

doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2021.16.013

沉默 LncRNA TUG1 通过上调 miR-214-5p 表达增加乳腺癌细胞的放射敏感性

孙露阳^① 葛锁华 彭俊华 周 红^② (江苏大学附属金坛医院检验科,常州 213200)

中图分类号 R737.9 文献标志码 A 文章编号 1000-484X(2021)16-1984-07

[摘要] 目的:探讨长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1(LncRNA TUG1)对乳腺癌细胞放射敏感性的影响并探究其可能作用机制。方法:选取 2015 年 4 月至 2016 年 3 月于本院就诊的 45 例乳腺癌患者为研究对象,根据放疗后病灶变化情况分为放射敏感组(25 例)与放射抵抗组(20 例),qRT-PCR 检测两组患者乳腺癌组织中 TUG1 表达水平。构建放射抵抗的乳腺癌细胞 MCF-7R,通过不同剂量 X 射线照射 MCF-7R 细胞与乳腺癌 MCF-7 细胞,qRT-PCR 检测 MCF-7R、MCF-7 细胞及人乳腺上皮细胞 MCF-10A 中 TUG1 的表达量。实验将 MCF-7R 细胞分为沉默 TUG1 组、沉默对照组、过表达 miR-214-5p 组、过表达 miR-NC 组、沉默 TUG1+抑制 miR-NC 组、沉默 TUG1+抑制 miR-214-5p 组。双荧光素酶报告实验验证 TUG1 与 miR-214-5p 的靶向作用关系。细胞克隆实验检测各组 MCF-7R 细胞存活率的影响;流式细胞术实验检测各组 MCF-7R 细胞的凋亡率。结果:TUG1 在 MCF-7R 细胞中的表达水平较 MCF-10A、MCF-7 细胞明显升高;沉默 TUG1 表达可降低 MCF-7R 细胞存活,促进细胞凋亡;TUG1 可负向调控 miR-214-5p 表达;miR-214-5p 在 MCF-7R 细胞中的表达水平较 MCF-10A、MCF-7 细胞明显降低,miR-214-5p 过表达可减少 MCF-7R 细胞存活分数,促进放射诱导的乳腺癌细胞凋亡;但抑制 miR-214-5p 表达可增加 MCF-7R 细胞存活分数,抑制细胞凋亡。结论:沉默 TUG1 可通过上调 miR-214-5p 表达进而增加乳腺癌细胞的放射敏感性。

[关键词] 乳腺癌;放射敏感性;LncRNA TUG1;miR-214-5p

Silencing LncRNA TUG1 increases radiosensitivity of breast cancer cells by upregulating expression of miR-214-5p

SUN Lu-Yang, GE Suo-Hua, PENG Jun-Hua, ZHOU Hong. Department of Laboratory, School of Medicine, Jiangsu University, Affiliated Jintan Hospital of Jiangsu University, Changzhou 213200, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of long noncoding ribonucleic acid taurine up-regulated gene 1 (LncRNA TUG1) on the radiosensitivity of breast cancer cells and explore its possible mechanism. **Methods:** 45 breast cancer patients who were admitted to our hospital from April 2015 to March 2016 were selected as subjects. According to the changes of lesions after radiotherapy, radiation-sensitive group (25 cases) and radiation resistance group (20 cases) were selected. Expression levels of TUG1 in breast cancer tissues of the two groups were tested by qRT-PCR. Radiation-resistant breast cancer cell MCF-7R was constructed, and MCF-7R cells and breast cancer MCF-7 cells were irradiated by different doses of X-rays. qRT-PCR was used to detect expressions of TUG1 in MCF-7R, MCF-7 cells and human mammary epithelial cells MCF-10A. MCF-7R cells were divided into silencing TUG1 group, silencing control group, overexpressing miR-214-5p group, overexpressing miR-NC group, silencing TUG1+inhibiting miR-NC group, and silencing TUG1+suppressing miR-214-5p group. Dual luciferase reporter assay validated the targeting relationship between TUG1 and miR-214-5p. The cell clone assay was used to detect survival rate of MCF-7R cells in each group. Apoptosis rate of MCF-7R cells in each group was detected by flow cytometry. **Results:** Expression level of TUG1 in MCF-7R cells was significantly higher than that in MCF-10A and MCF-7 cells. Silencing TUG1 expression can reduce the survival of MCF-7R cells and promote cell apoptosis. TUG1 can negatively regulate the expression of miR-214-5p. Expression level of miR-214-5p in MCF-7R cells was significantly lower than that of MCF-10A and MCF-7 cells. Overexpression of miR-214-5p reduced MCF-7R cell survival fraction and promoted radiation-induced apoptosis of breast cancer cells. However, inhibition of miR-214-5p expression increased MCF-7R cell survival fraction and inhibited apoptosis. **Conclusion:** Silencing TUG1 increased radiosensitivity of breast cancer cells by up-regulating miR-214-5p expression.

