

# MicroRNA-200a 通过抑制上皮-间充质转化影响乳腺癌细胞的恶性生物学行为\*

窦艳<sup>1△</sup>, 邱鹏<sup>2</sup>, 陈江伟<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>邢台市人民医院病理科, <sup>2</sup>邢台市人民医院肿瘤内科, 河北 邢台 054000)

**[摘要]** 目的: 探讨微小 RNA-200a(miR-200a)表达改变对乳腺癌细胞恶性生物学行为的影响及其调节机制。方法: RT-qPCR 法检测人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 MCF-7 中 miR-200a 的表达水平与正常人乳腺上皮细胞株 MCF-10A 的差异。CCK-8 法检测转染 miR-200a mimic 和 miR-inhibitor 后 MDA-MB-231 细胞活力的变化。采用流式细胞术及 Transwell 实验检测转染后 MDA-MB-231 细胞凋亡及侵袭能力的变化。采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测上皮钙黏素(E-cadherin)、神经钙黏素(N-cadherin)、SIP1、Snail、Twist、ZEB1 和 ZEB2 mRNA 及蛋白表达的变化。结果: 与 MCF-10A 细胞相比, miR-200a 在 MDA-MB-231 细胞中表达显著降低( $P < 0.05$ )。过表达 miR-200a 使 MDA-MB-231 细胞活力降低( $P < 0.05$ ), 凋亡率升高( $P < 0.05$ ), 侵袭能力下降( $P < 0.05$ ), SIP1、N-cadherin、Snail、Twist、ZEB1 和 ZEB2 的 mRNA 及蛋白表达显著下调( $P < 0.05$ ), 而 E-cadherin 的 mRNA 及蛋白表达显著增加( $P < 0.05$ ); 抑制 miR-200a 的表达使上述结果逆转( $P < 0.05$ )。结论: 上调 miR-200a 能够抑制 MDA-MB-231 细胞的活力和侵袭, 促进 MDA-MB-231 细胞的凋亡。miR-200a 可能通过抑制上皮-间充质转化调控乳腺癌的恶性生物学行为。

**[关键词]** 微小 RNA-200a; 上皮-间充质转化; 乳腺癌; 细胞凋亡; 细胞侵袭

**[中图分类号]** R737.9; R730.23

**[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.10.018

## MicroRNA-200a affects malignant biological behaviors of breast cancer cells by inhibiting epithelial-mesenchymal transition

DOU Yan<sup>1</sup>, QIU Peng<sup>2</sup>, CHEN Jiang-wei<sup>1</sup>

(Department of Pathology, Department of Oncology, The People's Hospital of Xingtai city, Xingtai 054000, China. E-mail: douyan1978@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effect of microRNA-200a (miR-200a) on the malignant biological behaviors of breast cancer cells and its regulatory mechanism. **METHODS:** The expression of miR-200a in human breast cancer cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-468 and MCF-7, and normal human mammary epithelial cell line MCF-10A was detected by RT-qPCR. CCK-8 assay was used to detect the viability of MDA-MB-231 cells after transfection with miR-200a mimic or miR-200a inhibitor. Flow cytometry method and Transwell assay were used to detect the apoptosis and invasive ability of MDA-MB-231 cells after transfection with miR-200a mimic or miR-200a inhibitor. The expression of SIP1, E-cadherin, N-cadherin, Snail, Twist, ZEB1 and ZEB2 at mRNA and protein levels was determined by RT-qPCR and Western blot. **RESULTS:** Compared with MCF-10A cells, the lowest expression of miR-200a was observed in the MDA-MB-231 cells ( $P < 0.05$ ). Over-expression of miR-200a attenuated the viability of MDA-MB-231 cells ( $P < 0.05$ ), increased apoptosis ( $P < 0.05$ ) and decreased the invasion ability ( $P < 0.05$ ). The expression of SIP1, N-cadherin, Snail, Twist, ZEB1 and ZEB2 at mRNA and protein levels was also significantly down-regulated, while the mRNA and protein expression of E-cadherin was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Transfection with miR-200a inhibitor reversed the above results. **CONCLUSION:** Up-regulation of miR-200a inhibits the viability and invasion ability of MDA-MB-231 cells and promotes the apoptosis of MDA-MB-231 cells. miR-200a may regulate the biological behaviors of breast cancer by inhibiting epithelial-mesenchymal transition.

