

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.14.002

LncRNA MCM3AP-AS1 调节 miR-424-5p/PSAT1 轴 对乳腺癌恶性进展的影响*

冯佳梅 万华 高晴倩 瞿文超 邵士珺 孙佳晔 吴雪卿[△]

(上海中医药大学附属曙光医院乳腺科 上海 200011)

摘要 目的:探讨长链非编码核糖核酸(lncRNA)微小染色体维持蛋白3相关蛋白-反义链1(MCM3AP-AS1)调节微小核糖核酸(miR)-424-5p/磷酸丝氨酸氨基转移酶1(PSAT1)轴对乳腺癌恶性进展的影响。**方法:**采用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测人正常乳腺上皮细胞MCF-10A和乳腺癌细胞株MDA-MB-231、BT549、BT20中LncRNA MCM3AP-AS1、miR-424-5p和PSAT1信使核糖核酸(mRNA)的表达水平。构建LncRNA MCM3AP-AS1低表达模型、miR-424-5p敲低与过表达模型,并使用RT-qPCR方法验证转染模型构建的成功。分别采用四氮甲基唑蓝(MTT)法、Transwell实验检测乳腺癌细胞株的增殖、迁移、侵袭能力。免疫印迹法检测各组MDA-MB-231细胞中细胞周期蛋白D1(CyclinD1)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和PSAT1蛋白的表达。经生物信息学分析后,采用双荧光素酶报告基因实验与RNA免疫共沉淀(RIP)实验分别验证LncRNA MCM3AP-AS1与miR-424-5p、miR-424-5p与PSAT1之间的靶向关系。**结果:**在乳腺癌细胞株MDA-MB-231、BT549、BT20中MCM3AP-AS1、PSAT1 mRNA的表达水平显著高于MCF-10A($P<0.05$),miR-424-5p表达水平显著低于MCF-10A($P<0.05$)。敲低MCM3AP-AS1或过表达miR-424-5p均可以降低MDA-MB-231细胞的吸光度(OD_{490})值、细胞迁移数目和细胞侵袭数目、CyclinD1、N-cadherin和PSAT1蛋白表达水平($P<0.05$),提高细胞E-cadherin蛋白表达水平($P<0.05$)。敲低miR-424-5p的表达逆转了下调MCM3AP-AS1对MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭以及相关蛋白表达的影响。双荧光素酶报告基因实验与RIP实验证实MCM3AP-AS1靶向负调控miR-424-5p表达,miR-424-5p靶向负调控PSAT1的表达。**结论:**LncRNA MCM3AP-AS1在乳腺癌中呈高表达,其低表达可通过靶向调节miR-424-5p/PSAT1轴抑制乳腺癌的恶性进展。

关键词:MCM3AP-AS1;miR-424-5p;PSAT1;乳腺癌

中图分类号:R-33;R737.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2024)14-2606-07

Effect of LncRNA MCM3AP-AS1 on Malignant Progression of Breast Cancer by Regulating miR-424-5p/PSAT1 Axis*

FENG Jia-mei, WAN Hua, GAO Qing-qian, QU Wen-chao, SHAO Shi-jun, SUN Jia-ye, WU Xue-qing[△]

(Department of Breast, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200011, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) microchromosome maintenance protein 3-associated protein-antisense chain 1 (MCM3AP-AS1) on malignant progression of breast cancer by regulating microribonucleic acid (miR)-424-5p/phosphoserine aminotransferase 1 (PSAT1) axis. **Methods:** The expression levels of LncRNA MCM3AP-AS1, miR-424-5p and PSAT1 mRNA in human normal breast epithelial cells MCF-10A and breast cancer cell lines MDA-MB-231, BT549 and BT20 were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). LncRNA MCM3AP-AS1 low expression model, miR-424-5p knockdown and overexpression model were constructed, and the success of transfection model construction was verified by RT-qPCR method. The proliferation, migration and invasion of breast cancer cell lines were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and Transwell assay respectively. The expressions of cyclin d1 (CyclinD1), E-cadherin (E-cadherin), N-cadherin (N-cadherin) and PSAT1 proteins in MDA-MB-231 cells were detected by Western blotting. After bioinformatics analysis, the targeting relationship between LncRNA MCM3 AP-AS1 and miR-424-5p, miR-424-5p and PSAT1 was verified by double luciferase reporter gene assay and RNA immunoprecipitation (RIP) assay respectively. **Results:** The expression levels of MCM3AP-AS1 and PSAT1 mRNA in breast cancer cell lines MDA-MB-231, BT549 and BT20 were significantly higher than those in MCF-10A ($P<0.05$), and the expression level of miR-424-5p was significantly lower than that in MCF-10A ($P<0.05$). Knockdown of MCM3AP-AS1 or overexpression of miR-424-5p could reduce the absorbance (OD_{490}) value of MDA-MB-231 cells, the number of cell migration and cell invasion, the expression levels of CyclinD1, N-cadherin and PSAT1 proteins ($P<0.05$), and increase the expression level of E-cadherin protein ($P<0.05$). Knockdown of miR-424-5p reversed the effects of down-regulation of MCM3AP-AS1 on the proliferation, migration and invasion of

* 基金项目:上海市卫生健康委员会科研课题计划项目(202040254)

作者简介:冯佳梅(1981-),女,博士,副主任医师,研究方向:乳腺疾病,E-mail: drjessiee@163.com

△ 通讯作者:吴雪卿(1973-),女,博士,主任医师,研究方向:乳腺疾病,E-mail: snow_zi@hotmail.com

(收稿日期:2024-01-28 接受日期:2024-02-23)

MDA-MB-231 cells and the expression of related proteins. The dual luciferase reporter gene assay and RIP assay confirm that MCM3AP-AS1 targeted and negatively regulated the expression of miR-424-5p, and miR-424-5p targeted and negatively regulated the expression of PSAT1. **Conclusion:** LncRNA MCM3AP-AS1 is highly express in breast cancer, and its low expression can inhibit the malignant progression of breast cancer by targeting the miR-424-5p/PSAT1 axis.

