

miR-335 通过下调 Fra-1 表达抑制人乳腺癌细胞增殖机制的实验研究

刘 冲¹, 张 静^{2a}, 李 胜¹, 赵 奇^{2b}

(1. 湖北理工学院附属妇幼保健院(儿童医院)/鄂东医疗集团黄石市妇幼保健院医学检验科, 湖北黄石 435000; 2. 黄石爱康医院 a. 医学检验科; b. 医学骨科, 湖北黄石 435000)

摘要: 目的 探讨微小核糖核酸(microRNA, miR)-335对人乳腺癌细胞增殖能力的影响, 以及其可能存在的机制。方法 体外培养乳腺癌细胞及正常乳腺组织细胞, 检测 miR-335 及 Fros 相关抗原 1(fros related antigen-1, Fra-1) 的表达量; 体外转染 miR-335 mimics 后, 通过细胞活力检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞的增殖能力, 检测 Fra-1 的表达变化及下游细胞增殖相关蛋白分子基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、血管内皮生长因子 C(vascular endothelial growth factor- C, VEGF-C) 的表达量; 生物信息学预测及双荧光素报告基因验证 Fra-1 为 miR-335 作用靶基因。结果 乳腺癌细胞中 miR-335 的表达量 (0.755 ± 0.034) 低于正常乳腺细胞 (1.495 ± 0.029), Fra-1 蛋白的表达量 (2.347 ± 0.120) 高于正常乳腺细胞 (1.319 ± 0.038), 差异均有统计学意义 ($t=0.075, 4.191$, 均 $P < 0.001$)。转染 miR-335 mimic 后 48, 72 h 乳腺癌细胞增殖能力 ($0.881 \pm 0.062, 0.887 \pm 0.082$) 低于对照组细胞 ($1.326 \pm 0.051, 1.493 \pm 0.038$), 差异均有统计学意义 ($t=44.096, 59.307$, 均 $P < 0.001$); 转染 miR-335 mimic 后乳腺癌细胞中 Fra-1 的蛋白表达量 (0.567 ± 0.091) 低于未转染细胞 (2.347 ± 0.204), 差异有统计学意义 ($t=3.763, P < 0.001$); 转染 miR-335 mimic 后细胞中 MMP-9 (0.469 ± 0.027), VEGF-C (0.540 ± 0.041) 的蛋白表达量低于对照组 ($0.958 \pm 0.058, 1.024 \pm 0.171$), 差异均有统计学意义 ($t=1.953, 7.856$, 均 $P < 0.001$); 荧光素报告基因实验结果显示 miR-335 下调 Fra-1 启动子核心转录区域 (-164 ~ -52nt) 的转录活性。结论 miR-335 通过抑制 MMP-9 和 VEGF-C 的表达, 并下调 Fra-1 启动子转录活性, 抑制了体外乳腺癌细胞的增殖。

关键词: 微小核糖核酸-335; Fos 相关抗原 1; 乳腺癌; 基因表达

中图分类号: R737.9; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2022) 05-076-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2022.05.016

Research of miR-335 Inhibited Proliferation of Human Breast Cancer Cells by Down-Regulated Fra-1 Expression

LIU Chong¹, ZHANG Jing^{2a}, LI Sheng¹, ZHAO Qi^{2b}

(1. Department of Clinical Laboratory, Hubei Institute of Technology Affiliated Maternal and Child Health Care Hospital (Children's Hospital)/Huangshi Maternal and Child Health Care Hospital of Edong Healthcare, Hubei Huangshi 435000, China; 2a. Department of Clinical Laboratory; 2b. Department of Orthopedics, Huangshi Aikang Hospital, Hubei Huangshi 435000, China)

Abstract: Objective To explore the effect of microRNA (miR)-335 on the proliferation of human breast cancer cells and its possible mechanism. **Methods** Breast cancer cells and normal breast tissue cells were cultured in vitro, and the expression of miR-335 and Fros related antigen-1 (Fra-1) were detected. MiR-335 mimics were transfected into breast cancer cells, the proliferation ability of breast cancer cells was detected by cell counting kit-8 (CCK-8). Real-time PCR and Western blotting were used to detect the expression of Fra-1 mRNA and protein, and detected the expression of cell proliferation-related molecules matrix metalloproteinase 9(MMP-9) and vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C); Bioinformatics prediction and luciferase reporter gene assay were confirmed that Fra-1 was the potential target genes of miR-335. **Result** The expression level of miR-335 in breast cancer cells (0.755 ± 0.034), which was lower than that in normal breast cells (1.495 ± 0.029), the expression level of Fra-1 protein (2.347 ± 0.120), which was higher than that in normal breast cells (1.319 ± 0.038), the differences were statistically significant ($t=0.075, 4.191$, all $P < 0.001$). MiR-335 mimic was transfected into breast cancer cells and cultured for

