doi:10.11659/jjssx.06E021012

·基础研究·

miR-129 靶向调节 Twist1 抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭

黄方杰[1],苏仕新[1],成玉嫦[2] [1.中国科学院大学深圳医院(光明)甲乳外科,广东 深圳 518000;2.中国科学院大学深圳医院(光明)肾内科,广东 深圳 518000]

[摘 要] **目的** 研究 miR-129 对乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响及其作用机制。**方法** 选取乳腺癌 SKBR3、AU565 细胞系,建立过表达与敲低 miR-129 细胞系,将细胞分为 Control-mimic 组、miR-129-mimic 组和 miR-129-mimic + miR-mimic-shRNA 组。采用 RT-PCR 检测 SKBR3、AU565 细胞系中 miR-129 的表达水平,CCK-8 法检测 SKBR3、AU565 细胞系的增殖能力,通过划痕实验及 Transwell实验测定 SKBR3、AU565 细胞系的迁移及侵袭能力。采用生物信息学和双荧光素酶报告系统检测 miR-129 与 Twist1 的互补结合位点,采用 Western blot 对 miR-129 是否是 Twist1 的转录靶点进行分析验证。**结果** miR-129-mimic 组 SKBR3 和 AU565 细胞中 miR-129 的表达水平显著高于 Control-mimic 组($P<0.05$)。miR-129-mimic 组 SKBR3 和 AU565 细胞的增殖能力明显低于 Control-mimic组($P<0.01$),而 miR-129-mimic + miR-mimic-shRNA 组逆转了 miR-129 过表达导致的细胞增殖能力降低。与 Control-mimic 组比较,miR-129-mimic 组中 SKBR3 和 AU565 细胞的迁移及侵袭能力明显下降($P<0.01$)。生物信息学软件分析显示,miR-129与 Twist1 的 3'-UTR 端有互补结合位点,且双荧光素酶试验结果显示,miR-129-mimic 组中 WT-3'Twist-UTR 的荧光素酶活性明显低于 Control-mimic 组($P<0.01$);而 miR-129-mimic 组中 Mut-3'Twist-UTR 的荧光素酶活性与 Control-mimic 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);Western blot 结果显示,与 Control-mimic 组比较,miR-129-mimic 组 SKBR3 和 AU565 细胞中 Twist1 蛋白水平明显下降($P<0.01$)。**结论** miR-129 可通过靶向调节 Twist1 抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,是乳腺癌诊断及治疗的潜在靶点。

[关键词] miR-129;乳腺癌;增殖;迁移;侵袭

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2021-06-03

miR-129 inhibits proliferation, migration and invasion of breast cancer cells by targeting Twist1

HUANG Fang-jie[1], SU Shi-xin[1], CHENG Yu-chang[2] [1. Department of Thyroid and Breast Surgery, Shenzhen Hospital (Guangming), University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen Guangdong 518000, China; 2. Department of Nephrology, Shenzhen Hospital (Guangming), University of Chinese Academy of Sciences, Shenzhen Guangdong 518000, China]

