

# miR-145 通过靶向吞噬和细胞活力蛋白 1 抑制乳腺癌细胞侵袭

颜子千, 盛智梅, 邓梓坤, 张宝刚\*

(潍坊医学院病理学教研室, 山东 潍坊 261042)

**摘要** 吞噬和细胞活力蛋白 1 (engulfment and cell motility protein 1, ELMO1) 可以促进多种癌细胞的侵袭和转移, 但 ELMO1 的表达是否受 miRNA 的调控鲜有研究。本研究旨在探讨 miR-145 与 ELMO1 表达的相关性, 以及 miR-145 通过结合 *ELMO1* 的 mRNA 对乳腺癌侵袭的影响。通过 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 靶基因预测软件预测与 *ELMO1* 的 3'UTR 结合的 miR-145。荧光素酶结果证实两者互补结合。Transwell 侵袭结果显示, miR-145 组和 siELMO1+miR-145 组 MDA-231 乳腺癌细胞穿膜数较对照组分别降低 40% ( $P<0.05$ ) 和 79% ( $P<0.05$ )。siELMO1+miR-145 组和 siELMO1 组细胞穿膜数则无显著差异 ( $P>0.05$ )。结果提示, miR-145 通过与 *ELMO1* 的 mRNA 结合抑制细胞侵袭。qRT-PCR 显示, 低侵袭的 MCF-7 乳腺癌细胞 miR-145 的表达量较高侵袭的 MDA-435 细胞高 80% ( $P<0.05$ ), 较 MDA-231 乳腺癌细胞高 75% ( $P<0.05$ ), 即 miR-145 与癌细胞侵袭能力呈负相关。Western 印迹结果表明, miR-145 组 ELMO1 表达量低于阴性对照组, miR-145 抑制组 ELMO1 表达量高于抑制剂 NC 组 ( $P<0.05$ ), 证明 miR-145 抑制 ELMO1 的表达。qRT-PCR 显示, 过表达 miR-145 后 *ELMO1* mRNA 含量与对照组无显著差异 ( $P>0.05$ )。结果提示, miR-145 对 ELMO1 的调控作用通过抑制其翻译实现。F-肌动蛋白聚合实验表明, miR-145 组和阴性对照组于 20 s 和 60 s 时 F-肌动蛋白聚合结果存在明显区别 ( $P<0.05$ )。Western 印迹结果表明, miR-145 组活化的 Rac1 表达量较阴性对照组降低 60% ( $P<0.05$ ), 抑制剂 NC 组活化的 Rac1 较 miR-145 抑制组降低 55% ( $P<0.05$ ); miR-145 组磷酸化的整合素  $\beta 1$  较对照组于 15 min 时降低 42% ( $P<0.05$ ), 于 30 min 时降低 31% ( $P<0.05$ )。由此得出的 miR-145 过表达显著促进乳腺癌细胞 F-肌动蛋白聚合、Rac1 活化和整合素  $\beta 1$  磷酸化结论。综上所述, miR-145 通过靶向 *ELMO1* 的 mRNA 抑制 ELMO1 翻译, 从而抑制乳腺癌的侵袭。

**关键词** 乳腺癌; microRNA-145; 吞噬和细胞活力蛋白 1; 侵袭

**中图分类号** R737.9

## MiR-145 Inhibits Invasion of Breast Cancer Cells by Targeting ELMO1

YAN Zi-Qian, SHENG Zhi-Mei, DENG Zi-Kun, ZHANG Bao-Gang\*

(Department of Pathology, Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong, China)

**Abstract** Engulfment and cell motility protein 1 (ELMO1) can promote the invasion and metastasis of many kinds of cancer cells, but whether the expression of ELMO1 is regulated by microRNAs is rarely studies. The purpose of this study was to explore the correlation between miR-145 and ELMO1

收稿日期: 2019-04-04; 修回日期: 2019-07-11; 接受日期: 2019-07-18

国家自然科学基金 (No. 81872163; No. 81672631) 资助

\* 通讯作者 Tel: 18663684343; E-mail: zbg0903@hotmail.com

Received: April 4, 2019; Revised: July 11, 2019; Accepted: July 18, 2019

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81872163; No. 81672631)

