

MiR-374a 通过 PTEN/AKT 信号通路调节乳腺癌细胞的增殖和凋亡

张馨月¹, 陈亮¹, 王华², 殷杰¹, 管义祥¹

(1. 海安市人民医院, 江苏 海安 226600; 2. 南通大学附属医院, 江苏 海安 226000)

摘要: [目的] 探讨 miR-374a 在乳腺癌细胞增殖和凋亡中的作用, 并进一步探讨其机制。[方法] 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测人乳腺癌细胞 MCF-7 及正常人乳腺细胞 Hs 578Bst 的 miR-374a 及 PTEN mRNA 转录水平, Western blot 法测定 MCF-7、Hs 578Bst 组细胞及对照、miR-374a 抑制剂组细胞的 PTEN、p-AKT 蛋白表达变化, 用 CCK-8 法及 TUNEL 法分别观察对照组和 miR-374a 抑制剂组细胞的增殖和凋亡, 并用 Western blot 法检测两组细胞的凋亡相关蛋白 Bcl-2、Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9 表达。[结果] 与人正常乳腺 Hs 578Bst 细胞相比, 乳腺癌 MCF-7 细胞的 miR-374a 表达水平显著性增高 ($P < 0.001$), PTEN mRNA 及蛋白的表达水平显著性降低 ($P < 0.001$), 而 p-AKT 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$)。miR-374a 抑制剂可抑制乳腺癌细胞的增殖 ($P < 0.001$), 并促进其凋亡的发生 ($P < 0.001$), 降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平 ($P < 0.001$) 的同时活化凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 ($P < 0.001$)。miR-374a 通过靶点 PTEN 影响 AKT 通路, miR-374a 组细胞 PTEN mRNA 表达水平显著性降低 ($P < 0.001$), 而 miR-374a 抑制剂处理后, PTEN 蛋白水平显著性升高 ($P < 0.001$), p-AKT 表达降低 ($P < 0.001$)。[结论] miR-374a 在乳腺癌细胞高表达, 并通过调节 PTEN/AKT 信号通路抑制乳腺癌细胞的增殖, 促进凋亡的发生。miR-374a/PTEN/AKT 信号通路有望成为乳腺癌的新治疗靶点。

关键词: 乳腺癌; miR-374a; 增殖; 凋亡; 蛋白酪氨酸磷酸酶基因

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)09-0762-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.09.B002

MicroRNA-374a Regulates Proliferation and Apoptosis of Breast Cancer Cells via PTEN/AKT Signaling Pathway

ZHANG Xin-yue¹, CHEN Liang¹, WANG Hua², YIN Jie¹, GUAN Yi-xiang¹

(1. Hai'an People's Hospital, Hai'an 226600, China;

2. Affiliated Hospital of Nantong University, Hai'an 226000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of microRNA-374a (miR-374a) on the proliferation and apoptosis of breast cancer cells, and its mechanism. [Methods] Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the transcript levels of miR-374a and phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) in human breast cancer MCF-7 cells and normal human breast Hs 578Bst cells. The expression of miR-374a was inhibited by transfection with miR-374a inhibitor. Western blot method was used to detect the changes of PTEN, p-AKT, AKT protein expression in MCF-7 cells after transfection. CCK-8 and TUNEL methods were used to measure the cell proliferation and apoptosis, and the expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2, cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 were detected by Western blot. [Results] Compared with Hs 578Bst cells, the expression of miR-374a in breast cancer MCF-7 cells significantly increased ($P < 0.001$), the expression of PTEN gene and protein significantly decreased ($P < 0.001$), and the protein expression level of p-AKT was significantly increased ($P < 0.001$). The miR-374a inhibitor inhibited the proliferation of breast cancer cells ($P < 0.001$) and promoted the cell apoptosis ($P < 0.001$), and decreased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.001$), meanwhile activated apoptosis-related protein cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 ($P < 0.001$). Compared with control group, PTEN mRNA levels in MCF-7 cells were significantly down-regulated ($P < 0.001$), but when treated with miR-374a inhibitor, the protein level of PTEN was significantly up-regulated ($P < 0.001$), and p-AKT protein expression was significantly down-regulated ($P < 0.001$). [Conclusion] The miR-374a is highly expressed in breast cancer cells, which promotes the proliferation of breast cancer cells and inhibits cell apoptosis by regulating PTEN/AKT signaling pathway. miR-374a/PTEN/AKT signaling pathway is expected to be a new therapeutic target for breast cancer.

