

# Hsa-miR-148a-3p 通过下调 DUSP1 基因促进乳腺癌细胞的恶性行为

许家铭<sup>1</sup>, 林 龙<sup>1</sup>, 陈琼慧<sup>2</sup>, 李 兰<sup>3</sup>

<sup>1</sup>海南省中医院, 海南 海口 570000; <sup>2</sup>海口市人民医院 肿瘤化疗科, 海南 海口 570208; <sup>3</sup>海南医学院第一附属医院, 海南 海口 570102

**摘要:**目的 通过生信分析结合体内外实验验证 Hsa-miR-148a-3p 调控双特异性磷酸酶 1(DUSP1)对乳腺癌细胞生物学行为的影响。方法 TCGA 数据库下载数据并鉴定差异微小 RNA(miRNA)和信使 RNA(mRNA);数据库筛选差异 miRNA 靶基因;String 和 Cytoscape 构建蛋白质互作网络及筛选 TOP10 hub 基因;TCGA 数据库验证 TOP10hub 基因的表达;Cytoscape 构建 miRNA-TOP10hub 基因网络。定量逆转录 PCR(RT-qPCR)实验检测 Hsa-miR-148a-3p 和 DUSP1 在人乳腺癌组织和细胞中的表达。采用 Hsa-miR-148a-3p mimic、Hsa-miR-148a-3p inhibitor 及对对照 NC 转染 MCF-7 细胞。分为 NC 组, NC mimics 组, Hsa-miR-148a-3p mimics 组, NC inhibitor 组, Hsa-miR-148a-3p inhibitor 组;荧光素酶报告基因实验验证 Hsa-miR-148a-3p 和 DUSP1 的结合;CCK-8, 划痕实验, Transwell 和细胞凋亡实验验证 Hsa-miR-148a-3p 对乳腺癌细胞增殖, 迁移, 侵袭和凋亡的影响。建立裸鼠成瘤模型, 测量小鼠肿瘤质量和体积;Kaplan-Meier 生存曲线分析小鼠生存情况;免疫组化检测 DUSP1 的表达水平。结果 获得乳腺癌差异 miRNA 54 个(8 个下调, 46 个上调), 差异 mRNA 799 个(509 个下调, 290 个上调);54 个差异 miRNA 预测靶基因 3716 个, 与差异 mRNA 取交集, 得到 150 个交集基因;蛋白-蛋白互作网络图中的 TOP10hub 基因为 MET, LPAR1, LAMC1, FOS, EGFR, PIK3R1, DUSP1, GNAI1, LAMA4, NR3C1, 这些基因在乳腺癌组织中均显著下调;双荧光素酶报告基因实验证实 Hsa-miR-148a-3p 能与 DUSP1 结合;RT-qPCR 结果表明, Hsa-miR-148a-3p 在乳腺癌组织和细胞中显著上调( $P<0.01$ ), 而 DUSP1 则显著下调( $P<0.01$ )。细胞实验结果表明, Hsa-miR-148a-3p 促进乳腺癌细胞增殖, 迁移和侵袭, 抑制细胞的凋亡( $P<0.01$ )。动物实验结果表明, Hsa-miR-148a-3p 促进小鼠体内肿瘤质量和体积的增长( $P<0.01$ ), 缩短小鼠的存活时间( $P<0.01$ ), 免疫组化结果显示, Hsa-miR-148a-3p 抑制 DUSP1 的表达水平( $P<0.01$ )。结论 Hsa-miR-148a-3p 通过抑制 DUSP1 的表达而作为癌基因发挥作用, 这有助于开发针对乳腺癌的新型治疗靶点。

**关键词:** Hsa-miR-148a-3p; DUSP1; 乳腺癌; 促癌

## Hsa-miR-148a-3p promotes malignant behavior of breast cancer cells by downregulating DUSP1

XU Jiaming<sup>1</sup>, LIN Long<sup>1</sup>, CHEN Qionghui<sup>2</sup>, LI Lan<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou 570000, China; <sup>2</sup>Department of Cancer Chemotherapy, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China; <sup>3</sup>First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China

**Abstract: Objective** To investigate the role of Hsa-miR-148a-3p in regulating biological behaviors of breast cancer cells and explore the mechanism. **Methods** TCGA database was used to identify the differential miRNAs and mRNAs in breast cancer, and the protein-protein interaction (PPI) network was constructed using String and Cytoscape to screen the top 10 hub genes and construct the miRNA-TOP10hub network. RT-qPCR was used to detect the expressions of Hsa-miR-148a-3p and DUSP1 in breast cancer tissues and cell lines. The effects of Hsa-miR-148a-3p mimic and inhibitor on proliferation, migration, invasion and apoptosis of MCF-7 cells were analyzed, and luciferase reporter gene experiment was performed to verify the binding of Hsa-miR-148a-3p to DUSP1. The effect of Hsa-miR-148a-3p overexpression on breast cancer cell xenograft growth was evaluated in nude mice. Kaplan-Meier survival curve analysis was used to analyze the survival of the tumor-bearing mice, and the expression level of DUSP1 in the xenografts was detected using immunohistochemistry. **Results** A total of 54 differential miRNAs and 799 differential mRNAs were identified in breast cancer; 3716 target genes were intersected with the differential mRNA, resulting in 150 intersected genes. The top 10 hub genes were downregulated in breast cancer tissues in the PPI network. Double luciferase reporter gene experiment confirmed that Hsa-miR-148a-3p was capable of binding to DUSP1. Hsa-miR-148a-3p was up-regulated and DUSP1 was down-regulated significantly in breast cancer tissues and cells ( $P<0.01$ ). In breast cancer cells, Hsa-miR-148a-3p mimic strongly promoted cell proliferation, migration and invasion and inhibited cell apoptosis ( $P<0.01$ ). Hsa-miR-148a-3p overexpression obviously promoted xenograft growth in nude mice ( $P<0.01$ ), shortened survival time of the mice ( $P<0.01$ ), and reduced the expression of DUSP1 in the xenografts ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Hsa-miR-148a-3p promotes malignant behavior of breast cancer cells by inhibiting the expression of DUSP1.

**Keywords:** Hsa-miR-148a-3p; DUSP1; breast cancer; tumor promotion

收稿日期: 2023-01-06

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目基金(821RC719)

作者简介: 许家铭, 主治医师, E-mail: 365812731@qq.com

通信作者: 林 龙, 主任医师, E-mail: 13907629038@163.com

乳腺癌是全世界最常见的肿瘤之一(11.7%), 甚至超过了肺癌(11.4%)<sup>[1]</sup>。其发病率逐年增加, 且发病年龄逐渐年轻化。目前, 已经成为威胁女性健康的第一杀手。乳腺癌的发生是一个由多种基因和多种因素引起

的复杂生物学过程。随着分子生物学的发展,通过对乳腺癌基因表达谱的分析发现,不同的基因表达与乳腺癌的各种生物学行为有关<sup>[2]</sup>。因此,肿瘤基因谱的研究有助于肿瘤的诊断和治疗以及预后的判断。

微小RNA(miRNA)通过与mRNA的3'非翻译区(3'UTR)的序列特异性碱基配对来抑制基因表达,导致其翻译抑制或降解。有证据表明,miRNA可通过控制癌细胞中不同的细胞和代谢途径来调节基因表达,进而作为抑癌基因或致癌基因,因此其可能成为多种癌症的有前途的生物标志物<sup>[3,4]</sup>。先前的研究提示,Hsa-miR-148a-3p在乳腺癌<sup>[5]</sup>,胃癌<sup>[6]</sup>,卵巢癌<sup>[7]</sup>中均有研究,提示其在癌症中可能是一个相对重要的miRNA,然而,关于其在乳腺癌中的研究较少,且尚未有研究关注其下游目标。本研究从生信分析出发,进行一系列数据库分析,确定了与乳腺癌相关的miRNA,即Hsa-miR-148a-3p,关于其对乳腺癌细胞增殖,迁移,侵袭和凋亡的影响进行了更具体的研究,且研究确定了其靶向的基因双特异性磷酸酶1(DUSP1),提出了一个新的信号轴,这或许可以为人类乳腺癌的治疗提供新的靶点和机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 数据收集及分析

