

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.14.004

## miR-204 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生物学特性的影响\*

吴刘成<sup>1,2</sup>,杜莉莉<sup>1</sup>,王静<sup>1</sup>,殷海琳<sup>1</sup>,马超<sup>1</sup>,蒋茂荣<sup>2</sup>,邵义祥<sup>2△</sup>

(1 南通大学杏林学院,江苏南通 226009;2 南通大学实验动物中心,江苏南通 226001)

**[摘要]** **目的** 研究 microRNA-204(miR-204)对乳腺癌细胞生物学特性的影响。**方法** 在人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中转染 miR-204 模拟物和抑制剂后 48 h,实时荧光 PCR(Real-time PCR)检测细胞中 miR-204 表达变化。流式细胞仪分析 miR-204 对 MDA-MB-231 细胞增殖、凋亡的影响。采用 Transwell 迁移小室分析法检测 miR-204 对 MDA-MB-231 细胞迁移的影响。**结果** 实时荧光 PCR 分析:miR-204 模拟物和抑制剂效果显著,与正常对照比较差异有统计学意义( $P<0.01$ );流式细胞仪分析:与正常对照相比,miR-204 模拟物组 G<sub>1</sub> 期细胞数目明显减少( $P<0.01$ ),G<sub>2</sub>/M 期细胞数目明显增多( $P<0.01$ ),而 miR-204 抑制剂的作用则相反,G<sub>1</sub> 期细胞数目明显增多( $P<0.01$ ),G<sub>2</sub>/M 期细胞数目明显减少( $P<0.01$ );miR-204 模拟物组明显促进细胞凋亡( $P<0.01$ ),而抑制剂组明显抑制细胞凋亡( $P<0.01$ )。Transwell 迁移小室分析:miR-204 模拟物组穿过 Transwell 迁移小室的细胞明显减少( $P<0.01$ ),而抑制剂组则相反,细胞数目明显增多( $P<0.01$ )。**结论** miR-204 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞具有负调控作用,能够抑制乳腺癌细胞增殖和迁移,促进癌细胞凋亡。

**[关键词]** 乳腺肿瘤;细胞凋亡;微 RNAs;miR-204;MDA-MB-231;细胞生物学特性**[中图分类号]** Q291**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)14-1881-04

## Effect of miR-204 in cell biological characteristics of breast cancer MDA-MB-231 cell\*

Wu Liucheng<sup>1,2</sup>, Du Lili<sup>1</sup>, Wang Jing<sup>1</sup>, Yin Hailin<sup>1</sup>, Ma Chao<sup>1</sup>, Jiang Maorong<sup>2</sup>, Shao Yixiang<sup>2△</sup>

(1. Xinglin College, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226009, China; 2. Laboratory Animals Centre, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of microRNA-204 (miR-204) on the biological characteristics of breast cancer cells. **Methods** Real-time PCR was used to detect the expression of miR-204 in human breast cancer cell MDA-MB-231 after transfection of miR-204 mimics and inhibitor for 48 h. Flow cytometry was used to analyse the effect of miR-204 on the proliferation and apoptosis of MDA-MB-231 cells. The effect of miR-204 on the migration of MDA-MB-231 cells was detected by Transwell migration assay. **Results** Real-time PCR analysis showed that miR-204 mimics and inhibitors had significant effect compared with normal control group( $P<0.01$ ). Flow cytometry analysis showed that compared with normal control group, the number of G<sub>1</sub> phase cells of miR-204 mimics group was significantly decreased( $P<0.01$ ), while the number of G<sub>2</sub>/M cells of miR-204 mimics group was significantly increased( $P<0.01$ ). In contrast, the number of G<sub>1</sub> phase cells of miR-204 inhibitor group was significantly increased( $P<0.01$ ), while the number of G<sub>2</sub>/M cells of miR-204 inhibitor group was significantly decreased( $P<0.01$ ). miR-204 mimics group significantly promoted apoptosis, while the inhibitor group significantly inhibited apoptosis( $P<0.01$ ). Transwell migration analysis showed that the number of cells of miR-204 mimics group were significantly reduced, while the number of cells was significantly increased in the inhibitor group( $P<0.01$ ). **Conclusion** We find miR-204, which can promote cell apoptosis and inhibit cell proliferation and migration, is a negative factor in the breast cancer cell line MDA-MB-231.

