

miR-4324与Talin2在乳腺癌中高表达

高鹏¹, 朱海涛², 裴文浩², 许培海¹, 丁勇兴¹

¹蚌埠医学院附属蚌埠市第三人民医院普外科, 安徽 蚌埠 233099; ²蚌埠医学院癌症转化医学安徽省重点实验室, 安徽 蚌埠 233030

摘要:目的 探讨miR-4324对踝蛋白2(Talin2)调控和乳腺癌细胞的影响及临床意义。方法 利用免疫组化法检验Talin2在乳腺癌组织(BCT)和对应癌旁乳腺组织(PCBT)的表达,结合病理资料分析Talin2与乳腺癌预后及病理特征间的关联; qRT-PCR法测定miR-4324在BCT和PCBT的表达;人乳腺癌细胞株(SKBR-3)体外培养,分为Control对照组(正常培养)及相关转染组(转染相关片段):miR-4324 mimics组;miR-4324 inhibitor组;miR-4324 NC组;si-Talin2组;miR-4324 inhibitor+si-Talin2组。通过细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭实验,检测SKBR-3的生物学活性改变;通过qRT-PCR及Western-blot实验测定Talin2的表达;利用荧光素酶活性实验验证miR-4324对Talin2靶向表达;利用Transwell回复实验验证miR-4324调控Talin2影响SKBR-3细胞的迁移能力。结果 Talin2在BCT中的表达高于PCBT,并与淋巴结转移、HER-2的高表达有关($P<0.05$),与年龄、临床分期、组织学分级及雌、孕激素受体(ER、PR)的表达间无明显相关性($P>0.05$); miR-4324在BCT中表达较PCBT降低($P<0.01$);与Control组比较,miR-4324 mimics组SKBR-3细胞增殖降低,凋亡增多($P<0.01$),迁移和侵袭能力降低($P<0.05$);双荧光素酶报告基因检测证实,相对于Control组,miR-4324 mimics共转染可显著降低Talin2-3'-UTR WT报告质粒的荧光素酶活性($P<0.05$); miR-4324 mimics组中Talin2的Mrna和蛋白表达较Control组降低($P<0.05$);Transwell迁移实验结果显示,相对于Control组,SKBR-3细胞的迁移能力在miR-4324 inhibitor组中上升($P<0.01$);si-Talin2组中下降($P<0.01$);miR-4324 inhibitor+si-Talin2组中居中($P<0.05$)。结论 Talin2高表达与乳腺癌患者淋巴结转移及HER-2过表达相关,下调miR-4324能抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭与迁移,并诱导凋亡,其中抑制迁移可能是其靶向抑制Talin2表达实现的。

关键词:乳腺癌;miR-4324;踝蛋白2

Expression of miR-4324 and its targeted gene Talin2 in breast cancer

GAO Peng¹, ZHU Haitao², PEI Wenhao², XU Peihai¹, DING Yongxing¹

¹Department of General Surgery, Bengbu Third People's Hospital Affiliated to Bengbu Medical College, Bengbu 233099, China; ²Anhui Provincial Key Laboratory of Translational Cancer Research, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To investigate the regulatory effect of miR-4324 on ankyrin 2 (Talin2) expression and biological behaviors of breast cancer cells and the clinical implications of changes in miR-4324 and Talin2 expressions in breast cancer. **Methods** In breast cancer and adjacent tissues, the expressions of Talin2 and miR-4324 were examined with immunohistochemistry and qRT-PCR, respectively and the association of Talin2 expression levels with the prognosis and clinicopathological features of breast cancer patients was analyzed. The human breast cancer cell line SKBR-3 was transfected with miR-4324 mimic, miR-4324 inhibitor, si-Talin2, or both miR-4324 inhibitor and si-Talin2, and the changes in biological behaviors of the cells were examined; the cellular expression of Talin2 at the mRNA and protein levels were detected with qRT-PCR and Western blotting. Dual luciferase reporter gene assay was used to verify the targeting relationship between miR-4324 and Talin2. The effect of miR-4324-mediated regulation of Talin2 on SKBR-3 cell migration was assessed using Transwell assays. **Results** Talin2 expression was significantly higher in breast cancer tissues than in the adjacent tissues, and its expression level was correlated with lymph node metastasis and high HER-2 expression in breast cancer ($P<0.05$) but not with the patient's age, clinical stage, histological grade or expressions of estrogen and progesterone receptors ($P>0.05$). The expression of miR-4324 was significantly reduced in breast cancer tissues as compared with the adjacent tissues ($P<0.01$). In SKBR-3 cells, transfection with miR-4324 mimics significantly inhibited proliferation, migration and invasion ($P<0.05$) and promoted apoptosis ($P<0.01$) of the cells. Dual luciferase reporter gene assay confirmed that cotransfection with miR-4324 mimics significantly reduced luciferase activity of Talin2-3'-UTR WT reporter plasmid ($P<0.05$). Transfection of the cells with miR-4324 mimics significantly reduced mRNA and protein expressions of Talin2 ($P<0.05$). Transwell migration assay showed that the migration ability of SKBR-3 cells was significantly enhanced after transfection with miR-4324 inhibitor ($P<0.01$), lowered after transfection with si-Talin2 ($P<0.01$), and maintained at the intermediate level after co-transfection with miR-4324 inhibitor + si-Talin2 group ($P<0.05$).

Conclusions High expression of Talin2 is associated with lymph node metastasis and HER-2 overexpression in breast cancer patients. Down-regulation of miR-4324 inhibits the proliferation, invasion and migration and induces apoptosis of breast cancer cells, and the inhibitory effect of miR-4324 knockdown on breast cancer cell migration is mediated probably by targeted inhibition of Talin2 expression.

