

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.007

## miR-148a-3p 抑制 NRAS 表达调控乳腺癌细胞增殖与凋亡的机制

李 杨<sup>1</sup>, 张 季<sup>2△</sup>, 杨思源<sup>2</sup>, 谢 琳<sup>1</sup>

(云南省肿瘤医院/昆明医科大学第三附属医院:1. 肿瘤内科;2. 乳腺科, 昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 探讨 miR-148a-3p 在乳腺癌中的作用及可能的机制。**方法** 根据人乳腺癌细胞株-7 (MCF-7) 细胞是否转染及是否存在 miR-148a-3p 的模拟物分为 3 组: 未转染组、miR-148a-3p 对照组和 miR-148a-3p 转染组。通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测转染后 miR-148a-3p 在各组的信使 RNA (mRNA) 水平, 运用四唑盐比色法 (MTT) 比较 MCF-7 细胞在 3 组的增殖情况, 应用 RT-qPCR 检测各组神经母细胞瘤病毒毒性 ras 致癌因子的同源物 (NRAS) 的基因水平, 应用 Western blot 检测各组 RAS 病毒致癌基因同源物 NRAS 的蛋白水平, 应用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况, 应用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-148a-3p 与 NRAS 之间的作用。**结果** 过表达 miR-148a-3p 显著抑制乳腺癌细胞株 MCF-7 的增殖 ( $P < 0.05$ ), 促进其凋亡 ( $P < 0.05$ ), 降低 NRAS 基因和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 双荧光素酶报告基因实验证明 NRAS 是 miR-148a-3p 的直接作用靶点。**结论** miR-148a-3p 可能通过靶向 NRAS 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖, 促进细胞凋亡。

**[关键词]** 乳腺肿瘤; MCF-7; 细胞增殖; 细胞凋亡; miR-148a-3p; ras 致癌因子的同源物

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3028-04

### Mechanism of miR-148a-3p regulating proliferation and apoptosis of breast cancer cells by inhibiting the expression of NRAS

LI Yang<sup>1</sup>, ZHANG Ji<sup>2△</sup>, YANG Siyuan<sup>2</sup>, XIE Lin<sup>1</sup>

(1. Department of Oncology; 2. Department of Breast Surgery, Yunnan Cancer Hospital/the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650118, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the role of miR-148a-3p in breast cancer and its possible molecular mechanism. **Methods** According to whether human breast cancer cell line-7 (MCF-7) cells were transfected and whether miR-148a-3p mimics were present, MCF-7 cells were divided into three groups: the untransfected group, the control group and the transfected group. The real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to assess the messenger RNA (mRNA) level, the proliferation of MCF-7 cells were conducted by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), RT-qPCR was used to detect the gene level of ras virus oncogene homolog (NRAS), the protein level of NRAS was detected by Western blot, the apoptosis was detected by cytometry, and the effect of miR-148a-3p and NRAS was verified by dual luciferase reporter gene assay. **Results** Overexpression of miR-148a-3p significantly inhibited the proliferation of MCF-7 cells ( $P < 0.05$ ), promoted the apoptosis of the cells ( $P < 0.05$ ), decreased the expression of NRAS gene and protein ( $P < 0.05$ ), dual luciferase reporter gene experiments demonstrated that NRAS was a direct target of miR-148a-3p. **Conclusion** miR-148a-3p inhibits the proliferation and induces the apoptosis of MCF-7 cells by inhibiting the expression of NRAS.

**[Key words]** breast neoplasms; MCF-7; cell proliferation; apoptosis; miR-148a-3p; ras virus oncogene homolog

乳腺癌 (BC) 每年约有 130 多万新发病例和 45 万死亡病例<sup>[1]</sup>, 是导致女性死亡的主要原因。根据癌细胞是否表达雌激素受体 (ER $\alpha$ )、孕激素受体 (PR) 和表皮生长因子受体-2 (HER2), 可将乳腺癌分为 ER $\alpha$ +, HER2+ 和三阴性乳腺癌 (TNBC) 3 种类型<sup>[2]</sup>。虽然乳腺癌的发病尚无明确观点, 但国内外大量研究标明微小 RNA (microRNA) 参与调控多种恶

性肿瘤的发生、发展, microRNA 在核糖核酸 (RNA) 沉默和调控基因表达的转录后翻译等过程中发挥重要作用<sup>[3-4]</sup>。2016 年研究发现, miR-148a-3p 可抑制膀胱癌等多种恶性癌细胞的增殖<sup>[5]</sup>, miR-148a-3p 在乳腺癌是否也存在类似作用。本研究旨在探讨 miR-148a-3p 对乳腺癌细胞增殖的影响及在乳腺癌中发挥作用的可能的机制, 现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 乳腺癌 MCF-7 细胞株和 MCF-10A 细胞株, 雌激素受体阳性, 购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库。