Key words: MCM3AP-AS1; miR-424-5p; PSAT1; Breast cancer

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R737.9 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)14-2606-07

前言

乳腺癌是位居女性癌相关死亡原因第二位的恶性肿瘤,发病率高,由于其发病隐匿、迅速,且筛查率较低,导致诊治不及时,患者预后较差^[1-3]。因此探寻与乳腺癌的发生与恶性进展密切相关的分子对指导临床诊治、改善预后具有重要意义。长链非编码核糖核酸(lncRNA)是一类长度超过 200bp 且不编码蛋白质的 RNA 分子,其在多种癌症如结直肠癌、肺癌、乳腺癌中异常表达^[4]。有研究发现,lncRNA 微小染色体维持蛋白 3 相关蛋白 - 反义链 1(MCM3AP-AS1)在乳腺癌细胞系中高水平表达,且通过提高 lncRNA MCM3AP-AS1 的表达可以加速乳腺癌恶性进展^[5]。微小核糖核酸(miR)也是一类非编码 RNA,其通常与 lncRNA 存在竞争性结合的关系,能够参与机体细胞增殖、生长、凋亡、信号传导等生理过程,也是癌症治疗中的重要靶点^[6]。通过靶基因预测发现,lncRNA MCM3AP-AS1 与 miR-424-5p 存在相同的结合位点。Zhang 等^[7]研究发现 miR-424-5p 在乳腺癌组织和细胞中呈低表达,促进 miR-424-5p 的表达能够阻碍乳腺癌细胞生长、侵袭迁移和上皮间质转化过程。磷酸丝氨酸氨基转移酶 1(PSAT1)是控制细胞丝氨酸和 α -酮戊二酸产生的关键酶,在许多肿瘤的进展中发挥关键作用^[8]。Wang 等^[9]研究发现过表达 PSAT1 能够促进三阴性乳腺癌的恶性进展,且与不良预后有关。相关研究显示,通过下调 miR-424-5p 表达水平增加 LCC9 和 ZR 细胞株中 PSAT1 表达,可恢复对内分泌治疗的敏感性。目前关于 lncRNA MCM3AP-AS1 能否通过调控 miR-424-5p/PSAT1 轴对乳腺癌细胞的恶性进展的关系尚不明确。本研究拟探讨 MCM3AP-AS1 对 miR-424-5p/PSAT1 轴的调控作用以及对乳腺癌恶性进展的影响,旨在为临床乳腺癌的治疗提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 细胞系

人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A、人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、BT20、BT549 均购自美国 ATCC 公司。

1.2 主要试剂及仪器

胰蛋白酶、杜氏改良 Eagle 培养基(DMEM)细胞培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;反转录试剂盒、RNA 提取试剂盒、聚合酶链式反应(PCR)试剂盒购自日本 TOYOBO 公司;细胞凋亡检测试剂盒、四氮甲基唑蓝(MTT)试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒和相应载体购自美国 Promega 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;脂质体(Lipofectamine)3000 试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司;sh-MCM3AP-AS1、sh- 阴性对照组(NC)、

miR-NC、anti-miR-424-5p、miR-424-5p 模拟物(mimics)、anti-miR-NC 购自美国 Thermo Fisher 公司;RNA 免疫共沉淀(RIP)试剂盒、双荧光素酶报告基因实验系统购自美国 Promega 公司;兔源细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和 PSAT1 一抗和羊抗兔二抗购自英国 Abcam 公司。Varioskan LUX 多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司。

1.3 细胞培养

在 37℃、5%二氧化碳(CO₂)、饱和湿度的细胞培养箱环境中,将人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A、乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、BT20、BT549 细胞分别放置在含 10%胎牛血清的 DMEM 细胞培养基中进行常规培养,且两种培养基中均添加青霉素和链霉素。适时进行传代,传代 3 次后取对数期细胞用于实验。

1.4 细胞转染与分组

将对数期的 MDA-MB-231 细胞于转染前接种于 6 孔板中(浓度为 1×10^6 个/mL),以保证在瞬时转染时的细胞汇合度在 50%以上。严格按照 Lipofectamine 3000 试剂盒的方法将不同的转染载体转染至 MDA-MB-231 细胞中,并根据转染载体不同将 MDA-MB-231 细胞分为 sh-NC 组(转染 sh-NC)、sh-MCM3AP-AS1 组(转染 sh-MCM3AP-AS1)、miR-NC 组(转染 miR-NC)、miR-424-5p 组(转染 miR-424-5p mimics)、sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC 组(sh-MCM3AP-AS1 与 anti-miR-NC 共转染)和 sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-424-5p 组(sh-MCM3AP-AS1 与 anti-miR-424-5p 共转染)。转染 48h 后,检测转染效率,进行后续实验。

1.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测 MCM3AP-AS1、miR-424-5p 和 PSAT1 信使核糖核酸(mRNA)的表达水平

取人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A、人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、BT20、BT549,使用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,使用反转录酶将 RNA 反转录,产生第一链互补脱氧核糖核酸(cDNA)。在 PCR 系统中,使用 SYBR 预混剂进行 PCR 扩增反应。引物序列设计与合成均由生工生物工程(上海)有限公司完成。引物序列设计如表 1 所示。以 GAPDH 作为 MCM3AP-AS1、PSAT1 的内参,U6 作为 miR-424-5p 的内参,基因表达量应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析计算。

1.6 MTT 法检测 MDA-MB-231 细胞增殖能力

取转染后的 MDA-MB-231 细胞,消化离心后以密度 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,置于含 5%CO₂ 的 37℃细胞培养箱常规培养 48 h。每孔中加入 20 μ L MTT 试剂(新鲜配制,浓度为 5 mg/mL),在细胞培养箱中继续孵育 4 h 后弃去上清液,加入

二甲基亚砜(DMSO)并在摇床上震荡 10 min,待结晶溶解,使用多功能酶标仪检测各组细胞在 490 nm 下的吸光度值(OD₄₉₀)。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Genes	Primer sequences(5'-3')
MCM3AP-AS1	F: GCTGCTAATGGCAACACTGA
	R: AGGTGCTGTCTGGTGGAGAT
miR-424-5p	F: GCGGCCAGCAGCAATTCATG
	R: CAGCCACAAAAGAGCACAAT
PSAT1	F: CTAAGCGTTGGTCTGGCAGGAAG
	R: AGAAGTGGAGAGCAGATGGAGGAG
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCACA
	R: AACGCTTCACGAATTTGCGT
GAPDH	F: CAGGAGGCATTGCTGATGAT
	R: GAAGGCTGGGGCTCATTT

