论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0568-04

miR-206 抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Cdc42 蛋白表达及其对细胞骨架的影响

刘 浩,曹友德,叶维霞,孙阳阳 (400016 重庆,重庆医科大学基础医学院病理学教研室,分子医学与肿瘤研究中心)

[摘要] 目的 探讨 miR-206 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 Cdc42 表达的调控及对细胞骨架的影响。**方法** 采用 Lipofectamine™ 2000 转染 miR-206 进入 MDA-MB-231 细胞,48 h 后 Western blot 检测转染后乳腺癌细胞 Cdc42、MMP-2 和 MMP-9 蛋白质表达。用免疫荧光显微镜观察细胞丝状伪足的改变,进一步用侵袭迁移实验检测转染前后细胞侵袭力和迁移力的变化。**结果** Western blot 检测 Cdc42、MMP-2 和 MMP-9 在转染前后的表达结果,其条带灰度值与阴性对照组相比明显下降($P<0.05$);细胞免疫荧光计数每个细胞平均丝状伪足数,空白对照组为(14.99±5.53),表皮生长因子(EGF)组为(23.59±3.92),miR-206 转染组为(9.45±3.59),miR-206 + EGF 组为(11.77±2.85)。与空白对照组和 EGF 组比较,miR-206 转染组或 miR-206 + EGF 组细胞丝状伪足明显减少($P<0.05$)。侵袭实验结果显示,小室膜下的细胞数量空白对照组为(311.7±23.5),miR-206 转染组为(65.0±13.9),二者差异有统计学意义($P<0.01$)。迁移实验结果显示,小室膜下的细胞数量空白对照组为(793.0±76.3),而 miR-206 转染组为(415.3±20.0),二者差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** miR-206 能抑制 MDA-MB-231 细胞 Cdc42 的表达和细胞丝状伪足的形成,并且能抑制细胞的侵袭迁移能力。

[关键词] 乳腺肿瘤;侵袭;转移;miR-206;Cdc42

[中图法分类号] R342.22;R73-36;R737.9 **[文献标志码]** A

miR-206 inhibits Cdc42 protein expression, invasion and migration of MDA-MB-231 cells

Liu Hao, Cao Youde, YE Weixia, Sun Yangyang (Department of Pathology, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] Objective To investigate whether miR-206 can regulate Cdc42 protein expression and cytoskeleton remodeling. **Methods** miR-206 was transfected into MDA-MB-231 cells using Lipofectamine™ 2000, and the transfected cells were harvested in 48 h. Western blot analysis was used to detect the protein expressions of Cdc42, MMP-2 and MMP-9. Actin-Tracker Green was used to stain F-actin and filopodia was observed by fluorescent microscopy. Invasion assay and Transwell migration assay were taken to examine the invasive and migratory ability of cells before and after the transfection respectively. **Results** Protein expressions of Cdc42, MMP-2 and MMP-9 were all down-regulated ($P<0.01$). The number of filopodia per cell in the blank group (untransfected group) was 14.99±5.53, in EGF group was 23.59±3.92, miR-206 group was (9.45±3.59), and miR-206 + EGF group was 11.77±2.85. The filopodia numbers in miR-206 and miR206 + EGF groups was much less than those in the blank group and EGF group ($P<0.05$). The invasion and migration of miR-206 transfected MDA-MB-231 cells (65.0±13.9) were significantly lower than MDA-MB-231 cells [blank control, 311.7±23.5, $P<0.05$]; Transwell migratory assay indicated that there were more migrated cells in blank control group than in miR-206 group [793.0±76.3 *vs* 415.3±20.0, $P<0.05$]. **Conclusion** miR-206 downregulates Cdc42 protein expression in MDA-MB-231 cells, inhibits the formation of filopodia, and thus inhibits the invasion and migration efficiency of the cells.

