

MiR-6838-5p过表达下调DDR1基因表达抑制乳腺癌MCF-7细胞的增殖

薛良军, 谈秋瑜, 许静文, 冯璐, 李文锦, 颜亮, 李玉磊

MiR-6838-5p overexpression inhibits proliferation of breast cancer MCF-7 cells by downregulating DDR1 expression

引用本文:

薛良军, 谈秋瑜, 许静文, 冯璐, 李文锦, 颜亮, 李玉磊. MiR-6838-5p过表达下调DDR1基因表达抑制乳腺癌MCF-7细胞的增殖[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(9): 1677-1684.

您可能感兴趣的其他文章

1. 肿瘤相关成纤维细胞上调hsa-miR-18b-5p靶向FBXL3促进前列腺癌的增殖及转移

引用本文: 骆金光, 陶怀祥, 闻志远, 等. 肿瘤相关成纤维细胞上调hsa-miR-18b-5p靶向FBXL3促进前列腺癌的增殖及转移[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(7): 1284-1296.

2. CDHR2过表达通过抑制PI3K/Akt通路抑制乳腺癌细胞增殖

引用本文: 房锦存, 刘立威, 林俊豪, 等. CDHR2过表达通过抑制PI3K/Akt通路抑制乳腺癌细胞增殖[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(6): 1117-1125.

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

引用本文: 许家铭, 林龙, 陈琼慧, 等. Hsa-miR-148a-3p通过下调DUSP1基因促进乳腺癌细胞的恶性行为[J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(9): 1515-1524.

4. miR-4324与Talin2在乳腺癌中高表达

引用本文: 高鹏, 朱海涛, 裴文浩, 等. miR-4324与Talin2在乳腺癌中高表达[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(10): 1517-1525.

5. MiR-4719通过靶向调控ARHGAP36抑制人乳腺癌细胞的迁移和侵袭

引用本文: 李侨, 邱宇翔, 金婷, 等. MiR-4719通过靶向调控ARHGAP36抑制人乳腺癌细胞的迁移和侵袭[J]. 南方医科大学学报, 2021, 41(6): 854-861.

MiR-6838-5p 过表达下调 DDR1 基因表达抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖

薛良军¹, 谈秋瑜², 许静文², 冯璐², 李文锦², 颜亮², 李玉磊²

¹皖南医学院第一附属医院放疗科, 安徽 芜湖 241002; ²皖南医学院基础医学院, 安徽 芜湖 241002

摘要:目的 探索 miR-6838-5p 调控 DDR1 基因表达水平对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响。方法 采用脂质体转染方法干预乳腺癌 MCF-7 细胞中 miR-6838-5p 及 DDR1 基因表达, 设置组别如下: Control mimic; miR-6838-5p mimic; Control inhibitor; miR-6838-5p inhibitor; Control siRNA, DDR1 siRNA, Control vector, DDR1 vector 及 miR-6838-5p 过表达+DDR1 过表达共转染组。qRT-PCR 实验检测 miR-6838-5p 在正常乳腺上皮细胞及乳腺癌细胞中的表达; 通过 TargetscanV 8.0 等软件预测 miR-6838-5p 可能作用的靶基因; 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-6838-5p 与 DDR1 存在靶向结合位点; CCK-8 实验及 EdU 实验检测细胞增殖情况; Western blotting 实验检测 DDR1 表达情况; 通过裸鼠荷瘤实验验证 miR-6838-5p 通过调控 DDR1 表达抑制了乳腺癌 MCF-7 细胞增殖。结果 miR-6838-5p 在乳腺癌细胞中表达量低于乳腺正常上皮细胞 ($P < 0.05$); 对比对照组, miR-6838-5p 能抑制乳腺癌细胞增殖 ($P < 0.05$); 双荧光素酶报告基因实验证明 miR-6838-5p 可以靶向结合 DDR1 ($P < 0.01$), Western blotting 实验证明 miR-6838-5p 能调控 DDR1 基因表达; DDR1 促进乳腺癌细胞的增殖 ($P < 0.05$); miR-6838-5p 过表达+DDR1 过表达共转染后能回复 miR-6838-5p 对乳腺癌细胞增殖的抑制作用 ($P < 0.05$); 裸鼠荷瘤实验结果表明过表达 miR-6838-5p 后肿瘤体积明显减小, Western blotting 结果表明肿瘤内 miR-6838-5p 过表达后抑制了 DDR1 的表达 ($P < 0.05$)。结论 miR-6838-5p 通过调控 DDR1 基因表达抑制了乳腺癌细胞的增殖。

关键词: miR-6838-5p; 乳腺癌; DDR1; 细胞增殖

MiR-6838-5p overexpression inhibits proliferation of breast cancer MCF-7 cells by downregulating DDR1 expression

XUE Liangjun¹, TAN Qiuyu², XU Jingwen², FENG Lu², LI Wenjin², YAN Liang², LI Yulei²

¹Department of Radiotherapy, First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; ²School of Basic Medicine, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

Abstract: Objective To explore the regulatory effect of miR-6838-5p on DDR1 gene expression and proliferation of breast cancer cells. **Methods** The expression levels of miR-6838-5p in normal breast epithelial cells and breast cancer cells were detected using qRT-PCR, and the potential target genes of miR-6838-5p was predicted using TargetscanV 8.0. Double luciferase reporter gene experiment was performed to verify the binding between miR-6838-5p and DDR1. Breast cancer MCF-7 cells were transfected via liposome, miR-6838-5p mimic, miR-6838-5p inhibitor, DDR1 siRNA, DDR1-overexpressing vector, or both miR-6838-5p mimic and DDR1-overexpressing vector, and the changes in cell proliferation were examined with CCK-8 and EdU assays; Western blotting was used to detect the expression of DDR1. The mediating role of DDR1 in miR-6838-5p overexpression-induced inhibition of MCF-7 cell proliferation was verified in a nude mouse model bearing MCF-7 cell xenografts. **Results** The expression of miR-6838-5p was significantly lower in breast cancer cells than in normal breast epithelial cells. In MCF-7 cells, miR-6838-5p overexpression induced significant inhibition of cell proliferation. Dual luciferase reporter gene experiment demonstrated a binding relationship between miR-6838-5p and DDR1 ($P < 0.01$). Western blotting showed that miR-6838-5p overexpression significantly lowered DDR1 expression in MCF-7 cells, and DDR1 overexpression promoted proliferation of the cells; co-transfection of the cells with DDR1-overexpressing vector significantly attenuated the inhibitory effect of miR-6838-5p mimic on cell proliferation. In the tumor-bearing nude mice, the xenografts overexpressing miR-6838-5p showed a significantly smaller volume with obviously the expression of DDR1. **Conclusion** Overexpression of miR-6838-5p inhibits breast cancer cell proliferation by regulating DDR1 expression.

