

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.038

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.038

miR-580对乳腺癌细胞系中 Twist1的调节作用

孟庆威¹, 孙嘉¹, 纪春连¹, 席玉慧²

(1. 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内四科, 哈尔滨 150081; 2. 哈尔滨医科大学病理生理教研室, 哈尔滨 150081)

[摘要] **目的:** 探讨miR-580在MCF-10A细胞系中对Twist1的调节。**方法:** 本实验利用生物信息学方法预测Twist1的靶miRNA是miR-580。首先, 采用qPCR法检测在MCF-10A系列细胞系中Twist1及miR-580的表达。然后, 在MCF-10A细胞系中分别转染miR-580类似物和miR-580抑制物后, 利用RT-PCR、Western blot、*t*检验分析Twist1的表达及细胞迁移能力的变化。最后利用荧光素酶实验验证miR-580通过结合在Twist1的3'UTR调节其表达。**结果:** 1)在MCF-10A细胞系中Twist1与miR-580的表达呈负相关; 2)在MCF-10A细胞系中转染miR-580类似物后, Twist1的表达下调; 在MCF-10A细胞系中转染miR-580抑制物后Twist1的表达上调; 3)在MCF-10A细胞系中引入miR-580类似物后细胞迁移能力降低; 4)miR-580直接结合在Twist1的3'UTR。**结论:** miRNA-580在MCF-10A细胞系中通过结合在Twist1的3'UTR负向调节Twist1的表达从而克制细胞的迁移。

[关键词] 乳腺癌; Twist1 蛋白; miR-580; 细胞迁移

Twist1 regulation by miR-580 in breast cancer cell lines

MENG Qingwei¹, SUN Jia¹, JI Chunlian¹, XI Yuhui²

(1. Forth Department of Medicine Oncology, Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150081; 2. Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin 150081, China)

Abstract **Objective:** To explore the role of miR-580 in regulating Twist1 expression in MCF-10A cell line. **Methods:** By bioinformatics, we postulated that miR-580 is one of the regulators of Twist1. First, qPCR was used to evaluate the expression of Twist1 and miR-580 in MCF-10A series cell lines. Then, we transfected miR-580 analogs and inhibitors into the MCF-10A cells, respectively, the expression of Twist1 and the cell migration were detected by using RT-PCR, western blot and student's *t*-test. Finally, by using luciferase experiments to verify the miR-580 can regulate the expression of Twist1 by binding to its 3'UTR. **Results:** 1) The expression of Twist1 is negatively correlated with miR-580 in MCF-10A cell lines; 2) transfected miR-580 analogues into MCF-10A cells can down-regulate the expression of Twist1, whereas transfected with miR-580 inhibitor can upregulate the expression of Twist1; 3) introduction of miR-580 analogues reduces cell migration in MCF-10A cell line; 4) miR-580 directly binds to Twist1 3'UTR. **Conclusion:** miRNA-580 regulates the expression of Twist1 and migration by binding to its 3'UTR in MCF-10A cell line.

Keywords Breast cancer; Twist1; miR-580; cell migration

收稿日期 (Date of reception): 2015-04-07

通信作者 (Corresponding author): 孟庆威, Email: mqwei@ems.hrbmu.edu.cn

基金项目 (Foundation item): 黑龙江省教育厅面上项目 (12521236)。This work was supported by Research Project of Heilongjiang Provincial Department of Education (12521236), P. R. China.

乳腺癌在世界范围内居女性恶性肿瘤发病之首。在我国城乡地区女性乳腺癌发病率均呈逐年升高趋势。研究表明上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤进展中的一个重要过程, 具有碱性螺旋-环-螺旋结构的Twist1是EMT过程中的重要调控因子, 对肿瘤的侵袭和转移有重要影响。Twist1蛋白是一个高度保守的转录因子, 在胚胎生长发育阶段诱导细胞迁移的调控过程中发挥重要作用。Twist1被证实参与了乳腺癌的发生及EMT过程, 但其调节机制还待证明。本实验通过对miR-580的干扰, 证实了在乳腺癌的发生发展过程中, miR-580通过直接结合在Twist1的3'UTR来负向调节Twist1的表达, 同时影响细胞的迁移。

