

# miR-324-3p 靶向 AKT1 调控乳腺癌细胞放射增敏性的机制研究

张亚珍<sup>1</sup>, 宋杰峰<sup>2</sup>, 吴煌福<sup>1</sup>, 黄光钺<sup>1</sup>

1. 海南医学院第二附属医院肿瘤外科, 海南 海口 570311;

2. 海南医学院第二附属医院放射科, 海南 海口 570311

**摘要:** **目的** 研究微小核糖核酸(miR)-324-3p 对体外培养的乳腺癌 MCF-7 细胞放射敏感性的影响并探讨其作用机制。**方法** 采用 qRT-PCR 法和 Western blot 法分别检测 miR-324-3p、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(AKT)1 蛋白的表达量;采用 Lipofectamine™2000 介导,将过表达 miR-324-3p 模拟物、沉默和过表达 AKT1 质粒转染乳腺癌 MCF-7 细胞并联合 4 Gy 放射照射,应用克隆形成实验、CCK-8 试剂盒、流式细胞术法检测细胞存活率、细胞活性、细胞凋亡率,并绘制单击多靶模型拟合曲线;利用 TargetScan 在线预测、荧光素酶基因报告试验及 Western blot 法验证 miR-324-3p 的靶向关系。**结果** 与正常乳腺上皮细胞 MCF10A 相比,乳腺癌 MDA-MB-435S、MCF-7 细胞中 miR-324-3p 的表达下调,AKT1 蛋白表达上调( $P$  均  $< 0.05$ )。过表达 miR-324-3p 联合放射照射,MCF-7 细胞放射敏感性增加,存活率呈剂量依赖性降低,细胞活性降低、凋亡率升高( $P$  均  $< 0.05$ )。miR-324-3p 靶向调控 AKT1 的表达,当沉默 AKT1 联合放射照射时,MCF-7 细胞放射敏感性增加,存活率下降并呈剂量依赖性,细胞活性降低、凋亡率升高( $P$  均  $< 0.05$ )。过表达 AKT1 逆转了 miR-324-3p 对乳腺癌放射敏感性、细胞增殖及凋亡的作用。**结论** 过表达 miR-324-3p 可以靶向调控 AKT1 的表达,增强乳腺癌 MCF-7 细胞的放射敏感性。

**关键词:** 微小核糖核酸-324-3p; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1; 乳腺癌; 放射增敏; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号:** R 815 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 8182(2020)07 - 0879 - 06

## Mechanism of miR-324-3p targeting AKT1 in regulating radiosensitization of breast cancer cells

ZHANG Ya-zhen\*, SONG Jie-feng, WU Huang-fu, HUANG Guang-yue

\* Department of Oncology Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570311, China

Corresponding author: SONG Jie-feng, E-mail: songjiefeng120@163.com

**Abstract: Objective** To study the effects of microRNA (miR)-324-3p on the radiosensitivity of breast cancer MCF-7 cells cultured in vitro and its mechanism. **Methods** The expression levels of miR-324-3p and serine/threonine protein kinase (AKT)1 were respectively detected by qRT PCR and Western blot. The overexpressed mir-324-3p mimics, silenced and overexpressed AKT1 plasmids were transfected into breast cancer MCF-7 cells by lipofectamine2000 and irradiated with 4 Gy. The cell survival fraction, cell viability, apoptosis rate were determined by colony formation assay, cell counting kit 8 assay (CCK-8 kit) and flow cytometry, respectively, and the fitting curve of click multi-target model was drawn. TargetScan online prediction, luciferase reporter gene assay and Western blot were used to verify the target orientation of miR-324-3p. **Results** Compared with normal mammary epithelial cells line MCF10A, the expression of miR-324-3p were down-regulated, and the expression of AKT1 protein were up-regulated in MDA-MB-435S and MCF-7 breast cancer cells (all  $P < 0.05$ ). Overexpression of miR-324-3p combined with radiation increased radiosensitivity of MCF-7 cells, decreased survival rate in a dose-dependent manner and cell activity, and increased the apoptosis rate (all  $P < 0.05$ ). MiR-324-3p targeting AKT1 expression, when silencing AKT1 combined with radiation, the radiosensitivity of MCF-7 cells increased, survival fraction decreased in a dose-dependent manner cell activity decreased, and the apoptosis rate of MCF-7 cells increased (all  $P < 0.05$ ). Overexpression of AKT1 reversed the effect of miR-324-3p on radiosensitivity, cell proliferation and apoptosis of breast cancer. **Conclusion** Overexpression of miR-324-3p can target the regulation of AKT1 expression and enhance the

radiosensitivity of breast cancer MCF-7 cells.

