

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.10.007

· 基础研究 ·

miR-31-5p 通过调控 *TNSI* 抑制乳腺癌细胞生物学行为及放疗抵抗的分子机制

余杰, 王旻, 贾彦召, 杨峥, 张森, 刘瀚文, 饶石磊, 张凯(南阳市中心医院 肿瘤放疗科, 河南 南阳 473009)

[摘要] **目的:** 探讨 miR-31-5p/张力蛋白 1 基因(*tension protein 1, TNSI*) 分子轴对乳腺癌细胞生物学行为的影响及其放疗抵抗的分子机制。**方法:** 收集 2017 年 7 月至 2017 年 12 月南阳市中心医院肿瘤放疗科收治的、经手术切除的 21 例乳腺癌患者癌及癌旁组织标本, 以及乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR-3, 采用 qPCR 法检测癌组织和癌细胞系中 miR-31-5p 的表达水平。通过 6 MV-X 射线照射 MCF-7 细胞, 构建放疗抵抗细胞株 MCF-7R。随后, 采用克隆形成实验、Transwell 小室法和 Annexin V/PI 染色流式细胞术检测过表达/敲降 miR-31-5p 对 MCF-7 和 MCF-7R 细胞放疗敏感性的影响; 用双荧光素酶报告基因验证 miR-31-5p 与 *TNSI* 的靶向关系。**结果:** 乳腺癌组织、细胞系和 MCF-7R 细胞中 miR-31-5p 表达水平显著低于癌旁组织、人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 和 MCF-7 细胞(均 $P < 0.01$)。过表达 miR-31-5p 显著抑制 MCF-7R 细胞的侵袭并促进细胞凋亡(均 $P < 0.01$), 沉默 miR-31-5p 在 MCF-7 细胞中结果相反。双荧光素酶报告基因法证实 *TNSI* 是 miR-31-5p 靶基因。过表达 miR-31-5p 通过靶向下调 *TNSI* 显著抑制 MCF-7R 细胞侵袭能力并促进细胞凋亡(均 $P < 0.01$), 沉默 miR-31-5p 通过上调 *TNSI* 显著促进 MCF-7 细胞侵袭和抑制细胞凋亡(均 $P < 0.01$), 从而上调 MCF-7R 对放疗治疗的敏感性。**结论:** miR-31-5p/*TNSI* 分子轴与乳腺癌放疗抵抗存在调控关系, 且过表达 miR-31-5p 可逆转 MCF-7R 细胞对放疗抵抗作用。

[关键词] 乳腺癌; miR-31-5p; 张力蛋白 1 基因(*TNSI*); 放疗抵抗; 侵袭; 凋亡

[中图分类号] R737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)09-1013-08

Mechanisms of miR-31-5p inhibiting biological behavior and radiotherapy resistance of breast cancer cells via regulating *TNSI*

YU Jie, WANG Yang, JIA Yanzhao, YANG Zheng, ZHANG Sen, LIU Hanwen, RAO Shilei, ZHANG Kai (Department of Cancer Radiotherapy, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473009, Henan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism of miR-31-5p/*tension protein 1 gene (TNSI)* axis modulating radiotherapy resistance in breast cancer. **Methods:** The breast cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues of 21 patients with breast cancer, who underwent surgical resection at Department of Cancer Radiotherapy of Nanyang Central Hospital from July 2017 to December 2017, were collected for this study; breast cancer cell lines (MCF-7, MDA-MB-23 and SKBR-3) were also collected; qPCR was applied to detect the expression level of miR-31-5p in breast cancer tissues and cell lines. The radiation resistant cell line MCF-7R was constructed by using 6 MV-X ray radiotherapy treatment. Subsequently, the influence of over-expression/knockdown of miR-31-5p on radiation sensitivity of MCF-7 and MCF-7R cells were detected by colony formation assay, Transwell assay and Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry assay, respectively. Moreover, luciferase reporter assay was used to verify whether *TNSI* was a target gene of miR-31-5p. **Results:** Compared with para-cancerous tissues, normal mammary epithelial MCF-10A cells and MCF-7 cells, miR-31-5p was low-expressed in breast cancer, cell lines and MCF-7R (all $P < 0.01$). Over-expression of miR-31-5p resulted in inhibited invasion and promoted apoptosis of MCF-7R cells ($P < 0.01$), whereas miR-31-5p knockdown got opposite results in MCF-7 cells. Moreover, luciferase reporter assay confirmed that *TNSI* was a target gene of miR-31-5p. Over-expression of miR-31-5p inhibited invasion and increased radio-sensitivity, apoptosis of MCF-7R cell via targeting *TNSI* ($P < 0.01$), whereas knockdown of miR-31-5p significantly promoted the invasion but reduced apoptosis of MCF-7R cells (all $P < 0.01$), and further up-regulated the radio-sensitivity of MCF-7R cells. **Conclusion:** miR-31-5p/*TNSI* axis regulates the radiotherapy resistance of breast cancer, and over-expression of miR-31-5p may reverse the resistance of MCF-7R to radiotherapy.

