

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.06.017

## miR-630 对三阴性乳腺癌细胞侵袭的影响及其机制研究

石岩<sup>1,2</sup>, 秦岩<sup>3△</sup>, 宋磊<sup>4</sup>, 梁月勉<sup>5</sup>, 王小磊<sup>1</sup>, 韩贵良<sup>1</sup>

(1. 河北大学附属医院肿瘤内科, 河北保定 071000; 2. 河北省放化疗机制与规程研究重点实验室, 河北保定 071000; 3. 河北大学附属医院中心实验室, 河北保定 071000; 4. 河北大学附属医院中西医肿瘤科, 河北保定 071000; 5. 河北大学附属医院病理科, 河北保定 071000)

**[摘要]** **目的** 研究 miR-630 在人体三阴性乳腺癌组织中的表达情况, 探讨 miR-630 是否通过下调 Sox4 影响三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞的侵袭。**方法** 收集 157 例行乳腺癌根治术患者癌组织标本及癌旁正常乳腺组织, 其中三阴性乳腺癌 36 例, 通过实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测各组(正常乳腺组、非三阴性乳腺癌组、三阴性乳腺癌组)组织中与乳腺癌相关的 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达情况; 蛋白免疫印迹试验(Western blot)检测 3 组标本中细胞侵袭相关蛋白 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9 的表达情况; 进一步在细胞实验中, 通过转染 miR-630 mimic 或空质粒后, 再转染过表达 Sox4 的质粒或空质粒至离体培养的细胞中, Western blot 检测细胞中 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9、Sox4 的表达情况, 划痕实验和 Transwell 法观察细胞迁移侵袭情况, 利用荧光素酶实验验证 Sox4 是 miR-630 的靶基因。**结果** 相比于正常乳腺组, miR-630、miR-21 在三阴性乳腺癌组织中的表达降低( $P < 0.01$ ); miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达在 3 组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 相比于正常乳腺组及非三阴性乳腺癌组, 三阴性乳腺癌组织中 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9、Sox4 的表达增多( $P < 0.05$ )。在细胞实验中, 相比于空质粒组, 转染 miR-630 mimic 后, MDA-MB-231 细胞中 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9、Sox4 的表达减少( $P < 0.05$ ), MDA-MB-231 细胞的迁移侵袭能力减弱( $P < 0.01$ ); 荧光素酶实验结果显示, miR-630 能够显著降低 Sox4-3'-UTR 质粒的荧光素活性( $P < 0.05$ ); 相比于过表达 miR-630+空质粒组, 转染过表达 miR-630+过表达 Sox4 组, MDA-MB-231 细胞中 COL1A1、COL1A5、MMP-2 和 MMP-9 表达增加( $P < 0.05$ ), 细胞的迁移侵袭能力增强( $P < 0.01$ )。**结论** 在三阴性乳腺癌组织中, miR-630 低表达; miR-630 可以通过下调 Sox4 从而抑制 MDA-MB-231 的迁移和侵袭。

**[关键词]** 三阴性乳腺癌; 微 RNA630; Sox4; 肿瘤浸润

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)06-0773-04

## MiR-630 inhibits MDA-MB-231 cells migration and invasion by targeting Sox4 in triple-negative breast cancer

Shi Yan<sup>1,2</sup>, Qin Yan<sup>3△</sup>, Song Lei<sup>4</sup>, Liang Yuemian<sup>5</sup>, Wang Xiaolei<sup>1</sup>, Han Guiliang<sup>1</sup>

(1. Department of Medical Oncology Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 2. Key Laboratory for Fractionation Mechanisms and Procedures of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; 3. Department of Central Laboratory Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 4. Department of Oncology Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China; 5. Department of Pathology Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding, Hebei 071000, China)

