

MiR-124 靶向调控 PKM2 基因表达抑制乳腺癌细胞的增殖和转移

伊丽娜¹,寇新红²,张晨光¹,许文婷¹,雪来提·派祖拉¹,蒋威华¹

(1. 新疆医科大学附属肿瘤医院,新疆 乌鲁木齐 830011;

2. 乌鲁木齐市妇幼保健院,新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要: [目的] 探讨 miR-124 对乳腺癌 MDA-MB231 细胞增殖和转移的影响。[方法] 运用实时荧光定量 PCR 法、免疫印迹实验检测 25 例乳腺癌组织及对应癌旁组织中的 miR-124、丙酮酸激酶同工酶(PKM2)相对表达量。将 pre-miR-124、抗 miR-124 转染至乳腺癌 MDA-MB231 细胞中,同时设置阴性对照组,检测三组细胞中 miR-124、PKM2 基因及蛋白表达量。运用 CCK-8 法及克隆形成实验检测转染后的 MDA-MB231 细胞增殖和转移。[结果] 乳腺癌组织中 miR-124(0.92±0.24)的相对表达量显著少于癌旁组织(1.55±0.28),PKM2 的相对表达量更高(0.69±0.18)。pre-miR-124 转染 MDA-MB231 细胞呈现 miR-124 过表达(0.37±0.08),且其可以反向调控 PKM2 基因(0.52±0.11)及蛋白表达量(0.19±0.04),抑制细胞的增殖与转移能力。抗 miR-124 转染 MDA-MB231 细胞呈现 miR-124 抑制表达(0.06±0.03),其 PKM2 基因(2.09±0.08)及蛋白表达量(0.47±0.10)显著性上升,促进细胞增殖与转移($P<0.05$)。[结论] miR-124 可以通过下调 PKM2 基因的表达,从而抑制乳腺癌 MDA-MB231 细胞的增殖和转移。

关键词: miR-124; PKM2; 乳腺癌; 增殖; 转移

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)09-0757-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.09.B001

MicroRNA-124 Inhibits Proliferation and Metastasis of Breast Cancer Cells by Targeting PKM2 Gene Expression

YI Li-na¹, KOU Xin-hong², ZHANG Chen-guang¹, XU Wen-ting¹, XUE LAITI · Paizula¹, JIANG Wei-hua¹

(1. Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Wulumuqi 830011, China;

2. Urumqi Maternal and Child Health Care Hospital, Wulumuqi 830000, China.)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of microRNA-124 (miR-124) on proliferation and metastasis of breast cancer cells. [Methods] Real-time fluorescence quantitative RT-PCR and immunoblotting were used to detect the relative expression of miR124 and PKM2 mRNA in breast cancer tissues and adjacent tissues of 25 patients with breast cancer. Pre-miR-124 and anti-miR-124 were transfected into breast cancer MDA-MB231 cells, and blank control group was set up to detect the expression of miR-124 and PKM2 mRNA and protein in the three groups. The proliferation and metastasis of transfected MDA-MB231 cells were detected by CCK-8 assay and clonogenic assay. [Results] The relative expression of miR-124(0.92±0.24) in breast cancer was significantly lower than that in adjacent breast tissues (1.55±0.28), and the relative expression of PKM2 mRNA was higher (0.69±0.18). The over-expression of miR-124 in MDA-MB231 cells transfected with pre-miR-124 was 0.37±0.08, and it down regulated expression of PKM2 mRNA (0.52±0.11) and protein (0.19±0.04), and inhibited cell proliferation and metastasis. AntimiR-124 transfected MDA-MB231 cells showed that the expression of miR-124a was inhibited (0.06±0.03), while the expression of PKM2 mRNA(2.09±0.08) and protein expression(0.47±0.10) was increased significantly, and the cell proliferation and metastasis were promoted(all $P<0.05$). [Conclusion] MicroRNA-124 can inhibit the proliferation and metastasis of breast cancer MDA-MB231 cells by down-regulating the expression of PKM2 gene.

