微小 RNA－664a－3p 在乳腺癌组织的表达及对乳腺癌细胞生物学行为的影响

张　沛　岳青芬　侯青霞　韩听锋

摘　要　目的　观察微小 RNA－664a－3p(miR－664a－3p)在乳腺癌组织中的表达及其对乳腺癌细胞生物学行为的影响。**方法**　提取 16 例乳腺癌手术标本及其癌旁组织中总 RNA,使用荧光实时定量聚合酶链反应(qPCR)检测 miR－664a－3p 在乳腺癌及其癌旁组织中的表达量,并检测 miR－664a－3p 在 4 种乳腺癌细胞株(T47D、MDA－MB－231、BT－549、MCF－7)及正常乳腺上皮细胞 MCF－10A 中的表达。选取 miR－664a－3p 表达水平最低的乳腺癌细胞瞬时转染 miR－664a－3p 模拟物(实验组)或 miR－NC(对照组)。qPCR 检测转染后细胞中 miR－664a－3p 的表达。生物信息学软件预测 miR－664a－3p 的靶基因。使用荧光素酶报告基因实验检测 miR－664a－3p 对靶基因肿瘤内皮标志物 8(TEM8)的靶向作用。qPCR 和 Western blot 法检测 TEM8 及下游基因的表达。流式细胞术检测细胞周期,细胞计数试剂盒(CCK－8)法检测细胞增殖能力,Transwell 实验检测细胞侵袭能力。**结果**　乳腺癌组织中 miR－664a－3p 的表达量显著低于癌旁组织($P<0.01$)。乳腺癌细胞株中 miR－664a－3p 的表达量显著低于正常乳腺上皮细胞($P<0.05$),其中 T47D 细胞的表达量最低($P<0.05$)。实验组和对照组 T47D 细胞中 miR－664a－3p 的表达量分别为 24.87 ± 2.17 和 1.02 ± 0.10($P<0.01$)。miR－664a－3p 可与 TEM8－3′－非编码区(UTR)特异性结合($P<0.01$)。与对照组比较,实验组中 TEM8 mRNA 及蛋白表达下调($P<0.05$)。转染 miR－664a－3p 能够显著抑制 T47D 细胞周期的进展($P<0.05$),降低细胞的增殖能力($P<0.01$),抑制细胞的侵袭能力($P<0.01$)。**结论**　miR－664a－3p 在乳腺癌组织和细胞株表达下调,过表达 miR－664a－3p 能够通过靶向抑制 TEM8 基因的表达,抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭能力。

关键词　微小 RNA－664a－3p　乳腺癌　肿瘤内皮标志物 8　增殖　侵袭

中图分类号　R737.9　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2019.05.039

Expression of MicroRNA－664a－3p in Breast Cancer and its Effect on the Biological Behavior of Breast Cancer Cells. *Zhang Pei, Yue Qingfen, Hou Qingxia, et al. Department of Gynecology, Luoyang Central Hospital, Zhengzhou University, Henan 471000, China*