**[Abstract]** **Objective** To verify whether miR-630 could inhibit MDA-MB-231 cells migration and invasion by targeting Sox4 in triple-negative breast cancer(TNBC). **Methods** Collection normal breast tissue and breast cancer tissue from patients undergoing breast cancer resection. RT-PCR were used to test the expression of miR-630, miR-21, miR-195, miR-134, miR-200a, miR-381 and miR-1228. Western blot were used to test the expression of COL1A1, COL1A5, MMP-2, MMP-9 and Sox4. In vitro experiment, after miR-630 was transfected into MDA-MB-231 cells, wound healing were employed to test the migratory ability of MDA-MB-231 cells, and transwell were used to test the invasion ability of MDA-MB-231 cells. Western blot were used to investigate the expressions of COL1A1, COL1A5, MMP-2, MMP-9 and Sox4 in MDA-MB-231 cell. Luciferase assay was used to confirmed whether Sox4-3'-UTR the target gene of miR-630. **Results** Compared with normal breast tissue, the expression of miR-630 was decreased( $P < 0.01$ ), meanwhile the expression of COL1A1, COL1A5, MMP-2, MMP-9 and Sox4 were significantly increased in the triple-negative breast cancer tissue( $P < 0.01$ ). In the vitro experiment, compared with the control group, the expression of COL1A1, COL1A5, MMP-2, MMP-9 and Sox4 were decreased in the miR-630 group ( $P < 0.05$ ); The migration activity of MDA-MB-231 cells was decreased in the miR-630 group ( $P < 0.01$ ); The Luciferase activity of the Sox4-3'-UTR plasmid was significantly suppressed by miR-630 ( $P < 0.05$ ); Over expression of Sox4 could reverse the effect of miR-630 on MDA-MB-231( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** In triple-negative breast cancer tissue, the expression of miR-630 decreased; miR-630 inhibits triple-negative breast cancer cells migration and invasion by targeting Sox4-3'-UTR.

**[Key words]** triple-negative breast cancer; microRNAs-630; sex determining region Y-box 4; neoplasm invasiveness

微小 RNA(micro RNA, miRNA)在肿瘤细胞的增殖和侵袭中具有重要的调控作用<sup>[1]</sup>, 其中乳腺癌领域热门的包括

miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228。Zhang 等<sup>[2]</sup>的研究发现 miR-21 在乳腺癌组织中表达增加,并可以通过下调 STAT3 从而参与乳腺癌的进展。O'Brien 等<sup>[3]</sup>通过检测乳腺癌患者血清中 miR-134 的表达情况,发现 miR-134 在乳腺癌患者血清中升高,并具有较好的敏感性和特异性,提示 miR-134 可作为乳腺癌诊断的一个指标<sup>[3]</sup>。最近国内研究发现 miR-138 和 miR-200a 都可以抑制乳腺癌细胞中 Cx-43 的表达。miR-630 已被证实是一种抑癌 miRNAs,可调节多种与肿瘤生长、转移、侵袭有关的抑癌基因或蛋白,从而发挥抑制肿瘤进展的作用<sup>[4]</sup>。但是目前为止这 7 种 miRNAs 在乳腺癌领域的研究都局限于细胞实验或人体非三阴性乳腺癌组织,在人体三阴性乳腺癌组织中的表达情况及作用尚未阐明。

Sox4 基因(SRY related high-mobile group box4)属于 Sox 基因家族中的 C 亚族,其编码的蛋白质通过高迁移率组蛋白(HMG)盒(high-mobility group DNA binding domain)与 DNA 结合,从而调控靶基因的转录活化或抑制,与干细胞的分化密切相关<sup>[5]</sup>。Sox4 已被证实参与多种肿瘤的发生发展,具有癌基因和抑癌基因双向调节功能<sup>[6]</sup>。最近的研究显示,抑制 Sox4 的表达可以抑制食管癌细胞、乳腺癌细胞、肺癌细胞、宫颈癌细胞等的增殖和侵袭<sup>[7]</sup>。本研究拟通过用 miR-630 干预三阴性乳腺癌细胞,探索 miR-630 是否是通过下调 Sox4 发挥对乳腺癌细胞迁移侵袭的抑制作用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2010—2014 年河北大学附属医院肿瘤科 157 例行乳腺癌根治术患者癌组织标本及癌旁正常乳腺组织,年龄 35~71 岁,平均(53.0±8.6)岁,样品采集后立即在液氮中保存。所有患者术前均未行任何放、化疗。术后病理诊断三阴性乳腺癌 36 例,非三阴性乳腺癌患者 121 例。本研究中患者均签署知情同意书,并由河北大学附属医院伦理委员会审核通过。

