

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.006

miR-32-5p 通过靶向 Dickkopf 相关蛋白 3 的表达调控乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的生物学行为

姚嘉^a, 李冠乔^a, 杨时平^b, 苏慧奎^c (海南省人民医院 a. 乳腺外科; b. 放疗科; c. 肾内科, 海南 海口 570311)

[摘要] **目的:** 通过生物信息学手段筛选乳腺癌中差异表达的关键 miRNA 及其靶基因, 干预其在乳腺癌细胞中的表达并观察对乳腺癌细胞功能的影响。 **方法:** 利用 GEO 数据库筛选在乳腺癌中差异表达的 miRNA, ENCORI 数据库验证差异 miRNA 的表达, 以选定最显著的差异表达 miRNA 为研究对象; 利用 Starbase、miRDB 和 miRWalk 数据库预测 miR-32-5p 的靶基因, 利用 DAVID 数据库对靶基因进行 GO 分析和 KEGG 分析, 利用 String 数据库联合 Cytoscape3.6.2 软件进行 PPI 网络分析及核心基因的筛选, 从核心基因中选择相互联系紧密“度值”最显著的 Dickkopf 相关蛋白 3 (DKK3) 基因进行后续实验。 qPCR 检测 miR-32-5p 在人正常乳腺细胞 MCF10A 和人乳腺癌细胞 MCF7、MDA-MB-231、MDA-MB-453 细胞中的表达。向 MDA-MB-231 细胞中转染 miR-32-5p mimic、miR-32-5p inhibitor 及各自的对照 (NC) 序列, 分别用 CCK-8 法、流式细胞术和 Transwell 实验检测过表达或抑制 miR-32-5p 对细胞增殖、凋亡和侵袭的影响。 **结果:** 从 GEO 数据库中获取的两个数据集共识别出两个差异 miRNA, ENCORI 数据库验证差异 miRNA 的表达发现 miR-32-5p 的表达水平与 GEO 数据库的结果一致, 故选择其进行研究; 预测得到 198 个 miR-32-5p 潜在的靶基因并鉴定出 10 个核心基因 (DKK3、WNT2B、SFRP5、SFRP2、SFRP1、LRP6、WNT6、KREMEN1、NEDD4L、TRIP12), 其中 DKK3 的度值最大可能在乳腺癌中较为重要, 于是选择 miR-32-5p/DKK3 轴进行后续研究。 miR-32-5p 在 3 种乳腺癌细胞中的表达水平显著高于正常乳腺细胞 (均 $P < 0.01$), 其中以 MDA-MB-231 细胞中表达最高。双荧光素酶基因报告实验验证了 miR-32-5p 与 DKK3 基因的靶向结合及其对后者表达的负向调控。转染 miR-32-5p mimic、miR-32-5p inhibitor 后成功提高或抑制了 MDA-MB-231 细胞中 miR-32-5p 的表达。与对照组相比, 过表达 miR-32-5p 可抑制 MDA-MB-231 细胞的凋亡而促进细胞增殖和侵袭 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 敲低 miR-32-5p 则起相反的作用 (均 $P < 0.01$)。 **结论:** miR-32-5p/DKK3 轴可能是影响乳腺癌发生发展的关键通路, 过表达 miR-32-5p 能够抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡而促进细胞增殖和侵袭。

[关键词] 乳腺癌; miR-32-5p; Dickkopf 相关蛋白 3; 生物信息学; MDA-MB-231 细胞; 增殖; 凋亡; 侵袭

[中图分类号] R737.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)12-1186-08

miR-32-5p regulates the biological behaviors of breast cancer MDA-MB-231 cells by targeting the expression of Dickkopf-related protein 3

YAO Jia^a, LI Guanqiao^a, YANG Shiping^b, SU Huiluan^c (a. Department of Breast Surgery; b. Department of Radiotherapy; c. Department of Nephrology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, Hainan, China)

[Abstract] **Objective:** To screen the key differentially expressed miRNAs and their target genes in breast cancer using bioinformatics tools, and to observe the effect of interfering their expression on the function of breast cancer cells. **Methods:** The GEO database was used to screen the differentially expressed miRNAs in breast cancer, and the ENCOR1 database was further used to verify the expression of screened miRNAs to identify the most differentially expressed miRNA as the research target. Starbase, miRDB and miRWalk databases were used to predict the target genes of miR-32-5p. GO analysis and KEGG analysis of target genes were done by using DAVID database. PPI network analysis and screening of hub genes were performed using String database and Cytoscape3.6.2 software. The Dickkopf-related protein 3 (DKK3) gene with the most significant degree was selected from the hub genes for follow-up experiments. qPCR was used to detect the expression of miR-32-5p in human normal breast MCF10A cells and human breast cancer cells (MCF7, MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells). MiR-32-5p mimics, miR-32-5p inhibitors and their control (NC) sequences were transfected into MDA-MB-231 cells. The effects of over-expression or inhibition of miR-32-5p on cell proliferation, apoptosis and invasion were detected by CCK-8 method, flow cytometry, and Transwell experiment, respectively. **Results:** Two differentially expressed miRNAs were identified from the two datasets in GEO database. ENCOR1 database was adopted to verify the differentially expressed miRNAs and showed that the expression level of miR-32-5p was consistent with the result in the GEO

[基金项目] 海南省自然科学基金青年资助项目 (No. 818QN314)。Project supported by the Youth Program of Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 818QN314)

[作者简介] 姚嘉 (1982—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事乳腺癌早期诊断的研究, E-mail: javance@163.com

