

# mir-130a-3p靶向RAB5B在耐药株MCF-7/ADR中的分析

王珂琼

(广西医科大学附属肿瘤医院乳腺外科 广西 南宁 530000)

**【摘要】**目的: 探讨下调mir-130a-3p的表达量后对RAB5B基因在耐药株MCF-7/ADR细胞中的影响。方法: 采用CCK8检测法检测耐药细胞株MCF-7/ADR和MCF-7细胞的耐药性及存活率; 采用qRT-PCR的方法验证MCF-7和MCF-7/ADR中mir-130a-3p、RAB5B的本底表达; 采用转染mimic的方法下调mir-130a-3p基因验证其对在MCF-7和MCF-7/ADR细胞中对RAB5B的影响。结果: MCF-7/ADR细胞株耐药性和存活率好。MCF-7和MCF-7/ADR中均有mir-130a-3p和RAB5B的表达, mir-130a-3p在耐药株和非耐药株表达差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ ), 但RAB5B在两株细胞中表达差异并无统计学意义 ( $p > 0.05$ ), 说明RAB5B基因对细胞的耐药性没有影响。结论: 。mir-130a-3p在耐药株和非耐药株中表达有差异, 但其靶基因RAB5B对细胞的耐药性并没有影响。

**【关键词】**mir-130a-3p, RAB5B; 乳腺癌; 耐阿霉素细胞

**【DOI】** 10.12252/j.issn.2096-6261.2021.12.1556

乳腺癌严重影响人们的身体健康及生活节奏。乳腺癌的治疗方式多种多样, 但化疗耐药一直是治疗乳腺癌的难题所在。Mir-130a-3p是近几年火热的microRNA。通过文献可知, RAB5B基因为mir-130a-3p的靶点<sup>[1]</sup>, 但mir-130a-3p是否会通过RAB5B影响细胞的耐药性还没有相关文章报道。由此本文通过分析mir-130a-3p在耐阿霉素细胞株MCF-7/ADR靶向RAB5B通路, 初步探讨mir-130a-3p在耐药里发挥的作用机制。

## 一、材料与方法

### (一) 研究对象

MCF-7细胞为人乳腺癌细胞株, MCF-7/ADR细胞为耐阿霉素的人乳腺癌细胞株。MCF-7细胞株购于中国上海科学院, MCF/ADR细胞由广西医科大学附属肿瘤医院实验研究部保存。

### (二) 试剂

RPMI1640、胰蛋白酶、MCF-7细胞使用血清由以色列BI公司提供, 耐药株血清为美国Gibco公司提供, 阿霉素为Selleck为美国提供, cck8试剂盒为日本同仁化学研究所提供, GAB5B抗体购于维百奥(北京)科技有限公司, RT-PCR试剂盒、Trizol试剂盒、反转录试剂盒购于日本TaKaRa公司、mir-130a-p mimic和阴性对照由上海和元生物技术(上海)股份有限公司提供。

### (三) 实验方法

#### 1. 细胞培养

将MCF-7细胞和MCF-7/ADR细胞至于完全培养基(90%RPMI-1640+10%胎牛血清+1%青-链霉素)中进行培养, 当细胞融合数达到80%-90%时进行传代。如细胞数量过多或品种珍贵, 可进行细胞冻存以供后续实验使用。

#### 2. CCK8检测MCF-7/ADR细胞耐药性

将阿霉素按一定浓度梯度分别稀释为0.01, 0.1, 0.5, 1, 5μg/mL。取出96孔板, 将药物按浓度梯度加入到细胞内, 每然后将药物处理的孔板置于培养箱中继续培养48h。向每个孔中加入10μl CCK-8, 培养箱中孵育2h, 使用酶标仪测定细胞在450nm处的吸光值(OD450)。根据OD值计算出每组细胞在不同药物浓度下的抑制率。细胞生长抑制率=[(OD未加药孔-OD加药孔)/(OD未加药孔-OD调零孔)]×100%。

### (四) MCF-7/ADR分组及转染

将MCF-7/ADR分成两组, 分别为: 实验组(inhibitor组), 阴性对照组(NC组)。实验组为MCF-7/ADR转染mir-130a-3p mimic, 阴性对照组为MCF-7/ADR加入NC储存液。培养24小时后, RT-PCR测定各细胞组内mir-130a-3p的表达水平。

### (五) qRT-PCR测mir-130a-3p和RAB5B表达水平

首先观察MCF-7细胞和MCF-7/ADR细胞融合率达到90%后, 从培养基中取出, 置于冰上。每个培养瓶中加入1ml RNAiso Plus, 轻晃使其均匀覆盖细胞表面, 置于冰上裂解10min, 用移液枪反复吹打细胞并转移至1.5ml高压灭菌的EP管中进行离心提取、提纯细胞中的RNA。用分光光度计计算RNA的浓度后逆转录成cDNA, RT-PCR测定MCF-7和MCF-7/ADR中mir-130a-3p

