

- [12] SIERZEGA M, KACZOR M, KOŁODZIEJCZYK P, et al. Evaluation of serum microRNA biomarkers for gastric cancer based on blood and tissue pools profiling: the importance of miR-21 and miR-331[J]. Br J Cancer, 2017, 117(2):266-273.
- [13] ZHOU G, XIE J, GAO Z, et al. MicroRNA 877 inhibits cell proliferation and invasion in non-small cell lung cancer by directly targeting IGF 1R[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(2):1449-1457.
- [14] XIONG D, DANG Y, LIN P, et al. A circRNA - miRNA - mRNA network identification for exploring underlying pathogenesis and therapy strategy of hepatocellular carcinoma[J]. J Transl Med, 2018, 16(1):220-240.
- [15] POUDYAL D, HERMAN A, ADELSBERGER JW, et al. A novel microRNA, hsa-miR-6852 differentially regulated by Interleukin-27 induces necrosis in cervical cancer cells by downregulating the FoxM1 expression[J]. Sci Reports, 2018, 8(1):900-912.
- [16] BARGER CJ, BRANICK C, CHEE L, et al. Pan-cancer analyses reveal genomic features of FoxM1 overexpression in cancer[J]. Cancers, 2019, 11(2): 251-273.
- [17] CHAND V, PANDEY A, KOPANJA D, et al. Opposing roles of the forkhead box factors FoxM1 and FoxA2 in liver cancer[J]. Mol Cancer Res, 2019, 17(5): 1063-1074.
- [18] 刘剑. 转录因子 FOXM1 促进胃癌转移的作用研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [19] 肖长纪, 陈红, 陈慧君, 等. 下调 FoxM1 基因表达对宫颈癌细胞侵袭能力的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(2): 254-257.
- [20] 刘冬焯. siRNA 沉默 FOXM1 基因对膀胱癌细胞生物学行为的影响[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2013.
- [21] 陈洁, 严晓娣, 张东升, 等. 干预 FoxM1 表达对食管癌细胞增殖、周期及凋亡的影响[J]. 武警医学, 2017, 28(10): 1035-1038.

(收稿日期: 2020-11-20, 修回日期: 2020-12-22)

引用本文: 梁猛. 微小 RNA-525-5p 通过靶向 RECQ 样蛋白 5 调控乳腺癌放射敏感性[J]. 安徽医药, 2022, 26(10): 2032-2037. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.10.029.

◇ 临床医学 ◇



微小 RNA-525-5p 通过靶向 RECQ 样蛋白 5 调控乳腺癌放射敏感性

梁猛

作者单位: 十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)肿瘤科, 湖北 十堰 442000

摘要: **目的** 探讨微小 RNA-525-5p(miR-525-5p)对乳腺癌细胞辐射照射敏感性的影响及机制。**方法** 该研究起止时间为 2019 年 6 月至 2020 年 6 月, 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7、BT474、非恶性乳腺上皮细胞 MCF-10A 均购自美国菌种保藏中心。运用 qRT-PCR 法检测人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7、BT474、非恶性乳腺上皮细胞 MCF-10A 中 miR-525-5p 的 mRNA 的表达; 将 miR-525-5p 模拟物(miR-525-5p mimics)阴性对照(miR-NC)组(转染 miR-NC)、miR-525-5p 组(转染 miR-525-5p mimics)、RECQL5 小干扰 RNA 阴性对照(si-NC)组(转染 si-NC)、RECQL5 小干扰 RNA(si-RECQL5)组(转染 si-RECQL5)、miR-525-5p+RECQL5 过表达空载体(pcDNA)组(共转染 miR-525-5p mimics 和 pcDNA)、miR-525-5p+RECQL5 过表达载体(pcDNA-RECQL5)组(共转染 miR-525-5p mimics 和 pcDNA-RECQL5), 均用脂质体法转染至 MDA-MB-231 细胞; Western blotting 检测细胞中 RECQ 样蛋白 5(RECQL5)的蛋白表达; 流式细胞术检测细胞凋亡; 双荧光素酶报告基因检测实验检测细胞的荧光活性; 克隆形成实验检测细胞的存活分数。**结果** 与非恶性乳腺上皮细胞 MCF-10A 相比, 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7、BT474 中 miR-525-5p 表达 $[0.28\pm 0.02, 0.33\pm 0.02, 0.42\pm 0.03]$ 比 $1.01\pm 0.08]$ 显著降低, RECQL5 mRNA 和蛋白表达 $[1.68\pm 0.15, 1.58\pm 0.12, 1.48\pm 0.11]$ 比 $1.00\pm 0.08; 1.43\pm 0.11, 1.38\pm 0.12, 1.53\pm 0.14]$ 显著升高($P<0.05$)。过表达 miR-525-5p 或敲减 RECQL5 均可促进乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡, 增强对辐射照射的敏感性。miR-525-5p 可抑制野生型 RECQL5 细胞的荧光活性, 并负向调控 RECQL5 的表达。过表达 RECQL5 可逆转 miR-525-5p 对乳腺癌细胞的凋亡促进及辐射增敏作用。**结论** miR-525-5p 可促进乳腺癌细胞凋亡, 增强对辐射照射的敏感性, 其机制与靶向 RECQL5 有关, 将可为乳腺癌的放射治疗提供新方向。**关键词:** 乳腺肿瘤; RecQ 解旋酶类; 微小 RNA-525-5p; 放射敏感性