**[KEY WORDS]** MicroRNA-200a; Epithelial-mesenchymal transition; Breast cancer; Apoptosis; Cell invasion

[收稿日期] 2018-12-25

[修回日期] 2019-03-22

\* [基金项目] 邢台市科研基金资助项目(No. 2018zc147)

△通讯作者 Tel: 0319-3286707; E-mail: douyan1978@163.com

乳腺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤,目前其发病率居世界第1位,死亡率居世界第5位<sup>[1]</sup>,是女性死亡的首要原因。近年来,虽然手术治疗联合新的放疗、化疗等手段已大大提高了早期乳腺癌患者的生存率,但晚期患者的临床生存率仍不容乐观<sup>[2]</sup>。分子靶向药物被认为是乳腺癌治疗的新途径<sup>[3]</sup>,但仍有部分患者的分子分型难以匹配分子靶点。因此,进一步阐明乳腺癌的发病机制,寻找新的治疗靶点,对提高乳腺癌的疗效和改善患者的预后具有重要的作用。

微小RNA (microRNA, miRNA, miR) 是一种非编码单链RNA分子,参与调控靶基因的翻译过程,在多种恶性肿瘤的发生发展过程中发挥作用。miR-200家族是一种上皮细胞标志物,是参与上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的主要调节分子<sup>[4]</sup>,其基因被认为是一种抑癌基因。然而,综合目前的研究结果发现,miR-200家族成员在不同肿瘤的发展中发挥的作用并不完全相同。miR-200家族在鼻咽癌中表达下调,在鼻咽癌细胞系中内源性miR-200a的表达随细胞分化程度的增加而增加<sup>[5]</sup>。在肾癌中miR-200a可以靶向 $\beta$ -catenin,抑制转化生长因子 $\beta$ 1诱导的近端肾小管的上皮-间充质转化<sup>[6]</sup>。在缺乏甲基饮食诱导的大鼠肝癌模型中miR-200b的表达也表现为下调<sup>[7]</sup>,而在相对于正常的黑色素细胞中miR-200家族的表达则是增加的<sup>[8]</sup>,但增加miR-200家族的表达水平并不能抑制黑色素瘤细胞的侵袭,而只是引起癌细胞侵袭方式的改变。miR-200c表达高的胰腺癌患者预后指标更好,但增加胰腺癌细胞中miR-200c的表达虽能抑制胰腺癌的侵袭,却会增强胰腺癌细胞的增殖能力<sup>[9]</sup>。这说明miR-200家族成员在不同肿瘤的发生发展中发挥的作用并不一致。miR-200a是miR-200家族的成员,其在乳腺癌中的表达水平发生改变会发挥怎样的作用尚不清楚。本实验筛选了乳腺癌细胞系中miR-200a的表达情况,构建了miR-200a的模拟物(mimic)及抑制剂(inhibitor),并转染作用于乳腺癌细胞,探讨其对乳腺癌恶性生物学行为的影响及其作用机制,为乳腺癌的靶向治疗提供参考资料。

## 材 料 和 方 法

### 1 主要试剂

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231、MDA-MB-468和MCF-7购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所;人乳腺上皮细胞株MCF-10A购自上海丰寿生物科技有限公司。BCA蛋白浓度测定试剂盒、PVDF膜和ECL发光液购自中国上海碧云天生物技术有限公

司;凋亡试剂盒和Transwell试剂盒购自Corning;TRIzol RNA提取试剂盒和逆转录试剂盒购自Qiagen;miRNA荧光定量PCR试剂盒和反转录引物购自广州市锐博生物科技有限公司;miR-200a mimic和inhibitor购自上海吉玛生物;Western抗体购自Proteintech;转染试剂Lipofectamine<sup>®</sup> 2000购自Invitrogen;CCK-8试剂购自日本同仁生物。

### 2 方法

**2.1 细胞培养和转染** 复苏乳腺癌细胞,培养于含10%胎牛血清的DMEM培养液中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>标准培养箱中培养,显微镜下观察,当细胞状态良好,密度达到80%时开始传代。应用Lipofectamine 2000转染,参照说明书进行,用不含有抗生素含血清的DMEM培养液重悬乳腺癌细胞,调整细胞浓度,接种于96孔细胞培养板中,放置于37℃、5%CO<sub>2</sub>孵箱中过夜。转染前24h细胞接种至6孔板中,密度为 $1 \times 10^5$ ,采用含有10%胎牛血清的DMEM培养液培养细胞,使转染时的细胞密度能够达到50%~80%。细胞转染按照riboFECT™ CP转染试剂盒说明书进行操作。实验设置3个组:阴性对照(miR-negative control, miR-NC)组,加入阴性对照mimic及riboFect™ CP试剂;模拟物(miR-mimic)组,加入miR-200a mimics及riboFect™ CP试剂;抑制剂(miR-inhibitor)组,加入miR-200a抑制剂及riboFect™ CP试剂。之后将6孔板放入CO<sub>2</sub>培养箱中培养6h。然后更换新鲜的含10%新生牛血清的DMEM全培养液,培养48h后可直接收集细胞,检测细胞周期和凋亡,检测相关蛋白表达。