1.7 Transwell 实验检测 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力

迁移实验:收集转染后的 MDA-MB-231 细胞并使用无血清培养基重悬,调整密度为 1×10^6 个/mL。在 Transwell 的下室中加入 500 μ L 含血清的细胞培养基作为迁移趋化物。在 Transwell 上室中加入细胞悬液,并置于 24 孔板中培养 24 h,棉签擦去上层未迁移的细胞,下室加入多聚甲醛进行固定,使用结晶紫染色,显微镜下对细胞迁移的数量进行计数。侵袭实验:采用基质胶包被后的 Transwell 小室,之后实验操作按迁移实验进行,分析细胞侵袭能力。

1.8 免疫印迹法检测 MDA-MB-231 细胞中 CyclinD1、E-cadherin、N-cadherin 和 PSAT1 蛋白的表达

收集转染后的 MDA-MB-231 细胞,室温下加入放射性免疫沉淀法裂解液进行超声破碎,提取细胞蛋白并使用二喹啉甲酸法检测蛋白的浓度。将蛋白进行煮沸,提前制备分离胶,将蛋白上样后进行凝胶电泳,湿法转膜,室温下置于封闭液中缓慢振荡 1 h。加入 CyclinD1(1:1000)、E-cadherin(1:800)、N-cadherin(1:500)、PSAT1(1:800)一抗孵育过夜(4 $^{\circ}$ C),洗膜后加入相应稀释后的二抗(1:5000)室温孵育 2 h,进行显色,以 GAPDH 为内参蛋白,观察蛋白质条带并计算表达水平。

1.9 RIP 实验

使用 RIP 检测试剂盒处理 MDA-MB-231 细胞,验证 MCM3AP-AS1 与 miR-424-5p 的结合力。用于 RIP 测定的抗体包括 Argonaute 2 (AGO2) 和对照免疫球蛋白(Ig)G,将 MDA-MB-231 细胞与 RIP 裂解缓冲液共孵育,将 AGO2 和 IgG 抗体与细胞裂解物在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,以捕获 RNA 蛋白抗体。将共沉淀的 RNA 合成 cDNA,并通过 RT-qPCR 进行评估。

1.10 双荧光素酶报告基因实验

构建 MCM3AP-AS1、PSAT1 野生型质粒(MCM3AP-AS1-WT 与 PSAT1-WT)和突变型质粒(MCM3AP-AS1-MUT 与 PSAT1-MUT)。用 Lipofectamine2000

试剂盒将构建的野生型与突变型质粒分别与 miR-NC 或 miR-424-5p mimic 共转染于 MDA-MB-231 细胞中。48 h 后,检测荧光素酶活性。每组实验重复 3 次。

1.11 统计学方法

本实验数据采用 Graphpad Prism 7.0 进行统计分析。两组间数据比较采用 t 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析方法,进一步两组间比较采用 LSD-t 检验方法。 $P < 0.05$ 表示数据间的差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 正常乳腺上皮细胞与乳腺癌细胞中 PSAT1 mRNA、MCM3AP-AS1、miR-424-5p 的表达水平

与 MCF-10A 相比,MDA-MB-231、BT549、BT20 细胞中 MCM3AP-AS1、PSAT1 mRNA 的表达水平显著升高($P < 0.05$),miR-424-5p 的表达量显著下降($P < 0.05$)。其中在 MDA-MB-231 细胞中这三种因子的表达差异最大,故选择 MDA-MB-231 细胞进行后续实验。见图 1。

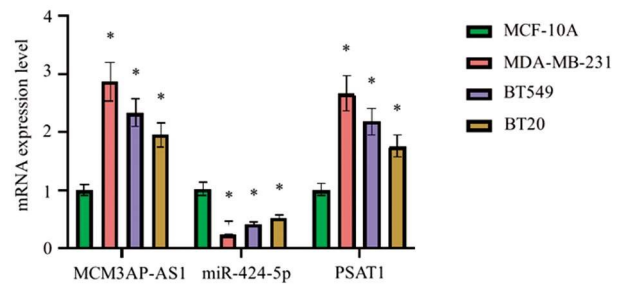


图 1 MCM3AP-AS1、miR-424-5p 和 PSAT1 mRNA 在乳腺癌细胞与正常乳腺上皮细胞中的表达

Fig.1 Expression of MCM3AP-AS1, miR-424-5p and PSAT1 mRNA in breast cancer cells and normal breast epithelial cells

Note: Compared with MCF-10A, * $P < 0.05$.

2.2 各组 MDA-MB-231 细胞转染效率的验证

与 sh-NC 组相比,sh-MCM3AP-AS1 组细胞中 MCM3AP-AS1、PSAT1 mRNA 表达显著降低($P < 0.05$),miR-424-5p 表达显著升高($P < 0.05$)。与 miR-NC 组相比,miR-424-5p 组细胞中 MCM3AP-AS1 表达变化无显著性差异($P > 0.05$),miR-424-5p 表达显著升高($P < 0.05$),PSAT1 mRNA 表达显著降低($P < 0.05$)。与 sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC 组相比,sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-424-5p 组细胞中 MCM3AP-AS1 表达无显著性差异($P > 0.05$),miR-424-5p 表达显著降低($P < 0.05$),PSAT1 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$)。见图 2。

2.3 各组 MDA-MB-231 细胞增殖能力的比较

与 sh-NC 组相比,sh-MCM3AP-AS1 组细胞 OD₄₉₀ 值显著降低($P < 0.05$)。与 miR-NC 组相比,miR-424-5p 组细胞 OD₄₉₀ 值显著降低($P < 0.05$)。与 sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC 组相比,sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-424-5p 组细胞 OD₄₉₀ 值显著升高($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 各组 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭能力的比较

与 sh-NC 组相比,sh-MCM3AP-AS1 组细胞迁移数目、细

胞侵袭数目显著减少 ($P < 0.05$)。与 miR-NC 组相比, miR-424-5p 组细胞迁移数目、细胞侵袭数目显著减少 ($P < 0.05$)。与 sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC 组相比, sh-MCM3AP-AS1+ anti-miR-424-5p 组细胞迁移数目、细胞侵袭数目显著增多 ($P < 0.05$)。见图 4~6。