**1.2 实验试剂** 三阴性乳腺癌细胞株 MDA-MB-231(上海拜力生物公司);DMEM 培养液、胰蛋白酶(Sigma 公司);胎牛血清(Gibco 公司);限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶,RNA 提取试剂(Invitrogen 公司);Takara 逆转录试剂盒(大连宝生物公司);SYBR Green 荧光染料试剂盒(Roche 公司);无内毒素质粒小、大提取试剂盒,兔或鼠抗人 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9、Sox4、 $\beta$ -actin、GAPDH 多克隆抗体(Abcam 公司);脂质体 2000(上海英骏公司);4',6'-二甲基-2-苯基吡啶(DAPI,Roche 公司);噻唑蓝(MTT,Emresco 公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或者抗鼠二抗、FITC 标记的山羊抗兔 IgG(Jackson 公司);Western bolt 相关试剂(江苏碧云天生物技术研究所)。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验分组** 手术取下的组织根据病理结果分为正常乳腺组( $n=70$ )、非三阴性乳腺癌组( $n=121$ )、三阴性乳腺癌组( $n=36$ );细胞实验中,在 miR-630 mimic 转染 MDA-MB-231 细胞后,将细胞分为空白对照组、过表达 miR-630 组和空质粒组 3 组;最后在用过表达 Sox4 的质粒转染 MDA-MB-231 细胞后,将细胞分为过表达 miR-630 组、过表达 miR-630+过表达 Sox4 组、过表达 miR-630+空质粒组。

**1.3.2 荧光定量 RT-PCR 检测基因表达** 提取组织或细胞中总 RNA,将提取的 RNA 进行逆转录成 cDNA,反应体系为 20  $\mu$ L,反应条件为:16  $^{\circ}$ C 30 min,45  $^{\circ}$ C 30 min,85  $^{\circ}$ C 5 min。

运用 SYBR Green 法检测 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达情况,运用的反应条件为:94  $^{\circ}$ C 15 min;94  $^{\circ}$ C 30 s;60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,共循环 40 次;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 8 min。每组样品重复 3 次,实验重复 3 次,统计分析各标本中 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达。

**1.3.3 Western blot 检测蛋白表达量** 提取组织或细胞中总蛋白,BCA 法定量蛋白,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶每孔加入 30  $\mu$ L 的样品,70 V 30 min 进行蛋白浓缩,100 V 2 h 进行蛋白电泳,并用孔径 0.45  $\mu$ m 的聚偏氯乙烯(PVDF)膜 250 mA 90 min 进行转膜。转膜后常温下 TBST 洗膜 3 次,封闭 1 h 后,以 1:1 000 浓度加入兔(鼠)抗人一抗(抗 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9、Sox4、 $\beta$ -actin、GAPDH 一抗),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,常温下 TBST 洗膜 3 次,辣根过氧化物酶标记羊抗兔(鼠)二抗孵育后 ECL 化学发光法检测。柯达胶片暗室显影,Quantity one 软件分析。

**1.3.4 转染细胞株 过表达质粒的构建:**miR-630 mimic 由上海吉玛公司设计合成,miR-630-mimic 序列为,上游引物:5'-AGU AUU CUG UAC CAG GGA AGG U-3',下游引物:3'-AC CUU CCC UGG UAC AGA AUA CU-5'<sup>[8]</sup>。Sox4 过表达质粒由上海吉玛公司设计合成,通过 Pubmed 查找 Sox4 基因的序列,引物根据 Genebank 中 Sox4 mRNA 序列设计引物。其上游引物:5'-CTT GAC ATG ATT AGC TGG CAT GATT -3';下游引物:5'-CCT GTG CAA TAT GCC GTG TAG A-3'。Sox4 基因和质粒 DNA 连接后,筛选重组质粒,测序验证。转染:将 MDA-MB-231 细胞系接种至 6 孔板,生长至 50%~70%密度时,以脂质体 2000 分别转染 miR-630 mimic 或对应的空质粒(mimic-对照);Sox4 过表达质粒或空质粒,各 100 pmol,24 h 后,提取总 RNA/蛋白后,PCR/Western blot 鉴定转染效率,进行后续实验。

**1.3.5 细胞划痕实验测 MDA-MB-231 细胞迁移** MDA-MB-231 细胞先用 1.8 mmol/L 羟基胍作用 12 h 以抑制细胞增殖,100  $\mu$ L 枪头垂直孔板制造细胞划痕,弃细胞培养液,PBS 冲洗孔板 3 次。培养细胞,拍照记录 0、12、24、48、72 h 图片,用 Image pro plus6.0 软件分析计算细胞迁移面积,以迁移面积和原划痕面积比值表示各组 MDA-MB-231 相对迁移面积的多少。

