

BRD4沉默联合吉西他滨为治疗三阴性 乳腺癌提供新的治疗方案

陈玉丽¹, 朱勤伟², 隋晓梅³, 王秀春³

1. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261041;
2. 潍坊市中医医院, 山东 潍坊 261041;
3. 潍坊医学院附属医院放疗科, 山东 潍坊 261042

[摘要] 背景与目的: 乳腺癌是女性发病率最高的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率逐渐上升, 特别是三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)缺乏有效的治疗靶点, 死亡率更高。在以往的研究中, BRD4在多种肿瘤的进展中起到重要的作用。该研究旨在研究BRD4在耐吉西他滨的TNBC中所起到的作用, 联合BRD4沉默和吉西他滨治疗TNBC的效果。方法: 分别应用反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和蛋白[质]印迹法(Western blot)检测人乳腺癌细胞株MDA-MB-231和MDA-MB-453在吉西他滨治疗中表达变化。BRD4被shBRD4沉默后, 通过体内和体外实验验证BRD4在耐药的TNBC中所起到的作用。结果: 在TNBC中, BRD4在吉西他滨诱导后表达量明显的升高($P<0.05$)。沉默BRD4基因后, 吉西他滨的半数抑制率明显降低, BRD4沉默联合吉西他滨使细胞的凋亡率明显升高($P<0.05$); 在体外实验中, BRD4沉默联合吉西他滨可以使肿瘤的生长速度明显降低($P<0.05$)。结论: BRD4在耐药的TNBC中起到重要的作用, BRD4沉默联合吉西他滨为治疗TNBC提供新的治疗方法。

[关键词] 三阴性乳腺癌; BRD4; 吉西他滨

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2016.09.005

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)09-0750-06

BRD4 silencing plus gemcitabine may be a novel therapy for triple-negative breast cancer CHEN Yuli¹, ZHU Qinwei², SUI Xiaomei³, WANG Xiuchun³ (1. Weifang Medical University, Weifang 261041, Shandong Province, China; 2. The Traditional Chinese Medicine Hospital of Weifang, Weifang 261041, Shandong Province, China; 3. Department of Radiotherapy of the Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261042, Shandong Province, China)

Correspondence to: SUI Xiaomei E-mail: suixiaomei2000@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Breast cancer has the highest morbidity and mortality rate in women worldwide. Triple-negative breast cancer (TNBC) has no specific target and has low survival rate. Recent studies have verified BRD4 could promote tumor progression. This study aimed to detect the expression level of BRD4 in TNBC after treatment with gemcitabine, and to reveal the effect of BRD4 silencing plus gemcitabine as a treatment for TNBC. **Methods:** The expression of BRD4 in TNBC cell lines treated with gemcitabine was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot. The effect of BRD4 silencing plus gemcitabine in TNBC was illustrated *in vitro* and *in vivo*. **Results:** The expression of BRD4 in TNBC was significantly increased after treatment with gemcitabine. *In vitro*, BRD4 knockdown significantly lowered the IC₅₀ value. The apoptotic rate of TNBC was significantly increased in the BRD4 silencing plus gemcitabine group compared to the other. The growth rate of tumor *in vivo* was significantly lowered in the BRD4 silencing plus gemcitabine group. **Conclusion:** BRD4 may play an important role in the drug resistance to gemcitabine in TNBC. BRD4 silencing plus gemcitabine may be a novel treatment strategy for TNBC.

[Key words] Triple-negative breast cancer; BRD4; Gemcitabine

近年来,乳腺癌发病率不断升高。有文献报道,乳腺癌已成为女性发病率最高的恶性肿瘤^[1]。目前,按照乳腺癌的基因表型可将乳腺癌分为Luminal A型、Luminal B型、人类表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor-2, HER-2)阳性型和三阴性(triple-negative breast cancer, TNBC),其中Luminal型和HER-2阳性型在手术及放疗后,给予内分泌、靶向治疗后其死亡率明显下降。TNBC约占全部乳腺癌的15%,分子表型为雌激素受体、孕激素受体、HER-2均为阴性,由于缺乏特异性靶点,所以治疗方法只能选择手术和放疗^[2-3]。目前TNBC主要以蒽环类联合紫杉类药物为主的化疗方案,但是患者出现复发耐药时,就需要研究新的治疗方案^[4]。经证实,吉西他滨在治疗TNBC中具有较好的效果^[5-6],但是也有研究认为,TNBC在应用吉西他滨治疗过程中容易出现耐药^[7]。因此,需要进一步地研究乳腺癌的发病机制,以发现新的治疗靶点,更好地治疗TNBC。

