

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.06.008

· 基础研究 ·

TRAIL 通过降低 EGFR 的表达水平抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的侵袭

李秀萍¹, 徐志伟¹, 刘葆金¹, 吴崇学¹, 朱坤潮¹, 谢亮¹, 朱小峰¹, 苏微微¹, 李海甲¹, 孟旭莉²(1. 桐乡市第一人民医院普外科, 浙江 桐乡 314500; 2. 浙江省立同德医院 乳腺外科, 浙江 杭州 311122)

[摘要] **目的:**探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的可能机制。**方法:**Western blotting、Real-time PCR 分别检测 rsTRAIL 处理对 MDA-MB-231 细胞内 EGFR、磷酸化转录因子 I κ B α (p-I κ B α)和 miR-146a 表达的影响。向 MDA-MB-231 细胞转染 miR-146a mimics、miR-146a inhibitor, Western blotting 检测 miR-146a 对 MDA-MB-231 细胞中 EGFR 表达水平的影响。Transwell 实验检测 rsTRAIL、miR-146a 和 EGFR 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响。**结果:**20 ng/ml rsTRAIL 显著抑制 MDA-MB-231 细胞中 EGFR 的表达(6 h, $t=4.35$, $P<0.05$; 12 h, $t=8.609$, $P<0.01$; 24 h, $t=10.84$, $P<0.01$), 提高 p-I κ B α (6 h, $t=-4.201$, $P<0.05$; 12 h, $t=-15.805$, $P<0.01$; 24 h, $t=-35.921$, $P<0.01$)和 miR-146a 的表达水平(6 h, $t=-4.67$, $P<0.05$; 12 h, $t=-11.635$, $P<0.01$; 24 h, $t=-15.8$, $P<0.01$), 并且呈时间依赖性。在 MDA-MB-231 细胞中转染 miR-146a mimics 显著抑制 EGFR 的表达($t=6.25$, $P<0.01$); 反之, 转染 miR-146a inhibitor 则促进细胞内 EGFR 的表达($t=-3.674$, $P<0.05$)。rsTRAIL 处理($t=7.108$, $P<0.01$)、转染 miR-146a mimics 或 siEGFR($t=6.051$, $P<0.01$; $t=5.245$, $P<0.01$)均导致细胞的侵袭能力显著下降。**结论:**rsTRAIL 通过特异性增加 miR-146a 的表达水平靶向降低 EGFR 的表达从而抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力。

[关键词] 乳腺癌; 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; miR-146a; 表皮生长因子受体

[中图分类号] R737.9; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)06-0724-05

TRAIL suppresses the invasion capability of human breast cancer MDA-MB-231 cells through reducing EGFR expression

Li Xiuping¹, Xu Zhiwei¹, Liu Baojin¹, Wu Chongxue¹, Zhu Kunchao¹, Xie Liang¹, Zhu Xiaofeng¹, Su Weiwei¹, Li Haijia¹, Meng Xuli²(1. Department of General Surgery, the First People's Hospital, Tongxiang 314500, Zhejiang, China; 2. Department of Breast Surgery, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 311122, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:**To investigate the potential mechanism by which tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) inhibits the invasion capability of breast cancer MDA-MB-231 cells. **Methods:**After treating MDA-MB-231 cells with rsTRAIL, the expression of EGFR and p-I κ B α were examined by immunoblotting, and the level of miR-146 was measured by real-time quantitative PCR. Immunoblotting was also used to detect the effect of miR-146a on EGFR expression. Transwell assay was carried out to assess the effects of rsTRAIL, miR-146a and EGFR on the invasion ability of MDA-MB-231 cells. **Results:** In MDA-MB-231 cells treated for 6, 12, and 24 hours, rsTRAIL (20 ng/ml) significantly suppressed the expression of EGFR (6 h, $t=4.35$, $P<0.05$; 12 h, $t=8.609$, $P<0.01$; 24 h, $t=10.84$, $P<0.01$), increased the level of the phosphorylated I κ B α (6 h, $t=-4.201$, $P<0.05$; 12 h, $t=-15.805$, $P<0.01$; 24 h, $t=-35.921$, $P<0.01$), and upregulated the expression of miR-146a (6 h, $t=-4.67$, $P<0.05$; 12 h, $t=-11.635$, $P<0.01$; 24 h, $t=-15.8$, $P<0.01$), and on time dependent. Compared with that in control cells, the level of EGFR ($t=6.25$, $P<0.01$) was significantly decreased in MDA-MB-231 cells transfected with miR-146a mimics, whereas in the same cells transfected with miR-146 inhibitor the expression of EGFR promoted ($t=-3.674$, $P<0.05$). Furthermore, transfection with rsTRAIL, as well as transfection with miR-146a mimics or siEGFR all dramatically decreased the invasion ability of MDA-MB-231 cells ($t=7.108$, $P<0.01$; $t=6.051$, $P<0.01$; $t=5.245$, $P<0.01$)