Keywords: breast cancer; miR-4324; Talin2

收稿日期:2022-03-28

基金项目:安徽省教育厅自然科学重大项目(KJ2019ZD28);蚌埠医学院科技计划重点项目(BYKY2019265ZD);蚌埠医学院面上项目攀登计划(2020bypd005)

作者简介:高鹏,硕士,E-mail: 395567514@qq.com

通信作者:丁勇兴,主任医师,硕士生导师,E-mail: dyx0105@163.com

2020年全球女性乳腺癌发病人数226.1万例,占全部恶性肿瘤的24.5%,致死率也高达15.5%,均位列首位^[1]。临床上乳腺癌首选手术治疗,跟据个体差异选择增加内分泌治疗及放化疗等。但部分患者发现不及时,导致复发和转移,预后较差^[2]。因此,早发现并及时给予临床干预是改善预后的积极手段。

miRNA是一种内生性、非编码的小分子RNA,长约19~25个nt^[3]。miRNA可通过靶基因的表达,从而影响细胞增殖、凋亡和侵袭等生物学活性^[4]。研究发现miR-4324通过靶向抑制RacGTP酶激活蛋白1基因在RCC细胞(肾细胞癌)中的表达,从而抑制RCC细胞的增殖^[5];通过调控靶基因瓣膜特异性核酸内切酶1(FEN1),抑制卵巢癌细胞生长,增加其凋亡率^[6]。经Targetscan分析发现,Talin2与miR-4324存在结合位点,可能为其潜在的靶基因之一。踝蛋白(Talin)是一类大的、多结构域的胞膜蛋白,参与合成粘着斑^[7]。Talin2表达的上调可以显著增加乳腺癌细胞的转移与侵袭力^[8]。

目前对于miR-4324及Talin2在乳腺癌组织中的表达以及与乳腺癌临床病理之间的相关性尚无报道。本研究通过分析miR-4324和Talin2在乳腺癌组织和癌旁乳腺组织中的表达情况,结合病理资料分析临床意义,为乳腺癌的早期诊断及预后评估提供相关标志物。

1 资料和方法

1.1 标本来源

本研究所选标本均来自蚌埠医学院附属蚌埠第三人民医院普外科及蚌埠医学院第一附属医院甲乳外科2020年10月~2021年12月通过手术治疗的15例乳腺浸润性导管癌的癌组织(BCT)及其癌旁组织(PCBT)的新鲜标本(PCBT需距离肿瘤组织边缘>5 cm)。纳入标准:经病理学检查确诊为乳腺癌的患者。排除标准:有其他恶性肿瘤史;有长期服用相关抗肿瘤药物史;有远处转移;有任何放化疗等相关治疗史。患者同意本研究方案并签署知情同意书,并经蚌埠医学院伦理委员会审批(伦科批字:2020第69号)。

1.2 标本处理

术中摘除组织后,用0.9%的生理盐水冲净血渍,于无菌操作下剖开组织,仔细确认后切取部分肿瘤组织及癌旁乳腺组织,两者大小1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm;放入10 mL无酶离心管中,并注入能没过组织的RNA保护液;将离心管放入液氮罐或冰盒中运输,后在-80 °C的条件下保存。收集的手术标本分成两份,其中15例样本用于术后的病理及免疫组化检查,符合样本要求的13例用于qRT-PCR检测miR-4324的表达。

1.3 一般资料与临床病理特征

收集的乳腺浸润癌患者均为女性,年龄43~87岁。

标本的病理结果已被两所医院的病理科确认。根据美国肿瘤联合会第8版乳腺癌分期标准(TNM法),其中临床分期为I~II期的患者共13人,III期共2人。淋巴结(+)5人,淋巴结(-)10人。

1.4 实验材料

SKBR-3(中科院细胞研究所);miR-4324 mimics(上海吉玛);新生胎牛血清(FBS)购自LONSA;DMEM培养基(Gibco);TRIzol试剂(Invitrogen);PCR试剂盒(Vazyme);Transwell小室(Corning);pmirGLO载体(GenePharma);焦碳酸二乙酯(DEPC)购自Sigma;兔抗人Talin2一抗(abclonal)。

1.5 实验步骤

1.5.1 免疫组化 将取到15例的乳腺组织进行石蜡包埋,后用机器切成约4 μm厚的石蜡切片;将切片脱蜡至水化,加入3%的H₂O₂,室温孵育20 min;用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3遍,修复抗原;37 °C条件下孵育一抗2 h, PBS冲洗3遍;相同条件孵育二抗1 h,清洗3遍;使用二氨基联苯胺(DAB)进行显色处理,镜下观察并拍照。Talin2染色结果的判定:当细胞膜、胞浆出现黄褐色、棕黄色颗粒时为判定依据,未着色、低于10%的细胞着色者记0分,高于10%则代表Talin2染色阳性,其中着色弱且无连续性记1分,着色中等、着色部分不连续记2分,着色强且连续性佳记3分。0~1分视为Talin2低表达,2~3分视为Talin2高表达。

1.5.2 细胞培养 人乳腺癌细胞SKBR-3置于10%灭活胎牛血清的DMEM培养基中,5% CO₂和37 °C细胞培养箱中培养;细胞融合度在90%左右时进行传代处理;根据具体生长情况予以换液或消化。

1.5.3 细胞转染 人乳腺癌细胞株(SKBR-3)体外培养,分为Control对照组(正常培养)及相关转染组(转染相关片段):miR-4324 mimics组;miR-4324 inhibitor组;miR-4324 NC组;si-Talin2组;miR-4324 inhibitor+si-Talin2组。在六孔板中接种SKBR-3细胞;配比转染试剂:A液为250 μL无血清培养基+5 μL Lipo 2000,B液为250 μL无血清培养基+5 μL mimics,A、B液混合均匀后静置一段时间即可;细胞融合度达在50%~60%时,根据分组,加入转染试剂和1.5 mL无血清培养基,轻轻摇匀后放入细胞培养箱中培养;6 h后,予以换液,加入10%灭活胎牛血清的DMEM培养基2 mL。

1.5.4 RNA的提取 细胞处理:采用0.25%-EDTA胰酶进行细胞消化,将得到的悬液于1500 g离心5 min,得到细胞沉淀;加入苯酚试剂(TRIzol)1 mL,静置20 min。组织处理:取出装有组织的离心管,解冻后将组织剪成适宜大小,将其与2~4颗钢珠球一起加入1.5 mL的无酶Ep管中,加入苯酚试剂1 mL,研磨,冰上10 min。提取RNA:将制备好装有细胞和组织的Ep管加入0.2 mL的三氯甲烷,震荡直至乳状,冰上5 min;12 000 g,4 °C离心