**2.2 CCK-8法检测细胞活力** 使用CCK-8试剂盒检测细胞增殖能力,按照试剂盒说明书操作。选择对数生长期的细胞,以 $3 \times 10^6$ /L的密度接种于96孔细胞培养板,每孔加100 $\mu$ L培养液,培养6h,行瞬时转染,转染细胞后的96孔板置于标准细胞恒温培养箱中培养。后续培养24、48和72h后分别加入10 $\mu$ L CCK-8试剂,37℃孵育2h,酶标仪上机检测波长为450nm处的吸光度(A)值,计算每组细胞增殖能力,实验重复验证3次。

**2.3 细胞凋亡检测** 细胞转染处理48h后,收集培养液上清,PBS清洗细胞2次,加入2mL 0.25%不含EDTA的胰酶消化液处理细胞,显微镜下观察到细胞形态开始变圆并脱离培养皿底部时,加入3mL含有10%胎牛血清的DMEM培养液终止消化,轻柔吹打分散细胞团;将含有细胞的混合液全部取到15mL无菌离心管中,600 $\times$ g离心5min,弃掉上清,加入500 $\mu$ L Binding Buffer悬浮细胞,加入5 $\mu$ L Annexin V-FITC混匀,避光染色15min,加入5 $\mu$ L PI染液,

室温避光染色 5 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡, FlowJo 软件分析凋亡检测结果。

**2.4 细胞侵袭检测** 无菌 24 孔板按实验需求放置 Transwell 小室, 小室内按 1:10 比例铺入 80  $\mu\text{L}$  基质胶, 将铺好基质胶的 24 孔板置于细胞恒温培养箱中沉降 4 h, 小室外的孔中加入 600  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 小室内按 200  $\mu\text{L}$  不含血清的细胞悬液中铺入  $5 \times 10^4$  转染 6 h 后的细胞, 24 孔板置于细胞恒温培养箱中培养 48 h。48 h 后取出小室, PBS 清洗小室底部 2 次, 用棉棒将小室内面未穿透的细胞擦干净, 小室置于 4% 多聚甲醛中固定 30 min, PBS 洗净固定液, 结晶紫染液 30 min, PBS 清洗结晶紫 2 次, 倒置晾干小室后在倒置显微镜下观察, 随机取 5 个视野计数细胞, 比较各组细胞侵袭能力。

**2.5 Real-time PCR 检测 miR-200a 以及 EMT 相关指标 mRNA 的表达水平** TRIzol 试剂盒提取细胞中总 RNA, 用 NanoDrop 2000 测量各组 RNA 浓度将 RNA 反转录为 cDNA。

用两步法染料试剂盒检测 SIPI、E-cadherin、N-cadherin、Snail、Twist、ZEB1 和 ZEB2 mRNA 的表达情况, 以  $\beta$ -actin 为内参照; 用两步探针法试剂盒检测 miR-200a 的表达情况, 以 U6 为内参照。2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup>  法表示 SIPI、E-cadherin、N-cadherin、Snail、Twist、ZEB1、ZEB2 和 miR-200c 的相对表达量, 实验中所用到 PCR 引物见表 1。反应程序为: 预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环。熔解曲线分析: 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s。采集信号进行定量分析。

**2.6 Western blot** 细胞转染处理 48 h 后抽提蛋白, 采用 BCA 蛋白浓度定量试剂盒检测蛋白样品的浓度, 计算上样量。取适量的蛋白与 5  $\times$  蛋白上样缓冲液混合 (4:1), 95  $^{\circ}\text{C}$  金属浴煮沸 5 min 蛋白变性。按照实验需求配置聚丙烯酰胺凝胶。蛋白上样, 电泳, 转膜, 封闭, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 I 抗过夜, TBST 洗膜 3 次, 加入相应 II 抗, 室温摇床孵育 2 h, TBST 洗膜 2 次, ECL 发光, 照相, Scion Image 软件测灰度值定量分析。

### 3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 各组实验数据均以均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行统计学分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 miR-200a 在乳腺细胞系中的表达情况

RT-qPCR 结果显示, 与正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 相比, miR-200a 在 MDA-MB-231 和 MDA-MB-468

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1. The primers used for RT-qPCR amplification

Name	Primer sequence
miR-200a	F: 5'-CCCTCGTCTTACCA-3' R: 5'-CCTCCATCATTACCC-3'
SIPI	F: 5'-AGGCATATGGTGACGCACAA-3' R: 5'-CTTGAAGCTGCGGTTACCTGC-3'
E-Ca	F: 5'-GTCAGTACACCAACGATAATCCT-3' R: 5'-TTTCAGTGTGGTATTACGACGTTA-3'
N-Ca	F: 5'-CCATCAAGCCTGTGGGAATC-3' R: 5'-GCAGATCGGACCGGATACTG-3'
Snail	F: 5'-ATGAGGAATCTGGCTGCTGT-3' R: 5'-CAGGAGAAAATGCCTTTGGA-3'
Twist	F: 5'-GGACAAGCTGAGCAAGATTCAGA-3' R: 5'-TCTGGAGGACCTGGTAGAGGAA-3'
ZEB1	F: 5'-AAGAAAGTGTACAGATGCAGCTG-3' R: 5'-CCCTGGTAACACTGTCTGGTC-3'
ZEB2	F: 5'-CACACAAGCCAGGGACAGAT-3' R: 5'-CTCGTAAGGTTTTTCACCACTGT-3'
U6	F: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3' R: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCTAT-3'
$\beta$ -actin	F: 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3' R: 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'

F: forward; R: reverse.