使用The Cancer Genome Atlas(TCGA)数据库(<https://www.facs.org/quality-programs/cancer/ncdb>)获取乳腺癌组织样本和癌旁组织样本的差异表达的miRNA和mRNA数据,使用R语言包对获取的数据进行分析,筛选差异基因的标准为: $|\log_2 \text{Fold change}| \geq 2$ 同时 $p\text{-value} < 0.01$ 。

### 1.2 差异miRNA靶基因的预测及mRNA的确定

使用miRTarBase(<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) TargetScan (<http://www.targetscan.org/>)和ENCORI(<https://starbase.sysu.edu.cn/>)数据库预测差异miRNA的靶基因,并将三个数据库的靶基因取交集,交集靶基因与mRNA测序基因取交集,确定后续研究的mRNA。

### 1.3 mRNA蛋白质-蛋白质互作分析及top10 Hub基因的筛选

使用String数据库联合Cytoscape3.7.1软件将mRNA的蛋白质-蛋白质互作分析网络图进行可视化,利用Cytoscape3.7.1软件的cytoHubba插件筛选top10Hub基因。

### 1.4 miRNA-TOP10hub基因网络图的构建及TOP10hub基因表达水平的验证

使用Cytoscape3.7.1软件将miRNA数据和TOP10hub基因数据导入软件,绘制miRNA-TOP10hub基因网络图。使用TCGA数据库的数据绘制TOP10hub

基因表达水平的箱线图。

### 1.5 实验验证

1.5.1 组织样本 收集2019年1月~2021年2月海南省中医院采集经病理学诊断证实的人乳腺癌和癌旁组织样本各30例。所有患者均签署知情同意书,所有组织标本均在手术切除时采集,然后立即在液氮中冷冻并储存在 $-80^\circ\text{C}$ 中备用。实验经海南省中医院伦理委员会批准。

1.5.2 细胞培养和细胞转染 正常乳腺上皮MCF10A细胞和人乳腺癌MCF-7,MDA-MB-231细胞从中国科学院上海细胞生物学研究所获得,并在 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的湿润环境中培养。人乳腺癌细胞系MCF-7和MDA-MB-231在Roswell Park Memorial Institute RPMI 1640培养基(Invitrogen)中培养,补充10%FBS和1%青霉素-链霉素。MCF10A细胞在含有5%马血清(HS,Invitrogen)、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氢化可的松(Sigma)、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  胰岛素(Sigma)、0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EGF(Pepro Tech)、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  霍乱毒素(Sigma)和青霉素-链霉素的DMEM-F12(Invitrogen)中培养。Hsa-miR-148a-3p mimics, NC mimics, Hsa-miR-148a-3p inhibitor, NC inhibitor由RiboBio(中国广州)构建。所有细胞系以 $5 \times 10^5$ /孔的密度在6孔板中培养,并孵育过夜。使用Lipofectamine™ 2000试剂(Invitrogen)进行转染,并在 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的潮湿条件下再孵育48 h。

1.5.3 定量逆转录PCR(RT-qPCR) 根据制造商的说明,使用TRIzol(TaKaRa)从细胞中提取总RNA。使用PrimeScript RT master mix(TaKaRa)或miScript逆转录试剂盒(Qiagen)进行mRNA或miRNA的逆转录(RT)。使用特异性引物进行扩增。SYBR Green定量PCR反应在20  $\mu\text{L}$ 反应体积,含有 $2 \times$  PCR Master Mix(Applied Biosystems)。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 方法对每个样本的基因表达进行相对定量。每个实验一式三份。引物序列如下:hsa-miR-148a-3p:上游引物:5'-TCAGTGCCTACAGAACTTTGT-3';下游引物:5'-GTGCGTGTTCGTGGAGTCG-3';DUSP1:上游引物:5'-AGAGCCCCATACGACCTCT-3';下游引物:5'-CCAGAGGAACTCGGGTGAAG-3';U6:上游引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3';下游引物:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';GAPDH:上游引物:5'-TCATGACCACAGTCCATGCC-3';下游引物:5'-TTCTAGACGGCAGGT CAGGT-3'。

1.5.4 荧光素酶报告活性测定 将DUSP1 3'UTR的野生型和突变型Hsa-miR-148a-3p结合序列克隆到pGL3 Basic载体中(Promega)。Hsa-miR-148a-3p和DUSP1重组质粒的3'UTR(WT或MUT)共转染293T细胞。使用Lipofectamine™ 2000试剂(Invitrogen)进行转染,并使

用双荧光素酶报告检测系统(Promega)检测荧光素酶活性。

**1.5.5 CCK-8 实验** 将细胞密度调整为 20 000/mL,用 CCK-8 试剂盒(MCE)检测细胞增殖。细胞转染后,在培养 24、48 和 72 h 后,向每个孔中加入 10  $\mu$ g CCK-8 溶液。用微量板读数器在 450 nm 的吸光度下测量光密度值。

**1.5.6 划痕实验** 将细胞置于六个孔板中,每孔含有  $3.5 \times 10^5$  个细胞和 2 mL 完整培养基。培养细胞直至达到 95% 汇合。然后,使用 20  $\mu$ L 移液管尖端在每个孔中创建垂直伤口,并将不含 FBS 的培养基添加到每个孔中。在 0 和 48 h 用光学显微镜(Axio Lab.A1 pol)收集每个孔的图像。ImageJ 软件 1.8.0(National Institutes of Health)用于分析图像。

**1.5.7 Transwell 实验** 通过用 50 mL Matrigel(BD Biosciences)涂覆腔室来评估细胞侵袭。将 100 mL 无血清培养基中的  $1 \times 10^5$  个细胞置于涂有 Matrigel 的上室中。将含有 10% FBS 的 500 mL 完整培养基置于下部室中。将侵袭到下腔室的细胞固定在 4% 多聚甲醛中,并在室温下用 0.1% 结晶紫染色 15 min,然后在倒置相差显微镜(Olympus)下选至少 3 个随机视野计数。

**1.5.8 流式细胞术** 使用 Annexin V/PI 试剂盒(KeyGen Biotech)通过流式细胞术检测细胞的凋亡。简而言之,转染后,将细胞置于六个孔板中,每孔含有  $2.0 \times 10^5$  个细胞和 2 mL 完整培养基。再孵育 24 h 后,收集细胞并在黑暗中与 Annexin V 孵育 15 min。然后,将细胞与 PI 在黑暗中孵育 25 min。并通过流式细胞仪(BD Biosciences)计算细胞凋亡率。

**1.5.9 动物实验** 5 周龄雄性 BALB/c 裸鼠 39 只,饲养在 25  $^{\circ}$ C 的无菌条件下。将稳定转染 Hsa-miR-148a-3p mimics、Hsa-miR-148a-3p inhibitor 的 MCF-7 细胞(100  $\mu$ L PBS 中含  $1 \times 10^7$  个细胞)皮下注射裸鼠的左侧区域。每组 3 只小鼠用于测量肿瘤体积和质量。6 周后,通过颈椎脱位对小鼠实施安乐死,并称取肿瘤组织的质量和计算肿瘤体积。通过游标卡尺测量肿瘤的长度(L)和宽度(W)并使用以下公式来计算肿瘤体积(V): $V(\text{mm}^3) = 0.5 \times L \times W^2$ 。每组 10 只小鼠用于生存分析,实验期间如果出现溃疡、感染或坏死,或小鼠濒临死亡,则终止实验并对小鼠实施安乐死。动物实验由海南省中医院动物伦理委员会批准。