15 min;上清吸至新的Ep管中,加入0.5 mL异丙醇,相同条件下离心10 min,得到RNA沉淀;加入1.0 mL 75%乙醇洗涤沉淀,7600 g,4 °C离心5 min;沉淀中加入DEPC水溶解,-80 °C保存。

1.5.5 qRT-PCR检测 利用SYBR荧光染料法检测miR-4324的表达,miR-4324 RQ(相对表达量)的计算公式为: $RQ=2^{-\Delta\Delta CT}$,其中 $\Delta\Delta CT=(CT_{miR-4324}-CT_{U6RNA})_{BCT}-(CT_{miR-4324}-CT_{U6RNA})_{PCBT}$ 的均值。qRT-PCR检测Talin2表达量。根据试剂盒指示进行逆转录合成cDNA后进行PCR扩增。

1.5.6 细胞增殖实验 胰酶消化对数生长期的SKBR-3细胞,接种在96孔板,密度为 2×10^3 /孔;细胞融合达60%左右时予以转染,继续培养;分别与24、48、72、96 h时加入10 μ L的CCK-8溶液,孵育1 h;酶标仪测定细胞的吸光度值 A_{450nm} 。

1.5.7 细胞凋亡检测 将处于对数生长期的细胞用胰酶消化,接种于6孔板内,37 °C细胞培养箱内培养;当细胞生长至60%~70%左右时按分组处理,继续培养24 h;加入无EDTA胰酶消化5~10 min,终止消化;1500 r/min离心3~5 min,弃上清,1% FBS调整细胞浓度;加入异硫氰酸荧光素(FITC)和藻红蛋白(PE),避光孵育30 min;上机检测。

1.5.8 细胞迁移实验(划痕实验) 对数生长期的SKBR-3细胞调整至适宜浓度;培养24 h后移液枪头垂直划痕,显微镜观察并拍照;继续培养48 h,观察并记录SKBR-3细胞的迁移活动情况。

1.5.9 Transwell细胞侵袭、迁移实验 带有基质胶预涂的24孔Transwell小室(迁移实验不铺胶)下室加入无血清含10%胎牛血清的培养基600 μ L;消化各组SKBR-3细胞,无血清DMEM培养基重悬,调整细胞浓度,取细胞悬液100 μ L加入transwell上室;培养箱中孵育24 h后,取出小室弃上清液,用棉签擦去小室内残余细胞;4%的多聚甲醛溶液固定;吉姆萨染色,倒置显微镜下(100 \times)随机计数5个视野中穿膜细胞数并拍照。

1.5.10 荧光素酶活性检测 合成含有miR-4324靶点的Talin2野生型(WT)或突变型(MUT)片段,并克隆入pmirGLO载体,构建pmir-GLO-Talin2-WT和pmir-GLO-Talin2-MUT荧光素酶报告载体;用Lipofectamine 2000将荧光素酶报告载体和miR-4324模拟物/miR-4324阴性对照组(NC)共转染SKBR-3细胞;转染48 h后,用双荧光素酶检测试剂盒分别检测萤火虫酶活性和海肾荧光活性。

1.5.11 Western blot检测蛋白表达 将对数生长期的细胞消化、离心、洗涤后加入蛋白裂解液(裂解液:PMSF=100:1),置于冰面50 min 4 °C,12 000 g离心15 min,取上清检测蛋白浓度;配置BCA工作液(A液:B液=50:1);

将0、1、2、4、8、12、16、20 μ L的蛋白标准品与2 μ L的待测样品分别加到96孔板中,并用PBS液补足至20 μ L,再加入200 μ L的BCA工作液,37 °C孵育30 min;酶标仪测 A_{562nm} 值,做蛋白标准曲线,计算待测蛋白浓度;SDS-PAGE电泳、转膜后,一抗孵育过夜,TBST缓冲液洗膜3次,20 min/次;二抗(稀释度1:5000)37 °C孵育2 h,洗膜,凝胶成像系统拍照并记录。

1.6 统计学分析

SPSS 21.0软件统计分析,使用Fisher确切概率法、配对*t*检验,Graphpad 8.3.0软件作图,均数 \pm 标准差表示计量资料,*t*检验表示两样本均数间差异, $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。所有相关实验均独立进行3次。

2 结果

2.1 Talin2在乳腺癌组织中高表达

用石蜡包埋的BCT及PCBT行免疫组化法来测定Talin2的表达水平。结果发现,Talin2在BCT中主要表达呈阳性,PCBT中表达为阴性(图1)。

2.2 乳腺癌患者中Talin2表达与临床病理特征的相关性分析

结合相关病理资料,用统计学方法分析相关性,结果发现Talin2的表达在年龄、组织学分级、临床分期、ER和PR表达差异等病理参数中的差异无统计学意义($P>0.05$),而在淋巴结转移、HER-2的表达差异有统计学意义($P<0.05$,表1)。

2.3 miR-4324在乳腺癌组织中表达下调

利用qRT-PCR检测乳腺癌组织(BCT)和癌旁组织(PCBT)中miR-4324的差异表达。结果发现,相对于PCBT,miR-4324在BCT中的表达下调 -10.27 ± 1.66 vs -6.64 ± 2.49 ($P<0.01$,图2)。

2.4 miR-4324抑制SKBR-3细胞的增殖能力

SKBR-3细胞中转染miR-4324 mimics后,利用qRT-PCR技术检测miR-4324的表达,结果发现,相对于对照组(Control),miR-4324阴性对照组(Negative control NC)miR-4324的表达差异无统计学意义,miR-4324 mimics组差异有统计学意义 119.04 ± 19.23 vs 1.00 ± 0.00 ($P<0.01$)。利用CCK-8实验检测miR-4324对细胞增殖的影响,结果发现,相对于Control组,miR-4324 mimics后吸光度值明显降低,24、48、72、96 h时,Control组与miR-4324 mimics组的吸光度值分别为: 0.28 ± 0.04 vs 0.25 ± 0.03 ; 0.64 ± 0.01 vs 0.44 ± 0.02 ; 1.02 ± 0.01 vs 0.65 ± 0.03 ; 1.14 ± 0.03 vs 0.81 ± 0.02 ,差异具有统计学意义($P<0.01$,图3)。

