

miR-486-3p对乳腺癌细胞MCF-7凋亡的调控作用研究

甘霖 王亚冬 王婷 闵捷 廖登辉 吕钢*

(重庆市中医院, 乳腺甲状腺科, 重庆 400021)

摘要 为探讨miR-486-3p对乳腺癌细胞MCF-7凋亡的调控作用, 采用qRT-PCR法和Western blot法测定24例乳腺癌组织和癌旁正常组织miR-486-3p和凋亡相关蛋白的表达水平; 采用qRT-PCR法测定乳腺癌细胞MCF-7、HBL101和正常乳腺细胞MCF10A中miR-486-3p的表达水平。将MCF-7、HBL101和MCF10A细胞分为正常对照组、模拟物对照组、miR-486-3p模拟物组、抑制物对照组和miR-486-3p抑制物组, 各组细胞转染后进行培养, 采用CCK-8法测定各组细胞增殖情况, 采用细胞划痕法测定MCF-7和MCF10A细胞的迁移情况, 采用Transwell法和流式细胞术测定各组细胞侵袭和凋亡情况, 采用qRT-PCR和Western blot法测定凋亡相关蛋白mRNA和蛋白的表达水平。该研究得出乳腺癌组织中miR-486-3p表达水平较癌旁正常组织显著降低($P<0.05$), 乳腺癌组织中Bcl-2蛋白表达水平较癌旁正常组织显著增加($P<0.05$), 而Bax和Caspase-3蛋白表达水平较癌旁正常组织显著降低($P<0.05$)。乳腺癌细胞MCF-7和HBL101中miR-486-3p表达水平较正常乳腺细胞MCF10A显著降低($P<0.05$), 其中以乳腺癌细胞MCF-7中miR-486-3p表达水平最低。miR-486-3p模拟物组乳腺癌细胞MCF-7和HBL101中miR-486-3p的表达水平较模拟物对照组显著升高($P<0.05$), miR-486-3p抑制物组miR-486-3p的表达水平较抑制物对照组显著降低($P<0.05$)。miR-486-3p模拟剂组乳腺癌MCF-7和HBL101细胞在24 h、48 h和72 h时的吸光度值较模拟物对照组显著降低($P<0.05$), 而miR-486-3p抑制物组在24 h、48 h和72 h时吸光度值较抑制物对照组显著升高($P<0.05$)。miR-486-3p模拟剂组乳腺癌MCF-7细胞划痕宽度显著宽于模拟物对照组($P<0.05$), 而miR-486-3p抑制物组乳腺癌MCF-7细胞划痕宽度显著窄于抑制物对照组($P<0.05$)。miR-486-3p模拟剂组乳腺癌MCF-7细胞穿膜细胞数量较模拟剂对照组显著降低($P<0.05$), 而miR-486-3p抑制物组穿膜细胞数量较抑制物对照组显著升高($P<0.05$)。miR-486-3p模拟剂组乳腺癌MCF-7细胞凋亡数量较模拟物对照组显著升高($P<0.05$), 而miR-486-3p抑制物组细胞凋亡数量较抑制物对照组显著降低($P<0.05$)。miR-486-3p模拟剂组乳腺癌MCF-7细胞中Bcl-2 mRNA和蛋白表达水平较模拟物对照组显著降低($P<0.05$), Bax和Caspase-3表达水平显著升高($P<0.05$), miR-486-3p抑制物组Bcl-2表达水平较抑制物对照组显著升高($P<0.05$), Bax和Caspase-3表达水平显著降低($P<0.05$)。总之, miR-486-3p是乳腺癌的抑癌基因, 可能通过调节凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA及蛋白的表达, 而对乳腺癌细胞的凋亡起促进作用。

关键词 乳腺癌; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax; Caspase-3

Regulation of miR-486-3p on Cell Apoptosis of Breast Cancer Cell Line MCF-7

GAN Lin, WANG Yadong, WANG Ting, MIN Jie, LIAO Denghui, LÜ Gang*

(Department of Breast and Thyroid, Chongqing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China)

收稿日期: 2021-04-08

接受日期: 2021-07-27

2018年重庆市科研机构绩效激励引导专项项目(批准号: cstc2018jxj1130063)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15823381366, E-mail: cqszyyrk@126.com

Received: April 8, 2021

Accepted: July 27, 2021

This work was supported by the Chongqing Scientific Research Institution Performance Incentive and Guidance Special Project in 2018 (Grant No. cstc2018jxj1130063)

*Corresponding author. Tel: +86-15823381366, E-mail: cqszyyrk@126.com

Abstract To investigate the regulatory effect of miR-486-3p on apoptosis in breast cancer cells MCF-7 and its related mechanism, the expressions of miR-486-3p and apoptosis-related proteins in breast cancer tissues and adjacent normal tissues from 24 breast cancer patients were examined employing qRT-PCR and Western blot, respectively. miR-486-3p expression in breast cancer cells MCF-7, HBL101 and normal breast cells MCF10A was assayed by qRT-PCR. The groups of normal control, mimics control and miR-486-3p mimics, inhibitor control and miR-486-3p inhibitor were set in the experiments. After cell culture and transfection, cell proliferation was tested by CCK-8. Cell migration and invasion were assessed by wound healing and transwell assays. Cell apoptosis was evaluated by flow cytometry. The mRNA and protein expressions of Bcl-2, Bax and Caspase 3 were measured by qRT-PCR and Western blot. The results showed that in normal controls, compared with adjacent normal tissues, miRNA-486-3p expression in breast cancer tissues was significantly decreased ($P<0.05$). Bcl-2 protein level was remarkably increased ($P<0.05$), but Bax and caspase-3 protein levels were markedly reduced in breast cancer tissues ($P<0.05$). Compared with normal breast cells MCF10A, miR-486-3p expression was obviously reduced in breast cancer cells MCF-7 and HBL101 ($P<0.05$). miR-486-3p expression was lowest in MCF-1 cells. In the miRNA-486-3p mimic group, miR-486-3p expression was higher compared to the control group in MCF-7 and HBL101 cells ($P<0.05$). The optical density values of MCF-7 and HBL101 cells were significantly declined at 24 h, 48 h and 72 h ($P<0.05$). Moreover, MCF-7 cells had wider scratches ($P<0.05$). There were fewer transmembrane cells ($P<0.05$) and more apoptotic cells of MCF-7 cells ($P<0.05$). Bcl-2 level in MCF-7 cells was lower ($P<0.05$), but the levels of Bax and Caspase-3 were higher ($P<0.05$). In the miR-486-3p inhibitor group, miR-486-3p expression was decreased compared to the normal group in MCF-7 and HBL101 cells ($P<0.05$). The optical density values of MCF-7 and HBL101 cells were significantly higher at 24 h, 48 h and 72 h ($P<0.05$). Additionally, MCF-7 cells had narrower scratches ($P<0.05$). There were more transmembrane cells ($P<0.05$) and fewer apoptotic cells of MCF-7 cells ($P<0.05$). Furthermore, Bcl-2 expression was obviously increased ($P<0.05$), but the levels of Bax and Caspase-3 were reduced in MCF-7 cells ($P<0.05$). Overall, these results indicated that miR-486-3p served as an antioncogene in breast cancer that might promote breast cancer apoptosis by regulating the mRNA and protein levels of Bcl-2, Bax and Caspase-3 related to apoptosis.

