

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.009

· 临床研究 ·

miR-28-3p 通过抑制 BIN1 表达促进三阴性乳腺癌 MDA-MB-468 细胞的恶性生物学行为

李杰^a, 刘天旭^b, 吕微^b, 张评梅^b, 段玉青^b, 王郁^b, 刘丽华^b(河北医科大学第四医院 a. 医务处; b. 肿瘤免疫治疗科, 河北 石家庄 050035)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-28-3p 在三阴性乳腺癌 (triple negative breast cancer, TNBC) 组织和细胞系中的表达及其对 MDA-MB-468 细胞恶性生物学行为的影响。 **方法:** 收集 2013 年 1 月至 2014 年 1 月河北医科大学第四医院乳腺中心手术切除的、经病理证实的 83 例女性 TNBC 患者的癌组织和癌旁组织标本, 以及 TNBC 细胞系 MDA-MB-468、HCC-1937、MDA-MB-231、MDA-MB-436、MDA-MB-453 和人正常乳腺上皮细胞 MCF10A, 用 qPCR 检测组织和细胞系中 miR-28-3p 的表达水平并分析其表达与患者临床病理特征的相关性。用 miR-28-3p 抑制剂转染 MDA-MB-468 细胞后, 用 CCK-8、流式细胞术、细胞划痕和 Transwell 实验分别检测 miR-28-3p 抑制剂对 MDA-MB-468 细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力的影响, 用 Western blotting 检测 MDA-MB-468 细胞中桥接整合因子 1 (bridging integrator-1, BIN1) 蛋白的表达水平。通过生物信息学工具预测 miR-28-3p 的靶基因 BIN1, 用双荧光素酶报告基因实验验证 miR-28-3p 对 BIN1 的调控作用。 **结果:** TNBC 组织及细胞系中 miR-28-3p 表达水平显著高于癌旁组织及 MCF10A 细胞 (均 $P < 0.01$); 83 例 TNBC 组织中共有 56 例 (67.47%) 高表达 miR-28-3p, 其高表达与患者的 Ki-67 表达水平、肿瘤大小和 TNM 分期密切相关 (均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 miR-NC 组比较, miR-28-3p 抑制剂组 MDA-MB-468 细胞增殖、侵袭和迁移能力降低, 凋亡率升高 (均 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。双荧光素酶报告基因和实验证实 BIN1 是 miR-28-3p 的靶基因, miR-28-3p 抑制剂可上调 MDA-MB-468 细胞中 BIN1 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。 **结论:** miR-28-3p 在 TNBC 组织及细胞中呈高表达状态, miR-28-3p 抑制剂上调 BIN1 表达进而抑制 MDA-MB-468 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 并促进其凋亡。

[关键词] 三阴性乳腺癌; MDA-MB-468 细胞; miR-28-3p; 桥接整合因子 1; 增殖; 侵袭; 迁移; 凋亡

[中图分类号] R737.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)01-0055-07

miR-28-3p promotes the malignant biological behaviors of triple negative breast cancer MDA-MB-468 cells via inhibiting BIN1

LI Jie^a, LIU Tianxu^b, LYU Wei^b, ZHANG Pingmei^b, DUAN Yuqing^b, WANG Yu^b, LIU Lihua^b (a. Medical Department; b. Department of Tumor Immunotherapy, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050035, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the miR-28-3p expression in triple negative breast cancer (TNBC) tissues and cell lines, and explore its effect on the malignant biological behaviors of MDA-MB-468 cells. **Methods:** Tumor tissues and matched para-cancerous tissues were collected from 83 TNBC patients, who underwent tumor resection and pathological confirmation in the Fourth Hospital of Hebei Medical University between Jan. 2013 and Jan. 2014. TNBC cell lines (MDA-MB-468, HCC-1937, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-453) and human normal breast epithelial cell line MCF10A were also used in this study. qPCR was used to detect the expression of miR-28-3p in above mentioned tissues and cell lines. The correlation between miR-28-3p expression and clinical parameters was analyzed. After transfection with miR-28-3p inhibitor, the proliferation, apoptosis, invasion and migration ability of MDA-MB-468 cells were detected with CCK-8, Flow cytometry, Transwell and Wound-healing experiment, respectively. And Western blotting was used to examine the protein expression of bridging integrator-1 (BIN1) in MDA-MB-468 cells. Bioinformatics BIN1 tool were used to predict the target gene of miR-28-3p. Luciferase reporter gene assay was performed to validate the regulatory effect of miR-28-3p on BIN1. **Results:** The expression of miR-28-3p in TNBC tissues and cell lines was higher than that in matched para-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81871894); 河北省自然科学基金资助项目 (No. H2018206318)。 Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81871894), and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2018206318)

