

姜黄素通过调控 miR-7641/PTPN14 分子轴抑制乳腺癌发展进程的分子机制研究

孟 亚¹, 张晓雯¹, 刘玉国²

1. 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 山东 济南 250200

2. 山东大学附属山东肿瘤医院药学部, 山东 济南 250117

摘要: 目的 探讨姜黄素通过调控 miR-7641/PTPN14 分子轴抑制乳腺癌发展进程的分子机制。方法 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测乳腺癌患者癌组织及细胞系中 miR-7641 表达情况; 使用 Kaplan-Meier 方法作乳腺癌患者生存曲线; 采用不同浓度的姜黄素处理细胞, 或转染 miR-7641 mimic、Anti-miR-7641 及 pcDNA-PTPN14 载体, 采用 qRT-PCR 检测 miR-7641 表达情况, MTT 实验及克隆形成实验检测细胞增殖能力, Transwell 小室法检测细胞迁移及侵袭, western blotting 检测 Ki67、pcDNA、CyclinD1、Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-8 蛋白表达水平, 采用双荧光素酶报告基因系统检测 miR-7641 与 PTPN14 靶向调控关系。结果 与癌旁组织或乳腺正常上皮细胞比较, miR-7641 在乳腺癌患者癌组织及乳腺癌细胞系中高表达 ($P < 0.01, 0.001$), 且 miR-7641 能够明显促进乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 并促进 Ki67、pcDNA、CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达, 抑制 Bax、caspase-3、caspase-8 蛋白表达; miR-7641 与 PTPN14 3'-UTR 靶向结合, 姜黄素通过 miR-7641/PTPN14 分子轴抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭 ($P < 0.01, 0.001$), 并抑制 Ki67、pcDNA、CyclinD1、Bax 蛋白表达, 促进 Bcl-2、caspase-3、caspase-8 蛋白表达。结论 姜黄素可通过下调 miR-7641 促进 PTPN14 表达, 进而抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

关键词: 姜黄素; miR-7641; PTPN14; 乳腺癌; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2020) 01-0042-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.01.007

The mechanism of curcumin suppressed progress of breast cancer by regulating miR-7641/PTPN14 axis

MENG Ya¹, ZHANG Xiaowen¹, LIU Yugu²

1. College of Medicine and Life Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, University of Jinan, Jinan 250200, China,

2. Department of Pharmacy, Shandong Cancer Hospital, Shandong University, Jinan 250117, China

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of curcumin inhibiting the development of breast cancer by regulating mir-7641 / ptpn14 molecular axis. **Methods** Detection of mir-7641 expression in breast cancer tissues and cell lines by real-time fluorescent quantitative PCR, the survival curve of breast cancer patients were analyzed using Kaplan-Meier. Breast cancer cells were treated with curcumin at different concentrations, or transfected with miR-7641 mimic, Anti- miR-7641 or pcDNA-PTPN14, qRT-PCR was used to measure miR-7641 expression, MTT assay and colony formation assay was used to determine cell viability, and Transwell assay used to performed to detect cell migration and invasion, Ki67, pcDNA, clinD1, Bax, Bcl-2, caspase-3 and caspase-8 protein level were analyzed by western blotting. Dual-luciferase report assay was performed to verify miR-7641 and PTPN14 relationship. **Results** miR-7641 expression was up-regulated in breast cancer tissues and cell lines ($P < 0.01$ and 0.001). miR-7641 promoted cell proliferation, migration and invasion ($P < 0.05, 0.01$ and 0.001), up-regulated Ki67, pcDNA, CyclinD1, Bax levels, inversely, inhibited Bcl-2, caspase-3, caspase-8 levels, miR-7641 directly targeted with PTPN14. mir-7641 and PTPN14 3' - UTR targeted binding, curcumin through mir-7641/PTPN14 molecular axis inhibit the proliferation, migration and invasion of breast cancer cells ($P < 0.01, 0.001$), and inhibit the expression of Ki67, pcDNA, CyclinD1, Bax protein, promote the expression of Bcl-2, Caspase-3, Caspase-8 protein. **Conclusion** Curcumin inhibited breast cancer cells proliferation, migration and invasion by

收稿日期: 2019-03-14

第一作者: 孟 亚 E-mail: hudh7563@126.com

down-regulating miR-7641 to increasing PTPN14 expression.

Key words: Curcumin; miR-7641; PTPN14; Breast cancer

乳腺癌是最常见的女性肿瘤之一^[1],全球发病率较高,每年约有25万女性被确诊为乳腺癌,死亡近4万^[2],在中国,乳腺癌发病率呈上升趋势^[3],乳腺癌的发生与家族遗传、雌激素水平、基因突变及生活方式等有关^[4-6]。手术治疗是目前乳腺癌治疗的主要手段,其次包括激素治疗、化疗、放疗及生物治疗等^[7-9]。虽然近年报道大量在乳腺癌发生发展过程中发挥作用的促癌及抑癌基因^[10-13],但是这些基因在乳腺癌发生发展过程中的分子机制仍未充分阐明,通过研究这些基因的分子机制开发乳腺癌治疗的新方案。

姜黄素是姜黄的主要成分,在不同的疾病中发挥重要的作用,如抗炎、抗凝血、抗高血脂、抗动脉粥样硬化、抗氧化和抗癌等^[14-19],近年来,受到人们广泛关注的是其抗癌作用及机制的研究。大量研究表明,姜黄素对多种肿瘤具有抑制作用,包括血液系统肿瘤^[20]、呼吸和消化道肿瘤^[21-22]、泌尿生殖系统肿瘤^[23]、妇科肿瘤^[24]、头颈部鳞状细胞癌^[25]、黑色素瘤^[26]和白血病^[20],此外,姜黄素能够促进肿瘤细胞凋亡及抗血管生成^[27],也可作为化学增敏剂,逆转肿瘤的多重耐药^[28]。然而姜黄素抗肿瘤作用的机制尚未完全阐明,据报道,姜黄素可通过调控表观遗传学变化,包括调控组蛋白修饰、抑制DNA甲基转移酶、调控microRNA(miRNA)表达,从而发挥其抗癌作用^[29]。

