

# miR-155 参与缺氧诱导的乳腺癌化疗耐药

张征峥<sup>1,2</sup>, 马翠卿<sup>1,2</sup>, 邓郁青<sup>1,2</sup>, 郝洁<sup>3</sup>, 李文建<sup>1,2</sup>, 高雪<sup>1,2</sup>, 宋淑霞<sup>1,2</sup>

(1. 河北医科大学免疫教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 河北省重大疾病的免疫机制及干预重点实验室, 河北 石家庄 050017; 3. 河北北方学院附属第二医院, 河北 张家口 075100)

**摘要:** [目的] 探讨 miR-155 在缺氧诱导的乳腺癌化疗耐药中的作用。[方法] 以 0、50、100、150、200 μmol/L 不同浓度 CoCl<sub>2</sub> 处理 4T1 细胞, 建立缺氧模型。实时定量 PCR 检测缺氧条件下 miR-155 的表达与耐药基因 *BCRP* 的表达。通过慢病毒载体转染使 miR-155 过表达, 通过 caspase 3/9 分光光度法探讨 miR-155 在缺氧环境下乳腺癌化疗耐药中的作用。[结果] 随缺氧程度的增加, miR-155 及 *BCRP* 基因表达增加, 过表达 miR-155 可抑制阿霉素诱导的 4T1 细胞的凋亡。[结论] 随着乳腺癌缺氧程度加重, miR-155 表达逐渐增加, miR-155 表达与乳腺癌化疗耐药相关。

**关键词:** miR-155; 缺氧; 乳腺癌; 化疗耐药; *BCRP*

中图分类号: R737.9 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2017)02-0135-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.02.A012

## MiR-155 Participates in the Breast Cancer Chemoresistance Induced by Hypoxia

ZHANG Zheng-zheng<sup>1,2</sup>, MA Cui-qing<sup>1,2</sup>, DENG Yu-qing<sup>1,2</sup>, et al.

(1. Department of Immunology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Key Laboratory of Immune mechanism and Intervention on Serious Disease in Hebei Province, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the effect of miR-155 on the drug resistance of breast cancer. [Methods] 4T1 cells were treated by 0, 50, 100, 150, 200 μmol/L CoCl<sub>2</sub>. Real time quantitative PCR was conducted to detect the expression of miR-155 and *BCRP*, a drug resistance gene, under hypoxic condition. To further explore the role of miR-155 in chemoresistance, a lentiviral vector carrying miR-155 precursor was transfected into 4T1 cells. Then the caspase 3/9 activity was conducted by spectrophotometric method. [Results] With the increase of hypoxia, the expression of miR-155 and *BCRP* gene increased. Over expression of miR-155 repress apoptosis induced by doxorubicin. [Conclusion] With the increasing of hypoxia, the expression of miR-155 increases. MiR-155 expression is associated with chemotherapy resistance in breast cancer.

**Key words:** miR-155; hypoxia; breast cancer; chemoresistance; *BCRP*

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 其发病率及死亡率分别居女性恶性肿瘤的首位和第 2 位<sup>[1]</sup>。作为乳腺癌治疗的重要手段, 在乳腺癌中晚期、复发转移以及手术治疗前后, 化疗起着非常重要的作用。然而化疗药物耐药导致的治疗失败, 仍是乳腺癌治疗中的难题。缺氧是实体肿瘤的重要特征之一, 越来越多的研究表明, 缺氧细胞对化疗药物存在耐药性,

其可通过激活缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)活性, 进而与下游调控基因的缺氧敏感元件结合, 启动下游耐药基因转录。miRNA 是一类内源性小分子非编码 RNA, 其大小约为 19~22nt, 在细胞内可调控多种基因的表达。近年研究发现, miRNA 可调控癌基因或抑癌基因的表达, 并在肿瘤的发生、侵袭、转移及对不同化疗药物的耐药中起重要作用。miR-155 与乳腺癌密切相关, 然而, 其在乳腺癌低氧条件下对化疗耐药的影响目前尚未见报道。为此, 本研究建立了缺氧乳腺癌细胞模型, 探讨了在缺氧条件下 miR-155

收稿日期: 2016-05-05; 修回日期: 2016-09-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81071710); 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2015011)