[Key words] breast cancer; miR-31-5p; *tension protein 1 (TNSI)*; radiotherapy resistance; invasion; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(9): 1013-1020. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.09.007]

[作者简介] 余杰(1981-), 男, 学士, 主治医师, 主要从事肿瘤放疗的临床研究, E-mail: lala2364@126.com

[通信作者] 王旻(WANG Yang, corresponding author), 学士, 主任医师, 主要从事肿瘤放疗的临床研究, E-mail: nyszxyflk@163.com

乳腺癌 99% 发生在女性, 男性仅占 1%, 目前全世界每年约有 120 万女性发生乳腺癌, 约有 50 万人死于该病^[1]。放疗是目前乳腺癌治疗的主要方式之一, 然而由于乳腺癌细胞继发性放疗抵抗的发生导致放疗后病灶残留, 使得预期无法达到, 甚至治疗失败。近期研究^[2-4]发现, 微小 RNA(miRNA) 作为 mRNA 翻译的调控者, 与多种肿瘤的发生发展密切相关。miR-31-5p 作为抑癌基因参与包括乳腺癌在内的肿瘤细胞增殖、侵袭和凋亡过程^[5-9], 但对于 miR-31-5p 调控乳腺癌细胞放疗抵抗性的作用机制尚未有相关报道。人张力蛋白 1(tension protein 1, TNS1) 通过影响细胞黏附和黏着斑的形成, 进而介导癌细胞的侵袭和转移。本课题通过检测乳腺癌组织和细胞系中 miR-31-5p 的表达水平, 用双荧光素酶报告基因验证 miR-31-5p 与 TNS1 的靶向调控关系, 探讨 miR-31-5p 通过靶向调控 TNS1 介导乳腺癌细胞放射抵抗性的作用机制, 旨在为乳腺癌临床治疗放射抵抗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2017 年 7 月至 2017 年 12 月间南阳市中心医院肿瘤放疗科收治的资料完整的 21 例乳腺癌患者, 经手术切除的乳腺癌组织和癌旁组织迅速保存于液氮中。病例纳入标准: (1) 经乳腺彩超、X 线摄影、MRI、病理组织学检查结果确认为乳腺癌; (2) 治疗前 3 周进行放疗等治疗手段。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。所有研究对象术前均告知并签署知情同意书, 研究方案经南阳市中心医院伦理委员会批准。

1.2 细胞系和主要试剂

乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR-3 及人正常乳腺上皮细胞 MCF-10A 均购自中科院上海细胞研究所。miR-31-5p 和 TNS1 的 siRNAs 和 mimics 购自上海吉玛公司, DMEM、胎牛血清(FBS) 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, Transwell 小室购自美国 Corning 公司, Annexin V-FITC 双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物有限公司, 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, 全蛋白提取试剂盒、细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自美国 Bio-Rad 公司, 免疫印迹一抗(antibody-TNS1) 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。

1.3 细胞培养

将乳腺癌 MCF-7、MDA-MB-231 和 SKBR-3 细胞及 MCF-10A 细胞置于含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml 的 DMEM 培养液中, 在 37 °C、5%CO₂ 培养箱中常规培养。

1.4 放疗抵抗细胞株 MCF-7R 的建立

将对数生长期乳腺癌 MCF-7 细胞, 采用直线加速器产生的 6 MV-X 射线进行垂直放疗细胞(剂量为 2 Gy/min), 剂量分别为 2、4、6、8 和 10 Gy, 刺激 24 h, 照射结束后继续于培养箱中培养。对于经低剂量放射处理的 MCF-7 细胞弃去培养基, 加入新鲜的 DMEM 培养基继续培养, 观察细胞活力, 若无明显死亡选择该对数期细胞增加放疗剂量, 反复传代培养, 直至最后在放射剂量为 6 Gy 下能够稳定存活, 即构建成功放疗抵抗细胞株 MCF-7R。

1.5 细胞转染

采用无血清细胞培养基 DMEM 培养液稀释质粒 DNA, 轻轻混匀, 标记为 A 液。同时, 将无血清的 DMEM 培养液用 Lipofectamine 2000 稀释, 混匀后于 24 °C 条件下放置 5 min, 标记为 B 液。将 A、B 液混合, 置于 24 °C 条件下孵育 30 min 后, 将 DNA-Lipofectamine 2000 复合物于 CO₂ 培养箱(37 °C) 中过夜培养。次日, 更换新的含有血清的 DMEM 培养液培养上述获得的复合物, 并在光镜下观察其转染效率。培养 3 d 后, 将复合物培养原液于 53 000×g 离心 10 min, 收集离心上清液。最后, 将 DMEM 于无菌条件下将病毒颗粒悬浮起来, 备用。

1.6 qPCR 法检测乳腺癌组织和细胞中 miR-31-5 的表达

采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA, 取 2 μg 逆转录为 cDNA。取 2 μl 逆转录产物进行 PCR 反应, 以 U6 为内参基因(引物序列见表 1)。按试剂盒说明建立终体积为 20 μl 的 PCR 反应体系 2 μl 逆转录产物、10 μl SYBR Green Mix、上下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μl。PCR 热循环参数为: 95 °C 5 min, 然后 3 步反应: 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 进行 45 个循环。检测结果采用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequence for PCR

