

• 基础研究 •

miRNA-34b/c-5p对乳腺癌中神经激肽1受体-截短型表达的影响*

张露方 王璐珊 董冬 周云丽

摘要 目的:探究乳腺癌中miRNA-34b/c-5p对神经激肽1受体-截短型(neurokinin1 receptor-truncated, NK1R-Tr)表达的影响及miRNA-34b/c-5p和NK1R-Tr对乳腺癌细胞迁移侵袭能力的影响。方法:收集2013年2月至5月天津医科大学肿瘤医院50例乳腺癌患者组织标本,采用实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测miRNA-34b/c-5p及NK1R-Tr的表达,采用蛋白免疫印迹实验检测乳腺癌MDA-MB-231和MCF-7细胞中miRNA-34b/c-5p对NK1R-Tr表达的影响,采用划痕及Transwell实验检测miRNA-34b/c-5p及NK1R-Tr对MDA-MB-231细胞迁移及侵袭能力的影响。结果:在乳腺癌组织及MDA-MB-231和MCF-7细胞中,miRNA-34b-5p和miRNA-34c-5p与NK1R-Tr表达呈负相关。发生淋巴结转移的乳腺癌患者组织中NK1R-Tr的相对表达量为5.75,未发生淋巴结转移者相对表达量为4.29,两者比较差异具有统计学意义($P=0.026$)。过表达miRNA-34b/c-5p及敲低NK1R-Tr可以显著抑制MDA-MB-231细胞的迁移侵袭能力(均 $P<0.001$)。结论:乳腺癌中miRNA-34b/c-5p与NK1R-Tr表达呈负相关,且miRNA-34b/c-5p和NK1R-Tr可能成为抑制乳腺癌转移的潜在治疗靶点。

关键词 神经激肽1受体 miRNA 乳腺癌 迁移 侵袭

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2018.07.404

The effect of miRNA-34b/c-5p on neurokinin-1 receptor-truncated expression in breast cancer

Lufang Zhang, Lushan Wang, Dong Dong, Yunli Zhou

Correspondence to: Yunli Zhou; E-mail: zhouyunli@tjmuch.com

Department of Clinical Laboratory, Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China

This work was supported by Natural Science Foundation of Tianjin (No. 16JCYBJC26000)

Abstract Objective: To investigate the effect of miRNA-34b/c-5p on the expression of neurokinin 1 receptor-truncated (NK1R-Tr) in breast cancer and the effect of miRNA-34b/c-5p and NK1R-Tr on the migration and invasion abilities of breast cancer cells. **Methods:** Real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) was used to detect the expression of miRNA-34b/c-5p and NK1R-Tr in 50 breast cancer specimens that were collected at Tianjin Medical University Cancer Institute & Hospital from February to May 2013. Western blot analysis was performed to detect the expression of miRNA-34b/c-5p and NK1R-Tr in breast cancer cell lines MDA-MB-231 and MCF-7. Scratch and Transwell assays were carried out to explore the effects of miRNA-34b/c-5p and NK1R-Tr on the migration and invasion abilities of MDA-MB-231 cells. **Results:** The expression of miRNA-34b/c-5p and NK1R-Tr in breast cancer tissues and cells were significantly negatively correlated. The relative expression of NK1R-Tr in breast cancer patients with lymph node metastasis was 5.75, and the relative expression of NK1R-Tr in patients with non-lymph node metastasis was 4.29. The relative expression was significantly different between the two groups ($P=0.026$). Overexpression of miRNA-34b/c-5p and knockdown of NK1R-Tr could significantly inhibit the migration and invasion abilities of MDA-MB-231 cells (all $P<0.001$). **Conclusions:** The expression of miRNA-34b/c-5p and NK1R-Tr was significantly negatively correlated. MiRNA-34b/c-5p and NK1R-Tr might be potential therapeutic targets for inhibiting the invasion of breast cancer cells.

