

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00691

抑制 miR-21 表达对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 生存和凋亡的影响

Effect of miR-21 inhibition on survival and apoptosis of breast cancer cell line MDA-MB-231

邱芳^{1*}, 李晶²

1. 中国医科大学附属盛京医院乳腺外科, 沈阳 110004

2. 中国医科大学附属盛京医院超声科, 沈阳 110004

[关键词] miR-21; 反义寡核苷酸类; 乳腺肿瘤; 细胞存活; 细胞凋亡

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2011)06-0691-03

microRNA(miRNA)是一种广泛存在的非编码小分子RNA,在重要生命过程如细胞生长、发育、代谢中等扮演着重要角色,其表达异常与肿瘤的发生发展关系密切,可能发挥促进或抑制癌细胞生长的重要作用。miR-21是一种较早发现在人体中发现、并且存在相对广泛的miRNA,在多种肿瘤细胞及组织中都具有较高水平的表达^[1-3]。研究发现乳腺癌患者血清中miR-21水平较健康对照组明显增高,且miR-21水平升高与癌细胞在内脏中的转移显著相关^[1],提示miR-21可能作为一种致癌miRNA在乳腺癌的发展过程中发挥重要作用。本研究以反义寡核苷酸技术(ASODN)抑制miR-21在乳腺癌中的表达,观察了miR-21下调后乳腺癌细胞的存活和凋亡情况以及肿瘤抑制相关蛋白TIMP-1、Caspase 3和肿瘤增殖相关蛋白Bcl-2的表达变化,为探寻乳腺癌的基因治疗靶点提供依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养和基因转染 在DMEM完全培养液中对乳腺癌MDA-MB-231细胞株(中国科学院上海细胞库ATCC)进行常规培养。实验分组:(1)空白对照组,给予20 μl PBS对照处理;(2)无义寡核苷酸对照组,取无义寡核苷酸(5'-AAG GCA AGC UGA CCC UGA AGU-3',上海生工生物工程技术有限公司合成)6 μg与10 μl Oligo Fectamine (Invitrogen公司,美国)混匀,加入MDA-MB-231细胞培养液中;(3)miR-21 ASODN(AS-miR-21)转染组,方法同无义寡核苷酸对照组,以2'-OMe-AS-miR-21(5'-GUC AAC AUC AGU CUG AUA AGC UA-3'^[2],上海生工生物工程技术有限公司合成)取代无义寡核苷酸加入培养液中。转染48 h后收获细胞,按照E. Z. N. A miRNA试剂盒(Omega,美国)说明书抽提总miRNA并进行反转录,参照All-in-One miRNA QRT-PCR检测试剂盒说明书(GeneCopoeia,美国)进行real-time PCR,采用韩国BIONEER公司生产的Ex-icyclerTM96荧光定量仪进行荧光定量分析,计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值以

衡量miR-21表达水平。

1.2 CCK-8法检测转染后MDA-MB-231细胞存活率 随机挑选对数生长期MDA-MB-231细胞阳性克隆扩增充分后常规消化,分别接种于96孔板,每孔2 000个细胞。接种12 h后,按1.1项下方法进行分组并转染细胞。72 h后加入CCK-8试剂(Cell Counting Kit,同仁化学研究所,日本),10 μl/孔,至37℃培养箱中孵育1 h,450 nm下测定光密度(D_{450})值,按照公式(细胞存活率=转染组细胞 D_{450} 值/对照组细胞 D_{450} 值 $\times 100\%$)计算细胞存活率。

1.3 Hoechst33258染色检测转染后MDA-MB-231细胞凋亡 随机挑选对数生长期MDA-MB-231细胞阳性克隆扩增充分后常规消化,分别接种于含盖玻片的6孔细胞培养板,接种12 h后,按1.1项下方法进行分组并转染细胞。24 h后,进行Hoechst33258细胞染色,共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.4 Bcl-2、TIMP-1和Caspase 3表达情况检测

1.4.1 RT-PCR检测 收集 1×10^7 细胞样本,按试剂盒(北京天根生化科技有限公司)说明书,分别提取各组样本的总RNA,定量后,应用随机引物进行反转录反应,以 β -actin为内参,进行RT-PCR检测。设计引物序列如下,Bcl-2 F: 5'-CAC CAA GAA AGC AGG AAA CC-3', R: 5'-GCA GGA TAG CAG CAC AGG AT-3'; TIMP-1 F: 5'-GAG ATC AAG GTC CTT TCC G-3', R: 5'-TGT ACT TCA GTT TCT GAG CGT A-3'; Caspase 3 F: 5'-GGT TCA TCC AGT CGC TTT G-3', R: 5'-CAT CTT CTC ACT TGG CAT ACA-3'。

1.4.2 蛋白质印迹法检测 将 5×10^7 待检细胞培养24 h后加入RIPA裂解液和1%体积的PMSF裂解细胞收获蛋白,将其稀释至适当浓度,20 μl上样量进行电泳。转膜,一抗杂交(1:1 000),再加HRP偶联的二抗进行反应(1:1 000),ECL显色,记录到胶片上,采用凝胶图像分析系统进行灰度分析。

