

miRNA 在食管癌放射敏感性中作用机制的研究进展

田晓康^{1,2}, 钱露茜^{1,3}, 杜鸣宇^{1,2}, 卢志伟^{1,3}, 朱宏明¹, 费倩^{1,3}, 张文君^{1,3},
王燕^{1,3}, 彭凡禹^{1,3}, 叶劲军¹, 何侠^{1,2,3}, 尹丽^{1,3}
(1. 江苏省肿瘤医院, 江苏省肿瘤防治研究所, 南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏南京 210009; 2. 徐州医科大学, 江苏徐州 221000; 3. 南京医科大学第四临床医学院, 江苏南京 210009)

摘要: 食管癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 放疗是食管癌主要的治疗手段, 其疗效具有个体化差异, 大量研究发现 miRNA 与食管癌放疗敏感性密切相关。全文对 miRNA 调节食管癌放疗敏感性的作用及机制进行概述。
关键词: miRNA; 食管肿瘤; 放射敏感性; 分子标志物
中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2019)08-0744-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2019.08.B013

Progress on miRNAs in Regulating Radiosensitivity of Esophageal Cancer

TIAN Xiao-kang^{1,2}, QIAN Lu-xi^{1,3}, DU Ming-yu^{1,2}, LU Zhi-wei^{1,3}, ZHU Hong-ming¹,
FEI Qian^{1,3}, ZHANG Wen-jun^{1,3}, WANG Yan^{1,3}, PENG Fan-yu^{1,3}, YE Jin-jun³,
HE Xia^{1,2,3}, YIN Li^{1,3}
(1. Jiangsu Cancer Hospital, Jiangsu Institute of Cancer Research, The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China; 2. Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China; 3. The Fourth Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Esophageal cancer is one of the most common malignant tumors in China. Radiotherapy is the main treatment of esophageal cancer, and its therapeutic effect has individual differences. A large number of studies have found that miRNAs are closely related to the radiosensitivity of esophageal cancer. This article summarizes the roles and mechanisms of miRNAs in regulating the radiosensitivity of esophageal cancer.
Subject words: miRNA; esophageal cancer; radiosensitivity; molecular markers

食管癌的发病率和死亡率居恶性肿瘤第 4 位, 我国食管癌主要的病理类型为食管鳞癌^[1]。放疗主要通过诱导细胞凋亡或细胞周期阻滞直接或间接抑制细胞增殖, 从而明显增加局部晚期患者的生存率^[2]。肿瘤细胞的放射敏感性取决于各种因素, 如 DNA 损

伤和修复, 细胞凋亡或细胞周期停滞以及细胞信号调节^[3]。但由于食管癌患者对放疗的敏感性存在差异进而导致治疗效果的差异, 所以深入探究食管癌放射敏感性的分子学机制成为该领域的研究热点。MicroRNA (miRNA) 是一类存在于真核生物中长度约 19~25 个核苷酸的内源性非编码单链小分子, 其序列具有高度保守性。可通过与 mRNA 的 3' 端非编码区结合, 降解或抑制靶 mRNA 的翻译, 从而实现靶基因转录后水平的调控^[4]。已有大量研究表明, miRNA 在肿瘤的发生、发展进程中发挥重要作用^[5]。近年来, 亦有学者发现 miRNA 和多种肿瘤的放射敏感性密切相关^[6]。本文拟对 miRNA 在食管癌放射敏

基金项目: 江苏省青年医学人才项目 (QNRC2016659); 江苏省卫计委面上项目 (H201614); 江苏省高层次人才“六个一工程”科研项目 (LGY2016024)
通信作者: 何侠, 教授, 主任医师, 博士; 南京医科大学附属肿瘤医院放疗科, 江苏省南京市玄武区百子亭 42 号 (210009); E-mail: hexiabm@163.com
尹丽, 副主任医师, 硕士生导师, 博士; 南京医科大学附属肿瘤医院放疗科, 江苏省南京市玄武区百子亭 42 号 (210009); E-mail: yinli_2012@126.com
收稿日期: 2018-06-05

