

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.10.002

X线辐射剂量对结直肠癌细胞中microRNA-221和p57^{kip2}表达的影响

孙凯¹, 张晓槟^{1*}, 邓海军¹, 钟育波², 雷尚通¹, 区文弢¹, 吴承堂¹**Effects of X-ray Dose on Expression of microRNA-221 and p57^{kip2} in Human Colorectal Carcinoma Cells**SUN Kai¹, ZHANG Xiaobin^{1*}, DENG Haijun¹, ZHONG Yubo², LEI Shangtong¹, OU Wentao¹, WU Chengtang¹

1. Department of General Surgery, Nangfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. The Third Department of General Surgery, Foshan Hospital, Southern Medical University (*: Tied for The First Author; Present: The Second Department of General Surgery, The Affiliated Nanhai Hospital, Southern Medical University, Foshan 528000, China)

Corresponding Author: DENG Haijun, E-mail: navyd999@tom.com

Abstract: Objective To investigate the effects of X-ray dose on the expression of microRNA-221(miR-221) and p57^{kip2} in human colorectal carcinoma (CRC) cells. **Methods** Conventionally cultured Caco2 cells were divided into 5 groups with different doses of X-ray (0, 2, 4, 6 and 8 Gy) respectively. The total RNA and protein of the cells were extracted after irradiation for 24 h. The expression level of miR-221 and p57^{kip2} mRNA were detected by real-time Q-PCR. The expression of p57^{kip2} in cells was detected by Western blot analysis. **Results** The radiation dose of X-ray had significant effect on the expression of miR-221 and p57^{kip2} protein in human Caco2 cells in a dose-dependent manner. The miR-221 expression level improved gradually with the increase of irradiation dose while the p57^{kip2} protein expression level reduced gradually ($P < 0.05$). **Conclusion** Radiation dose could affect the miR-221/p57^{kip2} regulation pathways in CRC cells. Suppressed miR-221 expression may enhance the radiosensitivity of CRC cells.

Key words: Colorectal carcinoma; microRNA-221; p57^{kip2}; Radiation dose; Radiosensitivity

摘要:目的 探讨不同剂量X线辐射对人结直肠癌Caco2细胞系中microRNA-221(miR-221)和p57^{kip2}表达的影响。**方法** 常规培养Caco2细胞系并分为5组,分别给予不同剂量X线(0、2、4、6和8 Gy)照射,24 h后提取细胞总RNA和蛋白质,应用real-time Q-PCR检测细胞中miR-221和p57^{kip2} mRNA的表达水平,Western blot检测p57^{kip2}蛋白的表达变化。**结果** Caco2细胞系在不同照射剂量下,miR-221表达水平随着照射剂量的增加而增加,而p57^{kip2}蛋白表达水平则随着照射剂量的增加而逐步降低,且呈剂量依赖效应,两者差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 放射线辐射剂量可影响结直肠癌细胞中miR-221/p57^{kip2}调控通路,抑制miR-221表达可能会提高结直肠癌细胞的放射敏感度。

关键词: 结直肠癌; microRNA-221; p57^{kip2}; 辐射剂量; 放射敏感度

中图分类号: R735.3 文献标识码: A

0 引言

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是我国常见多发的恶性肿瘤之一,其总体发病率近年来呈明显上升趋势,放疗已成为其综合治疗的重要措施之一^[1]。microRNA-221(miR-221)是新近发现的一种微小RNA,可通过调控细胞增殖周期而参与肿瘤的演进过程^[2]; p57^{kip2}属于细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinases inhibitors, CDKI)基因家族,由于其能使细胞增殖停滞于G₀/G₁期,发挥对细胞周期的负性调控作用而成为近年来的研究热点^[3];新近研究更证实CDKI家族可提高肿瘤细胞的放射敏感度^[4]。我们前期研究已证实

收稿日期: 2012-12-13; 修回日期: 2013-03-13

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(81101896); 广东省科技计划项目资助课题(2012B031800141); 广东省医学科研基金资助项目(B2012221); 广东高校优秀青年创新人才培养计划资助项目(2012LYM0035); 佛山市卫生局医学科研基金资助项目(2012079); 南方医科大学南方医院院长基金资助项目(2011B008)

