



miR-34a 通过 Notch 信号通路影响乳腺癌细胞的生物学行为

王雷

(河南大学附属淮河医院甲状腺乳腺外科,河南 开封 475001)

【摘要】 目的 探讨 miR-34a 通过 Notch 信号通路影响乳腺癌细胞的生物学行为。方法 乳腺癌细胞 MCF-7 分为 miR-34a 及 Control 组,分别利用脂质体转染 miR-34a mimics 及 miR-34a NC,RT-PCR 法检测细胞中 miR-34a 表达,MTT、Hoechst 染色及 transwell 法分别检测细胞活力、凋亡及侵袭情况;western blot 检测细胞中 Notch1, Notch2, Dll1 及 Jagged-1 蛋白表达情况。结果 与 Control 组比较,miR-34 mimics 组中 miR-34a 表达量上调,细胞皱缩,变圆变亮,细胞活力降低($P < 0.01$),细胞凋亡率显著提高($P < 0.01$),细胞侵袭数目减少($P < 0.01$),Notch1, Notch2, Dll1 及 Jagged-1 蛋白表达量都显著降低($P < 0.01$)。结论 miR-34a mimics 通过抑制 Notch 信号通路进而诱导 MCF-7 乳腺癌细胞凋亡并抑制其侵袭。

【关键词】 miR-34a;Notch 信号通路;乳腺癌细胞 MCF-7;apoptosis;侵袭

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0061-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.011

Effect of miR-34a on the biological behavior of breast cancer cell by Notch signal pathway

WANG Lei

Thyroid and breast surgery, Huaihe Hospital Affiliated to Henan University, Kaifeng, Henan, 475001 China

【Abstract】 **Objective** To explore effect of miR-34a on the biological behavior of breast cancer cell MCF-7 by Notch signal pathway. **Methods** The MCF-7 cells were divided into miR-34a and Control groups. The miR-34a mimics and miR-34a NC were transfected by liposome. The expression of miR-34a in MCF-7 cell was examined by RT-PCR. The cell viability was detected by MTT. The cell apoptosis was examined by Hoechst staining. The cell invasion was detected by transwell method. The expression of Notch1, Notch2, Dll1 and Jagged-1 was detected by western blot. **Results** Compared with Control group, the expression of miR-34a was up-regulated ($P < 0.01$), Cell shrinkage, rounded brighten, the cell viability was decreased ($P < 0.01$), cell apoptotic rate was increased ($P < 0.01$), cell invasion number was reduced ($P < 0.01$), the expression of Notch1, Notch2, Dll1 and Jagged-1 was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-34a mimics induced MCF-7 cell apoptosis and inhibited cell invasion via inhibition of Notch signal pathway.

【Key words】 miR-34a; Notch signal pathway; breast cancer cell MCF-7; apoptosis; invasion

乳腺癌是常见的女性恶性肿瘤之一,其死亡率 均女性恶性肿瘤第二位,且死亡率在全国甚至全世

界范围均呈上升趋势^[1-2]。近年来随着化疗,放疗及生物技术手段的普及,乳腺癌患者的预后得到很大改善,但其发病率及难治率还是居高不下,因此寻找有效的诊断及治疗方法一直是乳腺癌等肿瘤研究的重点^[3-4]。Notch 是美国著名遗传学家 Thomas 于 1917 年在果蝇的研究中发现并命名的,并于 1980 年克隆成功。Notch 信号通路包括 Notch 受体(Notch1, Notch2, Notch3, Notch4), Dell-like 配体(Dell1, 3, 4)及 Jagged 配体(Jagged-1, Jagged-2)。研究已经表明 Notch 信号通路的异常表达与乳腺癌的发生发展密切相关,同时针对 Notch 信号通路的抑制剂或单克隆抗体已逐渐应用于乳腺癌的治疗中^[5-7]。

miRNA 是一类内源性非编码的 RNA 分子,长度约为 19-23 nt,能与下游靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区结合,进而调控靶基因的转录,最终影响细胞的生物学行为。研究已经表明 Notch1 是 miR-34a 的下游靶基因之一,miR-34a 能通过负性调控 Notch1 表达进而抑制结肠癌 SW480 细胞,膀胱癌细胞 T24 细胞的增殖^[8-9]。而 miR-34a 是否能够通过负性调控 Notch1 表达,同时调控 Notch 信号通路其它蛋白表达进而影响乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为还尚未见报道,因此本研究将探讨 miR-34a 对乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为及 Notch 信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

