



· 论 著 ·

miR-107 靶向 NKD1 对乳腺癌细胞线粒体氧化磷酸化影响的实验研究

王嘉¹, 刘丹⁴, 石斌³, 马小兰¹, 肖雯²

- 宁夏医科大学总医院医学科学研究院, 宁夏 银川 750004;
- 宁夏医科大学总医院肿瘤内二科, 宁夏 银川 750004;
- 宁夏医科大学总医院急诊科, 宁夏 银川 750004;
- 银川市妇幼保健院病理科, 宁夏 银川 750004

[摘要] 背景与目的: 线粒体氧化磷酸化是肿瘤细胞获取能量的关键过程, 与肿瘤生物学特征密切相关。微小RNA (microRNA, miRNA) 可以通过与信使RNA (messenger RNA, mRNA) 结合调控肿瘤细胞代谢重编程。本研究旨在探究 miR-107 靶向裸角质层同源蛋白1 (naked cuticle homolog 1, NKD1) 调控乳腺癌细胞线粒体氧化磷酸化的作用机制。方法: 利用TNM数据库检测NKD1在乳腺癌组织样本 ($n=1095$) 和癌旁组织样本 ($n=403$) 的表达, 分析NKD1表达与患者预后的相关性; 回顾性收集2024年6月—2025年6月在宁夏医科大学总医院肿瘤外科就诊的符合纳入和排除标准患者的乳腺癌组织及癌旁组织样本, 采用实时定量反转录聚合酶链反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测验证NKD1在乳腺癌组织和细胞系中的表达。构建NKD1敲低载体 (siNKD1), RNA-seq分析敲低NKD1富集的生物功能及信号转导通路, Western blot方法验证NKD1对Wnt/ β -catenin通路及氧化磷酸化的影响。利用加权基因共表达网络分析 (weighted gene coexpression network analysis, WGCNA) 筛选TCGA和GEO数据库中与乳腺癌表型相关的核心miRNA模块; 采用在线生物信息学数据库TargetScan、miRWalk预测与NKD1高度相关的miRNA; 利用TCGA和GEO数据库及生存分析明确miR-107在乳腺癌中的表达及对患者预后的影响; 双荧光素酶报告分析验证miR-107和NKD1的靶向关系; 通过瞬时转染法在MDA-MB-231细胞中分别转染miR-107 mimic、miR-107 inhibitor, Western blot方法检测NKD1表达及细胞氧化磷酸化水平。本研究经宁夏医科大学总医院伦理委员会批准 (编号: KYLL-2022-0514)。结果: TNM数据库结合纳入本研究的10例乳腺癌组织及10例癌旁组织样本分析显示, NKD1在乳腺癌组织中低表达且与患者不良预后呈负相关; RNA-seq分析发现, 敲低NKD1显著富集Wnt/ β -catenin信号转导通路和氧化磷酸化通路, Western blot结果显示, 敲低NKD1促进Axin降解, 增加 β -catenin和GSK-3 β 蛋白表达; GSEA富集分析显示, 敲低NKD1增加c-Myc和IDH2蛋白表达; 氧化磷酸化抑制剂 (IACS-010759) 显著抑制细胞增殖, 联合siNKD1组对细胞增殖的抑制速率有所回复 ($P<0.05$)。WGCNA分析显示, TCGA-ME brown和GEO-ME blue模块与乳腺癌表型高度相关, 将上述模块与数据库联合分析显示, 靶向NKD1的miRNA为miR-107, 且NKD1表达与miR-107表达呈负相关。数据库分析表明, 与正常组织相比, 乳腺癌组织中miR-107高表达, 且与患者预后不良相关 ($P<0.05$)。双荧光素酶报告基因实验证实miR-107直接作用靶点为NKD1基因, miR-107与NKD1表达呈负相关。与对照组相比, 单独转染miR-107 inhibitor组细胞氧化磷酸化水平降低, 但共转染miR-107 inhibitor和siNKD1组细胞氧化磷酸化水平有所回复 ($P<0.05$)。结论: miR-107通过靶向抑制NKD1激活Wnt/ β -catenin信号转导通路促进乳腺癌细胞线粒体氧化磷酸化。

[关键词] 氧化磷酸化; miR-107; NKD1; 乳腺癌; Wnt/ β -catenin 信号转导

基金项目: 宁夏医科大学2023年校级科研项目 (XM2022012), 宁夏医科大学2025年校级科研项目 (XY2025001), 宁夏回族自治区自然科学基金 (2026AAC030995)。

利益冲突: 所有作者均声明无利益冲突。

伦理批件: KYLL-2022-0514。

知情同意: 不需要。

引用本文: 王嘉, 刘丹, 石斌, 等. miR-107 靶向 NKD1 对乳腺癌细胞线粒体氧化磷酸化影响的实验研究 [J]. 中国癌症杂志, 2026, 36(4): 363-374.

CC协议: CC BY-NC-ND 4.0。

Funding: Ningxia Medical University 2023 University-Level Research Project (XM2022012), Ningxia Medical University 2025 University-Level Research Project (XY2025001), Ningxia Hui Autonomous Region Natural Science Foundation Project (2026AAC030995).

Conflicts of interest: All authors declare no conflicts of interest.

Ethical approval: KYLL-2022-0514.

Informed consent: not required.

Cite this article: WANG J, LIU D, SHI B, et al. Effect of miR-107 targeting NKD1 on mitochondrial oxidative phosphorylation in breast cancer cells [J]. Chin Oncol, 2026, 36(4): 363-374.

CC license: CC BY-NC-ND 4.0.

通路

中图分类号: R737.9 文献标志码: A

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2026.04.005

Effect of miR-107 targeting NKD1 on mitochondrial oxidative phosphorylation in breast cancer cells WANG Jia¹, LIU Dan⁴, SHI Bin³, MA Xiaolan¹, XIAO Wen² (1. Institute of Medical Sciences, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; 2. Department of Medical oncology II, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; 3. Department of Emergency, General Hospital of Ningxia Medical University, Ningxia Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China; 4. Department of Pathology, Yinchuan Maternal and Child Health Care Hospital, Yinchuan 750004, Ningxia Hui Autonomous Region, China)

Correspondence to: XIAO Wen E-mail: xiaowen631126@163.com

[Abstract] Background and purpose: Mitochondrial oxidative phosphorylation is a key energy-generating pathway and is closely linked to aggressive biological behaviors in invasive cancers. Micro RNA (miRNAs) regulate tumor cell metabolic reprogramming and cellular functions through messenger RNA (mRNA) targeting. This study explored how microRNA-107 (miR-107) modulates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) in breast cancer via targeting naked cuticle homolog 1 (NKD1). **Methods:** NKD1 expression in breast cancer was first assessed by analyzing public databases (TNM) and its prognostic significance was evaluated. Additionally, breast cancer and adjacent normal tissue samples were retrospectively collected from patients who underwent surgical resection at the Department of Surgical Oncology, General Hospital of Ningxia Medical University between June 2024 and June 2025, following predefined inclusion and exclusion criteria. NKD1 expression in clinical tissues and breast cancer cell lines was validated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot. We then constructed a stable *NKD1*-knockdown cell model. High-throughput RNA sequencing (RNA-seq) was performed to identify altered biological pathways upon *NKD1* depletion. The regulatory effect of NKD1 on key proteins of the Wnt/ β -catenin pathway and cellular oxidative phosphorylation were confirmed by Western blot. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) identified core miRNA modules associated with breast cancer phenotypes from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Gene Expression Omnibus (GEO) databases. Bioinformatics tools (TargetScan, miRWalk) was used to predict potential miRNAs high correlation with NKD1. Pan-cancer and survival analyses was used to reveal the expression and prognostic significance of miR-107. Dual-luciferase reporter assay was used to verify miR-107 directly targets NKD1. MDA-MB-231 cells were transiently transfected with miR-107 mimic, miR-107 inhibitor, or co-transfected with miR-107 inhibitor plus NKD1 siRNA, and oxidative phosphorylation levels were assessed by Western blot. This study was approved by the Ethics Committee of General Hospital of Ningxia Medical University (approval number: KYLL-2022-0514). **Results:** Bioinformatics database (TNM) combined with 10 paired tissue samples analysis revealed that NKD1 expression was downregulated in breast cancer, and its low expression was positively correlated with favorable patient prognosis. RNA-seq analysis further demonstrated that *NKD1* knockdown significantly enriched pathways related to Wnt/ β -catenin signaling and oxidative phosphorylation. Western blot results indicated that depleting NKD1 promoted Axin degradation, increased the protein levels of β -catenin and GSK-3 β , and upregulated c-Myc and IDH2 expression. Treatment with the inhibitor IACS-010759 suppressed cell growth, and this inhibitory effect was partially reversed when combined with *NKD1* knockdown ($P < 0.05$). In addition, WGCNA analysis showed that the TCGA-ME brown and GEO-ME blue modules were highly associated with breast cancer phenotypes. Combining the above modules with database analysis shows, miR-107 was predicted as a potential upstream miRNA targeting NKD1 and NKD1 is negatively correlated with miR-107. Compared with normal tissues, elevated miR-107 expression in breast cancer correlated with poorer patient prognosis ($P < 0.05$). Dual-luciferase reporter assays confirmed that NKD1 is a direct target of miR-107, and the expression of miR-107 is negatively correlated with NKD1. Moreover, compared with the siNKD1 group, oxidative phosphorylation levels were decreased in cells transfected with miR-107 inhibitor alone, but partially restored in cells co-transfected with miR-107 inhibitor and siNKD1 ($P < 0.05$). **Conclusion:** miR-107 promotes breast cancer malignant progression by targeting and inhibiting NKD1, thereby activating Wnt/ β -catenin signaling and enhancing oxidative phosphorylation in breast cancer cells.

