

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.006

· 基础研究 ·

miR-620通过靶向ING4调控乳腺癌MCF-7细胞放射敏感性

谢文蕊^{1a}, 邓程伟^{1a}, 符正奇^{1b}, 张志东^{1c}, 吴进盛² (1. 海南省儋州市人民医院 a. 肿瘤内科, b. 放疗科, c. 肿瘤外科 海南 儋州 571700; 2. 海南医学院第一附属医院 肿瘤康复与姑息治疗科, 海南 海口 570100)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-620 对乳腺癌 MCF-7 细胞放射敏感性的影响及其机制。 **方法:** 收集 2017 年 3 月至 2018 年 3 月在海南省儋州市人民医院手术切除的 21 例乳腺癌患者的癌及癌旁组织标本, 以及乳腺癌细胞 MCF-7、BCaP-37 和乳腺上皮细胞 HBL-100, 采用 qPCR 法检测癌组织和细胞中 miR-620 和生长抑制因子 4(ING4)mRNA 的表达。利用脂质体转染技术, 分别将 miR-620 抑制剂(anti-miR-620)和抑制剂阴性对照(anti-miR-NC)、anti-miR-620 和 ING4 小干扰 RNA(si-ING4)、anti-miR-620 和小干扰 RNA 阴性对照序列(si-NC)转染至 MCF-7 细胞, 经放射处理后(依次记为 IR+anti-miR-620 组、IR+anti-miR-NC 组、IR+anti-miR-620+si-ING4 组、IR+anti-miR-620+si-NC 组), 利用克隆形成实验、MTT 法和 FCM 分别检测细胞放射敏感性、细胞增殖活力、细胞周期分布和凋亡率。双荧光素酶报告基因实验和 WB 法验证 miR-620 和 ING4 的靶向关系。 **结果:** 与癌旁组织和 HBL-100 细胞比较, 乳腺癌组织和细胞中 miR-620 表达均显著升高(均 $P<0.01$)、ING4 mRNA 表达均显著降低(均 $P<0.01$)。与 IR+anti-miR-NC 组比较, IR+anti-miR-620 组 MCF-7 细胞增殖活力、S 期细胞比例均显著降低(均 $P<0.01$), 细胞凋亡率、G0-G1 期细胞比例、放射敏感性均显著升高(均 $P<0.01$)。与 IR+anti-miR-620+si-NC 组比较, IR+anti-miR-620+si-ING4 组 MCF-7 细胞增殖活力、S 期细胞比例均显著升高(均 $P<0.01$), 细胞凋亡率、G0-G1 期细胞比例和放射敏感性均显著降低(均 $P<0.01$)。双荧光素酶报告基因实验证明 ING4 是 miR-620 的靶基因, miR-620 靶向负性调控 ING4 表达。 **结论:** 敲减 miR-620 可能通过上调 ING4 表达抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖, 并促进细胞凋亡和放射敏感性。

[关键词] miR-620; 生长抑制因子 4; 乳腺癌; MCF-7 细胞; 放射敏感性; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R737.9; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)03-0202-07

miR-620 regulates radiosensitivity of breast cancer MCF-7 cells by targeting ING4

XIE Wenrui^{1a}, DENG Chengwei^{1a}, FU Zhengqi^{1b}, ZHANG Zhidong^{1c}, WU Jinsheng² (1a. Department of Oncology, 1b. Department of Radiotherapy, 1c. Department of Surgical Oncology, Danzhou People's Hospital, Danzhou 571700, Hainan, China; 2. Department of Tumor Rehabilitation and Palliative Care, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou 570100, Hainan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of miR-620 on the radiosensitivity of breast cancer MCF-7 cells and its mechanism. **Methods:** The cancer tissues and para-cancerous tissue specimens of 21 patients with breast cancer who had surgical resection in Danzhou City People's Hospital of Hainan Province from March 2017 to March 2018 were collected. In addition, breast cancer MCF-7 and BCaP-37 cells and breast epithelial HBL-100 cells were also cultured *in vitro*. The mRNA expression of miR-620 and inhibitor of growth 4 (ING4) in breast cancer tissues and cells was detected by qRT-PCR. MCF-7 cells were respectively transfected with miR-620 inhibitor (anti-miR-620), inhibitor negative control (anti-miR-NC), anti-miR-620 with ING4 small interfering RNA (si-ING4), and anti-miR-620 with small interfering RNA negative control (si-NC) using Lipofectamine™2000 lipofection technology before radiotherapy, namely IR+anti-miR-620 group, IR+anti-miR-NC group, IR+anti-miR-620+si-ING4 group, and IR+anti-miR-620+si-NC group, respectively. The cell radiosensitivity, cell proliferation activity, cell cycle distribution and apoptosis rate were detected by clone formation assay, MTT and FCM, respectively. The dual-luciferase reporter gene assay and Western blotting were used to verify the targeting relationship between miR-620 and ING4. **Results:** Compared with para-cancerous tissues and HBL-100 cells, the expression of miR-620 was significantly increased while the mRNA expression of ING4 was significantly reduced in breast cancer tissues and cells (all $P<0.01$). Compared with the IR+anti-miR-NC group, the proliferation activity and S phase cell proportion of MCF-7 cells in the IR+anti-miR-620 group were significantly decreased (all $P<0.01$), but the apoptosis rate, the proportion of G0-G1 phase cells, and the radiosensitivity were significantly increased (all $P<0.01$). Compared with the IR+anti-miR-620+si-NC group, the proliferation activity and the S-phase cell proportion of MCF-7 cells in the IR+anti-miR-620+si-ING4 group were significantly increased (all

