

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.02.006

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.02.006

MiR-101在乳腺癌中的表达及其意义

朱蕾¹, 杨颖², 卢晶³, 缪妍¹, 陈红⁴, 崔少宁⁵, 翟丽云¹, 张金库⁴, 王春光¹

- (1. 保定市第一中心医院麻醉科, 河北 保定 071000; 2. 保定市第一中心医院乳腺外科, 河北 保定 071000;
3. 保定市第一中心医院肿瘤外科, 河北 保定 071000; 4. 保定市第一中心医院病理科, 河北 保定 071000;
5. 保定市第一中心医院手术室, 河北 保定 071000)

[摘要] 目的: 探讨miR-101在乳腺癌组织中的表达变化。方法: 收集乳腺癌组织及对应的癌旁组织, 以qRT-PCR方法测定miR-101在乳腺癌组织中的表达变化。在乳腺癌细胞中转染miR-101 mimics、mimics control, 以qRT-PCR方法检测上调效果, MTT方法测定细胞增殖变化, 流式细胞术测定细胞凋亡变化, Transwell小室测定细胞迁移和侵袭数目变化, 蛋白质印迹法测定细胞中cleaved caspase-3和MMP-2蛋白表达变化。结果: miR-101在乳腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织($P<0.05$)。与miR-NC比较, miR-101细胞中miR-101表达水平升高, 细胞增殖能力降低, 细胞凋亡率升高, 细胞侵袭和迁移数目下降, 细胞内的cleaved caspase-3蛋白水平表达升高, MMP-2蛋白表达水平减少($P<0.05$)。结论: MiR-101在乳腺癌组织中表达下调, 上调miR-101抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移并诱导细胞凋亡。

[关键词] 乳腺癌; miR-101; 侵袭; 凋亡; 增殖

Expression of miR-101 in breast cancer and its significance

ZHU Lei¹, YANG Ying², LU Jing³, MIAO Yan¹, CHEN Hong⁴, CUI Shaoning⁵, ZHAI Liyun¹,
ZHANG Jinku⁴, WANG Chunguang¹

- (1. Department of Anesthesiology, First Central Hospital of Baoding, Baoding Hebei 071000; 2. Department of Breast Surgery, First Central Hospital of Baoding, Baoding Hebei 071000; 3. Department of Surgical Oncology, Baoding First Hospital, Baoding Hebei 071000;
4. Baoding No. 1 Department of Pathology, First Central Hospital of Baoding, Baoding Hebei 071000; 5. Operating Room, First Central Hospital of Baoding, Baoding Hebei 071000, China)

Abstract **Objective:** To detect the expression of MiR 101 in breast cancer tissues. **Methods:** The expression of MiR 101 in breast cancer tissues and their adjacent tissues were detected by qRT-PCR. miR-101 mimics and mimics control were transfected into breast cancer cells. The up-regulation effect was detected by qRT-PCR, cell proliferation was measured by MTT, cell apoptosis was measured by flow cytometry, cell migration and invasion were measured by Transwell chamber, and the expression of cleaved caspase-3 and MMP-2 protein were measured by Western blot.

收稿日期 (Date of reception): 2019-08-07

通信作者 (Corresponding author): 张金库, Email: 843561234@qq.com

基金项目 (Foundation item): 保定市科技计划项目 (1941ZF041)。This work was supported by the Baoding Science and Technology Plan Project, China (1941ZF041).

Results: The expression level of miR-101 in breast cancer tissues was significantly lower than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). Compared with miR-NC, the expression of miR-101 decreased, cell proliferation ability decreased, cell apoptosis rate increased, cell invasion and migration decreased, the expression of cleaved caspase-3 protein increased, and the expression of MMP-2 protein decreased in miR-101 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** The down-regulation of the expression of miR-101 in breast cancer tissue and up-regulation of miR-101 inhibit the proliferation, invasion and migration of breast cancer cells and induce apoptosis.

