

SREBF2-AS1调控胆固醇合成代谢促进乳腺癌生长

邵玲, 杨宜英, 洪宏海

广州医科大学附属第三医院, 广东 广州

收稿日期: 2022年6月12日; 录用日期: 2022年6月22日; 发布日期: 2022年7月4日

摘要

目的: 研究SREBF2-AS1调控胆固醇合成代谢和SREBF2促进乳腺癌生长作用和分子机制。方法: qRT-PCR检测相关基因的转录水平。干扰SREBF2-AS1和过表达SREBF2后, MTT实验、BrdU实验和凋亡实验研究SREBF2-AS1在乳腺癌中作用及分子机制。结果: SREBF2-AS1在乳腺癌组织和乳腺癌细胞株中高表达。干扰掉SREBF2-AS1后抑制乳腺癌的生长和诱导其凋亡。进一步研究发现其通过调控SREBF2和胆固醇代谢进而调控乳腺癌生长。结论: SREBF2-AS1通过调控SREBF2和胆固醇代谢促进乳腺癌生长。

关键词

乳腺癌生长, SREBF2-AS1, 胆固醇合成代谢

SREBF2-AS1 Promotes the Growth of Breast Cancer via Regulating Cholesterol Anabolism

Ling Shao, Yiyang Yang, Honghai Hong

The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Guangdong

Received: Jun. 12th, 2022; accepted: Jun. 22nd, 2022; published: Jul. 4th, 2022

Abstract

Objective: To study the molecular mechanism of SREBF2-AS1 regulating cholesterol anabolism and SREBF2 promoting the growth of breast cancer. **Methods:** The transcription level of Genes was detected by qRT PCR. After interference with SREBF2-AS1 and overexpression of SREBF2, MTT assay,

BrdU assay and apoptosis assay were used to study the role and molecular mechanism of SREBF2-AS1 in breast cancer. Results: SREBF2-AS1 was highly expressed in breast cancer tissues and breast cell lines. Interference with SREBF2-AS1 inhibits the growth and induces apoptosis of breast cancer. Further studies found that it regulates the growth of breast cancer by regulating SREBF2 and cholesterol metabolism. Conclusion: SREBF2-AS1 can promote the growth of breast cancer by regulating SREBF2 and cholesterol metabolism.

Keywords

Breast Cancer Growth, SREBF2-AS1, Cholesterol Metabolism

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

全球肿瘤呈年轻化、发病率高和死亡率高趋势，攻克癌症和延长肿瘤患者生存期任重道远。乳腺癌是常见的肿瘤，其发病率在女性恶性肿瘤排第一，占妇女肿瘤的 30% [1]。外科手术切除是治疗早期乳腺癌有效的方法。然而，仍可能存在一些癌症细胞，导致乳腺癌复发和转移[2]。抑制乳腺癌生长和转移是治疗乳腺癌的首选策略，可延长患者生存期[3]。lncRNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一类普遍存在于哺乳动物，长度大于 200 bp 的非编码 RNA [4]。lncRNA 在乳腺癌生长和转移中发挥着重要作用[5]。临床前研究利用反义寡核苷酸靶向 MALAT1 有效抑制乳腺癌的转移[6]，提示着 lncRNA 在乳腺癌进展中起着重要作用，是乳腺癌治疗的潜在靶点。许多临床研究表明胆固醇和肿瘤发生成正相关[7]，胆固醇也是乳腺癌发生的危险因素[8]。更多的临床证据和体外实验表明使用降胆固醇药物他汀类延长无病生存期 (disease-free-survival, DFS)，防止乳腺癌复发和转移[9]。lncRNA 与胆固醇代谢调控关系以及它们在乳腺癌中作用和分子机制尚未清楚。我们此篇论文旨在寻找特异性的 lncRNA，研究其是否调控胆固醇代谢和乳腺癌生长作用，并进一步阐明其分子机制。

2. 材料与方法

2.1. 细胞培养

正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 购自 ATCC, 采用 MCF-10A 专用培养基培养(上海语纯生物科技有限公司)。MCF-7、MDA-MB-231、SKBR-3、BT483 和 MDA-MB-468 细胞为实验室自存细胞，于完全培养基无菌于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