[基金项目] 海南省卫生厅科学研究项目(No.16A200031)

[作者简介] 谢文蕊(1989—),女,硕士,主要从事肿瘤的临床治疗研究,E-mail: 3201194893@qq.com

[通信作者] 吴进盛,E-mail: wjs7911@126.com

$P < 0.01$), but the apoptosis rate, the proportion of G0-G1 phase cells, and the radiosensitivity were significantly decreased (all $P < 0.01$). The dual-luciferase reporter gene assay showed that ING4 is a target gene of miR-620, and miR-620 targeted and negatively regulated the expression of ING4. **Conclusion:** Knockdown of miR-620 could inhibit the proliferation of MCF-7 cells but promote the apoptosis and radiosensitivity of MCF-7 cells by up-regulating ING4.

[Key words] miR-620; inhibitor of growth 4 (ING4); breast cancer; MCF-7 cell; radiosensitivity; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(3): 202-208. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.03.006]

乳腺癌是全球女性最常见的恶性肿瘤,是女性癌症相关死亡的第二大原因。尽管乳腺癌的综合诊疗技术不断提高,但全世界每年仍有50万人死于乳腺癌^[1]。目前,放射治疗(简称放疗)作为乳腺癌治疗的主要辅助手段,对降低乳腺癌复发风险、提高患者生存(OS)率具有重要意义^[2-3]。然而,乳腺癌细胞放疗抗性的出现严重影响了放疗的效果^[4]。因此,了解乳腺癌细胞放疗抗性的潜在机制,提高其放射敏感性是临床乳腺癌放疗亟待解决的重大课题。有研究^[5]结果指出,miR-620表达上调可能与乳腺癌的发生与发展有关。miR-620通过调控靶基因表达可促进肿瘤细胞增殖,并增加肿瘤细胞的放疗抗性^[6]。此外,在乳腺癌组织中生长抑制因子4(inhibitor of growth 4, ING4)表达下调,上调ING4可抑制乳腺癌细胞增殖并诱导细胞凋亡^[7-8],但其在乳腺癌放疗中的作用并不清楚。生物信息学预测发现,miR-620对ING4具有潜在的靶向调控作用,然而,目前miR-620调控ING4表达介导乳腺癌细胞放射敏感性的作用机制尚未见报道。本研究通过检测miR-620和ING4在人乳腺癌组织和细胞中的表达水平,探讨miR-620/ING4轴调控乳腺癌细胞放射敏感性的分子机制,旨在为提高临床乳腺癌患者的放疗效果提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞和主要试剂

收集2017年3月至2018年3月在海南省儋州市人民医院确诊并手术切除的21例乳腺癌患者的癌组织及对应癌旁组织(距离肿瘤边缘大于5 cm)标本。所有乳腺癌患者术前均未接受放疗或化疗。患者均为女性,年龄28~65岁之间,中位年龄47岁。本研究开展前已征得患者或其家属同意并签署知情同意书,研究方案获得所在医院医学伦理委员批准。

人乳腺癌细胞MCF-7和BCaP-37以及乳腺上皮细胞HBL-100购于中国科学院上海细胞库;DMEM培养基和胎牛血清为美国Gibco公司产品,Lipofectamine™2000、BCA蛋白定量试剂盒、逆转录试剂盒和qPCR试剂盒均购于TaKaRa公司,TRIzol试剂、MTT试剂、Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒和WB相关试剂购于上海碧云天生物科技有限

公司,Cyclin D1、P21和ING4抗体均为Abcam公司产品,BAX、Bcl-2和GAPDH抗体及二抗均为Santa Cruz公司产品,实验所用引物、anti-miR-NC、anti-miR-620、si-NC、si-ING4、miR-NC、miR-620 mimics由北京华大基因公司提供。

1.2 细胞转染

将MCF-7细胞按照细胞密度 2×10^5 个/孔接种于6孔板,利用Lipofectamine™2000在细胞汇合度为60%时按照操作步骤进行转染。MCF-7细胞分组如下:miR-NC组(转染miR-NC)和miR-620组(转染miR-620 mimic)、anti-miR-NC组(转染anti-miR-NC)和anti-miR-620组(转染anti-miR-620)、anti-miR-620+si-NC组(anti-miR-620和si-NC共转染)和anti-miR-620+si-ING4组(anti-miR-620和si-ING4共转染)。转染24 h后,利用qPCR法检测miR-620或ING4 mRNA表达验证转染效果,转染成功的细胞方可用于后续实验。

1.3 qPCR法检测乳腺癌组织和细胞中miR-620和ING4 mRNA的表达水平

利用TRIzol试剂分别提取乳腺癌组织和细胞中总RNA,进行RNA定量。依照逆转录试剂盒说明书合成cDNA,按照qPCR试剂盒说明测定miR-620和ING4 mRNA水平。引物序列:miR-620上游为5'-GCCGAGATGGAGATAGATAT-3',下游为5'-CTC AACTGGTGTCTGTGA-3';U6上游为5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',下游为5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3';ING4上游为5'-CACAAGTCCTGAGTATGGGAT-3',下游为5'-AGGGGATGTGGAAGAAACTGT-3';GAPDH上游为5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG-3',下游为5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3'。qPCR反应条件:95℃预变性30 s;95℃变性10 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35个循环。分别以U6和GAPDH作为内参对照,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因mRNA的相对表达量。