基金项目: 湖北省卫生健康科研基金项目(WJ2019H203)。

作者简介: 刘冲(1987-), 男, 硕士, 主管技师, 主要从事肿瘤分子诊断研究, E-mail: 39662238@qq.com。

通讯作者: 赵奇, 硕士, 主治医师, E-mail: 649921632@qq.com。

48 and 72 hours, the proliferation ability of breast cancer cells were 0.881 ± 0.062 and 0.887 ± 0.082 , which were lower than that of control cells by 1.326 ± 0.051 and 1.493 ± 0.038 , the differences were statistically significant ($t=44.096, 59.307$, all $P < 0.001$). The protein expression of Fra-1 in breast cancer cells which transfected with miR-335 mimic was 0.567 ± 0.091 , which was lower than that untransfected cells (2.347 ± 0.204), the difference was statistically significant ($t=3.763$, $P < 0.001$). MiR-335 mimic was transfected into breast cancer cells, the protein expressions of MMP-9 and VEGF-C in the cells were 0.469 ± 0.027 and 0.540 ± 0.041 , which were lower than the control group by 0.958 ± 0.058 and 1.024 ± 0.171 , the differences were statistically significant ($t=1.953, 7.856$, all $P < 0.001$). Luciferase reporter gene assay showed that miR-335 could down-regulate the transcription activity of the core transcription region of Fra-1 promoter ($-164 \sim -52$ nt). **Conclusion** MiR-335 inhibited the proliferation of breast cancer cells in vitro by down-regulating the expression of MMP-9, VEGF-C and the transcriptional activity of Fra-1 promoter.

Keywords: microRNA-335; fros related antigen-1; breast cancer; gene expression

乳腺癌 (breast cancer) 是一种高发于女性的恶性肿瘤,我国近年来呈现出高发趋势,乳腺癌的发生发展与体内多种癌基因的活化密切相关^[1]。微小核糖核酸 (microRNA, miR) 是一类参与体内基因表达的内源性单链小分子 RNA 片段,参与体内多种生理病理过程的调控^[2]。研究表明,miR-335 在不同类型的肿瘤细胞中表达存在差异,在乳腺癌、胃癌、肝癌等多种癌细胞中表达下降,可以抑制上述肿瘤细胞的侵袭转移^[3];原癌基因 Fros 相关抗原-1(fros related antigen-1, Fra-1) 是 FOS 基因家族的一员,其表达产物是转录因子激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1) 的重要组成部分, Fra-1 参与调控体内肿瘤细胞的分化凋亡,与肿瘤的转移、血管生成密切相关^[4]。本研究通过上调 miR-335 在乳腺癌细胞中的表达,探讨 miR-335 在调控乳腺癌细胞增殖相关基因 Fra-1 的表达及 miR-335 影响 Fra-1 启动子转录的分子机制,为后续研究针对 miR-335 和 Fra-1 靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 人乳腺癌细胞系 MCF-7, 人正常乳腺细胞系 MCF-10A 均购于美国模式菌种收集中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。

1.2 仪器与试剂 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR 试剂盒、Lipofectamine 2000 转染脂质体试剂盒 (Invitrogen 公司); Fra-1, MMP-9, VEGF-C 鼠源单克隆抗体 (Cell Signaling 公司); miR-335 mimic 及 mimic control (广州锐博公司); CCK-8 试剂盒 (上海汉恒生物有限公司), 荧光素酶报告基因试剂盒 (美国 Promega 公司); 引物由上海生物工程公司合成; 胎牛血清 (Sigma 公司); DMEM 培养液 (Gibco 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养: 复苏 MCF-7 和 MCF-10A 细胞, 置于 37°C , 5ml/dl CO_2 培养箱中, 细胞培养使用含 10g/dl 胎牛血清的 DMEM 培养液, 待细胞生长至对数生长期使用 0.25g/dl 的胰酶消化, 抽提总 RNA

