

干扰 lncRNA DANCR 的表达增强直肠癌细胞放疗敏感性的作用研究*

刘伟¹ 边超¹ 周杨¹ 东丽²

(内蒙古自治区人民医院 1. 放射治疗科; 2. 肿瘤内科, 内蒙古 呼和浩特 010010)

【摘要】 目的 探讨长链非编码 RNA 分化拮抗非蛋白质编码 RNA (lncRNA DANCR) 对直肠癌细胞放疗抵抗的影响及其作用的可能机制。方法 选择在我院新辅助治疗的直肠癌患者标本 90 例, qRT-PCR 检测 DANCR 在直肠癌和癌旁组织中的表达水平, 统计学分析 DANCR 的表达与患者放疗抵抗及临床病理参数的关系, 生存分析 DANCR 的表达对患者预后的影响。常规培养 HT29 细胞, 采用分次放射剂量递增建立 HT29 放射抵抗细胞株 (HT29-R), MTS 检测 HT29 和 HT29-R 细胞的放疗敏感性, qRT-PCR 检测 DANCR 在 HT29 和 HT29-R 细胞中的表达。HT29-R 细胞分为对照组 (si-NC 组) 和干扰 DANCR 表达组 (si-DANCR 组) 并进行相应 siRNA 转染, MTS 检测干扰 DANCR 对 HT29-R 细胞放疗敏感性的影响。si-NC 组和 si-DANCR 组细胞于辐射作用下, 平板克隆检测各组细胞平板克隆形成能力, 流式细胞仪检测各组细胞周期和细胞凋亡率, western blot 检测各组细胞中周期相关蛋白 cyclinD1、CDK4、CDK6 和凋亡相关蛋白 caspase 3、Bcl-2、Bax 的表达。结果 DANCR 在直肠癌组织中的表达显著高于在癌旁组织中的表达, DANCR 的表达与直肠癌患者 TNM 分期和放疗敏感性相关 ($P < 0.05$), DANCR 高表达的患者预后较差 ($P < 0.05$)。与 HT29 细胞相比, HT29-R 细胞的放射抵抗性增加 ($P < 0.05$), HT29-R 细胞中 DANCR 表达增加 ($P < 0.05$)。干扰 DANCR 增强 HT29-R 细胞的放疗敏感性 ($P < 0.05$)。在放射作用下, 与 si-NC 组相比, si-DANCR 组 HT29-R 细胞平板克隆形成能力降低 ($P < 0.05$), 细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$), 细胞中周期相关蛋白 cyclinD1、CDK4、CDK6 表达降低和凋亡相关蛋白 caspase 3、Bax 表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。结论 DANCR 通过调控细胞周期及凋亡相关蛋白增加直肠癌细胞放疗敏感性, 是治疗直肠癌的潜在靶标。

【关键词】 直肠癌; 分化拮抗非蛋白质编码 RNA; 放疗敏感性; 细胞周期; 细胞凋亡

【中图分类号】 R735.3⁺7 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.11.008

Interfering with the expression of lncRNA DANCR to enhance the radiotherapy sensitivity of rectal cancer cells

LIU Wei¹, BIAN Chao¹, ZHOU Yang¹, DONG Li²

(1. Department of Radiotherapy, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010010, China;

2. Department of Internal Medicine Oncology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010010, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of differentiation antagonizing non-protein coding RNA (lncRNA DANCR) on the resistance of rectal cancer cells to radiotherapy and explore its possible mechanism. **Methods** Ninety specimens of rectal cancer patients were selected for neoadjuvant treatment in our hospital. qRT-PCR was used to detect the expression level of DANCR in rectal cancer and paracancerous tissues, and statistically analyze the relationship between DANCR expression and patients' radiotherapy resistance and clinicopathological parameters. Survival analysis was used to analyze the influence of DANCR expression on the prognosis of patients. HT29 cells were cultured routinely, and the HT29 radiation-resistant cell line (HT29-R) was established using fractional radiation dose escalation, MTS was used to detect the radiotherapy sensitivity of HT29 and HT29-R cells, and qRT-PCR was used to detect the expression of DANCR in HT29 and HT29-R cells. HT29-R cells were divided into control group (si-NC group) and interference DANCR

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金 (2019MS08090)

引用本文: 刘伟, 边超, 周杨, 等. 干扰 lncRNA DANCR 的表达增强直肠癌细胞放疗敏感性的作用研究 [J]. 西部医学, 2022, 34(11): 1600-1606, 1612. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2022.11.008

expression group (si-DANCR group) and were transfected with corresponding siRNA. MTS was used to detect the influence of interference DANCR on the sensitivity of HT29-R cells to radiotherapy. Cells in the si-NC and si-DANCR groups were exposed to radiation. Plate clones were used to detect the plate cloning ability of each group cells. Flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis rate of each group. Western blotting was used to detect the expression of cell cycle related proteins cyclinD1, CDK4, CDK6 and apoptosis-related proteins caspase 3, Bcl-2, Bax in each group of cells. **Results** The expression of DANCR in rectal cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues. The expression of DANCR was related to the TNM staging and radiotherapy sensitivity of rectal cancer patients ($P < 0.05$). Patients with high DANCR expression had a poorer prognosis ($P < 0.05$). Compared with HT29 cells, the radiation resistance of HT29-R cells were increased ($P < 0.05$), and the expression of DANCR in HT29-R cells were increased ($P < 0.05$). Interference with DANCR enhances the radiotherapy sensitivity of HT29-R cells ($P < 0.05$). Under the action of radiation, compared with the si-NC group, the plate clone formation ability of si-DANCR group HT29-R cell was reduced ($P < 0.05$), the cell cycle was arrested in the G2/M phase, and the apoptosis rate was increased ($P < 0.05$), the expression of cycle-related proteins cyclinD1, CDK4, CDK6 were decreased, the expression of apoptosis-related proteins caspase 3, Bax were increased, and the expression of Bcl-2 protein were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** DANCR increases the radiotherapy sensitivity of rectal cancer cells by regulating cell cycle and apoptosis-related proteins, and is a potential target for the treatment of rectal cancer.