[通信作者] 姚嘉 (YAO Jia, corresponding author)

database, so it was selected for subsequent research. 198 potential target genes of miR-32-5p were predicted and 10 hub genes (DKK3, WNT2B, SFRP5, SFRP2, SFRP1, LRP6, WNT6, KREMEN1, NEDD4L and TRIP12) were identified, among which DKK3 showed the most significant degree. So, miR-32-5p/DKK3 axis was selected for the subsequent research. The expression of miR-32-5p in three breast cancer was significantly higher than that in normal mammary gland cells (all $P < 0.01$), with the highest expression in MDA-MB-231 cells. Dual-luciferase reporter gene assay verified cell lines that miR-32-5p targeted and down-regulated. After transfection with miR-32-5p mimics or miR-32-5p inhibitors, the expression of miR-32-5p in MDA-MB-231 cells was successfully increased or inhibited. Compared with the control group, overexpression of miR-32-5p could inhibit the apoptosis of MDA-MB-231 cells and promote cell proliferation and invasion ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while knocking down miR-32-5p played an opposite role (all $P < 0.01$). **Conclusion:** miR-32-5p/DKK3 axis may be a key pathway affecting the development of breast cancer. Over-expression of miR-32-5p can inhibit the apoptosis but promote cell proliferation and invasion of breast cancer MDA-MB-231 cells.

[Key words] breast cancer; miR-32-5p; Dickkopf-related protein 3 (DKK3); bioinformatics; MDA-MB-231 cell; proliferation; apoptosis; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(12): 1187-1193. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.12.006]

乳腺癌是世界上女性最常见的恶性肿瘤之一^[1-3]。尽管开展了多种宣教活动和筛查项目,乳腺癌的发病率仍然居高不下。根据 GLOBOCAN 2018 数据库统计,2018 年全球新诊断出 200 万例乳腺癌,病死达 62.2 万例,病死率位列第四,仅次于肺癌、胃癌和肝癌^[4]。因此,进一步深入研究乳腺癌发生过程中的机制至关重要。通过对乳腺癌基因表达谱的分析能找到与乳腺癌治疗相关的基因,因此,对肿瘤基因谱的研究有助于肿瘤的诊断、治疗和预后判断。miRNA 可作为癌基因或抑癌基因在乳腺癌等恶性肿瘤的发病机制中起重要作用,其调控的靶基因有望成为新的生物标志物^[5-8]。例如,miR-182 过度表达促进乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的增殖和侵袭^[9]。本研究利用 GEO 数据库筛选乳腺癌差异表达的 miRNA,通过分析其靶点并构建与乳腺癌进展相关的 miRNA-hub mRNA 网络,选定关键的 miRNA,如 miR-32-5p 及其 Dickkopf 相关蛋白 3 (Dickkopf-related protein 3, DKK3) 基因,及其靶基因 mRNA,并通过细胞实验验证其相互作用以及它们对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 细胞凋亡、增殖与侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 获取乳腺癌基因表达数据集

从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)中下载两个数据集:数据集 GSE143564 包含来自 3 个健康人(对照)和 3 个乳腺癌患者的基因图谱数据;数据集 GSE53719 包含 5 个健康人(对照)和 11 个乳腺癌患者的基因表达数据。

1.2 乳腺癌差异表达 miRNA 的筛查与分析

用 GEO 数据库自带工具 GEO2R 对差异 miRNA 进行分析,筛查乳腺癌组织和正常组织之间的差异表达 miRNA。筛选的标准值设定为 $|\log_2(\text{FC})| > 1$ 和 $P < 0.05$ 。绘制维恩图,确定两个数据集中重叠的差异 miRNA,在 ENCORI 数据库中验证差异 miRNA 的表达。

1.3 预测乳腺癌差异 miRNA 的靶基因

利用数据库 Starbase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>)、miRDB (<http://mirdb.org/>) 和 miWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 分别预测乳腺癌差异表达 miRNA 的靶点基因,取三者交集作为最终预测靶基因进行后续研究。使用 Cytoscape3.6.2 软件将预测结果绘制成可视化图形。

1.4 靶基因 GO 和 KEGG 分析

使用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)对靶基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,选择 $P < 0.05$ 的条目,利用 Sangerbox (<http://sangerbox.com/>) 绘制富集结果的圈图。

1.5 靶基因 PPI 分析及核心基因筛选

将筛选得到的靶基因输入 String 数据库(<https://www.string-db.org/>) 得到靶基因表达蛋白的相互作用结果,下载 TSV 文件并导入 Cytoscape 3.7.2 软件,绘制网络图,并使用 Cytoscape 3.7.2 软件中的 CytoHubba 插件筛选前 10 个核心的靶基因。

1.6 细胞培养

人正常乳腺细胞 MCF10A,人乳腺癌细胞 MCF7、MDA-MB-231 和 MDA-MB-453 细胞购买于美国 ATCC,细胞在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液中常规培养。

1.7 qPCR 实验检测乳腺癌细胞中 miR-32-5p 及 DKK3 的表达水平

用 TRIzol 试剂(Invitgen, Thermo Fisher Science, Inc)从培养细胞中提取 RNA。为了检测样品中 miRNA 的表达水平,使用逆转录 PCR 试剂盒将 2 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA。用 Primer Premier Software 5.0 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) 设计引物并由 Invitrogen 公司合成,在 ABI 7500 系统进行 qPCR。U6 或 GAPDH 作为内源性对照,用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算目的基因的相对表达量。U6 上游引物: 5'-CTCGCTTCG GCAGCACA-3', 下游引物: 5'-AACGCTTCACGAAT

