

# miRNA-1271 对人乳腺癌细胞增殖的影响

张红晨 顾锡冬 谢小红

**【摘要】** 目的 探讨 miRNA-1271 对人乳腺癌细胞增殖的影响。方法 采用 RT-PCR 法检测 80 例乳腺癌组织及癌旁正常组织中 miRNA-1271 的表达。采用脂质体转染法将 miRNA-1271 模拟物转染至乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 中,应用 CCK-8 实验、克隆形成实验、流式细胞术、动物实验等探究 miRNA-1271 对乳腺癌细胞增殖、凋亡的影响。结果 乳腺癌组织中 miRNA-1271 相对表达量较癌旁正常组织明显降低( $P<0.05$ )。miRNA-1271 表达上调后,MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的吸光度值明显降低(均  $P<0.05$ ),克隆形成数明显减少(均  $P<0.05$ ),细胞凋亡率明显增高(均  $P<0.05$ )。动物实验结果显示,miRNA-1271 在体内亦能抑制 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖。结论 miRNA-1271 在乳腺癌组织中低表达;上调 miRNA-1271 表达,能抑制乳腺癌细胞的增殖,促进凋亡的发生,具有抑癌作用。

**【关键词】** miRNA-1271 乳腺癌 增殖 凋亡

Effects of miRNA-1271 on proliferation of human breast cancer cells ZHANG Hongchen, GU Xidong, XIE Xiaohong. Department of Mastology, Zhejiang Provincial TCM Hospital, Hangzhou 310006, China

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of miRNA-1271 on proliferation of human breast cancer cells. Methods The expression levels of miRNA-1271 were detected with RT-PCR in 80 samples of breast cancer and pericancerous breast tissues. Human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells were transfected with miRNA-1271 mimics, the proliferation of breast cancer cells was determined by CCK-8 and colony formation assays, cell apoptosis was examined by flow cytometry. The miRNA-1271-transfected breast cancer MCF-7 cells were inoculated in nude mice and the growth of transplanted tumors was measured. Results The expression level of miRNA-1271 in breast cancer tissues were significantly lower than that in pericancerous breast tissues( $P<0.05$ ). CCK-8 assay showed that the OD490 value was significantly lower in miRNA-1271-expressing breast cancer cells ( $P<0.05$ ). The number of clone formation cells was lower and the apoptosis rate was significantly higher than those in control group ( $P<0.05$ ). Animal experiments showed that miRNA-1271 also inhibited the growth of MCF-7 breast cancer in vivo. Conclusion miRNA-1271 is down-regulated in breast cancer tissues. Up-regulated miRNA-1271 significantly inhibits the proliferation of breast cancer cells and increases cell apoptosis.

**【Key words】** miRNA-1271 Breast cancer Proliferation Apoptosis

乳腺癌发病率居女性癌症的首位,且发病人群有年轻化趋势<sup>[1]</sup>。手术、放疗、化疗、内分泌治疗及靶向治疗是乳腺癌的主要治疗方式,若复发、转移或产生耐药,患者预后往往较差<sup>[2]</sup>。微小 RNA(miRNA)是一类长度约 22nt 的非编码单链 RNA 小分子,通过在转录或转录后水平对其靶基因的表达进行调控,进而参与细胞分化、增殖和凋亡<sup>[3]</sup>。相关文献表明,miRNA 在肿瘤发生、发展及变异过程中发挥着重要的调控作用<sup>[4]</sup>。本研究对 miRNA-

1271 在乳腺癌组织中的表达以及对人乳腺癌细胞增殖的影响作一探讨,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 材料 人乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 来源于中国科学院上海生命科学研究院;SPF 级健康雌性裸鼠(4~6 周)购于中国科学院上海实验动物中心,体重(20.0±3.0)g。改良杜氏伊格尔(DMEM)培养基购于美国 Gibco 公司;FBS 购自杭州四季青生物技术有限公司;转染过程中使用的 Lipofectamine™ 2000 试剂盒及 Trizol 试剂均购自美国 Invitrogen 公司;miRNA 检测试剂盒购于德国 Qiagen 公司;凋亡检测试剂盒及结晶紫

