

miR-429 对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响及其机制

牛婷婷¹ 吴琨¹ 侯琳² 仇碧茹² 赵晓晖¹ 李金洋¹

(1 青岛大学附属医院乳腺外科,山东 青岛 266003; 2 青岛大学医学部生物化学与分子生物学系)

[摘要] **目的** 探讨 miR-429 对乳腺癌细胞增殖和迁移的影响及其机制。**方法** 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)法和免疫印迹法,分别检测乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT-549 细胞及正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 的 *eIF4E* mRNA 和蛋白相对表达量。在 MCF-7 细胞中转染 miR-429 mimics(A 组)、mimics NC (B 组)、miR-429 inhibitors(C 组)及 inhibitors NC(D 组),采用 RT-qPCR 法、CCK8 法、细胞划痕实验和免疫印迹法检测 A~D 组细胞 miR-429 表达情况、细胞增殖和迁移情况、*eIF4E* mRNA 和蛋白相对表达量。在 293T 细胞中转染 eIF4E-3'UTR-Wt+miR-429 mimics(E 组)、eIF4E-3'UTR-Wt+mimics NC(F 组)、eIF4E-3'UTR-Mut+miR-429 mimics(G 组)、eIF4E-3'UTR-Mut+mimics NC(H 组),检测 E~H 组细胞相对荧光素酶活性,分析 miR-429 对 *eIF4E* 的靶向调控作用。**结果** RT-qPCR 与免疫印迹检测结果显示, MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT-549 细胞中的 *eIF4E* mRNA 以及蛋白的相对表达量均明显高于正常乳腺上皮细胞 MCF-10A ($F=74.414, 1\ 981.243, P<0.01$)。RT-qPCR 法检测结果显示, A 组细胞的 miR-429 相对表达量明显高于 B 组 ($t=25.390, P<0.01$), 而 *eIF4E* mRNA 相对表达量明显低于 B 组 ($t=-6.363, P<0.05$), C 组细胞 miR-429 相对表达量明显低于 D 组 ($t=-4.652, P<0.05$), 而 *eIF4E* mRNA 相对表达量明显高于 B 组 ($t=-2.928, P<0.05$)。CCK8 实验检测结果显示, 与 B 组细胞相比, A 组细胞第 24、48、72 小时时的增殖活力明显降低 ($F=26.148\sim 40.997, P<0.01$); 与 D 组细胞相比, C 组细胞第 24、48、72 小时增殖活力明显增高 ($F=6.410\sim 82.593, P<0.05$)。细胞划痕实验显示, A 组细胞愈合率明显低于 B 组 ($t=-22.584, P<0.01$), C 组细胞愈合率明显高于 D 组 ($t=11.464, P<0.01$)。免疫印迹法检测结果显示, A 组细胞中 *eIF4E* 蛋白相对表达量明显低于 B 组 ($t=-20.355, P<0.01$), C 组细胞 *eIF4E* 蛋白相对表达量明显高于 D 组 ($t=3.622, P<0.01$)。双荧光素酶报告基因实验结果显示, 各组细胞相对荧光素酶活性比较差异具有显著性 ($F=366.823, P<0.05$), 而且 E 组细胞相对荧光素酶活性显著低于 F 组 ($t=-42.961, P<0.01$)。**结论** miR-429 或通过靶向调控 *eIF4E* 基因进而抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移。