Abstract: Objective To study the effect of miR-129 on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells and its mechanism. **Methods** Breast cancer SKBR3 and AU565 cell lines were selected to establish overexpression and knockdown miR-129 cell lines. The cells were divided into the Control-mimic group, the miR-129-mimic group and the miR-129-mimic + miR-mimic-shRNA group. The expression level of miR-129 in SKBR3 and AU565 cell lines was detected by RT-PCR. The proliferation of SKBR3 and AU565 cell lines was detected by CCK-8 assay. The migration and invasion of SKBR3 and AU565 cell lines were detected by scratch assay and Transwell assay. The complementary binding sites of miR-129 and Twist1 were detected by bioinformatics and dual-luciferase reporter system. Western blot was used to analyze and verify whether miR-129 was a transcription target of Twist1. **Results** The expression level of miR-129 in SKBR3 and AU565 cells in the miR-129-mimic group was significantly higher than that in the Control-mimic group ($P<0.05$). The proliferation of SKBR3 and AU565 cells in the miR-129-mimic group was significantly lower than that in the Control-mimic group ($P<0.01$), while the miR-129-mimic + miR-mimic-shRNA group could reverse the decrease of cell proliferation caused by overexpression of miR-129. Compared with the Control-mimic group, the migration and invasion of SKBR3 and AU565 cells in the miR-129-mimic group were significantly decreased ($P<0.01$). Bioinformatics software analysis showed that miR-129 had complementary binding sites with the 3'-UTR end of Twist1. The results of dual-luciferase assay showed that the luciferase assay of WT-3'Twist-UTR in the miR-129-mimic group was significantly lower than that in the Control-mimic group ($P<0.01$); but there was no significant difference in luciferase activity of Mut-3'Twist-UTR between the miR-129-mimic group and the Control-mimic group ($P>0.05$). Western blot results showed that compared with the Control-mimic group, the Twist1 protein level in SKBR3 and AU565 cells of the miR-129-mimic group was significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** miR-129 can inhibit the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells by targeting Twist1, which is a potential target for diagnosis and treatment of breast cancer.

Keywords: miR-129; breast cancer; proliferation; migration; invasion

[基金项目] 深圳宝安区医疗卫生基础研究项目(2020JD395)

[通信作者] 黄方杰,E-mail:hkfkdhkgd@126.com

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一,具有较高的病死率[1]。早期乳腺癌临床症状不明显,容易造成误诊、漏诊,导致错失最佳治疗时机[2]。探究临床诊断及病理监测的生物学指标对乳腺癌的治疗及预后具有重要意义。miRNA 为非编码的小分子 RNA,其通过结合靶基因的 3' UTR 区影响 mRNA 转录,抑制蛋白质翻译,是理想的肿瘤标记物。miR-129 家族成员在人类癌症中发挥着重要作用[3],且与多种恶性肿瘤(如宫颈癌、食管癌、直肠癌等)的发生、发展密切相关[4]。研究发现 miR-129 在乳腺癌组织中呈低表达,可能与乳腺癌细胞的迁移及侵袭有关[5]。然而,目前关于 miR-129 在乳腺癌细胞增殖、迁移中的作用尚不明确,因此本研究选取人乳腺癌 SKBR3、AU565 细胞系作为研究对象,探讨 miR-129 对乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,并研究其潜在的生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

SKBR3 和 AU565 细胞系由中国科学院细胞库提供,所有细胞株均在 37 ℃、10% 胎牛血清、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 PRMI-1640 培养基中进行培养。采用等分冷冻法进行保存,可供 6 个月内使用。

1.2 试剂与仪器

柠檬酸钠溶液购自北京普析生物科技有限公司;PBS 购自潍坊中汇化工有限公司;乙醇购自济南乐俊化工有限公司;氯仿购自上海渊诺试剂有限公司;异丙醇购自天津大茂试剂有限公司;胎牛血清购自北京亚米生物科技有限公司;去离子水由天津科技大学制备。Control- mimic、miR-129-mimic、miR-mimic-shRNA 质粒、miR-129 引物及 U6 引物均由南京金斯瑞合成。

Trizol 试剂盒、反转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Premix Ex Taq)、ECL 显色液购自 Agencourt AMPure XP;RNA 提取试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司;离心机购自上海卢湘仪器有限公司;Lipofectamine 2000 试剂盒、流式细胞仪、恒温培养箱、凝胶成像系统及全自动酶标仪均购自赛默飞世尔科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞转染 将 SKBR3 或 AU565 细胞系均匀铺在 6 孔板中,待生长密度达 60% 时进行细胞转染。将细胞分为 Control-mimic 组、miR-129-mimic 组、miR-129-mimic + miR-mimic-shRNA 组。利用Lipofectamine 2000 试剂盒将 SKBR3、AU565 细胞系分别转染 Control-mimic、miR-129-mimic 和 miR-129-mimic + miR-mimic-shRNA,所有转染步骤均按照试剂盒说明书执行,转染 24 h 后收集细胞用于后续研究。