人乳腺癌细胞 MCF-7 购于中国科学院上海细胞库。

1.1.2 试剂

兔抗 Notch1, Notch2, Dll1 及 Jagged-1 多克隆抗体(美国 Abcam 公司);四甲基偶氮唑盐(美国 Gibco 公司);胎牛血清,transwell 试剂盒(美国 Hyclone 公司);小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L),BCA 试剂盒,Hoechst 33258 染色试剂盒(碧云天生物技术有限公司);Lipofectamine™2000,trizol 试剂盒,一步法 RT-PCR 试剂盒(大连宝生生物有限公司);miR-34a mimics 及 miR-34a NC(广州市锐博生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器

迷你双垂直电泳仪,迷你转印电泳仪(北京六

一仪器厂);ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);SMA2000 型微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染

当 MCF-7 细胞汇合度达到 50% 左右时候,利用 Lipofectamine™2000 脂质体转染试剂盒分别转染 miR34a NC(Control)、miR-34a mimics,6 h 以后换成含 10% 血清的 DMEM 培养基;37℃,CO₂ 培养箱培养 48 h。应用 RT-PCR 检测细胞中 miR-34a 的表达。

1.2.2 RT-PCR 检测细胞中 miR-34a 表达

参考 trizol 试剂盒使用说明书提取总 RNA,并用微量紫外分光光度计检测 RNA 的纯度,通过一步法 RT-PCR 试剂盒将逆转录 RNA,并进行 PCR 扩增,最后将扩增产物用于 2% 的琼脂糖胶电泳。引物分别加入 25 μL PCR 反应体系中,反应条件为 94℃ 变性 45 s,59℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 60 s,共 35 个循环。

1.2.3 MTT 法检测细胞活力

将 MCF-7 细胞接种于 96 孔板,按“1.2.1”进行转染。分别培养 24、48、72、96 h 后,于倒置显微镜下拍照,接着加入 20 μL 终浓度为 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4 h 后,将上清液舍弃,并每孔加入 150 μL 的二甲基亚砷,震荡使结晶物充分溶解,于酶标仪 560 nm 处测 OD 值,OD 值即代表细胞活力。

1.2.4 Hoechst 染色检测细胞凋亡

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染。48 h 后用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞,后按照 Hoechst 33258 染色试剂盒说明书进行操作,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤 3 次,加入 Hoechst 33258 染色液避光染色 15 min,PBS 洗涤 3 次,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.5 transwell 法检测细胞侵袭能力

将基质胶均匀平铺于 Transwell 小室的微膜(8 μm)上,制成凝胶备用。将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染。48 h 后,将消化下来的细胞接种到 Transwell 上室,而下室加入含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基,继续培养 24 h,取出 Transwell 小室,洗涤,下室用多聚甲醛固定,结晶紫染色,倒置光学显微镜下计数 5 个视野穿膜细胞个数,计算平均每个视野的细胞数,即表示细胞的侵袭能力。

每组实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测细胞中 Notch1 蛋白表达

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染,48 h 收集细胞,加入细胞裂解液,裂解 30 min 后,离心收集上清液,即可获得总蛋白。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳 1-2 h,后湿法转膜 30 - 50 min。将膜浸入一抗溶液(兔抗 Notch1、Notch2, Dll1 及 Jagged-1 多克隆抗体,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体,稀释比例:1:100)孵育,4℃ 过夜;次日二抗(辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L),稀释比例:1:200)室温孵育 1 h。并在膜上滴加化学曝光液,于凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件分析各抗体条带灰度值。

