

miR-210 对乳腺癌细胞生物学行为的影响

蓝永洪¹, 牛海艳¹, 王 晗², 杨 智¹, 江朝娜¹, 符碧薇¹

摘要 目的 探讨 microRNA-210 (miR-210) 对乳腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。方法 采用 RNA 干扰技术构建针对 miR-210 的 shRNA 真核表达载体, 转染 MCF-7 细胞, 采用实时荧光定量 PCR 技术检测转染后 miR-210 的表达情况, 观察转染后 MCF-7 细胞的增殖、侵袭和凋亡情况。结果 转染后 MCF-7 细胞中 miR-210 表达明显下降, 同时细胞增殖和侵袭能力减弱、凋亡率上升。结论 miR-210 能够影响乳腺癌的生物学行为。

关键词 microRNA-210; 乳腺癌; 增殖; 侵袭; 凋亡

中图分类号 R 737.9; R 364.4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)01-0083-03
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.017

微小 RNA (micro RNA, miRNA) 能特异性与其靶 mRNA 进行结合, 导致降解靶 mRNA 或者终止靶 mRNA 的翻译, 在肿瘤的发生过程中起到重要的作用^[1-2]。有文献^[3-4]报道, 乳腺癌组织 miR-210 的表达水平显著上升, 并且与其临床病理特征紧密关联。目前关于 miR-210 表达对乳腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响研究较少, 因此该研究通过抑制乳腺癌 MCF-7 细胞中 miR-210 的表达, 观察其抑制情况, 检测乳腺癌细胞的增殖、侵袭和凋亡情况, 初步分析 miR-210 对乳腺癌细胞生物学行为的影响, 为进一步阐明乳腺癌发生发展的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 MCF-7 细胞来源于中国科学院细胞库; DMEM 培养液为北京 Solarbio 公司的产品; 胎牛血清 (四季青) 为浙江天杭生物公司的产品; 0.25% 胰酶和 1 × Opti-MEM 培养液为 Gibco 公司的产品; Lipofectamine™ 2000 试剂盒为 Invitrogen 公司的产品; miR-210 的 shRNA 质粒载体由武汉浙玛公司设计; 引物由北京赛百盛公司合成; MTT 细

胞增殖及细胞毒性检测试剂盒和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒为上海碧云天公司的产品; 总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒和 SuperReal 荧光定量预混试剂为北京天根公司的产品; Transwell 板 (3422) 为 Corning 公司的产品; CO₂ 培养箱为 NuAire 公司的产品; 超净工作台为苏州安泰公司的产品; 核酸蛋白测定仪为 Eppendorf 公司的产品; 荧光定量 PCR 仪为 Agilent 公司的产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及转染 MCF-7 细胞用 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 胰酶消化细胞, 按 1 × 10⁵ / 孔进行接种, 细胞密度约为 90% 时进行转染。转染 A 液: 取 240 μl 1 × Opti-MEM 培养液, 加 10 μl Lipo 2000 混匀, 室温静置 5 min; 转染 B 液: 取 246 μl 1 × Opti-MEM 培养液, 加 4 μl 质粒 (转染组) 或阴性对照 (对照组) 混匀后, 将 AB 液混匀, 室温静置 20 min。用 2 ml 1 × Opti-MEM 培养液进行换液, 然后加入 AB 混合液混匀, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 后, 用 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 进行培养 48 h 后进行后续的检测。

1.2.2 qPCR 检测 miR-210 的表达 逆转录反应: 取 1 μg RNA 为模板, 反应体系为 20 μl, 含 2 μl 10 × RT Mix, 2 μl Super Pure dNTP, 2 μl 引物, 1 μl Quant Reverse Transcriptase; 反应条件为 37 °C 孵育 60 min。PCR 反应: 1 μl 逆转录产物为模板, 反应体系为 20 μl, 含 10 μl 2 × SuperReal PreMix Plus, 0.6 μl 引物, 0.4 μl 50 × ROX Reference; 反应条件为 95 °C 15 min, 95 °C 10 s, 62 °C 31 s, 45 个循环, miR-210 的相对表达量以 2^{-ΔΔCT} 值表示。

1.2.3 MTT 法检测 MCF-7 细胞的增殖 用培养液将 MCF-7 细胞配制成单个细胞悬液, 按 1 000 ~ 10 000 个细胞/孔接种于 96 孔板, 待细胞密度达到 90% 左右进行转染, 转染后 48 h 每孔加入 20 μl (5 mg/ml) MTT 液, 4 h 后每孔加入 150 μl 二甲基亚砷, 震荡 10 min, 结晶物得到充分溶解。在 570 nm 的波长下, 用酶标仪对各孔的光吸收值 (A₅₇₀) 进行测定, 记录测试结果, 计算细胞的相对增殖率 (%)

2016-08-26 接收

基金项目: 海南医学院科研培育基金 (编号: HY2013-12); 海南省自然科学基金 (编号: 814301)

