

# miR-495 对食管癌细胞株 Eca109 在不同放射剂量和顺铂浓度作用的影响及机制研究

刘伟<sup>a</sup>, 周杨<sup>a</sup>, 边超<sup>a</sup>, 东丽<sup>b</sup>

(内蒙古自治区人民医院 a. 放射治疗科; b. 肿瘤内科, 呼和浩特 010010)

**摘要:** **目的** 探讨微小核糖核酸 (microRNA, miR) -495 对食管癌细胞株 Eca109 在不同放射剂量和顺铂浓度作用下的影响及机制。**方法** 采用分次放疗递增法诱导建立放射抵抗型细胞株 Eca109 (Eca109-RAD) 及分次顺铂递增法诱导建立顺铂耐药型细胞株 Eca109 (Eca109-DDP), 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 miR-495 在 Eca109-RAD 及 Eca109-DDP 细胞中的表达。Eca109-RAD 及 Eca109-DDP 分为 NC 组和 miR-495 mimic 组, 转染后 qRT-PCR 检测各组细胞中 miR-495 的表达, CCK8 检测不同放射剂量对 Eca109-RAD 细胞和 Eca109 细胞存活能力的影响, 及不同浓度的顺铂对 Eca109-DDP 细胞和 Eca109 细胞存活能力的影响, NC 组和 miR-495 mimic 组经放射及顺铂处理后, 采用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率, Western blot 检测各组细胞中凋亡相关蛋白 caspase 3, Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达。**结果** 与 Eca109 细胞 ( $0.99 \pm 0.01$ ) 相比, Eca109-RAD 细胞中 miR-495 的表达 ( $0.48 \pm 0.03$ ) 及 Eca109-DDP 细胞中 miR-495 的表达 ( $0.52 \pm 0.05$ ) 均降低, 差异有统计学意义 ( $t=27.930, 15.970$ , 均  $P=0.000$ )。与 NC 组细胞相比, miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞中 miR-495 的表达 ( $4.82 \pm 0.48$  vs  $1.00 \pm 0.03$ ) 及 Eca109-DDP 细胞中 miR-495 的表达 ( $5.68 \pm 0.54$  vs  $1.00 \pm 0.01$ ) 均显著增加, 差异有统计学意义 ( $t=13.760, 15.100$ , 均  $P=0.000$ )。与 NC 组相比, miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞对放疗敏感度增加, 差异均有统计学意义 ( $t=6.780 \sim 18.860$ ,  $P=0.000 \sim 0.001$ ); 与 NC 组相比, miR-495 mimic 组 Eca109-DDP 细胞对顺铂敏感度增加, 差异均有统计学意义 ( $t=7.510 \sim 21.630$ , 均  $P=0.000$ )。经放射处理后, 与 NC 组相比, miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞平板克隆形成能力 ( $46.33 \pm 5.69$  个 vs  $93.33 \pm 4.51$  个) 及 Eca109-DDP ( $34.67 \pm 2.52$  个 vs  $89.00 \pm 4.03$  个) 细胞平板克隆形成能力显著降低 ( $t=11.210, 19.800$ , 均  $P=0.000$ )。经放射处理后, 与 NC 组相比, miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞凋亡率 ( $25.66\% \pm 2.41\%$  vs  $8.39\% \pm 0.82\%$ ) 及 Eca109-DDP 细胞凋亡率 ( $21.05\% \pm 5.37\%$  vs  $8.67\% \pm 1.15\%$ ) 均显著增加 ( $t=11.750, 10.030$ ,  $P=0.000, 0.001$ )。经放射处理后, 与 NC 组相比, miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞及 Eca109-DDP 细胞中 Bcl-2 蛋白表达均降低 ( $t=4.650, 7.450$ ,  $P=0.006, 0.001$ ), Bax 和 caspase 3 蛋白的表达均增加 ( $t=7.100 \sim 14.290$ ,  $P=0.000 \sim 0.001$ )。**结论** MiR-495 可能通过调控凋亡相关蛋白促进食管癌细胞放化疗敏感度。

**关键词:** 食管癌; 微小核糖核酸 -495; 凋亡; 放化疗敏感度

**中图分类号:** R735.1; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 04-013-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.003

## Effect of miR-495 on Esophageal Cancer Cell Line Eca109 at Different Radiation Doses and Cisplatin Concentrations and Its Mechanism