细胞中表达降低 ( $P < 0.05$ ), 在 MDA-MB-231 细胞中表达量最低, 在 MCF-7 细胞中表达无显著差异, 见图 1。后续实验选择 MDA-MB-231 作为 miR-200a 的转染对象。转染 miR-200a mimic 后, miR-200a 在 MDA-MB-231 细胞中的表达显著增加, 转染 miR-200a inhibitor 后 miR-200a 在 MDA-MB-231 细胞中的表达显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2, 说明 miR-200a 序列设计有效。

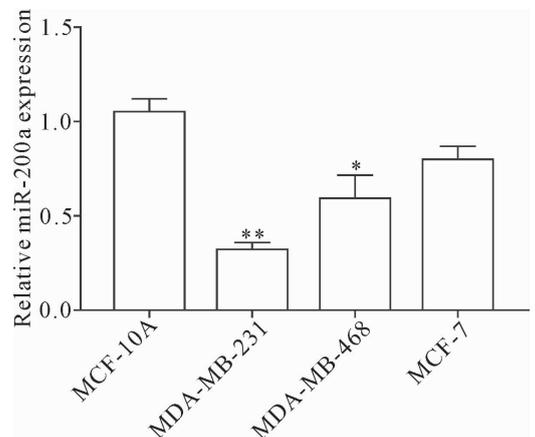


Figure 1. The relative expression of miR-200a in human normal breast epithelial cells and breast cancer cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs MCF-10A cells.

图 1 正常乳腺上皮细胞及乳腺癌细胞中 miR-200a 的表达情况

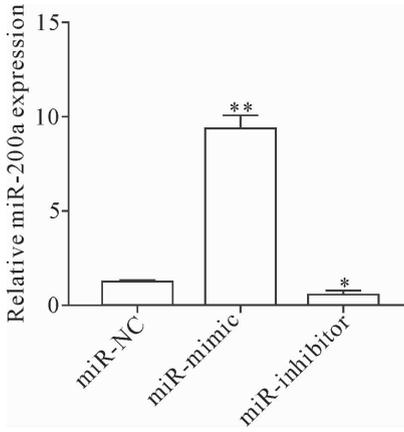


Figure 2. The relative expression of miR-200a after transfection. Mean ± SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs miR-NC group.

**图2 转染处理后 MDA-MB-231 细胞中 miR-200a 的表达情况**  
**2 转染 miR-200a 对 MDA-MB-231 细胞恶性表型的影响**

转染 miR-200a mimic 和 inhibitor 组 24 h 后,与 miR-NC 组相比,细胞增殖活力无显著差异 ( $P > 0.05$ );转染 48 和 72 h 后,miR-mimic 组的细胞增殖活力显著低于 miR-NC 组 ( $P < 0.05$ ),见图 3。转染

24 h 后,miR-mimic 组 MDA-MB-231 细胞的早期凋亡率为  $(12.7 \pm 4.27)\%$ ,miR-NC 组 MDA-MB-231 细胞的早期凋亡率为  $(4.61 \pm 4.07)\%$ ,miR-inhibitor 组 MDA-MB-231 细胞的早期凋亡率为  $(1.48 \pm 4.81)\%$ ,即 miR-mimic 组的细胞凋亡率显著增加 ( $P < 0.01$ ),而 miR-inhibitor 组的细胞凋亡率显著降低 ( $P < 0.01$ ),见图 4。

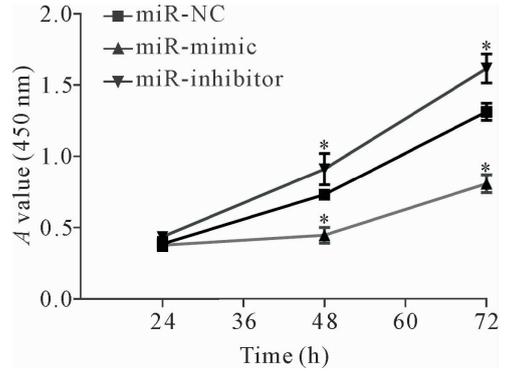


Figure 3. The viability of the MDA-MB-231 cells after miR-200a mimic or inhibitor transfection. Mean ± SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs miR-NC group.