[关键词] 乳腺肿瘤; 微 RNAs; 真核细胞起始因子 4E; 细胞增殖; 细胞运动**[中图分类号]** R737.9**[文献标志码]** A

EFFECT OF miR-429 ON THE PROLIFERATION AND MIGRATION OF BREAST CANCER CELLS AND ITS MECHANISM NIU Tingting, WU Li, HOU Lin, QIU Biru, ZHAO Xiaohui, LI Jinyang (Department of Breast Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of miR-429 on the proliferation and migration of breast cancer cells and its mechanism. **Methods** RT-qPCR and Western blotting were used to measure the relative mRNA and protein expression levels of *eIF4E* in breast cancer MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, and BT-549 cells and normal breast epithelial MCF-10A cells. MCF-7 cells were transfected with miR-429 mimics (group A), mimics NC (group B), miR-429 inhibitors (group C), and inhibitors NC (group D), and RT-qPCR, CCK-8 assay, wound healing assay, and Western blotting were used to measure the expression of miR-429, cell proliferation and migration, and the relative mRNA and protein expression levels of *eIF4E* in groups A-D. The 293T cells were transfected with eIF4E-3'UTR-Wt+miR-429 mimics (group E), eIF4E-3'UTR-Wt+mimics NC (group F), eIF4E-3'UTR-Mut+miR-429 mimics (group G), and eIF4E-3'UTR-Mut+mimics NC (group H), and relative luciferase activity was measured for groups E-H. The targeted regulatory effect of miR-429 on *eIF4E* was analyzed. **Results** RT-qPCR and Western blotting showed that the relative mRNA and protein expression levels of *eIF4E* in MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, and BT-549 cells were significantly higher than those in normal breast epithelial MCF-10A cells ($F=74.414, 1\ 981.243, P<0.01$). RT-qPCR showed that compared with group B, group A had a significantly higher relative expression level of miR-429 ($t=25.390, P<0.01$) and a significantly lower relative mRNA expression level of *eIF4E* ($t=-6.363, P<0.05$); group C had a significantly lower relative expression level of miR-429 than group D ($t=-4.652, P<0.05$) and a significantly higher relative mRNA expression level of *eIF4E* than group B ($t=-2.928, P<0.05$). CCK8 assay showed that compared with group B, group A had a significant reduction in proliferation activity at 24, 48, and 72 hours ($F=26.148-40.997, P<0.01$), and compared with group D, group C had a significant increase in proliferation activity at 24, 48, and 72 hours ($F=6.410-82.593, P<0.05$). Wound healing

assay showed that group A had a significantly lower healing rate than group B ($t=-22.584, P<0.01$), and group C had a significantly higher healing rate than group D ($t=11.464, P<0.01$). Western

[收稿日期] 2023-04-02; **[修订日期]** 2023-06-10**[基金项目]** 山东省重点研发项目(2019GSF107025)**[通讯作者]** 吴琨, Email: wuliqd@163.com

blotting showed that group A had a significantly lower relative protein expression level of *eIF4E* than group B ($t = -20.355, P < 0.01$), and group C had a significantly higher relative protein expression level of *eIF4E* than group D ($t = 3.622, P < 0.01$). Dual-luciferase reporter assay showed that there was a significant difference in relative luciferase activity between groups ($F = 366.823, P < 0.05$), and group E had a significantly lower relative luciferase activity than group F ($t = -42.961, P < 0.01$). **Conclusion** This study shows that *miR-429* may inhibit the proliferation and migration of breast cancer cells through targeted regulation of the *eIF4E* gene.

[KEY WORDS] Breast neoplasms; MicroRNAs; Eukaryotic initiation factor-4E; Cell proliferation; Cell movement

乳腺癌的发病率远高于其他女性肿瘤,严重威胁着女性生命健康,已成为全球第一大常见肿瘤^[1]。微小 RNA(miRNA)是在真核生物中内源性的具有调控功能的一类小分子非编码 RNA,其作用机制为通过与目的基因 mRNA 的 3'非翻译区(UTR)碱基互补配对结合,以转录后调节的方式调控靶基因的表达水平,影响细胞增殖、迁移等的生物学行为^[2]。*miR-429* 属于 miRNA-200 家族,作为癌基因或抑癌基因在多种肿瘤的发生发展中发挥着重要的调控作用^[3-4]。相关研究表明 *miR-429* 在乳腺癌中呈低表达,扮演抑癌基因的角色^[5]。真核细胞翻译起始因子 4E(*eIF4E*)可在翻译起始时特异性识别结合真核 mRNA 的 5'端帽子结构^[6],通过使 5'UTR 解旋影响 mRNAs 的代谢、加工、运输、翻译等,在帽依赖的翻译起始阶段发挥限制调控作用,调控蛋白质合成^[7-9]。近年研究发现,*eIF4E* 在乳腺癌组织中可能呈高表达,且其表达水平与乳腺癌的发生、浸润和转移密切相关^[10]。目前关于 *miR-429* 在乳腺癌发生进展中的调控机制尚不明确。本研究主要验证和探讨 *miR-429* 与 *eIF4E* 在乳腺癌中的靶向关系及其在乳腺癌细胞增殖、迁移中的作用,以求为乳腺癌的早期诊断、治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A、人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231、MDA-MB-468、MCF-7、BT-549 以及 293T 细胞获自青岛大学医学部分子生物学与生物化学实验室。DMEM 培养基购于武汉普诺赛生命科技有限公司,胰蛋白酶消化液、青/链霉素混合液、CCK-8 试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒购于自北京索莱宝生物科技有限公司,双荧光素酶报告基因检测试剂盒购于北京全式金生物;转染试剂 RNAi 购于上海汉恒生物科技有限公司,Trizol Reagent 购于美国 Invitrogen 公司,*eIF4E* 抗体购于英国 Abcam 公司,GAPDH 单克隆抗体购于武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.2 细胞培养及分组