Keywords: miR-6838-5p; breast cancer; DDR1; cell proliferation

据最新全球癌症统计, 乳腺癌(BC)是全球女性中
新发病第一、致死率仅次于肺癌的癌症^[1]。乳腺癌存在
发病机制复杂、容易转移和容易产生耐药性等特点, 这

些都导致了乳腺癌的治疗效果不佳^[2]。因此, 对乳腺癌
的发病机制进行研究并阐明具体机制, 可以提高乳腺癌
的治疗效果。

盘状蛋白结构域受体 1 (DDR1) 是一种新发现的受
体酪氨酸激酶, 由细胞外结构域 (与配体相互作用)、跨
膜区和通过激酶结构域传递信号的胞质内结构组
成^[3]。有研究表明, DDR1 在许多恶性肿瘤中高度表达,
如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌等, 其异常高表达与癌

收稿日期: 2024-05-20

基金项目: 安徽省高校科研编制重大项目 (2022AH040179); 安徽省大
学生创新创业训练计划项目 (S202310368008, S202310368041)

作者简介: 薛良军, 副主任医师, E-mail: xuelj016@163.com

通信作者: 李玉磊, 硕士, 讲师, E-mail: liyulei@wnmc.edu.cn

症的预后不良有关^[4-6]。其作用机制可以通过影响胶原蛋白的合成或者降解,从而调节肿瘤细胞生物学行为^[7,8]。最新的《nature》杂志报道,DDR1 细胞外结构域能促进胶原纤维的重新排列进而引发乳腺癌的免疫排斥,破坏DDR1的细胞外结构域可以抑制乳腺癌在体内的生长,同时细胞外结构域与肿瘤内抗肿瘤的T细胞丰度成负相关^[9]。以上研究结果表明,DDR1在乳腺癌的肿瘤发生发展中发挥重要作用,探索其上游调控机制对乳腺癌临床治疗新策略的研发具有重要作用。

微小RNA(miRNA)是一类长度小于25 bp的单链RNA,在调控细胞的生长、增殖、凋亡及周期等方面起到重要作用^[10-12]。研究证实,miRNAs通过结合靶基因的mRNA的3'端非翻译区进而抑制了靶基因的表达,从而对包括癌症等疾病的发生发展产生影响^[13,14]。本研究通过生物信息学分析发现miR-6838-5p可能为DDR1的调控miRNA,但目前在乳腺癌中尚未有miR-6838-5p调控DDR1表达的报道。

综上所述,本研究旨在探索乳腺癌中miR-6838-5p与DDR1是否存在调控关系,这一调控关系是否对乳腺癌细胞的增殖产生影响,以期为提高乳腺癌的临床治疗效果提供一个新的策略。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人乳腺癌细胞株MCF-7及人乳腺上皮细胞MCF-10A购置于中科院细胞库(上海)。

1.2 试剂

DMEM培养基、胎牛血清(sigma);miR-6838-5p过表达及抑制剂、EdU试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司);DDR1小干扰RNA及过表达质粒(上海吉玛生物科技有限公司);RNA转染试剂INTERFERin®(上海优宁维生物科技股份有限公司);过表达质粒DNA转染

试剂Muris(上海达科为生物技术有限公司);10% SDS-PAGE快速配胶试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司);逆转录及qRT-PCR试剂盒(宝生物工程公司);胰酶、Opti-MEM培养基购于(Gibco);CCK-8试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);DDR1及GAPDH抗体(Santa crus);RNA快速提取试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司)。化学发光底物(默克),PVDF膜(罗氏)。双荧光素酶实验检测试剂盒(广州复能基因有限公司)。miR-6838-5p过表达及对照慢病毒(上海吉玛生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人乳腺癌细胞MCF-7及乳腺上皮细胞MCF-10A在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养(37℃,5%CO₂)。待细胞密度超过80%后传代。

1.3.2 细胞转染 细胞转染按照以下组别进行分组:Control mimic、miR-6838-5p mimic、Control inhibitor、miR-6838-5p inhibitor; Si-Control、Si-DDR1; Control vector、DDR1 vector; Control mimic+Control vector、miR-6838-5p mimic+Control vector、Control mimic+DDR1 vector、miR-6838-5p mimic+DDR1 vector。培养皿中细胞密度超过80%后,消化后重新接种到十二孔板中;待细胞贴壁后,根据转染对象不同,分别按照以下体系进行转染:转染RNA,每孔加入INTERFERin®转染试剂3 μL,随后加入597 μL的不同转染RNA片段及完全培养基混合液;转染质粒DNA,每孔加入muris转染试剂3 μL、1 μg质粒及100 μL Opti-MEM培养基,随后用10%DMEM培养基补齐到600 μL;6 h将培养液换成10%DMEM。

1.3.3 qRT-PCR实验 转染后的细胞24 h后,消化收集。根据RNA快速提取试剂盒说明书将收集后的细胞提取RNA,提取后进行逆转录,随后进行实时荧光PCR。引物序列如表1所示。

表1 引物序列

Tab.1 Sequences of primers for RT-qPCR

Primer	Forward	Reverse
DDR1	5'-GAACACGGACGAGGACATG-3'	5'-CGGCAACGAGGGAGAAAGG-3'
GAPDH	5'-CGAGCCACATCGCTCAGACA-3'	5'-GTGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

