

·论 著·

## 三阴性乳腺癌患者血浆中三种 microRNA 的检测及对细胞增殖的影响和作用机制

郭巨锋 崔海东 项爱斋 胡淑芳 刘坚

**[摘要]** **目的** 探讨三种 microRNA 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响并分析其作用机制。**方法** 选取三阴性乳腺癌 (TNBC) 患者 40 例为 TNBC 组, 同期良性乳腺肿瘤 (BBC) 患者 40 例为 BBC 组, 同期体检健康者 40 例为对照组。检测三组血浆中 microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199 表达量, 并分别利用 microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199 转染 MDA-MB-231 细胞, 作为 microRNA-21 mimics 组、microRNAlet-7a mimics 组、microRNA-199 mimics 组。以单独转染空载脂质体作为 microRNA-NC 组。检测各组 MDA-MB-231 细胞增殖率, 以及细胞周期分析结果。**结果** TNBC 组和 BBC 组中 microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199 表达量均明显低于对照组, 差异均有统计学意义 ( $t$  分别=14.30、14.40、20.57、7.53、8.51、12.45,  $P$  均 $<0.05$ ); 且 TNBC 组中 microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199 表达量明显低于 BBC 组 ( $t$  分别=127.21、101.90、125.63,  $P$  均 $<0.05$ )。microRNA-21 mimics 组、microRNAlet-7a mimics 组、microRNA-199 mimics 组在 24 h、48 h、及 72 h 时的细胞增殖率均明显低于 microRNA-NC 组,  $G_0/G_1$  期细胞比例均明显高于 microRNA-NC 组, S 期细胞比例均明显低于 microRNA-NC 组, 差异均有统计学意义 ( $t$  分别=13.84、15.80、16.13、12.54、14.52、15.80、15.88、18.01、17.63; 18.33、19.02、15.43、29.03、28.64、30.34,  $P$  均 $<0.05$ )。**结论** MicroRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199 表达量随乳腺肿瘤性质恶化而降低; 三者均对 MDA-MB-231 细胞的增殖有抑制作用, 可将 MDA-MB-231 细胞滞留于  $G_0/G_1$  期。

**[关键词]** 三阴性乳腺癌; microRNA-21; microRNAlet-7a; microRNA-199; 细胞增殖; 细胞周期

**Detection of three kinds of microRNA in plasma and their effect on cell proliferation in patients with triple negative breast cancer** GUO Jufeng, CUI Haidong, XIANG Aizhai, et al. Department of Breast Surgery, Hangzhou First People's Hospital, Nanjing Medical University Affiliated Hangzhou Hospital, Hangzhou 310002, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of three kinds of microRNA on the proliferation of MDA-MB-231 cells and analyze its mechanism. **Methods** Totally 40 cases of TNBC patients were selected as TNBC group, 40 cases of benign breast cancer patients were selected as BBC group, and 40 healthy people were selected as control group. The expressions of microRNA-21, microRNAlet-7a and microRNA-199 of patients in three groups were measured by fluorescence. MDA-MB-231 cells were transfected by microRNA-21, microRNAlet-7a and microRNA-199 respectively, and then enrolled as the microRNA-21 mimic group, the microRNAlet-7a mimic group, and the microRNA-199 mimic group. At meanwhile, microRNA-NC group was set up with no-load liposome. The proliferation rate of MDA-MB-231 cells among three groups were detected by MTT assay and the cell cycles were analyzed by flow cytometry. **Results** The expressions of microRNA-21, microRNAlet-7a and microRNA-199 of TNBC group and BBC group were significantly lower than those of control group ( $t=14.30, 14.40, 20.57, 7.53, 8.51, 12.45, P<0.05$ ). The expressions of microRNA-21, microRNAlet-7a and microRNA-199 of TNBC group were significantly lower than those of BBC group ( $t=127.21, 101.90, 125.63, P<0.05$ ). The cell proliferation rates of microRNA-21 mimics group, microRNAlet-7a mimics group and microRNA-199 mimics group

were significantly lower than those of microRNA-NC group at 24h, 48h, and 72h ( $t=13.84, 15.80, 16.13, 12.54, 14.52, 15.80, 15.88, 18.01, 17.63, P<0.05$ ). The proportions of  $G_0/G_1$  phase cells of microRNA-21 mimics group, microRNAlet-7a mimics group and

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.05.007

基金项目: 杭州市科委医疗卫生项目 (20170533B26)

作者单位: 310002 浙江杭州, 杭州市第一人民医院、南京医科大学附属杭州医院乳腺外科

通讯作者: 刘坚, Email: liuj1224@sina.com

microRNA-199 mimics group were significantly higher than those of microRNA-NC group, and the proportions of S phase cells were significantly lower than those of microRNA-NC group ( $t=18.33, 19.02, 15.43, 29.03, 28.64, 30.34, P<0.05$ ).

