

- cardial ischemia/reperfusion injury by regulating macrophage polarization and neutrophil infiltration [J]. *Circulation*, 2019, 139 (5): 663-678.
- [9] Li K, Liang Z, Zhang J, et al. Attenuation of the inflammatory response and polarization of macrophages by photobiomodulation [J]. *Lasers Med Sci*, 2020, 35 (7): 1509-1518.
- [10] Morrell E D, Bhatraju P K, Mikacenic C R, et al. Alveolar Macrophage transcriptional programs are associated with outcomes in acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 200 (6): 732-741.
- [11] Schmidt J, Rattner D W, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy [J]. *Ann Surg*, 1992, 215 (1): 44-56.
- [12] Tisch R, Yang X D, Singer S M, et al. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice [J]. *Nature*, 1993, 366 (6450): 72-75.
- [13] Zhang S, Jiao Y, Li C, et al. Dimethyl itaconate alleviates the inflammatory responses of macrophages in sepsis [J]. *Inflammation*, 2020, 44 (2), 549-557.
- [14] Nakkala J R, Yao Y, Zhai Z, et al. Dimethyl itaconate-loaded nanofibers rewrite macrophage polarization, reduce inflammation, and enhance repair of myocardial infarction [J/OL]. *Small* (2020-11-08) [2021-03-14]. <https://doi.org/10.1002/smll.202006992>. htm.
- [15] Wang Q, Li X L, Mei Y, et al. The anti-inflammatory drug dimethyl itaconate protects against colitis-associated colorectal cancer [J]. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 2020, 98 (10): 1457-1466.
- [16] Yin D, Wang W, Han W, et al. Targeting Notch-activated M1 macrophages attenuate lung tissue damage in a rat model of ventilator induced lung injury [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44 (4): 1388-1398.
- [17] Klinkhamm A, Glaharn S, Srisook C, et al. M1 macrophage features in severe Plasmodium falciparum malaria patients with pulmonary oedema [J/OL]. *Malar J* (2019-12-18) [2020-05-15]. <https://doi.org/10.1186/s12936-020-03254-0>. htm.
- [18] Wang L, Zhang H, Sun L, et al. Manipulation of macrophage polarization by peptide-coated gold nanoparticles and its protective effects on acute lung injury [J/OL]. *J Nanobiotechnology* (2019-12-18) [2020-05-15]. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00593-7>. htm.
- [19] Feng L L, Xu L S, Guo M M, et al. 5, 7, 2', 4', 5'-Pentamethoxyflavone regulates M1/M2 macrophage phenotype and protects the septic mice [J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17 (5): 363-371.
- [20] Zhuo Y, Li D, Cui L, et al. Treatment with 3, 4-dihydroxyphenylethyl alcohol glycoside ameliorates sepsis-induced ALI in mice by reducing inflammation and regulating M1 polarization [J/OL]. *Biomed Pharmacother* (2019-4-2) [2019-05-21]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109012>. htm.
- [21] Miller L E, Justen H P, Scholmerich J, et al. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages [J]. *FASEB J*, 2000, 14 (13): 2097-2107.
- [22] Jiang H, Ding X, Ying C, et al. Dense intra-adipose sympathetic arborizations are essential for cold-induced beiging of mouse white adipose tissue [J]. *Cell Metabolism*, 2017, 26 (4): 686-692.
- [23] Muller P A, Koscsó B, Rajani G M, et al. Crosstalk between muscularis macrophages and enteric neurons regulates gastrointestinal motility cell [J]. *Cell*, 2014, 158 (5): 300-313.
- [24] Taborsky G J, Mei Q, Bornfeldt K E, et al. The p75 neurotrophin receptor is required for the major loss of sympathetic nerves from islets under autoimmune attack [J]. *Diabetes*, 2014, 63 (7): 2369-2379.
- [25] Calderon B, Suri A, Miller M J, et al. Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (16): 6121-6126.
- [26] In't Veld P, De Munck N, Van Belle K, et al. Beta-cell replication is increased in donor organs from young patients after prolonged life support [J]. *Diabetes*, 2010, 59 (7): 1702-1708.