MicroRNA-525-5p regulates radiosensitivity of breast cancer by targeting RECQ protein-like 5

LIANG Meng

Author Affiliation: Oncology Department, Shiyan Taihe Hospital(The Affiliated Hospital of Hubei Medical College), Shiyan, Hubei 442000, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of microRNA-525-5p (miR-525-5p) on the sensitivity of breast cancer cells to radiation exposure. **Methods** The start and end time of this study was from June 2019 to June 2020. Human breast cancer cell MDA-MB-231, MCF-7, BT474 and non-malignant mammary epithelial cell MCF-10A were purchased from the American Culture Collection. qRT-PCR was used to detect the expressions of miR-525-5p mRNA in human breast cancer cell line MDA-MB-231, MCF-7, BT474 and non-malignant mammary epithelial cell MCF-10A; miR-525-5p mimics negative control (miR-NC) group (transfected miR-NC), the miR-525-5p group (transfected miR-525-5p mimics), RECQL5 small interfering RNA negative control (si-NC) group (transfected si-NC), RECQL5 small interfering RNA (si-RECQL5) group (transfected si-RECQL5), miR-525-5p+RECQL5 overexpression empty vector (pcDNA) group (co-transfected miR-525-5p mimics and pcDNA), and miR-525-5p+RECQL5 overexpression vector (pcDNA-RECQL5) group (co-transfected miR-525-5p mimics and pcDNA-RECQL5) all transfected into MDA-MB-231 cells by liposome. The protein expression of RECQ protein-like 5 (RECQL5) in cells was detected by Western blotting, the apoptosis was detected by flow cytometry, and the fluorescence activity of cells was detected by double luciferase reporter gene assay. The colony formation assay detected the survival fraction of the cells. **Results** Compared with non-malignant mammary epithelial cells MCF-10A, the expressions of miR-525-5p [(0.28±0.02), (0.33±0.02), (0.42±0.03) vs. (1.01±0.08)] were significantly decreased and the mRNA and protein expressions of RECQL5 [(1.68±0.15), (1.58±0.12), (1.48±0.11) vs. (1.00±0.08); (1.43±0.11), (1.38±0.12), (1.53±0.14) vs. (0.99±0.07)] were significantly increased in human breast cancer cells MDA-MB-231, MCF-7 and BT474 ($P<0.05$). Overexpression of miR-525-5p or knockdown of RECQL5 could both promote the apoptosis of breast cancer cells MDA-MB-231 and enhance the sensitivity to radiation exposure. MiR-525-5p inhibited the fluorescence activity of wild-type RECQL5 cells and negatively regulated the expression of RECQL5. Overexpression of RECQL5 reversed the apoptosis promotion and irradiation sensitization of breast cancer cells by miR-525-5p. **Conclusion** MiR-525-5p can promote the apoptosis of breast cancer cells and enhance the sensitivity to radiation exposure. The mechanism is related to the targeting of RECQL5, which will provide a new idea for radiation therapy of breast cancer.