2.5 miR-4324诱导SKBR-3细胞的凋亡

利用流式细胞术检测miR-4324对细胞凋亡的影响,结果发现,相对于Control组,miR-4324 mimics组中

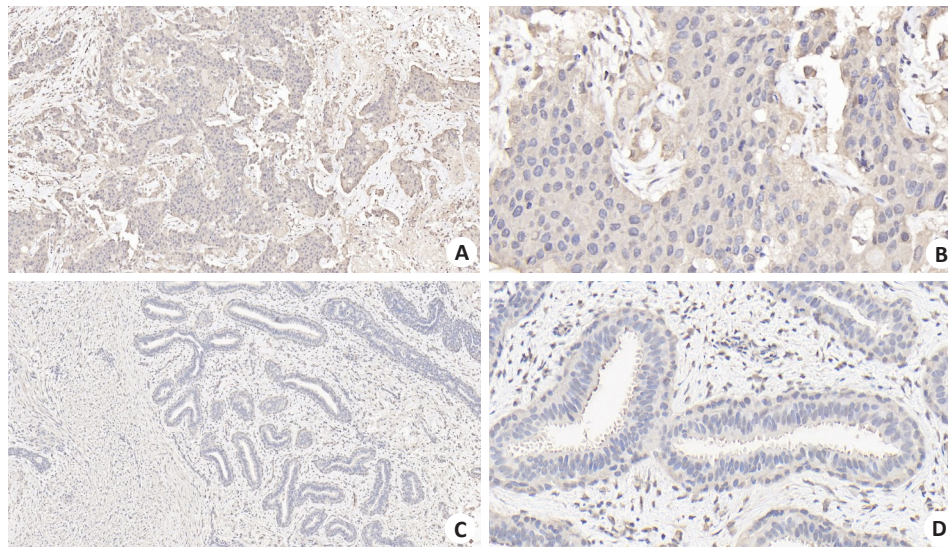


图1 免疫组化检测BCT及其PCBT中Talin2的表达

Fig.1 Immunohistochemical detection of Talin2 expression in breast cancer tissues (A, B) and adjacent tissues (C, D) (Original magnification: A, C: ×10; B, D: ×40).

表1 Talin2表达与乳腺癌患者临床病理间的关联

Tab.1 Association between Talin2 expression and clinicopathological features of breast cancer patients (n=15)

Variable	n	Talin2 expression (n)		P
		High expression	Low expression	
Age (year)				
≤45	1	1	0	1.000
>45	14	8	6	
Grade				
I-II	11	6	5	0.604
III	4	3	1	
Stage				
I-II	13	8	5	1.000
III-IV	2	1	1	
Lymph node metastasis				
-	10	4	6	0.044
+	5	5	0	
Estrogen receptor				
-	4	3	1	0.604
+	11	6	5	
Progesterone				
-	5	3	2	1.000
+	10	6	4	
HER-2				
Low	10	4	6	0.044
High	5	5	0	

SKBR-3 细胞的凋亡增加(13.78±1.15)% vs (3.85±0.64)%($P<0.01$,图4)。

2.6 miR-4324抑制SKBR-3细胞的迁移和侵袭能力

划痕与侵袭实验结果显示,48 h时,相对于对照组

(Control), miR-4324 mimics 组中 SKBR-3 细胞的迁移能力(7.73±1.60)% vs (31.9±2.82)%($P<0.01$,图5)和侵袭能力均下降 81.33±30.83 vs 174.00±64.09($P<0.05$,图6)。

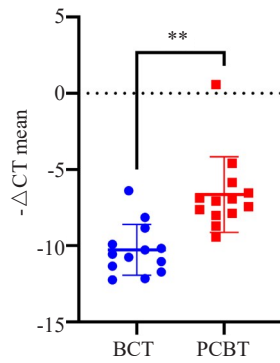


图2 miR-4324在乳腺癌组织(BCT)和癌旁组织(PCBT)的表达情况

Fig.2 miR-4324 expression in breast cancer tissues (BCT) and adjacent tissues (PCBT) detected by qRT-PCR. ** $P < 0.01$ BCT vs PCBT.

2.7 miR-4324 mimics靶向抑制Talin2的表达

为了确定miR-4324的潜在靶基因,经TargetScan分析,表明Talin2与miR-4324存在结合位点,可能为其潜在的靶点之一(图7)。构建含Talin2 3'-UTR与miR-4324结合位点野生型(WT)和突变型(MUT)的双荧光素酶报告载体(图8A),荧光素酶活性实验结果表明,相对于control组,miR-4324 mimics共转染可显著降低Talin2-3'-UTR WT报告质粒的荧光素酶活性(1.00 ± 0.04 vs 0.74 ± 0.10 , $P < 0.05$),而Talin2-3'-UTR MUT报告质粒的荧光素酶活性未见统计学差异(1.02 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.07 , $P > 0.05$,图8B);利用qRT-PCR及Western blot技术检测miR-4324对Talin2表达的影响,结果发现,相对于control组,miR-4324 mimics组Talin2

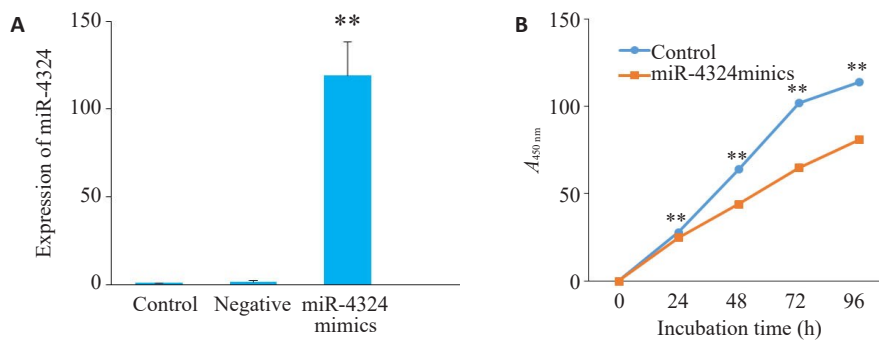


图3 miR-4324 mimics对SKBR-3细胞增殖的影响

Fig.3 Effect of miR-4324 mimics on proliferation of SKBR-3 cells. A: qRT-PCR to verify the transfection efficiency of miR-4324 mimics. B: Effect of miR-4324 mimics on proliferation of SKBR-3 cells detected by CCK-8 assay. ** $P < 0.01$ vs control group.

