网络出版时间:2024 - 10 - 21 11:24:35 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241018.0937.005

POLG 抑制剂阻碍线粒体生物合成抑制三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭

刘 行,樊双琴,晏小敏,赵仕杰,王 荣,沈祥春,周 雪,张 玥,陈 妍
(贵州医科大学天然药物资源优效利用重点实验室,安顺 561113)

摘要 目的 探究线粒体 DNA 聚合酶 γ(POLG)抑制剂扎西他滨(ddC)对三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的作用,并初步探讨其对线粒体生物合成的影响。**方法** MTT 法测定 ddC 对细胞活力的影响;细胞划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测细胞的迁移和侵袭能力;应用流式细胞术和 V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞的凋亡水平;Western blot 检测 POLG、NADH 脱氢酶亚基Ⅰ(NADH1)、NADH 脱氢酶亚基Ⅱ(NADH2)、ATP 合成酶亚基 6(ATPase6)、细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅰ(COX-1)和细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅲ(COX-3)的蛋白表达水平;qPCR 实验检测 POLG 的 mRNA 水平和 mtDNA 拷贝数;应用 MitoTracker Green 荧光探针和 ATP 定量试剂盒测定细胞的线粒体含量和 ATP 水平;将 POLG 的过表达载体转染到 MDA-MB-231 细胞中,用 Western blot、细胞划痕实验和 Transwell 侵袭实验验证 POLG 抑制剂对细胞的迁移和侵袭能力的影响。**结果** POLG 在 MDA-MB-231 细胞中的表达高于人正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞($P<0.01$)。ddC 剂量依赖性地抑制细胞活力,降低了 MDA-MB-231 细胞的迁移($P<0.01$)和侵袭能力($P<0.01$),且在实验剂量下对正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞无明显毒性。ddC 可下调 MDA-MB-231 细胞内 POLG 蛋白($P<0.01$)和 mRNA 水平($P<0.01$),并降低 mtDNA 拷贝数($P<0.01$)以及 mtDNA 编码的 NADH1、NADH2、ATPase6、COX-1 和 COX-3 蛋白表达($P<0.01$)。ddC 可抑制 MDA-MB-231 细胞的线粒体含量($P<0.01$)和 ATP 水平($P<0.01$)。在 MDA-MB-231 细胞内过表达 POLG 增强了细胞的迁移($P<0.05$)和侵袭能力($P<0.05$),而 ddC 对 POLG 过表达的 MDA-MB-231 细胞的迁移、侵袭能力未表现出明显抑制。**结论** ddC 可下调 MDA-MB-231 中 POLG 的表达,阻碍线粒体生物合成和降低 ATP 水平,进而抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭。

关键词 三阴性乳腺癌;迁移;侵袭;POLG 抑制剂;线粒体生物合成;ATP 合成
中图分类号 R 737.9
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2024)10 - 1720 - 09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2024.10.005

三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer,TNBC)具有高侵袭、高转移、易复发、预后差等特点,是乳腺癌中恶性程度最高的亚型[1]。手术和常规化疗是 TNBC 目前主要的治疗手段,但治疗效果不佳,患者在治疗过程中易发生转移并导致死亡[2],控制转移是治疗 TNBC 的关键因素。有研究[3]表明,TNBC 细胞在转移过程中可通过上调线粒体生物合成及氧化磷酸化水平增强其迁移、侵袭能力,抑制线粒体生物合成是抗 TNBC 转移的重要途径。mtDNA 聚合酶 γ(mitochondrial DNA polymerase γ,POLG)是线粒体中调节 mtDNA 复制、转录和翻译的关键酶之一[4]。抑制 POLG 可能阻碍 mtDNA 复制与修复,进而抑制线粒体生物合成和能量代谢,控制肿瘤细胞迁移和侵袭。扎西他滨(2′, 3′-dideoxycytidine, ddC)是 POLG 的选择性抑制剂,可竞争性地抑制 POLG 的催化活性[5],并增加白血病、胰腺癌细胞的 mtDNA 耗损,导致线粒体功能障碍及氧化磷酸化水平降低,提示 ddC 具有一定的抗肿瘤潜力[5-6],但其能否应用于乳腺癌治疗尚不明确。

该研究旨在探讨 ddC 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的影响,以及对 mtDNA 复制和翻译以及线粒体生物合成的作用,为 POLG 抑制剂类药物应用于 TNBC 的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 MDA-MB-231 和 MCF-10A 细胞分别购自中国科学院昆明细胞库和美国菌种保藏中

2024 - 07 - 01 接收
基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82273957);贵州省科技计划项目(编号:黔科合平台人才[2021]5632 号、黔科合基础-ZK[2023]重点 034);贵州省中医药、民族医药科学技术研究课题(编号:QZYY-2022-025);贵州省卫生健康委科学技术基金项目(编号:gzwkj2021-519);贵州医科大学大学生创新创业训练计划项目(编号:S202210660139)
作者简介:刘 行,男,硕士研究生;
陈 妍,女,博士,教授,博士生导师,通信作者,E-mail:s0710189@sina.com

中国知网 https://www.cnki.net

心(ATCC)。

1.1.2 主要仪器 3111 型 CO_2 培养箱、Varioskan LUX 酶标仪购自美国赛默飞世尔科技公司;DMi8 倒置显微镜购自德国 Leica 公司;NovoCyte 流式细胞仪购自美国艾森生物科学公司;1-14K 冷冻离心机购自美国 Sigma 公司;ChemiDocTM XRS+成像系统、CFX96 实时 PCR 系统购自美国 Bio-Rad 公司;SimpliAmp 逆转录仪购自美国应用生物系统公司。

