

肿瘤发病机制与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000128

反义 miR-18a 对乳腺癌细胞侵袭迁移的影响

陈戈, 骆萍, 龚宇, 周瑶, 赵瑞君, 谢春伟
(南昌市第三医院乳腺外科, 南昌 330009)

【摘要】目的:分析 miR-18a 在乳腺癌组织中的表达情况;体外研究 miR-18a 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)对乳腺癌细胞侵袭和迁移的影响。**方法:**运用荧光定量 PCR 检测 108 例乳腺癌组织及对应癌旁乳腺组织中 miR-18a 的表达;通过 miR-18a ASO 降低乳腺癌细胞中 miR-18a 的表达,采用 Transwell 实验和划痕实验观察 miR-18a ASO 对乳腺癌细胞侵袭和迁移能力的影响,同时运用 Western blot 的方法检测侵袭相关蛋白的表达变化。**结果:**在 108 例乳腺癌病例中,50.93%(55/108)的乳腺癌组织 miR-18a 表达明显高于对应正常组织($t=28.68, P=0.000$);与空白对照组和转染随机 ASO 组相比,miR-18a ASO 可以明显降低 miR-18a 的表达($F=321.67, P=0.001; F=563.28, P=0.000$);Transwell 实验和划痕实验结果显示转染 miR-18a ASO 后,乳腺癌细胞的侵袭迁移能力明显下降($P=0.000$),同时相关侵袭蛋白基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)2 和 MMP9 表达下降($P=0.000$)。**结论:**miR-18a 在乳腺癌组织中表达上调,降低 miR-18a 的表达,可有效抑制乳腺癌细胞的侵袭和迁移。miR-18a 有可能成为乳腺癌侵袭转移调控的新靶点。

【关键词】miR-18a;乳腺癌;侵袭;迁移;反义寡核苷酸**【中图分类号】**R735.7**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-05-18

Effect of antisense miR-18a on invasion and migration in breast cancer cells

Chen Ge, Luo Ping, Gong Yu, Zhou Yao, Zhao Ruijun, Xie Chunwei

(Department of Breast Surgery, the Third Hospital of Nanchang)

【Abstract】Objective: To investigate the expression of miR-18a in breast cancer tissues and to explore the regulative effects of miR-18a antisense oligonucleotide(ASO) on the invasion and migration of breast cancer cells in vitro. **Methods:** The expression of miR-18a in 108 breast cancer tissues and their adjacent breast tissues were detected by real-time quantitative PCR method. After transfection with miR-18aASO, the biological effects of miR-18a on breast cancer cells was measured by Transwell assay and wound healing assay and invasion-related protein expression was analyzed by Western blot. **Results:** miR-18a was found to be overexpressed in 50.93%(55/108) of the breast cancer cases($t=28.68, P=0.000$). miR-18a expression in breast cancer cells(transfection with miR-18a ASO) was significantly less than that of control group($F=321.67, P=0.001; F=563.28, P=0.000$). Transwell and wound healing assay results showed that the invasion and migration ability decreased greatly after the transfection with miR-18a ASO($P=0.000$), furthermore, down-regulation of miR-18a resulted in obvious inactivation of matrix metalloproteinase(MMP)2 and MMP9($P=0.000$). **Conclusions:** miR-18a is overexpressed in human breast cancer. Reducing the expression of miR-18a can effectively inhibit the invasion and migration of breast cancer cells. miR-18a may become a new target for the regulation of invasion and migration in breast cancer.

【Key words】miR-18a; breast cancer; invasion; migration; antisense oligonucleotide

微小 RNA 分子(microRNA, miRNA)是一种内源性的非编码小分子 RNA,广泛分布于动植物细胞体内,大量研究发现 miRNA 在恶性肿瘤细胞的发生、发展中发挥重要作用,其中包括调控细胞的增殖、分化和凋亡^[1-2]。近年研究报道,miR-18a 在食道癌、

