

miR-378a-3p靶向NUAK2抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭

陈建彬¹, 王泰人²

miR-378a-3p Targets NUA2 to Inhibit Proliferation, Migration, and Invasion of Breast Cancer Cells

CHEN Jianbin¹, WANG Tairen²

1. Department of Surgical Oncology, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, China;

2. Department of Plastic Surgery, Hangzhou Xihe Hospital, Hangzhou 310000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of microRNA-378a-3p (miR-378a-3p) affecting the development of breast cancer (BC) cells. **Methods** The expression of miR-378a-3p in BC cells based on the Cancer Genome Atlas Program database was analyzed. The starBase, miRDB, and miRWalk databases were used to predict the target genes of miR-378a-3p. Double-luciferase reporter experiments were performed to verify the targeted regulation of miR-378a-3p on NUA2 family kinase 2 (NUAK2). Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot analyses were used to detect the expression of miR-378a-3p and NUA2 mRNA and protein in BC cells. Cell proliferation ability was detected through cell-proliferation experiments. Cell scratch assay and invasion assay were used to detect the migration and invasion abilities of cells, respectively. Apoptosis and cell-cycle experiments were conducted to detect cell apoptosis rate and cell cycle distribution. **Results** The expression of miR-378a-3p was significantly downregulated in BC cells, and miR-378a-3p overexpression inhibited the proliferation, migration, and invasion of BC cells. miR-378a-3p directly targeted NUA2 and inhibited the mRNA and protein expression of NUA2. **Conclusion** miR-378a-3p inhibits the proliferation, migration, and invasion of BC cells by targeting NUA2.

Key words: Breast cancer; miR-378a-3p; NUA2; Proliferation; Migration; Invasion

Funding: Taizhou Science and Technology Projects (No. 22ywa41)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 探讨微小RNA-378a-3p (miR-378a-3p) 影响乳腺癌细胞发展的机制。方法 基于TCGA数据库分析miR-378a-3p在乳腺癌细胞中的表达情况; 利用starBase、miRDB、miRWalk数据库对miR-378a-3p进行靶基因预测, 双荧光素酶报告实验验证miR-378a-3p对NUAK家族激酶2 (NUAK2) 的靶向调控; qRT-PCR和Western blot检测miR-378a-3p和NUAK2在乳腺癌细胞中mRNA和蛋白的表达情况; 细胞增殖实验检测乳腺癌细胞的增殖能力; 细胞划痕实验和侵袭实验分别检测乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力。凋亡和周期实验检测乳腺癌细胞的凋亡率和细胞周期分布。结果 miR-378a-3p在乳腺癌细胞中显著下调, 过表达miR-378a-3p抑制了乳腺癌细胞的增殖, 迁移和侵袭。miR-378a-3p靶向下调NUAK2的表达。结论 miR-378a-3p通过靶向抑制NUAK2的表达, 从而抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 乳腺癌; miR-378a-3p; NUA2; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R737.9

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

乳腺癌 (breast cancer, BC) 是女性最常见的恶性肿瘤之一, 是女性癌症相关死亡的第二大原因^[1]。据统计, 2020年约有685 000名妇女死于乳腺

癌, 且有超230万新病例诊断为乳腺癌^[2]。目前, 乳腺癌的临床治疗主要采用手术切除和化学疗法。但是病程后期由于化疗耐药性的产生, 许多患者最终容易发生复发和转移^[3]。因此我们迫切需要寻找新的鉴定乳腺癌的生物标志物和治疗靶标, 以增加乳腺癌的诊断手段和治疗方向。

MicroRNA (miRNA) 是微小的非编码RNA (约22个核苷酸), 可在转录后水平调控基因表达^[4], 在许多生理和病理过程中显示出关键作用^[5-7]。研究

收稿日期: 2023-11-17; 修回日期: 2024-03-13

基金项目: 台州市科技计划项目 (22ywa41)

作者单位: 1. 318000 台州, 台州市立医院肿瘤外科;
2. 310000 杭州, 杭州熙禾医院整形外科

作者简介: 陈建彬 (1989-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事乳腺癌的基础与临床研究, ORCID: 0009-0007-0744-0569

报道, miRNA在胆囊癌^[8]、口腔鳞状细胞癌^[9]、胰腺癌^[10]等多种恶性肿瘤的侵袭和转移过程中发挥重要作用。在乳腺癌中,许多miRNA与肿瘤的侵袭和转移相关,如miR-548m、miR-132、miR-202-5p和miR-128等^[11-13]。虽然已有研究发现miR-378a-3p可能作为乳腺癌检测的潜在肿瘤生物标志物^[14]。但是,miR-378a-3p对乳腺癌生物学功能的研究仍然不够完善。

NUAK家族是AMPK家族的十二种蛋白激酶之一^[15]。蔗糖非发酵1(sucrose non-fermenting 1, SNF1)/AMP激活的蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)家族调节细胞代谢平衡^[16]。其中,NUAK家族激酶2(NUAK family kinase 2, NUA K2)位于1q32位点^[17]。目前,NUAK2的作用在许多癌症中已有研究,在肝癌中,NUAK2能够促进细胞的增殖、迁移和侵袭^[18];在胶质母细胞瘤中,NUAK2的过表达促进了细胞的增殖、迁移和侵袭^[19];在胃癌中,NUAK2能够促进细胞的增殖并调节其细胞周期^[20]。然而有关NUAK2在乳腺癌中作用的研究报道较少。

