

TUT4 通过调节 miR132 /212 簇的尿苷化影响食管上皮细胞放射敏感性

韩阳 于静萍 孙志强 罗居东
南京医科大学附属常州第二人民医院放疗科 213003
通信作者：罗居东，Email: judongluo@ 163. com

【摘要】 目的 验证末端尿苷基转移酶（TUT4）通过影响 miR132/212 簇的尿苷化作用影响食管上皮细胞（HEEC）的放射敏感性。**方法** 本研究通过 PCR 的方法检测 0、2、4、6 和 8 Gy X 射线照射后 0、6、18、24 和 48 h HEEC 中 TUT4 的表达。将细胞分为阴性对照组、下调 TUT4 表达组（shTUT4 组）、单纯 6 Gy 照射组（6 Gy 组）、6Gy 照射+下调 TUT4 表达组（6Gy+shTUT4 组）分别检测 TUT4 对细胞放射敏感性、细胞增殖、细胞周期、线粒体损伤、氧自由基产生的影响；通过 PCR 检测下调 TUT4 表达对 miR132/212 尿苷化的影响；克隆形成和增殖实验检测过表达 miR132/212 及 miR132/212+UUU（末端添加 3 个尿嘧啶的 miR132/212）时 HEEC 的放射敏感性；增殖实验检测在下调 TUT4 表达且过表达 miR132/212 及尿苷化 miR132/212 时 HEEC 的增殖情况。**结果** PCR 结果显示经 2、4、6 和 8 Gy X 射线照射后 TUT4 表达增加，差异有统计学意义（ $t=12.84、62.06、27.86、32.43, P<0.05$ ）；下调 TUT4 表达可增加 HEEC 的放射敏感性， $D_0、D_q、SF_2$ 的差异有统计学意义（ $t=13.2、5.85、7.31, P<0.05$ ），放射增敏比（ SER_{D0} ）为 1.41；与 6 Gy 组比较，6Gy+shTUT4 组细胞增殖减少（ $t=7.12、13.63, P<0.05$ ）、S 期细胞增加（ $t=11.98, P<0.05$ ）、线粒体损伤增加（ $t=11.98, P<0.05$ ）、氧自由基产生增加（ $t=15.65, P<0.05$ ）；下调 TUT4 表达可使 miR132/212 表达增加，miR132/212+UUU 表达减少（ $t=27.90、60.99, P<0.05$ ）；过表达 miR132/212 可增加 HEEC 的放射敏感性，过表达 miR132/212+UUU 可减少 HEEC 的放射敏感性， SER_{D0} 分别为 1.20、0.71；下调 TUT4 表达且过表达 miR132/212 时细胞较单纯下调 TUT4 表达增殖能力更差（ $t=4.76、7.65, P<0.05$ ），下调 TUT4 表达且过表达 miR132/212++UUU 时细胞较单纯下调 TUT4 表达增殖能力更强，差异有统计学意义（ $t=7.22, P<0.05$ ）。**结论** X 射线可增加 HEEC 中 TUT4 的表达，TUT4 可降低 HEEC 放射敏感性、减轻放射损伤，其机制与 miR132/212 的尿苷化相关。

【关键词】 食管放射损伤； 尿嘧啶转移酶； miR132/212 簇； 尿苷化

基金项目：国家自然科学基金（82073339；81773224）；江苏省自然科学基金（BK20191157）

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2021.11.000

TUT4 affects the radiosensitivity of esophageal epithelial cells by regulating the uridylation of miR132/212 clusters
HanYang, YuJingping, SunZhiqiang, LuoJudong
Department of Radiotherapy, Changzhou No. 2 People's Hospital, Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 213003, China
Corresponding author: Luo Judong, Email: judongluo@ 163. com

