-3p引起Hoechst阳性细胞数增多, 即凋亡数增多(图4A、B)。Caspase-3活力是细胞凋亡的重要指标, 与细胞凋亡正相关。检测caspase-3活力发现, 过表达miR-199a-3p显著增加caspase-3活力(图4C)。

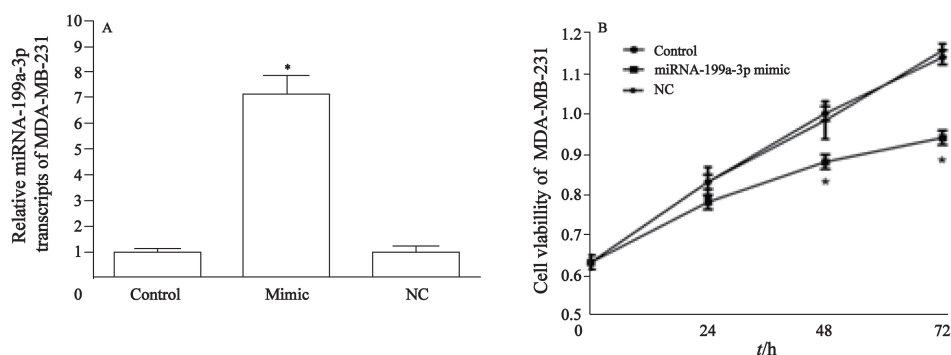


图3 miR-199a-3p mimic对MDA-MB-231细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of miR-199a-3p mimic on the proliferation of MDA-MB-231

A: Transfection with miR-199a-3p mimic significantly up-regulated the expression of miR-199a-3p; B: Transfection with miR-199a-3p mimic inhibited the proliferation of MDA-MB-231. NC: Negative control sequence; $n=3$; $*: P<0.05$, as compared with control

2.4 miR-199a-3p inhibitor促进MDA-MB-231增殖抑制其凋亡

转染miR-199a-3p inhibitor 24 h后, QRT-PCR检测miR-199a-3p表达量发现, miR-199a-3p表达显著下调, 沉默成功(图5A)。转染miR-199a-3p inhibitor, 分别于0、24、48和72 h运用MTT法检测细胞活力发现, 沉默miR-199a-3p明

显促进MDA-MB-231的增殖(图5B)。

转染miR-199a-3p inhibitor 24 h后, Hoechst染色法和caspase-3活力测试检测细胞凋亡发现, 沉默miR-199a-3p引起Hoechst阳性细胞数减少, 即凋亡数减少(图6A、B), caspase-3活力降低(图6C)。

