DOI:10.16016/j.1000-5404.201903048

miR-382 通过 PGC-1α 对三阴性乳腺癌细胞株 4T1 生物学特性的影响

雷优扬,周 华,代 朦,靳 鑫,明 佳 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院乳腺甲状腺外科

[摘要] **目的** 研究乳腺癌 4T1 细胞内 miR-382 下调 PGC-1α 对细胞生物学特性的影响。**方法** ①以 4T1 细胞作为研究对象,miR-382mimics 或抑制性探针 anti-miR-382 转染 4T1 细胞后,以 qRT-PCR 检测 4T1 中 miR-382 水平变化,qRT-PCR 和 Western blot 检测各组 PGC-1α 的表达水平变化;②荧光素酶报告基因检测 miR-382 与 PGC-1α 3′UTR 的结合位点;③将 miR-382mimics 或对照 miR 分别与 pCDNA3.1 或 pCDNA-PGC1α 共转染于 4T1 细胞,Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力的变化;CCK8 实验检测细胞增殖活力的变化;皮下移植瘤实验和尾静脉肺移植瘤实验分别检测小鼠体内肿瘤生长及肺转移的变化。**结果** 转染 miR-382 mimics 之后乳腺癌细胞 PGC-1α 表达明显降低($P<0.05$),转染抑制性探针 anti-miR-382 后 PGC-1α 表达明显升高($P<0.05$);miR-382 与 PGC-1α 存在靶向调控核心序列,其作用位点位于 PGC-1α 3′UTR 565-582(核心序列 ACAACTT)。相比对照+pCDNA3.1 组,miR-382+pCDNA3.1 组的细胞迁移和增殖活力明显降低,4T1 皮下移植瘤体积和尾静脉移植瘤肺转移灶的面积显著减小($P<0.05$);对照+pCDNA-PGC-1α 较对照+pCDNA3.1 组,细胞迁移和增殖活力明显提高,4T1 皮下移植瘤体积和尾静脉移植瘤肺转移灶的面积显著增加($P<0.05$);miR-382 的抑瘤效应因 PGC-1α 过表达而被阻断。**结论** miR-382 可能通过 PGC-1α 抑制 4T1 细胞株的增殖和肺转移能力,其作用位点可能位于 PGC-1α 3′UTR 565-582。

[关键词] 三阴性乳腺癌;microRNA-382;PGC-1α

[中图法分类号] R394.3; R730.23; R737.9 [文献标志码] A

MiR-382 inhibits proliferation and migration of triple negative breast cancer cell line 4T1 by mediating PGC-1α

LEI Youyang, ZHOU Hua, DAI Meng, JIN Xin, MING Jia Department of Mammary Gland and Thyroid, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of miR-382 down-regulating PGC-1α on the biological behaviors of triple negative breast cancer 4T1 cells. **Methods** ① After miR-382 mimics or inhibitory probe anti-miR-382 was transfected into 4T1 cells, the expression level of miR-382 was detected by qRT-PCR. The changes of PGC-1α expression at mRNA and protein levels were detected by qRT-PCR and Western blotting, respectively. ② Luciferase reporter gene assay was adopted to identify the binding site of miR-382 mimics to PGC-1α 3′UTR. ③miR-382 mimics or control miR were co-transfected into 4T1 cells with pCDNA3.1 or pCDNA-PGC1α, respectively. Transwell migration assay, CCK8 assay and subcutaneous xenografts and tail vein lung xenografts were respectively used to detect the changes in cell invasiveness, cell proliferation, and tumor growth and lung metastasis in mice. **Results** The expression of PGC-1α was significantly decreased in 4T1 cells after transfection with miR-382 mimics ($P<0.05$), and it was obviously increased after transfection

[基金项目] 重庆市卫生计生委医学科研计划项目(2016ZDXM012);重庆市科学技术委员会技术创新与应用示范(社会民生类,CSTC2018jscx-msybx0020);重庆市渝中区科技计划项目(20160104)

[通信作者] 明 佳,E-mail:mjia1001@sina.com

[网络首发] http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1126.r.20190505.1721.003.html

with anti-miR-382 ($P<0.05$). There was a targeted regulatory core sequence (ACAACTT) of miR-382 and PGC-1α, and the site was at PGC-1α 3′UTR 565-582. Compared with the control +pCDNA3.1 group, the cell migration and proliferation activity of the miR-382+pCDNA3.1 group was significantly decreased, and the size of the 4T1 subcutaneous tumor and the area of metastatic tumor in the lung were notably decreased ($P<0.05$). Compared with the control +pCDNA3.1 group, the cell migration and proliferation activity were significantly increased in the miR-382+pCDNA-PGC-1α group, and the size of 4T1 subcutaneous tumor and the area of metastatic tumor in the lung was significantly increased ($P<0.05$); The antitumor effect of miR-382 was blocked by overexpression of PGC-1α. **Conclusion** MiR-382 inhibits the proliferation and lung metastasis of 4T1 cells by down-regulating PGC-1α, and the interaction site may be PGC-1α 3′UTR 565-582.

