

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.27.003

miR-335 通过靶向生存素对乳腺癌细胞增殖的调控作用

黄雅娟, 杜 峰, 魏玲丽

(江西省妇幼保健院乳腺科 330006)

[摘要] **目的** 探讨 miR-335 通过靶向生存素对乳腺癌细胞增殖的调控作用。**方法** (1)选取乳腺癌组织及癌旁正常组织,分别采用 RT-PCR、Western blot 检测组织中 miR-335 及生存素蛋白表达。(2)选取乳腺癌细胞系 MCF-7,分别转染 miR-335 mimic 及 mimic 对照组,采用 RT-PCR、Western blot 检测组织中 miR-335 及生存素蛋白表达。(3)选取乳腺癌细胞系 MCF-7,分别将野生型 survivin 3'-UTR 质粒(survivin-wt)和突变型 survivin 3'-UTR 质粒(survivin-Mut)与 miR-335 mimic 或模拟物阴性对照(NC)共转染至乳腺癌细胞系 MCF-7,双荧光素酶报告基因检测细胞荧光素酶活性。(4)选取乳腺癌细胞系 MCF-7,分别转染 mimic 对照组、miR-335 mimic 及 miR-335 mimic+survivin,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测各组细胞增殖活性。**结果** (1)与癌旁组织相比较,乳腺癌组织中 miR-335 表达显著降低($P<0.05$),同时生存素蛋白表达显著增高($P<0.05$)。(2)与转染 mimic 对照组相比较,转染 miR-335 mimic 可使乳腺癌细胞 MCF-7 中 miR-335 表达上调($P<0.05$),同时生存素蛋白表达下调($P<0.05$)。(3)与转染 NC 相比较,共转染 miR-335 mimic 与 survivin-wt 可使 MCF-7 荧光素酶活性降低($P<0.05$),而共转染 miR-335 mimic 与 survivin-Mut 则 MCF-7 荧光素酶活性无显著性变化($P>0.05$)。(4)转染 miR-335mimic 后,MCF-7 增殖活性较转染 mimic 对照组显著降低($P<0.05$);而转染 miR-335 mimic+survivin 后,MCF-7 增殖活性较单纯转染 miR-335 mimic 显著提高($P<0.05$),但仍显著低于转染 mimic 对照组($P<0.05$)。**结论** 在乳腺癌组织中 miR-335 呈现低表达,生存素呈现高表达;而 miR-335 可通过靶向生存素抑制乳腺癌细胞系 MCF-7 增殖。

[关键词] 微 RNAs;乳腺肿瘤;细胞增殖;miR-335;生存素

[中图分类号] R737.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)27-3753-04

miR-335 regulate cell proliferation by targeting survivin in breast cancer cells MCF-7

Huang Yajuan, Du Feng, Wei Lingli

(Department of Galactophore, Jiangxi Provincial Maternal and Child Health Care Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of miR-335 regulate cell proliferation by targeting survivin in breast cancer cells MCF-7. **Methods** (1)Chose breast cancer tissue and para-carcinoma tissue, and used RT-PCR or Western blot to detect the expression of miR-335 and survivin protein. (2)Chose breast cancer cells MCF-7, respectively transfected miR-335 mimic and mimic control. The expression of miR-335 and survivin protein were detected by RT-PCR or Western blot. (3)Chose breast cancer cells MCF-7, respectively co-transfection wild type survivin 3'-UTR(survivin-wt) or mutant type urvivin 3'-UTR(survivin-Mut) and miR-335 mimic or negative control(NC) to breast cancer cells MCF-7. The cell luciferase activity were detected by dual-luciferase report gene experiment. (4)Chose breast cancer cells MCF-7, respectively transfected mimic control, miR-335 mimic and miR-335 mimic+survivin. The cell proliferation activity of each group were detected by MTT method. **Results** (1)Compared with para-carcinoma tissue, the miR-335 expression of breast cancer tissue significantly decreased($P<0.05$), and the survivin protein expression of breast cancer tissue significantly increased($P<0.05$). (2)Compared with transfection mimic control, transfection miR-335 mimic can made the miR-335 expression of MCF-7 increased($P<0.05$), and made the survivin protein expression of MCF-7 decreased($P<0.05$). (3)Compared with transfection NC, co-transfection miR-335 mimic and survivin-wt can made luciferase activity of MCF-7 significantly decreased($P<0.05$), but the luciferase activity of MCF-7 was not significantly changes after co-transfection miR-335 mimic and survivin-Mut ($P>0.05$). (4)Compared with transfection mimic control, the MCF-7 proliferative activity significantly decreased after transfection miR-335mimic($P<0.05$). Compared with transfection miR-335 mimic, the MCF-7 proliferative activity significantly increased after transfection miR-335 mimic+survivin($P<0.05$), but still lower than transfection mimic control($P<0.05$). **Conclusion** In breast cancer tissue, the miR-335 show low expression, and survivin show high expression. miR-335 can target survivin to inhibit the proliferation activity of breast cancer cells MCF-7.