[作者简介] 李秀萍(1977-),女,黑龙江省密云市人,主要从事乳腺肿瘤方面的研究,E-mail:xiuxiutx@163.com

[通信作者] 孟旭莉(Meng Xuli, corresponding author),E-mail:13516835772@163.com

respectively). **Conclusion:** rsTRAIL specifically suppresses EGFR-dependent invasion capability of human breast cancer through inducing increased expression of miR-146a.

[**Key words**] breast cancer; tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL); miR-146a; EGFR

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(6): 724-628]

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2 L)是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)家族成员之一^[1], 通过结合 TRAIL-R1 或 TRAIL-R2(又称 DR4 或 DR5)影响多种肿瘤细胞如结肠癌和乳腺癌细胞的生物学行为, 包括诱导凋亡^[2-4]和抑制转移和侵袭能力。目前对 TRAIL 抑制肿瘤细胞侵袭能力的分子机制研究还不十分深入。表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)是肿瘤血管生长的促进因子, 与肿瘤的发生和转移密切相关^[5]。EGFR 在多种肿瘤细胞中表达增加, 而 miR-146a 能够靶向下调 EGFR 的表达^[6-7], 并抑制肿瘤细胞转移侵袭能力。TRAIL 能否通过影响 miR-146a 的表达水平而调控 EGFR 的表达目前还没有报道, 本研究以乳腺癌 MDA-MB-231 细胞为研究对象, 从 miRNA 的角度探讨 TRAIL 对 EGFR 表达的调控机制, 为 TRAIL 在临床抗肿瘤治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳腺癌 MDA-MB-231 细胞由本实验室保存, 在含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基及 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。EGFR 的 siRNA(siEGFR)、过表达 miR-146a 的 miR-146a mimics 和抑制表达的 miR-146a inhibitor 以及对照小 RNA 分子(negative control, NC)和 Ctrl(control) inhibitor 均由 Life Technologies 公司合成。干粉 siRNA 用 DEPC 水稀释成 20 μmol/L 浓度, -20 °C 保存。转染试剂 INTERFERin[®] 购自 Polyplus-transfection SA 公司, 抗 EGFR 和抗 p-IκBα 抗体购自 CST 公司, TRIzol 购自 Ambion 公司, 重组人可溶性 TRAIL(recombinant soluble TRAIL, rsTRAIL)购自美国 PeproTech 公司。实时荧光定量 PCR 使用 ABI 公司 Taqman miRNA 分析系统。Transwell 小室购自美国 Corning Costar 公司。

1.2 Western blotting 检测 rsTRAIL 对 MDA-MB-231 细胞内 EGFR、p-IκBα 表达的影响

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 按 5 × 10⁵/ml 接种于 12 孔板, 加入浓度为 20 ng/ml 的 rsTRAIL, 培养 6、12、24 h 后, 提取细胞总蛋白, BCA

方法检测蛋白质浓度。每种样品取等量蛋白质经 10% SDS-PAGE, 转膜, 封闭, 分别与一抗和二抗孵育。使用 ECL 显影成像。运用 ImageJ 软件进行条带灰度值分析, 计算各蛋白质条带吸光度与相应内参吸光度的比值, 代表目的蛋白的相对表达量。实验重复 3 次。

