

miR-484 通过 SORBS2/MEK-ERK 通路调控 乳腺癌细胞增殖、转移和自噬

潘鑫¹, 刘析璘², 郭敏^{1*}

(1. 锦州医科大学医疗学院, 中国辽宁 锦州 121000; 2. 河北东方学院, 中国河北 廊坊 065000)

摘要: 为了分析 miR-484 在乳腺癌组织和细胞中的表达情况, 研究 miR-484 在乳腺癌细胞增殖、转移和自噬过程中的作用机制, 首先, 采用 GEO 数据库分析乳腺癌组织中差异表达 miRNA 谱, 并用实时荧光定量 PCR 在临床乳腺癌组织及其配对的癌旁组织中检测 miR-484 的表达情况; 其次, 利用 miR-484 模拟物、抑制剂检测 miR-484 对 MCF-7 乳腺癌细胞增殖、转移和自噬能力的影响; 再次, 预测 miR-484 的调控基因并进行验证, 同时构建 Sorbin 和 SH3 结构域包含蛋白 2 (Sorbin and SH3 domain-containing protein 2, SORBS2) 过表达载体, 检测 SORBS2 对乳腺癌细胞增殖、转移和自噬能力的影响; 最后, 用 Western-blot 分析 miR-484 调控下 MCF-7 细胞中丝裂原活化的胞外信号调节激酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK)/p-MEK 和胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)/p-ERK 的蛋白质含量变化。结果显示, miR-484 在乳腺癌组织及细胞中高表达, 具有提高乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力以及降低乳腺癌细胞自噬能力的作用; 而且, miR-484 可通过下调 SORBS2 并激活 MEK/ERK 通路参与乳腺癌的发生发展。

关键词: 乳腺癌; miR-484; Sorbin 和 SH3 结构域包含蛋白 2 (SORBS2); 转移; 自噬

中图分类号: Q25, Q52, R737.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-7847(2024)02-0103-10

miR-484 Regulates the Proliferation, Metastasis and Autophagy of Breast Cancer Cells Through SORBS2/MEK-ERK Pathway

PAN Xin¹, LIU Xilin², GUO Min^{1*}

(1. Medical College of Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning, China; 2. Hebei Oriental University, Langfang 065000, Hebei, China)

Abstract: In order to analyze the expression of miR-484 in breast cancer tissues and cells, and its mechanism in breast cancer cell proliferation, metastasis and autophagy, the differentially expressed microRNAs (miRNAs) in breast cancer tissues were analyzed using GEO database, and the expression of miR-484 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR in clinical breast cancer tissues and their paired paracancerous tissues. The effects of miR-484 on the proliferation, metastasis and autophagy of MCF-7 breast cancer cells were detected by the miR-484 mimic and inhibitor. Then, the target gene of miR-484 was predicted and verified, the Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (SORBS2) overexpression vector was constructed to detect the effects of SORBS2 on the proliferation, metastasis and autophagy of MCF-7 cells. Finally, the protein contents of mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK)/p-MEK and extracellular signal-regulated kinase (ERK)/p-ERK in MCF-7 cells under the regulation of miR-484 were analyzed by Western-blot. The results showed that miR-484 was highly expressed in breast cancer tissues and cells, and improved the proliferation, migration, invasion of breast cancer cells and reduced their autophagy ability. Meanwhile, miR-484 could down-regulate SORBS2 and activate MEK/ERK pathway to participate in the occurrence and development of breast cancer.

收稿日期: 2023-08-29; 修回日期: 2023-10-06; 网络首发日期: 2024-02-20

基金项目: 2023 年国家级大学生创新训练计划项目(202313213005)

作者简介: 潘鑫(1994-), 女, 辽宁丹东人, 助教, E-mail: 18102489322@162.com; * 通信作者: 郭敏(1958-), 女, 山东聊城人, 博士, 教授, 主要从事肿瘤凋亡和肾损伤研究, E-mail: 237957554@qq.com。

Key words: breast cancer; miR-484; Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (SORBS2); metastasis; autophagy

(*Life Science Research*, 2024, 28(2): 103–112)

乳腺癌是目前女性高发肿瘤,是威胁女性健康的“主要杀手”,发病率仅次于子宫癌,近几年男性患乳腺癌的概率也显著提高^[1]。早期乳腺癌患者可通过手术切除达到一定的治疗效果,而晚期患者通常因为肿瘤转移无法手术最终死亡^[2]。因此,研究乳腺癌转移过程中的作用机制对早期诊断、确定转移标志物和降低患者死亡率极其重要。

微RNA (microRNA, miRNA)是真核生物中一类内源性的、长度为20~24个核苷酸的非编码RNA,其主要作用方式是与靶基因mRNA的3'非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合,当二者完全互补时会导致mRNA的裂解,当二者不完全互补时,则抑制mRNA的翻译^[3]。研究显示,miRNA在肿瘤的多个生物学过程中都发挥重要作用,如细胞分化、凋亡以及迁移等^[4-7]。其中,miR-484在结直肠癌^[8]、脓毒症心肌病(sepsis-induced cardiomyopathy, SIC)^[9]、胃癌^[10]等多种疾病中表达失调,并与患者的早期诊断、病理分期及预后都有密切关系。在胃癌中,miR-484通过调控趋化因子配体18(chemokine ligand 18, CCL18)发挥抑癌作用^[10];而在前列腺癌中miR-484则起到促癌作用^[11]。目前,miR-484在乳腺癌发展过程中的作用并不明确。

Sorbin和SH3结构域包含蛋白2(Sorbin and SH3 domain-containing protein 2, SORBS2;又称为CAP)是Sorbin同源家族的关键成员,属于非受体酪氨酸激酶途径相关的支架蛋白质^[12]。本研究前期的生物信息学预测显示,其与miR-484存在较强的关联性。目前,SORBS2主要被作为心脏病的潜在生物标志物展开研究^[12]。少数研究显示,SORBS2与肿瘤发生发展相关,可被肌细胞增强因子2D(myocyte enhancer factor 2D, MEF2D)调节,通过激活非受体酪氨酸激酶c-Abl/胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号转导通路抑制肝细胞癌转移^[13],作用机制可能是其参与了细胞与细胞、细胞与胞外基质之间的连接和骨架重排^[14]。但在乳腺癌中SORBS2的作用机制尚未见报道。

本研究分析了miR-484在乳腺癌组织和细胞中的表达,探究了miR-484对乳腺癌细胞增

殖、迁移、侵袭和自噬能力的影响,寻找和确认了其调控的下游基因与相关信号通路,并以此为基础探讨了miR-484在乳腺癌转移过程中的作用机制,以为乳腺癌的诊断和治疗提供新线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

miR-484模拟物(mimic)、抑制剂(inhibitor)及其阴性对照(negative control, NC)以及riboFECT™ CP转染试剂购于广州锐博生物科技有限公司;TaqMan™ miRNA提取试剂盒和TRIzol RNA提取试剂购于美国ThermoFisher Scientific公司;miR-484、U6验证引物和All-in-One™ miRNA qRT-PCR试剂购于美国GeneCopoeia公司;二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、噻唑蓝(MTT)、台盼蓝染色液和磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)购于北京索莱宝科技有限公司;兔抗SORBS2多克隆抗体、兔抗LC3单克隆抗体、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记小鼠抗兔IgG抗体、小鼠抗 β -actin单克隆抗体和SORBS2过表达载体购于上海生工生物工程股份有限公司;兔抗丝裂原活化的胞外信号调节激酶(mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK)/p-MEK多克隆抗体、兔抗ERK/p-ERK多克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔IgG抗体、HRP标记兔抗小鼠IgG抗体购于沈阳万类生物科技有限公司。