\* Corresponding author Tel: 18663684343; E-mail: zbg0903@hotmail.com

expression, and the effect of miR-145 on the invasion of breast cancer by binding to ELMO1 mRNA. MiR-145 binding to ELMO1's 3'UTR was predicted by TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), and the luciferase reporter gene assays confirmed the complementary binding. Transwell invasion assay showed that the number of breast cancer cells that crossing the basement membrane decreased by 40% ( $P < 0.05$ ) in the miR-145 expression group and decreased by 79% ( $P < 0.05$ ) in the siELMO1+miR-145 group when compared with the negative control. However, the number of invaded cells in the siELMO1+miR-145 group and the siELMO1 group showed no significant difference ( $P > 0.05$ ), suggesting that miR-145 inhibited cells invasion by binding to the mRNA of ELMO1. Results from qRT-PCR found that miR-145 was significantly down-regulated in highly invasive breast cancer cell lines. Western blot data showed that ELMO1 expression in miR-145 group was lower than that in the negative control group, and ELMO1 expression in miR-145 inhibitor group was higher than that in inhibitor NC group, demonstrating that miR-145 inhibited ELMO1 expression. There was no significant difference in ELMO1 mRNA levels by qRT-PCR between the control group and the group with miR-145 overexpression ( $P > 0.05$ ), suggesting that the regulatory effect of miR-145 on ELMO1 was achieved by inhibiting its translation. F-actin polymerization experiments showed a significant difference between miR-145 group and control group at 20 s and 60 s ( $P < 0.05$ ). Results from Western blot demonstrated that Rac1 activation was 60% lower in miR-145 group than control group, and 55% lower in inhibitor negative control group as compared with the miR-145 inhibitor group. The phosphorylated integrin  $\beta 1$  with miR-145 transfection was 42% and 31% lower at 15 min and 30 min respectively as compared with that of the negative control group ( $P < 0.05$ ). It was concluded that overexpression of miR-145 significantly promotes F-actin polymerization, Rac1 activation and integrin  $\beta 1$  phosphorylation in breast cancer cells. In summary, miR-145 inhibits the translation of ELMO1 by targeting ELMO1 mRNA, by inhibiting the invasion of breast cancer.

**Key words** breast cancer; microRNA(miR-145); engulfment and cell motility protein 1(ELMO1); invasion

乳腺癌是威胁女性健康常见的恶性肿瘤。2017 年发布的中国癌症数据报告显示乳腺癌发病率逐年上升,复发和转移是造成患者死亡的主要原因。因此,研究其侵袭转移机制有重大意义<sup>[1]</sup>。吞噬和细胞活力蛋白 1(engulfment and cell motility protein 1, ELMO1)是在细胞迁移和吞噬中发挥重要作用的一种跨膜蛋白质。最近研究发现,ELMO1 对卵巢癌、横纹肌肉瘤、乳腺癌等多种肿瘤的侵袭和转移有重要作用<sup>[2-4]</sup>。所以,研究 ELMO1 的调节机制对研究乳腺癌的侵袭转移有一定意义。Micro-RNA 是一种内源性非编码单链 RNA 分子,可通过特异性结合靶基因 mRNA 的 3'UTR 调节基因表达,从而导致靶基因降解或蛋白质表达抑制<sup>[5]</sup>。不同乳腺癌细胞内的 ELMO1 表达有差异,推测其可受某种 miRNA 调控。通过 TargetScan 软件预测到,与 ELMO1 3'UTR 特异性结合的 microRNA-145(miR-145)来进一步验证此假设。MiR-145 广泛存在于组织中,有抑制肿瘤生成的作用。研究证明,miR-145 在乳腺癌、膀胱癌和肾癌等肿瘤中呈异常低表达<sup>[6-8]</sup>,更是在直肠肿瘤早期就出现表达下调<sup>[9]</sup>,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用。Rac 是与肌动蛋白动力和细胞迁移有关的关键调节因子<sup>[10-11]</sup>,整合素  $\beta 1$ (integrin  $\beta 1$ )

是细胞黏附分子之一,在细胞的侵袭转移中起重要作用<sup>[12-14]</sup>。Rac 激活和整合素  $\beta 1$  磷酸化可促使 F-肌动蛋白聚合从而影响细胞运动<sup>[15-17]</sup>。ELMO/Dock180 复合物可以用作 Rac 活化的鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)。本文旨在探讨 miR-145 对 ELMO1 表达的调控作用,以及 miR-145 通过影响 ELMO1 引起乳腺癌侵袭的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

乳腺癌细胞系 MDA-231、MCF-7、MDA-435 购自美国 ATCC 公司;培养基和相关试剂购自 Hy-clone 公司;细胞裂解液、胰酶、ELMO1 质粒中量抽提试剂盒、TaqMan miRNA 反转录试剂盒等购自北京碧云天公司;抗 ELMO1 单克隆抗体、抗  $\beta$ -肌动蛋白多克隆抗体购自北京中山金桥公司;PVDF 膜、侵袭实验所用 Transwell 小室购自 Corning 公司;Matrigel 购自 BD 公司;双荧光素酶活性检测试剂盒购自上海吉玛制药技术有限公司(GenePharma);Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,ELMO1 的特异性 siRNA 购自广州市锐博生物科技有限公司;表皮生

长因子 (EGF) 购自美国 R&D systems 公司; Phalloidin 购自美国 Molecular Probes 公司; 抗整合素  $\beta 1$ 、抗磷酸化整合素  $\beta 1$ 、抗 Rac1 以及抗磷酸化-Rac1 抗体购自美国 Millipore 公司。

## 1.2 细胞培养和转染

乳腺癌细胞系 MDA-231、MCF-7 和 MDA-435 置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中传代培养。将 MDA-231 细胞种植在 4 个 35 mm 培养皿内培养 24 h。根据试剂说明书, 用 miR-145 阴性对照、miR-145、miR-145 抑制剂、miR-145 抑制剂阴性对照的 Lipofectamine 2000 转染 MDA-231, 分别命名为: MDA-231/NC、MDA-231/miR-145、miR-145 抑制剂、抑制剂 NC。用 ELMO1 的特异性 siRNA 转染 MDA-231 和 MDA-231/miR-145, 分别命名为 MDA-231/siELMO1 和 MDA-231/siELMO1+miR-145, 置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱供后续实验使用。