**Key words:** MicroRNA-324-3p; Serine/threonine protein kinase; breast cancer; radiosensitization; cell proliferation; Apoptosis

**Fund program:** Key Research and Development Plan Project of Hainan Province (ZDYF2017087)

乳腺癌已经成为全球女性中发病率和死亡率均居首位的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,是发生在乳腺上皮组织的恶性肿瘤。2011 年中国女性乳腺癌发病人数为 25 万,发病率为 37.86/10 万,每年死亡约 6.0 万,死亡率为 9.21/10 万,近 10 年发病率和死亡率呈上升趋势,年龄调整后上升幅度减缓<sup>[2]</sup>。早期的乳腺癌不具备典型的症状和体征,故不易引起重视,等到发现时已无法经手术进行根除治疗,此时放射治疗成为备受关注的治疗手段。由于在治疗过程中患者出现放射敏感性降低会影响放射效果<sup>[3-4]</sup>,因此提高乳腺癌放射敏感性是改善乳腺癌治疗现状的重要问题。

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)广泛存在于动植物细胞中,可参与生命过程中一系列的重要过程,如细胞的增殖凋亡、造血、器官形成等,并且可通过与靶 mRNA 3'-UTR 特异性的碱基互补配对使 mRNA 降解或抑制其转录后翻译,进而降低靶基因的蛋白表达<sup>[5]</sup>。miRNA 对肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭具有调节作用,且在调控肿瘤的放射敏感性方面也发挥着重要作用<sup>[6]</sup>,如 miR-124 可以通过直接靶向同源异型核基因(PRRX)增加结直肠癌细胞的辐射敏感性<sup>[7]</sup>,miR-485-3p 可能通过靶向 Toll 样受体 1(TLR1)调控核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路,增强胃癌细胞的放射敏感性<sup>[8]</sup>。本研究以 miR-324-3p 为研究对象,研究其对乳腺癌细胞放射敏感性的影响并探索其作用机制,为深入研究乳腺癌细胞放射敏感性的调控机理提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人雌激素受体非依赖性乳腺癌细胞系 MDA-MB-435S、人雌激素受体依赖性乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MCF10A 乳腺上皮细胞均购自中国科学院上海细胞库。RPMI 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购于美国 Hyclone 公司;Trizol 试剂盒、Lipofectamine™ 2000 转染试剂购于 Invitrogen 公司;所用引物由华大基因合成;Annexin V-FITC/P 细胞凋亡检测试剂盒购于上海翔盛生物科技;RNA 结合蛋白免疫沉淀实验试剂盒购于广州赛诚生物科技;CCK-8 试剂盒购于 Dojindo。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与照射

乳腺癌细胞 MDA-MB-

435S、MCF-7 和乳腺上皮细胞 MCF10A 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液并于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养,常规 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞进行后续实验。使用 Siemens Primus 直线加速器 6MV X 射线室温照射,且吸收剂量率为 3 Gy/min,以 0、2、4、6、8 Gy 垂直照射,照射野 10 cm × 10 cm,源靶距 30 cm,在照射后 48 h 分别检查细胞的存活率。

#### 1.2.2 qRT-PCR 法检测 miR-324-3p 的 mRNA 表达

根据 Trizol 法抽提总 RNA,按照 PrimeScript TMRT Master Mix 试剂盒说明书进行操作合成 cDNA。采用 All-in-One™ miRNA qRT-PCR 试剂盒对 miR-324-3p 进行 qRT-PCR 反应,并以 U6 为内参,以 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法测定 miR-324-3p mRNA 的相对表达水平。

#### 1.2.3 Western blot 法检测 AKT1 蛋白的表达

以 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取适量蛋白以 SDS-PAGE 电泳,蛋白分离后转膜至 PVDF 膜,加入 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入相应一抗,4 °C 下孵育过夜,洗膜室温下孵育相应二抗 2 h,洗膜后经化学发光剂显影曝光,并以 GAPDH 含量作为内参。采用 FluorChemFC2 凝胶成像分析系统测定条带的灰度值。

