

· 基础研究 ·

miR-588在乳腺癌中的表达及对乳腺癌细胞增殖和侵袭的作用

陶爽¹, 陈兴阳², 程明加², 徐海峰², 李金平^{3*}¹常州市第七人民医院乳腺外科, 江苏 常州 213000; ²常州市德安医院普外科, 江苏 常州 213000; ³宁夏医科大学总医院乳腺外科, 宁夏 银川 750004

[摘要] 目的: 探讨 miR-588 在乳腺癌中的表达及对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。方法: 用化学合成的 miR-588 成熟模拟物(miR-588 mimic)过表达 miR-588, 并验证 miR-588 过表达率; 采用 MTT、克隆形成实验检测 miR-588 对乳腺癌细胞 MCF7 和 MDA-MB-231 增殖的影响; 采用划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验检测 miR-588 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的影响。结果: miR-588 在乳腺癌组织及细胞中的相对表达均低于癌旁正常组织及乳腺正常上皮细胞; 过表达 miR-588 能明显抑制 MCF7 和 MDA-MB-231 细胞的增殖; 上调 miR-588 可显著抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力。结论: miR-588 在乳腺癌中低表达, 过表达 miR-588 可抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭。

[关键词] miR-588; 乳腺癌; 增殖; 侵袭**[中图分类号]** R737.9**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)09-1318-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190911

Expression and effects of miR-588 on proliferation and invasion of breast cancer cells *in vitro*

Tao Shuang¹, Chen Xingyang², Chen Mingjia², Xu Haifeng², Li Jinping^{3*}¹Department of Breast Surgery, Changzhou Seventh People's Hospital of Jiangsu Province, Changzhou 213000; ²Department of General Surgery, De'an Hospital of Changzhou City, Changzhou 213000; ³Department of Breast Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the expression of miR-588 in breast cancer and its effects on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells. **Methods:** The miR-588 was synthesized by chemical synthesis (miR-588 mimic), and the over expression rate of miR-588 was verified. MTT and clonogenic assay were used to detect the effect of miR-588 on the proliferation of breast cancer cells of MCF7 and MDA-MB-231. The effects of miR-588 on migration and invasion of MDA-MB-231 cells were detected by scratch healing test and Transwell invasion test. **Results:** MiR-588 expression in breast cancer tissues were lower than those in adjacent normal tissues and normal breast epithelial cells; Overexpression of miR-588 could inhibit proliferation of MCF7 and MDA-MB-231 cells; upregulation of miR-588 could significantly inhibit the migration and invasion of MDA-MB-231 cells. **Conclusion:** The expression of miR-588 is low in breast cancer. Overexpression of miR-588 can inhibit the proliferation and invasion of breast cancer cells.

[Key words] miR-588; breast cancer; proliferation; invasion

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09): 1318-1322]

乳腺癌是女性最为常见的恶性肿瘤之一, 根据最新的世界卫生组织统计数据, 乳腺癌已成为危害妇女健康的重大疾病, 是导致女性死亡的主要原因^[1]。为了提高乳腺癌的治疗效果, 提高患者的远期生存

[基金项目] 宁夏人事厅留学人员资助项目; 国家自然科学基金(81760482); 宁夏自然科学基金(N217138); 常州市科技计划资助(CE20175035)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: 2634497264@qq.com

率, 需进一步研究乳腺癌的发病原因, 寻找新的有效生物治疗靶点。微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度 18~25 nt 的非编码内源性小分子 RNA, 这些小分子 RNA 参与人体约 30% 编码基因的调控, 通过直接或间接调控, 在多种恶性肿瘤的发生发展中发挥抑癌或促癌作用^[2-4]。已有研究表明, miR-588 在肺鳞状细胞癌中异常表达^[5], 而其在乳腺癌中的表达情况, 在乳腺癌发生发展中发挥何

种作用,国内外文献尚未见报道。本研究通过检测 miR-588 在乳腺癌组织和细胞中的表达,并通过功能实验观察过表达 miR-588 对乳腺癌细胞增殖、侵袭的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

