

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.016

蒽环类药物耐药乳腺癌细胞中 microRNA 差异表达分析

杨 桦

(河南省肿瘤医院乳腺科, 郑州 450003)

【摘要】目的:检测乳腺癌蒽环类药物耐药细胞株中微小 RNA(microRNA, miRNA)的表达差异,探讨 miRNA 与乳腺癌化疗耐药的关系。方法:miRNA 芯片检测乳腺癌蒽环类药物(阿霉素)耐药细胞 MCF-7/ADM 和其亲本细胞 MCF-7 的 miRNA 表达谱,找出差异表达的 miRNA,并利用实时荧光 RT-PCR 法对 miRNA 芯片结果进行验证。结果:耐药细胞株 MCF-7/ADM 与亲本细胞株 MCF-7 相比有 14 个差异表达的 miRNA,其中上调表达的有 6 个,下调表达的有 8 个;实时荧光 RT-PCR 进一步验证证实 has-miR-221、has-miR-222、has-miR-106a 在 MCF-7/ADM 细胞中表达显著上调,而 has-let-7a、has-miR-421、has-miR-23b 在 MCF-7/ADM 细胞中表达显著下调,与芯片的结果一致。结论:miRNA 在乳腺癌蒽环类药物耐药细胞和其亲本细胞中差异表达,可能参与乳腺癌耐药的发生。

【关键词】乳腺癌;耐药;microRNA**【中国图书分类法分类号】**R737.9**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-08-01

Analysis of differential microRNA expression in anthracycline-resistant breast cancer cell lines

YANG Hua

(Department of Breast, Henan Cancer Hospital)

【Abstract】Objective: To analyze the difference in microRNA expression in breast cancer cell lines of anthracycline anticancer drug resistance and explore the association between microRNA and drug resistance of breast cancer. **Methods:** The differentially expressed miRNAs between anthracycline anticancer drug-resistant breast cancer cell line MCF-7/ADM and its parental cell line MCF-7 were identified by miRNA profiling of these two cell lines using miRNA microarray; the results obtained by microarray profiling were validated using real-time RT-PCR analysis. **Results:** Microarray analysis of MCF-7 to MCF-7/ADM cells identified 14 differentially expressed genes, including 6 up-regulated and 8 down-regulated genes in MCF-7/ADM cells; real-time RT-PCR identified 6 microRNAs that were differentially expressed between MCF-7 and MCF-7/ADM cells, including 3 up-regulated microRNAs: has-miR-221, has-miR-222, has-miR-106a, and 3 down-regulated microRNAs: has-let-7a, has-miR-421, has-miR-23b in MCF-7/ADM cells. **Conclusion:** microRNA are differentially expressed in anthracycline anticancer drug-resistant breast cancer cell lines and its parental cell line, which suggests that microRNA may play a role in the development of drug-resistance in breast cancer cells.

【Key words】breast cancer; drug resistance; microRNA

乳腺癌是严重危害女性健康的恶性肿瘤之一,化疗在乳腺癌综合治疗中占重要地位,但是仍有相当部分的患者存在化疗抵抗。蒽环类抗肿瘤药物是目前对乳腺癌疗效较好的药物,对于未曾接受过治疗的患者这类药物的单药应答率为 31%^[1]。近年来微小 RNA(microRNA, miRNA)对转录后调控作用的日益显现,使得更多在转录后和翻译过程的重要信息需要进一步进行多角度的研究探讨。本实验通过分析蒽环类药物阿霉素耐药的乳腺癌细胞株中 miRNA 表达的差异,初步探讨 miRNA 与乳腺癌蒽环类药物化疗耐药的关系。

1 材料和方法

1.1 细胞株和试剂

人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人乳腺癌阿霉素耐药细胞株 MCF-7/ADM 由中国医学科学院上海细胞所提供。DMEM 培养基和胎牛血清均购自 Hyclone 公司,阿霉素购自深圳万乐药业有限公司,TRIZOL 试剂购自 Invitrogen 公司。

1.2 芯片

miRNA 表达谱芯片 miRCURYTM LNA microRNA Array (v 8.0)由丹麦 Exiqon 公司生产,上海康成生物工程有限公司代理。

1.3 细胞培养

人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人乳腺癌阿霉素耐药细胞株

作者介绍:杨 桦(1973-),女,主治医师,硕士,
研究方向:乳腺癌。

MCF-7/ADM 均以含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液于 37℃、5%CO₂ 的孵箱中常规培养。MCF-7/ADM 细胞的培养液中加入 1.0 μg/ml 的阿霉素以保持细胞耐药性。