miRNA是一类长度在18~22 nt的非编码内源小RNA,可通过与下游靶基因结合降解或抑制靶基因的表达。miRNA通过RNA聚合酶II转录为pri-miRNA,然后通过DGCR8将pri-miRNA加工成pre-miRNA,随后pre-miRNA被运输至细胞质中分裂为miRNA双链,成熟的miRNA在癌症的发生、发展中起着至关重要的作用。研究表明,姜黄素可通过调控miRNA表达发挥其抗肿瘤作用,如姜黄素可通过调控miR-98表达抑制肺癌细胞的增殖^[30],通过调控miR-138抑制骨肉瘤细胞的增殖及侵袭^[31],通过FOXO3/miR-143分子轴抑制前列腺癌^[32],通过调控miR-7641表达抑制膀胱癌的发展^[23],在乳腺癌中,姜黄素可通过调控miR-19、miR-34a等^[33-34]表达抑制乳腺癌的发生发展进程。此外,研究发现,miR-7641作为癌基因在多种肿瘤中高表达,包括结直肠癌、乳腺癌等^[35],姜黄素是否通过调控miR-7641在

乳腺癌中发挥抑癌作用未见相关报道。

蛋白酪氨酸磷酸酶14(Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 14,PTPN14)是蛋白酪氨酸磷酸酶超家族成员,参与调控多种细胞过程,包括细胞生长、分化等,在多种肿瘤中发挥抑癌基因作用,主要通过抑制YAP蛋白及Hippo信号通路发挥其抑癌作用^[36-37],在三阴性乳腺癌中,PTPN14与KIBRA协同抑制YAP/TAZ的激活表达^[38]。

因此,本研究分析miR-7641在乳腺癌患者及细胞中表达情况,并通过细胞实验验证姜黄素通过调控miR-7641的表达发挥其抑癌作用,为乳腺癌的治疗提供新的治疗方案及作用靶点。

1 材料

1.1 临床样本收集

收集2014年1月—2018年1月至本院乳腺外科接受治疗的乳腺癌女性患者72例,年龄在40~60岁。取手术中切除的乳腺癌组织和对应正常癌旁组织(≥ 3 cm癌组织),并将切下的新鲜组织即刻放入冻存管移液氮中保存备用。纳入标准:所有样本经病理组织学检查为乳腺癌,患者术前均未进行过任何形式的放化疗治疗和其他辅助治疗;排除标准:病理组织学检查为非乳腺癌的样本。所有临床样本均经医院伦理委员会同意,患者签署知情同意书。

1.2 细胞株

人乳腺癌细胞MCF-7、MDA-MB-231、SK-BR-3、ZR-75-1、BT-20,人乳腺正常上皮细胞Hs578Bst,均购买于美国ATCC公司;细胞培养于含10%胎牛血清及100 U/mL青霉素、100 mg/mL链霉素的DMEM培养基中,胎牛血清及DMEM培养基均购买于美国Thermo Scientific HyClone公司。

1.3 主要试剂

姜黄素(质量分数 $\geq 95\%$),购买于上海生工;Trizol reagent试剂、一步法逆转录试剂盒及SYBR Green PCR Premix Ex Taq试剂盒,购买于大连宝生物公司;RAPI蛋白裂解液及BCA试剂盒,购买自美国Invitrogen公司;抗体Ki67、pcDNA、CyclinD1、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、 β -actin,均购买于Abcam公司;山羊血清,购买于上海碧云天公司;ECL化学发光液从美国BioRad公司购买;MTT试剂购买于索莱宝公司;Lipofectamine 2000购买于美

国 Invitrogen 公司; Dual-Luciferase Reporter Assay Kit 购买于美国 Promega 公司; RT-PCR 引物由上海生工合成; miR-7641 mimic、Anti-miR-7641、阴性对照寡核苷酸(NC, Anti-NC), 由上海吉玛基因设计并合成。

2 方法

2.1 RNA 提取及 qRT-PCR 检测基因表达水平

使用 Trizol 试剂提取乳腺癌组织、癌旁组织及细胞中总 RNA, NanoDrop 检测 RNA 的浓度及纯度, 并将提取的全部 RNA 采用一步法逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 然后以合成的 cDNA 为模板, 使用 SYBR Green PCR Premix Ex Taq 试剂盒对 miR-7641 表达水平进行检测, 以 U6 作为内参对照, 扩增条件: 95 °C 10 min, 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火和延伸 60 s, 共 45 个循环, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-7641 的表达水平。实验设置 3 个重复。

2.2 Western blotting 检测蛋白表达水平

使用 RIPA 溶液裂解细胞提取蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度及纯度, 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 采用半干转移法将蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后, 加入按一定比例稀释的一抗(Ki67, 1:1 000; pcDNA, 1:2 000; CyclinD1, 1:1 000; Bcl-2, 1:1 000; Bax, 1:2 000; Caspase-3, 1:1 000; Caspase-8, 1:1 000) 4 °C 过夜孵育, 次日, 去除一抗, TBST 清洗 3 次后, 加入相应的二抗, 室温封闭 1 h, 最后加入 ECL 化学发光液置于凝胶成像系统中采集图像, 实验设置 3 个重复, 用 Image J 对蛋白条带进行定量分析。

2.3 细胞转染

转染前 1 天将细胞种于 6 孔板, 待细胞汇合度达到 70% 左右时, 使用 miR-7641 mimic、Anti-miR-7641、NC 及 Anti-NC 与终浓度为 50 nmol/L 的 Lipofectamine 2 000 脂质体混合转染 MCF-7 及 BT-20 细胞 48 h; PTPN14 回复实验, 使用 pcDNA3.1-PTPN14 表达载体及 Lipofectamine 2 000 脂质体混合转染 MCF-7 及 BT-20 细胞 48 h 后进行后续实验检测。

2.4 载体构建及双荧光素酶报告基因检测

使用 PCR 分别扩增 miR-7641 与 PTPN14 3'-UTR 区结合位点的序列片段, 并导入 pmirGLO luciferase 表达载体中, 获得 PTPN14 野生型载体(pmirGLO-PTPN14-WT), 将序列 GAGAUCA 突变为 GUCUAGA, 并导入 pmirGLO luciferase 表达载体获得 PTPN14 突变型载体(pmirGLO-PTPN14-

