

# DYRK1B 基因对食管鳞癌细胞放射敏感性影响的研究

王修身<sup>1</sup>, 许刚<sup>1</sup>, 丁丹红<sup>1</sup>, 周莎<sup>2</sup>, 卜珊珊<sup>1</sup>

(1. 郑州大学附属肿瘤医院, 河南 郑州 450052; 2. 中山大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060)

**摘要:** [目的] 探讨 DYRK1B 对食管鳞癌放射敏感性的影响及潜在机制, 为提高食管鳞癌患者放射敏感性提供理论依据。[方法] 用脂质体 Lipofectamine 3000 分别包裹 siNC、siDYRK1B 转染食管鳞癌细胞 ECA109, 48 小时后收集细胞 RT-PCR 和蛋白印迹实验检测 ECA109 细胞中 DYRK1B 表达水平。同时取转染 siNC、siDYRK1B 的 ECA109 细胞给予放射处理, 用克隆形成实验检测经不同剂量放射处理后的细胞存活情况并计算放射增敏比; 用流式细胞术检测 4Gy 照射后细胞凋亡率; 用蛋白印迹实验检测凋亡相关蛋白 cleaved PARP-1、cleaved caspase-3 及 DNA 损伤相关蛋白  $\gamma$ -H2AX 表达水平。[结果] 转染 siDYRK1B 的 ECA109 细胞中 DYRK1B mRNA 和蛋白水平明显下降 ( $P < 0.05$ )。与对照组相比, 转染 siDYRK1B 的 ECA109 细胞放射处理后细胞存活减少, 细胞凋亡率增加 ( $P < 0.05$ ), 细胞中 cleaved PARP-1、cleaved caspase-3、 $\gamma$ -H2AX 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。siDYRK1B 转染的 ECA109 细胞放射增敏比为 1.711。[结论] 下调 DYRK1B 明显增强食管鳞癌细胞的放射敏感性, 其机制可能与促进细胞凋亡、抑制 DNA 损伤修复有关。

**关键词:** DYRK1B; 食管鳞癌; 放射敏感性; 凋亡; DNA 损伤修复

**中图分类号:** R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2020)08-0629-05

**doi:** 10.11735/j.issn.1004-0242.2020.08.A012

## Effect of *DYRK1B* Gene on Radiosensitivity of Esophageal Squamous Cell Carcinoma ECA109 Cells

WANG Xiu-shen<sup>1</sup>, XU Gang<sup>1</sup>, DING Dan-hong<sup>1</sup>, ZHOU Sha<sup>2</sup>, BU Shan-shan<sup>1</sup>

(1. Zhengzhou University Affiliated Cancer Hospital, Zhengzhou 450052, China; 2. Sun Yat-sen University Affiliated Cancer Center, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the effect of DYRK1B on radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma and its potential mechanism. [Methods] Human esophageal squamous cell carcinoma ECA109 cells were transfected with siNC and siDYRK1B by Lipofectamine 3000, respectively. The expression levels of DYRK1B in ECA109 cells were detected by RT-PCR and Western blot 48 h after transfection. The transfected ECA109 cells were exposed to ionizing radiation, the survival of cells after radiation was evaluated by colony formation assay and the sensitive enhancement ratio (SER) was calculated accordingly. Apoptosis rate after 4Gy irradiation was detected by flow cytometry; the expression levels of cleaved PARP-1, cleaved caspase-3 and  $\gamma$ -H2AX were detected by Western blot. [Results] DYRK1B mRNA and protein levels were significantly decreased in ECA109 cells transfected with siDYRK1B ( $P < 0.05$ ). When treated with ionizing radiation, the survival of ECA109 cells transfected with siDYRK1B was decreased ( $P < 0.05$ ), the apoptosis rate was increased ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of cleaved PARP-1, cleaved caspase-3, and  $\gamma$ -H2AX proteins were upregulated compared with the control group ( $P < 0.05$ ). The SER in ECA109-siDYRK1B cells was 1.711. [Conclusion] Down-regulation of DYRK1B significantly enhances the radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma ECA109 cells, which may be related to promoting apoptosis and inhibiting DNA damage repair.

