

乳腺癌组织 miR-20a 的表达及其对乳腺癌细胞自噬的影响

韩涛^a, 曹明^b

(芜湖市第一人民医院, a 乳腺外科, b 病理科, 安徽 芜湖 241000)

摘要: **目的** 探究乳腺癌患者肿瘤组织中 miR-20a 的表达情况及其对乳腺癌细胞自噬功能的作用。 **方法** 收集芜湖市第一人民医院 2016 年 1 月至 2017 年 12 月间收治的接受手术治疗的乳腺癌患者 56 例, 逆转录实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测肿瘤组织与癌旁组织 miR-20a 与自噬相关基因 Beclin1、LC3、ATG5 及 ATG7 mRNA 的表达水平。脂质体法转染 pcDNA3/pri-miR-20a 质粒至 MCF7 细胞, 免疫蛋白印记实验检测 Beclin 1 与饥饿条件下 LC3 II 表达水平, 免疫荧光实验检测自噬斑点。 **结果** 肿瘤组织 miR-20a 的平均表达水平为 211.35 ± 67.43 , 癌旁组织 miR-20a 的平均表达水平为 126.72 ± 24.37 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 肿瘤组织较癌旁组织 Beclin1 mRNA 表达量降低 ($P < 0.05$), ATG5、ATG7 与 ATG12 mRNA 的表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。过表达 miR-20a 后 MCF7 细胞 Beclin1 蛋白表达量降低, 饥饿刺激下 LC3 II 表达水平降低且自噬斑点减少。 **结论** 乳腺癌组织中 miR-20a 呈高表达, 并且降低自噬调节蛋白 Beclin1 的表达以抑制自噬活化。 **关键词:** 乳腺肿瘤; 自噬; 微 RNAs; 逆转录聚合酶链反应; 蛋白质印迹 **doi:** 10.3969/j.issn.1009-6469.2018.10.023

Expression of miR-20a in breast cancer tissues and its effect on breast cancer cell autophagy

HAN Tao^a, CAO Ming^b

(a. Department of Breast Surgery, b. Department of Pathology, Wuhu First People's Hospital, Wuhu, Anhui 241000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of miR-20b in breast cancer and its effect on autophagy in breast cancer cells in vitro. **Methods** Fifty and six cases of patients suffering from breast cancer who underwent surgical treatment in Wuhu First People's Hospital during January 2016 and December 2017 were enrolled. Reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-20a, and autophagy associated gene mRNA including Beclin1, LC3, ATG5 and ATG7 in breast cancer tissues and adjacent tissues. pcDNA3/pri-miR-20a plasmid was transfected into MCF7 cells by lipofectamine 2000 reagent, and Beclin1 protein expression and LC3 II expression level under starvation conditions were detected by Western blot. The autophagy spots were observed by indirect immunofluorescence. **Results** The average levels of miR-20a in breast cancer tissues was (211.35 ± 67.43), and the average levels of miR-20a in adjacent tissues was (126.72 ± 24.37), and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Besides, the expression of Beclin1 mRNA in breast cancer tissues was lower than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of ATG5, ATG7 and ATG12 mRNA between breast cancer tissues and adjacent tissues ($P > 0.05$). After overexpression of miR-20a, the level of Beclin1 protein in MCF7 cells was decreased, the expression level of LC3 II and the autophagy spots under starvation conditions were decreased. **Conclusions** The miR-20a expression in breast cancer tissue is high, overexpression of miR-20a down-regulates the expression of autophagy associated protein Beclin1 to suppress autophagy activation.

Key words: Breast neoplasms; Autophagy; MicroRNAs; Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Western blotting

乳腺癌是我国最为常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率仍呈增高趋势^[1-2]。晚期乳腺癌可转移至骨、肺等重要脏器, 致死率较高, 严重威胁我国女性健康, 因此进一步探究乳腺癌发生发展的分子机制、寻找早期诊断与评估预后的分子指标具有重要意义^[3-4]。细胞自噬作为真核细胞的自我降解机制, 消除废旧蛋白、衰老细胞器及胞内病原体以维持内环境稳态, 而自噬功能障碍可作为细胞癌变的