**图3 miR-200a 转染后 MDA-MB-231 细胞活力的改变情况**

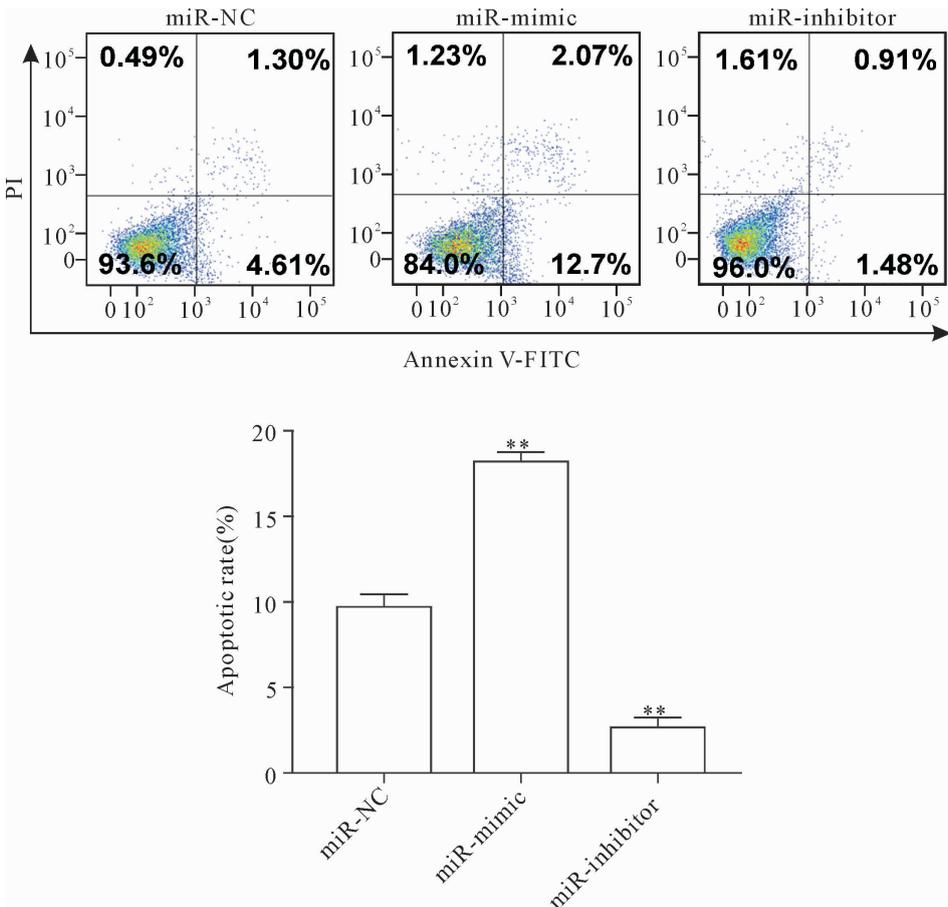


Figure 4. The apoptosis of MDA-MB-231 cells after miR-200a mimic or inhibitor transfection. Mean ± SD.  $n = 3$ . \*\*  $P < 0.01$  vs miR-NC group.

**图4 miR-200a 转染后 MDA-MB-231 细胞凋亡的改变情况**

Transwell 侵袭实验结果显示,MDA-MB-231 细胞转染 24 h 后,miR-mimic 组的跨膜细胞数较 miR-NC 组显著减少 ( $P < 0.05$ ),miR-inhibitor 组的跨膜

细胞数显著增多 ( $P < 0.05$ ),即 miR-mimic 组的细胞侵袭力能力显著减弱,而 miR-inhibitor 组的细胞侵袭力显著增加,见图 5。

