DOI:10.16016/j.2097-0927.202401022

lncRNA ENST 933 在乳腺癌中的作用及其机制研究

邓钰梅,陈俊霞 400016 重庆,重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心

［摘要］ **目的** 探讨长链非编码 RNA ENST00000579933(简称 lncRNA ENST 933)对乳腺癌(breast cancer,BC)发展的调控机制。**方法** 通过实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)检测 lncRNA ENST 933 在 BC 组织和 BC 细胞系(MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453)中的表达;运用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8)、克隆形成、EdU、Transwell、流式细胞仪、蛋白质印迹法(Western blot)、体内移植瘤实验检测 lncRNA ENST 933 和 miR-588 在 BC 细胞增殖、迁移、侵袭与周期中的作用;采用双荧光素酶报告基因、RNA 免疫共沉淀实验、RT-qPCR、Western blot 和挽救实验来评估 lncRNA ENST 933、miR-588、真核起始因子 6(eukaryotic initiation factor 6,EIF6)之间的互相作用。**结果** lncRNA ENST 933 在 BC 组织和 BC 细胞系中表达均显著上调($P<0.05$),过表达 lncRNA ENST 933 能够提升 BC 细胞增殖、迁移与侵袭能力,促进移植瘤生长,而敲低 lncRNA ENST 933 表达后 BC 的发展受到抑制,并导致细胞周期阻滞($P<0.05$)。miR-588 在 BC 组织中表达明显下调,过表达 miR-588 可抑制 BC 细胞的增殖、迁移与侵袭($P<0.05$)。挽救实验结果表明 lncRNA ENST 933 可通过与 miR-588 进行竞争性结合,从而促进靶基因 EIF6 的表达。Western blot 结果显示 miR-588 降低了 AKT 和 mTOR 的磷酸化水平($P<0.05$)。**结论** lncRNA ENST 933 可通过调控 miR-588/EIF6 轴促进 BC 的进展。

［关键词］ ENST00000579933;miR-588;EIF6;乳腺癌;增殖;侵袭
［中图法分类号］ R394.3; R730.23; R737.9 ［文献标志码］ A

Role of long non-coding RNA ENST 933 in breast cancer and its underlying mechanism

DENG Yumei, CHEN Junxia Molecular Medicine and Cancer Research Centre, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

［**Abstract**］ **Objective** To investigate the regulatory mechanism of long non-coding RNA (lncRNA) ENST00000579933 (hereinafter referred to as lncRNA ENST 933) on the development of breast cancer (BC). **Methods** The expression level of lncRNA ENST 933 in BC tissues as well as in BC cell lines (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453) was detected by fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction RT-qPCR. The effects of lncRNA ENST 933 and miR-588 on the proliferation, migration, invasion and cell cycle in BC were determined using CCK-8 assay, clone formation assay, EdU, Transwell assay, flow cytometry, Western blotting and *in vivo* transplantation tumor assay. Finally, dual luciferase reporter gene, RNA immunoprecipitation assay, RT-qPCR, Western blotting and rescue assay were used to evaluate the interactions among lncRNA ENST 933, miR-588, and eukaryotic initiation factor 6 (EIF6). **Results** The expression of lncRNA ENST 933 was up-regulated in both BC tissues and BC cell lines ($P<0.05$). Overexpression of lncRNA ENST 933 could enhance the proliferation, migration and invasion abilities of BC cells and promote the growth of transplanted tumors, while knockdown of lncRNA ENST 933 resulted in inhibited development of BC and arrested cell cycle ($P<0.05$). The expression of miR-588 was obviously down-regulated in BC tissues, and its overexpression inhibited cell proliferation, migration and invasion

［基金项目］ 国家自然科学基金面上项目(82173170)
［通信作者］ 陈俊霞,E-mail:chjunxia@126.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

abilities in the BC cells ($P<0.05$). Moreover, the results of rescue assay indicated that lncRNA ENST 933 promoted the expression of target gene EIF6 by competitively binding with miR-588. Western blotting revealed that miR-588 decreased the phosphorylation of AKT and mTOR ($P<0.05$). **Conclusion** lncRNA ENST 933 promotes the progression of BC by modulating the miR-588/EIF6 axis.

[**Key words**] ENST00000579933; miR-588; EIF6; breast cancer; proliferation; invasion

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82173170). Corresponding author: CHEN Junxia, E-mail: chjunxia@126.com

乳腺癌(breast cancer,BC)是全世界女性中最常见的高度异质性恶性妇科肿瘤,其发病比较隐匿,表现出年轻化状态,且其发病率位列成年女性恶性肿瘤首位,呈持续上升趋势,成为女性癌症相关死亡的主要原因之一,严重影响女性的生活质量[1-2]。虽然诊断和治疗方式有了很大的进步,但是 BC 患者的生存率仍然严峻,且其发生发展和转移过程中的调控机制仍不清楚。因此,深入研究和阐明 BC 的发病机理为 BC 患者的诊治及预后评估奠定基础。

lncRNA 是一类长达 200 个核苷酸的非编码 RNA,广泛参与多种生命活动,包括基因表达、生长、分化和发育等方面,其异常表达在癌症发生发展中发挥重要作用[3]。此外,近些年研究报道表明 lncRNA 的异常表达与 BC 的发生和发展密切相关,且 lncRNA 可竞争性结合 miRNA,从而调节靶基因的转录及生物活性[4],例如 lncRNA SEMA3B-AS1 通过 miR-3940/KLLN 抑制 BC 的进展[5]。ZHU 等[6]研究发现 lncRNA TRG-AS1 是一种内源性 RNA,通过与 miR-877-5p 竞争性结合上调 WISP2 表达,从而抑制乳腺癌骨转移。SUN 等[7]研究发现 lncRNA COX10-DT 可通过 COX10-DT/miR-206/BDNF 轴促进乳腺癌的发展,但目前尚未见到有关长链非编码 RNA ENST00000579933(简称 lncRNA ENST 933)的报告,其在 BC 中的表达和机制尚不清楚。

据报道,miR-588 在肺癌、胃癌和神经胶质瘤中起到肿瘤抑制作用,其抑制癌症生长的机制包括抑制增殖、侵袭、迁移、血管生成和诱导细胞凋亡,且 miR-588 在 BC 中表达下调,其异常表达与患者预后不良密切相关[8],但其在 BC 中的分子机制仍不清楚。

LIU 等[9]研究发现真核起始因子 6(eukaryotic initiation factor 6,EIF6)是 miR-588 在肝细胞癌中的直接靶点,介导 miR-588 和 lncRNA PICSAR 在肝细胞癌中的生物学效应。EIF6 是一种保守的 27 kDa 蛋白,在多种恶性肿瘤中功能和表达失调,促进肿瘤生长、侵袭和转移,包括 BC、肺癌、结直肠癌、恶性胸膜间皮瘤和卵巢腺癌[10],其在 BC 中表达上调,但关于 EIF6 在 BC 的作用机制有待进一步研究。

本研究通过 RNA 微阵列芯片数据分析,筛选出 BC 中显著高表达的 lncRNA ENST 933,进一步运用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)检测 lncRNA ENST 933 在 BC 组织和 BC 细胞系中的表达,并结合体内体外实验研究 lncRNA ENST 933 对 BC 细胞(MCF-7、MDA-MB-231)增殖、周期、侵袭和迁移的影响及其潜在分子机制,从而为 BC 的诊治提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织样本和细胞 收集重庆医科大学附属第一医院 2016 年 7 月至 2023 年 5 月接受手术病理确诊的 30 例乳腺癌患者切除的乳腺癌组织和配对的癌旁组织(同一患者的同一侧乳房,距离乳腺癌组织边缘 1~5 cm 处且经病理学诊断无癌细胞的乳腺正常组织,肉眼所见无明显异常),新鲜的乳腺癌组织及其匹配的癌旁组织经手术切除后 30 min 内放入液氮保存。本研究经过重庆医科大学伦理委员会的审查[2022 年科研伦理(2022-K228)],所有患者签署了知情同意书。选取标准:①病理学诊断为乳腺癌;②患者未接受任何放疗、化疗及靶向治疗;③患者临床资料、病理资料完整。MCF-10A 以及 3 种 BC 细胞系(MCF-7、MDA-MB-231 和 MDA-MB-453)保存于本实验研究中心。

1.1.2 主要试剂 FBS 购自重庆睿宸生物科技有限公司;DMEM 培养基购自美国 Gibico 公司;lncRNA ENST 933 引物和 EdU 试剂盒购自广州锐博生物科技公司;U6 引物、miR-588 引物和 EIF6 引物购自上海生工生物工程公司;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;Transwell 小室购自美国 Millipore 公司;细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8,CCK-8)试剂盒购自武汉博士德生物;兔抗 CDK4、兔抗 CCND1 和兔抗 Ki67 购自巴傲得生物公司;兔抗 CCNE1 购自美国 Abcam 公司;兔抗 EIF6、鼠抗 p-AKT、兔抗 AKT 和鼠抗 AGO2 购自 proteintech 公司;兔抗 p-mTOR 购自 Abmart 公司;兔抗 mTOR 购自华安生物;BALB/c 雌性裸鼠购自北京华阜康生物科学有限公司;lncRNA ENST 933 敲低、过表达质粒和对照质粒购自擎科生物;双荧

光素酶报告基因检测试剂盒购自 Promega 公司;lncRNA ENST 933 野生型(ENST 933-WT)和 lncRNA ENST 933 突变型(ENST 933-MUT)双荧光素酶报告载体、miR-588 mimic、miR-588 inhibitor 及对照由武汉金开瑞生物工程有限公司合成并测序鉴定;lncRNA ENST 933 FISH 探针和对照探针由广州锐博生物科技有限公司设计并合成。

1.2 *方法*

1.2.1 细胞培养与转染 使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养 MCF-7 和 MDA-MB-231,放置于湿润空气、5% CO_2 和 37 ℃的孵育箱中培养,每隔 1~2 d 更换新培养基,将细胞接种至 6 孔板,分为阴性对照组(NC)、lncRNA ENST 933 干扰质粒组(ENST 933 shRNA)和 lncRNA ENST 933 过表达质粒组(ENST 933 OE)、miR-588 mimic 组和 miR-588 inhibitor 组,参照细胞分组的干预内容,根据 lipofectamine 2000 试剂盒说明书进行转染。

1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)检测基因 mRNA 的表达 采用 Trizol 法从 BC 组织及癌旁组织或 BC 细胞及人正常乳腺上皮细胞(MCF-10A)中分离出 RNA,使用 NanoDrop ND-2000 分光光度计检测 RNA 浓度和完整性。根据反转录试剂盒说明书反转录总 RNA(1 μg),反转录合成 cDNA 第一链,以 cDNA 为模板,以 β-actin(mRNA)/U6 为内参,参照 SYBR Green Fast RT-qPCR Mix 说明书,应用 RT-qPCR 检测 lncRNA ENST 933、miR-588 和 EIF6 的表达,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法评估 lncRNA ENST 933、miR-588 和 EIF6 的表达。采用的特异性引物序列见表 1。

1.2.3 FISH 和核质分离实验观察 lncRNA ENST 933 亚细胞定位 将适量 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞铺于带有爬片的 24 孔板内,PBS 清洗 3 次,4%多聚甲醛(含 DEPC)室温静置固定 30 min,TritonX-100(0.5%)通透 30 min,添加预杂交液于爬片上,于 37 ℃/1 h 条件下烘箱中孵育;将 FISH 探针在 85 ℃下变性 5 min,37 ℃下平衡 2 min;滴加适量变性探针后放在暗盒内 45 ℃杂交 12 h,DAPI 室温孵育 20 min;用抗荧光淬灭液对爬片进行封片,然后使用显微镜拍照。

根据核质分离步骤说明书,提取 MCF-7 或 MDA-MB-231 的细胞质和细胞核的 RNA,RT-qPCR 检测 lncRNA ENST 933 在细胞质和细胞核的表达情况。

公式①:细胞核=$2^{-细胞核Ct}/(2^{-细胞核Ct}+2^{-细胞质Ct})\times100\%$

公式②:细胞质=1-公式①

1.2.4 双荧光素酶报告基因实验 利用 lncRNA ENST 933 结合位点的野生序列和突变序列,本研究合成双荧光素酶报告基因的载体。收集 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞并接种于 24 孔板上,当细胞融合度达到 80%时,使用 lipofectamine 2000 将双荧光素酶报告基因载体 lncRNA ENST 933 野生型/突变型与 mimic NC/miR-588 mimic 共转染至 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞中,以海肾荧光素酶作为转染对照,继续培养 48 h 后用双荧光素酶检测试剂检测各组荧光素酶活性。

双荧光素酶的活性比值=萤火虫荧光素酶反应强度/海肾荧光素酶反应强度

1.2.5 CCK-8、EdU、平板克隆实验检测细胞增殖能力

在对 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞进行稳定转染后,将其细胞数调整至 2×10^4/mL。在 96 孔板上每孔接种 100 μL 细胞悬液,在 CO_2 培养箱中分别培养 0、1、2、3 d,每孔加入 100 μL CCK-8 溶液,继续培养 2 h,之后用酶标仪检测波长 450 nm 处的光密度值[D(450)],并绘制细胞的生长曲线,评估细胞的增殖能力。