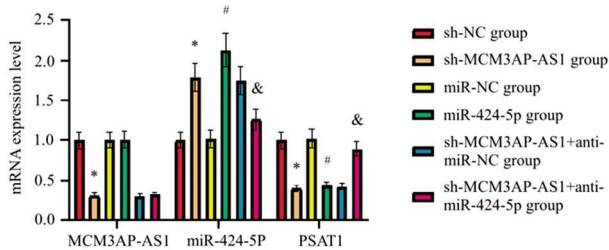


图 2 MCM3AP-AS1, miR-424-5p 和 PSAT1 mRNA 在各组 MDA-MB-231 细胞中的表达

Fig.2 The expression of MCM3AP-AS1, miR-424-5p and PSAT1 mRNA in MDA-MB-231 cells in each group

Note: Compared with sh-NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-NC group, # $P < 0.05$; Compared with sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC, & $P < 0.05$.

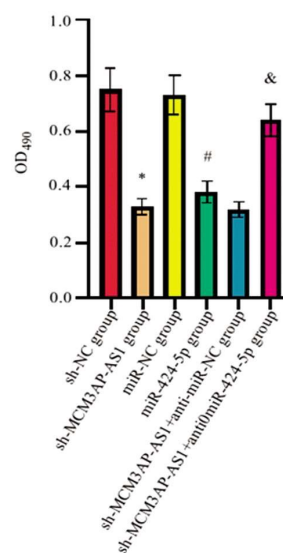


图 3 各组 MDA-MB-231 细胞的增殖能力

Fig.3 Proliferation ability of MDA-MB-231 cells in each group
Note: Compared with sh-NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-NC group, # $P < 0.05$; Compared with sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC, & $P < 0.05$.

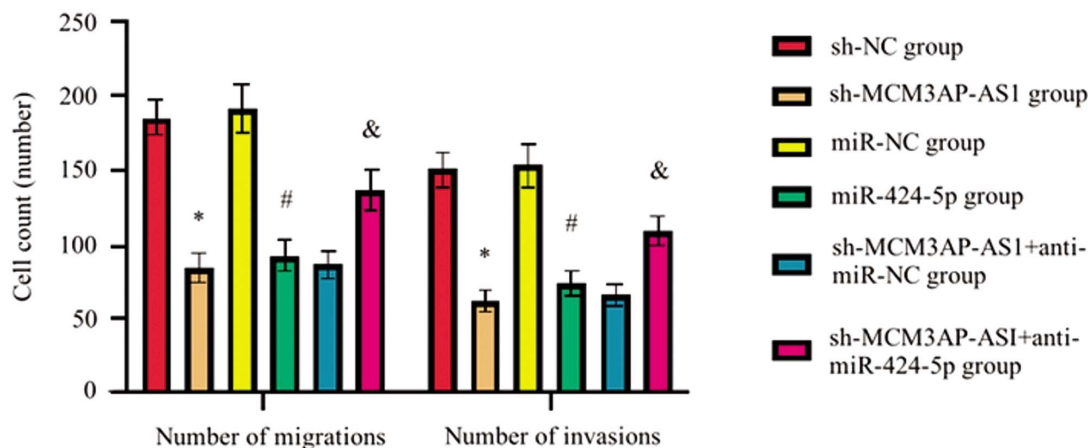


图 4 各组 MDA-MB-231 细胞迁移和侵袭细胞数目的比较

Fig.4 Comparison of the number of migration and invasion cells of MDA-MB-231 cells in each group

Note: Compared with sh-NC group, * $P < 0.05$; Compared with miR-NC group, # $P < 0.05$; Compared with sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC, & $P < 0.05$.

2.5 各组 MDA-MB-231 细胞 CyclinD1、E-cadherin、N-cadherin 和 PSAT1 蛋白表达的比较

sh-MCM3AP-AS1 组细胞 E-cadherin 蛋白表达水平比 sh-NC 组更高 ($P < 0.05$), N-cadherin、CyclinD1 和 PSAT1 蛋白表达比 sh-NC 组更低 ($P < 0.05$)。miR-424-5p 组细胞 E-cadherin 蛋白表达高于 miR-NC 组, CyclinD1、N-cadherin 和 PSAT1 蛋白表达低于 miR-NC 组 ($P < 0.05$)。sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-424-5p 组细胞 E-cadherin 蛋白表达低于 sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC 组 ($P < 0.05$), CyclinD1、N-cadherin 和 PSAT1 蛋白表达高于 sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC 组 ($P < 0.05$)。见图 7、8。

2.6 lncRNA MCM3AP-AS1 与 miR-424-5p、miR-424-5p 与 PSAT1 之间的靶向关系

生物信息学分析发现, lncRNA MCM3AP-AS1 与 miR-424-5p、miR-424-5p 与 PSAT1 之间存在结合位点。见图

9~10。同时, RIP 实验显示, AGO2 抗体可以同时富集 lncRNA MCM3AP-AS1 与 miR-424-5p; 而 miR-424-5p 与 PSAT1 也均可以被 AGO2 抗体富集, 见图 11。双荧光素酶报告基因实验结果显示, miR-424-5p 过表达可以抑制共转染野生型载体 MCM3AP-AS1-WT 细胞的荧光素酶活性 ($P < 0.05$); 而过表达 miR-424-5p 不能抑制共转染突变型载体 MCM3AP-AS1-MUT 细胞的荧光素酶活性 ($P > 0.05$)。同样, miR-424-5p 过表达可以抑制共转染野生型载体 PSAT1-WT 细胞的荧光素酶活性 ($P < 0.05$); 而过表达 miR-424-5p 不能抑制共转染突变型载体 PSAT1-MUT 细胞的荧光素酶活性 ($P > 0.05$), 见图 12。这验证了生物信息学的预测, lncRNA MCM3AP-AS1 与 miR-424-5p、miR-424-5p 与 PSAT1 之间存在一定的靶向调控关系。

