

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

沉默LncRNA WT1-AS对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭和迁移的影响

舒家武, 李熙君, 朱力勤, 王燕燕

引用本文:

舒家武, 李熙君, 朱力勤, 等. 沉默LncRNA WT1-AS对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭和迁移的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2021, 48(3): 244-247.

SHU Jiawu, LI Xijun, ZHU Liqin, et al. LncRNA WT1-AS Knockdown Promotes Invasion and Migration of Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2021, 48(3): 244-247.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2021.20.0744>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

丹参酮 II A对乳腺癌细胞阿霉素化疗敏感度的影响及相关机制

Tanshinone II A Enhances Chemosensitivity of Breast Cancer Cells to Doxorubicin and Related Mechanism

肿瘤防治研究. 2019, 46(07): 594-599 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.19.0098>

阿帕替尼通过抑制糖酵解途径对乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖抑制及凋亡的作用

Apatinib Suppresses Proliferation and Induced Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231 Through Glycolytic Inhibition

肿瘤防治研究. 2019, 46(05): 401-405 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1422>

环状RNA ciRS-7在三阴性乳腺癌中的表达及其对细胞侵袭和迁移的影响

Expression of Circular RNA ciRS-7 and Its Effect on Invasion and Migration of Triplenegative Breast Cancer Cells

肿瘤防治研究. 2019, 46(03): 233-238 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.0855>

TET1蛋白对人乳腺癌MDA-MB-231细胞株增殖和侵袭能力的影响及其相关机制

Effects of TET1 on Proliferation and Invasion of Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells and Related Mechanism

肿瘤防治研究. 2017, 44(7): 447-453 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0040>

NDRG2上调PTEN表达抑制乳腺癌细胞迁移的实验

NDRG2 Inhibits Migration of Breast Cancer Cells Through Upregulating PTEN Expression

肿瘤防治研究. 2017, 44(1): 5-10 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.01.002>



杂志官网



微信公众号

沉默LncRNA WT1-AS对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭和迁移的影响

舒家武¹, 李熙君², 朱力勤³, 王燕燕¹

LncRNA WT1-AS Knockdown Promotes Invasion and Migration of Triple Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells

SHU Jiawu¹, LI Xijun², ZHU Liqin³, WANG Yanyan¹

1. Department of Pharmacy, Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, China;

2. Department of Oncology, Yiling Hospital, Yichang 443100, China; 3. Department of

Oncology, Gezhoubu Central Hospital, Yichang 443000, China

Corresponding Author: WANG Yanyan, E-mail: 2041214839@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect of LncRNA WT1-AS on the invasion and migration of triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of WT1-AS and the efficiency of gene silencing in MDA-MB-231 cells. Transwell invasion test and scratch test were used to detect the invasion and migration of MDA-MB-231 cells; Western blot was used to detect the expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Snail in MDA-MB-231 cells. **Results** Compared with normal human mammary epithelial cells, the expression of WT1-AS in MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MDA-MB-468 cells were significantly up-regulated. Knockdown of WT1-AS significantly reduced the invasion and migration abilities of MDA-MB-231 cells, the expression of E-cadherin was increased but N-cadherin, Vimentin and Snail expression were decreased. **Conclusion** WT1-AS could promote the invasion and migration of triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231 via regulating epithelial-mesenchymal transition.

Key words: LncRNA WT1-AS; Triple negative breast cancer cells; Invasion; Migration

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 探讨LncRNA WT1-AS对三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231侵袭和迁移的影响。方法 qRT-PCR检测WT1-AS在三阴性乳腺癌细胞中的表达及基因沉默的效率; Transwell实验检测WT1-AS对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响; 划痕实验检测WT1-AS对MDA-MB-231细胞迁移能力的影响; Western blot检测WT1-AS对MDA-MB-231细胞E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和Snail表达的影响。结果 与正常乳腺上皮细胞相比, WT1-AS在三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-468中的表达量明显上调; 沉默WT1-AS后, MDA-MB-231细胞侵袭和迁移能力明显降低, 且E-cadherin表达明显上调, N-cadherin、Vimentin和Snail表达量显著下调。结论 WT1-AS可以通过调控EMT促进三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231的侵袭与迁移能力。