通讯作者: 宋淑霞, E-mail: prosongsx@163.com

对化疗耐药的影响,为进一步研究 miR-155 与乳腺癌的关系提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

小鼠乳腺癌细胞株 4T1 由本室保存,mmu-miR-155 反转录及实时定量 PCR 引物由广东锐博生物公司设计合成,BCRP 引物由上海生工合成。反转录及实时定量 PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,CoCl<sub>2</sub> 购自美国 Sigma 公司,HIF-1 $\alpha$  购自美国 Abcam 公司,慢病毒转染试剂盒购自广东复能生物有限公司,caspase 3/9 分光光度试剂盒购自上海凯基生物有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞培养

4T1 细胞培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中。CoCl<sub>2</sub> 分别设 0、50、100、150、200 $\mu$ mol/L 5 个终浓度加入处于对数生长期的 4T1 细胞中,24h 后收样做相应检测。

#### 1.2.2 Western blot

分别提取各组细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,选择 10% SDS-PAGE 凝胶,20 $\mu$ g 上样量进行电泳,50V 恒压待样品进入分离胶后改 100V 恒压至电泳结束。100V 恒压转膜(PVDF)60min 左右,用含 5%脱脂奶粉 TBST 室温封闭 1h,一抗(HIF-1 $\alpha$  1:1000, $\beta$ -Tubulin 1:5000)4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。TBST 洗膜 3 次后,以 1:5000 浓度加入二抗,室温孵育 1h 后,TBST 洗 3 次,加入 ECL,利用凝胶成像仪成像,Image J 分析蛋白表达灰度值。

#### 1.2.3 RNA 的提取和逆转录

6 孔细胞培养板每孔加入 1ml Trizol,在冰上静置 5min 后,转移至 EP 管中,按 Takara 公司 Trizol 试剂说明书提取 RNA。以所提 RNA 为模板,进行 miR-155 的 RT 反应,反应体系如下:RNA 模板 2 $\mu$ g,RT 引物工作液 2 $\mu$ l,DEPC 水补至 11 $\mu$ l,混匀,瞬时离心,70 $^{\circ}$ C 10min,冰浴 2min 后,加入 5 $\times$ RT buffer 5 $\mu$ l,2.5Mm dNTP 2 $\mu$ l,RNase inhibitor (40U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l,RNA 酶 (200U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l,DEPC 水补至 25 $\mu$ l,42 $^{\circ}$ C 60min,70 $^{\circ}$ C 10min,立即取出,快速冰上冷却。BCRP 基因的 RT 反应按常规说明书进行。

#### 1.2.4 实时定量 PCR

miR-155 实时定量 PCR 以 U6 为内参照,反应体系为:SYBR Green Mix 10 $\mu$ l,上游引物 (5 $\mu$ mol/L) 2 $\mu$ l,下游引物 (5 $\mu$ mol/L) 2 $\mu$ l,ROX 0.1 $\mu$ l,RT 产物 2 $\mu$ l,H<sub>2</sub>O 补至 20 $\mu$ l。qPCR 条件为:95 $^{\circ}$ C 10min 变性,95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min 共 40 个循环。BCRP 实时定量 PCR 步骤同上, $\beta$ -actin 为内参照。

#### 1.2.5 miR-155 高表达细胞株的建立

按慢病毒包装及感染细胞的说明,接种前一天将 1 $\times 10^5$ /孔的 4T1 细胞铺于 24 孔板,24h 后将收获的病毒液用完全培养基稀释 1 倍感染 4T1 细胞,同时加入终浓度为 8 $\mu$ g/ml 的 polybrene,做只加 polybrene 的对照,以及感染无关序列的对照。37 $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24h;24h 后弃去培养基,换新的不含 polybrene 的完全培养基,继续培养 48h。嘌呤霉素以 5 $\mu$ g/ml 的终浓度进行加压筛选,待未感染病毒的阴性对照组细胞全部死亡后,以 2.5 $\mu$ g/ml 的终浓度维持培养。用荧光显微镜观察转染效果。实时定量 PCR 检测 miR-155 表达。