因素之一^[5]。微小非编码 RNA (miRNA) 是一类长度仅 18 ~ 24 个核苷酸、高度保守的单链 RNA, 通过靶向目的 mRNA 并使之降解, 发挥转录后基因表达的调控功能, 目前已证明多种 miRNA 参与乳腺癌的发生发展^[6]。在宫颈癌中 miR-20a 可通过降低 ATG7 的表达抑制自噬, 促进宫颈肿瘤的发生与淋巴结转移, 然而 miR-20a 在乳腺癌中的作用仍有待进一步研究^[7]。本研究观察了乳腺癌组织中

miR-20a及多种自噬相关基因的表达,并利用乳腺癌细胞系 MCF7 细胞初步探究了二者的相互作用,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取芜湖市第一人民医院乳腺外科于2016年1月至2017年12月间收治的接受手术治疗的乳腺癌患者56例,年龄(50.9 ± 11.3)岁,年龄范围为33~82岁,其中右乳手术21例,左乳35例。患者接受乳腺癌保乳术31例,改良乳腺癌根治术20例,肿块切除术3例,单纯乳房切除术2例。根据术后病理检查,患者中Luminal A型乳腺癌17例,Luminal B型乳腺癌23例,三阴性乳腺癌9例,Her-2(3+)乳腺癌5例,Her-2(2+)乳腺癌2例。合并高血压患者8例,合并糖尿病患者3例,所有患者均无饮酒史或吸烟史。本研究获我院伦理委员会批准,患者或近亲属对研究方案签署知情同意书。

1.2 材料 DMEM基础培养基购自Gibco公司;Alexa Fluor 555标记的山羊抗兔IgG、Lipofectamine 2000 Reagent由invitrogen公司提供;mir Vana™ miRNA Isolation试剂盒购自美国Ambion公司。RT cDNA第一链合成试剂盒为Frdbio公司产品;焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)购自广州捷倍斯生物科技有限公司,兔抗人Beclin1多克隆抗体、兔源抗LC3多克隆抗体、兔抗人GAPDH单克隆抗体购自Abcam公司。pcDNA3/pri-miR-20a表达载体由上海Tolo Biotech生物科技有限公司构建,所用引物序列为pri-miR-20a-S:5'-GCCAGATCTAGTTGTGCAAATC-TATGC-3'、pri-miR-20a-A:5'-GGCGAATTCTAACCA TAGAACAGTGTTC-3',酶切位点分别为BamH 1、EcoR 1。MCF7细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。各引物均由上海生工生物有限公司合成,序列如表1。

1.3 方法

1.3.1 组织的总RNA提取与逆转录实时定量PCR检测 将乳腺癌患者手术切取的新鲜肿瘤组织与癌旁组织置于-80℃冰箱冻存。提取总RNA时取适量冻存组织,迅速称重后置于DEPC预处理的研钵中,加入液氮迅速研磨至粉末状后,按质量体积比为1:2加入裂解液继续匀浆,继而采用mir Vana™ miRNA Isolation试剂盒严格按说明书操作以提取并纯化大片段RNA与小片段RNA,采用紫外分光光度计测定RNA浓度后冻存于-80℃备用。逆转录实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)时先应用RT-PCR逆转录试剂盒合成cDNA第一链,采用

表1 实时定量PCR扩增引物序列

引物名称	引物序列
miR-20a	Forward:5'-GCCGCGGTAAAGTGCTTATAGTG-3' Reverse:5'-TGCAGGCTCCGAGGTAT-3'
U6	Forward:5'-CTCGCTTCGCGCAGCACA-3' Reverse:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
Beclin1	Forward:5'-TGGAGGAGTGGGTGTCG-3' Reverse:5'-AACAGCGTTTGTAGTTCTTGACA-3'
Atg5	Forward:5'-CAGATGACAAAGATG-3' Reverse:5'-CTCATAACCTTCTGAAAGTG-3'
Atg7	Forward:5'-ATGGGGGACCCTGGACTGG-3' Reverse:5'-GCAGAGTCACCATTGTAG-3'
Atg12	Forward:5'-ATGTCGAAGATTACAGAGG-3' Reverse:5'-TTTCTTGCTGTCTCCGGGAG-3'
GAPDH	Forward:5'-CCCACGGCAAGTTCAACGGCA-3' Reverse:5'-TGGCAGGTTTCTCCAGGCGG-3'

SYBR green I染料法在LightCycler480 RT-PCR仪上分别检测miR-20a及自噬相关基因Beclin1、LC3、ATG5及ATG7 mRNA的表达水平。miR-20a检测以U6 snoRNA为内参,mRNA检测以GAPDH mRNA为内参,相对定量法算得标准曲线及各待检RNA的相对表达量^[8]。