将 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT-549、MCF-10A、293T 细胞置于含体积分数 0.10 胎牛血清和青/链霉素溶液的 DMEM 培养基中(其中青霉素浓度为 1 000 U/L,链霉素浓度为 1 mg/L),于 37 °C、含体积分数 0.05 CO₂ 的细胞培养箱中常规培养,传 1~2 代且待细胞融合度达到 80%~90% 时备用。在 6 孔板中培养 MCF-7 细胞,当其融合度达到 60%~70% 时,细胞分别转染 *miR-429* mimics (A 组)、mimics NC (B 组)、inhibitors (C 组) 以及 inhibitors NC (D 组)。构建 *eIF4E*-野生型(Wt)和 *eIF4E*-突变型(Mut)重组质粒,接种 293T 细胞于 6 孔板中,37 °C 下培养,待其融合度约达 40% 时,分别转染 *eIF4E*-3'UTR-Wt + *miR-429* mimics (E 组)、*eIF4E*-3'UTR-Wt + mimics NC (F 组)、*eIF4E*-3'UTR-Mut + *miR-429* mimics (G 组) 以及 *eIF4E*-3'UTR-Mut + mimics NC (H 组)。

1.3 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法和免疫印迹法检测乳腺癌细胞 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT-549 以及正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 中 *eIF4E* mRNA、蛋白相对表达量

使用 Trizol 试剂提取 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468、BT-549、MCF-10A 细胞 RNA,逆转录构建 cDNA,*eIF4E* mRNA 以 *GAPDH* 为内参照,采用 RT-qPCR 法检测各细胞系 *eIF4E* mRNA 的表达。上机反应条件为:95 °C 预变性 5 min;然后 95 °C 变性 10 s,60 °C 退火/延伸 30 s,共循环 40 次。各样本重复检测 3 次,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算 *eIF4E* mRNA 相对表达量。各引物序列见表 1。

以 RIPA 裂解液裂解提取上述细胞中的蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度,然后在 SDS-PAGE 上 80 V 电泳 30 min,转膜,室温下以 50 g/L 脱脂奶粉封闭 2 h,加入内参 *GAPDH* 一抗(1 : 1 000)、目的基因 *eIF4E* 一抗(1 : 2 000),4 °C 下过夜,1 × TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;二抗室温孵育 1 h,用 1 × TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;ECL 发光液 1 : 1 加到 PVDF 膜上,室温放置 1 min,采用成像系统显

影、拍照并测量灰度值,以计算 eIF4E 蛋白的相对表达量。eIF4E 蛋白相对表达量=eIF4E 蛋白条带灰度值/内参 GAPDH 蛋白条带灰度值。

1.4 CCK-8 法检测 A~D 组细胞增殖活力

收集转染后各组 MCF-7 细胞以 2 000 个/孔接种至 96 孔板,37 °C 常规培养,每组设置 5 个复孔,待细胞贴壁后转染,第 0、24、48、72 小时时分别向各孔细胞中加入 10 μ L CCK8 检测试剂,细胞培养箱内孵育 2 h,酶标仪测定波长 450 nm 处各孔吸光(A)值,以吸光度值反映细胞的增殖活力。

1.5 细胞划痕实验检测 A~D 组细胞迁移能力

准备 6 孔板,用马克笔在 6 孔板背后画横线,横线相隔 1 cm。将 A~D 组细胞接种于 6 孔板内,待细胞生长至铺满整孔时,用 200 μ L 枪头垂直于 6 孔板背后横线划痕,此时可出现一条无细胞区域,用无血清培养基冲洗除去所有被刮下的细胞及碎片,在 6 孔板中每孔加入 2 mL 无血清培养基,拍照显微镜在第 0、24 小时时拍摄划痕愈合的情况,并计算愈合率。愈合率=(24 h 痕迹面积-0 h 痕迹面积)/0 h 痕迹面积 \times 100%。

1.6 E~H 组细胞双荧光素酶报告基因活性检测

在 37 °C 下培养 E~H 组细胞 48 h,收集各组细胞并接种于 96 孔板中。裂解细胞,离心取上清液备用,使用双荧光素酶报告基因试剂盒于多功能酶标仪中测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性值,并计算相对荧光素酶的活性值。相对荧光素酶的活性值=萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性值。

1.7 RT-qPCR 法检测 A~D 组细胞中 miR-429、eIF4E mRNA 相对表达量

使用 Trizol 试剂提取 A~D 组细胞总 RNA,逆转录构建 cDNA,miR-429 以 U6 为内参照,eIF4E mRNA 以 GAPDH 为内参照,采用 RT-qPCR 法检测各组细胞 miR-429 及 eIF4E mRNA 的表达。上机反应条件同 1.3。各引物序列见表 1。