[**Key words**] triple negative breast cancer; microRNA-382, PGC-1α

Supported by the Project of Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health and Family Planning Commission (2016ZDXM012), the Technology Innovation and Application Pilot Project of Chongqing Municipal Science and Technology Committee (CSTC2018jscx-msybx0020), and the Project of Science and Technology Plan of Yuzhong District, Chongqing (20160104). Corresponding author: MING Jia, E-mail: mjia1001@sina.com

三阴性乳腺癌(Triple Negative Breast Cancer,TNBC)是一种特殊类型的乳腺癌,TNBC 中雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人表皮生长因子受体 2(Her-2)均阴性表达。此类乳腺癌具有复发率高,易转移的特点,治疗和预后较差[1]。

PGC-1α 是 PGC-1 家族的亚型之一,是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ,PPARγ)的辅激活因子[2]。主要存在于高能量、高代谢、含有线粒体较多的细胞中。有研究表明,在浸润性乳腺癌中 PGC-1α 通过增强线粒体的功能促进癌细胞的远处转移[3]。PGC-1α 上游的许多微小 RNA(microRNA,miRNA)参与了对 PGC-1α 的表达调控。我们通过在线软件预测分析(http://www.microrna.org)发现,小鼠 PGC-1α 的 3′UTR 端非翻译区有 11 个潜在的 miRNA 结合位点。miRNA 是小型非编码 RNA,约含 20-22 个核苷酸,主要通过与靶信使 RNA(mRNA)的 3′非翻译区(3′-UTR)进行特异性结合,从而促进或抑制靶信使 mRNA 3′-UTR 的翻译,促进和抑制癌细胞的作用。许多研究都表明,miRNA 在细胞生长过程,包括代谢、稳态、增殖和凋亡的过程中都发挥着重要的作用[4]。有研究发现 miR-382 的表达水平与乳腺癌的预后密切相关[5]。我们前期研究发现在肿瘤相关巨噬细胞(tumor associated macrophages,TAMs)可以通过细胞内的 miR-382 抑制 PGC-1α 的表达,从而阻止 TAMs 的 M2 型分化及其后 PGC-1α 介导的氧化过程,进而抑制肿瘤环境代谢重编程和癌细胞的转移[6-7]。但是在乳腺癌细胞中本身就存在的 miR-382 是否通过调节 PGC-1α 介导乳腺癌细胞的转移目前尚不清楚。本课题主要研究 TNBC 的 4T1 细胞株中 miR-382 对 PGC-1α 及细胞生物学特征的影响,以便为 TNBC 的诊治提供更多的实验数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

质粒和细胞株 4T1 细胞株、293T 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库; pcDNA3.1 与 pcDNA3.1- PGC-1α 质粒(#1026, addgene, USA); pMIR-REPORT (Applied Biosystems Inc 公司); miR-382 以及 Anti-miR-382 (#4464066, Invitrogen)及 Control miR (#446405 8, Invitrogen); 逆转录试剂盒和 qRT-PCR 试剂盒(TaKaRa); GAPDH(碧云天公司); 抗 pgc1 抗体(Abcam 公司),Western blot 其他相关试剂(鼎国公司); 质粒大提无内毒素试剂盒(QIAGEN 公司)、荧光素酶检测试剂盒(promega)、opti-MEM (TBD)、TransIT-293 Transfection Reagent 2700 (Mirus Bio LLC)、Transwell 小室(孔径 0.4 m) 购自 Corning 公司、PROMEGA20/20 LUMINOMETER GLOMAX(promega)。细胞培养瓶、细胞培养板(Corning)、DMEM 高糖培养基、RPMI1640 培养基和胎牛血清(GIBCO); BB5060UV 二氧化碳培养箱(Heraeus)、倒置相差显微镜(Leica)。

1.2 细胞培养

4T1 细胞培养于含 10%胎牛血清(FBS) 、1%的青霉素-链霉素双抗的 RPMI1640 培养基中,在培养箱中常规培养,37 ℃、5%CO_2,饱和湿度。293T 细胞培养于含有 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 中,在培养箱中常规培养,37 ℃、5%CO_2,饱和湿度。

1.3 小鼠喂养

BALB/c 小鼠,雌性,SPF 级,6~8 周龄,每只 18~20 g,共 40 只,饲养于重庆医科大学动物实验中心。

1.4 实验分组

1.4.1 4T1(miR-382和PGC-1α相关表达) 实验分组:①对照组:对照miR转染4T1细胞;②miR-382实验组:miR-382mimics转染4T1细胞;③anti-miR-382实验组:miR-382的抑制性探针anti-miR-382转染至4T1细胞。每组实验重复3次。

1.4.2 细胞荧光素酶实验分组 ①野生对照组:将对照miR与含有核心互补序列的3′UTR报告质粒共转染4T1细胞;②野生实验组:将miR-382 mimics与含有核心互补序列的3′UTR报告质粒共转染4T1细胞;③突变对照组:将对照miR与含有突变的核心互补序列的3′UTR报告质粒共转染4T1细胞;④突变实验组:将miR-382 mimics与含有突变的核心互补序列的3′UTR报告质粒共转染4T1细胞。每组实验重复3次。