**1.5.9.1 免疫组织** 组织标本在室温下用 10% 福尔马林固定 5 h,包埋在石蜡中,然后切成切片(3  $\mu$ m)。随后,用二甲苯 I 和 II 对组织进行脱蜡(各 10 min),在梯度乙醇中脱水。用 pH 为 6 的柠檬酸盐缓冲液进行热介导回收抗原,然后将切片浸泡在 3% 过氧化氢中 10 min 以阻断内源性过氧化物酶,并在室温下用 5% 牛血清白蛋白密封 30 min。然后,将样品与以下抗体在 4  $^{\circ}$ C 下孵育过

夜:DUSP1(1:100;Affinity)。随后,将样品与山羊抗兔 IgG H&L/HRP 抗体在 37  $^{\circ}$ C 下孵育 50 min。将细胞在室温下用二氨基联苯胺染色 10 min,然后在室温下再用苏木精染色 3 min。使用光学显微镜捕获免疫染色图像。使用 Image pro plus v6.0 计算光密度。

## 1.6 统计学分析

使用 SPSS 软件(19.0 版)对本研究中的数据进行了 *t* 检验和单因素方差分析。LSD 和 Dunnet 被用作事后测试。统计数据用均数 $\pm$ 标准差表示。当  $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TCGA 数据库筛选乳腺癌中的差异 miRNA

使用 R 语言的 edge R 工具包处理数据,筛选出乳腺癌组织样本和癌旁组织样本中差异表达的 miRNA 和 mRNA,其结果表明,共筛选出乳腺癌中相关的差异 miRNA 共 54 个,其中 8 个下调,46 个上调,其火山图和热图(图 1A、B)。共筛选出乳腺癌中相关的差异 mRNA 共 799 个,其中 509 个下调,290 个上调,其火山图和热图(图 1C、D)。

### 2.2 乳腺癌中差异 miRNA 靶基因预测及分析

54 个差异 miRNA 预测得到靶基因 3716 个,与差异 mRNA 取交集,共得到 150 个交集基因(图 2A),交集基因进行蛋白-蛋白互作分析,去除单个的基因(图 2B)。筛选蛋白-蛋白互作网络图中的 TOP10 hub 基因,得到 10 个 hub 基因,分别为 MET, LPAR1, LAMC1, FOS, EGFR, PIK3R1, DUSP1, GNAI1, LAMA4, NR3C1(图 2C)。通过 Cytoscape 3.7.1 构建 miRNA-TOP10 hub 基因网络图,其中 DUSP1 基因连接的 miRNA 较多,说明其可能较为重要,且 Hsa-miR-148a-3p 可调控 DUSP1,故选择其中的 Hsa-miR-148a-3p/DUSP1 信号轴进行研究(图 2D)。

### 2.3 TCGA 数据库验证 TOP10 hub 基因的表达水平

TCGA 数据库验证 TOP10 hub 基因在乳腺癌中的表达水平,其结果显示,与正常组织相比,MET, LPAR1, LAMC1, FOS, EGFR, PIK3R1, DUSP1, GNAI1, LAMA4, NR3C1 基因在乳腺癌组织中均显著下调( $P < 0.05$ ,图 3)。

### 2.4 Hsa-miR-148a-3p 和 DUSP1 在乳腺癌组织和细胞中的表达水平

RT-qPCR 实验结果表明,与癌旁组织相比,Hsa-miR-148a-3p 在人乳腺癌组织中显著上调( $P < 0.05$ ,图 4A),而 DUSP1 在人乳腺癌组织中显著下调( $P < 0.01$ ,图 4B)。与 MCF10A 细胞相比,hsa-miR-148a-3p 在人乳腺癌 MCF-7, MDA-MB-231 细胞中显著上调( $P < 0.01$ )(图 4C),而 DUSP1 在乳腺癌细胞中显著下调( $P < 0.01$ ,图 4D)。

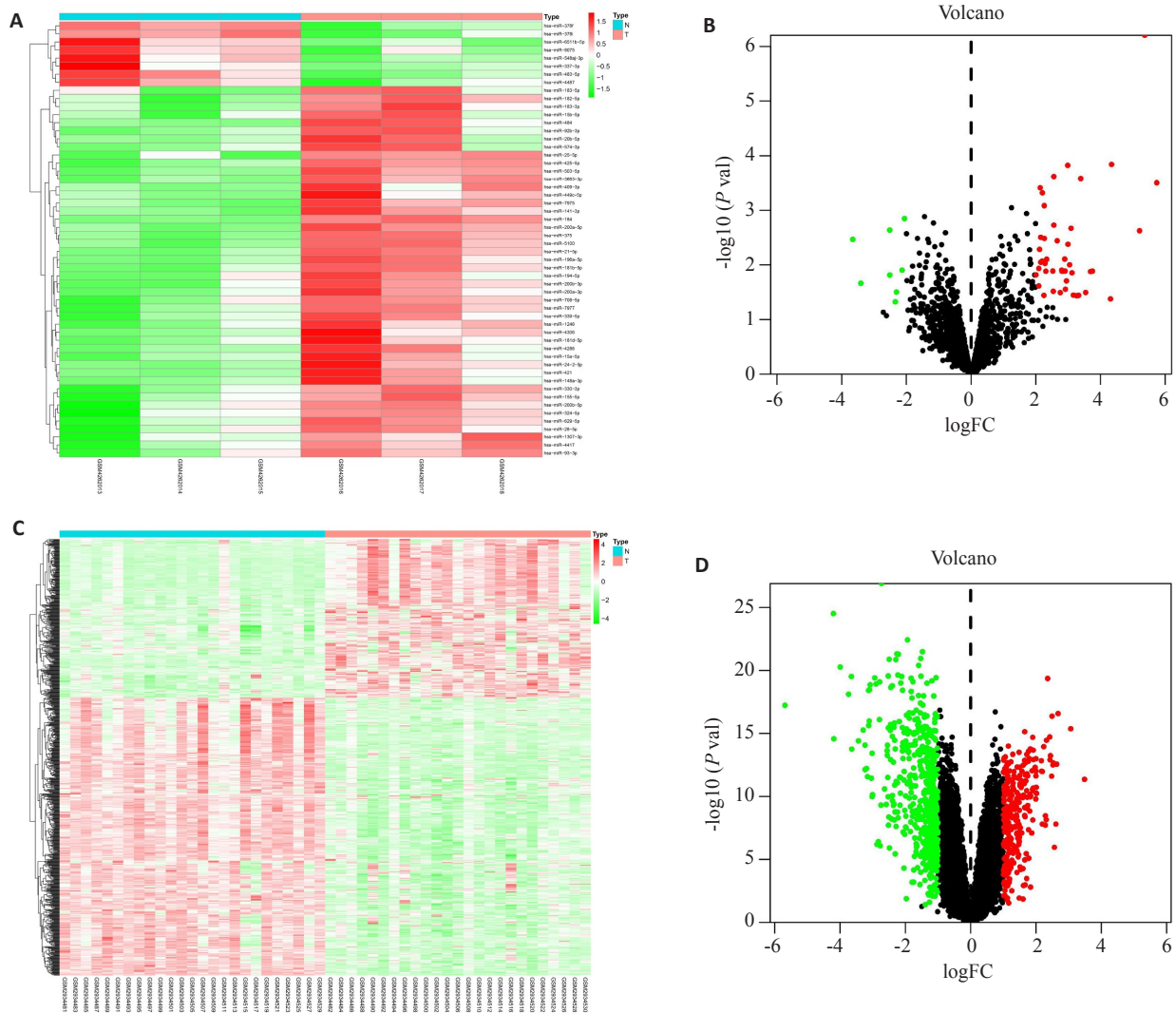


图1 乳腺癌中差异miRNA和mRNA火山图和热图

Fig.1 Volcano plot and Heat map of the differential miRNAs and mRNAs in breast cancer. A: Differential miRNA heat map in breast cancer. B: Volcano plot of differential miRNA in breast cancer. C: Differential mRNA heat map in breast cancer. D: Volcano plot of differential mRNA in breast cancer.

