

• 基础实验研究论著 •

人乳腺癌上皮细胞 miR-217 对 DNMT1 调控作用的研究^{*}

王璐璐¹, 刘萃萃², 郭 腾², 陶 然², 彭 攸², 赵卫卫², 王玉平², 孙振亮², 冯 景^{2△}

(1. 苏州大学医学院, 江苏苏州 215123; 2. 上海市奉贤区中心医院/上海交通大学附属第六人民医院检验科, 上海 201400)

摘 要:目的 验证在乳腺癌上皮细胞系中, miR-217 通过直接作用于 DNMT1 3'UTR 调控 DNMT1 表达, 为后期动物实验和临床试验提供实验基础。方法 利用瞬时转染技术, 在对应细胞系中, 过表达、抑制 miR-217, Western blot 检测各实验组中 DNMT1 蛋白表达, 并用含有 miR-217 野生型及突变型识别位点的 DNMT1 3'UTR 载体质粒分别转染 293T 细胞, 检测相对荧光素酶活性改变。结果 过表达 miR-217, DNMT1 表达下降; 抑制 miR-217, DNMT1 表达增高; 双荧光素酶检测实验, DNMT1-UTR-WT 的相对荧光素酶活性显著低于 DNMT1-UTR-MUT, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在乳腺癌上皮细胞系中, miR-217 对 DNMT1 表达具有调控作用, 且 miR-217 通过直接作用于 DNMT1 3'UTR 调控 DNMT1 表达。

关键词: miR-217; DNMT1 3'UTR; HBL-100; MCF-7; MDA-MB-231

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.008

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)24-3287-02

The research of the regulation of miR-217 to DNMT1 in breast cancer cells^{*}

Wang Lulu¹, Liu Cuicui², Guo Teng², Tao Ran², Peng You², Zhao Weiwei², Wang Yuping², Sun Zhenliang², Feng Jing^{2△}

(1. Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Fengxian District Central Hospital/Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 201400, China)

Abstract: **Objective** To validate whether miR-217 could directly regulate the expression of DNA DNA methyltransferase1 (DNMT1) by targeting on DNMT1 3' untranslated region(3'UTR) in breast cancer cells, and to lay the foundation for the further research of animal experiments and clinical trials. **Methods** The expression of miR-217 in human mammary epithelial cell lines of HBL-100, MCF-7 and MDA-MB-231 were detected by real-time polymerase chain reaction(RT-PCR). miR-217 mimics was transfected in the low expression of miR-217 cell line, and miR-217 inhibitor was transfected in the high expression of miR-217 cell line. The expression of DNMT1 protein in the transfected cells was analyzed by Western blot. The psiCHECK-2 reporter vectors containing 312-bp DNMT1 3'UTR with the wild-type(WT) and mutations(MUT) miR-217 recognizing sites were respectively transfected 293T cells and the relative luciferase activity was measured after 48 h. **Results** Upregulation of miR-217 expression in MDA-MB-231 cells(low expression of miR-217) could decrease the expression level of DNMT1 protein, the downregulation of miR-217 expression in HBL-100 cells(high expression of miR-217) could increase the expression level of DNMT1 protein. The results of dual-luciferase activity assay showed that the relative luciferase activity of DNMT1-UTR-WT was significantly lower than DNMT1-UTR-MUT($P < 0.05$). **Conclusion** In breast cancer cells, miR-217 could directly regulate the expression of DNMT1 by targeting on DNMT1 3'UTR.

Key words: miR-217; DNA methyltransferase1 3'untranslated region; HBL-100; MCF-7; MDA-MB-231

