

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.002

· 研究快报 ·

miR-200c 通过靶向细胞能量代谢和多种信号通路调控三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的恶性生物学行为

杨月^{1a}, 陈龙^{1b}, 方婷², 章丹丹^{1a} (1 上海中医药大学 a. 交叉科学研究院; b. 科技实验中心分析测试室, 上海 201203; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

[摘要] **目的:** 考察 miR-200c 对三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)细胞 MDA-MB-231 的增殖、凋亡和迁移的影响及其代谢相关的分子机制。**方法:** 以过表达 miR-200c 的 MDA-MB-231 (miR-200c-231) 细胞、无过表达 miR-200c 的阴性对照细胞 miR-NC-231 及其移植瘤裸鼠模型为研究对象, qPCR 检测细胞和移植瘤组织中 miR-200c 及其他相关基因的表达水平, 免疫组化技术分析瘤组织中 Ki67 阳性细胞数量, Transwell 小室法检测细胞的迁移能力, 流式细胞术检测细胞的凋亡率, Western blotting 检测细胞及组织中增殖、迁移和代谢相关信号通路多种蛋白的表达, Seahorse 能量代谢检测仪检测细胞的基础耗氧率 (oxygen consumption rate, OCR)、细胞外酸化度 (extracellular acidification rate, ECAR) 和代谢表型变化, 液相质谱联用技术检测细胞中代谢产物的变化。**结果:** miR-200c-231 细胞及其移植瘤组织中 miR-200c 表达较 miR-NC-231 细胞显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), miR-200c-231 移植瘤质量和体积均显著下降、瘤组织中 Ki67 阳性细胞数明显减少 ($P < 0.01$), miR-200c-231 细胞的迁移能力下降、细胞凋亡率提高 (均 $P < 0.01$)。同时伴随着 ZEB1/2、Vimentin、cyclinD1 的表达下调及 cleaved PARP 表达的提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), STAT1/3 和 NF- κ B 的磷酸化水平降低 (均 $P < 0.05$) 而 cAMP 通路蛋白的磷酸化水平提高 ($P < 0.05$)。miR-200c-231 细胞的 OCR 提高和 ECAR 降低、色氨酸 2,3-加二氧酶 (tryptophan-2,3-dioxygenase 2, TDO2) 表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 细胞内 10 种抗肿瘤代谢物质含量提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** miR-200c 靶向 TDO2 调控 TNBC 细胞 MDA-MB-231 胞内抗肿瘤代谢产物水平、促使细胞代谢类型由依赖糖酵解为主向有氧呼吸类型转化, 并失活 STAT3 和 NF- κ B 通路而激活 cAMP 通路, 从而影响 MDA-MB-231 细胞的恶性生物学行为。

[关键词] miR-200c; 三阴性乳腺癌; MDA-MB-231 细胞; 增殖; 迁移; 凋亡; 能量代谢; STAT3 信号通路

[中图分类号] R735.2; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2020)01-0009-10

miR-200c regulates malignant biological behaviors of triple negative breast cancer MDA-MB-231 cells *via* targeting cell energy metabolism and multiple signaling pathways

YANG Yue^{1a}, CHEN Long^{1b}, FANG Ting², ZHANG Dandan^{1a} (1a. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research; 1b. Laboratory of Analysis and Test in Experiment Center of Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of miR-200c on the proliferation, apoptosis and migration of triple negative breast cancer cell (TNBC) MDA-MB-231 and its metabolism-related molecular mechanism. **Methods:** miR-200c-231 (MDA-MB-231 over-expressing miR-200c) cells, miR-NC-231 (MDA-MB-231 transfected with miRNA-negative control) and the corresponding transplanted tumor models in nude mice were used as the study subjects. qPCR was used to detect the content of miR-200c and other related genes in cells and transplanted tumor tissues. The number of Ki67 positive cells in tumor tissue was analyzed by immunohistochemistry. The migration and apoptosis of cells were examined by Transwell chamber method and Flow cytometry, respectively. The expressions of proteins associated with proliferation, migration, and metabolism related signaling pathways in cells and tissues were confirmed by Western blotting. The changes of oxygen consumption rate (OCR), extracellular acidification rate (ECAR) and metabolic phenotype

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81773946, No. 81573673, No. 81001666)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81573673, No. 81773946, No. 81001666)

[作者简介] 杨月 (1996-), 女, 硕士生, 主要从事 miRNA 在肿瘤增殖与转移中作用及中药干预机制的研究, E-mail: 13074370952@163.com

[通信作者] 章丹丹 (ZHANG Dandan, corresponding author), 博士, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事抗肿瘤药理学的基础和临床研究, E-mail: izhangdd@126.com

were detected by Seahorse energy metabolism detector. UPLC/LTQ-Orbitrap-MS technique was used to profile the difference of metabolites in cells. **Results:** The content of miR-200c in miR-200c-231 cells was significantly higher than that in miR-NC-231 cells. The mass of miR-200c-231 transplanted tumor notably decreased, and the number of Ki67 positive cells in tumor tissues also decreased significantly. The migration ability of miR-200c-231 cells decreased and the apoptosis rate increased (all $P < 0.01$), accompanied with declined expressions of ZEB1/2, Vimentin, cyclin D1 and increased expression of cleaved PARP ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), as well as decreased phosphorylation lever of STAT1/3 and NF- κ B but increased phosphorylation lever of CAMP (all $P < 0.05$). Overexpression of miR-200c in MDA-MB-231 cells increased OCR and the content of 10 antitumor metabolites, but decreased ECAR and tryptophan 2,3-plus dioxygenase (TDO2) expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** miR-200c targeting TDO2 elevates the level of intracellular anticancer metabolites in TNBC MDA-MB-231 cells, promotes the transformation from glycolysis to aerobic respiration phenotype, and inactivates STAT3 and NF- κ B pathway but activates cAMP pathway TNBC MDA-MB-231 cells, thus affects the malignant biological behaviors of MDA-MB-231 cells.

[Key words] miR-200c; triple negative breast cancer (TNBC); MDA-MB-231 cell; proliferation; migration; apoptosis; energy metabolism; STAT3 signaling pathway

[Chin J Cancer Biother, 2020, 27(1): 9-18. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2020.01.002]

三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC) 占有乳腺癌的 15%~20%, 其雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和人类表皮生长因子-2(HER-2)均为阴性, 缺乏内分泌及抗 HER-2 治疗的靶点, 因而侵袭性强、预后不良^[1]。对于 TNBC 的综合治疗方案包括手术和放化疗, 目前尚无理想的治疗策略^[2]。近年来, 靶向肿瘤细胞的能量代谢从而抑制肿瘤细胞增殖的研究日益成为热点。miRNAs 是一类长度在 18~25 nt 的短链非编码 RNA, 主要是在转录后水平调控基因的表达和稳定^[3], 影响肿瘤细胞的存活、增殖、分化、干性、迁移、侵袭、耐药等生物学行为^[4-5]。miR-200 家族中 miR-200c 以依赖 ZEB1/2 或非依赖方式调控 EMT 进程^[6]、细胞干性^[7]和 TNBC 细胞增殖^[8]。miR-200c 的靶基因色氨酸 2,3-加二氧酶(tryptophan-2,3-dioxygenase 2, TDO2)是催化分解色氨酸(L-tryptophan, Trp)成犬尿氨酸(L-kynurenine, Kyn)的第一限速酶^[9], 在肝癌、乳腺癌、脑胶质瘤、直肠癌和肺癌等多种肿瘤中均高表达, 与预后不良有关^[10]。本研究观察 miR-200c 对 TNBC MDA-MB-231 细胞代谢表型和代谢产物的影响, 并探讨 TDO2 及 STAT3 信号通路调控 MDA-MB-231 细胞恶性生物学行为的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系与主要试剂