[Key words] microRNAs; breast neoplasms; cell proliferation; miR-335; survivin

近年来,我国乳腺癌发病率逐年上升,并有年轻化发展趋势^[1]。乳腺癌根治术是治疗早期乳腺癌的可靠手段,但由于起

病隐匿,大多数患者临床确诊时已为晚期,从而错失根治手术的最佳时机。包括放疗、化疗及内分泌治疗在内的辅助治

疗手段虽已广泛应用于乳腺癌临床治疗,但其所致的毒副反应及耐药性也不容忽视^[2]。因此,寻求更安全、高效的乳腺癌治疗方法是临床亟待解决的重点及难点问题。微小 RNA(miRNA, miRNA)是一类内源性非编码小分子 RNA,其可通过调控一个或多个靶基因翻译,参与恶性肿瘤的发生与发展^[3]。miR-335 定位于人类 7q32.2^[4]。研究证实,乳腺癌细胞系 BT474、T47D、MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-231 中 miR-335 表达均显著低于正常乳腺细胞系 MCF-10A($P < 0.05$),而过表达 miR-335 则可对乳腺癌细胞生物学特性产生影响,提示 miR-335 可能参与乳腺癌的进展过程^[5]。但 miR-335 对其下游靶基因的调控作用及机制尚未明确。Yang 等^[6]研究发现,miR-335 可通过靶向生存素(survivin)实现对胃癌细胞增殖、凋亡及侵袭能力的抑制。而 miR-335 靶向生存素对乳腺癌的影响尚未可知。针对上述问题,本研究拟选取乳腺癌组织样本及乳腺癌细胞系 MCF-7 为研究对象,观察 miR-335 靶向生存素对乳腺癌细胞系 MCF-7 增殖的调控作用,旨在为乳腺癌细胞的分子靶向治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2015 年 7~12 月 30 例女性乳腺癌组织及癌旁正常组织,由江西省妇幼保健院提供,均为手术切除的新鲜样本,术前告知患者并签订知情同意书,研究经江西省妇幼保健院伦理委员会批准。30 例患者中,年龄 27~65 岁,平均(52.4±6.5);WHO 分级:1+2 级 4 例,3 级 26 例;TNM 分期:I+II 期 9 例,III 期 21 例。Her-2 阴性 24 例,阳性 6 例;ER 阴性 11 例,阳性 19 例;PR 阴性 14 例,阳性 16 例;复发 21 例,未复发 9 例。

1.2 材料 乳腺癌细胞系 MCF-7,购于美国 ATCC 细胞库;RNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒、质粒提取试剂盒、LipofectamineTM2000 转染试剂盒、反转录试剂盒、miR-335 模拟物(miR-335 mimic)、模拟物阴性对照(NC)、survivin 3'-UTR 质粒,购于美国 Invitrogen 公司;Dual luciferase assays,购于美国 Promega 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、链霉素、青霉素,购于美国 Sigma 公司;一抗 survivin、 β -actin,购于大连 Santa Cruz 公司;ECL 化学发光试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒,购于碧云天生物试剂有限公司;miR-335、U6 引物,由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 常规复苏乳腺癌细胞系 MCF-7,用含有 10%胎牛血清和 1%双抗(青链霉素)的 DMEM 培养液重悬细胞,并置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每天换液 1 次,收集对数生长期细胞,提取细胞总 RNA 及总蛋白待进行后续实验。

