

- and inflammation. *Oncogene*, 2006, 25(40): 5537-5546.
- [22] Barreto G, Schafer A, Marhold J, et al. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, 2007, 445(7128): 671-675.
- [23] Bulavin DV, Kovalsky O, Hollander MC, et al. Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(11): 3859-3871.
- [24] Hollander MC, Fornace AJ Jr. Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a. *Oncogene*, 2002, 21(40): 6228-6233.
- [25] Wang X, Wang RH, Li W, et al. Genetic interactions between Brca1 and Gadd45a in centrosome duplication, genetic stability, and neural tube closure. *J Biol Chem*, 2004, 279 (28): 29606-29614.
- [26] Hollander MC, Philburn RT, Patterson AD, et al. Genomic instability in Gadd45a<sup>-/-</sup> cells is coupled with S-phase checkpoint defects. *Cell Cycle*, 2005, 4(5): 704-709.
- [27] Bishop AJ, Hollander MC, Kosaras B, et al. Atm<sup>-/-</sup>, p53<sup>-/-</sup>, and Gadd45a-deficient mice show an increased frequency of homologous recombination at different stages during development. *Cancer Res*, 2003, 63(17): 5335-5343.
- [28] Lundberg AS, Hahn WC, Gupta P, et al. Genes involved in senescence and immortalization. *Curr Opin Cell Biol*, 2000, 12(6): 705-709.
- [29] Tront JS, Hoffman B, Liebermann DA. Gadd45a suppresses Ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence. *Cancer Res*, 2006, 66(17): 8448-8454.

(收稿日期: 2008-11-30)

## 微小 RNAs 在分子放射生物学中的研究进展

周冲 王利利 周菊英

**【摘要】** 微小 RNAs (miRNAs) 是一类新近发现的能调节基因表达的短小非编码 RNA。miRNAs 通过负性调节靶基因, 在辐射诱导的凋亡、辐射耐受性、旁观者效应等辐射反应中起重要作用。越来越多的证据表明, miRNAs 与放射治疗所致的辐射生物效应相关。miRNAs 有可能成为改善放射治疗肿瘤疗效的潜在新靶点。

**【关键词】** 微小 RNAs; 基因表达调控; 辐射效应; 放射疗法

### Progress of microRNAs in molecular radiobiology

ZHOU Chong, WANG Li-li, ZHOU Ju-ying

(Department of Radiation Oncology, The First Hospital Affiliated to Soochow University, Suzhou 215006, China)

**【Abstract】** MicroRNAs (miRNAs) are recently identified short non-coding RNAs that down-regulate gene expression and play an important role in components of the radiation-induced radiobiologic response, such as apoptosis, radiation tolerance and bystander effects. Accumulating evidence suggests that miRNAs may be associated with the responses of cells to radiation treatment. MiRNAs may serve as potential new targets for co-therapies aiming to improve the effects of radiotherapy in cancer patients.

**【Key words】** MicroRNAs; Gene expression regulation; Radiation effects; Radiotherapy

辐射可以引起细胞周期阻滞、凋亡、纤维化、致癌等一系列生物反应, 其中涉及到众多辐射诱导的基因表达改变。而 miRNAs 是新近发现的一类长度约 22 个核苷酸的非编码小 RNA, 广泛参与基因表达调控。因此, 研究 miRNAs 如何参与辐射所致的生物学反应对于进一步揭示辐射的分子放射

生物学机制及潜在的临床应用价值具有重要意义。

### 1 miRNAs 的生物学特性

#### 1.1 miRNAs 的发现

1993 年, Lee 等<sup>[1]</sup> 在秀丽新小杆线虫中发现了一个能调控胚胎发育的基因 lin-4, 该基因不编码蛋白质, 而表达一种长度约 22 个核苷酸的小分子 RNA。2000 年, Reinhart 等<sup>[2]</sup> 在秀丽新小杆线虫中又发现了另一个小分子 RNA 基因 let-7。随

