

·基础研究·

# 长链非编码 RNA NBR2 对乳腺癌细胞放射敏感性的影响

李航 姜勉 樊赛军

300192 天津, 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

通信作者: 樊赛军, Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2018.02.005

**【摘要】目的** 探讨长链非编码 RNA(lncRNA)BRCA1 相邻基因 2(NBR2)(BRCA1 为乳腺癌易感基因 1) 对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞放射敏感性的影响。**方法** 根据处理方法的不同, 分别按以下方式将乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 进行分组。(1)分为 3 组: 空白对照组、4 Gy  $\gamma$  射线照射组和 8 Gy  $\gamma$  射线照射组, 采用实时定量 PCR 检测 lncRNA NBR2 的表达。(2)分为 4 组: 空白对照组、NBR2 转染组、4 Gy  $\gamma$  射线照射组以及 NBR2 转染+ $\gamma$  射线照射联合组, 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)方法来检测细胞增殖情况。(3)分为 3 组: 空白对照组、NBR2 单独转染组、NBR2+B 细胞淋巴瘤 2(BCL2)共转染组, 对 3 组细胞进行不同剂量的  $\gamma$  射线照射, 并采用 MTT 和克隆形成实验方法检测细胞生长情况。采用 Student *t*-test 对数据进行统计学分析,  $P<0.05$  表示差异有统计学意义。**结果** 实时定量 PCR 结果显示, 与空白对照组相比, 4 Gy  $\gamma$  射线照射和 8 Gy  $\gamma$  射线照射能够显著下调 lncRNA NBR2 的表达水平, 差异有统计学意义(MCF-7:  $t=10.75$ 、 $11.17$ , MDA-MB-231:  $t=11.22$ 、 $12.31$ , 均  $P<0.01$ )。MTT 实验结果显示, 与 4 Gy  $\gamma$  射线照射组相比, NBR2 转染+ $\gamma$  射线照射联合组的乳腺癌细胞增殖率明显降低, 差异有统计学意义(MCF-7:  $t=10.55$ , MDA-MB-231:  $t=11.97$ , 均  $P<0.01$ )。同时, lncRNA NBR2 过表达可以明显下调 BCL2 的 mRNA 及蛋白表达水平。另外, 与 NBR2 单独转染组相比, NBR2+BCL2 共转染组中 NBR2 对细胞增殖的影响显著降低, 差异有统计学意义(MCF-7:  $t=10.87$ , MDA-MB-231:  $t=11.37$ , 均  $P<0.01$ )。**结论** 辐照可以诱导 lncRNA NBR2 的表达水平降低, 人为过表达 NBR2 能够抑制 BCL2 的蛋白表达水平, 进而降低乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的增殖能力, 同时增强其放射敏感性。

**【关键词】** RNA, 长链非编码; 乳腺肿瘤; 细胞增殖; 辐射耐受性; BRCA1 相邻基因 2

**基金项目:** 科技部科研院所开发专项(2014EG150134); 天津市科技支撑项目(14ZCZDSY00001); 协和青年科研基金资助, 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2017310027)

**Effect of long non-coding RNA NBR2 on the radiosensitivity of breast cancer cells** Li Hang, Jiang Mian, Fan Saijun

Tianjin Key Laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Fan Saijun, Email: fansaijun@irm-cams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of long non-coding RNA neighbour of BRCA1 gene2 (NBR2) on the radiosensitivity of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. **Method** According to different treatment methods, breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells were divided into the following groups: (1) three groups including control group, 4 Gy  $\gamma$  ray irradiation group, and 8 Gy  $\gamma$  ray irradiation group, then the expression level of NBR2 was tested by real-time quantitative PCR(qRT-PCR) analysis; (2) four groups including control group, NBR2 transfection group, 4 Gy  $\gamma$  ray irradiation group, and NBR2 transfection+ $\gamma$  ray irradiation group, then the proliferation of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells was detected by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assays; (3) three groups including control group, NBR2 transfection group, and NBR2+B-cell lymphoma-2(BCL2) transfection group, and the cells were irradiated with different doses of  $\gamma$  ray, then the proliferation was detected by MTT and

clonogenic assay. Statistical significance of the results was determined by SPSS statistical software and analyzed by student's *t*-test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. **Results** qRT-PCR analysis revealed that compared with that in the control group, the expression of NBR2 was decreased significantly in breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with  $\gamma$  ray irradiation (MCF-7:  $t=10.75, 11.17$ , MDA-MB-231:  $t=11.22, 12.31$ , all  $P < 0.01$ ). MTT assays showed that compared with the cells irradiated alone, the breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells irradiated in the presence of NBR2 had significantly decreased proliferation (MCF-7:  $t=10.55$ , MDA-MB-231:  $t=11.97$ , both  $P < 0.01$ ). NBR2 could also down-regulate the mRNA and protein level of BCL2 in these cells. The enhanced BCL2 expression significantly reduced the NBR2 inhibition of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cell proliferation after irradiation as compared with that of NBR2 alone (MCF-7:  $t=10.87$ , MDA-MB-231:  $t=11.37$ , both  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Irradiation could decrease the expression level of NBR2. The overexpression of NBR2 could down-regulate the BCL2 level and suppress the proliferation of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells, thus enhancing the radiosensitivity of breast cancer cells.