MUT), 将 prirGLO、PTPN14 野生型载体、PTPN14 突变型载体、miR-7641 mimic 及 NC 分别与 Lipofectamine 2000 脂质体混合后转染 MCF-7 及 BT-20 细胞, 转染 48 h 后, 根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明检测荧光素酶活性。

2.5 MTT 法检测细胞活力

实验前 1 天, 按照 5×10^3 孔的细胞量将细胞种于 96 孔板中, 置于 37 °C 培养箱中培养 24 h, 每孔中加入不同浓度的姜黄素(1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 或等体积姜黄素溶剂 DMSO, 37 °C 培养箱分别培养 0、24、48、72 h, 每孔加入 20 μL 质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液, 37 °C 培养箱继续培养 4 h, 吸弃孔内培养液上清, 向每孔加入 100 μL DMSO 溶解结晶物, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 然后使用酶标仪在 490 nm 处检测各孔吸光度(A)值, 设置 3 个重复实验, 酶标仪测量重复 3 次。

2.6 Transwell 检测细胞迁移及侵袭

侵袭实验开始前, 使用孔径为 8 μm 的聚碳酸酯膜的 Transwell 小室进行实验, 用 50 mg/L Matrigel 1:8 稀释包被 Transwell 小室底部膜的上室, 37 °C 放置 30 min。实验前细胞无血清饥饿培养 12~24 h, 使用胰酶消化细胞, PBS 清洗 1~2 次, 用含 BSA 的无血清培养基重悬, 调整细胞密度为 $4 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ 。接种细胞: 取 100 μL 细胞悬液加入 Transwell 小室, 下室加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基。细胞常规培养于 37 °C、5% CO_2 培养箱 12 h。培养结束后, 用棉签擦去基质胶和上室内细胞, 用 1% 结晶紫染色 20 min, 并在显微镜下取 3~5 个视野进行计数。

进行迁移实验, 无需用 Matrigel 胶包被基底膜, 其余步骤同侵袭实验步骤。

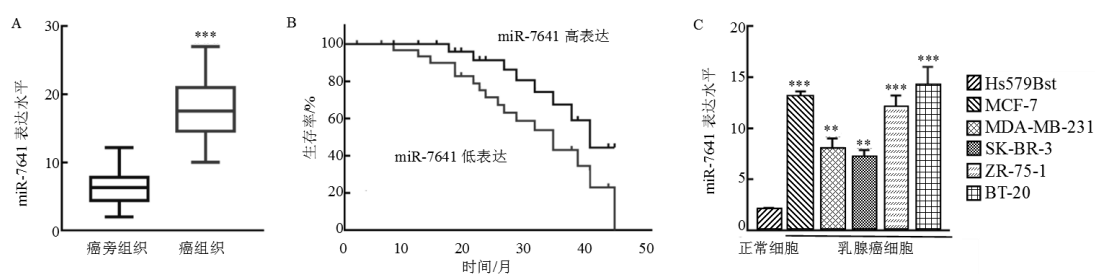
2.7 统计学方法

采用 SPSS19.0 进行数据统计, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 Student's *t* 检验, 多组间比较采用单因素 ANOVA 进行检测。使用 Kaplan-Meier 作生存曲线, 通过 log-rank 检验进行分析。

3 结果

3.1 miR-7641 在乳腺癌中高表达

qRT-PCR 检测结果显示, 与癌旁组织比较, miR-7641 在乳腺癌组织中高表达 ($P < 0.001$, 图 1A); Kaplan-Meier 生存分析结果显示, miR-7641 表达上调的患者生存率明显低于表达下调的患者, miR-7641 的表达与乳腺癌患者生存率呈负相关 ($P = 0.04$, 图 1B); 此外, qRT-PCR 检测结果显示, 与人正常乳腺上皮细胞 Hs579Bst 相比, miR-7641 在



A: qRT-PCR 检测 miR-7641 在乳腺癌患者癌组织和癌旁组织的表达水平,与癌旁组织比较:*** $P < 0.001$; B: Kaplan-Meier 分析 miR-7641 表达水平与患者生存率; C: qRT-PCR 检测 miR-7641 在正常乳腺上皮细胞和乳腺癌细胞株中的表达水平,与 Hs578Bst 细胞比较:** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

A: qRT-PCR was used to detect the expression level of mir-7641 in breast cancer tissues and paracancerous tissues, *** $P < 0.001$ vs paracancerous tissues; B: Kaplan Meier was used to analyze the expression level and survival rate of mir-7641; C: qRT-PCR was used to detect the expression level of mir-7641 in normal breast epithelial cells and breast cancer cell lines, ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs hs578bst cells

图1 miR-7641 在乳腺癌中高表达

Fig. 1 miR-7641 increased in breast cancer

乳腺癌细胞(MCF-7、MDA-MB-231、SK-BR-3、ZR-75-1、BT-20)中高表达($P < 0.01$ 、 0.001 ,图1C)。结果表明,miR-7641 的表达与乳腺癌的发生发展密切相关。

3.2 miR-7641 促进乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭

与NC组比较,MTT及克隆形成实验结果显示,转染 miR-7641 后显著促进了乳腺癌细胞的增殖($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001 ,图2A-E);Transwell 实验检测迁移及侵袭结果也显示,转染 miR-7641 后显著促进了细胞迁移及侵袭($P < 0.01$,图2F-I);western blotting 检测结果显示,转染 miR-7641 后,Ki67、pcDNA、CyclinD1、Bcl-2 的蛋白表达水平显著上调(图2J,K),而 Bax、caspase-3、caspase-8 的表达水平则显著下调(图2J,K)。与 Anti-NC 组比较,转染 Anti-miR-7641 后具有相反的结果。结果表明,miR-7641 能够促进乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