结肠癌、胰腺癌及肝癌等组织中表达增高^[3-6],且在肝癌细胞的增殖过程中起重要作用^[6]。另外,研究报道 miR-18a 在鼻咽癌中的高表达与患者的临床病理进展密切相关^[7]。然而 miR-18a 在乳腺癌中的表达及对乳腺癌细胞侵袭迁移能力的影响尚未见报道。本实验采用荧光定量 PCR 检测 miR-18a 在乳腺癌组织中的表达情况,同时利用反义寡核苷酸(antisense oligonucleotide, ASO)抑制 miR-18a 在乳腺癌细胞中的表达,分析 miR-18a 对乳腺癌细胞侵袭迁

作者介绍:陈戈, Email: luolaibin@163.com,

研究方向:乳腺癌的基础和临床。

通信作者:谢春伟, Email: huaigen@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000128.html>

移能力的影响,同时检查侵袭相关蛋白基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)2 和 MMP9 的表达变化。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料 收集 2006 年 1 月至 2012 年 5 月本科室 108 例乳腺癌及对应癌旁乳腺组织手术标本,所有标本均经病理学检查确诊,均为女性,年龄 16~68 岁。所有患者术前均未接受放化疗。

1.1.2 主要试剂和仪器 乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞由本实验室保存;TaqMan miRNA 分析试剂盒(美国 ABI 公司);DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司)、胎牛血清(美国 Hyclone 公司)、脂质体 Lipfectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);miR-18a ASO(大连宝生物公司);总蛋白提取试剂盒(北京普利莱)、兔抗人 MMP2 和 MMP9 单克隆抗体(美国 santa cruz 公司)、 β -actin 二抗(北京中杉金桥公司);Transwell Chamber(美国 Chemicon 公司),Matrigel 胶(美国 BD 公司);荧光定量 PCR 分析仪 7500(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测 miR-18a 的表达 采用 RNA 提取试剂提取瘤组织及对应正常组织中总 RNA,测定浓度, -80℃ 保存。运用 miRNA 分析试剂盒检测 miR-18a 的表达。首先取 2 μ g 总 RNA 为反应模板与 3 μ l 逆转录酶相互混合,反应体系为 20 μ l,反应条件为:16℃ 30 min,45℃ 30 min,85℃ 5 min。反应结束后,收集 cDNA。采用 SYBR Green 法定量检测,将质粒稀释品分别梯度稀释为 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} μ g/ml,用于建立标准曲线。反应条件:95℃ 15 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共 45 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。在每个循环的最后增加溶解曲线。阈值定义为基础荧光信号的 10 个标准差,即时循环数为 Ct,依据标准曲线计算目的基因的 mR-NA 量。实验重复 3 次。

1.2.2 miR-18a ASO 的设计 获取人 miR-18a 的序列(<http://www.sanger.ac.uk/software/Rfam/mirna>),设计其 ASO 序列,运用 NCBI BLAST 检索程序以排除其它的同源序列。另外,同时设计 1 条随机阴性对照序列,如下所示:miR-18a 正义链 5'-AGUCACUAGUGGUCCGUUA-3',反义链:5'-TAAA-CGGAACCACTAGTGACT-3';随机序列正义链:5'-UCUU-CCGAACGUGUCACGUTT-3',反义链:5'-AAGUGACACGUU-CCGAGAATT-3'。送上海英骏生物技术公司合成。

1.2.3 细胞培养和 ASO 转染 将 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞接种于 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,37℃、5% CO₂ 条件下培养。运用 Lipfectamine™ 2000 转染试剂盒进行转染,miR-18a ASO 终浓度分别为:50、100、150、200、250 nmol/L。本实验组筛选出最佳终干扰浓度为 150 nmol/L。转染后培养时间分别为 24、48、72 h,初步筛出最佳作用时间为 48 h。上述操作重复 3 次。