作者单位: 1. 510515 广州, 南方医科大学南方医院普通外科; 2. 南方医科大学附属佛山医院普外三科

通信作者: 邓海军, E-mail: navyd999@tom.com

作者简介: 孙凯(1978-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事结直肠癌基础与临床研究; 张晓槟(1987-), 男, 硕士, 主要从事结直肠癌方面的研究(*: 并列第一作者; 现单位: 528000 广东佛山, 南方医科大学附属南海医院普外二科)

miR-221可通过抑制p57^{kip2}表达而促进CRC细胞增殖^[5-7],但肿瘤细胞于放射治疗的应激状态下miR-221及其调控靶基因p57^{kip2}的表达变化规律却未证实。本实验通过测定不同照射剂量下CRC细胞中miR-221和p57^{kip2}的表达水平变化,初步评价miR-221/p57^{kip2}信号通路在CRC放疗中的作用及临床意义。

1 材料与方法

1.1 材料

人CRC细胞系HT-29、LoVo、SW-480、Caco2及正常对照人脐静脉内皮细胞HUVEC均由中国科学院上海生命科学院细胞库提供;由miRBase数据库(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)查找基因序列,使用软件Primer-Express 2.0进行引物及探针的设计。miR-221上游引物5'-ACA CTC CAG CTG GGA GCT ACA TTG TCT GCT GG-3',下游引物5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA-3',扩增片段73 bp;内参照U6上游引物5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA -3',下游引物5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT -3',扩增片段94 bp;p57^{kip2}上游引物5'-AAG AGA TCA GCG CCT GAG -3',下游引物5'-CGG TTG CTG CTA CAT GAA-3',扩增片段214 bp;18s rRNA上游引物5'-CCT GGA TAC CGC AGC TAG GA-3',下游引物5'-GGG CGC AAT ACG AAT GCC CC-3',扩增片段112 bp;上述引物均由广州莱德尔生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

Caco2细胞常规复苏后,以含10%胎牛血清(v/v)的RPMI 1640培养液(Hyclone)重悬,置于25 cm²培养瓶37℃、5% CO₂培养箱中静置培养,待细胞接触密度至80%~90%时常规胰酶消化传代,细胞传代4~8代后用于实验。

1.2.2 照射方法

采用美国瓦里安(Walsh)600直线加速器6 MV X线进行一次性照射,辐射时培养板上加盖2 cm厚有机玻璃板,使细胞处在剂量建成区下相对均匀区,源皮距为100 cm,剂量率为2 Gy/min。设置2、4、6和8 Gy等不同剂量照射组,以0 Gy作为空白对照。照射后细胞置于培养液中,放置24 h后行下一步检测。

1.2.3 real-time Q-PCR检测细胞中miR-221和p57^{kip2} mRNA的表达

收集各处理组培养细胞1×10⁷,加入Trizol(Invitrogen)试剂,按照说明书提取总RNA。取总RNA 1.0 μg加入无菌蒸馏水12 μl,混匀后85℃孵育5 min,以打开二环结构,随即置于冰上,以防止RNA复

性再次恢复二环结构;在另一去RNase的PCR管中配置以下液体:dNTP mixture 2.0 μl、RNase抑制剂0.5 μl、目的基因反转录引物0.5 μl、内参照反转录引物0.5 μl、5×buffer 4.0 μl、M-MLV反转录酶0.5 μl(Promega公司);配好后加入到刚才含总RNA的溶液中混匀,42℃孵育60 min,所得cDNA置于-20℃保存。构建目的基因和内参照的Real-time Q-PCR反应体系:cDNA5.0 μl、上下游引物各0.5 μl、2×SYBR Green荧光染料10 μl、无菌蒸馏水4.0 μl;反应条件:95℃变性10 min;95℃ 15 s、65℃ 30 s、72℃ 30 s,共40个循环;循环结束后72℃延伸10 min,每个标本均作复管PCR反应(试剂购自TOYOBO公司,PCR仪采用ABI PRISM[®] 7300)。按目的基因表达量=2^{-ΔΔCt}公式计算各样本中目的基因确切含量。以上实验均至少重复三次。