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.2.2018-1874

基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2015118161)

作者单位:310006 杭州,浙江省中医院乳腺科

通信作者:谢小红,E-mail:godblesszhc@163.com

染液均购于美国 Sigma 公司。CCK-8 试剂盒购于美国 BD Biosciences 公司。80 例乳腺癌组织及其癌旁正常组织标本来源于本院 2017 年 1 月至 2018 年 1 月经术后病理学证实的原发性乳腺癌患者,所有患者术前未接受过放化疗,年龄 28~75(39,66)岁,均签署知情同意书。

**1.2 RT-PCR 法检测乳腺癌组织及癌旁正常组织 miRNA-1271 表达** 将乳腺癌及癌旁正常组织标本制备成匀浆,离心除去碎片物质,取上清液,加入裂解液 1ml,依次用氯仿、异丙醇抽提,乙醇洗涤,通过紫外分光光度计检测样品中 RNA 浓度。miRNA-1271 引物为 5'-CUUGGCACCUAGCAAGCACUCA-3'。以 95℃ 5min、95℃ 15s、60℃ 30s、72℃ 30s 共 40 个循环进行 RT-PCR 检测。miRNA 反转录反应后,利用 TaqMan miRNA 检测并量化 miRNA-1271 在乳腺癌及癌旁正常组织中的相对表达量。

**1.3 细胞培养及转染** 将人乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 分别置于添加 10% FBS 的 DMEM 培养基中,在 37℃ 恒温、5%CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。在细胞对数生长期,使用乙二胺四乙酸消化。为研究 miRNA-1271 对乳腺癌细胞增殖能力的影响,笔者对 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞进行质粒转染,以增加 miRNA-1271 的表达。转染前取培养好的细胞接种于 6 孔培养板,转染时将培养液更换为无血清无双抗的培养液,按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒说明书,将 miRNA-1271 模拟物或阴性对照(空载质粒)与脂质体试剂混匀,室温静置 20min,转染后 6~8h,更换为正常的完全培养基。RT-PCR 法检测实验组及对照组 miRNA-1271 相对表达量。转染 miRNA-1271 模拟物物质粒的乳腺癌细胞为实验组;转染空载质粒的乳腺癌细胞为对照组。

**1.4 miRNA-1271 对乳腺癌细胞体外增殖的影响** 采用 CCK-8 实验。收集稳定转染后的 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞,分别制成单细胞悬液并在显微镜下计数。在 96 孔培养板中每孔接种细胞 1×10<sup>3</sup> 个,每孔加入培养液 100μl,复孔数设置为 6 个。连续 4d 在固定时间点每孔加入 CCK-8 试剂 10μl,摇匀后避光培养 3h。利用多功能酶标仪检测(波长 490nm 处)测定吸光度(OD)值,并绘制细胞生长曲线。

**1.5 miRNA-1271 对乳腺癌细胞克隆形成的影响** 采用集落形成实验。细胞转染 24h 后,用胰蛋白酶消化细胞,制成细胞悬液。细胞计数后铺于 6 孔板中,细胞密度为 300 个/孔。每组设 3 个复孔,反复吹打并摇匀,防止细胞成团。培养 2 周后,用 4%多聚甲醛固定细胞,0.1%结晶紫染色,在显微镜下计数并分析集落形成数。

**1.6 miRNA-1271 对乳腺癌细胞凋亡的影响** 采用流式细胞术。取稳定转染 24h 后实验组和对照组乳腺癌细胞,冰 PBS 洗涤,冰乙醇固定细胞,4℃过夜。离心 5min 后收集细胞,加入 5μl 异硫氰酸荧光素并轻轻混匀,3min 后再加入 10μl 碘化丙啶,37℃水箱中避光反应 15min;离心后重悬于 0.5ml 预冷的缓冲液中,混匀后用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