Subject words: miR-124; PKM2; breast cancer; proliferation; metastasis

众多研究报道 microRNA (miRNA) 在肿瘤组织

中呈异常表达,从而影响肿瘤细胞的分化、增殖与凋亡^[1]。MicroRNA-124(miR-124)作为广泛存在的 miRNA, 可以通过靶向调控相关基因的表达,从而抑制肿瘤的发展^[2]。本研究从丙酮酸激酶同工酶(PKM2)基因入手,探讨 miR-124 靶向调控该基因对乳腺癌细胞

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2017D01C379)

通信作者: 伊丽娜,主治医师,硕士;新疆医科大学附属肿瘤医院乳腺外科,新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市新市区苏州东街 789 号(830011); E-mail: 114003631@qq.com

收稿日期: 2019-12-13; **修回日期:** 2020-02-27

增殖和转移的影响。

1 资料与方法

1.1 材料

乳腺癌组织：选择 2018 年 6 月至 2019 年 6 月新疆医科大学附属肿瘤医院治疗乳腺癌患者 25 例，取其乳腺癌组织及对应癌旁组织作为研究材料。

仪器和试剂：pre-miR-124、抗 miR-124、无关序列（上海吉玛制药技术有限公司）；脂质体转染试剂、Trizol 试剂、QuantStudio 5 IVD 实时荧光定量 PCR 仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；Odyssey 红外荧光成像仪（美国 LICOR 公司）；PKM2 基因单克隆抗体（美国 Cell Signaling Technology 公司）；CCK-8 试剂盒（上海翊圣生物科技有限公司）。

细胞：本研究采用中国科学院上海细胞库购置的乳腺癌 MDA-MB231 细胞，培养基为上海索尔生物科技有限公司购置的 RPMI-1640 完全培养基。在培养基中加入上海慧颖生物科技有限公司购置的 10% 胎牛血清（FBS），置于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中孵育，每 2d 进行换液，每 3d 进行传代。将 MDA-MB231 细胞接种至 6 孔、12 孔、96 孔细胞培养板上，每孔细胞个数分别为 1×10^4 、 5×10^4 、 2×10^5 ，细胞生长密度达到 70%~80% 时，加入 pre-miR-124 或抗 miR-124 转染，转染操作完全按照试剂盒说明进行，同时保留无关序列作为阴性对照组。

1.2 研究方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测

选择液氮保存的乳腺癌组织样本及传代培养的 MDA-MB231 细胞，提取其 miRNA，严格按照 miRNA 分离提取试剂盒说明进行操作。测定提取的 miRNA 浓度与纯度，选择满足要求的样本。利用 Quant Studio 5 IVD 实时荧光定量 PCR 仪反转录为 cDNA，测定提取 miRNA 浓度与纯度，选择满足要求的样本利用 Quant Studio 5 IVD 实时荧光定量 PCR 仪反转录为 cDNA，miRNA 荧光定量 PCR 检测采用 SYBR® Green I 嵌合荧光法的原理进行 miRNA 荧光定量检测。试剂盒包含 miRNA 荧光定量检测的所有试剂，包括 2×miRNA qPCR Mix 和 Reverse primer。2×miRNA qPCR Mix（含 Sybr Green）是专门为 miRNA 定量检测而研发的新一代预混形式的荧

光定量 PCR 检测试剂，其中 DNA polymerase 采用的是抗体修饰的热启动形式，配合特殊的 Buffer 体系，使反应特异性更好，灵敏度更高，并能在更广的范围内进行准确定量（杭州昊鑫生物），反应条件：25℃ 30min，42℃ 30min，85℃ 5min。将反转录的 cDNA 作为模板，以 U6 snRNA 为内参进行 PCR 扩增，其中 PKM2 上游引物序列为 5'-CGCCTGGACATTGATTCA-3'，下游引物序列为 5'-GTTTCAGACGAGCCACATT-3'；miR-124 上游引物序列为 5'-TAAGGCACGCGGTGAATG-3'，下游引物序列为 5'-TGGTGTCTGGAGTCG-3'。反应条件：95℃ 3min，变性 95℃ 12s，退火 62℃ 40s，行 40 个循环。对实验结果进行相对定量分析。