1 材料与方 法

1.1 材 料

MCF-10A系列细胞系获赠于芭芭拉-安肿瘤中心(美国)。miR-580类似物(PM11647: UUGAGAAUGAUGAAUCAUAGG)及miR-580抑制剂(AM11647)购自于Applied生物公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

MCF-10A系列细胞系采用DMEM/F12培养液培养, 培养液中含有5%马血清、1 mM丙酮酸钠、100 μ g/mL链霉素、100 U/mL青霉素、10 μ g/mL胰岛素、20 ng/mL EGF、200 ng/mL氢化可的松和100 ng/mL霍乱毒素。细胞置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中恒湿培养。

1.2.2 生物信息学方法分析 miR-580 与 Twist1 的结合位点

通过生物信息学网站miRBase(<http://www.mirbase.org/>)及targetscan(<http://www.targetscan.org/>)联合预测miR-580与Twist1的结合位点。

1.2.3 细胞总RNA提取及qPCR(分别以GAPDH, U6基因为内参)

按照Trizol提取试剂盒提取总RNA, 经分光光度计定量后, 取2 μ g总RNA逆转录成cDNA后行PCR反应。将产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统扫描结果用Photoshop软件进行条带灰度分析, 分别计算与内参的灰度值比。

Twist1 forward(5'AGCTGAGCAAGATTCAGACCCT

CA3'), Twist1 reverse(5'CTGCAGCTTGCCATCTTGGA GT3')。

内参的GAPDH引物: GAPDH forward (5'GGACCTGCCGTCTAGAA3'), GAPDH reverse(5'GG TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG3')。

1.2.4 Western blot

用细胞裂解液裂解细胞, 提取其总蛋白, 在12%聚丙烯酰胺凝胶中电泳。将蛋白转膜至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭后, 分别加入Twist1(1:200)、 β -actin(1:2000)一抗(均购自Santa Cruz公司), 37 $^{\circ}$ C孵育2 h; TBST漂洗后与山羊抗兔IgG抗体反应, 37 $^{\circ}$ C孵育2 h; TBST漂洗, 10 min/次, 洗涤3次; 加入发光液后显影、定影、拍照。

1.2.5 荧光素酶实验

利用双荧光素酶报告分析系统(Promega)进行荧光素酶检测试验, 转染48 h后收获细胞, 弃去培养细胞的培养液, PBS洗细胞2~3次, 完全吸净PBS, 每孔中加入100 μ L 1 \times PLB被动裂解缓冲液, 放置在摇床上室温摇15 min后将裂解液吸入EP管, 12 000 rpm离心5 min, 吸取上清进行检测。在荧光化学发光微孔板检测仪中放入专用96孔板, 选择检测区域, 每孔加入100 μ L双荧光素酶报告基因试剂盒中Luciferase Assay Buffer II及20 μ L细胞裂解液, 混匀后30 s内进行检测, 得出萤火虫荧光素酶活性, 再加入100 μ L Stop&Glo缓冲液, Stop&Glo试剂可即刻淬灭萤火虫荧光并同时激发水母荧光, 检测得到水母荧光素酶活性。所得数值为水母荧光素酶活性与萤火虫荧光素酶活性的比值。

1.2.6 细胞迁移分析

Transwell迁移实验: 迁移实验采用无Matrigel胶的有孔小皿(孔径为8 μ m)(购自BD公司, 美国)。后放置于24孔板上, 含有细胞数 2.5×10^4 的无血清RPMI 1640培养基共500 μ L加入上室, 下室加入含10% FBS的RPMI 1650培养基750 μ L。待处理的药物加入上室。置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育24 h。24 h后弃去上室培养基, 棉签擦拭膜胶, 祛除未侵袭穿过膜胶的肿瘤细胞, 下室用多聚甲醛固定后结晶紫染色。选取5个视野并在40倍镜下计数。

1.2.7 统计学处理

两组或多组数据间的比较采用 t 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。统计分析采用软件SPSS 17.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)。

