

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.001>

· 论著 ·

## miR-126靶向EGFL7抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231 上皮-间质转化

姜青明, 周文文, 李光新, 肖觉

(重庆大学附属肿瘤医院, 重庆市肿瘤研究所, 重庆市肿瘤医院病理科, 重庆 400030)

**[摘要]** 目的: 探讨表皮生长因子样结构域7(epidermal growth factor-like domain 7, EGFL7)参与肿瘤细胞侵袭的可能分子机制。方法: 设计构建miR-126过表达质粒, 将该质粒转染并筛选培养乳腺癌细胞MDA-MB-231, Western印迹法检测EGFL7, Wnt-1,  $\beta$ -catenin, E-cadherin蛋白的表达变化, 免疫组织化学检测Vimentin蛋白的表达并观察细胞形态变化, RT-PCR检测Twist和Slug转录因子mRNA表达, Transwell小室体外侵袭实验观察肿瘤细胞的体外侵袭能力。结果: 成功建立过表达miR-126的转染乳腺癌细胞株MDA-MB-231/miR-126, 稳定转染细胞株EGFL7蛋白表达下调( $P < 0.01$ ), 并下调Wnt-1/ $\beta$ -catenin蛋白水平( $P = 0.02/P < 0.01$ ), E-cadherin蛋白表达上调( $P < 0.01$ ), Vimentin蛋白表达下调, 且细胞形态由梭形间充质样向多边形上皮样转化; Twist和Slug转录因子表达下调( $P < 0.01$ ), 肿瘤细胞体外侵袭能力减弱( $P < 0.01$ )。结论: miR-126通过靶向调节EGFL7调控Wnt-1/ $\beta$ -catenin信号通路及Twist, Slug转录因子, 抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), 降低了乳腺癌细胞MDA-MB-231体外侵袭能力, EGFL7可作为一种预测乳腺癌转移的重要生物标志物, 并可能成为一种潜在的治疗靶点。

**[关键词]** miR-126; 人表皮生长因子样结构域7; Wnt-1/ $\beta$ -catenin; 上皮-间质转化; 乳腺肿瘤

## MiR-126 targeting EGFL7 inhibits epithelial mesenchymal transition in breast cancer cell line MDA-MB-231

JIANG Qingming, ZHOU Wenwen, LI Guangxin, XIAO Jue

(Department of Pathology, Affiliated Hospital of Chongqing University; Chongqing Cancer Institute; Chongqing Cancer Hospital, Chongqing 400030, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the possible molecular mechanism of epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) involvement in tumor cell invasion. **Methods:** The recombinant miR-126 overexpression plasmid was designed and transfected. The plasmid was transfected into MDA-MB-231, and the protein expression of EGFL7, Wnt-1,  $\beta$ -catenin and E-cadherin was detected by Western blot. The protein expression of Vimentin was detected by

收稿日期 (Date of reception): 2018-07-29

通信作者 (Corresponding author): 肖觉, Email: path\_xj69@163.com

基金项目 (Foundation item): 重庆市卫生和计划生育委员会医学科研重点资助项目 (20141019)。This work was supported by the Medical Research Project from Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission, China (20141019).

immunohistochemistry and the morphological changes were observed. The mRNA expression of Twist and Slug transcription factors was detected by RT-PCR. The *in vitro* invasion ability of tumor cells was observed by Transwell chamber invasion assay. **Results:** The transfected breast cancer cell line MDA-MB-231/miR-126 with expression of miR-126 was successfully established, and the expression of EGFL7 protein in stably transfected cell line was down-regulated ( $P<0.01$ ), and protein expression of Wnt-1/ $\beta$ -catenin were down-regulated ( $P=0.02/P<0.01$ ), E-cadherin protein expression was up-regulated ( $P<0.01$ ), Vimentin protein expression was down-regulated, and cell morphology was transformed from fusiform mesenchyme to polygonal epithelial; the mRNA of Twist and Slug transcription factors were down-regulated ( $P<0.01$ ), and the invasive ability of tumor cells *in vitro* was weakened ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** miR-126 regulates Wnt-1/ $\beta$ -catenin signaling pathway and Twist and Slug transcription factors by targeting EGFL7, inhibits epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells MDA-MB-231, and reduced invasive ability of breast cancer cell MDA-MB-231 *in vitro*, EGFL7 can be used as an important biomarker for predicting breast cancer metastasis and may be a potential therapeutic target.