[Key words] Breast cancer; Radiosensitivity; LncRNA TUG1; miR-214-5p

①同时就读于江苏大学医学院,镇江 212000。

②通信作者,江苏大学医学院,镇江 212000, E-mail: hongzhou0123@163.com。

作者简介:孙露阳,男,主管技师,主要从事免疫学方面的研究, E-mail: sfq562@163.com。

乳腺癌是威胁女性生命安全的恶性肿瘤之一,随着现代社会节奏的加快,乳腺癌发病率逐年上升,已严重影响患者生活质量^[1]。目前乳腺癌的治疗方式为手术并辅以放疗或化疗,但术后患者预后差且极易发生转移^[2]。研究表明,长链非编码RNA牛磺酸上调基因1(long noncoding ribonucleic acid taurine up-regulated gene 1, LncRNA TUG1)可促进人乳腺癌细胞增殖和转移^[3]。LncRNA TUG1和微小RNA-145(microRNA-145, miR-145)间的双负反馈环促进人膀胱癌细胞的上皮间充质转换和放射抵抗性^[4]。下调LncRNA TUG1的表达可通过抑制HMGB1表达来增强膀胱癌的放射敏感性^[5]。然而,TUG1对乳腺癌细胞放射敏感性的影响仍然未知。miR-214可通过靶向抑制ATG12及其介导的自噬作用增加结直肠癌的放射敏感性^[6]。miR-214通过抑制自噬作用提高乳腺癌细胞对他莫昔芬和富维斯特的敏感性^[7]。然而,miR-214对乳腺癌放射敏感性的影响仍未完全阐明。starBase预测发现,TUG1与miR-214-5p具有互补结合的核苷酸位点,提示TUG1可通过充当miR-214-5p的海绵分子调控乳腺癌细胞的放射敏感性。因此,本研究通过检测TUG1的表达及其对乳腺癌细胞的放射敏感性及细胞凋亡的调控作用,探究TUG1与miR-214-5p的靶向作用关系及其可能的作用机制,为乳腺癌诊疗及提高治疗效果提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人乳腺上皮细胞MCF-10A与乳腺癌MCF-7细胞均自美国ATCC细胞库。RPMI1640培养基、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国Gibco公司;Lipofectamine2000转染试剂购自美国Thermo Fisher公司;TUG1干扰质粒、miR-214-5p mimics、miR-214-5p抑制剂(anti-miR-214-5p)及其各自相应的阴性对照购自上海吉玛生物科技有限公司;细胞凋亡检测试剂盒购自美国Sigma公司;Trizol试剂、反转录试剂盒及SYBR Green PCR Master Mix试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;双荧光素酶报告基因载体及其检测荧光素酶活性试剂购自美国Promega公司。

1.2 方法

1.2.1 研究对象及放射敏感性判定 选取2015年4月至2016年3月于本院就诊的45例乳腺癌患者为研究对象,所有患者均经手术病理证实为乳腺癌,年龄为42~65岁,平均为(55.26±5.36)岁。纳入标准:临床分期为Ⅲ~Ⅳ期;病理学诊断为乳腺浸润性

导管癌;患者入组前均未接受任何治疗;接受放疗并接受放疗后的临床评估;临床资料完整。排除标准:合并其他恶性肿瘤者;患有自身免疫性疾病者;肝、肾等重要组织器官严重损害者;依从性较差者。乳腺癌放射敏感性判定:根据放疗后病灶变化情况进行判定,放疗后原发肿瘤或部分肿瘤未出现未控及复发患者作为放射敏感组(25例),肿瘤未控及出现肿瘤复发患者作为放射抵抗组(20例),所有患者均于手术中切取乳腺癌组织,迅速放入液氮中,术后转移至-80℃超低温冰箱保存。

1.2.2 放射抵抗的乳腺癌细胞MCF-7R的建立 取对数生长期的乳腺癌MCF-7细胞,使用200 cGy射线照射细胞,37℃、5%CO₂培养箱继续培养,每隔24 h更换1次培养液,待存活的细胞处于对数生长期时进行传代培养,当细胞稳定传代后进行400 cGy射线照射细胞,重复上述步骤,依次给予600 cGy、800 cGy、1 000 cGy射线照射细胞,当累积剂量达到1 200 cGy时筛选具有稳定放射抵抗性表型的乳腺癌细胞系MCF-7R,MCF-7R细胞进行常规培养,待细胞稳定传代5代后进行后续实验。