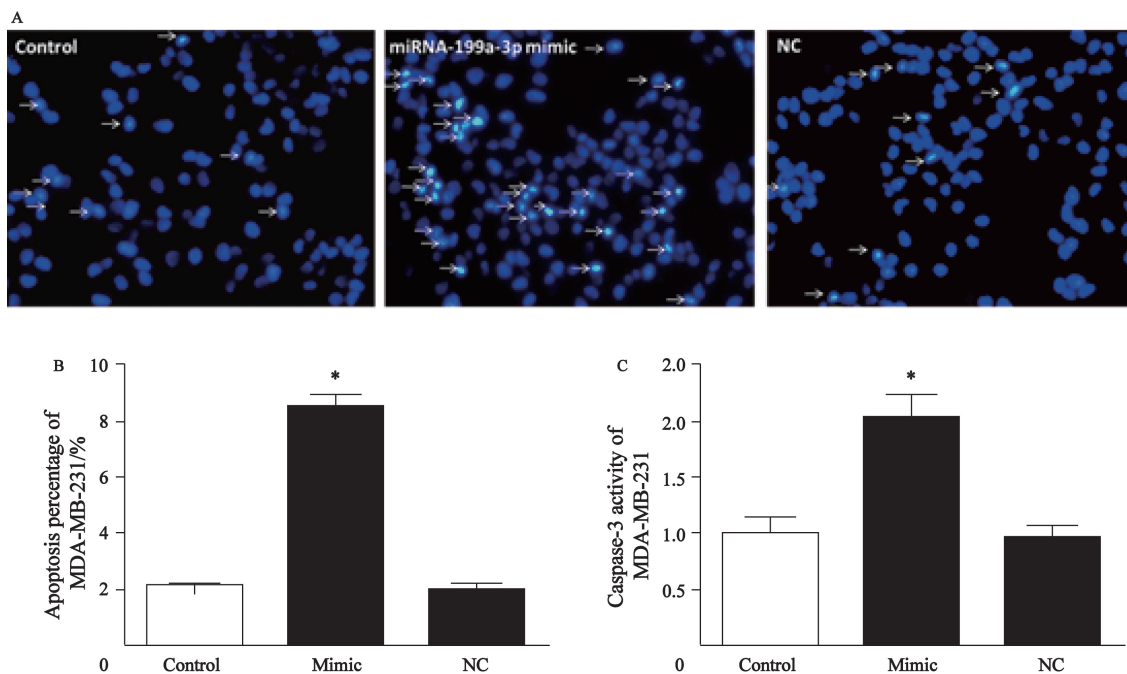


图4 miR-199a-3p mimic对MDA-MB-231细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of miR-199a-3p mimic on the apoptosis of MDA-MB-231

A: Transfection with miR-199a-3p mimic increased the Hoechst positive cells; B: Statistical result of figure A; C: Transfection with miR-199a-3p mimic increased the activity of caspase-3. $n=3$; *: $P<0.05$, as compared with control

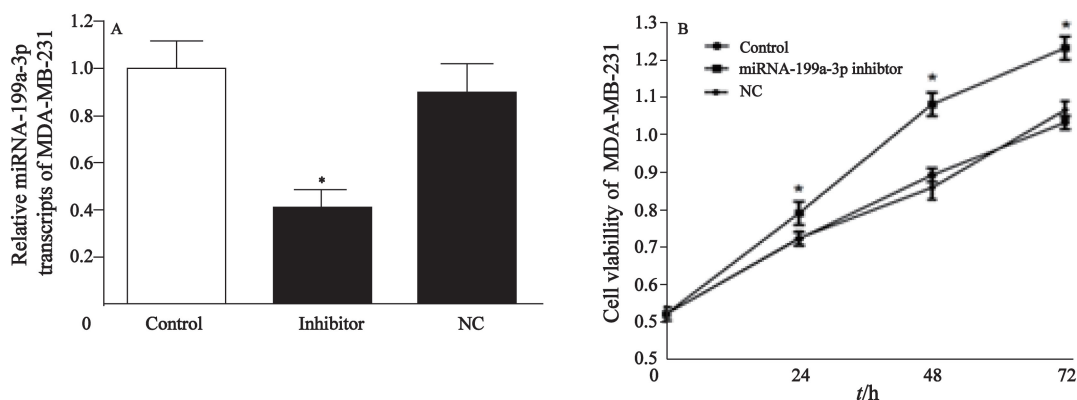


图5 miRNA-199a inhibitor对MDA-MB-231细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of miR-199a-3p inhibitor on the proliferation of MDA-MB-231

A: Transfection with miR-199a-3p inhibitor significantly down-regulated the expression of miR-199a-3p; B: Transfection with miR-199a-3p inhibitor promoted the proliferation of MDA-MB-231. $n=3$; *: $P<0.05$, as compared with control