Key words: Breast neoplasms; RecQ helicases; miR-525-5p; Radiosensitivity

保乳术后的放射治疗在临床上已经很成熟,可以保留大多数早期乳腺癌病人的器官;即使乳房切除后,放射治疗仍然是防止术后局部复发的有效手段^[1-2]。然而,放射抗性是影响乳腺癌病人预后的重要因素^[3-4]。miRNA在癌症中的功能得到普遍认可,其不仅参与癌症的发生发展,在癌症的放化疗抗性中可具有重要作用^[5-6]。研究报道微小RNA-525-5p(miR-525-5p)可抑制宫颈癌细胞的增殖和转移^[7]。朱长春等^[8]在乳腺癌放射治疗的研究中报道,miR-525-3p为乳腺癌细胞辐照后表达异常升高的miRNA之一,具有成为放射治疗新靶点的潜力。然而miR-525-5p对乳腺癌放射敏感性的影响及机制尚未清楚。RECQ解旋酶(recQ helicase)为DNA解旋酶,被称为“基因的守护者”,包括RECQL1、WRN、BLM、RECQL4和RECQL5等成员,其表达水平与乳腺癌病人的预后密切相关^[9-10]。RECQL5基因与DNA复制、修复和转录密切相关,Peng等^[11]报道,三阴性乳腺癌细胞中的RECQL5功能受损,导致DNA损伤持续存在、G2停滞,最终导致增殖停止,表明RECQL5可能是TNBC的潜在治疗靶点。RECQL5高表达促进非小细胞肺癌的转移和对顺铂的耐药性^[12],但是RECQL5在乳腺癌中的功能研究甚少。因此,本研究在2019年6月至2020年6月开展,旨在探讨miR-525-5p、RECQL5对人乳腺癌细胞MDA-MB-231辐射照射敏感性的影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7、BT474、非恶性乳腺上皮细胞MCF-10A均购自美国菌种保藏中心;DMEM培养基购自invitrogen公司;胎牛血清购自上海江林生物科技有限公司;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂购自美国Selleck公司;LipofectamineTM2000购自上海阳光生物科技有限公司;二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒购自上海玉博生物科技有限公司;逆转录试剂盒购自美国Promega公司;聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)购自武汉迈博瑞生物膜技术有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙锭(Annexin V-Fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)凋亡检测试剂盒购自上海臻诺生物有限公司。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人乳腺癌细胞MDA-MB-231、MCF-7、BT474以及正常乳腺上皮细胞MCF-10A使用DMEM培养基(10%胎牛血清)在37℃、5%二氧化碳的恒温细胞培养箱中进行常规培养。

1.2.2 转染和分组 将正常培养的MDA-MB-231、MCF-7、BT474、MCF-10A细胞分别标记为MDA-MB-231组、MCF-7组、BT474组、MCF-10A组。将MDA-MB-231细胞按随机数字表法分为miR-525-5p模拟物

(miR-525-5p mimics) 阴性对照(miR-NC)组、miR-525-5p组、RECQL5小干扰RNA阴性对照(si-NC)组、RECQL5小干扰RNA(si-RECQL5)组、miR-525-5p+RECQL5过表达空载体(pcDNA)组、miR-525-5p+RECQL5过表达载体(pcDNA-RECQL5)组。处理方法:按照脂质体Lipofectamine™2000的说明书操作,将miR-NC、miR-525-5p mimics、si-NC、si-RECQL5、miR-525-5p mimics+pcDNA、miR-525-5p mimics+pcDNA-RECQL5转染至MDA-MB-231细胞,转染4 h后,补充培养基继续培养48 h,在进行转染效率的检测。确定转染成功后方可用于后续试验。

1.2.3 miR-525-5p、RECQL5 mRNA的qRT-PCR检测实验 取适量对数生长期“1.2.2”各组细胞,提取细胞总RNA后,快速将其合成cDNA,再用qRT-PCR试剂盒进行miR-525-5p、RECQL5检测。以U6、GAPDH为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct} = [(CT_{miRNA} - CT_{U6}) \text{ Treatment group} - (CT_{miRNA} - CT_{U6}) \text{ Control group}]$ 计算miR-525-5p的表达, $2^{-\Delta\Delta Ct} = [(CT_{RECQL5} - CT_{GAPDH}) \text{ Treatment group} - (CT_{RECQL5} - CT_{GAPDH}) \text{ Control group}]$ 计算RECQL5的表达。信物序列(5'-3'): miR-525-5p正向引物CUC-CAGAGGGAUGCAC,反向引物GTGCAGGGTCC-GAGGT;U6、GAPDH均采用通用内参引物序列。RECQL5引物由上海吉玛公司设计合成。

1.2.4 RECQL5的蛋白检测实验 取适量对数生长期“1.2.2”各组细胞,冰上用蛋白裂解液充分裂解并提取总蛋白,定量后用沸水浴法进行变性。将蛋白用聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳,再将蛋白转移到PVDF膜。将膜用脱脂奶粉封闭2 h后浸入一抗(1:1 500)溶液中孵育过夜(4℃)。结束后再将膜浸入二抗(1:1 000)溶液中孵育2 h(37℃)。用超敏ECL电化学发光试剂盒对膜进行显影曝光,再用Image J分析条带灰度值。