Subject words: breast cancer; miR-374a; proliferation; apoptosis; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten

基金项目: 江苏省第五期“333 工程”科研资助项目 (BRA2016187)

通信作者: 陈亮, 住院医师, 本科; 海安市人民医院超声科, 江苏省南通市海安市

中坝中路 17 号 (226600); E-mail: 1192349674@qq.com

收稿日期: 2019-09-03; **修回日期:** 2020-03-11

乳腺癌是女性癌症相关性死亡的主要原因^[1]。越来越多的研究表明, MicroRNA (miRNAs) 是一类内源性非编码小 RNA, 可通过靶向结合 mRNA 的 3' 非编码区 (UTR), 在癌细胞的各种生物学和病理过程中发挥重要作用^[2]。近期研究报道 miR-374a 与多种癌症的发生发展密切相关^[3]。在乳腺癌方面, 研究发现 miR-374a 能够促进乳腺癌转移和进展, 且与不良预后有关^[4-5]。蛋白酪氨酸磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 是一个近年被发现的抑癌基因, 通过介导 AKT 等信号通路的活化, 在多种肿瘤发生发展中扮演着重要角色。Peng 等^[6]发现异甘草素可通过调节 miR-374a/PTEN/AKT 轴来抑制乳腺癌的发生和转移。此外, 还有研究发现异丙酚可通过下调肝癌细胞系中的 miR-374a 表达, 抑制凋亡相关蛋白 Bcl-2, 而增加 Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 蛋白的表达, 从而发挥促凋亡的作用^[7]。我们探讨 miR-374a 在乳腺癌增殖和凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人乳腺癌细胞 MCF-7 及正常人乳腺细胞 Hs 578Bst 购自美国 ATCC, 培养于含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 培养条件维持在 37°C, 5%CO₂, 以适宜细胞密度铺板进行实验。

1.2 试剂

胎牛血清、100U/ml 青霉素/链霉素、RPMI-1640 培养液均购自美国 Gibco, Trizol、Lipofectamine 2000、Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit、Superscript II Reverse Transcriptase 试剂盒、Power SYBR Green PCR Master Mix 均购自美国 Thermo Fisher Scientific, Cell Counting kit-8 试剂盒购自日本 Dojindo, RIPA 强裂解液、BCA 蛋白浓度测定工作液、蛋白 Marker、化学发光显影液均购自中国碧云天, PTEN、AKT-pan、p-AKT、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology, TUNEL 染色试剂盒购自德国 Roche。

1.3 miRNA 抑制剂转染

MCF-1 细胞以适宜密度接种培养于细胞板, 待细胞增长至 70%~80% 时, 在无血清状态下根据 Lipofectamine 2000 说明书进行转染。分组为对照组及 miR-374a 抑制剂组。

1.4 qRT-PCR 检测基因表达

Trizol 法提取细胞 mRNA, 取 10ng RNA 模板按照 Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit 试剂盒说明说进行操作, 逆转录得到 cDNA 后使用 Taqman 探针法检测 miR-374a 表达水平, 以 U6 基因作为内参。另外取 10ng RNA 模板按照 Superscript II reversetranscriptase 试剂盒说明书进行操作, 逆转录得到 cDNA 后扩增目的基因, 以 β -actin 作为内参基因。2^{- $\Delta\Delta Ct$} 法计算目的基因 mRNA 的表达变化倍数, 引物序列见 Table 1。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖与活性

以 8×10³ 个/孔的细胞密度将细胞铺于 96 孔板, 按照分组转染细胞, 转染 24h 后每孔加 10 μ l CCK-8 试剂, 1h 后震荡摇匀在分光光度计 450nm 波长下测定吸光度值。

1.6 Western blot 检测蛋白质表达

收取细胞蛋白前使用 PBS 洗涤细胞, 加入 RIPA 强裂解液。BCA 法测定蛋白浓度, 取将 20 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 湿转法转移蛋白至 PVDF 膜。4°C 孵育 PTEN、AKT-pan、p-AKT、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 抗体过夜, TBST 洗涤后孵育二抗, 随后化学发光成像仪显影。

1.7 TUNEL 染色检测细胞凋亡

根据试剂盒说明书进行操作, 使用荧光显微镜 (Eclipse 80I, Nikon, 日本), 每组随机选取 5 个视野 (400×放大倍数), 观察阳性细胞数。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验分析两组数据间差异。P<0.05 为差异有统计学意义。

