

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.17.005
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20210609.1520.005.html(2021-06-09)

miR-1246 对肺癌细胞放疗敏感性的调控及对放疗所致肺损伤的影响*

楚 丽,要雪品,梁 艳,段颖欣,姜 溪,王力军
(邢台医学高等专科学校第二附属医院放化疗科,河北邢台 054000)

[摘要] **目的** 探究微小 RNA(miR)-1246 对肺癌细胞放疗敏感性的调控及对放疗所致肺损伤的影响。**方法** 收集肺癌患者肺癌及癌旁组织,通过逆转录 PCR(RT-qPCR)检测 miR-1246 水平。将肺癌细胞 A549 分为阴性对照(NC)组和抑制剂组,分别转染 miR-1246NC 和抑制剂质粒,40 只小鼠分为 NC 组、放疗组、抑制剂组和抑制剂+放疗组,并通过尾静脉注射 miR-1246 抑制剂(4×10^7 TU,300 μ L)持续抑制 miR-1246 表达。在建模第 14 天于肿瘤部位行局部放疗,每天 1 次,连续 2 周。分析肿瘤生长情况,并检测肿瘤组织的增殖、凋亡情况及 β -catenin 蛋白表达水平。通过苏木素-伊红(HE)染色分析肺损伤情况,检测各组小鼠肺组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、炎性指标和 miR-1246 表达水平。**结果** 肺癌组织 miR-1246 相对表达水平高于癌旁组织[(3.47 $\pm$ 0.64) vs. (1.42 $\pm$ 0.31)],差异有统计学意义($P<0.05$)。放疗组和抑制剂组第 28 天肿瘤组织体积及质量、肿瘤组织 miR-1246 相对表达水平、CyclinD1、Ki-67、Bcl-2 和 β -catenin 蛋白水平低于 NC 组,高于抑制剂+放疗组,而 Bax 蛋白水平高于 NC 组,低于抑制剂+放疗组($P<0.05$)。放疗组肺组织损伤程度、MDA、炎性指标和肺组织 miR-1246 相对表达水平高于 NC 组和抑制剂组,而抑制剂+放疗组上述指标均低于放疗组($P<0.05$)。**结论** miR-1246 可能通过抑制 β -catenin 表达来提高肺癌对放疗的敏感性,降低 miR-1246 水平可缓解由放射线诱导的正常肺组织损伤。

[关键词] 肺癌;miR-1246;放射治疗;辐射敏感性;肺损伤; β -catenin

[中图法分类号] R734.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)17-2900-06

Regulation of miR-1246 on radiosensitivity of lung cancer cells and its effect on lung injury caused by radiotherapy*

CHU Li,YAO Xuepin,LIANG Yan,DUAN Yingxin,JIANG Xi,WANG Lijun
(Department of Radiotherapy and Chemotherapy,the Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College,Xingtai,Hebei 054000,China)

[Abstract] **Objective** To explore the regulation of microRNA (miR)-1246 on the sensitivity of lung cancer cells to radiotherapy and its influence on lung injury caused by radiotherapy. **Methods** Collected lung cancer and adjacent tissues,and detected the level of miR-1246 by reverse transcription PCR (RT-qPCR). The lung cancer cells A549 were divided into the negative control (NC) group and the inhibitor group,and were transfected with miR-1246NC and inhibitor plasmid,respectively. A total of 40 mice were divided into the NC group,the radiotherapy group,the inhibitor group and the inhibitor+radiotherapy group,miR-1246 inhibitor (4×10^7 TU,300 μ L) was injected through the tail vein to continuously inhibit the expression of miR-1246. Local radiotherapy was performed at the tumor site on the 14th day of modeling,once a day for 2 consecutive weeks. Analyzed tumor growth,and detected tumor tissue proliferation,apoptosis and β -catenin protein expression level. The lung injury was analyzed by hematoxylin-eosin (HE) staining,and the expression levels of malondialdehyde (MDA),superoxide dismutase (SOD),inflammatory indicators and miR-1246 in the lung tissues of each group of mice were detected. **Results** The level of miR-1246 in lung cancer tissue was higher than that in adjacent tissues [(3.47 $\pm$ 0.64) vs. (1.42 $\pm$ 0.31)],the difference was statistically significant ($P<0.05$). Tumor volume and mass at 28th day,the expression level of miR-1246,CyclinD1,Ki-67,Bcl-2 and β -catenin protein levels of the tumor tissues in the radiotherapy group and the inhibitor group were lower than

* 基金项目:河北省邢台市科技计划项目(2019ZC234)。 作者简介:楚丽(1982—),主治医师,硕士,主要从事肿瘤放疗研究。

those in the NC group, but higher than those in the inhibitor + radiotherapy group, while the Bax protein was higher than that in the NC group, but lower than that in the inhibitor + radiotherapy group ($P < 0.05$). The lung tissue damage degree, MDA, inflammatory index and miR-1246 expression level of the lung tissue in the radiotherapy group were higher than those in the NC group and the inhibitor group, while the above indicators in the inhibitor + radiotherapy group were lower than those in the radiotherapy group ($P < 0.05$).