Keywords breast cancer; miR-101; invasion; apoptosis; proliferation

乳腺癌是全球范围内妇女最为常见的恶性肿瘤之一, 每年全世界内有大约新增乳腺癌患者130万, 有50万妇女因乳腺癌致死^[1]。随着人们对乳腺癌发病机制的不断研究, 发现乳腺癌的发生与基因的异常表达有关, 这些基因包括miRNA和lncRNA等^[2]。研究^[3]表明: 绝大多数的miRNA发挥生理作用具有明显的组织特异性、保守性及时序性, 其参与人体组织生长、器官形成、病毒防御、肿瘤进展等过程。MiR-101是目前发现的与肿瘤有关的miRNA分子之一, 其在肿瘤进展中表达水平降低, 重建miR-101的表达可能是肿瘤治疗的有效途径之一^[4]。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2017年12月至2018年6月保定市第一中心医院收治的乳腺癌患者手术切除的乳腺癌组织和对应的癌旁组织(距肿瘤边缘5 cm的乳腺组织)各50例。所有乳腺癌患者均为女性, 中位年龄为42岁, 术前均为进行过放射治疗、化学药物治疗及内分泌等任何治疗), 收集的组织标本保存在液氮中。

1.2 主要试剂

RPMI-1640培养基、青霉素、链霉素购自美国Sigma公司; 胎牛血清购自美国GIBCO公司; Lipofectamine 2000转染试剂、TRIzol购自美国Invitrogen公司; miR-101 mimics、mimics control购自上海吉玛制药公司; Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒购自江苏凯基生物公司; MTT购自上海生工公司; Transwell小室购自美国Corning公司; PCR引物购自南京金斯瑞公司; SYBR® Premix ExTaq TMII、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit购自上海索宝生物科技有限公司; miRNA反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; SYBR Green Realtime PCR Master Mix购自美国Thermo公司; 兔抗MMP-2抗体、兔抗cleaved caspase-3抗体

购自美国Cell Signaling公司。

1.3 细胞培养和转染

所用乳腺癌细胞MDA-MB-231购自上海中国科学院细胞库。细胞培养于含10%胎牛血清、链霉素(100 U/mL)、青霉素(100 U/mL)的RPMI-1640培养液中。所有实验均使用处于对数生长期、状态良好的细胞。在显微镜下观察细胞汇合度为50%时进行细胞转染, 转染后48 h进行下一步实验。

1.4 MTT方法测定细胞增殖

取乳腺癌细胞, 胰蛋白酶消化后, 将细胞接种到96孔细胞培养板中, 每孔添加5 000个细胞。观察细胞贴壁以后进行细胞转染, 在转染后48 h分别在每个孔中添加10 μ L的MTT溶液, 继续放在培养箱中培养4 h。把上清溶液吸弃以后, 添加150 μ L的DMSO溶液, 在避光条件下震荡后混合均匀, 10 min后观察结晶物溶液以后, 用酶标仪检测490 nm的OD值。

1.5 流式细胞术测定细胞凋亡

细胞转染48 h后, 胰蛋白酶消化细胞, 离心后弃上清溶液, PBS洗涤细胞1次, 再次离心。添加500 μ L的结合缓冲液把细胞悬浮, 依次添加Annexin V-FITC和PI染色液各5 μ L; 在室温、避光条件下孵育15 min, 上流式细胞仪检测细胞凋亡变化。

1.6 Transwell小室测定细胞迁移和侵袭数目

侵袭实验: Matrigel和不含血清的培养液按1:9比例混合均匀, 添加到Transwell小室的上室中, 将整个聚碳酸酯膜包被, 37 $^{\circ}$ C孵育4 h, Matrigel凝聚成胶。把残余的液体吸除, 以不含血清的培养液将小室湿化30 min, 将乳腺癌细胞配制成含有 4×10^5 个细胞/mL的单细胞悬浮液; 在上室加100 μ L的细胞悬液, 在下室加入500 μ L含血清的培养液; 将小室置于培养箱中培养48 h后, PBS洗涤

1次; 4%的多聚甲醛溶液固定20 min; 结晶紫染色20 min; 棉签将没有侵袭的细胞擦掉, 置于400倍显微镜下随机选取5个视野计数细胞侵袭数目。迁移实验前不用Matrigel湿化, 其余步骤相同。

1.7 qRT-PCR检测乳腺癌组织中miR-101的表达水平和乳腺癌细胞转染miR-101 mimics效果

取液氮中保存的乳腺癌组织或转染miR-101 mimics的乳腺癌细胞, TRIzol试剂提取RNA, 按试剂盒说明加入特异性引物和其他相关试剂, qRT-PCR反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 72 °C 5 min, 40个循环(表1)。MiR-101的内参设置为U6, 结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示并进行分析。