1.4 双荧光素酶报告基因实验验证miR-620与ING4的靶向关系

用StarBase网站预测miR-620与ING4之间是否存在特异性结合位点。将含有miR-620结合位点的ING4-3'UTR的野生型(WT)序列、ING4的突变型(MUT)序列克隆到pmirGLO载体,构建双荧光素酶

报告基因质粒 WT-ING4、MUT-ING4。按照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书方法将 WT-ING4 与 miR-620 mimic 或 miR-NC、MUT-ING4 与 miR-620 mimic 或 miR-NC 共转染至 MCF-7 细胞, 培养 48 h 后, 收集各组细胞用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定各组细胞的荧光素酶活性。

1.5 克隆形成实验检测乳腺癌细胞克隆形成能力

将 anti-miR-NC 组、anti-miR-620 组、anti-miR-620+si-NC 组和 anti-miR-620+si-ING4 组 MCF-7 细胞分别以不同剂量 (0、2、4、6、8 Gy) 的 X 线照射 2 h, 继续培养 48 h, 更换新鲜培养液后继续培养, 当肉眼可见克隆形成时, 吸除培养液, PBS 洗涤后用甲醇固定 20 min, 再用 0.2% 结晶紫染色 10 min, 显微镜下计算 ≥ 50 个细胞的克隆数, 计算克隆形成率 (克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$)。利用 GraphPad Prism 7 软件, 单击多靶模型公式存活分数 (survival fraction, SF) = $1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$, 拟合细胞存活曲线, D 为照射剂量, D_0 为平均致死剂量。计算准域剂量 (D_q) 和放射增敏比 (sensitization enhancement ratio, SER), $D_q = \ln N \times D_0$, $SER = D_{0\text{对照组}}/D_{0\text{实验组}}$ 。照射剂量为 2 Gy 时对应的细胞存活分数记为 SF2。

1.6 MTT 法检测乳腺癌细胞增殖活力

将 anti-miR-NC 组、anti-miR-620 组、anti-miR-620+si-NC 组和 anti-miR-620+si-ING4 组 MCF-7 细胞消化为单细胞悬液, 按照每孔 200 μL 接种到 96 孔板 (5×10^3 个细胞/孔), 当细胞贴壁后用 4 Gy X 线照射 2 h, 依次记为 IR+anti-miR-NC 组、IR+anti-miR-620 组、IR+anti-miR-620+si-NC 组和 IR+anti-miR-620+si-ING4 组, 置于细胞培养箱中继续培养, 分别于 24、48、72 h 后, 上酶标仪在 490 nm 波长处测定每孔细胞的光密度 (D) 值。

1.7 FCM 检测乳腺癌细胞凋亡和周期

细胞凋亡检测: 取转染后 4 Gy X 线照射 2 h 并继续培养 48 h 的各组 MCF-7 细胞, PBS 液洗涤并重悬细胞, 每孔加入 Annexin V-FITC 和 PI 溶液各 5 μL , 混合均匀后, 避光处理 10 min, 上 FCM 检测细胞的凋亡情况。

细胞周期检测: 43 $\times$ g 离心 5 min 收集各组细胞沉淀, 弃上清, 用预冷 PBS 洗涤 2 次后, 加入预冷 75% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 4 h 以上。以 805 $\times$ g 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤后, 加入 400 μL PI (50 $\mu\text{g/mL}$)、100 μL RNase A (100 $\mu\text{g/mL}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光处理 30 min, 上 FCM 检测细胞周期分布情况。

1.8 WB 法检测乳腺癌细胞中 ING4、BAX、P21、Bcl-2 和 Cyclin D1 蛋白表达

利用 RIPA 裂解液提取各组 MCF-7 细胞总蛋白, BCA 法蛋白定量后, 沸水浴 3 min 变性细胞蛋白。随

后按照试剂盒说明书的实验步骤上样、进行 SDS-PAGE, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上, 在 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h。然后加入 ING4 (1:1 000)、BAX (1:500)、P21 (1:1 000)、Bcl-2 (1:500)、Cyclin D1 (1:1 000) 和 GAPDH (1:1 000) 一抗中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 处理 12 h, 洗膜后, 加入山羊抗兔二抗 (1:2 000) 中 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 2 h。利用 ELC 发光试剂盒进行显影, 凝胶成像系统拍照。以 GAPDH 为内参, 采用 ImageJ 软件分析目的蛋白条带的灰度值。

1.9 统计学处理

qPCR 法、克隆形成、MTT 法、FCM 和 WB 法等实验均重复 3 次。所有数据均用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌组织和细胞中 miR-620 高表达、ING4 mRNA 低表达

qPCR 法检测结果 (图 1) 显示, 与癌旁组织比较, 乳腺癌组织中 miR-620 表达显著升高、ING4 mRNA 表达水平显著降低 (均 $P < 0.01$, 图 1A); 与乳腺上皮细胞 HBL-100 比较, 乳腺癌 MCF-7 和 BCaP-37 细胞中 miR-620 表达水平均显著升高、ING4 mRNA 表达水平均显著降低 (均 $P < 0.01$, 图 1B)。由于 miR-620 在 MCF-7 细胞中的表达水平较高, 选用该细胞进行后续实验。

