

论著

文章编号:1000-5404(2013)09-0870-04

miR-18a 对 A549 细胞的放射增敏作用及其机制

吴磊¹, 孙建国¹, 徐睿¹, 李德志¹, 徐燕梅¹, 马虎², 李雪涛¹, 彭丽娜¹, 陈正堂¹ (400037 重庆, 第三军医大学新桥医院全军肿瘤诊治研究所¹; 563003 贵州 遵义, 遵义医学院附属医院肿瘤医院²)

[摘要] 目的 观察 miR-18a 对 A549 肺腺癌细胞放射敏感性的影响。方法 qRT-PCR 检测 2 Gy X 线照射 A549 细胞后 miR-18a 的变化; 将人工合成的 miR-18a 模拟物(mimics)转染 A549 细胞, 测定不同剂量照射后 A549 细胞的克隆形成能力, 描记细胞存活曲线, 测算 2 Gy 时存活分数(SF₂)等指标, 判断 miR-18a 对 A549 细胞放射敏感性的影响; 同时检测过表达 miR-18a 的 A549 细胞中共济失调-毛细血管扩张症突变基因(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)蛋白, 探讨 miR-18a 对 A549 细胞放射敏感性影响的分子机制。结果 与照射前(1.00 ± 0.04)相比, 2 Gy 剂量照射后 A549 细胞 miR-18a 水平[(0.18 ± 0.04) ~ (0.31 ± 0.09)]显著降低(P < 0.05)。miR-18a 过表达后 A549 细胞放射敏感性增强, miR-18a 过表达组、空白对照组 SF₂ 分别为 0.34, 0.48; 同时 miR-18a 过表达的 A549 细胞中 ATM、磷酸化 ATM(ATM phospho S1981)水平下降。结论 miR-18a 上调 A549 细胞放疗敏感性, 可能与 miR-18a 下调 ATM 有关。

[关键词] 肺癌; 放射治疗; 微小 RNA; 放射线耐受

[中图分类号] R394.6; R730.55; R734.2

[文献标志码] A

miR-18a enhancing radiosensitivity of A549 cells and its molecular mechanism

Wu Lei¹, Sun Jianguo¹, Xu Rui¹, Li Dezhi¹, Xu Yanmei¹, Ma Hu², Li Xuetao¹, Peng Lina¹, Chen Zhengtang¹ (¹Institute of Cancer Diagnosis and Treatment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037; ²Cancer Hospital, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003, China)

[Abstract] **Objective** To determine the effect of miR-18a on the radiosensitivity of A549 cells and investigate the underlying molecular mechanisms. **Methods** After A549 cells were treated with 2 Gy X-ray, miR-18a was determined by qRT-PCR. And then miR-18a mimics were transfected into A549 cells, after exposure to X-ray radiation at different doses, survival fraction was assessed by clonogenic assay. Survival fraction at 2 Gy (SF₂) and sensitive enhancement ration (SER) were calculated. The protein levels of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM (phospho S1981) were determined by Western blotting after up-regulating miR-18a. **Results** miR-18a was decreased from 1.00 ± 0.04 to 0.18 ± 0.04 - 0.31 ± 0.09 in A549 cells after exposure to 2 Gy X-ray (P < 0.05). miR-18a over-expression increased the radiosensitivity in A549 cells. The SF₂ in miR-18a over-expression cells and normal A549 cells was 0.34 and 0.48, respectively. Moreover, the expression levels of ATM and ATM (phospho S1981) were down-regulated in miR-18a over-expressed A549 cells. **Conclusion** In A549 cells, miR-18a enhances radiosensitivity by inhibiting ATM and ATM (phospho S1981).

[Key words] lung neoplasms; radiotherapy; miRNAs; radiation tolerance

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81272496) and the National Natural Science Foundation of Chongqing(CSTC 2012jjB0076).