Table 1 Primer sequence

Primer	Forward(5'-3')	Reverse(5'-3')
β -actin	CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	GCTGTCACCTTCACCGTTCC
PTEN	CCCAGTCAGAGCGCTATGTGTAT	GTTCCGCCACTGAACATTGG
miR-374a	ATTTTAGAGGAGGGGATT	TCACTTTAGCAGGCACAC
U6	CTCGCTTCGGCAGCAC	AACGCTTCACGAATTTGCGT

2 结果

2.1 miR-374a、PTEN/AKT 信号通路基因表达水平变化

qPCR 结果(Figure 1A)发现,与正常人正常乳腺细胞相比,乳腺癌细胞的 miR-374a mRNA 表达水平上调 ($P < 0.001$), PTEN mRNA 表达水平下调 ($P < 0.001$)。Western blot(Figure 1B)显示,与正常细胞相比,PTEN 蛋白表达减少 ($P < 0.001$),而 p-AKT 蛋白表达增多 ($P < 0.01$)。

2.2 miR-374a 抑制剂对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖的影响

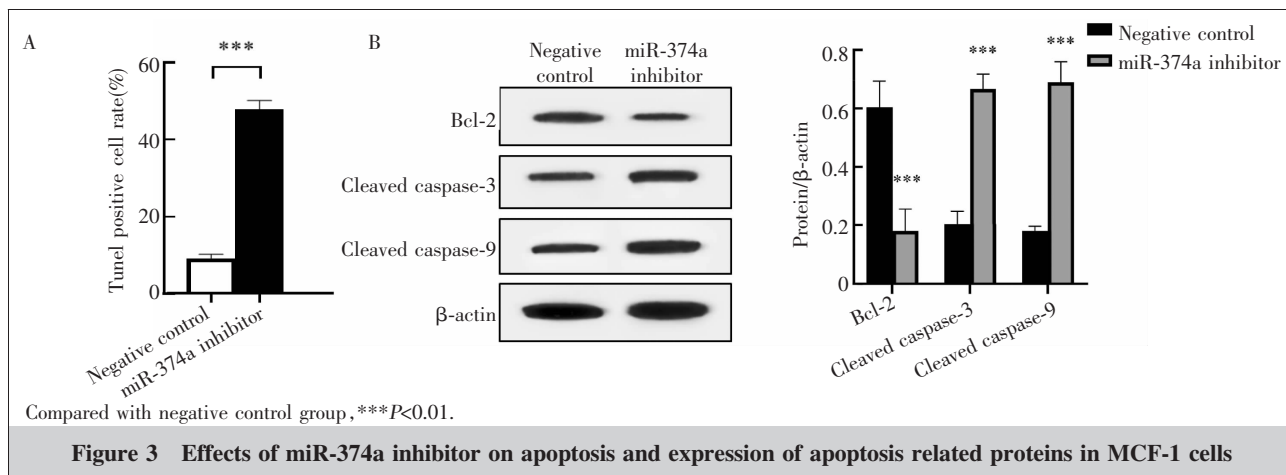
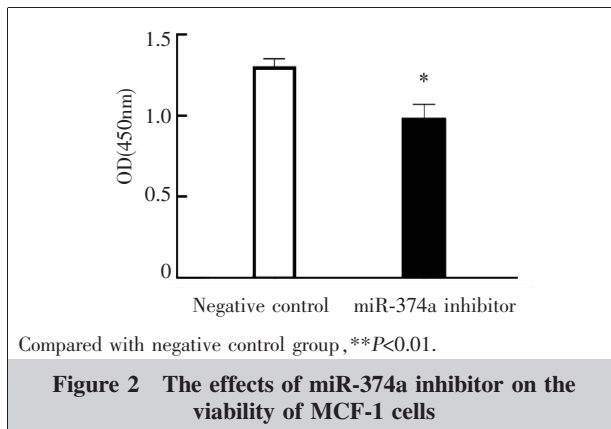
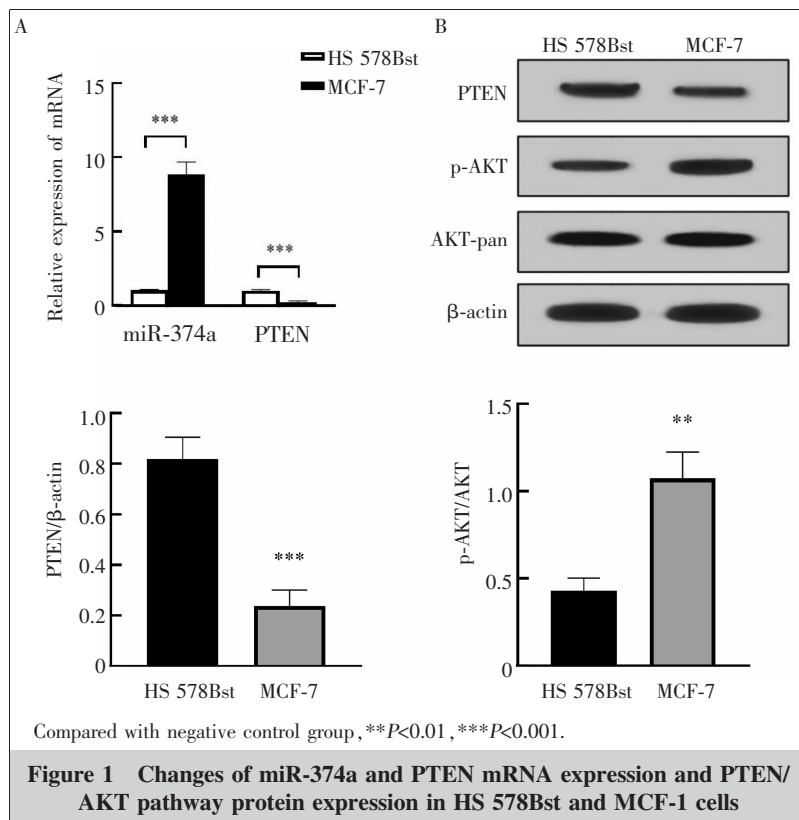
与对照组相比,miR-374a 抑制剂组细胞增殖率显著性降低 ($P < 0.01$) (Figure 2)。

