

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2019.01.008

· 基础研究 ·

miR-424通过靶向调控HMGA1对乳腺癌细胞放疗敏感性的影响

张云霞, 许敏, 张健, 赵于天(江南大学附属医院暨无锡市第四人民医院 肿瘤放疗科, 江苏 无锡 214062)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-424/高迁移率蛋白 A1 基因(high mobility protein A1, HMGA1)分子轴对乳腺癌细胞放疗敏感性的影响及其分子机制。 **方法:** 收集 2014 年 4 月至 2017 年 4 月无锡市第四人民医院肿瘤放疗科经手术切除的 50 例乳腺癌患者的癌组织标本, 用 qPCR 和 Western blotting 检测 miR-424 和 HMGA1 mRNA 与蛋白在乳腺癌放疗敏感患者和放疗抵抗患者癌组织中的表达水平。用不同辐射强度(0、2、4、6 和 8 Gy)的 ^{60}Co γ -射线处理人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 后, 观察细胞 miR-424 和 HMGA1 的表达变化。向 MDA-MB-468 细胞中转染 miR-424 mimic/inhibitor 和 pcDNA-HMGA1, 采用平板克隆形成实验、MTT 法、Transwell 小室法和 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测 miR-424 对辐射处理后乳腺癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。用双荧光素酶报告基因验证 miR-424 与 HMGA1 的靶向关系。 **结果:** 与放疗抵抗的乳腺癌患者比较, miR-424 在放疗敏感的乳腺癌患者癌组织中高表达($P<0.01$), HMGA1 低表达($P<0.01$)。与 0、2 和 4 Gy 处理组细胞比较, 6 和 8 Gy 的 γ -射线处理后乳腺癌 MDA-MB-468 细胞凋亡率和 miR-424 的表达水平显著升高(均 $P<0.01$); 细胞的侵袭能力和 HMGA1 的表达水平显著降低(均 $P<0.01$)。双荧光素酶报告基因证实 miR-424 靶向作用 HMGA1 并下调其表达水平。miR-424 通过靶向下调 HMGA1 显著抑制 MDA-MB-468 细胞的增殖、侵袭并促进细胞凋亡(均 $P<0.01$), 进而上调 MDA-MB-468 细胞对放疗的敏感性。 **结论:** miR-424/HMGA1 分子轴可调控乳腺癌放疗敏感性, 过表达 miR-424 可增强乳腺癌 MDA-MB-468 细胞对 γ -射线放疗的敏感性。

[关键词] 乳腺癌; MDA-MB-468 细胞; 微小 RNA-424; 高迁移率蛋白 A1 基因; 放疗敏感性; 增殖; 侵袭; 凋亡

[中图分类号] R737.9; R730.55 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2019)01-0042-08

miR-424 modulates radio-sensitivity of breast cancer cells *via* targeting HMGA1

ZHANG Yunxia, XU Min, ZHANG Jian, ZHAO Yutian (Department of Oncological Radiotherapy, the Affiliated Hospital of Jiangnan University & Wuxi Fourth People's Hospital, Wuxi 214062, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of miR-424/HMGA1 (high mobility protein A1) axis on the radio-sensitivity of breast cancer cells and the possible mechanism. **Methods:** A total of 50 cases of breast cancer tissues from patients, who underwent surgical resection at the Department of Oncological Radiotherapy, Wuxi Fourth People's Hospital from April 2014 to April 2017, were collected for this study. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and Western blotting were performed to evaluate the mRNA and protein expressions of miR-424 and HMGA1 in breast cancer tissues of radiation sensitive and insensitive patients. After being treated with different doses of ^{60}Co γ -ray radiation (0, 2, 4, 6 and 8 Gy), the expression changes of miR-424 and HMGA1 in breast cancer MDA-MB-468 cells were observed. Subsequently, miR-424 mimic/inhibitor and pcDNA-HMGA1 were transfected into MDA-MB-468 cells, and the effect of miR-424 on cell proliferation, invasion and apoptosis of radiation-treated MDA-MB-468 cells were evaluated by colony formation assay, MTT assay, Transwell assay and Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry assay, respectively. Furthermore, dual luciferase reporter gene assay was used to verify whether HMGA1 was a target gene of miR-424. **Results:** The patients in radio-sensitive group exhibited higher miR-424 expression but lower HMGA1 expression than the patients in insensitive group (all $P<0.01$). Compared with the cells treated with 0, 2 and 4 Gy radiation, the cells treated with 6 and 8 Gy radiation exhibited significantly higher apoptosis rate and miR-424 expression but lower HMGA1 expression and cell invasion (all $P<0.01$). Moreover, luciferase reporter gene assay confirmed that miR-424 down-regulated HMGA1 expression. Mechanistically, miR-424 significantly inhibited cell proliferation, invasion and induced apoptosis of MDA-MB-468 cells (all $P<0.01$) via targeted down-regulating HMGA1, and further up-regulated the radio-sensitivity of breast cancer cells. **Conclusion:** miR-424/HMGA1 axis regulates the radio-sensitivity of breast cancer, and over-expression of miR-424 may increase the sensitivity of MDA-MB-468 cells to γ -ray radiation therapy.