[Key words] Oxidative phosphorylation; miR-107; NKD1; Breast cancer; Wnt/ β -catenin pathway

乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤,全球每年新发病例高达230万,对女性生命健康构成严重威胁^[1]。近年来,随着早期诊断和基因检测技术的优化,乳腺癌患者的生存率得到显著改善,但仍未有效地减少肿瘤复发和转移^[2]。因

此,探索乳腺癌发病机制的关键靶点和调控网络对于改善患者预后至关重要。

代谢重塑是肿瘤的重要特征,肿瘤细胞适应性的代谢重编程为其活跃增殖提供能量支持。线粒体氧化磷酸化(mitochondrial oxidative

phosphorylation, OXPHOS) 在肿瘤代谢中发挥重要作用, 癌基因的异常激活使肿瘤细胞获得持续的增殖信号, 增强线粒体 OXPHOS 为肿瘤细胞提供能量, 进一步促进肿瘤的生长和扩散^[3-4]。近年来, OXPHOS 的异常活化被证实与乳腺癌侵袭转移和耐药性密切相关^[5]。然而, 调控 OXPHOS 的关键分子机制尚未完全阐明, 尤其是非编码 RNA 与 Wnt 信号转导通路的交互作用在代谢调控中的角色亟待探索。

Wnt/ β -catenin 信号转导通路是调控胚胎发育和稳态的重要调节因子, 与肿瘤发生、发展密切相关^[6]。裸角质层同源蛋白 1 (naked cuticle homolog 1, NKD1) 作为 Wnt 信号转导通路负调控因子, 通过 EF-hand 结构域与 Dvl 蛋白结合阻碍 β -catenin 在细胞核内积聚^[7]。NKD1 缺失已被证实可激活 β -catenin 并促进线粒体生物合成^[8]。本课题组前期研究^[9]发现, NKD1 是高三尖杉酯碱 (homoharringtonine, HHT) 的药物靶点, HHT 通过抑制 NKD1/PCMI 信号轴诱导结直肠癌细胞周期阻滞和凋亡发生; NKD1 通过负向调控 Wnt/ β -catenin 信号转导通路促进结直肠癌细胞增殖^[10]。研究发现 NKD1 在包括乳腺癌等其他多种恶性肿瘤中表达下调^[11-12], 与肿瘤细胞增殖侵袭能力增强显著相关^[13], 但 NKD1 调控肿瘤细胞 OXPHOS 进而影响乳腺癌发生发展的作用机制尚不明确。

研究^[14-15]发现, 微小 RNA (microRNA, miRNA) 在细胞通讯中的作用对肿瘤发生发展至关重要。miRNA 通过与靶基因 mRNA 的 3'-UTR 端互补结合, 靶向抑制 mRNA 翻译或促进其降解, 发挥转录后调节作用。microRNA-107 (miR-107) 在多种癌症中呈现差异表达, 其通过调控糖酵解和脂肪酸代谢影响肿瘤进展^[16]。miR-107 上调 FGFR1 促进非小细胞肺癌的恶性增殖^[17]; miR-107 靶向 SNCG 抑制 ERK1/ERK2/NF- κ B 信号转导通路减缓口腔鳞状细胞癌迁移和上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 发生^[18]。由此可见, miR-107 可通过靶向抑制多个抑癌基因和信号转导通路促进肿瘤细胞增殖和侵袭。但 miR-107 是否通过改变 OXPHOS 功能驱动乳腺癌恶性表型, 目前尚无直接证据。本研究旨在揭示 miR-107 通过靶向抑制 NKD1 调控乳腺癌细胞 OXPHOS 的分子机制, 为深入探究乳腺癌的代谢在靶向治疗机制中的作用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与材料

收集 2024 年 6 月—2025 年 6 月, 宁夏医科大学总医院肿瘤外科经手术切除的乳腺癌患者的肿瘤组织及癌旁组织样本。患者纳入标准为: ①病理学检查证实为乳腺癌; ②年龄 18~70 岁; ③美国东部肿瘤协作组 (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) 评分 ≤ 1 ; ④未接受任何抗肿瘤治疗; ⑤预期生存期 ≥ 6 个月。排除标准为: ①患有无法控制的严重全身性疾病; ②其他部位恶性肿瘤合并; ③癌症治疗并发症 (术后严重感染)。本研究经宁夏医科大学总医院伦理委员会批准 (伦理编号: KYLL-2022-0514)。

人正常乳腺上皮细胞系 MCF-10A 及人乳腺癌细胞系 MCF-7、BT474、T47D、MDA-MB-231 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。DMEM 培养基 (11965092)、1640 培养基 (61870036)、胎牛血清 (A5670701)、青霉素及链霉素混合液 (15140-122) 均购自美国 Gibco 公司, miR-107 mimics、miR-107 inhibitor、NKD1 敲低小干扰序列 (si-NKD1)、NKD1 质粒及引物、miRNA 荧光定量检测试剂盒 (E608006) 购自生工生物工程 (上海) 有限公司, Advanced Transfection Reagent 助转染试剂 (AD600075) 购自美国 ZATA LIFE 公司, 反转录试剂盒及实时定量逆转录聚合酶链反应试剂盒 (RR036A) 购自日本 Takara 公司, 蛋白提取试剂盒 (KGP250)、细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8; KGA317) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司, 二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 检测试剂盒 (23225)、TRIzol 试剂 (15596018) 购自美国 Thermo 公司, IDH2 (R24654)、c-Myc (R22809)、 β -catenin (R22820)、Axin (R23574)、GSK-3 β (R22868) 抗体购自成都正能生物技术有限责任公司, NKD1 抗体 (AF4346) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司, GAPDH (ab181602) 抗体购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司。

1.2 生物信息学数据获取及分析

TNM 数据库 (<https://tnmplot.com/>) 检测 NKD1 在乳腺癌组织样本 ($n=1\ 095$) 和癌旁组织样本 ($n=403$) 的表达, 分析 NKD1 表达与患者预后的相关性。采用 UCSC 数据库 (<http://xena.ucsc.edu/>) 数据库获取泛癌分析数据, 癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 获取乳腺癌 miRNA 数据和 RNA-seq 数据, 高通路基

因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据集 GSE37963 获取乳腺癌转录组 miRNA 芯片测序数据。使用 R 语言 “clusterProfiler” 包将 *NKD1* 根据基因表达量中位数划分为高低表达样本组进行 GSEA 分析, 共进行置换检验计算归一化富集分数 (normalized enrichment score, NES)。加权基因共表达网络分析 (Weighted Gene Co-Expression Network Analysis, WGCNA) 构建基因共表达网络筛选与乳腺癌表型相关的 miRNA 模块。使用 R 语言 “limma” 包和 “DEseq2” 包, 以 $|\log_2FC| > 1$ 和 $FDR < 0.05$ 筛选差异表达 miRNA。使用在线生物信息学数据库 miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) 预测靶向目标基因 *NKD1* 的 miRNAs 分子, 与 TCGA 和 GEO 数据库筛选最佳模块和差异 miRNA 进行 Venn 分析, 确定最优靶向 *NKD1* 的 miRNA 为 miR-107。经 TargetScan (<https://www.targetscan.org/>) 分析验证 *NKD1* 上游 miR-107 的结合性能。Pearson 分析 *NKD1* 与 miR-107 的相关性。

1.3 转录组测序分析

通过瞬时转染法构建敲低细胞模型, 利用 Advanced Transfection Reagent 转染试剂将 *NKD1* siRNA 转染至 MDA-MB-231 细胞, 设对照组 (control 组)、si*NKD1* 组, 提取 RNA 后使用欧易云平台进行测序及生物信息学分析。采用 DESeq2 软件分析转录组差异表达基因, 筛选标准为差异倍数 (fold change, FC) ≥ 1.5 且 $P < 0.05$ 。超几何检验分析通路显著性富集, 识别与整体基因组背景相比具有显著性差异的通路分布。