#### 1.2.6 miR-155 对凋亡的影响

按照 Caspase 3/9 分光光度法检测试剂盒说明书进行。收集 3 $\times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  细胞,加入 100 $\mu$ l 冰冷 Lysis Buffer,吹打混匀;置冰上裂解 30min,涡旋振荡 3~4 次,每次 10s,4 $^{\circ}$ C 离心 (10 000rpm) 1min;将离心上清转移至新的管中,并放置冰上;BCA 法测定蛋白浓度。吸取 50 $\mu$ l 含 50~200 $\mu$ g 蛋白的细胞裂解上清,加入 50 $\mu$ l 的 2 $\times$ Reaction Buffer,加入 5 $\mu$ l Caspase 3 Substrate 并于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4h;用酶标仪或分光光度计 (100 $\mu$ l 的比色皿) 在  $\lambda=405$ nm 测定其吸光值。以 Lysis Buffer 和 Reaction Buffer 作为参比,计算 OD<sub>实验组</sub>/OD<sub>阴性对照组</sub> 的倍数来确定凋亡实验组 Caspase 3/9 活化程度。

### 1.3 统计学处理

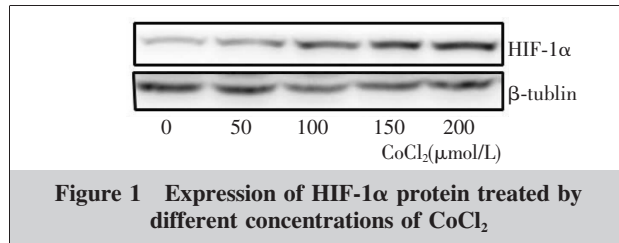
采用 SAS13.0 统计软件进行统计分析,多组间比较采用方差分析,有统计学差异后进一步采用 Dunnett 法两两比较,两组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 乳腺癌细胞缺氧模型的建立

CoCl<sub>2</sub> 是常用的应用于体外模拟细胞低氧环境

的药物,研究选取 0、50、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$  5 个浓度,Western blot 检测结果显示,随  $\text{CoCl}_2$  浓度增加,HIF-1 $\alpha$  表达逐渐增加,乳腺癌细胞缺氧模型建立成功(Figure 1)。



## 2.2 缺氧可诱导 miR-155 的表达

采用实时定量 PCR 法检测 miR-155 表达。不同浓度组间 miR-155 表达差异有统计学意义( $F=8.731$ ,  $P=0.003$ )。随着缺氧程度的增加,miR-155 表达水平增加(Figure 2)。

## 2.3 缺氧可诱导耐药基因 BCRP 的表达

采用实时定量 PCR 法检测 BCRP 基因表达。不同浓度间 BCRP 基因表达差异有统计学意义( $F=44.671$ ,  $P<0.001$ ),随着缺氧程度的增加,耐药基因 BCRP 表达增加,肿瘤细胞对化疗药物的抵抗增加(Figure 3)。

## 2.4 miR-155 高表达细胞株的建立

为了探讨 miR-155 在 4T1 中的作用,应用慢病毒载体 Lv-miR negative control 或 Lv-miR-155 转染 4T1 细胞株,建立高表达 miR-155 的稳转株(4T1-miR-155)及相应对照细胞株(4T1-negative control, 4T1-NC),倒置荧光显微镜下 4T1-miR-155 及 4T1-NC 细胞均可稳定表达绿色荧光蛋白。以 U6 为内参,应用 miR-155 TaqMan 探针检测 miR-155 在 4T1-miR155 稳转株中表达情况,研究发现,与 4T1-NC 相比 miR-155 增加( $759\pm39$ )倍,与对照组相比有显著性差异( $t=8.894$ ,  $P=0.007$ ),表明稳转株构建成功(Figure 4)。

## 2.5 miR-155 抑制阿霉素诱导的 4T1 细胞凋亡

Caspase 3/9 活性检测显示,与未经阿霉素处理的 4T1-NC 相比,4T1-NC 经阿霉素处理后,Caspase 3 活性明显增强( $t=43.958$ ,  $P<0.001$ ),Caspase 9 活性无明显改变 ( $t=$

2.620,  $P=0.059$ )。4T1-miR155 组经阿霉素处理前后,Caspase 3/9 活性均无明显改变( $t=0.655$ ,  $P=0.548$ ;  $t=0.870$ ,  $P=0.433$ )(Figure 5)。