【Abstract】 Objective To validate the effect of TUT4 on the radiosensitivity of esophageal epithelial cells (HEEC) by regulating the uridylation of miR132/212 clusters. **Methods** The expression of TUT4 in HEEC at 0, 6, 18, 24 and 48 h after 0, 2, 4, 6 and 8 Gy X-ray irradiation was detected by PCR. The HEEC cells were divided into four groups: NC group, shTUT4 group, 6 Gy group, and 6 Gy+shTUT4 group. The effects of TUT4 on cell radiosensitivity, cell proliferation, cell cycle, mitochondrial damage, and oxygen free radical production were detected respectively. The effect of down-regulated TUT4 expression on miR132/212 uridylation was detected by RT-PCR, and the radiosensitivity of HEEC with overexpression of miR132/212 or miR132/212+UUU was detected by clone formation and proliferation assay, respectively. Proliferation assay was performed to detect the proliferation of HEEC when TUT4

expression was down-regulated and miR132/212 or miR132/212+UUU was overexpressed. **Results** TUT4 expression increased after different doses of X-ray irradiation ($t = 12.84, 62.06, 27.86, 32.43, P < 0.05$). Downregulation of TUT4 expression increased the radiosensitivity of HEEC ($t = 13.2, 5.85, 7.31, P < 0.05$) with aSER_{D0} of 1.41. Compared with 6 Gy group, cell proliferation in 6Gy+ shTUT4 group was decreased ($t = 7.12, 13.63, P < 0.05$), cells in S phase were increased ($t = 11.98, P < 0.05$), mitochondrial damage was increased ($t = 11.98$), and ROS level was increased ($t = 15.65, P < 0.05$). Down-regulation of TUT4 expression increased miR132/212 expression and decreased miR132/212+UUU expression ($t = 27.90, 60.99, P < 0.05$). Overexpression of miR132/212 increased the radiosensitivity of HEEC, and overexpression of miR132/212+UUU decreased the radiosensitivity of HEEC, with SER_{D0} of 1.20 and 0.71, respectively. Cell proliferation of shTUT4 + miR132/212 group was lower than that of shTUT4 group ($t = 4.76, 7.65, P < 0.05$), and cell proliferation of shTUT4 + miR132/212+UUU group was higher than that of shTUT4 ($t = 7.22, P < 0.05$). **Conclusions** X-ray irradiation increased the expression of TUT4 in HEEC, and the down regulation of TUT4 reduced HEEC radiosensitivity and radiation damage, where the uridylation of miR132/212 was involved in.

【Key words】 Radiation esophagitis; TUT4; MiR132/212; Uridylation

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (82073339; 81773224); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20191157)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2021.11.000

放射治疗是胸部肿瘤治疗方式之一,但放疗可能引起放射性食管炎等不良反应。其中食管黏膜对电离辐射的炎性反应是放射性食管炎的病理基础,但目前仍缺乏有效的防治靶点^[1-3]。尿苷化是一种重要的转录后修饰的方式,在真核生物细胞中普遍存在,可影响 RNA 的成熟、稳定和翻译^[4]。末端尿苷基转移酶家族 (TUTases) 是尿苷化的主要组成部分,这些酶也被称为 poly U 聚合酶,属于 DNA 聚合酶 β (Pol β) 样核苷基转移酶超家族,负责催化编码 RNA 和非编码 RNA 3'端尿苷的非模板添加。其中 TUT4 (ZCCHC11) 可通过尿苷化特定 miRNA 的前体来控制 miRNA 的生物发生,改变其生物模式,加速衰变或促进降解,是重要的调节信号^[5-9]。MiR132 和 miR212 基因具有相同的结构,在鼠和人的基因座中串联排列,且成熟体有相似的序列和相同的“种子区域”,因此被称为 miR132/212 基因簇。其可通过末端添加 1~3 个尿嘧啶进行修饰,而其尿苷化程度的不同可影响其对下游靶基因的调控^[10-11]。本研究验证了 TUT4 通过调控 miR132/212 的尿苷化作用对食管上皮细胞的放射敏感性的影响,为减轻胸部肿瘤的食管放射损伤提供了研究依据。

材料与方法

1. 细胞培养:将人食管上皮细胞系 HEEC (中国凯基生物公司),接种于含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素双抗的 DMEM 培养基 (美国 GIBCO 公司) 将细胞培养皿中,置于 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中培养。待细胞生长到 70%~80% 时传代培

养,每 2 天用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗并更换培养基以保持细胞良好生长。

2. 照射条件:取汇合度达到 70%~80% 的对数生长期细胞,接种于 6 孔板,采用德国西门子 Primus-H 型医用直线加速器 6 MV X 射线照射。源靶距 (SSD) 100 cm,分别照射 2、4、6 和 8 Gy,吸收剂量率 1 Gy/min。