从宁夏医科大学总医院生物样本组织库中提取2014年1月—2015年12月收集的原发性乳腺癌和对应癌旁冻存组织各60例为研究对象。60例均为女性,中位年龄49(32~68)岁,术前未行化疗、放射治疗或内分泌治疗。术后病理类型:浸润性导管癌52例,浸润性小叶癌5例,乳头状癌2例,黏液癌1例;临床病理分期:I期14例,II期36例,III期10例。癌组织和癌旁正常组织均取自同一确诊乳腺癌患者,留取的乳腺癌组织和癌旁正常组织(距肿瘤组织边缘大于5 cm)均在离体30 min内放入液氮保存,收取标本时均告知患者留取标本将用于科学研究,并签署知情同意书。该研究得到医院伦理委员会批准。

人乳腺正常上皮细胞MCF10A及乳腺癌细胞MCF7和MDA-MB-231均购自美国ATCC(American Type Culture Collection),按说明进行培养。miR588模拟物(miR-588 mimic)(正向5'-GCUUCCAAA-GAUCAGGUAACATT-3',反向5'-UGUUACCG-AUCUUUGGAAGCTT-3')和阴性对照(miR-588 NC)(上海吉玛制药技术有限公司设计并合成)。转染试剂lipofectmin2000(Invitrogen公司,美国),总RNA提取试剂盒、RNA反转录试剂盒和Real-time PCR Taqman试剂(TaKaRa公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 Real-time PCR检测miR-588的表达

按照RNA提取试剂盒说明书中步骤提取组织及细胞总RNA,按RNA反转录试剂盒逆转录合成cDNA,以cDNA为模板,按照Real-time PCR试剂盒说明书配制反应体系,反应以U6为内参照,在ABI-7300实时荧光定量仪上进行PCR扩增。反应条件为:95℃预变性3 min;95℃变性12 s,62℃退火40 s,共40个循环。实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行表达量相对定量分析。

1.2.2 细胞瞬时转染

按照lipofectmin2000转染试剂盒说明书步骤和方法,将miR-588 mimic和miR-588 NC转染至对数生长期的乳腺癌细胞,转染24 h后将细胞正常培养,并储存于-80℃冰箱,供后续细胞实验使用。

1.2.3 MTT实验

将转染miR-588 mimic和miR-588 NC的乳腺癌细胞MCF7和MDA-MB-231及未做转染的空白对照组细胞以85个/mL的密度接种于96孔板中,每孔加入200 μL细胞培养液置于37℃、5%CO₂孵育箱中分别培养12、24、36、48 h后,吸除培养液,每孔加入10 μL MTT后在37℃细胞培养箱内继续孵育,1 h后每孔加DMSO 150 μL,放置摇床慢速震荡30 min,在酶标仪490 nm波长处测定各孔吸光度值,计算细胞增殖抑制率。每组平行重复6孔,重复实验3次。

1.2.4 克隆形成实验

收集对数生长期的乳腺癌细胞,计数后铺于6孔板,细胞密度为100个/孔。将其置于细胞培养箱中正常培养。2周后,当细胞培养板中出现肉眼可见克隆时,终止培养。用PBS小心冲洗2次后,用4%中性甲醇固定细胞15 min后,用瑞氏-吉姆萨复合染色液染色30 min,流水缓慢洗涤后自然空气干燥。在显微镜下计数大于50个细胞的克隆数,按照如下公式计算克隆形成率:克隆形成率=克隆数/接种细胞数×100%。

1.2.5 划痕愈合实验

将miRNA-588 mimic和miRNA-588 NC瞬时转染MDA-MB-231细胞24 h后接种至6孔板,待细胞铺满孔底,用枪头在孔底划痕,PBS清洗后加入含有2.5%胎牛血清的低血清新鲜培养基,倒置显微镜下拍照。沿划痕边缘等间距取3处测量划痕宽度,取平均值,48 h后继续拍照,在相同观察点测量划痕宽度。划痕愈合率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度×100%。

1.2.6 Transwell侵袭实验

使用8 μm孔径的Corning小室检测乳腺癌细胞的侵袭能力。单层Matrigel胶提前包被小室滤膜,在上室孔中加入miRNA-588 mimic组和阴性对照miRNA-588 NC组的MDA-MB-231细胞(1×10^5 个/孔),在下室中加入DMEM完全培养基,静置于37℃培养箱内培养24 h后。去除培养基,使用4%多聚甲醛固定,苏木精染色,置于显微镜下随机选取5个视野进行细胞计数。细胞侵袭率=(转染组穿透细胞数/空白对照组穿透细胞数)×100%。