**[Key words]** breast neoplasms; apoptosis; MicroRNAs; miR-204; MDA-MB-231; cell biological characteristics

乳腺癌是严重危害生命健康的恶性肿瘤之一,是女性第 2 位最常见的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,且乳腺癌的发病率和病死率呈逐年增长趋势<sup>[2]</sup>。目前,已经有开发相关的靶向药物用于临床治疗,但疗效并不乐观,分子靶向治疗被认为是一种有效途径<sup>[3]</sup>。微小 RNA(miRNA)的出现为研究乳腺癌的发病机制提供了新的策略和思路。有研究发现 miRNA-204(miR-204)过表达则可抑制胶质瘤细胞的增殖和迁移能力<sup>[4]</sup>。显然 miR-204 对肿瘤细胞具有抑制作用,而在乳腺癌中研究的还比较少。因此,本试验构建 miR-204 的模拟物及抑制剂,并转染作用于乳腺癌 MDA-MB-231 细胞,研究对该细胞的行为学变化,以期对乳腺癌的靶向治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 细胞** 使用人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系,由南通大学实验动物中心提供。

**1.1.2 主要仪器与试剂** CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo 公司,美国);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,中国);倒置显微镜(Olympus 公司,日本);流式细胞仪(BD 公司,美国);ABI stepone 实时荧光 PCR (Real-Time PCR) System (ABI 公司,美国);低温冷冻离心机(Eppendorf 公司,德国)。1640 培养基,胎牛血清(HyClone 公司,美国);Trizol (Invitrogen 公司,美国);细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒,Annexin V-FITC

Apoptosis Detection Kit(碧云天生物科技公司,中国);riboFECT™ CP 转染试剂盒(广州锐博生物科技有限公司,中国);SYBR® PrimeScript™ RT-PCR(Roch 公司,瑞士);Omniscrypt® Reverse Transcription kit(Qiagen 公司,德国)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞复苏及培养** 按照常规的细胞冻融方法操作,以缓慢速溶为原则,将冻存细胞从 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出,迅速放入 $37^{\circ}\text{C}$ 的水浴,使其快速融化,之后加入完全培养基。放入 $\text{CO}_2$ 培养箱,第2天更换培养基,每隔1~2天或者培养基变为黄色时更换培养基。

**1.2.2 miR-204 转染细胞方法** 转染前1d细胞接种至6孔板中,密度为 $1 \times 10^5$ ,采用含有10%胎牛血清(FBS)的1640培养基培养细胞,使转染时的细胞密度能够达到50%~80%。细胞转染按照riboFECT™ CP转染试剂盒说明书进行操作。试验设置4个组:正常对照组加入500  $\mu\text{L}$ 的磷酸盐缓冲液(PBS);阴性对照组加入阴性对照mimic及riboFECT™ CP Reagent;抑制剂组加入miR-204抑制剂及riboFECT™ CP Reagent;模拟物组加入miR-204 mimic及riboFECT™ CP Reagent。之后将6孔板放入 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48h。