1.2 数据资料

利用GEO(Gene Expression Omnibus)数据库^[15](<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, 2021年7月)筛选乳腺癌患者肿瘤组织中差异表达的miRNA。下载乳腺癌miRNA数据集GSE45498(数据集选择标准:物种为人;样本含量 $n \geq 20$;样品包含肿瘤组织和癌旁组织),运用GEO2R工具[参数设置:significance level cut-off为0.05;log₂(fold change)即log₂(FC)为0^[15]]比较正常乳腺组织样本(GSM10-29141-199)和乳腺癌组织样本(GSM1029200-258)中差异表达的miRNA。

1.3 标本收集

收集2021年9月至2022年9月锦州医科大

学附属第一医院乳腺癌手术切除的50例乳腺癌及相应癌旁组织(癌周1 cm)标本,用液氮冷却后放置在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。患者年龄32~68岁,其中男性4例,女性46例。所有肿瘤组织已经病理学医师评估并确诊为乳腺癌组织,且复查无误。

1.4 细胞培养

人乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MDA-MB-453、MCF-7和人正常乳腺上皮细胞株MCF-10A(ATCC)在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 无菌条件下,培养在含有10%胎牛血清(上海生工生物工程股份有限公司)的RPMI-1640培养基(上海生工生物工程股份有限公司)中。

1.5 细胞转染

将MCF-7细胞接种于细胞培养皿中,当细胞汇合度达到50%左右时,按照操作要求在无菌条件下将miR-484模拟物、抑制剂、阴性对照以及SORBS2过表达载体(SORBS2-over)和空载体(control)分别与转染试剂充分混合,放置15 min后分别与MCF-7细胞共孵育24 h。将未进行转染处理的细胞设置为空白对照组(blank control, BC)。

1.6 RNA提取和定量分析

按照miRNA提取试剂盒和TRIzol RNA提取试剂的说明书分别对乳腺癌细胞和组织进行RNA的提取,并测定浓度以及260 nm与280 nm处的吸光度比值(A_{260}/A_{280})。按照All-in-One™ miRNA qRT-PCR试剂盒的说明书对RNA进行逆转录和实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)。逆转录反应程序为: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、60 min; $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 min。qRT-PCR选用U6作为对照内参,反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min(预变性); $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s(变性); $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、1 min(退火); $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 s(延伸),共40个循环。每组数据重复3次。

1.7 MTT实验

取对数生长期的MCF-7细胞接种于96孔板中,每孔加入200 μL 细胞悬液(2 000个),分别培养24 h、48 h和72 h。然后,每孔加入20 μL MTT溶液(5 g/L), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h。弃掉MTT溶液,加入200 μL DMSO,振荡均匀后于室温孵育10 min,用酶标仪在490 nm波长下测定光密度(optical density, OD)值并绘制生长曲线。每个实验组设置3个复孔,每组数据重复3次。

1.8 划痕实验

取对数生长期的MCF-7细胞接种于12孔板上,在细胞融合度达到90%左右时,用200 μL 移

液器枪头在各孔细胞中划十字划道, PBS溶液清洗3次后,更换无胎牛血清的RPMI-1640培养基继续培养24 h。分别在0 h和24 h时随机选取3个不同区域测量划道间距,并计算细胞迁移的距离(迁移距离=0 h划道间距-24 h划道间距)。每组数据重复3次。

1.9 Transwell迁移和侵袭实验

取对数生长期的MCF-7细胞,用无胎牛血清的RPMI-1640培养基制备细胞悬液(细胞密度为 $2.0\times 10^5\text{ mL}^{-1}$)。取200 μL 细胞悬液加至无基质胶包被或有基质胶包被的Transwell小室上层,在下室加入600 μL 含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液,继续培养24 h。95%乙醇固定30 min,4%台盼蓝染色液染色30 min后,于显微镜下计算细胞数。随机选择5个视野求平均值。每组数据重复3次。

1.10 miR-484的调控基因分析

通过TargetScan[®] 8.0版本(<https://www.targets-can.org>, 2021年12月)预测miR-484与SORBS2的结合位点。利用GEPIA(Gene Expression Profiling Interactive Analysis)数据库^[17](<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>, 2021年12月)评估SORBS2在乳腺癌组织中的表达,参数设置: $|\log_2(\text{FC})|$ cutoff为2; P -value cutoff为0.05; log scale即 $\log_2(\text{TPM}+1)$ 为yes; jitter size为0.04; matched normal data选择match TCGA normal and GTEx data^[17]。

1.11 免疫荧光实验

制备MCF-7细胞爬片,24 h后取出。预冷的多聚甲醛固定30 min后,用PBS溶液清洗5 min,共清洗3次。加入2%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭液(上海生工生物工程股份有限公司)封闭2 h。弃封闭液,加入兔抗LC3单克隆抗体(1:2 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日取出, PBS溶液清洗5 min,共清洗3次。加入FITC标记小鼠抗兔IgG抗体(1:200)后于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 h,随后PBS溶液清洗5 min,共清洗3次。滴加4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI),避光孵育5 min,用PBS溶液清洗多余DAPI染液,而后用封片液进行封片。在荧光显微镜下进行观察并拍照。

1.12 Western-blot检测

取对数生长期的MCF-7细胞,使用RIPA裂解液(上海生工生物工程股份有限公司)进行细胞裂解,然后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min离心30 min收集蛋

白质。通过 BCA 蛋白质分析试剂盒(美国 Thermo-Fisher Scientific 公司)对蛋白质浓度进行量化。随后,对蛋白质进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。转膜后,加入小鼠抗 β -actin 单克隆抗体(1 : 600)、兔抗 SORBS2 多克隆抗体(1 : 800)、兔抗 MEK 多克隆抗体(1 : 1 000)、兔抗 p-MEK 多克隆抗体(1 : 500)、兔抗 ERK 多克隆抗体(1 : 1 000)、兔抗 p-ERK 多克隆抗体(1 : 1 000), 常温振荡孵育 4 h; 用 Tris 盐酸缓冲盐溶液(TBST)清洗 10 min, 共清洗 3 次; 加入 HRP 标记兔抗小鼠 IgG 抗体(1 : 3 000)或 HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体(1 : 3 000), 于 4 °C 孵育过夜; 次日, 用 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min; 利用 ECL 发光仪检测蛋白质含量。

1.13 统计学分析

对于 qRT-PCR 实验, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-484 的相对表达水平^[18]。其他实验结果采用 GraphPad Prism 软件进行统计分析, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验。显著差异标准设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-484 在乳腺癌组织和细胞中高表达