Corresponding author: Chen Zhengtang, Tel: 86-23-68755625; E-mail: zhengtangchen@yahoo.com.cn

[基金项目] 国家自然科学基金(81272496);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjB0076)

[通信作者] 陈正堂,电话:(023)68755626,E-mail:zhengtangchen@yahoo.com.cn

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130201.1715.004.html>(2013-02-01)

肺癌死亡率在恶性肿瘤中最高^[1],其中又以非小细胞肺癌(non-small cell cancer, NSCLC)最为常见,约为80%。手术治疗是早期NSCLC的首选治疗手段,但由于NSCLC确诊时大多处在晚期,只有少部分的患者能得到手术根治,约70%的NSCLC患者在治疗过程中需要接受放疗^[2]。然而,肺腺癌细胞对放射线抗拒,是肺癌患者放疗后复发的重要因素。因此,深入研究放射耐受机制,探寻潜在的治疗靶点,对于提高放疗疗效具有重要的意义。microRNA(miRNA)对基因的表达有着广泛而重要的调节作用。目前的研究发现,肿瘤细胞中多种miRNA表达异常,这些改变与包括放疗耐受性在内的各种肿瘤恶性表型密切相关^[3-4]。然而miRNA通过何种机制调节肿瘤细胞放射敏感性,还需要深入研究。本课题组前期研究发现,A549肺腺癌干细胞样细胞与普通A549细胞相比,miR-18a发生下调^[5];而现有研究认为放疗耐受是肿瘤干细胞的显著特性之一^[6-8]。此外,本实验组预实验显示上调miR-18a能提高肺腺癌放射敏感性。我们推测miR-18a下调可能与肺腺癌放射耐受有关。虽然现有研究显示,乳腺癌细胞中miR-18a通过共济失调-毛细血管扩张症突变基因(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)所编码蛋白ATM调节放射敏感性,但肺腺癌细胞中是否存在类似机制,并与肺腺癌干细胞的放疗抵抗有关,尚不清楚。在本研究中,我们观察了X线照射后A549细胞中miR-18a的变化以及miR-18a上调后A549细胞放疗敏感性的改变,同时对其机制作初步的探索。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株:人肺腺癌A549细胞株购自上海复祥生物有限公司。

药品与试剂:RPMI1640培养基及新生胎牛血清购自杭州四季青生物有限公司。hsa-miR-18a模拟物(miR-18a mimics)、乱序对照及hsa-miR-18a qRT-PCR引物(Bulge-Loop® miRNA qRT-PCR Primer Set)、U6 qRT-PCR引物(miRNA qRT-PCR Control Primer Set)购自广州市锐博生物科技有限公司。RNA提取试剂盒、qRT-PCR试剂盒购自宝生物工程(大连)公司。蛋白质提取和定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶配置试剂盒购自上海碧云天公司。兔抗人Anti-ATM、兔抗人Anti-ATM(phospho S1981)抗体购自Abcam公司。GAPDH抗体购自美国Signalway公司,羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。ECL试剂盒购自美国Pierce公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌A549细胞株培养于含10%胎

牛血清的RPMI1640培养基中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养,取对数生长期细胞为实验对象。

1.2.2 qRT-PCR 提取A549细胞RNA后,使用SYBR® Premix Ex Taq™ II对miR-18a水平进行检测,操作方法按照说明书进行,以U6为内参使用^{ΔΔ}Ct法对miR-18a的定量结果进行分析。

1.2.3 细胞转染 依照siPORT™ NeoFX™ Transfection Agent说明书,将miR-18a mimics及其乱序对照转染A549细胞。

1.2.4 细胞剂量存活曲线的拟合及放射生物学参数的计算

取对数生长期的miR-18a过表达组、乱序对照组、空白对照组的A549细胞,胰酶消化后用10%FBS培养基制成细胞悬液。将细胞悬液按一定比例在6孔板中稀释,将稀释的3组细胞分别置于0、2、4、6、8 Gy 5种不同的放射线剂量下照射。照射之后吸取等量细胞悬液接种于60 mm培养皿中,每个计量点设3个平行样本,养箱中培养10~14 d,待培养皿中出现肉眼可见的克隆时终止培养。甲醇固定,结晶紫染色,清水轻柔冲洗后室温干燥。于镜下计数≥50个细胞的克隆。按照公式计算集落形成率(plating efficacy, PE)和各剂量组细胞存活分数(survival fraction, SF):PE = 未照射细胞的克隆形成数/接种细胞数;SF = 某一剂量组克隆数/(该组细胞接种数 × PE)。用单剂多靶模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线,求出平均致死剂量(D₀)、准阈剂量(D_q)、2Gy时存活分数(SF₂),以SF₂计算放射增敏比(sensitive enhancement ration, SER):SER = SF₂对照组/SF₂实验组。