# 3 讨论

缺氧是多种恶性实体肿瘤的共同特点。由于肿瘤的快速生长对能量的需求增加,而相应血管供应减少,导致肿瘤中央区域缺氧明显。作为肿瘤微环境的重要因素之一,缺氧被认为有利于肿瘤细胞的存活、抵抗化疗和放疗<sup>[2]</sup>。临床和实验研究表明,肿瘤内缺氧可促进肿瘤微环境中肿瘤的侵袭转移<sup>[3,4]</sup>。然而缺氧诱导的乳腺癌化疗耐药的分子机制仍不清楚。作为低氧模拟药物, $\text{CoCl}_2$  被广泛应用于体内和

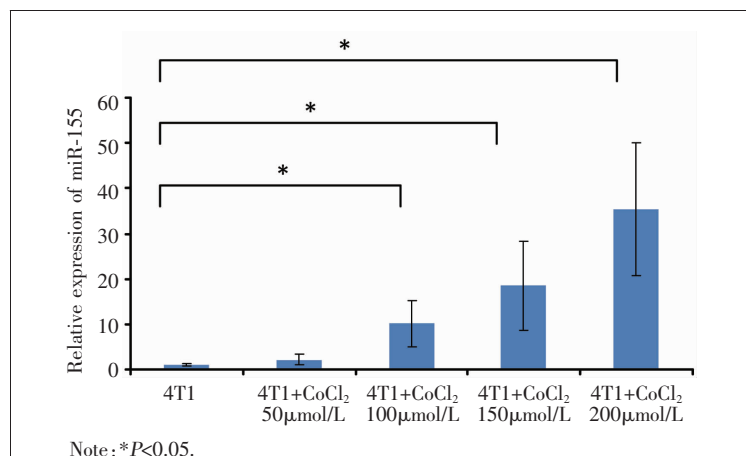


Figure 2 Expression of miR-155 treated by different concentrations of  $\text{CoCl}_2$