LIU Wei<sup>a</sup>, ZHOU Yang<sup>a</sup>, BIAN Chao<sup>a</sup>, DONG Li<sup>b</sup> (a. Department of Radiotherapy; b. Department of Oncology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010010, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of microRNA (miR)-495 on esophageal cancer cell line Eca109 under different radiation doses and cisplatin concentrations. **Methods** The radiation resistant cell line Eca109 (Eca109 RAD) was induced by fractionated radiotherapy and the cisplatin resistant cell line Eca109 (Eca109 DDP) was induced by fractionated cisplatin, the expression of miR-495 in Eca109-RAD and Eca109-DDP cells was detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR). Eca109-RAD and Eca109-DDP were divided into NC group and miR-495 mimic group. After transfection, the expression of miR-495 was detected by qRT-PCR, CCK8 was used to detect the effects of different radiation doses on the viability of Eca109 RAD cells and Eca109 cells, and the effects of different concentrations of cisplatin on the viability of Eca109 DDP cells and Eca109 cells. After radiation and cisplatin treatment, the apoptosis rate of cell in NC

**基金项目:** 内蒙古自治区自然科学基金 (2019MS08090)。

**作者简介:** 刘伟 (1979-), 男, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤的放射治疗及综合治疗, E-mail: liuwei1979703@163.com。

**通讯作者:** 周杨 (1987-), 男, 主治医师, E-mail: 240123137@qq.com。

group and miR-495 mimic group was detected by flow cytometry, and the expressions of apoptosis related proteins caspase 3, Bax and Bcl-2 in each group were detected by Western blot. **Results** Compared with Eca109 cells ( $0.99 \pm 0.01$ ), the expression of miR-495 in Eca109-RAD cells ( $0.48 \pm 0.03$ ) and Eca109-DDP cells ( $0.52 \pm 0.05$ ) decreased, the differences were statistically significant ( $t = 27.930, 15.970$ , all  $P = 0.000$ ). Compared with NC group, the expression of miR-495 in Eca109-RAD cells ( $1.00 \pm 0.03$  vs  $4.82 \pm 0.48$ ) and Eca109-DDP cells ( $1.00 \pm 0.01$  vs  $5.68 \pm 0.54$ ) in miR-495 mimic group were significantly increased, the differences were statistically significant ( $t = 13.760, 15.100$ , all  $P = 0.000$ ). Compared with NC group, Eca109-RAD cells in miR-495 mimic group were more sensitive to radiotherapy, the differences were statistically significant ( $t = 6.780 \sim 18.860$ ,  $P = 0.000 \sim 0.0010$ ), and compared with NC group, Eca109-DDP cells in miR-495 mimic group were more sensitive to cisplatin, the differences were statistically significant ( $t = 7.510 \sim 21.630$ , all  $P = 0.000$ ). After radiation treatment, compared with NC group, the plate clone forming ability of Eca109-RAD cells ( $93.33 \pm 4.51$  vs  $46.33 \pm 5.69$ ) and Eca109-DDP cells ( $89.00 \pm 4.03$  vs  $34.67 \pm 2.52$ ) in miR-495 mimic group decreased significantly, the differences were statistically significant ( $t = 11.210, 19.800$ , all  $P = 0.000$ ). After radiation treatment, compared with NC group, the apoptosis rates of Eca109-RAD cells ( $8.39\% \pm 0.82\%$  vs  $25.66\% \pm 2.41\%$ ) and Eca109-DDP cells ( $8.67\% \pm 1.15\%$  vs  $21.05\% \pm 5.37\%$ ) in miR-495 mimic group increased significantly ( $t = 11.750, 10.030$ ,  $P = 0.000, 0.001$ ). After radiation treatment, compared with NC group, the expression of Bcl-2 protein ( $0.001$ ), and the expression of Bax and caspase 3 protein increased ( $t = 7.100 \sim 14.290$ ,  $P = 0.000 \sim 0.001$ ). **Conclusion** MiR-495 may promote the chemoradiotherapy sensitivity of esophageal cancer cells by regulating apoptosis related proteins.

