

# 探究靶向*FTO*下调的miRNA及其对乳腺癌细胞生物学行为的调节

陆双欣 淮瑞平 陈孟旸 李钢 杨慧 熊莉丽\*

(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

**摘要** 该文筛选了靶向抑制*FTO*的miRNA并探究其乳腺癌细胞生物学行为的影响。通过生物信息学的方法筛选出了影响乳腺癌患者生存的m6A去甲基化酶*FTO*后, 再通过CCK-8实验验证了*FTO*的下调能够抑制乳腺癌细胞的增殖, 随后预测出靶向*FTO*的miRNA——miR-504-5p, RT-qPCR和Western blot实验检测了乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231中miRNA-504-5p对*FTO*表达水平的影响, 双荧光素酶报告基因实验验证了miRNA-504-5p与*FTO*的结合关系, 采用CCK-8、Transwell小室实验、流式细胞术等探究了miRNA-504-5p mimic(类似物)通过调控*FTO*对乳腺癌细胞增殖、迁移、凋亡和细胞周期的影响。实验结果表明, 低表达*FTO*的乳腺癌患者相较于高表达*FTO*的乳腺癌患者具有更高的生存概率, miRNA-504-5p作为潜在的靶向*FTO*的miRNA, 能够在mRNA与蛋白水平抑制*FTO*的表达, 并且miR-504-5p在*FTO* 3'-UTR的5' 927–5' 933位点处与*FTO*靶向结合, miR-504-5p能够通过下调*FTO*抑制乳腺癌细胞的增殖与迁移并促进乳腺癌细胞的凋亡, 使细胞阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。综上所述, 该研究发现了miR-504-5p能下调*FTO*的表达, 抑制乳腺癌细胞的增殖与迁移, 促进乳腺癌细胞的凋亡, 使乳腺癌细胞的细胞周期阻滞。这可以为乳腺癌的分子机制探究与治疗提供潜在的参考价值。

**关键词** 乳腺癌; miRNA; *FTO*; 甲基化

## Identification of miRNA Targeting *FTO*-Downregulation and Regulating Biological Behavior of Breast Cancer Cells

LU Shuangxin, HUAI Ruiping, CHEN Mengyang, LI Gang, YANG Hui, XIONG Lili\*

(School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

**Abstract** This study aimed to identify miRNA that targeted *FTO* and its role in biological behaviors of breast cancer cells. Bioinformatic analysis was used to screen out the survival-related RNA methylation regulator *FTO*. CCK-8 assay was performed to evaluate the proliferation of breast cancer cells with *FTO*-downregulation. miR-504-5p was subsequently predicted as a potential miRNA targeting *FTO*. qRT-PCR and Western blot were applied to investigate the effects of miR-504-5p on the expression of *FTO*. Dual-luciferase reporter assay was utilized to validate the relationship between miR-504-5p and *FTO*. CCK-8 assay, Transwell assay and flow cytometry were performed to evaluate the influence of miR-504-5p on the proliferation, migration, apoptosis and cell cycle distribu-

收稿日期: 2021-03-06 接受日期: 2021-05-08

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 31200999)、四川省科技计划项目(批准号: 18YYJC0551)和中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 2682020ZT112)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18215533008, E-mail: lxiong@swjtu.edu.cn

Received: March 6, 2021 Accepted: May 8, 2021

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31200999), the Sichuan Science and Technology Department (Grant No.18YYJC0551) and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (Grant No.2682020ZT112)

\*Corresponding author. Tel: +86-18215533008, E-mail: lxiong@swjtu.edu.cn

tion of breast cancer cells. The results indicated that FTO low-expressed breast cancer patients had more favorable survival rate than the FTO high-expressed breast cancer patients. miR-504-5p was able to down-regulate the expression of FTO mRNA or protein and it binded with FTO in the position of 5 927–5 933 of FTO 3'-UTR. miR-504-5p attenuated the proliferation and migration, meanwhile promoted the apoptosis of breast cancer cells, blocked the cell cycles in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. In summary, this study found that miR-504-5p could down-regulate the expression of FTO, inhibit the proliferation and migration of breast cancer cells, promote the apoptosis of breast cancer cells, and block the cell cycle of breast cancer cells. This study may provide potential reference values for molecular mechanism study and therapy of breast cancer.

**Keywords** breast cancer; miRNA; FTO; methylation

乳腺癌是全球女性常见的一种恶性肿瘤<sup>[1]</sup>, 得益于早期诊断和有效且系统的治疗, 乳腺癌在发达国家的死亡率有所下降, 然而在南美、非洲、亚洲等地区, 乳腺癌的发生率仍然呈上升趋势<sup>[2-3]</sup>。RNA腺嘌呤核苷酸N6位上的甲基化, 即N6-甲基腺嘌呤(N6-methyladenosine, m6A), 是真核生物mRNA中最丰富的内部修饰<sup>[4]</sup>。大量研究表明, m6A修饰具有调节基因表达的能力, m6A水平的改变会影响癌症进展, 包括维持诱导血管生成、促进侵袭和转移、维持细胞增殖等。生物体内的m6A主要是由三类调节酶即m6A甲基化酶(METTL3、METTL14、WTAP等)、m6A去甲基化酶(FTO、ALKBH5)以及m6A识别酶(YTHDF1-3、YTHDC1-2等)来调控的, 因此, m6A的失调常伴随着m6A调节酶的失调<sup>[5-7]</sup>。miRNA(microRNA)是一类长度在22个核苷酸左右的没有编码蛋白能力的小RNA<sup>[8]</sup>, 通过与靶向互补的mRNA的3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)结合引起mRNA的降解或翻译抑制, 从而影响着细胞分化、细胞增殖等生物学活动, 人类癌症中的miRNA表达失调, 影响着癌症的发生与发展<sup>[9]</sup>。2015年, ALARCÓN等<sup>[10]</sup>发现, m6A修饰影响miRNA的生物形成过程, 提示了m6A与miRNA之间可能存在着某些关系, 这样的调控机制可能决定着细胞命运, 影响到癌症进展。本研究旨在探究乳腺癌中miRNA与其靶向的m6A调节酶之间的关系, 探究其相互作用机制对乳腺癌生物学行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 乳腺癌细胞系MCF-7、MDA-MB-231与人肾上皮细胞系293T获取于四川大学华西医院。