Target	Sequence
U6	F: 5'-GATTTCTCCCTCATCGCTTACAG-3' R: 5'-CTGCTTCATGATCGTTGTTGCTTG-3'
TNS1	F: 5'-CGAGGCAGGATAGGAGTTGTCATCG-3' R: 5'-CCAGGTCCAGCATCAGCATATTG-3'
miR-31-5p	F: 5'-GAGAGGAGGCAAGATGCTG-3' R: 5'-GGCAATATGTTGGCATAGCAGG-3'

1.7 克隆形成实验检测乳腺癌细胞的克隆形成

细胞放疗后,将6孔板置于细胞培养箱中,继续培养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小心浸洗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个细胞的为一个克隆)。平板克隆形成率(%)=形成克隆数/接种细胞数×100%。

1.8 Transwell小室法检测乳腺癌细胞的增殖

将Transwell小室放入24孔板内,接种转染mimics或siRNA 24 h后的MCF-7或MCF-7R细胞悬液100 μ l(细胞密度为 2×10^5 个/ml),培养12 h后,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%多聚甲醛固定侵袭并黏附到小室微孔膜下面的细胞30 min,1%结晶紫染色10 min,PBS冲洗小室,干燥后置于倒置显微镜下($\times 100$ 倍)观察穿膜细胞数。

1.9 Annexin V/PI染色流式细胞术检测乳腺癌细胞的凋亡

选取经处理后的对数生长期MCF-7R和MCF-7细胞,PBS清洗2次,加入500 μ l预冷的1×结合缓冲液、5 μ l Annexin V-FITC及2.5 μ l PI,均匀混合后上流式细胞仪检测细胞的凋亡率。散点图的第四象限(Q4)代表健康的成活细胞(FITC-/PI-),第三象限(Q3)代表早期凋亡细胞(FITC+/PI-),第二象限(Q2)代表坏死细胞和晚期凋亡细胞(FITC+/PI+)。细胞凋亡率计算公式:凋亡率(%)=早期凋亡率(Q3)+晚期凋亡率(Q2)。

1.10 Western blotting检测乳腺癌细胞TNS1蛋白的表达

提取乳腺癌细胞的蛋白后,依据二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)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°C,维持10 min。每孔样品的载药量是30 μ g,添加

10%的聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白,后电泳、转膜、封闭。加入一抗(1:500),4°C下过夜培养。洗膜缓冲液(tris-buffered saline tween, TBST)冲洗蛋白3次,每次5 min,随后加入二抗(1:500),温室中培养1 h。再次洗膜3次后,加入化学发光试剂显影蛋白。 β -tubulin用作内参,Bio-Rad Gel Doc EZ成像器用来成像蛋白,用Image J软件分析靶带的灰度值。

1.11 双荧光素酶报告基因法检测miR-31-5p的靶基因

将MCF-7R细胞转染并表达miR-31-5p前体,按试剂盒说明书方法操作。于37°C、5%CO₂培养箱中培养48 h后,收集细胞。然后,采用双荧光素酶报告基因检测试剂盒对上述收集的细胞进行检测。实验重复3次。

1.12 统计学处理

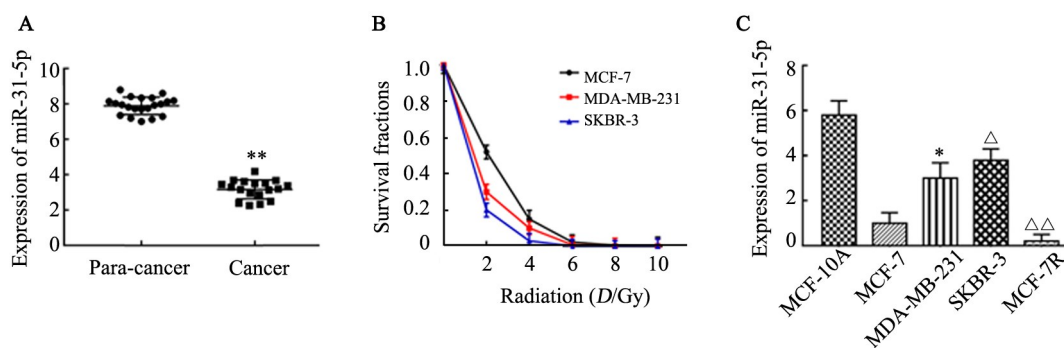
采用SPSS 20.0软件进行统计分析,两组间比较采用Student *t*检验。用GraphPad Prism 7软件对实验数据进行相关图片的绘制。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-31-5p在乳腺癌组织和细胞系中低表达

qPCR检测结果(图1A)显示,miR-31-5p在乳腺癌组织中的表达水平明显低于癌旁组织($t=1.69$, $P < 0.01$)。乳腺癌3株细胞系经不同剂量(0、2、4、6、8、10 Gy)的放射处理后,平板克隆形成实验分析结果(图1B)显示,相比于MCF-7细胞,MDA-MB-231和SKBR-3细胞对放疗更为敏感。

qPCR检测结果(图1C)证实,miR-31-5p在乳腺癌细胞系中的表达水平显著低于人正常乳腺上皮细胞MCF-10A,且MCF-7细胞中miR-31-5p的表达水平明显低于MDA-MB-231和SKBR-3细胞($t=2.91$, 2.92 ; $P < 0.05$)。由此可见,miR-31-5p在乳腺癌组织和细胞系中低表达,所以后续实验选用MCF-7细胞。