采用 EdU 实验检测细胞增殖能力,接种转染 48 h 后的对数生长期细胞,于温箱中培养 24 h 后 EdU 标记,Apollo 染色以及 DNA 染色,随后利用倒置显微镜进行拍照。

细胞增殖率=(EdU 细胞数/DAPI 细胞数)×100%

采用平板克隆实验检测细胞集落形成数,将各组细胞接种于 6 孔板中,培养 2 周左右看到克隆形成后,用结晶紫染色 30 min,在低倍光学显微镜下计数,计算细胞集落的大小和数量。

表 1 引物序列

基因名称	正向(5'—3')	反向(5'—3')	预期扩增长度/bp
lncRNA ENST 933	TGGAAACTTCTGCACCATGA	CAGTTTACTTGGCCCTCTGC	98
β-actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	250
miR-588	GCGTTGGCCACAATGGGT	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT	/
*U*6	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	94
*EIF*6	GGCCGACCAGGTGCTAGTAGG	CACACCAGTCATTCACCACCATCC	185

1.2.6 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力 侵袭实验:首先准备 50 μL 基质胶稀释液(按基质胶与无血清培养基 1∶8的比例配置),然后将此稀释液均匀铺布在 Transwell 小室的上室内。在进行 Transwell 迁移实验时,小室上室内不放基质胶。24 孔板内事先加入 500 μL 含血清培养基,再将小室放回孔板内,细胞转染 48 h 后,使用无血清培养基将细胞数调整至 1×10^5/mL,各组取 200 μL 细胞悬液放入小室上室内,于 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中孵育 24 h 后,将小室放置 4%多聚甲醛中固定 30 min,取出后在结晶紫中染色 30 min,拭除上室内不透过薄膜的细胞,在光学倒置显微镜下进行拍照并统计细胞数。

1.2.7 流式细胞术检测细胞周期 收集细胞,1 000 r/min 低速离心 5 min 后弃废液,用 500 μL PBS 重悬细胞后以 1 000 r/min 低速离心 5 min,弃废液,反复 2 次,重悬细胞于 100 μL PBS 缓冲液中,缓慢加入 900 μL 预冷 70%乙醇轻柔混匀,边加边震荡,避免细胞聚集,在 4 ℃条件下固定 12 h。1 000 r/min 低速离心 5 min 后弃乙醇,使用 PBS 洗涤 2 次。添加聚酰亚胺溶液 PI(50 μg/mL) 500 μL,随后避光室温条件下温育 30 min,用流式细胞仪测定各组细胞的细胞周期分布。

1.2.8 Western blot 检测蛋白的表达 使用 RIPA 裂解缓冲液(PMSF∶RIPA=1∶99)提取 BC 组织或细胞系的总蛋白。BCA 法测蛋白浓度,并将每个样品中等量的总蛋白(20 μg)上样到十二烷基硫酸钠(SDS)凝胶上进行电泳,电泳后 250 mA 进行转膜,转移至聚偏氟乙烯膜(PVDF)上。常温下,用 8%脱脂牛奶中封闭薄膜 2 h 后,与一抗于 4 ℃孵育 14 h。膜用 TBST 洗涤 3 次,然后与二抗(稀释比例 1∶5 000)在常温下孵育 1 h,用 TBST 洗涤 3 次。配置显影液,滴加 ECL 化学发光液进行显色。采用 Image J 软件分析内参 β-actin 和目标条带的灰度值。

目标条带蛋白水平=目标条带的灰度值/β-actin 的灰度值

1.2.9 抗 AGO2 RIP(RNA immunoprecipitation)实验 依据 RNA 免疫沉淀试剂盒说明书,分离和提取 MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞的 RNA 和蛋白质,RT-qPCR 检测 lncRNA ENST 933、miR-588 及 EIF6 的表达情况。

1.2.10 肿瘤异种移植小鼠模型 采用 5 周龄雌性 BALB/C nude 鼠,体质量 14~16 g 每只裸鼠侧翼皮下注射 1×10^7 个细胞,分为 4 组,分别为 shRNA NC、lncRNA ENST 933 shRNA、OE NC 和 lncRNA ENST 933 OE 组,每组各 5 只裸鼠。4 周后,处死小鼠,剥离移植瘤并拍照称量,制作石蜡切片,进行 HE 染色和免疫组化观察。免疫组化:石蜡切片在二甲苯中脱蜡,抗原修复后,切片经过氧化氢(H_2O_2)和山羊血清处理,与一抗在 4 ℃下孵育过夜。加入适量生物标记二抗静置 20 min;添加链霉卵白素反应 20 min,DAB 显色液及苏木精进行染色后,切片用酒精和二甲苯脱水,并在显微镜下拍照。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件和 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析,正态分布的计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立 t 检验进行两组间差异分析,$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

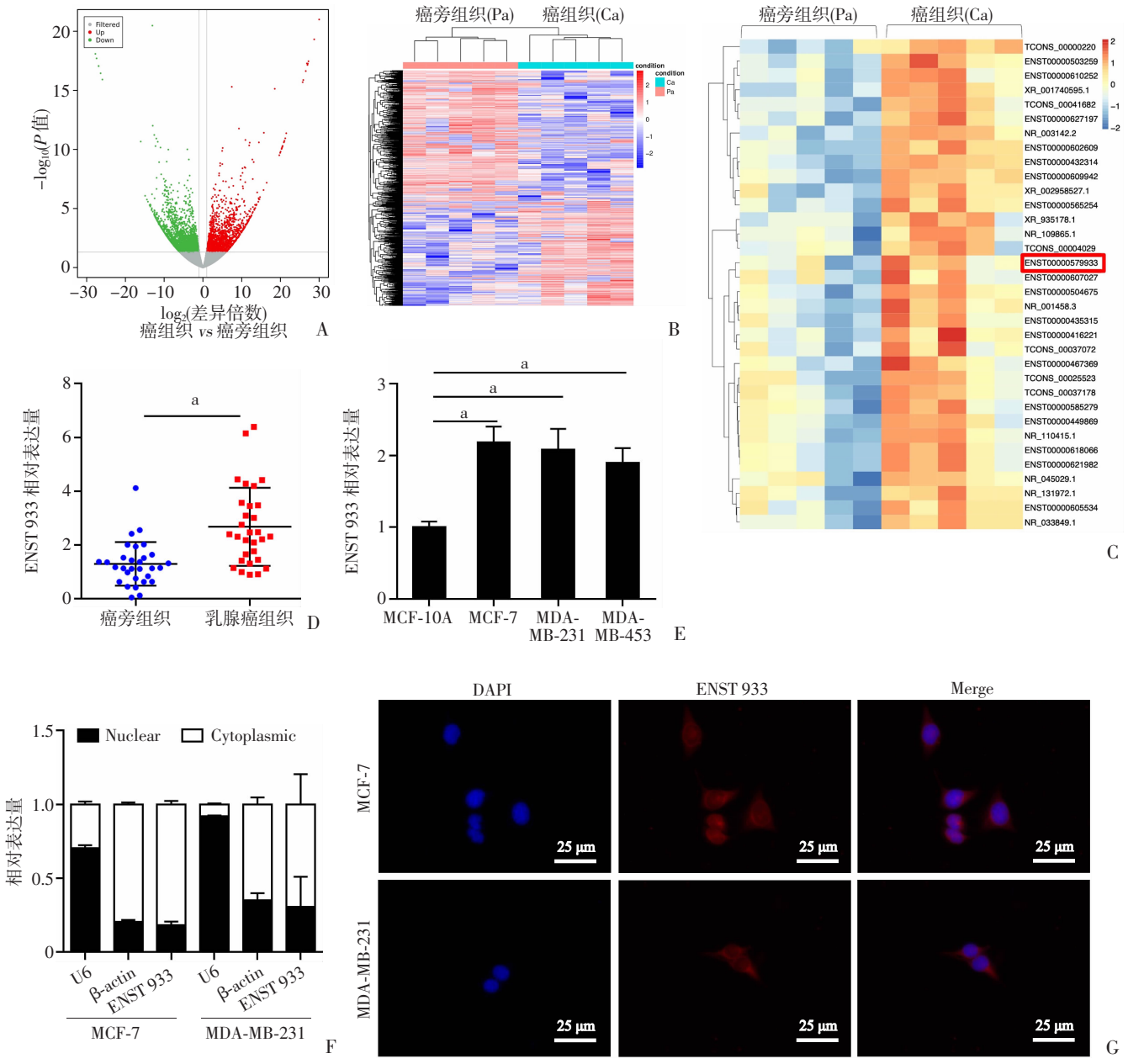
2 结果

2.1 lncRNA ENST 933 在 BC 中的表达及定位

首先收集 5 对 BC 组织和癌旁组织用于 RNA 微阵列芯片分析,以差异倍数>2,$P<0.05$ 为标准筛选出表达显著上调的 lncRNA ENST 933(图 1A~C)。随后对 lncRNA ENST 933 在 30 对 BC 组织和癌旁组织、BC 细胞(MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-453)和 MCF-10A 中的表达进行评估,RT-qPCR 结果显示,lncRNA ENST 933 在 BC 组织和细胞中的表达均异常升高($P<0.01$,图 1D、E),该结果与微阵列芯片分析结果一致,因此选择 lncRNA ENST 933 进行后续研究。此外通过 RNA 核质分离和 FISH 实验验证在 MCF-7 和 MDA-MB-231 中 lncRNA ENST 933 的亚细胞位置,结果显示,lncRNA ENST 933 主要集中在 MCF-7 和 MDA-MB-231 的细胞质(图 1F、G)。

2.2 lncRNA ENST 933 对 BC 细胞增殖、迁移、侵袭和周期的影响

为了探索 lncRNA ENST 933 表达对 BC 细胞生物学行为的影响,首先将 lncRNA ENST 933 过表达和敲低质粒及相应对照质粒转染 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞后,RT-qPCR 检测细胞中 lncRNA ENST 933 的表达,以确定 lncRNA ENST 933 质粒的敲低和过表达效果($P<0.05$,图 2A)。紧接着,进行了 CCK-8、EdU、平板克隆和 Transwell 的实验研究,并观察到 lncRNA ENST 933 表达沉默可抑制 BC 细胞的增殖、迁移和侵袭,相反,lncRNA ENST 933 的过度表达则会增强 BC 细胞的增殖、迁移和侵袭($P<0.05$,图 2B~E、图 3)。

