

MicroRNA-150对NK/T细胞淋巴瘤组织和NK-92细胞辐射敏感性的影响

吴少杰^a, 黄宇贤^a, 陈俊^b, 郭坤元^a (南方医科大学珠江医院 a. 血液科, b. 肿瘤科, 广东 广州 510282)

[摘要] **目的:** 探讨 microRNA-150(miR-150)对NK/T细胞淋巴瘤组织和NK-92细胞辐射敏感性的影响。**方法:** 选取2010年1月至2016年1月在南方医科大学珠江医院收治的NK/T细胞淋巴瘤患者36例为研究对象,并收集患者的组织标本。所有患者均接受放疗并采用淋巴瘤国际工作组标准(IWG)评价患者的近期疗效,根据疗效分为完全缓解(CR)组和未完全缓解组(Non-CR)。实时荧光定量PCR检测患者肿瘤组织及NK/T细胞淋巴瘤细胞系中miR-150的表达量,向淋巴瘤NK-92细胞转染miR-150 mimics,利用MTT法和集落形成实验分析过表达miR-150对NK-92细胞辐射敏感性的影响,流式细胞术检测转染过表达miR-150对NK-92细胞辐射致凋亡的影响,Western blotting实验检测miR-150对凋亡相关蛋白Caspase3和PARP表达的影响。**结果:** 根据IWG标准,12例患者CR,24例患者为Non-CR;与CR组相比,Non-CR组患者miR-150表达量普遍下调($P<0.05$)。与正常对照sCD3⁺CD56⁺ NK细胞相比,NK/T细胞淋巴瘤组织(9.10 ± 0.19 vs 4.01 ± 0.22 , $P<0.01$)和5种NK/T细胞淋巴瘤细胞系中miR-150呈明显低表达($P<0.05$)。过表达miR-150可明显降低辐射后NK-92细胞的增殖能力($P<0.01$)和集落形成能力($P<0.01$),明显提高NK-92细胞的辐射增敏比(10 Gy时辐增敏比为5.375),显著促进辐射诱导的NK-92细胞的凋亡[(37.3 ± 1.24)% vs (28.3 ± 2.34)%, $P<0.05$],可促进激活的Caspase 3和PARP蛋白表达。**结论:** miR-150在NK/T细胞淋巴瘤组织标本及体外培养细胞系中的表达呈显著低水平,miR-150表达量低的患者放疗后缓解率低;转染miR-150 mimics能够增强辐射对NK-92细胞增殖的抑制作用和促进辐射诱导致凋亡作用,对NK/T细胞淋巴瘤有辐射增敏作用。

[关键词] microRNA-150(miR-150);NK/T细胞淋巴瘤;辐射敏感性;增殖;凋亡

[中图分类号] R733.4; R730.59; R730.55 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2017)08-0838-07

Effect of microRNA-150 on the radiosensitivity of NK/T cell lymphoma tissues and NK-92 cells

WU Shaojie^a, HUANG Yuxian^a, CHEN Jun^b, GUO Kunyuan^a (a. Department of Hematology, b. Department of Oncology, Zhujiang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To investigate the expression of MicroRNA-150 (miR-150) in NK/T cell lymphoma tissues and its effect on radio-sensitivity of NK-92 cells. **Methods:** Thirty-six patients with NK/T cell lymphoma that treated in Zhujiang Hospital Affiliated to Southern Medical University were included as study subjects, and their tissue samples were collected. All the patients received similar radiotherapy, and the short-term efficacy was evaluated by the standard of International Workgroup (IWG) of Lymphoma. The patients were further divided into CR (complete remission) group and Non-CR (non-complete remission) group according the treatment efficacy. The miR-150 expression in lymphoma tissues and NK/T cell lymphoma cell lines were detected by qRT-PCR. The NK-92 cells were then transfected with miR-150 mimics. The effect of miR-150 mimics on NK-92 cell radiosensitivity was analyzed by MTT and colony formation assay; effect of miR-150 mimics on radiation induced apoptosis of NK-92 cells were analyzed by Flow Cytometry; and the effect of miR-150 mimics on the expression of apoptosis-related proteins (Caspase 3 and PARP) in NK-92 cells was determined by Western blotting. **Results:** According to IWG criteria, 12 patients had CR while the other 24 patients had Non-CR. Compared with CR group, the microRNA-150 level in Non-CR group was significantly decreased($P<0.05$). Compared with the normal sCD3⁺CD56⁺ NK cells, miR-150 was significantly lower in NK/T cell lymphoma tissues (9.10 ± 0.19 vs 4.01 ± 0.22 $P<0.01$) and five NK/T cell lymphoma

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目资助(No.81400156)。Project supported by the National Natural Science Foundation for Youth Scholar of China(No.81400156)