1.3.2 RT-PCR 检测细胞系中 miR-129 的表达水平 取转染 48 h 后的细胞,采用 Trizol 法提取细胞中的 RNA,采用 microRNA 茎环法逆转录试剂盒合成cDNA,采用 RT-PCR 试剂盒进行实时定量 PCR,条件设置为:预变性 90 ℃、5 min,变性 95 ℃、10 s,退火 60 ℃、30 s,延伸 70 ℃、30 s,共 40 个循环,以上所有操作严格按照说明书进行。miR-129 上游引物序列为 3'-GATACTCACTTTTTGCGGTCT-5',下游引物序列为 3'-GTGCAGGGTCCGAGGT-5';U6 上游引物序列为 3'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-5',下游引物序列为 3'-CAGGGGCCATGCTAATCTT-5'。

1.3.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力 将细胞以 3×10^4/mL的密度接种于 96 孔培养板中,每孔接种 150 μL细胞,置于 37 ℃、5% CO_2的恒温培养箱中培养过夜,然后加入质粒处理,继续在恒温培养箱过夜。培养结束后,在每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂,继续培养 4 h。用酶标仪检测各孔的 OD 值,计算细胞生长速率。

1.3.4 划痕实验检测细胞迁移能力 用 PBS 将细胞制成混悬液,各取 5×10^5个细胞置于 6 孔板中孵育,确保细胞融合率达到 100%,用枪头在培养皿中进行划痕,PBS 洗涤后,置于不含血清的 PRMI-1640 培养基中,拍照记录初始划痕宽度,然后置于培养基中培养 48 h,再次拍照记录培养后划痕宽度,两次划痕的差值即为细胞的迁移距离。

1.3.5 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 采用预先铺好基质胶的 Transwell 小室,取 200 μL 细胞铺于 Transwell 小室的上室,在下室加入 500 μL 含 15% 胎牛血清的 PRMI-1640 培养基,于 37 ℃、5% CO_2条件下培养 48 h,使用甲醛固定细胞,结晶紫染色后,每个小室取 5 个视野,计算细胞侵袭能力。

1.3.6 靶向基因预测及双荧光素酶报告系统 采用生物信息学软件 TargetScan 预测 miR-129 与 Twist1 的 3'-UTR 端是否存在结合位点。使用 Promega 荧光素酶检测试剂盒对 Control-mimic 组与 miR-129-mimic 组细胞荧光强度进行检测:12 孔板每孔加入细胞裂解液 250 μL,室温振荡 15 min,吸取 20 μL 细胞裂解液,加入 100 μL 双荧光素酶底物后立即放入生物发光检测仪检测 Firefly 荧光强度。在原管加入 100 μL Stop&Glo Reagent,轻柔混匀后立即检测 Renilla 荧光强度。

1.3.7 Western blot 检测 miR-129 对 Twist1 蛋白的影响 取转染 48 h 后的细胞,用含蛋白酶抑制剂(Roche Molecular Biochemicals)的细胞裂解液(20 nm

Tris-HCl pH 7.4,5 mmol/L EDTA,1% Trition X-100,150 mmol/L NaCl,1% DTT)进行裂解,提取总蛋白,进行 SAS-PAGE 凝胶电泳,转膜后用5%的脱脂奶粉进行封闭,然后分别用相应的一抗、二抗对 PVDF 膜进行孵育,充分洗涤后加入 ECL 底物显色液,采用凝胶成像系统进行曝光。采用 ImageJ 测定 Control-mimic 组与 miR-129-mimic 组中 Twist1 蛋白的灰度值并统计表达差异。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 统计学软件进行数据处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料以率(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。细胞的增殖能力采用重复测量分析,组间差异采用 *Tukey* 法分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-129 的表达水平检测

