论著

文章编号:1000-5404(2011)10-0984-04

实时定量PCR检测miR-373*、miR-200c在乳腺癌干细胞中的表达及其靶基因预测

邱 钧[1],金俊余[1],孙建国[1],廖荣霞[2],王欣欣[1],陈正堂[1] (400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所[1];400038 重庆,第三军医大学基础医学部医学英语教研室[2])

【摘要】 **目的** 分析miR-373*、miR-200c在乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells,BCSCs)和MCF-7乳腺癌细胞株中的差异表达。**方法** Trizol法分别抽提乳腺癌干细胞和MCF-7细胞总RNA,实时定量PCR检测miRNAs表达,对表达差异显著的miRNAs进行潜在靶基因预测。**结果** miR-373*在乳腺癌干细胞中较MCF-7细胞高表达(6.684±0.548),而miR-200c在乳腺癌干细胞中较MCF-7细胞低表达(0.345±0.031)。通过软件分析预测,miR-373*与TP53INP2、CASP8、EIF4A1、EEF1A1等基因均具有可能靶位点,miR-200c与TCF2、TDE2、SYVN1、PDCD10、RAP2C等基因均具有可能靶位点。**结论** miR-373*在乳腺癌干细胞中高表达,可能是一个潜在的癌基因。miR-200c在乳腺癌干细胞中低表达,可能是一个潜在的抑癌基因。

【关键词】 miRNAs;乳腺癌;肿瘤干细胞;非编码RNA

【中图法分类号】 R394.3;R730.3;R737.9 **【文献标志码】** A

Detection of miR-373* and miR-200c expression in breast cancer stem cells by real-time PCR and prediction of their target genes

Qiu Jun[1], Jin Junyu[1], Sun Jianguo[1], Liao Rongxia[2], Wang Xinxin[1], Chen Zhengtang[1] ([1]Cancer Research Center, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; [2]Department of Medical English, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 **Objective** To analyze the differential expression of miR-373* and miR-200c in breast cancer stem cells (BCSCs) and breast cancer cell line MCF-7. **Methods** Total RNA of BCSCs and MCF-7 cells were extracted with Trizol. MicroRNA (miRNA) expression was detected by real-time PCR. The potential target genes of miRNAs that exhibited significant differential expression were predicted using software PicTar, miRanda, and Targetscan. **Results** Compared with those in MCF-7 cells, the expression levels of miR-373* and miR-200c were about 7 times higher (fold change = 6.684±0.548) and about 3 times lower (fold change = 0.345±0.031), respectively, in BCSCs. Prediction software analysis indicated that miR-373* had potential target sites in TP53INP2, CASP8, EIF4A1 and EEF1A1, and miR-200c had potential target sites in TCF2, TDE2, SYVN1, and some RAS oncogene family members. **Conclusion** In comparison with MCF-7 cells, BCSCs show up-regulated expression of miR-373*, which may be a potential oncogene, and down-regulated expression of miR-200c, which may be a potential anti-oncogene.

【Key words】 miRNAs; breast cancer; cancer stem cells; non-coding RNAs

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30772108), the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2008AA02Z104) and the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06G069) and the National Natural Science Foundation of China (30971289). Corresponding author: Chen Zhengtang, Tel: 86-23-68755626, E-mail: czt05@163.com@mail.tmmu.com.cn; Sun Jianguo, Tel: 86-23-68774490, E-mail: sunjg09@yahoo.com.cn

微小RNA(microRNAs,miRNAs)是一类19~25 nt的小分子非编码单链RNA,通过与靶mRNA的3′非翻译区(3′-UTR)结合,导致靶mRNA的降解或者抑制其翻译,在转录或转录后水平调控编码蛋白基因的表达,从而调控细胞分化、生长、增殖、代谢、凋亡等。miRNAs的表达异常与多种肿瘤相关[1]。乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,发病率占全身各种恶性肿瘤的7%~10%,仅次于子宫癌。常因癌细胞发生耐药、复发和转移,其根本原因是治疗后乳腺癌干细胞(breast cancer stem cells,BCSCs)的残留[2]。乳腺癌干细胞表面分子表型为$ESA^+CD44^+CD24^{-/low}$,具有干