Conclusion miR-1246 may increase the sensitivity of lung cancer to radiotherapy by inhibiting the expression of β -catenin, reducing miR-1246 level can alleviate radiation-induced normal lung tissue damage.

[Key words] lung cancer; microRNA-1246; radiotherapy; radiosensitivity; lung injury; β -catenin

肺癌是临床发病率较高的恶性肿瘤,最新的统计报告显示肺癌占有所有肿瘤患者的 26%~29%^[1]。现阶段治疗肺癌的方法包括放疗、化疗等,但肿瘤的转移和复发是影响治疗结果的重要因素^[2]。放疗可通过诱导 DNA 损伤导致突变负荷增加、染色体畸变和(或)基因组不稳定,从而诱导细胞死亡^[3]。但化疗也会引起骨髓抑制、肺放射性损伤等副作用,提高肺癌细胞对放疗的敏感性具有重要意义^[4]。

微小 RNA(miR)是一种内源性的、仅有 22~25 个核苷酸长度的一种单链 RNA,虽然 miR 不具备编码蛋白质的能力,但其可靶向结合信使 RNA(mRNA)的 3'端的非翻译区域(3'-UTR)使其降解,从而抑制基因的表达^[5]。miR-1246 是一种新发现的与肿瘤有关的基因,研究显示提高 miR-1246 的表达可促进肺癌细胞的转移能力^[6]。且一项最新研究发现降低 miR-1246 的水平可提高放射线对膀胱癌细胞的杀伤力^[7]。本文主要分析 miR-1246 对肺癌细胞放疗敏感性的影响及对放疗所致肺损伤的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肺癌组织标本

选取 2018 年 12 月至 2019 年 12 月本院 70 例患者的肺癌组织和癌旁组织标本,其中男 41 例,女 29 例,年龄 39~74 岁,中位数 53 岁。纳入标准:(1)通过病理确诊为肺癌;(2)入组前未接受放疗、化疗等抗肿瘤治疗;(3)患者知情同意。排除标准:合并其他原发性恶性肿瘤的患者。

1.1.2 细胞和试剂

人肺癌细胞 A549(CCL-185,美国 ATCC 公司);DMEM 培养基血清和抗体(美国 Invitrogen 公司);慢病毒负载的 miR-1246 阴性对照(NC)和抑制剂(中国 GenePharma 公司);Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司);TRIzol(美国 Sigma 公司);miScript 试剂盒(德国 GmbH 公司);PrimeScript-RT 和 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒(日本 Takara 公司);抗体和山羊抗兔 IgG H&L[辣根过氧化物酶(HRP),美国 Abcam 公司];聚偏氟乙烯(PVDF)膜(美国 Bio-Rad 公司);电化学发少(ECL)显色试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司);氧化应激试剂盒(中国三工生物技术有限公司);ELISA 试剂盒(中国 Beyotime 研究所)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组和转染

将 DMEM 培养基中处于对数生长期的 A549 细胞分为 NC 组和抑制剂组,分别通过 Lipofectamine2000 转染 50 nmol/L 的 miR-1246NC 和 miR-1246 抑制剂,转染条件为 7 ℃,5% CO₂,48 h 后收集细胞。通过逆转录 PCR(RT-qPCR)检测 miR-1246 水平分析转染效率。

1.2.2 荷瘤裸鼠模型构建和分组

将转染后的细胞重新配置成浓度为 1×10^7 个细胞/mL 的溶液,然后将 0.2 mL 的细胞悬液注射在小鼠右前腋下,若第 7 天可触摸瘤体生成则提示建模成功。分别选择 20 只转染 miR-1246NC 建模成功的小鼠和 20 只转染 miR-1246 抑制剂建模成功的小鼠,各分为 2 组,共得到 4 组:NC 组、放疗组、抑制剂组和抑制剂+放疗组($n=10$)。为持续抑制肿瘤组织和肺组织 miR-1246 表达,在建模后第 14、21 天,通过尾静脉注射 miR-1246 抑制剂(4×10^7 TU,300 μ L)^[8]。同时,在建模后第 14 天,小鼠接受肿瘤组织局部放疗^[9],放射源为钴-60,波长为 80 cm,照射剂量为 7 Gy/f,剂量率为 0.5 Gy/min,每天 1 次,连续 2 周。