表1 PCR引物

Table 1 PCR primer

基因	PCR引物序列
<i>miR-101</i>	
正向引物	5'-TACAGTACTGTGATAACTGAA-3'
反向引物	5'-CTCAACTGGTGTCTCGTGGA-3'
U6	
正向引物	5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3'
反向引物	5'-TTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'

1.8 蛋白质印迹法测定乳腺癌细胞中cleaved caspase-3和MMP-2蛋白表达

以GAPDH作为内参, 检测cleaved caspase-3和MMP-2蛋白表达, 使用扫描仪扫描X胶片, 用Quantity One软件分析条带的灰度值。蛋白表达水平=目的蛋白灰度值÷GAPDH灰度值。

1.9 统计学处理

采用SPSS21.0软件进行数据分析, 计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用t检验, 多组差异比较采用单因素方差分析, 组间比较采用SNK-q检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-101在乳腺癌组织中表达下调

检测乳腺癌组织和对应正常癌旁组织中miR-101的表达变化发现: 乳腺癌组织中miR-101的表

达水平明显低于正常癌旁组织(图1, $P<0.05$)。MiR-101在乳腺癌组织中表达下调。

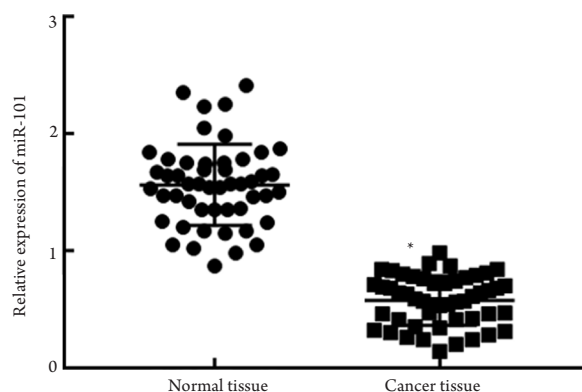


图1 miR-101在乳腺癌组织中表达下调

Figure 1 Down-regulation of microRNA-101 expression in breast cancer

与正常组织相比, $*P<0.05$ 。

Compared with the normal tissues, $*P<0.05$.

2.2 MiR-101 mimics上调乳腺癌细胞中miR-101的表达水平

在乳腺癌细胞中转染miR-101 mimics, 经过qRT-PCR检测发现: miR-101-mimics转染后的乳腺癌细胞中miR-101表达水平明显升高(图2)。

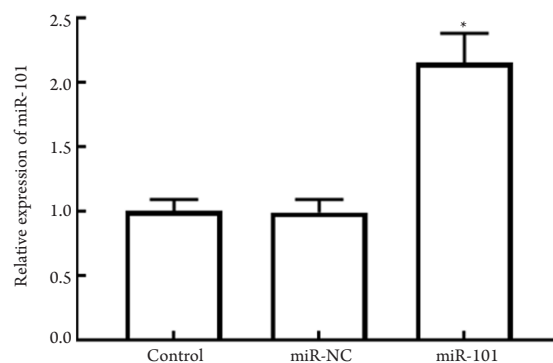


图2 miR-101 mimics上调乳腺癌细胞中miR-101表达水平

Figure 2 miR-101 mimics up-regulates the expression of miR-101 in breast cancer cells

与miR-NC比较, $*P<0.05$ 。

Compared with miR-NC, $*P<0.05$.

2.3 上调miR-101抑制乳腺癌细胞增殖能力

乳腺癌细胞中转染miR-101 mimics后, 经过MTT方法测定发现: miR-101 mimics转染可以明显下调乳腺癌细胞增殖能力(图3)。

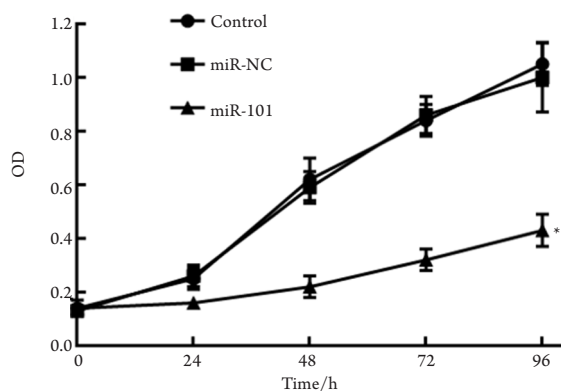


图3 上调miR-101抑制乳腺癌细胞增殖

Figure 3 Upregulation of miR-101 inhibits proliferation of breast cancer cells

与miR-NC比较, * $P < 0.05$ 。

Compared with miR-NC, * $P < 0.05$.

