

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.22.002

上调 miR-216a-5p 通过靶向双特异性磷酸酶 10 抑制胃癌细胞自噬并增强放射敏感性*

尹建浩^{1#} 陈威^{2#} 王琼² 袁达伟² 朱琨² 李康² 线胤生² 张勇² 许刚^{2Δ}

(1 陕西省肿瘤医院 陕西 西安 710061; 2 西安交通大学第一附属医院肿瘤外科 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探究 miR-216a-5p 对胃癌细胞自噬和放射敏感性的调控机制及其对双特异性磷酸酶 10(DUSP10)的调控作用。**方法:**采用直线加速器 6-MV X 射线照射 SGC-7901 细胞, 剂量率为 0.8Gy/min, 总剂量为 8Gy。用 Lipofectamine 2000 试剂将 miR-216a-5p mimic、NC mimic、pcDNA DUSP10 或 pcDNA NC 转染到 SGC-7901 细胞中。转染后, 将细胞分为 miR-216a-5p mimic 组和 NC mimic 组, 每组又分为 0Gy 和 8Gy 两个亚组。在拯救实验中, 将细胞分为 miR-216a-5p mimic+pcDNA DUSP10 组和 miR-216a-5p mimic+pcDNA NC 组。通过 qRT-PCR 检测 miR-216a-5p 和 DUSP10 mRNA 水平。通过 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)掺入实验和集落形成测定检测细胞增殖。通过流式细胞仪评估细胞凋亡。通过 Western blot 检测 DUSP10、Bax、Bad、Bcl-2、LC3 和 p62 的蛋白表达。通过免疫荧光法检测 γ H2AX 的表达, 用于评估细胞中的 DNA 双链断裂(DSB)。通过荧光素酶报告基因检测 miR-216a-5p 和 DUSP10 的靶向关系。通过 GFP-mRFP-LC3 检测自噬体。**结果:**与 8Gy NC-mimic 组相比, 8Gy miR-216a-5p-mimic 组的集落数量、EdU 阳性率和 Bcl-2 蛋白表达水平降低, 而 γ H2AX 阳性率、细胞凋亡率和 Bax 和 Bad 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。与 8Gy NC-mimic 组相比, 8Gy miR-216a-5p-mimic 组的自噬体数量和 LC3II 蛋白表达水平降低, 而 p62 蛋白表达水平升高($P<0.001$)。与 miR-216a-5p-mimic 共培养后, 与 DUSP10-3'-UTR-MUT 组相比, DUSP10-3'-UTR-WT 的相对荧光素酶活性显著降低($P<0.001$)。与 NC-mimic 组相比, miR-216a-5p-mimic 组的 DUSP10 mRNA 和蛋白表达水平均降低($P<0.001$)。与 miR-216a-5p mimic+pcDNA NC 组相比, miR-216a-5p mimic+pcDNA DUSP10 组的集落数量和自噬体数量升高, 而细胞凋亡率降低($P<0.001$)。**结论:**miR-216a-5p 通过抑制 DUSP10 来抑制细胞增殖、增加放射诱导的细胞凋亡并抑制放射诱导的自噬, 从而增强胃癌细胞的放射敏感性。

关键词:胃癌; miR-216a-5p; 双特异性磷酸酶 10; 自噬; 放射敏感性

中图分类号:R-33; R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)22-4206-09

Up-regulation of miR-216a-5p Inhibits Autophagy and Enhances Radiosensitivity in Gastric Cancer Cell by Targeting Dual-Specificity Phosphatase 10*

YIN Jian-hao^{1#}, CHEN Wei^{2#}, WANG Qiong², YUAN Da-wei²,ZHU Kun², LI Kang², XIAN Yin-sheng², ZHANG Yong², XU Gang^{2Δ}

(1 Department of General Surgery, Shaanxi Provincial Cancer Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 Department of Surgical Oncology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the regulatory mechanism of miR-216a-5p on autophagy and radiosensitivity of gastric cancer cell and its regulatory effect on dual-specificity phosphatase 10 (DUSP10). **Method:** SGC-7901 cells were irradiated with linear accelerator 6-MV X-ray at a dose rate of 0.8 Gy/min. The total dose is 8Gy. miR-216a-5p-mimic, NC-mimic, pcDNA-DUSP10 or pcDNA-NC were transfected into SGC-7901 cells with Lipofectamine 2000 reagent. After transfection, the cells were divided into miR-216a-5p-mimic group and NC-mimic group, and each group was divided into two subgroups, 0Gy and 8Gy. In the rescue experiment, the cells were divided into miR-216a-5p mimic+pcDNA DUSP10 group and miR-216a-5p mimic+pcDNA NC group. The mRNA levels of miR-216a-5p and DUSP10 were detected by qRT-PCR. Cell proliferation was detected by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation test and colony formation assay. The apoptosis was assessed by flow cytometry. The protein expressions of DUSP10, Bax, Bad, Bcl-2, LC3 and p62 were detected by Western blot. The expression of γ H2AX was detected by immunofluorescence method to evaluate DNA double-strand break (DSB) in cells. The targeting relationship between miR-216a-5p and DUSP10 was detected by

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81372280); 陕西省自然科学基金研究计划项目(2019JQ-960)

为共同第一作者

作者简介: 尹建浩(1989-), 男, 博士研究生, 主要研究方向: 胃肠道肿瘤, E-mail: yin_jianhao@126.com, 电话: 15529521705;

陈威(1989-), 男, 博士研究生, 主要研究方向: 胃肠道肿瘤, E-mail: chen.wei1989@stu.xjtu.edu.cn, 电话: 13228040526

Δ 通讯作者: 许刚(1980-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 胃肠道肿瘤, E-mail: Xugang2919@126.com, 电话: 15829030108

(收稿日期: 2022-04-26 接受日期: 2022-05-22)

luciferase reporter gene. Autophagosomes were detected by GFP-mRFP-LC3. **Results:** Compared with the 8Gy NC-mimic group, the number of colonies, EdU positive rate and Bcl-2 protein expression level in the 8Gy miR-216a-5p-mimic group decreased, while the positive rate of γ H2AX, the rate of apoptosis and the expression levels of Bax and Bad proteins increased ($P<0.01$). Compared with the 8Gy NC-mimic group, the number of autophagosomes and the expression level of LC3II protein in the 8Gy miR-216a-5p-mimic group decreased, while the expression level of p62 protein increased ($P<0.001$). After co-culture with miR-216a-5p-mimic, the relative luciferase activity of DUSP10-3'-UTR-WT was significantly reduced compared with the DUSP10-3'-UTR-MUT group ($P<0.001$). Compared with the NC-mimic group, the DUSP10 mRNA and protein expression levels in the miR-216a-5p-mimic group were lower ($P<0.001$). Compared with the miR-216a-5p mimic+pcDNA NC group, the number of colonies and autophagosomes in the miR-216a-5p mimic+pcDNA DUSP10 group increased, while the apoptosis rate was decreased ($P<0.001$). **Conclusion:** miR-216a-5p inhibits cell proliferation, increases radiation-induced apoptosis and inhibits radiation-induced autophagy by inhibiting DUSP10, thereby enhancing the radiosensitivity of gastric cancer cells.