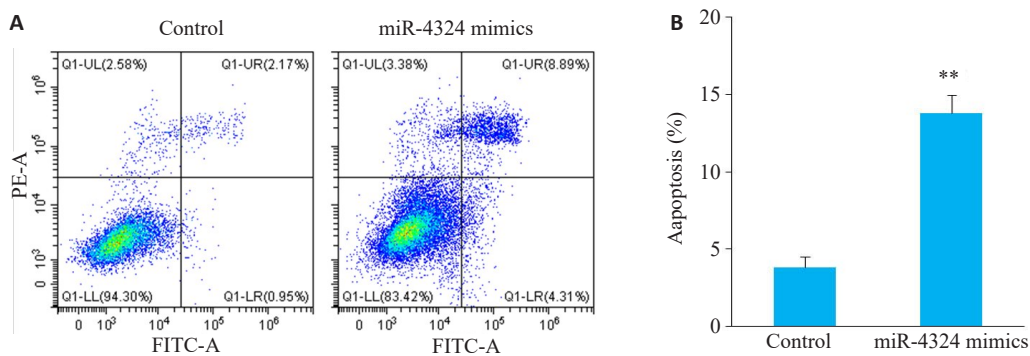


图4 miR-4324 mimics诱导SKBR-3细胞的凋亡

图4 Effect of miR-4324 mimics on apoptosis of SKBR-3 cells. A: Effect of miR-4324 on apoptosis detected by flow cytometry; B: Quantitative analysis of the results. ** $P < 0.01$.

的mRNA(0.82 ± 0.27 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$,图9A)和蛋白表达降低(0.68 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.10 , $P < 0.05$,图9B、C)。

2.8 miR-4324通过靶向抑制Talin2来抑制乳腺癌细胞SKBR-3细胞的迁移能力

为了验证miR-4324影响乳腺癌细胞的迁移能力是

通过Talin2发挥作用,我们进行了Transwell迁移实验。结果提示,相对于对照组(Control),miR-4324 inhibitor组中SKBR-3细胞的迁移能力增强(351.6 ± 45.0 vs 271.3 ± 68.8 , $P < 0.01$);si-Talin2组中SKBR-3细胞的迁移能力降低(151.2 ± 18.2 vs 271.3 ± 68.8 , $P < 0.01$);

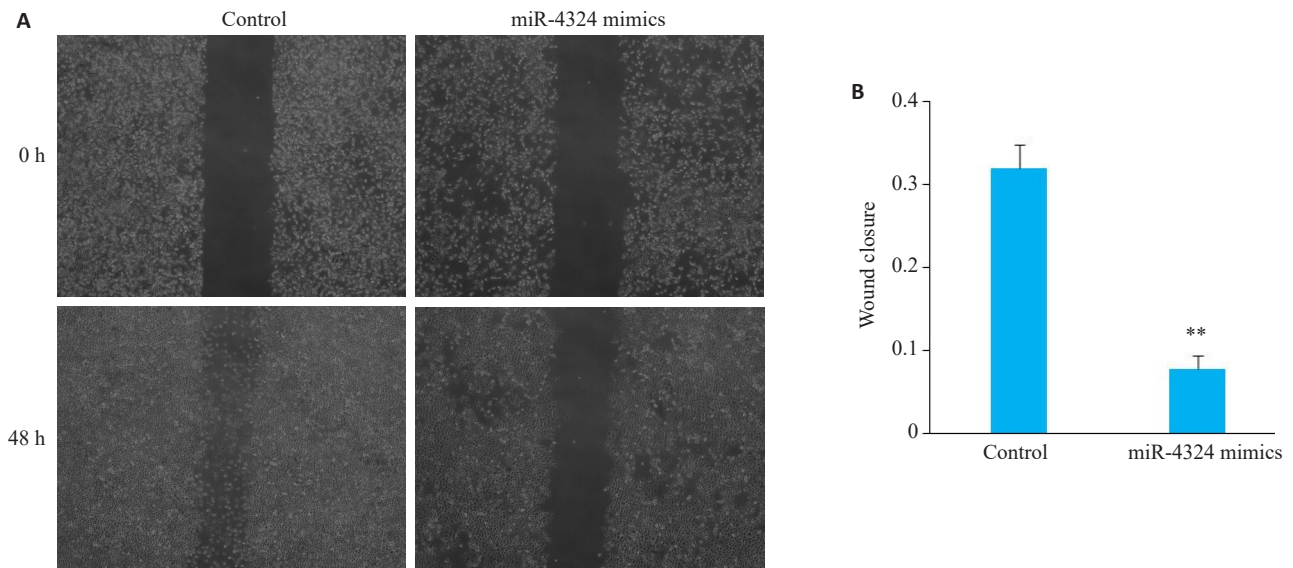


图5 miR-4324 mimics对SKBR-3细胞迁移能力的影响

Fig.5 Effect of miR-4324 mimics on the migration capacity of SKBR-3 cells. **A:** Scratch experiments (×100). **B:** Quantitative analysis of the results. ** $P < 0.01$.