BRD4是BET蛋白家族成员,BET蛋白家族由BRDT、BRD2、BRD3和BRD4组成。应用BRD4的靶向药物JQ1可以有效地控制急性白血病、胰腺癌、黑色素瘤、骨肉瘤、前列腺癌和恶性周围性神经鞘瘤等肿瘤^[8-11]。而最近的研究报道证实,BRD4在乳腺癌的进展中起到重要的作用^[12]。然而,BRD4在药物抵抗方面的研究目前阐述不清楚,这就需要进一步明确BRD4在TNBC中的作用和与药物抵抗之间的关系。本研究旨在探讨BRD4在耐吉西他滨的TNBC中的作用,以及沉默BRD4基因联合吉西他滨治疗TNBC的效果。

1 材料和方法

1.1 材料

人TNBC细胞株MDA-MB-231和MDA-MB-453购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。DMEM、胎牛血清购自美国Gibco公司。BRD4多克隆抗

体购自美国Santa Cruz公司。 β -actin单克隆抗体购自上海碧云天生物技术有限公司。BRD4引物购自上海化工研究院。shBRD4由汉恒生物科技(上海)有限公司构建。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养及给药方法

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231和MDA-MB-453在37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养,培养基为含有10%血清和1%青霉素、链霉素的DMEM培养基。所有的实验细胞均处于对数生长期。用2 μ mol/L的吉西他滨分别诱导TNBC细胞株24、48 h。

1.2.2 建立稳定转染shBRD4的MDA-MB-231和MDA-MB-453细胞株

shBRD4由汉恒生物科技(上海)有限公司构建。shBRD4序列为5'-CAGACATCCACACACAGTA-3',shcontrol序列为5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。转染前一天铺6孔板,转染时细胞密度为50%,细胞培养基被含有100 μ L (1 \times 10⁸ TU/mL)的病毒悬浮液和8 μ g/mL的polybrene的1 mL无血清培养基更换,温育24 h后,转染细胞用含有3 μ g/mL嘌呤霉素的含血清细胞培养基进行培养,嘌呤霉素抵抗的细胞株筛选3代后,通过蛋白[质]印迹法(Western blot)验证沉默BRD4的效率。

1.2.3 反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测

每组细胞的总RNA通过TRIzol试剂抽提。按照宝生物工程(大连)有限公司反转录试剂盒说明进行反转录。反应条件:95℃ 2 min; 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环。BRD4正义链为5'-CCCAATTACAACCCCGACATC-3',反义链为5'-TCACCCGCAGTTTCACTCCT-3'; β -actin正义链为5'-GATCATTGCTCCTCCTGAGC-3',反义链为5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'。

1.2.4 Western blot检测

加入蛋白酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞,震荡离心后抽提总蛋白。采用BCA法测定总蛋白浓度,将等量蛋白(25 μ g)加入缓冲液后煮沸使蛋白变性。随后在10% SDS-PAGE上电

泳分离, 转至PVDF膜, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 加入一抗置于4 ℃冰箱温育过夜。第2天, 采用TBST冲洗30 min后, 加入HRP标记的二抗在室温温育2 h, 增强化学发光法显影。

1.2.5 MTT法检测

采用MTT法检测沉默BRD4前后吉西他滨对MDA-MB-231和MDA-MB-453的半数抑制率IC₅₀值。

1.2.6 动物实验

4周龄雌性BALB/c裸鼠均购自扬州大学动物实验中心, 在SPF级动物实验中心喂养并进行实验。将shcontrol和shBRD4 MDA-MB-231细胞株分别注射到动物皮下, 各12只, 然后将两组裸鼠分别再随机分为shcontrol组, shcontrol+吉西他滨组, shBRD4组和shBRD4+吉西他滨组, 每组6只, 每5 d检查肿瘤的体积, 到25 d处死裸鼠, 切除肿瘤, 拍照, 并称量肿瘤的质量。肿瘤体积计算公式为 $V(\text{mm}^3)=0.5 \times \text{长轴} \times \text{短轴}^2$ 。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0对所有的数据进行统计。所有实验均重复3次。数值的记录方法为 $\bar{x} \pm s$, 两

