

miR-371a-5p 靶向抑制 LZTS2 促进三阴性乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间充质转化

杨良权, 于森, 姜茜, 贺红梅, 张宁(秦皇岛市妇幼保健院乳腺外科, 河北秦皇岛 066001)

摘要: 目的 探究微小RNA(miR)-371a-5p 靶向调控亮氨酸拉链肿瘤抑制因子2(LZTS2)对三阴性乳腺癌(TNBC)细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间充质转化(EMT)的影响。方法 收集2022年8月~2024年8月在秦皇岛市妇幼保健院接受根治性手术的60例TNBC患者作为研究对象,收集TNBC组织和邻近的非肿瘤乳腺组织,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测非肿瘤乳腺组织、TNBC组织和人正常乳腺MCF-10A细胞、TNBC细胞系中LZTS2 mRNA的相对表达水平。将MDA-MB-231细胞分为对照组、LZTS2空载质粒组、LZTS2过表达组、miR-371a-5p阴性对照组、miR-371a-5p模拟物组、miR-371a-5p模拟物+LZTS2过表达组。qRT-PCR检测各组LZTS2 mRNA和miR-371a-5p相对表达水平;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)、划痕愈合实验和Transwell实验分别检测各组MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭;蛋白质印迹(Western blotting)法检测LZTS2和EMT相关蛋白表达;双荧光素酶报告基因实验确认miR-371a-5p与LZTS2之间的靶向关系;裸鼠异种移植肿瘤实验检测小鼠体内miR-371a-5p对LZTS2 mRNA表达和肿瘤生长的影响。结果 与非肿瘤乳腺组织比较, TNBC组织中LZTS2 mRNA(0.33 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.04)表达水平显著降低,差异具有统计学意义($t=81.051, P < 0.05$);与MCF-10A细胞比较, HCC-1937细胞、MDA-MB-231细胞、MDA-MB-436细胞、MDA-MB-468细胞中LZTS2 mRNA($0.44 \pm 0.05, 0.35 \pm 0.04, 0.38 \pm 0.05, 0.53 \pm 0.07$ vs 1.00 ± 0.05)表达水平显著降低,差异具有统计学意义($t=15.454 \sim 28.712$, 均 $P < 0.05$);且MDA-MB-231细胞中LZTS2 mRNA表达水平最低,故选MDA-MB-231细胞进行后续实验。与对照组和LZTS2空载质粒组比较, LZTS2过表达组LZTS2 mRNA、LZTS2蛋白、E-cadherin蛋白表达水平显著升高,差异具有统计学意义($q_{\text{对照组}}=25.034, 13.598, 11.714; q_{\text{LZTS2空载质粒组}}=23.493, 11.993, 10.190$, 均 $P < 0.05$),细胞活力、划痕愈合率、侵袭细胞数量、N-cadherin蛋白、Vimentin蛋白、Twist蛋白表达水平显著降低,差异具有统计学意义($q_{\text{对照组}}=9.416 \sim 13.894, q_{\text{LZTS2空载质粒组}}=10.850 \sim 15.309$, 均 $P < 0.05$)。miR-371a-5p能够特异性靶向LZTS2 mRNA 3'-非翻译区中的结合位点。与miR-371a-5p阴性对照组比较,miR-371a-5p模拟物组miR-371a-5p、细胞活力、划痕愈合率、侵袭细胞数量、N-cadherin蛋白、Vimentin蛋白、Twist蛋白表达水平显著升高($q=9.034 \sim 19.579$), LZTS2 mRNA、LZTS2蛋白、E-cadherin蛋白表达水平显著降低($q=21.400, 15.757, 9.617$),差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$);与miR-371a-5p模拟物组比较, miR-371a-5p模拟物+LZTS2过表达组细胞活力、划痕愈合率、侵袭细胞数量、N-cadherin蛋白、Vimentin蛋白、Twist蛋白表达水平显著降低($q=2.648 \sim 10.124$), LZTS2 mRNA、LZTS2蛋白、E-cadherin蛋白表达水平显著升高($q=11.200, 17.258, 4.909$),差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。miR-371a-5p过表达可通过抑制LZTS2 mRNA促进裸鼠体内TNBC的肿瘤生长。结论 miR-371a-5p可能通过靶向抑制LZTS2表达促进TNBC细胞增殖、迁移、侵袭和EMT。

关键词: 微小核糖核酸-371a-5p; 亮氨酸拉链肿瘤抑制因子2; 三阴性乳腺癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间充质转化
中图分类号: R737.9; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2026)02-070-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2026.02.012

MiR-371a-5p Targeted Inhibition of LZTS2 Promoted the Proliferation, Migration, Invasion and Epithelial Mesenchymal Transition of Triple-Negative Breast Cancer Cells

YANG Liangquan, YU Miao, JIANG Qian, HE Hongmei, ZHANG Ning

(Department of Breast Surgery, Qinhuangdao Maternal and Child Health Hospital, Hebei Qinhuangdao 066001, China)