[作者简介] 吴少杰(1982-),博士,主治医师,讲师,主要从事淋巴瘤耐药机制的研究,E-mail:wshj510515@163.com

[通信作者] 郭坤元(GUO Kunyuan,corresponding author),博士、主任医师、教授,主要从事恶性血液肿瘤的防治基础和临床研究,E-mail:wodeyoujian@foxmail.com

[优先发表] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170731.1054.018.html>

cell lines ($P<0.05$); over-expression of miR-150 significantly decreased the proliferation and colony formation of NK-92 cells (all $P<0.01$), and increased the sensitivity enhancement ratio (SER) after radiation (the SER was 5.375 after 10 Gy exposure; in addition, over-expressions of miR-150 significantly promoted the radiation-induced apoptosis of NK-92 cells [(37.3±1.24)% vs (28.3±2.34)% , $P<0.05$], and promoted the protein expression of caspase 3 and PARP in NK-92 cells. **Conclusion:** miR-150 expression significantly decreased in both NK/T cell lymphomas tissues and cell lines. The patients of low miR-150 expression had low CR after radiotherapy. miR-150 mimics transfection promoted radiation-induced apoptosis of NK-92 cells. miR-150 has an enhancement effect on radio-sensitivity of NK/T cell lymphoma.

[Key words] microRNA-150 (miR-150); NK/T cell lymphoma; radiosensitivity; proliferation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(8): 838-844. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2017.08.004]

NK/T细胞淋巴瘤好发于亚洲及拉丁美洲,在中国占恶性淋巴瘤的5%~10%^[1]。NK/T细胞淋巴瘤具有高度侵袭性,预后差且患者生存期短。对于局限性的NK/T细胞淋巴瘤患者,放疗是主要的治疗方法,单纯放疗CR能达到70%以上。NK/T细胞淋巴瘤对以蒽环类为主的化疗药物抵抗,化疗和放疗联合治疗的患者长期生存并未获益^[2]。约50%患者接受放疗后出现复发,肿瘤细胞对放疗的反应是复杂的,治疗效果依赖于多个因素,包括剂量、剂量率、放疗次数及肿瘤细胞特性等。目前认为放疗失败的主要原因是肿瘤细胞放疗抵抗^[3]。因此,更好地了解放疗抵抗的分子机制有利于改进放疗策略。MicroRNA (miRNA)是一类短的、高度保守的非编码RNA,具有调控细胞生长和促凋亡作用^[4]。有研究^[5]显示,miRNA在各类肿瘤中异常表达。也有证据^[6]表明,miRNA能调节肿瘤细胞辐射敏感性,表明其具有提高放疗作用的潜能。MicroRNA-150(miR-150)被认为是免疫细胞分化和活化的关键调节因子,在成熟B、T、NK细胞及造血系统的其他类型细胞中高表达^[7]。研究^[7-8]表明,miR-150对部分肿瘤起到抑癌作用而对另一部分肿瘤中起到致癌作用。有研究^[9]进一步证实,低表达的miR-150促进NK/T细胞淋巴瘤的发生及发展,但miR-150在NK/T细胞淋巴瘤治疗中的应用目前未见报道。本研究检测miR-150在NK/T细胞淋巴瘤组织和细胞系中表达情况,探索其对NK/T细胞淋巴瘤辐射敏感性的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年1月至2016年1月南方医科大学珠江医院收治的经病理证实的NK/T细胞淋巴瘤患者36例为研究对象,其中男性20例,女性16例;年龄23~65岁,平均年龄(46.0±7.0)岁。结合CT及PET/CT结果,根据Ann Arbor分期标准^[10]: I期3例, II期7例, III期18例, IV期8例。纳入标准:均在我院行鼻

腔肿物及淋巴结活检术后病理证实为NK/T细胞淋巴瘤,患者确诊之前未接受放化疗。排除标准:中性粒细胞 $<0.5\times 10^9/L$ 患者,妊娠或者哺乳期妇女;免疫缺陷性疾病患者,口服免疫抑制剂或合并严重感染未控制的患者,合并其他恶性肿瘤患者, ECOG评分 >2 分者,研究者判断的其他不适合入组的患者。上述标本的获取均取得受试者或其家属的知情同意,并通过南方医科大学伦理委员会批准。

1.2 主要材料与试剂

人NK/T细胞淋巴瘤细胞系(NK-92、KHYG-1、HANK-1、SNK-1和SNK-6)购自ATCC,对照的sCD3⁺CD56⁺表型的NK细胞系由本课题组培养并鉴定。RPMI 1640培养基、含0.25% EDTA胰酶购于Gibco公司,胎牛血清购于BIOSUN公司,Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒购于大连美罗公司, TaqTM II实时荧光定量PCR检测试剂盒购自TaKaRa公司, Lipofectamine™ 2000转染试剂盒购自美国Invitrogen公司, Caspase 3活性检测试剂盒购于碧云天公司, miR-150 mimic和miR-150 NC由广州锐博生物科技有限公司合成,总RNA快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.3 随访和疗效评价