Key words: Gastric cancer; miR-216a-5p; Dual-specificity phosphatase 10; Autophagy; Radiosensitivity

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)22-4206-09

前言

手术切除是胃癌(gastric cancer, GC)的主要治疗方法,但对于不能耐受或不愿接受手术的胃癌晚期患者而言,放疗是最有效的治疗方法之一。然而,肿瘤的抗放射性降低了放疗的治疗效果,因此,探索胃癌放射抗性的潜在分子机制并确定增加细胞放射敏感性的可能策略可改善患者临床结局^[1]。microRNA(miRNA)在转录后调控中发挥关键作用,miRNA充当基因表达的负调节剂,其可以降解 mRNA 或抑制其翻译。miRNA 的功能障碍与多种疾病(包括癌症)的发展有关^[2]。也有报道说,miRNA 可以通过影响 DNA 损伤修复、自噬、凋亡等来调节肿瘤的放射敏感性^[3]。据报道,miR-29b 可以通过影响宫颈鳞癌的细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)信号传导来调节放射敏感性^[4]。miR-203 的低表达可能引起头颈部鳞状细胞癌的固有放射抗性^[5]。miR-23b 水平降低会提高 ATG12 和自噬水平,从而提高胰腺癌细胞的放射抗性^[6]。现有研究证实,miR-216a 在胃癌中异常表达,并且参与调节自噬^[7]。然而,目前尚不清楚 miR-216a 的异常表达是否调节胃癌细胞的放射敏感性。因此,本研究的目的是揭示 miR-216a-5p 对胃癌细胞放射敏感性的调节作用,并分析其是否通过调控靶基因和自噬来调节放射敏感性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胃癌细胞系 SGC-7901 购自美国 ATCC。miR-216a-5p mimic 及阴性对照(NC mimic)、过表达 DUSP10 的 pcDNA3.1 载体(PcDNA DUSP10)及阴性对照(PcDNA NC)均由上海吉玛制药技术有限公司合成。RPMI-1640 培养基购自美国 GIBCO 公司。Trizol 购自美国 Invitrogen 公司。One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit 和 PrimeScript RT Master Mix Kit 购自日本 TaKaRa 公司。Universal SYBR Green Master Mix 购自瑞士 Roche 公司。Lipofectamine 2000 试剂购自美国 Invitrogen 公司。EdU 检测试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司。PI/Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD Pharmingen 公司。RIPA 缓冲液购自碧云天生物技术有限公司。增

强型 BCA 蛋白质检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。兔抗 DUSP10、Bax、Bad、Bcl-2、LC3、p62 和 GAPDH 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。增强型 ECL 试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。兔抗 γ H2AX 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。Alexa 488/555 Fluor 二抗购自碧云天生物技术有限公司。pmirGLO 双荧光素酶载体购自上海吉玛制药技术有限公司。双荧光素酶报告基因分析系统购自美国 Promega 公司。GFP-mRFP-LC3 慢病毒购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901 细胞在 37℃、5%CO₂ 的潮湿培养箱内于 RPMI-1640 培养基中培养,培养基中含有 10%的胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素。

1.2.2 照射方法 采用直线加速器 6-MV X 射线照射细胞,剂量率为 0.8 Gy/min。总剂量为 8Gy。照射野为 15 cm×15 cm,源靶距为 100 cm。

1.2.3 qRT-PCR 检测基因表达水平 根据试剂说明书,使用 Trizol 从细胞中提取总 RNA。使用 NanoDrop 分光光度计检测 RNA 的质量和浓度。使用 One Step PrimeScript miRNA cDNA Synthesis Kit 和 PrimeScript RT Master Mix Kit 进行 miRNA 和 mRNA 逆转录。使用 Universal SYBR Green Master Mix 和 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System 进行 RT-PCR。将 miRNA 和 mRNA 的相对表达量标准化为 U6 和 β -actin。引物序列如下:miR-216a-5p:正向,5'-GGAAGTCCGATCAACTGAGCC-3';反向,5'-TGAAGTCCGATCAACTGAGCC-3';U6:正向,5'-GCGGGTACAATTCATCATAAT-3';反向,5'-CGAATGTCTACACGTTCTACGCAT-3';DUSP10:正向,5'-AGGAGATGACAAGATGCGGGA-3';反向,5'-GAGCCTTCATTTCCTTG-GCTTGGGT-3'; β -actin:正向,5'-ACCCTTTGGCTCCCCTTCTGGA-3';反向,5'-GAACAGCCCTTTGGACCCCT-3'。

1.2.4 细胞转染及分组 根据试剂说明书,用 Lipofectamine 2000 试剂将 miR-216a-5p mimic、NC mimic、pcDNA DUSP10 或 pcDNA NC 转染到 SGC-7901 细胞中。转染后,将细胞分为 miR-216a-5p mimic 组和 NC mimic 组,每组又分为 0Gy 和 8Gy 两个亚组。在拯救实验中,将细胞分为 miR-216a-5p mim-

ic+pcDNA DUSP10 组和 miR-216a-5p mimic+pcDNA NC 组。

1.2.5 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)掺入实验 EdU 检测试剂盒用于评估细胞增殖。首先将细胞以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种到 24 孔板中,并培养 24 h。接下来,用 6-MV X 射线以 8Gy 的剂量照射细胞。然后将细胞在含有 $50 \mu\text{M}$ EdU 的培养基中培养 6 h,并按照试剂说明书进行处理。在荧光显微镜下获得图像,计算细胞中 EdU 阳性细胞的比例。

1.2.6 集落形成测定 将 SGC-7901 细胞接种到 6 孔板中(500 细胞/孔),并在 37°C 下孵育过夜。第二天,以 0Gy 和 8Gy 剂量照射细胞。然后培养细胞 2 周,每周更换培养基。将细胞用 PBS 洗涤两次,在 4°C 下用甲醇固定 30 min,并在室温下用结晶紫染料(0.1% w/v)染色 1 h。

1.2.7 细胞凋亡检测 首先将细胞以每孔 1×10^5 细胞的密度接种到 6 孔板中,并以 0Gy 和 8Gy 剂量照射细胞。收集细胞,并根据试剂说明书的规程用 PI/Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。使用流式细胞仪评估细胞凋亡率。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达水平 使用 RIPA 缓冲液将细胞裂解并分离出总蛋白。通过增强型 BCA 蛋白质检测试剂盒对蛋白进行定量。然后在 10%SDS-PAGE 上分离等量的蛋白质并转移到 PVDF 膜上。将膜用 5%脱脂奶粉封闭 2 h,然后与兔抗 DUSP10、Bax、Bad、Bcl-2、LC3、p62 和 GAPDH 单克隆抗体(1:2000)一抗于 4°C 孵育过夜。第二天,将膜与相应二抗在室温下孵育 2 h。通过增强型 ECL 试剂盒显影。GAPDH 作为内参蛋白。

1.2.9 免疫荧光实验 免疫荧光法检测 γH2AX 用于评估细胞中的 DNA 双链断裂(DSB)。将细胞接种在玻璃皿上,并以 0Gy 和 8Gy 剂量照射细胞,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤,并在室温下用 4%多聚甲醛固定 20 min。在 4°C 下用兔抗 γH2AX 单克隆抗体(1:200)将细胞染色过夜,然后在室温下用 Alexa 488/555 Fluor 二抗染色 1.5 h。用 $2 \mu\text{g/mL}$ DAPI 对细胞核复染。

1.2.10 荧光素酶报告基因检测 使用生物信息学工具(TargetScan)预测 miR-216a-5p 的潜在靶 mRNA,筛选出 DUSP10 的 3'-UTR 端可能是 miR-216a-5p 的靶向结合位点。委托上海吉玛制药技术有限公司将 DUSP10 的野生型或突变型 3'-UTRs 克隆到 pmirGLO 双荧光素酶载体中构建 DUSP10-3'-UTR-WT 和 DUSP10-3'-UTR-MUT 载体。序列如下:DUSP10-3'-UTR-WT: ...AACUUUUGAUGCCAUUGAGAUUC..., DUSP10-3'-UTR-MUT:AACUUUUGAUGCCAUACUCUAAC。将SGC-7901 细胞与 miR-216a-5p mimic 或 NC-mimic 以及 DUSP 10-3'-UTR-WT 或 DUSP10-3'-UTR-MUT 共转染。转染 24 h 后,使用双荧光素酶报告基因分析系统分析。