1.3.4 CCK-8增殖实验 转染后的细胞24 h后,消化收集并计数。按照5000/孔的密度接种到96孔板中。分别在12、24、36、48 h后将培养基更换为100 μL 10%DMEM培养基(含10% CCK-8试剂),随后将96孔板在培养箱中放置2 h后,酶标仪(波长450 nm)测定每孔的吸光度。

1.3.5 Western blotting 细胞转染48 h后,消化收集并转移至1.5 mL离心管。再加入RIPA裂解液进行冰上裂解。测定裂解后的蛋白质浓度,按照每孔蛋白质60 μg的量进行SDS-PAGE电泳,随后300 mA转膜90 min,常温封闭60 min,4℃一抗孵育12 h(稀释比例为DDR1 1:1000,GAPDH 1:2000),洗膜后二抗(稀释比

例为1:3000)常温孵育1 h,加入发光底物后进行曝光。

1.3.6 EdU实验 将转染后的细胞接种到24孔板中(每孔 1×10^5)。贴壁后,加入含EdU(0.1%)的完全培养基孵育2 h;随后用150 μL 的4%多聚甲醛固定细胞0.5 h;弃上清,再加入150 μL 甘氨酸溶液(2 mg/mL),孵育5 min;清洗2~3次,再加入250 μL PBS(0.5% TritonX100)孵育15 min,清洗1次;再加入Apollo染色液250 μL ,黑暗条件下染色0.5 h;清洗细胞2~3次;最后加入适量DAPI,黑暗条件下染色0.5 h,清洗2次。完成上述步骤后,在荧光倒置显微镜下拍照。使用ImageJ软件进行数据定量分析,统计同一视野下DAPI、EdU的数量,通过EdU/DAPI的比值进行比较。

1.3.7 双荧光素酶报告基因实验 MCF-7细胞于24孔板中铺板,待细胞贴壁后,按照下列进行分组转染: Pezx-FR02-3'UTR (Wide type)质粒+Control mimic; Pezx-FR02-3'UTR (Wide type)质粒+miR-6838-5p mimic; Pezx-FR02-3'UTR (Mutant Type)质粒+Control mimic; Pezx-FR02-3'UTR (Mutant Type)质粒+miR-6838-5p mimic。转染后48 h,用双荧光素酶检测试剂盒进行测定。

1.3.8 动物实验 实验动物为8只小鼠(雌性,BALB/c-裸体),购自GemPharmatech(中国南京)于皖南医学院的SPF实验动物室饲养。动物实验的方案获得皖南医学院实验动物伦理委员会审查批准(WNMC-AWE-2024299)。在小鼠检疫1周后进行后续实验。将传代的MCF-7细胞种于六孔板中,待细胞贴壁后分别加入10、20、30 μL 的慢病毒感染MCF-7细胞。48 h后,通过qRT-PCR实验测定每孔的感染效率,从而选择最佳的感染浓度。过表达miR-6838-5p的慢病毒或空慢病毒载体感染的MCF-7细胞(1×10^7 /只,4只/组)皮下注射。待肿瘤长出来后,每隔1 d进行测量每个肿瘤的长度和宽度并记录,通过以下公式计算肿瘤体积=(长度/2) \times (宽度²)。33 d后,对小鼠实施安乐死后取出肿瘤组织。对肿瘤组织样本进行Western blotting和qRT-PCR实验。剩余样本用4%多聚甲醛固定;并进行免疫组织化学染色试验。

1.4 统计学分析

每个实验都做了3次独立重复。统计学分析采用SPSS 20.0软件,所有数据用均数 \pm 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-6838-5p抑制了乳腺癌细胞的增殖

RT-PCR结果表明,与乳腺正常细胞相比,miR-6838-5p在乳腺癌细胞中表达水平明显下降(图1A)。CCK-8

结果表明,与对照组相比,过表达miR-6838-5p后,MCF-7细胞的增殖速率在24 h后明显下降($P < 0.0001$,图1B);而抑制miR-6838-5p表达后MCF-7细胞的增殖速率在24 h后明显升高($P < 0.0001$,图1C)。EdU实验表明,与对照组相比,过表达miR-6838-5p后,MCF-7细胞的增殖速率得到抑制($P < 0.01$,图1D、E);而抑制miR-6838-5p表达后MCF-7细胞的增殖速率受到明显促进($P < 0.01$,图1D、E)。

2.2 miR-6838-5p调控DDR1基因的表达

通过TargetScan、miRBase以及RNAhybrid软件进行生物信息学分析表明,miR-6838-5p可能是DDR1的潜在调控miRNA,且通过计算结合能发现二者的结合能为-26.3 kcal/mol,符合miRNA与靶基因结合能范围(图2A)。双荧光素酶报告基因结果表明(图2B)与Control mimic组相比,miR-6838-5p mimics对野生型报告质粒DDR1-WT的报告荧光有明显下降($P < 0.0001$),而突变型报告基因质粒,mimics组荧光没变化。Western blotting结果表明,与乳腺正常细胞MCF-10A相比,DDR1蛋白在乳腺癌MCF-7细胞中表达水平升高($P < 0.0001$,图2C、D)。在乳腺癌细胞中过表达miR-6838-5p降低了DDR1的mRNA与蛋白表达水平($P < 0.05$,图2F、G);而抑制miR-6838-5p升高了DDR1的mRNA与蛋白表达水平($P < 0.05$,图2F、G)。miR-6838-5p转染效率如图2H所示,过表达miR-6838-5p后,细胞内的miR-6838-5p水平明显升高($P < 0.05$),而干扰miR-6838-5p后,细胞内的miR-6838-5p水平明显降低($P < 0.01$)。

2.3 DDR1促进了乳腺癌细胞的增殖

在MCF-7细胞中过表达或干扰DDR1的蛋白表达水平(图3A、B)。CCK-8结果表明,与对照组相比,抑制DDR1表达后MCF-7细胞的增殖速率在24 h后明显下降($P < 0.0001$,图3C);而过表达DDR1后,MCF-7细胞的增殖速率在24 h后明显上升($P < 0.01$,图3D)。EdU实验表明,与对照组相比,过表达DDR1表达后,MCF-7细胞的增殖速率得到促进($P < 0.05$,图3E、F);而抑制DDR1表达后MCF-7细胞的增殖速率受到明显抑制($P < 0.05$,图3G、H)。