[作者简介] 李杰 (1981-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事乳腺肿瘤的临床与基础研究, E-mail: jiyilj@aliyun.com

[通信作者] 刘丽华 (LIU Lihua, corresponding author), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫学、肿瘤分子生物学、肿瘤表观遗传学和肿瘤综合治疗研究, E-mail: lihualiu567@hotmail.com

cancerous tissues and MCF10A cells (all $P < 0.01$), respectively. Among the total 83 TNBC tissues, 56 (67.47%) showed high miR-28-3p expression. High expression of miR-28-3p was closely correlated with the Ki-67 expression, tumor size and TNM stage (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with miR-NC group, transfection of miR-28-3p inhibitor significantly decreased the proliferation, invasion and migration of MDA-MB-468 cells while increased the apoptosis rate (all $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Luciferase reporter gene assay confirmed that BIN1 was a target gene of miR-28-3p, and miR-28-3p inhibitor could up-regulate BIN1 expression in MDA-MB-468 cells ($P < 0.05$).

Conclusion: miR-28-3p is highly expressed in TNBC tissues and cell lines. miR-28-3p inhibitor up-regulates the expression of BIN1 to inhibit the proliferation, invasion and migration ability while promote the apoptosis of MDA-MB-468 cells.

[Key words] triple negative breast cancer (TNBC); MDA-MB-468 cell; miR-28-3p; bridging integrator-1 (BIN1); proliferation; invasion; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(1): 55-61. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.01.009]

乳腺癌是全球第二大常见的恶性肿瘤,其发病率高居女性恶性肿瘤之首,严重威胁女性健康^[1]。近年来,随着包括手术、化疗、放疗、靶向治疗、内分泌治疗等多种治疗手段在内的肿瘤综合治疗的发展,乳腺癌的整体治疗效果已较前显著提高^[1-2]。但是,在4种分子分型的乳腺癌中,三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)治疗手段较为局限,预后最差^[1]。因此,寻找与乳腺癌进展密切相关的因素有助于进一步改善患者的预后。微小RNA(microRNA, miRNA)是一种主要在转录后水平发挥调控作用的小分子非编码RNA,其主要机制为结合靶基因的3'-非编码区(untranslated region, UTR)后诱导其降解或抑制其翻译^[3]。研究^[4-6]表明,miR-28-3p在结肠癌、食管癌和鼻咽癌等多种肿瘤中发挥促癌作用,是一条功能较为明确的miRNA。目前,尚无miR-28-3p在乳腺癌中表达及其作用的研究报道。本研究通过检测miR-28-3p在TNBC组织和细胞中的表达及其对MDA-MB-468细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响,阐明其在TNBC发生发展中的作用及意义,为深入研究TNBC提供理论依据和实验数据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2013年1月至2014年1月于河北医科大学第四医院乳腺中心接受手术切除的83例女性乳腺癌患者,年龄25~67岁,年龄(44.80±7.95)岁。每例患者均各取1份肿瘤组织标本进行后续实验,同时取距离癌灶边缘2 cm的癌旁组织作为对照。一部分标本置于液氮中冻存以提取RNA用于qPCR检测,另一部分标本石蜡包埋并切片以备免疫组化染色检测。所有患者术前均未行任何抗肿瘤治疗,术后经病理及免疫组化检查确诊为TNBC。按照国际抗癌联盟(UICC)第七版标准对患者进行TNM分期: I期17例, II期27例, III期39例。本研究中所有标本及临床资料的收集均征得患者同意并签署了知情同意书,研究方案获得河北医科大学第四医院医学伦理委员会批准。

1.2 细胞系及主要试剂

人TNBC细胞系MDA-MB-468、HCC-1937、MDA-MB-231、MDA-MB-436、MDA-MB-453和正常人正常乳腺上皮细胞MCF10A由中国医学科学院北京协和医学院基础研究所惠赠。