3 讨论

乳腺癌是常见的女性恶性肿瘤, 异质性强, 且容易复发和

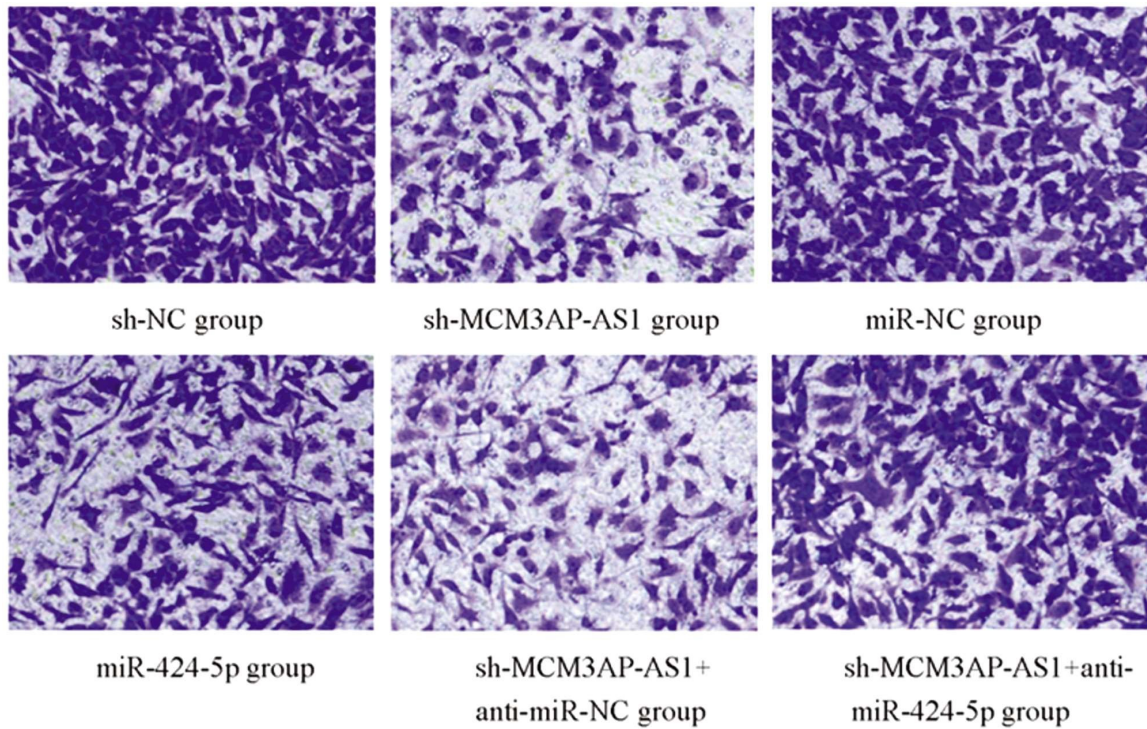


图 5 Transwell 实验测定 MDA-MB-231 细胞迁移能力($\times 400$)

Fig.5 Transwell assay was used to determine the migration ability of MDA-MB-231 cells($\times 400$)

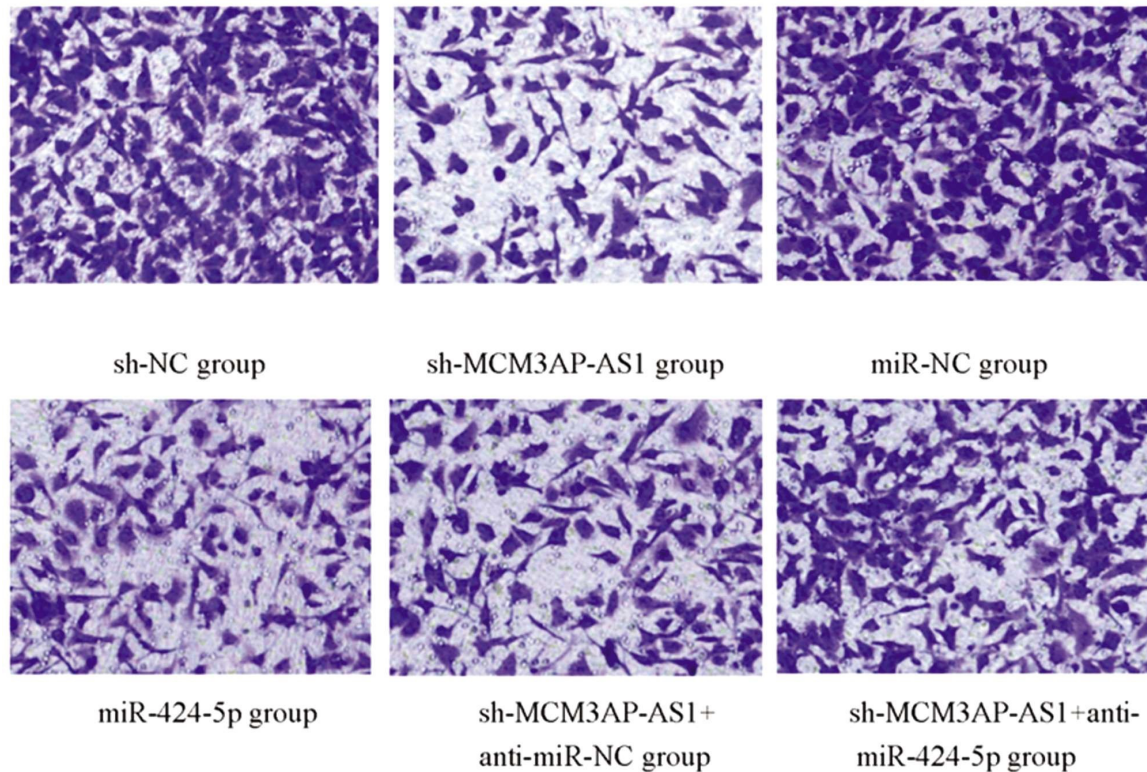


图 6 Transwell 实验测定 MDA-MB-231 细胞侵袭能力($\times 400$)

Fig.6 Transwell assay was used to determine the invasion ability of MDA-MB-231 cells($\times 400$)