1.4 细胞转染与分组

MDA-MB-231 细胞按 1.2×10^5 /孔接种于 12 孔板, 待贴壁融合度至 50% 时, 采用 Advanced Transfection Reagent 将 *NKD1* siRNA 瞬时转染至细胞中, 设对照组 (control 组)、si*NKD1* 组, 48 h 后收集细胞进行后续验证。设计并构建 miR-107 mimics、miR-107 inhibitor 及其阴性对照质粒, 将其分别转染至细胞中。为探索 *NKD1* 联合 miR-107 对细胞 OXPHOS 的影响, 设对照组 (control 组)、si*NKD1* 组、miR-107 inhibitor 组、si*NKD1*+miR-107 inhibitor 组, 完成共转染实验, 将转染试剂与目的基因同比例转染至细胞 (各 8 μ L), 48 h 收集转染后的细胞, 通过实时定量反转录聚合酶链反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测

RNA 表达和蛋白水平。

1.5 Western blot 检测蛋白表达

收集各组细胞沉淀, 加入放射免疫沉淀分析 (radio-immunoprecipitation assay, RIPA) 细胞裂解液裂解细胞并利用全蛋白提取试剂盒提取总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。按比例加入 5 \times 上样缓冲液配制成蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离蛋白, 将目的蛋白切胶后转移至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF), 用 5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 2 h。按照抗体说明书加入 *NKD1*、c-Myc、IDH2、 β -catenin、Axin、GSK-3 β 抗体 (稀释比 1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 温育过夜, TBST 清洗后加入二抗于室温下温育 1 h, 用 TBST 洗膜后加入增强电化学发光液 (electrochemiluminescence, ECL) 进行凝胶成像曝光显影, 以 GAPDH 为内参检测蛋白质的表达水平。

1.6 qRT-PCR 检测 miRNA 及 mRNA 表达

收集肿瘤组织、癌旁组织和对数生长期细胞, 使用 TRIzol 试剂提取组织和细胞总 RNA, 按照 cDNA 反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 参照试剂盒分别扩增 miR-107 和 *NKD1* 基因。miRNA 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 180 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 循环 45 次; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 97 $^{\circ}$ C 15 s, 循环 1 次。mRNA 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共扩增 40 个循环。分别以 *U6* 和 *GAPDH* 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 测定目的基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列

Tab. 1 Gene primer sequence

Gene primer	Prime sequence (3'-5')
miR-107-forward	ATGATGAGCAGCATTGTACAGG
miR-107-reverse	GCAGGGTCCGAGGTATTC
<i>NKD1</i> -forward	GCCTTGGTGGTGTATGAGAG
<i>NKD1</i> -reverse	CTGGTAGAAGTGGTGGTAATGG
<i>GAPDH</i> -forward	TGTTGCCATCAATGACCCCTT
<i>GAPDH</i> -reverse	CTCCACGACGTACTCAGCG
<i>U6</i> -forward	TGCCCCACATAATGCTACC
<i>U6</i> -reverse	TATGTCCGTCTGTGGAAACC

1.7 CCK-8检测细胞增殖活力

取对数生长期的各组MDA-MB-231细胞接种于96孔板,每组设5个复孔,PBS进行封边。细胞贴壁后加入OXPHOS抑制剂(IACS-010759, 1 $\mu\text{mol/L}$),分别于24、48、72和96 h移除细胞上清液,加入CCK-8试剂20 μL ,于培养箱中温育2 h。使用酶标仪测定450 nm波长处每孔的吸光度(D)值,绘制细胞生长曲线,计算细胞抑制率。

1.8 双荧光素酶报告基因实验

利用NCBI数据库获取NKD1基因序列,通过RNAhybrid 2.2软件预测miR-107与NKD1-3'-UTR的碱基结合位点。构建包含预测结合位点野生型(pmirGLO-NKD1-WT)质粒,根据结合位点设计突变引物,构建突变型(pmirGLO-NKD1-Mut)质粒。接种HEK293T细胞于12孔板,将NKD1-WT和NKD1-Mut质粒转染至HEK-293T细胞,同时与miR-107 mimics和阴性对照(mimics NC)进行共转染。继续培养6 h后更换为DMEM完全培养基,48 h后冰上裂解细胞,收集裂解液,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书加入对应的荧光素酶反应液,分别测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶的活性,计算相对荧光强度。

1.9 统计学处理

采用GraphPad 9和IBM SPSS 22.0软件进行统计学分析,正态计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,配对设计采用配对 t 检验。非正态分布的两组独立样本比较采用非参数Mann-Whitney U 检验(秩和检验),数据以中位数(四分位数间距)表示,组间差异以平均秩和 P 值描述。检验水准为 $\alpha=0.05$,采用双侧检验,并在结果中给出精确 P 值。多组均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较使用LSD- t 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NKD1在乳腺癌中低表达且与患者预后呈正相关

纳入TNM数据集(<https://tnmplot.com/>)分析结果显示,NKD1在乳腺癌组织($n=1\ 095$)中较正常组织($n=403$)低表达(图1A, $P<0.01$);根据GSE16446数据集绘制生存曲线,显示NKD1低表达患者预后更差(图1B, $P<0.05$)。Western blot结果显示,与人正常乳腺上皮细胞MCF-10A相比,NKD1在乳腺癌细胞T47D、MDA-MB-231、MCF-7、BT474中表达下调(图1C)。

本研究共纳入10对乳腺癌组织及癌旁组织配对样本。纳入及排除标准见图2。根据纳入排除标准,从宁夏医科大学总医院肿瘤外科收集10对乳腺癌癌组织及配对的癌旁组织标本,qRT-PCR及Western blot结果显示,与癌旁组织(N)相比,癌组织(T)中NKD1 mRNA及蛋白表达均下调(图1D、1E)。

2.2 NKD1与Wnt/ β -catenin信号转导通路密切相关

通过转染siRNA构建NKD1敲低细胞模型,Western blot结果显示,NKD1蛋白表达在siNKD1-2、siNKD1-3组较对照组(control)降低(图3A),后续实验选择siNKD1-3进行转染;RNA-seq结果显示,与control组相比,敲低组共筛选出140个上调基因和123个下调基因(图3B),对筛选出的所有差异表达基因进行GO和KEGG分析,差异表达基因显著富集于Wnt、OXPHOS、线粒体呼吸链等生物学功能及信号转导通路(图3C、D)。Western blot检测结果显示,与control组相比,siNKD1组Wnt/ β -catenin信号转导通路中Axin蛋白表达水平降低, β -catenin和GSK-3 β 蛋白表达水平升高(图3E、F)。

2.3 NKD1与OXPHOS通路密切相关

根据NKD1基因表达量进行GSEA富集分析,结果显示,NKD1相关基因显著富集于ATP生物合成、线粒体呼吸链、OXPHOS途径,且OXPHOS信号转导通路受NKD1调控最显著($ES=-0.670\ 2$, $FDR=4.932e^{-9}$,图4A);GO生物过程富集分析发现,OXPHOS是NKD1调控乳腺癌代谢的核心通路(图4B);Pearson分析证实NKD1表达与OXPHOS途径呈负相关($r=-0.253$, $P<0.001$,图4C);Western blot结果显示,与control组相比,siNKD1组c-Myc和IDH2蛋白表达升高(图4D、F);利用OXPHOS抑制剂(IACS-010759, 1 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞,CCK-8结果表明,IACS-010759抑制剂可抑制细胞生长,联合敲低NKD1后,对细胞生长的抑制作用有所恢复(图4E)。

2.4 WGCNA分析筛选与乳腺癌表型相关的核心miRNA模块

通过对TCGA-BRCA和GEO(GSE37963)数据库转录组数据进行WGCNA分析,基于平均分层聚类和动态剪切树分析,将具有相似表达的基因聚集到相同色块(图5A、B)。TCGA数据共鉴定5个聚类模块,GEO数据共鉴定7个聚类模块,其中,TCGA-ME brown模块(相关性系数0.78, $P<0.001$)和GEO-ME blue模块($r=0.23$, $P>0.05$)与乳腺癌表型相关度最高(图