[Key words] breast cancer; MDA-MB-468 cell; miR-424; high mobility protein A1 (HMGA1); radio-sensitivity; proliferation; invasion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2019, 26(1): 42-49. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.01.008]

[作者简介] 张云霞(1982-), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤的放射治疗研究, E-mail: 492475758@qq.com

[通信作者] 赵于天(ZHAO Yutian, corresponding author), 副主任医师, 主要从事肿瘤的放射治疗研究, E-mail: 13961730258@139.com

乳腺癌是全球女性中最为常见的恶性肿瘤,其每年新增患病人数约100万,年病死数在全部癌症中仅次于肺癌(超过40万)^[1]。目前临床上着重于应用早期诊断和辅助放化疗来延长乳腺癌患者的生存期,由于乳腺癌细胞对放疗存在耐受性,乳腺癌治疗的预期疗效无法达到。有研究^[2-3]指出,miR-424作为抑癌基因,其表达与乳腺癌的发生发展密切相关。miR-424通过调控下游基因参与宫颈癌^[4]、肺癌^[5-6]、卵巢癌^[7-8]和胃癌^[9]等肿瘤细胞的增殖、侵袭和凋亡过程。此外,高迁移率族蛋白A1基因(high mobility group A1, HMGA1)在包括乳腺癌在内的多种恶性肿瘤中过度表达,并且与某些肿瘤的转移和预后不良有关,但HMGA1在乳腺癌放疗中的作用尚不清楚^[10]。生物信息学数据库TargetScan预测发现,miR-424对HMGA1具有潜在的靶向调控作用。然而,目前miR-424调控HMGA1进而介导乳腺癌细胞放疗敏感性的作用机制尚未见相关研究报道。本研究以⁶⁰Co γ -射线辐射处理后的乳腺癌MDA-MB-468细胞的增殖、侵袭和凋亡表型为标准来判断癌细胞放疗敏感性,通过检测miR-424和HMGA1在人乳腺癌组织和细胞中的表达水平,探讨miR-424/HMGA1分

子轴对乳腺癌细胞放疗敏感性的分子机制,旨在为改善乳腺癌患者的放疗效果提供实验依据和分子标志物。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2013年4月至2017年4月无锡市第四人民医院肿瘤放疗科收治的资料完整、经手术切除的50例乳腺癌患者(其中放疗敏感患者25例,放疗抵抗患者25例;表1)癌组织标本,迅速保存于液氮中。病例纳入标准:(1)经乳腺彩超、X线摄影、磁共振检查、病理组织学检查结果确诊为乳腺癌;(2)治疗前3周未进行放疗等治疗手段;(3)患者术后再经放射干预后肿块退缩为放疗敏感患者;(4)术后再放疗仍有局部复发和总生存期短的为放疗抵抗患者。病例排除标准:(1)之前进行任何放射治疗的患者;(2)患者不同意样本的采集;(3)不能耐受手术的患者;(4)合并有免疫系统疾病的患者。所有研究对象在采集组织标本前均签署知情同意书,本研究方案经无锡市第四人民医院伦理委员会批准。

表1 50例乳腺癌患者的临床病例特征(n)
Tab. 1 Clinicopathological features of 50 patients with breast cancer(n)

Clinicopathological feature	N	Radiation sensitive	Radiation resistance
Gender			
Male	3	1	2
Female	47	24	23
Age (t/a)			
>50	30	16	14
≤50	20	9	11
Tumor size (d/cm)			
>5	21	9	12
≤5	29	16	13
Tumor stage			
TNF (I-II)	22	17	5
TNF (III-IV)	28	8	20
Lymph node metastases			
Yes	32	10	22
No	18	15	3

1.2 细胞株、主要试剂与仪器

人乳腺癌细胞系MDA-MB-468购自中科院上海细胞研究所。miR-424和HMGA1的siRNAs和mimics购自上海吉玛公司,DMEM和胎牛血清购自美国Biological Industries公司,青霉素和链霉素均购自北京雷根生物技术有限公司,Lipofectamine™ 2000和逆转录试剂盒均购自日本TaKaRa公司,Transwell小

室购自美国Corning公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物有限公司,MTT购自中国万类生物科技有限公司,高纯总RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE凝胶快速制备试剂盒均购自美国Bio-Rad公司,Western blotting一抗(antibody-HMGA1和antibody-GAPDH)和二抗[羊抗兔IgG(H+L)]

均购自美国 CST 公司, PCR 引物序列由昆明擎科生物科技有限公司合成。

酶标仪、qPCR 仪及电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 超速冷冻离心机、电泳槽购自北京六一生物科技有限公司, PHOE-NIX ^{60}Co 系统购自日本 Phoenix Contact 公司。

1.3 细胞培养与转染

将乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 置于含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DMEM 培养液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中常规培养。选取对数生长期的细胞, 用胰酶消化后, 再用 DMEM 培养基调整细胞密度为 1×10^5 个/ml。将细胞接种到 6 孔板 (2 ml/孔), 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 24 h, 随后分别用 miR-424 inhibitor、miR-424 mimic、pcDNA-HMGA1 转染细胞, 其转染方法参考 LipofectamineTM 2000 转染试剂说明书, 转染 48 h 后于荧光显微镜下观察细胞的转染效果。

1.4 克隆形成实验检测乳腺癌 MDA-MB-468 细胞的克隆形成

将对数生长期的 MDA-MB-468 细胞采用胰酶消化后, 将细胞接种于 6 孔板中 (5×10^3 个细胞/孔), 设置 3 个平行孔。待细胞贴壁生长后采用 ^{60}Co γ -射线 (0、2、4、6 和 8 Gy) 放射处理 2 h 后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 2 周。当出现肉眼可见的细胞克隆时, 终止培养, 弃去培养液, PBS 浸洗 3 次, 干燥后, 加 4% 多聚甲醛固定 30 min, 再用 PBS 清洗 3 次, 加入 1% 结晶紫染色 10 min。用 PBS 缓慢洗去染色液, 空气干燥后用肉眼直接计算克隆数 (≥ 50 个细胞为 1 个克隆)。采用单间的多靶单击模型评估细胞存活率: $\text{SF} = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ (D_0 为平均致死剂量, D 为准阈剂量, N 为外推数)。实验重复 3 次。