• 基础研究 •

长链非编码 RNA MALAT1 对肺癌细胞放疗敏感性的作用

福建省肿瘤医院 福建医科大学附属肿瘤医院放疗科 (福州 350014) 郑 飞 李建成¹

【摘要】目的 研究长链非编码 RNA (LncRNA) 肺腺癌转移相关转录本 1 (MALAT1) 对肺癌细胞放射治疗敏感性的作用。**方法** 运用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测肺癌细胞 A549 中 MALAT1 的表达, 应用慢病毒在 A549 细胞中干扰或者过表达 MALAT1, 并通过克隆形成实验检测干扰或者过表达 MALAT1 后 A549 细胞放疗敏感性的改变, 通过 Western blot 检测干扰或者过表达 MALAT1 后 A549 细胞放疗后 DNA 损伤标记物 γ -h2ax 表达的改变。**结果** 通过慢病毒在 A549 细胞中干扰 MALAT1 后, A549 细胞的放射敏感性增加, 放疗后 DNA 损伤标记物 γ -h2ax 的表达增加。通过慢病毒在 A549 细胞中过表达 MALAT1 后, A549 细胞的放射敏感性降低, 放疗后 DNA 损伤标记物 γ -h2ax 的表达

1 通信作者, Email: jianchengli6@126.com

减少。结论 调控长链非编码 RNA MALAT1 可以影响肺癌细胞的放射治疗敏感性, 且有可能成为肺癌放疗增敏的新靶点。

【关键词】肺癌; 放射治疗; 长链非编码 RNA

【中图分类号】R734.2 【文献标识码】A 【文章编号】1002-2600(2021)06-0125-04

Effect of long non-coding RNA MALAT1 on radiosensitivity of lung cancer cells ZHENG Fei, LI Jiancheng.

Department of Radiology, Fujian Cancer Hospital, Fujian Medical University Cancer Hospital, Fuzhou, Fujian 350014, China

【Abstract】 Objective To study the effect of long non-coding RNA MALAT1 on radiosensitivity of lung cancer cells. **Methods** qRT-PCR was used to detect the expression of MALAT1 in lung cancer cells A549, lentivirus was used to knockdown or overexpress MALAT1 in A549 cells, and clone formation experiment was used to detect the changes in radiosensitivity of A549 cells after knockdown or overexpression of MALAT1, Western blot was used to detect the changes in the expression of γ -h2ax, a radiation induced DNA damage marker in A549 cells after knockdown or overexpression of MALAT1. **Results** After the knockdown of MALAT1 in A549 cells by lentivirus, the radiosensitivity of A549 cells increased, and the expression of DNA damage marker γ -h2ax increased after radiotherapy. After overexpressing MALAT1 in A549 cells by lentivirus, the radiosensitivity of A549 cells was reduced, and the expression of DNA damage marker γ -h2ax after radiotherapy was reduced. **Conclusion** The regulation of long non-coding RNA MALAT1 can affect the radiosensitivity of lung cancer cells, and it may become a new target for lung cancer radiotherapy sensitization.

【Key words】 lung cancer; radiotherapy; long non-coding RNA

作为我国发病率最高的恶性肿瘤, 肺癌严重危害着人民的身体健康^[1]。放疗是不可手术局部晚期肺癌的标准治疗手段之一, 随着研究的进展, 目前对于早期不可手术的肺癌患者可行立体定向放疗 (SBRT), 而晚期肺癌可以接受姑息性放疗^[2-3]。因此, 目前放疗在肺癌治疗中的地位越来越重要; 因此, 需要进一步探索如何提高肺癌的放射治疗效果。长链非编码 RNA (LncRNA) 作为目前医学基础研究领域的一个重要热点, 被发现在多种肿瘤的发生、发展及治疗抵抗中发挥重要的作用^[4]。LncRNA 同样被证实其可以影响肺癌的治疗疗效。LncRNA 肺腺癌转移相关转录本 1 (MALAT1) 位于人类染色体 11q13.1^[5], 其在肺癌 A549 细胞中高表达, 并且与 A549 细胞的增殖、侵袭、凋亡及化疗抵抗相关^[6]。然而对于 MALAT1 与肺癌细胞放射敏感性的研究, 目前尚未见文献报道, 因此, 本研究了 MALAT1 对 A549 细胞放射敏感性的作用, 以期寻找到肺癌放疗增敏的新靶点。