**Key words:** DYRK1B; esophageal squamous cell carcinoma; radiosensitivity; apoptosis; DNA damage repair

放射治疗是食管鳞癌不可或缺的治疗手段之

一, 放疗抵抗是影响放疗疗效的重要因素。因此探索影响食管鳞癌放射敏感性的关键基因及潜在机制, 对于提高食管鳞癌患者长期生存具有重要意义。双

收稿日期: 2020-04-07; 修回日期: 2020-06-19

通信作者: 卜珊珊, E-mail: bushanshan98@163.com

特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 DYRK1B(dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1B,也称为 Mirk)是 DYRK 蛋白激酶家族成员,在胰腺癌、肺癌、卵巢癌、结肠癌、横纹肌肉瘤、骨肉瘤和乳腺癌等多种恶性肿瘤中表达升高,并调节细胞周期、增殖、迁移、脂肪形成等生物学过程<sup>[1-9]</sup>。然而 DYRK1B 对食管鳞癌放射敏感性的影响尚不清楚。本研究通过 RNA 干扰技术下调 ECA109 细胞中 DYRK1B 表达,探讨 DYRK1B 对食管鳞癌放射敏感性的影响及潜在机制,为提高食管鳞癌患者放射敏感性提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

食管鳞癌 ECA109 细胞由中山大学肿瘤防治中心惠赠。RPMI-1640 培养基及胎牛血清购于美国 Gibco 公司,Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于北京四正柏生物科技有限公司,RNA 提取试剂 TRIzol 及转染试剂 Lipofectamine 3000 均购于 Invitrogen 公司,siRNA 购于广州锐博生物技术有限公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒购于碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 细胞转染

将对数生长期的 ECA109 细胞用胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,按照  $5 \times 10^5$ /孔的密度将单细胞悬液均匀铺于 6 孔板,待细胞贴壁生长,融合率达 60% 时使用脂质体 Lipofectamine 3000 分别包裹 siNC、siDYRK1B 进行转染,48h 后收集细胞进行后续实验。

### 1.3 RT-PCR

RNA 提取试剂 TRIzol 提取细胞中总 RNA,以 mRNA 为模板,使用逆转录试剂盒逆反转录成 cDNA,在引物的指导下,以 cDNA 为模板进行扩增,从而获取目的基因的表达。文中使用的 RT-PCR 引物如下:

**DYRK1B:** 上游引物: CACACGCAGGTATTGCTTGAT; 下游引物: GTCCACAGAGAGCTTACGCA。

**GAPDH:** 上游引物: GGAGCGAGATCCCTCAAAAT; 下游引物: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG。

### 1.4 蛋白印迹实验

去除细胞培养基,细胞样品用冷的 PBS 洗 2 遍后加入 1ml 预冷的细胞裂解液裂解细胞提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取  $30 \mu\text{g}$  变性蛋白进行 SDS-PAGE 电泳、PVDF 转膜后,5% 脱脂牛奶室温封闭 1h,一抗  $4^\circ\text{C}$  过夜孵育后用 TBST 洗膜  $10\text{min} \times 3$  次,二抗室温孵育 1h 后洗膜,暗室中滴加显色液显影曝光。

### 1.5 克隆形成实验

取对数生长期的各组细胞消化成单细胞悬液,按每孔 300、300、300、1000、2000 个的细胞密度种植于 6 孔板,每组设置 3 个复孔;细胞贴壁后予以 0、2、4、6、8Gy 照射,照射后静止培养 14 天,行甲醛固定、结晶紫染色、计数含  $\geq 50$  个细胞的克隆数;计算克隆形成率(PE)和细胞存活分数(SF); $\text{PE} = \text{克隆数} / \text{接种细胞数} \times 100\%$ ,  $\text{SF} = \text{受照射细胞 PE} / \text{对照组细胞 PE}$ ;实验重复 3 次,取平均值;根据单击多靶模型  $\text{SF} = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$  拟合细胞存活曲线,计算放射增敏比,比较组间放射敏感性差异。