的表达水平, 反应条件为: 95℃预变性持续5min, 之后按照95℃ 30s 1个循环, 95℃ 5s, 60℃ 30s 40个循环进行, 在60℃ 30s 40个循环处收集荧光。

### (六) Western Blot

通过Western Blot实验我们检测了MCF-7和MCF-7/ADR中RAB5B的表达水平, 也检测了转染后MCF-7/ADR实验组和阴性对照组中RAB5B的表达水平。给将MCF-7和MCF-7/ADR实验组和阴性对照组两组细胞各取一个培养瓶进行蛋白裂解(PMSF:RIPA按1:100), 30min后体提取蛋白, BCA试剂盒计数后煮熟加入已经制好的SDS-PAGE凝胶中进行电泳, 转膜等操作。一抗过夜孵育。(RAB5B稀释浓度为1:100; Goat Anti-mouse IgG稀释浓度为1:3000; GAPDH稀释浓度为1:10000; Goat Anti-rabbit IgG稀释浓度为1:3000)。第二天将PVDF膜从一抗中取出开始数二抗, 二抗完毕后ECL发光液进行显影。

### (七) 统计学分析

实验数据使用SPSS22.0软件进行数据分析, 采用GraphPad Prism 5.0作图。均数比较采用独立t检验方法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 二、结果

通过CCK8测得不同浓度阿霉素处理后MCF-7/ADR的IC50。如图所示, 耐药细胞株MCF-7/ADR细胞的IC50较亲本细胞株MCF-7明显增高 ( $p < 0.05$ ) 耐药株MCF-7/ADR细胞的耐药性好, 存活率高。

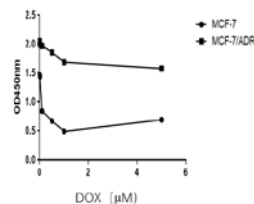


图1 cck8检测MCF-7与MCF-7/ADR的IC50 (Figure 1 IC50 of cck8 to detect MCF-7 and MCF-7/ADR)

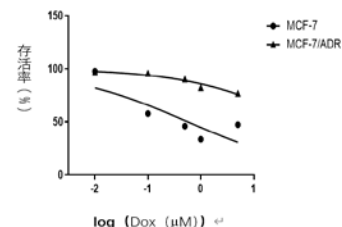


图2 cck8检测MCF-7和MCF-7/ADR细胞的存活率 (Fig.2 The survival rate of MCF-7 and MCF-7/ADR)

cells detected by cck8)

在进行转染之前, 本课题组将MCF-7和MCF-7/ADR做了本底表达, 发现MCF-7和MCF-7/ADR中都有mir-130a-3p的表达, MCF-7/ADR中mir-130a-3p的表达更低, 差异具有统计学意义。(p<0.05)。将MCF-7/ADR转染成功后, 各组细胞进行RT-PCR的验证。与阴性对照组相比, 实验组的mir-130a-3p明显降低, 差异具有统计学意义, (p<0.05)表明MCF-7/ADR细胞转染成功。

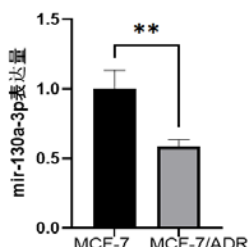


图3 MCF-7和MCF-7/ADR细胞中mir-130a-3p的表达量 (Figure 3 Expression of mir-130a-3p in MCF-7 and MCF-7/ADR cells)

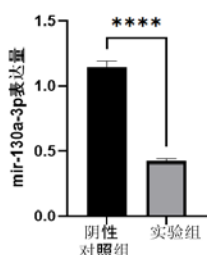


图4 MCF-7/ADR转染后各组细胞mir-130a-3p的表达量 (Figure 4 Expression of mir-130a-3p in each group of cells after transfection in MCF-7/ADR cell)

在进行转染之前, 本课题组进行了RAB5B基因的本底表达。qRT-PCR结果显示, MCF-7细胞和MCF-7/ADR细胞中都有RAB5B的表达, 且差异没有统计学意义。(p>0.05)。课题组又进行了WB实验验证, WB结果与qRT-PCR得到的结果显示一致, MCF-7与MCF-7/ADR中, RAB5B的表达量差异没有统计学意义。

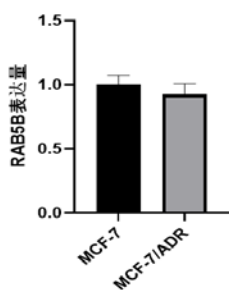


图5 qRT-PCR显示MCF-7与MCF-7/ADR细胞中RAB5B的表达量 (Figure 5 qRT-PCR shows the expression of RAB5B in MCF-7 and MCF-7/ADR cells)