**1.3.6 Transwell 法检测细胞侵袭** MDA-MB-231 细胞先用血清饥饿使细胞同步化,1.8 mmol/L 羟基胍作用 12 h 用以抑制细胞增殖,用 0.25%胰蛋白酶消化 MDA-MB-231 细胞后,用 DMEM 培养基(1%血清)配成细胞悬液并计数( $5 \times 10^4$  个/mL)。各组 24 孔板配套 Transwell 小室(0.8  $\mu$ m)上室加入 200  $\mu$ L 的细胞悬液,下室加入含有 10%FBS 的培养液 500  $\mu$ L,分别培养 4、8、12、24、48 h。以棉签擦去上层未穿透膜的 MDA-MB-231 细胞,取下 Transwell 半透膜,PBS 洗 3 次,用 3.7%多聚甲醛室温固定 5 min,再 PBS 清洗 3 次,用 2  $\mu$ g/mL 的 6DAPI 染核,PBS 清洗 3 次,荧光显微镜每组取 5 个视野观察计数并记录穿膜细胞数。

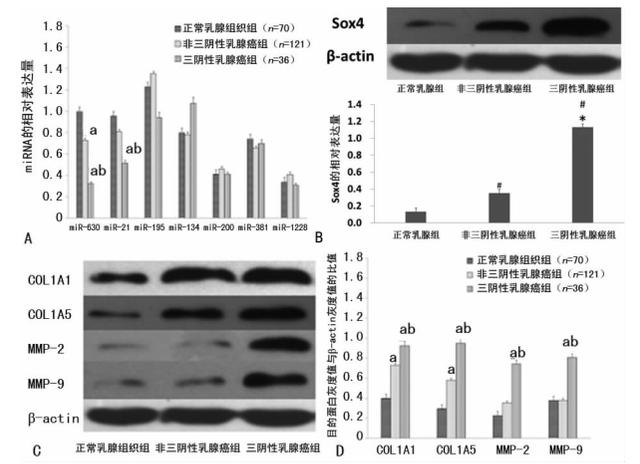
**1.3.7 荧光素酶实验** 设计合成 Sox4-3'-UTR 的序列及突变序列,以 Sox4 质粒为载体,分别构建能够表达荧光素酶的包含 Sox4-3'-UTR 和 Sox4-3'-UTR 突变序列的质粒,然后将 MDA-MB-231 细胞系按每孔  $1 \times 10^5$  个接种至 24 孔板,24 h 后以脂质体 2000 共转染 200 ng 包含 Sox4-3'-UTR 或 Sox4-3'-UTR 突变序列的荧光素酶质粒和 80 ng 海肾荧光质粒及 60 pmol miR-630-mimic 或对照,48 h 后用荧光检测仪检测荧

光强度,海肾荧光作为内参照,每组实验重复 3 次。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件统计分析数据。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组均数间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA,多组均数比较用 LSD 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 乳腺癌相关的 miRs 和蛋白质在三阴性乳腺癌组织、非三阴性乳腺癌组织和正常乳腺组织中的表达** 实时荧光定量 PCR 检测 3 组中 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达情况,结果发现相对正常乳腺组,三阴性乳腺癌组、非三阴性乳腺癌组织中 miR-630 的表达降低( $P < 0.05$ );相比于非三阴性乳腺癌组,三阴性乳腺癌组中 miR-630、miR-21 的表达减少( $P < 0.01$ )。miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达量在两组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。Western blot 检测结果显示,相比于正常乳腺组织,非三阴性乳腺癌组中 COL1A1、COL1A5、Sox4 的表达增加( $P < 0.01$ );三阴性乳腺癌组中 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9、Sox4 表达增多( $P < 0.01$ )。相比于非三阴性乳腺癌组,三阴性乳腺癌组中 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9、Sox4 表达增多( $P < 0.01$ )。见图 1。



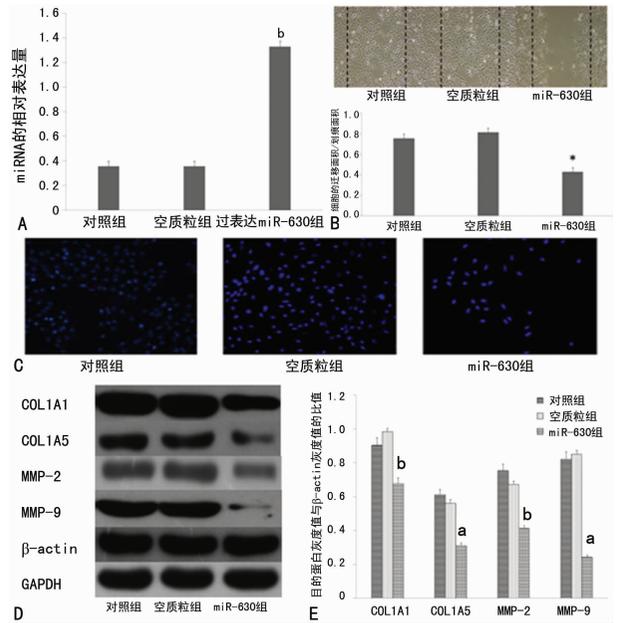
A: 7 个基因 RNA 分析图; B: Sox4 mRNA 电泳图; C: 各蛋白 Western blot 图; D: 各蛋白表达分析图; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与正常乳腺组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与非三阴性乳腺癌组比较。