1.2.3 检测指标

1.2.3.1 肿瘤组织体积、质量

在建模后第 14、28 天用卡尺测量各组小鼠皮下肿瘤组织体积,使用下式计算:体积=[(长度×宽度)/2]³×0.523 6。在建模后第 28 天脱颈处死小鼠,取出肿瘤组织,检测质量。

1.2.3.2 逆转录 PCR(RT-qPCR)检测 miR-1246

通过 TRIzol 获得组织中总 RNA,对于 miR-1246,通过 miScript 试剂盒合成互补 DNA(7 ℃,60 min,95 ℃,5 min,4 ℃下保存),利用 SYBR-Green PCR 试剂盒检测互补 DNA(95 ℃,10 s,55 ℃,30 s,72 ℃,30 s,40 个循环)。U6 用作 miR-1246 的内源参照。对于 mRNA,分别通过 PrimeScript-RT 和 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行逆转录(37 ℃,15 min,85 ℃,5 s)和 PCR(95 ℃,5 min,95 ℃,30 s,40 个循环,65 ℃,45 s)。GAPDH 用作内源参照。通过比较循环阈值评估 miR-1246 相对于 U6 和 GAPDH 的表达水平。

1.2.3.3 Western blot 检测蛋白

将组织研磨萃取总蛋白,蛋白浓度通过 BCA 试

剂盒测量。进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE, 80~120 V, 90 min) 分离 40 μg 的总蛋白。在 100 mV 的恒定电压下与 PVDF 膜进行湿转移。在 5% 牛血清蛋白中于室温孵育 1 h, 然后将 1:500 稀释的抗 Cyclin D1、抗 Ki-67、抗 Bcl-2、抗 Bax 和抗 β-catenin 添加到 PVDF 膜中, 并在 4℃ 下孵育 8 h。洗涤后在室温下添加二抗孵育 2 h, 然后加入化学发光试剂进行显影, GAPDH 用作内参, 用 Image J 软件分析目标条带的灰度值。

1.2.3.4 苏木素-伊红(HE)染色检测肺损伤

小鼠处死后立即取出肺组织, 用 4% 的多聚甲醛固定并用梯度醇脱水, 包埋在石蜡中, 制成厚度为 4 μm 的切片制作玻片标本。加入苏木素在室温下赋孵育 10 min, 然后加入 0.5% 伊红溶液室温下孵育 3 min, 显微镜下观察。

1.2.3.5 丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平检测

将肺组织制作成组织匀浆, 以 3 000 r/min 的速度离心 25 min, 根据氧化应激试剂盒检测 MDA 和 SOD 水平。

1.2.3.6 ELISA 检测炎症指标

将肺组织匀浆、离心 (2 000 r/min, 20 min) 并收集上清液, 再根据试剂盒说明书加入抗体和显色剂, 通过酶标仪检测 450 nm 处吸光度, 然后根据标准曲线计算白细胞介素 (IL)-1β、IL-6 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺癌组织及癌旁组织 miR-1246 表达情况

肺癌组织 miR-1246 相对表达水平高于癌旁组织 [(3.47±0.64) vs. (1.42±0.31)], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 各组小鼠肿瘤组织体积、质量比较

建模第 14 天, 各组小鼠肿瘤组织体积比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。建模第 28 天, 放疗组和抑制剂组肿瘤组织体积、质量均低于 NC 组, 抑制剂+放疗组肿瘤组织体积、质量均低于放疗组和抑制剂组 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 各组小鼠肿瘤组织 miR-1246 相对表达水平比较

各组小鼠肿瘤组织 miR-1246 相对表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。放疗组和抑制剂组肿瘤组织 miR-1246 相对表达水平低于 NC 组, 抑制剂+放疗组肿瘤组织 miR-1246 相对表达水平低于放疗组和抑制剂组 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.4 各组小鼠肿瘤组织 Cyclin D1 和 Ki-67 蛋白表