## 1.3 MiR-145 表达水平检测

参照安宁等<sup>[19]</sup>研究的操作步骤, 用 Trizol 试剂盒提取 MDA-231 细胞的总 RNA。按照 cDNA 反转录试剂说明书, 对所提取的总 RNA 进行反转录, 反应体系为 20  $\mu$ L。PCR 反应体系: 去离子水、cDNA、上、下游引物、dNTP Mixture、10 $\times$  Taq 缓冲液、Taq 酶。反应条件: 95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环。反应结束后, 确认 qRT-PCR 的扩增、融解曲线以及 qRT-PCR 定量时, 制作标准曲线等。U6 snRNA 作内参, 相对 miRNA 表达用 Ct 值精确计算。

## 1.4 Western 印迹分析

$\beta$ -肌动蛋白作为内参, 操作步骤参照姬静等<sup>[20]</sup>的研究。将转染后的 MDA-231/NC、MDA-231/miR-145、miR-145 抑制剂、抑制剂 NC 细胞培养 72 h 后提取蛋白质并煮沸, 样品经 SDS-PAGE 分离, 转膜、封闭。孵一、二抗, 用 ECL 显影, X 胶片曝光后获得 ELMO1 蛋白表达情况。抗体浓度:  $\beta$ -肌动蛋白 (1:1 000), ELMO1 (1:2 000), Rac1 (1:1 000), 磷酸化 RAC1 (1:1 000), 整合素  $\beta 1$  (1:5 000), 磷酸化整合素  $\beta 1$  (1:1 000)。重复 3 次。用 Image J 软件处理结果, 将第 1 个数值作基数, 其他数值与第 1 个数值的比值为相对密度。

## 1.5 QRT-PCR 检测 ELMO1 mRNA 表达

提取转染 24 h 的 MDA-231/NC 组、MDA-231/miR-145 组细胞的 RNA, 按照试剂 MMLV 说明书进

行反转录 cDNA。反应条件: 42℃ 30 min, 反应体系: 20  $\mu$ L。将  $\beta$ -肌动蛋白和 ELMO1 引物用双蒸水稀释至 100  $\mu$ L, 按照北京碧云天公司 SYBR Premix (Perfect Real Time) 试剂盒说明书配置 PCR 反应体系 20  $\mu$ L, 再使用两步法进行扩增。反应结束后将  $\beta$ -肌动蛋白作为内参, 采用 Ct 值精确计算。

## 1.6 荧光素酶测定

通过 TargetScan 软件预测可靶向结合 ELMO1 的 miRNA, 筛选出 miR-145 以及其可能结合的 ELMO1 的 3' UTR 区 (5'-UCCCUAAGGACCCUUUGACCUG-3')。3'UTR 端突变报告载体由上海吉玛制药有限公司设计构建。根据 Lipofectamine 2000 说明书用荧光素酶报告载体与 miR-145-5p、miR-145-5p inhibitor、miR-145-5p mutant 及对照序列共转染 MDA-231 细胞, 换液, 置于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 48 h, 用检测仪检测荧光素酶活性。

计算相对荧光素酶活性 = 萤火虫荧光素酶活性值/海肾荧光素酶活性。

## 1.7 体外细胞侵袭实验

具体参照安宁等<sup>[19]</sup>研究的操作步骤。在 Transwell 小室的上室碳酸脂膜表面, 涂 20  $\mu$ g Matrigel (基质胶), 将各组细胞用胰酶消化离心, 加入无血清培养基混匀, 种植  $1 \times 10^5$  个细胞于上室, 600  $\mu$ L 胎牛血清加至下室, 温箱培养 24 h, 取出小室, 将膜下表面的细胞用甲醇固定 15 min, 再用吉姆萨染色。在 400 倍光镜下观察实验结果, 取 5 个高倍镜视野计数, Boy-den 小室下室面细胞数即为穿透人工基膜的细胞数。

## 1.8 F-肌动蛋白聚合检测

参照本课题组<sup>[20]</sup>先前研究的操作步骤进行。将饥饿 3 h 的细胞铺于 6 孔板, 在不同时间用表皮生长因子刺激细胞, 固定、清洗, 加入带荧光的鬼笔环肽 (phalloidin) 室温避光孵育 1 h, 清洗, 用 100% 甲醇于 4℃ 下萃取鬼笔环肽 1 h, 离心取上清, 酶标仪读数。荧光信号用总蛋白质标准化, 样品总蛋白质浓度用 BCA 法测得, 不同时间的 F-肌动蛋白相对聚合量计算公式为:  $F\text{-actin } \Delta t / F\text{-actin } 0 = \text{fluorescence } \Delta t / \text{fluorescence } 0$ 。

## 1.9 统计学方法

所有数据使用 SPSS 17.0 统计软件作统计分析。每种实验重复 3 次, 计量资料之间的比较采用独立样本  $t$  检验和配对样本  $t$  检验。定量数据使用  $\text{mean} \pm SD$ ,  $P < 0.05$  被认为差异有统计学意义。