**Keywords** miR-126; epidermal growth factor-like domain 7; Wnt-1/ $\beta$ -catenin; epithelial mesenchymal transition; breast tumor

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。肿瘤转移(cancer metastasis)是恶性肿瘤的最重要的一个基本特征,也是导致恶性肿瘤患者死亡的主要原因。肿瘤转移是一个多步骤、多阶段、多基因调控的动态过程,涉及多种分子生物学过程以及与微环境的相互作用<sup>[1]</sup>。在众多有关肿瘤转移的学说中,上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是近年来被广泛探讨的热点之一<sup>[2-3]</sup>。表皮生长因子结构域-7(epidermal growth factor-like domain 7, EGFL7)是2003年首先发现的一种血管内皮特异性表达的基因<sup>[4-5]</sup>。EGFL7基因编码的蛋白在胰腺癌<sup>[6-7]</sup>、肝细胞癌<sup>[8]</sup>、胶质瘤<sup>[9]</sup>、上皮性卵巢癌<sup>[10]</sup>、结直肠癌<sup>[11]</sup>等恶性肿瘤组织中表达上调,预示EGFL7与恶性肿瘤的发生、进展密切相关。miRNA是一种长度为18~24 nt的内源性非编码的核苷酸分子,广泛表达于身体的各种组织,参与细胞的发育、增殖和凋亡等生命过程。miR-126定位于EGFL7基因第7号内含子, Tavazieo等<sup>[12]</sup>研究发现:miR-126与乳腺癌转移密切相关,组织标本低表达miR-126的患者复发转移的中位时间短于高表达miR-126的患者,即miR-126的表达与乳腺癌的转移呈负相关。 $\beta$ -catenin基因是Wnt信号通路的下游基因,其表达蛋白是一种单链多肽,存在于细胞膜和细胞质,介导细胞黏附及信号转导,在肿瘤发生过程中具有重要作用<sup>[13]</sup>。乳腺癌细胞形态多样,包括有上皮样多边形和间充质梭形特征,其中具有间充质梭形特征的肿瘤细胞恶性程度高,进展快,推测EMT可能参与乳腺癌的侵袭转移。本研究以具有间充质梭形细胞特征的乳腺

癌细胞MDA-MB-231为模型,观察通过转染过表达miR-126的重组质粒至MDA-MB-231细胞并筛选培养,发现乳腺癌MDA-MB-231细胞EGFL7蛋白表达下调,抑制了Wnt-1/ $\beta$ -catenin信号通路,伴随核转录因子Slug, Twist的失活,观察乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞形态的变化对肿瘤细胞体外侵袭力的影响,从而探讨miR-126靶向调节EGFL7蛋白表达,进而调控乳腺癌细胞在EMT过程中的可能分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

乳腺癌细胞MDA-MB-231由重庆医科大学病理学教研室张徽教授馈赠, RPMI Medium 1640 购自美国Gibco公司, EGFL7单克隆鼠抗人(Q9QXT5-1)抗体(S0472-M07B)购于北京Sino Biological试剂有限公司; TRIzol RNA提取试剂购自美国Invitrogen公司, 鼠抗人单克隆抗体Vimentin(ZA-0260), E-cadherin(ZM-0092)和 $\beta$ -catenin(ZM-0442)购于北京中杉金桥生物技术有限公司, 鼠抗人单克隆抗体Wnt-1(TA319584)购于美国OriGene试剂有限公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗为PV-9000D增强型检测试剂盒购自北京中杉金桥试剂公司; 质粒小量提取试剂盒购自美国OMEGA公司, 重组质粒pEGFP-N1-miR-126购自美国Invitrogen公司, 空载体质粒pEGFP-N1购自湖南优宝生物公司, 哺乳动物细胞蛋白提取试剂购自上海novoprotein公司(PX004-01B), 蛋白浓度测定试剂盒购自美国

Pierce公司; 细胞体外侵袭实验使用Transwell小室购自美国Corning Costar Corp公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 针对靶基因 EGFL7 的 miR-126 过表达质粒的设计、构建

通过使用TargetScan和miRanda软件对miR-126进行靶向预测,发现EGFL7的3'-UTR具有miR-126的结合位点,位于EGFL7第7号内含子上,通过以上分析,针对靶基因EGFL7(NP\_057299),设计、构建直接靶向于分泌型EGFL7的重组质粒pEGFP-N1-miR126,并对靶序列进行同源性分析,排除非特异性miRNA,miR-126序列如下:5'-CAUUAUUACUUUUGGUACGCG-3',同时设置对照序列。转化重组质粒到感受态细菌,培养细菌及进行质粒纯化抽提备用。

### 1.2.2 miR-126 过表达质粒转染乳腺癌细胞并筛选

转染前1 d,取对数生长期的人乳腺癌细胞MDA-MB-231以每孔 $1 \times 10^5$ 个接种于12孔培养板,次日观察细胞长至约90%聚合开始转染。转染方法按Lipofectamine™ 2000(美国Invitrogen Corp公司)说明书操作,转染36 h后在荧光显微镜下观察绿色荧光显色情况,镜下计数10个 $40 \times$ 视野发绿色荧光的细胞数占总细胞的百分率作为转染效率的近似值。转染72 h后开始用 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的G418(美国Sigma公司)选择培养液进行筛选,每3 d换液1次,1周后用 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的G418选择培养液维持筛选6周,收集该时段的细胞进行实验分析检测。qRT-PCR检测转染前后miR-126表达的变化<sup>[14]</sup>。