**图 1 各组乳腺组织中乳腺癌相关的 miRs 和细胞侵袭相关蛋白的表达情况**

**2.2 miR-630 对 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移的影响** miR-630 mimic 转染 MDA-MB-231 细胞后,实时荧光定量 PCR 检测结果发现过表达 miR-630 组中 miR-630 的表达较对照组和空质粒组明显升高( $P < 0.01$ ),图 2A。miR-630 mimic 转染 MDA-MB-231 细胞后,相比于对照组和空质粒组,过表达 miR-630 组中 MDA-MB-231 的迁移减弱( $P < 0.01$ ),图 2B;侵袭能力降低( $P < 0.01$ ),图 2C。Western blot 检测发现,相比于对照组和空质粒组,过表达 miR-630 组 MDA-MB-231 细胞中 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9 细胞侵袭迁移相关蛋白表达减少( $P < 0.01$ ,图 2D、E)。

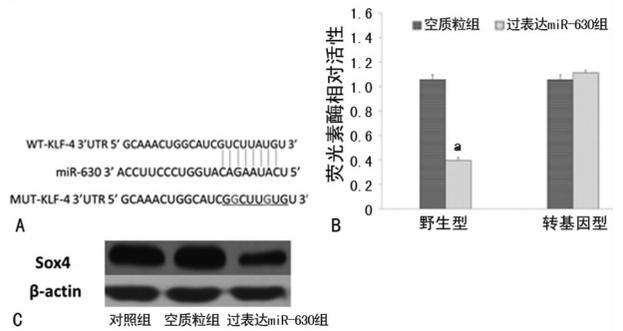
**2.3 miR-630 通过识别 3'-UTR 抑制 Sox4 的表达** 分别构建包含 Sox4-3'-UTR 和其突变序列的荧光素酶质粒(图 3A),与 miR-630 mimic 或者空质粒对照共转 MDA-MB-231 细胞,培养 24 h 后,检测各组细胞荧光素酶活性。结果显示,miR-630 mimic+WT-Sox4-3'-UTR 组荧光素酶活性显著低于空质

粒+WT-Sox4-3'-UTR 组( $P < 0.01$ ),见图 3B。Western blot 检测结果显示,相比于对照组和空质粒组,miR-630 组 MDA-MB-231 细胞中 Sox4 的表达明显降低( $P < 0.01$ ),见图 3C。



A: 各组细胞中 miR-630 的相对表达分析图; B: 干预 48 h 后各组细胞的迁移能力分析; C: 干预 24 h 后各组细胞侵袭能力分析; D: 各组细胞中肿瘤侵袭相关蛋白 Western blot 图; E: Western blot 分析图。<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与空质粒组,对照组比较。

**图 2 miR-630 抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭和迁移**

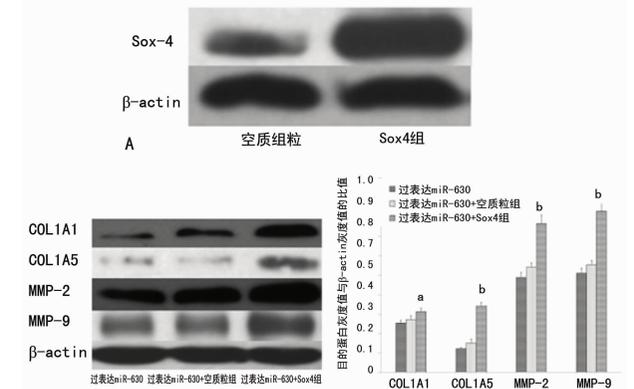


A: miR-630 与 Sox4 序列作用图; B: 荧光酶素分析图; C: 各组 Sox4 Western blot 图; D: Western blot 分析图。<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与空质粒组比较。