关键词: LncRNA WT1-AS; 三阴性乳腺癌细胞株; 侵袭; 迁移

中图分类号: R737.9

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

三阴性乳腺癌 (triple-negative breast cancer, TNBC) 是一种人表皮生长因子2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2)、雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 和孕激素受体 (progesterone

receptor, PR) 均为阴性的乳腺癌。TNBC大约占有乳腺癌患者的15%~20%, 常见于年轻女性, 并具有高侵袭、恶性程度高的特点^[1]。目前, 化疗仍然是治疗TNBC的主要手段。虽然在治疗前期, 传统的化疗有效, 但TNBC恶性程度高, 与其他亚型相比更易复发和死亡, 4年内的复发率超过70%^[2]。因此, 寻找TNBC的治疗手段意义重大。

Long non-coding RNA (LncRNA) 是一种长度大于200个核苷酸、不具有编码蛋白质功能的RNA, 它们参与着细胞增殖、分化、染色体重塑、表观遗传调控、转录及转录后调控等过程^[3]。研究发现LncRNA在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌等肿瘤细胞的生长、耐药及上皮间质转化 (epithelial-to-

收稿日期: 2020-06-30; 修回日期: 2020-10-16

作者单位: 1. 443003 宜昌, 宜昌市中心人民医院药学部; 2. 443100 宜昌, 宜昌市夷陵医院肿瘤内科; 3. 443000 宜昌, 国药葛洲坝中心医院肿瘤内科

通信作者: 王燕燕 (1964-), 女, 博士, 主任医师, 主要从事抗肿瘤药物药理学机制方面的研究, E-mail: 2041214839@qq.com

作者简介: 舒家武 (1971-), 男, 本科, 主管药师, 主要从事抗肿瘤新药研发工作

mesenchymal transition, EMT) 等过程中起着重要作用^[4]。LncRNA WT1-AS是Wilm's肿瘤基因的翻译转录物, 编码锌指结构域, 同时具有致癌与抑癌作用^[5], 它的表达量与肝癌患者的生存期呈正相关^[6], 而与早期宫颈癌患者生存呈负相关^[7]。有研究发现WT1-AS在TNBC中表达显著上调^[8]。但目前关于WT1-AS在TNBC中的研究仍较少, 本文通过检测WT1-AS在TNBC细胞中的表达, 探讨WT1-AS对TNBC细胞侵袭、迁移的影响, 探讨其在TNBC发生发展的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺上皮细胞MCF-10A和人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-468购自北京协和细胞资源中心; DMEM/F12和L15培养基购自美国Hyclone公司; 马血清购自上海Solarbio公司; 胎牛血清购自美国Gibco公司; 胰蛋白酶、BCA蛋白浓度测定试剂盒、RIPA裂解液、5×上样缓冲液、RNA提取试剂和反转录试剂、嘌呤霉素及ECL超敏发光液购自上海Solarbio公司; Lipofectamine RNAiMAX和SYBR Select Master Mix试剂盒购自美国ThermoFisher Scientific公司; shRNA-WT1-AS购自上海RealGene公司; 引物购自上海英潍捷基公司; E-cadherin鼠单克隆抗体、N-cadherin鼠单克隆抗体、Vimentin鼠单克隆抗体、Snail鼠单克隆抗体、GAPDH鼠单克隆抗体和HRP标记抗鼠抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂, 购自中国国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与慢病毒感染 人乳腺上皮细胞MCF-10A使用含5%热灭活马血清、10 μg/ml胰岛素、20 ng/ml EGF、100 ng/ml霍乱毒素和0.5 μg/ml氢化可的松DMEM/F12培养基于37℃、5%CO₂培养箱中培养, 每隔两天更换培养基。