**1.2 主要仪器与试剂** 凝胶电泳仪、垂直电泳槽及凝胶成像系统(Bio-rad, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 ABI 7300(Applied Biosystems, 美国), 青霉素-链霉素混合溶液(Sigma, 美国), miR-148a-3p 模拟物和对照载体(上海吉码生物科技有限公司), pGL3 荧光素酶检测系统(Promega, 美国), DEPC 水(碧云天生物生物科技公司), 荧光定量试剂盒 One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR Kit(大连宝生物有限公司), PCR 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、兔抗神经母细胞瘤病毒性 ras 致癌因子的同原体(NRAS)及辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠二抗(Abcam, 美国), 四甲基偶氮唑盐(MTT)、Annexin V-FITC/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡试剂盒、SDS/PAGE 电泳凝胶混合液及 ECL 显色试剂(碧云天生物生物科技公司)。微量紫外可见光分光光度计、恒温培养箱、超净工作台、改良 Eagle 培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)、Opti-MEM 培养基、Lipofectamine<sup>®</sup> 3000、质粒提取试剂盒、Trizol 试剂和蛋白 Maker(Thermo, 美国)。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养及转染** 人乳腺癌细胞株-7(MCF-7)细胞株用 10% FBS 和 90% DMEM 培养液培养, 加入 1% 青霉素-链霉素, 置于 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱, 培养过夜。将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板内, 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔, 待细胞汇合率达到约 80%, 用 Lipofectamine<sup>®</sup> 3000 转染试剂将 miR-148a-3p 的模拟物和 miR-148a-3p 进行转染, 待转染 48 h, 备用。MCF-7 细胞未经转染处理为未转染组, 根据 MCF-7 细胞是否转染及是否存在 miR-148a-3p 分为 3 个组: 未转染组、miR-148a-3p 对照组和 miR-148a-3p 转染组。

**1.3.2 四唑盐比色法(MTT)细胞增殖实验** 将 3 个组细胞接种于 6 孔板内, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL MTT, 放回细胞培养箱内继续培养。4 h 后, 根据 450 nm 酶标仪比色测定的每孔的吸光度值(A)来分析细胞增殖情况。

**1.3.3 提取总 RNA** 将 3 组细胞收集细胞至 EP 管并加入 1 mL Trizol 试剂和 0.2 mL 氯仿, 用力震荡后室温静置 3 min, 在 4 °C 低温离心机 12 000 r/min 离心 15 min。吸取上层水相, 转至新的 EP 管, 加 0.5 mL 异丙醇, 室温静置 20 min, 在 4 °C 低温离心机 12 000 r/min 离心 15 min。弃上清液, 得到白色沉淀, 即核糖核酸(RNA)。用 75% 乙醇洗涤 RNA 2 次, 室温晾干, 用焦碳酸二乙酯(DEPC)水溶解。紫外分光光度计测定 RNA 溶液的纯度, 即 A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub> 的比值, 为 1.8~2.1。

**1.3.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)实验** 反转录用 TaKaRa PrimeScript 试剂盒的 SYBR Green Assay。反应体系: 5 倍的 PrimeScript 缓冲液 2 μL, 反转录酶 0.5 μL, 寡核苷酸 0.5 μL, 6 核苷酸的随机引物 0.5 μL, 把总 RNA 定量至 500 ng, 不含 RNase 的双蒸水定容终体系为 10 μL。反转录流程: 将上述反转录体系在 37 °C 水浴 15 min, 85 °C 水浴持续 5 s。用 cDNA 为模板采用 7300 Real-time PCR 系统(Applied Biosystems, 美国)进行 RT-qPCR 检测。反应体系: 2 μL cDNA 模板, 上游引物和下游引物各 0.5 μL, 5 μL 2 × 混合缓冲液和 2 μL dd 水。反应条件: 95 °C 10 min, 持续 40 个循环: 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 溶解曲线 60~90 °C。以公式 2<sup>-ΔΔCt</sup> 进行计算, ΔCt = Ct 基因 - Ct 内参, U6 为内参。分析 3 组细胞 miR-148a-3p mRNA 表达。