2.4 miR-6838-5p调控DDR1基因的表达抑制了乳腺癌细胞的增殖

CCK-8结果表明,与对照组相比,miR-6838-5p与DDR1同时过表达组的细胞增殖速率介于单独过表达miR-6838-5p和单独过表达DDR1组之间(图4A)。EdU结果表明,与对照组相比,miR-6838-5p与DDR1同时过表达组的细胞增殖速率介于单独过表达miR-6838-5p和单独过表达DDR1组之间(图4B、C)

2.5 体内实验证明miR-6838-5p通过靶向DDR1抑制乳腺癌细胞的增殖

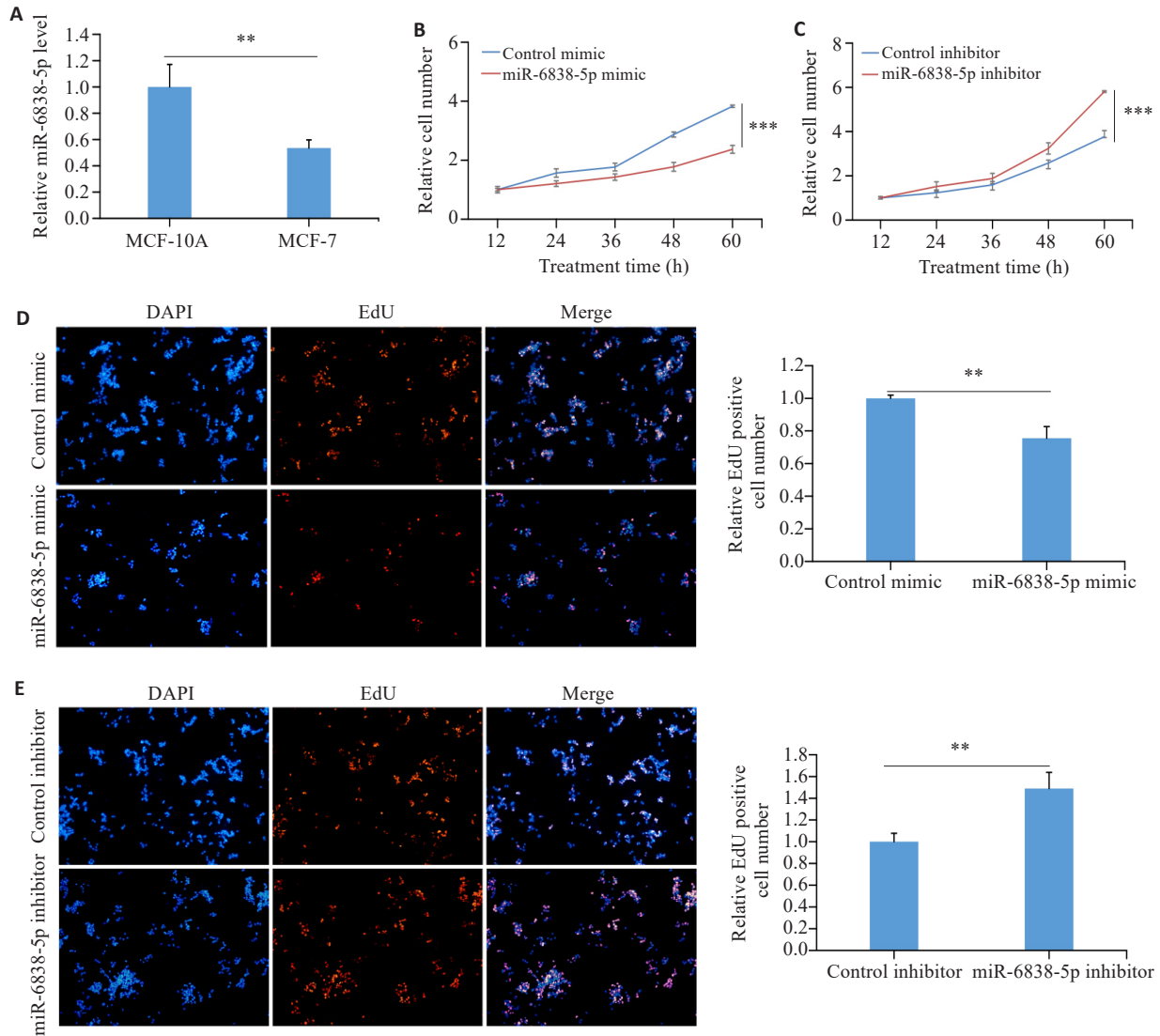


图1 miR-6838-5p在乳腺癌细胞及正常细胞表达情况及其对乳腺癌细胞增殖的影响

Fig.1 Expression of miR-6838-5p in breast cancer cells and normal cells and its effect on proliferation of breast cancer cells. A: Expression of miR-6838-5p in breast cancer cells and normal breast epithelial cells. B, C: Results of CCK-8 assay for assessing the effect of miR-6838-5p interference and overexpression on MCF-7 cell proliferation. D, E: EdU assay for assessing the effect of miR-6838-5p interference and overexpression on proliferation of MCF-7 cells (Original magnification: $\times 100$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

与对照组相比,miR-6838-5p过表达组的肿瘤大小和生长速率显著减少(图5A~C)。qRT-PCR结果表明,miR-6838-5p过表达组的miR-6838-5p表达显著升高($P < 0.05$,图5D),而Western blotting结果表明DDR1的表达显著减弱($P < 0.05$,图5E)。免疫组化结果表明,与对照组相比,miR-6838-5p过表达组的肿瘤细胞Ki67阳性细胞数显著减少,且DDR1阳性细胞数也明显减少(图5F)。

3 讨论

DDR1是细胞外基质(ECM)的重要组成成分,在细胞的包括增殖、分化等各种细胞功能中发挥重要作用^[15]。早期的研究表明,DDR1与肝脏、肾脏等器官的纤维化以及动脉粥样硬等炎症相关疾病密切相关^[16]。