2.2 成功转染 anti-miR-620 和 si-ING4

qPCR 法检测结果显示, anti-miR-620 组 MCF-7 细胞中 miR-620 表达水平显著低于 anti-miR-NC 组 (0.31 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$), 说明 anti-miR-620 转染成功; anti-miR-620+si-ING4 组 ING4 mRNA 表达水平显著低于 anti-miR-620+si-NC 组 (0.37 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.09 , $P < 0.01$)。结果表明, anti-miR-620 和 si-ING4 转染成功。

2.3 敲减 miR-620 或同时敲减 ING4 对 MCF-7 细胞的放射敏感性的影响

以 0、2、4、6、8 Gy X 线照射各转染组 MCF-7 细胞后, 克隆形成实验结果 (图 2) 显示, anti-miR-620 组细胞存活分数显著低于 anti-miR-NC 组 ($P < 0.01$), anti-miR-620+si-ING4 组细胞存活分数显著高于 anti-miR-620+si-NC 组 ($P < 0.01$)。结果表明, 敲减 miR-620 降低放射线照射的 MCF-7 细胞活性, 而同时敲减 ING4 则逆转敲减 miR-620 对放射线照射的 MCF-7 细胞活性的影响。

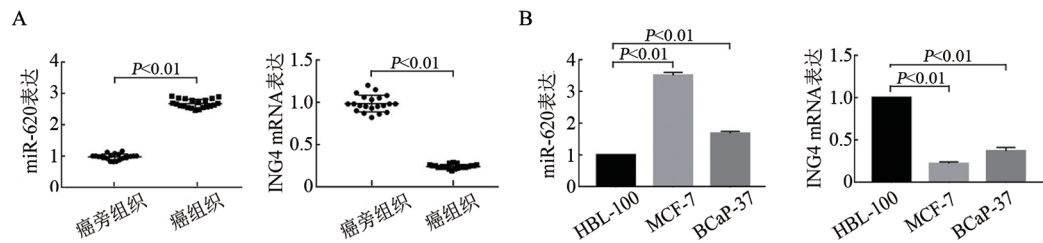
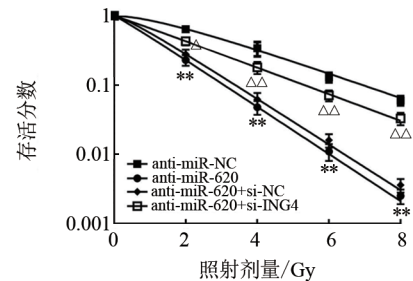


图1 miR-620和ING4 mRNA在乳腺癌组织(A)和细胞(B)中的表达

当照射剂量为4 Gy时,敲减 miR-620 的 MCF-7 细胞活性抑制率约为 50%,因此比较照射剂量为 4 Gy 时细胞克隆形成率和增敏比,结果(图 3,表 1)显示,IR+anti-miR-620 组细胞克隆形成率显著低于 IR+anti-miR-NC 组($P<0.01$),增敏比为 1.891; IR+anti-miR-620+si-ING4 组细胞克隆形成率显著高于 IR+anti-miR-620+si-NC 组($P<0.01$),增敏比为 0.628。结果表明,敲减 miR-620 提高 MCF-7 细胞放射敏感性,而同时敲减 ING4 则逆转敲减 miR-620 对 MCF-7 细胞放射敏感性的作用。



与 anti-miR-NC 组比较, * $P<0.01$; 与 anti-miR-620+si-NC 组比较, ^ $P<0.01$

图2 不同剂量照射后各组 MCF-7 细胞的存活曲线

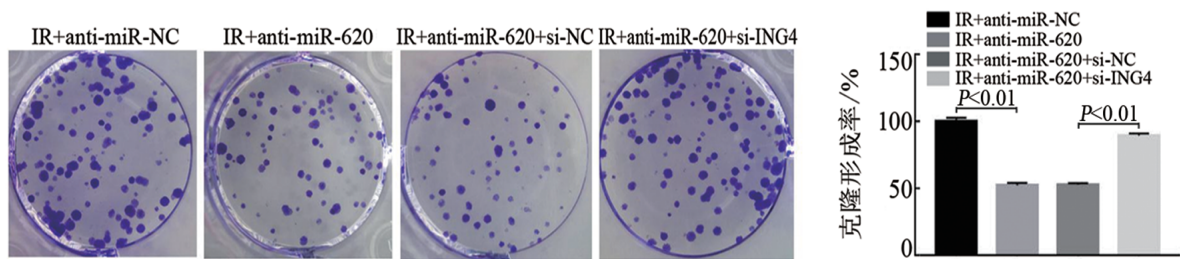


图3 敲减 miR-620 和同时敲减 ING4 对 MCF-7 细胞克隆形成的影响

表1 单击多靶模型参数

组别	D_0 (Gy)	D_q (Gy)	N	SF_2	k	SER
IR+anti-miR-NC	2.412	1.446	1.821	0.648	0.4146	—
IR+anti-miR-620	1.275	0.142	1.118	0.230	0.7841	1.891
IR+anti-miR-620+si-NC	1.315	0.376	1.331	0.280	0.7604	—
IR+anti-miR-620+si-ING4	2.095	0.096	1.047	0.399	0.4774	0.628