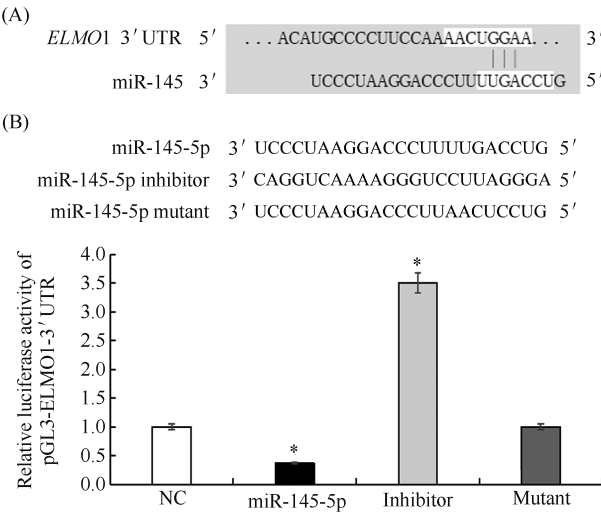
2 结果

2.1 miR-145 与 ELMO1 的 3'UTR 互补结合

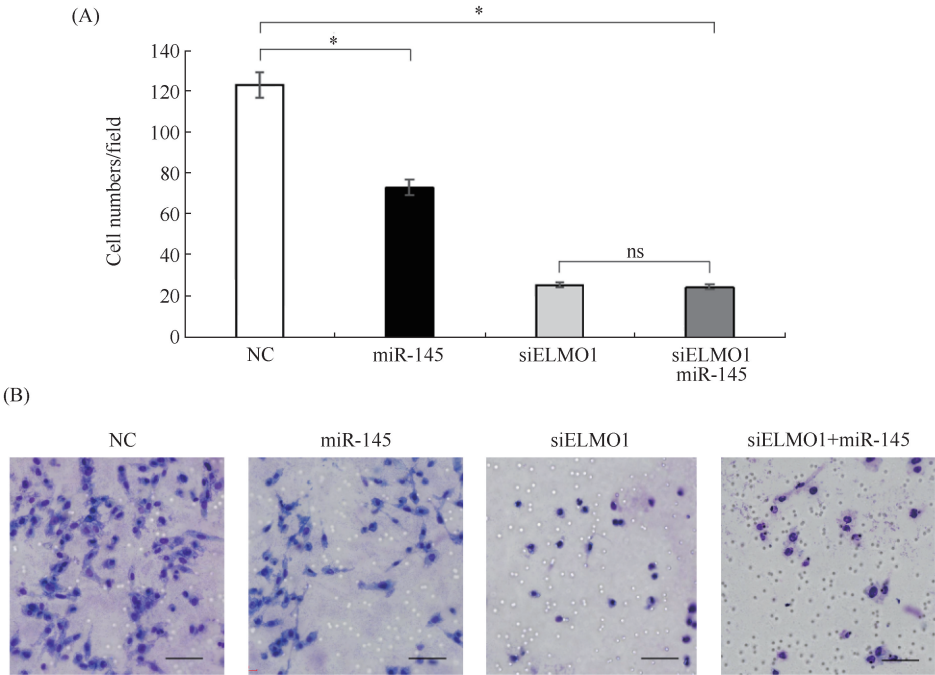
TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 靶基因预测软件预测,miR-145 可能与 *ELMO1* 的 3'UTR 互补结合 (Fig.1A)。通过荧光素酶报告基因检测,结果显示:miR-145-5p 高表达组 MDA-231 细胞的 pGL3-ELMO1-3'UTR 荧光素酶活性比阴性对照组降低 63% ( $P<0.05$ );miR-145-5p 抑制组的荧光素酶活性为阴性对照组的 3.5 倍 ( $P<0.05$ );miR-145-5p 突变组与阴性对照组相比荧光素酶活性无显著差异 ( $P>0.05$ , Fig.1B)。证明 *ELMO1* 是 miR-145 的靶基因。

2.2 miR-145 通过与 ELMO1 的 mRNA 结合抑制癌细胞侵袭

采用 Transwell 侵袭实验,检测 miR-145 和 *ELMO1* 对 MDA-231 乳腺癌细胞侵袭能力的影响。结果显示:miR-145 高表达组穿过人工基膜的细胞数较阴性对照组减少 40% ( $*P<0.05$ );siELMO1+miR-145 组穿过人工基膜的细胞数较阴性对照组减少 79% ( $*P<0.05$ ),而与 siELMO1 组相比却无显著性差异 ( $P>0.05$ , Fig.2)。该结果提示,miR-145 通过 *ELMO1* 的 mRNA 对癌细胞侵袭发挥抑制作用。



**Fig.1 Luciferase reporter gene assays and bioinformatics were performed to analyze the relationship between miR-145 and ELMO1** (A) Target Scan predicted that miR-145 combined with *ELMO1*. (B) The target relationship between miR-145 and *ELMO1* verified by luciferase reporter gene assays. Compared with the control group, the pGL3-ELMO1-3'UTR luciferase activity of breast cancer cells was decreased after transfection of miR-145-5p ( $*P<0.05$ ), but increased in the miR-145-5p inhibition group ( $*P<0.05$ ). No difference was detected between groups with negative control or miR-145 mutant transfection ( $P>0.05$ ,  $n=3$ )