### 2.5 Hsa-miR-148a-3p和DUSP1在乳腺癌中靶向关系的验证

RT-qPCR实验结果表明,过表达Hsa-miR-148a-3p后,Hsa-miR-148a-3p的表达水平升高( $P<0.01$ ),DUSP1的表达水平降低( $P<0.01$ );敲除Hsa-miR-148a-3p后,Hsa-miR-148a-3p表达水平降低( $P<0.01$ ),DUSP1的表达水平升高( $P<0.01$ ,图5A,B)。TargetScan数据库发现Hsa-miR-148a-3p和DUSP1具有结合位点(图5C),双荧光素酶活性报告实验结果显示,Hsa-miR-148a-3p mimic转染降低了含有wt-DUSP1的细胞的荧光素酶活性( $P<0.01$ )(图5D)。

### 2.6 Hsa-miR-148a-3p对乳腺癌细胞增殖的影响

CCK-8实验结果表明,Hsa-miR-148a-3p过表达后可促进乳腺癌细胞的增殖( $P<0.01$ ),Hsa-miR-148a-3p敲除后则抑制乳腺癌细胞的增殖( $P<0.01$ ,图6)。

### 2.7 Hsa-miR-148a-3p对乳腺癌细胞迁移的影响

划痕实验结果表明,Hsa-miR-148a-3p过表达后可促进乳腺癌细胞的迁移( $P<0.01$ ),Hsa-miR-148a-3p敲除后则抑制乳腺癌细胞的迁移( $P<0.01$ ,图7)。

### 2.8 Hsa-miR-148a-3p对乳腺癌细胞侵袭能力的影响

Transwell实验结果表明,Hsa-miR-148a-3p过表达后可促进乳腺癌细胞的侵袭( $P<0.01$ ),Hsa-miR-148a-3p敲除后则抑制乳腺癌细胞的侵袭( $P<0.01$ ,图8)。

### 2.9 Hsa-miR-148a-3p对乳腺癌细胞凋亡的影响

流式细胞术实验结果表明,Hsa-miR-148a-3p过表达后可抑制乳腺癌细胞的凋亡( $P<0.01$ ),Hsa-miR-148a-3p敲除后则促进乳腺癌细胞的凋亡( $P<0.01$ ,图9)。

### 2.10 Hsa-miR-148a-3p对小鼠肿瘤及DUSP1的影响

在乳腺癌异种移植小鼠模型中,与NC组相比,Hsa-miR-148a-3p mimics组小鼠的肿瘤质量和体积显

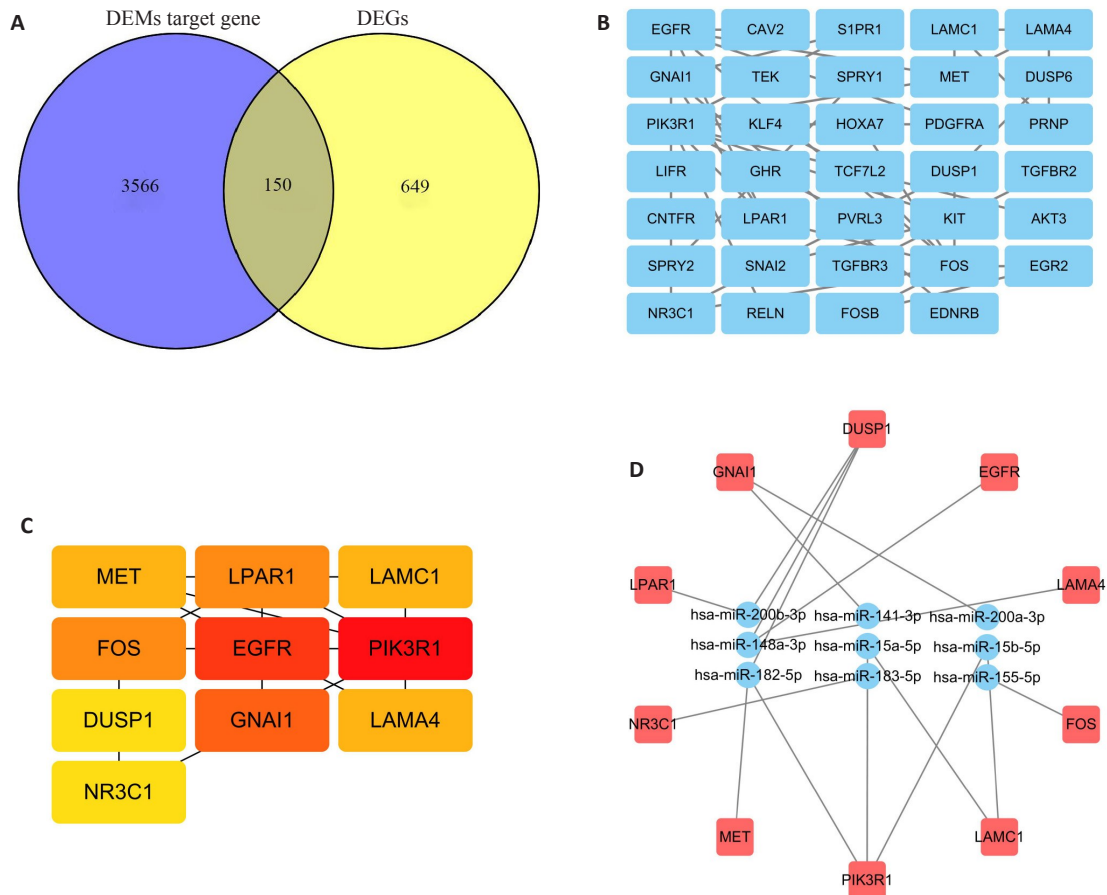


图2 乳腺癌中差异miRNA靶基因的预测及分析  
 Fig.2 Prediction and analysis of differential miRNA the of in breast cancer. A: Venn diagram of the target genes of the Differential miRNA and mRNA. B: PPI analysis of differential miRNA target genes. C: TOP10 hub gene network. D: MiRNA-top10hub gene network. DEMs: Differential expression miRNA; DEGs: Differential expression mRNA.