转移,进展迅速^[10]。随着医疗技术的快速发展,乳腺癌的治疗效果和预后在逐步改善,但中晚期患者的预后仍不理想^[11]。因此,探寻乳腺癌新的治疗靶点和方法对提高乳腺癌患者的预后具有重要意义。

lncRNA 是与恶性肿瘤的发生发展过程相关的一类 RNA 分子,具有 200 多个核苷酸转录本,能发挥调控肿瘤细胞多种

生物学行为的作用,参与肿瘤发生进展^[12,13]。相关报道显示,部分 lncRNA 参与了乳腺癌的恶性进展,可能有望成为乳腺癌治疗、诊断的新靶点^[14]。Tang 等^[15] 研究发现 lncRNA MCM3AP-AS1 在乳腺癌中显著上调,且与患者的临床病理特征有关;下调 MCM3AP-AS1 能够显著抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,诱导其凋亡。Ren 等^[16]研究发现在三阴性乳腺

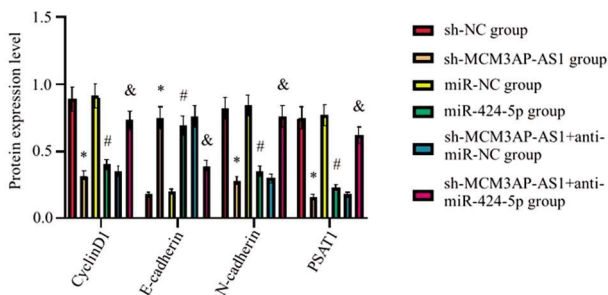


图7 各组 MDA-MB-231 细胞 CyclinD1、E-cadherin、N-cadherin 和 PSAT1 蛋白表达的比较

Fig.7 Comparison of CyclinD1, E-cadherin, N-cadherin and PSAT1 protein expression in MDA-MB-231 cells in each group

Note: Compared with sh-NC group, * $P < 0.05$;

Compared with sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC, # $P < 0.05$;

Compared with miR-NC group, & $P < 0.05$.



图9 lncRNA MCM3AP-AS1 与 miR-424-5p 的结合位点

Fig.9 Binding sites of lncRNA MCM3AP-AS1 and miR-424-5p

Binding Site of hsa-miR-424-5p on PSAT1:

Show 10 entries

TargetRegion	Type	Alignment
chr9:78329349-78329356[+]	8mer	Target: 5' GCGUATUUUGGCCUUUGGUGUA 3' miRNA : 3' AAGUUUUGUACUUAACGACGAC 5'

图10 miR-424-5p 与 PSAT1 的结合位点

Fig.10 Binding sites of miR-424-5p and PSAT1

癌细胞中, lncRNA M3M3AP-AS1 的过表达导致母系表达基因 3 表达的下调, 且导致癌细胞的增殖速率加快。本研究结果显示, 在乳腺癌细胞株 MDA-MB-231、BT549、BT20 中 lncRNA MCM3AP-AS1 的表达水平高于正常乳腺上皮细胞, 而且, 敲低 lncRNA MCM3AP-AS1 可以降低 MDA-MB-231 细胞的 OD₄₉₀ 值、细胞迁移数目和细胞侵袭数目、CyclinD1、N-cadherin 和 PSAT1 蛋白表达水平, 提高细胞 E-cadherin 蛋白表达水平。提示敲低 lncRNA MCM3AP-AS1 可以抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭, 抑制乳腺癌恶性进展。

研究显示, lncRNAs 可以部分互补性竞争 miRNA 的结合位点, 导致 miRNA 水平的降低或活性受损, 这种调控作用可以影响肿瘤进展^[17-19]。Dastmalchi 等^[20]研究发现 miR-424-5p 能够增强乳腺癌细胞对紫杉醇的敏感性, 降低细胞的耐药性。同时, 该课题组的研究还发现 miR-424-5p 在乳腺癌组织标本中下调, miR-424-5p 能够通过调节细胞凋亡和自噬途径降低 MDA-MB-231 细胞的活力^[21,22]。本研究通过生物信息学预测 miR-424-5p 是 lncRNA MCM3AP-AS1 潜在作用靶点, 二者存在互补碱基对, 且通过双荧光素酶报告基因实验、RIP 实验验证了二者之间的调控作用。本研究结果显示, 乳腺癌细胞株 BT549、MDA-MB-231、BT20 中 miR-424-5p 表达水平低于正常乳腺上皮细胞。同时, 过表达 miR-424-5p 可以降低 MDA-MB-231 细胞的 OD₄₉₀ 值、细胞迁移数目和细胞侵袭数

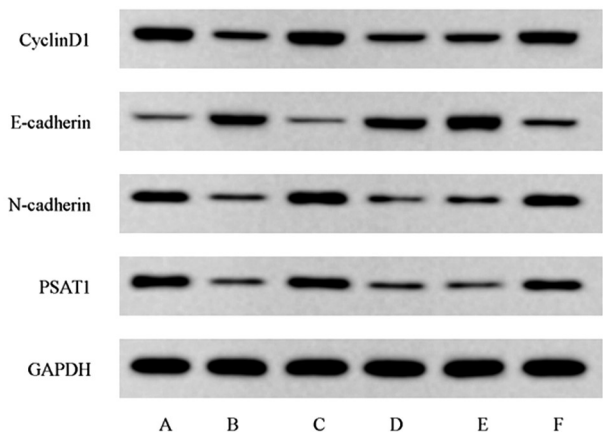


图8 各组 MDA-MB-231 细胞 CyclinD1、E-cadherin、N-cadherin 和 PSAT1 蛋白表达

Fig.8 The expression of CyclinD1, E-cadherin, N-cadherin and PSAT1 protein in MDA-MB-231 cells of each group

Note: A: sh-NC group; B: sh-MCM3AP-AS1 group; C: miR-NC group;

D: miR-424-5p group; E: sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-NC group;

F: sh-MCM3AP-AS1+anti-miR-424-5p group.