过表达 miR-200c 的 MDA-MB-231 细胞(miR-200c-231)及阴性对照细胞(miR-NC-231)由美国佛罗里达大学黄爽教授馈赠。DMEM 培养基干粉、胰酶、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司, 噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)购自 Life Technologies 公司, PVDF 膜购自美国 Millipore 公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo 公司, Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、Matrigel 胶购自 BD 公司, RNA 提取试剂 TRIzol、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits、TaqMan Small RNA Assays、miR-200c

及 U6 引物购自 Life Technologies 公司, 糖酵解速率分析试剂盒、线粒体压力测试试剂盒和 Seahorse 分析培养基(Base Medium)购自 Seahorse Bioscience 公司, 抗体 cyclinD1、cleaved-PARP 和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自 Abcam 公司, Vimentin、STAT3、P-STAT3^{Tyr705}、STAT1、p-STAT1^{Tyr701}、VASP、p-VASP^{Ser157} 购自 Cell Signal Technology 公司, p-NF- κ Bp65^{ser536}、NF- κ Bp65 购自 Santa Cruz 公司, ZEB1、ZEB2、TDO2 和 GAPDH 购自 Proteintech 公司。Ki67 免疫组化检测实验由武汉赛维尔生物科技有限公司完成。

1.2 细胞培养

miR-NC-231 和 miR-200c-231 细胞用含 10%FBS 的 DMEM 高糖培养基, 置于 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度的恒温培养箱中培养。

1.3 乳腺癌原位荷瘤裸鼠模型的建立及观察

雌性、5 周龄、体质量约 20 g 的 BALB/c 裸鼠(实验动物合格证号: 2015000559619)购自中国科学院斯莱克公司, 饲养于上海中医药大学动物实验中心。裸鼠以随机数字表法随机分为 miR-NC-231 组和 miR-200c-231 组, 每组 6 只。将处于对数生长期的细胞调整密度至 2×10^6 个/ml, 加入等体积 Matrigel 胶并混合, 在裸鼠第二对乳房脂肪垫原位接种。每 4 d 测定动物体质量和肿瘤体积, 荷瘤 38 d 后处死动物, 分离并剥取瘤组织, 称质量。瘤组织经液氮速冻后 -80 °C 冻存, 或直接用 4% 多聚甲醛固定以待免疫组化检测。

1.4 qPCR 检测细胞和移植瘤组织中 miR-200c、ZEB2、Vimentin、TDO2、IL-6 和 IL-1 β 等基因的表达

称取 miR-NC-231 组和 miR-200c-231 组瘤块组织各 50 mg, 用 TRIzol 法提取 miR-NC-231 细胞、miR-200c-231 细胞和组织中总 RNA。(1)检测 miR-200c 含量时, 将 RNA 质量浓度调整为 2 ng/ μ l。根据 Taqman miRNA 试剂盒说明书, 各样品取 10 ng 总 RNA 逆转成 cDNA 后进行 PCR 反应。PCR 反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C

15 s, 60 °C 60 s; 共40个循环。(2)检测其他指标(ZEB2、Vimentin、TDO2、IL-6和IL-1 β)时,将RNA浓度调整至500 ng/ μ l,按试剂盒说明书逆转成cDNA后,根据PCR试剂盒说明书进行PCR。PCR反应条件:50 °C 2 min, 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s; 共40个循环。引物序列见表1。各样品的miR-200c和其他指标分别以U6和 β -actin作为内参进行校正后,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对表达水平。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequence

Gene	Primer sequence
miR-200c	F: 5'-GCCCCGTAATACTGCCGGGTAAT-3' R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
U6	F: 5'-CAGCACATATACTAAAATTGGAACG-3' R: 5'-ACGAATTTGCGTGTTCATCC-3'
ZEB2	F: 5'-GCCGAGTCCATGCGAACT-3' R: 5'-CCATGATCGGCTGCTTCAT-3'
Vimentin	F: 5'-TGAGATTGCCACCTACAGGA-3' R: 5'-GAGGGAGTGAATCCAGATTAGTTT-3'
TDO2	F: 5'-CGGTGGTTCCTCAGGCTATC-3' R: 5'-CTTCGGTATCCAGTGTCTGGG-3'
IL-6	F: 5'-CCCTGAGAAAGGAGACATGTAA-3' R: 5'-AGATTCTTTGCCTTTTCTGC-3'
IL-1 β	F: 5'-ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-3' R: 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-3'
β -actin	F: 5'-CTCCTCCTGAGCGCAAGTACTC-3' R: 5'-CGGACTCGTCATACTCCTGCT-3'

1.5 Transwell小室法检测细胞的迁移能力

miR-NC-231细胞和miR-200c-231细胞培养于细胞培养皿中,用胰酶消化细胞后,取 1×10^5 个细胞加入Transwell上室,下室加入600 μ l无血清DMEM培养液,6 h后用4%多聚甲醛固定30 min,0.5%结晶紫染色后,用水清洗小室,用棉签小心去除上室膜上未迁移的细胞,显微镜下观察小室膜下迁移的细胞数目。用33%醋酸溶液溶解小室膜上结晶紫染色的细胞,使用Spectra MAX190酶标仪(MD,美国)在490 nm处读数,检测醋酸溶解膜下细胞的光密度(D)值表示细胞的迁移能力。

1.6 Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测细胞的凋亡率

取对数生长期的各组细胞,无血清处理24 h后,用不含EDTA的胰酶消化,根据Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书进行检测。简言之,将细胞使用结合缓冲液调整至 1×10^6 个/ml后,取100 μ l加入5 μ l Annexin V-FITC进行染色,冰上避光孵育30 min,在上机检测前加入5 μ l PI。使用FACS-Calibur (BD Biosciences, 美国)进行检测,使用ModFit

LT3.0软件(BD Biosciences)分析细胞的凋亡率。

1.7 Seahorse能量代谢分析仪检测TNBC细胞代谢表型的相关指标

将miR-NC-231细胞和miR-200c-231细胞以 1×10^4 个/ml的密度接种于Seahorse Xfe96专用培养板,室温静置1 h,于细胞培养箱中培养过夜,水化探针板过夜,用预热的分析试剂清洗2遍后,根据试剂盒说明书依次加入寡霉素(oligomycin)、FCCP(1 μ mol/L)、抗霉素A/鱼藤酮(antimycin A/rotenone)、2-脱氧-D-葡萄糖(2-deoxy-D-glucose, 2-DG)等试剂,37 °C孵育30 min,上机检测细胞基础耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)、细胞外酸化(extracellular acidification rate, ECAR)和基础质子流速率(basal proton efflux rate, BPER)。每孔细胞测定总蛋白对数值进行校正。

