doi:10.11659/jjssx.03E018001

·基础研究·

miR-128 通过 RECK 靶向作用影响乳腺癌细胞的生物学行为

叶彦军[1],郝福军[1],陈 巍[1],张 玲[2] (1.宝鸡市人民医院普外科,陕西 宝鸡 721000;2.宝鸡市中心医院血液肿瘤科,陕西 宝鸡 721000)

[摘 要] **目的** 探讨 miR-128 通过 RECK 靶向作用影响乳腺癌细胞的生物学行为及其作用机制。**方法** Western blot 检测 miR-128 在细胞株中的表达情况及慢病毒转染效率;流式细胞术检测 miR-128 对乳腺癌细胞凋亡行为的影响;双荧光素酶实验检测 miR-128 和 RECK 在乳腺癌细胞中的相互作用;流式细胞术实验检测 RECK 对 miR-128 在乳腺癌细胞周期和集落形成过程中的逆转作用。**结果** MCF-7 细胞中 miR-128 的表达量是 NC 组细胞的 3.05 倍,慢病毒转染效率明显;miR-128 通过诱导细胞凋亡和抑制细胞周期进程来抑制 MCF-7 细胞的生长;RECK 是 miR-128 的直接靶基因,miR-128 可以直接调控 RECK 的表达活性;RECK 异位恢复时,miR-128 对乳腺癌细胞的凋亡和细胞周期的抑制也得到了部分恢复。**结论** miR-128 在乳腺癌的发生发展过程中起重要作用,可以和 RECK 相互影响调控乳腺癌细胞的生物学行为,提示 miR-128 和 RECK 可能成为乳腺癌的潜在治疗靶标。

[关键词] 乳腺癌;miR-128;RECK;细胞周期;凋亡;MCF-7 细胞

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-03-01

miR-128 affects biological behavior of breast cancer cells through the targeting of RECK

YE Yan-jun[1], HAO Fu-jun[1], CHEN Wei[1], ZHANG Ling[2] (1. Department of General Surgery, People's Hospital of Baoji, Baoji Shaanxi 721000, China; 2. Department of Hematology and Oncology, Baoji Central Hospital, Baoji Shaanxi 721000, China)

Abstract: Objective To investigate the biological behavior of breast cancer cells induced by miR-128 targeting RECK and its possible mechanism. **Methods** The expression of miR-128 in cell lines and transfection efficiency of lentiviral were detected by Western blot. Flow cytometry was used to detect the effect of miR-128 on the apoptosis of breast cancer cells. The dual luciferase assay was used to detect the interaction of miR-128 and RECK in breast cancer cells. Flow cytometry was used to detect the reversal effect of RECK on miR-128 in the cell cycle and colony formation of breast cancer cells. **Results** The expression of miR-128 in MCF-7 cells was 3.05 times that of NC cells, and the lentiviral transfection efficiency was obvious. miR-128 inhibits the growth of MCF-7 cells by inducing apoptosis and inhibiting cell cycle progression. RECK was the direct target of miR-128, and miR-128 directly regulated the expression of RECK. RECK ectopic recovery, miR-128 on breast cancer cell apoptosis and cell cycle inhibition had also been partially restored. **Conclusion** miR-128 plays an important role in the development and progression of breast cancer. It can interact with RECK to regulate the biological behavior of breast cancer cells, which suggests that miR-128 and RECK may be the potential therapeutic targets of breast cancer.

Keywords: breast cancer; miR-128; RECK; cell cycle; apoptosis; MCF-7 cells

微小 RNA(miRNA)是由约 22 个核苷酸组成的小非编码 RNA,负调节真核生物中的基因表达[1-3]。miRNA 基因是哺乳动物中最丰富的调控基因类型之一;越来越多的证据表明,miRNA 是动物发育的关键调节者,并参与人类疾病,如多种类型的恶性肿瘤[4-5]。miR-128 在各种实体肿瘤中过表达,包括乳腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌和甲状腺癌[6-7]。此外,已有研究发现 miR-128 的高表达水平与肺癌和胰腺肿瘤的不良预后相关联[8-10]。所有这些证据都以 miR-128 在人类癌症中作为致癌 miRNA(oncomiR)起作用。然而 miR-128 在乳腺癌细胞中的作用机制在很大程度上是未知的。本研究旨在探讨 miR-128 对 MCF-7 乳腺癌细胞生长和裸鼠体内成瘤行为的影响,验证 RECK 是否为 miR-128 的靶点,并探讨 miR-128 在这个过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 组织样本和实验器材