Keywords: neurokinin1 receptor, miRNA, breast cancer, migration, invasion

乳腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,其中远处转移是最主要的致死原因^[1]。研究发现乳腺癌中miRNA-34b/c-5p低表达^[2],这使研究者开始关注其下游的致癌基因。神经激肽1受体(neurokinin 1 receptor, NK1R)的表达与肿瘤转移密切相关^[3],且通过生物信息学预测到其3'UTR

区存在miRNA-34b/c-5p的结合位点。在结构上NK1R分为全长型(NK1R-full length, NK1R-FL)及截短型(NK1R-truncated, NK1R-Tr)。本课题组^[4]前期发现NK1R-Tr在迁移侵袭能力较强的乳腺癌细胞中高表达,因此本研究旨在分析miRNA-34b/c-5p对NK1R-Tr的

作者单位:天津医科大学肿瘤医院检验科,国家肿瘤临床医学研究中心,天津市肿瘤防治重点实验室,天津市恶性肿瘤临床医学研究中心(天津市300060)

*本文课题受天津市自然科学基金项目(编号:16JCYBJC26000)资助

通信作者:周云丽 zhouyunli@tjmuch.com

调控作用,及 miRNA-34b/c-5p 和 NK1R-Tr 对乳腺癌细胞迁移侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本 收集 2013 年 2 月至 5 月 50 例天津医科大学肿瘤医院手术切除乳腺癌组织标本,均经病理学证实,其中乳腺浸润性导管癌 46 例、浸润性乳头状癌 2 例、髓样癌 2 例。采用美国癌症联合会(AJCC)乳腺癌指南(第七版)进行 TNM 分期,其中 I 期 14 例、II 期 21 例、III 期 15 例。本研究获得本院伦理委员会批准,且得到受试者知情同意。

1.1.2 细胞与主要试剂 乳腺癌 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞系来源于天津医科大学肿瘤医院公共实验室。miRNA-34b/c-5p、U6、NK1R-Tr、 β -actin 的 PCR 引物,miRNA-34b/c-5p 模拟物、模拟物对照、miRNA-34b/c-5p 抑制剂、抑制剂对照和 NK1R-Tr 的干扰试剂(siNK1R-Tr)均购自广州锐博生物科技有限公司;转染试剂 Lip-2000 购自美国 Invitrogen 公司; β -actin 单克隆抗体购自美国 Sigma-Aldrich 公司;NK1R-Tr 单克隆抗体购自美国 Romantique & Distingue 公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自英国 Upstate 公司;RT-PCR 试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)扩增条件为 95℃ 15 s、51~58℃(根据各基因不同)15 s、72℃ 45 s,共 40 个循环。目的基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,其中 $-\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (标准基因) - ΔCt (目的基因)。NK1R-Tr 和 β -actin 引物序列见表 1。

表 1 NK1R-Tr 和 β -actin 引物序列

基因	序列
NK1R-Tr	上游 5'-GACCATCTACATACACAGTGGC-3'
	下游 5'-GGCTGAGTTGTGTGATGATAAG-3'
β -actin	上游 5'-TTGCCGACAGGATGCAGAAGGA-3'
	下游 5'-AGGTGGACAGCGAGGCCAGGAT-3'

1.2.2 蛋白免疫印迹实验 NK1R-Tr 蛋白表达的方法参见本课题组前期研究^[4]。

1.2.3 细胞转染 转染稀释液和 Lipo2000 稀释液分别室温孵育 5 min,之后混合孵育 20 min,缓慢加入细胞培养液中,继续培养 6 h 后换液。miRNA-34b/c-5p 模拟物和抑制剂序列见表 2。

1.2.4 划痕实验 细胞转染 48 h 后使用 10 μ L 枪头在细胞表面进行划痕,更换无血清培养液,记录此刻为 0 h。随机选取 5 个视野,使用倒置显微镜观察细胞从划痕处向中央迁移的情况,并分别于 0、6、12、24 h 拍照并记录两条划痕线间的距离。实验重复 3 次。

1.2.5 Transwell 小室侵袭实验 细胞转染 48 h 后将细胞重悬,调整细胞密度为 2.5×10^5 /mL,取 0.2 mL 细胞悬液接种于含有基质胶的 Transwell 上室中,下室加入含 10% 胎牛血清的培养液,并放于细胞培养箱中培养,24 h 后对穿膜的细胞进行染色。实验重复 3 次。

表 2 miRNA-34b/c-5p 模拟物和抑制剂序列

基因	序列
miRNA-34b-5p 模拟物	5'-UAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG-3'
	5'-CAAUCAGCUAAUGACACUGCCUA-3'
miRNA-34b-5p 抑制剂	5'-CAAUCAGCUAAUGACACUGCCUA-3'
miRNA-34c-5p 模拟物	5'-AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC-3'
	5'-GCAAUCAGCUAACUACACUGCCU-3'
miRNA-34c-5p 抑制剂	5'-GCAAUCAGCUAACUACACUGCCU-3'