1.3 Real-time PCR 检测 rsTRAIL 对 MDA-MB-231 细胞内 miR-146a 表达的影响

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 按 5 × 10⁵/ml 接种于 12 孔板, 加入浓度为 20 ng/ml 的 rsTRAIL, 分别培养 6 h, 12 h 和 24 h 后, TRIzol 法抽提细胞总 RNA, 利用 Taqman miRNA 分析系统检测 miRNA 表达水平, 以 U6 作为参照。miR-146a 和 U6 的 PCR 探针合成于美国 ABI 公司。每组均设 3 个重复孔, PCR 反应条件参照 Taqman miRNA 试剂盒说明书, 应用 Roche Lightcycler 2.0 仪器检测。以 2^{-ΔΔCt} 表示 miRNA 的相对表达水平。

1.4 Western blotting 检测 miR-146a 对 MDA-MB-231 细胞内 EGFR 表达的影响

取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 按 1 × 10⁵/ml 接种于 12 孔板。贴壁过夜后, 按照 INTERFERin[®] 使用手册转染 miR-146a mimics 和 miR-146a inhibitor, 分别以 NC 或 Ctrl inhibitor 为对照。取转染 48 h 后的 MDA-MB-231 细胞, Western blotting 检测各组细胞内 EGFR 的表达, 方法同 1.2。

1.5 Transwell 迁移实验检测转染小 RNA 对 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力的影响

MDA-MB-231 细胞分为 4 组: 两组转染 NC、一组转染 siEGFR、一组转染 miR-146a mimics。转染 48 h 后, 各组细胞胰酶消化, 制成 2.5 × 10⁵/ml 细胞悬液, 取 100 μl 加入到 8 nm 滤膜的 Transwell 小室上层, 其中一组转染 NC 的细胞培养基中加入 rsTRAIL。Transwell 小室下层加入 1 ml 含 10% FBS 的高糖 DMEM 培养基。37 °C、5% CO₂ 条件下培养 18 h 后取出小室, PBS 漂洗 2 次, 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, 苏木精染色 15 min, 置于显微镜下拍照, 计数每张滤膜 10 处视野下的细胞数量, 取其平均值表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.6 统计学处理

采用 SPSS15.0 软件进行数据统计, 结果以 $\bar{x} \pm s$

表示,组间数据资料对比采用 *t* 值检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 rsTRAIL 抑制 MDA-MB-231 细胞中 EGFR 表达、提高 IκBα 磷酸化水平

Western blotting 检测结果显示,20 ng/ml 的 rsTRAIL 刺激 6 h 后,EGFR 的表达量显著下降($t =$

4.35, $P < 0.05$),12 h 和 24 h 的表达量下降更明显(12 h, $t = 8.609$, $P < 0.01$; 24 h, $t = 10.84$, $P < 0.01$) (图 1 A、B)。而转录因子 IκBα 的磷酸化(p-IκBα)水平随 rsTRAIL 处理时间的延长而显著增加(6 h, $t = -4.201$, $P < 0.05$; 12 h, $t = -15.805$, $P < 0.01$; 24 h, $t = -35.921$, $P < 0.01$) (图 1 A、C)。