Keywords breast cancer; apoptosis; Bcl-2; Bax; Caspase-3

乳腺癌(breast cancer, BC)是女性常见的恶性肿瘤,发病率呈逐年增高的趋势^[1-2],其发病年龄逐渐年轻化,并且已成为全球女性中发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,严重危害女性生命健康^[3]。目前乳腺癌主要治疗手段包括手术切除、术后化疗、内分泌调节等治疗方式,其中化疗是患者术后辅助治疗的主要手段,然而在化疗中容易产生骨髓抑制、神经损伤等严重不良反应,并且随着治疗的推进,患者会逐渐产生耐药和预后效果差等问题。miRNA是一类由19~25个核苷酸组成的内源性非编码RNA,在肿瘤的发生过程中发挥着促癌基因或抑癌基因的功能,与mRNA互补片段结合,可调节细胞增殖、细胞凋亡、细胞自我更新,以及诱导上皮细胞间质转化等^[4]。miR-486-3p是新发现的miRNA,目前在肿瘤的发生发展过程中的作用研究较少。本文通过对miR-486-3p在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中的表

达以及miR-486-p对肿瘤细胞凋亡的调控作用进行研究,为miR-486-3p治疗结乳腺癌的应用提供理论基础。

1 实验材料

1.1 实验用细胞株

正常乳腺细胞株 MCF10A、乳腺癌细胞株 MCF-7和 HBL101,均购自中国科学院细胞资源中心。

1.2 组织样本

24例乳腺癌组织和癌旁正常组织均来自重庆市中医院病理科,各组织样本从手术室获得后后立即置于 -80°C 液氮中保存。本组患者年龄为34~67岁,中位年龄为48岁,pTNM分期I期3例(12.50%),IIa期8例(33.33%),IIb期9例(37.50%),III期和IV期各2例(8.33%),其中伴有淋巴结转移13例(54.17%),全部病例术前均未

接受放化疗。本研究经重庆市中医院伦理会批准(伦理编号: 2019-ky-49), 且所有患者知情同意。

1.3 主要试剂

主要试剂包括: RPMI-1640培养液(美国HyClone公司), 胎牛血清和Lipofectamine 2000转染试剂(美国Invitrogen Gibco公司), miR-486-3p mimic及mimic control、miR-486-3p inhibitor及inhibitor control(上海吉玛制药技术有限公司), CCK-8检测试剂(美国Abbkine公司), Trizol试剂、逆转录试剂盒、Super Real Pre Mix Plus(SYBR Green)试剂(天根生化科技(北京)有限公司), Annexin V-FITC/PI 试剂盒(美国Everbright Inc公司), Transwell小室(美国Corning公司), B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)、Bax、Caspase-3、 β -actin一抗(美国Affinity Biosciences公司), 胰蛋白酶、HRP标记的二抗、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。Bcl-2、Bax、Caspase-3、 β -actin引物序列均由TaKaRa公司提供, 引物序列及产物长度见表1。

1.4 主要仪器

主要仪器包括: 微量移液器(德国Eppendorf公司), 371型CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司), X-15R型低温离心机(美国Allergra公司), Cryomill全自动冷冻研磨仪(德国Retsch公司), Multiskan Sky全自动酶标仪(美国Thermo Fisher公司), FC500型流式细胞仪(美国Beckman公司), 9700型PCR仪(美国ABI公司), Western blot电泳仪、电转仪(美国Bio-Red公司)。

2 方法

2.1 乳腺组织miR-486-3p mRNA和凋亡相关蛋白表达水平的测定

取乳腺癌组织和癌旁正常组织各100 mg用4 °C

预冷的PBS液冲洗, 研碎成微细颗粒。分别采用Trizol试剂和RIPA裂解液提取总RNA和总蛋白, 并测定浓度和纯度, 采用qRT-PCR和Western blot法测定乳腺癌组织和癌旁正常组织中miR-486-3p mRNA和凋亡相关蛋白(Bcl-2、Bax和Caspase-3)的表达水平。

2.2 细胞培养

将冻存的乳腺癌细胞MCF-7、HBL101和正常乳腺细胞MCF10A复苏, 用RPMI-1640培养液(含10%胎牛血清)于37 °C、5% CO₂条件下培养, 当细胞在细胞培养瓶底部数量达到80%~90%时进行传代, 取第3~4代对数期细胞用于后续实验。采用qRT-PCR测定各细胞中miR-486-3p的表达水平。

2.3 细胞分组和转染

将乳腺癌细胞MCF-7、HBL101和正常乳腺细胞MCF10A分为正常对照组(NC)、模拟物对照组(Mimics control)、miR-486-3p模拟物组(miR-486-3p mimics)、抑制物对照组(Inhibitor control)和miR-486-3p抑制物组(miR-486-3p inhibitor)。各组细胞分别转染生理盐水、Mimics control、miR-486-3p mimics、Inhibitor control和miR-486-3p inhibitor持续6 h。采用qRT-PCR测定细胞中miR-486-3p的表达水平。各组细胞更换为RPMI-1640培养液在37 °C、5% CO₂条件下继续培养进行后续实验。

2.4 细胞增殖实验

乳腺癌细胞MCF-7、HBL101和正常乳腺细胞MCF10A转染后按 1.0×10^5 个/孔接种于6孔培养板, 在RPMI-1640培养液中于37 °C、5% CO₂条件下继续培养24 h、48 h和72 h, 每孔避光加入CCK-8检测试剂10 μ L混匀, 1 h后用酶标仪在450 nm条件下检测吸光度值(D值), 各组细胞的相对数量用吸光度值衡量。

表1 PCR引物序列和产物长度

Table 1 Primer sequence and product length of PCR

名称 Name	序列 Primer sequence	产物长度/bp Product length /bp
Bcl-2	Forward: 5'-GCG GTC AAA ATG GGT GAA TTT C-3' Reverse: 5'-TGT CTT CTG TTC GCC TGG TA-3'	205
Caspase-3	Forward: 5'-CAG CTC ATA CCT GTG GCT GT-3' Reverse: 5'-TTC CCT GAG GTT TGC TGC AT-3'	393
Bax	Forward: 5'-TCC ACC AAG AAG CTG AGC GAG-3' Reverse: 5'-GTC CAG CCC ATG ATG GTT CT-3'	207
β -actin	Forward: 5'-ATC AGC AAG CAG GAG TA TG-3' Reverse: 5'-AAT AAA GCC ATG CCA ATC-3'	105