2014 年 3 月至 2015 年 3 月于宝鸡市人民医院收集 60 例组织标本,其中包括乳腺癌癌组织和相邻的正常组织,所有样本均立即保存于液氮中。手术后,-80 ℃储存直到 RNA 提取。所有组织诊断都具有病理和/或细胞学证据。脂质体 Lipofectamine 2000 购自上海吉凯基因,Trizol 购自美国 Ambion 公司,PCR 试剂盒购自美国 Kapa 公司,荧光素酶活性检测试剂盒购自 Promega 公司,荧光素酶报告载体由 Promega 公司合成,Transwell 小室购自美国 Millipore 公司,Matrigel

[基金项目] 宝鸡市科技计划项目(2017SH2)

购自 Bio-Rad。该研究经医院医学伦理委员会批准。

1.2 细胞株和培养

人类乳腺癌细胞系(MCF-7)获自中国科学院细胞库(中国上海)。所有细胞在含有 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素或 100 mg/mL 链霉素的 Dulbecco's 改良的 Eagle 培养基中培养,培养条件:37 ℃的含 5% CO_2 的恒温孵箱中。

1.3 RNA 分离和定量实时 PCR(qRT-PCR)分析

使用 TRIzol 试剂从组织或细胞中分离总 RNA,并按照制造商的说明书用逆转录酶(TaKaRa)和寡核苷酸(dT)合成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex TaqTM II 试剂盒进行实时 PCR。实时 PCR 的条件如下:94 ℃ 10 s,94 ℃ 5 s,52 ℃ 30 s 退火,72℃ 15 s,然后 40 个循环。本实验使用 miR-128 的特异性引物(正向引物 5'TTTTCGAGGCGAGAAAATCG-3' 以及反向引物 5'ATGGAGGCTAGGGCGAAATC-3')作为对照,用特异性引物(正向引物 5'-CATCACCATCAGGAGAGTCG-3' 和反向引物 5'-TGACGCTTGCCCACAGCCTT-3')扩增 U6。

1.4 细胞转染

miR-128 模拟物和相应的阴性对照(miR-NC)分别转染到实验细胞株中。按照生产商的说明,使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen)将模拟物或质粒转染到细胞中。转染后 24 h,收集细胞并进行基因表达分析、细胞增殖、周期和侵袭测定。

1.5 双荧光素酶报告分析

RECK 的野生型(Wt)和突变型(Mut)3' 非转录区(3'-UTR)由生物技术公司提供设计制备,并克隆到 pMIR-Report 质粒中,称为 RECK-WT 和 RECK-Mut。对于荧光素酶测定,将 1×10^5 个细胞铺板并在 12 孔板中培养以达到约 70% 汇合。细胞与 miR-128 模拟物或 NC 共转染,检测 RECK Wt/Mut 报告质粒的荧光表达活性。使用双荧光素酶报告基因测定试剂盒,转染 48 h 后进行萤光素酶测定。实验重复 3 次。

1.6 裸鼠皮下成瘤实验

裸鼠成瘤实验:将不同组的 2×10^7 个乳腺癌细胞分别离心,用 50 μL PBS 稀释重悬待用。10 只 4 周左右的裸鼠,分为 miR-128-siRNA 组和 NC 组,每组 5 只,将 2 组乳腺癌细胞分别注射入左侧腋下,2 周后观察肿瘤形成情况。6 周后将肿瘤剥除,测量并称重肿瘤。