### 1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的各组细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁生长至 70%~80% 融合度时予以 4Gy X 射线照射,分别继续培养 24h 后收集细胞。PBS 洗涤、离心,用  $1 \times \text{Binding Buffer}$  调整细胞浓度为  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,加入适量 Annexin V-FITC/PI 后用流式细胞仪测定结果各组细胞凋亡率。

### 1.7 统计学处理

使用 SPSS 24.0 软件进行  $t$  检验或单因素方差分析比较差异。在 Graph Pad Prism 7.0 软件中使用单击多靶模型拟合细胞存活曲线,使用 Image J 软件对蛋白印迹条带进行量化分析。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 siDYRK1B 转染 ECA109 细胞干扰效率检测

与对照组相比,转染 siDYRK1B 后 ECA109 细胞中 DYRK1B mRNA 及蛋白水平明显下降。对照组 ECA109 细胞中 DYRK1B mRNA 相对表达量为  $1.000 \pm 0.065$ , siDYRK1B 组 ECA109 细胞中 DYRK1B mRNA 相对表达量为  $0.247 \pm 0.026$ ,差异具有统计学

意义( $P<0.001$ )。对照组 ECA109 细胞中 DYRK1B 蛋白相对表达量为  $1.000\pm0.018$ , siDYRK1B 组 ECA109 细胞中 DYRK1B 蛋白相对表达量为  $0.249\pm0.018$ , 差异具有统计学意义( $P<0.001$ ) (Table 1, Figure 1)。

## 2.2 DYRK1B 增加 ECA109 细胞放射敏感性

与对照组相比, 下调 DYRK1B 后 ECA109 细胞放射敏感性增加, 对照组 ECA109 细胞 SF2 为 0.735; siDYRK1B 组 ECA109 细胞 SF2 为 0.408, 细胞放射增敏比为 1.711 (Table 2, Figure 2)。

## 2.3 下调 DYRK1B 增加放射诱导的 ECA109 细胞凋亡

与对照组相比, 下调 DYRK1B 及放射线照射均增加 ECA109 细胞凋亡率, 下调 DYRK1B 后放射线诱导的细胞凋亡率进一步增加。对照组 ECA109 细胞凋亡率为  $(4.003\pm0.341)\%$ , siDYRK1B 组 ECA109 细胞凋亡率为  $(7.957\pm0.254)\%$ ; 4Gy 照射条件下, 对照组 ECA109 细胞凋亡率为  $(10.320\pm0.471)\%$ , siDYRK1B 组 ECA109 细胞凋亡率为  $(40.513\pm1.037)\%$ ; siDYRK1B 组与对照组相比差异均具有统计学意义( $P<0.001$ ) (Table 3, Figure 3)。

## 2.4 下调 DYRK1B 增加放射处理后 ECA109 细胞中凋亡及 DNA 损伤相关蛋白表达水平

下调 DYRK1B 增加 ECA109 细胞中 cleaved caspase-3 ( $P=0.004$ )、cleaved PARP-1 ( $P<0.001$ ) 蛋白水平; 放射线处理的条件下, 下调 DYRK1B 的 ECA109 细胞中 cleaved PARP-1 ( $P<0.001$ )、cleaved caspase-3 ( $P<0.001$ ) 升高更多; 此外, 下调 DYRK1B 增加放射处理后 ECA109 细胞中 DNA 损伤相关蛋白  $\gamma$ -H2AX 表达水平 ( $P<0.001$ ) (Table 4, Figure 4)。