1.2.5 细胞凋亡检测 按照Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒要求操作,首先将“1.2.2”各转染组细胞用500 μL的结合缓冲液悬浮,然后依次加入Annexin V-FITC、PI,避光反应后上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。细胞总凋亡率(%)为Annexin V-FITC染色阳性细胞百分比与PI阳性染色细胞百分比之和。

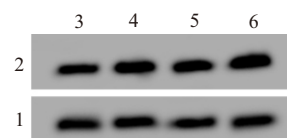
1.2.6 克隆形成实验检测细胞的辐射敏感性 先用Siemens Primus直线加速器6 mV高能X线,设置剂量率3 Gy/min,以0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy垂直照射10 cm×10 cm范围,距靶源30 cm,在辐射照射结束后放置在37℃,5%二氧化碳培养箱中常规培养传代,约培养4 d。平皿底部出现肉眼可见的小白点,用甲醇固定(15 min)和吉姆萨染色(25 min),最后在显微镜下观察细胞的克隆数,并计数。

1.2.7 双荧光素酶报告基因检测实验检测miR-525-5p与RECQL5的结合力 用生物信息学在线预测网站Target Scan(<http://www.targetscan.org/>)预测miR-525-5p的靶标。为了验证miR-525-5p与RECQL5之间的靶向关系,将RECQL5 3'UTR-WT(含RECQL5 3'UTR片段)和RECQL5 3'UTR-MUT(含RECQL5 3'UTR片段突变体)克隆至载体psiCHECK2中,构建荧光素酶报告载体psiCHECK2-RECQL5-3'UTR WT、psiCHECK2-RECQL5-3'UTR MUT。再用Lipofectamine™2000法分别将其与miR-525-5p、miR-NC、miR-525-5p抑制物(anti-miR-525-5p)、anti-miR-525-5p阴性对照(anti-miR-NC)共转染至MDA-MB-231,24 h后,按双荧光素酶报告基因检测试剂盒技术手册操作并分析检测结果。

1.2.8 统计学方法 实验数据的分析使用SPSS 21.0软件,数据相关图片的绘制使用GraphPad Prism 6.0,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用单因素方差分析+LSD-*t*检验,两组比较采用独立样本*t*检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞中miR-525-5p、RECQL5的表达 与MCF-10A组相比,MDA-MB-231、MCF-7、BT474组细胞中miR-525-5p mRNA表达显著降低,RECQL5 mRNA和蛋白表达均显著升高(*P*<0.05)。选择与正常细胞差异有统计学意义的MDA-MB-231细胞进行后续试验研究。见图1,表1。



注:1—β-肌动蛋白(β-actin);2—RECQL5样蛋白5(RECQL5);3—人非恶性乳腺上皮细胞(MCF-10A);4—人乳腺癌细胞(MDA-MB-231);5—人乳腺癌细胞(MCF-7);6—人乳腺癌细胞(BT474)。

图1 RECQL5蛋白的表达

表1 miR-525-5p、RECQL5在乳腺癌细胞中的表达/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复 次数	miR-525-5p mRNA	RECQL5 mRNA	RECQL5 蛋白
MCF-10A	9	1.01±0.08	1.00±0.08	0.99±0.07
MDA-MB-231	9	0.28±0.02 ^①	1.68±0.15 ^①	1.43±0.11 ^①
MCF-7	9	0.33±0.02 ^①	1.58±0.12 ^①	1.38±0.12 ^①
BT474	9	0.42±0.03 ^①	1.48±0.11 ^①	1.53±0.14 ^①
<i>F</i> 值		508.74	58.98	39.55
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:MCF-10A为人非恶性乳腺上皮细胞,MDA-MB-231、MCF-7、BT474为人乳腺癌细胞,miR-525-5p为微小RNA-525-5p,RECQL5为RECQL5样蛋白5。

①与MCF-10A组比较,*P*<0.05。

2.2 细胞凋亡及过表达miR-525-5p调节乳腺癌细胞的辐射敏感性 与miR-NC组相比,miR-525-5p组MDA-MB-231细胞中miR-525-5p表达显著升高,细胞凋亡率显著升高,在2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy辐照下,细胞存活分数均显著降低($P<0.05$),见表2;图2、3。miR-NC组、miR-525-5p组的单击多靶模型的参数值见表3,放射增敏比(SER)值为1.659,具有增敏作用。

