

miR-98-5p 靶向 CCR7 对乳腺癌细胞 MCF-7 运动能力的影响及其机制研究

谢竞, 赵晓燕, 赵冰, 高峰, 霍彦平* (郑州大学附属郑州中心医院乳腺外科, 郑州 450007)

摘要: 目的 探究 miR-98-5p 靶向作用于趋化因子受体(CC chemokine receptor 7, CCR7)对乳腺癌细胞 MCF-7 运动能力的影响及相关机制。方法 MCF-7 细胞分为对照组、miR-98-5p mimic 组、miR-98-5p NC 组、pc-CCR7 组、miR-98-5p+pc-CCR7 组, 分别转染相应的 miRNA 和 CCR7 过表达载体, RT-PCR 检测 miR-98-5p 和 CCR7 基因表达水平, 荧光素酶报告试验检测 miR-98-5p 和 CCR7 靶向关系, Transwell 法检测细胞侵袭, 划痕法检测细胞迁移, Western blotting 检测 CCR7、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9、血管内皮生长因子(VEGF)、E-钙黏着蛋白(E-cadherin)、N-cadherin、波形蛋白(Vimentin)蛋白表达水平。结果 与 CCR7 WT+miR-98-5p NC 比较, CCR7 WT+miR-98-5p mimic 荧光素酶活性显著降低。与对照组比较, miR-98-5p mimic 组中 miR-98-5p 表达水平、E-cadherin 蛋白表达水平显著升高, CCR7 基因和蛋白表达水平、细胞侵袭和迁移能力、MMP-2、MMP-9、VEGF、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平显著降低, pc-CCR7 组细胞侵袭和迁移能力、CCR7、MMP-2、MMP-9、VEGF、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平显著升高, E-cadherin 蛋白表达水平显著降低; 与 pc-CCR7 组比较, miR-98-5p+pc-CCR7 组细胞侵袭和迁移能力、CCR7、MMP-2、MMP-9、VEGF、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达水平显著降低, E-cadherin 蛋白表达水平显著升高。结论 miR-98-5p 可靶向作用于 CCR7, 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 运动能力, 其作用机制与上皮细胞间充质转化有关。

关键词: 乳腺癌; miR-98-5p; 趋化因子受体; 上皮间充质转化

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)20-2446-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.20.003

引用本文: 谢竞, 赵晓燕, 赵冰, 等. miR-98-5p 靶向 CCR7 对乳腺癌细胞 MCF-7 运动能力的影响及其机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(20): 2446-2452.

Effect of miR-98-5p Targeting CCR7 on the Mobility of Breast Cancer Cell MCF-7 and Its Related Mechanism

XIE Jing, ZHAO Xiaoyan, ZHAO Bing, GAO Feng, HUO Yanping* (Department of Breast Surgery, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect and mechanism of miR-98-5p on the mobility of breast cancer cell MCF-7 by targeting CC chemokine receptor 7(CCR7). **METHODS** MCF-7 cells were divided into control, miR-98-5p mimic, miR-98-5p NC, pc-CCR7, miR-98-5p+pc-CCR7 groups, each group was treated with corresponding miRNA and CCR7 overexpression vector, gene levels of miR-98-5p and CCR7 were measured by RT-PCR, luciferase reporter assay was performed for measuring the relationship between miR-98-5p and CCR7, invasion ability was observed by Transwell, migration was observed by cell scratch. Western blotting was used to determine the protein levels of CCR7, MMP-2, MMP-9, VEGF, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin. **RESULTS** In the Luciferase reporter assay, the luciferase activity of CCR7 WT+miR-98-5p mimic group was significantly reduced compared to CCR7 WT+miR-98-5p NC group. Compared with control group, the level of miR-98-5p, protein level of E-cadherin were increased notably, and the gene and protein levels of CCR7, cell invasion and migration ability, protein levels of MMP-2, MMP-9, VEGF, N-cadherin, Vimentin were decreased significantly in miR-98-5p mimic group, the cell invasion and migration ability, protein levels of CCR7, MMP-2, MMP-9, VEGF, N-cadherin, Vimentin were increased markedly, and the protein level of E-cadherin decreased notably in pc-CCR7 group. Compared with pc-CCR7 group, the cell invasion and migration ability, protein levels of CCR7, MMP-2, MMP-9, VEGF, N-cadherin, Vimentin were decreased markedly, and the protein level of E-cadherin was increased significantly. **CONCLUSION** miR-98-5p can target CCR7, to inhibit the mobility of breast cancer cell MCF-7, and the mechanism related to epithelial-mesenchymal transition.