**1.3.5 Western blot 检测** MCF-7 细胞转染 48 h 后, 收集细胞。用预冷的磷酸缓冲盐溶液(PBS)漂洗细胞 3 次, 4 °C 超低温离心机 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。按沉淀质量/体积 1 : 5 加入里帕(RIPA)蛋白裂解液, 超声匀浆, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。利用二喹啉甲酸(BCA)试剂盒测定蛋白质浓度, 将每组样本分别置于 1.5 mL EP 管中。蛋白样品中加入等体积的 2 倍十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液, 沸水 5 min 使蛋白变性。进行 SDS-PAGE 电泳, 将分离后的蛋白采用湿转法将凝胶分离后的蛋白转移到硝酸纤维素(PVDF)膜上。室温下, 用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 洗涤分别加入 NRAS 及 GAPDH 的一抗(1 : 100)4 °C 摇床孵育过夜。次日用辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 室温摇床孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, 用化学发光法(ECL)显色液显色, GAPDH 为内参, 凝胶成像设备观察 3 组细胞 miR-148a-3p 蛋白表达。

**1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 将 3 个组细胞用 PBS 洗 2 次, 向各组细胞加入 500 μL 结合缓冲液重悬细胞, 加 5 μL Annexin V-FITC 混匀, 加入 5 μL 碘化丙啶(PI)室温避光孵育 15 min, 上流式细胞仪检测。

**1.3.7 miR-148a-3p 的靶基因预测** 采用生物信息学软件 Targetscan 预测 miR-148a-3p 可以结合 NRAS 的 3' 端非翻译区(UTR)。

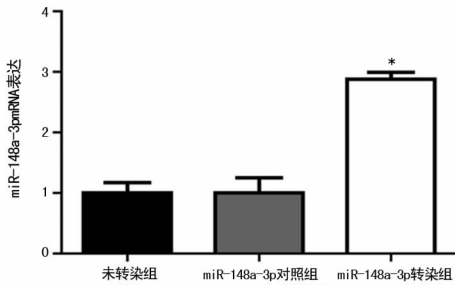
**1.3.8 双荧光素酶报告基因** 构建野生型和突变型 NRAS-3' UTR 的报告基因质粒, 并将所得质粒及 pRL-TK 质粒, miR-148a-3p 模拟物及 miR-148a-3p 转染到 MCF-10A 细胞中, 48 h 之后按照双荧光素酶检测说明书检测细胞的相对荧光强度(荧光虫荧光强度/猴肾荧光强度)。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用方差分析, 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

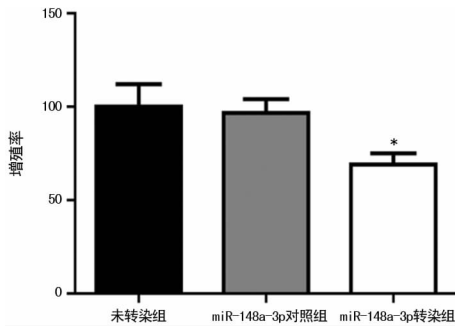
**2.1 不同组别的 miR-148a-3p 表达** 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组相比, miR-148a-3p 转染组的 miR-148a-3p mRNA 显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。



\*:  $P < 0.05$ , 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组比较

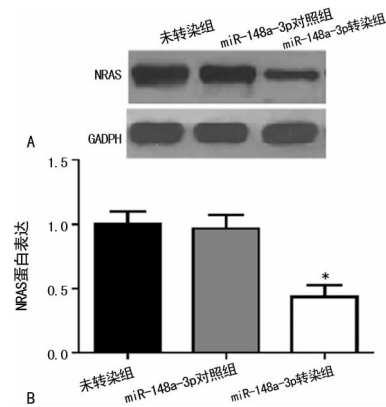
图 1 不同组别的 miR-148a-3p 表达

**2.2 不同组别的细胞增殖的情况** 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组相比, miR-148a-3p 转染组的 MCF-7 细胞的增殖能力最低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。



\*:  $P < 0.05$ , 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组比较

图 2 不同组别的细胞增殖率



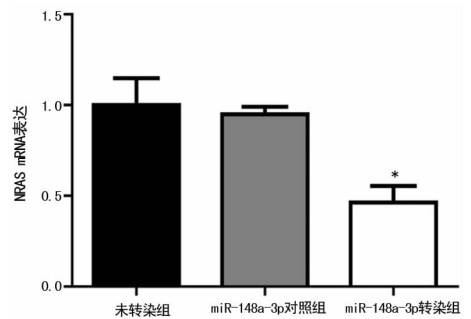
A: Western blot; B: NRAS 表达; \*:  $P < 0.05$ , 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组比较