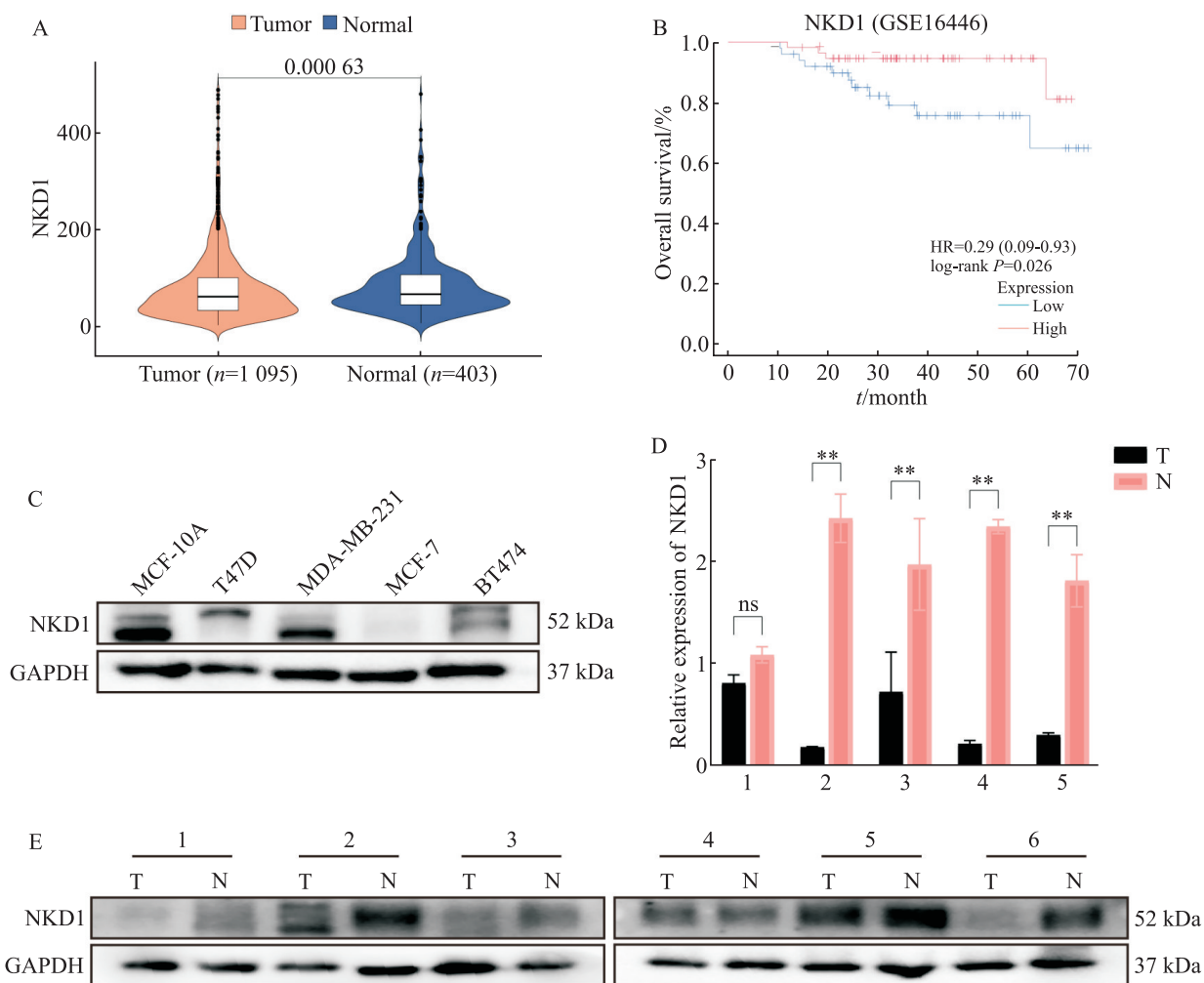


图1 NKD1在乳腺癌中表达及与患者预后相关性

Fig. 1 Expression of NKD1 in breast cancer and its prognosis correlation with patients

A: NKD1 expression in breast tumor versus normal tissues as analyzed based on TNM database; B: Kaplan-Meier lotter analysis for the overall survival based on NKD1 expression (GSE16446). C: Western blot analysis was used to verify NKD1 protein expression levels in normal breast (MCF-10A) vs breast cancer the cell lines (T47D, MDA-MB-231, MCF-7, BT474) ; D: qRT-PCR was performed to detect the mRNA expression of NKD1 in breast cancer tissues. The numbers on the horizontal axis represented paired cancer and adjacent tissues; E: NKD1 protein expression in breast cancer tissues validated by Western blot. N: Normal; T: Tumor; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$.

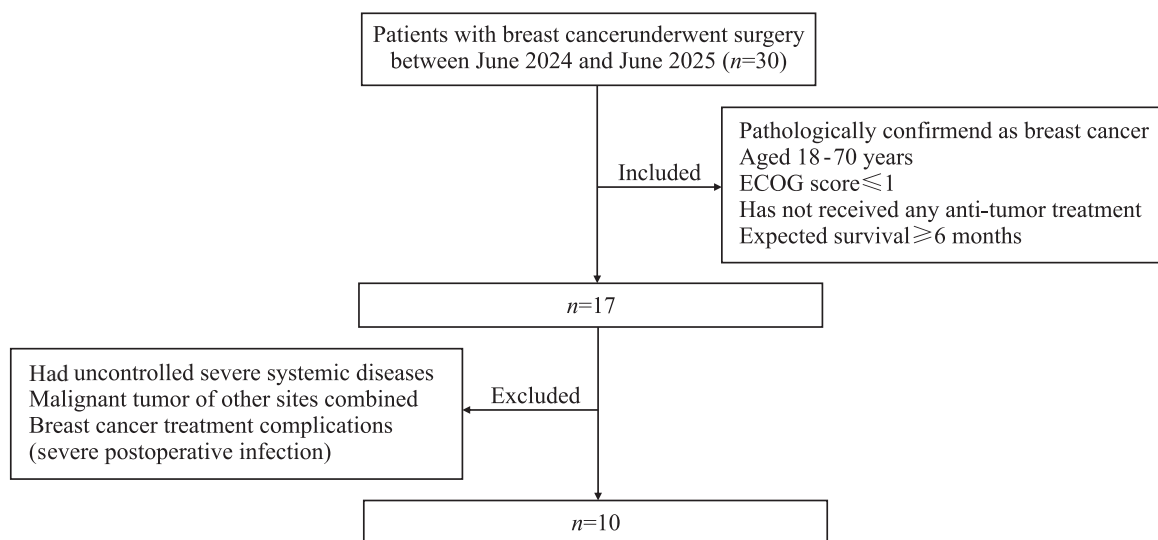


图2 患者纳入和排除标准的流程图

Fig. 2 Flow diagram of participant selection

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.

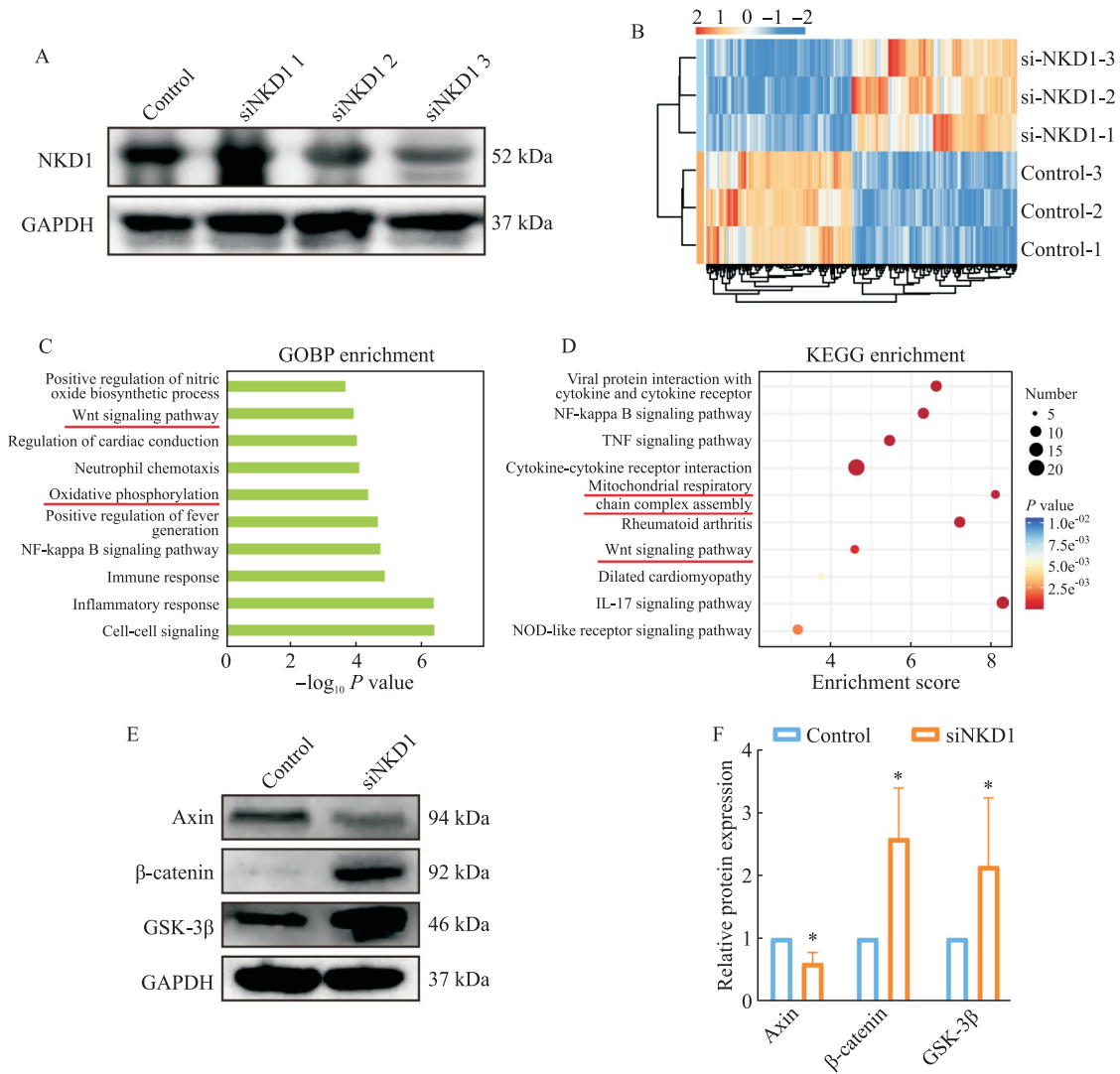


图3 NKD1与Wnt/β-catenin信号转导通路密切相关

Fig. 3 NKD1 is closely related to the Wnt/β-catenin signal transduction pathway

A: Western blot verified the knockdown effect of NKD1 protein in MDA-MB-231; B: Heatmap visualization of differential gene clustering analysis results from RNA-seq; C: Perform GOBP enrichment analysis on differentially expressed genes; D: Perform pathway analysis of differentially expressed protein-coding genes using the KEGG database; E, F: Western blot detection of Wnt/β-catenin pathway protein expression levels after *NKD1* knockdown. *: $P < 0.05$.