2.2. 试剂耗材

Real time PCR 的 SYBER Green 和逆转录酶试剂盒购自 Takara 公司。RNA 提取试剂盒购自康为世纪公司和 Qigen 公司。siSREBF2-AS 小分子干扰片段购自锐博公司。转染试剂 Lipo 2000 和 RNA MAX 购自 Invitrogen 公司。细胞培养液购自 Hyclone 公司。细胞培养皿购自康宁公司。MTT 和 BrDu 试剂盒购自北京鼎国公司。

2.3. 实验方法

1) 细胞增殖活力测定(MTT 法)

取对数生长肝癌细胞，接种细胞到 96 孔板中，每孔加入 250 μ l 细胞悬液，置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养；细胞贴壁后，融合度达到 80%左右，瞬时转染小分子干扰片段或过表达质粒，随后加入 100 μ l 的 MTT 工作液(浓度为 5 mg/ml)，继续培养 4 小时；吸除上清后每孔加入 1 ml 二甲基亚砷(DMSO)，摇床震荡摇匀，用酶标仪测定 OD₅₇₀ 的光密度值。实验中每组设 6 个复孔，重复 3 次。

2) BrdU 实验

在六孔板内放入一块盖玻片，乳腺癌细胞接种于六孔板中，转染 siSREBF2-AS1，固定，5% Triton 穿孔，孵育 BrdU 抗体，荧光检测。

3) Annexin V 凋亡实验

乳腺癌细胞转染 siSREBF2-AS1，用秋水仙碱做阳性对照。收集细胞加入 Annexin V 和 PI 室温避光染色，流式细胞仪分析凋亡率。

4) qRT-PCR 实验

qRT-PCR 检测 SREBF2-AS、SREBF2 和胆固醇合成代谢相关基因的转录瓶。具体实验如下：收集处理后的乳腺癌细胞 RNA，逆转录为 cDNA，用 Takara 公司的 SYBER green 试剂盒进行实时荧光 PCR 实验 PCR 条件为：95 $^{\circ}$ C 30 s，1 个循环；PCR 反应，95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 15 s，45 个循环；溶解，95 $^{\circ}$ C 0 s，65 $^{\circ}$ C 20 s，95 $^{\circ}$ C 0 s，1 个循环。PCR 结束后，根据反应得到的 Cp 值，使用相对定量的分析方法，以标准曲线进行校正，最后计算出样品中各 mRNA 的相对浓度。进行 qRT-PCR 引物序列如表 1。

Table 1. Real-time fluorescence quantitative PCR primers

表 1. 实时荧光定量 PCR 引物

Gene	Forward primers	Reverse primers
β -actin	5'-GCACTCTCCAGCCTTCCTT-3'	5'-GTTGGCGTACAGGTCTTTGC-3'
SREBF2	5'-GACCTGAAGATCGAGGACTTTAAT-3'	5'-AGAGTCAATGGAGTAGGGAGAG-3'
MSMO1	5'-CATGGGTGACCATTTCGTTTATTAG-3'	5'-GCCGAGAACCAGCATAGAA-3'
SQLE	5'-GCTTCCTTCCTTCATCAG-3'	5'-CAGTCATTCTCCACCAGTAAG-3'
IDII	5'-CTGGCAGAGATGTGTATCCTTAT-3'	5'-GCTCGATGCAATAATCCTTTCTC-3'
MVD	5'-CGTGGCATCGGTGAACAAC-3'	5'-GTGTAGGCTAGGCAGGCATA-3'
MVK	5'-AGAGCAAGTGGAGAAGCTAAAG-3'	5'-CGGCAGATGGACAGGTATAAG-3'
HMGCR	5'-GAGACAGGGATAAACCAGAAAG-3'	5'-GGAGGAGTTACCAACCACAAA-3'
HMGCS	5'-TGATGGTGTAGATGCTGAAAG-3'	5'-ACCACAGTCATGCAAAGAGAG-3'

5) 过表达质粒或小分子干扰片段转染

转染试剂为 Lipo 2000 (Invitrogen 公司)，详细操作步骤见说明书。乳腺癌细胞转染 4~6 个小时后换上普通培养液，在不同的待测时间点，收细胞蛋白或 RNA 进行相应分析。

