

· 论著 ·

微 RNA-3178 和三羟异黄酮对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 化疗敏感性的影响

陶静¹ 陈列² 孔鹏² 周文斌² 潘红² 王水²

【摘要】 目的 探讨微 RNA(miRNA)-3178 和三羟异黄酮(genistein, Gen)在三阴性乳腺癌化疗敏感性中的作用。**方法** (1)分别用不同浓度的单药多柔比星(DOX, 0.125、0.250、0.500 $\mu\text{mol/L}$)、紫杉醇(PTX, 0.20、0.40、0.80 $\mu\text{mol/L}$)或联合 Gen(2.5 $\mu\text{mol/L}$)处理 MDA-MB-231 细胞后,用 MTT 法检测细胞生长情况,并计算药物的 IC_{50} ; (2)采用小分子干扰 RNA(siRNA)干扰技术,将 miRNA-3178 小干扰片段瞬时转染 MDA-MB-231 细胞(miRNA-3178 siRNA 组),以转染无义 siRNA 的细胞作为阴性对照组,再用 real-time PCR 法检测干扰结果,并分别用不同浓度 DOX 或 PTX 处理 miRNA-3178 siRNA 组及阴性对照组细胞,检测 2 组细胞间化疗药物敏感性的差异; (3)分别用 0.250 $\mu\text{mol/L}$ DOX、0.40 $\mu\text{mol/L}$ PTX 及 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 处理 MDA-MB-231 细胞,再用 real-time PCR 法检测所有处理组与未处理组细胞 miRNA-3178 表达量的差异。2 组细胞间生长抑制率及 miRNA-3178 表达量的比较采用 t 检验,多组细胞间 miRNA-3178 表达量的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。**结果** (1)MTT 结果显示:用 0.125、0.250、0.500 $\mu\text{mol/L}$ DOX 单药处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,细胞生长抑制率分别为 16.7% \pm 0.4%、25.9% \pm 0.1% 及 44.9% \pm 0.1%,联合 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 处理后细胞生长抑制率均显著增加,分别为 29.8% \pm 0.3%、45.3% \pm 0.4% 及 68.5% \pm 0.4%,组间比较,差异均有统计学意义($t=38.12$ 、61.57、82.70, P 均 <0.001);用 0.20、0.40、0.80 $\mu\text{mol/L}$ PTX 单药处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,细胞生长抑制率分别为 15.3% \pm 0.3%、27.9% \pm 0.5% 及 39.2% \pm 0.1%,联合 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 处理后细胞生长抑制率也显著增加,分别为 32.7% \pm 0.7%、48.3% \pm 0.1% 及 63.3% \pm 0.2%,组间比较,差异也均有统计学意义($t=34.41$ 、58.63、213.91, P 均 <0.001)。DOX 单独作用于细胞的 IC_{50} 为 1.230 $\mu\text{mol/L}$,联合 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 后, IC_{50} 降低为 0.440 $\mu\text{mol/L}$; PTX 单独作用于细胞的 IC_{50} 为 0.64 $\mu\text{mol/L}$,联合 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 后, IC_{50} 降低为 0.27 $\mu\text{mol/L}$ 。(2)在不同浓度 DOX(0.125、0.250、0.500 $\mu\text{mol/L}$)或 PTX(0.20、0.40、0.80 $\mu\text{mol/L}$)的作用下,miRNA-3178 siRNA 组 MDA-MB-231 细胞生长抑制率均明显低于其阴性对照组(转染无义 siRNA)(12.3% \pm 0.6% 比 16.7% \pm 0.4%、21.2% \pm 0.9% 比 25.9% \pm 0.1%、27.2% \pm 0.9% 比 44.9% \pm 0.1%, $t=8.99$ 、7.33、27.34, P 均 <0.050 ; 8.8% \pm 0.5% 比 15.3% \pm 0.3%、13.4% \pm 1.1% 比 27.9% \pm 0.5%、20.2% \pm 0.9% 比 39.2% \pm 0.1%, $t=16.80$ 、17.57、30.48, P 均 <0.001)。(3)所有处理组及未处理组细胞间 miRNA-3178 表达量的差异具有统计学意义($F=66.57$, $P<0.001$)。组间两两比较显示,与未处理组相比, DOX(0.250 $\mu\text{mol/L}$)及 PTX(0.40 $\mu\text{mol/L}$)处理组 MDA-MB-231 细胞 miRNA-3178 表达量无明显变化($P=0.611$ 、0.235),而 Gen(2.5 $\mu\text{mol/L}$)可显著增加 MDA-MB-231 细胞 miRNA-3178 的表达量(11.10 \pm 0.33 比 5.77 \pm 0.21, $P<0.010$)。**结论** Gen 和 miRNA-3178 可能增加三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 对 PTX 和 DOX 化疗的敏感性。

【关键词】 乳腺肿瘤; 微 RNA; 染料木黄酮; 多柔比星; 紫杉醇; 三阴性乳腺癌**【中图分类号】** R737.9 **【文献标志码】** A

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0807.2018.05.002

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81502286)

作者单位:210031 南京市浦口医院普外科¹;210029 南京医科大学第一附属医院乳腺外科²

陶静和陈列对本文有同等贡献,均为第一作者

通信作者:潘红,Email: pamghong@163.com

Effect of miRNA-3178 and genistein on chemosensitivity of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells

Tao Jing¹, Chen Lie², Kong Peng², Zhou Wenbin², Pan Hong², Wang Shui². ¹Department of General Surgery, Nanjing Pukou Hospital, Nanjing 210031, China; ²Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Tao Jing and Chen Lie contributed equally to the article.

