

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.12.004  
文章编号: 1005-8982 (2024) 12-0017-07

实验研究·论著

## MicroRNA-26b 下调 MALAT-1 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞恶性生物学行为的机制研究\*

阮思蓓<sup>1</sup>, 熊小明<sup>1</sup>, 赵梓亦<sup>2</sup>, 杨青坤<sup>1</sup>, 张翠薇<sup>1</sup>

(1. 西南医科大学附属医院 病理科, 四川 泸州 646000; 2. 成都中医药大学附属医院 中医药调节代谢性疾病四川省重点实验室, 四川 成都 610000)

**摘要: 目的** 探索 microRNA-26b (miR-26b) 通过 MALAT-1 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞恶性生物学行为的分子机制。**方法** 以乳腺癌细胞系 MCF-7 作为研究对象, 采用慢病毒 LV-miR-26b-ctrl 和 LV-miR-26b 转染肿瘤细胞, 逆转录聚合酶链反应检测 MALAT-1、miR-26a 和 miR-26b 的 mRNA 表达, 平板克隆形成实验、CCK-8 细胞增殖实验、软琼脂成瘤实验、细胞划痕实验、Transwell 细胞侵袭实验分别检测肿瘤细胞的增殖、体外成瘤、迁移和侵袭能力。**结果** E2 组与 Mock 组 MCF-7 细胞 24、48、72 和 96 h 时吸光度值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点吸光度值比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ②两组吸光度值比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与 Mock 组比较, E2 组 72 和 96 h 时细胞增殖能力较 Mock 组提高 ( $P < 0.05$ ); ③两组吸光度值变化趋势比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 Mock 组相比, E2 组 MALAT-1 相对表达量升高 ( $P < 0.05$ ), miR-26a、miR-26b mRNA 相对表达量下降 ( $P < 0.05$ )。高表达 miR-26b 的乳腺癌患者的生存情况优于低表达 miR-26b 组, 死亡风险更低 ( $P < 0.05$ ), 低表达 miR-26a 组患者的生存情况优于高表达 miR-26a 组 ( $P < 0.05$ ), 用 Cox 比例风险回归模型, 将 miR-26a 作为一个独立的预后因素来比较, 两组患者的死亡风险比较无差异 ( $P > 0.05$ )。与 LV-miR-26b-ctrl 组比较, LV-miR-26b-ctrl/E2 组乳腺癌细胞的 MALAT-1 相对表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 与 LV-miR-26b-ctrl/E2 组比较, LV-miR-26b/E2 组乳腺癌细胞的 MALAT-1 相对表达量降低 ( $P < 0.05$ )。LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组、LV-miR-26b/E2 组细胞在 24、48、72 和 96 h 时吸光度值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点吸光度值比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ②各组吸光度值比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), LV-miR-26b-ctrl/E2 组 72 和 96 h 时细胞增殖能力明显较 LV-miR-26b-ctrl 组增强 ( $P < 0.05$ ), LV-miR-26b/E2 组 72 和 96 h 时细胞增殖能力较 LV-miR-26b-ctrl/E2 组降低 ( $P < 0.05$ ); ③各组吸光度值变化趋势比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。E2 处理后的 LV-miR-26b-ctrl 肿瘤细胞增殖和体外成瘤能力增强。与 LV-miR-26b-ctrl/E2 组比较, LV-miR-26b/E2 组肿瘤细胞的增殖和体外成瘤能力降低。在 24 h 时, LV-miR-26b-ctrl/E2 组细胞划痕间隙较 LV-miR-26b-ctrl 组变窄, LV-miR-26b/E2 组 24 h 时细胞的划痕间隙较 LV-miR-26b-ctrl/E2 组明显增宽。LV-miR-26b-ctrl/E2 组 Transwell 小室下方的乳腺癌细胞数量较 LV-miR-26b-ctrl 组增多, LV-miR-26b/E2 组的肿瘤细胞数量较 LV-miR-26b-ctrl/E2 组减少。**结论** 下调 MALAT-1 可能是 miR-26b 抑制乳腺癌恶性生物学行为的分子机制之一, miR-26b 有望成为乳腺癌治疗的调控靶点。

**关键词:** 乳腺癌; microRNA-26b; MALAT-1; 雌二醇; lncRNA; 浸润; 转移

**中图分类号:** R737.9

**文献标识码:** A

## MicroRNA-26b inhibits the malignant biological behavior of MCF-7 breast cancer cells by down-regulating MALAT-1\*

收稿日期: 2023-09-08

\* 基金项目: 四川省科技厅重点项目 (No: 2022YFS0404); 四川省中医药管理局 2021 年度中医药科研专项 (No: 2021MS510); 泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作应用基础研究项目 (No: 2019LZXNYDJ13)