**【Key words】** RNA, long noncoding; Breast neoplasms; Cell proliferation; Radiation tolerance; Neighbour of BRCA1 gene 2

**Fund programs:** Technology and Development and Research Projects for Research Institutes, Ministry of Science and Technology (2014EG150134); Science and Technology Support Plan Project of Tianjin (14ZCZDSY00001); PUMC Youth Fund and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2017310027)

乳腺癌是女性最常见、病死率最高的恶性肿瘤之一，其发生发展及恶性程度与许多癌基因和抑癌基因相关<sup>[1-2]</sup>。我国女性乳腺癌的发病率和病死率在全球范围内处于比较低的水平，但呈迅速增长的趋势<sup>[3]</sup>。乳腺癌的发生与环境、生活方式密切相关，营养干预、减少超重和肥胖已被证实是有效的一级预防措施<sup>[4-5]</sup>。放疗在乳腺癌的治疗策略中一直发挥着重要作用，包括根治术后补充放疗、保留乳房放疗等<sup>[6-7]</sup>。然而，在乳腺癌的放疗方面仍然存在许多争议，如：放疗对根治术后患者生存的影响，导管原位癌和小叶原位癌术后放疗的取舍等<sup>[8]</sup>。更重要的是，部分中晚期乳腺癌患者对放疗表现出耐辐射性，逐渐变得不敏感，需加大治疗的照射剂量，然而剂量的提高会给肿瘤患者带来比较严重的不良反应及引起并发症，降低患者的生活质量<sup>[9-10]</sup>。因此，有效地增加乳腺癌的放疗敏感性，减少放疗中正常组织的放射损伤，从而提升患者的放疗效果和治愈率，这是近年来乳腺癌治疗研究的热点。

人类基因组转录出的 RNA 只有 2% 左右编码合成蛋白质，剩余 98% 的 RNA 不翻译为蛋白质，被称为非编码 RNA。转录片段长度大于 200 bp 的 RNA 称为长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)。近年来，对于 lncRNA 的研究已成为分子生物学以及基础医学领域研究的热点。lncRNA

在高等动物的发育、细胞分化以及疾病的发生发展，尤其是代谢性疾病和肿瘤的发生发展等过程中发挥着极为重要的调节功能<sup>[11-13]</sup>。

lncRNA BRCA1 相邻基因 2 (neighbour of BRCA1 gene 2, NBR2) (BRCA1 为乳腺癌易感基因 1) 是近几年新发现的一个重要的 lncRNA，因其在染色体上与肿瘤抑制基因 BRCA1 相邻而得名<sup>[14]</sup>。有研究结果表明，lncRNA NBR2 的表达水平与多种癌症，特别是乳腺癌的发生发展呈负相关<sup>[15]</sup>。同时，有研究者揭示了 NBR2 能够被腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 上调，同时反过来与 AMPK 相互作用进而促进 AMPK 的激酶活性，最终抑制肿瘤细胞的生长<sup>[16]</sup>。笔者选用乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞系为研究对象，研究 lncRNA NBR2 过表达对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞放射敏感性的影响，为探索乳腺癌的放疗增敏的新途径提供实验依据和理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

MTT、聚偏氟乙烯膜、Lipofectamine 3000、Opti-MEM、Real-Time PCR 试剂盒均购自美国赛默飞世尔科技有限公司；二甲基亚砜购自美国 Sigma 公司；姬姆萨染色液 (G8220-10 g) 购自北京索莱

宝生物科技有限公司; 兔抗人 B 细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma-2, BCL2)抗体购自美国 Proteintech 公司; 小鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体及山羊抗兔或小鼠 IgG 购自英国 Abcam 公司; lncRNA NBR2 及 pcDNA-BCL2 过表达载体由深圳华大基因科技有限公司合成;  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源购自加拿大原子能有限公司(Autocell40); ChemiDoc MP 凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司; RT-6500 酶标分析仪购自深圳雷杜生命科学股份有限公司。

## 1.2 细胞培养、分组处理及照射

人类乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞购自美国 ATCC 细胞库, 采用含 10% 胎牛血清的 1640 培养液, 于含 5%  $\text{CO}_2$  的 37°C 恒温培养箱中培养, 待细胞生长至密度约为 80% 时进行传代亚培养。选择处于对数生长期的肿瘤细胞进行实验。根据处理方法的的不同, 分别按以下方式进行分组。(1)把乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 分为 3 组: 空白对照组、4 Gy  $\gamma$  射线照射组和 8 Gy  $\gamma$  射线照射组, 采用实时定量 PCR 检测 lncRNA NBR2 的表达; (2)把乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 分为 4 组: 空白对照组、NBR2 转染组、4 Gy  $\gamma$  射线照射组和 NBR2 转染+ $\gamma$  射线照射联合组, 采用 MTT 方法来检测细胞增殖情况; (3)将乳腺癌 MCF-7 细胞分为 2 组: 空白对照组和 NBR2 转染组, 采用实时定量 PCR 检测靶基因的表达; (4)将乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞分为 3 组: 空白对照组、NBR2 0.5  $\mu\text{g}$  转染组和 NBR2 1.0  $\mu\text{g}$  转染组, 采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测目的基因的表达水平变化; (5)把乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 分为 3 组: 空白对照组、NBR2 单独转染组和 NBR2+BCL2 共转染组, 对 3 组细胞进行不同剂量的  $\gamma$  射线照射, 并采用 MTT 和克隆形成实验方法检测细胞生长情况。采用  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  射线照射源进行照射, 照射剂量为 2、4 和 8 Gy, 剂量率为 1 Gy/min。