1.2.3 细胞照射、转染及分组 人乳腺上皮细胞MCF-10A与乳腺癌MCF-7细胞、MCF-7R细胞培养于含10%胎牛血清与青霉素-链霉素混合溶液的RPMI1640培养基,置于恒温培养箱培养,取生长良好的细胞按照实验要求用不同剂量的X射线照射,照射条件为100 cm的源靶距,10 cm×10 cm的照射野,5 Gy/min的剂量率。同时取生长状态良好的MCF-7R细胞,胰蛋白酶消化细胞,调整细胞浓度为2×10⁵个/ml,接种于6孔板,待细胞培养细胞浓度达到80%左右参照Lipofectamine2000转染试剂说明书进行转染,将TUG1干扰表达质粒(TUG1 siRNA)及其阴性对照干扰质粒转染至MCF-7R细胞,分别记为沉默TUG1组(si-TUG1)、沉默对照组(si-control)。将miR-214-5p mimics及其相应阴性对照分别转染至MCF-7R细胞,分别记为过表达miR-214-5p组(miR-214-5p)、过表达miR-NC组(miR-NC),将miR-214-5p抑制剂(anti-miR-214-5p)及其阴性对照分别与TUG1 siRNA共转染至MCF-7R细胞,分别记为沉默TUG1+抑制miR-NC组(si+TUG1+anti-miR-NC)、沉默TUG1+抑制miR-214-5p组(si-TUG1+anti+miR-214-5p)。转染前1 d将培养基更换为Opti-MEM减血清培养基,转染6 h后弃转染液并将细胞培养基更换为含10%胎牛血清的RPMI1640完全培养基,继续培养。转染后48 h用4 Gy剂量照射各组细胞,

照射 48 h 后检测细胞凋亡。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 TUG1、miR-214-5p 表达 用 Trizol 试剂盒提取乳腺癌组织及各组细胞总 RNA,测定 RNA 浓度,利用反转录试剂盒合成 cDNA,反转录体系共 12 μ l: 2 μ g RNA(根据 RNA 浓度计算加入体积),1 μ l oligo(dT),4 μ l 反应缓冲液,1 μ l RNase 抑制剂,2 μ l dNTP,1 μ l 逆转录酶,ddH₂O 补足至 12 μ l。反应程序设定为 65℃ 5 min,42℃ 1 h,70℃ 5 min,反转录得到 cDNA,将 cDNA 置于-20℃ 冰箱保存。按照实时荧光定量 PCR 试剂盒配置 qRT-PCR 反应体系,反应体系共 20 μ l: SYBR 10 μ l,正反向引物各 0.8 μ l, cDNA 1 μ l,ddH₂O 补足至 20 μ l。置于实时荧光定量 PCR 仪检测,反应程序设定为 95℃ 5 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 TUG1 与 miR-214-5p 的相对表达量。

1.2.5 细胞克隆实验 收集各组 MCF-7 与 MCF-7R 细胞,胰蛋白酶消化细胞后接种于 6 孔板,分别用 0、2、4、6、8 Gy 不同照射剂量照射细胞,实验均设置 3 次重复,置于恒温培养箱中培养,待细胞克隆生长出现细胞克隆团时,PBS 洗涤 10 min×3 次,甲醇固定 20 min,0.5% 结晶紫染色 15 min,置于显微镜下观察有效克隆数,使用 GraphPad Prism 7 软件单机多靶计算增敏比(SER),细胞克隆形成率=(有效克隆数/接种细胞)×100%,细胞存活分数=受照射细胞克隆形成率/对照细胞克隆形成率×100%。

1.2.6 细胞凋亡检测 转染后各组 MCF-7R 细胞经 4 Gy 剂量照射 48 h,用预冷 PBS 洗涤细胞 5 min×2 次,加入 1×Binding Buffer 重悬细胞(100 μ l),调整细胞密度(2×10^5 个/ml),将 195 μ l 细胞悬液加入检测管内,依次分别加入 Annexin V-FITC 5 μ l,避光孵育 15 min,用 200 μ l 的 1×Binding Buffer 洗涤细胞,4℃ 条件下,1 000 r/min 离心 3 min,用 190 μ l 的 1×Binding Buffer 重悬细胞,加入 10 μ l PI,避光孵育 15 min,置于流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 双荧光素酶报告基因实验 运用生物信息学数据库对 TUG1 可能吸附的 miRNA 进行预测,结果发现 TUG1 可能吸附 miR-214-5p,将含有 miR-214-5p 结合位点的 TUG1 3'UTR 序列及其突变体插入荧光素酶报告基因载体中得到 TUG1-Wt、TUG1-Mut,同时将 MCF-7R 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 24 孔板,待细胞生长融合度达 80% 左右时将 miR-214-5p mimic 或 miR-NC 与 TUG1-Wt、TUG1-Mut 分别共转染 MCF-7R 细胞,每组实验均设置 3 个复孔。

放入恒温培养箱培养 48 h 后加入 25 μ l/孔 1×Passive 裂解缓冲液,室温静置 15 min 后以每孔加入 20 μ l 裂解液的密度将其加入白板中,同时加入荧光素酶缓冲液(50 μ l/孔),置于多功能酶标仪检测萤火虫荧光素酶活性。加入 Stop&Glo(50 μ l/孔),于多功能酶标仪检测海肾荧光素酶活性,以萤火虫荧光素酶活性值与海肾荧光素酶活性值的比值作为荧光素酶活性。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS21.0 分析数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较经正态性检验,服从正态分布采用 *t* 检验,多组间比较经方差齐性检验,采用单因素方差分析,两两比较采用 *LSD-t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 放射抵抗的乳腺癌组织和细胞中 TUG1 高表达 qRT-PCR 检测放射敏感组与放射抵抗组患者乳腺癌组织中 TUG1 的表达水平。如图 1A 所示,放射抵抗组患者乳腺癌组织中 TUG1 的表达水平较放射敏感组明显升高($P < 0.05$)。细胞克隆形成实验结果显示,随着照射剂量的增加,MCF-7R 细胞的存活分数与 MCF-7 细胞比较明显升高($P < 0.05$),见图 1B。单击多靶模型参数值见表 1,MCF-7R 细胞增敏比(SER)为 0.829。用 qRT-PCR 法进一步检测人乳腺癌上皮细胞 MCF-10A 及乳腺癌 MCF-7 细胞、乳腺癌放射抵抗 MCF-7R 细胞中 TUG1 的表达水平,如图 1C 所示,与 MCF-10A 相比,MCF-7 细胞与 MCF-7R

