

doi: 10.3969/j.issn.1000-484X.2019.06.010

## • 肿瘤免疫学 •

**microRNA-31 通过靶向调控 Dock1 抑制乳腺癌的上皮-间质转化<sup>①</sup>**曾国栋 陈智凯 林祥博 尹崇高<sup>②</sup> 李洪利<sup>③</sup>

(山东省潍坊医学院生物科学与技术学院, 潍坊 261053)

中图分类号 R734.2 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2019)06-0693-05

**[摘要]** 目的:探讨 microRNA-31(miR-31) 靶向调控 Dock1 对乳腺癌上皮-间质转化的影响。方法:通过 qRT-PCR、Western blot 检测人正常乳腺上皮细胞与乳腺癌细胞中 miR-31、Dock1 的表达情况;将含有 miR-31 的过表达质粒或 Dock1 的敲除质粒转入乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中并检测转染效率;用 Western blot 检测转染后各组细胞中 Dock1 的表达变化;Transwell 侵袭实验检测转染及共转染后各组细胞的侵袭能力的变化;Western blot 检测转染及共转染后各组细胞中 EMT 标志物的表达情况。结果:MCF-7 细胞中 miR-31 的表达明显高于 MDA-MB-231 细胞,但两组都低于其在 MCF-10A 中的表达。转染对照及过表达质粒后,MDA-MB-231 细胞中 miR-31 的表达较正常组与对照组明显上调,Dock1 表达明显下调。Transwell 侵袭实验结果显示,MDA-MB-231/miR-31 组相比于 MDA-MB-231/NC 组穿过基底膜的细胞数明显减少,而与 MDA-MB-231/miR-31+con 组相比无明显差距;MDA-MB-231/miR-31+Dock1 组与 MDA-MB-231/miR-31+con 组相比穿过基底膜的细胞数明显增多。Western blot 结果显示,MDA-MB-231/miR-31 和 MDA-MB-231/miR-31+con 细胞相比于 MDA-MB-231/NC 细胞中 E-cadherin 表达水平显著上调,在 MDA-MB-231/miR-31+Dock1 细胞中 E-cadherin 的表达水平与对照组相比无统计学意义;与 MDA-MB-231/NC 细胞相比,MDA-MB-231/miR-31 和 MDA-MB-231/miR-31+con 细胞中 Vimentin 表达水平明显下调,MDA-MB-231/miR-31+Dock1 细胞中 Vimentin 的表达水平几乎无变化。结论:miR-31 可以靶向调控 Dock1 来抑制乳腺癌的上皮-间质转化,进而抑制乳腺癌的侵袭与转移。

**[关键词]** 乳腺癌;miR-31;Dock1;侵袭;上皮-间质转化

**microRNA-31 inhibits epithelial mesenchymal transition in breast cancer through modulating Dock1**

ZENG Guo-Dong, CHEN Zhi-Kai, LIN Xiang-Bo, YIN Chong-Gao, LI Hong-Li. Weifang Medical University, College of Biological Science and Technology, Weifang 261053, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of microRNA-31(miR-31) in breast cancer of epithelial-mesenchymal transition by targeting Dock1. **Methods:** The expression of miR-31 and Dock1 in human normal mammary epithelial cells and breast cancer cells were detected by qRT-PCR and Western blot. The overexpression plasmids of miR-31 or the knock-out plasmids of Dock1 was transfected into the breast cancer cells MDA-MB-231 and the transfection efficiency was detected. Western blot was used to detect the expression of Dock1 in each group after transfection. Transwell invasion assay was used to detect the invasiveness of cells in each group after transfection or cotransfection. Western blot was used to detect the expression of EMT markers in transfected cells or cotransfected cells. **Results:** The expression of miR-31 in MCF-7 cells was significantly higher than MDA-MB-231 cells, but the expression of the two groups was lower than MCF-10A cells. After transfection of control and overexpression plasmids, the expression of miR-31 in MDA-MB-231 cells was significantly higher than the normal group and the control group, and the expression of Dock1 was obviously down regulated. Transwell invasion assay showed that the number of cells in MDA-MB-231/miR-31 group compared with MDA-MB-231/NC group