DMEM培养基、胰蛋白酶、逆转录试剂盒Super-Script RT购自美国Thermo Fisher Scientific公司,总RNA提取试剂TRIzol购自美国Invitrogen公司,qPCR引物由上海英骏生物技术公司合成。胎牛血清购自杭州四季青公司,兔抗人桥接整合因子1(bridging integrator 1, BIN1)、鼠抗人锌指E-box同源盒蛋白1(zinc-finger E-box binding homeobox-1, ZEB1)、鼠抗人Twist和兔抗人GAPDH抗体购自美国Abcam公司,鼠抗人上皮钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏蛋白(N-cadherin)抗体购自美国Cells Signaling Technology公司,细胞凋亡检测试剂盒购自BD Biosciences公司,Lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司,CCK-8试剂盒购自北京索莱宝公司,荧光素酶报告基因试剂盒pRL-CMV购自美国Promega公司,SP试剂盒和DAB试剂盒购自北京中山金桥公司,miR-28-3p抑制剂(inhibitor)及miR-NC质粒购自美国Thermo Fisher公司。

1.3 细胞培养、转染及分组

使用含10%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)及链霉素(100 μg/ml)的DMEM培养基MDA-MB-468、HCC-1937、MDA-MB-231、MDA-MB-436、MDA-MB-453和MCF10A细胞,置于37℃、5%CO₂的培养箱中进行培养。待细胞汇合度达到70%~80%时,使用胰酶消化后收集细胞并铺至6孔板中,检测细胞恶性生物学行为的实验分为miR-NC组(对照组)和miR-28-3p组(处理组);检测miR-28-3p对BIN1表达的影响相关实验分为miR-NC组(阴性对照组)、miR-28-3p组(处理组)和NC组(空白对照),之后按miR-28-3p抑制剂及miR-NC质粒说明书进行操作对细胞转染。

1.4 qPCR检测TNBC组织及细胞系中miR-28-3p表达水平

按说明书的方法用TRIzol分别提取TNBC组织及

细胞系中总RNA,紫外分光光度计测量纯度及含量,参照逆转录试剂盒说明书加样,以1 μg 提取的总RNA作为模板,将RNA逆转录为cDNA。以此cDNA为模板进行qPCR扩增,反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共40个循环。引物序列:miR-28-3p F为5'-CGGATCCAGGCCCTTCAAGG ACTTTCT-3', R为5'-CGAATTCACAGAGCTCCTGCTGTGTCA-3'; U6 F为5'-CTCGCTTCGGCAGCACATA-3', R为5'-AACGCTTACGAATTTGCGT-3'。以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法计算miR-28-3p的相对表达水平。

1.5 免疫组化染色检测TNBC组织中BIN1的表达水平

按照说明书使用SP法进行免疫组化检测组织中BIN1表达。主要步骤:3 μm 厚的组织切片常规脱蜡、水化,pH6.0的枸橼酸缓冲液高压修复5 min,自然冷却至室温后用含3%过氧化氢的甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶,血清封闭20 min,加入BIN1(1:300)抗体后于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中过夜。次日,依次加入生物素化二抗工作液和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记链霉卵白素工作液,DAB显色,苏木精复染,常规脱水、透明,中性树脂封片。对照组以PBS替代一抗处理,其余步骤同前。显微镜下($\times 200$)随机选择5个视野,计算阳性细胞百分率,用0~12分半定量评分系统,总分为染色强度得分和染色细胞数量得分的乘积。总分为0~4被视作低表达,总分为5~12被视作高表达。由2位病理医师独立鉴定结果,当存在争议时由第3位病理医师阅片并决定结果。

1.6 CCK-8法检测MDA-MB-468细胞的增殖能力

按照CCK-8试剂盒说明书的方法对MDA-MB-468细胞增殖能力进行检测。主要步骤:将 2×10^3 个细胞接种于96孔板。当细胞黏附以后,每孔各加入10 μl CCK-8试剂后在培养箱中常规孵育2 h。在转染的第0、24、48、72、96 h分别使用酶标仪检测波长450 nm处的光密度(D)值,计算细胞的增殖倍数。

1.7 Annexin V/PI染色流式细胞术检测MDA-MB-468细胞的凋亡水平

按照细胞凋亡检测试剂盒说明书进行检测。主要步骤:使用不含胰蛋白酶的EDTA溶液收获MDA-MB-468细胞后,用预冷的PBS洗2次,再用100 μl 的结合缓冲液将 5×10^5 个细胞重悬后,分别加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI。在暗室中室温孵育10 min,每管中加入400 μl 结合缓冲液后,上流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

