

miR-210 敲低联合放疗对裸鼠移植人肝癌的抑瘤效应

魏 静¹ 杨 巍¹ 孙 婷² 刘芬菊¹

¹ (苏州大学放射医学与防护学院放射生物学教研室 苏州 215123)

² (苏州大学附属第一医院脑神经研究室 苏州 215006)

摘要 为探索 miR-210 敲低联合放疗对裸鼠体内移植人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑瘤效应, 将稳定转染 miR-210 反义序列和随机序列的人肝癌细胞 SMMC-7721 接种于裸鼠。待各组裸鼠肿瘤直径达到 6 mm–8 mm, 检测各组裸鼠 miR-210 和相关蛋白表达; 各组裸鼠肿瘤局部在正常氧或乏氧条件下接受 8 Gy X 射线照射, 检测各组裸鼠放疗后不同时间的肿瘤体积; 照射后 24 h 用免疫组化染色检测肿瘤细胞增殖活性和肿瘤间质微血管密度, 用 TUNEL 法检测肝癌细胞凋亡率。结果表明: miR-210 敲低组的 miR-210 和乏氧诱导因子-1 α (Hypoxia induced factor 1 α , HIF-1 α) 表达明显低于对照组; miR-210 靶基因蛋白表达明显高于对照组; 照射后 9 d–30 d, miR-210 敲低常氧或乏氧照射组的肿瘤体积分别明显小于随机序列常氧或乏氧照射组; 照射后 24 h, miR-210 敲低常氧或乏氧照射组的肿瘤细胞增殖活跃度和肿瘤间质微血管密度明显低于随机序列常氧或乏氧照射组, 细胞凋亡率则明显升高。结果提示, miR-210 敲低可提高裸鼠移植人肝癌的放疗效果。

关键词 miR-210, 乏氧, 放疗, 肝癌

中图分类号 R730.55

miRNAs 是一群非编码小 RNA, 通过与转录物非编码区作用而与转录后基因沉默有关。miR-210 是一种重要的乏氧诱导的 miRNAs, 它通过靶基因沉默效应发挥多种作用, 包括调控细胞增殖、能量代谢、DNA 修复以及血管生成等。目前的研究表明, miR-210 在肿瘤的发生发展过程中起着多方面的作用, 在多数实体瘤中高表达, 例如乳腺癌、脑胶质瘤、黑色素瘤和肺癌等^[1]。我们的前期实验已成功通过慢病毒介导的 miR-210 反义寡核苷酸转导技术下调 miR-210 的表达, 发现 miR-210 敲低对乏氧人肝癌细胞具有辐射增敏作用^[2], 本实验在此基础上, 利用稳定转染 miR-210 反义序列和随机序列的人肝癌细胞 SMMC-7721 建立裸鼠体内移植人肝癌模型, 并分别在常氧和乏氧条件下接受 ⁶⁰Co X 射线局部照射, 进一步研究 miR-210 敲低联合放疗对裸鼠移植人肝癌的体内抑瘤效应及机制。

1 实验材料和方法

1.1 细胞株和主要试剂

人肝癌细胞株 SMMC-7721、稳定转染 miR-210 反义序列的人肝癌细胞 SMMC/Lv-anti-210 和稳定转染随机序列的人肝癌细胞 SMMC/Lv-scr 为本室

保存, 人肝癌细胞株 SMMC-7721 以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37℃、5% CO₂ 培养箱中常规培养, SMMC/Lv-anti-210 和 SMMC/Lv-scr 细胞在培养液中加入终浓度为 1 μ g/mL 的嘌呤霉素进行培养和扩增。Trizol 购自上海生工公司; Hairpin-itTM miRNAs 定量 PCR 试剂盒购自上海吉玛公司; UltraSensitiveTM S-P (MAIXIN-Bio) 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术公司; 兔抗人 HIF-1 α 、Myc 依赖性转录激活和细胞生长拮抗因子 (Antagonist of Myc-dependent transcriptional activation and cell growth, MNT) 和受体酪氨酸激酶配体 Ephrin A3 (Receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3, EFNA3) 单克隆抗体以及兔抗人凋亡诱导因子线粒体相关蛋白 3 (Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 3, AIFM3) 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品; 兔抗人 ki67 单克隆抗体和 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 兔抗鼠 CD31 单克隆抗体为美国 eBioscience 公司产品。

1.2 荷瘤裸鼠模型的建立

Balb/c 裸鼠, 雌性, 6–8 周龄, 健康, 购自上海生命科学研究院实验动物中心。分为三组, 分别

国家自然科学基金面上项目 (81071958)、江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD) 资助

第一作者: 魏静, 女, 1987 年 8 月出生, 苏州大学 2006 级放射医学七年制专业, 研究生在读

通讯作者: 杨巍, E-mail: detachedy@yahoo.com.cn

收稿日期: 初稿 2012-12-19, 修回 2013-01-15

于每只小鼠右后肢皮下接种 0.1 mL 浓度为 $5 \times 10^6/\text{mL}$ 的 SMMC-7721 (11 只)、SMMC/Lv-scr (23 只) 和 SMMC/Lv-anti-210 (23 只) 细胞悬液。

