

# Hsa-miR-145 对人三阴性乳腺癌细胞侵袭和迁移的影响

赵晓艾 胡金华 赵新汉

**【摘要】 目的** 探讨 Hsa-miR-145 对人三阴性乳腺癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响,并初步分析其影响三阴性乳腺癌细胞增殖、侵袭及迁移的可能机制。**方法** 运用脂质体介导的转染方法将 miR-145 阻遏物(miR-145 inhibitors)转染人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,以 inhibitor negative control (inhibitor NC)作为阴性对照,通过 MTT 法和 Transwell 侵袭实验检测细胞的增殖能力和侵袭力;采用 Transwell 迁移实验及划痕试验检测细胞的迁移能力;利用生物信息学方法预测 miR-145 的靶基因,并对其靶基因进行基因功能分析。**结果** (1)miR-145 inhibitors 组细胞增殖活性明显高于 inhibitor NC 组( $P < 0.05$ );(2)划痕后 miR-145 inhibitors 组细胞迁移能力比 inhibitor NC 组明显增强( $P < 0.05$ );(3)Transwell 侵袭及迁移实验均显示转染 miR-145 inhibitors 后,MDA-MB-231 细胞的侵袭及迁移能力明显增强( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );(4)生物信息学方法预测 miR-145 的靶基因中,部分发挥了促进细胞增殖、侵袭及迁移的生物学功能。**结论** (1)miR-145 对人三阴性乳腺癌细胞的增殖、侵袭及迁移能力可能存在负性调控作用;(2)miR-145 可能通过多种靶基因发挥其对肿瘤的调控作用。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 微 RNAs; miR-145; Transwell 侵袭及迁移

**Effect of Hsa-miR-145 on invasion and migration potential in triple-negative breast cancer cell** ZHAO Xiao-ai, HU Jin-hua, ZHAO Xin-han. Department of Medical Oncology, The First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Corresponding author: ZHAO Xin-han, Email: zhaoxinhan@mail.xjtu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of miR-145 on proliferation, invasion and migration potential in triple-negative breast cancer cell and to explore its possible targets and mechanism. **Methods** Human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells were transfected with Hsa-miR-145 inhibitors by Lipofectamine to inhibit the activity of Hsa-miR-145. MDA-MB-231 cells transfected with inhibitor negative control (inhibitor NC) were cultured as negative control. Cell proliferation and invasion potential were evaluated by MTT assay and transwell invasion assay. Cell migrating ability was detected by transwell migration assay and wound healing assay. Then the possible target genes of miR-145 were forecasted by bioinformatics tools and the function of these genes was analyzed. **Results** (1) Cells transfected with Hsa-miR-145 inhibitors revealed significant higher growth ability compared to the inhibitor NC transfectants ( $P < 0.05$ ). (2) Remarkable enhancement of cell migration was observed in Hsa-miR-145 inhibitors transfectant after the scratch ( $P < 0.05$ ). (3) Transfection of Hsa-miR-145 inhibitors into MDA-MB-231 cells led to a significant increase in cell invasion and migration detected by transwell invasion and migration assay ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ ). (4) The possible target genes of miR-145 might play a biological function of promoting cell proliferation, invasion and migration. **Conclusions** miR-145 may negatively regulate the proliferation, invasion and migration potential of triple-negative breast cancer cells. It plays the function of regulation on tumor development through some target genes.

**【Key words】** Breast neoplasms; MicroRNAs; miR-145; Transwell invasion and migration

MiRNAs 是一类长约 22 nt 的非编码单链 RNA,它

通过与靶 mRNA 完全或不完全的互补配对,促进靶标 mRNA 的降解或抑制蛋白质翻译,在细胞生长和发育的过程中起着多种调节作用,参与生命过程中一系列的重要进程,包括发育、造血、器官形成、凋亡、细胞增殖,甚至肿瘤发生<sup>[1]</sup>。MiRNAs 对 mRNA 异常的转录后调节可以促进细胞增殖、抑制细胞凋亡及增强细胞的

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.15.093

基金项目:陕西省科学技术研究发展计划项目(社发攻关)(2010K14-01)