1.5 MTT 法检测乳腺癌 MDA-MB-468 细胞的增殖

用含 10% 胎牛血清的培养液配制成 MDA-MB-468 细胞悬液, 将 100 μl 细胞接种到 96 孔板 (5×10^3 个细胞/孔), 设置 5 个平行孔。待细胞贴壁生长后采用 ^{60}Co γ -射线放射 (0、6 和 8 Gy) 处理 2 h 后置于细胞培养箱中, 并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后更换 100 μl /孔新鲜的培养液 (不含酚红), 并每孔加入 10 μl 的 MTT 液 (5 mg/ml), 水平摇床上低速混匀 1 min 后, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 4 h。随后, 直接吸掉旧的培养液, 避免枪尖刮破单细胞层, 并加入 100 μl /孔甲臞溶液, 用枪充分混匀后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 4 h。孵育结束后放置在酶标仪上摇匀后, 测定波长在 490 处的光密度 (D) 值, 记录结果, 比色以空白调零。实验重复 3 次。

1.6 Transwell 小室法检测乳腺癌 MDA-MB-468 细

胞的侵袭

选择转染 MDA-MB-468 细胞为实验组, 未转染的细胞为对照组。分别将各处理组细胞用胰酶消化处理后, 接种于 Transwell 小室 24 孔板 (2×10^5 个细胞/ml) 内, 上室加 100 μl 细胞悬液, 下室加 250 μl 含 10% 胎牛血清的培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后, 取出小室, 棉签擦去微孔膜上室的细胞, PBS 小心冲洗小室上下面 2 遍, 4% 多聚甲醛溶液固定侵袭并黏附到小室微孔膜下面的细胞 15 min, 1% 结晶紫溶液染色 15 min, PBS 冲洗小室, 干燥后置于倒置显微镜 ($\times 100$) 下观察。实验重复 3 次。

1.7 Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞术检测乳腺癌 MDA-MB-468 细胞的凋亡

选取经 ^{60}Co γ -射线放射处理后的对数生长期 MDA-MB-468 细胞, PBS 清洗 2 次。用 500 μl 预冷的 1 $\times$ 结合缓冲液、5 μl 的 Annexin V-FITC 均匀地混合细胞, 室温避光孵育 15 min, 然后在上机前 5 min 再加入 2.5 μl 的 PI 染色, 之后上流式细胞仪检测 MDA-MB-468 细胞的凋亡情况。实验重复 3 次。

1.8 qPCR 检测乳腺癌 MDA-MB-468 细胞中 miR-424 和 HMGA1 的表达

收集临床样本及转染后 48 h 的 MDA-MB-468 细胞, 并采用 TRIzol 试剂提取不同组织及细胞总 RNA, NanoDrop1000 分光光度计检测和琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 浓度和质量。逆转录体系为 500 ng 总 RNA, 2 μl 5 $\times$ Mix、0.5 μl Random 6 primer 和 0.5 μl oligo dT Primer, ddH₂O 补充至 10 μl ; 逆转录程序为 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min、85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。miRNA 特异性逆转录则需用 miRNA 特异性茎环引物代替 Random 6 primer 和 oligo dT Primer, 其余成分相同, 转录程序为 42 $^{\circ}\text{C}$ 15 min、85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

用 Bio-Rad CFX96 仪进行 qPCR 反应, 反应体系为 25 μl , 其中包括 12.5 μl SYBR Premix Ex Taq II, 10 ng cDNA 和上下游引物各 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$, ddH₂O 补充至 25 μl 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 39 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s、65 $^{\circ}\text{C}$ 6 s、95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s。PCR 引物序列见表 2。目的基因 HMGA1 mRNA 相对表达量计算方法为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, 其中分别以 GAPDH 和 U6 作为内参。实验重复 3 次。

1.9 Western blotting 检测乳腺癌 MDA-MB-468 细胞 HMGA1 蛋白的表达

提取蛋白后, 依据二喹啉甲酸试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。上样缓冲液加入萃取的蛋白后, 加热至 95 $^{\circ}\text{C}$, 维持 10 min。每孔样品的载药量是 30 μg , 添加 10% 的聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白。凝胶电泳的电压控制在 80~120 V, 湿式转运和转膜的压力控制在 100

mV,持续45~70 min。在聚偏二氟乙烯转膜后,蛋白密封于5%的牛血清蛋白中维持1 h,再向其中加入一抗(抗HMGA1抗体(1:1 000)),4℃下过夜培养。洗膜缓冲液冲洗蛋白3次,每次5 min,随后加入羊抗兔IgG二抗(1:500),温室中培养1 h。洗膜3次后,加入化学发光试剂CEL显影蛋白。GAPDH用作内参,Bio-rad Gel DoIEZ成像器用来成像蛋白,用Image J软件分析靶带的灰度水平。实验重复3次。

表2 引物序列
Tab. 2 Primer sequences

Target	Sequence
U6	F: 5'-GATTTCTCCCTCATCGTTACAG-3' R: 5'-CTGCTTCATGATCGTTGTTGCTTG-3'
GAPDH	F: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' R: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGHACC-3'
miR-424	F: 5'-GGCAGCAGCAATTCATG-3' R: 5'-CAGTGC GTGTCGTGGAGT-3'
HMGA1	F: 5'-AGCGCTGGTAGGGAGTCA-3' R: 5'-TCTGCCCTTGTTTCCTTC-3'