2.4. 统计分析

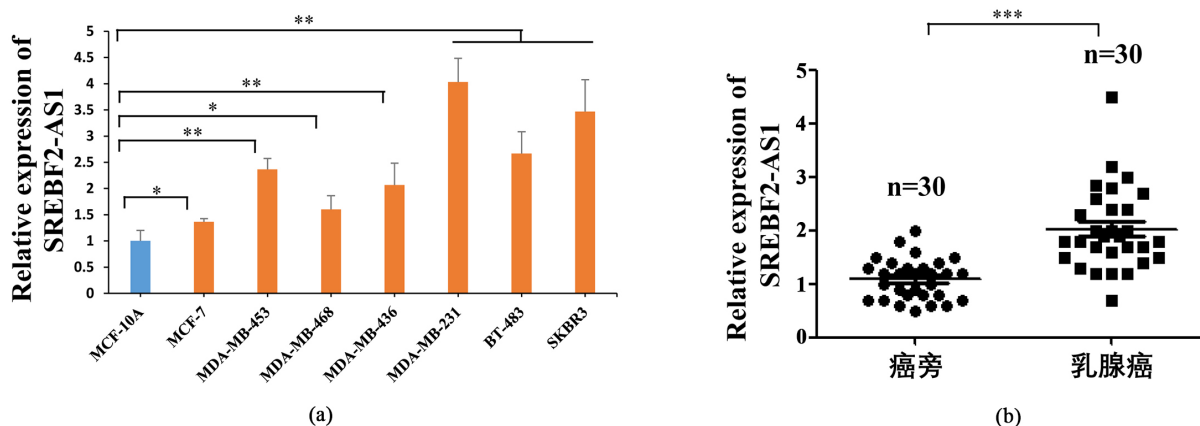
正态分布数据采用 t 检验统计方法进行组间比较分析，P < 0.05 为显著差异。所有实验重复 3 次。非正态分布数据采用秩和检验。

3. 实验结果

3.1. 乳腺癌细胞株和乳腺癌组织中 SREBF2-AS 表达

为了研究 SREBF2-AS 在乳腺癌中表达，我们设计 SREBF2-AS 引物，采用 RT-PCR 检测乳腺癌细胞

株和乳腺癌组织中 SREBF2-AS 水平。以乳腺上皮细胞 MCF-10A 为对照组,分别收集乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-453、MDA-MB-468、MDA-MA-436、MDA-MB-231、BT-483 和 SKBR3 的 RNA。此外,也收集 30 例乳腺癌病人的癌组织和癌旁组织进行 SREBF2-AS 检测。结果显示,乳腺癌细胞株中 SREBF2-AS 水平明显高于乳腺正常细胞 MCF-10A (图 1(a))。与此对应,乳腺癌组织中 SREBF2-AS 水平明显高于癌旁组织(图 1(b))。



(a) SREBF2-AS 乳腺癌细胞株水平。RT-PCR 检测乳腺癌细胞株 SREBF2-AS 水平; (b) SREBF2-AS 乳腺癌组织中水平。RT-PCR 检测乳腺癌组织中 SREBF2-AS 水平。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

Figure 1. The relative expression of SREBF2-AS in breast cancer cell line and breast cancer
图 1. 乳腺癌细胞株和乳腺癌组织中 SREBF2-AS 水平