人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MDA-MB-453和MDA-MB-468使用含有10%热灭活胎牛血清(FBS)的L15培养基于37℃, 无CO₂培养箱中培养, 每隔两天更换培养基。

使用10 cm的培养皿培养细胞, 当融合至50%~60%后进行转染。使用Lipofectamine RNAiMAX将WT1-AS转染至MDA-MB-231细胞。感染后培养4周, 换成含嘌呤霉素(1.5 μg/ml)的培养基继续培养两周, 每3天更换含嘌呤霉素的培

养基获得慢病毒感染且稳定敲除WT1-AS的MDA-MB-231细胞株。

1.2.2 实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 参照说明书利用TRIzol提取细胞总RNA, 用反转录试剂盒进行反转录得到cDNA。然后利用SYBR Select Master Mix试剂盒在ABI 7900仪器上进行qRT-PCR实验。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算基因相对表达量。引物序列: WT1-AS: 5'-GCCTCTCTGTCCTCTTCTTTGT-3' (正义引物), 长度22 bp, 5'-GCTGTGAGTCCTGGTGCTTAG-3' (反义引物), 长度21 bp; GAPDH: 5'-GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3' (正义引物), 长度20 bp, 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC3' (反义引物), 长度20 bp。

1.2.3 划痕实验 将对数生长期的MDA-MB-231细胞接种至6孔板, 培养24 h后用200 μl枪头划痕, 然后用0.01 mol/L PBS冲洗3次, 并更换为含有1%血清的培养基, 划痕后0、24 h观察细胞迁移并拍照。迁移率=(宽度_{0h}-宽度_{24h})/宽度_{0h}×100%。

1.2.4 Transwell实验 将Transwell小室放置24孔板中, 小室内膜用Matrigel胶(1:8稀释)80 μl均匀涂抹, 37℃孵育30 min使胶凝固。使用无血清培养基稀释肿瘤细胞, 将1×10⁵个细胞(100 μl)加入Transwell上室, 在下室中加入600 μl含10%FBS的培养基, 置于培养箱培养24 h。然后将细胞固定并用结晶紫染色, 擦拭去掉内膜的细胞, 于镜下拍照并统计细胞数量。

1.2.5 Western blot实验 收集各组的心肌细胞, 使用含有蛋白酶抑制剂Cocktail的RIPA裂解液冰上裂解细胞提取总蛋白, 通过BCA法测定蛋白浓度, 并将蛋白液95℃处理5 min变性。取50 μg蛋白样本行8%SDS-PAGE。湿法转印至PVDF膜上, 5%脱脂牛奶室温封闭1 h, 加入E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail和GAPDH抗体4℃过夜。二抗室温孵育1 h, 凝胶成像系统采集图像。

1.3 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析。数据用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用Student's *t*-test检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LncRNA WT1-AS在TNBC细胞MDA-MB-231中的表达

qRT-PCR结果显示, TNBC细胞MDA-MB-231、MDA-MB-453、MDA-MB-468中LncRNA WT1-AS的表达量显著高于正常乳腺细胞MCF10A

($P=0.001$ 、 $P=0.007$ 、 $P=0.005$)，见图1A。转染后MDA-MB-231细胞LncRNA WT1-AS的表达量显著降低($P=0.001$)，见图1B。