1.3 实时定量逆转录 PCR (RT-PCR) 分析 miR-210 表达

待各组裸鼠肿瘤直径达到 6 mm—8 mm (SMMC 组和 Lv-scr 组接种后 14 d, Lv-anti-miR-210 组接种后 21 d), 随机从三组裸鼠中各取 3 只处死, 取肿瘤组织, 磨碎, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA, 取总 RNA 2 ng 为初始模板, 逆转录反应体系为 20 μL , 反应条件: 16 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。hsa-miR-210 引物序列为 CUGUGCGUGUGACAG-CG GCUGA; 内参 U6 引物序列为 CGCAAGGAUG-ACACGCAAUUCGUGAAGCGUUC CAU AUU- UU。PCR 反应体系为 20 μL , 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 12 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行相对定量, CT 表示反应的实时荧光强度显著大于背景值时的循环数, 目的基因 ΔCT 值=目的基因 CT 值-同一样本 U6 CT 值, 重复 3 次, 取平均值。 $\Delta\Delta\text{CT}$ 值=处理组目的基因 ΔCT 值-对照组目的基因 ΔCT 值。对照组目的基因表达量为 1, 处理组目的基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 表示。

1.4 Western blot 检测 HIF-1 α 、MNT、EFNA3 和 AIFM3 表达

用单去污剂裂解法提取细胞总蛋白, 每个样品取 10 μL 进行 SDS-PAGE 电泳分离。电泳完成后, 通过半干式转移电泳槽将凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜 (NC) 上。转移结束后, 将 NC 膜在 3% 脱脂奶粉-PBS 中室温封闭 2 h, 用相应抗体进行杂交, 洗膜, 暗室曝光。

1.5 荷瘤裸鼠模型的分组及照射

取材后 24 h 内将剩余裸鼠分组。设置接种 SMMC 细胞株的裸鼠为①对照组 (Control); 接种 Lv-scr 细胞的裸鼠随机分为 3 组: ②无处理组 (scr) ③常氧照射组 (scr Normal+8 Gy) ④乏氧照射组 (scr Hypoxia+8 Gy); 接种 Lv-anti-210 细胞的裸鼠随机分为 3 组: ⑤无处理组 (m210) ⑥常氧照射组 (m210 Normal+8 Gy) ⑦乏氧照射组 (m210 Hypoxia+8 Gy)。③和⑥组肿瘤局部给予 8 Gy X 射线照射, ④和⑦组照射前 5 min 至照射结束肿瘤近心端用棉线捆绑降低肿瘤血氧供应, 其他部位铅板屏蔽, 测量各组裸鼠接受放疗后不同时间肿瘤体积。

1.6 照射条件

德国西门子医用直线加速器, 6 MV X 射线, 设定靶距 100 cm, 剂量率为 1 Gy/min。

1.7 肿瘤体积测定

用游标卡尺测量肿瘤最长径 (L) 和垂直方向最大横径 (W), 每 3 d 测量 1 次, 肿瘤体积 $V=LW^2/2$ 。

1.8 免疫组化检测移植瘤组织肿瘤细胞增殖活跃度

照射后 1 d 杀鼠, 取肿瘤组织, 按常规方法制作病理切片, HE 染色, 在光镜下检查肿瘤组织结构, 利用 UltraSensitiveTM S-P (MAIXIN-Bio) 试剂盒按操作说明进行免疫组化染色, 相应一抗为 ki67 抗体。每例随机观察 9 个高倍视野 ($\times 400$), 计数每个视野中阳性细胞百分数。

1.9 移植瘤组织细胞凋亡检测

移植瘤组织依照 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒说明书标记细胞, 每例随机观察 9 个高倍视野 ($\times 400$), 计数每个视野中阳性细胞百分数。

1.10 移植瘤组织微血管密度检测

以 CD31 抗体对瘤组织进行免疫组化染色, 光镜下观察肿瘤血管内皮细胞染色情况, 单个内皮细胞着色 (棕黄) 即作为一个计数单位, 不以是否形成血管管腔或管腔内是否有红细胞作为计数标准, 计数每例肿瘤组织单位视野内的平均血管数, 即肿瘤间质微血管密度 (Intratumoral micro-vessel density, IMVD), 每例随机观察 9 个高倍视野 ($\times 400$)。

1.11 统计学分析

实验结果用 SPSS14.0 统计软件进行分析, 采用单因素方差分析进行检验, $p < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测各组裸鼠相关 miR-210 表达结果

RT-PCR 检测各组裸鼠 miR-210 基因表达, 结果见图 1, 接种 SMMC 肝癌细胞组和接种 SMMC/lv-scr 肝癌细胞组的 miR-210 表达没有显著差异, 接种 SMMC/lv-anti-210 肝癌细胞株的 miR-210 表达则明显低于对照组 ($p < 0.01$)。

