

转录因子 ETS-1 对乳腺癌细胞增殖作用的影响

胡 嵩¹, 张岩巍², 姜鹏飞³, 孙贝贝¹

[摘要] **目的:** 研究转录因子 ETS-1 通过调节 miR-96 对乳腺癌细胞增殖的影响。**方法:** 通过 RNAi 技术下调乳腺癌细胞 MCF-7 中 ETS-1 的表达后, 检测 miR-96 的表达; 运用生物信息学方法预测转录因子 ETS-1 的结合位点, 染色体免疫共沉淀反应加以验证; 将 miR-96 转入乳腺癌细胞 MCF-7, 观察对乳腺癌细胞增殖和克隆形成的影响。**结果:** 抑制 ETS-1 表达, miR-96 在乳腺癌细胞 MCF-7 中的表达明显上调 ($P < 0.01$); ETS-1 通过结合在 miR-96 启动子区域, 调节 miR-96 的表达; 与对照组比较, 过表达 miR-96 后, MCF-7 的增殖能力和克隆形成能力均明显增强 ($P < 0.01$)。**结论:** ETS-1 通过调节 miR-96 的表达, 影响乳腺癌细胞增殖和克隆形成能力, 有望在乳腺癌治疗中成为新的靶标。

[关键词] 乳腺肿瘤; 细胞增殖; ETS-1; miR-96; 克隆形成

[中图分类号] R 737.9

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.01.007

Effect of transcription factor ETS-1 on the proliferation of breast cancer cells

HU Song¹, ZHANG Yan-wei², JIANG Peng-fei³, SUN Bei-bei¹

(1. Department of Research Center, 2. Department of Pulmonary Medicine, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030; 3. Department of Laboratory Medicine, Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200123, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of transcription factors ETS-1 on the proliferation of the breast cancer cells by regulating miR-96. **Methods:** The expression of miR-96 in breast cancer cell MCF-7 with silencing the ETS-1 expression induced by the RNA interference technique was detected. The binding site of transcription factor ETS-1 was predicted using bioinformatics method, and validated with chromatin immune precipitation reaction. The miR-96 was transfected into breast cancer cell MCF-7, and the effect of which on the proliferation and clone information of breast cancer cells was observed. **Results:** The expression of miR-96 in breast cancer cells was significantly increased after inhibiting the expression of ETS-1 ($P < 0.01$). The expression of ETS-1 was regulated by the ETS-1 binding to the promoter region of miR-96. Compared with the control group, the abilities of proliferation and clone formation of MCF-7 were significantly increased after the overexpression of miR-96 ($P < 0.01$). **Conclusions:** ETS-1 can affect the proliferation and clone formation ability of breast cancer cells by regulating the expression of miR-96, which is expected to become a new target in the treatment of breast cancer.

[Key words] breast neoplasms; cell proliferation; ETS-1; miR-96; clone formation

ETS 转录因子家族包括 30 多个成员, 通过调节细胞增殖、分化、凋亡及细胞与细胞间的作用, 在许多生理病理过程中发挥重要调控作用^[1]。ETS-1 是 ETS 转录因子家族的重要成员, 在白血病和淋巴瘤中, 均能检测到 ETS-1 过表达^[2]。过去的研究表明, 过表达的 ETS-1 与乳腺癌^[3]、肺癌^[4]的恶性增殖有关。MicroRNA (miRNA) 是一类大小在 21 ~ 25 个核苷酸的内源小分子非编码 RNA, 普遍存在于动物、植物及微生物中^[5-6]。随着基因组测序技术和生物信息学技术的发展, 迄今为止, 已在不同物种中发现

超过 9 500 种 miRNA, miRNA 参与到肿瘤发生的各个步骤中, 对肿瘤发生起到重要的调节作用, 如本文研究的 miR-96。Monzo 团队首先发现了 miR-96 在结肠直肠癌中明显高表达^[7], 表明 miR-96 在肿瘤发生中起到重要作用; 深入研究揭示, 在结肠癌和恶性滑膜肉瘤中, miR-96 通过抑制核转录早期生长因子 1 (EGR1) 蛋白表达, 导致抑癌蛋白第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (PTEN) 表达水平下降, 促进了肿瘤细胞迁移^[8]。ETS-1 作为转录因子与 miRNA 间的关系还不明晰, 需要进一步探索。本研究基于分子生物学实验手段, 在细胞水平探讨转录因子 ETS-1 对 miR-96 的调控作用及相应的生物学功能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人乳腺癌细胞株 MCF-7 购于美国模式培养物集存库 (ATCC); DMEM 培养基 (美国