1.2.4 Western blot检测细胞中p57^{kip2}蛋白的表达

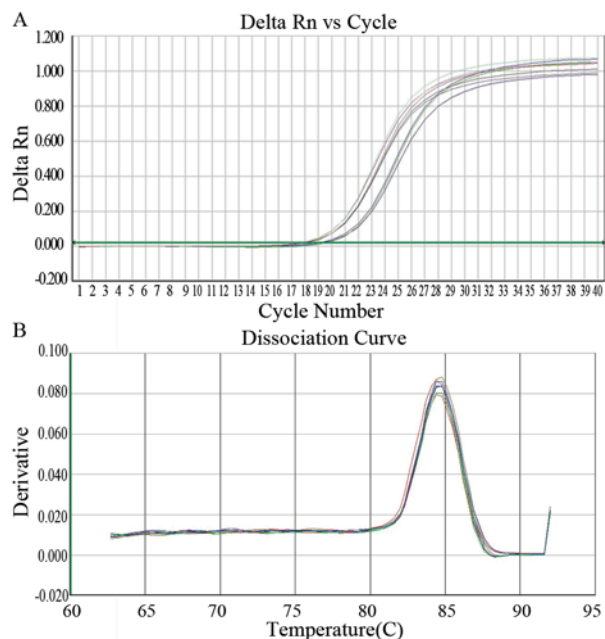
收集各处理组培养细胞,加入适量预冷的PBS漂洗2次,置于冰上,加入裂解液裂解30 min,在4℃下14 000 g离心5 min,收集裂解物总蛋白;将蛋白溶液和5×上样缓冲液按5:1混合煮沸5 min,按每孔20 μl上样进行电泳并转印至PVDF膜,膜经5%的脱脂奶粉封闭后,与兔抗人p57^{kip2}(稀释1:1 000)和内参照GAPDH(稀释1:10 000)多克隆抗体分别孵育,再与羊抗兔二抗(稀释1:5 000)反应(一抗、二抗均购自Southern Biotech),增强化学发光法发光显影,与内参照进行灰度比较以半定量分析。以上实验均至少重复三次。

1.3 统计学方法

实验所得数据均用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用完全随机设计的单因素方差分析,多个样本均数间的两两比较采用Student-Newman-Keuls(S-N-K)检验,以P<0.05为差异有统计学意义,所有操作均用SPSS 13.0统计软件完成。

2 结果

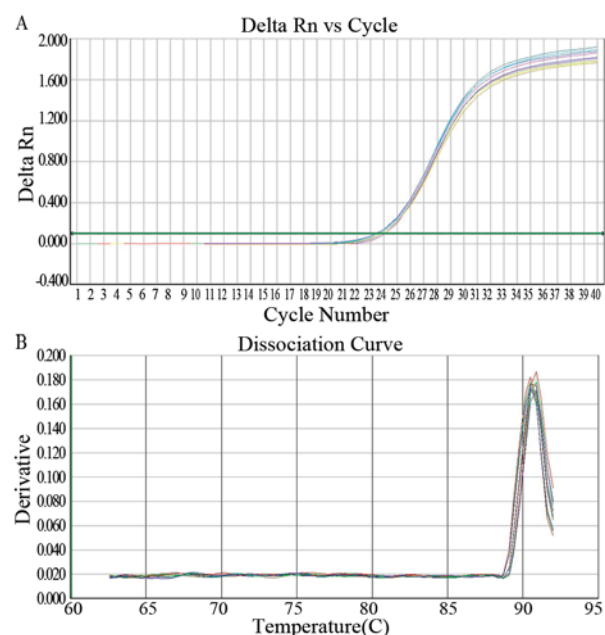
所有样本中miR-221及p57^{kip2} cDNA显示指数增长,并达到平台期,其扩增曲线均为一组典型的倒S型曲线,见图1A、2A,扩增效率较高;通过设置复孔取平均值,即得到各样本中目的基因扩增的Ct值作为miR-221及p57^{kip2}定量判定。miR-221及p57^{kip2}的PCR产物分别为73 bp和214 bp,其对应的熔解温度分别为(74.71±0.56)℃和(85.29±0.43)℃,熔解温度均一,峰的形状均较锐利,见图1B、2B。四种人CRC细胞系HT-29、LoVo、SW-480、Caco2中miR-221表达量分别为2.29±0.21、1.12±0.14、1.93



A: the amplification curves of miR-221; B: the melting curves of miR-221

图 1 real-time Q-PCR检测miR-221表达的扩增曲线(A)及溶解曲线(B)

Figure 1 The amplification (A) and melting curves (B) of miR-221 by real-time Q-PCR



A: the amplification curves of p57^{kip2}; B: the melting curves of p57^{kip2}

图 2 real-time Q-PCR检测p57^{kip2} mRNA表达的扩增曲线(A)及溶解曲线(B)

Figure 2 The amplification (A) and melting curves (B) of p57^{kip2} by real-time Q-PCR

±0.22、0.54±0.14, 与正常对照HUVEC相比(0.12±0.04), 差异具有统计学意义(P<0.01)。选取miR-221基线表达水平适中的Caco2细胞系作为进一步研究对象。在0~8 Gy照射剂量范围内, Caco2细