Abstract: Objective To explore the effects of miR-371a-5p targeting leucine zipper tumor suppressor 2 (LZTS2) on proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in triple-negative breast cancer (TNBC) cells. **Methods** TNBC tissues and adjacent non-tumor breast tissues of 60 patients with TNBC who underwent radical surgery in Qinhuangdao Maternal and Child Health Hospital from August 2022 to August 2024 were collected. Real-time quantitative fluorescent PCR (RT-qPCR) was used to detect the relative expression level of LZTS2 messenger RNA (mRNA) in non-tumor breast tissue, TNBC tissue and human normal breast MCF-10A cells and TNBC cell lines. MDA-MB-231 cells were divided into control

基金项目: 秦皇岛市科学技术研究与发展计划项目(202301A259)。

作者简介: 杨良权(1980-),男,硕士,副主任医师,研究方向:乳腺肿瘤综合治疗, E-mail: yangliangquan6749@163.com。

group, LZTS2 empty vector plasmid group, LZTS2 overexpression group, miR-371a-5p negative control group, miR-371a-5p mimics group, miR-371a-5p mimics+LZTS2 overexpression group. The relative expression levels of LZTS2 mRNA and miR-371a-5p were detected by RT-qPCR. Cell proliferation, migration and invasion of MDA-MB-231 cells were detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8), scratch healing experiment and Transwell assay, respectively. The expression of LZTS2 and EMT-related proteins was detected by Western blotting. A dual luciferase reporter assay was used to confirm the targeting relationship between miR-371a-5p and LZTS2. The effects of miR-371a-5p on LZTS2 mRNA expression and tumor growth were detected using nude mouse xenograft tumor models. **Results** Compared with non-tumor breast tissue, LZTS2 mRNA (0.33 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.04) levels in TNBC tissue were significantly decreased ($t=81.051$, $P<0.05$). Compared with MCF-10A cells, LZTS2 mRNA (0.44 ± 0.05 , 0.35 ± 0.04 , 0.38 ± 0.05 , 0.53 ± 0.07 vs 1.00 ± 0.05) levels in HCC-1937, MDA-MB-231, MDA-MB-436, and MDA-MB-468 cells were significantly decreased ($t=15.454 \sim 28.712$, all $P<0.05$). MDA-MB-231 cells exhibited the lowest LZTS2 mRNA level, thus selected for subsequent experiments. Compared with control group and LZTS2 empty vector group, the levels of LZTS2 mRNA, LZTS2 protein and E-cadherin protein in the LZTS2 overexpression group were significantly increased, with statistically significant differences ($q_{\text{control group}}=25.034, 13.598, 11.714$, $q_{\text{LZTS2 empty plasmid group}}=23.493, 11.993, 10.190$, all $P<0.05$). Cell viability, scratch healing rate, invasive cell count, and expression levels of N-cadherin, Vimentin and Twist proteins were significantly decreased, with statistically significant differences ($q_{\text{control group}}=9.416 \sim 13.894$, $q_{\text{LZTS2 empty plasmid group}}=10.850 \sim 15.309$, all $P<0.05$). MiR-371a-5 can specifically target the binding site in the 3'-untranslated region of LZTS2 mRNA. Compared with miR-371a-5p negative control group, the miR-371a-5p mimic group showed significantly increased levels of miR-371a-5p, cell viability, scratch healing rate, invasive cell number, N-cadherin protein, Vimentin protein and Twist protein expression levels ($q=9.034 \sim 19.579$, all $P<0.05$), while the levels of LZTS2 mRNA, LZTS2 protein and E-cadherin protein were significantly decreased ($q=21.400, 15.757, 9.617$, all $P<0.05$). Compared with the miR-371a-5p mimics group, cell viability, scratch healing rate, invasive cell count, N-cadherin protein, Vimentin protein and Twist protein expression levels in the miR-371a-5p mimics + LZTS2 overexpression group were significantly decreased ($q=2.648 \sim 10.124$, all $P<0.05$), while the levels of LZTS2 mRNA, LZTS2 protein and E-cadherin protein were significantly increased ($q=11.200, 17.258, 4.909$, all $P<0.05$). Overexpression of miR-371a-5p can promote TNBC tumor growth in nude mice by inhibiting LZTS2 mRNA. **Conclusions** MiR-371a-5p may promote TNBC cell proliferation, migration, invasion and EMT through targeted-inhibition of LZTS2 expression.

Keywords: microRNA-371a-5p; leucine zipper tumor suppressor 2; triple-negative breast cancer; proliferation; migration; invasion; epithelial mesenchymal transition

三阴性乳腺癌(triplenegative breast cancer, TNBC)作为恶性的乳腺癌亚型,其特点是缺乏雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体^[1]。与其他乳腺癌亚型相比, TNBC更具侵袭性,预后更差,这与其缺乏有效的靶向治疗有关^[2-3]。因此,有必要通过研究影响TNBC细胞生长和转移的新分子机制以丰富治疗策略。亮氨酸拉链肿瘤抑制因子2(leucine zipper tumor suppressor 2, LZTS2)属于LZTS家族,位于人类染色体10q24.3,该基因表达在多种恶性肿瘤中减弱甚至丢失,提示LZTS2发挥抑癌作用^[4-5]。已有研究证实LZTS2在TNBC中低表达^[6],而关于LZTS2在TNBC中的作用机制尚不明晰。微小RNA(microRNA, miR)是一类可以与靶信使RNA(messenger RNA, mRNA)的3'-非翻译区(3'-untranslated area, 3'-UTR)结合后降解或抑制翻译进而发挥调节作用的保守性单链RNA^[7]。通过生物信息学分析软件预测发现, miR-371a-5p是LZTS2潜在结合的miRNA,已有研究证实miR-371a-5p可参与调控多种疾病进程,且与乳腺癌的发生和进展有关^[8-9]。本研究将探讨miR-371a-5p是否通过靶向LZTS2促进TNBC细胞上皮间充质转化

