

miR-34a 通过靶向调控 Notch1 表达影响 乳腺癌细胞的增殖

高砚春

(川北医学院附属医院甲状腺乳腺外科, 四川 南充 637000)

【摘要】 目的 探讨 miR-34a 通过靶向调控 Notch1 表达影响乳腺癌细胞的增殖。**方法** 乳腺癌细胞 MCF-7 转染 miR-34a mimics 及 miR-34a NC, RT-PCR 法检测细胞中 miR-34a 表达, MTT, 克隆形成实验, Hoechst 染色及流式细胞术分别检测 miR-34a mimics 对乳腺癌 MCF-7 细胞活力、克隆能力、凋亡情况及细胞周期的影响; 通过双荧光素酶报告基因实验, western blot 及 RT-PCR 检测 Notch1 是否是 miR-34a 的下游靶基因。**结果** 与 miR-34a NC 比较, miR-34a mimics 组中 miR-34a 表达量上调, 细胞活力降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率显著提高 ($P < 0.01$), 细胞克隆数目减少 ($P < 0.01$), 细胞周期阻滞在 G1 期 ($P < 0.01$), Notch1 蛋白及 mRNA 表达量都显著降低 ($P < 0.01$), 同时荧光素酶报告基因实验也证实 miR-34a mimics 能与报告基因结合。**结论** miR-34a mimics 能通过负性调控 Notch1 表达, 从而显著的抑制 MCF-7 乳腺癌细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。

【关键词】 miR-34a; Notch1; 乳腺癌细胞 MCF-7; 增殖

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0055-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.010

Inhibitory effect of miR-34a on the proliferation of breast cancer cell by targeting Notch1

GAO Yan-chun

(Department of thyroid and breast surgery of the Affiliated Hospital of Chuanbei Medical College,
Sichuan Nanchong, 637000, China)

【Abstract】 Objective To explore inhibitory effect of miR-34a on the proliferation of breast cancer cell MCF-7 by targeting Notch1. **Methods** MCF-7 cells were transferred with miR-34a mimics and miR-34a NC. 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. Cell cycle was detected by flow cytometry. Western blot, RT-PCR and dual luciferase reporter gene assay was to detect whether Notch1 was a downstream target gene of miR-34a. **Results** Compared with miR-34a NC group, the expression of miR-34a was up-regulated, the cell viability was decreased, cell apoptotic rate was increased, cell cycle was arrested in the G1 phase, the expression of Notch1 protein and mRNA was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-34a mimics inhibited MCF-7 cell proliferation and induced cell apoptosis via targeting regulation expression of Notch1.

【Key words】 miR-34a; Notch1; breast cancer cell MCF-7; proliferation

乳腺癌是女性较容易患的恶性肿瘤之一,是导致女性癌症死亡的第二大原因,在我国及全世界范围内发病率都呈上升趋势。尽管近年来放疗、化疗以及生物治疗技术的不断发展,使得乳腺癌患者的预后及生存期获得了很大改善,但是乳腺癌复发率及难治率仍居高不下^[1]。因此寻找有效的诊断及治疗方法是乳腺癌研究一直以来的关注点。Notch 是 1917 年美国著名遗传学家 Thomas 在果蝇缺口翅膀中发现并命名的,并于 1980 年克隆成功。Notch 包括配体,受体及下游效应分子。其中受体包括 4 种,分别为 Notch1, Notch2, Notch3, Notch4。研究显示 Notch 信号通路在包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤中高表达,特别是 Notch1^[2-3]。Notch1 在乳腺癌中高表达^[4],沉默 Notch1 表达能显著的抑制 MCF-7 细胞增殖,并诱导细胞凋亡^[5]。同时研究也表明 Notch1 的高表达与 miRNA 的异常表达密切相关^[6-8],从而提示 miRNA 可能通过调控 Notch1 表达从而影响肿瘤的增殖与凋亡等生物学行为。

