

miR-138 对小鼠乳腺上皮细胞的作用 及其调控的靶序列*

王春梅 李庆章** 李 晔

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 miRNA 是一类长约 20~25 nt 的内源性非编码蛋白的小 RNA。miRNAs 的作用遍及生命体的发生、生长、发育、分化和死亡等过程, 但目前对 miRNA 在细胞中的确切功能和其如何发挥作用知之甚少。应用 miRNA 基因沉默技术, 抑制小鼠乳腺上皮细胞 miR-138 的表达, 应用荧光定量 PCR、Western blot、细胞活力分析技术等分析 mi-138 的表达及 miR-138 对小鼠乳腺上皮细胞的影响, 结果显示, miR-138 抑制后细胞活性增强($P < 0.05$), PRL-R 蛋白表达增强($P < 0.05$), 信号转导通路分子 STAT5、MAPK 表达加强。研究认为, miR-138 抑制小鼠乳腺上皮细胞的增殖。miR-138 在乳腺上皮细胞调控的靶序列是 PRL-R, 抑制其表达而发挥作用。miR-138 通过调控 STAT5、MAPK 信号转导通路而调控乳腺上皮细胞增殖。

关键词 乳腺上皮细胞, miR-138, 基因沉默

学科分类号 Q78, S73

microRNA(miRNA, 即微小 RNA)是长度约为 20~25 nt 的 5'端带磷酸基团和 3'端带羟基的非蛋白编码的小 RNA 家族^[1]。miRNA 可以通过部分互补结合到目的 mRNA 靶位的 3'非编码区(3'UTRs), 以一种未知方式诱发蛋白质翻译抑制, 进而抑制蛋白质合成。哺乳动物乳腺的发育过程与其他器官不同, 主要是在雌性动物性成熟后的妊娠期迅速完成。乳腺发育、泌乳及退化过程受到激素等诸多因素的调控, 催乳素(prolactin, PRL)及其受体(prolactin-receptor, PRL-R)对乳腺生长和分化有广泛的作用^[2]。STAT5 在调控细胞增殖、分化及凋亡过程中起重要作用, STAT5 在正常乳腺组织中有一个基础的活化水平以传递上游来的信号。PRL-R 激活的信号转导激活转录子 STAT5 的活动^[3], 同时在乳腺上皮细胞中, PRL-R 还可激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路, MAPK 通过影响基因的转录和调控, 进而影响乳腺上皮细胞的生物学行为, 如细胞增殖、分化、转化及凋亡等^[4]。

miRNAs 在乳腺发育、泌乳及退化过程中发挥重要的作用, 其中 miR-138 在乳腺发育周期中呈周期性变化, 在乳腺的发育、泌乳及退化中起着重

要的调控作用^[5,6]。但目前 miRNA 在乳腺发育、泌乳及退化中的作用及其机制尚未见报道。

为更好地研究 miR-138 在乳腺发育、泌乳及退化中的作用及其机制, 应用 miR-138 沉默技术抑制内源性 miR-138, 以探讨 miR-138 功能及作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠乳腺上皮细胞由本研究室培养、分离、纯化和鉴定。Negative Control、miR-138 inhibitor、miR-138、内参 5s RT 及荧光定量 PCR 引物由美国 Ambion 公司合成。小 RNA 分离试剂、荧光定量 PCR 试剂盒、siPORT NeoFX 均购自美国 Ambion 公司。DMEM、Opti-MEM I medium、胎牛血清购自 Gibco 公司。角蛋白 18FITC 直标抗体购自德国 Acris 公司, PRL-R、STAT5、MAPK、 β -actin 多克隆抗体购自 Santa 公司, 辣根过氧化物酶标记抗体购自北京中山生物技术公司, ECL 发

* 黑龙江省博士专项基金资助(2005)。

** 通讯联系人。

Tel: 0451-55190999, E-mail: qingzhangli@hotmail.com

收稿日期: 2008-02-13, 接受日期: 2008-03-21

光染料购自北京普利莱公司, β 酪蛋白标准品购自 Sigma 公司.