**1.7 miRNA-1271 对 MCF-7 乳腺癌细胞体内增殖的影响** 采用动物实验。取实验组(稳定过表达 miRNA-1271)和对照组 MCF-7 细胞,分别配置成 1×10<sup>7</sup> 个/ml 细胞悬液,接种于裸鼠右腋下。在无病原体环境下饲养裸鼠。细胞接种 4 周后,处死小鼠,取出移植瘤组织并称重。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 统计软件。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 乳腺癌组织与癌旁正常组织中 miRNA-1271 相对表达量比较** 乳腺癌组织中 miRNA-1271 相对表达量为 0.55±0.02,明显低于癌旁正常组织中的 1.50±0.03,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

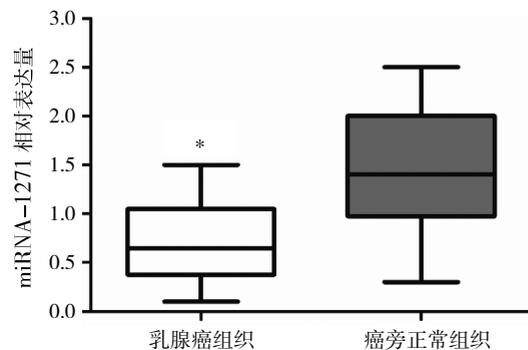


图 1 乳腺癌组织与癌旁正常组织中 miRNA-1271 相对表达量比较( $P < 0.05$ )

**2.2 miRNA-1271 对乳腺癌细胞体外增殖的影响** 与对照组比较,实验组 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 miRNA-1271 相对表达量均明显升高(均  $P < 0.05$ ),即转染成功,见图 2。与对照组比较,上调 miRNA-1271 表达后的 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 OD 值明显低于对照组(均  $P < 0.05$ ),见图 3。这表明上调 miRNA-1271 表达后,MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的体外增殖能力受到明显抑制。

**2.3 miRNA-1271 对乳腺癌细胞克隆形成的影响** 与

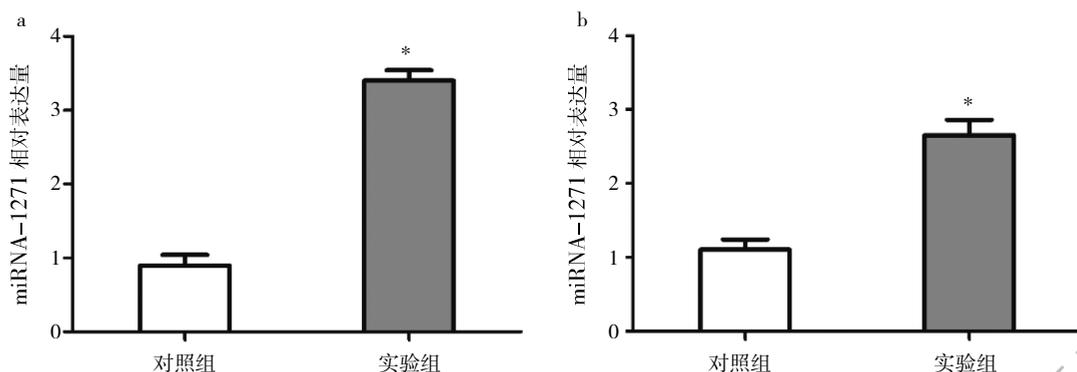


图2 乳腺癌细胞中 miRNA-1271 的转染效率(a: MCF-7 细胞; b: MDA-MB-231 细胞; 与对照组比较,  $P < 0.05$ )