1.1.2 主要试剂 主要试剂包括: DMEM培养基(美国HyClone公司)、胎牛血清(以色列Biological Industries公司)、TRIzol<sup>®</sup> reagent(美国Invitrogen公司)、miRNA mimic及阴性对照和miRNA逆转录试剂盒(广州锐博生物技术有限公司)、siRNA(上海吉玛制药技术有限公司)、兔抗FTO抗体(美国Abcam公司)、鼠抗GAPDH抗体(美国Abcam公司)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗鼠IgG(北京博奥森生物技术有限公司)、Lipofectamine<sup>™</sup> 3000(lipo3000)转染试剂盒(美国Invitrogen公司)、CCK-8试剂盒(美国APEX-BIO公司)、细胞周期检测试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司)、Transwell小室(美国Corning公司)、Annexin V-APC/PI细胞凋亡试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。双荧光素酶报告基因试剂盒、RT-qPCR试剂盒ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix与逆转录试剂盒HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。RT-qPCR引物均交由擎科生物公司合成(表1)。

### 1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 通过UCSC Xena(<https://xenabrowser.net/datapages/>)下载TCGA数据库中乳腺癌患者样本中m6A相关调节酶的基因表达数据及其临床数据。人类基因组注释文件Homo\_sapiens.GRCh38.94.chr.gtf.gz下载于<http://asia.ensembl.org/index.html>。通过R语言对转录组数据进行注释并提取出m6A相关调节酶在不同乳腺癌患者中的表达信息。通过R包“survival”及“survminer”进行生存分析和作图。通过TargetScan、MiRanda、DIANA-microT三个数据库预测靶向FTO的miRNA并取交集得到共同预测出来的miRNA。

1.2.2 细胞培养 MCF-7、MDA-MB-231和293T

表1 本研究中所采用的的引物及siRNA序列  
Table 1 Primer and siRNA sequences in present study

基因 Gene	正义链(5'→3') Forward (5'→3')	反义链(5'→3') Reverse (5'→3')
<i>FTO</i>	ACT TGG CTC CCT TAT CTG ACC	TGT GCA GTG TGA GAA AGG CTT
<i>GAPDH</i>	TTG CAA CCG GGA AGG AAA TG	GGA CTG TGG TCA TGA GTC CT
<i>FTO</i> 3'-UTR1	AGC TTC CAT TTT TCG CTA GGC	TGC AGA CAG GCA AAC AGA TCT
MUT1	AAG TAC TAA AGC CAG TCT ATT TCA AGG GGA GGG A	GAC TGG CTT TAG TAC TTA GAC ATT CAG AGT CAA TAA ACA ATT G
<i>FTO</i> 3'-UTR2	GCC GTG GCT TAT AAC TCA TCC	AAA CAA TCA CTG CAG CCC TT
MUT2	CCC AAC CAA AAT CAC GCT GAG AGG GAT CTC GG	GCG TGA TTT TGG TTG GGA GCA GAG GAG GGA AG
siRNA1	GCA GCA UAC AAC GUA ACU UTT	AAG UUA CGU UGU AUG CUG CTT
siRNA2	GCU GUG CUU CAU GAA GUU ATT	UAA CUU CAU GAA GCA CAG CTT
Negative control (NC)	UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT	ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT

细胞系均置于37 °C、5%二氧化碳培养箱中培养, 定期换液, 细胞长至80~90%时进行细胞传代。

1.2.3 miR-504-5p mimic与siRNA转染 取对数生长期细胞接种到24孔板中, 置于37 °C培养箱中孵育, 于孵育24 h内待细胞生长至密度为70%~80%时转染siRNA或miRNA mimic。在转染前1 h, 将24孔板中的培养基换成无血清培养基, 按照每个孔板所需miRNA mimic/siRNA浓度, 取一定体积的miRNA mimic加入到预先装好一定体积DMEM的EP管中, 37 °C孵育5 min, 取适量体积lipo3000加入到预先装好一定体积DMEM的EP管中, 37 °C孵育5 min后将lipo3000与miRNA mimic混合, 用移液器轻柔混匀, 静置15 min。将复合物转染至24孔板, 转染6 h后将DMEM换成含胎牛血清的DMEM培养基。

1.2.4 RT-qPCR检测*FTO* mRNA表达水平 按照TRIzol® reagent试剂盒说明书提取总RNA, miRNA通过Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Primer试剂盒提供的逆转录引物进行逆转, 总RNA根据HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒进行逆转录合成cDNA, 采用SYBR Green I荧光法进行RT-qPCR反应。

1.2.5 Western blot实验检测*FTO*蛋白表达水平 按照RIPA试剂盒说明提取蛋白, 通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定并计算蛋白浓度。按照蛋白样品: SDS上样缓冲液为4:1的比例混合, 100 °C变性8 min。按照计算得到的蛋白浓度, 每个孔加入30 μg蛋白样品、5 μL蛋白marker, 跑胶结束后, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜, 用含5%脱脂奶粉的TBST摇床室温封闭2 h, 加入一抗(与TBST的比例为1:5 000)于4 °C孵

育过夜。TBST洗膜3次后, 加入二抗(与TBST的比例为1:2 500)室温孵育2 h, TBST洗膜后加入ECL化学发光液进行显影分析。

1.2.6 荧光素酶报告基因法检测miR-504-5p与*FTO*的结合活性 根据TargetScan预测出来的miR-504-5p与*FTO* 3'-UTR的两个结合位点, 构建包含有*FTO* 3'-UTR的两个pmirGLO野生型质粒(WT1与WT2), 再根据诺唯赞官网CE Disign工具设计定点突变引物。按照Mut Express MultiS Fast Mutagenesis Kit V2试剂盒说明书构建突变质粒(MUT1和MUT2), 质粒构建成功后将miR-NC与miR-504-5p mimics共转染到293T细胞, 转染48 h后, 按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明处理细胞, 酶标仪检测荧光强度。

1.2.7 CCK-8实验检测细胞增殖 取对数生长期的细胞接种于96孔板, 每个孔加入100 μL的胎牛血清培养基, 在培养24 h内待细胞生长至密度为70%~80%时进行siRNA或miRNA mimic转染, 按照需求分别于转染0、24、48、72 h时, 弃原培养基, 避光条件下于无菌操作台下每孔加入培养基与CCK-8试剂比例为9:1的混合液100 μL, 锡箔纸覆盖后于细胞培养箱中室温孵育3 h, 酶标仪测定波长为450 nm处的吸光度值。