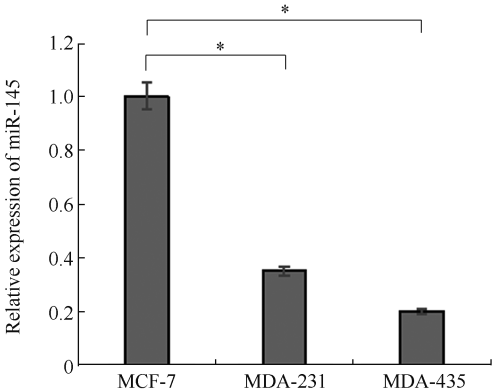


**Fig.2 MiR-145 inhibited invasion of cancer cells by binding to ELMO1's mRNA** The number of cells crossing the basement membrane in the high-expression miR-145 group decreased by 40% as compared with the negative control group ( $*P<0.05$ ) in Transwell invasion assay. The number of invasive cells in the siELMO1+miR-145 group decreased by 79% ( $*P<0.05$ ), but there was no significant difference between the siELMO1 group and siELMO1+miR-145 group ( $P>0.05$ ,  $n=3$ , scale bar 50  $\mu\text{m}$ )



2.3 miR-145 的表达与乳腺癌细胞侵袭能力呈负相关

用 qRT-PCR 分别检测 3 种乳腺癌细胞系: MCF-7、MDA-231 和 MDA-435(侵袭能力依次增强)细胞中 miR-145 的表达。结果显示:3 种细胞系中 miR-145 的表达均不同,低侵袭的 MCF-7 细胞 miR-145 的表达量较侵袭力强的 MDA-435 细胞高 80%,较 MDA-231 细胞高 75%,差异有统计学意义 (\* $P<0.05$ ,Fig.3)。结果提示,miR-145 的表达与乳腺癌细胞侵袭能力呈反比。



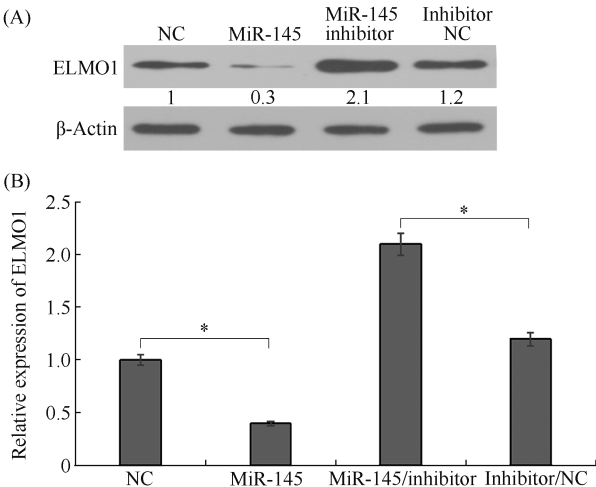
**Fig. 3 The expression of miR-145 was negatively correlated with the invasion ability of breast cancer cells** The expression of miR-145 detected by QRT-PCR was different in three breast cancer cell lines with different invasion ability. The results showed that miR-145 was significantly down-regulated in highly invasive breast cancer cell lines (\* $P<0.05$ ,  $n=3$ )

2.4 ELMO1 的表达与 miR-145 呈负相关

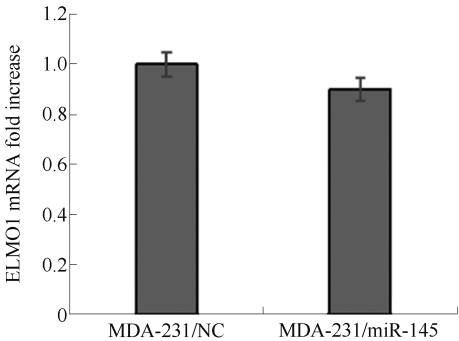
为探究 miR-145 对 ELMO1 蛋白表达的影响,采用 Western 印迹检测转染后的细胞中 ELMO1 的表达量。结果显示:miR-145 组的 ELMO1 表达量低于阴性对照组,miR-145 抑制组 ELMO1 表达量高于抑制剂 NC 组,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ , Fig.4)。表明 ELMO1 的表达与 miR-145 呈负相关。

2.5 miR-145 与 ELMO1 的 3'UTR 区结合抑制其翻译

miRNA 对靶基因的调节方式有两种,一种是使其降解,另一种是抑制翻译。为了验证 miR-145 对 ELMO1 的作用方式,利用 qRT-PCR 分别检测 MDA-231/miR-145、MDA-231/NC 组细胞中 ELMO1 mRNA 的表达。结果显示:MDA-231/miR-145 组与 MDA-231/NC 组 ELMO1 mRNA 表达水平的差异无统计学意义 ( $P>0.05$ , Fig.5)。结果提示,miR-145 通过抑制 ELMO1 mRNA 的翻译来发挥作用。