3.2. SREBF2-AS 在乳腺癌中生长作用

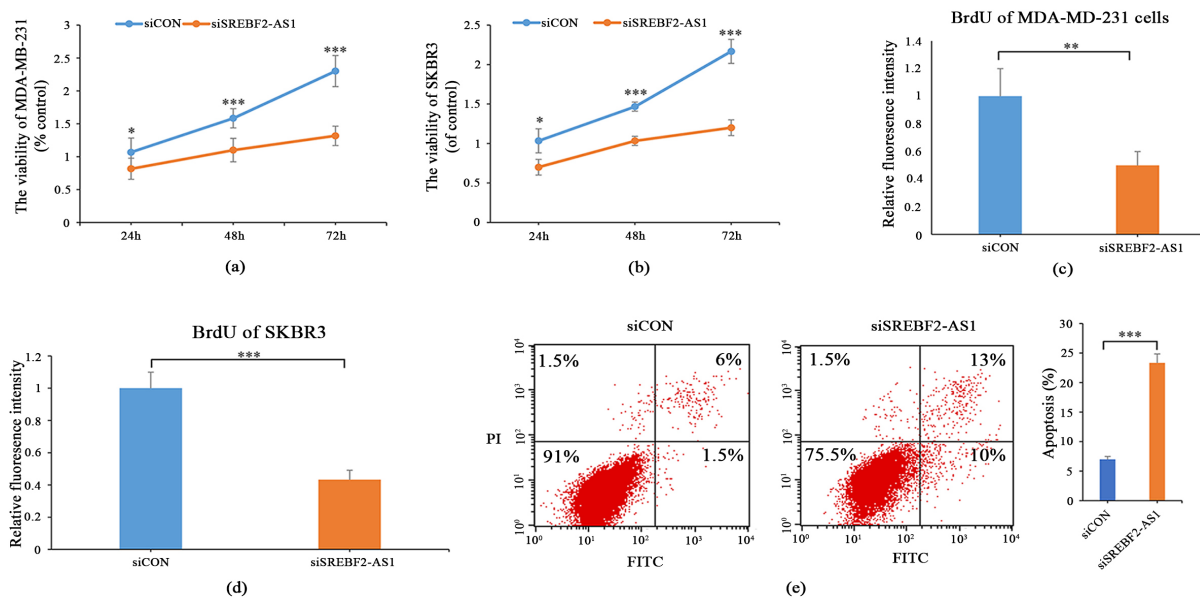
为了研究 SREBF2-AS 在乳腺癌中作用,我们首先合成小分子干扰片段敲低 SREBF2-AS 水平,然后采用 MTT、BrdU 和流式细胞技术检测 SREBF2-AS 对乳腺癌作用。结果显示,干扰 SREBF2-AS 后,明显抑制了乳腺癌的生长(图 2(a)~(d))。此外,干扰 SREBF2-AS 后也诱导乳腺癌细胞凋亡(图 2(e))。

3.3. SREBF2-AS 调控胆固醇代谢途径

为了研究 SREBF2-AS 调控乳腺癌生长作用分子机制,我们首先进行转录组测序分析。转录组测序分析结果显示,干扰 SREBF2-AS 后,主要影响胆固醇代谢合成途径(图 3(a))和下调胆固醇合成途径相关基因转录(图 3(b))。此外,体外实验干扰 SREBF2-AS 后也明显抑制胆固醇合成代谢途径中 MSMO1、SQLE、MVK、IDI1、MVD、MVK、HMGCR 和 HMGCS1 表达(图 3(c))。

