

miR-512-3p 在乳腺癌中的表达及其功能研究*

梁 挺 王培军

摘要 目的:观察 miR-512-3p 在浸润性乳腺癌和癌旁组织中的表达,以及对乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 增殖、凋亡、周期和克隆形成能力的影响,并分析其可能机制。**方法:**运用荧光定量 PCR 检测浸润性乳腺癌和癌旁组织中的 miR-512-3p 的表达量。运用 MTT 法、流式细胞仪和平板克隆形成实验分析 miR-512-3p 对细胞增殖、凋亡、周期和克隆形成能力的影响。通过 TargetScan、PicTar 和 miRanda 软件寻找 miR-512-3p 可能靶基因,应用 RT-PCR 和 Western blot 技术进行验证。**结果:**乳腺癌组织中 miR-512-3p 表达明显低于正常组织 ($P < 0.05$)。MTT 试验中,72 h 浓度为 100 nmol/L 时,miR-512-3p 对乳腺癌细胞增殖的抑制作用最明显,抑制率为 45.38%。miR-512-3p 能明显诱导细胞发生早期凋亡 (9.32 ± 0.41)%,与空白对照组 (3.1 ± 0.54)%,负对照组 (2.9 ± 0.39)% 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与空白对照组比较, G_0/G_1 期细胞明显增多, G_2/M 期细胞明显减少 ($P < 0.05$)。平板克隆试验显示过表达 miR-512-3p 可显著抑制细胞的克隆形成能力,并与对照组差异性显著。荧光定量 PCR 和 Western blot 实验结果显示 100 nmol/L miR-512-3p 显著抑制 c-FLIP mRNA 和蛋白表达水平。**结论:**miR-512-3p 在乳腺癌组织中表达明显低于正常组织,其可能通过作用于下游基因 c-FLIP 抑制乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的增殖和克隆形成能力,诱导凋亡,其在肿瘤发生发展中可能担任着抑癌基因的角色,可能成为未来乳腺癌诊断和治疗的一个新的靶点。

关键词 乳腺癌 miR-512-3p 增殖 凋亡 克隆形成 c-FLIP

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20121921

MiR-512-3p expression pattern and function in breast cancer

Ting LIANG, Peijun WANG

Correspondence to: Pei-jun WANG; E-mail: tongjipjwang@vip.sina.com

Department of Medical Imaging, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81272240) and the Fund Project of the Shanghai Commission of Science and Technology (No. STCSM 10411964700).

Abstract Objective: This study aims to investigate the expression pattern of miR-512-3p in breast cancer and noncancerous paired specimens as well as the effects of miR-512-3p on the proliferation, apoptosis, cell cycle, and cloning of MD-MBA-231 breast cancer cells. The study also aims to identify the miR-512-3p target gene. **Methods:** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted to quantify the miR-512-3p expression in breast cancer and noncancerous paired specimens. Methylthiazol tetrazolium (MTT) assay, flow cytometry, and clone formation assay were used to characterize the function of miR-512-3p in breast cancer. Target prediction was performed using the TargetScan, PicTar, and miRanda software. The results were validated using RT-PCR and western blot target validation. **Results:** The relative expression of miR-512-3p in breast cancer specimens was significantly lower than those in normal breast specimens ($P < 0.05$). MTT assay revealed that 48 h after transfection, miR-512-3p significantly repressed the proliferation of MD-MBA-231 cells at a suppression rate of 45.38% and at a concentration of 100 nmol/L. MiR-512-3p increased the percentage of early apoptotic cells in the treatment groups (9.32 ± 0.41)% compared with those in the blank controls (3.1 ± 0.54)% and in the negative controls (2.9 ± 0.39)% ($P < 0.05$). Significant differences were found in the percentages of the G_0/G_1 - and G_2/M -phase cells after miR-512-3p transfection compared with those in the controls ($P < 0.05$). In the cloning assay, clone formation was inhibited in the miR-512-3p-transfected groups compared with those in the control groups. RT-PCR and western blot results indicate that miR-512-3p significantly inhibited the c-FLIP mRNA and protein expression. **Conclusion:** MiR-512-3p expression is relatively decreased in breast cancer specimens compared with those in the normal samples. The negative effect of miR-512-3p on cell proliferation and clone formation and its positive effect on early apoptosis through c-FLIP targeting suggest that miR-512-3p acts as a tumor suppressor gene in breast cancer. Therefore, miR-512-3p may be a new target for the diagnosis and treatment of breast cancer in the future.