通过对 GEO 数据库中乳腺癌 miRNA 数据集进行分析发现, 与正常乳腺组织相比, 乳腺癌组织共有差异表达 miRNA 317 个, 其中上调 miRNA

155 个(前 50 位见表 1), miR-484 位列其中; 下调 miRNA 162 个(前 50 位见表 2)。

进一步采用 qRT-PCR 检测 50 例乳腺癌患者肿瘤组织以及体外培养的乳腺癌细胞中 miR-484 的表达水平。结果显示: 乳腺癌组织中 miR-484 的表达水平明显高于癌旁组织(图 1A); 乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-453 和 MCF-7 中 miR-484 的表达水平均明显高于人正常乳腺上皮细胞株 MCF-10A (图 1B)。检测结果与预测结果一致, 证明 miR-484 在乳腺癌组织和细胞中高表达。

2.2 miR-484 促进乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭

选取 miR-484 表达水平最高的 MCF-7 细胞用作转染实验的工具细胞。首先, 分别转染 miR-484 模拟物和抑制剂, 以上调和下调 MCF-7 细胞中 miR-484 的表达(图 2A)。随后, 利用 MTT 实验检测各转染组细胞的增殖能力, 结果显示: 上调 miR-484 的表达后, MCF-7 细胞的增殖能力明显高于 NC 组; 而下调表达后, MCF-7 细胞的增殖能力则显著弱于 NC 组(图 2B)。上述结果说明, miR-484 促进乳腺癌细胞增殖。

接下来, 通过细胞划痕实验检测 miR-484 对乳腺癌细胞迁移能力的影响。结果显示: 与 NC 组相比, miR-484 表达上调的 MCF-7 细胞的迁移距离明显增加; 相反, 低表达 miR-484 的 MCF-7 细胞的迁移距离则明显减小(图 3A)。Transwell 迁移实验也得到相同结果, 即模拟物组 MCF-7 迁出的细胞数目多于 NC 组, 抑制剂组 MCF-7 迁出的细胞数目则少于 NC 组(图 3B)。此外, 利用 Tran-

表 1 乳腺癌中表达上调的前 50 位 miRNA

Table 1 The top 50 up-regulated miRNAs in breast cancer

miRNA ID	<i>P</i> value	log ₂ (FC)	miRNA ID	<i>P</i> value	log ₂ (FC)	miRNA ID	<i>P</i> value	log ₂ (FC)
hsa-miR-210	<0.001	2.880	hsa-miR-421	<0.001	1.690	hsa-miR-146a	<0.001	1.420
hsa-miR-21	<0.001	2.850	hsa-miR-96	<0.001	1.680	hsa-miR-484	<0.001	1.410
hsa-miR-135b	<0.001	2.810	hsa-miR-27a	<0.001	1.680	hsa-miR-490-3p	<0.001	1.410
hsa-miR-141	<0.001	2.780	hsa-miR-155	<0.001	1.640	hsa-miR-454	<0.001	1.390
hsa-miR-106b	<0.001	2.760	hsa-miR-18b	<0.001	1.640	hsa-miR-15b	<0.001	1.340
hsa-miR-19a	<0.001	2.470	hsa-miR-151-3p	<0.001	1.580	hsa-miR-22	<0.001	1.320
hsa-miR-20a	<0.001	2.440	hsa-miR-374b	<0.001	1.510	hsa-miR-660	<0.001	1.290
hsa-miR-429	<0.001	2.340	hsa-miR-200c	<0.001	1.510	hsa-miR-106a	<0.001	1.240
hsa-miR-9	<0.001	2.340	hsa-miR-340	<0.001	1.490	hsa-miR-183	<0.001	1.240
hsa-miR-19b	<0.001	2.310	hsa-miR-24	<0.001	1.490	hsa-miR-32	<0.001	1.240
hsa-miR-374a	<0.001	2.220	hsa-miR-203	<0.001	1.490	hsa-miR-130b	<0.001	1.220
hsa-miR-15a	<0.001	2.190	hsa-miR-25	<0.001	1.470	hsa-miR-148a	<0.001	1.220
hsa-miR-142-3p	<0.001	2.190	hsa-miR-107	<0.001	1.460	hsa-miR-29b	<0.001	1.200
hsa-miR-200b	<0.001	2.100	hsa-miR-1979	<0.001	1.440	hsa-miR-1246	<0.001	1.200
hsa-miR-93	<0.001	2.020	hsa-miR-532-5p	<0.001	1.440	hsa-miR-187	<0.001	1.200
hsa-miR-1290	<0.001	1.800	hsa-miR-1299	<0.001	1.440	hsa-miR-1200	<0.001	1.190
hsa-miR-455-5p	<0.001	1.750	hsa-miR-934	<0.001	1.440			

表 2 乳腺癌中表达下调的前 50 位 miRNA
Table 2 The top 50 down-regulated miRNAs in breast cancer

miRNA ID	P value	log ₂ (FC)	miRNA ID	P value	log ₂ (FC)	miRNA ID	P value	log ₂ (FC)
hsa-miR-145	<0.001	-2.410	hsa-miR-497	<0.001	-0.797	hsa-miR-199a-5p	<0.001	-0.576
hsa-miR-125b	<0.001	-1.950	hsa-miR-154	<0.001	-0.763	hsa-miR-495	<0.001	-0.559
hsa-miR-205	<0.001	-1.780	hsa-miR-299-5p	<0.001	-0.763	hsa-miR-328	<0.001	-0.559
hsa-miR-99a	<0.001	-1.590	hsa-miR-335	<0.001	-0.763	hsa-miR-595	<0.001	-0.559
hsa-miR-204	<0.001	-1.560	hsa-miR-542-3p	<0.001	-0.746	hsa-miR-657	<0.001	-0.559
hsa-miR-7c	<0.001	-1.390	hsa-miR-34c-3p	<0.001	-0.678	hsa-miR-1539	<0.001	-0.559
hsa-miR-548g	<0.001	-1.170	hsa-miR-193a-5p	<0.001	-0.678	hsa-miR-486-3p	<0.001	-0.559
hsa-miR-199b-5p	<0.001	-1.150	hsa-miR-652	<0.001	-0.644	hsa-miR-488	<0.001	-0.559
hsa-miR-10b	<0.001	-1.120	hsa-miR-371-3p	<0.001	-0.644	hsa-miR-453	<0.001	-0.542
hsa-miR-216a	<0.001	-1.120	hsa-miR-32-3p	<0.001	-0.644	hsa-miR-523	<0.001	-0.542
hsa-miR-451	<0.001	-1.050	hsa-miR-2113	<0.001	-0.644	hsa-miR-1225-3p	<0.001	-0.542
hsa-miR-127-3p	<0.001	-1.030	hsa-miR-520b-3p	<0.001	-0.627	hsa-miR-450-5p	<0.001	-0.525
hsa-miR-100	<0.001	-1.020	hsa-miR-620	<0.001	-0.627	hsa-miR-1254	<0.001	-0.525
hsa-miR-296-5p	<0.001	-0.966	hsa-miR-563	<0.001	-0.610	hsa-miR-520e	<0.001	-0.525
hsa-miR-195	<0.001	-0.932	hsa-miR-615-5p	<0.001	-0.576	hsa-miR-526a	<0.001	-0.508
hsa-miR-487b	<0.001	-0.898	hsa-miR-619	<0.001	-0.576	hsa-miR-1283	<0.001	-0.508
hsa-miR-337-3p	<0.001	-0.814	hsa-miR-432	<0.001	-0.576			