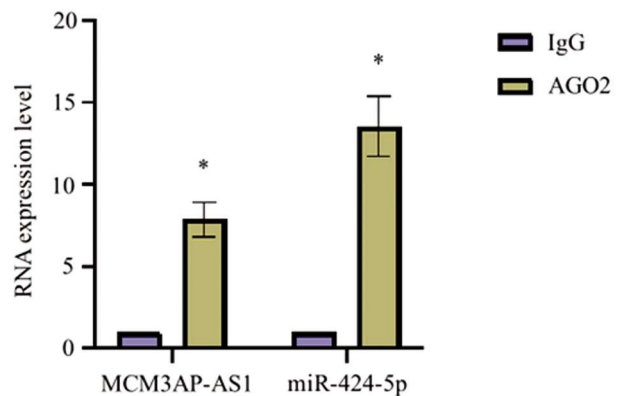


图11 免疫沉淀物中 lncRNA MCM3AP-AS1 与 miR-424-5p 的表达水平(与 IgG 组相比, * $P < 0.05$)

Fig.11 Expression levels of lncRNA MCM3AP-AS1 and miR-424-5p in immunoprecipitates (Compared with IgG group, * $P < 0.05$)

目、N-cadherin、CyclinD1 和 PSAT1 蛋白表达水平, 提高细胞 E-cadherin 蛋白表达水平。提示过表达 miR-424-5p 可以阻止 MDA-MB-231 细胞的增殖、迁移和侵袭, 抑制乳腺癌的恶性生物学行为, 发挥抑癌活性。

本研究在生物信息学预测中还发现, miR-424-5p 与 PSAT1 存在结合位点。Pan 等^[23]研究发现 PSAT1 在卵巢癌细胞中高表达, miR-145-5p 能通过敲低 PSAT1 的表达抑制卵巢癌细胞的生长、迁移和侵袭。Li 等^[24]研究发现 PSAT1 在非小细胞肺癌中的组织中高表达, 且与患者的总生存率低、预后不良相关, 敲低 PSAT1 后, 非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭受到抑制^[25]。本研究结果显示, PSAT1 在乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、BT549、BT20 中呈过表达。而且, 敲低 lncRNA MCM3AP-AS1 下调了 PSAT1 的表达, 下调 miR-490-3p 对 PSAT1 蛋白表达起促进作用。提示 lncRNA MCM3AP-AS1 可能通过调控 miR-424-5p/PSAT1 轴, 影响乳腺癌的恶性进展。

综上所述, lncRNA MCM3AP-AS1 在乳腺癌中呈高表达, 其低表达可通过靶向调节 miR-424-5p/PSAT1 轴抑制乳腺癌的

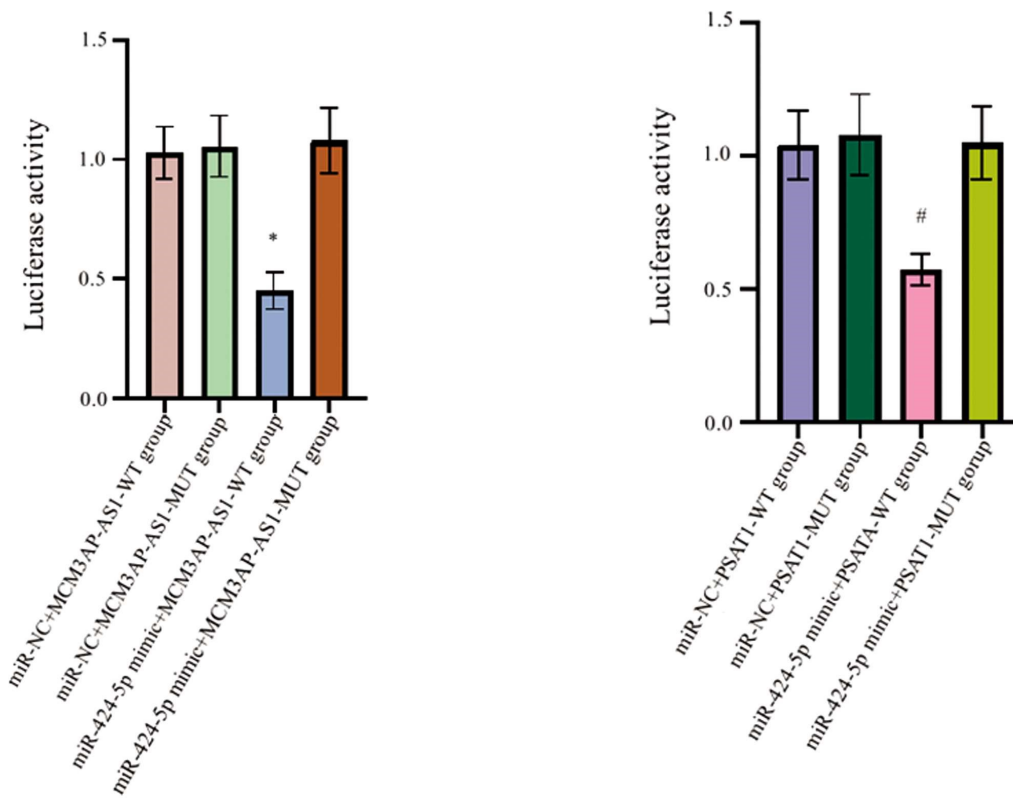


图 12 荧光素酶活性比较(A:与 miR-NC+MCM3AP-AS1-WT 组相比, * $P<0.05$;B:与 miR-NC+PSAT1-WT 组相比, # $P<0.05$)
 Fig.12 Comparison of luciferase activity (A: Compared with miR-NC+MCM3AP-AS1-WT group, * $P<0.05$;
 B: Compared with miR-NC+PSAT1-WT group, # $P<0.05$)

恶性进展。本研究为进一步分析乳腺癌的发生发展机制、开发潜在治疗靶点提供了科学依据和参考。相关机制还需进一步验证。

参考文献(References)

[1] Criscitiello C, Corti C. Breast Cancer Genetics: Diagnostics and Treatment[J]. Genes (Basel), 2022, 13(9): 1593.

[2] Katsura C, Ogunmwoyi I, Kankam HK, et al. Breast cancer: presentation, investigation and management [J]. Br J Hosp Med (Lond), 2022, 83(2): 1-7.

[3] Tsang JYS, Tse GM. Molecular Classification of Breast Cancer[J]. Adv Anat Pathol, 2020, 27(1): 27-35.

[4] Chen S, Shen X. Long noncoding RNAs: functions and mechanisms in colon cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 167.

