

· 论 著 ·

miRNA-301b 对三阴性型乳腺癌的血管生成拟态和预后的影响

洪志鹏, 陈德波, 王青兰, 洪成业

福建医科大学附属泉州第一医院乳腺科, 福建 泉州 362000

摘要: **目的** 探讨微小核糖核酸 301b(miR-301b)对体外三阴性型乳腺癌(TNBC)细胞血管生成拟态的作用,并结合微阵列数据库的生物信息学数据分析 miR-301b 对 TNBC 患者预后的影响。**方法** 体外培养 TNBC 细胞株 MDA-MB-231 细胞,使用脂质体 Lipofectamine2000 将 miR-301b 模拟物(miRNA 过表达组)、miR-301b 抑制剂(miRNA 抑制组)、miR-301b 阴性对照(阴性对照组)分别转染于 MDA-MB-231 细胞,通过血管生成拟态实验验证 miR-301b 在 TNBC 细胞中的血管生成作用。同时,通过 Kaplan-Meier Plotter 平台(<http://kmplot.com/analysis/>)的微阵列数据库获取相关数据分析 miR-301b 高/低表达对 TNBC 患者 10 年、15 年生存的影响。**结果** 血管生成拟态实验表明,miR-301b 过表达组 MDA-MB-231 细胞的管形成数量分别是阴性对照组的 3.9 倍($P < 0.01$)、miR-301b 抑制组的 9.6 倍($P < 0.01$),而 miR-301b 抑制组 MDA-MB-231 细胞的管形成数量比阴性对照组减少了 58% ($P < 0.01$)。根据微阵列数据库获取相关的 10 年、15 年的队列随访数据,miR-301b 的高表达是 TNBC 患者不良预后的危险因素($HR = 2.09, 95\% CI: 1.21 \sim 3.60, P = 0.0068$);第 3 四分位数(P_{75})生存时间:miR-301b 高表达队列 TNBC 患者是 38.27 个月,miR-301b 低表达队列 TNBC 患者是 106.59 个月。**结论** MDA-MB-231 细胞中存在血管生成拟态现象,miR-301b 过表达促进 TNBC 细胞的血管生成,是 TNBC 的一个负性预后因子。进一步寻找、研究、验证 miR-301 在 TNBC 中的靶基因,有望成为 TNBC 抗血管生成治疗的一个突破口。

关键词: 微小核糖核酸 301b; 乳腺癌,三阴性型; 血管生成拟态; 微阵列数据库; 生存分析

中图分类号: R 737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2019)04-0443-04

Effect of miRNA-301b on vasculogenic mimicry and prognosis of triple-negative breast cancer in vitro

HONG Zhi-peng, CHEN De-bo, WANG Qing-lan, HONG Cheng-ye

Department of Breast Surgery, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian 362000, China

Corresponding author: CHEN De-bo, E-mail: deboqz@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect of microRNA (miR) -301b on vasculogenic mimicry of triple-negative breast cancer (TNBC) cells in vitro, and to analyze the prognostic effect of miR-301b on TNBC patients by bioinformatics data from microarray database. **Methods** TNBC cell line MDA-MB-231 cells were cultured in vitro. Lipofectamine 2000 was used to transfect miR-301b mimic(miR-301b overexpression group), miR-301b inhibitor (miR-301b inhibition group) and miR-301b negative control (NC group) into MDA-MB-231 cells, respectively. Vasculogenic mimicry experiment was used to verify the effect of angiogenesis of miR-301b in MDA-MB-231 cells. At the same time, relevant data were obtained from the microarray database of the Kaplan-Meier Plotter platform (<http://kmplot.com/analysis/>) to analyze the effect of miR-301b high/low expression on the survival of TNBC patients at 10 and 15 years. **Results** Vasculogenic mimicry experiment showed that the number of tube formation of MDA-MB-231 cells in miR-301b overexpression group was 3.9 times as much as that in NC group ($P < 0.01$) and 9.6 times as much as that in miR-301b inhibition group ($P < 0.01$), respectively, while the number of tube formation in miR-301b inhibition group was reduced by 58% compared with NC group ($P < 0.01$). According to followed-up cohort data of 10 years and 15 years from microarray database, high expression of miR-301b was a risk factor of poor prognosis in patients with TNBC ($HR = 2.09, 95\% CI: 1.21 \sim 3.60, P = 0.0068$). The survival time [third four quantile (P_{75})] was 38.27 months for TNBC patients with miR-301b high-expression cohort, and