Corresponding author: Pan Hong, Email: pamghong@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of miRNA-3178 and genistein on chemosensitivity of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** (1) MDA-MB-231 cells were treated by doxorubicin (0.125, 0.250, 0.500 $\mu\text{mol/L}$) and paclitaxel (0.20, 0.40, 0.80 $\mu\text{mol/L}$) alone or combined with genistein (2.5 $\mu\text{mol/L}$). MTT assay was performed to detect the cell growth. IC_{50} was also determined. (2) Using small interfering RNA (siRNA) technique, MDA-MB-231 cells were transfected with small interference fragment miRNA-3178 (miRNA-3178 siRNA group), and the cells transfected with nonsense siRNA served as negative control. The real-time PCR was used to detect the interference results. The miRNA-3178 siRNA group and negative control group were treated with different concentrations of doxorubicin or paclitaxel respectively to detect the chemosensitivity of cells between two groups. (3) MDA-MB-231 cells were treated with 0.250 μmol doxorubicin, 0.40 $\mu\text{mol/L}$ paclitaxel and 2.5 $\mu\text{mol/L}$ genistein, respectively, and the expression of miRNA-3178 in all treated and untreated groups was detected by real-time PCR. The t test was used to compare the growth inhibition rate of cells and miRNA-3178 expression between two groups. One-way analysis of variance was used to compare the expression of miRNA-3178 among multiple groups. The LSD method was used for pairwise comparison. **Results** (1) After being treated with 0.125, 0.250, 0.500 $\mu\text{mol/L}$ doxorubicin for 48 h, the growth inhibition rate of MDA-MB-231 cells was 16.7% \pm 0.4%, 25.9% \pm 0.1% and 44.9% \pm 0.1%, respectively. If combined with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ genistein, the growth inhibition rate was 29.8% \pm 0.3%, 45.3% \pm 0.4% and 68.5% \pm 0.4%, respectively, indicating a significant difference ($t = 38.12, 61.57, 82.70, P < 0.001$). After MDA-MB-231 cells were treated with 0.20, 0.40, 0.80 $\mu\text{mol/L}$ paclitaxel for 48 h, the growth inhibition rate was 15.3% \pm 0.3%, 27.9% \pm 0.5% and 39.2% \pm 0.1% respectively. If combined with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ genistein, the growth inhibition rate was 32.7% \pm 0.7%, 48.3% \pm 0.1% and 63.3% \pm 0.2%, respectively, indicating a significant difference ($t = 34.41, 58.63, 213.91, \text{all } P < 0.001$). The IC_{50} was 1.230 $\mu\text{mol/L}$ when MDA-MB-231 cells were treated with doxorubicin alone, and decreased to 0.440 $\mu\text{mol/L}$ if combined with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ genistein. The IC_{50} was 0.64 $\mu\text{mol/L}$ when MDA-MB-231 cells were treated with paclitaxel alone, and decreased to 0.27 $\mu\text{mol/L}$ if combined with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ genistein. (2) Under different concentrations of doxorubicin (0.125, 0.250, 0.500 $\mu\text{mol/L}$) or paclitaxel (0.20, 0.40, 0.80 $\mu\text{mol/L}$), the growth inhibition rate of MDA-MB-231 cells in miRNA-3178 siRNA group was significantly lower than that in negative control group (transfected with non-sense siRNA) (12.3% \pm 0.6% vs 16.7% \pm 0.4%, 21.2% \pm 0.9% vs 25.9% \pm 0.1%, 27.2% \pm 0.9% vs 44.9% \pm 0.1%, $t = 8.99, 7.33, 27.34, \text{all } P < 0.050$; 8.8% \pm 0.5% vs 15.3% \pm 0.3%, 13.4% \pm 1.1% vs 27.9% \pm 0.5%, 20.2% \pm 0.9% vs 39.2% \pm 0.1%, $t = 16.80, 17.57, 30.48, \text{all } P < 0.001$). (3) The difference in miRNA-3178 expression was statistically significant between treatment groups and untreated groups ($F = 66.57, P < 0.001$). The results of pairwise comparison showed that compared with untreated group, the expression of miRNA-3178 in MDA-MB-231 cells treated with 0.40 $\mu\text{mol/L}$ paclitaxel and 0.250 $\mu\text{mol/L}$ doxorubicin treatment group presented no significant difference ($P = 0.611, 0.235$), and the combination with 2.5 $\mu\text{mol/L}$ genistein significantly increased the expression of miRNA-3178 in MDA-MB-231 cells (11.10 \pm 0.33 vs 5.77 \pm 0.21, $P < 0.010$). **Conclusion** miRNA-3178 combined with genistein may increase the chemosensitivity of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells to paclitaxel and doxorubicin.