即, *lin-4* 基因及 *let-7* 基因引起了科学界广泛的关注。因其高度的保守性, 在多种生物包括人类中也发现了相同的调节性 RNA。研究发现, 这些小分子 RNA 能够通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对引起靶 mRNA 的降解或者抑制其翻译, 从而对基因进行转录后表达的调控, 人们将这些小分子的非编码调节性 RNA 称为 miRNAs。

## 1.2 miRNAs 的功能

miRNAs 的功能主要是负性调控基因表达。据推测, 人类基因组中编码 1000 多个 miRNAs 基因, 约 1/3 的人类基因受 miRNAs 调节。这表明, miRNAs 很可能是基因调控的枢纽。利用微阵列芯片技术可以方便地检测组织的 miRNAs 表达谱, 更重要的工作是寻找这些 miRNAs 的靶基因并揭示其功能。既往的研究发现, miRNAs 在组织发育、细胞分化和凋亡、肿瘤形成等过程中起重要作用<sup>[3]</sup>。miRNAs 在肿瘤的发生发展中可以起到癌基因和抑癌基因的作用。如, 癌基因作用的 miR-17-92 过表达可以促进小细胞肺癌和慢性骨髓性白血病的发展<sup>[4]</sup>。miR-34 可以诱导神经母细胞的凋亡起到抑癌基因作用<sup>[5]</sup>。近年的研究又表明, miRNAs 也参与了辐射诱导的一系列分子生物学变化。

## 2 miRNAs 在分子放射生物学中的研究进展

### 2.1 辐射诱导的细胞内 miRNAs 的变化

辐射可以引起细胞内 miRNAs 表达的变化, 研究表明, 这种变化依赖于特定的细胞类型、辐射剂量、照射时间。Ishii 等<sup>[6]</sup>用 <sup>137</sup>Cs 照射鼠胚纤维母细胞 2h 后观察到总 miRNAs 表达量降低, 而同样的剂量和照射时间在鼠胚干细胞则引起总 miRNAs 表达升高。Marsit 等<sup>[7]</sup>用 2.5 Gy 的  $\gamma$  射线照射淋巴瘤母细胞 4 h 及 6 d, 两个时间点均未发现 miRNAs 表达较对照组有显著差异。有时即使是同一次照射在不同的时间点观察 miRNAs 的表达也有差异, Maes 等<sup>[8]</sup>为研究辐射所致的人纤维母细胞 miRNAs 表达差异的机制, 使用两种不同的照射剂量 (0.1 Gy 及 2.0 Gy) 照射细胞株, 观察不同时间点细胞 miRNAs 表达情况, 结果发现, 辐射在早期 0.5 h 和晚期 6 h、24 h 会引起细胞 miRNAs (miR-92b、miR-137、miR-660 及 miR-656) 水平下调; 而 2.0 Gy 照射条件下, 照射后 2 h 则观察到 miR-662 表达上调; 进一步研究这些变化的 miRNAs 靶基因

及相应表达蛋白的变化, 结果表明 miRNAs 可能是辐射致细胞反应的中枢调节因子, 细胞受辐射后立即下调 miRNAs 表达量以启动 DNA 修复机制, 而后上调 miRNAs 表达量抑制细胞凋亡从而有利于细胞存活。这种细胞内 miRNAs 表达随时间和剂量的差异有可能作为一种新的辐射剂量标志物应用于放疗患者生物剂量监测中。但究竟 miRNAs 的变化是辐射直接引起的, 还是辐射引起下游信号转导变化的结果, 有待于进一步的研究。

