

PRL 促进乳腺癌细胞增殖及与 microRNA 表达谱变化的相关性研究

何 伟,魏钦俊,刘 然,姚 俊,鲁雅洁,曹 新*

(南京医科大学生物技术系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨基于催乳素(prolactin,PRL)反应的人乳腺癌细胞 microRNA(miRNA)表达谱变化,以了解其在乳腺癌发生和发展中的潜在作用。方法:人重组 PRL 处理高表达催乳素受体(PRLR)的人乳腺癌 T-47D 细胞系,MTT 法检测细胞增殖能力变化,流式细胞术检测细胞周期和凋亡变化情况。利用 Solexa 高通量测序技术检测 PRL 处理组和未处理组的 T-47D 细胞 miRNAs 表达谱,荧光定量 PCR 法进行初步验证,同时进行相关的生物信息学分析。结果:PRL 作用于 T-47D 细胞后,MTT 结果显示细胞增殖能力增强,细胞周期检测结果表明 PRL 处理后,G1 期的细胞比例减少,S 期的细胞比例升高,而 G2/M 期没有变化。细胞凋亡分析结果则显示 PRL 可抑制细胞凋亡,导致细胞凋亡率下降。通过 Solexa 高通量测序技术成功检测了 PRL 处理和未处理组的人乳腺癌 T-47D 细胞 miRNA 表达谱,两组中分别检测到 821 个和 798 个 miRNAs 成熟体,其中 428 个共表达,42 个为两组间明显差异表达。选取的 4 个 miRNAs 分子经荧光定量 PCR 法证实其细胞内的表达与测序结果一致。两组 miRNA 表达谱中同时也检测到 86 个和 115 个 novel miRNAs 成熟体,其中 46 个 novel miRNAs 在两组细胞中共表达。结论:在初期实验明确 PRL 对人乳腺癌 T-47D 细胞产生促增殖作用的基础上,利用 Solexa 高通量测序技术检测两类 T-47D 细胞 miRNAs 表达谱,获得了一系列与 PRLR 信号通路高度相关的 miRNAs 分子,为进一步研究 miRNAs 分子在人乳腺癌发生发展中的作用奠定重要的研究基础。

[关键词] 乳腺癌;Solexa 高通量测序;催乳素;microRNA

[中图分类号] R737.9

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)03-303-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130303

Correlational study between prolactin promoting breast cancer cell proliferation and microRNA expression profiling change

He Wei, Wei Qinjun, Liu Ran, Yao Jun, Lu Yajie, Cao Xin*

(Department of Biotechnology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To explore changes of microRNA expression profiling in human breast cancer cell based on prolactin(PRL) treatment, and to understand their potential roles in breast cancer initiation and progression. **Methods:** Human breast cancer T-47D cells, in which PRL receptor (PRLR) is highly expressed, were treated with or without human recombinant PRL, two group cells were subjected to detect their proliferation, cell cycle and apoptosis alteration by the MTT assay and flow cytometry method (FCM). miRNA expression profile of PRL treated and untreated cells were analyzed by Solexa sequencing technology, miRNAs were validated by real-time PCR and undertaken bioinformatic analysis. **Results:** In MTT results, it showed that T-47D cell proliferation ability was enhanced by PRL treatment. FCM revealed that G1 phase cells were reduced, while S phase cells were increased. Meanwhile, cell apoptotic rate was reduced in PRL group. Two miRNAs expression profiles were successfully analyzed from PRL-treated and untreated T-47D cells by Solexa sequencing technology. Within the Solexa sequencing results, 821 and 798 miRNAs were detected in the two libraries, respectively. 428 miRNAs were co-expressed, and 42 miRNAs were significantly differentially expressed. Four miRNAs were validated by real-time PCR, their intracellular expression was consistent with Solexa sequencing data. Besides, 86 and 115 novel miRNAs were also detected in the two libraries, and 46 novel miRNAs were co-expressed. **Conclusion:** PRL can enhance breast cancer cell proliferation ability, and miRNAs expression profiles in T-47D cells treated with or without PRL are successfully analyzed by Solexa sequencing technology. Series of PRLR signaling pathway related miRNAs were harvested. This study provides a reference for

[基金项目] 国家自然科学基金(81172142);江苏高校优势学科建设工程资助

*通信作者(Corresponding author), E-mail: caoxin@njmu.edu.cn

elucidating the complex miRNA-mediated regulatory networks of PRL/PRLR signaling pathway that affect breast cancer tumorigenesis and progression.