1.2.11 GFP-mRFP-LC3 自噬体检测 使用 GFP-mRFP-LC3 慢病毒进行自噬体检测。按照试剂说明书,用 GFP-mRFP-LC3 慢病毒感染 SGC-7901 细胞。然后将细胞培养在玻璃皿上,用 0Gy 和 8Gy 剂量照射细胞。在共聚焦显微镜下对自噬体进行定位和定量。

1.3 统计学分析

SPSS21.0 软件用于统计分析。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。使用 t 检验进行两组间比较,使用单因素方差分析及 LSD

事后检验进行多组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-216a-5p 抑制胃癌细胞照射后的增殖

与 0Gy 组相比,8Gy 组的 SGC-7901 细胞中 miR-216a-5p 的表达水平降低($P < 0.001$,图 1A)。转染 miR-216a-5p-mimic 后,与 Control 组比较,miR-216a-5p-mimic 组的 miR-216a-5p 的表达水平升高($P < 0.001$,图 1B)。集落形成实验中,与 0Gy NC-mimic 组相比,8Gy NC-mimic 组的集落数量降低($P < 0.001$)。与 8Gy NC-mimic 组相比,8Gy miR-216a-5p-mimic 组的集落数量进一步降低($P < 0.01$,图 1C 和 D)。EdU 染色中,与 NC-mimic 组相比,miR-216a-5p-mimic 组的 EdU 阳性率降低($P < 0.001$,图 1E 和 F)。 γH2AX 免疫荧光染色中,与 NC-mimic 组相比,miR-216a-5p-mimic 组的 γH2AX 阳性率升高($P < 0.001$,图 1G 和 H)。

2.2 miR-216a-5p 促进胃癌细胞照射后的凋亡

流式细胞术检测结果显示,与 0Gy NC-mimic 组相比,8Gy NC-mimic 组的细胞凋亡率升高($P < 0.05$)。与 8Gy NC-mimic 组相比,8Gy miR-216a-5p-mimic 组的细胞凋亡率进一步升高($P < 0.001$,图 2A 和 B)。Western blot 检测显示,与 0Gy NC-mimic 组相比,8Gy NC-mimic 组的 Bax 和 Bad 蛋白表达水平升高,Bcl-2 降低($P < 0.001$)。与 8Gy NC-mimic 组相比,8Gy miR-216a-5p-mimic 组的 Bax 和 Bad 蛋白表达水平进一步升高,Bcl-2 降低($P < 0.001$,图 2C-F)。

2.3 miR-216a-5p 抑制胃癌细胞照射后的自噬

GFP-mRFP-LC3 检测结果显示,与 0Gy NC-mimic 组相比,8Gy+NC-mimic 组的自噬体数量升高($P < 0.05$)。与 8Gy+NC-mimic 组相比,8Gy+miR-216a-5p-mimic 组的自噬体数量降低($P < 0.001$,图 3A-B)。Western blot 检测结果显示,与 0Gy NC-mimic 组相比,8Gy NC-mimic 组的 LC3II 蛋白表达水平升高,p62 蛋白表达水平降低($P < 0.001$)。与 8Gy NC-mimic 组相比,8Gy miR-216a-5p-mimic 组的 LC3II 蛋白表达水平降低,p62 蛋白表达水平升高($P < 0.001$,图 3C-E)。

2.4 DUSP10 是胃癌细胞中 miR-216a-5p 的直接靶标

使用生物信息学工具(TargetScan)预测 miR-216a-5p 的潜在靶 mRNA。结果显示,DUSP10 是 miR-216a-5p 的潜在靶标(图 4A)。荧光素酶报告基因检测显示,与 miR-216a-5p-mimic 共培养后,与 DUSP10-3'-UTR-MUT 组相比,DUSP10-3'-UTR-WT 的相对荧光素酶活性显著降低($P < 0.001$,图 4B)。与 NC-mimic 组相比,miR-216a-5p-mimic 组的 DUSP10 mRNA 和蛋白表达水平均降低($P < 0.001$,图 4C 和 D)。

2.5 照射对胃癌细胞中 DUSP10 表达的影响

与 0Gy 组相比,8Gy 组的 DUSP10 mRNA 和蛋白表达水平均升高($P < 0.001$,图 5A-B)。为了进一步揭示 DUSP10 的生物学作用,本研究构建了过表达 DUSP10 的 pcDNA 质粒(pcDNA DUSP10)。转染 pcDNA DUSP10 后,与对照组相比,pcDNA DUSP10 组的 DUSP10 mRNA 和蛋白表达水平均升高($P < 0.001$,图 5C-D)。