2 结果

2.1 在 MCF-10A 系列细胞系中 Twist1 与 miR-580 的表达情况

MCF-10A 系列细胞系代表了肿瘤发生发展的不同阶段(图1A)。我们看到 Twist1 mRNA 在细胞系中的表达随着恶性转化而减低: A10>NeoT>CA1a(78%; 35%; 5%); 在向EMT的过程中再次获得 Twist1 的表达(图1B-C)。我们通过 Target Scan 预测了可能结合于 Twist1 mRNA 3'UTR 的 miRNA, 并检测了各种 miRNA 的表达情况。发现 miR-580 的表达与 Twist1 的表达量呈负相关: CA1a>NeoT>A10(图1D)。

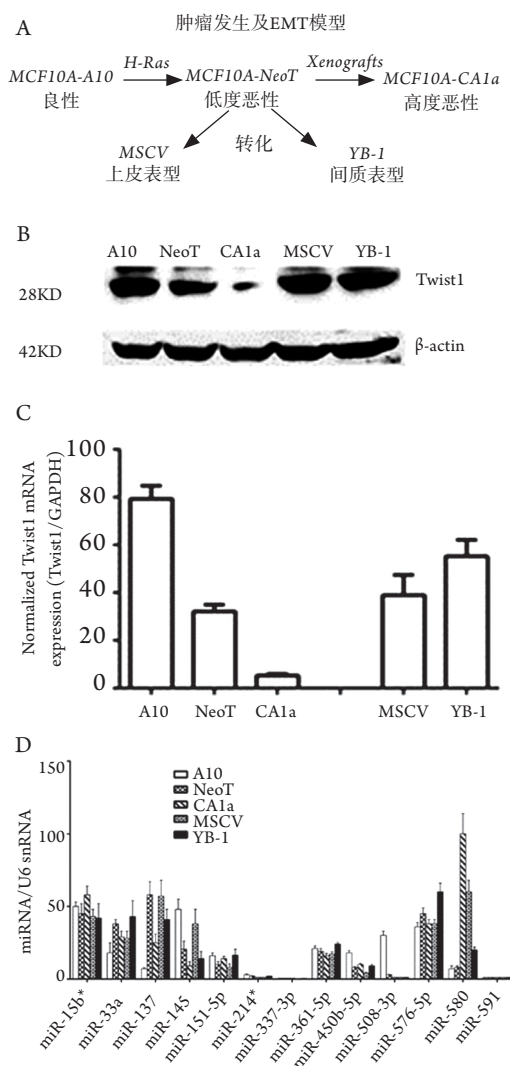


图1 Twist1及miRNA在MCF-10A系列乳腺癌细胞系中的表达

Figure 1 Twist1 and miRNA expression pattern in MCF-10A-derived breast cancer cell lines

2.2 miR-580 对 Twist1 的表达负向调节

利用 RT-PCR 检测 Twist1 mRNA 的表达。在 MCF-10A 细胞系中转染 miR-580 类似物后, Twist1 的表达下调; 在 MCF-10A 细胞系中转染 miR-580 抑制物后, Twist1 的表达上调(图2)。

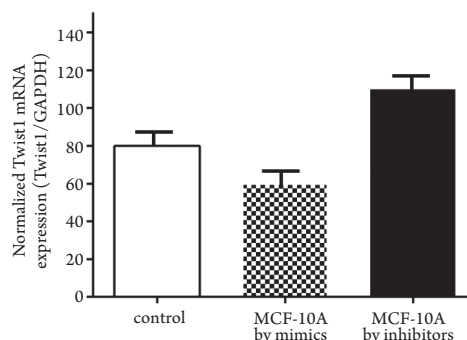


图2 miR-580可抑制Twist1表达

Figure 2 miR-580 inhibits Twist1 expression

2.3 miR-580 对细胞迁移能力的影响

Transwell 迁移实验显示与对照组相比, 在 MCF-10A 细胞系中引入 miR-580 后细胞迁移能力明显降低。在 MCF-10A 细胞系中干扰 Twist1 后, 细胞迁移能力下降(图3A-B)。