图 3 不同组别的 NRAS 蛋白表达

**2.3 miR-148a-3p 与 NRAS-3' UTR 的关系**

NRAS-3' UTR 序列与 miR-148a-3p 序列间存在特定结合区域, NRAS 可能是 miR-148a-3p 的靶点。

**2.4 不同组别的 NRAS 表达** 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组相比, miR-148a-3p 转染组的 NRAS 的 mRNA 和蛋白水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3、4。



\*:  $P < 0.05$ , 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组比较

图 4 不同组别的 NRAS mRNA 表达

**2.5 不同组别的凋亡情况** 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组相比, miR-148a-3p 转染组的凋亡明显 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

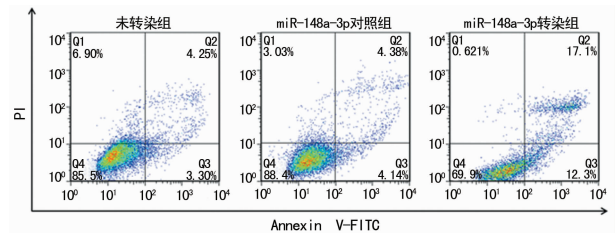
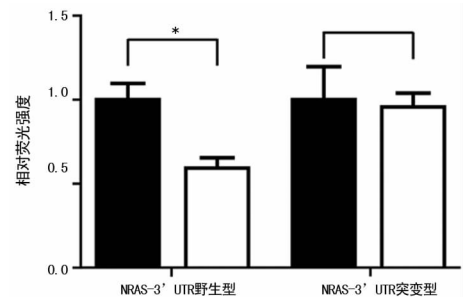


图 5 不同组别的凋亡情况

**2.6 miR-148a-3p 与 NRAS-3' UTR 的关系** miR-148a-3p 显著抑制野生型 NRAS-3' UTR 质粒转染的细胞的荧光素酶活性 ( $P < 0.05$ ), 对突变型 NRAS-3' UTR 质粒转染细胞的荧光素酶活性并无明显的影响 ( $P > 0.05$ ), 见图 6。



\*:  $P < 0.05$

图 6 miR-148a-3p 与 NRAS-3' UTR 的关系

## 3 讨论

microRNA 是一类广泛存在于植物, 动物甚至病毒体内的包含约 22 个核苷酸的小的非编码 RNA, 在 RNA 沉默和调控基因表达的转录后翻译等过程中发挥作用<sup>[3-4]</sup>。miRNA 在细胞的生长和分化及信息传递等过程中均扮演重要的角色。近年来研究表明 miRNA 在肿瘤的发生和发展过程中发挥促癌或抑癌的作用, 影响进而肿瘤的增殖、凋亡、侵袭和转移等行为学<sup>[6]</sup>。miR-148a-3p 位于 7p15.2 染色体区域, 是已知的肿瘤抑制因子<sup>[7]</sup>。近年研究显示 miR-148a-3p 在多种恶性肿瘤发挥重要作用: (1) miR-148a-3p 可以通过抑制 BMP 信号通路抑制胃癌细胞系的侵袭和转移<sup>[8]</sup>; (2) miR-148a-3p 通过调节 ERBB3/AKT2/c-

myc 和 ERBB3/AKT2/Snail 等信号通路抑制膀胱癌细胞增殖<sup>[5]</sup>; (3) miR-148-3p 在喉鳞状细胞癌中严重减少, 通过 DNMT1 调节 RUNX3 的表达抑制细胞增殖<sup>[9]</sup>。与之前的研究类似, 本研究结果显示, 在乳腺癌 MCF-7 细胞中瞬时过表达 miR-148a-3p 可以显著抑制细胞的增殖, 并促进细胞凋亡, 但乳腺癌 MCF-7 细胞中 miR-148a-3p 的作用通过何种下游分子实现还未见相关报道。本研究发现在 MCF-7 细胞中瞬时过表达 miR-148a-3p 后, 与未转染组和 miR-148a-3p 对照组相比, miR-148a-3p 转染组 NRAS 的 mRNA 及蛋白水平明显下降, 双荧光素酶报告基因实验证实, miR-148a-3p 直接靶向 NRAS-3'UTR。NRAS 是 NRAS 基因编码的一种酶, 由 Robin Weiss 等首次在神经母细胞瘤中发现<sup>[10-11]</sup>。人类的 ras 基因共分为 HRAS, KRAS 和 NRAS 等 3 种基因, 他们拥有结合 GTP/GDP 及 GTPase 的能力, 正常生理状态下控制细胞的正常生长。12、13 或 61 位氨基酸残基的突变可以激活 N-ras 的潜能, 并促进肿瘤的恶化, 例如黑色素瘤<sup>[12]</sup>; 另外, 在伊朗人群中, 结直肠癌患者体内发现有 NRAS 基因的突变<sup>[13]</sup>; NRAS siRNA 可以显著抑制肺癌细胞的活性<sup>[14]</sup>。现研究明确的 NRAS 信号通路的下游有 2 种, 即 MAPK 信号通路和 PI3K/AKT/mTOR 信号通路<sup>[15-16]</sup>。本研究的结果与之前关于 NRAS 在肿瘤中作用的报道一致。本课题也存在以下两方面的问题: (1) 研究指出与耐药胃癌细胞系相比, 非耐药胃癌细胞系的 miR-148a-3p 表达相对较高, 本课题未进行耐药 MCF-7 细胞的研究, 探讨 miR-148a-3p 的作用仍较单薄<sup>[11]</sup>; (2) miR-148a-3p 靶向 NRAS-3'UTR 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖过程所涉及的具体的分子, 未做研究, 具体将在未来工作中开展并探讨。综上所述, 本课题结果显示乳腺癌 MCF-7 细胞中, miR-148a-3p 通过靶向 NRAS-3'UTR 调控细胞的增殖与凋亡, 提示 miR-148a-3p 可以作为治疗乳腺癌新的靶点, miR-148a-3p 高表达可能与乳腺癌良好预后相关。