Keywords: breast cancer, miR-512-3p, proliferation, apoptosis, colony formation, c-FLIP

作者单位: 同济大学附属同济医院影像科 (上海市 200065)

*本文课题受国家自然科学基金项目 (编号: 81272240) 和上海市科委基金项目 (编号: STCSM10411964700) 资助

通信作者: 王培军 zhenshi861@163.com

网络出版日期: 2013-9-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1099.R.20130923.1445.003.html>

MicroRNAs (miRNA)是近年来发现的一类小分子RNA,但2000年以后才引起重视。miRNAs是由长约22个核苷酸组成的非编码蛋白RNA,作用机制是通过与mRNA的3'端非翻译区(3'untranslated regions, UTRs)进行序列特异性的结合从而抑制基因的转录后表达^[1]。大量的研究表明,miRNAs在多种肿瘤中都有其独自的表达谱^[2-4]。目前尚无miR-512-3p在乳腺癌中确切表达情况及其功能的研究报道,因此本研究运用荧光定量PCR检测miR-512-3p在浸润性乳腺癌组织和癌旁组织中表达水平,后行功能试验探索其对于MDA-MB-231细胞增殖、周期和克隆形成能力的影响,并寻找其可能靶基因,为临床诊断治疗乳腺癌提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料 人乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞株购于中国科学院。实验标本取自2012年1月至2012年8月上海第十人民医院甲乳科诊治的20例女性乳腺癌患者。并取患者距离肿瘤组织>5 cm正常乳腺组织20例作为对照。本组中年龄为33~86岁,中位年龄57岁,30~40岁1例;41~50岁3例;51~60岁7例;61~75岁7例,75岁以上2例。术前均未行化疗、放疗及内分泌治疗。

1.1.2 主要试剂与耗材 RPMI-1640培养基、胎牛血清(购自美国Hyclone公司),Lipofectamine 2000转染试剂(购自美国Invitrogen公司),转染用无血清培养基OPTI-MEM(购自美国GIBCO公司),MTT细胞增殖/毒性检测试剂盒(购自美国Promega公司),Transwell侵袭小室(8.0 m孔径PC膜,购自美国Corning公司),基质胶(购自美国BD公司),Hsa-miR-512-3p(miR-512-3p)及其NC(购自上海吉玛公司)。靶基因通过TargetScan、PicTar和miRanda软件预测。

1.2 方法

1.2.1 miRNAs提取和逆转录 按照TIANGEN公司miRcute microRNA提取分离试剂盒说明书进行操作。microRNAs逆转录参照Chen等^[5]的方法,通过特异茎环引物,按照下列顺序在PCR试管中加入反应物(体积为8.6 μL):超纯水2 μL,5×buffer 1.7 μL,microRNAs茎环引物(各个microRNAs及内参U6)1.9 μL,逆转录酶(Primescript RT Enzyme Mix1) 1 μL,microRNAs sample 2 μL。反应条件为:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 8 min,4℃ 10 min,反应结束后置于4℃冰箱保存。

1.2.2 实时定量RT-PCR 按照Takara公司SYBR Premix Ex Taq(Perfect Real Time) DRR041A说明书完成加样,反应条件为95℃预变性2 min;变性95℃ 30 s,退火、延伸60℃ 45s,重复35个循环,70~95℃绘制