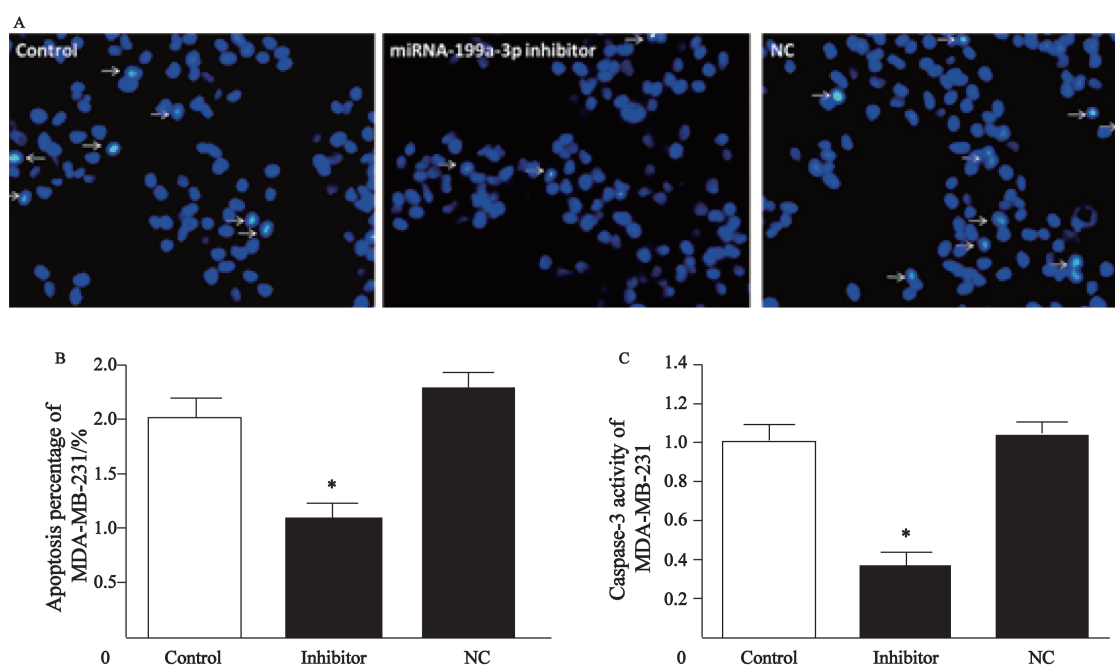


图6 miRNA-199a inhibitor对MDA-MB-231细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effect of miR-199a-3p inhibitor on the apoptosis of MDA-MB-231

A: Transfection with miR-199a-3p inhibitor decreased the Hoechst positive cells; B: Statistical result of figure A; C: Transfection with miR-199a-3p inhibitor decreased the activity of caspase-3. $n=3$; *: $P<0.05$, as compared with control

3 讨 论

miRNA调控人类30%的基因表达，与人类疾病密切相关。miRNA通过与靶基因mRNA的3'-非翻译区(3'-UTR)互补配对，调节靶基因mRNA降解和蛋白合成，从而调控转录后靶基因的表达水平，最终影响细胞增殖、分化和凋亡等功能。研究发现，癌组织的miRNA表达异常，并参与调控肿瘤的发生、发展。在肿瘤组织中高表达，表现出癌基因的特性，促进癌细胞增殖、转化和迁移的miRNA称为促癌miRNA；在肿瘤组织中低表达，负性调控癌基因的表达的miRNA称为抑癌miRNA^[4]。

miR-199a-3p在胃癌、肝癌、子宫内膜癌、睾丸癌和骨肉瘤的癌组织中表达下调，并通过抑制相应癌细胞增殖促进其凋亡发挥抑癌作用^[6-10]。miRNA-199a-5p和miR-199a-3p在乳腺癌患者血浆中表达下调^[12]，miRNA-199a-5p通过调节辐射引起的自噬影响乳腺癌细胞功能^[11]。本研究显示，相对癌旁正常组织，乳

腺癌患者癌组织miR-199a-3p表达下调。乳腺癌细胞miR-199a-3p表达水平较正常乳腺细胞也下调，其中MDA-MB-231下调最明显，故用于下一步功能实验。本研究利用化学合成的miR-199a-3p mimic和miR-199a-3p inhibitor转染MDA-MB-231细胞，成功过表达和沉默miR-199a-3p。MDA-MB-231中过表达miR-199a-3p促进其凋亡抑制增殖，而沉默miR-199a-3p促进其增殖。