**1.2.3 Real-time PCR 检测 miR-204 表达水平** 本试验检测miR-204采用U6作为内参,其中RT反应中的颈环引物和Real-time PCR反应中的颈环引物,均由广州锐博生物有限公司设计并合成。细胞总RNA提取。转染48h,然后弃掉培养基,使用预冷PBS缓冲液洗2次;6孔板中加入1.0 mL Trizol,水平放置片刻;用枪头吹打几次,转入1.5 mL EP管中,反复吹打至无明显沉淀;室温孵育5 min;加入0.2 mL 三氯甲烷;涡旋振荡器上震荡15 s;室温孵育5 min; $4^{\circ}\text{C}$ ,12 000 r/min,15 min;吸取大约0.5 mL上清液;加入0.5 mL 异丙醇,上下颠倒混匀;室温孵育10 min; $4^{\circ}\text{C}$ ,12 000 r/min,10 min;弃去上清液;加入1.0 mL 75%乙醇;轻微混匀, $4^{\circ}\text{C}$ ,7 500 g,5 min,弃去上清液;重复上一步骤;静置5~10 min,晾干;用RNase-free水重悬; $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 水浴10~15 min,超微量分光光度计测定核酸浓度。PCR反应体系及条件:RNA template(2  $\mu\text{g}$ ), Bulge-Loop™ miRNA RT Primer(62.5 nmol/L) 2.0  $\mu\text{L}$ ,加RNase-free water至14  $\mu\text{L}$ ,以上体系混匀后,瞬时离心, $70^{\circ}\text{C}$ 放置10 min后,再加入以下试剂进行RT反应,10 $\times$ Buffer RT 2  $\mu\text{L}$ ,dNTP Mix(5 mmol/L each dNTP) 2  $\mu\text{L}$ ,RNase抑制剂(10 U/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ,Omniscrypt Reverse Transcriptase 1  $\mu\text{L}$ ,total reaction volume 20  $\mu\text{L}$ ,瞬时离心, $37^{\circ}\text{C}$  60 min, $70^{\circ}\text{C}$  10 min,于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。Real-time PCR反应体系及条件。20  $\mu\text{L}$ 反应体系;2 $\times$ SYBGreen Master Mix 10  $\mu\text{L}$ ,Bulge-Loop™ miRNA Forward Primer(5  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,Bulge-Loop™ miRNA Reverse Primer(5  $\mu\text{mol/L}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,cDNA 2  $\mu\text{L}$ ,加ddH<sub>2</sub>O至20  $\mu\text{L}$ 。试剂混匀后短暂离心置于ABI stepone Real-time PCR仪,程序如下: $95^{\circ}\text{C}$  5 min;( $95^{\circ}\text{C}$  10 s, $60^{\circ}\text{C}$  20 s, $72^{\circ}\text{C}$  20 s收集荧光) $\times 45$ ; $55.0\sim 90.0^{\circ}\text{C}$ 每上升 $0.3^{\circ}\text{C}$ 读荧光值生成熔解曲线。每个PCR反应设置3个复孔,扩增结束后,根据扩增曲线和熔解曲线分析扩增效率和特异性,并得到各反应管的循环阈值(Ct),miR-204的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方程进行计算。

**1.2.4 细胞增殖和凋亡检测方法** 分别在6孔板中转染试剂48h后,按照碧云天生物科技公司试剂盒说明书操作,并用流

式细胞仪检测。

**1.2.5 细胞迁移检测方法** 在6孔板中细胞转染试剂48h后,更换为基础培养基,饥饿24h,收集细胞,PBS洗涤再重悬,向Transwell上室中加入200  $\mu\text{L}$ 细胞悬液( $2 \times 10^5$ ),下室中加入500  $\mu\text{L}$ 完全培养基,参照文献[5]操作。

**1.3 统计学处理** 采用STATA10.0统计软件计算,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ ,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-204 抑制剂和模拟物转染效率的检测** 4组转染效率比较差异有统计学意义( $F=198.9, P=0.000$ )。与正常对照组相比,阴性对照组miR-204表达水平率略有上升,但比较差异无统计学意义( $t=2.637, P=0.062$ );抑制剂组miR-204水平明显下降( $t=11.60, P=0.000$ );模拟物组miR-204水平明显上升( $t=14.10, P=0.0000$ ),见图1。

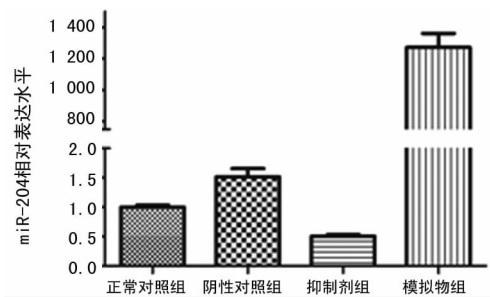
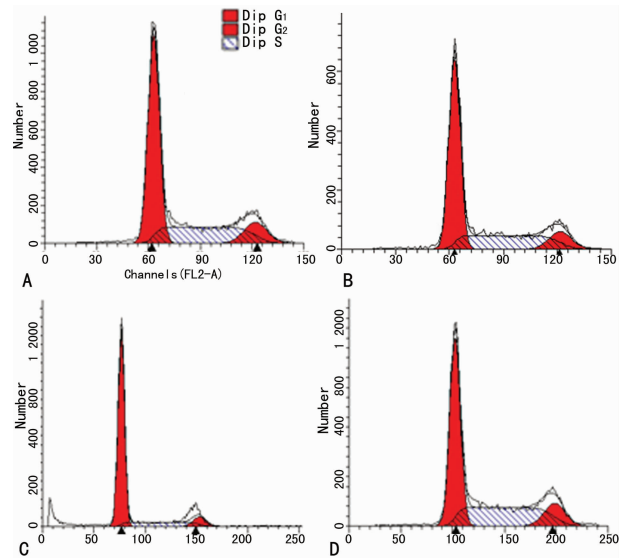