[Key words] breast tumor; invasion; migration; miR-206; Cdc42

Corresponding author: Cao Youde, E-mail:cydcyj@163.com

microRNAs 是一种单链、非编码 RNAs[1]。近年来,研究者发现 microRNAs 具有重要的生物学作用,包括对乳腺癌侵袭转移的调控作用[2]。Huang 等[3]发现 miR-373 和 miR-520c 能促进肿瘤的侵袭转移,Tavazoie 等[4]发现内源性的 microRNAs 能抑制肿瘤的侵袭转移。在高转移性的 MDA-MB-231 细胞中,miR-206 的

[通信作者] 曹友德,E-mail:cydcyj@163.com

表达减少;在这些细胞中恢复 miR-206 的表达后,MDA-MB-231 细胞的侵袭转移能力减弱。miR-206 是如何抑制乳腺癌细胞侵袭和转移却仍不清楚。本研究拟转染 miR-206 进入 MDA-MB-231 细胞,使其过表达 miR-206,进一步检测与乳腺癌侵袭转移相关的蛋白质如 Cdc42、MMP-2 和 MMP-9 的表达,并对细胞形态和侵袭迁移能力进行观察和研究。

1 材料与方法

1.1 miR-206 模拟体(miR-206 mimics)及主要试剂

miR-206 mimics 购买于上海吉玛制药技术有限公司。miR-206 正义链:5′-UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG-3′,反义链:5′-ACACACUUCCUUACAUUCCAUU-3′;阴性对照:正义链:5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′,反义链:5′-GCGUGACACGUUCGGAGAATT-3′。脂质体(Lipofectamine™2000)购买于 Invitrogen 公司,SDS-PAGE 凝胶试剂盒购买于博士德生物工程有限公司,抗 Cdc42 抗体、抗 NF-kb 抗体购买于 Santa Cruz 公司,抗 MMP-2 抗体、MMP-9 抗体购买于北京博奥森生物技术有限公司,辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购买于中杉金桥,Pro-light HRP 化学发光检测试剂购买于天根生物技术有限公司,微丝绿色荧光探针(Actin-Traker Green)购买于碧云天生物技术研究所,EGF 细胞因子购买于 PEPROTECH 公司,Transwell(0.8 μm)小室购买于 Millipore 公司,基质胶(BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix)购买于 BD 公司。

1.2 miR-206 mimics 的转染

按照 Invitrogen 公司提供的操作手册中描述的 Reverse Transfection 进行转染。在 10 μl 的 miR-206 中加入 2×10^5 细胞。转染前后细胞均用加入 10% 小牛血清的无抗 RPMI1640 培养,48 h 后收集细胞。

1.3 Western blot 检测蛋白质表达

在6孔板中培养和转染细胞。48 h 后在每个空中加入 100 μl 添加了 10% PMSF 的 Western 及 IP 细胞裂解液,细胞充分裂解后收集到 1.5 ml 的 EP 管中,-20 ℃裂解 20 min,13 000 r/min 4 ℃离心 5 min,取上清液。MMP-2、MMP-9、β-actin 电泳时使用 10% 的胶,Cdc42 电泳时使用 15% 的胶,上样量为每孔 20 μg 蛋白。转膜用 PVDF 膜,30 V 15 min。5% 的脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,化学发光检测。

1.4 细胞免疫荧光检测 miR-206 对 MDA-MB-231 细胞形态影响

在 24 孔板中培养细胞,分别设置空白对照组、空脂质体组、阴性对照组和 miR-206 转染组,48 h 后,用 4% 的多聚甲醛室温下固定细胞 10 min,TBST×(TBS+0.1% Triton X-100)洗细胞 3 次,每次 5 min,在每个孔中加入 200 μl 以 1∶200 稀释的 Actin-Tracker Green,室温避光孵育 60 min,TBST×洗 3 次,每次 5 min,封片,荧光显微镜进行观察。以上实验重复 3 次。