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(30772108);国家高技术研究发展计划(863计划,2008AA02Z104);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G069);国家自然科学基金(30971289)

【通信作者】 陈正堂,电话:(023)68755626,E-mail:czt05@163.com
孙建国,电话:(023)68774490,E-mail:sunjg09@yahoo.com.cn

细胞自我更新以及多项分化潜能的基本特性。通过 miRNAs 在乳腺癌干细胞中作用的研究，可进一步阐明乳腺癌干细胞自我维持、增殖及分化过程的内在机制，从而为临床上根治肿瘤和防止肿瘤复发与转移提供新的思路。

我们在前期研究中利用北京博奥生物芯片有限公司研制的哺乳动物 miRNAs 检测微阵列，已成功筛查了乳腺癌 miRNAs 表达谱[3] 及乳腺癌干细胞 miRNAs 表达谱[4]，其中 miR-373* 在 BCSCs 中较 MCF-7 细胞高表达，miR-200c 在 BCSCs 中与 MCF-7 细胞表达差异不显著(1.720)。国外文献表明 miR-200c 及其 miR-200 家族在乳腺癌中起着重要作用，是正常乳腺上皮干细胞发生恶性变的重要分子[5]。因此，尽管芯片结果显示其差异不明显，本研究仍将其作为研究对象，同时验证芯片结果的准确性。本研究运用实时定量 PCR 分析 miR-373*、miR-200c 在乳腺癌干细胞与 MCF-7 乳腺癌细胞株中的差异表达并与前期研究的芯片结果进行验证，对表达差异显著 miRNA 进行靶位点预测，初步探讨关键 miRNAs 参与乳腺癌发生、发展及转移的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器

Trizol、DEPC(美国 Invitrogen 公司)，DMEM 培养基、优等胎牛血清(美国 Hyclone 公司)，胰蛋白酶(Amresco 公司)，2000 bp DNA Ladder(Promega 公司)，Lightcycler-faststart DNA master SYBR green I(Roche 公司)，Light Cycler PCR 仪(型号 PTC-225，Roche 公司)，MCF-7 乳腺癌细胞株由本肿瘤中心提供。

1.2 乳腺癌干细胞的分离及鉴定

BCSCs 培养及分选方法参见文献[4]。成功分离并鉴定 BCSCs，满足实验需求，备用。

1.3 MCF-7 细胞培养

MCF-7 细胞用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清及 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养，每 3 天更换培养基，0.25% 胰蛋白酶消化传代。取对数生长期的细胞用于后继实验。

1.4 总 RNA 提取

分别用 Trizol 一步法提取 BCSCs 和 MCF-7 细胞总 RNA，异丙醇法浓缩 RNA，经 RNA 琼脂糖凝胶电泳分光光度计测总 RNA 纯度。

1.5 实时定量 PCR 检测

实时定量 PCR 引物均用 Primer Express version 2.0 设计(表 1)。取 0.05 μg 总 RNA 在 Superscript Ⅱ反转录酶作用下反转录形成第 1 链 cDNA；以实时定量 miRNAs 特异引物和第 1 链 cDNA 为模板进行 PCR 反应。反应条件：镁离子浓度 3 mmol/L，引物浓度 0.25 μmol/L，95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 30 s，重复 40 个循环。70～95 ℃绘制熔解曲线，并进行数据分析。PCR 反应以 U6 RNA 作为用于归一化的基因(内标)。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

miRNAs	上游 (5′→3′)	下游 (5′→3′)	片段长度
miR-373*	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACGGAAAG	ACTCAAAATGGGGGCGCT	236 bp
miR-200c	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT ATTCGCACTGGATACGACCCATCA	CGCTAATACTGCCGGGTAATG	214 bp
U6 RNA	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	163 bp