**图 3 miR-MDA-MB-231 通过识别 3'-UTR 抑制 Sox4 的表达**

**2.4 过表达 Sox4 可以逆转 miR-630 抑制 MDA-MB-231 细胞侵袭的作用** 过表达 Sox4 的质粒转染 MDA-MB-231 细胞后(Sox4 组),相比于空质粒组,Sox4 组 MDA-MB-231 细胞中 Sox4 的表达增加( $P < 0.01$ ),见图 4A;Western blot 检测发现,相比于过表达 miR-630 组和过表达 miR-630+空质粒组,过表达 miR-630+过表达 Sox4 组 MDA-MB-231 细胞中 COL1A1、COL1A5、MMP-2、MMP-9 细胞侵袭迁移相关蛋白表达增加( $P < 0.01$ ,图 4C、D)。相比于过表达 miR-630 组和过表达

miR-630+空质粒组,过表达 miR-630+过表达 Sox4 组中 MDA-MB-231 的迁移增加( $P<0.01$ ),见图 5。



A:转染 Sox4 过表达质粒后,MDA-MB-231 中 Sox4 表达增强;B:各组细胞中肿瘤侵袭相关蛋白 Western blot 图;C:Western blot 分析图。<sup>a</sup>: $P<0.05$ ; <sup>b</sup>: $P<0.01$ ,与 miR-630+空质粒组,miR-630 组比较。

图 4 过表达 Sox4 增加 MDA-MB-231 细胞的侵袭和迁移

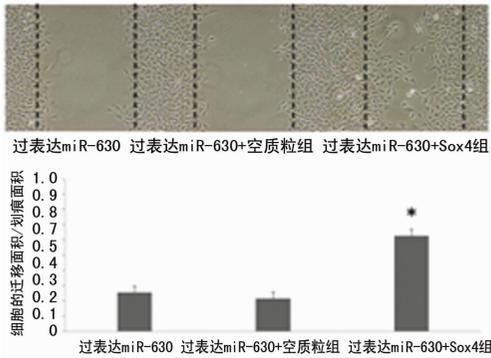


图 5 干预 48 h 后各组细胞的迁移能力分析

### 3 讨论

侵袭转移是恶性肿瘤的基本生物学特征,不仅与肿瘤细胞的侵袭性增强、黏附能力下降有关,还与肿瘤的血管生成、细胞外基质的降解及间质重构等密切相关<sup>[8-9]</sup>。因此,抑制肿瘤细胞侵袭迁移对临床治疗肿瘤有重要意义。

miRNAs 是一类进化上高度保守的非编码小分子单链 RNA,越来越多的证据显示 miRNAs 参与了对肿瘤细胞迁移侵袭和细胞表型的调控。miR-630 是一种抑癌 miRNAs,可调节多种与肿瘤生长、侵袭、转移调节有关的抑癌基因或蛋白,从而调控多种肿瘤的发生发展。Shu 等<sup>[10]</sup>通过检测 236 例未行放疗化疗的胃癌患者胃癌组织和癌旁正常胃组织中 miR-630 的表达情况,发现 miR-630 在胃癌组织中表达降低,并进一步通过对这些病例的随访发现 miR-630 的表达与胃癌患者的预后相关。最近的研究又发现 miR-630 在结肠癌和肝癌的发展中具有重要的作用。另外,Song 等<sup>[11]</sup>的研究发现 miR-630 可以通过靶向抑制 LMO3 从而参与调节肺癌细胞的增殖与恶化;与上述研究结果相符,笔者通过检测 157 例行乳腺癌根治术患者癌组织标本及癌旁正常乳腺组织中 7 种与乳腺癌相关的 miRNAs 的表达,发现在三阴性乳腺癌组织中 miR-630 的表达明显降低,在之后的离体实验中笔者进一步证实 miR-630 可以抑制与肿瘤细胞侵袭相关的蛋白 COL1A11、COL1A5、MMP-2、MMP-9 的表达,抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移侵袭。