### 1.2.3 Western 印迹法检测 EGFL7, Wnt-1, $\beta$ -catenin 和 E-cadherin 蛋白

收集细胞, PBS洗3次,加入哺乳动物细胞蛋白提取试剂,裂解细胞(每10 mg细胞加 $100 \mu\text{L}$ 裂解液),室温置10 min,  $15\ 300 \text{ r}/\text{min}$ 离心15 min,吸取上清,测蛋白浓度,以蛋白上样量 $60 \mu\text{g}$ 行稳流(合成胶10 mA,分离胶15 mA),10%SDS-PAGE,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下电泳,稳压冰浴电转至NC膜(美国Gibco BRL公司),  $5 \text{ g}/100 \text{ mL}$  TBST( $20 \text{ mmol}/\text{L}$  Tris-HCl, pH 8.0,  $150 \text{ mmol}/\text{L}$  NaCl, 0.05% Tween 20)溶解的脱脂奶粉室温封闭1 h,分别加入鼠抗人单克隆抗体EGFL7,鼠抗人单克隆抗体Wnt-1,鼠抗人单克隆抗体 $\beta$ -catenin,鼠抗人单克隆抗体E-cadherin,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;次日TBST洗膜,加HRP标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司产品,工作浓度1:2 000),室温孵育1 h, TBST洗

膜, ECL(北京中杉金桥生物技术有限公司产品)化学发光法显影,以 $\beta$ -Actin为内参照。

### 1.2.4 qRT-PCR 检测转录因子 Twist, Slug

采取TRIzol(美国Gibco BRL公司)一步法提取总RNA,紫外分光光度法和1%琼脂糖凝胶电泳定量,取 $2 \mu\text{g}$ 总RNA用M-MLV反转录酶进行逆转录,分别取 $2 \mu\text{L}$  cDNA行PCR扩增Slug, Twist,以18SrRNA作内参照。18SrRNA引物序列为:上游引物:5'-TTGACGGAAGGGCACCACCAG-3',下游引物:5'-GCACCACC AACGGAATCG-3',PCR反应条件:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $56.5 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  20 s,共25个循环,扩增片段长度130 bp。Twist(157 bp)上游引物:5'-GGCGGCCAGGTACATCGACTT-3',下游引物:5'-G CTAGTGGGACGCGGACAT-3',PCR反应条件:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $59 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  20 s,共30个循环。Slug(158 bp)上游引物:5'-ATGCATATTCGGACCCACACATTAC-3',下游引物:5'-AGATTTGACCTGTCTGCAATGCTC-3',PCR反应条件:  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  20 s,共30个循环。产物经紫外分光光度计(Gel Doc 1000,美国BIO RAD Corp公司)用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离, Slug, Twist mRNA表达以其光密度/18S rRNA光密度的比值表示。

### 1.2.5 免疫组织化学观察 Vimentin 表达强度及细胞形态变化

经转染后筛选培养的细胞爬片至85%~90%的细胞密度,用95%的酒精室温下固定20 min;免疫组织化学方法采用Envision二步法。步骤如下:1)预实验测定一抗试剂的最优浓度为1:100表达较好。2)3%的过氧化氢去离子水孵育10 min,阻断内源性过氧化物酶,降低非特异性染色。3)滴加一抗(鼠抗人单克隆抗体Vimentin),  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱孵育过夜;PBS洗涤5 min  $\times$ 3次,滴加二抗试剂(辣根过氧化物酶标记得羊抗鼠/兔IgG聚合物),  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育30 min, PBS洗涤5 min  $\times$ 3次。4)DAB显色。5)蒸馏水冲洗、苏木精复染、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。6)光学显微镜下观察,用已知阳性标本作为阳性对照,以PBS缓冲液代替一抗作阴性对照。

### 1.2.6 Transwell 小室体外侵袭实验观察

细胞侵袭实验使用Transwell chamber(美国Corning Costar Corp公司),按照说明书操作。向Transwell小室下室各孔加入 $800 \mu\text{L}$ 按1:1混合的条件培养液(无血清培养24 h的NIH3T3细胞上清液和完全培养液),上室小孔每孔加入细胞悬液 $200 \mu\text{L}$ (细胞数约 $1 \times 10^5/\text{mL}$ )<sup>[15-16]</sup>。  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养24 h,



用棉签擦去微孔滤膜上层未侵袭的细胞, 95%乙醇固定, 4%台盼蓝染色, 镜下计数穿膜细胞数。设穿过无Matrigel胶的微孔滤膜细胞数为对照, 各实验组穿过Matrigel胶的细胞数与其相比得到相对百分率, 以此百分率表示细胞体外侵袭指数, 每孔重复3次。

### 1.2.7 图像分析

应用Quantity One 4.5图像分析系统对Western印迹法和qRT-PCR结果进行图像分析, 计算条带的光密度OD值, 每条条带测3次。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0软件进行分析。数据以均数±标准