1 材料与方法

1.1 材料: 肺癌细胞株 A549 细胞购自中科院上海细胞库; RPMI 1640 培养基及胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司; CO₂ 培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 荧光倒置相差显微镜购自德国 LEICA 公司; 干扰及过表达 MALAT1 的慢病毒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司; γ -h2ax 及 β -actin 抗体购自美国 CST 公司。

1.2 方法:

1.2.1 人肺癌 A549 细胞培养基: 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基; 培养环境: 37 °C、5% CO₂ 浓度、恒温恒湿培养箱中培养。

1.2.2 实验分组: 通过慢病毒调控肺癌 A549 细胞中 MALAT1 的表达, 将 A549 细胞分为干扰对照组、干扰 MALAT1 组、过表达对照组、过表达 MALAT1 组。

1.2.3 qRT-PCR 实验: 根据 RNA 抽提试剂盒说明书, 取适量指数生长期的肺癌细胞, 提取细胞中的 RNA, 然后进行定量分析, 接下来依据逆转录试剂盒按照说明书, 合成洗

脑 cDNA, 最后采用 qRT-PCR 试剂盒说明书操作检测细胞中 MALAT1 的表达情况。MALAT1 引物序列如下, Forward: 5'-GCCTGGAAGCTGAAAAACGG-3', Reverse: 5'-TGGAAAACGCCTCAATCCCA-3'。

1.2.4 细胞辐射: 细胞辐射采用医用直线加速器的 6MV-X 射线进行照射, 剂量率设定为 350 cGy/min, SSD 设定为 100 cm, 照射野设定为 40×40 cm。

1.2.5 克隆形成实验: 计算照射剂量分别为 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy 时的细胞克隆形成率, 并计算细胞存活分数。运用 GraphPad Prism 5.0 软件, 根据模型公式 “SF = 1 - (1 - e^{-D/D0})^N” 进行多靶单击模型曲线拟合, 得到克隆形成曲线。

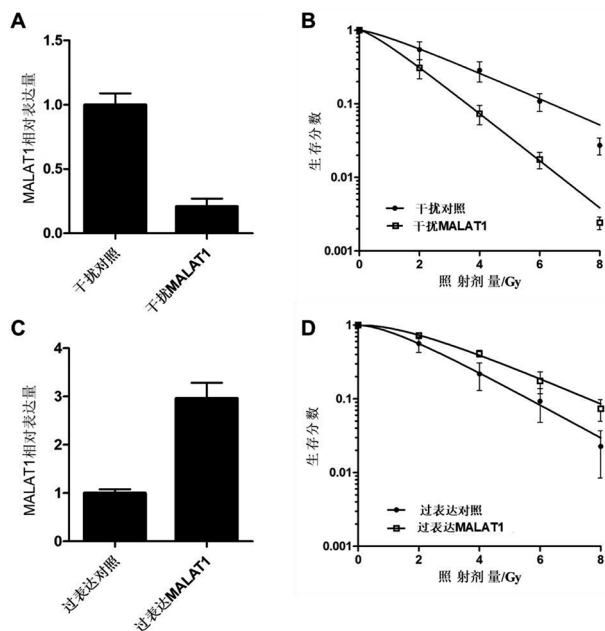
1.2.6 Western blot 检测蛋白表达: 将分组处理后的细胞利用 RIPA 裂解液进行裂解, 于 4 °C 下进行高速离心, 取离心后的上清液, 采用 BCA 蛋白测定法测定蛋白的浓度, 接下来进行蛋白变性。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行蛋白质电泳, 并采用湿法转膜转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 于室温下封闭 1 h, 使用 γ -h2ax 抗体 (CST) 于 4 °C 下孵育过夜, TBST 缓冲液洗膜后采用二抗于室温下孵育 1 h, TBST 缓冲液洗膜, 采用电化学发光 (ECL) 试剂显色拍照。