TTGCGT-3'; miR-32-5p 上游引物: 5'-TATTGCACA TTAATAAGTTGCA-3', 下游引物: 5'-GTGCGTGTC GTGGAGTCG-3'; DKK3 上游引物: 5'-AGGTGTCAT GGACTGTTGCC-3', 下游引物: 5'-TCCAAGAAGTAC AGAAGAGCAGTT-3'; GAPDH 上游引物: 5'-GAAAGC CTGCCGGTACTA-3', 下游引物: AGGGATCTCGCT CCTGGAAG。

1.8 荧光素酶报告基因实验验证 miRNA-32-5p 与 DKK3 3'UTR 之间的靶向结合

将野生型和突变型 miRNA-32-5p 结合序列从 DKK3 3'UTR 克隆到 pGL3 载体 (Promega 公司)。将 miRNA-32-5p 和 pmirGLO-DKK3 的 3'UTR (野生或突变) 共转染到 293T 细胞中, 使用 Lipofectamin 3000 试剂 (Invitrogen 公司) 进行转染, 双荧光素酶报告检测系统检测荧光素酶活性。

1.9 细胞转染和凋亡分析

miR-NC mimic、miR-32-5p mimic、miR-NC inhibitor 和 miR-32-5p inhibitor 由百奥迈科生物技术有限公司 (中国江苏) 合成。细胞转染前, 将 MDA-MB-231 细胞接种于 96 孔板中, 待细胞生长至汇合度 50%~80% 时, 使用 riboFECT CP 转染试剂盒 (中国广州锐博生物科技有限公司) 在 37 °C 下将 miR-NC mimic、miR-32-5p mimic、miR-NC inhibitor 和 miR-32-5p inhibitor 转染 MDA-MB-231 细胞。48 h 后使用 Annexin V -FITC 凋亡检测试剂盒 (BD Biosciences 公司) 检测细胞凋亡水平 (使用 Becton-Dickinson FACS-420 流式细胞仪进行分析)。

1.10 CCK-8 法检测 miR-32-5p 表达对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

各组 MDA-MB-231 细胞转染 (每组设置 6 个重复孔) 48 h 后, 以 3×10^5 个细胞/孔的密度接种到 96 孔板中。在培养 24、48、72 和 96 h 后, 加入 10 μ l CCK-8 溶液, 于 37 °C 处理 1 h, 用酶标仪检测 450 nm 处光密度 (D) 值, 以 D 值代表细胞增殖水平, 并绘制细胞增殖曲线。

1.11 平板克隆形成实验检测 miR-32-5p 对 MDA-

MB-231 细胞克隆形成的影响

将转染成功的各组细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板, 设置 3 个复孔。在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养, 显微镜下观察细胞的克隆形成情况, 培养约 15 d 后即出现肉眼可见的克隆, 终止培养, 弃去培养液。4% 多聚甲醛固定 15 min, 加适量吉姆萨染液染色 15 min, 流水缓慢洗去未结合的染色液, 空气中干燥后置显微镜下 (低倍镜) 计数大于 50 个细胞的克隆数, 计算克隆形成率。克隆形成率 = 克隆形成数 / 接种细胞数 \times 100%。

1.12 Transwell 实验检测 miR-32-5p 对 MDA-MB-231 细胞侵袭的影响

Transwell 小室 (上室, 孔径 8 μ m) 按标准程序涂抹 100 μ l 稀释的人工基膜胶 (metrigel), 37 °C 静置 2 h, 向下室中加入 500 μ l 含 10% 胎牛血清的 DMEM, 向上室中加入含 4×10^5 个细胞的 100 μ l 无血清培养基, 继续培养 24 h, 取出上室底部滤膜, 用棉签将残留在上表面的非侵袭性细胞去除, 膜下表面的侵袭细胞用 75% 甲醇固定、瑞特-吉姆萨染色。在光学显微镜下计数膜下表面的细胞数量。

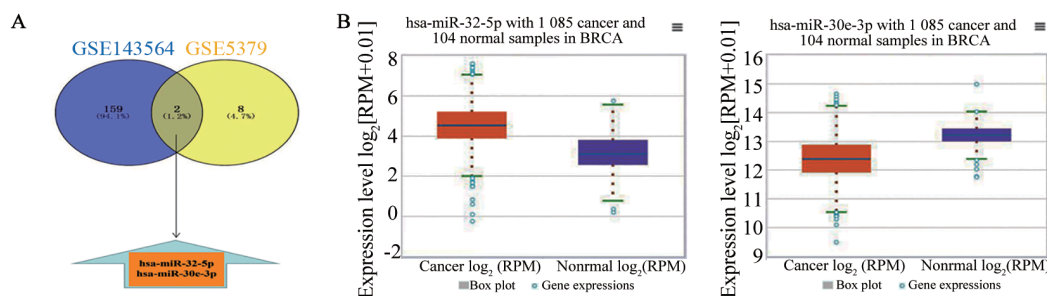
1.13 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较应用 *t* 检验, 多组间比较采用 *F* 检验, 以 *P* < 0.05 或 *P* < 0.01 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织中差异表达最显著的 miRNA 为 miR-32-5p

在数据集 GSE143564 中筛选得到 161 个差异 miRNA, 其中 16 个上调、145 个下调; 在数据集 GSE53719 中筛选得到 10 个差异 miRNA, 其中 9 个上调、1 个下调。两数据库取交集, 共得到两个差异 miRNA, 分别为 miR-32-5p 和 miR-30e-3p 且此两个 miRNA 均上调。经 ENCORI 数据库验证, 发现 miR-32-5p 的表达和测序结果一致, 因此选择该 miRNA 进行后续研究 (图 1)。



