

大分割与小分割 X 线放疗方案 对乳腺癌 MCF-7 细胞 lncRNA GATA6-AS1 基因表达的影响

宁宁¹, 唐启胜², 杨渝晨³, 赵卫合⁴, 杨龙飞⁵

1. 西北妇女儿童医院病理科, 陕西 西安 710061;
2. 空军军医大学附属唐都医院泌尿外科, 陕西 西安 710038;
3. 西安市精神卫生中心检验科, 陕西 西安 710061;
4. 空军军医大学附属唐都医院放疗科, 陕西 西安 710038;
5. 空军军医大学附属唐都医院中心实验室, 陕西 西安 710038

【摘要】目的 探讨大分割与小分割 X 线放疗方案对乳腺癌 MCF-7 细胞长链非编码 RNA GATA6 反义 RNA 1 (GATA6-AS1) 基因表达的影响。**方法** 给予 MCF-7 细胞 4Gy X 线照射, 分为小分割组(每次 0.5 Gy, 共 8 次)、大分割组(每次 2 Gy, 共 2 次), 以未照射组为对照组。利用 CCK-8 实验检测各组 MCF-7 细胞的增殖能力, 流式细胞仪检测各组 MCF-7 细胞凋亡, qRT-PCR 法检测各组 MCF-7 细胞 GATA6-AS1 基因表达变化, 进一步通过 Westernblot 法检测其邻近基因表达产物 GATA6 的表达情况。**结果** 通过 CCK-8 实验发现, X 线照射能够抑制 MCF-7 细胞的增殖, 大分割组 MCF-7 细胞增殖抑制较小分割组更明显, 72 h 抑制率可达($57.0 \pm 8.86\%$), 而小分割组仅为($25.0 \pm 4.15\%$), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 流式细胞仪检测发现大分割组 MCF-7 细胞的凋亡较小分割组更明显, 48 h 凋亡率达($19.07 \pm 2.38\%$), 而小分割组仅为($13.22 \pm 2.71\%$), 差异有统计学意义($P < 0.05$); qRT-PCR 法检测发现, X 线照射会引起 MCF-7 细胞内 GATA6-AS1 基因表达增强, 大分割组 GATA6-AS1 基因表达增强更明显, 达到对照组的(2.13 ± 0.19)倍, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); Western blot 法检测发现, X 线照射可下调 GATA6-AS1 基因邻近蛋白 GATA6 的表达, 大分割组 GATA6 蛋白下调更明显。**结论** 大分割法 X 线照射能够明显抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖并促进细胞凋亡, 增强乳腺癌 MCF-7 细胞 GATA6-AS1 基因表达, 并下调其邻近基因表达产物 GATA6 的表达。

【关键词】 乳腺癌; 放射疗法; 小分割; 大分割; 基因表达

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2022)15—1905—04

Effect of hypofractionated and hyperfractionated X-ray radiotherapy on lncRNA GATA6-AS1 gene expression in breast cancer MCF-7 cells. NING Ning¹, TANG Qi-sheng², YANG Yu-chen³, ZHAO Wei-he⁴, YANG Long-fei⁵.
1. Department of Pathology, Northwest Women and Children's Hospital, Xi'an 710061, Shaanxi, CHINA; 2. Department of Urology, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, CHINA; 3. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Mental Health Center, Xi'an 710061, Shaanxi, CHINA; 4. Department of Radiotherapy, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, CHINA; 5. Department of Medical Laboratory and Research Center, Tangdu Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hypofractionated and hyperfractionated X-ray radiotherapy on the expression of GATA6 antisense RNA 1 (GATA6-AS1) gene in breast cancer MCF-7 cells. **Methods** MCF-7 cells were given 4Gy X-ray irradiation, which were divided into hyperfractionated radiotherapy groups (0.5 Gy, 8 times) and hypofractionated radiotherapy groups (2 Gy, twice), and the non-irradiation groups were used as controls. The proliferation ability of MCF-7 cells was detected by CCK-8 assays, the cell apoptosis was detected by flow cytometry, the expression of GATA6-AS1 gene was detected by qRT-PCR, and the expression of the adjacent gene expression product GATA6 was further detected by western blot. **Results** CCK-8 assays showed that X-ray irradiation inhibited the proliferation of MCF-7 cells, and the proliferation inhibition of MCF-7 cells in the hypofractionated radiotherapy group was more significant than that of hyperfractionated radiotherapy group after the treatment for 72 h: ($57.0 \pm 8.86\%$) vs ($25.0 \pm 4.15\%$), $P < 0.05$. Flow cytometry analysis revealed that the apoptosis of MCF-7 cells was more significantly promoted in hypofractionated radiotherapy group than that of hyperfractionated radiotherapy group after the treatment for 48 h: ($19.07 \pm 2.38\%$) vs ($13.22 \pm 2.71\%$), $P < 0.05$. Results from qRT-PCR showed that X-ray irradiation increased the expression of GA-

