

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.07.001

❖ 基础研究 ❖

miR-7-5p 靶向抑制 REG γ 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移及侵袭能力的调控作用

姚旭枫, 蒲映宏, 杨君毅, 罗鑫荣, 王小毅

(重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科, 重庆 400016)

【摘要】目的: 探讨 miR-7-5p 靶向抑制 REG γ 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移和侵袭能力的调控作用。**方法:** 培养乳腺癌 MDA-MB-231 细胞, 设置阴性对照组、REG γ 敲减组、miR-7-5p 过表达组、miR-7-5p + REG γ 同时过表达组。采用划痕愈合实验检测细胞的迁移能力; Transwell 实验检测细胞的侵袭能力; qRT-PCR 检测 REG γ 和 miR-7-5p 的表达水平; 荧光素酶报告基因检测 miR-7-5p 靶向调控 REG γ 。**结果:** miR-7-5p 可特异结合 REG γ 的 3' 端非翻译区。与阴性对照组相比, 敲减 REG γ 可抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移及侵袭能力 ($P < 0.05$); 过表达 miR-7-5p 可降低 REG γ 的表达水平 ($P < 0.05$), 并抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移及侵袭能力 ($P < 0.05$)。与过表达 miR-7-5p 相比, 同时过表达 miR-7-5p 和 REG γ 可降低 miR-7-5p 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的抑制作用 ($P < 0.05$)。**结论:** miR-7-5p 能够抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移和侵袭能力, 机制可能与靶向调控 REG γ 的表达水平有关。

【关键词】 miR-7-5p; REG γ ; 迁移; 侵袭; 三阴性乳腺癌细胞

【中图分类号】 R737.9; R73.36 **【文献标志码】** A

Effect of miR-7-5p inhibiting migration and invasion of triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231 by regulating REG γ

YAO Xu-feng, PU Ying-hong, YANG Jun-yi, LUO Xin-rong, WANG Xiao-yi

(Department of Endocrine and Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】Objective: To explore the effect of miR-7-5p inhibiting migration and invasion of triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231 by regulating REG γ . **Methods:** Triple-negative breast cancer cells MDA-MB-231 were cultured and grouped, which included negative control group, REG γ inhibiting group, miR-7-5p over-expressing group, miR-7-5p and REG γ co-expressing group. Wound healing assay was used to measure cell migration, transwell assay was used to measure cell invasion, qRT-PCR was used to detect the expression of REG γ and miR-7-5p, luciferase reporter assay was used to verify the relationship between miR-7-5p and REG γ . **Results:** miR-7-5p could bind the 3' untranslated regions of REG γ directly in MDA-MB-231 cells. Compared with negative control group, knockdown of REG γ could inhibit the migration and invasion of MDA-MB-231 cells ($P < 0.05$). The overexpression of miR-7-5p reduced the expression level of REG γ ($P < 0.05$), and inhibit the migration and invasion of MDA-MB-231 cells. Compared with the overexpression of miR-7-5p, simultaneous overexpression of miR-7-5p and REG γ reduced the inhibitory effect of miR-7-5p on the migration and invasion of MDA-MB-231 cells. **Conclusion:** miR-7-5p suppressed cell migration and invasion in MDA-MB-231 cells, and mainly by targeting REG γ . miR-7-5p can inhibit the migration and invasion of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231, the mechanism may be related to the targeted regulation of REG γ .

【Key words】 miR-7-5p; REG γ ; Migration; Invasion; Triple-negative breast cancer cells

乳腺癌目前已成为全球发病率及死亡率最高的女性恶性肿瘤, 三阴性乳腺癌是其中一种类型, 特征为肿瘤细胞不表达雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体 2, 由于缺乏相对特异的治疗措施, 预后相对较差^[1]。肿瘤转移是恶性肿瘤最重要的特征之一, 严重影响患者的生存时间及生活质