1.2.9 统计学分析

所有数据均用 SPSS 17.0 统计分析,至少重复三次,并用 $\bar{x} \pm s$ 表示,经 *t* 检验显著性差异,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果

2.1 miR-34a 转染效果的检测

如图 1 所示,与对照组比较,miR-34a mimics 组中 miR-34a 表达量显著提高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

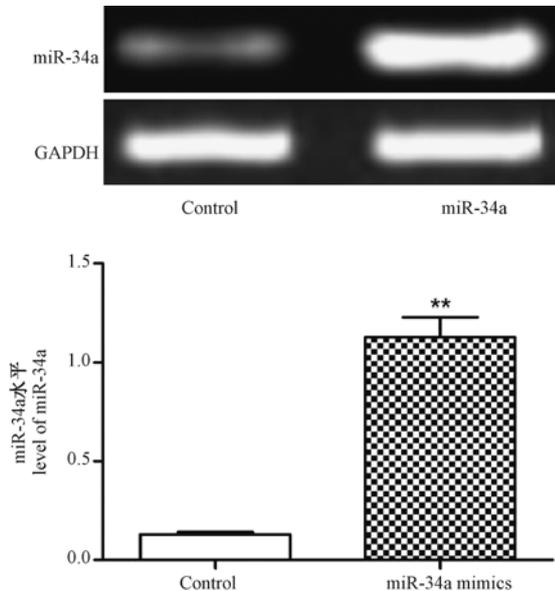


图 1 miR-34a 转染效果的检测,与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig.1 Detection of transfection efficiency of miR-34a, compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$ 。

2.2 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞活力的影响

如图 2 所示,在作用 24、48、72、96 h 时,与对照组比较,miR-34a mimics 组细胞活力显著降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。且在 48、72、96 h 时作用强度一致,因此选择 48 h 作为后续研究作用时间。同时在 48 h 倒置显微镜下观察到 miR-34a mimics 组较对照组细胞皱缩,变圆变亮(图 3)。

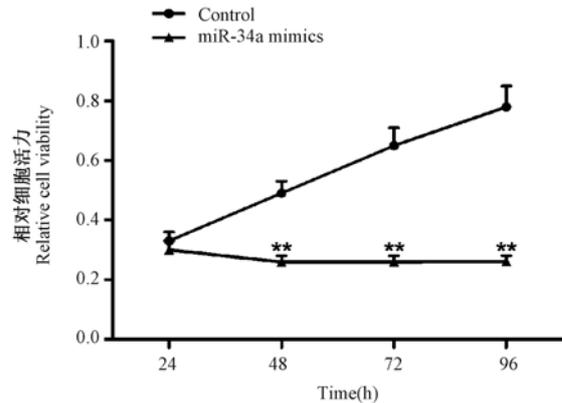


图 2 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞活力的影响,与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

Fig.2 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell viability, compared with control group, ** $P < 0.01$ 。

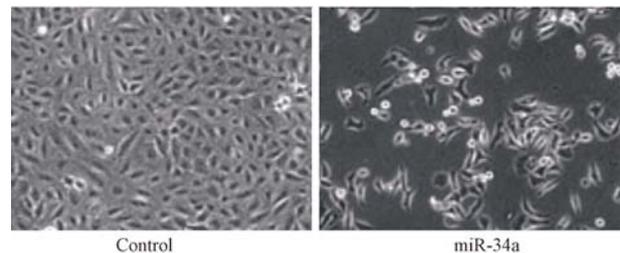


图 3 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞形态的影响($\times 20$)

Fig.3 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell morphology($\times 20$)