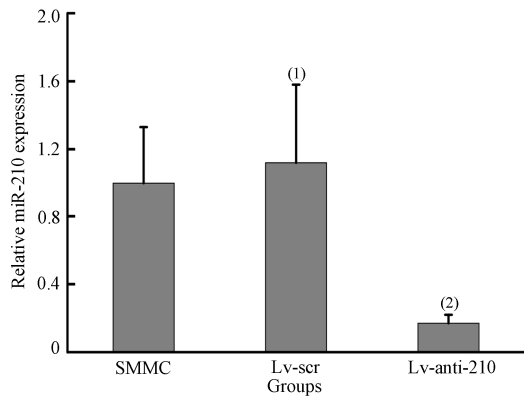


图1 RT-PCR 检测各组裸鼠移植人肝癌组织 miR-210 的表达
Fig.1 Relative miR-210 expression determined by RT-PCR on human hepatoma xenograft mice $\bar{x} \pm s$, $n=3$, ⁽¹⁾ $p>0.05$ and ⁽²⁾ $p<0.01$ vs. SMMC

2.2 Western blot 检测各组裸鼠 HIF-1 α 、MNT、EFNA3 和 AIFM3 表达

Western blot 检测各组裸鼠的 HIF-1 α 、MNT、EFNA3 和 AIFM3 表达结果见图 2。接种 SMMC 和 SMMC/Lv-scr 细胞的裸鼠的 HIF-1 α 、MNT、EFNA3 和 AIFM3 表达无显著差异,接种 SMMC/Lv-anti-210 细胞株组裸鼠的 HIF-1 α 表达明显低于对照组 ($p<0.01$), 而 MNT、EFNA3 和 AIFM3 表达则明显高于对照组 ($p<0.01$)。

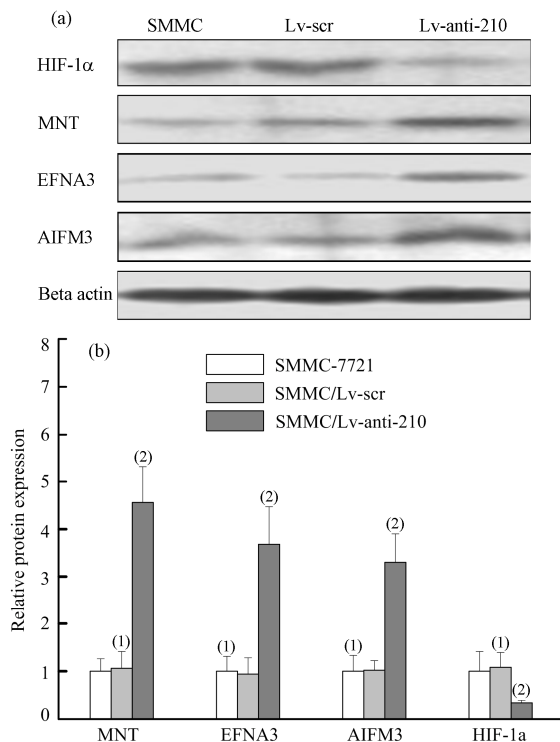


图2 Western blot 检测各组裸鼠移植人肝癌肿瘤组织的相关蛋白表达(MNT, EFNA3, AIFM3, HIF-1 α)
Fig.2 Expression of relative protein (MNT, EFNA3, AIFM3, HIF-1 α) determined by Western blot on human hepatoma xenograft mice $\bar{x} \pm s$, $n=3$, ⁽¹⁾ $p>0.01$ vs. SMMC-7721, ⁽²⁾ $p<0.01$ vs. SMMC-7721

2.3 miR-210 敲低结合放疗对裸鼠移植人肝癌的生长抑制效应

放疗后不同时间点测量各组裸鼠肿瘤体积, 结果见图 3。第 6 天—30 天, scr 组与对照组无显著差异, scr (Normal+8 Gy) 组、scr (Hypoxia+8 Gy) 组、m210 组、m210 (Normal+8 Gy) 组和 m210 (Hypoxia+8 Gy) 组裸鼠肿瘤体积明显小于对照组 ($p<0.01$)。第 9 天—30 天, m210 (Hypoxia+8 Gy) 组裸鼠肿瘤体积小于 scr (Hypoxia+8 Gy) 组 ($p<0.01$), m210 (Normal+8 Gy) 组裸鼠肿瘤体积小于 scr (Normal+8 Gy) 组 ($p<0.01$)。第 30 天, scr (Normal+8 Gy) 组、scr (Hypoxia+8 Gy) 组、m210 组、m210 (Normal+8 Gy) 组和 m210 (Hypoxia+8 Gy) 组肿瘤体积分别为对照组体积的 51.52%、81.43%、73.08%、33.47%和 65.35%。