[Key words] Breast neoplasms; MicroRNAs; Genistein; Doxorubicin; Paclitaxel; Triple negative breast cancer

三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 占有类型乳腺癌的 15% ~ 20%^[1-2]。与其他类型乳腺癌相比, TNBC 预后最差^[3], 目前缺乏有

效的靶向治疗措施, 化疗是 TNBC 全身辅助治疗的重要手段^[4]。但 TNBC 是一类异质性极强的肿瘤, 化疗疗效存在明显的个体差异, 总体预后较差^[5]。

寻找新的联合治疗方案,提高 TNBC 的化疗疗效将是乳腺癌研究的重点和难点,而寻找新的化疗增敏剂是重要途径之一。

化疗增敏剂是能够增加肿瘤化疗药敏感性的药物,使化疗药能更大程度的提高疗效并减少不良反应,在恶性肿瘤的治疗中具有重要作用。天然植物的提取物受到越来越多的关注。三羟异黄酮(genistein, Gen)是一种重要的天然植物雌激素,是大豆异黄酮的主要成分,对人体几乎无不良反应^[6]。既往研究发现,Gen 可有效抑制乳腺癌细胞增殖、诱导细胞凋亡,并可促进乳腺癌细胞分化^[7-8]。然而,Gen 是否可提高 TNBC 对化疗药物的敏感性国内外研究报道甚少。既往国内外学者在前列腺癌、肾癌等研究中发现,Gen 可调节多种微 RNA(microRNA, miRNA)的表达水平,从而发挥一系列的生物学作用^[9],提示 miRNA 可能在 Gen 抗肿瘤作用中发挥重要的调节作用。

本实验选取人 TNBC 细胞 MDA-MB-231,通过体外研究 Gen 联合乳腺癌化疗药物多柔比星(doxorubicin, DOX)或紫杉醇(paclitaxel, PTX)对细胞生长的作用,初步探讨 Gen 及 miRNA-3178 是否可以对 TNBC 化疗敏感性产生影响。

材料与方法

一、主要材料和试剂

人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 购自美国 ATCC 公司;DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清、胰酶、青霉素-链霉素购自美国 Gibco 公司;反转录试剂盒、real-time PCR 试剂盒购自日本 TakaRa 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;引物购自上海英骏生物有限公司;Trizol、脂质体 2000(Lipofectamine 2000)购自美国 Invitrogen 公司。CO₂ 细胞培养箱为美国 Thermo Forma 公司产品;荧光定量 PCR 机 7300 为美国 ABI 公司产品;台式低温离心机为德国 Eppendorf 公司产品;AE-100 电子分析天平为瑞士 Mettler 公司产品。

二、细胞培养

将 MDA-MB-231 细胞加入含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,每 2~3 d 更换培养液。

三、研究设计

本研究拟通过化疗药物 DOX、PTX 及 Gen 体外单独或联合处理细胞,初步探讨 Gen 及 miRNA-3178 在 TNBC 细胞 MDA-MB-231 化疗敏感性中的作用。

实验步骤如下:(1)初步探讨 Gen 增加 MDA-MB-231 化疗敏感性的作用。实验分为不同浓度单药 DOX(0.125、0.250、0.500 μmol/L)处理组、单药 PTX(0.20、0.40、0.80 μmol/L)处理组及其分别联合 Gen(2.5 μmol/L)处理组,作用于 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞生长情况并计算药物的 IC₅₀。(2)运用细胞克隆形成实验验证 Gen 增加 MDA-MB-231 细胞化疗敏感性的作用。实验分为未处理组、Gen(2.5 μmol/L)处理组、DOX(0.250 μmol/L)处理组、PTX(0.40 μmol/L)处理组、Gen(2.5 μmol/L)+DOX(0.250 μmol/L)处理组及 Gen(2.5 μmol/L)+PTX(0.40 μmol/L)处理组,10 d 后检测细胞的克隆形成率。(3)初步探讨 miRNA-3178 在 TNBC 细胞 MDA-MB-231 化疗敏感性中的作用。采用小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)干扰技术,将 miRNA-3178 小干扰片段瞬时转染 MDA-MB-231 细胞(miRNA-3178 siRNA 组),以转染无义 siRNA 的 MDA-MB-231 细胞作为阴性对照组,用 real-time PCR 法检测干扰结果,然后,分别用不同浓度的 DOX、PTX 处理 miRNA-3178 siRNA 组与其阴性对照组细胞,检测 2 组细胞对化疗药物敏感性的差异。(4)检测 Gen、DOX 及 PTX 对 MDA-MB-231 细胞中 miRNA-3178 表达的影响。实验分为未处理组、DOX(0.250 μmol/L)处理组、PTX(0.40 μmol/L)处理组及 Gen(2.5 μmol/L)处理组,用 real-time PCR 法检测各组细胞中 miRNA-3178 表达量的差异。