基金项目:国家自然科学基金(编号:81502671)

通讯作者:杨龙飞, E-mail:y68lf@163.com

TA6-AS1 gene in MCF-7 cells, and the expression of GATA6-AS1 gene was more significant in hypofractionated radiotherapy group than that of hyperfractionated radiotherapy group ($FC=2.13\pm 0.19$, $P<0.05$). Results from western blot showed that X-ray irradiation reduced the expression of GATA6 protein adjacent to GATA6-AS1 gene, and the down-regulation of GATA protein was more significant in hypofractionated radiotherapy group. **Conclusion** X-ray irradiation with hypofractionated radiotherapy obviously inhibits the proliferation of breast cancer MCF-7 cells, promotes cell apoptosis, enhances the expression of GATA6-AS1 gene, and reduces the expression of the adjacent gene expression product GATA6 in MCF-7 cells.

[Key words] Breast cancer; Radiotherapy; Hyperfractionated radiotherapy; Hypofractionated radiotherapy; Genetic expression

乳腺癌是最常见的女性肿瘤之一,是发生于乳腺的上皮性恶性肿瘤。放射治疗是乳腺癌治疗的主要手段之一,有研究认为乳腺癌对低剂量放射线不敏感,其中具体机制不明^[1]。长链非编码 RNA (lncRNA) 对人类基因的表达具有重要的调控作用,能够影响肿瘤的发生、发展以及转移,对肿瘤诊断与治疗具有潜在价值。有研究发现乳腺癌组织中长链非编码 RNA GATA6 反义 RNA 1 (GATA6-AS1) 表达降低,且与预后不良有关^[2]。GATA6-AS1 与肿瘤细胞放射敏感性间的关系尚不明确。为了研究乳腺癌更合理的放疗方式,为临床放疗选择提供依据,本研究拟探讨 X 线不同分割剂量放疗方案对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖、细胞凋亡以及 GATA6-AS1 基因及其邻近基因表达产物 GATA6 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 细胞培养试剂 DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶与新生牛血清购自 Gibco 公司,CCK-8 细胞增殖检测试剂盒购自翌圣公司。RNA 提取试剂 Trizol、反转录试剂盒与 SYBR green PCR mix 购自 Invitrogen 公司。兔抗人 GATA6 单克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔二抗购自 CST 公司。

1.2 细胞与处理 人乳腺癌 MCF-7 细胞来源于 ATCC 菌种库,使用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养。实验分为小分割组(每次 0.5 Gy,共 8 次)、大分割组(每次 2 Gy,共 2 次)和对照组(无照射)。小分割组每天给予 4 次 X 线照射,每次 0.5 Gy,间隔 3 h 照射,共 8 次;大分割组每天照射 1 次,每次 2 Gy,共 照射两次。两组细胞给予放射线总剂量相同,均在 48 h 内完成。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖 将三组乳腺癌细胞 MCF-7 培养至对数期后,用 0.25% 胰蛋白酶消化,以 5×10^3 /孔密度铺 96 孔细胞培养板,37°C 培养箱中培养过夜。实验组按上述设定方案给予 X 线照射,分别于 24 h、48 h 和 72 h 后每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液,37°C 继续培养 4 h,450 nm 波长检测 OD 值,绘制生长曲线。

1.4 流式细胞仪检测不同分割剂量照射对 MCF-7 细胞凋亡的影响 照射组与未照射组乳腺癌细胞 MCF-7 生长至对数期后,以 5×10^5 /孔密度铺 6 孔

细胞培养板,37°C 培养箱中培养过夜。实验组按上述方案给予 X 线照射,于 48 h 后用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5 qRT-PCR 法检测 GATA6-AS1 基因表达变化 乳腺癌细胞 MCF-7 生长至对数期后,按预定方案给予 X 线照射,分别于 24 h 与 48 h 后使用 Trizol 法提取照射组与对照组细胞总 RNA,并反转录为 cDNA,使用 SYBR green PCR mix 进行 qRT-PCR 检测。

