

## • 实验研究 •

# 微小 RNA206 和连接蛋白 43 在乳腺癌原发灶及腋窝转移淋巴结中的表达变化

明佳 范林军 钟玲 陈庆秋 姜军

**【摘要】** 目的 探讨微小 RNA-206 (miR-206)和连接蛋白(Cx)43 在乳腺癌原发灶 (PTs)及腋窝转移淋巴结 (MLNs)中的表达变化关系。方法 收集 8 例经病理学证实为浸润性导管癌的乳腺癌患者,取手术切除的癌旁正常腺体组织、乳腺癌 PTs、配对的正常腋窝淋巴结(NLN)及 MLNs,采用实时定量 PCR 和 Western blotting 等实验方法,检测正常腺体组织、乳腺癌 PTs、配对的 NLNs、MLNs 中 miR-206 和 Cx43 的 mRNA 和蛋白表达。各组间均数比较行单因素方差分析和 Post hoc 检验(SNK/LSD)。结果 与正常乳腺腺体组织比较,乳腺癌 PTs 和 NLNs 中 miR-206 的 mRNA 表达明显降低,配对的 MLNs 中 miR-206 的 mRNA 表达较 PTs 和 NLNs 进一步降低( $P < 0.05$ )。PTs、NLNs 和 MLNs 中 Cx43mRNA 表达较正常乳腺组织明显降低( $P < 0.05$ ),而 PTs 与 MLNs 中 Cx43 mRNA 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。PTs 和 NLNs 中 Cx43 蛋白表达较正常乳腺组织明显降低( $P < 0.05$ );与 PTs 比较,NLN 中 Cx43 蛋白表达的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而 MLNs 中 Cx43 蛋白的表达明显增加( $P < 0.05$ )。结论 miR-206 和 Cx43 基因的相互作用可能与乳腺癌腋窝淋巴结转移有关。

**【关键词】** 乳腺肿瘤;远处转移;腋窝淋巴结;微小 RNA206;连接蛋白 43

**【中图分类号】** R737.9 **【文献标识码】** A

## Expressions of miR-206 and Cx43 in primary breast tumours and metastatic lymph nodes

MING Jia, FAN Lin-jun, ZHONG Ling, CHEN Qing-qiu, JIANG Jun. Breast Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: JIANG Jun, E-mail: jcbd@medmail.com.cn

**【Abstract】** **Objective** To explore the expression and regulation role of microRNA-206(miR-206) and connexin 43 (Cx43) in primary breast tumours (PTs) and metastatic lymph nodes (MLNs). **Methods** Eight patients of pathologically confirmed infiltrating duct carcinoma of the breast were enrolled. Pericancer normal tissues, primary breast tumors (PTs), paired normal axillary lymph nodes (NLNs) and paired metastatic lymph nodes (MLNs) were obtained from the resected tumors of the patients. The expressions of mRNA and protein of miR-206 and Cx43 in pericancer normal tissue, PTs, NLNs and MLNs were tested using real-time PCR and Western blot techniques. Comparison between groups was performed using one way analysis of variances and SNK or LSD test. **Results** Compared with the normal breast tissues, the mRNA expression of miR-206 in PTs and NLNs decreased significantly, and it further decreased in MLNs compared with PTs and NLNs ( $P < 0.05$ ). The

mRNA expressions of Cx43 was significantly decreased in PTs, NLNs and MLNs compared with the normal ( $P < 0.05$ ), but there was no statistical difference between PTs and MLNs ( $P > 0.05$ ). The protein expression of Cx43 in PTs and NLNs were significantly lower than in the normal ( $P < 0.05$ ). Compared with PTs the protein expression of Cx43 had no statistical difference in NLNs ( $P > 0.05$ ), but significantly increased in MLNs ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The interaction of miR-206 and Cx43 probably play a role in the metastasis of axillary lymph node in breast cancer.