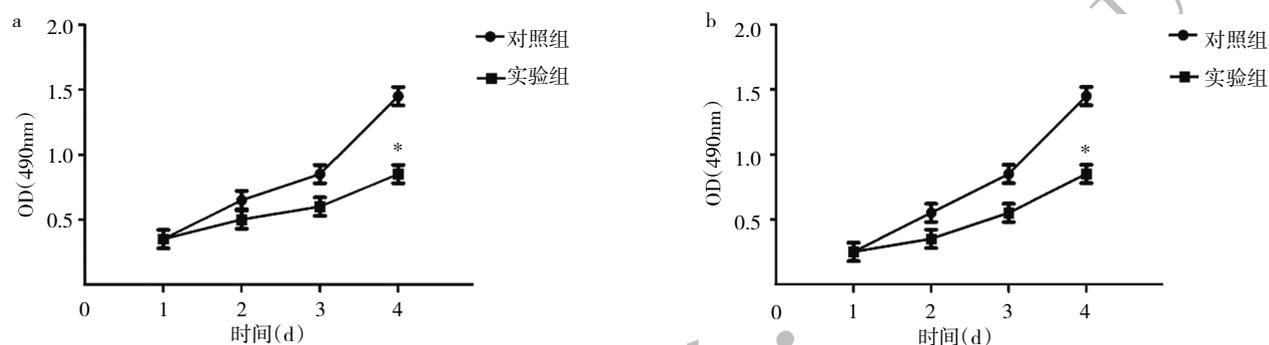


图3 miRNA-1271 对乳腺癌细胞体外增殖的影响(a: MCF-7 细胞; b: MDA-MB-231 细胞; 与对照组比较,  $P < 0.05$ )

对照组比较, miRNA-1271 过表达后的 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞形成克隆体积更小、数目更少, 实验组与对照组集落形成数比较差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ), 见图 4。这表明 miRNA-1271 能抑制 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的克隆形成能力。

2.4 miRNA-1271 对乳腺癌细胞凋亡的影响 与对照组比较, 转染 miRNA-1271 的 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞凋亡率明显升高 (均  $P < 0.05$ ), 见图 5。这表明 miRNA-1271 能促进 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞凋亡。

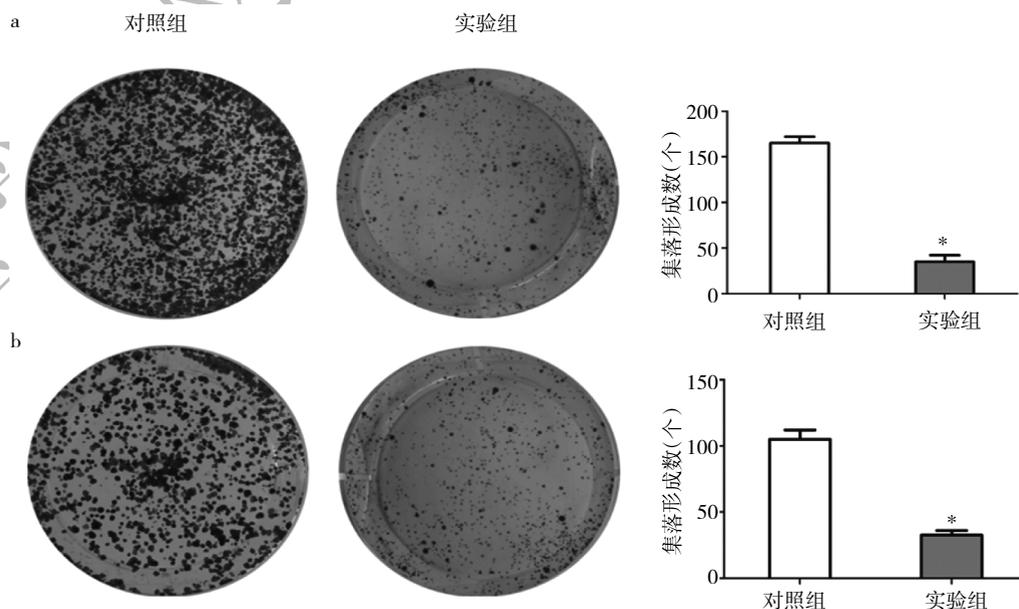


图4 miRNA-1271 对乳腺癌细胞克隆形成的影响(a: MCF-7 细胞; b: MDA-MB-231 细胞; 与对照组比较,  $P < 0.05$ )