**Keywords:** esophageal cancer; miR-495; apoptosis; chemoradiotherapy sensitivity

食管癌是中国第六大常见癌症,也是导致肿瘤相关死亡的第四大原因,2018年统计数据显示,全球有超过57万例新诊断食管癌病例和51万左右食管癌死亡病例<sup>[1]</sup>。尽管食管癌的诊断技术和治疗取得了进步,但是食管癌患者的总体生存率仍然很差<sup>[2]</sup>。食管癌患者对化疗和放疗敏感度降低是患者病情进展导致预后不良的重要原因<sup>[3]</sup>,而食管癌化疗和放疗抵抗的分子机制尚未完全明确,因此迫切需要进行探讨,以寻找新的治疗手段改善患者疗效。研究报道微小核糖核酸(microRNA, miRNA)密切参与肿瘤的恶性进展,包括增殖、侵袭和转移以及肿瘤的化疗和放疗抵抗<sup>[4]</sup>。MiR-495是肿瘤抑制因子,在子宫内膜癌和口腔鳞状细胞癌等恶性肿瘤中抑制肿瘤的发生发展<sup>[5-6]</sup>,在非小细胞肺癌和胃癌中与肿瘤耐药相关<sup>[7]</sup>,并且研究报道miR-495抑制食管癌的增殖<sup>[8]</sup>,但是miR-495与食管癌化疗和放疗敏感度的关系未见有报道。基于顺铂的化疗方案是治疗食管癌的一线药物,也常常引起患者耐药<sup>[9]</sup>,因此本文对miR-495在食管癌细胞顺铂和放疗敏感度中的作用及机制进行了探讨,以期发现miR-495增加食管癌细胞对顺铂和放疗治疗敏感度的作用及机制,以及作为逆转食管癌化疗和放疗抵抗候选靶点的证据。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 食管癌细胞系Eca109,购于中国上海科学院,快速复苏后重悬至含有10g/dl胎牛血清的细胞培养液中培养,放置在37℃,5ml/dl CO<sub>2</sub>的全湿度培养箱中。隔天更换新鲜培养液,细胞长至95%左右时,一比三进行细胞传代。

1.2 仪器与试剂 基础培养液、胎牛血清和胰蛋白酶(美国Hyclone公司);miR-495 mimic(中国上海吉凯生物技术有限公司);Trizol试剂(日本TaKaRa公司);OneStep RT-PCR Kit试剂盒、RIPA和荧光素酶报告基因试剂盒(北京索莱宝试剂公司);miR-495和GAPDH引物(上海捷瑞生物工程有限公司);Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);CCK8试剂(美国GlpBio公司);BCA检测蛋白浓度试剂盒(美国Thermo公司);Bcl-2, Bax和caspase 3抗体(美国proteintech公司);ECL化学发光试剂盒(美国millipore公司)。

## 1.3 方法

1.3.1 Eca109-RAD及Eca109-DDP的构建:取对数生长期的Eca109细胞 $1 \times 10^5$ 个接种至6孔板中,进行分次递增放射,1, 2, 4和8Gy剂量各辐射3次,总量为45 Gy。辐射后敏感性细胞死去,存活的放射抵抗细胞形成细胞克隆,获得的放射抵抗细胞(Eca109-RAD)可在4 Gy放射剂量下生长。Eca109-RAD扩大培养用于后续实验研究。

取对数生长期的Eca109细胞 $1 \times 10^5$ 个接种至6孔板中,以0.1, 0.2, 0.4和0.8ng/ml顺铂分次处理诱导,顺铂敏感的细胞死去,具有耐药性的细胞形成细胞克隆,获得顺铂耐药的细胞(Eca109-DDP)可在0.4ng/ml浓度下生长。将Eca109-DDP扩大培养用于后续实验研究。

1.3.2 细胞转染:取对数生长期的Eca109-RAD细胞或Eca109-DDP细胞 $1 \times 10^5$ 个接种至6孔板中,分为NC组和miR-495 mimic组,12h后采用脂质

体2000进行各组细胞的转染,10h后更换新鲜完全培养液,转染48h进行后续实验研究。

**1.3.3 qRT-PCR 细胞:**经 Trizol 试剂裂解后加入氯仿,低温高速离心后获取上层上清液,加入异丙醇和无水乙醇试剂获取细胞中总 RNA,根据 OneStep RT-PCR Ki 试剂盒说明书配制反应体系,25×One Step 1μl, RTase mix 5×One Step RT Mix Buffer 5μl, Primer (1)2.5μl, Primer (2)2.5μl, RNA 0.5μg 和双蒸水补足 25μl。以反转录 50℃ 20min,变性 95℃ 3min (变性 95℃ 15 s, 退火延伸 60℃ 30 s, 延伸 72℃ 30 s)40 个循环进行 qRT-PCR 扩增反应, miR-495 引物 F: 5'-TCCGATTCTTCACGTGGTAC-3', R: 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'; U6 引物 F: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3', R: 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC-3'。按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  公式计算,以 U6 为内参计算 miR-495 相对表达量。