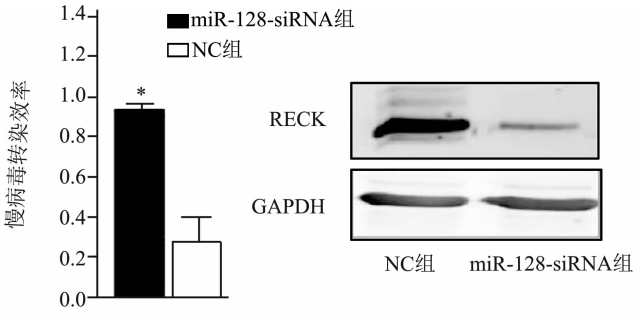
1.7 统计学分析

定量数据采用 SPSS 19.0 版(IBM,USA)进行分析,并用至少 3 次独立实验的平均值 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用 ANOVA 或双向 t 检验比较组间的差异。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-128 在细胞株中的慢病毒转染效率对 RECK 蛋白的影响

本研究通过 qPCR 分析来检测 miR-128 的转染效率,结果显示,与 NC 组相比,MCF-7 细胞转染 miR-128-siRNA 之后的 miR-128 表达显著更高。Western blot实验检测 RECK 蛋白的表达水平发现,抑制 miR-128 的表达后 RECK 蛋白表达水平相对下调[(8.36 ± 1.11) *vs.* (2.09 ± 0.86),$P<0.05$],差异有统计学意义(图 1)。



*:与 NC 组比较,$P<0.05$

图 1 miR-128 在细胞株中的慢病毒转染效率对 RECK 蛋白的影响

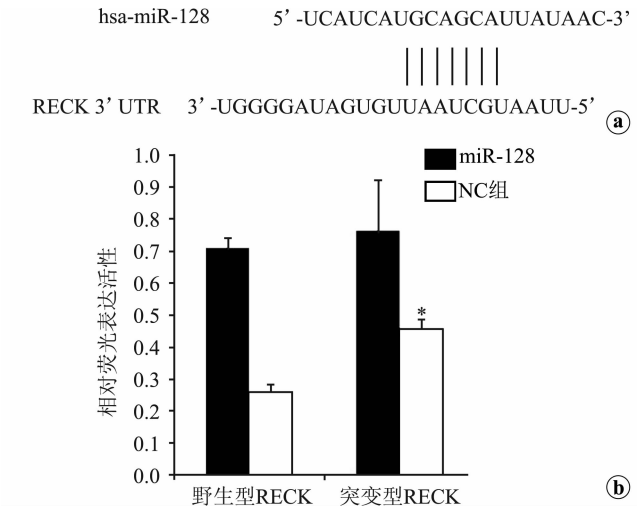
2.2 miR-128 与 RECK 在乳腺癌细胞中的关系

本实验进一步研究 miR-128 在乳腺癌、TargetScan、Pictar-Vert 和 microRNA 发展中的作用机制和致癌作用。在组合预测的 3 个软件中,本实验发现 RECK 是 miR-128 的潜在靶标。RECK 3'UTR 与 miR-128 的结合位点相似(图 2a),表明 RECK 可能是 miR-128 的直接靶标。因此通过双荧光素酶实验了解 miR-128 和 RECK 之间的相互调控关系,我们构建了含有与荧光素酶基因融合的野生型或突变型 RECK 的 3'UTR 的质粒(图 2b),将野生型或突变质粒共转染至具有 miR-128m 或 miR-128m NC 的 293 细胞中。miR-128 显著降低 RECK 的野生型 3'UTR 的荧光素酶活性,而 RECK 的突变型 3'UTR 的荧光素酶活性不被 miR-128 抑制,表明 miR-128 可以直接结合 RECK 的 3'UTR。上述实验结果显示 RECK 是乳腺癌细胞中 miR-128 的直接靶标,并且 mRNA 降解涉及 miR-128 抑制 RECK 的表达。