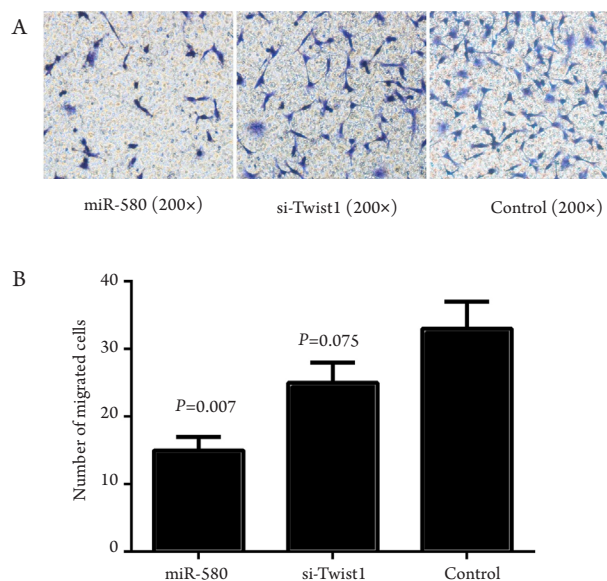


图3 miR-580对乳腺癌细胞系MCF-10A迁移的影响

Figure 3 miR-580 inhibits migration of MCF-10A cell line

2.4 miR-580 调节 Twist1 表达的机制

Twist1 的 3'UTR 报告质粒和 miR-580 共转染 MCF-10A 细胞系, 实验组较对照组相对荧光素酶

活性明显降低($P=0.037$), 表明miR-580与Twist1的3'UTR具有直接的相互作用(图4)。

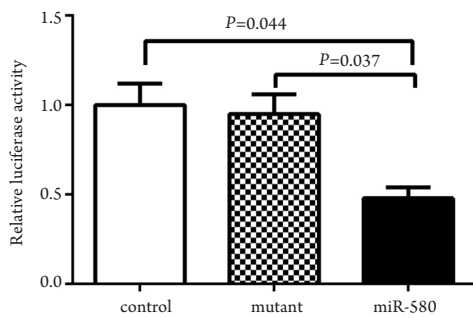


图4 荧光素酶实验证实miR-580对twist1的直接调节作用

Figure 4 Direct regulation of twist1 expression by miR-580 tested by luciferase test

3 讨论

Twist基因是胚胎生长发育阶段诱导细胞迁移过程中起关键调控作用的转录因子。Twist家族主要包括Twist1和Twist2两种基因。最近的研究^[1]显示, Twist1是一种癌基因蛋白, 能够抑制肿瘤细胞凋亡, 参与肿瘤细胞周期的调控, 并通过调节肿瘤细胞EMT等参与恶性肿瘤的发生, 对肿瘤侵袭、转移及耐药都有重要影响^[2-9]。Cho等^[10-11]发现, Twist1表达的上调能促进前列腺癌细胞的侵袭。有研究表明在肝癌^[12]、甲状腺癌^[13]、乳腺癌^[14-15]、食管癌^[16]、胃癌^[17]、结肠癌^[18]等多种肿瘤中Twist1表达都是上调的。Twist1调节机制包含转录水平及转录后水平^[19]。近来, 研究较多的是microRNA介导的转录后调节^[20]。microRNAs是一类微小非编码的单链RNA, 全长18~25 bp, 由基因组转录出具有茎环结构的转录前体再加工而成, 其主要表现在转录后水平对靶基因的表达进行调控^[21]。本实验通过在MCF-10A系列细胞系研究miR-580通过直接结合在Twist1的3'UTR来负向调节Twist1的表达降低细胞的迁移能力。特别是在肿瘤形成的早期, Twist1被下调; 而在转移能力强的细胞系YB-1中, Twist1再次被上调。这也印证了Twist1在EMT中可能发挥着重要的作用。