1.5 统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件包,单因素方

[收稿日期] 2011-03-21 [接受日期] 2011-06-11

[作者简介] 邱芳,博士,主治医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 024-96615-31511, E-mail: roseqifang@163.com

差分析比较组间差异,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 AS-miR-21 转染后 MDA-MB-231 细胞中 miR-21 表达水平下调 Real-time PCR 结果表明,AS-miR-21 转染组 miR-21 表达下调,仅为对照组的(0.13±0.01),与对照组相比差异有统计学意义($P<0.01$);无义寡核苷酸对照组中 miR-21 表达水平未发生明显改变。

2.2 AS-miR-21 转染后 MDA-MB-231 细胞存活率下降 设定对照组细胞存活率为 100%,AS-miR-21 转染组

MDA-MB-231 细胞存活率为(40.82%±0.89%),与对照组相比明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$);无义寡核苷酸组细胞存活率为(95.45%±7.09%),与对照组相比差异无统计学意义。

2.3 AS-miR-21 转染后 MDA-MB-231 细胞凋亡率升高 Hoechst33258染色结果见图 1,可见转染 AS-miR-21 的 MDA-MB-231 细胞与对照组相比,细胞核浓缩现象加剧,表现为致密浓染,说明细胞凋亡加剧;无义寡核苷酸组与对照组相比无明显差异。

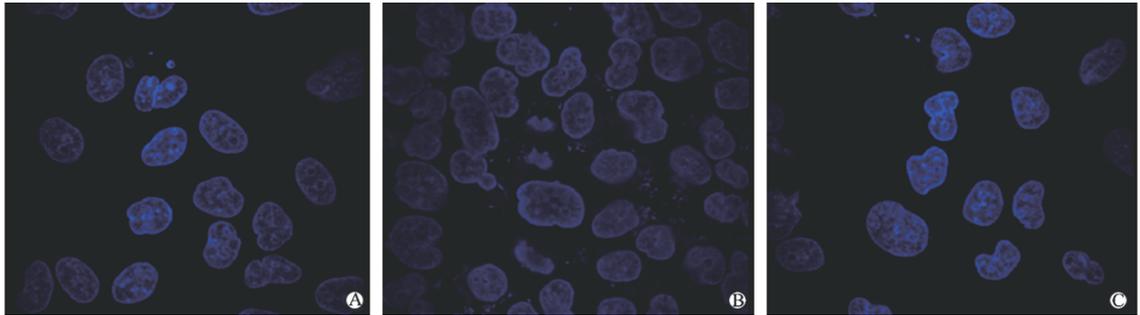


图 1 Hoechst33258 染色检测转染后 MDA-MB-231 细胞凋亡情况

A: 对照组; B: 无义寡核苷酸对照组; C: AS-miR-21 转染组. Original magnification: ×1 000

2.4 AS-miR-21 转染后 MDA-MB-231 细胞 Bcl-2、TIMP-1 和 Caspase 3 表达变化 应用 RT-PCR 方法检测 Bcl-2、TIMP-1 和 Caspase 3 mRNA 水平的表达变化,结果发现在转染 AS-miR-21 的 MDA-MB-231 细胞中,Bcl-2 表达较空白组和无义寡核苷酸对照组 MDA-MB-231 细胞降低;而 TIMP-1 及 Caspase 3 表达均升高($P<0.01$,图 2)。蛋白质印迹检测结果与 RT-PCR 结果一致($P<0.01$,图 3)。

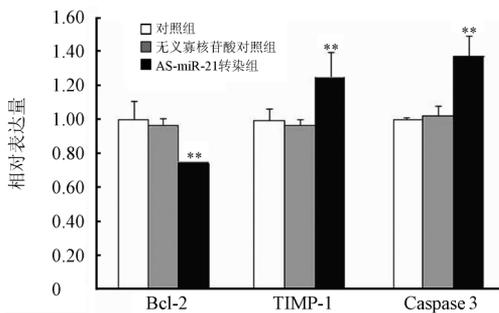


图 2 RT-PCR 检测转染后 MDA-MB-231 细胞各基因表达情况

** $P<0.01$ 与对照组相比; $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

乳腺癌作为严重威胁女性健康的常见恶性肿瘤之一,目前主流的治疗手段仍集中在手术及化疗等方面,但总生存率一直并不理想,寻找治疗乳腺癌新的分子靶标将是今后研究的主要方向^[3]。近年人们对于 miRNA 在肿瘤发生、发展中的作用以及针对 miRNA 进行基因治疗进行了多层面的研