【Key words】 Rectal cancer; Differentiation antagonizing non-protein coding RNA; Radiotherapy sensitivity; Cell cycle; Apoptosis

结直肠癌是全球第三大常见恶性肿瘤,2018 年诊断出约 180 万新发病例,每年导致超过约 5 万人死亡^[1]。在这些病例中,近三分之一的肿瘤起源于大肠的远端部分,即齿状线和直肠-乙状结肠交界处的直肠癌。目前结直肠癌,尤其是直肠癌的治疗仍然具有挑战性,缺乏分子靶向治疗^[2]。最近的研究表明,直肠癌的发病率仍然不断上升,具有年轻化趋势,生存率更差^[3]。新辅助放疗是缩小局部/晚期直肠癌体积和分期的首选方法^[4]。研究表明肿瘤进展中差异表达的分子影响肿瘤细胞对放射治疗的敏感性^[5]。长链非编码 RNA 分化拮抗非蛋白质编码 RNA(Long noncoding RNA Differentiation antagonizing non-protein coding RNA, lncRNA DANCR)作为致癌基因促进包括增殖、侵袭、转移和化学治疗抗性等恶性生物学行为,正在成为恶性肿瘤治疗的新靶点^[6-7]。Lu 等^[8]报道 DANCR 在结直肠癌组织和细胞系中表达升高,并与患者 TNM 分期增加和淋巴结转移阳性显著相关,DANCR 过表达促进结直肠癌细胞增殖、迁移、侵袭和细胞周期进程,抑制细胞凋亡。同时 Xiong 等^[9]发现 DANCR 的表达可以抑制多柔比星作用的肿瘤细胞凋亡,进而抑制结直肠癌细胞的恶性进展。本研究旨在探讨 DANCR 是否在直肠癌放疗抵抗中发挥重要作用,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床样本 选择 2012 年 1 月~2015 年 3 月在我院治疗的直肠癌患者,入组要求:患者进行根治术前已进行新辅助放射治疗;患者具有完整的病理分期和生存资料;手术标本包括癌组织和远离癌组织 3 cm

的癌旁组织;患者及家属均签署知情同意书;具备放疗前后的影像学资料,并根据 CT 扫描结果进行放疗疗效评定,根据实体瘤评价标准,放疗抵抗为稳定及疾病进展,放疗敏感为完全缓解和部分缓解。所有患者均接受随访。最终收集 90 例直肠癌组织和配对的癌旁组织。本研究遵从赫尔辛基宣言进行,并获得我院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂材料 Trizol 试剂购于日本 TaKaRa 公司;AMV One-step RT-PCR 试剂盒,上海生物工程有限公司;DANCR 和 GAPDH 引物,上海生工生物工程有限公司;直肠癌细胞系 HT29 购自美国 ATCC 细胞库;胎牛血清、培养基和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;MTS 试剂购自美国 Sigma 公司;DANCR siRNA 购自广州奥博生物技术有限公司;吉姆萨染液和细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司;RIPA 蛋白裂解液和 BCA 检测蛋白浓度试剂盒购自北京索莱宝试剂有限公司;PVDF 膜购自美国 millipore 公司;ECL 化学发光试剂盒购自上海慧颖生物科技有限公司;cyclinD1、CDK4、CDK6 和凋亡相关蛋白 caspase 3、Bcl-2、Bax 抗体购自英国 Abcam 公司。

1.3 qRT-PCR 检测 直肠癌组织和癌旁组织中加入 Trizol 试剂进行组织裂解,并采用氯仿提取 RNA 方法获得总 RNA。检测 RNA 浓度及纯度后采用 one step RT-PCR 检测试剂盒检测 DANCR 的相对表达量。反应体系为 10X One Step RT-PCR Buffer 5 μ L、上游引物 2 μ L、下游引物 2 μ L、RNA 1 μ g、Taq DNA

polymerase 1 μL 、AMV RT 0.5 μL 、RNase inhibitor 0.5 μL 、无 RNA 酶的双蒸水补足 50 μL 。设置反应条件为:45 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 30 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,其中变性、退火和延伸进行 40 个循环,于 7500PCR 仪进行 qRT-PCR 扩增反应。按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式以 GAPDH 为内参计算 DANCR 的相对表达量。DANCR 引物 F:5'-GCCA-CAGGAGCTAGAGCAGT-3', R:5'-GCAGAGTAT-TCAGGGTAAGGGT-3';GAPDH 引物 F:5'-AACG-GATTTGGTCGTATTGGG-3', R:5'-CGCTCCTG-GAAGATGGTGAT-3'。