1.2.5 Western blot 检测ATM、磷酸化ATM(phospho S1981)的表达 取对数生长期的miR-18a过表达组、乱序对照组、空白对照组的A549细胞提取蛋白,调整蛋白浓度后变性,8%/12% SDS-PAGE分离蛋白,转膜后5%脱脂牛奶封闭6 h,一抗[Anti-ATM(1:5 000); Anti-ATM(phospho S1981)(1:5 000); GAPDH(1:1 000)] 4℃作用过夜, TBST洗膜, ECL发光剂显影, Chemilmager 5500 成像系统采集图像; 使用Quantity One 软件在采集的图像中建立相应泳道, 然后建立目的蛋白ATM或磷酸化ATM(phospho S1981)条带及GAPDH条带, 并采集各个条带灰度。以空白对照组作为标准样本, 以GAPDH为内参, 计算各组目的蛋白条带的灰度相对量。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 17.0统计软件进行处理,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 2 Gy照射后A549细胞miR-18a水平降低

分别收集受2 Gy照射后0、0.5、1、2、4 h的A549细胞5组,提取RNA后利用qRT-PCR检测miR-18a的表达情况。结果显示:A549细胞受到2 Gy剂量X线照射后,0.5、1、2、4 h组miR-18a相对表达量均较0 h组显著降低($P < 0.05$,图1)。

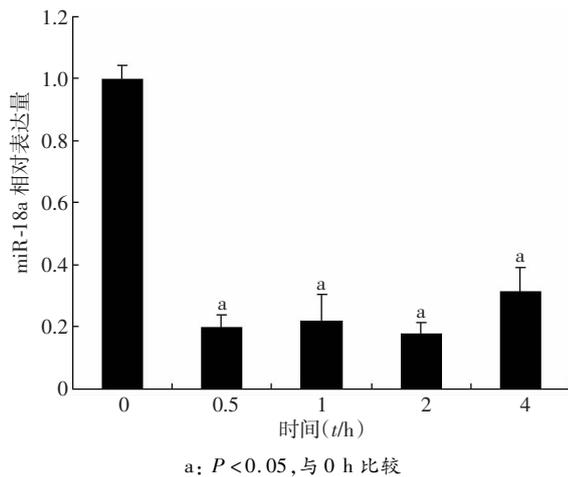


图1 2 Gy 剂量照射后不同时间 A549 细胞中 miR-18a 水平变化

2.2 转染 miR-18a mimics 后 A549 中 miR-18a 高表达

使用转染试剂将 miR-18a mimics 或乱序对照转染 A549 细胞后,分别收集 miR-18a 过表达组、乱序对照组、空白对照组 A549 细胞,利用 qRT-PCR 检测 miR-18a 的表达情况。结果显示:miR-18a 过表达组、乱序对照组、空白对照组 miR-18a 相对表达量分别为(1064.82 ± 225.22)、(1.16 ± 0.23)、(1.00 ± 0.05);miR-18a 过表达组 miR-18a 水平较其余两组显著增高($P < 0.05$)。

2.3 miR-18a 过表达对 A549 细胞放射敏感性的影响

分别计算 miR-18a 过表达组、乱序对照组、空白对照组 3 组 A549 细胞受不同剂量照射后的存活分数(图 2),miR-18a 过表达组、乱序对照组、空白对照组 SF_2 分别为(0.34 ± 0.07)、(0.48 ± 0.05)、(0.48 ± 0.04),miR-18a 过表达组与其余两组比较 SF_2 降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。运用单点击多靶模型拟合剂量存活曲线显示:miR-18a 过表达组的 D_0 、 Dq 、 SF_2 值均低于乱序对照组和空白对照组, SER 为 1.41(表 1)。提示 miR-18a 过表达可增强 A549 细胞的放射敏感性。