[收稿日期] 2016-03-28

[基金项目] CSCO-先声抗肿瘤血管靶向治疗科研基金 (Y-S 2014-003)

[作者单位] 上海交通大学附属胸科医院 1. 中心实验室, 2. 呼吸内科, 上海 200030; 3. 上海市东方医院南院 检验科, 200123

[作者简介] 胡 嵩 (1989 -), 男, 硕士, 研究实习员。

[通信作者] 孙贝贝, 工程师。E-mail: bbsun167@sina.com

Gbico);胎牛血清(奥地利 PAA);胰酶-EDTA 溶液(美国 Sigma);Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen);青霉素-链霉素(美国 Ameresco);RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、SYBR Green PCR Mix(日本 TakaRa);MTT 试剂、二甲基亚砷 DMSO、多聚甲醛(美国 Sigma);ETS-1 兔源多克隆抗体(Santa Cruz, CAT#sc-350), β -actin 鼠源单克隆抗体和辣根过氧化物酶偶联的二抗均购自美国(Sigma, CAT # A3854)。

1.2 细胞培养与传代 人乳腺癌细胞株 MCF-7 用含有 10% 血清的 DMEM 高糖完全培养基,培养基中加入青霉素-链霉素合剂,浓度为:青霉素 1×10^5 U/L,链霉素为 0.1 g/L,在 5% CO₂、饱和水蒸汽 37 °C 培养箱中培养,培养 2~3 d 后至细胞融合度为 80%~90%后,胰酶消化 2~3 min 后进行传代。所有细胞操作都在无菌超净台中进行。

1.3 细胞转染脂质体转染法 转染前 1 天将对数期 MCF-7 细胞接种到六孔板中,待细胞密度达到 60%~80%后进行转染,使用 lipofectamine 2000 进行转染,转染前更换无青霉素-链霉素合剂培养基,转染剂量按照说明书进行操作,转染后 6 h 更换成含血清培养基继续培养,48 h 进行后续实验操作。

1.4 细胞总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 提取细胞总 RNA 时,先胰酶消化 MCF-7 细胞,离心沉淀至离心管底部,然后按照试剂盒说明书进行提取操作,得到 RNA 用 DEPC 水溶解后,用移液枪缓缓吹打后测其纯度与浓度,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性,然后按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录,RNA 逆转录成 cDNA 后,进行荧光定量 PCR 反应,总体积为 20 μ L,在 ABI VII Real-time PCR System 上进行二步法检测,反应条件为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 34 s,40 次循环,添加熔解曲线,以小核 U6 snRNA 作为内参基因,按照 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算表达的变化量。

1.5 MTT 法检测细胞增殖 首先将对数期 MCF-7 细胞用胰酶消化后,转移到 96 孔板中,每孔 100 μ L 培养液含有 10^4 个细胞,每组设 6 个复孔,之后进行转染,分别于转染 24 h、48 h、72 h、96 h 后,每孔加入 20 μ L 的 MTT 溶液,继续培养 4 h 后,弃去上清液后,加入 100 μ L 的 DMSO 溶解结晶,震动混匀沉淀 10 min,酶标仪检测 490 nm 处吸光度值,以空白对照组细胞为对照,收集数据统计分析。

1.6 软琼脂集落实验 首先用无菌双蒸水配置 2 \times DMEM 培养基,加入 10% 青链霉素合剂,20% 胎牛

血清,同时用 0.2 μ m 的滤膜过滤培液于空瓶中,42 °C 水浴保温;无菌水配置上层 0.6% 琼脂糖溶液,下层 1.2% 琼脂糖溶液,42 °C 水浴保温。底层胶由 1 mL 2 \times 完全培养基和 1 mL 1.2% 琼脂糖溶液混合而成,混合均匀加入到六孔板的孔中。室温放置 30 min 凝固后配置下层胶。细胞用胰酶消化,1 500 g 离心 5 min 收集细胞,用 1 mL 不含血清的培液重悬细胞,按上述方法配置上层胶(2 \times 完全培养基与 0.6% 琼脂糖溶液混合),每孔加入 20 000 个细胞,混匀后加入到底层胶上。室温静置 0.5 h 保证充分凝固,置于 37 °C 培养箱培养。每隔 10 d 每个孔滴加 50 μ L 培养液,30 d 后,用结晶紫染色并记录。