1.2 方法

1.2.1 小鼠乳腺上皮细胞的培养、纯化及鉴定. 培养用的乳腺组织块来自妊娠中期雌鼠. 颈椎处死法处死小鼠, 取乳腺组织, 置于 I 型胶原酶与透明质酸酶的消化液中, 37℃ 消化 2 h, 400 目筛网过滤, D-Hank's 液清洗滤出液直至上清液无浑浊, 将细胞沉淀以适量(1×10^6)的密度接种于培养器具中(中培养瓶), 于 CO₂ 培养箱中培养. 根据对酶消化敏感性不同, 在混合生长的原代或传代细胞培养物中, 先加 0.25% 胰蛋白酶的 D-Hank's 液, 37℃ 消化, 在倒置显微镜下观察, 待成纤维细胞细胞质回缩, 细胞间隙增大, 脱离瓶壁时, 加培养液终止消化, 将酶液倾出, 然后在培养物中加入 0.15% 胰蛋白酶 -0.02% EDTA 的 Hank's 液, 37℃ 继续消化 5~6 min, 吸管轻轻吹打悬浮细胞, 离心, 重悬细胞, 计数, 以适量密度接种于培养器具中继续培养. 经 3~4 次选择传代, 可得到纯化的乳腺上皮细胞. 小鼠乳腺上皮细胞的鉴定借助于细胞角蛋白 18 免疫荧光染色, 步骤如下: a. 细胞铺片的制作, 取处理过的普通洁净的盖玻片, 接种细胞; b. 待细胞长成 80% 汇合单层时, 倒掉培养液, 用预冷的 TBSTx 冲洗细胞两次; c. 用 1 ml 甲醇于 4℃ 固定 10 min; d. 用 TBSTx 冲洗细胞 3 次, 每次 5 min, 然后用干净滤纸擦掉边缘残液; e. 用含 5% BSA 的 TBSTx 封闭 60 min, 可以用摇床轻轻摇动; f. 去封闭液, 用含 5% BSA 的 TBSTx 稀释的特定一抗作用 60 min; g. 去除一抗, 用 TBSTx 冲洗细胞 3 次, 每次 5 min, 然后用干净滤纸擦掉边缘残液. 滴加 PI 染料, 染色 10 min 后, 用 TBSTx 冲洗细胞 3 次, 每次 5 min. 将 1 滴抗荧光淬灭剂滴于洁净的载玻片, 封片, 于激光共聚焦显微镜下观察细胞角蛋白 18 的特异性表达.

1.2.2 miR-138 inhibitor 对小鼠乳腺上皮细胞的 miR-138 基因的沉默. a. 小鼠乳腺上皮细胞计数与收集用胰酶消化细胞, 24 孔板细胞浓度 4×10^4 , 12 孔板 1×10^5 , 6 孔板 3×10^5 , 将细胞用正常培养基调成终浓度, 37℃ 孵育至用时; b. 用 Opti-MEM I medium 稀释 siPORT NeoFX 脂质体转染试剂 24 孔培养板(3+97) μ l, 12 孔培养板(6+147) μ l, 6 孔培养板(9+291) μ l, 轻轻混匀, 室温孵育 10 min; c. 将不同浓度的 Anti-miR™

miRNA Inhibitor 用适量 Opti-MEM I medium 稀释(24 孔培养板稀释至 100 μ l, 12 孔培养板稀释至 150 μ l, 6 孔培养板稀释至 300 μ l); d. 将 b, c 复合物混匀, 轻轻吹打, 室温 10 min, 放入培养板中; e. 将准备的细胞加入, 水平震动培养板, 37℃ 培养, 24 h 后更换正常培养基.

1.2.3 qRT-PCR 技术鉴定 miR-138 基因沉默后的 miR-138 的表达. miR-138 RTprimer: CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGACACTTAG, PCR 扩增引物为: F, 5' GGTGTCTGGAGTCGGCAA 3', R, 5' AACTTCACAACACCAGCTTA 3'. 取 300 ng 总 RNA, miR-138 RT 引物逆转录合成 miR-138 cDNA 第一链, 以 miR-138 实时定量 PCR 引物和第一链 cDNA 为模板进行 PCR 反应, 应用 ABI7500PCR 仪, 反应条件: 95℃ 3 min 变性, 95℃ 10 s、60℃ 30 s, 40 个循环. 以 5 s 为内参照, 进行数据分析.

1.2.4 Western blot 技术检测转染后相关蛋白质的表达变化. 分别收集对照组及 miR-138 inhibitor 作用组细胞, 用细胞裂解液提取总蛋白, 分别进行 SDS-PAGE, 随后转硝酸纤维素膜(NC 膜), 分别以 PRL-R、STAT5、MAPK 抗体为一抗, 辣根过氧化物酶标记的 IgG 为二抗, ECL 发光系统显示蛋白质表达. 以 β -actin 为内参照, 进行光密度分析.