(epithelial mesenchymal transition, EMT),进而影响其侵袭能力,为进一步阐明LZTS2对TNBC恶性生物学特征影响的作用机制以及寻找TNBC治疗的新靶点提供新的见解。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 临床标本:收集2022年8月~2024年8月在秦皇岛市妇幼保健院接受根治性手术的60例TNBC患者的TNBC组织和邻近的非肿瘤乳腺组织(距离肿瘤组织>5cm)。所有患者[年龄33~75(52.61 ± 10.28)岁]均经组织病理学确诊,术前均未接受过化疗、放疗或免疫治疗。收集的所有标本储存在 -80°C 直至使用。本研究获得所有TNBC患者的知情同意及医院伦理委员会批准(批准号:QHDFY-202206-03)。

1.1.2 实验细胞:人正常乳腺细胞MCF-10A(批号YS1230C)、TNBC细胞系HCC-1937(批号YS1466C)、MDA-MB-231(批号YS3897C)、MDA-MB-436(批号YS2219C)、MDA-MB-468(批号YS193C)(上海雅吉生物科技有限公司)。

1.1.3 实验动物:雌性BALB/c裸鼠(4周龄,SPF级,

体质量12~15g, 湖南斯莱克景达实验动物有限公司), 动物生产许可证号: SCXK(湘)2024-0009, 裸鼠饲养于无病原体实验室(相对湿度42%~48%, 温度20℃~25℃)中。

1.2 仪器与试剂 RPMI-1640培养液(批号A46171)、Trizol试剂(批号A33254)、细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)试剂(批号D12492)、结晶紫染色液(批号D16583)、聚偏二氟乙烯膜(PVDF, 批号M50168)、羊抗鼠二抗(批号M53259)[安诺伦(北京)生物科技公司]; LZTS2空载质粒(批号YLR605)、重组LZTS2质粒(批号YLR608)、miR-371a-5p阴性对照质粒(批号YLR203)、miR-371a-5p模拟物质粒(批号YLR217)、Lipofectamine 3000转染试剂(批号YLR144)(福州奕澜瑞生物科技公司); cDNA合成试剂盒(批号WL01572)、PCR试剂(批号WL01531)、基质胶(批号WL01528)、RIPA裂解缓冲液(批号WL01643)、化学发光底物试剂盒(批号WL01689)(沈阳万类生物科技公司); 鼠源LZTS2(批号FNab04918)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)(批号FNab02618)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)(批号FNab05569)、波形蛋白(Vimentin)(批号FNab09408)、碱性螺旋环螺旋转录因子(Twist)(批号FNab09117)、 β -肌动蛋白(β -actin)(批号FNab08563)单克隆抗体、双荧光素酶报告基因检测试剂盒(批号FNab06158)(武汉菲恩生物科技公司); Emos-Gene 400A实时荧光定量PCR(real time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR)仪、Gemini XPS酶标仪(上海殷诺生物科技公司); MF53-N显微镜、3415 Transwell小室(广州浩康生物科技公司); Universal Hood蛋白成像仪(上海实维实验仪器公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与分组干预: MCF-10A细胞和TNBC细胞系(HCC-1937、MDA-MB-231、MDA-MB-436和MDA-MB-468)维持在RPMI-1640培养液[含10%(v/v)胎牛血清]于37℃, 5%(v/v)CO₂的培养箱中培养,

并设置8个平行样。qRT-PCR检测非肿瘤乳腺组织、TNBC组织和各细胞中LZTS2 mRNA相对表达水平, 具体方法见1.3.2。

首先将MDA-MB-231细胞分为对照组(用RPMI-1640培养液常规培养MDA-MB-231细胞)、LZTS2空载质粒组(向MDA-MB-231细胞中转染LZTS2空载质粒, 然后用RPMI-1640培养液培养)、LZTS2过表达组(向MDA-MB-231细胞中转染重组LZTS2质粒, 然后用RPMI-1640培养液培养)用于研究LZTS2在TNBC中的功能。再次将MDA-MB-231细胞分为miR-371a-5p阴性对照组(向MDA-MB-231细胞中转染miR-371a-5p阴性对照质粒, 然后用RPMI-1640培养液培养)、miR-371a-5p模拟物组(向MDA-MB-231细胞中转染miR-371a-5p模拟物质粒, 然后用RPMI-1640培养液培养)、miR-371a-5p模拟物+LZTS2过表达组(向MDA-MB-231细胞中共同转染miR-371a-5p模拟物和重组LZTS2质粒, 然后用RPMI-1640培养液培养)用于研究LZTS2在TNBC中的作用机制。以上均按照Lipofectamine 3000转染试剂说明书进行转染, 并设置8个平行样, 培养48h后用于以下研究。