1.7 染色体免疫共沉淀 首先染色体交联,空白组和对照组细胞加入终浓度 1% 多聚甲醛的 DMEM 高糖培液,在 37 °C 细胞培养箱中交联 15 min。之后滴加 2.5 mol/L 甘氨酸溶液,使其终浓度达到 125 mmol/L,37 °C 培养 5 min,终止多聚甲醛的交联作用。4 °C 1 000 g 离心 5 min,15 mL 冰 PBS 重悬清洗细胞 3 次,1 000 g 离心 5 min 收集细胞。

超声破碎交联染色体。用 1 mL FA lysis buffer (50 mmol/L HEPES-KOH pH 7.5, 140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA pH 8, 1% TritonX-100, 0.1% Sodium Deoxycholate, 0.1% SDS, 100 mmol/L PMSF) 重悬细胞,冰上孵育 15 min 后,4 °C 超声裂解细胞,调节非接触式超声破碎仪(Bioruptor UCD-300)功率为 30 W,通过设置时间梯度,将 DNA 破碎为 200~1 000 bp 片段,每个时间段取出 50 μ L,然后酚-三氯甲烷抽提 DNA,琼脂糖电泳检测片段大小。

免疫沉淀 IP,根据实验加 2 μ g 特异性抗体到 500 μ L 裂解液中,4 °C 旋转混合 5 h,然后加入 30 μ L protein A/G Plus Agarose BSA,4 °C 旋转混合过夜,同时添加鼠源 IgG 作为阴性对照组,此外预留 50 μ L 作为阳性对照。第二天 2 000 g 离心 1 min 去上清液,冰上洗脱液 a(0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2 mmol/L EDTA pH 8, 150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8)洗脱 3 次,洗脱液 b(0.1% SDS, 1% TritonX-100, 2 mmol/L EDTA pH 8, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8)洗脱 1 次,离心去上清液,加 400 μ L Elution Buffer(50 mmol/L Tris-HCl, 1% SDS, 10 mmol/L EDTA) 25 μ L 5 mol/L NaCl, 65 °C 水浴过夜解交联。根据生物信息学预测位点设计引物进行 PCR 检测,琼脂糖电泳确定。

1.8 统计学方法 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 ETS-1 表达下调促进了 miR-96 的表达

Western blot 免疫印迹实验结果显示,与对照组比较,ETS-1 siRNA 显著抑制了 ETS-1 在乳腺癌细胞 MCF-7 中的表达(见图 1)。荧光定量 PCR 结果显示,下调 ETS-1 表达后,miR-96 表达高于对照组($P < 0.01$)(见表 1)。

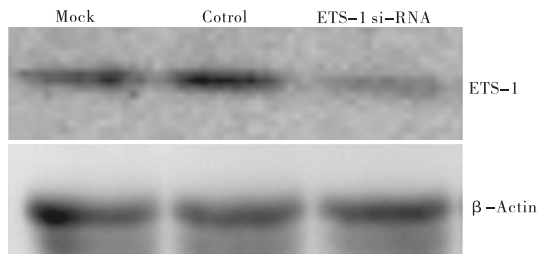


图1 免疫印迹检测各组间ETS-1表达水平

表1 ETS-1 siRNA 上调 miR-96 的表达($n=4; \bar{x} \pm s$)

分组	miR-96	$\bar{d} \pm s_d$	t	P
ETS-1 siRNA	5.834 ± 1.976	4.819 ± 1.848	5.22	< 0.01
Control 组	1.015 ± 0.212			

2.2 ETS-1 在 miR-96 启动子区域的结合位点 通过 TF search 分析软件预测得到 miR-96 启动子区域的 ETS-1 结合位点(见图 2)。染色体免疫共沉淀结果显示,ETS-1 确实结合在 -840 到 -641 区域(见图 3)表明转录因子 ETS-1 通过结合在 miR-96 启动子区域调控 miR-96 的表达。