3.3 姜黄素抑制乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭

使用不同浓度(1、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)的姜黄素处理乳腺癌细胞,并以 DMSO 为对照,MTT 实验结果显示,使用姜黄素处理细胞后显著抑制了细胞的增殖,且抑制效果呈剂量相关性($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001 ,图3A-B);克隆形成实验结果显示,使用 20 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素处理细胞后,明显抑制了细胞的克隆形成($P < 0.001$,图3C-D);Transwell 实验结果显示,姜黄素处理细胞后,显著抑制了细胞的迁移($P < 0.001$,图3E-G)及侵袭($P < 0.001$,图3F-H)。western blotting 结果显示,姜黄素处理细胞后,显著抑制了 Ki67、pcDNA、CyclinD1、Bcl-2 的蛋白表达水平,而 Bax、caspase-3、caspase-8 的表达水平则显著提高(图4)。实验结果表明,姜黄素能够抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

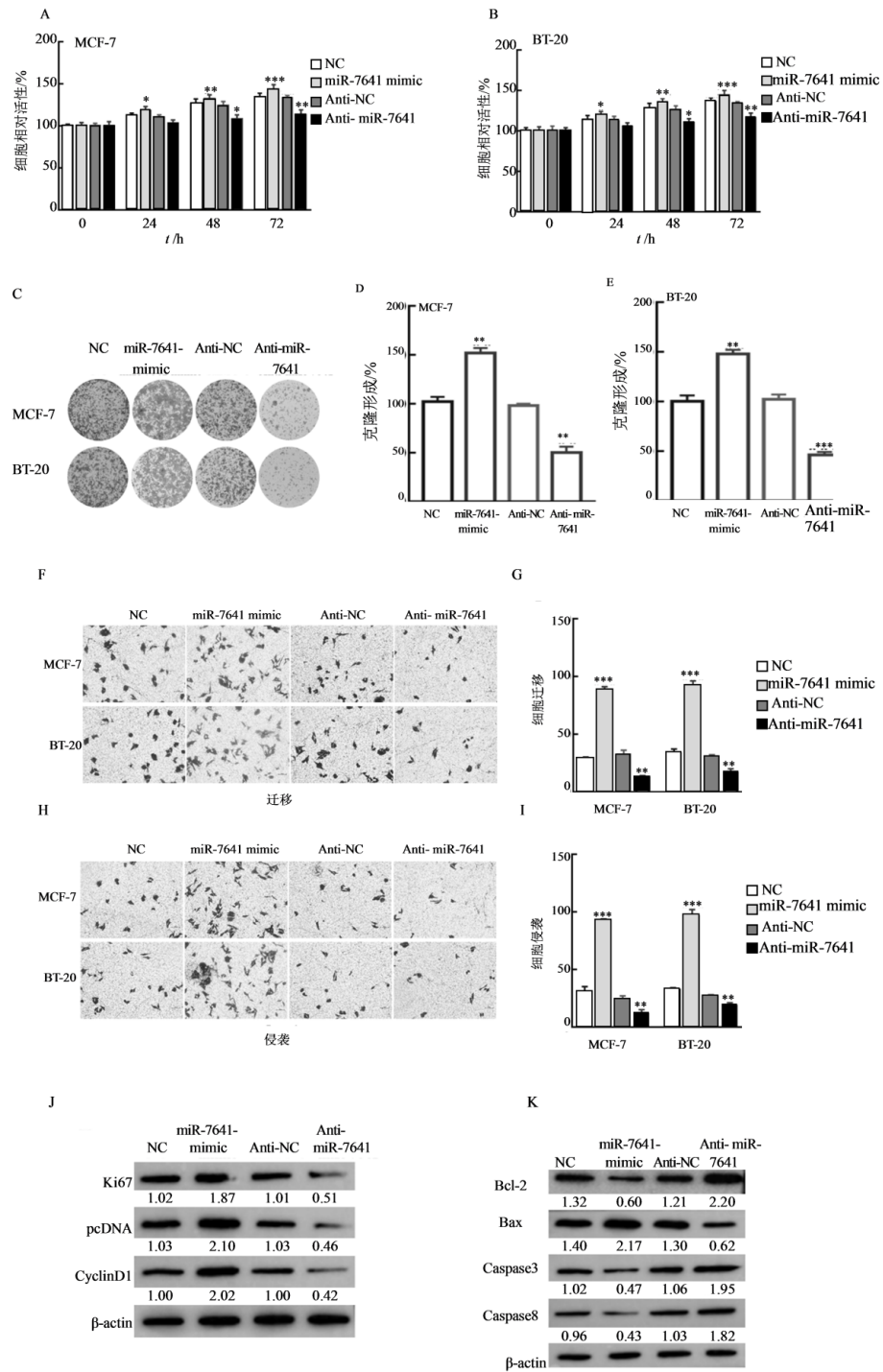
3.4 miR-7641 与 PTPN14 靶向结合

通过 Targetscan 生物学软件分析预测,PTPN14 为 miR-7641 的靶基因(图5A),且 PTPN14 在肿瘤中发挥抑癌基因作用,因此,对 miR-7641 及 PTPN14 的靶向调控关系进行研究。双荧光素酶报告基因检测结果显示,同时转染 miR-7641 mimic 及 PTPN14 WT 表达载体后荧光素酶活性明显下降($P < 0.001$,图5B、C),而当序列 GAGAUCA 突变为 GUCUAGA 后,荧光素酶活性无明显改变(图5B和C);western blotting 检测结果显示,过表达 miR-7641 显著抑制了 PTPN14 蛋白的表达水平(图5D)。实验结果表明,miR-7641 与 PTPN14 靶向结合并抑制其表达。

3.5 姜黄素通过调控 miR-7641/PTPN14 分子轴影响乳腺癌细胞生物学特性

乳腺癌细胞单独转染 miR-7641 mimic 及同时转染 miR-7641 mimic 及 PTPN14 过表达载体,并使用姜黄素处理乳腺癌细胞,验证姜黄素通过调控 miR-7641/PTPN14 分子轴影响乳腺癌细胞的增殖能力、迁移及侵袭。MTT 实验结果显示,过表达 miR-7641 能够显著促进乳腺癌细胞增殖($P < 0.001$,图6A和B),姜黄素处理则能够显著抑制乳腺癌细胞的增殖($P < 0.001$,图6A和B),而过表达 miR-7641 时,使用姜黄素处理或同时过表达 PTPN14 则显著抑制了 miR-7641 对乳腺癌细胞增殖的促进作用($P < 0.01$,图6A和B)。