1.1.3 主要试剂与抗体 ddC(货号:HY-17392)购自美国 MedChemExpress 公司;胎牛血清(货号:10099141)、马血清(货号:16050130)购自美国 Gibco 公司;DMEM/F-12 培养基购自美国 ATCC(货号:30-2006)和 Gibco 公司(货号:C11330500BT);苏木精伊红(HE)染色试剂盒(货号:G1120)购自北京索莱宝科技有限公司;细胞培养小室(货号:353097)、Matrigel 基质胶(货号:356234)购自美国 Corning 公司;V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(货号:KGA107)购自江苏凯基生物公司;细胞线粒体分离试剂盒(货号:C3601)购自上海碧云天生物技术有限公司;RNA 提取试剂盒(货号:ET111)、逆转录试剂盒(货号:AE311)、qPCR 试剂盒(货号:AQ601)购自北京全式金生物技术有限公司;ATP 定量试剂盒(货号:A22066)、MitoTracker Green FM(货号:M7514)购自美国赛默飞世尔科技公司。POLG 抗体(货号:sc-390634)购自美国 Santa Cruz biotechnology 公司;β-actin 抗体(货号:BS6007M)购自南京巴傲得生物科技有限公司;TOM20 抗体(货号:11802-1-AP)、NADH1 抗体(货号:19703-1-AP)、NADH2 抗体(货号:19704-1-AP)、COX-1(货号:13393-1-AP)购自美国 Proteintech 公司;ATPase6 抗体(货号:abs146200)、COX-3(货号:abs138441)购自爱必信(上海)生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MDA-MB-231 细胞培养于含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM/F-12 培养基(Gibco)中;MCF-10A 细胞培养于含有 10% 马血清、1% 青-链霉素、0.5 mg/L 氢化可的松、0.1 mg/L 霍乱毒素、20 μg/L 表皮生长因子 EGF、10 mg/L 胰岛素的 DMEM/F-12 培养基(ATCC)中。以上细胞均置于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养,待细胞生长融合至 90% 时进行传代,实验所用细胞均处于生长对数期。

1.2.2 MTT 检测细胞活力 将细胞以 8×10^3 个/孔的密度接种至 96 孔板内 24 h 后,给予不同终浓度的 ddC(0、0.156 25、0.312 5、0.625、1.25、2.5、5、10、20 μmol/L)处理,以 0 μmol/L 为对照组,其余浓度为给药组,每个浓度设置 3 个复孔。48 h 后,加入 20 μl 的 MTT 溶液(5 mg/ml),继续在 37 ℃环境中孵育。4 h 后,吸除培养基,加入 DMSO(100 μl/孔)并置于摇床振摇 10 min,用酶标仪测定各孔在 570 nm 处的吸光度值 A,计算抑制率:抑制率(%)$=(1-A_{给药组}/A_{对照组})\times100\%$。每组的结果用相对于对照组的抑制率表示,并做统计学分析。

1.2.3 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 将细胞接种于 6 孔板,培养细胞至密度达 90% 时,使用 10 μl 无菌枪头进行划痕,用 PBS 清洗漂浮的细胞碎片后给药,分别在 0、48 h 拍照,计算迁移率:迁移率(%)=(1-48 h 的划痕宽度/0 h 的划痕宽度)×100%,每组的结果用相对于对照组的迁移率表示。

1.2.4 细胞侵袭实验检测细胞侵袭能力 收集给药 48 h 后的细胞,用 DMEM/F-12 基础培养基重悬细胞,并接种于铺有 Matrigel 基质胶的细胞培养小室内,然后将小室放置于含有完全培养基的 24 孔板中。继续培养 16 h 后,用棉签将小室内的基质胶蘸去,分别经甲醇固定 10 min、苏木精染色 5 min 和伊红染色 10 min,最后通过倒置显微镜拍照,每组随机选取 3 个视野,以相对于对照组的穿过微孔滤膜的细胞侵袭率为统计结果。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡水平 收集给药 48 h 后的细胞,使用 V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行荧光染色,并通过流式细胞仪检测在 Ex/Em=488/630、488/530 nm 处的荧光强度,采用 NovoExpress 软件进行分析。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 细胞给药处理 48 h 后,加入 RIPA 裂解液并置于冰上裂解,收集裂解物后以 12 000 r/min、4 ℃离心 20 min,吸取上清液总蛋白;另外,应用试剂盒分离提取胞质蛋白和线粒体蛋白。用 BCA 法定量蛋白,然后通过 SDS-PAGE 电泳分离,转印至 PVDF 膜并用 2% BSA 封闭 1.5 h 并与稀释的抗体于 4 ℃孵育过夜。使用化学发光液显影,Bio-Rad 成像系统获取图像,Image Lab 软件进行灰度值分析。

1.2.7 qPCR 检测 mRNA 水平和 mtDNA 拷贝数 给予细胞给药处理 48 h 后,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,并逆转为 cDNA,最后使用 cDNA、引物和 PerfectStart® Green qPCR SuperMix 试剂在 qPCR 检测系统内进行扩增,以 β-actin 为内参,$2^{-\Delta\Delta C_T}$法计算 POLG 的 mRNA 表达量;引物序列为:正义链 5′-

中国知网 https://www.cnki.net

GGTCACACCTAAACTCATGG-3′,反义链 5′-CTGAG-TAGTGCAGAGGGAAG-3′;β-actin:正义链 5′-GAT-TCCTATGTGGGCGACGA-3′,反义链 5′-CACCAGAA-GAGGTAGCGGG-3′。另外,使用 MiniBEST 通用基因组 DNA 提取试剂盒提取细胞基因组 DNA,再结合 mtDNA 监测引物组(SLCO2B1、SERPINA1、ND1 和 ND5)和 TB Green® Premix Ex Taq™ Ⅱ 试剂在 qPCR 检测系统内进行扩增,根据公式计算:mtDNA 拷贝数 = $[2^{(SLCO2B1-ND1)}+2^{(SERPINA1-ND5)}]/2$。

1.2.8 MitoTracker Green 染色检测线粒体含量 使用基础培养基将 MitoTracker Green 荧光探针稀释至 100 nmol/L 的工作浓度,并置于 37 ℃培养箱中提前预温。取出给药 48 h 后的细胞,弃去培养基后加入预温好的荧光染液,放入 37 ℃培养箱孵育。30 min 后吸除染液,用无 EDTA 胰酶消化细胞,离心收集细胞并用 PBS 重悬,通过流式细胞仪检测其在 Ex/Em = 488/530 nm 处的荧光强度,并使用 NovoExpress 软件进行结果分析。

1.2.9 ATP 定量试剂盒检测 ATP 水平 给予细胞 48 h 给药处理后,根据 1.2.6 的方法裂解细胞,离心并收集裂解液,通过 ATP 定量试剂盒检测在 560 nm 处的化学发光值,并通过 BCA 定量试剂盒定量蛋白。结果用化学发光值/蛋白浓度归一化。

