

辐射诱导性 miR-34a 的表达对细胞辐射敏感性的影响

程 赢, 和生辉, 刘 聪, 周传丰, 崔建国, 孙 顶, 蔡建明, 李百龙, 高 福*

第二军医大学海军医学系放射医学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨 miR-34a 的表达与细胞、组织辐射敏感性的关系。**方法** 采用 RT-PCR 检测辐射前后不同组织、细胞中 miR-34a 的表达量; 利用流式细胞术检测细胞凋亡率, MTT 法检测细胞活力; 在肿瘤细胞 U87MG 中转染 miR-34a mimics 上调 miR-34a 的表达并检测其细胞活力; 在正常细胞 HEK293 中转染 miR-34a inhibitors 下调 miR-34a 的表达水平并检测其细胞凋亡率。**结果** 照前辐射敏感性高的细胞 miR-34a 表达水平高, 辐射敏感性低的细胞 miR-34a 表达水平低; 照后辐射敏感性高的细胞 miR-34a 表达上调幅度远高于辐射敏感性低的细胞。上调 miR-34a 表达水平使得肿瘤细胞 U87MG 照后细胞活力降低, 下调 miR-34a 表达使得正常细胞 HEK293 照后细胞凋亡率降低。**结论** 细胞辐射敏感性与 miR-34a 的表达水平正相关, 辐射敏感性高的细胞照后 miR-34a 的表达上调幅度更大; 上调 miR-34a 表达水平对肿瘤细胞 U87MG 有明显的辐射增敏作用, 下调 miR-34a 表达对正常细胞 HEK293 有明显的辐射防护作用。

[关键词] miR-34a; 辐射耐受性; 辐射增敏药; 辐射防护

[中图分类号] R 818

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)04-0368-04

Effect of irradiation-induced miR-34a expression on irradiation-sensitivity of cells

CHENG Ying, HE Sheng-hui, LIU Cong, ZHOU Chuan-feng, CUI Jian-guo, SUN Ding, CAI Jian-ming, LI Bai-long, GAO Fu*

Department of Radiation Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship between miR-34a expression and the irradiation-sensitivity of cells and tissues. **Methods** RT-PCR was used to detect the miR-34a expression in different cells and tissues before and after irradiation; flow cytometry was employed to examine the apoptosis of cells and MTT assay was used to observe the cell viability. The U87MG tumor cells were transfected with miR-34a mimics to promote miR-34a expression and the cell viability was observed 24 h later. The HEK293 renal epithelial cells were transfected with miR-34a inhibitors to decrease miR-34a expression and the cells apoptosis was observed 24 h later. **Results** The expression of miR-34a was higher in highly irradiation-sensitive cells than in lowly irradiation-sensitive cells before irradiation; the increase of miR-34a expression was greatly higher in highly irradiation-sensitive cells than in lowly irradiation-sensitive cells 24 h after irradiation. The up-regulation of miR-34a decreased the viability of U87MG tumor cells, and down-regulation of miR-34a decreased the apoptosis of HEK293 cells. **Conclusion** The irradiation-sensitivity of cells is positively associated with miR-34a; cells with high irradiation-sensitivity have a greater up-regulation of miR-34a expression after irradiation. Increased miR-34a expression can noticeably increase the irradiation-sensitivity of U87MG tumor cells and decreased miR-34a expression has a irradiation prevention effect on normal HEK293 cells.

[Key words] miR-34a; radiation tolerance; radiation-sensitizing agents; radiation protection

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4): 368-371]

miRNA 是一类包含 21~25 个核苷酸的内源性非编码的小 RNA, 具有很强的组织特异性。迄今为止, 人类已经发现了约 11 000 种 miRNA, 它们广泛存在于各种动、植物以及病毒中。尽管 miRNA 的具体功能还不是很明确, 但是随着研究的不断深入, 发现 miRNA 与多种肿瘤有着极为密切的关系。而 miR-34a 就是第一个被鉴定出来的辐射诱导性

miRNA^[1-3], miR-34a 是进化中高度保守的 miR-34 家族 (包含 3 个成员: miR-34a、miR-34b、miR-34c) 成员之一, 与肿瘤抑制蛋白 p53 的关系极度密切并且可以特异性靶向 Bcl-2、CDK4 等重要功能分子^[4]。目前有关 miR-34a 促进细胞衰老^[5-6]、诱导肿瘤细胞凋亡^[7-9]等方面的研究较多, 但有关 miR-34a 与电离辐射敏感性的关系及 miR-34a 对肿瘤细胞的

[收稿日期] 2011-04-11

[接受日期] 2011-04-16

[基金项目] 国家自然科学基金(30970679, 31070761). Supported by National Natural Science Foundation of China(30970679, 31070761).