1.4.3 检测4T1细胞生物学特征及动物成瘤模型实验分组 ①对照miR pCDNA3.1组:对照miR pCDNA3.1共转染于4T1细胞;②对照miR pCDNA-PGC-1α组:对照miR pCDNA-PGC-1α共转染于4T1细胞;③miR-382+pCDNA3.1组:miR-382 mimics和pCDNA3.1共转染于4T1细胞;④miR-382+pCDNA-PGC-1α组:miR-382 mimics和pCDNA-PGC-1α共转染于4T1细胞。每组实验重复3次。

1.5 qRT-PCR实验

收集各组细胞,使用TRIzol提取RNA,之后使用逆转录试剂盒合成cDNA再进行qRT-PCR检测,小鼠PGC-1α mRNA PCR引物:正义链:5′-AACCACACCCACAGGATCAGA-3′;反义链:5′-TCTTCGCTTTATTGCTCCATGA-3′。反应条件及RNA的相对表达水平计算同前期研究[6]。

1.6 Western blot检测

收集各组细胞后BCA法蛋白定量,测定蛋白浓度,具体方法见文献[6]报道。

1.7 双荧光素酶实验

利用Target Scan和PicTar软件预测miR-382靶基因筛选出预测结果一致的靶基因。结合Target Scan和NCBI数据库,我们利用PrimerPremier 5软件设计PGC-1 3UTR PCR引物:(正义链:5′-GCAAGCTTCGTGTTCCCAGGCTGAGGAATG-3′反义链:5′-CGGAGCTCGTCTGCTCCTCAGAAGGAGCCA-3′。以DNA为模板进行PCR扩增,合成3′-UTR序列片段扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,胶回收PCR产物,选择*Hind*Ⅲ/*Sac*Ⅰ限制性内切酶加入引物5′端,并加上碱基GC做保护,37 ℃酶切过夜。将质粒和目的片段纯化,加入T4连接酶在4 ℃反应过夜,然后将连接产物转化至感受态细胞中。之后挑取单菌落进行培养,使用质粒抽提试剂提取质粒后进行测序验证,测序由上海吉凯公司完成。测序正确后提取质粒,293T细胞培养至对数生长期,接种于24孔板,每孔细胞数为5×10^4个,使用Mirus转染试剂转染,按照实验分组要求,取对照、正常或突变质粒,分别用opti-MEM 50 μL稀释,并加入miR382轻柔混匀;opti-MEM 50 μL加入Mirus 2 μL,室温孵育5 min;将以上两步骤溶液混合在一起,常温孵育20 min;将混合物1次加入24孔板中并十字混匀;在培养箱中温育5~6 h后,用正常培养基替换,然后进行荧光素酶测定。

1.8 Transwell共培养实验

将miR-382或对照miR分别与pCDNA3.1或pCDNA-PGC1α共转染于4T1细胞,使细胞处于对数生长期,用D-Hanks液充分洗涤2次,再加入无血清RPMI1640培养基,使细胞饥饿生长12 h。用0.25%胰酶消化后加入无血清RPMI1640培养基制备细胞悬液,调整至细胞密度为1.33×10^6/mL。Transwell板中加入500 μL含20% FBS的完全培养基,将小室放入板中。在Transwell小室中加入200 μL的细胞悬液,将Transwell板37 ℃下于CO_2培养箱中培养24 h。将小室取出,用PBS洗去培养基,结晶紫染色10 min;自来水将表面的结晶紫洗除干净,用棉签将上室中接种侧的细胞擦除干净,于显微镜下对非细胞接种侧拍照。在显微镜下观察并计数穿膜细胞数,随机取5个视野取均值。

1.9 CCK-8检测

将miR-382或对照miR分别与pCDNA3.1或pCDNA-PGC1α共转染于4T1细胞,在96孔培养板中配置100 μL(约10 000个细胞)的细胞悬液,每组设5个复孔。将培养板在培养箱预培养48 h,使细胞贴壁。然后在培养板加入100 μL各组待测物质。将培养板在培养箱干预6、12、24、48 h后,每孔分别加入10 μL CCK-8溶液,将培养板继续放在培养箱内孵育。用酶标仪测定在450 nm处的光密度值$D(450)$。所得数值以细胞数量为X轴,光密度值为Y轴,就可以制作标准曲线。

1.10 皮下移植瘤实验

将miR-382或对照miR分别与pCDNA3.1或pCDNA-PGC-1α共转染于4T1细胞,取5×10^6/100 μL细胞悬液接种于小鼠右侧腹股沟下方,每只注射0.2 mL(细胞数为1×10^7/只),同时在左侧腹股沟下方注射0.2 mL的生理盐水作为阴性对照,每天观察小鼠注射