** $P < 0.01$ vs Para-cancer tissues; * $P < 0.05$, ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$ vs MCF-7 cells

A and C: The expression of miR-31-5p in breast cancer tissues and cell lines was measured by qPCR;

B: Cell viability was detected by colony formation assay

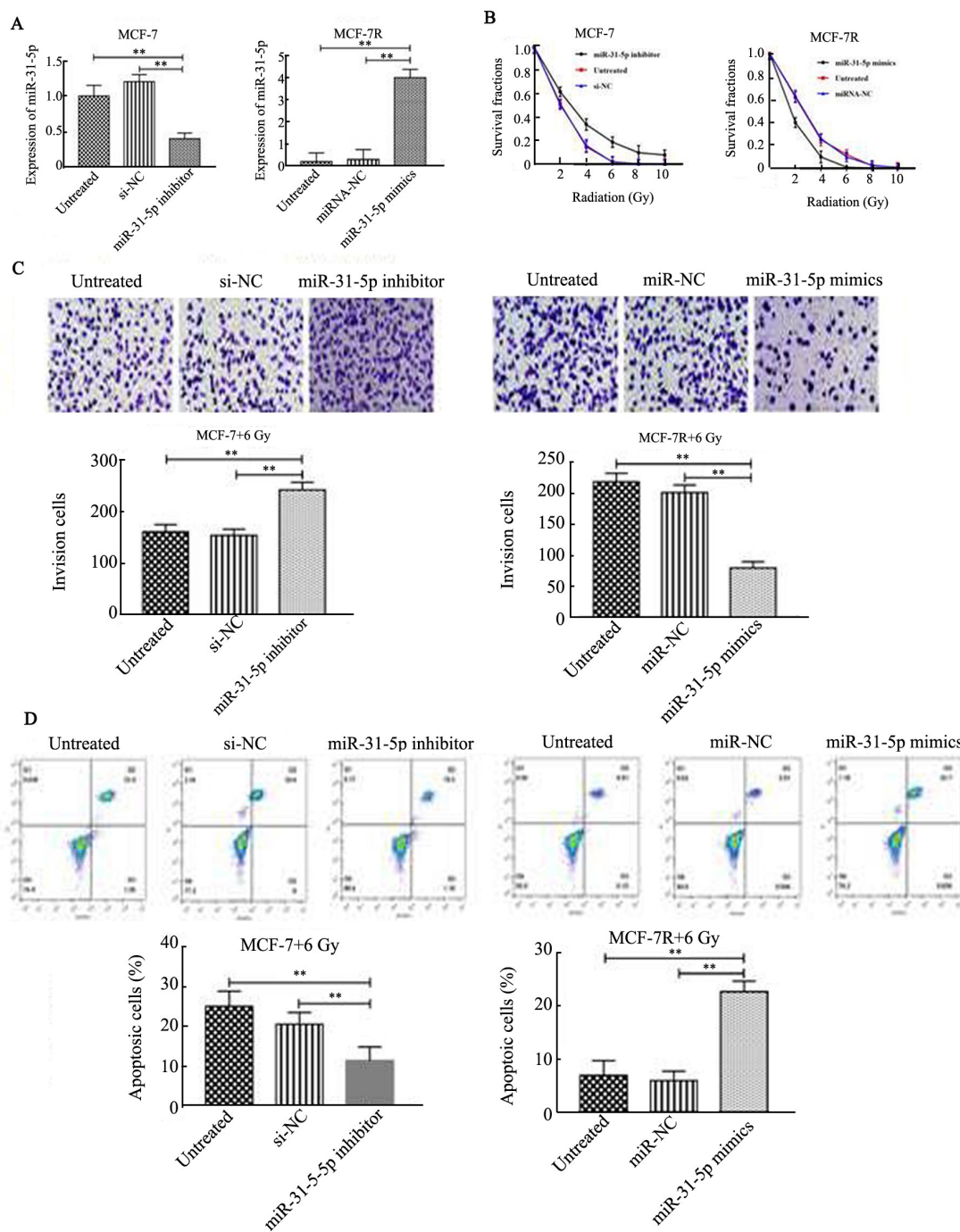
图1 miR-31-5p在乳腺癌组织和细胞中的表达

Fig. 1 The expression of miR-31-5p in breast cancer tissues and cells

2.2 过表达 miR-31-5p 增强乳腺癌细胞放疗的敏感性

q-PCR 检测结果(图 2A)显示,与 MCF-7 细胞比较,沉默 miR-31-5p 可显著抑制 MCF-7R 细胞 miR-31-5p 的表达水平($t=26.21, P<0.01$),过表达 miR-31-5p 可显著促进 MCF-7R 细胞 miR-31-5p 的表达($t=49.37, P<0.01$)。