1.2.5 CASY 细胞分析仪绘制转染前后细胞生长曲线及测定细胞活性. 收集对数生长期的细胞, 调整浓度为 1.0×10^4 /ml, 将细胞接种于 4 组 24 孔培养板中: a. 实验组 1, anti-miR138 (20 μ mol/L)/+ siPORT NeoFX; b. 实验组 2, anti-miR3850(μ mol/L)/+ siPORT NeoFX; c. miR 对照组, 阴性对照 + siPORT NeoFX; d. 细胞空白组, 加培养液, 各 3 个平行孔, 同等条件培养, 连续 6 天消化收集各组细胞, CASY 细胞分析仪检测活细胞数及测定细胞活性.

1.2.6 HPLC 检测 β -酪蛋白的表达变化. 首先对 β -酪蛋白标准品进行 HPLC, 以 β -酪蛋白浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作 β -酪蛋白标准曲线. 细胞样品与 β -酪蛋白标准品采用完全相同的 HPLC 检测条件.

2 结 果

2.1 小鼠乳腺上皮细胞的培养及鉴定

原代培养的小鼠乳腺上皮细胞 3~4 天贴壁后, 经胰酶消化法将成纤维细胞除去至乳腺上皮细胞纯

化, 纯化后的小鼠乳腺上皮细胞形态光学图像及角蛋白 18 鉴定结果如图 1.

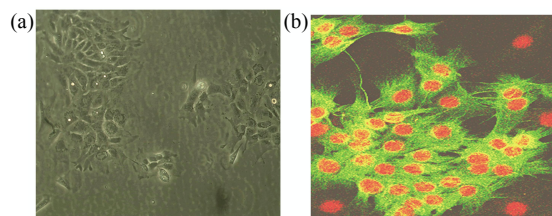


Fig. 1 Culture and identification of mouse mammary epithelial cells

(a) Mammary gland epithelial cells (200 $\times$). (b) Ceratin18 staining of mouse mammary epithelial cells (400 $\times$).

2.2 miRNA-138 基因沉默后的鉴定

脂质体转染法分别以 20、50 $\mu\text{mol/L}$ 抑制剂及 miR 阴性对照转染小鼠乳腺上皮细胞, 48 h 后收获细胞, PBS 清洗后, 提取总 RNA, 应用 qRT-PCR 方法检测转染后 miRNA-138 的表达量, 可见内源性 miR-138 在小鼠乳腺上皮细胞中的表达量随 miR-138 抑制剂的剂量增加而降低(图 2). miR-138 抑制剂可有效促使小鼠乳腺上皮细胞内源表达的 miR-138 基因沉默($P < 0.01$).

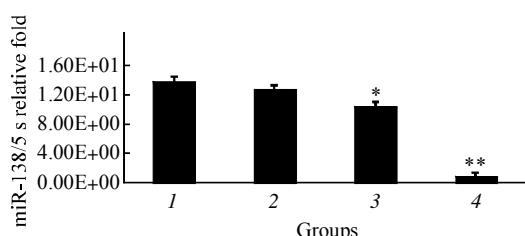


Fig. 2 Expression of miR-138 in mouse mammary epithelial cells by qRT-PCR after miR-138 inhibitor

Endogenous miR-138 was decreased in the cells with anti-miR138. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. 1: No treatment; 2: Negative control; 3: anti-miR-138 (20 $\mu\text{mol/L}$); 4: anti-miR-138 (50 $\mu\text{mol/L}$).

2.3 miRNA-138 基因沉默后 PRL-R 蛋白 Western blot 结果

经脂质体法转染 miR-138 抑制剂的小鼠乳腺上皮细胞培养 48 h 后, 提取总蛋白, Western Blot 鉴定 PRL-R 蛋白的表达, 可见 50 $\mu\text{mol/L}$ anti-miR-138 作用的小鼠乳腺上皮细胞中 PRL-R 蛋白表达显著高于非转染小鼠乳腺上皮细胞及阴性对照处理小鼠

乳腺上皮细胞($P < 0.05$), 即 miR-138 降低小鼠乳腺上皮细胞中 PRL-R 蛋白的表达(图 3).