1.2.8 Transwell小室检测细胞迁移 取对数生长期的细胞接种于24孔板, 细胞汇合至80%时转染miRNA mimic。转染24 h后, 使用胰酶消化收集细胞, 使用DMEM重悬, Transwell上室加入200 μL细胞悬液, 下室加入600 μL含10%胎牛血清的培养基, 培养箱中培养24 h。弃上下室培养液, PBS润洗3次后, 使

用棉签擦拭, 去除未迁移细胞, 下室加入800  $\mu\text{L}$  甲醇, 固定30 min, 风干, 使用0.1%结晶紫固定30 min后, 使用PBS润洗3次, 风干, 于倒置显微镜中观察并拍照。

**1.2.9 流式细胞术检测细胞周期** 取对数生长期细胞接种于6孔板, 在接种24 h内进行miRNA mimic转染, 转染48 h后, 使用胰酶进行消化收集细胞, 并调整细胞数至 $1 \times 10^6$  细胞/mL。然后用PBS润洗2次, 1 200 r/min离心5 min, 收集沉淀, 再使用70%乙醇重悬细胞, 于4  $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置2 h, 使用PBS洗去固定液, 加入提前配制好的PI/RNase A染色工作液, 避光放置40 min, 上机检测。

**1.2.10 流式细胞术检测细胞凋亡** 取对数生长期的细胞接种于6孔板, 24 h以内进行miRNA mimic转染, 细胞转染48 h后, 用不含EDTA的胰酶消化收集, 使用无钙PBS润洗2次, 加入500  $\mu\text{L}$  Binding Buffer重悬细胞, 依次加入5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC、5  $\mu\text{L}$  PI溶液, 混匀, 室温避光反应15 min后, 于流式细胞仪观察和检测。

**1.2.11 统计学方法** 通过GraphPad Prism 8.0.2进行统计学分析, 实验均重复3次, 独立样本数据两两比较用*t*检验进行分析,  $P > 0.05$ 表示没有显著性差异,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ 表示显著差异和极显著差异, 具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生物信息学分析筛选m6A调节酶

生存分析结果显示, 如图1A, *FTO*高表达的乳腺癌患者, 相对于*FTO*低表达的患者, 具有更低的生存概率( $P < 0.05$ ), 其他m6A调节酶的表达水平与乳腺癌病人的生存情况没有出现显著的相关性(图1B~图1L), 因此我们选择*FTO*作为下一步实验的研究对象。

### 2.2 下调*FTO*抑制乳腺癌细胞的增殖

qRT-PCR结果(图2A和图2B)与Western blot结果(图2C和图2D)显示, 转染siRNA后, 与阴性对照组相比, *FTO*的mRNA与蛋白水平出现了下调, 说明转染成功。CCK-8实验显示, 与NC组相比, 在MCF-7细胞中, 转染siRNA后的24、48 h细胞增殖受到不同水平的抑制, 而在72 h时, 细胞增殖水平与NC组没有呈现出显著的差别, 甚至略微超过了NC组的细胞增殖水平, 我们推测有可能是96孔板中的细胞, 尤其是NC组的细胞, 在生长72 h后, 细胞生长过密, 空间受限, 会出现细胞代谢物的累积、死细胞增加的情况,

所以对存活细胞的生长产生一定的影响(图2E)。而在MDA-MB-231细胞转染siRNA后的24、48、72 h均能引起细胞增殖水平的下降(图2F)。

### 2.3 miR-504-5p靶向*FTO*的验证

TargetScan、MiRanda、DIANA-microT数据库均显示, miR-504-5p是潜在的可能靶向*FTO*的miRNA, 其中TargetScan数据库预测的miR-504-5p与*FTO*的两个结合位点如图3A和图3B所示。qRT-PCR结果(图3C和图3D)与Western blot结果(图3E和图3F)显示, 转染miR-504-5p后, *FTO*的蛋白表达水平出现下降。根据TargetScan数据库给出的miR-504-5p与*FTO*的两个结合位点, 我们成功构建了两个野生型质粒和两个对应的突变质粒, 将质粒与miR-504-5p或NC共转染到293T细胞系后, 发现miR-504-5p+WT1组相对于NC+WT1组, 荧光强度出现了显著下降, 而MUT1组荧光强度没有出现显著变化, 说明miR-504-5p能够在结合位点1靶向*FTO*并且使*FTO*的mRNA水平发生下降, 而miR-504-5p+WT2组相对于NC+WT2组, 荧光强度没有发生变化, 说明miR-504-5p没有在结合位点2与*FTO*结合(图3G)。因此, 荧光素酶报告实验证明了miR-504-5p能靶向*FTO*, 并且在结合位点1处与*FTO*靶向结合的。

### 2.4 上调miR-504-5p能够抑制乳腺癌细胞的增殖

CCK-8实验结果显示, MCF-7细胞在转染miR-504-5p mimic后与NC组相比, 在24、48、72 h的增殖能力发生了显著下降(图4A,  $P < 0.01$ ), 同时, MDA-MB-231细胞的增殖能力在转染后的48、72 h出现显著下降(图4B,  $P < 0.05$ )。

### 2.5 上调miR-504-5p能够抑制乳腺癌细胞的迁移

Transwell小室迁移实验检测MDA-MB-231细胞转染miR-NC与miR-504-5p mimic后细胞的迁移情况, 结果显示, 与NC组相比, 转染miR-504-5p后, 细胞的迁移水平出现下降(图5)。

### 2.6 上调miR-504-5p能够促进乳腺癌细胞的凋亡

流式细胞术检测MDA-MB-231细胞转染NC与miR-504-5p mimic后的细胞凋亡, 结果显示, 与NC组相比, 转染miR-504-5p mimic 48 h后, 早期凋亡细胞(Q1-LR)和晚期凋亡、坏死细胞(Q1-UR)的水平都比NC组高(图6), 说明miR-504-5p能促进乳腺癌细胞凋亡。