1.2.2 免疫印迹实验

超声粉碎乳腺癌组织及 MDA-MB231 细胞，于 4℃ 环境下进行离心，离心力 12000×g，离心 1h 后取上清。运用 BCA 法检测 PKM2 蛋白浓度。将玻璃板卡入电泳槽，配置 5% 浓缩胶与 10% 分离胶注入玻璃板间隙中，根据蛋白浓度补充缓冲液，加样后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完成后，切取目的蛋白所在胶区，置于聚偏二氟乙烯（PVDF）上，准备电转仪对其进行转膜。将完成转膜的 PVDF 膜放于 5% 脱脂奶粉溶液中，于 37℃ 环境下摇床封闭 1h，加入一抗孵育，以 PBS 液清洗后加入二抗。以 ECL 液发光，并于暗室中进行 X 线胶片曝光。运用 Odyssey 红外荧光成像仪扫描胶片，测定蛋白条带积分吸光度。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖能力

选择转染过 miR-124 和空载体的 MDA-MB231 细胞及野生型呈对数生长的 MDA-MB231 细胞，以 1ml 0.25% 胰蛋白酶消化，接种于 96 孔细胞培养板，每孔 3000 个细胞，培养 48h，使用酶标仪测量光密度（OD）以评估细胞增殖能力。

1.2.4 克隆形成实验

选择对数生长期，生长状态良好的 MDA-MB231 细胞，弃去原有培养液，以磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗并用 1ml 0.25% 胰蛋白酶消化，将细胞悬于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中统计其数量。明确细胞个数后将其接种于 6 孔细胞培养板，初始密度每孔 200 个细胞，置于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中孵育 2 周。孵育结束后以 PBS 冲洗 2 次，加入 4% 中性甲醇固定细胞并加入 Wright-Giemsa 复合染色液

染色 30min,以流水洗涤并于常温环境下自然干燥。运用显微镜记录细胞克隆数,仅记录大于 50 个细胞的克隆数,克隆形成率计算方式为:克隆形成率=细胞克隆数/接种细胞数×100%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件,计量单位资料以平均数±标准差表示,组间差异以 *t* 检验或方差检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织及癌旁组织中 miR-124、PKM2 相对表达量

乳腺癌组织中 miR-124 的相对 U6 内参的表达量显著性少于癌旁组织,PKM2 相对表达量明显高于癌旁组织,差异具有统计学意义($P<0.05$) (Table 1, Figure 1)。

2.2 MDA-MB231 细胞中 miR-124、PKM2 基因及蛋白表达量

pre-miR-124 转染组 MDA-MB231 细胞中 miR-124 表达水平比阴性对照组高,而 PKM2 基因及蛋白的表达显著性降低($P<0.05$);抗 miR-124 转染组 MDA-MB231 细胞中 miR-124 表达水平受到抑制,表达水平低于阴性对照组,PKM2 基因及蛋白的表达明显增高($P<0.05$) (Table 2, Figure 2)。

Table 1 Comparison of relative expression of miR-124 and PKM2 in breast cancer and adjacent tissues ($\bar{x}\pm s$)

Group	N	miR-124	PKM2
Breast cancer	25	0.92±0.24	0.40±0.11
Adjacent tissues	25	1.55±0.28	0.69±0.18
<i>t</i>		-8.254	-6.874
<i>P</i>		<0.001	<0.001