①本文为国家自然科学基金青年基金项目(No. 81702932, 81641111)、山东省自然科学基金(No. ZR2015HL065)、山东省高等学校科技计划(No. J12LK03)、潍坊医学院国家级大学生创新创业项目(No. 201810438029)和潍坊医学院大学生科技创新基金(No. KX2017012、KX2018007)资助。

②潍坊医学院护理学院, 潍坊 261053。

③潍坊医学院医学研究实验中心, 潍坊 261053。

作者简介:曾国栋,男,主要从事乳腺癌相关研究,E-mail:15650271024@163.com。

通讯作者及指导教师:李洪利,女,硕士,副教授,主要从事肿瘤分子生物学相关研究,E-mail:wfyxylihongli@163.com。

through the basement membrane was significantly reduced but no significant difference compared with the MDA-MB-231/miR-31+con group, MDA-MB-231/miR-31+Dock1 group compared with MDA-MB-231/miR-31+con group, the number of cells through the basement membrane increased significantly. Western blot results showed that MDA-MB-231/miR-31 and MDA-MB-231/miR-31+con cells compared with MDA-MB-231/NC cells the expression level of E-cadherin were significant increased, the E-cadherin expression level in MDA-MB-231/miR-31+Dock1 cells compared with the control group was not statistically significant. Comparing with MDA-MB-231/NC cells, the level of Vimentin was significantly down-regulated, the expression of Vimentin in MDA-MB-231/miR-31+Dock1 cells no change almost. **Conclusion:** miR-31 can inhibits the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer by targeting Dock1, and then inhibits the invasion and metastasis of breast cancer.

**[Key words]** Breast cancer; miR-31; Dock1; Invasion; Epithelial-mesenchymal transition(EMT)

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,近年的发病率逐年上升,严重危害全球女性生命健康<sup>[1]</sup>。原位乳腺癌并不致命,90%以上患者死亡的主要原因是癌细胞的侵袭与转移<sup>[2]</sup>。近年来,临床上对于乳腺癌的治疗已有很大的进展,但乳腺癌的发病率及死亡率仍呈现不断上升的趋势<sup>[3]</sup>。因此,研究乳腺癌侵袭与转移相关的分子机制可以为治疗乳腺癌提供新的依据。microRNA(miRNA)是一种内源性非编码单链RNA,长度约为22个核苷酸<sup>[4,5]</sup>。它不编码蛋白质,却可以通过与目标mRNA的互补结合,下调靶基因的表达或翻译,从而调控细胞的增殖、凋亡、侵袭、转移等行为<sup>[6,7]</sup>。研究发现miR-31在多种恶性肿瘤的侵袭转移中起重要作用,包括肝癌、肺癌、胃癌、神经性胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌等,且多数肿瘤的侵袭和转移与上皮-间质转化(Epithelial-mesenchymal transition,EMT)有关<sup>[8-13]</sup>。本课题组前期研究发现miR-31可以靶向调控Dock1,通过此机制抑制神经性胶质瘤的侵袭转移<sup>[14]</sup>,但是其能否在乳腺癌中起相同作用尚未见报道,因此本文通过对乳腺癌中miR-31及Dock1的研究,为乳腺癌的临床治疗及预防其侵袭和转移提供新的靶点和途径。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 胎牛血清、RPMI1640购自美国Hyclone公司,Lipofectamine 2000转染试剂购自美国Invitrogen公司,反转录试剂盒Prime Script<sup>®</sup> RT reagent Kit和SYBR<sup>®</sup> Prime Script<sup>®</sup> miRNA RT-PCR Kit购自大连TaKaRa公司,Transwell小室购于Corning公司,Matrigel购于BD公司,抗体试剂均购于Abcam公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人正常上皮乳腺细胞MCF-10A培养于含血清、氢化可的松(Hydrocortisone)、霍乱毒素(Cholera toxin)、胰岛素(Insulin)、表皮生长因