本研究探讨了miR-378a-3p表达对乳腺癌细胞生物学行为的影响及其相关的分子机制,为乳腺癌患者提供了潜在的治疗靶标。

1 材料与方法

1.1 细胞

人乳腺上皮细胞MCF-12F(mi096801)购自上海酶联生物科技有限公司;人乳腺癌细胞MCF7(BNCC100137)、人乳腺癌细胞MDA-MB-231(BNCC337894)和人乳腺癌细胞SK-BR-3(BNCC348736)均购自上海北纳生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

含10%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640完全培养基(BNCC338360,北纳生物,中国);含有10%FBS的DMEM-H完全培养基(BNCC338068,北纳生物,中国);含有10%FBS的McCoy's 5a完全培养基(BNCC338364,北纳生物,中国);TRIzol试剂(Invitrogen,美国);All-in-One™第一链cDNA合成试剂盒(FulGen,中国);SYBR green(Biosystems,美国);Lipofectamine 2000(Invitrogen,美国);CCK-8试剂(索莱宝,中国);Transwell小室和Matrigel(Corning,美国);RIPA裂解缓冲液(ProMab Biotechnologies,美国);BCA蛋白测定试剂盒(Pierce Biotechnology,美国);PVDF膜(Invitrogen,美国);兔

抗NUAK2(ab126048,Abcam,英国);兔抗 β -actin(ab8227,Abcam,英国);辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗兔IgG H&L(HRP)(ab6721,Abcam,英国);ECL Western blot检测试剂(Amersham Pharmacia Biotech,美国);pmirGLO荧光素酶报告载体(Promega,美国);双重荧光素酶报告试剂盒(Promega,美国);Annexin V-FITC/PI Apoptosis Detection Kit(诺唯赞,中国);碘化丙啶(PI;诺唯赞,中国);加湿培养箱(ThermoFisher,美国);酶标仪SpectraMax M5(Molecular Devices,美国);AccuriC6流式细胞仪(BD,美国)。

1.3 生信分析

从TCGA(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)中下载乳腺癌的miRNA成熟体表达量数据(Normal: 104, Tumor: 1 103)、mRNA的表达量数据(Normal: 113, Tumor: 1 109),利用“edgeR”包对miRNA, mRNA进行normal组和tumor组的差异分析(|logFC|>2, Padj<0.05)获得差异miRNA及差异mRNA,通过文献引证确定研究的目标基因miRNA。利用starBase(<http://starbase.sysu.edu.cn/starbase2/browseNcRNA.php>),miRDB(<http://mirdb.org/>)和miRWalk(<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)数据库进行miRNA靶基因预测,并与差异mRNA取交集,利用相关性分析最终确定靶基因mRNA。

1.4 细胞培养

MCF-12F、MCF7和MDA-MB-231、SK-BR-3细胞系分别培养在含有10%FBS的RPMI-1640完全培养基、含有10%FBS的DMEM-H完全培养基和含有10%FBS的McCoy's 5a完全培养基中,并于37℃,含5%CO₂的加湿培养箱中培养。

1.5 RNA提取和qRT-PCR检测

用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA。用All-in-One™第一链cDNA合成试剂盒合成miR-378a-3p和NUAK2的cDNA。用SYBR green进行qRT-PCR。通过2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法分析相对表达水平。分别用 β -actin和U6作为NUAK2和miR-378a-3p的内参。引物序列见表1。

1.6 质粒构建和转染

从锐博生物(广州,中国)购得miR-378a-3p mimic质粒(miR-mimic)和阴性对照空白mimic(NC-mimic)、编码NUAK2的pcDNA3.1质粒(oe-NUAK2)以及空白pcDNA3.1质粒(oe-NC)。根据说明书,用Lipofectamine 2000将上述质粒分别转染

表 1 qRT-PCR引物序列表

Table 1 qRT-PCR primer sequences

Genes	Primer sequence
miR-378a-3p	Forward primer: 5'-CTCAATGGTGTCTGGAGT-3' Reverse primer: 5'-GGGACTGGACTTGGAGTC-3'
U6	Forward primer: 5'-CTCGCTTCGGGCGAGCACA-3' Reverse primer: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'
NUAK2	Forward primer: 5'-GCACAGCCTACTGATCCCC-3' Reverse primer: 5'-TCTTCATTAGGGGCTTGGGC-3'
β-actin	Forward primer: 5'-TCACCATGGATGATGATATCGC-3' Reverse primer: 5'-AATCCTTCTGACCCATGCC-3'

MDA-MB-231细胞，分别命名为miR-378a-3p过表达 (miR-mimic) 细胞系及其阴性对照 (NC-mimic) 细胞系，对照 (NC-mimic+oe-NC) 细胞系、NUAK2过表达 (NC-mimic+oe-NUAK2) 细胞系以及miR-378a-3p和NUAK2同时过表达 (miR-mimic+oe-NUAK2) 细胞系。温育6 h后，除去培养基，并用普通培养基替代培养48 h。

1.7 细胞增殖测定

转染48 h后，将转染后的MDA-MB-231细胞 (1×10^3 /孔) 接种到96孔板中，并加入200 μl 10%FBS/DMEM培养液。分别于接种0、24、48、72和96 h后，将CCK-8试剂添加到培养基中，继续培养2 h，使用酶标仪SpectraMax M5测量各时间段450 nm处的吸光度。实验重复3次。