1.4 细胞培养和 HT29-R 细胞的构建 于液氮取出直肠癌细胞系 HT29 后快速放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中,细胞冻存液溶解后,于 800 rpm 离心 3 min,弃掉细胞冻存液,采用含有 10% 胎牛血清的细胞培养基中重悬细胞,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的全湿度培养箱中培养。显微镜下观察细胞状态,及时更换新鲜培养基,并且采用胰酶消化进行细胞传代。将生长状态良好的 HT29 细胞进行放射线辐射,并进行分次递增照射,首先 1 Gy 剂量的放射线辐射细胞,培养 48 h 后继续辐射 1 次,然后 2 Gy 剂量辐射 2 次,4 Gy 剂量辐射 2 次。将细胞克隆团胰酶消化后培养,最终细胞稳定生长在 4 Gy 的辐射剂量中。

1.5 细胞转染 取生长状态较好的 HT29-R 细胞,以 2×10^5 个细胞接种至 6 孔板中,分为 si-NC 组和 si-DANCR 组,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的全湿度培养箱中培养 12 h。采用脂质体 2000 与 siRNA 混合后进行各组细胞的转染,si-NC 组转染对照 siRNA,si-DANCR 组转染 DANCR siRNA,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的全湿度培养箱中培养 12 h 后更换新鲜培养基。采用 qRT-PCR 检测各组细胞中 DANCR 的相对表达量。

1.6 MTS 实验检测细胞增殖能力 取生长状态较好的 HT29 细胞和 HT29-R 细胞,以 3000 个细胞接种至 96 孔板中,每组设置 6 个重复孔,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的全湿度培养箱中培养 12 h。分别采用 0、1、2、4、8、16 和 32 Gy 的放射剂量处理 HT29 细胞和 HT29-R 细胞。培养 48 h 后,每孔加入 20 μL MTS 试剂,继续放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的全湿度培养箱中培养 2 h,测得细胞 490 nm 处的吸光度(OD 值)。细胞增殖率=(对应放射剂量组平均 OD 值/0 组平均 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.7 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力 取生长状态较好的 HT29-R 细胞,以 1000 个细胞接种至 6 孔板中,分为 si-NC 组和 si-DANCR 组,每组设置 3 个重复孔,按上述转染方法转染各组细胞,并采用 4 Gy

放射剂量照射细胞,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的全湿度培养箱中培养。显微镜下观察细胞状态,及时更换细胞培养基。待细胞形成肉眼可见的克隆团时,终止细胞培养。PBS 洗 3 次,加入甲醇溶液固定细胞 10 min,弃掉甲醇,加入吉姆萨染液染色 10 min,PBS 洗 3 次后计数细胞克隆形成数目。

1.8 流式细胞仪检测细胞周期 取生长状态较好的 HT29-R 细胞,以 2×10^5 个细胞接种至 6 孔板中,分为 si-NC 组和 si-DANCR 组,每组设置 3 个重复孔,按上述转染方法转染各组细胞,并采用 4 Gy 放射剂量照射细胞,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的全湿度培养箱中培养 48 h。采用胰酶消化收集各组细胞,PBS 洗 3 次后,加入细胞周期检测缓冲液 500 μL 重悬细胞,同时加入碘化丙啶染色液(PD)25 μL 和 RNA 酶 10 μL ,混匀后放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 中避光孵育 30 min,采用流式细胞仪检测各组细胞周期比率。

1.9 流式细胞仪检测细胞凋亡 取生长状态较好的 HT29-R 细胞,以 2×10^5 个细胞接种至 6 孔板中,分为 si-NC 组和 si-DANCR 组,每组设置 3 个重复孔,按上述转染方法转染各组细胞,并采用 4 Gy 放射剂量照射细胞,放置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 的全湿度培养箱中培养 48 h。采用无 EDTA 的胰酶消化收集各组细胞,PBS 洗 3 次后,加入细胞凋亡检测染色缓冲液 500 μL 重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 试剂 5 μL 和 PI 试剂 5 μL ,混匀后于常温中避光孵育 30 min,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.10 Western blot 检测 胰酶消化收集待检测的细胞,PBS 洗 3 次后,加入 RIPA 蛋白裂解液,细胞完全裂解后于低温高速离心去除细胞碎片,将蛋白上清液移至新的 EP 管中,并采用 BCA 试剂盒检测各样品蛋白浓度。蛋白经煮沸变性后进行凝胶电泳,采用 10% 的凝胶,蛋白样品加入凝胶中,采用 80 V 进行样品的蛋白分离。电泳完成后采用 100 V 湿转进行 PVDF 膜蛋白转移。蛋白膜经封闭液常温孵育 1 h、TBST 洗 3 次后,与目的一抗(cyclinD1、CDK4、CDK6、caspase 3、Bcl-2、Bax)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗 3 次后,与兔二抗或鼠二抗室温孵育 1 h,采用 ECL 试剂盒曝光蛋白条带。

1.11 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,独立样本 *t* 检验比较两组间的统计学差异,LogRank 检验分析 DANCR 的表达对患者生存的影响。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有实验重复 3 次。

2 结果

2.1 qRT-PCR 检测 DANCR 在直肠癌组织中的表

达及临床意义 qRT-PCR 检测结果显示, DANCR 在直肠癌和癌旁组织中的表达水平分别为 1.78 ± 0.75 和 0.83 ± 0.38 ; 与癌旁组织相比, DANCR 在直肠癌组织中的表达显著上调 ($t = 10.80, P < 0.001$) (图 1)。同时 DANCR 在 TNM 分期晚期和放疗抵抗直肠癌组织中的表达分别高于其在 TNM 分期早期和放疗敏感的直肠癌组织中的表达 ($P < 0.05$), 表明 DANCR 的表达与直肠癌患者 TNM 分期和放疗抵抗性相关, 见表 1。