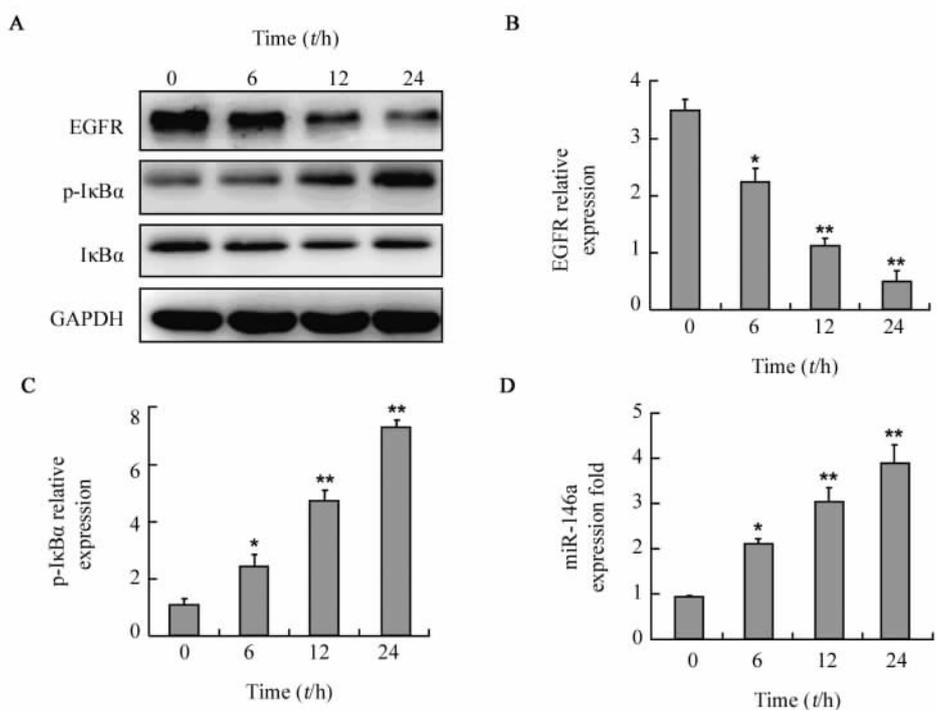


图 1 TRAIL 对 MDA-MB-231 细胞中 EGFR、NF-κB 和 miR-146a 表达水平的影响

Fig. 1 Effects of TRAIL on expression of EGFR, NF-κB and miR-146a in MDA-MB-231 cells

A: Western blotting; B, C: Relative expression level; D: Q-PCR assay;

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs untreated cells (0 h group)

2.2 rsTRAIL 提高 MDA-MB-231 细胞中 miR-146a 的表达水平

Real-time PCR 检测结果(图 1D)显示,rsTRAIL 处理 MDA-MB-231 细胞后,miR-146a 的水平显著增加(6 h, $t = -4.67$, $P < 0.05$; 12 h, $t = -11.635$, $P < 0.01$; 24 h, $t = -15.8$, $P < 0.01$),呈时间依赖性变化。

2.3 miR-146a 降低 MDA-MB-231 细胞中 EGFR 的表达水平

与对照 RNA 相比,miR-146a mimics 在乳腺癌细胞中能够降低 EGFR 水平,相对表达值从 1.0 ± 0.2 下降到 0.2 ± 0.2 ($t = 6.25$, $P < 0.01$),而 miR-146a inhibitor 的结果与之相反,相对表达值从 $0.4 \pm$

0.1 增加到 0.7 ± 0.1 ($t = -3.674$, $P < 0.05$) (图 2)。该结果表明,miR-146a 能够在 MDA-MB-231 细胞中抑制 EGFR 的表达。

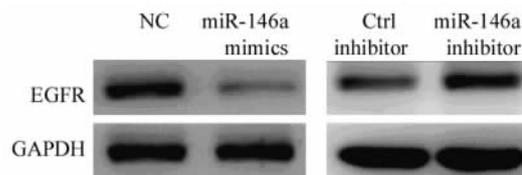


图 2 miR-146a 调控 MDA-MB-231 细胞中 EGFR 的表达水平

Fig. 2 Expression of EGFR in MDA-MB-231 cells regulated by miR-146a

2.4 rsTRAIL 处理及 miR-146a、EGFR 的表达变化均影响 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力

Transwell 实验结果(图 3)显示,与对照组相比,经 rsTRAIL 处理后 MDA-MB-231 细胞穿过滤膜的数量显著减少($t = 7.108, P < 0.01$),而转染 miR-146a mimics($t = 6.051, P < 0.01$)或 siEGFR($t = 5.245, P < 0.01$)组的细胞侵袭能力均显著下降。