## 1.3 lncRNA NBR2 及 BCL2 过表达载体的细胞转染

转染前 1 d, 将细胞接种于六孔板中, 每孔加入约 2 mL 无抗生素培养基, 使转染时的细胞密度能够达到 50%。取 2  $\mu\text{L}$ /孔 Lipofectamine 3000 与 50  $\mu\text{L}$ /孔 Opti-MEM 混匀后室温下孵育 5 min; 取 0.5  $\mu\text{g}$ /孔 NBR2 或 pcDNA-BCL2 过表达载体与 50  $\mu\text{L}$ /孔 Opti-MEM 混匀后室温下孵育 5 min。将以

上 2 步所得溶液混匀, 室温下放置 30 min, 即为转染液。将转染液加入含有细胞及培养液的孔中, 轻轻摇晃孔板, 使混合均匀, 在 37°C 的  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 6 h 后将培养基换成含血清的完全培养基。

## 1.4 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞, 调整细胞浓度为  $1.0 \times 10^4$  个/mL, 接种于 96 孔培养板中, 然后进行细胞转染和(或) $\gamma$  射线照射, 处理后 48 h 弃去培养基, 每孔中加入 20  $\mu\text{L}$  MTT, 继续培养 4 h。加入 120  $\mu\text{L}$  二甲基亚砷并振摇 10 min。采用酶标分析仪检测细胞在 490 nm 波长下的光密度值, 以 A490(A 为吸光度)值代表细胞活力。以未作任何处理的细胞作为空白对照组, 其细胞存活率为 100%, 其余各实验组按存活率 = (实验组吸光度值/空白对照组吸光度值)  $\times$  100% 进行计算。

## 1.5 克隆形成实验

乳腺癌细胞接受瞬时转染及不同剂量照射后, 按不同的照射剂量接种不同数量的细胞至 60 mm 培养皿中。细胞连续培养 2 周后用甲醇固定, 姬姆萨染液染色, 计数细胞数  $\geq 50$  个的克隆个数。计算克隆形成率和存活分数, 其中, 克隆形成率 = (空白对照组克隆数/实验组细胞数)  $\times$  100%, 存活分数 = 空白对照组克隆数 / (实验组细胞数  $\times$  克隆形成率), 并按多靶单击模型拟合绘制细胞存活曲线。

## 1.6 Western blot

收集瞬时转染并接受  $\gamma$  射线照射后的细胞, 用细胞裂解液冰上裂解, 提取总蛋白, 采用二喹啉甲酸法进行蛋白定量。取各组等量蛋白用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜、封闭后, 分别加入兔抗人 BCL2 抗体(1:2000 稀释), 以小鼠抗人 GAPDH(1:6000 稀释)作为内参抗体, 4°C 孵育过夜。次日洗膜, 然后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或小鼠 IgG(1:5000 稀释), 室温下孵育 1 h, 洗膜后显色, 用凝胶成像系统采集成像。

## 1.7 实时定量 PCR 检测 lncRNA NBR2 和 BCL2 mRNA 表达及芯片数据分析

收集细胞, 采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 反转录获得 cDNA, 检测 NBR2 和 BCL2 mRNA 的表达, 同时检测 GAPDH mRNA 的表达作为内参。PCR 扩增条件为: 95°C 预变性 30 s; 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 循环 40 次。数据采

用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行分析。

GAPDH 引物序列:

正向 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AAT-3';

反向 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3';

LncRNA NBR2 引物序列:

正向 5'-CTT CCA GTT GCG GCT TAT-3';

反向 5'-ATC TTC CTC ATC CAG GTA TT-3'

BCL2 引物序列:

正向 5'-TGG TCC ACC TGA CCC TC-3';

反向 5'-CCC ACC GAA CTC AAA GAA-3'

另外, 由于 NBR2 可以通过激活 AMPK 进而发挥功能, 因此, 我们将 AMPK 的基因芯片与照射后变化的基因进行了对比分析。BCL2 在乳腺或乳腺癌组织中的表达情况, 由数据库 (<https://www.oncomine.org/resource/login.html>) 分析获得。

## 1.8 统计学方法

应用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行统计学分析。原始数据均服从正态分布和方差齐性, 采用 *t* 检验比较组间差异, 分析方法为 Student *t*-test。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LncRNA NBR2 的高表达对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞放射敏感性的影响

实时定量 PCR 结果 (图 1 中 A、B) 显示, 与空白对照组相比,  $\gamma$  射线 (4 Gy 或 8 Gy) 照射能够下调乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 NBR2 mRNA 的表达水平, 差异有统计学意义 (MCF-7: *t*=10.75、11.17, 均 *P*<0.01; MDA-MB-231: *t*=11.22、12.31, 均 *P*<0.01)。MTT 实验结果 (图 1 中 C、D) 显示, 与空白对照组相比, 虽然单纯的  $\gamma$  射线 (4 Gy) 或 NBR2 转染都抑制了乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231

细胞的生长, 但差异无统计学意义; 与 4 Gy  $\gamma$  射线照射组相比, NBR2 转染+ $\gamma$  射线照射联合组可以明显抑制乳腺癌细胞的生长, 且生长程度的差异有统计学意义 (24、48、72 h) (MCF-7: *t*=9.96、10.34、10.55, MDA-MB-231: *t*=10.28、10.79、11.97, 均 *P*<0.01)。以上实验结果表明, 通过 LncRNA NBR2 转染提高 NBR2 的表达能有效提高乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞对  $\gamma$  射线的放射敏感性。