部位肿瘤生长情况。并用游标卡尺测量和计算小鼠肿瘤体积。

1.11 尾静脉移植瘤实验

将 miR-382 或对照 miR 分别与 pCDNA3.1 或 pCDNA-PGC-1α 共转染于 4T1 细胞,取 5×10^6/100 μL 细胞悬液,在无菌条件下通过尾静脉注射接种,每只注射 0.2 mL(细胞数为 1×10^7/只)。10 d 后处死小鼠,取其肺脏组织,使用 4%多聚甲醛固定后用石蜡包埋切片,之后苏木精和伊红染色,封片后在显微镜下观察。使用 OlympusCX41 显微镜系统对图像进行分析,圈定肿瘤面积利用软件分析系统计算各组切片肿瘤面积,记录面积的数据后算出肿瘤相对面积的比值 。

1.12 统计学分析

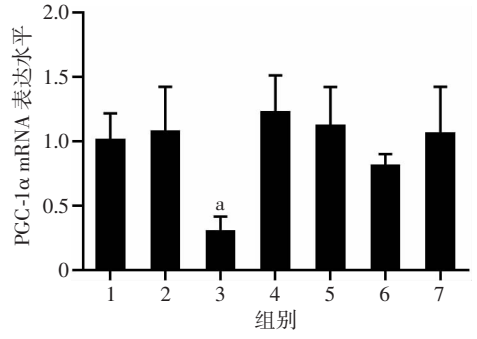
采用 SPSS 20.0 软件进行统计处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较行方差分析及 t 检验。检验水准:$\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 miR-382 对 PGC-1α 表达的影响

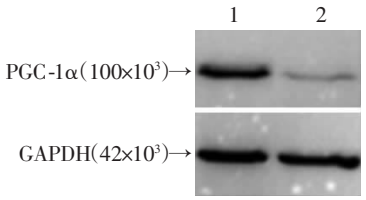
2.1.1 过表达 miR-382 对 PGC-1α 表达水平的影响

通过生物信息学在线网站(http://www.microrna.org/microrna)发现小鼠 PGC1α 基因 3′UTR 存在多个潜在的 miR 结合位点,分别是:mmu-miR-382、mmu-miR-539、mmu-miR-218、mmu-miR-202-3p、mmu-miR-451、mmu-miR-320、mmu-miR-375、mmu-miR-129-5p、mmu-miR-335-5p、mmu-miR-362-3p、mmu-miR-543。取预测分数前 5 位的 miRs,转染小鼠乳腺癌细胞 4T1,如图 1 所示,miR-382 对 PGC-1α 的 mRNA 的表达水平(0.30±0.09)的抑制作用最为显著。48 h 收集蛋白,行 Western blot 检测,如图 2 所示,与对照组(0.38±0.03)相比,miR-382 可大幅抑制 PGC-1α 蛋白水平[(0.14±0.02),$P<0.05$]。



1:空白;2:对照;3:miR-382;4:miR-539;5:miR-218;6:miR-202-3p;7:miR-451;a:$P<0.05$,与对照组比较

图 1 在线预测的潜在 miR 对 PGC-1αmRNA 的表达的影响

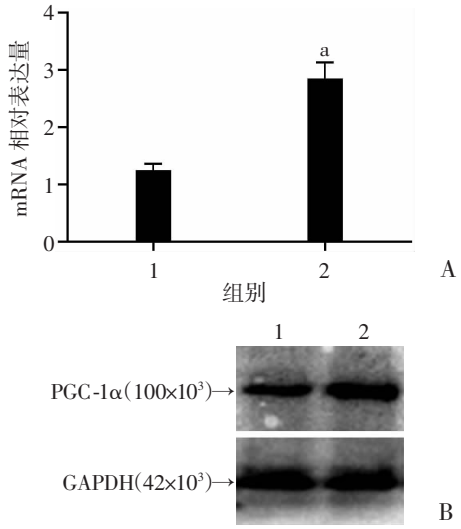


1:对照组;2:miR-382 实验组

图 2 过表达 miR-382 对 PGC-1α 蛋白表达的影响

2.1.2 抑制 miR-382 表达对 PGC-1α 表达的影响

抑制性探针 anti-miR-382 或对照 miR 转染 4T1 细胞,48 h 后行 Real-time PCR 检测和 Western blot 检测。如图 3 所示,与对照组(0.32±0.02)相比,anti-miR-382 显著上调 PGC-1α 的 mRNA 水平(0.56±0.07)和蛋白水平($P<0.05$)。

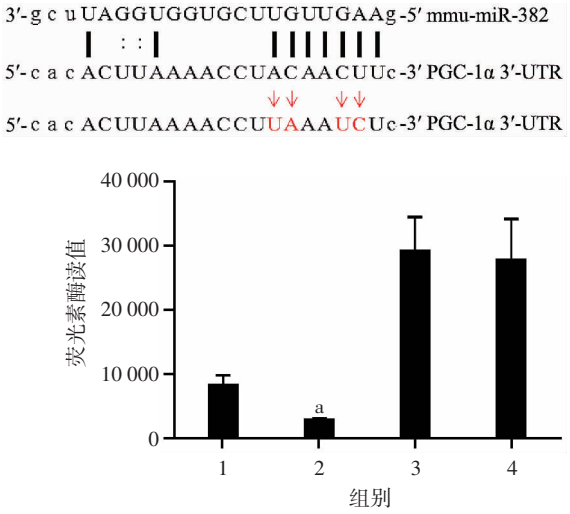


1:对照组;2:anti-miR-382 实验组;A:QT-PCR 检测 PGC-1α mRNA 相对表达量 a:$P<0.05$,与对照组比较;B:Western blot 检测结果

