

miR-21 靶向调控 STAT3 基因抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭

赵守香 王涛 李玉军

作者单位:266003 青岛市,青岛大学附属医院病理科(赵守香 李玉军)

121013 锦州市,辽宁医学院医疗学院(王涛)

通讯作者:李玉军, E-mail:liyujun.66@163.com

【摘要】 目的 探讨 miR-21 和信号传导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 基因在人乳腺癌 MCF-7 细胞中的表达, 阐明 miR-21 对 STAT3 基因的靶向作用及其对 MCF-7 细胞侵袭的影响。方法 购买并培养 MCF-7 细胞, 采用免疫荧光法检测 STAT3 在癌细胞中的表达。运用生物信息学方法对 miR-21 和 STAT3 基因的靶向配对关系进行预测, 采用荧光素酶报告系统鉴定; 脂质体 2000 转染 miR-21 模拟物后, qRT-PCR 检测 miR-21 和 STAT3 mRNA 在癌细胞中的表达, Western blot 检测 STAT3 蛋白在癌细胞中的表达, Transwell 小室检测 MCF-7 细胞体外的侵袭性。结果 光镜下可见人乳腺癌 MCF-7 细胞成片生长, 有突起; 细胞免疫荧光法检测结果显示胞质内有 STAT3 蛋白的表达, 显示红色荧光。生物信息学软件 miRanda 和 TargetScan 显示 miR-21 和 STAT3 基因二者靶向配对良好, 荧光素酶报告系统鉴定发现 miR-21 mimics 能够抑制 STAT3 mRNA 表达。qRT-PCR 和 Western blot 检测结果表明过表达 miR-21 能够降低 STAT3 mRNA 和蛋白的表达。Transwell 小室实验结果表明 miR-21 的过表达能够抑制 MCF-7 细胞的侵袭。结论 miR-21 通过负性调控人乳腺癌 MCF-7 细胞中 STAT3 基因的表达, 进而抑制癌细胞的侵袭。

【关键词】 微小 RNA; 信号传导与转录激活因子 3; 乳腺癌 MCF-7 细胞; 生物信息学

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.01.002

The role of miR-21 in human breast cancer MCF-7 cells invasion by regulating STAT3 expression

ZHAO Shou-xiang¹, WANG Tao², LI Yu-jun¹. ¹Department of Pathology, the Affiliated Hospital, Qingdao University, Qingdao 266003, China ²Medical Treatment College, Liaoning Medical University, Jinzhou 121013, China

【Abstract】 Objective To identify expressions of miR-21 and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in human breast cancer MCF-7 cells and explore the role of miR-21 on cell invasion which regulate expression of STAT3. **Methods** MCF-7 cells were cultured in vitro. Cell morphology was observed by phase contrast microscope and the expression of STAT3 in MCF-7 cells was determined by immunofluorescence cytochemistry method. MiR-21 which regulated expression of STAT3 was predicted by bioinformatics and identified with luciferase assay. After transfection of miR-21 mimics into cells, the expressions of miR-21 and STAT3 were determined by qRT-PCR and Western blot. The invasion of MCF-7 cells was detected in vitro by transwell chamber. **Results** The MCF-7 cell grew flakily with prominency under light microscope. Expression of STAT3 was positive by immunofluorescence cytochemistry. MiRanda and TargetScan showed that miR-21 was well complementary with STAT3 gene. MiR-21 mimics could inhibit STAT3 mRNA expression showed by luciferase assay. Results of qRT-PCR and Western blot showed that over-expression of miR-21 down-regulated expression of STAT3 mRNA and protein. The invasion of MCF-7 cells was suppressed after transfection of miR-21 mimics. **Conclusion** MiR-21 may negatively regulate STAT3 expression in human breast cancer MCF-7 cells and inhibit cells invasion.