1.2.10 细胞转染 将细胞接种于 6 孔板,培养细胞至 70% ~80% 融合度时更换为 Opti-MEM 培养基。4 h 后,用 Opti-MEM 培养基分别稀释 Lipofectamin 2000 试剂、pcDNA3.1-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP-POLG 质粒,轻轻混匀后静置 20 min。随后滴加至细胞培养基中转染,6 h 后用完全培养基换液,继续培养 24 h 后进行后续给药。

1.3 统计学处理 数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件对至少 3 次独立重复实验结果进行统计学分析,统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验数据归一化采用各组数据除以对照组归一化的统计方式,以对照组为“1(100%)”,两组数据比较采用 t 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ddC 对 MDA-MB-231、MCF-10A 细胞活力的影响 该研究通过 Western blot 实验检测 POLG 在不同细胞中的表达。结果(图 1A、1B)显示,POLG 在 MDA-MB-231 细胞中的表达水平比正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞高,提示 POLG 抑制剂对正常细胞和肿瘤细胞的影响可能存在差异。MTT 实验结果(图 1C)显示,与对照组相比,ddC 作用 48 h 后,药物浓度为 2.5 μmol/L 及以上时出现明显抑制(F = 429.8,P < 0.01),半数抑制浓度 IC_{50} 为 3.93 μmol/L。为排除 ddC 潜在毒性的影响,使用 MTT 法检测相同浓度下 ddC 对正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞的抑制率。结果(图 1C)显示,当 ddC 处理 48 h 后,2.5 μmol/L 及以下浓度的 ddC 对 MCF-10A 细胞活力没有明显的抑制(F = 3.189,P > 0.05)。基于上述结果,分别检测 0.25、0.5、1.0 μmol/L 这 3 个剂量的 ddC 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响,结果显示(图 1D、1E),0.25、0.5、1.0 μmol/L 的 ddC 作用 48 h 后,细胞凋亡无显著变化(F = 3.059,P > 0.05)。此外,使用高浓度 ddC(1.0 μmol/L)分别处理 MDA-MB-231 细胞 12 h、24 h 和 48 h,细胞活力也无明显变化(图 1F)。因此,选用 0.25、0.5、1.0 μmol/L 作为后续 ddC 实验低、中、高剂量的给药浓度。

2.2 ddC 对 MDA-MB-231 细胞迁移、侵袭能力的影响 为确定 ddC 对 MDA-MB-231 细胞迁移、侵袭能力的影响,分别进行细胞划痕实验和细胞侵袭实验。划痕实验结果如图 2A、2B 所示,ddC 作用 48 h 后,与对照组相比,低、中、高剂量组的细胞迁移率分别为(83.08 ± 5.40)%、(53.91 ± 2.27)%、(17.94 ± 4.34)%;另外,细胞侵袭实验(图 2C、2D)显示,相比对照组,低、中、高剂量组的侵袭率分别为:(69.74 ± 5.52)%、(36.78 ± 4.92)%、(11.52 ± 2.58)%,差异均有统计学意义(F = 194.9、194.2,P < 0.01)。以上剂量的 ddC 均可明显抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移、侵袭。

2.3 ddC 对 POLG 蛋白、线粒体分布和 mRNA 水平的影响 为探究 ddC 抑制 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的机制,采用试剂盒分离 MDA-MB-231 细胞的胞质蛋白、线粒体蛋白,并提取总蛋白进行 Western blot 实验,结果(图 3A、3B)显示,与对照组相比,经 1 μmol/L ddC 处理 48 h 后,MDA-MB-231 细胞 POLG 的总蛋白、胞质蛋白和线粒体蛋白表达均显著下调(P < 0.01);另外 qPCR 实验结果(图 3C)显示,相比对照组,经 1 μmol/L ddC 处理的 MDA-MB-231 细胞 POLG 的 mRNA 水平明显降低(P < 0.01)。

2.4 ddC 对 mtDNA 的拷贝数和所编码蛋白表达的影响 上述结果显示 ddC 可抑制 POLG 的表达,为进一步确定 ddC 是否会影响 mtDNA 的拷贝数,通