患者至少接受1个疗程总剂量为45 Gy的放疗,放疗后4周来院做CT或PET/CT等影像学检查并判断疗效。近期疗效评估采用淋巴瘤国际工作组评价疗效标准(IWG)^[11]: CR为所有目标病灶完全消失,至少维持4周; PR为基线病灶最大径之和减少50%以上,至少维持4周; SD为基线病灶最大径之和有所减少但未达PR,或有增加,但未达病变进展,无新病灶出现,持续4周以上; PD为基线病灶最大径之和增加50%以上或出现新病灶。将PR、SD、PD均设定为未完全缓解组(Non-CR组)。

1.4 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测NK/T细胞淋巴瘤组织及细胞系中miR-150的表达

使用TRIzol试剂提取NK/T细胞淋巴瘤组织、人

NK/T 细胞淋巴瘤细胞系(NK-92、KHYG-1、HANK-1、SNK-1 和 SNK-6)及正常人血清中收集的 sCD3⁺CD56⁺表型的NK 细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA, 其中 miR-150 的逆转录引物序列为 5'-GTCGTATGCCT-CAACTGGTGTCTGGA-3', 定量上游引物序列为 5'-ACACTCCAGCTGGGTCTCCCAACCCTTGAC-CA-3', 定量下游引物序列为 5'-CTCAACTGGTGTCTGGA-3'。U6 的逆转录引物序列为 5'-CGCTT CACGAACGCTTCACGAATTTGCGTGTGCAT-3', U6 定量上游引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 下游引物序列为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGTGT-3'。使用 ReverTra Ace qRT-PCR Kit 反转录试剂盒中的缓冲液和酶进行逆转录, 反应程序为 16 °C, 5 min; 37 °C, 30 min; 98 °C, 5 min; 4 °C 短期保存。定量 PCR 检测程序为: 50 °C 2 min; 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 32 s, 40 个循环。NK/T 细胞中 miR-150 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算; NK/T 细胞淋巴瘤组织样品中 miR-150 的相对表达量以 $\log_2 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

1.5 NK-92 细胞系培养和 miR-150 mimics 转染至 NK-92 细胞

人 NK-92 细胞系(经以上实时荧光定量 PCR 检测 miR-150 表达量最低的细胞系)使用含 10% 胎牛血清及 100 U/ml IL-2 的 DMEM 培养基, 传代时使用 0.25% 胰酶消化细胞 2 min, 均置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。实验共设置三组: 未转染组(Mock)、阴性对照转染(NC mimics)组、转染 miR-150 mimics 组。利用 Lipofectamine™ 2000 试剂, NK-92 细胞处于对数生长期时, 以每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板, 转染前 9 h 铺板, 过夜, 待汇合度合适后, 将待转染的 miR-150 mimics 及 miR-NC 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 °C、5% CO₂ 培养 6~8 h 后换液, 必要时 24 h 后重复转染 1 次, 48 h 后收集细胞。以上实验重复 3 次。qRT-PCR 鉴定转染效果。

1.6 MTT 法检测转染 miR-150 mimics 对照射后淋巴瘤细胞增殖的影响

取对数生长期 NK-92 细胞, 消化后计数, 在 6 孔板中每孔接种 4 000 个 NK-92 细胞, 设未转染组(Mock)、阴性对照组转染(NC mimics)组、miR-150 mimics 组, 各组细胞均暴露于 6 mV 的 X 线加速器中, 剂量率为 300 cGy/min, 分别接受 0、2、4、6、8 和 10 Gy 剂量照射。照射结束后以完全培养基培养 72 h, 吸出培养基, 每孔加入 100 μ l 培养基和 10 μ l 的 MTT 母液, 置于细胞培养箱 4 h 后吸出培养液, 每孔加入二甲基亚砜 100 μ l, 震荡 10 min, 置酶标仪测