[通信作者] 张翠薇, E-mail: zcw.37@163.com

Ruan Si-bei<sup>1</sup>, Xiong Xiao-ming<sup>1</sup>, Zhao Zi-yi<sup>2</sup>, Yang Qing-kun<sup>1</sup>, Zhang Cui-wei<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. TCM Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610000, China)

**Abstract: Objective** To explore the molecular mechanism of microRNA-26b (miR-26b) inhibiting the malignant biological behavior of MCF-7 breast cancer cells through MALAT-1. **Methods** MCF-7 breast cancer cell line was transduced with lentivirus-based vectors LV-miR-26b-ctrl and LV-miR-26b, and expressions of MALAT-1, miR-26a and miR-26b were measured by RT-PCR. The colony formation assay, CCK-8 assay, soft agar colony formation assay, scratch assay, and Transwell invasion assay were performed to detect the proliferation ability, in vitro tumorigenic capability, and migration and invasion abilities, respectively. **Results** The optical density values of MCF-7 cells at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h in the E2 group and the Mock group were compared via the repeated measures analysis of variance, which demonstrated that they were different among the time points ( $P < 0.05$ ) and between the two groups ( $P < 0.05$ ), and that the proliferation ability of cells at 72 h and 96 h in the E2 group was higher than that in the Mock group ( $P < 0.05$ ). There were differences in the change trends of the optical density values between the two groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the Mock group, the expression of MALAT-1 in the E2 group was higher ( $P < 0.05$ ), and the expressions of miR-26a and miR-26b were lower ( $P < 0.05$ ). Compared with the miR-26b low-expression group, the position of the survival curve of patients with breast cancer was higher in the miR-26b high-expression group, indicating a lower risk of death ( $P < 0.05$ ). Compared with the miR-26a low-expression group, the position of the survival curve of patients with breast cancer was lower in the miR-26a high-expression group ( $P < 0.05$ ). However, the risk of death was not significantly different between the two groups when including miR-26a as an independent prognostic factor in the Cox regression model ( $P > 0.05$ ). The expression of MALAT-1 in breast cancer cells of the LV-miR-26b-ctrl/E2 was higher than that in the LV-miR-26b-ctrl group ( $P < 0.05$ ), while the expression of MALAT-1 in breast cancer cells of the LV-miR-26b/E2 group was lower than that in the LV-miR-26b-ctrl/E2 ( $P < 0.05$ ). The optical density values of cells at 24 h, 48 h, 72 h and 96 h in the LV-miR-26b-ctrl group, LV-miR-26b-ctrl/E2 group, and LV-miR-26b/E2 group were compared via the repeated measures analysis of variance, and the results showed that they were different among the time points ( $P < 0.05$ ) and among the groups ( $P < 0.05$ ). The proliferation ability of cells at 72 h and 96 h in the LV-miR-26b-ctrl/E2 group was higher than that in the LV-miR-26b-ctrl group ( $P < 0.05$ ), and the proliferation ability of cells at 72 h and 96 h in the LV-miR-26b/E2 group was lower than that in the LV-miR-26b-ctrl/E2 group ( $P < 0.05$ ). There were differences in the change trends of the optical density values of cells among the groups ( $P < 0.05$ ). After E2 treatment, the proliferation ability and in vitro tumorigenic capability of cancer cells in the LV-miR-26b-ctrl group were enhanced. Compared with the LV-miR-26b-ctrl/E2 group, the proliferation ability and in vitro tumorigenic capability of cancer cells in the LV-miR-26b/E2 group were weakened. At 24 h, the gap in the scratch assay in the LV-miR-26b-ctrl/E2 group was narrower than that in the LV-miR-26b-ctrl group, while the gap in the scratch assay in the LV-miR-26b/E2 group was wider than that in the LV-miR-26b-ctrl/E2. The number of breast cancer cells in the bottom chamber of the Transwell in the LV-miR-26b-ctrl/E2 group was higher than that in the LV-miR-26b-ctrl group, whereas that in the LV-miR-26b/E2 group was lower compared with the LV-miR-26b-ctrl/E2 group. **Conclusions** Down-regulation of MALAT-1 may be one of the mechanisms underlying the role of miR-26b in inhibiting the malignant biological behavior of MCF-7 breast cancer cells, and miR-26b holds promise as a target for breast cancer therapy.