1.3 统计学方法

数据分析应用Graphpad Prism 5.0统计软件完成,数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表达,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-588 在人乳腺癌组织及细胞中的表达

实时荧光定量 PCR 检测 60 例原发性乳腺癌患者癌组织和匹配癌旁正常组织中 miR-588 的相对表达量。在乳腺癌组织中,相对于管家基因 U6, miR-588 相对表达量 (3.03 ± 0.35) 明显低于癌旁正常组织 (5.63 ± 0.85), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 1A)。其在乳腺癌细胞 MCF7 和 MDA-MB-231 中的相对表达量 (4.86 ± 0.4 、 1.63 ± 0.15) 亦明显低于乳腺正常上皮细胞 MCF10A (7.2 ± 0.5), 差异有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 1B)。

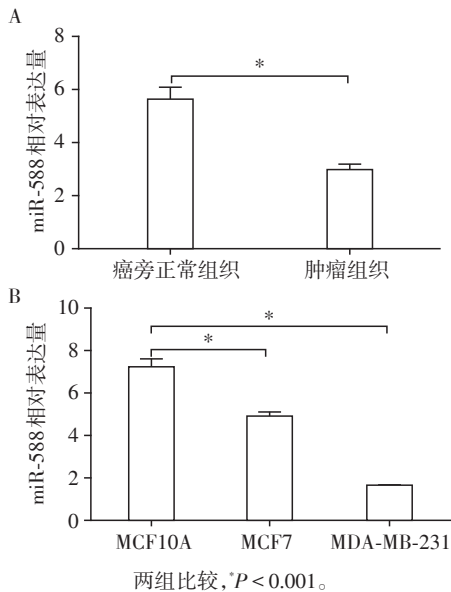


图1 miR-588 在乳腺癌组织(A)及细胞(B)中的表达
Figure 1 Expression of miR-588 in breast cancer tissues (A) and cells (B)

2.2 miR-588 过表达和转染效率鉴定

转染 miR-588 mimic 后 MDA-MB-231 和 MCF 细胞的 miR-588 相对表达水平分别为空白对照组的 2.7 倍和 2.2 倍 ($P < 0.001$), 而阴性对照 miR-588 NC 组与空白对照组的 miR-588 表达水平比较差异无统计学意义(图 2)。由此可以明确, miR-588 mimic 已成功转染至乳腺癌细胞并显著上调了 miR-588 在 MCF7 和 MDA-MB-231 中的表达, 可进行后续的功能实验研究。

2.3 过表达 miR-588 对乳腺癌细胞增殖的影响

与阴性对照 miR-588 NC 组相比, 过表达 miR-588 能明显抑制乳腺癌细胞 MCF7 和 MDA-MB-231 的体外增殖能力, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 3)。软琼脂克隆形成实验显示, 过表达 miR-588 能

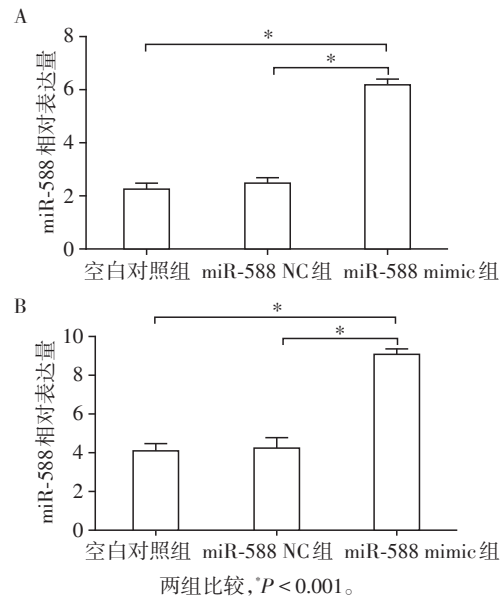


图2 miR-588 转染 MDA-MB-231 (A) 和 MCF7 (B) 细胞后的相对表达量
Figure 2 Relative expression of miR-588 in MDA-MB-231 (A) and MCF7 (B) cells after transfection