1.3.2 qRT-PCR检测LZTS2 mRNA和miR-371a-5p相对表达水平: 使用Trizol试剂从组织或细胞中提取总RNA, 通过互补DNA(complementary DNA, cDNA)合成试剂盒制备cDNA。在荧光定量PCR系统上使用PCR试剂混合体系进行扩增。引物由广州艾基生物技术有限公司设计和合成, 引物序列见表1。LZTS2以 β -actin作为内参基因, miR-371a-5p以U6作为内参基因。总反应体系40 μ l: 17 μ l的PCR试剂混合体系, 上、下游引物各1.5 μ l, 4 μ l的cDNA, 16 μ l的双蒸水。扩增条件: 97℃ 170s, 然后进行45个循环(94℃ 19s, 74℃ 17s, 78℃ 14s)。使用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算LZTS2 mRNA和miR-371a-5p的相对表达水平。

表 1

基因	上游引物	下游引物
LZTS2	5'-GCTTCATCCACCCAGACATCAA-3'	5''-CGACAGTTAGACACATCATCCG-3'
β -actin	5'-TGGCACCCAGCACAATGAATCCATG-3'	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'
miR-371a-5p	5'-ACACTCCAGCTGGGTAGCTTATCAGACTGATG-3'	5'-CTCAACTGGTGTCTGGATTAGCTTACCGAT-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACACTA-3'	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'

1.3.3 CCK-8法检测细胞增殖: 将转染后的MDA-MB-231细胞接种到96孔板中(3 \times 10³个/孔), 37℃培养48h, 将每个孔的细胞与10 μ l CCK-8试剂一起孵育2h, 用酶标仪检测吸光度(A)值, 计算细胞活力 = $A_{各转染组}/A_{对照组(或miR-371a-5p阴性对照组)} \times 100\%$ 。

1.3.4 划痕愈合实验检测细胞迁移: 将转染后的MDA-MB-231细胞接种在6孔板中(5 \times 10⁵个/孔), 待细胞融合度超过90%时, 使用无菌微量移液器吸头刮除单层细胞。用显微镜分别捕捉0h和48h后的图像, 测量愈合面积以评估划痕愈合率。划痕愈合率=(0h划痕面

积-48h划痕面积)/0h划痕面积 × 100%。

1.3.5 Transwell实验检测细胞侵袭: 将转染后的MDA-MB-231细胞悬浮在无血清的培养液中并接种在预涂有基质胶的Transwell小室上室中(2×10^5 个/孔), 下室补充600 μ l完全培养液, 48h后将下室细胞通过甲醛固定后用结晶紫染色。最后使用显微镜观察细胞, 随机选取6个视野对侵袭细胞数量平均值进行计数。

1.3.6 蛋白质印迹(Western blot)检测LZTS2和EMT相关蛋白表达: 使用RIPA裂解缓冲液提取细胞中总蛋白质样品, 定量蛋白质浓度后, 通过凝胶电泳分离蛋白质后转移到聚偏二氟乙烯膜上, 在室温下使用5%(v/v)脱脂牛奶封闭2h, 将膜与LZTS2(1:1700)、E-cadherin(1:1500)、N-cadherin(1:1500)、Vimentin(1:1300)、Twist(1:1300)和内参 β -actin(1:2100)一抗在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜, 然后添加二抗(1:3600)孵育2h, 根据化学发光底物试剂盒在蛋白成像仪中显影蛋白质条带。

1.3.7 双荧光素酶报告基因检测: 合成含有野生型(WT)或突变型(MUT)miR-371a-5p结合位点的LZTS2 3'-UTR片段, 并将其插入pGL3载体。将LZTS2 WT或LZTS2 MUT重组质粒和miR-371a-5p模拟物或miR-371a-5p阴性对照质粒共转染至MDA-MB-231细胞, 设置8个平行样, 48h后, 按照试剂盒说明测定相对荧光素酶活性。

1.3.8 体内肿瘤生长实验: 用10只雌性BALB/c裸鼠建立异种移植肿瘤模型。将裸鼠随机分为两组(每组5只), 分别注射不同的稳定转染miR-371a-5p阴性对照质粒(裸鼠阴性对照组)和miR-371a-5p模拟物质粒(裸鼠miR-371a-5p过表达组)的MDA-MB-231细胞(5×10^5 个/只)。30天后裸鼠安乐死, 分离肿瘤组织并测量肿瘤体积和重量; qRT-PCR法检测各肿瘤组织中miR-371a-5p和LZTS2 mRNA表达水平。

1.4 统计学分析 采用SPSS 26.0软件进行数据分

析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示(均符合正态分布), 两组间比较采用 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LZTS2 mRNA在TNBC组织和细胞中的表达水平 与非肿瘤乳腺组织(1.00 ± 0.04)比较, TNBC组织中LZTS2 mRNA表达水平(0.33 ± 0.05)显著降低, 差异具有统计学意义($t=81.051, P < 0.001$)。与MCF-10A细胞(1.00 ± 0.05)比较, HCC-1937细胞(0.44 ± 0.05)、MDA-MB-231细胞(0.35 ± 0.04)、MDA-MB-436细胞(0.38 ± 0.05)、MDA-MB-468细胞(0.53 ± 0.07)中LZTS2 mRNA表达水平显著降低, 差异具有统计学意义($t=22.400, 28.712, 24.800, 15.454$, 均 $P < 0.001$); 且MDA-MB-231细胞中LZTS2 mRNA表达水平最低, 故选MDA-MB-231细胞为研究对象进行后续实验。