达情况比较

各组小鼠肿瘤组织 Cyclin D1 和 Ki-67 蛋白水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。放疗组和抑制剂组肿瘤组织 Cyclin D1 和 Ki-67 蛋白水平低于 NC 组, 抑制剂+放疗组肿瘤组织 Cyclin D1 和 Ki-67 蛋白水平低于放疗组和抑制剂组 ($P < 0.05$), 见图 1、表 3。

表 1 各组小鼠肿瘤组织体积、质量比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	第 14 天体积 (mm ³)	第 28 天体积 (mm ³)	第 28 天质量 (g)
NC 组	104.26±11.82	274.26±16.82	0.37±0.05
放疗组	112.15±12.03	144.26±14.38 ^a	0.26±0.04 ^a
抑制剂组	111.07±12.84	182.36±16.24 ^a	0.29±0.04 ^a
抑制剂+放疗组	108.92±11.77	92.57±10.58 ^{abc}	0.21±0.03 ^{abc}
<i>F</i>	0.474	38.878	12.812
<i>P</i>	0.345	<0.001	0.008

^a: $P < 0.05$, 与 NC 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与放疗组比较; ^c: $P < 0.05$, 与抑制剂组比较。

表 2 各组小鼠肿瘤组织 miR-1246 相对表达水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	miR-1246
NC 组	3.81±0.35
放疗组	2.84±0.30 ^a
抑制剂组	1.56±0.17 ^a
抑制剂+放疗组	0.91±0.10 ^{abc}
<i>F</i>	45.675
<i>P</i>	<0.001

^a: $P < 0.05$, 与 NC 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与放疗组比较; ^c: $P < 0.05$, 与抑制剂组比较。

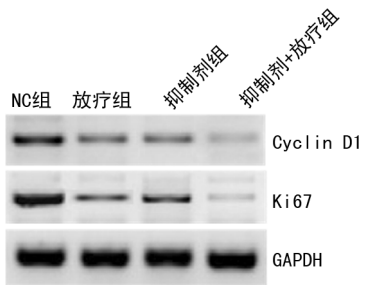


图 1 Western blot 检测各组小鼠肿瘤组织 Cyclin D1 和 Ki-67 蛋白表达情况

2.5 各组小鼠肿瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况比较

各组小鼠肿瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。放疗组和抑制剂组肿瘤组织 Bcl-2 蛋白水平低于 NC 组, 而 Bax 蛋白水平高于 NC 组, 抑制剂+放疗组肿瘤组织 Bcl-2 蛋白水平低于放疗组和抑制剂组, 而 Bax 蛋白水平高于放疗组和抑制剂组 ($P < 0.05$), 见图 2、表 4。

表 3 各组小鼠肿瘤组织 Cyclin D1 和 Ki-67 蛋白水平比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	Cyclin D1	Ki-67
NC 组	2.15±0.18	3.07±0.29
放疗组	0.91±0.09 ^a	0.96±0.10 ^a
抑制剂组	0.97±0.10 ^a	1.36±0.13 ^a
抑制剂+放疗组	0.42±0.05 ^{abc}	0.34±0.04 ^{abc}
F	43.548	61.297
P	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与放疗组比较;^c: $P<0.05$,与抑制剂组比较。

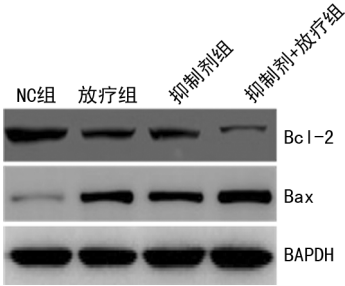


图 2 Western blot 检测各组小鼠肿瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况

表 4 各组小鼠肿瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	Bcl-2	Bax
NC 组	3.24±0.29	0.52±0.06
放疗组	1.78±0.18 ^a	3.15±0.30 ^a
抑制剂组	1.70±0.16 ^a	2.54±0.26 ^a
抑制剂+放疗组	0.85±0.09 ^{abc}	4.21±0.45 ^{abc}
F	51.034	67.542
P	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与放疗组比较;^c: $P<0.05$,与抑制剂组比较。

