

靶向 siRNA 抑制 TLR9 表达对放射抗拒肺癌 A549 细胞辐射敏感性的影响

高彩霞 乔田奎 张彬 袁素娟

201508 上海, 复旦大学附属金山医院肿瘤科

通信作者: 乔田奎, Email: qiaotk@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2016.11.002

【摘要】 目的 旨在研究抑制放射抗拒肺癌 A549 的 TLR9 表达对其辐射敏感性的影响。方法 以放射抗拒肺癌 A549 (R-A549) 细胞为研究对象, 利用脂质体转染技术将靶向 siRNA 转染至 R-A549 细胞, Western blot 验证; 给予 0、2、4、6 和 8 Gy X 射线照射后, 进行细胞克隆集落计数并绘制细胞存活曲线, 经过单击多靶模型拟合, 得到 A549 细胞、R-A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞照射的 D_0 、 D_q 、 N 值; 对 4 组细胞增殖能力进行测定。对 R-A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞 X 射线 10 Gy 照射前后流式细胞周期分析, 进一步说明抑制 TLR9 表达对 R-A549 细胞辐射敏感性的影响。**结果** TLR9 siRNA 成功抑制 R-A549 细胞 TLR9 表达, 照射后其细胞克隆形成率降低, 与 R-A549 细胞的放射增敏比 (SER_{D_0}) 达到 1.37, 而 A549 细胞与 R-A549 细胞的 SER_{D_0} 为 1.09; 照射后 TLR9 siRNA 转染细胞较 R-A549 细胞 G_2/M 期分布增加 ($t = 4.323, P < 0.05$), 而 TLR9 siRNA 转染细胞 G_1/G_0 期分布少于 R-A549 细胞, 差异有统计学意义 ($t = 7.616, P < 0.05$)。**结论** siRNA 可以抑制 TLR9 表达, 降低照射后 R-A549 细胞的克隆形成, 提高放射增敏比; 照射后更多细胞发生 G_2/M 期阻滞, 同时 G_1/G_0 期细胞减少也有效抑制了照射后细胞潜在致死性损伤的修复, 因此, 具有辐射增敏的作用。

【关键词】 TLR9 表达; 放射抗拒肺癌 A549 细胞; 靶向 siRNA; 辐射敏感性

Inhibition of TLR9 expression by siRNA influences radiosensitivity of lung cancer A549 cells

Gao Caixia, Qiao Tiankui, Zhang Bin, Yuan Sujuan

Department of Oncology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China

Corresponding author: Qiao Tiankui, Email: qiaotk@163.com

【Abstract】 Objective To study the influence of TLR9 on the radiosensitivity of radiation-resistance lung cancer A549 cells (R-A549). **Methods** TLR9 siRNA was transfected to R-A549 cells with liposome and TLR9 expression level was examined by Western blot. After X-ray irradiation with doses from 0 to 8 Gy, colony formation assay was performed and cell survival curve was fitted with the multi-target single-hitting model and D_0 , D_q , and N value of the survival of A549, R-A549, control siRNA transfected and TLR9 siRNA transfected cells was calculated. Cell proliferation ability and cell cycle distributions of these four groups were also determined. **Results** TLR9 siRNA successfully suppressed TLR9 expression in R-A549 cells and reduced the colony formation after irradiation with a sensitization enhancement ratio (SER_{D_0}) of 1.37 to R-A549. SER_{D_0} of A549 to R-A549 was 1.09. After irradiation, compared to R-A549, cells in G_2/M phase of TLR9 siRNA transfected population increased significantly ($t = 4.323, P < 0.05$) but G_1/G_0 phase decreased significantly ($t = 7.616, P < 0.05$). **Conclusions** TLR9 siRNA increased the radiosensitivity of R-A549. Radiation induced G_2/M phase arrest and G_1/G_0 phase decrease could suppress potential lethal damage repair and results in the enhancement of radiation sensitivity.