Abstract　Objective　To observe the expression of microRNA－664a－3p (miR－664a－3p) in breast cancer and its effect on the biological behavior of breast cancer cells. **Methods**　Sixteen cases of breast cancer specimens and their adjacent tissues were collected for total RNA extraction. The expression of miR－664a－3p in breast cancer and adjacent normal tissues was detected by real－time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The expression of miR－664a－3p in four breast cancer cell lines (T47D, MDA－MB－231, BT－549, MCF－7) and normal breast epithelial cells MCF－10A was detected by qPCR. The miR－664a－3p mimics (experimental group) or miR－NC (control group) were transiently transfected into breast cancer cells with the lowest miR－664a－3p expression level. The expression of miR－664a－3p in transfected cells was detected by qPCR. Bioinformatics software predicts the target gene of miR－664a－3p. Luciferase reporter assay was used to detect the targeting effect of miR－664a－3p on target gene tumor endothelial marker 8 (TEM8). The expression of TEM8 and downstream genes was detected by qPCR and Western blot. Flow cytometry was used to detect the cell cycle distribution in both groups. Cell counting kit (CCK－8) method was used to detect cell proliferation, and cell invasion assay was performed by Transwell assay. **Results**　The expression of miR－664a－3p in breast cancer tissues was significantly lower than that in paracancerous tissues ($P<0.01$). The expression of miR－664a－3p in breast cancer cell lines was significantly lower than that in normal breast epithelial cells ($P<0.05$), of which the expression level in T47D cells was the lowest ($P<0.05$). The expression levels of miR－664a－3p in experimental group and control group were respectively 24.87 ± 2.17 and 1.02 ± 0.10($P<0.01$). miR－664a－3p can specifically binds to the TEM8－3′－non－coding region (3′－UTR) ($P<0.01$). Compared with the control group, the expression of TEM8 mRNA and protein was decreased in experimental group ($P<0.05$). Transfection of miR－664a－3p significantly inhibited the progression of T47D cell cycle ($P<0.05$), reduced cell proliferation ($P<0.01$), inhibited cell invasive ability ($P<0.01$).

作者单位:471000　郑州大学附属洛阳中心医院妇科

通讯作者:岳青芬,电子信箱:15837966012@163.com

Conclusion miR－664a－3p is down－regulated in breast cancer tissues and cell lines. Overexpression of miR－664a－3p can inhibit the proliferation and invasion of breast cancer cells by inhibiting the expression of TEM8.

Key words microRNA－664a－3p; Breast cancer; Tumor endothelial markers 8; Proliferation; Invasion

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一，中国乳腺癌发病人数仅次于美国，居全球第二位，且呈逐年上升趋势[1,2]。微小 RNA（microRNA，miRNA）是一类内源性非编码 RNA，长度约为 19～25 个核苷酸[3]。miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3′－UTR 配对结合，导致靶基因 mRNA 降解或者抑制其翻译，负向调控靶基因的表达[4]。miR－664a－3p 的研究尚处于起步阶段，目前仅发现 miR－664a－3p 在骨肉瘤细胞中具有肿瘤抑制作用[5]。本研究通过 qPCR 检测 miR－664a－3p 在乳腺癌组织和细胞株的表达，并将 miR－664a－3p 转染到乳腺癌细胞中，观察 miR－664a－3p 对乳腺癌细胞增殖和侵袭的影响，探讨其影响乳腺癌细胞生物学行为的分子机制。

材料与方法

1. 实验材料：（1）一般资料：经笔者医院医学伦理学委员会同意，患者本人或家属签署知情同意书，收集笔者医院妇产科 2017 年 1 月～8 月经手术切除的新鲜乳腺癌组织标本 16 例，所有患者在手术前均未行放射治疗、化学治疗等。取其乳腺癌原发肿瘤组织和癌旁组织（距离癌灶边缘 >5cm）标本。经病理学诊断证实所得标本为乳腺癌组织，根据具体术中病理报告分为早期浸润癌 10 例、浸润癌 6 例。标本术中取出后立即放入液氮中保存。（2）细胞与试剂：RNA 提取试剂盒和荧光实时定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。DMEM/F12 培养基、RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。工具细胞 HEK293、人乳腺癌细胞株（T47D、MDA－MB－231、BT－549、MCF－7）和正常乳腺上皮细胞 MCF－10A 购自中国医学科学院基础医学研究所。miR－664a－3p 模拟物和 miR－NC 购自广州市锐博生物科技有限公司。脂质体转染试剂 Lipofectamine 3000 购自美国 Invitrogen 公司。pGL3 荧光素酶检测系统购自美国 Promega 公司。二喹啉甲酸（BCA）蛋白定量试剂盒购自武汉博士德公司。一抗 β－actin、TEM8、CDK4、Cyclin D1、Vimentin、β－catenin 和辣根过氧化物酶标记的二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。增强型化学发光（ECL）检测试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。细胞周期检测试剂盒购自中国凯基公司。Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