感性中的作用和机制进行总结。

1 miRNA 在食管癌放疗敏感性中的作用

1.1 miRNA 和放射抵抗

从 1993 年 Lee 等^[7]在线虫中发现第一个 miRNA-lin-4 起,miRNA 以其独特的结构和生物功能开始渐渐进入研究人员的视线,迄今为止,已有 1000 多种 miRNA 被发现。这些 miRNA 能够识别特定的目标 mRNA,并在转录后水平通过促进靶 mRNA 的降解和(或)抑制翻译过程而发挥负调控基因表达的作用^[4]。越来越多的研究表明,miRNA 不仅参与了胚胎发育、细胞增殖、分化、凋亡及肿瘤形成过程等生理和病理过程,甚至在肿瘤治疗疗效中也发挥着举足轻重的作用。有些 miRNA 通过调控药物靶点、调控细胞周期、调控凋亡信号通路参与耐药机制进而影响化疗效果。也有大量研究发现,异常表达的 miRNA 也参与了肿瘤的放射敏感性来影响放疗疗效。

放疗是利用电离辐射直接物理作用于自由基使癌细胞发生致死性伤害,DNA 损伤修复失败是导致癌细胞死亡的重要原因^[8]。在肿瘤放疗过程中,肿瘤能逐渐适应相应的理化环境变化,产生放疗抵抗。放疗抵抗性的产生是一个多基因、多因子和多机制共同作用的复杂过程。临床放射生物学的研究提出在放疗过程中影响放疗敏感性的 4 个生物学因素:亚致死损伤和潜在致死损伤与修复、细胞再增殖、细胞周期再分布和再氧合^[9]。

1.2 miRNA 和食管癌放射敏感性

放疗在食管鳞状细胞癌中应用广泛,在食管癌治疗中发挥不可替代的作用。但是由于食管鳞状细胞癌存在高复发率,并且放射抵抗的机制依然不明确,如何提高食管癌放射敏感性是该领域研究者追求的主要目标^[10]。由于 miRNA 在食管癌组织和体液中已经能检测到,所以有希望成为潜在的分子标志物来评价放疗效果和判断预后^[11],为将来进一步为食管癌预后分级奠定基础,并为预测食管癌的预后和选择治疗方式提供指导。

Su 等^[12]用 miRNA 芯片检测人食管癌耐放射细胞株 KYSE-150R 与其亲本细胞 KYSE-150 之间差异表达的 microRNAs,生物信息学分析有 10 个

miRNA 显著上调,25 个 miRNA 显著下调,通过 qRT-PCR 证实 hsa-miR-301a、hsa-miR-141 和 hsa-miR-18b 表达下调水平的统计学显著性 ($P < 0.05$)。通过功能分析,确认 miRNA 的靶基因与细胞凋亡(63 个基因)、细胞周期(67 个基因)、DNA 损伤和修复(18 个基因)密切相关。提示 miRNA 可能通过调控相关基因的表达参与了辐射抵抗。

有研究者收集 145 对食管鳞癌(ESCC)组织样本和癌旁组织,通过 PCR 验证发现 miR-96 在癌组织中明显高表达。体内外实验均证实上调 miR-96 可以通过直接作用于 RECK 促进细胞增殖,RECK 是功能明确的抑癌基因,它通过抑制肿瘤细胞侵袭和抗血管生成来发挥抑癌作用^[13]。miR-96 正是通过直接抑制 RECK 的表达从而增加了肿瘤细胞的放射抗性。

通过 q-PCR 检测 100 例食管鳞状细胞癌的组织,结果显示在食管鳞状细胞癌中 miRNA-22 表达下降。miRNA-22 是一种肿瘤抑制因子,且其表达水平与肿瘤放疗患者的生存率呈正相关。上调 miRNA-22 的表达水平可以促进食管鳞状细胞癌的放疗敏感性^[14]。

2 miRNA 调节食管癌放射敏感性的机制

miRNA 可直接对电离辐射做出反应,它的变化可直接参与 DNA 损伤修复相关机制,目前研究揭示 miRNA 参与调节食管癌放疗敏感性可能主要通过以下几种方式:影响 DNA 损伤修复、细胞周期检查点、肿瘤微环境和信号通路等方式^[15]。