3.4. SREBF2-AS 调控 SREBF2 和胆固醇代谢促进乳腺癌的生长

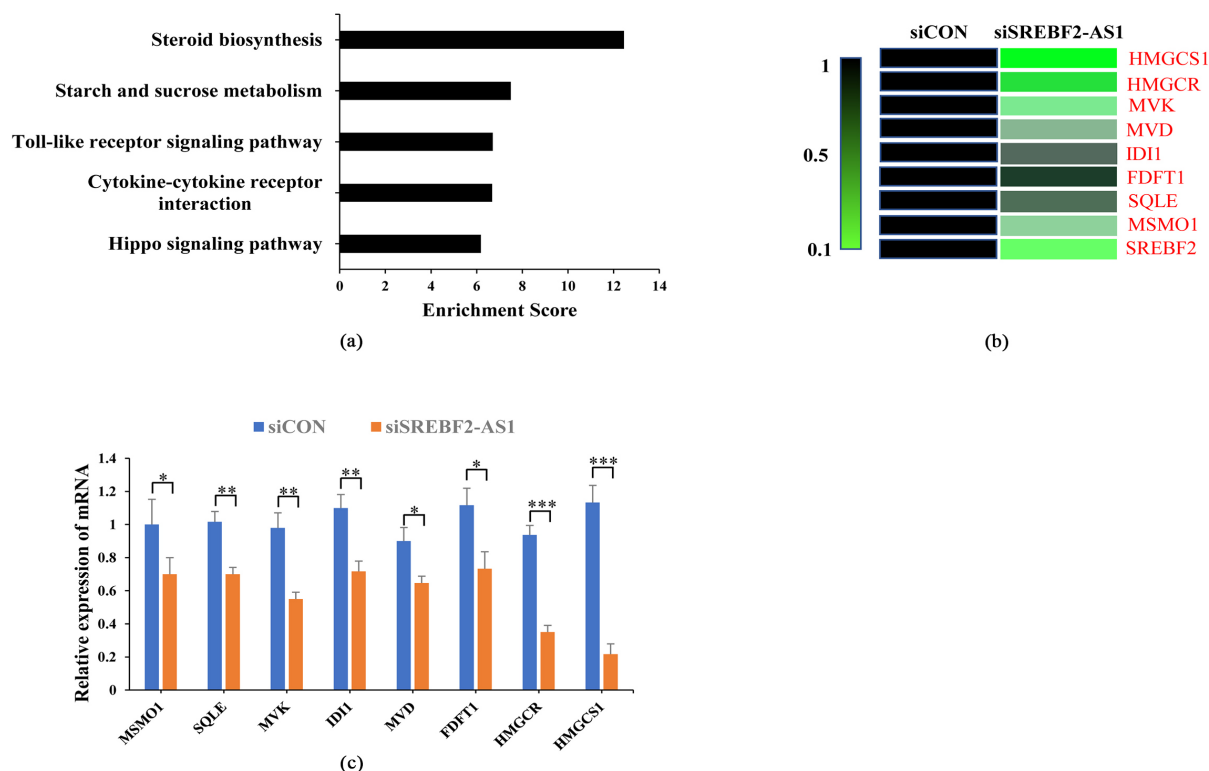
固醇调节元件结合转录因子 2 (sterol regulatory element transcription factor 2, SREBF2)是调节细胞脂质合成代谢的中心枢纽和主要的转录因子,其主要通过调控脂质合成代谢过程中相关基因的表达进而调节脂质合成代谢[10]。为了研究 SREBF2-AS 通过调控 SREBF2 进而调控胆固醇途径和乳腺癌生长,我们首先研究 SREBF2-AS 是否调控 SREBF2 表达。结果显示,干扰 SREBF2-AS 后,明显抑制 SREBF2 表达(图 4(a)),而干扰掉 SREBF2 也明显抑制胆固醇合成途径相关基因水平(图 4(b))。此外,我们发现在干扰 SREBF2-AS 同时过表达 SREBF2,明显消除了 SREBF2-AS 调控胆固醇合成作用和乳腺癌生长作用(图 4(c),图 4(d)),表明 SREBF2-AS 通过调控 SREBF2 和胆固醇代谢促进乳腺癌的生长。