**Table 2 Data from each group of ECA109 cells fitted by single-hit multi-target model**

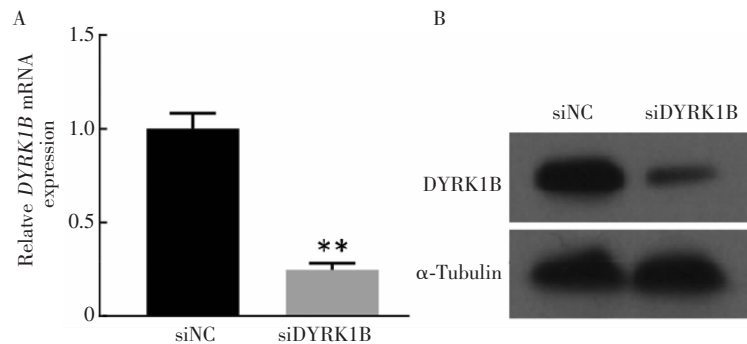
| Groups   | D0 (Gy) | Dq (Gy) | SF2   | SER   |
|----------|---------|---------|-------|-------|
| siNC     | 3.465   | 2.242   | 0.735 | 1.711 |
| siDYRK1B | 2.025   | 0.323   | 0.408 |       |

Note: SER: the sensitive enhancement ratio

**Table 1 Relative expression of DYRK1B mRNA and protein in control and siDYRK1B ECA109 cells**

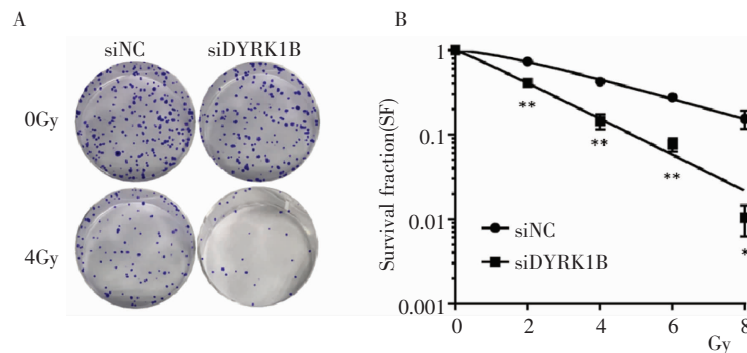
| Groups   | DYRK1B mRNA       | DYRK1B protein    |
|----------|-------------------|-------------------|
| siNC     | $1.000\pm0.065$   | $1.000\pm0.018$   |
| siDYRK1B | $0.247\pm0.026^*$ | $0.249\pm0.018^*$ |

Note: \*:  $P<0.001$ , vs negative control group



Notes: A: relative expression of DYRK1B mRNA in control and siDYRK1B ECA109 cells; B: relative expression of DYRK1B protein in control and siDYRK1B ECA109 cells; \*\*:  $P<0.001$ , vs negative control group

