

· 诊断技术 - 医学检验 ·

# 乳腺癌细胞中 miR-1246、ZO-1、vimentin 的表达及相关性研究

王攀<sup>1</sup>, 赵玲萍<sup>2</sup>, 朱杰<sup>1</sup>, 陈文举<sup>1</sup>, 李招云<sup>1</sup>

1. 台州市中心医院检验科, 浙江台州 318000; 2. 台州市中心医院妇产科, 浙江台州 318000

**摘要:**目的 检测 miR-1246、ZO-1、vimentin 在乳腺正常上皮细胞 MCF10A 和乳腺癌细胞 MCF7、MDA-MB-231 中的表达, 并探讨 miR-1246 在促进乳腺癌上皮-间质化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 中的作用。方法 用荧光定量 PCR 法检测乳腺正常上皮细胞 MCF10A、乳腺癌细胞 MCF7、MDA-MB-231 中 miR-1246 的相对表达量, 用免疫印迹法检测乳腺正常上皮细胞 MCF10A、乳腺癌细胞 MCF7、MDA-MB-231 中紧密连接蛋白 ZO-1、波形蛋白 vimentin 的表达情况。采用 SPSS 16.0 统计软件分析, 用 *U* 检验、*t* 检验和 Spearman 相关分析分析数据。结果 miR-1246 和 ZO-1 在恶性乳腺癌细胞中的表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), vimentin 在恶性乳腺癌细胞中的表达明显增加 ( $P < 0.05$ ), miR-1246 与 ZO-1 表达呈正相关 ( $r = 0.940, P < 0.05$ ), miR-1246 与 vimentin 表达呈负相关 ( $r = -0.714, P < 0.05$ )。结论 miR-1246 表达水平与 EMT 标志物 ZO-1、vimentin 的表达水平存在一定的相关性, 提示 miR-1246 在促进乳腺癌 EMT 过程中扮演重要角色。

**关键词:** miR-1246; ZO-1; vimentin; 乳腺肿瘤

**中图分类号:** R737.9 R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2016)08-1373-03

**DOI:** 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2016.08.042

**Expression and correlation of miR-1246, ZO-1 and vimentin in breast cancer cells** WANG Pan, ZHAO Ling-ping, ZHU Jie, et al. Department of Clinical Laboratory, Taizhou Central Hospital, Taizhou, Zhejiang 318000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression and correlation of ZO-1, vimentin and miR-1246 in normal breast epithelial cells (MCF10A) and breast cancer cells (MCF7, MDA-MB-231), and analyze the role of miR-1246 in promoting breast cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods** The relative expression levels of miR-1246 in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 were detected by qPCR assay; the expression of ZO-1 and vimentin protein in MCF10A, MCF7 and MDA-MB-231 were detected by WB assay. Data were analyzed using *U* test, *t* test and spearman rank correlation analysis by SPSS 16.0. **Results** The expression of miR-1246 and ZO-1 in malignant breast cancer cells were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the expression of vimentin in malignant breast cancer cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ). MiR-1246 was positively correlated with ZO-1 expression ( $r = 0.940, P < 0.05$ ), miR-1246 and vimentin expression were negatively correlated ( $r = -0.714, P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression level of miR-1246 and EMT markers is correlated, so miR-1246 is suggested to play an important role in the promotion of EMT in breast cancer.

**Key words:** Mir-1246; ZO-1; Vimentin; Breast cancer

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 严重危害女性的健康。美国调查预测, 仅 2013 年美国新发乳腺癌患者约 234 580 人, 而其中约有 40 030 人死于乳腺癌<sup>[1]</sup>。而在亚洲, 虽然乳腺癌的发病率较低, 但是随着生活条件的改善、环境恶化等因素, 近年来, 乳腺癌的发病率在不断的上升。在我国, 每年有高达 3% ~ 4% 的新增发病率, 成为我国癌症中发病率上升最快的肿瘤之一, 并且呈现年轻化趋势<sup>[2-3]</sup>。近年来随着乳腺癌筛查技术不断改进和完善, 使乳腺癌癌前病变早期诊断和治疗率有所提高, 但是乳腺癌的浸润、转移和复发仍是乳腺癌患者死亡的主要原因。因此, 筛选乳腺癌浸润转移相关标志物, 对于设计乳腺癌靶向治疗方