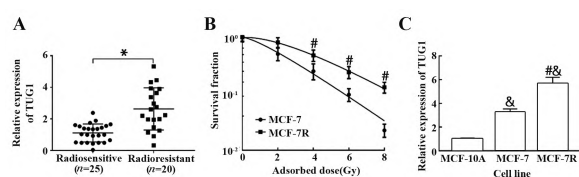


图1 放射抵抗的乳腺癌组织和细胞中 TUG1 的表达

Fig.1 TUG1 expression in radioresistant breast cancer tissues and cells

Note: *, $P < 0.05$, compared with radiosensitive group; #, $P < 0.05$, compared with MCF-7 cells; &, $P < 0.05$, compared with MCF-10A cells.

表1 乳腺癌 MCF-7 和 MCF-7R 细胞的单击多靶模型参数值

Tab.1 Parameter values of single-click multi-target model for breast cancer MCF-7 and MCF-7R cells

Groups	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	N	SF2	k	SER
MCF-7	3.953	1.383	1.419	0.730	0.253	-
MCF-7R	4.769	3.497	2.082	0.893	0.210	0.829

细胞中TUG1的表达水平明显升高($P<0.05$),与MCF-7细胞相比,MCF-7R细胞中TUG1的表达水平显著升高($P<0.05$)。

2.2 沉默TUG1增加MCF-7R细胞的放射敏感性 利用瞬时转染技术将si-TUG1及其阴性对照转染至乳腺癌MCF-7R细胞,qRT-PCR验证转染效率,如图2A所示,沉默TUG1组乳腺癌MCF-7R细胞中TUG1的表达水平较沉默对照组明显降低($P<0.05$),表明转染成功。细胞克隆实验检测沉默TUG1后乳腺癌MCF-7R细胞的放射敏感性,结果显示沉默TUG1组乳腺癌MCF-7R细胞存活分数较沉默对照组明显降低,见图2B,其中照射剂量为4 Gy时乳腺癌MCF-7R细胞存活分数出现显著差异,因此后续实验中以4 Gy照射细胞。沉默TUG1后MCF-7R细胞单击多靶模型的参数值见表2,沉默TUG1组乳腺癌MCF-7R细胞增敏比(SER)为1.440,表明沉默TUG1后可明显增加乳腺癌MCF-7R细胞放射敏感性。

2.3 沉默TUG1促进放射照射诱导的MCF-7R细胞凋亡 转染si-TUG1及其阴性对照后用4 Gy照射剂量照射MCF-7R细胞,分别为沉默对照+4Gy组、沉默TUG1+4Gy组。流式细胞仪检测经4 Gy照射后MCF-7R细胞的凋亡情况,如图3所示,与沉默对照组相比,沉默TUG1组、沉默对照+4Gy组MCF-7R细胞凋亡率均明显升高($P<0.05$),与沉默对照+4Gy组相比,沉默TUG1+4Gy组MCF-7R细胞凋亡率明显升高($P<0.05$)。表明沉默TUG1后可通过促进放射照射诱导的MCF-7R细胞凋亡进而增加乳腺癌细胞放射敏感性。

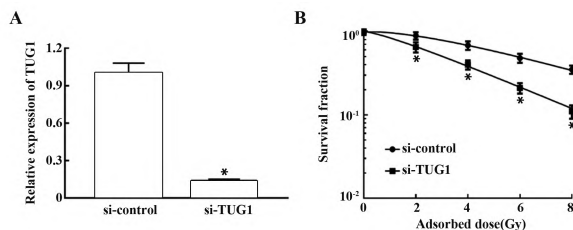


图2 沉默TUG1对MCF-7R细胞放射敏感性的影响
Fig.2 Effect of silencing TUG1 on radiosensitivity of MCF-7R cells

Note: *. $P<0.05$, compared with si-control group.