1.3.2 脂质体法转染 pcDNA3/pri-miR-20a 至 MCF7 细胞 乳腺癌细胞系 MCF7 细胞采用含10%胎牛血清与 $10 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素/链霉素的DMEM完全培养基培养。常规条件下培养细胞至融合率约85%,以细胞消化液消化细胞并按 2×10^5 个每孔接种至六孔细胞培养板培养12 h。 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的pcDNA3/pri-miR-20a质粒与pcDNA3空白质粒分别按质量体积比1:3与Lipofectamine 2000 Reagent混悬并转染细胞,倒置显微镜观察细胞状态。

1.3.3 免疫蛋白印记实验检测 MCF7 细胞 Beclin 1 与饥饿条件下 LC3 II 的表达 MCF7 细胞转染48 h后,弃去培养基并以预冷的PBS冲洗细胞,加入细胞裂解液充分吹打细胞,并置于水平摇床平摇20 min后获得裂解产物,转移至EP管后以 $15\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 低温离心15 min,收集上清并加入上样缓冲液,煮沸5 min并冷却后,样本按等体积进行SDS-PAGE电泳分离。电转至PVDF膜并封闭后,采用兔抗人Beclin 1单克隆抗体或兔抗人GAPDH单克隆抗体按1:1 000稀释后孵育PVDF膜,在4℃水平摇床慢摇10 h后洗膜,尔后加入1:3 000稀释的HRP标记的山羊抗兔IgG室温孵育1 h,化学发光法显示信号。成像系统采集图像后,分析条带灰度

值,以目的蛋白与内参条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。检测饥饿条件下 MCF7 细胞 LC3 II 的表达前,弃去转染后细胞的培养基,加入 Hank'平衡盐溶液处理 20 min 后进行 LC3 II 的免疫蛋白印记实验检测。一抗孵育时采用 1:1 000 稀释的兔源抗 LC3 多克隆抗体,其他条件与检测 Beclin 1 时相同。

1.3.4 免疫荧光实验观察饥饿条件下 MCF7 细胞 LC3 蛋白的分布 MCF7 细胞转染 pcDNA3/pri-miR-20a 质粒或 pcDNA3 空白质粒后,采用 Hank'平衡盐溶液饥饿细胞。20 min 后弃去溶液,轻柔滴加预冷的甲醇,尔后将细胞培养板置于 -20 ℃ 冰箱固定细胞 20 min。弃去甲醇,滴加 3% BSA 并于 37 ℃ 恒温箱封闭 60 min,继而以 1:300 稀释的兔源 LC3 多克隆抗体于 37 ℃ 孵育 60 min,PBST 洗涤后加入 Alexa Fluor 555 标记的山羊抗兔 IgG。室温孵育 60 min 后以 0.01 μg · mL⁻¹ DAPI 溶液对细胞核着色,用荧光倒置显微镜观察图像。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中 miR-20a 的表达高于癌旁组织 通过 qRT-PCR 技术对 56 例乳腺癌患者肿瘤组织与癌旁组织的 miR-20a 表达水平的检测发现,肿瘤组织 miR-20a 的平均表达水平为 211.35 ± 67.43,明显高于癌旁组织 126.72 ± 24.37,差异有统计学意义(*P* < 0.05),初步表明 miR-20a 的表达上调与乳腺癌的发生存在一定的相关性。

2.2 乳腺癌组织中 Beclin1 mRNA 的相对表达量低于癌旁组织 在检测 miR-20a 表达的同时,我们还采用 qRT-PCR 技术检测了 6 例患者肿瘤组织与癌旁组织 4 种自噬相关基因 mRNA 的表达。结果显示该组患者肿瘤组织 Beclin1 mRNA 的相对表达量明显低于癌旁组织(*P* < 0.05),而 ATG5、ATG7 及 ATG12 mRNA 表达水平的两组间比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 2。

表 2 乳腺癌与癌旁组织中 4 种自噬相关基因 mRNA 的相对表达量/ $\bar{x} \pm s$

类别	例数	Beclin1	ATG5	ATG7	ATG12
肿瘤组织	6	1.13 ± 0.31	3.08 ± 0.64	1.98 ± 0.41	4.65 ± 1.03
癌旁组织	6	1.98 ± 0.24	2.85 ± 0.75	2.16 ± 0.35	4.43 ± 1.22
<i>t</i> 值		5.311	0.571	0.818	0.338
<i>P</i> 值		0.000	0.580	0.432	0.743

