

引用本文:叶惠荣,张玉娟,曹茵,等.下调HOX转录反义RNA对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖、周期及侵袭能力的影响[J].安徽医药,2021,25(5):999-1002.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.05.038.



◇临床医学◇

下调HOX转录反义RNA对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231增殖、周期及侵袭能力的影响

叶惠荣,张玉娟,曹茵,王西跃,吴丽华,陈桂林,陈丽娟,袁惠玲

作者单位:东莞市人民医院乳腺科,广东 东莞 523000

通信作者:袁惠玲,女,副主任医师,研究方向为乳腺肿瘤,Email:85342116@qq.com

基金项目:东莞市社会科技发展(重点)项目(201850715001557)

摘要: **目的** 研究下调HOX转录反义RNA(HOTAIR)水平对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞MDA-MB-231增殖、周期及侵袭能力的影响。**方法** si-HOTAIR对MDA-MB-231细胞转染,实验分为对照组、si-阴性对照组、si-HOTAIR组,实时荧光定量法测定转染后MDA-MB-231细胞中HOTAIR表达水平;分别用MTT法、流式细胞仪、Transwell小室实验测定转染后MDA-MB-231细胞活性、周期、侵袭能力;蛋白印迹法(WB)测定转染后MDA-MB-231细胞中c-myc、Ki-67、PCNA、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)表达水平。**结果** 与MCF-10A细胞组相比,对照组MDA-MB-231细胞中HOTAIR表达水平升高[(1.85±0.21)比(1.06±0.13), $P<0.05$]。与对照组、si-阴性对照组相比,si-HOTAIR组MDA-MB-231细胞中HOTAIR表达水平(1.34±0.15)、细胞活性(98.04±6.28)%、侵袭能力(35.66±8.04)降低($P<0.05$),细胞G0/G1期下调,阻滞在G2/M期;与对照组、si-阴性对照组相比,si-HOTAIR组MDA-MB-231细胞中c-myc、Ki-67、PCNA、MMP-9、MMP-2表达水平降低($P<0.05$)。**结论** HOTAIR在MDA-MB-231细胞中高表达,下调HOTAIR表达水平可抑制MDA-MB-231细胞增殖、阻滞细胞周期、降低肿瘤细胞侵袭能力。**关键词:** 三阴性乳腺癌; HOX转录反义RNA; 增殖; 周期; 侵袭

Effects of down-regulation of HOTAIR on proliferation, cycle and invasive ability of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231

YE Huirong,ZHANG Yujuan,CAO Yin,WANG Xiyue,WU Lihua,CHEN Guilin,CHEN Lijuan,YUAN Huiling

Author Affiliation:Department of Mastology, the People's Hospital of Dongguan, Dongguan, Guangdong 523000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of down-regulation of HOX transcript antisense RNA (HOTAIR) on proliferation, cell cycle and the invasive ability of triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231.**Methods** MDA-MB-231 cells were transfected with si-HOTAIR, the experiment was divided into control group, si-negative control group and si-HOTAIR group, the expression of HOTAIR in transfected MDA-MB-231 cells was measured by real-time fluorescence quantitative method; MTT assay, flow cytometry and Transwell cell assay were used to determine the activity, cycle and invasive ability of MDA-MB-231 cells after transfection; and the expression levels of c-myc, Ki-67, PCNA, MMP-9 and MMP-2 in MDA-MB-231 cells were determined by Western blotting (WB).**Results** Compared with MCF-10A cell group, HOTAIR expression level in MDA-MB-231 cells in control group increased significantly [(1.85±0.21) vs. (1.06±0.13), $P<0.05$]. Compared with control group and si-negative control group, HOTAIR expression level (1.34±0.15), cell activity (98.04±6.28) % and invasive ability (35.66±8.04) of MDA-MB-231 cells in si-HOTAIR group were significantly decreased ($P<0.05$), G0/G1 cell phase was down-regulated and cells blocked in G2/M phase; compared with the control group and the si-negative control group, the expression levels of c-myc, Ki-67, PCNA, MMP-9 and MMP-2 in MDA-MB-231 cells in the si-HOTAIR group decreased significantly ($P<0.05$).**Conclusion** HOTAIR is highly expressed in MDA-MB-231 cells, and downregulation of HOTAIR can inhibit MDA-MB-231 cell proliferation, block cell cycle and reduce cell invasion ability.