was 106.59 months for TNBC patients with miR-301b low-expression cohort. **Conclusions** Vasculogenic mimicry exists in MDA-MB-231 cells. Overexpression of miR-301b can promote angiogenesis of TNBC cells and is a negative prognostic factor of TNBC. Further searching, studying and verifying the target gene of miR-301b in TNBC is expected to be a breakthrough in anti-angiogenesis therapy of TNBC.

Key words: MicroRNA-301b; Triple-negative breast cancer; Vasculogenic mimicry; Microarray database; Survival analysis

Fund program: Youth Research Project of Fujian Health and Family Planning Commission (2016-1-91)

乳腺癌是一种异质性和复杂性疾病,主要分为四种生物亚型,即腔 A、腔 B、人上皮生长受体 2 (HER-2) 过表达型和三阴性型乳腺癌 (TNBC)^[1-3]。TNBC 占有乳腺癌病例的 10% ~ 20%,其特点是孕激素受体 (PR)、雌激素受体 (ER) 和 HER-2 均阴性表达。这几种生物学亚型可以通过免疫组织化学 (IHC) 生物标记物或基因表达谱来定义^[2,4]。一般来说,乳腺癌疾病的标准预后和预测因子是 PR、ER、HER2 和增殖细胞核抗原 (Ki-67) 状态^[3,5]。局部或全身治疗的选择也与这些不同的乳腺癌亚型有关^[4]。由于不能用内分泌治疗或针对 HER2 的治疗, TNBC 患者的预后相对较差。因此,这种类型的转移性乳腺癌需要特殊的治疗方法。据报道, TNBC 的转移包括多个步骤,如遗传和表观遗传改变、血管生成、肿瘤-基质相互作用、通过基底膜向血管内渗透、循环中的存活以及迁出血管进入远处组织^[6]。除了经典肿瘤血管生成途径外,不依赖机体内皮细胞的肿瘤微循环模式,即肿瘤细胞本身会构建它们自己的血管来获取血供,这一过程称作“血管生成拟态”(vasculogenic mimicry),同样可影响癌症的治疗和预后。目前抗血管生成已经成为 TNBC 治疗的一个新手段。因此,抗血管生成成为 TNBC 治疗的新方向。

微小核糖核酸 (microRNA, miR) 的异常表达在肿瘤的发生、发展中起着重要作用。据研究发现, miR-301b 在胰腺癌、肝癌、肺癌、口腔癌和结直肠癌等肿瘤中表达上调^[7-11],并且与肿瘤细胞增殖、克隆形成、迁移、侵袭、肿瘤生长、微血管密度等有关。最新一项研究表明 miR-301b 过表达促进 TNBC 细胞增殖,同时抑制 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 诱导的细胞凋亡^[12]。但对于 miR-301b 在 TNBC 细胞中的血管生成作用尚不清楚。本研究旨在通过研究 miR-301b 在 TNBC 中的血管生成作用,结合大宗微阵列数据库的 miR-301b 生物信息学数据^[13],探讨 miR-301b 是否可能成为 TNBC 血管治疗的新方向。

1 材料与方法

1.1 材料 TNBC 细胞 MDA-MB-231 自上海生物科

学研究院细胞资源中心获得。miR-301b mimic (模拟物)、miR-301b inhibitor (抑制物)、miR-301b 阴性对照 (negative control, NC) 均由上海吉玛制药技术有限公司合成。牛血清蛋白、胎牛血清、DMEM 培养基、Lipofectamine2000 购自 Thermo Fisher Scientific 公司, Matrigel 胶购自 BD 公司,倒置显微镜为 Nikon。

1.2 细胞培养 TNBC 细胞 MDA-MB-231 在 DMEM 培养基中培养,细胞培养基中添加 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/ml 链霉素,并在 37°C 加 5% CO₂ 的细胞培养箱中常规培养。根据细胞状态每隔 2 ~ 3 d 换新鲜培养基 1 次。