**Conclusion** The expressions of microRNA-21, microRNAlet-7a and microRNA-199 of MDA-MB-231 cells is decreasing with the deterioration of breast tumor properties. Three kinds of micro RNA have inhibitory effect on the proliferation of MDA-MB-231 cells by trapping the most of the MDA-MB-231 cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase.

**[Key words]** triple negative breast cancer; microRNA-21; microRNAlet-7a; microRNA-199; cell proliferation; cell cycle

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)是一种特殊类型的乳腺癌。目前因缺乏内分泌及抗原癌基因人类表皮生长因子受体2治疗的靶点,尚无针对性的标准治疗方案。因此,寻找新的治疗靶点和手段是三阴乳腺癌研究中的热点。microRNA是一类由内源基因编码的长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子, microRNA调节着人类三分之一的基因。本次研究分析了microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199在TNBC患者血浆中的表达及增殖情况,以期为TNBC的治疗提供实验依据。现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2016年7月至2017年7月在杭州市第一人民医院乳腺外科行乳腺癌改良根治术的并经病理学检查及免疫组织化学检测证实的TNBC患者40例为TNBC组,均为女性,年龄26~78岁,平均年龄(41.50±7.52)岁;选取同期本院收治的良性乳腺肿瘤(bilateral breast cancer, BBC)患者40例为BBC组,均为女性,年龄29~76岁,平均年龄(47.46±8.81)岁;另选取同期于本院体检的健康者40例为对照组,均为女性,年龄29~70岁,平均年龄(45.32±10.45)岁。所有患者均签署知情同意书,实验获伦理委员会批准。三组患者一般资料比较,差异均无统计学意义( $P$ 均>0.05)。

## 1.2 方法

**1.2.1 血浆中microRNA检测** 各组患者分别采血后2 h内,吸取血浆并利用miRcute\_miRNA试剂盒(由天根生化科技有限公司生产)提取micro-RNA,合成cDNA后利用miRcute\_miRNA荧光定量试剂盒,使用实时荧光定量PCR检测microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199表达情况。

**1.2.2 转染microRNA mimics** 利用脂质体法分别以microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199 (Med Chem Express, America)转染MDA-MB-231细胞(由上海研生生化试剂有限公司生产),作为mi-

croRNA-21 mimics组、microRNAlet-7a mimics组、microRNA-199 mimics组。转染前将细胞培养液改为不完全培养液(不含抗生素且不含血清)。分别将待转染microRNA-21、microRNAlet-7a及microRNA-199按照说明书加入到300 μl培养液中,吹打混匀。将5~10 μl脂质体加入到300 μl培养液中,吹打混匀。室温静置10 min后,混匀后于室温条件下孵育30 min,将混合液加入到待转孔中并混匀。培养5 h后,将细胞培养液换成完全培养液。将培养板置于37℃的CO<sub>2</sub>培养箱中培养。以单独转染空载脂质作为microRNA-NC组。

**1.2.3 MTT法检测细胞增殖** 分别将上述转染后的MDA-MB-231细胞接种于96孔细胞培养板中(2×10<sup>3</sup>个/孔)。每组设三个复孔,分别于转染24 h、48 h和72 h后,每孔加入20 μl MTT溶液(含MTT 5 μg/ml的磷酸缓冲盐溶液),37℃避光孵育5 h后,弃培养液,每孔加入150 μl二甲基亚砷,震荡15 min,于波长570 nm处利用酶标仪测定各孔OD值。细胞增殖率=(待测组平均OD值/正常对照组平均OD值)×100%。实验独立重复三次,取均值。正常对照组为未经任何处理的MDA-MB-231细胞。

**1.2.4 细胞周期分析** 将待测细胞利用磷酸缓冲盐溶液清洗后置于离心管中,以1 000 r/min速度离心5 min。弃去上清液后80%乙醇重悬细胞,4℃固定24 h,1 000 r/min离心5 min。弃去固定液,加入碘化丙啶染液重悬细胞。室温避光30 min后用CytoFLEX S流式细胞仪(由贝克曼库尔特公司生产)进行细胞周期分析。

**1.3 统计学方法** 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。各指标水平均符合正态分布,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。两组间比较采用独立样本的 $t$ 检验,多组间比较采用单因素方差分析法。设 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血浆中microRNA表达见表1