融解曲线。反应结束后,RQ manager分析软件统计处理,获取Ct值,并根据熔解曲线判断产物的纯度。

1.2.3 MDA-MB-231细胞计数 用含10%FBS的DMEM培养基以按 2.5×10^5 个细胞/孔接种于6孔板上。待6孔板细胞密度长到约30%~50%时,按照TIANGEN公司脂质体说明书完成miR-512-3p转染,并使miR-512-3p终浓度分别达到50、100、细胞增殖检测150 nmol/L,空白对照组为脂质体处理组,负对照组为NC转染组。5~6 h后,细胞消化重悬计数,以5 000细胞/孔分别接种入96孔板。按24、48、72和96,4个细胞培养时间段进行如下操作;每孔加入20 μL MTT溶液(5 mg/L),继续培养4 h。吸取上清弃掉,每孔加入150 μL二甲基亚砷(DMSO),置摇床上低速震荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪测量490 nm处各孔的吸光值。抑制率计算公式如下:抑制率(%)=(空白对照组吸光值-实验组吸光值)/空白对照组吸光值×100%。

1.2.4 细胞凋亡、周期检测 miR-512-3p转染同MTT试验,使miR-512-3p终浓度达到100 nmol/L。转染48 h后细胞消化重悬离心,PBS洗涤2次。凋亡检测:配置标记液:Buffer以ddH₂O 4倍稀释;Annexin V液:50 μL Buffer+2.5 μL Annexin V;PI液:250 μL Buffer+5 μL PI;标记:每 1×10^5 个细胞加入52.5 μL Annexin V液,混匀,避光反应15~20 min;加入255 μL PI液,避光反应3~5 min;混匀上机检测,统计结果。周期检测:加入预冷70%乙醇,4℃固定过夜;RNase(终浓度为0.1 g/L)消化30 min;细胞染色:加入0.05 g/L碘化丙锭(PI)250 μL,室温避光染色30 min,流式细胞仪检测,统计结果。

1.2.5 平板细胞克隆形成试验 细胞6孔板铺板及miR-512-3p转染同MTT试验,转染后消化细胞成单细胞悬液,6孔板每孔接种 4×10^2 个细胞,轻轻转动使细胞分散均匀。置细胞培养箱中培养3周,PBS小心浸洗2次,然后用95%乙醇固定10 min,风干;用0.1%结晶紫染色10 min,自来水冲洗3次,空气干燥。计数>10个细胞的克隆数,计算克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.2.7 蛋白免疫印迹 实验分组和miR-512-3p转染同细胞周期检测,分别收集实验组和对照组细胞,用预冷的RIPA裂解液裂解后取上清,以Bradford法蛋白定量,10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,然后电转移至硝酸纤维素(NC)膜上,分别加入1:1 000稀释的c-FLIP单克隆抗体(Santa Cruz biotechnology) 4℃孵育过夜,1:500稀释的二抗稀释液中孵育,PBST洗膜后进行奥德赛系统扫描。

1.3 统计学方法

实时荧光定量检测,结果分析根据Livak等^[6]的描述,采用半定量分析。本实验用两独立样本*t*检验检测 miR-512-3p 在浸润性乳腺癌组织和癌旁组织中的表达水平, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。细胞功能试验所有标本均重复检测3次,去除异常值后取平均值行*t*检验统计数据分析 MDA-MB-231 细胞株转染组及对照组之间的差异。

2 结果

2.1 Real-time PCR结果

Real-time PCR 结果显示正常乳腺组织中 miR-512-3p 表达水平为配对乳腺癌标本的8.013倍,癌组织中 miR-512-3p 表达明显低于正常组织($P<0.05$,图1)。

2.2 MTT试验结果分析

与对照组比较,miR-512-3p 抑制作用一定程度上呈剂量及时间依赖性。当作用时间为72 h、浓度为100 nmol/L时,对该株细胞的增殖抑制最强,抑制率为45.38%($P<0.05$,图2)。