1.3 细胞转染 使用 Lipofectamine2000 对 miR-301b mimic (miR-301b 过表达组)、miR-301b inhibitor (miR-301b 抑制组)、miR-301b 阴性对照组 (NC 组) 分别进行转染,根据转染试剂说明书操作,未转染组作为空白对照组。转染 48 h 后收集细胞进行后续实验。

1.4 血管生成拟态实验 取 48 孔培养板,每孔加入 100 μ l Matrigel 原液,37 °C 下培养箱内孵育 30 min,待其凝固后,在每孔内接种浓度为 2×10^4 /ml 的各组细胞悬液,12 h 后终止培养,观察各种细胞的管腔样结构排列情况和完整程度。管形成数量计数:使用倒置显微镜对每孔细胞进行拍照并计数管状细胞结构 (完整围成一圈),随机取上、下、左、右、中心 5 个视野计数,取平均值作为该孔最终计数结果。实验重复 3 次。

1.5 微阵列数据库 通过 Kaplan-Meier Plotter 平台 (<http://kmpplot.com/analysis/>) 的微阵列国际乳腺癌协会的分子分类 (METABRIC) 数据库^[13] 获取相关数据,对 miR-301b 高/低表达 (截断值为 7.05,表达值高于 7.05 为高表达,低于 7.05 为低表达) 对 TNBC 预后影响进行生物信息学分析,主要分析 miR-301b 在 TNBC 的差异表达所导致的患者生存情况。该数据分析研究中设置的限制条件为患者均经过完整的系统治疗,包括病情需要的化学治疗等。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分

析对四组间的统计学差异进行分析。微阵列数据库的数据结果在该平台上默认加载到 R 统计软件中进行运算,绘制出 Kaplan-Meier 生存曲线,并计算风险比(HR)、95% 置信区间(95% CI)和 log-rank *P*。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-301b 过表达促进 TNBC 细胞血管生成

图 1 为四组血管生成拟态显微镜下图像。如图 2 所示,miR-301b 过表达组的 MDA-MB-231 细胞血管形成能力明显增强,是 NC 组细胞的管形成数量的 3.9 倍($P < 0.01$),是 miR-301b 抑制组细胞的管形成数

量的 9.6 倍($P < 0.01$);而 miR-301b 抑制组的 MDA-MB-231 细胞血管形成能力明显减弱,比 NC 组管形成数量减少了 58% ($P < 0.01$)。

2.2 微阵列 METABRIC 数据库获取数据的 miR-301b 高/低表达与 TNBC 的预后情况

根据微阵列 METABRIC 数据库获取的 10 年、15 年的队列随访数据,miR-301b 的高表达是 TNBC 患者不良预后的危险因素 ($HR = 2.09, 95\% CI: 1.21 \sim 3.60, P = 0.0068$)。低表达者的生存还未下降到 50% 中位生存时间,故对比了第 3 四分位数(P_{75})生存时间:miR-301b 高表达队列 TNBC 患者是 38.27 个月,miR-301b 低表达队列 TNBC 患者是 106.59 个月。提示 miR-