1.3.2 细胞转染 收集对数生长期的乳腺癌细胞系 MCF-7,用含有 10%胎牛血清和 1%双抗(青链霉素)的 DMEM 培养液将细胞密度调节至 2×10^5 cell/well,后接种于 6 孔板中,共 9 孔,将细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h;将上述 9 孔细胞随机分为 3 组,每组 3 孔,即 mimic 对照组、miR-335 mimic 组及 miR-335 mimic+survivin 组,根据上述分组不同,利用 LipofectamineTM2000 转染 miR-335mimic(50 nmol/L)、相应的 mimic 对照组(50 nmol/L)及 survivin 表达质粒(50 nmol/L);转染后将细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h;收集细胞总 RNA 及总蛋白待进行后续实验。

1.3.3 双荧光素酶报告基因检测 分别构建含有野生型 survivin 3'-UTR 序列的荧光素酶报告基因质粒(survivin-wt)和含有突变型 survivin 3'-UTR 序列的荧光素酶报告基因质粒(survivin-Mut)。收集对数生长期的乳腺癌细胞系 MCF-7,用含有 10%胎牛血清和 1%双抗(青链霉素)的 DMEM 培养液将细胞密度调节至 2×10^5 cell/well,后接种于 24 孔板中,将 survivin-wt 质粒与 miR-335 mimic 或 NC 共转染至乳腺癌细胞系 MCF-7,将 survivin-Mut 质粒与 miR-335 mimic 或 NC 共转染至乳腺癌细胞系 MCF-7,每组设 3 个复孔,将细胞置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h;采用双荧光素酶活性检测试剂盒检测细胞荧光素酶活性,以海肾质粒荧光值作为内参。

1.3.4 MTT 法检测细胞增殖 收集对数生长期的乳腺癌细胞系 MCF-7,按方法 1.3.2 对细胞进行分组并转染,转染结束后每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μ L,37℃、5% CO₂ 培养箱继续 4 h;利用 MTT 法检测 HSC 增殖活性,即培养结束后,800 r/min 离心 10 min,弃上清液,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μ L,继续置于 37℃、5% CO₂ 培养箱 4 h 进行显色实验,后吸弃孔内培养上清液,每孔加入 100 μ L DMSO 终止显色,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,采用全自动酶标仪测定 A_{490nm} 吸光值。

1.3.5 Real-time PCR 检测 miR-335 表达 采集经处理后的乳腺癌细胞系 MCF-7、乳腺癌组织标本及癌旁组织样本,参照 Trizol 试剂盒说明书提取细胞或组织中的总 RNA,利用反转录试剂盒逆转录总 RNA 至 cDNA,取逆转录产物加入 SYBR Green 法行 RT-PCR。miR-335 以 U6 为内参,miR-335 相对表达量为 miR-335 与 U6 拷贝数比值。miR-335 序列(5'-3'):上游 5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC G-3';下游 5'-AGG TAT TCG CAC TGG ATA CGA CA-3'。U6 序列(5'-3'):上游 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3';下游 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

1.3.6 Western blot 法检测 survivin 蛋白表达 采集经处理后的乳腺癌细胞系 MCF-7、乳腺癌组织标本及癌旁组织样本,常规提取蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒检测样品蛋白浓度,取适量样品行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转至硝酸纤维膜,5%封闭液 4℃封闭 4 h,后依次加入一抗(1:2 000)、二抗(1:500)孵育,按 ECL 试剂盒说明书行电化学发光检测。

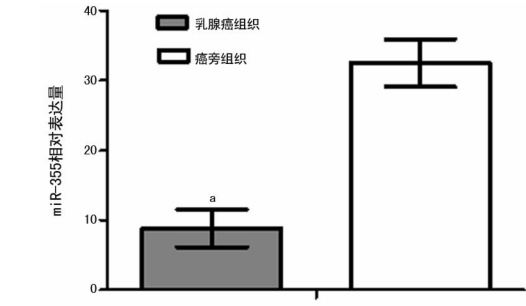
1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件对研究数据进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差检验,两两间比较用独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