组计量资料采用独立样本t检验方法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 吉西他滨诱导后BRD4在TNBC细胞株中表达升高

为了研究BRD4在TNBC耐药中所起的作用, 本研究首先研究BRD4在应用吉西他滨诱导MDA-MB-231和MDA-MB-453前后表达量的变化。应用2 μg/mL的吉西他滨诱导2种细胞株24或48 h后, 通过Western blot和RT-PCR的方法, 证实细胞株中蛋白表达和mRNA表达明显增加(图1)。这种增加可能是乳腺癌细胞的一种适应性反应。

2.2 沉默BRD4对吉西他滨诱导TNBC细胞株凋亡的影响

为了进一步地明确BRD4在TNBC中对吉西他滨耐药中所起到的作用, 首先建立稳定转染了shBRD4和shcontrol的MDA-MB-231和MDA-MB-453, 用Western blot验证其沉默效率。通过

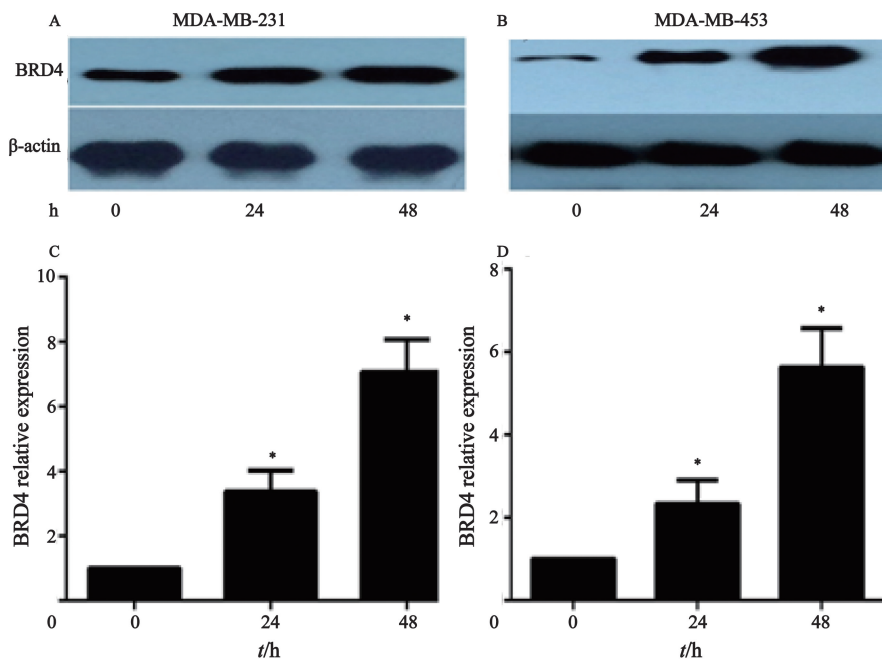


图1 BRD4经吉西他滨诱导后表达明显升高

Fig. 1 The expression of BRD4 was increased in TNBC treated with gemcitabine

*: $P < 0.05$, as compared with shcontrol. A, C: BRD4 expression in MDA-MB-231 cells; B, D: BRD4 expression in MDA-MB-453 cells

流式细胞术检查细胞的凋亡率证实吉西他滨可以使MDA-MB-231和MDA-MB-453的凋亡率升高，而沉默BRD4可以使细胞凋亡率明显升高。进一步研究吉西他滨的IC₅₀值变化，结果发现，IC₅₀值明显减少(图2)。

2.3 在体外实验中沉默BRD4对肿瘤生长速度的影响

本研究首先将稳定转染的shBRD4和shcontrol的MDA-MB-231细胞株种植于裸鼠皮

下并成瘤，然后分为shcontrol组、shcontrol+吉西他滨组、shBRD4组和shBRD4+吉西他滨组，每组6只。每3 d测量肿瘤的大小，直到第25天，处死裸鼠后，取出肿瘤后拍照图，肿瘤称重，证实虽然BRD4和吉西他滨都可以减慢肿瘤的生长速度，但是当沉默BRD4后可以明显减慢肿瘤的生长速度，说明他们具有协同治疗作用(图3)。