2.2 LZTS2过表达可抑制MDA-MB-231细胞增殖、迁移、侵袭和EMT 见表2。对照组LZTS2 mRNA、细胞活力、划痕愈合率、侵袭细胞数量、LZTS2蛋白、E-cadherin蛋白、N-cadherin蛋白、Vimentin蛋白、Twist蛋白表达水平与LZTS2空载质粒组比较, 差异无统计学意义($q=1.114, 3.284, 0.988, 1.182, 1.325, 1.330, 1.131, 1.449, 0.920$, 均 $P > 0.05$); 与对照组和LZTS2空载质粒组比较, LZTS2过表达组LZTS2 mRNA、LZTS2蛋白、E-cadherin蛋白表达水平显著升高, 差异具有统计学意义($q_{\text{对照组}}=25.034, 13.598, 11.714; q_{\text{LZTS2空载质粒组}}=23.493, 11.993, 10.190$, 均 $P < 0.05$); 细胞活力、划痕愈合率、侵袭细胞数量、N-cadherin蛋白、Vimentin蛋白、Twist蛋白表达水平显著降低, 差异具有统计学意义($q_{\text{对照组}}=12.384, 13.894, 13.544, 13.576, 9.416, 10.864, q_{\text{LZTS2空载质粒组}}=11.778, 15.060, 15.309, 14.667, 12.000, 10.850$, 均 $P < 0.05$)。

表2 LZTS2过表达对MDA-MB-231细胞LZTS2 mRNA、增殖、迁移、侵袭能力及LZTS2和EMT相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

项目	对照组	LZTS2空载质粒组	LZTS2过表达组	F值	P值
LZTS2 mRNA	1.00 \pm 0.03	1.03 \pm 0.07	2.79 \pm 0.20	550.445	< 0.001
细胞活力 (%)	100.00 \pm 0.00	98.63 \pm 1.18	64.71 \pm 8.06	144.543	< 0.001
划痕愈合率 (%)	52.23 \pm 5.25	49.89 \pm 4.16	22.33 \pm 3.08	122.090	< 0.001
侵袭细胞数量 (个)	205.19 \pm 20.36	194.55 \pm 15.28	98.65 \pm 8.97	113.448	< 0.001
LZTS2蛋白 (/ β -actin)	0.48 \pm 0.04	0.51 \pm 0.05	0.91 \pm 0.08	123.962	< 0.001
E-cadherin蛋白 (/ β -actin)	0.82 \pm 0.07	0.87 \pm 0.08	1.36 \pm 0.11	91.316	< 0.001
N-cadherin蛋白 (/ β -actin)	0.56 \pm 0.04	0.54 \pm 0.03	0.32 \pm 0.03	125.176	< 0.001
Vimentin蛋白 (/ β -actin)	0.65 \pm 0.06	0.69 \pm 0.05	0.39 \pm 0.05	74.047	< 0.001
Twist蛋白 (/ β -actin)	0.71 \pm 0.06	0.74 \pm 0.07	0.41 \pm 0.05	72.655	< 0.001

2.3 miR-371a-5p可直接靶向LZTS2的3'-UTR抑制LZTS2表达 为了揭示LZTS2在TNBC中的作用机制,首先通过生物信息学(TargetScan、miRanda等)预测LZTS2的3'-UTR显示出与miR-371a-5p具有互补作用位点,见图1。双荧光素酶实验结果显示,与miR-371a-5p阴性对照和LZTS2 WT共转染(1.06 ± 0.05)比较,miR-371a-5p模拟物和LZTS2 WT共转染的MDA-MB-231细胞中相对荧光素酶

活性(0.36 ± 0.04)显著降低,差异具有统计学意义($t=30.921, P < 0.001$);与miR-371a-5p阴性对照和LZTS2 MUT共转染(1.01 ± 0.04)比较,miR-371a-5p模拟物和LZTS2 MUT共转染的MDA-MB-231细胞中相对荧光素酶活性(0.98 ± 0.08)差异无统计学意义($t=0.949, P=0.359$)。证明miR-371a-5能够特异性靶向LZTS2 mRNA 3'-UTR中的结合位点。

	miRNA (bottom)	type	score	percentile	weight context score
Position 454-460 of LZTS2 3' UTR	5' ... GGGCUCGGUUCAG-GUUUGAGC...				
hsa-miR-371a-5p	3' UCACGGGGGUGCAAACUCA	7mer-m8	-0.02	74	-0.02