D_0 : 平均致死剂量; D_q : 准域剂量; N: 外推数; SF_2 : 照射剂量为 2 Gy 时对应的细胞存活分数; k: 细胞存活曲线的钝化常数; SER: 放射增敏比

2.4 敲减 miR-620 或同时敲减 ING4 对 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响

4 Gy 照射 MCF-7 细胞后, MTT 法和 FCM 检测结果(表 2, 图 4)显示,与 IR+anti-miR-NC 组比较, IR+anti-miR-620 组 MCF-7 细胞增殖活力、S 期细胞比例均显著降低(均 $P<0.01$), 细胞凋亡率、G0-G1 期细胞比例显著升高(均 $P<0.01$); 与 IR+anti-miR-620+si-NC 组比较, IR+anti-miR-620+si-ING4 组 MCF-7 细胞增殖活力、S 期细胞比例均显著升高(均 $P<0.01$), 细胞凋亡率、G0-G1 期细胞比例均显著降低(均 $P<0.01$)。

结果表明,敲减 miR-620 抑制放射线照射的 MCF-7 细胞增殖和细胞周期进程,并促进细胞凋亡;同时敲减 ING4 可逆转敲减 miR-620 对放射线照射的 MCF-7 细胞增殖、细胞周期进程及凋亡的作用。

2.5 miR-620 靶向负性调控 ING4 的表达

靶基因测序工具 StarBase 预测结果(图 5A)显示, ING4 的 3'UTR 存在于 miR-620 特异性结合的核苷酸序列。双荧光素酶报告基因实验结果(图 5B)显示,与共转染 WT-ING4 与 miR-NC 的细胞相比,共转染 WT-ING4 与 miR-620 mimic 的细胞荧光素酶活性

显著降低($P<0.01$);而与共转染MUT-ING4与miR-NC的细胞相比,共转染MUT-ING4与miR-620 mimic的细胞荧光素酶活性无变化($P=0.851>0.05$)。qPCR法和WB法检测结果(图5C)显示,与miR-NC组比较,miR-620组MCF-7细胞中miR-620表达水平显著升高(4.15 ± 0.12 vs 1.00 ± 0.00 , $P<0.01$)、ING4蛋白表达

显著降低($P<0.01$); anti-miR-620组MCF-7细胞miR-620表达低于miR-NC组(0.31 ± 0.03 vs 1.00 ± 0.00 , $P<0.01$)、ING4蛋白表达显著高于anti-miR-NC组($P<0.01$)。结果表明,miR-620靶向负性调控ING4的表达。

表2 敲减miR-620或同时敲减ING4对MCF-7的细胞周期、增殖和凋亡的影响

组别	细胞周期(%)			细胞增殖活力(D_{490})			细胞凋亡率(%)
	G0-G1	S	G2-M	24 h	48 h	72 h	
IR+anti-miR-NC	51.25 $\pm$ 3.26	25.82 $\pm$ 1.06	22.93 $\pm$ 0.86	0.48 $\pm$ 0.04	0.82 $\pm$ 0.08	1.31 $\pm$ 0.12	8.02 $\pm$ 0.66
IR+anti-miR-620	72.96 $\pm$ 4.75**	4.15 $\pm$ 0.55**	22.89 $\pm$ 1.19	0.38 $\pm$ 0.03**	0.46 $\pm$ 0.04**	0.58 $\pm$ 0.06**	23.28 $\pm$ 2.15**
IR+anti-miR-620+si-NC	73.15 $\pm$ 4.88	4.22 $\pm$ 0.37	22.63 $\pm$ 1.24	0.35 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.04	0.56 $\pm$ 0.06	24.04 $\pm$ 2.23
IR+anti-miR-620+si-ING4	57.12 $\pm$ 2.87 $\Delta\Delta$	20.73 $\pm$ 1.47 $\Delta\Delta$	22.15 $\pm$ 1.13	0.43 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$	0.61 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$	0.89 $\pm$ 0.09 $\Delta\Delta$	12.68 $\pm$ 1.22 $\Delta\Delta$
<i>F</i>	22.889	405.365	0.311	15.680	57.818	99.475	130.480
<i>P</i>	0.000	0.000	0.817	0.000	0.000	0.000	0.000

