

miRNA - 22 对食管癌细胞放射敏感性的影响

曲媛¹, 王小春², 车轶群³

1. 中国医学科学院肿瘤医院放射治疗科, 北京 100021;

2. 中国医学科学院放射医学研究所, 天津市分子核医学重点实验室;

3. 中国医学科学院肿瘤医院检验科

中图分类号: R815.6 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 714X(2014) 03 - 0198 - 03

摘要: 目的 探究 miRNA - 22 对食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)放射敏感性的影响。方法 建立 miRNA - 22 表达的稳定转染细胞模型,通过克隆形成实验和 MTT 法检测 miRNA - 22 表达对受照食管癌细胞增殖活性的改变。结果 体外稳定转染细胞模型中,克隆形成实验和 MTT 法结果表明,miRNA - 22 表达升高,显著降低了食管癌细胞增殖活性($P < 0.01$),促进了 ESCC 细胞对 γ - 射线的放射敏感性。反之,miRNA - 22 表达降低,显著增加了食管癌细胞增殖活性($P < 0.01$),抑制了 ESCC 细胞对 γ - 射线的放射敏感性。结论 miRNA - 22 的表达与食管癌放射敏感性密切相关,miRNA - 22 表达量越高,食管癌细胞放射敏感性越高。

关键词: miRNA - 22; ESCC; γ - 射线; 放射敏感性

DOI:10.13491/j.cnki.issn.1004-714x.2014.03.002

Effects of MiRNA - 22 Expression on the Radiosensitivity of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. QU Yuan, WANG Xiao - chun, CHE Yi - qun. 1. Department of Radiation Oncology, Cancer Hospital(Institute), Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021 China. 2. Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences. 3. Department of Clinical Laboratory, Cancer Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences.

Corresponding Author: CHE Yi - qun, E - mail: cyq@cicams.ac.cn

Abstract: **Objective** To study the effects of miRNA - 22 expression on radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** Stable transfected cell models with different miRNA - 22 expression were built. The changes of proliferation activity were measured by MTT and colony formation assay. **Results** The results of MTT and colony formation assay demonstrated that increased expression of miRNA - 22 significantly inhibited the proliferation activity ($P < 0.01$) and sensitized ESCC cells to γ - ray radiation. Contrarily, decreased expression of miRNA - 22 significantly promoted the proliferation activity ($P < 0.01$) and depressed radiosensitivity of ESCC cells. **Conclusion** These results demonstrated that the expression of miRNA - 22 was associated with radiosensitivity of ESCC. Increased expression of miRNA - 22 promoted the radiosensitivity of ESCC.

Key words: miRNA - 22; ESCC; γ - ray; Radiosensitivity

食管癌是一种常见的恶性肿瘤,食管癌患者治疗后平均 5 a 存活率低于 25%^[1]。食管癌包括食管鳞状细胞癌和食管腺癌两种类型,相对于西方国家以腺癌为主,食管鳞状细胞癌(esophageal squamous cell carcinoma, ESCC)是中国的主要类型^[2]。而放射治疗是 ESCC 的主要治疗手段,在现阶段食管癌治疗中应用极为普遍。然而,放射治疗后期,食管癌患者肿瘤组织放疗耐受性的产生,成为严重影响放疗疗效的主要因素,大大降低了患者的生存率。因此,寻找食管癌细胞

相关的放疗耐受或放射敏感基因,调节其表达,以提高放射敏感性,是目前提高放疗疗效的有效手段。

miRNA 是一类高度保守的非编码单链小 RNA,含有 19 ~ 22 个核苷酸。miRNA 可以通过与靶基因 mRNA 的 3' UTR 相结合,在转录后水平干扰基因的表达或影响其 mRNA 稳定性,从而降低蛋白水平^[3]。研究表明多种 miRNA 起到癌基因或抑癌基因的作用。miRNA 表现出对细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡、细胞转移和侵袭、新陈代谢、血管生成、肿瘤微环境、肿瘤免疫等方面的调节作用。miRNA 可能成为肿瘤放射敏感性调节的新靶点。本次研究中,我们将采用体外