### 2.2 miRNAs 与辐射诱导的凋亡

辐射可以诱导细胞凋亡, 肿瘤放疗学家希望通过某些干预手段使放疗引起更多的肿瘤细胞凋亡。然而, 这必须建立在对辐射分子放射生物学机制充分了解的基础上。目前, 许多研究显示 miRNAs 参与了辐射诱导的细胞凋亡。Jaklevic 等<sup>[9]</sup>报道, 果蝇幼虫芽细胞受辐射后可通过 *bantam* miRNA 上调其下游靶基因 (前凋亡基因 *hid*) 的表达, 从而减少辐射所致的凋亡, 在生理情况下起到保护性作用。而既往的研究发现, *hid* 基因为 *p53* 基因的下游靶基因之一。但 *hid* 基因与 *p53* 基因突变的关系目前尚不清楚。辐射可以激活 *p53* 蛋白, 从而启动一些 DNA 修复、细胞周期阻滞、凋亡等相关基因的表达<sup>[10]</sup>。这提示科研人员可以进一步探索 miRNAs 与 *p53* 基因在辐射中的关系。在 2007 年, 全世界有 7 个实验室几乎同时发现 miRNAs 中的 miR-34 家族是 *p53* 基因的直接靶点<sup>[11]</sup>, 即辐射等原因引起 DNA 损伤后, 激活 *p53* 基因通过 miR-34 家族引起细胞凋亡、G<sub>1</sub> 期阻滞等下游生物学效应。

### 2.3 miRNAs 与辐射敏感性

如何提高肿瘤组织的辐射敏感性、增加正常组织的辐射耐受性, 一直是肿瘤放射生物学研究的热点问题。最近许多报道发现, miRNAs 可参与细胞辐射敏感性的调节。肿瘤组织中, miRNAs 表达量与其辐射敏感性相关。Weidhaas 等<sup>[12]</sup>用微阵列技术检测肺腺癌细胞株 A549 在照射后 2 h、8 h、24 h 时间点 miRNAs 的表达情况, 发现照射后 2 h 有超过 100 种 miRNAs 发生变化, 但最为显著的是其中的 *let-7* 家族, 提示 *let-7* 在该细胞株中可能起到辐射反应调节的作用; 为验证这种猜测, 研究者人为改变细胞株 *let-7* 的表达, 结果发现, 细胞的辐射敏感性随 *let-7* 表达的增加而增加。这提示, 可以开发某种新型药物, 通过改变肿瘤组织中某些

调节辐射敏感性的 miRNAs 表达来增加肿瘤的辐射敏感性。

辐射可以影响肿瘤组织血管的生成,辐射所致的血管损伤是决定肿瘤辐射效应的重要因素之一<sup>[13]</sup>。Hua 等<sup>[14]</sup>利用人鼻咽癌细胞株研究了缺氧状态下 miRNAs 对血管内皮生长因子和其他一些血管生成因子的调节,发现缺氧状态下 miR-15b、miR-16、miR-20a 和 miR-20b 等参与了血管生成因子的调节,推测这些 miRNAs 可能与缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 的改变有关。目前已知 HIF-1 $\alpha$  在缺氧所致的辐射抗性中起重要作用,多种机制参与其调节<sup>[15]</sup>,但 miRNAs 能否调节 HIF-1 $\alpha$ ,究竟在 HIF-1 $\alpha$  转化过程中起何作用等,仍有待于进一步的研究。

#### 2.4 miRNAs 与辐射诱导旁观者效应(旁效应)

辐射不仅会引起受照射细胞的放射生物学变化,而且某些未受照射细胞也会产生辐射损伤,这种现象称之为旁效应<sup>[16]</sup>。Koturbash 等<sup>[17]</sup>对不同性别的鼠脑行 X 射线照射,同时对鼠身体的其他部位行挡铅防护,研究发现,在未受照射的鼠脾组织中观察到了旁效应,进一步分析脾组织中 miRNAs 表达的变化发现,不同性别的鼠 miRNAs 表达具有显著性差异,表明辐射所致的旁效应具有性别特异性。为了进一步研究这种表达差异的机制,Illytsky 等<sup>[18]</sup>应用 miRNA 谱方法分析了性别依赖的造血淋巴组织的辐射敏感性反应,研究显示,辐射可以导致显著的、性别依赖的鼠脾及甲状腺组织 miRNA 表达改变,发现雄性鼠脾组织中有 15 种 miRNAs 发生了显著变化,雌性鼠脾发生显著变化的只有 9 种,而雌、雄鼠脾共同变化的 miRNAs 仅有 2 种: miR-34a 和 miR-346,且均呈上调性改变,因此这两种 miRNAs 表达量的改变在对抗辐射的细胞毒作用上可能起到重要的保护性作用。