570 nm 波长处光密度(D)值, 细胞抑制率(%)=(1-实验组 D_{570} 值 / 对照组 D_{570} 值)×100%。实验重复 3 次。

1.7 集落形成实验检测转染 miR-150 mimics 对照射后淋巴瘤细胞克隆形成能力的影响

分别取 Mock 组、NC mimics 组及 miR-150 mimics 转染组对数生长期培养细胞, 用 PBS 洗涤后胰酶消化、离心。采用血球计数板计数细胞。按一定细胞数量(照射 0 Gy 组接种 200 个/孔, 照射 2 Gy 接种 400 个/孔, 照射 4 Gy 接种 600 个/孔, 照射 6 Gy 组接种 1×10^3 个/孔, 照射 8 Gy 组接种 1.5×10^3 个/孔, 照射 10 Gy 接种 2×10^3 个/孔)接种于 6 孔板中, 分别接受 0、2、4、6、8、10 Gy 剂量照射。照射后置 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱培养 12 d, 每天观察细胞, 待细胞集落形成即可终止实验。弃去培养皿中的培养液, PBS 清洗后, 使用 100% 甲醇固定 30 min, 吉姆萨染色后显微镜下计数细胞克隆数。计算出细胞存活分数(survival fraction, SF), 实验重复 3 次。克隆形成率(%)=(克隆数/接种细胞数)×100%, SF=某一剂量照射组克隆形成率/未照射组克隆形成率。利用软件 GraphPad Prism 6 并根据单击多靶模型方程 $y=1-1-\exp(-D/Do)^n$ 拟合细胞存活曲线^[12], 计算放射增敏比(SER), SER=对照组 SF/实验组 SF。实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测转染 miR-150 mimics 对照射后淋巴瘤细胞凋亡的影响

将 Mock 组、NC mimics 组及 miR-150 mimics 组的 NK-92 细胞铺入 6 孔板, 3 组细胞接受 6 Gy 照射, 培养 48 h 后收集细胞。按照细胞凋亡检测试剂盒 PE Annexin V Apoptosis Detectin Kit 说明操作, 取 1×10^6 个细胞用预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入 200 μ l 的结合缓冲液重悬后, 加入 5 μ l Annexin V 和 10 μ l 碘化丙啶染色液, 混匀后室温避光孵育 15 min, 流式细胞仪检测凋亡, 用 FACS Diva 软件分析数据。实验重复 3 次。

1.9 Western blotting 检测不同转染组淋巴瘤细胞照射后 Caspase-3 和 PARP 的表达水平

NC mimics 组及 miR-150 mimics 组 NK-92 细胞经 6 Gy 照射后, 弃去培养基, 用 PBS 冲洗细胞, 然后每孔加入适量细胞裂解缓冲液, 冰上裂解细胞并收集蛋白。采用 BCA 法测定细胞裂解液中蛋白的浓度。每个样本取等量的总蛋白, 加上适量的 5× 上样缓冲液, 进行 10% SDS-PAGE, 将蛋白转印到 PVDF 膜上, 然后用合适的一抗和二抗杂交, ECL 发光检测。Gene gnome 采集图像并利用 ImageJ 软件进行灰度值分析, 计算 Caspase-3 和 PARP 蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

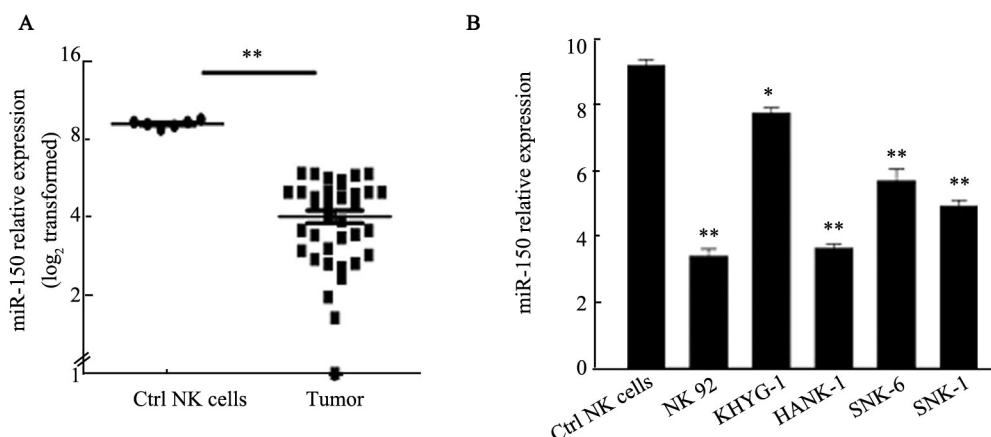
1.10 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学软件析, 定量数据以 $\bar{x} \pm s$

表示,数据采用配对或不配对的 t 检验,采用 Graph-Pad Prism 6 图像软件进行图形处理,利用卡方检验验证 miR-150 与淋巴瘤临床病理特征的关系,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-150 在 NK/T 细胞淋巴瘤组织及细胞系中低表达



A: Expression of miR-150 in 36 tumor samples and Ctrl NK cells;

B: miR-150 expression levels varied in different NK/T lymphoma cell lines

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Ctrl NK cell group

图1 qRT-PCR检测miR-150在NK/T细胞淋巴瘤组织及细胞系中的表达

Fig.1 Expression levels of miR-150 in NK/T cell lymphoma tissues and cell lines examined by qRT-PCR