Sox4 基因属于 Sox C 亚族,主要表达于胚胎发育过程中

的中枢神经系统、心脏和胸腺,此外,Sox4 还在干细胞中高表达,对干细胞的稳定具有重要作用。因此,Sox4 基因的突变、缺失或过表达不仅会引起先天性疾病的发生,而且与肿瘤的发生发展密切相关。过去的研究结果显示,在多种肿瘤组织中 Sox4 基因表达增加。之后 Wang 等<sup>[12]</sup>的研究都发现 Sox 基因的表达与肿瘤患者预后相关,Sox4 可以作为肿瘤治疗的一个靶向位点。此外,还有研究发现 miR-211 可以通过靶向抑制 Sox4 的表达从而抑制胃癌细胞的增殖和迁移;与此同时,Jin 等<sup>[13]</sup>的研究结果也显示 miR-388 可以通过下调 Sox4 的表达,抑制乳腺癌细胞的侵袭。与上述实验结果相符,本研究发现相比于正常乳腺组织,Sox4 在乳腺癌组织中的表达增加。而且,相比于非三阴性乳腺癌组织,三阴性乳腺癌组织中 Sox4 的表达进一步升高。在用 miR-630 mimic 干预 MDA-MB-231 细胞后,细胞中 Sox4 的表达减少。之后本研究通过荧光素酶实验发现 miR-630 可以与 Sox4 的 3'-UTR 靶向结合,从而减少 Sox4 的表达。鉴于 Sox4 在肿瘤细胞侵袭中的重要性,进一步用 Sox4 过表达质粒转染 MDA-MB-231 细胞,发现 Sox4 过表达质粒的转染可以逆转 miR-630 抑制 MDA-MB-231 侵袭的作用,最终证实 miR-630 是通过下调 Sox4 的表达,从而发挥抑制 MDA-MB-231 细胞侵袭的作用。

本实验通过 RT-PCR 检测正常乳腺组织、非三阴性乳腺癌组织及三阴性乳腺癌组织中 miR-630、miR-21、miR-195、miR-134、miR-200a、miR-381、miR-1228 的表达情况,发现 miR-630 在三阴性乳腺癌中表达减少、Sox4 在三阴性乳腺癌组织中表达增加。之后在离体实验中证实 miR-630 可以抑制 MDA-MB-231 细胞的侵袭迁移,并进一步通过荧光素酶和转染过表达 Sox 质粒的方法证明其机制是通过靶向抑制 Sox4 的表达,为三阴性乳腺癌的治疗提供新的思路。

### 参考文献

- [1] Song JH, Meltzer SJ. MicroRNAs in pathogenesis, diagnosis, and treatment of gastroesophageal cancers[J]. Gastroenterology, 2012, 143(1): 35-47.
- [2] Zhang C, Liu K, Li T, et al. miR-21: A gene of dual regulation in breast cancer[J]. Int J Oncol, 2016, 48(1): 161-172.
- [3] O'Brien K, Lowry MC, Corcoran C, et al. miR-134 in extracellular vesicles reduces triple-negative breast cancer aggression and increases drug sensitivity[J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 32774-32789.
- [4] 周伙想,王辰龙,于安路,等. miR-630 通过靶向 MTDH 抑制乳腺癌进程[J]. 中国病理生理杂志, 2015, (10): 1848.
- [5] Foronda M, Morgado-Palacin L, Gomez-Lopez G, et al. Profiling of Sox4-dependent transcriptome in skin links tumour suppression and adult stem cell activation[J]. Genom Data, 2015, 6: 21-24.
- [6] Yoon TM, Kim SA, Cho WS, et al. Sox4 expression is associated with treatment failure and chemoradioresistance in oral squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 888-891.
- [7] Li Y, Zu L, Wang Y, et al. miR-132 inhibits lung cancer cell migration and invasion by targeting Sox4[J]. J Thorac Dis, 2015, 7(9): 1563-1569.
- [8] Li S, Qin X, Li Y, et al. MiR-133a suppresses the migration and invasion of esophageal cancer (下转第 779 页)

### 3 讨 论

YB-1 蛋白是一种冷休克蛋白<sup>[11]</sup>, 其主要在转录和翻译水平控制基因的表达<sup>[12]</sup>。它在多种恶性肿瘤中存在高表达, 且研究发现<sup>[13-14]</sup>, YB-1 蛋白还可以与抑癌基因 P53 蛋白结合, 抑制 P53 启动子转录, 从而降低 P53 活性, 因此被认为是一种原癌基因。