本研究所选药物浓度均为加入培养液后的药物终浓度。

四、MTT 法检测药物处理后 MDA-MB-231 细胞增殖活性并计算药物 IC₅₀

将 MDA-MB-231 细胞以每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板,培养 24 h,分别用单药 DOX(0.125、0.250、0.500 μmol/L)、PTX(0.20、0.40、0.80 μmol/L)或联合 Gen(2.5 μmol/L)处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,采用 MTT 法检测细胞生长情况。通过 siRNA 干扰技术,将 miRNA-3178 小干扰片段瞬时转染 MDA-MB-231 细胞,下调其 miRNA-3178 表达,以转染无义 siRNA 为阴性对照组,分别用 DOX(0.125、0.250、0.500 μmol/L)或 PTX(0.20、0.40、0.80 μmol/L)处理 MDA-MB-231 细胞 48 h,同样用 MTT 法检测细胞生长情况。每组 3 个复孔,每孔加入 5 g/L MTT 20 μl,37 ℃ 避光孵育 4 h 后终止培养,小心吸尽培养液,每孔加入 150 μl 的 DMSO,避光至完全溶解后,用酶标仪在 490 nm 处检测每个孔

的吸光度值(D 值)。计算细胞生长抑制率及药物的半数抑制浓度(IC_{50})。细胞生长抑制率($\%$)= $[1-\text{实验组 } D(490 \text{ nm}) \text{ 值} / \text{对照组 } D(490 \text{ nm}) \text{ 值}] \times 100\%$;计算细胞生长抑制率时,根据不同浓度的药物与对应的细胞生长抑制率制作直线回归曲线,从而可计算出药物的 IC_{50} [10]。

五、细胞克隆形成实验检测处理后 MDA-MB-231 细胞增殖活性

将 MDA-MB-231 细胞以每孔 3×10^2 个接种于 6 孔板,轻轻转动使细胞分散均匀,细胞接种 24 h 后行药物干预。实验分为未处理组、Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 处理组及 Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组,将细胞置于培养箱中培养 10 d 后,弃去培养液,用 PBS 小心浸洗 2 次,加甲醇室温固定 15 min,弃去固定液,加适量吉姆萨染色液进行染色 20 min,用流水缓慢洗去染色液,置于空气中干燥后计数,检测接种细胞后贴壁细胞成活形成克隆的情况。实验重复 3 次。细胞克隆形成率($\%$) = 细胞克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

六、MDA-MB-231 细胞中 miRNA-3178 的干扰

将对数生长期 MDA-MB-231 细胞用胰酶消化并计数后接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 1×10^5 个,用无抗生素的 DMEM 培养基培养,24 h 后,细胞融合度达 50% 左右时应用 Lipofectamine 2000 进行转染,分别加入 miRNA-3178 抑制剂- Lipofectamine 2000 混合液,将 miRNA-3178 小干扰片段瞬时转染 MDA-MB-231 细胞(miRNA-3178 siRNA 组),以转染无义 siRNA 的细胞作为阴性对照组,混匀放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO_2 培养箱中培养 48 h。为避免 Lipofectamine 2000 对细胞的毒性作用,转染 6 h 后换成 DMEM 完全培养基。转染 48 h 后收集各组细胞,用 real-time PCR 法检测 miRNA-3178 的表达情况。每个样品设 3 个复孔,以 U6 作为内参,按以下方法计算细胞中 miRNA-3178 表达量及其抑制率:计算 CT (cycle threshold) 平均值,按照 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 值计算 miRNA-3178 siRNA 组的表达量;抑制率($\%$) = $(1 - \text{干扰组 miRNA-3178 表达量} / \text{阴性对照组 miRNA-3178 表达量}) \times 100\%$ 。

七、real-time PCR 检测 miRNA-3178 表达

收集药物作用后的各组细胞,用 Trizol 方法提取细胞总 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,用 PCR 试剂盒对 miRNA-3178 的 mRNA 水平进行检测。miRNA-3178 引物序列:正向 5'-

GGGGCGCGCCCGGATCG-3', 反向 5'-GCTGTCAACG ATACGCTACGTAACG-3';内参 U6 引物序列:正向 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。PCR 的扩增条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 1 个循环;变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 延伸 75 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 40 个循环。扩增过程及荧光信号检测、数据储存和分析均由美国 ABI 公司荧光定量 PCR 机 7300 完成。按以下方法计算细胞中 miRNA-3178 表达量:计算 CT 平均值,按照 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 值计算 miRNA-3178 的表达量。