总之, 本研究为肿瘤转移治疗提供了新的研究方向, miR-580可能是一个潜在的抑制肿瘤转移的药物基础。

参考文献

1. Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, et al. Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(17): 2207-2217.
2. 陶菲, 罗招阳. EMT与肿瘤[J]. *医药前沿*, 2012, 2(30): 111-112.
TAO Fei, LUO Zhaoyang. EMT and cancer[J]. *The Frontier of Medicine*, 2012, 2(30): 111-112.
3. 张可华, 宋建国. EMT与肿瘤[J]. *生命的化学*, 2008, 28(5): 523-526.
ZHANG Kehua, SONG Jianguo. EMT and cancer[J]. *Chemistry of Life*, 2008, 28(5): 523-526.
4. 张飞, 史玉荣, 张霖, 等. 乳腺癌多药耐药细胞MCF-7/ADR中Twist的表达与EMT现象的实验研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(7): 361-365.
ZHANG Fei, SHI Yurong, ZHANG Lin, et al. The expression of Twist1 and EMT in multidrug resistance of breast cancer[J]. *Chinese Clinical Cancer*, 2007, 34(7): 361-365.
5. 郑月娥, 李里香. EMT诱导因子的最新研究进展[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2013, 29(3): 321-324.
ZHENG Yuee, LI Lixiang. The progress of EMT inducible factor[J]. *Clinical and Experimental Pathologic Journal*, 2013, 29(3): 321-324.
6. 王凤琴. Twist、E-cadherin在乳腺良恶性病变中的表达与EMT的关系及其意义[J]. *医学临床研究*, 2011, 28(10): 1864-1867.
WANG Fengqin. Twist1 and E-cadherin in breast benign and malignant disease and their relationship with EMT[J]. *Clinical Research of Medicine*, 2011, 28(10): 1864-1867.
7. 杨育才, 王朝霞. MicroRNA与肿瘤上皮-间质转化关系的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(7): 1635-1639.
YANG Yucai, WANG Zhaoxia. The progress of study on the relationship between miRNA and EMT in cancer[J]. *Modern Tumor Medicine*, 2013, 21(7): 1635-1639.
8. Laursen KB, Mielke E, Iannaccone P, et al. Mechanism of transcriptional activation by the proto-oncogene Twist1[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(48): 34623-34633.
9. Eckert MA, Lwin TM, Chang AT, et al. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(3): 372-386.
10. Cho KH, Jeong KJ, Shin SC, et al. STAT3 mediates TGF-beta1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion[J]. *Cancer Lett*, 2013, 336(1): 167-173.
11. Alexander NR, Tran NL, Rekapally H, et al. N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(7): 3365-3369.
12. Sun T, Zhao N, Zhao XL, et al. Expression and functional significance

- of Twist1 in hepatocellular carcinoma: its role in vasculogenic mimicry[J]. *Hepatology*, 2010, 51(2): 545-556.
13. Buehler D, Hardin H, Shan W, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition regulators SNAI2 and TWIST1 in thyroid carcinomas[J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(1): 54-61.
 14. Gort EH, Suijkerbuijk KP, Roothaan SM, et al. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of TWIST1 in breast cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008, 17(12): 3325-3330.
 15. Hong J, Zhou J, Fu J, et al. Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(11): 3980-3990.
 16. Lee KW, Lee NK, Kim JH, et al. Twist1 causes the transcriptional repression of claudin-4 with prognostic significance in esophageal cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 423(3): 454-460.
 17. Sung CO, Lee KW, Han S, et al. Twist1 is up-regulated in gastric cancer-associated fibroblasts with poor clinical outcomes[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(4): 1827-1838.
 18. Gomez I, Pena C, Herrera M, et al. TWIST1 is expressed in colorectal carcinomas and predicts patient survival[J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18023.
 19. Nairismagi ML, Fuchtbauer A, Labouriau R, et al. The proto-oncogene TWIST1 is regulated by microRNAs[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e66070.
 20. Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, et al. Experimental validation of miRNA targets[J]. *Methods*, 2008, 44(1): 47-54.
 21. Hagan JP, Croce CM. MicroRNAs in carcinogenesis[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2007, 118(2-4): 252-259.

本文引用: 孟庆威, 孙嘉, 纪春连, 席玉慧. miR-580 对乳腺癌细胞系中 Twist1 的调节作用[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(6): 1065-1069. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.038

Cite this article as: MENG Qingwei, SUN Jia, JI Chunlian, XI Yuhui. Twist1 regulation by miR-580 in breast cancer cell lines[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2015, 35(6): 1065-1069. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2015.06.038