### 2.2 NBR2 对 BCL2 mRNA 表达水平的影响和 BCL2 在乳腺或乳腺癌组织中的表达水平分析

AMPK 的基因芯片 (775 个基因) 与照射后变化的基因 (248 个基因) 的对比结果显示, 有 5 个基因 [BCL2、细胞分裂周期蛋白 25A (CDC25A)、肿瘤易

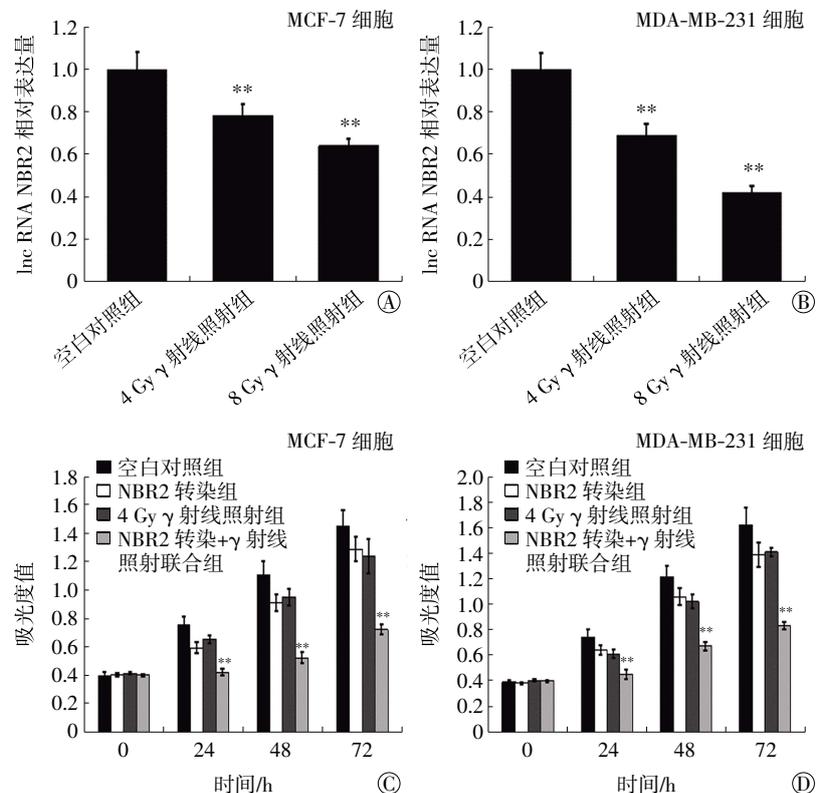


图 1 实时定量 PCR 和 MTT 实验检测 NBR2 表达水平与  $\gamma$  射线照射以及乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞生长之间的关系 图中, A: 与空白对照组相比,  $\gamma$  射线 (4 Gy 或 8 Gy) 照射能够下调乳腺癌 MCF-7 细胞中 NBR2 的 mRNA 表达水平 (\*\*: *t*=10.75、11.17, 均 *P*<0.01); B: 与空白对照组相比,  $\gamma$  射线 (4 Gy 或 8 Gy) 照射能够下调乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 NBR2 的 mRNA 表达水平 (\*\*: *t*=11.22、12.31, 均 *P*<0.01); C: 与 4 Gy  $\gamma$  射线照射组相比, NBR2 转染+ $\gamma$  射线照射联合组可以明显抑制 MCF-7 细胞的生长 (24、48、72 h) (\*\*: *t*=9.96、10.34、10.55, 均 *P*<0.01); D: 与 4 Gy  $\gamma$  射线照射组相比, NBR2 转染+ $\gamma$  射线照射联合组可以明显抑制 MDA-MB-231 细胞的生长 (24、48、72 h) (\*\*: *t*=10.28、10.79、11.97, 均 *P*<0.01)。MTT: 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5 二苯基四氮唑噻唑盐; NBR2: BRCA1 相邻基因 2。

Fig.1 Relationship between NBR2 expression level, 4 Gy  $\gamma$  ray irradiation, and breast cancer MCF-7, MDA-MB-231 cells growth was detected by qRT-PCR analysis and MTT assays

感性候选蛋白 1(CASC1)、活化 T 细胞 2 蛋白相互作用核因子蛋白(NFATC2IP)、胞质多聚腺苷酸化元件结合蛋白 1(CPEB1)]能够同时被调控。实时定量 PCR 结果进一步显示,与空白对照组相比,NBR2 过表达确实能够对这 5 个基因的 mRNA 水平产生一定的下调作用,且 BCL2 的下调水平最为明显( $t=12.13, P<0.01$ )(图 2 中 A)。此外,数据库分析结果显示,BCL2 在浸润性乳腺癌中的表达水平显著高于正常乳腺组织(图 2 中 B);同时,BCL2 在不同类型的乳腺癌组织中均存在不同程度的表达(图 2 中 C)。这些实验结果表明,NBR2 在乳腺癌 MCF-7 细胞中能够下调 BCL2 的表达水平,且 BCL2 可以作为 NBR2 发挥增敏作用的潜在靶点。

### 2.3 NBR2 对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中 BCL2 的 mRNA 及蛋白表达水平的影响

与空白对照组相比,NBR2 过表达可以下调乳腺癌 MCF-7 细胞中 BCL2 的 mRNA 及蛋白表达水平(图 3 中 A);同时,与空白对照组相比,NBR2 过表达也可以下调乳腺癌 MDA-MB-231 细胞中 BCL2 的 mRNA 及蛋白表达水平(图 3 中 B)。这些实验结果表明,NBR2 能够在乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞中抑制 BCL2 的 mRNA 及蛋白表达水平。