1.10 双荧光素酶报告基因验证miR-424和HMGA1的靶向关系

首先将miR-424的候选靶基因HMGA1 3'UTR靶序列插入到萤火虫荧光素酶基因下游。将表达载体pcDNA-EGFP-pre-miR-424与其靶基因HMGA1验证载体pmirGLO-miR-424-HMGA1 3'UTR分别共转染到293T细胞,并设置空质粒载体与miR-424表达

载体共转染对照。具体方法:在24孔板种,每孔细胞中转染pmir-GLO-miRNA-基因3'UTR 200 ng、pcDNA-EGFP-pre-miRNA 600 ng及阴性对照30 pmmol/L。50 μl的Opti-MEM I培养基稀释2 μl Lipofectamine™ 2000试剂后室温孵育5 min;混合需转染的DNA和稀释的Lipofectamine™ 2000,室温孵育20 min后直接将复合物加到含0.4 ml Opti-MEM I培养基的细胞中,轻轻摇动培养板混匀;在37℃、5%CO₂培养箱培养8 h后换0.5 ml含10%胎牛血清,不含抗生素的正常DMEM培养基,在37℃、5%CO₂培养箱中培养48 h,收集细胞。荧光素酶检测按照双荧光素酶报告基因试剂盒说明书,采用酶标仪检测萤火虫和海肾荧光值,并以海肾荧光值作为内参。

1.11 统计学处理

采用SPSS 20.0软件进行统计分析,用GraphPad Prism 7对实验数据进行相关图片的绘制。两组间比较采用t检验。以P<0.05或P<0.01表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放疗敏感乳腺癌患者癌组织中miR-424高表达而HMGA1低表达

qPCR检测结果(图1)显示,miR-424在乳腺癌放疗敏感患者癌组织中的表达水平显著高于放疗抵抗患者($t=-7.47, P<0.01$;图1A);HMGA1在乳腺癌放疗敏感患者组织中的表达水平显著低于放疗抵抗患者($t=12.88, P<0.01$;图1B)。由此可知,miR-424和HMGA1的表达可能与乳腺癌放疗敏感性相关。

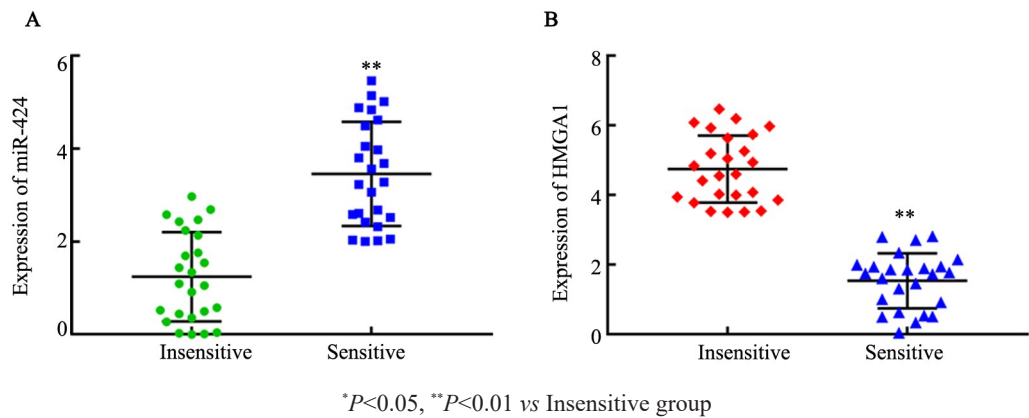


图1 miR-424(A)和HMGA1(B)在乳腺癌组织中的表达
Fig.1 The expression of miR-424 (A) and HMGA1 (B) in breast cancer tissues

2.2 miR-424对乳腺癌MDA-MB-468细胞放疗敏感性的影响

平板克隆形成实验结果显示,经6和8 Gy ⁶⁰Co γ-射线处理后的MDA-MB-468细胞的克隆形成率显著

低于0~4 Gy剂量处理组细胞($t_{6Gy}=-6.86, -4.70, -2.98$; $t_{8Gy}=-10.50, -7.30, -5.27$,均 $P<0.01$;图2A)。