中国知网 https://www.cnki.net

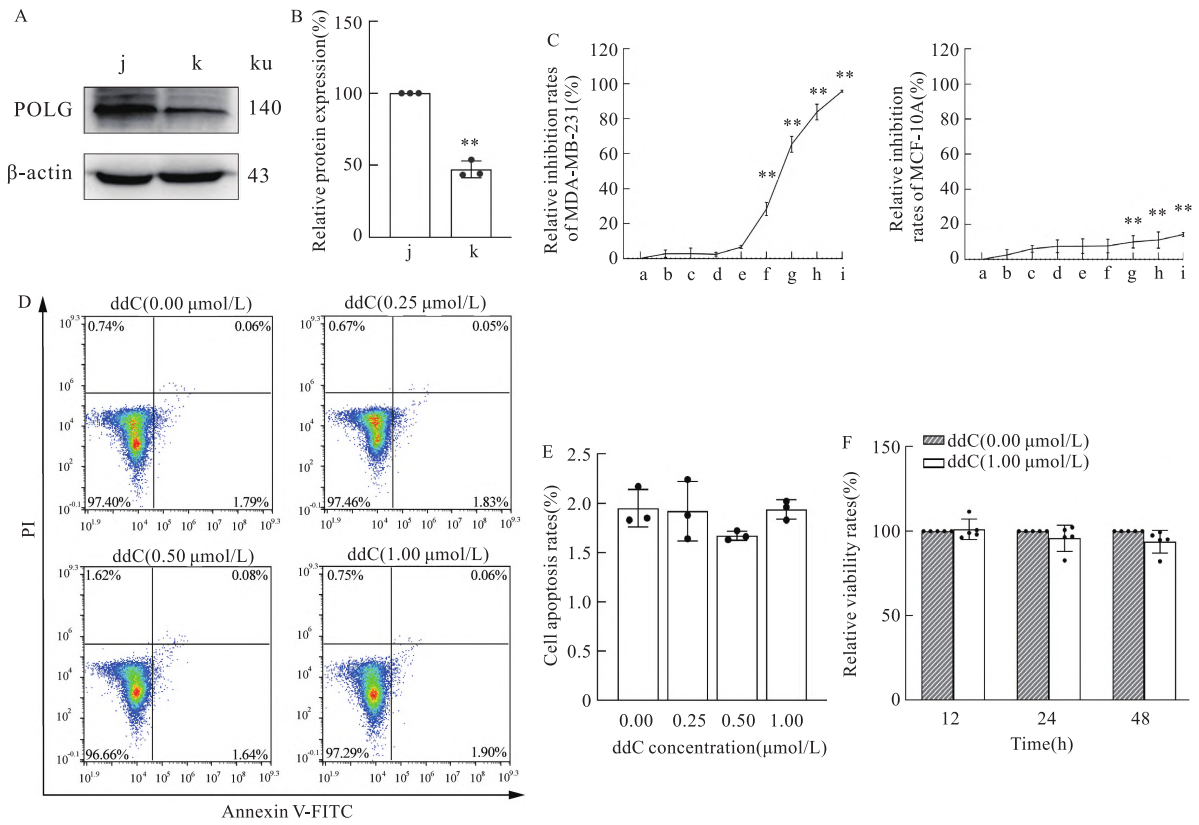

图 1 ddC 对不同细胞活力的影响

Fig. 1 The effects of ddC on cell viability of different cells

A,B:Immunoblots and expression level statistics of POLG protein in MDA-MB-231 and MCF-10A cells ($n=3$); C: Inhibition rates of ddC on the vitality of different cells ($n=3$); D,E:The analysis images of flow cytometry and quantitative analysis in MDA-MB-231 cells ($n=3$); F: The effects of ddC treatment at different times on the viability in MDA-MB-231 cells ($n=5$); a: 0 μmol/L group (control group); b: 0.156 25 μmol/L group; c: 0.312 5 μmol/L group; d: 0.625 μmol/L group; e: 1.25 μmol/L group; f: 2.5 μmol/L group; g: 5 μmol/L group; h: 10 μmol/L group; i: 20 μmol/L group; j:MDA-MB-231 cells group (control group); k:MCF-10A cells group; $^{**}P<0.01$ *vs* 0 μmol/L group.

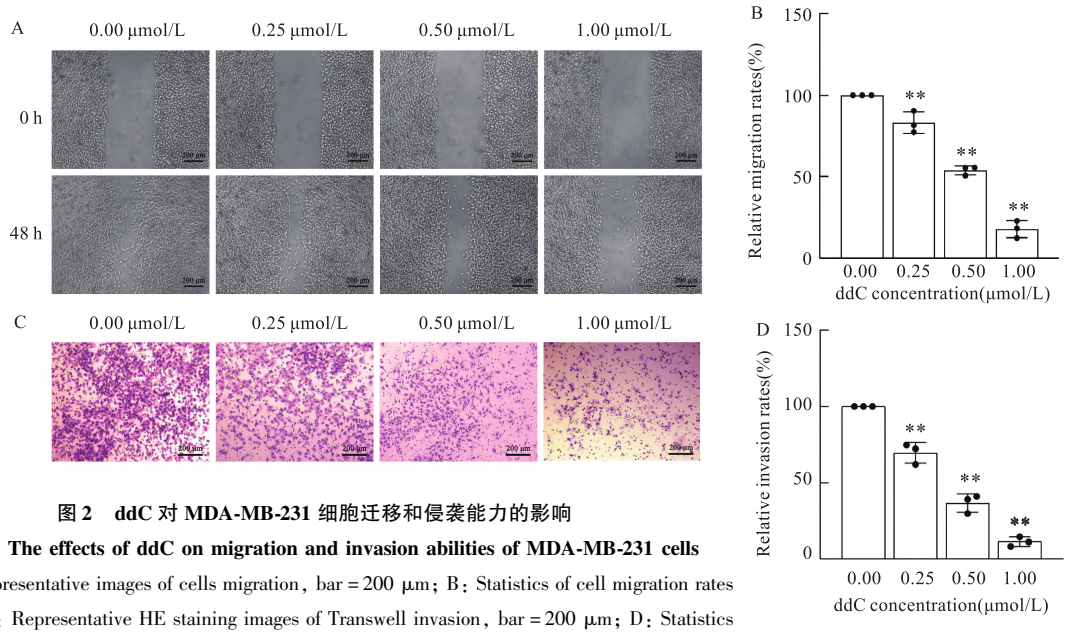

图 2 ddC 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig. 2 The effects of ddC on migration and invasion abilities of MDA-MB-231 cells

A: Representative images of cells migration, bar = 200 μm; B: Statistics of cell migration rates ($n=3$); C: Representative HE staining images of Transwell invasion, bar = 200 μm; D: Statistics of Transwell invasion rates ($n=3$); $^{**}P<0.01$ *vs* 0.00 μmol/L group.

中国知网 https://www.cnki.net

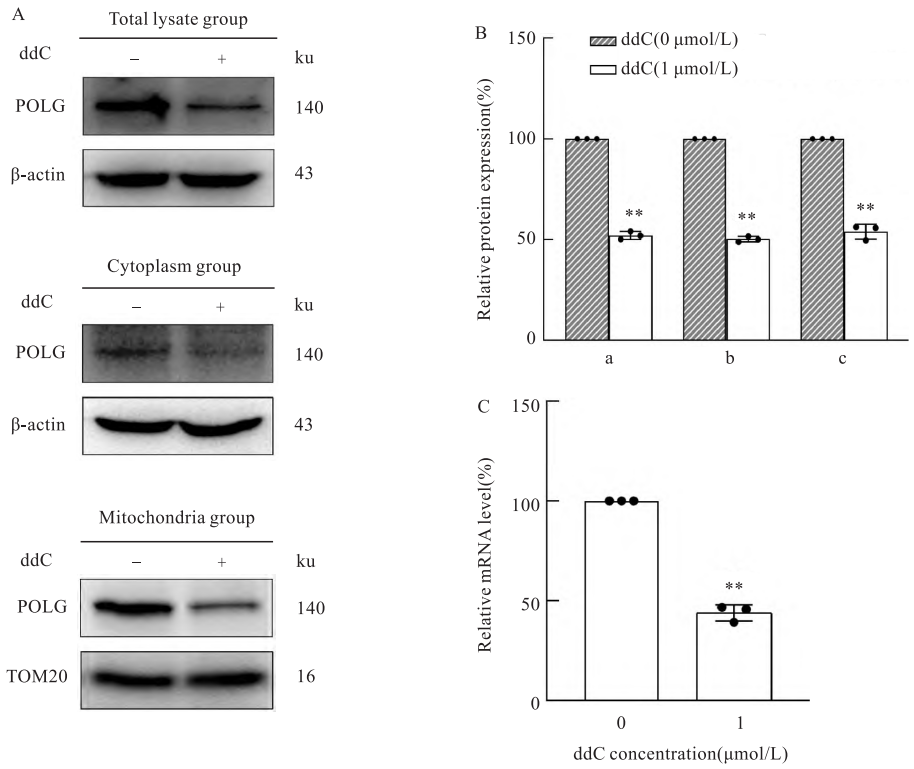

图 3 ddC 对 MDA-MB-231 细胞 POLG 蛋白表达、线粒体分布和 mRNA 水平的影响

Fig. 3 The effects of ddC on POLG protein expression, mitochondria distribution and mRNA level of MDA-MB-231 cells