2.3 miR-128 对乳腺癌细胞体外成瘤行为的影响

为了阐明表达 miR-128 对 MCF-7 细胞的生长抑制机制,本实验分析了其在裸鼠体内成瘤能力的变化。裸鼠体内成瘤实验结果发现,抑制 miR-128 的表达导致乳腺癌细胞在裸鼠体内成瘤行为,肿瘤的体积和质

量都受到一定程度的抑制,提示 miR-128 可以直接抑制裸鼠体内移植瘤的生长(图 3)。



a:miR-128 与 RECK 的相关结合位点;b:荧光素酶活性

图 2 miR-128 与 RECK 在乳腺癌细胞中的关系

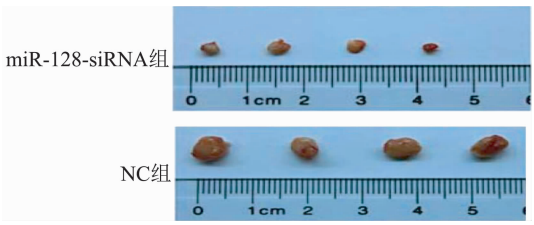
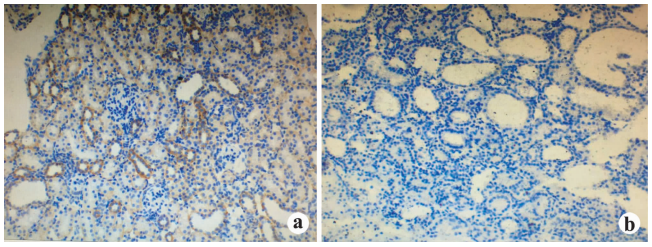


图 3 miR-128 对乳腺癌细胞体外成瘤行为的影响

2.4 裸鼠体内移植瘤中 RECK 蛋白的表达情况

如图 4 所示,可见 NC 组图 RECK 蛋白的表达阳性率明显升高,与 NC 组相比,细胞核中的染色比例明显较处理过的乳腺癌细胞在裸鼠内成瘤组织中 RECK 蛋白的表达水平相对减弱,用 miR-128-siRNA 转染的 MCF-7 细胞的 RECK 蛋白表达阳性率,提示 miR-128 可能调控裸鼠体内 RECK 蛋白的表达。



a:NC 组;b:miR-128-siRNA 组

图 4 裸鼠体内移植瘤中 RECK 蛋白的表达情况(×40)

3 讨论

目前乳腺癌是全世界常见的女性恶性肿瘤之一,在发展中国家,乳腺癌是主要死因之一[11]。乳腺癌早期易出现转移,晚期的治疗手段有限,且治疗效果通常不佳,因而提高乳腺癌患者的早期诊断率和治疗效果尤为重要,关于乳腺癌发生发展过程的机制探讨及新型治疗靶点的研究尤为关键。

miR-128 能通过靶向肿瘤抑制因子 TP53INP1 和 RhoA 分别促进胰腺肿瘤发展和乳腺上皮细胞迁移及侵袭[7-8]。另外,miR-128 通过在转基因小鼠模型中靶向 Ship 和 C/EBPβ 诱导 B 细胞恶性肿瘤[9-10]。鉴于 miRNA 通常调控大量目标,推测可能有更多 miR-128 靶标参与肿瘤发生[11]。尽管已发现 miR-128 在乳腺癌中上调,但其在乳腺肿瘤发生中的作用尚未确定。研究 miR-128 在乳腺癌中的表达情况及相关作用机制,可以为乳腺癌的临床侵袭发展等情况提供一定的理论参考。

miR-128 基因座位于被称为 B 细胞整合簇的区域内,最初被认为是与淋巴瘤相关的原癌基因[12]。在 B 细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞白血病中 BIC/miR-128 表达上调,miR-128 首先涉及造血系统恶性肿瘤的发生[13-14]。此外,本研究显示,miR-128 的表达下调可以显著抑制 MCF-7 细胞的生长并促进细胞凋亡,这与 Ji 等[15]探讨的使用 miR-128 抑制剂阻断 miR-128 抑制细胞生长并促进细胞凋亡的结果一致。但是,miR-128 如何在细胞内发挥功能,从而解释 miR-128 对 MCF-7 细胞生物学行为的影响目前尚未见相关研究。