【Key words】 TLR9 expression; Lung cancer cells A549; Targeted siRNA; Radiosensitivity

目前放疗仍然是肺癌重要的治疗手段, 而放射抗拒是导致放疗后局部肿瘤复发和远处转移最重要的原因。Toll 样受体家族 (TLRs) 是沟通天然免疫和获得性免疫的天然模式识别受体 (pattern

recognition receptor, PRR), 在识别和抵御各种病原微生物感染中发挥着重要作用; 而越来越多研究表明, TLR9 在多数肿瘤组织中表达增高, 并且 TLR9 信号通路的激活参与了肿瘤的发生发展和侵袭的

过程,并且影响着肿瘤治疗的结果。在本组前期研究中已经证实肺癌组织 TLR9 高表达,并且 TLR9 表达增高与肺癌患者术后放疗生存相关,在此基础上本研究通过靶向干扰 RNA 技术旨在探讨抑制 TLR9 表达对 R-A549 细胞辐射敏感性的影响。

材料与方法

1. 实验试剂及材料:改良型 RPMI 1640 培养基(美国赛默飞公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);靶向 TLR9 siRNA 及阴性对照 siRNA[(美国 SANTA CRUZ 公司) TLR9siRNA(h): sc-40270, siRNA-A: sc-37007],转染试剂 Lipofectamine™ 2000、无抗培养基 Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司);兔源 TLR9 单抗和鼠源 GAPDH 单抗(美国 Abcam 公司);FITC 细胞周期 PI 试剂(美国 BD phamingen 公司)。

2. 放射抗拒肺癌 A549 细胞制备:人肺癌细胞株 A549 由复旦大学附属肿瘤医院馈赠,以 10% 小牛血清 + 改良型 RPMI 1640 培养,置于 37℃、含 5% 的 CO₂ 培养箱中,0.25% 胰酶消化传代,取 2~3 代对数生长期细胞进行 R-A549 细胞制备和实验。采用本组前期研究方法制备 R-A549 细胞^[1],瑞典 Elekta 直线加速器,6 MV X 射线照射,源靶距 100 cm,吸收剂量率 2 Gy/min,6.37 Gy/次,共照射 10 次,每次照射后更换 1 次培养基,之后根据细胞贴壁生长状态,2~3 d 再次更换培养基,细胞传 5 代以内且贴壁达 80% 左右再次照射,直到完成 10 次照射,完成 R-A549 细胞制备。

3. R-A549 细胞培养及 siRNA 转染:R-A549 细胞于 RPMI 1640 培养基、10% 胎牛血清置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱培养传代,取其 1~2 代对数生长期细胞进行 siRNA 转染。将稳定生长的对数期 R-A549 细胞以 3.5×10^5 /孔接种于 6 孔板,以 RPMI 1640 培养基、10% 胎牛血清继续培养,待其贴壁生长达 50%~70% 时进行转染;按照说明分别以 60、80 和 100 μmol/L 的转染终浓度进行实验,取相应量 TLR9 siRNA 和对照 siRNA 分别与 Lipofectamine™ 2000 混合形成转染复合物,将转染复合物加入无抗培养基 Opti-MEM 至 2 ml/孔,再加入 6 孔板轻轻混匀进行细胞转染,期间置于 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱 6 h,后换液 RPMI 1640 培养基、10% 胎牛血清继续培养;48 h 后进行蛋白抽提,验证 TLR9siRNA 转染抑制效率,确定转染终浓度为