A,B: Immunoblots and expression level statistics of POLG protein from total lysate, cytoplasm and mitochondria in MDA-MB-231 cells ($n=3$); C: The quantitative analysis of POLG mRNA level in MDA-MB-231 cells ($n=3$); a: total lysate group; b: cytoplasm group; c: mitochondria group; $^{**}P<0.01$ *vs* 0 μmol/L group.

过 qPCR 实验对 MDA-MB-231 细胞的 mtDNA 拷贝数进行测定。结果(图 4A)显示,ddC 显著降低了 MDA-MB-231 细胞中 mtDNA 的拷贝数($P<0.01$)。采用 Western blot 实验测定 mtDNA 编码的蛋白,观察 ddC 对 MDA-MB-231 细胞的 mtDNA 翻译的影响。结果(图 4B、4C)显示,与对照组相比,1 μmol/L ddC 能明显下调与线粒体能量代谢相关的 NADH1、NADH2、ATPase6、COX-1 和 COX-3 蛋白的表达($P<0.01$)。

2.5 ddC 对线粒体含量和 ATP 水平的影响 为探究 ddC 对 MDA-MB-231 细胞能量代谢功能的影响,该研究通过 Mito Tracker Green 染色和 ATP 定量分别检测细胞的线粒体含量和 ATP 水平。结果如图 5 所示,与对照组相比,1 μmol/L ddC 处理 48 h 后,MDA-MB-231 细胞的线粒体含量($P<0.01$)和 ATP 水平均降低($P<0.01$),差异均有统计学意义。

2.6 POLG 表达对 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力的影响 为探究 POLG 的表达对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的影响,该研究对 MDA-MB-231 细胞进行 POLG 过表达处理(图 6A、6B),观察过表达 POLG 并给予 ddC 后对细胞的迁移和侵袭的影响。结果(图 6C – 6F)显示,相比阴性对照组(negative control, NC),POLG 过表达组(overexpression, OE)细胞的迁移和侵袭能力更强;给予 NC 组细胞 ddC(1 μmol/L)处理后,细胞的迁移、侵袭能力仍被明显抑制,差异均有统计学意义($F=64.53$、134.90, $P<0.01$);而给予 OE 组细胞 ddC(1 μmol/L)处理后,细胞的迁移、侵袭能力未表现出明显抑制,差异无统计学意义,表明 POLG 过表达能够逆转 ddC(1 μmol/L)对细胞迁移、侵袭的抑制作用($F=72.31$、148.60, $P<0.01$)。

3 讨论

TNBC 目前仍以化疗为主要的药物治疗手段,尽管靶向和免疫治疗在 TNBC 的治疗中取得了一定的进展,如多聚 ADP 核糖聚合酶抑制剂、雄激素受

中国知网 https://www.cnki.net

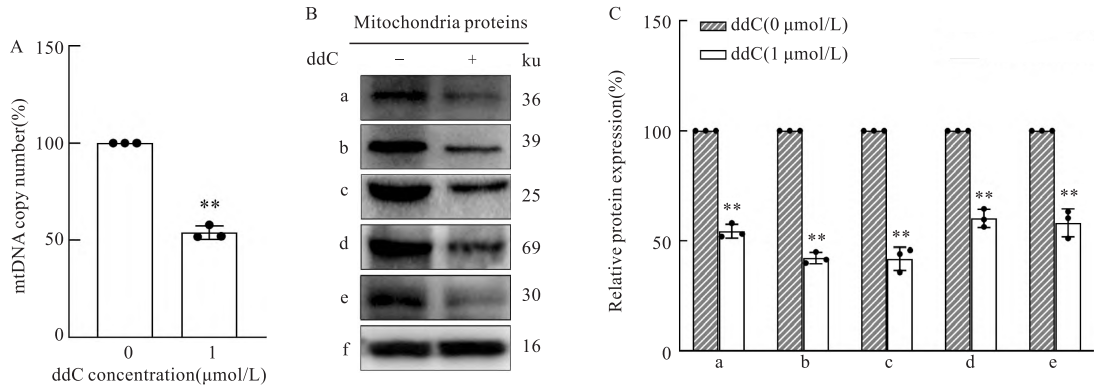

图 4 ddC 对 MDA-MB-231 细胞 mtDNA 拷贝数和 mtDNA 编码的蛋白质的影响

Fig. 4 The effects of ddC on mtDNA copy number and mtDNA-coded proteins in MDA-MB-231 cells

A: The quantitative analysis of mtDNA copy number in MDA-MB-231 cells ($n=3$); B,C: Immunoblots and expression level statistics of mtDNA-coded proteins in MDA-MB-231 cells ($n=3$); a: NADH1 group; b: NADH2 group; c: ATPase6 group; d: COX-1 group; e: COX-3 group; f: TOM20 group (endogenous reference protein); $^{**}P<0.01$ *vs* 0 μmol/L group.