1.2.4 转染 miR-18a ASO 后对 miR-18a 表达的影响 转染终浓度为 150 nmol/L 的 miR-18a ASO 48 h 后,提取总 RNA,测定浓度,逆转录为 cDNA(反应条件同 1.2.1),测定 cDNA 浓度。运用 microRNA 检测试剂盒检测 miR-18a 的表达(具体条件同 1.2.1)。上述操作重复 3 次。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 Transwell 小室的上下室之间以孔径为 8 μ m 的聚碳酸酯微膜孔分隔开,滤膜上层铺盖人工基底胶(Matrigel)。实验开始前将 Transwell 小室复温至 37℃,在内室中加入 300 μ l 的 DMEM 培养液,置于培养箱中孵育 2 h,使 Matrigel 水化。用胰酶消化细胞成单细胞悬液,800 r/min 离心 5 min,收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次,最后用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞,调整细胞数为 1.0×10^6 个/ml。吸出内室中培养液,吸取 500 μ l 含 10% 血清的 DMEM 于外室中作为趋化因子,加 300 μ l 细胞悬液于内室中,37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。取出 Transwell 小室吸除培养基,利用棉签擦净 Transwell 小室滤膜上层的 Matrigel 及未穿过滤膜的细胞。将小室浸入细胞染色液中染色 20 min,采用蒸馏水冲洗,风干。实验中每组每次同时做 3 个重复小室,显微镜观察计数,取平均值。

1.2.6 Transwell 迁移实验 具体过程与 Transwell 侵袭实验基本一致,不同的是 Transwell 迁移实验不需要铺 Matrigel。

1.2.7 划痕实验 采用 Marker 笔在 6 孔板背面均匀划横线,约 0.5~1.0 cm 宽,横穿过孔,每孔至少穿过 5 条线。在孔中加入约 5×10^5 个细胞,掌握为过夜细胞能铺满整孔。第 2 天利用 10 μ l 枪头依横线划痕,注意枪头垂直。PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入培养基。置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。0、48 h 取样,在显微镜拍照。每个样本至少重复 3 次。

1.2.8 检测各组细胞中 MMP2 和 MMP9 蛋白表达 收集各组 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞,运用总蛋白提取试剂盒提取各组细胞中的总蛋白,经 10% SDS-PAGE 电泳后转膜,将膜放在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中 37℃ 封闭 2 h,加一抗稀释液 1:400 稀释兔抗人 MMP2 和 MMP9 单克隆抗体在 4℃ 孵育过夜,1 $\times$ TBST 缓冲液 3 次(每次 10 min),加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释),置于 37℃ 孵育 2 h,1 $\times$ TBST 缓冲液 3 次(每次 10 min),运用 ECL 化学发光法检测目的蛋白条带。以 β -actin 作为内参。

1.3 统计处理

采用 SPSS 17.0 统计软件包进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,癌及癌旁组织比较采用配对样本 t 检验,多组均数之间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 乳腺癌组织 miR-18a 的表达情况

运用实时荧光定量 PCR 检测 108 例乳腺癌病人癌及癌旁组织中 miR-18a 的表达情况,结果发现:50.93%(55/108)病例乳腺癌组织 miR-18a 的表达明显高于相对应的正常癌旁组织,差异有统计学意义($t=28.68$, $P=0.000$)(图 1)。

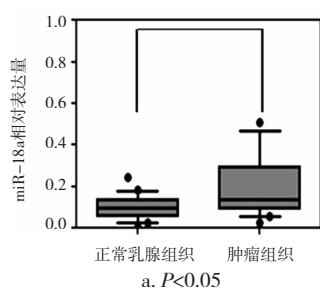


图 1 实时荧光定量 PCR 检测 108 例病人乳腺癌及对应的癌旁组织 miR-18a 表达的盒须图

Fig.1 Box plot of miR-18a expression in breast cancer and adjacent normal tissues in 108 patients using real-time quantitative PCR

2.2 转染 miR-18a ASO 后对 miR-18a 表达的影响

荧光定量 PCR 方法检测结果发现:MCF-7 细胞转染 miR-18a ASO 组 miR-18a 的相对表达量较空白对照组和转染随机 ASO 组明显降低(组间 $F=321.67$, $P=0.001$;空白对照组比 miR-18a ASO 组 $P=0.016$;转染随机 ASO 组比 miR-18a ASO 组 $P=0.000$;空白对照组比转染随机 ASO 组 $P=0.687$);MDA-MB-231 细胞同样发现 miR-18a ASO 组 miR-18a 的相对表达量较空白对照组和转染随机 ASO 组明显下调(组间 $F=563.28$, $P=0.000$;空白对照组比 miR-18a ASO 组 $P=0.002$;转染随机 ASO 组比 miR-18a ASO 组 $P=0.000$;空白对照组比转染随机 ASO 组 $P=0.875$),见图 2。