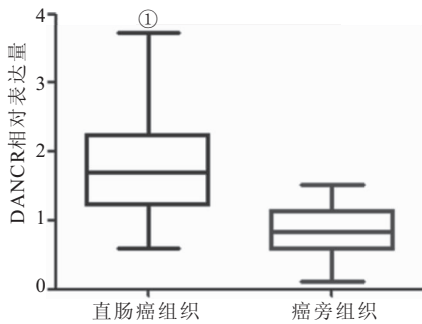


图 1 qRT-PCR 检测直肠癌组织中 DANCR 的表达

Figure 1 qRT-PCR was used to detect the expression of DANCR in the rectal cancer tissue

注: 与癌旁组织比较, ① $P < 0.05$

表 1 DANCR 表达与直肠癌患者临床病理参数之间的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Relationship between expression of DANCR and clinicopathological parameters in patients with rectal cancer

参数	n	DANCR	t	P
性别			0.593	0.555
女	40	1.74 ± 0.48		
男	50	1.81 ± 0.61		
年龄(岁)			0.969	0.335
≤ 60	44	1.71 ± 0.72		
> 60	46	1.85 ± 0.65		
分化程度			1.264	0.210
中高分化	56	1.71 ± 0.68		
低分化	34	1.90 ± 0.71		
T 分期			1.806	0.074
T1-2	58	1.69 ± 0.72		
T3-4	32	1.95 ± 0.51		
淋巴结转移			1.883	0.063
有	46	1.65 ± 0.67		
无	44	1.92 ± 0.69		
TNM 分期			2.413	0.018
III	51	1.64 ± 0.68		
IV	39	1.96 ± 0.54		
放疗疗效			2.276	0.025
敏感型	47	1.63 ± 0.70		
抵抗型	43	1.94 ± 0.58		

2.2 DANCR 的表达对直肠癌患者预后影响 依据 DANCR 在直肠癌组织中的表达水平分为 DANCR 高表达组 ($n = 52, > 1.78$) 和 DANCR 低表达组 ($n = 38,$

≤ 1.78), 采用 Kaplan-Meier 绘制生存曲线, LogRank 分析显示与 DANCR 低表达的直肠癌患者相比, DANCR 高表达的直肠癌患者预后较差 ($P < 0.05$), 见图 2。

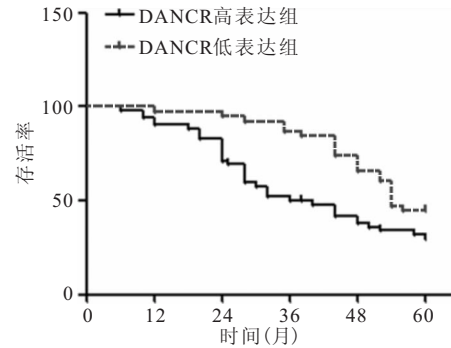


图 2 LogRank 分析 DANCR 的表达对直肠癌患者预后影响

Figure 2 LogRank analysis of DANCR expression on the prognosis of patients with rectal cancer

2.3 HT29-R 细胞的构建 分次放射剂量递增建立放射抵抗型细胞株 HT29-R, qRT-PCR 检测结果显示, DANCR 在 HT29 细胞中的相对表达量为 1.35 ± 0.12 , 在 HT29-R 细胞中的相对表达量为 3.97 ± 0.20 , 与放射敏感性细胞 HT29 相比, DANCR 在放射抵抗细胞 HT29-R 中的表达增加 ($t = 19.46, P < 0.001$) (图 3)。采用不同放射剂量照射 HT29 和 HT29-R 细胞, MTS 结果显示在相同放射剂量照射下, HT29-R 细胞的增殖率显著高于 HT29 细胞的增殖率 ($P < 0.05$), HT29-R 细胞具有显著放疗抵抗性, 见表 2。

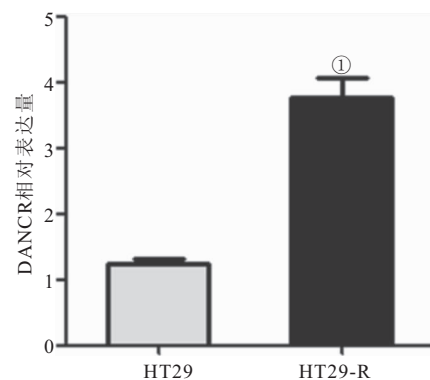


图 3 qRT-PCR 检测 DANCR 在 HT29 和 HT29-R 中的表达

Figure 3 qRT-PCR was used to detect the expression of DANCR in the HT29 and HT29-R cells

注: 与 HT29 比较, ① $P < 0.05$

2.4 DANCR siRNA 的干扰效果 DANCR siRNA 转染 HT29-R 细胞, qRT-PCR 检测结果显示, DANCR 在 si-NC 组细胞中 DANCR 的表达量为 0.99 ± 0.04 , 在 si-DANCR 组细胞中的表达量为 0.45 ± 0.08 ,

表 2 不同放射剂量对 HT29 和 HT29-R 细胞增殖率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of different radiation doses on the proliferation rate of HT29 and HT29-R cells

放疗剂量	细胞增殖率(%)		t	P
	HT29	HT29-R		
0	100.00±0.00	100.00±0.00		
1	95.40±2.44	98.31±0.97	2.121	0.057
2	64.87±4.99	89.96±9.08	4.232	0.001
4	50.05±3.64	77.53±7.31	3.566	0.004
8	34.83±5.65	68.24±6.95	3.121	0.010
16	25.93±5.25	49.67±4.68	5.751	0.000
32	15.01±2.58	36.37±5.78	2.914	0.021