克隆形成实验结果也显示,使用姜黄素处理或过表达 PTPN14 能够显著抑制 miR-7641 对乳腺癌细胞克隆形成的促进作用($P < 0.01$,图6C和E),Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭结果也显示,使用姜黄素处理或过表达 PTPN14 能够显著抑制 miR-

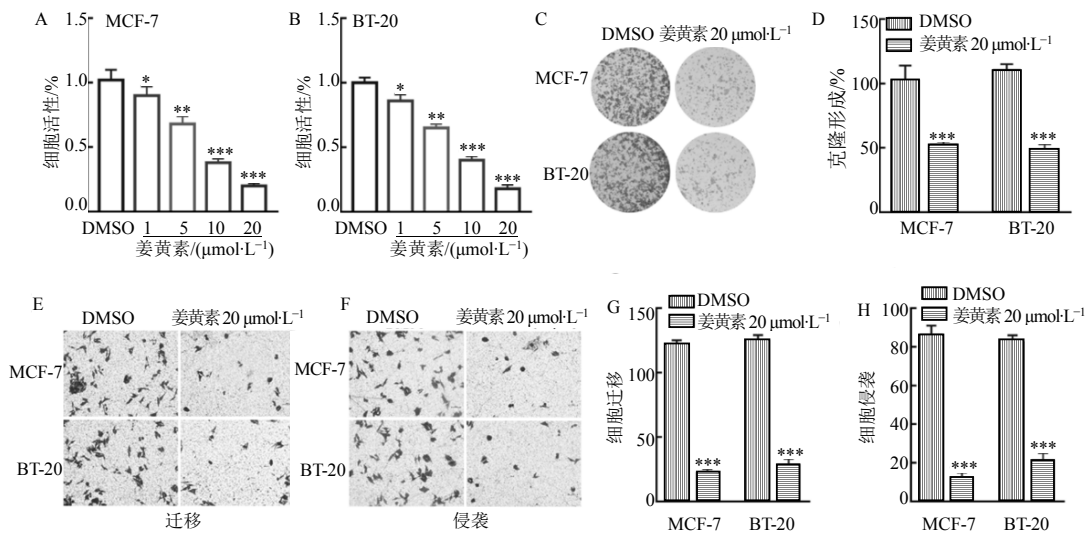


与NC或Anti-NC组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; A-B: CCK-8实验检测miR-7641对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞增殖活力的影响; C-E: 克隆形成实验检测miR-7641对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞克隆形成能力的影响; F-G: Transwell实验检测miR-7641对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞迁移的影响; H-I: Transwell实验检测miR-7641对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞侵袭的影响; J-K: Western blotting检测miR-7641对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞增殖和凋亡相关蛋白的表达的影响

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs NC or Anti-NC group; A-B: CCK-8 test to detect the effect of miR-7641 on the proliferation of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells; C-E: clonogenesis test to detect the effect of miR-7641 on the clonogenesis of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells; F-G: Transwell test to detect the effect of miR-7641 on the migration of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells; H-I: Transwell test to detect the effect of miR-7641 on the invasion of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells; J-K: Western blotting to detect the effect of miR-7641 on the proliferation and apoptosis related protein expression of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells

图2 miR-7641促进乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭 (n=3)

Fig. 2 miR-7641 promoted breast cancer cells proliferation, migration and invasion (n=3)



与DMSO组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ A-B: CCK-8法检测姜黄素对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞增殖活力的影响; C-D: 克隆形成实验检测姜黄素对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞克隆形成能力的影响; E-G: Transwell实验检测姜黄素对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞迁移的影响; F-H: Transwell实验检测姜黄素对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞侵袭的影响

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs DMSO group A-B: CCK-8 method to detect the effect of curcumin on the proliferation of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells; C-D: clonogenesis experiment to detect the effect of curcumin on the clonogenesis of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells; E-G: Transwell experiment to detect the effect of curcumin on the migration of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells; F-H: Transwell experiment to detect the effect of curcumin on the invasion of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells

图3 姜黄素抑制乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Curcumin inhibited breast cancer cells proliferation, migration and invasion ($\bar{x} \pm s, n=3$)

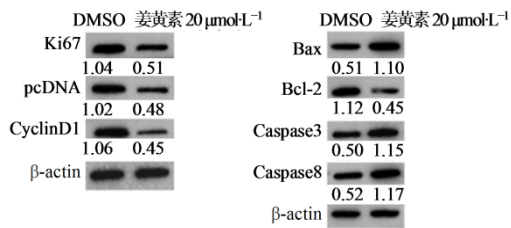


图4 Western blotting检测姜黄素对MCF-7和BT-20乳腺癌细胞增殖和凋亡相关蛋白的表达的影响

Fig. 4 western blotting to detect effect of curcumin on expression of proliferation and apoptosis related proteins in MCF-7 and BT-20 breast cancer cells