图1 4组miR-204表达水平



A:正常对照组;B:阴性对照组;C:抑制剂组;D:模拟物组。

图2 细胞流式术检测各组人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖

**2.2 细胞流式术检测人乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖** G<sub>1</sub>期、S期及G<sub>2</sub>/M期,3个时期中的4组百分比细胞计数的均数差异有统计学意义( $F_{G_1期}=106.98, F_{S期}=25.80, F_{G_2/M期}=28.24, P<0.01$ )。G<sub>1</sub>期:与正常对照组相比,阴性对照组细胞数目增多,但比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),抑制剂组细胞数目明显增多( $P<0.01$ ),模拟物组细胞数目明显减少( $P<0.01$ )。S期:与正常对照组相比,阴性对照组细胞数目减少,但比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),抑制剂组细胞数目明显

减少( $P < 0.01$ ),模拟物组细胞数目略有增多,但比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。 $G_2/M$ 期:与正常对照组相比,阴性对照组细胞数目增多,但比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),抑制剂组细胞数目明显减少( $P < 0.01$ ),模拟物组细胞数目明显增多( $P < 0.01$ ),见图 2、3。

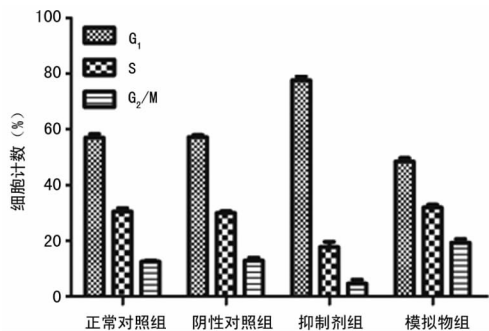
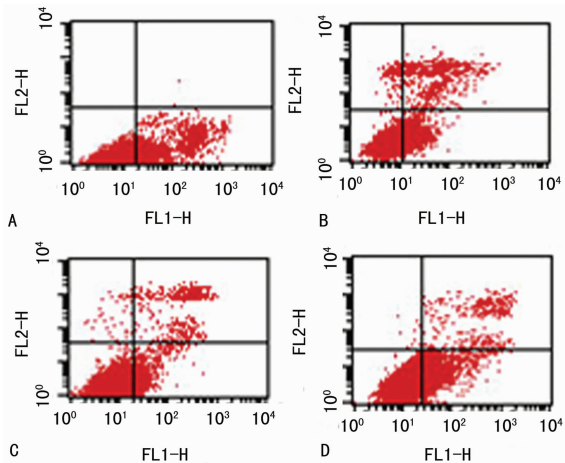


图 3 miR-204 对各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞周期的影响

**2.3 细胞流式术检测人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡** 4 组百分比细胞凋亡计数的均数比较差异有统计学意义( $F = 118.3, P < 0.01$ )。与正常对照组相比,阴性对照组细胞凋亡数目减少,但比较差异无统计学意义( $t = 2.267, P = 0.086$ ),抑制剂组细胞凋亡数目明显减少( $t = 12.77, P < 0.01$ ),模拟物组细胞凋亡数目明显增多( $t = 7.086, P < 0.01$ ),见图 4、5。



A: 正常对照组; B: 阴性对照组; C: 抑制剂组; D: 模拟物组。

图 4 细胞流式术检测各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡

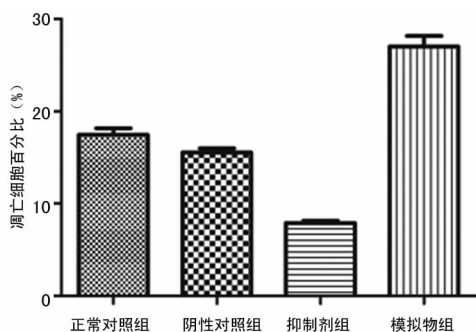
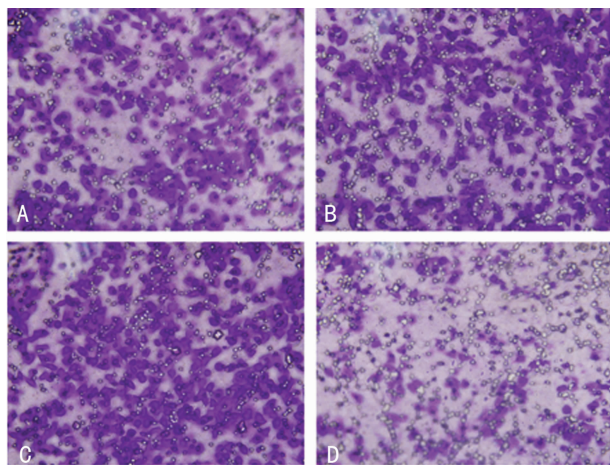