1.8 免疫印迹法测定 A~D 组 MCF-7 细胞 eIF4E 蛋白相对表达量

收集 A~D 组 MCF-7 细胞,RIPA 裂解液裂解提取蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。采用免疫印迹法检测各组细胞 eIF4E 蛋白的表达量。

1.9 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件对实验数据进行统计学分析,以 Image J 软件处理图像。所有实验均独立重复 3 次,结果取均值。各细胞系中 eIF4E mRNA

及蛋白均以 MCF-10A 作为对照,A、C 组 miR-429、eIF4E mRNA 及蛋白以 B、D 组为对照,将数据进行归一化处理。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,两组不同时间比较采用重复测量设计方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度 (bp)
miR-429	F:5'-GCGCTAATACTGTCTGGTAA-3'	20
	R:5'-TGCAGGGTCCGAGGTATT-3'	18
eIF4E	F:5'-AAACAACGGGGAGGACGA-3'	19
	R:5'-GAGGCTGAAGTGGGAGGAT-3'	19
GAPDH	F:5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAAG-3'	22
	R:5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'	19
U6	F:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17
	R:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	20

2 结 果

2.1 各乳腺癌细胞系及正常乳腺上皮细胞 eIF4E mRNA 及蛋白表达情况

RT-qPCR 法检测结果显示,乳腺癌 MDA-MB-468、MCF-7、BT549、MDA-MB-231 细胞以及正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 的 eIF4E mRNA 相对表达量分别为 2.077 ± 0.119 、 1.443 ± 0.055 、 1.175 ± 0.064 、 1.113 ± 0.041 、 1.000 ± 0.057 ,各组比较差异有显著性($F = 74.414$, $P < 0.01$)。免疫印迹结果显示,上述各细胞系中 eIF4E 蛋白相对表达量分别为 3.483 ± 0.025 、 2.675 ± 0.038 、 2.038 ± 0.019 、 1.635 ± 0.039 、 1.000 ± 0.027 ,各组比较差异有显著性($F = 1\,981.243$, $P < 0.01$)。

2.2 A~D 组细胞 miR-429 相对表达量比较

RT-qPCR 结果显示,A~D 组细胞 miR-429 相对表达量分别为 41.565 ± 2.259 、 1.000 ± 0.048 、 0.578 ± 0.087 、 1.000 ± 0.094 ,各组细胞 miR-429 相对表达量比较差异均具有显著性($F = 647.102$, $P < 0.01$);其中 A 组较 B 组细胞 miR-429 相对表达量显著增高($t = 25.390$, $P < 0.01$),C 组较 D 组细胞 miR-429 的相对表达量显著降低($t = -4.652$, $P < 0.05$),说明转染成功,可进行后续实验。

2.3 A~D 组细胞增殖活力比较

重复测量设计的方差分析结果显示,时间、组别、时间与组别交互作用对 A、B 组 MCF-7 细胞增殖活力均具有显著的影响($F_{\text{时间}} = 1\,146.338$, $F_{\text{组别}} = 39.809$, $F_{\text{时间} \times \text{组别}} = 14.510$, $P < 0.01$)。单独效应分

析结果显示, A 组细胞第 0、24 小时时的增殖活力相比, B 组细胞第 0、24 小时时的增殖活力相比, 差异均有显著性 ($F = 332.338, 827.901, P < 0.01$); 培养至第 24、48、72 小时时, A 组细胞增殖活力明显低于 B 组 ($F = 26.148 \sim 40.997, P < 0.01$)。重复测量设计的方差分析结果显示, 时间、组别、时间与组别交互作用对 C、D 组 MCF-7 细胞增殖活力均具有明显的影响 ($F_{\text{时间}} = 682.353, F_{\text{组别}} = 32.159, F_{\text{时间} \times \text{组别}} = 4.321, P < 0.01$)。单独效应分析结果显示, C 组细胞第 0、24 小时时的增殖活力相比, D 组细胞第 0、24 小时时的增殖活力相比, 差异均具有显著性 ($F = 756.132, 209.376, P < 0.01$); 培养至第 24、48、72 小时时, C 组细胞的增殖活力较 D 组显著性增强 ($F = 6.410 \sim 82.593, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 A~D 组 MCF-7 细胞增殖活力比较 ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