1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。多组数据采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两比较采用 Student-Newman-Keuls 法, Pearson 相关系数分析乳腺癌组织中 miRNA-34b-5p、miRNA-34c-5p 和 NK1R-Tr 间的表达相关性。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-34b/c-5p 和 NK1R-Tr 的表达量与乳腺癌进展的关系

在 50 例患者乳腺癌标本中,检测 miRNA-34b/c-5p 及 NK1R-Tr 的相对表达量发现,III 期乳腺癌患者组织中 miRNA-34b-5p 表达量明显低于 II 期患者($P = 0.043$),但 I 期与 II 期和 III 期相比,miRNA-34b-5p 的表达量均无显著性差异(均 $P > 0.05$)。III 期乳腺癌患者组织中 miRNA-34c-5p 的表达量明显低于 I 期患者($P = 0.041$),但 I 期与 II 期、II 期与 III 期相比,miRNA-34c-5p 表达量均无显著性差异(均 $P > 0.05$)。III 期乳腺癌患者组织中 NK1R-Tr 表达量明显高于 I 期患者($P = 0.038$),但 I 期与 II 期、II 期与 III 期相比,NK1R-Tr 表达量均无显著性差异(均 $P > 0.05$,图 1)。发生淋巴结转移的乳腺癌患者组织中 NK1R-Tr 的相对表达量为 5.75,而未发生淋巴结转移者相对表达量为 4.29,两者比较差异具有统计学意义($P = 0.026$),但 miRNA-34b/c-5p 表达量均无显著性差异(均 $P > 0.05$)。分析 miRNA-34b/c-5p 和 NK1R-Tr 表达相关性时发现,miRNA-34b-5p 与 miRNA-34c-5p 的相对表达量呈正相关($r = 0.762, P < 0.001$),而 miRNA-34b-5p 与 NK1R-Tr 的相对表达量呈负相关($r = -0.672, P < 0.001$),miRNA-34c-5p 与 NK1R-Tr 的相对表达量亦呈负相关($r = -0.628, P < 0.001$)。

2.2 乳腺癌细胞中 miRNA-34b/c-5p 和 NK1R-Tr 表达与乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 miRNA-34b/c-5p

的相对表达量低于MCF-7细胞,但NK1R-Tr表达高于MCF-7细胞(图2)。

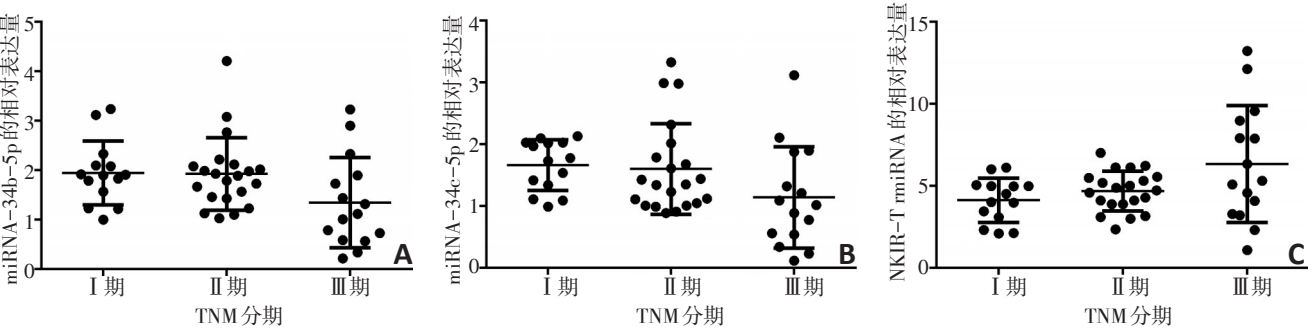
2.3 miRNA-34b/c-5p对乳腺癌细胞中NK1R-Tr表达的调控

在乳腺癌MDA-MB-231和MCF-7细胞中,进行转染miRNA-34b/c-5p模拟物与转染模拟物对照比较,NK1R-Tr表达量降低,而进行转染miRNA-34b/