**1.3.4 CCK8 检测放射敏感度:**转染的 NC 组和 miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞或 Eca109-DDP 细胞以每孔 3 000 个细胞接种至 96 孔板中,每组包含 6 个复孔,接种 12h 后分别采用不同放射剂量 (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 和 64 Gy) 照射 Eca109-RAD 细胞各组细胞、不同浓度的顺铂 (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 和 3.2μg/ml) 处理 Eca109-DDP 细胞,放置于 37℃, 5ml/dl CO<sub>2</sub> 的全湿度培养箱中 48h,加入 10μl 的 CCK8 试剂,孵育 1h,采用酶标仪检测各个孔的 490nm 吸光度值 (A)。细胞存活率=(处理组平均 A 值/不处理组平均 A 值)×100%。

**1.3.5 平板克隆实验检测克隆形成率:**各组细胞经胰酶消化后以 500 个细胞接种至 6 孔板中,每组包含 3 个重复孔,NC 组和 miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞以 4Gy 的放射剂量进行辐射,NC 组和 miR-495 mimic 组 Eca109-DDP 细胞以 0.4ng/ml 放射剂量进行辐射。各组细胞放置于 37℃, 5ml/dl CO<sub>2</sub> 的全湿度培养箱中培养 10 天左右,细胞克隆团形成。终止培养,PBS 洗两次,甲醇溶液固定 10min,吉姆萨染液染色 10min,晾干后计数细胞克隆团数目,细胞克隆形成率=(miR-495 mimic 组平均克隆团数目/NC 组平均克隆团数目)×100%。

**1.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡:**各组细胞经胰酶消化后以 500 个细胞接种至 6 孔板中,每组包含 3 个重复孔,NC 组和 miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞以 4Gy 的放射剂量进行辐射,NC 组和 miR-495 mimic 组 Eca109-DDP 细胞以 0.4ng/ml 放射剂量进行辐射。各组细胞放置于 37℃, 5ml/dl CO<sub>2</sub> 的全湿度培养箱中培养 48h。终止培养,经胰酶消化后按照 Annexin V-FITC/PI 染色试剂盒依次加入染色缓冲液 500μl, Annexin V-FITC 5μl 和 PI 5μl

混匀后常温放置 10min 后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**1.3.7 Western blotting:**增强型电化学发光法。细胞经 RIPA 裂解后,14 000r/min 离心 30min,获得上清细胞总蛋白。采用 BCA 试剂盒检测细胞总蛋白浓度,沸水中煮 5min 蛋白变性,上样进行凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白 (80V, 2h),电湿转 (350mA, 2h) 将蛋白转移至 PVDF 膜上。8% 封闭液室温封闭 1h,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2h,增强型化学发光试剂盒 (enhanced chemiluminescence, ECL) 加至 PVDF 膜上,显影液和定影液曝光。

**1.4 统计学分析** 采用软件 SPSS19.0 进行统计学分析。数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,采用独立样本 *t* 检验比较两组间的统计学差异。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 qRT-PCR 检测 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 细胞中 miR-495 的表达** qRT-PCR 检测显示 miR-495 在 Eca109, Eca109-RAD 细胞和 Eca109-DDP 细胞中的表达分别为  $0.99 \pm 0.01$ ,  $0.48 \pm 0.03$  和  $0.52 \pm 0.05$ ,与 Eca109 细胞相比,Eca109-RAD 细胞和 Eca109-DDP 细胞中 miR-495 的表达显著降低,差异均有统计学意义 ( $t=27.930, 15.970$ , 均 *P*=0.000)。

**2.2 qRT-PCR 检测 miR-495 mimic 转染效果** qRT-PCR 检测 miR-495 mimic 转染食管癌细胞 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 的过表达效果,结果显示 miR-495 在 NC 组 Eca109-RAD 细胞、miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞、NC 组 Eca109-DDP 细胞、miR-495 mimic 组 Eca109-DDP 细胞中 miR-495 的相对表达量分别为  $1.00 \pm 0.03$ ,  $4.82 \pm 0.48$ ,  $1.00 \pm 0.01$ ,  $5.68 \pm 0.54$ 。在 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 细胞中与 NC 组相比,miR-495 mimic 组中 miR-495 相对表达量均增加,差异有统计学意义 ( $t=13.760, 15.100$ , 均 *P*=0.000)。表明 miR-495 mimic 成功转染至 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 细胞中,可以进行后续实验。

**2.3 miR-495 对食管癌细胞放射和顺铂敏感度的影响** 见表 1。NC 组和 miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞经不同放射剂量照射 48h, CCK8 结果显示在相同放射剂量作用下,miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 细胞存活率显著低于 NC 组,表明 miR-495 mimic 增加 Eca109-RAD 细胞放射敏感度。NC 组和 miR-495 mimic 组 Eca109-DDP 细胞经不同浓度的顺铂处理 48h, CCK8 结果显示在相同浓度顺铂作用下,miR-495 mimic 组 Eca109-DDP 细胞存活率显著低于 NC 组,表明 miR-495 mimic 增