表1 MDA-MB-231细胞中三种microRNA表达量

组别	microRNA-21	microRNAlet-7a	microRNA-199
TNBC组	6.25 ± 0.12*#	5.87 ± 0.10*#	7.06 ± 0.13*#
BBC组	12.07 ± 0.22*	10.03 ± 0.20*	13.12 ± 0.23*
对照组	18.55 ± 4.71	16.05 ± 3.87	22.43 ± 4.09

注: \*:与对照组比较,  $P < 0.05$ ; #:与BBC组比较,  $P < 0.05$ 。

由表1可见, TNBC组和BBC组中microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199表达量均明显低于对照组( $t$ 分别=14.30、14.40、20.57、7.53、8.51、12.45,  $P$ 均 $< 0.05$ );且TNBC组中microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199表达量明显低于BBC组( $t$ 分别=127.21、101.90、125.63,  $P$ 均 $< 0.05$ )。

2.2 MDA-MB-231细胞增殖率和周期分析见表2

表2 MDA-MB-231细胞增殖率和细胞周期分析结果

组别	细胞增殖率/%			细胞周期分析/%		
	24 h	48 h	72 h	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
microRNA-21 mimics组	0.46 ± 0.11*	0.46 ± 0.13*	0.46 ± 0.07*	68.60 ± 10.21*	22.69 ± 4.32*	7.73 ± 2.02
microRNAlet-7a mimics组	0.43 ± 0.09*	0.44 ± 0.09*	0.42 ± 0.05*	68.73 ± 9.74*	23.63 ± 3.91*	7.73 ± 2.52
microRNA-199 mimics组	0.42 ± 0.09*	0.43 ± 0.06*	0.42 ± 0.06*	63.57 ± 9.17*	22.44 ± 3.81*	7.70 ± 2.62
microRNA-NC组	0.91 ± 0.14	0.95 ± 0.17	0.94 ± 0.15	45.52 ± 7.43	46.32 ± 6.90	8.16 ± 2.97

注: \*:与microRNA-NC组比较,  $P < 0.05$ 。

由表2可见, microRNA-21 mimics组、microRNAlet-7a mimics组、microRNA-199 mimics组在24 h、48 h、及72 h时,细胞增殖率均明显低于microRNA-NC组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=13.84、15.80、16.13、12.54、14.52、15.80、15.88、18.01、17.63,  $P$ 均 $< 0.05$ )。microRNA-21 mimics组、microRNAlet-7a mimics组、microRNA-199 mimics组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例均明显高于microRNA-NC组, S期细胞均明显低于microRNA-NC组,差异均有统计学意义( $t$ 分别=18.33、19.02、15.43、29.03、28.64、30.34,  $P$ 均 $< 0.05$ ), G<sub>2</sub>/M期细胞比例与microRNA-NC组比较,差异均无统计学意义( $t$ 分别=1.42、1.30、1.28,  $P$ 均 $> 0.05$ )。

### 3 讨论

近年来我国乳腺癌发病率一直呈上升趋势,已成为当前社会的重大公共卫生问题,其发病机制尚未完全清楚,研究发现乳腺癌的发病率与年龄有关<sup>[1]</sup>。此外,家族史亦为乳腺癌发生的危险因素之一。因此,学者们对乳腺癌的易感基因作了大量的研究,发现了几种直接与遗传性乳腺癌有关的基因,包括乳腺癌基因1号、2号(BRCA1、BRCA2)、p53、PTEN等,与这些基因突变相关的乳腺癌称为遗传性乳腺癌,占全部乳腺癌的5%~10%。TNBC是一种特殊类型乳腺癌,约占所有乳腺癌的15%,其许多生物学特性和基底细胞样型乳腺癌相似,但两者之间存在某些基因表达谱和免疫表型上的差异,因此亦不能完全等同。TNBC因缺乏内分泌及抗HER-2治疗的靶点,尚无针对性的标准治疗方

案。研究发现, TNBC与人表皮生长因子受体-2过表达乳腺癌相比,前者癌细胞的侵袭性更强,恶性程度更高,且更易发生腋下淋巴结转移,导致预后更差<sup>[2]</sup>。研究发现, microRNA在细胞分化、生物发育及疾病发生发展过程中发挥巨大作用,其异常表达与多种肿瘤的发生发展密切相关,越来越多的引起研究人员的关注<sup>[3-6]</sup>。microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199均为抑癌RNA,可调节多种与肿瘤生长、侵袭、转移调节有关的抑癌基因或蛋白,从而调控多种肿瘤的发生、发展<sup>[7-9]</sup>。