### 3 miRNAs 与肿瘤放疗

#### 3.1 miRNAs 用于预测放射治疗效果

在治疗之前预测肿瘤对放疗的反应性是制定个体化放疗方案的关键。为了研究 miRNAs 在预测直肠癌临床疗效中的作用, Svoboda 等<sup>[19]</sup>通过穿刺取 35 例未经治疗的患者肿瘤组织及 31 例术前行新辅助治疗患者(卡培他滨联合放疗) 2 周后的肿瘤组织观察两者之间 miRNAs 表达情况,发现治疗后多种

miRNAs (miR-10a、miR-21、miR-145、miR-212、miR-339、miR-361) 发生变化,但是有很大的个体差异;然而,另有两种 miRNAs (miR125b、miR137) 在治疗后多数样本中表达量呈中等程度的升高而且发现 miR125b 及 miR137 的高表达提示直肠癌对治疗不敏感。

#### 3.2 miRNAs 与调强放疗

调强放疗技术已广泛应用于临床实践,而高精度的调强放疗与普通放疗产生的分子生物学效应是否不同,目前知之甚少。在调强放疗技术如火如荼开展的今天,深入了解其辐射生物机制就显得尤为重要。Ahmed 等<sup>[20]</sup>对人类上皮细胞株 HT-29 分别使用调强放疗和普通放疗,照射 2 Gy,观察到两者 miRNAs 表达具有显著性差异,而后在这些 miRNAs 的靶蛋白质水平中又进一步验证了这一点,这提示同样照射剂量使用不同的照射技术产生的生物学效应可能不同。至于这些 miRNAs 的变化究竟会如何影响辐射生物效应,如何通过干预其表达而有益于临床放疗等,均有待于更深入的研究。

#### 3.3 miRNAs 与放疗的不良反应

受照射区组织纤维化是放疗后常见的远期不良反应,常严重影响患者生活质量。Simone 等<sup>[21]</sup>在小鼠身上研究了辐射所致的组织纤维化与 miRNAs 表达之间的关系:使用 35 Gy 单次照射 CH3 小鼠的右后腿诱发纤维化,左腿为对照组,90 d 后发现受照射鼠腿发生明显萎缩、纤维化;进一步分析 miRNAs 表达情况发现,照射组小鼠肌组织 let-7b 的表达量较对照组减少 26%, let-7a 减少 21%,这提示辐射可能通过 miRNAs 的改变,参与调节纤维化的形成。深入了解其具体机制可能有助于开发出有针对性的预防放疗后组织纤维化的药物。

随着放疗技术的进步,越来越多的肿瘤患者经放疗后可获得长期生存,但放疗后所诱发的第二原发癌不容忽视,目前就辐射致癌机制方面已进行了广泛的研究<sup>[22]</sup>。既往研究表明,放疗后的第二原发癌与辐射诱导的旁观者效应有关。Koturbash 等<sup>[23]</sup>为了研究 X 射线诱导的远处组织的长期旁观者效应,观察了小鼠脑组织受 20 Gy X 射线照射 7 个月后鼠脾组织的表观遗传学变化(DNA 甲基化、组蛋白甲基化和 miRNAs 表达),结果发现,7 个月后的受照射鼠脾组织中 miR-194 表达较对照组显著上调;有趣的是,既往报道的人类脑肿瘤放疗后所致的第

二原发癌通常在10年左右达发病高峰,而小鼠的7个月在其生命周期中恰恰相当于人类的10年。

#### 4 结语

综上所述,miRNAs通过下调相应靶蛋白的表达,广泛参与辐射分子放射生物学网络的调节,由此设计出一些以miRNAs为靶点的靶向性药物具有潜在的临床应用价值。目前,日臻完善的放射物理技术已能做到和肿瘤靶区的高度适形,肿瘤放疗的下一个突破点很可能来自与基础放射生物学的结合。虽然不能寄希望于miRNAs去解释所有的复杂辐射调控网络,但有理由相信随着研究的深入,会有更多的miRNAs参与的辐射调控机制被阐明,并最终运用于临床肿瘤放疗。