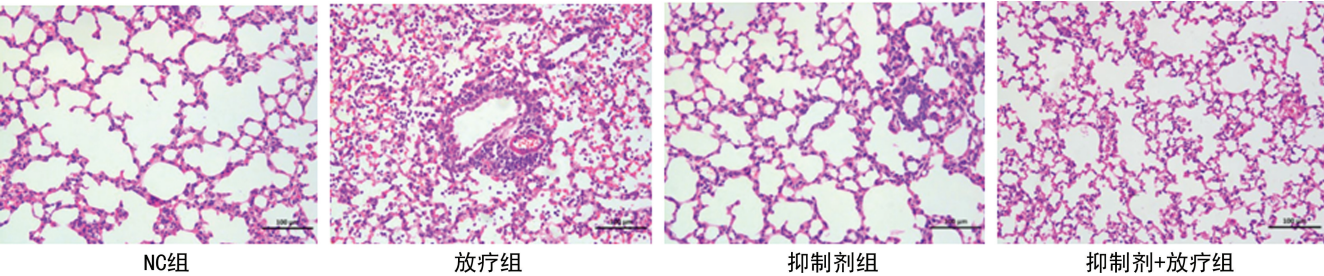


图 4 各组小鼠肺组织病理变化(HE,×200)

2.8 各组小鼠肺组织 MDA 和 SOD 水平比较
各组小鼠肺组织 MDA、SOD 水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。放疗组肺组织 MDA 水平高于 NC 组和抑制剂组,而 SOD 水平明显低于 NC 组和抑制剂组($P<0.05$),抑制剂+放疗组肺组织 MDA 水平低于放疗组,而 SOD 水平高于放疗组($P<$

2.6 各组小鼠肿瘤组织 β -catenin 蛋白表达情况比较
各组小鼠肿瘤组织 β -catenin 蛋白水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。放疗组和抑制剂组肿瘤组织 β -catenin 蛋白水平低于 NC 组,抑制剂+放疗组 β -catenin 蛋白水平低于放疗组和抑制剂组($P<0.05$),见图 3、表 5。

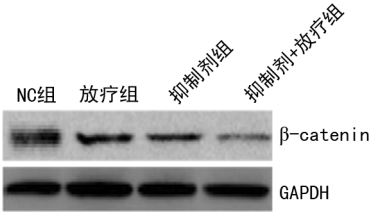


图 3 Western blot 检测各组小鼠肿瘤组织 β -catenin 蛋白表达情况

表 5 各组小鼠肿瘤组织 β -catenin 蛋白水平比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	β -catenin
NC 组	3.62±0.34
放疗组	2.45±0.22 ^a
抑制剂组	1.37±0.14 ^a
抑制剂+放疗组	0.72±0.08 ^{abc}
F	56.172
P	<0.001

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与放疗组比较;^c: $P<0.05$,与抑制剂组比较。

2.7 各组小鼠肺组织病理变化
NC 组和抑制剂组小鼠肺组织一切正常。放疗组肺组织出现广泛的肺部损伤,支气管上皮细胞脱落,并可明显地观察到出血和炎性浸润,肺泡结构基本丧失。与放疗组比较,抑制剂+放疗组炎性反应情况明显缓解,可观察到基本的肺泡结构,见图 4。

0.05),见表 6。
2.9 各组小鼠肺组织炎性指标比较
各组小鼠肺组织炎性指标比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。放疗组肺组织 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平高于 NC 组和抑制剂组,抑制剂+放疗组肺组织 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平低于放疗组($P<0.05$),见

表 7。

表 6 各组小鼠肺组织 MDA 和 SOD 水平比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)		
组别	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mL)
NC 组	4.85±0.51	135.63±13.68
放疗组	14.13±1.68 ^{ac}	91.26±11.75 ^{ac}
抑制剂组	4.52±0.62	132.52±17.24
抑制剂+放疗组	10.29±1.42 ^{abc}	113.18±20.58 ^{abc}
<i>F</i>	34.842	14.198
<i>P</i>	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与放疗组比较;^c: $P<0.05$,与抑制剂组比较。

表 7 各组小鼠肺组织炎症指标水平比较($n=10, \bar{x} \pm s, \times 10^{-9} \text{ g/L}$)			
组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
NC 组	39.18±4.98	41.29±4.67	53.54±5.84
放疗组	78.31±9.75 ^{ac}	86.28±9.35 ^{ac}	114.73±13.24 ^{ac}
抑制剂组	37.58±5.34	42.73±6.01	51.84±6.81
抑制剂+放疗组	58.64±8.20 ^{abc}	66.50±8.92 ^{abc}	89.61±10.34 ^{abc}
<i>F</i>	24.187	27.923	28.075
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与放疗组比较;^c: $P<0.05$,与抑制剂组比较。

2.10 各组小鼠肺组织 miR-1246 相对表达水平比较
抑制剂组肺组织 miR-1246 相对表达水平低于 NC 组,放疗组肺组织 miR-1246 相对表达水平高于 NC 组,抑制剂+放疗组肺组织 miR-1246 相对表达水平低于放疗组($P<0.05$),见表 8。