1.6 Western blot 法检测 GATA6 蛋白表达变化 乳腺癌细胞 MCF-7 生长至对数期后,按预定方案给予 X 线照射,48 h 后提取照射组与对照组细胞总蛋白,BCA 法定量蛋白,Western blot 法检测 GATA6 蛋白表达。兔抗人 GATA6 单克隆抗体(1:1 000),HRP 标记山羊抗兔二抗(1:2 000)。

1.7 统计学方法 应用 SPSS13.0 软件进行数据统计学分析。计量资料符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 Student t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小分割与大分割放射线照射对 MCF-7 细胞增殖的影响 将 MCF-7 细胞分为小分割组与大分割组,放射线总剂量 4 Gy,通过 CCK-8 法检测 24 h、48 h 与 72 h 细胞增殖能力,发现大分割组 MCF-7 细胞的增殖抑制较小分割组更明显,72 h 抑制率可达($57.0\pm 8.86\%$),分别与对照组及小分割组分别比较差异均具有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 不同分割剂量照射后 MCF-7 细胞的增殖活力比较($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞活力($OD_{450\text{nm}}$)			
	0 h	24 h	48 h	72 h
对照组	0.98±0.09	1.21±0.15	1.63±0.13	2.01±0.15
小分割组	1.02±0.14	0.92±0.13	0.74±0.15*	0.75±0.17*
大分割组	0.99±0.11	0.84±0.10	0.54±0.17*	0.43±0.19*
F 值	0.06	7.96	47.2	170.46
P 值	0.94	<0.01	<0.01	<0.01

注:与对照组比较,* $P<0.05$,与小分割组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 小分割与大分割放射线照射对 MCF-7 细胞凋亡的影响 将 MCF-7 细胞分为小分割组与大分割

组,放射线总剂量 4 Gy,通过流式细胞仪检测照射后 48 h 细胞凋亡率,发现大分割法放射线照射对 MCF-7 细胞的凋亡促进更明显,凋亡率达到(19.07±2.38)%,

小分割组凋亡率为(13.22±2.71)%,而对照组凋亡率仅为(4.81±0.40)% ,差异具有统计学意义($F=84.24, P<0.05$),见图 1。

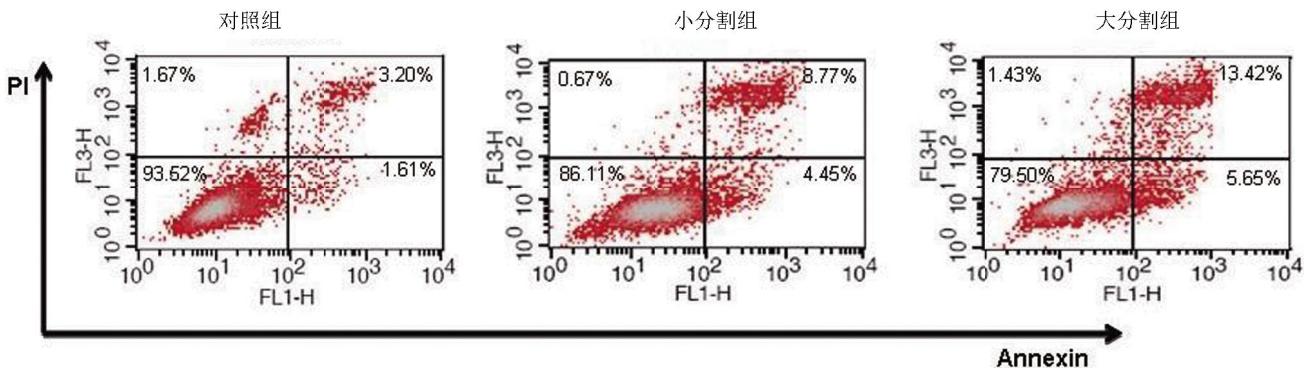


图 1 流式细胞仪检测不同分割剂量照射对 MCF-7 细胞凋亡的影响

2.3 小分割及大分割放射线照射对 MCF-7 细胞 GATA6-AS1 基因表达的影响 qRT-PCR 法检测结果表明,放射线照射能够增强 MCF-7 细胞中 GATA6-AS1 基因的表达,大分割组 GATA6-AS1 基因增强更明显,48 h 达到对照组的(2.13±0.19)倍,与小分割组比较差异具有统计学意义($t=6.8894, P<0.01$),见表 2。