### 2.7 上调miR-504-5p能够阻滞乳腺癌细胞的生长周期

通过流式细胞术检测 miR-504-5p 对 MDA-

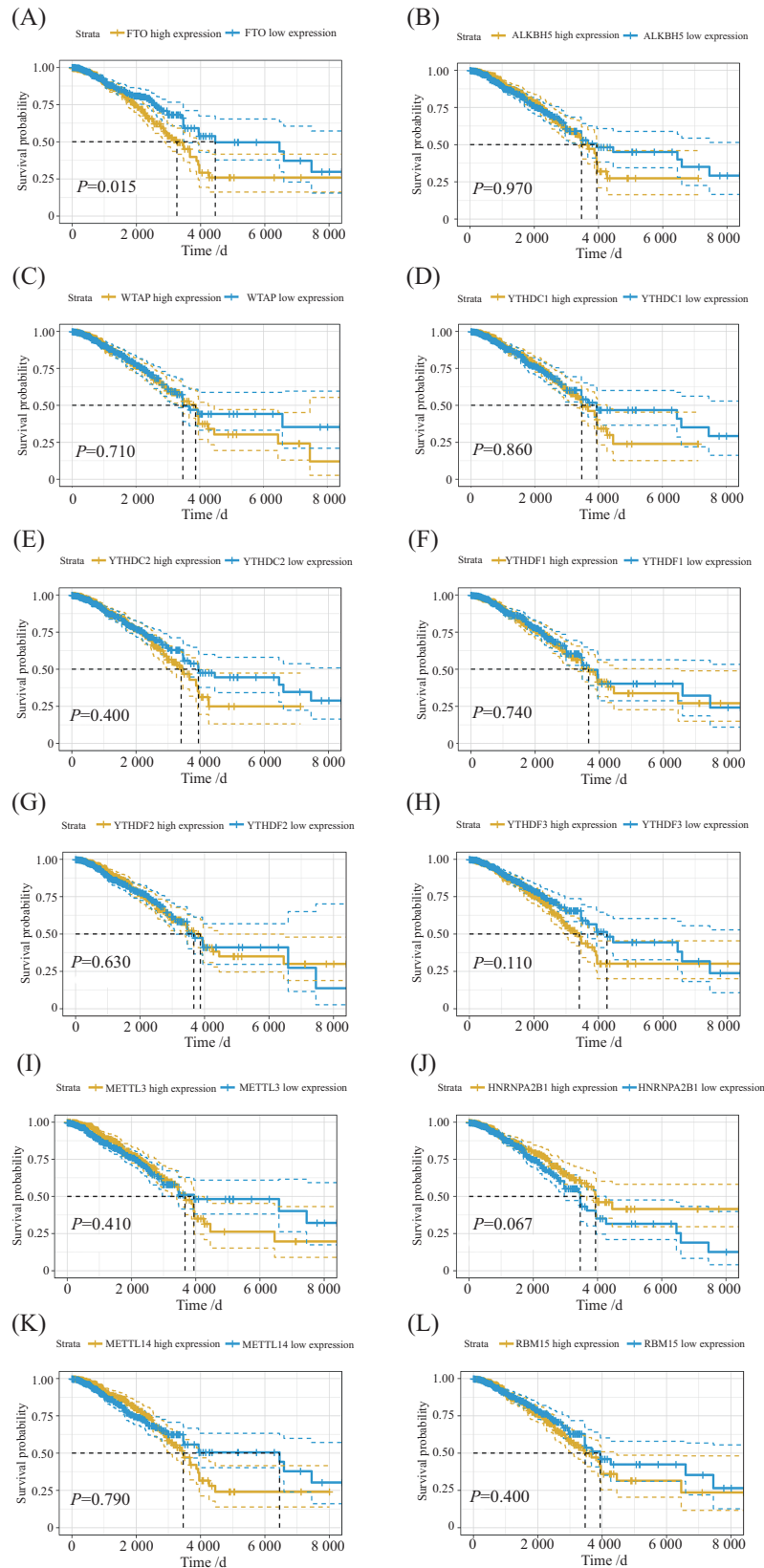
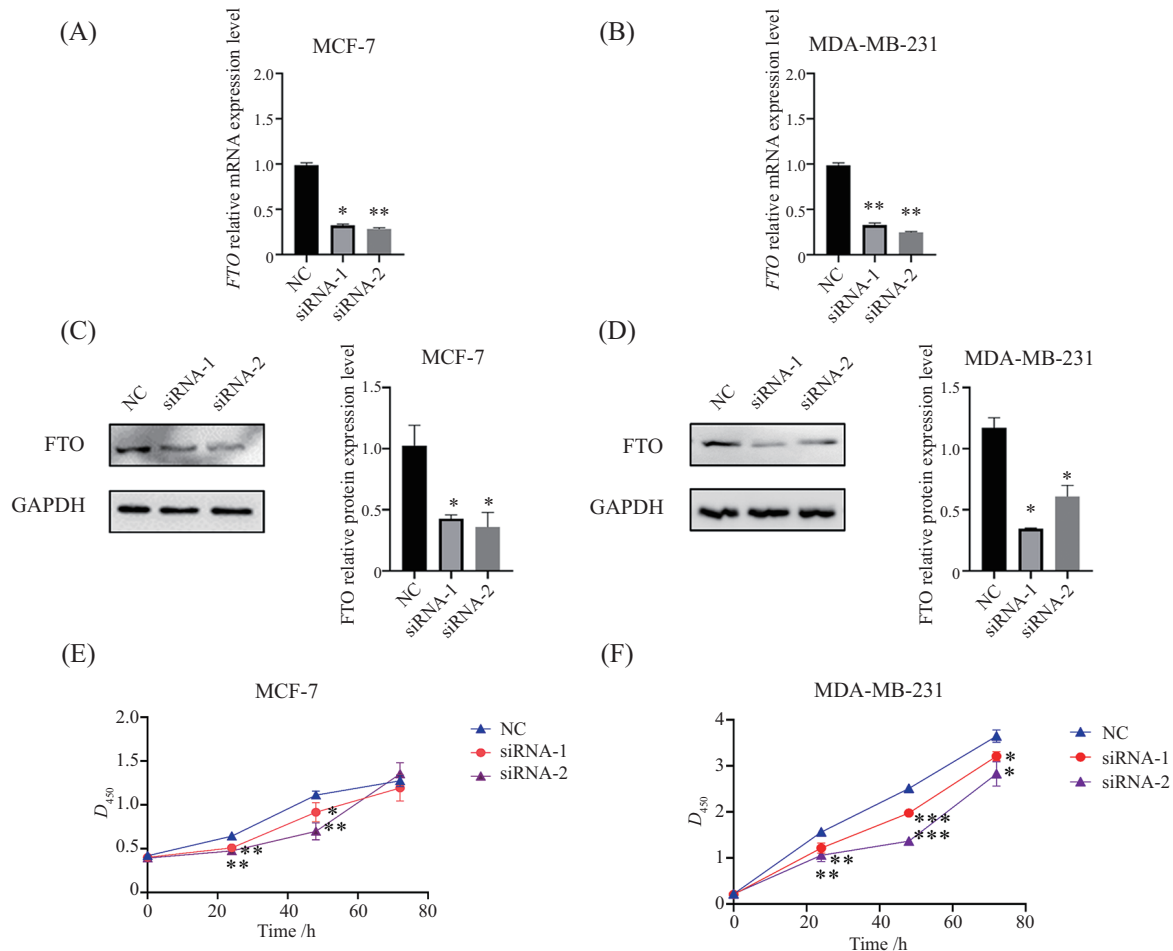