80 μmol/L;细胞照射安排在转染 24 h 后进行,照射剂量 10 Gy,6 MV X 射线单次照射。

4. 实验细胞分组及其 TLR9 表达:将 A549 细胞(A549)、R-A549 细胞(R-A549)、阴性 siRNA 转染细胞、TLR9 siRNA 转染 4 组细胞作为实验对象。Western blot 验证其 TLR9 表达。于细胞转染 48 h 后,冰上裂解细胞,超声破碎进行蛋白抽提,二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度,之后进行蛋白变性处理。SDS-PAGE 分离胶为 5%~10% 的梯度胶,为等体积加样,每加样孔上样量为 10 μl,80 V 恒压电泳至 marker 开始分离时改为 120 V 恒压电泳到底;以 100 V 恒压湿法转膜 60 min,10% 牛奶(脱脂奶粉 + TBST + 0.1% 吐温-20)室温摇床封闭 4 h,1 × TBST 清洗 3 次,每次 10 min,一抗(兔源 TLR9 单抗、鼠源 GAPDH 抗体:abcam)4℃ 孵育过夜;第 2 天弃去一抗,1 × TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗室温孵育 1 h,1 × TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,ECL 化学显色(A 液:B 液 = 1:1),暗室曝光显影图像处理。

5. 各实验组照射前后细胞活力的测定:siRNA 转染 24 h 后分别取 4 个实验组的对数生长期细胞,以每孔 3 000 个细胞接种于 96 孔板,各组设 3 个复孔,以 PBS 作为空白对照,培养 24 h 后,加入 10 μl/孔 CCK-8 试剂,振荡后避光培养 2 h,上酶标仪测其吸光度($A_{450\text{nm}}$)值;照射组实验细胞进行 6 MV X 射线照射 10 Gy,继续培养 24 h 后加入 CCK-8 试剂,避光 2 h 后上酶标仪检测各组细胞活力。细胞存活率(%) = siRNA 转染细胞平均 $A_{450\text{nm}}$ /R-A549 细胞平均 $A_{450\text{nm}} \times 100\%$ 。

6. 转染细胞克隆集落形成实验:将指数生长期 R-A549 细胞和转染组细胞,接种于 6 孔板(每孔 3.5×10^5 个细胞),培养 24 h 后分别给以 0、2、4、6 和 8 Gy 6 MV X 射线照射细胞,照射后立即用胰酶消化细胞,吹打成细胞悬液,分别接种于培养皿(每皿接种 1 000 个细胞)中,培养 14 d,中间更换培养液 1 次。之后磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 遍,甲醇固定 2 h,姬姆萨染色,计数细胞集落(含 50 个细胞以上);计算集落形成率(PE, %) = 集落数/接种细胞数 × 100%,细胞存活分数(SF) = 处理组 PE/空白对照组 PE。

7. siRNA 转染细胞照射前后细胞周期检测:R-A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞完成以上处理并培养 24 h 后,进行 6 MV X

射线源靶距 100 cm 照射,照射剂量 10 Gy 后换液继续培养 24 h,胰酶消化和收集各组细胞,预冷 PBS 洗 3 次,预冷的 70% 乙醇固定于 -20℃ 2 h 以上;室温 1 000 g 离心 5 min,去上清,PBS 洗 1 次,吸去上清,加入细胞周期试剂 PI (50 μg/ml) 重悬细胞,避光 4℃ 静置 20 min,上流式细胞仪检测。对 siRNA 转染细胞和 R-A549 细胞不予 X 射线照射,同期流式细胞周期检测。

8. 统计学处理:计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据分析采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,组间比较采用方差分析;应用 GraphPad Prism5.0 软件进行统计图形制作。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. Western blot 检测各组细胞 TLR9 表达结果:对肺癌 A549 细胞和 R-A549 细胞以及转染 siRNA 后各实验组细胞 TLR9 蛋白 Western blot 检测,结果见图 1,R-A549 细胞比 A549 细胞 TLR9 的表达水平增高,差异有统计学意义 ($t = 5.429, P < 0.05$),TLR9 siRNA 转染细胞 TLR9 表达水平较 R-A549 细胞降低,其 TLR9 表达水平为 R-A549 细胞的 38%,二者比较差异有统计学意义 ($t = 8.549, P < 0.05$)。

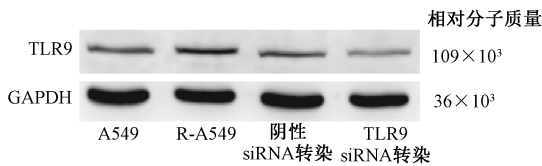


图 1 4 组实验细胞 TLR9 蛋白 Western blot 检测结果

Figure 1 TLR9 expressions in A549, R-A549, TLR9-siRNA transfected R-549 and its negative control R-A549 cells