而最新的研究表明,DDR1主要通过调控胶原蛋白的合成和降解,参与癌细胞的增殖、迁移、侵袭和基质重塑^[8,17]。DDR1在许多恶性肿瘤中高度表达,如肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌等,其高表达与肿瘤预后不良密切相关^[18]。例如,在肝癌中,DDR1招募PSD4与ARF6结合,从而激活ARF6及其下游MAPK信号通路,进而正向调节肝癌细胞的肺转移^[19]。据最新的《nature》杂志报道,DDR1能抑制抗肿瘤免疫来促进乳腺肿瘤的生长^[20,21]。本研究通过细胞增殖实验发现DDR1过表达促进了乳腺癌细胞的增殖,而抑制DDR1表达抑制了乳腺癌细胞的增殖,这也与前人的研究结果相一致^[22-24]。以上研究表明DDR1在多种肿瘤的发展中发挥重要作用,尤其是在乳腺癌中DDR1可以作为一个新的药物治疗的靶点。因此发现能抑制其表达的相关调控机制对于

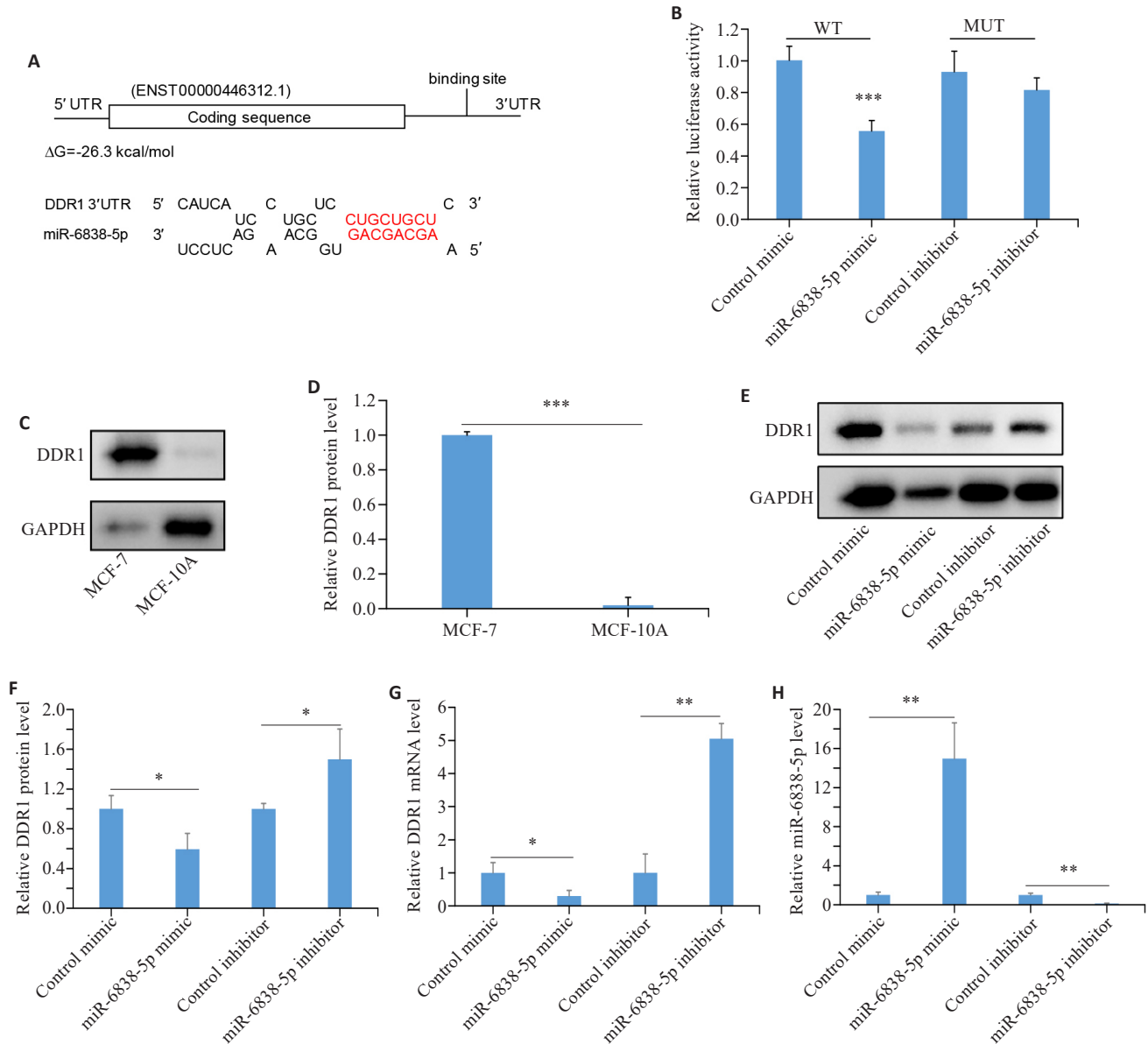


图2 miR-6838-5p调控DDR1基因的表达

Fig.2 MiR-6838-5p regulates DDR1 expression in MCF-7 cells. A: Bioinformatics analysis of miR-6838-5p binding to DDR1. B: Luciferase activity assay. C-G: Western blotting and qRT-PCR for DDR1 expression level. H: Analysis of transfection efficiency of miR-6838-5p using qRT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ vs Control.

乳腺癌的临床治疗新策略的发现具有十分重要的意义。

目前,有关miRNA调控DDR1表达的研究较少,且都仅限于卵巢癌、白血病的相关研究,如姜黄素衍生物ST09调节miR-199a-5p/DDR1轴并调节卵巢癌细胞的增殖和迁移^[25];miR-199b-5p通过靶向DDR1抑制三阴性乳腺癌细胞增殖、迁移和侵袭^[26];miR-199b-5p直接靶向PODXL和DDR1,并且在急性髓系白血病中miR-199b-5p水平的降低与PODXL与DDR1表达的升高相关^[27]。以上报道表明miRNA可以调控DDR1表达,虽然在乳腺癌中有miRNA调控DDR1表达,但仅局限于miR-199家族对DDR1的作用。本研究通过生物信息学软件发现miR-6838-5p与DDR1存在结合位点,并通过双荧光素酶报告基因实验得到了证实,提示二者可能