3. 实时荧光定量 PCR 测定 TUT4 的 mRNA 表达:HEEC 细胞接种于 6 孔板培养后待其汇合度达到 70%~80% 时予 2、4、6 和 8 Gy 剂量照射,并使用离心柱法 RNA 提取试剂盒 (中国百泰克公司) 分别提取不同剂量照射后 0、6、18、24 和 48 h 细胞的 RNA, RNA 的浓度和纯度使用酶标仪检测 (美国 BioTek 公司)。按照 PCR 试剂盒 (中国新贝生物公司) 说明书步骤反转录后在 ABI ViiA7 系列 PCR 仪 (美国 ThermoFisher 公司) 中扩增,得到 CT 值后计算相对表达量。

4. TUT4 慢病毒转染:将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板培养过夜,第 2 天将完全培养基换成含有 5 μ g/ml 嘌呤霉素的慢病毒稀释液 (中国吉玛公司) 后放回含 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中继续培养,第 3 天弃感染细胞的病毒液,持续用含嘌呤霉素的培养基培养以保持稳定筛选,存活细胞即为感染阳性的细胞,在荧光显微镜下观察感染细胞荧光情况,并采用 RT-PCR 的方法验证目的基因表达下调。转染成功的细胞后续实验分为 4 组:阴性对照组、单纯下调 TUT4 表达组 (shTUT4 组)、单纯 6Gy 照射组 (6Gy 组)、下调 TUT4 表达细胞经 6Gy 照射组 (6Gy+shTUT4 组)。

5. 克隆形成实验：取对数生长期的细胞以每孔 500、1000、2000、4000 和 8 000 个细胞梯度接种于 6 孔板中培养过夜后分别给予剂量为 0、2、4、6 和 8 Gy 的照射，继续培养 12 d 后用 4%多聚甲醛固定、0.5%结晶紫染色细胞，记录含有 50 个以上细胞的集落数并计算克隆形成率。在 Prism 软件上应用单击多靶模型拟合生存曲线，计算相关的放射剂量学参数： D_0 （平均致死剂量）、 D_q （准阈剂量）、 SF_2 （经 2 Gy 照射后的细胞存活分数）、以及 D_0 和 D_q 的放射增敏比（SER）， SER_{D_0} 、 SER_{D_q} 。

6. 细胞增殖实验：细胞以每孔 1 000 个接种于 96 孔板中，第 2 天 6 Gy 照射后别于照射后 0、24、48 和 72 h 每孔加入 10 μ L CCK-8（日本 Dojindo 公司）试剂在 37℃ 培养箱中孵育 2 h，之后用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度（A）值。

7. 细胞周期实验：将细胞配成密度为 2×10^5 个/ml 的细胞悬液，按照细胞周期试剂盒（日本 Dojindo 公司）的操作步骤加入碘化丙啶（PI）荧光染料，混匀后在遮光条件下 37℃ 培养 15 min，过滤后用流式细胞仪分析各期细胞的比例。

8. 线粒体膜电位检测实验：线粒体膜电位检测试剂盒（日本 Dojindo 公司）中 JC-1 粉末加二甲亚砜（DMSO）溶解后，加入培养基配置成工作液。接种于 24 孔板的细胞加入 50 μ L/孔工作液并在 37℃ 培养箱中培养 1 h，染料会伴随膜电位的聚集过程由绿色荧光变为红色荧光。清洗后加入 200 μ L Buffer 缓冲液。在荧光显微镜下观察观察各组细胞红色荧光的荧光强度。线粒体膜电位荧光强度越低说明线粒体损伤越严重。

9. 活性氧自由基（ROS）检测实验：ROS 是在线粒体合成 ATP 时产生的高活性氧簇。本实验按照高灵敏度活性氧检测试剂盒（日本 Dojindo 公司）中的说明书操作，将接种于 24 孔板的转染细胞经 6Gy 照射后加入配置好的工作液（150 μ L/孔）置于培养箱内培养 30 min，经 PBS 清洗后置于荧光显微镜下观察，记录各组细胞绿色荧光的荧光强度，荧光强度越高说明 ROS 产生越多。