miRNA 是一类高度保守的非编码内源性 RNA 分子,长度大约为 19-23 nt,能通过结合于其下游靶基因 3'端非编码区,从而调控靶基因的转录,进而影响细胞的生物学行为。研究表明 miR-34a 能与 Notch1 报告基因结合,从而影响结肠癌 SW480 细胞,膀胱癌细胞 T24 细胞的增殖作用^[7-8]。但对于在乳腺癌中 miR-34a 是否能够通过靶向 Notch1 表达从而影响 MCF-7 细胞的增殖还未见报道,所以本研究将对此展开研究。

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 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(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,细胞周期检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);LipofectamineTM 2000,trizol 试剂盒,一步法 RT-PCR 试剂盒(大连宝生生物有限公司);野生型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Wt,突变型载体 pmir-RB-ReportTM

3' UTR-Mut,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);ChemiDocTM XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);TS100 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 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 LipofectamineTM 2000 脂质体转染试剂盒分别转染 miR34a NC、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。

12.2 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。48 h 后,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。

1.2.3 集落形成实验

将 MCF-7 细胞接种于 96 孔板,按“1.2.1”进行转染,48 h 后,用含 10% 甲醛和 0.1% 结晶紫染液固定染色,室温中放置 30 min。轻轻甩去染色液,用蒸馏水洗涤各孔,将培养板倒置于吸水纸上吸干水分,然后拍照分析。

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 流式细胞术检测细胞周期

将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板,按“1.2.1”进行转染。48 h 后,按细胞周期检测试剂盒说明书进行检测:用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,离心,并重悬,接着加入 5 μL 终浓度为 10 mg/mL 的 Rnase,37℃孵育 1 h,再加入 碘化丙啶染液,室温下避光染色 30 min,用流式细胞仪进行细胞周期检测分析。

1.2.6 RT-PCR 检测细胞中 miR-34a 及 Notch1

mRNA 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。引物如下,Notch1 上游引物:5'-GTCAACGCCGTAGATGACCT-3',下游引物:5'-TCTCCTCCCTGTTGTTCTGC-3'; GAPDH 上游引物:5'-AGCCACATCGCTCAGACA-3',下游引物:5'-TGGACTCCACGACGTACT-3'。引物分别加入 25 μ L PCR 反应体系中,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,59 $^{\circ}$ C 复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 35 个循环。

1.2.7 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,4 $^{\circ}$ C,10000 r/min 离心 10 min,吸取上清,即可获得总蛋白。采用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳,后湿法转膜 30 min。将膜浸入一抗溶液(兔抗 Notch1 多克隆抗体,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体,稀释比例:1:100)孵育,4 $^{\circ}$ C 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 ECL 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。

1.2.8 荧光素酶报告基因表达分析

miR-34a 及 Notch1 重组载体共转染到 MCF-7 细胞中。分组如下:miR-34a mimics + Wt Notch1, miR-34a NC + Wt Notch1, miR-34a mimics + Mut Notch1, miR-34a NC + Mut Notch1。应用双荧光素酶检测系统检测转染好的荧光素酶活性,计算公式:相对荧光值 = 萤火虫荧光素酶荧光值/海肾荧光素酶荧光值。

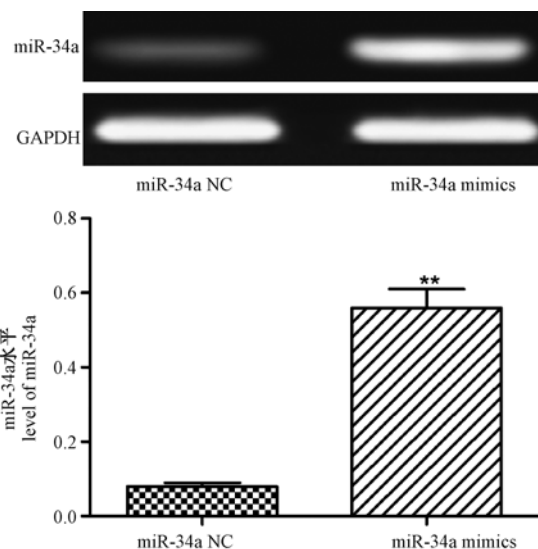
1.2.9 统计学分析

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 miR-34a 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($P < 0.01$)。