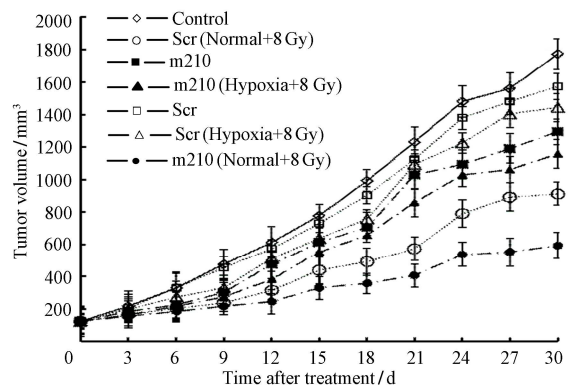


图3 miR-210 敲低联合放疗对裸鼠移植人肝癌的抑瘤效果
Fig.3 Inhibitory effects of knockdown of miR-210 combined with radiotherapy on human hepatoma xenograft growth in athymic nude mice $\bar{x} \pm s$, $n=6$

2.4 miR-210 敲低联合放疗对裸鼠移植人肝癌增殖活性的影响

以肿瘤组织 ki-67 阳性细胞率为指标检测各组裸鼠移植人肝癌的体内增殖活性, 胞核染成深棕色为阳性, 结果见图 4。scr 组 ki-67 阳性细胞率和对照组无明显差异, scr (Normal+8 Gy) 组和 scr (Hypoxia+8 Gy) 组 ki-67 阳性细胞率则低于对照组 ($p<0.01$), Lv-anti-210 的三组一即 m210 组、m210 (Normal+8 Gy) 组和 m210 (Hypoxia+8 Gy) 组的 ki-67 阳性细胞率均低于对照组 ($p<0.01$); m210 组 ki-67 阳性细胞率明显低于 scr 组 ($p<0.01$), m210 (Hypoxia+8 Gy) 组 ki-67 阳性细胞率低于 scr (Hypoxia+8 Gy) 组 ($p<0.01$), m210 (Normal+8 Gy) 组 ki-67 阳性细胞率明显低于 scr (Normal+8 Gy) 组 ($p<0.01$), m210 (Normal+8 Gy) 组 ki-67 阳性细胞率最低。

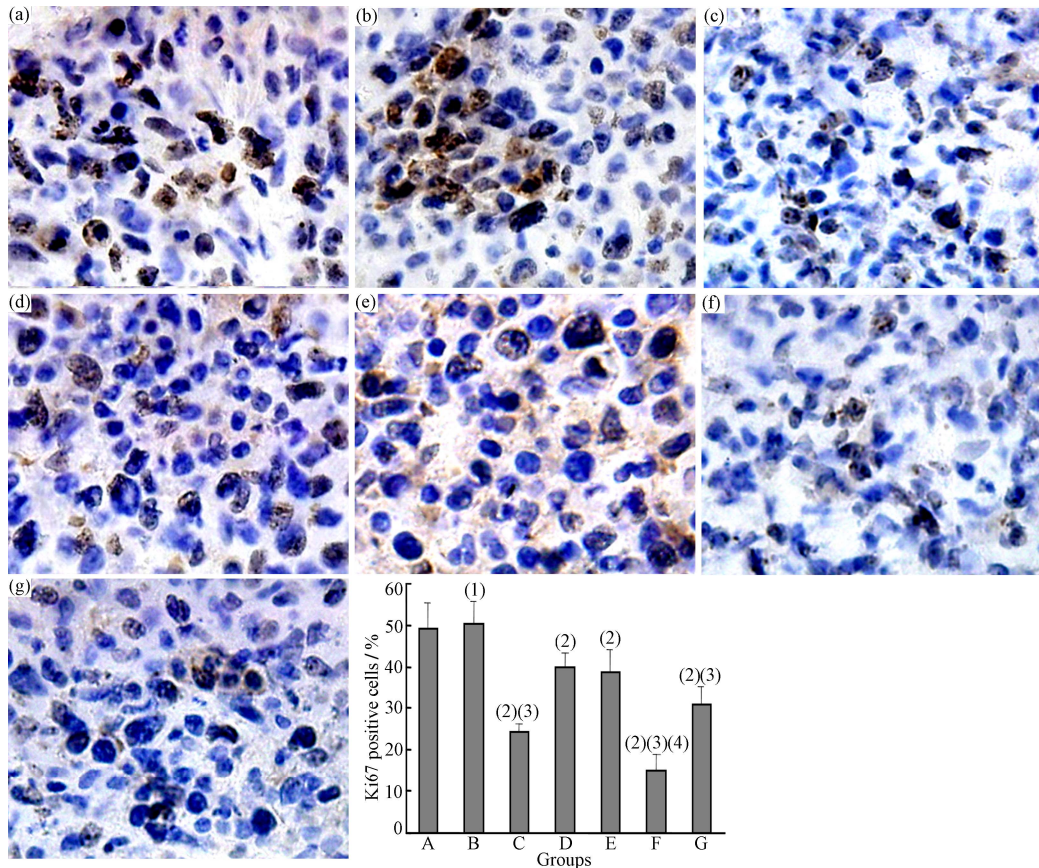


图4 免疫组织化学分析照射后1天移植肿瘤组织中ki67阳性细胞率(%)