[Key words] breast cancer; Solexa sequencing; prolactin; microRNA

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 303-307]

乳腺癌是女性最常见的一种肿瘤,占女性肿瘤的22.9%,是全球第五大致死性肿瘤。在亚洲地区,乳腺癌的发病率相对较低,但也呈逐年增加的趋势,且病死率很高^[1]。乳腺癌的病理发生涉及到多种因素的复杂调控,包括细胞因子参与的信号通路调控、基因突变等。然而,乳腺癌的分子发病机制仍不清楚。催乳素(prolactin, PRL)是一种多肽类激素,主要由垂体合成和分泌,在正常乳腺组织和恶性肿瘤组织的增殖中发挥重要作用,包括促进凋亡、血管形成、增强肿瘤细胞增殖和迁移等^[2-4]。PRL主要通过与其受体结合,激发其下游信号通路,引起细胞的相关生物学改变。PRLR是一类跨膜受体,属细胞因子受体家族。PRL与PRLR结合后,PRLR发生二聚化,受体的胞内结构域部分发生快速磷酸化并活化PRLR相关的信号级联途径,如JAK2-STAT5A^[5]、Grb2-Sos-Ras-Raf-MEK-MAPK^[6]和Nek3-Vav2-Rac1^[7]。前期的研究显示PRLR在众多乳腺癌细胞系和部分肿瘤组织中高表达^[8-9],且PRL/PRLR的异常表达与乳腺癌的发生和发展高度相关^[10]。近年有大量文献报道PRL/PRLR和miRNAs在乳腺癌的发生和发展中的表达变化及其调控功能改变^[11-12],但靶向PRL/PRLR信号通路的miRNAs相关研究尚未报道。

miRNA是一类内源性非编码的小RNA分子,长度为21~25个核苷酸。miRNA基因转录形成发夹状的Pri-miRNA,再经过细胞核内的Drosha酶和胞浆中的Dicer酶两次酶切形成成熟的miRNA分子。成熟的miRNA可以通过与靶基因mRNA 3'-UTR区的互补配对,导致mRNA的降解或翻译抑制,最终影响靶基因的表达或调控^[13]。随着高通量测序技术的广泛应用,围绕乳腺癌相关miRNAs表达谱及其调控网络的研究已经取得一定的进展。但是迄今为止,关于乳腺癌中PRL/PRLR相关的miRNAs仍未有系统的研究。本文以人乳腺癌T-47D细胞系为材料,探索基于PRL反应的人乳腺癌细胞的miRNA表达谱的构建并进行了相关的分析。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌T-47D细胞系由本实验室冻存,胎牛血清和DMEM培养基(Gibco公司,美国),DMSO和MTT试剂(Sigma公司,美国)。人重组PRL(Pepro-Tech公司,美国)。细胞凋亡和周期检测试剂盒(南京凯基生物),TRIzol(Invitrogen公司,美国)。反转录试剂盒(TaKaRa公司,日本),SYBR Green I(Roche公司,瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

T-47D细胞常规培养于含10%(V/V)胎牛血清的DMEM高糖培养基,其中包含2 mmol/L的谷氨酰胺,100 U/ml的青霉素和100 μg/ml的链霉素,置于5% CO₂、饱和湿度的37℃细胞培养箱中培养,每2~3 d传代1次。Solexa高通量测序委托北京华大基因完成。

1.2.2 MTT细胞增殖实验

T-47D细胞接种于96孔培养板,每孔细胞数量为2 000个。细胞完全贴壁后,更换培养基,分别设置3个不同浓度的PRL(50、100、150 μg/ml)处理细胞,对照组仅加基本培养基。处理后的细胞继续置培养箱培养。每组设6个复孔,分别于12、24、48和72 h加入MTT(100 μg/孔)。MTT孵育2 h后加入150 μl DMSO,振荡10 min,测吸光度值(波长570 nm),并通过吸光度值的大小来判断PRL处理细胞前后的细胞增殖变化情况。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