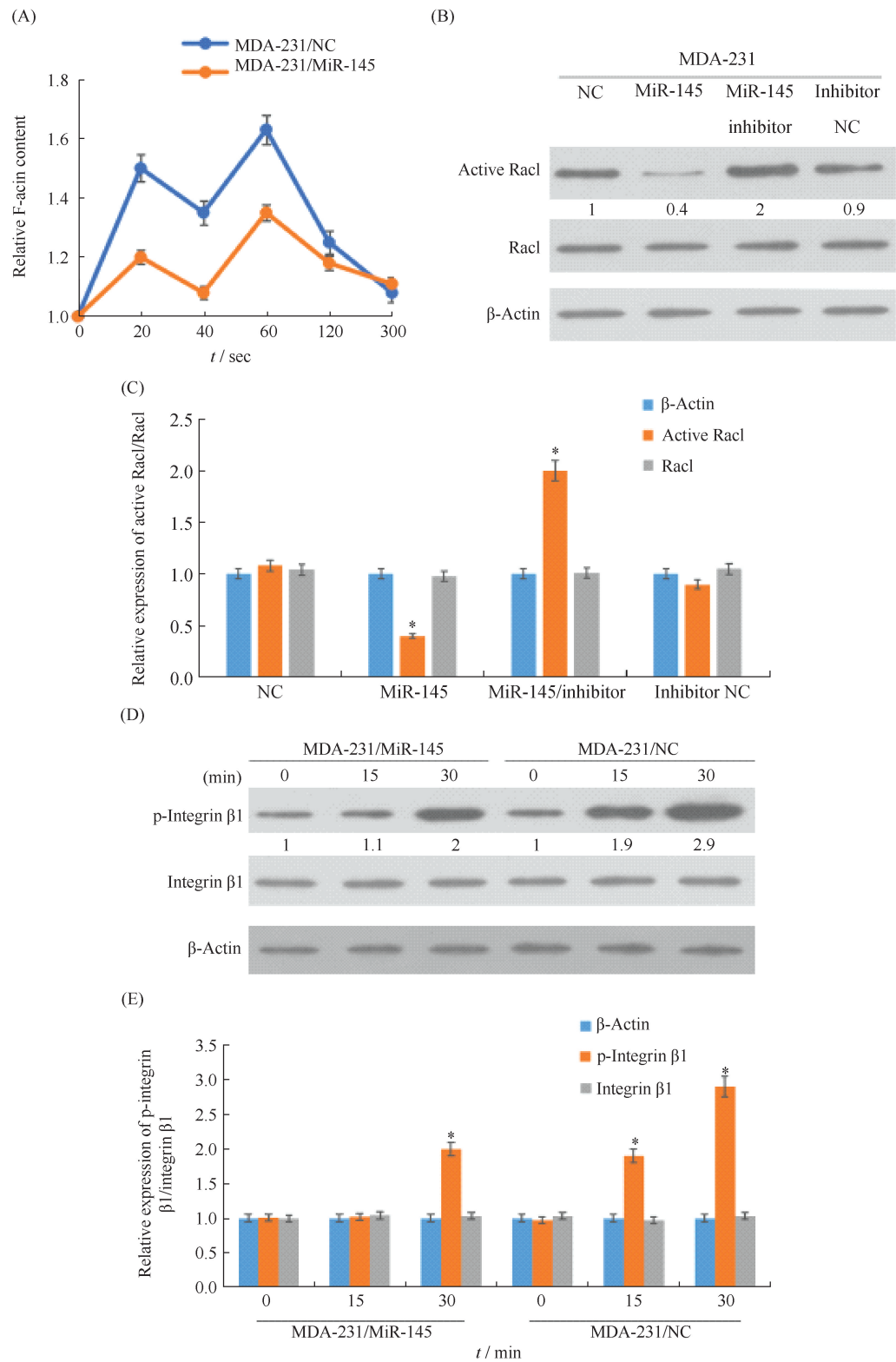
**Fig.4 The expression of ELMO1 was decreased in breast cancer cells transfected with miR-145** Western blot was used to detect the expression of ELMO1 after overexpression or inhibition of miR-145. The protein levels of ELMO1 decreased when miR-145 was overexpressed (\* $P<0.05$ ), and increased when miR-145 was suppressed by inhibitor (\* $P<0.05$ ,  $n=3$ )



**Fig.5 The expression of ELMO1 mRNA was detected by qRT-PCR after miR-145 transfection** The results from qRT-PCR experiment proved that there was no significant difference in the levels of ELMO1 mRNA after overexpression of miR-145 as compared with the control group ( $P>0.05$ ,  $n=3$ )

2.6 miR-145 参与 Rac1 活化、整合素  $\beta 1$  磷酸化以及 F-肌动蛋白聚合

通过 F-肌动蛋白聚合实验和 Western 印迹研究 miR-145 对乳腺癌细胞 F-肌动蛋白聚合、Rac1 活化和整合素  $\beta 1$  磷酸化的影响。F-肌动蛋白聚合结果显示:MDA-231/NC 组在 20 s 和 60 s 发生 F-肌动蛋白聚合。与此同时,MDA-231/miR-145 组 F-肌动蛋白聚合被显著抑制 ( $P<0.05$ , Fig.6A)。Western 印迹结果显示,MDA-231/miR-145 组活化的 Rac1 表达量较 MDA-231/NC 组降低 60% ( $P<0.05$ ),抑制剂 NC 组活化的 Rac1 较 miR-145 抑制组降低 55%