图 3 抑制 miR-382 对 PGC-1α 表达的影响

2.2 荧光素酶实验检测 miR-382 与 PGC-1α 的可能作用位点

如图 4 所示,小鼠 miR-382(mmu-miR-382)的序列与小鼠野生型 PGC1α 3′UTR 有较高互补性,作用位点位于 PGC-1α 3′UTR 565-582,核心互补序列为 ACAACUU。构建核心互补序列被突变为 UAAAUCU 的质粒,转染 293T 细胞行荧光素酶报告基因检测,结果显示:相比对照[相对荧光素酶活性为(1.00±0.14)],miR-382 显著抑制野生型报告质粒的活性[相对荧光素酶活性为(0.31±0.09),$P<0.05$];而在突变型报告质粒组,miR-382 无明显抑制效应。

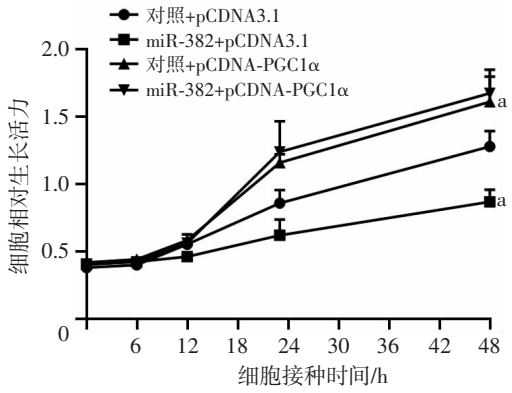


A:在线软件预测两者之间的作用位点;B:荧光素酶实验结果读值　1:野生对照组;2:野生实验组;3:突变对照组;4:突变实验组;a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　荧光素酶实验检测 miR-382 与 PGC-1α 的作用位点

2.3　miR-382/PGC-1α 信号通路对 4T1 细胞生物学特性的影响

2.3.1　对 4T1 细胞增殖能力的影响　　将 miR-382mimics 或对照 miR 分别与 pCDNA3.1 或 pCDNA-PGC1α 共转染于 4T1 细胞,应用 CCK-8 法检测细胞增殖活力,如图 5 所示,根据第 48 小时的数据,与对照+pCDNA3.1 组(1.27±0.11)比较,miR-382 可显著抑制 4T1 细胞体外增殖[(0.87±0.08),$P<0.05$];对照+pCDNA-PGC1a 的表达值为(1.61±0.17),证明过表达 PGC-1α 可明显促进细胞增殖活力,抵消了 miR-382 对 PGC-1α 的抑制作用($P<0.05$)。