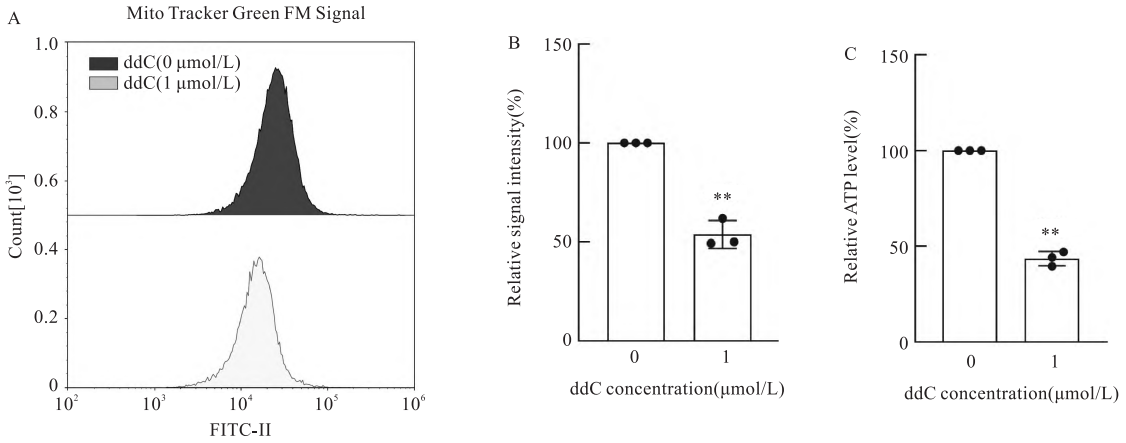

图 5 ddC 对 MDA-MB-231 细胞线粒体和 ATP 含量的影响

Fig. 5 The effects of ddC on mitochondria and ATP contents in MDA-MB-231 cells

A,B: The analysis images of flow cytometry and quantitative analysis in MDA-MB-231 cells ($n=3$); C: The quantitative analysis of ATP level in MDA-MB-231 cells ($n=3$); $^{**}P<0.01$ *vs* 0 μmol/L group.

体拮抗剂、周期蛋白依赖性激酶抑制剂和免疫检查点抑制剂等[7],但大部分药物还处于临床试验阶段,控制 TNBC 转移仍缺乏有效的方法,因此,寻找新的抗 TNBC 转移药物十分必要。

ddC 属于核苷类逆转录酶抑制剂,可竞争性地抑制病毒 DNA 链的合成与延长,临床上主要应用于人类免疫缺陷病毒 HIV-1 的治疗。在接受包括核苷类逆转录酶抑制剂在内的稳定抗 HIV 治疗方案的 HIV 患者中,乳腺癌、结肠癌和前列腺癌的发病率明显降低[8-9]。该研究表明,ddC 对 MDA-MB-231 细胞的迁移和侵袭能力产生抑制作用,但其作用机制仍需进一步阐明。

TNBC 细胞中线粒体含量高与转移呈正相关[10],其在转移过程中通过上调线粒体生物合成增加其代谢水平,提高迁移、侵袭、血管内渗和外溢的能力,进而转移到达内脏器官[3]。肿瘤细胞进行线粒体代谢时,除了为转移至远端组织提供所需的 ATP,活化的线粒体可分布至肌动蛋白细胞骨架,产生局部高水平 ATP,使黏着斑复合物解聚,促进片状伪足的膜运动,增强肿瘤细胞的运动能力[11];局部高水平 ATP 还能激活血管内皮细胞的 P2Y2 受体,促使血管内皮屏障开放,允许肿瘤细胞发生跨内皮细胞迁移,进入血液循环[12]。因此,抑制线粒体生物合成是抗 TNBC 转移的有效途径。该研究表明,ddC 能通过降低 MDA-MB-231 细胞内线粒体含量和 ATP 水平,发挥抗三阴性乳腺癌细胞迁移和侵袭的

中国知网 https://www.cnki.net

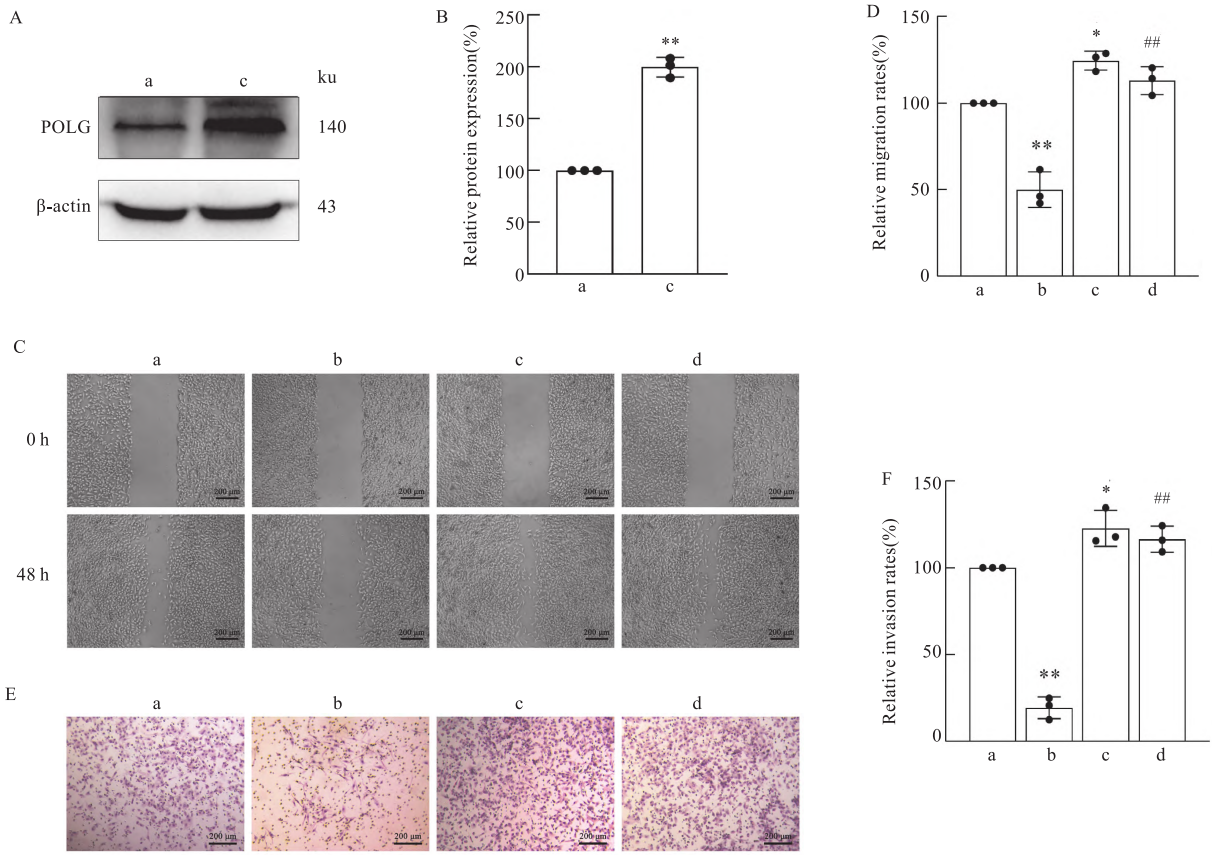

图 6 POLG 表达对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭的影响

Fig. 6 The effects of POLG expression on migration and invasion of MDA-MB-231 cells