克隆形成实验分析结果(图 2B)显示,过表达 miR-31-5p 可下调 MCF-7R 细胞对放疗的抵抗性,即促进放疗作用效果,而沉默 miR-31-5p 下调 MCF-7 细胞对放疗的敏感性,且 MCF-7 和 MCF-7R 细胞在放射剂量为 6 Gy 时,细胞存活率分别为 21% 和 3%。



**P<0.01

A: The expression of miR-31-5p was detected by qPCR; B: Cell viability was detected by colony formation assay; C: The invasion ability of breast cancer was measured by Transwell assay (×100); D: The percentage of apoptosis cell was detected by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry

图 2 miR-31-5p 对乳腺癌细胞放疗敏感性的影响

Fig.2 The effect of miR-31-5p on radio-sensitivity of breast cancer cells

Transwell小室法检测结果(图2C)表明,过表达miR-31-5p可显著抑制MCF-7R细胞侵袭能力($t=26.24, P<0.01$),而沉默miR-31-5p可显著促进MCF-7细胞侵袭能力($t=35.51, P<0.01$)。

流式细胞术检测结果(图2D)证实,过表达miR-31-5p可显著促进MCF-7R细胞凋亡($t=91.85, P<0.01$),而沉默miR-31-5p可显著抑制MCF-7细胞凋亡($t=31.54, P<0.01$)。

上述实验结果表明,过表达miR-31-5p有助于增强乳腺癌细胞对放射线的敏感性,沉默miR-31-5p会使乳腺癌细胞产生放疗抵抗作用。

2.3 *TNS1* 是 miR-31-5p 的靶基因

通过生物信息学数据库 StarBase V2.0 和 TargetScan 预测结果(图3A)显示, *TNS1* 可能是 miR-31-5p 的靶基因。

双荧光素酶报告基因验证结果(图3B)显示, miR-31-5p 可以结合 *TNS1* 3'UTR, 并且 miR-31-5p 可以负调控 *TNS1* 的表达($t=29.15, P<0.01$)。Western blotting 检测结果(图3C、D)显示,过表达 miR-31-5p 显著抑制 MCF-7R 细胞中 *TNS1* 蛋白的表达水平($t=2.92, P<0.01$),而敲降 miR-31-5p 明显促进 MCF-7 细胞中 *TNS1* 蛋白的表达($t=2.75, P<0.01$)。结果表明, *TNS1* 是 miR-31-5p 的直接靶基因,且 miR-31-5p 可负调控 *TNS1* 的表达。

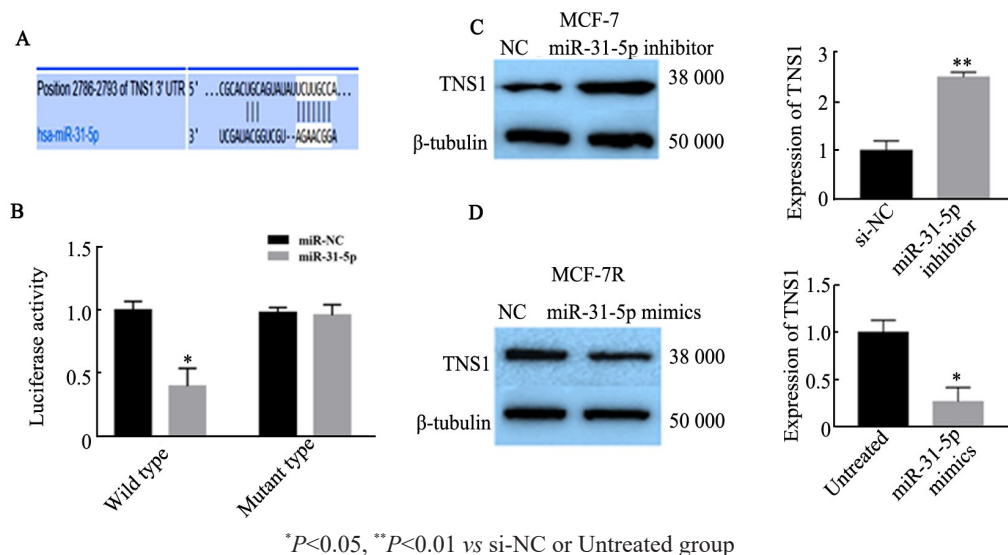
2.4 miR-31-5p/*TNS1* 分子轴调控乳腺癌细胞放疗敏感性

克隆形成实验结果(图4A)显示,在不同剂量的

放射处理下,沉默 miR-31-5p 可增强 MCF 细胞对放疗抵抗作用($F=31.33, P<0.05$),而同时沉默 miR-31-5p 和 *TNS1* 与对照组比较差异无统计学意义($F=8.24, P>0.05$);过表达 miR-31-5p 可显著上调 MCF-7R 细胞对放射线的敏感性($F=32.48, P<0.05$),同时过表达 miR-31-5p 和 *TNS1* 则可促进 MCF-7R 细胞对放疗的抵抗作用($F=6.14, P>0.05$),且 MCF-7 和 MCF-7R 细胞在放射剂量为 6 Gy 时,细胞存活率分别为 19% 和 1%。