KEYWORDS: breast cancer; miR-98-5p; CC-chemokine receptor 7; epithelial-mesenchymal transition

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤, 该病发生率和致死率呈逐年上升的趋势^[1]。乳腺癌细胞侵袭转移的特性是威胁患者生命的主要因素, 通过手术

切除及化学药物辅助治疗等手段治疗乳腺癌, 部分患者会在若干年后复发和转移, 导致了预后不佳^[2]。因此抑制乳腺癌细胞转移是治疗该疾病的关键。

基金项目: 河南省科技发展计划项目(162102310449)

作者简介: 谢竞, 女, 博士, 主治医师 Tel: 15038299126
Tel: 13838328697 E-mail: rjwk08@163.com

E-mail: fuecukwcpm621@sina.com

*通信作者: 霍彦平, 男, 主任医师

键因素。趋化因子及其受体参与了肿瘤细胞的增生、血管形成和侵袭迁移,其中CC趋化因子受体7(CC-chemokine receptor 7, CCR7)在大量文献中报道了其于乳腺癌细胞增殖和转移的关系,是可用于临床诊断和治疗的靶向基因^[3-5]。

MicroRNA(miRNA)是一类可以调控基因表达的小分子非编码RNA^[6-7], miR-98-5p参与了多种肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭的调控,并有着不同的作用机制^[8-9],近期已有研究表明miR-98-5p具有抑制乳腺癌细胞增殖、侵袭和迁移,促进细胞凋亡的能力^[10],其作用机制与靶向抑制高迁移率族蛋白A2(high mobility group A2, HMGA2)有关。本研究通过生物信息学数据库TargetScan预测CCR7也是miR-98-5p潜在的靶基因,而目前对于miR-98-5p是否可以通过靶向抑制CCR7表达调控乳腺癌细胞的运动能力还未见报道。本研究通过培养人乳腺癌细胞株MCF-7,构建CCR7过表达细胞株,并通过miR-98-5p mimic处理MCF-7细胞,以探究miR-98-5p对CCR7的调控作用及对MCF-7细胞运动能力的影响及相关机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM培养液和胎牛血清均购自美国Hyclone公司;青链霉素、Trizol试剂、RIPA裂解液、BCA试剂盒、ECL显色液均购自北京索莱宝生物公司;QuantNova SYBR Green PCR试剂盒(德国Qiagen公司);lipofectamine 2000、pcDNA3.1购自Invitrogen公司;miR-98-5p mimic、miR-98-5p NC由上海吉玛公司合成;双荧光素酶报告检测系统(美国Promega公司);CCR7(批号:ab32527)、基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)(批号:ab37150)、MMP-9(批号:ab38898)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)(批号:ab52917)、E-钙黏着蛋白(E-cadherin)(批号:ab15148)、N-cadherin(批号:ab202030)、波形蛋白(Vimentin)(批号:ab193555)、 β -actin(ab8226)抗体均购自Abcam公司,实验所用引物采用Primer3 input设计,由上海生工合成。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞株MCF-7购自美国ATCC公司,采用含10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青链霉素的DMEM培养液于5% CO₂, 37℃恒温培养箱中

进行培养。

1.3 细胞分组及处理方法

将细胞分为对照组、miR-98-5p mimic组(转染miR-98-5p mimic)、miR-98-5p NC组(转染miR-98-5p NC)、pc-CCR7组[转染连接了CCR7基因的pcDNA(pc-CCR7)]、miR-98-5p+pc-CCR7组(转染miR-98-5p mimic和pc-CCR7),转染24 h后用于后续试验。

1.4 荧光素酶报告试验检测靶向作用

生物信息学法预测miR-98-5p与CCR7基因的靶向结合位点,构建CCR7 Lenti-reporter-luciferase野生型和突变型载体,细胞分别记为CCR7 WT和CCR7 MUT组,24孔板预培养1 d。野生型载体和pRL-CMV载体共转染CCR7 WT组细胞,突变型载体和pRL-CMV载体共转染CCR7 MUT组细胞,细胞进一步分为CCR7 WT+miR-98-5p NC、CCR7 WT+miR-98-5p mimic、CCR7 MUT+miR-98-5p NC、CCR7 MUT+miR-98-5p mimic组,其中miR-98-5p NC转染CCR7 WT+miR-98-5p NC和CCR7 MUT+miR-98-5p NC组,miR-98-5p mimic转染CCR7 WT+miR-98-5p mimic和CCR7 MUT+miR-98-5p mimic组,转染48 h后使用荧光素酶报告基因系统检测荧光素酶活性。

1.5 RT-PCR检测CCR7 mRNA表达水平

按“1.3”项下方法分组和处理后,Trizol提取RNA,反转录合成cDNA,进行PCR反应,条件设置:95℃预变性2 min,95℃变性5 s,60℃退火延伸10 s,反应进行40个循环,按照QuantNova SYBR Green PCR kit说明书检测CCR7 mRNA和miRNA水平,2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行计算。

1.6 Western blotting检测蛋白表达水平

按“1.3”项下方法分组和处理后,RIPA提取蛋白质,并通过BCA试剂盒定量,点样每孔30 μ g,10% SDS-PAGE分离各组蛋白,转移至PVDF膜上,5%脱脂牛奶处理2 h,4℃一抗孵育过夜,PBA洗净后二抗孵育2 h,使用ECL显色液显色,实验使用 β -actin作为内参。