A,B: Immunoblots and expression level statistics of POLG proteins of negative control group and overexpression group ($n=3$); C,D: Representative images of cell migration and statistics of migration rates ($n=3$), bar = 200 μm; E,F: Representative HE staining images of Transwell invasion and statistics of invasion rates ($n=3$), bar = 200 μm; a: NC group; b: NC + ddC group; c: OE group; d: OE + ddC group; $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* NC group; $^{\#\#}P<0.01$ *vs* NC + ddC group.

效应。

已有研究[4, 13]表明,POLG 是大多数动物细胞线粒体中发现的唯一 DNA 聚合酶,具有 DNA 聚合酶、3′-5′外切酶和 5′-dRP 裂解酶的活性,其在乳腺癌组织中的表达高于正常乳腺组织,且 POLG 高表达与乳腺癌的易感性、血管侵入和组织学分级呈正相关[14],而敲除或突变 POLG 后,细胞 mtDNA 含量降低,线粒体功能和代谢下调[15]。POLG 的抑制剂能降低人急性髓系白血病细胞中 mtDNA 的含量,下调 mtDNA 编码的呼吸链分子 COX-1 和 COX-3 的 mRNA 和蛋白水平,阻碍线粒体代谢,诱导细胞生长抑制和分化[5]。因此,抑制 POLG 可能是抑制线粒体生物合成,从而抑制 MDA-MB-231 细胞迁移、侵袭的有效途径。该研究表明,POLG 在 MDA-MB-231 细胞中的表达高于正常乳腺上皮 MCF-10A 细胞;ddC 可下调 MDA-MB-231 细胞内 POLG 蛋白和 mRNA 水平,并降低 mtDNA 的含量及其编码蛋白的水平。为进一步确定 POLG 对 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的影响,该实验对 MDA-MB-231 细胞进行 POLG 过表达处理,结果显示过表达 POLG 增强了 MDA-MB-231 细胞迁移、侵袭,且使 ddC 抑制其迁移、侵袭的作用显著降低。综上所述,ddC 可通过下调 POLG 的表达和线粒体分布,降低 mtDNA 的含量及其翻译功能,进而下调线粒体生物合成和 ATP 水平,从而抑制 MDA-MB-231 细胞的迁移、侵袭。

参考文献

[1] Yin L, Duan J J, Bian X W, et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress[J]. Breast Cancer Res, 2020, 22(1):61. doi:10.1186/s13058-020-01296-5.

[2] Nakhjavani M, Samarasinghe R M, Shigdar S. Triple-negative breast cancer brain metastasis: an update on druggable targets, current clinical trials, and future treatment options[J]. Drug Dis-

中国知网 https://www.cnki.net

cov Today, 2022, 27(5): 1298 – 314. doi:10.1016/j.drudis.2022.01.010.

[3] LeBleu V S, O'Connell J T, Gonzalez Herrera K N, et al. PGC-1α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(10): 992 – 1003, 1 – 15. doi:10.1038/ncb3039.

[4] Hudson G, Chinnery P F. Mitochondrial DNA polymerase-gamma and human disease[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15 Spec No 2: R244-52. doi:10.1093/hmg/ddl233.

[5] Liyanage S U, Hurren R, Voisin V, et al. Leveraging increased cytoplasmic nucleoside kinase activity to target mtDNA and oxidative phosphorylation in AML[J]. Blood, 2017, 129(19): 2657 – 66. doi:10.1182/blood – 2016 – 10 – 741207.

[6] Li C, Zhang Y, Liu J, et al. Mitochondrial DNA stress triggers autophagy-dependent ferroptotic death[J]. Autophagy, 2021, 17(4): 948 – 60. doi:10.1080/15548627.2020.1739447.

[7] 汪立刚, 文原梅, 周 亮. 三阴性乳腺癌用药进展[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1509 – 16. doi:10.13748/j.cnki.issn1007 – 7693.2022.11.018.

[7] Wang L G, Wen Y M, Zhou L. Progress in medications for triple negative breast cancer[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2022, 39(11): 1509 – 16. doi:10.13748/j.cnki.issn1007 – 7693.2022.11.018.

[8] Rajurkar M, Parikh A R, Solovyov A, et al. Reverse transcriptase inhibition disrupts repeat element life cycle in colorectal cancer[J]. Cancer Discov, 2022, 12(6): 1462 – 81. doi:10.1158/2159 – 8290.CD – 21 – 1117.

[9] Coghill A E, Engels E A, Schymura M J, et al. Risk of breast, prostate, and colorectal cancer diagnoses among HIV-infected individuals in the United States[J]. J Natl Cancer Inst, 2018, 110(9): 959 – 66. doi:10.1093/jnci/djy010.

[10] Witkiewicz A K, Whitaker-Menezes D, Dasgupta A, et al. Using the "reverse Warburg effect" to identify high-risk breast cancer patients: stromal MCT4 predicts poor clinical outcome in triple-negative breast cancers[J]. Cell Cycle, 2012, 11(6): 1108 – 17. doi:10.4161/cc.11.6.19530.

[11] Caino M C, Ghosh J C, Chae Y C, et al. PI3K therapy reprograms mitochondrial trafficking to fuel tumor cell invasion[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(28): 8638 – 43. doi:10.1073/pnas.1500722112.

[12] Schumacher D, Strilic B, Sivaraj K K, et al. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis *via* P2Y2 receptor[J]. Cancer Cell, 2013, 24(1): 130 – 7. doi:10.1016/j.ccr.2013.05.008.

[13] Singh B, Owens K M, Bajpai P, et al. Mitochondrial DNA polymerase POLG1 disease mutations and germline variants promote tumorigenic properties[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0139846. doi:10.1371/journal.pone.0139846.