究。一种 miRNA 通常会对多个靶基因起调控作用,因此如果以其为治疗靶点,则治疗效率远高于针对单一靶基因^[4]。miR-21 作为在许多恶性肿瘤细胞中表达上调的 miRNA 代表,在乳腺癌组织中的表达水平远高于正常组织。而研究表明 miR-21 的反义寡聚核苷酸能在体外明显抑制多种肿瘤细胞的生长并诱导其凋亡^[5]。为此,本研究采用 AS-miR-21 体外转染乳腺癌细胞株 MDA-MB-231,观察抑制 miR-21 表达对乳腺癌细胞增殖及凋亡的影响,对体外以 miR-21 为靶点的乳腺癌基因治疗进行了初步探讨。

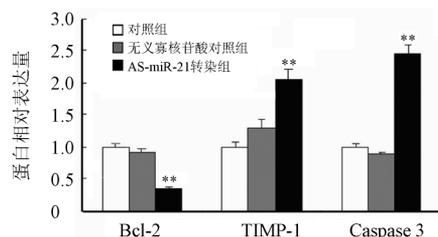
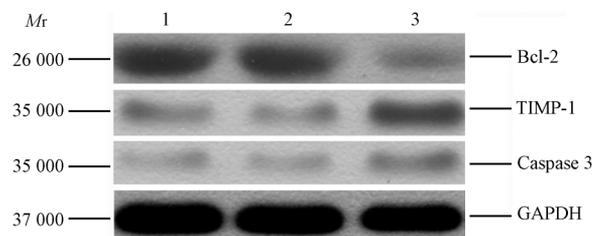


图 3 蛋白质印迹检测 Bcl-2、TIMP-1 和 Caspase 3 表达

1: 对照组; 2: 无义寡核苷酸对照组; 3: AS-miR-21 转染组. ** $P<0.01$ 与对照组相比; $n=3, \bar{x} \pm s$

纽约大学比较功能基因组中心提供的 PicTar 预测,可能受 miR-21 调控的靶标约 190 个^[6]。Bcl-2 是肿瘤组织中重要的原癌基因,其编码的 Bcl-2 蛋白的高度表达能够抑制细胞凋亡,促进细胞增生^[7]。Caspase 3 作为凋亡机制的核心蛋白酶,是重要的凋亡调控因子,其表达水平可能作为乳腺癌临床评价及预后判断的参考指标。基质金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs) 家族主要抑制基质金属蛋白酶 MMPs 的活性,从而影响肿瘤的生长、浸润和转移,也有研究显示在乳腺癌组织中 TIMP-1 表达量较高,其机制仍不清楚,但对 TIMP-1 进行的 shRNA 干扰试验并未对肿瘤细胞产生影响^[8]。根据上述研究,推测 miR-21 表达水平下调后, Bcl-2、TIMP-1 和 Caspase 3 的表达可能会受到不同程度影响。因此,本研究采用 RT-PCR 和蛋白质印迹法考察了三者的表达。

本研究结果证实,经 AS-miR-21 转染后,肿瘤细胞凋亡比例明显增高; Bcl-2 蛋白在转染后肿瘤细胞中表达降低,表明经过 AS-miR-21 转染后肿瘤细胞 DNA 复制、增殖活性降低; Hoechst33258 染色结果显示在下调 miR-21 表达水平后肿瘤细胞凋亡程度加剧,而抑癌基因 TIMP-1 及 Caspase 3 表达量升高,也证明肿瘤细胞增殖可能受到抑制。推测 miR-21 可能通过对肿瘤抑制相关蛋白 TIMP-1 及 Caspase 3 和肿瘤增殖相关蛋白 Bcl-2 等的表达调控以及诱导凋亡抑制肿瘤细胞生长,这为进一步鉴定 miR-21 下游的靶标蛋白,阐明乳腺癌发病、增殖、迁移机制,制定有效的乳腺癌基因治疗策略提供了依据。

[参考文献]

[1] Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano A E, Hoon

D S. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer[J]. Clin Chem, 2011, 57: 84-91.

- [2] Chart J A, Krichevsky A M, Kosik K S. MicroRNA-21 is an anti-apoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. Cancer Res, 2005, 65: 6029-6033.
- [3] Song B, Wang C, Liu J, Wang X, Lv L, Wei L, et al. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 29.
- [4] Chart J A, Krichevsky A M, Kosik K S. MicroRNA-21 is an anti-apoptotic factor in human glioblastoma cells[J]. Cancer Res, 2005, 65: 6029-6033.
- [5] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6: 857-866.
- [6] Si M L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y Y, et al. miR-21-mediated tumor growth[J]. Oncogene, 2007, 26: 2799-2803.
- [7] Ke H, Pei J, Ni Z, Xia H, Qi H, Wodds T, et al. Putative tumor suppressor Lats2 induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and Bcl-x_L[J]. Exp Cell Res, 2004, 298: 329-338.
- [8] Bigelow R L, Williams B J, Carroll J L, Daves L K, Cardelli J A. TIMP-1 overexpression promotes tumorigenesis of MDA-MB-231 breast cancer cells and alters expression of a subset of cancer promoting genes *in vivo* distinct from those observed *in vitro* [J]. Breast Cancer Res Treat, 2009, 117: 31-44.

[本文编辑] 孙岩