2.3 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞凋亡情况的影响

如图 4, Hoechst 染色结果所示,与对照组 (3.73 ± 0.37) 比较,miR-34a mimics 组 (39.98 ± 4.03) 细胞凋亡率显著提高,差异具统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞迁移侵袭能力的影响

如图 5, transwell 染色结果所示,与对照组 (128.42 ± 10.35) 比较,miR-34a mimics 组 (35.71 ± 3.58) 细胞凋亡率显著提高,差异具统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch 信号通路的影响

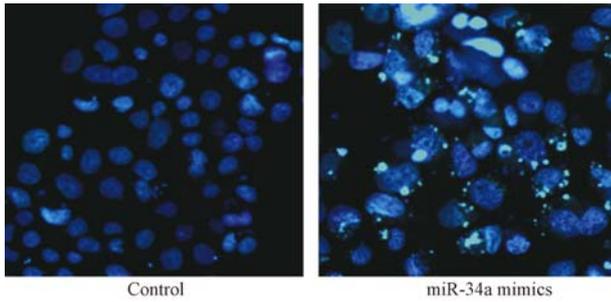


图 4 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞凋亡情况的影响(×20)

Fig. 4 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell apoptosis (×20)

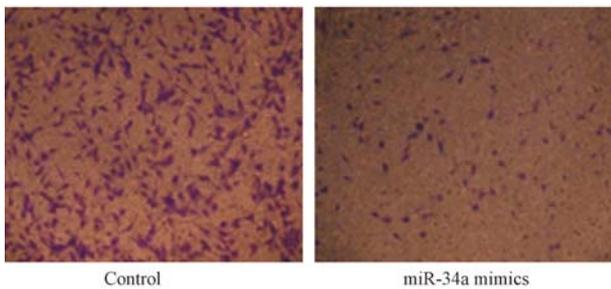


图 5 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞迁移侵袭能力的影响(×20)

Fig. 5 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell invasion viability (×20)

如图 6 所示,与对照组比较,miR-34a mimics 组中 Notch1、Notch2、Dll1 及 Jagged-1 表达量显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

自 1993 年 Ambros 和 Ruvkun 在秀丽线虫中第一次发现 miRNA,即 lin-4,科学家对于 miRNA 的研究已有二十几年时间了,总共发现了 6000 多种的 miRNA 分子,在人类基因上就发现了 600 多种的 miRNA。研究发现 miRNA 通过结合于其靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域,通过调控靶基因的转录,参与多种肿瘤细胞的生长,增殖,凋亡,分化,迁移,侵袭及血管生成等生物学行为^[10-11]。miR-34a 是其中一类被认为具有抑癌基因作用的 miRNA,广泛存在于节肢动物及哺乳动物之中,包括三个同源基因,miR-34a,miR-34b,miR-34c。后两种 miRNA 除了表达于肺组织外,其它正常组织中几乎不表达,而 miR-34a 几乎表达于所有正常组织中,所以常作为 miR-34 家族典型 miRNA 进行研究探讨^[12]。研究表明 miR-34a 不仅仅在乳腺癌中低表达或缺失,

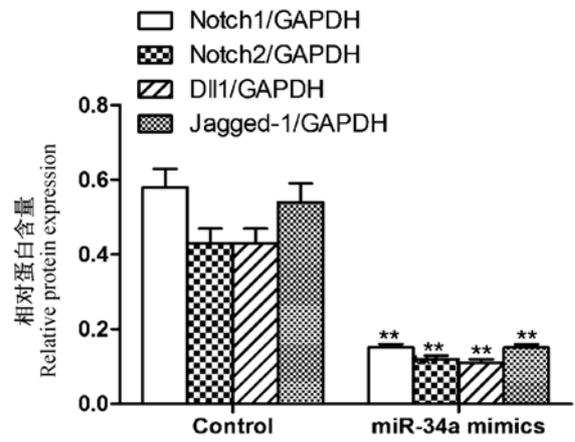
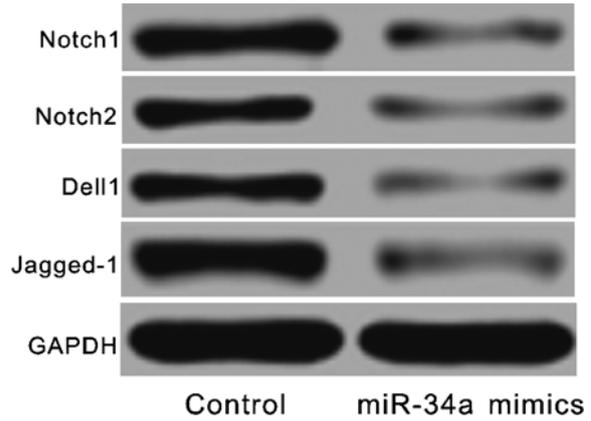