综上所述，本研究首次发现miR-199a-3p在乳腺癌组织和多种乳腺癌细胞中表达下调，进一步研究发现，miR-199a-3p抑制乳腺癌细胞的增殖促进其凋亡。miR-199a-3p可能是治疗乳腺癌的重要靶点。miR-199a-3p调控乳腺癌功能的靶标蛋白未知，这将是我们的下一步工作的重点。

[参 考 文 献]

- [1] GREENE L R, WILKINSON D. The role of general nuclear medicine in breast cancer [J]. J Med Radiat Sci, 2015, 62(1): 54-65.
- [2] GAGAN J, VAN ALLEN E M. Next-generation sequencing to

- guide cancer therapy [J]. *Genome Med*, 2015, 7(1): 80.
- [3] HUDSON W H, ORTLUND E A. The structure, function and evolution of proteins that bind DNA and RNA [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(11): 749-760.
- [4] MONROIG PDEL C, CHEN L, ZHANG S, et al. Small molecule compounds targeting miRNAs for cancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 81:104-116.
- [5] BERTOLI G, CAVA C, CASTIGLIONI I. MicroRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer [J]. *Theranostics*, 2015, 5(10): 1122-1143.
- [6] PENG W, CHEN Z Y, WANG L, et al. MicroRNA-199a-3p is downregulated in gastric carcinomas and modulates cell proliferation [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(3): 3038-3047.
- [7] FORNARI F, MILAZZO M, CHIECO P, et al. MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(12): 5184-5193.
- [8] WU D, HUANG H J, HE C N, et al. MicroRNA-199a-3p regulates endometrial cancer cell proliferation by targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(7): 1191-1197.
- [9] CHEN B F, GU S, SUEN Y K, et al. MicroRNA-199a-3p, DNMT3A, and aberrant DNA methylation in testicular cancer [J]. *Epigenetics*, 2014, 9(1): 119-128.
- [10] TIAN Y, ZHANG Y Z, CHEN W. MicroRNA-199a-3p and microRNA-34a regulate apoptosis in human osteosarcoma cells [J]. *Biosci Rep*, 2014, 34(4): e00132.
- [11] YI H, LIANG B, JIA J, LIANG N, et al. Differential roles of miR-199a-5p in radiation-induced autophagy in breast cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(5): 436-443.
- [12] SHIN V Y, SIU J M, CHEUK I, et al. Circulating cell-free miRNAs as biomarker for triple-negative breast cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(11): 1751-1759.

(收稿日期: 2015-09-09 修回日期: 2015-12-21)

《肿瘤影像学》杂志2016年征订启事

《肿瘤影像学》杂志自1992年创刊以来深受医学界赞颂, 1998年经原国家科委、中央新闻出版总署批准为国内外公开正式发行的期刊, 刊号: ISSN 1008-617X, CN31-1793/R。杂志由优质铜版纸印制, 大16开, 80页, 为季刊。被中国学术期刊综合评价数据库、中国核心期刊(遴选)数据库、中国期刊全文数据库等收录。主要报道医学影像领域中科研成果、临床应用、综述、病例报告、讲座及与理工结合的有关论文等。

《肿瘤影像学》坚持学术性与科学性, 信息量大, 具有临床实用价值。是医院图书馆、影像科室及高等医药院校收存和使用的学术刊物, 是临床医学影像医务人员晋升中、高级职称的重要论文发表园地。欢迎各医学院校、医学图书馆、影像科室及个人向当地邮局订阅。

本刊季末出版, 邮发代号4-653, 定价每期15元, 每年共60元整。

单位全称: 《肿瘤影像学》杂志编辑部

通讯地址: 上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院

邮 编: 200032

电 话: (021)54244927 (021)64043766

传 真: (021)54244927

E-mail: imaging109@163.com

《肿瘤影像学》杂志编辑部