及总蛋白备用。

1.3.2 细胞转染: 使用胰酶消化处于对数生长期的 MCF-7 细胞, 将细胞密度调整至 $2 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔板中培养, 24h 后将浓度为 50nmol/L 的 miR-335 mimic 转染细胞, 同时设转染 mimic control 的细胞为对照组, 48h 后提取细胞总 RNA, 总蛋白用于后续实验。

1.3.3 细胞增殖实验: miR-335 mimic 转染 MCF-7 细胞, 48h 后消化细胞并计数, 转种到 96 孔板中, 向贴壁细胞中加入 $10\mu\text{l}/\text{孔}$ 的 CCK-8 试剂溶液, 待培养 24, 48, 72h 后用酶标仪测定 450nm 处的吸光度数据绘制细胞生长曲线。

1.3.4 蛋白检测: 提取各实验组和对照组培养细胞的总蛋白, 测定提取蛋白的浓度, 按照 Western-blot 法检测各组蛋白表达水平。

1.3.5 mRNA 检测: 收集转染后的各组细胞, 总 RNA 提取依据 Trizol 试剂盒说明书进行, Invitrogen 试剂盒说明书进行逆转录反应获取 cDNA 进行 RT-PCR 扩增检测, 引物序列见表 1。

1.3.6 Fra-1 启动子转录活性检测: 分别构建 Fra-1 启动子双荧光霉素报告载体 (命名为 pGL3B-2163) 及不同长度的短截报告载体 (根据长度分别命名为 pGL3B-1475, pGL3B-880, pGL3B-676, pGL3B-386, pGL3B-256), 取对数生长期的 MCF-10A 和 MCF-7 细胞至 24 孔细胞培养板中培养, 待细胞完全贴壁后转染 Fra-1 启动子报告载体, 同时分别转染 miR-335 mimic 及 mimic control 作为实验组和对照组, 转染荧光霉素内参报告载体 pRL-TK, 培养 5h 后更换完全培养液 (含 10g/dl 胎牛血清) 培养 48h 后收集细胞, 裂解细胞并检测荧光蛋白活性。

1.4 统计学分析 采用 SPSS.22.0 软件分析数据, 所有实验均重复三次, 计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采取 t 检验, 不同时间比较采用重复测量设计方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表1 miR-335, U6, Fra-1, MMP-9, VEGF-C, GAPDH 的引物序列表

类 别	序 列
miR-335 逆转录引物	上游 5'-AGGTATTGCGACTGGATACGACA-3'
	下游 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCG-3'
miR-335 扩增引物	上游 5'-AGCCGTCAAGAGCAATAACGAA-3'
	下游 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6 扩增引物	上游 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'
	下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
Fra-1 扩增引物	上游 5'-CAGGCGGAGACTGACAACT-3'
	下游 5'-CTTCAGCACCAGCTCTAGC-3'
MMP-9 扩增引物	上游 5'-GACTCGGTCTTTGAGGAGCC-3'
	下游 5'-GAACTCACGCGCCAGTAGAA-3'
VEGF-C 扩增引物	上游 5'-AGCTACCTCAGCAAGACGTTA-3'
	下游 5'-GCAGGAAGTGTGATTGGCAAA-3'
内参引物 GAPDH	上游 5'-GGGAAGGTGAAGGTGCGAGTC-3'
	下游 5'-AGCAGAGGGGCGAGAGATGAT-3'

2 结果

2.1 乳腺癌 MCF-7 细胞系中 miR-335, Fra-1 表达情况 乳腺癌 MCF-7 细胞中 miR-335 的表达量 (0.755 ± 0.034) 低于正常乳腺细胞 MCF-10A 的表达量 (1.495 ± 0.029), Fra-1 蛋白的表达量 (2.347 ± 0.120) 高于正常乳腺细胞 MCF-10A 的表达量 (1.319 ± 0.038), 差异均有统计学意义 ($t=0.075$, 4.191 , 均 $P < 0.001$)。