图2 ETS-1结合位点示意图

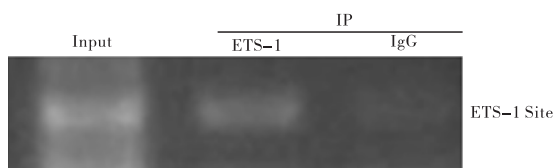


图3 ETS-1染色体免疫共沉淀结果

2.3 过表达 miR-96 促进乳腺癌细胞 MCF-7 增殖

MTT 结果显示,与对照组比较,过表达 miR-96 后,明显促进了乳腺癌肿瘤细胞 MCF-7 的增殖,且在 72 h 时作用最强($P < 0.01$)(见表 2)。Western blot 免疫印迹结果显示,与空白对照组(Mock)和阴性对照组(Control)比较,过表达 miR-96 后增殖细胞核抗原 PCNA 表达水平增加($P < 0.01$)(见图 4、

表 3)。

表2 过表达 miR-96 促进乳腺癌细胞 MCF-7 增殖($\bar{x} \pm s$)

分组	n	相对细胞活力		
		24 h	48 h	72 h
实验组	3	1.36 ± 0.05	2.40 ± 0.21	4.92 ± 0.36
对照组	3	1.49 ± 0.08	1.97 ± 0.18	3.37 ± 0.28
t	—	2.39	2.69	5.89
P	—	> 0.05	> 0.05	< 0.01

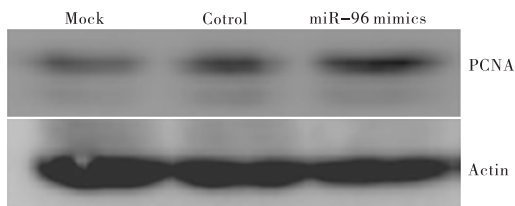
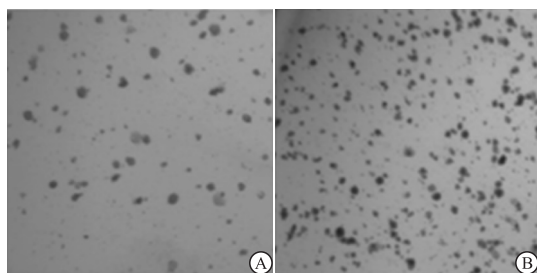


图4 各组间PCNA蛋白表达水平差异

表3 组间 PCNA 表达水平($n_i=3; \bar{x} \pm s$)

分组	PCNA	t	P
miR-96 组	5.80 ± 0.06	107.85	< 0.01
Control 组	1.31 ± 0.04		

2.4 过表达 miR-96 促进乳腺癌细胞 MCF-7 克隆形成 软琼脂集落实验结果显示,实验组过表达 miR-96 后,软琼脂上形成的克隆数目明显多于对照组($P < 0.01$)(见图 5、表 4)。



A:CtrlRNA;B:miR-96

图5 对照组与实验组间软琼脂集落数目

表4 miR-96 促进乳腺癌细胞 MCF-7 克隆形成($n_i=3; \bar{x} \pm s$)

分组	克隆数目	t	P
miR-96 组	126.33 ± 23.007	5.76	< 0.01
Control 组	49.33 ± 2.517		

3 讨论

迄今为止,科学家已经发现了超过 9 500 种 miRNA,随着分子生物学技术的发展,越来越多的(下转第 33 页)

号通路,增强 Runx2 的表达,从而促进间充质干细胞定向成骨分化^[10]。而 miR-637 通过靶向 Osterix 基因能够抑制间充质干细胞的成骨分化^[11]。本研究运用生物信息学方法对 miR-186 和 OPN 基因的靶向配对关系进行预测,发现二者靶向配对良好,采用荧光素酶报告系统鉴定发现 miR-186 能够抑制 OPN mRNA 表达;脂质体 2000 转染 miR-186 模拟物以及干扰 RNA 后,Real-time PCR 和 Western blot 检测结果表明过表达 miR-186 能够降低 OPN mRNA 和蛋白的表达。由此可见,miR-186 能够负性调控 OPN 基因表达,抑制 bMSCs 的成骨分化。

[参 考 文 献]

- [1] CHUA JH, ARMUGAM A, JEYASEELAN K. MicroRNAs: biogenesis, function and applications[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2009, 11(2):189.
- [2] LAOHAVIROJ M, CHAMGRAMOL Y, PAIROJKUL C, et al. Clinicopathological Significance of Osteopontin in Cholangiocarcinoma Cases[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(1):201.
- [3] DING Y, CHEN J, CUI G, et al. Pathophysiological role of osteopontin and angiotensin II in atherosclerosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(1):5.
- [4] WANG C, WANG K, LIU S, et al. Decreased level of osteopontin in children with allergic rhinitis during sublingual immunotherapy

[J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2016, 8:15.