1.6 数据分析

采用美国 Biosystems 公司 SDS 2.2.2 软件进行数据处理。目的基因的相对表达水平可以采用 $^{\triangle\triangle Ct}$ 方法来计算。单次实验，比较实时定量 PCR 与前期研究芯片结果[4] 的符合率，初步判断芯片结果的真实性。对于一致的实验结果，重复进行 3 次实时定量 PCR，进一步验证实时定量 PCR 的可靠性，将原始数据(Ct 值) 取 3 次重复的平均值后用内参基因 U6 RNA 进行归一化，计算 miR-373*、miR-200c 的差异表达，并与芯片结果进行比较。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件进行组间两两比较 t 检验。

1.7 miRNAs 靶基因预测

应用预测软件 PicTar、miRanda 和 Targetscan 预测 miRNA 的靶基因，选取至少 2 种计算方法均能预测到的基因作为其潜在靶基因。

2 结果

2.1 总 RNA 质量检测

经 RNA 琼脂糖凝胶电泳，清晰可见 28S、18S、5S 条带，且 28S∶18S 基本在 2∶1，5S 较弱，证明所提取的 RNA 完整性较好，无降解。满足实验需求。

2.2 实时定量 PCR 分析

各 miRNAs 扩增产物的熔解曲线均可扩增出单峰，且 3 次重复表现一致，表明扩增的特异性和重复性良好。

miR-373* 在 BCSCs 细胞中较 MCF-7 细胞高表达(6.684 ± 0.548)，miR-200c 在 BCSCs 细胞中较 MCF-7 细胞低表达(0.345 ± 0.031，表 2)。由于小 RNA 在芯片杂交前进行了扩增实验，对于差异不显著的 miRNAs 的敏感性较定量 PCR 低。因此，前述芯片的检测结果是基本可信的。

表 2 实时定量 PCR 与芯片数据的对比分析

名称	扩增效率	Ct(BCSCSs)	Ct(MCF-7)	△Ct (BCSCSs－MCF7)	BCSCSs/U6	MCF-7/U6	BCSCSs/MCF7	芯片 (BCSCSs/MCF7)
U6 RNA	1.893 ± 0.087	18.307 ± 0.163	15.003 ± 0.227	3.303 ± 0.297	－	－	8.154 ± 0.516	－
miR-373*	1.902 ± 0.040	24.370 ± 1.438	24.060 ± 1.404	0.310 ± 0.096	0.019 ± 0.001	0.003 ± 0.000	6.684 ± 0.548	6.183
miR-200c	1.888 ± 0.053	24.513 ± 0.658	19.527 ± 0.938	4.987 ± 0.290	0.032 ± 0.004	0.100 ± 0.013	0.345 ± 0.031	1.720

表3 miR-373*、miR-200c靶基因预测

miRNAs	全称	缩写	基本功能
miR-200c	Homo sapiens transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	TMEFF2	生长因子
	Homo sapiens TGFB inducible early growth response	TIEG	生长因子
	Homo sapiens transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	TGFB1I4	生长因子
	Homo sapiens tumor differentially expressed 2	TDE2	肿瘤分化
	Homo sapiens transcription factor 8	TCF8	转录因子
	Homo sapiens transcription factor 2, hepatic ;LF-B3	TCF2	转录因子
	Homo sapiens TATA box binding protein	TBP	信号转导
	Homo sapiens synovial apoptosis inhibitor 1	SYVN1	凋亡抑制
	Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 2	SFRS2	基因剪切
	Homo sapiens splicing factor, arginine/serine-rich 1	SFRS1	基因剪切
	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 [APO-1/CD95 (Fas)-assoc iated phosphatase]	PTPN13	凋亡抑制
	Homo sapiens RAP2C, member of RAS oncogene family	RAP2C	癌基因
	Homo sapiens RAP1B, member of RAS oncogene family	RAP1B	癌基因
	Homo sapiens RAB7, member RAS oncogene family	RAB7	癌基因
	Homo sapiens RAB21, member RAS oncogene family	RAB21	癌基因
	Homo sapiens programmed cell death 10	PDCD10	凋亡抑制
	Homo sapiens GATA binding protein 4	GATA4	信号转导
	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2	FGFR2	生长因子
	Homo sapiens estrogen-related receptor gamma	ESRRG	激素受体
	Homo sapiens epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	EPS8	生长因子
	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 5B	EIF5B	翻译调控
	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3	EIF3S1	翻译调控
	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 2B	EIF2B5	翻译调控
	Homo sapiens androgen-induced proliferation inhibitor	APRIN	激素调控
miR-373*	Homo sapiens tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	TP53INP2	抑癌基因
	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	TNFRSF21	细胞因子
	Homo sapiens methyltransferase like 4	METTL4	甲基化
	Homo sapiens inhibitor of growth family, member 4	ING4	生长因子
	Homo sapiens caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	CASP8	凋亡
	Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 2	FGFR2	生长因子
	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4A	EIF4A1	翻译调控
	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	EEF1A1	翻译调控
	Homo sapiens CDC-like kinase 3	CLK3	细胞周期
	Homo sapiens cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	CDH1	黏附素
	Homo sapiens cell division cycle 25A	CDC25A	细胞分化