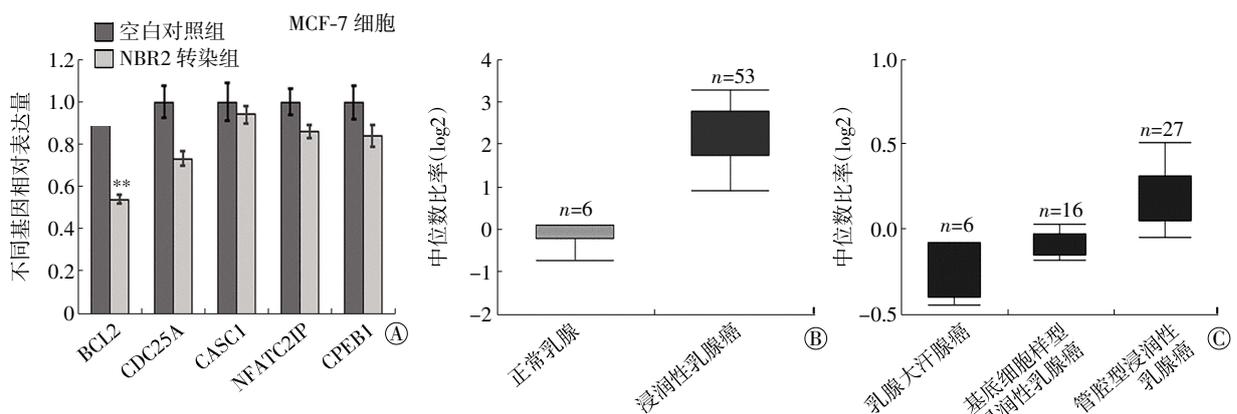
### 2.4 NBR2 和 BCL2 共转染对乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的放射敏感性的影响

MTT 实验结果(图 4 中 A、B)显示,与空白对

照组相比,NBR2 单独转染明显提高了乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的放射敏感性,且差异有统计学意义( $t=12.36、11.95, 均 P<0.01$ );而共转染了 NBR2 和 BCL2 的乳腺癌细胞则出现了辐射抵抗。另外,克隆形成实验结果(图 4 中 C、D)显示,与空白对照组相比,NBR2 单独转染能够显著提高乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的放射敏感性,且差异有统计学意义( $t=12.89、12.22, 均 P<0.01$ );而共转染了 NBR2 和 BCL2 的乳腺癌细胞的放射敏感性则明显下降,且差异有统计学意义( $t=10.87、11.37, 均 P<0.01$ )。这些结果表明 NBR2 可以通过抑制 BCL2 的表达水平进而增强乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞的放射敏感性。

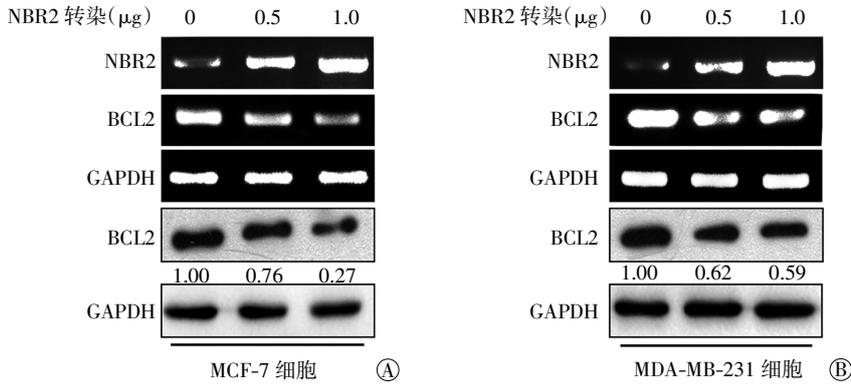
## 3 讨论

乳腺癌是全球范围内女性最为高发的恶性肿瘤,其表现为高转移率、高致死率以及预后差<sup>[17-18]</sup>。乳腺癌的多诱因性增加了临床上对乳腺癌诊断以及治疗的难度,也使乳腺癌的个体化治疗成为发展的必然趋势。辅助外科手术的放疗是治疗原位以及浸润性乳腺癌的常用手段<sup>[19]</sup>。我国大约有 70% 的肿瘤患者需要综合放疗或单纯放疗的手段治疗癌症<sup>[20-21]</sup>。但是,临床以及流行病学研究结果显示,不少的乳腺癌患者表现出明显的辐射抵抗,放疗的效果不佳,严重影响了乳腺癌的治疗以及预后<sup>[10,21]</sup>。然而迄今为止,其中的具体机制尚不清楚。