2.2 NK/T 细胞淋巴瘤组织中 miR-150 表达水平与临床病理特征的关系

根据图 1A 中 miR-150 相对表达量,应用接受者操作特征曲线(ROC 曲线)分析 miR-150 表达水平来确定 miR-150 表达的临界阈值为 4.54 ± 1.12 ,将高于此值定为高表达组,而低于此值定为低表达组。另外,NK/T 细胞淋巴瘤的发生发展与 EBV 反复感染有关,本组患者把 EBV 病毒载量作为随访指标,将 < 50 copy/ml 定为阴性、 ≥ 50 copy/ml 定为阳性。分析结果(表 1)显示,miR-150 低表达组患者中 EBV 血症阳性率明显升高($P < 0.05$),而患者性别、年龄、临床分期、IPI 评分等与 miR-150 表达无关($P > 0.05$)。在短期疗效(放疗后 4 周)评估中,本组患者有 12 例患者 CR,24 例患者 Non-CR,Non-CR 组中 miR-150 表达水平普遍低($P < 0.01$),表明低 miR-150 表达水平对放疗不敏感。

2.3 转染后 NK-92 细胞 miR-150 mimics 明显过表达

利用 qRT-PCR 法检测转染 miR-150 mimics 组及对照组淋巴瘤细胞系(NK-92、KHYG-1、HANK-1、SNK-1 和 SNK-6)中 miR-150 的相对表达量。结果

qRT-PCR 检测结果(图 1A)显示,NK/T 细胞淋巴瘤组织中 miR-150 的表达量明显低于正常 sCD3-CD56⁺ NK 细胞(4.01 ± 0.22 vs 9.10 ± 0.19 , $P < 0.01$);此外,5 个 NK/T 细胞淋巴瘤细胞系均较正常对照 NK 细胞呈明显低表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 1B)。其中,NK-92 细胞 miR-150 表达量最低,故选取该细胞系作为后续细胞实验的研究对象。

(图 2)显示,转染组细胞的 miR-150 表达量显著升高,转染组的 miR-150 表达量是对照组的 1 000~3000 倍。

2.4 过表达 miR-150 明显增强辐射对 NK-92 细胞增殖的抑制作用

Mock 组、NC mimics 组及 miR-150 mimics 组细胞接受不同剂量照射后的 MTT 实验结果(图 3)显示,同 Mock 组及 NC mimics 组相比,miR-150 mimics 转染组细胞杀伤效应明显增加($P < 0.01$);而 Mock 组与 NC mimics 组间无统计学差异($P > 0.05$)。结果表明 miR-150 mimics 增加了 NK-92 细胞对辐射的敏感性。

2.5 过表达 miR-150 明显增强 NK-92 细胞对辐射的敏感性

集落形成实验被认为是检测细胞辐射敏感性的金标准。将各组细胞均接受 0、2、4、6、8 和 10 Gy 剂量照射,利用集落形成实验检测其集落形成率,计算 SF,绘制存活曲线。结果(图 4)表明,过表达 miR-150 能降低 NK-92 细胞照射后的 SF,10 Gy 照时,miR-150 mimics 组细胞的 SF(0.0016)明显低于 NC mimics 组

(0.0086),其辐射增敏比SER_{10Gy}为5.375,该结果说明miR-150能够明显增强NK-92细胞的辐射敏感性。

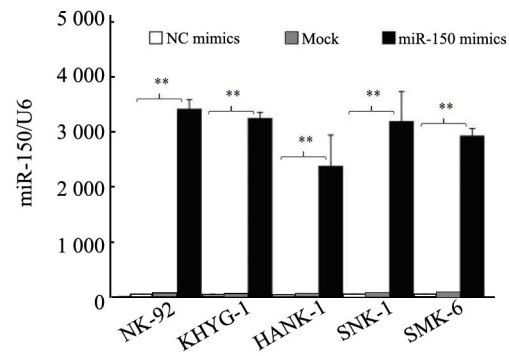
2.6 过表达miR-150能明显促进辐射所致的NK-92细胞的凋亡

NK-92细胞转染miR-150 mimics和NC mimics后,培养24h,接受不同剂量的照射(0、2、4、6、8和10 Gy),24h后进行AnnexinV/PI双染色及流式细胞仪分析。结果(图5A)显示,6 Gy照射的miR-150 mimics组细胞凋亡率较NC mimics组明显升高[(37.3±1.24)% vs (28.3±2.34)%*P*<0.05]; Western blotting方法检测激活的Caspase3和PARP表达量,结果(图5B)显示,miR-150 mimics组细胞中Caspase3和PARP表达量均明显高于NC mimics组(0.12±0.02 vs 0.06±0.01, 0.32±0.03 vs 0.05±0.01;均*P*<0.01)。上述结果表明,miR-150可能通过诱导细胞凋亡而发挥辐射增敏作用。

表1 NK/T细胞淋巴瘤组织中miR-150表达水平与临床病理特征的关系[n(%)]

Tab.1 Correlation between the expression of miR-150 in NK/T cell lymphoma tissues and clinicopathologic features(n[%])