1.8 液相质谱联用技术检测TNBC细胞代谢组学相关指标

细胞加入200 μ l纯水后刮取,超声粉碎,取50 μ l细胞上清液,加入200 μ l甲醇和5 μ l的苯丙氨酸(3 mg/10 ml)混匀,12 000 $\times$ g离心10 min,取200 μ l上清液上机检测。色谱条件:色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m),流动相为纯水(含0.1%甲酸,A)和乙腈(含0.1%甲酸,B)。洗脱程序:0~1.0 min,95%A;1.0~2.0 min,95%~60%A;2.0~7.0 min,60%~20%A;7~11 min,20%~5%A;11~15 min,5%A;15~15.5 min,5%~95%A;15.5~19.5 min,95%A。体积流量0.3 ml/min;进样量4 μ l。柱温40 °C。质谱条件:以Orbitrap Elite为检测器,采用正离子模式和负离子模式两种模式检测,离子源温度为300 °C,鞘气流速为35 arb,辅气流速为15 arb。负离子模式另外加入反吹气,流速为1 arb;正离子模式下喷雾电压为3.8 kV,负离子模式下为3.2 kV,毛细管温度为350 °C。正离子模式下为S-Lens RF Level、30%,负离子模式下为60%。

1.9 Western blotting实验检测细胞和移植瘤组织中多个信号通路相关的蛋白及其磷酸化水平

取miR-NC-231和miR-200c-231细胞及移植瘤组织,加入RIPA蛋白裂解液和蛋白酶/磷酸蛋白酶抑制剂后,低温超声或研磨破碎,经低温高速离心15 min后吸取上清。BCA蛋白测定试剂盒测定样品蛋白浓度。变性蛋白样品以80 V恒压2 h SDS-PAGE,转膜后用5%脱脂牛奶封闭,加入稀释比例均为1:1 000的cyclinD1、Vimentin、STAT3、p-STAT3^{Tyr705}、STAT1、p-STAT1^{Tyr701}、VASP、p-VASP^{ser157}以及cleaved-PARP(1:5 000)、p-NF- κ Bp65^{ser536}(1:200)、NF- κ Bp65(1:200)、ZEB1(1:500)、ZEB2(1:500)、TDO2(1:600)、GAPDH(1:10 000)等孵育16~18 h后,加入山羊抗兔

的二抗(1:10 000)继续孵育1 h。使用上海天能5200 Multi成像系统进行显影,通过Tanon Image进行灰度值分析并根据内参进行校正。

1.10 统计学处理

上述的独立实验均重复3次。使用Compound Discover 2.1软件(美国Thermo公司)对所得的LC-MS原始数据进行提取及预处理,再使用Excel进行归一化,使数据呈二维矩阵形式,采用SIMCA13.0软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘法(partial least square discriminant analysis, PLS-DA)判别分析,差异代谢物以PLS-DA模型得到的变量权重(variable importance plot, VIP)值及 t 检验所得的 P 值为标准进行列举。采用SPSS23.0软件进行统计学分析,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

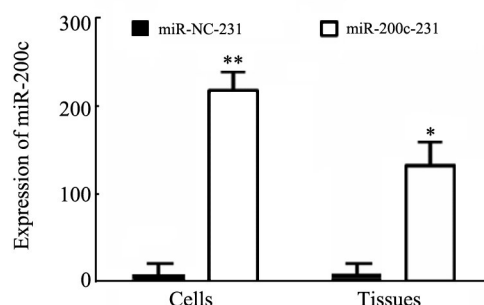
2 结果

2.1 miR-200c-231细胞及其移植瘤组织中miR200c显著过表达

qPCR检测结果(图1)显示,miR-200c-231细胞及其移植瘤组织中miR-200c含量均显著高于对照组,分别提高至对照组表达量的217倍和130倍($t=13.83$ 、 22.23 ,均 $P < 0.01$)。

2.2 miR-200c过表达抑制MDA-MB-231移植瘤的生长

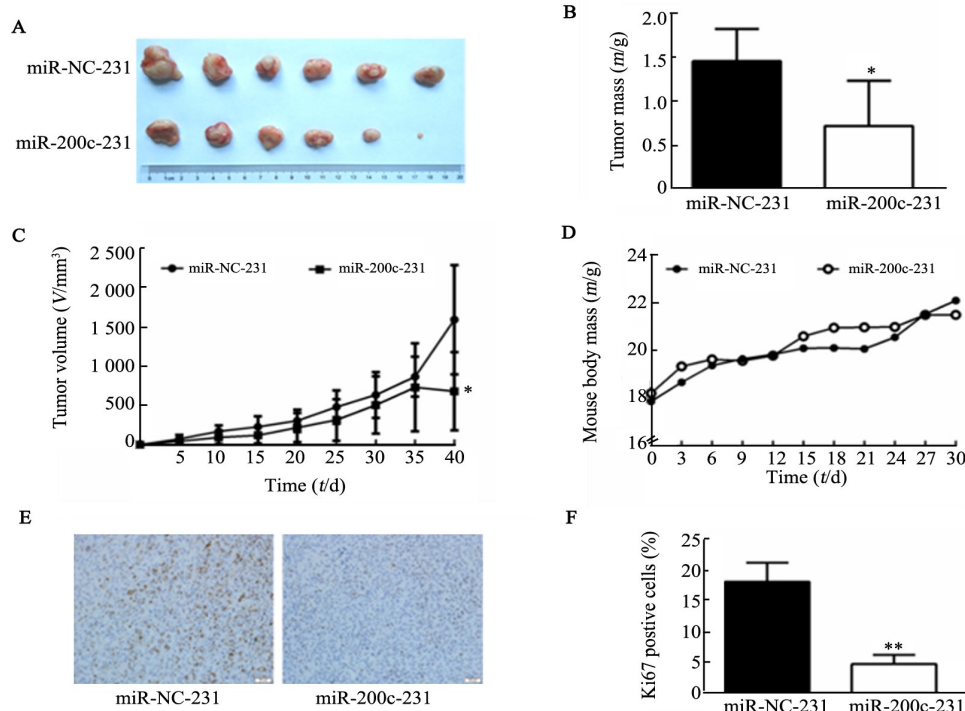
建立乳腺癌原位荷瘤裸鼠模型38 d后,miR-NC-231组瘤体质量为 (1.46 ± 0.33) g,miR-200c-231组瘤体质量为 (0.72 ± 0.46) g,miR-200c-231组的瘤质量和瘤体积较对照组均显著降低($t=4.66$,均 $P < 0.05$),而两组裸鼠体质量比较差异无统计学意义($t=2.13$, $P > 0.05$)。免疫组化染色结果显示,miR-200c-231组移植瘤组织内Ki67表达水平显著低于miR-NC-231组($t=4.04$, $P < 0.01$)。两组动物中均未观察到明显的肺转移。详见图2。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC-231 group

图1 miR-200c-231细胞及其移植瘤组织中miR-200c表达水平明显升高

Fig.1 The expression level of miR-200c was significantly increased in miR-200c-231 cells and their transplanted tumor tissues



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC-231 group

A, B: Tumor mass of miR-NC-231 and miR-200c-231 groups; C: Tumor volume of miR-NC-231 and miR-200c-231 groups; D: Mouse body mass of miR-NC-231 and miR-200c-231 groups; E, F: Ki67 immunohistochemistry of tumor tissues in miR-NC-231 and miR-200c-231 groups ($\times 200$)