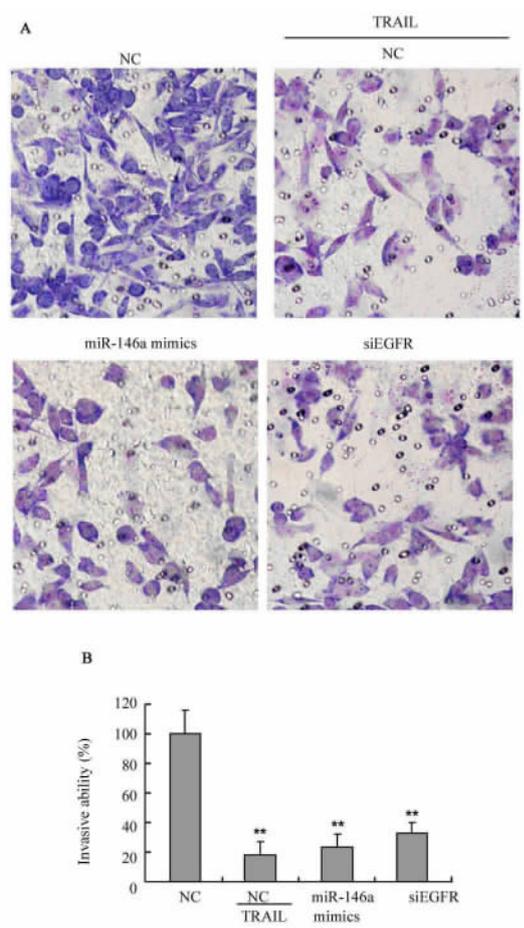


图 3 rsTRAIL 处理,或转染 miR-146a mimics 或 siEGFR 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的影响($\times 200$)

Fig. 3 Effects of the treatment with rsTRAIL, or transfection of miR-146a mimics or siEGFR on invasive ability of MDA-MB-231($\times 200$)

A:Transwell assay;B:The quantified migration of cells

** $P < 0.01$ vs NC group

3 讨论

EGFR 对乳腺癌的发生、发展和转移均起着重要的促进作用,其表达水平高低可作为临床预后评估和治疗效果评价的客观指标。TRAIL 对肿瘤细胞具有选择性的细胞毒作用,具有良好的临床应用前

景^[8]。最近的研究^[9-10]发现,TRAIL 除能够诱导肿瘤细胞凋亡外,还能够显著抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭。本研究在 TRAIL 敏感的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中发现,TRAIL 能够显著抑制 EGFR 的蛋白质表达水平,同时也能够增加 NF- κ B 依赖的 miR-146a 的表达水平。有研究^[6, 11]发现 miR-146a 能够靶向调控肿瘤细胞中 EGFR 的表达。本研究证实,TRAIL 通过诱导 miR-146a 的表达而特异性地降低 EGFR 的表达水平,从而抑制了乳腺癌细胞的侵袭。

尽管 MDA-MB-231 细胞是 TRAIL 敏感细胞,但较高浓度的 TRAIL 处理细胞后仍然有 20% 的细胞存活,而这些存活的肿瘤细胞的迁移能力明显受到抑制^[9]。最近有报道^[12-13]发现,TRAIL 能够通过增加 miR-146a 水平而抑制肿瘤细胞的关键转移分子-CXCR4 的表达。该 TRAIL-miR-146a-CXCR4 分子轴可能是 TRAIL 具有抑制肿瘤细胞侵袭能力的主要机制。NF- κ B 是 miR-146a 启动子区的关键转录因子^[14],TRAIL 能够通过激活 NF- κ B 活性而增强 miR-146a 的表达^[9]。有报道证实,miR-146a 抑制肿瘤细胞侵袭除靶向调控 CXCR4 外,还能够特异性靶向 EGFR 的 3' UTR 区而调控 EGFR 的表达水平^[6-7, 11]。但 TRAIL 是否能够通过增强 miR-146a 的表达而抑制 EGFR 的表达还没有报道。在本研究中,TRAIL 能够显著抑制 MDA-MB-231 细胞中 EGFR 的表达,而 miR-146a 也能够显著抑制 EGFR 的表达。该 TRAIL-miR-146a-EGFR 分子轴提示,TRAIL 影响肿瘤细胞生物学活性的机制较为复杂,既能够直接参与基因表达的调控^[15-16],还能够通过特异性调节 miRNA 的表达而间接调控某些基因的表达。

本研究证实,TRAIL 通过降低 EGFR 的表达而抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移能力。乳腺癌 MDA-MB-231 细胞是 TRAIL 敏感的细胞株,TRAIL 处理后少量残存的肿瘤细胞迁移能力也明显受到了抑制,为临床上 TRAIL 的抗肿瘤治疗提供了依据,拓宽了视野。

[参考文献]

- [1] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. Immunity, 1995, 3(6): 673-682.
- [2] Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, et al. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL [J]. Science, 1997, 276(5309): 111-113.
- [3] Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors [J].