2. 细胞培养及转染：在 37°C、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中，使用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基常规培养 MCF－10A、T47D、MDA－MB－231 和 HEK293 细胞，使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基常规培养 BT－549 和MCF－7 细胞。将对数生长期的 T47D 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板。依据 Lipofectamine 3000 转染试剂盒说明书进行转染，转染浓度为 50nmol/L。实验细胞分两组，即实验组（转染 miR－664a－3p 模拟物）和对照组（转染 miR－NC）。

3. 荧光实时定量聚合酶链反应（qPCR）检测 miR－664a－3p 和靶基因 mRNA 表达：Trizol 试剂提取总 RNA，依据 RNA 反转录试剂盒说明书反转录 RNA 为 cDNA，取反转录产物 qPCR 反应，扩增条件为 94℃ 5min，94℃ 30s，60℃ 20s，72℃ 20s，共 40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算miR－664a－3p 相对于内参 U6 的表达量及 TEM8 相对于内参 GAPDH 的表达量。引物序列详见表 1。

4. 生物信息学软件预测 miR－664a－3p 靶基因及双荧光素酶活性检测：生物信息学软件 miRWalk、TarBase 和 TargetScan 预测 miR－664a－3p 的靶基因并取交集，miR－664a－3p 的靶基因可能为 TEM8，互补结合序列详见图 1。构建野生型及突变型 TEM8－3′ UTR 的报告基因质粒，突变区域详见图 1，并将野生型、突变型分别与 miR－664a－3p 和 miR－NC 共转染入 HEK293 细胞中，48h 后按照双荧光素酶检测试剂盒说明书，检测各组萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性。以萤火虫荧光强度/海肾荧光强度比值反映各组的相对荧光强度。

5. Western blot 法检测目的蛋白表达：分别使用细胞裂解液提取两组细胞总蛋白。取 25μg 蛋白，行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS－PAGE），电转至聚偏氟乙烯（PVDF）膜，5% 脱脂牛奶 26℃封闭 3h。一抗 4℃孵育 12h。Tris－HCl 缓冲液漂洗 2 次，辣根过氧化物酶标记的二抗 26℃孵育 2h，Tris－HCl 缓冲液漂洗 2 次，滴加增强型化学发光试剂（ECL）发光显影分析比较条带变化。

6. 流式细胞术（FCM）检测细胞周期：将两组细

胞消化收集，使用磷酸盐缓冲液（PBS）漂洗 2 次，加入 1ml 70% 乙醇溶液 4℃ 固定 1h，离心去上清，PBS 溶液漂洗 2 次，加入 1ml 碘化丙啶（PI）试剂，26℃ 避光孵育 30min，流式细胞仪检测并分析各组细胞周期，以细胞所处细胞周期百分率表示。

7. CCK－8 法检测细胞活力：将两组 T47D 细胞重悬后计数，每孔 4000 个接种于 96 孔板，每间隔 24h 每孔加入 CCK－8 试剂 10μl，培养箱内孵育 4h，在酶标仪 450nm 波长处测定吸光度（*A*）值，连续检测 5 天，以时间为横轴，*A* 值为纵轴，绘制细胞生长曲线。每组实验重复 4 次。

8. 细胞侵袭实验：Transwell 侵袭小室上室面铺以细胞外基质（ECM）胶，培养箱内放置 4h 使 ECM 胶凝固。将转染后 48h 的两组 T47D 细胞消化，使用无血清培养基重悬并计数，以 2×10^4 个/孔接种于上室，下室中加入 500μl 完全培养基，放入培养箱内孵育 24h，吸取培养基，小室内加入 1ml 甲醇固定 20min，加入结晶紫溶液 500μl 染色 20min，自来水清洗，棉签擦去未穿过小室底膜的细胞，倒置显微镜下计数穿过小室底膜的细胞数目。