[5] Chen Q, Xu H, Zhu J, et al. LncRNA MCM3AP-AS1 promotes breast cancer progression via modulating miR-28-5p/CENPF axis [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128(1): 110-122.

[6] Hill M, Tran N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer[J]. Dis Model Mech, 2021, 14(4): 47-60.

[7] Zhang C, Yang T. Long Non-coding RNA LINC00473 Promotes Breast Cancer Progression via miR-424-5p/CCNE1 Pathway [J]. Protein Pept Lett, 2023, 30(1): 72-84.

[8] Jiang J, Zhang L, Chen H, et al. Regorafenib induces lethal autophagy arrest by stabilizing PSAT1 in glioblastoma [J]. Autophagy, 2020, 16(1): 106-122.

[9] Wang H, Fang Q, You S, et al. miRNA-195-5p/PSAT1 feedback loop in human triple-negative breast cancer cells [J]. Genes Genomics, 2023, 45(1): 39-47.

[10] Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern[J]. Br J Radiol, 2022, 95(1130): 202-213.

[11] Coughlin SS. Epidemiology of Breast Cancer in Women[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1152(1): 9-29.

[12] Cao HL, Liu ZJ, Huang PL, et al. lncRNA-RMRP promotes proliferation, migration and invasion of bladder cancer via miR-206 [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(3): 1012-1021.

[13] 吴雪芳, 瞿菲, 刘谦, 等. LNCRNA FAR2P1 对乳腺癌细胞增殖迁移和凋亡的影响研究[J]. 现代生物医学进展, 2023, 23(5): 801-806, 817.

[14] Venkatesh J, Wasson MD, Brown JM, et al. LncRNA-miRNA axes in breast cancer: Novel points of interaction for strategic attack [J]. Cancer Lett, 2021, 509(1): 81-88.

[15] Tang TP, Qin CX, Yu H. MCM3AP-AS1 regulates proliferation, apoptosis, migration, and invasion of breast cancer cells via binding with ZFP36[J]. Transl Cancer Res, 2021, 10(10): 4478-4488.

[16] Ren G, Han G, Song Z, et al. LncRNA MCM3AP-AS1 Downregulates LncRNA MEG3 in Triple Negative Breast Cancer to Inhibit the Proliferation of Cancer Cells [J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2021, 31(4): 81-87.

[17] Xu J, Wu KJ, Jia QJ, et al. Roles of miRNA and lncRNA in triple-negative breast cancer [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2020, 21(9): 673-689.

[18] 胡晓云, 刘明妍, 吴慧哲, 等. miRNA 与其宿主同源基因 lncRNA 在肿瘤发生发展中的研究进展[J]. 肿瘤药学, 2019, 9(3): 354-358, 370.

[19] Shetty A, Venkatesh T, Kabbekodu SP, et al. LncRNA-miRNA-mRNA regulatory axes in endometrial cancer: a comprehensive overview[J]. Arch Gynecol Obstet, 2022, 306(5): 1431-1447.

- 1-12.
- [26] Xiao S, Wang C, Yang Q, et al. Rea regulates microglial polarization and attenuates neuronal apoptosis via inhibition of the NF- κ B and MAPK signalings for spinal cord injury repair [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(3): 1371-1382.
- [27] 姚鹏, 陈勇, 李依玲, 等. 海马神经细胞铁死亡通过 Nrf2/GPX4 信号通路导致脓毒症相关性脑病大鼠认知功能障碍[J]. *中华危重病急救医学*, 2019, 31(11): 1389-1394.
- [28] Chen S, Chen Y, Zhang Y, et al. Iron metabolism and ferroptosis in epilepsy[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 601193.
- [29] Chu J, Jiang Y, Zhou W, et al. Acetaminophen alleviates ferroptosis in mice with sepsis-associated encephalopathy via the GPX4 pathway [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2022, 41: 9603271221133547.
- [30] Wang J, Zhu Q, Wang Y, et al. Irisin protects against sepsis-associated encephalopathy by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 signal axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187: 171-184.
- [31] Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: an introduction [J]. *Radiat Res*, 1996, 145(5): 523-531.
- [32] Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(12): 118535.
- [33] Liu W, Chakraborty B, Safi R, et al. Dysregulated cholesterol homeostasis results in resistance to ferroptosis increasing tumorigenicity and metastasis in cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 5103.
- [34] Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: death by lipid peroxidation[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165-176.
- [35] Agyeman AS, Chaerkady R, Shaw PG, et al. Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132(1): 175-187.
- [36] Harada N, Kanayama M, Maruyama A, et al. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 508(1): 101-109.
- [37] Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, et al. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 454(1): 7-15.
- [38] Salazar M, Rojo AI, Velasco D, et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 14841-14851.
-
- (上接第 2612 页)
- [20] Dastmalchi N, Safaralizadeh R, Hosseinpourfeizi MA, et al. MicroRNA-424-5p enhances chemosensitivity of breast cancer cells to Taxol and regulates cell cycle, apoptosis, and proliferation[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(2): 1345-1357.
- [21] Dastmalchi N, Hosseinpourfeizi MA, Khojasteh SMB, et al. Tumor suppressive activity of miR-424-5p in breast cancer cells through targeting PD-L1 and modulating PTEN/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 259(1): 118-128.
- [22] Zhou Y, Yamamoto Y, Takeshita F, et al. Delivery of miR-424-5p via Extracellular Vesicles Promotes the Apoptosis of MDA-MB-231 TNBC Cells in the Tumor Microenvironment[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 844.
- [23] Pan Y, Huang Q, Peng X, et al. Circ_0015756 promotes ovarian cancer progression via the miR-145-5p/PSAT1 axis [J]. *Reprod Biol*, 2022, 22(4): 100-108.
- [24] Li H, Wu C, Chang W, et al. Overexpression of PSAT1 is Correlated with Poor Prognosis and Immune Infiltration in Non-Small Cell Lung Cancer[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2023, 28(10): 243-255.
- [25] Biyik-Sit R, Kruer T, Dougherty S, et al. Nuclear Pyruvate Kinase M2 (PKM2) Contributes to Phosphoserine Aminotransferase 1 (PSAT1)-Mediated Cell Migration in EGFR-Activated Lung Cancer Cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(16): 3938.