2.2 miR-335 调控 Fra-1 蛋白表达对乳腺癌细胞增殖的影响 见表 2。RT-PCR 结果显示转染 miR-335 mimic 后细胞中 miR-335 (1.761 ± 0.059) 的表达量高于对照组 (0.735 ± 0.029), 差异有统计学意义 ($t=1.465$, $P < 0.001$); Western blot 检测显示上调 miR-335 后细胞中 Fra-1 (0.567 ± 0.091) 的蛋白表达量低于对照组 (2.347 ± 0.204), 差异有统计学意义 ($t=3.763$, $P < 0.001$)。转染 miR-335 mimic 后分别于 24, 48 和 72h 检测乳腺癌细胞增殖率, 结果显示时间、组别对乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖能力有明显影响 ($F_{\text{时间}}=226.395$, $F_{\text{组别}}=98.733$, $F_{\text{时间} \times \text{组别}}=12.081$, 均 $P < 0.001$); 与对照组相比, 共培养 48 和 72h 实验组的细胞增殖能力低于对照组, 差异均有统计学意义 ($t=44.096$, 59.307 , 均 $P < 0.001$)。

2.3 miR-335 对乳腺癌细胞增殖相关蛋白 MMP-9 及 VEGF-C 的调控 见表 3。RT-PCR 结果显示 MMP-9 和 VEGF-C 的 mRNA 表达量低于对照组, 差异均有统计学意义 ($t=1.722$, 2.202 , 均 $P < 0.001$); Western blot 检测结果显示上调 miR-335 后的乳腺

癌细胞中 MMP-9 和 VEGF-C 的蛋白表达量低于对照组, 差异有统计学意义 ($t=1.953$, 7.856 , 均 $P < 0.001$)。

表2 miR-335 对 MCF-7 细胞增值能力的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	miR-335 mimic 实验组	mimic control 对照组	t 值	P 值
24	0.851 ± 0.043	0.874 ± 0.094	2.072	0.211
48	0.881 ± 0.062	1.326 ± 0.051	44.096	< 0.001
72	0.887 ± 0.082	1.493 ± 0.038	59.307	< 0.001

表3 miR-335 对乳腺癌 MCF-7 细胞 MMP-9, VEGF-C 表达水平影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

项目	miR-335 mimic 实验组	mimic control 对照组	t 值	P 值
MMP-9 mRNA	0.462 ± 0.038	0.902 ± 0.070	1.722	< 0.001
MMP-9 蛋白表达	0.469 ± 0.027	0.958 ± 0.058	1.953	< 0.001
VEGF-C mRNA	0.409 ± 0.020	1.023 ± 0.081	2.202	< 0.001
VEGF-C 蛋白表达	0.540 ± 0.041	1.024 ± 0.171	7.856	< 0.001

2.4 miR-335 调控 Fra-1 启动子转录活性分析 见表 4, 图 1。Fra-1 启动子转录活性分析显示, 乳腺癌细胞系 MCF-7 中 Fra-1 启动子的转录活性 (5.384 ± 0.431) 高于正常人乳腺细胞 MCF-10A 的转录活性 (3.238 ± 0.103), 差异有统计学意义 ($t=8.977$, $P < 0.05$); MCF-7 细胞转染 miR-335 后 Fra-1 启动子的转录活性低于对照组, 差异有统计学意义 ($t=9.293$, $P < 0.05$); Fra-1 启动子系列短截荧光素报告基因分析结果显示, 转染 miR-335 mimic 及 mimic control 的乳腺癌细胞 Fra-1 启动子系列短截报告载体 (pGL3B-1475, pGL3B-880, pGL3B-368) 分别与全长报告载体 (pGL3B-2163) 荧光活性比较, 差异均无统计学意义 ($t=0.722$, 0.501 , 0.917 , 均 $P > 0.05$), 短截报告载体 pGL3B-256 荧光活性则低于全长启动子报告载体 (pGL3B-2163) 的活性, 差异有统计学意义 ($t=28.747$, $P < 0.05$)。以上实验结果说明乳腺癌细胞 MCF-7 中 Fra-1 启动子上游 -164nt ~ -52nt 区域中有着重要的调控转录区域; 分别转染 miR-335 mimic 及 mimic control 的乳腺癌细胞中, miR-335 mimic 转染组短截报告载体 pGL3B-256 与 mimic control 组报告载体 pGL3B-256 相比, 差异无统计学意义 ($t=0.401$, $P > 0.05$)。说明 miR-335 调控 Fra-1 启动子活性的核心调控区域也是在 -164nt ~ -52nt 区域。