**【Key words】** breast neoplasms; metastasis; lymph nodes; microRNA-206; connexin 43

乳腺癌是中国女性发病率和病死率最高的恶性肿瘤,远处转移是乳腺癌患者死亡的主要原因之一。乳腺癌的转移是一个多基因参与、多种因素协同作用、通过多步骤完成的复杂过程<sup>[1]</sup>。微小 RNA(microRNA, miRNA)是一种长度约为 18~25 个核苷酸、进化上比较保守的非编码蛋白质的单链小 RNA 分子。有文献报道,miRNA 调节 30% 的蛋白编码基因的表达<sup>[2]</sup>。它通过调节恶性肿瘤细胞的转化及转移相关基因参与肿瘤远处转移的调节<sup>[3]</sup>。miR-206 在乳腺癌中表达降低;与 miR-206 低表达的乳腺癌患者相比,miR-206 高表达的乳腺癌患者较晚发生远处转移,患者的无转移生存期长,miR-206 参与了乳腺癌远处转移的调节<sup>[4]</sup>,但是 miR-206 的作用靶点尚不清楚。缝隙连接是存在于相邻细胞间的膜通道结构,它的基本组成单位是连接蛋白(connexin, Cx),在人类基因谱中连接蛋白有 21 个成员,分别以其相对分子质量( $M_r$ )命名,例如:Cx43,代表  $M_r$  43 000 的连接蛋白。人类乳腺组织主要表达 Cx26、Cx43<sup>[5]</sup>,Cx43 参与了乳腺癌远处转移的调节<sup>[6-7]</sup>,miR-206 通过 Cx43 调节了成骨细胞的分化<sup>[8]</sup>,miRNA-206 是否通过调节 Cx43 的表达参与了乳腺癌远处转移的调控,目前尚不清楚。

笔者运用两个 miRNA 靶基因预测软件 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)和 PicTar ([http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar\\_vertbrate.cgi](http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertbrate.cgi)) 筛查 GJA1(Cx43 基因)的 3'非翻译区,两个程序都提示 Cx43 的 3'非翻译区有两个可以与 miRNA-206 完全互补的序列,它们分别位于 GJA1 的 478~484 位点和 1609~1615 位点。为此,笔者进一步运用手术切除的人乳腺癌标本研究了乳腺癌原发灶(primary breast tumours, PTs)及配对腋窝转移淋巴结(matched paired metastasis to lymph nodes, MLNs)、无癌转移淋巴结(normal lymph nodes, NLNs)中 miR-206 和 Cx43 的表达,以期了解 miR-206 和 Cx43 的相互作用是否与乳腺癌腋窝淋巴结转移有关。

## 1 材料与方法

### 1.1 组织样本的来源

选取 2010 年 10 月 1 日至 11 月 1 日第三军医大学附属西南医院乳腺疾病中

心手术切除并经病理学证实为浸润性导管癌的乳腺癌患者 8 例, 年龄 42~62 岁(中位年龄 51 岁), 均为女性, 行乳腺癌改良根治术, 具有完整的临床病理学资料。肿瘤直径 1.6~2.5 cm(平均直径 2.2 cm)。术中, 在无菌条件下留取 4 处标本, 分别为: 距离癌边缘 3 cm 以上癌旁正常腺体组织(N, 正常乳腺组织)、癌组织(PTs)、无癌转移腋窝淋巴结(NLNs)、癌转移腋窝淋巴结(MLNs)。样本获取后立即用无 RNA 酶的 0.9% NaCl 冲洗, 快速浸入 RNA 酶抑制剂中, 4 °C 过夜, 次日移除保护液, 置 -80 °C 冰箱内保存。所取标本全部经病理检查证实, 患者术前均未接受任何治疗(新辅助化疗及内分泌治疗)。组织学分类按照 WHO(2003 年)的标准, 每例患者术后病理诊断均为浸润性导管癌, 腋窝淋巴结转移  $\geq 1$  枚。