2.4 上调miR-101促进乳腺癌细胞凋亡

乳腺癌细胞中转染miR-101 mimics后, 经流式细胞术检测发现: 转染miR-101 mimics能够提高乳腺癌细胞凋亡率(图4A, 4B)。Cleaved caspase-3是一个细胞凋亡发生的标志蛋白, 蛋白质印迹法发现miR-101 mimics转染还可以促进细胞中凋亡蛋白cleaved caspase-3表达(图4C, 4D)。

2.5 上调miR-101抑制乳腺癌细胞侵袭和迁移

乳腺癌细胞中转染miR-101 mimics后, 经Transwell小室检测发现: 转染miR-101 mimics能够减少细胞侵袭和迁移数目(图5A, 5B)。MMP-2是一个与细胞侵袭和迁移有关的基质金属蛋白酶, 蛋白质印迹法发现miR-101 mimics转染促进细胞中MMP-2蛋白表达(图5C, 5D)。

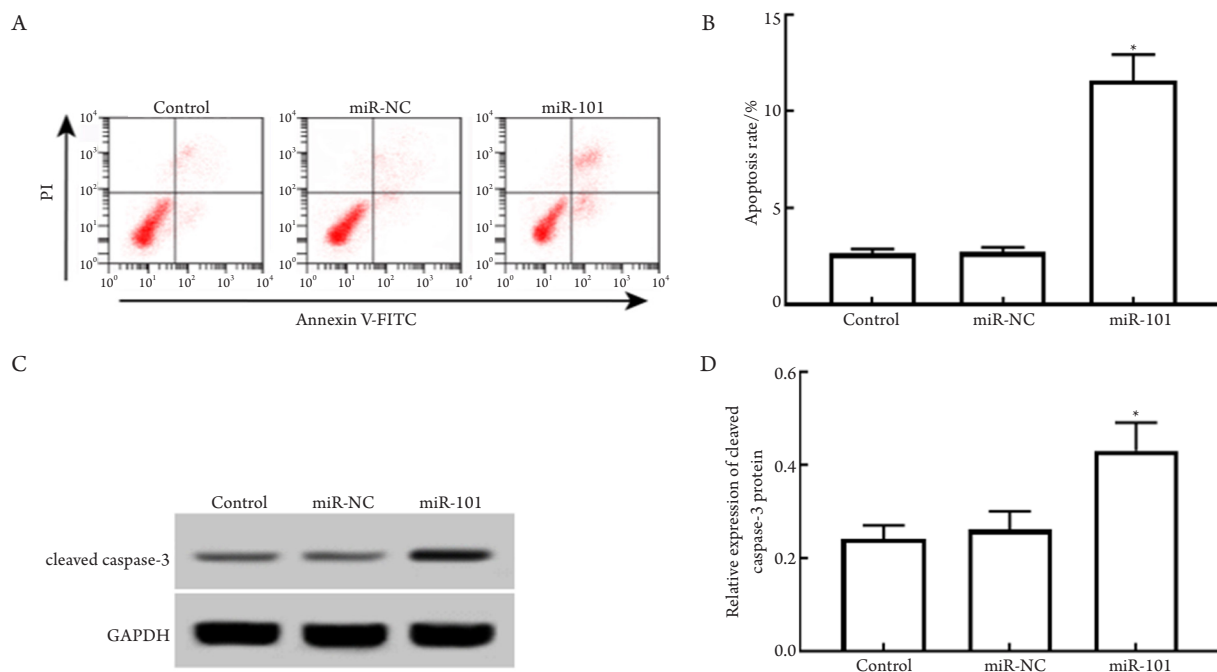


图4 上调miR-101诱导乳腺癌细胞凋亡和cleaved caspase-3蛋白表达

Figure 4 Upregulates the expression of cleaved caspase-3 and apoptosis of breast cancer cells induced by miR-101

(A) 流式细胞术检测上调miR-101后乳腺癌细胞凋亡变化; (B) 乳腺癌细胞凋亡率比较; (C) 蛋白质印迹法检测上调miR-101后乳腺癌细胞中cleaved caspase-3蛋白表达变化; (D) 以GAPDH作为参照, 分析cleaved caspase-3蛋白表达变化。与miR-NC比较, * $P < 0.05$ 。

(A) Flow cytometry was used to detect the apoptotic changes of breast cancer cells after up-regulation of miR-101; (B) Comparison of apoptotic rate of breast cancer cells; (C) Western blot was used to detect the expression changes of cleaved caspase-3 protein in breast cancer cells after up-regulation of miR-101; (D) GAPDH was used as a reference to analyze the expression changes of cleaved caspase-3 protein. Compared with miR-NC, * $P < 0.05$.