T-47D细胞接种于6孔板,每孔细胞数量为5 × 10⁴个。设3个复孔。待细胞贴壁后,实验组用150 μg/ml的PRL处理细胞72 h,对照组加等量的基本培养液。0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞,用冷PBS缓冲液洗2次后,加入500 μl的Annexin V Binding Buffer悬浮细胞,加入5 μl Annexin V-FITC混匀后,再加入5 μl Propidium Iodide,混匀后室温避光反应10 min;细胞处理完毕,用流式细胞仪检测细胞PRL处理组和对照组之间的细胞周期和凋亡变化情况。

1.2.4 Solexa高通量测序技术

RNA的5'和3'端加上接头后,进行反转录得到cDNA,cDNA再用于后续的PCR反应,最终得到的

PCR 纯化产物用于高通量测序(深圳华大基因)。测序产生的 50 nt 序列,通过去接头和去污染等过程获得处理数据,对其进行序列长度分布的统计及样品间公共序列统计。通过与 Rfam (10.1) 和 miR-Base 18.0 (<http://www.mirbase.org/>) 比对,获得样品中包含的各组分及表达量信息,从而进行分类注释。对注释的 miRNA 分子数目进行标准化分析,获得两组间 miRNA 差异表达谱。将所有小 RNA 片段注释后,用剩下的未注释片段来进行 novel miRNA 的预测和已知 miRNA 的碱基编辑预测。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 验证

根据 miRBase18.0 中的 miRNA 成熟体序列,设计 miRNAs 的特异性反转录引物和正反向 PCR 引物,利用荧光定量 PCR 验证在两个表达谱中差异表达的 4 个 miRNAs 分子的细胞内表达情况:miR-449c-5p、miR-16-5p、miR-15b-5p 和 miR-193a-3p,其相对定量的方法使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。T-47D 细胞分两组分别接种 6 孔板,贴壁约 70% 左右时实验组用 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PRL 处理 72 h,对照组只加基本培养基。处理完毕后用 TRIzol 提取细胞总 RNA,反转录 0.5 μg RNA,合成的 cDNA 用于荧光定量检测 4 个差异表达的 miRNAs 在细胞内的表达情况,U6 snRNA 作为内参基因。反转录的反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。荧光定量 PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 共 40 个循环;变性 10 min 后存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。引物序列:miR-449c-5p RT:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-TTCGCACTGGATACGACACAGCC-3',FW:5'-AGC-CGTAGGCAGTGTATTGCTAGC-3';miR-16-5p RT:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-TTCGCACTGGATACGACACAGCC-3',FW:5'-AGCCGTAGCAGC-ACGTAAATA-3';miR-15b-5p RT:5'-GTCGTATCCA-GTGCAGGGTCCGAGGTA-TTCGCACTGGATACGAC-TGTAATA-3',FW:5'-AGCCGTAGCAGCACATCATGG-3';miR-193a-3p RT:5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA-TTCGCACTGGATACGACTGG-3',FW:5'-AGCCGAAGTGGCCTACAAAGT-3';U6 RT:5'-CGCTTACGAATTTGCGTGTGCAT-3',FW:5'-GCTT-CGGCAGCACATATACTAAAAT-3',RV:5'-CGCTT-CACGAATTTGCGTGTGCAT-3'。4 个 miRNAs 共同反向引物为 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT3'。

1.3 统计学方法

结果中数据采用 SPSS12.0 软件进行统计学分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素

方差分析, P 值 ≤ 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 PRL 作用 T-47D 细胞的增殖变化

3 种不同浓度的 PRL 作用于 T-47D 细胞后,分别在 4 个时间点利用 MTT 法检测细胞的增殖变化情况。结果显示在 24、48 和 72 h 3 个浓度的 PRL 处理组的细胞比对照组在 570 nm 波长下吸光度值均升高,且差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。MTT 结果表明 PRL 能够促进 T-47D 细胞的增殖,细胞增殖与 PRL 浓度呈正相关。