2.6 DUSP10 介导 miR-216a-5p 对胃癌细胞照射后的增殖、凋亡和自噬

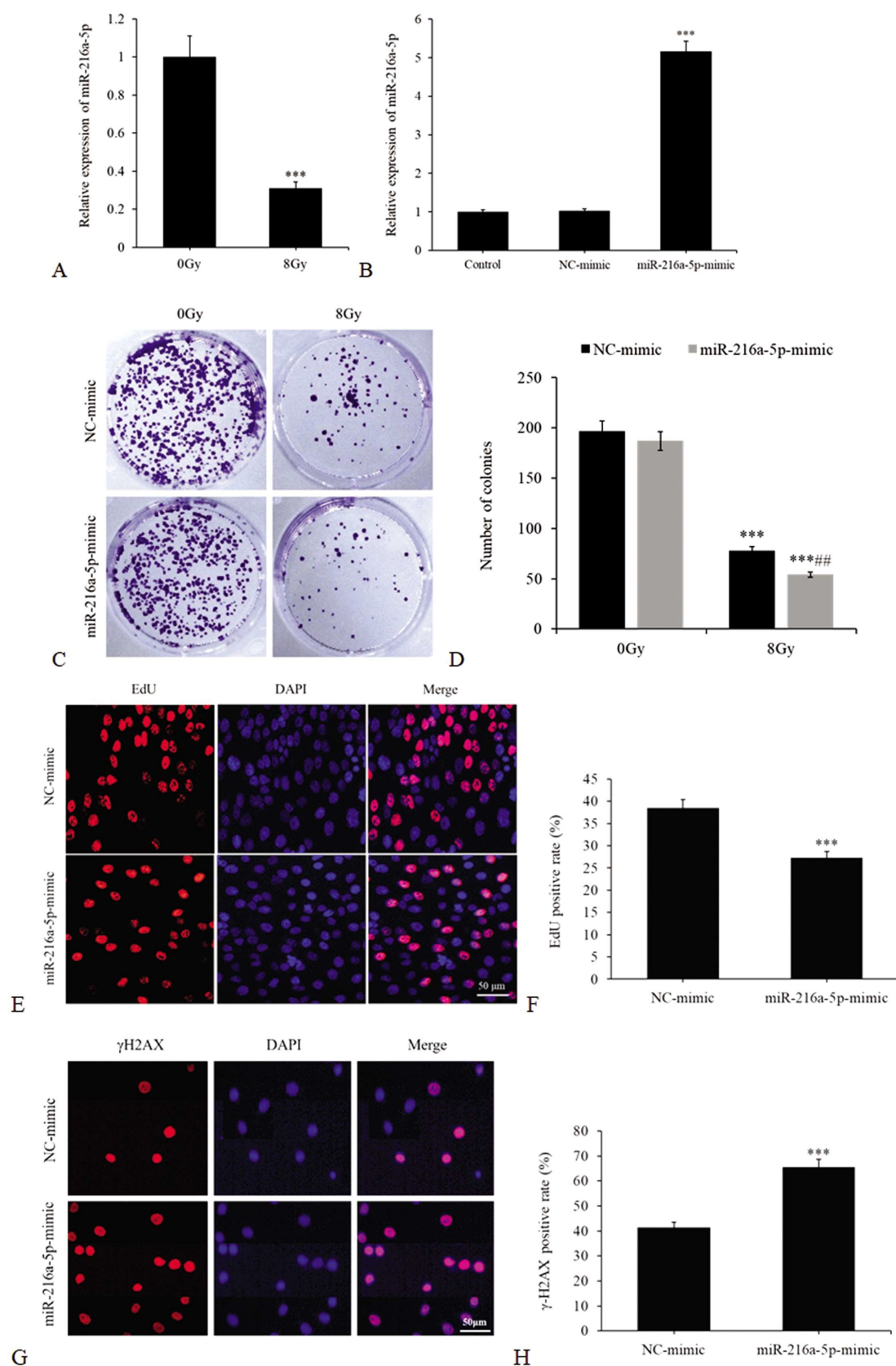


图1 miR-216a-5p抑制胃癌细胞照射后的增殖

Fig. 1 miR-216a-5p inhibits the proliferation of gastric cancer cells after irradiation

Note: A: The effect of 8Gy irradiation on miR-216a-5p, Compared with 0Gy, *** P <0.001; B: The transfection efficiency of miR-216a-5p-mimic, Compared with Control, *** P <0.001; C and D: Colony formation experiment to evaluate the cell proliferation after miR-216a-5p mimic transfection and 8Gy dose irradiation, *** P <0.001 Compared with 0Gy NC-mimic, *** P <0.001, Compared with 8Gy NC-mimic, $^{###}P$ <0.01; E and F: EdU staining after 8Gy dose irradiation, Compared with NC-mimic, *** P <0.001; G and H: γ H2AX immunofluorescence staining after 8Gy dose irradiation, Compared with NC-mimic, *** P <0.001.

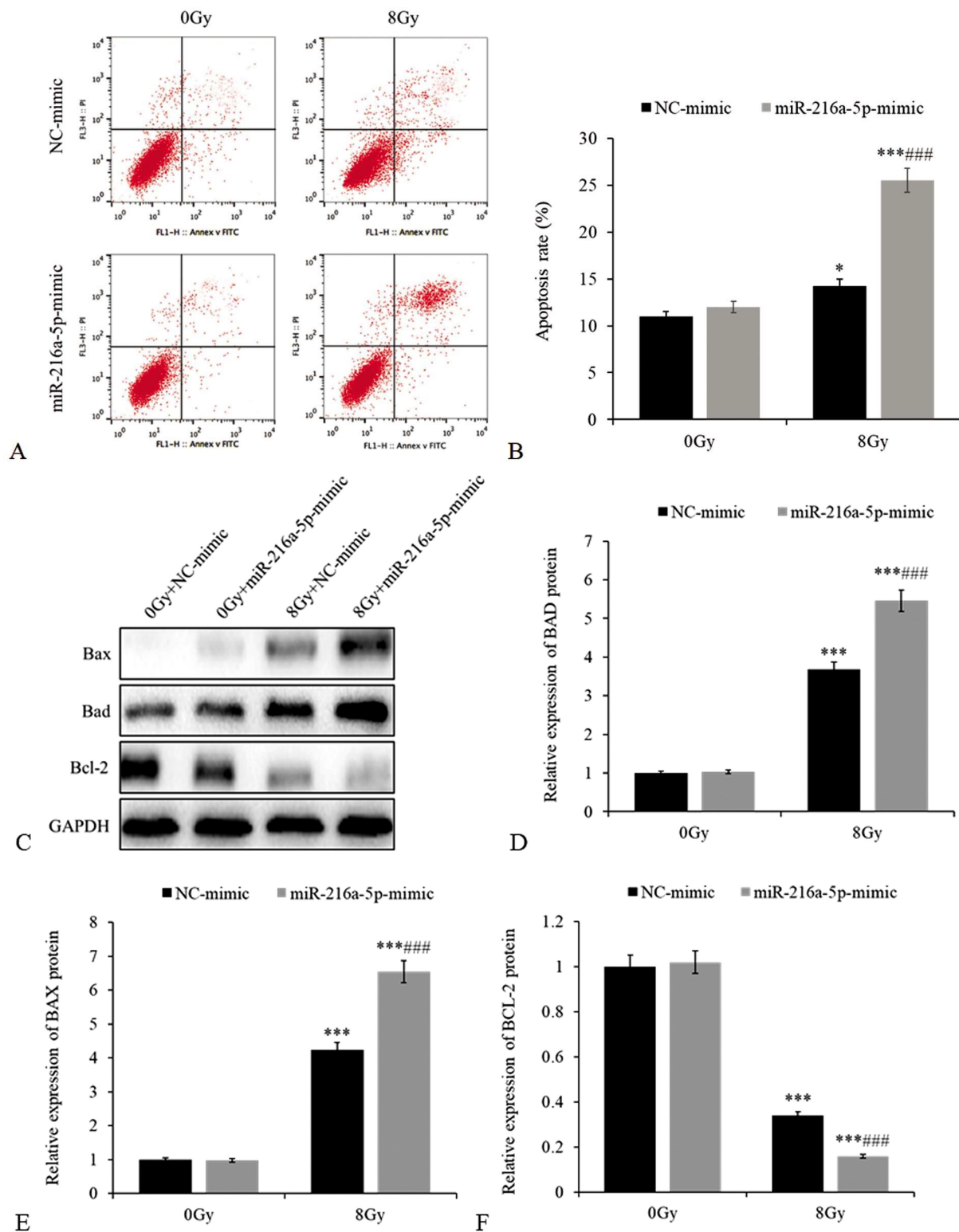


图2 miR-216a-5p 促进胃癌细胞照射后的凋亡

Fig. 2 miR-216a-5p promotes apoptosis of gastric cancer cells after irradiation

Note: A and B: Flow cytometry to detect cell apoptosis after miR-216a-5p mimic transfection and 8Gy dose irradiation; CF: Western blot to detect protein expression of Bax, Bad and Bcl-2 after miR-216a-5p-mimic transfection and 8Gy dose irradiation; Compared with 0Gy NC-mimic, * $P<0.05$, *** $P<0.001$; Compared with 8Gy NC-mimic, ### $P<0.001$.

集落形成实验结果显示,与 miR-216a-5p mimic+pcDNA NC 组相比,miR-216a-5p mimic+pcDNA DUSP10 组的集落数量升高 ($P<0.001$, 图 6A-B)。流式细胞术结果显示,与 miR-216a-5p mimic+pcDNA NC 组相比,miR-216a-5p mimic+pcDNA

DUSP10 组的细胞凋亡率降低 ($P<0.001$, 图 6C-D)。GFP-mRFP-LC3 检测结果显示,与 miR-216a-5p mimic+pcDNA NC 组相比,miR-216a-5p mimic+pcDNA DUSP10 组的自噬体数量升高 ($P<0.001$, 图 6E-F)。