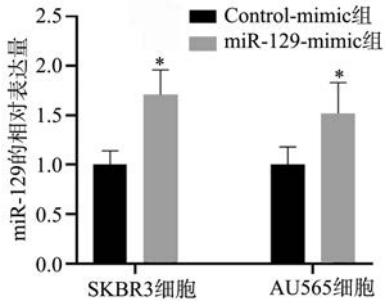
相比于 Control-mimic 组,miR-129-mimic 组SKBR3细胞和 AU565 细胞中 miR-129 的表达水平显著上调($t=3.45$、3.21,$P<0.05$),见图1。

2.2 miR-129-mimic 抑制乳腺癌细胞的增殖

SKBR3 和 AU565 细胞中转染 miR-129-mimic 后,miR-129-mimic 组细胞的增殖能力显著低于 Control-mimic 组($P<0.01$);miR-129-mimic + miR-mimic-shRNA 组逆转了 miR-129-mimic 导致的细胞增殖能力降低($P<0.01$),但与 Control-mimic 组相比,其增殖能力无明显变化($P>0.05$),见图2。

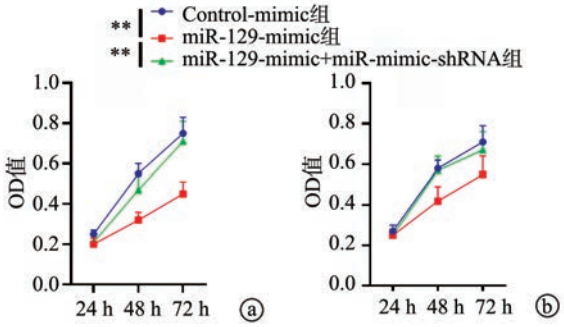
2.3 miR-129-mimic 抑制乳腺癌细胞迁移及侵袭

与 Control-mimic 组比较,miR-129-mimic 组中 SKBR3和 AU565 细胞的迁移及侵袭能力明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示 miR-129 具有抑制乳腺癌细胞侵袭及迁移的作用,见图3。