表 8 各组小鼠肺组织 miR-1246 相对表达水平比较($n=10, \bar{x} \pm s$)	
组别	miR-1246
NC 组	1.05±0.09
放疗组	3.19±0.42 ^a
抑制剂组	0.67±0.07 ^a
抑制剂+放疗组	1.52±0.18 ^{abc}
<i>F</i>	49.688
<i>P</i>	<0.001

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与放疗组比较;^c: $P<0.05$,与抑制剂组比较。

3 讨 论

一项全球性调查统计研究显示,2018 年新发肺癌患者共 2 093 876 例,占有所有肿瘤的 11.6%,死亡 1 761 007 例,占有所有肿瘤死亡患者的 18.4%,肺癌的发病率和病死率均排名第一^[10]。吸烟、辐射、烟尘、毒性物质(如石棉、镍、铬和砷等)均是肺癌的诱发因素,但目前关于肺癌发病和进展的机制尚不完全明确。放疗是治疗肺癌的最主要方法之一,但放疗的实际应

用中有两个主要局限,一方面由于肺癌细胞可能产生对放射线的抗性,另一方面放射线也会对周围正常肺组织造成损伤,提高肺癌对放疗的敏感性和减轻对正常肺组织的损伤具有重要的临床意义^[11]。

miR 可通过碱基配对的方式与 mRNA 的 3'UTR 区域结合,从而调节基因的表达水平,miR 的这种在转录后水平上调控的方式可影响基因的表达,从而参与肿瘤的发生、发展^[12]。miR-1246 是一种新发现的与肿瘤有关的 miR,体内外实验结果显示在宫颈癌、胰腺癌等肿瘤中发挥抑癌作用^[13-14]。研究认为 miR-1246 是肺癌起始和癌症进展的关键驱动器,循环中 miR-1246 可用作跟踪肺癌进展的生物标记物和治疗靶标^[15]。KIM 等^[16]研究发现,miR-1246 可提高肺癌细胞的侵袭能力。但 miR-1246 能否提高肺癌细胞对放疗的敏感性仍不清楚。本研究结果显示降低肺癌细胞中 miR-1246 不仅能抑制肺癌荷瘤裸鼠模型的肿瘤生长,促进肿瘤细胞的凋亡,还可提高肺癌对放疗的敏感性,提高放射线的杀伤力。放射线诱导 DNA 的断裂是治疗肿瘤的关键机制,DNA 的损伤修复是肿瘤细胞具有对放射线抗性的关键,研究显示 miR-1246 可通过调控 DNA 连接酶 4 的表达参与 DNA 损伤修复^[17]。 β -catenin 是 Wnt 通路中的关键蛋白,参与放射线引起的肿瘤细胞凋亡,有研究发现抑制 β -catenin 可促进干细胞对放射线的敏感性^[18]。体内外研究结果已经显示了抑制 β -catenin 的表达可消除直肠癌细胞对放射线的抗性,提高放疗的杀伤力^[19]。而大量的实验已经证实了 miR-1246 对 β -catenin 的抑制作用^[20]。本研究证实了在体内抑制 miR-1246 进而抑制肺癌生长的现象,且抑制 miR-1246 的表达可能通过调控 DNA 损伤修复相关蛋白的表达降低肺癌细胞对放射性的抗性,和可能通过抑制 β -catenin 相关通路提高放射线对肿瘤的杀伤力,从而提高放疗效果。

放疗的实际应用过程中不但会造成肿瘤细胞的 DNA 损伤,也会引起正常肺组织的损伤。可耐受剂量的放疗不但可能导致生活质量下降,还可能诱发肺炎和纤维化。近年来,已经证明细胞氧化应激在放射致肺损伤中起着重要作用,且将氧化应激作为肺损伤发生、发展和预后的监测指标^[21]。活性氧的存在会引起 DNA 损伤和随后的细胞凋亡,且会诱导炎症细胞因子的分泌。本研究中,为持续降低 miR-1246 的水平,通过静脉注射 miR-1246 慢性毒的方式抑制 miR-1246 的水平。结果显示放疗会引起肺癌裸鼠模型肺组织氧化应激反应和炎症因子的释放,造成明显肺损伤,而抑制 miR-1246 可有效地缓解肺损伤。在脂多糖诱导的软骨 ADDC5 细胞的炎性损伤模型中,miR-1246 的抑制通过上调肝细胞核因子 4 α 的表达调控炎性通路,从而缓解细胞的炎性损伤^[22]。一项最新研究显示,在 NaIO₃ 诱导的氧化应激细胞模型中,抑制 miR-1246 会降低活性氧水平,提高视网膜色素上皮