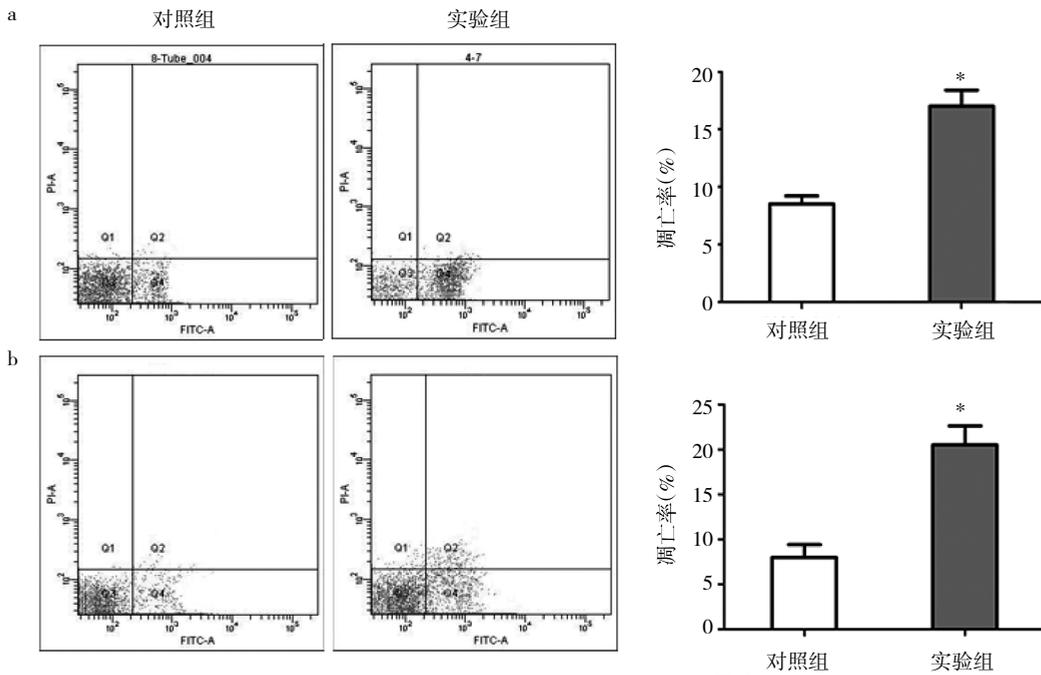


图 5 miRNA-1271 对乳腺癌细胞凋亡的影响(a: MCF-7 细胞; b: MDA-MB-231 细胞; 与对照组比较, \* $P < 0.05$ )

2.5 miRNA-1271 对 MCF-7 乳腺癌细胞体内增殖的影响 与对照组比较, 实验组裸鼠移植瘤体积明显较小, 质量明显较低, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 6。这

表明上调 miRNA-1271 表达后, MCF-7 乳腺癌细胞的体内增殖能力受到明显抑制。

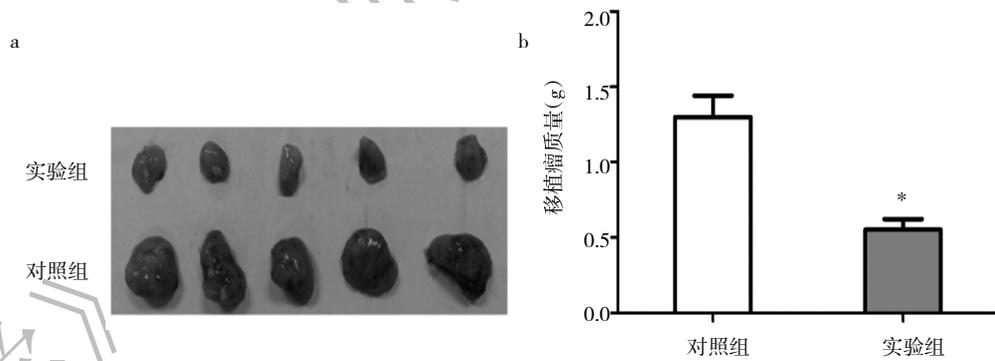


图 6 miRNA-1271 对乳腺癌细胞体内增殖的影响(a: 两组移植瘤体积比较; b: 两组移植瘤质量比较, \* $P < 0.05$ )