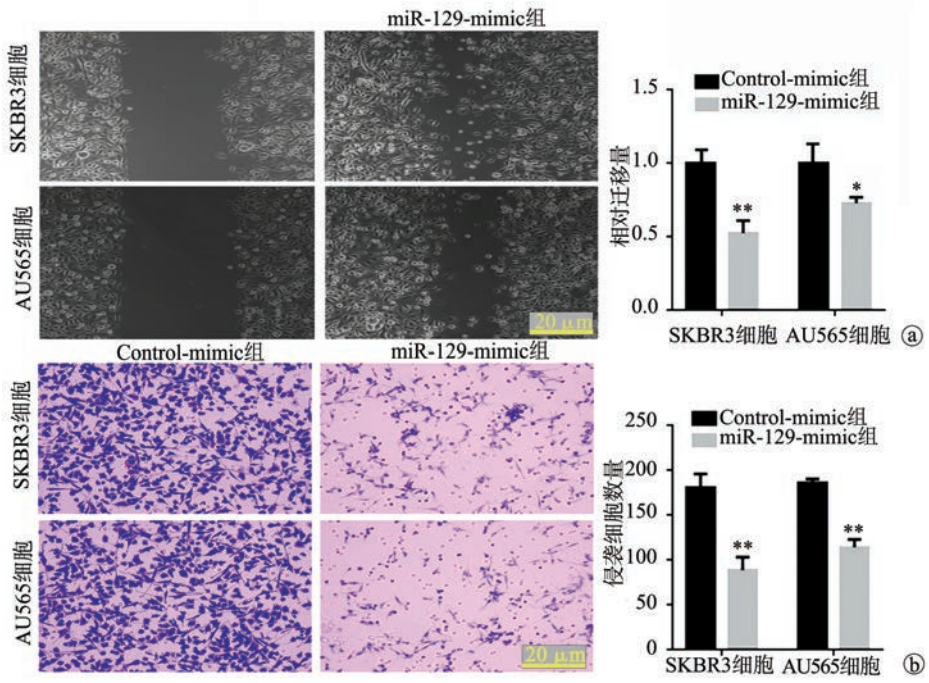
*:与 Control-mimic 组比较,$P<0.05$

图1 SKBR3 细胞和 AU565 细胞中 miR-129 的表达水平



a:SKBR3 细胞增殖能力;b:AU565 细胞增殖能力 **:与 miR-129-mimic 组比较,$P<0.01$

图2 细胞的增殖曲线



a:细胞迁移实验结果;b:细胞侵袭实验结果 *:与 Control-mimic 组比较,$P<0.05$;**:与 Control-mimic 组比较,$P<0.01$

图3 Control-mimic 组与 miR-129-mimic 组中迁移及侵袭作用

2.4 miR-129 靶向调控 Twist1

生物信息学软件分析显示,miR-129 与 Twist1 的 3'-UTR 端有互补结合位点,见图 4。双荧光素酶试验结果显示,miR-129-mimic 组中 WT-3'Twist-UTR 的荧光素酶活性明显低于 Control-mimic 组($P<0.01$);而 miR-129-mimic 组中 Mut-3'Twist-UTR 的荧光素酶活性与 Control-mimic 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 5。

2.5 上调 miR-129 对 Twist1 蛋白的影响

在 SKBR3、AU565 细胞中,与 Control-mimic 组比较,miR-129-mimic 组 SKBR3 细胞和 AU565 细胞中 Twist1 蛋白水平下降,差异具有统计学意义($P<0.01$),见图 6。

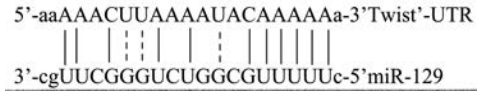
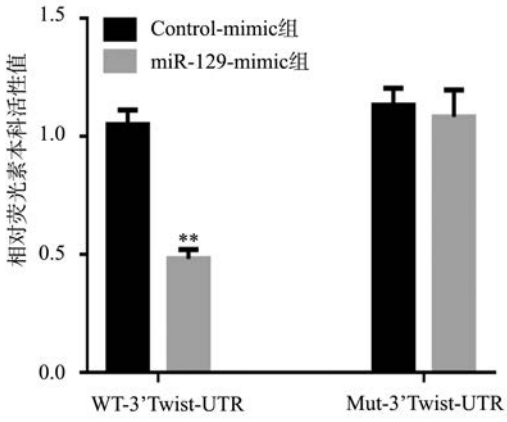
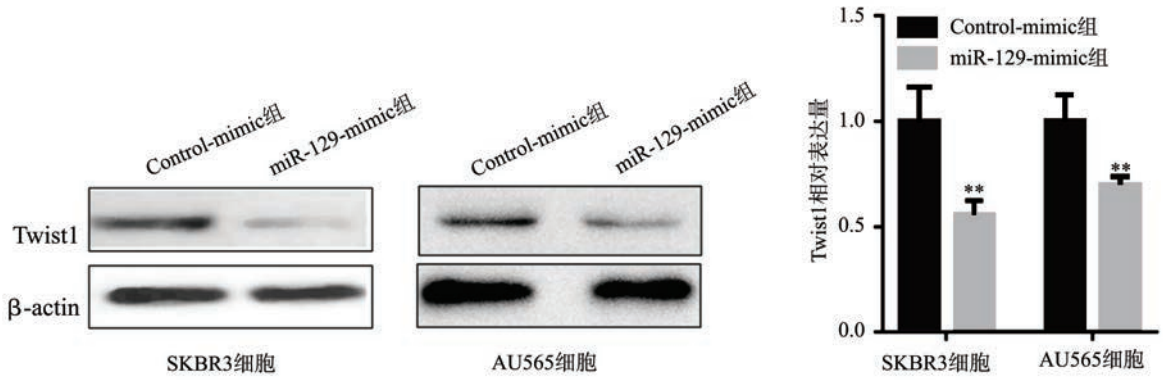