2. siRNA 转染 R-A549 细胞克隆集落形成: A549 细胞、R-A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞、TLR9 siRNA 转染细胞给予 0、2、4、6 和 8 Gy 照射后进行细胞存活分数对比,结果显示,2、4、6 和 8 Gy 照射后 A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞、TLR9 siRNA 转染细胞存活分数均低于 R-A549 组细胞;经过单击多靶模型曲线拟合(图 2),计算得到 4 组细胞 D_0 、 D_q 、 N 值,结果见表 1,其中 A549 细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞较 R-A549 细胞有较低的 D_0 、 D_q 和 N 值,阴性 siRNA 转染细胞较 R-A549 细胞 D_0 值增高,根据放射增敏比公式计算得到 A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞相对于 R-A549 细胞的放射增敏比 (SER_{D_0}),分别为 1.09、0.90 和 1.37。

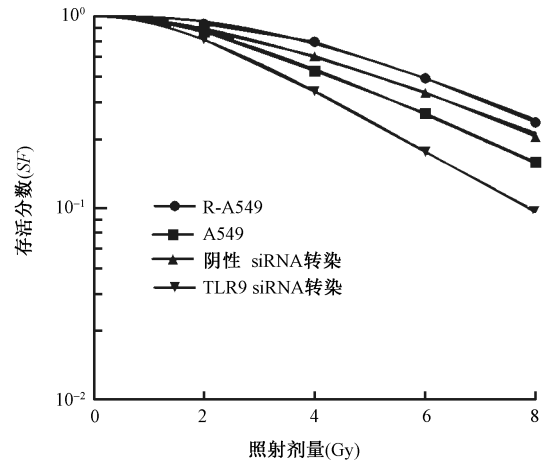


图 2 各实验组细胞集落形成结果

Figure 2 Cloning survival of A549, R-A549, TLR9-siRNA transfected R-549 and its negative control R-549 cells

3. 实验组细胞活力测定:对 4 组实验细胞进行细胞增殖能力测定,结果见表 2,与 R-A549 细胞相比,给予 0 Gy 照射时,阴性 siRNA 转染细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞活力增加,照射 10 Gy 后 A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞活力较 0 Gy 照射降低,照射前后 A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞增殖能力变化差异均有统计学意义 ($t = 3.041、4.077$ 和 $8.410, P < 0.05$)。

表 1 4 组实验细胞放射增敏比比较

Table 1 SER_{D_0} of A549, R-A549, TLR9-siRNA transfected R-549 and its negative control R-549 cells

组别	D_0	D_q	N	SER_{D_0}
R-A549 组	3.381	4.207	3.471	-
A549 组	3.114	2.645	2.338	1.09
阴性 siRNA 转染组	3.747	3.039	2.250	0.90
TLR9 siRNA 转染组	2.462	2.154	2.399	1.37

注: D_0 ·平均致死剂量, D_q ·准阈剂量, N ·细胞内所含的放射敏感靶数; SER_{D_0} ·照射 R-A549 细胞的 D_0 值与其他 3 组照射 D_0 值的比值

4. siRNA 转染细胞周期分布检测结果:对 R-A549 细胞、阴性 siRNA 转染细胞和 TLR9 siRNA 转染细胞进行 10 Gy 照射前后的流式细胞周期检测,结果见表 3。R-A549 细胞、TLR9 siRNA 转染细胞照射后, G_2/M 和 S 期细胞均比照射前增加;而 G_1/G_0 期细胞则比照射前减少;阴性 siRNA 转染细胞照射前后表现为 G_2/M 期细胞分布降低, G_1/G_0 期细胞分布增加。进一步对比照射后 siRNA 转染细胞和 R-A549 细胞周期分布,发现 TLR9 siRNA 转染细胞 G_2/M 和 S 期分布较 R-A549 细胞