乳腺癌的发生、发展是一个多因素、多阶段的过程, 其中组蛋白甲基化及 DNA 甲基化等变化发挥了重要作用^[1-2]。人 DNMT1(DNA methyltransferase1)定位于 19p13.22p13.3, 是人体内最重要的甲基转移酶, 维系着新合成的 DNA 子链的甲基化^[3], 在肿瘤细胞中, 抑癌基因的高度甲基化、细胞的异常增殖分化等均与 DNMT1 活性增高有关。相关研究中曾利用经典分子生物学方法, 结合慢病毒 lenti-miRNAs 文库筛选出了包涵 miR-217 在内的 17 个靶向 EZH2 的 miRNAs, miRanda 软件预测得到 DNMT1 是 miR-217 的靶基因^[4]。本研究通过实时定量 PCR(RT-PCR)、Western blot 和双荧光素酶报告基因等一系列实验方法, 研究乳腺癌上皮细胞系中 miR-217 与 DNMT1 之间的作用机制, 为 miR-217 可能作为乳腺癌潜在治疗靶点的体外实验研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人正常乳腺上皮细胞系 HBL-100, 乳腺癌上皮细胞系 MCF-7、MDA-MB-231 及人胚肾细胞 293T 均购自上海中科院; 杭州吉诺生物医药技术有限公司的 DMEM 高糖培养液(GNM12800)、胰酶(GNM27250)、青-链霉素溶液(GNM15140)、胎牛血清(GIBCO 16000-044); TRIzol 试剂(北京鼎国生物 NEP019); 逆转录试剂盒(TaKaRa DRR037A); RT-PCR 仪(SLAN-96P); RT-PCR 用 2×Mix, Syber Green 染料、Mg²⁺(上海水源生物科技有限公司); DNMT1, 18 s、U6 引物(上海捷瑞生物工程有限公司合成); 5×蛋白裂解液(碧云天 P0013); 一抗 DNMT1(Promega bas-0586)、β-actin(碧云天 AA128); 二抗羊抗鼠(碧云天 A0216); 免疫印迹凝胶配置试剂(上海水源生物科技有限公司); 免疫印迹配胶、电泳、电转装置

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202104); 上海市自然科学基金面上项目(12ZR1426300); 上海市卫生系统优秀学科带头人培养计划资助项目(XBR2013114)。 作者简介: 王璐璐, 女, 研究生在读, 主要从事肿瘤的早期诊断研究。 △ 通讯作者, E-mail: fengjing8801530@163.com。

(Bio-Rad 165-8001);DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒(碧云天 P0203);转染试剂 Lipofecter(碧云天 C0516);miR-217 检测试剂盒 (GenePharma QPM-010)、miR-217 minics (GenePharma G04003)、miR-217 inhibitor (GenePharma G04003)、siRNA-mate (GenePharma G04003);psiCHECKTM-2 双荧光素酶载体 (Promega C802A);双荧光素酶检测试剂盒(Promega E1910)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR Trizol 法提取对数生长期的单层培养细胞总 RNA,用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA,进行 RT-PCR。DNMT1 引物序列:5'-AGC CGA GCG AGC CAG AGA TAG AGA-3'(上游),5'-TGT GGA GCC GGG GTT GTT CAG-3'(下游);扩增产物 179 bp。反应条件:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环。miR-217 引物序列:5'-TAC TCA ACT CAC TAC TGC ATC AGG A-3'(上游),5'-TAT GGT TGT TCT GCT CTC TGT GTC-3'(下游);扩增产物 84 bp。反应条件:95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃ 变性 12 s,60 ℃ 退火、延伸 20 s,共 40 个循环。PCR 总反应体系(30 μL):2×Mix 15 μL,引物(目的基因/内参基因)P3、P5 各 0.5 μL,SYBR Green 0.5 μL,Mg²⁺ 2 μL,cDNA 模板 2 μL,ddH₂O 9.5 μL。实验重复 2 次,由 PCR 反应曲线得到阈值循环数(Ct),以 18S 或 U6 作为内参照,计算基因相对表达量。

1.2.2 Western blot 将收集的细胞加入 100 μL 5×蛋白裂解液,摇床上冰浴裂解 15 min,再加 25 μL 蛋白 loading buffer 颠倒混匀,100 ℃ 干浴锅煮 10 min,室温冷却后,4 ℃ 保存待用。每泳道 20 μL 蛋白样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转硝酸纤维素(NC)膜,鼠抗人 DNMT1(1:300)过夜,二抗羊抗鼠(1:300)室温孵育 3 h,暗室中利用 DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒进行显色。以 β-肌动蛋白(β-actin)作为参照。蛋白表达定量由 Launch Sensian-sys 软件进行灰度分析获得。