图1 生物信息学预测 LZTS2 mRNA 3'-UTR 中的 miR-371a-5p 结合位点

2.4 LZTS2过表达可削弱miR-371a-5p对MDA-MB-231细胞增殖、迁移、侵袭和EMT的促进作用 见表3。与miR-371a-5p阴性对照组比较,miR-371a-5p模拟物组miR-371a-5p、细胞活力、划痕愈合率、侵袭细胞数量、N-cadherin蛋白、Vimentin蛋白、Twist蛋白表达水平显著升高,差异具有统计学意义($q=19.579, 9.034, 11.252, 10.225, 16.489, 13.408, 14.577$), LZTS2 mRNA、LZTS2蛋白、E-cadherin蛋白表达水平显著降低($q=21.400, 15.757, 9.617$), 差

异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与miR-371a-5p模拟物组比较,miR-371a-5p模拟物+LZTS2过表达组miR-371a-5p表达水平差异无统计学意义($q=0.665, P=0.517$), 细胞活力、划痕愈合率、侵袭细胞数量、N-cadherin蛋白、Vimentin蛋白、Twist蛋白表达水平显著降低($q=2.648, 5.184, 6.179, 10.124, 7.878, 9.021$), LZTS2 mRNA、LZTS2蛋白、E-cadherin蛋白表达水平显著升高($q=11.200, 17.258, 4.909$), 差异具有统计学意义,均 $P < 0.05$)。

表3 LZTS2过表达可削弱miR-371a-5p对MDA-MB-231细胞增殖、迁移、侵袭和EMT的促进作用($\bar{x} \pm s, n=8$)

项目	miR-371a-5p 阴性对照组	miR-371a-5p 模拟物组	miR-371a-5p 模拟物+LZTS2 过表达组	F值	P值
miR-371a-5p	1.00±0.06	3.05±0.29	2.96±0.25	214.439	< 0.001
LZTS2 mRNA	1.00±0.07	0.39±0.04	0.78±0.09	156.877	< 0.001
细胞活力 (%)	100.00±0.00	162.19±19.47	137.85±17.23	34.870	< 0.001
划痕愈合率 (%)	46.89±4.03	79.54±7.15	62.29±6.12	61.087	< 0.001
侵袭细胞数量 (个)	179.36±18.52	286.48±23.13	220.36±19.52	55.686	< 0.001
LZTS2 蛋白 (/β-actin)	0.51±0.05	0.21±0.02	0.43±0.03	152.421	< 0.001
E-cadherin 蛋白 (/β-actin)	0.92±0.08	0.58±0.06	0.74±0.07	46.604	< 0.001
N-cadherin 蛋白 (/β-actin)	0.48±0.04	0.95±0.07	0.62±0.06	138.376	< 0.001
Vimentin 蛋白 (/β-actin)	0.59±0.05	1.12±0.10	0.78±0.07	99.448	< 0.001
Twist 蛋白 (/β-actin)	0.68±0.05	1.35±0.12	0.89±0.08	120.961	< 0.001

2.5 miR-371a-5p过表达可抑制LZTS2 mRNA促进裸鼠体内TNBC的肿瘤生长 见图2和表4。结果显示,与裸鼠阴性对照组比较,裸鼠miR-371a-5p过表达组肿瘤体积、肿瘤重量、肿瘤组织miR-371a-5p表达水平显著升高,LZTS2 mRNA表达水平显著降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。说明miR-371a-5p过表达可通过抑制LZTS2 mRNA促进裸鼠体内TNBC的肿瘤生长。

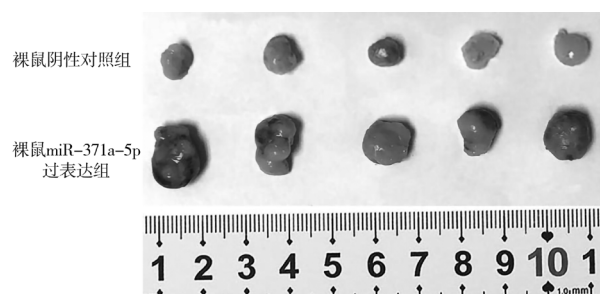


图2 裸鼠异种移植肿瘤组织

表4 miR-371a-5p 过表达可抑制 LZTS2 mRNA 促进裸鼠体内 TNBC 的肿瘤生长 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

项目	裸鼠阴性对照组	裸鼠 miR-371a-5p 过表达组	t 值	P 值
肿瘤体积 (mm ³)	215.36±20.39	658.58±58.65	15.961	< 0.001
肿瘤重量 (g)	0.24±0.02	0.59±0.04	17.500	< 0.001
miR-371a-5p	1.00±0.04	2.45±0.15	20.885	< 0.001
LZTS2 mRNA	1.00±0.03	0.49±0.04	22.808	< 0.001

3 讨论

乳腺癌在女性恶性肿瘤中居首位,严重威胁女性健康。尽管手术、放化疗和免疫治疗等方法有所进展,但 TNBC 总体的生存期仍不令人满意^[10]。越来越多的研究表明,肿瘤抑制基因的衰减或丢失,对 TNBC 的发生和发展起着至关重要的作用^[11-12]。因此,阐明肿瘤抑制基因的异常表达对于建立新的治疗策略和改善 TNBC 患者预后是极为重要的。