图 6 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch 信号通路的影响,与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Effect of miR-34a mimics on Notch signal pathway in MCF-7 cell, compared with control group, ** $P < 0.01$ 。

在肺癌,肝癌,卵巢癌,膀胱癌,结肠癌等组织中表达量均处于下调状态甚至缺失,所以 miR-34a 被认为是乳腺癌,卵巢癌等多种肿瘤发生发展及预后的有效检测指标^[13-15]。

1917 年美国著名遗传学家 Thomas 在研究果蝇功能时发现果蝇部分功能缺失导致果蝇翅膀边缘产生缺口,因此将造成此缺口的基因命名为 Notch,并于 1980 克隆成功。此信号通路包括 4 种受体(Notch1,Notch2,Notch3,Notch4),2 类配体,分别为 Delta-like 样配体(Dll1,Dll3 及 Dll4)及 Serrate 样配体(Jagged-1,Jagged-2)。Notch 信号通路通过其受体配体结合并扩大信号传递,使相邻细胞间分子之间产生差异,最终决定了乳腺癌、卵巢癌等多种肿瘤细胞的命运,在乳腺癌、卵巢癌等肿瘤的发生发展过程中发挥着重要的作用。研究显示在乳腺癌中 Notch 信号通路异常激活,而针对此信号通路的抑制剂如 γ -分泌酶抑制剂或者单克隆抗体联合化

疗已在逐步的用于乳腺癌的治疗当中^[5-7]。

同时研究也显示 Notch 信号通路的受体之一 Notch1 是 miR-34a 的靶基因之一, miR-34a 过表达后能通过下调 Notch1 表达从而抑制膀胱癌细胞, 结肠癌细胞的增殖^[8-9]。此外 Li 等^[16] 研究也表明 miR-34a 过表达不仅能下调 Notch1 表达, 也能下调 Notch2 表达, 同时还能调控细胞周期相关蛋白表达, 从而抑制神经胶质瘤细胞的增殖。Pang 等^[17-18] 研究表明 miR-34a mimics 通过下调 Notch1, Dll1 及 Jagged-1 表达, 进而抑制绒毛膜癌细胞 BeWo 及 JEG-3 的增殖及侵袭, 并利用 siRNA Notch1 及 Dll1 单克隆抗体进一步验证了 miR-34a 对细胞增殖侵袭的抑制作用, 至少部分抑制作用是通过 Notch1 及 Dll1 实现的。所以本研究将在此基础上探讨 miR-34a 是否也能够通过 Notch 信号通路影响乳腺癌细胞 MCF-7 增殖, 凋亡与侵袭。首先本研究利用脂质体转染 miR-34a mimics 及 miR-34a NC, 并采用 RT-PCR 证实了转染的成功。接着 MTT 法检测了 miR-34a mimics 在 24、48、72、96 h 对 MCF-7 细胞活力的影响, 结果表明随着作用时间的推移, miR-34a mimics 能显著的降低 MCF-7 细胞活力, 不过在 48、72、96 h 时候抑制程度趋向一致, 因此选为后续实验时间。接着采用 Hoechst 染色进一步验证了 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞的凋亡诱导作用, 与 miR-34a mimics 在其它肿瘤细胞中的作用效果一致^[8,9]。另外 transwell 结果也显示 miR-34a mimics 能显著的抑制 MCF-7 细胞的侵袭能力。最后通过 western blot 检测 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch 信号通路的影响, 结果表明 miR-34a mimics 能显著的下调 Notch1, Notch2, Dll1 及 Jagged-1 表达, 与 Pang 等^[17-18] 研究结果一致, 从而提示 miR-34a mimics 能通过抑制 Notch 信号通路从而诱导 MCF-7 细胞凋亡, 并抑制细胞增殖及侵袭。