案, 提高乳腺癌治疗效果具有重要意义。

许多研究发现微小非编码 RNA (miRNA) 在多种疾病特别是肿瘤的发生发展中起着十分重要的作用。它主要通过与其靶 mRNA 3' UTR 的完全或不完全配对, 降解靶基因或抑制其翻译, 在转录后的水平上影响细胞的分化、繁殖、转移、凋亡等多种病理生理过程。miR-1246 位于染色体 2q31.1 上, 通过生物信息学分析其调控的靶基因功能富集在细胞周期、信号转导、转录调控等生物学过程中。据报道, miR-1246 的一个靶基因为 DYRK1A, 通过 miR-1246-DYRK1A-NFAT 途径, 抑制 DYRK1A 基因的表达, 从而激活 NFAT 基因的表达, 最终引导细胞凋亡<sup>[4-5]</sup>。也有不同的观点认为<sup>[6]</sup>, miR-1246 也许参与 SV40 小 T 抗原 (SV40 small T antigen) 诱导的支气管上皮细胞的恶性转化的过程。本研究拟通过检测乳腺癌细胞株中 miR-1246 的表达

**基金项目:** 浙江省科技计划项目 (2012C37037); 浙江省台州市科技计划项目 (2011ky0701); 浙江省台州市医学会科研研究项目 (TZSYXH15-27)

**通信作者:** 李招云, E-mail: lzy8151@163.com

量,发现其与乳腺癌细胞上皮细胞间质化的相关性。

### 1 材料与方法

1.1 资料来源 MCF7 和 MD-MB-231 由温州医科大学实验室惠赠, MCF10A 细胞购自赛佰康公司。细胞培养条件:用含 10% 胎牛血清的 DEME 培养基,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。

1.2 试剂和仪器 Trizol 试剂购自美国 sigma 公司, miRNeasy Serum/Plasma Kit、miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control、miScript II RT Kit、miScript Primer Assay、miScript SYBR Green PCR Kit 试剂盒均购自德国 Qiagen 公司, vimentin 和 ZO-1 抗体购自美国 CST 公司。StepOne Plus Real-Time PCR 仪购自美国 Applied Biosystems 公司,电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司。

### 1.3 实验方法

1.3.1 RNA 提取 细胞 RNA 提取按照传统的 Trizol 操作步骤进行,提取后的 RNA,放置 -80 °C 保存。

1.3.2 逆转录 取 2 μl 模版 RNA 配成 20 μl 反应体系,按照 miScript II RT Kit 试剂盒说明书操作,得到的 cDNA 加 200 μl 无 RNA 酶水, -20 °C 保存。

1.3.3 荧光定量 PCR 取 2 μl 模版 cDNA 配成 20 μl 反应体系,按照 miScript SYBR Green PCR Kit 试剂盒说明书操作进行 PCR 反应。以外源性 Cel-miR-39 为内参, miR-1246 的相对表达量 = 2<sup>-ΔΔCt</sup>, ΔΔCt = (C<sub>miRNA</sub> - C<sub>miR-39</sub>)<sub>肿瘤</sub> - (C<sub>miRNA</sub> - C<sub>miR-39</sub>)<sub>正常组平均值</sub>。

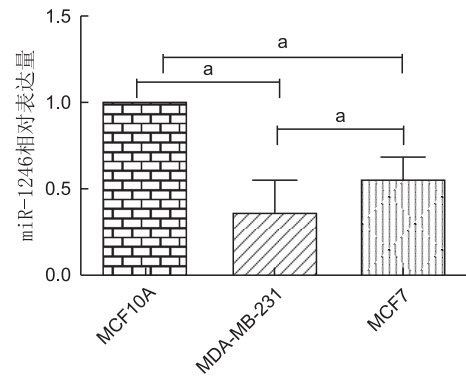
1.3.4 蛋白质提取和 WB 检测 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测蛋白浓度并调蛋白浓度一致,按 4: 1 比例加入 5 × Loading Buffer, 100 °C 加热 10 min 变性。用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭,一抗(兔抗人 ZO-1 多克隆抗体 1: 1 000, 兔抗人 vimentin 多克隆抗体 1: 1 000) 4 °C 过夜,洗涤,二抗(山羊抗兔 1: 1 000)室温 1 h,洗涤,显影,最后用 Image J 软件分析条带灰度值。GAPDH 作为内参。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计学软件进行

统计学分析,实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Mann-Whitney U 检验、t 检验分析 miR-1246、ZO-1、vimentin 的表达量, Spearman 分析 miR-1246 与 ZO-1、vimentin 这 2 种蛋白表达的关系,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 miR-1246 在乳腺癌细胞株中的表达 miR-1246 在乳腺正常上皮细胞 MCF10A 和管腔型乳腺癌细胞 MCF7、基底型乳腺癌细胞 MD-MB-231 中的相对表达量分别为 1.000 ± 0.000、0.595 ± 0.084 和 0.305 ± 0.079,随着乳腺癌细胞恶性程度的增高, miR-1246 的表达量呈下降趋势,且两两比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 1。