表2 沉默TUG1后MCF-7R细胞单击多靶模型的参数值
Tab.2 Parameter values of MCF-7R cell click multi-target model after silencing TUG1

Groups	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	N	SF2	k	SER
si-control	4.771	3.343	2.015	0.885	0.210	-
si-TUG1	3.312	1.014	1.358	0.659	0.302	1.440

2.4 TUG1可吸附并调控miR-214-5p的表达 靶基因网站预测TUG1可能吸附的miRNA,结果发现TUG1可能靶向调控miR-214-5p,TUG1与miR-214-5p存在互补结合核苷酸位点,见图4A。通过双荧光素酶报告基因实验探讨TUG1是否可以靶向miR-214-5p,结果显示,与过表达miR-NC组相比,miR-214-5p过表达能够明显抑制野生型TUG1-Wt的荧光素酶活性($P<0.05$),TUG1与miR-214-5p结合位点突变后,miR-214-5p过表达对突变型TUG1-Mut的荧光素酶活性无明显抑制效果($P>0.05$),见图4B。qRT-PCR检测结果显示,沉默TUG1组乳腺癌MCF-7R细胞中miR-214-5p的表达水平较沉默对照组明显升高($P<0.05$),见图4C。表明TUG1可靶向吸附miR-214-5p而抑制其表达。

2.5 过表达miR-214-5p增加MCF-7R细胞的放射敏感性 qRT-PCR检测miR-214-5p在人乳腺上皮细胞MCF-10A及乳腺癌MCF-7、MCF-7R细胞中的表达水平,结果显示,与MCF-10A细胞相比,MCF-7、MCF-7R细胞中miR-214-5p表达水平均明显降低($P<0.05$),与MCF-7细胞相比,MCF-7R细胞中miR-214-5p的表达水平明显降低($P<0.05$),表明miR-214-5p表达水平的降低可能降低乳腺癌细胞放射敏感性(图5A)。将miR-214-5p mimics及其阴性对

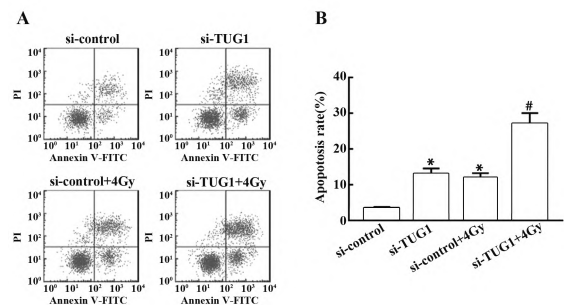


图3 沉默TUG1对辐射照射后MCF-7R细胞凋亡的影响
Fig.3 Effect of silencing TUG1 on apoptosis of MCF-7R cells after radiation exposure

Note: *. $P<0.05$, compared with si-control group; #. $P<0.05$, compared with si-control+4Gy group.

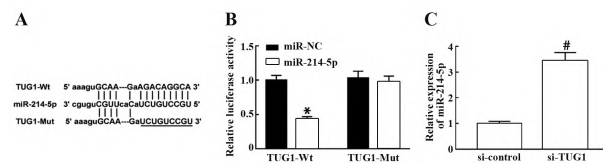


图4 TUG1可调控miR-214-5p的表达
Fig.4 TUG1 can regulate expression of miR-214-5p
Note: *. $P<0.05$, compared with miR-NC group; #. $P<0.05$, compared with si-control group.

照转染至 MCF-7R 细胞, qRT-PCR 验证转染效率, 结果显示, 过表达 miR-214-5p 组 MCF-7R 细胞中 miR-214-5p 的表达水平明显高于过表达 miR-NC 组 ($P < 0.05$, 图 5B)。细胞克隆形成实验结果显示, 随着照射剂量的增加, 过表达 miR-214-5p 组 MCF-7R 细胞存活分数较过表达 miR-NC 组明显降低 ($P < 0.05$, 图 5C), 过表达 miR-214-5p 后 MCF-7R 细胞单击多靶模型的参数值见表 3, 过表达 miR-214-5p 组 MCF-7R 细胞增敏比 (SER) 为 1.455。表明 miR-214-5p 过表达可增强乳腺癌细胞敏感性。流式细胞术检测 miR-214-5p 过表达后 MCF-7R 细胞凋亡情况, 结果显示, 与过表达 miR-NC 组相比, 过表达 miR-214-5p 组与过表达 miR-NC+4Gy 组 MCF-7R 细胞凋亡率均明显增加 ($P < 0.05$), 与过表达 miR-NC+4Gy 组相比, 过表达 miR-214-5p+4Gy 组 MCF-7R 细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$), 见图 5D。表明 miR-214-5p 过表达可通过促进放射诱导的乳腺癌细胞凋亡进而增加细胞放射敏感性。

2.6 抑制 miR-214-5p 可逆转沉默 TUG1 对 MCF-7R 细胞放射敏感性的影响 将 si-TUG1 与 miR-NC 共转染至 MCF-7R 细胞, si-TUG1 与 miR-214-5p 抑制剂 (anti-miR-214-5p) 共转染至 MCF-7R 细胞, 以验证 TUG1 是否通过抑制 miR-214-5p 表达进而降低乳腺癌细胞放射敏感性, 细胞克隆形成实验结果显示, 沉默 TUG1+抑制 miR-214-5p 组 MCF-7R 细胞存活分数较沉默 TUG1+抑制 miR-NC 组明显升高 ($P <$