【Key words】 miRNA; Signal transducer and activator of transcription 3; Breast cancer MCF-7 cells; Bioinformatics

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤, 其发病率呈逐年上升趋势并呈现年轻化特点, 手术切除不仅对患者身体造成极大地创伤, 也对女性患者造成极大地

心理负担。因此, 探寻乳腺癌的发生发展机制及其新的治疗方法在当前是迫切的。信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription

3, STAT3) 是一种与酪氨酸磷酸化信号通道偶联的功能蛋白, 主要存在于线粒体中^[1,2]。最近研究^[3,4]发现 STAT3 在乳腺癌组织中异常高表达, 对肿瘤的发生发展起着重要作用。微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类非编码 RNA, 长度大约为 21~25 nt, 通过与靶基因 mRNA 3' 端非翻译区 (3' untranslated regions, 3'UTR) 互补, 降解目的基因并下调其表达^[5], 以此参与疾病发生过程中基因表达的调控。

本文研究应用生物信息学方法对 miR-21 和 STAT3 基因的靶向配对关系进行预测, 并采用荧光素酶报告系统鉴定 STAT3 基因在乳腺癌细胞中的表达; 脂质体 2000 转染 miR-21 模拟物进入人乳腺癌 MCF-7 细胞后, qRT-PCR 检测 miR-21 和 STAT3 mRNA 在癌细胞中的表达, Western blot 检测 STAT3 蛋白在癌细胞中的表达, 阐明 miR-21 对 STAT3 基因的靶向作用; Transwell 小室检测癌细胞体外的侵袭性, 揭示 miR-21 对人乳腺癌 MCF-7 细胞生物学行为的影响, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶购自 Gibco 公司, 反转录试剂盒、pMD 18-T 载体、DNA 连接试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、RNAiso for small RNA 和 SYBR Premix Ex Taq II 购自 TaKaRa 公司, pmirGLO 质粒和 Dual-Luciferase 报告系统购自 Promega 公司, 质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司, 脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司, miR-21 mimics 购自 GenePharma 公司, 兔抗人 STAT3 抗体购自 Santa Cruz 公司, 人乳腺癌 MCF-7 细胞购自上海生物细胞研究所。

1.2 MCF-7 细胞培养及免疫荧光检测 STAT3 表达 MCF-7 细胞接种于 25 cm² 培养瓶内, 孵箱中 (37 °C、5% CO₂) 培养, 每 3 d 换一次液, 细胞贴壁达到 80% 左右, 用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 消化并传代。取适量细胞涂片, 10% 甲醛固定后, 0.1% BSA 封闭 1 h, 加兔抗人 STAT3 抗体, 室温孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 二抗加 TRITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (1:200), DAPI 复染细胞核。

1.3 生物信息学方法预测 运用 miRNA 生物信息学软件 miRanda (<http://www.microrna.org/>) 和 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 对 miR-21 和 STAT3 基因的靶向配对关系进行预测。

1.4 荧光素酶报告系统鉴定 提取 MCF-7 细胞的总 RNA 并反转录为 cDNA, 运用正向引物 5'-CC-GAGCTCATTGTCCACCAGCATT-3' 和反向引物

5'-GCTCTAGAAGCCAGCCAGTATTTTA-3' 扩增 STAT3 mRNA 的 3'UTR。Sac I 和 Xba I 双酶切 STAT3 3'UTR 以及 pmirGLO 质粒, DNA 连接试剂盒连接酶切片段, 构建荧光素酶报告载体 (3'UTR-pmirGLO), 转化入感受态细胞中扩增, 质粒提取试剂盒提取重组质粒。脂质体 2000 转染 STAT3 3'UTR-pmirGLO 以及 miR-21 mimics 或对照 miRNA, Dual-Luciferase 报告系统检测荧光强度。

1.5 qRT-PCR 检测 取转染 miR-21 mimics 的 MCF-7 细胞以及空白对照组细胞, 分别加入 Trizol 或 RNAiso for small RNA (TaKaRa) 提取总 mRNA 或总 miRNA, 运用反转录试剂盒反转录为 cDNA, 稀释后加入 SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) 和引物 (表 1), 跑 40 个循环的 PCR 反应, 并对反应结果进行定量分析。

表 1 引物序列

引物名称	序列
U6 forward	5'CGCTTCGGCAGCACATATAC3'
U6 reverse	5'TTCACGAATTTCCTGTCTAT3'
hsa-miR-21	5'TAGCTTATCAGACTGATGTTGA3'
GAPDH forward	5'CCCCTTCATTGACCTCAACT3'
GAPDH reverse	5'ATGAGTCCTCCACGATACC3'
STAT3 forward	5'GCCGGAGAAACAGGATGGCCCAA3'
STAT3 reverse	5'CTGCCGCAGCTCCATTGGGAA3'