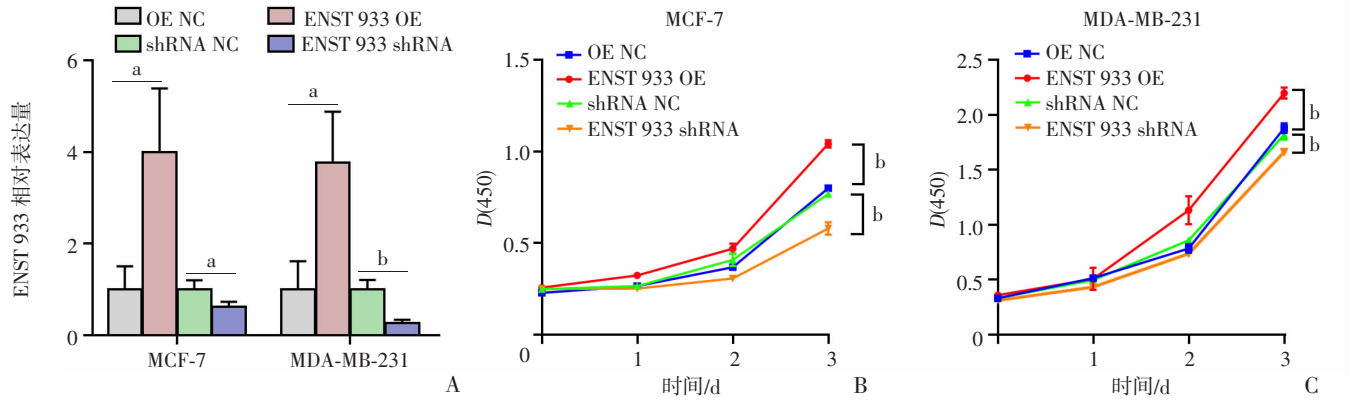


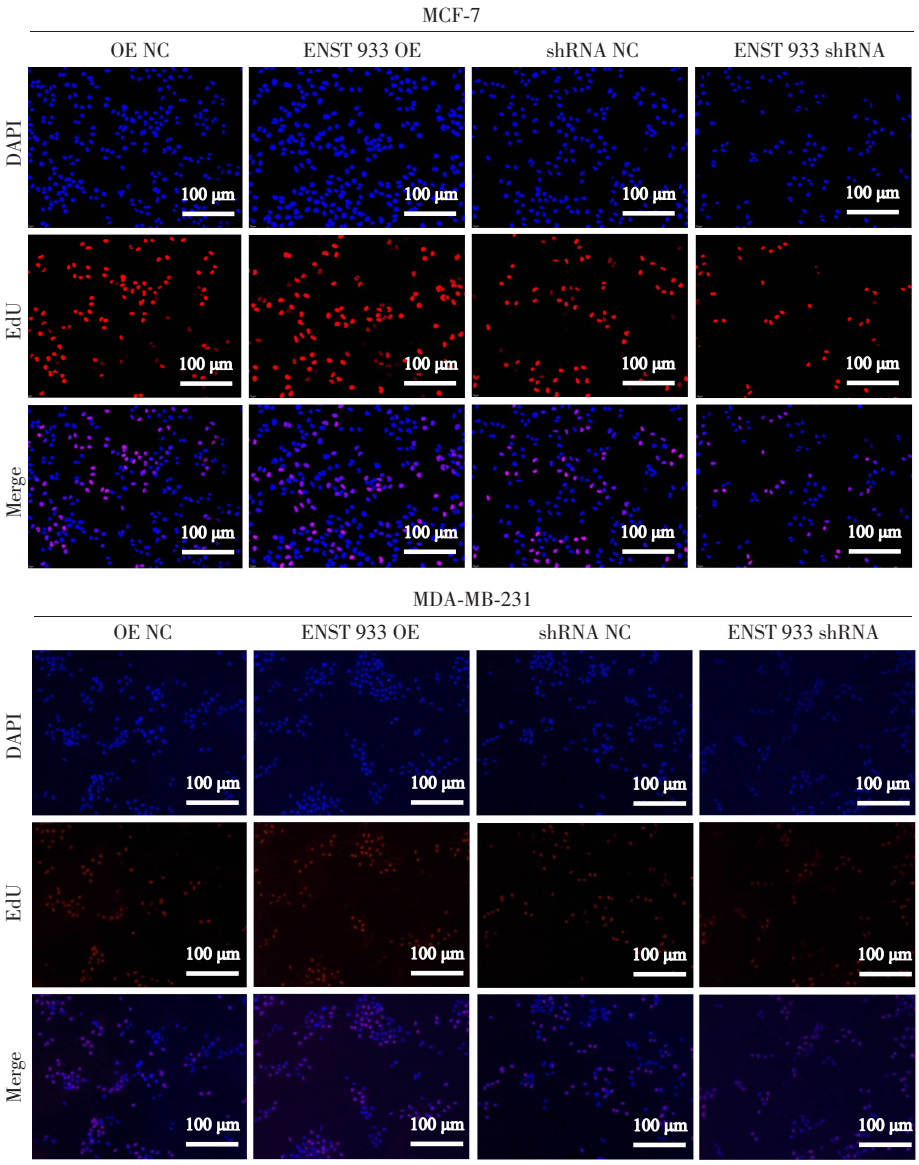
a:P<0.01

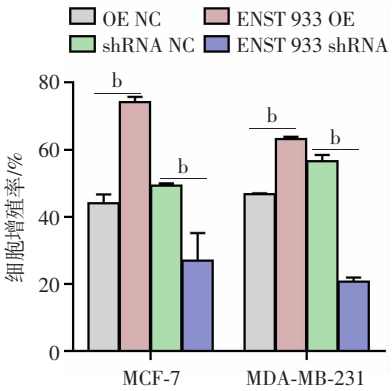
A、B:全转录组分析差异表达的 lncRNA 的火山图和热图;C:BC 组织和癌旁组织中部分差异表达的 lncRNA 聚类热图;D、E:RT-qPCR 检测 lncRNA ENST 933 在 BC 组织(n=30)和细胞(n=3)中的表达;F、G:使用核质分离实验和 FISH 实验分析 lncRNA ENST 933 在 BC 细胞中的定位

图 1 lncRNA ENST 933 在 BC 中的表达及定位

进一步观察敲低和过表达 lncRNA ENST 933 对 BC 细胞周期的影响,通过流式细胞仪检测细胞周期的分布,结果显示,与相应对照组相比,敲低 lncRNA ENST 933 后 G1 期细胞明显增多,S 期减少,而过表达 lncRNA ENST 933 后 G1 期细胞显著减少,S 期增多,表明敲低和过表达 lncRNA ENST 933 影响 BC 细胞周期分布(P<0.05,图 4A)。此外,采用 Western blot 检测细胞周期相关蛋白 CCND1、CCNE1 和 CDK4 的表达,结果显示,与 shRNA NC 组相比,lncRNA ENST 933 shRNA 组 CCND1、CCNE1 和 CDK4 蛋白表达明显下降,而与 OE NC 组相比,lncRNA ENST 933 OE 组 CCND1、CCNE1 和 CDK4 蛋白表达水平显著上升(P<0.05,图 4B)。以上结果提示 lncRNA ENST 933 在 BC 细胞中起着致癌作用。





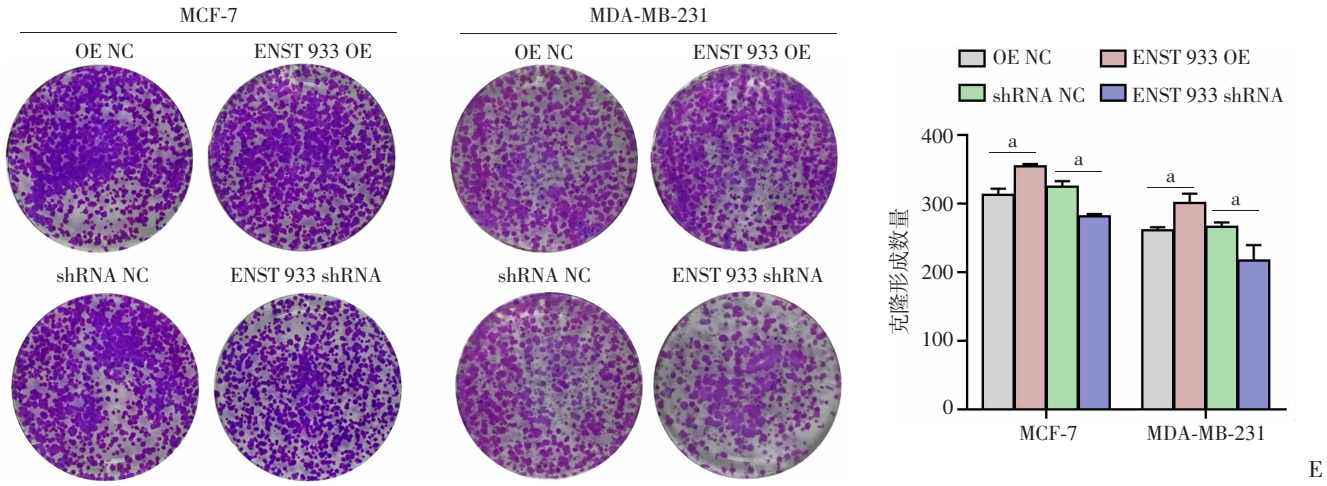


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:RT-qPCR 检测 BC 细胞中的 lncRNA ENST 933 敲低和过表达质粒效力;B~D:CCK-8 和 EdU 实验检测 BC 细胞的增殖

图 2 lncRNA ENST 933 调控 BC 细胞增殖

(图 2E 续下页)

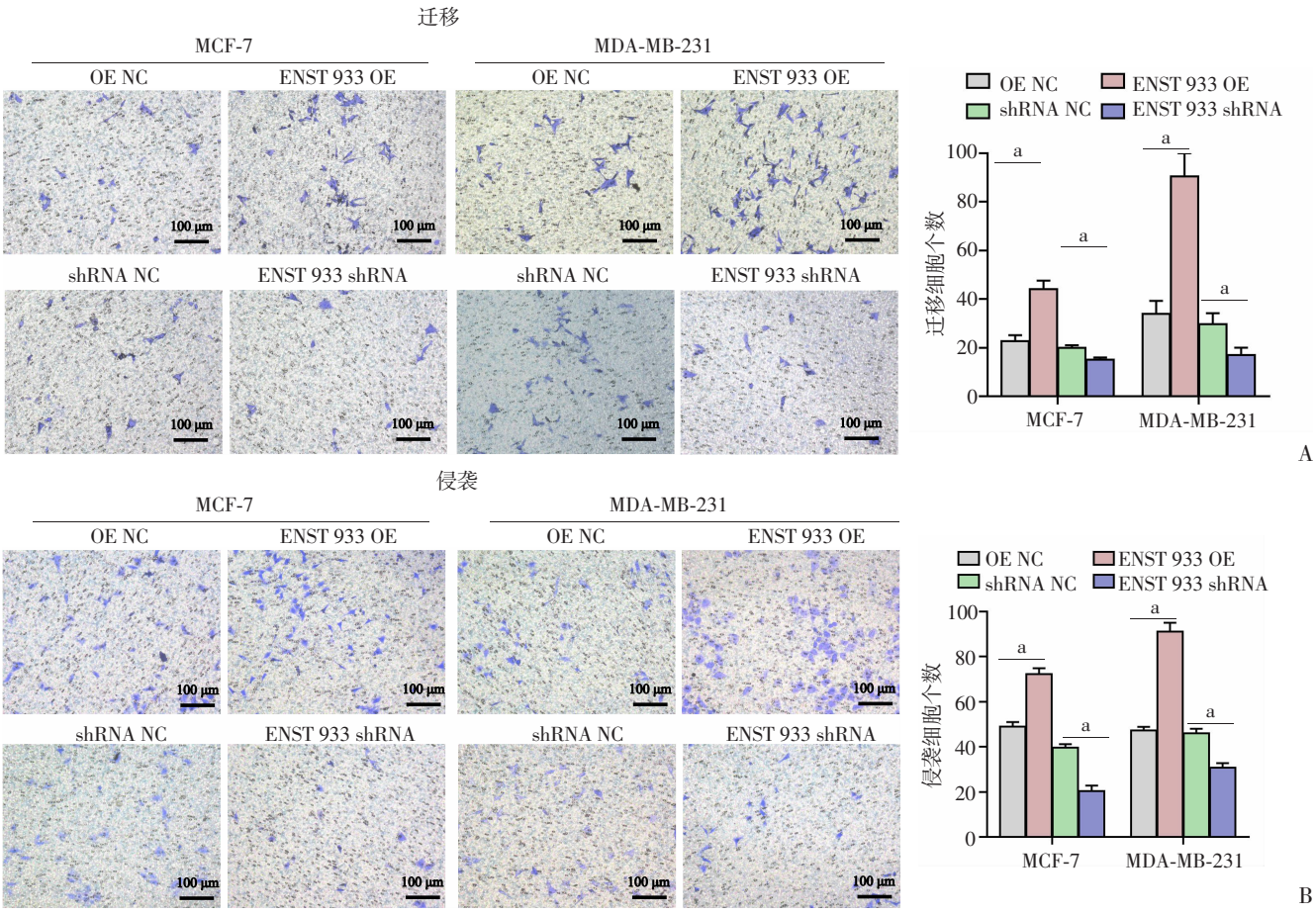


E

a:$P<0.01$

E:平板克隆实验检测 BC 细胞的增殖

续图 2 lncRNA ENST 933 调控 BC 细胞增殖



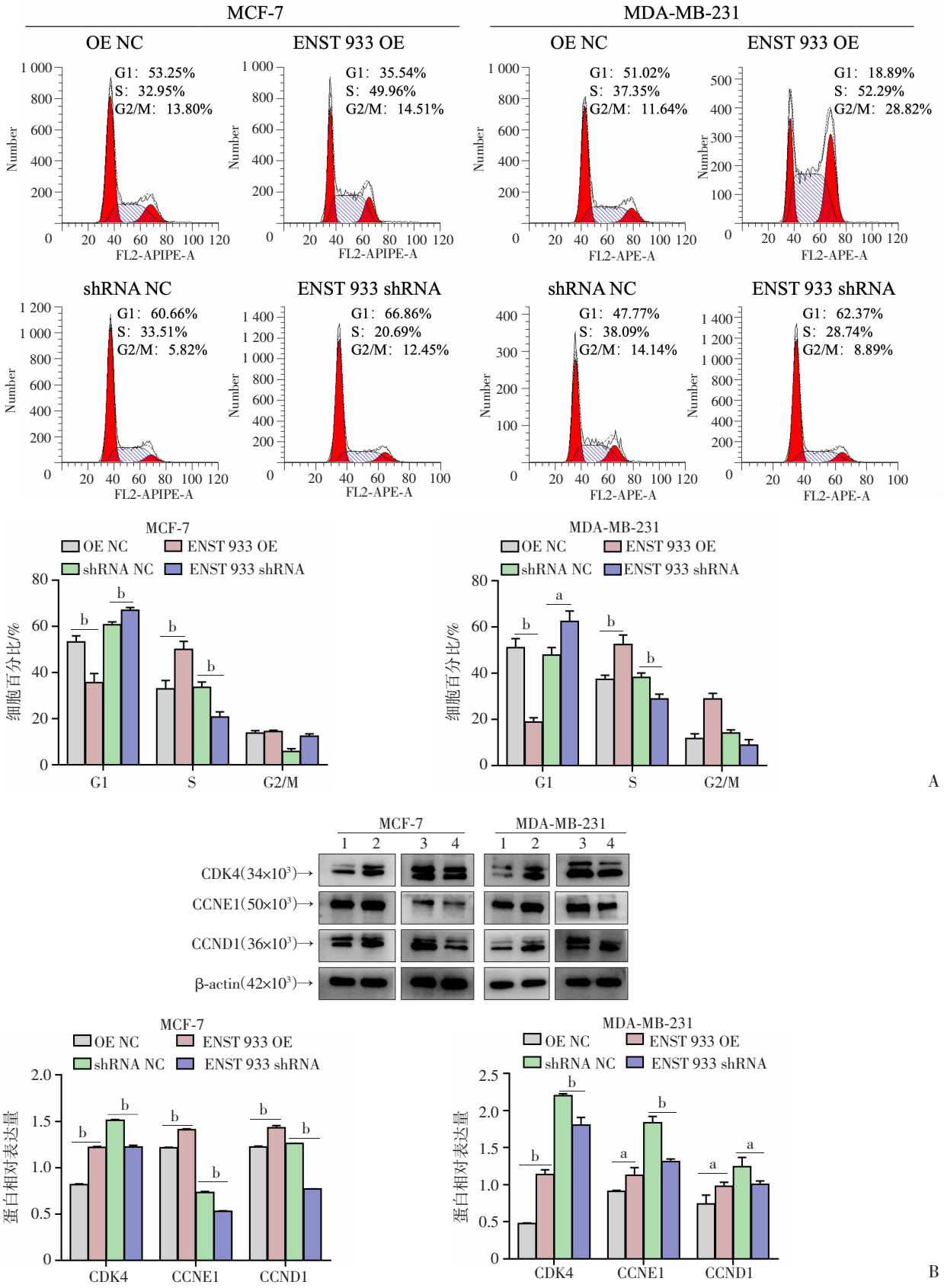
A

B

a:$P<0.01$

A、B:Transwell 实验检测 BC 细胞的迁移和侵袭

图 3 lncRNA ENST 933 调控 BC 细胞迁移与侵袭



a:$P<0.05$;b:$P<0.01$

A:流式细胞仪检测 BC 细胞中的细胞周期;B:Western blot 检测细胞周期相关蛋白 1:OE NC;2:ENST 933 OE;3:shRNA NC;4:ENST 933 shRNA