7641对乳腺癌细胞迁移及侵袭的促进作用 ($P < 0.05$, 图6F-I)。

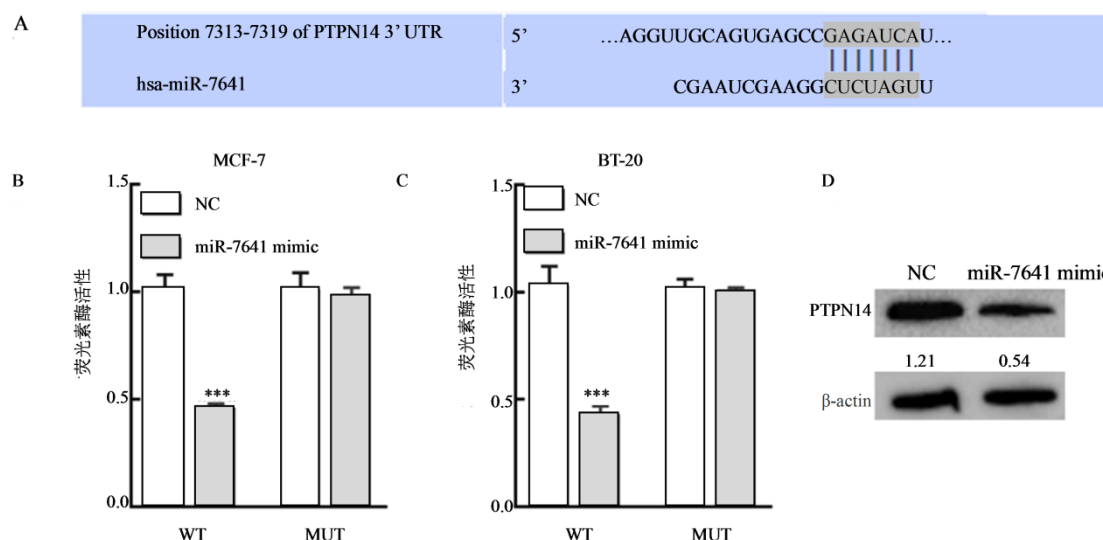
Western blotting结果也显示,使用姜黄素处理或过表达PTPN14能够显著抑制miR-7641对Ki67、pcDNA、CyclinD1、Bax、Bcl-2、caspase-3、caspase-8蛋白水平的影响(图6J和K)。实验结果表明,姜黄素通过调控miR-7641/PTPN14分子轴影响乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

4 讨论

据报道,miR-7641通过调控靶基因的表达,参与多种肿瘤的发生及发展进程,如miR-7641可通过调控p16表达促进膀胱癌的发生及发展^[22],在结直

肠癌细胞外泌体中高表达^[38],此外,miR-7641还可作为结直肠癌及乳腺癌诊断及治疗的靶点^[34]。本研究发现,miR-7641在乳腺癌患者癌组织及细胞系中高表达,过表达miR-7641能够显著促进乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭,此外,本研究结果表明,姜黄素可通过调控miR-7641及其靶基因PTPN14表达,抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭,因此,miR-7641参与了姜黄素对乳腺癌的抑制过程。

本研究检测出在乳腺癌中高表达的miR-7641,并发现其与姜黄素调控的抗癌作用相关,miR-7641在乳腺癌中的研究较少,近年来,在其他疾病及肿瘤中的作用受到关注,如miR-7641通过mTOR信号通过参与肺癌干细胞的调控,且在间充质干细胞中发现miR-7641的表达,miR-7641在人胚胎干细胞向内皮细胞分化过程中表达下调,miR-7641在转录和翻译后水平显著抑制CXCL1表达,表明miR-7641可能与内皮细胞的分化有关^[34]。miR-7641通过促进细胞增殖、迁移及侵袭在乳腺癌中扮演癌基因角色,通过分析发现,miR-7641靶向调控PTPN14表达,PTPN14是近年来研究发现的重要的抑癌基因,主要通过调控YAP蛋白表达^[35,39-40]及Hippo信号通路^[41-42]发挥其抑癌作用。本研究结果表明,姜黄素通过抑制miR-7641表达,促进PTPN14



A: TargetScan 预测 miR-7641 与 PTPN14 的结合序列; B-C: 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-7641 与 PTPN14 在 MCF-7 和 BT-20 乳腺癌细胞中的靶向结合, 与 NC 组比较: *** $P < 0.001$; D: Western blotting 检测过表达 miR-7641 对 PTPN14 蛋白表达的影响。

*** $P < 0.001$ vs NC group; A: targetscan predicted the binding sequence of miR-7641 and PTPN14; B-C: Double luciferase reporter gene experiment verified the targeted binding of miR-7641 and PTPN14 in MCF-7 and BT-20 breast cancer cells, *** $P < 0.001$ vs NC group; D: Western blotting detected the effect of overexpression of miR-7641 on PTPN14 protein expression.

图5 miR-7641 靶向负调控 PTPN14 表达 ($n=3$)

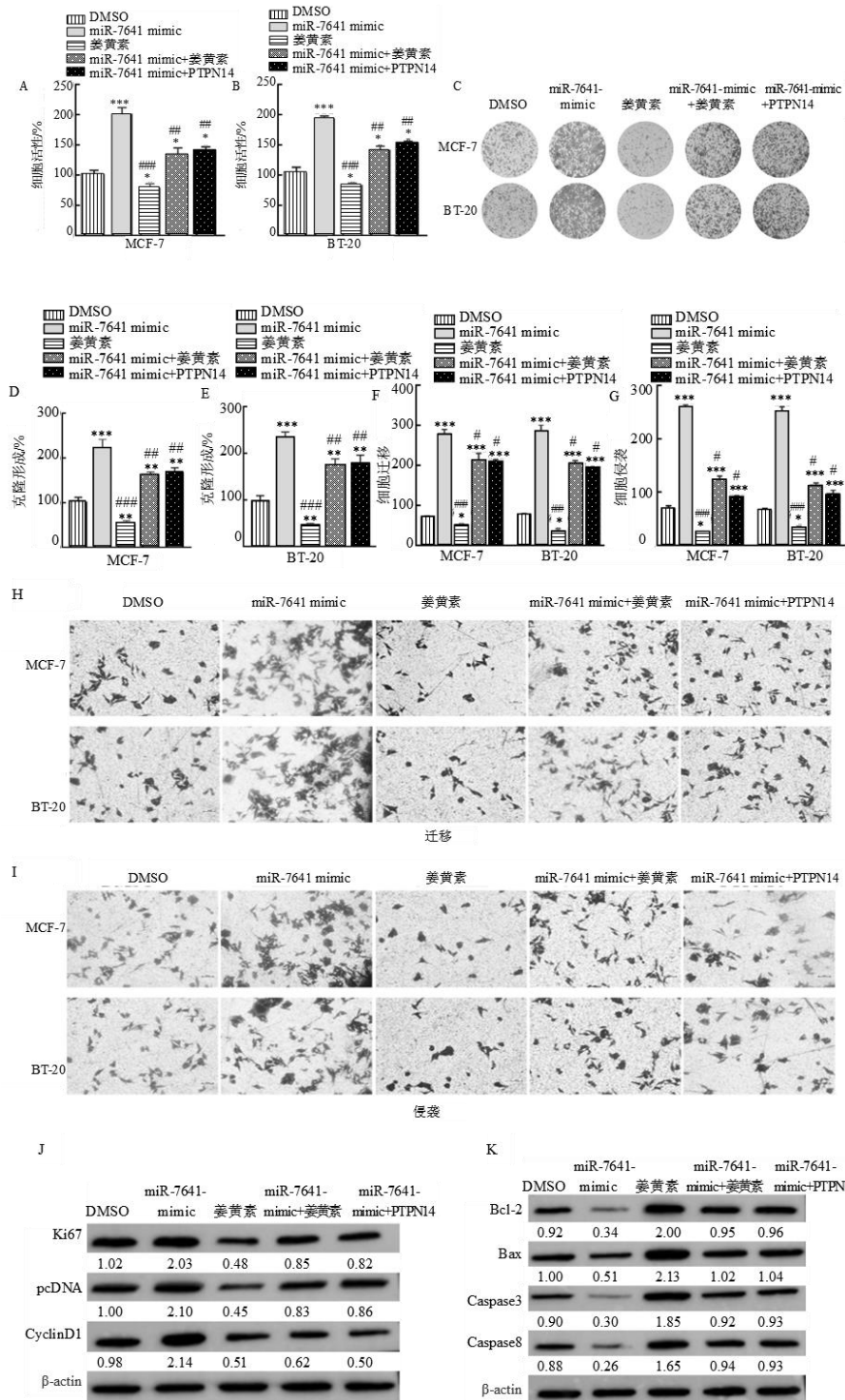
Fig. 5 PTPN14 was targeted and negatively regulated by miR-7641 ($n=3$)