1.6 Western blot 检测 取转染 miR-21 mimics 的 MCF-7 细胞及对照组细胞, 分别加入 RIPA 裂解液充分震荡, 超声破碎, 在 4 °C 下以离心半径 8 cm, 12000 r/min 离心 20 min, 采用 BCA 法测定样品总蛋白量。取 15 μ l 样品经 SDS-PAGE 分离后转膜, 用 4% BSA 封闭 1 h, 加入兔抗人 STAT3 抗体 (1:200), 4 °C 过夜后, 滴加二抗 (1:800), 4 °C 摇床 1 h 后凝胶成像系统 ECL 发光显影, 以 β -actin 作为内参。

1.7 Transwell 小室检测 MCF-7 细胞体外侵袭 将转染 miR-21 mimics 的 MCF-7 细胞以及空白对照组细胞加入无血清培养基并置入 Transwell 上室中, 下室加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基, 24 h 后, 取出小室, 用甲醇固定小室反面细胞 20 min, 于结晶紫染液中染色 15 min。光镜下取 3 个随机视野计算穿膜细胞数。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间计量资料的比较采用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MCF-7 细胞培养及免疫荧光法检测 STAT3 表达 光镜下可见人乳腺癌 MCF-7 细胞成片生长,有突起,见图 1A;细胞免疫荧光法检测结果显示胞质内有 STAT3 蛋白的表达,呈红色荧光,见图 1B~D。

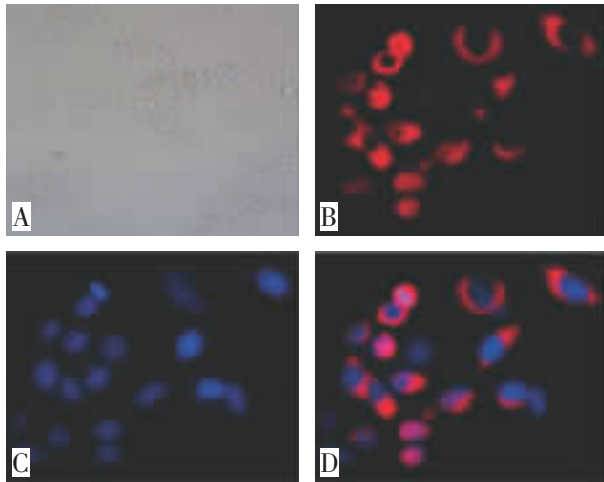


图 1 MCF-7 细胞形态学观察

注:A:光镜下 MCF-7 细胞形态(100×);B:免疫荧光检测 STAT3 表达(400×);C:DAPI 标示细胞核(400×);D:融合图片(400×)

2.2 miR-21 和 STAT3 基因靶向配对关系 分别运用 TargetScan 和 miRanda 生物信息学软件对 miR-21 和 STAT3(NM_003150)基因的靶向配对关系进行预测,TargetScan 显示 miR-21 在 STAT3 mRNA 3'UTR 上有一个保守的靶位点,其类型为 7mer-m8, 匹配得分为 95。miRanda 结果表明 miR-21 与靶位点的 mirSVR 得分为-0.7660, 综合两个生物信息学软件预测结果可以看出 miR-21 与 STAT3 基因配对良好,见表 2。

2.3 荧光素酶报告系统鉴定结果 荧光素酶报告系统检测结果显示,将对照组 STAT3 3'UTR-pmirGLO 荧光素酶的表达量设为 100%,则 miR-21 mimics 能使 STAT3 3'UTR-pmirGLO 的荧光素酶表达量下降为(46.98±6.01)%,二者经比较差异有统计学意义($t=2.732, P<0.05$),见图 2。

2.4 qRT-PCR 检测 miR-21 和 STAT3 mRNA 的表达结果 将对照组 miR-21 的表达量设为 100%,则转染组的相对表达量是(21.08±7.48)%,两者差异有统计学意义($t=3.286, P<0.05$),见图 3a。将对照组 STAT3 mRNA 的表达量设为 100%, 转染后发现