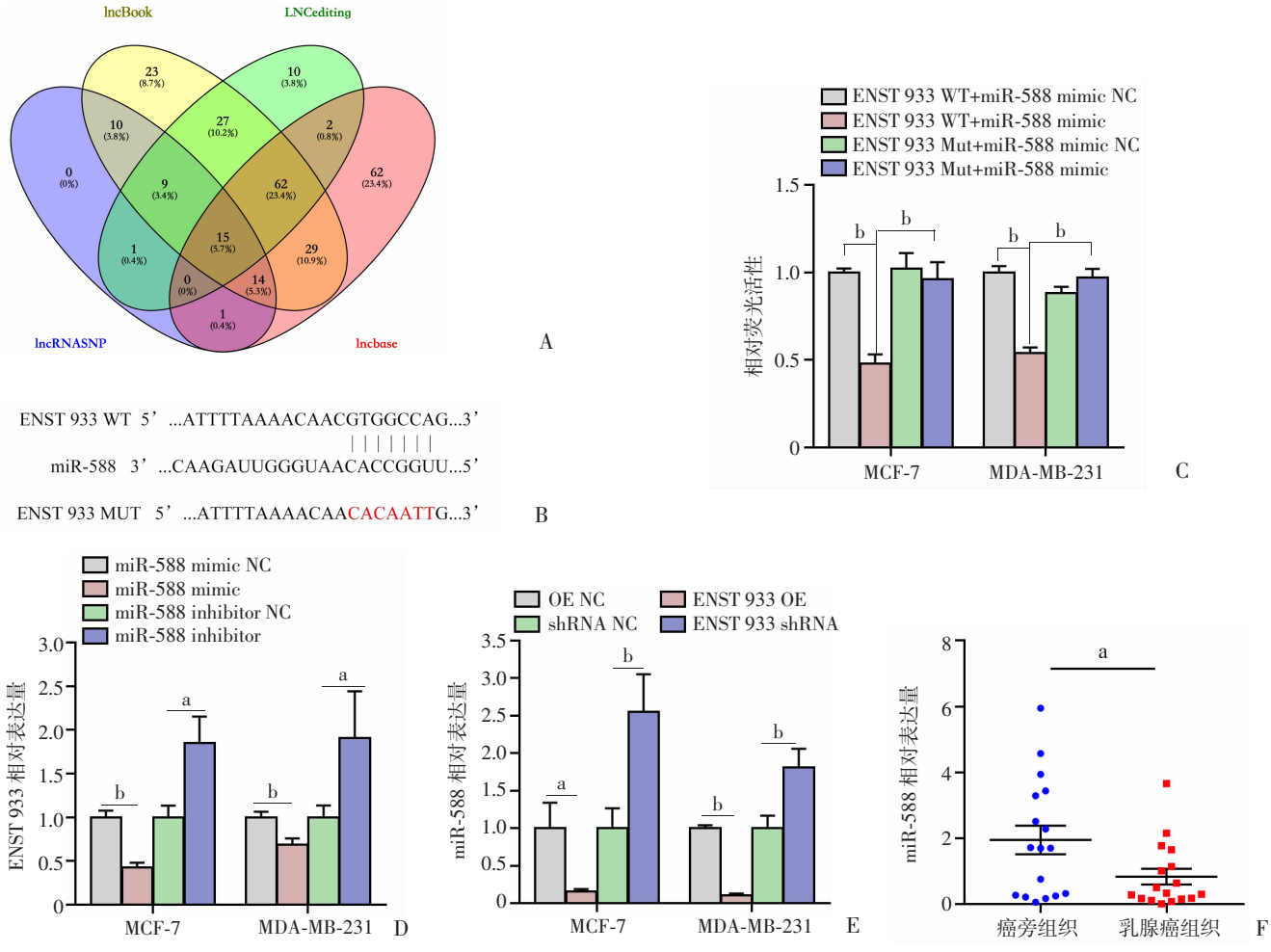
图 4 lncRNA ENST 933 调控 BC 细胞周期

2.3 lncRNA ENST 933 在 BC 细胞中与 miR-588 的相互作用

为了进一步探索 lncRNA ENST 933 在 BC 发展中的潜在机制,首先利用 miRNA 靶标预测数据库 lncRNASNP、LNCediting、lncBook 和 lncbase 预测 miR-588 可能作为 lncRNA ENST 933 的下游靶标(图 5A)。接着为了确认 lncRNA ENST 933 靶向结合 miR-588 的假设,合成野生型或突变型双荧光素酶报告基因载体(图 5B)。之后,双荧光素酶报告基因实验显示了 lncRNA ENST 933 可以与 miR-588 直接结合($P<0.01$,图 5C)。此外,发现 lncRNA ENST 933 表达水平受 miR-588 过表达或敲低的影响($P<0.05$,图 5D)。相反,lncRNA ENST 933 可以影响 miR-588 表达水平($P<0.05$,图 5E)。进一步还发现 miR-588 在 BC 组织中的表达明显低于癌旁组织($P<0.05$,图 5F)。以上结果表明 lncRNA ENST 933 可能靶向海绵 miR-588,从而下调 miR-588 的表达,参与 BC 的进展。

2.4 lncRNA ENST 933 通过 miR-588 调控 BC 细胞的增殖、迁移、侵袭和周期

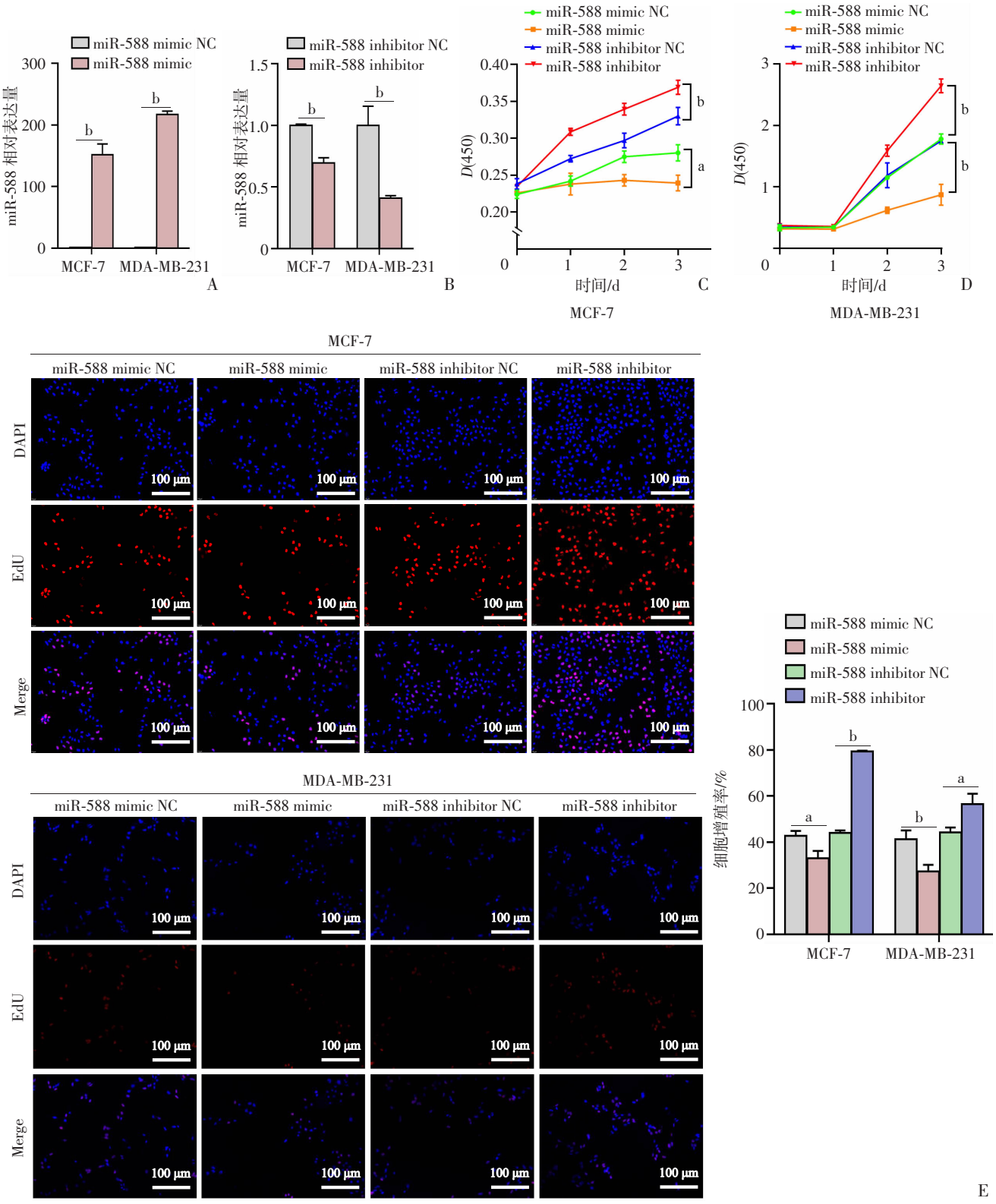
首先通过 RT-qPCR 确认了 miR-588 mimic 及 miR-588 inhibitor 的转染效率($P<0.01$,图 6A、B)。并利用 CCK-8、EdU、平板克隆、Transwell 实验评估了 miR-588 对 BC 的增殖、迁移和侵袭的影响。随后实验结果发现,在 BC 细胞中转染 miR-588 mimic 后,BC 细胞增殖能力、迁移和侵袭数量降低,而转染 miR-588 inhibitor 后显著提升了 BC 细胞增殖、迁移与侵袭能力($P<0.05$,图 6C~F,图 7A、B)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:利用生物信息数据库预测 lncRNA ENST 933 的潜在 miRNA 靶标;B、C:双荧光素酶报告基因实验验证 miR-588 是 lncRNA ENST 933 的靶向目标;D:RT-qPCR 检测 miR-588 影响 lncRNA ENST 933 的表达;E:RT-qPCR 检测 lncRNA ENST 933 影响 miR-588 的表达;F:RT-qPCR 检测 BC 和癌旁组织中 miR-588 的表达

图 5 lncRNA ENST 933 靶向结合 miR-588

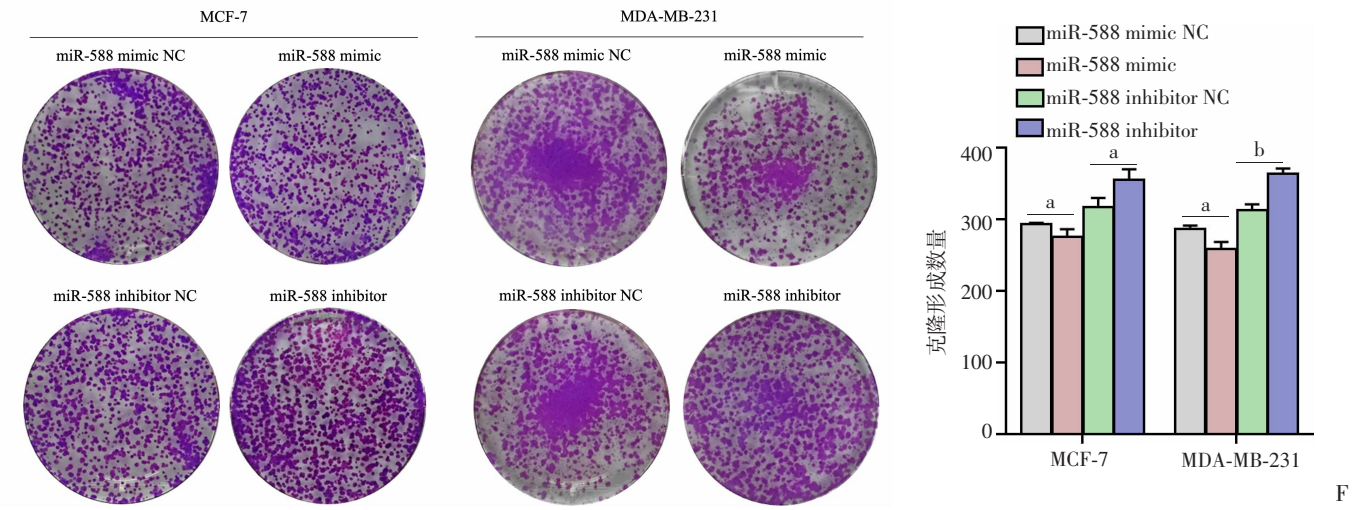


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A、B:RT-qPCR 检测 BC 细胞中的 miR-588 敲低和过表达效力;C~E:CCK-8 和 EdU 实验检测 BC 细胞的增殖