作者单位:710061 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤内科

通讯作者:赵新汉,Email:zhaoxinhan@mail.xjtu.edu.cn

侵袭能力,从而导致肿瘤的发生和发展<sup>[2-3]</sup>。本课题组利用 miRNA 芯片技术检测了三阴性乳腺癌和癌旁乳腺组织的 miRNA 差异表达,结果表明三阴性乳腺癌相对于癌旁乳腺组织 miR-145 表达显著下调,并且其表达与肿瘤的侵袭转移呈负相关。本研究选择三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为模型,通过转染 miR-145 inhibitors 抑制三阴性乳腺癌细胞中 miR-145 的活性以探讨 miR-145 对三阴性乳腺癌细胞增殖、侵袭及迁移的影响,并利用生物信息学方法预测 miR-145 的靶基因,初步分析 miR-145 影响三阴性乳腺癌细胞增殖、侵袭及迁移的可能机制。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 细胞株:人三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 从中科院上海细胞库购得。

2. 主要试剂与耗材:胎牛血清(杭州四季青公司),Lipofectamine 2000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司),DMEM 培养基、转染用无血清培养基 OPTI-MEM (美国 GIBCO 公司),MTT(美国 Sigma 公司),Transwell 侵袭小室(8.0  $\mu\text{m}$  孔径 PC 膜,美国 Costar 公司),基质胶(美国 BD 公司),6 cm 细胞培养皿、96 孔细胞培养板(德国 Greiner 公司),miRNA inhibitor 及其 NC(上海吉玛公司)。Hsa-miR-145 inhibitors 序列为 5'-AGG-GAUUCCUGGAAAACUGGAC-3'; miRNA inhibitor NC 序列为 5'-UCUACUCUUUCUAGGAGGUUGUGA-3',该 NC 序列与人类基因组非同源,对任何人 miRNA 均无干扰作用。

3. 仪器设备:低速离心机(上海安亭科学仪器公司),ZHJH-C1112C 智能型垂直流超净工作台(上海智城分析仪器公司),CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo Election Corporation),酶标仪(Thermo scientific),相差倒置显微镜(OLYMPUS),单反相机(Canon)。

### 二、方法

1. 细胞培养:MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养。

2. 接种细胞:转染前 1 d 将培养好的 MDA-MB-231 细胞铺于 6 cm 培养皿中,使其汇合度在 60% ~ 70%,置于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养。

3. 转染:Hsa-miR-145 inhibitors 及 miRNA inhibitor NC 干粉离心后配制成终浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  的工作液。铺板 24 h 内进行转染,按照 Invitrogen Lipofectamine 2000 说明书进行转染。转染后 6 h 将培养液更换成正常的完全培养基,继续培养以用于后续实验。

4. MTT 法检测细胞增殖活性:设转染 miRNA inhibitor NC 阴性对照组和转染 miR-145 inhibitors 两组。转染 48 h 后,用胰蛋白酶消化细胞,细胞计数,铺于 96 孔板中,每个组 6 个平行孔,待细胞贴壁后,取其中一块板每个孔加 20  $\mu\text{l}$  MTT(5 mg/ml),CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 4 h 后,每孔加 150  $\mu\text{l}$  DMSO,室温震荡待甲贲完全溶解均匀,然后 490 nm 下测定各样品的 OD 值。以时间点为横坐标,各样品的 OD 值为纵坐标,绘制细胞生长曲线,分析两组细胞活性有无统计学差异。

5. 划痕实验:转染后,待细胞丰度达到 90% 时,用无血清 DMEM 培养基饥饿 12 h,然后每个平皿用 20  $\mu\text{l}$  的小枪头划一条划痕,在相差显微镜下取划痕处几个不同视野拍照(0 h),37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养并每隔 24 h 拍照,然后分析图片中不同视野中划痕的宽度。

6. Transwell 侵袭及迁移实验:MDA-MB-231 细胞转染 48 h 后,用胰蛋白酶消化细胞,细胞计数  $5 \times 10^4$ ,铺于 24 孔 Transwell 小室,每孔铺 200  $\mu\text{l}$  细胞,然后板孔中加入 600  $\mu\text{l}$  完全培养基,小室中补加 200  $\mu\text{l}$  无血清培养基。其中侵袭实验在小室接种细胞前一晚将 Matrigel(基质胶)用无血清 DMEM-H 培养基稀释成浓度为 1:7,每个侵袭小室加 60  $\mu\text{l}$ ,而迁移实验不加基质胶。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,侵袭实验 28 h 后再迁移实验 20 h,取出小室用 90% 乙醇固定,0.1% 结晶紫溶液染色,置于显微镜下观察并拍照,随机选取 4 个低倍视野( $\times 100$ )进行细胞计数,并计算平均值。实验重复 2 次。