1.4 microRNA 芯片分析

人乳腺癌阿霉素耐药细胞株 MCF-7/ADM 脱药培养 1 周后,用 TRIZOL 反复吹打对数生长细胞,进行消化、裂解,TRIZOL 体积按 1 ml/10 cm² 比例加入,提取细胞总 RNA 后对 RNA 进行定量和质检。采用 miRCURY TM Array Labelling kit (exiqon 公司)对样品进行荧光标记,然后采用 RNeasy Mini Kit (Qiagen 公司)浓缩标记样品。将浓缩过的标记样品溶于杂交缓冲液中,60℃杂交 16 h。杂交结束后,分别在洗涤溶液 A、B、C 中清洗。通过离心(1 000 r/min, 5 min)的方式干燥芯片,即可用于扫描。使用 Genepix 4000B 进行图像扫描,使用 635 nm 激发。图像存成 TIF 文件,使用 Array-Pro(Media Cybernetics)软件对杂交图像进行数字化转换,将图像信号转化为数字信号。杂交数据经背景信号扣除和局部加权回归分析(LOWESS, Locally-Weighted Regression)方法进行数据归一化处理,排除了样品含量不一致、荧光标记偏差等因素造成的误差,真实地反映生物相关性差异。对于每个具有信号的 miRNA 探针,将计算其平均值和 CV(变异系数)值。两检测样品间进行信号比较时,选择组织内源的 5SrRNA 作为 miRNA 芯片的内源性对照,将两样品信号进行标准化,使之具有可比性。每个 miRNA 探针重复 7 次,取其信号平均值和变异系数进行 *t* 检验计算 *P* 值,当 *P* 值<0.01 时,通常被认为显著性检测信号是真实可靠的,两样品 miRNA 表达存在差异。两检测样品间的信号比值将转换为以 2 为底的对数(log2)。

1.5 实时荧光定量 RT-PCR 对部分 miRNAs 表达水平的验证

根据 miRNA 芯片结果,将差异表达较明显的 miRNA 进一步进行实时荧光定量 RT-PCR 检测。设计引物,使用 ABI StepOne(Applied Biosystems)实时定量 PCR 仪,每 1 份 cDNA 标本分 2 管进行 PCR 扩增,一管扩增目的基因,另一管扩增内参基因 GAPDH。反应体系含 cDNA 2 μl, 10 μmol/L Forward Primer 0.5 μl, 10 μmol/L Reverse Primer 0.5 μl, 2×SYBR Premix Ex Taq 12.5 μl, 加灭菌双蒸水至 25 μl。扩增时选择不同的退火温度和循环次数,获得适宜的实验参数,建立实时 PCR 反应体系。最终确定扩增条件为 95℃预变性 10 s, 95℃变性 5 s, 60℃退火 20 s, 72℃延伸 30 s, 循环 45 次。融解曲线提示无非特异性扩增。

1.6 统计学分析

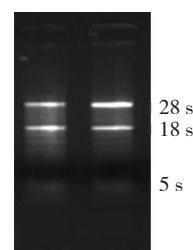
计量资料用“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS13.0 软件处理。数据显著性检验用方差分析,并进行两两比较。*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA 芯片结果

抽提人乳腺癌细胞株 MCF-7 和人乳腺癌阿霉素耐药细

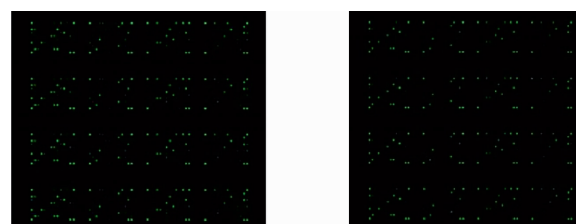
胞株 MCF-7/ADM 2 种细胞的总 RNA,通过紫外定量和琼脂糖凝胶电泳分析表明所提取的 RNA 无明显降解, RNA 质量符合 miRNA 芯片测定的要求(见图 1)。经 Hy3 荧光标记、纯化,进行芯片杂交,图像采集(见图 2),数据进行归一化处理,以 2 种细胞 Hy3 荧光标记信号强度的比值≤0.5 或≥2 为标准判定差异表达 miRNA,结果发现,与对照组 MCF-7 细胞相比, MCF-7/ADM 细胞中有 14 个差异表达的 miRNA,其中上调表达的 miRNA 有 6 个,分别为 has-miR-221、has-miR-222、has-miR-106a、has-miR-106b、has-miR-15b、has-miR-155;下调表达的 miRNA 有 8 个,分别为 has-let-7a、has-miR-421、has-miR-23b、has-miR-200a、has-miR-200b、has-miR-196a、has-miR-183、has-miR-320。