1.8 克隆形成实验

将转染后的MDA-MB-231细胞 (1×10^3 /孔) 接种于12孔板中，并加入2 ml 10%FBS/DMEM培养液。2~3周后，在带有结晶紫染色的Zeiss显微镜 (Zeiss, 德国) 下计算细胞克隆的数量。该测定重复3次。

1.9 划痕愈合实验

转染后48 h，将细胞 (5×10^4 /孔) 接种在12孔板中，汇合度达到90%时，使用200 μl的移液枪枪头划出2 mm宽的划痕区域。之后在0和24 h时拍摄划痕区域宽度。在Zeiss显微镜 (40×) 下，通过划痕区域的宽度来测量和评估肿瘤细胞的迁移能力。

1.10 细胞侵袭实验

为了评估细胞的侵袭能力，使用24孔腔室进行Transwell分析。该腔室用带Matrigel的聚碳酸酯膜隔开。转染后48 h，将MDA-MB-231细胞 (2×10^4 /孔) 接种到无FBS的DMEM培养液上腔室中，

在下腔室中加入10%FBS/DMEM。使细胞在湿润的条件下于37℃培养36 h。含5%CO₂的环境下，除去膜上侧的细胞后，将膜下侧的细胞用0.1%的结晶紫染色，并由两个独立的研究人员在Zeiss显微镜 (100×) 下进行计数。

1.11 Western blot实验

用补充了蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液从转染后的细胞中提取总蛋白。提取液在4℃下14 000 r/min离心15 min。收集上清液，BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白质浓度。在此基础上，蛋白质通过10%SDS-PAGE进行上样与电泳，并转移至PVDF膜上，用5%脱脂乳封闭膜1 h。之后将膜分别放置于一抗兔抗NUAK2 (1:1 000) 和兔抗β-actin (1:5 000) 中一起孵育，4℃过夜。TBST洗涤3次并与二抗羊抗兔IgG H&L (HRP) (1:5 000) 一起孵育1 h。TBST洗涤2次，ECL Western blot检测试剂检测蛋白质。

1.12 双荧光素酶实验

将处于对数期的MDA-MB-231细胞接种到96孔板 (100 微升/孔) 中，并在转染前于37℃孵育过夜。为了研究miR-378a-3p对NUAK2的调节功能，构建了插入NUAK2野生型 (wt) 和突变型 (mut) 3'-UTR的pmirGLO荧光素酶报告载体。为了探索miR-378a-3p表达的调控，用Lipofectamine 2000将pmirGLO荧光素酶报告载体与miR-378a-3p过表达 (miR-378a-3p-mimic, miR-mimic) 或miR-378a-3p对照 (NC-mimic) 进行共转染。转染36 h后，按双重荧光素酶报告试剂盒说明书方法检测海肾荧光素酶和萤火虫荧光素酶活性。实验重复3次。

1.13 细胞凋亡实验

将转染后的MDA-MB-231细胞 (1×10^3 /孔) 接种到24孔板中。温育48 h后，收集细胞并重悬。用5 μl Annexin V-FITC和PI对细胞悬浮液染色20 min。FACS Calibur流式细胞仪计算细胞凋亡率。

1.14 细胞周期测定

将质粒转染24 h后的细胞 (8.0×10^5) 接种到100 mm的培养皿中培养。2 000 r/min离心5 min、PBS洗涤3次，随后用70%乙醇重悬细胞，并在4℃下固定12 h，PBS洗去残留乙醇，将固定的细胞与100 μl无DNase的RNaseA (200 μg/ml) 在37℃下孵育30 min，然后加入1 mg/ml PI。流式细胞仪确定细胞周期分布。

1.15 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, 美国) 软件进行统计分析。每个测定至少进行

3次。结果以均数±标准差表示，两组间比较采用学生t检验，采用单因素方差分析（ANOVA）进行多组间的比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-378a-3p在乳腺癌细胞中显著低表达

为了研究miRNA在乳腺癌发展中的功能，利用edgeR差异分析，选择了包括miR-378a-3p在内的74种miRNA作为潜在的调控候选物，见图1A。生信分析结果显示miR-378a-3p在乳腺癌组织中显著低表达，见图1B。基于此，我们选择miR-378a-3p作为研究对象。

为了进一步评价生信分析得到结果的准确性，我们用qRT-PCR方法分析了乳腺癌细胞系及人乳腺上皮细胞中miR-378a-3p的表达。qRT-PCR的结果显示miR-378a-3p在乳腺癌细胞中显著低表达，见图1C。选用乳腺癌细胞系MDA-MB-231进行后续功能实验。

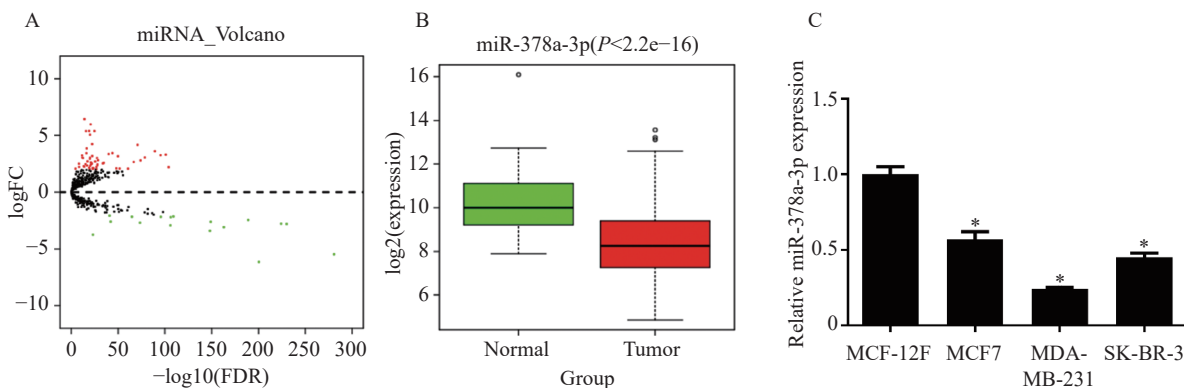
2.2 过表达miR-378a-3p可抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭并促进细胞的凋亡

