



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.010  
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4098.shtml

· 基础研究 ·

# miRNA-639 在乳腺癌中表达及其意义

徐泰

(广东省梅州市人民医院 乳腺外科, 广东 梅州 514000)

## 摘要

**目的:** 探讨 miRNA-639 (miR-639) 在乳腺癌中的表达及其与乳腺癌生长、侵袭及转移的关系。

**方法:** 采用荧光定量 PCR 方法检测 miR-639 在 60 例乳腺癌组织 (转移性乳腺癌 30 例, 非转移性 30 例) 与 30 例癌旁组织、以及人乳腺癌 MD231 细胞与 MCF-7 细胞中的表达; 分析 miR-639 表达水平与乳腺癌患者临床病理特征关系; 分别通过 CCK-8 实验、细胞划痕实验、Boyden 小室实验检测 miR-639 在乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭中的作用。

**结果:** miR-639 的表达水平在乳腺癌组织中明显高于癌旁组织、在转移性乳腺癌组织中明显高于非转移性乳腺癌组织、在高侵袭性 MD231 细胞中明显高于低侵袭性 MCF-7 细胞, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。在各项临床病理因素中, miR-639 的表达与仅乳腺癌患者的 M 分期有关 ( $P < 0.01$ )。转染 miR-639 抑制物后, MD231 细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显降低, 而转染 miR-639 后, MCF-7 细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显升高 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** miR-639 在乳腺癌中表达升高, 且乳腺癌的增殖、迁移和侵袭能力随 miR-639 的表达水平升高而增加。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1506-1511]

## 关键词

乳腺肿瘤; 微 RNAs; miRNA-639; 肿瘤浸润  
中图分类号: R737.9

## MiRNA-639 expression in breast cancer and its significance

XU Tai

(Department of Breast Surgery, Meizhou People's Hospital, Meizhou, Guangdong 514000, China)

Corresponding author: XU Tai, Email: yixue8001@163.com

## ABSTRACT

**Objective:** To investigate miRNA-639 (miR-639) expression in breast cancer and its relations with growth, invasion and metastasis of the breast cancer.

**Methods:** The miR-639 expression in 60 specimens of breast cancer tissue (30 metastatic cases and 30 non-metastatic cases) and 30 specimens of tumor adjacent tissue, along with human breast cancer MD231 and MCF-7 cells were detected by using fluorescent quantitative PCR. The relationship between miR-639 expression level and clinicopathologic features of breast cancer patients was analyzed. The effects of miR-639 on the proliferation, migration and invasion of breast cancer were evaluated by CCK-8 assay, wound scratch assay and Boyden chamber assays, respectively.

**Results:** MiR-639 expression level in breast cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissue, in metastatic breast cancer tissue was significantly higher than that in non-metastatic tissue, and in highly

收稿日期: 2014-09-15; 修订日期: 2014-10-23。

作者简介: 徐泰, 广东省梅州市人民医院主治医师, 主要从事乳腺肿瘤临床诊疗方面的研究。

通信作者: 徐泰, Email: yixue8001@163.com

invasive MD231 cells was significantly higher than that in low invasive MCF-7 cells, with all differences reaching statistical significance (all  $P < 0.05$ ). Among the studied clinicopathologic factors, the miR-639 expression was only associated with the M stage of the breast cancer patients ( $P < 0.01$ ). The proliferative, migratory and invasive abilities of MD231 cells were significantly decreased after miR-639 inhibitor transfection, whereas in MCF-7 cells they were significantly increased after miR-639 transfection (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** MiR-639 expression is elevated in breast cancer, and the abilities of proliferation, migration and invasion of breast cancer are increased proportionately with the level of miR-639 expression.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(11):1506-1511]