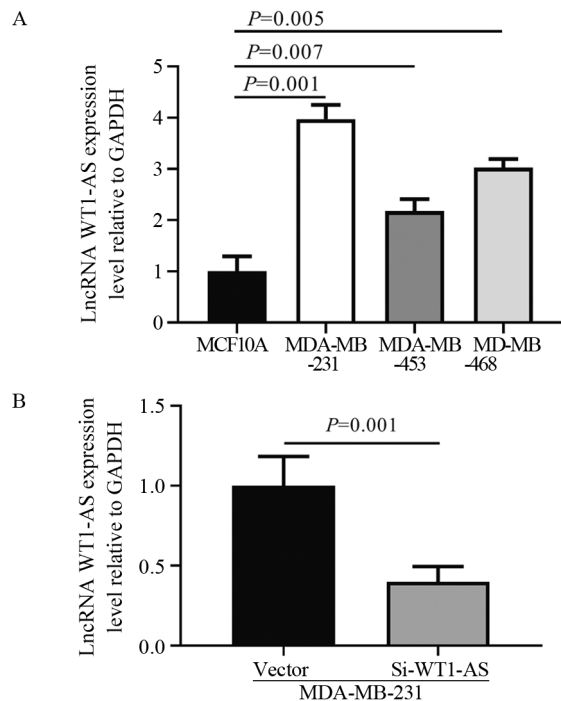


图1 LncRNA WT1-AS在TNBC细胞中的表达

Figure 1 Expression of LncRNA WT1-AS in triple-negative breast cancer (TNBC) cells

2.2 LncRNA WT1-AS对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响

Transwell结果显示，在沉默MDA-MB-231细胞LncRNA WT1-AS表达后，穿膜细胞的数量由 107 ± 6 下降至 61 ± 5 ，差异有统计学意义($P=0.005$)，见图2。表明下调LncRNA WT1-AS可以抑制MDA-MB-231细胞侵袭能力。

2.3 LncRNA WT1-AS对MDA-MB-231细胞迁移能力的影响

划痕实验结果表明，沉默MDA-MB-231细胞LncRNA WT1-AS表达后，细胞在24 h时的迁移率显著下降 (Vector: (52.0 ± 2.7)%，Si-WT1-AS: (35.6 ± 2.9)%； $P=0.002$)，见图3。表明下调LncRNA WT1-AS可以抑制MDA-MB-231细胞迁移能力。

2.4 LncRNA WT1-AS对MDA-MB-231细胞EMT的影响

Western blot结果显示，沉默MDA-MB-231细胞LncRNA WT1-AS表达后，E-cadherin表达量显著上调($P=0.000$)，N-cadherin、Vimentin和Snail表达量显著下调($P=0.000$)，见图4。说明下调LncRNA WT1-AS抑制了MDA-MB-231细胞的EMT能力。

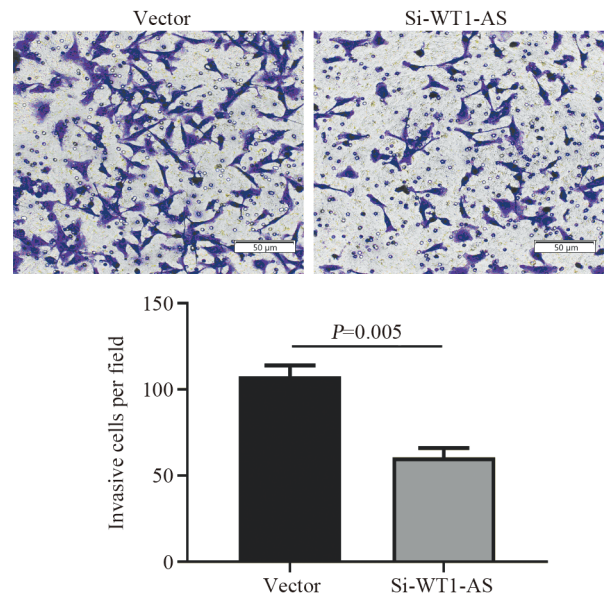


图2 Transwell实验检测LncRNA WT1-AS对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响($\times 200$)

Figure 2 Effect of LncRNA WT1-AS on invasion ability of MDA-MB-231 cells detected by Transwell assay ($\times 200$)