参考文献:

- [1] Casellas-Grau A, Vives J, Font A, *et al.* Positive psychological functioning in breast cancer: An integrative review[J]. *Breast*, 2016,27:136-168.
- [2] Zavos A, Valachis A. Risk of chemotherapy-induced amenorrhea in patients with breast cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Acta Oncol*, 2016,55(6):664-670.
- [3] 刘海鸥, 张喜平. 乳腺癌新辅助化疗的研究进展[J]. *医学综述*, 2014,20(4):653-656.
- [4] 王方. 乳腺癌分子靶向治疗研究进展[J]. *中国肿瘤临床与康复*, 2013,20(3):280-282.
- [5] 刘兆国, 朱智杰, 周梁, 等. Notch 信号通路与肿瘤研究[J]. *中国药理学通报*, 2012,28(8):1045-1048.
- [6] 赵春霞, 曹玉文, 付欣鸽, 等. Notch 信号通路相关基因与乳腺癌发生发展的研究新进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2011,19(10):2092-2095.
- [7] 郭璐, 张瑾. Notch 信号通路在乳腺癌干细胞中的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2014,41(14):938-941.
- [8] 张超, 姚志勇, 朱鸣阳, 等. MicroRNA-34a 通过 Notch1 对膀胱肿瘤细胞株 T24 增殖的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2012,37(5):426-430.
- [9] 邵新宏, 于游, 张才全. miR-34a 靶向调控 NOTCH1 基因对 SW480 细胞增殖的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2012,34(22):2297-2301.
- [10] Kaboli P J, Rahmat A, Ismail P, *et al.* MicroRNA-based therapy and breast cancer: A comprehensive review of novel therapeutic strategies from diagnosis to treatment[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 97:104-121.
- [11] Rothschild S I. microRNA therapies in cancer[J]. *Mol Cell Ther*, 2014,2(1):1-8.
- [12] 王洪一, 郭洪, 李娟, 等. miR-34a 的表达调控及其与肿瘤发生的关系[J]. *医学综述*, 2012,18(7):1020-1023.
- [13] 巩雅宁, 刘为青, 董坚. miR-34a 对肿瘤发生发展调控作用的最近研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2013,42(6):6-9.
- [14] Ren F, Zhang X, Liang H, *et al.* Prognostic significance of MiR-34a in solid tumors: a systemic review and meta-analysis with 4030 patients[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015,8(10):17377-17391.
- [15] Wang J, Dan G, Zhao J, *et al.* The predictive effect of overexpressed miR-34a on good survival of cancer patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Onco Targets Ther*, 2015,8:2709-2719.
- [16] Li Y, Guessous F, Zhang Y, *et al.* MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes[J]. *Cancer Res*, 2009,69(19):7569-7576.
- [17] Pang R T, Leung C O, Lee C L, *et al.* MicroRNA-34a is a tumor suppressor in choriocarcinoma via regulation of Delta-like1[J]. *BMC Cancer*, 2013,13(1):25.
- [18] Pang R T, Leung C O, Ye T M, *et al.* MicroRNA-34a suppresses invasion through downregulation of Notch1 and Jagged1 in cervical carcinoma and choriocarcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2010,31(6):1037-1044.