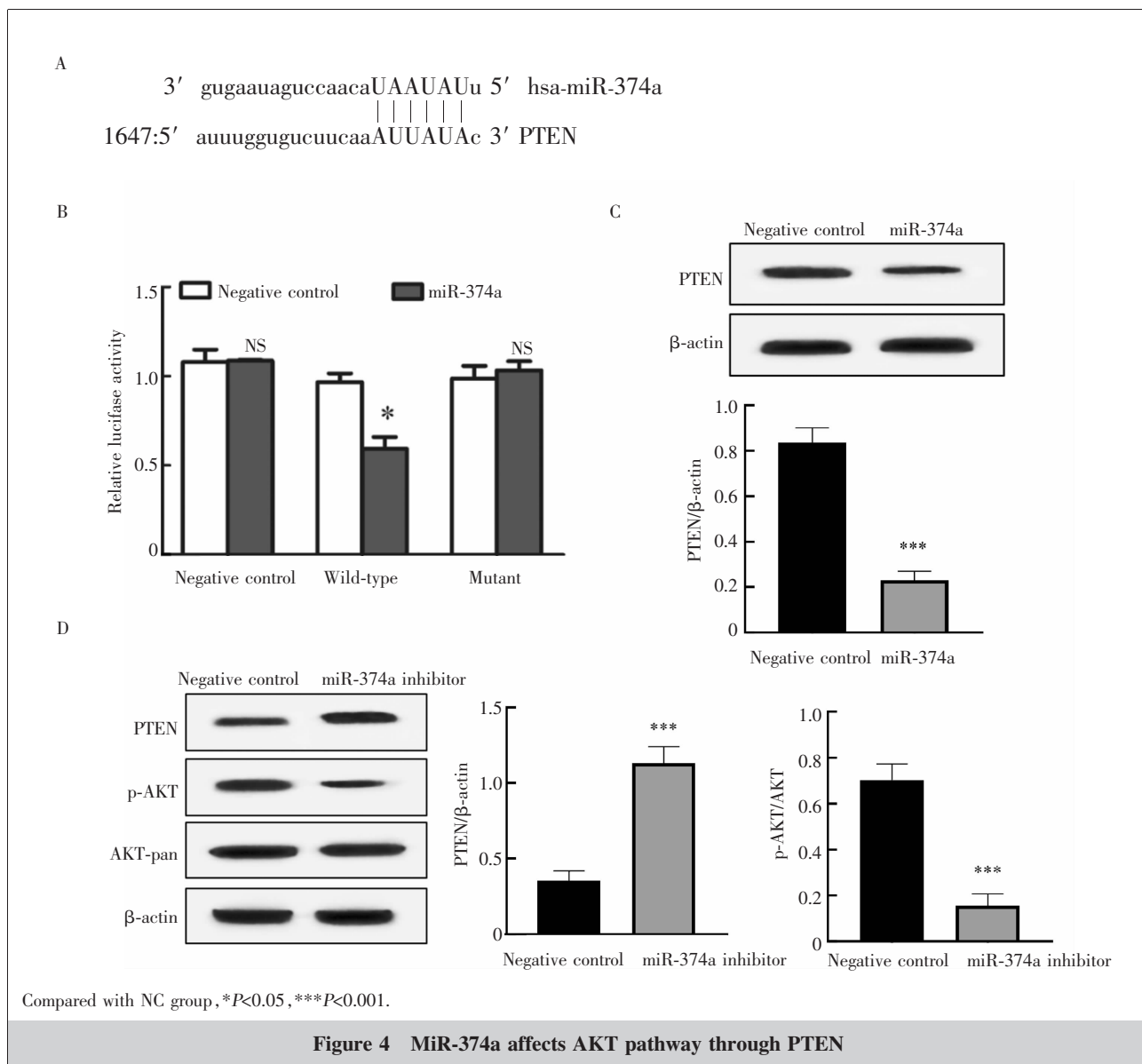
2.3 miR-374a 抑制剂对乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的影响