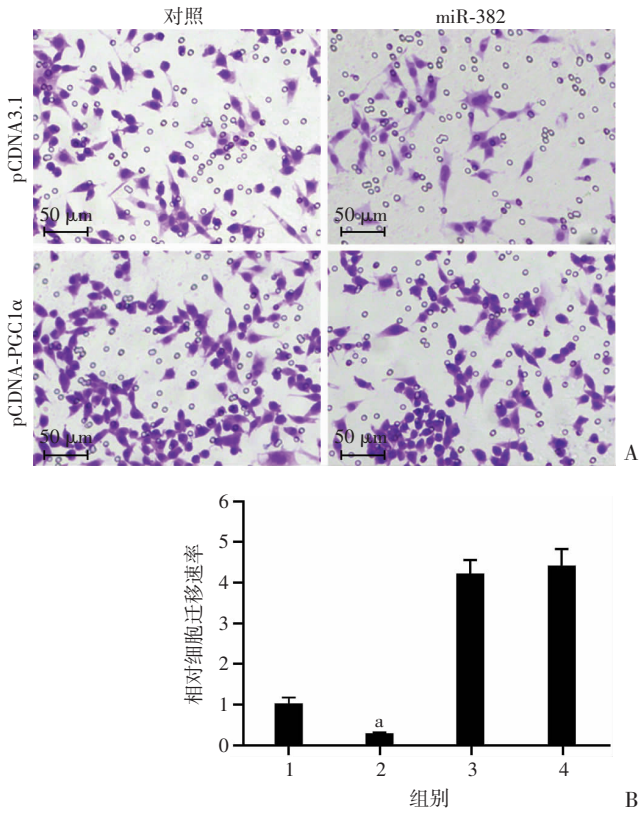


a:$P<0.05$,与对照+pCDNA3.1 组比较

图 5　CCK-8 检测 miR-382/PGC-1α 信号通路对 4T1 细胞体外增殖的影响

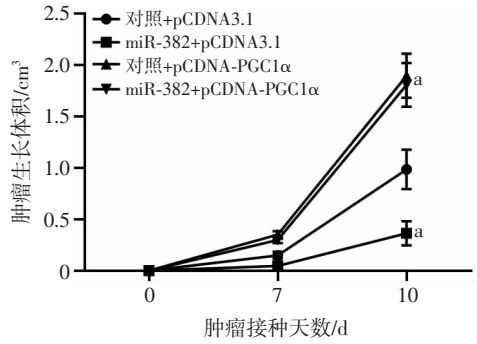
2.3.2　对 4T1 细胞迁移能力的影响　　如图 6 所示,对照+pCDNA3.1 组的穿膜细胞数(830±119)个;miR-382+pCDNA3.1 组为(219±31)个,miR-382 可显著抑制 4T1 细胞的迁移能力($P<0.05$);对照+pCDNA-PGC-1α 组细胞数为(3 480±246)个,证明过表达 PGC-1α 可明显促进 4T1 细胞的迁移活性,抵消了 miR-382 对 PGC1α 的抑制作用($P<0.05$)。

2.3.3　对皮下移植瘤生长的影响　　如图 7 所示,将 miR-382mimics 或对照 miR 分别与 pCDNA3.1 或 pCDNA-PGC1α 共转染于 4T1 细胞,后建立小鼠皮下移植瘤模型,参照第 10 天的数据,结果显示:对照+pCDNA3.1 组移植瘤体积为(0.98±0.17)cm^3,miR-382+pCDNA3.1 组为(0.36±0.10)cm^3,miR-382 可显著抑制 4T1 移植瘤的生长($P<0.05$);对照+pCDNA-PGC-1α 组为(1.89±0.19)cm^3,过表达 PGC1α 可明显促进移植瘤的生长($P<0.05$);miR-382 的抑瘤效应因 PGC1α 过表达而被阻断,过表达 PGC-1α 可明显促进移植瘤的生长。



1:对照+pCDNA3.1 组;2:miR-382+pCDNA3.1 组;3:对照+pCDNA-PGC-1α 组;4:miR-382+pCDNA-PGC-1α 组;A:各组细胞镜下穿膜图片;B:各组细胞穿膜相对速率柱状统计分析　a:$P<0.05$,与对照+pCDNA3.1 组比较

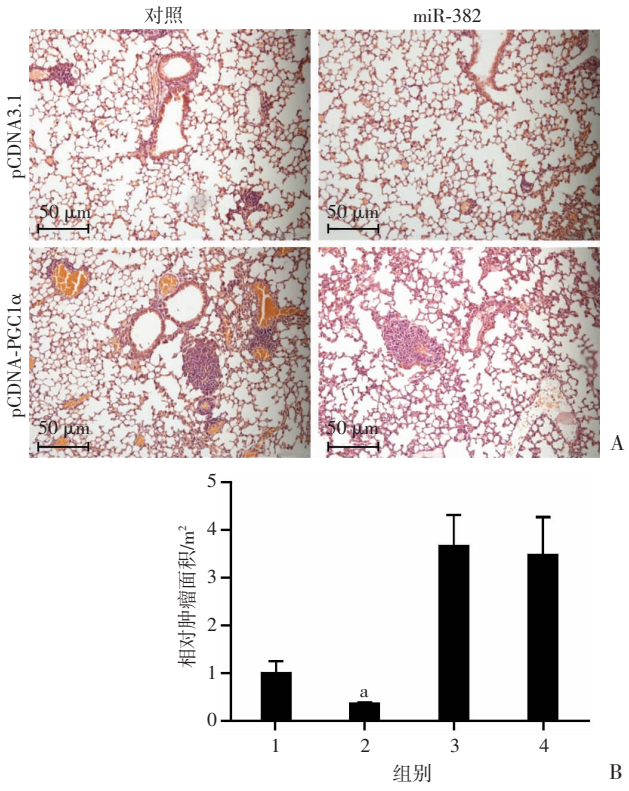
图 6　Transwell 检测 miR-382/PGC-1α 信号通路对 4T1 细胞迁移能力的影响



a：$P<0.05$，与对照+pCDNA3.1组比较

图7 皮下移植瘤实验检测 miR-382/PGC-1α 信号通路对4T1细胞皮下移植瘤成瘤能力的影响

2.3.4 对尾静脉肺移植灶生长的影响 如图8所示，对照+pCDNA3.1组转移瘤面积为(7 996±1 617) μm^2，miR-382+pCDNA3.1组为(2 848±166) μm^2，miR-382可显著抑制4T1肿瘤肺部转移灶的形成($P<0.05$)；对照+pCDNA-PGC-1α组为(29 233±4 268) μm^2，过表达PGC-1α可明显促进4T1细胞的肺部转移能力($P<0.05$)；miR-382的抑制转移效应因PGC1α过表达而被阻断，过表达PGC-1α可明显促进移植瘤的生长。



1：对照+pCDNA3.1组；2：miR-382+pCDNA3.1组；3：对照+pCDNA-PGC-1α组；4：miR-382+pCDNA-PGC-1α组；a：$P<0.05$，与对照+pCDNA3.1组比较