## 1.2 荧光实时定量 PCR

**1.2.1 组织总 RNA 和 miRNA 分离:** 将保存于 -80 °C 的样本用 Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)抽提总 RNA, 然后用紫外分光光度计测 260 nm 和 280 nm 波长下的吸光度比值  $[D(260)/D(280)]$ , 并检测其浓度, 再用琼脂糖电泳检测总 RNA 质量。使用 mirVana™ miRNA isolation Kit (Ambion 公司, 美国)从总 RNA 中分离出 miRNA。

**1.2.2 逆转录反应:** 采用 SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit (Takara, 日本), 在 0.5 ml 的 Eppendorf 管中加入 RNasin 0.5  $\mu$ l, 总 RNA 1  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l, 10 $\times$ buffer 缓冲液 2  $\mu$ l, 逆转录酶 1  $\mu$ l, 逆转录引物 1  $\mu$ l(Cx43 采用 Oligo (dt), miR-206 逆转录引物为 5'-GCGCGTGAGCAGGCTGGAGAAATTAACCACGCGC-3'), 用二乙基焦磷酸胺(diethyl pyrocar-bonate, DEPC)处理过的水补足至总体积 20  $\mu$ l, 混匀, 42 °C 反应 40 min, 95 °C 5 min 终止反应, 冰浴冷却 5 min, -70 °C 保存。

**1.2.3 实时定量 PCR:** Cx43 采用 SYBR® Prime-Script® RT-PCR Kit (Takara, 日本), miR-206 采用 mirVana™ qRT-PCR miRNA Detection Kit (Ambion, 美国), 反应体系严格按照说明书配制; 采用美国伯乐公司 Bio-Rad IQ5 四通道定量 PCR 仪; 使用磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydro-genase, GAPDH, 在不同样品间表达量基本恒定)作为内参, GAPDH、miR-206 和 Cx43 的引物见表 1。miR-206 和 Cx43 的热循环程序: (1)94 °C 5 min; (2)94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 30 s, 收集荧光, 设第 2 程序 40 个 PCR 循环。PCR 反应的特异性通过产物熔解曲线进行确认。mRNA 相对含量根据公式: 相对倍数变化 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , 其中,  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(实验组)} - \Delta Ct_{(正常乳腺组织)}$ ;  $\Delta Ct = Ct_{(实验组)} - Ct_{(GAPDH)}$ 。

表 1 miR-206、Cx43 和 GAPDH 的 PCR 引物序列

基因	上游引物	下游引物
miR-206	5-UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG-3'	5-ACACACUUCUUACAUCUCCAUU-3'
Cx43	5-GGCGTGACTTCACTACTTTTAAGCA-3'	5-CAGTTGAGTAGGCTTGAACCTTGTC-3'
GAPDH	5-ATGTTTCGTCATGGGTGTGAAC-3'	5-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'

### 1.3 Western blotting 检测 Cx43 蛋白

按常规方法提取细胞总蛋白,用 Folin-酚法将样本总蛋白定量为 4 mg/ml。取 35  $\mu$ l 样本总蛋白加入 5  $\mu$ l 上样缓冲液<sup>[9]</sup>,100  $^{\circ}$ C 沸水煮 5 min,进行 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)(120 V 电压,2~3 h)。电泳完毕后进行常规的转膜,封闭后孵育兔抗人 Cx43 多克隆抗体(4  $\mu$ g/ml, Santa cruz, 美国)、兔抗人 GAPDH 多克隆抗体(1:1000, Santa cruz, 美国),然后与辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗(1:2000, 中杉金桥产品)室温孵育 1 h 后,于暗室中将膜与增强发光底物反应(Pierce, 美国)约 5 min, X 胶片感光、显影及定影。以 GAPDH 基因( $M_r$  36000)作内对照,将 X 胶片通过扫描呈像,运用 Photoshop 8.0 进行条带灰度的数据采集,将 Cx43 与 GAPDH 的比值作为连接蛋白表达水平的参数,对 Cx43 进行相对定量。