与对照组相比,miR-374a 抑制剂组细胞的凋亡细胞数明显增加 ($P < 0.001$),且凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9 均有不同程度的活化 ($P < 0.001$) (Figure 3)。

2.4 miR-374a 通过靶点 PTEN 影响 AKT 通路

通过 microRNA.org 预测发现 PTEN 可能为 miR-374a 的一个靶点(Figure 4A),并用荧光素酶报告基因进行了验证 (Figure 4B),且 PTEN 蛋白水平可被 miR-374a 抑制(Figure 4C)。miR-374a 抑制剂处理后,PTEN 蛋白水平显著性升高 ($P < 0.001$),p-AKT 表达降低 ($P < 0.001$) (Figure 4D)。





3 讨论

越来越多的证据表明,miRNA 在乳腺癌细胞增殖和凋亡调控中发挥着重要的作用,一些 miRNA 在乳腺癌中发现表达增加。miR-492 过表达通过抑制 SOX7 表达,miR-96 通过靶向结合 RECK 促进乳腺癌细胞增殖^[8];miRNA-183-5p 可通过靶向结合 PD-CD4 抑制乳腺癌细胞凋亡^[9]。在本研究中,我们重点关注 miR-374a。miR-374a 在不同类型的人类癌症中既可以作为肿瘤抑制因子,也可以作为肿瘤启动子^[10]。本文发现 miR-374a 在乳腺癌细胞中表达显著性上调。此外,miR-374a 抑制剂显著性抑制了乳腺

癌细胞的增殖,并促进其凋亡,提示 miR-374a 在乳腺癌中发挥着肿瘤启动子的作用。

本研究首先探究了 miR-374a 对乳腺癌的增殖和凋亡细胞的调控能力。在细胞增殖功能方面,通过 CCK-8 实验发现抑制乳腺癌细胞表达 miR-374a,可抑制细胞的增殖活性;在细胞凋亡功能方面,Tunel 染色显示抑制 MCF-1 细胞表达 miR-374a 可增加其凋亡细胞数。已知 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白的平衡调节线粒体凋亡途径,Bcl-2 是 Bcl-2 家族的关键蛋白,在调节线粒体外膜通透性方面发挥着重要作用^[11]。而促凋亡蛋白则可通过诱导线粒体膜孔的开放和降低线粒体跨膜电位来启动凋亡,从

而激活 Caspase 级联反应。当 Caspase-9 被激活后, 可通过激活 Caspase-3 导致细胞凋亡^[12]。研究发现, 与对照组相比, 通过使用 miR-374a 抑制剂可明显减少 MCF-7 细胞的抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 而增加促凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3 和 Cleaved Caspase-9 表达。