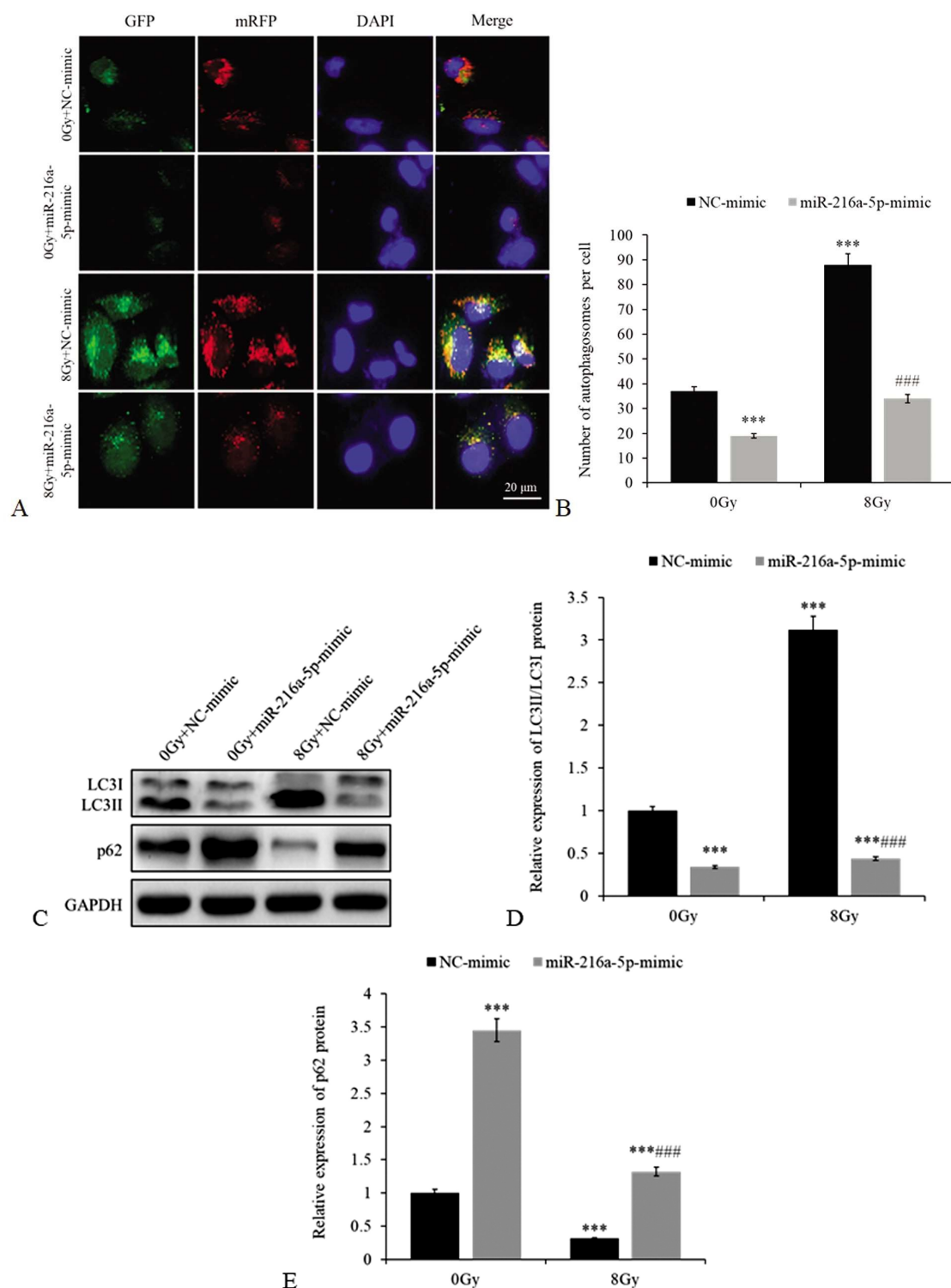


图3 miR-216a-5p 抑制胃癌细胞照射后的自噬

Fig. 3 miR-216a-5p inhibits autophagy in gastric cancer cells after irradiation

Note: A and B: GFP-mRFP-LC3 detects autophagosomes after miR-216a-5p-mimic transfection and 8Gy dose irradiation; CE: Western blot detects the protein expression of LC3 and p62; Compared with 0Gy NC-mimic, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; Compared with 8Gy NC-mimic, #### $P < 0.001$.

3 讨论

放疗是胃癌最有效的治疗方法之一。然而,固有的或获得性的放射抗性经常发生并且限制了放疗的临床应用。目前,对癌症抗放射性的机制仍知之甚少,但研究人员已在改善放射敏感性方面取得了积极成果。相关证据表明,miRNA 在与

放射敏感性相关的过程中起重要作用^[3]。miRNA 是小的非编码 RNA,通过直接靶向 mRNA 进行翻译抑制而在基因表达中发挥调节作用^[2]。miRNA 在放射治疗中具有放射增敏剂或放射抵抗剂的作用。如先前报道,let7、miRNA-21 和 miRNA221 与其他癌症的放射抗性有关^[8]。

据报道,miR-216a-5p 通过调节 Bcl-2 家族蛋白抑制小细

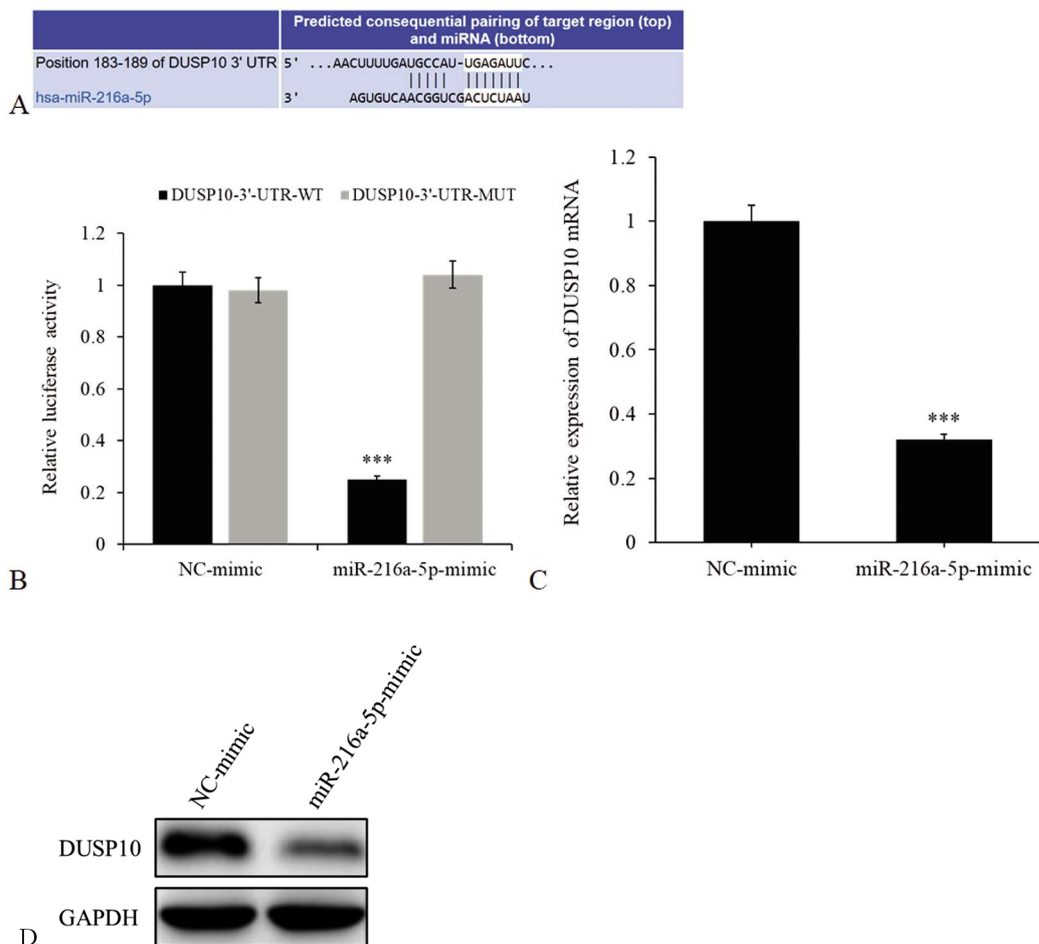


图4 DUSP10 是胃癌细胞中 miR-216a-5p 的直接靶标

Fig. 4 DUSP10 is the direct target of miR-216a-5p in gastric cancer cells

Note: A: miR-216a-5p and DUSP10 3'UTR region binding site; B: DUSP10-3'-UTR-WT and DUSP10-3'-UTR-MUT relative luciferase activity, compared with DUSP10 -3'-UTR-MUT, *** $P < 0.001$; C and D: miR-216a-5p inhibits DUSP10 mRNA and protein expression level; compared with NC-mimic, *** $P < 0.001$.