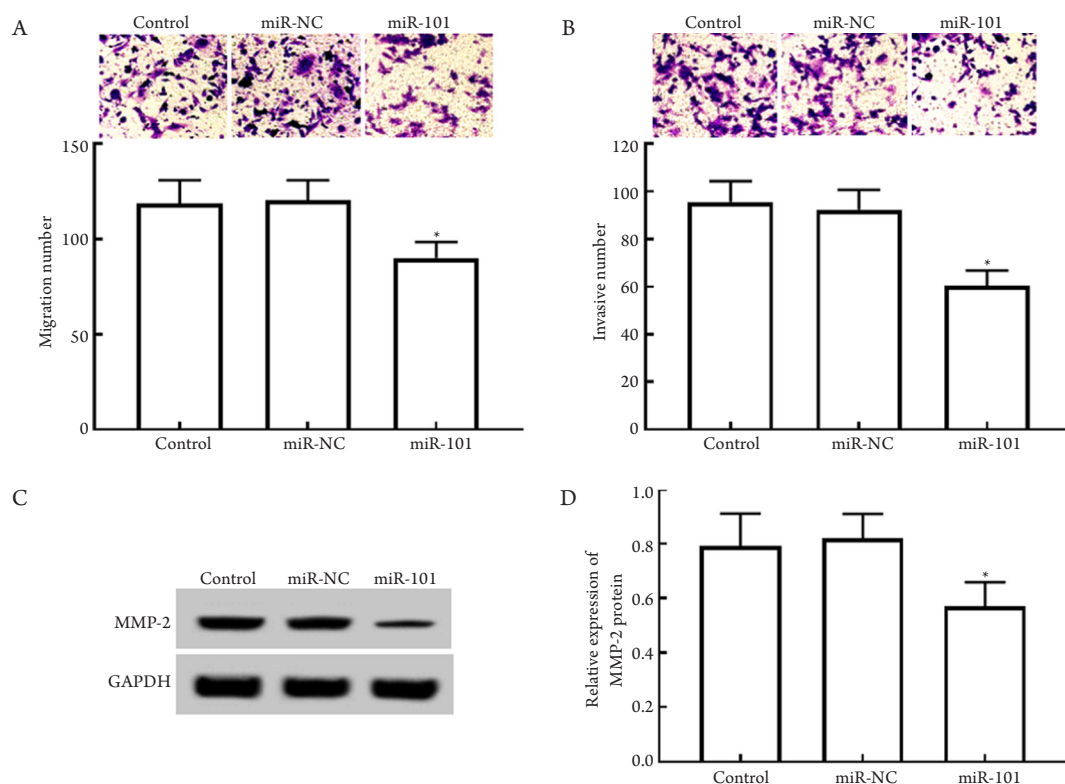


图5 上调miR-101抑制乳腺癌细胞侵袭迁移和MMP-2蛋白表达

Figure 5 Upregulates the expression of miR-101 and MMP-2 in breast cancer cells

(A) Transwell小室检测上调miR-101后乳腺癌细胞迁移数目变化(结晶紫染色, $\times 400$); (B) Transwell小室检测上调miR-101后乳腺癌细胞侵袭数目变化(结晶紫染色, $\times 400$); (C) 蛋白质印迹法检测上调miR-101后乳腺癌细胞中MMP-2 蛋白表达变化; (D) 以GAPDH作为参照, 分析MMP-2蛋白表达变化。与miR-NC比较, $*P < 0.05$ 。

(A) Transwell chamber was used to detect the change of the number of breast cancer cell migration after up-regulation of miR-101 (crystal violet staining, $\times 400$); (B) Transwell chamber was used to detect the change of breast cancer cell invasion after down-regulation of SNHG1 (crystal violet staining, $\times 400$); (C) Western blot was used to detect the change of MMP-2 protein expression in breast cancer cells after up-regulation of miR-101; (D) GAPDH was used as a reference to analyze the change of MMP-2 protein expression. Compared with miR-NC, $*P < 0.05$.