加 Eca109-DDP 细胞顺铂敏感度。

#### 2.4 miR-495 对食管癌细胞克隆形成能力的影响

miR-495 mimic 转染 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 后, 平板克隆实验结果显示, NC 组细胞克隆形成数目分别为  $93.33 \pm 4.51$  个,  $89.00 \pm 4.03$  个, miR-

495 mimic 组细胞克隆形成数目分别为  $46.33 \pm 5.69$  个,  $34.67 \pm 2.52$  个, 与 NC 组相比, miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 细胞平板克隆形成能力均显著降低, 差异均有统计学意义 ( $t=11.210$ ,  $19.800$ , 均  $P=0.000$ )。

表 1 miR-495 对食管癌细胞放射和顺铂敏感度的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

放射剂 (Gy)	Eca109-RAD				DDP 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Eca109-DDP			
	NC 组	miR-495mimic 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值		NC 组	miR-495mimic 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
0	$100.00 \pm 0.00$	$100.00 \pm 0.01$			0	$100.00 \pm 0.02$	$100.00 \pm 0.00$		
1	$99.20 \pm 2.11$	$92.00 \pm 3.05$	7.760	0.001	0.05	$99.21 \pm 1.23$	$91.54 \pm 2.18$	7.510	0.000
2	$98.06 \pm 3.07$	$78.12 \pm 2.67$	12.010	0.000	0.1	$95.04 \pm 2.15$	$80.41 \pm 3.09$	9.520	0.000
4	$93.30 \pm 3.84$	$54.54 \pm 4.59$	15.870	0.000	0.2	$92.33 \pm 2.20$	$63.83 \pm 4.24$	14.620	0.000
8	$65.10 \pm 2.99$	$36.24 \pm 2.26$	18.860	0.000	0.4	$76.10 \pm 3.27$	$41.59 \pm 2.14$	21.630	0.000
16	$48.50 \pm 3.48$	$25.41 \pm 3.17$	12.020	0.000	0.8	$49.25 \pm 3.31$	$23.23 \pm 1.19$	18.120	0.000
32	$21.30 \pm 2.04$	$14.24 \pm 1.53$	6.780	0.000	1.6	$22.67 \pm 2.24$	$12.56 \pm 1.12$	9.890	0.000
64	$10.20 \pm 1.57$	$4.26 \pm 1.04$	7.730	0.000	3.2	$14.31 \pm 1.09$	$8.67 \pm 1.07$	9.050	0.000

miR-495 mimic 转染 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 后, 流式细胞仪检测结果显示 NC 组细胞凋亡率分别为  $(8.39 \pm 0.82)\%$ ,  $(8.67 \pm 1.15)\%$ , miR-495 mimic 组细胞凋亡率分别为  $(25.66 \pm 2.41)\%$ ,  $(21.05 \pm 5.37)\%$ , 与 NC 组相比, miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 细胞的细胞凋亡率均显著增加, 差异均有统计学意义

( $t=11.750$ ,  $10.030$ ,  $P=0.000$ ,  $0.001$ )。

2.5 miR-495 对食管癌细胞凋亡相关蛋白表达的影响 见表 2。Western blotting 结果显示 Eca109-RAD 细胞经辐射、Eca109-DDP 细胞经顺铂处理后, 与 NC 组相比, miR-495 mimic 组 Eca109-RAD 和 Eca109-DDP 细胞中 Bcl-2 蛋白表达均降低, Bax 和 caspase 3 蛋白的表达均增加 ( $P < 0.05$ )。

表 2 Western blotting 检测 miR-495 对食管癌细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	Eca109-RAD				Eca109-DDP			
	NC 组	miR-495mimi 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	NC 组	miR-495mimic 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
Bcl-2	$1.09 \pm 0.06$	$0.91 \pm 0.03$	4.650	0.006	$0.89 \pm 0.05$	$0.52 \pm 0.07$	7.450	0.001
Bax	$0.73 \pm 0.08$	$2.06 \pm 0.14$	14.290	0.000	$0.28 \pm 0.04$	$1.03 \pm 0.10$	12.060	0.000
caspase 3	$0.32 \pm 0.05$	$0.83 \pm 0.07$	10.270	0.000	$0.44 \pm 0.06$	$0.85 \pm 0.08$	7.100	0.001