**Keywords:** breast cancer; microRNA-26b; MALAT-1; estradiol; lncRNA; invasion; metastasis

乳腺癌是全球第一大癌症<sup>[1]</sup>,发生、发展与雌激素水平密切相关<sup>[2]</sup>。综合疗法是目前乳腺癌最普遍的治疗手段。近年来,随着对非编码RNA(non-coding RNA, ncRNA),尤其是长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和微RNA(microRNA, miRNA)及其相互关系在癌基因和抑癌基因的研究

不断深入,越来越多的学者认为,ncRNA可以作为新的更有效的乳腺癌治疗靶点<sup>[3-5]</sup>。转移相关的肺腺癌转录物1(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)是一种可促进乳腺癌浸润和转移的主要lncRNA<sup>[6-7]</sup>。MALAT1可以通过“分子海绵”作用吸附多种miRNA<sup>[8]</sup>,miR-26家族就是其中之一。

目前,在雌激素调控网络中,MALAT1 与 miR-26b 的相互作用及其对乳腺癌恶性生物学行为的影响和分子机制尚不清楚。本文通过研究 MALAT-1 和 miR-26b 在经雌二醇(Estradiol, E2)处理的乳腺癌 MCF-7 细胞中的功能作用,并深入探寻其分子机制,期望为乳腺癌探寻新的基因治疗靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系、主要试剂及仪器

人乳腺细胞系 MCF-7 细胞购自美国 ATCC 细胞库,DMEM 培养基及胎牛血清均购自美国 Gibco 公司,TRIzol 试剂盒购自美国 Life Technology 公司,Oligo(dT) 购自上海生工生物工程技术有限公司,CCK-8 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,基底膜基质 Matrigel 和酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司。

### 1.2 细胞培养及分组

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 MCF-7 细胞,在 37 °C、5% 二氧化碳细胞培养箱中培养。将 MCF-7 细胞随机分为空白对照组(Mock 组)、雌二醇激素组(E2 组),观察 E2 处理对 MCF-7 细胞的影响。结合实验结果,将 MCF-7 细胞随机分为 miR-26b 高表达对照组(LV-miR-26b-ctrl 组)、miR-26b 高表达对照+E2 处理组(LV-miR-26b-ctrl/E2 组)、miR-26b 高表达+E2 处理组(LV-miR-26b/E2 组)。E2 组、LV-miR-26b/E2 组和 LV-miR-26b-ctrl/E2 组均使用 10 nmol/L 的 E2 处理 MCF-7 细胞,Mock 组和 LV-miR-26b-ctrl 组用同等体积的细胞培养基。

### 1.3 慢病毒转染

用慢病毒 LV-miR-26b-ctrl 转染 LV-miR-26b-ctrl 组和 LV-miR-26b-ctrl/E2 组的目的细胞,慢病毒 LV-miR-26b 转染 LV-miR-26b/E2 组的目的细胞,持续筛选获得稳定表达的肿瘤细胞。

### 1.4 方法

**1.4.1 逆转录聚合酶链反应检测 MALAT-1、miR-26a、miR-26b mRNA 表达** 细胞处理 48 h 后,用 1 mL TRIzol 试剂盒从  $5 \times 10^6$  个细胞中提取总 RNA,并用 100  $\mu$ L 去离子水溶解。将 1  $\mu$ g 细胞总 RNA 以 Oligo(dT) 为引物逆转录为 cDNA,反应条件:95 °C 预变性 2 min、95 °C 变性 10 s、72 °C 扩增 30 s,共 40 个循环。以  $\beta$ -actin 为内参,引物由广州复能基因有限公司合成。MALAT-1 正向引物:5'-CTTCCCTAGGGGATTTC

AGG-3',反向引物:5'-TAGTTGGCATCAAGGCAC TG-3',长度均 172 bp, $\beta$ -actin 正向引物:5'-CATG TACGTTGCTATCCAGGC-3',反向引物:5'-CTCCTT AATGTCACGCACGAT-3',长度均 250 bp。miR-26a 引物序列由广州复能基因有限公司设计并合成(货号:HmiRQP0353),miR-26b 引物序列由美国 Sigma-Aldrich 公司设计并合成(货号:MIRAP00065)。95 °C 预变性 1 min 后扩展并收集信号,每个检测重复 3 次,以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算目的基因的相对表达量。

**1.4.2 CCK-8 法检测细胞增殖** 在 96 孔板中接种 MCF-7 细胞,培养过夜使细胞贴壁。在 24、48、72 和 96 h 分别加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂,继续培养 1 h。结束后,注意避光,并采用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。每个组别设置 3 个复孔,以吸光度值表示各组细胞增殖活性,并绘制细胞生长曲线。

**1.4.3 平板克隆形成实验检测细胞增殖** 将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中,经胰蛋白酶消化、梯度倍数稀释后接种于培养皿中,培养 14 d,经甲醇固定、Giemsa 染色、于光镜下统计克隆细胞数,检测细胞增殖能力。