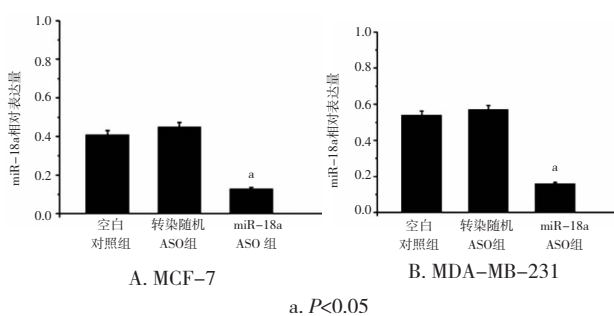


图 2 转染 miR-18a ASO 后 miR-18a 的表达变化

Fig.2 Changes in expression of miR-18a after the transfection of miR-18a ASO

2.3 Transwell 实验检测抑制 miR-18a 的表达对乳腺癌细胞侵袭能力的影响

通过各组细胞穿过人工基质胶细胞数量的多少,评估各组细胞的侵袭能力,每组取 5 个高倍镜视野。结果显示:转染 miR-18a ASO 组的 MCF-7 细胞侵袭能力与空白对照组及转染随机 ASO 组相比明显降低(组间 $F=663.46$, $P=0.000$;空白对照组比 miR-18a ASO 组 $P=0.000$;转染随机 ASO 组比 miR-18a ASO 组 $P=0.000$),而空白对照组与转染随机 ASO 组无明显差别($P=0.548$),见图 3。MDA-MB-231 细胞实验结果与 MCF-7 细胞一致。结果显示:转染 miR-18a ASO 组的 MDA-MB-231 细胞侵袭能力与空白对照组、转染随机 ASO 组相比明显降低(组间 $F=546.18$, $P=0.000$;空白对照组比 miR-18a

ASO 组 $P=0.000$;转染随机 ASO 组比 miR-18a ASO 组 $P=0.000$),而空白对照组与转染随机 ASO 组无明显差别($P=0.667$)。见图 4。

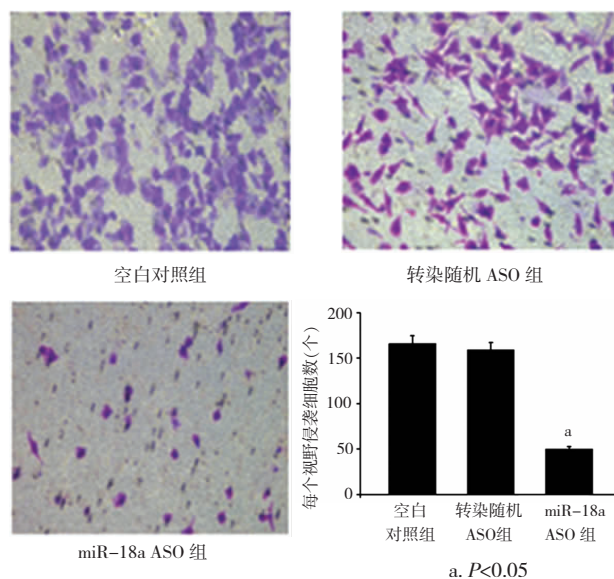


图 3 转染 miR-18a ASO 后,MCF-7 细胞的侵袭能力明显下降

Fig.3 Significantly reduced invasion ability of MCF-7 cells after the transfection of miR-18a ASO

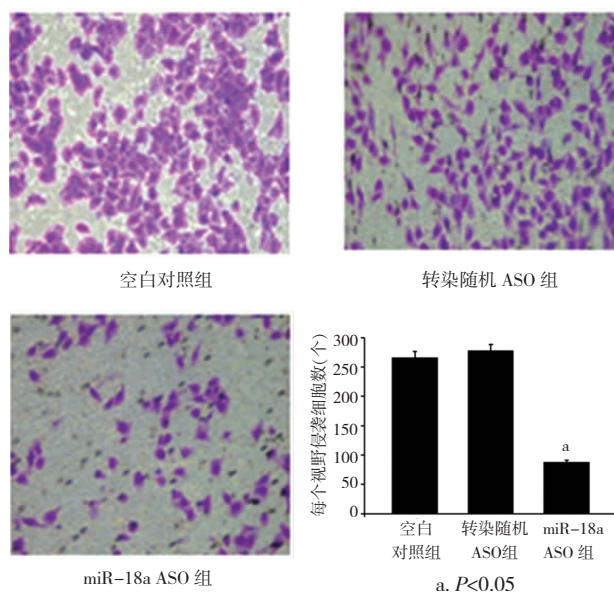


图 4 转染 miR-18a ASO 后,MDA-MB-231 细胞的侵袭能力明显下降

Fig.4 Significantly reduced invasion ability of MDA-MB-231 cells after the transfection of miR-18a ASO