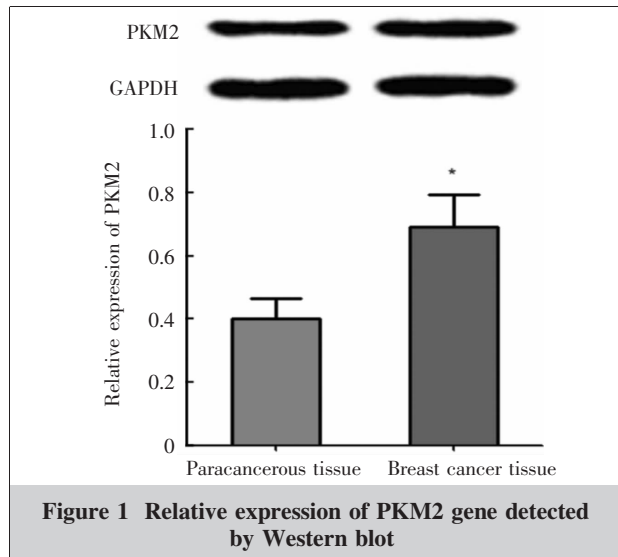
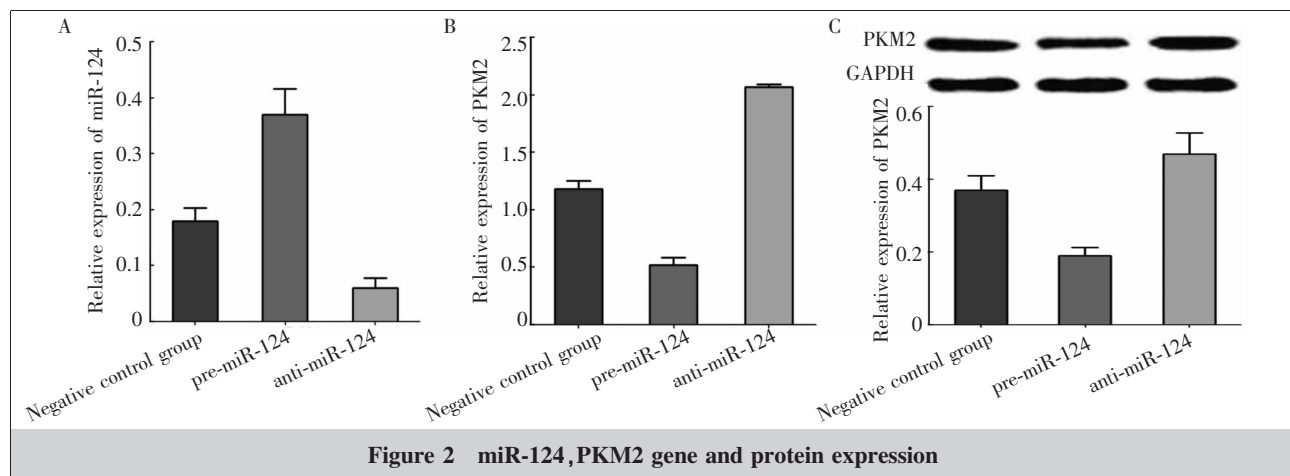


Table 2 Comparison of miR-124, PKM2 gene and protein expression in MDA-MB231 cells of three groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	N	miR-124 (%)	PKM2 gene (%)	PKM2 gene (%)
Negative control group	3	0.18±0.04	1.18±0.13	0.37±0.07
pre-miR-124 transfection group	3	0.37±0.08 ^a	0.52±0.11 ^a	0.19±0.04 ^a
anti-miR-124 transfection group	3	0.06±0.03 ^b	2.09±0.08	0.49±0.04 ^b
<i>t^a</i>		-3.679	6.713	3.867
<i>P^a</i>		0.021	0.003	0.018
<i>t^b</i>		4.157	-10.326	-2.855
<i>P^b</i>		0.014	0.000	0.046

Note: a; the difference between the negative control group and the pre-miR-124 transfection group was significant. b; the difference between the negative control group and the anti-miR-124 transfection group was significant.



2.3 MDA-MB231 细胞体外增殖能力及转移能力

三组 MDA-MB231 细胞采用 CCK-8 法测定其增殖能力,结果显示 pre-miR-124 转染 48h 后,细胞增殖能力受到抑制,OD 值显著性降低,而抗 miR-124a 转染 48h 后,OD 值明显增高,细胞增殖能力强于阴性对照组($P<0.05$)。采用克隆形成实验检测三组 MDA-MB231 细胞转移能力,结果显示 pre-miR-

124 转染组克隆形成率低于空白对照组,而抗 miR-124 转染组克隆形成率高于阴性对照组($P<0.05$) (Table 3, Figure 3~4)。

3 讨论

MicroRNA (miRNA) 是参与转录后基因表达调控的非编码单链 RNA 分子,其在人体内呈不同水平的表达,可以对细胞增殖、分化及凋亡起到调控作用,从而影响包括肿瘤在内众多疾病的发生与发展^[3]。miR-124 作为其中一员,已被证实与宫颈癌、口腔鳞状细胞癌、前列腺癌等疾病相关^[4-5]。而在本研究中,也显示了乳腺癌组织及对应癌旁组织中存在 miR-124 表达,其中乳腺癌组织中 miR-124 显著性低于癌旁组织($P<0.05$)。