分组	第 0 小时	第 24 小时	第 48 小时	第 72 小时
A 组	0.473±0.010	0.518±0.011	0.938±0.061	1.152±0.038
B 组	0.462±0.026	0.560±0.012	1.088±0.029	1.311±0.020
C 组	0.473±0.025	0.640±0.024	1.200±0.024	1.451±0.052
D 组	0.485±0.051	0.518±0.013	1.077±0.047	1.318±0.086

2.4 A~D 组细胞迁移能力比较

细胞划痕实验结果显示, A~D 组的细胞愈合率分别为 $16.497 \pm 0.419, 31.806 \pm 0.862, 39.293 \pm 0.715, 31.428 \pm 0.656$, 各组细胞愈合率比较差异有显著性 ($F = 392.425, P < 0.01$); 其中 A 组细胞较 B 组细胞愈合率明显降低 ($t = -22.584, P < 0.01$); 而 C 组细胞较 D 组细胞愈合率明显增高 ($t = 11.464, P < 0.01$)。见图 1。

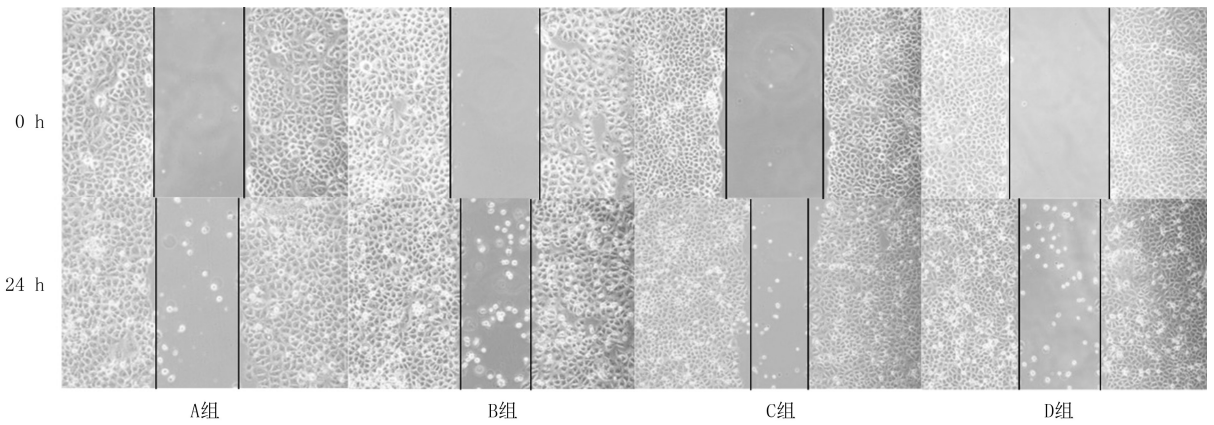


图 1 转染后 A~D 组 MCF-7 细胞迁移能力比较 (40 倍)

2.5 E~H 组细胞双荧光素酶报告基因活性检测

双荧光素酶报告基因实验检测结果显示, E~H 组细胞相对荧光素酶活性值分别为 $0.503 \pm 0.008, 0.997 \pm 0.014, 0.995 \pm 0.031, 0.995 \pm 0.011$, 各组细胞相对荧光素酶活性比较差异均具有显著性 ($F = 366.823, P < 0.05$); 其中 E 组较 F 组细胞相对荧光素酶活性显著性下调 ($t = -42.961, P < 0.01$), G 组与 H 组细胞比较相对荧光素酶活性无显著性变化 ($P > 0.05$)。

2.6 A~D 组细胞 eIF4E mRNA 相对表达量比较

RT-qPCR 法结果显示, A~D 组细胞 eIF4E mRNA 的相对表达量分别为 $0.304 \pm 0.050, 1.000 \pm 0.144, 1.727 \pm 0.328, 1.000 \pm 0.126$, 各组细胞中 eIF4E mRNA 相对表达量比较差异有显著性 ($F = 18.342, P < 0.01$); 其中 A 组较 B 组细胞 eIF4E mRNA 的相对表达量显著降低 ($t = -6.363, P < 0.05$), C 组较 D 组细胞 eIF4E mRNA 的相对表达量显著升高 ($t = -2.928, P < 0.05$)。

2.7 A~D 组 eIF4E 蛋白相对表达量比较

免疫印迹结果显示, A~D 组细胞 eIF4E 蛋白相对表达量分别为 $0.309 \pm 0.012, 1.000 \pm 0.046, 1.166 \pm 0.058, 1.000 \pm 0.028$, 各组细胞 eIF4E 蛋白相对表达量比较差异具有显著性 ($F = 178.306, P < 0.01$); 其中 A 组较 B 组细胞 eIF4E 蛋白相对表达量显著降低 ($t = -20.355, P < 0.01$), C 组较 D 组细胞 eIF4E 蛋白的相对表达量显著升高 ($t = 3.622, P < 0.05$)。见图 2。