## 参考文献

- [1] JUNG H K, PARK S, KIM N W, et al. Development of second primary cancer in Korean breast cancer survivors [J]. *Ann Surg Treat Res*, 2017, 93(6): 287-292.
- [2] ZHANG F F, HASLAM D E, TERRY M B, et al. Dietary isoflavone intake and all-cause mortality in breast cancer survivors: the breast cancer family registry [J]. *Cancer*, 2017, 123(11): 2070-2079.
- [3] XIN Z C, YANG H Q, WANG X W, et al. Diagnostic value of microRNAs in breast cancer: a meta-analysis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(2): 284-291.
- [4] CHANG J T, WANG F, CHAPIN W, et al. Identification of microRNAs as breast cancer prognosis markers through the cancer genome atlas [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0168284.
- [5] WANG X, LIANG Z, XU X, et al. miR-148a-3p represses proliferation and EMT by establishing regulatory circuits between ERBB3/AKT2/c-myc and DNMT1 in bladder cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): e2503.
- [6] LEIVONEN S K, ICAY K, JÄNTTI K, et al. MicroRNAs regulate key cell survival pathways and mediate chemosensitivity during progression of diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Blood Cancer J*, 2017, 7(12): 654.
- [7] MA L, XU Z, XU C, et al. MicroRNA-148a represents an independent prognostic marker in bladder cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7915-7920.
- [8] SHI C, HUANG F, GU X, et al. Adipogenic miRNA and meta-signature miRNAs involved in human adipocyte differentiation and obesity [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40830-40845.
- [9] JILI S, ERYONG L, LIJUAN L, et al. RUNX3 inhibits laryngeal squamous cell carcinoma malignancy under the regulation of miR-148a-3p/DNMT1 axis [J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(8): 597-605.
- [10] YAN J, WU X, YU J, et al. Analysis of NRAS gain in 657 patients with melanoma and evaluation of its sensitivity to a MEK inhibitor [J]. *Eur J Cancer*, 2017, 89(11): 90-101.
- [11] DRUILLENNEC S, POUPONNOT C, EYCHÈNE A. NRAS-driven melanoma: A RAF can hide another [J]. *Mol Cell Oncol*, 2017, 4(6): e1344758.
- [12] PONTI G, MANFREDINI M, GRECO S, et al. BRAF, NRAS and C-KIT advanced melanoma: clinico-pathological features, targeted-therapy strategies and survival [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(12): 7043-7048.
- [13] MOHSEN N, AHMADREZA S, FATEMEH H, et al. Frequency of K-RAS and N-RAS gene mutations in colorectal cancers in Southeastern Iran [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(9): 4511-4515.
- [14] NELSON-TAYLOR S K, LE A T, YOO M, et al. Resistance to RET-inhibition in RET-rearranged NSCLC is mediated by reactivation of RAS/MAPK signaling [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(8): 1623-1633.
- [15] DORARD C, ESTRADA C, BARBOTIN C, et al. RAF proteins exert both specific and compensatory functions during tumour progression of NRAS-driven melanoma [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(4): 15262.
- [16] ZHANG L, HUO X, LIAO Y, et al. Zeylenone, a naturally occurring cyclohexene oxide, inhibits proliferation and induces apoptosis in cervical carcinoma cells via PI3K/AKT/Mtor and MAPK/ERK pathways [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1669.