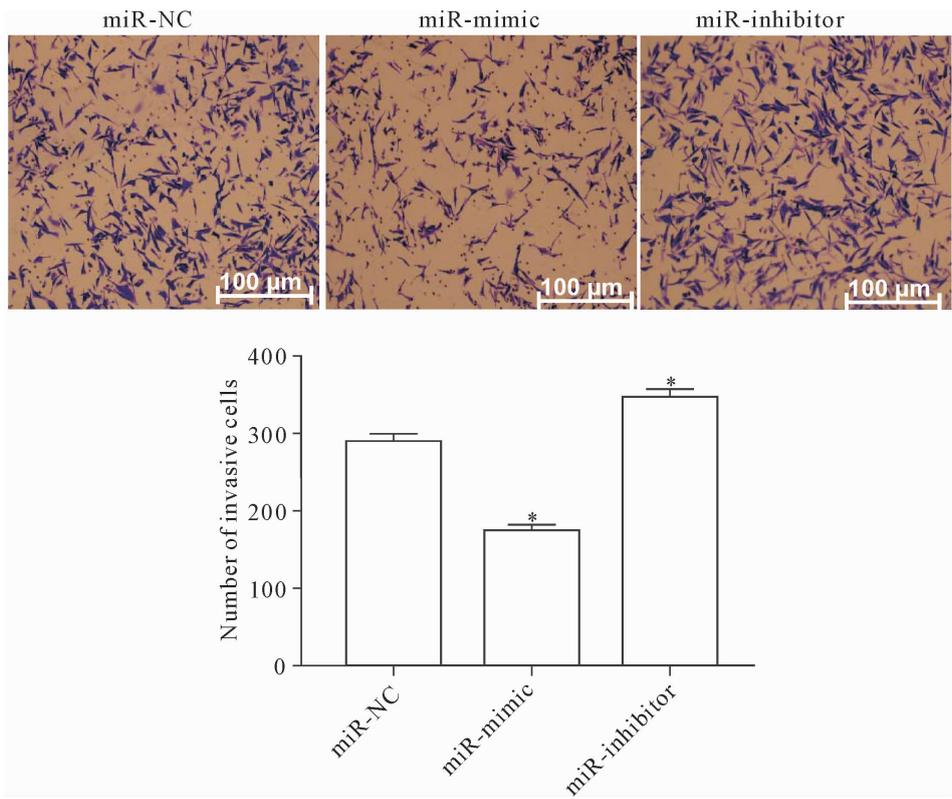


Figure 5. The invasion ability of MDA-MB-231 cells after miR-200a mimic or inhibitor transfection. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs miR-NC group.

图 5 miR-200a 转染处理后 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的改变情况

### 3 miR-200a 表达改变对 MDA-MB-231 细胞表型及 EMT 通路相关 mRNA 和蛋白表达的影响

RT-qPCR 及 Western blot 结果显示,MDA-MB-231 细胞转染 24 h 后,miR-mimic 组 SIP1、N-cadherin、Snail、Twist、ZEB1 和 ZEB2 的 mRNA 和蛋白水平上较阴性对照表达显著下调,E-cadherin 在 mRNA 和蛋白水平上较阴性对照表达显著上调 ( $P < 0.05$ ); miR-inhibitor 组 SIP1、N-cadherin、Snail、Twist、ZEB1 和 ZEB2 在 mRNA 和蛋白水平上较阴性对照表达显著上调,E-cadherin 在 mRNA 和蛋白水平上较阴性对照表达显著下调 ( $P < 0.05$ ),见图 6、7。

## 讨 论

MicroRNA 是一类非编码小分子 RNA,可通过碱基互补的方式与靶分子 mRNA 特异性结合,影响 mRNA 的降解和翻译,在调控基因表达、细胞周期、生物体发育时序等生命过程中发挥着重要作用<sup>[10]</sup>。miR-200 家族是上皮细胞的标志物,是 EMT 的主要调节分子之一,在多种肿瘤和正常组织间存在差异表达,其基因可作为癌基因或抑癌基因参与肿瘤的

发生发展<sup>[8-9, 11-12]</sup>。然而,同一种 miR-200 家族分子在不同肿瘤中表现出不同的作用。在胰腺癌中 miR-200a 呈低表达,在癌旁正常组织中呈高表达,高表达 miR-200a 的胰腺癌患者预后更好,但 miR-200a 高表达的胰腺癌细胞的增殖能力更强。在黑色素瘤细胞中,miR-200c 高表达导致较高比例的细胞以圆形“阿米巴样”的方式侵袭,而 miR-200a 高表达使细胞以拉长“间质型”方式侵袭。研究证实,miR-200a 能通过促进 PTEN 的表达,抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的胰腺形状细胞的活化和细胞外基质的形成,并抑制 AKT 和 mTOR 的磷酸化<sup>[13]</sup>。miR-200a 和 miR-200b 可靶向抑制 PTEN 的表达,促进子宫内膜细胞的体外增殖<sup>[14]</sup>。这些研究表明,miR-200 家族的功能在不同类型的肿瘤或细胞中有很大的异质性,其不同亚型在乳腺癌中的具体作用尚未见报道。本项工作显示,在乳腺癌中,miR-200a 的过表达可抑制癌细胞的增殖及侵袭,促进乳腺癌细胞的凋亡,提示 miR-200a 在乳腺癌中可发挥抑制乳腺癌恶性生物学行为的抑癌作用。