差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 对样本的平均光密度采用完全随机设计两总体均数方差齐性检验和 $t$ 检验, 检验水准 $\alpha$ 为0.05。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MDA-MB-231 转染细胞 miR-126 表达分析及对细胞形态的影响

qRT-PCR检测转染前后miR-126表达的变化, 转染后MDA-MB-231细胞内miR-126表达量显著高于转染前( $P < 0.05$ , 表1)。细胞形态通过荧光显微镜观察, 由梭形间充质细胞样变成多边形上皮样细胞(图1)。

表1 qRT-PCR检测转染前、后乳腺癌细胞内miR-126的表达

Table 1 Real-time quantitative PCR was used to detect the expression of miR-126 in breast cancer cells before and after transfection

组别	miR-126	$P$ (方差齐性检验)	$P$ ( $t$ 检验)
MDA-MB-231/转染前	0.9267 ± 0.2028		
MDA-MB-231/空载体	0.9633 ± 0.1528	0.519	0.070
MDA-MB-231/miR-126	2.1733 ± 0.2517	0.812*, 0.468 <sup>#</sup>	<0.01*, <0.01 <sup>#</sup>

\*: 转染空载体与转染前比较; #: 转染miR-126与转染空载体比较。

\*: transfection of empty vector compared with transfection before; #: transfection miR-126 compared with transfected empty vector.

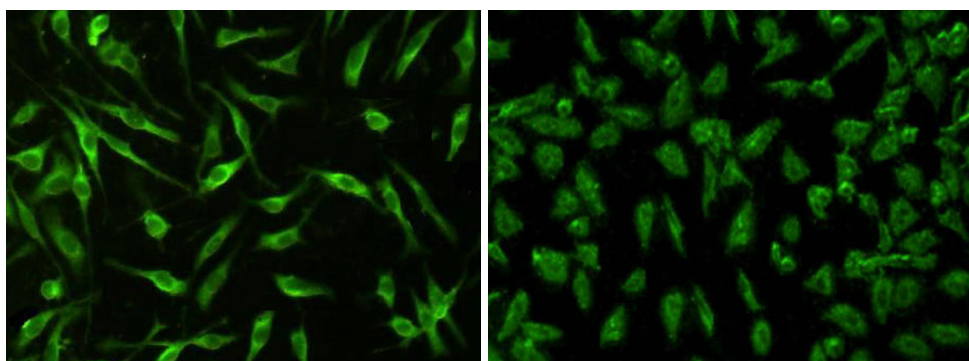


图1 MDA-MB-231细胞转染miR-126前、后细胞形态变化: 转染前肿瘤细胞呈梭形间充质样, 转染miR-126后肿瘤细胞呈多角型上皮样(荧光显微镜观察图片)

Figure 1 Morphological changes of MDA-MB-231 cells before and after miR-126 transfection: The tumor cells were spindle-shaped mesenchymal cells before transfection, and the tumor cells were polygonal epithelial after transfection with miR-126 (fluorescence microscope observation picture)

## 2.2 Western 印迹法检测 EGFL7, Wnt-1, $\beta$ -catenin 和 E-cadherin 的蛋白表达

转染后G418筛选培养乳腺癌MDA-MB-231细胞后, 提取蛋白采用Western印迹法检测EGFL7, Wnt-1,  $\beta$ -catenin, E-cadherin的蛋白表达变化, 可见EGFL7蛋白表达下调( $P<0.05$ ), Wnt-1蛋白表达下调( $P<0.05$ ),  $\beta$ -catenin蛋白表达下调( $P<0.05$ ), E-cadherin蛋白表达上调( $P<0.05$ , 图2)。

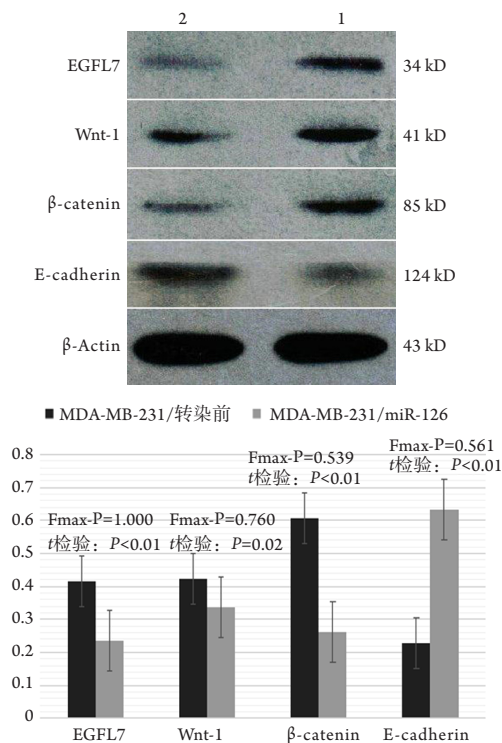


图2 MDA-MB-231细胞EGFL7, Wnt-1,  $\beta$ -catenin, E-cadherin蛋白表达变化

## Figure 2 Expression of EGFL7, Wnt-1, $\beta$ -catenin and E-cadherin proteins in MDA-MB-231 cells

1: 转染前, EGFL7, Wnt-1,  $\beta$ -catenin蛋白较高表达, E-cadherin蛋白较低表达; 2: 转染筛选培养MDA-MB-231细胞后EGFL7, Wnt-1,  $\beta$ -catenin蛋白表达下调, E-cadherin蛋白表达上调。

1: Before transfection, EGFL7, Wnt-1,  $\beta$ -catenin protein is highly expressed, E-cadherin protein is down-regulated; 2: the expression of EGFL7, Wnt-1 and  $\beta$ -catenin was down-regulated and the expression of E-cadherin was up-regulated in MDA-MB-231 cells.

