

过表达 miR-613 通过靶向下调 Wee1 提高结直肠癌细胞放疗敏感性的机制研究

赵维山 朱燕昆 王若天 管傲然 李汝红

昆明医科大学附属延安医院普通外科,昆明 650051

赵维山和朱燕昆对本文有同等贡献

通信作者:李汝红,Email: lirh632@sina.com

【摘要】 目的 研究微小 RNA-613(miR-613)/Wee1 分子轴影响结直肠癌细胞放疗敏感性的分子机制。**方法** 选取 2016 年 11 月至 2017 年 5 月昆明医科大学附属延安医院收治的放疗敏感结直肠癌患者 20 例、放疗抵抗患者 20 例,另选取人结直肠癌细胞株 LoVo、HCT116,并建立放疗抵抗细胞株 LoVo/R、HCT116/R,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 miR-613 和 Wee1 在结直肠癌组织和细胞株中的表达情况。在结直肠癌放疗抵抗细胞中转染 miR-613 mimic,未转染细胞为对照组,采用 CCK-8、Transwell 和 Western blotting 方法检测在不同放疗剂量下,过表达 miR-613 对细胞增殖活力、侵袭能力和细胞周期的影响。进一步实验,采用双荧光素酶报告基因验证 miR-613 与 Wee1 的靶向关系。在结直肠癌放疗抵抗细胞中转染 si-Wee1 或同时转染 si-Wee1 和 miR-613 inhibitor,未转染细胞为对照组,采用 CCK-8、Transwell 和 Western blotting 方法检测在不同放疗剂量下,miR-613/Wee1 分子轴对细胞增殖活力、侵袭能力和细胞周期的影响。**结果** miR-613 在放疗抵抗结直肠癌患者组织中的表达量低于放疗敏感患者($1.54 \pm 0.25 : 2.64 \pm 0.45; t = 3.140, P = 0.009$),其在放疗抵抗结直肠癌细胞株中低表达(LoVo/R:LoVo 为 $1.03 \pm 0.12 : 3.05 \pm 0.15, t = 8.944, P = 0.006$;HCT116/R:HCT116 为 $1.01 \pm 0.11 : 2.85 \pm 0.16, t = 8.050, P = 0.008$)。同时,与对照组相比,过表达 miR-613 显著抑制结直肠癌放疗抵抗 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞增殖(LoVo/R 细胞: $t_{6\text{ Gy}} = 6.018, P = 0.013$;HCT116/R 细胞: $t_{6\text{ Gy}} = 5.634, P = 0.015$),抑制细胞侵袭(LoVo/R 细胞: $45.00 \pm 8.95 : 180.15 \pm 6.95, t_{6\text{ Gy}} = 11.93, P = 0.003$;HCT116/R 细胞: $49.97 \pm 6.21 : 170.20 \pm 7.03, t_{6\text{ Gy}} = 12.82, P = 0.006$),并下调 G₂-M 期相关蛋白细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)和 cyclin B 的表达水平。此外,双荧光素酶报告基因证实 miR-613 靶向作用于 Wee1。进一步实验发现,miR-613 通过靶向下调 Wee1 显著抑制 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞增殖(转染 si-Wee1、同时转染 si-Wee1 和 miR-613 inhibitor 以及对照组 3 组比较,LoVo/R 细胞: $F_{8\text{ Gy}} = 40.742, P = 0.007$;HCT116/R 细胞: $F_{8\text{ Gy}} = 28.958, P = 0.011$),抑制细胞侵袭(LoVo/R 细胞: $F_{8\text{ Gy}} = 55.413, P = 0.004$;HCT116/R 细胞: $F_{8\text{ Gy}} = 65.634, P = 0.003$),并将细胞阻滞在 G₂-M 期,进而上调 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞对放疗的敏感性。**结论** miR-613/Wee1 分子轴与结直肠癌细胞放疗抵抗性存在调控关系,且过表达 miR-613 可逆转结直肠癌细胞的放疗抵抗性。

【关键词】 微 RNAs; 结直肠肿瘤; Wee1; 放疗敏感性

基金项目: 云南省科技厅-昆明医科大学基础研究联合专项资金(2015fb088)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2019.03.006

Overexpression of miR-613 enhanced radiosensitivity of colorectal cancer cells via targeting downregulation of Wee1

Zhao Weishan, Zhu Yankun, Wang Ruotian, Guan Aoran, Li Ruhong

Department of General Surgery, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650051, China

Corresponding author: Li Ruhong, Email: lirh632@sina.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of microRNA-613 (miR-613)/Wee1 axis on the radiosensitivity of colorectal cancer cells. **Methods** A total of 20 patients with radiosensitive colorectal cancer and 20 patients with radioresistance were selected from Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University from

November 2016 to May 2017. Human colorectal cancer cell lines LoVo and HCT116 were selected and the radioresistant cell lines LoVo/R and HCT116/R were established for subsequent experiments. Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of miR-613 and Wee1 in colorectal cancer tissues and cell lines. The radioresistant cells were transfected by miR-613 mimic, and non-transfected cells were used as control group. The effects of miR-613 overexpression on the proliferation, invasion and cell cycle of radiation resistance of colorectal cancer cells at different radiation doses were evaluated by CCK-8 assay, Transwell assay and Western blotting, respectively. Furthermore, dual-luciferase reporter gene assay was used to verify whether Wee1 was a target gene of miR-613. si-Wee1 was transfected into radioresistant cells of colorectal cancer, or co-transfected with si-Wee1 and miR-613 inhibitor, and non-transfected cells were used as control group. The effects of miR-613/Wee1 axis on cell proliferation, invasion and cell cycle were detected by CCK-8, Transwell and Western blotting at different radiation doses.