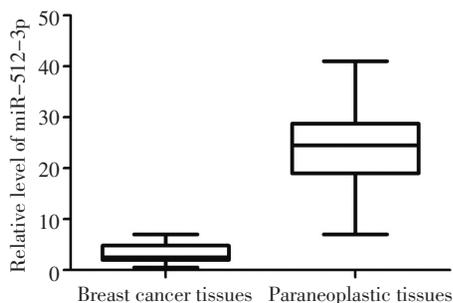


图1 乳腺癌组织及癌旁正常组织中 miR-512-3p 相对表达水平
Figure 1 RT-PCR results reveal the relative expression of miR-512-3p in breast cancer and paraneoplastic tissues

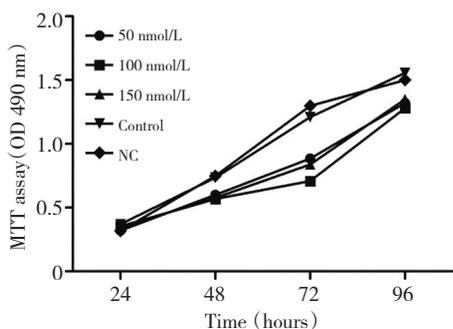


图2 MTT试验结果
Figure 2 MTT assay results

2.3 细胞凋亡、周期检测

用100 nmol/L miR-512-3p 转染 MDA-MB-231 细胞株48 h后,流式细胞仪分析显示 miR-512-3p 能明显诱导其发生早期凋亡($9.32\pm 0.41\%$),与空白对照

组($3.1\pm 0.54\%$),负对照组($2.9\pm 0.39\%$)比较,差异有统计学意义($P<0.05$,图3)。G₀/G₁期细胞数量($69.46\pm 0.65\%$),G₂/M期细胞数量($10.65\pm 0.037\%$),S期细胞数量($19.89\pm 0.077\%$),与空白对照组、负对照组数据差异明显,G₀/G₁期细胞明显增多,G₂/M期细胞明显减少,表明细胞增殖指数明显降低(图4)。

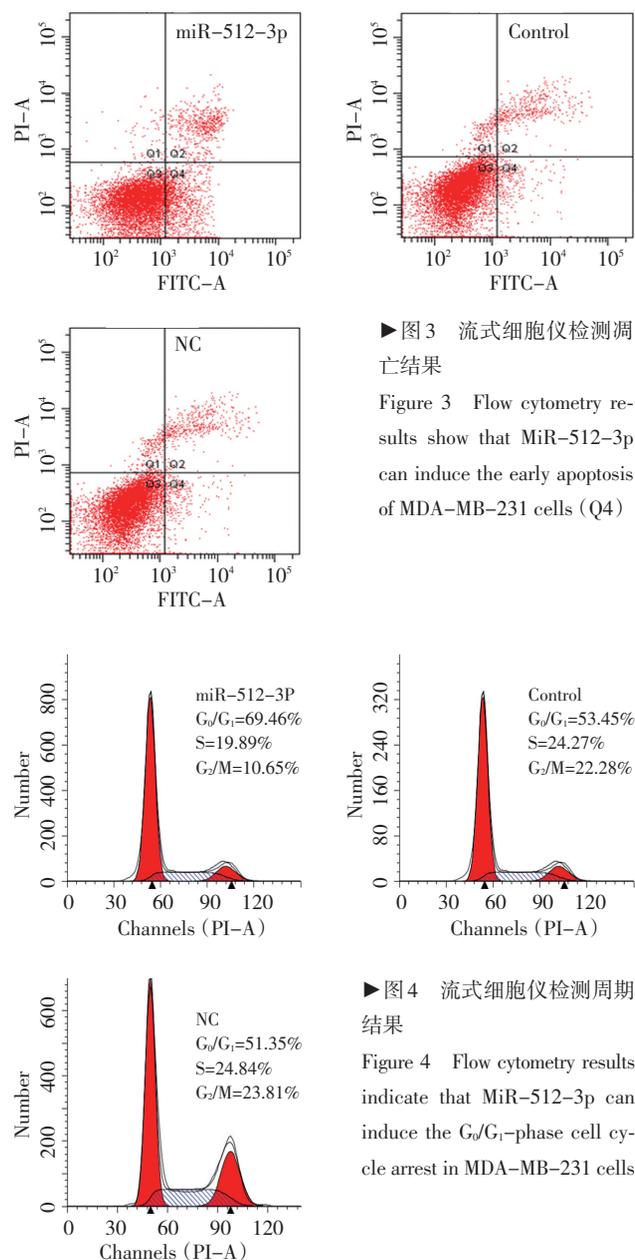


图3 流式细胞仪检测凋亡结果
Figure 3 Flow cytometry results show that MiR-512-3p can induce the early apoptosis of MDA-MB-231 cells (Q4)