图 6 miR-588 调控 BC 细胞增殖

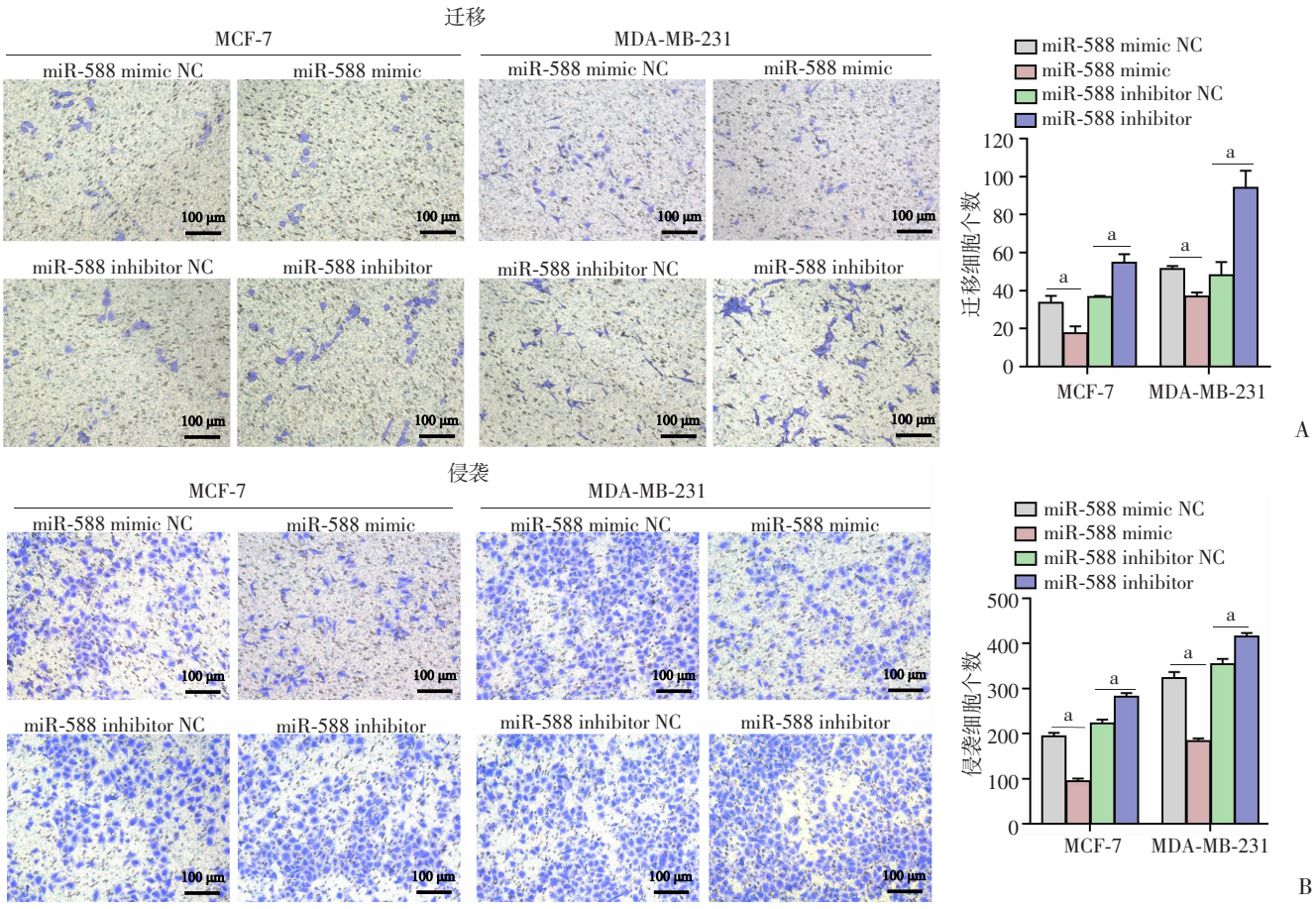
(图 6F 续下页)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

F:平板克隆实验检测 BC 细胞的增殖

续图 6 miR-588 调控 BC 细胞增殖

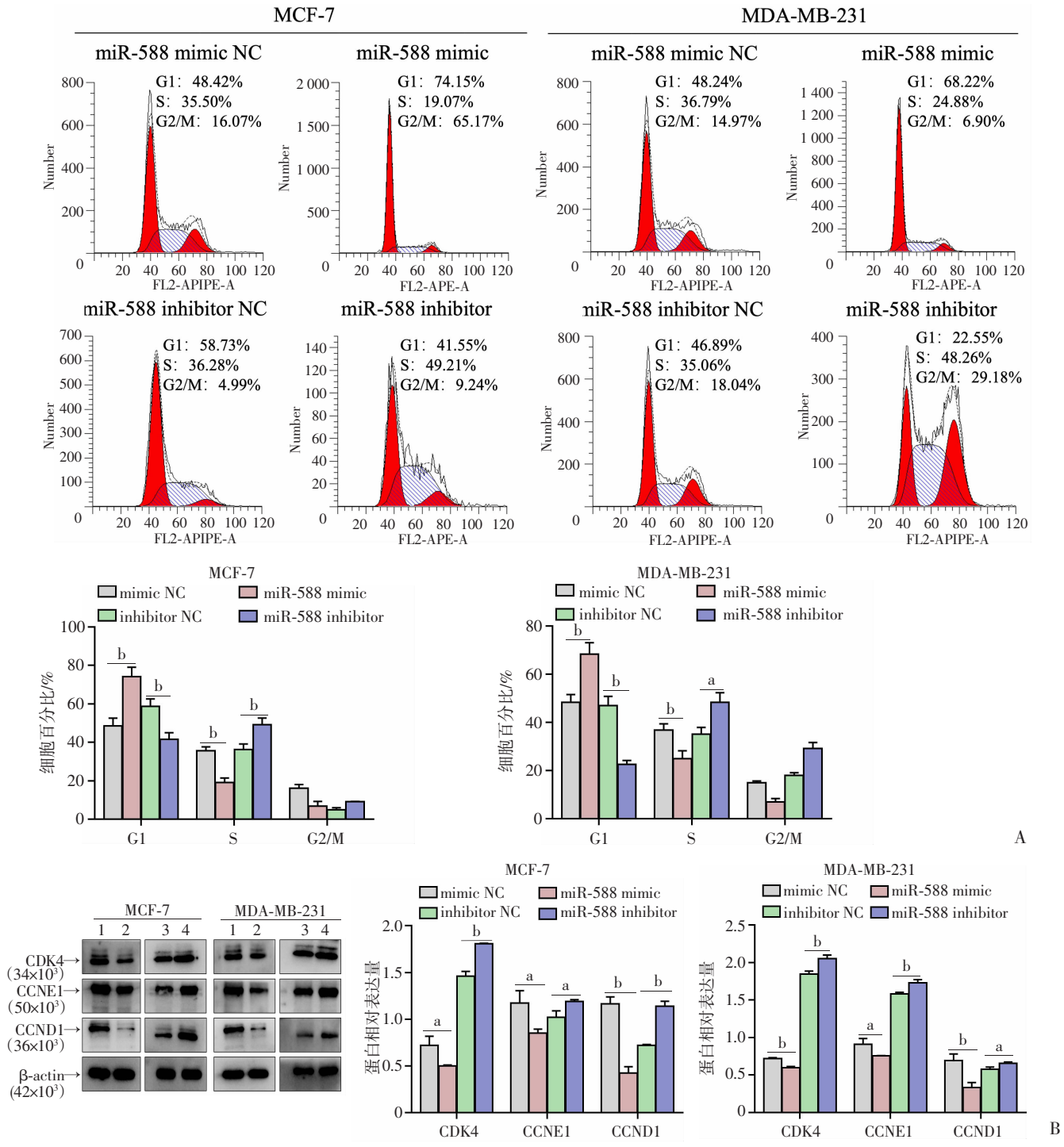


a:$P<0.01$

图 7 miR-588 调控 BC 细胞迁移(A)与侵袭(B)

接着进一步研究过表达和敲低 miR-588 对 BC 细胞周期的影响,通过流式细胞仪检测细胞周期的分布,结果显示,与相应对照组相比,过表达 miR-588 后 G1 期细胞明显增多,S 期减少,而敲低 miR-588 后 G1 期细胞显著减少,S 期增多,表明敲低和过表达 miR-588 影响 BC 细胞周期分布($P<0.05$,图 8A)。此外,

Western blot 检测细胞周期相关蛋白 CCND1、CCNE1 和 CDK4 的表达,结果显示,与 mimic NC 组相比,miR-588 mimic 组 CCND1、CCNE1 和 CDK4 蛋白表达水平明显下降,而与 inhibitor NC 组相比,miR-588 inhibitor 组 CCND1、CCNE1 和 CDK4 蛋白表达水平显著上升($P<0.05$,图 8B)。

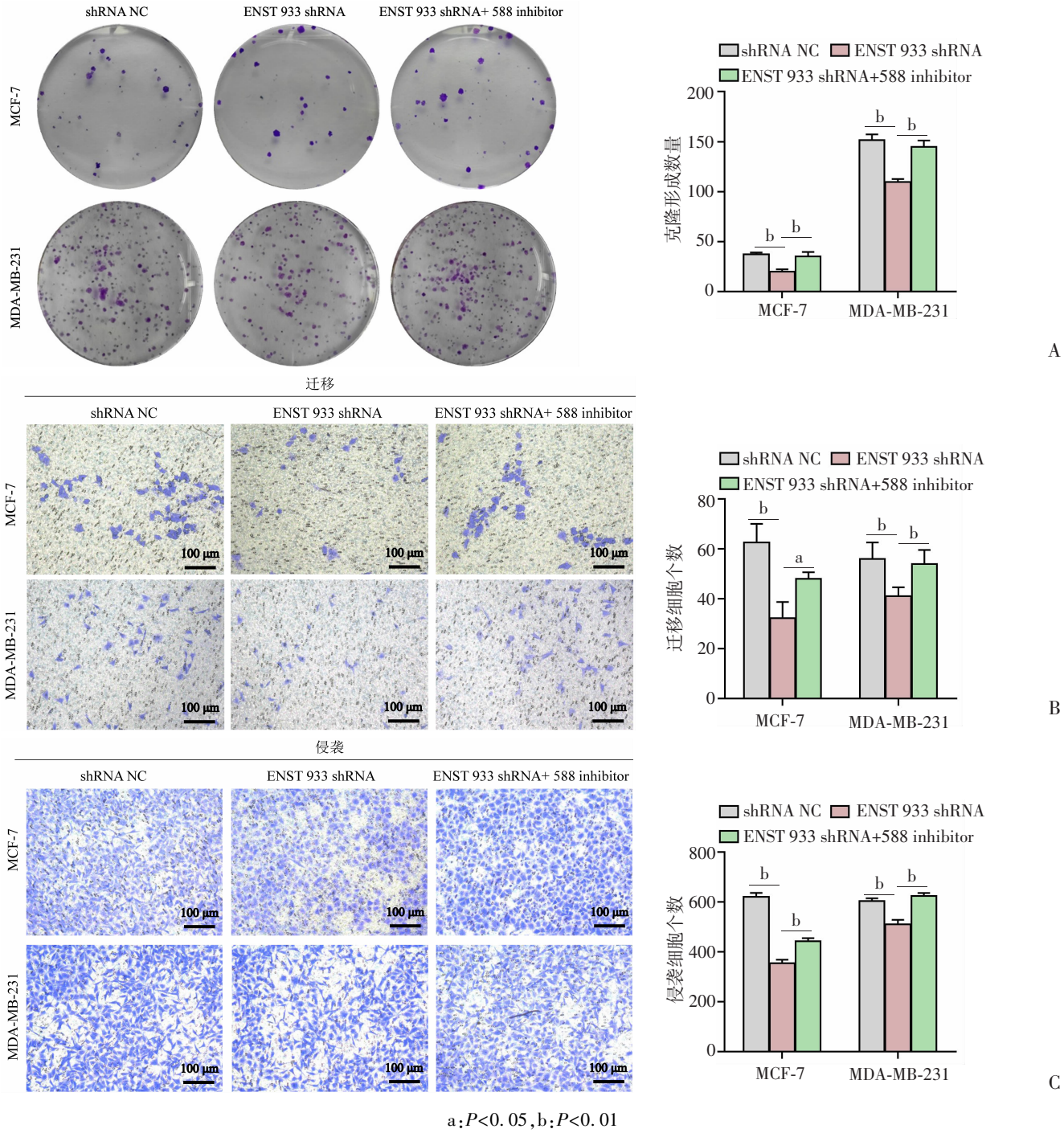


a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:流式细胞仪检测 BC 细胞中的细胞周期;B:Western blot 检测细胞周期相关蛋白　1:mimic NC;2:miR-588 mimic;3:inhibitor NC;4:miR-588 inhibitor