子(EGF)的DMEM/F12培养基中,乳腺癌细胞MDA-MB-231培养在含10%胎牛血清的RPMI1640培养基中,MCF-7细胞使用MEM培养基加10%胎牛血清培养。所有细胞均置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的环境中培养。

**1.2.2 逆转录及荧光定量PCR(Quantitative Real-time PCR,qRT-PCR)茎环法** 逆转录及qRT-PCR具体实验步骤见本课题组先前实验结果<sup>[15]</sup>。PCR条件为95℃ 5 s、63℃ 30 s、72℃ 30 s进行35个循环,采用U6作为内参。miR-31上游引物:GCGAG-GCAAGATGCTGGC,下游引物:AGTGCAGGGTC-CGAGGTATT,茎环序列:GTCGTATCCAGTGCAG-GGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGCTAT。

**1.2.3 Western blot** 实验过程见本课题组先前实验过程<sup>[16]</sup>,所用抗体浓度如下:β-actin(1:1 000)、Dock1(1:1 000)、E-cadherin(1:500)、Vimentin(1:1 000)。β-actin作为内参。

**1.2.4 Transwell侵袭实验** 将转染后的150 μl(4×10<sup>5</sup> cells/ml)细胞悬液添加到Transwell小室上层中,下层加入20%胎牛血清的培养基500 μl,置于细胞培养箱中培养,24 h后4%多聚甲醛固定20 min,使用Giemsa染色35 min,PBS清洗3次,于显微镜下随机选取10个视野拍照计数,取平均值为实验的最终结果。所有实验均重复3次。

**1.3 统计学分析** 所有实验数据均用SPSS22.0进行统计学分析,两组定量资料采用独立样本t检验,多组比较采用单因素方差分析,计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,P<0.05被认为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-31及Dock1在人正常乳腺上皮细胞与乳腺癌细胞中的表达情况** qRT-PCR、Western blot分别检测人正常乳腺上皮细胞MCF-10A、乳腺癌细胞MDA-MB-231和MCF-7中miR-31、Dock1的表达情况。结果显示,miR-31在MCF-7细胞中的表达水平

高于 MDA-MB-231 细胞,但都明显低于正常肺上皮细胞 MCF-10A 细胞中的表达水平;MDA-MB-231 细胞中 Dock1 的表达水平高于 MCF-7 细胞, Dock1 在 MCF-10A 细胞中表达水平最低(见图 1)。结果提示, miR-31 在乳腺癌中为抑癌基因, Dock1 为癌基因。

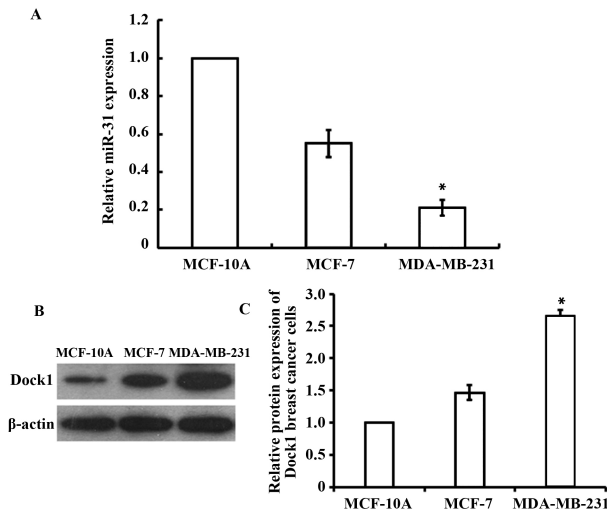


图 1 miR-31 及 Dock1 在人正常乳腺上皮细胞与乳腺癌细胞中的表达

Fig. 1 Expression of miR-31 and Dock1 in human normal mammary epithelial cells and breast cancer cells

Note: A. Expression level of miR-31 in the cells of each group; B. Expression level of Dock1 in the cells of each group; C. Gray value of B diagram; \* .  $P < 0.05$ .