表 1　qPCR 引物序列

RNAs	引物序列（5′→3′）
miR－664a－3p	GGCGTATTCATTTATCCCCAGC
miR－664a－3p	CAGTGCGTGTCGTGGAGT
U6	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6	AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH	CTGGGCTACACTGAGCACC
GAPDH	AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG
TEM8	ACAGTTGGCTCACAAATTCATCA
TEM8	TCACTGGCCCTTTCAAATCCT

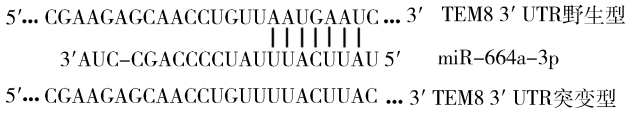

图 1　野生型 TEM8 mRNA 的 3′－UTR 区域含有 miR－664a－3p 靶向结合片段

9. 统计学方法：采用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。使用 *t* 检验比较两组间差异，使用 *One－way ANOVA* 检验比较多组间差异，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. miR－664a－3p 在乳腺癌组织的表达：qPCR 结果显示（图 2），miR－664a－3p 在乳腺癌组织和癌旁组织的表达量分别为 1.03 ± 0.09、2.10 ± 0.20，miR－664a－3p 在乳腺癌组织中表达量显著低于癌旁组织（$t=4.83$，$P<0.01$）。

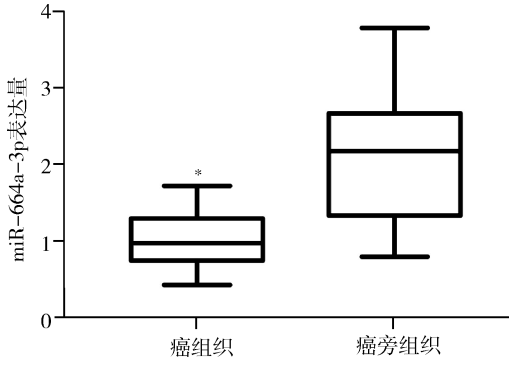

图 2　qPCR 检测 miR－664a－3p 在乳腺癌及癌旁组织的表达量

与癌旁组织比较，* $P<0.01$

2. miR－664a－3p 在乳腺癌细胞株的表达：qPCR 结果显示，miR－664a－3p 在乳腺癌细胞 T47D、MDA－MB－231、BT－549、MCF－7 的表达量明显下调，其中在 T47D 细胞中的表达量最低，与正常乳腺上皮细胞 MCF－10A 及其他乳腺癌细胞株比较，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 3）。以 T47D 细胞为对象进行后续实验。

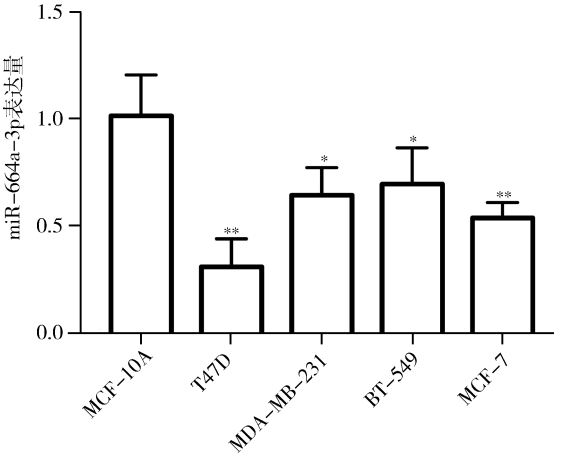

图 3　qPCR 检测 miR－664a－3p 在乳腺癌细胞株及正常乳腺上皮细胞的表达量

与正常乳腺上皮细胞，* $P<0.05$，** $P<0.01$

3. 转染 miR－664a－3p 对 T47D 细胞 miR－664a－

3p 表达的影响：qPCR 结果显示，T47D 细胞转染miR－664a－3p 后 miR－664a－3p 表达较对照组明显增加（24.87 ±2.17 vs 1.02 ±0.10，t =10.96，P <0.01）。