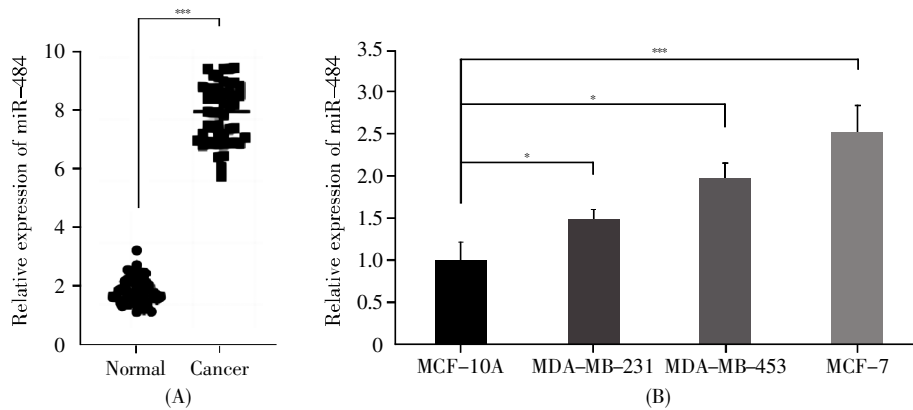


图 1 miR-484 在乳腺癌组织和细胞中的相对表达水平

(A) miR-484 在乳腺癌组织及癌旁组织中的表达分析; (B) miR-484 在正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 以及乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MDA-MB-453 和 MCF-7 中的表达分析。*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$ 。

Fig.1 Relative expression of miR-484 in breast cancer tissues and cells

(A) The expression of miR-484 in breast cancer tissues and adjacent tissues; (B) The expression of miR-484 in normal breast epithelial MCF-10A cells and breast cancer MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MCF-7 cells. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

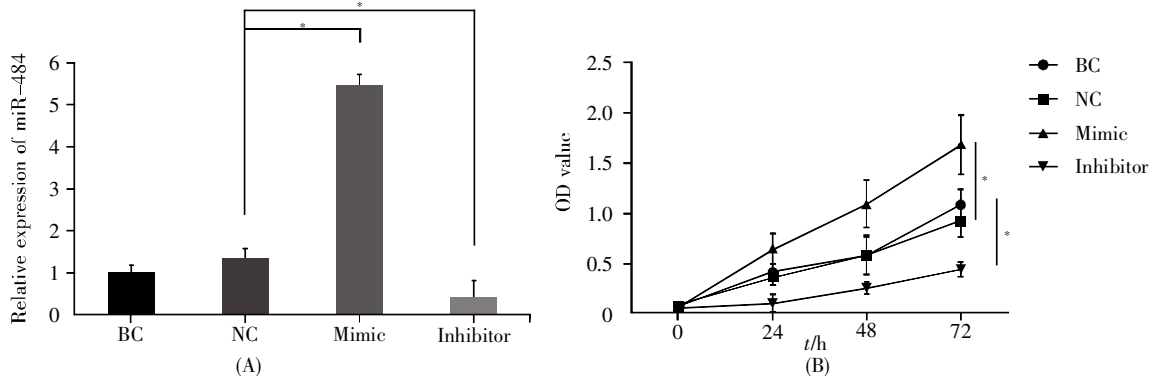


图 2 miR-484 对乳腺癌细胞增殖能力的影响

(A) qRT-PCR 验证 miR-484 模拟物和抑制剂的转染效果; (B) MTT 检测 miR-484 对 MCF-7 细胞增殖能力的影响。*: $P < 0.05$ 。

Fig.2 The effect of miR-484 on proliferation of breast cancer cells

(A) The transfection effect of the miR-484 mimic and inhibitor verified by qRT-PCR; (B) The effect of miR-484 on the proliferation ability of MCF-7 cells detected by MTT assay. *: $P < 0.05$.

swell 侵袭实验检测 miR-484 对乳腺癌细胞侵袭能力的影响。结果显示: 与 NC 组相比, 模拟物组 MCF-7 侵出的细胞数目明显增多, 而抑制剂组 MCF-7 侵出的细胞数目则显著较少(图 3C)。这些结果表明, miR-484 可促进乳腺癌细胞迁移和侵袭。

2.3 miR-484 抑制乳腺癌细胞自噬

采用免疫荧光实验观察改变 miR-484 含量后 MCF-7 细胞中 LC3 荧光的形成情况, 结果显示: 过表达 miR-484 24 h 后, MCF-7 细胞中 LC3 的荧光形成明显减弱; 而低表达 miR-484 的

MCF-7 细胞中, LC3 的荧光形成显著增强(图 4)。这些结果证明 miR-484 抑制乳腺癌细胞自噬。

2.4 miR-484 调控 SORBS2 的表达

TargetScan 8.0 版本的预测结果显示, miR-484 与 *SORBS2* 之间存在结合位点(图 5A), 表明 *SORBS2* 可能是 miR-484 潜在的调控基因。GEPIA 数据库的分析结果显示, *SORBS2* 在乳腺癌肿瘤组织($n=1085$)中的表达明显低于癌旁组织($n=291$) (图 5B)。进一步的 Western-blot 实验结果显示: 上调 MCF-7 细胞中 miR-484 的表达后, *SORBS2* 蛋

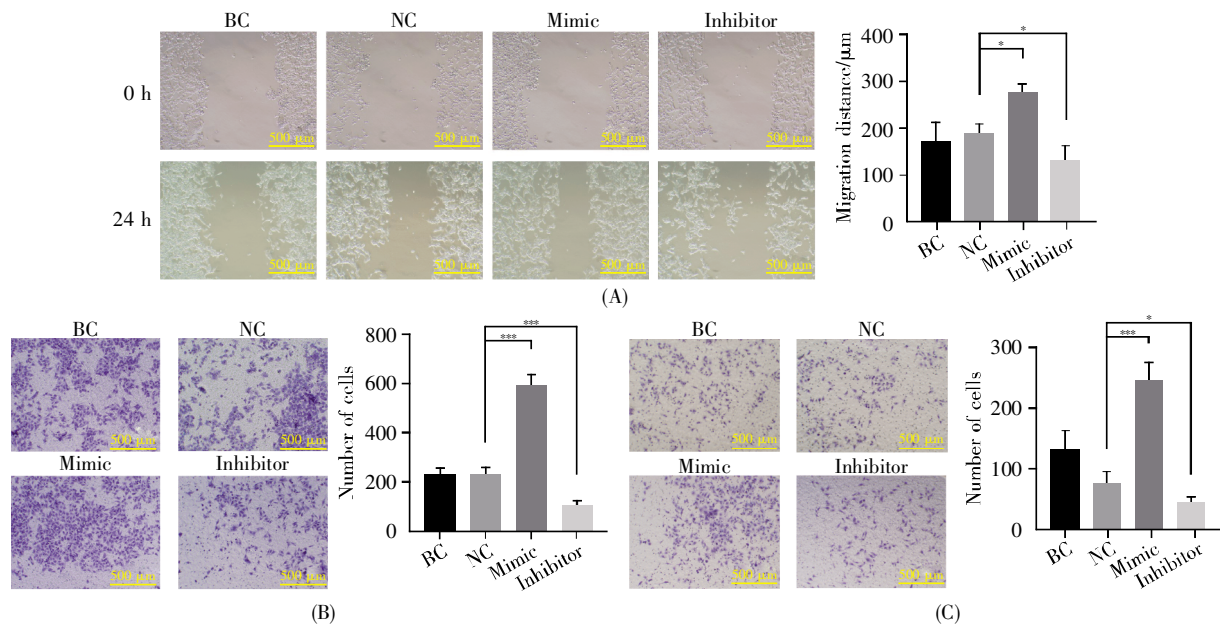


图 3 miR-484 对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响

(A) 划痕实验检测转染后 MCF-7 细胞迁移能力的变化; (B) Transwell 检测转染后 MCF-7 细胞迁移能力的变化; (C) Transwell 检测转染后 MCF-7 细胞侵袭能力的变化。*: $P<0.05$; ***: $P<0.001$ 。