图4 流式细胞仪检测周期结果
Figure 4 Flow cytometry results indicate that MiR-512-3p can induce the G₀/G₁-phase cell cycle arrest in MDA-MB-231 cells

2.4 平板细胞克隆形成试验

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中过表达 miR-512-3p 可显著抑制细胞的克隆形成能力,与空白对照组($0.560\pm 0.003 657$)和负对照组($0.493\pm 0.004 537$)相比,实验组($0.270\pm 0.007 031$)克隆形成率明显降低,细胞增殖活力显著降低(图5)。

2.5 C-FLIP 基因 Real-time PCR 结果分析

TargetScan、PicTar 和 miRanda 软件预测 c-FLIP 可能

为 miR-512-3p 下游基因,图 5 中显示结合位点。通过荧光定量 PCR 检测转染前后 c-FLIP 基因的表达变化。结果显示 c-FLIP mRNA 相对表达水平在实验组 (0.273±0.057) 对比负对照组 (0.978±0.064) 及空白对照组 (1.078±0.047) 差异明显 ($P < 0.05$, 图 6), 表明上调 miR-512-3p 的表达可明显抑制 c-FLIP mRNA 的表达。

2.6 Western blot 结果分析

空对照组及负对照组相比, miR-512-3p (100 nmol/L) 作用乳腺癌 MD-MBA-231 细胞株 48 h 后, c-FLIP 蛋白的表达量明显减少, 表明上调 miR-512-3p 的表达可明显抑制 c-FLIP 蛋白的表达 (图 6)。

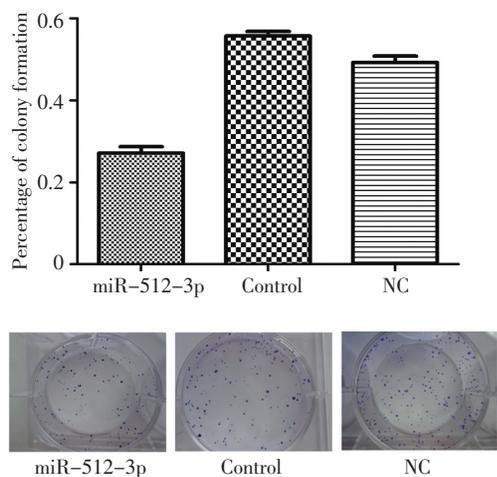


图 5 平板克隆形成试验结果, 与空白对照和 NC 组相比, miR-512-3p 转染组 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力受到抑制
Figure 5 In the plate clone formation test, the cloning ability was inhibited in the miR-512-3p-transfected groups compared with those in the controls and in the negative control groups

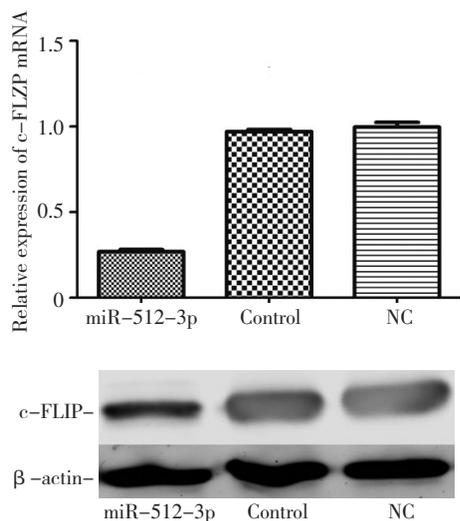


图 6 c-FLIP mRNA、蛋白水平表达情况
Figure 6 The expression levels of c-FLIP mRNA and protein were determined in the MDA-MB-231 cells. MiR-512-3p significantly inhibited the c-FLIP mRNA and protein expression