为了研究miR-378a-3p的作用机制，我们通过控制MDA-MB-231细胞中miR-378a-3p的表达量，进行了miR-378a-3p功能研究。qRT-PCR实验显示过表达miR-378a-3p的MDA-MB-231细胞中miR-378a-3p的表达水平显著提高，见图2A。细胞增殖实验结果表明，与正常表达量的细胞相比，过表达miR-378a-3p可显著抑制乳腺癌细胞活力，见图2B。克隆形成实验结果显示过表达miR-378a-3p减弱了乳腺癌细胞的增殖能力，见图2C。与正常表达量的细胞相比，过表达miR-378a-3p的MDA-MB-231细胞系明显减弱了细胞迁移能力，见图2D。此外，

在侵袭试验中，与正常表达量的细胞相比，过表达miR-378a-3p显著抑制了细胞侵袭，见图2E。这些结果表明，miR-378a-3p可以通过抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭来抑制乳腺癌的发展。我们利用细胞周期实验检测了不同处理组的乳腺癌细胞的细胞周期变化情况，结果显示过表达miR-378a-3p处理的乳腺癌细胞在G₀/G₁期的占比增加，见图2F，说明过表达miR-378a-3p促使乳腺癌细胞阻滞在G₀/G₁期。为了进一步研究miR-378a-3p对乳腺癌细胞细胞凋亡的影响，我们进行了细胞凋亡实验检测过表达miR-378a-3p乳腺癌细胞的凋亡率，结果显示过表达miR-378a-3p显著上调了乳腺癌细胞的凋亡水平，见图2G。这些结果表明，miR-378a-3p可能通过抑制肿瘤细胞的生长，在乳腺癌中发挥抑制作用。

2.3 乳腺癌细胞中NUAK2显著高表达且被miR-378a-3p靶向结合与调控

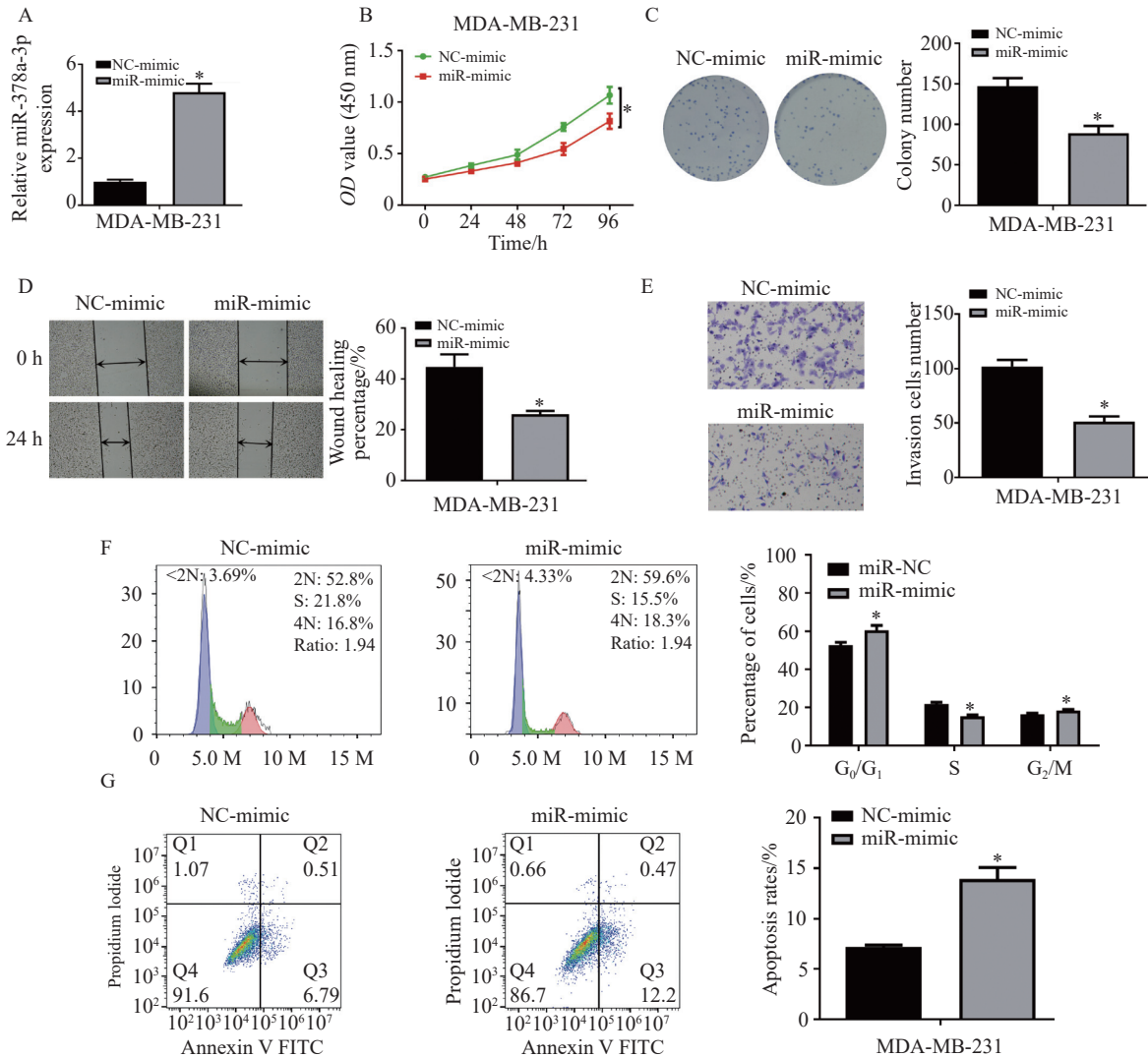
为了鉴定miR-378a-3p靶向的基因，我们利用生物信息学方法进行了预测。edgeR差异分析结果显示2 155个差异mRNA，见图3A。利用starBase、miRDB和miRWalk数据库对miR-378a-3p进行靶基因预测，预测结果与上调的1 381个差异mRNA取交集，获得与miR-378a-3p具有靶向结合位点的5个差异mRNA，见图3B。将miR-378a-3p与这5个mRNA进行Pearson相关性分析，发现其中NUAK2与miR-378a-3p呈负相关且相关系数最高，见图3C，且分析结果显示NUAK2在乳腺癌组织中过表达，见图3D。qRT-PCR和Western blot检验结果显示乳腺癌细胞系中NUAK2的表达较正常乳腺上皮细胞系显著增加，见图3E~F。为了进一步研究miR-378a-3p与NUAK2之间的关系，我们利用生信分析