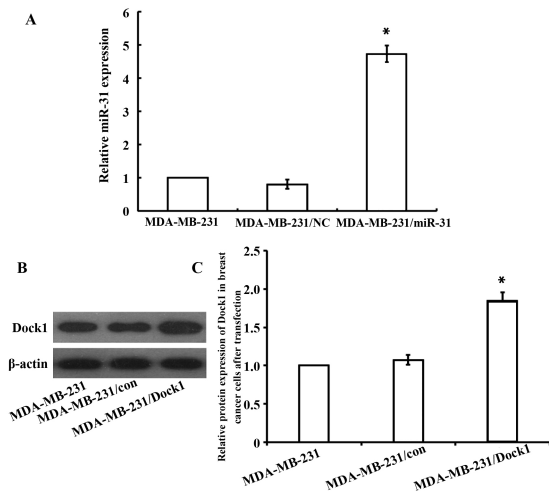


图 2 MDA-MB-231 细胞 miR-31 及 Dock1 的转染效率

Note: A. Transfection efficiency of miR-31 in MDA-MB-231 cells; B. Transfection efficiency of Dock1 in MDA-MB-231 cells; C. Gray value of B diagram; \* .  $P < 0.05$ .

2.2 转染后 miR-31 和 Dock1 在各组乳腺癌细胞中的表达情况 qRT-PCR、Western blot 检测转染不同质粒后各组乳腺癌细胞中 miR-31、Dock1 的表达情况,结果显示,MDA-MB-231 细胞在转染对照质粒后 miR-31 的表达水平与正常组相比无明显差距,但在转染过表达质粒后 miR-31 的表达水平明显升高。Western blot 检测转染后各组乳腺癌细胞中 Dock1 的表达情况,MDA-MB-231 对照组与正常组比较 Dock1 表达水平几乎无差距,转染敲除质粒后 Dock1 的表达水平明显下调(见图 2)。结果提示转染成功。

2.3 转染后各组乳腺癌细胞中 Dock1 蛋白的表达变化 为了检测转染过后各组细胞中 Dock1 蛋白的表达变化情况而采用 Western blot 实验。结果显示 MDA-MB-231/miR-31 细胞相比于 MDA-MB-231/NC 细胞中 Dock1 的表达水平明显下调(见图 3),结果提示,miR-31 可以负向调控 Dock1 蛋白的表达。

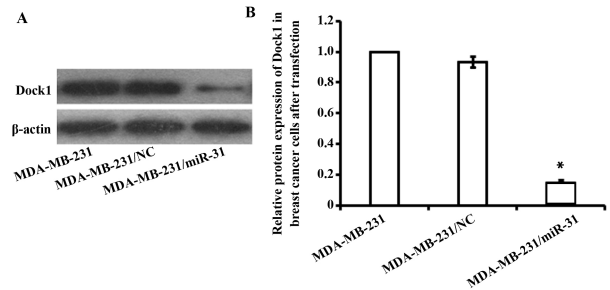


图 3 转染后各组乳腺癌细胞中 Dock1 蛋白的表达变化

Note: A. Expression of Dock1 protein in breast cancer cells after transfection; B. Gray value of A diagram; \* .  $P < 0.05$ .