Key words: Triple negative breast neoplasms; HOX transcript antisense RNA; Proliferation; Cycle; Invasion

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)病人雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)、人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)表达均为阴性,约占乳腺癌的17%^[1-2]。TNBC因缺少PR、ER、HER2的表达,不能接受分泌治

疗和抗HER2治疗的手段,目前临床上主要依赖化疗,但其乳腺癌细胞具有强转移和侵袭能力,导致相对其它类型乳腺癌,TNBC整体预后仍差^[3-5]。由于缺乏明确的治疗靶点,因此越来越多学者关注TNBC治疗靶点的研究。长链非编码RNA(Long Non-coding RNA, lncRNA)长度一般为200个核苷酸

序列,不编码蛋白质,在X染色体灭活、染色体重塑、转录调节、细胞周期调控、MicroRNA活性、表观基因调节等生物过程均发挥重要作用^[6-7]。lncRNA HOX转录反义RNA(HOX Transcript Antisense RNA, HOTAIR)能够通过反式作用调节基因的表达^[8]。研究发现,HOTAIR在TNBC组织中表达水平升高,与TNBC的临床病理分期相关^[9]。但HOTAIR对TNBC细胞调控机制尚不清楚,本研究自2019年2—7月以TNBC细胞MDA-MB-231为模型,探究下调HOTAIR表达水平对MDA-MB-231细胞增殖、周期及侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器 RPMI 1640培养基(货号:C11875500BT)、胎牛血清(FBS)(货号:10091-148)均购自美国GIBCO公司;转染试剂Lipofectamine 2000(货号11668019)购自武汉科昊佳生物科技有限公司;阴性对照si-Control、si-HOTAIR由上海吉玛公司合成;兔抗人c-myc(货号BS94081)、兔抗人Ki-67(货号BS90768)、兔抗人PCNA(货号BS6438)、兔抗人MMP-9(货号BS6893)、兔抗人MMP-2(货号BS72289)、兔抗人内参 β -Actin(货号:AP0060)均购自美国Bioworld公司;羊抗兔二抗(货号31466)购自美国Pierce公司;RNA提取试剂Trizol(货号15596026)购自英潍捷基(上海)贸易有限公司;PrimeScript逆转录-PCR试剂盒(货号DRR042A)购自南京赛鸿瑞生物科技有限公司;FC 500系列流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特有限公司;Multiskan FC酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 细胞培养和转染 细胞系:正常乳腺上皮细胞系MCF-10A、TNBC细胞系MDA-MB-231购自南京安研生物科技有限公司。MCF-10A细胞、MDA-MB-231细胞在相对湿度98%、5%二氧化碳、温度为37℃的培养箱中常规培养,培养液为含有1%青链霉素双抗、10% FBS的1640培养基,待细胞单层平铺培养瓶约80%时胰酶消化传代,收集对数生长期的细胞进行后续实验。细胞转染:实验分为对照组、si-阴性对照组、si-HOTAIR组。严格按照说明书操作将si-HOTAIR(5'-GAACGGGAGUACAGAGA-GAUU-3')和阴性对照si-Control(5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3')转染至MDA-MB-231细胞中,细胞在6孔板中培养48 h后用做后续实验。

1.3 RT-qPCR检测MDA-MB-231细胞HOTAIR表达水平 使用RNA提取试剂Trizol提取各组细胞总RNA,PrimeScript逆转录-PCR试剂盒反转录得到cDNA,严格按照PCR试剂盒说明书操作,将cDNA稀释至25 ng/mL,然后加入到反应体系中,使用PCR仪对HOTAIR进行扩增。HOTAIR正向引物序列:

5'-GGGTGTTGGTCTGTGGAAGT-3',反向引物序列:5'-CAGTGGGGAAGTCTGACTCG-3';内参GAPDH正向引物序列:5'-CTTTGGTATCGTGAAGGACTC-3',反向引物序列:5'-CAGTGGGGAAGTCTGACTCG-3',反应条件:首先在94℃条件下预变性300 s,随后94℃条件下变性30 s,65℃退火1 min,最后在60℃条件下延伸30 s,进行30个循环,60℃终末延伸5 min。各组设置6个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对MDA-MB-231细胞HOTAIR表达水平进行定量分析。

1.4 MTT法测定MDA-MB-231细胞活性 将细胞以 1×10^4 个/孔接种到96孔板上,实验分组同“1.2”,每组设置6个复孔,培养过夜,待细胞贴壁后弃培养液,PBS清洗3次,加入不含血清的培养液继续培养。培养48 h后加入25 μ L MTT(5 mg/mL)溶液,孵育4 h后弃去孔内培养液,加入150 μ L DMSO溶液,100 r/min 37℃恒温震荡10 min,使用多功能酶标仪测定样品在570 nm处吸光度(OD值)。根据公式计算细胞活性。细胞活性(%)=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD-空白组OD) $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪测定MDA-MB-231细胞周期 收集MDA-MB-231细胞,实验分组同“1.2”,设置6个复孔,离心后用预冷的PBS清洗3次,之后将细胞置于4℃70%乙醇中固定0.5 h,用预冷的PBS清洗3次,最后将细胞重悬于含有100 μ g RNase A和40 μ g PI的PBS中,25℃避光孵育0.5 h,用流式细胞仪测定。

1.6 Transwell小室侵袭实验测定MDA-MB-231细胞侵袭能力 将Matrigel胶从-20℃冰箱中取出,4℃环境中过夜解冻,用1640培养液稀释至200 μ L/mL,之后涂抹到transwell板的滤膜上面(200 μ L/cm²),37℃放置3 h,取出后在超净台上干燥过夜。按照“1.2”实验分组处理,设置6个复孔,将细胞以 1×10^5 个/孔接种到上室,同时下室加入600 μ L不含细胞的培养液,常规培养,待细胞贴壁后更换上室培养液,然后继续培养48 h,用棉签轻轻擦去Matrigel和上室内细胞,甲醇固定5 min,然后用PBS清洗3次,0.1%结晶紫染色5 min,PBS清洗3次后显微镜下拍照,每组随机选择6个视野计数,取平均值。

1.7 蛋白印迹法(western blotting, WB)测定MDA-MB-231细胞c-myc、Ki-67、PCNA、MMP-9、MMP-2表达水平 使用RIPA法提取各组细胞蛋白并测定总蛋白含量,垂直电泳法分离所需目标蛋白,用BIO-RAD法将目标蛋白转至PVDF膜上,5% BSA将结合位点封闭1 h。加入兔抗人c-myc、兔抗人Ki-67、兔抗人PCNA、兔抗人MMP-9、兔抗人MMP-2、兔抗人内参 β -Actin(稀释比例均为1:1 000),4℃孵育过夜,加入羊抗兔二抗(1:1 000),

PBS清洗3次,37℃孵育0.5h,PBS清洗3次,显色、曝光、凝胶成像设备观察。

1.8 统计学方法 使用SPSS 22.0版软件对数据进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较行单因素方差分析,两组均数相比行snk-*q*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组MDA-MB-231细胞HOTAIR表达水平比较 与MCF-10A细胞组(1.06±0.13)相比,对照组MDA-MB-231细胞HOTAIR基础表达水平(1.85±0.21)升高($P < 0.05$)。与对照组相比,si-HOTAIR组HOTAIR表达水平(1.34±0.15)降低($P < 0.05$),si-阴性对照组(1.80±0.31),差异无统计学意义。