A: Differentially expressed miRNAs shown by Venn diagram; B: The expression level of miRNA was verified by ENCORI database

图 1 乳腺癌组织和正常组织表达差异 miRNA 筛选的韦恩图及 ENCORI 数据库验证 miRNA 差异表达

Fig.1 Identification of differentially expressed miRNAs between breast cancer tissues and normal tissues by Venn diagram, and the validation of miRNA expression using ENCORI database

2.2 预测miR-32-5p的靶基因共有198个

从数据库 Starbase 预测 miR-32-5p 的靶基因, 共得到 2 848 个; 从数据库 miRDB 预测得到 985 个靶基因; 从 miRWalk 数据库预测得到 2 442 个靶基因。对上述 3 个数据库所获靶基因取交集, 共得到 198 个共同预测靶基因(图 2)。将 miR-32-5p 及对应的 198 个靶基因的 TSV 格式文件导入 Cytoscape 3.7.2 数据库绘制出 miRNA-靶基因网络图(图 3)。

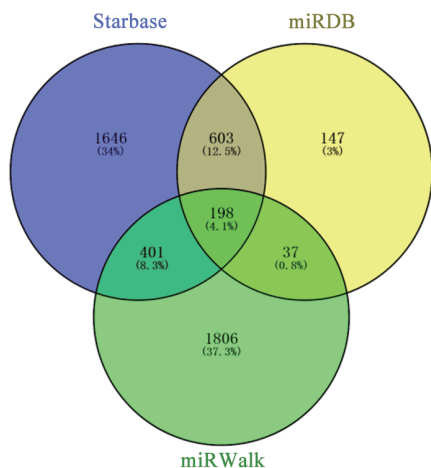


图 2 靶基因预测结果韦恩图

Fig.2 Venn diagram for the prediction of target genes

2.3 miR-32-5p靶基因相关的信号通路及生物学功能

KEGG 分析结果显示, 靶基因主要富集的通路有 FcγR 介导的吞噬作用、黏着斑、癌症蛋白聚糖和病毒致癌通路等(图 4、表 1)。GO 分析结果显示, 分子功能主要富集于 Wnt 蛋白结合、卷曲结合和 Wnt 激活受体活性等; 生物过程主要富集于典型 Wnt 信号通路的负调控、Wnt 信号通路参与体细胞发生和上皮细胞向间充质细胞转化的负调控等(图 4、表 2)。

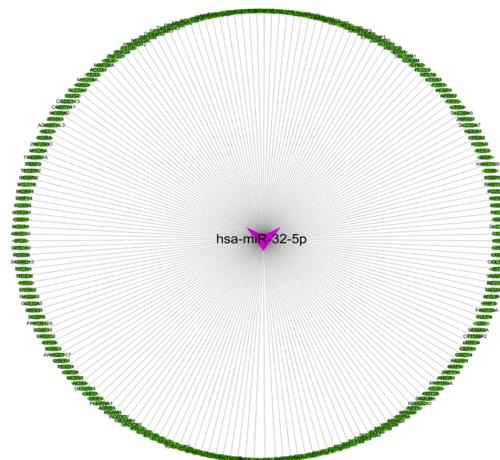


图 3 miR-32-5p 靶基因网络图

Fig.3 miR-32-5p target gene network

表 1 KEGG 富集分析结果

Tab.1 KEGG enrichment analysis results

| Term | Count | P | Gene |
|----------------------------------|-------|--------|--|
| Fc gamma R-mediated phagocytosis | 4 | 0.0446 | CDC42, PRKCE, PIK3CB, PIK3R1 |
| Focal adhesion | 7 | 0.0127 | CDC42, PPP1R12A, COL27A1, IBSP, ITGAV, PIK3CB, IK3R1 |
| Proteoglycans in cancer | 6 | 0.0399 | CDC42, PPP1R12A, FRS2, ITGAV, PIK3CB, PIK3R1 |
| Viral carcinogenesis | 6 | 0.0437 | CDC42, GTF2A1, EGR2, TRAF3, PIK3CB, PIK3R1 |
| Fc gamma R-mediated phagocytosis | 4 | 0.0446 | CDC42, PRKCE, PIK3CB, PIK3R1 |
| Small cell lung cancer | 4 | 0.0459 | TRAF3, ITGAV, PIK3CB, PIK3R1 |
| Regulation of actin cytoskeleton | 6 | 0.0476 | CDC42, PIKFYVE, PPP1R12A, ITGAV, PIK3CB, PIK3R1 |