[作者简介] 程 赢, 助理实验师. E-mail: winningbest@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871149, E-mail: gaofu_2002@yahoo.com.cn

辐射增敏作用未见系统报道。因此,本研究首先通过实验论证 miR-34a 的表达与辐射敏感性的关系,进而通过过表达或者抑制表达来探讨调控 miR-34a 表达是否可增强肿瘤细胞辐射敏感性,为 miR-34a 作为肿瘤基因治疗手段应用于肿瘤辐射增敏奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 实验动物为 4 周龄雌性 BALB/c 小鼠,购自中国科学院上海实验动物中心。实验所需细胞系:人脑星形胶质母细胞瘤 U87MG、人肺腺癌细胞株 A549、人肾上皮细胞系 HEK293 由本实验室稳定传代。RPMI 1640 和 DMEM 完全培养液以及胎牛血清均购自 PAA Laboratories; OPTI 无血清培养液购自 Gibco 公司;本室用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养液(PAA Laboratories)培养,常规传代贴壁细胞;用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液培养常规传代悬浮细胞及胸腺、脾脏和肝脏原代细胞。TRIzol 及转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司,microRNA 检测用反转录试剂盒 miScript Reverse Transcription Kit 及 Real-time PCR 试剂盒 miScript SYBR Green PCR system 购自 Qiagen 公司;部分实验也采用了 TaKaRa 公司反转录试剂盒及 Real-time PCR 试剂盒。实验所需 miR-34a 高表达 miRNA 的 mimics 及 inhibitors 购自上海吉玛制药技术有限公司(GenePharma),流式细胞凋亡检测试剂 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)购自 Bipeccom 公司,MTT[溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑]、二甲亚砜(DMSO)及 CCK8 (cell number counting kit)试剂盒购自日本同仁生物公司;其他常规分子生物学及细胞培养试剂由本室常规提供。

1.2 Real-time PCR 检测 miRNA 具体为 TRIzol (Invitrogen)提取总 RNA,采用 miScript Reverse Transcription Kit(Qiagen)反转录为 cDNA,进而应用 miScript SYBR Green PCR system (Qiagen) 在 Rotorgene 3000 series PCR machine (Corbett Research)上进行 PCR 反应,最后由 Rotorgene 软件进行 miRNA 定量分析,以上实验采用 6 个小鼠样本 3 次重复体系并以 U6B、U6 或 GAPDH 为内参。

1.3 miR-34a mimics 及 inhibitors 的转染 利用 Lipofectamine 2000 试剂,按照说明书操作转染目标 miR-34a mimics 及 inhibitors。主要步骤为:转染前 8~12 h 铺板,过夜待合适浓度后,将待转染的 miR-34a 与脂质体 Lipofectamine 2000 分别用 OPTI 无

血清培养液稀释并按一定比例混合,室温作用 15~30 min 后加入待转染细胞,置 37℃、5% CO₂ 培养 6~8 h 后换液;必要时 24 h 后重复转染 1 次;48 h 后收细胞进行下一步实验。

1.4 细胞凋亡检测 收集各种处理组的细胞,用 Annexin V-FITC (BIPEC) 标记 15 min 后,用 PI (1 μg/ml) 标记 5 min,流式细胞术检测细胞凋亡情况。

1.5 细胞增殖的检测 MTT 法检测细胞活力:对不同处理及转染的细胞,用含 EDTA 的胰酶小心将细胞消化下来,按每孔 1×10³个细胞接种于 96 孔平底培养板,各设 3 个复孔。分别再培养 12、24、48、72 h。培养结束前 4 h 时每孔(100 μl)加入 10 μl MTT(5 mg/ml),37℃继续孵育。结束时小心将培养上清吸出,加入 100 μl/孔 DMSO,37℃孵育 10 min 溶解细胞内的甲臞(formazan),用酶标仪(Biorad M-550)测定 570 nm 波长处的光密度(D)值。