Results The expression of miR-613 was downregulated in the radiation resistance group of patients (1.54 ± 0.25 vs. 2.64 ± 0.45 ; $t = 3.140$, $P = 0.009$) and radiation resistance cell lines (LoVo/R vs. LoVo: 1.03 ± 0.12 vs. 3.05 ± 0.15 ; $t = 8.944$, $P = 0.006$; HCT116/R vs. HCT116: 1.01 ± 0.11 vs. 2.85 ± 0.16 ; $t = 8.050$, $P = 0.008$). Overexpression of miR-613 was significantly inhibited the proliferation (LoVo/R: $t_{6\text{ Gy}} = 6.018$, $P = 0.013$; HCT116/R: $t_{6\text{ Gy}} = 5.634$, $P = 0.015$) and invasion (LoVo/R: 45.00 ± 8.95 vs. 180.15 ± 6.95 , $t_{6\text{ Gy}} = 11.93$, $P = 0.003$; HCT116/R: 49.97 ± 6.21 vs. 170.20 ± 7.03 , $t_{6\text{ Gy}} = 12.82$, $P = 0.006$) of LoVo/R and HCT116/R cells and decreased the expression levels of G₂-M phase cell cycle correlated proteins (CDK1 and cyclin B). Moreover, dual-luciferase reporter gene assay confirmed that Wee1 was a target of miR-613. Mechanistically, overexpression of miR-613 promoted the radiosensitivity of LoVo/R and HCT116/R cells through inhibiting cell proliferation (compared with si-Wee1 group, co-transfected with si-Wee1 and miR-613 inhibitor, and control group, LoVo/R: $F_{8\text{ Gy}} = 40.742$, $P = 0.007$; HCT116/R: $F_{8\text{ Gy}} = 28.958$, $P = 0.011$), invasion (LoVo/R: $F_{8\text{ Gy}} = 55.413$, $P = 0.004$; HCT116/R: $F_{8\text{ Gy}} = 65.634$, $P = 0.003$) and arresting cell at G₂-M phase via downregulating Wee1.

Conclusion miR-613/Wee1 axis plays a certain role in regulating the radiation resistance of colorectal cancer cells, overexpression of miR-613 may reverse the radiation resistance of colorectal cancer cells.

【Key words】 MicroRNAs; Colorectal neoplasms; Wee1; Radiosensitivity

Fund program: Joint Special Fund for Basic Research of Yunnan Provincial Department of Science and Technology and Kunming Medical University (2015fb088)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-422X.2019.03.006

结直肠癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,尤其是包括中国在内的亚太地区,其发病率逐年上升^[1-2],因此研究结直肠癌发生发展的分子机制非常重要。目前,临床上着重于应用早期诊断和辅助放化疗来延长结直肠癌患者的生存期。然而,由于结直肠癌细胞对放疗存在耐受性,所以预期疗效无法达到。近期有研究报道,微小 RNA-613 (miR-613) 属于抑癌基因,且其表达与结直肠癌^[3]、食管鳞状细胞癌^[4]和卵巢癌^[5]的发生发展密切相关。同时,也有研究报道 miR-613 通过靶向下游基因参与调控非小细胞肺癌对放疗的敏感性^[6]。Wee1 激酶是一种细胞周期相关调控蛋白,可以调控细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (CDK1) 的磷酸化状态从而影响细胞的增殖。本研究通过检测 miR-613 和 Wee1 在结直肠癌组织和细胞株中的表达情况,并深入探讨 miR-613 通过调控 Wee1 介导结直肠癌细胞放疗抵抗性的分子机制,以期改善结直肠癌临床治疗放疗抵抗性以及患者预后提供更多的依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 11 月至 2017 年 5 月昆明医科大学附属延安医院收治的资料完整的结直肠癌患者 40 例,其中放疗敏感患者 20 例,放疗抵抗患者 20 例。经手术切除的结直肠癌组织迅速保存于液氮中。

入选标准:①经肠镜、影像学(超声、CT、MRI)、病理组织学检查结果确认为结直肠癌;②手术前 2 周进行放化疗等治疗手段。

排除标准:①之前进行过任何放疗或化疗的患者;②患者不同意样本的采集;③不能耐受手术的患者;④合并有免疫系统疾病的患者。

所有研究对象对本研究均签署知情同意书,本研究经昆明医科大学附属延安医院伦理委员会批准(批准文号:2018-074-01)。

1.2 药品、试剂与仪器

miR-613 inhibitor 和 mimic 购自上海吉玛制药技术有限公司;DMEM 和胎牛血清购自美国 Biological

Industries 公司;青霉素和链霉素均购自北京雷根生物技术有限公司;Transwell 小室购自美国康宁公司;高纯总 RNA 快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;Lipofectamine 2000 和反转录试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司;CCK-8 试剂盒、蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒均购自美国 Bio-Rad 公司;Western blotting 一抗和二抗均购自美国 CST 公司。

酶标仪、实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪及电泳仪和凝胶成像系统均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;超速冷冻离心机、电泳槽购自北京六一生物科技有限公司;PHOENIX ⁶⁰Co 系统购自日本 Phoenix Contact 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养:人结直肠癌细胞株 LoVo, HCT116 均购自中科院上海细胞研究所,结直肠癌细胞株采用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 μg/ml 的 DMEM 培养液在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。

1.3.2 结直肠癌放疗抵抗细胞株的建立:收集对数生长期结直肠癌 LoVo 和 HCT116 细胞,采用直线加速器产生的 6 MV-X 射线进行垂直放疗细胞(剂量为 2 Gy/min),剂量分别为 2、4、6、8 和 10 Gy,刺激 24 h,结束后于培养箱继续培养。对于经低剂量放射处理的 LoVo 和 HCT116 细胞弃去培养基,加入新鲜的 DMEM 培养基继续培养,观察细胞活力,若无明显死亡选择该对数期细胞增加放疗剂量,反复传代培养,直至最后在放射剂量为 6 Gy 下能够稳定存活,即成功构建放疗抵抗细胞株 LoVo/resistance(简称 LoVo/R)和 HCT116/resistance(简称 HCT116/R)。

1.3.3 细胞转染:采用无血清细胞 DMEM 培养液稀释质粒 DNA,轻轻混匀,标记为 A 液。同时,采用无血清的 DMEM 培养液稀释 Lipofectamine 2000,混匀后于 24 °C 条件下放置 5 min,标记为 B 液。将 A、B 液混合,置于 24 °C 条件下孵育 30 min。混合液加入至细胞培养皿中,并于 CO₂ 培养箱(37 °C)中过夜培养。次日,更换新的含有血清的 DMEM 培养液继续培养细胞,并检测其转染效率。培养 3 d 后,将细胞培养液于 1 000 × g 离心 10 min,离心后收集上清液,检测病毒滴度,备用。