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

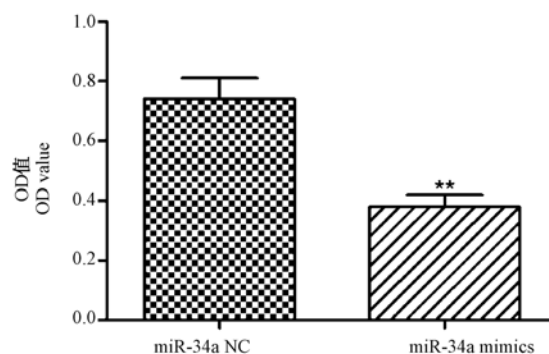
图 1 miR-34a 转染效果的检测

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 Detection of transfection efficiency of miR-34a

2.2 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞活力及克隆数目的影响

如图 2 MTT 结果所示,与 miR-34a NC 组比较,miR-34a mimics 组中细胞活力显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。如图 3 细胞克隆实验结果所示,与 miR-34a NC 组 (128.57 ± 10.69) 比较,miR-34a mimics 组 (34.59 ± 3.46) 中细胞克隆数目显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

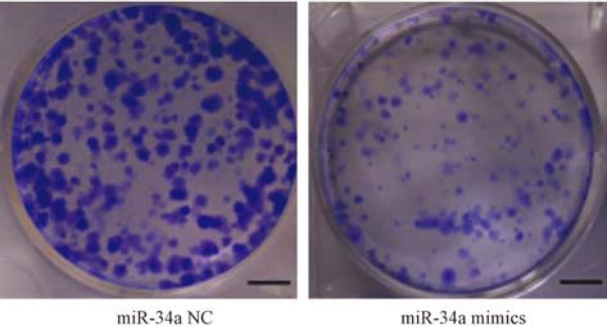
图 2 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞活力的影响

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig. 2 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell viability

2.3 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞周期的影响

如图 4 流式细胞术结果所示,与 miR-34a NC 组比较,miR-34a mimics 组中细胞周期 G1 期显著延



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞克隆能力的影响

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig.3 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell clone viability

表 1 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell viability

组别 Group	G1 期 G1 phase	S 期 S phase	G2 期 G2 phase
miR-34a NC	68.58 $\pm$ 2.59	21.73 $\pm$ 2.04	9.69 $\pm$ 0.45
miR-34a mimics	81.47 $\pm$ 2.45 **	13.53 $\pm$ 1.46 **	5.00 $\pm$ 0.44 **

注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

2.4 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞凋亡情况的影响

如图 5 Hoechst 染色结果所示,与 miR-34a NC 组(3.56 ± 0.36)比较,miR-34a mimics 组(36.48 ± 3.65)细胞凋亡率显著提高,差异具统计学意义($P < 0.01$)。

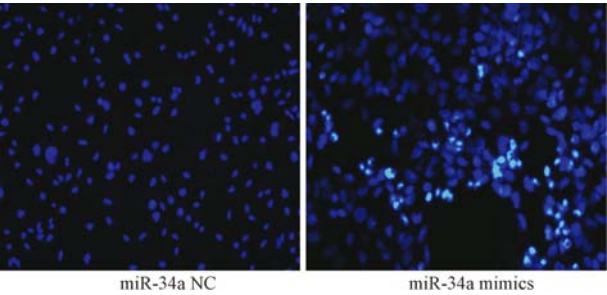


图 5 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞凋亡情况的影响 ($\times 20$)