胞肺癌的恶性进展^[9]。miR-216a-5p 通过靶向乳腺癌中的 PAK2 来调节细胞增殖和转移,并充当肿瘤抑制因子^[10]。miR-216a-5p 通过靶向 TPT1/mTORC1 抑制胰腺癌的发生发展^[11]。然而,在大肠癌中,下调 miR-216a-5p 则可抑制大肠癌进展^[12]。在胃癌细胞中,上调 miR-216a-5p 的表达可提高胃癌细胞的顺铂敏感性并促进细胞凋亡^[7]。另外,miR-216a-5p 通过靶向自噬相关基因 Beclin1 抑制人脐静脉内皮细胞的自噬^[13]。本研究发现 miR-216a-5p 在照射后存活的胃癌细胞中被下调。上调 miR-216a-5p 的表达可进一步抑制照射后的胃癌细胞增殖,并增强放射诱导的细胞凋亡。表明 miR-216a-5p 与胃癌细胞对放射的反应密切相关。

值得注意的是,虽然本研究发现 X 射线照射下调了 SGC-7901 细胞中 miR-216a-5p 的表达。但是,本研究对 SGC-7901 细胞转染 miR-216a-5p-mimic 后,集落形成实验中未发现 miR-216a-5p 的表达上调影响未照射细胞的增殖,流式细胞术和 Western blot 检测检测结果也显示,miR-216a-5p 的表达上调未影响细胞凋亡及凋亡相关蛋白的表达 (Bax, Bad 和 Bcl-2)。由以上这些结果可知,在 SGC-7901 细胞中,miR-216a-5p 在 X 射线照射后对细胞功能的影响可能是照射后特异性的机制,而不是 miR-215a-5p 本身的固有调节作用。

因此,需要进一步揭示 miR-216a-5p 在照射后调节细胞功能的具体机制。

自噬是一种应激反应细胞过程。该过程涉及细胞器和大分子的自降解和再循环,这有助于癌细胞的存活^[14-18]。自噬在肿瘤发展中通常被称为 "双刃剑",因为它可能是促进肿瘤或抑制肿瘤的因素^[19,20]。自噬抑制剂能够促进各种癌症的凋亡^[20]。因此,自噬通常被认为是在应激条件下的生存机制。先前的研究报道了 miRNA 调控的自噬在各种癌症的放射反应中的功能^[21-23]。miR-122 可以靶向 PIM1 以抑制细胞自噬并降低前列腺癌细胞的放射抗性^[24]。miR-214 介导的自噬抑制可能是降低结直肠癌放射抗性的潜在策略^[25]。本研究发现 miR-216a-5p 的过度表达可显著抑制放射诱导的自噬。因此,miR-216a-5p 增强胃癌细胞放射敏感性的机制可能与其对自噬的抑制有关。另外, GFP-mRFP-LC3 和 Western blot 检测结果显示, miR-216a-5p 的表达上调同样降低了未照射的 SGC-7901 细胞的自噬体数量及 LC3II 蛋白表达水平,并升高了 p62 蛋白表达水平。这些结果说明,在胃癌发生过程中,miR-216a-5p 的水平与癌细胞自噬活性密切相关。miR-216a-5p 的表达上调抑制了 SGC-7901 细胞的自噬活性,而这种抑制作用并未影响细胞的存活,但提高了细胞的放射敏感性。这可能是 miR-216a-5p 在

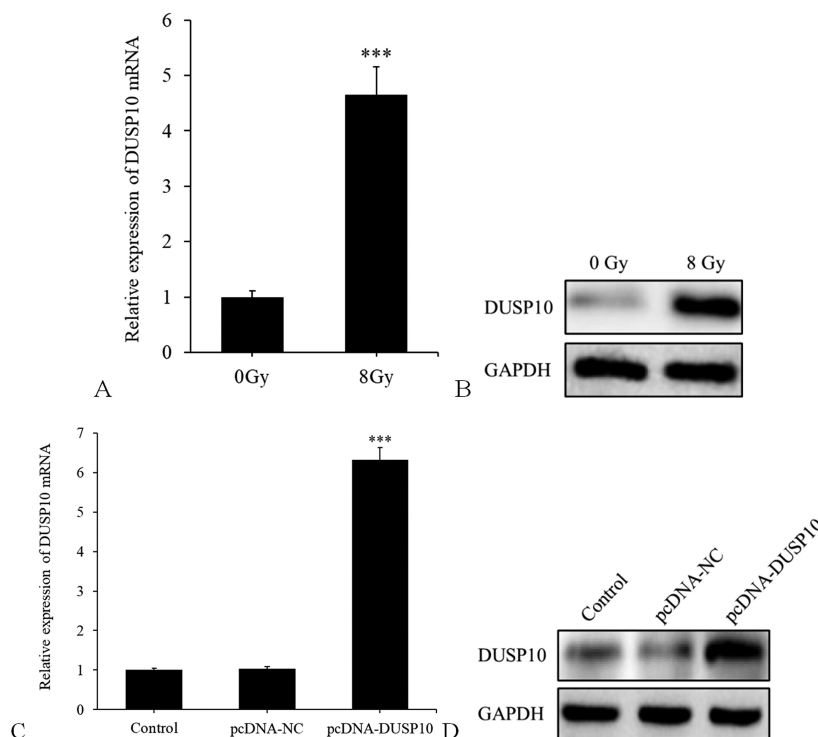


图 5 照射对胃癌细胞中 DUSP10 表达的影响及 pcDNA-DUSP10 的转染效率

Fig. 5 The effect of irradiation on the expression of DUSP10 in gastric cancer cells and the transfection efficiency of pcDNA-DUSP10

Note: A and B: the effect of 8Gy dose irradiation on the mRNA and protein expression of DUSP10, compared with 0Gy, *** $P < 0.001$; C and D: the transfection efficiency of pcDNA-DUSP10, compared with control group, *** $P < 0.001$.