A: Volcano plot of differential miRNAs; B: box-line plot of miR-378a-3p expression in normal and tumor tissues; C: qRT-PCR to detect the expression level of miR-378a-3p in the human mammary epithelial cell line MCF-12F and the human breast cancer cell lines MCF7, MDM-MB-231, and SK-BR-3; *: $P < 0.05$, compared with the MCF-12F group.

图1 miR-378a-3p在乳腺癌细胞中低表达

Figure 1 Low expression of miR-378a-3p in breast cancer cells



A: qRT-PCR assay; B: CCK-8 assay; C: clone formation assay, *: $P < 0.05$, compared with the NC-mimic group; D: scratch healing assay (40 \times); E: cell invasion assay (100 \times), *: $P < 0.05$, compared with the NC-mimic group; F: cell cycle assay; G: apoptosis assay, *: $P < 0.05$, compared with the NC-mimic group.

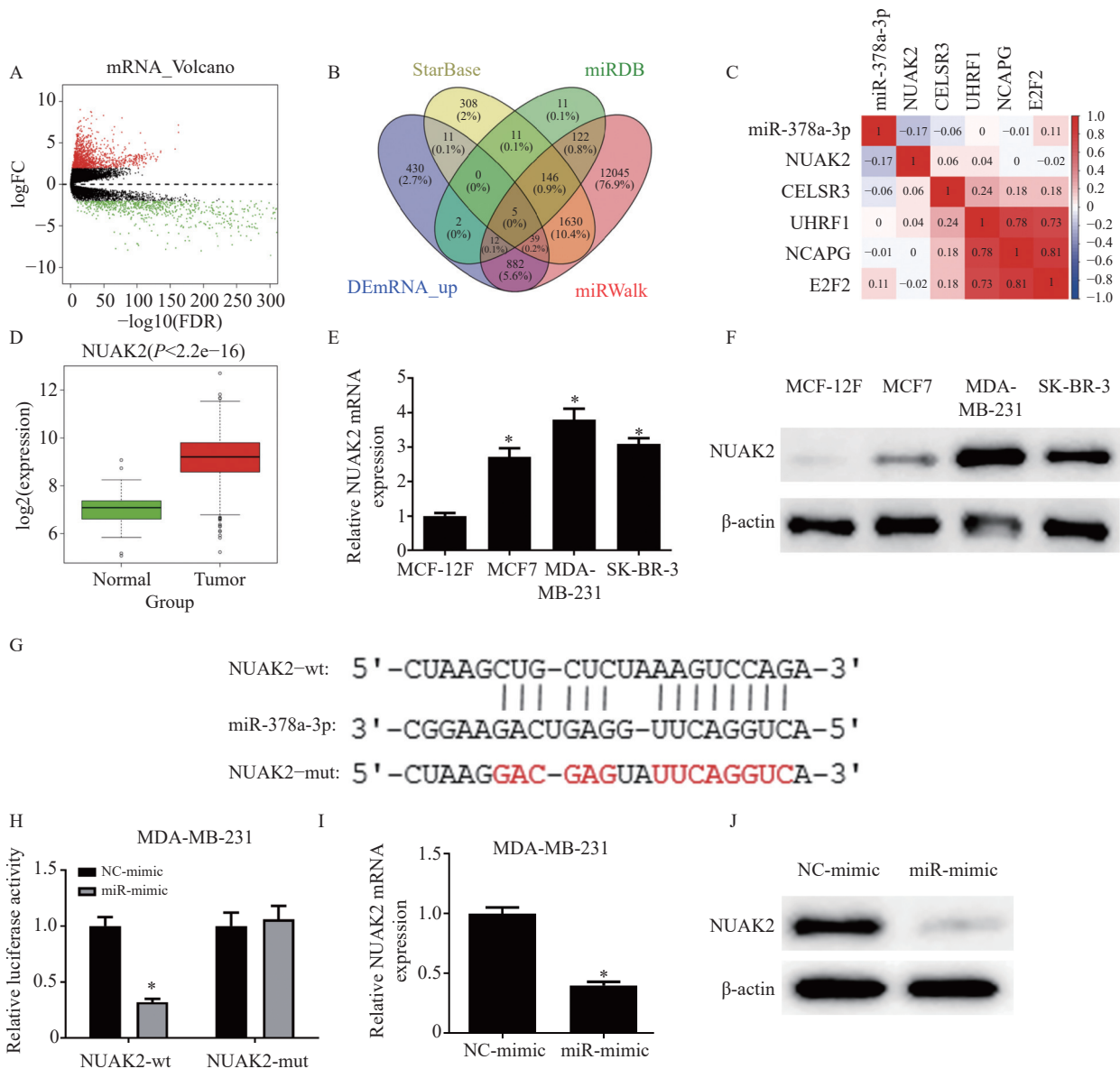
图2 过表达miR-378a-3p抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭并促进乳腺癌细胞的凋亡