[14] Golubickaite I, Ugenskiene R, Korobeinikova E, et al. The impact of mitochondria-related POLG and TFAM variants on breast cancer pathomorphological characteristics and patient outcomes[J]. Biomarkers, 2021, 26(4): 343 – 53. doi:10.1080/1354750X.2021.1900397.

[15] Young M J, Humble M M, DeBalsi K L, et al. POLG2 disease variants: analyses reveal a dominant negative heterodimer, altered mitochondrial localization and impaired respiratory capacity[J]. Hum Mol Genet, 2015, 24(18): 5184 – 97. doi:10.1093/hmg/ddv240.

POLG inhibitor suppresses migration and invasion of triple-negative breast cancer cells *via* blocking mitochondrial biogenesis

Liu Xing, Fan Shuangqin, Yan Xiaomin, Zhao Shijie,
Wang Rong, Shen Xiangchun, Zhou Xue, Zhang Yue, Chen Yan
(*Key Laboratory of Optimal Utilization of Natural Medicinal Resources*,
Guizhou Medical University, *Anshun* 561113)

Abstract ***Objective*** To investigate the effects of zalcitabine (ddC), a mitochondrial DNA polymerase γ (POLG) inhibitor, on the migration, invasion, and to preliminarily explore mitochondrial biogenesis of human triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. ***Methods*** The effect of ddC on cell viability was detected using the MTT assay. The migration and invasion abilities of the cells were evaluated using the cell scratch and Transwell invasion assays. Cell apoptosis was determined using flow cytometry and a V-FITC/PI cell apoptosis detection kit. The protein expression of POLG, NADH dehydrogenase subunit Ⅰ (NADH1), NADH dehydrogenase subunit Ⅱ (NADH2), ATP synthase subunit 6 (ATPase6), cytochrome c oxidase subunit Ⅰ (COX-1) and cytochrome c oxidase subunit Ⅲ (COX-3) were determined using Western blot. The POLG mRNA level and mtDNA copy number were determined using qPCR. The mitochondrial content and ATP levels were determined using MitoTracker Green fluorescent probe staining and an ATP determination kit. MDA-MB-231 cells were transfected with pcDNA3.1-EGFP-POLG plasmids to overexpress POLG. The inhibitory effects of ddC on cell migration and invasion were detected

中国知网 https://www.cnki.net

in POLG-overexpressed MDA-MB-231 cells. ***Results*** POLG expression was higher in MDA-MB-231 cells than in normal mammary epithelial cells (MCF-10A) ($P<0.01$). ddC inhibited cell viability in a dose-dependent manner. ddC inhibited the migration ($P<0.01$) and invasion ($P<0.01$) of MDA-MB-231 cells; however, it displayed no significant inhibitory effects on cell viability in normal mammary epithelial cells (MCF-10A) at the same concentration. ddC downregulated the protein ($P<0.01$) and mRNA ($P<0.01$) levels of POLG, reduced mtDNA copy number ($P<0.01$) and downregulated mtDNA-coded NADH1, NADH2, ATPase6, COX-1 and COX-3 protein expression ($P<0.01$) in MDA-MB-231 cells. Furthermore ddC inhibited mitochondrial content ($P<0.01$) and ATP ($P<0.01$) levels in MDA-MB-231 cells. POLG overexpression increased the migration ($P<0.05$) and invasion ($P<0.05$) abilities of MDA-MB-231 cells, while ddC did not significantly inhibit the migration and invasion abilities of MDA-MB-231 cells overexpressing POLG. ***Conclusion*** ddC downregulates POLG expression in MDA-MB-231 cells and inhibits mitochondrial biogenesis and ATP levels, thereby inhibiting the migration and invasion of MDA-MB-231 cells.

Key words triple-negative breast cancer; migration; invasion; POLG inhibitor; mitochondrial biogenesis; ATP synthesis

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82273957); Guizhou Province Science and Technology Plan Project (Nos. Qiankehe Platform Talent [2021]5632, Qiankehe Foundation-ZK [2023] Keynote 034); Research Project on Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine Science and Technology in Guizhou Province (No. QZYY-2022-025); Science and Technology Fund Project of Guizhou Provincial Health Commission (No. gzwkj2021-519); Guizhou Medical University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (No. S202210660139)

Corresponding author Chen Yan, E-mail: s0710189@sina.com

(上接第 1719 页)

invasion were observed by cell counting kit-8 (CCK-8), cloning, wound healing, Transwell, invasion assays, and the effect of miR-142-5p on angiogenesis was also detected by lumen formation assay. The expression of angiogenesisrelated proteins vascular endothelial growth factor (VEGFA), vascular endothelial calreticulin (VE-cadherin), epithelial calreticulin (E-cadherin), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) was detected by Western blot after overexpression of miR-142-5p. ***Results*** miR-142-5p was lowly expressed in oral tumour tissues and cell lines. CCK-8 and clonogenic assays showed that miR-142-5p was inversely correlated with the proliferation of OSCC cells, wound healing and Transwell assays showed that miR-142-5p was inversely correlated with the migration of OSCC cells, and cell invasion assays showed that miR-142-5p was conversely correlated with the invasion of OSCC cells. Analysis of lumen formation assay showed that overexpression of miR-142-5p reduced the tube length and nodes of HUVECs. Western blot assay showed that up-regulation of miR-142-5p inhibited the VEGFA, VE-cadherin, MMP2, MMP9 expression and promoted E-cadherin expression. ***Conclusion*** Overexpression of miR-142-5p inhibites the proliferative, migratory and invasive effects of oral squamous carcinoma cells as well as angiogenesis, suggesting that miR-142-5p is a novel target for anti-tumour angiogenesis and against oral squamous carcinoma.

Key words non-coding RNA; oral squamous cell carcinoma; miR-142-5p; angiogenesis; proliferation; migration

Fund programs Health Research Project of Anhui Province (No. AHWJ2022b001); Research Project of Anhui Provincial Institute of Translational Medicine (No. 2022zhyx-B03); Basic and Clinical Collaborative Research Enhancement Project of Anhui Medical University (No. 2020xkjT024); Discipline Construction "Fengyuan" Collaborative Projects of College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University (No. 2022xkfyts 04)

Corresponding authors Xu Wenhua, E-mail: xuwenhua@ahmu.edu.cn; Wang Yuanyin, E-mail: wyy19700548@sohu.com

中国知网 https://www.cnki.net