图 4 miR-129 与 Twist1 的 3'-UTR 端的互补结合位点



**:与 Control-mimic 组比较,$P<0.01$

图 5 相对荧光素酶活性



**:与 Control-mimic 组比较,$P<0.01$

图 6 Western blot 检测 Twist1 蛋白的表达水平

3 讨论

我国乳腺癌患者约占全球乳腺癌患者的 12%[6]。乳腺癌侵袭性强、恶性程度高,并且其组织学异质性大,患者预后往往不够理想[7]。随着分子生物学的不断发展,基因治疗成为了乳腺癌治疗的新方向[8]。但乳腺癌的发生、发展受多种分子机制的影响,因此,研究乳腺癌的发病机制对其治疗具有重要意义。

miRNAs 是一类长度为 20~24 个核苷酸的非编码 RNA,通过与内源性 mRNA 碱基配对抑制靶基因的表达来发挥其生物学功能,进而影响肿瘤的发生、发展[9]。miR-129 为一种常见的 miRNAs,可影响炎症因子及血管上皮细胞的生成,且对肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭等过程均具有一定的调控作用[10]。有研究表明 miR-129 在膀胱癌、肝细胞癌及甲状腺癌中呈低表达[11]。本研究中 miR-129-mimic 组 SKBR3 和 AU565 细胞 D 的增殖能力明显低于 Control-mimic 组,说明 miR-129 在一定程度上能够抑制乳腺癌细胞的增殖。

细胞的迁移与侵袭是影响恶性肿瘤患者预后的关键,出现肿瘤细胞迁移的乳腺癌患者往往具有较高的耐药性,治疗较为复杂,生存期短。肿瘤细胞的迁移、侵袭与上皮—间质转化密切相关,会导致肿瘤细胞失去极性,表现出一定的迁移性,进而侵袭正常组织[12-14]。贺炳胜等[15]研究表明,miR-129 能够在一定程度抑制乳腺癌细胞的迁移及侵袭,进而抑制病情的进展,延长患者的生存期。本研究结果显示,miR-129-mimic 能够使人乳腺癌细胞SKBR3、AU565 的迁移及侵袭能力明显下降,说明miR-129在一定程度上能够抑制乳腺癌细胞的迁移、侵袭,对肿瘤的发展起到一定的调控作用。

研究表明 miR-129 对乳腺癌存在多种调控途径。miR-129 可通过调控 Notch 信号通路影响乳腺癌肿瘤干细胞自我更新的能力,也可靶向 CAMK2N1 干预乳腺癌细胞增殖[16-17]。但 miR-129 对乳腺癌迁移与侵袭的作用机制尚不明确,且其靶点尚未发现。本研究通过生物信息学方法证实了 miR-129 与 Twist1 的

3'-UTR端有互补结合位点,且 miR-129 中 Twist1 的荧光素酶活性明显下降;进一步通过 Western blot 检测发现,转染了 miR-129-mimic 的 SKBR3 和 AU565 细胞中 Twist1 表达水平降低。因此推测 miR-129 通过靶向调节 Twist1 发挥生物学作用。

综上所述,miR-129 与乳腺癌的发生、发展密切相关,其能够在一定程度上靶向调节 Twist1 进而影响肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭,是乳腺癌诊断及治疗的潜在靶点。

[参考文献]

[1] 陈倩欣,张怡心,李 科,等. 广州市 2008-2017 年全人群女性乳腺癌特征及其与预后的关系[J]. 中华流行病学杂志,2020,41(11):1831 - 1835. doi:10.3760/cma. j. cn112338 - 20191012 - 00731.

[2] 赵 晶,吴 楠,张世超,等. 乳腺癌靶向治疗新进展[J]. 中华肿瘤杂志,2020,42(5):353 - 361. doi:10.3760/cma. j. cn112152 - 112152 - 20190919 - 00614.

[3] Zheng T,Zhang X,Wang Y,et al. Predicting associations between micro RNAs and target genes in breast cancer by bioinformatics analyses[J]. Oncol Lett,2016,12(2):1067 - 1073. doi:10.3892/ol.2016.4731.