#### 1.2.4 细胞转染

收集对数生长期的乳腺癌 MCF-7 细胞,适当密度接种到 6 孔板上,待细胞融合到 70% 以上时,按照 Lipofectmine™ 2000 转染试剂盒说明书将过表达 miR-324-3p 的模拟物和其阴性对照分别转染至乳腺癌 MCF-7 细胞中,分别标记为 miR-324-3p 组和 miR-NC 组。后续实验中将 MCF-7 随机分为 si-AKT1 组[沉默 AKT1 的小干扰 RNA (siRNA)]、si-NC 组(沉默 AKT1 的阴性对照)、miR-324-3p + pcDNA3.1-AKT1 (过表达 miR-324-3p 的模拟物与过表达 AKT1 的 pcDNA3.1 共转染)、miR-324-3p + pcDNA3.1 (过表达 miR-324-3p 的模拟物与过表达 AKT1 的阴性对照共转染)等组,采用上述方法转染后进行后续实验。

#### 1.2.5 克隆形成实验

将转染后的 MCF-7 细胞分别以 0、2、4、6、8 Gy 照射后培养 48 h,更换新鲜培养液,继续培养至肉眼可见克隆形成,磷酸缓冲液洗涤后加入适量甲醇固定 25 min,0.2% 结晶紫染色 10 min,计数 ≥ 50 个细胞的克隆数。克隆形成率

(%) = (克隆数/接种细胞数) × 100%, 细胞存活分数(SF<sub>2</sub>) = 实验组克隆形成率/对照组克隆形成率; 放射增敏比 = 沉默前细胞存活分数/沉默后细胞存活分数。使用 GraphPad Prism 7 软件进行单击多靶模型曲线拟合, 计算准阈剂量(D<sub>q</sub>)、平均致死剂量(D<sub>0</sub>)、SF<sub>2</sub>、放射增敏比(SER)。

1.2.6 荧光素酶报告基因实验 采用 TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 靶基因预测库预测到 miR-324-3p 与 AKT1 存在结合位点。猜测 miR-324-3p 可能是 AKT1 的一个靶基因。为验证之, 本研究构建了野生型 WT-AKT1 和突变型 MUT-AKT1 的荧光素酶报告载体。参照 1.2.4 中的方法按 Lipofectamine™2000 转染试剂盒说明书, 将 miR-NC 和 miR-324-3p 分别与 WT-AKT1 和 MUT-AKT1 共转染, 置于细胞培养箱中常规培养 48 h。收集各组细胞, 参照双荧光素酶报告基因检测试剂盒操作步骤进行检测。

1.2.7 CCK-8 检测细胞的活性 转染 miR-NC、miR-324-3p mimics、si-NC、si-AKT1、miR-324-3p mimics + pcDNA3.1、miR-324-3p mimics + pcDNA3.1-AKT1 的细胞按每孔 1 × 10<sup>4</sup> 个细胞每孔接种于 96 孔板, 用 4 Gy 放射线照射, 分别记为 IR + miR-NC 组、IR + miR-324-3p 组、IR + si-NC 组、IR + si-AKT1 组、IR + miR-324-3p + pcDNA3.1 组、IR + miR-324-3p + pcDNA3.1-AKT1 组。各组设 2 个复孔。于培养箱中分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 10 μl CCK 溶液, 继续孵育 1.5 h, 检测 490 nm 处吸光度值。实验重复 3 次。

1.2.8 流式细胞术检测细胞的凋亡 收集各组待测细胞, 以每孔 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞种植于 6 孔板, 根据 AnnexinV-FITC/PI 凋亡双染试剂盒处理细胞, 简要步骤如下: 用缓冲液重悬细胞, 轻摇至均匀避光孵育 15 min, 加入适量 AnnexinV-FITC/PI, 避光条件下孵育 15 min, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量数据均行正态性和方差齐性检验, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较应用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间多重比较使用 SNK-*q* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 miR-324-3p、AKT1 在细胞 MDA-MB-435S、MCF-7 和 MCF10A 中的表达 图 1 和表 1 显示, 与乳腺上皮细胞 MCF10A 相比, 乳腺癌 MDA-MB-435S、MCF-7 细胞中 miR-324-3p 相对表达量明显下降, 磷酸化