2.4 Transwell 实验检测抑制 miR-18a 的表达对乳腺癌细胞迁移能力的影响

通过各组细胞穿过人工基质胶细胞数量的多少,评估各组细胞的迁移能力,每组取 5 个高倍镜视野。结果显示:转染 miR-18a ASO 组的 MCF-7 细胞迁移能力与空白对照组及转

染随机 ASO 组相比明显降低 ($F=427.85, P=0.003$; 空白对照组比 miR-18a ASO 组 $P=0.002$; 转染随机 ASO 组比 miR-18a ASO 组 $P=0.000$), 而空白对照组与转染随机 ASO 组无明显差别 ($P=0.896$), 见图 5。MDA-MB-231 细胞实验结果与 MCF-7 细胞一致。结果显示: 转染 miR-18a ASO 组的 MDA-MB-231 细胞迁移能力与空白对照组、转染随机 ASO 组相比明显降低 ($F=353.13, P=0.008$; 空白对照组比 miR-18a ASO 组 $P=0.004$; 转染随机 ASO 组比 miR-18a ASO 组 $P=0.011$), 而空白对照组与转染随机 ASO 组无明显差别 ($P=0.758$), 见图 6。

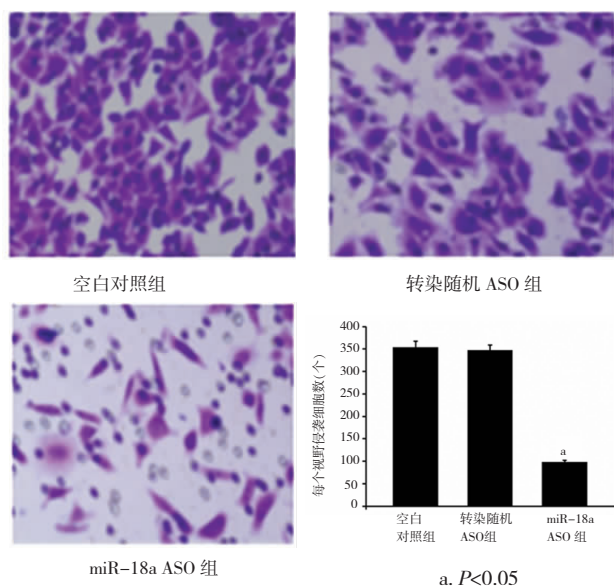


图 5 转染 miR-18a ASO 后, MCF-7 细胞的迁移能力明显下降
Fig.5 Significantly reduced migration ability of MCF-7 cells after the transfection of miR-18a ASO

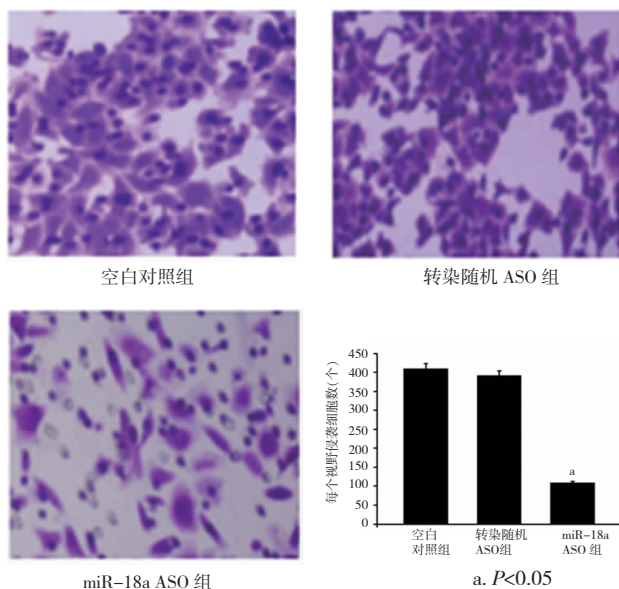


图 6 转染 miR-18a ASO 后, MDA-MB-231 细胞的迁移能力明显下降

Fig.6 Significantly reduced migration ability of MDA-MB-231 cells after the transfection of miR-18a ASO