2.2 各组MDA-MB-231细胞活性比较 与对照组(102.64±3.29)%相比,si-HOTAIR组MDA-MB-231细胞活性(98.04±6.28)%降低($P < 0.05$),si-阴性对照组(81.93±5.87)%无明显变化,差异无统计学意义。

2.3 各组MDA-MB-231细胞周期比较 与对照组相比,si-HOTAIR组MDA-MB-231细胞G0/G1期下调,主要阻滞在G2/M期,si-阴性对照组无明显变化,见图1。

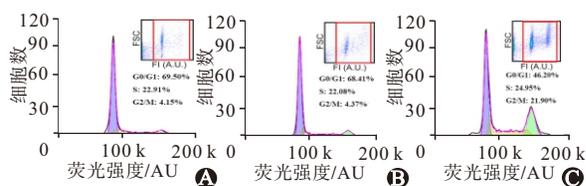
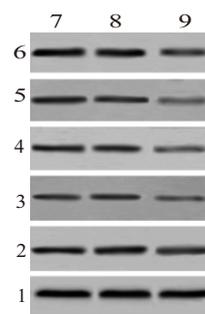


图1 MDA-MB-231细胞周期:A为对照组;B为si-阴性对照组;C为si-HOTAIR组

2.4 各组MDA-MB-231细胞侵袭能力比较 与对照组相比,si-HOTAIR组MDA-MB-231细胞通过Matrigel到达滤膜底层的细胞数明显减少[(35.66±8.04)个比(125.92±13.55)个, $P < 0.05$],si-阴性对照组[(128.17±16.53)个],差异无统计学意义。

2.5 各组MDA-MB-231细胞中c-myc、Ki-67、PCNA、MMP-9、MMP-2表达水平比较 与对照组、si-阴性对照组相比,si-HOTAIR组c-myc、Ki-67、PCNA、MMP-9、MMP-2表达水平降低($P < 0.05$),si-阴性对照组差异无统计学意义,见图2和表1。



注:1— β -Actin;2—MMP-9;3—MMP-2;4—PCNA;5—Ki-67;6—c-myc;7—对照组;8—si-阴性对照组;9—si-HOTAIR组。

图2 MDA-MB-231细胞中c-myc、Ki-67、PCNA、MMP-9、MMP-2表达水平

3 讨论

TNBC相比其它类型乳腺癌,治疗及预后、基因型和生物学行为有明显差异^[10]。研究发现TNBC病人3~5年期间生存率较低,10年后复发率与其它乳腺癌病人相当^[11]。因此,尽管TNBC侵袭能力强,预后差,但如能找到合适的治疗靶点,TNBC仍有望临床治愈。

近几年,HOTAIR在乳腺癌组织中异常表达受到越来越多研究者的关注,研究发现,HOTAIR在TNBC病人外周血清和癌组织中表达水平升高,且在转移性TNBC病人中尤其高^[12]。乳腺癌组织中HOTAIR高表达,上调MCF-7细胞中HOTAIR表达水平后,细胞侵袭能力增强,提示HOTAIR高表达有助于提高乳腺癌细胞侵袭能力^[13]。李苗等^[14]构建MDA-MB-231细胞三维培养体系,发现RNA-HOTAIR表达水平升高。本研究证实,与MCF-10A细胞组相比,MDA-MB-231细胞中HOTAIR表达水平升高,说明在MDA-MB-231细胞中HOTAIR高表达,提示HOTAIR可能与TNBC有关。Liu等^[15]研究发现HOTAIR在肺癌组织和细胞系中的高表达,敲除CAV-1后能够下调HOTAIR表达水平,抑制肺癌细胞增殖和侵袭,提示HOTAIR有望成为治疗肺癌的新靶点。朱意等^[16]研究表明lncRNA-HOTAIR在前列腺癌组织中高表达,与前列腺癌细胞的生长及侵袭能力有关,使细胞G2期阻滞,G1期的下调。另有研究发现,HOTAIR-siRNA组子宫内膜癌细胞增殖水平、侵袭能力与迁移能力低于对照组和阴性对照组,提示lncRNA-HOTAIR参与子宫内膜癌的转移