著增加( $P<0.05$ ), Hsa-miR-148a-3p inhibitor组小鼠的肿瘤质量和体积显著降低( $P<0.05$ , 图 10A~C)。Kaplan-Meier生存曲线分析结果显示, 与NC组相比, Hsa-miR-148a-3p mimics组小鼠的存活时间短, 而Hsa-miR-148a-3p inhibitor组小鼠的生存水平高于NC组小鼠( $P<0.05$ , 图 10D)。免疫组化结果显示, 与NC组相比, Hsa-miR-148a-3p mimics组DUSP1的表达水平显著降低( $P<0.01$ ), Hsa-miR-148a-3p inhibitor组DUSP1的表达水平显著增加( $P<0.01$ , 图 10E、F)。

### 3 讨论

通过大规模基因测序发现, 人类基因组中只有不到2%基因被转录成编码蛋白质的RNA, 98%以上的基因被转录成非编码蛋白RNA<sup>[8]</sup>。本研究通过分析TCGA数据库中的测序数据, 分析乳腺癌中相关miRNA-mRNA对。先前研究认为, miRNA以完全或不完全互补的方式与mRNA的3'-UTR区相互作用, 促进mRNA降解并抑制miRNA翻译, 其在细胞生长发育、分化、增

殖、凋亡、细胞周期等细胞生物学行为中发挥着重要作用<sup>[9-12]</sup>。通过一系列数据库分析, 本研究确定研究对象Hsa-miR-148a-3p及其靶向的基因DUSP1。研究发现, miR-148-3p在部分癌症中作为抑癌基因, 在部分癌症中又可作为促癌基因, 比如, miR-148-3p作为抑癌基因靶向抑制DNMT1 mRNA的3'-UTR, 降低DNMT1的翻译水平, 进而抑制肺癌细胞的增殖、侵袭, 促进细胞凋亡<sup>[13]</sup>; miR-148a-3p通过靶向SRPK2抑制结肠癌细胞的转移及侵袭能力<sup>[14]</sup>; miR-148a-3p过表达可以显著抑制其靶基因ERBB3和AKT2的mRNA和蛋白水平, 进一步抑制膀胱癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力<sup>[15]</sup>; 本研究发现, hsa-miR-148a-3p在乳腺癌细胞和组织中显著上调, 其可促进乳腺癌细胞的增值, 迁移和侵袭, 抑制乳腺癌细胞的凋亡。在动物实验中发现, hsa-miR-148a-3p促进肿瘤组织质量和体积的增加, 缩短小鼠生存期, 说明其在乳腺癌中可作为促癌基因存在。

DUSP1也称为丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(MKP-1), 最初在培养的小鼠细胞中鉴定<sup>[16, 17]</sup>, 其是双

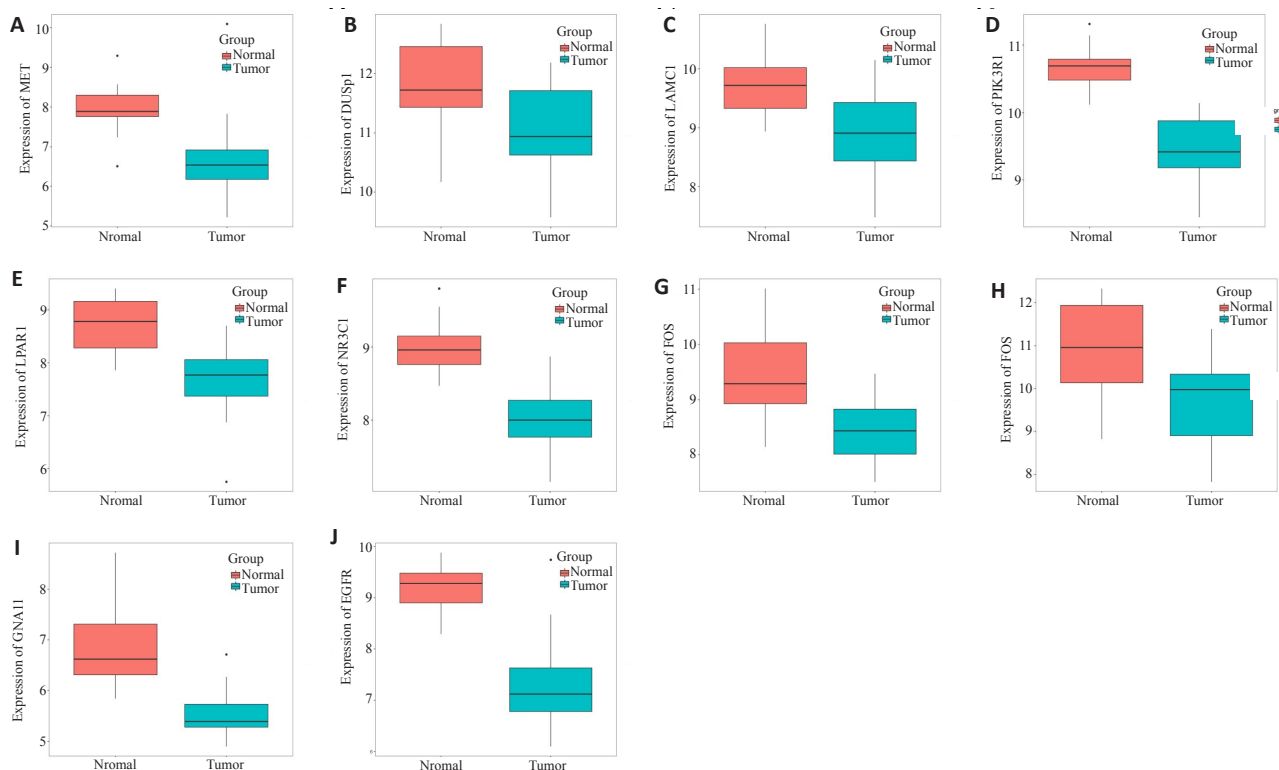


图3 TCGA数据库验证TOP10 hub基因的表达量

Fig.3 TCGA database verification of TOP10 hub gene expression. A-J: TCGA database verifies the expression level of MET, LPAR1, LAMC1, FOS, EGFR, PIK3R1, DUSP1, GNAI1, LAMA4, and NR3C1 genes in normal tissues and breast cancer tissues.

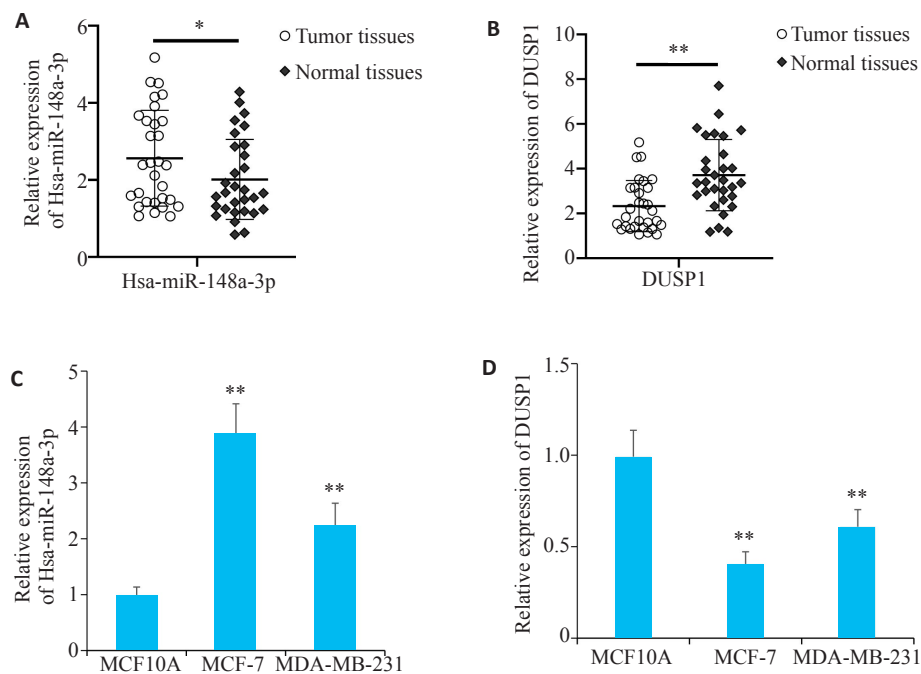


图4 RT-qPCR实验检测Hsa-miR-148a-3p和DUSP1在乳腺癌组织和细胞中的表达水平

Fig.4 Expression levels of Hsa-miR-148a-3p and DUSP1 in breast cancer tissues and cells detected by RT-qPCR. A, B: Expression of Hsa-miR-148a-3p and DUSP1 in breast cancer and adjacent tissues detected by RT-qPCR; \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs normal tissues group. C, D: The expression of Hsa-miR-148a-3p and DUSP1 in MCF10A cells, MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells by RT-qPCR. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$  vs MCF10A group.