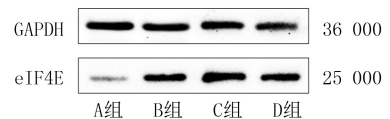


图 2 转染后 A~D 组 MCF-7 细胞 eIF4E 蛋白免疫印迹结果

3 讨 论

乳腺癌是一种十分常见女性恶性肿瘤, 目前其发病率呈逐年上升趋势, 因此发现并了解参与乳腺癌发生发展的可能基因位点, 探讨乳腺癌发生的分

子机制,具有十分重要的意义^[11]。

miRNA 通过与目的基因 mRNA 的 3'UTR 碱基互补配对结合,降解或抑制靶基因转录,从而抑制转录后蛋白质的翻译,负性调节基因表达,影响癌细胞生物学功能^[2-3,12]。有研究发现,miR-429 在多种肿瘤中存在表达并发挥调控作用。如 miR-429 在肾细胞癌^[13]、胰腺导管腺癌^[14]、子宫颈癌^[15]等肿瘤中呈低表达,可发挥抑癌基因作用;但在肺癌^[16]、前列腺癌^[17]、子宫内膜癌^[18]等肿瘤中呈高表达,发挥癌基因作用。目前相关的研究发现,miR-429 可通过调控 *Bcl-2*、*LRP1*、*ZEB1/ZEB2* 等靶基因来参与细胞增殖^[4]、侵袭及上皮间质转化等过程^[19]。

研究发现,*eIF4E* 的过表达在体外可促进细胞的增殖和恶性转化,在体内实验中则可促进小鼠肿瘤的形成并增加肿瘤侵袭性^[20]。*eIF4E* 作为正常的翻译起始因子存在于所有正常细胞中,但在多种恶性肿瘤中被检测到其高表达,因此 *eIF4E* 可能作为癌基因在肿瘤发病中起着重要作用^[21]。*eIF4E* 表达水平与肿瘤的发生、进展和转移等恶性生物学行为密切相关,*eIF4E* 表达升高时可以促进一部分 *eIF4E* 敏感性的基因(如 *c-Myc*^[22]、*VEGF*^[23] 以及 *MMP-9* 等)的出核和翻译启动,进而促进癌基因表达。*eIF4E* 蛋白磷酸化在 *eIF4E* 致癌机制中起决定性的作用^[6],*eIF4E* 的磷酸化水平在多种肿瘤中升高并与肿瘤进展和预后相关。研究证实,磷酸化的 *eIF4E* 可以使肿瘤细胞获得最大的侵袭和转移潜能^[24-25],转移性肿瘤细胞中磷酸化 *eIF4E* 水平远高于非侵袭性或非转移性细胞^[26]。*miR-429* 是否参与调控 *eIF4E* 磷酸化过程以及是否能够调控磷酸化 *eIF4E* 蛋白参与肿瘤细胞恶性行为,有待进一步实验验证和探讨。

本研究采用生物信息学方法预测 *miR-429* 与 *eIF4E* 靶向关系,结果显示 *eIF4E* 基因 3'UTR 与 *miR-429* 存在互补配对的结合位点;E 组细胞较 F 组细胞相对荧光素酶活性显著下调,双荧光素酶实验表明 *miR-429* 与 *eIF4E* 间存在结合作用;A 组细胞较 B 组细胞 *miR-429* 表达水平增高,细胞增殖及迁移能力被显著抑制,*eIF4E* mRNA 和蛋白表达水平显著降低;而 C 组细胞较 D 组细胞 *miR-429* 表达被抑制,细胞增殖、迁移能力明显增强,*eIF4E* mRNA 和蛋白表达水平升高。故而证明 *miR-429* 通过靶向 *eIF4E* 调控乳腺癌的增殖、迁移能力,从而抑制乳腺癌的发生发展。*miR-429* 与 *eIF4E* 基因 3'UTR 互补结合以实现调控作用,调控机制可

能为 *miR-429* 抑制或降解 *eIF4E* mRNA,进而抑制翻译产生 *eIF4E* 蛋白,最终减少翻译起始复合物的形成,影响基因 5'UTR 解旋,减少其他相关癌蛋白的合成。

综上所述,*miR-429* 可通过靶向调控 *eIF4E* 抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移,从而抑制乳腺癌发生进展。生物信息学预测发现 *miR-429* 参与调控多个靶基因以及信号通路,其调控更多靶基因的机制以及 *eIF4E* 促癌的机制尚需进一步研究。