1.5 细胞免疫荧光检测 miR-206 对 F-actin 的影响

在 24 孔板中培养细胞,分别设置阴性对照组、表皮生长因子(EGF)组、miR-206 转染组和 EGF + miR-206 组 4 个组,48 h 后,在 EGF 组和 miR-206 + EGF 组中分别加入 EGF,最终浓度为 100 ng/ml,5 min 后吸去培养液,立即用 4% 的多聚甲醛室温下固定细胞 10 min,TBST×(TBS+0.1% Triton X-100)洗细胞 3 次,每次 5 min,在每个孔中加入 200 μl 以 1∶200 稀释的 Actin-Tracker Green,室温避光孵育 60 min,TBST×洗 3 次,每次 5 min,封片,荧光显微镜进行观察。以上实验重复 3 次,取其均值。

1.6 侵袭实验检测 MDA-MB-231 细胞侵袭力的变化

用 RPMI1640 以 1∶8 的比例稀释基质胶,混匀,铺在小室上,室温放置 1 h,转染,在上室中加入添加了 5% BSA 的 200 μl 无血清的细胞悬液(5×10^5/ml),在下室中加入 500 μl 含有 10% 胎牛血清的完全培养液。48 h 后,小心擦去上层基质胶,用结晶紫对下层膜进行染色 5 min,倒置相差显微镜拍照。以上实验重复 3 次,取其均值。

1.7 迁移实验检测 MDA-MB-231 细胞迁移力的变化

实验步骤与侵袭实验一样,只是小室内不铺基质胶。以上实验各设 3 个复组,取其均值。

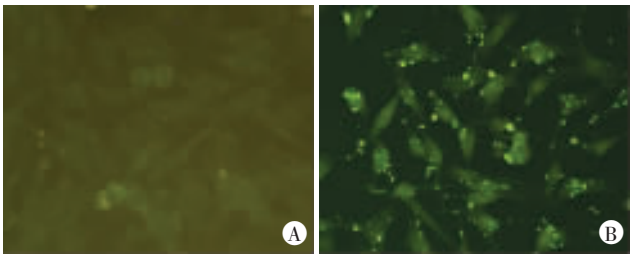
1.8 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。实验均值以 $\bar{x}\pm s$ 表示,均数间差异采用 t 检验或 One-Way ANOVA 检验。

2 结果

2.1 miR-206 的转染效率

转染 miR-206 进 MDA-MB-231 细胞,细胞中带有绿色荧光的小点即为 miR-206。计数 50 个细胞内的平均绿色荧光点数。90% 的细胞荧光点多于 5 个,空白对照组内未见荧光(图 1)。

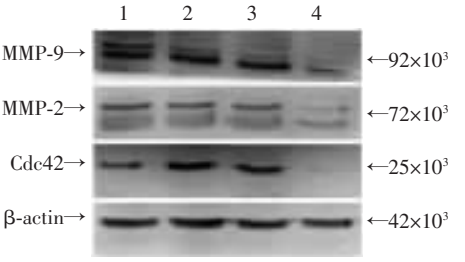


A:空白对照组;B: miR-206 转染组

图 1 miR-206 转染 48 h MDA-MB-231 细胞 (荧光显微镜 ×400)