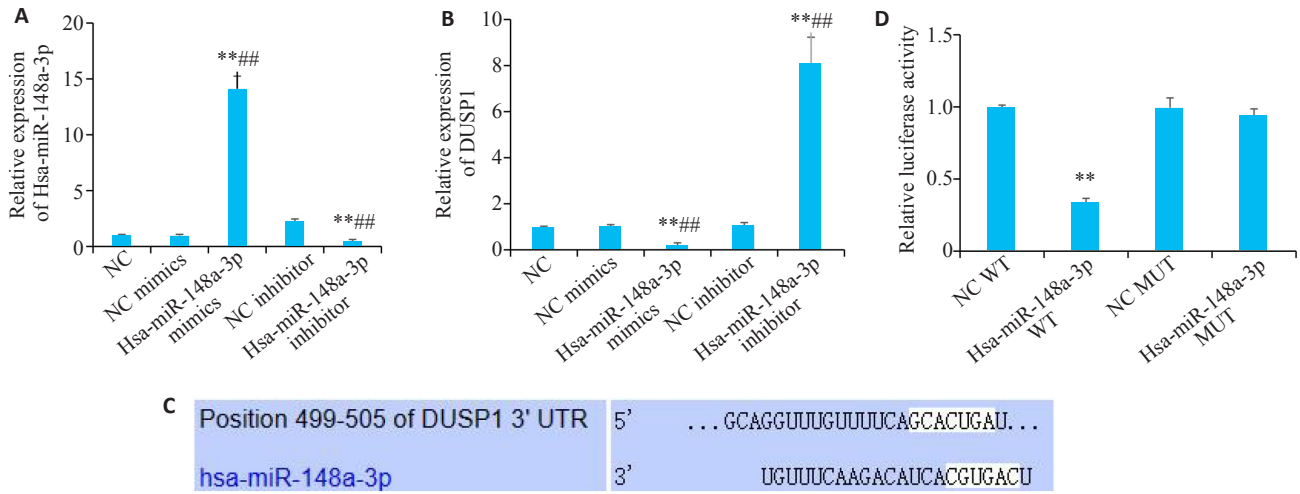


图5 Hsa-miR-148a-3p和DUSP1在乳腺癌中的靶向关系

Fig.5 Targeting relationship between Hsa-miR-148a-3p and DUSP1 in breast cancer. **A, B:** After overexpression of Hsa-miR-148a-3p, the expression level of Hsa-miR-148a-3p and DUSP1 was detected by RT-qPCR; **C:** Prediction of the binding sites of Hsa-miR-148a-3p and DUSP1 using TargetScan database; **D:** Target binding of Hsa-miR-148a-3p to DUSP1 detected by double luciferase activity reporting assay. <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs NC group, NC WT group; <sup>#</sup>*P*<0.01 vs NC mimics group, NC inhibitor group.

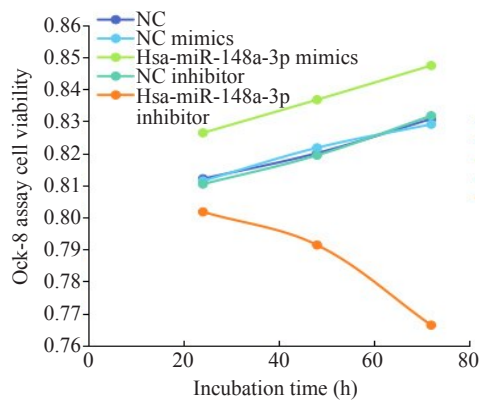


图6 Hsa-miR-148a-3p促进乳腺癌细胞的增殖

Fig.6 Hsa-miR-148a-3p promotes proliferation of breast cancer cells. <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs NC group, <sup>#</sup>*P*<0.01 vs NC mimics group, <sup>#</sup>*P*<0.01 vs NC inhibitor group.

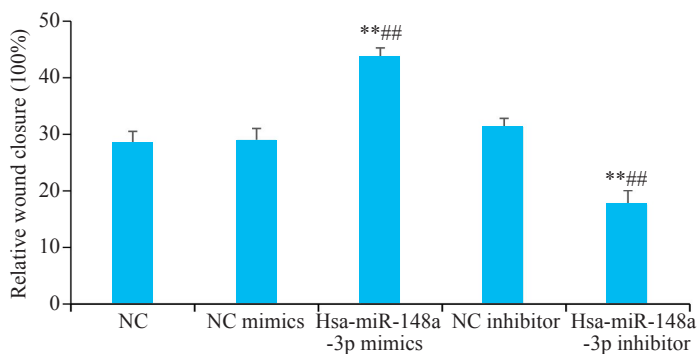
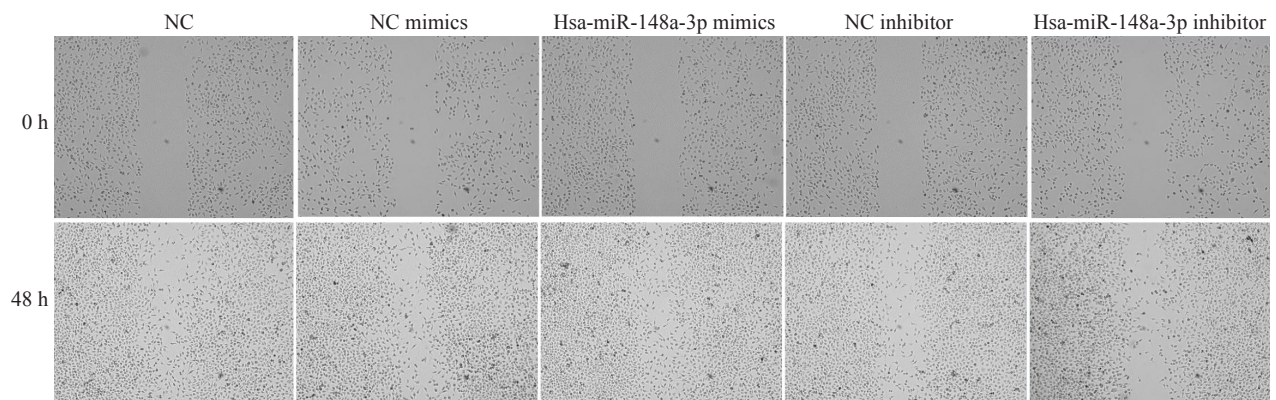


图7 Hsa-miR-148a-3p促进乳腺癌细胞的迁移

Fig.7 Hsa-miR-148a-3p promotes migration of breast cancer cells (Original magnification: ×40). <sup>\*\*</sup>*P*<0.01 vs NC group, <sup>#</sup>*P*<0.01 vs NC mimics and NC inhibitor group.