1.8 细胞划痕愈合实验检测MDA-MB-468细胞的迁移能力

取 5×10^5 个MDA-MB-468细胞并将其接种于6

孔板,在6孔板背面画5条平行线作为标记,24 h后用无菌移液器针头在细胞中划2条垂直于背面平行线的直线,用PBS洗3次后加入2 ml无血清的DMEM培养基,于0、12、24 h在倒置显微镜下观察细胞向划痕区域的迁移距离并拍照。

1.9 Transwell实验检测MDA-MB-468细胞的侵袭能力

使用8 μm 孔径、6.5 mm直径的Transwell小室,用Matrigel基质胶包被Transwell小室的上室,加入密度 2×10^5 个MDA-MB-468细胞。下室加入含10%胎牛血清的DMEM培养基。常规培养24 h后取出小室,吸干上室固定液,PBS冲洗后,用湿棉棒擦去上室底部膜表面的细胞,将膜用4%多聚甲醛固定,PBS冲洗后移到含Giemsa染液的孔中室温染色10 min,在显微镜下拍照并取9个随机视野计算穿膜细胞数。

1.10 Western blotting(WB)检测MDA-MB-468细胞中BIN1蛋白的表达水平

提取NC组、miR-NC组和miR-28-3p inhibitor组MDA-MB-468细胞的总蛋白。各取含30 μg 蛋白样品,加入上样缓冲液和PBS配齐20 μl 体系,沸水中煮10 min,置于冰上冷却后,进行SDS-PAGE、转膜,5%脱脂奶粉中室温封闭2 h,TBST缓冲液洗膜后,加入兔抗人BIN1抗体(1:800),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,洗膜后,加入HRP标记的山羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育2 h,后加入ECL化学发光液进行曝光、显影。使用Quantity One 4.6软件分析图像,以GAPDH作为内参,以蛋白条带的灰度值之比表示BIN1蛋白的相对表达量。

1.11 统计学处理

qPCR、CCK-8、流式细胞术、Transwell及细胞划痕愈合和WB实验均重复3次。用SPSS 25.0统计软件进行数据分析,并用Graphpad Prism 8软件绘制统计图。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间数据比较采取两独立样本 t 检验,TNBC组织与癌旁组织比较采取配对 t 检验,BIN1蛋白与患者临床病理特征的关系采用 χ^2 检验,TNBC组织中BIN1与miR-28-3p表达相关性采用Spearman等级相关分析。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-28-3p在TNBC组织和细胞系中均高表达

qPCR实验结果显示,TNBC组织中miR-28-3p表达水平显著高于癌旁组织($t=7.697, P<0.01$;图1A);83例组织标本中,27例(32.53%)低表达、56例(67.47%)高表达,miR-28-3p表达与患者Ki-67表达水平、TNM分期、肿瘤大小密切相关($P<0.05$ 或

$P < 0.01$), 与患者年龄和淋巴结转移无关 ($P > 0.05$, 表 1)。与 MCF10A 细胞比较, MDA-MB-468、HCC-1937、MDA-MB-231、MDA-MB-436 和 MDA-MB-453 细胞中 miR-28-3p 表达水平平均上调 ($t=18.440、23.724、31.833、27.635、36.032$, 均 $P < 0.01$; 图 1B), 其中以 MDA-MB-468 细胞中 miR-28-3p 表达水平最高, 所以后续实验选用该细胞株。

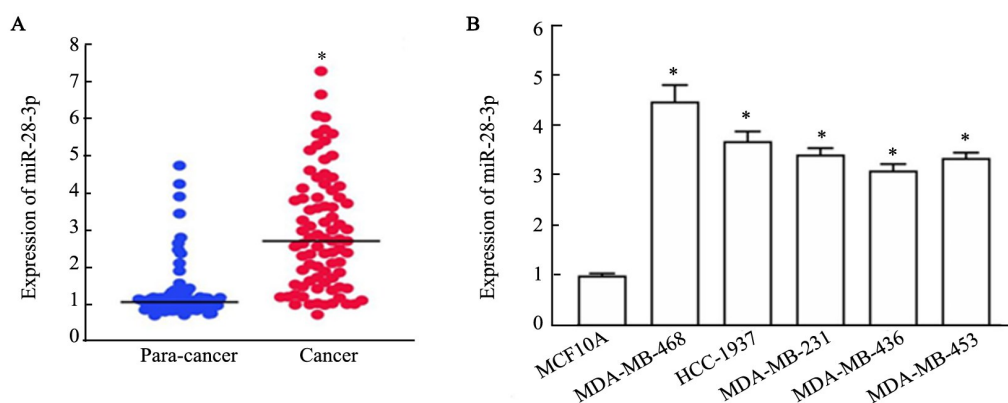
2.2 miR-28-3p 抑制剂降低 MDA-MB-468 细胞的增殖、侵袭和迁移并促进凋亡