稳定转染细胞模型,来研究 miRNA-22 的表达与食管鳞状细胞癌(ESCC)放射敏感性的关系。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 食管癌细胞 EC9706(购自中美合资博慧斯生物医药科技有限公司)用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.2 γ 射线照射 用 ¹³⁷Cs γ 射线照射 EC9706 细胞,根据实验设计照射不同剂量,剂量率为 1.0 Gy/min,源靶距为 15 cm。

1.3 质粒构建和细胞转染 miRNA-22 正义表达载体(含有 miRNA-22 前体序列的 pSuppressorNeo 重组质粒,购自 ABI 公司,下文称空载组 + miRNA-22),含有一段无义寡核苷酸序列的重组载体转染作为阴性对照组(下文称空载组)。Anti-miRTM miRNA-22 抑制剂(购自 ABI 公司)可以用来敲降 miRNA-22 的表达。将上述正义表达载体、RNAi 载体及阴性对照组通过 Lipofectamine 2000(购自 Invitrogen 公司)转染进入 EC9706 细胞。northern blots 用来检测转染效果。

1.4 miRNA northern blots 从组织中提取的总 RNA,通过 15% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。转移至杂交膜,并与寡核苷酸探针(与 miRNA-22 互补、末端标记 T4 多核苷酸激酶的寡核苷酸片段)结合。42℃ 杂交过夜。用 42℃ 的 0.1 × SSPE 和 0.1% × SDS 洗膜两次,每次 15min。用 Typhoon 9410 成像。以 5sRNA 作为内参。

1.5 克隆形成实验 照射后 EC 9706 细胞以 400 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,37℃、5% CO₂ 条件下培养 10 d,弃去培养基,PBS 洗两次,加入甲醇,固定 10 min。弃去固定液,姬姆萨染色 20 min,倒置显微镜下观察细胞克隆并计数各孔 50 个以上的集落数。

1.6 MTT 法检测细胞增值活性 照射后 EC 9706 细胞采用 MTT 法检测不同分组的细胞增殖活性的变化。细胞计数后以 3 × 10³/孔的细胞浓度接种于 96 孔板中,每组设 3 个复孔。在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 8 h。取出培养板,每孔加入 MTT 溶液 10 μl (10 μg/ml),继续培养 4 h。吸去孔内培养基,每孔加入二甲亚砜(DMSO) 150 μl,震荡 10 min,使结晶充分溶解。选择 490 nm 波长,酶联免疫检测仪测定各孔吸光值,并把各组此时的生长率定为 0。此后每隔 1 d(24 h)检测 1 次,记录吸光度(A)值。

1.7 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件对结果进行 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA-22 的表达对食管癌细胞放射敏感性的影响 MTT 法结果表明,6 Gy 照射后,miRNA-22 表达升高的 EC9706 细胞增殖能力比对照组降低(*P* < 0.05),见表 1。而 miRNA-22 表达降低的 EC9706 细胞克隆形成能力比对照组升高(*P* < 0.05),见表 2。用 miRNA northern blots 法检测转染效果。通过克隆形成实验和 MTT 法来检测 miRNA-22 表达改变对食管癌细胞放射敏感性的影响。Northern blots 结果显示,miRNA-22 正义载体(Vector + miRNA-22)和干扰载体(Vector + miRNA-22i)都成功转染,分别升高或降低了 EC9706 细胞中 miRNA-22 的表达见图 1 A、C。克隆形成实验结果表明,经过 6、8、10 Gy 照射后,miRNA-22 表达升高的 EC9706 细胞克隆形成能力比对照组降低(*P* < 0.01),见图 1 B。而 miRNA-22 表达降低的 EC9706 细胞克隆形成能力比对照组升高(*P* < 0.01),见图 1 D。

表 1 miRNA-22 正义转染对照照射后不同时间 EC9706 细胞增殖活力的影响(A 值 $\bar{x} \pm s$)