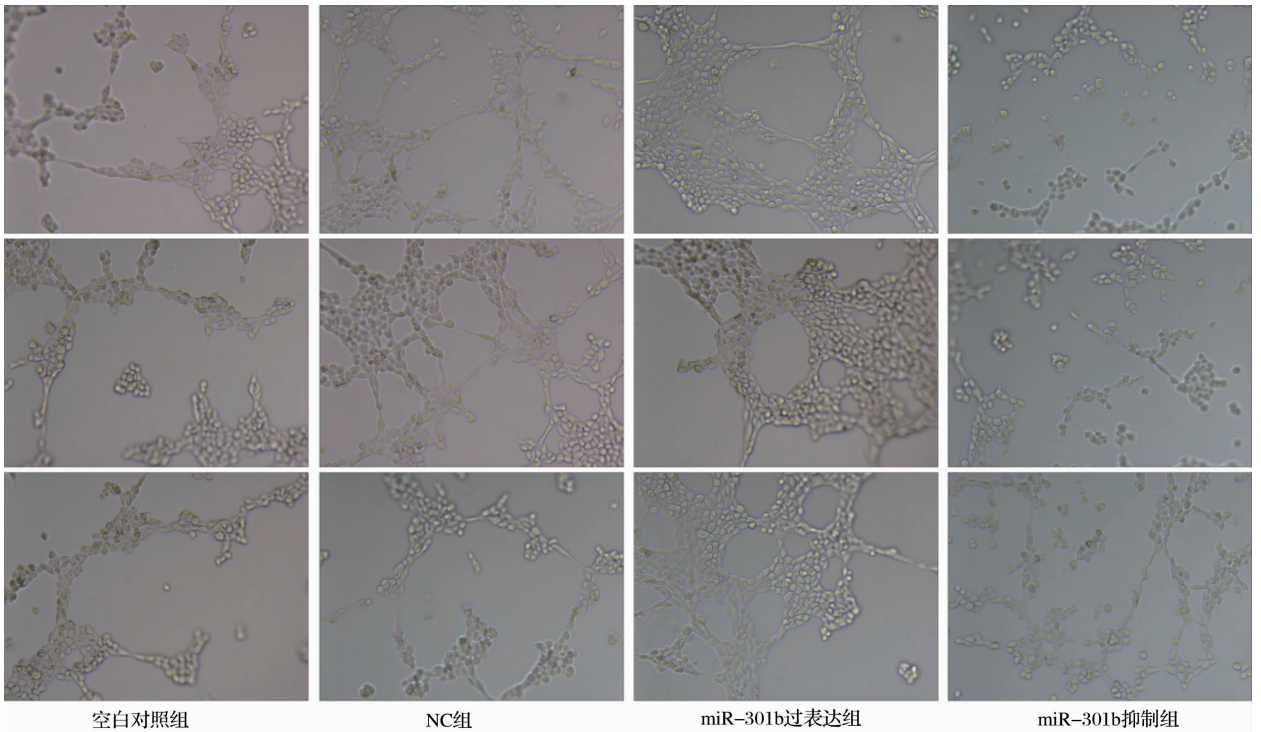
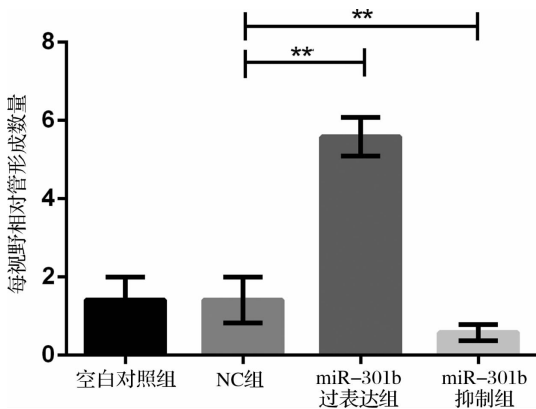


图 1 四组血管生成拟态显微镜下图像(×100)



注:与 NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 转染后 MDA-MB-231 细胞系中的管形成数量