**1.4.4 软琼脂克隆形成实验检测肿瘤细胞的体外成瘤性** 将细胞接种于琼脂糖与培养基混合并凝固的试管中,培养 14 d。采用甲醇固定法对细胞进行室温固定 15 min, PBS 清洗 3 次后,用 Giemsa 室温染色 20 min,镜下观察采图,计算细胞克隆形成率,检测肿瘤细胞体外成瘤性。

**1.4.5 细胞划痕实验检测细胞迁移** 在 6 孔板中接种  $1 \times 10^6$  个/孔细胞密度的 MCF-7 细胞,培养过夜使细胞贴壁。待细胞融汇度达 100% 时,使用白色枪头同向、均匀划动,形成平行划痕,控制划痕宽度约 50  $\mu$ m。PBS 清洗,重新培养于无血清培养基中,0、24 h 后在相同位置成像,观察划痕愈合程度,计算细胞划痕愈合率,划痕愈合率=( $d_{0h}-d_{24h}$ )/ $d_{0h} \times 100\%$ 。

**1.4.6 Transwell 实验检测细胞侵袭** 将 50  $\mu$ L Matrigel 涂布于 Transwell 小室上层,并室温晾干。用胰酶重悬细胞,并将  $1 \times 10^4$  个细胞接种在小室上层空间,培养 48 h,用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 10 min。PBS 清洗,用棉签抹掉上层的 Matrigel 和未侵袭细胞,并用 0.1% 结晶紫室温染色 30 min。用 PBS 清洗 3 次后,镜下成像,计算侵袭细胞数。

### 1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 26.0 统计软件。计量资料

以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用  $t$  检验、单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用  $t$  检验; Kaplan-Meier 法分析生存资料并绘制生存曲线, Log-rank  $\chi^2$  检验比较两样本的生存曲线, Cox 比例风险回归模型分析影响患者预后的因素。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 E2 组与 Mock 组不同时间点吸光度值比较

E2 组与 Mock 组 MCF-7 细胞 24、48、72 和 96 h 时吸光度值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点吸光度值比较, 差异有统计学意义 ( $F = 311.931, P = 0.000$ ); ②两组吸光度值比较, 差异有统计学意义 ( $F = 39.273, P = 0.003$ ), 与 Mock 组比较, E2 组 72 和 96 h 时细胞增殖能力较 Mock 组提高 ( $P < 0.05$ ); ③两组吸光度值变化趋势比较, 差异有统计学意义 ( $F = 609.797, P = 0.000$ )。见表 1。

表 1 E2 组与 Mock 组不同时间点吸光度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
Mock 组	0.20 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.06
E2 组	0.21 $\pm$ 0.01	0.39 $\pm$ 0.03	0.60 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.06

### 2.2 E2 组与 Mock 组 MALAT-1、miR-26a、miR-26b mRNA 相对表达量比较

E2 组与 Mock 组 MALAT-1、miR-26a、miR-26b mRNA 相对表达量比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 与 Mock 组比较, E2 组的 MALAT-1 表达量升高, miR-26a、miR-26b 的表达量下降。见表 2。

表 2 E2 组与 Mock 组 MALAT-1、miR-26a、miR-26b mRNA 相对表达量比较 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	MALAT-1	miR-26a	miR-26b
Mock 组	0.98 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.08	1.16 $\pm$ 0.07
E2 组	3.33 $\pm$ 0.22	0.33 $\pm$ 0.08	0.41 $\pm$ 0.06
$t$ 值	17.836	11.905	14.649
$P$ 值	0.000	0.000	0.000

### 2.3 不同 miR-26a 和 miR-26b 表达水平乳腺癌患者的生存曲线

低表达 miR-26b 乳腺癌患者平均生存时间为 (115.67  $\pm$  2.55) 个月, 高表达 miR-26b 乳腺癌患者为

(123.09  $\pm$  2.18) 个月, 经 log-rank  $\chi^2$  检验, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 4.769, P = 0.029$ ), 高表达 miR-26b 乳腺癌患者生存情况优于低表达 miR-26b 组 ( $P < 0.05$ ), 死亡风险更低 ( $\hat{HR} = 0.657, P = 0.003$ ) (见图 1A)。低表达 miR-26a 乳腺癌患者的平均生存时间为 (122.29  $\pm$  2.05) 个月, 高表达 miR-26a 组乳腺癌患者为 (114.82  $\pm$  2.75) 个月, 经 Log-rank  $\chi^2$  检验, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 6.534, P = 0.011$ ), 低表达 miR-26a 组生存情况优于高表达 miR-26a 组 ( $P < 0.05$ ), 用 Cox 比例风险回归模型, 将 miR-26a 作为一个独立的预后因素来比较, 两组患者的死亡风险比较无差异 ( $\hat{HR} = 1.122, P = 0.061$ ) (见图 1B)。以上结果提示, miR-26b 是与乳腺癌患者预后更为密切相关的分子靶点。