胞中miR-221的表达水平随着放射剂量的增加而升高(P<0.01), 见图3; p57^{kip2} mRNA的表达水平无明显变化(P>0.05), 见图4, 但其蛋白表达水平随着放射剂量的增加而逐渐降低(P<0.01), 见图5。这说明, X线照射在上调CRC细胞中miR-221表达的同时, 可通过转录后调控机制下调p57^{kip2}蛋白的表达水平, 且两者在一定范围内呈剂量依赖性关系。

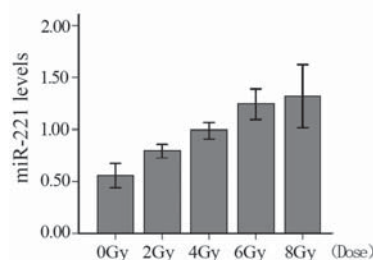


图 3 不同照射剂量下Caco2细胞中miR-221表达水平
Figure 3 The expression levels of miR-221 in Caco2 cells

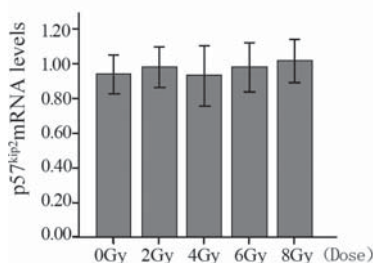


图 4 不同照射剂量下Caco2细胞中p57^{kip2} mRNA表达水平

Figure 4 The expression levels of p57^{kip2} mRNA in Caco2 cells in different radiation doses

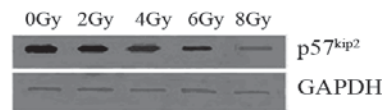


图 5 Western blot检测不同照射剂量下Caco2细胞中p57^{kip2}蛋白表达情况

Figure 5 Western blot detecting p57^{kip2} protein levels in different radiation doses in Caco2 cells

3 讨论

放疗目前已成为CRC综合治疗的重要组成部分, 尤其对于T3以上或任何T、N1的中低位直肠癌患者, 2012年NCCN指南已明确指出术前新辅助放疗可显著降低其局部复发率, 增加保肛率, 且对于长期预后改善亦有益处^[8]。但新辅助放疗的最大缺点是患者选择具有一定的盲目性, 部分患者难以从新辅助放疗中获益, 常于放疗期间出现肿瘤进展而丧失手术机会^[9]。目前临床上主要依据肿瘤的一般病理学特征, 包括肿瘤大小、活动度、分化程度以及影像学检查提示的肿瘤分期等进行病例选择, 但这些临床

指标普遍缺乏与肿瘤放疗敏感度的确切关联；而尽管其他诸多研究试图寻找有关CRC放疗敏感度预测的生物标志物或联合化疗、分子靶向治疗等进行增敏，但在临床上尚难以得到广泛应用^[10]。因而如何从众多患者中筛选出可放疗获益的“个体化治疗”者，继而增加患者的放射敏感度、提高肿瘤学效果具有现实意义。

MiRNA对生命体的生长发育、增殖分化等基本生物学行为起着关键的调控作用，而近年来越来越多研究表明其失衡表达亦可促进多种人类疾病尤其是肿瘤的发生发展^[11]。新近研究更发现某些miRNA参与了肿瘤细胞对抗放射线等细胞毒性因素的生物学过程，某些特征性miRNA表达状况可作为放射敏感度高低的预测指标，而改变相应的miRNA表达水平则可调节肿瘤细胞的放射敏感度^[12]。miR-221是新近发现的一种微小RNA，可通过调控细胞增殖周期而参与肿瘤的演进过程^[13]；p57^{kip2}属于激酶抑制蛋白CIP/KIP基因家族，由于其能使细胞增殖停滞于G₀/G₁期，发挥对细胞周期的负性调控作用而成为近年来的研究热点^[14]。我们前期实验已证实miR-221可通过抑制p57^{kip2}蛋白表达而促进CRC增殖，但肿瘤细胞于放射治疗的应激状态下miR-221表达有何改变却未证实；而通过观察CRC细胞受照射后miR-221的表达变化规律，可初步验证miR-221是否在CRC细胞放射抵抗中发挥作用。