的抗凋亡能力并缓解损伤^[23]。体内实验也显示了 miR-1246 的耗竭减弱了脂多糖诱导的小鼠肺部炎症,并缓解中性粒细胞浸润和血管通透性^[24]。且本研究也显示抑制剂+放疗组肺组织的 miR-1246 水平明显低于放疗组,这提示抑制 miR-1246 的表达可能通过缓解氧化应激反应抑制炎症反应,从而缓解由放疗引起的肺损伤。

综上所述,miR-1246 可能通过抑制 β -catenin 的表达提高肺癌对放疗的敏感性,且降低 miR-1246 的水平可缓解有放射线诱导的正常肺组织的损伤。本研究结果发现了 miR-1246 在肺癌荷瘤裸鼠肿瘤组织和肺组织不同的作用,在肺癌组织中 miR-1246 起到诱导凋亡的作用,而在正常肺组织中,miR-1246 起到缓解氧化应激和肺组织保护作用。而对于接受放疗的肺癌患者来说,miR-1246 的作用均是有益的,关于 miR-1246 在肺癌患者中的意义和与放疗的关系仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] DANXIA Y, WEI Z, MATTIAS J, et al. Overall and central obesity and risk of lung cancer; a pooled analysis[J]. J Natl Cancer Inst, 2018, 110(8):831-842.
- [2] TAO Z, MCCALL N S, WIEDEMANN N, et al. SMAC mimetic debio 1143 and ablative radiation therapy synergize to enhance antitumor immunity against lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(3):1113-1124.
- [3] SHAH J L, LOO B W J R. Stereotactic ablative radiotherapy for early-stage lung cancer[J]. Semin Radiat Oncol, 2017, 27(3):218-228.
- [4] 范诚诚, 赵路军, 毕楠, 等. 非小细胞肺癌术后放疗相关肺毒性风险因素分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2019, 28(10):735-740.
- [5] GEBERT L F R, MACRAE I J. Regulation of microRNA function in animals[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(1):21-37.
- [6] YANG F, XIONG H, DUAN L, et al. MiR-1246 promotes metastasis and invasion of A549 cells by targeting GSK-3 β -mediated Wnt/ β -catenin pathway[J]. Cancer Res Treat, 2019, 51(4):1420-1429.
- [7] 吴雅莉, 吴文强, 李华兵, 等. 姜黄素通过调控 microRNA-1246 激活 P53 蛋白对膀胱癌 T24 细胞进行放疗增敏的作用机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(3):319-326.
- [8] 游焜, 王大军, 王亮, 等. 微小 RNA-33 对小鼠肝再生的影响及其作用机制[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(6):1079-1081.
- [9] 林晶, 胡旭东, 李向阳, 等. 弹性蛋白酶抑制剂对小鼠 Lewis 肺癌放射性肺损伤保护作用研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2019, 26(2):88-93.
- [10] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin. 2018, 68(6):394-424.
- [11] 冯勤付, 郑苗丽, 伍艳玲. 如何减少非小细胞肺癌放疗中的肺损伤[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2018, 27(7):629-632.
- [12] KHAN A Q, AHMED E I, ELAREER N R, et al. Role of miRNA-regulated cancer stem cells in the pathogenesis of human malignancies[J]. Cells, 2010, 8(8):840.
- [13] 杜萍, 赖月华, 姚德生, 等. 慢病毒介导的 miR-1246 表达下调对宫颈癌细胞系 SiHa 细胞生物学行为的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2018, 7(7):481-486.
- [14] XU Y F, HANNAFON B N, ZHAO Y D, et al. Plasma exosome miR-196a and miR-1246 are potential indicators of localized pancreatic cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(44):77028-77040.
- [15] ZHANG W C, CHIN T M, YANG H, et al. Tumour-initiating cell-specific miR-1246 and miR-1290 expression converge to promote non-small cell lung cancer progression [J]. Nat Commun, 2016, 7(1):11702-11706.
- [16] KIM G, AN H J, LEE M J, et al. Hsa-miR-1246 and hsa-miR-1290 are associated with stemness and invasiveness of non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2016, 91(7):15-22.
- [17] MO L J, SONG M, HUANG Q H, et al. Exosome-packaged miR-1246 contributes to bystander DNA damage by targeting LIG4[J]. Br J Cancer, 2018, 119(4):492-502.
- [18] CHEN F, CHEN X, REN Y, et al. Radiation-induced glucocorticoid receptor promotes CD44⁺ prostate cancer stem cell growth through activation of SGK1-Wnt/ β -catenin signaling[J]. J Mol Med (Berl), 2019, 97(8):1169-1182.
- [19] EMONS G, SPITZNER M, REINEKE S, et al. Chemoradiotherapy resistance in colorectal cancer cells is mediated by Wnt/ β -catenin signaling[J]. Mol Cancer Res, 2017, 15(11):1481-1490.