2.3 过表达 miR-20a 抑制 MCF7 细胞 Beclin 1 的表达 为探究乳腺癌组织中 miR-20a 表达升高是否参与 Beclin1 mRNA 表达水平的下调,我们采用乳腺癌细胞系 MCF7 细胞,通过脂质体转染 pcDNA3/pri-miR-20a 重组质粒过表达 miR-20a,以表达载体 pcDNA3 质粒作为对照,免疫蛋白印记实验检测 Beclin1 表达水平。结果显示,过表达 miR-20a 后 MCF7 细胞 Beclin1 蛋白相对表达量为 0.18 ± 0.12,较载体对照组 0.72 ± 0.11 及空白对照组 0.70 ± 0.45 细胞显著降低(*P* < 0.05),而载体对照组与空白对照组之间差异无统计学意义(*P* > 0.05),见图 1。

2.4 过表达 miR-20a 抑制饥饿条件下 MCF7 细胞 LC3 II 的表达 在自噬通路激活与自噬体构建的过程中,Beclin1 作为调节分子发挥了关键性作用。为观察乳腺癌组织及乳腺癌细胞系中 Beclin1 表达下调对自噬功能的影响,我们采用 Hank'平衡盐溶液替代培养基对细胞进行饥饿处理,进而检测功能状态下的自噬标记蛋白 LC3 II 的表达水平。免疫蛋白印记显示过表达 miR-20a 后,饥饿刺激下的 MCF7 细胞 LC3 II 的表达量低于载体对照组与空白对照组细胞,显示其自噬活化受到抑制(图 2)。

2.5 过表达 miR-20a 抑制饥饿条件下 MCF7 细胞的自噬体构建 自噬体的构建是显示自噬水平增高的重要依据,因此我们采用免疫荧光实验标记自噬体膜蛋白 LC3,根据 LC3 聚集为斑点状反映自噬体形成。荧光倒置显微镜下可见,通过饥饿诱导 MCF7 细胞自噬后载体对照组与空白对照组细胞中分布大量红色荧光斑点,而过表达 miR-20a 后 MCF7 细胞的细胞质之中红色斑点较少,进一步反映了 miR-20a 抑制 MCF7 细胞的自噬活化(图 3)。

3 讨论

近年来,对于 miRNA 在肿瘤发生发展中作用的研究愈加广泛和深入。其中,miR-20a 参与了多种癌症进展的分子病理过程^[9]。在非小细胞肺癌中,miR-20a 通过靶向早期生长反应蛋白 2 促进癌细胞的扩散与侵袭^[10],并且患者外周血中高循环 miR-20a 与非小细胞肺癌的不良预后呈正相关^[11]。此外,有证据显示 miR-20a 参与了对细胞自噬功能的负向调节。Guo L 等^[12]发现 miR-20a 通过降低巨噬细胞 ATG7 与 ATG16L1 的表达抑制自噬,从而有助于结核分支杆菌的存活,而 Li S 等^[13]报道了在乳腺癌中 miR-20a 可靶向于 RB1CC1/FIP200 复合物降低自噬水平。为进一步探究 miR-20a 在乳腺癌中扮演的角色,我们首先检测了乳腺癌组织中 miR-20a

的表达水平。与先前的报道一致,乳腺癌组织中 miR-20a 的平均相对表达量高于癌旁组织。

此外,我们检测了 Beclin1、Atg5、Atg7 及 Atg12 共 4 种自噬相关基因 mRNA 的表达量。结果显示,肿瘤组织 Beclin1 mRNA 的表达水平显著低于癌旁组织,而 Atg5、Atg7 与 Atg12 mRNA 表达量的两组间比较差异无统计学意义。目前认为,细胞自噬对肿瘤的发生与生长具有双向作用。由于肿瘤组织代谢旺盛,生长较快时能量需求更高,在周围环境提供能量不足时自噬可通过降解长寿蛋白为其提供营养,维持肿瘤细胞的存活。特别在患者接受放疗或化疗时,物理及化疗药物对细胞的杀伤作用和细胞功能的干扰,可导致蛋白质和细胞器的大量损伤^[14]。而自噬活化可对其降解为营养物质并再利用,在放化疗的应激条件下对癌细胞发挥保护作用。与此同时,自噬对肿瘤的发生具有抑制作用,自噬水平过低可增加 DNA 损伤与基因突变,而 Beclin1 是第一个被确认的自噬相关抑癌基因^[15-16]。