八、统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件分析和 Graphpad Prism 6 作图。实验数据均为定量资料,数据表达用 $\bar{x} \pm s$ 表示。2 组间细胞生长抑制率及 miRNA-3178 表达量的比较采用 t 检验;多组间细胞克隆形成率及 miRNA-3178 表达量的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法。以 $P < 0.050$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、Gen 与 DOX 或 PTX 联合应用对 MDA-MB-231 细胞生长的影响

MTT 结果显示,用 0.125、0.250、0.500 $\mu\text{mol/L}$ DOX 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,细胞生长抑制率分别为 $16.7\% \pm 0.4\%$ 、 $25.9\% \pm 0.1\%$ 及 $44.9\% \pm 0.1\%$,联合 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 后细胞生长抑制率均显著增加,分别为 $29.8\% \pm 0.3\%$ 、 $45.3\% \pm 0.4\%$ 及 $68.5\% \pm 0.4\%$,组间比较,差异均有统计学意义($t = 38.12, 61.57, 82.70, P$ 均 < 0.001)。同样,Gen 与 PTX 联合应用,亦具有协同抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的作用。用 0.20、0.40、0.80 $\mu\text{mol/L}$ 单药 PTX 处理 MDA-MB-231 细胞 48 h 后,细胞生长抑制率分别为 $15.3\% \pm 0.3\%$ 、 $27.9\% \pm 0.5\%$ 及 $39.2\% \pm 0.1\%$,而联合 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 后细胞生长抑制率均显著增加,分别为 $32.7\% \pm 0.7\%$ 、 $48.3\% \pm 0.1\%$ 及 $63.3\% \pm 0.2\%$,组间比较,差异也均有统计学意义($t = 34.41, 58.63, 213.91, P$ 均 < 0.001)。此外,DOX 单独作用于细胞的 IC_{50} 为 1.230 $\mu\text{mol/L}$,联合 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 后, IC_{50} 降低为 0.440 $\mu\text{mol/L}$;PTX 单独作用于细胞的 IC_{50} 为 0.64 $\mu\text{mol/L}$,联合 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 后, IC_{50} 降低为 0.27 $\mu\text{mol/L}$ 。

二、Gen 与 DOX 或 PTX 联合应用对 MDA-MB-231 细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验结果显示,未处理组、Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) +

DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 处理组及 Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组 MDA-MB-231 细胞的克隆形成率分别为 $64.3\% \pm 4.2\%$ 、 $46.3\% \pm 3.3\%$ 、 $36.7\% \pm 2.4\%$ 、 $27.3\% \pm 4.1\%$ 、 $14.0\% \pm 2.9\%$ 和 $10.0\% \pm 1.6\%$, 6 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 80.81, P < 0.001$)。其中, Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 处理组细胞克隆形成率均显著低于单药 Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组和单药 DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 处理组 (P 均 < 0.001), 并且 Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组细胞克隆形成率也均显著低于单药 Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组和单药 PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组 (P 均 < 0.001) (图 1)。

三、下调细胞中 miRNA-3178 表达后, 化疗药物对 MDA-MB-231 细胞生长的抑制减弱

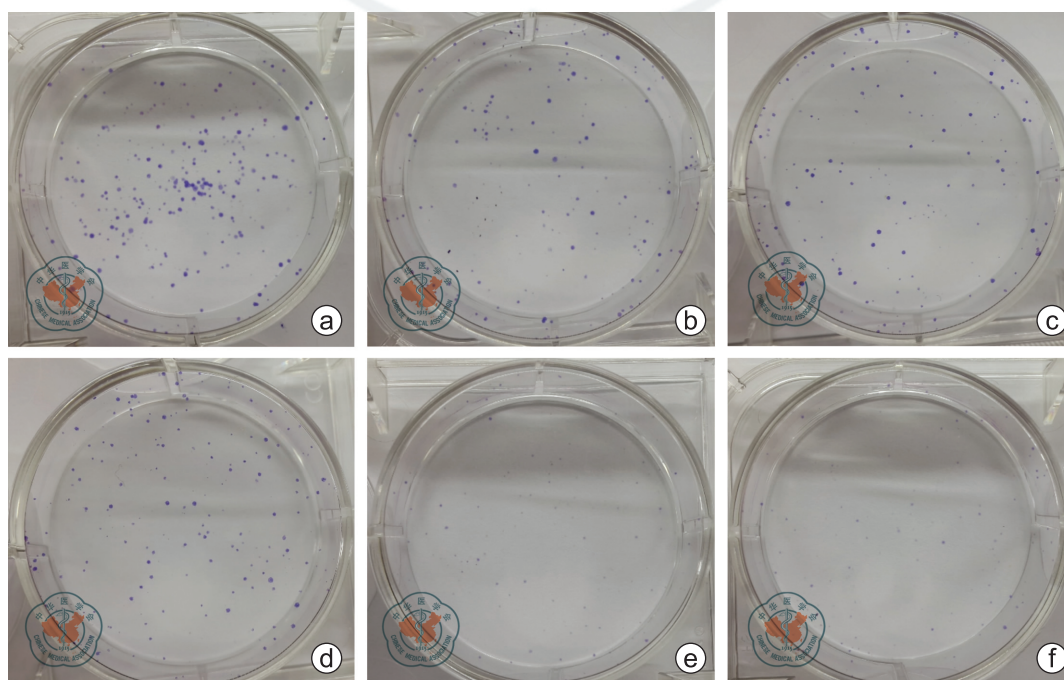
阴性对照组 (转染无义 siRNA) MDA-MB-231 细胞 miRNA-3178 表达量为 5.72 ± 0.59 , 而 miRNA-3178 siRNA 转染后 MDA-MB-231 细胞 miRNA-3178 表达量显著降低为 1.33 ± 0.35 , 2 组细胞比较, 差异有统计学意义 ($t = 11.05, P = 0.004$)。miRNA-3178 siRNA 对 miRNA-3178 的抑制率为 $76.1\% \pm 8.2\%$ 。