qPCR检测结果表明,经6和8 Gy的⁶⁰Co γ-射线放射处理后MDA-MB-468细胞miR-424表达水平显

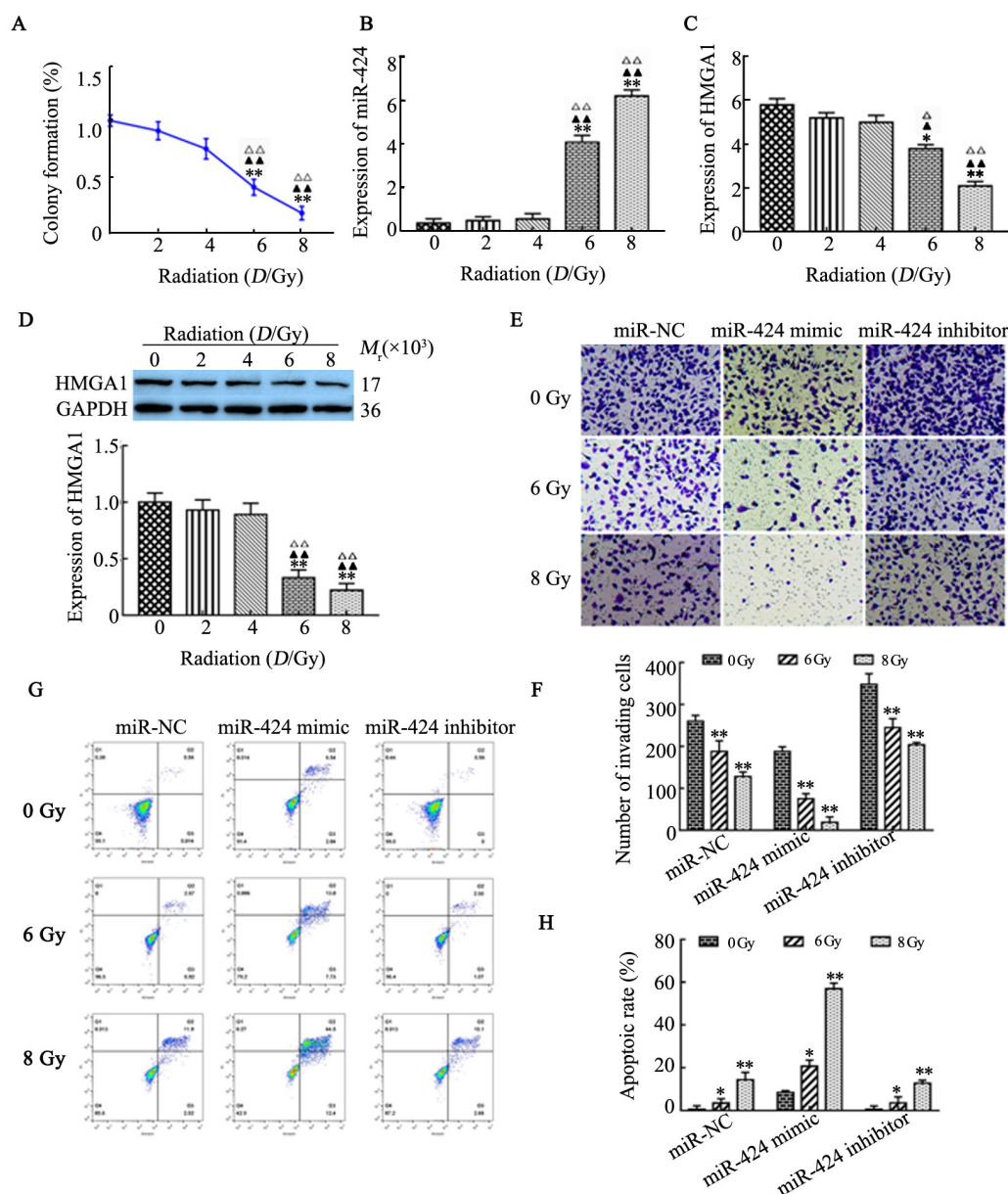
著高于0~4 Gy处理组细胞($t_{6\text{Gy}}=-10.26, 10.23, 9.71$; $t_{8\text{Gy}}=16.09, 16.24, 15.53$, 均 $P<0.01$;图2B), 而HMGA1表达水平显著低于后者($t_{6\text{Gy}}=-5.72, -5.20, -5.83$; $t_{8\text{Gy}}=-10.26, -10.96, -12.97$, 均 $P<0.01$;图2C)。

Western blotting检测结果(图2D)证实, 经6和8 Gy剂量的 ^{60}Co γ -放射线处理后MDA-MB-468细胞中HMGA1蛋白的表达水平显著低于0~4 Gy处理组细胞($t_{6\text{Gy}}=-5.49, -5.26, -4.59$; $t_{8\text{Gy}}=-6.69, -6.56, -5.75$, 均 $P<0.01$)。

Transwell小室法检测结果(图2E、F)表明, 沉默miR-424后再经 ^{60}Co γ -射线放射处理后, MDA-MB-

468细胞侵袭能力显著强于对照组细胞($t=8.56$, $P<0.01$); 过表达miR-424可显著抑制MDA-MB-468细胞的侵袭能力($t=3.23$, $P<0.01$)。

Annexin V-FITC/PI染色流式细胞术检测结果(图2G、H)证实, 过表达miR-424可显著促进MDA-MB-468细胞凋亡($t=2.56$, $P<0.05$), 而沉默miR-424可显著抑制MDA-MB-468细胞凋亡($t=3.05$, $P<0.05$)。结果表明过表达miR-424有助于增强乳腺癌细胞对放疗的敏感性, 沉默miR-424可能会使乳腺癌细胞产生放疗抵抗作用。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs 0 Gy group; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs 2 Gy group; $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ vs 4 Gy group

A: Colony formation of MDA-MB-468 cells based on the colony formation assay; B and C: The expression of miR-424 and HMGA1 in MDA-MB cells were measured by qPCR; D: The expression of HMGA1 protein in MDA-MB cells was measured by Western blotting;

E and F: The invasion capability of MDA-MB-468 cells were measured by Transwell assay (Crystal violet staining, $\times 100$);