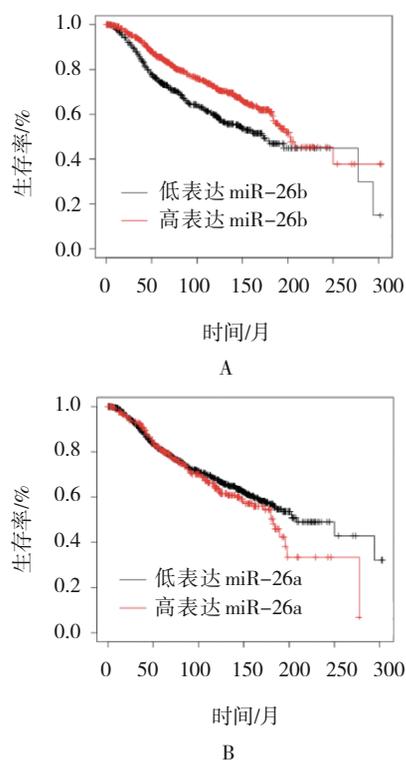


图 1 不同 miR-26a 和 miR-26b 表达水平乳腺癌患者的生存曲线

### 2.4 LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组与 LV-miR-26b/E2 组肿瘤细胞 MALAT-1 mRNA 相对表达量比较

LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组和 LV-miR-26b/E2 组肿瘤细胞 MALAT-1 mRNA 相对表达量分别为 (1.02  $\pm$  0.08)、(3.17  $\pm$  0.34)、(0.92  $\pm$  0.04), 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 122.192, P = 0.000$ )。与 LV-miR-26b-ctrl 组比较, LV-miR-

26b-ctrl/E2 组乳腺癌细胞的 MALAT-1 mRNA 相对表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 与 LV-miR-26b-ctrl/E2 组比较, LV-miR-26b/E2 组乳腺癌细胞的 MALAT-1 mRNA 相对表达量降低 ( $P < 0.05$ )。结合 2.1 结果提示, 过表达 miR-26b 可降低 E2 处理引起的 MALAT-1 的上调。

### 2.5 LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组与 LV-miR-26b/E2 组不同时间点吸光度值比较

LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组、LV-miR-26b/E2 组细胞在 24、48、72 和 96 h 时吸光度值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点吸光度值比较, 差异有统计学意义 ( $F = 809.688, P = 0.000$ ); ②各组吸光度值比较, 差异有统计学意义 ( $F = 46.361, P = 0.000$ ), LV-miR-26b-ctrl/E2 组 72、96 h 时细胞增殖能力较 LV-miR-26b-ctrl 组增强 ( $P < 0.05$ ), LV-miR-26b/E2 组 72 和 96 h 时细胞增殖能力较 LV-miR-26b-ctrl/E2 组降低 ( $P < 0.05$ ); ③各组吸光度值变化趋势比较, 差异有统计学意义 ( $F = 3847.702, P = 0.000$ )。见表 3。

### 2.6 平板克隆形成实验和软琼脂成瘤实验结果

LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组、LV-miR-26b/E2 组细胞增殖数分别为 ( $319.33 \pm 7.51$ )、( $752.33 \pm 27.68$ ) 和 ( $233.67 \pm 16.04$ ) 个/HP, 平板克隆成瘤数分别为 ( $34.33 \pm 1.16$ )、( $55.33 \pm 1.53$ ) 和 ( $25.00 \pm 1.00$ ) 个/HP。各组细胞增殖数、平板克隆

表 3 LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组与 LV-miR-26b/E2 组不同时间点吸光度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
LV-miR-26b-ctrl 组	0.21 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.53 ± 0.04	0.73 ± 0.05
LV-miR-26b-ctrl/E2 组	0.22 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.67 ± 0.04	0.98 ± 0.01
LV-miR-26b/E2 组	0.22 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.57 ± 0.04

成瘤数比较, 差异均有统计学意义 ( $F = -26.148, -18.995$ , 均  $P = 0.000$ ), E2 处理后的 LV-miR-26b-ctrl 肿瘤细胞增殖和体外成瘤能力较其他细胞增强 ( $P < 0.05$ ), 与 LV-miR-26b-ctrl/E2 组相比, LV-miR-26b/E2 组肿瘤细胞的增殖和体外成瘤能力显著降低 ( $P < 0.05$ )。结合 2.1 结果提示, 过表达 miR-26b 可逆转 E2 引起的乳腺癌 MCF-7 细胞增殖。见图 2、3。