4. 荧光素酶报告基因实验：荧光素酶活性检测结果显示，miR－664a－3p 可明显抑制野生型 TEM8－3′ UTR 质粒转染细胞的荧光素酶活性（P <0.01），而对突变型 TEM8－3′ UTR 质粒转染细胞的荧光素酶活性并无影响（图 4）。

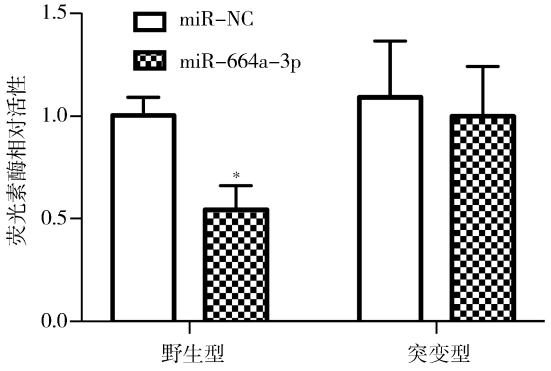

图 4　荧光素酶报告基因验证 miR－664a－3p 与 TEM8－3′ UTR 的靶向结合

与“miR－NC＋野生型质粒”共转染比较，* P <0.01

5. 转染 miR－664a－3p 对 T47D 细胞 TEM8 mRNA 表达的影响：qPCR 结果显示，T47D 细胞转染 miR－664a－3p 后 TEM8 mRNA 表达较对照组明显下调（0.27 ±0.07 vs 1.00 ±0.01，t =9.97，P <0.01）。

6. 转染 miR－664a－3p 对 T47D 细胞 TEM8 相关蛋白表达的影响：Western blot 法检测结果显示，T47D 细胞转染 miR－664a－3p 后 TEM8、CDK4、Cyclin D1、Vimentin 蛋白表达较对照组显著下调，β－catenin 蛋白表达较对照组显著上调（图 5）。

7. 转染 miR－664a－3p 对 T47D 细胞周期的影响：流式细胞术结果显示，T47D 细胞转染 miR－664a－3p 后在 G_0/G_1 期的细胞比例较对照组明显上升，高表达 miR－664a－3p 可抑制 T47D 细胞周期的进展（P <0.01，表 2）。

8. 转染 miR－664a－3p 对 T47D 细胞增殖能力的影响：使用 CCK－8 连续 5 天检测 T47D 细胞的生长，当细胞生长至第 4 天和第 5 天，对照组细胞 A 值显著高于实验组，差异有统计学意义（P <0.01，图 6）。

9. 转染 miR－664a－3p 对 T47D 细胞侵袭能力影响：Transwell 实验结果显示，在乳腺癌 T47D 细胞中高表达miR－664a－3p的细胞穿过小室底膜的细胞数明显低于对照组（96.76 ±14.54 vs 217.50 ±17.96，t =5.22，P <0.01）。

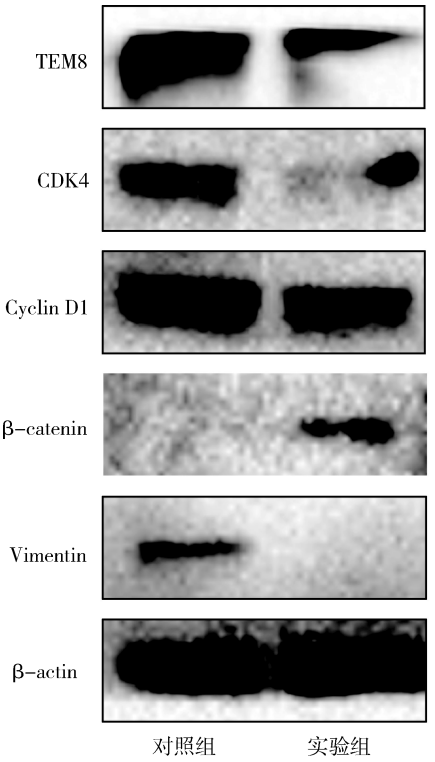

图 5　Western blot 法检测 miR－664a－3p 转染 T47D 细胞后目的蛋白的表达水平

表 2　miR－664a－3p 对乳腺癌细胞周期的影响（$\bar{x} \pm s$，n =4）

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	38.48 ±1.55	33.22 ±1.17	28.30 ±1.95
实验组	53.56 ±2.82	24.27 ±1.98	22.17 ±1.04
t	4.70	3.89	2.78
P	<0.01	0.01	0.03