Fig.3 The effects of miR-484 on migration and invasion of breast cancer cells

(A) The migration ability of MCF-7 cells after transfection detected by scratch test; (B) The migration ability of MCF-7 cells after transfection detected by Transwell test; (C) The invasion ability of MCF-7 cells after transfection detected by Transwell test. *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$.

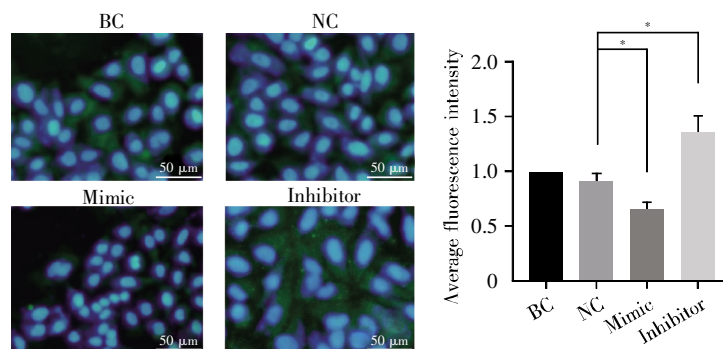


图 4 免疫荧光实验检测转染 miR-484 后 MCF-7 细胞中 LC3 荧光的形成情况

Fig.4 The formation of LC3 fluorescence in MCF-7 cells after miR-484 transfection detected by immunofluorescence assay

*: $P<0.05$.

白的含量与NC组相比明显减少;相反地,下调miR-484后,SORBS2蛋白的含量明显增多(图5C)。以上数据提示,在乳腺癌细胞中,miR-484可调控SORBS2的表达。

2.5 SORBS2抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭

将SORBS2过表达载体转染MCF-7细胞,Western-blot结果显示载体构建成功(图6A),得到SORBS2过表达细胞。分别利用MTT实验、划痕实验和Transwell实验检测SORBS2过表达细胞的增殖、迁移和侵袭能力。结果显示:与control组相比,SORBS2过表达细胞的增殖能力明显减弱(图6B)、迁移能力(图6C、6D)和侵袭能力(图6E)也显著降低。这些结果表明,SORBS2可抑制乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

2.6 SORBS2促进乳腺癌细胞自噬

采用免疫荧光实验观察转染SORBS2过表达载体后MCF-7细胞中LC3荧光的形成情况,结果显示:与control组相比,上调SORBS2蛋白的表达后,MCF-7细胞中LC3荧光的形成明显增强(图7)。这提示SORBS2促进乳腺癌细胞自噬。

2.7 miR-484通过调控SORBS2激活ERK通路

采用Western-blot检测miR-484和SORBS2对MCF-7细胞中MEK/p-MEK和ERK/p-ERK

表达的影响,结果显示:上调MCF-7细胞内miR-484的含量后,细胞中p-MEK和p-ERK的蛋白质表达显著增多,同时过表达SORBS2则逆转了该结果(图8)。这表明miR-484可通过调控SORBS2激活MEK/ERK信号通路。

3 讨论

众所周知,乳腺癌是近几年女性的高发疾病,其发病率及死亡率逐年递增^[1],致死原因主要是肿瘤转移。而自噬在肿瘤细胞的迁移和侵袭及肿瘤干细胞的维持和治疗抵抗中发挥重要作用^[19]。因此,明确乳腺癌转移和自噬的分子机制,有助于为乳腺癌的预防和治疗提供靶点,从而改善患者预后,提高患者生存率。

一些miRNA被发现于肿瘤中表达失调,比如:miR-10在胰腺癌细胞中呈现高表达,并通过抑制PTEN基因促进癌细胞增殖和迁移^[20];miR-342-3p作为潜在的肿瘤抑制因子,在肝细胞癌中显著低表达^[21]。这表明miRNA在肿瘤的发生发展过程中既可以发挥促癌作用也可以发挥抑癌作用。作为miRNA家族中的一员,miR-484在多种肿瘤中存在异常表达的现象。Li等^[22]研究显示,在胃癌中miR-484低表达,并且下调其表达可增强

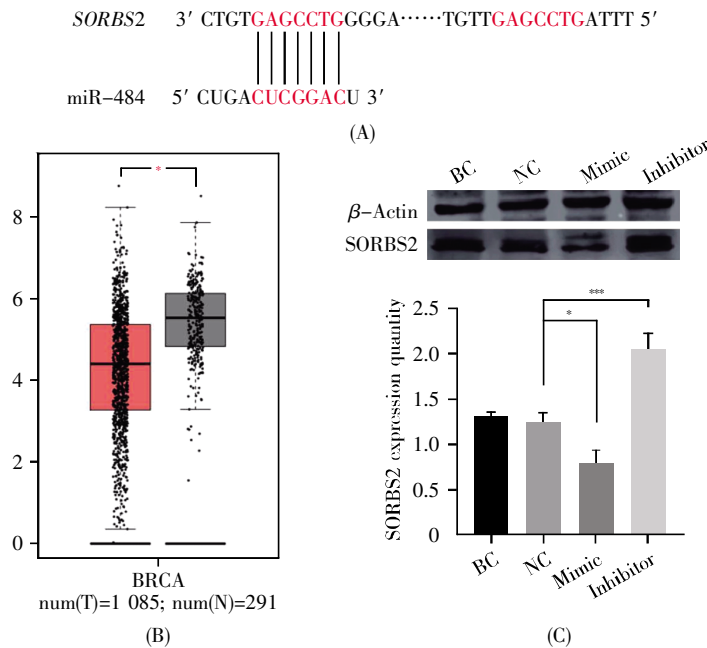


图5 miR-484调控SORBS2的表达

(A) miR-484与SORBS2之间存在结合位点;(B) GEPIA数据库检索SORBS2在乳腺癌组织中的表达;(C) Western-blot检测转染miR-484后SORBS2蛋白的表达。*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$ 。

Fig.5 miR-484 regulates the expression of SORBS2

(A) The binding sites between miR-484 and SORBS2; (B) The expression of SORBS2 in breast cancer tissues analyzed using GEPIA database; (C) SORBS2 protein expression after miR-484 transfection detected by Western-blot. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