图 5 miR-204 对各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

**2.4 Transwell 小室试验检测人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移能力** 4 组迁移细胞数目的均数比较差异有统计学意义

( $F = 60.77, P < 0.01$ )。与正常对照组相比,阴性对照组细胞迁移数目增多,但比较差异无统计学意义( $t = 1.011, P = 0.369$ ),抑制剂组细胞迁移数目增多( $t = 6.411, P < 0.01$ ),模拟物组细胞迁移数目减少( $t = 7.115, P < 0.01$ ),见图 6、7。



A: 正常对照组; B: 阴性对照组; C: 抑制剂组; D: 模拟物组。

图 6 Transwell 小室检测各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移

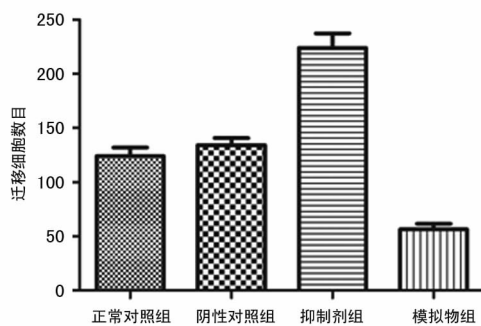


图 7 miR-204 对各组人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移的影响

3 讨论

miRNA 是一种非编码小 RNA 分子(约含 22 个核苷酸),存在于植物、动物和一些病毒中,功能主要是 RNA 沉默和转录后修饰调控基因表达<sup>[6]</sup>。成熟的 miRNA 是 RNA 诱导沉默复合体(RISC)的重要组成部分,该沉默复合体还包括核糖核酸酶和许多相关的蛋白质<sup>[7]</sup>。miR-204 定位于人类第 9 号染色体 73424891 和 73425000 位之间。有研究表明 miR-204 在肿瘤组织中存在异常表达,并与肿瘤增殖<sup>[8]</sup>、侵袭转移<sup>[9]</sup>、化疗抵抗<sup>[10]</sup>及不良预后<sup>[11]</sup>密切相关。然而,miR-204 在不同的肿瘤中起着不同的作用。比如,miR-204 在急性淋巴白血病<sup>[12]</sup>和前列腺癌<sup>[13]</sup>肿瘤中高表达,起癌基因作用,促进肿瘤的增殖和转移。而在鼻咽癌<sup>[9]</sup>和子宫内膜癌<sup>[10]</sup>等肿瘤中表达下调,起抑癌基因作用,抑制肿瘤的发展。

本研究结果显示,miR-204 促进乳腺癌细胞凋亡,与 Wang 等<sup>[14]</sup>报道的结果一致,抑制细胞的增殖,这与 Xiong 等<sup>[15]</sup>报道的结果相似,抑制细胞的迁移能力,这与 Imam 等<sup>[16]</sup>等报道的结果相似。研究结果提示,miR-204 在乳腺癌细胞中起抑癌基因的作用,能够抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移并促进其凋亡,具有作为诊治乳腺癌分子靶标的潜能。但是 miR-204 调控乳腺癌增殖和转移的具体机制还不是很清楚,还有待于更进一步