**KEYWORDS** Breast Neoplasms; MicroRNAs; miRNA-639; Neoplasm Invasiveness

**CLC number:** R737.9

在世界范围内, 女性乳腺癌的发病率居于女性恶性肿瘤的第 1 位, 且乳腺癌的发病率以每年 2% 的速度递增<sup>[1]</sup>。乳腺癌致死的主要原因是癌症的转移。然而关于乳腺癌转移的机制目前研究的还不是很清楚。microRNA (miRNA) 是一种小的非编码 RNA, 对细胞的增殖、分化、凋亡以及应激等生物过程有广泛的调节作用<sup>[2-3]</sup>。文献报道, 在病理状态下, miRNA-639 (miR-639) 的表达是异常的, 同时, 文献还报道在膀胱癌患者的血清中 miR-639 的表达是失衡的<sup>[4-5]</sup>。这些结果提示, miR-639 可能参与了癌症的发生发展过程。而关于 miR-639 在乳腺癌发生发展中的作用目前研究的还不是很清楚。据此, 本文希望通过对乳腺癌组织中 miR-639 的表达, 及其对乳腺癌细胞系增殖、迁移和侵袭能力的影响研究, 初步探讨 miR-639 在乳腺癌发生发展中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 选取 2012 年 8 月 1 日—2013 年 11 月 30 日在我科住院并行手术治疗的乳腺癌患者 60 例, 均为女性; 其中转移性乳腺癌患者 30 例, 非转移性乳腺癌 30 例。患者术前均未接受化学治疗、放射治疗或免疫治疗, 收取患者癌组织标本及 30 例患者癌旁组织标本, 组织标本离体后 10 min 内冻存于液氮中保存。每例样本均经过组织病理学诊断证实为乳腺癌。60 例患者平均年龄 ( $60.1 \pm 13.9$ ) 岁。

**1.1.2 细胞及主要试剂** 人乳腺癌 MD231 细胞(高侵袭性)与 MCF-7 细胞(低侵袭性)均购自美国 ATCC, 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培

养基中。转染试剂 Lipofectamine2000 及 TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司, SYBR Green PCR 试剂盒、miR-639、miR-639 对照、miR-639 抑制物、miR-639 抑制物对照购自 Ambion 公司; 侵袭实验用 Boyden 小室购自美国 Millipore 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 荧光定量 PCR** TRIzol 提取细胞总 RNA, 反转录成 cDNA。PCR 反应条件: 95 °C 5 min, 95 °C 10 s, 60 °C 20 s, 共 40 个循环。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计数 miR-639 的相对表达量。

**1.2.2 细胞转染** 细胞长至 70% 融合时可用于转染。严格按照 Lipofectamine2000 转染说明书进行操作, 转染 36 h 后可用于功能实验。

**1.2.3 细胞增殖检测** 按文献<sup>[6]</sup>方法, 取对数生长期细胞, 接种于 96 孔平底培养板。在 37 °C、饱和湿度、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中常规培养, 继续培养 48 h, 然后加入 10 μL CCK-8 试剂, 在培养箱内培养 2 h, 置酶联免疫检测仪测定 OD<sub>450</sub> 值。

**1.2.4 迁移和侵袭能力检测** 采用划痕愈合实验方法检测细胞迁移能力, 具体操作方法参见文献<sup>[7]</sup>方法。采用 Boyden 小室分析<sup>[8]</sup>检测细胞侵袭能力, 具体步骤: 用于实验的细胞采用台盼蓝染色计数并重悬。将  $1 \times 10^5$  个细胞置于经过铺胶的上层小室中, 并补加培养基至 300 μL。下层小室中加入含 10% 胎牛血清的培养基 500 μL。孵育 12 h 后, 未发生侵袭的细胞用棉拭子从上层腔室除去。下层小室中的细胞以 0.1% 结晶紫固定染色, 计算出现侵袭的细胞数。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析。两组数据间比较采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-639 在乳腺癌组织及乳腺癌细胞系中的表达

乳腺癌癌旁组织中, miR-639 的相对表达量为  $0.44 \pm 0.05$ , 乳腺癌组织中 miR-639 的相对表达量为  $1.54 \pm 0.11$ , 前者明显高于后者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。转移性乳腺癌组织中 miR-