Figure 2 Overexpression of miR-378a-3p inhibited proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells and promoted apoptosis of breast cancer cells

对miR-378a-3p和NUAK2的结合位点进行预测,发现miR-378a-3p和NUAK2 3'-UTR区域具有结合位点,见图3G。双荧光素酶实验结果显示,过表达miR-378a-3p会抑制含有NUAK2-wt的细胞的荧光素酶活性,而对含有NUAK2-mut的细胞的荧光素酶活性没有影响,见图3H。这些结果证明了miR-378a-3p和NUAK2基因的特异性靶向关系。为了确认miR-378a-3p对乳腺癌细胞中NUAK2的作用,我们研究了过表达miR-378a-3p后的NUAK2 mRNA和蛋白表达水平。qRT-PCR和Western blot结果显示过表达miR-378a-3p抑制了NUAK2表达,见图3I~J。上述结果说明在乳腺癌细胞中miR-378a-3p能够靶向结合NUAK2,并且调控其表达,过表达miR-378a-3p抑制NUAK2表达。

2.4 miR-378a-3p通过靶向NUAK2调控乳腺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡

qRT-PCR和Western blot结果显示:过表达NUAK2可促进MDA-MB-231细胞中NUAK2 mRNA和蛋白的表达,而过表达NUAK2和miR-378a-3p则会逆转这种作用,见图4A~B。此外,过表达miR-378a-3p还可以减弱过表达NUAK2对乳腺癌细胞增殖的促进作用,见图4C~D。划痕愈合实验和细胞侵袭实验结果显示:过表达NUAK2会显著增强乳腺癌细胞的迁移和侵袭能力,而同时过表达NUAK2和miR-378a-3p则会减弱过表达NUAK2对乳腺癌细胞迁移和侵袭能力的促进作用,见图4E~F。细胞周期和凋亡实验结果显示:过表达NUAK2后,乳腺癌细胞G₀/G₁期细胞占比减少,而S和G₂/M



A: Volcano plot of differential mRNAs, with red dots indicating upregulation and green dots indicating downregulation; B: Venn plot of miR-378a-3p-predicted target-gene mRNAs and upregulated differential mRNAs; C: Pearson's correlation analysis of miR-378a-3p and predicted target genes; D: boxplots of the expression of NUA2 in normal and breast cancer tissues, with the Green box plots indicating normal samples and red box plots indicating tumor samples; E-F: qRT-PCR and Western blot detection of mRNA and protein expression levels of NUA2 in human breast epithelial cell line MCF-12F and human breast cancer cell lines MCF7, MDM-MB-231, and SK-BR-3, *: $P < 0.05$, compared with the MCF-12F group; G: schematic of the potential binding site of miR-378a-3p with NUA2 in the 3' untranslated region (3' UTR); H: dual-winning enzyme assay to validate the binding relationship between miR-378a-3p and NUA2; I-J: qRT-PCR and Western blot assays for mRNA and protein expression levels of NUA2 in MDA-MB-231 cells after transfection with mimic, *: $P < 0.05$, compared with NC-mimic group.