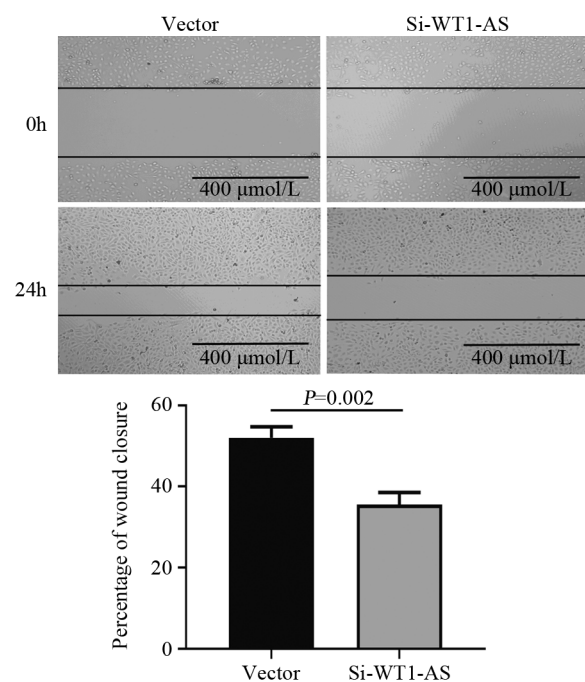
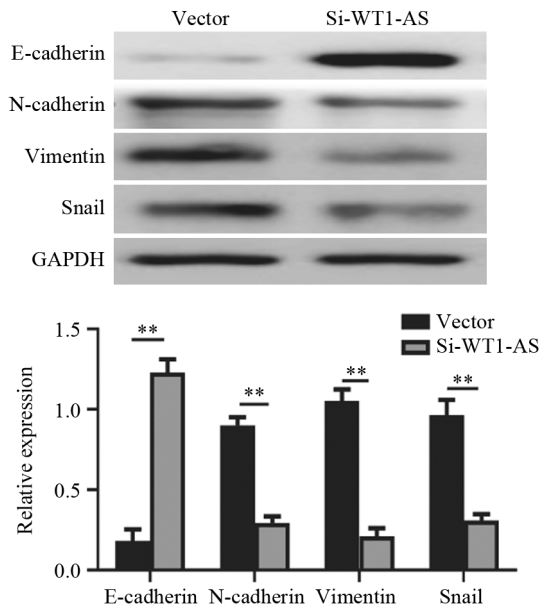


图3 划痕实验检测LncRNA WT1-AS对MDA-MB-231细胞侵袭能力的影响($\times 100$)

Figure 3 Effect of LncRNA WT1-AS on invasion ability of MDA-MB-231 cells detected by wound healing assay ($\times 100$)

3 讨论

TNBC是乳腺癌中预后最差的亚型，其中位生存期很少超过18月^[9]。只有30%~45%的TNBC患者可以达到与其他乳腺癌亚型相同的病理完全缓解和生存率^[10]。目前，仍然没有有效的靶点治疗TNBC。LncRNA在肿瘤的发生发展中扮演着重要



** $P<0.01$.

图4 Western blot检测LncRNA WT1-AS对MDA-MB-231细胞E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和Snail表达的影响
Figure 4 Effect of LncRNA WT1-AS on E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Snail expression in MDA-MB-231 cells detected by Western blot

作用。众多LncRNA在肿瘤中发生失调，它们可能是治疗肿瘤的潜在靶点^[3]。研究发现，WT1-AS在人胃癌组织中表达下调，过表达后胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭受到抑制^[11-12]。此外，过表达WT1-AS抑制了宫颈癌细胞的凋亡、迁移、侵袭^[12]。目前关于WT1-AS在TNBC中的表达及其发生发展中的作用未见报道。我们检测发现WT1-AS在MDA-MB-231、MDA-MB-453及MDA-MB-468等TNBC细胞中表达升高。沉默WT1-AS后，通过Transwell和划痕实验发现，MDA-MB-231细胞的侵袭和迁移能力受到抑制。这说明WT1-AS具有促进TNBC细胞MDA-MB-231侵袭与迁移的能力。