作者单位: 海南医学院¹ 形态学实验室、² 生理学教研室, 海口 571199

作者简介: 蓝永洪, 男, 硕士, 副研究员, 责任作者, E-mail: 411382095@qq.com

= 实验组 A_{570} 值 / 对照组 A_{570} 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Transwell 侵袭实验检测 MCF-7 细胞的侵袭力 实验前 1 d 将基质胶用无血清 DMEM 培养液按 1 : 8 进行稀释, 每个 Transwell 上室加入 60 μ l 稀释液 晾干备用。细胞转染后 48 h, 用 DMEM 培养液 (无血清) 调整细胞密度至 4×10^5 个/ml, 每个 Transwell 上室加入 200 μ l 细胞悬液, 下室加入 1 300 μ l DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清), 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 取出上室, 用棉签轻轻擦去室内的细胞, 4% 多聚甲醛固定后, 采用结晶紫进行染色, 在显微镜 ($\times 100$) 下进行细胞计数, 计算其均值。

1.2.5 流式细胞术检测 MCF-7 细胞的凋亡情况 细胞转染后 48 h, 用 DMEM 培养液 (含 10% 胎牛血清) 将细胞配制成单个细胞悬液, 1 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 1 次, 1 000 r/min 离心 5 min; Annexin V 重悬细胞, 室温避光孵育 15 min; 1 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 1 次, 加入碘化丙啶 (PI) 4 $^{\circ}$ C 下避光孵育 20 min, 流式细胞仪进行检测, 记录检测结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计分析软件, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本的 t 检验分析比较不同组间的差异, 上述假设检验为双侧检验, 检验水平 α 为 0.05, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后 MCF-7 细胞 miR-210 的表达 qPCR 的检测结果显示, 转染组 MCF-7 细胞中 miR-210 的相对表达水平 (0.212 ± 0.028) 明显低于对照组 (0.989 ± 0.031), 差异有统计学意义 ($t = 32.300, P = 0.001$)。

2.2 转染后 MCF-7 细胞的增殖情况 MTT 结果显示, 转染组 MCF-7 细胞的增殖率 (62.0 ± 1.0)% 明显低于对照组 (97.9 ± 1.9)%, 差异有统计学意义 ($t = 45.259, P = 0.001$)。

2.3 转染后 MCF-7 细胞的侵袭能力 Transwell 侵袭实验结果显示: 转染组 MCF-7 细胞的穿过小孔的细胞数明显少于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 30.892, P = 0.001$) 见图 1。

2.4 转染后 MCF-7 细胞的凋亡情况 FCM 检测结果显示, 转染组的 MCF-7 细胞凋亡率明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 32.804, P = 0.001$), 见图 2。

3 讨论

乳腺癌在女性恶性肿瘤中发病率为第一位, 病

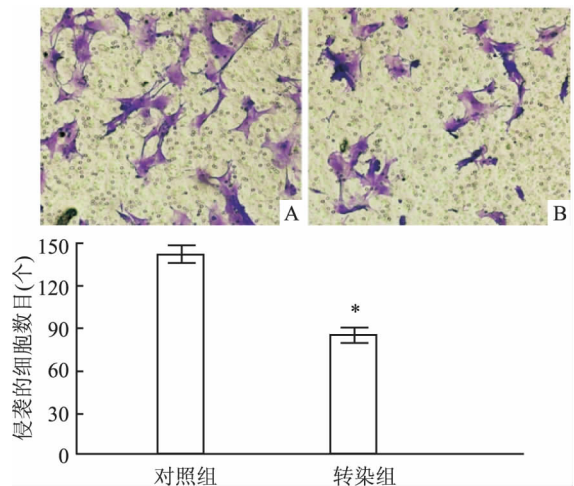


图 1 miR-210 对 MCF-7 细胞侵袭力的影响 结晶紫染色 $\times 100$ A: 对照组; B: 转染组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

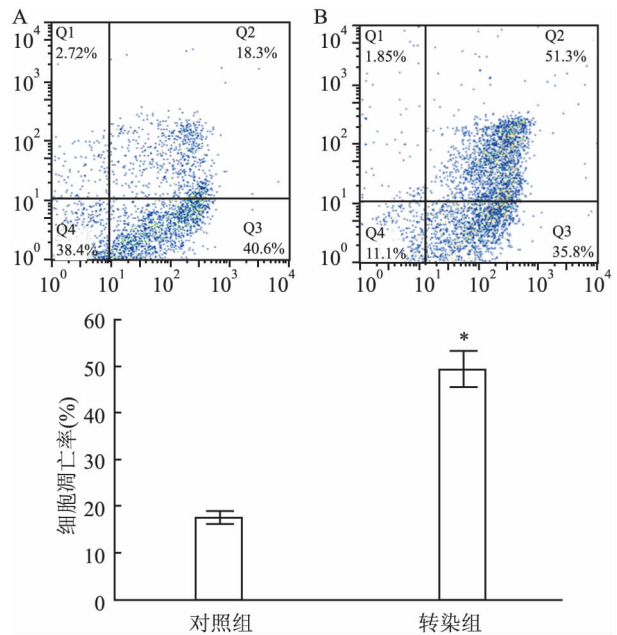


图 2 miR-210 对 MCF-7 细胞凋亡率的影响 A: 对照组; B: 转染组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