1.6 照射条件 ⁶⁰Co γ 射线全身照射小鼠或者细胞,照射剂量 8 Gy,剂量率 0.8 Gy/min。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 12.0 统计软件,采用 *t* 检验比较组间差异。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 miR-34a 与不同细胞辐射敏感性的关系 结果表明:在未经照射条件下,在正常细胞 HEK293 中检测到的 miR-34a 的表达水平最高,肿瘤细胞 U87MG 中检测到的 miR-34a 表达水平最低,而肿瘤细胞 A549 中 miR-34a 的表达水平介于两者之间(图 1A);接受照射后,3 种细胞的 miR-34a 表达水平均出现明显上调,其中 HEK293 上调幅度远高于 U87MG,A549 上调幅度介于两者之间(图 1B)。

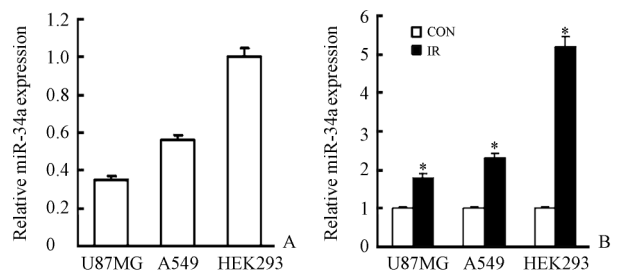


图 1 miR-34a 与不同细胞辐射敏感性的关系

Fig 1 Relationship between miR-34a and irradiation sensitivity of different cells

A: The expression of miR-34a in U87MG, A549 and HEK293 cells. B: The levels of miR-34a in U87MG, A549 and HEK293 cells before and after irradiation. The level of miR-34a in un-irradiated cells was regarded as 1.0. Data show the relative miR-34a expression level. n=6, $\bar{x} \pm s$. * *P*<0.05 vs CON. CON: Control. IR: Irradiated (8 Gy, dose rate 0.8 Gy/min)

2.2 miR-34a 与不同组织辐射敏感性的关系 结果表明:与照前相比较,照后 BALB/c 小鼠胸腺、脾脏及肝脏中 miR-34a 的表达均出现不同程度上调,其中胸腺上调最大,脾脏次之,肝脏上调最小(图 2A)。采用流式细胞术检测对照组与照射组照后 24

h 3 种组织的细胞凋亡情况发现,与对照组比较,照射组胸腺细胞凋亡率最高,肝脏凋亡率最低,脾脏介于二者之间(图 2B)。MTT 检测细胞活力发现照后肝脏细胞的活力最强,胸腺细胞最弱,脾脏细胞居中(图 2C)。

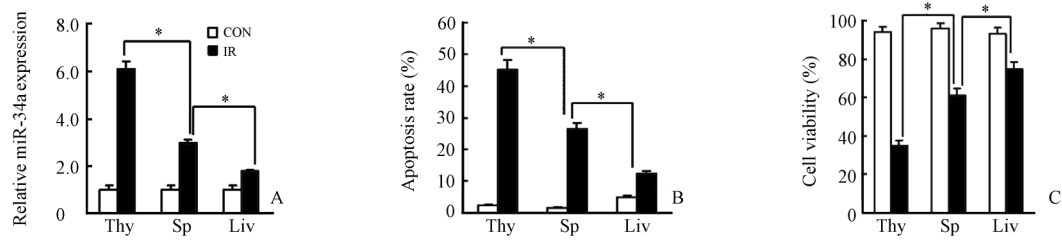


图 2 miR-34a 与不同组织辐射敏感性的关系

Fig 2 Relationship between miR-34a and irradiation sensitivity of different tissues

A: The expression of miR-34a in the thymus(Thy), spleen(Sp) and liver(Liv) before and after irradiation. The level of miR-34a in un-irradiated cells was regarded as 1.0. Data show the relative miR-34a expression level. B: The apoptosis rates of thymus, spleen and liver cells before and after irradiation. C: The cell viability of thymus, spleen and liver before and after irradiation. CON: Control. IR: Irradiated (8 Gy, dose rate 0.8 Gy/min). $n=6$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$