3 讨论

miRNAs 是一类内源性非蛋白质编码的 RNA 分子,广泛分布在病毒、植物到高等哺乳动物中。多数的 miRNAs 具有高度保守性、时序性、组织细胞特异性,受到发育和空间的调控,并参与细胞的分化、增殖、死亡。大量研究证明,miRNAs 与多种肿瘤的存在密切相关,它的作用靶点可为抑癌基因,定位于扩增区,使其表达下调,则发挥原癌基因样作用;其靶点也可为癌基因,当癌基因 mRNA 表达水平升高时,miRNAs 则发挥阻止细胞的恶性转化的作用。越来越多的研究发现 miRNAs 通过作用于下游基因参与了乳腺癌细胞增殖、凋亡、转移侵袭及放化疗抵抗等,在乳腺癌的发生发展中扮演着重要的角色^[7]。

cFLIP 是一种凋亡抑制蛋白,通过与 Caspase-8 争夺 Fas 相关蛋白 (FADD) 的 N 端两个 DED 位点,阻断 Fas 信号的传入。动物实验^[8]证实小鼠 cFLIP 转基因肿瘤细胞在体内能逃避 Fas 介导的 T 淋巴细胞的免疫监视,并且肿瘤细胞的 cFLIP 表达水平同其抵抗 Fas 诱导的细胞凋亡的活性具有显著的相关性,说明 cFLIP 能阻断 Fas 介导的凋亡信号转导,导致肿瘤逃避机体免疫细胞的监视。目前已经研究发现 FLIP 过表达与乳腺癌^[9]、恶性黑色素瘤^[10]、Kaposi 肉瘤、非霍奇金氏淋巴瘤^[11]、大肠癌^[12]、子宫内膜癌^[13]、肺癌^[14]、胃癌^[15]等多种肿瘤的发生发展相关。

Xiong 等^[16]检测乳腺癌细胞系和临床标本结果显示 miR-512-3p 在乳腺癌细胞系和乳腺癌组织中的表达量普遍小于正常乳腺组织细胞。到现在为止,均未见关于 miR-512-3p 的研究。本研究发现 miR-512-3p 在浸润性乳腺癌组织中表达低于配对正常组织,与其研究结果一致。本次研究发现 100 nmol/L 的 miR-512-3p 在作用 72 h 对 MD-MBA-231 抑制细胞增殖作用最强,抑制率为 45.38%,说明 miR-512-3p 能够显著抑制 MD-MBA-231 细胞的增殖。100 nmol/L miR-512-3p 转染 MD-MBA-231 细胞株 48 h 后,流式细胞仪分析显示早期凋亡细胞明显增加,细胞周期中 G₀/G₁ 期细胞比例明显增加, G₂/M 期细胞减少,表明 miR-512-3p 能够诱导细胞早期凋亡,并使细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期,以此发挥抑制细胞增殖的效应。平板克隆试验表明 miR-512-3p 能够显著抑制细胞的克隆形成能力。miR-512-3p 在乳腺癌中表达明显下调,功能实验证明其能够显著抑制乳腺癌细胞株的增殖能力,诱导细胞发生早期凋亡,促进细胞周期停滞在 G₀/G₁ 期,抑制细胞的克隆形成能力,这些研究结果表明 miR-512-3p 在乳腺癌发生发展中扮演着抑癌基因的角色。TargetScan 预测 miR-512-3p 的下游靶基因研究发现 cFLIP 与

miR-512-3p有两处互补结合位点。荧光定量PCR和westbolt实验结果显示100 nmol/L miR-512-3p显著抑制cFLIP mRNA和蛋白表达水平。这从实验基础上证明miR-512-3p可能通过作用于cFLIP基因参与乳腺癌细胞的增殖过程,有望成为未来乳腺癌诊断和治疗的一个新的靶点。