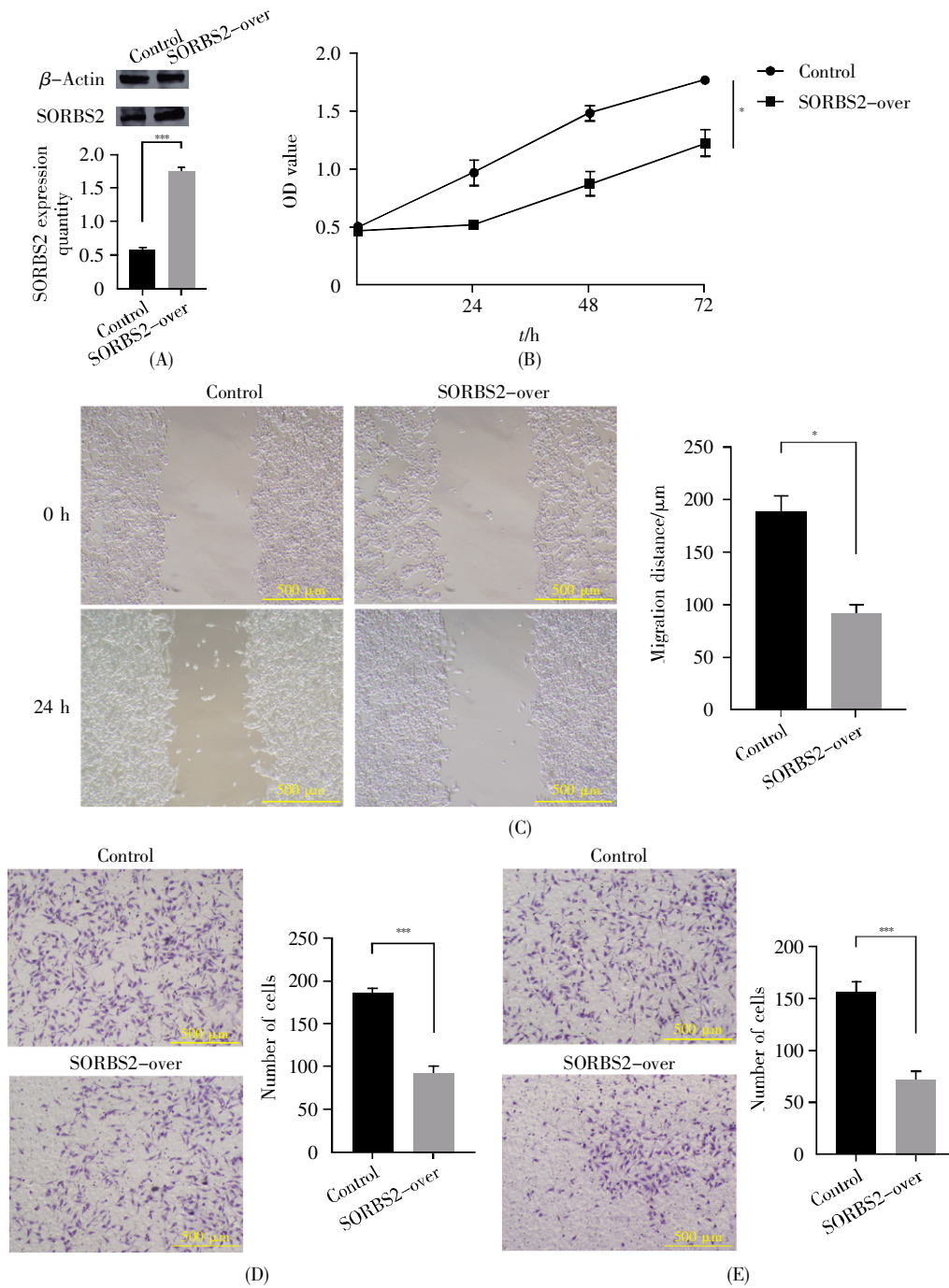


图 6 SORBS2 对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响

(A) Western-blot 检测 SORBS2 过表达载体的转染情况; (B) MTT 检测 SORBS2 对 MCF-7 细胞增殖能力的影响; (C) 划痕实验检测 SORBS2 对 MCF-7 细胞迁移能力的影响; (D) Transwell 检测 SORBS2 对 MCF-7 细胞迁移能力的影响; (E) Transwell 检测 SORBS2 对 MCF-7 细胞侵袭能力的影响。*: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$ 。

Fig.6 The effects of SORBS2 on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells

(A) The transfection of SORBS2 over-expression vector detected by Western-blot; (B) The effect of SORBS2 on the proliferation ability of MCF-7 cells detected by MTT assay; (C) The effect of SORBS2 on the migration ability of MCF-7 cells detected by scratch test; (D) The effect of SORBS2 on the migration ability of MCF-7 cells detected by Transwell assay; (E) The effect of SORBS2 on the invasion ability of MCF-7 cells detected by Transwell assay. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭; Hu 等^[23]则发现, miR-484 可通过调控膜结合基质金属蛋白酶 14 (matrix metalloproteinase 14, MMP14)和肝细胞核因

子 1A (hepatocyte nuclear factor 1A, HNF1A)抑制宫颈癌细胞黏附和上皮间质转化。然而, miR-484 在乳腺癌中的作用机制尚不明确。

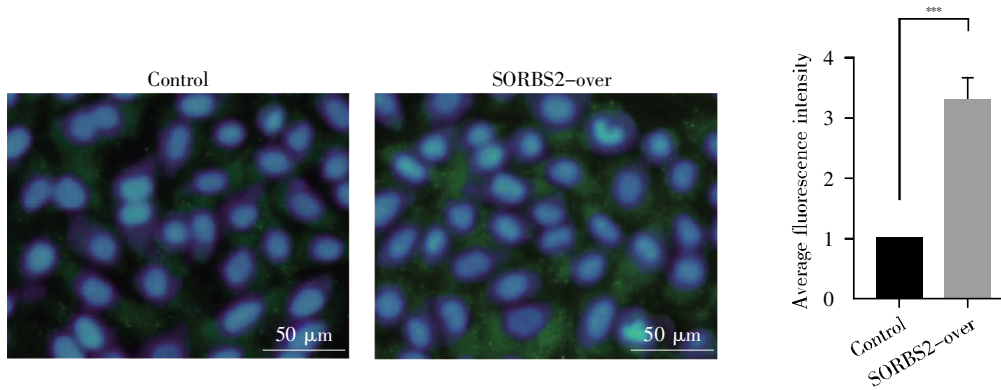


图 7 免疫荧光实验检测转染 SORBS2 过表达载体后 MCF-7 细胞中 LC3 荧光的形成情况
Fig.7 The formation of LC3 fluorescence in MCF-7 cells detected by immunofluorescence assay after transfection with SORBS2 over-expression vector
 ***: $P < 0.001$.