量^[2]。因此, 寻找能够负向调控三阴性乳腺癌细胞侵袭转移能力的靶向具有重要意义。本课题组前期研究^[3]发现, 蛋白酶体激活因子 3 (REG γ) 在乳腺癌中表达显著上升, 与淋巴结转移直接相关, 提示 REG γ 在乳腺癌中发挥促进肿瘤的作用。因此, 如何抑制 REG γ 的表达发挥抑癌作用值得进一步研

基金项目: 重庆市科学技术局科研项目 (cstc2021jcyj - msxmX0147)

作者简介: 姚旭枫 (1996 -), 男, 硕士研究生, 住院医师。E-mail: 910237978@qq.com

通讯作者: 王小毅。E-mail: wxytsf@sina.com

究。微小 RNA (microRNA) 是一类高度保守的小分子 RNA, 能够转录后调控基因的表达受到关注^[4]。通过生物信息软件查询, REG γ 为 miR-7-5p 下游潜在靶基因。多项研究^[5-7]表明, miR-7-5p 可通过调控 PI3K/Akt、FAK、KLF4 等基因抑制肿瘤细胞的增生、上皮间质转化、转移等。本课题组前期研究^[8]还发现, miR-7-5p 能够通过靶向调控 REG γ 的表达, 进而抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖, 但是否参与调控三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移和侵袭尚不明确。本研究以 MDA-MB-231 细胞为研究对象, 旨在探讨 miR-7-5p 靶向抑制 REG γ 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移和侵袭能力的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料

MDA-MB-231 细胞株 (中科院上海细胞资源中心), 1640 培养液 (Gibco 公司, c11875500bt), 胎牛血清 (Gibco 公司, 10099141c), 胰蛋白酶 (Gibco 公司, 25200072), 双荧光素酶报告基因试验系统 (Promega 公司, E1910), miRNA 反转录试剂盒 (锐博公司, Lot2121), miRNA qRT-PCR 引物 (锐博公司, MQPS0002204), qRT-PCR 试剂盒 (Invitrogen, 4385617), Transwell 小室 (Millipore 公司, MCMP24H48), Matrigel 胶 (Millipore 公司, E1270), TRIzol (Invitrogen 公司, 15596026), 脂质体 2000 (Invitrogen 公司, 11668019)

1.2 方法

1.2.1 MDA-MB-231 细胞培养及分组 MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液进行贴壁培养, 培养条件: 37 °C, 5% CO₂ 培养箱; 当细胞生长至铺满培养板底部 80% ~ 90% 时, 使用 0.125% 胰蛋白酶进行消化和传代。根据实验需求, 将细胞接种至 6 孔板并分为阴性对照组, REG γ 敲减组, miR-7-5p 过表达组, REG γ 和 miR-7-5p 同时过表达组。一般为 2×10^5 /mL, 当细胞密度为 70% ~ 80% 时进行 RNA 或蛋白提取。

1.2.2 划痕愈合实验 MDA-MB-231 细胞接种在 6 孔板中, 生长至基本铺满 6 孔板, 使用 20 μ L 移液头以相同的力度及角度在培养孔中央作一纵行划痕, 用 PBS 洗掉多余的细胞, 并进行拍照记录, 划痕

宽度记为 L0, 24 h 后进行拍照, 划痕宽度记为 L1。按照公式 (L0-L1)/L0 计算划痕愈合程度。

1.2.3 Transwell 实验 侵袭实验需提前铺 Matrigel 胶, 迁移实验则不需要; 将 Matrigel 胶与无血清 1640 培养液按照 1:8 比例稀释, 每个小室加入 50 μ L, 37 °C 至胶凝固; 使用时铺胶的小室加入无血清培养基, 然后轻轻吸出所有的液体; 经过处理的 MDA-MB-231 细胞, 计数 2×10^5 /mL, 用无血清 1640 重悬后接种 100 μ L 在涂有 Matrigel 胶的 Transwell 上层小室内, 小室的下层加入 600 μ L 含有 10% 胎牛血清的 1640 培养液, 24 h 后, 用磷酸盐缓冲液漂洗小室 3 次, 棉签擦拭小室上层的细胞和 Matrigel 胶, 4% 多聚甲醛固定过夜, 0.1% 结晶紫染色, 室温放置, 将膜洗净晾干, 固定于载玻片上, 显微镜照相计数。