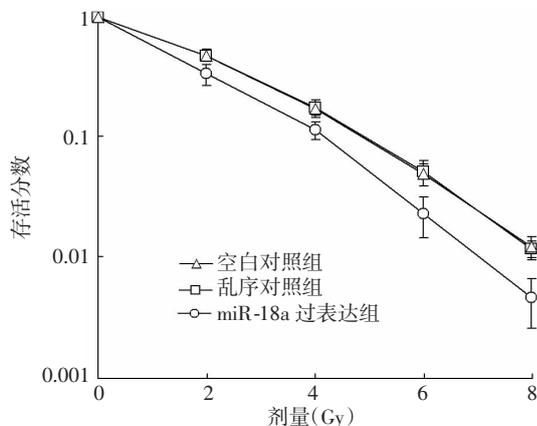


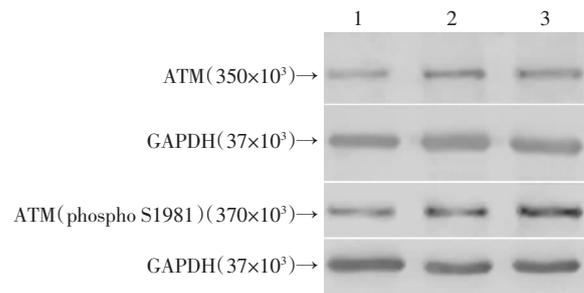
图2 不同辐照剂量下各组 A549 细胞的细胞存活分数比较

表1 各组 A549 细胞的放射生物学参数比较

组别	D_0 (Gy)	Dq (Gy)	SF_2	SER
miR-18a 过表达组	1.70	0.64	0.34	-
乱序对照组	1.75	1.10	0.48	1.41
空白对照组	1.75	1.08	0.48	1.41

2.4 miR-18a 下调 A549 细胞中 ATM 及磷酸化 ATM (phospho S1981)

分别收集 miR-18a 过表达组、乱序对照组、空白对照组 A549 细胞,提取总蛋白后利用 Western blot 检测 ATM 及磷酸化 ATM(phospho S1981) 的表达情况。结果显示:转染 miR-18a mimics 后,以 GAPDH 为内参,A549 细胞内 ATM 及磷酸化 ATM(phospho S1981) 水平均有降低(图 3)。经 Quantity One 软件获取 3 次重复实验的图像的灰度后进行统计分析,以空白对照组作为基准样本,miR-18a 过表达组、乱序对照组 A549 细胞中 ATM 相对表达量分别为(0.68 ± 0.12)、(1.07 ± 0.15);磷酸化 ATM(phospho S1981) 相对表达量分别为(0.48 ± 0.05)、(0.93 ± 0.13);miR-18a 过表达组与其余两组比较,ATM 或磷酸化 ATM(phospho S1981) 的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



1:miR-18a 过表达组;2:乱序对照组;3:空白对照组

图3 Western blot 检测各组 A549 细胞 ATM 及磷酸化 ATM (phospho S1981) 蛋白水平

3 讨论

放疗可以引起各种 DNA 损伤,进而破坏细胞的功能。DNA 损伤反应(DNA damage response)可以修复 DNA 的损伤,使得 DNA 能够正确复制并被精确传到下一代,在放疗后细胞修复中起着重要作用,而抑制 DNA 损伤的修复可以提高放疗的疗效^[9-10]。研究证明,DNA 损伤反应是一个复杂过程,受到多重调控,可以通过多种手段对其进行干预从而达到增加放射敏感性,提高放疗疗效的目的^[11]。miRNAs 对细胞功能有广泛的调节作用,也与 DNA 损伤反应有关,其能调节 DNA 损伤修复过程中的关键分子,以 miRNA 水平为切入点可以对 DNA 损伤修复过程施加干预,如 miR-421 可以调控 ATM,miR-24 可以调控组蛋白 H2AX,进而影响细胞的放射敏感性^[12-13]。本课题组之前的实验发现,与普通 A549 细胞相比,在 A549 肺腺癌细胞干细胞样细胞中 miR-18a 下调,而本实验中对受到 X 线照射后的 A549 细胞进行观察也发现 miR-18a 水平下降,结合干细胞样细胞普遍存在放射敏感性降低的现象^[8] 及 miR-18a 降低可以增强乳腺癌细胞 DNA

损伤修复^[4],我们有理由推测 miR-18a 水平降低与 A549 细胞 DNA 损伤反应有关,而提高 miR-18a 的水平则可抑制修复进而提高放射敏感性。在本实验中通过集落形成实验证实,提高 miR-18a 的水平确能提高 A549 细胞放射敏感性。