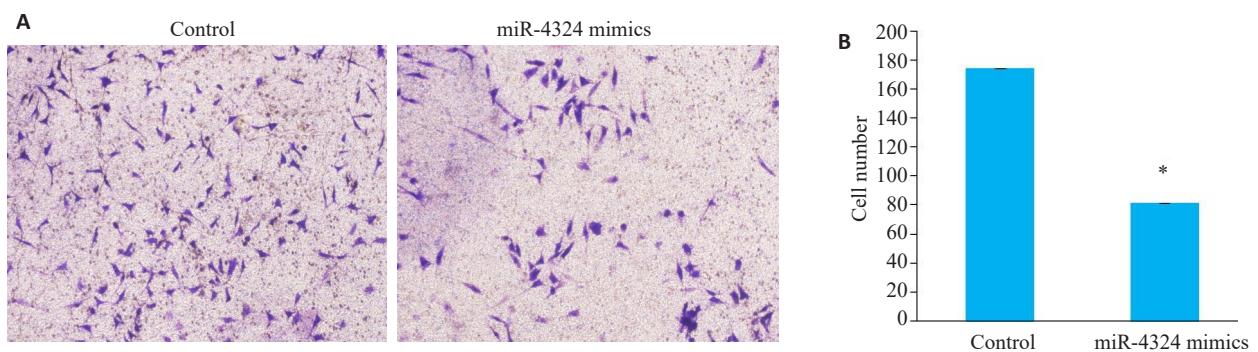


图6 miR-4324 mimics对SKBR-3细胞侵袭能力的影响

Fig.6 Effect of miR-4324 mimics on invasive ability of SKBR-3 cells. **A:** Invasion experiments (×100). **B:** Quantitative analysis of the results. * $P < 0.05$.

		Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P _{CT}	Predicted relative K _D
Position 240-247 of TLN2 3' UTR	5'	...UCAUGCCUCACCGUGUCUCAGGA...							
hsa-miR-4324	3'	AAUUCCAAUCCAGAGUCCC	8mer	-0.03	48	-0.03	0	N/A	N/A

图7 TargetScan预测的miR-4324与Talin2互补结合位点图

Fig.7 Complementary binding sites of miR-4324 and Talin2 predicted by TargetScan.

miR-4324 inhibitor+si-Talin2组中SKBR-3细胞的迁移能力居中(201.5±27.2 vs 271.3±68.8, $P < 0.05$); (201.5±27.2 vs 351.6±45.0, $P < 0.01$, 图10A、B)

3 讨论

乳腺癌是一种分布广泛,且致死率偏高的恶性肿瘤^[9]。临床上急切需求新的诊断方法与治疗方案,提

高乳腺癌早期检出率,以及尽可能降低治疗损伤及副作用,达到“精准治疗”^[10]。乳腺癌相关病理生理是一个极为复杂的过程,涉及到多种基因表达的差异以及信号通路的变化^[11],因此尚需寻找关键的调控因子。

目前研究发现,miRNA在肿瘤的发生发展、耐药机制以及早期诊断方面的发挥关键的作用^[12]。miRNA的异常表达可以直接参与肿瘤细胞的增殖、迁移、免疫以

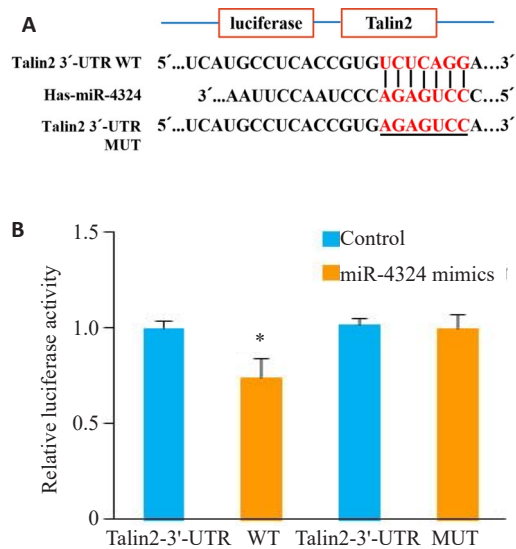


图8 荧光素酶活性实验验证 miR-4324 与 Talin2 的关系
Fig.8 Luciferase activity assay for validating the relationship between miR-4324 and Talin2. A: Potential binding site between miR-4324 and the 3'-UTR region of Talin2. B: Dual luciferase reporter gene validation of miR-4324 target gene Talin2. * $P < 0.05$.

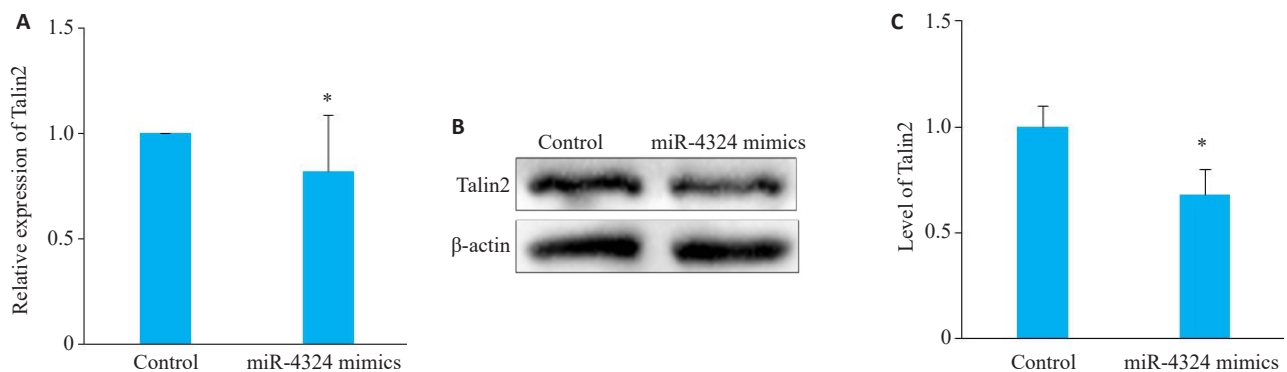


图9 通过 Western-blot 及 qRT-PCR 检测 SKBR-3 细胞中 Talin2 的表达水平

Fig.9 Detection of Talin2 expression in SKBR-3 cells by qRT-PCR (A) and Western blotting (B). C: Quantitative analysis of the results of Western blotting. * $P < 0.05$.