1.3.4 CCK-8 检测细胞增殖:将处于对数生长期的转染 miR-613 mimic、si-Weel 或 si-Weel 和 miR-613 inhibitor 后的 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞接种于 96 孔板,每孔含细胞 10⁴ 个/ml,每孔含培养基 100 μl。于待检测前 1 h,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,

37 °C 培养 1 h 后,采用酶标仪在 450 nm 处测量各孔的吸光度(A)值。

1.3.5 qRT-PCR 检测:采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,取 2 μg 反转录为 cDNA。取 2 μl 反转录产物进行 PCR 反应,以 U6 为内参基因(引物序列见表 1)。按试剂盒说明建立终体积为 20 μl 的 PCR 反应体系:2 μl 反转录产物,10 μl SYBR Green Mix,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μl, ddH₂O 补足至 20 μl。PCR 反应条件:第 1 步,95 °C 5 min;第 2 步,95 °C 10 s,60 °C 20 s,72 °C 20 s,进行 40 个循环;第 3 步,78 °C 20 s(收集荧光强度)。检测结果采用 2^{-ΔΔCt}法进行计算。

表 1 miR-613、Weel 及内参引物序列

名称	引物序列
miR-613	正向引物:5'-GTGAGTGCCTTTCCAAGTGT-3'
	反向引物:5'-TGAGTGGCAAAGAAGGAACAT-3'
Weel	正向引物:5'-AACAAAGGATCTCCAGTCCACA-3'
	反向引物:5'-GGGCAAGCGCAAAAATATCTG-3'
U6	正向引物:5'-GAGGCACAGCGGAACG-3'
	反向引物:5'-CTACCACATAGTCCAGG-3'

注:miR-613 为微小 RNA-613

1.3.6 Western blotting 检测:提取结直肠癌放疗敏感患者和放疗抵抗患者组织以及细胞中的蛋白后,依据二喹啉甲酸(BCA)试剂盒的指导要求检测蛋白浓度。上样缓冲液加入萃取的蛋白后,加热至 95 °C,维持 10 min。每孔样品的载药量是 30 μg,添加 10% 的聚丙烯酰胺凝胶以分离蛋白,后电泳、转膜、封闭。加入一抗(1:500),4 °C 下过夜培养。洗膜缓冲液(TBST)冲洗蛋白 3 次,每次 5 min,随后加入二抗(1:500),温室中培养 1 h。再次洗膜 3 次后,加入化学发光试剂显影蛋白。β-actin 用作内参,Bio-rad Gel DoleZ 成像器用来成像蛋白,用 Image J 软件分析靶带的灰度水平。

1.3.7 Transwell 实验:选择转染细胞为实验组,未转染细胞为对照组,分别将各组细胞用胰酶消化处理后接种于 Transwell 小室 24 孔板内,上室加 100 μl(密度为 2 × 10⁵ 个/ml)细胞悬液,下室加 250 μl 含 10% FBS 的培养基,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,取出小室,棉签擦去微孔膜上室的细胞,PBS 小心冲洗小室上下面 2 遍,4% 的多聚甲醛固定侵袭并黏附到小室微孔膜下面的细胞 15 min,结晶紫染色 15 min,PBS 冲洗小室,干燥后置于 100 倍的倒置显微镜观察并计数细胞。

1.3.8 双荧光素酶报告基因: 采用 PCR 扩增 miR-613 与 Wee1 结合片段并插入荧光素酶载体, 构建 Wee1 野生质粒。用基因突变技术将结合片段中部分核苷酸突变, 构建 Wee1 突变质粒。用 miR-613 mimic 和 Wee1 野生质粒或突变质粒共转染 293T 细胞, 利用报告基因试剂盒检测各组的荧光素酶活性。

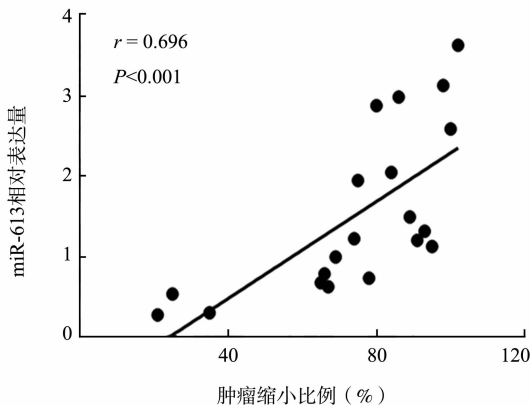
1.4 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件分析实验数据, 计量资料符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 进一步两两比较采用 LSD 法, 采用 Pearson 相关系数分析 miR-613 与肿瘤缩小比例的相关性。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-613 在结直肠癌放疗抵抗患者和细胞株中的异常表达

qRT-PCR 检测结果显示, miR-613 在结直肠癌放疗敏感患者和放疗抵抗患者组织中的表达水平分别为 2.64 ± 0.45 和 1.54 ± 0.25 , 差异有统计学意义 ($t = 3.140, P = 0.009$)。同时, 分析 20 例结直肠癌放疗抵抗患者组织中 miR-613 的相对表达量与患者经放疗后肿瘤体积缩小比例的相关性, 结果显示 miR-613 表达量与结直肠癌患者放疗疗效呈正相关 ($r = 0.696, P < 0.001$, 图 1)。此外, miR-613 在 LoVo 和 LoVo/R 细胞中的相对表达量分别为 3.05 ± 0.15 和 1.03 ± 0.12 , 差异具有统计学意义 ($t = 8.944, P = 0.006$); miR-613 在 HCT116 和 HCT116/R 细胞中的相对表达量分别为 2.85 ± 0.16 和 1.01 ± 0.11 , 差异具有统计学意义 ($t = 8.050, P = 0.008$)。由此可知, miR-613 在结直肠癌放疗抵抗患者组织及放疗抵抗细胞中低表达, 推测其可能参与结直肠癌放疗敏感性的调控。