5C、D)。以 $|\log_2FC| > 1$ 和 $FDR < 0.05$ 为阈值，筛选乳腺癌与癌旁组织之间差异表达的miRNA，聚类热图展示TCGA-ME brown模块和GEO-ME blue模块top20差异表达miRNA(图5E、F)。

2.5 数据库筛选靶向NKD1的miRNA

通过miRWalk预测与*NKD1* 3'-UTR端结合且得分为1的所有miRNA，富集到上游miRNA共825个，经与下游重合部分降重后得到716个miRNA。将其与TCGA和GEO筛选的差异基因进行Venn分析，共富集5个miRNA可能潜在靶向NKD1(图6A)，分别为miR-107、miR-140-3p、miR-940、miR-1976、miR-4286(图6B)。将TCGA-ME brown模块、GEO-ME blue模块、*NKD1*上游关联miRNA以及TCGA和GEO中差异表达的miRNA进行Venn分析，共富集1个

miRNA为miR-107(图6C)。TargetScan网站预测结果提示miR-107与*NKD1*存在结合位置域(图6D)。Pearson分析结果显示，*NKD1*与miR-107在乳腺癌中表达呈负相关($r = -0.093$, $P < 0.001$;图6E)。以上结果表明，miR-107可能为*NKD1*上游核心miRNA。

2.6 miR-107在乳腺癌中的表达及与患者的预后相关性

TCGA泛癌分析显示，miR-107在多种肿瘤组织中表达较正常组织显著上调，包括乳腺癌(BRCA)、胃癌(STAD)、子宫内膜癌(UCEC，图7A)；纳入TCGA数据库和GSE37963数据集分析结果显示，肿瘤组织miR-107表达水平显著高于正常组织(图7B, $P < 0.05$)；根据GSE40267数据集绘制生存曲线，结果显示，miR-107高表

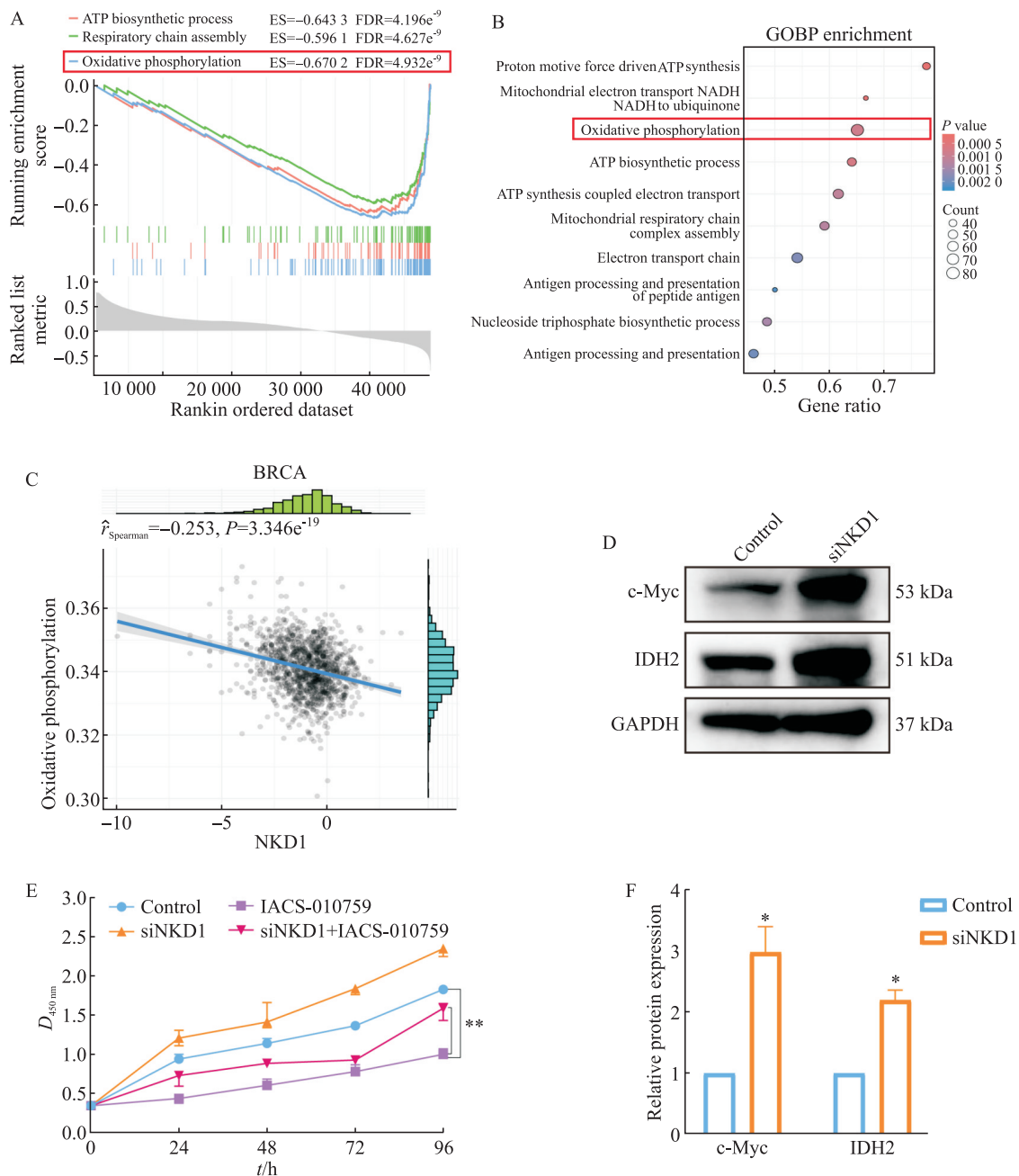


图4 NKD1与OXPHOS通路密切相关

Fig. 4 NKD1 is closely related to the mitochondrial oxidative phosphorylation

A: GSEA enrichment analysis results of oxidative phosphorylation pathway based on NKD1 expression ratio; B: Bubble chart showing the top 10 significantly enriched GOBP terms were associated with NKD1; C: Pearson correlation analysis between NKD1 expression and oxidative phosphorylation activity; D: Western blot analysis of the expression levels of proteins in the mitochondrial oxidative phosphorylation pathway after *NKD1* knockdown; E: CCK-8 assay showed the growth rate of different groups of cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ IACS-010759. *: $P < 0.05$, compared with control group; **: $P < 0.01$, compared with control group.