1.7 Transwell法检测细胞侵袭

按“1.3”项下方法分组和处理后,Transwell中加入50 μ L基质胶,37℃放置3 h,上室加入无血清培养基,下室加入完全培养基,各组细胞分别接种于Transwell上室,培养48 h,擦除未过

膜的细胞,使用多聚甲醛固定,结晶紫染色后通过光学显微镜拍照。每小室分别取6个视野拍照计数,取各视野均数对细胞侵袭进行统计。

1.8 划痕法检测细胞迁移

按“1.3”项下方法分组和处理后,各组细胞接种于6孔板培养,细胞铺满板内80%时,中枪头进行水平垂直划线,PBS清洗,5% CO₂,37℃培养箱中培养24 h后通过光学显微镜拍照。采用如下公式统计划痕愈合率:划痕愈合率=(实验组0 h宽度-实验组24 h宽度)/(对照组0 h宽度-对照组24 h宽度)×100%。

1.9 统计学分析

使用统计学软件SPSS 17.0定量分析实验数据,所有数据均符合正态分布,组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $\bar{x} \pm s$ 表示所有实验结果, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-98-5p抑制CCR7 mRNA表达水平

与对照组比较,miR-98-5p mimic组MCF-7细胞中miR-98-5p表达水平显著升高(26.910 ± 2.190 , $P < 0.01$),差异有统计学意义,表明成功转染了miR-98-5p mimic。同时,与对照组比较,miR-98-5p mimic组MCF7细胞中CCR7 mRNA表达水平显著降低(0.250 ± 0.060 , $P < 0.01$),差异有统计学意义。miR-98-5p NC组miR-98-5p表达水平和CCR7 mRNA表达水平与对照组比均无显著差异。结果见图1。

2.2 miR-98-5p与CCR7靶向相互作用

根据生物信息学数据库TargetScan提供的算法,将miRNA 5'端的2~8位的碱基与CCR7 mRNA

的3'UTR区域进行互补配对,将配对区域向两侧延伸,出现错配时终止,通过context scores和Pct对预测结果的可能性进行评分,其中miR-98-5p具有高靶向结合可能性,进一步通过荧光素酶报告试验对预测结果进行验证,与CCR7 WT+miR-98-5p NC比较,CCR7 WT+miR-98-5p mimic荧光素酶活性显著降低(0.350 ± 0.070 , $P < 0.01$),差异有统计学意义。CCR7 MUT miR-98-5p NC与CCR7 MUT miR-98-5p mimic比较无显著差异。结果见图2。

2.3 miR-98-5p抑制CCR7蛋白表达

与对照组比较,miR-98-5p mimic组MCF-7细胞中CCR7蛋白表达水平显著降低(0.310 ± 0.060 , $P < 0.01$),pc-CCR7组MCF-7细胞中CCR7蛋白表达水平显著升高(1.550 ± 0.150 , $P < 0.01$),差异有统计学意义;与pc-CCR7组比较,miR-98-5p+pc-CCR7组MCF-7细胞中CCR7蛋白表达水平显著降低(0.730 ± 0.080 , $P < 0.01$),差异有统计学意义。结果见图3。

2.4 miR-98-5p和CCR7对MCF-7细胞侵袭的调控作用

与对照组比较,miR-98-5p mimic组MCF-7细胞侵袭数量显著降低(54 ± 6 , $P < 0.01$),pc-CCR7组MCF-7细胞侵袭数量显著升高(238 ± 21 , $P < 0.01$),差异有统计学意义;与pc-CCR7组比较,miR-98-5p+pc-CCR7组MCF-7细胞侵袭数量显著降低(109 ± 10 , $P < 0.01$),差异有统计学意义。结果表明miR-98-5p mimic抑制细胞侵袭,CCR7促进细胞侵袭,miR-98-5p可显著降低CCR7对细胞侵袭的促进作用。结果见图4。

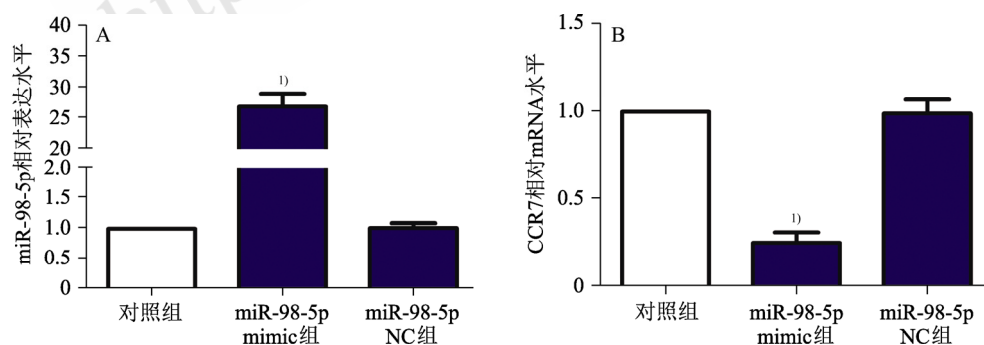


图1 RT-PCR检测miR-98-5p mimic转染效率及对CCR7 mRNA表达水平的影响

A-RT-PCR验证miR-98-5p mimic转染效率; B-RT-PCR检测CCR7 mRNA表达水平;与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 RT-PCR detection of miR-98-5p mimic transfection efficiency and its effect on CCR7 mRNA expression

A-RT-PCR for detecting the transfection efficiency of miR-98-5p mimic; B-RT-PCR for detecting the mRNA level of CCR7; compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$.