10. 实时荧光定量 PCR 测定 miRNA 表达：提取 6Gy 组和 6 Gy+shTUT4 组细胞的总 RNA，按照前述 PCR 方法测定两组的 miR132/212 表达和 miR132/212+UUU 表达，统计结果用表格表示。

11. MiRNA 的慢病毒转染：HEEC 细胞转染过

表达 miRNA132/212 和过表达 miRNA132/212+UUU 的慢病毒，操作按照前述转染方法进行，验证后得到稳定转染的两组 HEEC 细胞，分别为 miRNA132/212 组（上调 miRNA132/212 表达组）和 miRNA132/212+UUU 组（上调 miRNA132/212+UUU 表达组）。两组细胞分别照射 0、2、4、6 和 8 Gy，按前述方法进行克隆形成实验并计算克隆形成率。将经 6 Gy 照射的 6 Gy+miRNA132/212 组和 6 Gy+miRNA132/212+UUU 组以阴性对照组细胞为对照，按前述实验方法进行细胞增殖实验。

12. 双重转染细胞的增殖实验：将 shTUT4 组细胞分别转染过表达 miRNA132/212 和过表达 miRNA132/212+UUU 的慢病毒，操作按照前述转染方法进行，转染成功的细胞经 6 Gy 照射处理。将此时的细胞分为 6 Gy+shTUT4+miRNA132/212 组（下调 TUT4 表达且过表达 miRNA132/212 后经 6 Gy 照射组）和 6Gy+shTUT4+miRNA132/212+UUU 组（下调 TUT4 表达且过表达 miRNA132/212+UUU 后经 6 Gy 照射组），按照前述方法进行增殖实验。

13. 统计学处理：采用 GraphPad Prism7 软件进行数据处理。本实验所有结果数据经正态性检验数据均符合正态分布，对于两组间的比较采用组间 t 检验，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。对于两组以上的比较使用单因素方差分析。所有统计分析均采用 GraphPad Prism7 软件，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. PCR 检测 0、2、4、6 和 8 Gy 不同剂量 X 射线照射后 0、6、18、24 和 48 h 不同时间 HEEC 细胞中 TUT4 的表达：图 1 荧光定量 PCR 的结果显示了 X 射线照射后 TUT4 在 HEEC 中的表达变化，照射剂量 <4 Gy 时 TUT4 在 HEEC 中的表达随照射剂量增大而增多；照射剂量 >4 Gy 时 TUT4 表达较 4 Gy 时表达减少，照射 6 或 8 Gy 后 48 h 时 TUT4 表达量极低。经 2、4、6、8 Gy 照射的 HEEC 细胞 48 h 内的 TUT4 表达均值与 0Gy 比较差异均有统计学意义（ $t = 12.84、62.06、27.86、32.43$ ， $P < 0.05$ ）。结果表明 HEEC 中 TUT4 的表达与照射剂量和照射后时间密切相关，据此本研究后续实验将选择 TUT4 表达相对稳定时对应的 6 Gy 剂量作为照射条件处理 HEEC 细胞。

2. 克隆形成实验和细胞增殖实验检测下调

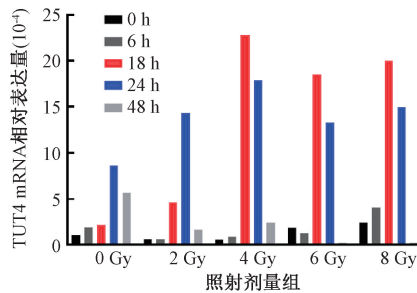


Figure 1 The expression level of TUT4 in HEEC at different time of radiation

TUT4 表达对 HEEC 细胞放射敏感性的影响：克隆形成实验结果显示 shTUT4 组的细胞的 D_0 、 D_q 、 SF_2 值分别为 0.79、1.61、0.47；阴性对照组细胞的 D_0 、 D_q 、 SF_2 值分别为 1.10、2.42、0.80，两组差异均有统计学意义 ($t=13.2$ 、 5.85 、 7.31 , $P<0.05$)；shTUT4 组的 SER_{D0} 、 SER_{Dq} 值分别为 1.41、1.50。CCK8 增殖实验的结果显示 6 Gy + shTUT4 组的细胞与 6 Gy 组比较 48 和 72 h 时增殖明显减少，差异均有统计学意义 ($t=7.12$ 、 13.63 , $P<0.05$)。结果表明下调 TUT4 的表达可增加 HEEC 细胞的放射敏感性。