7. 靶基因预测及基因功能分类:采用 TargetScan、miRWalk、PicTar4 和 miRanda 四个数据库进行 Hsa-miR-145 检索,预测其靶基因,并对这些靶基因进行初步的基因功能分类。

### 三、统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件进行 *t* 检验分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. miR-145 inhibitors 对 MDA-MB-231 细胞增殖能力的影响(图 1):细胞接种 96 孔板 24 h、48 h 和 72 h 后,转染 miR-145 inhibitors 组细胞增殖活性明显高于转染 inhibitors NC 组( $P < 0.05$ )。

2. 转染 miR-145 inhibitors 后细胞侵袭及迁移能力的变化:Transwell 侵袭实验(图 2)及迁移实验(图 3)结果显示 miR-145 inhibitors 组侵出小室的细胞数较 inhibitor NC 组均明显增加( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。划痕实验(图 4)显示划痕后 24 h 和 48 h miR-145 inhibitors

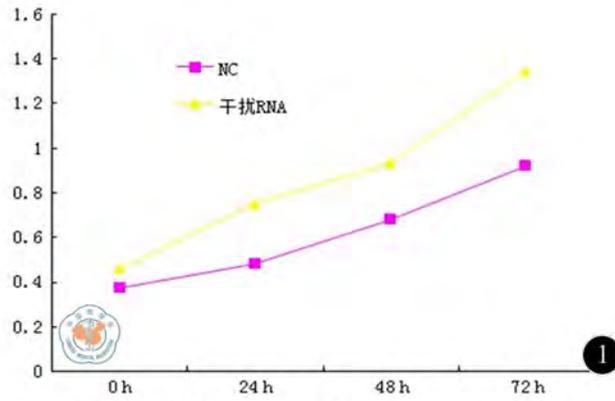


图1 抑制MDA-MB-231细胞miR-145活性对细胞增殖能力的影响

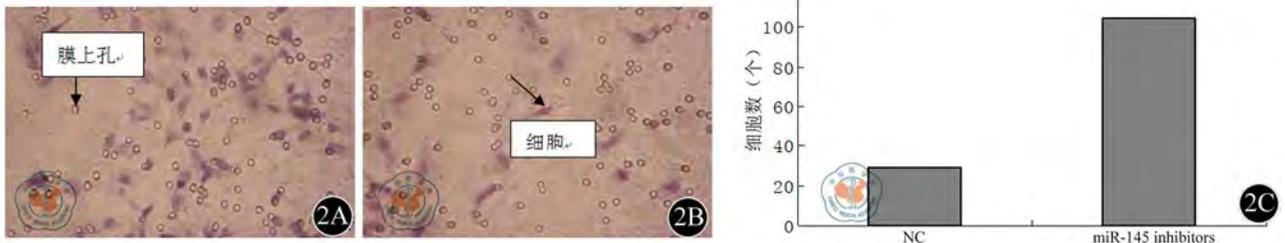


图2 Transwell侵袭实验。2A: 转染miR-145 inhibitors组; 2B: 转染inhibitor NC组; 2C: 每低倍镜视野的平均穿膜细胞数

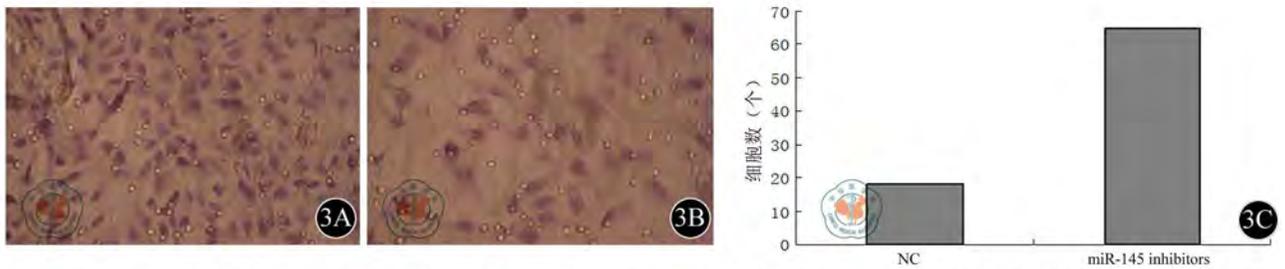


图3 Transwell迁移实验。3A: 转染miR-145 inhibitors组; 3B: 转染inhibitor NC组; 3C: 每低倍镜视野的平均穿膜细胞数