### 2.7 各组细胞迁移能力比较

随着细胞培养时间延长, 各组乳腺癌细胞划痕间隙越来越小。LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组、LV-miR-26b/E2 组细胞划痕愈合率分别为 ( $0.09 \pm 0.05$ )%、( $0.57 \pm 0.02$ )%、( $0.36 \pm 0.04$ )%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 130.955, P = 0.000$ ) 在 24 h 时, LV-miR-26b-ctrl/E2 组细胞划痕间隙较 LV-miR-26b-ctrl 组变窄 ( $P < 0.05$ ), LV-miR-26b/E2 组 24 h 时细胞的划痕间隙较 LV-miR-26b-ctrl/E2 组明显增宽 ( $P < 0.05$ )。说明过表达 miR-26b 后, 乳腺癌细胞的迁移能力明显降低。见图 4。

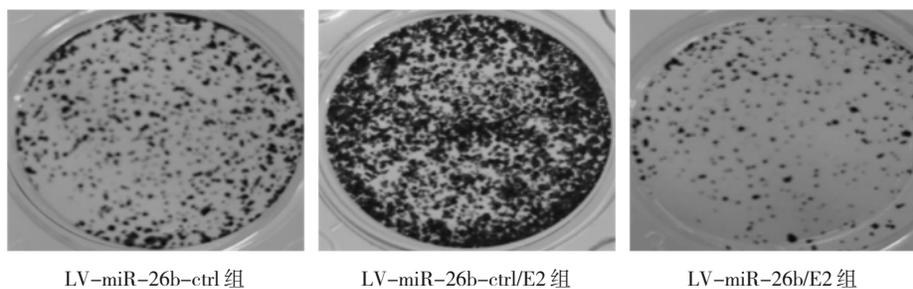


图 2 各组细胞克隆形成实验 ( $\times 10$ )

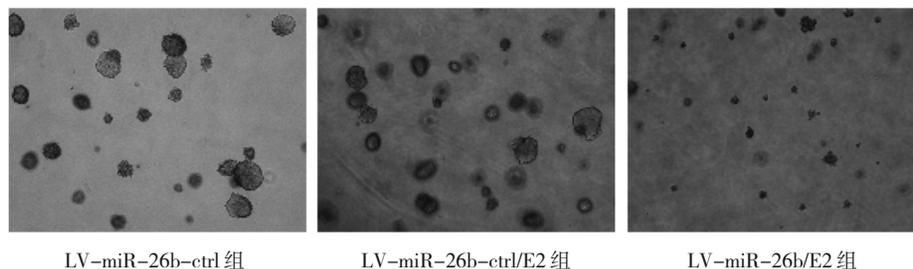


图 3 各组细胞软琼脂成瘤实验 ( $\times 10$ )

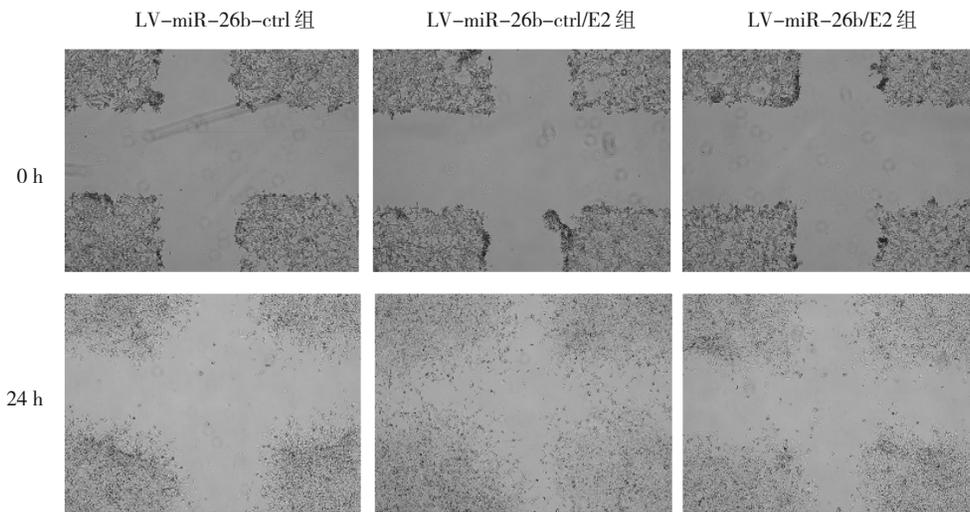


图4 各组细胞不同时间点的迁移能力 (×40)

### 2.8 各组细胞侵袭能力比较

LV-miR-26b-ctrl 组、LV-miR-26b-ctrl/E2 组、LV-miR-26b/E2 组 Transwell 小室下方每低倍视野的乳腺癌细胞数分别为  $(341.00 \pm 12.12)$  个/HP、 $(512.33 \pm 3.79)$  个/HP、 $(132.00 \pm 7.55)$  个/HP, 经方差分析, 差异具有统计学意义 ( $F = 1495.577, P =$