(a) 对照组, (b) 随机序列对照组, (c) 随机序列常氧照射组, (d) 随机序列乏氧照射组, (e) miR-210 敲低对照组, (f) miR-210 敲低常氧照射组和(g) miR-210 敲低乏氧照射组

Fig.4 ki67 positive cells (%) in tumor xenograft by immunohistochemical analysis 1 day after treatment

(a) Control, (b) scr, (c) scr (Normal+8 Gy), (d) scr (Hypoxia+8 Gy), (e) m210, (f) m210 (Normal+8 Gy) and (g) m210 (Hypoxia+8 Gy) $\bar{x} \pm s$, $n=9$, ⁽¹⁾ $p>0.05$ and ⁽²⁾ $p<0.01$ vs. Control, ⁽³⁾ $p<0.01$ vs. scr (Hypoxia+8 Gy), ⁽⁴⁾ $p<0.01$ vs. scr (Normal+8 Gy)

2.5 miR-210 敲低联合放疗对裸鼠移植人肝癌的细胞凋亡率的影响

TUNEL 法检测各组裸鼠移植人肝癌细胞凋亡率, 胞核染成棕黄色为阳性, 结果见图5, scr 组和对照组 TUNEL 阳性细胞率无明显差异, scr (Normal+8 Gy) 组和 scr (Hypoxia+8 Gy) 组 TUNEL 阳性细胞率则高于对照组 ($p<0.01$), Lv-anti-210 的三组一即 m210 组、m210 (Normal+8 Gy) 组和 m210 (Hypoxia+8 Gy) 组 TUNEL 阳性细胞率都明显高于对照组 ($p<0.01$); m210 组 TUNEL 阳性细胞率明显高于 scr 组 ($p<0.01$), m210 (Hypoxia+8 Gy) 组的 TUNEL 阳性细胞率明显高于 scr (Hypoxia+8 Gy) 组 ($p<0.01$), m210 (Normal+8 Gy) 组的 TUNEL 阳性细胞率明显高于 scr (Normal+8 Gy) 组 ($p<0.01$), m210 (Normal+8 Gy) 组的 TUNEL 阳性细胞率最高。

2.6 miR-210 敲低联合放疗对裸鼠移植人肝癌肿瘤组织微血管密度的影响

以 CD31 单抗为一抗对瘤组织进行免疫组化染色, 肿瘤血管内皮细胞着色为棕黄色, 结果见图6, Lv-scr 三组即 scr 组、scr (Normal+8 Gy) 组和 scr (Hypoxia+8 Gy) 组的肿瘤组织微血管密度 (MVD) 与对照组无明显差异, Lv-anti-210 三组即 m210 组、m210 (Normal+8 Gy) 组和 m210 (Hypoxia+8 Gy) 三组的 MVD 无明显差异, 并且明显低于对照组 ($p<0.01$); m210 组的 MVD 低于 scr 组 ($p<0.01$), m210 (Hypoxia+8 Gy) 组的 MVD 明显低于 scr (Hypoxia+8 Gy) 组 ($p<0.01$), m210 (Normal+8 Gy) 组的 MVD 明显低于 scr (Normal+8 Gy) 组 ($p<0.01$)。

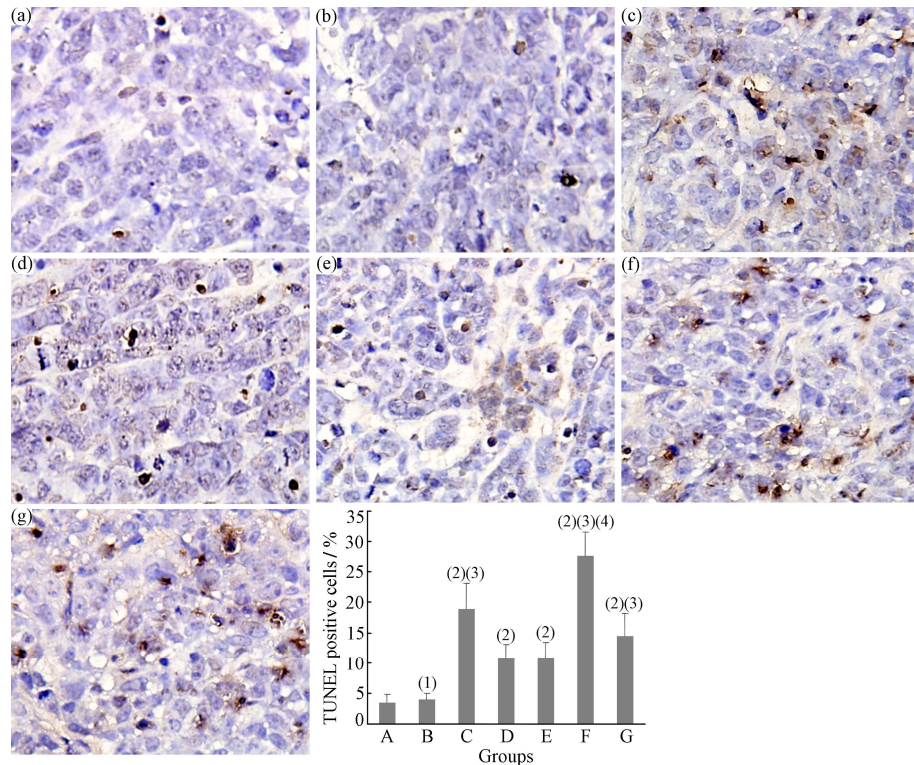


图5 照射后1天移植肿瘤组织的TUNEL阳性细胞率(%)