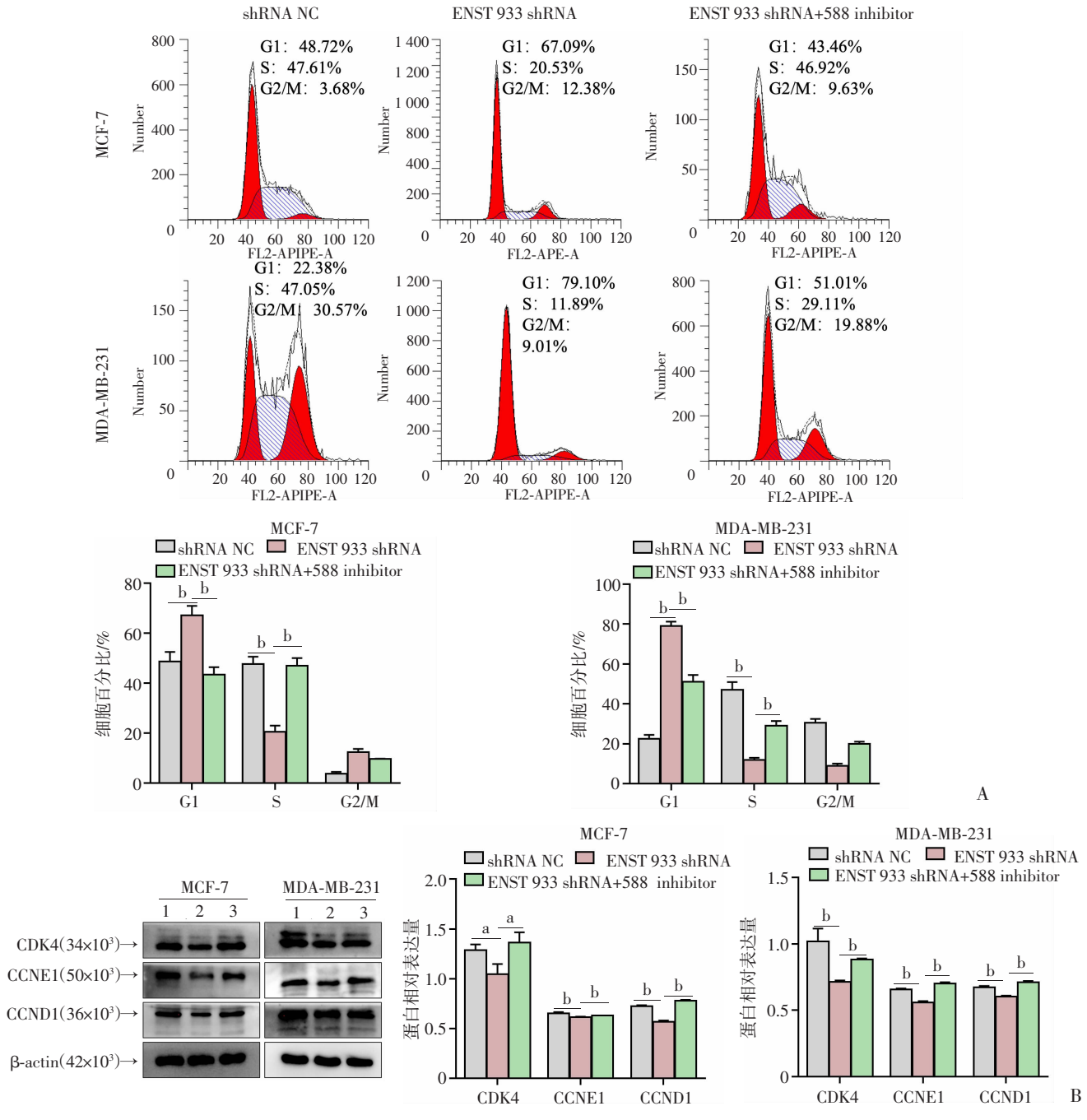
图 8　miR-588 调控 BC 细胞周期

紧接着在 lncRNA ENST 933 shRNA 组中加入 miR-588 inhibitor 展开挽救实验,验证 lncRNA ENST 933 是否在 BC 细胞中通过 miR-588 发挥自己的生物学功能。结果发现 miR-588 inhibitor 能够部分逆转 lncRNA ENST 933 沉默介导的 BC 细胞增殖、侵袭和迁移的抑制作用以及 G1 期的阻滞作用($P<0.05$,图 9、10)。因此,认为 lncRNA ENST 933 可通过调控 miR-588 来促进 BC 细胞的增殖、迁移与侵袭。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

图 9 miR-588 可部分逆转由 lncRNA ENST 933 沉默介导的 BC 细胞增殖(A)、迁移(B)与侵袭(C)的抑制作用



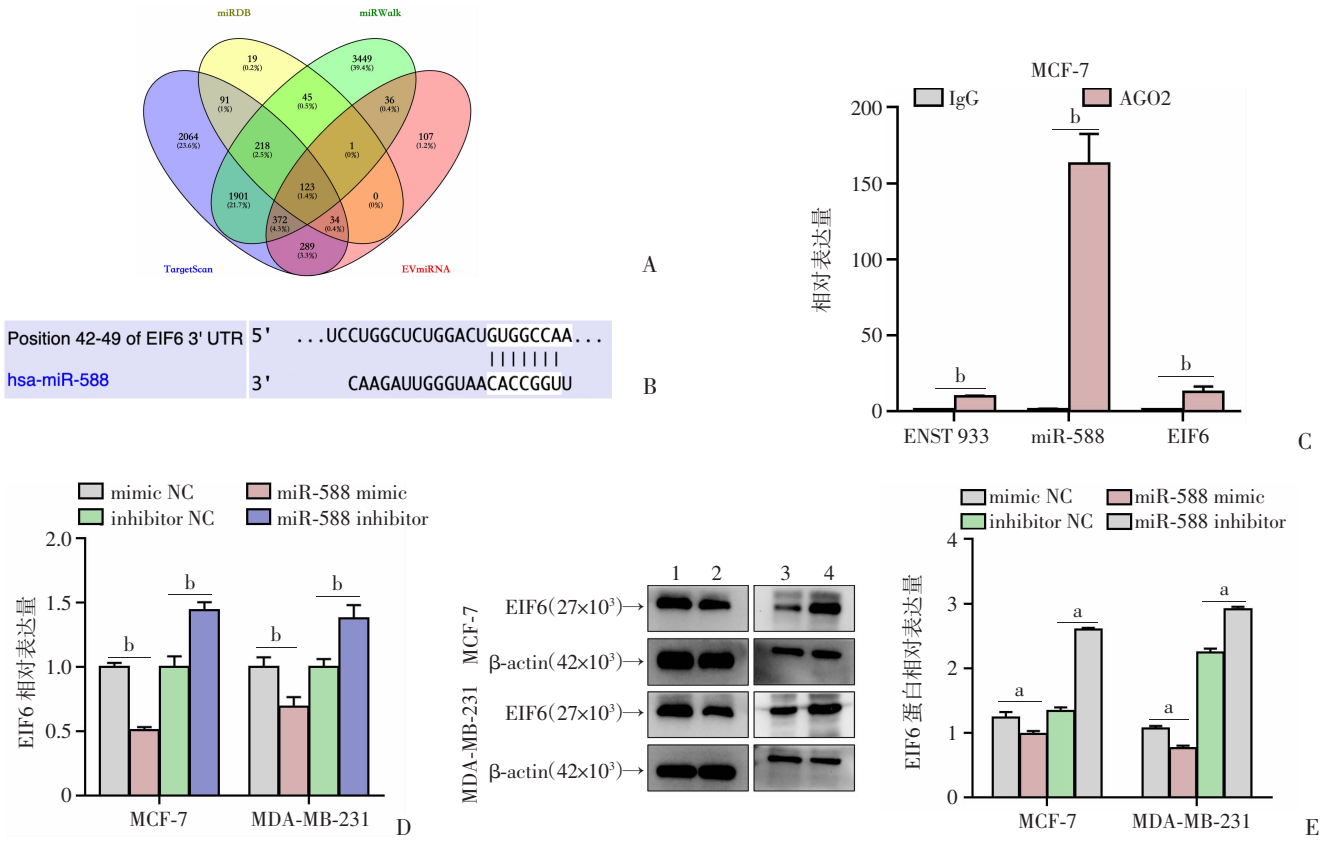
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A:流式细胞仪检测 BC 细胞中的细胞周期;B:Western blot 检测细胞周期相关蛋白 1:shRNA NC;2:ENST 933 shRNA;3:ENST 933 shRNA+588 inhibitor

图 10 miR-588 可部分逆转由 lncRNA ENST 933 沉默介导的 BC 细胞周期的抑制作用

2.5 lncRNA ENST 933 通过 miR-588 调控靶基因 EIF6 的表达

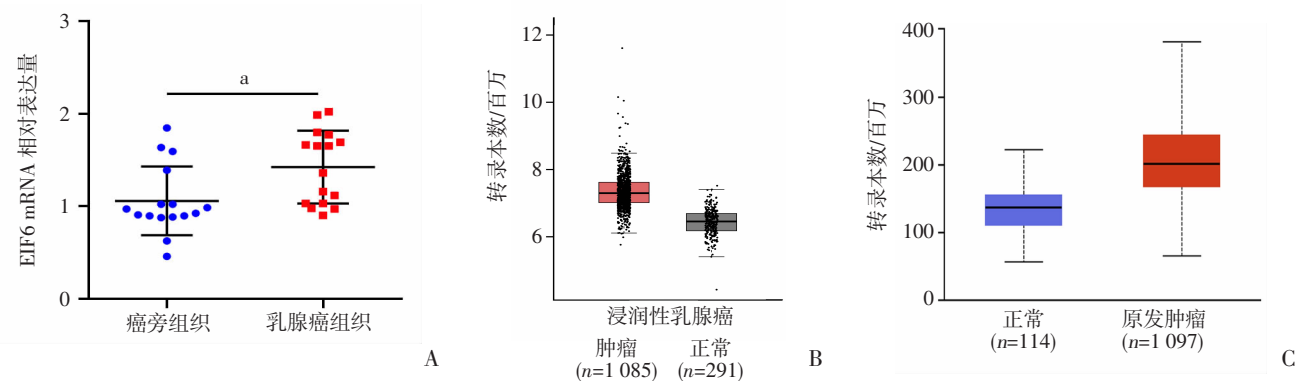
首先利用生物信息学数据库 miRDB、TargetScan、miRWalk 和 EVmiRNA 预测 miR-588 潜在靶向目标,结果发现 miR-588 与 EIF6 之间具有靶向结合位点(图 11A、B)。接着通过 RIP 实验发现 lncRNA ENST 933、miR-588 及 EIF6 均能够被抗 AGO2 抗体拉下(图 11C),表明 lncRNA ENST 933 可通过 AGO2 方式结合 miR-588,lncRNA ENST 933 和 EIF6 能靶向结合 miR-588。随后通过 TCGA 和 GEPIA 数据库检索发现,相比正常乳腺组织,EIF6 在 BC 中显著高表达(图 12B、C)。而且 RT-qPCR 结果显示,与癌旁组织相比,16 个成对 BC 组织中 EIF6 mRNA 水平被上调($P<0.05$,图 12A),与上述预测结果一致。此外发现转染 miR-588 mimic 后 EIF6 表达降低,相反,转染 miR-588 inhibitor 后 EIF6 表达增加($P<0.01$,图 11D、E)。



a:$P<0.01$

A:生物信息数据库预测 miR-588 结合的靶基因;B:通过 TargetScan 数据库预测 miR-588 和 EIF6 的结合位点;C:RT-qPCR 检测 Anti-AGO2 RIP 实验中 lncRNA ENST 933、miR-588 和 EIF6 的表达;D、E:RT-qPCR 与 Western blot 检测 miR-588 影响内源性 EIF6 mRNA 与蛋白的表达 1:mimic NC;2:miR-588 mimic;3:inhibitor NC;4:miR-588 inhibitor