**Figure 1 Expression of DYRK1B mRNA and protein in ECA109 cells transfected with or without siDYRK1B**



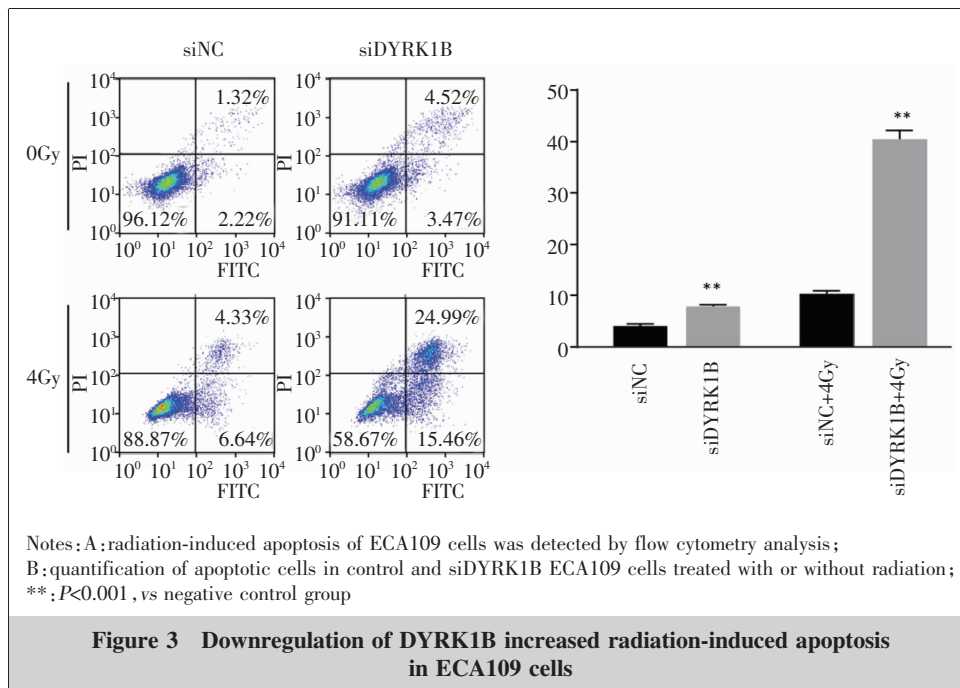
Notes: A: representative images of colonies surviving with or without ionizing radiation in DYRK1B downregulation and control ECA109 cells; B: survival curves of control and siDYRK1B ECA109 cells treated with different radiation doses; \*:  $P<0.01$ , \*\*:  $P<0.001$ , vs negative control group

**Figure 2 Downregulation of DYRK1B enhanced the radiosensitivity of ECA109 cells**

**Table 3 Apoptosis ratio of different group of ECA109 cells (Mean $\pm$ SD)**

| Groups       | Apoptosis ratio (%) |
|--------------|---------------------|
| siNC         | $4.003\pm0.341$     |
| siDYRK1B     | $7.957\pm0.254^*$   |
| siNC+4Gy     | $10.320\pm0.471^*$  |
| siDYRK1B+4Gy | $40.513\pm1.037^*$  |

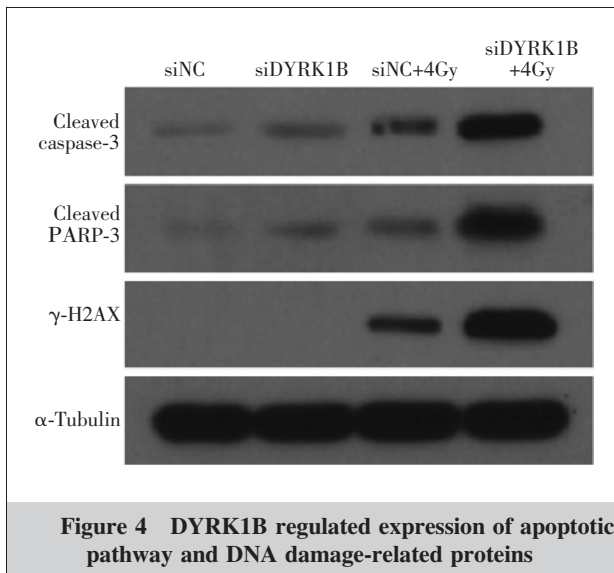
Note: \*:  $P<0.001$ , vs negative control group



**Table 4 Relative expression level of cleaved caspase-3, cleaved PARP-1 and  $\gamma$ -H2AX (Mean $\pm$ SD)**

| Groups       | Cleaved caspase-3  | Cleaved PARP-1     | $\gamma$ -H2AX     |
|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| siNC         | 0.157 $\pm$ 0.014  | 0.125 $\pm$ 0.010  |                    |
| siDYRK1B     | 0.247 $\pm$ 0.016* | 0.228 $\pm$ 0.010* |                    |
| siNC+4Gy     | 0.295 $\pm$ 0.014* | 0.243 $\pm$ 0.026* | 0.355 $\pm$ 0.017  |
| siDYRK1B+4Gy | 0.753 $\pm$ 0.026* | 0.762 $\pm$ 0.046* | 0.825 $\pm$ 0.060* |