(a) 对照组, (b) 随机序列对照组, (c) 随机序列常氧照射组, (d) 随机序列乏氧照射组, (e) miR-210 敲低对照组, (f) miR-210 敲低常氧照射组和(g) miR-210 敲低乏氧照射组

Fig.5 TUNEL positive cells (%) in tumor xenograft 1 day after treatment

(a) Control, (b) scr, (c) scr (Normal+8 Gy), (d) scr (Hypoxia+8 Gy), (e) m210, (f) m210 (Normal+8 Gy) and (g) m210 (Hypoxia+8 Gy)
 $\bar{x} \pm s$, $n=9$, ⁽¹⁾ $p>0.05$ and ⁽²⁾ $p<0.01$ vs. Control, ⁽³⁾ $p<0.01$ vs. scr (Hypoxia+8 Gy), ⁽⁴⁾ $p<0.01$ vs. scr (Normal+8 Gy)

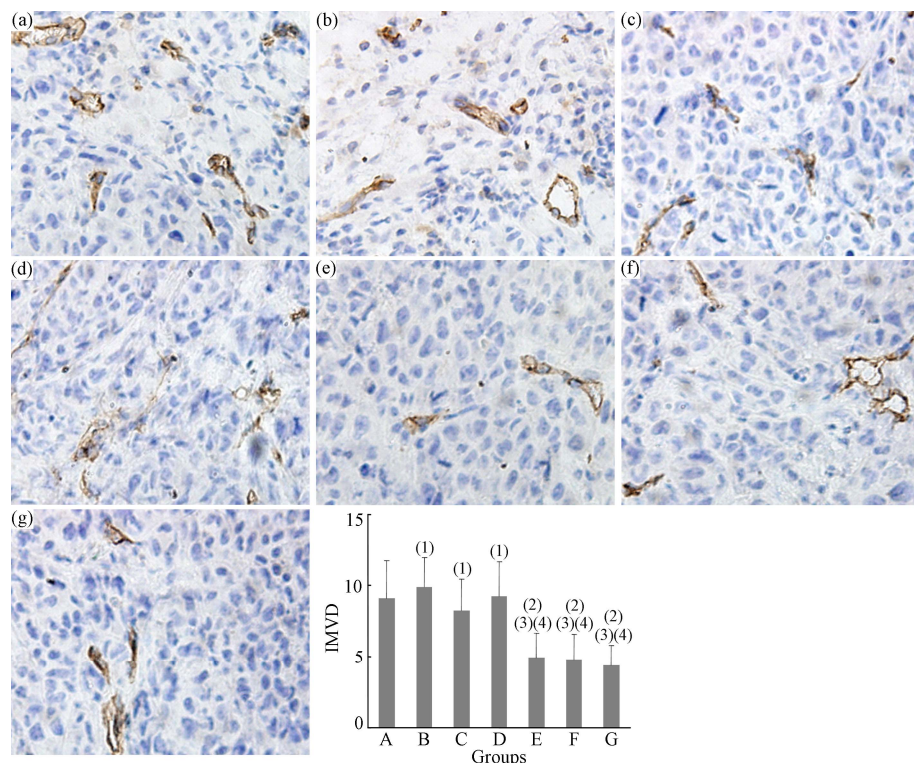


图6 miR-210 敲低联合放疗对移植肿瘤组织的微血管密度(MVD)的影响

(a) 对照组, (b) 随机序列对照组, (c) 随机序列常氧照射组, (d) 随机序列乏氧照射组, (e) miR-210 敲低对照组, (f) miR-210 敲低常氧照射组和(g) miR-210 敲低乏氧照射组

Fig.6 Effects of knockdown of miR-210 combined with radiotherapy on MVD of human hepatoma xenografts

(a) Control, (b) scr, (c) scr (Normal+8Gy), (d) scr (Hypoxia+8 Gy), (e) m210, (f) m210 (Normal+8 Gy) and (g) m210 (Hypoxia+8 Gy)
 $\bar{x} \pm s$, $n=9$, ⁽¹⁾ $p>0.05$ and ⁽²⁾ $p<0.05$ vs. Control, ⁽³⁾ $p<0.01$ vs. scr (Hypoxia+8 Gy), ⁽⁴⁾ $p<0.01$ vs. scr (Normal+8 Gy)