AI  
0.05)。

2.2 过表达 miR-324-3p 联合放射照射降低乳腺癌细胞 MCF-7 的存活率 图 2 表明, miR-324-3p 组细胞和 miR-NC 组细胞照射 0、2、4、6、8 Gy 剂量后, miR-324-3p 组细胞较对应剂量下 miR-NC 组细胞的存活率显著降低, 差异有统计学意义(P 均 < 0.05)。表 2 结果显示, miR-324-3p 组 SER 值为 1.777, 表明过表达 miR-324-3p 可显著增强细胞的放射敏感性, 降低乳腺癌 MCF-7 细胞的存活率。

2.3 过表达 miR-324-3p 联合 4 Gy 放射抑制乳腺癌细胞 MCF-7 增殖并诱导其细胞凋亡 图 3 和表 3 显示, 与 IR + miR-NC 组相比, IR + miR-324-3p 组细胞中 miR-324-3p 的表达量升高(P < 0.05), 成功构建了过表达 miR-324-3p 的 MCF-7 细胞。与 IR + miR-NC 组相比, 转染 24、48、72 h 后, IR-miR-324-3p 组细胞的活性下降(P < 0.05); IR + miR-324-3p 组细胞的凋亡率较 IR + miR-NC 组上升(P < 0.05); 可见过表达 miR-324-3p 联合 4 Gy 放射照射可抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖并诱导其细胞凋亡。

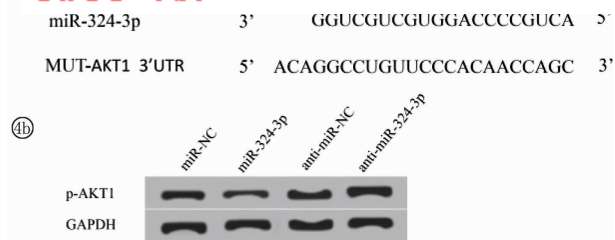
2.4 miR-324-3p 可靶向抑制 AKT1 的表达 图 4a 为 TargetScan 软件检测结果, 表明 miR-324-3p 与 AKT1 之间存在互补结合位点。表 4 是双荧光素酶报告基因实验结果, 同 miR-NC 与 WT-AKT1 共转染相比, miR-324-3p 与 WT-AKT1 共转染后, MCF-7 细胞荧光素酶活性显著下降(P < 0.05); 而 miR-NC、miR-324-3p 分别与 MUT-AKT1 共转染后, MCF-7 细胞荧光素酶活性差异不明显; 可见 miR-324-3p 对 AKT1 具有靶向作用。图 4b 结果显示, 与 miR-NC 组相比, miR-324-3p 组 p-AKT1 蛋白的表达量显著降低(0.89 ± 0.08 vs 0.36 ± 0.03, P < 0.05); 相反, 与 anti-miR-NC 组相比, anti-miR-324-3p 组中 p-AKT1 蛋白的表达量显著升高(0.88 ± 0.07 vs 1.24 ± 0.10, P < 0.05); 可见 miR-324-3p 可负向调控 AKT1 的表达。

2.5 沉默 AKT1 表达可增加 MCF-7 细胞放射敏感性

图 5 结果显示, si-AKT1 组细胞和 si-NC 组细胞照射 0、2、4、6、8 Gy 剂量后, si-AKT1 组细胞较对应剂量下 si-NC 组细胞的存活率显著降低, 呈剂量依赖性(P < 0.05)。表 2 结果示, si-AKT1 组细胞的 SER 值为 1.564, 表明沉默 AKT1 表达可显著增强细胞的放射敏感性, 降低乳腺癌 MCF-7 细胞的存活率。表 5 结果显示, 与 IR + si-NC 组相比, IR + si-AKT1 组细胞的 p-AKT1 蛋白的表达量显著下降(P < 0.05), 说明沉默 AKT1 细胞的 MCF-7 细胞转染成功。IR + si-AKT1 组细胞的活性较 IR + si-NC 组明显下降(P <

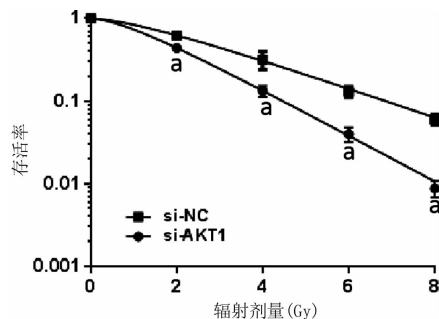
0.05); IR + si-AKT1 组细胞的凋亡率较 IR + si-NC 组显著上升 ( $P < 0.05$ ); 可见沉默 AKT1 表达联合放射降低细胞 MCF-7 的存活率、抑制其细胞增殖并诱导细胞凋亡。