Transwell小室检测结果(图4B)表明,相比于对照组,转染 miR-31-5p inhibitor 后再经 6 Gy 放射处理后可增强 MCF-7 细胞的侵袭能力($t=52.48, P<0.01$)。但是,相比于仅转染 miR-31-5p 组,同时沉默 miR-31-5p 和 *TNS1* 的表达后可下调 miR-31-5p inhibitor 对 MCF-7 细胞侵袭能力的促进作用。在 MCF-7R 细胞中过表达 miR-31-5p 后,再经 6 Gy 放射处理下可显著抑制 MCF-7R 细胞的侵袭能力($t=68.75, P<0.01$),而同时过表达 miR-31-5p 和 *TNS1* 后再经 6 Gy 放射处理则上调了细胞的侵袭能力。

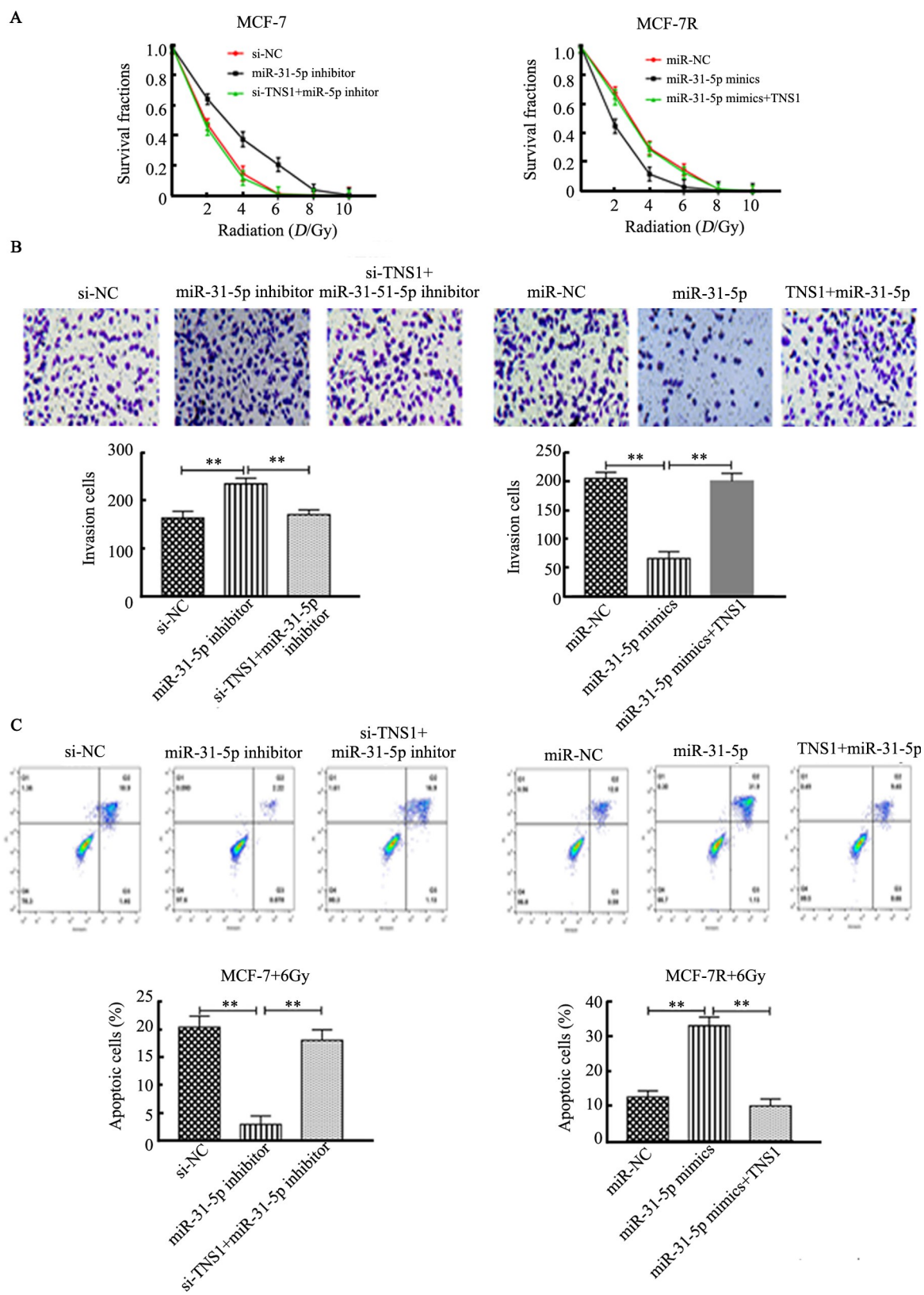
流式细胞术检测结果(图4C)进一步证实,转染 miR-31-5p inhibitor 可显著抑制 MCF-7 细胞凋亡($t=64.31, P<0.01$),而同时转染 miR-31-5p 和 si-*TNS1* 下调 miR-31-5p inhibitor 对 MCF-7 细胞凋亡抑制作用。过表达 miR-31-5p 可显著促进 MCF-7R 细胞凋亡($t=59.35, P<0.01$),而同时过表达 miR-31-5p 和 *TNS1* 与对照组比较差异无统计学意义。