表1 MDA-MB-231细胞中c-myc、Ki-67、PCNA、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、基质金属蛋白酶2(MMP-2)表达水平 $\bar{x} \pm s$

组别	复孔数	c-myc/ β -Actin	Ki-67/ β -Actin	PCNA/ β -Actin	MMP-2/ β -Actin	MMP-9/ β -Actin
对照组	6	1.12±0.13	0.95±0.15	1.21±0.14	0.72±0.05	1.25±0.13
si-阴性对照组	6	1.07±0.16	0.91±0.16	1.19±0.13	0.71±0.03	1.27±0.16
si-HOTAIR组	6	0.59±0.14 ^{①②}	0.35±0.04 ^{①②}	0.62±0.05 ^{①②}	0.36±0.06 ^{①②}	0.76±0.07 ^{①②}
F值		24.821	40.757	51.800	108.086	31.684
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:①与对照组相比, $P < 0.05$ 。②与si-阴性对照组相比, $P < 0.05$ 。

侵袭进程^[17]。本研究表明,与对照组、si-阴性对照组相比,si-HOTAIR组MDA-MB-231细胞活性、侵袭能力降低,细胞G0/G1期下调,主要阻滞在G2/M期,说明下调HOTAIR表达水平可抑制MDA-MB-231细胞增殖、阻滞细胞周期、降低侵袭能力,提示HOTAIR可能成为治疗TNBC的新靶点。

c-myc作为位于细胞核的原癌基因,具有诱导细胞增殖、分化、凋亡等作用,研究发现,下调抑制c-myc蛋白表达,可抑制TNBC细胞增殖^[18]。Ki-67蛋白具有200多个磷酸化部位,易受到相关蛋白酶作用,Ki-67蛋白是癌细胞增殖过程中必需的结合蛋白,是临床上常用评价细胞增殖标志物^[19]。PCNA在细胞核特异性表达,与细胞增殖活性相关,研究发现,抑制PCNA蛋白表达水平,能够抑制肝癌细胞增殖^[20]。本研究表明,与对照组、si-阴性对照组相比,si-HOTAIR组MDA-MB-231细胞中c-myc、Ki-67、PCNA蛋白表达水平降低,说明下调HOTAIR表达水平可能抑制c-myc、Ki-67、PCNA蛋白表达,提示下调HOTAIR可能通过降低c-myc、Ki-67、PCNA蛋白表达水平而抑制MDA-MB-231细胞增殖。基质金属蛋白酶(MMP)能够降解细胞外基质和基底膜促进肿瘤细胞侵袭和迁移,研究发现,miR-125a-5p能够通过调控PI3K/Akt信号通路,下调MMP-2、MMP-9表达水平,从而抑制乳腺癌细胞侵袭和迁移^[21]。杨彧、付雯^[22]研究发现TAGLN基因过表达可能通过下调MMP-2、MMP-9表达水平,从而抑制乳腺癌细胞迁移和侵袭。本研究表明,与对照组、si-阴性对照组相比,si-HOTAIR组MDA-MB-231细胞中MMP-9、MMP-2蛋白表达水平降低,说明MMP-9、MMP-2蛋白表达水平可能受HOTAIR调控,提示下调HOTAIR水平使MDA-MB-231细胞侵袭能力下降可能通过抑制MMP-9、MMP-2蛋白表达实现。

综上所述,HOTAIR在MDA-MB-231细胞中高表达,下调HOTAIR表达水平可抑制MDA-MB-231细胞增殖、阻滞细胞周期、降低细胞侵袭能力。但是具体通过调控哪种信号通路影响MDA-MB-231细胞还有待进一步研究。