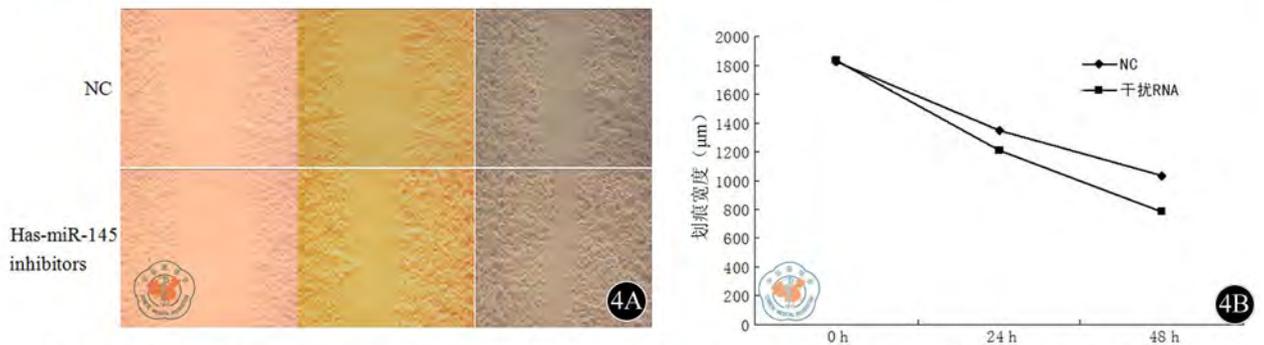


图4 划痕实验。4A: 转染miR-145 inhibitors组划痕愈合速度明显快于inhibitor NC组; 4B: 转染miR-145 inhibitors组划痕宽度明显窄于inhibitor NC组

组划痕愈合速度明显快于 inhibitor NC 组 ( $P < 0.05$  和  $P < 0.01$ )。

3. miR-145 靶基因预测及基因功能分类: 表 1 显示 4 个数据库分别预测的与细胞侵袭、迁移和黏附相关的 miR-145 的可能靶基因。

### 讨 论

研究表明 miR-145 在多种肿瘤组织, 包括胃癌<sup>[4]</sup>、膀胱癌<sup>[5]</sup>、肠癌<sup>[6]</sup>、B 细胞淋巴瘤<sup>[7]</sup>、宫颈癌<sup>[8]</sup>、肝癌<sup>[9]</sup> 以及卵巢癌<sup>[10]</sup> 中表达显著下调, 说明 miR-145 作为肿瘤抑癌基因在肿瘤的发生发展转移过程中起着重要的

表1 miR-145 增殖、侵袭及迁移相关部分预测靶基因

数据库	基因名
miRanda	BCL2L11、CDH5、LRPPRC、G3BP1、FARPI
TargetScan	BCL2L11、DH5、SCAMP3、G3BP1
PicTar4	SCAMP3、ACTR3、CDK6、SEMA3A、
miRWalk	BCL2L11、CDH5、SCAMP3、TSPAN5、LRPPRC

作用,并且可能通过相同的靶点抑制了肿瘤的发生。Shi等<sup>[11]</sup>证明了miR-145可能作用于胰岛素信号通路、RAS-MAPK信号通路等信号通路中的基因抑制肠癌细胞的生长。

Iorio等<sup>[12]</sup>发现miR-145在乳腺癌组织中显著下调,并且其表达情况与乳腺癌的病理特征如肿瘤分期、增殖指数、血管浸润等密切相关。同样,本课题组先前的研究表明miR-145在三阴性乳腺癌组织中亦表达下调,并且其表达与肿瘤的增殖、侵袭转移呈负相关。为了明确miR-145对人三阴性乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用,本文将miR-145 inhibitors转染至三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231中,观察其功能缺失对细胞的影响,结果表明抑制miR-145活性后,在不显著影响细胞增殖的前提下,能够显著增强MDA-MB-231细胞的增殖、侵袭及迁移能力,表明miR-145可能抑制三阴性乳腺癌的侵袭和转移,而具有高度的侵袭/转移性正是三阴性乳腺癌的最大特征,从而为进一步研究miR-145在三阴性乳腺癌治疗中的作用奠定了基础。