## 2.3 EMT 相关转录因子在转染 MDA-MB-231 细胞前后的表达变化

RT-PCR检测细胞中EMT相关转录因子Slug及Twist的表达变化, 经转染后筛选培养的MDA-MB-231细胞转录因子Slug及Twist的表达较转染前

显著下调, 差异有统计学意义(图3)。

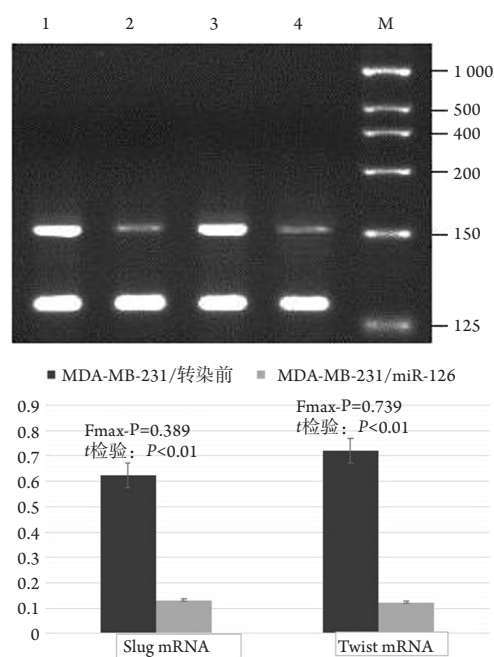


图3 miR-126过表达质粒转染MDA-MB-231前后细胞转录因子表达情况

## Figure 3 Expression of transcription factors in cells before and after transfection of MDA-MB-231 by miR-126 overexpressing plasmid

M: DNA标志物; 1: 转染前Slug mRNA表达; 2: 转染筛选培养后Slug mRNA表达下调; 3: 转染前Twist mRNA表达; 4: 转染筛选培养后Twist mRNA表达下调。

M: DNA marker; 1: Expression of Slug mRNA before transfection; 2: Down-regulation of Slug mRNA after transfection screening. 3: Twist mRNA expression before transfection; 4: Down-regulation of Twist mRNA expression after transfection screening.

## 2.4 免疫组织化学观察乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Vimentin 蛋白表达及细胞形态变化

经转染筛选培养后, 免疫组织化学检测乳腺癌MDA-MB-231细胞Vimentin蛋白表达下调, 且细胞形态由为梭形间充质细胞样转变为多边形上皮样(图4)。

## 2.5 转染筛选培养和乳腺癌细胞 MDA-MB-231 后体外侵袭能力变化观察

经转染筛选培养后乳腺癌细胞MDA-MB-231体外侵袭力观察采用Transwell小室侵袭实验进行, 以转染前的侵袭指数作为对照, MDA-MB-231细胞经转染筛选培养后侵袭力(侵袭指数)减弱, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 图5, 表2)。

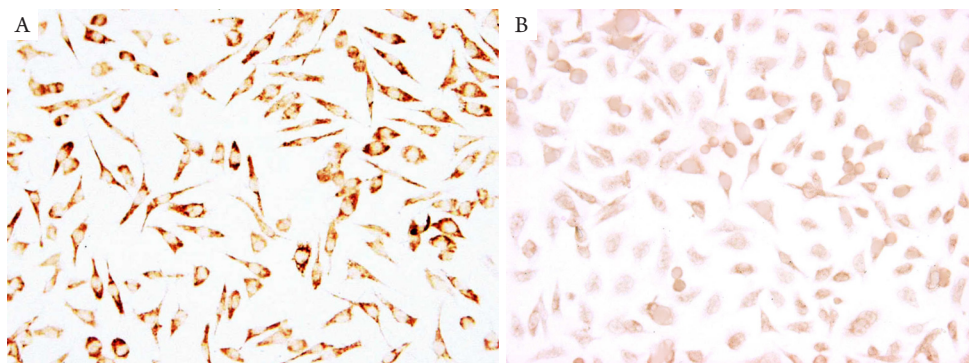


图4 乳腺癌MDA-MB-231细胞Vimentin蛋白表达及细胞形态变化(IHC,  $\times 200$ )

Figure 4 Vimentin protein expression and cell morphology in breast cancer MDA-MB-231 cells (IHC,  $\times 200$ )

(A) 转染前乳腺癌MDA-MB-231细胞, Vimentin蛋白表达较强; (B) 转染筛选培养后乳腺癌MDA-MB-231细胞, Vimentin蛋白表达减弱。

(A) Pre-transfection breast cancer MDA-MB-231 cells, strong expression of Vimentin protein; (B) Transfection screening for cultured breast cancer MDA-MB-231 cells, Vimentin protein expression is diminished.