表达发挥抑癌作用, 姜黄素通过上调 PTPN14 促进其抑癌作用的机制有待进一步研究。

姜黄素可通过下调 miR-7641 促进 PTPN14 表达, 抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移及侵袭, 表明姜黄素对乳腺癌具有潜在的治疗作用, 姜黄素具有作为抗乳腺癌药物的潜能。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386.
- [2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A 9. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA: Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [3] Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA: Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] Horn-Ross P L, Canchola A J, Bernstein L, et al. Lifetime body size and estrogen-receptor-positive breast cancer risk in the *California Teachers Study* cohort [J]. *Breast Cancer Res*, 2016, 18(1): 132.
- [5] Junod B, Zahl P H, Kaplan R M, et al. An investigation of the apparent breast cancer epidemic in France: screening and incidence trends in birth cohorts [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 401.
- [6] Shapira N. The potential contribution of dietary factors to breast cancer prevention [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2017, 26(5): 385-395.
- [7] Burt L M, Ying J, Poppe M M, et al. Risk of secondary malignancies after radiation therapy for breast cancer: Comprehensive results [J]. *Breast*, 2017, 35: 122-129.
- [8] Fietz T, Tesch H, Rauh J, et al. Palliative systemic therapy and overall survival of 1, 395 patients with advanced breast cancer - Results from the prospective German TMK cohort study [J]. *Breast*, 2017, 34: 122-130.
- [9] Wang Y M, Lewin N, Qaoud Y, et al. The oncologic impact of hormone replacement therapy in premenopausal breast cancer survivors: A systematic review [J]. *Breast*, 2018, 40: 123-130.
- [10] Ahmad A, Zhang W J, Wu M M, et al. Tumor-suppressive miRNA-135a inhibits breast cancer cell proliferation by targeting ELK1 and ELK3 oncogenes [J]. *Genes Genomics*, 2018, 40(3): 243-251.
- [11] McCullough L E, Chen J, Cho Y H, et al. Modification of the association between recreational physical activity and survival after breast cancer by promoter methylation in breast cancer-related genes [J]. *Breast Cancer Res*, 2017, 19(1): 19.
- [12] Naik A, Al-Yahyaee A, Abdullah N, et al. Neuropilin-1 promotes the oncogenic Tenascin-C/integrin $\beta 3$ pathway and modulates chemoresistance in breast cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 533.
- [13] Wang F, Li L, Chen Z, et al. MicroRNA-214 Acts as a potential oncogene in breast cancer by targeting the



A-B: CCK-8 实验检测各组 MCF-7 和 BT-20 乳腺癌细胞增殖活力; C-E: 克隆形成实验检测和量化各组 MCF-7 和 BT-20 乳腺癌细胞克隆形成能力; F 和 H: Transwell 实验检测各组 MCF-7 和 BT-20 乳腺癌细胞迁移; G 和 I: Transwell 实验检测各组 MCF-7 和 BT-20 乳腺癌细胞侵袭; J-K: Western blotting 检测 MCF-7 和 BT-20 乳腺癌细胞增殖和凋亡相关蛋白的表达; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 miR-7641 mimic 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

A-B: CCK-8 test to detect the proliferation activity of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells in each group; C-E: clonogenesis test to detect and quantify the clonogenesis ability of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells in each group; F and H: Transwell test to detect the migration of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells in each group; G and I: Transwell test to detect the invasion of MCF-7 and BT-20 breast cancer cells in each group; J-K: Western blotting test to detect MCF-7 and BT- Expression of proliferation and apoptosis related proteins in breast cancer cells; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs NC group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs miR-7641 mimic group

图6 姜黄素通过 miR-7641/PTPN14 分子轴调控乳腺癌细胞增殖、迁移及侵袭

Fig. 6 Curcumin regulated breast cancer cells proliferation, migration and invasion through miR-7641/PTPN14 axis