3 讨论

miR-210 在不同种类的正常和肿瘤细胞中由乏氧诱导产生^[3]。miR210 的茎-环结构位于非编码 RNA 的内含子,该 RNA 由 AK123483 的 11p15.5 染色体转录而来^[4]。miR-210 主要受 HIF-1 α 调节, HIF1 α 直接与邻近 miR-210 启动子的缺氧反应元件 (HRE) 结合^[5], miR-210 的启动子 HRE 在生物学上的高度保守表明了 miR-210 在调节乏氧基因表达的重要性。除了 HIF-1 α , miR-210 也受核因子 κ B (NF κ B) 调节,它是一个乏氧敏感转录因子, NF κ B p50 可以在乏氧条件下与一个保守的 κ B 结合位点相互作用并激活 miR-210 前体^[6]。

Myc 依赖性转录激活和细胞生长拮抗因子 (Antagonist of Myc-dependent transcriptional activation and cell growth, MNT) 是 miR-210 的靶基因,它是一种 Myc 基因受体拮抗剂,在如结肠癌细胞和宫颈癌细胞等变异细胞中可以阻滞细胞周期进程。MNT 和 Myc 竞争结合配体 Myc 相关因子 X 和 E box DNA 序列 (CANNTG) 来抑制基因的反式激活,控制细胞周期进程^[5]。EFNA3 (受体酪氨酸激酶配体 Ephrin A3) 是一类涉及血管生长 ephrin 家族成员之一^[7], miR-210 在乏氧条件下通过抑制 EFNA3 表达,促进血管生成。而 EFNA3 的过表达能显著地阻断 miR-210 促血管生成作用^[8]。AIFM3 是凋亡诱导因子 (Apoptosis-inducing factor AIF) 的同源基因,是人肝癌细胞中 miR-210 的直接靶基因^[9],可促进细胞色素 C 的释放,并以 caspase 依赖的方式诱导细胞凋亡。

目前对 miR-210 在肿瘤的发生发展中所起的作用还存在争议。在多数实体瘤中 miR-210 均为高表达。有研究表明 miR-210 的高表达与乳腺癌病人的治愈以及总体生存期负相关。另外, miR-210 的水平和乳腺癌肿瘤的侵袭性以及潜在的转移相关联。然而,在人卵巢上皮肿瘤中 miR-210 的基因缺失暗示它具有潜在的抑癌作用。本实验建立了 miR-210 表达下调的人肝癌细胞 SMMC-7721 荷瘤裸鼠模型,结果发现,接种 Lv-anti-miR-210 细胞悬液的裸鼠肿瘤成瘤期间明显较其他组裸鼠延迟。为研究其机制,我们用 Western blot 检测 HIF-1 α 、MNT、EFNA3 和 AIFM3 的表达。结果显示,接种 Lv-anti-m210 的裸鼠的 HIF-1 α 表达明显低于其他组,而 MNT、EFNA3 和 AIFM3 表达则高于其他组。HIF-1 α 是乏氧的主要传感器^[10],本实验中其表达下调可能是由于乏氧下 HIF-1 α 调节 miR-210 表达这一正反馈路径被破坏所致,在这一路径中, miR-210 是触发这一正反馈的关键, miR-210 的过表达可以在乏

氧下通过抑制甘油三磷酸脱氢酶-1-like (GPD1L) 的表达从而导致 HIF-1 α 的表达升高, GPD1L 的过表达则可以降低 HIF-1 α 蛋白的稳定性^[11]。本实验中敲低 miR-210,可能通过 GPD1L 的表达增加,导致 HIF-1 α 表达下降。HIF-1 α 下调在乏氧肿瘤细胞中可发挥抑制增殖、促进凋亡和增加辐射敏感性作用^[12,13]。免疫组化分析结果表明, miR-210 敲低组裸鼠的 ki-67 阳性率和 MVD 明显降低,而 TUNEL 阳性率则明显升高。这些结果提示,接种 Lv-anti-miR-210 细胞的裸鼠出瘤时间延迟,可能是由于 miR-210 敲低导致细胞增殖和血管生成抑制、细胞凋亡增加。

为了探讨 miR-210 敲低联合放疗对裸鼠移植人肝癌细胞 SMMC-7721 的肿瘤生长抑制效果,我们检测了各组裸鼠照后的肿瘤体积变化。结果显示,第 9 天起, miR-210 敲低常氧照射组和乏氧照射组肿瘤体积分别小于随机序列常氧或乏氧照射组。第 30 天, miR-210 敲低常氧照射组的肿瘤平均体积为 593 mm³,仅为对照组肿瘤体积的 33.57%。无论乏氧还是常氧条件下, miR-210 敲低联合放疗的体内抑瘤效应,都明显优于单纯放疗组或是单纯 miR-210 敲低组。照射后 24 h, miR-210 敲低常氧或乏氧照射组的肿瘤细胞增殖活跃度和肿瘤间质微血管密度,明显低于随机序列常氧或乏氧照射组,细胞凋亡率则明显升高。这些结果提示, miR-210 敲低可提高裸鼠移植人肝癌在常氧(仍有一定比例的乏氧细胞)或乏氧下的放疗效果, miR-210 可能是提高肝癌放疗效果的新有效靶点。但需要指出的是,随机序列常氧照射组体内抑瘤效应优于 miR-210 敲低乏氧照射组,说明 miR-210 敲低对乏氧肿瘤细胞的辐射放射增敏作用仍难以达到氧合所能产生的辐射增敏效果。