3. 细胞周期实验检测下调 TUT4 表达的 HEEC 细胞周期的变化：细胞周期实验结果显示 6 Gy 组和 6 Gy+shTUT4 组分别较阴性对照组和 shTUT4 组细胞的 G_2/M 期细胞明显增多，差异均有统计学意义 ($t=6.67$ 、 9.16 , $P<0.05$)；且与 6 Gy 组相比，6 Gy+shTUT4 组 S 期细胞

增多，差异有统计学意义 ($t=4.79$, $P<0.05$)。结果表明 X 射线照射可增加细胞的 G_2/M 期阻滞，且下调 TUT4 表达可增加受照射细胞的 S 期阻滞。

表 1 6 Gy 照射各细胞周期的细胞比例 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Cell cycle distribution in different groups after 6 Gy irradiation ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
阴性对照组	3	46.0 ± 1.7	19.2 ± 1.2	24.2 ± 2.2
shTUT4 组	3	57.9 ± 2.4	14.9 ± 1.8	5.65 ± 3.1
6 Gy 组	3	35.4 ± 2.3	4.53 ± 1.1	$35.2\pm2.2a$
6 Gy+shTUT4 组	3	25.3 ± 2.0	$8.42\pm1.5c$	$37.3\pm1.8b$

注：与阴性对照组同周期比较，^a $t=6.67$, $P<0.05$ ；与 shTUT4 组同周期比较，^b $t=9.16$, $P<0.05$ ；与 6 Gy 组同周期比较，^c $t=4.79$, $P<0.05$

4. 线粒体膜电位检测实验检测下调 TUT4 表达的 HEEC 细胞线粒体损伤情况：线粒体膜电位损伤实验结果显示，阴性对照组、shTUT4 组、6 Gy 组和 6 Gy+shTUT4 组的平均荧光强度分别为 61.9、56.6、33.8、21.0。其中 6Gy 组和 6Gy+shTUT4 组分别较阴性对照组和 shTUT4 组细胞的荧光强度减低，差异均具有统计学意义 ($t=25.6$ 、 55.69 , $P<0.05$)；且与 6 Gy 组相比，6 Gy+shTUT4 组的荧光强度减低，差异有统计学意义 ($t=11.98$, $P<0.05$)。结果表明 X 射线照射可增加细胞的线粒体损伤，且下调 TUT4 表达可增加受照射细胞的线粒体损伤。

5. 活性氧自由基 (ROS) 检测实验检测下调 TUT4 表达的 HEEC 细胞的 ROS 产生情况：ROS 检

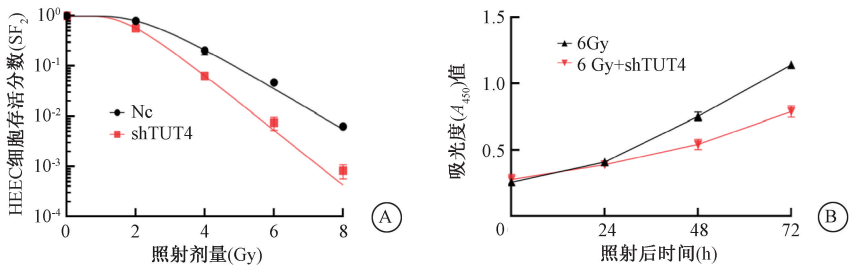


Figure 2 The effect of down-regulated TUT4 on radiosensitivity of HEEC. A. Survival curves of HEEC cells. B. CCK8 assay of cell proliferation after 6 Gy irradiation