2.1 DNA 损伤应答(DNA-damage response,DDR)

电离辐射(ionizing radiation,IR)诱导基因组 DNA 中的双链(dsDNA)断裂,这一过程通过某些因子如:ATM、H2AX 感受和转导并进一步募集 DNA 修复机制效应蛋白复合物[如 DNA 依赖性蛋白激酶(DNA-PKcs)、BRCA1]。未能在有丝分裂之前恢复基因组完整性可导致细胞死亡或恶性转化。一些研究较充分的 miRNA 可通过诱导细胞中的 DDR 途径的相关重要因子活化,促进 DNA 损伤感应或修复导致放射抗性增加^[16]。Meng 等^[9]研究表明,过表达 miR-193a-3p 可增加食管癌放射敏感细胞 KYSE-150 的

抗辐射性;相反,miR-193a-3p 水平下调降低了放射抵抗细胞的辐射耐受性。研究通过检测 γ -H2A 与 miR-193a-3p 不同表达水平的关系,证实 miR-193a-3p 是通过参与诱导 DNA 损伤修复机制来增强食管癌放射抵抗。

另一项研究发现 miRNA-31 的异常表达能使射线抵抗的细胞重新致敏。已经证实 miRNA-31 可能改变 13 种和 DNA 修复相关基因的表达。这些基因在射线诱导的 DNA 损伤中起着重要的防御作用。在放射抵抗的食管癌肿瘤中,miRNA-31 显著低表达。而相关 DNA 损伤修复基因高表达,证实 miRNA-31 通过抑制 DNA 损伤修复基因的表达来使细胞增强放疗敏感性。该研究强调需要进一步探索 miRNA-31 作为预测放射治疗预后的一个潜在标志物,或者作为放射治疗的一种新的治疗药物^[17]。

2.2 细胞周期检查点

细胞周期中的三个检查点可以使细胞周期阻滞,为 DNA 损伤修复留出时间(即, G₁/S 期、G₂/M 期 S 间期)。当损伤修复后,细胞重新进入周期,而损伤持续则细胞直接进入凋亡^[18]。细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶蛋白质调节周期进程或停滞:这些蛋白的减少有助于阻滞在检查点进程。共济失调毛细血管扩张征突变蛋白(ATM)是细胞周期的主要检查分子之一(与 ATR, MNR 复合物和 H2AX 一起),用于 DNA 损伤的应答,尤其对 DSB 检测敏感^[19]。为研究 miR-200c 的增敏机制,转染 miR-200c 的模拟类似物使其表达升高,在体内外实验中验证,miR-200c 可通过下调细胞周期蛋白 B1, cdc2 和上调 P21 的表达水平诱导 G₂/M 和 sub-G₁ 期阻滞,降低 S 期比例,进而明显提高食管癌细胞 Eca-109 放射敏感性^[20]。

2.3 凋亡、信号转导

最近发现一些经典的多功能信号转导通路在调节食管癌辐射反应中发挥着重要的作用,其中 PI3K/AKT, MAPK/ERK, NF- κ B 和 TGF- β 通路等四种信号转导通路作用最明显,miRNA 在辐射相关信号转导途径中也发挥着关键的调控作用^[21]。miR-93 高表达和食管癌放疗抵抗密切相关。miR-93 可以特异性结合于 BTG3 基因并抑制其表达,BTG3 基因是 BTG/TB 抗增殖基因家族重要成员之一,作为抗细胞增殖和促进细胞凋亡的分子可能是肿瘤治疗中一重