图1 Kaplan-Meier曲线比较m6A调节酶(A~L: FTO、ALKBH5、WTAP、YTHDC1、YTHDC2、YTHDF1、YTHDF2、YTHDF3、METTL3、HNRNPA2B1、METTL14、RBM15)高表达与低表达的乳腺癌患者的总体生存率  
 Fig.1 Kaplan-Meier plots compare of the overall survival rates of breast cancer patients with high and low-expression of m6A enzyme (A-L: FTO, ALKBH5, WTAP, YTHDC1, YTHDC2, YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, METTL3, HNRNPA2B1, METTL14, RBM15)



A、B: 在乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231转染siRNA后qRT-PCR检测*FTO*的mRNA表达水平; C、D: 在乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231转染siRNA后Western blot检测*FTO*的蛋白表达水平; E、F: CCK-8检测在MCF-7和MDA-MB-231细胞转染siRNA后细胞增殖情况。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与阴性对照组比较。

A,B: qRT-PCR was applied to detect the mRNA expression level of *FTO* in MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with siRNAs; C,D: Western blot was performed to detect the protein expression level of *FTO* in MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with siRNAs; E,F: CCK-8 assay was used to evaluate the proliferation of MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with siRNAs. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NC group.

图2 下调*FTO*抑制乳腺癌细胞的增殖

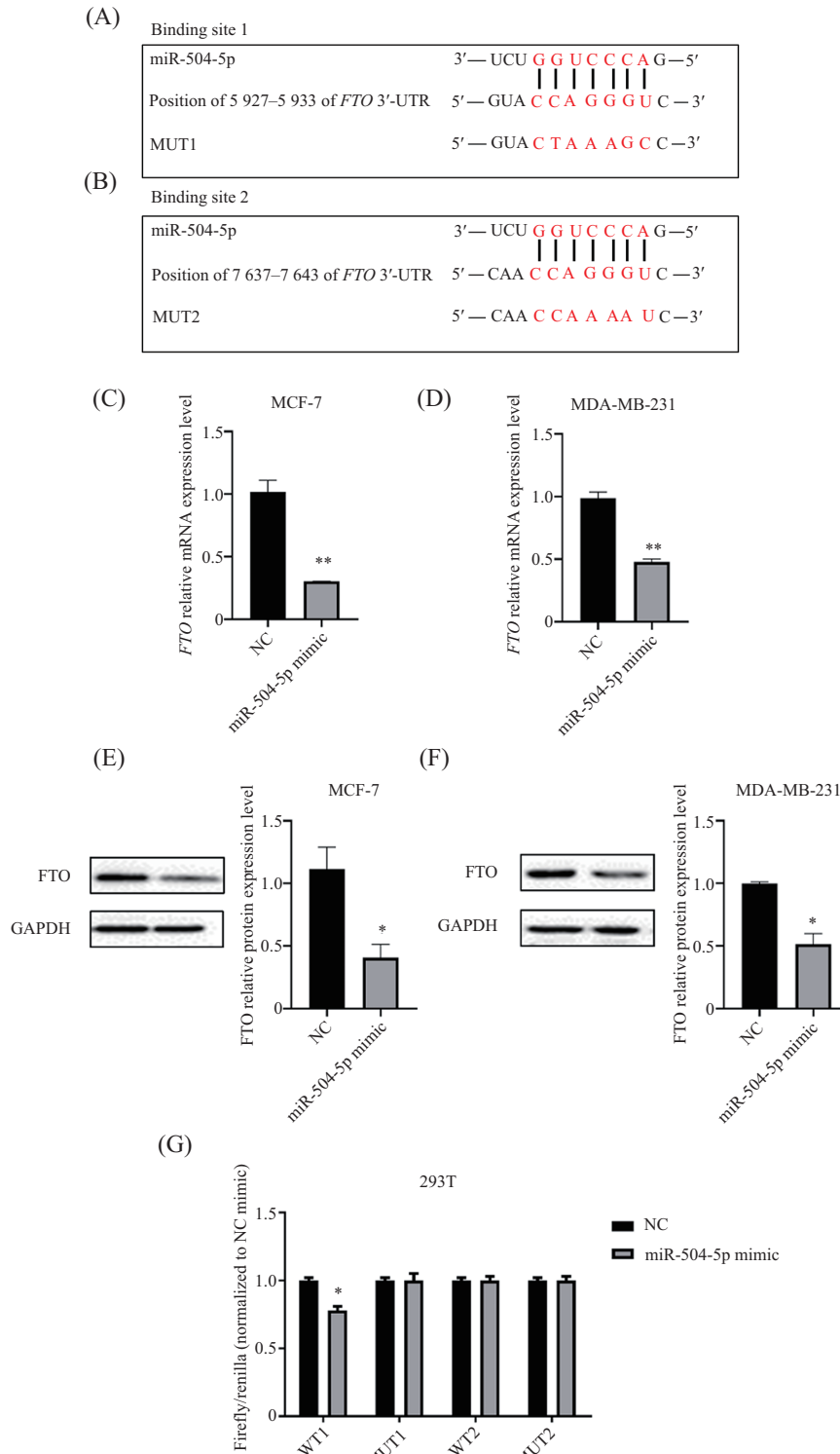
Fig.2 Down-regulation of *FTO* inhibits the proliferation of breast cancer cells