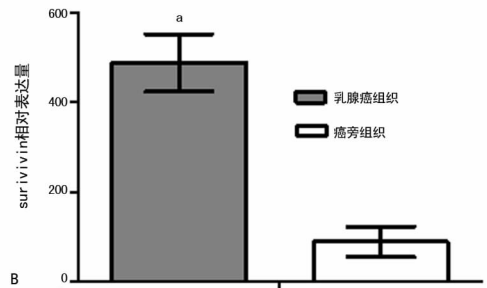
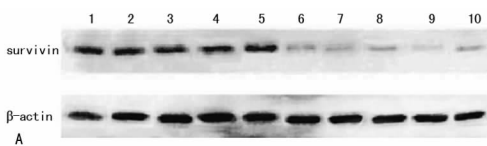
2.1 乳腺癌组织、癌旁正常组织中 miR-335、survivin 表达及相关性 RT-PCR 结果显示,与癌旁正常组织相比较,乳腺癌组织中 miR-335 表达显著降低($P < 0.05$),见图 1。Western blot 结果显示,与癌旁正常组织相比较,乳腺癌组织中 survivin 蛋白表达显著增高($P < 0.05$),见图 2。Pearson 相关性分析结果显示,乳腺癌组织中 miR-335 与 survivin 蛋白表达水平呈负相关($r = -0.327, P = 0.014$)。

2.2 转染 miR-335 mimic 对乳腺癌细胞 MCF-7 中 miR-335、survivin 表达的影响 RT-PCR 结果显示,与转染 mimic 对照组相比较,转染 miR-335 mimic 可使乳腺癌细胞 MCF-7 中

miR-335 表达显著上调 ($P < 0.05$), 见图 3。Western blot 结果显示, 与转染 mimic 对照组相比较, 转染 miR-335 mimic 可使乳腺癌细胞 MCF-7 中 survivin 表达显著下调 ($P < 0.05$), 见图 4。

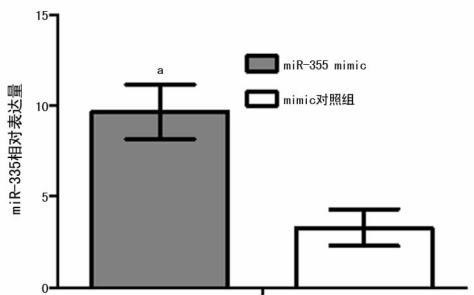


a: $P < 0.05$, 与癌旁组织相比较。
图 1 乳腺癌组织及癌旁正常组织中 miR-335 表达



1~5: 乳腺癌组织; 6~10: 癌旁正常组织; A: Western blot 蛋白条带; B: 蛋白定量分析结果; a: $P < 0.05$, 与癌旁组织相比较。

图 2 乳腺癌组织及癌旁组织中 survivin 蛋白表达

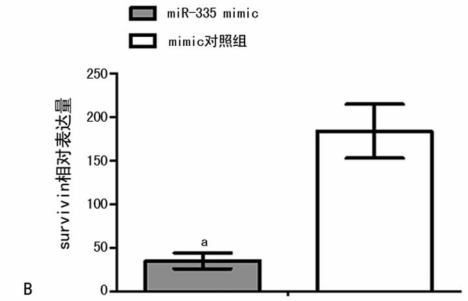
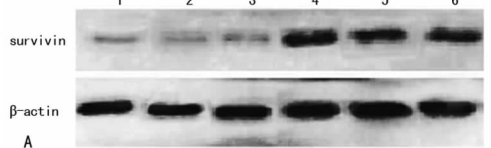


a: $P < 0.05$, 与 mimic 对照组相比较。
图 3 转染 miR-335 mimic 对乳腺癌细胞 MCF-7 中 miR-335 表达的影响

2.3 miR-335 对 survivin 3'-UTR 的靶向作用 双荧光素酶活性检测结果显示, 共转染 miR-335 mimic 与 survivin 3'-UTR 野生质粒后, 乳腺癌细胞 MCF-7 荧光素酶活性较 NC 组显著降低 ($P < 0.05$); 共转染 miR-335 mimic 与 survivin 3'-UTR 突变质粒后, 乳腺癌细胞 MCF-7 荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 5。