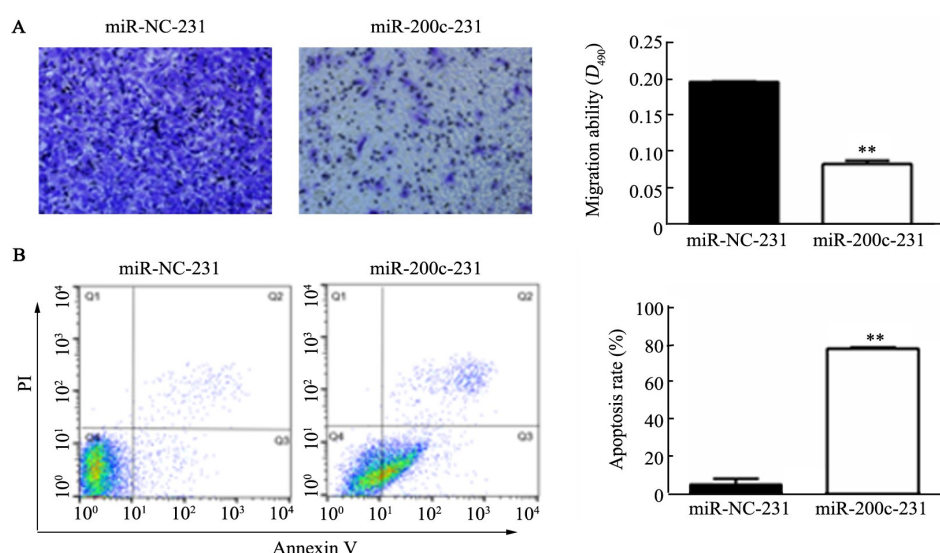
图2 miR-200c过表达抑制MDA-MB-231细胞移植瘤的生长

Fig.2 Over expression of miR-200c inhibited the growth of MDA-MB-231 cell graft tumor

2.3 miR-200c 过表达抑制 MDA-MB-231 细胞迁移和诱导凋亡

Transwell 实验结果(图 3A)显示,miR-200c-231 组 MDA-MB-231 细胞的迁移率显著低于 miR-NC-

231 组($t=49.14, P<0.01$)。流式细胞术检测结果(图 3B)显示,miR-200c-231 组 MDA-MB-231 的细胞凋亡率显著高于 miR-NC-231 组($t=33.37, P<0.01$)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs miR-NC-231 group

A: Migration assay of miR-NC-231 and miR-200c-231 cells (crystal violet staining, $\times 200$);

B: Apoptosis assay of miR-NC-231 and miR-200c-231 cells

图3 过表达 miR-200c 对 MDA-MB-231 细胞迁移和凋亡的影响

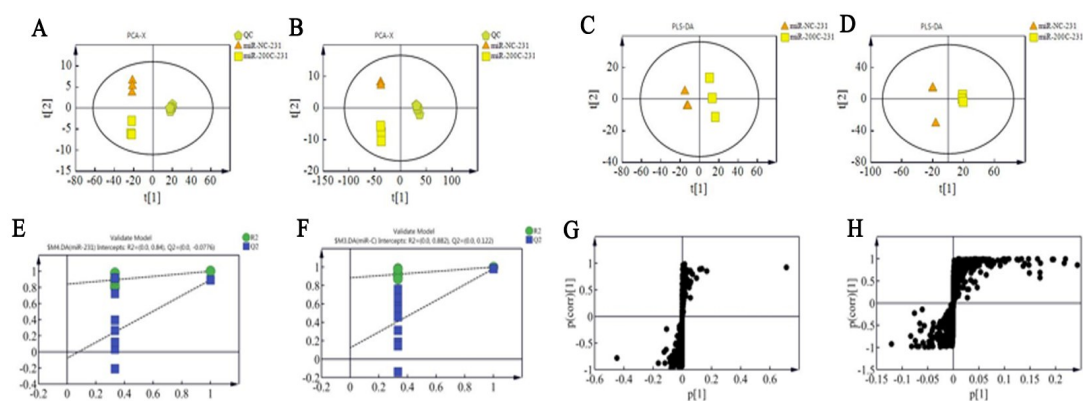
Fig.3 Effect of overexpression of miR-200c on migration and apoptosis of MDA-MB-231 cells

2.4 miR-200c 过表达导致 MDA-MB-231 细胞非靶向代谢产物的变化

利用液相质谱联用技术于正离子和负离子模式下进行 miR-NC-231 与 miR-200C-231 细胞代谢物组学分析,用 Compound Discoverer 2.1 软件(Thermo, 美国)对检测到的数据进行提取、解卷积及归一化,得到数据矩阵;用 Simca-P14.1 软件(Umetrics, 美国)对数据矩阵进行多元统计分析。首先进行 PCA 分析,通过正负模式的 PCA 分析得分图(图 4A、B)看出, QC 组作为质控样品,样品聚簇说明仪器稳定。miR-NC-231 与 miR-200C-231 两组细胞有明显区分,分别聚集分布在不同象限里,两组数据在正离子模式下共得到 2 个主成分: $R^2X=0.931$ 、 $Q^2=0.887$; 负离子模式下共得到 2 个主成分: $R^2X=0.948$ 、 $Q^2=0.929$ (R^2X 、 Q^2 值为模型的解释率和预测率,两者大于 0.5 说明模型可靠)。通过 PCA 分析已经发现两组细胞存在差异,之后通过 PLS-DA(图 4A、C、D)寻找两组样品间的差异物质。从 PLS-DA 得分图也可以看出两者区分明显,两组数据在正离子模式下共得到 3 个主成分: $R^2X=0.601$ 、 $R^2Y=0.999$ 、 $Q^2=0.887$; 负离子模式下也得到 3 个主成分: $R^2X=0.645$ 、 $R^2Y=1$ 、 $Q^2=0.965$ 。置换检验图(图 4E、F)可以有效地评估 PLS-

DA 的模型是否存在过拟合的风险,通过对样本的 Y 值进行顺序上的置换,多次交叉验证以获得随机模型的 R^2 和 Q^2 ,通过对 R^2 和 Q^2 拟合得到回归线的斜率和截距来判断模型是否过拟合。当 R^2 的 X 值=1 时,其 Y 值越接近 1,说明建立的模型越好,可反映样本数据的真实情况; Q^2 的 Y 值越接近 1,说明当新样本加入时,得到近似分布的概率越高。由图 4E、F 可见,此次模型的建立可以较好地解释两组间的差异,其模型的解释率,预测率、以及置换检测,均说明该模型可靠,未出现过拟合现象,可用于寻找差异代谢物。

S-plot 的作用是筛选在两组之间起主要作用的物质,在 S-plot 中离原点越远且越分散在两端,其对应的 VIP 越大,在两组间产生的影响也就越大(图 4G、H)。以 VIP>1、组间差异 $P<0.05$ 作为指标筛选差异代谢物质,对于差异物质借由人源代谢数据库(Human Metabolome Database, HMDB)进行比对鉴定,筛选所得的差异代谢物共有 16 个(表 1),其中 10 个代谢物(包括丙酰肉碱、尿嘧啶等)含量显著提高($t=6.91$ 、 10.12 , 均 $P<0.01$)、6 个代谢物[包括 L - α -甘油磷酸胆碱(L - α -glyceryl phosphoryl choline)、5-氨基咪唑核苷酸(5-aminoimidazole ribotide 等)]含量显著降低($t=20.97$ 、 20.31 , 均 $P<0.01$)。