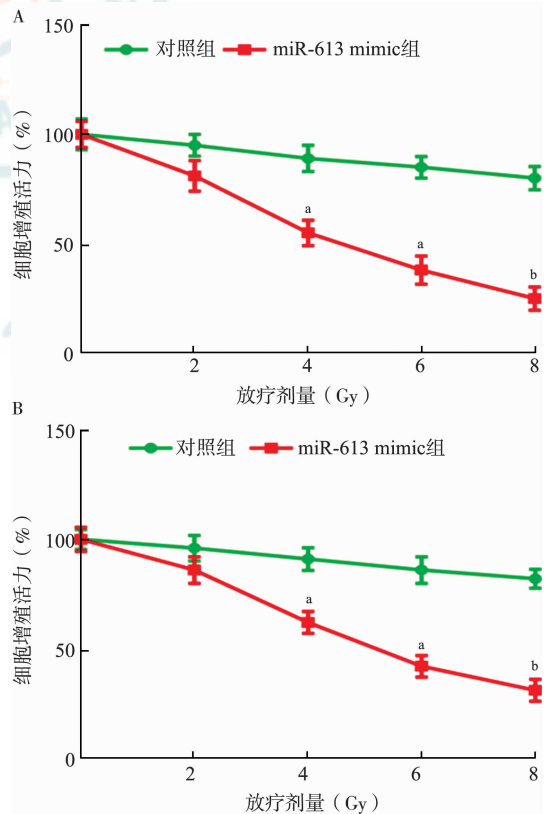
注: miR-613 为微小 RNA-613

图 1 20 例结直肠癌放疗抵抗患者组织中 miR-613 的相对表达量与肿瘤缩小比例的相关性

2.2 过表达 miR-613 对结直肠癌细胞放疗敏感性的影响

基于 miR-613 在结直肠癌放疗抵抗患者组织及 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞中低表达, 进一步探讨过表达 miR-613 对 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞增殖、侵袭能力和细胞周期的影响。首先, qRT-PCR 检测结果显示, 在 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞中转染 miR-613 mimic 后, LoVo/R 细胞对照组和过表达 miR-613 组中的相对表达水平分别为 1.01 ± 0.12 和 3.81 ± 0.20 , 差异具有统计学意义 ($t = 12.522, P = 0.003$); HCT116/R 细胞对照组和过表达 miR-613 组中的相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 3.03 ± 0.17 , 差异具有统计学意义 ($t = 8.954, P = 0.006$)。

随后, CCK-8 检测结果表明 (图 2), 过表达 miR-613 可显著抑制 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞在 4、6、8 Gy 放疗剂量下的增殖活力, 差异有统计学意义 (LoVo/R 细胞: $t_{4\text{Gy}} = 4.007, P = 0.029, t_{6\text{Gy}} = 6.018, P = 0.013, t_{8\text{Gy}} = 7.778, P = 0.008$; HCT116/R 细胞: $t_{4\text{Gy}} = 4.101, P = 0.027, t_{6\text{Gy}} = 5.634, P = 0.015, t_{8\text{Gy}} = 7.965, P = 0.008$)。



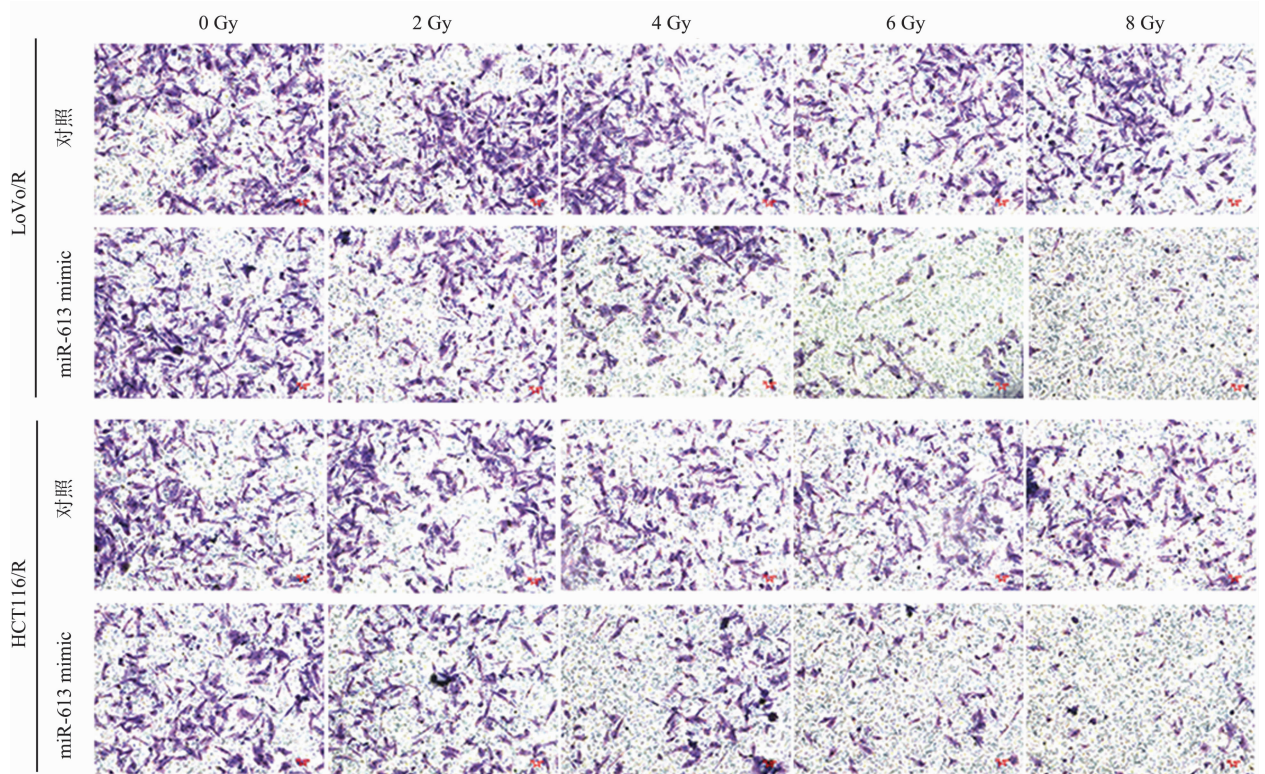
注: miR-613 为微小 RNA-613; LoVo/R 和 HCT116/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

图 2 CCK-8 检测不同放疗剂量下过表达 miR-613 对 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞增殖活力的影响 A 为 LoVo/R 细胞; B 为 HCT116/R 细胞

此外, Transwell 检测结果见图 3, LoVo/R 和 HCT116/R 细胞转染 miR-613 mimic 后, 过表达 miR-613 组和对照组中穿膜细胞相对数如表 2 和表 3 所示, 放疗剂量为 4、6、8 Gy 时, 两组差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