图8 尾静脉肺移植灶实验检测 miR-382 与 PGC-1α 对4T1细胞肺转移瘤生长的影响

3 讨论

三阴性乳腺癌中是一种起源复杂的异质性疾病，其发生、发展与环境、遗传等因素息息相关[8]，占所有乳腺癌的15%~20%，具有独特的临床病理特征，如病理组织学分级高、易局部复发、转移早、侵袭性强、预后差等特点[9-10]。目前，随着手术水平的不断提高，放射治疗和化疗方案的进一步规范，乳腺癌的诊断和治疗水平也取得了很大进展。然而，远处转移仍然是治疗瓶颈，是乳腺癌的研究热点之一。

这PGC-1α是PGC-1家族的亚型之一，是过氧化物酶体增殖物激活受体γ(peroxisomeprolife-rator-activated receptor γ, PPARγ)的辅激活因子[11]。人PGC-1基因位于染色体4p15，分子量为91kDAa，最早是PUIG-SERVER[12]利用酵母双杂交技术从小鼠的棕色脂肪组织构建的cDNA库中发现的，并且ST-PIERRE等[13]研究发现，PGC-1α能有效抑制ROS生成，促进线粒体复制和转录，增加ATP生成，进而促进肿瘤细胞转移。在乳腺癌方面，血浆PGC-1α水平高的患者相比血浆PGC-1α水平低的乳腺癌患者预后和生存率要差[12]。在浸润性乳腺癌中PGC-1α通过增强线粒体的功能来促进癌细胞的远处转移[14]。但调控PGC-1α的上游具体机制尚未明确。

我们通过基因在线预测软件发现PGC-1α基因3′UTR存在多个潜在的miR结合位点。miRNA是转录后调控因子中最大的一组。microRNA(miRNA)是转录后调控因子之一[15]，其5'末端可与靶基因的3'非翻译区(3′UTR)结合，从而使基因翻译退化并减少蛋白质表达[16]。miRNA参与一系列生物过程，包括细胞周期，生长，凋亡，分化和应激反应[17]，多种miRNA通过靶向基因调节乳腺癌的细胞增殖、血管生成、侵袭和转移。首次发现与乳腺癌相关的miRNA是miR-206。乳腺癌组织中miR-206显著下降，低miR-206水平与晚期临床分期也和总体生存率较短密切相关[18]。miR-125也可通过RTNK抑制ErBb2，miR-145对乳腺癌的转移也起到一定作用[14,19]。有研究表明，miR-382也与癌症的发生发展息息相关。例如，miR-382通过抑制SETD8表达参与非小细胞肺癌发生和转移[20]。结直肠癌中，miR-382调节NR2F2促进癌症的发生发展[21]。但miR-382在乳腺癌中是否与PGC-1α有靶向调节关系仍待确定。我们前期研究发现在TAMs中miR-382通过降低PGC-1α表达，阻止有氧氧化依赖的M2巨噬细胞活化，进而抑

制癌细胞转移[6-7]。但在乳腺癌细胞中两者的关系还不清楚。

所以本实验首先利用生物信息学网站发现有多个miRNA对PGC-1α潜在的结合位点,分别是mmu-miR-382、mmu-miR-539、mmu-miR-218、mmu-miR-202-3p、mmu-miR-451、mmu-miR-320、mmu-miR-375、mmu-miR-129-5p、mmu-miR-335-5p、mmu-miR-362-3p、mmu-miR-543。其中miR-382可以明显抑制PGC-1α的基因和蛋白表达,抑制miR-382后PGC-1α的表达显著增高,说明PGC-1α受miR-382的调控,但是作用位点尚不清楚。

于是我们构建PGC-1α双荧光素酶报告质粒和突变质粒,与miR-382 mimics共转染293T细胞,检测荧光素酶活性的变化。荧光素酶报告基因的原理在于miRNA主要通过作用于靶基因的3′UTR起作用,可以将目的基因3′UTR区域构建至载体中报告基因Luciferase的后面,构建荧光素酶质粒。然后转染至细胞中,通过比较过表达或者干扰miRNA后,监测荧光素酶的活性变化,检测报告基因表达的改变从而可以定量反映miRNA对目的基因的抑制作用。本实验发现miR-382可明显降低PGC-1α的荧光素酶活性的表达,证明miR-382对PGC-1α有调节作用,作用位点位于PGC-1α 3′UTR 565-582。

虽然我们通过上述两部分实验说明miR-382对PGC-1α有调节作用,作用位点位于PGC-1α 3′UTR 565-582,但是miR-382对PGC-1α的调控具体在乳腺癌生物学特征方面的作用尚不清楚,因此我们运用pcDNA3.1与pcDNA3.1-PGC-1α质粒改变miR-382/PGC-1α信号通路在4T1细胞的增殖、迁移、成瘤及肺转移方面的作用,结果发现过表达miR-382能明显降低细胞体外增殖和迁移能力,并显著抑制癌细胞的成瘤和肺转移;而过表达PGC-1α可显著增加细胞体外增殖和迁移能力,并明显促进癌细胞的成瘤和肺转移。

综上,miR-382可能通过PGC-1α抑制4T1细胞株的增殖和肺转移;其作用位点位于PGC-1α 3′UTR 565-582位点,本实验为我们后续研究人体乳腺癌组织中两者关系进行了进一步探究,为TNBC的治疗提供了新的实验数据,为该型靶向药物的研究提供的新的思路。

参考文献:

[1] BOSCH A, EROLES P, ZARAGOZA R, *et al*. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. [J]. Cancer Treatment Rev, 2010, 36(3):206-215.