1.2.4 qRT-PCR 实验 收集经过处理的 MDA-MB-231 细胞, 采用 TRIzol 法提取样本的总 RNA 并 ND2000 测取浓度, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, 使用锐博 miRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增。miR-7-5p 以 U6 为内参, REG γ 以 β -actin 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量, 实验重复 3 次。

1.2.5 双荧光素酶报告基因实验 使用课题组前期构建的携带 REG γ 3' 端非编码区质粒, 野生型 pMIR-REPORT-REG γ -3' UTR-WT 和突变型 pMIR-REPORT-REG γ -3' UTR-Mut, 在 MDA-MB-231 细胞中使用脂质体 2000 共转染携带 REG γ 3' 端非编码区质粒, miR-7-5p 或阴性对照, 海肾荧光 pRL-TK 质粒。转染后 48 h, 使用双荧光素酶报告基因实验系统检测荧光值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件对数据进行分析与处理, 组间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 敲减 REG γ 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的抑制作用

采用课题组前期构建的阴性对照细胞株及 REG γ 敲减细胞株, 通过 Transwell 检测 MDA-MB-231 细胞的侵袭能力, 结果显示, 与阴性对照组相比, REG γ 敲减组的侵袭细胞数目减少 (P < 0.05)。见图 1。

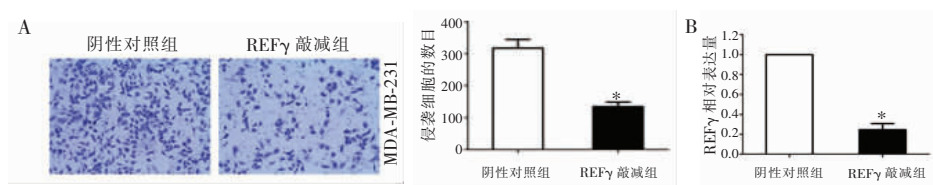


图 1 敲减 REG γ 对 MDA-MB-231 细胞侵袭能力的抑制作用

A. 敲减 REG γ 对细胞迁移能力的抑制作用; B. qRT-PCR 检测 REG γ 的表达。*P < 0.05, 与阴性对照组相比。

2.2 miR-7-5p 可特异结合 REG γ 的 3 端非翻译区

采用课题组前期构建的野生型 pMIR-REPORT-REG γ -3'UTR-WT (REG γ 3'UTR) 和突变型 pMIR-REPORT-REG γ -3'UTR-Mut (REG γ 3'UTRm) 质粒, 双荧光素酶报告基因实验检查荧光值, 结果显示, 在 MDA-MB-231 细胞中, 与突变型质粒相比, miR-7-5p 可抑制野生型质粒组的相对荧光值 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 过表达 miR-7-5p 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的调控作用

Transwell 实验结果显示, 与阴性对照组相比, miR-7-5p 过表达组划痕愈合明显减缓 ($P < 0.05$), 侵袭细胞数目明显减少 ($P < 0.05$)。见图 3。