MTT 实验结果显示, 不同浓度 DOX (0.125、0.250、0.500 $\mu\text{mol/L}$) 对阴性对照组 MDA-MB-231 细胞生长的抑制率分别为 $16.7\% \pm 0.4\%$ 、 $25.9\% \pm 0.1\%$ 及 $44.9\% \pm 0.1\%$, 而对 miRNA-3178 siRNA 组

细胞生长的抑制作用均显著减弱, 抑制率分别为 $12.3\% \pm 0.6\%$ 、 $21.2\% \pm 0.9\%$ 及 $27.2\% \pm 0.9\%$, 组间比较, 差异均有统计学意义 ($t = 8.99, 7.33, 27.34, P = 0.001, 0.002, 0.001$) (图 2a)。同样, 不同浓度 PTX (0.20、0.40、0.80 $\mu\text{mol/L}$) 对 MDA-MB-231 细胞生长的抑制率分别为 $15.3\% \pm 0.3\%$ 、 $27.9\% \pm 0.5\%$ 及 $39.2\% \pm 0.1\%$, 而对 miRNA-3178 siRNA 组 MDA-MB-231 细胞生长的抑制作用均显著减弱, 抑制率分别为 $8.8\% \pm 0.5\%$ 、 $13.4\% \pm 1.1\%$ 及 $20.2\% \pm 0.9\%$, 组间比较, 差异也均有统计学意义 ($t = 16.80, 17.57, 30.48, P < 0.001$) (图 2b)。

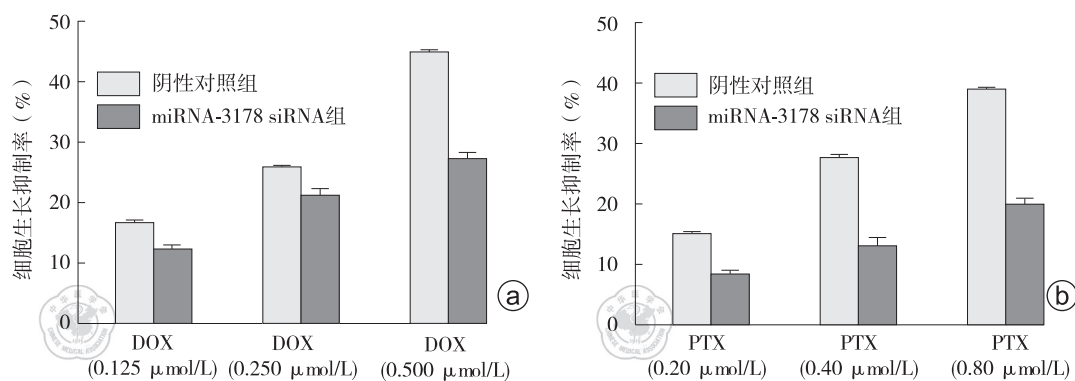
四、化疗药物及 Gen 对 MDA-MB-231 细胞 miRNA-3178 表达量的影响

分别用 Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$)、DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 及 PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 单药处理细胞 48 h 后, real-time PCR 检测发现: 所有处理组及未处理组细胞 miRNA-3178 表达量的差异有统计学意义 ($F = 66.57, P < 0.001$)。其中, DOX 处理组和 PTX 处理组细胞 miRNA-3178 表达量分别为 6.00 ± 0.49 和 6.33 ± 0.62 , 与未处理组细胞的 (5.77 ± 0.21) 相比, 差异均无统计学意义 ($P = 0.611, 0.235$); 用 Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 48 h 后, 同样用 real-time PCR 检测发现, Gen 可显著增加细胞中 miRNA-3178 的表达量 (11.10 ± 0.33) ($P < 0.010$, 图 3)。