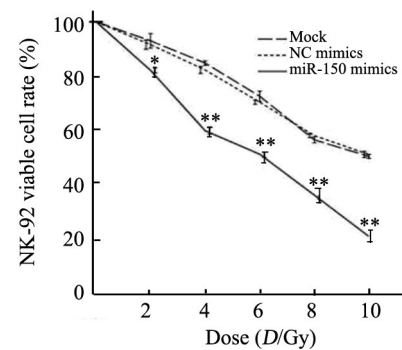
Feature	N	miR-150 level		P
		Low	High	
Gender				0.278
Female	16	12(75.0)	4(25.0)	
Male	20	12(55.0)	8(40.0)	
Age(t/a)				0.637
≥40	15	10(66.7)	5(33.3)	
<40	21	14(77.8)	7(22.2)	
Therapy response				0.000
CR	12	3(25.0)	9(75.0)	
Non-CR	24	21(87.5)	3(12.5)	
Clinical stage				0.133
I	3	1(33.3)	2(66.7)	
II	7	3(42.8)	4(57.2)	
III	18	15(83.4)	3(16.6)	
IV	8	5(62.5)	3(37.5)	
IPI stage				0.853
1	18	13(72.2)	5(27.7)	
2	14	9(64.2)	5(35.7)	
3	2	1(50.0)	1(50.0)	
4	2	1(50.0)	1(50.0)	
EBV				0.007
Negative	10	3(30.0)	7(70.0)	
Positive	26	21(80.7)	5(19.2)	



***P*<0.01 vs NC mimics group or Mock group

图2 NK/T细胞系转染后过表达miR-150

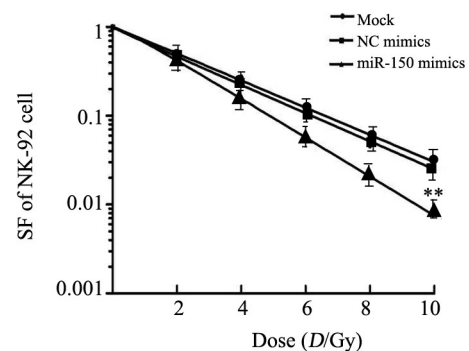
Fig.2 miR-150 was over-expressed in NK/T cells after transfection



***P*<0.05, ***P*<0.01 vs Mock or NC mimics group

图3 MTT检测各组细胞接受不同剂量辐射后的损伤效应

Fig.3 Injury effect on cells of each groups after receiving different doses of radiation detected by MTT



***P*<0.01 vs Mock or NC mimics group

图4 miR-150增强NK-92细胞的辐射敏感性

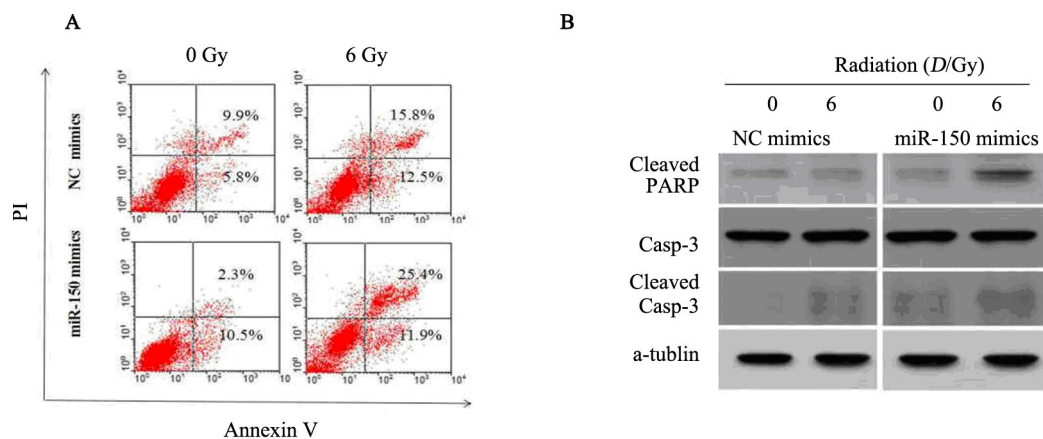
Fig.4 miR-150 mimics enhances the sensitivities of NK-92 cells to IR

3 讨论

NK/T细胞淋巴瘤单纯放疗的效果不是很理想,因为大多数肿瘤都对放疗存在一定的耐受和抵抗,如果加大放疗剂量,又会对周围重要组织造成损

伤。因此,迫切需要利用各种手段降低肿瘤细胞对辐射的抵抗性和耐受性,从而增加其敏感性,比如辐射增敏剂的应用,如丙戊酸钠、甲基莲心碱、特异性

环氧合酶抑制剂以及鱼藤素等。这些药物通过特定的机制对特定肿瘤起到放疗增敏作用。



A: miR-150-transfected and negative-control NK-92 cells were treated with IR.