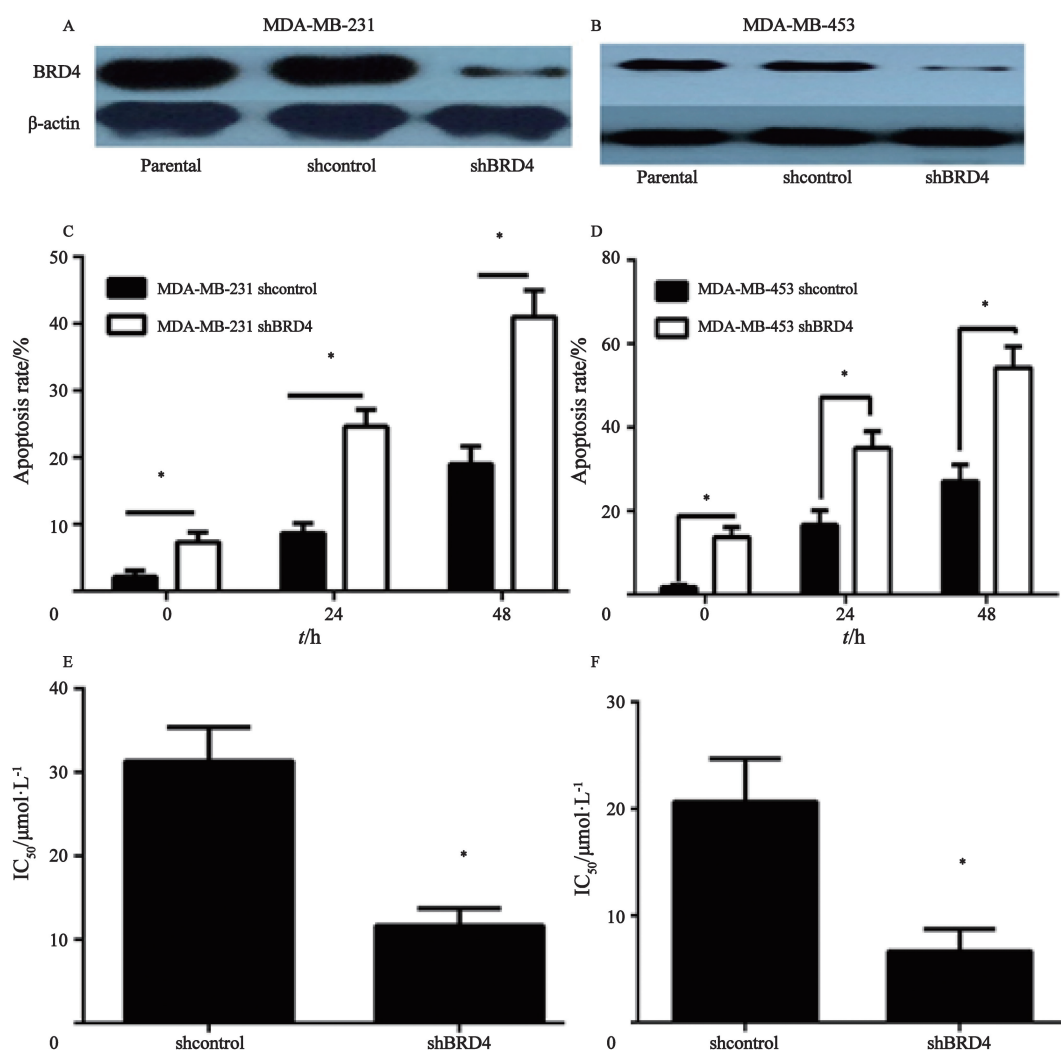


图 2 沉默BRD4后增加TNBC对吉西他滨的敏感性

Fig. 2 BRD4 silencing sensitized TNBC cells to gemcitabine in vitro

*: $P < 0.05$, as compared with shcontrol; A: BRD4 expression in MDA-MB-231 cells; B: BRD4 expression in MDA-MB-453 cells; C: MDA-MB-231 cells apoptosis; D: DA-MB-453 cells apoptosis; E: IC₅₀ of MDA-MB-231 shcontrol and MDA-MB-231 shBRD4; F: IC₅₀ of MDA-MB-453 shcontrol and MDA-MB-453 shBRD4