进一步采用 Western blotting 检测 G₂-M 期相关蛋白 CDK1 和 cyclin B 的表达水平, 结果见图 4。相

比于对照组, 转染 miR-613 mimic 后在放疗剂量为 4、6、8 Gy 时, 细胞周期 G₂-M 限制点中的关键蛋白 CDK1 和 cyclin B 在 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞中表达下调。由此可知, 过表达 miR-613 可显著抑制结直肠癌放疗抵抗细胞增殖和侵袭能力, 以及下调细胞周期 G₂-M 限制点中的相关蛋白表达水平, 即明显提高了结直肠癌细胞对放疗的敏感性。



注: miR-613 为微小 RNA-613; LoVo/R 和 HCT116/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株

图 3 Transwell 检测不同放疗剂量下过表达 miR-613 对 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞侵袭能力的影响 结晶紫染色 ×100

表 2 Transwell 检测不同放疗剂量下 LoVo/R 细胞穿膜细胞相对数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
对照组	210.45 ± 8.02	206.52 ± 9.03	198.23 ± 6.58	180.15 ± 6.95	176.09 ± 6.14
过表达 miR-613 组	212.04 ± 9.97	174.98 ± 9.05	98.04 ± 8.03	45.00 ± 8.95	36.11 ± 6.03
t 值	0.12	2.47	9.65	11.93	16.27
P 值	0.456	0.066	0.005	0.003	0.002

注: LoVo/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株; miR-613 为微小 RNA-613

表 3 Transwell 检测不同放疗剂量下 HCT116/R 细胞穿膜细胞相对数 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
对照组	209.89 ± 8.54	197.89 ± 8.21	174.88 ± 7.98	170.20 ± 7.03	167.88 ± 4.96
过表达 miR-613 组	212.10 ± 9.05	175.15 ± 8.05	97.95 ± 6.12	49.97 ± 6.21	32.09 ± 5.89
t 值	0.18	1.98	7.65	12.82	17.63
P 值	0.438	0.093	0.008	0.006	0.003

注: HCT116/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株; miR-613 为微小 RNA-613

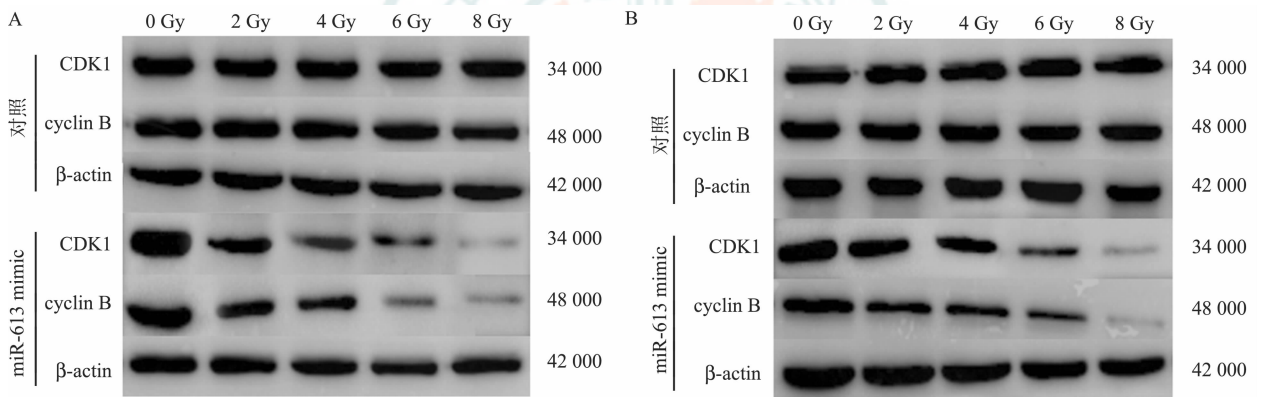
2.3 miR-613 靶向负调控 Wee1

基于 miR-613 对结直肠癌放疗抵抗细胞生物学行为的影响。首先,分析临床 20 例结直肠癌放疗抵抗患者组织中 Wee1 相对表达量与 miR-613 的表达水平和经放疗后瘤体缩小比例的相关性。Pearson 相关性分析结果显示,Wee1 的相对表达量与肿瘤瘤体缩小比例呈负相关($r = -0.590, P = 0.006$, 图 5A),且与 miR-613 的表达呈负相关($r = -0.772, P < 0.001$, 图 5B)。同时,借助生物信息学数据库 TargetScan、miRnada 和 PITA 对 miR-613 的靶基因进行预测,发现 miR-613 可以结合 Wee1 的 3'UTR。随后采用荧光素酶报告基因验证实验发现,在 Wee1 3'UTR 野生型重组载体组中,过表达 miR-613 组和对照组荧光比值相对表达分别为 0.25 ± 0.06 和 1.00 ± 0.05 , 差异具有统计学意义($t = 9.603, P = 0.005$); Wee1 3'UTR 突变型重组载体组中,过表达 miR-613 组和对照组荧光

比值相对表达分别为 0.98 ± 0.08 和 0.97 ± 0.07 , 差异无统计学意义($t = 0.094, P = 0.467$)。此外,Western blotting 检测结果证实,在 LoVo/R 细胞中,过表达 miR-613 和对照组中 Wee1 的相对表达水平分别为 0.20 ± 0.04 和 1.00 ± 0.09 , 且差异具有统计学意义($t = 7.428, P = 0.009$), 见图 6。由此可知,Wee1 是 miR-613 的靶基因,并且 miR-613 可负调控 Wee1 的表达。