[4] Mandujano-Tinoco EA, Garcia-Venzor A, Munoz-Galindo L, et al. miRNA expression profile in multicellular breast cancer spheroids[J]. Biochim Biophys Acta,2017,1864(10):1642 - 1655. doi:10.1016/j. bbamcr.2017.05.023.

[5] 雷海鸣,李 剑,王立胜. miR-129-5p 通过调控 PTPRZ1 对乳腺癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 临床肿瘤学杂志,2019,2(12):1074 - 1078. doi:10.3969/j. issn.1009 - 0460.2019.12.004.

[6] 江泽飞,许凤锐. 真实世界研究在乳腺癌诊疗中的发展现状与未来[J]. 中华外科杂志,2020,58(2):91 - 94. doi:10.3760/cma. j. issn.0529 - 5815.2020.02.003.

[7] 魏 兵,杨文涛,步 宏. 乳腺癌新辅助治疗的病理诊断专家共识(2020 版)[J]. 中华病理学杂志,2020,1(4):296 - 298. doi:10.3760/cma. j. cn112151 - 20200102 - 00007.

[8] 李 江,杨珂璐,蔡依彤,等. 全球乳腺癌筛查指南质量评价[J]. 中华流行病学杂志,2021,42(2):219 - 226. doi:10.3760/cma. j. cn112338 - 20200806 - 01032.

[9] 刘亭亭,贾冬萍,王秀梅. 外泌体源性 miRNAs 作为诊断标志物在肿瘤中的研究进展[J]. 国际遗传学杂志,2019,41(2):143 - 148. doi:10.3760/cma. j. issn.1673 - 4386.2019.02.008.

[10] 许 涛,李 萍,庞国莲,等. 乳腺癌组织 miRNAs 的异常表达及犀黄丸对体外乳腺癌细胞候选 miRNAs 的表达影响[J]. 中国医师杂志,2019,21(7):979 - 983. doi:10.3760/cma. j. issn.1008 - 1372.2019.07.005 .

[11] 罗 琳,郭俊明. 微小 RNA-129 在肿瘤发生中的作用机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2013,29(11):1024 - 1028. doi:10.13865/j. cnki. cjbmb.2013.11.003.

[12] 马 琛,彭 力,陈 静,等. miR-137 通过 TWIST1 调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭,迁移及凋亡[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(10):1844 - 1850. doi:10.3969/j. issn.1000 - 4718.2019.10.017.

[13] 杨 帆,袁昌劲. 微小 RNA-326 靶向调控 TWIST1 表达及对肝癌细胞上皮间质转化的影响[J]. 临床肿瘤学杂志,2019,24(8):17 - 22. doi:10.3969/j. issn.1009 - 0460.2019.08.003.

[14] 赵 钊,李 娟,金泉秀,等. 血清微小 RNA-128 和微小 RNA-129 水平与乳腺癌患者化学治疗效果及预后的关系[J]. 临床误诊误治,2019,32(5):98 - 102. doi:10.3969/j. issn.1002 - 3429.2019.05.020.

[15] 贺炳胜,王 猛,杜 宁,等. miR-129 对乳腺癌肿瘤干细胞自我更新能力的调控作用及其机制探讨[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(18):11 - 16. doi:10.3969/j. issn.1672 - 4992.2018.18.002.

[16] 冯 腾,曾令瑞,徐盼盼,等. 环靶明对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 Hedgehog 和 Notch 信号通路影响[J]. 中华肿瘤防治杂志,2019,26(12):831 - 835. doi:10.16073/j. cnki. cjcpt.2019.12.003.

[17] 张裔麒元,王佳宁,周 昱. miR-129 通过靶向调节 CAMK2N1 抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. 国际免疫学杂志,2019,42(5):468 - 474. doi:10.3760/cma. j. issn.1673 - 4394.2019.05.005.

(编辑:杨 颖)