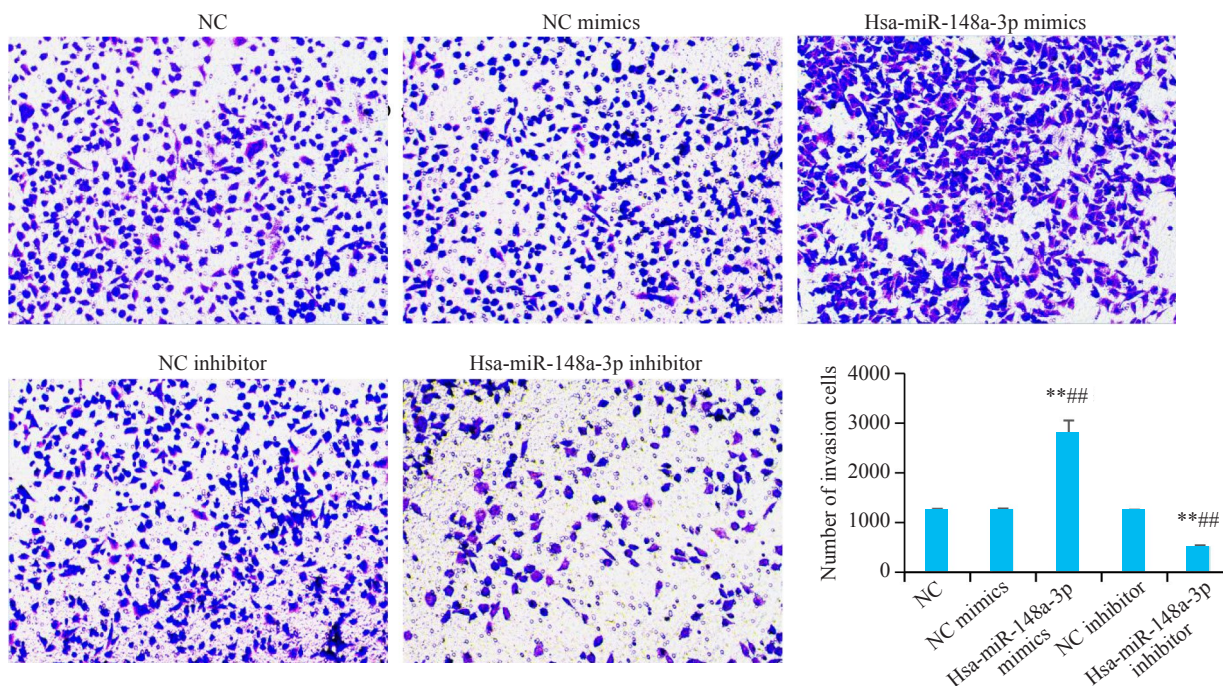


图8 Hsa-miR-148a-3p促进乳腺癌细胞的侵袭

Fig.8 Hsa-miR-148a-3p promotes invasion of breast cancer cells (×100). \*\* $P < 0.01$  vs NC group, # $P < 0.01$  vs NC mimics group and NC inhibitor group.

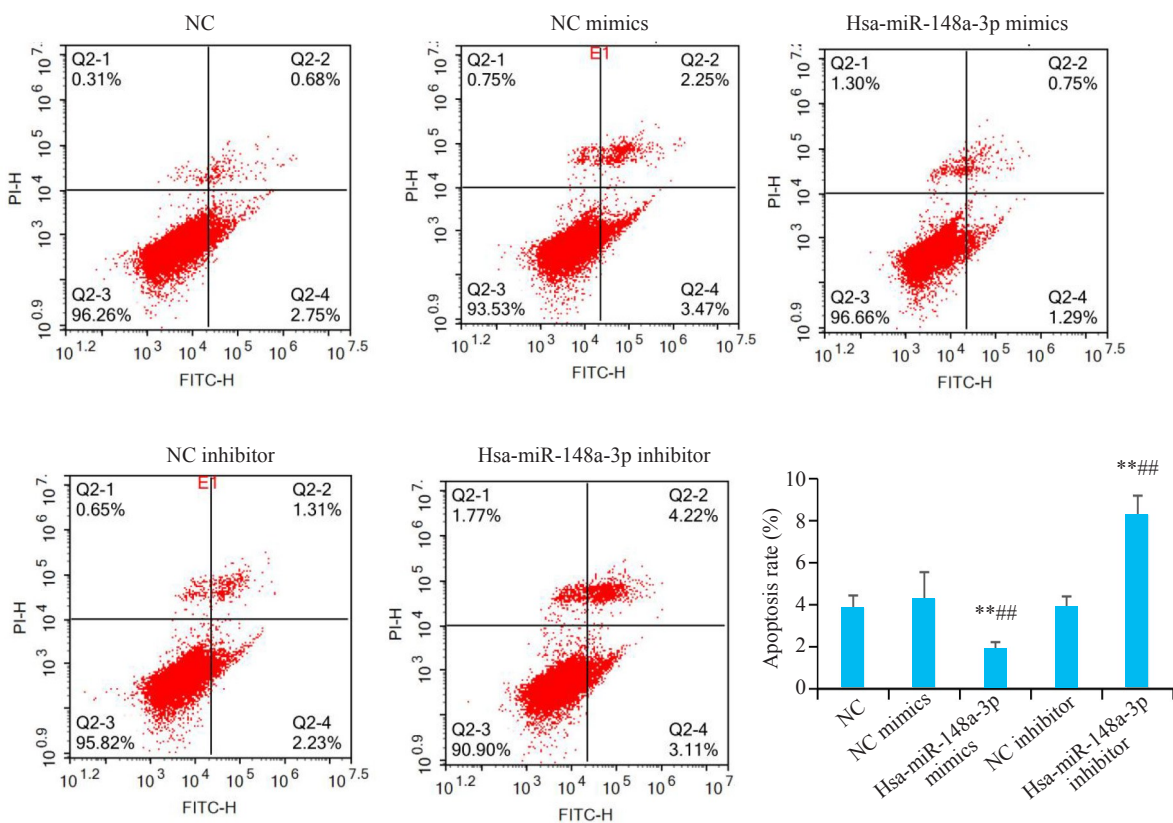


图9 Hsa-miR-148a-3p抑制乳腺癌细胞的凋亡

Fig.9 Hsa-miR-148a-3p inhibits apoptosis of breast cancer cells. \*\* $P < 0.01$  vs NC group, # $P < 0.01$  vs NC mimics group and NC inhibitor group.