在乳腺癌中 miR-4324 可能作为一个潜在的抑癌基因发挥作用。但关于 miRNA-4324 在乳腺癌中的作用及相关靶蛋白尚未见报道。利用 Targetscan 数据库分析,发现 Talin2 与 miR-4324 存在潜在的结合位点,预测 Talin2 是 miR-4324 的靶基因之一。

Talin2 在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用^[23-25],可影响肿瘤细胞的侵袭、血管生成,以及转移等,从而加速肿瘤细胞轴突树突的形成、运动以及通过血管渗入组织导致肺转移^[26];阻断乳腺癌细胞中 Talin2 的表达后,细胞核与染色质明显缩小,且形态学也发生明显改变,表明低表达 Talin2 诱导肿瘤细胞凋亡,并抑制细胞的转移和侵袭力^[27]。

及细胞凋亡等生理过程^[13-15]。研究表明,miRNA 可通过与特定的靶点相结合来调控靶基因的表达,从而参与肿瘤细胞生物学活性的调控^[16]。癌基因 P-21 激活激酶 1 (PAK1) 是 miR-494 的直接靶点,乳腺癌中 miR-494 表达下调,导致 PAK1 的表达增加,从而诱导乳腺癌细胞的增殖、转移和侵袭^[17]; miR-4443 高表达可通过抑制其靶基因磷脂酰乙醇胺结合蛋白 1 的表达来诱导乳腺癌的转移^[18]。因此,miRNA 有望成为乳腺癌诊断及治疗中的关键靶点。研究发过表达 miR-4324 抑制 Rac-GTP 酶激活蛋白 1,拮抗膀胱癌的生长^[19];食管鳞癌细胞中,miR-4324 可通过降低内粘着斑激酶 (FAK) 的表达,抑制食管癌细胞的侵袭等能力^[20]。乳腺癌中,通过临床样本横断面研究,发现乳腺癌组织中 miR-4324 表达下调^[21]。在三阴乳腺癌中,发现 PTEN 缺失与 miR-4324、miR-125b、miR-145 和 miR136 等表达下调与乳腺癌转移相关,可预测不良预后^[22]。本研究发现 miR-4324 在乳腺癌组织中的表达明显低于癌旁组织,过表达 miR-4324 可抑制细胞的增殖、侵袭和迁移能力,并诱导凋亡,表明

临床上,肿瘤组织的病理学特征可作为判断乳腺癌类型、临床分期、分子分型和预后等^[28],其中淋巴结转移与术后复发关系密切,激素受体的表达及 HER-2 受体表达水平是确定内分泌及靶向治疗的关键指标^[29]。本研究发现,在 miR-4324 低表达的乳腺癌组织中,Talin2 表达呈阳性,而对应的癌旁组织表达几乎为阴性,表明 Talin2 在乳腺癌中的表达增高,且 miR-4324 与 Talin2 成负相关,过表达 miR-4324 可靶向抑制 Talin2 的表达。通过临床病理特征的相关性分析,发现 Talin2 与淋巴结的转移、HER-2 的高表达呈正相关。Transwell 的回复实验证明了 miR-4324 通过靶向调控 Talin2 抑制乳腺癌细胞 SKBR-3 细胞的迁移能力。Wen^[30]等也证实 Talin2

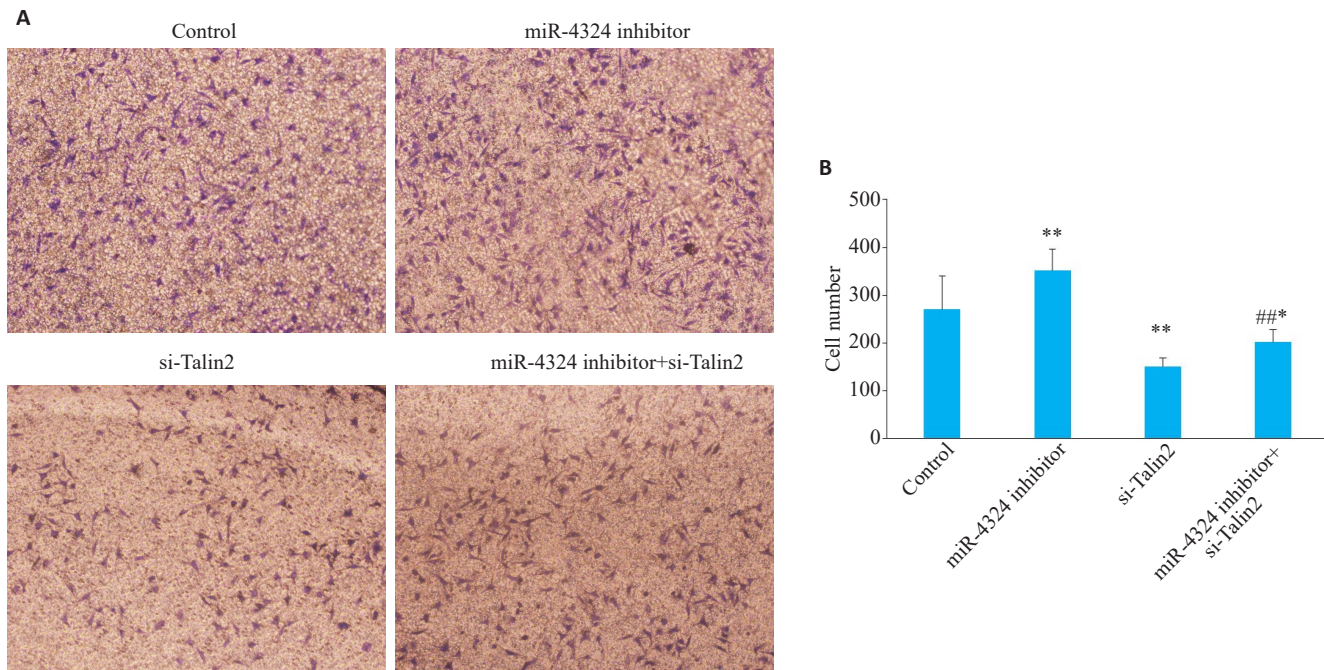


图10 miR-4324 inhibitor调控Talin2对SKBR-3细胞迁移的影响

Fig.10 Effect of miR-4324 inhibitor-mediated regulation of Talin2 on migration of SKBR-3 cells. A: Transwell migration experiment (×100).