MDA-MB-468 细胞中转染 miR-28-3p 抑制剂后, 与对照组比较, (1) qPCR 检测结果 (图 2A) 表明, MDA-MB-468 细胞中 miR-28-3p 的表达水平显著下调 ($t=21.176, P < 0.01$); (2) CCK-8 法检测结果 (图 2B)

显示, MDA-MB-468 细胞的增殖能力显著下降 (24 h: $t=4.347, P < 0.05$; 48 h: $t=7.624, P < 0.01$; 72 h: $t=12.746, P < 0.01$); (3) 流式细胞术检测结果显示, MDA-MB-468 细胞的凋亡率显著升高 [$(32.91 \pm 1.36)\%$ vs $(13.73 \pm 0.65)\%$, $t=22.550, P < 0.01$]; (4) Transwell 实验结果 (图 2C) 显示, miR-28-3p 抑制剂组 MDA-MB-468 细胞的侵袭数目显著减少 [(48.00 ± 4.00) vs (101.67 ± 3.51) 个, $t=17.463, P < 0.01$]; (5) 细胞划痕实验结果 (图 2D) 显示, MDA-MB-468 细胞的迁移能力显著降低 [$(27.30 \pm 3.62)\%$ vs $(66.73 \pm 3.81)\%$, $t=13.000, P < 0.01$]。结果表明, miR-28-3p 抑制剂显著降低 MDA-MB-468 细胞的增殖、侵袭和迁移能力并促进细胞凋亡。

表 1 TNBC 组织中 miR-28-3p 表达与 TNBC 患者临床病理特征的关系 [n (%)]
Tab.1 The relationship between the expression of miR-28-3p in TNBC tissues and the clinicopathological characteristics of TNBC patients [n (%)]

Clinicopathological characteristics	N	miR-28-3p		χ^2	P
		Low expression	High expression		
Age (t/a)					
<45	43	16 (68.18)	27 (31.82)	0.890	0.345
≥ 45	40	11 (66.67)	29 (33.33)		
TNM stage					
I + II	44	20 (77.42)	24 (22.58)	7.127	0.008
III	39	7 (38.10)	32 (61.90)		
Invasion range					
T1+T2	61	24 (84.90)	37 (15.10)	4.869	0.027
T3+T4	22	3 (36.67)	19 (63.33)		
Lymph node metastasis					
No	37	19 (78.95)	18 (21.05)	0.221	0.638
Yes	46	26 (57.78)	20 (42.22)		
Ki-67 (%)					
≤ 14	33	19 (82.86)	14 (17.14)	15.656	0.001
> 14	50	8 (56.25)	42 (43.75)		