2.5 细胞划痕实验

乳腺癌细胞MCF-7和正常乳腺细胞MCF10A的各組细胞转染后按 1.0×10^5 个/孔接种于6孔培养板,在RPMI-1640培养液中培养至细胞融合率超过80%,用20 μ L移液枪头垂直划线,用PBS冲洗3次以去除细胞碎片,更换为RPMI-1640培养液后继续培养48 h,测量划痕间距。

2.6 Transwell实验

采用稀释的Matrigel基质胶(RPMI-1640培养液4:1稀释)包被Transwell小室的上室,37 $^{\circ}$ C放置1 h,按 1.0×10^5 个/mL的密度将乳腺癌细胞MCF-7和正常乳腺细胞MCF10A的各組转染后细胞加入到Transwell小室(上室),然后将各組上室放入含RPMI-1640培养液的细胞培养板孔(下室),于培养48 h后取出上室,用湿棉签轻轻擦去Matrigel基质胶和膜表面的细胞,用多聚甲醛固定,染色,双蒸水冲洗上室,在光学显微镜下取3~5个视野进行计数。

2.7 细胞凋亡实验

乳腺癌细胞MCF-7和正常乳腺细胞MCF10A的各組细胞转染后更换为RPMI-1640培养液,继续培养至48 h。收获各組细胞后用PBS洗涤,经胰酶消化后将细胞悬浮液移至离心管中,离心条件为1 500 r/min、5 min、4 $^{\circ}$ C,弃上清,加入1 mL PBS冲洗,将其吸至规格为1.5 mL的EP管中,离心,悬浮细胞,加入FITC标记的Annexin-V,室温避光孵育。加入PI,冰浴中避光孵育后加入PBS,采用流式细胞仪检测各組细胞的凋亡率。

2.8 qRT-PCR实验

乳腺癌细胞MCF-7和正常乳腺细胞MCF10A的各組细胞转染后,更换为RPMI-1640培养液,继续培养至48 h。收获各組细胞后加入Trizol液提取总RNA,测定浓度和纯度,逆转录为cDNA,进行定量PCR扩增。PCR条件:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s,55 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸60 s,反应40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因(*Bcl-2*、*Bax*和*Caspase-3*)的相对表达量。

2.9 Western blot实验

乳腺癌细胞MCF-7和正常乳腺细胞MCF10A的各組细胞转染后,更换为RPMI-1640培养液继续培养至48 h。收获各組细胞, PBS漂洗3次,用RIPA提取总蛋白后测定浓度,煮沸使蛋白变性。10% SDS-PAGE凝胶电泳后湿法转至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,洗膜,加入一抗(1:1 000)后4 $^{\circ}$ C过夜,洗

膜,加入二抗(1:1 000),25 $^{\circ}$ C下孵育1 h,洗膜,显色,采用Fluor Chem Q蛋白印迹成像和定量分析系统测定各組细胞中相关凋亡蛋白(*Bcl-2*、*Bax*和*Caspase-3*)表达量。

2.10 统计学分析

采用SPSS 21.0进行数据统计分析。数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 乳腺癌组织和癌旁正常组织中miR-486-3p mRNA和凋亡相关蛋白表达水平的比较

乳腺癌组织中miR-486-3p表达水平较癌旁正常组织显著降低($P < 0.05$);乳腺癌组织中*Bcl-2*蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),而*Bax*和*Caspase-3*蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。具体结果见图1和图2。

3.2 乳腺癌细胞和正常乳腺细胞中miR-486-3p表达水平的比较

乳腺癌细胞MCF-7和HBL101中miR-486-3p表达水平较正常乳腺细胞MCF10A均显著降低($P < 0.05$),其中MCF-7细胞中水平最低。具体结果见图3。

3.3 转染后各組细胞中miR-486-3p表达水平的比较

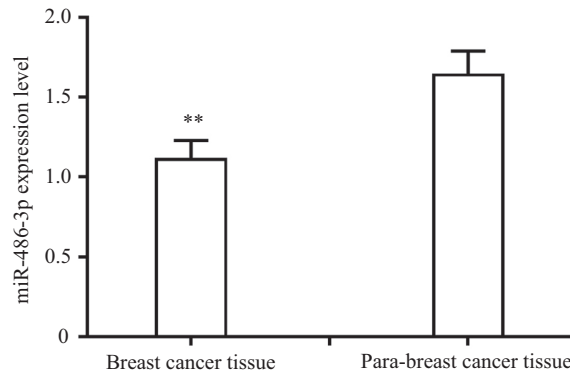
miR-486-3p模拟物组乳腺癌MCF-7和HBL101细胞中miR-486-3p的表达水平较模拟物对照组显著升高($P < 0.01$),miR-486-3p抑制物组乳腺癌MCF-7和HBL101细胞中miR-486-3p的表达水平较抑制物对照组显著降低($P < 0.01$),正常对照组、模拟物对照组和抑制物对照组乳腺癌MCF-7和HBL101细胞中miR-486-3p的表达水平差异无统计意义($P > 0.05$)。在正常乳腺细胞MCF10A中也观察到类似结果。具体结果见图4。

3.4 转染后各組细胞增殖情况的比较

miR-486-3p模拟物组乳腺癌MCF-7细胞中在24 h、48 h和72 h吸光度较模拟物对照组显著降低($P < 0.05$);miR-486-3p抑制物组乳腺癌MCF-7吸光度值较抑制物对照组显著升高($P < 0.05$),正常对照组、模拟物对照组和抑制物对照组在24 h、48 h和72 h乳腺癌MCF-7的吸光度值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在正常乳腺细胞MCF10A中也观察到类似结果。具体结果见图5。

3.5 转染后各組细胞迁移情况的比较

miR-486-3p模拟物组乳腺癌MCF-7细胞划痕

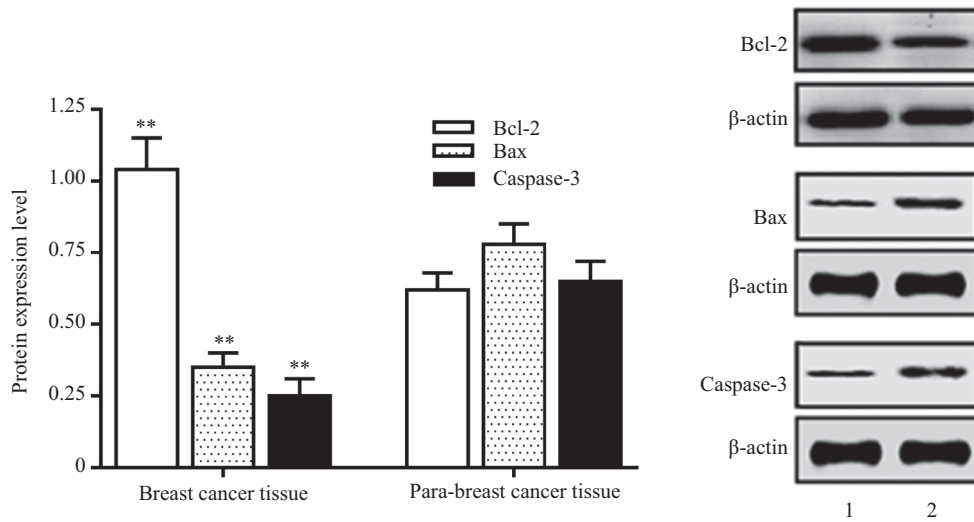


** $P < 0.01$, 与癌旁组织比较。

** $P < 0.01$ compared with para-breast cancer tissue.

图1 乳腺癌组织和正常乳腺癌旁组织中miR-486-3p的表达水平

Fig.1 miR-486-3p expression level in breast cancer tissue and para-breast cancer tissue