3 讨论

乳腺癌是女性患者中最常见的恶性肿瘤之一, 高发于 40 ~ 60 岁更年期前后的女性患者,

流行病学调查结果显示,乳腺癌的全球女性发病率为24.2%^[5],乳腺癌是一种多因素、多阶段、多基因参与的疾病,与遗传易感基因的多态性、遗传性相关的疾病^[6]。研究表明,miR-335在乳腺癌、胃癌、宫颈癌及前列腺癌中低表达,并发挥着抑癌基因的作用,但在非小细胞肺癌中高表达,并发挥着促癌基因的作用^[7],miR-335可调节转录因子SP1(transcription factor SP1)、Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1(Rho associated coiled coil forming protein kinase 1, ROCK1)等多个靶基因来调节肿瘤细胞的增殖和分化^[8],在乳腺癌细胞中,miR-335可通过靶向生存素抑制乳腺的增殖,从而抑制肿瘤的侵袭^[9]。Fra-1作为Fos家族中的一员,参与了多种肿瘤的恶性进展,Fra-1过表达启动了肿瘤恶性进展相关基因的转录并诱导上皮细胞间质化,使肿

瘤细胞获得较强的侵袭转移能力^[10]。Fra-1在高侵袭性的乳腺癌中表达明显增高,可促进乳腺癌细胞的增殖、黏附和迁移的能力^[11],研究表明,在体外培养的乳腺癌细胞株中,反式作用因子AP1通过激活Fra-1基因启动子上调其表达^[12]。

表4 乳腺癌MCF-7及正常乳腺MCF-10A

细胞Fra-1启动子转录活性分析($n=3, \bar{x} \pm s$)

类别	miR-335 mimic 实验组	mimic control 对照组	t值	P值
pGL3B-2163	3.304 ± 0.156	5.384 ± 0.431	9.293	<0.001
pGL3B-1475	3.028 ± 0.406	5.071 ± 0.393	8.628	<0.001
pGL3B-880	2.936 ± 0.441	4.987 ± 0.405	9.455	<0.001
pGL3B-368	2.869 ± 0.402	4.702 ± 0.411	7.894	<0.001
pGL3B-256	2.276 ± 0.379	2.288 ± 0.309	1.202	0.318

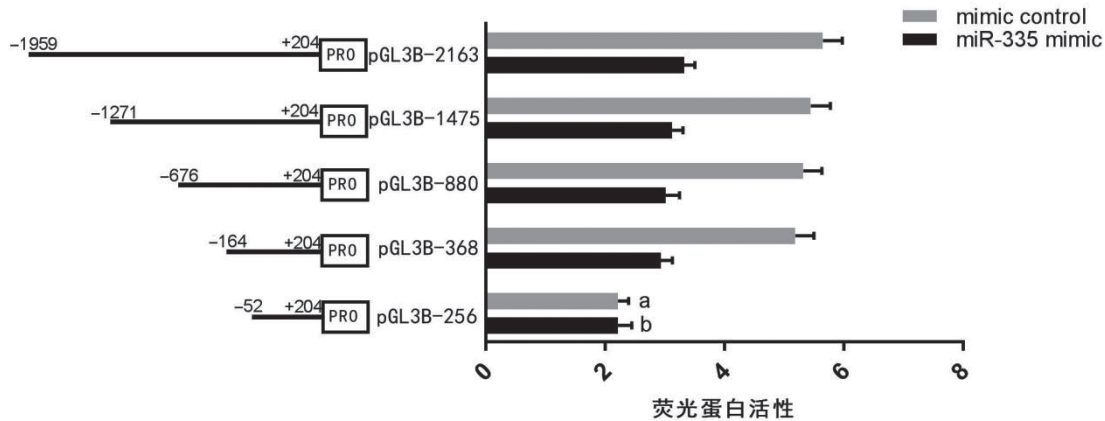


图1 miR-335 调控靶基因Fra-1启动子转录活性分析

miR-335和Fra-1与乳腺癌的发生发展有着密切的关系,我们前期的实验研究发现miR-335与Fra-1在乳腺癌组织学水平和细胞学水平呈负相关关系,课题组在先期研究结果的基础上进一步深入探讨乳腺癌细胞中miR-335表达与Fra-1及下游肿瘤侵袭转移相关蛋白之间相互影响机制。通过RT-PCR和蛋白质免疫印迹技术检测人乳腺癌细胞株MCF-7中miR-335和Fra-1的表达情况,与正常人乳腺细胞MCF-10A相比,MCF-7中miR-335表达下调,而Fra-1表达上调,上述研究结果与杨浚泓等^[13]人的研究结果一致。研究表明,在胃癌、直肠癌、非小细胞肺癌、乳腺癌等肿瘤组织中基质金属蛋白酶(MMP-9)均高表达,MMP-9以酶原的形式分泌,被激活后形成IV型胶原酶可以降解破坏细胞外基质中的IV型、V型胶原和明胶,促进肿瘤细胞沿着缺失的基底膜向周围组织浸润^[14];血管内皮生长因子C(VEGF-C)可以增强血管的通透性从而促进血浆蛋白外渗形成临时血管基质,有利于肿瘤组织血管形