Note: \*,  $P < 0.01$ , vs negative control group



### 3 讨论

放疗抵抗是改善食管癌预后的重要障碍, 因此探索影响食管鳞癌放射敏感性的调节因素, 提高食

管鳞癌放射敏感性, 对于提高食管癌患者生存具有重要意义。DYRK1B 在少数正常组织和许多类型的人类肿瘤中表达, DYRK1B 蛋白表达程度与患者预后呈负相关, 敲除 DYRK1B 可以抑制非小细胞肺癌细胞生长并诱导骨肉瘤和胰腺癌细胞凋亡。我们的研究发现下调 DYRK1B 能够诱导 ECA109 细胞凋亡, 抑制放射治疗后 DNA 损伤修复, 增强放射线对 ECA109 细胞的杀伤作用, 提高食管鳞癌细胞的放射敏感性, 提示 DYRK1B 是一种潜在的提高食管鳞癌放射敏感性的分子靶点。

磷酸化是调节蛋白质活性和功能的最基本和最重要的机制, 在肿瘤

发生中起决定性作用。蛋白质磷酸化主要发生在三个氨基酸上, 即丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。DYRK1B 具有自磷酸化酪氨酸然后磷酸化丝氨酸和苏氨酸的能力。既往研究表明, DYRK1B 在多种生物学过程中通过磷酸化途径控制靶基因的功能。例如, DYRK1B 通过在 Thr286 上磷酸化 CCND1 而以不依赖于 GSK3 $\beta$  的方式促进 CCND1 的降解, 进而促进 G<sub>1</sub> 期细胞周期阻滞<sup>[10]</sup>; DYRK1B 通过调节 mTOR/AKT 信号通路磷酸化来阻断经典的并促进的非经典的 Hedgehog 信号传导<sup>[11]</sup>; 体外激酶实验结果显示 DYRK1B 通过在 Ser185 上磷酸化 NKX3.1 导致 NKX3.1 发生多泛素化和蛋白酶体降解<sup>[12]</sup>。此外 DYRK1B 还可以通过上调抗氧化相关基因 SOD2/SOD3 表达或介导 FOXO1/FOXO3A 的抑癌基因出核等促进细胞存活<sup>[13]</sup>。我们的研究发现, 下调 DYRK1B 增加放射处理后 ECA109 细胞中凋亡相关蛋白 cleaved PARP-1、cleaved caspase-3 以及 DNA 损伤相关组蛋白 H2AX 的磷酸化水平。细胞凋亡、DNA 损伤应答及修复过程需要多种激酶参与<sup>[14-15]</sup>, 我们推测 DYRK1B 可能通过磷酸化

途径参与调节细胞凋亡、DNA 损伤应答及修复过程。

药理抑制 DYRK1B 激酶活性具有重要的临床应用价值<sup>[16]</sup>。目前已有多个 DYRK1B 小分子抑制剂在体外细胞实验及体内动物实验中被证实能够有效对抗多种肿瘤细胞。小分子抑制剂 AZ191 靶向 DYRK1B 可抑制细胞生长、降低细胞运动性、诱导凋亡,增强阿霉素、顺铂、吉西他滨的抗肿瘤作用<sup>[7-8]</sup>; EHT5372 使肿瘤细胞球体失去休眠标签并诱导细胞凋亡,在动物实验中增强 mTOR 抑制剂 RAD001 的肿瘤抑制作用<sup>[17-18]</sup>。我们的研究发现通过 RNA 干扰技术下调 DYRK1B 增加 ECA109 细胞放射敏感性,那么 DYRK1B 抑制剂是否能够成为临床上提高食管鳞癌放疗敏感性的有效方法呢?对于 DYRK1B 抑制剂在调控食管鳞癌放射敏感性中的具体作用,我们将在以后的实验中进一步深入探索。