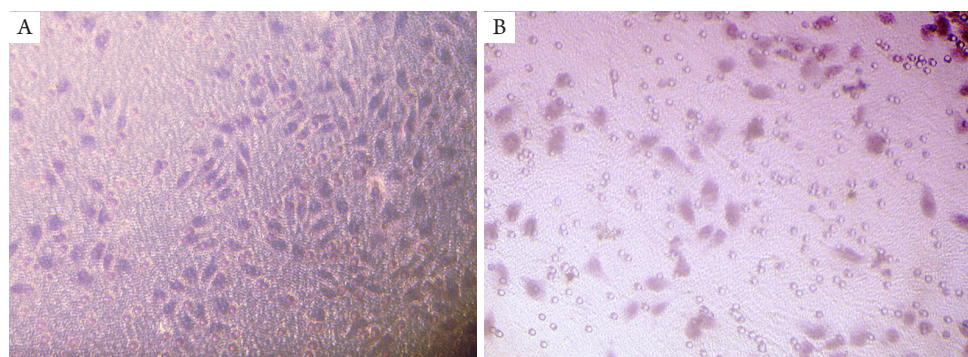


图5 Transwell小室侵袭实验观察转染筛选培养乳腺癌细胞MDA-MB-231后体外侵袭力的变化( $\times 200$ )

Figure 5 Transwell chamber invasion assay to observe the invasive ability of transfected breast cancer cells MDA-MB-231 ( $\times 200$ )

(A) 转染前乳腺癌MDA-MB-231细胞, Transwell小室侵袭实验穿膜细胞较多; (B) 转染筛选培养后乳腺癌MDA-MB-231细胞, Transwell小室侵袭实验穿膜细胞减少。

(A) Before transfection, the Transwell cell invasion test of breast cancer MDA-MB-231 cells was more frequent. (B) Transfection screening for cultured breast cancer MDA-MB-231 cells Transwell chamber invasion assays reduced transmembrane cells.

表2 Transwell小室评估转染前、后MDA-MB-231细胞体外侵袭指数(侵袭力)的变化

Table 2 Transwell chamber assessment of changes in invasive index (invasiveness) of MDA-MB-231 cells before and after transfection

组别	体外侵袭指数/%	P(方差齐性检验)	P(t检验)
MDA-MB-231/转染前	56.65 $\pm$ 1.68		
MDA-MB-231/miR-126	38.46 $\pm$ 1.59	0.921	<0.01

### 3 讨论

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 据国家癌症中心2015年的统计数据<sup>[15]</sup>, 其发病率和病死率已位居城市女性恶性肿瘤的首位, 发病率逐年增加

且趋于年轻化。据国家癌症研究机构预计, 到2030年我国乳腺癌每年新发病将达23.4万例以上, 因乳腺癌死亡超过7.0万例, 病死率上升至47.94%<sup>[16]</sup>。

肿瘤转移涉及复杂的基因遗传学的改变, 是导致患者死亡的主要原因, 肿瘤转移的早期监测和



治疗是需要关注的重要课题。EGFL7是Soncin以及Park的实验室分别于2003年和2004年发现的一个在血管内皮特异性表达的基因, 分别将其命名为VE-statin 和EGFL7<sup>[5,17-18]</sup>。哺乳动物EGFL7基因编码的蛋白相对分子质量为30 kD (1 D=1 u), 该蛋白包含一个信号肽序列, 提示EGFL7是一种分泌蛋白; 同时在其氨基端存在EMI样结构, 与调节细胞间的黏附作用有关<sup>[17]</sup>。

MicroRNA(miRNA)是一组广泛分布于各种生物体内的非编码小RNA, 长度18~24 nt, 能够在转录后水平调节基因<sup>[19]</sup>。近年的研究<sup>[20]</sup>显示: 约有1 000多种miRNA存在, 有1/3的基因表达受其调控。miRNA参与了一系列重要生命进程, 在细胞的增殖、分化、凋亡, 与肿瘤的发生发展密切相关, 扮演癌基因或抑癌基因的角色。miR-126定位于EGFL7基因7号内含子上, 由3个不同的EGFL7基因转录产生, 它参与多种病理生理过程, 包括细胞增殖、分化以及调控血管生成。miR-126在大多数肿瘤中发挥抑癌基因的作用, 调控肿瘤侵袭与转移。Tavaziee等<sup>[12]</sup>研究发现: miR-126的表达与乳腺癌的转移呈负相关。