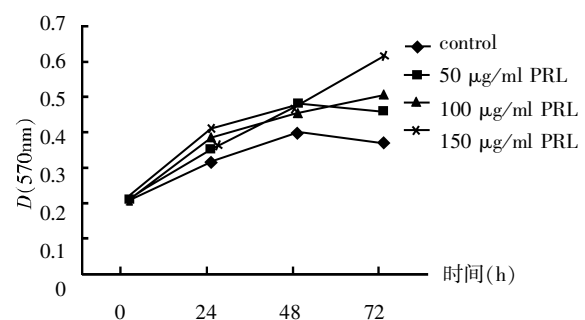


图 1 3 种不同浓度的 PRL 作用于乳腺癌 T-47D 细胞后的 MTT 结果

Figure 1 MTT result of PRL on breast cancer T-47D cells with 3 different concentration

2.2 PRL 改变细胞周期并抑制细胞凋亡

T-47D 细胞用 PRL 处理 72 h 后用流式细胞术检测细胞的周期和凋亡变化情况。结果显示 PRL 作用后,G1 期的细胞比例减少,S 期的细胞比例升高,而 G2/M 期没有变化(表 1)。细胞凋亡的结果显示 PRL 作用后使得 T-47D 细胞的凋亡比例下降,具有统计学差异($P < 0.05$,图 2)。

表 1 PRL 作用于 T-47D 细胞前后的细胞周期变化

Table 1 Cell cycle of T-47D cells before and after PRL treatment

treatment	($\bar{x} \pm s$)		
	G1	S	G2/M
T-47D control	73.77 \pm 1.98	14.93 \pm 1.85	11.30 \pm 0.61
T-47D PRL	67.05 \pm 2.12*	21.64 \pm 1.17*	11.31 \pm 1.32

与 T-47D control 比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 miRNAs 差异表达谱及荧光定量 PCR 验证

两组 T-47D 细胞 RNA 进行 Solexa 高通量测序后,用筛选序列进行比对分类。结果显示 PRL 处理组获得 821 个 miRNAs 成熟体序列,未处理组检测到 798 个 miRNAs 成熟体序列。428 种 miRNA 分子在两组中共同表达,其中 42 种 miRNA 分子呈显

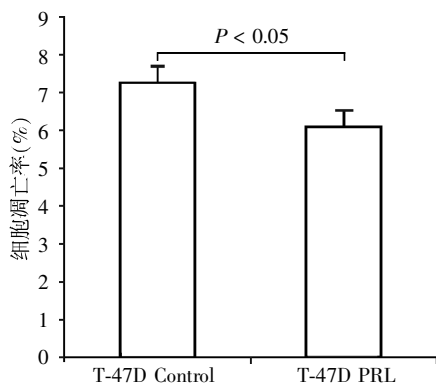


图2 PRL作用于T-47D细胞72h后的细胞凋亡变化结果
Figure 2 Cell apoptosis result of PRL treatment on T-47D for 72 h

表2 两组细胞中存在表达差异的miRNA分子

Table 2 Differentially expressed miRNAs in two libraries

表达差异	miR-name
表达水平升高	miR-1226-3p, miR-345-3p, miR-331-3p, miR-2277-5p, miR-3127-3p, miR-1307-5p, miR-4470, miR-3158-3p, miR-4774-5p, miR-500a-5p, miR-500b, miR-188-5p, miR-766-3p, let-7e-3p, miR-3676-3p, miR-629-3p, miR-503, miR-378c, miR-18a-5p, miR-4741, miR-20b-3p, miR-324-5p, miR-940, miR-296-5p, miR-184, miR-339-5p, miR-15b-5p, miR-100-5p, miR-4485, miR-363-5p, miR-4454, miR-1284, miR-624-5p, miR-3124-5p, miR-16-5p, miR-193a-3p
表达水平降低	miR-105-5p, miR-4742-3p, miR-3193, miR-3936, miR-449b-3p, miR-449c-5p