表 2 不同分割剂量照射后 MCF-7 细胞内 GATA6-AS1 基因表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	GATA6-AS1 基因 FC 值	
	24 h	48 h
对照组	1.00±0.00	1.00±0.00
小分割组	1.16±0.07	1.31±0.08
大分割组	1.33±0.14	2.13±0.19 ^{ab}
F 值	9.94	72.09
P 值	<0.05	<0.01

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,与小分割组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 小分割及大分割放射线照射对 MCF-7 细胞 GATA6-AS1 邻近蛋白 GATA6 表达的影响 Western blot 法检测结果表明,放射线照射能够降低 MCF-7 细胞中 GATA6-AS1 邻近蛋白 GATA6 的表达,大分割组 GATA6 下调作用更明显,见图 2。

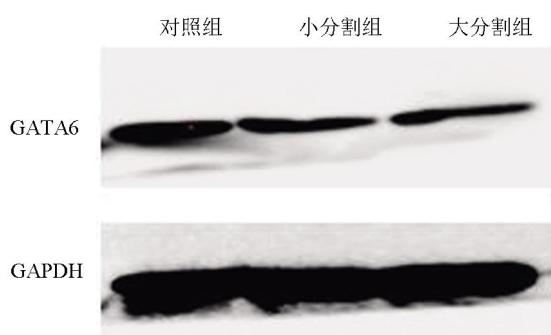


图 2 不同分割剂量照射对 MCF-7 细胞 GATA6 蛋白表达的影响

3 讨论

肿瘤细胞的异常增殖是乳腺癌发生发展的关键因素,放射线照射能够通过产生次级电子引起电离效应,诱发肿瘤细胞产生自由基,最终导致肿瘤细胞死亡。放疗是乳腺癌术后主要的辅助治疗手段,可以预防肿瘤复发及淋巴结转移,但放疗同时会造成正常组织的损伤,放射剂量越大,损伤越大,如何保证疗效的同时降低放疗剂量依旧是临床难题。近期大量前瞻性随机对照研究表明,采用短程大分割放疗方案治疗早期乳腺癌,具有与传统分割方案相同的疗效而不增加副反应的优点^[3-4]。李金高等^[5]发现总剂量相同的情况下,给予小分割方案多次小剂量照射能够抑制鼻咽癌细胞增殖,抑制效果明显优于大分割照射方案。小剂量照射被认为具有损伤小、费用低、耐受性好、可诱导机体免疫反应等优点^[6]。为了探讨乳腺癌更合理的放疗方式,为临床放疗选择提供依据,本研究分别使用小分割及大分割法照射乳腺癌 MCF-7 细胞,然后通过 CCK-8 法与流式细胞仪检测两种照射法对乳腺癌细胞增殖与凋亡的影响。乳腺癌的临床治疗中,常规放射线放疗剂量定义为 2 Gy/次,存在人体组织的干扰;而在细胞学研究中,因细胞没有周围组织的干扰而对放射线照射更敏感,杀伤效果更强,本研究参考李金高等^[5]的鼻咽癌细胞放疗方案,将 2 Gy/次定义为细胞水平大分割,0.5 Gy/次定义为细胞水平小分割。CCK8 实验结果发现乳腺癌 MCF-7 细胞对小分割低剂量照射不敏感,而大分割放疗对其增殖具有明显的抑制作用。采用流式细胞术进一步检测细胞凋亡发现,大分割法放疗对 MCF-7 细胞的凋亡促进也更明显,这与鼻咽癌细胞研究结果不一致。其中原因尚不清楚,ENNS 等^[1]认为肿瘤细胞对低剂量放疗敏感性与 p53 依赖的细胞凋亡信号通路有关。