$\beta$ -catenin基因是Wnt信号通路的下游基因, 其表达的 $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)是一种多功能蛋白质, 据文献<sup>[21]</sup>报道: 可以通过参与E-cadherin/ $\beta$ -catenin复合体的形成, 在细胞黏附中发挥作用, 而且可作为Wnt信号传导通路的中心环节, 参与肿瘤细胞的分化增殖, 迁移及凋亡的调控。有研究<sup>[22]</sup>发现:  $\beta$ -catenin酪氨酸磷酸化可以破坏E-cadherin/ $\beta$ -catenin复合物的结构, 导致细胞黏附力下降, 异常活化的Wnt信号可以使 $\beta$ -catenin蛋白水平上调, 从而进入细胞核与TCF/LEF信号通路发生作用, 激活下游靶基因的表达, 促进肿瘤侵袭转移。Zhang等<sup>[23]</sup>研究发现: BCL9可通过Wnt/ $\beta$ -catenin途径诱导NSCLC细胞EMT的发生, 增强干细胞特性, 促进肿瘤细胞的侵袭, 并导致顺铂耐药。

本实验以具有间充质梭形细胞样乳腺癌MDA-MB-231细胞为模型, 通过转染过表达miR-126质粒至MDA-MB-231细胞并筛选培养, 检测发现乳腺癌MDA-MB-231细胞EGFL7蛋白表达下调, Wnt-1和 $\beta$ -catenin蛋白表达下调, Vimentin蛋白表达下调, 而E-cadherin蛋白表达上调, 肿瘤细胞形态由梭形间充质细胞样转化为多角形上皮样, 且转录因子Twist和Slug mRNA表达下调, Transwell体外侵袭实验显示转染筛选后穿膜肿瘤细胞数减少。通过实验结果, 探讨EGFL7可能存在调控肿瘤细胞EMT

的分子机制, 即通过miR-126靶向抑制EGFL7蛋白表达, 进而抑制了Wnt-1/ $\beta$ -catenin信号通路, 伴随核转录因子Snail, Twist的失活下调, 从而负向调控乳腺癌细胞MDA-MB-231 EMT, 表现为细胞形态由梭形向上皮样转化, EMT相关蛋白Vimentin表达减弱, 提示上皮转化与细胞黏附性相关的蛋白E-cadherin表达上调, 而且肿瘤细胞体外侵袭能力减弱。

有关EGFL7调控肿瘤细胞EMT的研究, Luo等<sup>[24]</sup>研究发现: EGFL7通过激活EGFR-AKT-Snail信号通路, 调控胃癌细胞EMT, 促进肿瘤细胞侵袭、转移。而本实验结果提示: EGFL7在调控肿瘤细胞EMT的机制除了Luo等<sup>[24]</sup>所报道的外, 还可能经由Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路以及核转录因子Slug, Twist等共同参与调控。另据文献<sup>[9]</sup>报道: 上调EGFL7蛋白表达水平还可通过Akt/ $\beta$ -catenin/TCF4信号通路促进胶质瘤的肿瘤发生与恶性进展。另外miR-126也可通过PI3K/AKT/Snail信号通路抑制肺癌细胞的EMT<sup>[25]</sup>。总之EGFL7调控肿瘤EMT过程中, 存在不同的分子途径组成复杂的调控网络, 相互之间可能存在协同或拮抗作用。本实验miR-126可能协同参与了EGFL7调控肿瘤EMT这一过程。

本实验结果表明miR-126负向调控EGFL7蛋白表达, 同时抑制乳腺癌细胞Wnt-1/ $\beta$ -catenin信号通路, 伴随下调核转录因子Slug, Twist, 负向调控乳腺癌细胞上皮-间质转化, 减弱肿瘤细胞体外侵袭力。EGFL7可能成为一种预测乳腺癌转移的重要分子标志物和潜在的治疗靶点, 而miR-126与EGFL7和Wnt/ $\beta$ -catenin之间在调控肿瘤EMT的内联及相互作用方面尚需要深入研究。

## 参考文献

1. 杨芳, 于雁. 肿瘤微环境——肿瘤转移的关键因素[J]. 中国肺癌杂志, 2015, 18(1): 48-54.  
YANG Fang, YU Yan. Tumor microenvironment—a key factor in tumor metastasis[J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 2015, 18(1): 48-54.
2. 刘海霞, 陈必良, 李佳, 等. EMT参与肿瘤侵袭转移的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(14): 2790-2793.  
LIU Haixia, CHEN Biliang, LI Jia, et al. The research progress of EMT in tumor invasion and metastasis[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(14): 2790-2793.
3. 张弦.  $\beta$ -榄香烯逆转乳腺癌上皮-间质转化作用机制的基础研