MCF-7 MCF-7/ADM

图 1 抽提 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞总 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis result of total RNA extract from MCF-7 and MCF-7/ADM cell



MCF-7细胞

MCF-7/ADM细胞

图 2 miRNA 芯片杂交扫描图

Fig.2 Scanning result of miRNA genechips

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 结果

为了验证芯片结果,通过实时荧光定量 RT-PCR 检测 MCF-7 细胞和 MCF-7/ADM 细胞中差异表达显著的 6 个 miRNA。比较 MCF-7 细胞和 MCF-7/ADM 细胞之间目的 miRNA 表达水平的差异(以比值表示, MCF-7 细胞设为 1),结果如图 3 所示:与 MCF-7 细胞相比, has-miR-221、has-miR-222、has-miR-106a 在 MCF-7/ADM 细胞中表达显著上调,其表达值分别为: $(2.77 \pm 0.22) \times 10^{-1}$ 、 $(3.18 \pm 0.20) \times 10^{-1}$ 、 $(2.41 \pm 0.24) \times 10^{-1}$, 差异有统计学意义($F=64.517$, $P=0.001$);而 has-let-7a、has-miR-421、has-miR-23b 在 MCF-7/ADM 细胞中表达显著下调,其表达值分别为: $(0.43 \pm 0.18) \times 10^{-1}$ 、 $(0.32 \pm 0.16) \times 10^{-1}$ 、 $(0.51 \pm 0.15) \times 10^{-1}$, 差异有统计学意义($F=110.901$, $P=0.000$),与芯片的结果一致。差异 miRNAs 在 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞中的相对表达水平如图 3。

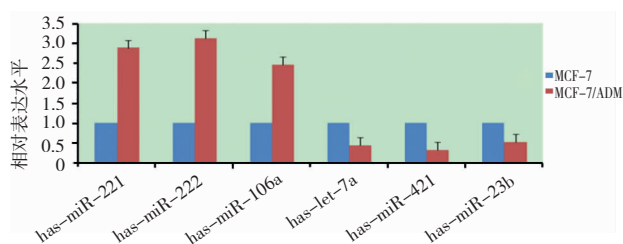


图3 差异 miRNAs 在 MCF-7 和 MCF-7/ADM 细胞中的相对表达水平

Fig 3 The difference miRNA expression level of MCF-7 and MCF-7/ADM cell

3 讨论

我们推测在调控基因的广泛性中,miRNA 也可能参与乳腺癌耐药的发生发现,并且在鉴定耐药细胞方面发挥作用,而肿瘤细胞对化疗药物的耐药是导致肿瘤患者临床化疗失败及生存预后差的主要原因之一。miRNA 是近年来在真核生物中新发现的一类长 19~25 个核苷酸的内在性非编码单链 RNA 分子,通过碱基配对与相应的靶 mRNA 的 3'UTR 结合,导致靶 mRNA 降解或转录后翻译抑制^[2]。据预测,每个 miRNA 可以调控大约 200 个基因的表达,存在于人体内的 miRNA 可调控超过 1/3 的蛋白编码基因的表达,影响着几乎所有的信号通路。miRNA 作为目前已知的人体内最大的一类基因表达调控因子,已证实参与细胞凋亡、分化、增殖,并在肿瘤的发生发展过程发挥重要作用。结合 miRNA 目前已经明确的功能和其亲本细胞间的差异 miRNA 并对其功能进行研究,可能为已发现的差异表达 miRNA 和蛋白之间提供关键的联系,有助于描绘出一幅更加清晰、全面的乳腺癌耐药分子网络图。