- Science, 1997, 277(5327): 818-821.
- [4] Suliman A, Lam A, Datta R, et al. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways [J]. *Oncogene*, 2001, 20(17): 2122-2133.
- [5] He K, Gao JL. Protopine inhibits heterotypic cell adhesion in MDA-MB-231 cells through down-regulation of multi-adhesive factors [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2014, 11(2): 415-424.
- [6] Li Y, Vandenboom TG, Wang Z, et al. Up-regulation of miR-146a contributes to the inhibition of invasion of pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(Suppl 8): 5703.
- [7] Li Y, Vandenboom TG, Wang Z, et al. miR-146a suppresses invasion of pancreatic cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(4): 1486-1495.
- [8] Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, et al. Nature's TRAIL-on a path to cancer immunotherapy [J]. *Immunity*, 2003, 18(1): 1-6.
- [9] Wang D, Liu D, Gao J, et al. TRAIL-induced miR-146a expression suppresses CXCR4-mediated human breast cancer migration [J]. *FEBS J*, 2013, 280(14): 3340-3353.
- [10] Azijli K, Yuvaraj S, Peppelenbosch MP, et al. Kinome profiling of non-canonical TRAIL signaling reveals RIP1-Src-STAT3-dependent invasion in resistant non-small cell lung cancer cells [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 19): 4651-4661.
- [11] Hurst DR, Edmonds MD, Scott GK, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(4): 1279-1283.
- [12] Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment [J]. *Blood*, 2006, 107(5): 1761-1767.
- [13] Ehtesham M, Winston JA, Kabos P, et al. CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness [J]. *Oncogene*, 2006, 25(19): 2801-2806.
- [14] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(33): 12481-12486.
- [15] Liu N, Chen T, Wang X, et al. Msi1 confers resistance to TRAIL by activating ERK in liver cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(8): 897-903.
- [16] Matte I, Lane D, Boivin M, et al. MUC16 mucin (CA125) attenuates TRAIL-induced apoptosis by decreasing TRAIL receptor R2 expression and increasing c-FLIP expression [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:234.
- [收稿日期] 2015 - 07 - 30 [修回日期] 2015 - 11 - 12
[本文编辑] 党瑞山

· 科技动态 ·

拟南芥细胞核中 RNA-蛋白相互作用与 RNA 二级结构呈负相关关系

真核细胞中,转录后调控需要顺式作用元件和反式作用因子共同发挥作用,而其中 RNA 的二级结构以及 RNA-蛋白相互作用直接影响了 RNA 在转录后的被调控以及 RNA 行使功能。因此,研究任何物种中 RNA 的二级结构以及 RNA-蛋白相互作用,并探究这两者之间的联系具有重要的科学意义,但目前尚无相关文献报道这两者之间的关系。

该文作者利用了可以分别特异性识别并降解单链 RNA、双链 RNA 的 RNA 酶,对拟南芥的胞核 RNA 进行蛋白结合 RNA 图谱分析(protein interaction profile sequencing, PIP-seq)。首先分析了 RNA 上的蛋白结合位点(protein-protected sites, PPS)的保守性,发现在外显子/内含子区 PPS 保守性显著高于其两翼未结合蛋白的序列,暗示了 PPS 生物学功能上的重要性。然后分析了 PPS 在基因上的分布,绝大部分 PPS 分布在核内的 mRNA 上,其中,编码序列(coding sequence, CDS)分布最多,内含子次之。

研究重点揭示了 RNA 二级结构与 RNA 结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)结合呈负相关关系。无论是 RNA 的起始密码子、终止密码子、内含子区以及上游开放读码框区,蛋白结合与二级结构均呈负相关关系,即 RNA 二级结构越显著的序列片段与 RBP 结合越少。另外,作者还发现可以利用 PIP-seq 预测核内 mRNA 的加工剪接方式以及多聚腺苷酸化的方式。最后,作者根据 PPS 预测了一系列蛋白结合基序,并利用其进行 RNA 亲和色谱-质谱检测发现,主要定位于叶绿体的 RBP CP29A 也可以于胞核内与 RNA 相互作用。

总之,该研究首次对真核细胞核中 RNA-蛋白相互作用与 RNA 二级结构的关系进行了分析,并揭示了真核细胞中 RNA 二级结构与 RBP 结合的负相关关系,该成果对真核细胞中 RNA 的作用机制研究具有重要指导意义。

[徐俊芳 摘译,王品 审阅. Gosai SJ, Foley SW, Wang D, et al. *Mol Cell*, 2015, 57(2): 376-388.]