图 11 EIF 能靶向结合 miR-588

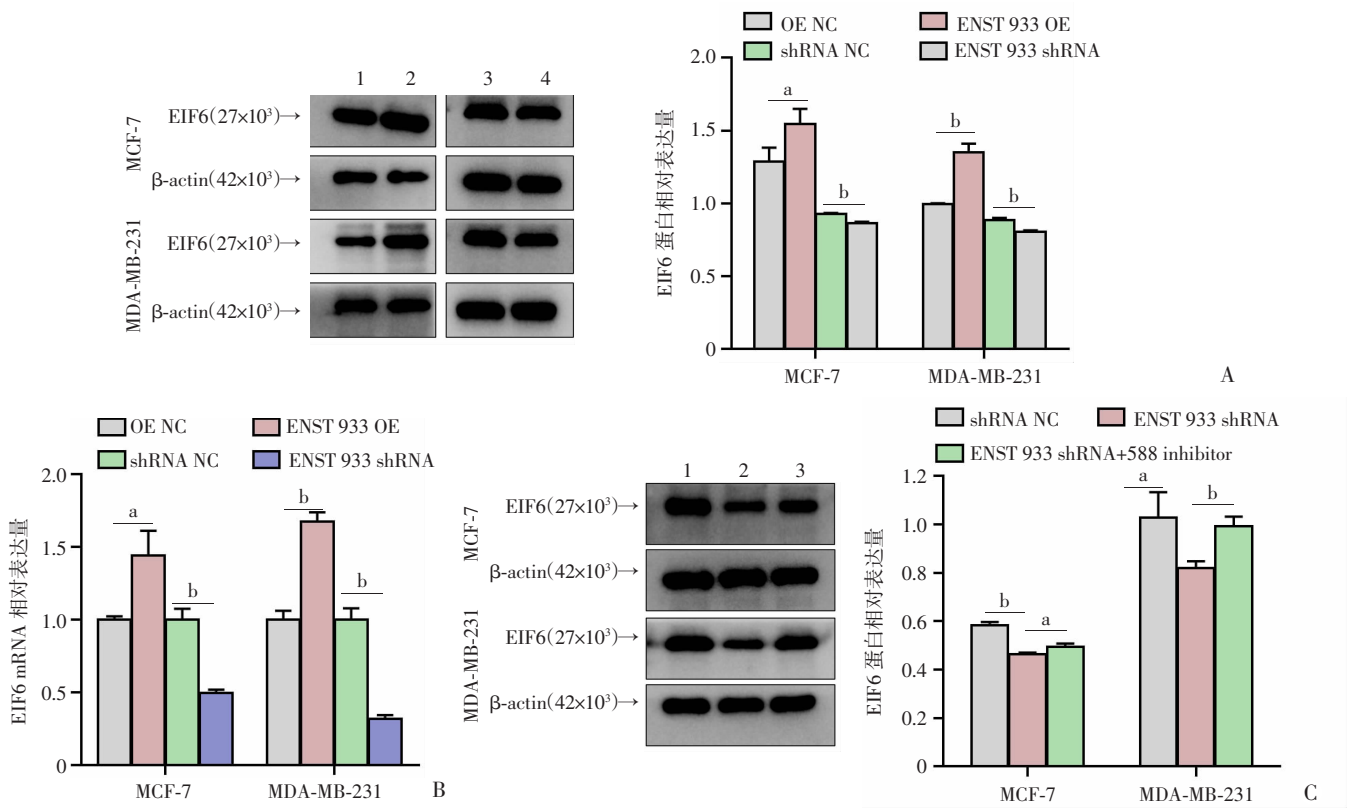


a:$P<0.05$

A:RT-qPCR 检测 BC 组织和癌旁组织中的 EIF6 mRNA 表达;B、C:GEPIA 和 TCGA 数据库预测 EIF6 在 BC 组织中的表达

图 12 EIF6 在 BC 中的表达

RT-qPCR 和 Western blot 检测结果显示,敲低 lncRNA ENST 933 后 EIF6 表达水平显著降低,过表达 lncRNA ENST 933 后 EIF6 表达水平明显升高($P<0.05$,见图 13A、B)。为了验证 lncRNA ENST 933 表达敲除是否通过靶向作用于 miR-588 来限制 EIF6 的表达,Western blot 检测结果显示,敲低 lncRNA ENST 933 后 EIF6 蛋白表达水平显著降低,但是在转染 miR-588 inhibitor 后,至少部分恢复了 EIF6 蛋白表达水平($P<0.05$,图 13C)。提示 lncRNA ENST 933 可能通过与 miR-588 实现竞争性结合,从而实现对 EIF6 表达的影响。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

A、B:Western blot 与 RT-qPCR 检测 lncRNA ENST 933 影响内源性 EIF6 蛋白与 mRNA 的表达 1:OE NC;2:ENST 933 OE;3:shRNA NC;4:ENST 933 shRNA;C:Western blot 检测共转染 miR-588 inhibitor 部分抵消 lncRNA ENST 933 shRNA 在 BC 细胞诱导的 EIF6 下调作用 1:shRNA NC;2:ENST 933 shRNA;3:ENST 933 shRNA+588 inhibitor

图 13 lncRNA ENST 933 通过竞争性结合 miR-588 促进 BC 细胞中靶基因 EIF6 的表达

2.6 miR-588 通过靶向 EIF6 抑制 BC 细胞中的 AKT/mTOR 信号通路

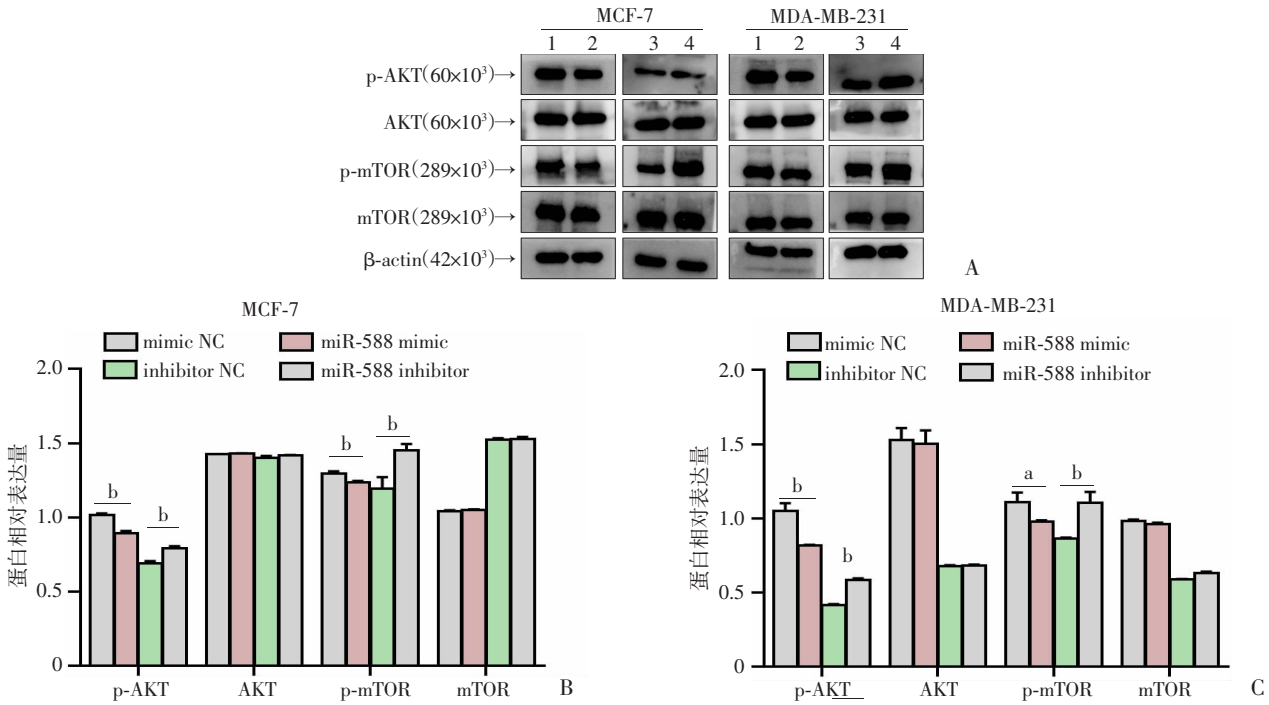
Western blot 结果发现 miR-588 降低了 AKT 和 mTOR 的磷酸化水平($P<0.05$,图 14),因此,miR-588 可通过靶向 EIF6 抑制 AKT/mTOR 通路,影响 BC 的发展。

2.7 lncRNA ENST 933 对体内移植瘤的影响

为了确认 lncRNA ENST 933 在体内对 BC 发展的影响,将 MDA-MB-231 细胞稳定转染 lncRNA ENST 933 敲低和过表达质粒及对照质粒,注射到裸鼠的皮下。与相应对照组相比,干扰 lncRNA ENST 933 后裸鼠肿瘤体积显著减小,质量明显减轻,而 lncRNA ENST 933 过表达后肿瘤体积和质量明显高于对照组($P<0.05$,图 15A、C)。HE 染色结果显示过表达 lncRNA ENST 933 可显著促进肿瘤微血管的生成,而干扰 lncRNA ENST 933 可明显减少肿瘤微血管数量($P<0.05$,图 15B、D)。IHC 染色实验发现 lncRNA ENST 933 shRNA 组内,EIF6、Ki67、CDK4 的表达水平显著下降,而 lncRNA ENST 933 OE 组内 EIF6、Ki67、CDK4 的表达水平明显提高(图 16)。提示敲低 lncRNA ENST 933 抑制体内 BC 肿瘤生长,过表达 lncRNA ENST 933 促进体内 BC 肿瘤生长。

3 讨论

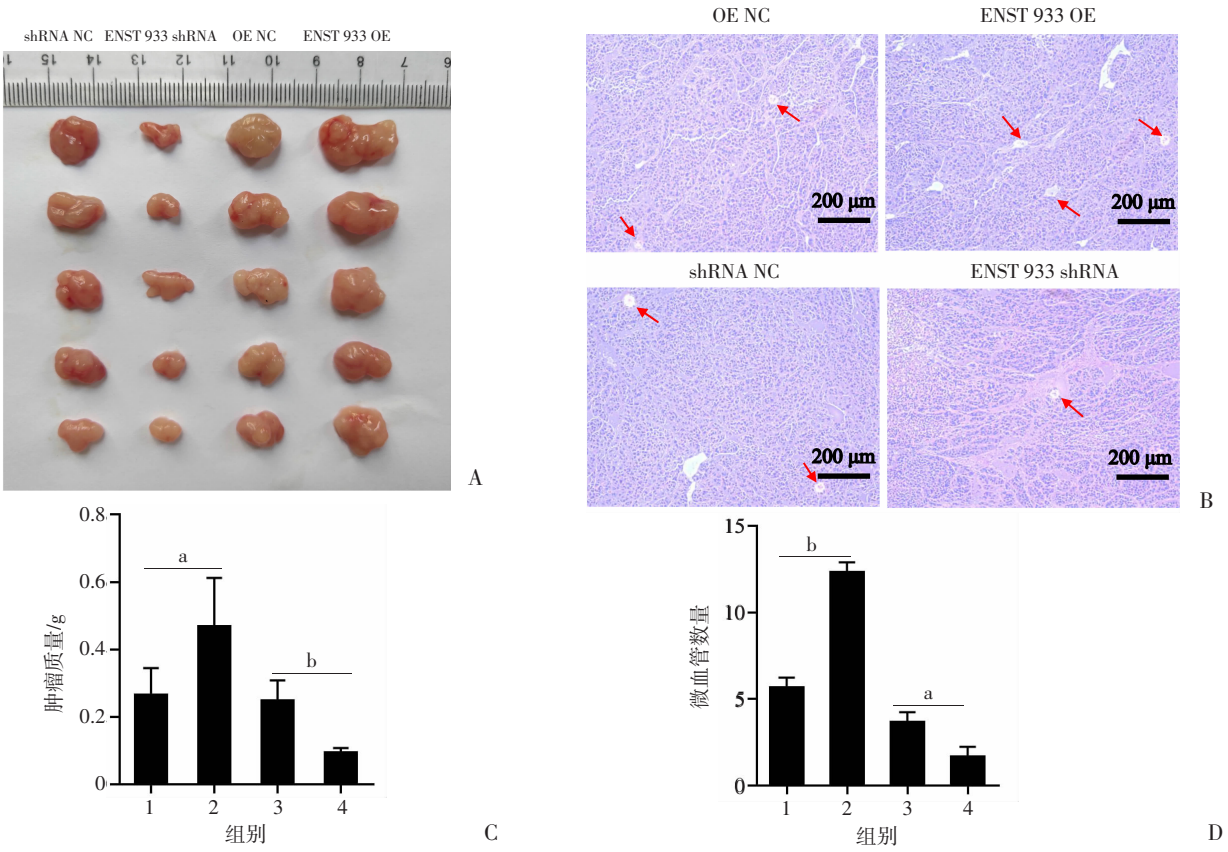
lncRNA 是近年来受到重点关注的非编码转录本,在真核细胞内外分布广泛[1]。其根据碱基互补配对的原理,具有多样化二级结构,可特异性结合多种蛋白质和核酸来影响下游基因的表达,从而通过控制增殖、迁移和侵袭等重要的细胞过程,在多种肿瘤中发挥调控作用[11],因此 lncRNA 的研究具有非常重要的意义。除了 lncRNA 与 DNA、RNA 或蛋白质的直接相互作用外,竞争性内源 RNA(ceRNA)假说也被提出,XIU 等[12]的研究显示,lncRNA LINC01315 通过靶向 miR-876-5p/GRK5 轴进而促进三阴乳腺癌的发展并预测不良结果。还有研究发现 LINC00665 海绵 miR-641,靶向 SNF2 相关 CREBBP 激活蛋白促进 BC 的进展[13]。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$ 1:mimic NC; 2: miR-588 mimic; 3: inhibitor NC; 4: miR-588 inhibitor