** $P < 0.01$ vs miR-NC-231 group

A: PCA-X score plot in positive ion mode; B: PCA-X score plot in negative ion mode; C: Validation of PLS-DA score plot in positive ion mode; D: Validation of PLS-DA model in negative ion mode; E: Validation of PLS-DA model in positive ion mode; F: Validation of PLS-DA model in negative ion mode; G: S-plot of PLS-DA model in positive ion mode; H: S-plot of PLS-DA model in negative ion mode

图4 液相质谱联用技术对正负离子模式下 miR-NC-231 和 miR-200c-231 细胞的多变量分析($n=3$)

Fig.4 Multivariate analysis based on the UPLC/LTQ-Orbitrap-MS profiling data for miR-NC-231 and miR-200c-231 cells in positive and negative ion mode ($n=3$)

表2 过表达 miR-200c 导致 MDA-MB-231 细胞产生的差异代谢物

Tab.2 Overexpression of miR-200c resulted in differential metabolites produced by MDA-MB-231 cells

No	Metabolite name	RT (t/min)	VIP	Fold	HMDB ID
1	Propionylcarnitine	1.88	2.08	5.21**	HMDB0000824
2	Uracil	1.41	1.59	4.56**	HMDB0000300
3	D-Gluconic acid	0.88	5.33	2.75**	HMDB0000127
4	Citric acid	0.94	8.57	2.46**	HMDB0000094
5	Dehydroascorbic acid	1.40	2.99	2.40*	HMDB0001264
6	Acetylcarnitine	1.39	1.71	2.30**	HMDB0000201
7	Itaconic acid	0.94	1.62	2.18*	HMDB0002092
8	(±)Malic acid	1.48	2.87	1.83**	HMDB0000744
9	8-hydroxy-deoxyguanosine	1.62	1.17	1.58**	HMDB0003333
10	Guanine	1.00	1.81	1.53**	HMDB0000132
11	Paraldehyde	4.11	2.96	0.27**	HMDB0032456
12	Taurine	0.88	1.66	0.23*	HMDB0000251
13	3-indole carboxylic acid glucuronide	3.75	1.03	0.13**	HMDB0013189
14	Ethyl lactate	3.68	1.66	0.12**	HMDB0040735
15	5-aminoimidazole ribotide	0.89	1.62	0.10**	HMDB0001235
16	L-alpha-Glyceryl phosphoryl choline	0.92	5.10	0.05**	HMDB0000086

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC-231 group. RT: Retention time; VIP: Variable importance plot;

HMDB: Human Metabolome Database

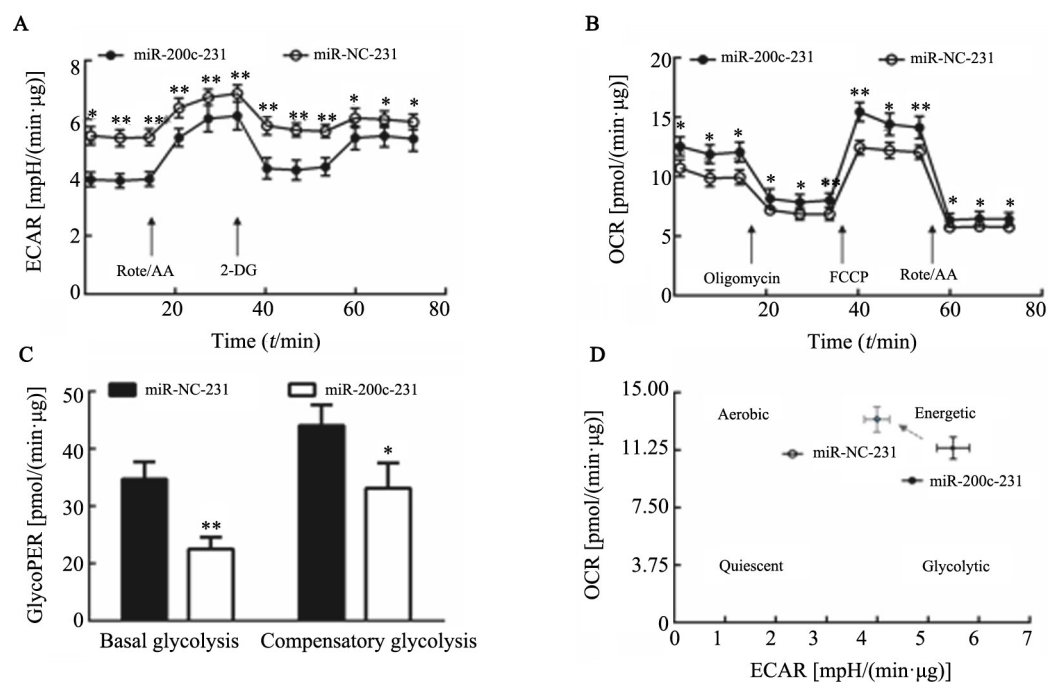
2.5 miR-200c 过表达致 MDA-MB-231 细胞代谢表型的变化

miR-200c-231 细胞 ECAR 显著降低 ($t=9.70$, $P < 0.01$), 而 OCR 明显提高 ($t=6.81$, $P < 0.01$; 图 5A、B); 其基础糖酵解 (basal glycolysis, BG) 从对照组的 (49.5 ± 6.0) 降到 (25.1 ± 4.1) pmol/(min·μg); 而补偿性糖酵解 (compensatory glycolysis, CG) 也显著下降, 从 (68.2 ± 7.2) 降至 (46.3 ± 8.7) pmol/(min·μg)。BPER 从 (52.6 ± 6.3) 降至 (28.5 ± 4.7) pmol/(min·μg) (图 5C)。以 ECAR 和 OCR 值为横、纵坐标作图 (图 5D), 4 个

象限分别代表有氧型(aerobic)、糖酵解型(glycolytic)、活化型(energetic)和静息型(quiescent), 图中可见 miR-200c 过表达使 MDA-MB-231 细胞代谢表型从依赖糖酵解为主向有氧呼吸转化。

2.6 过表达 miR-200c 影响细胞及瘤组织中转移、代谢和增殖相关基因和蛋白的表达

Western blotting 检测结果 (图 6) 显示, miR-200c-231 细胞和移植瘤组织内 IL-1β、IL-6、ZEB1/2、Vimentin、TDO2、cyclinD1 的表达下调, 而 cleaved PARP (c-PARP) 蛋白量则显著提升 ($t=12.83$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