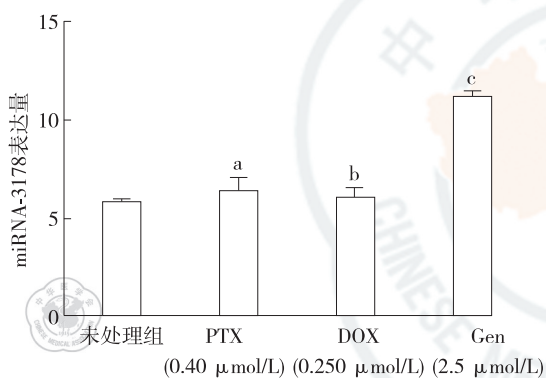
注: Gen 为三羟异黄酮; DOX 为多柔比星; PTX 为紫杉醇

图 1 Gen 可增强 DOX 和 PTX 抑制 MDA-MB-231 细胞克隆形成的能力 a~f 图分别为未处理组、PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理组、Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + DOX (0.250 $\mu\text{mol/L}$) 处理组和 Gen (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + PTX (0.40 $\mu\text{mol/L}$) 处理组的细胞克隆形成情况



注: a 图中各 miRNA-3178 siRNA 组与其阴性对照组(转染无义 siRNA)相比, $t = 8.99, 7.33, 27.34, P = 0.001, 0.002, 0.001$; b 图中各 miRNA-3178 siRNA 组与其阴性对照组(转染无义 siRNA)相比, $t = 16.80, 17.57, 30.48, P < 0.001$; DOX 为多柔比星; PTX 为紫杉醇

图 2 下调 MDA-MB-231 细胞 miRNA-3178 表达后, DOX 及 PTX 抑制细胞增殖的作用均减弱 a、b 图分别显示不同浓度 DOX 或 PTX 抑制细胞增殖的情况



注: ^a 与未处理组比较, $P = 0.611, 0.235$; ^c 与未处理组比较, $P < 0.010$; DOX 为多柔比星; PTX 为紫杉醇; Gen 为三羟异黄酮

图 3 单药 Gen、DOX 及 PTX 对 MDA-MB-231 细胞 miRNA-3178 表达量的影响

讨论

乳腺癌的发病率在世界范围内居于女性恶性肿瘤的首位^[11]。其中, TNBC 是指 ER、PR 及 HER-2 表达均为阴性的一类乳腺癌, 好发于年轻女性, 预后最差, 易复发转移, 5 年生存率低于 15%^[2-3]。如何提高 TNBC 化疗的敏感性, 改善患者的预后是临床亟待解决的难题。寻找新的联合治疗方案, 提高 TNBC 的化疗疗效将是乳腺癌研究的重点和难点, 而寻找新的化疗增敏剂是重要途径之一。

目前, 天然植物的提取物越来越受到学者们关注。与常规化疗药相比, 它不仅不良反应小, 而且可以靶向作用于多条信号通路^[12]。临床试验证实, 大豆异黄酮的摄入能够显著降低乳腺癌的复发风险及死亡风险^[13]。以往研究表明, Gen 能够抑制肿瘤细胞的细胞周期、诱导细胞凋亡并促进细胞分化^[7-8]。

笔者在前期研究工作中发现, Gen 同样可抑制 TNBC 细胞 MDA-MB-231 生长, 诱导其凋亡及阻滞细胞周期^[14]。然而, Gen 是否可提高 TNBC 对化疗药物的敏感性, 国内外研究报道甚少。本研究中, 笔者选取人 TNBC 细胞株 MDA-MB-231, 体外将 Gen 与 DOX 或紫杉醇联合应用, 结果显示低剂量 Gen (2.5 μmol/L) 即可显著增加 PTX 及 DOX 抑制 TNBC 细胞 MDA-MB-231 生长的作用, 并可降低药物的 IC₅₀, 增加药物的敏感性。据此推测, Gen 可能增加 TNBC 对 PTX 和 DOX 的化疗敏感性。然而, 其作用机制并未明确。

miRNA 是恶性肿瘤研究的一个热点^[15-16]。miRNA 是一类长约 21 ~ 23 个核苷酸的非编码单链小分子 RNA, 不编码蛋白质, 在基因转录后的调控中发挥着重要作用。miRNA 从 DNA 转录而来, 其通过与互补下游 mRNA 特异性结合, 从而抑制转录后基因翻译的过程^[17-19]。miRNA 就像调节基因表达的“总开关”, 一种 miRNA 分子可以调节数十甚至上百个下游靶基因的表达, 通过对多个靶基因及基因网络的调控, 参与多种生理、病理过程, 并且与肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[20-22]。近年来, 研究发现 miRNA 可能与肿瘤化疗的敏感性存在一定的相关性^[23-24]。随着这方面实验证据的不断积累, 使得 miRNA 的调控可能成为干预肿瘤化疗耐药的一个新手段。

本研究下调 MDA-MB-231 细胞中 miRNA-3178 的表达量后进行药物干预, 结果显示, PTX 及 DOX 对细胞的生长抑制作用显著减弱, 均呈现一定的耐药性, 进一步证实 miRNA-3178 参与了 TNBC 化疗耐药性的产生。