死率为第二位, 近年来乳腺癌的发病人数、发病率和病死率均有明显的上升趋势^[5-6]。miR-210 位于染色体 11p15.5, 序列为“CUGUGCGUGUGACAGCG-GCUGA”^[7]。有文献^[8]显示 miR-210 能够减弱细胞的增殖能力, 并能够抑制线粒体的新陈代谢, 减弱 DNA 损伤修复的能力, 促进血管的再生, 在肿瘤的病理过程中起着重要作用。有研究^[9-10]显示, miR-210 在乳腺癌组织和细胞中的表达水平明显高于癌旁组织和正常乳腺细胞, 而且与乳腺癌患者预后不良相关。同时有研究^[11-12]显示, 乳腺癌患者的外周

血循环 miR-210 水平明显升高,并且与临床分期、淋巴结转移、预后密切相关,表明 miR-210 有可能成为乳腺癌诊断和预后的标志物^[13-14]。本研究通过瞬时转染将针对 miR-210 的 shRNA 转染至 MCF-7 细胞中,建立 miR-210 低表达的人乳腺癌 MCF-7 细胞模型,并设立对照组与之比较,结果显示,转染后 MCF-7 细胞的 miR-210 表达明显下降,细胞的增殖和侵袭能力明显减弱,细胞凋亡率明显上升,这与张楠等^[3]的研究结果相似,但是其研究对象为高转移性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,转染物为 miR-210 的抑制物 miR-210 inhibitor,结果显示 miR-210 对 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭能力也起到促进作用。说明无论较低恶性度雌激素受体阳性的 MCF-7 细胞,还是高转移性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,miR-210 都能够影响乳腺癌细胞的生物学行为,在乳腺癌的发生发展中起到重要作用,有可能成为乳腺癌新的治疗靶点^[15],同时结合 miR-210 外周血水平对于乳腺癌的诊断价值,提示 miR-210 有望成为乳腺癌诊断和治疗的生物标志物,但是 miR-210 如何调控其靶基因的表达从而影响乳腺癌的发生发展还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Khoshnaw S M, Green A R, Powe D G, et al. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer [J]. *Clin Pathol*, 2009, 62(5): 422-8.
- [2] Lovat F, Valeri N, Croce C M. MicroRNAs in the pathogenesis of cancer [J]. *Semin Oncol*, 2011, 38(6): 724-33.

- [3] 张楠,李少游,巩雅宁,等. miRNA-210 对人乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2013, 20(3): 289-94.
- [4] Hong L, Yang J, Han Y, et al. High expression of miR-210 predicts poor survival in patients with breast cancer: a meta-analysis [J]. *Gene*, 2012, 507(2): 135-8.
- [5] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59(4): 225-49.
- [6] 郑莹,吴春晓,张敏璐. 乳腺癌在中国的流行状况和疾病特征 [J]. *中国癌症杂志*, 2013, 23(8): 561-9.
- [7] 史孟婧,赵远鹏,邹仲敏,等. MiR-210 在缺氧中调控机制的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2013, 13(16): 3173-5.
- [8] Ivan M, Huang X. miR-210: fine-tuning the hypoxic response [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 772: 205-27.
- [9] Xie X, Wu W, Liang L, et al. Prognostic role of microRNA-210 in various carcinomas: a meta-analysis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 15238-9.
- [10] Ivan M, Harris A L, Martelli F, et al. Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(5A): 1426-31.
- [11] O Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer [J]. *Breast Cancer Res*, 2010, 12(2): 201.
- [12] Lu J, Xie F, Geng L, et al. Potential role of microRNA-210 as biomarker in human cancers detection: A meta-analysis [J]. *Biomol Res Int*, 2015, 2015: 303987.
- [13] Li M, Ma X, Li M, et al. Prognostic role of microRNA-210 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis [J]. *Dis Markers*, 2014, 2014: 106197.
- [14] Dang K, Myers K A. The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(3): 6353-72.
- [15] Hong L, Han Y, Zhang H, et al. miR-210: a therapeutic target in cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2013, 17(1): 21-8.

Effect of miR-210 on biological behavior of breast cancer cell

Lan Yonghong¹, Niu Haiyan¹, Wang Han², et al

(¹Morphological Laboratory, ²Dept of Physiology, Hainan Medical College, Haikou 571199)

Abstract Objective To explore the effect of microRNA-210 (miR-210) on proliferation, invasion and apoptosis of breast cancer cell. **Methods** The plasmid expression vector of short hairpin RNA (shRNA) targeting miR-210 was constructed and transfected into MCF-7 cell by LipofectamineTM2000. The expression of miR-210 was detected by Real-time fluorescence quantitative PCR method after transfection, and proliferation, invasion, apoptosis of MCF-7 cell were observed. **Results** The expression of miR-210 decreased significantly in MCF-7 cell, and proliferative and invasive ability weakened, and cell apoptosis rate increased after transfection with miR-210 shRNA. **Conclusion** miR-210 expression can affect biological behavior of breast cancer. **Key words** microRNA-210; breast cancer; proliferation; invasion; apoptosis