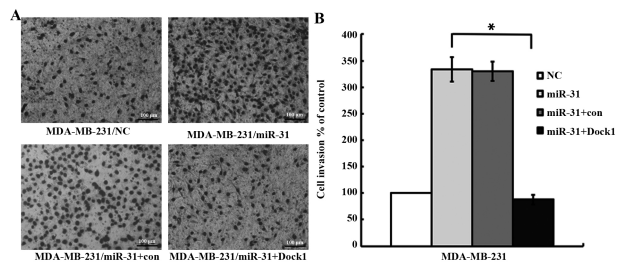


图 4 miR-31 靶向调控 Dock1 对乳腺癌细胞侵袭转移的影响

Fig. 4 Effect of miR-31 targeting Dock1 on invasion and metastasis of breast cancer cells

Note: A. Changes in cell invasion and metastasis of cells in each group; B. Counting the cells of each cell group in the A diagram; \* .  $P < 0.05$ .

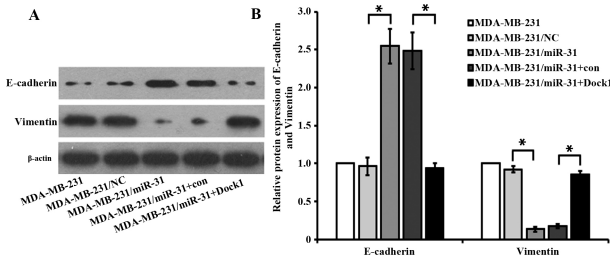


图 5 miR-31 靶向调控 Dock1 对乳腺癌 EMT 的影响

Fig. 5 Effect of miR-31 targeting Dock1 on EMT in breast cancer

Note: A. Changes of EMT markers in the each group cells; B. Gray value of A diagram; \* .  $P < 0.05$ .

**2.4 miR-31 靶向调控 Dock1 对乳腺癌细胞侵袭转移的影响** 为了验证 miR-31 靶向调控 Dock1 在乳腺癌中的具体作用,利用 Transwell 侵袭实验检测 miR-31 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响。结果显示 MDA-MB-231/miR-31 组相比于 MDA-MB-231/NC 组穿过基底膜的细胞数明显减少,而与 MDA-MB-231/miR-31+con 组相比无明显差距;MDA-MB-231/miR-31+Dock1 组与 MDA-MB-231/miR-31+con 组相比穿过基底膜的细胞数明显增多(见图 4),差异具有统计学意义。结果提示,miR-31 可以通过调控 Dock1 表达来抑制乳腺癌的侵袭转移。

**2.5 miR-31 靶向调控 Dock1 对乳腺癌 EMT 的影响** 用 Western blot 检测 EMT 标志分子的表达变化来验证 miR-31 和 Dock1 与乳腺癌 EMT 的联系。结果显示,MDA-MB-231/NC 细胞与 MDA-MB-231 细胞 E-cadherin、Vimentin 表达水平相比无明显变化,MDA-MB-231/miR-31 和 MDA-MB-231/miR-31+con 细胞相比于 MDA-MB-231/NC 细胞中 E-cadherin 表达水平显著上调,在 MDA-MB-231/miR-31+Dock1 细胞中 E-cadherin 的表达水平与对照组相比无统计学意义;与 MDA-MB-231/NC 细胞相比,MDA-MB-231/miR-31 和 MDA-MB-231/miR-31+con 细胞中 Vimentin 表达水平明显下调,MDA-MB-231/miR-31+Dock1 细胞中 Vimentin 的表达水平几乎无变化(见图 5)。结果提示,miR-31 通过靶向调控 Dock1 蛋白的表达,进而调节乳腺癌 EMT 的发生。

### 3 讨论

乳腺癌细胞常在特定生理或病理状态下发生 EMT,即丧失正常上皮细胞的特性,获得间质细胞的形态及迁移运动能力<sup>[17]</sup>。黏附性降低的癌细胞可以浸润转移至其他组织或随血液播散至全身,形成转移,危及生命。EMT 的标志物有很多,如 E-钙黏蛋