为进一步探索乳腺癌细胞对小分割放疗不敏感的机制,本研究从 lncRNA 和蛋白表达水平方面进行了验证。lncRNA 参与细胞生长、分化、凋亡以及核内物质运输等多种生物学过程,并在表观遗传、转录水平及转录后水平等多个方面调控基因的表达。近年来研究表明,LncRNA 的异常表达与包括恶性肿瘤在内的多种疾病的发生发展密切相关,其中 GATA6 的反义 RNA1 (GATA6-AS1) 是一种新型的肿瘤抑制因子,能够抑制肺癌和胃癌细胞增殖和侵袭^[7-8]。在卵巢癌、胰腺癌等组织中 GATA6-AS1 被认为是一种抑癌基因^[9],而在乳腺癌组织中,GATA6-AS1 的作用尚不清楚,有研究认为 GATA6-AS1 在乳腺癌组织中表达水平降低与肿瘤体积大、临床分期晚、淋巴结转移和 HER-2 扩增有关,GATA6-AS1 的低表达是乳腺癌预后不良的指标^[2]。本研究发现在总放射剂量相同时,大分割放疗线照射后乳腺癌 MCF-7 细胞增殖能力较小分割照射后明显降低,同时 GATA6-AS1 基因表达升高更明显,说明两者之间存在关联,大分割放疗方法通过某种途径诱导乳腺癌 MCF-7 细胞内 GATA6-AS1 基因表达提高,从而改善乳腺癌预后。但是 GATA6-AS1 基因相关蛋白表达是否存在同样的变化趋势仍是未知。GATA6 蛋白是 GATA 蛋白家族中的一员,在胆管癌、胃癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞中呈高表达^[10-12]。Western blot 实验发现,乳腺癌细胞放疗后 GATA6 蛋白表达下降,且大分割放疗线照射后 GATA6 蛋白下降更明显,这与细胞增殖能力及 GATA6-AS1 基因表达变化趋势一致,推测 GATA 蛋白也参与了低剂量放疗线照射对乳腺癌细胞增殖的敏感性,具体机制有待进一步研究。

综上所述,乳腺癌细胞对大分割放疗线照射更敏感,其中机制可能与 GATA6-AS1 升高及 GATA6 蛋白表达下降有关。

参考文献

- [1] ENNS L, BOGEN KT, WIZNIAK J, et al. Low-dose radiation hypersensitivity is associated with p53-dependent apoptosis [J]. Mol Cancer Res, 2004, 2(10): 557-566.
- [2] 王晓文, 李江, 蒋威华, 等. 乳腺癌组织的 GATA6-AS1 水平和临床意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2020, 25(12): 1096-1099.
- [3] OWEN JR, ASHTON A, BLISS JM, et al. Effect of radiotherapy fraction size on tumour control in patients with early-stage breast cancer after local tumour excision: long-term results of a randomised trial [J]. Lancet Oncol, 2006, 7(6): 467-471.
- [4] KO DHI, NORRISS A, HARRINGTON CR, et al. Hypofractionated radiation treatment following mastectomy in early breast cancer: The Christchurch experience [J]. J Med Imaging Radiat Oncol, 2015, 59(2): 243-247.
- [5] 李金高, 叶建明, 陈文学, 等. 2Gy 多分割不同顺序照射对鼻咽癌 CNE-2 细胞生物效应的研究 [J]. 实用癌症杂志, 2009, 24(2): 125-128.
- [6] 李爱杰, 贺科文, 穆向魁, 等. 低剂量照射在肿瘤治疗中的作用及机制 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(22): 81-86.
- [7] WANG Z, PAN L, YANG L, et al. Long non-coding RNA GATA6-AS1 sponges miR-324-5p to inhibit lung cancer cell proliferation and invasion [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 9741-9751.
- [8] LI ZT, ZHANG X, WANG DW, et al. Overexpressed lncRNA GATA6-AS1 Inhibits LNM and EMT via FZD4 through the Wnt/β-Catenin Signaling Pathway in GC [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 19: 827-840.
- [9] 赵蔚, 赵艳滨, 张诗博, 等. 转录调节因子 GATA6 在肿瘤中的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(6): 955-957.
- [10] TIAN F, CHEN J, ZHENG S, et al. miR-124 targets GATA6 to suppress cholangiocarcinoma cell invasion and metastasis [J]. BMC Cancer, 2017, 17(1): 175-183.
- [11] SONG SH, JEON MS, NAM JW, et al. Aberrant GATA2 epigenetic dysregulation induces a GATA2/GATA6 switch in human gastric cancer [J]. Oncogene, 2018, 37(8): 993-1004.
- [12] SONG Y, TIAN T, FU X, et al. GATA6 is overexpressed in breast cancer and promotes breast cancer cell epithelial-mesenchymal transition by upregulating slug expression [J]. Exp Mol Pathol, 2015, 99(3): 617-627.

(收稿日期:2021-12-13)