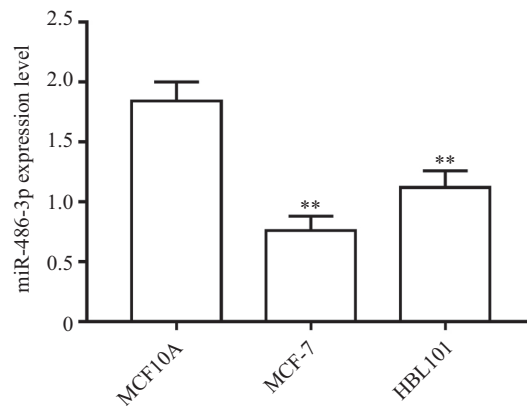


** $P < 0.01$, 与癌旁组织比较。1: 乳腺癌组织; 2: 癌旁组织。

** $P < 0.01$ compared with para-breast cancer tissue. 1: breast cancer tissue; 2: para-breast cancer tissue.

图2 乳腺癌组织和正常乳腺癌旁组织中凋亡相关蛋白的表达水平

Fig.2 Apoptosis-related protein expression level in breast cancer tissue and para-breast cancer tissue



** $P < 0.01$, 与正常乳腺细胞MCF10A比较。

** $P < 0.01$ compared with normal mammary gland cell MCF10A.

图3 乳腺癌细胞MCF-7、HBL101和正常乳腺细胞MCF10A中miR-486-3p的表达水平

Fig.3 miR-486-3p expression level in breast cancer cells MCF-7, HBL101 and normal mammary gland cell MCF10A

显著宽于模拟物对照组 ($P < 0.01$), miR-486-3p抑制物组乳腺癌 MCF-7细胞划痕显著窄于抑制物对照组 ($P < 0.01$), 正常对照组、模拟物对照组和抑制物对照组乳腺癌 MCF-7细胞划痕宽度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在正常乳腺细胞 MCF10A 中也观察到类似结果。具体结果见图6。

3.6 转染后各组细胞侵袭能力的比较

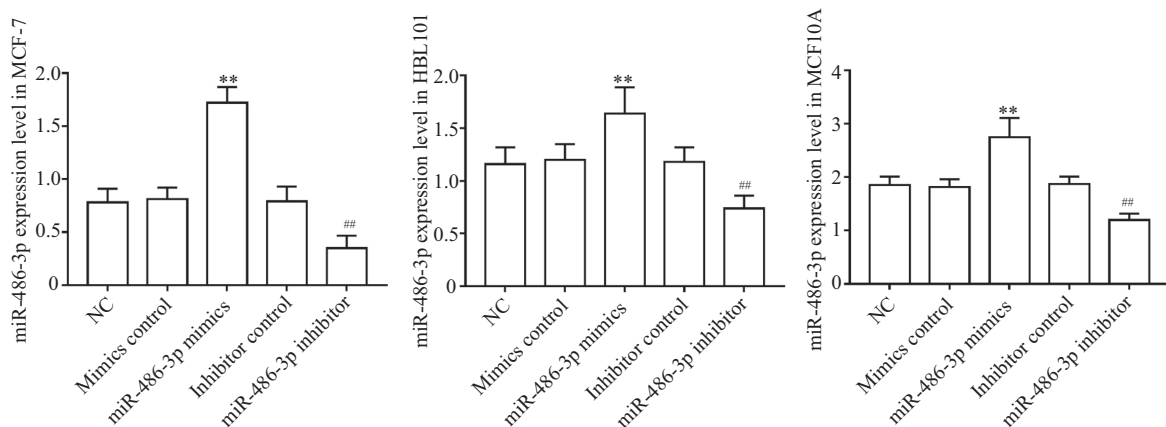
miR-486-3p模拟物组乳腺癌细胞 MCF-7穿膜细胞数量较模拟物对照组显著降低 ($P < 0.05$), miR-486-3p抑制物组乳腺癌细胞 MCF-7穿膜细胞数量较抑制物对照组显著升高 ($P < 0.05$), 正常对照组、模拟物对照组和抑制物对照组乳腺癌细胞 MCF-7穿膜细胞数量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在正常乳腺细胞 MCF10A 中也观察到类似结果。具体结果见图7。

3.7 转染后各组细胞凋亡情况的比较

miR-486-3p模拟物组乳腺癌 MCF-7细胞凋亡率较模拟物对照组显著升高 ($P < 0.05$), miR-486-3p抑制物组乳腺癌 MCF-7细胞凋亡率较抑制物对照组显著降低 ($P < 0.05$), 正常对照组、模拟物对照组和抑制物对照组乳腺癌 MCF-7细胞凋亡率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。在正常乳腺细胞 MCF10A 中也观察到类似结果。具体结果见图8。

3.8 转染后各组细胞 *Bcl-2*、*Bax*和 *Caspase-3* mRNA表达水平的比较

miR-486-3p模拟物组乳腺癌 MCF-7细胞中 *Bcl-2* mRNA表达水平较模拟物对照组显著降低 ($P < 0.05$), *Bax*和 *Caspase-3* mRNA表达水平显著升高 ($P < 0.05$); miR-486-3p抑制物组乳腺癌 MCF-7细胞