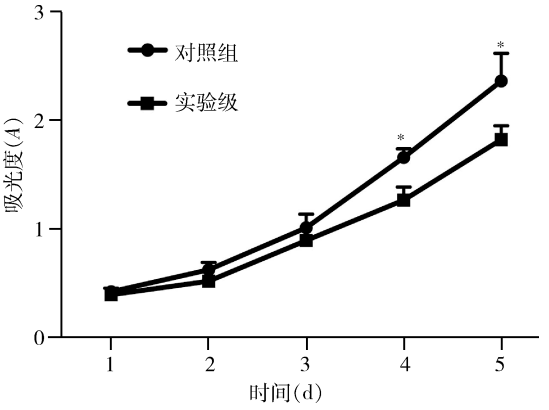

图 6　CCK－8 法检测转染 miR－664a－3p 后不同时点 T47D 细胞增殖能力的变化

与对照组比较，* P <0.01

讨 论

miRNA 在转录水平对肿瘤细胞中的抑癌基因或癌基因的表达发挥重要的调节作用[6]。几乎所有的肿瘤中均出现 miRNA 的异常表达,与肿瘤细胞的恶性生物学行为如增殖、侵袭转移等密切相关[7]。miRNA 的异常表达参与乳腺癌的发生和发展。miR－320、miR－770、miR－361－5p 等 miRNA 通过抑制癌基因的表达负向调控乳腺癌细胞的增殖或迁移、侵袭[8~10]。miR－421、miR－1246、miR－27a 等 miRNA 可抑制抑癌基因的表达,促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[11~13]。miR－664a－3p 是 miRNA 家族的重要一员,可抑制骨肉瘤细胞的迁移和侵袭,然而其在乳腺癌中的作用目前尚不清楚[5]。

本研究结果显示,miR－664a－3p 在乳腺癌组织及乳腺癌细胞中低表达,提示 miR－664a－3p 可能与乳腺癌的发生、进展有一定的关系。生物信息学软件分析显示肿瘤内皮标志物 8(TEM8)可能是 miR－664a－3p 的靶基因。以往的研究表明 TEM8 在肿瘤血管内皮细胞中高表达,通过促进内皮细胞的迁移进而利于肿瘤血管的生成,在肿瘤血管生成中发挥关键性作用[14]。近年来研究显示,TEM8 可促进肿瘤细胞的增殖和侵袭,在越来越多的肿瘤发生、发展中发挥重要作用[15]。有研究表明,TEM8 在乳腺癌组织中高表达,其表达水平与患者的预后呈负相关[16]。本研究通过双荧光素酶检测实验进一步验证 TEM8 是 miR－664a－3p 的靶基因。本研究结果通过 qPCR 和 Western blot 法检测结果发现,过表达 miR－664a－3p 后 TEM8 mRNA 和蛋白的表达均明显降低。细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)和细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)是正向调控细胞周期的重要蛋白。本研究显示 TEM8 蛋白的下调引起 CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达降低。β－链蛋白(β－catenin)和波形蛋白(Vimentin)与肿瘤细胞迁移侵袭能力的变化密切相关,β－catenin 蛋白的减少和 Vimentin 蛋白的增加均是肿瘤细胞迁移侵袭能力增强的表现。本研究显示 TEM8 蛋白的下调引起 β－catenin 蛋白表达降低,Vimentin 蛋白表达升高。本研究通过转染miR－664a－3p 至乳腺癌细胞 T47D,发现 T47D 细胞周期进展明显被抑制,细胞增殖能力和侵袭能力显著降低,提示 miR－664a－3p 具有显著的抑癌作用。