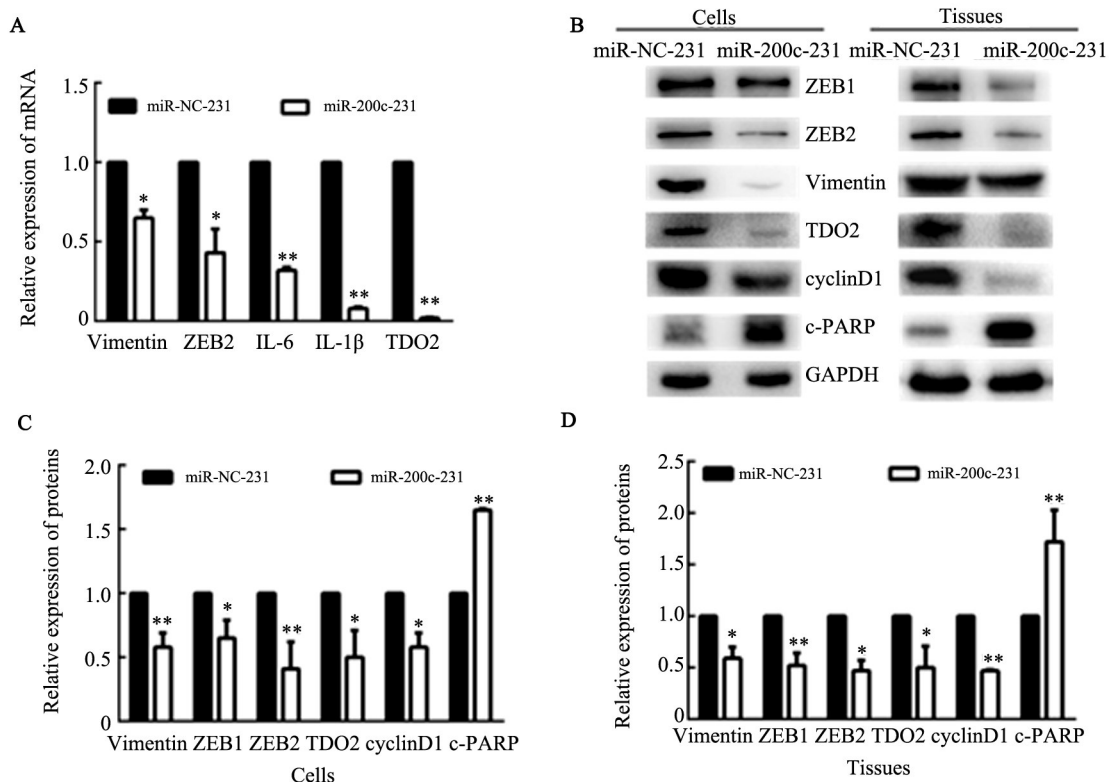


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC-231 group

A: miR-200c suppressed ECAR in MDA-MB-231 cells; B: MiR-200c enhanced OCR in MDA-MB-231 cells; C: miR-200c suppressed GlycoPER in MDA-MB-231 cells; D: miR-200c altered metabolic phenotype. ECAR, OCR and GlycoPER were detected by the Agilent's Seahorse Bioscience XF96 Extracellular Flux Analyzer

图5 过表达miR-200c抑制MDA-MB-231细胞的糖酵解且改变代谢表型

Fig.5 Overexpression of miR-200c suppressed the glycolysis of MDA-MB-231 cells and altered metabolic phenotype



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC-231 group

A: Gene mRNA expressions of ZEB2, Vimentin, TDO2, IL-6 and IL-1β in cells; B: Protein expressions of ZEB1/2, Vimentin, TDO2, cyclinD1 and c-PARP in miR-NC-231 and miR-200c-231 cells (left) and tumor tissues (right); C, D: Data analysis of protein expressions

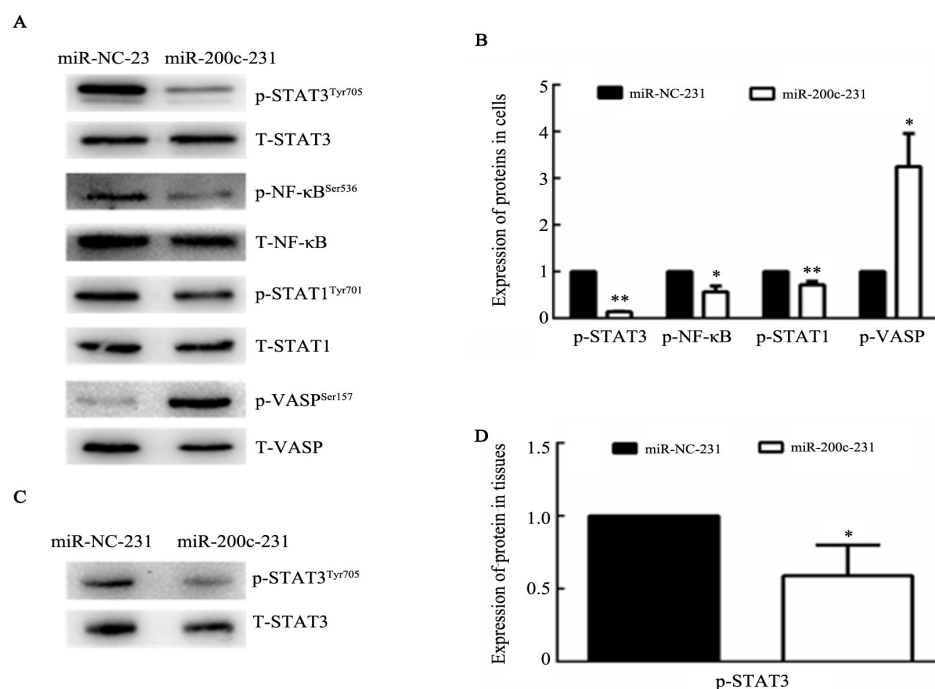
图6 过表达miR-200c引起癌细胞和组织中转移、代谢和增殖相关生物标志物的变化

Fig.6 Overexpression of miR-200c caused changes of biomarkers associated with metastasis, metabolism, and proliferation in cancer cells and its tissues

2.7 miR-200c 过表达使细胞及瘤组织中 STAT1/3、NF- κ B 通路失活和 cAMP 通路激活

Western blotting 检测结果(图7)显示,与 miR-NC-231 对照组细胞相比,miR-200c-231 细胞中 STAT1/3 和 NF- κ B 通路蛋白的磷酸化水平降低,其中 STAT3 失活的

程度最大($t=149.00, P<0.01$);而反映 cAMP 信号通路活化情况的 VASP 的 ser157 位点磷酸化显著提高($t=9.08, P<0.05$)。TNBC 组织中 STAT3 蛋白磷酸化的变化情况与细胞变化的趋势一致,提示 STAT3 信号通路在 miR-200c 过表达的情况下失活。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs miR-NC-231 group

A, B: The phosphorylation level of STAT1/3, NF- κ B and VASP pathways in cells;

C, D: The phosphorylation level of STAT3 pathway in tumor tissues

图7 miR-200c 过表达使 MDA-MB-231 细胞和组织中 STAT1/3 和 NF- κ B 通路失活和 cAMP 通路激活

Fig.7 The overexpression of miR-200c inactivated the STAT1/3 and NF- κ B pathways and activated the cAMP pathway in MDA-MB-231 cells and tissues

3 讨论

TNBC 因其高度恶性生物学行为导致患者预后差和病死率高。miRNA 作为重要的内源性基因表达调控因子,在肿瘤进程中发挥重要的调节作用。miR-200c 是多功能的微小 RNA,调控众多靶基因,在肿瘤增殖、转移、耐药和免疫逃逸中均发挥重要作用。

本研究结果发现,在 TNBC 细胞 MDA-MB-231 中提高 miR-200c 的表达,可抑制其体内增殖和体外迁移的恶性生物学行为,可使 miR-200c-231 移植瘤的体积和质量较对照组显著降低,体外培养细胞凋亡加剧,伴随着细胞周期蛋白 cyclinD1 表达降低和 cleaved PARP 的提高。VASP-ser157 位点磷酸化水平反映 cAMP 信号通路活化情况,VASP-ser157 位点磷酸化的提高提示 miR-200c 可通过部分激活 cAMP 信号通路发挥抑制 MDA-MB-231 细胞的恶性增殖,与 cAMP 信号通路激活后抑制乳腺癌增殖的文献报道^[11]一致。miR-200c-231 细胞体外迁移显著下降,迁