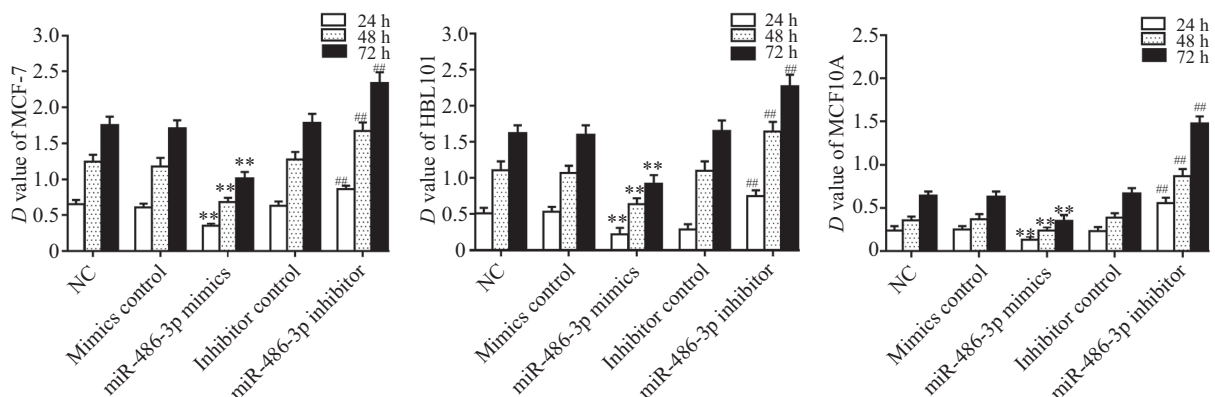


** $P < 0.01$, 与模拟物对照组比较; ## $P < 0.01$, 与抑制物对照组比较。

** $P < 0.01$ compared with Mimics control Group; ## $P < 0.01$ compared with Inhibitor control Group.

图4 转染后各组乳腺癌细胞中miR-486-3p表达水平

Fig.4 miR-486-3p expression level in each group of breast cancer cells after transfection

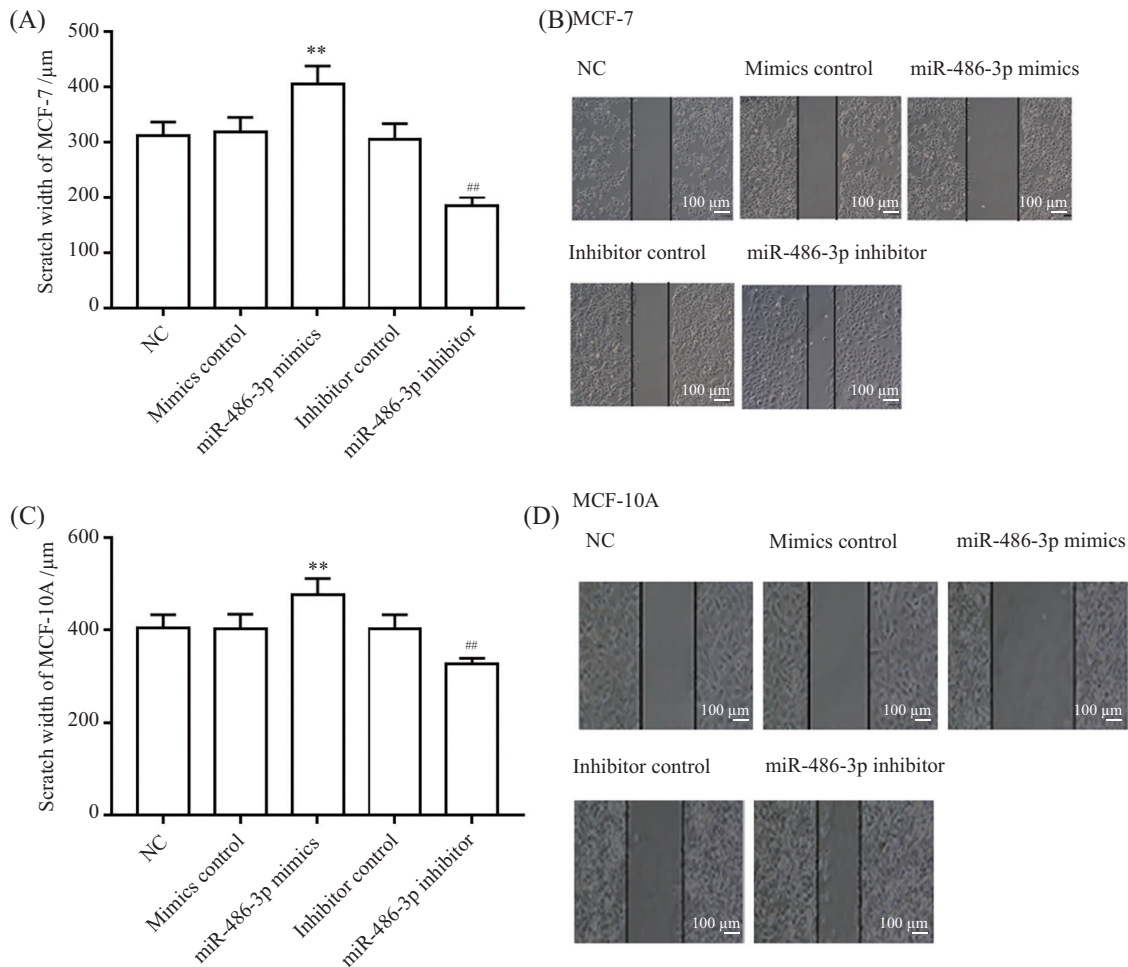


** $P < 0.01$, 与模拟物对照组比较; ## $P < 0.01$, 与抑制物对照组比较。

** $P < 0.01$ compared with Mimics control Group; ## $P < 0.01$ compared with Inhibitor control Group.

图5 转染后各组细胞的增殖情况

Fig.5 Proliferation of cells in each group after transfection



** $P < 0.01$, 与模拟物对照组比较; ** $P < 0.01$, 与抑制物对照组比较。

** $P < 0.01$ compared with Mimics control Group; ## $P < 0.01$ compared with Inhibitor control Group.

图6 转染后各组细胞的迁移情况

Fig.6 The migration of cells in each group after transfection

中 *Bcl-2* mRNA 表达水平较抑制物对照组显著升高 ($P < 0.05$), *Bax* 和 *Caspase-3* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 正常对照组、模拟物对照组和抑制物对照组乳腺癌 MCF-7 细胞中 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在正常乳腺细胞 MCF10A 中也观察到类似结果。具体结果见图 9。