在观察到乳腺癌组织中 miR-20a 表达升高与 Beclin1 mRNA 表达降低后,我们利用了乳腺癌细胞系 MCF7 探究了二者之间的相互关系。通过重组质粒载体过表达 miR-20a 后,免疫蛋白印记实验显示 Beclin1 蛋白表达水平降低。进而,我们发现过表达 miR-20a 后 MCF7 细胞 LC3 II 蛋白表达量与自噬体数量均明显降低,显示 miR-20a 对于乳腺癌细胞的自噬功能具有负向调节作用。

综上所述,我们首次发现了在乳腺癌中 miR-20a 通过降低自噬调节蛋白 Beclin1 的表达以抑制自噬的作用。后续我们将进一步探究 miR-20a 与 Beclin1 mRNA 的直接相互作用,为乳腺癌发生、发展的分子机制提供更多的理论依据。

(本文图 1~3 见插图 10-2)

参考文献

- [1] OMARINI C, GUAITOLI G, PIPITONE S, et al. Neoadjuvant treatments in triple-negative breast cancer patients: where we are now and where we are going[J]. Cancer Manag Res, 2018, 15(10): 91-103.
- [2] 李军, 黄梅, 石新蕾. 三七总皂苷联合三苯氧胺对人乳腺癌细胞的抑制作用及对 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的影响[J]. 安徽医药, 2017, 21(10): 1780-1784.
- [3] REINERT T, BARRIOS CH. Overall survival and progression-free survival with endocrine therapy for hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer: review[J]. Ther Adv Med Oncol, 2017, 9(11): 693-709.
- [4] SULAIMAN A, WANG L. Bridging the divide: preclinical research discrepancies between triple-negative breast cancer cell lines and patient tumors[J]. Oncotarget, 2017, 8(68): 113269-113281.
- [5] 吴颖, 王哲, 孔静, 等. 阿司匹林通过诱导乳腺癌细胞凋亡及自噬从而抑制细胞增殖[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(10): 1348-1353.
- [6] 唐炜叶, 叶熹昱, 潘凌霄, 等. miR-20b 在乳腺癌的表达及对乳腺癌细胞增殖的影响[J]. 岭南现代临床外科, 2016, 16(4): 391-396.
- [7] ZHAO S, YAO D, CHEN J, et al. MiR-20a promotes cervical cancer proliferation and metastasis in vitro and in vivo[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0120905. DOI: 10.1371/journal.pone.0120905.
- [8] 赵瑾, 刘宏鹏, 段相国, 等. 雷帕霉素对 RAW264.7 细胞 6 种 miRNAs 表达的影响及 miR-20a 对 ATG16L1 的靶向调控作用[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(5): 687-691.
- [9] 任红娟. 卵巢浆液性囊腺癌组织中 miR-20a、Let-7a 表达变化及与患者预后的关系[J]. 山东医药, 2016, 56(7): 47-49.
- [10] WEI L, RAN F. MicroRNA-20a promotes proliferation and invasion by directly targeting early growth response 2 in non-small cell lung carcinoma[J]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 271-277.
- [11] XU X, ZHU S, TAO Z, et al. High circulating miR-18a, miR-20a, and miR-92a expression correlates with poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer[J]. Cancer Med, 2018, 7(1): 21-31.
- [12] GUO L, ZHAO J, QU Y, et al. MicroRNA-20a inhibits autophagic process by targeting ATG7 and ATG16L1 and favors mycobacterial survival in macrophage cells[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 18(6): 134-148.
- [13] LI S, QIANG Q, SHAN H, et al. MiR-20a and miR-20b negatively regulate autophagy by targeting RB1CC1/FIP200 in breast cancer cells[J]. Life Sci, 2016, 15(147): 143-152.
- [14] 杜云广, 王书华. 细胞自噬及其与肿瘤发生关系的研究进展[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2018, 34(2): 49-55.
- [15] LOCK R, DEBNATH J. Extracellular matrix regulation of autophagy[J]. Curr Opin Cell Biol, 2008, 20(5): 583-588.
- [16] 蒲倩, 吴成林, 周丽君. 自噬相关基因 Beclin1 在乳腺癌发生发展及治疗中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(1): 98-103.

(收稿日期: 2018-02-28, 修回日期: 2018-05-17)