与anti-miR-NC组比较,** $P<0.01$;与anti-miR-620+si-NC组比较, $\Delta\Delta P<0.01$

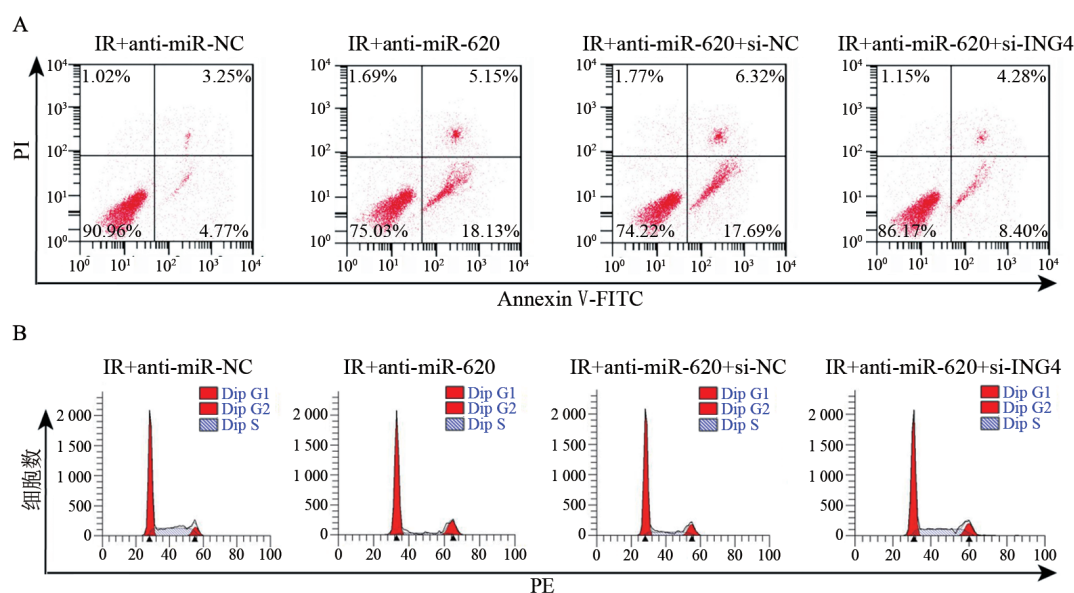


图4 敲减miR-620和同时敲减ING4对MCF-7细胞凋亡(A)和细胞周期(B)的影响

2.6 敲减miR-620或同时敲减ING4对MCF-7细胞中ING4、细胞周期和凋亡相关蛋白表达的影响

4 Gy照射MCF-7细胞后, WB法检测结果(图6)显示,与IR+anti-miR-NC组比较, IR+anti-miR-620组细胞中BAX、P21和ING4蛋白表达均显著升高(均 $P<0.01$), Bcl-2和Cyclin D1蛋白表达均显著降低(均 $P<0.01$);与IR+anti-miR-620+si-NC组比较, IR+anti-miR-620+si-ING4组细胞中BAX、P21和ING4蛋白表达均显著降低(均 $P<0.01$)、Bcl-2和Cyclin D1蛋白表达显著升高(均 $P<0.01$)。结果表

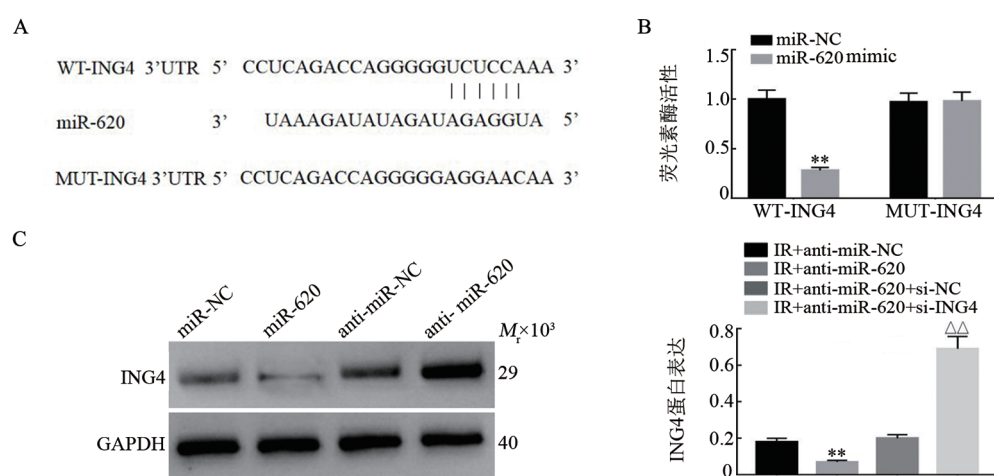
明,敲减miR-620可能通过靶向下调ING4调控BAX、P21、Bcl-2和Cyclin D1的表达,进而抑制放射线照射的MCF-7细胞增殖并促进细胞凋亡。

3 讨论

目前,放疗是局部晚期乳腺癌患者的主要治疗方式之一,但由于肿瘤细胞放射抗性的产生,使肿瘤细胞增殖能力增强,进而诱导肿瘤的复发和转移,导致乳腺癌患者预后不良。因此,探究调控乳腺癌细胞放射敏感性的基因和分子机制,对解决临床乳腺

癌细胞放射抗性难题具有重要意义。miRNA 是一类短链非编码 RNA, 其通过与靶 mRNA 的 3' 非编码区结合, 导致转录本降解或抑制蛋白质翻译。miRNA 的异常表达与肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭转移等过程密切相关, 影响着恶性肿瘤的发生和发展^[9-10]。近年来, 有研究^[11-13]结果证实, miRNA 与肿瘤细胞的放射抗性密切相关, 多种 miRNA 通过调控其靶基因参与对肿瘤细胞放射敏感性的调控。例如, miR-139-5p 通过抑制 DNA 修复和 ROS 防御的多基因网络调控乳腺癌的放疗耐药^[12], miR-22 通过靶向 SIRT1 抑制肿瘤发生, 提高乳腺癌细胞的放射敏感性^[13]。此外,