LZTS2 属于 LZTS 家族,与转录和细胞周期调控有关,其可作为抑癌基因,在防止自发性肿瘤的发展方面发挥重要作用^[13]。XU 等^[14]研究发现,LZTS2 在肝细胞癌患者肝癌组织中低表达,而激活 LZTS2 活性能够抑制肝癌细胞增殖和转移。DONG 等^[15]报道显示,提高结直肠癌细胞内 LZTS2 水平可使其增殖和转移能力显著减弱。本研究结果发现,LZTS2 mRNA 在 TNBC 组织和细胞中均呈现低表达,且 LZTS2 过表达可明显降低 MDA-MB-231 细胞活力、划痕愈合率、侵袭数量;与 XU 等^[14-15]研究结果一致,表明 LZTS2 可发挥对 TNBC 细胞恶性生物学行为的抑制效果。据报道,影响 TNBC 细胞侵袭和转移的关键因素是 EMT 的发生,EMT 是癌细胞获得间充质表型的过程,对肿瘤细胞的某些恶性行为极为重要,例如迁移、侵袭和免疫逃逸等^[16]。EMT 过程中发生的变化之一是上皮极性和细胞连接的丢失,E-cadherin 和 N-cadherin 水平变化在 EMT 中起着关键作用;另一方面,在 EMT 过程中,由于 Vimentin 与细胞极性蛋白的作用,导致细胞骨架和蛋白质复合物会发生变化,引起癌细胞发生转移^[17-18]。研究显示转录因子 Twist 可通过直接与 E-cadherin 作用进而诱导 EMT 的发生^[19]。本研究结果还发现,LZTS2 过表达会导致 MDA-MB-231 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平明显升高,N-cadherin 蛋白、Vimentin 蛋白、Twist 蛋白表达水平明显降低,提示 LZTS2 可能通过抑制 EMT 相关转录因子的表达进而抑制 EMT 的发生,从而达到减弱 TNBC 细胞增殖、迁移、侵袭的目的。

研究显示,miRNA 的异常表达与 TNBC 的发生发展密切相关,如:致癌基因 miR-429 能够促进 TNBC 细胞增殖、侵袭和 EMT^[20];抑制 miR-33a-5p

水平可显著促进 TNBC 细胞的增殖、浸润和转移^[21]。为了探究 LZTS2 的作用机制,经生物信息学分析发现,miR-371a-5p 可能通过与 LZTS2 的 3'-UTR 结合调控其表达,且通过双荧光素酶证实二者之间存在相互作用关系。随后本研究发现,MDA-MB-231 细胞中转染 miR-371a-5p 模拟物可显著抑制 LZTS2 mRNA 和蛋白表达,在 MDA-MB-231 细胞中 miR-371a-5p 可靶向负调控 LZTS2 水平。有报道发现,miR-371a-5p 与肝癌恶性程度呈正相关,其高表达能够使得肝癌细胞增殖和侵袭能力增强^[22]。为验证 miR-371a-5p 是否参与 TNBC 发展,本研究通过在 MDA-MB-231 细胞中转染 miR-371a-5p 模拟物来研究其功能,结果显示,过表达 miR-371a-5p 可明显促进 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT,表明 miR-371a-5p 在 TNBC 中发挥肿瘤促进因子的作用。进一步采用 miR-371a-5p 模拟物和 LZTS2 过表达联合转染 MDA-MB-231 细胞,发现 LZTS2 过表达可部分逆转 miR-371a-5p 模拟物对 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 的作用效果。同时裸鼠异种移植肿瘤实验证实,miR-371a-5p 过表达可有效加快肿瘤的生长,同时抑制 LZTS2 mRNA 的表达,表明 miR-371a-5p 可能通过靶向抑制 LZTS2 表达促进 TNBC 进展。

综上所述,本研究首次证明 LZTS2 是 TNBC 细胞中 miR-371a-5p 的下游基因,并且 miR-371a-5p 可能通过靶向抑制 LZTS2 对 TNBC 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 发挥促进作用。miR-371a-5p/LZTS2 轴可能作为一个 TNBC 治疗的靶点,为临床上应用 miRNA 抑制剂治疗 TNBC 提供理论依据。

参考文献:

- [1] JAN A, SOFI S, JAN N, et al. An update on cancer stem cell survival pathways involved in chemoresistance in triple-negative breast cancer[J]. *Future Oncology*, 2025, 21(6): 715-735.
- [2] LEON FERRE R A, JONAS S F, SALGADO R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer[J]. *JAMA*, 2024, 331(13): 1135-1144.
- [3] 张玲,徐海燕,王强力,等.三阴性乳腺癌组织中 lncRNA HCG11 mRNA 和 miR-4465 水平表达与临床病理特征及预后的相关性研究[J]. *现代检验医学*