要的靶向治疗基因。miR-93 正是通过抑制促凋亡的靶基因的表达来促使食管癌细胞发生放射抗性^[22]。研究者将 358 例食管癌组织分成放射敏感组和放射抵抗组,在放射敏感组,miR-133a 表达较高,而 EGFR 表达水平较低。经体内外实验验证,miR-133a 可通过作用于 EGFR 进而抑制 MEK/ERK 信号通路,促进细胞凋亡,提高食管癌细胞放射敏感性^[23]。Park 等^[24]发现和亲本细胞 TE-4 相比,在诱导获得的具有放射抗性的细胞株 TE-4R 中 miR-338-5p 表达水平明显降低。体内外实验均验证使 miR-338-5p 过表达可通过抑制 survivin 活化 PI3K/AKT 信号通路诱导细胞凋亡并且提高放疗敏感性,说明 miR-338-5p 是潜在的放疗增敏剂,并且可能成为食管鳞状细胞癌放疗抵抗患者的治疗靶标。另一项研究发现,相比亲本细胞,miR-205 在放射抵抗的食管癌细胞株中高表达,体内外实验均验证降低 miR-205 表达水平可使食管癌放疗敏感性增强。深入的机制探究发现 miR-205 通过活化其宿主基因,进而发挥协同作用共同作用于 Sp1 促进 EMT 进程,另一方面,miR-205 还可以靶向结合 PTEN,同样通过作用于 PI3K/AKT 信号通路发挥放疗抵抗作用^[25]。另外,研究者发现下调 hsa-miR-301a 可以通过上调 Wnt1 促进食管癌细胞株 KYSE-150R 的放射抗性,这说明 Wnt/ β -catenin 信号通路也可能在放射耐受中起重要作用^[26]。

2.4 肿瘤组织微环境(缺氧)

缺氧的肿瘤内微环境可以通过几种途径保护癌细胞免受辐射。首先,缺氧会削弱 DNA 受到的化学损伤,导致产生更少的致命的双链 DNA 断裂。其次,低氧环境可以通过激活缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路和 HIF-1 应答基因的转录来影响放射敏感性^[27]。研究表明缺氧微环境可以和一些 miRNA 相互作用。Li 等^[28]在食管鳞状细胞癌(ESCC)患者血液循环中首次观察到 miR-210 的表达水平升高,并且在食管癌缺氧条件下可以诱导 miR-210 表达水平升高。CCK8 实验验证高水平的 miR-210 细胞能显著抑制 ESCC 细胞的增殖能力,并能通过诱导 G₂/M 期细胞周期阻滞降低食管癌的放射抵抗。低氧肿瘤微环境与 miRNA 之间的复杂调控可能是细胞的另一抗辐射原因。

3 结语及展望

随着分子生物学和生物信息学的快速发展,研究者发现了越来越多的 miRNA 在肿瘤中差异表达,深入研究发现他们参与了肿瘤的放射抵抗或放射增敏。深入研究 miRNA 影响食管癌放射敏感性中的潜在机制,不仅将为转录后水平上的肿瘤放射敏感性调节提供新的见解,而且还将预测各种新的诊断标志物和治疗靶点,以改善放疗的疗效。此外,随着转化医学的发展,我们更希望研究成果从“试验台”转至“病床”,miRNA 在食管癌放射反应中的临床应用最终会为肿瘤患者带来更多的希望和福音。

参考文献:

- [1] Luo Y, Mao Q, Wang X, et al. Radiotherapy for esophageal carcinoma: dose, response and survival [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10(1): 13–21.
- [2] Li Y, Huang HC, Chen LQ, et al. Predictive biomarkers for response of esophageal cancer to chemo(radio)therapy: A systematic review and meta-analysis [J]. *Surg Oncol*, 2017, 26(4): 460–472.
- [3] Chen GZ, Zhu HC, Dai WS, et al. The mechanisms of radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma and current strategies in radiosensitivity [J]. *J Thorac Dis*, 2017, 9(3): 849–859.
- [4] David S. MicroRNA involvement in esophageal carcinogenesis [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2011, 11(6): 612–616.
- [5] Sakai NS, Samia-Aly E, Barbera M. A review of the current understanding and clinical utility of miRNAs in esophageal cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2013, 23 (6 Pt B): 512–521.
- [6] Hu LL, Wang JJ. Progress in Radiosensitivity Markers for Esophageal Cancer [J]. *Cancer Progress*, 2015, (6): 593–596. [胡乐林, 王俊杰. 食管癌放射敏感性标志物的研究进展 [J]. *癌症进展*, 2015, (6): 593–596.]
- [7] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *Celegans* heterochronic gene *lin-14* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854.
- [8] Doss M, Kolb HC, Walsh JC, et al. Biodistribution and radiation dosimetry of ¹⁸F-CP-18, a potential apoptosis imaging agent, as determined from PET/CT scans in healthy volunteers [J]. *J Nucl Med*, 2013, 54(12): 2087–2092.
- [9] Meng F, Qian L, Lv L, et al. miR-193a-3p regulation of chemoradiation resistance in oesophageal cancer cells via the PSEN1 gene [J]. *Gene*, 2016, 579(2): 139–145.
- [10] Mawhinney MR, Glasgow RE. Current treatment options for the management of esophageal cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2012(4): 367–377.
- [11] Korpela E, Vesprini D. MicroRNA in radiotherapy: miRage or miRador? [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(5): 777–782.
- [12] Su H, Jin X, Zhang X, et al. Identification of microRNAs involved in the radioresistance of esophageal cancer cells [J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(3): 318–325.
- [13] Lei L, Huang Y, Gong W. Inhibition of miR-92b suppresses non-small cell lung cancer cells growth and motility by targeting RECK [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 387 (1–2): 171–176.
- [14] Wang XC, Zhang ZB, Wang YY, et al. Increased miRNA-22 expression sensitizes esophageal squamous cell carcinoma to irradiation [J]. *J Radiat Res*, 2013, 54(3): 401–408.
- [15] Cellini F, Morganti AG, Genovesi D, et al. Role of microRNA in response to ionizing radiations: evidences and potential impact on clinical practice for radiotherapy [J]. *Molecules*, 2014, 19(4): 5379–5401.
- [16] Hu H, Du L, Nagabayashi G, et al. ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(4): 1506–1511.
- [17] Lynam-Lennon N, Reynolds JV, Marignol L, et al. MicroRNA-31 modulates tumor sensitivity to radiation in oesophageal adenocarcinoma [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90 (12): 1449–1458.
- [18] Moskwa P, Buffa FM, Pan Y, et al. miR-182-mediated down-regulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors [J]. *Mol Cell*, 2011, 41(2): 210–220.
- [19] Korpela E, Vesprini D, Liu SK. Endothelial perturbations and therapeutic strategies in normal tissue radiation damage [J]. *Radiat Oncol*, 2014, 9(1): 266–269.
- [20] Zheng R, Liu Y, Zhang X, et al. miRNA-200c enhances radiosensitivity of esophageal cancer by cell cycle arrest and targeting P21 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90 (2): 517–523.
- [21] Zhao L, Lu X. MicroRNA and signal transduction pathways in tumor radiation response [J]. *Cell Signal*, 2013, 25 (7): 1625–1634.
- [22] Cui H, Zhang S, Zhou H. Direct downregulation of B-Cell translocation gene 3 by microRNA-93 is required for desensitizing esophageal cancer to radiotherapy [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(8): 1995–2003.
- [23] Yang QS, Jiang LP, He CY, et al. Up-regulation of microRNA-133a inhibits the mek/erk signaling pathway to promote cell apoptosis and enhance radio-sensitivity by targeting EGFR in esophageal cancer in vivo and in vitro [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(9): 2625–2634.
- [24] Park M, Yoon HJ, Kang MC, et al. MiR-338-5p enhances the radiosensitivity of esophageal squamous cell carcinoma by inducing apoptosis through targeting survivin [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10977–10979.
- [25] Pan F, Mao H, Bu F, et al. Sp1-mediated transcriptional activation of miR-205 promotes radioresistance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(4): 5735–5752.
- [26] Jing Z, Gong L, Xie CY, et al. Reverse resistance to radiation in KYSE-150R esophageal carcinoma cell after epidermal growth factor receptor signal pathway inhibition by cetuximab [J]. *Radiat Oncol*, 2009, 9(3): 468–473.
- [27] Meijer TW, Kaanders JH, Span PN, et al. Targeting hypoxia, HIF-1, and tumor glucose metabolism to improve radiotherapy efficacy [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20): 5585–5594.
- [28] Li C, Zhou X, Wang Y, et al. miR-210 regulates esophageal cancer cell proliferation by inducing G₂/M phase cell cycle arrest through targeting PLK1 [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 10(4): 2099–2104.