本实验研究 miR-128 在乳腺癌细胞中的作用靶点,TargetScan、Pictar-Vert 和 microRNA 软件组合预测中发现 RECK 是一个潜在的 miR-128 的靶标。因此,我们将注意力集中在 RECK 的表达效果上。p53 主要通过转录诱导参与多个过程(包括细胞周期检查点和细胞凋亡)的靶基因发挥其肿瘤抑制功能[16]。RECK 也是 p53 的靶基因之一,是位于染色体 8q22 上的 p53 诱导型细胞应激反应基因[17]。其表达依赖于广泛型 p53 的激活[18]。最初,RECK 表达可以直接诱导小鼠急性胰腺炎的体内发展。肿瘤抑制基因 RECK 的过度表达可以诱导细胞周期阻滞,并增强 p53 介导的细胞凋亡[19]。在本实验研究中,我们还发现 RECK 的异位表达通过抑制细胞凋亡和调控细胞周期进程来促进 MCF-7 细胞的生长。Walsh 等[20]对 RECK 的表达进行免疫组化检测,在 81 例乳腺癌中,与正常乳腺组织相比,45 例(55.6%)RECK 的表达降低。RECK 的表达水平与肿瘤组织学分级、肿瘤大小、淋巴结转移阳性和 p53 异常表达呈负相关关系[20]。此外,有报道显示 RECK 的阳性率随着胃癌的进展而下降,RECK 蛋白阴性与胃癌的侵袭性病理表型显著相关[21-23]。这些观察结果表明 RECK 通过其抗增殖和促凋亡活性在抑

制包括乳腺癌在内的肿瘤进展中发挥关键作用。本实验结果表明,miR-128 的过表达不仅导致 RECK 的下调,在裸鼠体内 RECK 蛋白的表达也受 miR-128 的调控,提示 miR-128 显著降低了 RECK 3'UTR 的相对荧光素酶活性,进一步支持了两者相互调控的关系。

综上所述,miR-128 在乳腺癌细胞系中表达上调,miR-128 表达的上调可以进一步促进乳腺癌细胞的增殖和裸鼠体内的生长,并且提示 miR-128 和 RECK 可能成为乳腺癌的潜在治疗靶标。后续实验拟研究 miR-128 调控相关信号通路的关系及对乳腺癌细胞运动能力的影响,完善相关研究机制。

[参考文献]

[1] Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor-α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(7): 1757 – 1767. doi: 10.1158/0008 – 5472. CAN – 17 – 1265.

[2] Ono M, Kosaka N, Tominaga N, et al. Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells[J]. Sci Signal, 2014, 7(332): ra63. doi: 10.1073/pnas.1704862114.

[3] Kong W, He L, Richards EJ, et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer[J]. Oncogene, 2014, 33(6): 679 – 689. doi: 10.1038/onc.2012.636.

[4] Erbes T, Hirschfeld M, Rücker G, et al. Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 193. doi: 10.1186/s12885 – 015 – 1190 – 4.

[5] Lei R, Tang J, Zhuang X, et al. Suppression of MIM by microRNA-182 activates RhoA and promotes breast cancer metastasis[J]. Oncogene, 2014, 33(10): 1287 – 1296. doi: 10.1038/onc.2013.65.

[6] Sochor M, Basova P, Pesta M, et al. Oncogenic microRNAs: miR-128, miR-19a, miR-181b, and miR-24 enable monitoring of early breast cancer in serum[J]. BMC Cancer, 2014, 14(1): 448. doi: 10.1186/1471 – 2407 – 14 – 448

[7] Bacci M, Giannoni E, Fearns A, et al. miR-128 drives metabolic reprogramming of ER + breast cancer cells following long-term estrogen deprivation and predicts clinical response to aromatase inhibitors[J]. Cancer Res, 2016, 76(6): 1615 – 1626. doi: 10.1158/0008 – 5472

[8] De La Parra C, Cruz-Collazo A, Castillo-Pichardo L, et al. Downregulation of miR-128 contributes to the anti-proliferative effects of the soy isoflavone genistein in estrogen receptor negative breast cancer[J]. FASEB J, 2015, 29(1 Supplement): 578 – 585. doi: 10.1096/fasebj.29.1_supplement.578.5

[9] Liu F, Kong X, Lv L, et al. TGF-β1 acts through miR-128 to down-regulate TP53INP1 in promoting epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotypes[J]. Cancer Lett, 2015, 359(2): 288 – 298. doi: 10.1016/j.canlet.2015.01.030.