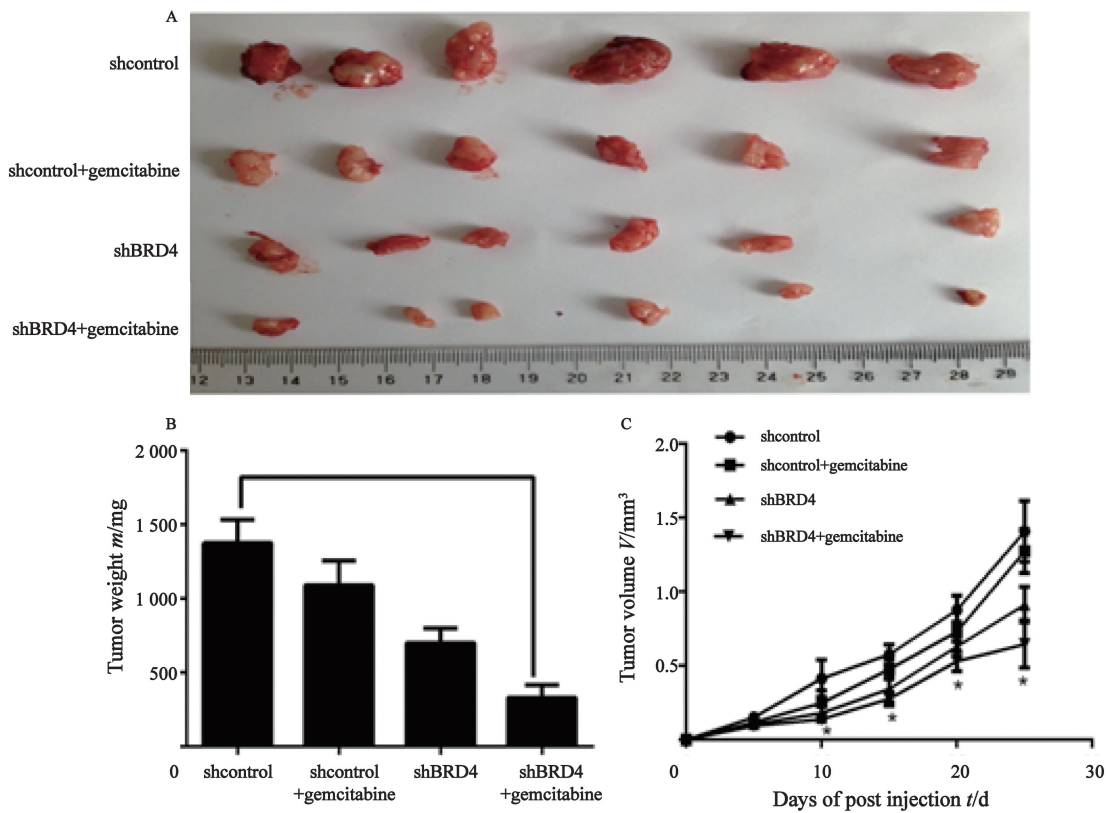


图3 *BRD4*沉默后, 肿瘤的生长速度明显降低

Fig. 3 *BRD4* knockdown plus gemcitabine significantly suppressed the tumor growth *in vivo*

*: $P < 0.05$, as compared with shcontrol; A: Tumor growth of different groups; B: Tumor weight of different groups; C: Tumor volume of different groups

3 讨论

本研究证实, *BRD4*在TNBC中可以增加药物抵抗性。此外, 在体内和体外试验中均证实吉西他滨和沉默*BRD4*基因可以协同治疗TNBC, 说明*BRD4*是治疗TNBC的有效靶点。目前以手术为主的综合治疗, 并没有有效地改善TNBC患者的总生存率。目前TNBC缺乏特异性的靶向治疗目标, 这就需要我们寻找TNBC的发病机制, 并找到新的治疗方法。

近年来的研究已经证实, 在胰腺癌、恶性黑色素瘤、骨肉瘤和恶性周围型神经鞘瘤中, 通过抑制*BRD4*基因的表达可以有效地抑制上述肿瘤的进展。最新的研究证实, *BRD4*在乳腺癌中促进肿瘤的进展, 然而尚无与药物耐药的相关研究, 这就需要阐述*BRD4*在乳腺癌耐药中的作用, 并为治疗乳腺癌提供新的治疗靶点。