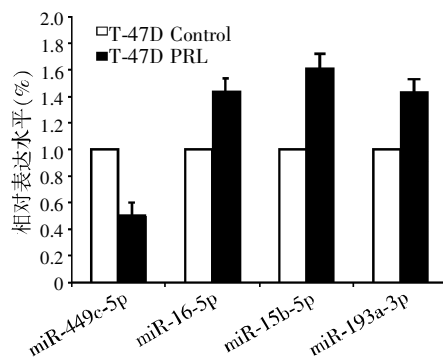


图3 选择的4种miRNA分子荧光定量PCR验证结果
Figure 3 Real-time PCR result of miRNAs

3 讨论

PRL/PRLR是乳腺癌细胞中重要的信号通路。PRL通过与PRLR结合,激发其下游信号通路,促进乳腺癌细胞增殖以及增强细胞迁移能力^[14]。靶向此通路在探索乳腺癌发生机制及靶向分子治疗方面已经取得了一定的进展。研究显示,PRLR拮抗剂G129R与抗肿瘤药物顺铂和赫赛汀等的联合使用能够抑制AKT、HER2和MAPK磷酸化,影响STAT5和STAT3活性,上调TGF- β 1和活化caspase-3等,从而抑制乳腺癌细胞增殖^[15-17]。对大量肿瘤细胞系和肿瘤组织的研究结果表明,很多miR-

NA分子表达水平升高,6种miRNA分子表达水平降低(表2)。另外,在428种共表达的miRNAs分子中,包含145种miRNA*分子(即miRNA star forms,miRNAs功能单链的互补链);差异表达的42种miRNAs包含13种miRNA*分子。在两个表达谱中,选择4种显著差异表达的miRNAs进行荧光定量PCR验证,结果显示PRL处理后miR-449c-5p表达水平下调,而miR-16-5p,miR-15b-5p和miR-193a-3p表达水平升高(图3),结果与Solexa测序结果完全一致。同时,在两组细胞中,分别检测到86个和115个novel miRNAs分子,其中46个miRNAs为两组细胞共表达。

NA通过与不同的靶基因结合,在乳腺癌细胞中发挥癌基因或抑癌基因的功能,如miR-335调控SOX4基因表达抑制乳腺癌细胞转移;miR-373靶向抑制CD44,促进乳腺癌细胞转移等。而且,随着对miRNA研究的深入,组织特异性的miRNAs正被广泛用来作为乳腺癌临床诊断的生物标志物^[18]。在乳腺癌中,多种信号通路如NF- κ B、Notch、Wnt、TGF- β 相关的miRNA研究已有文献报道^[19-20],然而,围绕PRL/PRLR信号通路的miRNA表达调控研究尚不清楚。流行病学结果显示高水平的血清PRL增加乳腺癌发病概率,且在乳腺癌标本中PRLR也呈高表达状态。在甲状旁腺癌和喉癌等其他肿瘤中,PRLR也呈高表达状态^[21]。前期研究显示PRL/PRLR对乳腺癌细胞的增殖、分化、血管生成、迁移和凋亡等起着重要的调节作用^[14],推测miRNA也参与了这些生物学变化的过程。基于此,利用Solexa高通量测序技术检测PRL处理乳腺癌细胞前后miRNA表达谱变化,可为PRL/PRLR信号通路相关的miRNA研究提供理论支持。

Solexa高通量测序技术是近年来发展的新测序技术,它具有高通量、高准确性,与微阵列芯片相比,还能获得新的miRNA分子等特点^[22]。本研究通过Solexa高通量测序技术成功构建了PRL处理前后两

组细胞的 miRNAs 表达谱,并检测到一系列的 novel miRNAs。另外,对已知 miRNAs 和 novel miRNAs 进行分析发现:其成熟体的 5'端和 3'有多种不同的修饰方式存在,如若干碱基的缺失或添加等。在已知 miRNAs 的成熟体中,本研究发现同一种 miRNA 的种子序列区有多种不同的碱基修饰形式存在。此可能是 PRL 作用于细胞后,导致了 miRNAs 成熟体的碱基修饰变化。miRNA 的成熟体异形体和修饰形式的存在,增加了 miRNAs 的多样性,使得 miRNAs 的靶基因发生改变,最终导致其调控网络的变化。

综上所述,PRL 作用于 T-47D 细胞后,导致一系列细胞行为学的变化,也导致了细胞 miRNA 表达谱的改变,PRL/PRLR 在乳腺癌生物学过程中发挥着重要调控作用,为后续探索 PRL/PRLR 相关 miRNAs 在乳腺癌发生和发展中的作用提供依据,也为今后 miRNAs 在乳腺癌细胞 PRL/PRLR 信号途径中的深入探索提供了前期工作基础。