1.2.3 miR-217 的靶基因预测 应用 DIANA-microT、miRanda、PicTar、Target Scans 软件共同预测 miR-217 的靶基因。

1.2.4 miR-217 过表达与抑制实验 细胞以 2×10⁵ 个/孔接种于 6 孔培养板中,将 10 nmol/L 的 miR-217 minics(实验组)及 miR-217 minics control(对照组)转染到低表达 miR-217 的 MDA-MB-231 细胞中。50 nmol/L 的 miR-217 inhibitor(实验组)及 miR-217 inhibitor control(对照组)转染到高表达 miR-217 的 HBL-100 细胞中。采用 siRNA-MateTM 试剂转染 RNA,37 ℃,CO₂ 培养箱孵育 48 h 后收集细胞。

1.2.5 双荧光素酶检测实验 将含有野生型 miR-217 识别位点的 361 bp 的 DNMT1 3'UTR(DNMT1-UTR-WT)进行 PCR 扩增,反应条件:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 30 个循环。将 PCR 产物亚克隆于 psiCHECKTM-2 双荧光素酶载体上(海肾荧光素酶位于插入片段的上游,萤火虫荧光素酶位于插入片段的下游)。应用 NCBI BLAST 比对,miR-217 与 DNMT1 3'UTR 有 7 个连续的互补配对碱基,使这 7 个碱基发生突变(图 1),构建含有 miR-217 突变位点的 psiCHECKTM-2 载体,即 DNMT1-UTR-MUT。利用转染试剂 Lipofecter C0516 将 1 μg 的质粒和 50 nmol/L 的 miR-217 minics 转染到 293T 细胞中。37 ℃ 下 CO₂ 培养箱孵育 48 h 后裂解细胞,进行荧光素酶活性检测。相对荧光素酶活性由海肾/萤火虫得到。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t* 检验进行比较。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-217 在乳腺上皮细胞系中的转录与表达 RT-PCR 结果显示,与正常乳腺上皮细胞系 HBL-100(相对表达量为 0.314 5)比较,miR-217 在乳腺癌上皮细胞系 MCF-7(相对表达量为 0.002 6)和 MDA-MB-231(相对表达量为 0.000 6)中显著低表达,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.2 过表达和抑制 miR-217 对 DNMT1 表达影响 应用 DIANA-microT、miRanda、PicTar、Target Scans 软件共同预测 miR-217 靶基因,结果 miRanda 软件预测得到 DNMT1 是 miR-217 的靶基因。MDA-MB-231 细胞转染 miR-217 minics 后,实验组 miR-217 相对表达量(179.01)是对照组相对表达量(8.26)的 21.67 倍;与对照组相比,实验组 DNMT1 蛋白表达量下降了 99.95%(图 2)。HBL-100 细胞转染 miR-217 inhibitor 后,与对照组相对表达量(0.16)相比,实验组 miR-217 相对表达量(2.49)下降了 85.65%,DNMT1 蛋白表达量增加了 70%(图 3)。