[10] Al-Haidari AA, Syk I, Thorlacius H. MiR-128-5p positively regulates CCL17-induced colon cancer cell migration by targeting RhoA[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 14887. doi: 10.18632/oncotarget.14841.

[11] Rouquette-Jazdanian AK, Kortum RL, Li W, et al. miR-128 controls lymphoproliferation in LAT mutant mice by restraining T-cell apoptosis via SHIP-1/mTOR and PAK1/FOXO3/BIM pathways[J]. PloS One, 2015, 10(6): e0131823. doi: 10.1371/journal.pone.0131823

[12] Liu F, Fan H, Ren D, et al. TLR9-induced miR-155 and Ets-1 decrease expression of CD1d on B cells in SLE[J]. Eur J Immunol, 2015, 45(7): 1934 – 1945. doi: 10.1002/eji.201445286.

[13] Yao Y, Vasoya D, Kgosana L, et al. Activation of gga-miR-128 by reticuloendotheliosis virus T strain and its contribution to transformation[J]. J Gen Virol, 2017, 98(4): 810 – 820. doi: 10.1099/jgv.0.000718.

[14] Gasparini P, Lovat F, Fassan M, et al. Protective role of miR-128 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(12): 4536 – 4541. doi: 10.1073/pnas.1402604111.

[15] Ji Y, Wrzesinski C, Yu Z, et al. miR-128 augments CD8 + T-cell antitumor activity in lymphoreplete hosts by enhancing responsiveness to homeostatic γc cytokines[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(2): 476 – 481. doi: 10.1038/cddis.2013.46

[16] Bouamar H, Jiang D, Wang L, et al. MicroRNA 155 control of p53 activity is context dependent and mediated by Aicda and Socs1 [J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(8): 1329 – 1340. doi: 10.1128/MCB.01446 – 14.

[17] Wang R, Li J, Zhao Y, et al. Investigating the therapeutic potential and mechanism of curcumin in breast cancer based on RNA sequencing and bioinformatics analysis[J]. Breast Cancer, 2018, 25(2): 206 – 212. doi: 10.1007/s12282 – 017 – 0816 – 6.

[18] Zhang X, Liu J, Zang D, et al. Upregulation of miR-572 transcriptionally suppresses RECK and p21 and contributes to human ovarian cancer progression[J]. Oncotarget, 2015, 6(17): 15180. doi: 10.18632/oncotarget.3737.

[19] Li Y, Liang C, Ma H, et al. miR-221/222 promotes S-phase entry and cellular migration in control of basal-like breast cancer[J]. Molecules, 2014, 19(6): 7122 – 7137. doi: 10.3390/molecules19067122.

[20] Walsh LA, Roy DM, Reyngold M, et al. RECK controls breast cancer metastasis by modulating a convergent, STAT3-dependent neoangiogenic switch[J]. Oncogene, 2015, 34(17): 2189 – 2203. doi: 10.1038/onc.2014.175.

[21] Gomes LR, Fujita A, Mott JD, et al. RECK is not an independent prognostic marker for breast cancer[J]. BMC cancer, 2015, 15(1): 660. doi: 10.1038/onc.2014.175.

[22] Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 49 – 63. doi: 10.1038/nrm3722.

[23] Chen Y, Fu LL, Wen X, et al. Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy[J]. Apoptosis, 2014, 19(8): 1177 – 1189. doi: 10.1007/s10495 – 014 – 0999 – 7.

(编辑:魏 源)