既往国内外学者在前列腺癌、肾癌等研究中发现, Gen 可调节多种 miRNA 的表达, 同时靶向作用于多个基因, 从而发挥一系列的生物学作用, 如细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移等^[9], 提示 miRNA 可能在 Gen 的作用中发挥重要的调节作用。据此笔者推测: Gen 可能通过调节特定的耐药相关 miRNA 的表达, 从而发挥增加 TNBC 对化疗药物敏感性的作用。本研究用 2.5 $\mu\text{mol/L}$ Gen 处理细胞 48 h 后, 用 real-time PCR 检测显示, miRNA-3178 表达量显著增加, 初步表明, Gen 及 miRNA-3178 可以增加 TNBC 细胞 MDA-MB-231 对 PTX 和 DOX 化疗的敏感性。

为进一步探讨 miRNA-3178 促进 TNBC 化疗敏感性的具体机制, 笔者采用多个生物信息学靶基因预测软件(TargetScan、miRanda 以及 PicTar) 预测了 miRNA-3178 的靶基因, 将每个软件预测到的靶基因进行 GO(gene ontology) 功能聚类分析, 并进行了生物学通路分析, 将报道可能与化疗敏感性有关的靶基因作为候选基因, 随后将所有软件的候选靶基因取交集。其中, Notch-1 被 3 款靶基因软件预测到, 可能为 miRNA-3178 的作用靶标。文献报道, Notch-1 高表达与乳腺癌预后差相关^[25]。笔者将在后续的研究中进一步探讨 Gen 是否通过影响 miRNA-3178 的表达, 进而调节 Notch-1 信号通路, 从而提高 TNBC 对化疗药的敏感性。

综上所述, 本研究初步显示了 Gen 及 miRNA-3178 在 TNBC 化疗中的潜在应用价值, 进一步的深入研究有望为 TNBC 的药物治疗提供新的思路, 开辟一条新的、有效的途径。

参 考 文 献

- [1] Albeck JG, Brugge JS. Uncovering a tumor suppressor for triple-negative breast cancers [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 638-640.
- [2] Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers [J]. *Nature*, 2012, 486(7403): 395-399.
- [3] Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(15 Pt 1): 4429-4434.
- [4] 梁璟慧, 吴毓东, 杨丽萍. 三阴性乳腺癌新辅助化疗的最新进展[J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2016, 9(4): 270-274.
- [5] Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(7): 1688-1698.
- [6] Wu AH, Yu MC, Tseng CC, et al. Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk [J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(1): 9-14.
- [7] Li Z, Li J, Mo B, et al. Genistein induces cell apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells via mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Toxicol in Vitro*, 2008, 22(7): 1749-1753.
- [8] Li Z, Li J, Mo B, et al. Genistein induces G2/M cell cycle arrest via stable activation of ERK1/2 pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2008, 24(5): 401-409.
- [9] Phuah NH, Nagoor NH. Regulation of microRNAs by natural agents: new strategies in cancer therapies [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 804 510.
- [10] 唐倩倩, 王云飞, 聂勇战, 等. 贝母素乙对 5 种肿瘤细胞的化疗增敏作用研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(34): 4796-4800.
- [11] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [12] Song J, Liu H, Li Z, et al. Cucurbitacin I inhibits cell migration and invasion and enhances chemosensitivity in colon cancer [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 1867-1871.
- [13] Nechuta SJ, Caan BJ, Chen WY, et al. Soy food intake after diagnosis of breast cancer and survival: an in-depth analysis of combined evidence from cohort studies of US and Chinese women [J]. *Am J Clin Nutr*, 2012, 96(1): 123-132.
- [14] Pan H, Zhou W, He W, et al. Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF-kappaB activity via the Notch-1 pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(2): 337-343.
- [15] Cheng CJ, Bahal R, Babar IA, et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment [J]. *Nature*, 2015, 518(7537): 107-110.
- [16] 韩晓翠, 左晓丽, 李敏, 等. 微 RNA221/222 在乳腺癌中的研究进展[J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2017, 11(6): 369-371.
- [17] Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. MicroRNAs and atherosclerosis: new actors for an old movie [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2012, 22(11): 937-943.
- [18] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [19] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [20] Schickel R, Boyerinas B, Park SM, et al. MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death [J]. *Oncogene*, 2008, 27(45): 5959-5974.
- [21] Chua JH, Armugam A, Jeyaseelan K. MicroRNAs: biogenesis, function and applications [J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11(2): 189-199.
- [22] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers [J]. *Nature*, 2005, 435(7043): 834-838.
- [23] Iorio MV, Casalini P, Tagliabue E, et al. MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(18): 2753-2759.
- [24] Shen YL, Jiang YG, Greenlee AR, et al. MicroRNA expression profiles and miR-10a target in anti-benzo[a] pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide-transformed human 16HBE cells [J]. *Biomed Environ Sci*, 2009, 22(1): 14-21.
- [25] Reedijk M, Odorcic S, Chang L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(18): 8530-8537.

(收稿日期: 2017-11-30)

陶静, 陈列, 孔鹏, 等. 微 RNA-3178 和三羟异黄酮对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 化疗敏感性的影响[J/CD]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2018, 12(5): 263-269.