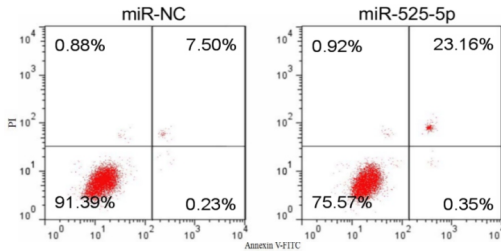


图2 过表达miR-525-5p调节乳腺癌细胞的凋亡

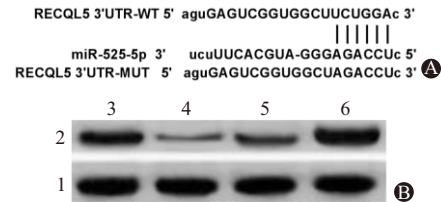
表3 miR-NC组、miR-525-5p组的单击多靶模型参数

组别	D_0/Gy	D_q/Gy	N	SF_2	k	SER
miR-NC	2.587	1.308	1.798	0.679	0.358	—
miR-525-5p	1.108	0.674	1.720	0.411	0.649	1.659

注:miR-NC为微小RNA-525-5p模拟物阴性对照,miR-525-5p为微小RNA-525-5p, D_0 为平均致死剂量, D_q 为准阈剂量,N、k为单击多靶模型 $y=1-[1-\exp(-kx)]^N$ 中的参数, SF_2 为2 Gy剂量照射后的细胞存活分数,SER为放射增敏比。

2.3 miR-525-5p靶向RECQL5 结果如图4A所示,生物信息学预测显示,miR-525-5p与RECQL5存在靶向互补结合位点。与miR-NC组相比,miR-525-5p组WT-RECQL5细胞的荧光活性显著降低 0.23 ± 0.02 , 1.00 ± 0.08 ;与miR-NC组相比,miR-525-5p组细胞中RECQL5相对蛋白表达量显著降低 0.20 ± 0.02 , 1.01 ± 0.08 ,与anti-miR-NC组相比,anti-miR-525-5p

组细胞中RECQL5相对蛋白表达量显著升高 1.79 ± 0.16 , 1.00 ± 0.09 (图4B, $P<0.05$)。



注:1—RECQ样蛋白5(RECQL5);2—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);3—微小RNA-525-5p模拟物阴性对照(miR-NC);4—微小RNA-525-5p(miR-525-5p);5—miR-525-5p抑制物阴性对照(anti-miR-NC);6—miR-525-5p抑制物(anti-miR-525-5p)。

图4 RECQL5的3'UTR中含有与miR-525-5p互补的核苷酸序列和RECQL5蛋白表达

2.4 敲减RECQL5对乳腺癌细胞辐射敏感性的影响 与si-NC组相比,si-RECQL5组MDA-MB-231细胞中RECQL5表达显著降低,细胞凋亡率显著升高,在2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy辐照下,细胞存活分数均显著降低($P<0.05$),见表4,图5。si-NC组、si-RECQL5组的单击多靶模型的参数值见表5,SER值为1.882,具有增敏作用。

2.5 过表达RECQL5逆转miR-525-5p对乳腺癌细胞辐射的增敏作用 与miR-525-5p+pcDNA组相比,miR-525-5p+pcDNA-RECQL5组MDA-MB-231细胞中miR-525-5p表达显著降低,细胞凋亡率显著降低,在2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy辐照下,细胞存活分数均显著升高($P<0.05$),见表6,图6。miR-525-5p+pcDNA组、miR-525-5p+pcDNA-RECQL5组的单击多靶模型的参数值见表7,SER值为1.286,具有增敏作用。

表2 过表达miR-525-5p对乳腺癌细胞辐射敏感性的影响/ $\bar{x}\pm s$

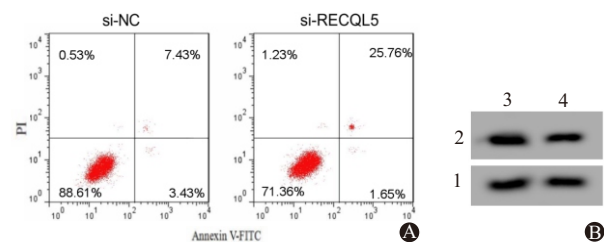
组别	重复次数	miR-525-5p	凋亡率/%	存活分数			
				2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
miR-NC	9	1.00 ± 0.06	7.43 ± 0.54	0.89 ± 0.06	0.75 ± 0.07	0.55 ± 0.05	0.34 ± 0.03
miR-525-5p	9	1.86 ± 0.07	25.76 ± 1.15	0.67 ± 0.54	0.41 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
t值		27.98	43.28	1.22	12.65	30.01	29.41
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:miR-NC为微小RNA-525-5p模拟物阴性对照,miR-525-5p为微小RNA-525-5p。