2.6 过表达 AKT1 可逆转 miR-324-3p 对乳腺癌细胞 MCF-7 放射敏感性的作用 图 6 表明, 随着照射 0、2、4、6、8 Gy 剂量加大, 各组内细胞的存活率逐渐降低, 且 miR-324-3p 组细胞较对应剂量下 miR-NC 组细胞的存活率显著降低 ( $P$  均  $< 0.05$ ), miR-324-3p + pcDNA3.1 + AKT1 组较对应剂量下 miR-324-3p + pcDNA3.1 组细胞的存活率明显上升 ( $P < 0.05$ )。表 2 结果显示, miR-324-3p 组细胞的 SER 值为 1.777; miR-324-3p + pcDNA3.1 + AKT1 组细胞的 SER 值为 1.152。表 6 可见, 与 IR + miR-NC 相比, IR + miR-324-3p 组细胞 p-AKT1 蛋白的表达显著下降, 细胞活性明显下降, 凋亡率显著升高 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 与 miR-324-3p + pcDNA3.1 组相比, miR-324-3p + pcDNA3.1 +



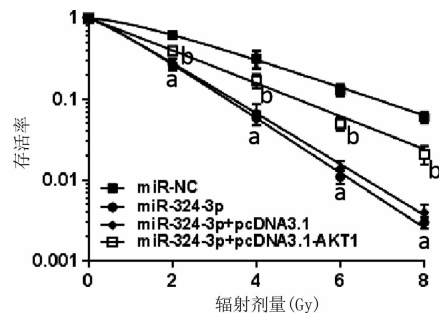
注: 4a: TargetScan 软件检测结果; 4b: 过表达 miR-324-3p 的模拟物和其阴性对照、干扰 miR-324-3p 表达的模拟物和其阴性对照四组的 p-AKT1 蛋白表达情况。

图 4 miR-324-3p 靶向、调控 AKT1 的表达



注: 与 si-NC 组比较,  $^a P < 0.05$ 。

图 5 沉默 AKT1 表达联合放射对细胞 MCF-7 存活率影响



注: 与 miR-NC 组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与 miR-324-3p + pcDNA3.1 组比较,  $^b P < 0.05$ 。

图 6 过表达 AKT1 能逆转 miR-324-3p 对乳腺癌细胞 MCF-7 放射敏感性的作用

表 1 miR-324-3p、AKT1 在细胞 MDA-MB-435S、MCF-7 和 MCF10A 中的表达 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

细胞	miR-324-3p	p-AKT1 蛋白
MCF10A	1.63 ± 0.12	0.43 ± 0.04
MDA-MB-435S	0.95 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.78 ± 0.07 <sup>a</sup>
MCF-7	0.61 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.85 ± 0.08 <sup>a</sup>
F 值	208.378	70.651
P 值	0.000	0.000

注: 与 MCF10A 细胞比较,  $^a P < 0.05$ 。

表 2 单击多靶模型参数

组别	$D_0$ (Gy)	$D_q$ (Gy)	N	$SF_2$	k	SER
miR-NC	2.449	1.274	1.682	0.625	0.4083	-
miR-324-3p	1.378	0.286	1.231	0.282	0.7256	1.777
si-NC	2.449	1.274	1.682	0.625	0.4083	-
si-AKT1	1.566	0.898	1.574	0.440	0.6387	1.564
miR-324-3p + pcDNA3.1	1.282	0.370	1.335	0.270	0.7803	-
miR-324-3p + pcDNA3.1-AKT1	2.126	0.087	1.042	0.403	0.4700	1.152