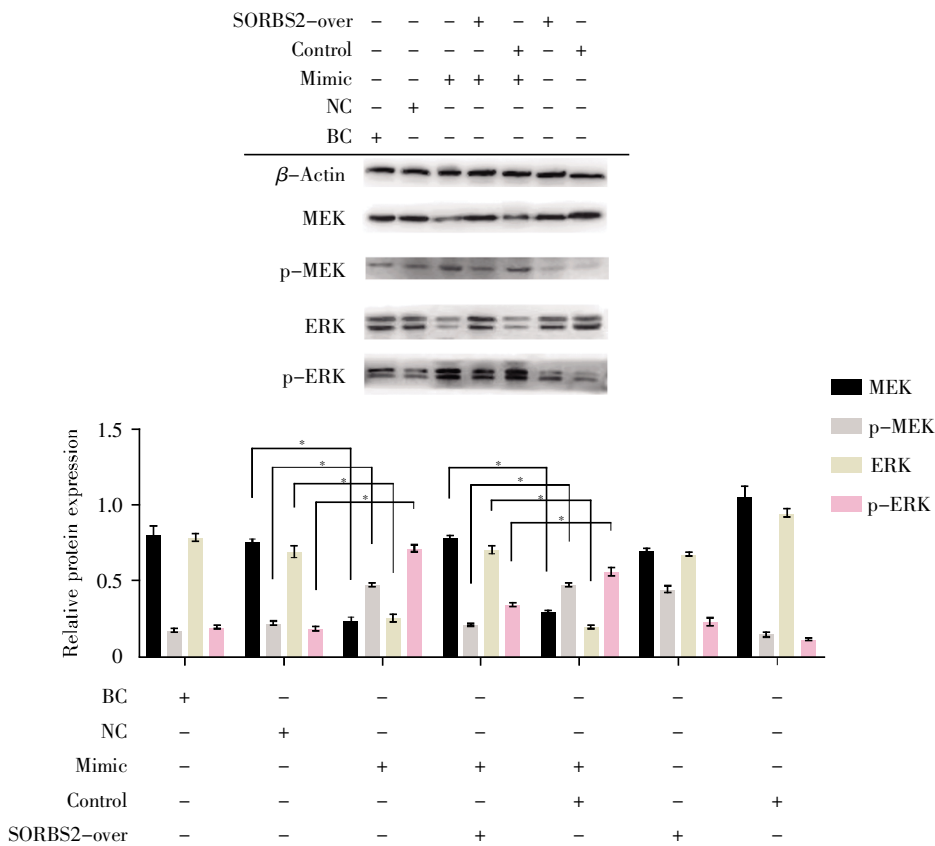


图 8 Western-blot 检测不同条件处理下 MCF-7 细胞中 MEK/p-MEK、ERK/p-ERK 的蛋白质表达水平
Fig.8 Western-blot detection of the expression levels of MEK/p-MEK and ERK/p-ERK in MCF-7 cells under different treatments
 *: $P < 0.05$.

本研究从 GEO 数据库中下载乳腺癌肿瘤组织和癌旁组织的 miRNA 数据集并对其进行分析,共得到差异表达 miRNA 317 个,其包含上调 miRNA 155 个,miR-484 就是其中之一(表 1)。qRT-PCR 实验进一步证实 miR-484 在乳腺癌中呈现高表达(图 1)。为了深入探究 miR-484 在乳腺癌中

的作用,本研究分析了 miR-484 对乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。结果显示,上调 miR-484 的表达后,乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显提高(图 2~3),提示 miR-484 可促进乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

自噬作为细胞内的一个动态降解回收系统,

能够为细胞生存提供新的原材料和能量以维持细胞内稳态^[19]。在肿瘤形成的早期,肿瘤细胞通过自噬不断适应缺氧和营养匮乏的微环境,促进存活、侵袭及转移^[24]。然而,自噬的过度增强会诱导肿瘤细胞发生自噬性死亡^[25]。因此,自噬在肿瘤中的作用十分复杂,具体机制目前尚未完全阐明。本研究发现,MCF-7 细胞的自噬水平较高,而 miR-484 的过表达会造成细胞内 LC3 的荧光形成减弱(图 4),说明 miR-484 过表达后细胞的自噬水平明显降低,低水平的细胞自噬则能加剧乳腺癌的进程。因此,进一步探讨 miR-484 调控乳腺癌细胞转移和自噬的关键靶标与信号通路,对于明确乳腺癌的发病机制以及开发治疗方案具有十分重要的意义。

本研究对 miR-484 调控的基因进行了预测和分析,发现 miR-484 与 *SORBS2* 之间存在互补序列(图 5A),且 *SORBS2* 在乳腺癌组织中低表达(图 5B)。此外,伴随着 miR-484 的上调,MCF-7 细胞内 *SORBS2* 蛋白的表达量显著降低;相反地,干扰 miR-484 的表达后,MCF-7 细胞内 *SORBS2* 蛋白的含量显著增多(图 5C),表明 *SORBS2* 是 miR-484 的调控靶点。*SORBS2* 位于人类基因组 4q35,参与肌动蛋白动力学、信号转导和细胞骨架建立的调节^[26]。目前,有关 *SORBS2* 的报道多集中在左室心肌致密化不全型心肌病^[27]、脓毒症心肌病^[28] 等心脏相关疾病;在肿瘤方面,*SORBS2* 被报道参与调控结直肠癌的转移过程^[29]。本研究结果显示,*SORBS2* 蛋白过表达后,MCF-7 细胞的增殖、迁移和侵袭能力减弱(图 6);同时,细胞自噬能力增强(图 7),表明 miR-484 可通过调控 *SORBS2* 影响乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和自噬过程。Yan 等^[3] 研究发现,在肝细胞癌中 *SORBS2* 可抑制 ERK 通路。因此,本研究对 MCF-7 细胞中 MEK/ERK 通路的相关蛋白质水平进行了检测。结果显示,上调 miR-484 的表达后,细胞内 p-MEK 和 p-ERK 的蛋白质水平明显增多;而过表达 *SORBS2* 蛋白能够逆转该结果(图 8),证明 miR-484 通过抑制 *SORBS2* 可激活 MEK/ERK 通路,进而参与调控乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和自噬过程。

综上所述,miR-484 在乳腺癌中呈现高表达,其过表达可促进乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭并抑制细胞自噬;*SORBS2* 作为 miR-484 的调控基因,可激活 MEK/ERK 通路,进而介导乳腺癌的转移和自噬。

参考文献(References):