综上所述,通过 RNA 干扰技术下调 ECA109 中 DYRK1B 表达水平之后增强了 ECA109 细胞的放射敏感性,表现为降低了放射治疗后细胞的克隆形成能力、增强了放射线诱导的细胞凋亡、抑制了 DNA 损伤修复能力。其机制可能与 PARP-1、caspase-3 相关凋亡信号通路以及 DNA 损伤修复信号通路有关,但具体机制尚待进一步研究。靶向 DYRK1B 有望成为提高食管鳞癌放疗敏感性的新策略。

## 参考文献:

- [1] Deng X, Ewton DZ, Li S, et al. The kinase Mirk/Dyrk1B mediates cell survival in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 4149-4158.
- [2] Gao J, Zheng Z, Rawal B, et al. Mirk/Dyrk1B, a novel therapeutic target, mediates cell survival in non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8: 1671-1679.
- [3] Friedman E. Mirk/dyrk1B kinase in ovarian cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3): 5560-5575.
- [4] Lee K, Deng X, Friedman E. Mirk protein kinase is a mitogen-activated protein kinase substrate that mediates survival of colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 3631-3637.
- [5] Mercer SE, Ewton DZ, Shah S, et al. Mirk/Dyrk1b mediates cell survival in rhabdomyosarcomas[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 5143-5150.
- [6] Yang C, Ji D, Weinstein EJ, et al. The kinase Mirk is a potential therapeutic target in osteosarcoma [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(4): 552-558.
- [7] Chen H, Shen J, Choy E, et al. Targeting DYRK1B suppresses the proliferation and migration of liposarcoma cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 9(17): 13154-13166.
- [8] Chen Y, Wang S, He Z, et al. Dyrk1B overexpression is associated with breast cancer growth and a poor prognosis [J]. *Hum Pathol*, 2017, 66: 48-58.
- [9] Becker W. A wake-up call to quiescent cancer cells-potential use of DYRK1B inhibitors in cancer therapy [J]. *FEBS J*, 2018, 285(7): 1203-1211.
- [10] Ashford AL, Oxley D, Kettle J, et al. A novel DYRK1B inhibitor AZ191 demonstrates that DYRK1B acts independently of GSK3 $\beta$  to phosphorylate cyclin D1 at Thr(286), not Thr(288)[J]. *Biochem J*, 2014, 457(1): 43-56.
- [11] Singh R, Dhanyamraju PK, Lauth M, et al. DYRK1B blocks canonical and promotes non-canonical Hedgehog signaling through activation of the mTOR/AKT pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 833-845.
- [12] Song LN, Silva J, Koller A, et al. The tumor suppressor NKX3.1 is targeted for degradation by DYRK1B kinase[J]. *Mol Cancer Res*, 2015, 13(5): 913-922.
- [13] Gao J, Yang X, Yin P, et al. The involvement of FoxO in cell survival and chemosensitivity mediated by Mirk/Dyrk1B in ovarian cancer [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(4): 1203-1209.
- [14] Shariati M, Meric-Bernstam F. Targeting AKT for cancer therapy[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28(11): 977-988.
- [15] Jin MH, Oh DY. ATM in DNA repair in cancer [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 203: 107391.
- [16] Szamborska-Gbur A, Rutkowska E, Dreas A, et al. How to design potent and selective DYRK1B inhibitors? Molecular modeling study[J]. *J Mol Model*, 2019, 25(2): 41.
- [17] Deng X, Friedman E. Mirk kinase inhibition blocks the in vivo growth of pancreatic cancer cells [J]. *Genes Cancer*, 2014, 5: 337-347.
- [18] Deng X, Hu J, Ewton DZ, et al. Mirk/ dyrk1B kinase is upregulated following inhibition of mTOR[J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(9): 1968-1976.