A:Western blot 检测结果;B:MCF-7 中蛋白表达定量分析;C:MDA-MB-231 中蛋白表达定量分析

图 14 Western blot 检测 miR-588 对 AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$ 1: OE NC; 2: ENST 933 OE; 3: shRNA NC; 4: ENST 933 shRNA

A:裸鼠移植瘤观察;B:裸鼠肿瘤组织 HE 染色观察 ↑:示微血管;C:肿瘤质量;D:肿瘤微血管数量

图 15 lncRNA ENST 933 促进体内移植瘤生长

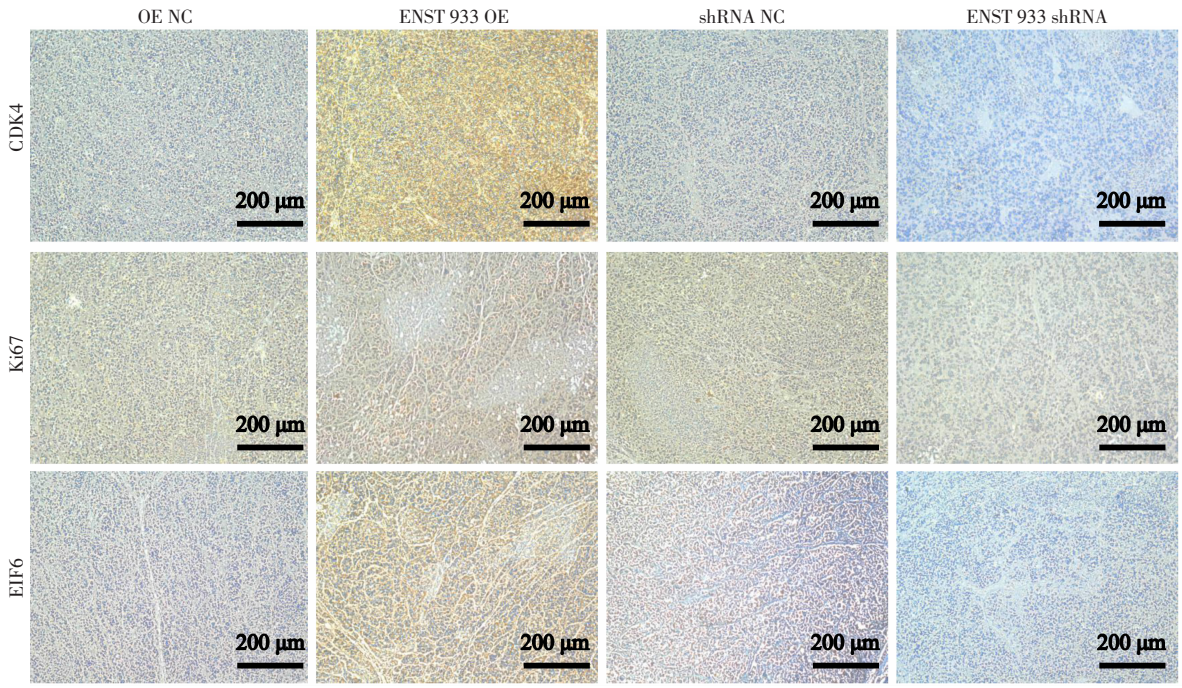


图 16 IHC 实验检测异种移植瘤中 EIF6、Ki67、CDK4 的蛋白表达水平

上述研究提示,深入研究 lncRNA 在 BC 中的作用有利于提高 BC 的诊断和治疗效果。然而,lncRNA ENST 933 在癌症发展中的作用机制尚未见报告,RT-qPCR 结果显示 lncRNA ENST 933 在 BC 组织和细胞系中均表达上调,与 RNA 微阵列芯片数据分析的结果一致。为了探讨 lncRNA ENST 933 在 BC 进展中的作用,本研究进一步展开体外细胞增殖、迁移、侵袭、流式细胞仪实验与体内异种移植实验,结果表明 lncRNA ENST 933 充当了致癌基因的作用,在体外和体内均能显著促进 BC 的增殖、迁移与侵袭,提示抑制 lncRNA ENST 933 可能是一种新的 BC 治疗策略,为 BC 的分子靶向治疗提供依据。当然,本研究也存在一定的局限性。例如,shRNA 存在一定的脱靶和不完全干扰效应,如果通过基因编辑技术,如 CRISPR/Cas9 方法将 lncRNA ENST 933 完全敲除,结果将更有说服力。

为进一步探讨 lncRNA ENST 933 调控 BC 发展的可能机制,通过生物信息数据库分析,发现 miR-588 可能靶向作用于 lncRNA ENST 933 和 EIF6 的 3'-UTR。且已有报道 miR-588 参与不同癌症的进展,包括结直肠癌[14]、喉鳞状细胞癌[15]和骨肉瘤[16]。YU 等[17]研究发现 miR-588 在 BC 中低表达,这种低表达与患者预后不良有关,且过表达 miR-588 可抑制 BC 细胞的增殖与侵袭和增加其顺铂化疗敏感性,提示 miR-588 在 BC 中可能是一个抑癌基因。然而,miR-588 在 BC 中的作用机制研究有限。本研究采用双荧光素酶报告基因和 RNA 免疫沉淀反应检测结果显示,lncRNA ENST 933 可作为细胞质中 miR-588 的分子海绵,与 miR-588 结合。进一步研究发现 lncRNA ENST 933 表达水平受 miR-588 过表达或敲低的影响,相反,lncRNA ENST 933 可以影响 miR-588 表达水平。且 miR-588 在 BC 组织中低表达,体外实验表明其表达上调后可抑制 BC 细胞增殖、迁移和侵袭,导致细胞周期 G1 期阻滞。接着挽救实验显示 miR-588 能够逆转 lncRNA ENST 933 沉默介导的 BC 细胞增殖、迁移,侵袭和周期的抑制作用,提示 miR-588 可充当肿瘤抑制因子,参与 lncRNA ENST 933 介导的 BC 发展。近年来,EIF6 在癌症中的重要性日益明显,已有研究表明 EIF6 在结直肠癌、恶性胸膜间皮瘤和卵巢癌中过表达,是细胞周期和肿瘤发生的限速因子[18],表明 EIF6 在致癌作用中具有潜在意义。GATZA 等[19]发现 EIF6 在 BC 中过表达,其表达增强与 BC 预后不良相关。本研究表明 miR-588 可抑制 EIF6 的表达,在 mRNA 的转录后抑制中发挥作用,阐述了 miR-588 对 EIF6 的靶向作用,而 lncRNA ENST 933 可促进 EIF6 的表达,且进一步发现 EIF6 在 BC 组织中的 mRNA 表达明显高于癌旁组织,与 TCGA 和 GEPIA 描述一致。接着挽救实验显示 lncRNA ENST 933 靶向 miR-588 调控 EIF6 的表达。据研究表明,EIF6 参与了蛋白质翻译的起始步骤,并与 AKT/mTOR 信号通路有关[20],本研究结果表明 miR-588 可靶向 EIF6 抑制 AKT/mTOR 信号通路。

除 miR-588 调控 EIF6 表达外,lncRNA ENST 933 在 BC 中可能还存在其他直接或间接调控 EIF6 表达的机制。我们将在未来的研究中进行深入探讨。

综上,lncRNA ENST 933 在 BC 中作为一种致癌基因,可充当 miR-588 的分子海绵,与 miR-588 竞争性结合,从而解除 miR-588 对靶基因 EIF6 表达的抑制作用,促进 BC 的发展。本研究结果为 BC 的早期筛查和诊疗提供新靶点,但 lncRNA ENST 933 调控 BC 发展的具体分子机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] XU J, WU K J, JIA Q J, *et al*. Roles of miRNA and lncRNA in triple-negative breast cancer[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2020, 21(9): 673-689. DOI: 10.1631/jzus.B1900709.

[2] CUI Y, FAN Y H, ZHAO G C, *et al*. Novel lncRNA PSMG3-AS1 functions as a miR-143-3p sponge to increase the proliferation and migration of breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2020, 43(1): 229-239. DOI: 10.3892/or.2019.7390.

[3] MIRZAEI S, GHOLAMI M H, HUSHMANDI K, *et al*. The long and short non-coding RNAs modulating EZH2 signaling in cancer[J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 18. DOI: 10.1186/s13045-022-01235-1.

[4] HUANG Z K, MA Y Y, ZHANG P P, *et al*. Long non-coding RNA H19 confers resistance to gefitinib via miR-148b-3p/DDAH1 axis in lung adenocarcinoma[J]. Anticancer Drugs, 2020, 31(1): 44-54. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000831.

[5] HU J, HUANG H H, XI Z H, *et al*. LncRNA SEMA3B-AS1 inhibits breast cancer progression by targeting miR-3940/KLLN axis[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(9): 800. DOI: 10.1038/s41419-022-05189-7.

[6] ZHU J X, DAI H, LI X, *et al*. LncRNA TRG-AS1 inhibits bone metastasis of breast cancer by the miR-877-5p/WISP2 axis[J]. Pathol Res Pract, 2023, 243: 154360. DOI: 10.1016/j.prp.2023.154360.

[7] SUN J, LI X H, YIN J, *et al*. Long non coding RNA COX10-DT promotes the progression of breast cancer via the COX10-DT/miR-206/BDNF axis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2023, 639: 46-53. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.11.057.

[8] YU R, ZHAO R R, SUN X P, *et al*. MicroRNA-588 regulates the invasive, migratory and vasculogenic mimicry-forming abilities of hypoxic glioma cells by targeting ROBO1[J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(2): 1333-1347. DOI: 10.1007/s11033-022-08063-z.

[9] LIU Z K, MO H Y, SUN L K, *et al*. Long noncoding RNA PICSAR/miR-588/EIF6 axis regulates tumorigenesis of hepatocellular carcinoma by activating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Cancer Sci, 2020, 111(11): 4118-4128. DOI: 10.1111/cas.14631.

[10] SUN L P, LIU S G, WANG X P, *et al*. eIF6 promotes the malignant progression of human hepatocellular carcinoma via the mTOR signaling pathway[J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 216. DOI: 10.1186/s12967-021-02877-4.

[11] KLINGE C M. Non-coding RNAs in breast cancer: intracellular and intercellular communication[J]. Noncoding RNA, 2018, 4(4): 40. DOI: 10.3390/ncrna4040040.

[12] XIU Y, CAO S N, JIANG R, *et al*. lncRNA LINC01315 promotes malignancy of triple-negative breast cancer and predicts poor outcomes by modulating microRNA-876-5p/GRK5[J]. Bioengineered, 2022, 13(4): 10001-10009. DOI: 10.1080/21655979.2022.2062536.

[13] CAO W, LIU X J, SU W J, *et al*. LINC00665 sponges miR-641 to promote the progression of breast cancer by targeting the SNF2-related CREBBP activator protein (SRCAP)[J]. Bioengineered, 2022, 13(2): 4573-4586. DOI: 10.1080/21655979.2022.2031402.

[14] HE C, FU Y, CHEN Y, *et al*. Long non-coding RNA SNHG8 promotes autophagy as a ceRNA to upregulate ATG7 by sponging microRNA-588 in colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2021, 22(2): 577. DOI: 10.3892/ol.2021.12838.

[15] ZHAO J, LI X D, WANG M, *et al*. Circular RNA ABCB10 contributes to laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) progression by modulating the miR-588/CXCR4 axis[J]. Aging, 2021, 13(10): 14078-14087. DOI: 10.18632/aging.203025.

[16] YU T, LIANG S, MA T H, *et al*. Downregulation of miR-588 is associated with tumor progression and unfavorable prognosis in patients with osteosarcoma[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(6): 592. DOI: 10.3892/etm.2021.10024.

[17] YU M, ZHANG X, LI H, *et al*. MicroRNA-588 is downregulated and may have prognostic and functional roles in human breast cancer[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 5690-5696. DOI: 10.12659/msm.905126.

[18] MILUZIO A, OLIVETO S, PESCE E, *et al*. Expression and activity of eIF6 trigger malignant pleural mesothelioma growth *in vivo*[J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 37471-37485. DOI: 10.18632/oncotarget.5462.

[19] GATZA M L, SILVA G O, PARKER J S, *et al*. An integrated genomics approach identifies drivers of proliferation in luminal-subtype human breast cancer[J]. Nat Genet, 2014, 46(10): 1051-1059. DOI: 10.1038/ng.3073.

[20] LIN J X, YU X H, XIE L P, *et al*. eIF6 promotes colorectal cancer proliferation and invasion by regulating AKT-related signaling pathways[J]. J Biomed Nanotechnol, 2019, 15(7): 1556-1567. DOI: 10.1166/jbn.2019.2792.

(收稿:2024-01-05;修回:2024-03-09)

(编辑 汪勤俭)