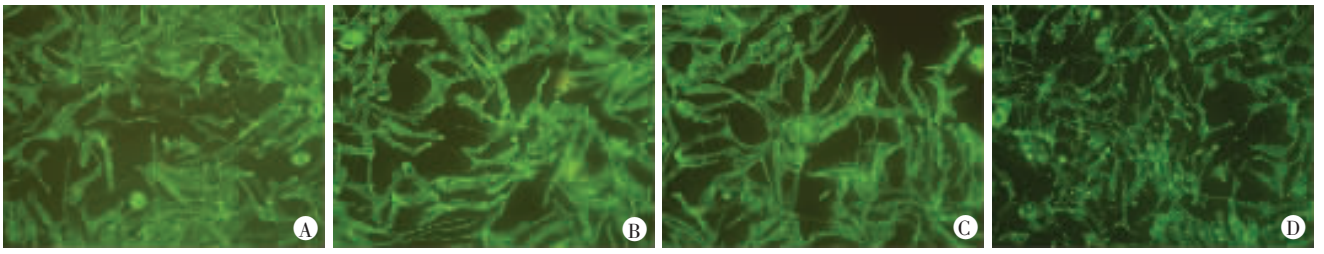
2.2 Western blot 检测蛋白质的结果

Western blot 检测了 Cdc42、MMP-2 和 MMP-9 在转染前后的表达情况。Quantity One 测量条带灰度值,并对其进行分析。转染组灰度值较空白对照组、空脂质体组和阴性对照组显著下降($P<0.01$,图 2,表 1)。



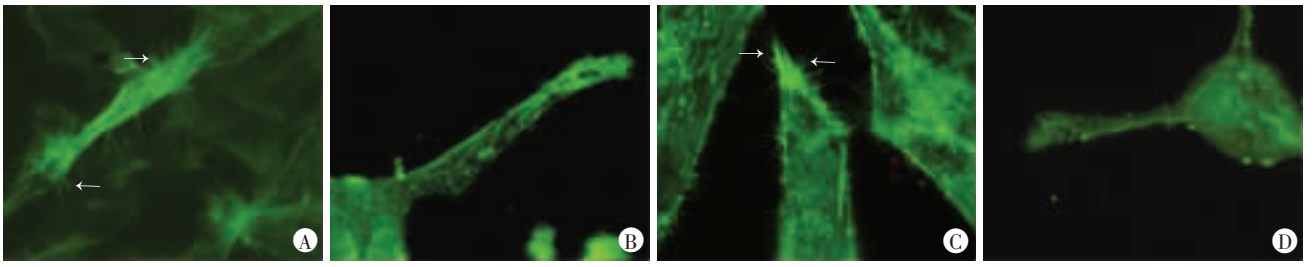
1:空白对照组;2:空脂质体组;3:阴性对照组;4:miR-206 转染组

图 2 Western blot 检测转染 48 h 后细胞蛋白质表达的变化



A:空白对照组;B:空脂质体组;C:阴性对照组;D:miR-206 转染组

图3 miR-206 对 MDA-MB-231 细胞形态的影响 （免疫荧光显微镜 ×400）



A:阴性对照组; B: miR-206 转染组; C: EGF 组; D: miR-206 + EGF 组; ↑:丝状伪足

图4 各组细胞丝状伪足的变化 （免疫荧光显微镜 ×400）

表1 各组中 Cdc42、MMP-2 和 MMP-9 蛋白质的相对灰度值

($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Cdc42	MMP-2	MMP-9
空白对照组	0.100 4 ± 0.003 2[a]	0.620 6 ± 0.023 6[a]	1.267 8 ± 0.051 7[a]
空脂质体组	0.187 7 ± 0.012 1[a]	0.420 5 ± 0.004 9[a]	1.078 7 ± 0.015 1[a]
阴性对照组	0.161 8 ± 0.012 3[a]	0.467 5 ± 0.080 3[a]	0.145 4 ± 0.113 2[a]
miR-206 转染组	0.036 0 ± 0.003 2	0.261 6 ± 0.024 0	0.700 5 ± 0.056 1