### 3 讨论

食管癌是导致世界范围内高死亡率和预后差的最常见恶性消化系统肿瘤之一, 严重威胁患者的生命健康和降低患者的生存质量<sup>[1]</sup>。根据组织病理学食管癌分为两种亚型: 食管鳞状细胞癌和食管腺癌, 其中食管鳞状细胞癌是最主要和最普遍的组织学亚型, 在中国食管癌病例中食管鳞状细胞癌占 90% 以上<sup>[10]</sup>。早期食管癌的治疗主要是手术切除, 但是由于患者早期缺乏特异的临床症状, 食管癌患者往往被诊断为晚期, 晚期患者由于出现转移和周围组织器官浸润, 无法进行手术切除, 因此化学治疗和放射治疗是晚期患者的主要治疗手段, 但是大部分患者出现化疗和放疗抵抗, 导致患者 5 年生存率较低, 不足 30%<sup>[2]</sup>。因此研究食管癌化疗和放疗敏感度相关的分子机制, 对探索治疗靶点, 改善食管癌

患者预后具有重要意义。

miRNA 属于长度为 19 ~ 24 个核苷酸的小非编码 RNA, 不具备编码蛋白质的功能, 可以通过与靶 mRNA 的互补结合而在转录后调控靶基因, 在细胞分化、生长、发育和运动等几乎所有的生理过程中发挥重要调控作用<sup>[11]</sup>。研究报道 miRNA 表达异常导致疾病的发生, 其中人类恶性肿瘤发生发展中具有关键作用<sup>[4]</sup>, 是目前的研究热点。人类 14q32.31 基因簇位于基因组的印迹区域, 包含许多编码 miRNA 的基因, 参与促进正常组织的发育并调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、转移和化学敏感性<sup>[12]</sup>。miR-495 是 14q32.31 miRNA 簇的成员, 是正常胰腺发育的重要因子, 其与 miRNA let-7b 一起诱导分化, 通过抑制肝细胞核因子 6 来防止胰腺腺泡细胞的化生, 同时 miR-495 与 14q32.31 簇中的其他

miRNA一样,密切参与肿瘤的进展<sup>[13]</sup>。miR-495在口腔鳞状细胞癌组织和细胞系中表达下调,并显著抑制口腔鳞状细胞癌细胞的增殖、迁移、侵袭和上皮-间质转化(EMT)相关蛋白<sup>[6]</sup>。同时miR-495在食管癌中也有研究报道,MAO等<sup>[8]</sup>报道在食管癌组织中miR-495的表达降低,并与淋巴结转移、侵袭、TNM分期增加和患者预后不良相关,miR-495的过表达抑制细胞增殖、迁移和侵袭能力,诱导细胞周期阻滞,表明miR-495在食管癌中是具有重要功能的分子。在非小细胞肺癌中miR495-UBE2C-ABCG2/ERCC1轴通过下调抗药基因和减少顺铂抗性逆转顺铂的抗性,以及miR-495低表达与胃癌多药耐药性相关<sup>[7]</sup>,表明miR-495与肿瘤的耐药相关,但是miR-495在食管癌耐药方面的相关报道未知,miR-495是否与食管癌包括肿瘤化疗和放疗的治疗抵抗相关,引起我们的关注。

本文首先诱导建立了放疗抵抗食管癌细胞Eca109-RAD及顺铂耐药食管癌细胞Eca109-DDP,qRT-PCR检测发现miR-495在Eca109-RAD及Eca109-DDP细胞中表达降低,提示miR-495与食管癌放疗抵抗和化疗耐药相关。以及miR-495 mimic转染Eca109-RAD细胞后发现miR-495增加食管癌细胞对放疗敏感度,以及经4 Gy剂量照射NC组和miR-495 mimic组Eca109-RAD细胞后,miR-495 mimic组细胞增殖和平板克隆形成能力降低,细胞凋亡增多,表明miR-495与食管癌放疗敏感性相关。CHEN等<sup>[8]</sup>研究发现miR-495通过抑制耐药相关基因ABCG2和ERCC1逆转非小细胞肺癌细胞顺铂的耐药。顺铂是广泛应用于各种恶性肿瘤的化学药物,具有广谱性,在食管癌患者的化疗治疗中处于一线药物地位,但食管癌细胞对其常常产生抵抗性,导致患者治疗效果不佳<sup>[9]</sup>,因此本文研究了miR-495在食管癌细胞顺铂耐药方面的作用。首先miR-495 mimic转染Eca109细胞后发现miR-495增加食管癌细胞对顺铂作用的敏感度,经0.4 ng/ml浓度处理NC组和miR-495 mimic组Eca109-DDP细胞后,miR-495 mimic组细胞增殖和平板克隆形成能力降低,细胞凋亡增多,表明miR-495与食管癌化疗耐药相关。同时结果表明miR-495增加食管癌细胞对放射和顺铂敏感性可能是通过调控细胞凋亡发挥作用,而细胞凋亡的发生是在细胞凋亡蛋白的调控作用下发生的,因此本文采用Western blotting检测了相关凋亡蛋白的变化,其中Bcl-2基因是经典的抗凋亡基因,和促凋亡基因Bax均属于Bcl-2家族,Bcl-2蛋白的活性可被Bax调控,两者在肿瘤的放疗、化疗和靶向治疗等治疗作用中发挥重要的调控作用<sup>[14]</sup>,在已有的报道中两者与食管癌的化疗和放疗