图3 NUA2在乳腺癌细胞中高表达，miR-378a-3p靶向结合并调控NUAK2

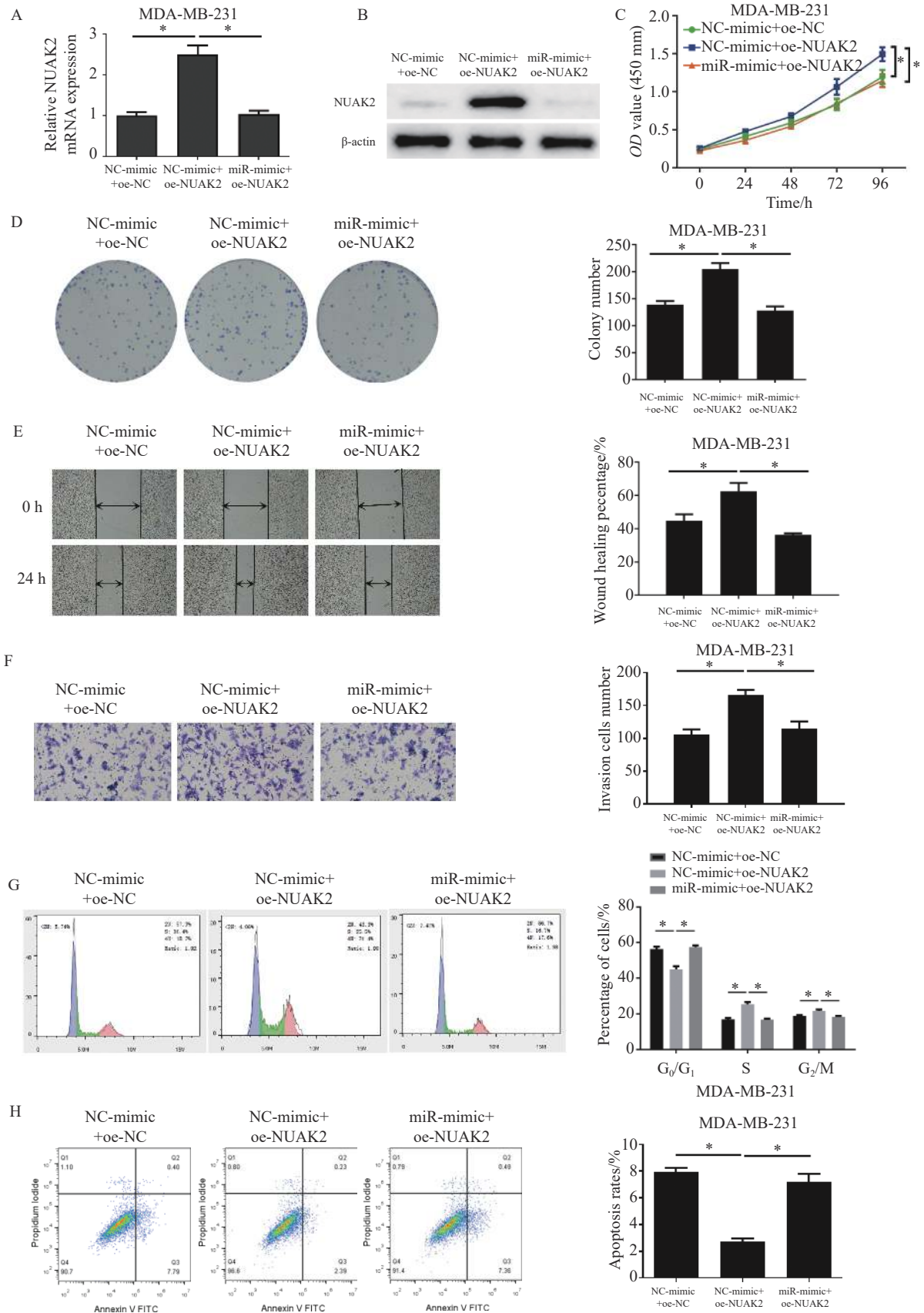
Figure 3 NUA2 was highly expressed in breast cancer cells, and miR-378a-3p targeted and regulated NUA2

期占比增加，且凋亡率下降，而同时过表达NUAK2和miR-378a-3p则会减弱这种现象，见图4G~H。这些结果表明miR-378a-3p通过下调NUAK2表达来抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭，并促进乳腺癌细胞的凋亡。

3 讨论

miRNA在癌症的发生和发展中起着关键的调

节作用，包括细胞增殖、凋亡、分化、侵袭、转移和耐药性^[8,21-22]。研究证实，miRNA通过靶向结合并调控其靶基因，影响着癌症的发展进程，例如，miR-378a-3p通过下调PDIA4促进卵巢癌进展^[23]；miR-378a-3p/CPEB3可以抑制宫颈癌的发展^[24]。日本学者发现miR-378a-3p通过靶向GOLT1A调节乳腺癌MCF-7细胞中他莫昔芬的敏感性^[14]。但是，关于miR-378a-3p在乳腺癌中的生物学功能和分子机制



A-B: qRT-PCR and Western blot assay; C: CCK-8 assay; D: clone-formation assay; E: scratch-healing assay (40 \times); F: invasion assay to detect the migration ability (100 \times); G: cell-cycle assay; H: apoptosis assay, *: $P < 0.05$.

图 4 miR-378a-3p 靶向 NUA2 抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭并促进凋亡

Figure 4 miR-378a-3p targeting NUA2 inhibited proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells and promoted apoptosis

的研究较为缺乏。本研究揭示了miR-378a-3p可能通过直接靶向NUAK2来调节乳腺癌发展。结果发现与正常的人乳腺上皮细胞相比，乳腺癌细胞中的miR-378a-3p的表达下调，且CCK-8、克隆形成、划痕、侵袭和流式检测结果表明miR-378a-3p过表达显著抑制了乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖、迁移和侵袭能力，并促进了MDA-MB-231细胞凋亡。

NUAK2是一个新兴的致癌基因，在许多肿瘤细胞中起调节细胞周期进展和细胞迁移的作用^[25-26]。本研究通过实验证实了NUAK2是miR-378a-3p的直接靶标，且在乳腺癌细胞中表达显著上调，过表达miR-378a-3p下调NUAK2表达。过表达miR-378a-3p可以削弱NUAK2对乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖、迁移和侵袭的促进作用，同时还对乳腺癌MDA-MB-231细胞的凋亡有抑制作用。

综上，本研究我们阐明了miR-378a-3p对乳腺癌细胞发展的潜在生物学机制。研究发现，miR-378a-3p通过抑制NUAK2的表达抑制乳腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭过程，并诱导乳腺癌细胞凋亡，为乳腺癌患者治疗提供了潜在的生物标记。在今后需要进一步的研究，证实miR-378a-3p/NUAK2轴在动物水平和临床水平上对乳腺癌的发生和发展的影响。

利益冲突声明：

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献：

[1] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.