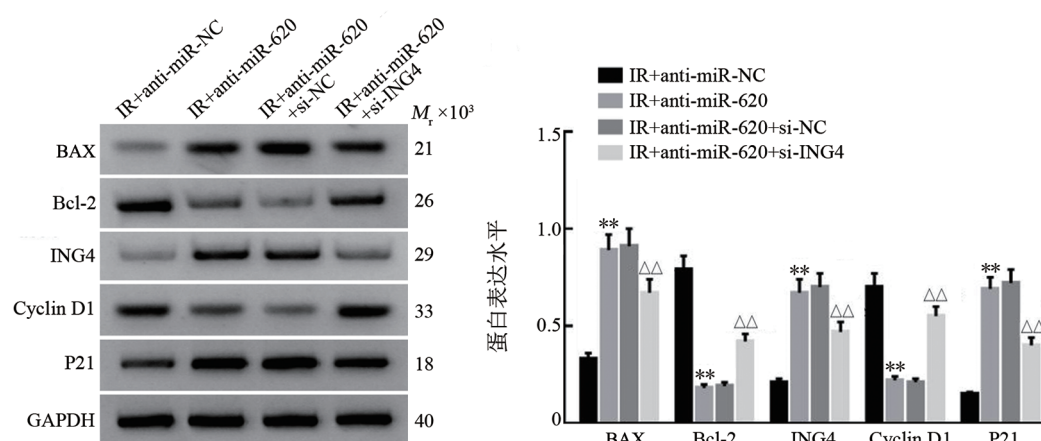
HUANG 等^[6]研究发现, miR-620 通过靶向下调 HPGD 表达, 促进癌细胞增殖, 减少 G2/M 阻滞, 从而增强癌细胞的放疗抗性。本研究结果发现, 与乳腺上皮细胞 HBL-100 相比, miR-620 在乳腺癌细胞中呈高表达。选取表达量最高的 MCF-7 细胞进行实验, 发现敲减 miR-620 表达可降低促增殖蛋白 Cyclin D1、抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 提高抗增殖蛋白 P21、促凋亡蛋白 BAX 表达水平, 抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 进而上调 MCF-7 细胞的放射敏感性。这与 HUANG 等^[6]miR-620 增强乳腺癌细胞 MDA-MB-231 放疗抗性的结论相吻合。



与 miR-NC 组或 IR+anti-miR-NC 组比较, ** $P < 0.01$; 与 IR+anti-miR-620+si-NC 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

A: miR-620 与 ING4 mRNA 的结合位点; B: 双荧光素酶报告基因实验; C: WB 法检测敲减 miR-620 对 ING4 蛋白表达的影响

图5 miR-620 靶向负调控 ING4 的表达



与 IR+anti-miR-NC 组比较, ** $P < 0.01$; 与 IR+anti-miR-620+si-NC 组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

图6 敲减 miR-620 或 ING4 对 MCF-7 细胞中 ING4 细胞周期和凋亡相关蛋白表达的影响

ING4 是生长抑制蛋白家族的成员之一, 该家族成员具有相似的结构特征, 包括 PHD 指状结构域、典型的核定位信号和一个未知功能的特殊区域^[14]。ING4 是一种潜在的肿瘤抑制因子, 在调控细胞周期、凋亡、DNA 修复、染色质修饰、抑制细胞迁移和血管

生成等过程发挥重要作用, ING4 表达下调与肿瘤转移增加、TMN 分期进展及乳腺癌患者预后不良有关^[15-16]。已有研究^[17]证实, ING4 在非小细胞肺癌组织中呈低表达, 过表达 ING4 可增强非小细胞肺癌细胞 SPC-A1 的放射敏感性。此外, 有研究^[18]结果发现,

ING4在乳腺癌组织中表达下调,ING4和IL-24两种抑癌基因的共表达可显著提乳腺癌MDA-MB-231细胞的放疗敏感性。生物信息学预测显示,ING4可能是miR-620的靶基因,但miR-620能否通过调控ING4表达影响乳腺癌细胞的放射敏感性尚未可知。本研究通过双荧光素酶报告基因实验和WB实验证实,miR-620可靶向负性调控ING4表达。研究结果^[19]表明,ING4可能通过引起G2/M期阻滞,诱导细胞凋亡,进而抑制乳腺癌细胞增殖,这与本研究中敲减ING4逆转anti-miR-620对Cyclin D1蛋白表达抑制和P21蛋白表达促进作用的结果相吻合。此外,本研究结果发现,敲减ING4能解除anti-miR-620对MCF-7细胞增殖抑制和凋亡促进的作用,并降低细胞的放射敏感性。

综上所述,miR-620在乳腺癌MCF-7细胞中表达上调,敲减miR-620可促进ING4表达,抑制MCF-7细胞增殖,促进细胞凋亡,从而增加MCF-7细胞的放射敏感性,这为临床乳腺癌的放射治疗提供了新的靶点。