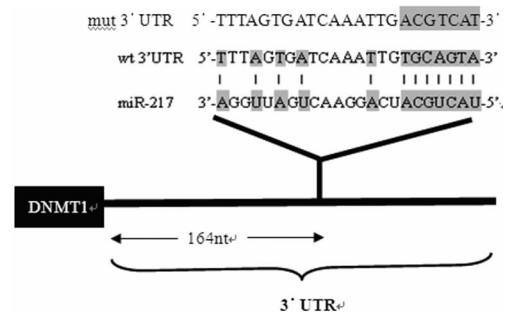


图 1 miR-217 与 DNMT1 3'UTR 的 7 个连续互补配对碱基

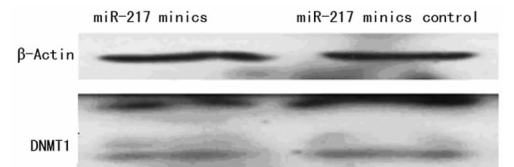


图 2 转染后 48 h MDA-MB-231 细胞中 DNMT1 蛋白表达情况

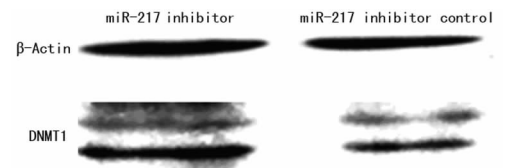


图 3 转染后 48 h HBL-100 细胞中 DNMT1 蛋白表达情况

2.3 双荧光素酶报告系统验证 miR-217 对 DNMT1 靶向调控作用 双荧光素酶报告实验结果显示,293T 细胞分别转染 DNMT1-UTR-WT 和 DNMT1-UTR-MUT 载体 48 h 后,野生型 DNMT1-UTR-WT 的相对荧光素酶活性是 3.425 RLU,突变型 DNMT1-UTR-MUT 的相对荧光素酶活性是 5.543 RLU,两者相比,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

3 讨论

研究表明,miRNAs 通过与 DNMT1 的 3'-UTR 结合来调节 DNMT1 表达,如 miR-152、miR-126、miR-140 可分别在动脉粥样硬化、系统性红斑狼疮(SLE)及肝肿瘤中,通过作用于 DNMT1 而参与相应疾病的治疗和肿瘤的发生^[5-7]。

miR-217 作为 microRNAs 家族中的一员,是一种多功能的 microRNA,例如,miR-217 可以通过靶向作用于 KRAS 抑制胰腺导管癌的发生^[8];在大鼠肾小球系膜(下转第 3291 页)

Eotaxin 的浓度在 AFE 作用相同时间后并没有出现升高的趋势,而且 65 ℃、30 min 对 AFE 进行热处理后作用不同时间,16HBE 细胞仍然能分泌 Eotaxin,虽然在作用 12 h 后 Eotaxin 浓度与未进行热处理组相比有所降低,但是随作用时间的延长依然呈上升趋势。可见,AFE 刺激支气管上皮细胞细胞合成和分泌 Eotaxin 并非依赖其蛋白酶活性,因此,Eotaxin 浓度的升高与 AFE 蛋白浓度无关。在哮喘发生过程中,吸入的过敏原活化肺部肥大细胞和 Th2 型淋巴细胞,使之产生 IL-4、IL-13 和 TNF- α 。这些细胞因子能诱导气道平滑肌细胞、鼻黏膜成纤维细胞、支气管上皮细胞产生 Eotaxin^[8]。有文献报道出芽的烟曲霉孢子或菌丝能刺激肺泡上皮细胞分泌 IL-6、IL-8、TNF- α 的表达^[9-10],笔者推测一定浓度的烟曲霉提取物中的菌丝成分有可能刺激支气管上皮细胞分泌某些细胞因子,在细胞因子的作用下支气管上皮细胞分泌 Eotaxin 增加,具体的机制还需要进一步的研究。

参考文献

[1] 王菲. 烟曲霉致病因子的研究进展[J]. 中华医学杂志, 2007, 31(5):357-358.
[2] Kauffman HF, Tomee JF, Vande Riet MA, et al. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production[J]. J Allergy Clin Immunol, 2000, 105(6):1185-1193.
[3] 龙飞,高福生,丁星,等. 烟曲霉菌提取物对人支气管上皮细胞-巨噬细胞集落刺激因子表达的影响[J]. 第二军医大学学报,