为了研究*BRD4*在乳腺癌耐药中的作用, 本研究首先检测其在药物治疗中是否起到适应性反应, 在乳腺癌细胞株MDA-MB-231和MDA-MB-453中加入吉西他滨, 在药物的诱导下, *BRD4*的表达明显升高, 这说明*BRD4*在DNA损伤应激反应中可能起到适应性反应。为了进一步研究*BRD4*是否在乳腺癌的耐药中所起作用, 本研究在TNBC细胞株中沉默*BRD4*基因, 通过Western blot检测验证沉默效率, 接着比较shcontrol组、shcontrol+吉西他滨组、sh*BRD4*组和sh*BRD4*+吉西他滨组在24和48 h的凋亡率。结果证实, 虽然在乳腺癌中沉默*BRD4*基因或者采用吉西他滨均可以提高肿瘤细胞的凋亡率, 但是当沉默*BRD4*基因+吉西他滨组却明显增加了乳腺癌细胞的凋亡率, 说明沉默*BRD4*基因和吉西他滨治疗乳腺癌具有协同治疗作用。

为了进一步研究其在治疗中所起到的作

用,进行裸鼠成瘤实验以验证BRD4沉默联合吉西他滨治疗乳腺癌的作用。结果证实,在shBRD4+吉西他滨组,肿瘤的生长速度明显减慢,肿瘤种植25 d后,肿瘤质量较shcontrol组明显减少,说明在体内实验中,shBRD4联合吉西他滨组可以明显抑制肿瘤的生长速度。

综上所述,本研究证实BRD4在TNBC的吉西他滨耐药中起到重要的作用,通过在TNBC中沉默BRD4联合吉西他滨可以有效地治疗TNBC。

[参 考 文 献]

- [1] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J] . CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9–29.
- [2] ANDREOPOULOU E, SCHWEBER S J, SPARANO J A, et al. Therapies for triple–negative breast cancer [J] . 2015, 16(7): 983–998.
- [3] WAHBA H A, EL–HADAAD H A. Current approaches in treatment of triple–negative breast cancer [J] . Expert Opin Pharmacother, 2015, 12(2): 106–116.
- [4] LIEDTKE C, RODY A. New treatment strategies for patients with triple–negative breast cancer [J] . Oncotarget, 2015, 27(1): 77–84.
- [5] HU X C, ZHANG J, XU B H, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first–line therapy for metastatic triple–negative breast cancer (CBCSG006): a randomised, open–label, multicentre, phase 3 trial [J] . Lancet Oncol, 2015, 16(4): 436–446.
- [6] ZHANG J, FAN M, XIE J, et al. Chemotherapy of metastatic triple–negative breast cancer: Experience of using platinum–based chemotherapy [J] . 2014, 6(40): 43135–43143.
- [7] O’SHAUGHNESSY J, SCHWARTZBERG L, DANSO M A, et al. Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple–negative breast cancer [J] . J Clin Oncol, 2014, 32(34): 3840–3847.
- [8] ASANGANI I A, DOMMETI V L, WANG X, et al. Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration–resistant prostate cancer [J] . 2015, 510(7504): 278–282.
- [9] HU Y, ZHOU J, YE F, et al. BRD4 inhibitor inhibits colorectal cancer growth and metastasis [J] . Int J Mol Sci, 2015, 16(1): 1928–1948.
- [10] VENKATARAMAN S, ALIMOVA I, BALAKRISHNAN I, et al. Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self–renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma [J] . Oncotarget, 2014, 5(9): 2355–2371.
- [11] WANG Y H, SUI Y N, YAN K, et al. BRD4 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell proliferation and enhances gemcitabine resistance [J] . Oncol Rep, 2015, 33(4): 1699–1706.
- [12] BIHANI T, EZELL S A, LADD B, et al. Resistance to everolimus driven by epigenetic regulation of MYC in ER+ breast cancers [J] . Oncotarget, 2015, 6(4): 2407–2420.

(收稿日期: 2016–01–21 修回日期: 2016–04–24)