### 3 讨论

在女性恶性肿瘤中, 乳腺癌发病率及病死率均居首位, 严重威胁着女性健康<sup>[5]</sup>。miRNA 是一组进化保守且具有调控功能的非编码 RNA, 通过与靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区互补配对结合, 导致 miRNA 降解或抑制其翻译表达<sup>[6]</sup>。许多 miRNA 发挥着类似于癌基因或抑癌基因的作用, 是肿瘤的潜在治疗靶点和预后指标<sup>[7]</sup>。miRNA-1271 是在人类胚胎干细胞中的 ARL10 基因第 2 内含子区域被识别, 是 miRNA-96 的同源类似物<sup>[8]</sup>。最近研究发现, miRNA-1271 在肝癌<sup>[9]</sup>、肺癌<sup>[10]</sup>、结肠癌<sup>[11]</sup>、前

列腺癌<sup>[12]</sup>和胃癌<sup>[13]</sup>中均呈低表达。在肺癌中, miRNA-1271 表达降低; 外源性上调其表达后, miRNA-1271 通过调控 mTOR 基因可抑制癌细胞的增殖<sup>[10]</sup>。在胃癌中, miRNA-1271 因甲基化而表达降低, 通过靶向调控 MEK1/ERK/MAPK 信号转导途径在胃癌细胞生长、侵袭和迁移过程中发挥着重要作用<sup>[13]</sup>。然而, miRNA-1271 在乳腺癌中的研究报道尚少, 其生物学功能尚待阐明。

本研究对 80 例乳腺癌及癌旁正常组织中 miRNA-1271 表达进行检测, 结果发现 miRNA-1271 在乳腺癌组织中呈低表达, 说明 miRNA-1271 可能在乳腺癌中发挥抑癌基因的作用。于是, 笔者对 MCF-7 和 MDA-MB-

231 乳腺癌细胞稳定转染 miRNA-1271 模拟物,以探究上调 miRNA-1271 对乳腺癌细胞生物学功能的影响。CCK-8 实验结果发现,miRNA-1271 的表达水平升高后,乳腺癌细胞的体外增殖能力受到明显抑制;集落形成实验发现,miRNA-1271 能明显减弱肿瘤细胞的成瘤能力。裸鼠成瘤实验结果证实,miRNA-1271 在体内亦能抑制乳腺癌细胞的增殖。细胞凋亡,即细胞的程序性死亡,是由基因控制的细胞自主的有序死亡<sup>[14]</sup>。凋亡是多基因多步骤严格控制的过程,而凋亡调控的失衡是肿瘤发生、发展的重要过程。本实验利用流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果发现 miRNA-1271 能通过促进凋亡的发生来抑制乳腺癌细胞的增殖能力。Qin 等<sup>[15]</sup>实验结果与之相似,在肝癌中低表达的 miRNA-1271,通过靶向作用于 FOXQ1 基因,促进肝癌细胞凋亡比例增加,从而抑制肝癌细胞的增殖。关于乳腺癌的研究发现,FOXQ1 是 TGF- $\beta$  信号通路中的一个重要靶点,miRNA-1271 促进乳腺癌细胞凋亡的机制可能与 FOXQ1 相关<sup>[16]</sup>。Du 等<sup>[17]</sup>近期研究发现,miRNA-1271 在乳腺癌组织及细胞中的表达明显降低,并通过靶向调控 SPIN1 基因表达来抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移能力,呈现出抑癌基因的活性。

综上所述,miRNA-1271 在乳腺癌组织中低表达;上调 miRNA-1271 表达,能抑制乳腺癌细胞的增殖,促进凋亡的发生,具有抑癌作用。本研究为乳腺癌的治疗提供了一个新思路,为后续深入探讨 miRNA-1271 在乳腺癌中的作用机制提供了前期实验基础。