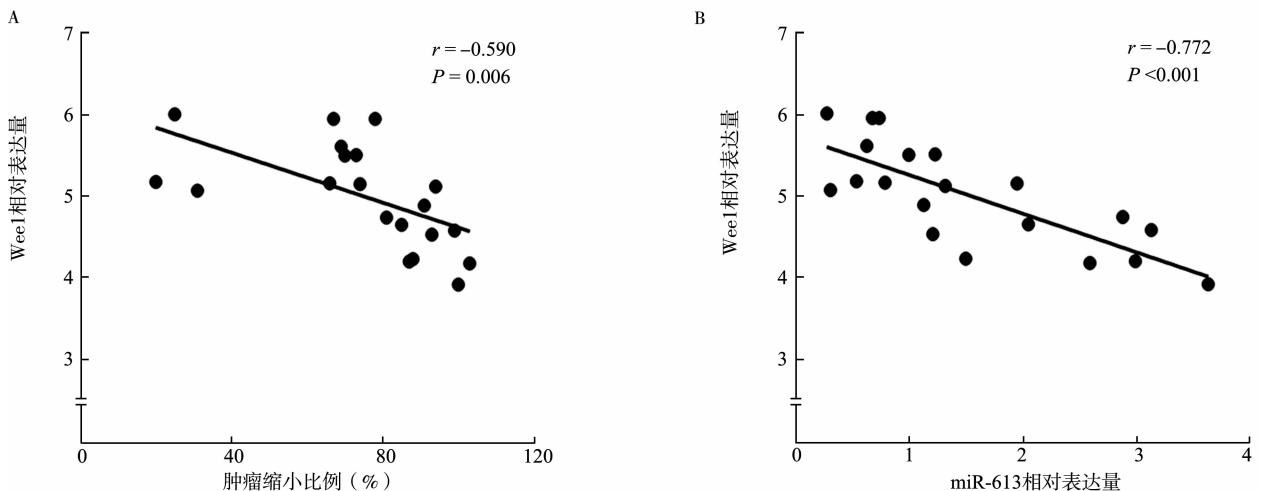
2.4 miR-613/Wee1 分子轴对结直肠癌细胞放疗敏感性的影响

为了进一步明确 miR-613/Wee1 分子轴对结直肠癌放疗敏感性的影响,在结直肠癌放疗抵抗细胞株中转染 si-Wee1 或同时转染 si-Wee1 和 miR-613 inhibitor 后,通过 CCK-8、Transwell 和 Western blotting 分别检测结直肠癌放疗抵抗细胞株 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞增殖活力、侵袭能力和细胞周期的变化。



注:miR-613 为微小 RNA-613;LoVo/R 和 HCT116/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株;CDK1 为细胞周期蛋白依赖性激酶 1

图 4 Western blotting 检测不同放疗剂量下过表达 miR-613 对 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞中 G₂-M 限制点关键蛋白表达水平的影响 A 为 LoVo/R;B 为 HCT116/R



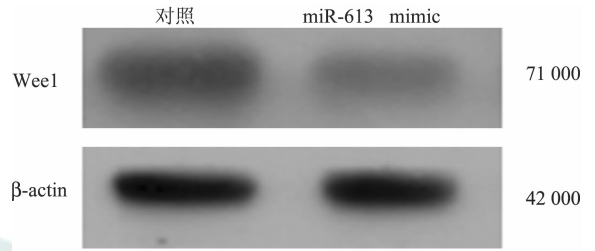
注:miR-613 为微小 RNA-613

图 5 20 例结直肠癌放疗抵抗患者 Wee1 表达水平与肿瘤缩小比例及 miR-613 表达的相关性 A 为 Wee1 表达水平与肿瘤缩小比例的相关性; B 为 Wee1 与 miR-613 在结直肠癌放疗抵抗癌组织中的表达相关性

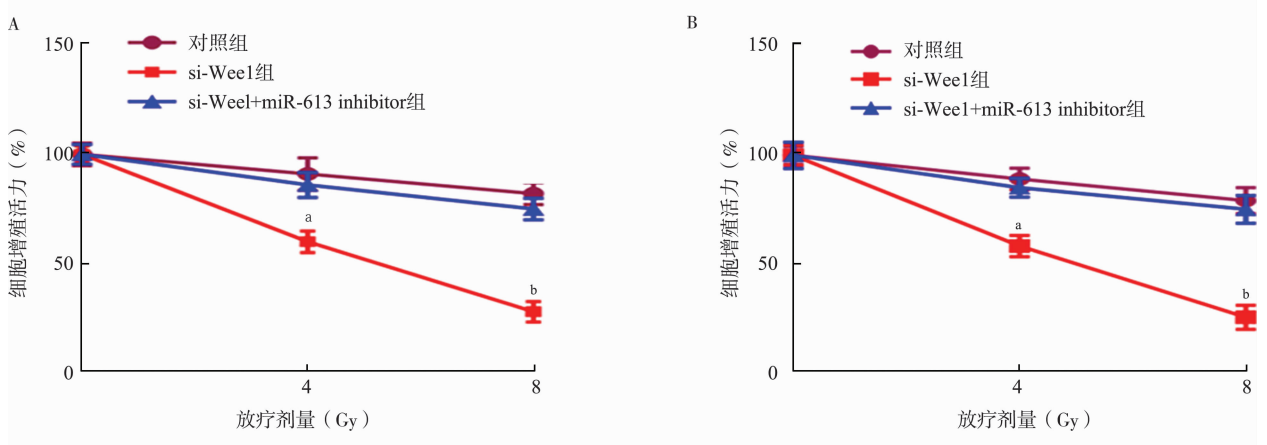
CCK-8 检测结果表明(图 7),对照组、si-Wee1 组和共转染 miR-613 inhibitor + si-Wee1 组细胞增殖活力差异具有统计学意义(LoVo/R 细胞: $F_{4 Gy} = 11.952, P = 0.037; F_{8 Gy} = 40.742, P = 0.007$; HCT116/R 细胞: $F_{4 Gy} = 20.310, P = 0.018; F_{8 Gy} = 28.958, P = 0.011$),进一步两两比较,对照组和 si-Wee1 组差异具有统计学意义($P < 0.05$),对照组和共转染 miR-613 inhibitor + si-Wee1 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

同时,Transwell 检测结果显示(图 8、表 4、表 5),放疗剂量为 4、8 Gy 时,对照组、si-Wee1 组和共转染 miR-613 inhibitor + si-Wee1 组细胞侵袭能力差异具有统计学意义($P < 0.05$),进一步两两比较,对照组和 si-Wee1 组差异具有统计学意义($P < 0.05$),对照组和共转染 miR-613 inhibitor + si-Wee1 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