$0.000$ )。LV-miR-26b-ctrl/E2 组 Transwell 小室下方的乳腺癌细胞数量较 LV-miR-26b-ctrl 组增多 ( $P < 0.05$ ), LV-miR-26b/E2 组的肿瘤细胞数量较 LV-miR-26b-ctrl/E2 组减少 ( $P < 0.05$ )。说明过表达 miR-26b 后, 乳腺癌细胞的侵袭能力明显降低。见图 5。

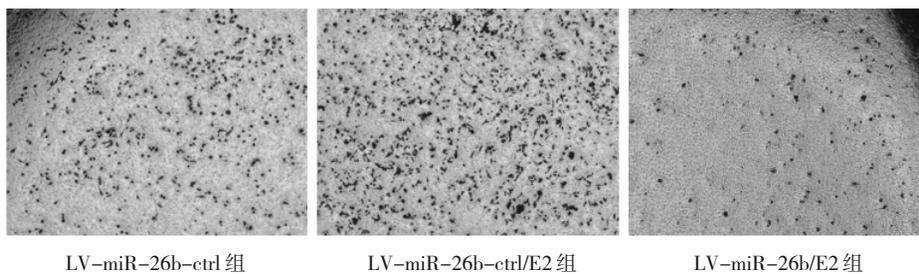


图5 各组细胞的侵袭能力 (×40)

## 3 讨论

乳腺癌是雌激素依赖性恶性肿瘤, 抑制雌激素作用下的癌细胞迁移、侵袭是控制疾病进展、改善预后的关键<sup>[9]</sup>。在雌激素发挥作用的复杂网络中, lncRNA 参与了表观遗传学、转录水平、转录后水平等不同层面的基因表达调控<sup>[10-11]</sup>, 成为影响乳腺癌浸润和转移的关键性因素。

目前认为, MALAT1 在乳腺癌组织中表达上调, 是一个影响乳腺癌浸润和转移的关键性 lncRNA<sup>[12]</sup>。本研究结果证实, 10 nmol/L E2 处理乳腺癌 MCF-7 细胞后, 上调的 MALAT-1 促进了肿瘤细胞增殖。MALAT-1 由超过 8 000 个核苷酸组成, 且其 3'-末端

为三螺旋结构, 这一结构更有利于暴露结合位点, 使其发挥“分子海绵”的作用吸附多种 miRNAs<sup>[13]</sup>, 并与 miRNAs 相互作用, 共同参与基因的转录后调控<sup>[14]</sup>。本研究通过对乳腺癌患者肿瘤组织的生物信息学筛选发现, lncRNA MALAT1 的表达水平与多种 miRNAs 的表达密切相关, 特别是与 miR-26a、miR-26b 的表达有相关性。miR-26a、miR-26b 均属于 miR-26 家族, 在多种恶性肿瘤中的表达与同源的正常组织或细胞有明显差异<sup>[15-17]</sup>, 广泛参与肿瘤的多种生物学过程<sup>[18-19]</sup>。因此, 本研究检测了 E2 作用下乳腺癌细胞的 miR-26a 和 miR-26b 的表达水平, 结果显示, E2 处理组的 miR-26a 及 miR-26b 相对表达量下降。说明 E2 促进 MCF-7 细胞增殖, 可能与上调

MALAT-1、下调 miR-26a 和 miR-26b 的表达有关。

接着笔者通过检索 TCGA 数据库, 并采用 Cox 比例风险回归模型将 miR-26b 和 miR-26a 作为独立的预后因素来比较, 结果显示: 高表达 miR-26b 组患者的死亡风险低于低表达 miR-26b 组, 而高表达 miR-26b 和低表达 miR-26b 组患者的死亡风险无统计学差异。这一结果说明, miR-26b 是一个更值得关注的、与乳腺癌患者的预后密切相关的分子靶点。于是笔者将慢病毒 LV-miR-26b-ctrl 和 LV-miR-26b 转染至乳腺癌 MCF-7 细胞, 结果显示, 过表达 miR-26b 可逆转 E2 引起的肿瘤细胞增殖、抑制 MCF-7 的体外成瘤、迁移和侵袭; 过表达 miR-26b 后, MALAT-1 的表达显著降低。结合 miR-26b 转染后的肿瘤细胞在 E2 处理条件下, 其细胞增殖、迁移、侵袭和体外成瘤能力均显著降低这一实验结果, 初步表明在 E2 作用下, 下调 MALAT-1 表达可能是 miR-26b 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞恶性生物学行为的分子机制之一, 过表达 miR-26b 可望成为新的乳腺癌靶向治疗方案。