表4 敲减RECQL5对乳腺癌细胞辐射敏感性的影响/ $\bar{x}\pm s$

组别	重复次数	RECQL5	凋亡率/%	存活分数			
				2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
si-NC	9	1.73 ± 0.14	7.50 ± 0.51	0.89 ± 0.09	0.75 ± 0.07	0.55 ± 0.05	0.34 ± 0.03
si-RECQL5	9	0.86 ± 0.07	23.16 ± 2.01	0.67 ± 0.06	0.41 ± 0.04	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01
t值		16.68	22.66	6.10	14.62	30.01	29.41
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:RECQL5为RECQ样蛋白5,si-NC为RECQ样蛋白5小干扰RNA阴性对照,si-RECQL5为RECQ样蛋白5小干扰RNA。



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—RECQ样蛋白5(RECQL5);3—RECQ样蛋白5小干扰RNA阴性对照(si-NC);4—RECQ样蛋白5小干扰RNA(si-RECQL5)。

图5 敲减RECQL5对乳腺癌细胞辐射敏感性的影响:A为流式细胞仪检测细胞凋亡;B为Western blotting检测RECQL5蛋白表达

表5 si-NC组、si-RECQL5组的单剂多靶模型参数

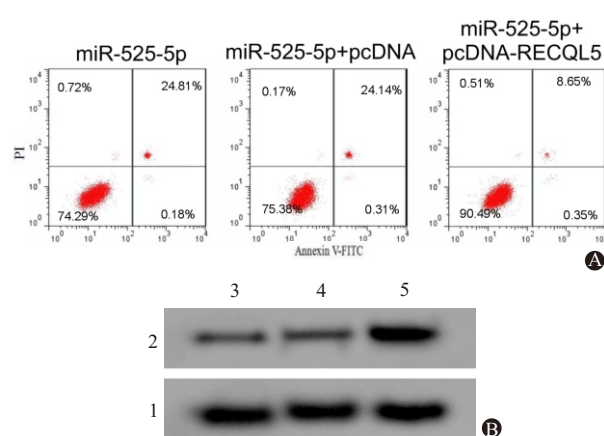
组别	D_0 /Gy	D_q /Gy	N	SF_2	k	SER
si-NC	2.565	1.987	2.170	0.736	0.390	—
si-RECQL5	1.363	1.039	2.144	0.430	0.734	1.882

注:1.“—”为无相关数据。

2.si-NC为RECQ样蛋白5小干扰RNA阴性对照,si-RECQL5为RECQ样蛋白5小干扰RNA, D_0 为平均致死剂量, D_q 为准阈剂量,N、k为单剂多靶模型 $y=1-[1-\exp(-k \times x)]^N$ 中的参数, SF_2 为2 Gy剂量照射后的细胞存活分数,SER为放射增敏比。

3 讨论

miRNA是一种有19-25个核苷酸组成的内源性、稳定的非编码小分子RNA,其可沉默靶基因的转录,抑制蛋白的翻译,进而参与癌症的进展^[13]。Anne等^[14]报道miR-525-3p在宫颈癌细胞、骨肉瘤细胞和脐静脉细胞融合细胞辐射照射后的表达水平明显上调,增强辐射照射的敏感性,并且miR-525-3p可靶向 β 抑制蛋白1(β -arrestin 1, ARRB1)、硫氧还蛋白(thioredoxin, TXN1)和热休克蛋白A9(heat-shock protein A9, HSPA9),揭示miR-525-3p的上调及其直接靶标ARRB1、TXN1和HSPA9的下调是辐射后细胞存活的关键作用,提示miR-525-3p可能是改善放射敏感性的潜在靶标。Mark等^[15]发现,在膀胱癌和乳腺癌中miR-525-3p为DNA修复基因结合位点miRNA之一,其表达水平异常下调,且对放射治疗后膀胱癌、乳腺癌病人的生存率具有明显的调