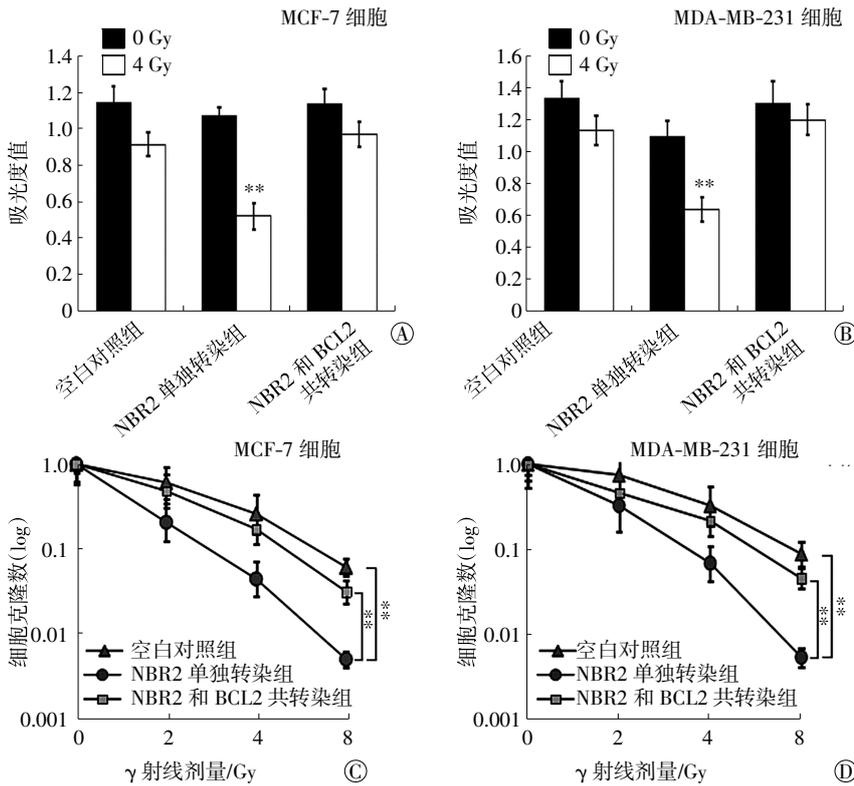
**图 2** NBR2 对 BCL2 mRNA 表达水平的影响以及 BCL2 在乳腺或乳腺癌组织中的表达水平分析 图中, A: 与空白对照组相比, NBR2 过表达能够对这 5 个基因的 mRNA 水平产生一定的下调作用, 且 BCL2 的下调水平最为明显(\*\*:  $t=12.13, P<0.01$ ); B: BCL2 在 Finak Breast 数据库中的表达水平分析结果显示 BCL2 在浸润性乳腺癌中的表达水平显著高于正常乳腺组织; C: BCL2 在 Farmer Breast 数据库中的表达水平分析结果显示 BCL2 在不同类型的乳腺癌组织中均存在不同程度的表达。NBR2: BRCA1 相邻基因 2; BCL2: B 细胞淋巴瘤 2; CDC25A: 细胞分裂周期蛋白 25A; CASC1: 肿瘤易感性候选蛋白 1; NFATC2IP: 活化 T 细胞 2 蛋白相互作用核因子蛋白; CPEB1: 胞质多聚腺苷酸化元件结合蛋白 1。

**Fig.2** Effect of NBR2 on the mRNA level of BCL2 (A) and analysis of BCL2 expression in breast or breast cancer tissues (B, C)



**图3** NBR2对乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞中BCL2 mRNA及蛋白表达水平的影响。图中，A：NBR2转染下调了MCF-7细胞中BCL2的mRNA(上)及蛋白(下)表达水平；B：NBR2转染下调了MDA-MB-231细胞中BCL2的mRNA(上)及蛋白(下)表达水平。A、B中BCL2蛋白条带下方数字为运用ImageJ软件对BCL2的蛋白条带进行灰度分析所得结果(相对值)。NBR2：BRCA1相邻基因2；BCL2：B细胞淋巴瘤2；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

**Fig.3** Effect of NBR2 on the expression of BCL2 at the mRNA and protein levels in MCF-7(A) and MDA-MB-231 (B) cells



**图4** MTT实验和克隆形成实验检测NBR2和BCL2共转染对乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞放射敏感性的影响。图中，A、B：MTT实验结果显示，与空白对照组相比，NBR2单独转染明显提高了乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞的放射敏感性(\*\*：t=12.36、11.95，均P<0.01)，而共转染了NBR2和BCL2的乳腺癌细胞则出现了辐射抵抗；C、D：克隆形成实验结果显示，与空白对照组相比，NBR2单独转染能够显著提高乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞的放射敏感性(\*\*：t=12.89、12.22，均P<0.01)，而共转染了NBR2和BCL2的乳腺癌细胞的放射敏感性明显下降(\*\*：t=10.87、11.37，均P<0.01)。MTT：3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑啉盐；NBR2：BRCA1相邻基因2；BCL2：B细胞淋巴瘤2。

**Fig.4** Effects of NBR2 and pcDNA-BCL2 co-transfection on the radiosensitivity of breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells were detected by MTT (A, B) and clonogenic (C, D) assays

最近有研究结果表明，lncRNA NBR2作为一个重要的非编码RNA，其在乳腺肿瘤的抑制过程中发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。该研究还揭示了NBR2的缺失或表达水平的降低会导致细胞周期紊乱，进而促进体内肿瘤的生长<sup>[15]</sup>。同时，NBR2在多种癌细胞或肿瘤组织中的表达水平均有显著降低<sup>[14]</sup>。进一步的研究结果表明，NBR2可以通过各种应激作用而被诱导表达，同时在外界能量刺激下与AMPK相互作用，最终抑制肿瘤的发生发展<sup>[16]</sup>。

在本研究中，我们探究了通过lncRNA NBR2转染人为升高NBR2的表达对乳腺癌MCF-7和MDA-MB-231细胞放射敏感性的影响，结果发现NBR2确实可以明显提高乳腺癌细胞的放射敏感性，而且放射敏感性的提高伴随着细胞凋亡蛋白BCL2的表达水平的明显降低，揭示了NBR2的增敏作用可能与其调节细胞的凋亡通路相关蛋白有关。