移相关蛋白 ZEB1/2 和 Vimentin 的表达也随之下调。ZEB1/2 是 miR-200c 干预 EMT 进程的关键靶基因,可通过 NF- κ B、IL-6-STAT3、IL-1 β -STAT1 信号通路发挥调控迁移与侵袭关键进程^[12]。除此之外,miR-200c 可靶向 Foxf2 抑制 MDA-MB-231 的迁移^[13]。本研究发现 miR-200c 部分通过失活 STAT1/3 和 NF- κ B 信号通路,靶向 ZEB1/2 抑制 MDA-MB-231 的体外迁移。以上结果验证了 miR-200c 抑制 TNBC 增殖和迁移等恶性生物学行为的部分机制。

代谢组学是系统生物学的组成部分,聚焦代谢分子的动态变化。非靶向代谢组学因其对代谢物系统全面的分析而在探寻新的生物标志物和分析肿瘤机制等领域被广泛使用。本研究利用液相质谱联用技术对过表达 miR-200c 的 MDA-MB-231 细胞进行非靶向代谢组学分析,结果发现该细胞中多种具有抗癌作用的代谢产物增加。如丙酰肉碱提高 5.21 倍;有报道^[14]其在肝癌中表达低,在区分肝癌、慢性肝炎和肝硬化中是预后预测的潜力指标。又如尿嘧啶提高 4.56 倍;据报道^[15-17]

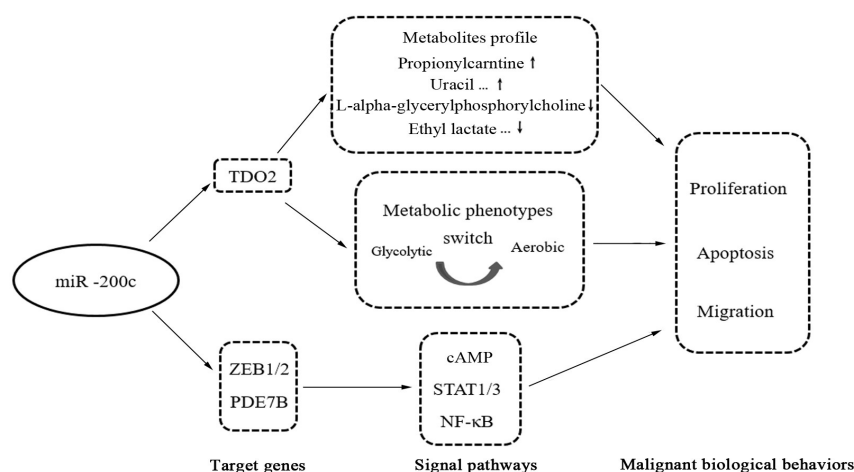
尿嘧啶和氟尿嘧啶联用提高肝癌切除后患者和病理 I 期肺癌患者的生存率;顺铂、氟尿嘧啶、尿嘧啶和依立替康联合治疗在复发和转移性头颈癌的 I、II 期临床研究中显示中度反应,并提高患者生活质量。再如去氢抗坏血酸提高 2.4 倍;它可转化肿瘤细胞中大量同型半胱氨酸的巯基为细胞毒物质 3-mercaptopropional-dehyde,从而抑制多种侵袭性小鼠肿瘤^[18]。另外如乙酰肉毒碱提高 2.3 倍;有报道^[19]它与丁酸盐治疗结肠癌荷瘤小鼠上有增效作用。

肿瘤细胞内能量代谢途径的变化维持着异常增殖、侵袭转移、耐药和免疫逃逸等恶性生物学行为。肿瘤细胞即便在氧供给充足的情况下也主要以有氧糖酵解而非氧化磷酸化方式提供能量(即 Warburg 效应)^[20]。降低肿瘤细胞的糖酵解能力,有望抑制其恶性增殖或转移,糖酵解抑制剂在肿瘤的治疗中取得较好的疗效^[21]。能量代谢全时监测图中显示,miR-200c 显著抑制 MDA-MB-231 细胞的糖酵解指标 ECAR、降低基础糖酵解率和补偿性糖酵解率,同时提高 OCR,提示氧化磷酸化加强。ATP 柠檬酸裂解酶的耗竭伴随着柠檬酸盐的积累,可抑制 A549 肺癌细胞和前列腺癌细胞的体外增殖和体内生长^[22-24]。含柠檬酸的功能膳食补充剂可显著抑制黑色素瘤小鼠中肿瘤的生长^[25]。苹果酸作为有氧代谢的促进剂,能够促进组织有氧氧化,加速线粒体呼吸。三羧酸(tricarboxylic acid, TCA)循环是以乙酰辅酶 A 与草酰乙酸生成柠檬酸为起点的环式反应结构,而草酰

乙酸是在苹果酸脱氢酶的催化下由苹果酸生成的。柠檬酸和苹果酸是 TCA 循环中不可或缺的中间体。TCA 循环是细胞中氧化磷酸化的主要途径,可氧化葡萄糖,谷氨酰胺和脂肪酸为细胞提供能量,合成大分子并维持氧化还原平衡^[26]。有研究^[27-28]表明,肿瘤细胞可绕过 TCA 循环利用有氧糖酵解为自身提供能量支撑。本研究中,在 miR-200c 过表达后,细胞中柠檬酸及苹果酸水平分别提高 2.46 及 1.83 倍,提示 miR-200c 通过干预 TCA 循环和抑制糖酵解从而调控细胞的能量代谢,最终起到抑制细胞增殖的作用。

TDO2 在 TNBC 中以依赖 NF- κ B 方式协助失巢抵抗促进肺转移^[29];且 TDO2 可抑制 CD8⁺T 细胞活力,抑制抗肿瘤免疫反应,促进肿瘤生长^[30]。本研究结果中,过表达 miR-200c 可通过失活 STAT3 信号通路(图 7)抑制 TDO2 表达而调控代谢,抑制肿瘤细胞增殖生长和体外迁移。

综上所述,miR-200c 作为多功能 miRNA,除靶向 ZEB1/2 阻滞细胞迁移、靶向 PDE7B 诱导细胞凋亡、通过失活 STAT1/3/NF- κ B 信号通路和活化 cAMP 信号通路而抑制 MDA-MB-231 增殖和转移之外,本研究还揭示了 miR-200c 可通过靶向 TDO2 调控细胞能量代谢而提高内源性抗癌性代谢物质的含量,以及改变细胞代谢表型,从而抑制 MDA-MB-231 细胞恶性生物学行为的作用机制(图 8)。



TDO2: Tryptophan-2,3-dioxygenase 2; PDE7B: Phosphodiesterase 7B; ZEB1/2: Zinc finger E-box-binding protein 1/2; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; STAT1/3: Signal transducers and activators of transcription 1/3; NF- κ B: Nuclear factor kappa beta

图 8 miR-200c 通过调控肿瘤细胞能量代谢和多种信号通路抑制 TNBC 细胞恶性生物学行为的示意图

Fig.8 miR-200c suppressed malignant biological behaviors of TNBC cells via targeting cell energy metabolism and relating multiple signaling pathways

[参考文献]

[1] TAHERIAN-FARD A, SRIHARI S, RAGAN M A. Breast cancer classification: linking molecular mechanisms to disease prognosis[J].