639 的相对表达量为  $2.11 \pm 0.32$ , 非转移性乳腺癌组织中的 miR-639 的相对表达量为  $1.04 \pm 0.15$ , 前者明显高于后者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1A)。高侵袭高转移能力的乳腺癌细胞系 MD231 中 miR-639 的相对表达量为  $1.89 \pm 0.26$ , 低侵袭低转移能力的乳腺癌细胞系 MCF-7 中 miR-639 的相对表达量为  $1.13 \pm 0.12$ , 前者明显高于后者, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 1B)。

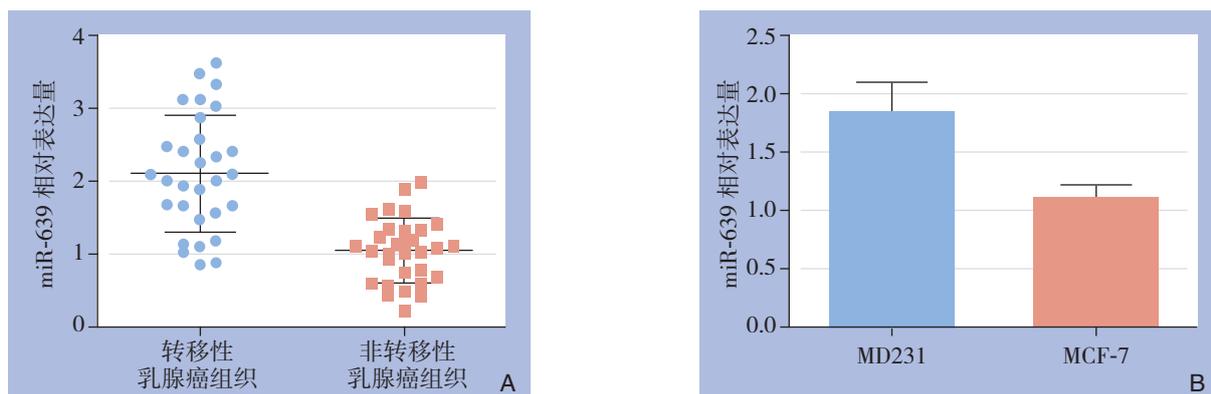


图 1 乳腺癌组织和乳腺癌细胞中 miR-639 表达检测 A: 乳腺癌组织; B: 乳腺癌细胞

Figure 1 Determination of miR-639 expression in breast cancer tissue and cell lines

A: Breast cancer tissues; B: Breast cancer cells

### 2.2 miR-639 表达与乳腺癌临床病理特征关系

单因素分析结果显示, miR-639 在乳腺癌组织的表达水平仅与患者 M 分期有关 ( $P < 0.05$ ), 而与患者年龄、病理分级、T 分期、是否吸烟和是否饮酒等其他因素无明显关系 (均  $P > 0.05$ ) (表 1)。

### 2.3 miR-639 对乳腺癌细胞增殖的影响

与各自的对照组比较, 高侵袭性 MD231 细胞在转入 miR-639 抑制物后, 增殖能力明显降低 ( $P < 0.05$ ), 而低侵袭性 MCF-7 细胞在转入 miR-639 后, 增殖能力明显升高 ( $P < 0.05$ ) (图 2A-B)。

### 2.4 miR-639 对乳腺癌细胞迁移的影响

伤口愈合实验显示, 划痕后 24 h, 转染 miR-639 抑制物的高侵袭性 MD231 细胞的划痕距离明显大于其对照组 ( $P < 0.05$ ), 即迁移能力明显降低; 转染 miR-639 的低侵袭性 MCF-7 细胞的划痕距离明显小于其对照组 ( $P < 0.05$ ), 即迁移能力明显增加 (图 3)。

### 2.5 miR-639 对乳腺癌细胞侵袭的影响

Boyden 小室实验结果显示, 转染 miR-639 抑制物的高侵袭性 MD231 细胞的侵袭细胞数明显少于其对照组 ( $P < 0.05$ ), 即侵袭能力减弱, 而转染

miR-639 的低侵袭性 MCF-7 细胞的侵袭细胞数明显多于其对照组 ( $P < 0.05$ ); 即侵袭能力增加 (图 3)。

表 1 miR-639 表达量与乳腺癌临床病理特征的关系  
Table 1 Relationship between miR-639 expression level and clinicopathologic features of breast cancer