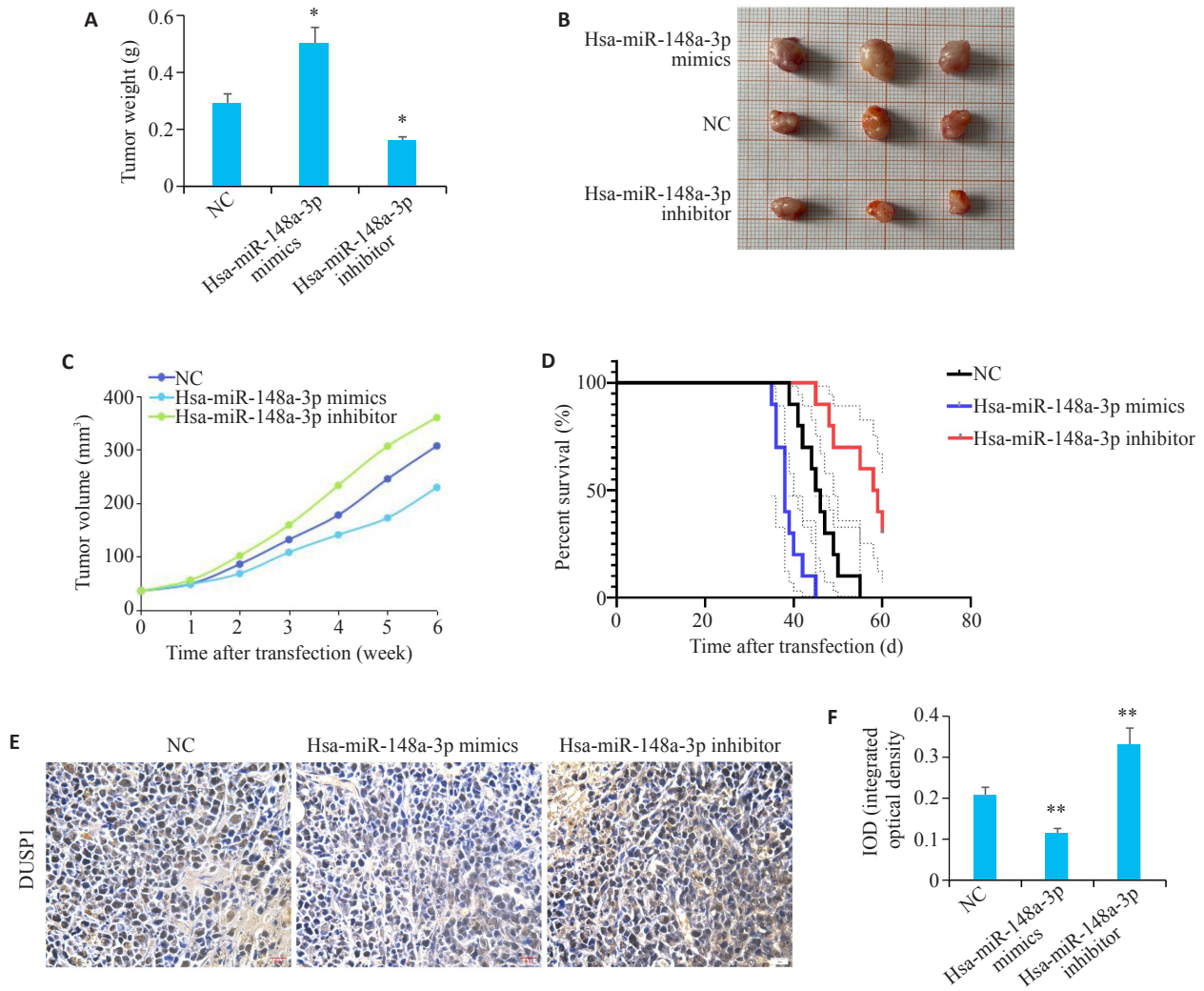


图 10 Hsa-miR-148a-3p在体内对小鼠肿瘤及DUSP1表达的影响

Fig.10 Effect of Hsa-miR-148a-3p on breast cancer cell xenograft growth and DUSP1 expression in nude mice. **A, B:** Tumor weight in mice. **C:** Tumor volume in mice. **D:** Kaplan-Meier survival curve analysis of survival of the mice. **E, F:** Immunohistochemistry for detecting the protein expression level of DUSP1 in the xenografts (×400). \*\**P*<0.01 vs NC group.

特异性磷酸酶的原型成员,在灭活丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)的不同亚型中发挥重要作用<sup>[18,19]</sup>。近年来,DUSP1在许多领域得到了研究。DUSP1的功能集中于细胞增殖、分化和转化、应激反应、炎症、周期阻滞和凋亡,其主要是通过调节MAPK信号通路实现的<sup>[20]</sup>。越来越多的研究发现,DUSP1对肿瘤的影响可能多种多样且复杂<sup>[21]</sup>。DUSP1在某些肿瘤中可能致癌<sup>[22,23]</sup>,而在某些肿瘤中可能抗癌<sup>[24,25]</sup>。本研究发现,DUSP1在乳腺癌中显著下调,数据库分析发现其可能是hsa-miR-148a-3p的靶基因,其表达水平可能受到hsa-miR-148a-3p的负调控。通过双荧光素酶报告基因实验证实hsa-miR-148a-3p和DUSP1之间的负调节。细胞实验和动物实验均进一步证实了hsa-miR-148a-3p可以调节DUSP1的表达水平。

总之,研究证实了hsa-miR-148a-3p是一种起促癌

作用的miRNA,DUSP1是一种抑癌基因。在乳腺癌细胞中,hsa-miR-148a-3p通过抑制DUSP1表达而作为癌基因发挥作用。由于hsa-miR-148a-3p对乳腺癌细胞生物学行为的影响是一种综合效应。因此,关于hsa-miR-148a-3p下游的靶基因仍需进一步研究。

**参考文献:**

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [2] Kapetas P, Maria Marino MD, et al. New diagnostic tools for breast cancer[J]. *memo*, 2017, 10(3): 175-80.
- [3] Lu TX, Rothenberg ME. microRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-7.
- [4] He BX, Zhao ZY, Cai QD, et al. miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2628-47.

- [5] Zheng JX, Yang T, Gao SH, et al. miR-148a-3p silences the CANX/MHC-I pathway and impairs CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immune attack in colorectal cancer[J]. *FASEB J*, 2021, 35(8): e21776.
- [6] Song M, Liu J, Zheng X, et al. miR-148a-3p targets CEMIP to suppress the genesis of gastric cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 575: 42-9.
- [7] Wang W, Dong J, Wang MX, et al. miR-148a-3p suppresses epithelial ovarian cancer progression primarily by targeting c-Met[J]. *Oncol Lett*, 2018; 15(5):6131-6.
- [8] 邓镇涛, 许朋, 王燕. 长链非编码RNA与恶性肿瘤发生发展关系的研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(9): 2286-8.
- [9] Evangelista Adriane F, Oliveira Renato J, O Silva Viviane A, et al. Integrated analysis of mRNA and miRNA profiles revealed the role of miR-193 and miR-210 as potential regulatory biomarkers in different molecular subtypes of breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1).
- [10] Fridrichova I, Zmetakova I. microRNAs contribute to breast cancer invasiveness[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1361.
- [11] Petri BJ, Klinge CM. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(3): 837-86.
- [12] Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. microRNAs: new biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer[J]. *Theranostics*, 2015, 5(10): 1122-43.
- [13] 孙震, 宋翔, 李艳光. miR-148a-3p靶向DNMT1表达调控肺癌细胞A549增殖、迁移和侵袭作用研究[J]. *解剖学研究*, 2022, 44(1): 45-50.
- [14] 王小东, 马博昭, 戚峰. miR-148a-3p通过靶向SRPK2抑制结肠癌细胞转移[J]. *天津医科大学学报*, 2019, 25(2): 99-104, 109.
- [15] 王潇. miR-148a-3p在膀胱癌中的抑癌作用及其分子机制研究[D]. 杭州: 浙江大学.
- [16] Lau LF, Nathans D. Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells[J]. *EMBO J*, 1985, 4(12): 3145-51.
- [17] Farooq A, Zhou MM. Structure and regulation of MAPK phosphatases[J]. *Cell Signal*, 2004, 16(7): 769-79.
- [18] Shen JL, Zhang YP, Yu H, et al. Role of DUSP1/MKP1 in tumorigenesis, tumor progression and therapy [J]. *Cancer Med*, 2016, 5(8): 2061-8.
- [19] Aspasia T, Alan A. MAP kinase phosphatases [J]. *Genome Biol*, 2002, 3(7): REVIEWS3009.
- [20] Owens DM, Keyse SM. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases [J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3203-13.
- [21] 曹君, 陈灿, 葛明华. DUSP1基因在肿瘤研究中的进展[J]. *中国肿瘤*, 2015, 24(9): 767-70.
- [22] Moncho-Amor V, Ibañez de Cáceres I, Bandres E, et al. DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2011, 30(6): 668-78.
- [23] Liu F, Gore AJ, Wilson JL, et al. DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84982.
- [24] Shen JL, Zhou SJ, Shi L, et al. DUSP1 inhibits cell proliferation, metastasis and invasion and angiogenesis in gallbladder cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(7): 12133-44.
- [25] Casteel M, Nielsen C, Kothlow S, et al. Impact of DUSP1 on the apoptotic potential of deoxynivalenol in the epithelial cell line HepG2[J]. *Toxicol Lett*, 2010, 199(1): 43-50.

(编辑:吴锦雅)