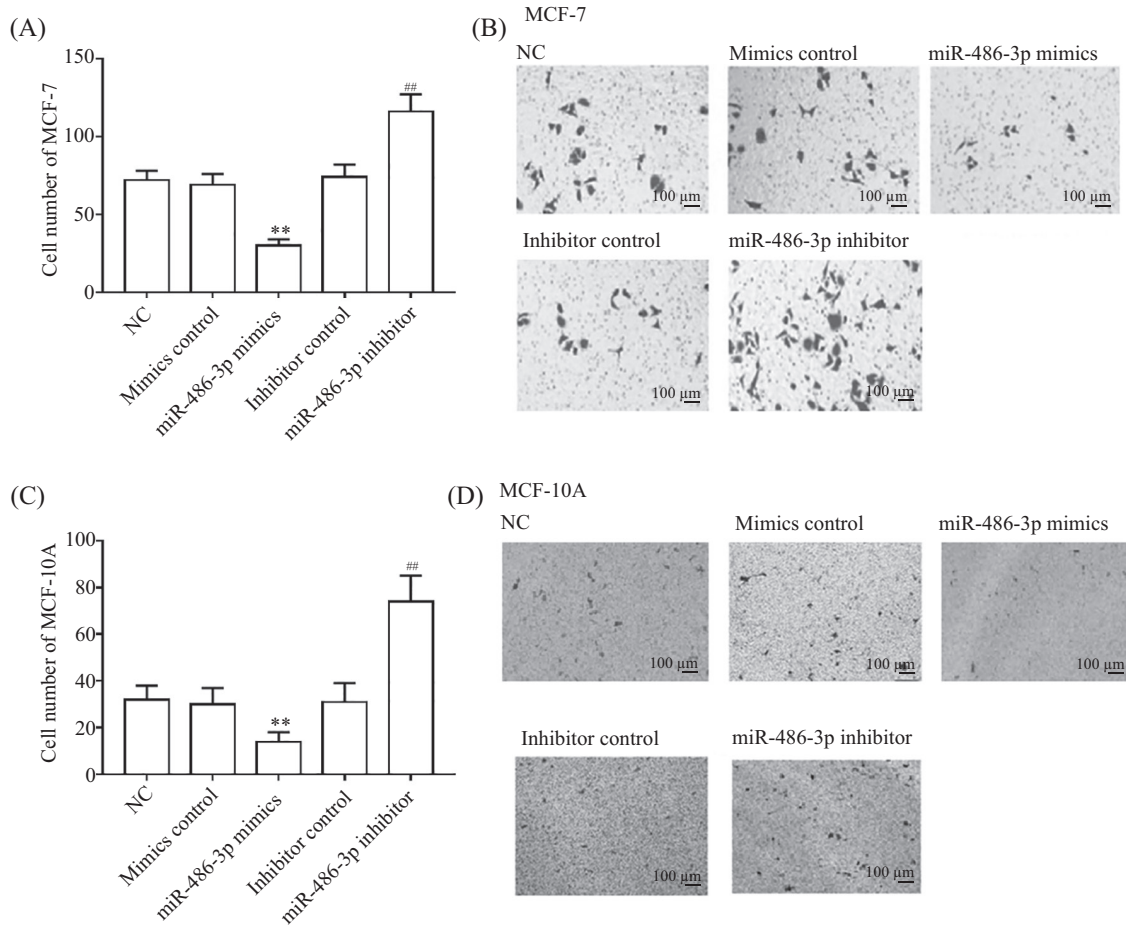
3.9 转染后各组细胞 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 蛋白表达水平的比较

miR-486-3p 模拟物组乳腺癌 MCF-7 细胞中 *Bcl-2* 蛋白表达水平较模拟物对照组显著降低 ($P < 0.05$), *Bax* 和 *Caspase-3* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); miR-486-3p 抑制物组乳腺癌 MCF-7 细胞中 *Bcl-2* 蛋白表达水平较抑制物对照组显著升高

($P < 0.05$), *Bax* 和 *Caspase-3* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 正常对照组、模拟物对照组和抑制物对照组乳腺癌 MCF-7 细胞中 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在正常乳腺细胞 MCF10A 中也观察到类似结果。具体结果见图 10。

4 讨论

miR-486 位于锚蛋白 -1 基因的第 40 个内含子中, 最早在人胎肝中被发现, 目前发现, miR-486 有 miR-486-5p 和 miR-486-3p 两种存在形式。血清 miR-486-5p 可用于肺癌的临床诊断, 并且是复发风险较高的肝细胞癌患者的监测指标^[5]。而 miR-486-5p 在神经胶质瘤^[6]中表达上调, 表现出促癌基因的作用