参数	n	miR-639	P
年龄 (岁)			
< 60	34	$1.87 \pm 0.19$	0.737
$\geq 60$	26	$1.80 \pm 0.23$	
病理分级			
I	21	$1.55 \pm 0.22$	0.085
II	18	$1.86 \pm 0.14$	
III	21	$1.99 \pm 0.16$	
T 分期			
T <sub>1</sub>	20	$1.77 \pm 0.23$	0.389
T <sub>2</sub>	21	$1.65 \pm 0.25$	
T <sub>3</sub>	19	$1.35 \pm 0.15$	
M 分期			
M <sub>0</sub>	30	$1.04 \pm 0.15$	0.009
M <sub>1</sub>	30	$2.11 \pm 0.32$	
是否吸烟			
是	21	$1.49 \pm 0.27$	0.652
否	39	$1.38 \pm 0.21$	
是否饮酒			
是	22	$1.28 \pm 0.31$	0.252
否	33	$1.35 \pm 0.29$	

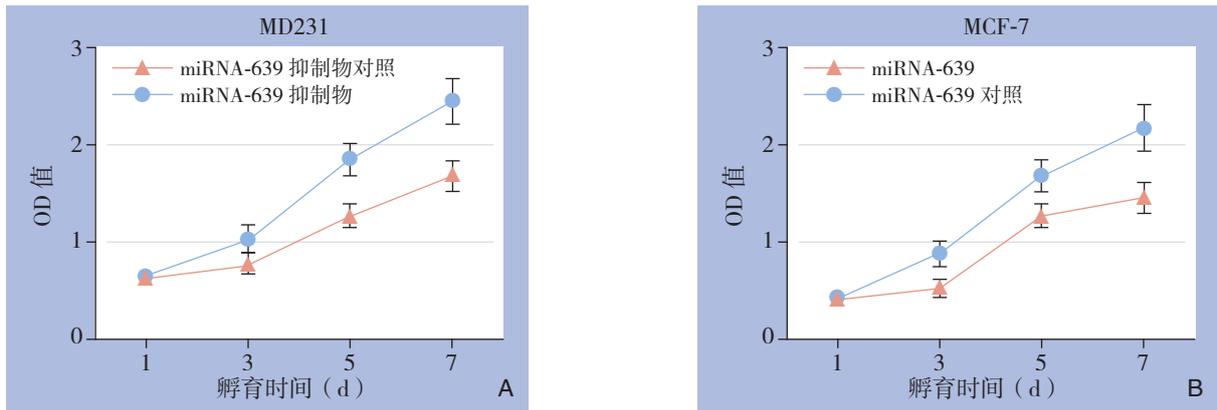


图 2 miR-639 对乳腺癌细胞增殖的影响 A: miR-639 抑制物对 MD231 细胞增殖的作用; B. miR-639 对 MCF-7 细胞增殖的作用

Figure 2 Effect of miR-639 on proliferation of breast cancer cells A: Effect of miR-639 inhibitor on proliferation of MD231 cells; B: Effect of miR-639 on proliferation of MCF-7 cells