注:1— β -肌动蛋白(β -actin);2—RECQ样蛋白5(RECQL5);3—微小RNA-525-5p(miR-525-5p);4—微小RNA-525-5p与RECQ样蛋白5过表达空载体(miR-525-5p+pcDNA);5—微小RNA-525-5p与RECQ样蛋白5过表达载体(miR-525-5p+pcDNA-RECQL5)。

图6 乳腺癌细胞凋亡及RECQL5蛋白表达:A为流式细胞仪检测细胞凋亡;B为Western blotting检测RECQL5转染情况

控作用。令人遗憾的是,miR-525-5p对乳腺癌细胞辐射照射的敏感性的调控并未深入探究。本研究检测了乳腺癌细胞系MDA-MB-231、MCF-7、BT474中miR-525-5p的表达,结果显示,miR-525-5p异常降低,为其在癌症中的功能研究奠定基础;进一步研究发现,过表达miR-525-5p可促进乳腺癌细胞的凋亡,增强癌细胞对辐射照射的敏感性,为提高乳腺癌的放射治疗的疗效提供新的作用靶点;通过生物信息学分析、双荧光素酶报告基因检测实验及Western blotting证实miR-525-5p可负向调控RECQL5的表达。

RECQL5是RecQ家族DNA解旋酶的成员,在同源重组、碱基切除修复、复制和转录中具有关键作用^[16]。Lin等^[17]研究发现胃癌组织中RECQL5 mRNA的表达显著下调,RECQL5的低表达与肿瘤的浸润深度、组织学分化程度和TNM分期显著相关,提示胃癌病人的预后较差。Arora等^[18]的研究中发现,乳腺癌中RECQL5的表达水平明显升高,这与高组织学分级、更高的有丝分裂指数、去分化、多形

表6 过表达RECQL5对miR-525-5p的乳腺癌细胞辐射增敏作用的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	RECQL5	miR-525-5p	凋亡率/%	存活分数			
					2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
miR-525-5p	9	0.32±0.03	1.00±0.08	24.81±2.11	0.69±0.07	0.41±0.07	0.05±0.01	0.04±0.02
miR-525-5p+pcDNA	9	0.30±0.02	0.98±0.07	24.14±2.02	0.66±0.06	0.38±0.04	0.04±0.01	0.03±0.01
miR-525-5p+pcDNA-RECQL5	9	0.81±0.08	0.46±0.04 ^①	8.65±0.79 ^①	0.85±0.07 ^①	0.72±0.05 ^①	0.57±0.05 ^①	0.38±0.04 ^①
F值		292.56	196.19	246.48	21.02	106.30	919.00	510.43
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:RECQL5为RECQ样蛋白5,miR-525-5p为微小RNA-525-5p,miR-525-5p+pcDNA为微小RNA-525-5p与RECQ样蛋白5过表达空载体,miR-525-5p+pcDNA-RECQL5为微小RNA-525-5p与RECQ样蛋白5过表达载体。

①与miR-525-5p+pcDNA组比较, $P<0.05$ 。

表7 miR-525-5p+pcDNA组、miR-525-5p+pcDNA-RECQL5组的单击多靶模型参数

组别	D ₀ /Gy	D _q /Gy	N	SF ₂	k	SER
miR-525-5p+pcDNA	1.213	1.025	2.034	0.361	0.711	
miR-525-5p+pcDNA-RECQL5	2.289	1.443	1.612	0.541	0.401	1.286

注: miR-525-5p+pcDNA 为微小 RNA-525-5p 与 RECQ 样蛋白 5 过表达空载体, miR-525-5p+RECQL5 为微小 RNA-525-5p 与 RECQ 样蛋白 5 过表达载体, D₀ 为平均致死剂量, D_q 为准阈剂量, N、k 为单击多靶模型 $y=1-[1-\exp(-k \times x)]^N$ 中的参数, SF₂ 为 2 Gy 剂量照射后的细胞存活分数, SER 为放射增敏比。

性和生存率低显著相关,揭示了其在乳腺癌中的致癌功能,提示 RECQL5 是一种有前途的乳腺癌生物标志物。Sun 等^[19]发现, RECQL 是一种潜在的乳腺癌易感基因,其突变有助于家族性乳腺癌的发展。因此,我们推测 RECQL5 在乳腺癌放射治疗中具有增敏作用。本研究检测了乳腺癌细胞中 RECQL5 的表达,发现 RECQL5 高表达,这与前人的研究结果均相一致;进一步研究发现,敲减 RECQL5 可促进乳腺癌细胞凋亡,增强其对辐照的敏感性,更重要的是,过表达 RECQL5 可逆转 miR-525-5p 对乳腺癌细胞辐照的增敏作用,这不仅说明 RECQL5 具有辐照增敏作用,其辐照增敏功能还受 miR-525-5p 的逆向调控。这些结果为增强乳腺癌放射治疗的疗效提供新靶点,探索 miR-525-5p、RECQL5 在乳腺癌中的功能机制提供更充分的实验依据。