在 miR-374a 对乳腺癌细胞发挥影响的机制方面, 我们检索文献发现已有研究证实 miR-374a/PTEN/AKT 轴参与了乳腺癌的发生和转移^[6]。已知 PTEN 蛋白是一种脂质磷酸酶, 可通过拮抗酪氨酸激酶、抑制磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/AKT 通路的活性而抑制肿瘤的发生发展。PTEN 缺失是乳腺癌发生的一个常见事件。我们通过预测工具发现 PTEN 有可能是 miR-384a 的一个作用靶点, 并通过荧光素酶报告基因证实了此观点。在后续研究中, 发现 miR-374a 可促进抑制 PTEN 蛋白的表达, 使用 miR-374a 抑制剂则可抑制 AKT 及 PI3K 信号通路的活化, 以上结果提示 miR-374a 可在乳腺癌细胞中发挥促增殖和抗凋亡作用, 该作用可能是通过调节 PTEN/AKT 通路实现的。该发现与 Peng 等^[6]证实 miR-374a/PTEN/AKT 轴具有调节乳腺癌的发生和转移作用的结果一致。此外, 在非小细胞肺癌中 Zhao 等^[13]同样发现 miR-374a 可通过激活 PTEN 及 AKT 发挥促增殖、迁移和侵袭作用。然而, 鉴于目前关于 miR-374a 在癌症中发挥作用的研究较少, 因此其在癌症中扮演的角色和机制仍需进一步探究。

综上所述, 乳腺癌细胞高表达 miR-374a, 而 PTEN 表达较低; miR-374a 抑制剂可抑制乳腺癌细胞增殖, 并促进凋亡反应的发生; miR-374a 抑制剂可能通过调节 PTEN/AKT 通路发挥上述作用。miR-374a 有望成为治疗乳腺癌的新靶点。

参考文献:

- [1] Ligibel JA. Could the women's health initiative breathe new life into breast cancer prevention?[J]. J Clin Oncol, 2020, Mar 9.
- [2] Kanchan RK, Siddiqui JA, Mahapatra S, et al. microRNAs orchestrate pathophysiology of breast cancer brain metastasis; advances in therapy[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1):29.
- [3] Bian H, Zhou Y, Zhou D, et al. The latest progress on miR-374 and its functional implications in physiological and pathological processes[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5):3063-3076.
- [4] Zhang J, He Y, Yu Y, et al. Upregulation of miR-374a promotes tumor metastasis and progression by downregulating LACTB and predicts unfavorable prognosis in breast cancer[J]. Cancer Med, 2018, May 23.
- [5] Cai J, Guan H, Fang L, et al. MicroRNA-374a activates Wnt/beta-catenin signaling to promote breast cancer metastasis[J]. J Clin Invest, 2013, 123(2):566-579.
- [6] Peng F, Tang H, Liu P, et al. Isoliquiritigenin modulates miR-374a/PTEN/Akt axis to suppress breast cancer tumorigenesis and metastasis[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):9022.
- [7] Liu SQ, Zhang JL, Li ZW, et al. Propofol inhibits proliferation, migration, invasion and promotes apoptosis through down-regulating miR-374a in hepatocarcinoma cell lines[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(6):2099-2110.
- [8] Zhang J, Kong X, Li J, et al. miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 31(3):1357-1363.
- [9] Cheng Y, Xiang G, Meng Y, et al. MiRNA-183-5p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human breast cancer by targeting the PDCD4[J]. Reprod Biol, 2016, 16(3):225-233.
- [10] Wu H, Liu Y, Shu XO, et al. MiR-374a suppresses lung adenocarcinoma cell proliferation and invasion by targeting TGFA gene expression[J]. Carcinogenesis, 2016, 37(6):567-575.
- [11] Huang L, Jiang WW, Zhu LJ, et al. γ -oryzanol suppresses cell apoptosis by inhibiting reactive oxygen species-mediated mitochondrial signaling pathway in H2O2-stimulated L02 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121:109554.
- [12] Jiao CW, Chen W, Tan XP, et al. Ganoderma lucidum spore oil induces apoptosis of breast cancer cells in vitro and in vivo by activating caspase-3 and caspase-9 [J]. J Ethnopharmacol, 2020, 247:112256.
- [13] Zhao M, Xu P, Liu Z, et al. Dual roles of miR-374a by modulated c-Jun respectively targets CCND1-inducing PI3K/AKT signal and PTEN-suppressing Wnt/ β -catenin signaling in non-small-cell lung cancer[J]. Cell Death Dis, 2018, 23(9):78.