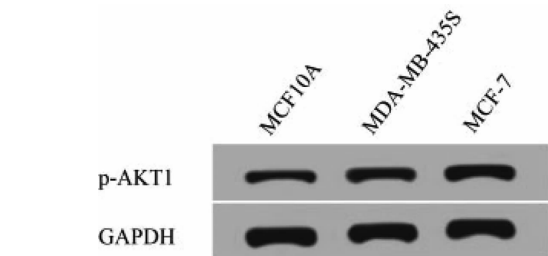
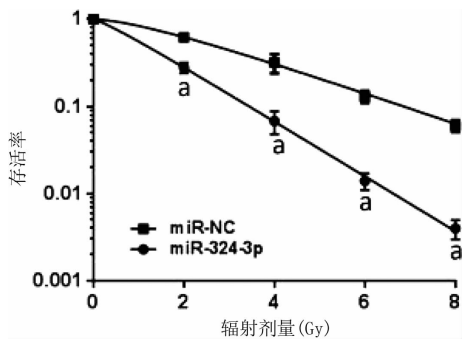
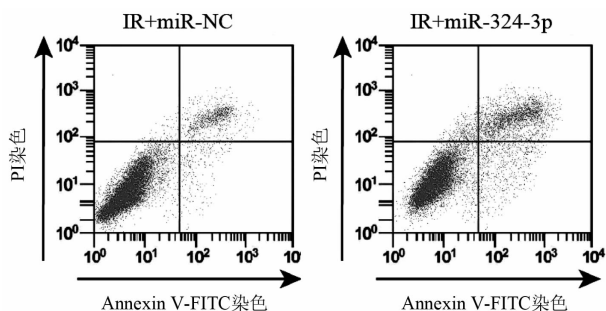


图 1 p-AKT1 蛋白的表达



注: 与 miR-NC 组比较,  $^a P < 0.05$ 。

图 2 不同剂量照射后细胞 MCF-7 的存活曲线



注: 左上、左下、右下、右上象限分别代表坏死、活、早期凋亡和晚期凋亡细胞。

图 3 过表达 miR-324-3p 联合 4 Gy 放射对细胞 MCF-7 凋亡的影响

表 3 过表达 miR-324-3p 联合 4 Gy 放射对细胞

分组	miR-324-3p	细胞活性(OD 490 nm)			凋亡率(%)
		24 h	48 h	72 h	
IR + miR-NC	0.58 ± 0.06	0.44 ± 0.04	0.76 ± 0.06	1.21 ± 0.09	8.36 ± 0.69
IR + miR-324-3p	0.86 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.06 <sup>a</sup>	27.19 ± 2.13 <sup>a</sup>

注:与 IR + miR-NC 组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05。

表 4 两组双荧光素酶报告实验 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	WT-AKT1	MUT-AKT1
miR-NC	1.01 ± 0.08	1.04 ± 0.09
miR-324-3p	0.41 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.07

注:与 miR-NC 组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05。

表 5 沉默 AKT1 联合 4 Gy 放射对细胞 MCF-7 增殖、凋亡的影响 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	p-AKT1 蛋白	细胞活性(OD 490 nm)			凋亡率(%)
		24 h	48 h	72 h	
IR + si-NC	0.88 ± 0.08	0.44 ± 0.04	0.76 ± 0.06	1.21 ± 0.09	8.36 ± 0.69
IR + si-AKT1	0.36 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.07 <sup>a</sup>	20.11 ± 1.63 <sup>a</sup>

注:与 IR + si-NC 组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05。

表 6 过表达 miR-324-3p 和 AKT1 联合 4 Gy 放射对 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	p-AKT1	细胞活性(OD490 nm)			凋亡率(%)
		24 h	48 h	72 h	
IR + miR-NC	0.88 ± 0.08	0.44 ± 0.04	0.76 ± 0.06	1.21 ± 0.09	8.36 ± 0.69
IR + miR-324-3p	0.36 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.06 <sup>a</sup>	27.19 ± 2.13 <sup>a</sup>
IR + miR-324-3p + pcDNA3.1	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.46 ± 0.04	0.63 ± 0.06	27.03 ± 2.11
IR + miR-324-3p + pcDNA3.1-AKT1	0.64 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.97 ± 0.09 <sup>b</sup>	16.63 ± 1.17 <sup>b</sup>

注:与 IR + miR-NC 组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 IR + miR-324-3p + pcDNA3.1 组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.05。

AKT1 组细胞 AKT1 蛋白的表达显著上升,细胞活性显著上升,细胞的凋亡率显著降低(*P* 均 < 0.05);可见过表达 AKT1 可逆转 miR-324-3p 对乳腺癌细胞 MCF-7 放射敏感性、细胞增殖及凋亡的作用。