- 究[D]. 大连: 大连医科大学, 2013.
- ZHANG Xian.  $\beta$ -elemene reverses the basic mechanism of breast cancer epithelial-mesenchymal transition[D]. Dalian: Dalian Medical University, 2013.
4. Park LH, Schmidt M, Jin SW, et al. The endothelial-cell-derived secreted factor EGFL7 regulates vesicular tubeformation[J]. *Nature*, 2004, 428(6984): 754-758.
  5. Soncin F, Mattot V, Lionneton F, et al. VE-statin, an endothelial repressor of smooth muscles cell migration[J]. *EMBO J*, 2003, 22(21): 5700-5711.
  6. Zhou L, Li J, Zhao YP, et al. Prognostic significance of epidermal growth factor-like domain 7 in pancreatic cancer[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2014, 13(5): 523-528.
  7. Shen X, Han Y, Xue X, et al. Epidermal growth factor-like domain 7 promotes cell invasion and angiogenesis in pancreatic carcinoma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 77(2): 167-175.
  8. Campagnolo L, Telesca C, Massimiani M, et al. Different expression of VEGF and EGFL7 in human hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Liver Dis*, 2016, 48(1): 76-80.
  9. Wang FY, Kang CS, Wang-Gou SY, et al. EGFL7 is an intercellular EGFR signal messenger that plays an oncogenic role in glioma[J]. *Cancer Lett*, 2017, 384: 9-18.
  10. Oh J, Park SH, Lee TS, et al. High expression of epidermal growth factor-like domain 7 is correlated with poor differentiation and poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer[J]. *J Gynecol Oncol*, 2014, 25(4): 334-341.
  11. Hansen TF, Nielsen BS, Sorensen FB, et al. Epidermal growth factor-like domain 7 predicts response to first-line chemotherapy and bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(9): 2238-2245.
  12. Tavazoe SF, Alarcon C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. *Nature*, 2008, 451(7175): 147-152.
  13. 陈超, 姚莉敏. 胃癌中 $\beta$ -catenin、ki-67和Her-2/Neu表达及对胃癌侵袭、转移的影响[J]. *重庆医学*, 2016, 45(18): 2504-2506.  
CHEN Chao, YAO Limin. Expression of  $\beta$ -catenin, ki-67 and Her-2/Neu in gastric carcinoma and their influence on infiltration and metastasis of gastric carcinoma[J]. *Chongqing Medical Journal*, 2016, 45(18): 2504-2506.
  14. 崔明, 肖茗耀, 乔丹, 等. 实时荧光定量RT-PCR检测乳腺组织中miR-126的表达水平[J]. *临床普外科电子杂志*, 2015, 3(2): 19-22.  
CUI Ming, XIAO Mingyao, QIAO Dan, et al. Real-time quantitative RT-PCR for detection of miR-126 expression in breast tissue[J]. *Journal of Clinical General Surgery*, 2015, 3(2): 19-22.
  15. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
  16. Fan L, Strasser-Weippl K, Li JJ, et al. Breast cancer in China[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-e289.
  17. Yang RH, Qi SH, Ruan SB, et al. EGFL7-overexpressing epidermal stem cells promotes fibroblast proliferation and migration via mediating cell adhesion and strengthening cytoskeleton[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 423(1/2): 1-8.
  18. 罗柏花. EGFL7诱导EMT促进胃癌细胞侵袭和转移机制的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2014.  
LUO Baihua. EGFL7 induces EMT to promote the invasion and metastasis of gastric cancer cells[D]. Changsha: Central South University, 2014.
  19. Hirschberger S, Hinske LC, Kreth S. MiRNAs: dynamic regulators of immune cell functions in inflammation and cancer[J]. *Cancer Lett*, 2018, 431: 11-21.
  20. 韩庆, 廖艳丹. miR-126的研究进展[J]. *广东医学*, 2013, 34(13): 2102-2105.  
HAN Qing, LIAO Yandan. Research progress of miR-126[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2013, 34(13): 2102-2105.
  21. 刘卫梅.  $\beta$ -catenin及EGFR在宫颈鳞癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国医药指南*, 2016, 14(16): 58-59.  
LIU Weimei. Expression and clinical significance of  $\beta$ -catenin and EGFR in cervical squamous cell carcinoma[J]. *Guide of China Medicine*, 2016, 14(16): 58-59.
  22. 林辉, 张祥贵. Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路肾脏疾病[J]. *海南医学*, 2017, 28(2): 267-271.  
LIN Hui, ZHANG Xianggui. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and renal disease[J]. *Hainan Medical Journal*, 2017, 28(2): 267-271.
  23. Zhang Y, Zhang Q, Chen H, et al. BCL9 promotes epithelial mesenchymal transition and invasion in cisplatin resistant NSCLC cells via  $\beta$ -catenin pathway[J]. *Life Sci*, 2018, 208: 284-294.
  24. Luo BH, Xiong F, Wang JP, et al. Epidermal growth factor-like domain-containing protein 7 (EGFL7) enhances EGF receptor-AKT signaling, epithelial-mesenchymal transition, and metastasis of gastric cancer cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99922.
  25. Jia Z, Zhang Y, Xu Q, et al. miR-126 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis by targeting PI3K/AKT/Snail signaling of lung cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7369-7375.

**本文引用:** 姜青明, 周文文, 李光新, 肖觉. miR-126靶向EGFL7抑制乳腺癌细胞MDA-MB-231上皮-间质转化[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(10): 2055-2062. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.001

**Cite this article as:** JIANG Qingming, ZHOU Wenwen, LI Guangxin, XIAO Jue. MiR-126 targeting EGFL7 inhibits epithelial mesenchymal transition in breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(10): 2055-2062. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.10.001