A: The bioinformatics analysis result showed that miR-31-5p had a binding site with *TNS1*; B: The luciferase activity in *TNS1*-wt transfected with miR-31-5p was lower than that in NC group detected by dual-luciferase reporter assay; C and D: The expression of *TNS1* protein was measured by Western blotting

图3 *TNS1* 是 miR-31-5p 的靶基因

Fig.3 *TNS1* was a target of miR-31-5p



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

A: The cell viability was detected by colony formation assay; B: The invasion ability of MCF-7 or MCF-7R cells were measured by Transwell assay ($\times 100$); C: The percentage of apoptosis cell was promoted in miR-31-5p mimics by Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry

图4 miR-31-5p通过TNS1对乳腺癌细胞放疗抵抗的调控作用

Fig.4 miR-31-5p modulates radiotherapy resistance of breast cancer cell via regulating TNS1

上述结果表明,过表达 miR-31-5p 通过下调 *TNS1* 抑制乳腺癌 MCF-7R 侵袭和促进细胞凋亡,进而上调 MCF-7R 细胞对放射线的敏感性。

3 讨论

据中国国家癌症中心和卫生部疾病预防控制局 2012 年公布的 2009 年乳腺癌发病数据显示,全国肿瘤登记地区乳腺癌发病率位居女性恶性肿瘤的第 1 位,女性乳腺癌发病率(粗率)全国合计为 42.55/10 万,城市为 51.91/10 万,农村为 23.12/10 万,提示乳腺癌已成为当前社会的重大公共卫生问题^[10]。目前,对于乳腺癌治疗主要以放疗为主,但有研究^[11-12]提示乳腺癌产生放疗抵抗,导致治疗失败,患者生存期短。因此,迫切需要寻找乳腺癌中调控放射抵抗的相关基因的上游关键分子,并深入研究其分子机制,进一步为乳腺癌临床治疗放疗抵抗性提供更多的依据。

miRNAs 的异常调节被认为是调控包括乳腺癌在内的多种肿瘤放射抵抗的关键因素。miR-373 通过靶向调控 *TIMP2* 上调乳腺癌放疗敏感性^[13]; miR-99a 通过靶向 *mTOR* 增加非小细胞肺癌的放疗敏感性^[14]。近年来,miRNA 在调控乳腺癌发生发展中的作用已被广泛研究。ZALESKA 等^[15]报道,miR-21、miR-155 和 miR-221 在乳腺癌细胞中经放射处理后均有异常表达。同时,miR-22^[16]和 miR-668^[17]也与乳腺癌放疗敏感性的调控有关。然而,目前尚未见 miR-31-5p 与乳腺癌放疗敏感性的调控作用机制研究的文献报道。

本研究发现,miR-31-5p 在乳腺癌患者组织及细胞系中低表达,同时其在放疗抵抗细胞 MCF-7R 中的表达水平显著低于 MCF-7 细胞。据此推测,miR-31-5p 的表达水平与乳腺癌放疗抵抗可能存在调控关系。通过在 MCF-7 和 MCF-7R 细胞水平探究 miR-31-5p 对乳腺癌放疗敏感性的调控机制,结果显示 miR-31-5p 过表达可显著抑制 MCF-7R 细胞侵袭和促进细胞对放射性的敏感性和凋亡,而沉默 miR-31-5p 可显著促进 MCF-7 细胞侵袭、放疗抵抗作用和抑制凋亡。同时,双荧光素酶报告基因检测结果显示 miR-31-5p 可以结合 *TNS1* 3'UTR,并且 miR-31-5p 可以负调控 *TNS1* 的表达。近期有研究^[18]发现,*TNS1* 通过调控细胞极性,并具有介导肿瘤细胞迁移和侵袭的作用。此外,miR-31-5p 通过靶向下调 *TNS1* 能抑制乳腺癌 MCF-7R 细胞侵袭和促进细胞凋亡,即 miR-31-5p 可通过 *TNS1* 调控乳腺癌细胞对放疗的敏感性。

综上所述,本研究揭示了乳腺癌放疗抵抗的部分相关分子机制,也可能为乳腺癌放疗抵抗提供治

疗靶点和分子标志物。此外,深入探讨 miR-31-5p/*TNS1* 介导的下游信号通路对乳腺癌放疗敏感性的作用机制,将会是本课题组下一阶段的重点研究方向。

[参考文献]