Brief Bioinform, 2015, 16(3): 461-474. DOI:10.1093/bib/bbu020.

[2] OUALLA K, EL-ZAWAHRY H M, ARUN B, et al. Novel therapeutic strategies in the treatment of triple-negative breast cancer[J/OL]. Ther Adv Med Oncol, 2017, 9(7): 493-511[2019-10-22]. <https://www.ncbi.>

- nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5502951/. DOI: 10.1177/1758834017711380.
- [3] SAYED D, ABDELLATIF M. MicroRNAs in development and disease[J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 827-887. DOI: 10.1152/physrev.00006.2010.
 - [4] DI LEVA G, GAROFALO M, CROCE C M. MicroRNAs in cancer[J]. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2014, 9(1): 287-314. DOI:10.1146/annurev-pathol-012513-104715.
 - [5] 樊宏斌, 叶明. micro-RNA200s在肿瘤转移中的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(11): 840-844. DOI:CNKI:SUN:ZHLU.0.2012-11-013.
 - [6] MUTLU M, RAZA U, SAATCI Ö, et al. MiR-200c: a versatile watchdog in cancer progression, EMT, and drug resistance[J]. *J Mol Med*, 2016, 94(6): 629-644. DOI:10.1007/s00109-016-1420-5.
 - [7] SHIMONO Y, ZABALA M, CHO R W, et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells[J/OL]. *Cell*, 2009, 138(3): 592-603[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2731699/>. DOI:10.1016/j.cell.2009.07.011.
 - [8] ZHANG D D, LI Y, XU Y, et al. Phosphodiesterase 7B/microRNA-200c relationship regulates triple-negative breast cancer cell growth[J]. *Oncogene*, 2019, 38(7): 1106-1120. DOI:10.1038/s41388-018-0499-2.
 - [9] ROGERS T J, CHRISTENSON J L, GREENE L I, et al. Reversal of triple-negative breast cancer EMT by miR-200c decreases tryptophan catabolism and a program of immunosuppression[J/OL]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(1): 30-41[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6318067/>. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-18-0246.
 - [10] PILOTTE L, LARRIEU P, STROOBANT V, et al. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2, 3-dioxygenase[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(7): 2497-2502[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3289319/>. DOI:10.1073/pnas.1113873109.
 - [11] DONG H L, CLAFFEY K P, BROCKE S, et al. Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2015, 152(1): 17-28. DOI:10.1007/s10549-015-3445-9.
 - [12] ROKAVEC M, WU W L, LUO J L. IL6-mediated suppression of miR-200c directs constitutive activation of inflammatory signaling circuit driving transformation and tumorigenesis[J/OL]. *Mol Cell*, 2012, 45(6): 777-789[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3319241/>. DOI:10.1016/j.molcel.2012.01.015.
 - [13] ZHANG T, WAN J G, LIU J B, et al. MiR-200c inhibits metastasis of breast tumor via the downregulation of Foxf2[J]. *Genet Mol Res*, 2017, 16(3). DOI:10.4238/gmr16038971.
 - [14] HUANG Q, TAN Y X, YIN P Y, et al. Metabolic characterization of hepatocellular carcinoma using nontargeted tissue metabolomics[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(16): 4992-5002. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-0308.
 - [15] ISHIZUKA M, KUBOTA K, NEMOTO T, et al. Administration of adjuvant oral tegafur/uracil chemotherapy post hepatocellular carcinoma resection: a randomized controlled trial[J]. *Asian J Surg*, 2016, 39(3): 149-154. DOI:10.1016/j.asjsur.2015.04.008.
 - [16] KATO H, ICHINOSE Y, OHTA M, et al. A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(17): 1713-1721. DOI: 10.1056/NEJMoa032792.
 - [17] CHEN S C, CHANG P M, YANG M H. Cisplatin/tegafur/uracil/irinotecan triple combination therapy for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: a phase I / II clinical study [J/OL]. *Oncologist*, 2016, 21(5): 537-538[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4861372/>. DOI: 10.1634/theoncologist.2015-0515.
 - [18] TOOHEY J I. Dehydroascorbic acid as an anti-cancer agent[J]. *Cancer Lett*, 2008, 263(2): 164-169. DOI:10.1016/j.canlet.2008.02.002.
 - [19] ELIMRANI I, DIONNE S, SARAGOSTI D, et al. Acetylcarnitine potentiates the anticarcinogenic effects of butyrate on SW480 colon cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(2): 755-763. DOI: 10.3892/ijo.2015.3029.
 - [20] 张亚珍, 何贵省, 吴晓明, 等. miR-103a-3p在乳腺癌组织和血清中的表达及通过下调 PDK4 抑制乳腺癌细胞的有氧糖酵解及增殖[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2018, 25(5): 490-496. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2018.05.009.
 - [21] GATENBY R A, GILLIES R J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?[J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(11): 891-899. DOI:10.1038/nrc1478.
 - [22] HANAI J, DORO N, SASAKI A T, et al. Inhibition of lung cancer growth: ATP citrate lyase knockdown and statin treatment leads to dual blockade of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI₃K)/AKT pathways[J/OL]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(4): 1709-1720[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407542/>. DOI:10.1002/jcp.22895.
 - [23] ICARD P, LINCET H. The reduced concentration of citrate in cancer cells: an indicator of cancer aggressiveness and a possible therapeutic target[J]. *Drug Resist Updat*, 2016, 29: 47-53. DOI:10.1016/j.drug.2016.09.003.
 - [24] SHAH S, CARRIVEAU W J, LI J Y, et al. Targeting ACLY sensitizes castration-resistant prostate cancer cells to AR antagonism by impinging on an ACLY-AMPK-AR feedback mechanism[J/OL]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43713-43730[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5190055/>. DOI:10.18632/oncotarget.9666.
 - [25] AWA H, FUTAMURA A, HIGASHIGUCHI T, et al. Effects of combined treatment with branched-chain amino acids, citric acid, L-carnitine, coenzyme Q10, zinc, and various vitamins in tumor-bearing mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(3): 266-271. DOI:10.1248/bpb.b16-00638.
 - [26] ANDERSON N M, MUCKA P, KERN J G, et al. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism[J]. *Protein Cell*, 2018, 9(2): 216-237. DOI: 10.1007/s13238-017-0451-1.
 - [27] CHEN J Q, RUSSO J. Dysregulation of glucose transport, glycolysis, TCA cycle and glutaminolysis by oncogenes and tumor suppressors in cancer cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1826(2): 370-384. DOI:10.1016/j.bbcan.2012.06.004.
 - [28] PAVLOVA N N, THOMPSON C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism[J/OL]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 27-47[2019-10-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4715268/>. DOI:10.1016/j.cmet.2015.12.006.
 - [29] D'AMATO N C, ROGERS T J, GORDON M A, et al. A TDO2-AhR signaling axis facilitates anoikis resistance and metastasis in triple-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(21): 4651-4664. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-15-2011.
 - [30] GREENE L I, BRUNO T C, CHRISTENSON J L, et al. A role for tryptophan-2, 3-dioxygenase in CD8 T-cell suppression and evidence of tryptophan catabolism in breast cancer patient plasma[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(1): 131-139. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0362.

[收稿日期] 2019-10-23

[修回日期] 2019-12-24

[本文编辑] 党瑞山