[2] Arnold M, Morgan E, Rungay H, *et al.* Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040[J]. *Breast*, 2022, 66: 15-23.

[3] Xi J, Ma CX. Sequencing Endocrine Therapy for Metastatic Breast Cancer: What Do We Do After Disease Progression on a CDK4/6 Inhibitor?[J]. *Curr Oncol Rep*, 2020, 22(6): 57.

[4] Farré PL, Duca RB, Massillo C, *et al.* MiR-106b-5p: A Master Regulator of Potential Biomarkers for Breast Cancer Aggressiveness and Prognosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(20): 11135.

[5] Martínez B, Peplow PV. MicroRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers of age-related macular degeneration: advances and limitations[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(3): 440-447.

[6] Chen D, Liu J, Wu Z, *et al.* Role of miR-132/methyl-CpG-binding protein 2 in the regulation of neural stem cell differentiation[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(2): 345-349.

[7] Nagao M, Fukuda I, Asai A, *et al.* Diagnostic potential of miR-483 family for IGF-II producing non-islet cell tumor hypoglycemia[J]. *Eur J Endocrinol*, 2021, 184(1): 41-49.

[8] Zhang X, Zhang L, Chen M, *et al.* miR-324-5p inhibits gallbladder carcinoma cell metastatic behaviours by downregulation of transforming growth factor beta 2 expression[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 315-324.

[9] Chen L, Zhu Q, Lu L, *et al.* MiR-132 inhibits migration and invasion and increases chemosensitivity of cisplatin-resistant oral

squamous cell carcinoma cells via targeting TGF-beta1[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 91-102.

[10] Zhang CW, Zhou B, Liu YC, *et al.* LINC00365 inhibited lung adenocarcinoma progression and glycolysis via sponging miR-429/KCTD12 axis[J]. *Environ Toxicol*, 2022, 37(8): 1853-1866.

[11] Wm Nor WMFSB, Chung I, Said NABM. MicroRNA-548m Suppresses Cell Migration and Invasion by Targeting Aryl Hydrocarbon Receptor in Breast Cancer Cells[J]. *Oncol Res*, 2021, 28(6): 615-629.

[12] Ibrahim HM, Ismail MB, Ammar RB, *et al.* Thidiazuron suppresses breast cancer via targeting miR-132 and dysregulation of the PI3K-Akt signaling pathway mediated by the miR-202-5p-PTEN axis[J]. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99(3): 374-384.

[13] Cao D, Zhu H, Zhao Q, *et al.* MiR-128 suppresses metastatic capacity by targeting metadherin in breast cancer cells[J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 43.

[14] Ikeda K, Horie-Inoue K, Ueno T, *et al.* miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting GOLTI1A[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13170.

[15] Lizcano JM, Göransson O, Toth R, *et al.* LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1[J]. *EMBO J*, 2004, 23(4): 833-843.

[16] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(10): 774-785.

[17] Legembre P, Schickel R, Barnhart BC, *et al.* Identification of SNF1/AMP kinase-related kinase as an NF-kappaB-regulated anti-apoptotic kinase involved in CD95-induced motility and invasiveness[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(45): 46742-46747.

[18] Wang D, Song X, Zhang N, *et al.* MiR-1179 represses cell proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma through suppression of NUAK2[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(1): 223-239.

[19] Fu TG, Wang L, Li W, *et al.* miR-143 inhibits oncogenic traits by degrading NUAK2 in glioblastoma[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(6): 1627-1635.

[20] Tang L, Tong SJ, Zhan Z, *et al.* Expression of NUAK2 in gastric cancer tissue and its effects on the proliferation of gastric cancer cells[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(2): 676-680.

[21] Ren Z, Liu X, Si Y, *et al.* Long non-coding RNA DDX11-AS1 facilitates gastric cancer progression by regulating miR-873-5p/SPC18 axis[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48(1): 572-583.

[22] Ning L, Zhang M, Zhu Q, *et al.* miR-25-3p inhibition impairs tumorigenesis and invasion in gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 81-90.

[23] Chanjiao Y, Chunyan C, Xiaoxin Q, *et al.* MicroRNA-378a-3p contributes to ovarian cancer progression through downregulating PDIA4[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2021, 9(1): 108-119.

[24] Zhang Y, Yu R, Li L. LINC00641 hinders the progression of cervical cancer by targeting miR-378a-3p/CPEB3[J]. *J Gene Med*, 2020, 22(9): e3212.

[25] Yamamoto H, Takashima S, Shintani Y, *et al.* Identification of a novel substrate for TNFalpha-induced kinase NUAK2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 365(3): 541-547.

[26] Namiki T, Coelho SG, Hearing VJ. NUAK2: an emerging acral melanoma oncogene[J]. *Oncotarget*, 2011, 2(9): 695-704.

[编辑：刘红武；校对：黄园玲]

作者贡献：

陈建彬：选题和实验的设计与实施、文章撰写

王泰人：数据采集及分析、文章修改