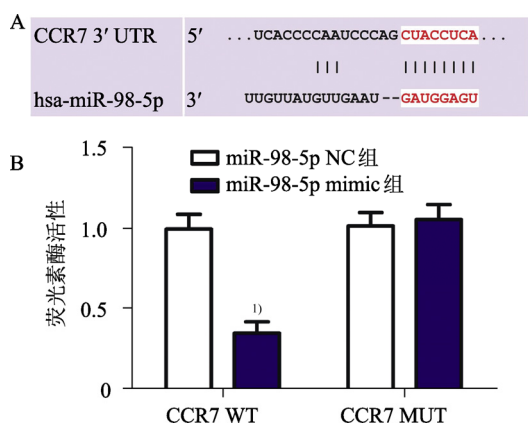


图 2 荧光素酶报告试验检测 miR-98-5p 和 CCR7 的靶向关系 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A-miR-98-5p 和 CCR7 靶向关系预测; B-荧光素酶报告试验验证 miR-98-5p 和 CCR7 靶向关系; 与 miR-98-5p NC 组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Luciferase reporter assay was performed for measuring the targeting relationship between miR-98-5p and CCR7 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A-prediction of the relationship between miR-98-5p and CCR7; B-Luciferase reporter assay for testing the relationship between miR-98-5p and CCR7; compared with miR-98-5p NC group, ¹⁾ $P<0.01$ 。

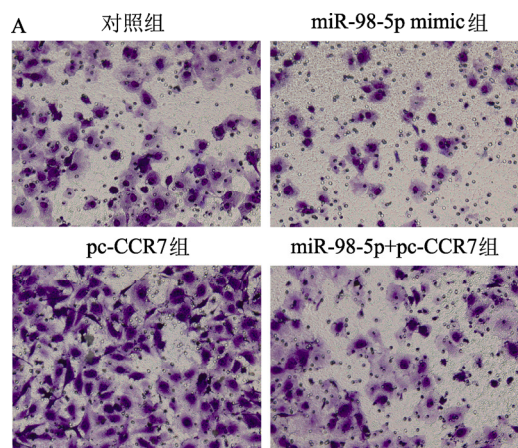


图 4 miR-98-5p 和 CCR7 对 MCF-7 细胞侵袭的调控作用 ($\times 400$) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A-Transwell 观察细胞侵袭; B-各组细胞侵袭数目; 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 pc-CCR7 组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Regulation of miR-98-5p and CCR7 on invasion ability of MCF-7 cell line ($\times 400$) ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A-Transwell assay for observing cell invasion; B-cell invasion in each group; compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with pc-CCR7 group, ²⁾ $P<0.01$ 。

2.5 miR-98-5p 和 CCR7 对 MCF-7 细胞迁移的调控作用

与对照组比较, miR-98-5p mimic 组 MCF-7 细胞划痕愈合率显著降低 ($17.811 \pm 8.050, P<0.01$), pc-CCR7 组 MCF-7 细胞划痕愈合率显著升高 ($76.890 \pm 2.960, P<0.01$), 差异有统计学意义; 与 pc-CCR7 组比较, miR-98-5p+pc-CCR7 组 MCF-7 细胞划痕愈合率显著降低 ($56.460 \pm 4.880, P<0.01$), 差异有统计学意义。结果表明 miR-98-5p 抑制 MCF-7 细胞的迁移, CCR7 促进细胞迁移,