**Fig.6 miR-145 played an important role in Rac1 activation, integrin β1 phosphorylation and F-actin polymerization**  
(A) Data showed that the aggregation of F-actin polymerization was accelerated after transfection with miR-145 ( \*  $P<0.05$ ,  $n=3$  ).  
(B) Results from Western blot assays demonstrated that Rac1 activation was 60% lower in miR-145 group than the control group, and 55% lower in group with inhibitor negative control when compared with the miR-145 inhibitor group ( \*  $P<0.05$ ,  $n=3$  ). (C) Experiments showed that the phosphorylated integrin β1 with miR-145 transfection was 42% and 31% lower at 15 and 30 minutes respectively as compared with that of the negative control group ( \*  $P<0.05$ ,  $n=3$  )

( $P<0.05$ , Fig. 6B-C); MDA-231/miR-145 组磷酸化的整合素  $\beta 1$  较 MDA-231/NC 组于 15 min 时降低 42% ( $P<0.05$ ), 于 30 min 时降低 31% ( $P<0.05$ , Fig. 6D-E)。结果提示, miR-145 对 F-肌动蛋白聚合、Rac1 活化和整合素  $\beta 1$  磷酸化有促进作用。

3 讨论

乳腺癌是来源于乳腺上皮细胞的恶性肿瘤。全世界每年新增乳腺癌患者 120 万例, 死亡患者 40 万例, 是女性最常见死亡率最高的恶性肿瘤<sup>[20-21]</sup>。近年来乳腺癌广受关注, 侵袭和转移是造成患者死亡的主要原因, 故其侵袭转移机制成为众多研究的核心。miRNA 可在多种肿瘤中异常表达, 广泛参与肿瘤细胞的发生、发展、侵袭和转移。通过利用特定的 miRNA 抑制剂或模拟物来调节其靶基因 mRNA 的表达, 可对心脑血管疾病、自身免疫相关性疾病及肿瘤等产生积极作用<sup>[22]</sup>。ELMO1 表达增加可促进卵巢癌、横纹肌肉瘤和神经胶质瘤侵袭和转移<sup>[23]</sup>, ELMO1/Dock180 复合物作为 Rac1 活化的 GEF 在调控趋化性肌动蛋白的聚合中发挥关键作用。为验证 ELMO1 的表达是否受某种 miRNA 的影响, 通过 TargetScan 预测软件查找到可能与 ELMO1 的 3'UTR 结合的 miRNA (miR-145), 以探究 miR-145 与 ELMO1 3'UTR 结合对乳腺癌细胞侵袭能力的影响, 这对抑制乳腺癌侵袭有一定意义。miR-145 位于染色体 9q31, 具有肿瘤抑制功能, 已有早期文献报导, miR-145 无论在多种空腔脏器肿瘤还是实体肿瘤中均有表达下调现象<sup>[24]</sup>。本实验提示, miR-145 与 ELMO1 3'UTR 的靶向结合并抑制 ELMO1 表达。

我们首次证明, miR-145 通过靶向 ELMO1 抑制乳腺癌细胞侵袭。miRNA 与靶基因结合后通过两种方式对其调控: 一是基于 miRNA 与编码蛋白质 mRNA 几乎完全互补诱导的基因表达沉默, 由相关酶切断沉默复合体, 靶基因降解; 二是 miRNA 结合到目的基因 3'非翻译区降低蛋白质翻译水平<sup>[25]</sup>。在本文研究中, 经细胞转染我们推测 miR-145 有可能在翻译水平调控 ELMO1。有研究表明, 整合素  $\beta 1$ 、Rac1 在乳腺癌发生发展过程中扮演重要角色<sup>[26-27]</sup>, Rac1 通过影响黏着斑的改变、参与片状伪足的形成, 进而促进癌细胞的运动, 从而浸润或形成远处转移<sup>[28]</sup>。本研究证明, miR-145 促进乳腺癌细胞 F-肌动蛋白聚合、Rac1 活化和整合素  $\beta 1$  磷酸化。综上所述, miR-145 可通过靶向 ELMO1 抑制乳腺癌细胞侵袭。miR-145 有望成为通过 ELMO1 逆

转乳腺癌侵袭的新靶点和生物学标记物, 在改善患者生存质量和预后测评方面将有重要意义。

参考文献 (References)

[ 1 ] 郭鱼波, 王春晖, 裴晓华. 乳腺癌细胞上皮间质转化的分子机制及其防治的研究进展 [J]. 中国肿瘤 (Guo YB, Wang CH, Pei XH. Research Progress on Molecular Mechanism of Epithelial-mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells and Its prevention and Treatment [J]. Chin Cancer), 2018, **27**(12): 933-943

[ 2 ] Wang J, Dai JM, Che YL, *et al.* Elmo1 helps dock180 to regulate Rac1 activity and cell migration of ovarian cancer [J]. Int J Gynecol Cancer, 2014, **24**(5): 844-850

[ 3 ] Rapa E, Hill SK, Morten KJ, *et al.* The over-expression of cell migratory genes in alveolar rhabdomyosarcoma could contribute to metastatic spread [J]. Clin Exp Metastasis, 2012, **29**(5): 419-429