G and H: The apoptotic rate was measured by flow cytometry

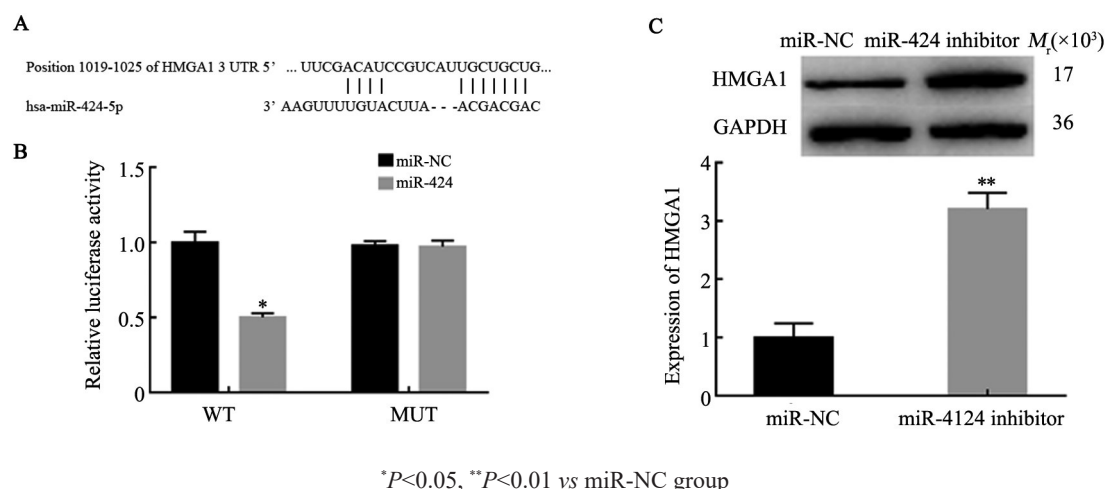
图2 miR-424对乳腺癌MDA-MB-468细胞放疗敏感性的影响

Fig. 2 Effect of miR-424 expression on the radio-sensitivity of breast cancer MDA-MB-468 cells

2.3 miR-424对HMGA1表达的调控作用

通过生物信息学数据库TargetScan预测HMGA1可能是miR-424的靶基因,其预测序列如图3A所示。同时,双荧光素酶报告基因验证结果(图3B)显示,miR-424可以结合HMGA1的3'UTR,并且424可以

负调控HMGA1的表达($t=2.86, P<0.05$)。Western blotting检测结果(图3C)显示,敲降miR-424后显著促进MDA-MB-468细胞中HMGA1蛋白的表达水平($t=7.86, P<0.01$)。由此可知,HMGA1是miR-424的直接靶基因,且miR-424可负调控HMGA1的表达。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs miR-NC group

A: The bioinformatics analysis result showed that miR-424 had a binding site with HMGA1; B: The luciferase activity in HMGA1-wt transfected with miR-424 was lower than that in NC group detected by dual luciferase reporter assay;

C: The expression of HMGA1 was measured by Western blotting

图3 HMGA1是miR-424的靶基因

Fig. 3 HMGA1 was a target gene of miR-424

2.4 miR-424/HMGA1分子轴对放疗的调控作用

通过在MDA-MB-468细胞中敲降HMGA1和同时敲降miR-424和HMGA1后,Western blotting检测结果表明,HMGA1敲降后显著抑制了HMGA1蛋白的表达($t=-8.68, P<0.01$;图4A),而同时敲降miR-424和HMGA1则与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);同时,qPCR检测结果显示,HMGA1敲降后显著上调miR-424的表达水平($t=10.68, P<0.01$;图4B),而同时敲降miR-424和HMGA1后与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

MTT法检测结果(图4C)显示,与对照组比较,6和8 Gy的 ^{60}Co γ -射线放射处理下敲降HMGA1可显著抑制MDA-MB-468细胞的增殖($t=-9.86, P<0.01$),而同时敲降miR-424和HMGA1则差异无统计学意义($P>0.05$)。

Transwell小室法检测结果(图4D、F)表明,与对照组比较,敲降HMGA1后再经剂量为6和8 Gy的 ^{60}Co γ -射线放射处理后可显著抑制MDA-MB-468细胞侵袭能力($t=7.35, P<0.01$),而同时敲降miR-424和HMGA1后回复了细胞的侵袭能力。

流式细胞术检测结果(图4E、G)证实,敲降HMGA1可显著促进MDA-MB-468细胞的凋亡($t=10.21, P<0.01$),而同时敲降miR-424和HMGA1与对照组