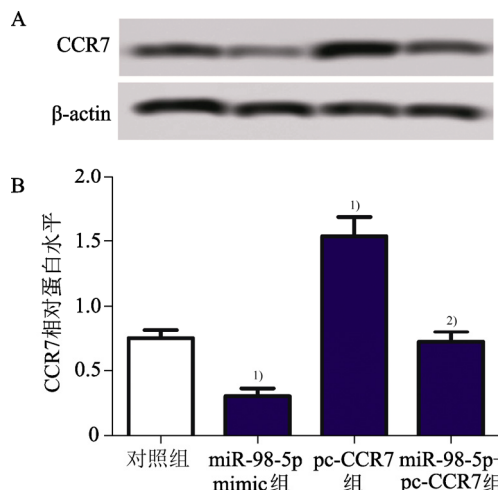
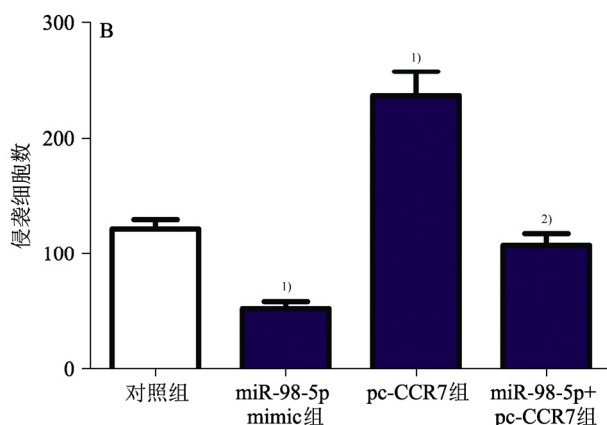


图 3 Western blotting 检测 miR-98-5p 对 CCR7 蛋白表达的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A-Western blotting 检测 CCR7 蛋白表达; B-各组细胞 CCR7 蛋白水平; 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 pc-CCR7 组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Western blotting analysis of the regulation of miR-98-5p on CCR7 protein expression level ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A-Western blotting for detecting the protein expression of CCR7; B-CCR7 protein level in cell of each group; compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with pc-CCR7 group, ²⁾ $P<0.01$ 。



miR-98-5p 可降低 CCR7 对细胞迁移的促进作用。结果见图 5。

2.6 miR-98-5p 和 CCR7 对 MCF-7 细胞侵袭迁移相关蛋白表达的调控

与对照组比较, miR-98-5p mimic 组 MCF-7 细胞中 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白表达水平显著降低 ($0.250 \pm 0.060, 0.230 \pm 0.060, 0.110 \pm 0.030, P<0.01$), pc-CCR7 组 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白表达水平显著升高 ($0.870 \pm 0.090, 0.650 \pm 0.080, 0.400 \pm 0.050, P<0.01$), 差异有统计学意义; 与

pc-CCR7 组比较, miR-98-5p+pc-CCR7 组 MCF-7 细胞中 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白表达水平显著降低(0.520 ± 0.070 , 0.400 ± 0.060 , 0.180 ± 0.030 , $P<0.01$), 差异有统计学意义。结果表明 miR-98-5p 可抑制细胞质基质降解和肿瘤血管生成, CCR7 可促进这一过程, miR-98-5p 可显著降低 CCR7 对 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白表达的促进作用。结果见图 6。

2.7 miR-98-5p 和 CCR7 对上皮间充质转化(EMT)相关蛋白表达的调控

与对照组比较, miR-98-5p mimic 组 MCF-7 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平显著降低(1.25 ± 0.13 ,

0.240 ± 0.040 , 0.290 ± 0.040 , $P<0.01$), 差异有统计学意义, pc-CCR7 组 MCF-7 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平显著降低, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平显著升高(0.220 ± 0.040 , 1.170 ± 0.120 , 1.010 ± 0.110 , $P<0.01$), 差异有统计学意义; 与 pc-CCR7 组比较, miR-98-5p+pc-CCR7 组 MCF-7 细胞中 E-cadherin 蛋白表达水平显著升高, N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平显著降低(0.780 ± 0.080 , 0.700 ± 0.080 , 0.570 ± 0.070 , $P<0.01$), 差异有统计学意义。结果表明 miR-98-5p 可抑制 MCF-7 细胞上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 进程, CCR7 促进这一进程, miR-98-5p 可显著降低 CCR7 对 EMT 的促进作用。结果见图 7。

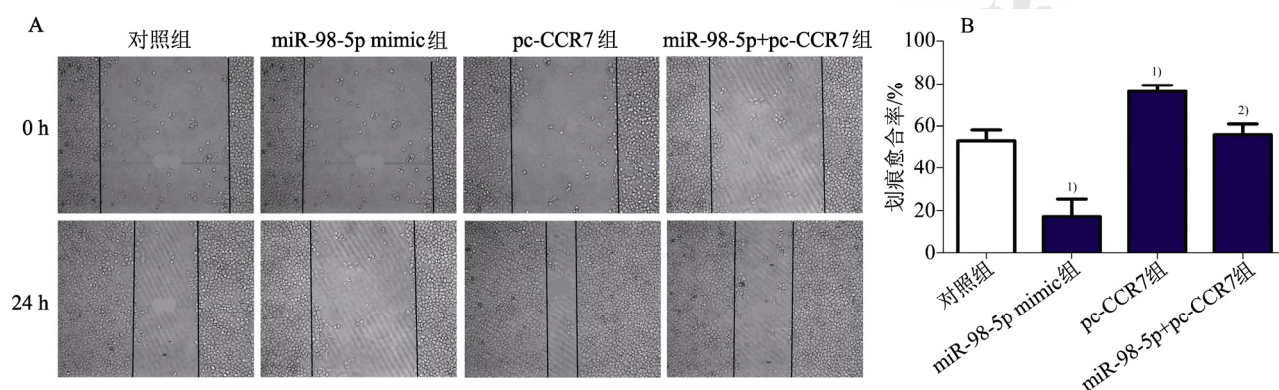


图 5 miR-98-5p 和 CCR7 对 MCF-7 细胞迁移的调控作用($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

A-划痕愈合法观察细胞迁移; B-各组细胞迁移率; 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 pc-CCR7 组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Regulation of miR-98-5p and CCR7 on migration ability of MCF-7 cell line($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

A-wound healing for observing the cell migration; B-wound closure rate in each group; compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with pc-CCR7 group, ²⁾ $P<0.01$.