Fig.5 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell apoptosis ($\times 20$)

2.4 荧光素酶报告基因表达分析

将 miR-34a mimics、miR-34a NC 及野生型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Wt、及突变型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Mut 转入 MCF-7 细胞中,结果发现,miR-34a mimics 与野生型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Wt 共转染组的荧

光信号强度明显弱于其它转染组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),说明 miR-34a mimics 能使细胞周期显著阻滞在 G1 期。

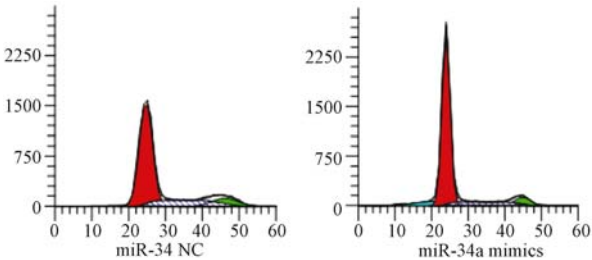
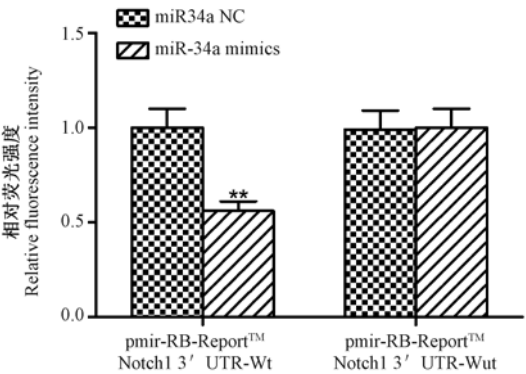


图 4 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞周期的影响

Fig.4 Effect of miR-34a mimics on MCF-7 cell viability

光信号强度明显弱于其它转染组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。而对于突变型载体 pmir-RB-ReportTM Notch1 3' UTR-Mut 来说,各组间荧光强度无任何差别($P > 0.05$),说明 Notch1 是 miR-34a 下游靶基因(图 6)。



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

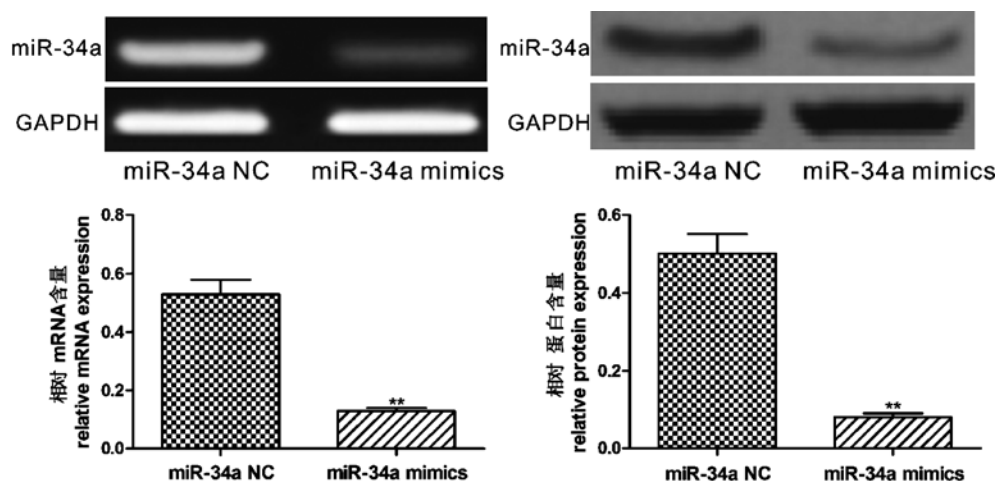
图 6 荧光素酶报告基因表达分析

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig.6 Luciferase reporter gene expression analysis

2.5 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量的影响

如图 7 所示,与 miR-34a NC 组比较,miR-34a mimics 组中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量显著降低($P < 0.05$)。



注:与 miR-34a NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 7 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量的影响

Note: Compared with miR-34a NC group, ** $P < 0.01$.