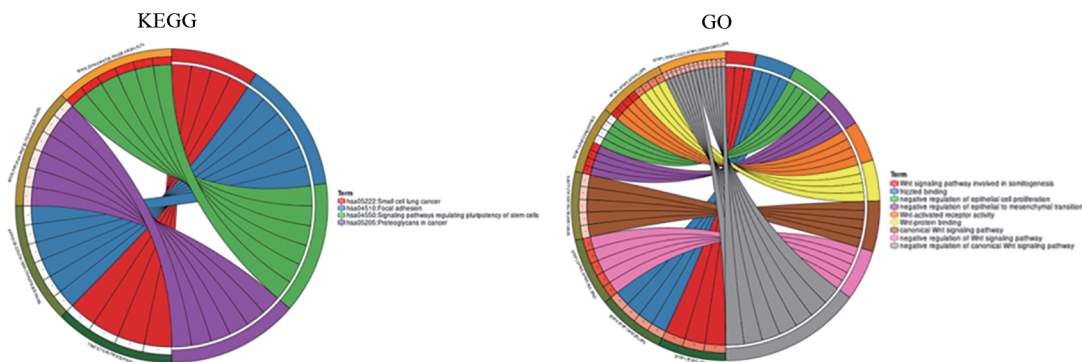


图 4 靶基因 GO 和 KEGG 富集分析结果图

Fig.4 GO and KEGG enrichment analyses of target genes

表2 GO富集分析结果
Tab.2 Go enrichment analysis results

| Category | Term | Count | P | Gene |
|----------|---|-------|---------|---|
| BP | Negative regulation of epithelial to mesenchymal transition | 4 | 0.001 6 | SFRP1, SFRP2, DAB2IP, PBLD |
| BP | Negative regulation of canonical Wnt signaling pathway | 7 | 0.008 1 | SFRP1, SFRP2, CUL3, SFRP5, DAB2IP, DKK3, LRP6 |
| BP | Negative regulation of epithelial cell proliferation | 4 | 0.021 9 | SFRP1, SFRP2, DAB2IP, PBLD |
| BP | canonical Wnt signaling pathway | 5 | 0.011 9 | SFRP1, WNT2B, TBL1XR1, KLF4, LRP6 |
| BP | Negative regulation of Wnt signaling pathway | 5 | 0.002 3 | SFRP1, SFRP2, SFRP5, NLK, DKK3 |
| BP | Wnt signaling pathway involved in somitogenesis | 3 | 0.003 9 | SFRP1, SFRP2, LRP6 |
| MF | Wnt-protein binding | 4 | 0.004 0 | SFRP1, SFRP2, SFRP5, LRP6 |
| MF | Frizzled binding | 4 | 0.006 2 | WNT6, SFRP1, WNT2B, LRP6 |
| MF | Wnt-activated receptor activity | 4 | 0.001 5 | SFRP1, SFRP2, SFRP5, LRP6 |

2.4 PPI分析得到10个核心靶基因

靶基因PPI分析结果(图5)显示,其网络图中共有126个节点、152条边。利用CytoHubba工具插件筛选得到的10个核心靶基因分别为DKK3、WNT2B、SFRP5、SFRP2、SFRP1、LRP6、WNT6、KREMEN1、NEDD4L、TRIP12,其中DKK3、WNT2B、SFRP5、SFRP2、SFRP1、LRP6、WNT6、KREMEN1等8个靶基

因之间的联系紧密。联系紧密度值(简称度值),指的是某一个基因与周围基因的联系的数量,度值越大,代表与之有相互作用的基因越多,说明其可能较为重要。从网络图(图6)中发现DKK3的度值相对较大,说明其在乳腺癌中可能较为重要,因此选择DKK3基因进行研究。

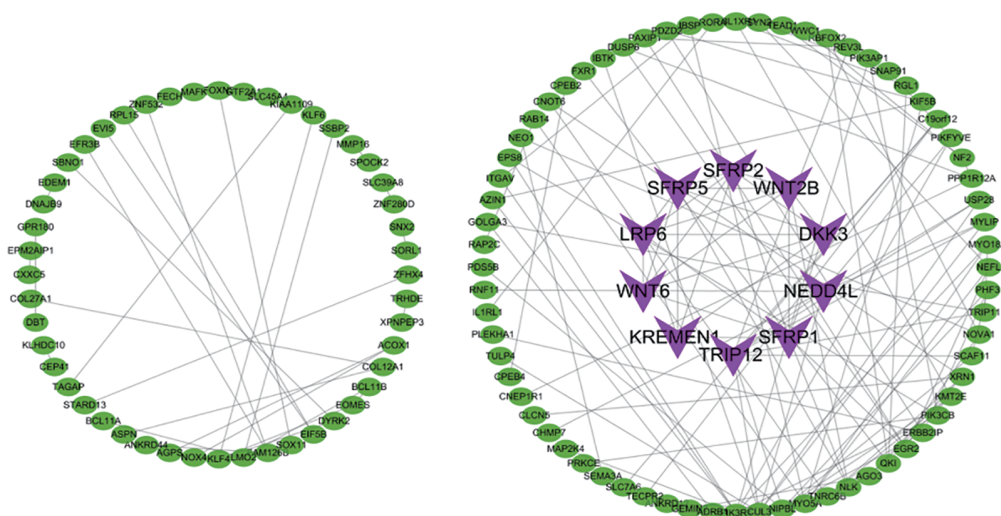


图5 靶基因PPI网络图
Fig.5 PPI network of target genes

2.5 miR-32-5p在乳腺癌细胞中呈高表达且对DKK3表达负向调控

qPCR检测结果(图7A)显示,与正常乳腺细胞MCF10A相比,miR-32-5p在乳腺癌细胞MCF7、MDA-MB-231和MDA-MB-453中均呈表达,且在MDA-MB-231细胞中表达水平最高,于是后期细胞实验均选用MDA-MB-231细胞进行。

与各自的对照组相比,转染miR-32-5p mimic后MDA-MB-231细胞中miR-32-5p的表达在被显著上调,

而转染miR-32-5p inhibitor后被显著下调(均 $P < 0.01$,图7B)。过表达miR-32-5p后细胞中DKK3的表达下调,而抑制miR-32-5p后DKK3的表达上调(图7C),提示miR-32-5p与DKK3之间可能存在着负性调控的关系,DKK3是miR-32-5p潜在的下游靶基因。