MB-231细胞周期的影响, 转染NC与miR-504-5p mimic 48 h后, 结果显示, 与NC组相比, 转染miR-504-5p mimic后 $G_0/G_1$ 期的细胞比例升高,  $G_2/M$ 与S期细胞的比例下降, 细胞增殖被阻滞在 $G_0/G_1$ 期(图7)。

### 3 讨论

乳腺癌是具有高度异质性的一种癌症, 耐药性、复发转移也给乳腺癌的治疗带来了挑战<sup>[11]</sup>, 和DNA甲基化与组蛋白修饰一样, m6A是生物体内一种重要的表观遗传修饰, m6A的失调与癌症的发生发展密切相关<sup>[12]</sup>。miRNA是影响多种癌症包括乳腺癌的发生发展的小RNA分子, 被认为在癌症的诊断、预后与治疗中有着巨大的潜力, 研究已经证实

了miRNA在乳腺癌中的表达失调与不同的临床病理特征如癌症分期、受体状态和存活率有关, 然而miRNA与靶基因之间“多对一”、“一对多”的复杂关系给miRNA在临床上的应用带来了难度, 因此, 更详细全面地了解miRNA与靶基因之间的关系以及miRNA对重要通路的影响是非常有必要的<sup>[13-14]</sup>。自从m6A被报道能够影响miRNA的生物形成后, 关于m6A与miRNA之间调控关系的研究才逐渐多了起来, 然而在乳腺癌中关于miRNA与m6A调节酶之间的分子机制及其对乳腺癌发生发展的作用却鲜有报道。因此, 探究乳腺癌中的关键m6A调节酶, 阐明m6A调节酶与相应miRNA之间的调控关系及其对乳腺癌细胞生物学活性的影响是非常具有研究意义的。

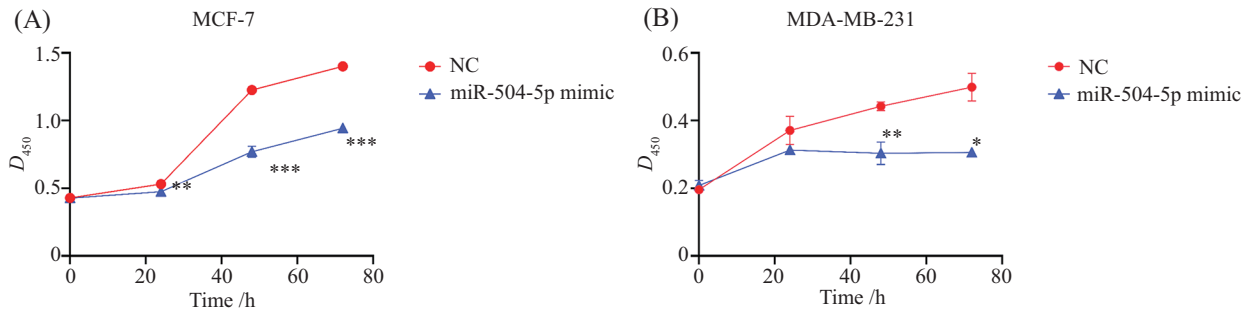


A、B: TargetScan数据库预测出的miR-504-5p与*FTO*的两个结合位点及其突变位点; C、D: 在乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231转染miR-504-5p mimic后qRT-PCR检测*FTO*的表达水平; E、F: 在乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231转染miR-504-5p mimic后Western blot检测*FTO*的蛋白表达水平; G: 双荧光素酶报告实验验证miR-504-5p与*FTO*的结合关系。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与阴性对照组比较。红色碱基代表结合位点。

A,B: binding sites and mutation sites of miR-504-5p with *FTO* were predicted by TargetScan; C,D: qRT-PCR was used to detect the expression level of *FTO* in MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with miR-504-5p mimic; E,F: Western blot was used to detected the *FTO* expression level in MCF-7 and MDA-MB-231 cells transfected with miR-504-5p mimic; G: Dual-luciferase reporter assay was used to validate the binding relationship between miR-504-5p and *FTO*. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group. Red bases represent binding sites.

图3 *FTO*是miR-504-5p的靶基因

Fig.3 *FTO* is the target gene of miR-504-5p

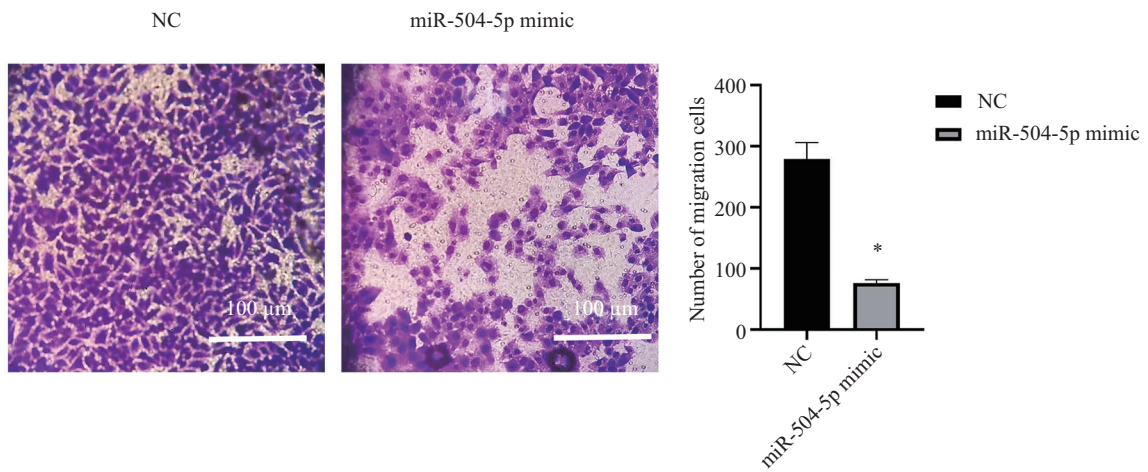


A、B: CCK-8实验检测转染miR-504-5p mimic后乳腺癌细胞系的增殖情况。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与阴性对照组比较。

A,B: CCK-8 assay was used to detect the proliferation of breast cancer cells transfected with miR-504-5p mimic. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NC group.

图4 miR-504-5p的上调能够抑制乳腺癌细胞的增殖

Fig.4 Up-regulation of miR-504-5p inhibits the proliferation of breast cancer cells



\* $P < 0.05$ , 与阴性对照组比较。

\* $P < 0.05$  vs NC group.