- [1] FAN L, STRASSER-WEIPPL K, LI J J, et al. Breast cancer in China[J/OL]. *Lancet Oncol*, 2014, 15(7): e279-289[2018-05-25]. <https://www.thelancet.com/retrieve/pii/S1470204513705679>. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70567-9.
- [2] XIE Y, WANG Y, LI J, et al. Promise of chemokine network-targeted nanoparticles in combination nucleic acid therapies of metastatic cancer[J/OL]. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2018, 26: e1528[2018-05-25]. [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1939-0041](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1939-0041). DOI: 10.1002/wnan.1528.
- [3] LIU H, LEI C, HE Q, et al. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer[J/OL]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 64[2018-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5822656/>. DOI: 10.1186/s12943-018-0765-5.
- [4] KHETRAPAL P, LEE M W L, TAN W S, et al. The role of circulating tumour cells and nucleic acids in blood for the detection of bladder cancer: a systematic review[J/OL]. *Cancer Treat Rev*, 2018, 66: 56-63[2018-05-25]. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/03057372>. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.03.007.
- [5] KISS I, MLCOCHOVA J, BORTLICEK Z, et al. Efficacy and toxicity of panitumumab after progression on cetuximab and predictive value of miR-31-5p in metastatic wild-type KRAS colorectal cancer patients [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(9): 4955-4959. DOI: 10.21873/anticancer.11063.
- [6] LAI Y H, LIU H, CHIANG W F, et al. MiR-31-5p-ACOX1 axis enhances tumorigenic fitness in oral squamous cell carcinoma via the promigratory prostaglandin E2[J/OL]. *Theranostics*, 2018, 8(2): 486-504[2018-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5743562/>. DOI: 10.7150/thno.22059.
- [7] MLCOCHOVA J, FALTEJSKOVA-VYCHYTILOVA P, FERRACIN M, et al. MicroRNA expression profiling identifies miR-31-5p/3p as associated with time to progression in wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with cetuximab[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(36): 38695-38704. DOI: 10.18632/oncotarget.5735.
- [8] ZHAO G, HAN C, ZHANG Z, et al. Increased expression of microRNA-31-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion via regulating Sp1 transcription factor in HepG2 hepatocellular carcinoma cell line[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 371-377. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.050.
- [9] ZHONG Z, DONG Z, YANG L, et al. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(3): 1959-1965. DOI: 10.1007/s13277-013-0741-z.
- [10] LIU L Y, WANG Y J, WANG F, et al. Factors associated with insufficient awareness of breast cancer among women in Northern and Eastern China: a case-control study[J/OL]. *BMJ Open*, 2018, 8(2): e018523[2018-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5855304/>. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-018523.

- [11] LOGANADANE G, XI Z, XU H P, et al. Patterns of locoregional failure in women with breast cancer treated by postmastectomy conformal electron beam radiation therapy (PMERT): large scale single center experience[J/OL]. *Clin Transl Radiat Oncol*, 2017, 4: 46-50[2018-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5833921/>. DOI: 10.1016/j.ctro.2017.03.004.
- [12] PAJIC M, FROIO D DALY S, et al. miR-139-5p modulates radiotherapy resistance in breast cancer by repressing multiple gene networks of DNA repair and ROS defense[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(2): 501-515. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3105.
- [13] GUO Y, JIANG Y, SANG M, et al. Down-regulation of miR-373 increases the radiosensitivity of lung cancer cells by targeting TIMP2 [J/OL]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 99: 203-210[2018-05-25]. <http://sciencedirect.com/science/journal/13572725>. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.04.014.
- [14] YIN H, MA J, CHEN L, et al. MiR-99a enhances the radiation sensitivity of non-small cell lung cancer by targeting mTOR[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(2): 471-481. DOI: 10.1159/000488615.
- [15] ZALESKA K, PRZYBYLA A, KULCENTY K, et al. Wound fluids affect miR-21, miR-155 and miR-221 expression in breast cancer cell lines, and this effect is partially abrogated by intraoperative radiation therapy treatment[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4029-4036. DOI: 10.3892/ol.2017.6718.
- [16] ZHANG X, LI Y, WANG D, et al. miR-22 suppresses tumorigenesis and improves radiosensitivity of breast cancer cells by targeting Sirt1[J/OL]. *Biol Res*, 2017, 50(1): 27[2018-05-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5590131/>. DOI: 10.1186/s40659-017-0133-8.
- [17] LUO M, DING L, LI Q, et al. miR-668 enhances the radioresistance of human breast cancer cell by targeting IκBα[J]. *Breast Cancer*, 2017, 24(5): 673-682. DOI: 10.1007/s12282-017-0756-1.
- [18] HALL E H, DAUGHERTY A E, CHOI C K, et al. Tensin 1 requires protein phosphatase-1 alpha in addition to RhoGAP DLC-1 to control cell polarization, migration, and invasion[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 34713-34722. DOI: 10.1074/jbc.M109.059592.

[收稿日期] 2018-05-25

[修回日期] 2018-07-30

[本文编辑] 党瑞山