### 1.4 统计学分析

应用 SPSS16.0 进行统计分析。结果数据经分析符合正态分布,方差整齐,因此数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。各组间均数比较行单因素方差分析和 Post hoc 检验(SNK/LSD),以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-206 和 Cx43 的 mRNA 表达变化

乳腺癌 PTs 和 NLNs 中 miR-206 的 mRNA 表达较正常乳腺腺体组织明显降低( $P < 0.05$ , 表 2),配对的 MLNs 中 miR-206 的 mRNA 表达较 PTs 和 NLNs 进一步降低( $P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 乳腺癌中 miR-206 与 Cx43 的 mRNA 表达

组织	miR-206		Cx43	
	Ct 值( $\bar{x} \pm s$ )	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值	Ct 值( $\bar{x} \pm s$ )	$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值
N	25.02 $\pm$ 0.96	1.000	26.70 $\pm$ 0.83	1.000
PTs	18.10 $\pm$ 0.62 <sup>a</sup>	0.021	21.70 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>	0.028
NLNs	18.30 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	0.024	21.27 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>	0.026
MLNs	17.29 $\pm$ 0.37 <sup>abc</sup>	0.011	20.51 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	0.023

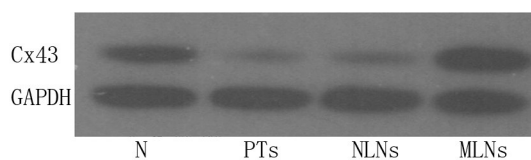
N: 正常乳腺组织; PTs: 乳腺癌原发灶; NLNs: 无转移淋巴结; MLNs: 癌转移淋巴结; a:  $P < 0.05$ , 与 N 组比较; b:  $P < 0.05$ , 与 PTs 比较; c:  $P < 0.05$ , 与 NLNs 比较

PTs、NLNs 和 MLNs 中 Cx43 的 mRNA 表达较正常乳腺腺体组织明显降低( $P < 0.05$ , 表 2)。与乳腺癌 PTs 比较,与其配对的 NLNs 和 MLNs 中 Cx43 的 mRNA 表达略有下降,但是差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 2.2 Cx43 蛋白的表达变化

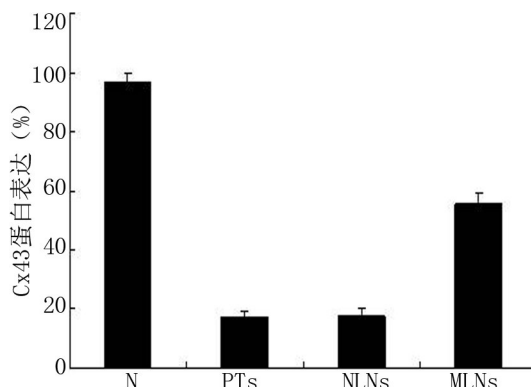
与正常乳腺腺体组织比较,Cx43 蛋白表达在 PTs 和 NLNs 中明显降低( $P < 0.05$ , 图 1);与 PTs 比较,NLNs 中 Cx43 蛋白表达的差异无统计学意义

( $P > 0.05$ ), 而 MLNs 中 Cx43 蛋白表达较 PTs 明显增加( $P < 0.05$ , 图 1、2)。



N: 正常乳腺组织; PTs: 乳腺癌原发灶;  
NLNs: 无癌转移淋巴结; MLNs: 癌转移淋巴结

图 1 不同组织的 Cx43 蛋白电泳图



N: 正常乳腺组织; PTs: 乳腺癌原发灶; NLNs: 无癌转移淋巴结; MLNs: 癌转移淋巴结; a:  $P < 0.05$ , 与 N 比较;  
b:  $P < 0.05$ , 与 PTs 比较