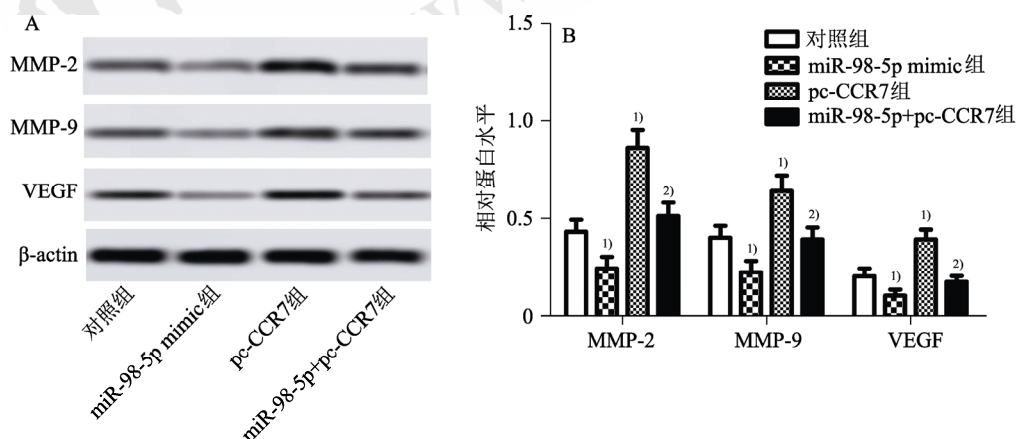


图 6 miR-98-5p 和 CCR7 对 MCF-7 细胞 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

A-Western blotting 检测 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白表达; B-各组细胞 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白水平; 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与 pc-CCR7 组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effects of miR-98-5p and CCR7 on the expression levels of MMP-2, MMP-9, VEGF($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

A-Western blotting for detecting the protein expressions of MMP-2, MMP-9, VEGF; B-MMP-2, MMP-9, VEGF protein levels in cell of each group; compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with pc-CCR7 group, ²⁾ $P<0.01$.

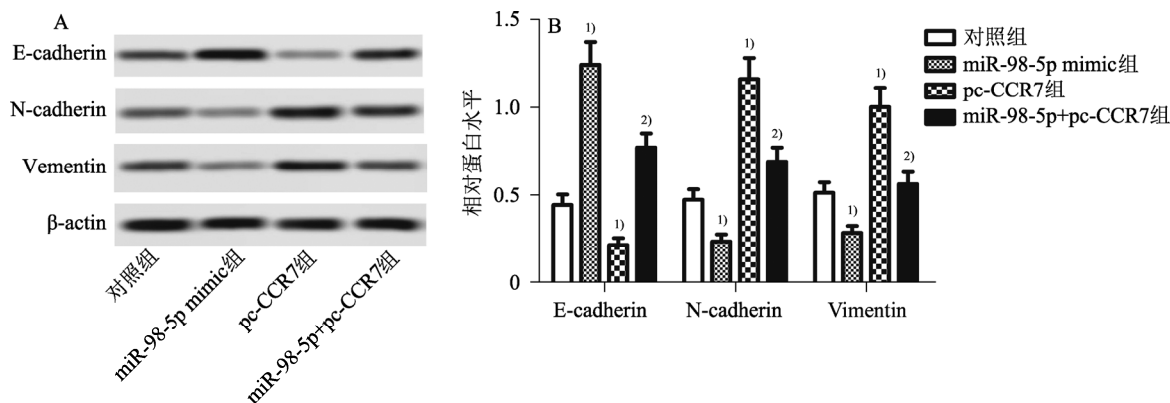


图 7 miR-98-5p 和 CCR7 对 EMT 相关蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A—Western blotting 检测 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达；B—各组细胞 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白水平；与对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与 pc-CCR7 组比较，²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 7 Effects of miR-98-5p and CCR7 on the expression levels of EMT related proteins($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

A—Western blotting for detecting the protein expressions of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin; B—E-cadherin, N-cadherin, Vimentin protein levels in cell of each group; compared with control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with pc-CCR7 group, ²⁾ $P<0.01$.