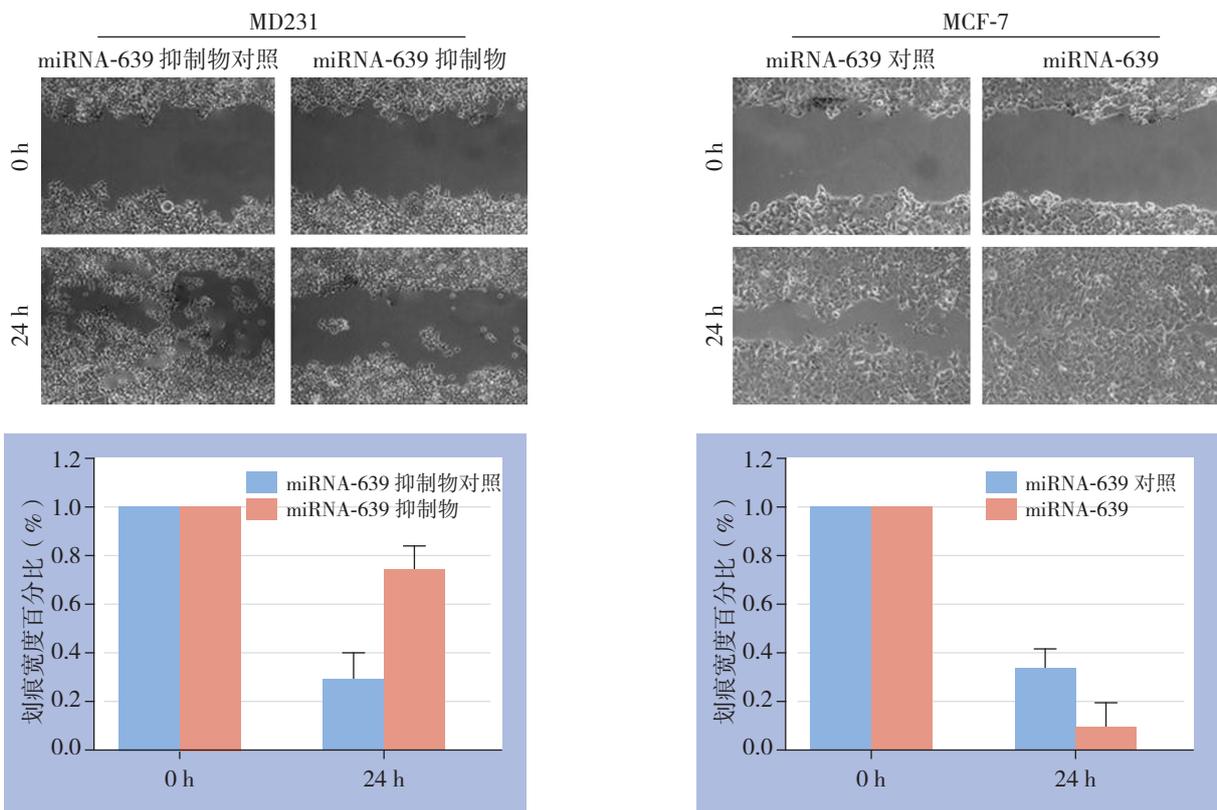


图 3 miR-639 对乳腺癌细胞迁移的影响 Figure 3 Effect of miR-639 on migration of breast cancer cells