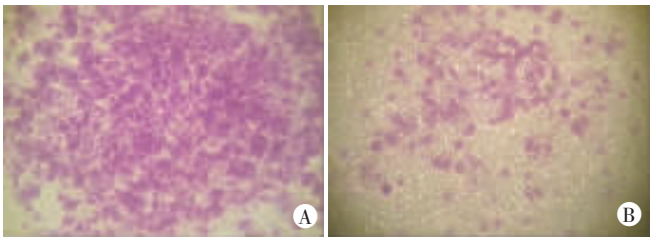
a: $P<0.01$, 与 miR-206 转染组比较

2.3 细胞免疫荧光观察

在显微镜下,细胞呈梭形,多数为两极(图 3A,B,C)。转染 miR-206 后,细胞的两极变长变细,胞体呈圆形或椭圆形(图 3D)。培养液中的 MDA-MB-231 细胞有一些丝状伪足,加入 EGF 刺激后,丝状伪足变多变长(图 4)。经计数,丝状伪足的数量分别为:空白对照组(14.99 ± 5.53),EGF 组(23.59 ± 3.92),miR-206 转染组(9.45 ± 3.59),miR-206 + EGF 组(11.77 ± 2.85)。miR-206 转染组细胞丝状伪足数量明显少于其他各组($P<0.05$)。结果提示转染 miR-206 后,丝状伪足数量减少,即使在 EGF 的刺激下也受到明显抑制。

2.4 侵袭迁移实验

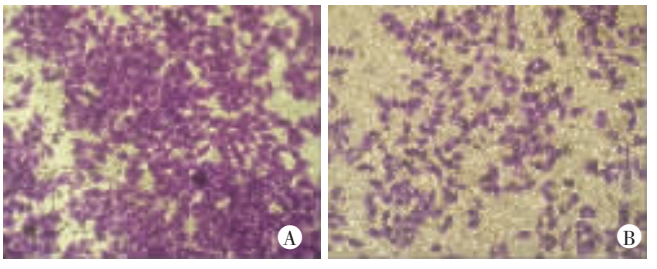
侵袭实验结果显示:空白对照组为(317.67 ± 23.54),miR-206 转染组(65.00 ± 13.89)。结果显示,转染 miR-206 进入 MDA-MB-231 细胞后,转染组侵袭细胞数量明显减少($P<0.05$,图 5)。迁移结果显示:空白对照组细胞数(793.00 ± 76.34),miR-206 转染组为(415.33 ± 20.01)。结果提示,运动的细胞明显减少($P<0.05$,图 6)。



A:空白对照组;B: miR-206 转染组

图5 侵袭实验观察转染 48 h 后下层膜上的细胞

（倒置相差显微镜 ×400）



A:空白对照组,B: miR-206 转染组

图6 迁移实验观察转染 48 h 后下层膜上的细胞

（倒置相差显微镜 ×400）

3 讨论

microRNAs 是一种长度只有 19 ~ 30 个核苷酸的非编码 RNAs,它能降解 mRNAs 或通过翻译抑制作用来抑制 mRNAs 的表达[1]。近年研究不断发现,microRNA 发挥着广泛的生理调控作用,包括对肿瘤侵袭转移的影响[2-6]。Tavazoie 等[4]发现,在高转移性的

MDA-MB-231 细胞中 miR-206 的表达下调,miR-206 不改变肿瘤细胞的生长率或凋亡率,却能减弱肿瘤细胞侵袭和迁移的能力。通过 Targetscan 和 Pictar 的预测,在众多靶基因中,Cdc42 吸引了我们的注意,因为,Cdc42 与细胞肌动蛋白骨架重塑和细胞运动有关,并且对肿瘤细胞丝状伪足(filopodia)和侵袭性伪足(invadopodia)的形成也有重要作用[7,8]。我们转染 miR-206 进入 MDA-MB-231 细胞,上调它的表达,并观察它对 MDA-MB-231 细胞的影响。通过检测,我们发现转染了 miR-206 的细胞 Cdc42 的表达有所下调,然而,miR-206 是否直接作用于 Cdc42 的 mRNA3′端非编码区或通过其他间接途径发挥的作用,还有待进一步的研究。在检测中,我们还发现,转染组细胞 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达均有下调。MMP-2 和 MMP-9 在乳腺癌的侵袭转移中有重要作用,并且也是侵袭性伪足的组成部分[9-10]。