* $P < 0.01$ vs Para-cancer or MCF10A group

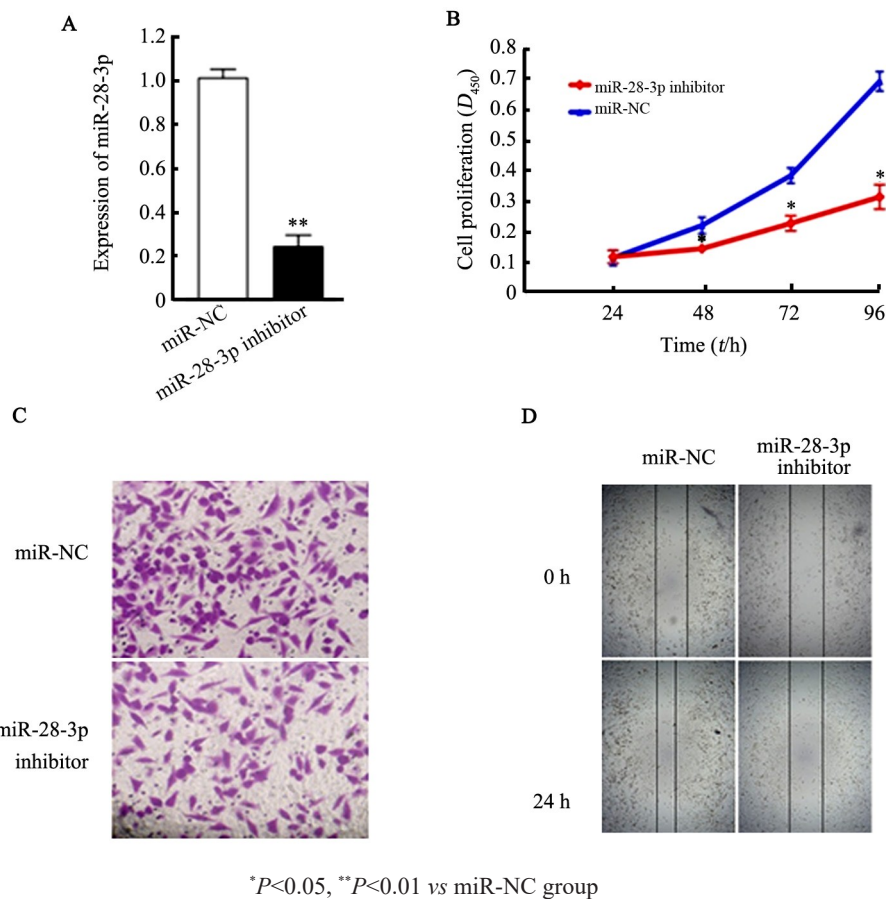
图 1 TNBC 组织(A)和细胞系(B)中 miR-28-3p 的表达

Fig.1 The expression of miR-28-3p in TNBC tissues (A) and cell lines (B)

2.3 BIN1是miR-28-3p的靶基因

通过生物信息学工具PITA和Starbase V3.0分析发现,BIN1的3'-UTR上存在与miR-28-3p互补结合的位点,提示BIN1可能是miR-28-3p的一个靶基因(图3A)。构建携带BIN1的3'-UTR上miR-28-3p突变位点的序列(3'-UTR-Mut)并将其转染进MDA-MB-468细胞后,双荧光素酶报告基因实验检测结果(图3B)显示,加入miR-28-3p模拟物能够显著降低3'-UTR-野生(3'-UTR-Wt)组的荧光强度($t=18.048, P<0.01$),但不能降低3'-UTR-Mut组的荧光强度

($t=2.266, P>0.05$)。WB实验结果(图3C)显示,与空白对照组和加入miR-NC组比较,miR-28-3p抑制剂组MDA-MB-468细胞中BIN1的蛋白显著提高($t=29.908, 29.670$, 均 $P<0.01$),而miR-NC组细胞中BIN1蛋白表达水平与空白对照组比较差异无统计意义($t=0.629, P>0.05$)。免疫组化染色结果(图3D)显示,BIN1表达于细胞核中,83例TNBC组织中有38例(45.78%)高表达BIN1,45例(54.22%)低表达BIN1;TNBC组织中BIN1与miR-28-3p表达水平呈负相关($r=-0.239, P<0.05$)。



A: The expression of miR-28-3p was detected by qPCR; B: CCK-8 assay was used to test the proliferation ability of cells; C: Flow cytometry was used to determine the apoptosis of MDA-MB-468 cells; D: Transwell assay was used to test the cell invasion ability of cells ($\times 400$); E: The ability of cell migration was measured with Wound-healing assay

图2 miR-28-3p抑制剂对MDA-MB-468细胞恶性生物学行为的影响

Fig.2 The effect of miR-28-3p inhibitor on the malignant biological behaviors of MDA-MB-468 cells