敏感性中均具有重要作用<sup>[15]</sup>。在凋亡信号刺激的作用下,Bax蛋白表达升高,导致线粒体膜的通透性增加,促使凋亡蛋白caspase 3的激活,caspase 3蛋白的激活是凋亡发生不可逆转的重要标志<sup>[16]</sup>。本文发现在Eca109-RAD细胞和Eca109-DDP细胞中过表达miR-495,并在放射线和DDP的作用下,细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2表达降低,促凋亡蛋白Bax和caspase 3的表达增加,表明miR-495通过调控凋亡相关蛋白促进细胞凋亡在食管癌放疗和化疗中发挥增敏作用。

综上所述,miR-495促进食管癌细胞化疗和放疗的敏感性,其作用机制可能通过调控凋亡蛋白促进细胞凋亡发挥作用,miR-495可能是逆转食管癌化疗和放疗抵抗性,以及治疗食管癌的潜在分子靶点。

#### 参考文献:

- [1] 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-A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] BAI Yongying, LIN Huayue, FANG Zanxi, et al. Plasma microRNA-19a as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma diagnosis and prognosis[J]. Biomarkers in Medicine, 2017, 11(5): 431-441.
- [3] ZHANG Nan, ZHANG Shaowei. Long-term effects of radiation prior to surgery and chemotherapy on survival of esophageal cancer undergoing surgery[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(43): e17617.
- [4] RAZDAN A, DE SOUZA P, ROBERTS T L. Role of microRNAs in treatment response in prostate cancer[J]. Current Cancer Drug Targets, 2018, 18(10): 929-944.
- [5] TAN Aili, LUO Ruoyu, RUAN Peng. MiR-495 promotes apoptosis and inhibits proliferation in endometrial cells via targeting PIK3R1[J]. Pathology Research and Practice, 2019, 215(3): 594-599.
- [6] WANG Yong, JIA Li, WANG Bin, et al. MiR-495/IGF-1/AKT signaling as a novel axis is involved in the Epithelial-to-Mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma[J]. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2019, 77(5): 1009-1021.
- [7] CHEN Sheng, WU Jian, JIAO Kai, et al. MicroRNA-495-3p inhibits multidrug resistance by modulating autophagy through GRP78/mTOR axis in gastric cancer[J]. Cell Death & Disease, 2018, 9(11): 1070.
- [8] MAO Yu, LI Liang, LIU Jia, et al. MiR-495 inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by targeting Akt1[J]. Oncotarget, 2016, 7(32): 51223-51236.
- [9] 国家卫生健康委员会. 食管癌诊疗规范(2018年版)[J]. 中华消化病与影像杂志(电子版), 2019, 9(4): 158-192.

(下转第29页)