1.3 统计学分析: 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料采用 *t* 检验进行分析, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 调控 MALAT1 对肺癌 A549 细胞放射敏感性的影响: 通过慢病毒在 A549 细胞中干扰 MALAT1 后, qRT-PCR 检测提示干扰 MALAT1 组 MALAT1 的相对表达量低于干扰对照组, 差异有统计学意义 (0.21 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.09, *t* = 7.266, *P* = 0.001 9) (图 1A), 克隆形成实验显示 A549 细胞的放射敏感性增加 (图 1B)。通过慢病毒在 A549 细胞中过表达 MALAT1 后, qRT-PCR 检测提示过表达

MALAT1 组 MALAT1 的相对表达量高于过表达对照组, 差异有统计学意义 (2.96 ± 0.32 vs. 1.00 ± 0.08 , $t = 5.904$, $P = 0.0041$) (图 1C); 克隆形成实验显示 A549 细胞的放射敏感性降低 (图 1D)。



注: A, qRT-PCR 检测通过慢病毒干扰 MALAT1 后 A549 细胞中 MALAT1 的表达水平; B, 克隆形成实验检测干扰 MALAT1 后 A549 细胞的放射敏感性; C, qRT-PCR 检测通过慢病毒过表达 MALAT1 后 A549 细胞中 MALAT1 的表达水平; D, 克隆形成实验检测过表达 MALAT1 后 A549 细胞的放射敏感性。

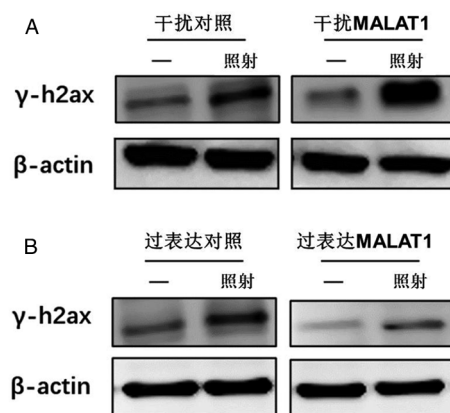
图 1 慢病毒调控 MALAT1 后 A549 细胞放射敏感性的变化

2.2 调控 MALAT1 对肺癌 A549 细胞放疗后 DNA 损伤的影响: 通过慢病毒在 A549 细胞中干扰 MALAT1 后, Western blot 实验显示 A549 细胞放疗导致的 DNA 损伤标记物 γ -h2ax 的表达增加 (图 2A); 通过慢病毒在 A549 细胞中过表达 MALAT1 后, Western blot 实验显示 A549 细胞放疗导致的 DNA 损伤标记物 γ -h2ax 的表达降低 (图 2B)。

3 讨论

肺癌是全球第一大恶性肿瘤。在我国, 其发病率和癌症死亡率均居我国恶性肿瘤之首^[1]。放疗作为恶性肿瘤的重要治疗手段之一, 在肺癌的治疗中扮演着重要的角色, 不可手术的局部晚期肺癌接受根治性同步放化疗, 早期不可手术的肺癌患者可行 SBRT, 而晚期肺癌可以接受姑息性放疗以达到减症甚至提高疗效的目的^[7]。而肺癌放疗治疗的疗效有限, 仍有相当一部分患者由于放疗不敏感而无法获得应有的疗效。我们的研究发现调控长链非编码 RNA MALAT1 可以影响肺癌细胞的放射治疗敏感性, 其有可能成为肺癌放疗增敏的新靶点, 进而帮助临床提高肺癌患者的放射治疗疗效。

长链非编码 RNA (LncRNA), 作为曾经的基因组“转



注: A, Western blot 检测干扰 MALAT1 后 A549 细胞放疗后 γ -h2ax 的表达; B, Western blot 检测过表达 MALAT1 后 A549 细胞放疗后 γ -h2ax 的表达。