[2] 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. DOI:10.1038/ncb3039.

[3] PUIGSERVER P,WU Z,PARK C W,*et al*. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis[J]. Cell, 1998, 92(6): 829-839. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81410-5.

[4] CALIN G A,CROCE C M. MicroRNA signatures in human cancers[J]. Nat Rev Cancer,2006,6(11): 857-866. DOI: 10.1038/nrc1997.

[5] FU L, LI Z, ZHU J, *et al*. Serum expression levels of microRNA-382-3p, -598-3p, -1246 and -184 in breast cancer patients.[J]. Oncol Letters, 2016, 12(1):269. DOI: 10.3892/ol.2016.4582.

[6] 代朦,靳鑫,雷优扬,等.过表达miR-382的肿瘤相关巨噬细胞对三阴性乳腺癌生物学特性的影响[J].第三军医大学学报,2018,40(15):1375-1382. DOI:10.16016/j.1000-5404.201801107.
DAI M,JIN X,LEI Y Y, *et al*. Effect of miR-382 overexpressing tumor-associated macrophages on biological properties of triple-negative breast cancer 4T1 cells [J]. J Third Mil Med Univ, 2018, 40(15): 1375-1382. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201801107.

[7] 靳鑫,倪田根,王宁,等.PGC-1α通过线粒体介导巨噬细胞极化状态的机制研究[J].第三军医大学学报,2019,41(1):56-62. DOI:10.16016/j.1000-5404.201808139.
JIN X, NI T G,WANG N,*et al*. Mechanism of mitochondria-mediated PGC-1α in macrophage polarization[J]. J Third Mil Med Univ, 2019, 41(01): 56-62. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201808139.

[8] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, *et al*. Breast cancer in China[J]. Lancet Oncology, 2014, 15(7):e279-e289. DOI:10.1016/S1470-2045(13)70567-9.

[9] COSTA R,SHAH A N,SANTA-MARIA C A,*et al*. Targeting Epidermal Growth Factor Receptor in triple negative breast cancer: New discoveries and practical insights for drug development[J]. Cancer Treatment Rev, 2017, 53: 111-119. DOI:10.1016/j.ctrv.2016.12.010.

[10] DENKERT C,LIEDTKE C,TUTT A,*et al*. Molecular alterations in triple-negative breast cancer-the road to new treatment strategies[J]. Lancet, 2017, 389(10087): 2430-2442. DOI:10.1016/S0140-6736(16)32454-0.

[11] 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. DOI:10.1038/ncb3039.

[12] PUIGSERVER P, WU Z, PARK C W, *et al*. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis[J]. Cell, 1998, 92(6):829-839. DOI:10.1016/S0092-8674(00)81410-5.

[13] ST-PIERRE J, DRORI S, ULDRY M,*et al*. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1α transcriptional coactivators [J]. Cell, 2006, 127(2):397-408. DOI:10.1016/j.cell.2006.09.024.

[14] YU Z, BASERGA R, CHEN L, *et al*. MicroRNA, cell cycle, and human breast cancer[J]. Am J Pathol, 2010, 176(3):1058-1064. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090664.

[15] STENVANG J, PETRI A, LINDOW M, *et al*. Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides [J]. Silence, 2012, 3(1):1. DOI: 10.1186/1758-907X-3-1.

[16] ZHANG H, LI Y, LAI M. The microRNA network and tumor metastasis. Oncogene, 2010,29:937-948. DOI: 10.1038/onc.2009.406.

[17] JOVANOVIC M, HENGARTNER M O. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. Oncogene, 2006, 25:6176-6187. DOI: 10.1038/sj.onc.1209912.

[18] LI Y, HONG F, YU Z. Decreased expression of microRNA-206 in breast cancer and its association with disease characteristics and patient survival[J]. J Int Med Res, 2013, 41(3):596-602. DOI: 10.1177/0300060513485856.

[19] KONG Y W, FERLAND-MCCOLLOUGH D, JACKSON T J, *et al*. MicroRNAs in cancer management[J]. Lancet Oncol. 2012, 13(6): e249-e258. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70073-6.

[20] CHEN T, REN H, THAKUR A, *et al*. MiR-382 inhibits tumor progression by targeting SETD8 in non-small cell lung cancer[J]. Biomedicine&Pharmacotherapy, 2017, 86:248-253. DOI:10.1016/j.biopha.2016.12.007.

[21] ZHOU B, SONG J, HAN T, *et al*. MiR-382 inhibits cell growth and invasion by targeting NR2F2 in colorectal cancer [J]. Mol Carcinogen, 2016,55(12): 2260-2267. DOI: 10.1002/mc.22466.

(**收稿**:2019-03-06;**修回**:2019-04-26)

(编辑 王 红)