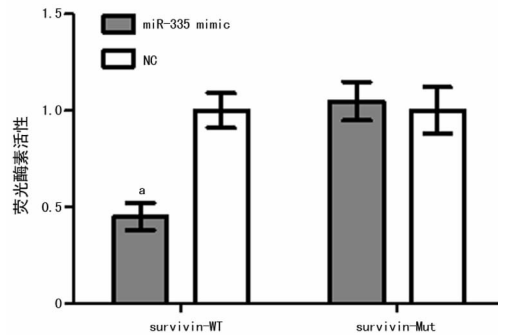
2.4 转染 miR-335 mimic、survivin 乳腺癌细胞 MCF-7 增殖活性的影响 MTT 法检测结果显示, 转染 miR-335 mimic 24 h、48 h 及 72 h 后, 乳腺癌细胞 MCF-7 增殖活性较转染 mimic 对

照组显著降低 ($P < 0.05$); 而共转染 miR-335 mimic、survivin 后, 乳腺癌细胞 MCF-7 增殖活性较单纯转染 miR-335 mimic 显著提高 ($P < 0.05$), 但仍显著低于转染 mimic 对照组 ($P < 0.05$), 见图 6。



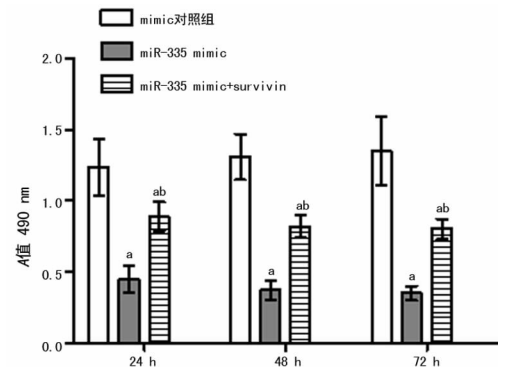
1~5: 转染 miR-335 mimic; 6~10: 转染 mimic 对照组; A: Western blot 蛋白条带; B: 蛋白定量分析结果; a: $P < 0.05$, 与 mimic 对照组相比较。

图 4 转染 miR-335 mimic 对乳腺癌细胞 MCF-7 中 survivin 蛋白表达的影响



a: $P < 0.05$, 与 NC 组相比较。

图 5 双荧光素酶报告基因检测乳腺癌细胞 MCF-7 中 miR-335



a: $P < 0.05$, 与 mimic 对照组相比较; b: $P < 0.05$, 与 miR-335 mimic 组相比较。

图 6 转染 miR-335 mimic、survivin 对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖活性的影响

3 讨论

既往研究表明, miRNA 参与了众多病理生理过程, 尤其是

通过发挥类似抑癌或促癌基因的作用,参与恶性肿瘤的发生、发展过程^[7]。miR-335 已被证实多种恶性肿瘤中差异表达。但不同恶性肿瘤中 miR-335 表达趋势并不相同。王鹤等^[8]研究证实,miR-335 在非小细胞肺癌组织中呈现高表达状态,而抑制 miR-335 表达可起到抑制非小细胞肺癌细胞 SPCA-1 迁移、侵袭及增殖能力的作用,提示 miR-335 在非小细胞肺癌中发挥类似促癌基因功能。而王勇等^[9]研究发现,miR-335 在骨肉瘤组织中呈现低表达,并可通过靶向 rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(ROCK1)发挥类似抑癌基因功能。本研究结果显示,乳腺癌中 miR-335 表达显著低于癌旁组织($P < 0.05$);而转染 miR-335 mimic 可使乳腺癌细胞 MCF-7 中 miR-335 表达上调,并对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖活性起到一定程度的抑制作用,提示 miR-335 在乳腺癌的进展过程中发挥着类似抑癌基因的功能^[10]。