丙酮酸激酶(PK)是细胞代谢过程中发挥关键作用的酶,其可以促进糖酵解,且与细胞分化与增殖密切相关。PKM2 作为 PK 的一种同工酶,多是以四聚体形式存在于正常人体细胞中,而有研究发现,PKM2 在恶性肿瘤细胞中表达量会异常上升,且以二聚体形式存在^[6]。本研究利用免疫印迹实验检测了乳腺癌组织及癌旁组织中 PKM2 基因的表达,发现乳腺癌组织中的 PKM2 基因相对表达量高于癌旁组织($P<0.05$),结果与先前研究一致^[6-7]。相关研究发现,PKM2 在卵巢癌、大肠癌和肺癌等肿瘤患者的外周血和肿瘤组织标本中均可见异常高表达,沉默 PKM2 表达可以抑制胶质瘤细胞的增殖和肿瘤形成,且还有学者发现 PKM2 促进大肠癌细胞的增殖与上调 Bcl-xL 基因表达相关。但应当注意的是,PKM2 在乳腺癌发展过程中,是否是 miR-124 的下游靶点,需要进一步进行研究。

近年来研究发现 miRNAs 能够调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、炎症等生物学行为,在肿瘤的发生发展中发挥着必不可少的作用。有学者研究发现了 miR-124 通过靶向调控整合素 $\beta 1$ 的表达抑制口腔鳞状细胞癌的增殖,也可以通过靶向调控 Slug 表达抑制乳腺癌的侵袭。本研究利用脂质体转染试剂将 pre-miR-124a、抗 miR-124 转染至 MDA-MB231 细胞中,并以实时荧光定量 PCR 法、免疫印迹实验检测 miR-124、PKM2 基因及蛋白表达量。研究结果显示,pre-miR-124a 转染 MDA-MB231 细胞呈现 miR-124

Table 3 Comparison of proliferation and metastasis of MDA-MB231 cells in vitro in three groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	N	OD	Cloning formation rate (%)
Negative control group	3		63.68 $\pm$ 2.54
pre-miR-124 transfection group	3	0.28 $\pm$ 0.03	45.07 $\pm$ 2.01 ^a
anti-miR-124 transfection group	3	0.53 $\pm$ 0.09 ^b	80.16 $\pm$ 3.14 ^b
F^a	—	—	9.951
P^a	—	—	0.001
F^b	—	-10.200	-7.068
P^b	—	0.001	0.002

Note: a: significant difference between negative control group and model control group, b: significant difference between negative control group and drug treatment group.