在进一步的实验中我们对 miR-18a 提高 A549 细胞放射敏感性的机制进行了探索。现有研究显示,ATM 是 miR-18a 的靶点,miR-18a 在乳腺癌细胞中可以下调 ATM 的表达,使乳腺癌细胞放射敏感性增加^[4],而 ATM 是调节放射敏感性的重要分子^[14-15]。现在的观点认为,在放射引起的多种 DNA 损伤之中,DNA 双链断裂(double strand breaks,DSBs)对哺乳动物细胞会造成致命破坏,与放疗疗效密切相关。ATM 可以启动一个修复 DSBs 的重要途径——同源重组修复(homologous recombination repair,HRR)^[16](另一途径为非同源末端连接修复),在放疗后细胞的修复过程中起着重要作用。ATM 在未受到刺激的情况下以同源二聚体或多聚体的形式存在,受到刺激后,结合状态的 ATM 发生分子间 1981 号位点丝氨酸的自磷酸化,形成磷酸化 ATM(phospho S1981)并解聚,进一步发挥激酶的功能激活下游通路^[17]。在 A549 细胞内,抑制 ATM 或者磷酸化 ATM(phospho S1981)可以提高 A549 细胞放射敏感性^[18-20]。本实验证明,在 A549 细胞中过表达 miR-18a 确能抑制 ATM 及磷酸化 ATM(phospho S1981)的表达,提示 X 线照射后 A549 细胞 miR-18a 下降,使得 ATM 或者磷酸化 ATM(phospho S1981)的水平升高,HRR 增多,而上调 miR-18a 能降低 ATM 及磷酸化 ATM(phospho S1981)的水平抑制 HRR,部分降低细胞对 DSBs 的修复,进而提高 A549 细胞的放射敏感性。

参考文献:

[1] Smith R A, Cokkinides V, Brawley O W. Cancer screening in the United States, 2008: a review of current American Cancer Society guidelines and cancer screening issues[J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58(3): 161-179.

[2] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[3] Qi J, Mu D. MicroRNAs and lung cancers: from pathogenesis to clinical implications[J]. *Front Med*, 2012, 6(2): 134-155.

[4] Song L, Lin C, Wu Z, et al. miR-18a impairs DNA damage response through downregulation of ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e25454.

[5] Lin S, Sun J G, Wu J B, et al. Aberrant microRNAs expression in

CD133(+)/CD326(+) human lung adenocarcinoma initiating cells from A549[J]. *Mol Cells*, 2012, 33(3): 277-283.

[6] Diehn M, Cho R W, Lobo N A, et al. Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells[J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 780-783.

[7] Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(7): 545-554.

[8] Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, et al. Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer stem cell[J]. *Cancer Lett*, 2012, 322(2): 139-147.

[9] Ciccia A, Elledge S J. The DNA damage response: making it safe to play with knives[J]. *Mol Cell*, 2010, 40(2): 179-204.

[10] Harper J W, Elledge S J. The DNA damage response: ten years after[J]. *Mol Cell*, 2007, 28(5): 739-745.

[11] Borchiellini D, Etienne-Grimaldi M C, Thariat J, et al. The impact of pharmacogenetics on radiation therapy outcome in cancer patients. A focus on DNA damage response genes[J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(6): 737-759.

[12] Shin S, Cha H J, Lee E M, et al. Alteration of miRNA profiles by ionizing radiation in A549 human non-small cell lung cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(1): 81-86.

[13] Hu H, Gatti R A. MicroRNAs: new players in the DNA damage response[J]. *J Mol Cell Biol*, 2011, 3(3): 151-158.

[14] Xue L, Yu D, Furusawa Y, et al. Regulation of ATM in DNA double strand break repair accounts for the radiosensitivity in human cells exposed to high linear energy transfer ionizing radiation[J]. *Mutat Res*, 2009, 670(1/2): 15-23.

[15] Kastan M B, Lim D S, Kim S T, et al. ATM--a key determinant of multiple cellular responses to irradiation[J]. *Acta Oncol*, 2001, 40(6): 686-688.

[16] Morrison C, Sonoda E, Takao N, et al. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage[J]. *EMBO J*, 2000, 19(3): 463-471.

[17] Bakkenist C J, Kastan M B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation[J]. *Nature*, 2003, 421(6922): 499-506.

[18] Koll T T, Feis S S, Wright M H, et al. HSP90 inhibitor, DMAG, synergizes with radiation of lung cancer cells by interfering with base excision and ATM-mediated DNA repair[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(7): 1985-1992.

[19] Russell K J, Wiens L W, Demers G W, et al. Abrogation of the G₂ checkpoint results in differential radiosensitization of G₁ checkpoint-deficient and G₁ checkpoint-competent cells[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(8): 1639-1642.

[20] Zou J, Qiao X, Ye H, et al. Antisense inhibition of ATM gene enhances the radiosensitivity of head and neck squamous cell carcinoma in mice[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27: 56.

(收稿:2012-12-10;修回:2013-01-17)

(编辑 汪勤俭)