生存素属于凋亡抑制蛋白家族成员,是目前已知的活性最强的抗凋亡因子,其在恶性肿瘤的增殖、凋亡过程中发挥至关重要的作用。生存素高表达在食管癌、胰腺癌等多种恶性肿瘤组织中已得到证实^[11-12]。生物信息学基因组预测提示:生存素可能是 miRNA-335 的靶向基因之一。但 miRNA-335 是否可通过靶向生存素参与乳腺癌细胞增殖及凋亡过程尚未可知。本研究结果显示,乳腺癌组织中生存素蛋白表达显著高于癌旁组织($P < 0.05$),而转染 miR-335 mimic 可使 MCF-7 中生存素蛋白表达得到显著抑制,提示乳腺癌中 miR-335 表达与生存素蛋白表达存在一定相关性,而这种相关性很可能是由 miR-335 负向调控生存素所致^[13]。双荧光素酶报告基因检测结果显示,共转染 miR-335 mimic 与 survivin-WT 可使乳腺癌细胞荧光酶活性降低,而共转染 miR-335 mimic 与 survivin-Mut 则对乳腺癌细胞荧光酶活性无影响,提示 miR-335 可特异性与 survivin 3'-UTR 结合,进而为 miR-335 靶向生存素提供有力佐证。MTT 法检测结果证实,单纯转染 miR-335 可显著抑制 MCF-7 增殖,而共转染 miR-335 及生存素可实现 miR-335 对 MCF-7 增殖抑制作用的部分逆转,提示 miR-335 靶向生存素是调控 MCF-7 增殖活性的重要机制。但值得注意的是,转染生存素并无法完全逆转 miR-335 对 MCF-7 增殖的抑制,分析其原因可能与 miR-335 靶基因众多有关。目前已知的 miR-335 靶基因包括 Sp1、ROCK1、HER3 等,而 miR-335 靶向生存素可能仅是 miR-335 调控乳腺癌增殖的其中一个机制^[14-15]。

综上所述,miR-335 可通过靶向生存素参与乳腺癌细胞增殖过程;此外,miR-335 还可能通过靶向其他下游基因参与乳腺癌的发生与发展。

参考文献

[1] Kwong A, Mang OK, Tam AP, et al. Abstract P3-07-32: breast cancer in Hong Kong, southern China; the population-based, ten-year analysis of epidemiological characteristics, stage-specific, cancer-specific, & disease-free survival in breast cancer patients; 1997-2006 [J]. *Cancer Res*,

2015, 75(9):P3-32.

[2] Buffa FM, Camps C, Winchester L, et al. microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17):5635-5645.

[3] Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(3):143-159.

[4] Gong M, Ma J, Guillemette R, et al. miR-335 inhibits small cell lung cancer bone metastases via IGF-IR and RANKL pathways [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(1):101-110.

[5] 伍家燕, 高月, 曾帆, 等. miR-335 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞生物学特性的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2015, 2(14):1406-1411.

[6] Yang B, Huang J, Liu H, et al. miR-335 directly, while miR-34a indirectly modulate survivin expression and regulate growth, apoptosis, and invasion of gastric cancer cells [J]. *Tumour Biol*, 2015, 1(29):1-9.

[7] Lim L, Balakrishnan A, Huskey N, et al. MicroRNA-494 within an oncogenic microRNA megacluster regulates G₁/S transition in liver tumorigenesis through suppression of mutated in colorectal cancer [J]. *Hepatology*, 2014, 59(1):202-215.

[8] 王鹤, 刘志利, 德伟, 等. microRNA-335 对人非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭及增殖能力的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 2(6):795-799.

[9] 王勇, 王科峰, 赵伟. miR-335 靶向 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1 抑制人骨肉瘤细胞 MG-63 侵袭转移的实验研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2014, 24(11):801-807.

[10] 熊思维, 伏雯, 钟唯德, 等. miR-335 表达失调对前列腺癌细胞株 LNCaP 生物学的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2013, 29(13):2086-2088.

[11] 李牧, 李安桂, 王玮. 生存素和 PEDF 蛋白在食管癌中的表达及临床意义 [J]. *重庆医学*, 2013, 1(1):31-32, 36.

[12] 尚培中, 王金, 马学柱, 等. 生存素在胰腺癌组织中的表达及其临床意义 [J]. *解放军医药杂志*, 2013, 3(3):47-49.

[13] 王勇, 王科峰, 赵伟. miR-335 及 ROCK1 在骨肉瘤中表达及相互关系研究 [J]. *重庆医学*, 2015, 44(16):2170-2173.

[14] 刘志洋, 刘伟伟, 贾萍, 等. 微小 RNA-335 通过靶定人类表皮生长因子 3 调控乳腺癌细胞的侵袭 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(5):954-958.

[15] 王勇, 赵伟. miR-335 靶向 Sp1 对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖的调控 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(8):1428-1432.