有调控关系。现有文献表明miR-6838-5p通过靶向结合GPRIN3影响了Wnt/ β -Catenin信号通路进而影响了胃癌细胞生长、迁移和侵袭^[28];miR-6838-5p通过抑制DMTF1/ARF-p53轴促进肾细胞癌细胞的增殖和侵袭^[29];miR-6838-5p通过下调CBX4表达抑制了ERK信号进而抑制人肝癌干细胞的自我更新和转移^[30]。但miR-6838-5p在乳腺癌中对DDR1表达及其对细胞增殖的影响还未见报道。本研究发现miR-6838-5p过表达抑制了乳腺癌的增殖,而抑制了miR-6838-5p表达后乳腺癌的增殖得到促进。在乳腺癌细胞中干预miR-6838-5p的表达,免疫印迹实验表明miR-6838-5p调控了DDR1蛋白表达水平,同时细胞功能回复实验也进一步验证了miR-6838-5p调控DDR1的表达进而抑制乳

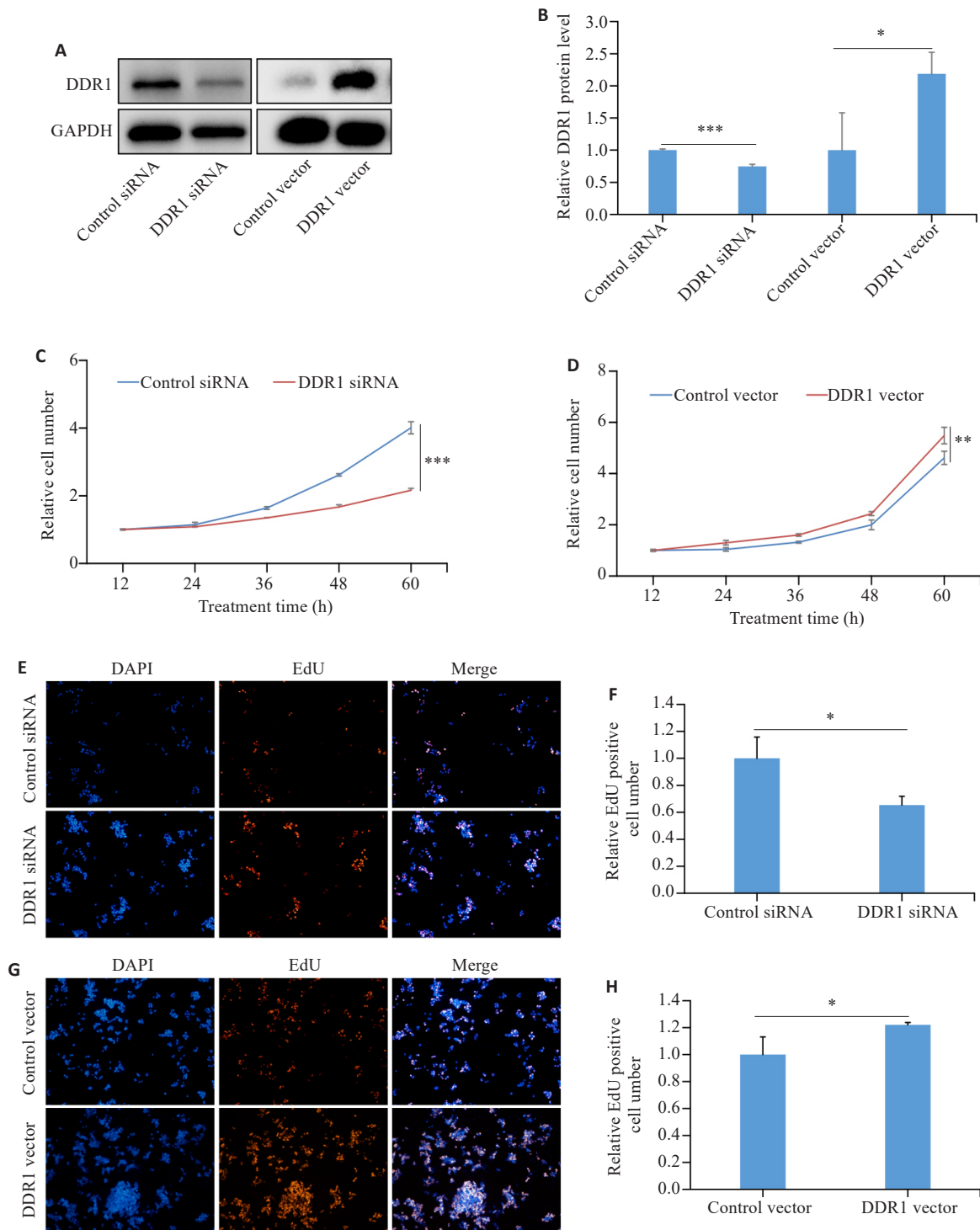


图3 DDR1促进了乳腺癌细胞的增殖

Fig. 3 DDR1 overexpression promotes proliferation of breast cancer cells. **A, B**: Western blotting for DDR1 protein level. **C, D**: CCK-8 assay for assessing the effect of DDR1 interference and overexpression on proliferation of breast cancer cells. **E-H**: EdU assay for assessing the effect of DDR1 interference and overexpression on proliferation of breast cancer cells (×100). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$.