3 讨论

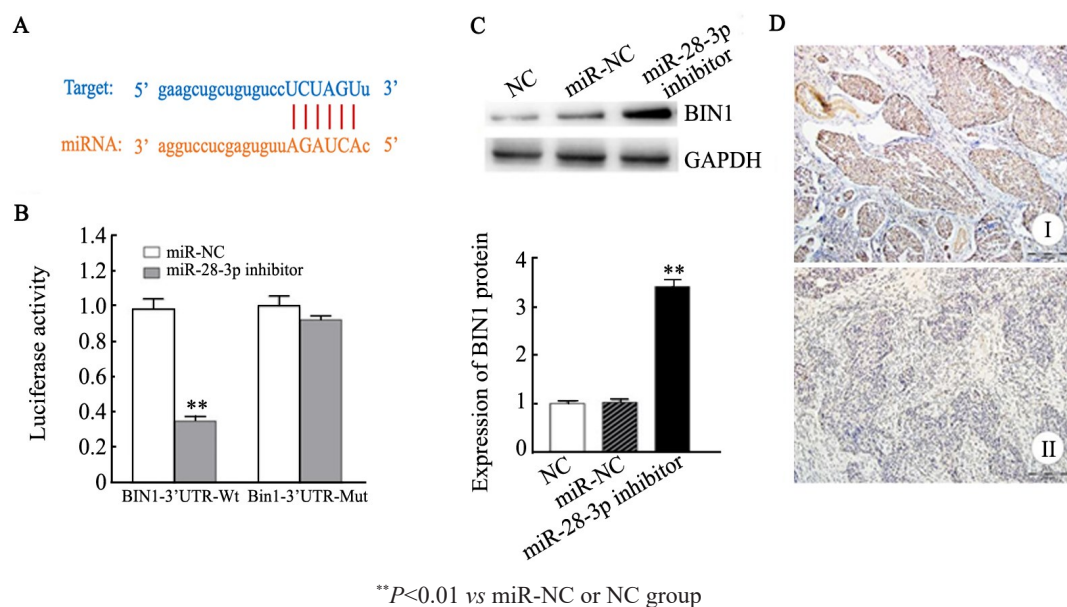
乳腺癌是一种全球范围内常见的恶性肿瘤^[1]。为预测患者预后和制定精准治疗策略,学者们提出根据ER、PR、Ki-67和HER-2表达情况对乳腺癌进行分子分型,分别为Luminal A型、Luminal B型、HER-2过表达型和TNBC型,其中以TNBC型预后最差^[7-9]。癌基因的异常高表达能够促进肿瘤的增殖、转移、侵

袭和耐药等多种恶性生物学行为,在肿瘤发生发展中起重要作用^[10-11]。探索与TNBC密切相关的癌基因表达及其功能有助于进一步研究其发生发展的相关机制,为改善患者预后提供新的潜在治疗靶点。

DNA元件百科全书计划已证实人类大多数基因转录本是不包含有效开放阅读框的非编码RNA,miRNA是其中的重要组成部分^[12]。根据miRNA调控的靶蛋白的功能不同,miRNA在肿瘤发生发展中

既可作为癌基因,也可作为抑癌基因^[3]。已有研究^[4-6]证实,miR-28-3p通过促进细胞侵袭、转移和EMT等生物学行为参与多种恶性肿瘤的进展。目前尚无miR-28-3p在TNBC中的表达及其生物学功能的研究。本研究首先分析了TNBC患者癌及其癌旁组织中miR-28-3p的表达水平,结果表明在TNBC组织中miR-28-3p表达水平显著提高,与患者的Ki-67表达水平、肿瘤大小和TNM分期密切相关。为进一步研究miR-28-3p在TNBC中的生物学功能,本研究对TNBC细胞系中miR-28-3p的表达进行了检测,结果表明miR-28-3p在所有TNBC细胞系中均为高表达,其中MDA-MB-468细胞表达水平最高。用miR-28-3p抑制剂转染后,MDA-MB-468细胞的增殖、侵袭和迁移能力均显著降低,同时凋亡能力显著提高,表明miR-28-3p在MDA-MB-468细胞中可发挥抑癌功能。为进一步明确miR-28-3p的作用机制,使用生物信息学分析工具预测其靶基因,发现BIN1的3'-UTR上

存在与miR-28-3p互补的序列,可能是miR-28-3p的潜在靶基因。BIN1是一种具有抑癌功能的配体蛋白,目前已有研究证实BIN1在肺癌、食管癌、肝癌等恶性肿瘤中呈低表达或表达缺失状态,与肿瘤细胞的多重恶性生物学行为密切相关^[3,13-14]。在TNBC中BIN1亦呈低表达状态,与患者不良预后密切相关^[15]。但目前BIN1在TNBC中表达下调的原因尚不完全清楚。本研究使用荧光素酶报告基因进行验证,结果表明TNBC中BIN1是miR-28-3p的靶基因,用miR-28-3p抑制剂干预能显著提高MDA-MB-468细胞中BIN1蛋白表达水平,该结果表明miR-28-3p过表达可能是TNBC中BIN1表达降低的机制。由于BIN1与肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移和凋亡密切相关^[3,16-17],因此当用miR-28-3p抑制剂干预后,MDA-MB-468细胞的增殖、侵袭和迁移能力显著降低,而凋亡能力显著提高。



A: The predicted sites in the BIN1 3'-UTR for binding miR-28-3p; B: Luciferase reporter assay to verify the relationship between miR-28-3p and BIN1; C: The effect of miR-28-3p inhibitor on BIN1 expression; D: Representative expression of BIN1 in TNBC tissues (×200). I and II shows high and low expression of BIN1, respectively

图3 生物信息学预测并验证BIN1是miR-28-3p的靶基因

Fig.3 Bioinformatics predicted and verified that BIN1 was the target gene of miR-28-3p

综上所述,miR-28-3p在TNBC中表达水平显著提高,与患者的Ki-67表达、肿瘤大小和TNM分期密切相关。miR-28-3p在MDA-MB-468细胞中能够通过下调BIN1表达促进其增殖、侵袭和迁移能力,并抑制其凋亡。以miR-28-3p为靶点逆转BIN1低表达的治疗策略可能为改善TNBC患者预后做出贡献。

[参考文献]

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J].