参考文献

- 1 Foekens J A, Sieuwerts A M, Smid M, *et al.* Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer [J]. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(35): 13021-13026
- 2 YANG Wei, SUN Ting, CAO Jianping, *et al.* Downregulation of miR-210 expression inhibits proliferation, induces apoptosis and enhances radiosensitivity in hypoxic human hepatoma cells in vitro [J]. *Exp Cell Res*, 2012, **318**(8): 944-954
- 3 Devlin C, Greco S, Martelli F, *et al.* miR-210: More than a silent player in hypoxia [J]. *IUBMB Life*, 2011, **63**(2): 94-100
- 4 HUANG Xin, Le Q T, Giaccia A J. MiR-210-

- micromanager of the hypoxia pathway [J]. Trends Mol Med, 2010, **16**(5): 230-237
- 5 ZHANG Zhan, SUN Hong, DAI Hongyue, *et al.* MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT [J]. Cell Cycle, 2009, **8**(17): 2756-2768
- 6 ZHANG Yi, FEI Mingyu, XUE Geng, *et al.* Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in preeclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease [J]. J Cell Mol Med, 2012, **16**(2): 249-259
- 7 HU Shijun, HUANG Mei, LI Zongjin, *et al.* MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease [J]. Circulation, 2010, **122**(11suppl): S124-131
- 8 Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, *et al.* MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits thereceptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3 [J]. J Biol Chem, 2008, **283**(23): 15878-15883
- 9 Mutharasan R K, Nagpal V, Ichikawa Y, *et al.* microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, **301**(4): 1519-1530
- 10 Kaelin W G Jr, Ratcliffe P J. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway [J]. Mol Cell, 2008, **30**(4): 393-402
- 11 Timothy J K, Amanda L S, Clary B C, *et al.* A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 α stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like [J]. Mol Cell Biol, 2011, **31**(13): 2696-2706
- 12 YANG Wei, SUN Ting, CAO Jianping, *et al.* Hypoxia-Inducible Factor-1 α downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and enhances radiosensitivity in chemical hypoxic human hepatoma SMMC-7721 cells [J]. Cancer Biother Radio, 2011, **26**(5): 565-571
- 13 Moeller B J, Richardson R A, Dewhirst M W, *et al.* Hypoxia and radiotherapy: opportunities for improved outcomes in cancer treatment [J]. Cancer Metastasis Rev, 2007, **26**(2): 241-248

Anti-tumor effects of knockdown miR-210 combined with radiotherapy on human hepatoma xenograft in nude mice

WEI Jing¹ YANG Wei¹ SUN Ting² LIU Fenju¹

¹ (Department of Radiobiology, School of Radiological Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou 215123, China)

² (Brain and Nerve Laboratory, the First Affiliated Hospital, Soochow University, Suzhou 215006, China)

ABSTRACT In order to investigate the anti-tumor effects of knockdown of miR-210 combined with radiotherapy on human hepatoma xenograft in nude mice, SMMC-7721, SMMC/Lv-scr and SMMC/Lv-anti-miR-210 cells were subcutaneously implanted into nude mice, when the diameter of tumor reached 6 mm–8 mm, we assessed expression of miR-210 and relative protein in tumor tissues. After irradiation of 8 Gy X rays under normoxia and hypoxia conditions for 24 h, the cell proliferation and intratumoral microvessel density were detected by Immunohistochemical staining while apoptotic cells in tumor tissue were detected by TUNEL method. The results showed that knockdown of miR-210 decreased expression of miR-210 and hypoxia induced factor 1 α (HIF-1 α), but increased the expression of proteins which are target genes of miR-210 in hepatoma xenograft. The tumor volumes of m210 (Normal+8 Gy) group and m210 (Hypoxia+8 Gy) group were significantly lower than those of scr (Normal+8Gy) group and scr (Hypoxia+8 Gy) group within 9–30 days after the beginning of therapy, respectively. The cell proliferation and intratumoral microvessel density of m210 (Normal+8 Gy) group and m210 (Hypoxia+8 Gy) group were significantly lower than those of scr (Normal+8 Gy) group and scr (Hypoxia+8 Gy) group, respectively, while the percentage of apoptotic cells in tumor tissue was higher 1 day after therapy. These results can be suggested that knockdown of miR-210 combined with radiotherapy can effectively enhance the anti-tumor effects either in normoxia or hypoxia condition on human hepatoma xenograft.

KEYWORDS MiR-210, Hypoxia, Radiotherapy, Hepatoma

CLC R730.55