本实验表明，X线辐射剂量可影响CRC细胞中miR-221及其调控靶基因p57^{kip2}表达。具体表现为，miR-221表达水平随着照射剂量的增加而逐步上调，而p57^{kip2}蛋白表达水平则随着照射剂量的增加而逐步下降，在一定范围内呈剂量依赖效应。我们推测，放射线作为一种应激因素可导致肿瘤细胞死亡增加；而随着应激因素的强度增强，肿瘤细胞为了对抗此种毒性作用，可通过上调miR-221继而抑制p57^{kip2}表达来发挥自我保护效应，以减少自身损伤；虽然不能完全避免细胞死亡，但是表现出一定程度的放射抵抗。检测CRC细胞中miR-221/p57^{kip2}调控通路的表达水平可能反映及预测肿瘤细胞的放射敏感度，此为提高CRC患者放疗的肿瘤学效果提供了新的思路和实验基础。虽然miR-221与p57^{kip2}在放射抵抗中的确切关系还需进一步验证，但根据本实验结果，抑制CRC细胞中上调的miR-221表达水平应能发挥放疗增敏作用，而这正是我们的后继研究内容。

参考文献:

[1] Sun K, Wang W, Zeng JJ, *et al.* MicroRNA-221 inhibits

- CDKN1C/p57 expression in human colorectal carcinoma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(3): 375-84.
- [2] Bartels CL, Tartels CL. MicroRNAs novel biomarkers for human cancer[J]. *Ann Biol Clin*, 2010, 68(3): 263-72.
- [3] Kavanagh E, Joseph B. The hallmarks of CDKN1C (p57, KIP2) in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1816(1): 50-6.
- [4] Borriello A, Caldarelli I, Bencivenga D, *et al.* p57(Kip2) and cancer: time for a critical appraisal[J]. *Mol Cancer Res*, 2011, 9(10): 1269-84.
- [5] Wang W, Sun K, Wu CT, *et al.* Effect of miR-221-specific inhibitor on the proliferation and apoptosis of human colorectal carcinoma cells[J]. *Nanfang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2011, 31(4): 674-7.[王伟, 孙凯, 吴承堂, 等. 特异性miR-221抑制剂对结肠直肠癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(4): 674-7.]
- [6] Wang JP, Sun K, Lei ST, *et al.* Expression pattern and significance of microRNA-221 in colorectal carcinoma[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2011, 38(11): 1276-9.[王剑平, 孙凯, 雷高通, 等. miR-221在结肠直肠癌中的表达及意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(11): 1276-9.]
- [7] Zeng JJ, Sun K, Wu CT, *et al.* Expression of miRNA-221 in colorectal carcinoma and non-tumorous tissues by real-time quantitative PCR[J]. *Shandong Yi Yao*, 2010, 50(12): 26-8.[曾俊杰, 孙凯, 吴承堂, 等. 应用实时荧光定量PCR检测结肠癌与癌旁组织中miRNA-221的差异表达状况[J]. *山东医药*, 2010, 50(12): 26-8.]
- [8] Ortholan C, Romestaing P, Chapet O, *et al.* Correlation in rectal cancer between clinical tumor response after neoadjuvant radiotherapy and sphincter or organ preservation: 10-year results of the Lyon R 96-02 randomized trial [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(2): 165-71.
- [9] Bisceglia G, Misceglia G, Rucci B, *et al.* Effectiveness of neoadjuvant radiotherapy in the treatment of locally advanced rectal cancer: a single-center experience in 263 patients [J]. *Dig Surg*, 2010, 27(3): 217-23.
- [10] Lin C, Yu Y, Zhao HG, *et al.* Combination of quercetin with radiotherapy enhances tumor radiosensitivity in vitro and in vivo[J]. *Radiother Oncol*, 2012, 104(3): 395-400.
- [11] Sun K, Zeng JJ, Wang W, *et al.* MicroRNA-221 controls CDKN1C/P57 expression in human colorectal carcinoma[J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2011, 14(4): 279-83.[孙凯, 曾俊杰, 王伟, 等. 微小RNA-221对结肠直肠癌中CDKN1C/p57表达的调控研究[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2011, 14(4): 279-83.]
- [12] Zhao L, Bode AM, Cao Y, *et al.* Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miRNA in tumor radiosensitivity[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(11): 2220-7.
- [13] Callegari E, Elamin BK, Giannone F, *et al.* Liver tumorigenicity promoted by microRNA-221 in a mouse transgenic model[J]. *Hepatology*, 2012, 56(3): 1025-33.
- [14] Joaquin M, Gubern A, Posas F. A novel G1 checkpoint mediated by the p57 CDK inhibitor and p38 SAPK promotes cell survival upon stress[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(8): 3339-40.

[编辑: 刘红武; 校对: 杨 卉]