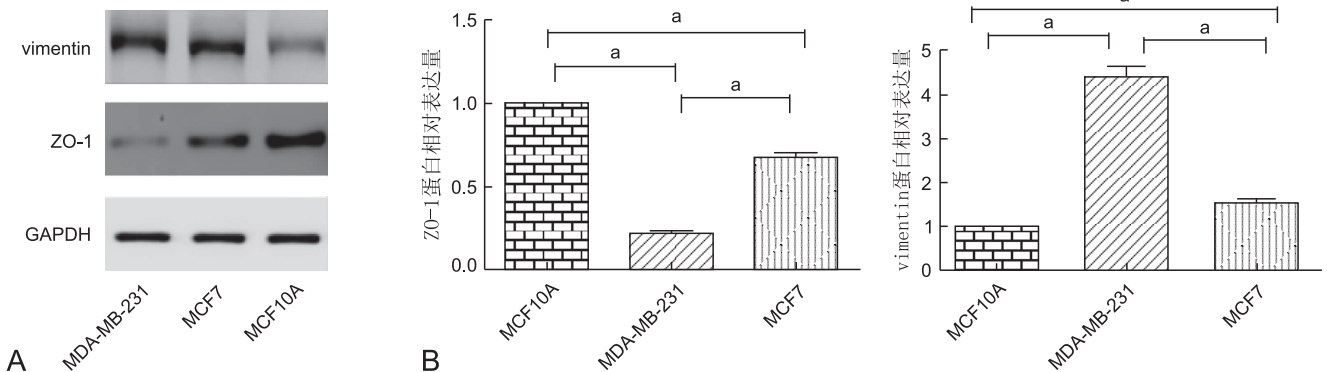


注: <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 1 miR-1246 在 MCF10A、MCF7 和 MD-MB-231 三种细胞株中的相对表达量

### 2.2 ZO-1 和 vimentin 在乳腺癌细胞株中的表达

ZO-1 在乳腺正常上皮细胞 MCF10A 和管腔型乳腺癌细胞 MCF7、基底型乳腺癌细胞 MD-MB-231 中表达随着乳腺癌细胞恶性程度的增高而降低, vimentin 在乳腺正常上皮细胞 MCF10A 和管腔型乳腺癌细胞 MCF7、基底型乳腺癌细胞 MD-MB-231 中表达随着乳腺癌细胞恶性程度增高而增高,且差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 2。



注:图 2A 示 ZO-1 和 vimentin 蛋白的表达量;图 2B 示图 2A 的灰度分析结果(Image J 软件)。<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 ZO-1 和 vimentin 在 MCF10A、MCF7 和 MD-MB-231 三种细胞株中的表达

2.3 miR-1246 与 ZO-1、vimentin 在乳腺癌细胞株中表达的关系 miR-1246 与 ZO-1 在乳腺癌细胞株的表达

呈正相关 ( $r = 0.940, P < 0.05$ ), miR-1246 与 vimentin 在乳腺癌细胞株的表达呈负相关 ( $r = -0.714, P <$

0.05)。

### 3 讨论

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程是由具有极性的整齐排列的上皮细胞丧失粘附性,并转化成具有移动能力的梭型不稳定的间质细胞的过程,因此在肿瘤侵袭转移中扮演着重要的角色。已有大量研究表明,EMT过程中会伴随着相关蛋白的改变。ZO-1是第1个被确认的紧密连接相关蛋白,属于膜相关鸟苷酸激酶家族一员,与ZO-2和ZO-3形成复合体发挥作用。有研究发现,ZO蛋白不仅参与了组装紧密连接、调节细胞旁通透性,还参与了调节细胞骨架组织和功能活动以及连接周围肌动球蛋白环,与细胞的增殖、分化、形态改变密切相关<sup>[7]</sup>。研究发现,在非小细胞肺癌中ZO-1的缺失可形成有利用肿瘤生长的微环境<sup>[8]</sup>,而高表达则与疾病的良好预后密切相关<sup>[9]</sup>。郭兴军等<sup>[10]</sup>通过检测正常胆管组织、胆管癌组织、胆管肝癌组织中ZO-1后发现,胆管癌组织中ZO-1表达量要比胆管正常组织中低,发生局部或远处转移的要比没有发生转移的低,而在胆管肝癌组织中的表达则缺失。vimentin即波形蛋白,通常在正常组织的间质表达,属于Ⅲ型中间丝蛋白一种,与微丝、微管等共同组成细胞骨架,对于维持和调节细胞功能起着十分重要的作用。同时也是一种信号因子,参与细胞内信息传递等过程<sup>[11]</sup>。因此,vimentin与细胞生长、凋亡、粘附和移行密切相关,并在多种肿瘤和组织中表达升高,与肿瘤的侵袭和转移相关<sup>[12-13]</sup>。刘志荣等<sup>[14]</sup>采用免疫组织化学法SP法检测正常乳腺组织、乳腺癌旁组织和乳腺癌组织,发现随着乳腺癌的转变进展,vimentin蛋白的表达逐渐增强。姚乐申等<sup>[15]</sup>采用WB法检测乳腺癌细胞发现,vimentin在乳腺癌细胞MDA-MB-231中的表达高于MCF7,与本研究结果一致。