表 2 X 射线照射对各组细胞活力的影响(A 值, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of 10 Gy X-ray radiation on the viability of A549, R-A549, TLR9-siRNA transfected R-549 and its negative control R-549 cells(A, $\bar{x} \pm s$)

照射剂量(Gy)	样本数	A549	R-A549	阴性 siRNA 转染	TLR9siRNA 转染
0	3	0.979 ± 0.082	1.000 ± 0	1.357 ± 0.150	2.125 ± 0.178
10	3	0.662 ± 0.047	1.000 ± 0	0.933 ± 0.039	1.250 ± 0.255
t 值		3.041	0.000	4.077	8.410
P 值		<0.05	>0.05	<0.05	<0.05

表 3 siRNA 转染 R-A549 细胞照射前后各组细胞周期分布($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The cell cycle distribution of TLR9-siRNA transfected R-A549 cells before and after irradiation($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	G ₂ /M 期		G ₁ /G ₀ 期		S 期	
		照射前	照射后	照射前	照射后	照射前	照射后
R-A549 组	3	3.86 ± 3.40	9.89 ± 1.33	81.80 ± 4.39	66.60 ± 2.12	14.37 ± 2.21	23.50 ± 3.47
阴性 siRNA 转染组	3	3.74 ± 1.90	2.06 ± 3.57 ^a	83.63 ± 2.50	85.80 ± 4.10 ^a	12.60 ± 1.91	12.13 ± 0.67 ^a
TLR9siRNA 转染组	3	6.28 ± 0.42	15.40 ± 0.53 ^a	78.63 ± 2.06	50.00 ± 0.36 ^a	15.10 ± 2.34	34.63 ± 0.85 ^a
F 值		1.202	27.39	1.936	135.1	1.061	86.25
P 值		0.36	<0.05	0.22	<0.05	0.40	<0.05

注:与同细胞周期照射后的 R-A549 比较,^at=3.042、4.323、8.809、7.616、6.635、6.499,P<0.05

均增加($t = 4.323、6.499, P < 0.05$), G₁/G₀ 期细胞分布较 R-A549 细胞减少,差异有统计学意义($t = 7.616, P < 0.05$); 阴性 siRNA 转染细胞则表现为 G₂/M 期、S 期细胞分布低于 R-A549 细胞, G₁/G₀ 期细胞分布增加。

讨 论

已知 TLR9 受体在树突状细胞(pDC) 和 B 细胞中高表达, 细菌和病毒 DNA 中的非甲基化 CpG DNA 作为其配体, 通过激活 TLR9 信号通路 pDC 可产生大量的 I 型 IFNs, 发挥直接和/或间接的细胞毒作用, 并刺激 B 细胞大量增殖, 同时促进 IgM 分泌^[2-3], 在识别和抵御各种病原微生物感染中发挥着重要作用; 而现在越来越多的研究^[4-6]表明, TLR9 也在多种实体肿瘤中表达增高, 参与了肿瘤的产生、侵袭和转移过程, 不仅与肿瘤的临床分期相关, 也影响着肿瘤治疗的结果。

放射治疗是肺癌最常用的治疗方法, 常规分割照射“4R”理论—肿瘤细胞再氧合、细胞周期再分布、照射后期细胞再增殖和再群体化贯穿于放射治疗的全过程, 这一过程中部分肿瘤细胞成为放射耐受细胞, 进一步克隆增殖后产生放射抗拒^[7]。而进一步研究证实, 电离辐射诱导激活了一系列的信号分子和通路, 诸如细胞周期调控、DNA 损伤与修复、细胞凋亡、癌基因与抑癌基因、细胞代谢等过程, 有结果显示受到照射的肿瘤细胞 60 多种基因的表达上调^[8], 导致细胞粘附、肿瘤血管生成增加, 利于肿