恶性肿瘤的侵袭和转移由肿瘤细胞与其存在的

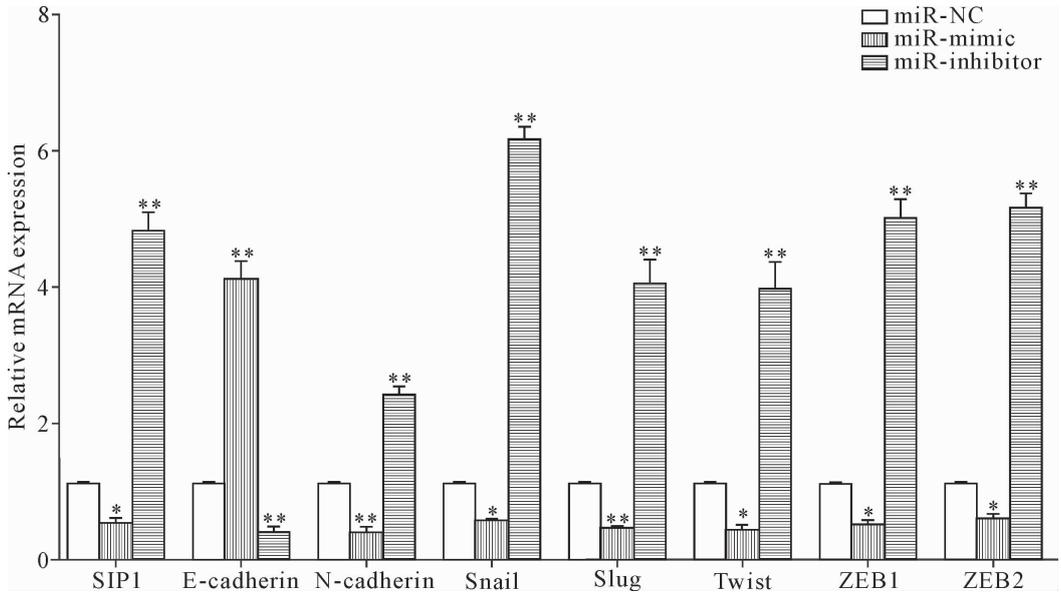


Figure 6. The changes of the mRNA expression in MDA-MB-231 cells after miR-200a mimic or inhibitor transfection. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs miR-NC group.

图6 miR-200a 转染处理后 MDA-MB-231 细胞 mRNA 表达的改变情况

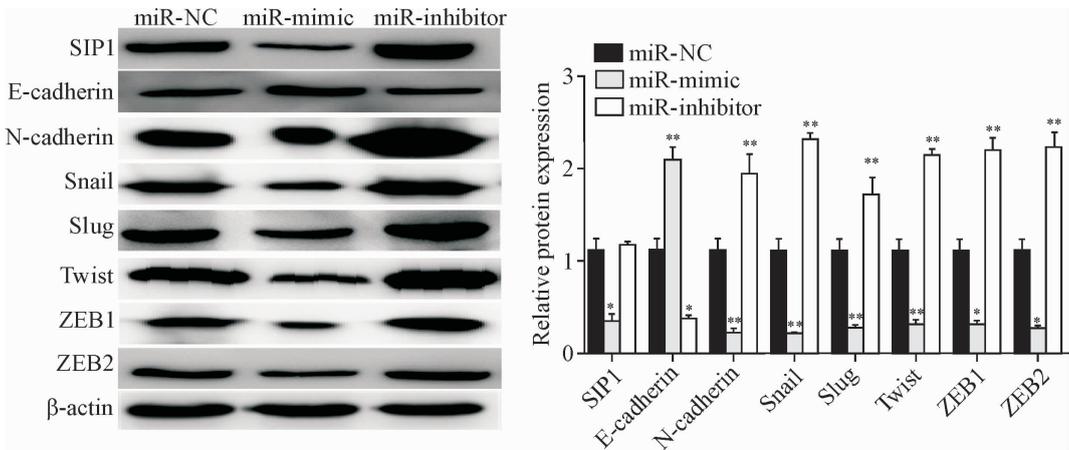


Figure 7. The changes of the proteins related to EMT signaling pathway in MDA-MB-231 cells after miR-200a mimic or inhibitor transfection. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs miR-NC group.

图7 miR-200a 转染处理后 MDA-MB-231 细胞 EMT 信号通路相关蛋白的改变情况

微环境相互作用而产生,其中 EMT 是肿瘤进展和肿瘤恶性表型转化的首要迹象<sup>[15]</sup>。EMT 可使上皮来源的肿瘤细胞失去正常极性,失去与基底膜的连接,促进细胞外基质的沉积,肿瘤细胞获得干细胞样特性和较高迁移与侵袭能力,甚至获得耐药性<sup>[16-17]</sup>。新近研究表明,miRNA 和 EMT 之间关系密切,过表达 miR-186 可抑制 E-cadherin 的表达从而促进肝癌细胞的侵袭<sup>[18]</sup>。在前列腺癌细胞中,miRNA-29b 的高表达可以通过靶向 Snail 分子,逆转 EMT 进程,抑制细胞的浸润表型<sup>[19]</sup>。miR-200a 一方面通过靶向 ZEB1/ZEB2,调节 cadherin 复合体,从而影响 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性,另一方面直接抑制  $\beta$ -catenin 的表达,进而引起细胞内  $\beta$ -catenin 分布改变,抑