#### 参 考 文 献

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 1993, 75(5): 843-854.
- [2] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000, 403(6772): 901-906.
- [3] Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. *Virchows Arch*, 2008, 452(1): 1-10.
- [4] Venturini L, Battmer K, Castoldi M, et al. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34<sup>+</sup> cells. *Blood*, 2007, 109(10): 4399-4405.
- [5] Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 2007, 26(34): 5017-5022.
- [6] Ishii H, Saito T. Radiation-induced response of micro RNA expression in murine embryonic stem cells. *Med Chem*, 2006, 2(6): 555-563.
- [7] Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 10843-10848.
- [8] Maes OC, An J, Sarojini H, et al. Changes in MicroRNA expression patterns in human fibroblasts after low-LET radiation. *J Cell Biochem*, 2008, 105(3): 824-834.
- [9] Jaklevic B, Uyetake L, Wichmann A, et al. Modulation of ionizing radiation-induced apoptosis by bantam microRNA in *Drosophila*. *Dev Biol*, 2008, 320(1): 122-130.
- [10] Ohnishi T, Takahashi A, Mori E, et al. p53 Targeting can enhance cancer therapy via radiation, heat and anti-cancer agents. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008, 8(5): 564-570.
- [11] Hermeking H. p53 enters the microRNA world. *Cancer Cell*, 2007, 12(5): 414-418.
- [12] Weidhaas JB, Babar I, Nallur SM, et al. MicroRNAs as potential agents to alter resistance to cytotoxic anticancer therapy. *Cancer Res*, 2007, 67(23): 11111-11116.
- [13] Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, 2003, 300(5622): 1155-1159.
- [14] Hua Z, Lv Q, Ye W, et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One*, 2006, 1(1): e116.
- [15] Yee Koh M, Spivak-Kroizman TR, Powis G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci*, 2008, 33(11): 526-534.
- [16] Morgan WF, Sowa MB. Non-targeted bystander effects induced by ionizing radiation. *Mutat Res*, 2007, 616(1-2): 159-164.
- [17] Koturbash I, Zemp FJ, Kutanzi K, et al. Sex-specific microRNAome deregulation in the shielded bystander spleen of cranially exposed mice. *Cell Cycle*, 2008, 7(11): 1658-1667.
- [18] Ilnytsky Y, Zemp FJ, Koturbash I, et al. Altered microRNA expression patterns in irradiated hematopoietic tissues suggest a sex-specific protective mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(1): 41-45.
- [19] Svoboda M, Izakovicova Holla L, Sefr R, et al. Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *Int J Oncol*, 2008, 33(3): 541-547.
- [20] Ahmed FE, Allison RR, Sibata C, et al. Genomic and proteomic perspective in human cells irradiated with X-ray [J/OL]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 69(3 Suppl 1): S408[2008-10-22]. [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6T7X-4PS4X0B-XC&\\_user=3192114&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000059499&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=3192114&md5=d5547067c124f51e4808abc0fc25f64e](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7X-4PS4X0B-XC&_user=3192114&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000059499&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3192114&md5=d5547067c124f51e4808abc0fc25f64e).
- [21] Simone NL, Soule BP, Sowers A, et al. microRNA expression is altered in vivo by ionizing radiation and may be a target to prevent fibrosis[J/OL]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 72(1 Suppl 1): S 686-687 [2008-10-25]. [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6T7X-4T85W5M-1XV&\\_user=3192114&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000059499&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=3192114&md5=5ef982d35d825e11b55f13393e432e6c](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7X-4T85W5M-1XV&_user=3192114&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000059499&_version=1&_urlVersion=0&_userid=3192114&md5=5ef982d35d825e11b55f13393e432e6c).
- [22] Little MP, Heidenreich WF, Moolgavkar SH, et al. Systems biological and mechanistic modelling of radiation-induced cancer. *Radiat Environ Biophys*, 2008, 47(1): 39-47.
- [23] Koturbash I, Boyko A, Rodriguez-Juarez R, et al. Role of epigenetic effectors in maintenance of the long-term persistent bystander effect in spleen in vivo. *Carcinogenesis*, 2007, 28(8): 1831-1838.