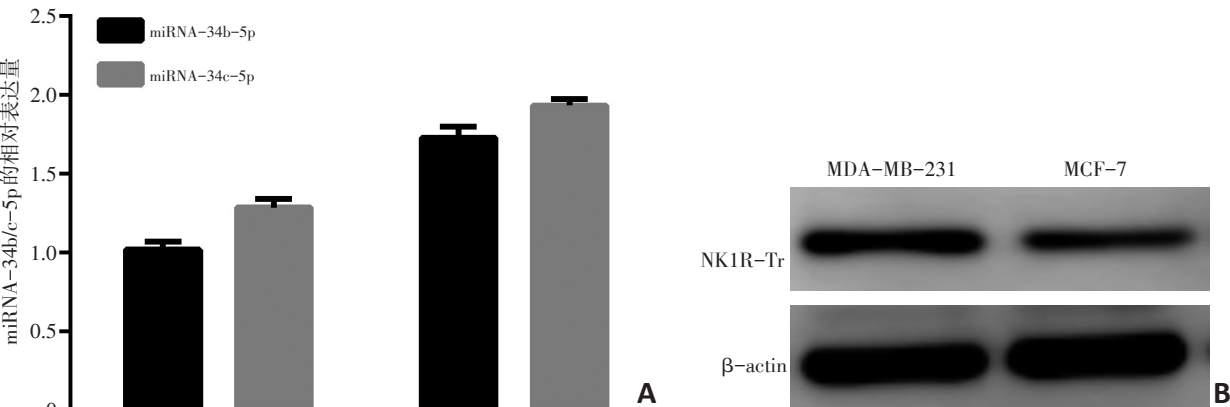
c-5p抑制剂与转染抑制剂对照比较,NK1R-Tr表达量升高(图3)。

2.4 miRNA-34b/c-5p及NK1R-Tr对MDA-MB-231细胞迁移及侵袭能力的影响

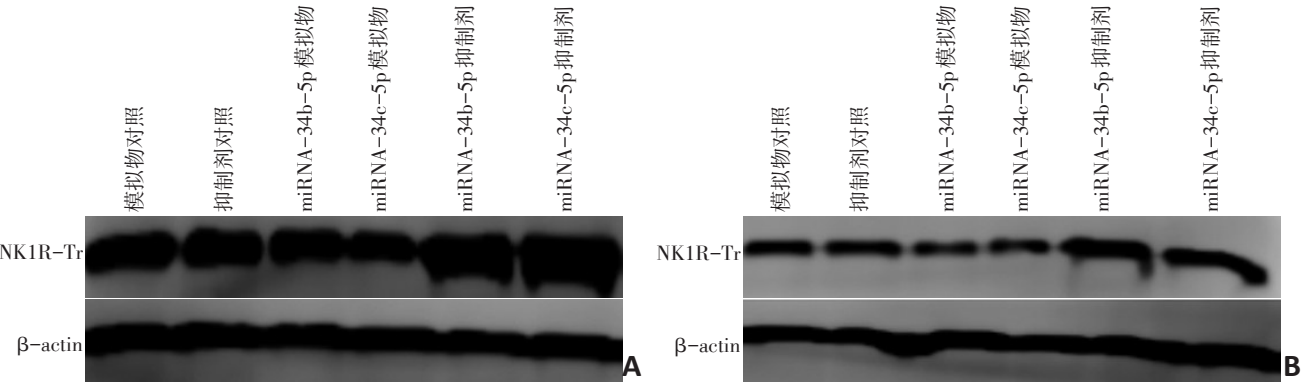
过表达miRNA-34b/c-5p及敲低NK1R-Tr可以显著抑制MDA-MB-231细胞的迁移及侵袭能力(均 $P<0.001$,图4)。



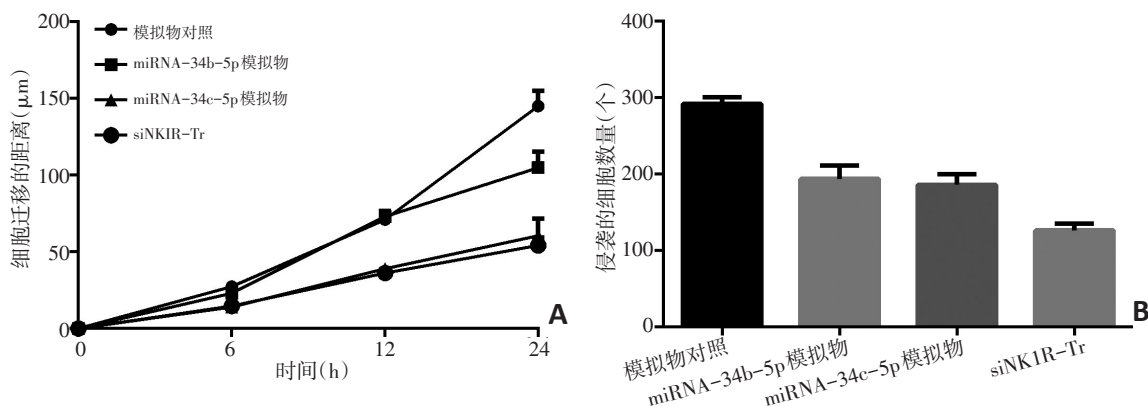
A:miRNA-34b-5p;B:miRNA-34c-5p;C:NK1R-Tr
图1 miRNA-34b/c-5p及NK1R-Tr的表达与乳腺癌临床分期的关系