2.5 划痕实验检测降低 miR-18a 基因表达对肝癌细胞迁移能力的影响

采用划痕实验检测 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的迁移能力, 结果显示, 划痕 48 h 后, 结果发现 miR-18a ASO 组细胞划痕的愈合率比空白对照组和转染随机 ASO 组细胞划痕愈合率明显下降, 差异具有统计学意义 (MCF-7 细胞组间 $F=469.51, P=0.000$; 空白对照组比 miR-18a ASO 组 $P=0.001$; 转染随机 ASO 组比 miR-18a ASO 组 $P=0.000$; 空白对照组比转染随机 ASO 组 $P=0.442$ 。MDA-MB-231 细胞组间 $F=316.23, P=0.023$; 空白对照组比 miR-18a ASO 组 $P=0.016$; 转染随机 ASO 组比 miR-18a ASO 组 $P=0.028$; 空白对照组比转染随机 ASO 组 $P=0.561$), 见图 7。

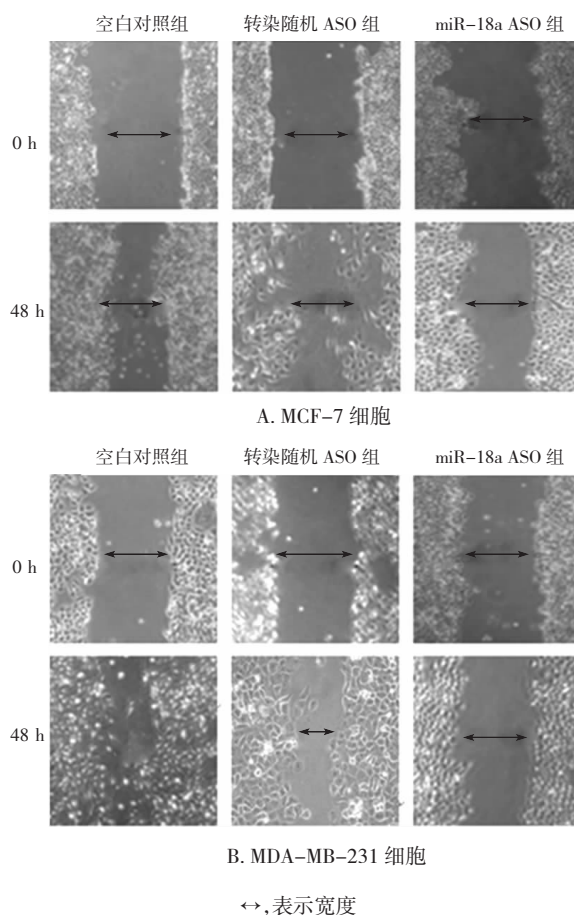


图 7 转染 miR-18a ASO 后, MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的划痕愈合能力明显下降

Fig.7 Significantly reduced wound healing ability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells after the transfection of miR-18a ASO

2.6 抑制 miR-18a 的表达对 MMP2 和 MMP9 蛋白表达的影响

miR-18a ASO 转染 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞后, Western blot 检查各组细胞中 MMP2 和 MMP9 蛋白表达水平, 结果发现 miR-18a ASO 组 MMP2 和 MMP9 的相对表达水平明显低于空白对照组和转染随机 ASO 组 ($P=0.000$), 见图 8。

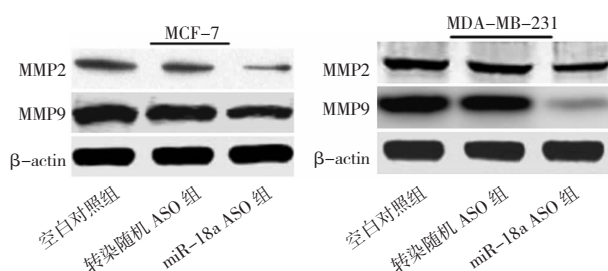


图 8 MMP2 和 MMP9 蛋白在转染 miR-18a ASO 的 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中的表达情况