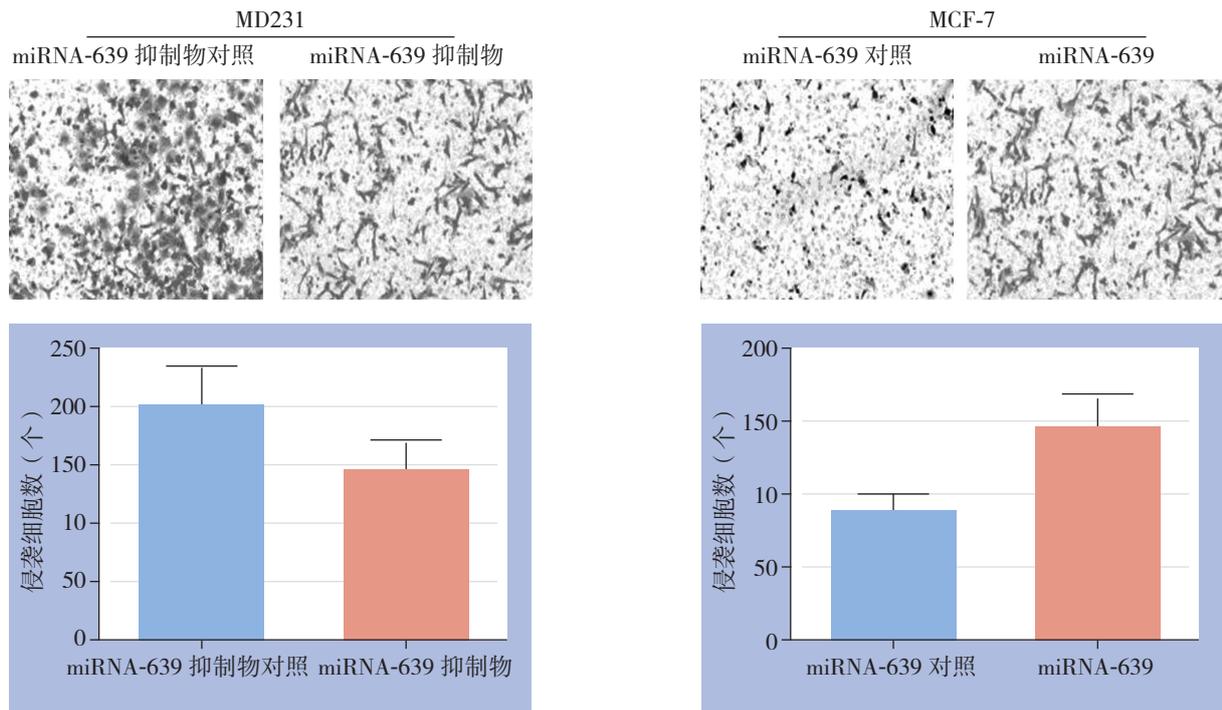


图 4 miR-639 对乳腺癌细胞侵袭的影响

Figure 4 Effect of miR-639 on invasion of breast cancer cells

### 3 讨论

全球乳腺癌发病率自 20 世纪 70 年代末开始一直呈上升趋势。中国虽不是乳腺癌的高发国家,但近年来我国乳腺癌发病率呈每年递增的趋势<sup>[9-11]</sup>。据国家癌症中心和卫生部疾病预防控制中心的数据显示,乳腺癌发病率已越剧女性恶性肿瘤的第 1 位<sup>[12-13]</sup>。乳腺癌已成为当前社会的重大公共卫生问题。目前已知乳腺癌致死的主要原因并非原发肿瘤所致,而是癌症的转移所致。然而关于乳腺癌转移的机制目前研究的还不是很清楚。

尽管文献记载在多数肿瘤组织中,miRNA 的表达是显著下调的,且这些 miRNA 均参与了肿瘤的转移过程<sup>[14-16]</sup>,然而在肿瘤组织中也有少数 miRNA 的表达是出现上调的<sup>[17-21]</sup>。近年来,多种 miRNA 被证实参与了肿瘤的转移过程<sup>[22]</sup>。据此,在乳腺癌肿瘤转移过程中具有重要的作用的 miRNA 引起了许多研究者的关注。研究表明,在病理状态下,miR-639 的表达是会出现异常的,同时,文献<sup>[4-5]</sup>报道在膀胱癌患者的血清中 miR-639 的表达是失衡的。而关于 miR-639 在乳腺癌发生发展中的作用目前研究的还不是很清楚。据此,本研究主要关注了 miR-639 在乳腺癌发生发

展中的作用。

本研究中,通过对乳腺癌组织中 miR-639 的表达分析,发现乳腺癌组织中 miR-639 的表达量显著高于癌旁组织,且转移性乳腺癌组织中 miR-639 的表达量显著高于非转移性乳腺癌组织,提示 miR-639 参与了乳腺癌的发生发展过程,且与乳腺癌的转移是密切相关的。进一步对 miR-639 的表达情况与乳腺癌临床病理特征关系进行分析的结果显示 miR-639 表达仅与乳腺癌是否存在转移相关,而与患者年龄、病理分级、T 分期、是否吸烟和是否饮酒均无明显关系。转染 miR-639 抑制剂可显著抑制高表达 miR-639 的乳腺癌细胞系 MD231 的增殖能力,而转染 miR-639 后低表达 miR-639 的乳腺癌细胞系 MCF-7 的增殖能力显著升高;同时,转染 miR-639 抑制物可显著抑制乳腺癌细胞 MD231 的迁移和侵袭能力,而转染 miR-639 可增加乳腺癌细胞系 MCF-7 的迁移和侵袭能力。