瘤的侵袭和转移, 产生肿瘤的放射抗拒。已知 TLR9 被相应配体激活后, 分别激活核转录因子 AP-1、NF-kB 和 Stat1, 一方面诱导各类细胞增殖因子合成而促进肿瘤的生长, 另一方面促进炎症介质 TNF α 、IL-1、IL-6、IL-8 等合成增加, 引起促炎症免疫反应或抑炎症免疫反应, 参与肿瘤微环境的形成^[9]; Ren 等^[10] Xu 等^[11]研究证实, 肺癌细胞 TLR9 信号通路激活能上调炎症因子、MMP-2(基质金属蛋白酶)和趋化因子受体水平, 同时又促进免疫抑制因子 IL-10 的分泌, 最终导致肿瘤细胞显著增殖, 从而增加了肿瘤细胞侵袭和转移的能力。本组的前期研究中通过免疫组织化学证实肺癌组织中 TLR9 表达增高, 而正常肺泡细胞中 TLR9 并无表达, 肺癌组织 TLR9 表达增高的水平与肿瘤直径、淋巴结有无转移呈正相关, 且 TLR9 表达与肺癌术后放疗的生存相关^[12]; 因此, 本研究利用前期研究的 TLR9 表达增高的放射抗拒肺癌 A549 细胞作为研究对象, 通过 siRNA 脂质体转染技术, 探讨抑制其 TLR9 表达对辐射治疗结果的影响。

本组前期对 CpG ODN7909 的辐射增敏研究发现^[1], 放射抗拒肺癌 A549(R-A549) 细胞 TLR9 表达明显增高, 细胞倍增时间明显延长, 辐射敏感性下降。本研究沿用了前期制备 R-A549 细胞的实验方法, 并经 Western blot 证实 R-A549 细胞 TLR9 表达高于 A549 细胞; 采用脂质体转染技术将 TLR9 siRNA 及阴性 siRNA 对 R-A549 细胞进行瞬时转染并予以 TLR9 表达的验证, TLR9 siRNA 转染组细胞

呈现出 TLR9 蛋白的低水平表达,为后续的辐射增敏研究奠定基础。国内有研究者通过 RNA 干扰技术抑制 MDC1 蛋白表达,对放射线诱导食管癌细胞 ECA109 克隆形成率下降有促进作用^[13]。本研究通过细胞克隆集落形成实验也得出类似结果。转染 TLR9 siRNA 组 R-A549 细胞照射后细胞克隆形成率低于 R-A549 细胞和 A549 细胞,转染阴性 siRNA 组 R-A549 细胞照射后克隆形成与 R-A549 细胞克隆集落形成相差不大,经过单击多靶模型拟合,结果 A549 细胞和转染 TLR9 siRNA 组细胞均较 R-A549 细胞有较低的 D_0 、 D_q 、 N 值,二者的放射增敏比分别为 1.09 和 1.37,而转染阴性 siRNA 组细胞较 R-A549 细胞 D_0 值增高, D_q 、 N 值降低,二者的放射增敏比为 0.90;说明通过靶向 siRNA 抑制 R-A549 细胞 TLR9 表达,能够降低 R-A549 照射后的克隆集落形成率,具有放射增敏的作用。

进一步对 siRNA 转染细胞照射前后的细胞周期分布进行分析,结果显示,照射后 R-A549 组和 TLR9 siRNA 转染组细胞的 G_2/M 期分布均较照射前增多,而 G_1/G_0 期细胞分布照射后二者均减少;其中照射后 TLR9 siRNA 转染组细胞的 G_2/M 期分布比 R-A549 组明显增多,显示出 TLR9 siRNA 转染组细胞较 R-A549 细胞照射后有更多细胞阻滞在 G_2/M 期;已有研究证实 DNA 损伤后细胞周期激酶立即被激活,通过激活下游调节通路,主要调节 S 期和/或 G_2/M 期检测点^[14]。周福祥等^[15]发现放射抗拒细胞 Hep-2R 有 CDC25 基因下调,导致 G_2/M 期细胞减少,而 CDC25B 基因主要是调节细胞向 G_2/M 期转化,因此,本研究中 TLR9 siRNA 转染组细胞照射后发生 G_2/M 期阻滞意味着放射敏感性的提高;同时照射后 TLR9 siRNA 转染组细胞的 G_1/G_0 期分布比 R-A549 组明显减少,也有效抑制了放疗后肿瘤细胞的潜在致死性损伤修复能力,也利于 R-A549 细胞放射敏感性的提高。本研究结果显示 TLR9 siRNA 转染细胞照射后 S 期细胞分布明显高于 R-A549 细胞,而 S 期细胞是对放射线最不敏感。