### 3 讨论

乳腺癌是各国女性中最常见的恶性肿瘤,占女性新发恶性肿瘤的 23%,具有发病率高、侵袭性强、病程缓慢等特点<sup>[9]</sup>,严重影响患者的健康和生存质量。放疗是肿瘤治疗的主要手段之一,但在放疗的过程中很多肿瘤会产生耐受性,因此寻找对乳腺癌细胞放射敏感性起关键作用的因子,对提高乳腺癌的治疗效果具有积极意义。

miRNA 可以通过影响细胞周期凋亡、DNA 损伤修复、放射相关的信号通路等有效调节肿瘤细胞的放射敏感性<sup>[10-11]</sup>。研究发现 miR-324-3p 在非小细胞肺癌、鼻咽癌细胞中下调表达,过表达 miR-324-3p 可抑制癌细胞增殖以及迁移等行为<sup>[12]</sup>。有研究利用 miRNA 芯片对乳腺癌组织及配对的癌旁组织中 miRNA 表达谱进行分析,发现 miR-324-3p 在乳腺癌组织中下调表达<sup>[13]</sup>,但 miR-324-3p 对乳腺癌细胞放射敏感性的影响及其机制目前还未见报道。本课题通过 qRT-PCR 法检测发现,与正常乳腺上皮细胞 MCF10A 相比,乳腺癌 MDA-MB-435S、MCF-7 细胞中 miR-324-3p 表达下调,提示其在乳腺癌中起抑癌基因的作用。过表达 miR-324-3p 联合放射照射则显著

增强乳腺癌细胞的放射敏感性,细胞活性明显下降,凋亡率显著升高。

PI3K-AKT 信号通路当经历电离辐射后被一些外源刺激性因子激活,促进肿瘤细胞存活,有研究证实其与放射抵抗相关<sup>[14-15]</sup>。AKT1 是 PI3K 的重要下游靶基因,AKT 家族包括 AKT1、AKT2、AKT3 三个家族成员。AKT1/蛋白激酶 B 信号通道调控细胞增殖生长、促进肿瘤的发生<sup>[16]</sup>。已有很多证据证实 PI3K-AKT 是乳腺癌的致癌基因<sup>[17]</sup>,在乳腺癌中 AKT1 与淋巴结转移、TNM 分期密切相关,其可作为影响乳腺癌预后的重要生物学标记物<sup>[18]</sup>,并发现抑制 AKT1 的表达对乳腺癌细胞的增殖有一定的抑制作用<sup>[19]</sup>。本课题通过 Western blot 法检测发现 AKT1 在乳腺癌细胞中表达上调,沉默 AKT1 的表达可增强乳腺癌细胞放射敏感性,抑制乳腺癌细胞的活性并诱导细胞凋亡,与此前研究相一致;并发现沉默 AKT1 对乳腺癌细胞的影响与过表达 miR-324-3p 恰好相同。通过生物信息预测发现 AKT1 可能是 miR-324-3p 的靶基因,miR-324-3p 与 AKT1 的 3'UTR 之间存在互补的核苷酸结合位点。荧光素酶报告基因实验和 Western blot 实验进一步证实 miR-324-3p 可靶向调控 AKT1 的表达,提示 AKT1 是 miR-324-3p 的下游靶基因。此外,研究还发现过表达 AKT1 可逆转 miR-324-3p 对乳腺癌细胞 MCF-7 放射敏感性的作用。

总之,本课题就 miR-324-3p 在乳腺癌中的表达

志, 2012, 17(2): 315 - 316.

- [15] 余晓燕, 王芳. 中重度慢性阻塞性肺疾病合并肺癌患者的围术期肺功能变化及处理[J]. 中国医刊, 2019, 54(3): 291 - 293.
- [16] 聂晓红, 张剑, 罗立. 慢性阻塞性肺疾病合并肺癌临床特点及肺功能分析[J]. 临床肺科杂志, 2016, 21(8): 1478 - 1481.
- [17] Fernández-Rodríguez L, Torres I, Romera D, et al. Prediction of post-operative lung function after major lung resection for lung cancer using volumetric computed tomography[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2018, 156(6): 2297 - 2308. e5.
- [18] 程留慧, 张保朋, 周舟, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者肺气肿的 MSCT 定量分析[J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2018, 16(6): 588 - 590.
- [19] 施晓雷, 夏艺, 范丽, 等. 慢性阻塞性肺疾病患者肺气肿改变对气道重塑与气流受限相关性的影响[J]. 临床放射学杂志, 2018, 37(6): 931 - 935.