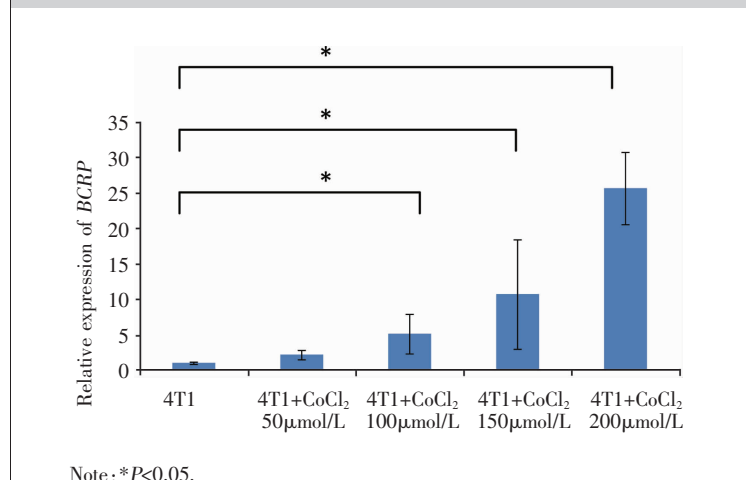
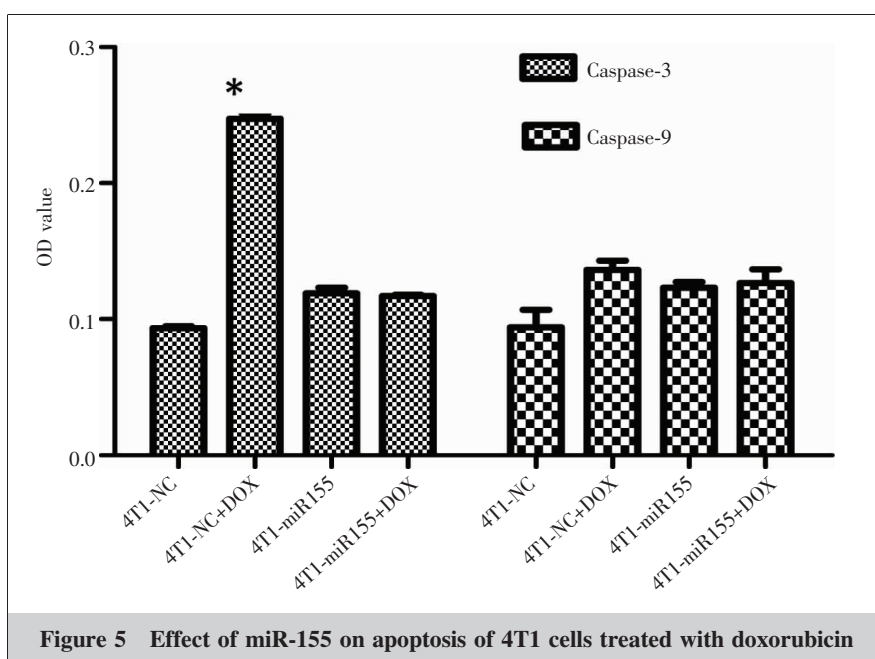
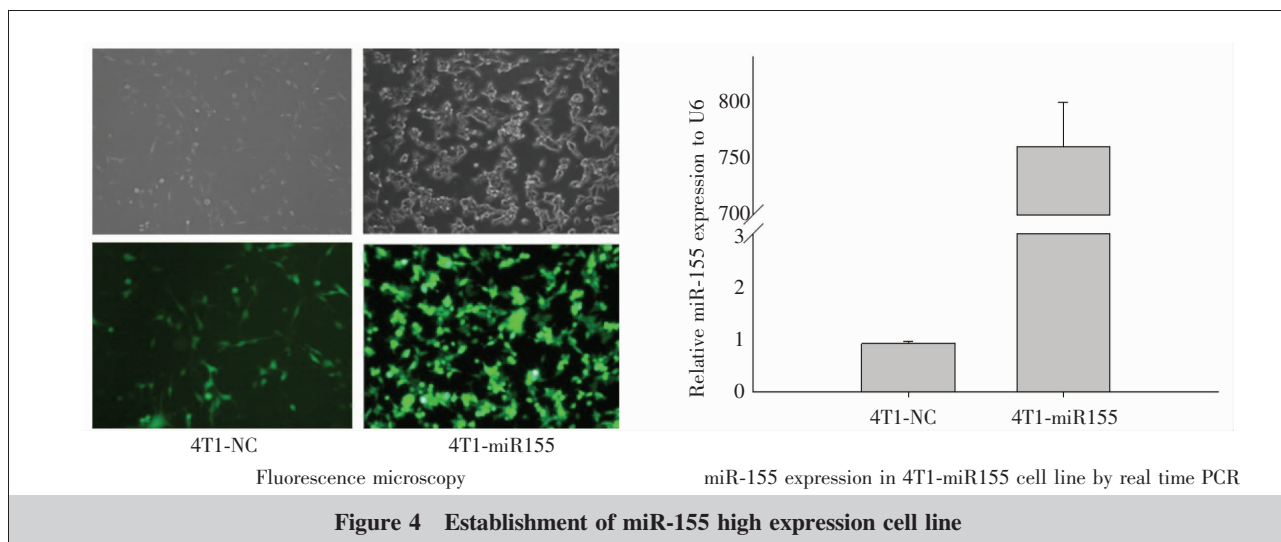


Figure 3 Expression of BCRP treated by different concentrations of  $\text{CoCl}_2$



为近年来研究的热点。研究发现,在肿瘤发生发展中不同 miRNAs 发挥着促癌或抑癌作用(oncomirs or tumor suppressor miRNAs)<sup>[10]</sup>。MicroRNA-155 是一类多功能 microRNA,与乳腺癌发生发展及转移预后密切相关。在小鼠乳腺上皮细胞模型中,miR-155 可靶向 Rho A 促进 TGF- $\beta$  诱导的 EMT 过程<sup>[11]</sup>。通过对一系列人类乳腺癌细胞株的研究发现,在高表达 miR-155 的乳腺癌细胞株 HS578T 中,通过 miR-155ASO 抑制 miR-155 表达,可导致细胞周期阻滞,诱导细胞凋亡;而在低表达 miR-155 的 BT474 乳腺癌细胞株中,异位高表达 miR-155