腺癌细胞增殖。最后体内实验表明 miR-6838-5p 通过负调控 DDR1 的表达抑制乳腺癌肿瘤的增长。

综上所述,本研究发现 miR-6838-5p 通过负调控 DDR1 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖,本研究结果对肿瘤发生发展中 miR-6838-5p 的功能提供了一个新的途径,并为乳腺癌治疗提供一个新策略。但本研究也存在

一定的不足,如下游的具体分子机制仍待阐明,本研究也检测了 miR-6838-5p 干预后磷酸化的 AKT 表达水平,结果发现磷酸化的 AKT 表达没有发生变化,提示 miR-6838-5p 负调控 DDR1 表达抑制乳腺癌细胞增殖的下游信号通路还有待进一步探索。

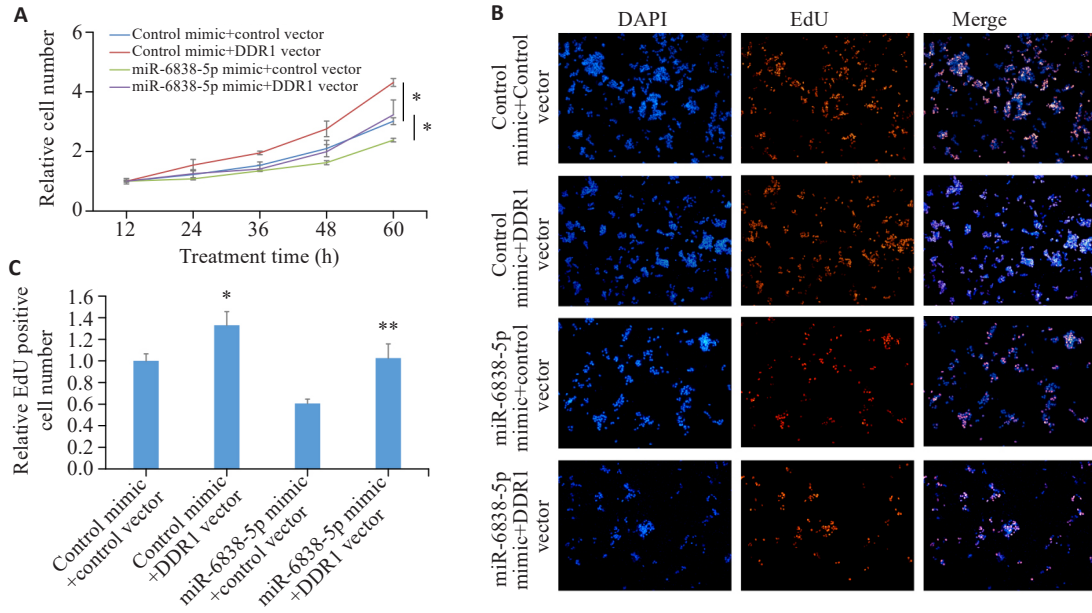


图4 miR-6838-5p调控DDR1基因的表达抑制了乳腺癌细胞的增殖

Fig. 4 MiR-6838-5p inhibits breast cancer cell proliferation by regulating DDR1 expression. **A**: CCK-8 assay for assessing the effect of co-transfection with miR-6838-5p mimics and DDR1 vector on proliferation of breast cancer cells. **B**, **C**: EdU assay for assessing the effect of co-transfection with miR-6838-5p mimics and DDR1 vector on proliferation of breast cancer cells ($\times 100$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

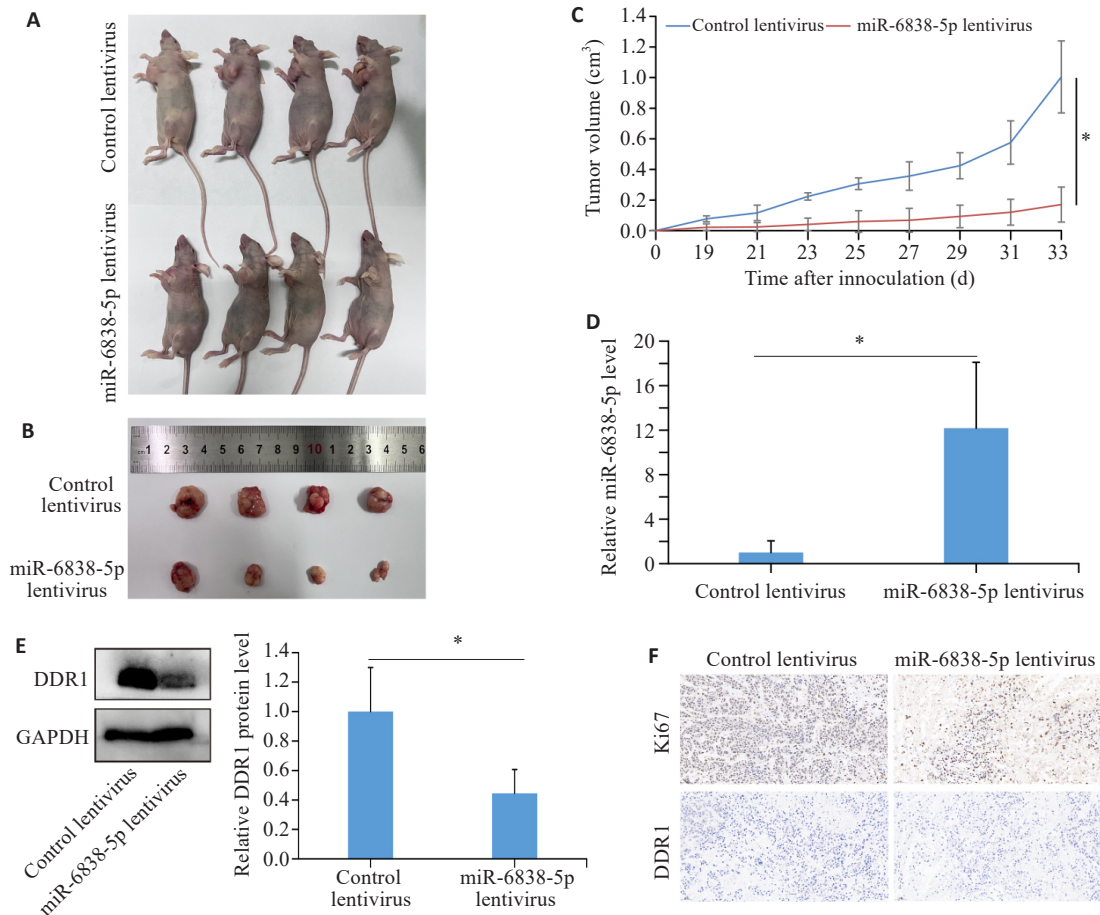


图5 体内实验证明miR-6838-5p通过靶向DDR1抑制乳腺癌细胞的生长

Fig. 5 MiR-6838-5p overexpression inhibits the growth of breast cancer cells in nude mice by targeting DDR1. **A**: Representative images of xenografts derived from MCF-7 cells infected with miR-6838-5p or empty lentiviruses. **B**, **C**: Growth curve of the xenografts. **D**: Analysis of miR-6838-5p expression in the xenografts detected by qRT-PCR. **E**: DDR1 protein levels in the xenografts detected by Western blotting. **F**: Immunohistochemistry for examining Ki67 and DDR1 expressions in the xenografts ($\times 100$). * $P < 0.05$.