** $P < 0.01$, 与模拟物对照组比较; ## $P < 0.01$, 与抑制物对照组比较。

** $P < 0.01$ compared with that of Mimics control Group; ## $P < 0.01$ compared with that of Inhibitor control Group.

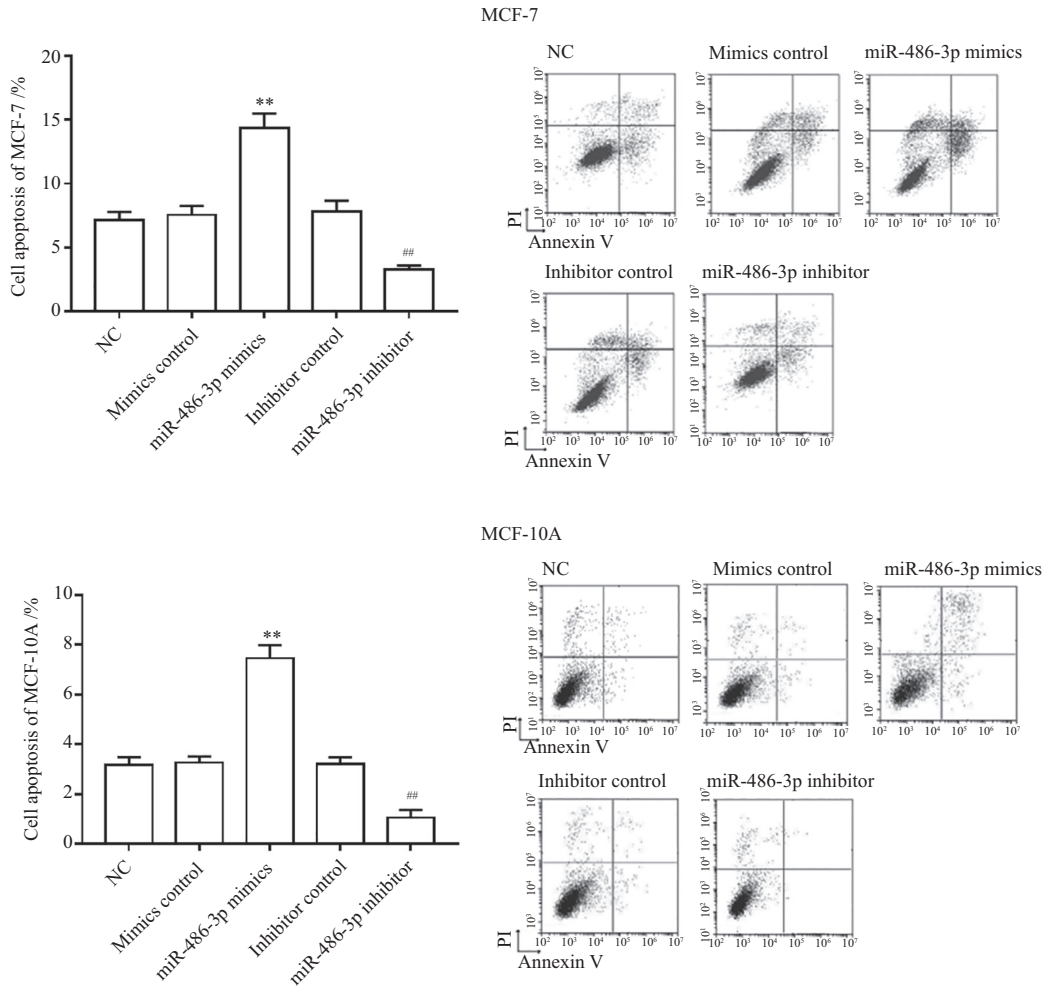
图7 miR-486-3p对MCF-7和MCF10A细胞侵袭的影响

Fig.7 Effect of miR-486-3p on MCF-7 and MCF10A cell invasion

用。miR-486-5p作为抑癌基因在非小细胞肺癌中被下调, miR-486-5p可抑制非小细胞肺癌生长, 其作用可能通过靶向调控CDK4而发挥作用^[7]。有关miR-486-3p在其他癌症中的研究很少, 在乳头状甲状腺癌组织中miR-486-3p水平显著升高^[8], miR-486-3p靶向ECM1的miR-486-3p抑制宫颈癌中细胞的增殖和迁移能力^[9]。但是目前关于miR-486-3p在乳腺癌中的作用鲜有报道。通过研究细胞中miR-486-3p的表达量与乳腺癌之间的关系, 为研究乳腺癌的发生发展机制具有很大的意义, 同时可以为研究血清miR-486-3p的表达量与乳腺癌的关系、miR-486-3p表达量在临床监测中的意义等提供较好的思路。本研究显示, 乳腺癌组织中miR-486-3p表达水平较癌旁正常组织显著降低($P < 0.05$), 此外体外细胞实验显示, 乳腺癌细胞MCF-7和HBL101的miR-486-3p表达水平较正常乳腺细胞MCF10A显著降低($P < 0.05$), 并且

miR-486-3p模拟剂可显著抑制乳腺癌细胞MCF-7和HBL101的增殖($P < 0.05$), 而在miR-486-3p抑制物组结果相反, 在正常乳腺细胞MCF10A中也观察到类似结果。因此, miR-486-3p在乳腺癌中可能发挥抑癌基因的作用, 可能抑制乳腺癌的发生和发展。

侵袭转移是恶性肿瘤的基本生物学特征, 与肿瘤细胞侵袭性增强、黏附能力降低、细胞外基质降解等因素有关^[10]。划痕实验中, miR-486-3p模拟物组MCF-7细胞划痕宽度显著宽于模拟物对照组($P < 0.05$), 在Transwell实验中miR-486-3p模拟物组穿膜MCF-7细胞数量显著降低($P < 0.05$), 而miR-486-3p抑制剂组结果相反, 并在正常乳腺细胞MCF10A中也观察到类似结果。由于miR-486-3p模拟物和miR-486-3p抑制物分别可使乳腺癌MCF-7细胞中的miR-486-3p表达上调和下调, 说明miR-486-3p表达水平可调控乳腺癌细胞迁移和侵袭。