体外研究。CoCl<sub>2</sub> 是一种亚铁螯合酶的底物,可以与血红蛋白结合,替代 Fe<sup>2+</sup>,从而使细胞进入缺氧状态<sup>[5,6]</sup>。HIF-1 $\alpha$  是缺氧适应性反应的关键调节因子,可激活信号通路及下游基因促进肿瘤细胞生长,改变肿瘤生物学特性。

microRNA(miRNA,miR)是一类内源性、单链非编码小 RNA 分子,由 19~22 个核苷酸组成。成熟 microRNA 5'端含有关键的 2~8 个核苷酸(又被称为“种子序列”),可特异性识别靶 mRNA 的 3'-非编码区(3'-UTR)并与之结合,从而参与靶基因的转录后调控<sup>[7-9]</sup>。由于其调控的广泛性及复杂性,miRNA 成

可促进细胞增殖,增强化疗抵抗<sup>[12]</sup>。在 MCF-7 细胞中,miR-155 高表达同样促进了细胞的增殖,而抑制 miR-155 表达可减慢细胞增殖速度,诱导肿瘤细胞放疗抵抗<sup>[13]</sup>。然而,有关 miR-155 在乳腺癌缺氧微环境中对化疗耐药的作用,目前国内外少见报道。

在本研究中,将不同浓度的 CoCl<sub>2</sub> 处理 4T1 细胞,结果显示随着 CoCl<sub>2</sub> 浓度的增加,HIF-1 $\alpha$  蛋白表达逐渐增加,miR-155 及耐药基因 BCRP 表达也随之增加,表明随着缺氧程度的加深,miR-155 表达增加。那么 miR-155 是否参与了化疗耐药?为此,我们构建了高表达 miR-155 的 4T1 细胞株,Caspase 3/9

活性测定结果显示,阿霉素可通过 Caspase 3 途径诱导对照组细胞凋亡,而高表达 miR-155 的 4T1 细胞组,细胞并未发生凋亡。以上结果提示,miR-155 可能参与了缺氧微环境中的化疗耐药,进一步的机制有待于进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Chen WQ,Zheng RS,Zhang SW,et al. Report of cancer incidence and mortality in China,2012[J]. China Cancer, 2016,25(1):1-8. [陈万青,郑荣寿,张思维,等. 2012 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2016,25(1):1-8.]
- [2] Toffoli S,Michiels C. Intermittent hypoxia is a key regulator of cancer cell and endothelial cell interplay in tumours [J]. FEBS J,2008,275(12):2991-3002.
- [3] Chu CY,Jin YT,Zhang W,et al. CA IX is upregulated in CoCl<sub>2</sub>-induced hypoxia and associated with cell invasive potential and a poor prognosis of breast cancer[J]. Int J Oncol,2016,48(1):271-280.
- [4] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer,2003,3(10):721-732.
- [5] Goldberg MA,Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin[J]. J Biol Chem,1994,269(6):4355-4359.
- [6] Yang G,Xu S,Peng L,et al. The hypoxia-mimetic agent CoCl<sub>2</sub> induces chemotherapy resistance in LOVO colorectal cancer cells[J]. Mol Med Rep,2016,13(3):2583-2589.
- [7] Wiwanitkit S,Wiwanitkit V. MicroRNA from tuberculosis RNA:A bioinformatics study[J]. J Thorac Dis,2012,4(3):296-297.
- [8] He L,Hannon GJ. MicroRNAs;small RNAs with a big role in gene regulation[J]. Nat Rev Genet,2004,5(7):522-531.
- [9] Hammond SM,Caudy AA,Hannon GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA[J]. Nat Rev Genet, 2001,2(2):110-119.
- [10] Friedman RC,Farh KK-H,Burge CB,et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [J]. Genome Res,2009,19(1):92-105.
- [11] Kong W,Yang H,He L,et al. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA [J]. Mol Cell Biol,2008,28(22):6773-6784.
- [12] Kong W,He L,Coppola M,et al. MicroRNA-155 regulates cell survival,growth,and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer[J]. J Biol Chem,2010,285(23):17869-17879.
- [13] Zhang CM,Zhao J,Deng HY. miR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1 [J]. J Biomed Sci,2013,20:79.

## 启 事

每期杂志出版后,本刊都将给作者/通讯作者通过邮局,以印刷品挂号形式寄赠当期杂志 2 册。如未能及时收到杂志,请登录 <http://www.chinaoncology.cn>

⇒ 点击中国肿瘤

再点击

信息公告

MORE

查找 2016 年第 X 期《中国肿瘤》

杂志作者邮寄名单,按“挂号号”可在当地邮局查询。