- PTEN-PI₃K/Akt signaling pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(5): 1421-1428.
- [14] Arshad L, Haque M A, Abbas Bukhari S N, et al. An overview of structure-activity relationship studies of curcumin analogs as antioxidant and anti-inflammatory agents [J]. *Future Med Chem*, 2017, 9(6): 605-626.
- [15] Cheng F, Chen Y H, Zhan Z, et al. Curc-mPEG454, a PEGylated curcumin derivative, improves anti-inflammatory and antioxidant activities: a comparative study [J]. *Inflammation*, 2018, 41(2): 579-594.
- [16] Li M Y, Yue G G, Tsui S K, et al. Turmeric extract, with absorbable curcumin, has potent anti-metastatic effect *in vitro* and *in vivo* [J]. *Phytotherapy*, 2018, 46: 131-141.
- [17] Liang H H, Huang C Y, Chou C W, et al. Heat shock protein 27 influences the anti-cancer effect of curcumin in colon cancer cells through ROS production and autophagy activation [J]. *Life Sci*, 2018, 209: 43-51.
- [18] Nabil S, El-Rahman S N A, Al-Jameel S S, et al. Conversion of curcumin into heterocyclic compounds as potent anti-diabetic and anti-histamine agents [J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(7): 1071-1077.
- [19] 李军, 熊琨, 龚元, 等. 基于信号转导通路的姜黄素抗氧化机制研究进展 [J]. *中草药*, 2016, 47(13): 2373-2380.
- [20] Guo Y, Shan Q Q, Gong P Y, et al. The autophagy induced by curcumin via MEK/ERK pathway plays an early anti-leukemia role in human Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia SUP-B15 cells [J]. *J Cancer Res Ther*, 2018, 14(Supplement): S125-S131.
- [21] Man S L, Zhang L L, Cui J X, et al. Curcumin enhances the anti-cancer effects of *Paris Saponin II* in lung cancer cells [J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(4): e12458. DOI: 10.1111/cpr.12458.
- [22] Hagi A, Azimi H, Rahimi R. A comprehensive review on pharmacotherapeutics of three phytochemicals, curcumin, quercetin, and allicin, in the treatment of gastric cancer [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2017, 48(4): 314-320.
- [23] Wang K, Tan S L, Lu Q, et al. Curcumin suppresses microRNA-7641-mediated regulation of p16 expression in bladder cancer [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(6): 1357-1368.
- [24] He M S, Wang D, Zou D L, et al. Re-purposing of curcumin as an anti-metastatic agent for the treatment of epithelial ovarian cancer: *in vitro* model using cancer stem cell enriched ovarian cancer spheroids [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(52): 86374-86387.
- [25] Roomi M W, Kalinovsky T, Roomi N W, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibition of human Fanconi Anemia head and neck squamous carcinoma by a phytonutrient combination [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(5): 2261-2266.
- [26] Liao W, Xiang W, Wang F F, et al. Curcumin inhibited growth of human melanoma A375 cells via inciting oxidative stress [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2017, 95: 1177-1186.
- [27] Gaikwad D, Shewale R, Patil V, et al. Enhancement in *in vitro* anti-angiogenesis activity and cytotoxicity in lung cancer cell by pectin-PVP based curcumin particulates [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 104(Pt A): 656-664.
- [28] Abouzeid A H, Patel N R, Sarisozen C, et al. Transferrin-targeted polymeric micelles co-loaded with curcumin and paclitaxel: efficient killing of paclitaxel-resistant cancer cells [J]. *Pharm Res*, 2014, 31(8): 1938-1945.
- [29] Li W J, Pung D, Su Z Y, et al. Epigenetics reactivation of Nrf2 in prostate TRAMP C1 cells by curcumin analogue FN₁ [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(4): 694-703.
- [30] Liu W L, Chang J M, Chong I W, et al. Curcumin inhibits LIN-28A through the activation of miRNA-98 in the lung cancer cell line A549 [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): E929.
- [31] Yu D Z, An F M, He X, et al. Curcumin inhibits the proliferation and invasion of human osteosarcoma cell line MG-63 by regulating miR-138 [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 14946-14952.
- [32] Cao H W, Yu H J, Feng Y G, et al. Curcumin inhibits prostate cancer by targeting PGK1 in the FOXD3/miR-143 axis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(5): 985-994.
- [33] Li X T, Xie W, Xie C F, et al. Curcumin modulates miR-19/PTEN/AKT/p53 axis to suppress bisphenol A-induced MCF-7 breast cancer cell proliferation [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(10): 1553-1560.
- [34] Guo J L, Li W P, Shi H L, et al. Synergistic effects of curcumin with emodin against the proliferation and invasion of breast cancer cells through upregulation of miR-34a [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 382(1/2): 103-111.
- [35] Reza A M M T, Choi Y J, Yuan Y G, et al. MicroRNA-7641 is a regulator of ribosomal proteins and a promising targeting factor to improve the efficacy of cancer therapy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8365.
- [36] Mello S S, Valente L J, Raj N, et al. A p53 super-tumor suppressor reveals a tumor suppressive p53-Ptpn14-Yap axis in pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(4): 460-473.e6.
- [37] Szalmás A, Tomaić V, Basukala O, et al. The PTPN14 tumor suppressor is a degradation target of human papillomavirus E7 [J]. *J Virol*, 2017, 91(7): e00057-e00017.

- [38] Knight J F, Sung V Y C, Kuzmin E, et al. KIBRA (WWC1) is a metastasis suppressor gene affected by chromosome 5q loss in triple-negative breast cancer [J]. *Cell Rep*, 2018, 22(12): 3191-3205.
- [39] Chen M S, Xu R, Rai A, et al. Distinct shed microvesicle and exosome microRNA signatures reveal diagnostic markers for colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2019, 14(1): e0210003. DOI:10.1371/journal.pone.0210003.
- [40] Wilson K E, Li Y W, Yang N, et al. PTPN14 forms a complex with Kibra and LATS1 proteins and negatively regulates the YAP oncogenic function [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(34): 23693-23700.
- [41] Liu X, Yang N, Figel S A, et al. PTPN14 interacts with and negatively regulates the oncogenic function of YAP [J]. *Oncogene*, 2013, 32(10): 1266-1273.
- [42] Wilson K E, Yang N, Mussell A L, et al. The regulatory role of KIBRA and PTPN14 in hippo signaling and beyond [J]. *Genes (Basel)*, 2016, 7(6): E23.
- [43] Zhang J M, Yao S, Hu Q, et al. Genetic variations in the hippo signaling pathway and breast cancer risk in African American women in the AMBER consortium [J]. *Carcinogenesis*, 2016, 37(10): 951-956.