(下转第 2911 页)

- [6] SU Z F, SUN Z W, ZHANG Y, et al. Regulatory effects of miR-146a/b on the function of endothelial progenitor cells in acute ischemic stroke in mice[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2017, 33(8):369-378.
- [7] LO W Y, PENG C T, WANG H J. MicroRNA-146a-5p mediates high glucose-induced endothelial inflammation via targeting interleukin-1 receptor-associated kinase 1 expression [J]. *Front Physiol*, 2017, 2(8):551.
- [8] LI W D, LI X Q. Endothelial progenitor cells accelerate the resolution of deep vein thrombosis[J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 83:10-16.
- [9] LIANG H, CHEN Y, LI H, et al. MiR-22-3p suppresses endothelial progenitor cell proliferation and migration via inhibiting onecut 1 (OC1)/vascular endothelial growth factor A (VEGFA) signaling pathway and its clinical significance in venous thrombosis[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 2(26):e925482.
- [10] DU B, WANG J, ZANG S, et al. Long non-coding RNA MALAT1 suppresses the proliferation and migration of endothelial progenitor cells in deep vein thrombosis by regulating the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(4):3138-3146.
- [11] PAN J A, TANG Y, YU J Y, et al. MiR-146a attenuates apoptosis and modulates autophagy by targeting TAF9b/P53 pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(9):668.
- [12] AN R, FENG J, XI C, et al. MiR-146a attenuates sepsis-induced myocardial dysfunction by suppressing IRAK1 and TRAF6 via targeting ErbB4 expression[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018:7163057.
- [13] HUANG W, TIAN S S, HANG P Z, et al. Combination of microRNA-21 and microRNA-146a attenuates cardiac dysfunction and apoptosis during acute myocardial infarction in mice[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2016, 5(3):e296.
- [14] FAN X, HE L, DAI Q, et al. Interleukin-1beta augments the angiogenesis of endothelial progenitor cells in an NF-kappaB/CXCR7-dependent manner[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(10):5605-5614.
- [15] KIM J H, KIM J Y, PARK M, et al. NF-kappaB-dependent miR-31/155 biogenesis is essential for TNF-alpha-induced impairment of endothelial progenitor cell function[J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(8):1298-1309.
- [16] LEE K H, JEONG J, WOO J, et al. Globular adiponectin exerts a pro-inflammatory effect via IkappaB/NF-kappaB pathway activation and anti-inflammatory effect by IRAK-1 down-regulation[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(8):762-770.

(收稿日期:2020-12-18 修回日期:2021-03-08)

(上接第 2905 页)

- [20] HUANG Y J, HUANG T H, YADAV V K, et al. Preclinical investigation of ovatodiolide as a potential inhibitor of colon cancer stem cells via downregulating sphere-derived exosomal β -catenin/STAT3/miR-1246 cargoes [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(8):2337-2354.
- [21] 张蕴蕴, 周宪, 吴永忠. 红景天苷调节 Nrf2/ROS 通路增强 U-251MG 的放射敏感性[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(12):1463-1468.
- [22] WU D P, ZHANG J L, WANG J Y, et al. MiR-1246 promotes LPS-induced inflammatory injury in chondrogenic cells ATDC5 by targeting HNF4 γ [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(5):2010-2021.
- [23] CHEN Q, LIN H, DENG X, et al. MiR-1246 promotes anti-apoptotic effect of mini-aA in oxidative stress-induced apoptosis in retinal pigment epithelial cells[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2020, 48(5):682-688.
- [24] FANG Y, GAO F, HAO J, et al. MicroRNA-1246 mediates lipopolysaccharide-induced pulmonary endothelial cell apoptosis and acute lung injury by targeting angiotensin-converting enzyme 2 [J]. *Am J Transl Res*. 2017, 9(3):1287-1296.

(收稿日期:2020-12-25 修回日期:2021-04-16)