达患者预后更差 (图7C, $P < 0.05$)。以上结果表明, miR-107在乳腺癌中高表达且与患者预后不良相关。

2.7 miR-107通过3'-UTR靶向NKD1调控OXPHOS

qRT-PCR和Western blot检测结果显示,与NC组相比,miR-107 mimics组miR-107表达上调,NKD1表达下调;相反miR-107 inhibitor组miR-107表达下调,NKD1表达上调(图8A~C,

$P < 0.05$); TargetScan预测结果显示,miR-107与NKD1基因3'-UTR存在靶向结合序列(图8D);双荧光素酶实验结果显示,NKD1-WT组miR-107 mimics共转染组较mimics NC共转染组荧光素酶活性明显降低,而NKD1-MUT组荧光素酶活性差异无统计学意义(图8E)。以上结果提示miR-107通过3'-UTR靶向调控NKD1表达,二者表达呈负相关。将siNKD1与miR-107 inhibitor共转染检测对细胞OXPHOS的影响,Western blot

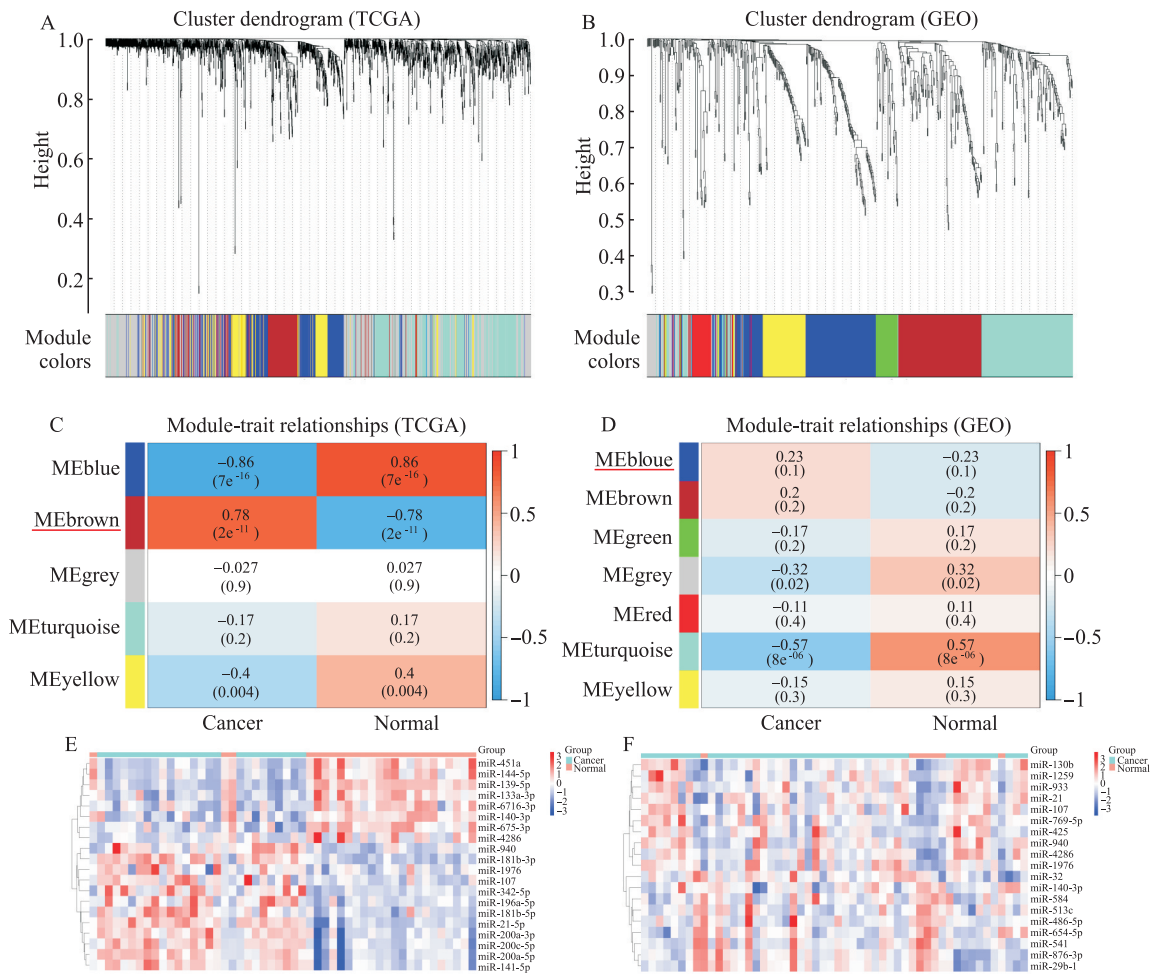


图5 WGCNA分析筛选与乳腺癌表型相关的核心 miRNA 模块

Fig. 5 WGCNA analysis screened breast cancer-related miRNAs modules

Cluster dendrogram of TCGA (A) and GEO GSE37963 (B) datasets, showing gene hierarchical clustering (top) and different gene modules (bottom); Module-trait correlations of TCGA (C) and GSE37963 (D), displaying correlation coefficients and *P* values (red means positive correlation, blue means negative correlation; color intensity indicates correlation strength); Cluster heatmap of the top20 differential miRNA expression from the TCGA-brown (E) and GEO-blue (F) datasets.

结果显示，与 control 组相比，miR-107 inhibitor 组 c-Myc 和 IDH2 蛋白表达降低，siNKD1 组表达升高，而二者联合组 c-Myc 和 IDH2 蛋白表达有所回复 (图 8F、G)。

3 讨论

乳腺癌综合治疗的发展仍未有效地控制复发、转移问题，因此亟待深入研究其分子机制以发掘新的治疗靶点与预后标志物。NKD1 广泛表达于多种重要脏器细胞质中，在乳腺癌中发挥抑癌基因的调控作用。苗玉等^[19]研究发现乳腺癌中 NKD1 低表达与肿瘤高侵袭相关。本研究结果显示，NKD1 在乳腺癌中低表达，且与患者预后呈正相关，这与上述研究结果一致。为了进一步探究 NKD1 参与调控乳腺癌恶性进展的分子机制，本研究通过 RNA-Seq 分析发现敲低 NKD1 后，差异表达基因显著富集 Wnt/ β -catenin 信号转

导通路和 OXPHOS 过程。NKD1 作为 Wnt 信号转导通路抑制剂发挥其负向调控作用。我们通过体外实验验证发现敲低 NKD1 促进 Axin 降解，增加 β -catenin、GSK-3 β 蛋白表达，即 NKD1 缺失可增强 Wnt/ β -catenin 信号转导通路活性。

乳腺癌作为高度异质性的恶性肿瘤，其进展与代谢重编程密切相关。通常肿瘤细胞线粒体表现为高度活跃的 OXPHOS 状态，其异常激活与肿瘤侵袭、转移和耐药性相关，发挥调控细胞通讯、促进肿瘤进展的重要作用^[20]。本研究采用 GSEA 富集分析，显示 NKD1 相关差异基因显著富集于 ATP 生物合成、线粒体呼吸链、OXPHOS 途径，且信号转导通路受 NKD1 调控最显著，二者活性呈负相关。体外结果进一步证实敲低 NKD1 促进 c-Myc 和 IDH2 蛋白表达水平升高。c-Myc 是调控细胞 OXPHOS 的核心转录因子，激活 c-Myc 及下游分子 IDH2 可上调肿瘤细胞 OXPHOS 水平^[21]。研究^[22]表明，SNX17 通过调

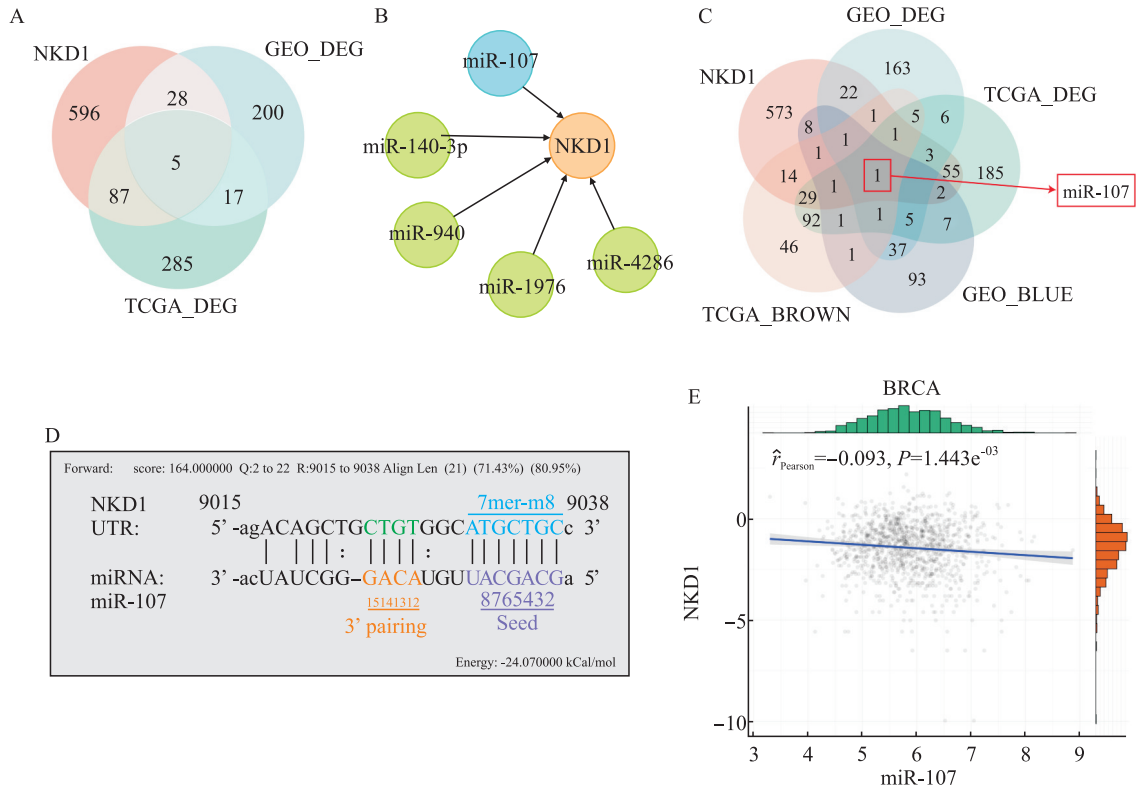


图6 数据库筛选靶向NKD1的miRNA

Fig. 6 The database screened miRNA molecules targeting NKD1

A: Screening of candidate miRNAs through Venn analysis of miRWalk predictions and TCGA/GEO data; B: Selection of 5 potential NKD1-targeting miRNAs with a score >1; C: Identification of core miRNA miR-107 by Venn analysis of five datasets; D: Prediction of miR-107 binding sites on NKD1 by TargetScan; E: Pearson correlation analysis of NKD1 and miR-107 expression. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