放疗后调节胃癌细胞功能的关键点。

直接靶向 mRNA 是 miRNA 发挥其生物学功能的一种方式。为了探索放疗后 miR-216a-5p 对胃癌细胞影响的潜在机制,通过生物信息学分析预测了 miR-216a-5p 在胃癌细胞中的潜在靶标。本研究的荧光素酶报告基因检测表明,DUSP10 是 miR-216a-5p 的直接靶标。双特异性磷酸酶(Dual-specificity-phosphatases,DUSPs)会对丝裂原激活的蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases,MAPK) 超家族成员产生负调控。DUSP10 可以与 MAPK 超家族成员 p38 和 SAPK/JNK 结合并使其失活^[26]。DUSP10 在多种组织和器官中广泛表达,并且在应激刺激下表达升高^[27]。据报道,MAPK 可以负调节自噬^[28]。p38 和 SAPK/JNK 的激活可以加剧电离放射诱导的胃癌细胞 DNA 损伤和凋亡^[29]。在本研究中,上调 DUSP10 的表达可以逆转 miR-450a-5 对胃癌细胞放射敏感性的促进作用和对自噬的抑制作用。这些结果进一步证实了 miR-450a-5 通过靶向 DUSP10 来抑制放射诱导的自噬,从而提高胃癌细胞的放射敏感性。由于 p38 和 SAPK/JNK 的激活可提高胃癌细胞的放射敏感性^[29],作为 p38 和 SAPK/JNK 的抑制分子,因此,DUSP10 的表达上调则可能提高了胃癌细胞的放射抵抗性。其他文献报道,DUSP10 的表达上调通过抑制 p38 MAPK 并阻止 p53 激活来抑制乳腺癌细胞凋亡,从而发挥促癌基因的作用^[30]。本研究中也观察到了照射后 SGC-7901 细胞的 DUSP10 mRNA 和蛋白表达水平均升高。因此,miR-216a-5p 在照射后增强胃癌细胞放射敏感性的分子机制不仅与其抑制自噬有关,而且与靶向抑制 DUSP10 有关。

综上所述,本研究表明 X 线照射 SGC-7901 细胞后,

miR-216a-5p 通过抑制 DUSP10 来抑制细胞增殖、增加放射诱导的细胞凋亡并抑制放射诱导的自噬,从而增强胃癌细胞的放射敏感性。miR-216a-5p 和 DUSP10 可能是预测胃癌患者放射敏感性的生物标志物及提高放射敏感性的潜在靶标。

参考文献(References)

- [1] Dai T, Shah MA. Chemoradiation in oesophageal cancer[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015, 29(1): 193-209
- [2] Hammond SM. An overview of microRNAs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87(1): 3-14
- [3] Chaudhry MA. Radiation-induced microRNA: discovery, functional analysis, and cancer radiotherapy[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(3): 436-449
- [4] Zhang T, Xue X, Peng H. Therapeutic Delivery of miR-29b enhances radiosensitivity in cervical cancer[J]. Mol Ther, 2019, 27(6): 1183-1194
- [5] de Jong MC, ten Hoeve JJ, Grénman R, et al. Pretreatment microRNA expression impacting on epithelial-to-mesenchymal transition predicts intrinsic radiosensitivity in head and neck cancer cell lines and patients[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(24): 5630-5638
- [6] Wang P, Zhang J, Zhang L, et al. MicroRNA 23b regulates autophagy associated with radioresistance of pancreatic cancer cells[J]. Gastroenterology, 2013, 145(5): 1133-1143
- [7] Zhao R, Zhang X, Zhang Y, et al. HOTTIP predicts poor survival in gastric cancer patients and contributes to cisplatin resistance by sponging miR-216a-5p[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8(3): 348-359
- [8] Li G, Liu Y, Su Z, et al. MicroRNA-324-3p regulates nasopharyngeal carcinoma radioresistance by directly targeting WNT2B [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(11): 2596-2607

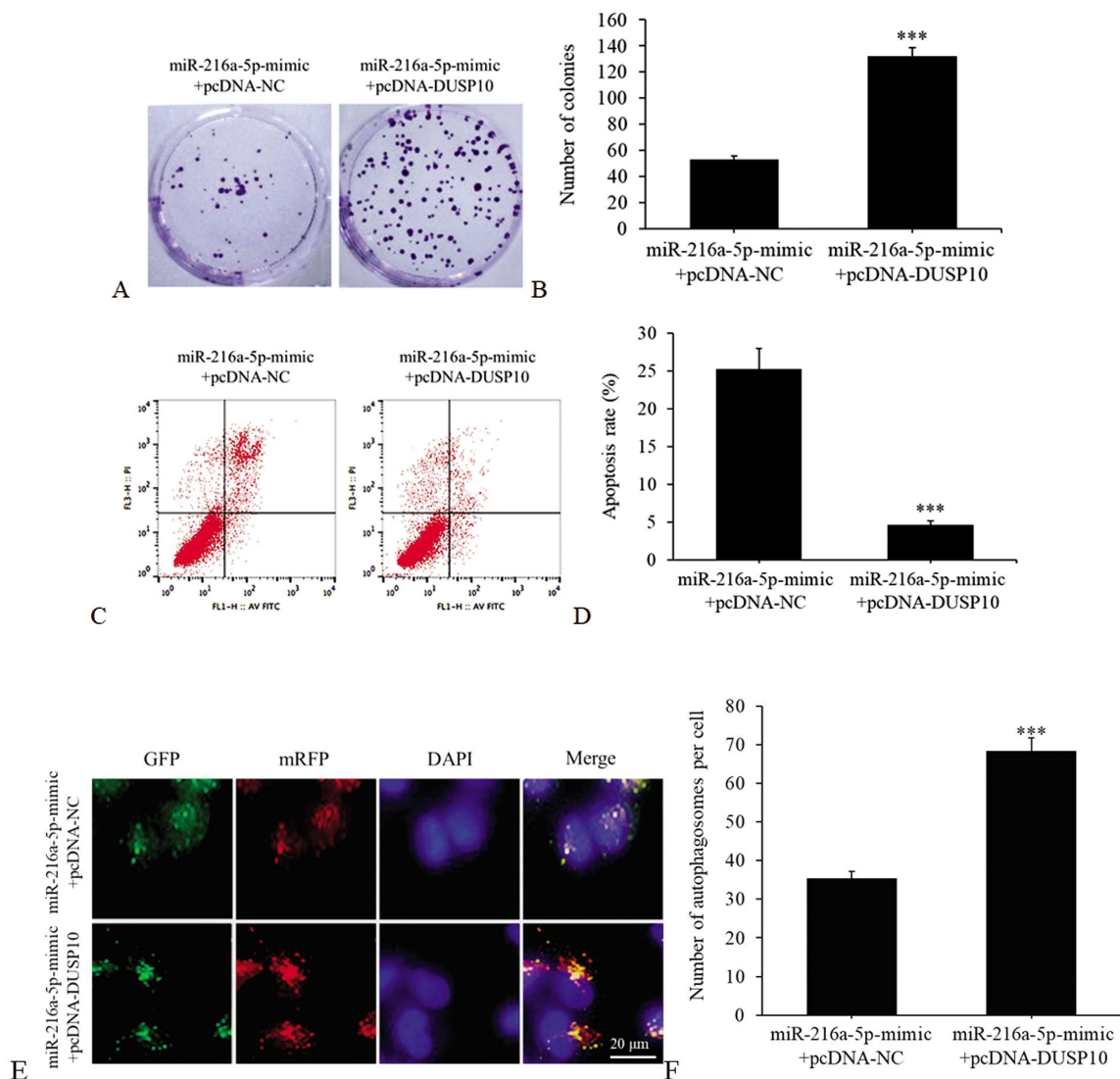


图 6 DUSP10 介导 miR-216a-5p 对胃癌细胞照射后的增殖、凋亡和自噬

Fig. 6 DUSP10 mediates the proliferation, apoptosis and autophagy of gastric cancer cells after miR-216a-5p irradiation

Note: A and B: Colony formation experiment to evaluate the effect of DUSP10 on cell proliferation, compared with miR-216a-5p mimic+pcDNA NC, *** $P<0.001$; C and D: Flow cytometry to detect the effect of DUSP10 on cell apoptosis, compared with miR-216a-5p mimic+pcDNA NC, *** $P<0.001$; E and F: GFP-mRFP-LC3 detects the effect of DUSP10 on autophagosomes, compared with miR-216a-5p mimic+pcDNA NC, *** $P<0.001$