明显抑制 MCF7 和 MDA-MB-231 细胞克隆形成, 与阴性对照 miR-588 NC 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4)。

2.4 过表达 miR-588 对乳腺癌细胞迁移的影响

划痕 48 h 后比较 miR-588 mimic 组和阴性对照 miR-588 NC 组细胞迁移的距离。结果显示: miR-588 mimic 组细胞迁移的距离为 (23.58 ± 3.46) μm , 而阴性对照 miR-588 NC 组细胞迁移的距离为 (62.34 ± 4.25) μm , 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 5)。实验表明, 过表达 miR-588 能抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移能力。

2.5 过表达 miR-588 对乳腺癌细胞侵袭的影响

Transwell 小室比较过表达 miR-588 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 侵袭能力的影响。实验结果显示: 阴性对照 miR-588 NC 组穿膜细胞数明显高于 miR-588 mimic 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 6)。实验结果表明, 过表达 miR-588 能够抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。

3 讨论

肿瘤侵袭转移是一复杂的多因素调节过程, 经历肿瘤细胞从原发部位脱离、经淋巴和血液循环转移及转移灶的形成, 癌基因、抑癌基因及细胞因子等多种因素参与这一过程^[6]。其中 miRNA 的直接或间接调控在肿瘤侵袭转移过程中发挥着举足轻

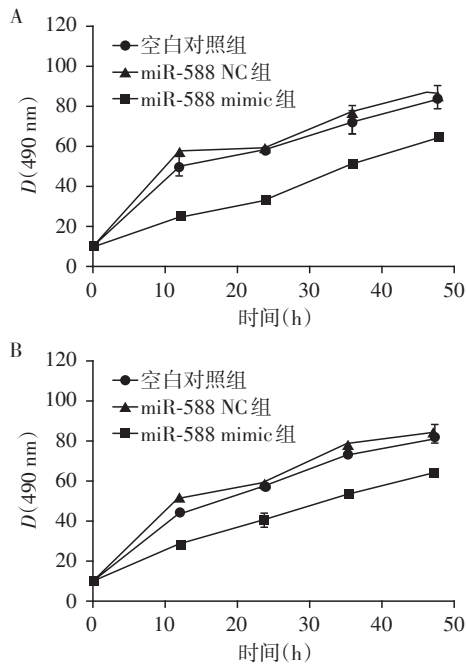


图3 MTT实验检测miR-588对乳腺癌细胞MCF7(A)和MDA-MB-231(B)增殖的影响

Figure 3 The effect of miR-588 on proliferation of breast cancer cells MCF7 (A) and MDA-MB-231 (B) verified by MTT

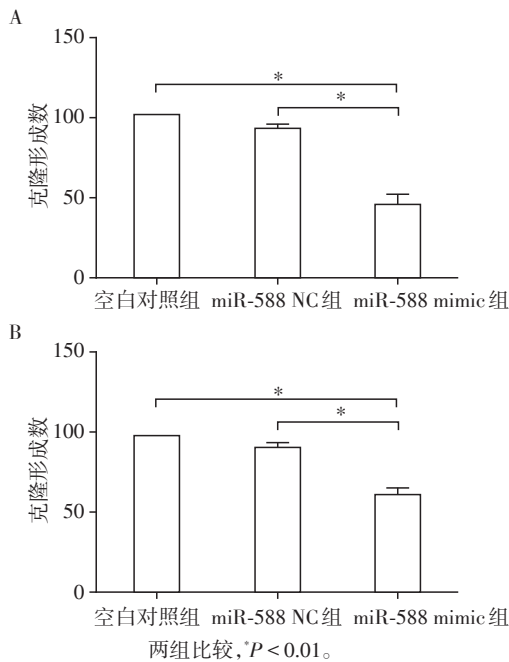


图4 克隆形成实验验证miR-588对乳腺癌细胞MCF7(A)和MDA-MB-231(B)增殖的影响

Figure 4 The effect of miR-588 on proliferation of breast cancer cells MCF7 (A) and MDA-MB-231 (B) verified by colony formation assay