目前已有 miRNA 参与调控肿瘤细胞的药物敏感性的报道,某些在肿瘤中异常表达的 miRNA 也被证实与肿瘤对某些药物的耐受有关。如 Si 等^[3]研究发现抑制 miR-21 表达不仅可以降低乳腺癌细胞的增殖和成瘤能力,还可以提高 topotecan(一种临床常用的喜树碱类似物)对乳腺癌细胞的生长抑制效应达 40%。Blower 研究组检测了 60 株肿瘤细胞系中 279 个 miRNA 分子的表达谱,并将其与 3 089 种化合物的药效谱进行相关性分析,发现二者之间存在显著的关联,提示 miRNA 可能参与肿瘤细胞对化疗药物的敏感性或耐药性^[4]。

使用 miRNA 微阵列对乳腺癌细胞株及其萜环类药物(阿霉素)耐药株进行了研究,得到 14 个差异表达基因,其中耐药株 MCF-7/ADM 细胞中上调表达的 miRNA 有 6 个,下调表达的 miRNA 有 8 个。将 miRNA 芯片结果中差异表达较显著的 6 个 miRNA 进一步进行实时荧光定量 RT-PCR 检测,发现与 MCF-7 细胞相比,has-miR-221、has-miR-222、has-miR-106a 在 MCF-7/ADM 细胞中表达显著上调,而 has-let-7a、has-miR-421、has-miR-23b 在 MCF-7/ADM 细胞中表达显著下调,与芯片的结果一致。通过 pubmed 检索,发现筛选出

的 14 个差异表达的 miRNAs 部分已有文献报道,其中,has-miR-15b、has-miR-106a 和 has-miR-106b 分别属于同一 miRNA 家族,可能在乳腺癌萜环类药物耐药过程中发挥相似或协同的作用。Miller 等^[5]研究证实 miR-221/222 的过表达是乳腺癌获得对他莫西芬耐受的重要标志,miR-221/222 作为癌基因作用于细胞周期抑制因子 p27(kip1)从而控制细胞增殖。has-let-7a 有文献报道在肺癌中表达缺失或降低,而它编码的基因所在的染色体位点在肺癌中经常发生缺失,被证实调控靶基因 Ras 的表达,发挥类似抑癌基因的效应^[6]。也有国外学者研究了 miRNA-451 在 MCF-7 乳腺癌细胞株获得对阿霉素耐药中的作用,显示阿霉素耐药细胞株 MCF-7/ADR 中有异常的 microRNA 表达框架改变及 microRNA 处理酶类的异常^[6]。此外,has-miR-23b、has-miR-320 也被发现在某些肿瘤组织或细胞中异常表达或参与肿瘤细胞的恶性生物学行为。

miRNA 已被证实广泛参与多种生理病理过程,包括肿瘤的发生和发展。多实验已经证实 miRNA 在肿瘤细胞生物学及对特殊药物的敏感及耐受中发挥重要作用。目前,化疗仍是不能手术切除肿瘤的主要治疗手段,而多药耐药的产生是化疗失败的主要原因,因此探讨肿瘤多药耐药的机制是目前肿瘤化疗领域的研究重点,而 miRNA 与肿瘤多药耐药的研究为也肿瘤化疗提供了新的研究思路。但此方面的研究尚处于起步阶段,一些问题仍限制其应用和发展:如提高 miRNA 检测的灵敏度和特异性;准确预测 miRNA 的靶基因;利用 miRNA 表达谱为临床提供更准确的诊断和预后预测;特异有效地将 miRNA 或其抑制剂转入肿瘤细胞内等等。相信通过这一系列问题的解决,必将大大拓展 miRNA 在肿瘤预防、诊断和治疗中的作用。

参 考 文 献

- [1] He X Y, Chen J X, Zhang Z, et al. The let-7a microRNA protects from growth of lung carcinoma by suppression of k-Ras and c-Myc in nude mice[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2010, 136(7):1023-1028.
- [2] Zamore P D, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs[J]. Science, 2005, 309(5740): 1519-1524.
- [3] Si M L, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth[J]. Oncogene, 2007, 26(19):2799-2803.
- [4] Blower P E, Chung J H, Verducci J S, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(1):1-9.
- [5] Miller T E, Ghoshal K, Ramaswamy B, et al. MicroRNA-221/222 confers tamoxifen resistance in breast cancer by targeting p27(Kip1)[J]. J Biol Chem, 2008, 283(44):29897-29903.
- [6] Kovalehuk O, Filkowski J, Meservy J, et al. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug dexamethasone[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7):2152-2159.

(责任编辑:冉明会)