图 2 慢病毒调控 MALAT1 后 A549 细胞放疗导致 DNA 损伤的变化

录噪声”, 正成为当前医学研究领域的一个重要新兴热点, 逐渐被大量的基础研究揭开其神秘的面纱^[4]。LncRNA MALAT1 位于人类染色体 11q13.1, 既往研究显示 MALAT1 在肺癌 A549 细胞及肺癌组织中呈现高表达, 并且干扰 A549 细胞的 MALAT1 表达水平后, 细胞的增殖、迁移、侵袭能力及自噬水平下降, 而凋亡水平升高, 提示调控 MALAT1 可以影响肺癌的恶性进展^[6-9]。有研究显示 MALAT1 还参与了肺癌的化疗抵抗, MALAT1 可以通过靶向 miR-197-3p 和调节 p120-ctn 表达来改变 NSCLC 细胞的化疗抵抗^[10]。多项研究显示了非编码长链 RNA 在恶性肿瘤放疗过程中发挥着关键作用^[11], 然而对于 MALAT1 与肺癌细胞放射敏感性的研究, 目前未见国内外报道。我们的研究显示通过慢病毒在 A549 细胞中干扰 MALAT1 后, A549 细胞的放射敏感性增加、放疗后 DNA 损伤标记物 γ -h2ax 的表达增加。通过慢病毒在 A549 细胞中过表达 MALAT1 后, A549 细胞的放射敏感性降低、放疗后 DNA 损伤标记物 γ -h2ax 的表达减少。

肿瘤放射治疗敏感性变化的相关机制十分复杂, 我们的研究提示了长链非编码 RNA MALAT1 可以影响肺癌细胞的放疗敏感性, 对于在临床上克服肺癌放射治疗抵抗提供了新的理论依据和潜在的治疗靶点, 但 MALAT1 调控放疗敏感性的具体机制尚不明确, 需要进一步的深入机制研究予以阐明; 并且体内研究的结果如何目前尚不明确, 期待未来开展动物实验及临床组织标本验证以进一步明确 MALAT1 对于肺癌放疗敏感性的调控作用。

本研究显示调控长链非编码 RNA MALAT1 可以影响肺癌细胞的放射治疗敏感性, 其有可能成为肺癌放疗增敏的新靶点。

参考文献

- [1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41 (1): 19-28.
- [2] Brown S, Banfill K, Aznar MC, et al. The evolving role of ra-

- diotherapy in non-small cell lung cancer [J]. Br J Radiol, 2019, 92 (1104): 20190524.
- [3] Baker S, Dahele M, Lagerwaard F J, et al. A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer [J]. Radiat Oncol, 2016, 11 (1): 115.
- [4] Jiang M C, Ni J J, Cui W Y, et al. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities [J]. Am J Cancer Res, 2019, 9 (7): 1354-1366.
- [5] Li Z X, Zhu Q N, Zhang H B, et al. MALAT1: a potential biomarker in cancer [J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 6757-6768.
- [6] Ma J, Wu K, Liu K, et al. Effects of MALAT1 on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cells in vitro and tumor xenograft growth in vivo by modulating autophagy [J]. Cancer Biomark, 2018, 22 (1): 63-72.
- [7] 中华医学会放射肿瘤治疗学分会, 中国医师协会放射肿瘤治疗医师分会, 中国抗癌协会放射治疗专业委员会, 等. 中国非小细胞肺癌放射治疗临床指南 (2020 版) [J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2020, 29 (8): 599-607.
- [8] Wu J, Weng Y, He F, et al. LncRNA MALAT-1 competitively regulates miR-124 to promote EMT and development of non-small-cell lung cancer [J]. Anticancer Drugs, 2018, 29 (7): 628-636.
- [9] 孙秀凤, 周芬, 吴婷. 长链非编码 RNA MALAT1 对 NSCLS 增殖、侵袭迁移及凋亡的影响 [J]. 中国肿瘤外科杂志, 2020, 12 (2): 148-152, 157.
- [10] Yang T, Li H, Chen T, et al. LncRNA MALAT1 depressed chemo-sensitivity of NSCLC cells through directly functioning on miR-197-3p/p120 catenin axis [J]. Mol Cells, 2019, 42 (3): 270-283.
- [11] Huang Q. Predictive relevance of ncRNAs in non-small-cell lung cancer patients with radiotherapy: a review of the published data [J]. Biomark Med, 2018, 12 (10): 1149-1159.