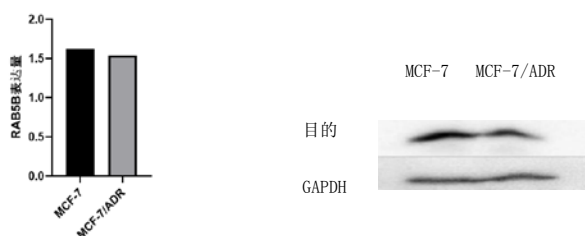


图6 Western Blot显示MCF-7与MCF-7/ADR细胞中RAB5B的表达量

(Figure 6 Western Blot shows the expression of RAB5B in MCF-7 and MCF-7/ADR cells)

进行转染之后, 本课题组再一次跑了RAB5B的Western Blot, 结果如图所示, 实验组MCF-7/ADR、阴性对照组MCF-7/ADR中RAB5B的表达水平差异无统计学意义。(p>0.05)结果表明, 耐药株和非耐药株的表达没有差异, RAB5B对细胞的耐药性没有影响。

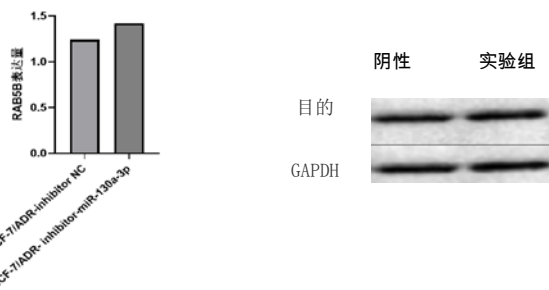


图7 转染mir-130a-3p的mimic后实验组和阴性对照组中RAB5B的表达量

(Figure 7 Expression of RAB5B in experimental group and negative control group after mimic transfected with mir-130a-3p)

### 三、讨论

药物耐药是治疗乳腺癌治疗的一个难题。阿霉素作为一中广谱、高效的蒽环类肿瘤细胞抑制药物, 广泛应用于乳腺癌的治疗。但阿霉素在临床化疗中存相当高比例的肿瘤耐药性, 所以对阿霉素耐药的研究一直层出不穷。

MicroRNA是microRNA (miRNA) 是一类长度约22nt的小型非编码RNA, 不仅在在包括DNA损伤修复、氧化应激、衰老、分化、凋亡等重要细胞过程中发挥作用<sup>[2]</sup>。在众多的Rab蛋白当中, Rab5特异性定位于早期腔室并调节内吞作用<sup>[3]</sup>。Rab5有三种亚型, Rab5a, Rab5b和Rab5c存在于哺乳动物细胞中<sup>[4]</sup>。最新的研究表明, Rab5在不同的细胞亚型中存在的的作用也是不同的<sup>[5]</sup>。

在正常的乳腺癌MCF-7细胞株和耐阿霉素MCF-7/ADR细胞株中, 本课题组通过qRT-PCR实验验证了mir-130a-3p在两个细胞株的表达, 结果显示在乳腺癌耐药细胞MCF-7/ADR里mir-130a-3p的表达比正常的乳腺癌细胞MCF-7低, 说明mir-130a-3p的减少会增加细胞的耐药性。说明mir-130a-3p是抑癌基因。同样的, 本课题组通过qRT-PCR实验验证了MCF-7细胞和MCF-7/ADR细胞中RAB5B基因的表达, 结果显示两种细胞株中RAB5B的表达差异并无统计学意义。为了更进一步说明RAB5B在两株细胞中的表达情况, 本课题组进行了Western Blot实验验证, 结果与qRT-PCR, RAB5B在两种细胞株中的表达差异没有统计学意义。(p>0.05)当下调mir-130a-3p时, 阴性对照组和实验组中RAB5B的表达差异没有统计学意义。

(p>0.05)由以上实验得知, 在乳腺癌MCF-7细胞和耐阿霉素MCF-7/ADR细胞中, 耐药株和非耐药株的表达没有差异, RAB5B对细胞的耐药性没有影响。

开发抗多药耐药药物是癌症化疗的重要策略之一。即使RAB5B在乳腺癌耐药的机制中发挥的作用不大, 近几年对阿霉素耐药的研究却层出不穷。METTL3通过m6A的方式加速pri-microRNA-221-3p成熟促进乳腺癌细胞的耐药性, 所以阻断之间的连接可以减少乳腺癌细胞的耐药从而解决耐药的问题<sup>[6]</sup>。

总而言之, 克服肿瘤的耐药是一个难度较大但必须解决的困难, 我们期待克服成功的那一天。(通讯作者: 刘剑仑)

### 参考文献

[1] 刘雪妮, 王超, 程艳红, 杨鹏. 慢病毒载体上调GADD45 $\alpha$ 增强伊马替尼耐药株K562IR细胞的药物敏感性[J]. 安徽医科大学学报, 2021 (10).