重的作用^[7-12]。miRNA是存在于真核生物体内长度约22个碱基高度保守的非编码小分子RNA,通过碱

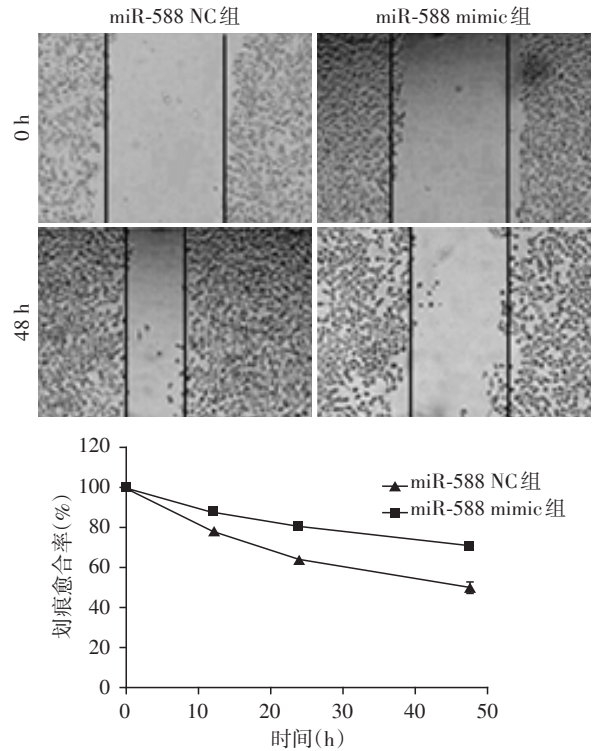


图5 划痕愈合实验检测miR-588对乳腺癌细胞MDA-MB-231迁移能力的影响

Figure 5 The effect of miR-588 on migration of breast cancer MDA-MB-231 cells detected by the scratch healing test

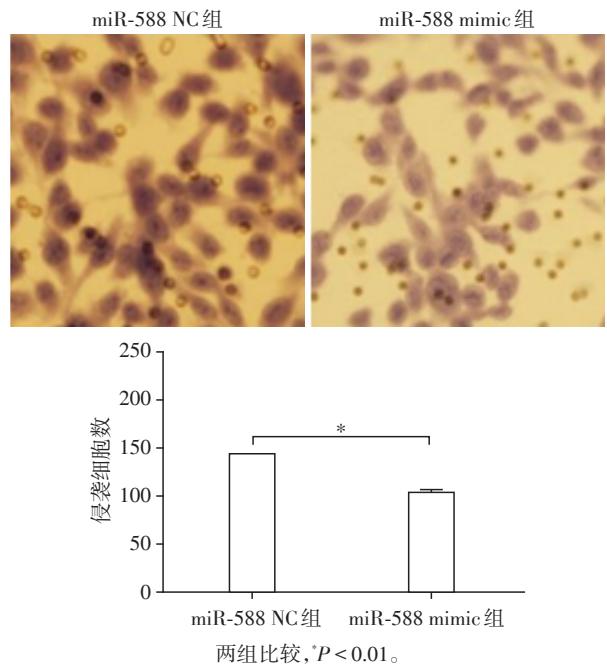


图6 Transwell实验检测miR-588对乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭能力的影响

Figure 6 The effect of miR-588 on invasive ability of breast cancer MDA-MB-231 cells detected by Transwell assay

基配对特异性地与 mRNA 相结合,从而影响 mRNA 降解和翻译成蛋白质的过程,间接调控靶基因的表达,影响细胞周期和细胞凋亡等过程^[13-15]。

最新文献报道,miR-588 通过靶向调控颗粒体蛋白(granulin, GRN)抑制肺鳞状细胞癌的侵袭和转移^[5]。但 miR-588 在乳腺癌中的表达及其在乳腺癌发生发展中所发挥的作用尚无文献报道。miR-588 属于 miRNA 中一类非编码的小分子 RNA,通过与靶基因 3'末端的非翻译区域(3'-UTR)结合,促进靶基因 mRNA 的降解或抑制其翻译转录,从而参与调控肿瘤细胞的增殖、凋亡及侵袭转移等。