A:miRNA-34b/c-5p;B:NK1R-Tr
图2 乳腺癌细胞中miRNA-34b/c-5p和NK1R-Tr的表达



A:MDA-MB-231;B:MCF-7
图3 乳腺癌细胞中miRNA-34b/c-5p对NK1R-Tr表达影响



A: 迁移; B: 侵袭

图4 miRNA-34b/c-5p及NK1R-Tr对MDA-MB-231细胞迁移及侵袭能力的影响

3 讨论

全球女性癌症患者中乳腺癌的发生率及死亡率最高,其特点是局部浸润和远处转移的频率较高,很多患者被确诊时已为癌症进展期^[5]。miRNA-34家族由位于染色体1p36的miRNA-34a,和共同位于11q23染色体的miRNA-34b和miRNA-34c组成,miRNA-34b/c-5p在miRNA-34b/c中占大多数^[6]。研究认为位于同一条染色体的miRNA在癌症中也起着相似的生物学作用^[2]。在乳腺癌相关研究中有关miRNA-34a的功能已相对明确^[7-9],但miRNA-34b/c的功能有待进一步探索。

本研究发现,乳腺癌组织中NK1R-Tr的相对表达量与乳腺癌TNM分期密切相关,其中Ⅲ期患者组织中NK1R-Tr的相对表达量明显高于Ⅰ期患者。另外在发生淋巴结转移的患者组织中,NK1R-Tr的相对表达量明显升高,这与本课题组的前期研究结果^[4]一致。乳腺癌组织中miRNA-34b/c-5p的相对表达量与乳腺癌TNM分期及淋巴结是否转移无显著性差异,但Ⅲ期乳腺癌患者组织中miRNA-34b-5p的相对表达量明显低于Ⅱ期患者,miRNA-34c-5p的相对表达量明显低于Ⅰ期患者,考虑可能因Ⅱ期乳腺癌患者已出现淋巴结转移,但发生转移的淋巴结数量尚较少。因此miRNA-34b/c-5p有可能成为晚期乳腺癌的预测指标,提示NK1R-Tr可能也同时受到其他基因的调控,另外乳腺癌标本收集数量较少也可能是其中一个原因。此外,本研究进行miRNA-34b/c-5p和NK1R-Tr相关性分析时发现,miRNA-34b-5p与miRNA-34c-5p的相对表达量呈正相关,更加印证了位于同一染色体的miRNA有着相似的功能这一结论^[2]。乳腺癌组织中miRNA-34b/c-5p与NK1R-Tr表达相关性也更加提示,miRNA-34b/c-5p可能通过靶向作用于NK1R-Tr,从而实现对乳腺癌的抑制作用。本研究发现迁移侵袭能力较强的MDA-MB-231

细胞中miRNA-34b/c-5p表达量低于MCF-7细胞,这与多项研究结果^[10-12]一致。而且本研究还发现,过表达miRNA-34b/c-5p可以抑制MDA-MB-231细胞的迁移及侵袭能力。上述所有研究结果均提示miRNA-34b/c-5p可能抑制乳腺癌的进展,其抑制作用可能通过调控NK1R-Tr来实现。

NK1R为G蛋白偶联受体家族中的一员,在乳腺癌、胃癌及非小细胞肺癌中均显著表达^[13-15]。本研究发现在迁移侵袭能力较强的乳腺癌MDA-MB-231细胞中,NK1R-Tr表达量高于迁移侵袭能力较弱的MCF-7细胞,这与本课题组的前期研究结果一致^[4]。在MDA-MB-231细胞中敲低NK1R-Tr可抑制细胞的迁移及侵袭能力,说明NK1R-Tr与乳腺癌的转移密切相关。另外,研究发现miRNA-34b/c-5p可负向调控NK1R-Tr表达,提示miRNA-34b/c-5p可能通过调控NK1R-Tr从而实现对乳腺癌的抑制作用。