综上所述, E2 处理后的乳腺癌 MCF-7 细胞 MALAT-1 表达增加、miR-26b 表达降低, 细胞增殖能力增强; 过表达 miR-26b 后 MALAT-1 表达下调, 且显著抑制雌激素条件下的乳腺癌细胞增殖、体外成瘤、迁移和侵袭, 因此, 下调 MALAT-1 可能是 miR-26b 抑制乳腺癌的分子机制之一。miR-26b 可能成为乳腺癌靶向治疗的分子标志物。

#### 参 考 文 献 :

- [1] REN W H, CHEN M Y, QIAO Y L, et al. Global guidelines for breast cancer screening: a systematic review[J]. *Breast*, 2022, 64: 85-99.
- [2] 路珩, 张一奇. 雌激素受体在雌激素受体阳性乳腺癌患者中的表达及其临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(18): 55-59.
- [3] WANG Z W, DENG H, JIN Y, et al. Circular RNAs: biology and clinical significance of breast cancer[J]. *RNA Biol*, 2023, 20(1): 859-874.
- [4] 郭艾敏, 朱爽, 张军. 乳腺癌中长非编码 RNA 及 LncRNA 编码多肽的功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2024, 40(3): 312-321.
- [5] SINGH S, SAINI H, SHARMA A, et al. Breast cancer: miRNAs monitoring chemoresistance and systemic therapy[J]. *Front Oncol*, 2023, 13: 1155254.
- [6] WANG Y Y, ZHANG Y J, HU K M, et al. Elevated long noncoding RNA MALAT-1 expression is predictive of poor prognosis in patients with breast cancer: a meta-analysis[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(8): BSR20200215.
- [7] 王亚军, 史珂, 刘辉, 等. 长链非编码 RNA 肺腺癌转移相关转录

本 1 在恶性肿瘤中作用和应用的进展[J]. *中国医药*, 2023, 18(12): 1897-1901.

- [8] YANG X Y, QIN C, ZHAO B B, et al. Long noncoding RNA and circular RNA: two rising stars in regulating epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 910678.
- [9] ABDERRAHMAN B, JORDAN V C. Estrogen for the treatment and prevention of breast cancer: a tale of 2 Karnofsky lectures[J]. *Cancer J*, 2022, 28(3): 163-168.
- [10] 刘凡, 施文瑜, 刘益飞, 等. 三阴性乳腺癌组织长链非编码 RNA-P21、microRNA-17-3p 的表达及其临床意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(5): 16-22.
- [11] 赵梓亦, 熊小明, 谢雨鹏, 等. 褪黑素通过雌激素受体下调长非编码 RNA MALAT-1 并发挥抗乳腺癌的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(3): 499-505.
- [12] MEKKY R Y, RAGAB M F, MANIE T, et al. MALAT-1: immunomodulatory lncRNA hampering the innate and the adaptive immune arms in triple negative breast cancer[J]. *Transl Oncol*, 2023, 31: 101653.
- [13] 金焯. lncRNA MALAT1 通过海绵吸附 miRNA-141-3p 调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 促进卵巢癌的生长及转移[J]. *医学研究杂志*, 2024, 53(4): 115-121.
- [14] ZHENG L H, ZHANG Y H, FU Y J, et al. Long non-coding RNA MALAT1 regulates BLCAP mRNA expression through binding to miR-339-5p and promotes poor prognosis in breast cancer[J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(2): BSR20181284.
- [15] HE Y, LIU H, JIANG L Y, et al. miR-26 induces apoptosis and inhibits autophagy in non-small cell lung cancer cells by suppressing TGF- $\beta_1$ -JNK signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1509.
- [16] CHENG X, JIA X P, WANG C N, et al. Hyperglycemia induces PFKFB3 overexpression and promotes malignant phenotype of breast cancer through RAS/MAPK activation[J]. *World J Surg Oncol*, 2023, 21(1): 112.
- [17] XU T T, XIE M Y, JING X M, et al. Loss of miR-26b-5p promotes gastric cancer progression via miR-26b-5p-PDE4B/CDK8-STAT3 feedback loop[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 77.
- [18] 宋倩倩, 徐克. MicroRNA-26a 与肿瘤[J]. *中国肺癌杂志*, 2017, 20(11): 769-774.
- [19] MIYAMOTO K, SEKI N, MATSUSHITA R, et al. Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer[J]. *Br J Cancer*, 2016, 115(3): 354-363.

(李科 编辑)

本文引用格式: 阮思蓓, 熊小明, 赵梓亦, 等. MicroRNA-26b 下调 MALAT-1 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞恶性生物学行为的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(12): 17-23.

Cite this article as: RUAN S B, XIONG X M, ZHAO Z Y, et al. MicroRNA-26b inhibits the malignant biological behavior of MCF-7 breast cancer cells by down-regulating MALAT-1[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(12): 17-23.