与 si-NC 组相比, si-DANCR 组细胞中 DANCR 的表达降低($t=3.982, P=0.011$), 见图 4。

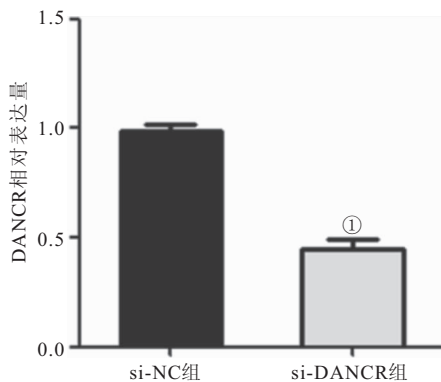


图 4 qRT-PCR 检测 DANCR siRNA 转染 HT29-R 细胞的干扰效果

Figure 4 qRT-PCR was used to detect interference effect of DANCR siRNA transfection HT29-R cells

注:与 si-NC 组比较, ① $P<0.05$

2.5 干扰 DANCR 对 HT29-R 细胞放疗敏感性的影响 采用不同放射剂量照射 si-NC 组和 si-DANCR 组 HT29-R 细胞, MTS 结果显示, 在相同放射剂量照射下, si-DANCR 细胞的增殖率显著低于 si-NC 组 HT29-R 细胞的增殖率($P<0.05$), 干扰 DANCR 增强 HT29-R 细胞的放疗敏感性, 见表 3。

2.6 干扰 DANCR 对 HT29-R 细胞平板克隆能力的

表 3 干扰 DANCR 对 HT29-R 细胞放疗敏感性的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of interference with DANCR on radiosensitivity of HT29-R cells

放疗剂量	细胞增殖率(%)		t	P
	si-NC 组	si-DANCR 组		
0	100.00±0.00	100.00±0.00		
1	96.38±2.91	90.76±5.68	2.157	0.054
2	85.49±7.98	58.88±5.71	6.643	<0.001
4	72.62±3.76	45.66±4.06	12.031	<0.001
8	65.02±6.58	30.62±4.04	10.913	<0.001
16	47.91±2.63	21.47±4.84	11.757	<0.001
32	34.54±6.91	12.56±2.70	7.257	<0.001

影响 4 Gy 放射剂量照射 si-NC 组和 si-DANCR 组 HT29-R 细胞, 平板克隆实验结果显示, si-NC 组细胞克隆形成数目为(68.67±6.33)个, si-DANCR 组细胞克隆形成数目为(42.33±5.84)个, 与 si-NC 组相比, si-DANCR 组细胞的克隆形成能力显著降低($t=5.297, P=0.003$), 见图 5。

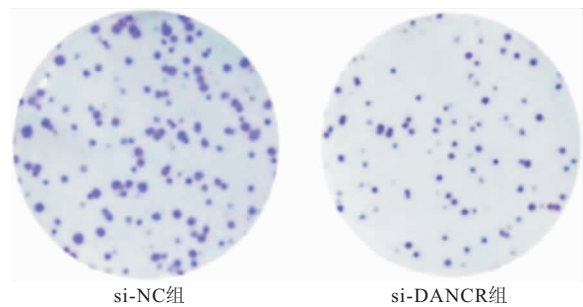


图 5 平板克隆实验检测各组细胞克隆形成能力

Figure 5 Plate clone formation experiment was used to detect the clone formation ability of each group cells

2.7 干扰 DANCR 对 HT29-R 细胞周期的影响 4 Gy 放射剂量照射 si-NC 组和 si-DANCR 组 HT29-R 细胞, 流式细胞实验结果显示, 与 si-NC 组相比, si-DANCR 组细胞周期阻滞在 G0/G1 期($t=4.312, P=0.008$), 见图 6。

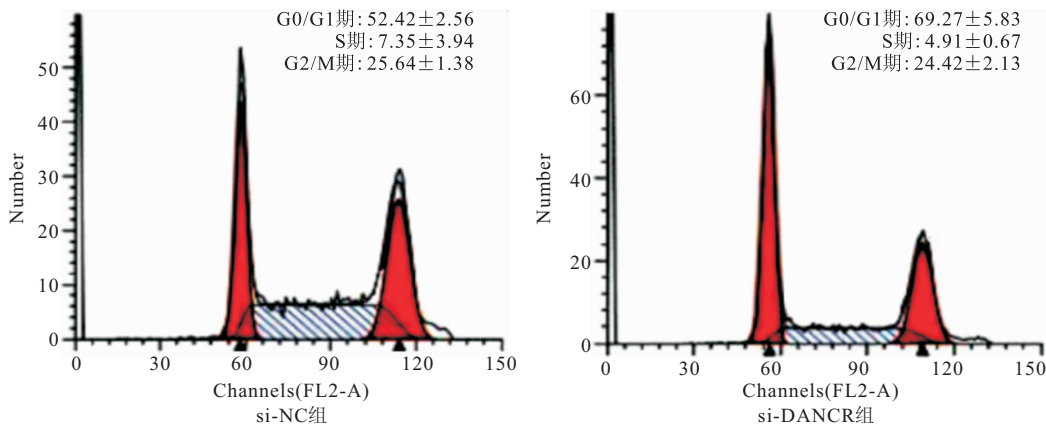


图 6 流式细胞实验检测各组细胞周期

Figure 6 Streaming cell experiment was used to detect cell cycles of each group

2.8 干扰 DANCR 对 HT29-R 细胞凋亡的影响
4 Gy 放射剂量照射 si-NC 组和 si-DANCR 组 HT29-R 细胞,流式细胞实验结果显示,si-NC 组细胞凋亡率为