BCL2是抗凋亡基因家族Bcl2中的一员，其通过抑制多种DNA修复而具有致癌活性，并可抑制癌细胞凋亡<sup>[23-24]</sup>。同时，BCL2作为控制细胞凋亡的最终调节者，在多种肿瘤中高表达，包括乳腺癌<sup>[25-26]</sup>。其表达水平上调的机制很复杂，雌激素、表皮生长

因子受体等多种因素均可能参与其中<sup>[27-29]</sup>。有研究表明,抑制 BCL2 基因或蛋白可增加乳腺癌细胞的凋亡,并逆转癌细胞对放化疗的耐受性,提高乳腺癌患者的放化疗疗效,改善患者预后<sup>[30-32]</sup>。本研究结果显示,γ 射线照射可以下调 lncRNA NBR2 的表达水平,但是过表达 NBR2 明显增强了乳腺癌细胞的放射敏感性,同时抑制了 BCL2 的表达水平,这一结果提示 γ 射线照射是通过下调 NBR2 的表达水平进而增强 BCL2 的表达,最终引发辐射抵抗,即:辐照→NBR2↓→BCL2↑→放射敏感性↓。本研究结果同时揭示了 NBR2 所介导的放射敏感性的提高是通过影响 BCL2 表达水平进而调控相关的凋亡信号通路来完成的。这一结论也在 NBR2 和 pcDNA-BCL2 共转染细胞的生存实验中得以验证,即提高 BCL2 的表达水平可以抑制 NBR2 的放射增敏效应。

总之,笔者发现人为地提高 NBR2 的表达水平能够增强乳腺癌细胞系 MCF-7 和 MDA-MB-231 的放射敏感性,而这种作用是通过抑制 BCL2 的表达水平及其信号通路来完成的。因此,深入研究 lncRNA NBR2 作为乳腺癌放疗敏感性调控的新靶点具有非常重要的临床意义和价值。本研究为乳腺癌的放疗增敏提供了新的实验依据和治疗策略,也为临床乳腺癌放疗疗效的提高奠定了基础。

**利益冲突** 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展,不涉及任何利益冲突。

**作者贡献声明** 李航负责设计实验方案、相关实验操作、收集数据和撰写论文;姜勉负责协助进行实验操作、论文校对;樊赛军负责实验指导、论文审阅等。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Chien LH, Tseng TJ, Chen CH, et al. Comparison of annual percentage change in breast cancer incidence rate between Taiwan and the United States-A smoothed Lexis diagram approach[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(7): 1762-1775. DOI: 10.1002/cam4.1102.
- [ 2 ] Debourdeau P, Espié M, Chevret S, et al. Incidence, risk factors, and outcomes of central venous catheter-related thromboembolism in breast cancer patients: the CAVECCAS study[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(11): 2732-2744. DOI: 10.1002/cam4.1201.
- [ 3 ] Wang S, Li Y, Li C, et al. Distribution and Determinants of Unmet Need for Supportive Care Among Women with Breast Cancer in China[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 1680-1687. DOI: 10.12659/MSM.905282.
- [ 4 ] Terry MB, Bradbury A. Family-based Breast Cancer Prevention Efforts in Adolescence [J]. *Pediatrics*, 2016, 138 (Suppl 1): S78-S80. DOI: 10.1542/peds.2015-4268K.
- [ 5 ] Todhunter ME, LaBarge MA. Cell and Tissue Biology Paves a Path to Breast Cancer Prevention[J]. *Trends Cancer*, 2017, 3(5): 313-315. DOI: 10.1016/j.trecan.2017.03.001.
- [ 6 ] Arenas M, García-Heredia A, Cabré N, et al. Effect of radiotherapy on activity and concentration of serum paraoxonase -1 in breast cancer patients[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0188633[2018-01-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5703554>. DOI: 10.1371/journal.pone.0188633.
- [ 7 ] EER H, Small W. Intraoperative Radiotherapy for Breast Cancer[J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 317. DOI: 10.3389/fonc.2017.00317.
- [ 8 ] Saiki H, Petersen IA, Scott CG, et al. Risk of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction in Older Women After Contemporary Radiotherapy for Breast Cancer[J]. *Circulation*, 2017, 135(15): 1388-1396. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025434.
- [ 9 ] Zhou Y, Wang C, Liu X, et al. Long non-coding RNA HOTAIR enhances radioresistance in MDA-MB231 breast cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(3): 1143-1148. DOI: 10.3892/ol.2017.5587.
- [ 10 ] Qi XS, Pajonk F, McCloskey S, et al. Radioresistance of the breast tumor is highly correlated to its level of cancer stem cell and its clinical implication for breast irradiation[J]. *Radiother Oncol*, 2017, 124(3): 455-461. DOI: 10.1016/j.radonc.2017.08.019.
- [ 11 ] Roeszler KN, Itman C, Sinclair AH, et al. The long non-coding RNA, MHM, plays a role in chicken embryonic development, including gonadogenesis[J]. *Dev Biol*, 2012, 366(2): 317-326. DOI: 10.1016/j.ydbio.2012.03.025.
- [ 12 ] Luan W, Zhou Z, Ni X, et al. Long non-coding RNA H19 promotes glucose metabolism and cell growth in malignant melanoma via miR-106a-5p/E2F3 axis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018, 144(3): 531-542. DOI: 10.1007/s00432-018-2582-z.
- [ 13 ] Li T, Liu Y, Xiao H, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes cell proliferation and metastasis in human breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2017, 24(4): 535-543. DOI: 10.1007/s12282-016-0736-x.
- [ 14 ] Liu X, Gan B. lncRNA NBR2 modulates cancer cell sensitivity to phenformin through GLUT1[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(24): 3471-3481. DOI: 10.1080/15384101.2016.1249545.
- [ 15 ] Xiao ZD, Liu X, Zhuang L, et al. NBR2: A former junk gene emerges as a key player in tumor suppression[J/OL]. *Mol Cell Oncol*, 2016, 3(4): e1187322[2018-01-27]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4972102>. DOI: 10.1080/23723556.2016.1187322.
- [ 16 ] Liu X, Xiao ZD, Han L, et al. lncRNA NBR2 engages a metabolic checkpoint by regulating AMPK under energy stress [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(4): 431-442. DOI: 10.1038/ncb3328.
- [ 17 ] Secginli S, Nahcivan NO, Gunes G, et al. Interventions Promoting Breast Cancer Screening Among Turkish Women With Global Implications: A Systematic Review[J]. *Worldviews Evid Based Nurs*, 2017, 14(4): 316-323. DOI: 10.1111/wvn.12245.
- [ 18 ] Yu C, Wang J. A Physical Mechanism and Global Quantification of Breast Cancer[J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0157422[2018-01-27].