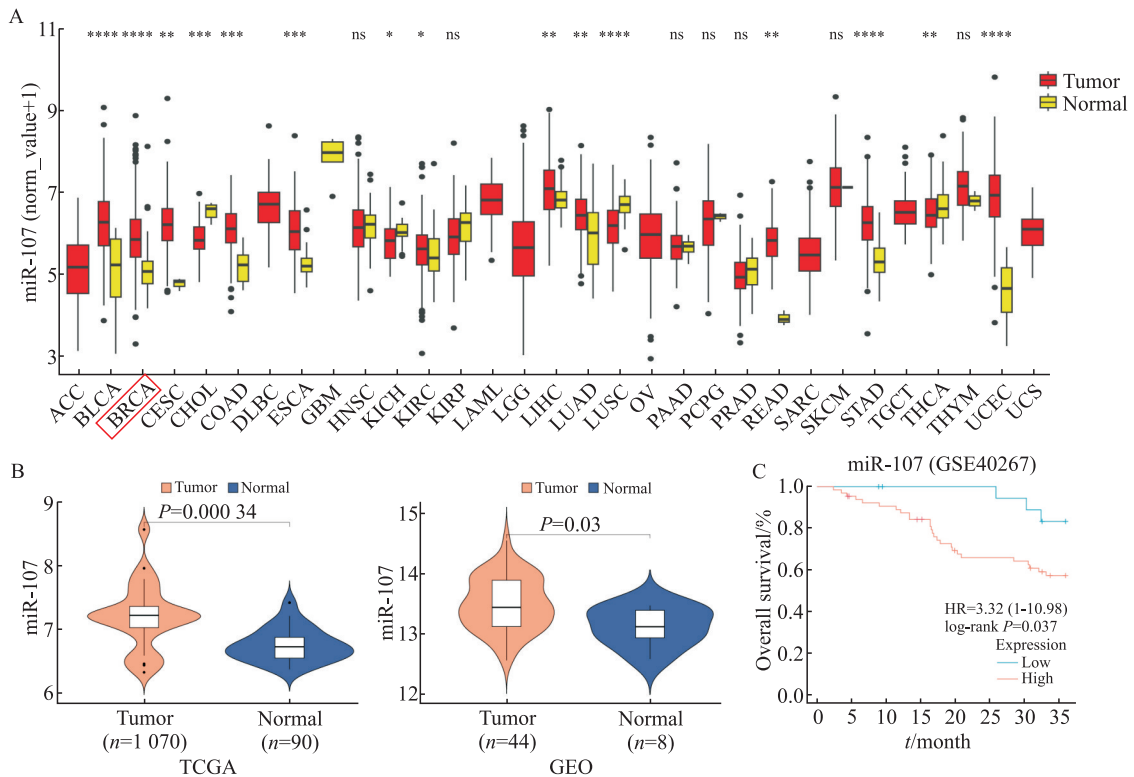


图7 乳腺癌中miR-107的表达及与患者的预后相关性

Fig. 7 Expression of miR-107 in breast cancer and its prognosis correlation with patients

A: Pan-cancer expression profile of miR-107 based on TCGA database; B: miR-107 expression in breast tumor versus normal tissues was analyzed based on TCGA and GSE37693 dataset; C: Kaplan-Meier lotter analysis for the overall survival based on miR-107 (GSE40267 dataset).

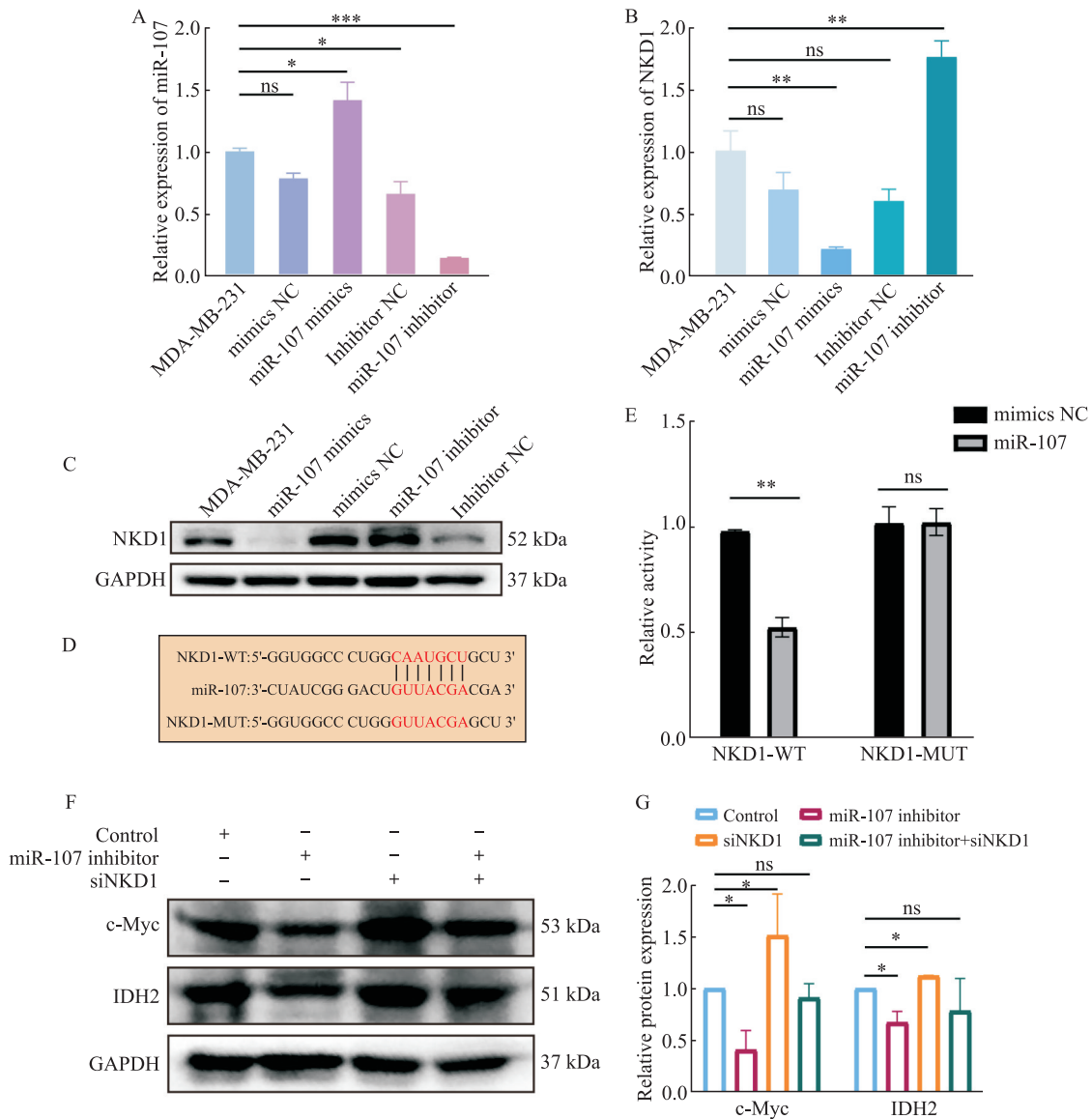


图8 miR-107靶向NKD1调控乳腺癌细胞氧化磷酸化

Fig. 8 miR-107 modulates breast cancer OXPHOS via NKD1 signaling

A: qRT-PCR analysis of miR-107 expression after cell transfection; B: qRT-PCR was used to analyze the effect of miR-107 on NKD1 mRNA expression; C: Western blot analysis of NKD1 protein expression upon modulation of miR-107; D: Schematic diagram of the predicted binding site of miR-107 on the NKD1 3'-UTR and the mutant constructs; E: Dual-luciferase reporter assay confirmed miR-107 targeting NKD1 via 3'-UTR; F, G: Western blot analysis was used to detect the expression levels of oxidative phosphorylation-related proteins after *NKD1* knockdown and inhibition of miR-107. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, $n = 3$.