比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

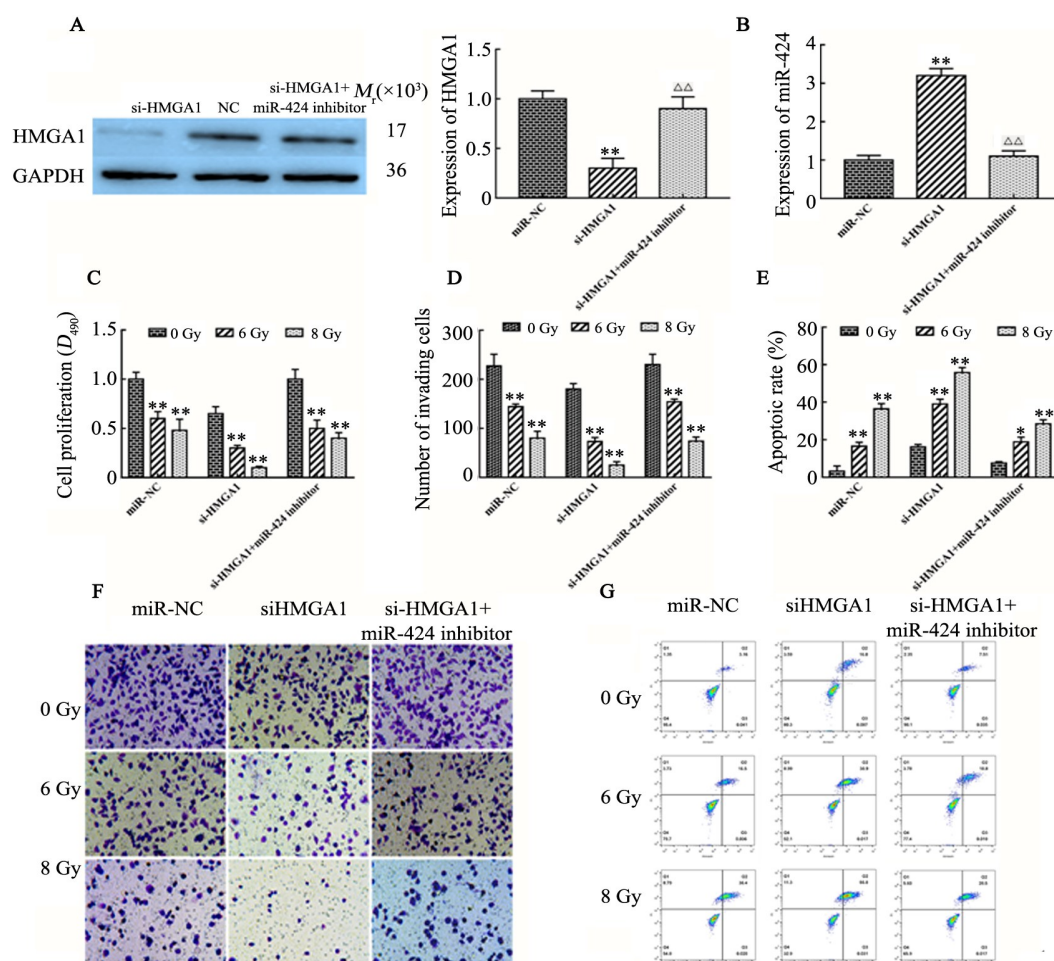
上述结果表明,miR-424通过下调HMGA1抑制乳腺癌MDA-MB-438细胞增殖、侵袭并促进细胞凋亡,进而上调MDA-MB-468细胞对 ^{60}Co γ -射线放疗的敏感性。

3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一。据报道^[1],发达国家中乳腺癌的发病率显著高于发展中国家,且年龄段越低的人群患乳腺癌的风险较低,如40岁以下的女性患者人数仅占总患者人数的6.6%。众多病因学研究^[12]表明,乳腺癌的高发病风险与早发月经初潮、晚发绝经、一级亲属的乳腺癌家族史、遗传易感性以及环境风险等因素的相关性较高。目前,根治性乳腺切除术及辅助性放、化疗的不断完善,使早期乳腺癌患者的5年生存率提高到90%左右,但是对于晚期乳腺癌患者的治疗效果仍不容乐观。放射治疗是局部晚期乳腺癌最主要的治疗方式之一,但肿瘤辐射抵抗效应的产生,进而诱发肿瘤复发、转移等,严重影响了放疗效果。为此,探讨调控乳腺癌放疗敏感性的作用基因及其分子调控机制,为解决乳腺癌临床治疗放射抵抗性难题提供更多的依据。微小RNA(microRNAs, miRNAs)是一类长度约为20~

22个核苷酸的短小非编码RNA。近年来研究^[13-14]发现,miRNAs的异常表达在肿瘤发生、发展中起着重要的作用,影响着肿瘤细胞的增殖、凋亡、分化、转移等。此外,miRNAs还与肿瘤的治疗反应密切相关,且越来越多的研究证实多个miRNAs可以调控肿瘤

细胞的放疗敏感性^[15]。本研究发现,miR-424在放疗敏感乳腺癌患者组织中高表达。过表达miR-424靶向下调HMGA1进而抑制乳腺癌MDA-MB-468细胞增殖、侵袭并促进细胞凋亡,从而上调MDA-MB-468细胞对放疗敏感性。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs miR-NC group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs si-HMGA1 group

A: The expression of HMGA1 was detected by Western blotting; B: The expression of miR-424 was measured by qPCR; C: The proliferative viability of different groups of cells under various doses of ^{60}Co γ -ray radiation was detected by the MTT assay; D and F: The invasion capability of MDA-MB-468 cells were measured by Transwell assay (Crystal violet staining, $\times 100$); E and G: The percentage of apoptotic cells was measured by flow cytometer assay

图4 miR-424/HMGA1分子轴对乳腺癌MDA-MB-468细胞放疗治疗的调控作用

Fig. 4 Effect of miR-424/HMGA1 axis on the radio-sensitivity of breast cancer MDA-MB-468 cells

HMGA1是一类被称之为“结构转录因子”的基因调节分子,与肿瘤的发生、发展等有关,并且影响肺癌、胰腺癌细胞等的放疗敏感性。HMGA1是其超家族成员之一,目前已经证实HMGA1在乳腺癌中高表达,且影响乳腺癌化疗敏感性^[16],但是对乳腺癌放疗敏感性的研究尚未见相关文献报道。本研究发现,敲降HMGA1可显著促进乳腺癌细胞凋亡进而增强放疗对乳腺癌细胞的杀伤作用,而同时敲降HMGA1和miR-424则可显著回复敲降HMGA1对乳腺