0.05), 见图 6B。抑制 miR-214-5p 联合沉默 TUG1 后 MCF-7R 细胞单击多靶模型的参数值见表 4, 沉默 TUG1+抑制 miR-214-5p 组 MCF-7R 细胞增敏比 (SER) 为 0.713, 相较于沉默 TUG1 组明显降低。表明抑制 miR-214-5p 可逆转沉默 TUG1 对 MCF-7R 细胞放射敏感性的增强作用。流式细胞术检测结果显示, 沉默 TUG1+抑制 miR-214-5p 组 MCF-7R 细胞凋亡率较沉默 TUG1+抑制 miR-NC 组明显降低 ($P < 0.05$), 见图 6C。表明抑制 miR-214-5p 可逆转沉默 TUG1 对放射诱导的乳腺癌细胞凋亡的促进作用。

表 3 过表达 miR-214-5p 后 MCF-7R 细胞单击多靶模型的参数值

Tab. 3 MCF-7R cell click multi-target model parameter values after overexpression of miR-214-5p

Groups	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	N	SF2	k	SER
miR-NC	4.769	3.194	1.954	0.877	0.210	—
miR-214-5p	3.278	1.329	1.500	0.691	0.305	1.455

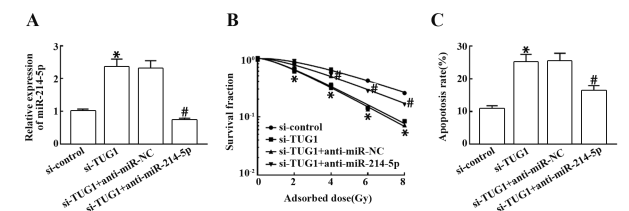


图 6 抑制 miR-214-5p 联合沉默 TUG1 对 MCF-7R 细胞放射敏感性影响及放射诱导的细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effect of miR-214-5p combined with silencing TUG1 on radiosensitivity of MCF-7R cells and radiation-induced apoptosis

Note: A. Inhibits expression of miR-214-5p in MCF-7R cells after miR-214-5p combined si-TUG1; B. Inhibits effect of miR-214-5p combined si-TUG1 on the radiosensitivity of MCF-7R cells; C. Inhibits miR-214-5p combined with si-TUG1 on radiation-induced apoptosis of MCF-7R cells. *, $P < 0.05$, compared with si-control group; #, $P < 0.05$, compared with si-TUG1+inhibited miR-NC group.

表 4 抑制 miR-214-5p 联合沉默 TUG1 后 MCF-7R 细胞单击多靶模型的参数值

Tab. 4 Inhibition of miR-214-5p combined with silencing TUG1 in MCF-7R cells by clicking multi-target model parameter values

Groups	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	N	SF2	k	SER
si-control	4.796	3.257	1.972	0.880	0.209	—
si-TUG1	3.323	1.005	1.353	0.658	0.301	1.443
si-TUG1+anti-miR-NC	3.236	0.937	1.336	0.645	0.309	—
si-TUG1+anti-miR-214-5p	4.541	2.005	1.555	0.799	0.220	0.713

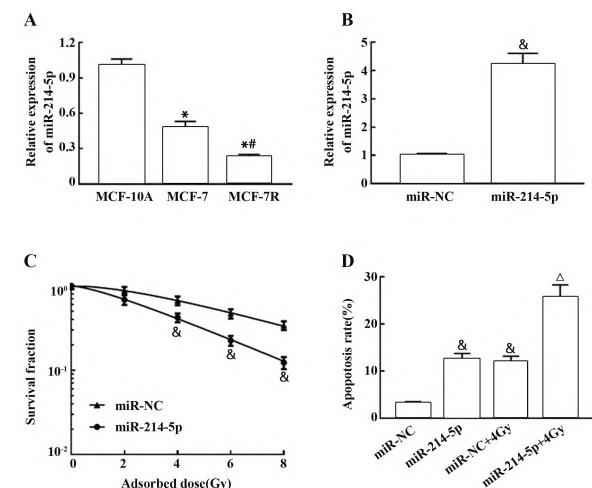


图 5 过表达 miR-214-5p 对 MCF-7R 细胞放射敏感性的影响

Fig. 5 Effect of miR-214-5p overexpression on radiosensitivity of MCF-7R cells

Note: *, $P < 0.05$, compared with MCF-10A cells; #, $P < 0.05$, compared with MCF-7 cells; &, $P < 0.05$, compared with miR-NC group; Δ , $P < 0.05$, compared with miR-NC+4Gy group.