2008, 29(8):917-920.
[4] 龙飞,高福生,丁星,等. 烟曲霉菌提取物对人支气管上皮细胞 Muc5ac 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(2):327-332.
[5] Im GJ, Hwang CS, Jung HH. Quantitative expression levels of regulated on activation, normal T cell expressed and secreted and eotaxin transcripts in toluene diisocyanate-induced allergic rats[J]. Acta Otolaryngol, 2005, 125(4):370-377.
[6] 高贵民. 嗜酸性粒细胞活化趋化因子与支气管哮喘的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2006, 29(2):93-96.
[7] 欧维琳. 嗜酸性粒细胞趋化因子的表达及影响因素[J]. 华夏医学, 2006, 19(6):1288-1290.
[8] Gounni AS, Hamid Q, Rahman SM, et al. IL-9-mediated induction of eotaxin1/CCL11 in human airway smooth muscle cells[J]. J Immunol, 2004, 173(4):2771-2779.
[9] Balloy V, Sallenave JM, Wu Y, et al. Aspergillus fumigatus-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway[J]. J Biol Chem, 2008, 283(45):30513-30521.
[10] Bellanger AP, Millon L, Khoufache K, et al. Aspergillus fumigates germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(2):174-179.

(收稿日期:2013-07-23)

(上接第 3288 页)

细胞(MC)中 miR-216a 协同 miR-217 靶向 PTEN(phosphatase and tensin homologue)可促使 TGF- β 激活 Akt^[9];人内皮细胞中,随着年龄的增长 miR-217 逐渐增多从而抑制 SirT1(silent information regulator 1)表达,诱导细胞的早期衰老^[10]等。但在乳腺上皮细胞中,miR-217 与 DNMT1 的作用机制尚不清楚。

瞬时转染 miR-217 minics 和 miR-217 inhibitor,过表达和抑制 miR-217,结果显示过表达 miR-217, DNMT1 蛋白表达下降;抑制 miR-217, DNMT1 蛋白表达增高,说明 miR-217 可以下调 DNMT1 的表达。利用 293T 细胞作为双荧光素酶报告实验的工具细胞,分别转染 DNMT1-UTR-WT 及 DNMT1-UTR-MUT 载体质粒,48 h 后进行双荧光检测,结果显示两者的相对荧光素酶活性具有统计学差异($P<0.05$),说明 miR-217 通过直接作用于 DNMT1 3'UTR 下调 DNMT1 表达。

总之,本研究结果表明,在乳腺癌上皮细胞中 miR-217 对 DNMT1 表达具有调控作用,且 miR-217 通过直接作用于 DNMT1 3'UTR 调控 DNMT1 表达。这为 miR-217 可能作为乳腺癌潜在治疗靶点的体外实验研究提供了实验依据。

参考文献

[1] Alford SH, Toy K, Merajver SD, et al. Increased risk for distant metastasis in patients with familial early-stage breast cancer and high EZH2 expression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(2):429-437.
[2] Shi JF, Li XJ, Si XX, et al. ER α positively regulated DNMT1 expression by binding to the gene promoter region in human breast cancer MCF-7 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 427

(1):47-53.
[3] 陈道荣,王丕龙,黄爱龙,等. 沉默 dnmt1 基因对胃癌细胞株 AGS 细胞周期、增殖及凋亡的影响[J]. 癌症, 2006, 25(3):308-314.
[4] 彭攸,赵卫卫,李晓娇,等. 人 EZH2 基因编码区及 3'非翻译区融合蛋白重组慢病毒表达载体构建及其在 293T 细胞中的表达[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(24):8151-8155.
[5] Wang YS, Chou WW, Chen KC, et al. MicroRNA-152 mediates DNMT1-regulated DNA methylation in the estrogen receptor α gene [J]. PLoS One, 2012, 7(1):e30635.
[6] Sha Z, Yu W, Yun SL, et al. MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4⁺ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase1 [J]. Arthritis Rheum, 2011, 63(5):1376-1386.
[7] Akemi T, Motoyuki O, Takeshi Y, et al. MiRNA-140 acts as a liver tumor suppressor by controlling NF- κ B activity via directly targeting Dnmt1 expression[J]. Hepatology, 2013, 57(1):162-170.
[8] Zhao WG, Yu SN, Lu ZH, et al. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(10):1726-1733.
[9] Kato M, Putta S, Wang M, et al. TGF- β activates Akt kinase via a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN[J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(7):881-889.
[10] Rossella M, Viviana C, Marina C, et al. MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1[J]. Circulation, 2009, 120(15):1524-1532.

(收稿日期:2013-08-28)