(a)和(b) MTT 实验检测 MDA-MB-231 (a)和 SKBR3 (b)的生长情况; (c)和(d) BrdU 实验检测 MDA-MB-231 (c)和 SKBR3 (d)的增殖情况; (e) Annexin V 凋亡实验检测乳腺癌凋亡情况。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

Figure 2. The role of SREBF2-AS on breast cancer growth

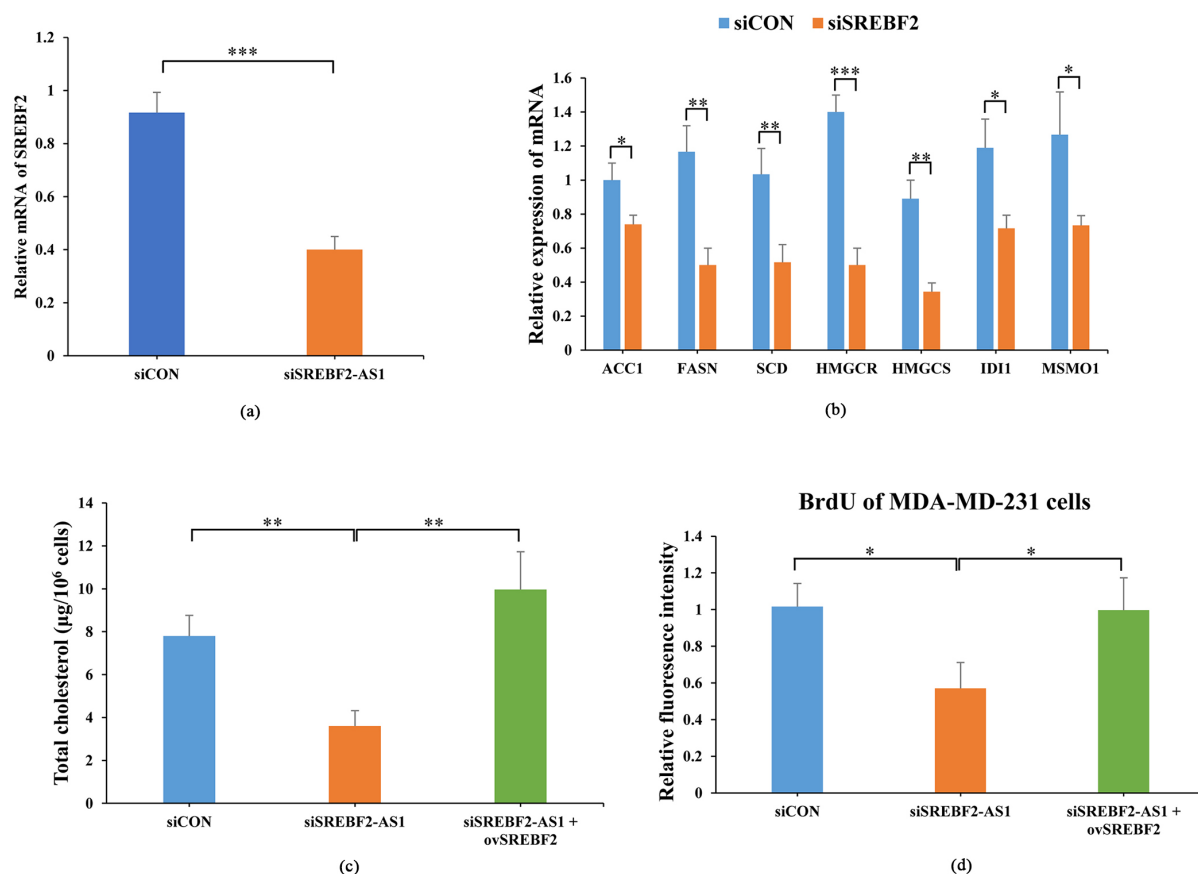
图 2. SREBF2-AS1 调控乳腺癌生长作用



(a) KEGG pathway 分析干扰 SREBF2-AS1 后转录组变化富集的信号通路; (b) 转录组测序结果中胆固醇合成代谢过程相关基因的变化; (c) 干扰 SREBF2-AS1 后胆固醇合成代谢过程相关基因表达。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

Figure 3. SREBF2-AS regulates cholesterol metabolism of breast cancer

图 3. SREBF2-AS1 调控胆固醇合成代谢途径



(a) 干扰 SREBF2-AS1 后 SREBF2 的 mRNA 水平; (b) 干扰 SREBF2 后胆固醇合成代谢相关基因的表达; (c)和(d) 干扰 SREBF2-AS1 的同时过表达 SREBF2, 检测乳腺癌的胆固醇含量(c)和增殖情况(d)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

Figure 4. SREBF2-AS regulates cholesterol metabolism and growth of breast cancer via SREBF2

图 4. SREBF2-AS1 通过调控 SREBF2 进而调控胆固醇合成代谢及乳腺癌生长

4. 讨论

目前乳腺癌的治疗方案有外科手术、放疗、化疗、激素治疗、靶向治疗和免疫治疗等。外科手术切除是治疗早期乳腺癌有效的方法。然而, 仍可能存在一些癌症细胞, 导致乳腺癌复发和转移[2]。抑制乳腺癌生长和转移是治疗乳腺癌的首选策略, 可延长患者生存期[3]。lncRNA 在乳腺癌生长和转移中发挥着重要作用[5]。临床前研究利用反义寡核苷酸靶向 MALAT1 有效抑制乳腺癌的转移[6], 提示着 lncRNA 在乳腺癌进展中起着重要作用, 是乳腺癌治疗的潜在靶点。我们前期实验通过 lncRNA 芯片分析发现 lncRNA-SREBF2-AS1 在乳腺癌组织中高表达, 随后 qRT-PCR 结果也证明 SREBF2-AS1 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞中高表达。进一步的功能实验表明, 干扰掉 SREBF2-AS1 后抑制乳腺癌的生长和诱导其凋亡。但是其分子机制尚未清楚。

许多临床研究表明胆固醇和肿瘤发生成正相关[7], 胆固醇也是乳腺癌发生的危险因素[8]。更多的临床证据和体外实验表明使用降胆固醇药物他汀类延长无病生存期(disease-free-survival, DFS), 防止乳腺癌复发和转移[11]。而我们通过转录组测序分析结果表明, 沉默 SREBF2-AS1 后主要影响胆固醇合成代谢通路。沉默 SREBF2-AS1 后明显抑制胆固醇合成代谢过程中相关基因 HMGCS1, HMGCR, MVK, IDI1, FDFT1, SQLE 和 MSMO1 的表达。固醇调节元件结合转录因子(sterol regulatory element transcription factors, SREBFs)是调节细胞脂质合成代谢的中心枢纽和主要的转录因子, 其主要通过调控脂质合成代谢过程中相关基因