综上所述,本研究主要对乳腺癌组织和细胞中miRNA-34b/c-5p与NK1R-Tr表达的相关性,及miRNA-34b/c-5p、NK1R-Tr对乳腺癌细胞迁移侵袭的影响进行了分析,miRNA-34b/c-5p及NK1R-Tr可能成为抑制乳腺癌转移的潜在治疗靶点,但miRNA-34b/c-5p对NK1R-Tr的具体调控机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] DeSantis CE, Siegel RL, Sauer AG, et al. Cancer statistics for African Americans, 2016: Progress and opportunities in reducing racial disparities[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4):290-308.
- [2] Engkvist ME, Stratford EW, Lorenz S, et al. Analysis of the miRNA-34 family functions in breast cancer reveals annotation error of miRNA-34b[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):9655.
- [3] Dong J, Feng F, Xu G, et al. Elevated SP/NK-1R in esophageal carcinoma promotes esophageal carcinoma cell proliferation and migration[J]. Gene, 2015, 560(2):205-210.
- [4] Zhou Y, Zhao L, Xiong T, et al. Roles of full-length and truncated neurokinin-1 receptors on tumor progression and distant metastasis in human breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2013, 140

- (1):49-61.
- [5] Alwan NAS, Mualla FH, Al Naqash M, et al. Clinical and pathological characteristics of triple positive breast cancer among Iraqi patients[J]. Gulf J Oncolog, 2017, 1(25):51-60.
- [6] Rokavec M, Li H, Jiang L, et al. The p53/miRNA-34 axis in development and disease[J]. J Mol Cell Biol, 2014, 6(3):214-230.
- [7] Si W, Li Y, Shao H, et al. MiR-34a inhibits breast cancer proliferation and progression by targeting Wnt1 in Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Am J Med Sci, 2016, 352(2):191-199.
- [8] Wang Y, Zhang X, Chao Z, et al. MiR-34a modulates ErbB2 in breast cancer[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(1):93-101.
- [9] Lin X, Chen W, Wei F, et al. Nanoparticle delivery of miRNA-34a eradicates long-term-cultured breast cancer stem cells via targeting C22ORF28 directly[J]. Theranostics, 2017, 7(19):4805-4824.
- [10] Zeng Z, Chen X, Zhu D, et al. Low expression of circulating microRNA-34c is associated with poor prognosis in triple-negative breast cancer[J]. Yonsei Med J, 2017, 58(4):697-702.
- [11] Sanaei S, Hashemi M, Rezaei M, et al. Evaluation of the pri-miRNA-34b/c rs4938723 polymorphism and its association with breast cancer risk[J]. Biomed Rep, 2016, 5(1):125-129.
- [12] Hermeking H. The miRNA-34 family in cancer and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2):193-199.
- [13] Zhou Y, Zuo D, Wang M, et al. Effect of truncated neurokinin-1 receptor expression changes on the interaction between human breast cancer and bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Genes Cells, 2014, 19(9):676-691.
- [14] Kanduluru AK, Srinivasarao M, Low PS. Design, synthesis, and evaluation of a neurokinin-1 receptor-targeted near-ir dye for fluorescence-guided surgery of neuroendocrine cancers[J]. Bioconjug Chem, 2016, 27(9):2157-2165.
- [15] Kelsey CR, Higgins KA, Peterson BL, et al. Local recurrence after surgery for non-small cell lung cancer: a recursive partitioning analysis of multi-institutional data[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 146(4):768-773.
- (2017-12-19收稿)
(2018-03-08修回)
(编辑:张侃 校对:武斌)



作者简介

张露方 专业方向为乳腺癌分子机制研究。
E-mail:xiyuexiyue@163.com

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国肿瘤临床》文章荐读:核素标记小分子多肽靶向诊治肿瘤新生血管的应用研究进展

早期诊断、精准治疗可以明显改善恶性肿瘤患者的预后。有研究发现肿瘤新生血管不仅在肿瘤的发生发展中发挥极其关键的作用,也是肿瘤诊治的重要靶点。特定序列的多肽可以特异地靶向肿瘤新生血管内皮细胞上的特定分子。放射性核素标记这类小分子多肽所制备的分子探针在肿瘤诊治方面具有优势。《中国肿瘤临床》2017年第2期“专家论坛”栏目,特邀北京大学第一医院核医学科王荣福教授,结合其团队的研究成果,阐述放射性核素标记小分子多肽RGD及RRL在靶向肿瘤新生血管的显像与治疗方面的应用研究进展,以期优化治疗策略,实现肿瘤的精准医疗。

阅读本文请登录网站 www.cjco.cn 或关注本刊微信公告号(扫描文章下方二维码)查看。



——本刊编辑部