- [1] 雷少元, 郑荣寿, 张思维, 等. 乳腺癌发病率和死亡率的全球模式: 一项基于人群的 2000—2020 年肿瘤登记数据分析研究[J]. 癌症(LEI Shaoyuan, ZHENG Rongshou, ZHANG Siwei, *et al.* Global patterns of incidence rate and mortality of breast cancer: a population-based analysis of cancer registry data from 2000 to 2020[J]. Chinese Journal of Cancer), 2022, 41(7): 324–335.
- [2] PARIDA P K, MARQUEZ-PALENCIA M, NAIR V, *et al.* Metabolic diversity within breast cancer brain-tropic cells determines metastatic fitness[J]. Cell Metabolism, 2022, 34(1): 90–105.e7.
- [3] 王晓宇, 牛廷献, 贾庆华, 等. 微小 RNA 与乳腺癌恶性生物学行为的研究进展[J]. 华南国防医学杂志(WANG Xiaoyu, NIU Tingxian, JIA Qinghua, *et al.* Research progress on microRNAs and malignant biological behavior of breast cancer[J]. Military Medical Journal of South China), 2022, 36(9): 761–764.
- [4] MARTÍNEZ-ILLESCAS N G, LEALS, GONZÁLEZ P, *et al.* miR-203 drives breast cancer cell differentiation[J]. Breast Cancer Research, 2023, 25: 91.
- [5] XU G C, MENG Y, WANG L H, *et al.* miRNA-214-5p inhibits prostate cancer cell proliferation by targeting SOX4[J]. World Journal of Surgical Oncology, 2021, 19: 338.
- [6] 鞠宝玲, 海艳洁, 鄂志野, 等. miRNA-193a-3p 靶向 *TGF-β2* 基因诱导肝癌细胞凋亡的分子机制研究[J]. 中国现代医生(JU Baoling, HAI Yanjie, E Zhiye, *et al.* Molecular mechanism of miRNA-193a-3p induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through targeting *TGF-β2*[J]. China Modern Doctor), 2022, 60(20): 1–5.
- [7] YONG W J, ZHANG K, DENG Y M, *et al.* miR-511-5p suppresses cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition through targeting PAK2 in gastric cancer[J]. Biochemical Genetics, 2022, 60(3): 899–913.
- [8] LI Y R, WANG W, WU M N, *et al.* lncRNA LINC01315 silencing modulates cancer stem cell properties and epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer via miR-484/DLK1 axis[J]. Cell Cycle, 2022, 21(8): 851–873.
- [9] XU M, LI X Y, SONG L C, *et al.* miR-484 targeting of Yap1-induced LPS-inhibited proliferation, and promoted apoptosis and inflammation in cardiomyocyte[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2021, 85(2): 378–385.
- [10] LIU J, LIS M. miR-484 suppressed proliferation, migration, invasion and induced apoptosis of gastric cancer via targeting CCL-18[J]. International Journal of Experimental Pathology, 2020, 101(6): 203–214.
- [11] LEE D, TANG W, DORSEY T H, *et al.* miR-484 is associated with disease recurrence and promotes migration in prostate cancer[J]. Bioscience Reports, 2020, 40(5): BSR20191028.
- [12] 李珊珊, 王如兴. 接头蛋白 Sorbs 家族在心血管疾病中作用的研究进展[J]. 江苏大学学报(医学版)(LI Shanshan, WANG Ruxing. Research progress on the role of the Sorbs family of connector proteins in cardiovascular diseases[J]. Journal of Jiangsu University (Medicine Edition)), 2020, 30(5): 455–460.
- [13] YAN B, PENG Z Y, XING C G. *SORBS2*, mediated by MEF2D, suppresses the metastasis of human hepatocellular carcinoma by inhibiting the c-Abl-ERK signaling pathway[J]. American Journal of Cancer Research, 2019, 9(12): 2706–2718.

- [15] ZHOU H, ZHANG Q, HUANG W, *et al.* Epigenetic silencing of ZCCHC10 by the lncRNA SNHG1 promotes progression and venetoclax resistance of acute myeloid leukemia[J]. *International Journal of Oncology*, 2023, 62(5): 64.
- [16] DANINO Y M, EVEN D, IDESES D, *et al.* The core promoter: at the heart of gene expression[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1849(8): 1116–1131.
- [17] VO NGOC L, CASSIDY C J, HUANG C Y, *et al.* The human initiator is a distinct and abundant element that is precisely positioned in focused core promoters[J]. *Genes & Development*, 2017, 31(1): 6–11.
- [18] YUAN R X, CHEN Y F, HE X S, *et al.* CCL18 as an independent favorable prognostic biomarker in patients with colorectal cancer[J]. *The Journal of Surgical Research*, 2013, 183(1): 163–169.
- [19] LEUNG S Y, YUEN S T, CHU K M, *et al.* Expression profiling identifies chemokine (C–C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(2): 457–469.
- [20] QUINTÁS-CARDAMA A, HU C, QUTUB A, *et al.* p53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status[J]. *Leukemia*, 2017, 31(6): 1296–1305.

(上接第 112 页)

- [14] FREDRIKSSON-LIDMAN K, VAN ITALLIE C M, TIETGENS A J, *et al.* Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (SORBS2) is a component of the acto-myosin ring at the apical junctional complex in epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0185448.
- [15] CLOUGH E, BARRETT T. The Gene Expression Omnibus database[M]/MATHÉ E, DAVIS S. *Statistical Genomics. Methods in Molecular Biology*, Vol. 1418. New York: Humana Press, 2016: 93–110.
- [16] MCGEARY S E, LIN K S, SHI C Y, *et al.* The biochemical basis of microRNA targeting efficacy[J]. *Science*, 2019, 366(6472): eaav1741.
- [17] TANG Z F, LI C W, KANG B X, *et al.* GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W98–W102.
- [18] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [19] 李祺瑞, 陈美娟. 细胞自噬与非小细胞肺癌关系的研究进展[J]. *中国肿瘤*(LI Qirui, CHEN Meijuan. *Advances on the relationship between autophagy and non-small cell lung cancer*[J]. *China Cancer*), 2022, 31(5): 380–386.
- [20] 刘玉兰, 何凤屏, 郭伟强, 等. MicroRNA-10 调控 PTEEN 基因在促进胰腺癌细胞增殖和迁移的作用[J]. *中国医学创新*(LIU Yulan, HE Fengping, GUO Weiqiang, *et al.* The role of PTEEN gene regulated by microRNA-10 in promoting proliferation and migration of pancreatic cancer cells[J]. *Medical Innovation of China*), 2022, 19(25): 29–34.
- [21] KOMOLL R M, HU Q L, OLAREWAJU O, *et al.* MicroRNA-342-3p is a potent tumour suppressor in hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of Hepatology*, 2021, 74(1): 122–134.
- [22] LI Y, LIU Y S, YAO J, *et al.* Downregulation of miR-484 is associated with poor prognosis and tumor progression of gastric cancer[J]. *Diagnostic Pathology*, 2020, 15: 25.
- [23] HU Y, WU F X, LIU Y K, *et al.* DNMT1 recruited by EZH2-mediated silencing of miR-484 contributes to the malignancy of cervical cancer cells through MMP14 and HNF1A[J]. *Clinical Epigenetics*, 2019, 11: 186.
- [24] 石峰, 王明荣. 细胞自噬及其与肿瘤关系的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(SHI Feng, WANG Mingrong. *Progress in studies on the relationship between autophagy and cancer*[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2011, 33(12): 1366–1373.
- [25] ONORATI A V, DYCZYNSKI M, OJHA R, *et al.* Targeting autophagy in cancer[J]. *Cancer*, 2018, 124(16): 3307–3318.
- [26] 赵浩然, 李满. 肝细胞癌相关 RNA 结合蛋白研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*(ZHAO Haoran, LI Man. *Research progress of hepatocellular carcinoma-related RNA binding protein*[J]. *Practical Oncology Journal*), 2021, 35(6): 576–579.
- [27] LI C Y, ZHENG Y, LIU Y, *et al.* The interaction protein of SORBS2 in myocardial tissue to find out the pathogenic mechanism of LVNC disease[J]. *Aging*, 2022, 14(2): 800–810.
- [28] WANG J, WANG X T, LIU D W, *et al.* Induction and deduction in sepsis-induced cardiomyopathy: five typical categories[J]. *Chinese Medical Journal*, 2020, 133(18): 2205–2211.
- [29] ZHANG T, CHEN S X, PENG Y, *et al.* NOVA1-mediated SORBS2 isoform promotes colorectal cancer migration by activating the Notch pathway[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 673873.