Cdc42 能调节其下游效应分子 N-WASP,介导丝状伪足和侵袭性伪足(podosomes/invadopodia)的形成[8,11]。在细胞免疫荧光实验中,我们发现不仅转染组细胞的丝状伪足相对于空白对照组明显减少、变短,而且在转染组中加入 EGF 刺激后,细胞的丝状伪足也并没增加,明显少于空白对照组细胞经 EGF 作用后细胞的丝状伪足。丝状伪足能感受 EGF 并通过受体对其梯度运输产生反应[12]。阻断丝状伪足的形成能抑制扁平伪足(lamellipodium)形成新的局部黏附[13]。可见,miR-206 能抑制丝状伪足的形成并抑制其感受 EGF。在迁移实验中,我们发现转染了 miR-206 的细胞,其迁移能力明显减弱,这与丝状伪足数量的多少有一定的相关性。miR-206 也许能通过抑制细胞丝状伪足的形成来抑制细胞的运动迁移能力。在侵袭实验中我们发现转染组侵入基质胶,穿过膜的细胞明显减少,这很可能与侵袭性伪足有关,值得进一步研究。

Cdc42 在细胞信号转导中,特别是对肌动蛋白骨架的调节有重要作用[14]。本实验结果表明 miR-206 抑制肿瘤侵袭转移很可能是通过调节细胞肌动蛋白骨架,如丝状伪足得以实现。miR-206 除了下调 Cdc42,还调控着其他蛋白质的表达。Song 等[15]发现 miR-206 能以 Notch3 为靶基因下调其表达,激活凋亡和抑制肿瘤细胞的运动。可见,miR-206 的肿瘤调控作用很广泛,其靶基因有待我们进一步发现和研究。

参考文献:

[1] Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 287-297.

[2] Khoshnaw S M, Green A R, Powe D G, *et al*. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer[J]. J Clin Pathol, 2009, 62(5): 422-428.

[3] Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, *et al*. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(2): 202-210.

[4] Tavazoie S F, Alarcon C, Oskarsson T, *et al*. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis[J]. Nature, 2008, 451(7175): 147-152.

[5] Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg R A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer[J]. Nature, 2007, 449(7163): 682-688.

[6] Wu H, Zhu S, Mo Y Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer[J]. Cell Res, 2009, 19(4): 439-448.

[7] El-Sibai M, Nalbant P, Pang H, *et al*. Cdc42 is required for EGF-stimulated protrusion and motility in MTLn3 carcinoma cells[J]. J Cell Sci, 2007, 120(Pt 19): 3465-3474.

[8] Yamaguchi H, Lorenz M, Kempiak S, *et al*. Molecular mechanisms of invadopodium formation: the role of the N-WASP-Arp2/3 complex pathway and cofilin[J]. J Cell Biol, 2005, 168(3): 441-452.

[9] Mizutani K, Miki H, He H, *et al*. Essential role of neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts[J]. Cancer Res, 2002, 62(3): 669-674.

[10] Monsky W L, Lin C Y, Aoyama A, *et al*. A potential marker protease of invasiveness, seprase, is localized on invadopodia of human malignant melanoma cells[J]. Cancer Res, 1994, 54(21): 5702-5710.

[11] Nobes C D. Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia[J]. Cell, 1995, 81(1): 53-62.

[12] Lidke D S, Lidke K A, Rieger B, *et al*. Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors[J]. J Cell Biol, 2005, 170(4): 619-626.

[13] Schafer C, Borm B, Born S, *et al*. One step ahead: role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(7): 1212-1224.

[14] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton[J]. Science, 1998, 279(5350): 509-514.

[15] Song G, Zhang Y, Wang L. MicroRNA-206 targets notch3, activates apoptosis, inhibits tumor cell migration and foci formation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(46): 31921-31927.

(**收稿**:2009-09-25;**修回**:2009-11-08)

(编辑 张 维)