2.3 miR-373*、miR-200c靶基因预测

miR-373* 与TP53INP2、CASP8、EIF4A1、EEF1A1等基因均具有可能靶位点，miR-200c与TCF2、TDE2、PDCD10、SYVN1、RAP2C等基因均具有可能靶位点(表3)。

3 讨论

miRNAs作为生物体重要基因的调控分子，起着调控细胞分化、生长、增殖、代谢、凋亡等重要功能。多数肿瘤中存在着miRNAs的上调或者下调，目前对这些miRNAs的研究仍是热点。miRNAs的异常表达参与了乳腺癌的发生、发展及转移，并与肿瘤相关的信号转导通路有密切联系[6]。Ma等[7]研究发现miR-10b在转移性乳腺癌细胞株中的表达明显升高，miR-10b在癌细胞的转移过程中可能起着促进作用。miR-125b在乳腺癌中表达下调[8]，提示可能起着抑癌作用。

肿瘤干细胞是指生长不受控制，在肿瘤组织内数量较少的一群细胞群体，具有自我更新并多向分化的能力，是形成不同分化程度肿瘤细胞和肿瘤不断扩大的源泉。miRNAs通过复杂的网络，对干细胞的自我更新、功能维持和哺乳动物的早期发育起着重要的调控作用。Liao等[9]发现miR-520h可以通过抑制ABCG2的表达，促进造血干细胞向祖细胞的分化。另有研究表明，miR-373*、miR-200c、miR-21、miR-31等miRNAs与人胚胎干细胞的多向分化和自我更新功能密切相关[10]。miRNAs同样也对乳腺癌干细胞起重要的调控作用。Yu等[11]发现在乳腺癌的干细胞中低表达的let-7，通过调控其靶基因Ras影响干细胞的自我更新能力，调控HMGA2的表达影响干细胞的分化能力。因此，对乳腺癌干细胞相关miRNAs的研究，不仅可以探讨其参与乳腺癌干细胞形成分子机制，而且也为miRNAs作为乳腺癌诊断、复发转移检测以及生物治疗靶点的探索奠定了基础。由于小RNA在芯片杂交前进行了扩增实验，因此芯片杂交可能存在着与实际

不符的结果,需进一步验证其真实可靠性。本研究运用实时定量 PCR 分析 miR-373*、miR-200c 在乳腺癌干细胞及 MCF-7 细胞中的表达差异,并对前期基于芯片的结果进行验证,结果显示 miR-373* 在乳腺癌干细胞中较 MCF-7 细胞高表达,与芯片结果一致;miR-200c 在乳腺癌干细胞中较 MCF-7 细胞低表达。O'Day等[12]研究表明 miR-373* 在乳腺癌干细胞高表达,miR-200c 在乳腺癌干细胞低表达,与我们的结果一致。一方面本研究结果与国外研究相一致,表明定量 PCR 是准确的;另一方面也表明,芯片对于差异不显著的 miRNAs 的敏感性较定量 PCR 低。因此,本研究表明,前述芯片的检测结果是基本可信的。