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943646>. DOI: 10.1371/journal.pone.0157422.
- [19] 李敏, 孟庆慧, 胡旭东, 等. B 细胞易位基因 2 的表达水平对肿瘤细胞放射敏感性的影响[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2013, 37(3): 129–134. DOI: 10.3760/ema.j.issn.1673-4114.2013.03.001. Li M, Meng QH, Hu XD, et al. Effect of B-cell translocation gene 2 alteration on radiosensitivity of cancer cells [J]. Int J Radiat Med Nucl Med, 2013, 37(3): 129–134.
- [20] Chen MY, Chen YS, Hu LJ, et al. The end-of-treatment telephone response and prognosis of post-radiotherapy nasopharyngeal carcinoma patients in southern China[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9): 16564–16570.
- [21] Zhang Y, Hui ZG, Zhang JH, et al. Survey on the use of radiotherapy to treat early breast cancer following breast-conserving surgery in China[J]. Tumori, 2014, 100(5): 512–517. DOI: 10.1700/1660.18166.
- [22] Kim YG, Yoon YN, Choi HS, et al. Breast cancer stem cells in HER2-negative breast cancer cells contribute to HER2-mediated radioresistance and molecular subtype conversion: clinical implications for serum HER2 in recurrent HER2-negative breast cancer[J]. Oncotarget, 2018, 9(5): 5811–5822. DOI: 10.18632/oncotarget.23528.
- [23] Sims EK, Lakhter AJ, Anderson-Baucum E, et al. MicroRNA 21 targets BCL2 mRNA to increase apoptosis in rat and human beta cells[J]. Diabetologia, 2017, 60(6): 1057–1065. DOI: 10.1007/s00125-017-4237-z.
- [24] Vartak SV, Hegde M, Iyer D, et al. A novel inhibitor of BCL2, Disarib abrogates tumor growth while sparing platelets, by activating intrinsic pathway of apoptosis[J]. Biochem Pharmacol, 2016, 122: 10–22. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.09.028.
- [25] Min KW, Kim DH, Do SI, et al. High Ki67/BCL2 index is associated with worse outcome in early stage breast cancer[J]. Postgrad Med J, 2016, 92(1094): 707–714. DOI: 10.1136/postgradmedj-2015-133531.
- [26] Bouchalova K, Kharaisvili G, Bouchal J, et al. Triple negative breast cancer-BCL2 in prognosis and prediction. Review[J]. Curr Drug Targets, 2014, 15(12): 1166–1175.
- [27] Eom YH, Kim HS, Lee A, et al. BCL2 as a Subtype-Specific Prognostic Marker for Breast Cancer[J]. J Breast Cancer, 2016, 19(3): 252–260. DOI: 10.4048/jbc.2016.19.3.252.
- [28] Kordezangeneh M, Irani S, Mirfakhraie R, et al. Regulation of BAX/BCL2 gene expression in breast cancer cells by docetaxel-loaded human serum albumin nanoparticles[J]. Med Oncol, 2015, 32(7): 208. DOI: 10.1007/s12032-015-0652-5.
- [29] 姜勉, 董佳丽, 李航, 等. HBXIP 蛋白表达对宫颈癌细胞的增殖能力及放射敏感性的影响[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2017, 41(5): 340–346. DOI: 10.3760/ema.j.issn.1673-4114.2017.05.007. Jiang M, Dong JL, Li H, et al. Effects of HBXIP protein expression on the proliferation and radiosensitivity of cervical cancer cells[J]. Int J Radiat Med Nucl Med, 2017, 41(5): 340–346.
- [30] Azimian H, Dayyani M, MTB T, et al. Bax/Bcl-2 expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(3): 325–332. DOI: 10.22038/IJBMS.2018.26179.6429.
- [31] Li JY, Li YY, Jin W, et al. ABT-737 reverses the acquired radioresistance of breast cancer cells by targeting Bcl-2 and Bcl-xL [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31: 102. DOI: 10.1186/1756-9966-31-102.
- [32] Abdel-Fatah TM, Perry C, Dickinson P, et al. Bcl2 is an independent prognostic marker of triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings[J]. Ann Oncol, 2013, 24(11): 2801–2807. DOI: 10.1093/annonc/mdt277.

(收稿日期: 2018-01-27)