EMT是一种高度保守的细胞程序，调控极化上皮细胞转化为可运动的间质细胞，在肿瘤发生发展过程中，细胞间的黏附性降低，极性丧失，基质重塑。EMT与肿瘤的发生、恶性进展、肿瘤干细胞、迁移、肿瘤细胞进入血循环、侵袭及药物抵抗相关^[12]。E-cadherin、N-cadherin是跨膜黏附糖蛋白，EMT的进程中出现上皮细胞标志物E-cadherin表达降低，间质细胞标志物N-cadherin表达上调，此外，Vimentin和Snail亦是EMT发生的两个标志物^[13]。本研究发现，沉默WT1-AS后，E-cadherin表达上调，N-cadherin、Vimentin和Snail表达下调。说明沉默WT1-AS逆转了MDA-MB-231细胞EMT的过程。

综上所述，本研究发现WT1-AS在TNBC细胞的侵袭迁移过程中发挥着重要作用，并发现WT1-AS通过调控EMT促进TNBC细胞的侵袭迁移。这提示了调控WT1-AS也许是治疗TNBC可能的手段之一，但其具体机制仍需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Kwa MJ, Adams S. Checkpoint inhibitors in triple-negative breast cancer (TNBC): Where to go from here[J]. Cancer, 2018, 124(10): 2086-2103.
- [2] Giudici F, Petracci E, Nanni O, *et al*. Elevated levels of eEF1A2 protein expression in triple negative breast cancer relate with poor prognosis[J]. PLoS One, 2019, 14(6): e0218030.
- [3] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(1): 47-62.
- [4] Calle AS, Kawamura Y, Yamamoto Y, *et al*. Emerging roles of long non-coding RNA in cancer[J]. Cancer Sci, 2018, 109(7): 2093-2100.
- [5] Dallosso AR, Hancock AL, Malik S, *et al*. Alternately spliced WT1 antisense transcripts interact with WT1 sense RNA and show epigenetic and splicing defects in cancer[J]. RNA, 2007, 13(12): 2287-2299.
- [6] Lv L, Chen G, Zhou J, *et al*. WT1-AS promotes cell apoptosis in hepatocellular carcinoma through down-regulating of WT1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34: 119.
- [7] Cao J, Wang H, Xu P, *et al*. Loss of long noncoding RNA WT1-AS is associated with better survival in early stage of cervical cancer[J]. Int J Clin Exp Med, 2018, 11(8): 8158-8163.
- [8] Tian T, Gong Z, Wang M, *et al*. Identification of long non-coding RNA signatures in triple-negative breast cancer[J]. Cancer Cell Int, 2018, 18: 103.
- [9] Kast K, Link T, Friedrich K, *et al*. Impact of breast cancer subtypes and patterns of metastasis on outcome[J]. Breast Cancer Res Treat, 2015, 150(3): 621-629.
- [10] Kalimutho M, Parsons K, Mittal D, *et al*. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer: Combating a Stubborn Disease[J]. Trends Pharmacol Sci, 2015, 36(12):822-846.
- [11] Du T, Zhang B, Zhang S, *et al*. Decreased expression of long non-coding RNA WT1-AS promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1862(1): 12-19.
- [12] Luo H, Zhang J, He Z, *et al*. Long Noncoding RNA WT1-AS Inhibits the Progression of Cervical Cancer by Sponging miR-205[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2020. Online ahead of print.
- [13] Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3): 212-226.

[编辑: 周永红; 校对: 黄国玲]

作者贡献:

舒家武: 细胞培养、细胞转染、划痕实验、Transwell实验及全部实验数据的分析工作, 撰写论文
李熙君: 实时定量PCR实验
朱力勤: Western blot实验
王燕燕: 实验设计、实验数据审核及指导文章修改