- for Medical and Pharmacological Sciences, 2019, 23(7): 2809-2816.
- [8] FESLER A, JU Jingfang. Development of microRNA-based therapy for pancreatic cancer[J]. Journal of Pancreatolgy, 2019, 2(4): 147-151.
- [9] LIN Wan, MIAO Yu, MENG Xiangkun, et al. MiRNA-765 mediates multidrug resistance via targeting BATF2 in gastric cancer cells[J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(6): 1021-1030.
- [10] WANG Shishuo, FANG Yeying, HUANG Jiacheng, et al. Clinical value of microRNA198-5p downregulation in lung adenocarcinoma and its potential pathways[J]. Oncology Letters, 2019, 18(3): 2939-2954.
- [11] 邵建斌, 杨梅兰. miR-198 靶向 MAPK1 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的调控作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25(12):1259-1263.
- SHAO Jianbin, YANG Meilan. MiR-198 regulates proliferation and apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via targeting MAPK1 [J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2018, 25(12):1259-1263.
- [12] XU Fei, NI Mengdong, LI Jiajia, et al. Circ0004390 promotes cell proliferation through sponging miR-198 in ovarian cancer[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 526(1): 14-20.
- [13] 张鑫浩, 张涛元, 李俏, 等. 基于 GEO 芯片数据的肝癌关键生物标志物的筛选与鉴定及生物信息学分析[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(4):26-31.
- ZHANG Xinhao, ZHANG Taoyuan, LI Qiao, et al. Screening, identification and bioinformatics analysis of key biomarkers for hepatocellular carcinoma based on GEO chip data [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(4):26-31.
- [14] CHEN Liang, HEIKKINEN L, WANG Changliang, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(5): 1836-1852.
- [15] SALIMINEJAD K, KHORRAM KHORSHID H R, SOLEYMANI FARD S, et al. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(5): 5451-5465.
- [16] ZHU Lin, XUE Feng, XU Xiangying, et al. MicroRNA198 inhibition of HGF/c-MET signaling pathway overcomes resistance to radiotherapy and induces apoptosis in human non-small-cell lung cancer[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(9): 7873-7886.
- [17] 王磊, 师国珍. miR-198 在肝细胞癌组织中的表达[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2019, 33(9):904-906.
- WANG Lei, SHI Guozhen. Expression of miR-198 in hepatocellular carcinoma [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2019, 33(9):904-906.
- [18] ASHRAFIZADEH M, ANG H L, MOGHADAM E R, et al. MicroRNAs and their influence on the ZEB family: Mechanistic aspects and therapeutic applications in cancer therapy[J]. Biomolecules, 2020, 10(7): 1040.
- [19] GLOUSHANKOVA N A, ZHITNYAK I Y, RUBTSOVA S N. Role of Epithelial-Mesenchymal transition in tumor progression[J]. Biochemistry(Mosc), 2018, 83(12): 1469-1476.
- [20] 张青云, 傅俊江, 陈汉春. 上皮间质转化介导肿瘤转移的分子机制[J]. 生命科学研究, 2018, 22(6):503-510.
- ZHANG Qingyun, FU Junjiang, CHEN Hanchun. The molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transition mediating tumor metastasis [J]. Life Science Research, 2018, 22(6):503-510.

收稿日期: 2021-01-07

修回日期: 2021-09-08

## (上接第17页)

- National Health Commission. Esophageal cancer diagnosis and treatment specification(2018 edition) [J]. Chinese Journal of Digestion and Medical Imageology(Electronic Edition), 2019, 9(4): 158-192.
- [10] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2017, 67(1): 7-30.
- [11] 肖小平, 张熊, 秦光明. 食管癌和良性食管疾病患者血浆 miRNA-21 和 miRNA-143 检测的临床应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(4):72-75, 139.
- XIAO Xiaoping, ZHANG Xiong, QIN Guangming. Clinical research of detecting plasma miRNA-21 and miRNA-143 for identifying early esophageal cancer and benign esophageal diseases[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(4):72-75, 139.
- [12] AMES H M, YUAN Ming, VIZCAINO M A, et al. MicroRNA profiling of low-grade glial and glioneuronal tumors shows an independent role for cluster 14q3231 member miR-487b[J]. Modern Pathology, 2017, 30(2): 204-216.
- [13] CHEN Hongli, WANG Xiaman, BAI Ju, et al. Expression, regulation and function of miR-495 in healthy and tumor tissues[J]. Oncology Letters, 2017, 13(4): 2021-2026.
- [14] 杨萍, 汪莉, 王青, 等. 奥沙利铂联合放疗治疗鼻咽癌患者的效果及对血清 Bcl-2, Bax 蛋白水平的影响[J]. 河南医学研究, 2019, 28(19):3467-3471.
- YANG Ping, WANG Li, WANG Qing, et al. Effect of oxaliplatin combined with radiotherapy on serum Bcl-2, Bax protein level in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. Henan Medical Research, 2019, 28(19): 3467-3471.
- [15] WU Gang, CHEN Guangzong, ZHOU Jialiang, et al. Liriodenine enhances radiosensitivity in esophageal cancer ECA-109 cells by inducing apoptosis and G/M arrest[J]. Oncology Letters, 2018, 16(4): 5020-5026.
- [16] SUN Lei, WEI Lingyun, WEI Lei, et al. Correlation between Bax gene polymorphisms and esophagus cancer[J]. Oncology Letters, 2018, 16(6): 7097-7101.

收稿日期: 2021-09-03

修回日期: 2021-10-30