图5 miR-504-5p的上调能够抑制乳腺癌细胞的迁移

Fig.5 Upregulation of miR-504-5p inhibits the migration of breast cancer cells

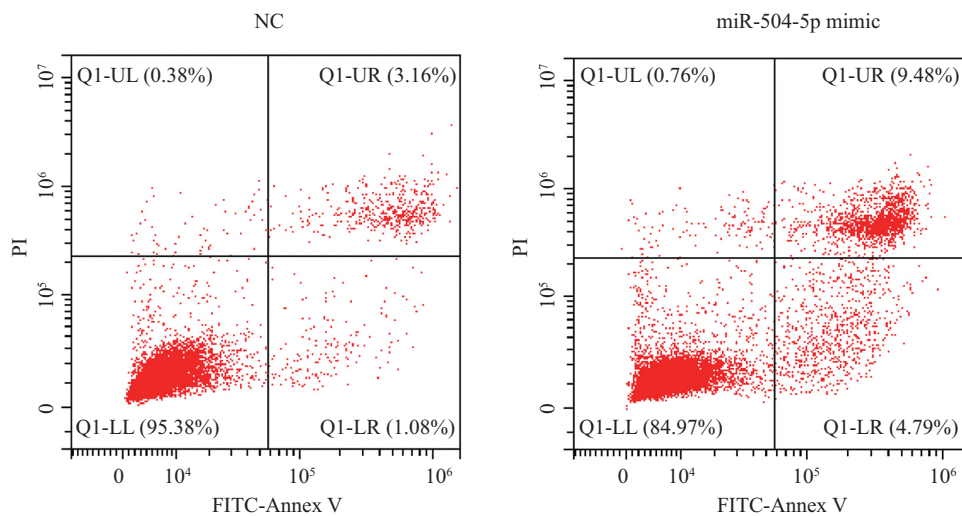


图6 过表达miR-504-5p能促进乳腺癌细胞凋亡

Fig.6 Overexpression of miR-504-5p promotes the apoptosis of breast cancer cells



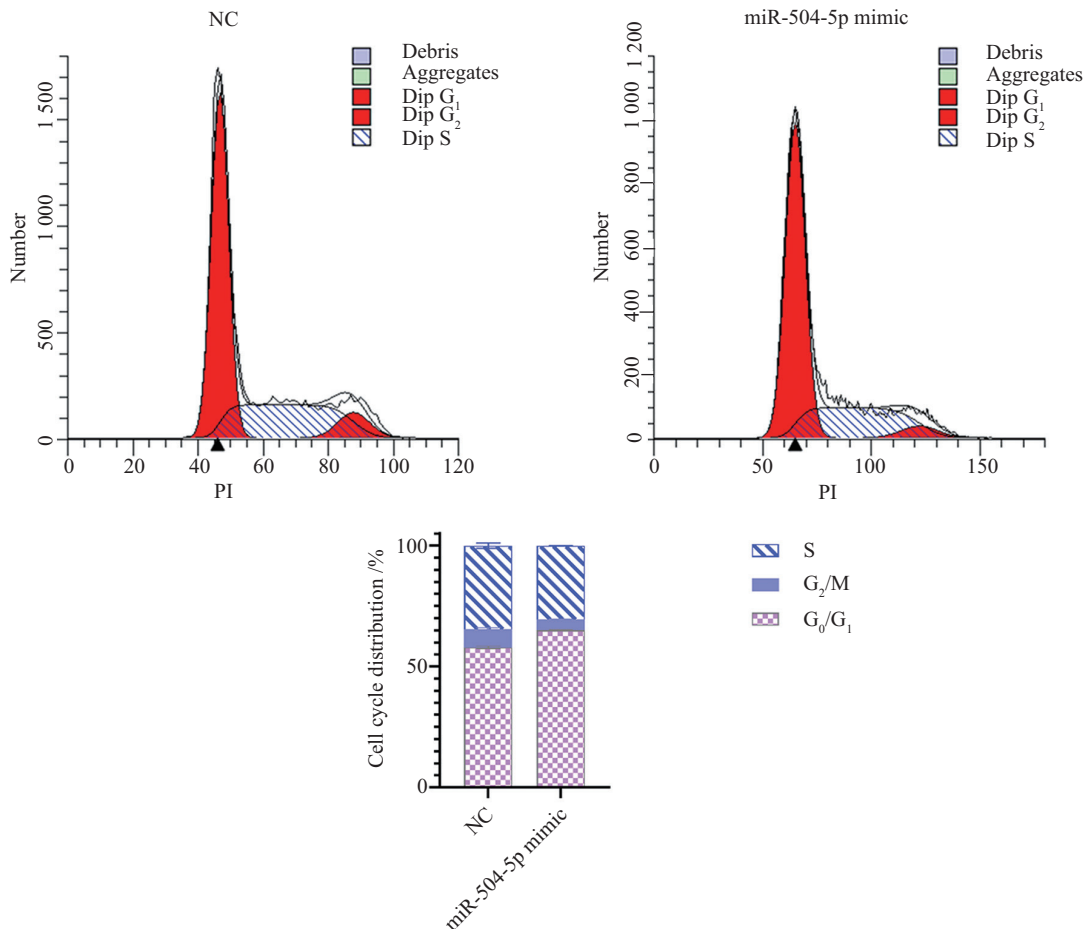


图7 上调miR-504-5p可以促进乳腺癌细胞的细胞周期阻滞

Fig.7 Upregulation of miR-504-5p blocks the cell cycle of breast cancer cells

在本研究中, 我们通过前期的生物信息学分析发现, m6A去甲基化酶FTO可能影响着乳腺癌患者的生存, CCK-8实验表明, FTO水平的下调可以抑制乳腺癌细胞的增殖能力。FTO起初作为一个体重与脂肪形成相关的蛋白为人们熟知, 而临床资料和流行病学研究已经将肥胖列为患乳腺癌的一个风险因素<sup>[15-16]</sup>。有研究发现, FTO在乳腺癌组织中的表达高于乳腺增生组织, 并且乳腺癌患者在接受新辅助化疗之后FTO的表达水平发生了下调<sup>[17]</sup>, FTO可以通过调节肿瘤抑制因子*BNIP3*(*BCL2*/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3) mRNA上的m6A水平从而抑制*BNIP3*的表达, 起到促进乳腺癌细胞增殖的作用。GHOLAMALIZADEH等<sup>[18]</sup>发现, FTO可以激活PI3K/Akt信号通路并促进雌激素受体阳性乳腺癌患者的乳腺癌细胞增殖, 这与我们的前期分析基本一致, 认为FTO可以促进乳腺癌的进展, 因此, 我们选择FTO作为下一步的研究对象。