3 讨论

CCR7 是免疫系统的一种重要的趋化因子受体，其配体包括 CCL19 和 CCL21，正常组织中主要由 NK 细胞、T 细胞和 DC 细胞表达，主要作用是介导免疫细胞的定向迁移，从而参与机体的各种免疫活动^[11]。研究表明，CCR7 在多种肿瘤细胞中均呈现高表达^[12-13]，表明 CCR7 在肿瘤发生中起着重要作用，在乳腺癌中同样发现了 CCR7 高表达，Huang 等^[4]研究表明，抑制乳腺癌细胞中的转化生长因子 β 激酶 1(TGF- β -activated protein kinase 1, TAK1)表达可降低 CCR7 的表达并抑制肿瘤增殖和转移。Xu 等^[5]研究表明，CCR7 可通过蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)途径诱导 EMT，从而促进乳腺癌细胞侵袭与迁移。因此，CCR7 作为一种有潜力的诊断标志物及靶向治疗位点，是当前乳腺癌研究的热点。

miR-98-5p 已被证实在多种癌症中均具有抑制肿瘤生长和转移的作用，生物信息学预测 miR-98-5p 与 CCR7 可能存在靶向作用。为了证实这一预测，本研究检测了过量 miR-98-5p 处理下的 CCR7 mRNA 转录水平，发现 CCR7 转录水平显著降低，同时荧光素酶报告试验显示，miR-98-5p 和 CCR7 存在靶向作用关系，表明 miR-98-5p 参与了 CCR7 的表达调控，其作用机制是直接靶向沉默 CCR7 基因表达。进一步研究发现，miR-98-5p 可显著抑制 CCR7 过表达细胞中 CCR7 蛋白表达水平，进一步证实了 miR-98-5p 对 CCR7 的靶向调控作用。

肿瘤细胞的运动能力主要体现为对正常组织

的侵袭和迁移，细胞外基质降解和肿瘤血管生成在该进程中扮演着重要角色^[14-15]。基质金属蛋白酶家族是分解细胞外基质的 Zn-蛋白水解酶类，其中 MMP-2 和 MMP-9 在细胞外基质降解和 VEGF 释放中发挥着关键作用^[16-17]。VEGF 是血管内皮细胞特异性的生长因子，具有促进机体血管内皮细胞增殖，诱导血管新生的作用，在肿瘤血管生成中 VEGF 发挥着重要的作用^[18-19]。本研究发现，miR-98-5p 可显著降低人乳腺癌细胞 MCF-7 的侵袭和迁移能力，并可显著抑制 CCR7 诱导的侵袭和迁移；同时 miR-98-5p 显著下调了 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 的蛋白表达水平，并可显著抑制 CCR7 诱导的 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达提升，结果表明 miR-98-5p 可抑制 CCR7 诱导的细胞外基质降解和肿瘤血管生成，进而抑制 MCF-7 细胞的侵袭和迁移。

EMT 在肿瘤细胞的侵袭和迁移中具有重要的作用。在 EMT 过程中，细胞失去黏附连接作用，顶端去极化，从上皮细胞表型向间叶细胞表型转化，导致细胞迁移和侵袭能力增加。E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 是 EMT 的典型标志物^[20-21]，E-cadherin 参与了细胞之间的黏附作用，阻止细胞迁移和侵袭，E-cadherin 表达下降会促进肿瘤形成；N-cadherin 常见于间叶细胞和神经细胞当中，当 N-cadherin 异常表达时，会促使细胞发生 EMT^[22]。Vimentin 常见于间叶细胞，在肿瘤细胞中细胞骨架主要成分角蛋白(cytokeratin)表达水平下调，并被 Vimentin 取代，从而提高了细胞的迁移和侵袭能力^[23]。本研究发现，miR-98-5p 能显著

提高 E-cadherin 的表达, 抑制 N-cadherin 和 Vimentin 的表达, CCR7 可诱导 N-cadherin 和 Vimentin 表达水平提升, 抑制 E-cadherin 表达, 同时 miR-98-5p 可显著降低 CCR7 对 E-cadherin 的抑制作用以及对 N-cadherin 和 Vimentin 的促进作用, 表明 miR-98-5p 可抑制 CCR7 诱导的 EMT 过程, 进而抑制 MCF-7 细胞的侵袭和迁移。

综上所述, miR-98-5p 可通过靶向沉默 CCR7, 阻断乳腺癌细胞的 EMT 进程, 从而抑制 MMP-2、MMP-9、VEGF、N-cadherin 和 Vimentin 的蛋白表达, 并促进 E-cadherin 蛋白表达, 进而抑制细胞外基质降解和肿瘤血管生成, 降低 MCF-7 细胞的运动能力。本研究表明 miR-98-5p 可通过靶向沉默 CCR7 抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的运动能力, 其作用机制与抑制 EMT 的激活有关。本研究首次探究了 miR-98-5p 在乳腺癌细胞中通过靶向沉默 CCR7 对其运动能力的影响及作用机制, 可能为乳腺癌靶向治疗提供了新的治疗思路。后期将对 miR-98-5p 靶向 CCR7 对乳腺癌细胞增殖与凋亡等其他方面的作用及机制进行更深入的研究。