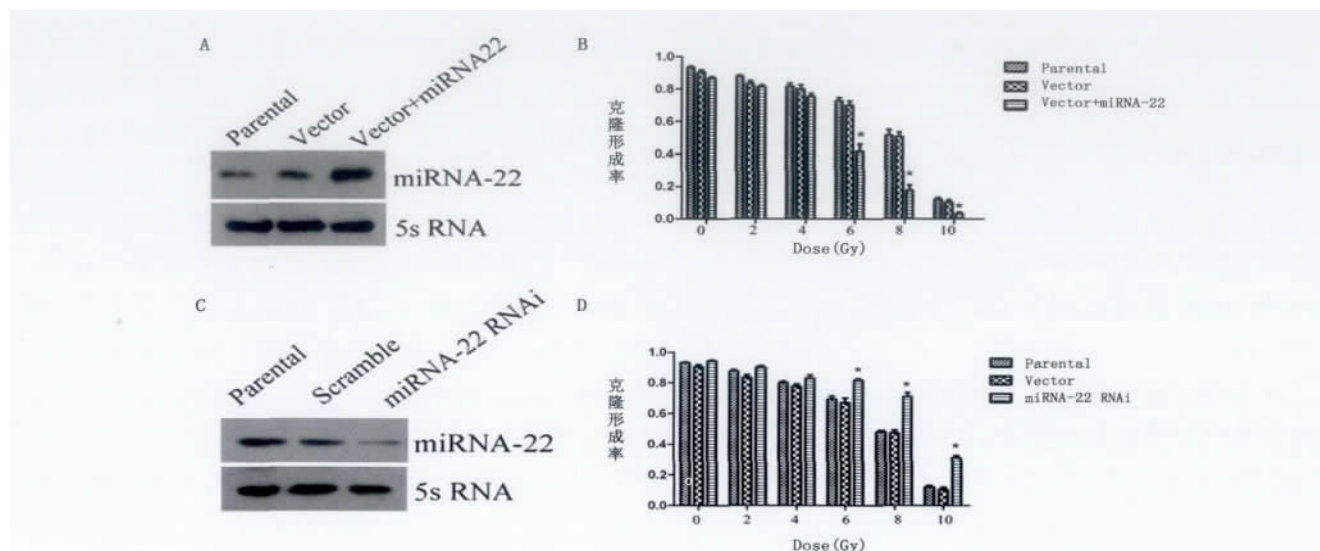
组别	样本数	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
亲本组	3	0	0.173 ± 0.020	0.266 ± 0.018	0.525 ± 0.120	0.831 ± 0.144	1.450 ± 0.083	1.622 ± 0.074
空载组	3	0	0.167 ± 0.015	0.257 ± 0.023	0.519 ± 0.136	0.778 ± 0.098	1.233 ± 0.067	1.509 ± 0.119
正义转染组	3	0	0.115 ± 0.022	0.143 ± 0.039	0.25 ± 0.130	0.438 ± 0.105	0.738 ± 0.501 ^{1) 2)}	0.829 ± 0.061 ^{1) 2)}

注:1) 与亲本组相比 *P* < 0.05; 2) 与空载组相比 *P* < 0.05。

表 2 miRNA-22 RNAi 对照照射后不同时间 EC9706 细胞增殖活力的影响(A 值 $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d
亲本组	3	0	0.188 ± 0.047	0.353 ± 0.081	0.713 ± 0.120	0.883 ± 0.096	1.228 ± 0.143	1.588 ± 0.142
空载组	3	0	0.163 ± 0.038	0.314 ± 0.107	0.672 ± 0.097	0.827 ± 0.128	1.211 ± 0.065	1.509 ± 0.093
RNAi 组	3	0	0.296 ± 0.050	0.582 ± 0.073	1.105 ± 0.084	1.579 ± 0.130 ^{1) 2)}	1.924 ± 0.077 ^{1) 2)}	2.337 ± 0.106 ^{1) 2)}