本研究发现,miR-1246的表达水平随着乳腺癌细胞恶性程度的增加而降低,与Zhang Y等<sup>[4]</sup>的研究结果一致,表明miR-1246极有可能参与了乳腺癌细胞的侵袭和迁移活动。EMT相关蛋白ZO-1的表达水平随着乳腺癌细胞恶性程度的增加而减少,vimentin的表达在基底型乳腺癌细胞中显著增加,表明ZO-1和vimentin也极有可能参与了乳腺癌细胞的侵袭和迁移活动,且miR-1246的表达与ZO-1表达正相关,与vimentin表达呈负相关。因此,笔者推测在乳腺癌发生的过程中,是否有条通路是通过miR-1246表达水平的改变,导致ZO-1蛋白表达下调,vimentin蛋白表达上调,促进了乳腺癌细胞形态的改变,使得细胞粘附能力下降,运动能力增强,最终导致乳腺癌的侵袭和转移,但

是需要进一步的实验研究证实。

综上所述,随着乳腺癌细胞株恶性程度的增加,miR-1246和ZO-1在细胞内的表达量明显降低,并呈正相关;而vimentin在细胞内的表达量明显升高,与miR-1246的表达量呈负相关。深入研究不同乳腺癌细胞株的miR-1246、ZO-1、vimentin异常表达水平及其机制,并研究相应的有效干预措施,将有助于了解乳腺癌的发生、发展、侵袭和转移等生物过程,并为乳腺癌的靶向治疗提供新思路。

### 参考文献

- [1] Siege IR, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer Journal for Clinicians, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] Enserink M. A push to fight cancer in the developing world [J]. Science, 2011, 331(6024): 1548-1550.
- [3] 郑刚, 杨靖, 左文述, 等. 中国乳腺癌前哨淋巴结活检验证阶段研究结果的系统评价 [J]. 中华医学杂志, 2011, 91(6): 361-363.
- [4] Zhang Y, Liao JM, Zeng SX, et al. p53 downregulates Down syndrome-associated DYRK1A through miR-1246 [J]. EMBO Reports, 2011, 12(8): 811-817.
- [5] Liao JM, Zhou X, Zhang Y, et al. MiR-1246: a new link of the p53 family with cancer and Down syndrome [J]. Cell Cycle, 2012, 11(14): 2624-2630.
- [6] Wang Q, Li D, Li Z, et al. Upregulation of miR-27a contributes to the malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by SV40 small T antigen [J]. Oncogene, 2011, 30(36): 3875-3886.
- [7] Fanning AS, Van Itallie CM, Anderson JM. Zonula occludens-1 and-2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia [J]. Mol Biol Cell, 2012, 23(4): 577-590.
- [8] 王晔恺, 周吉航, 曾芳, 等. 非小细胞肺癌组织中ZO-1的表达及其临床意义 [J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14(2): 146-150.
- [9] Ni SH, Xu LQ, Huang JF, et al. Increased ZO-1 expression predicts valuable prognosis in non-small cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(12): 2887-2895.
- [10] 郭兴军, 王敏, 江建新, 等. ZO-1和Claudin-1在胆管癌中的表达以及意义 [J]. 中华实验外科杂志, 2014, 8(31): 1739-1741.
- [11] Taavi Päll, Anne Pink, Lagle Kasak, et al. Soluble CD44 Interacts with Intermediate Filament Protein Vimentin on Endothelial Cell Surface [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e29305.
- [12] Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The Role of Vimentin Intermediate Filaments in the Progression of Lung Cancer [J]. J Respir Cell Mol Biol, 2014, 50(1): 1-6.
- [13] Barrière GI, Tartary M, Rigaud M. Metformin: a rising star to fight the epithelial mesenchymal transition in oncology [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13(2): 333-340.
- [14] 刘志荣, 吴诚义. Snail在乳腺癌中的表达及其与上皮-间质转化的关系 [J]. 中国医药生物技术, 2012, 7(1): 37-42.
- [15] 姚乐申, 张保国, 李燕, 等. vimentin在三阴性乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. 实用老年医学, 2012, 26(6): 466-469.

(本文编辑:代莹莹)

收稿日期:2015-11-09