3 讨论

乳腺癌的治疗方式中放疗技术应用较为广泛,在一定程度上可延长乳腺癌患者生存期,但由于患者体质或病理程度不同导致放疗效果相差较大,部分患者甚至出现放疗抵抗性,因此如何通过增强肿瘤细胞放射敏感性成为提高乳腺癌患者临床治疗效果的重要切入点^[8]。研究表明长链非编码RNA BRCA1 相邻基因 2(LncRNA NBR2)在放射诱导的乳腺癌细胞中呈低表达,上调LncRNA NBR2表达可通过抑制乳腺癌细胞增殖能力进而增强肿瘤细胞的放射敏感性^[9]。近年来,研究发现部分LncRNA异常表达与乳腺癌细胞放疗敏感性有关,并可能作为肿瘤细胞放疗抵抗的预测因子^[10]。但仍有部分LncRNA与乳腺癌细胞放疗敏感性的相关性研究尚未明确,需进一步深入挖掘LncRNA并探讨其与乳腺癌细胞放射敏感性的关系,为提高临床治疗效果提供参考。

TUG1在多种恶性肿瘤进展中均具有重要调控作用,研究表明TUG1在乳腺癌中呈高表达,其表达水平与乳腺癌患者肿瘤直径、TNM分期及淋巴结转移等呈正相关,TUG1表达可能通过下调p27表达进而促进乳腺癌生长^[11]。肺腺癌组织中TUG1表达上调,其高表达与患者恶性临床病理特征密切相关,TUG1可能通过抑制p16表达促进肺腺癌的发生发展^[12]。提示TUG1可能作为肿瘤诊断及治疗的重要分子标志物。张恒瑜等^[13]研究表明,TUG1在神经母细胞瘤细胞中呈高表达,并可促进肿瘤细胞迁移及侵袭。越来越多的研究表明,TUG1可通过充当竞争性内源性RNA吸附miRNA或与RNA结合蛋白相互作用进而调控靶基因表达,最终影响癌症发生及发展过程,TUG1可能作为肿瘤诊断及评估患者预后的重要生物标志物及治疗靶点基因^[14]。ZHAO等^[15]研究表明TUG1可通过充当miR-382的海绵进而促进胰腺癌细胞增殖、迁移及EMT过程。LEI等^[16]研究表明TUG1可通过靶向调控miR-145影响乳头状甲状腺癌细胞增殖、迁移及EMT过程。本研究结果表明,乳腺癌细胞中TUG1的表达水平明显高于乳腺上皮细胞,而放射抵抗性乳腺癌MCF-7R细胞中TUG1的表达水平较乳腺癌细胞明显升高,说明TUG1的表达水平升高可降低乳腺癌细胞放射敏感性。本研究通过沉默TUG1表达,发现MCF-7R细胞存活分数明显降低,细胞增敏比明显升高,说明沉默TUG1表达可增加乳腺癌细胞放射敏感性,提示TUG1可能作为乳腺癌靶向治疗的潜在靶点。

本研究同时发现,沉默TUG1表达后经X射线照射后乳腺癌细胞凋亡率明显升高,说明沉默TUG1表达可通过促进乳腺癌细胞凋亡进而增加乳腺癌细胞放射敏感性。提示TUG1高表达可通过抑制放射诱导的乳腺癌细胞凋亡进而降低细胞放射敏感性。

miR-214-3p在宫颈癌细胞中呈高表达,上调miR-214-3p表达后可促进宫颈癌细胞增殖,抑制miR-214-3p表达后可抑制宫颈癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,为宫颈癌临床诊断及治疗提供新靶点^[17]。研究表明miR-214-5p在胰腺癌细胞中呈低表达,上调miR-214-5p表达可抑制胰腺癌细胞迁移及侵袭^[18]。LI等^[19]研究表明miR-214-5p过表达可抑制肝细胞癌细胞迁移及侵袭。miR-214-5p可靶向抑制ROCK1表达进而抑制人骨肉瘤细胞增殖及侵袭^[20]。本研究发现乳腺癌细胞中miR-214-5p的表达水平明显升高,其在乳腺癌放射抵抗细胞中的表达水平较乳腺癌细胞明显降低,说明miR-214-5p表达水平与乳腺癌细胞放射敏感性密切相关。通过将miR-214-5p mimics转染入放射抵抗乳腺癌MCF-7R细胞以提高miR-214-5p的表达水平,结果发现miR-214-5p过表达可明显降低MCF-7R细胞存活分数,促进MCF-7R细胞凋亡,增加乳腺癌细胞放射敏感性。提示miR-214-5p过表达可明显增加乳腺癌细胞放射敏感性。双荧光素酶报告实验证实TUG1可吸附miR-214-5p而降低其表达,为验证其是否通过调控miR-214-5p表达降低乳腺癌细胞放射敏感性,将沉默TUG1与抑制miR-214-5p共转染至MCF-7R细胞,结果发现共转染后MCF-7R细胞存活分数明显增加,增敏比明显降低,细胞凋亡率明显降低。提示沉默TUG1可通过上调miR-214-5p表达进而增加乳腺癌细胞放射敏感性。

综上所述,TUG1在乳腺癌细胞中高表达,沉默TUG1可通过上调miR-214-5p表达而促进乳腺癌细胞凋亡并增加细胞放射敏感性。但TUG1在乳腺癌细胞增殖、放疗抵抗及凋亡中的具体作用机制尚需深入研究。

参考文献:

- [1] 卢敏莹,贾小婷,罗利云,等. miR-200c-3p靶向FOSL1增加乳腺癌细胞化疗敏感性[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2016,32(12):1360-1365. DOI:10.13865/j.cnki.cjbm.2016.12.13.
- [2] VICINI F A, CECCHINI R S, WHITE J R, *et al.* Long-term primary results of accelerated partial breast irradiation after breast-conserving surgery for early-stage breast cancer: A randomised, phase 3, equivalence trial[J]. Lancet, 2019,394(10215):2155-

2164. DOI:10.1016/S0140-6736(19)32514-0.
- [3] LI T, LIU Y, XIAO H, *et al.* Long non-coding RNA TUG1 promotes cell proliferation and metastasis in human breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2017, 24 (4) : 535-543. DOI: 10.1007/s12282-016-0736-x.
- [4] TAN J, QIU K, LI M, *et al.* Double-negative feedback loop between long non-coding RNA TUG1 and miR-145 promotes epithelial to mesenchymal transition and radioresistance in human bladder cancer cells [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589 (20) : 3175-3181. DOI:10.1016/j.febslet.2015.08.020.
- [5] JIANG H, HU X, ZHANG H, *et al.* Down-regulation of LncRNA TUG1 enhances radiosensitivity in bladder cancer via suppressing HMGB1 expression [J]. *Radiat Oncol*, 2017, 12 (1) : 65-75. DOI:10.1186/s13014-017-0802-3.
- [6] HU J L, HE G Y, LAN X L, *et al.* Inhibition of ATG12-mediated autophagy by miR-214 enhances radiosensitivity in colorectal cancer [J]. *Oncogenesis*, 2018, 7 (2) : 16-25. DOI: 10.1038/s41389-018-0028-8.
- [7] YU X, LUO A, LIU Y, *et al.* MiR-214 increases the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen and fulvestrant through inhibition of autophagy [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14 (B11) : 208-223. DOI:10.1186/s12943-015-0480-4.
- [8] 任 涛, 王仙凤, 唐勇全. siRNA-SNCG 增加乳腺癌细胞放射敏感性的实验研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25 (14) : 36-39. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2017.14.007.
- [9] 李 航, 姜 勉, 樊赛军. 长链非编码 RNA NR2 对乳腺癌细胞放射敏感性的影响 [J]. *国际放射医学核医学杂志*, 2018, 42 (2) : 121-128. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2018.02.005.
- [10] 邱 杨, 张怀文, 骆 萍, 等. 长非编码 RNA (lncRNA) 与乳腺癌多药耐药患者放疗敏感性的相关性 [J]. *实用癌症杂志*, 2017, 32 (9) : 1416-1419. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2017.09.006.
- [11] 赵筱倩, 陆肖玮. 长链非编码核糖核酸牛磺酸上调基因 1 在乳腺癌中的表达及其对细胞增殖凋亡的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26 (8) : 22-27. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.08.005.
- [12] 韩鸮赢, 沈 鹏. 长链非编码核糖核酸牛磺酸上调基因 1 在肺腺癌中的表达及生物学意义研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27 (7) : 41-45. DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.07.009.
- [13] 张桓瑜, 张 虹, 姜 忠, 等. 长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1 对人神经母细胞瘤侵袭和转移能力的影响 [J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35 (12) : 2284-2285. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2018.12.033.
- [14] 周 慧, 高子煦, 谢 峥, 等. 长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1 在人类癌症中的研究进展 [J]. *中国细胞生物学报*, 2018, 40 (11) : 1965-1972. DOI: 10.11844/cjcb.2018.11.0160.
- [15] ZHAO L, SUN H, KONG H, *et al.* The LncRNA-TUG1/EZH2 axis promotes pancreatic cancer cell proliferation, migration and EMT phenotype formation through sponging miR-382 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42 (6) : 2145-2158. DOI: 10.1159/000479990.
- [16] LEI H, GAO Y, XU X. LncRNA TUG1 influences papillary thyroid cancer cell proliferation, migration and EMT formation through targeting miR-145 [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2017, 49 (7) : 588-597. DOI:10.1093/abbs/gmx047.
- [17] 周 煜, 徐战战, 石 芳, 等. hsa-miR-214-3p 对宫颈癌 Si-Ha 细胞生物学行为的影响 [J]. *武汉大学学报 (医学版)*, 2017, 38 (3) : 401-406. DOI: 10.14188/j.1671-8852.2017.03.013.
- [18] CAO T H, LING X, CHEN C, *et al.* Role of miR-214-5p in the migration and invasion of pancreatic cancer cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22 (21) : 7214-7221. DOI: 10.26355/eurev_201811_16255.
- [19] LI H, WANG H, REN Z. MicroRNA-214-5p inhibits the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells by targeting wiskott-aldrich syndrome like [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46 (2) : 757-764. DOI:10.1159/000488734.
- [20] ZHANG M, WANG D, ZHU T, *et al.* miR-214-5p targets ROCK1 and suppresses proliferation and invasion of human osteosarcoma cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25 (1) : 75-81. DOI: 10.3727/096504016X14719078133401.

[收稿 2020-06-28 修回 2020-12-01]

(编辑 陈 阳)

欢迎订阅和投稿《中国免疫学杂志》