- [20] 陈佳艳, 王佳舟, 张军华, 等. 基于 CT 或 PET/CT 的影像组学信息预测 I 期非小细胞肺癌立体定向消融放疗疗效的初步研究[J]. 中国癌症杂志, 2017, 27(2): 128 - 134.
- [21] 王珍珠, 李啸天, 阮翹, 等. <sup>18</sup>F-FMISO PET/CT 对非小细胞肺癌放疗前后乏氧情况的监测及疗效评价[J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2019, 39(5): 262 - 265.
- [22] de Smet M, Schuring D, Nijsten S, et al. Accuracy of dose calculations on kV cone beam CT images of lung cancer patients[J]. Med Phys, 2016, 43(11): 5934.
- [23] 暴锐, 鄂林宁, 吴山, 等. MSCT 双相扫描定量分析 COPD 患者小气道重塑与肺功能相关性[J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(4): 348 - 351.

收稿日期: 2020 - 03 - 18 修回日期: 2020 - 05 - 14 编辑: 石嘉莹

(上接第 883 页)

情况及其对乳腺癌细胞放射敏感性的影响和具体机制展开研究, 发现 miR-324-3p 可通过靶向 AKT1 的表达增强乳腺癌细胞的放射敏感性, 可为临床降低乳腺癌患者放疗的耐受性提供理论参考依据。

#### 参考文献

- [1] 师金, 梁迪, 李道娟, 等. 全球女性乳腺癌流行情况研究[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(9): 683 - 690.
- [2] 陈万青, 郑荣寿. 中国女性乳腺癌发病死亡和生存状况[J]. 中国肿瘤临床, 2015, 42(13): 668 - 674.
- [3] Gasparini P, Lovat F, Fassan M, et al. Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(12): 4536 - 4541.
- [4] He MY, Rancoule C, Rehalia-Blanchard A, et al. Radiotherapy in triple-negative breast cancer: current situation and upcoming strategies[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018, 131(1): 96 - 101.
- [5] 沈月兰, 蒋义国. microRNA 与癌症发生相关性研究的现状[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(1): 68 - 71.
- [6] Zhao L, Lu X, Cao Y. MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response[J]. Cell Signal, 2013, 25(7): 1625 - 1634.
- [7] 林水苗, 夏琼, 张余琴, 等. MiR-124 通过靶向 PRRX1 调节结肠癌细胞的辐射敏感性[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(8): 1110 - 1116.
- [8] 李明君, 吴广银, 樊慧杰, 等. miR-485-3p 通过靶向 TLR1/NF- $\kappa$ B 信号通路调节胃癌细胞放射敏感性[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2016, 25(8): 879 - 884.
- [9] 张玉松. 虎杖苷抗肿瘤作用及机制研究[D]. 苏州: 苏州大

学, 2013.

- [10] Zhao L, Bode A M, Cao Y, et al. Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miRNA in tumor radiosensitivity[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(11): 2220 - 2227.
- [11] 吴彪, 肖莎, 陈晓希, 等. miRNA-466 检测在肺癌诊断中的临床价值研究[J]. 中国热带医学, 2019, 19(12): 1161 - 1164.
- [12] 于法明, 姜东亮, 赵云, 等. 微小 RNA-324 对非小细胞肺癌细胞迁移侵袭及 ETS1 表达的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2018, 23(3): 206 - 210.
- [13] 邵碧波. 乳腺癌基因组表达谱中 miRNA 的血清学差异性表达分析[D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- [14] Wendel HG, De Stanchina E, Fridman JS, et al. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy[J]. Nature, 2004, 428(6980): 332 - 337.
- [15] Rossi DJ, Weissman IL. Pten, tumorigenesis, and stem cell self-renewal[J]. Cell, 2006, 125(2): 229 - 231.
- [16] Kim D, Kim S, Koh H, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production[J]. FASEB J, 2001, 15(11): 1953 - 1962.
- [17] Horn G, Gazieli A, Wreschner DH, et al. ERK and PI3K regulate different aspects of the epithelial to mesenchymal transition of mammary tumor cells induced by truncated MUC1[J]. Exp Cell Res, 2009, 315(8): 1490 - 1504.
- [18] 史圆圆, 吴建农, 路名芝. 乳腺癌中 Akt1 和 girdin 的表达及临床病理意义[J]. 诊断病理学杂志, 2016, 23(2): 103 - 106.
- [19] 梅玫, 任玉, 周旋, 等. RNAi 调下 AKT1、PI3K P85 表达抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1): 51 - 56.

收稿日期: 2019 - 11 - 11 修回日期: 2019 - 12 - 05 编辑: 王海琴