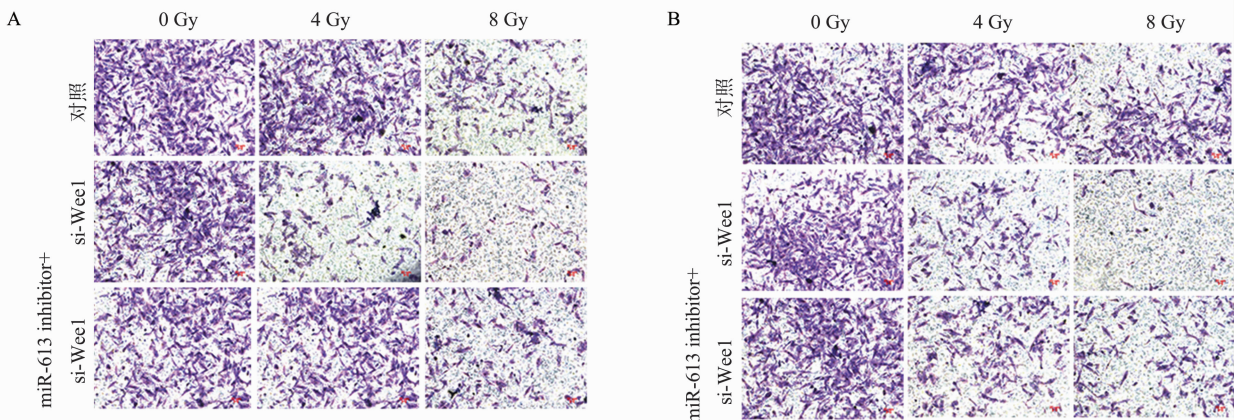
Western blotting 检测结果进一步证实(图 9),与对照组相比,转染 si-Wee1 后细胞周期中 G₂-M 检查点相关蛋白 CDK1 和 cyclin B 蛋白明显下调;而共转染 miR-613 inhibitor 和 si-Wee1 后 CDK1 和 cyclin B 蛋白的表达与对照组没有明显差异。由此可知,miR-613 通过靶向下调 Wee1 增强结直肠癌细胞对放疗的敏感性。



注:miR-613 为微小 RNA-613;LoVo/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株
图 6 过表达 miR-613 对 Wee1 在 LoVo/R 细胞中表达水平的影响



注:LoVo/R 和 HCT116/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株;
与 si-Wee1 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;miR-613 为微小 RNA-613
图 7 CCK-8 检测 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞增殖活力 A 为 LoVo/R;B 为 HCT116/R



注:LoVo/R 和 HCT116/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株;miR-613 为微小 RNA-613
图 8 Transwell 检测不同放疗剂量下 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞侵袭能力
结晶紫染色 ×100 A 为 LoVo/R;B 为 HCT116/R

表 4 Transwell 检测不同放疗剂量下 LoVo/R 细胞穿膜细胞相对数($\bar{x} \pm s$)

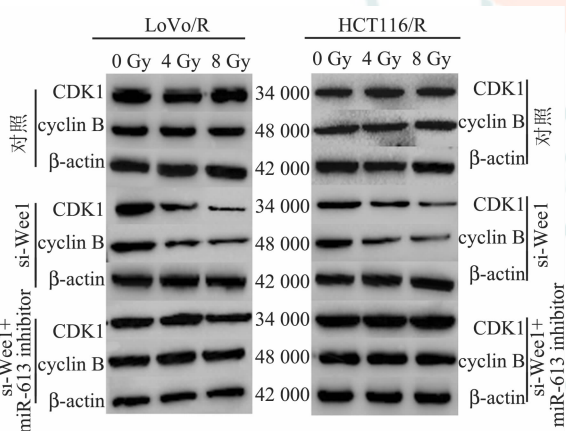
组别	0 Gy	4 Gy	8 Gy
对照组	215.10 ± 8.95	189.96 ± 10.02	119.88 ± 7.42
si-Wee1 组	211.85 ± 9.21	100.21 ± 8.21 ^{ab}	23.12 ± 6.52 ^{ab}
共转染 miR-613 inhibitor + si-Wee1 组	215.11 ± 9.78	180.14 ± 7.95	125.10 ± 8.63
F 值	0.041	32.018	55.413
P 值	0.961	0.009	0.004

注:LoVo/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株;与对照组比较,^a*P* < 0.01;与共转染 miR-613 inhibitor + si-Wee1 组比较,^b*P* < 0.01;miR-613 为微小 RNA-613

表 5 Transwell 检测不同放疗剂量下 HCT116/R 细胞穿膜细胞相对数($\bar{x} \pm s$)

组别	0 Gy	4 Gy	8 Gy
对照组	219.98 ± 9.24	178.06 ± 10.03	132.42 ± 7.05
si-Wee1 组	223.05 ± 9.30	89.41 ± 8.14 ^{ab}	15.41 ± 4.68 ^{ab}
共转染 miR-613 inhibitor + si-Wee1 组	225.32 ± 10.21	174.23 ± 8.07	112.84 ± 8.78
F 值	0.078	33.250	65.634
P 值	0.927	0.009	0.003

注:HCT116/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株;与对照组比较,^a*P* < 0.01;与共转染 miR-613 inhibitor + si-Wee1 组比较,^b*P* < 0.01;miR-613 为微小RNA-613



注:LoVo/R 和 HCT116/R 为放疗抵抗结直肠癌细胞株;

CDK1 为细胞周期蛋白依赖性激酶 1;miR-613 为微小 RNA-613

图 9 Western blotting 检测不同放疗剂量下 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞 G₂-M 检查点相关蛋白 CDK1 和 cyclin B 的表达情况

对放疗的敏感性。同时,miR-145 和 miR-106b 也与结直肠癌放疗敏感性的调控有关^[11-12]。本研究发现,miR-613 在放疗抵抗的结直肠癌患者组织和细胞中低表达,且过表达 miR-613 可显著抑制结直肠癌放疗抵抗细胞株增殖和侵袭能力。

Wee1 是一种细胞核激酶,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,已被证明其在保持基因的完整性中发挥重要作用,作用机制主要是诱导细胞周期 G₂-M 检查点的阻滞^[13],从而在细胞进行有丝分裂前参与受损 DNA 的修复。目前,Wee1 已被发现在包括结直肠癌的多种肿瘤治疗中可能发挥重要作用^[14-15]。同时,Wee1 在胃癌、头颈癌和非小细胞肺癌中高表达,且其高表达与非小细胞肺癌细胞周期 G₂ 检查点密切相关^[16-18]。本研究结果证实,Wee1 的相对表达量与结直肠癌放疗疗效呈负相关,且敲降 Wee1 可逆转结直肠癌细胞对放疗的抵抗性。