综上所述,本研究结果提示,miR-639 在转移性乳腺癌中的表达是出现显著上调的,且上调表达的 miR-639 参与了乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。初步提示,miRNA 表达异常参与了肿瘤的发生发展,包括乳腺癌。

## 参考文献

- [1] 王雷, 马菲, 郭宝良. microRNA 在三阴性乳腺癌中的研究进展 [J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(11):1490-1494.
- [2] 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.
- [3] Zhang J, Guo H, Qian G, et al. MiR-145, a new regulator of the DNA fragmentation factor-45 (DFF45)-mediated apoptotic network[J]. *Mol Cancer*, 2010, 9:211. doi: 10.1186/1476-4598-9-211.
- [4] Ragusa M, Caltabiano R, Russo A, et al. MicroRNAs in vitreous humor from patients with ocular diseases[J]. *Mol Vis*, 2013, 19:430-440.
- [5] Scheffer AR, Holdenrieder S, Kristiansen G, et al. Circulating microRNAs in serum: novel biomarkers for patients with bladder cancer?[J]. *World J Urol*, 2014, 32(2):353-358.
- [6] 谭晖, 吉晓霞, 王娟, 等. 二烯丙基二硫对 K562 细胞生长抑制和促凋亡的作用 [J]. 中南医学科学杂志, 2011, 39(4):372-375.
- [7] Liu S, Li L, Zhang Y, et al. The oncoprotein HBXIP uses two pathways to up-regulate S100A4 in promotion of growth and migration of breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(36):30228-30239.
- [8] 魏付桥, 申清香, 刘昌化, 等. PEITC 通过抑制结肠癌细胞 PI3K/NF- $\kappa$ B 活性而抑制 MMP-9 表达 [J]. 中南医学科学杂志, 2014, 42(4):351-354.
- [9] Sun B, Zhang F, Wu SK, et al. Gene expression profiling for breast cancer prognosis in Chinese populations[J]. *Breast J*, 2011, 17(2):172-179.
- [10] Tas F. Factors influencing the hormone receptor and HER2 levels in breast cancer: a population-based analysis[J]. *Onkologie*, 2012, 35(3):95-98.
- [11] 史立晖, 蒋宏传, 李杰, 等. 体质量指数与乳腺癌的关系探讨 [J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(11):1329-1333.
- [12] 王健, 马鸿达, 孙燕, 等. 乳腺癌中白细胞介素 -10 和血管内皮生长因子的表达及其对树突状细胞的抑制作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(10):1184-1185.
- [13] 杨维良, 张东伟. 乳腺癌基因治疗的研究现状及展望 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(5):633-635.
- [14] Kumar MS, Lu J, Mercer KL, et al. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis[J]. *Nat Genet*, 2007, 39(5):673-677.
- [15] Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. *Nature*, 2005, 435(7043):834-838.
- [16] Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, et al. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(12):1788-1793.
- [17] Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(7):2257-2261.
- [18] Liu H, Wang Y, Li X, et al. Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3):1713-1722.
- [19] Gramantieri L, Foruani F, Callegari E, et al. MicroRNA involvement in hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6A):2189-2204.
- [20] Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. *Mol Cancer*, 2007, 6:60.
- [21] Radojicic J, Zaravinos A, Vrekoussis T, et al. MicroRNA expression analysis in triple-negative(ER, PR and Her2/neu) breast cancer[J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(3):507-517.
- [22] Sun Q, Zhang J, Cao W, et al. Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(3):513-520.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 徐泰. miRNA-639 在乳腺癌中表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1506-1511. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.010

Cite this article as: XU T. MiRNA-639 expression in breast cancer and its significance[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(11):1506-1511. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.010