图 2 不同组织的 Cx43 蛋白表达比较

### 3 讨论

miRNA 与生物体的生长发育、细胞增殖、分化、凋亡、肿瘤发生等密切相关; 与正常组织比较, 许多 miRNA 在肿瘤组织中表达水平失衡<sup>[10-12]</sup>。有文献报道, miR-206 可能参与调节了乳腺癌的远处转移, 与 miR-206 低表达的乳腺癌相比, miR-206 高表达的乳腺癌较晚发生远处转移, 且无转移生存期长<sup>[4]</sup>。本实验结果提示, PTs 和 NLNs 中 miR-206 的 mRNA 表达降低, 在 MLNs 中 miR-206 的 mRNA 表达进一步降低, Cx43 的 mRNA 表达在 PTs 和 MLNs 之间无明显差异, 其蛋白表达在 MLNs 中较 PTs 明显增加, 提示乳腺癌发生腋窝淋巴结转移时可能存在着 Cx43 的转录后调控。而 miRNA 是最大的一类基因表达转录后调控因子<sup>[13]</sup>, 它们主要通过和靶 mRNA 的结合, 发挥其抑制翻译和诱导 mRNA 降解的功能<sup>[3]</sup>, 使目的 mRNA 在蛋白表达水平发生变化。本实验发现, miR-206 mRNA 表达由 PTs 到 MLNs 呈现出明显降低的趋势, 而 Cx43 蛋白的表达变化则相反。结合现有的基础理论, 笔者推测: 在正常情况下, miR-206 的 5'端的 2~8 个碱基与 Cx43 mRNA 上的相应靶点结合, 发挥其抑制翻译和诱导 Cx43 降解的功能; 在乳腺癌腋窝淋巴结转移的过程中, miR-206 mRNA 的表达下

调,不能有效干扰 Cx43 mRNA 的转录,引起 Cx43 蛋白表达上调,Cx43 蛋白进一步通过细胞骨架参与了细胞运动的调控<sup>[14-15]</sup>,进而影响了乳腺癌细胞的腋窝淋巴结转移。当然,本实验发现的这一现象尚需在以后的工作中进行更深入的研究证实;同时,本实验发现 Cx43 的 mRNA 表达在 PTs 和 MLNs 之间无明显差异,考虑到本实验的样本量仅 8 例,所选病例又均为乳腺浸润性导管癌,因此有待在以后的工作中进一步扩大样本量及病理类型证实这一结果。

本研究还发现,Cx43 蛋白表达在乳腺癌原发灶中降低,与 Kanczuga Koda 等<sup>[16]</sup>的研究结果一致。因为缝隙连接不仅在细胞间起机械连接作用,还可以通过电偶联和化学偶联两种方式介导细胞间电化学信号传递,它允许电信号和  $M_r$  低于 1000 或直径小于 1.0 nm 的离子或小分子物质通过,如小分子代谢产物、水分子、第二信使(钙离子、三磷酸肌醇、环核苷酸)等<sup>[17]</sup>。当机体受到外部或内部刺激后,通过改变连接蛋白的表达使机体适应这种变化,Cx43 蛋白的表达与缝隙连接的通透性呈正相关<sup>[18]</sup>,Cx43 的表达降低使得细胞间缝隙连接交流降低或丧失,可以引起细胞的异质性增加,而异质性是恶性肿瘤细胞的重要特征之一<sup>[19]</sup>。与原发灶中 Cx43 表达降低相反的是,在乳腺癌等恶性肿瘤远处转移中缝隙连接交流是增加的。因为在发生远处转移时,恶性肿瘤细胞需要与周围的基质细胞、血管内皮细胞等发生相互作用和必要的信息交流,机体通过上调 Cx43 等缝隙连接交流来实现<sup>[20]</sup>。本实验发现:Cx43 的蛋白表达在癌转移淋巴结中表达明显高于原发灶和无转移淋巴结;而 mRNA 表达在有癌转移的腋窝淋巴结和无转移淋巴结间的差异无统计学意义。由此可以看出,Cx43 在恶性肿瘤原发灶和转移灶中的作用不同,作用机制也较复杂,对 Cx43 的研究尚有待进一步深入。