2.6 miR-32-5p表达变化对MDA-MB-231细胞凋亡、增殖、迁移的影响

流式细胞术检测结果(图8A、B)显示,与各自的对照NC组比较,miR-32-5p mimic组细胞凋亡率显著

降低 ($P < 0.05$), miR-32-5p inhibitor 组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。MTT 实验结果 (图 8C) 表明, 与各自的对照 NC 组比较, miR-32-5p mimic 组细胞增殖能力显著升高 ($P < 0.01$)、miR-32-5p inhibitor 组细胞增殖能力显著降低 ($P < 0.01$)。平板克隆形成实验结果 (图 8D) 表明, 与对照 NC 组比较, miR-32-5p mimic 组细胞克隆形成率显著升高 ($P < 0.01$)、miR-32-5p inhibitor 组细胞克隆形成率显著降低 ($P < 0.01$)。Transwell 实验结果 (图 8E) 表明, 与各自的对照 NC 组比较, miR-32-5p mimic 组发生侵袭的细胞数显著升高 ($P < 0.01$)、miR-32-5p inhibitor 组侵袭细胞数显著下降 ($P < 0.01$)。

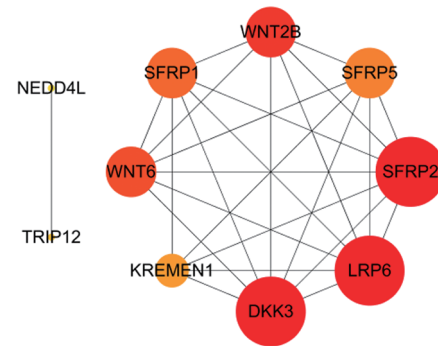
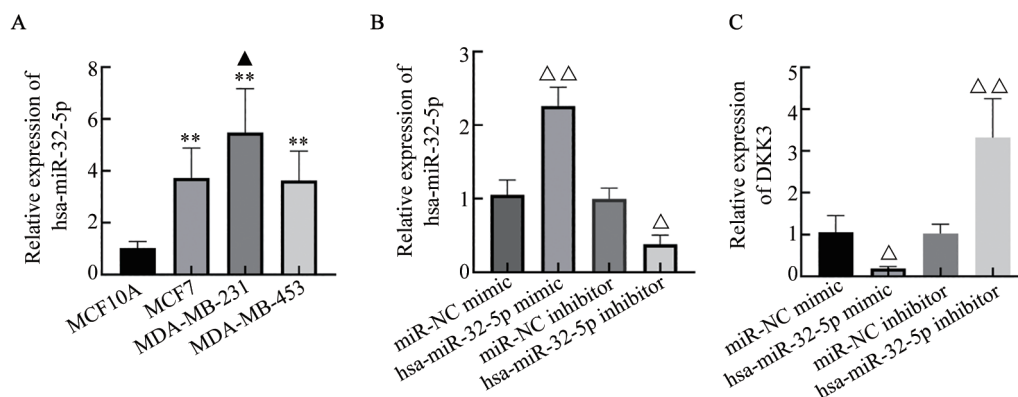


图6 TOP 10核心基因的网络图
Fig.6 Network of the TOP 10 hub genes



** $P < 0.01$ vs MCF10A; ▲ $P < 0.05$ vs MCF7 or MDA-MB-453; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs miR-NC-mimic or miR-NC-inhibitor

A: Expression of miR-32-5p in normal breast cells and breast cancer cells;

B: Relative expression of miR-32-5p; C: Relative expression of DKK3

图7 miR-32-5p在正常乳腺细胞和乳腺癌细胞中的表达情况及其对DKK3表达的影响

Fig.7 Expression of miR-32-5p in normal breast cells and breast cancer cells and its effect on DKK3 expression

2.7 miR-32-5p靶向结合并负向调控DKK3的表达

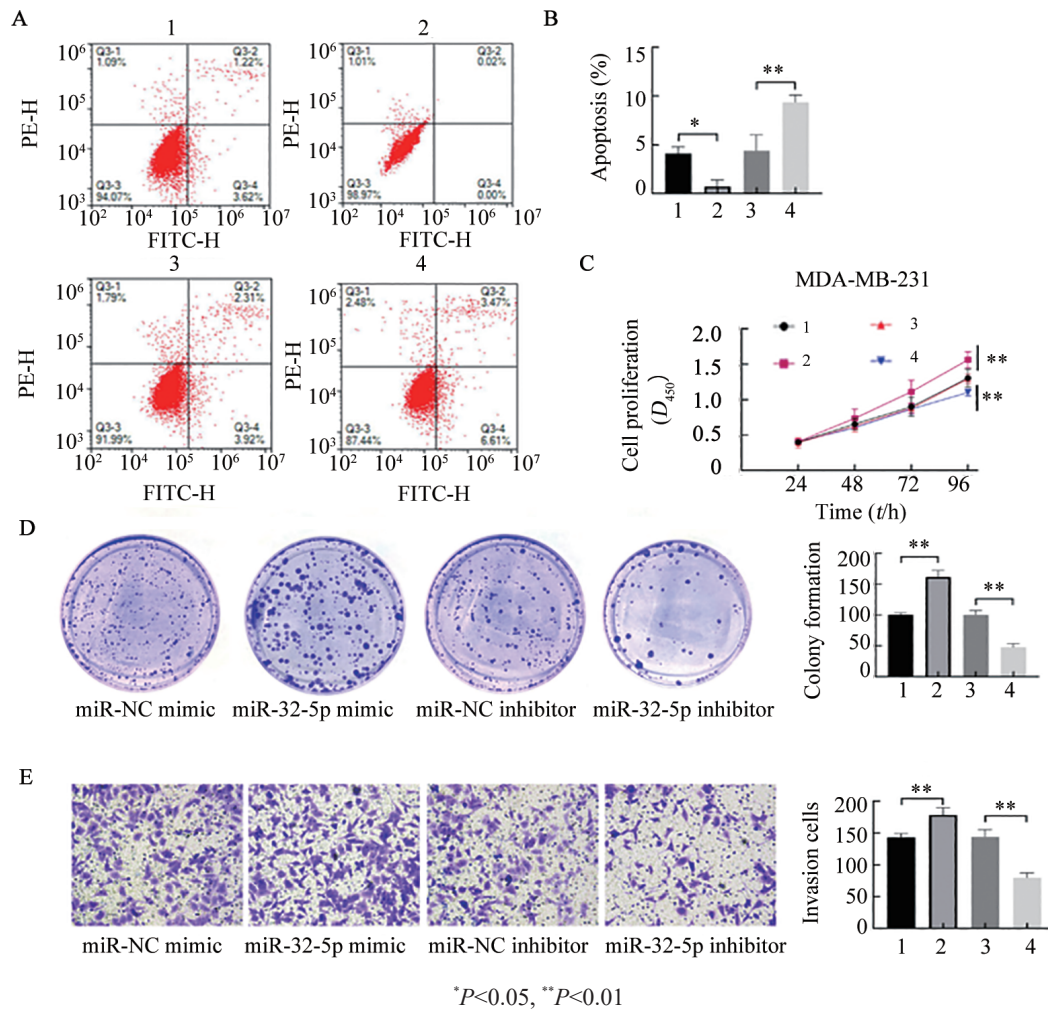
根据 Targetscan 数据库的预测结果 (图 9A), DKK3 和 miR-32-5p 有互补结合序列。双荧光素酶报告基因检测结果 (图 9B) 显示, 与 NC WT 组相比, miR-32-5p WT 组的双荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.01$); 与 NC MUT 组相比, miR-32-5p MUT 组的双荧光素酶活性无显著改变, 说明 miR-32-5p 与 DKK3 的 3' UTR 有直接的特异性结合, 即 DKK3 是 miR-32-5p 的下游靶基因。