本研究结果显示: YB-1 蛋白的阳性表达主要集中在细胞核。在慢性宫颈炎组织中无表达, 在 CIN I 级组、CIN II ~ III 级组、SCC 组中阳性表达呈逐渐增高趋势, 而 SCC 组中 YB-1 蛋白阳性表达明显高于慢性宫颈炎组、CIN I 级组、CIN II ~ III 级组 ( $P < 0.05$ ), 说明 YB-1 蛋白在癌组织中高表达, 而在非癌组织中低表达, 这与其他学者的报道类似<sup>[15]</sup>, 表明 YB-1 蛋白的表达随宫颈病变程度加重而增加。探讨其原因, 可能与其激活信号传导通路, 促进细胞增殖, 影响细胞凋亡有关。同时研究发现, YB-1 阳性表达与 SCC 临床病理学特征差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 虽在 II 期的表达强于 I 期, 在深肌层和全层浸润组的表达强于浅肌层浸润, 但差异并无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 这与刘小满等<sup>[15]</sup>的研究结果不尽一致, 原因可能在于: (1) 肿瘤组织的特异性; (2) 样本量的限制。因此尚不能认为 YB-1 在 SCC 中的表达与上述病理因素无关, 具体原因可待进一步的研究后再明确。

综上所述, YB-1 蛋白在宫颈癌的发生发展过程中具有一定的促进作用, 可能作为一种新的评估癌症的生物标记物。但能否通过对 YB-1 蛋白的检测, 推测宫颈癌患者的预后, 有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 李霓, 郑荣寿, 张思维, 等. 2003-2007 年中国宫颈癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2012, 21(11): 801-804.
- [2] 应倩, 夏庆民, 邢豫明, 等. 中国 2009 年宫颈癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2013, 22(8): 612-616.
- [3] Shibao K, Takano H, Nakayama Y, et al. Enhanced co-expression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas[J]. Int J Cancer, 1999, 83(6): 732-737.
- [4] Yu YN, Yip GW, Tan PH, et al. Y-box binding protein 1 is up-regulated in proliferative breast cancer and its inhibition deregulates the cell cycle[J]. International Journal of Oncology, 2010, 37(2): 483-492.
- [5] Didier DK, Schiffenbauer J, Woulfe SL, et al. Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the ma-

tor histocompatibility complex class II Y box[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(19): 7322-7326.

- [6] Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-kappa B as the matchmaker[J]. Nature Immunology, 2011, 12(8): 715-723.
- [7] Lasham A, Lindridge E, Rudert F, et al. Regulation of the human fas promoter by YB-1, Pur alpha and AP-1 transcription factors[J]. Gene, 2000, 252(1/2): 1-13.
- [8] Evdokimova V, Tognon C, Ng T, et al. Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition[J]. Cancer Cell, 2009, 15(5): 402-415.
- [9] Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, et al. Twist1 and Y-box-binding protein-1 promote malignant potential in bladder cancer cell[J]. BJU Int, 2011, 108(2 Pt 2): E142-149.
- [10] Bargou RC, Jurchott K, Wagener C et al. Nuclear localization and increased levels of Transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression[J]. Nat Med, 1997, 3(4): 447-450.
- [11] Grant CE, Deeley RG. Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver[J]. Mol Cell Biol, 1993, 13(7): 4186-4196.
- [12] De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16: 17-27.
- [13] Lasham A, Samuel W, Cao H, et al. YB-1, the E2F pathway, and regulation of tumor cell growth[J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(2): 133.
- [14] Schitteck B, Psenner K, Sauer B, et al. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance [J]. Int J Cancer, 2007, 120(10): 2110.
- [15] 刘小满, 谭志军. YB-1 蛋白在结肠癌组织中的表达部位及意义[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2014, 2(2): 127-130.

(收稿日期: 2016-10-26 修回日期: 2016-11-28)

(上接第 776 页)

- cells by targeting the EMT regulator Sox4[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(8): 1390-1403.
- [9] Hanieh H. Aryl hydrocarbon receptor-microRNA-212/132 axis in human breast cancer suppresses metastasis by targeting Sox4[J]. Mol Cancer, 2015, 14: 172-182.
- [10] Sun R, Jiang B, Qi H, et al. Sox4 contributes to the progression of cervical cancer and the resistance to the chemotherapeutic drug through ABCG2[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(1): 16-20, 37-40.
- [11] Song YF, Hong JF, Liu DL, et al. miR-630 targets LMO3

to regulate cell growth and metastasis in lung cancer[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(7): 1271-1279.

- [12] Wang CY, Hua L, Sun J, et al. MiR-211 inhibits cell proliferation and invasion of gastric cancer by down-regulating Sox4[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 14013-14020.
- [13] Jin Y, Zhao M, Xie Q, et al. MicroRNA-338-3p functions as tumor suppressor in breast cancer by targeting Sox4[J]. Int J Oncol, 2015, 47(4): 1594-1602.

(收稿日期: 2016-10-28 修回日期: 2016-11-26)