注:1) 与亲本组相比 *P* < 0.05; 2) 与空载组相比 *P* < 0.05。



A: miRNA-22 正义转染后, miRNA-22 表达量升高; B: 经过 6、8、10 Gy 照射后, miRNA-22 表达量升高的 EC9706 细胞克隆形成率比对照组显著降低 ($P < 0.01$); C: miRNA-22 RNAi 载体转染后, miRNA-22 表达量降低; D: 经过 6、8、10 Gy 照射后, miRNA-22 表达量降低的 EC9706 细胞克隆形成率比对照组显著升高 ($P < 0.01$)。

图 1 miRNA-22 的表达对食管癌细胞放射敏感性的影响

3 讨论

miRNA 是近年来人们研究的热点。目前人们发现的 miRNA 前体约有 25000 种,能调控人类基因组中约 30% 的基因^[4]。研究表明 miRNA 在多种癌症中,如淋巴瘤、大肠癌、肺癌、乳房癌、肝癌、胶质母细胞癌和胃癌^[5]有着异常表达,并在肿瘤细胞的发生、侵袭等多种细胞进程中起着重要作用。miRNA-22 是一种肿瘤抑制因子,在多种肿瘤中出现异常表达,并影响肿瘤进程。miRNA-22 在肺癌组织中表达量明显低于正常组织,其过表达能明显抑制肺癌细胞的增殖和侵袭^[6]。miRNA-22 在肝癌中也表现为表达下调,并且 miRNA-22 低表达与肝癌患者的低存活率正相关^[7]。然而,miRNA-22 在食管癌中的表达和功能方面的研究很少,与 ESCC 放射敏感性的关系还不明确。

本研究中,我们通过体外细胞模型去探究 miRNA-22 与 ESCC 放射敏感性的关系。通过建立不同 miRNA-22 表达的稳定转染细胞模型,探究 miRNA-22 表达与 ESCC 细胞放射敏感性的关系。克隆形成实验和 MTT 法结果表明,miRNA-22 表达水平升高会促进 ESCC 细胞的放射敏感性。反之,miRNA-22 表达水平降低会抑制 ESCC 细胞放射敏感性。miRNA-22 可以通过调控多个靶基因的表达,进而调节多个信号通路。在结肠癌中,miRNA-22 可以通过抑制 TIAM1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1) 的表达从而抑制结肠癌细胞的迁移和侵袭^[8]。然而,miRNA-22 对 ESCC 放射敏感性的调节机制并不明确,还有待进一步的研究。

综上所述,本研究结果表明,miRNA-22 表达水平升高会促进 ESCC 的放射敏感性,为食管癌的临床放射治疗提供了理论依据。miRNA-22 是潜在的 ESCC 放射敏感性的调节靶点,有待深入研究其调节作用的分子机制,将提供更多的临床应用价值。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin 2008, 58(2): 71-96.
- [2] Berger B, Belka C. Evidence-based radiation oncology: oesophagus [J]. Radiother Oncol 2009, 92(2): 276-290.
- [3] Chaudhry MA, Kreger B, Omaruddin RA. Transcriptional modulation of micro-RNA in human cells differing in radiation sensitivity [J]. Int J Radiat Biol 2010, 86(7): 569-583.
- [4] Miranda KC, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes [J]. Cell 2006, 126(6): 1203-1217.
- [5] Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nature Reviews Cancer 2006, 6(11): 857-866.
- [6] Ling B, Wang GX, Long G, et al. Tumor suppressor miR-22 suppresses lung cancer cell progression through posttranscriptional regulation of ErbB3 [J]. J Cancer Res Clin Oncol 2012, 138(8): 1355-1361.
- [7] Zhang J, Yang Y, Yang T, et al. microRNA-22, downregulated in hepatocellular carcinoma and correlated with prognosis, suppresses cell proliferation and tumorigenicity [J]. Br J Cancer 2010, 103(8): 1215-1220.
- [8] Li B, Song Y, Liu TJ, et al. miRNA-22 suppresses colon cancer cell migration and invasion by inhibiting the expression of T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 and matrix metalloproteinases 2 and 9 [J]. Oncol Rep 2013, 29(5): 1932-1938.

收稿日期: 2014-03-19