#### 4 参考文献

- [1] Bandyopadhyay S, Bluth MH, Ali-Fehmi R. Breast Carcinoma: Updates in Molecular Profiling 2018[J]. Clin Lab Med, 2018, 38(2): 401-420. DOI:10.1016/j.cll.2018.02.006.
- [2] Chan CWH, Law BMH, So WKW, et al. Novel Strategies on Personalized Medicine for Breast. Cancer Treatment: An Update[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(11):E2423. DOI: 10.3390/ijms18112423.
- [3] Zaleska K. miRNA-Therapeutic tool in breast cancer? Where are we now? [J]. Rep Pract Oncol Radiother, 2015, 20 (2):79-86. DOI:10.1016/j.rpor.2014.10.009.
- [4] Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, et al. miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment[J]. Cancer Discov, 2016, 6(3): 235-246. DOI: 10.1158/2159-8290.
- [5] Ades F, Tryfonidis K, Zardavas D. The past and future of breast cancer treatment—from the papyrus to individualised treatment approaches[J]. Ecancermedicallscience, 2017, 11:746. DOI:10.3332/ecancer.2017.746.
- [6] Mulrane L, McGee SF, Gallagher WM, et al. miRNA dysregulation in breast cancer[J]. Cancer Res, 2013, 73(22): 6554-6562. DOI: 10.1158/0008-5472.
- [7] Schoepp M, Stroese AJ, Haier J. Dysregulation of miRNA Expression in Cancer Associated Fibroblasts (CAFs) and Its Consequences on the Tumor Microenvironment[J]. Cancers(Basel), 2017,9(6):e54. DOI:10.3390/cancers9060054.
- [8] Xu Z, Huang C, Hao D. MicroRNA-1271 inhibits proliferation and promotes apoptosis of multiple myeloma cells through inhibiting smoothened-mediated Hedgehog signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2017, 37(2): 1261-1269. DOI:10.3892/or.2016.5304.
- [9] Li C, Jiang Y, Miao R, et al. MicroRNA-1271 functions as a metastasis and epithelial-mesenchymal transition inhibitor in human HCC by targeting the PTP4A1/c-Src axis[J]. Int J Oncol, 2018, 52 (2): 536-546. DOI: 10.3892/ijo.2017.4224.
- [10] Zhen Z, Niu XM, Li C, et al. Inhibition of the growth of non-small cell lung cancer by miRNA-1271[J]. Am J Transl Res, 2015, 7 (10): 1917-1924.DOI:10.26355/eurrev\_201802\_14293.
- [11] Li J, Xu J, Yan X, et al. Suppression of Capn4 by microRNA-1271 impedes the proliferation and invasion of colorectal cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 99:162-168.DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.107.
- [12] Zhong J, Liu Y, Xu Q, et al. Inhibition of DIXDC1 by microRNA-1271 suppresses the proliferation and invasion of prostate cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 484(4): 794-800. DOI:10.1016/j.bbrc.2017.01.169.
- [13] Lim B, Kim HJ, Heo H, et al. Epigenetic silencing of miR-1271 enhances MEK1 and TEAD4 expression in gastric cancer [J]. Cancer Med, 2018. DOI:10.1002/cam4.1605. [Epub ahead of print]
- [14] Finlay D, Teriete P, Vamos M, et al. Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins[J]. F1000Res, 2017, 6:587. DOI:10.12688/f1000research.10625.1.
- [15] Qin A, Zhu J, Liu X, et al. miRNA-1271 inhibits cellular proliferation of hepatocellular carcinoma[J]. Oncology Letters, 2017, 14: 6783-6788.DOI:10.26355/eurrev\_201805\_14966.
- [16] Fan DM, Feng XS, Qi PW, et al. Forkhead factor FOXQ1 promotes TGF- $\beta$  expression and induces epithelial-mesenchymal transition[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 397:179-186.DOI:10.1007/s11010-014-2185-1.
- [17] Du HY, Liu B. MiR-1271 as a tumor suppressor in breast cancer proliferation and progression via targeting SPIN1[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(9):2697-2706.DOI:10.26355/eurrev\_201805\_14966.

(收稿日期:2018-07-23)

(本文编辑:陈丹)