STAT3 mRNA 的表达量下降至(49.97±8.62)%,两者差异有统计学意义($t=2.461, P<0.05$),见图 3b。

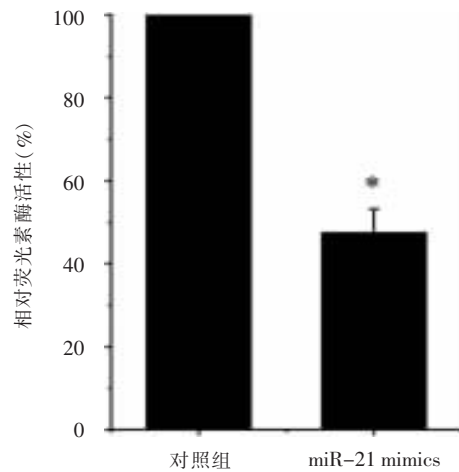


图 2 荧光素酶相对活性

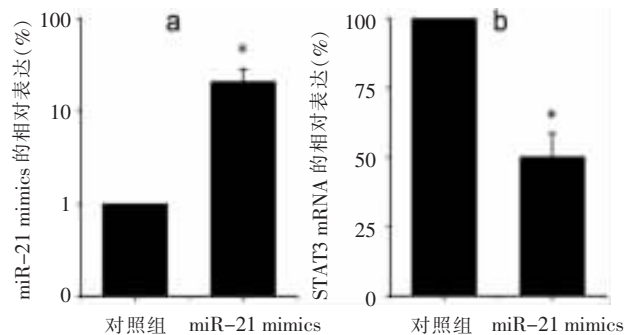


图 3 转染后 miR-21 和 STAT3 mRNA 的相对表达

2.5 Western blot 检测 STAT3 蛋白的表达水平 Western blot 检测结果显示,miR-21 mimics 组 STAT3 蛋白相对表达量(0.46±0.11)较对照组(0.83±0.17)明显降低,且差异具有统计学意义($t=2.269, P<0.05$), 见图 4。表明过表达 miR-21 能够降低 STAT3 蛋白的表达, 结合荧光素酶报告系统以及 qRT-PCR 检测结果, 表明 miR-21 能够靶向作用 STAT3 3'UTR 负性调控 STAT3 基因表达。

2.6 Transwell 小室检测 miR-21 抑制 MCF-7 细胞的侵袭结果 Transwell 小室检测 MCF-7 细胞的体外侵袭能力, 发现转染组(mimics)的穿膜细胞数(19.27±6.54)较空白对照组(85.46±10.35)明显降低,差异有统计学意义($t=4.095, P<0.05$),见图 5。

3 讨论

研究发现在非哺乳期 STAT3 能够促进乳腺的

表 2 miR-21 与 STAT3 基因靶向配对关系

组别	miRanda	TargetScan
hsa-miR-21	3'aguugUAGUCA-G-ACUAUUCGau5'	3'AGUUGUAGUCAGAC--UAUUCGAU5'
STAT3 1930	5'cacuCUUCAGUACAUAUAAGCUu3'	5'ACUCUUCAGUACAUAUAAGCUU3'