(6.12±2.53)%, si-DANCR 组细胞凋亡率为 (33.85±6.07)%, 与 si-NC 组相比, si-DANCR 组细胞的凋亡显著增加 ($t=7.304, P=0.001$), 见图 7。

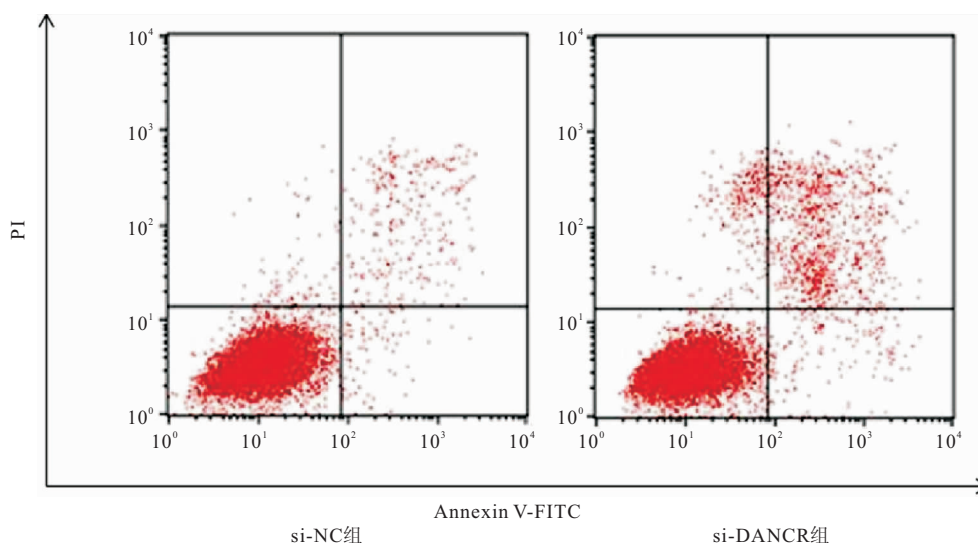


图 7 流式细胞实验检测各组细胞凋亡

Figure 7 Streaming cell experiment was used to detect cell apoptosis of each group

2.9 干扰 DANCR 对 HT29-R 细胞中周期和凋亡相关蛋白的影响
4 Gy 放射剂量照射 si-NC 组和 si-DANCR 组 HT29-R 细胞,western blot 结果显示,与 si-NC 组相比, si-DANCR 组细胞中周期相关蛋白

cyclinD1、CDK4、CDK6 表达降低和凋亡相关蛋白 caspase 3、Bax 表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低活化 ($P<0.05$)。见图 8、表 4。

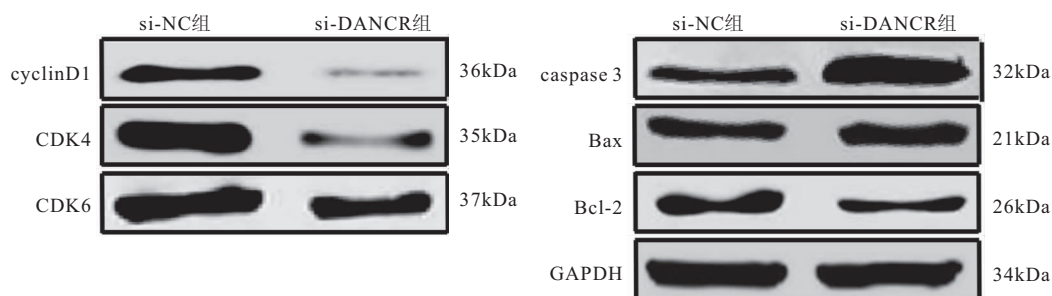


图 8 western blot 检测各组细胞周期和凋亡相关蛋白的表达

Figure 8 Western blotting was used to detect the expression cell cycle and cell apoptosis related protein of each group

表 4 各组细胞中凋亡相关蛋白的相对表达量($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Relative expression of apoptosis related proteins in cells of each group

蛋白表达量	si-NC 组	si-DANCR 组	<i>t</i>	<i>P</i>
cyclinD1(36 kDa)	0.42±0.06	0.13±0.02	7.942	0.001
CDK4(35 kDa)	1.58±0.15	0.19±0.05	15.227	<0.001
CDK6(37 kDa)	1.07±0.12	0.85±0.05	2.931	0.033
caspase 3(32 kDa)	0.37±0.08	1.48±0.09	15.966	<0.001
Bax(21 kDa)	0.52±0.04	0.97±0.10	7.237	0.001
Bcl-2(26 kDa)	0.70±0.09	0.25±0.04	7.914	0.001