2.3 上调 miR-34a 表达对肿瘤细胞的辐射增敏作用 在肿瘤细胞 U87MG 中转染目标 miR-34a mimics 24 h 后,检测发现转染后的 U87MG 细胞 miR-34a 表达水平与 NC mimics 组相比有明显的上调(图 3A);通过细胞活力检测发现,与未照射组相比,照射后 NC mimics 组和 miR-34a mimics 组细胞活力都有明显下降,而 miR-34a mimics 组比 NC mimics 组细胞活力要下降得更多(图 3B)。

用 在正常细胞 HEK293 中转染目标 miR-34a inhibitors 24 h 后发现, Anti-miR-34a 组中 miR-34a 的表达比 Anti-NC 组有一定程度的下调(图 4A)。通过流式检测细胞凋亡情况发现,与空白对照组比 Anti-34a 组和 Anti-NC 组细胞凋亡率都有很大的提高,但是照后 Anti-34a 组比 Anti-NC 组细胞凋亡率增加的要小,并且有明显的统计学差异(图 4B)。

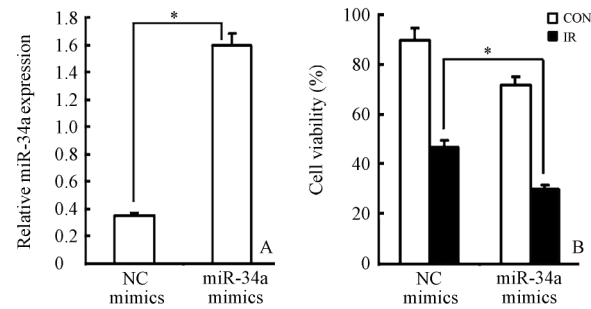


图 3 上调 miR-34a 表达对肿瘤细胞的辐射增敏作用

Fig 3 Up-regulation of miR-34a decreases viability of U87MG cells after irradiation

A: The expression of miR-34a in the U87MG cells transfected with miR-34a mimics was much higher than that in the U87MG cells transfected with NC mimics. Data show the relative miR-34a expression level. B: The cell viability of the U87MG cells transfected with miR-34a mimics was much lower than the U87MG cells transfected with NC mimics before and after irradiation. CON: Control. IR: Irradiated (8 Gy, dose rate 0.8 Gy/min). $n=6$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$. NC: Nonspecific control

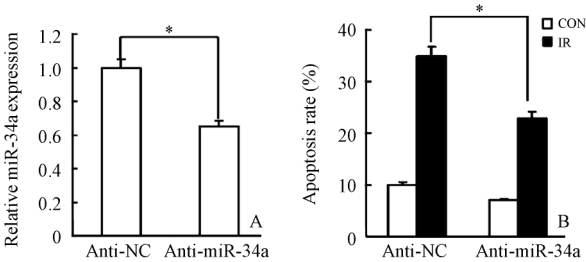


图 4 下调 miR-34a 表达对正常细胞的辐射防护作用

Fig 4 Down-regulation of miR-34a decreased apoptosis of HEK293 cells

A: The expression of miR-34a in the HEK293 cells transfected with anti-NC was much higher than that in the HEK293 cells transfected with anti-miR-34a. Data show the relative miR-34a expression level. B: The apoptosis rate of the HEK293 cells transfected with anti-NC was much higher than that of the HEK293 cells transfected with anti-miR34a before and after irradiation. CON: Control. IR: Irradiated (8 Gy, dose rate 0.8 Gy/min). $n=6$, $\bar{x}\pm s$. * $P<0.05$. NC: Nonspecific control

3 讨论

2.4 下调 miR-34a 表达对正常细胞的辐射防护作用 miR-34a 与肿瘤抑制蛋白 p53 之间存在着正反

馈调节关系^[10-11],而且可以特异性靶向 Bcl-2、CDK4 等重要功能分子,在细胞周期阻滞、促进细胞衰老、诱导细胞凋亡及阻止细胞迁移等方面的研究^[10]较多,但作为第一个被鉴定出来的辐射诱导性 miRNA,miR-34a 在细胞、组织对电离辐射敏感性方面及 miR-34a 在辐射增敏与辐射防护方面的研究还没有系统的报道。