B: Quantitative analysis of the results. *P<0.05, **P<0.01 vs control group; ##P<0.01 vs miR-4324 inhibitor group.

表达的上调可以显著增加乳腺癌肿瘤细胞的侵袭及转移能力。

综上所述,本研究证实在乳腺癌中,miR-4324低表达而Talin2表达上调,与乳腺癌患者的淋巴结转移和HER-2表达呈正相关;过表达miR-4324可抑制乳腺癌细胞的增殖、侵袭与迁移,并诱导凋亡;miR-4324通过靶向抑制Talin2来抑制乳腺癌细胞SKBR-3细胞的迁移能力。进一步阐明miR-4324及其靶基因Talin2的作用机制,可为乳腺癌患者的早期诊断以及个体化、精准化治疗提供理论依据和分子标志物。

参考文献:

[1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.

[2] Traves KP, Cokenakes SEH. Breast cancer treatment[J]. Am Fam Physician, 2021, 104(2): 171-8.

[3] Yang LX, Song C, Chen Y, et al. Circular RNA circ_0103552 forecasts dismal prognosis and promotes breast cancer cell proliferation and invasion by sponging miR-1236 [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 15553-60.

[4] Wang YY, Yan L, Zhang LY, et al. NT21MP negatively regulates paclitaxel-resistant cells by targeting miR-155-3p and miR-155-5p via the CXCR4 pathway in breast cancer[J]. Int J Oncol, 2018, 53(3): 1043-54.

[5] 张庆松,李文贤,郭磊,等. miR-4324通过作用于RacGAP1抑制人RCC细胞的增殖[J]. 临床泌尿外科杂志, 2021, 36(12): 954-60.

[6] Wu HX, Yan YL, Yuan JL, et al. miR-4324 inhibits ovarian cancer

progression by targeting FEN1 [J]. J Ovarian Res, 2022, 15(1): 32.

[7] Haining AWM, Lieberthal TJ, del Río Hernández A. Talin: a mechanosensitive molecule in health and disease [J]. FASEB J, 2016, 30(6): 2073-85.

[8] Li LQ, Li X, Qi L, et al. The role of talin2 in breast cancer tumorigenesis and metastasis[J]. Oncotarget, 2017, 8(63): 106876-87.

[9] 马丹丹,刘坤,齐晓伟. 2018年全球癌症统计: 乳腺癌发病和死亡人数统计[J]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2018, 12(6): 375.

[10] 翟婧彤,吕丹,马飞. 2020年度乳腺癌治疗新进展[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(1): 24-33.

[11] Mirbeik-Sabzevari A, Tavassolian N. Ultrawideband, stable normal and cancer skin tissue phantoms for millimeter-wave skin cancer imaging[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2019, 66(1): 176-86.

[12] Lukianova NY, Borikun TV, Chekhun VF. Tumor microenvironment-derived miRNAs as prognostic markers of breast cancer [J]. Exp Oncol, 2019, 41(3): 242-7.

[13] Li Y, Zhang LY, Dong ZY, et al. microRNA-155-5p promotes tumor progression and contributes to paclitaxel resistance via TP53INP1 in human breast cancer[J]. Pathol Res Pract, 2021, 220: 153405.

[14] Wang HF, Dong ZY, Yan L, et al. The N-terminal polypeptide derived from vMIP-II exerts its antitumor activity in human breast cancer through CXCR4/miR-7-5p/Skp2 pathway[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(12): 9474-86.

[15] Wang WR, Zhang LY, Wang YY, et al. Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(10): e3071.

[16] Shi M, Liu D, Duan HJ, et al. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis [J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(4): 785-99.

- [17] Zhan MN, Yu XT, Tang J, et al. microRNA-494 inhibits breast cancer progression by directly targeting PAK1 [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(1): e2529.
- [18] 王金焱, 王晋秋, 顾 途, 等. miR-4443 通过抑制 PEBP1 的表达促进乳腺癌细胞的迁移和侵袭 [J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(12): 1712-9.
- [19] Ge QQ, Lu MX, Ju LG, et al. miR-4324-RACGAP1-STAT3-ESR1 feedback loop inhibits proliferation and metastasis of bladder cancer [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(12): 3043-55.
- [20] Zhou J, Zhu JT, Jiang GJ, et al. Downregulation of microRNA-4324 promotes the EMT of esophageal squamous-cell carcinoma cells *via* upregulating FAK [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4595-604.
- [21] Danková Z, Grendár M, Dvorská D, et al. miRNA profile of luminal breast cancer subtypes in Slovak women [J]. *Ceska Gynekol*, 2020, 85(3): 174-80.
- [22] Wang DY, Gendoo DMA, Ben-David Y, et al. A subgroup of microRNAs defines PTEN-deficient, triple-negative breast cancer patients with poorest prognosis and alterations in RB1, MYC, and Wnt signaling [J]. *Breast Cancer Res*, 2019, 21(1): 18.
- [23] Malla RR, Vempati RK. Talin: a potential drug target for cancer therapy [J]. *Curr Drug Metab*, 2020, 21(1): 25-32.
- [24] Qi L, Kolodziej T, Rajfur Z, et al. Roles of Talin2 in traction force generation, tumor metastasis and cardiovascular integrity [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, 19(11): 1071-8.
- [25] Qi L, Jafari N, Li X, et al. Talin2-mediated traction force drives matrix degradation and cell invasion [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(19): 3661-74.
- [26] Gligorijevic B, Wyckoff J, Yamaguchi H, et al. N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors [J]. *J Cell Sci*, 2012, 125(Pt 3): 724-34.
- [27] Liang YF, Chen HW, Ji L, et al. Talin2 regulates breast cancer cell migration and invasion by apoptosis [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(1): 285-93.
- [28] Rakha EA, Pareja FG. New advances in molecular breast cancer pathology [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 72: 102-13.
- [29] 熊荣国, 田野, 田 振. 乳腺癌预后分子生物标志物的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(19): 3150-4.
- [30] Wen ZW, Liang YF, Deng SM, et al. Talin2 regulates invasion of human breast cancer MDA-MB-231 cells via alteration of the tumor microenvironment [J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(6): 4835-42.

(编辑:孙昌朋)