制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的活性,抑制胃癌细胞的恶性生物学表型<sup>[20]</sup>。研究证实<sup>[21]</sup>, Snail、Slug、ZEB1、ZEB2 以及 SIP1 等转录因子可以直接结合在 E-cadherin 基因上游的启动子区域,通过降低 E-cadherin 表达促进 EMT 的发生,且这类转录因子还可以促进细胞内 ERK、NF- $\kappa$ B 和 PI3K 等信号通路的传导,促进肿瘤的恶性生物学行为。本项工作显示,在乳腺癌中 miR-200a 表达增加,癌细胞中 SIP1、N-cadherin、Snail、Twist、ZEB1 和 ZEB2 在 mRNA 和蛋白水平上较阴性对照均发生表达下调, E-cadherin 在 mRNA 和蛋白水平上表达显著上调,而转染 miR-200c inhibitor 后上述结果被逆转,这表明 miR-200a 在乳腺癌中可抑制 EMT 进程,而 miR-200a 表达增加乳腺

癌细胞恶性生物学行为被抑制可能是通过抑制 EMT 的进程来实现的。

总之,我们通过体外研究证实,miR-200a 可以抑制乳腺癌细胞的增殖,侵袭,促进乳腺癌细胞的凋亡,其可能机制是通过调节乳腺癌细胞的 EMT 来实现的,miR-200a 可作为乳腺癌患者潜在的生物治疗靶点。但是 miR-200a 对乳腺癌细胞 EMT 表型的靶向调控方式,miR-200a 表达改变对乳腺癌细胞 EMT 相关信号通路的影响,miR-200a 表达水平与乳腺癌患者临床病理特征及预后之间的关系等尚不清楚,有待深入研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(4):524-548.
- [2] 王照岩, 杨玉玲, 杨志一, 等. miR-125a-5p 通过 GSK-3 $\beta$ /Snail 信号通路抑制乳腺癌细胞的上皮-间充质转化[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(6):1008-1013.
- [3] 范丹丹, 刘启榆, 赵凌凌. 乳腺癌靶向治疗进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(68):32-33.
- [4] Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5):593-601.
- [5] Xia H, Ng SS, Jiang S, et al. miR-200a-mediated down-regulation of ZEB2 and CTNBN1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1):535-541.
- [6] Gong Y, Qin Z, Zhou B, et al. MicroRNA-200a inhibits transforming growth factor  $\beta$ 1-induced proximal tubular epithelial-mesenchymal transition by targeting  $\beta$ -catenin[J]. *Nephron*, 2017, 137(3):237-249.
- [7] Tryndyak VP, Ross SA, Beland FA, et al. Down-regulation of the microRNAs miR-34a, miR-127, and miR-200b in rat liver during hepatocarcinogenesis induced by a methyl-deficient diet[J]. *Mol Carcinog*, 2009, 48(6):479-487.
- [8] Elson-Schwab I, Lorentzen A, Marshall CJ. MicroRNA-200 family members differentially regulate morphological plasticity and mode of melanoma cell invasion[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10):e13176.
- [9] Yu J, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:169.
- [10] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2):281-297.
- [11] Park SM, Gaur AB, Lengyel E, et al. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(7):894-907.
- [12] Roh MS, Lee HW, Jung SB, et al. Expression of miR-200c and its clinicopathological significance in patients with colorectal cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2018, 214(3):350-355.
- [13] Xu M, Wang G, Zhou H, et al. TGF- $\beta$ 1-miR-200a-PTEN induces epithelial-mesenchymal transition and fibrosis of pancreatic stellate cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 431(1/2):161-168.
- [14] Wu Q, Lu RL, Li JX, et al. MiR-200a and miR-200b target PTEN to regulate the endometrial cancer cell growth *in vitro*[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10(5):498-502.
- [15] 赵良中, 崔家博, 马静, 等. 胡桃醌通过调节 Wnt/ $\beta$ -catenin/Snail 通路抑制前列腺癌细胞上皮-间充质转化[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(10):1910-1913.
- [16] Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(1):28-39.
- [17] 李艳莉, 邓金勇, 王金龄, 等. lncRNA PCAT1 表达下调抑制口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、生长、侵袭、迁移及上皮-间充质转化[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(11):2004-2010.
- [18] Gou Y, Zhai F, Zhang L, et al. RUNX3 regulates hepatocellular carcinoma cell metastasis via targeting miR-186/E-cadherin/EMT pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37):61475-61486.
- [19] Ru P, Steele R, Newhall P, et al. miRNA-29b suppresses prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition signaling[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(5):1166-1173.
- [20] Su J, Zhang A, Shi Z, et al. MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by interacting with P-catenin[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(4):1162-1170.
- [21] 阮水良, 韩晨阳, 官俏兵, 等. IL-9 通过 TGF- $\beta$ /Smad 通路诱导胃癌 MKN-45 细胞上皮-间充质转化[J]. *中国病理生理杂志* 2018, 34(10):1748-1753.

(责任编辑: 余小慧, 罗森)