近期研究发现,miR-17-92 簇可以直接靶向 Wee1,调控其表达^[19]。此外 miR-381 和 miR-497 也是肿瘤中调控 Wee1 的重要非编码 RNA^[20-21]。本研究双荧光素酶报告基因结果证实,miR-613 可靶向负调控 Wee1 的表达。

综上所述,本研究揭示了过表达 miR-613 通过靶向 Wee1 可显著抑制 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞增殖、侵袭和阻断细胞周期 G₂-M,进而提高结直肠癌 LoVo/R 和 HCT116/R 细胞对放疗的敏感性。后续的

3 讨论

miRNA 是长度为 19 ~ 23 个核苷酸的非编码 RNA,在包括结直肠癌在内的多种恶性肿瘤中发挥重要调控作用^[7]。近年来,miRNA 在调控结直肠癌发生发展过程中的作用已被广泛研究。例如,Andaur 等^[8]报道,miR-205-3p、miR-1、miR-133b、miR-122-5p 和 miR-134-5p 在经放射处理的结直肠癌细胞中均有异常表达。miR-451 通过靶向下调 CAB39 和 EMSY 增强结直肠癌细胞放疗敏感性^[9]。Hu 等^[10]研究发现,miR-214 通过靶向下调 ATG12 促进结直肠癌细胞

研究应进一步明确 miR-613 调控的信号通路,为进一步揭示结肠癌对放疗产生抵抗性的分子机制提供更多的实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90. DOI: 10.3322/caac.20107.
- [2] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [3] Li B, Xie Z, Li Z, et al. MicroRNA-613 targets FMNL2 and suppresses progression of colorectal cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(12): 5475-5484.
- [4] Guan S, Wang C, Chen X, et al. MiR-613: a novel diagnostic and prognostic biomarker for patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4383-4391. DOI: 10.1007/s13277-015-4271-8.
- [5] Fu X, Cui Y, Yang S, et al. MicroRNA-613 inhibited ovarian cancer cell proliferation and invasion by regulating KRAS[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(5): 6477-6483. DOI: 10.1007/s13277-015-4507-7.
- [6] Chen X, Xu Y, Liao X, et al. Plasma miRNAs in predicting radiosensitivity in non-small cell lung cancer[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(9): 11927-11936. DOI:10.1007/s13277-016-5052-8.
- [7] Zhang J, Zhang Y, Li X, et al. MicroRNA212 inhibits colorectal cancer cell viability and invasion by directly targeting PIK3R3 [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(5): 7864-7872. DOI: 10.3892/mmr.2017.7552.
- [8] Andaur R, Tapia JC, Moreno J, et al. Differential miRNA expression profiling reveals miR-205-3p to be a potential radiosensitizer for low-dose ionizing radiation in DLD-1 cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(41): 26387-26405. DOI: 10.18632/oncotarget.25405.
- [9] Ruhl R, Rana S, Kelley K, et al. microRNA-451a regulates colorectal cancer proliferation in response to radiation [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 517. DOI: 10.1186/s12885-018-4370-1.
- [10] Hu JL, He GY, Lan XL, et al. Inhibition of ATG12-mediated autophagy by miR-214 enhances radiosensitivity in colorectal cancer[J]. *Oncogenesis*, 2018, 7(2): 16. DOI: 10.1038/s41389-018-0028-8.
- [11] Yang P, Yang Y, An W, et al. The long noncoding RNA-ROR promotes the resistance of radiotherapy for human colorectal cancer cells by targeting the p53/miR-145 pathway[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32(4): 837-845. DOI:10.1111/jgh.13606.
- [12] Zheng L, Zhang Y, Liu Y, et al. MiR-106b induces cell radioresistance via the PTEN/PI3K/AKT pathways and p21 in colorectal cancer[J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 252. DOI: 10.1186/s12967-015-0592-z.
- [13] Liu KC, Shih TY, Kuo CL, et al. Sulforaphane induces cell death through G₂/M phase arrest and triggers apoptosis in HCT 116 human colon cancer cells[J]. *Am J Chin Med*, 2016, 44(6): 1289-1310. DOI: 10.1142/S0192415X16500725.
- [14] Ge XC, Wu F, Li WT, et al. Upregulation of WEE1 is a potential prognostic biomarker for patients with colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4341-4348. DOI: 10.3892/ol.2017.5984.
- [15] Webster PJ, Littlejohns AT, Gaunt HJ, et al. Upregulated WEE1 protects endothelial cells of colorectal cancer liver metastases [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 42288-42299. DOI: 10.18632/oncotarget.15039.
- [16] Liu YL, Zhang GQ, Yang Y, et al. Genistein induces G₂/M arrest in gastric cancer cells by increasing the tumor suppressor PTEN expression[J]. *Nutr Cancer*, 2013, 65(7): 1034-1041. DOI: 10.1080/01635581.2013.810290.
- [17] Friedman J, Morisada M, Sun L, et al. Inhibition of WEE1 kinase and cell cycle checkpoint activation sensitizes head and neck cancers to natural killer cell therapies [J]. *J Immunother Cancer*, 2018, 6(1): 59. DOI: 10.1186/s40425-018-0374-2.
- [18] Zhang LL, Feng ZL, Su MX, et al. Downregulation of Cyclin B1 mediates nagilactone E-induced G₂ phase cell cycle arrest in non-small cell lung cancer cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 830: 17-25. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.04.020.
- [19] Brockway S, Zeleznik-Le NJ. WEE1 is a validated target of the microRNA miR-17-92 cluster in leukemia [J]. *Cancer Genet*, 2015, 208(5): 279-287. DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.01.001.
- [20] Chen B, Duan L, Yin G, et al. miR-381, a novel intrinsic WEE1 inhibitor, sensitizes renal cancer cells to 5-FU by up-regulation of Cdc2 activities in 786-O [J]. *J Chemother*, 2013, 25(4): 229-238. DOI: 10.1179/1973947813Y.0000000092.
- [21] Creevey L, Ryan J, Harvey H, et al. MicroRNA-497 increases apoptosis in MYCN amplified neuroblastoma cells by targeting the key cell cycle regulator WEE1 [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 23. DOI: 10.1186/1476-4598-12-23.

(收稿日期:2018-08-27 修回日期:2018-12-25)
(本文编辑:孙娜)