• 基础研究 •

中低强度运动训练对早期高血压大鼠中枢系统 ACE2-Ang(1-7)-Mas 与 ACE-AngII-AT1 轴 ACE2、ACE、AT1 的影响

厦门大学附属福州第二医院康复医学科 (福州 350001) 陈舜喜 王宏秀 苏锦兰

【摘要】目的 考察中低强度运动训练对早期高血压大鼠 (SHR) 中枢系统血管紧张素转化酶 2-人血管紧张素 (1-7)-G 蛋白偶联受体 [ACE2-Ang (1-7)-Mas] 与血管紧张素转化酶-人血管紧张素 II-血管紧张素 1 型受体 (ACE-Ang II-AT1) 轴的影响, 探讨中低强度运动训练对 SHR 血压调节能力的作用机制。**方法** 采用大鼠跑台的训练方式对大鼠进行中低强度运动训练, 采用静脉快速注射苯肾上腺素引起反射性心动过缓或过速, 采用“尾套法”记录心率变化 (ΔHR)、血压变化 (ΔMAP), 利用大鼠脑立体定位仪结合大鼠脑图谱进行大鼠中枢系统延髓腹外侧部 (RVLM)、孤束核 (NTS) 和室旁核 (PVN) 组织的定位剥离, 采用 Real-time PCR 检测 ACE2-Ang (1-7)-Mas 与 ACE-Ang II-AT1 轴血管紧张素转化酶 2 (ACE2)、G 蛋白偶联受体 (Mas)、血管紧张素转化酶 (ACE)、血管紧张素 1 型受体 (AT1) 的 mRNA 表达。**结果** 与同源正常血压大鼠安静 (WKY+Sed) 组相比, 自发性高血压大鼠安静 (SHR+Sed) 组 LVEDP、LVM 升高, $-dp/dt \max$ 降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 自发性高血压大鼠运动 (SHR+ExT) 组与自发性高血压大鼠安静 (SHR+Sed) 组相比, LVEDP、LVM 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)、 $+dp/dt \max$ 、 $-dp/dt \max$ 升高; 与 WKY+Sed 组相比, SHR+Sed 组压力反射敏感性 (BRS) 下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), SHR+ExT 组的 BRS 较 SHR+Sed 组增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 在 RVLM、NTS 及 PVN 中, 与 WKY+Sed 组相比, SHR+Sed 组 ACE2 均下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), RVLM 及 PVN 中的 ACE、AT1 上升, NTS 中的 AT1 上升 ($P < 0.05$); 在 RVLM、NTS 及 PVN 中, WKY+ExT 组的 ACE2、ACE、AT1 与 WKY+Sed 组差异无统计学意义, SHR+ExT 组的 ACE2 较 SHR+Sed 组增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), AT1 下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与 WKY+Sed 组、WKY+ExT 组差异无统计学意义; 在 PVN 中, 与 WKY+Sed 组、WKY+ExT 组相比, SHR+ExT 组的 ACE 增强, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 中低强度运动训练可能通过改善 BRS、调节 ACE2-Ang (1-7)-Mas 与 ACE-Ang II-AT1 轴 ACE2、ACE、AT1 的表达改善自发性大鼠血压。

【关键词】 中低强度; 运动训练; 早期高血压大鼠; ACE2-Ang (1-7)-Mas; ACE-Ang II-AT1

【中图分类号】 R54 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2021)06-0128-03

高血压作为一种多基因遗传病, 其发病机制至今尚未完全明确, 运动训练增强动脉压力反射功能是降低高血压的重

要手段, 而肾素-血管紧张素系统 (renin angiotensin system, RAS) 在其中扮演着关键角色。本项目通过选择高