目前,从已知的miRNA与靶基因之间的相互作用中,人们得出miRNA 5'端第2~7个核苷酸(被称为种子序列)可以与靶mRNA 3'端非编码(UTR)区完全互补<sup>[13]</sup>。这一特点被各种靶基因预测软件广泛采用,即各种不同计算机预测方法基本原理是基于miRNA与其靶基因的自然配对。当前比较常用的预测软件主要有TargetScan、PicTar、miRanda、miRWalk、miRNA Viewer等,通过将预测结果与生理状况下miRNA和靶标的表达情况联系起来,并利用Gene Ontology(GO)数据库对这些靶基因进行初步的基因功能分类,发现miR-145的预测靶基因的生物功能涉及肿瘤发生发展的多个节点,如调节细胞生长、分化、凋亡、转录、信号转导、细胞或基质间黏附以及细胞侵袭、迁移能力等。与增殖、侵袭及迁移相关的部分预测靶基因在表1中列出。Götte等<sup>[14]</sup>发现过表达miR-145的MDA-MB-231、MCF-7乳腺癌细胞可下调细胞间黏附蛋白JAM-A和fascin的表达,从而抑制肿瘤细胞的侵袭、运动能力,认为JAM-A和fascin是miR-145调节乳腺癌细胞侵袭能力的新的靶点。Sachdeva等<sup>[15]</sup>证实miR-145虽不影响

已转移的乳腺癌细胞株的生长,但可显著抑制其侵袭能力,并且在动物模型中抑制肺转移;而这种抑制作用是通过抑制基因MUC1的表达实现的。

综上所述,我们的实验结果与他人的研究一致性地证实了miR-145不仅可抑制包括乳腺癌在内的多种肿瘤的生长,更为重要的是其可抑制三阴性乳腺癌和其他乳腺癌的侵袭和转移,为其在转移性三阴性乳腺癌治疗中的作用奠定了理论基础。当然具体的靶基因,或者其影响乳腺癌侵袭与转移是通过调节其他的侵袭、迁移及黏附相关基因而产生的作用,本课题组将在下一步研究中进行验证。

## 参考文献

- [1] He L, Hannon GJ. MicroRNAs; small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004, 5:522-531.
- [2] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 2007, 302:1-12.
- [3] 赵苏瑛, 李岷. miRNA与乳腺癌的关系及其研究进展. *检验医学与临床*, 2010, 7:2026-2027.
- [4] Takagi T, Iio A, Nakagawa Y, et al. Decreased expression of microRNA-143 and-145 in human gastric cancers. *Oncology*, 2009, 77:12-21.
- [5] Chiyomaru T, Enokida H, Tatarano S, et al. MiR-145 and miR-133a function as tumour suppressors and directly regulate FSCN1 expression in bladder cancer. *Br J Cancer*, 2010, 102:883-891.
- [6] Sachdeva M, Zhu S, Wu F, et al. P53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106:3207-3212.
- [7] Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, et al. Downregulation of microRNAs-143 and-145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci*, 2007, 98:1914-1920.
- [8] Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, et al. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*, 2007, 67:6031-6043.
- [9] Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008, 47:1223-1232.
- [10] Iorio MV, Visone R, Di Leva G, et al. MicroRNA Signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 2007, 67:8699-8707.
- [11] Shi B, Sepp-Lorenzino L, Prisco M, et al. Micro RNA 145 targets the insulin receptor substrate-1 and inhibits the growth of colon cancer cell. *J Bio Chem*, 2007, 282:32582-32590.
- [12] Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005, 65:7065-7070.
- [13] Bartel DP. MicroRNAs; target recognition and regulatory functions. *Cell*, 2009, 136:215-233.
- [14] Götte M, Mohr C, Koo CY, et al. miR-145-dependent targeting of junctional adhesion molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene*, 2010, 29:6569-6580.
- [15] Sachdeva M, Mo YY. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res*, 2010, 70:378-387.

(收稿日期:2012-04-17)

(本文编辑:马超)