- 杂志, 2025, 40(1): 84-89.
- ZHANG L, XU H Y, WANG Q L, et al. Correlation between lncRNA HCG11 mRNA and miR-4465 expression levels and clinicopathological features and prognosis in triple-negative breast cancer tissues[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2025, 40(1): 84-89.
- [4] 吴静静, 张辉. LZTS2、FN1、miR-146a与甲状腺癌临床病理参数关系研究[J]. *诊断病理学杂志*, 2024, 31(12): 1170-1174.
- WU J J, ZHANG H. Relationship between LZTS2, FN1, miR-146a and clinicopathologic parameters of thyroid cancer[J]. *Chinese Journal of Diagnostic Pathology*, 2024, 31(12): 1170-1174.
- [5] TANG Y N, SANG S L, GAO S, et al. Mechanistic insights into super-enhancer-related genes as prognostic signatures in colon cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2024, 16(11): 9918-9932.
- [6] ZHANG J, ZHANG L N, WANG J L, et al. Long non-coding RNA linc00921 suppresses tumorigenesis and epithelial-to-mesenchymal transition of triple-negative breast cancer via targeting miR-9-5p/LZTS2 axis[J]. *Human Cell*, 2022, 35(3): 909-923.
- [7] TAKAHASHI T, FUNAMURA M, WAKAI S, et al. Serum/glucose starvation enhances binding of miR-4745-5p and miR-6798-5p to HNRNPA1 mRNA 3'UTR: a novel method to identify miRNAs binding to mRNA 3'UTR using λ N peptide-boxB sequence [J]. *Non-coding RNA Research*, 2025, 11: 188-199.
- [8] WU W, LU P L, HUANG Y J, et al. Emodin regulates the autophagy via the miR-371a-5p/PTEN axis to inhibit hepatic malignancy[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 619(1): 1-8.
- [9] WANG C, FENG G S, ZHU J J, et al. Developing an immune signature for triple-negative breast cancer to predict prognosis and immune checkpoint inhibitor response[J]. *Future Oncology*, 2022, 18(9): 1055-1066.
- [10] VALCARCEL B, TORRES-ROMAN J S, ENRIQUEZ D, et al. Temporal variation of treatment patterns and survival outcomes of Triple-negative breast cancer patients: a real-world experience from 2000 to 2014[J]. *Clinical Breast Cancer*, 2023, 23(7): 737-745.e5.
- [11] ADAMS C M, MITRA R, XIAO Y C, et al. Targeted MDM2 degradation reveals a new vulnerability for p53-inactivated triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Discovery*, 2023, 13(5): 1210-1229.
- [12] MANOOCHEHRI M, BORHANI N, GERHÄUSER C, et al. DNA methylation biomarkers for noninvasive detection of triple-negative breast cancer using liquid biopsy[J]. *International Journal of Cancer*, 2023, 152(5): 1025-1035.
- [13] PENG Y, GREENLAND N Y, LANG U E, et al. LZTS2: a novel and independent prognostic biomarker for clear cell renal cell carcinoma [J]. *Pathology - Research and Practice*, 2022, 232: 153831.
- [14] XU L, LIU Q M, LIU H L, et al. Disrupting CCDC137-mediated LZTS2 and β -TrCP interaction in the nucleus inhibits hepatocellular carcinoma development via β -catenin and AKT[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2025, 32(1): 134-148.
- [15] DONG Z X, LI J H, DAI W Q, et al. RRP15 deficiency induces ribosome stress to inhibit colorectal cancer proliferation and metastasis via LZTS2-mediated β -catenin suppression[J]. *Cell Death & Disease*, 2023, 14(2): 89.
- [16] LI B, HUANG L, RUAN J. PKMYT1 promotes epithelial-mesenchymal transition process in triple-negative breast cancer by activating notch signaling[J]. *Revista de Investigacion Clinica*, 2024, 76(1): 45-59.
- [17] ASHRAFI P, SARI S, JAVANI J F, et al. Potentiated effects of photobiomodulation and celecoxib on the epithelial-mesenchymal transition signaling of E-cadherin, N-cadherin, α -SMA in breast cancer cells, MCF7, and MDA-MB-231[J]. *Photobiomodulation Photomedicine and Laser Surgery*, 2025, 43(4): 115-123.
- [18] FANG T Y, ZHANG L, YIN X, et al. The prognostic marker elastin correlates with epithelial-mesenchymal transition and vimentin-positive fibroblasts in gastric cancer[J]. *Journal of Pathology Clinical Research*, 2023, 9(1): 56-72.
- [19] NARWAL A, KUMARI K, KAUSHAL S, et al. The study of miRNA-200c expression and epithelial-to-mesenchymal transition-related transcription factors in the primary bladder urothelial carcinoma[J]. *Urology Annals*, 2023, 15(1): 35-42.
- [20] LI Y, MENG X, LUO Y Q, et al. The oncogenic miR-429 promotes triple-negative breast cancer progression by degrading DLC1[J]. *Aging (Albany NY)*, 2023, 15(18): 9809-9821.
- [21] CAO X H, CHEN X, YANG K, et al. Vaspin accelerates the proliferation, invasion and metastasis of Triple-negative breast cancer through miR-33a-5p/ABHD2[J]. *Cancer Medicine*, 2023, 12(4): 4530-4542.
- [22] LÜ Z B, QIU X, JIN P, et al. MiR-371a-5p positively associates with hepatocellular carcinoma malignancy but sensitizes cancer cells to oxaliplatin by suppressing BECN1-dependent autophagy[J]. *Life*, 2022, 12(10): 1651.

收稿日期: 2024-10-29

修回日期: 2025-04-27

欢迎来稿 欢迎订阅