本研究从乳腺癌干细胞调控性相关 miRNAs 入手,探讨 miR-373*、miR-200c 参与乳腺癌发生的机制。国外文献表明,miR-373*、miR-200c 在乳腺癌的发生、发展、转移及预后[13-14]中起着重要的作用。Huang 等[15]发现人 miR-373 在体内和体外均能通过抑制 CD44 的表达来促进肿瘤细胞的转移和浸润,并且在临床乳腺癌转移的患者中,也发现 miR-373 的上调与 CD44 的表达成负相关。Shimono 等[16]发现 miR-200c 通过调节 BMI 1,抑制乳腺癌细胞的增殖和胚胎癌细胞的生长。更重要的是,miR-200c 能强烈的抑制乳腺癌干细胞形成肿瘤的能力。

目前 miR-373*、miR-200c 调控作用的分子机制尚不完全清楚,我们通过 PicTar、miRanda 和 Targetscan 等生物信息学工具初步预测其靶点,发现其作用靶点是与细胞增殖、细胞周期调控、细胞信号转导、癌基因、抑癌基因等生物特性密切相关的基因,涉及到肿瘤发生、发展、转移的各个方面,由此说明某些关键 miRNAs 表达水平的失衡可能是乳腺癌发生和发展的重要原因之一。miRNAs 通过 mRNA 切割或翻译抑制两种机制指导 RISC 下调其靶基因表达,从而发挥作用。miR-373* 在乳腺癌干细胞中高表达,其可能靶基因为细胞周期、分化、调控、凋亡、抑癌基因等相关基因,可能是一个潜在的癌基因,通过下调其可能靶基因(如 TP53INP2),发挥着癌基因的作用。Lee 等[17]发现 miR-373 可能是一个潜在的癌基因,通过抑制 LATS2 的表达促使食管癌的发生。而 miR-200c 在乳腺癌干细胞中低表达,其可能靶基因为生长因子、转录因子、凋亡抑制、癌基因等相关基因,可能是一个潜在的抑癌基因,通过下调其可能靶基因(如 SYVN1)发挥抑癌基因的作用。我们将在后续工作中对这些靶点进行筛选,并应用双荧光素酶报告系统进行靶点验证试验及靶点功能试验,从而明确miRNAs 在肿瘤发生、发展过程中的生物学功能。

参考文献:

[1] Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(4): 259-269.

[2] Zhang M, Rosen J M. Stem cells in the etiology and treatment of cancer[J]. Curr Opin Genet Dev, 2006, 16(1): 60-64.

[3] 廖荣霞,孙建国,张亮,等. 乳腺癌 miRNAs 表达谱检测及初步分析[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28 (22): 2209-2212.

[4] 孙建国, 廖荣霞, 周度金, 等. 基于基因芯片的乳腺癌干细胞 miRNAs 检测分析[J]. 重庆医学, 2007, 36(13): 1280-1282.

[5] Iliopoulos D, Lindahl-Allen M, Polytarchou C, *et al*. Loss of miR-200 inhibition of Suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells [J]. Mol Cell, 2010, 39(5): 761-772.

[6] Wang V, Wu W. MicroRNA: a new player in breast cancer development[J]. Cancer Mol, 2007, 3(5): 133-138.

[7] 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.

[8] Iorio M V, Ferracin M, Liu C G, *et al*. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7065-7070.

[9] Liao R, Sun J, Zhang L, *et al*. MicroRNAs play a role in the development of human hematopoietic stem cells[J]. J Cell Biochem, 2008, 104(3): 805-817.

[10] Sun J G, Liao R X, Qiu J, *et al*. Microarray-based analysis of microRNA expression in breast cancer stem cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 174.

[11] Yu F, Yao H, Zhu P, *et al*. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells [J]. Cell, 2007, 131 (6): 1109-1123.

[12] O'Day E, Lal A. MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2010, 12(2): 201.

[13] Negrini M, Calin G A. Breast cancer metastasis: a microRNA story [J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(2): 203.

[14] Wright J A, Richer J K, Goodall G J. microRNAs and EMT in mammary cells and breast cancer [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 45(2): 213-223.

[15] 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.

[16] Shimono Y, Zabala M, Cho R W, *et al*. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells[J]. Cell, 2009, 138(3): 592-603.

[17] Lee K H, Goan Y G, Hsiao M, *et al*. MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(15): 2529-2538.

(收稿 2011-01-18 修回 2011-03-25)

(编辑 王 红)