Fig. 7 Effect of miR-34a mimics on the expression of Notch1 protein and mRNA MCF-7 cell

3 讨论

miRNA 具有癌基因或抑癌基因的作用,能够结合于靶基因 mRNA 的 3'-UTR 区域,阻遏靶基因的翻译,从而抑制靶基因表达,并与肿瘤的发生发展密切相关,在肿瘤的增殖,凋亡,侵袭转移中起重要作用^[9-10]。miR-34 家族是一类高度保守的 miRNA,广泛存在于节肢动物及哺乳动物中,包括三个同源基因,即 miR-34a, miR-34b, miR-34c。其中 miR-34a 是 miR-34 基因突变的结果,染色体定位于 1p36.23,且能够广泛存在肺以外的所有正常组织中,而 miR-34b 及 miR-34c 是 miR-34 串联形成的,在肺以外的正常组织中表达量有限^[11]。研究认为 miR-34 家族是具有抑癌作用的 miRNA,miR-34 家族在包括乳腺癌在内的大多数肿瘤组织中低表达,特别是 miR-34a,miR-34a 的异常表达可作为乳腺癌患者患瘤风险,诊断,预后的标志^[11]。而且 miR-34a 表达量上调后对膀胱癌细胞,结肠癌细胞的增殖具有显著的影响^[7-8]。因此我们推测 miR-34a 对乳腺癌细胞的增殖凋亡等生物学行为也具有显著的影响作用,所以本研究在此推论上,首先通过脂质体转染 miR-34a mimics 及 miR-34a NC,RT-PCR 检测转染后 MCF-7 细胞中 miR-34a 的表达,结果表明 miR-34 mimics 转染成功,接着通过 MTT 法及克隆实验证实了 miR-34a mimics 能显著的降低 MCF-7 细胞活力及细胞克隆数目,说明 miR-34a mimics 对 MCF 细胞增殖具有显著的抑制作用。Hoechst 染色

结果也证实了结论,也与 Nie 等^[12],Zhao 等^[13]研究 miR-34a mimics 在食管鳞状细胞癌细胞,骨肉瘤细胞中的作用一致。另外肿瘤细胞的恶性增殖,说明了肿瘤细胞周期的紊乱及不可控,且大多数抗癌药物也通过调控细胞周期的变化来发挥其疗效的,所以本研究接着采用流式细胞术检测 miR-34a mimics 对 MCF-7 细胞周期的影响,结果表明 miR-34a mimics 能延长 MCF-7 细胞周期,使细胞周期阻滞在 G1 期,并缩短 G2 和 M 期,从而阻断了细胞的有丝分裂及 DNA 复制,进一步的说明了 miR-34a mimics 对 MCF 细胞增殖的抑制作用,与 Ghawanmeh 等^[14]研究观点一致。

miRNA 对细胞生物学行为的调控作用基本都是基于其对下游靶基因的调控作用,miR-34a 也不例外。有学者通过生物软件预测发现 Notch1 可能是 miR-34a 的下游靶基因之一,且此基因与细胞增殖密切相关^[7,8]。Notch1 是 1991 年在人类 T 淋巴细胞白血病中被鉴定出来,并被证实与肿瘤的发生发展密切相关。Notch1 是由 RAM 结构区,6 个与细胞周期相关的重复区,2 个细胞核定位信号,富含谷氨酸区及 PEST 序列构成的。研究显示 Notch1 与肿瘤的生长,分化,凋亡密切相关^[15]。而且本研究的双荧光素酶报告基因实验证实了 miR-34a mimics 能显著的与 Notch1 的 3' 端结合,接着 western blot 及 RT-PCR 也证实了较 miR-34a NC 比较,miR-34a mimics 组中 Notch1 蛋白及 mRNA 表达量均显著下调,从而说明了 Notch1 是 miR-34a 的下游靶基因,