3 讨论

直肠癌是一种常见的致命疾病,治疗的首选方法是手术切除,研究显示直肠癌患者治愈率与肿瘤整体

切除率密切相关。而大多数直肠癌患者是在晚期被诊断出来,失去手术机会,放疗作为晚期患者的重要治疗策略,但晚期患者的生存率仍较低^[2]。直肠癌是一项复杂的临床挑战,需要多模式治疗和手术才能提供最佳治愈机会。研究显示在许多患者中,新辅助放化疗是降低肿瘤分期、减少结肠造口术和减少局部复发的主要治疗方法,新辅助放化疗后进行手术可减少局部复发,被认为是局部晚期直肠癌的标准治疗^[4]。然而放射治疗的抵抗是患者预后较差的主要障碍^[10]。因此研究直肠癌放疗抵抗的分子机制具有重要意义。

lncRNA 是一类长度从 200 nt 到 100 kb 的非编码 RNA,由于其广泛的作用而受到越来越多的关注。

lncRNA 的表达失调通过影响表观遗传学参与肿瘤的发生发展, lncRNA 的调控是抑制肿瘤进展和克服肿瘤耐药性的重要策略, 正在成为肿瘤诊断的新型生物标志物和肿瘤治疗的靶点^[11]。DANCR 位于 4 号染色体上, 长度为 855 个碱基对, 具有抑制表皮祖细胞分化的功能。研究显示 DANCR 表达异常导致包括人类肿瘤在内的疾病发生, 在肺癌和卵巢癌等常见肿瘤中 DANCR 表达上调, 促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移^[6-7]。同时 DANCR 密切参与胃癌和肝细胞肝癌等消化系统的化疗耐药^[12-13], 提示 DANCR 可能与肿瘤放疗抵抗相关。Shen 等^[14]报道结直肠癌组织和血清中 DANCR 水平显著上调, 术后患者血清 DANCR 表达较治疗前和复发患者降低, DANCR 的高表达是结直肠癌诊断的潜在生物标志物。本研究采用 qRT-PCR 检测发现 DANCR 在直肠癌组织中表达升高, 高表达 DANCR 与患者 TNM 分期显著相关, 与 Lu 等^[8]报道一致。Assani 等^[15]报道 DANCR 在结肠癌组织和细胞中表达较高, 较高水平的 DANCR 与患者较差的预后和较短的生存时间相关, 而本研究生存分析显示 DANCR 高表达预示结直肠癌患者预后较差。同时本研究发现与直肠癌放疗敏感性患者相比, 直肠癌放疗抵抗患者组织中 DANCR 的表达增加, 表明 DANCR 可能促进直肠癌的放疗抵抗。

既往研究表明 DANCR 促进结直肠癌细胞增殖、细胞周期、侵袭、转移和耐药, 并抑制细胞凋亡^[8], 本研究注重 DANCR 在直肠癌放疗抵抗中发挥的作用, 首先成功诱导直肠放疗抵抗耐药细胞株 HT29-R, qRT-PCR 检测显示与放疗敏感性的细胞相比, DANCR 在直肠放疗抵抗耐药细胞株 HT29-R 中的表达升高, 干扰 DANCR 的表达后, MTS 结果显示 HT29-R 细胞的放射敏感性增加。同时在放射线辐射作用下干扰 DANCR 的表达后, HT29-R 细胞的平板克隆形成能力降低, 表明降低 DANCR 的表达增强直肠癌细胞放疗敏感性。细胞周期调控失控及细胞凋亡是肿瘤细胞放疗抵抗的重要机制^[16], 本研究显示干扰 DANCR 的表达后, HT29-R 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 细胞凋亡率增加。在胃癌细胞中干扰 DANCR 的表达诱导细胞阻滞在 G₀/G₁ 期, 促进细胞的凋亡, 敲减 DANCR 的表达抑制细胞周期蛋白 cyclinD1 表达, 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 促凋亡蛋白 Bax 表达上调^[12]。cyclinD1 蛋白和周期蛋白依赖性激酶 CDK4、CDK6 结合形成复合物促进细胞周期由 G₀/G₁ 期至 S 期的转变, 以促进细胞周期进展^[17-18], 本研究采用 western blot 检测显示敲减 DANCR 的表达,

HT29-R 细胞中 cyclinD1、CDK4 和 CDK6 蛋白表达降低。Caspase 蛋白激活后促使细胞发生凋亡, caspase、Bcl-2 和 Bax 蛋白是调控细胞线粒体凋亡途径重要机制^[19-20]。本研究结果显示敲减 DANCR 的表达, HT29-R 细胞中 caspase 3、Bax 表达增加, Bcl-2 蛋白表达降低。表明 DANCR 通过调控细胞周期相关蛋白和凋亡相关蛋白促进直肠癌细胞放疗抵抗。

4 结论

DANCR 在直肠癌组织中表达上调, 与患者 TNM 分期、放疗抵抗和生存预后相关。干扰 DANCR 的表达显著增强直肠癌细胞放疗敏感性, 其作用机制可能是通过调控细胞周期和凋亡相关蛋白。DANCR 是直肠癌患者预后和治疗潜在分子靶点。本研究的不足之处在于未能深入的研究 DANCR 具体的作用靶点及调控机制, 仍需在后续研究中进一步探讨。