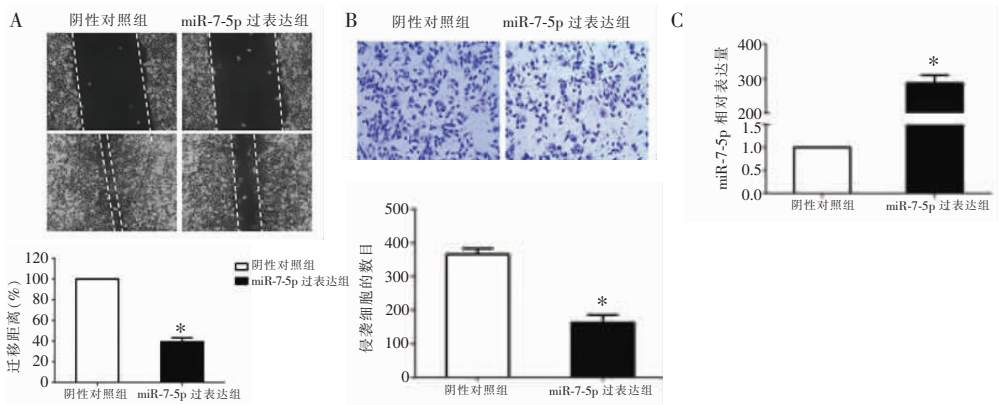


图 3 miR-7-5p 抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭

A. 过表达 miR-7-5p 对细胞迁移能力的抑制作用; B. 过表达 miR-7-5p 对细胞侵袭能力的抑制作用; C. qRT-PCR 检测 miR-7-5p 的表达水平。* $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

2.4 共表达 miR-7-5p 和 REG γ 对 MDA-MB-231 细胞侵袭的调控作用

Transwell 实验结果显示, 与单独过表达 miR-7-

5p 相比, 同时过表达 miR-7-5p 和 REG γ 可使侵袭细胞数目增多 ($P < 0.05$), 但未超过阴性对照组 ($P < 0.05$)。

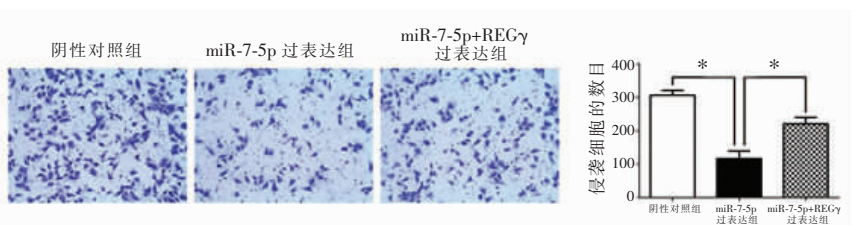


图 4 REG γ 可减弱 miR-7-5p 对 MDA-MB-231 细胞侵袭的抑制作用

* $P < 0.05$, 与阴性对照组相比。

3 讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤最重要的生物学特征, 具体调控机制尚不明确, 严重影响患者的生存时间及生活质量^[2]。三阴性乳腺癌是乳腺癌的其中一个亚型, 占 15% ~ 20%, 因缺乏相对特异的治疗措施, 治疗效果欠佳^[9]。本课题组前期研究发现, miR-7-5p 可通过靶向调控 REG γ 抑制三阴性乳腺癌细胞的增殖能力。为明确 miR-7-5p 在三阴性乳腺

癌细胞 MDA-MB-231 迁移和侵袭中的调控作用, 本研究通过敲减 REG γ , 过表达 miR-7-5p, 同时过表达 REG γ 和 miR-7-5p, 发现过表达 miR-7-5p 可抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力, 过表达 REG γ 可削弱 miR-7-5p 的抑癌作用, 证实 miR-7-5p 可通过靶向调控 REG γ 的表达, 从而抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力, 发挥抑癌作用。

REG γ 又名 PSME3, 是一类通过水解下游目标蛋白发挥癌基因角色的蛋白酶, 具体机制不明确, 可

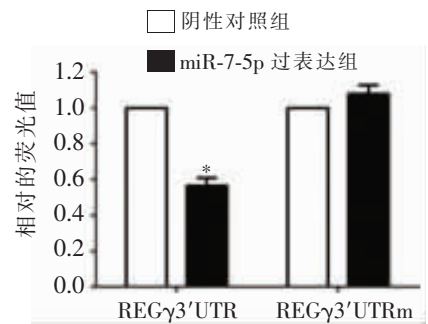
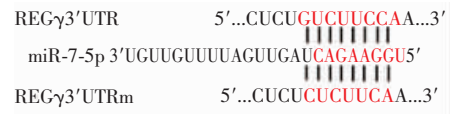