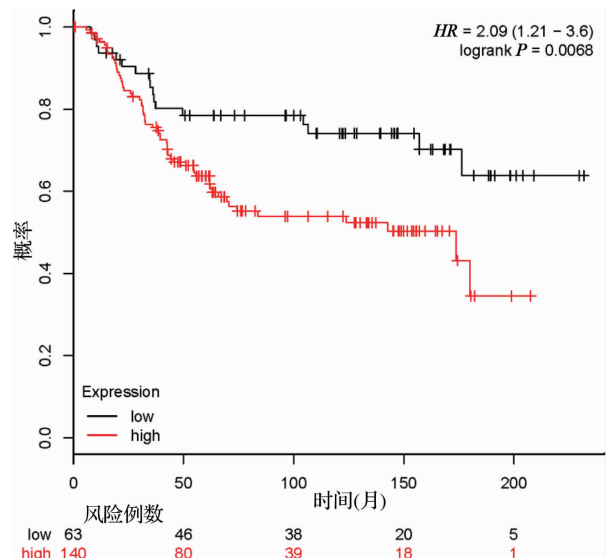


图 3 miR-301b 的高/低表达与 TNBC 的预后分析

301b 高表达是 TNBC 的一个负性预后因子。见图 3。

3 讨论

在许多类型的癌症中,miRNA 表达失控是导致癌症发生和发展的原因。研究显示,miRNA 的异常表达与细胞增殖、细胞侵袭和化疗敏感性有关。在这些 miRNA 中,有越来越多的证据表明 miR-301 在一些恶性肿瘤^[7,10-11]中上调。此外,miR-301 的功能作用也得到进一步的研究^[14-15]。Shi 等^[15]研究证实,miR-301 过表达是淋巴结阴性浸润性导管乳腺癌的一个负性预后因子;miR-301 表达减弱可通过靶向 FOXF2、BBC3、PTEN 和 COL2A1,降低细胞增殖、克隆形成性、迁移、侵袭、三苯氧胺抗性、肿瘤生长和微血管密度。本研究结果显示,miR-301b 过表达促进 TNBC 细胞血管生成,并且 miR-301 过表达是 TNBC 的一个负性预后因子,与以上研究结果一致。

由于高度侵袭性肿瘤具有模仿胚胎血管生成模式的独特能力,TNBC 中存在血管生成拟态^[16-17]。TNBC 能够在体内和体外、异种移植模型和人体标本中形成血管样网络。血管生成拟态决定了肿瘤细胞包围形成血管的能力,并且代表和指示了 TNBC 患者的不良预后^[17]。本研究发现 miR-301b 低表达可抑制 TNBC 细胞血管生成,并且 miR-301b 低表达显示出更长久的生存获益。因此,进一步寻找、研究、验证 miR-301 在 TNBC 中的靶基因,有望成为 TNBC 抗血管生成治疗的一个突破口,从而改善 TNBC 的不良预后。

参考文献

[1] Gerratana L, Fanotto V, Bonotto M, et al. Pattern of metastasis and outcome in patients with breast cancer[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2015, 32(2): 125-133.

[2] Kang Y, Siegel PM, Shu W, et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone[J]. *Cancer Cell*, 2003, 3(6): 537-549.

[3] Feys L, Descamps B, Vanhove C, et al. Radiation-induced lung damage promotes breast cancer lung-metastasis through CXCR4 signaling[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 26615-26632.

[4] Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011[J]. *Ann Oncol*, 2011, 22(8): 1736

-1747.

- [5] Karlsson E, Appelgren J, Solterbeck A, et al. Breast cancer during follow-up and progression-A population based cohort on new cancers and changed biology[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(17): 2916-2924.
- [6] Neophytou C, Boutsikos P, Papageorgis P. Molecular mechanisms and emerging therapeutic targets of triple-negative breast cancer metastasis[J]. *Front Oncol*, 2018, 8:31.
- [7] Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer[J]. *Int J Cancer*, 2007, 120(5): 1046-1054.
- [8] Jiang J, Gusev Y, Aderca I, et al. Association of microRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(2): 419-427.
- [9] Miko E, Czimmerer Z, Csúny E, et al. Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer[J]. *Exp Lung Res*, 2009, 35(8): 646-664.
- [10] Lu YC, Chen YJ, Wang HM, et al. Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2012, 5(4): 665-674.
- [11] Wang YX, Zhang XY, Zhang BF, et al. Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis[J]. *J Dig Dis*, 2010, 11(1): 50-54.
- [12] Song H, Li D, Wu T, et al. MicroRNA-301b promotes cell proliferation and apoptosis resistance in triple-negative breast cancer by targeting CYLD[J]. *BMB Rep*, 2018, 51(11): 602-607.
- [13] Lúnczky A, Nagy Á, Bottai G, et al. miRpower: a web-tool to validate survival-associated miRNAs utilizing expression data from 2178 breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 160(3): 439-446.
- [14] Cao G, Huang B, Liu Z, et al. Intronic miR-301 feedback regulates its host gene, ska2, in A549 cells by targeting MEOX2 to affect ERK/CREB pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(4): 978-982.
- [15] Shi W, Gerster K, Alajez NM, et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(8): 2926-2937.
- [16] Luan YY, Liu ZM, Zhong JY, et al. Effect of grape seed proanthocyanidins on tumor vasculogenic mimicry in human triple-negative breast cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(2): 531-535.
- [17] Plantamura I, Casalini P, Dugnani E, et al. PDGFR β and FGFR2 mediate endothelial cell differentiation capability of triple negative breast carcinoma cells[J]. *Mol Oncol*, 2014, 8(5): 968-981.

收稿日期:2018-12-07 修回日期:2019-02-20 编辑:石嘉莹