本次研究结果显示: TNBC组及BBC组中microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199表达量均明显低于对照组( $P$ 均 $< 0.05$ );且TNBC组中microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199表达量明显低于BBC组( $P$ 均 $< 0.05$ )。表明microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199表达量与乳腺肿瘤性质有关,即与良性乳腺癌相比,在TNBC患者MDA-MB-231细胞中表达量降低。研究结果还发现, microRNA-21 mimics组、microRNAlet-7a mimics组、microRNA-199 mimics组细胞增殖率均明显低于microRNA-NC组( $P$ 均 $< 0.05$ )。表明microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199过表达后,可明显抑制MDA-MB-231细胞的增殖。其作用机制可能与microRNA参与癌细胞周期的调控有关。细胞周期是指细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程,分为间期与分裂期两个阶段。间期又分为三期,即DNA合成前期(G<sub>1</sub>期)、

DNA合成期(S期)与DNA合成后期(G<sub>2</sub>期);分裂期即M期。在有丝分裂完成后和DNA合成刚开始时有短暂的停顿或间隙,同样的停顿或间隙存在于DNA合成期后和有丝分裂开始之时。这个过程中,DNA通过转录将遗传信息传递给mRNA,mRNA通过翻译把信息传递给蛋白质。本实验利用流式细胞仪对转染后的MDA-MB-231细胞进行细胞周期分析,结果显示: microRNA-21 mimics组、microRNAlet-7a mimics组、microRNA-199 mimics组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例均明显高于microRNA-NC组,S期细胞比例均明显低于microRNA-NC组(*P*均<0.05)。说明转染microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199可以将MDA-MB-231细胞阻滞在DNA合成前期,使处于DNA合成期的细胞明显减少,进而阻止细胞进入有丝分裂期,使细胞增殖率下降。研究表明,microRNA可以靶向调控并降解编码蛋白质的mRNA,影响调控癌细胞增殖、转移相关基因的表达<sup>[10]</sup>。可见高表达的microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199可以与控制MDA-MB-231细胞增殖的mRNA相结合,使多数癌细胞滞留于DNA合成前期。同时,因为mRNA所携带的遗传信息可以指导相关蛋白质合成,所以高表达的microRNA对癌细胞增殖的抑制作用可能与相关功能蛋白表达的增多或较少有关。本次研究因缺少相关仪器,未对上述细胞进行凋亡实验,有待进一步完善实验结果,以保证结论的准确性。

综上所述,microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199表达量随乳腺肿瘤性质恶化而降低;microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199均对MDA-MB-231细胞的增殖有抑制作用,可将多数MDA-MB-231细胞滞留于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。通过调节与microRNA-21、microRNAlet-7a、microRNA-199有关的蛋白质水平,进行TNBC的治疗,需要进一步研究。

#### 参考文献

- 1 张莹,任占平,张莹.老年女性浸润性乳腺癌的分子分型及临床病理特点分析[J].实用老年医学,2015,29(11):952-954.
- 2 周海丰,范玉宏,武雪亮,等.三阴性乳腺癌和HER-2过表达乳腺癌的临床病理特征比较[J].海南医学,2014,25(6):906-909.
- 3 盛仲楠.P53、C-erbB-2及Ki-67在乳腺癌组织中的表达作用研究[J].湖南师范大学学报(医学版),2015,12(5):9-11.
- 4 Kaukonen KM, Rauhala HE, Scaravilli M, et al. Epigenetically altered miR-193b targets cyclin D1 in prostate cancer[J]. Cancer Med, 2015, 4(9): 1417-1425.
- 5 Nakaoka H, Hirono K, Yamamoto S, et al. MicroRNA-145-5p and microRNA-320a encapsulated in endothelial microparticles contribute to the progression of vasculitis in acute kawasaki disease[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1016.
- 6 Shen R, Wang Y, Wang CX, et al. MiRNA-155 mediates TAM resistance by modulating SOCS6-STAT3 signalling pathway in breast cancer[J]. Am J Transl Res, 2015, 7(10): 2115-2126.
- 7 王子航,王志成,张嘉星,等.MicroRNA-199a/b-3p抑制三阴性乳腺癌细胞增殖机制研究[J].中国免疫学杂志,2016,32(4):480-482.
- 8 曾梓涵,赵玫,彭华,等.microRNA-21、microRNAlet-7a在三阴性乳腺癌与LuminalA型乳腺癌血清中的表达差异[J].实用医学杂志,2015,31(21):3499-3501.
- 9 许文景,黄冬云,陈平,等.microRNA-Let-7a在肺癌患者中的表达及其抑癌机制的探讨[J].中国免疫学杂志,2016,32(2):234-238.
- 10 Hu Y, Qiu Y, Yagüe E, et al. MiRNA-205 targets VEGFA and FGF2 and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(6): e2291.

(收稿日期 2018-03-14)

(本文编辑 蔡华波)