[ 4 ] 张长杰, 徐新伟, 李洪利, 等. 吞噬细胞运动蛋白-1 在 IL-8 有道德乳腺癌细胞的侵袭和转移中发挥重要作用 [J]. 中国药理学通报 (Zhang CJ, Xu XW, Li HL, *et al.* Important role of ELMO1 in invasion and migration of breast cancer cells induced by IL8 [J]. Chin Pharmacol Bull), 2016, **32**(10): 1452-1457

[ 5 ] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. Science, 2001, **294**(5543): 853-858

[ 6 ] Sachdeva M, Mo YY. MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1 [J]. Cancer Res, 2010, **70**(1): 378-387

[ 7 ] Kou B, Gao Y, Du C, *et al.* MiR-145 inhibits invasion of bladder cancer cells by targeting PAK1 [J]. Urol Oncol, 2014, **32**(6): 846-854

[ 8 ] Doberstein K, Steinmeyer N, Hartmetz AK, *et al.* MicroRNA-145 targets the metalloprotease ADAM17 and is suppressed in renal cell carcinoma patients [J]. Neoplasia, 2013, **15**(2): 218-230

[ 9 ] Kitade Y, Akao Y. Micro RNAs and their therapeutic potential for human diseases: micro RNAs, miR-143 and -145, function as anti-oncomirs and the application of chemically modified miR-143 as an anti-cancer drug [J]. J Pharmacol Sci, 2010, **114**(3): 276-280

[ 10 ] Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, *et al.* The small GTP binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling [J]. Cell, 1992, **70**(3): 401-410

[ 11 ] Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, *et al.* Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI (3)K [J]. Nature, 1997, **390**(6660): 632-636

[ 12 ] Hart IR. Role of integrins in tumor invasion and metastasis [J]. Exp Dermatol, 2004, **13**(10): 663

[ 13 ] Ganguly KK, Pal S, Moulik S, *et al.* Integrins and metastasis [J]. Cell Adh Migr, 2013, **7**(3): 251-261

[ 14 ] An J, Enomoto A, Weng L, *et al.* Significance of cancer-associated fibroblasts in the regulation of gene expression in the leading cells of invasive lung cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2013, **139**(3): 379-388

[ 15 ] Pollard TD, Borisov GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments [J]. Cell, 2003, **112**(4): 453-465

[ 16 ] Insall RH, Machesky LM. Actin dynamics at the leading edge: From simple machinery to complex networks [J]. Dev Cell, 2009, **17**(3): 310-322

[ 17 ] Sun CX, Magalhaes MA, Glogauer M. Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor [J]. J Cell Biol, 2007, **179**(2): 239-245

[ 18 ] Oh JY, Suh HN, Choi GE, *et al.* Modulation of sonic hedgehog-induced mouse embryonic stem cell behaviours through E-cadherin expression and integrin  $\beta 1$ -dependent F-actin formation [J]. Br J Pharmacol, 2018, **175**(17): 3548-3562

[19] 安宁, 李宏敏, 于瑞莲, 等. miR-216a-5p 通过下调 MMP16 表达抑制肺癌细胞的侵袭 [J]. 中国癌症杂志 (An N, Li HM, Yu RL, *et al.* miR-216a-5p inhibits invasion ability in human lung cancer cells by down-regulation of MMP16 expression [J]. Chin Oncol), 2015, **25**(8): 588-594

[20] 姬静, 张宝刚, 张伟栋, 等. ARK5 与乳腺癌侵袭转移关系的研究 [J]. 临床与实验病理学杂志 (Ji J, Zhang BG, Zhang WD, *et al.* ARK5 is associated with the invasive and metastatic of breast carcinoma [J]. J Clin Exp Pathol), 2012, **28**(4): 382-385

[21] Chen W, Zheng R, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, **66**(2): 115-132

[22] Torre LA, Bray F, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, **65**(2): 87-108

[23] van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of age [J]. EMBO Mol Med, 2014, **6**(7): 851-864

[24] 郭称明, 彭会云, 罗文, 等. ELMO 蛋白家族与恶性肿瘤侵袭转移关系的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志 (Guo CM, Peng HY, Luo W, *et al.* Progress of ELMO family on malignant tumor invasion and metastasis [J]. Chin J Pathophysiol), 2015, **31**(12): 2296-2300

[25] 郭文炜, 曾志勇, 徐驰. miR-145 与肿瘤相关性研究进展 [J]. 实用医学杂志 (Guo WW, Zeng ZY, Xu C. J Pract Med), 2013, **29**(23): 3947-3948

[26] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. Science, 2001, **294**(5543): 853-858

[27] Thibaudau L, Taubenberger AV, Theodoropoulos C, *et al.* New mechanistic insights of integrin  $\beta$ 1 in breast cancer bone colonization [J]. Oncotarget, 2015, **6**(1): 332-344

[28] Rozenchan PB, Pasini FS, Roela RA, *et al.* Specific upregulation of RHOA and RAC1 in cancer-associated fibroblasts found at primary tumor and lymph node metastatic sites in breast cancer [J]. Tumor Biol, 2015, **36**(12): 9589-9597