3 讨论

乳腺癌的浸润和转移是影响患者疗效和生存期的关键因素, 然而其转移机制尚不清楚。因此, 积极探索乳腺癌发生发展的生物学机制及明确影响乳腺癌发生发展过程的关键基因, 对于乳腺癌早期诊断、减少复发转移和开发治疗新策略具有重要的意义^[10]。

转录组测序技术的应用能更加便捷地获取乳腺癌发生发展过程中差异表达的基因, 而这些差异表

达的基因即可能是乳腺癌治疗的关键靶点。miRNA 是一类由内源基因编码长度约 2~23 个核苷酸的单链非编码 RNA 分子, 其广泛参与基因表达调控和 RNA 沉默^[11]。如 miR-21 通过靶向亮氨酸拉链转录因子样 1 (leucine zipper transcription factor-like 1, LZTFL1) 促进乳腺癌生长和转移^[12]; miR-155-3p 可负性调节乳腺癌 MCF-7 细胞中细胞黏附分子 1 (cell adhesion molecule 1, CADM1) 的表达, 促进细胞增殖和抑制细胞凋亡^[13]。在本研究中, 通过分析 GEO 数据库中乳腺癌的测序数据获取了乳腺癌相关的 miRNA 测序结果, 鉴定出两个差异 miRNA, 分别为 miR-32-5p 和 hsa-miR-30e-3p, 其中 miR-32-5p 的表达经验证与测序结果一致。先前研究结果证实, miR-32-5p 可调节结直肠癌^[14]和宫颈癌的进展^[15]; miR-32-5p 靶向叉头框蛋白 (forkhead N3, FOXN3) 可能通过 EMT 通路调控子宫内膜癌细胞迁移和侵袭^[16]; miR-32-5p 通过靶向 SMAD 家族 3 抑制肺腺癌 EMT 和转移^[17], 表明 miR-32-5p 与癌症密切相关。后续构建的 PPI 网络

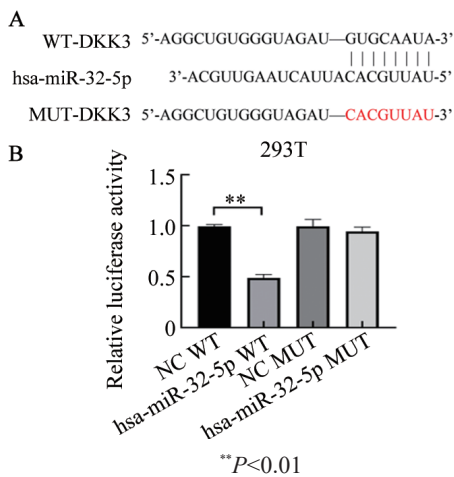


*P<0.05, **P<0.01
1: miR-NC mimic; 2: miR-32-5p mimic; 3: miR-NC inhibitor; 4: miR-32-5p inhibitor

A: Cell apoptosis; B: Apoptosis rate; C: Cell proliferation detected by CCK-8;
D: Cell clone formation experiment; E: Transwell experiment (×200)

图8 miR-32-5p对MDA-MB-231细胞凋亡、增殖和细胞侵袭的影响

Fig.8 The effect of miR-32-5p on apoptosis, proliferation and invasion of MDA-MB-231 cells



A: Predicted binding site of DKK3 and miR-32-5p;
B: The binding of miR-32-5p and DKK3 was verified by Dual luciferase report gene experiment

图9 miR-32-5p与靶基因DKK3结合位点的预测和鉴定
Fig.9 Prediction and identification of binding site of miR-32-5p and DKK3