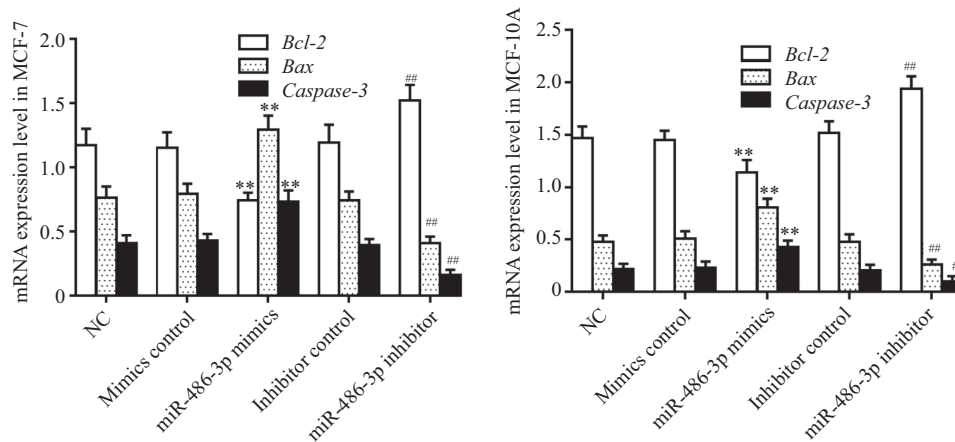


** $P < 0.01$, 与模拟物对照组比较; ## $P < 0.01$, 与抑制物对照组比较。

** $P < 0.01$ compared with Mimics control Group; ## $P < 0.01$ compared with Inhibitor control Group.

图8 miR-486-3p对MCF-7和MCF10A细胞凋亡的影响

Fig.8 Effect of miR-486-3p on apoptosis of MCF-7 and MCF10A cells

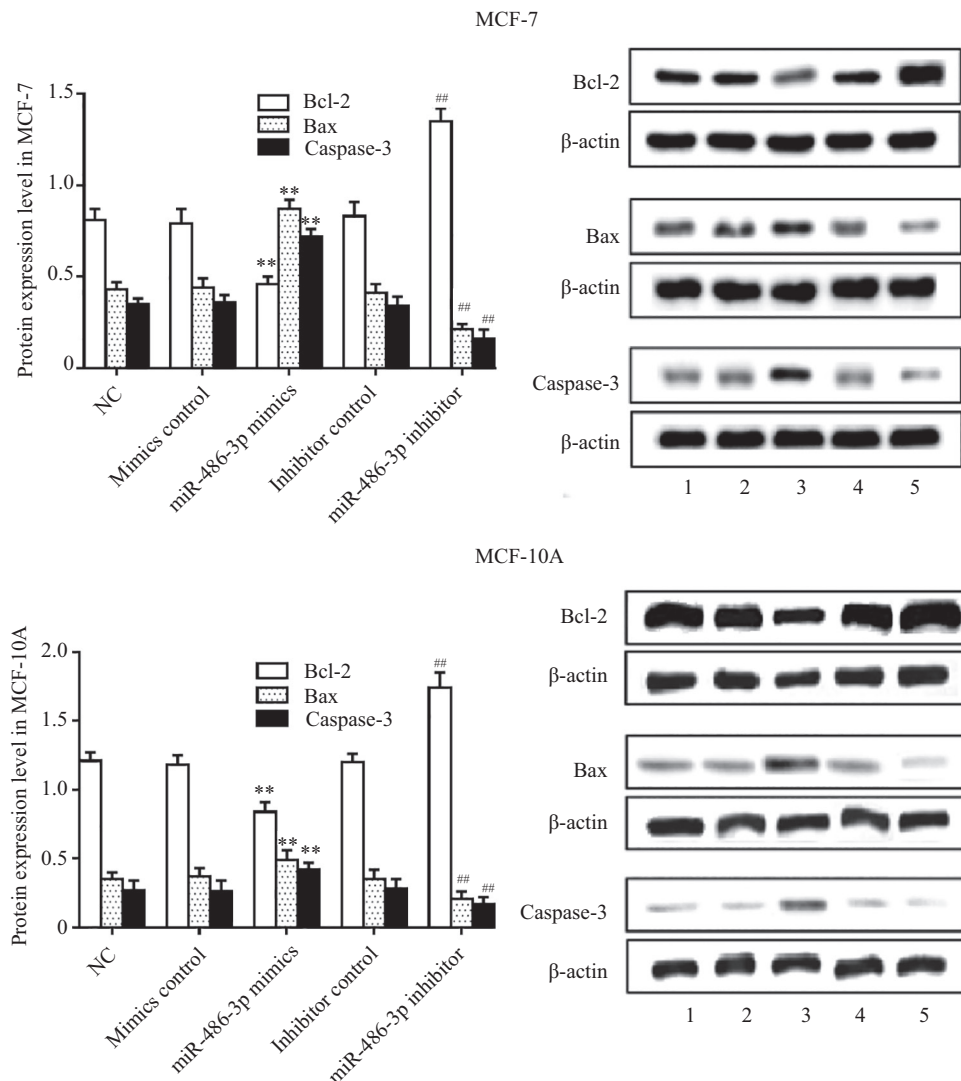


** $P < 0.01$, 与模拟物对照组比较; ## $P < 0.01$, 与抑制物对照组比较。

** $P < 0.01$ compared with Mimics control Group; ## $P < 0.01$ compared with Inhibitor control Group.

图9 转染后各组细胞Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA表达水平

Fig.9 mRNA expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in each group after transfection



1: 正常对照组; 2: 模拟物对照组; 3: miR-486-3p模拟物组; 4: 抑制物对照组; 5: miR-486-3p抑制物组; ** $P < 0.01$, 与模拟物对照组比较; ## $P < 0.01$, 与抑制物对照组比较。

1: NC; 2: Mimics control; 3: miR-486-3p mimics; 4: Inhibitor control; 5: miR-486-3p inhibitor; ** $P < 0.01$ compared with Mimics control Group; ## $P < 0.01$ compared with Inhibitor control Group.

图10 转染后各组细胞Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达水平的比较

Fig.10 Protein expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in each group after transfection

细胞凋亡是指细胞在基因调控下主动有序的死亡。正常生理情况下凋亡对于细胞维持内环境稳定的作用举足轻重,当细胞出现增殖失控、凋亡抑制时则发生肿瘤,故抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡是治疗肿瘤的重要策略^[11]。本研究结果显示,miR-486-3p模拟剂可使MCF-7细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$),而在miR-486-3p抑制物组结果则相反,在正常乳腺细胞MCF10A中也观察到类似结果。细胞凋亡实验说明,miR-486-3p表达水平可调控MCF-7细胞的凋亡情况,进而在调控MCF-7增殖、迁移和侵袭中发挥极其重要的作用。

抗凋亡蛋白(Bcl-2等)与促凋亡蛋白(如Bax、Cas-

pase-3等)在调控细胞凋亡或生存的过程中发挥重要作用^[12]。Bcl-2是细胞凋亡研究中最受重视的癌基因之一,通过表达凋亡抑制蛋白会导致细胞凋亡机制紊乱而促使肿瘤发生、发展^[13]。Bcl-2与Bax多以异源二聚体的形式存在,二者相对水平的变化在细胞凋亡中发挥非常重要的作用^[14]。Bax表达增多可形成Bax同源二聚体,导致下游凋亡蛋白Caspase-3的活化,诱发细胞凋亡。本研究结果显示,乳腺癌组织中Bcl-2蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$),而Bax和Caspase-3蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。体外细胞实验结果显示,miR-486-3p模拟剂可使MCF-7细胞中Bcl-2表达水平显著降低($P < 0.05$),Bax和Cas-

pase-3表达水平显著升高($P<0.05$),而在miR-486-3p抑制物组结果相反,这可能与miR-486-3p的抑制MCF-7细胞增殖和促进凋亡作用有关。此外,在正常乳腺细胞MCF10A中也观察到类似结果。

总之,miR-486-3p是乳腺癌的抑癌基因,其可能通过调节凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA和蛋白的表达而对乳腺癌细胞的凋亡发挥促进作用。

参考文献 (References)

- [1] DESANTIS C E, MA J, GAUDET M M, et al. Breast cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 438-51.
- [2] EBRAHIMI S, GHORBANI E, SHAFIEE M, et al. Therapeutic potency of oncolytic virotherapy in breast cancer targeting, current status and perspective [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 2801-9.
- [3] 李文涛. 中国乳腺癌的外科诊治历程回顾与展望[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*(LI W T. Review and prospect of surgical diagnosis and treatment of breast cancer in China [J]. *J Chin Pract Diagn*), 2021, 35(8): 757-9.
- [4] SIOMI H, SIOMI M C. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(3): 323-32.
- [5] WANG L, LIU M, ZHU H, et al. Identification of recurrence-related serum microRNAs in hepatocellular carcinoma following hepatectomy [J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(10): 1445-52.
- [6] SHAO Y, SHEN Y Q, LI Y L, et al. Direct repression of the oncogene CDK4 by the tumor suppressor miR-486-5p in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34011-21.
- [7] SONG L, LIN C, GONG H, et al. miR-486 sustains NF- κ B activity by disrupting multiple NF- κ B-negative feedback loops [J]. *Cell Res*, 2013, 23(2): 274-89.
- [8] SWIERNIAK M, WOJCICKA A, CZETWERTYNSKA M, et al. In-depth characterization of the microRNA transcriptome in normal thyroid and papillary thyroid carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(8): E1401-9.
- [9] YEA H Q, YUB X L, XIA J Y, et al. MiR-486-3p targeting ECM1 represses cell proliferation and metastasis in cervical cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, doi: 10.1016/j.biopha.2016.02.019.
- [10] YIO X, DIAMON D M, ZHANG J Y, et al. Trefoil factor family-1 mutations enhance gastric cancer cell invasion through distinct signaling pathways [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(6): 1696-706.
- [11] PFEFFER C M, SINGH A. Apoptosis: a target for anticancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 448-57.
- [12] 李攀登,王永红,肖芸,等. 氢醌对人白血病细胞凋亡及相关蛋白Bcl-2、Bax及Caspase-3表达的影响[J]. *现代预防医学*(LI P D, WANG Y H, XIAO Y, et al. Effects of hydroquinone on apoptosis and expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in human leukemia cells [J]. *Modern Preventive Medicine*), 2018, 45(5): 878-82.
- [13] 邢春瑶,冷维春,周家文. Bcl-2和Survivin在宫颈癌中的研究进展[J]. *中国实验诊断学*(XING C Y, LENG W C, ZHOU J W. Research progress of bcl-2 and Survivin in cervical cancer [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*), 2014, 18(1): 167-9.
- [14] CAMPBELL K J, TAIT S. Targeting Bcl-2 regulated apoptosis in cancer [J]. *Open Biol*, 2018, 8(5): 180002.