综上所述,本研究通过靶向干扰 RNA 方法成功抑制了 R-A549 细胞 TLR9 表达水平,降低了 R-A549 细胞的克隆形成,而且通过抑制 TLR9 表达使其放疗后发生 G_2/M 期细胞阻滞并减少 G_1/G_0 期细胞分布。因此,具有放射增敏的作用,为肺癌放疗效果预测或放疗增敏提供了新的思路。

利益冲突 本研究受上海市金山区科委基金资助,课题编号 2014-3-19,与其他研究者未因进行该研究而接受任何不正当的职务或财务利益,在此对研究的独立性和科学性予以保证。与其他作者及基金无任何利益冲突

作者贡献声明 高彩霞设计研究方案,执行实验的主要内容,收集数据后统计并起草论文;乔田奎指导实验过程,修改论文;张彬负责细胞照射;袁素娟负责细胞实验检测

参 考 文 献

- [1] Yan L, Xu G, Qiao T, et al. CpG-ODN 7909 increases radiation sensitivity of radiation-resistant human lung adenocarcinoma cell line by overexpression of Toll-like receptor 9 [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2013, 28 (7): 559-564. DOI: 10.1089/cbr.2012.1450.
- [2] Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, et al. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection [J]. *J Exp Med*, 2005, 202 (5): 637-650. DOI: 10.1084/jem.20050821.
- [3] Havenar-Daughton C, Kolumam GA, Murali-Krishna K. Cutting edge: the direct action of type I IFN on CD4 T cells is critical for sustaining clonal expansion in response to a viral but not a bacterial infection [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (6): 3315-3319. DOI: 10.4049/jimmunol.176.6.3315.
- [4] Jukkola-Vuorinen A, Rahko E, Vuopala KS, et al. Toll-like receptor-9 expression is inversely correlated with estrogen receptor status in breast cancer [J]. *J Innate Immun*, 2009, 1 (1): 59-68. DOI: 10.1159/000151602.
- [5] Väisänen MR, Jukkola-Vuorinen A, Vuopala KS, et al. Expression of Toll-like receptor-9 is associated with poor progression-free survival in prostate cancer [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5 (5): 1659-1663. DOI: 10.3892/ol.2013.1204.
- [6] Qiu J, Shao S, Yang G, et al. Association of Toll like receptor 9 expression with lymph node metastasis in human breast cancer [J]. *Neoplasma*, 2011, 58 (3): 251-255.
- [7] Short SC, Woodcock M, Marples B, et al. Effects of cell cycle phase on low-dose hyper-radiosensitivity [J]. *Int J Radiat Biol*, 2003, 79 (2): 99-105.
- [8] Torres-Roca JF, Eschrich S, Zhao H, et al. Prediction of radiation sensitivity using a gene expression classifier [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (16): 7169-7176. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0656.
- [9] Chen K, Huang J, Gong W, et al. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7 (10): 1271-1285. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.05.016.
- [10] Ren T, Xu L, Jiao S, et al. TLR9 signaling promotes tumor progression of human lung cancer cell *in vivo* [J]. *Pathol Oncol Res*, 2009, 15 (4): 623-630. DOI: 10.1007/s12253-009-9162-0.
- [11] Xu L, Wang C, Wen Z, et al. CpG oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of adoptive cell transfer using tumor infiltrating lymphocytes by modifying the Th1 polarization and local infiltration of Th7 cells [J]. *Clio Dev Immunol*, 2010, 2010: 410893. DOI: 10.1155/2010/410893.