## 参考文献

- [1] 邵志敏. 乳腺癌转移机制的研究及其临床应用[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2009,3(5):475-479.
- [2] Lewis BP, Shih IH, Jones Rhoades MW, et al. Prediction of mammalian microRNA targets [J]. Cell, 2003,115(7):787-798.
- [3] Zhang H, Li Y, Lai M. The microRNA network and tumor metastasis [J]. Oncogene, 2010, 18,29(7):937-948.
- [4] Tavazoie SF, Alarcón C, Oskarsson T, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis [J]. Nature, 2008,451(7175):147-152.
- [5] Conklin CM, Bechberger JF, MacFabe D, et al. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2007, 28(1):93-100.
- [6] Elzarrad MK, Haroon A, Willecke K, Dobrowolski R, Gillespie MN, et al. Connexin-43 up-regulation in micrometastases and tumor vasculature and its role in tumor cell attachment to pulmonary endothelium [J]. BMC Med, 2008, 22(6):20.
- [7] Kanczuga Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, et al. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer [J]. J Clin Pathol, 2006,59(4):429-33.
- [8] Inose H, Ochi H, Kimura A, et al. microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009,106(49):20 794-20 799.
- [9] Joseph S, David WR. Molecular Cloning: a laboratory manual [M]. 3rd ed. Beijing :Beijing Science Publishing Company, 2002:

1564-1595.

- [10] He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(7) : 522- 531.
- [11] Hutvagner G. MicroRNAs and cancer: issue summary [J]. Oncogene, 2006, 25: 6154- 6155.
- [12] Esquela Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6 (4) :259- 269.
- [13] Yu Z, Baserga R, Chen L, Wang C, Lisanti MP, Pestell RG. microRNA, cell cycle, and human breast cancer [J]. Am J Pathol, 2010 ,176(3):1058-1064.
- [14] Xu X, Francis R, Wei CJ, et al. Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells [J]. Development, 2006,133(18):3629-3639.
- [15] Homkajorn B, Sims NR, Muyderman H. Connexin 43 regulates astrocytic migration and proliferation in response to injury[J]. Neurosci Lett, 2010, 486(3):197-201.
- [16] Kanczuga Koda L, Sulkowski S, Tomaszewski J, et al. Connexins 26 and 43 correlate with Bak, but not with Bcl-2 protein in breast cancer [J]. Oncol Rep, 2005,14(2):325-329.
- [17] Parthasarathi K, Ichimura H, Monma E, et al. Connexin 43 mediates spread of Ca<sup>2+</sup> dependent proinflammatory responses in lung capillaries [J]. J Clin Invest, 2006, 116 (8): 2193-2200.
- [18] Goldberg GS, Moreno AP, Lampe PD. Gap junctions between cells expressing connexin43 or 32 show inverse permselectivity to adenosine and ATP [J]. J Biol Chem , 2002, 277(39):36 725-36 730.
- [19] Oktem G, Bilir A, Ayla S, et al. Role of intercellular communications in breast cancer multicellular tumor spheroids after chemotherapy [J]. Oncol Res, 2006,16(5):225-233.
- [20] Kanczuga Koda L, Sulkowski S, Lenczewski A, et al. Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer [J]. J Clin Pathol, 2006,59(4):429-433.

(收稿日期:2011-01-24)

(本文编辑:罗承丽)

明佳,范林军,钟玲,等.微小RNA206和连接蛋白43在乳腺癌原发灶及腋窝转移淋巴结中的表达变化[J/CD].中华乳腺病杂志:电子版,2011,5(1):65-71.