而且干扰 Notch1 表达能显著的抑制 MCF-7 增殖^[5],进而得出 miR-34a mimics 通过靶向下调 Notch1 表达,从而抑制 MCF 细胞的增殖。

综上所述,miR-34a mimics 能通过靶向负调控 Notch1 表达,诱导乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡,并抑制细胞增殖,使细胞周期阻滞在 G1 期。此外研究还证实 p53 基因能与 miR-34a 启动子结合,从而激活 miR-34a 的转录,而在肿瘤组织中 p53 发生突变,导致 miR-34a 的转录受到抑制,呈低表达状态^[16]。而且另有大量研究表明 p53 与 Notch1 之间也存在着直接的联系^[17]。从而提示了 MCF-7 细胞中 miR-34a 对于 Notch1 的调控作用可能与 p53 信号通路有关,将是本课题组将来的研究方向。

参考文献:

- [1] Dubey A K, Gupta U, Jain S. Breast cancer statistics and prediction methodology: a systematic review and analysis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015,16(10):4237-4245.
- [2] Yun J, Espinoza I, Pannuti A, *et al.* p53 Modulates Notch Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells by Associating With the Notch Transcriptional Complex Via MAML1 [J]. J Cell Physiol, 2015,230(12):3115-3127.
- [3] D'Angelo R C, Ouzounova M, Davis A, *et al.* Notch reporter activity in breast cancer cell lines identifies a subset of cells with stem cell activity [J]. Mol Cancer Ther, 2015,14(3):779-787.
- [4] Yuan X, Zhang M, Wu H, *et al.* Expression of Notch1 Correlates with Breast Cancer Progression and Prognosis [J]. PLoS One, 2015,10(6):e131689.
- [5] 毛俊,牟秋菊,李连宏,等. RNA 干扰 Notch1 基因对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2012,28(1):11-14.
- [6] Zhang H D, Sun D W, Mao L, *et al.* MiR-139-5p inhibits the biological function of breast cancer cells by targeting Notch1 and mediates chemosensitivity to docetaxel [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015,465(4):702-713.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Rothschild S I. microRNA therapies in cancer [J]. Mol Cell Ther, 2014,2(1):1-8.
- [11] 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.
- [12] Nie J, Ge X, Geng Y, *et al.* miR-34a inhibits the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma by targeting Yin Yang-1 [J]. Oncol Rep, 2015,34(1):311-317.
- [13] Zhao H, Ma B, Wang Y, *et al.* miR-34a inhibits the metastasis of osteosarcoma cells by repressing the expression of CD44 [J]. Oncol Rep, 2013,29(3):1027-1036.
- [14] Ghawanmeh T, Thunberg U, Castro J, *et al.* miR-34a expression, cell cycle arrest and cell death of malignant mesothelioma cells upon treatment with radiation, docetaxel or combination treatment [J]. Oncology, 2011,81(5-6):330-335.
- [15] Mansoori B, Mohammadi A, Shirjang S, *et al.* Micro RNA 34a and Let-7a Expression in Human Breast Cancers is Associated with Apoptotic Expression Genes [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016,17(4):1887-1890.
- [16] Javeri A, Ghaffarpour M, Taha M F, *et al.* Downregulation of miR-34a in breast tumors is not associated with either p53 mutations or promoter hypermethylation while it correlates with metastasis [J]. Med Oncol, 2013,30(1):413.
- [17] Yun J, Espinoza I, Pannuti A, *et al.* p53 Modulates Notch Signaling in MCF-7 Breast Cancer Cells by Associating With the Notch Transcriptional Complex Via MAML1 [J]. J Cell Physiol, 2015,230(12):3115-3127.

[修回日期]2016-07-28