- [9] Sun Y, Hu B, Wang Y, et al. miR-216a-5p inhibits malignant progression in small cell lung cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins[J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10(1): 4735-4745
- [10] Zhang Y, Lin P, Zou JY, et al. MiR-216a-5p act as a tumor suppressor, regulating the cell proliferation and metastasis by targeting PAK2 in breast cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(6): 2469-2475
- [11] Zhang J, Gao S, Zhang Y, et al. MiR-216a-5p inhibits tumorigenesis in Pancreatic Cancer by targeting TPT1/mTORC1 and is mediated by LINC01133[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2612-2627
- [12] Zeng X, Liu Y, Zhu H, et al. Downregulation of miR-216a-5p by long noncoding RNA PVT1 suppresses colorectal cancer progression via modulation of YBX1 expression [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(1): 6981-6993
- [13] Menghini R, Casagrande V, Marino A, et al. MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(1): 1029-1037
- [14] Endo S, Nakata K, Ohuchida K, et al. Autophagy is required for activation of pancreatic stellate cells, associated with pancreatic cancer progression and promotes growth of pancreatic tumors in mice [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(6): 1492-1506
- [15] Babaei G, Aziz SG, Jaghi NZZ. EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of meta stasis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110909
- [16] Devis-Jauregui L, Eritja N, Davis ML, et al. Autophagy in the physiological endometrium and cancer [J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1077-1095
- [17] Piffoux M, Eriau E, Cassier PA. Autophagy as a therapeutic target in pancreatic cancer[J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(2): 333-344
- [18] Su H, Yang F, Fu R, et al. Cancer cells escape autophagy inhibition via NRF2-induced macropinocytosis [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(5): 678-693.e611

- 子及相关因素探讨[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(1): 86-90
- [13] Shakya N, Sharma D, Newaskar V, et al. Epidemiology, Microbiology and Antibiotic Sensitivity of Odontogenic Space Infections in Central India[J]. J Maxillofac Oral Surg, 2018, 17(3): 324-331
- [14] 王晶, 代成林, 张淑悦. 闭式冲洗留置负压引流治疗口腔颌面部间隙感染患者的疗效观察[J]. 临床口腔医学杂志, 2021, 37(2): 107-110
- [15] 周子琪, 郭丽娟, 杨森, 等. 高压氧联合负压封闭引流术治疗口腔颌面部间隙感染的效果观察[J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(8): 1525-1528
- [16] Keswani ES, Venkateshwar G. Odontogenic Maxillofacial Space Infections: A 5-Year Retrospective Review in Navi Mumbai [J]. J Maxillofac Oral Surg, 2019, 18(3): 345-353
- [17] 许桂坤, 黄艳玲. 口腔颌面部间隙感染的相关研究及治疗进展[J]. 西部医学, 2022, 34(4): 615-619
- [18] Umeshappa H, Shetty A, Kavatagi K, et al. Microbiological profile of aerobic and anaerobic bacteria and its clinical significance in antibiotic sensitivity of odontogenic space infection: A prospective study of 5 years[J]. Natl J Maxillofac Surg, 2021, 12(3): 372-379
- [19] Singh M, Kambalimath DH, Gupta KC. Management of odontogenic space infection with microbiology study [J]. J Maxillofac Oral Surg, 2014, 13(2): 133-139
- [20] Kang SH, Kim MK. Antibiotic sensitivity and resistance of bacteria from odontogenic maxillofacial abscesses[J]. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg, 2019, 45(6): 324-331
- [21] Taub D, Yampolsky A, Diecidue R, et al. Controversies in the Management of Oral and Maxillofacial Infections[J]. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 2017, 29(4): 465-473
- [22] 刘璇, 吴磊. 血清 IL-6、TNF- α 、CRP 及 CD64 对老年烧伤感染患者病情及创面愈合程度评估的意义[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(13): 3204-3207
- [23] 蒲金霞, 李晨曦, 贺多敏, 等. 126 例口腔颌面部间隙感染患者治疗效果相关影响因素分析[J]. 上海口腔医学, 2018, 27(5): 491-494
- [24] Salvo P, Dini V, Kirchhain A, et al. Sensors and Biosensors for C-Reactive Protein, Temperature and pH, and Their Applications for Monitoring Wound Healing: A Review[J]. Sensors (Basel), 2017, 17(12): 2952
- [25] Hamade B, Huang DT. Procalcitonin: Where Are We Now?[J]. Crit Care Clin, 2020, 36(1): 23-40
- [26] 祁俊, 胡克芬, 张逸. 切割痂植皮术结合术后银离子凝胶治疗对高龄深度烧伤恢复及 CRP、降钙素原水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(1): 97-99
- [27] 王兆钺. D 二聚体临床应用的进展[J]. 血栓与止血学, 2014, 20(1): 46-48
- [28] 舒文韬, 郭长松. 慢性皮肤创面免疫微环境的特点及调控[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(3): 367-375
- [29] Opneja A, Kapoor S, Stavrou EX. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing[J]. Thromb Res, 2019, 179(7): 56-63
- [30] Moore HB, Moore EE, Neal MD, et al. Fibrinolysis Shutdown in Trauma: Historical Review and Clinical Implications [J]. Anesth Analg, 2019, 129(3): 762-773

(上接第 4214 页)

- [19] Yamazaki T, Bravo-San Pedro JM, Galluzzi L, et al. Autophagy in the cancer-immunity dialogue[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2021, 169: 40-50
- [20] Li B, Wang W, Li Z, et al. MicroRNA-148a-3p enhances cisplatin cytotoxicity in gastric cancer through mitochondrial fission induction and cyto-protective autophagy suppression[J]. Cancer Lett, 2017, 410(9): 212-227
- [21] Fan L, Li B, Li Z, et al. Identification of autophagy related circRNA-miRNA-mRNA-subtypes network with radiotherapy responses and tumor immune microenvironment in non-small cell lung cancer[J]. Front Genet, 2021, 12: 730003
- [22] Huang T, Wan X, Alvarez AA, et al. MIR93 (microRNA -93) regulates tumorigenicity and therapy response of glioblastoma by targeting autophagy[J]. Autophagy, 2019, 15(6): 1100-1111
- [23] Podralska M, Ciesielska S, Kluiver J, et al. Non-coding RNAs in cancer radiosensitivity: microRNAs and lncRNAs as regulators of radiation-induced signaling pathways[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(6): 1662
- [24] Gu H, Liu M, Ding C, et al. Hypoxia-responsive miR-124 and miR-144 reduce hypoxia-induced autophagy and enhance radiosensitivity of prostate cancer cells via suppressing PIM1 [J]. Cancer Med, 2016, 5(6): 1174-1182
- [25] Hu JL, He GY, Lan XL, et al. Inhibition of ATG12-mediated autophagy by miR-214 enhances radiosensitivity in colorectal cancer [J]. Oncogenesis, 2018, 7(2): 16-27
- [26] Teng CH, Huang WN, MenG TC. Several dual specificity phosphatases coordinate to control the magnitude and duration of JNK activation in signaling response to oxidative stress[J]. J Biol Chem, 2007, 282(39): 28395-28407
- [27] Choi HR, Kim WK, Kim EY, et al. Dual-specificity phosphatase 10 controls brown adipocyte differentiation by modulating the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. PLoS One, 2013, 8(8): 72340-72346
- [28] Webber JL, Tooze SA. Coordinated regulation of autophagy by p38 α MAPK through mAtg9 and p38IP[J]. Embo j, 2010, 29(1): 27-40
- [29] Son Y, Kim S, Chung HT, et al. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases[J]. Methods Enzymol, 2013, 528(12): 27-48
- [30] Hrstka R, Bouchalova P, Michalova E, et al. AGR2 oncoprotein inhibits p38 MAPK and p53 activation through a DUSP10-mediated regulatory pathway[J]. Molecular Oncology, 2015, 10(5): 652-662