REFERENCES

- [1] GREANEY M L, SPRUNCK-HARRILD K, RUDDY K J, et al. Study protocol for Young & Strong: a cluster randomized design to increase attention to unique issues faced by young women with newly diagnosed breast cancer [J]. BMC Public Health, 2015, 31(15): 37.
- [2] GANZ P A, GOODWIN P J. Breast cancer survivorship: Where are we today? [J]. Adv Exp Med Biol, 2015(862): 1-8.
- [3] TUTUNEA-FATAN E, MAJUMDER M, XIN X P, et al. The role of CCL21/CCR7 chemokine Axis in breast cancer-induced lymphangiogenesis [J]. Mol Cancer, 2015(14): 35.
- [4] HUANG H L, CHIANG C H, HUNG W C, et al. Targeting of TGF- β -activated protein kinase 1 inhibits chemokine (C-C motif) receptor 7 expression, tumor growth and metastasis in breast cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(2): 995-1007.
- [5] XU B, ZHOU M J, QIU W C, et al. CCR7 mediates human breast cancer cell invasion, migration by inducing epithelial-mesenchymal transition and suppressing apoptosis through AKT pathway [J]. Cancer Med, 2017, 6(5): 1062-1071.
- [6] EROLES P, TORMO E, PINEDA B, et al. MicroRNAs in breast cancer: One more turn in regulation [J]. Curr Drug Targets, 2016, 17(9): 1083-1100.
- [7] HAN J, ZHAO J, ZHANG L. Propofol inhibits the HCT116 cell proliferation and promotes apoptosis of HCT116 cells by regulating the expression of microRNA-133a/SOX4 [J]. J Mol Dia Ther, 2019, 11(3): 238-244.
- [8] ZHANG J J, CHEN J T, HUA L, et al. miR-98 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation via targeting EZH2 and suppressing Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2017(85): 472-478.
- [9] CAI C, HUO Q, WANG X L, et al. SNHG16 contributes to breast cancer cell migration by competitively binding miR-98 with E2F5 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(2): 272-278.
- [10] WANG M J, ZHANG H, LI J, et al. microRNA-98 inhibits the proliferation, invasion, migration and promotes apoptosis of breast cancer cells by binding to HMGA2 [J]. Biosci Rep, 2018, 38(5): bsr20180571.
- [11] PESCE S, MORETTA L, MORETTA A, et al. Human NK cell subsets redistribution in pathological conditions: A role for CCR7 receptor [J]. Front Immunol, 2016(7): 414.
- [12] ZHOU M, WANG S, HU L Y, et al. miR-199a-5p suppresses human bladder cancer cell metastasis by targeting CCR7 [J]. BMC Urol, 2016, 16(1): 64.
- [13] CHI B J, DU C L, FU Y F, et al. Silencing of CCR7 inhibits the growth, invasion and migration of prostate cancer cells induced by VEGFC [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 12533-12540.
- [14] ZHANG J W, ZHANG Y, MU C Z. Relationships among the expression of VEGF, MMP-2, MMP-9 and metastasis in breast carcinoma [J]. J Chin Physician(中国医师杂志), 2010(11): 1490-1493.
- [15] XING H, ZHAO M, GUO Y. Correlation between serum sex hormones, IGF-1, VEGF and tissue LOX levels and lymph node metastasis in patients with breast cancer [J]. J Mol Dia Ther, 2019, 11(2): 122-127.
- [16] ZHOU J F, LI X J. Effects of α -Lipoic acid on the expression of CD147 and matrix metalloproteinases in atherosclerotic plaques in rabbits [J]. J Med Mol Biol, 2017, 14(3): 147-151.
- [17] GUO L, HAN C. Study on anti tumor mechanism of piperine based on Wnt/ β -catenin signal [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2019, 36(13): 1627-1632.
- [18] GUYOT M, HILMI C, AMBROSETTI D, et al. Targeting the pro-angiogenic forms of VEGF or inhibiting their expression as anti-cancer strategies [J]. Oncotarget, 2017, 8(6): 9174-9188.
- [19] YAN W T, XU H Y, WEI Z C. Correlation between serum levels of VEGF, NT-proBNP, cTnT and the severity of coronary arterial lesions in elderly patients with coronary heart disease [J]. J Med Mol Biol, 2017, 14(2): 96-99.
- [20] NIETO M A. Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells [J]. Science, 2013, 342(6159): 1234850.
- [21] ZEISBERG M, NEILSON E G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1429-1437.
- [22] ASHAIE M A, CHOWDHURY E H. Cadherins: the superfamily critically involved in breast cancer [J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(5): 616-638.
- [23] LIU C Y, LIN H H, TANG M J, et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation [J]. Oncotarget, 2015, 6(18): 15966-15983.

收稿日期: 2019-08-09

(本文责编: 曹粤锋)