Fig.8 MMP2 and MMP9 protein level in MCF-7 and MDA-MB-231 cells after the transfection of miR-18a ASO

3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,目前已成为严重影响妇女身心健康和危及妇女生命的疾病。晚期乳腺癌可出现淋巴结转移,肝、肺等远处器官转移。所以乳腺癌发现的时间越早,治疗效果越理想,因此,迫切地需要找到新的肿瘤标志物来进一步提高乳腺癌的早期诊疗效果。近年来随着 miRNAs 研究的逐渐增多和深入,研究已经证实许多异常表达的 miRNAs 可以通过调控目标靶基因的表达而调节包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤的发生发展,临床大规模的筛选恶性肿瘤发生及发展过程中出现的异常表达的 miRNAs 将为人们全面研究癌症的生物学行为发挥重要作用,同时也为乳腺癌的早期诊治提供了新的希望。研究报道 miR-18a 在多种肿瘤组织和细胞中表达较高^[3-6],但 miR-18a 在乳腺癌中的作用目前还不清楚。

研究已经证实 miR-18a 在多种恶性肿瘤中表达失调,但 miR-18a 在乳腺癌中的表达及作用目前尚不清楚。本实验首先利用实时荧光定量 PCR 检测临床乳腺癌标本及相对应的正常癌旁组织,结果发现 miR-18a 在乳腺癌组织中呈明显高表达。这表明 miR-18a 在乳腺癌发生发展中发挥重要作用。为了研究 miR-18a 对乳腺癌细胞侵袭迁移能力的影响,本实验首先通过转染 miR-18a ASO 降低乳腺癌细胞中 miR-18a 的表达,同时利用 Transwell 方法检测

降低 miR-18a 的表达后乳腺癌细胞侵袭迁移能力的变化,结果显示转染 miR-18a ASO 的乳腺癌细胞侵袭迁移能力明显降低。此外进一步利用划痕实验观察到抑制 miR-18a 的表达后,乳腺癌细胞的划痕愈合能力明显下调。这些结果都表明 miR-18a 在乳腺癌细胞的侵袭迁移过程中起着非常重要的作用,这与 Luo 等^[7]研究发现降低 miR-18a 的表达可以明显抑制鼻咽癌的侵袭迁移能力结果基本一致,说明 miR-18a 在恶性肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用。为了进一步分析降低 miR-18a 表达后引起乳腺癌细胞侵袭迁移能力下降的可能机制,本课题组发现,抑制 miR-18a 的表达可以明显降低侵袭相关蛋白 MMP2 和 MMP9 蛋白的表达,说明 miR-18a 可能是通过调控 MMP2 和 MMP9 的表达而对肿瘤细胞侵袭迁移能力产生影响。

综上所述,miR-18a 在调控乳腺癌细胞的侵袭和迁移方面发挥重要作用,其很可能成为一个乳腺癌侵袭转移新的调节基因,为乳腺癌临床基因治疗提供新的靶点。

参 考 文 献

- [1] Croce CM, Calin GA. miRNAs cancer, and stem cell division[J]. Cell, 2005, 122(1): 6-7.
- [2] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science, 2004, 303(5654): 83-86.
- [3] Hirajima S, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Clinical impact of circulating miR-18a in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma[J]. Br J Cancer, 2013, 108(9): 1822-1829.
- [4] Wu CW, Dong YJ, Liang QY, et al. MicroRNA-18a attenuates DNA damage repair through suppressing the expression of ataxia telangiectasia mutated in colorectal cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e57036.
- [5] Morimura R, Komatsu S, Ichikawa D, et al. Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 105(11): 1733-1740.
- [6] Liu WH, Yeh SH, Lu CC, et al. MicroRNA-18a prevents estrogen receptor- α expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells[J]. Gastroenterology, 2009, 136(2): 683-693.
- [7] Luo Z, Dai Y, Zhang L, et al. miR-18a promotes malignant progression by impairing microRNA biogenesis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(2): 415-425.

(责任编辑:冉明会)