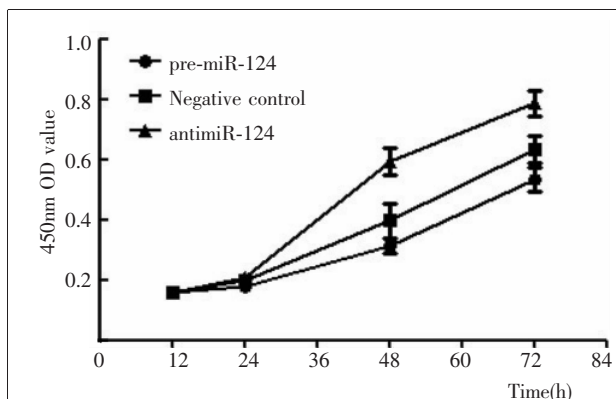


Figure 3 CCK-8 method for cell proliferation

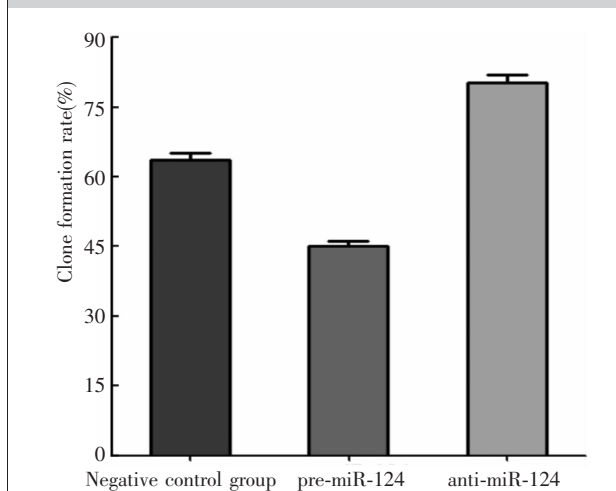


Figure 4 Cell metastasis by clonogenesis in three groups

过表达,且其可以反向调控 PKM2 基因及蛋白表达量;抗 miR-124 转染 MDA-MB231 细胞呈现 miR-124 抑制表达,其 PKM2 基因及蛋白表达量显著性上升,提示 PKM2 基因为 miR-124a 的下游靶点。同时采用 CCK-8 法及克隆形成实验检测转染后的 MDA-MB231 细胞的增殖和转移情况,结果显示,pre-miR-124 转染组细胞增殖能力及克隆形成能力都受到了明显抑制,而抗 miR-124 转染组相比空白对照组细胞增殖能力及克隆形成能力都有明显增强 ($P<0.05$),说明 miR-124 可能是通过靶向调控 PKM2 基因影响乳腺癌增殖与转移。

综上所述,miR-124 可以下调 PKM2 基因的表达,从而抑制乳腺癌 MDA-MB231 细胞的增殖和转移。miR-124 在抗乳腺癌发展过程中可以发挥重要作用,为乳腺癌治疗提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Xu ML,Wang C,Wang N,et al. MALAT1 up-regulates SMYD3 and promotes breast cancer cell proliferation and migration by competing with miR-124 [J]. Journal of China Pharmaceutical University,2019(3):344-351.[徐曼丽,王畅,王楠,等. MALAT1 通过竞争 miR-124 上调 SMYD3 并促进乳腺癌细胞增殖与迁移[J]. 中国药科大学学报,2019(3):344-351.]
- [2] Li JS,Huang AJ,Lin K,et al. MiR-124 targets inhibition of NFATC1 to regulate cartilage differentiation in C3H10T1/2 cells of mice[J]. New Medicine,2018,49(1):36-41.[李斯松,黄爱军,林昆,等. miR-124 靶向抑制 NFATc1 调控小鼠 C3H10T1/2 细胞软骨分化的研究 [J]. 新医学,2018,49(1):36-41.]
- [3] Song X,Kong FY,Zong ZF,et al. miR-124 and miR-142 enhance cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells through repressing autophagy via directly targeting SIRT1[J]. RSC Advances,2019,9(9):5234-5243.
- [4] Yang YC,Chien MH,Liu HY. Nuclear translocation of PKM2/AMPK complex sustains cancer stem cell populations under glucose restriction stress[J]. Cancer Letters,2018,421:28-40.
- [5] Shaghayegh G,Alabsi AM,Ali-Saeed R,et al. Effects of damnacanthol and nordamnacanthol on proliferation, apoptosis,and migration of oral squamous cell carcinoma cells[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp,2017,18(12):3333-3341.
- [6] Guo H,Zhang B,Hu LM. Targeting regulation of SOX11 expression by microRNA-145 and its effect on breast cancer cell proliferation and apoptosis[J]. Journal of Clinical Oncology,2018,23(3):200-205. [郭辉,张斌,胡利民. 微小 RNA-145 靶向调控 SOX11 表达及其对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 临床肿瘤学杂志,2018,23(3):200-205.]
- [7] Yao A,Fan LJ,Huang F,et al. Effects of PKM2 on aerobic glycolysis,proliferation and apoptosis of breast cancer cells [J]. Biotechnology,2018,(3):273-277. [姚奥,范丽娟,黄凤,等. PKM2 对乳腺癌细胞有氧糖酵解、增殖和凋亡的影响[J]. 生物技术,2018,(3):273-277.]