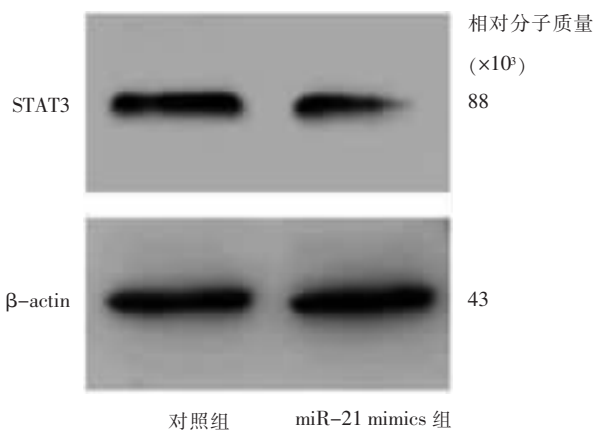


图4 转染后 STAT3 蛋白的表达

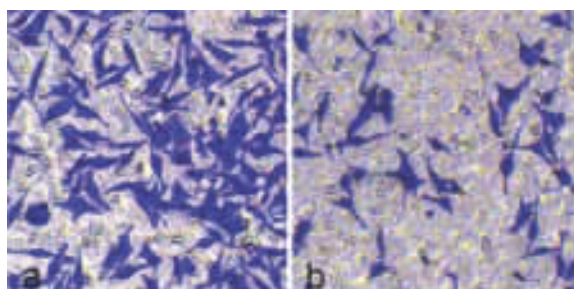


图5 Transwell 检测 MCF-7 细胞的侵袭力

注:a 为对照组;b 为 miR-21 mimics 组

退化^[6],但在癌症中 STAT3 的激活具有致癌性^[7]。STAT3 基因定位于人类第 12 号染色体上,生理状态下 STAT3 蛋白的激活是快速而短暂的,有利于维持细胞正常的生理功能,而持续性的激活可参与诱导细胞增殖、分化以及凋亡,其下游基因伴随异常高表达,致使癌症产生,该途径在乳腺癌中尤为突出^[8-10]。大约 70% 的乳腺癌中都有 STAT3 的激活,并且发生在各级乳腺癌尤其是缺乏雌激素受体或孕激素受体表达的三阴性乳腺癌^[11]。在乳腺癌中,STAT3 主要由白介素-6(interleukin, IL-6)所激活,许多乳腺癌细胞系能够产生 IL-6,其通过 IL-6 受体和 JAK 激酶信号通路以自分泌的方式激活 STAT3,进而上调增殖、侵袭和凋亡抑制基因的表达,促进癌细胞的上皮间质转化,改变细胞的形态以及运动潜能,对癌细胞的生物学行为有重要影响^[12-14]。此外,除了通过酪氨酸磷酸化激活 STAT3 之外,STAT3 也能够通过羧基末端的丝氨酸残基被磷酸化而激活,大约 60% 乳腺癌 STAT3 的激活都是丝氨酸磷酸化,并与雌激素受体阴性的肿瘤相关联。最近有研究^[15]发现丝氨酸磷酸化的 STAT3 可在癌细胞的线粒体中找到,通过对线粒体功能的影响促进癌细胞的存活。

本文研究发现,光镜下可见人乳腺癌 MCF-7 细胞成片生长,有突起;细胞免疫荧光检查结果显示,

胞质内有 STAT3 蛋白的表达,显示红色荧光;qRT-PCR 和 Western blot 检测结果均表明,乳腺癌 MCF-7 细胞内有 STAT3 mRNA 和蛋白的高表达,提示 STAT3 基因与乳腺癌关系密切,或可作为其临床诊断指标之一。

miRNA 已被证实与乳腺癌密切相关,在癌症的发生发展中起重要作用^[16]。Wang 等^[17]研究发现,在乳腺癌细胞中 miR-204 能够靶向调控 JAK2 基因的表达,并能够通过 STAT3/Bcl-2/survivin 信号转导通路诱导癌细胞凋亡。本文研究运用生物信息学方法对 miR-21 和 STAT3 基因的靶向配对关系进行预测,发现二者配对关系良好,采用荧光素酶报告系统鉴定发现 miR-21 能够抑制 STAT3 mRNA 表达;脂质体 2000 转染 miR-21 mimics 后,qRT-PCR 和 Western blot 检测结果均表明,过表达 miR-21 能够降低 STAT3 mRNA 和蛋白的表达。Transwell 小室检测结果发现过表达 miR-21 能够抑制 MCF-7 细胞的侵袭能力,提示 miR-21 通过靶向作用于 STAT3 基因能够抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的侵袭。由此可以得出,miR-21 通过负性调控人乳腺癌 MCF-7 细胞中 STAT3 基因的表达,进而抑制癌细胞的侵袭。上述研究结果与 Dong 等^[18]的研究中 miR-21 能够促进癌细胞转移的结论相反,可能与实验对象、条件、环境、操作者等因素都会对结果产生一定影响有关,具体原因有待进一步研究。

综上所述,miR-21 能够通过负性调控人乳腺癌 MCF-7 细胞中 STAT3 基因的表达,进而抑制癌细胞的侵袭。本文研究为深入探讨乳腺癌的发生、发展机制及其新的治疗途径奠定了一定的基础。