综上所述,本研究表明 miR－664a－3p 在乳腺癌组织中处于高表达的状态,通过抑制 TEM8 基因的表达,抑制细胞增殖能力和侵袭能力,在未来可能具有较好的临床应用价值,并可能成为乳腺癌潜在的肿瘤标志物,用于乳腺癌的临床诊断。

参考文献

1 Qu S, Wang T, Huang J. Presence of the minor allele of microRNA205 rs3842530 polymorphism increases 18FDG uptake in patients with breast cancer via targeting VEGF[J]. Mol Med Rep,2018,17(1):636－642

2 Farina NH, Ramsey JE, Cuke ME, *et al*. Development of a predictive miRNA signature for breast cancer risk among high－risk women[J]. Oncotarget,2017,8(68):112170－112183

3 Tahiri A, Aure MR, Kristensen VN. MicroRNA networks in breast cancer cells[J]. Methods Mol Biol,2018,1711:55－81

4 Xiao M, Lou C, Xiao H, *et al*. MiR－128 regulation of glucose metabolism and cell proliferation in triple－negative breast cancer[J]. Br J Surg,2018,105(1):75－85

5 Sahin Y, Altan Z, Arman K, *et al*. Inhibition of miR－664a interferes with the migration of osteosarcoma cells via modulation of MEG3[J]. Biochem Biophys Res Commun,2017,490(3):1100－1105

6 Xu Y, Chao L, Wang J, *et al*. miRNA－148a regulates the expression of the estrogen receptor through DNMT1－mediated DNA methylation in breast cancer cells[J]. Oncol Lett,2017,14(4):4736－4740

7 Li J, Lai Y, Ma J, *et al*. MiR－17－5p suppresses cell proliferation and invasion by targeting ETV1 in triple－negative breast cancer[J]. BMC Cancer,2017,17(1):745

8 Li Y, Liang Y, Sang Y, *et al*. MiR－770 suppresses the chemo－resistance and metastasis of triple negative breast cancer via direct targeting of STMN1[J]. Cell Death Dis,2018,9(1):14

9 Bai JW, Wang X, Zhang YF, *et al*. MicroRNA－320 inhibits cell proliferation and invasion in breast cancer cells by targeting SOX4[J]. Oncol Lett,2017,14(6):7145－7152

10 Ma F, Zhang L, Ma L, *et al*. MiR－361－5p inhibits glycolytic metabolism, proliferation and invasion of breast cancer by targeting FGFR1 and MMP－1[J]. J Exp Clin Cancer Res,2017,36(1):158

11 Wu J, Sun Z, Sun H, *et al*. MicroRNA27a promotes tumorigenesis via targeting AKT in triple negative breast cancer[J]. Mol Med Rep,2018,17(1):562－570

12 Hu TB,Chen HS,Cao MQ,*et al*. MicroRNA－421 inhibits caspase－10 expression and promotes breast cancer progression[J]. Neoplasma,2018,65(1):49－54

13 Li XJ, Ren ZJ, Tang JH, *et al*. Exosomal microRNA miR－1246 promotes cell proliferation, invasion and drug resistance by targeting CCNG2 in breast cancer[J]. Cell Physiol Biochem,2017,44(5):1741－1748

14 Jia Z, Ackroyd C, Han T, *et al*. Effects from metal ion in tumor endothelial marker 8 and anthrax protective antigen: biolayer interferometry experiment and molecular dynamics simulation study[J]. J Comput Chem,2017,38(15):1183－1190

15 Gong Q, Liu C, Wang C, *et al*. Effect of silencing TEM8 gene on proliferation, apoptosis, migration and invasion of XWLC05 lung cancer cells[J]. Mol Med Rep,2018,17(1):911－917

16 Byrd TT, Fousek K, Pignata A, *et al*. TEM8/ANTXR1－specific car T cells as a targeted therapy for triple－negative breast cancer[J]. Cancer Res,2018,78(2):489－500

(收稿日期:2018－02－05)
(修回日期:2018－04－08)