参考文献

- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2):215-233.
- Wu HL, Zhu SM, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer [J]. Cell Res, 2009, 19(4):439-448.
- Guo X, Wu YH, Hartley RS. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer [J]. RNA Biol, 2009, 6(5): 575-583.
- Ji Q, Hao X, Meng Y, et al. Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumor spheres [J]. BMC Cancer, 2008, 8:266.
- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(20):e179.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- Li M, Li J, Ding X, et al. MicroRNA and cancer [J]. AAPS J, 2010, 12(3):309-317.
- 魏金星,武玉东,刘会凡,等.Fas配体基因在肾细胞癌中的表达及意义 [J].中华实验外科杂志,2000,17(3):215-216.
- 罗海蓉,刘连新,姜洪池,等.c-FLIP在乳腺癌中的表达及其与患者预后的相关性研究 [J].中华普通外科杂志,2007,22(7):537-539.
- Bullani RR, Huard B, Vlard-Leveugle I, et al. Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions [J]. J Invest Dermatol, 2001, 117(2):360-364.
- Irisarri M, Plumas J, Bonnefoix T, et al. Resistance to CD95 mediated apoptosis through constitutive c-FLIP expression in a non Hodgkin's lymphoma B cell line [J]. Leukemia, 2000, 14(12):2149-2158.
- Ryu BK, Lee MG, Chi SG, et al. Increased expression of c-FLIP in colonic adenocarcinoma [J]. Pathol, 2001, 194(1):15-19.
- 陈红霞,刘元姣,黎辉,等.c-FLIP基因在子宫内膜腺癌组织中的表达 [J].癌症,2004,23(3):254-258.
- 吴军,胡永校,杜杰,等.c-FLIP反义寡核苷酸对人肺腺癌SP-CA-1细胞作用的探讨 [J].中国肿瘤临床,2005,32(10):571-574.
- 周晓东,于皆平,于红刚,等.胃癌组织中细胞FLICE抑制蛋白基因表达研究 [J].中华消化杂志,2005,25(1):10-14.
- Xiong JH, Yu DK, Wei N, et al. An estrogen receptor alpha suppressor, microRNA-22, is downregulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer cell lines and clinical samples [J]. Febs Journal, 2010, 277(7):1684-1694.

(2012-12-20收稿)

(2013-02-08修回)

(本文编辑:贾树明)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

第十三届中国抗癌协会全国淋巴瘤学术大会 暨2013年Best of 12-ICML(Lugano)国际淋巴瘤大会通知

由中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会主办、广东省抗癌协会协办、中山大学肿瘤防治中心和深圳大学医学院承办的“第十三届中国抗癌协会全国淋巴瘤学术大会暨2013年Best of 12-ICML(Lugano)国际淋巴瘤大会”将于2013年10月19日至20日在深圳福田香格里拉酒店举行。作为全国淋巴瘤界一次最重要的学术交流盛会,组委会力邀前国际抗癌联盟(UICC)主席、现任欧洲肿瘤学院(ESO)科学委员会主席、Lugano国际淋巴瘤大会创办者Franco Cavalli教授携多位欧美淋巴瘤领域的著名专家们来华讲座与交流。本届全国淋巴瘤大会是首届唯一获得官方指定的Lugano国际淋巴瘤大会,今后亦将由中国抗癌协会淋巴瘤专业委员会继续定期在中国主办该会议。

本届全国淋巴瘤大会将本着求真务实、促进学术交流、提高规范化诊治水平的原则,邀请国内外淋巴瘤临床、病理、基础研究领域的著名专家、学者,全方位和及时地传达国际淋巴瘤基础和临床研究热点,检阅国内外淋巴瘤新进展,促进与国际淋巴瘤界的合作交流,不断提高国内淋巴瘤的诊治和研究水平。

(会议信息查询网站:<http://www.sysucc.org.cn/>,<http://www.ccchina.net/>)