4 参考文献

- 1 Nie XH, Ou-Yang J, Xing Y, et al. Paeniflorin inhibits human glioma cells via STAT3 degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 5611-5622.
- 2 Hayashi S, Fujishiro T, Hashimoto S, et al. p21 deficiency is susceptible to osteoarthritis through STAT3 phosphorylation. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17: 314.
- 3 Sapio L, Sorvillo L, Illiano M, et al. Inorganic phosphate prevents erk1/2 and Stat3 activation and improves sensitivity to doxorubicin of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Molecules*, 2015, 20: 15910-15928.
- 4 Wei G, Mingliang Z, Yong C, et al. Expression of signal transducer and activator of transcription 3 in breast cancer and its clinical significance. *J Cancer Res Ther*, 2015, 11: c56-c58.
- 5 Chua JH, Armugam A, Jeyaseelan K. MicroRNAs: biogenesis, func-

- tion and applications. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11: 189-199.
- 6 Humphreys RC, Brier B, Zhao L, et al. Deletion of Stat3 blocks mammary gland involution and extends functional competence of the secretory epithelium in the absence of lactogenic stimuli. *Endocrinology*, 2002, 143: 3641-3650.
- 7 Burke WM, Jin X, Lin HJ, et al. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene*, 2001, 20: 7925-7934.
- 8 Zhang F, Wang Z, Yuan J, et al. RNAi-mediated silencing of Anxa2 inhibits breast cancer cell proliferation by downregulating cyclin D1 in STAT3-dependent pathway. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 153: 263-275.
- 9 Sonnenblick A, Brohée S, Fumagalli D, et al. Constitutive phosphorylated STAT3-associated gene signature is predictive for trastuzumab resistance in primary HER2-positive breast cancer. *BMC Med*, 2015, 13: 177.
- 10 Rodriguez-Barrueco R, Yu J, Saucedo-Cuevas LP, et al. Inhibition of the autocrine IL-6-JAK2-STAT3-calprotectin axis as targeted therapy for HR-/HER2+ breast cancers. *Genes Dev*, 2015, 29: 1631-1648.
- 11 Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+CD24-stem cell-like breast cancer cells in human tumors. *J Clin Invest*, 2011, 121: 2723-2735.
- 12 Sullivan NJ, Sasser AK, Axel AE, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*, 2009, 28: 2940-2947.
- 13 Yadav A, Kumar B, Datta J, et al. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAI1 signaling pathway. *Mol Cancer Res*, 2011, 9: 1658-1667.
- 14 Walker SR, Chaudhury M, Nelson EA, et al. Microtubule-targeted chemotherapeutic agents inhibit signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling. *Mol Pharmacol*, 2010, 78: 903-908.
- 15 Gough DJ, Corlett A, Schlessinger K, et al. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science*, 2009, 324: 1713-1716.
- 16 Deng X, Zhao Y, Wang B. miR-519d-mediated downregulation of STAT3 suppresses breast cancer progression. *Oncol Rep*, 2015, 34: 2188-2194.
- 17 Wang X, Qiu W, Zhang G, et al. MicroRNA-204 targets JAK2 in breast cancer and induces cell apoptosis through the STAT3/Bcl-2/survivin pathway. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8: 5017-5025.
- 18 Dong G, Liang X, Wang D, et al. High expression of miR-21 in triple-negative breast cancers was correlated with a poor prognosis and promoted tumor cell in vitro proliferation. *Med Oncol*, 2014, 31: 57.

(收稿日期: 2016-01-23)

(本文编辑: 陈淑莲)

消 息

致谢

《实用检验医师杂志》编辑部全体工作人员衷心感谢以下编委/专家对本刊出版的大力支持! (姓名以拼音为序)

陈小岩 段 荣 冯笑梅 符生苗 郭微媛 胡成进 胡晓波
 贾克刚 焦连亭 孔鹏洲 李会强 李连青 李玉军 梁国威
 刘 勇 路名芝 吕 元 孟冬娅 穆 红 宋秀宇 唐爱国
 魏殿军 魏路清 夏时海 张会英 张时民 赵克斌 周 欣
 邹学森