【参考文献】

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] DAYDE D, TANAKA I, JAIN R, *et al.* Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 573.
- [3] MURPHY C C, SINGAL A G, BARON J A, *et al.* Decrease in Incidence of Young-Onset Colorectal Cancer Before Recent Increase[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(6): 1716-1719. e4.
- [4] 袁野, 田少博, 张培, 等. 局部进展期中低位直肠癌新辅助化疗疗效预测分子标志物的研究进展[J]. *腹部外科*, 2021, 34(2): 159-164.
- [5] 侯歌, 肖陈虎, 陈晓娟, 等. lncRNA LINC00909 靶向 miR-548-3p 对结直肠癌细胞放射敏感性的研究[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2020, 29(12): 1110-1117.
- [6] ZHEN Q, GAO L N, WANG R F, *et al.* LncRNA DANCR Promotes Lung Cancer by Sequestering miR-216a[J]. *Cancer Control*, 2018, 25(1): 1073274818769849.
- [7] LIN X, YANG F, QI X, *et al.* LncRNA DANCR promotes tumor growth and angiogenesis in ovarian cancer through direct targeting of miR-145 [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(12): 2286-2296.
- [8] LU W, HUANG Z, WANG J, *et al.* Long non-coding RNA DANCR accelerates colorectal cancer progression via regulating the miR-185-5p/HMGA2 axis[J]. *J Biochem*, 2021, 171(4): 389-398.
- [9] XIONG M, WU M, DAN PENG, *et al.* LncRNA DANCR represses Doxorubicin-induced apoptosis through stabilizing MAL-AT1 expression in colorectal cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 24.

- bioenergetics prevents CD4 T cell-mediated activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2020, 59(10): 2816-2828.
- [18] LORTHOLARY O, FERNANDEZ-RUIZ M, BADDLEY J W, *et al.* Infectious complications of rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis during targeted and biological therapies: a viewpoint in 2020[J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(12): 1532-1543.
- [19] CHEN S, BLIJRDORP I C, VAN MENS L J J, *et al.* Interleukin 17A and IL-17F Expression and Functional Responses in Rheumatoid Arthritis and Peripheral Spondyloarthritis[J]. *J Rheumatol*, 2020, 47(11): 1606-1613.
- [20] SONG B, LI X, XU Q, *et al.* Inhibition of BMP3 increases the inflammatory response of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(12): 12305-12323.
- [21] FANG L, XU X F, LU Y, *et al.* MicroRNA-495 attenuates proliferation and inflammatory response in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through attenuating β -catenin pathway[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34(3): 837-844.
- [22] TANG J, YI S, LIU Y. Long non-coding RNA PVT1 can regulate the proliferation and inflammatory responses of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by targeting microRNA-145-5p[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(4): 1081-1090.
- [23] ZHAO M, WANG Y, ZHAO Y, *et al.* Caspase-3 knockout attenuates radiation-induced tumor repopulation via impairing the ATM/p53/Cox-2/PGE2 pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(21): 21758-21776.
- [24] SMITH V M, DIETZ A, HENZ K, *et al.* Specific interactions of BCL-2 family proteins mediate sensitivity to BH3-mimetics in diffuse large B-cell lymphoma[J]. *Haematologica*, 2020, 105(8): 2150-2163.
- [25] KVANSAKUL M, CARIA S, HINDS M G. The Bcl-2 family in host-virus interactions[J]. *Viruses*, 2017, 9(10): 290.
- [26] QU Y, ZHANG Y P, WU J, *et al.* Downregulated microRNA-135a ameliorates rheumatoid arthritis by inactivation of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway via phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 2[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17663-17676.
- [27] 杨永杰,王宇蝶,符庆臻,等. 与神经系统疾病相关的 miRNA 研究进展[J]. *智慧健康*, 2020, 6(33): 31-32.
- (收稿日期:2021-10-27;修回日期:2022-08-05;编辑:刘灵敏)

(上接第 1606 页)

- [10] DAYDE D, TANAKA I, JAIN R, *et al.* Predictive and Prognostic Molecular Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiation in Rectal Cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 573.
- [11] 王雯智,郑蕾,李虹. LncRNA PVT1 miR-30d 表达与上皮性卵巢癌患者化疗敏感性及其预后的关系[J]. *西部医学*, 2020, 32(5): 687-691.
- [12] XU Y D, SHANG J, LI M, *et al.* LncRNA DANCR accelerates the development of multidrug resistance of gastric cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(7): 2794-2802.
- [13] LIU Y, CHEN L, YUAN H, *et al.* LncRNA DANCR Promotes Sorafenib Resistance via Activation of IL-6/STAT3 Signaling in Hepatocellular Carcinoma Cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:1145-1157.
- [14] SHEN X, XUE Y, CONG H, *et al.* Circulating lncRNA DANCR as a potential auxiliary biomarker for the diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(3): BSR20191481.
- [15] ASSANI G, ZHOU Y. Effect of modulation of epithelial-mesenchymal transition regulators Snail1 and Snail2 on cancer cell radiosensitivity by targeting of the cell cycle, cell apoptosis and cell migration/invasion[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 23-30.
- [16] 郭亚,朱小东,曲颂,等. 鼻咽癌放射抗拒相关的信号通路[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2011, 31(2): 167-171.
- [17] DOZIER C, MAZZOLINI L, CÉNAC C, *et al.* CyclinD-CDK4/6 complexes phosphorylate CDC25A and regulate its stability [J]. *Oncogene*, 2017, 36(26): 3781-3788.
- [18] GUO X, TIAN S, CAO P, *et al.* High Expression of PIGC Predicts Unfavorable Survival in Hepatocellular Carcinoma[J]. *J Hepatocell Carcinoma*, 2021, 8: 211-222.
- [19] BEROSKE L, VAN DEN WYNGAERT T, STROOBANTS S, *et al.* Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3 Radiotracers[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8): 3948.
- [20] 张子曦,王永顺,向洪聪,等. 丙泊酚激活线粒体凋亡通路诱导乳头状甲状腺癌 TPC-1 细胞凋亡和生长阻滞[J]. *西部医学*, 2021, 33(7): 976-981.
- (收稿日期:2021-11-21;修回日期:2022-08-24;编辑:刘灵敏)