The cells were collected and stained with PI and Annexin V;

B: After treatment with IR, the cleavages of caspase 3 and PARP was detected by Western blotting analysis

图5 miR-150促进辐射(6 Gy)诱导的NK-92细胞凋亡

Fig. 5 miR-150 promotes the apoptosis of NK-92 cells induced by IR (6 Gy)

miRNA为短链非编码RNA,通过与靶基因特定区域的结合降解靶基因的表达,实现转录后调控作用。因此,miRNA可能通过若干靶基因形成复杂的调控网络,从而影响细胞生长的调节。研究^[7-8]证实,miRNA可以调控肿瘤细胞的生长、周期以及凋亡,为miRNA在放疗增敏中发挥作用提供了实验依据。本研究首先验证了miR-150在NK/T细胞淋巴瘤组织中表达明显下调,这与既往文献报道^[9,13]一致;同时发现低表达miR-150的患者放疗后缓解率低下。另外,5种NK/T细胞淋巴瘤细胞系中miR-150表达量均低且NK-92细胞系中最低。既往文献^[14-16]认为,miRNA在某些肿瘤中具有放疗增敏作用。赵林等^[17]证实miR-126在胃癌中低表达,过表达miR-126具有增加胃癌细胞辐射敏感性的作用。本课题的目的就是探索过表达miR-150是否也能增强NK-92细胞对辐射的敏感性。细胞实验证实,miR-150 mimics组NK-92细胞在同样的辐射剂量下细胞增殖能力及克隆形成率明显下降,过表达miR-150使10 Gy照后NK-90细胞的辐射增敏比上升至5.375,表明miR-150高表达能增强NK/T细胞淋巴瘤辐射敏感性。文献^[18]报道,细胞对辐射的反应与细胞周期和凋亡有关。胡焯等^[19]研究表明,miRNA能调节细胞凋亡。因此,笔者进行了细胞凋亡的检测,结果表明辐射可诱导NK-92细胞的凋亡;在6 Gy剂量照射下miR-150转染组较未转染组NK-92细胞的凋亡率明显增加。表明过表达miR-150可能通过促进辐射诱导的凋亡增强NK-92细胞

的辐射敏感性。本实验结果表明,转染miR-150 mimics组NK-92细胞较阴性对照组细胞的凋亡相关信号蛋白激活的Caspase3和PARP表达明显增加,说明转染miR-150引起的辐射致凋亡作用的加强是与该蛋白信号通路有关。李雪等^[20]认为,miRNA通过影响一些信号通路,比如Ras/MEK/ERK通路及PI3K/AKT通路等来实现放疗增敏作用。HUANG等^[16]证实,AKT信号通路促进NK/T细胞淋巴瘤发生及发展。有研究^[21-23]认为,PI3K/AKT信号通路的活性能导致肿瘤放疗抵抗,抑制该通路能增加肿瘤细胞放化疗敏感性。另有文献报道^[9,24-25],miR-150调节机制与AKT通路活性密切相关,但miR-150是否是通过影响AKT信号通路来增加辐射敏感性值得进一步研究。

总之,过表达miR-150能增强NK-92细胞辐射敏感性,有望成为NK/T细胞淋巴瘤放疗敏感性的潜在靶点。

[参考文献]

- [1] AU W Y, WEISENBURGER D D, INTRAGUMTORNCHAI T, et al. Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project[J]. Blood, 2009, 113(17): 3931-3937.DOI: 10.1182/blood-2008-10-185256.
- [2] LI Y X, LIU Q F, FANG H, et al. Variable clinical presentations of nasal and Waldeyer ring natural killer/T-cell lymphoma[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(8): 2905-2912.DOI: 10.1158/1078-0432.