作者声明:牛婷婷、侯琳、吴琨参与了研究设计;牛婷婷、吴琨、仇碧茹、赵晓晖、李全洋参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 宓露丝,李婧婷,边学海,等. CYFRA21.1 在辅助乳腺癌临床诊疗中的应用进展[J]. 中国实验诊断学, 2021, 25(8):1240-1243.
- [2] CORREIA DE SOUSA M, GJORGJIEVA M, DOLICKA D, et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(24):6249.
- [3] 韩清昕,侯琳,吴琨,等. miR-429 对乳腺癌细胞增殖的影响及其作用机制[J]. 精准医学杂志, 2020, 35(4):334-338.
- [4] GUO C M, LIU S Q, SUN M Z. miR-429 as biomarker for diagnosis, treatment and prognosis of cancers and its potential action mechanisms: A systematic literature review[J]. Neoplasma, 2020, 67(2):215-228.
- [5] ZHANG X X, YU X Y, ZHAO Z G, et al. microRNA-429 inhibits bone metastasis in breast cancer by regulating CRKL and MMP-9[J]. Bone, 2020, 130:115139.
- [6] YANG X T, ZHONG W, CAO R F. Phosphorylation of the mRNA cap-binding protein eIF4E and cancer[J]. Cell Signal, 2020, 73:109689.
- [7] UTTAM S, WONG C, PRICE T J, et al. eIF4E-dependent translational control: A central mechanism for regulation of pain plasticity[J]. Front Genet, 2018, 9:470.
- [8] ROSS-KASCHITZA D, ALTMANN M. eIF4E and interactors from unicellular eukaryotes[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(6):2170.
- [9] HERNÁNDEZ G. The versatile relationships between eIF4E and eIF4E-interacting proteins[J]. Trends Genet, 2022, 38(8):801-804.
- [10] 田世馨,尚立娜,马应全,等. 乳腺癌中肿瘤相关巨噬细胞的浸润与 *eIF4E* 表达的关系[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2019, 40(3):54-58.
- [11] 何丽杰,陈会佳,王静,等. miRNA-200b 通过靶向 RhoA 抑制宫颈癌细胞增殖、促进细胞凋亡[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(13):1576-1581.
- [12] LU T X, ROTHENBERG M E. microRNA[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(4):1202-1207. (下转第 408 页)

- [2] PHAN N N, CHATTOPADHYAY A, LEE T T, et al. High-performance deep learning pipeline predicts individuals in mixtures of DNA using sequencing data[J]. *Brief Bioinform*, 2021,22(6):bbab283.
- [3] FUKUTA M, KATO C, BIWASAKA H, et al. Sex estimation of the pelvis by deep learning of two-dimensional depth images generated from homologous models of three-dimensional computed tomography images[J]. *Forensic Sci Int*, 2020, 2:100129.
- [4] NGUYEN X H, TRAN T S, LE V T, et al. Learning Spatio-temporal features to detect manipulated facial videos created by the Deepfake techniques [J]. *Forensic Sci Int*, 2021, 36: 301108.
- [5] 李媛,赵欢,梁伟波,等. 计算机辅助法医影像学骨骼个体识别的研究进展[J]. *法医学杂志*, 2021,37(2):239-247.
- [6] 黎智辉,谢兰迟,王桂强,等. 基于人脸特征相似度分数似然比的人脸比对方法[J]. *刑事技术*, 2019,44(1):1-8.
- [7] 冯妍妍,魏德健,倪伟. 深度学习在肺结节辅助诊断中的应用[J]. *计算机工程与应用*, 2022,58(18):59-70.
- [8] 张军,黄勇,黄晓雨,等. 基于深度学习的食管癌肿瘤靶区自动勾画临床价值研究[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2022,35(4):334-340.
- [9] 邢珍珍,颜立祥,张麟华. 基于深度学习的 2D/3D 图像配准方法在脊柱微创导航手术中的应用[J]. *护理研究*, 2022,36(9):1631-1636.
- [10] 潘英华,董建军,刘丰春. 烟台地区青少年膝、踝部长骨干骺融合的研究[J]. *中国保健*, 2007,15(8):12-13.
- [11] 彭钊,范飞,李真林,等. 应用膝关节三种磁共振加权像推断年龄[J]. *刑事技术*, 2020,45(5):491-496.
- [12] ZABIHOLLAHY F, SCHIEDA N, KRISHNA JEYARAJ S, et al. Automated segmentation of prostate zonal anatomy on T2-weighted (T2W) and apparent diffusion coefficient (ADC) map MR images using U-Nets[J]. *Med Phys*, 2019,46(7):3078-3090.
- [13] 王亚辉,朱广友,应充亮,等. 青少年膝、踝关节骨骺闭合趋势与骨龄鉴定[J]. *法医学杂志*, 2010,26(2):91-96.
- [14] 李明,杨小城,宋若冰,等. 男性第四肋软骨和肋骨胸骨端形态推断年龄的研究[J]. *中国法医学杂志*, 2021,36(4):379-381.
- [15] 张继宗,李卫平. 髌骨耳状面的年龄变化[J]. *刑事技术*, 1988(3):25-26.
- [16] 阿不都吉里力·阿不都克里木,李学刚,成建定,等. 男性青少年骨盆 X 线片骨骺融合增龄性变化的初步观察[J]. *新疆医科大学学报*, 2010,33(8):947-949.
- [17] LU T, SHI L, ZHAN M J, et al. Age estimation based on magnetic resonance imaging of the ankle joint in a modern Chinese Han population[J]. *Int J Leg Med*, 2020,134(5):1843-1852.
- [18] 钟鑫. 应用膝关节磁共振 T1 加权像和 PD 加权像推断活体年龄[D]. 青岛:青岛大学, 2021.
- [19] 宋娟,宫平,高畅,等. 基于深度学习的儿童骨龄智能评估模型构建及初步临床验证[J]. *中华放射学杂志*, 2019,53(11):974-978. (本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 404 页)