- [5] DENHARDT DT, GUO X. Osteopontin: a protein with diverse functions[J]. *Faseb J*, 1993, 7(15):1475.
- [6] CHAN SC, TEKARI A, BENNEKER LM, et al. Osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells is hindered by the presence of intervertebral disc cells [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 18(1):29.
- [7] FERREIRA LB, ELOY C, PESTANA A, et al. Osteopontin expression is correlated with differentiation and good prognosis in medullary thyroid carcinoma [J]. *Eur J Endocrinol*, 2016, 174(4):551.
- [8] WANG Y, YANG J, LIU H, et al. The association between osteopontin and survival in non-small-cell lung cancer patients: a meta-analysis of 13 cohorts [J]. *Onco Targets Ther*, 2015(8):3513.
- [9] KIM YJ, BAE SW, YU SS, et al. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue[J]. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(5):816.
- [10] ZHANG J, TU Q, BONEWALD LF, et al. Effects of miR-335-5p in modulating osteogenic differentiation by specifically downregulating Wnt antagonist DKK1 [J]. *J Bone Miner Res*, 2011, 26(8):1953.
- [11] ZHANG JF, FU WM, HE ML, et al. MiR-637 maintains the balance between adipocytes and osteoblasts by directly targeting Osterix [J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22(21):3955.

(本文编辑 周洋)

(上接第 29 页)

miRNA 的功能被解读,其在肿瘤发生中的过程也受到大家的重视。ETS-1 作为重要的转录因子,通过与目的基因启动子区域相结合,调控基因表达,在血管发生和免疫系统发生过程中发挥重要作用^[9]。然而二者的关系,却极少有人阐述。

本研究证明,ETS-1 作为重要转录因子,通过直接结合到 miR-96 基因的启动子区域对 miR-96 的表达起到负反馈调节。乳腺癌细胞中过表达 miR-96 后, MCF-7 的增殖能力和克隆形成能力均明显提高。可见, ETS-1 通过 miR-96 起到调控肿瘤增殖的重要作用。转录因子作为基因的重要调控因子,在肿瘤发生发展的过程中扮演着重要角色, ETS-1 与其他 miRNA 的相互作用以及 miR-96 的生物学功能,将是我們下一步研究的目标,希望能够更多的了解肿瘤发生的机制,为临床诊断、治疗提供帮助。

[参 考 文 献]

- [1] WANG CY, PETRYNIAK B, HO IC, et al. Evolutionarily conserved Ets family members display distinct DNA binding specificities[J]. *J Exp Med*, 1992, 175(5):1391.
- [2] ROVIGATTI U, WATSON DK, YUNIS JJ. Amplification and rearrangement of Hu-ets-1 in leukemia and lymphoma with involvement of 11q23 [J]. *Science*, 1986, 232(4748):398.

- [3] BEHRENS P, ROTHE M, WELLMANN A, et al. The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer [J]. *J Pathol*, 2001, 194(1):43.
- [4] SASAKI H, YUKIUE H, MOIRIYAMA S, et al. Clinical significance of matrix metalloproteinase-7 and Ets-1 gene expression in patients with lung cancer [J]. *J Surg Res*, 2001, 101(2):242.
- [5] CARNINCI P, KASUKAWA T, KATAYAMA S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome [J]. *Science*, 2005, 309(5740):1559.
- [6] CHALFIE M, HORVITZ HR, SULSTON JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans* [J]. *Cell*, 1981, 24(1):59.
- [7] BANDRÉS E, CUBEDO E, AGIRRE X, et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues [J]. *Molecular Cancer*, 2006, 5(1):1.
- [8] SARVER AL, LI L, SUBRAMANIAN S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(23):9570.
- [9] BASSUK AG, LEIDEN JM. The role of Ets transcription factors in the development and function of the mammalian immune system [J]. *Adv Immunol*, 1997, 64:65.

(本文编辑 刘璐)