的研究。总之,miR-204 可能在乳腺癌的发生、发展及治疗过程中发挥重要作用,靶向 miR-204 治疗也可能为乳腺癌的治疗提供新思路。

#### 参考文献

- [1] 张敏璐,黄哲宙,郑莹. 中国 2008 年女性乳腺癌发病、死亡和患病情况的估计及预测[J]. 中华流行病学杂志, 2012,33(10):1049-1051.
- [2] Kantelhardt EJ, Cubasch H, Hanson C. Taking on breast cancer in East Africa: global challenges in breast cancer [J]. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2015, 27(1): 108-114.
- [3] 范雅文,张旭辉,张嵘,等. 三阴乳腺癌的异质性及靶向治疗[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(3): 442-445
- [4] Ying Z, Li Y, Wu J, et al. loss of miR-204 expression enhances glioma migration and stem cell-like phenotype[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(2): 990-999.
- [5] Yi M, Li M, Long X, et al. miR-520e regulates cell proliferation, apoptosis and migration in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5): 3543-3548.
- [6] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355
- [7] Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(1): 23-36.
- [8] Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, et al. VHL-regulated MiR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(4): 532-546.
- [9] Vimalraj S, Miranda PJ, Ramyakrishna B, et al. Regulation of breast cancer and bone metastasis by microRNAs[J]. *Dis Markers*, 2013, 35(5): 369-387.

- [10] Ryan J, Tivnan A, Fay J, et al. MicroRNA-204 increases sensitivity of neuroblastoma cells to cisplatin and is associated with a favourable clinical outcome[J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(6): 967-976.
- [11] Zeng L, Yu J, Huang T, et al. Differential combinatorial regulatory network analysis related to venous metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13 Suppl 8: S14.
- [12] Kovaleva V, Mora R, Park YJ, et al. miRNA-130a targets ATG2B and DICER1 to inhibit autophagy and trigger killing of chronic lymphocytic leukemia cells[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(7): 1763-1772.
- [13] Boll K, Reiche K, Kasack K, et al. MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma[J]. *Oncogene*, 2013, 32(3): 277-285.
- [14] Wang X, Qiu W, Zhang G, et al. MicroRNA-204 targets JAK2 in breast cancer and induces cell apoptosis through the STAT3/BCI-2/survivin pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 5017-5025.
- [15] Xiong F, Liu K, Zhang F, et al. MiR-204 inhibits the proliferation and invasion of renal cell carcinoma by inhibiting RAB22A expression [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 3000-3008.
- [16] Imam JS, Plyler JR, Bansal H, et al. Genomic loss of tumor suppressor miRNA-204 promotes cancer cell migration and invasion by activating AKT/mTOR/Rac1 signaling and actin reorganization[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52397.

(收稿日期:2016-11-23 修回日期:2017-01-11)

(上接第 1880 页)

- [3] 马戈甲,易成刚,孙智勇,等. 不同剂量雌激素对裸鼠血管瘤模型的影响[J]. 中国美容医学, 2010, 9(2): 200-203.
- [4] Caiazza F, Ryan EJ, Doherty G, et al. Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis [J]. *Front Oncol*, 2015(5): 19.
- [5] Gebhart JB, Rickard DJ, Barrett TJ, et al. Expression of estrogen receptor isoforms alpha and beta messenger RNA in vaginal tissue of premenopausal and postmenopausal women [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 185(6): 1325-1330.
- [6] Chang EC, Frasier J, Komm B, et al. Impact of estrogen receptor beta on gene networks regulated by estrogen receptor alpha in breast cancer cells [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(10): 4831-4842.
- [7] 周迪炜,范军,刘丽江. 17 $\beta$ -雌二醇和他莫西芬对人胃癌细胞株 BGC-823 活力及 ER- $\alpha$ 36 蛋白表达的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(13): 2001-2004.
- [8] 于正洪,王新星,陈龙邦,等. 雌二醇和胰岛素样生长因子- I 诱导的胰岛素样生长因子- I 受体和雌激素受体间

的作用研究[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(9): 907-911.

- [9] 连艳,杨鹰,谢荣凯. 戊酸雌二醇对去势大鼠子宫雌激素受体亚型表达的影响[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(21): 3643-3645.
- [10] 刘江斌,肖现民,盛民立. 雌激素和血管内皮细胞生长因子促进血管瘤增殖的体外实验研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2004, 25(3): 231-234.
- [11] 江成鸿,庄福连,许东坡,等. 雌激素受体、血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子在小儿血管瘤中的表达及意义[J]. 中华医学美容美容杂志, 2006, 12(5): 290-292.
- [12] 刘丽青,刘轼初. 小儿血管瘤 ER、VEGF、bFGF 的表达及其相关性[J]. 中国民康医学, 2015, 27(10): 67-69.
- [13] Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, et al. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(12): 3183-3190.

(收稿日期:2016-11-24 修回日期:2017-01-12)