- CCR-08-2914.
- [3] NOWARSKI R, WILNER O I, CHESHIN O, et al. APOBEC3G enhances lymphoma cell radioresistance by promoting cytidine deaminase-dependent DNA repair[J]. *Blood*, 2012, 120(2): 366-375. DOI: 10.1182/blood-2012-01-402123.
- [4] SHUKIA G C, SINGH J, BARIK S. MicroRNAs: processing, maturation, target recognition and regulatory functions[J]. *Mol Cell Pharmacol*, 2011, 3(3): 83-92. PMID: 22468167.
- [5] FERNANDEZ-MERCADO M, MANTEROLA L, LAWRIE C H. MicroRNAs in lymphoma: regulatory role and biomarker potential [J]. *Curr Genomics*, 2015, 16(5): 349-358. DOI: 10.2174/1389202916666150707160147.
- [6] ZHANG P, WANG L, RODRIGUEZ-AGUAYO C, et al. miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13[J/OL]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5671[2017-07-12]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377070/>. DOI:10.1038/ncomms6671.
- [7] VASILATOU D, PAPAGEORGIOU S, PAPPA V, et al. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis[J]. *Eur J Haematol*, 2010, 84(1): 1-16. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2009.01348.x.
- [8] WANG F, REN X, ZHANG X. Role of microRNA-150 in solid tumors[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(1): 11-16. DOI: 10.3892/ol.2015.3170.
- [9] WATANABE A, TAGAWA H, YAMASHITA J, et al. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma[J]. *Leukemia*, 2011, 25(8): 1324-1334. DOI: 10.1038/leu.2011.81.
- [10] YANG H, FU G, LIU J, et al. Clinical analysis of 42 cases of EBV-positive mature T/NK-cell neoplasms[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 567-574. DOI: 10.3892/etm.2017.4531.
- [11] 黄岩, 樊卫, 曹亚兵, 等. 恶性淋巴瘤的疗效评价-国际工作组标准与修订标准的比较[J]. *肿瘤预防与治疗*, 2008, 21(2): 119-122. DOI: 10.3969/j.issn.1674-0904.2008.02.003.
- [12] KE G, LIANG L, YANG J M, et al. MiR-181a confers resistance of cervical cancer to radiation therapy through targeting the pro-apoptotic PRKCD gene[J]. *Oncogene*, 2013, 32(25): 3019-3027. DOI: 10.1038/onc.2012.323.
- [13] HE Y, JIANG X, CHEN J. The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis[J]. *Oncogene*, 2014, 33(30): 3887-3893. DOI: 10.1038/onc.2013.346.
- [14] ZHANG J X, QIAN D, WANG F W, et al. MicroRNA-29c enhances the sensitivities of human nasopharyngeal carcinoma to cisplatin-based chemotherapy and radiotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2013, 329(1): 91-98. DOI: 10.1016/j.canlet.2012.10.033.
- [15] GONG P, ZHANG T, HE D, et al. MicroRNA-145 modulates tumor sensitivity to radiation in prostate cancer[J]. *Radiat Res*, 2015, 184(6): 630-638. DOI: 10.1667/RR14185.1.
- [16] HUANG Y, DE REYNIES A, DE LEVAL L, et al. Gene expression profiling identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type[J]. *Blood*, 2010, 115(6): 1226-1237. DOI: 10.1182/blood-2009-05-221275.
- [17] 田晓刚, 赵林, 张春林, 等. MicroRNA-126与胃癌患者放化综合治疗效果的关系及其对胃癌SGC-7901细胞的放射增敏作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2017(4): 705-710. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2017.04.021.
- [18] PAVLOPOULOU A, BAGOS P G, KOUTSANDREA V, et al. Molecular determinants of radiosensitivity in normal and tumor tissue: A bioinformatic approach[J]. *Cancer Lett*, 2017, 403(1): 37-47. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.05.023.
- [19] 胡焯, 许小青, 王冰晶, 等. MiR-142-5p通过靶向作用IGF2BP3调控多柔比星诱导的肝癌细胞凋亡[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2017, 24(6): 581-587. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.06.002.
- [20] 李雪, 刘宁波, 赵路军, 等. mTOR抑制剂放疗增敏的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2014(17): 1128-1130. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.20140360.
- [21] MARTINI M, DE SANTIS M C, BRACCINI L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review[J]. *Ann Med*, 2014, 46(6): 372-383. DOI: 10.3109/07853890.2014.912836.
- [22] CANI A, SIMIONI C, MARTELLI A M, et al. Triple Akt inhibition as a new therapeutic strategy in T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(9): 6597-6610. DOI 10.18632/oncotarget.3260.
- [23] WESTIN J R. Status of PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors in lymphoma[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2014, 14(5): 335-342. DOI 10.1016/j.clml.2014.01.007.
- [24] WUERKENBIEKE D, WANG J, LI Y, et al. miRNA-150 downregulation promotes pertuzumab resistance in ovarian cancer cells via AKT activation[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 292(5): 1109-1116. DOI: 10.1007/s00404-015-3742-x.
- [25] SANG W, SUN C, ZHANG C, et al. MicroRNA-150 negatively regulates the function of CD4(+) T cells through AKT3/Bim signaling pathway[J]. *Cell Immunol*, 2016, 306(37): 35-40. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.05.007.

[收稿日期] 2017-06-07

[修回日期] 2017-07-15

[本文编辑] 王映红

· 读者·作者·编者·

文稿中统计学符号规范化书写的要求

本刊严格遵守国家标准 GB 3358-93《统计学术语》的有关规定。为此,请作者书写统计学符号时注意以下要求:(1)样本的算术平均数用英文小写 \bar{x} ,不用大写 X,也不用 Mean 或 M;(2)标准差用英文小写 s,不用 SD;(3)标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$,不用 SE;(4) t 检验用英文小写 t;(5) F 检验用英文大写 F;(6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ;(7)相关系数用英文小写 r;(8)自由度用希腊文小写 ν ;(9)样本数用英文小写 n;(10)概率用英文大写 P;(11)以上符号 \bar{x} 、s、 $s_{\bar{x}}$ 、t、F、 χ^2 、r、 ν 、n、P 均为斜体。请作者注意遵照执行。

(本刊编辑部)