成,在肺癌、胃癌、肝癌等多种实体肿瘤中均高表达,可以促使肿瘤组织中新血管形成增加肿瘤供血从而促进了肿瘤组织的生长^[15]。研究表明Fra-1可以通过激活诱导MMP-9和VEGF-C的表达促进细胞的侵袭能力,也可以直接与MMP-9结合诱导靶基因的转录^[16]。在乳腺癌细胞中混合谱系激酶3(mixed lineage kinase 3, MLK3)可以诱导Fra-1的表达上调,并伴有MMP-9和VEGF-C的表达升高,从而促进肿瘤的增殖与侵袭^[17]。我们因此推断在乳腺癌细胞中miR-335可能在下调Fra-1表达的同时也会影响MMP-9和VEGF-C的表达,从而抑制细胞的增殖、侵袭和转移,为进一步证实我们的想法,通过上调乳腺癌细胞株MCF-7中miR-335的表达量,发现上调miR-335后的乳腺癌细胞中Fra-1的表达量明显受到了抑制,同时检测与乳腺癌细胞增殖转移能力相关的蛋白MMP-9和VEGF-C的表达情况,二者的表达明显均受到了抑制。CCK-8法检测上调miR-335表达后的乳腺癌细胞的细胞增殖能力,

发现其细胞增殖能力也明显受到了抑制。基因启动子是调控基因表达的重要序列, RNA聚合酶可以特异性识别从而控制转录的起始, 启动子区域还存在着多个转录因子调控位点, 转录因子和RNA聚合酶共同调节基因在细胞内的表达^[18]。为进一步探明乳腺癌细胞中 miR-335 调控 Fra-1 表达的分子机制, 我们构建了 Fra-1 启动子全长的荧光霉素报告载体, 同时利用生物信息学预测软件并结合相关的文献报道构建了系列 Fra-1 启动子荧光霉素短截报告载体, 通过分析上述启动子的活性, 研究发现乳腺癌 MCF-7 细胞株 Fra-1 启动子上游 -164nt~-52nt 区域中有着重要的调控转录区域, miR-335 通过调控该区域的启动子转录来抑制 Fra-1 的转录启动, 上述研究结果与周秋媛等^[19]人关于乳腺癌细胞中 Fra-1 启动子高转录活性分子机制的研究结论是一致的。基因启动子是调控基因表达的关键序列, 是被 RNA 聚合酶识别辨认的区域, 是基因转录起始的开关^[20], 上述实验结果说明乳腺癌细胞中 miR-335 可以影响 Fra-1 启动子的转录起始来抑制基因的表达。通过生物信息软件预测分析显示, 该区域有 SP1, AP1, AP2 和 EGR1 等多个转录因子结合位点, 我们推测 miR-335 可能是通过影响上述转录因子与 Fra-1 启动子的结合来调控 Fra-1 基因在乳腺癌细胞中的转录, 我们将在后续通过凝胶迁移阻滞实验和染色质免疫共沉淀技术来进一步寻找 miR-335 影响 Fra-1 启动子调控的分子机制。

综上所述, 本课题阐明乳腺癌细胞中 miR-335 通过调控 Fra-1 启动子核心转录区域 (-164nt~-52nt) 抑制转录, 同时抑制 MMP-9 和 VEGF-C 的表达来抑制乳腺癌细胞的增殖转移能力。miR-335 作为一种肿瘤抑制小分子 miRNA, 可能通过调节细胞内多个信号转导通路的靶基因的表达来改变信号转导通路的活性^[21], 从而影响肿瘤细胞的增殖转移, miR-335 对 Fra-1 的负性调控作用可能是上述信号转导通路中多个靶基因中的一个, 本课题研究结果对后续研究乳腺癌增殖转移机制有一定的参考价值, 随着研究的进一步深入, miR-335 调控 Fra-1 表达可能成为治疗乳腺癌的一个新策略。

参考文献:

- [1] 曹毛毛, 陈万青. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2021, 13(3): 63-69.
CAO Maomao, CHEN Wanqing. Interpretation on the global cancer statistics of GLOBOCAN 2020[J]. Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science(Electronic Version), 2021, 13(3): 63-69.
- [2] CORREIA D M, GJORGJEVA M, DOLICKA D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(24): 6249.
- [3] HAO Jie, LAI Minghua, LIU Chunsheng. Expression of miR-335 in triple-negative breast cancer and its effect on chemosensitivity[J]. J BUON, 2019, 24(4): 1526-1531.
- [4] TALOTTA F, CASALINO L, VERDE P. The nuclear oncoprotein Fra-1: a transcription factor knocking on therapeutic applications' door[J]. Oncogene, 2020, 39(23): 4491-4506.
- [5] 尹阳, 孙巨军, 李越, 等. 基于 TCGA 数据库筛选微小 RNA(miRNA) 用于原发性乳腺癌早期诊断的生物信息学分析[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(5): 33-37.
YIN Yang, SUN Jujun, LI Yue, et al. Bioinformatics analysis of screening miRNA for early diagnosis of primary breast cancer based on TCGA database[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(5): 33-37.
- [6] WANG Y A, JIAN J W, HUNG C F, et al. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 315.
- [7] YE Lingling, WANG Fen, WU Hao, et al. Functions and targets of miR-335 in cancer[J]. Onco Targets and Therapy, 2021, 14: 3335-3349.
- [8] WANG Yong, WANG Ningning, ZENG Xiandong, et al. MicroRNA-335 and its target Rock1 synergistically influence tumor progression and prognosis in osteosarcoma[J]. Oncology Letters, 2017, 13(5): 3057-3065.
- [9] 黄雅娟, 杜峰, 魏玲丽. miR-335 通过靶向生存素对乳腺癌细胞增殖的调控作用[J]. 重庆医学, 2016, 45(27): 3753-3756.
HUANG Yajuan, DU Feng, WEI Lingli. MiR-335 regulate cell proliferation by targeting survivin in breast cancer cells MCF-7[J]. Chongqing Medicine, 2016, 45(27): 3753-3756.
- [10] CASALINO L, TALOTTA F, CIMMINO A, et al. The Fra-1/AP-1 oncoprotein: From the "undruggable" transcription factor to therapeutic targeting[J]. Cancers, 2022, 14(6): 1480.
- [11] ANNIS M G, OUELLET V, RENNHACK J P, et al. Integrin-uPAR signaling leads to FRA-1 phosphorylation and enhanced breast cancer invasion[J]. Breast Cancer Research, 2018, 20(1): 9.
- [12] TOLZA C, BEJJANI F, EVANNO E, et al. AP-1 signaling by Fra-1 directly regulates HMGA1 oncogene transcription in Triple-Negative breast cancers[J]. Molecular Cancer Research, 2019, 17(10): 1999-2014.
- [13] 杨浚泓, 李文环, 李海, 等. 微小 RNA-335 靶向 Sp1 对乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖的调控作用[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(11): 3.
YANG Junfeng, LI Wenhuan, LI Hai, et al. MicroRNA-335 regulates proliferation of breast cancer cells MCF-7 by targeting Sp1 [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2015, 32(11): 3.
- [14] HUANG Hao. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a cancer biomarker and MMP-9 biosensors: recent advances[J]. Sensors (Basel, Switzerland), 2018, 18(10): 3249.