参考文献

- [1] FKI H M'HAMED I, PRIVAT M, TRIMECHE M, et al. miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 expression in triple negative vs non triple negative breast cancer: potential biomarkers[J]. *Pathol Oncol Res*, 2017, 23(4): 815-827.
- [2] ENG M S, KAUR J, PRASMICKAITE L, et al. Enhanced targeting of triple-negative breast carcinoma and malignant melanoma by photochemical internalization of CSPG4-targeting immunotoxins[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2018, 17(5): 539-551.
- [3] 肖梅仙, 赵金波. 三阴性乳腺癌预后的临床相关因素[J]. *医学综述*, 2017, 23(2): 281-285.
- [4] CHENG E, KO D, NGUYEN M, et al. Residual pure intralymphatic breast carcinoma following neoadjuvant chemotherapy is indicative of poor clinical outcome, even in node-negative patients [J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(9): 1275-1282.
- [5] 刘子梅, 沈赞. 三阴性乳腺癌靶向治疗最新进展[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(1): 36-40.
- [6] MIN L, GARBUTT C, TU C, et al. Potentials of long noncoding RNAs (LncRNAs) in sarcoma: from biomarkers to therapeutic targets[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4): 18040731. DOI: 10.3390/ijms18040731.
- [7] 刘磊, 吴灵. 乳腺癌相关长链非编码RNA的研究进展[J]. *中国癌症杂志*, 2017, 27(8): 668-674.
- [8] DA C, ZHAN Y, LI Y, et al. The expression and significance of HOX transcript antisense RNA and epithelial-mesenchymal transition-related factors in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 1853-1862.
- [9] 程苒, 崔军威, 方征宇, 等. HOX转录反义RNA在三阴性乳腺癌组织的表达及意义[J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(8): 1391-1393.
- [10] CHUE BM, COURSE BDLA. Case report of long-term survival with metastatic triple-negative breast carcinoma; treatment possibilities for metastatic disease [J/OL]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(16): e15302. DOI: 10.1097/MD.00000000000015302.
- [11] BOICHUK S, GALEMBIKOVA A, SITENKOV A, et al. Establishment and characterization of a triple negative basal-like breast cancer cell line with multi-drug resistance. [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 5039-5045.
- [12] TAO S, HE H, CHEN Q. Estradiol induces HOTAIR levels via GPER-mediated miR-148a inhibition in breast cancer [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 131-138.
- [13] 吕峰, 孔舒欣, 于洋, 等. 长链非编码RNA-HOTAIR对乳腺癌细胞MCF-7侵袭转移能力的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2017, 46(3): 271-275.
- [14] 李苗, 李锡, 谢芳. HOTAIR在Matrigel三维培养乳腺癌细胞的表达[J]. *解剖科学进展*, 2019, 25(1): 8-10.
- [15] LIU W, YIN N C, LIU H, et al. Cav-1 promote lung cancer cell proliferation and invasion through lncRNA HOTAIR [J]. *Gene*, 2018, 641: 335-340.
- [16] 朱意, 虞日考, 纪阿林, 等. 长链非编码RNA—HOTAIR对前列腺癌细胞周期和侵袭影响的实验研究[J]. *中华男科学杂志*, 2015, 21(9): 792-796.
- [17] 王明娟, 周晓慧, 刘超. 长链非编码RNA-HOTAIR对子宫内腺癌转移侵袭能力的影响[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(7): 32-36.
- [18] 解荣, 李继勇, 喻远航, 等. 微小RNA-26a通过靶向癌基因c-Myc抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(1): 63-65.
- [19] 文雪梅, 陈瑛, 李婷, 等. 白花蛇舌草对宫颈癌细胞增殖、凋亡及Ki-67表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(3): 561-563.
- [20] WANG L, HU F, SHEN S, et al. Knockdown of SOX12 expression inhibits the proliferation and metastasis of lung cancer cells [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(9): 4003-4014.
- [21] 杨玉玲, 王照岩, 杨志一, 等. miR-125a-5p通过PI3K/Akt/MMP信号通路抑制乳腺癌细胞的侵袭与转移[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(8): 1145-1149.
- [22] 杨彧, 付雯. TAGLN基因过表达对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响[J]. *实用肿瘤杂志*, 2017, 32(5): 411-415.

(收稿日期:2019-10-09,修回日期:2019-11-08)