3 讨论

根据非编码RNA的大小将RNA划分为lncRNA和miRNA。miRNA是一个长19~25 nt的内源性小分子RNA, 与lncRNA一样, 没有开放阅读框, 因此没有编码蛋白质的功能^[5]。MiRNA在真核生物体内广泛存在, 常常以多拷贝、单拷贝或者基因簇的方式存在, 其在生成过程中遵循高度保守且独特的模式^[6]。研究^[7]报道lncRNA调控肿瘤进展的机制与靶向下游miRNA的表达有关, 同一个lncRNA可以同时靶向调控多个miRNA发挥多种功能。MiR-101是一个小分子RNA, 其同样不含有开放阅读框, 其在肿瘤组织中表达缺失与肿瘤的进展有关^[8]。

本研究结果发现: miR-101在乳腺癌组织中表达较对应的癌旁组织中明显降低; 进一步采用

miR-101 mimics转染乳腺癌细胞, 上调乳腺癌细胞miR-101表达, 经过MTT、流式细胞术、Transwell小室等多个实验证实, 上调miR-101后的乳腺癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力下降, 且细胞凋亡增多, 这说明miR-101在乳腺癌发生中扮演抑制作用。此外, 经过蛋白质印迹法实验证实上调miR-101表达后的乳腺癌细胞中cleaved caspase-3蛋白水平升高, 这与流式细胞术检测细胞凋亡结果相符合; 上调miR-101后的乳腺癌细胞中的MMP-2蛋白表达水平降低, 这与Transwell小室检测结果一致, 提示上调miR-101能够抵抗乳腺癌转移潜能。

综上所述, 上调乳腺癌细胞中miR-101表达, 可以抑制细胞增殖、侵袭和迁移能力, 并且使乳腺癌细胞凋亡增加。miR-101的表达和乳腺癌的发生相关, 具体机制待进一步研究。

参考文献

1. Nguyen TL, Aung YK, Evans CF, et al. Mammographic density defined by higher than conventional brightness thresholds better predicts breast cancer risk[J]. *Int J Epidemiol*, 2017, 46(2): 652-661.
2. 侯敏, 蒋琳, 詹红梅, 等. 乳腺癌相关lncRNA-miRNA-mRNA共表达及关键基因网络构建预测[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2018, 25(1): 26-33. HOU Min, JIANG Lin, ZHAN Hongmei, et al. Prediction of breast cancer related lncRNA-miRNA-mRNA co-expression and key genes based on network construction method[J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*, 2018, 25(1): 26-33.
3. Scheel TK, Luna JM, Liniger M, et al. A broad RNA virus survey reveals both miRNA dependence and functional sequestration[J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(3): 409-423.
4. Liu P, Ye F, Xie X, et al. mir-101-3p is a key regulator of tumor metabolism in triple negative breast cancer targeting AMPK[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 35188-98.
5. Li J, Li Q, Huang H, et al. Overexpression of miRNA-221 promotes cell proliferation by targeting the apoptotic protease activating factor-1 and indicates a poor prognosis in ovarian cancer[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(4): 1087-1096.
6. Guo H, Nan Y, Zhen Y, et al. miRNA-451 inhibits glioma cell proliferation and invasion by downregulating glucose transporter 1[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(10): 1-11.
7. Xue M, Pang H, Li X, et al. Long non-coding RNA urothelial cancer-associated 1 promotes bladder cancer cell migration and invasion by way of the hsa-miR-145-ZEB1/2-FSCN1 pathway[J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(1): 18-27.
8. Cui Y, Zhang F, Zhu C, et al. Upregulated lncRNA SNHG1 contributes to progression of non-small cell lung cancer through inhibition of miR-101-3p and activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 1778-1779.

本文引用: 朱蕾, 杨颖, 卢晶, 缪妍, 陈红, 崔少宁, 翟丽云, 张金库, 王春光. MiR-101在乳腺癌中的表达及其意义[J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(2): 296-301. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.02.006

Cite this article as: ZHU Lei, YANG Ying, LU Jing, MIAO Yan, CHEN Hong, CUI Shaoning, ZHAI Liyun, ZHANG Jinku, WANG Chunguang. Expression of miR-101 in breast cancer and its significance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(2): 296-301. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.02.006