(下转第 831 页)

- Engl J Med, 2001, 345 (10): 725-730. DOI: 10.1056/NEJMoa010187.
- [5] Misirlioglu HC, Coskun-Breuneval M, Kucukpilakeci B, et al. Adjuvant Radiotherapy for Gastric Carcinoma; 10 years follow-up of 244 cases from a Single Institution[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(20):8871-8876. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.20.8871.
- [6] Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, et al. Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116; a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(19):2327-2333. DOI: 10.1200/JCO.2011.36.7136.
- [7] Skoropad V, Berdov B, Zagrebina V. Concentrated preoperative radiotherapy for resectable gastric cancer; 20-years follow-up of a randomized trial[J]. J Surg Oncol, 2002, 80(2): 72-78. DOI: 10.1002/jso.10102.
- [8] Fiorica F, Cartei F, Enea M, et al. The impact of radiotherapy on survival in resectable gastric carcinoma; a meta-analysis of literature data[J]. Cancer Treat Rev, 2007, 33(8): 729-740. DOI:10.1016/j.ctrv.2007.08.005.
- [9] 赵林, 应红艳, 管梅, 等. 老年胃癌的临床特点[J]. 中国医学科学院学报, 2010, 32(4): 412-416. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2010.04.011.
- Zhao L, Ying HY, Guan M, et al. The clinical characteristics of elderly gastric cancer[J]. Acta Acad Med Sin, 2010, 32(4): 412-416. DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2010.04.011
- [10] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours; revised RECIST guideline (version 1.1)[J]. Eur J Cancer, 2009, 45(2): 228-247. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
- [11] Fiorica F, Berretta M, Colosimo C, et al. Safety and efficacy of radiotherapy treatment in elderly patients with localized prostate cancer; a retrospective analysis[J]. Arch Gerontol Geriatr, 2010, 51(3): 277-282. DOI:10.1016/j.archger.2009.11.019.
- [12] Kawashima M, Kagami Y, Toita T, et al. Prospective trial of radiotherapy for patients 80 years of age or older with squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 64(4): 1112-1121. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2005.09.027.

(收稿日期:2016-07-20)

(上接第 810 页)

- [12] 高彩霞, 乔田奎, 张彬, 等. 肺癌组织中 Toll 样受体 9 的表达及其对术后放疗生存的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(4):294-298. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616x.2015.04.008.
- Gao CX, Qiao TK, Zhang B, et al. Effect of Toll-like receptor 9 expression in postoperative radiotherapy in lung cancer survivors[J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2015, 27(4): 294-298. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616x.2015.04.008.
- [13] 刘志坤, 祝淑钗, 苏景伟, 等. RNA 干扰 MDC1 基因对食管癌细胞 X 线照射后细胞周期及相关蛋白表达影响[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2015, (24)6:708-712.
- Liu Zhikun, Zhu Shuchai, Su Jingwei, et al. Effect of RNA interference of MDC1 gene cell cycle and expression of related proteins in esophageal carcinoma cells after X-ray radiation[J]. Chin J Radiat Oncol, 2015, 24(6):708-712. DOI:10.3760/cma.j.issn.1004.4221.2015.06.025.
- [14] Sasaki H, Yukiue H, Kobayashi Y, et al. Expression of the CDC25B gene as a prognosis marker in non-small cell lung-cancer[J]. Cancer Letters, 2001, 173(2):187-192. DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00669-3.
- [15] 周福祥, 周云峰, 骆志国, 等. 放射抗拒 Y 细胞模型基因表达异常对比研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2007, 27(6): 526-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2007.06.003.
- Zhou FX, Zhou YF, Luo ZG, et al. Alterations in gene expression profiles between radioresistant and radiosensitive cell lines[J]. Chin J Radiol Med Prot, 2007, 27(6): 526-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2007.06.003.

(收稿日期:2016-05-31)

欢迎订阅 欢迎投稿 欢迎刊登广告
中华放射医学与防护杂志

www.cjrmp.net

邮发代号:18-93 电话:010-62389620 Email:cjrmp@cjrmp.sina.net

邮编:100088 地址:北京市西城区德胜门外新康街2号