[参考文献]

- [1] Curado MP. Breast cancer in the world;incidence and mortality[J]. Salud Publica Mex,2011,53(5):372-384
- [2] LaPensee EW,Ben-Jonathan N. Novel roles of prolactin and estrogens in breast cancer;resistance to chemotherapy[J]. Endocr Relat Cancer,2010,17(2):R91-107
- [3] Goldhar AS,Vonderhaar BK,Trott JF,et al. Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1[J]. Mol Cell Endocrinol,2005,232(1-2):9-19
- [4] Liby K,Neltner B,Mohamet L,et al. Prolactin overexpression by MDA-MB-435 human breast cancer cells accelerates tumor growth [J]. Breast Cancer Res Treat,2003,79(2):241-252
- [5] Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer[J]. Am J Pathol,2004,165(5):1449-1460
- [6] Harris J,Stanford PM,Oakes SR,et al. Prolactin and the prolactin receptor:new targets of an old hormone[J]. Ann Med,2004,36(6):414-425
- [7] Miller SL,Antico G,Raghunath PN,et al. Nek3 kinase regulates prolactin-mediated cytoskeletal reorganization and motility of breast cancer cells [J]. Oncogene,2007,26(32):4668-4678
- [8] Ferreira M,Mesquita M,Quaresma M,et al. Prolactin receptor expression in gynaecomastia and male breast carcinoma[J]. Histopathology,2008,53(1):56-61
- [9] Ginsburg E,Alexander S,Lieber S,et al. Characterization of ductal and lobular breast carcinomas using novel prolactin receptor isoform specific antibodies[J]. BMC Cancer,2010,10:678
- [10] Tworoger SS,Hankinson SE. Prolactin and breast cancer risk[J]. Cancer Lett,2006,243(2):160-169
- [11] Clevenger CV,Samantha L. New mechanisms for PRLr action in breast cancer [J]. Trends Endocrin Met,2009,20(5):223-229
- [12] Lee YS,Dutta A. MicroRNAs in cancer [J]. Annu Rev Pathol,2009,4:199-227
- [13] Bartel DP. MicroRNAs:Genomics,biogenesis,mechanism and function[J]. Cell,2004,116(2):281-297
- [14] Freeman ME,Kanyicska B,Lerant A,et al. Prolactin: structure,function,and regulation of secretion[J]. Physiol Rev,2000,80(4):1523-1631
- [15] Goffin V,Touraine P,Culler MD,et al. Drug Insight:prolactin-receptor antagonists,a novel approach to treatment of unresolved systemic and local hyperprolactinemia?[J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab,2006,2(10):571-581
- [16] Ramamoorthy P,Sticca R,Wagner TE,et al. *In vitro* studies of a prolactin antagonist,hPRL-G129R in human breast cancer cells[J]. Int J Oncol,2001,18(1):25-32
- [17] Scotti ML,Langenheim JF,Tomblyn S,et al. Additive effects of a prolactin receptor antagonist,G129R,and herceptin on inhibition of HER2-overexpressing breast cancer cells [J]. Breast Cancer Res Treat,2008,111(2):241-250
- [18] Krell J,Frampton AE,Jacob J,et al. miRNAs in breast cancer:ready for real time? [J]. Pharmacogenomics,2012,13(6):709-719
- [19] Ahmad A,Sarkar SH,Bitar B,et al. Garcinol regulates EMT and Wnt signaling pathways *in vitro* and *in vivo*, leading to anticancer activity against breast cancer cells [J]. Mol Cancer Ther,2012,11(10):2193-2201
- [20] Keklikoglou I,Koerner C,Schmidt C,et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-kappaB and TGF-beta signaling pathways [J]. Oncogene,2012,31(37):4150-4163
- [21] González-Lucano LR,Muñoz-Valle JF,Ascencio-Cedillo R,et al. Increased expression of the prolactin receptor is associated with malignant laryngeal tumors[J]. Exp Ther Med,2012,3(4):603-607
- [22] Git A,Dvinge H,Salmon-Divon M,et al. Systematic comparison of microarray profiling,real-time PCR,and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression[J]. RNA,2010,16(5):991-1006