节 c-Myc 促进肝细胞癌细胞 OXPHOS。

近年来，miRNA 分子在肿瘤恶性进展中发挥的作用逐渐被揭示^[23]，本研究首先通过 WGCNA 分析筛选与乳腺癌表型相关的核心 miRNA 模块，利用生信数据库预测靶向 *NKD1* 的上游 miRNA 分子为 miR-107。研究^[24]表明，miR-107 在多种癌症中高表达，通过靶向多个信号转导通路和 mRNA 分子调控肿瘤细胞增殖转移等生物学行为。在本研究中，通过 TCGA 和 GEO 数据库发现 miR-107 在乳腺癌中高表达，与患者预后呈负相关。进一步通过双荧光素酶报告基因实验证实，miR-107 可直接结合 *NKD1* mRNA 的 3'-UTR 区并抑制其表达，与 *NKD1* mRNA 呈负相

关。有研究^[25]报道，miR-107 通过靶向 LDHA 减少乳酸堆积，间接增强线粒体有氧呼吸，同时上调泛酸激酶 (PanK) 加速辅酶 A 合成，为 TCA 循环和电子传递链提供充足底物，从而正向调控 OXPHOS。本研究结果发现，抑制 miR-107 导致 c-Myc 和 IDH2 蛋白表达降低，而联合敲低 *NKD1* 可以有效地逆转对 OXPHOS 的抑制作用。

在乳腺癌中，活跃的 OXPHOS 不仅是 ATP 的主要供给途径，还通过强化抗氧化防御、激活促存活信号等多重机制，协同构建支撑肿瘤增殖、转移与耐药的核心代谢框架^[26-27]。本研究发现，在乳腺癌中 miR-107 通过靶向 Wnt 通路关键抑制基因 *NKD1*，解除对 β -catenin 的抑制，进而

上调 c-Myc 及 IDH2 表达, 最终激活 OXPHOS。揭示了全新的 miR-107/NKD1/c-Myc/OXPHOS 调控轴, 为理解 miR-107 调控 OXPHOS 在乳腺癌中发挥促癌作用提供了新的视角。

综上所述, 本研究揭示了 miR-107 通过靶向抑制 NKD1 激活 Wnt- β -catenin 信号, 促进乳腺癌细胞 OXPHOS 的分子机制。本研究结果为确立基于代谢干预的精准治疗策略提供了新的线索。

第一作者:

王嘉 (ORCID: 0000-0001-9800-4277), 医学学士, 助理实验师。

通信作者:

肖雯 (ORCID: 0009-0000-4776-5500), 硕士研究生, 住院医师, E-mail: xiaowen631126@163.com。

作者贡献声明:

王嘉: 操作实验, 科研绘图, 撰写文章; 刘丹: 文献调研与整理; 石斌: 收集并整理数据; 马小兰: 生物信息学分析; 肖雯: 设计实验, 修改文章, 论文审校。

[参考文献]

- [1] GIAQUINTO A N, SUNG H, NEWMAN L A, et al. Breast cancer statistics 2024[J]. CA A Cancer J Clin, 2024, 74(6): 477-495.
- [2] ONKAR S S, CARLETON N M, LUCAS P C, et al. The great immune escape: understanding the divergent immune response in breast cancer subtypes [J]. Cancer Discov, 2023, 13(1): 23-40.
- [3] ZHANG H L, LU B J. microRNAs as biomarkers of ovarian cancer[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2020, 20(5): 373-385.
- [4] ALCALÁ S, VILLARINO L, RUIZ-CAÑAS L, et al. Targeting cancer stem cell OXPHOS with tailored ruthenium complexes as a new anti-cancer strategy[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2024, 43(1): 33.
- [5] DAI M, ZHANG D H. PRDX6 drives breast cancer progression through mitochondrial biosynthesis and oxidative phosphorylation [J]. Cancer Med, 2025, 14(13): e71005.
- [6] LIU J Q, XIAO Q, XIAO J N, et al. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 3.
- [7] BELL I, KHAN H, STUTT N, et al. Nkd1 functions downstream of Axin2 to attenuate Wnt signaling [J]. MBoC, 2024, 35(7): ar93.
- [8] ZHOU Y J, HUANG Q, YUAN X H, et al. m6A-mediated upregulation of miR-3690 drives HNSCC progression by regulating nuclear-cytoplasmic signaling pathway [J]. Cell Mol Life Sci, 2025, 82(1): 379.
- [9] CAO J, TAO X, SHI B, et al. NKD1 targeting PCMI regulates the therapeutic effects of homoharringtonine on colorectal cancer [J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(8): 6543-6556.
- [10] 石斌, 王嘉, 马荣, 等. NKD1调控Wnt/ β -catenin信号转导通路影响结肠肿瘤细胞周期的机制研究[J]. 宁夏医学杂志, 2023, 45(5): 393-397.
- SHI B, WANG J, MA R, et al. Study on the mechanism of NKD1 regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway affecting colorectal cancer cell cycle[J]. Ningxia Med J, 2023, 45(5): 393-397.
- [11] 刘迁, 戴宇阳, 于华裔, 等. NKD1可促进结肠癌细胞的葡萄糖吸收: 基于激活YWHAE基因的转录活性[J]. 南方医科大

学学报, 2023, 43(4): 585-589.

- LIU Q, DAI Y Y, YU H Y, et al. NKD1 promotes glucose uptake in colon cancer cells by activating YWHAE transcription [J]. J South Med Univ, 2023, 43(4): 585-589.
- [12] DAI Y Y, LIU J S, LI X Y, et al. Let-7b-5p inhibits colon cancer progression by prohibiting APC ubiquitination degradation and the Wnt pathway by targeting NKD1[J]. Cancer Sci, 2023, 114(5): 1882-1897.
- [13] LI L J, GAO R Y, HUANGFU W Z, et al. Clinical significance of NKD1 inhibitor of WNT signaling pathway 1 (NKD1) in glioblastoma[J]. Genet Res, 2023, 2023: 1184101.
- [14] LV Y X, DUANMU J Z, FU X R, et al. Identifying a new microRNA signature as a prognostic biomarker in colon cancer [J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0228575.
- [15] MUSTAFOV D, AHMAD M S, SERRANO A, et al. microRNA: Siglec crosstalk in cancer progression[J]. Curr Opin Chem Biol, 2024, 81: 102502.
- [16] PAN H, PENG H W, DAI Y, et al. Effects of miR-107 on breast cancer cell growth and death via regulation of the PTEN/AKT signaling pathway[J]. J Oncol, 2023, 2023(1): 1244067.
- [17] FAN Y F, LI H X, YU Z P, et al. Long non-coding RNA FGD5-AS1 promotes non-small cell lung cancer cell proliferation through sponging hsa-miR-107 to up-regulate FGFR1 [J]. Biosci Rep, 2020, 40: BSR20193309.
- [18] LIU H, ZHENG J, REN Z D, et al. miR-107 modulates EMT progression of OSCC by targeting SNCG and inhibiting the ERK/NF- κ B signaling pathways[J]. J Transl Med, 2025, 23(1): 881.
- [19] 苗玉, 张欣, 邢荣格, 等. 乳腺癌组织NKD1与 β -catenin表达临床意义[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(4): 233-238.
- MIAO Y, ZHANG X, XING R G, et al. NKD1 and β -catenin expression in the breast cancer tissue and its significance [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2019, 26(4): 233-238.
- [20] GREENE J, SEGARAN A, LORD S. Targeting OXPHOS and the electron transport chain in cancer; Molecular and therapeutic implications[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86(Pt 2): 851-859.
- [21] LEE K M, GILTANE J M, BALKO J M, et al. MYC and MCL1 cooperatively promote chemotherapy-resistant breast cancer stem cells via regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation[J]. Cell Metab, 2017, 26(4): 633-647.e7.
- [22] LIU Y Q, TIAN W, GE C, et al. SNX17 mediates STAT3 activation to promote hepatocellular carcinoma progression via a retromer dependent mechanism [J]. Int J Biol Sci, 2025, 21(6): 2762-2779.
- [23] HO P T B, CLARK I M, LE L T T. microRNA-based diagnosis and therapy[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7167.
- [24] ZHUANG Y, WANG S G, FEI H D, et al. miR-107 inhibition upregulates CAB39 and activates AMPK-Nrf2 signaling to protect osteoblasts from dexamethasone-induced oxidative injury and cytotoxicity[J]. Aging, 2020, 12(12): 11754-11767.
- [25] NOLFI-DONEGAN D, BRAGANZA A, SHIVA S. Mitochondrial electron transport chain: oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement [J]. Redox Biol, 2020, 37: 101674.
- [26] HE P, FENG J J, XIA X T, et al. Discovery of a potent and oral available complex I OXPHOS inhibitor that abrogates tumor growth and circumvents MEKi resistance [J]. J Med Chem, 2023, 66(9): 6047-6069.
- [27] ZHAO Z Y, MEI Y, WANG Z Y, et al. The effect of oxidative phosphorylation on cancer drug resistance[J]. Cancers, 2023, 15(1): 62.

(收稿日期: 2025-10-09 修回日期: 2026-04-01)

(责任编辑: 王琳辉)