白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)等,E-cadherin 是上皮组织中的一类依赖  $Ca^{2+}$  的细胞间黏附分子,可以维持细胞间黏附性和极性,Vimentin 是间质细胞标志分子,E-cadherin 表达下调、Vimentin 的表达异常上调是 EMT 发生的重要特征<sup>[18]</sup>。众多研究发现 miR-31 可协调抑制多种靶基因,从而调控恶性肿瘤的侵袭转移及 EMT 的发生<sup>[19]</sup>。Gao 等<sup>[20]</sup>研究发现 miR-31 通过负向调控 LATS2 可以调节食管癌的 EMT; Cottonham 等<sup>[21]</sup>发现,miR-31 通过聚集 TIAM1 来调节结肠癌侵袭和转移。本实验结果显示 miR-31 在乳腺癌细胞中表达相对较低,改变乳腺癌细胞中 miR-31 的表达会影响乳腺癌的侵袭能力及 EMT 的发生。本课题组前期研究发现 miR-31 通过靶向调控 Dock1 对胶质瘤 EMT 的发生起抑制作用,提示 miR-31 可能通过调控 Dock1 来发挥作用。

Dock1(Dedicator of cytokinesis 1)属于 Dock 家族蛋白之一,亦是整合素信号通路的重要组分<sup>[22]</sup>。Wang 等<sup>[23]</sup>发现 Dock1 的蛋白结构域 DHR2(Dock homology regions 2)与 Crk 蛋白结合,可激活 Rac1 并发挥促进细胞迁移等作用。此外,Dock1 还在乳腺癌、肺癌等诸多恶性肿瘤中发挥重要作用<sup>[24-25]</sup>,本研究采用 Western blot 检测转染后的乳腺癌细胞中 Dock1 表达水平的变化,证实 miR-31 参与调节 Dock1 的表达。

综上所述,本研究证实 miR-31 可以调控 Dock1 的表达来抑制乳腺癌细胞 EMT 的发生,进而抑制乳腺癌的侵袭与转移,这一发现将为乳腺癌的治疗提供新的思路与途径。但 miR-31 是否会结合其他靶基因共同调控乳腺癌的侵袭与转移目前尚不清楚,需要我们进行更加深入的研究。

### 参考文献:

[1] 张建波,宋魏,王媛媛,等. miR-218 调控 SNX4 蛋白对乳腺癌细胞增殖和侵袭的影响[J]. 中国免疫学杂志 2017, 33(9): 1320-1325.  
Zhang JB, Song W, Wang YY, et al. Effects of miR-218 on SNX4 protein on proliferation and invasion of breast cancer cells [J]. Chin J Immunol 2017, 33(9): 1320-1325.

[2] Lee J, Park S, Kim S, et al. Characteristics and survival of breast cancer patients with multiple synchronous or metachronous primary cancers [J]. Yonsei Med J 2015, 56(5): 1213-1220.

[3] Qiu Y, Liu Y, Li WH, et al. P2Y2 receptor promotes the migration and invasion of breast cancer cells via EMT-related genes Snail and E-cadherin [J]. Oncol Rep 2018, 39(1): 138-150.

[4] Muti P, Donzelli S, Sacconi A, et al. MiRNA-513a-5p inhibits progesterone receptor expression and constitutes a risk factor for breast cancer: the ORDET prospective study [J]. Carcinogenesis 2018,