综上所述, miR-525-5p 可增强乳腺癌细胞对辐照照射的敏感性,这可能与靶向 RECQL5 促进癌细胞凋亡有关,为乳腺癌的放射治疗提供新方向。

(本文图3见插图10-3)

参考文献

- [1] TAFAZOLI A. Coenzyme Q10 in breast cancer care[J]. Future Oncol, 2017, 13(11): 1035-1041.
- [2] CASTANEDA SA, STRASSER J. Updates in the treatment of breast cancer with radiotherapy [J]. Surg Oncol Clin N Am, 2017, 26(3): 371-382.
- [3] GIUGLIANO FM, FALIVENE S, ESPOSITO E, et al. External radiotherapy for breast cancer in the elderly [J]. Aging Clin Exp Res, 2017, 29(Suppl 1): 149-157.
- [4] BOYAGES J. Radiation therapy and early breast cancer: current controversies[J]. Med J Aust, 2017, 207(5): 216-222.
- [5] MCGUIRE A, BROWN JA, KERIN MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring[J]. Cancer Metastasis Rev, 2015, 34(1): 145-155.
- [6] TUTAR Y. miRNA and cancer; computational and experimental approaches[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2014, 15(5): 429.
- [7] CHEN M, LIU LX. MiR-525-5p repressed metastasis and anoikis resistance in cervical cancer via blocking UBE2C/ZEB1/2 signal axis[J]. Dig Dis Sci, 2020, 65(8): 2442-2451.
- [8] 朱长春, 冯国兴, 樊赛军. 基于生物信息学筛选乳腺癌放疗抵抗相关微小 RNA 的研究[J]. 国际生物医学工程杂志, 2018, 41(3): 245-249, 260.
- [9] ZHU X, CHEN H, YANG Y, et al. Istinct prognosis of mRNA expression of the five RecQ DNA-helicase family members-RECQL, BLM, WRN, RECQL4, and RECQL5-in patients with breast cancer[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 6649-6668.
- [10] MILLS M, HARAMI GM, SEOL Y, et al. RecQ helicase triggers a binding mode change in the SSB-DNA complex to efficiently initiate DNA unwinding [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(20): 11878-11890.
- [11] PENG J, TANG L, CAI M, et al. RECQL5 plays an essential role in maintaining genome stability and viability of triple-negative breast cancer cells [J]. Cancer Med, 2019, 8(10): 4743-4752.
- [12] XIA HW, ZHANG ZQ, YUAN J, et al. Human RECQL5 promotes metastasis and resistance to cisplatin in non-small cell lung cancer [J]. Life Sci, 2020, 17: 118768. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118768.
- [13] BACKES C, MEESE E, KELLER A. Specific miRNA disease biomarkers in blood, serum and plasma: challenges and prospects [J]. Mol Diagn Ther, 2016, 20(6): 509-518.
- [14] ANNE K, ZARKO B, HAKAN S, et al. Cell survival following radiation exposure requires miR-525-3p mediated suppression of ARRB1 and TXN1 [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(10): e77484. DOI: 10.1371/journal.pone.0077484.
- [15] MARK TWTEO, LANDI D, TAYLOR CF, et al. The role of microRNA-binding site polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for bladder cancer and breast cancer and their impact on radiotherapy outcomes [J]. Carcinogenesis, 2012, 33(3): 581-586.
- [16] WU J, ZHI L, DAI X, et al. Decreased RECQL5 correlated with disease progression of osteosarcoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 467(4): 617-622.
- [17] LIN Y, WANG H, WANG X, et al. Low expression of RecQlike helicase 5 is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. Oncol Lett, 2020, 19(1): 985-991.
- [18] ARORA A, ABDEL FTM, AGARWAL D, et al. Clinicopathological and prognostic significance of RECQL5 helicase expression in breast cancers[J]. Carcinogenesis, 2016, 37(1): 63-71.
- [19] SUN J, WANG Y, XIA Y, et al. Mutations in RECQL gene are associated with predisposition to breast cancer[J/OL]. PLoS Genet, 2015, 11(5): e1005228. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005228.

(收稿日期: 2020-09-25, 修回日期: 2020-12-08)