通过TargetScan、MiRanda、DIANA-microT数据库, 我们筛选出了miR-504-5p作为潜在的靶向*FTO*的miRNA, 双荧光素酶报告基因实验验证了miR-504-5p与*FTO*的靶向结合关系以及阐明了miR-504-5p与*FTO*的结合位点, miR-504-5p此前被报道在乳腺癌中能够靶向结合染色质解旋酶DNA结合蛋白1基因(chromodomain helicase/ATPase DNA binding protein 1-like gene), 从而抑制乳腺癌细胞侵袭, 因此是乳腺癌发生发展中的关键miRNA<sup>[19]</sup>。通过CCK-8实验、Transwell小室实验、流式细胞术等发现, 在乳腺癌细胞中miR-504-5p水平的提高可以抑制细胞的增殖与迁移并促进细胞的凋亡, 细胞被阻滞在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期。

综上所述, 本研究发现了miRNA-504-5p能够通过靶向调节FTO, 且抑制乳腺癌细胞的生物学活性, 为乳腺癌的分子机制探究和临床诊断提供新的视角及参考, 但是, miR-504-5p通过FTO影响乳腺癌细胞活

性的分子机制尚不明晰。CAO等<sup>[20]</sup>发现, 在乳腺癌中, miRNA let-7g可以靶向m6A甲基化酶*METTL3*的3'-UTR来调节*METTL3*的表达水平, 而乙肝病毒X蛋白结合蛋白(hepatitis B X interacting protein, HBXIP)通过抑制let-7g来促进*METTL3*水平的上调, *METTL3*又可以通过m6A修饰促进HBXIP的表达, 从而形成HBXIP/let-7g/*METTL3*/HBXIP的正反馈回路, 影响着乳腺癌的进展。基于此我们猜测, miR-504-5p与*FTO*及其靶基因之间可能也存在类似HBXIP/miR-504-5p/*FTO*/HBXIP的回路调节, 另外, HBXIP与*FTO*的相关性, *METTL3*对HBXIP m6A水平的调节是否能被*FTO*影响, miR-504-5p是否能介导*FTO*对PI3K/Akt信号通路调控, 对这些分子机制的研究将更深入地揭示乳腺癌的发生发展过程。我们的下一步工作将对miR-504-5p靶向*FTO*后影响乳腺癌细胞增殖和凋亡的分子机制进行探究。

#### 参考文献 (References)

- [1] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer [J]. *Lancet*, 2017, 389(10074): 1134-50.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70: 7-30.
- [3] DESANTIS C E, MA J, GAUDET M M, et al. Breast cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69: 438-51.
- [4] MEYER K D, JAFFREY S R. The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(5): 313-26.
- [5] WANG S, SUN C, LI J, et al. Roles of RNA methylation by means of N6-methyladenosine (m6A) in human cancers [J]. *Cancer Lett*, 2017, 408: 112-20.
- [6] BATISTA P J. The RNA modification N6-methyladenosine and its implications in human disease [J]. *Genomics, Proteomics Bioinforma*, 2017, 15: 154-63.
- [7] LIU J, HARADA B T, HE C. Regulation of gene expression by N6-methyladenosine in cancer [J]. *Trends Cell Biol*, 2019, 29(6): 487-99.
- [8] O'BRIEN J, HAYDER H, ZAYED Y, et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation [J]. *Front Endocrinol*, 2018, 9: 1-12.
- [9] PENG Y, CROCE C M. The role of microRNAs in human cancer [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2016, 1: 15004
- [10] ALARCÓN C R, LEE H, GOODARZI H, et al. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing [J]. *Nature*, 2015, 519(7544): 482-5.
- [11] HARBECK N, PENAULT-LLORCA F, CORTES J, et al. Breast cancer [J]. *Nat Rev Dis Prim*, 2019, 5(1): 67.
- [12] DAI D, WANG H, ZHU L, et al. N6-methyladenosine links RNA metabolism to cancer progression [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 124
- [13] TAHIRI A, LEIVONEN S K, LÜDERS T, et al. Deregulation of cancer-related miRNAs is a common event in both benign and malignant human breast tumors [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 35(1): 1-10.
- [14] SHI M, LIU D, DUAN H, et al. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(4): 785-99.
- [15] HELMRICH S P, SHAPIRO S, ROSENBERG L, et al. Risk factors for breast cancer [J]. *Am J Epidemiol*, 1983, 117(1): 35-45.
- [16] BIGLIA N, PEANO E, SGANDURRA P, et al. Body mass index (BMI) and breast cancer: impact on tumor histopathologic features, cancer subtypes and recurrence rate in pre and postmenopausal women [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2013, 29(3): 263-7.
- [17] 马英路, 袁凯, 张坤, 等. *FTO*基因在乳腺癌组织的表达及新辅助化疗对其表达的影响 [J]. *中国普通外科杂志 (MA Y L, YUAN K, ZHANG K, et al. FTO gene expression in breast cancer tissue before and after neoadjuvant chemotherapy [J]. Chinese Journal of General Surgery)*, 2012, 21(11): 1385-8.
- [18] WANG J W, CHEN L J, QIANG P. The potential role of N6-methyladenosine (m6A) demethylase fat mass and obesity-associated gene (*FTO*) in human cancers [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 15(13): 12845-56.
- [19] 王照岩, 杨志一, 林祥博, 等. miR-504靶向*CHD1L*抑制乳腺癌细胞侵袭的分子机制 [J]. *临床与实验病理学杂志 (WANG Z Y, YANG Z Y, LIN X B, et al. Mechanism of miR-504 targeting *CHD1L* inhibits migration of breast cancer cells [J]. J Clin Exp Pathol)*, 2018, 34(12): 1302-7.
- [20] CAI X, WANG X, CAO C, et al. HBXIP-elevated methyltransferase *METTL3* promotes the progression of breast cancer via inhibiting tumor suppressor let-7g [J]. *Cancer Lett*, 2018, 415: 11-9.