本研究采用 Real-time PCR 法检测乳腺癌组织、癌旁正常组织及乳腺癌细胞、乳腺正常上皮细胞中 miR-588 的相对表达量。结果显示,其在乳腺癌组织中的相对表达量明显低于癌旁正常组织,差异有统计学意义。在细胞实验中也得出了相似结果,miR-588 在两株乳腺癌细胞中的表达均明显低于正常乳腺上皮细胞,差异有统计学意义。接着采用 MTT 和克隆形成实验检测 miR-588 对乳腺癌细胞增殖的影响。采用瞬时转染技术将 miR-588 mimic 瞬时转染至乳腺癌细胞 MCF7 和 MDA-MB-231,构建研究用细胞模型,经实时荧光定量 PCR 检测转染成功后应用于生物学功能研究。MTT 和克隆形成实验结果显示:过表达 miR-588 能显著抑制乳腺癌细胞株 MCF7 和 MDA-MB-231 的增殖能力,差异有统计学意义。以上 MTT 和克隆形成实验提示 miR-588 具有抑制乳腺癌细胞增殖的作用。为进一步考察 miR-588 对乳腺癌细胞侵袭和迁移能力的影响,设计了细胞划痕愈合实验和 Transwell 侵袭实验,此两项实验结果显示:miR-588 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭和迁移有明显抑制作用,与对照组相比,差异有统计学意义。上述实验结果表明,miR-588 可能在乳腺癌疾病进展中发挥抑癌作用,可作为新的潜在药物治疗靶点应用于乳腺癌的基因治疗。

通过 miRTarBase 数据库(<http://mirtarbase.mbc.ntcu.edu.tw>)检索,miR-588 可能的靶标基因为 GRN,目前正在实验验证中。上述研究初步揭示了 miR-588 可能在乳腺癌中发挥抑癌作用,为后续抑癌机制的深入研究提供了基础。

[参考文献]

[1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132
[2] Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, et al. miRNAs in human

cancer[J]. J Pathol, 2011, 223:102-115
[3] 韩国勇,张 龙,陈志强,等. miRNA-873 促进肝癌细胞的迁移与侵袭[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(9):1076-1080
[4] 余丹丹,张 林,徐晓兰,等. miRNA-497 抑制卵巢癌细胞中 FASN 的表达[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(2):220-223
[5] Qian L, Lin LL, Du YF, et al. MicroRNA-588 suppresses tumor cell migration and invasion by targeting GRN in lung squamous cell carcinoma[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4):3021-3028
[6] Aznavoorian S, Murphy AN, Liotta LA, et al. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis[J]. Cancer, 1993, 71(4):1368-1383
[7] Gu YX, Cheng Y, Song Y, et al. MicroRNA-493 suppresses tumor growth, invasion and metastasis of lung cancer by regulating E2F1[J]. PLoS One, 2014, 9(8):e102602
[8] Ito M, Teshima K, Ikeda S, et al. MicroRNA-150 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting the chemokine receptor CCR6, in advanced cutaneous T-cell lymphoma [J]. Blood, 2014, 123(10):1499-1511
[9] Li D, Li Z, Xiong J, et al. MicroRNA-212 functions as an epigenetic-silenced tumor suppressor involving in tumor metastasis and invasion of gastric cancer through down-regulating PXN expression[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(10):2980-2997
[10] Liu XY, Ge XX, Zhang Z, et al. MicroRNA-940 promotes tumor cell invasion and metastasis by downregulating ZNF24 in gastric cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(28):25418-25428
[11] Chen JS, Li HS, Huang JQ, et al. MicroRNA-379-5p inhibits tumor invasion and metastasis by targeting FAK/AKT signaling in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2016, 375(1):73-83
[12] Wu DD, Li XS, Meng XN, et al. MicroRNA-873 mediates multidrug resistance in ovarian cancer cells by targeting ABCB1[J]. Tumour Biol, 2016, 37(8):10499-10506
[13] Mei Q, Li X, Guo M, et al. The miRNA network: micro-regulator of cell signaling in cancer[J]. Expert Rev Anti-cancer Ther, 2014, 14(12):1515-1527
[14] Romero - Cordoba SL, Salido - Guadarrama IA, Hidalgo - Miranda A. miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2014, 15(11):1444-1455
[15] Jinling W, Sijing S, Jie Z, et al. Prognostic value of circulating microRNA - 21 for breast cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2017, 45(6):1-6

[收稿日期] 2017-06-09