- YAN Bo, YUE Zongwei, LI Huajian, et al. Characteristics of pathogens in patients with stroke-associated pneumonia and their correlation with serum cf-DNA/NETs[J]. Journal of Parasitic Biology, 2021, 16(8):937-939, 946.
- [13] 孟强, 屈峰, 董伟, 等. 外周血游离 DNA/NETs 在脓毒症诊断和预后评估中的应用价值 [J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2018, 17(3):255-258.
- MENG Qiang, QU Feng, DONG Wei, et al. Clinical value of peripheral serum cf-DNA/NETs level in diagnosis and severity assessment of sepsis patients [J]. Chinese Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2018, 17(3):255-258.
- [14] LE JONCOUR A, MARTOS R, LOYAU S, et al. Critical role of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with Behcet's disease[J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2019, 78(9): 1274-1282.
- [15] 张慧, 封昱辰, 康国荣, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在类风湿关节炎致病机制中的初步探究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2019, 23 (5) : 305-308, 后插 1.
- ZHANG Hui, FENG Yuchen, KANG Guorong, et al. A preliminary study on the pathogenesis of neutrophil extracellular traps in rheumatoid arthritis [J]. Chinese Journal of Rheumatology, 2019, 23(5):305-308, Insert after 1.
- [16] UCHINO S, SAITA Y, WADA A, et al. The immature platelet fraction affects the efficacy of platelet rich plasma therapy for knee osteoarthritis[J]. Regenerative Therapy, 2021, 18(1): 176-181.
- [17] TAMBIAH J R S, KENNEDY S, SWEARINGEN C J, et al. Individual participant symptom responses to intra-articular loxoprofen in knee osteoarthritis: post hoc analysis of a phase 2B trial[J]. Rheumatology and Therapy, 2021, 8(2): 973-985.
- [18] SORKPOR S K, GALLE K, TEIXEIRA A L, et al. The relationship between plasma BDNF and pain in older adults with knee osteoarthritis[J]. Biological Research for Nursing, 2021, 23(4): 629-636.
- [19] 许成燕, 陈军香, 王教明, 等. 中国人群膝骨关节炎危险因素 Meta 分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2021, 21(7):772-778.
- XU Chengyan, CHEN Junxiang, WANG Jiaoming, et al. The risk factors for knee osteoarthritis among Chinese population: A meta-analysis [J]. Chinese Journal of Evidence-Based Medicine, 2021, 21(7):772-778.
- [20] 王欢, 孙贺, 张耀南, 等. 中国 40 岁以上人群原发性膝骨关节炎各间室患病状况调查 [J]. 中华骨与关节外科杂志, 2019, 12(7):528-532.
- WANG Huan, SUN He, ZHANG Yaonan, et al. Morbidity of primary knee osteoarthritis in different compartments in Chinese population aged over 40 years old [J]. Chinese Journal of Bone and Joint Surgery, 2019, 12(7):528-532.
- [21] 郭利刚, 郭庆功, 王胜利, 等. 上肢腓关节面坡度与原发性膝骨关节炎的相关性研究 [J]. 中华解剖与临床杂志, 2018, 23(5):384-387.
- GUO Ligang, GUO Qinggong, WANG Shengli, et al. The effects of upper tibiofibular joint surface slope on primary knee osteoarthritis [J]. Chinese Journal of Anatomy and Clinics, 2018, 23(5):384-387.
- [22] 易志勇, 韩清民, 郭斯印. ERa 基因多态性与女性膝骨性关节炎经筋分型及中医证型的相关性研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(12):1900-1906.
- YI Zhiyong, HAN Qingmin, GUO Siyin. Correlation of ERa genetic polymorphisms with muscle-along-meridian classification and traditional Chinese medicine syndrome types of knee osteoarthritis in women [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2019, 36(12):1900-1906.

收稿日期: 2021-11-27
修回日期: 2022-01-20

(上接第 80 页)

- [15] MELINCOVICI C S, BOSCA A B, SUSMAN S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis[J]. Romanian Journal of Morphology and Embryology, 2018, 59(2): 455-467.
- [16] YOUNG M R, COLBURN N H. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention [J]. Gene, 2006, 379: 1-11.
- [17] RATTANASINCHAI C, LLEWELLYN B J, CONRAD S E, et al. MLK3 regulates FRA-1 and MMPs to drive invasion and transendothelial migration in triple-negative breast cancer cells[J]. Oncogenesis, 2017, 6(6): e345.
- [18] MCCULLOUGH L E, COLLIN L J, CONWAY K, et al. Reproductive characteristics are associated with gene-specific promoter methylation status in breast cancer[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 926.
- [19] 周秋媛, 李虹, 王红莉, 等. Fra-1 在乳腺癌细胞中高表达原因及其启动子高转录活性的分子机制研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2017(22): 3113-3115.
- ZHOU Qiuyuan, LI Hong, WANG Hongli, et al. Causes of Fra-1 high expression in breast cancer cells and molecular mechanism of Fra-1 high transcription activity [J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2017(22):3113-3115.
- [20] TATOSYAN K A, STASENKO D V, KOVAL A P, et al. TATA-like boxes in RNA polymerase III promoters: Requirements for nucleotide sequences[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(10): 3706.
- [21] GAO Yue, ZENG Fan, WU Jiayan, et al. MiR-335 inhibits migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein c-Met[J]. Tumour Biology, 2015, 36(4): 2875-2883.

收稿日期: 2021-08-16
修回日期: 2022-06-22