- 39(2):98-108.
- [5] Zhao X, Wang Y, Deng R *et al.* miR186 suppresses prostate cancer progression by targeting Twist1 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(22): 33136-33151.
- [6] Ma F, Zhang L, Ma L, *et al.* MiR-361-5p inhibits glycolytic metabolism, proliferation and invasion of breast cancer by targeting FGFR1 and MMP-1 [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 158.
- [7] Dalmay T. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation [J]. *Essays Biochem* 2013, 54: 29-38.
- [8] Kim HS, Lee KS, Bae HJ *et al.* MicroRNA-31 functions as a tumor suppressor by regulating cell cycle and epithelial-mesenchymal transition regulatory proteins in liver cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 8089-8102.
- [9] Yu M, Liang H, Fu Z, *et al.* BAP1 suppresses lung cancer progression and is inhibited by miR-31 [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(12): 13742-13753.
- [10] Ge F, Wang C, Wang W, *et al.* MicroRNA-31 inhibits tumor invasion and metastasis by targeting RhoA in human gastric cancer [J]. *Oncol Rep* 2017, 38(2): 1133-1139.
- [11] Pan J, Lu F, Xu H, *et al.* Low p21 level is necessary for the suppressive effects of microRNA-31 on glioma cell migration and invasion [J]. *Tumour Biol* 2016, 37(7): 9663-9670.
- [12] Wang H, Liu W, Black S *et al.* Kaiso, a transcriptional repressor, promotes cell migration and invasion of prostate cancer cells through regulation of miR-31 expression [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5677-5689.
- [13] Luo LJ, Yang F, Ding J, *et al.* MiR-31 inhibits migration and invasion by targeting SATB2 in triple negative breast cancer [J]. *Gene* 2016, 594(1): 47-58.
- [14] Zhang B, Li H, Yin C, *et al.* Dock1 promotes the mesenchymal transition of glioma and is modulated by MiR-31 [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2017, 43(5): 419-32.
- [15] Sun L, Zhang B, Liu Y *et al.* MiR125a-5p acting as a novel Gab2 suppressor inhibits invasion of glioma [J]. *Mol Carcinog* 2016, 55(1): 40-51.
- [16] Li H, Yin C, Zhang B, *et al.* PTTG1 promotes migration and invasion of human non-small cell lung cancer cells and is modulated by miR-186 [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(9): 2145-2155.
- [17] Shi L, Wang Y, Lu Z, *et al.* miR-127 promotes EMT and stem-like traits in lung cancer through a feed-forward regulatory loop [J]. *Oncogene* 2017, 36(12): 1631-1643.
- [18] Barber AG, Castillo-Martin M, Bonal DM, *et al.* PI3K/AKT pathway regulates E-cadherin and Desmoglein 2 in aggressive prostate cancer [J]. *Cancer Med* 2015, 4(8): 1258-1271.
- [19] Stepicheva NA, Song JL. Function and regulation of microRNA-31 in development and disease [J]. *Mol Reprod Dev* 2016, 83(8): 654-674.
- [20] Gao Y, Yi J, Zhang K *et al.* Downregulation of MiR-31 stimulates expression of LATS2 via the hippo pathway and promotes epithelial-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res* 2017, 36(1): 161.
- [21] Cottonham CL, Kaneko S, Xu L. miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells [J]. *J Biol Chem* 2010, 285(46): 35293-35302.
- [22] Chen DJ, Chen W, Jiang H, *et al.* Downregulation of DOCK1 sensitizes bladder cancer cells to cisplatin through preventing epithelial-mesenchymal transition [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 2845-2853.
- [23] Wang H, Linghu H, Wang J, *et al.* The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3 [J]. *Tumour Biol* 2010, 31(1): 59-67.
- [24] Li H, Yang L, Fu H, *et al.* Association between Galphai2 and ELMO1/Dock180 connects chemokine signalling with Rac activation and metastasis [J]. *Nat Commun* 2013, 4: 1706.
- [25] Shi L, Zhang B, Sun X *et al.* CC chemokine ligand 18 (CCL18) promotes migration and invasion of lung cancer cells by binding to Nir1 through Nir1-ELMO1/DOCK180 signaling pathway [J]. *Mol Carcinog* 2016, 55(12): 2051-2062.

[收稿 2018-03-06]

(编辑 倪鹏)

## • 启事 •

## 《中国免疫学杂志》关于彩图处理的有关说明

《中国免疫学杂志》的全部来稿一经采用,来稿所附图片根据具体需要,酌情制作彩图,彩图制作费包含在该稿件的版面制作费中,一并开具发票,望周知!

《中国免疫学杂志》编辑部