和TOP10核心基因的网络图中发现,DKK3所连接的基因较多,表明其在乳腺癌中的可能较为重要。DKK是Wnt通路经典的细胞外抑制剂之一,其包含5个成员(DKK1-4和DKKL1),其中DKK3被广泛地认为具有肿瘤抑制作用^[18-19]。有研究报道,DKK3的缺失促进基底部乳腺癌的发生^[20];DKK3的表达降低可能在乳腺癌的形成中起重要的作用,DKK3可以作为一个判断乳腺癌预后的指标^[21],上述研究说明DKK3在乳腺癌中较为重要,故本课题选择miR-32-5p/DKK3信号轴进行后续研究。首先验证了miR-32-5p/DKK3轴在乳腺癌细胞中的作用。发现miR-32-5p在乳腺癌细胞中呈高表达,而DKK3呈低表达,这与生物信息学分析的结果相一致。细胞功能实验结果表明,miR-32-5p过表达可抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞凋亡、促进细胞的增殖、迁移和侵袭。进一步利用荧光素酶活性报告基因实验验证了miR-32-5p与DKK3的相互结合作用,发现miR-32-5p降

低了携带WT-DKK3的MDA-MB-231细胞的荧光素酶活性,表明miR-32-5p与DKK3有直接联系。这些结果表明,miR-32-5p在乳腺癌中起着致癌的作用,提示miR-32-5p/DKK3轴在乳腺癌中起着重要作用。

综上所述,本研究发现miR-32-5p/DKK3轴可能是影响乳腺癌发生发展的关键通路,miR-32-5p能够抑制乳腺癌MDA-MB-231细胞的凋亡、促进细胞增殖和侵袭。但本研究仍存在一些局限性,未能在动物体内研究miR-32-5p对乳腺癌的影响;其次,miR-32-5p/DKK3轴参与调控乳腺癌进程的潜在下游分子和信号通路尚未进一步研究。今后,本课题组将从以上两个方面进一步探索。

【参考文献】

- [1] DESANTIS C E, MA J, GODING SAUER A, et al. Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(6): 439-448. DOI: 10.3322/caac.21412.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(8): 1941-1953. DOI: 10.1002/ijc.31937.
- [4] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- [5] NYGAARD S, JACOBSEN A, LINDOW M, et al. Identification and analysis of miRNAs in human breast cancer and teratoma samples using deep sequencing[J]. *BMC Med Genomics*, 2009, 2(1):35-35. DOI: 10.1186/1755-8794-2-35.
- [6] ROBERTSON N M, YIGIT M V. The role of microRNA in resistance to breast cancer therapy[J]. *WIREs RNA*, 2014, 5(6): 823-833. DOI: 10.1002/wrna.1248.
- [7] YAHYA S M, ELSAYED G H. A summary for molecular regulations of miRNAs in breast cancer[J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(6): 388-396. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2014.12.013.
- [8] GILLIES J K, Lorimer I A. Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(16): 2005-2009. DOI: 10.4161/cc.6.16.4526.
- [9] LIU H, WANG Y, LI X et al. Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3): 1713-1722. DOI: 10.1007/s13277-013-0708-0.
- [10] YIN Z, WANG W, QU G, et al. miRNA impacts the progression of breast cancer through targeting FOXO3[J]. *Thoracic Cancer*, 2020, 11(4): 956-963. DOI: 10.1111/1759-7714.13348
- [11] LAI E C. MicroRNAs are complementary to 3'UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation[J]. *Nat Genet*, 2002, 30(4): 363-364. DOI: 10.1038/ng865.
- [12] WANG H, TAN Z, HU H, et al. MicroRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1[J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 738. DOI: 10.1186/s12885-019-5951-3.
- [13] ZHANG G, ZHONG L, LUO H, et al. MicroRNA-155-3p promotes breast cancer progression through down-regulating CADM1[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 7993-8002. DOI: 10.2147/OTT.S206180.
- [14] LIANG H, TANG Y, ZHANG H, et al. miR-32-5p regulates radiosensitization, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting TOB1 gene[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 9651-9661. DOI: 10.2147/OTT.S228995.
- [15] LIU Y J, ZHOU H G, CHEN L H, et al. miR-32-5p regulates the proliferation and metastasis of cervical cancer cells by targeting HOXB8[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1): 87-95. DOI: 10.26355/eurrev_201901_16752.
- [16] 董艳, 杜安飞, 辛本勤, 等. miR-32-5p靶向FOXN3调控EMT通路影响子宫内腺癌细胞迁移和侵袭[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13(6): 947-951. DOI: 10.19930/j.cnki.jmdt.2021.06.025.
- [17] ZHANG J X, YANG W, WU J Z, et al. MicroRNA-32-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in lung adenocarcinoma by targeting SMAD family 3[J]. *J Cancer*, 2021, 12(8):2258-2267. DOI: 10.7150/jca.48387.
- [18] NIEHRS C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators[J]. *Oncogene*, 2006, 25(57): 7469-7481. DOI: 10.1038/sj.onc.1210054.
- [19] SHAO Y C, WEI Y, LIU J F, et al. The role of Dickkopf family in cancers: from Bench to Bedside[J]. *Am J Cancer Res*, 2017, 7(9): 1754-1768.
- [20] EVA L, SOPHIE T A, CORDELIA G, et al. Loss of Dickkopf 3 promotes the tumorigenesis of basal breast cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0160077 [2021-05-12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27467270/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0160077.
- [21] 童辉. DKK3蛋白在乳腺癌中的表达及其临床意义[D]. 福州: 福建医科大学, 2011.

[收稿日期] 2021-07-10

[修回日期] 2021-12-20

[本文编辑] 黄静怡