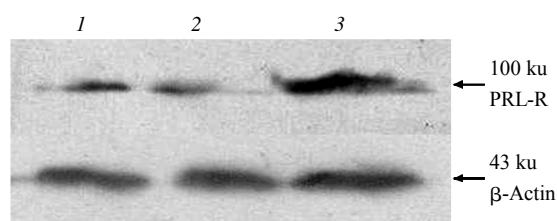


Fig. 3 Western blot analysis of expression of PRL-R after miR-138 inhibitor

1: No specific deal with; 2: Negative control; 3: anti-138 (50 $\mu\text{mol/L}$).

2.4 miRNA-138 基因沉默后 STAT5、MAPK 蛋白 Western blot 结果

Western blot 检测转染后小鼠乳腺上皮细胞中信号转导分子 STAT5、MAPK 蛋白的表达, 可见 50 $\mu\text{mol/L}$ anti-miR-138 作用的小鼠乳腺上皮细胞中 STAT5、MAPK 蛋白表达显著高于非转染小鼠乳腺上皮细胞及阴性对照处理小鼠乳腺上皮细胞($P < 0.05$), 即 miR-138 抑制小鼠乳腺上皮细胞中 STAT5、MAPK 蛋白的表达(图 4).

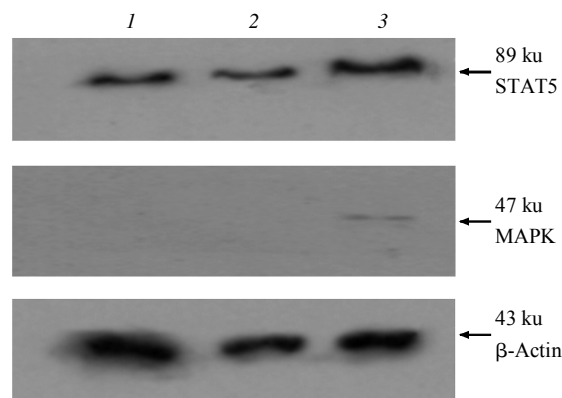


Fig. 4 Western blot analysis of expression of MAPK after miR-138 inhibitor

1: No specific deal with; 2: Negative control; 3: anti-miR138 (50 $\mu\text{mol/L}$).

2.5 miRNA-138 基因沉默后细胞生长曲线变化

miR-138 抑制剂转染后 24 h 开始对培养的小鼠乳腺细胞计数, 结果可见 miR-138 抑制组小鼠乳腺上皮细胞数高于对照组($P < 0.01$), miR-138 抑制后小鼠乳腺上皮细胞增殖能力高于对照组, 即 miR-138 降低小鼠乳腺上皮细胞增殖能力(图 5).

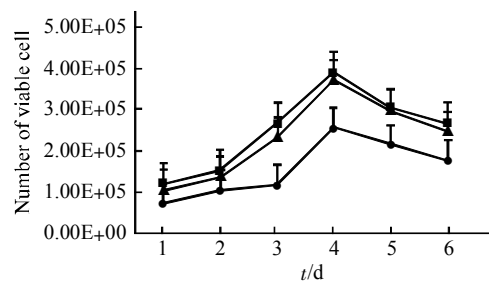


Fig. 5 Change of mouse mammary epithelial cells curve after miR-138 inhibitor
●—●: Negative control; ■—■: anti-miR-138 (50 μmol/L); ▲—▲: anti-miR-138 (20 μmol/L).

2.6 miRNA-138 基因沉默后细胞活性分析
miR-138 抑制剂转染后 48 h CASY 细胞分析仪分析小鼠乳腺上皮细胞活性, anti-miR-138(50 μmol/L) 组小鼠乳腺上皮细胞活性高于对照组($P < 0.01$), 即 miR-138 降低小鼠乳腺上皮细胞活性(表 1).

Table 1 Viable of anti-miR-138 on mouse mammary epithelial cells	
Groups	Viable/%
anti-miR-138 (20 μmol/L)	87.38±0.54 ^a
anti-miR-138 (50 μmol/L)	85.49±0.73 ^a
Negative control	79.55±1.03 ^b

Significant difference between a and b, $P < 0.01$, $n=4$.