癌细胞生物学行为的影响。研究^[17]表明,HMGA1的抗凋亡作用可能通过抑制p53基因的功能,阻止细胞凋亡,也可能是通过抑制凋亡蛋白酶Caspase-3和Caspase-9的活性,从而抑制细胞凋亡。这与本研究中的流式细胞术检测结果中敲降HMGA1显著促进乳腺癌细胞凋亡的结果一致。此外,课题组在后续研究中将会进一步探究HMGA1是如何介导乳腺癌放疗敏感性的作用机制。

综上所述,本研究发现miR-424在乳腺癌放疗敏

感患者癌组织中高表达。同时,双荧光素酶报告基因检测结果显示 miR-424 可以结合 HMGA1 的 3' UTR,并且 miR-424 可以负调控 HMGA1 的表达。此外,过表达 miR-424 通过靶向下调 HMGA1 抑制经 ^{60}Co γ -射线处理后的乳腺癌 MDA-MB-468 细胞侵袭并促进细胞凋亡,即 miR-424/HMGA1 分子轴参与调控乳腺癌细胞放疗敏感性的作用过程。

[参 考 文 献]

- [1] TORRE L A, TRABERT B, DESANTIS C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(4): 284-296. DOI: 10.3322/caac.21456.
- [2] WANG J, WANG S, ZHOU J, et al. miR-424-5p regulates cell proliferation, migration and invasion by targeting doublecortin-like kinase 1 in basal-like breast cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 147-152[2018-06-25]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332218307431>. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.03.018.
- [3] RODRIGUEZ-BARRUECO R, NEKRITZ E A, BERTUCCI F, et al. miR-424(322)/503 is a breast cancer tumor suppressor whose loss promotes resistance to chemotherapy[J]. *Genes Dev*, 2017, 31(6): 553-566. DOI:10.1101/gad.292318.116.
- [4] ZHOU Y, AN Q, GUO R X, et al. miR424-5p functions as an anti-oncogene in cervical cancer cell growth by targeting KDM5B via the Notch signaling pathway[J/OL]. *Life Sci*, 2017, 171: 9-15[2018-06-25]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320517300061>. DOI:10.1016/j.lfs.2017.01.006.
- [5] LU C, WANG H, CHEN S, et al. Baicalein inhibits cell growth and increases cisplatin sensitivity of A549 and H460 cells via miR-424-3p and targeting PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(4): 2478-2487. DOI:10.1111/jcmm.13556.
- [6] ZHANG M, GAO C, YANG Y, et al. MiR-424 promotes non-small cell lung cancer progression and metastasis through regulating the tumor suppressor gene TNFAIP1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(1): 211-221. DOI:10.1159/000477314.
- [7] LIU J, GU Z, TANG Y, et al. Tumour-suppressive microRNA-424-5p directly targets CCNE1 as potential prognostic markers in epithelial ovarian cancer[J/OL]. *Cell Cycle*, 2018, 17(3): 309-318[2018-06-25]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272517300274?via%3Dihub>. DOI:10.1080/15384101.2017.1407894.
- [8] WU X, RUAN Y, JIANG H, et al. MicroRNA-424 inhibits cell migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition by down-regulating doublecortin-like kinase 1 in ovarian clear cell carcinoma[J/OL]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 85: 66-74[2018-06-25]. <http://sciencedirect.com/science/journal/13572725>. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.01.020.
- [9] ZHANG J, LIU H, HOU L, et al. Circular RNA_LARP4 inhibits cell proliferation and invasion of gastric cancer by sponging miR-424-5p and regulating LATS1 expression[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 151. DOI:10.1186/s12943-017-0719-3.
- [10] PALLANTE P, SEPE R, PUCA F, et al. High mobility group a proteins as tumor markers[J/OL]. 2015, 2: 15[2018-06-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4373383/>. DOI: 10.3389/fmed.2015.00015.
- [11] ANDERS C K, JOHNSON R, LITTON J, et al. Breast cancer before age 40 years[J]. *Semin Oncol*, 2009, 36(3): 237-249. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2009.03.001.
- [12] KAMINSKA M, CISZEWSKI T, LOPACKA-SZATAN K, et al. Breast cancer risk factors[J]. *Prz Menopauzalny*, 2015, 14(3): 196-202. DOI:10.5114/pm.2015.54346.
- [13] KARBASFOROOSHAN H, ROOHBAKHSH A, KARIMI G. SIRT1 and microRNAs: the role in breast, lung and prostate cancers[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 367(1): 1-6. DOI:10.1016/j.yexcr.2018.03.023.
- [14] NASSAR F J, NASR R, TALHOUK R. MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction[J/OL]. *Pharmacol Ther*, 2017, 72: 34-49[2018-06-25]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725816302388?via%3Dihub>. DOI:10.1016/j.pharmthera.2016.11.012.
- [15] MUELLER A K, LINDNER K, HUMMEL R, et al. MicroRNAs and their impact on radiotherapy for cancer[J]. *Radiat Res*, 2016, 185(6): 668-677. DOI:10.1667/RR14370.1.
- [16] SANTUARIO-FACIO S K, CARDONA-HUERTA S, PEREZ-PARAMO Y X, et al. A new gene expression signature for triple negative breast cancer using frozen fresh tissue before neoadjuvant chemotherapy[J]. *Mol Med*, 2017, 23(1): 101-111. DOI:10.2119/molmed.2016.00257.
- [17] PUCA F, COLAMAIIO M, FEDERICO A, et al. HMGA1 silencing restores normal stem cell characteristics in colon cancer stem cells by increasing p53 levels[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(10): 3234-3245. DOI:10.1371/journal.pone.0085046.

[收稿日期] 2018-07-26

[修回日期] 2018-11-11

[本文编辑] 党瑞山