参考文献

- [1] HARBECK N, GNANT M. Breast cancer[J]. Lancet, 2017, 389 (10074): 1134-1150. DOI:10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
- [2] PAN C, SUN G Z, SHA M, *et al.* Investigation of miR-93-5p and its effect on the radiosensitivity of breast cancer[J/OL]. Cell Cycle, 2021, 20(12): 1173-1180[2022-03-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8265785/>. DOI:10.1080/15384101.2021.1930356.
- [3] BAKHTARI N, MOZDARANI H, SALIMI M, *et al.* Association study of miR-22 and miR-335 expression levels and G2 assay related inherent radiosensitivity in peripheral blood of ductal carcinoma breast cancer patients[J]. Neoplasma, 2021, 68(1): 190-199. DOI:10.4149/neo_2020_200225N185.
- [4] WANG L B, YUAN C, LV K Z, *et al.* Lin28 mediates radiation resistance of breast cancer cells via regulation of caspase, H2A. X and Let-7 signaling[J/OL]. PLoS One, 2013, 8(6): e67373[2021-06-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23840685/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0067373.
- [5] WU C, ZHAO A L, TAN T Z, *et al.* Overexpression of microRNA-620 facilitates the resistance of triple negative breast cancer cells to gemcitabine treatment by targeting DCTD[J/OL]. Exp Ther Med, 2019, 18(1): 550-558[2021-06-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6566059/>. DOI:10.3892/etm.2019.7601.
- [6] HUANG X Y, TAEB S, JAHANGIRI S, *et al.* miR-620 promotes tumor radioresistance by targeting 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD)[J/OL]. Oncotarget, 2015, 6(26): 22439-22451[2021-06-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4673174/>. DOI: 10.18632/oncotarget.4210.
- [7] 张金山, 朱宗恒, 王钢胜, 等. 乳腺癌组织中ING4、HIF-1 α 和HIF-2 α 表达及与肿瘤微血管新生的关系[J]. 安徽医药, 2017, 21 (5): 847-851. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.05.018.
- [8] JIAO Y Y, YUAN C L, WU H X, *et al.* Oncogenic microRNA-765 promotes the growth and metastasis of breast carcinoma by directly targeting ING4[J/OL]. J Cell Biochem, 2019, 2019: Online ahead of print[2021-02-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31724215/>. DOI:10.1002/jcb.29545.
- [9] LI D N, LI Q. microRNA-200b-3p restrains gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion via C-X-C motif chemokine ligand 12/CXC chemokine receptor 7 axis[J]. Bioengineered, 2022, 13(3): 6509-6520. DOI:10.1080/21655979.2022.2034585.
- [10] FENG X N, ZOU B, NAN T H, *et al.* miR-25 enhances autophagy and promotes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma via targeting FBXW7[J/OL]. Int J Med Sci, 2022, 19(2): 257-266[2022-03-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8795798/>. DOI:10.7150/ijms.67352.
- [11] JIANG K X, ZOU H W. microRNA-20b-5p overexpression combing Pembrolizumab potentiates cancer cells to radiation therapy via repressing programmed death-ligand 1[J]. Bioengineered, 2022, 13(1): 917-929. DOI:10.1080/21655979.2021.2014617.
- [12] TAO X, CHENG J S, WANG X H. Effect of miRNA-200a on radiosensitivity of osteosarcoma cells by targeting Bone morphogenetic protein receptor 2[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 12625-12635. DOI:10.1080/21655979.2021.2011015.
- [13] LIU J, YAN S L, HU J, *et al.* MiRNA-4537 functions as a tumor suppressor in gastric cancer and increases the radiosensitivity of gastric cancer cells[J/OL]. Bioengineered, 2021, 12(1): 8457-8467[2022-03-05]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8806832/>. DOI: 10.1080/21655979.2021.1982843.
- [14] SMOLLE E, FINK-NEUBOECK N, LINDENMANN J, *et al.* The biological and clinical relevance of inhibitor of growth (ING) genes in non-small cell lung cancer[J/OL]. Cancers (Basel), 2019, 11(8): E1118[2021-06-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6721451/>. DOI:10.3390/cancers11081118.
- [15] CUI S Y, GAO Y P, ZHANG K, *et al.* The emerging role of inhibitor of growth 4 as a tumor suppressor in multiple human cancers[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(2): 409-422. DOI: 10.1159/000430108.
- [16] JIANG L J, ZHANG X L, XIANG C L, *et al.* Differential cellular localization of CELSR2 and ING4 and correlations with hormone receptor status in breast cancer[J]. Histol Histopathol, 2018, 33(8): 835-842. DOI:10.14670/HH-11-979.
- [17] PAN X, WANG R, BIAN H B, *et al.* Overexpression of inhibitor of growth 4 enhances radiosensitivity in non-small cell lung cancer cell line SPC-A1[J/OL]. Technol Cancer Res Treat, 2017, 16(5): 533-545[2021-06-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5665145/>. DOI:10.1177/1533034616656315.
- [18] ZHAO Y, LI Z, SHENG W, *et al.* Radiosensitivity by ING4-IL-24 bicistronic adenovirus-mediated gene cotransfer on human breast cancer cells[J]. Cancer Gene Ther, 2013, 20(1): 38-45. DOI: 10.1038/cgt.2012.82.
- [19] 刘科, 张波, 王国斌, 等. 抑癌基因ING4转染对乳腺癌细胞MDA-MB-435S生物学行为的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2010, 39(4): 442-445. DOI:10.3870/j.issn.1672-0741.2010.04.004.

[收稿日期] 2021-06-04

[修回日期] 2022-03-06

[本文编辑] 党瑞山