2.7 miRNA-138 对小鼠乳腺上皮细胞 β-酪蛋白表达的影响
miR-138 抑制剂转染后的小鼠乳腺上皮细胞培养 48 h, 收集细胞, HPLC 检测分析, 根据 β-酪蛋白标准曲线可以得到不同处理组中小鼠乳腺上皮细胞 β-酪蛋白的含量. 通过对 β-酪蛋白含量进行分析, 与对照组相比, miR-138 抑制后 β-酪蛋白表达降低($P < 0.05$), 即 miR-138 增加 β-酪蛋白表达(表 2).

Table 2 β-casein content in mouse mammary epithelial cells	
Groups	β-casein/(g·L ⁻¹)
Control	7.47±0.93 ^a
anti-miR-138 (50 μmol/L)	1.29±0.12 ^b

Significant difference between a and b, $P < 0.05$.

3 讨 论

miRNA 是一种广泛存在的对基因表达进行微调的分子, 主要通过抑制靶基因来起调控作用^[7], 目前对于多数 miRNA 而言, 它们调节目标基因的精确作用方式还不清楚^[8]. 本研究应用基因沉默技术研究 miR-138 抑制后, 小鼠乳腺上皮细胞中 PRL-R^[2]、STAT5^[3]、MAPK^[4]蛋白表达的变化.

Western blot 结果提示, PRL-R 表达受到 miR-138 的抑制, miR-138 通过调控 PRL-R mRNA 的翻译影响乳腺的发育. STAT5、MAPK 蛋白表达也同时变化. miR-138 在小鼠乳腺发育、泌乳及退化过程中调控的靶序列为催乳素受体(PRL-R), 通过调控受体蛋白的表达量而影响乳腺的发育、泌乳及退化过程, 研究证实, STAT5、MAPK 在调控细胞增殖、分化及凋亡过程中起重要作用, miR-138 对乳腺上皮细胞的增殖、分化作用以及乳腺发育、泌乳及退化的作用可能通过调控 STAT5、MAPK 信号转导分子而实现.

参 考 文 献

1 Bartel D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, **116**(2): 281~297

2 Topper Y J, Freeman C S. Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev*, 1980, **60** (4): 1049~1067001510

3 Buettner R, Mora L B. Jove R1 Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res*, 2002, **8** (4) : 9452~9541

4 Wada T, Penninger J M. Mitogen-activated protein kinases inapoptosis regulation. *Oncogene*, 2004, **23**(16) : 2838~2849

5 Gregory R I, Chendrimada T P, Cooch N, *et al*. HumanRISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 2005, **123**(4): 631~640

6 Wang C M, Li Q Z. Identification of differentially expressed microRNAs during the development of Chinese murine mammary gland. *J Genetics Genomics*, 2007, **34**(11): 974~983

7 Visvanathan J, Lee S, Lee B, *et al*. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev*, 2007, **21**(7): 744~749

8 Kruger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucl Acids Res*, 2006, **1**(34): W451~454

miR-138 Function and Its Targets on Mouse Mammary Epithelial Cells*

WANG Chun-Mei, LI Qing-Zhang**, LI Ye

(Key Laboratory Dairy Science of Education Ministry Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract miRNA was 20~25 nt endogenous non-coding RNA. miRNAs are encoded small RNAs that hybridize with messenger RNAs, resulting in degradation or translational inhibition of targeted transcripts. In order to investigate the function of miR-138 on mouse mammary epithelial cells, technique for gene silencing-miRNA inhibitor (anti-miRNA) was applied to make miR-138 silence, qRT-PCR was showed valid for inhibitor miR-138. And Western blot, CASY® -technology was put in use to study some change of mouse mammary epithelial cells after miR138 inhibitor. It was shown that miR-138 suppresses the exepress of PRL-R($P < 0.05$). It was proved that miR-138 can inhibit activity and proliferation of mouse mammary epithelial cells after miR-138 inhibitor($P < 0.01$). HPLC was used to study expression of β -casin mouse mammary epithelial cells after miR-138 inhibitor, it shows down express of β -casin($P < 0.05$). Results indicated that the target of miR-138 was PRL-R, miR-138 suppresses translation of PRL-R. MiR-138 suppressed the viable and proliferation of mouse mammary epithelial cells.

Key words mammary epithelial cell, miR-138, gene silencing

*This work was supported by a grant from The Doctor Study Project of Heilongjiang Education in 2005.

**Corresponding author.

Tel: 86-451-55190999, E-mail: qingzhangli@hotmail.com

Received: February 13, 2008 Accepted: March 21, 2008