本研究发现,未经照射条件下,肿瘤细胞 A549 中 miR-34a 表达水平高于 U87MG 细胞,低于正常细胞 HEK293,这 3 种细胞中 miR-34a 表达水平从高到低的排列顺序与这 3 种细胞的辐射敏感性从高到低的排列顺序完全一致,这就提示 miR-34a 表达水平的高低与细胞本身的辐射敏感性存在正相关。而在照后,正常细胞 HEK293 的 miR-34a 表达水平上调幅度最大,U87MG 细胞上调幅度最小,A549 细胞介于二者之间,这说明辐射能够诱导辐射敏感性高的细胞表达更多的 miR-34a。这一点在 BALB/c 小鼠组织实验中得到了印证,照后胸腺细胞表达 miR-34a 最多,肝脏细胞表达最少,脾脏居于两者之间,这个结果与三者间的辐射敏感性恰好一致。细胞凋亡和细胞活力检测则说明了高表达的 miR-34a 更能降低细胞活力,诱导细胞凋亡,这就提示 miR-34a 很可能在辐射增敏和辐射防护方面发挥作用。

本研究进一步通过在肿瘤细胞 U87MG 中转染目标 miR-34a mimics 来成功上调 U87MG 细胞中 miR-34a 表达水平,经过照射后,与转染 NC mimics 不影响 miR-34a 表达组相比较,miR-34a mimics 组肿瘤细胞 U87MG 的存活率明显降低,照前上调肿瘤细胞 miR-34a 表达水平能够显著降低照后肿瘤细胞活力,这预示 miR-34a 具有辐射增敏作用。同时在正常细胞 HEK293 中转染目标 miR-34a inhibitors 来抑制 miR-34a 的表达,经过照射,与转染 anti-NC 不影响 miR-34a 表达水平组相比较,anti-miR-34a 组正常细胞在照后的凋亡率明显降低,这表明照前下调正常细胞的 miR-34a 表达水平能够降低照后细胞的凋亡率,起到辐射防护的作用。

放疗是目前肿瘤治疗的重要手段之一,但是大部分肿瘤对辐射不敏感,而且放疗不但会杀伤肿瘤细胞,也会对正常细胞产生损伤。因此,在放疗中,如何利用各种手段提高肿瘤的辐射敏感性,同时尽可能减轻对正常组织的辐射损伤,是肿瘤治疗领域亟待解决的重要难题之一。目前临床上还没有令人满意的放疗增敏药物。本研究发现上调肿瘤细胞的

miR-34a 表达水平能够增强肿瘤细胞的辐射敏感性,而下调正常细胞的 miR-34a 表达水平能够对细胞起到辐射防护的作用。这些结果提示 miR-34a 作为基因水平肿瘤治疗的辐射增敏剂的可能,但是有关 miR-34a 辐射增敏作用的机制还有待进一步探讨。

[参考文献]

- [1] He L, He X, Lim L P, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network [J]. *Nature*, 2007, 447: 1130-1134.
- [2] Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskavits N, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2007, 26: 731-743.
- [3] Chang T C, Wentzel E A, Kent O A, Ramachandran K, Mullen-dore M, Lee K H, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2007, 26: 745-752.
- [4] Wei C L, Wu Q, Vega V B, Chiu K P, Ng P, Zhang T, et al. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome [J]. *Cell*, 2006, 124: 207-219.
- [5] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15472-15477.
- [6] Kumamoto K, Spillare E A, Fujita K, Horikawa I, Yamashita T, Appella E, et al. Nutlin-3a activates p53 to both down-regulate inhibitor of growth 2 and up-regulate miR-34a, miR-34b, and miR-34c expression, and induce senescence [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 3193-3203.
- [7] Rokhlin O W, Scheinker V S, Taghiyev A F, Bumcrot D, Glover R A, Cohen M B. MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7: 1288-1296.
- [8] Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein C J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13421-13426.
- [9] Welch C, Chen Y, Stallings R L. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 5017-5022.
- [10] Yan D, Zhou X, Chen X, Hu D N, Dong X D, Wang J, et al. MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 1559-1565.
- [11] 娄文加,陈 青,刘 立,钱 程. miR-34 家族——肿瘤抑制蛋白 p53 高度相关的 microRNA [J]. *遗传*, 2010, 32: 423-430.

[本文编辑] 贾泽军