的表达进而调节脂质合成代谢[10]。哺乳动物 SREBFs 家族主要有 SREBF1 和 SREBF2 两种基因, 分别编码 SREBF1 和 SREBF2 蛋白[12]。SREBF1 主要激活脂酸合成代谢相关基因的转录, 而 SREBF2 是胆固醇合成代谢过程的主要转录因子, 激活胆固醇合成代谢过程中限速酶 HMGCR 及其它基因转录[13]。我们研究发现干扰 SREBF2-AS 后, 明显抑制 SREBF2 表达, 而干扰掉 SREBF2 也明显抑制胆固醇合成途径相关基因水平, 表明 SREBF2-AS 通过调控 SREBF2 调控胆固醇代谢途径。本文我们进一步发现在干扰 SREBF2-AS 同时表达 SREBF2, 明显消除了 SREBF2-AS 调控胆固醇合成作用和乳腺癌生长作用, 表明 SREBF2-AS 通过调控 SREBF2 调控胆固醇代谢和合成, 进而促进乳腺癌的生长。本文还需在动物实验水平确认 SREBF2-AS 对乳腺癌生长作用以及阐明 SREBF2-AS 调控 SREBF2 分子机制。

基金项目

国家自然科学基金(项目编号 81901557, 81902693)。广东省自然科学基金(项目编号 2022A1515012513)。

参考文献

- [1] Desantis, C., Ma, J., Bryan, L. and Jemal, A. (2014) Breast Cancer Statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **64**, 52-62. <https://doi.org/10.3322/caac.21203>
- [2] Horton, J.K., Jagsi, R., Woodward, W.A. and Ho, A. (2018) Breast Cancer Biology: Clinical Implications for Breast Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, **100**, 23-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2017.08.025>
- [3] Fontes-Sousa, M., Amorim, M., Salta, S., Palma, D.S.S., Henrique, R. and Jeronimo, C. (2019) Predicting Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: It's Time for Epigenetic Biomarkers (Review). *Oncology Reports*, **41**, 1431-1438. <https://doi.org/10.3892/or.2019.6967>
- [4] Mercer, T.R., Dinger, M.E. and Mattick, J.S. (2009) Long Non-Coding RNAs: Insights into Functions. *Nature Reviews Genetics*, **10**, 155-159. <https://doi.org/10.1038/nrg2521>
- [5] Kang, M.J., Abdelmohsen, K., Hutchison, E.R., et al. (2014) HuD Regulates Coding and Noncoding RNA to Induce APP → A β Processing. *Cell Reports*, **7**, 1401-1409. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.050>
- [6] Mendell, J.T. (2016) Targeting a Long Noncoding RNA in Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **374**, 2287-2289. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1603785>
- [7] Touvier, M., Fassier, P., His, M., et al. (2015) Cholesterol and Breast Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *British Journal of Nutrition*, **114**, 347-357. <https://doi.org/10.1017/S000711451500183X>
- [8] Kitahara, C.M., Berrington, D.G.A., Freedman, N.D., et al. (2011) Total Cholesterol and Cancer Risk in a Large Prospective Study in Korea. *Journal of Clinical Oncology*, **29**, 1592-1598. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.5200>
- [9] Melvin, J.C., Seth, D., Holmberg, L., et al. (2012) Lipid Profiles and Risk of Breast and Ovarian Cancer in the Swedish AMORIS Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **21**, 1381-1384. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0188>
- [10] Goldstein, J.L., Debose-Boyd, R.A. and Brown, M.S. (2006) Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell*, **124**, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.022>
- [11] Borgquist, S., Giobbie-Hurder, A., Ahern, T.P., et al. (2017) Cholesterol, Cholesterol-Lowering Medication Use, and Breast Cancer Outcome in the BIG 1-98 Study. *Journal of Clinical Oncology*, **35**, 1179-1188. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.3116>
- [12] Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L. and Shimano, H. (1998) Activation of Cholesterol Synthesis in Preference to Fatty Acid Synthesis in Liver and Adipose Tissue of Transgenic Mice Overproducing Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2. *Journal of Clinical Investigation*, **101**, 2331-2339. <https://doi.org/10.1172/JCI2961>
- [13] Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R.E., et al. (1997) Elevated Levels of SREBP-2 and Cholesterol Synthesis in Livers of Mice Homozygous for a Targeted Disruption of the SREBP-1 Gene. *Journal of Clinical Investigation*, **100**, 2115-2124. <https://doi.org/10.1172/JCI119746>