参考文献:

- [1] Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] Nolan E, Lindeman GJ, Visvader JE. Deciphering breast cancer: from biology to the clinic[J]. *Cell*, 2023, 186(8): 1708-28.
- [3] Chen L, Kong XY, Fang Y, et al. Recent advances in the role of discoidin domain receptor tyrosine kinase 1 and discoidin domain receptor tyrosine kinase 2 in breast and ovarian cancer[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 747314.
- [4] Elkamhawy A, Lu QL, Nada H, et al. The journey of DDR1 and DDR2 kinase inhibitors as rising stars in the fight against cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12): 6535.
- [5] Deng J, Kang YA, Cheng CC, et al. DDR1-induced neutrophil extracellular traps drive pancreatic cancer metastasis[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(17): e146133.
- [6] Ming F, Li BF, Yi SZ, et al. Circ_0087378 intensifies the malignant behavior of non-small cell lung cancer cells *in vitro* by facilitating DDR1 *via* sponging miR-199a-5p[J]. *Transl Lung Cancer Res*, 2023, 12(4): 770-85.
- [7] Merlo L, Bighi S, Cervi PM, et al. Digital radiography in neonatal intensive care[J]. *La Radiol Med*, 1990, 80(3): 230-3.
- [8] Xiong YX, Zhang XC, Zhu JH, et al. Collagen I-DDR1 signaling promotes hepatocellular carcinoma cell stemness *via* Hippo signaling repression[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(7): 1648-65.
- [9] Sun XJ, Wu BG, Chiang HC, et al. Tumour DDR1 promotes collagen fibre alignment to instigate immune exclusion[J]. *Nature*, 2021, 599(7886): 673-8.
- [10] Martins CSM, LaGrow AP, Prior JAV. Quantum dots for cancer-related miRNA monitoring[J]. *ACS Sens*, 2022, 7(5): 1269-99.
- [11] Menon A, Abd-Aziz N, Khalid K, et al. miRNA: a promising therapeutic target in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11502.
- [12] Shui B, Beyett TS, Chen Z, Li X, La Rocca G, Gazlay WM, Eck MJ, Lau KS, Ventura A, Haigis KM: Oncogenic K-Ras suppresses global miRNA function[J]. *Mol Cell* 2023, 83(14):2509-2523.e2513.
- [13] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(3): 203-22.
- [14] Uzuner E, Ulu GT, Gürler SB, et al. The role of MiRNA in cancer: pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2257: 375-422.
- [15] di Martino JS, Nobre AR, Mondal C, et al. A tumor-derived type III collagen-rich ECM niche regulates tumor cell dormancy[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(1): 90-107.
- [16] Zhang YX, Zhang YJ, Liang HF, et al. Serum N-terminal DDR1: a novel diagnostic marker of liver fibrosis severity[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2021, 9(5): 702-10.
- [17] Su H, Karin M. Collagen architecture and signaling orchestrate cancer development[J]. *Trends Cancer*, 2023, 9(9): 764-73.
- [18] Su H, Karin M. Multifaceted collagen-DDR1 signaling in cancer[J]. *Trends Cell Biol*, 2024, 34(5): 406-15.
- [19] Zhang XC, Hu YB, Pan YL, et al. DDR1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis through recruiting PSD4 to ARF6[J]. *Oncogene*, 2022, 41(12): 1821-34.
- [20] Jiang DJ, Gao XQ, Tan RL, et al. *Euphorbia* factor L1 suppresses breast cancer liver metastasis *via* DDR1-mediated immune infiltration[J]. *Aging*, 2023, 15(17): 9217-29.
- [21] Zhong X, Zhang WW, Sun TH. DDR1 promotes breast tumor growth by suppressing antitumor immunity[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(6): 2844-54.
- [22] Vella V, Giuliano M, Nicolosi ML, et al. DDR1 affects metabolic reprogramming in breast cancer cells by cross-talking to the insulin/IGF system[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 926.
- [23] Han Q, Xiao F, Ma LL, et al. DDR1 promotes migration and invasion of breast cancer by modulating the Src-FAK signaling[J]. *Neoplasma*, 2022, 69(5): 1154-64.
- [24] Belfiore A, Malaguarnera R, Nicolosi ML, et al. A novel functional crosstalk between DDR1 and the IGF axis and its relevance for breast cancer[J]. *Cell Adh Migr*, 2018, 12(4): 305-14.
- [25] Ravindran F, Koroth J, Manjunath M, et al. Curcumin derivative ST09 modulates the miR-199a-5p/DDR1 axis and regulates proliferation and migration in ovarian cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 23025.
- [26] Wu AH, Chen Y, Liu Y, et al. MiR-199b-5p inhibits triple negative breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting DDR1[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 4889-96.
- [27] Favreau AJ, Cross EL, Sathyanarayana P. MiR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p correlate with elevated expressions of PODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia[J]. *Am J Hematol*, 2012, 87(4): 442-6.
- [28] Zhou WD, Ding XY, Jin PH, et al. MiR-6838-5p affects cell growth, migration, and invasion by targeting GPRIN3 *via* the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer[J]. *Pathobiology*, 2020, 87(6): 327-37.
- [29] Zhai XQ, Wu Y, Zhang D, et al. MiR-6838-5p facilitates the proliferation and invasion of renal cell carcinoma cells through inhibiting the DMTF1/ARF-p53 axis[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2021, 53(2): 191-202.
- [30] Dou ZM, Lu F, Hu JJ, et al. MicroRNA-6838-5p suppresses the self-renewal and metastasis of human liver cancer stem cells through downregulating CBX4 expression and inactivating ERK signaling[J]. *Biol Chem*, 2023, 404(1): 29-39.

(编辑:余诗诗)