图 2 miR-7-5p 可特异结合 REG γ 的 3 端非翻译区
* $P < 0.05$, 与突变型质粒相比。

能是通过激活 20s 蛋白酶体或非泛素化依赖的途径发挥蛋白降解功能^[10-12]。课题组前期研究^[3,13]显示,REG γ 在乳腺癌中表达上升,与淋巴结转移密切相关,敲减 REG γ 的表达能够抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭,提示 REG γ 与乳腺癌的侵袭转移有密切关系。本研究显示,无论是直接敲减 REG γ ,还是通过 miR-7-5p 的转录后抑制,均可达到抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的侵袭能力,提示靶向抑制 REG γ 可发挥抑制三阴性乳腺癌细胞的侵袭转移的作用,但 REG γ 如何发挥抑制作用目前尚无明确的机制。肿瘤侵袭转移于 Wnt、JAK/STAT 等信号通路异常活化关系密切,REG γ 是否可能通过水解信号通路抑制因子发挥促进肿瘤的作用值得进一步研究。

miRNA 是一类高度保守的 RNA,依靠调控下游基因的不同发挥不同的生物学功能。研究显示,miR-7-5p 在多种恶性肿瘤中表达下调,可通过负向调控 PI3K/Akt、FAK 和 KLF4 等下游靶标发挥抑制肿瘤侵袭转移的特性^[5-7]。但是,miRNA 也表现出靶点不特异的缺点。本研究显示,过表达 miR-7-5p 可靶向结合 REG γ 的 3 断非编码区,从而抑制三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的迁移和侵袭,但是这种抑制作用无法被过表达下游基因 REG γ 完全逆转。miR-7-5p 可靶向结合 REG γ 并抑制 REG γ 的表达,可以作为一个基因精准调节的工具;另外,miR-7-5p 还同时调控其它下游基因发挥抑癌作用。因此,miRNA 是通过调控下游基因的表达发挥特定功能。

综上所述,miR-7-5p 通过靶向抑制 REG γ 的表达,通过负向调控三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移和侵袭,进而发挥抑癌作用。

参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021

[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2021, 71(1): 7-33.

[2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[3] Wang X, Tu S, Tan J, et al. REG gamma: a potential marker in breast cancer and effect on cell cycle and proliferation of breast cancer cell [J]. Medical oncology, 2011, 28(1): 31-41.

[4] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nature reviews Cancer, 2006, 6(11): 857-866.

[5] Fang Y, Xue JL, Shen Q, et al. MicroRNA-7 inhibits tumor growth and metastasis by targeting the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2012, 55(6): 1852-1862.

[6] Kong X, Li G, Yuan Y, et al. MicroRNA-7 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via targeting FAK expression [J]. PLoS one, 2012, 7(8): e41523.

[7] Okuda H, Xing F, Pandey PR, et al. miR-7 suppresses brain metastasis of breast cancer stem-like cells by modulating KLF4 [J]. Cancer research, 2013, 73(4): 1434-1444.

[8] Shi Y, Luo X, Li P, et al. miR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REGgamma [J]. Cancer letters, 2015, 358(1): 27-36.

[9] Yin L, Duan JJ, Bian XW, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress [J]. Breast cancer research: BCR, 2020, 22(1): 61.

[10] Gao G, Wong J, Zhang J, et al. Proteasome activator REGgamma enhances coxsackieviral infection by facilitating p53 degradation [J]. Journal of virology, 2010, 84(21): 11056-11066.

[11] Li X, Amazit L, Long W, et al. Ubiquitin-and ATP-independent proteolytic turnover of p21 by the REGgamma-proteasome pathway [J]. Molecular cell, 2007, 26(6): 831-842.

[12] Chen X, Barton LF, Chi Y, et al. Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome [J]. Molecular cell, 2007, 26(6): 843-852.

[13] Tian M, Xiaoyi W, Xiaotao L, et al. Proteasomes reactivator REG gamma enhances oncogenicity of MDA-MB-231 cell line via promoting cell proliferation and inhibiting apoptosis [J]. Cellular and molecular biology, 2009, 55(Suppl): 1121-1131.

(收稿日期: 2022-03-11

修回日期: 2022-04-15)