- [13] 郭春梅,刘淑清,孙明忠. miR-429 与肿瘤[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018,34(8):826-832.
- [14] LIU D, SONG L Q, DAI Z J, et al. miR-429 suppresses neurotrophin-3 to alleviate perineural invasion of pancreatic cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018,505(4):1077-1083.
- [15] SHEN F J, ZHENG H Y, ZHOU L M, et al. Overexpression of MALAT1 contributes to cervical cancer progression by acting as a sponge of miR-429[J]. *J Cell Physiol*, 2019,234(7):11219-11226.
- [16] 张文思,陈吉. 肝癌缺失基因-1 在结肠癌中的相关性研究[J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2018,6(16):27,30.
- [17] ABISOYE-OGUNNIYAN A, LIN H X, GHEBREMEDHIN A, et al. Transcriptional repressor kaiso promotes epithelial to mesenchymal transition and metastasis in prostate cancer through direct regulation of miR-200c[J]. *Cancer Lett*, 2018, 431:1-10.
- [18] DONKERS H, BEKKERS R, GALAAL K. Diagnostic value of microRNA panel in endometrial cancer: A systematic review[J]. *Oncotarget*, 2020,11(21):2010-2023.
- [19] SHEN J, HONG L, YU D, et al. LncRNA XIST promotes pancreatic cancer migration, invasion and EMT by sponging miR-429 to modulate ZEB1 expression[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2019,113:17-26.
- [20] ROBICHAUD N, HSU B E, ISTOMINE R, et al. Translational control in the tumor microenvironment promotes lung metastasis: Phosphorylation of eIF4E in neutrophils[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018,115(10):E2202-E2209.
- [21] LIU X J, VAIDYA A M, SUN D, et al. Role of eIF4E on epithelial-mesenchymal transition, invasion, and chemoresistance of prostate cancer cells[J]. *Cancer Commun*, 2020,40(2-3):126-131.
- [22] KNIGHT J R P, ALEXANDROU C, SKALKA G L, et al. MNK inhibition sensitizes KRAS-mutant colorectal cancer to mTORC1 inhibition by reducing eIF4E phosphorylation and c-MYC expression[J]. *Cancer Discov*, 2021,11(5):1228-1247.
- [23] 胡权腾,郭海谢,吴春雷,等. 基于 AKT/mTORC1 和 HIF1/VEGF 通路研究 eIF4E 基因调控肺腺癌血管新生中的作用机制[J]. *中国卫生检验杂志*, 2020,30(18):2183-2185,2207.
- [24] 邢运,周大臣,贺良,等. 萝卜硫素下调结肠癌中 eIF4F 翻译起始复合物的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2022,57(10):1645-1649,1655.
- [25] JIA X F, ZHOU H. Phospho-eIF4E: A new target for acute myeloid leukemia[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2021,22:328-335.
- [26] TANG Y X, LUO J D, YANG Y, et al. Overexpression of p-4EBP1 associates with p-eIF4E and predicts poor prognosis for non-small cell lung cancer patients with resection[J]. *PLoS One*, 2022,17(6):e0265465. (本文编辑 范睿心 厉建强)