CA: A Cancer J Clin, 2019, 69(1): 7-34. DOI:10.3322/caac.21551.

[2] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer[J]. Lancet, 2017, 389 (10074): 1134-1150. DOI:10.1016/s0140-6736(16)31891-8.

[3] ZHENG J B, WANG J L, JIA Y L, et al. MicroRNA-211 promotes proliferation, migration, and invasion ability of oral squamous cell carcinoma cells via targeting the bridging integrator 1 protein[J/OL]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 4644-4653[2019-08-18]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6585605/. DOI: 10.1002/jcb.27753.

[4] ALMEIDA M I, NICOLOSO M S, ZENG L Z, et al. Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer

- cells[J/OL]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 886-896. e9[2019-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321100/>. DOI:10.1053/j.gastro.2011.12.047.
- [5] LIU S G, QIN X G, ZHAO B S, et al. Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue[J/OL]. *Oncol Lett*, 2013, 5(5): 1639-1642[2019-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3678876/>. DOI:10.3892/ol.2013.1251.
- [6] LV Y, YANG H J, MA X K, et al. Strand-specific miR-28-3p and miR-28-5p have differential effects on nasopharyngeal cancer cells proliferation, apoptosis, migration and invasion[J/OL]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 187[2019-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6642532/>. DOI:10.1186/s12935-019-0915-x.
- [7] CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours[J/OL]. *Nature*, 2012, 490(7418): 61-70[2019-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3465532/>. DOI:10.1038/nature11412.
- [8] HOLM J, ERIKSSON L, PLONER A, et al. Assessment of breast cancer risk factors reveals subtype heterogeneity[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): 3708-3717. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-16-2574.
- [9] 裴蓓, 成琳. 不同分子分型乳腺癌患者预后与淋巴结转移率的相关性分析[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(7): 776-781. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.07.009
- [10] NIE W, GE H J, YANG X Q, et al. LncRNA-UCA1 exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer by targeting miR-193a-3p[J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(1): 99-106. DOI:10.1016/j.canlet.2015.11.024.
- [11] WANG J, JIA Y, ZHAO S, et al. BIN1 reverses PD-L1-mediated immune escape by inactivating the c-MYC and EGFR/MAPK signaling pathways in non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2017, 36(45): 6235-6243. DOI:10.1038/onc.2017.217.
- [12] GUTTMAN M, AMIT I, GARBER M, et al. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals[J/OL]. *Nature*, 2009, 458(7235): 223-227[2019-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2754849/>. DOI:10.1038/nature07672.
- [13] 李欢, 王梦杰, 张翔宇, 等. 桥接整合因子1通过c-MYC途径抑制非小细胞肺癌A549细胞中PD-L1的表达[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(8): 762-766. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.08.002.
- [14] PAN K, LIANG X T, ZHANG H K, et al. Characterization of bridging integrator 1 (BIN₁) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Mol Med*, 2012, 18: 507-518[2019-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3356425/>. DOI:10.2119/molmed.2011.00319.
- [15] GHANEIE A, ZEMBA-PALKO V, ITOH H, et al. Bin1 attenuation in breast cancer is correlated to nodal metastasis and reduced survival[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(2): 192-194. DOI:10.4161/cbt.6.2.3587.
- [16] WANG X X, WANG J L, JIA Y L, et al. Methylation decreases the Bin1 tumor suppressor in ESCC and restoration by decitabine inhibits the epithelial mesenchymal transition[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(12): 19661-19673[2019-08-18]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5386712/>. DOI:10.18632/oncotarget.14914.
- [17] ELLIOTT K, GE K, DU W, et al. The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program[J]. *Oncogene*, 2000, 19(41): 4669-4684. DOI:10.1038/sj.onc.1203681.

[收稿日期] 2019-08-20

[修回日期] 2019-10-29

[本文编辑] 党瑞山