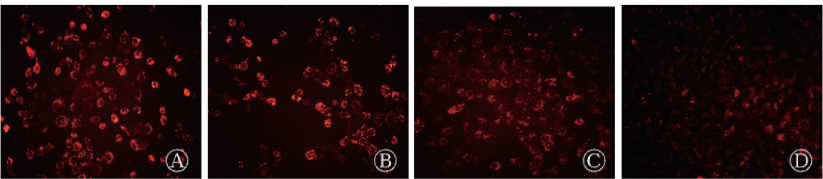


Figure 3 Fluorescence images of mitochondrial membrane potential in each group (590 nm, X200). A. NC group; B. shTUT4 group; C. 6 Gy group; D. 6 Gy + shTUT4 group

测实验结果显示, 阴性对照组、shTUT4 组、6 Gy 组和 6 Gy + shTUT4 组的荧光强度分别为 44.0、40.3、36.0、25.0。其中 6Gy 组和 6Gy+shTUT4 组分别较 Nc 组和 shTUT4 组细胞的绿

色荧光强度更高, 差异均具有统计学意义 ($t = 17.56$ 、 23.73 , $P < 0.05$); 且 6Gy+shTUT4 组与 6Gy 组相比 ROS 水平更高, 两组比较差异有统计学意义 ($t = 15.65$, $P < 0.05$)。结果表明 X 射线照射可增加细胞的 ROS 产生, 且下调 TUT4 表达可增加受照射细胞的 ROS 产生。

6. PCR 检测 6Gy+shTUT4 组细胞中 miR132/212 和 miR132/212+UUU 的表达: PCR 实验结果表明 6 Gy+TUT4 组较 6 Gy 组的 miR132/212 的表达增多, miR132/212+UUU 的表达减少, 差异均有显著统计学意义 ($t = 27.90$ 、 60.99 , $P < 0.05$), 见表 2。结果表明下调 TUT4 表达的 HEEC 细胞经照射后 miR132/212 的尿苷化程度减少。

7. 克隆形成实验和细胞增殖实验检测过表达 miR132/212 和 miR132/212+UUU 对 HEEC 细胞放射敏感性的影响: 克隆形成实验结果显示 miR132/212 组细胞 D_0 、 D_q 、 SF_2 值分别为 0.87、2.02、0.66, 相比于 Nc 组均减少 ($t = 10.56$ 、 4.58 、 5.34 , $P < 0.05$), SER_{D_0} 、 SER_{D_q} 分别为 1.20、1.22; miR132/212+UUU 组的细胞的 D_0 、 D_q 、 SF_2 值分别为 1.48、2.95、0.89, 比 Nc 组均增加, 差异有统计学意义 ($t = 8.72$ 、 7.49 、 5.11 , $P < 0.05$),

表 2 两组细胞中 miR132/212 和 miR132/212+UUU 的相对表达量 (10^{-4}) ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relative expression levels of miR132/212 and miR132/212+UUU in two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	miR132/212	miR132/212+UUU
6 Gy 组	3	0.44±0.03	0.66±0.11
6 Gy+shTUT4 组	3	0.90±0.05	0.07±0.02
t 值	27.9	60.99	
P 值	<0.05	<0.05	

SER_{D_0} 、 SER_{D_q} 分别为 0.71、0.84; 增殖实验结果显示 6Gy+miR132/212 组细胞在照射后 48 和 72 h 时的增殖较 6Gy 组减少, 差异均有统计学意义 ($t = 11.56$ 、 11.72 , $P < 0.05$); 6Gy + miR132/212 + UUU 组细胞在照射后 72 h 时的增殖较 6Gy 组增加, 差异有统计学意义 ($t = 5.21$, $P < 0.05$)。结果表明过表达 miR132/212 可增加 HEEC 细胞的放射敏感性, 过表达 miR132/212+UUU 可降低 HEEC 细胞的放射敏感性。

8. 双重转染细胞的增殖实验检测: 细胞增殖实验结果显示: (6 Gy+TUT4+miR132/212) 组较 (6 Gy+TUT4) 组的增殖受抑制程度在照射后 48、72 h 时增加, 差异有统计学意义 ($t = 4.76$, 7.65 , $P < 0.05$); (6 Gy+TUT4+miR132/212+UUU) 组较 (6 Gy+TUT4) 组增殖受抑制程度在照射后 72 h 时减少, 差异有统计学意义 ($t = 7.22$, $P < 0.05$), 结果表明 TUT4 可通过调控 miR132/212 的尿苷化影响食管上皮细胞的放射敏感性, 见表 3。

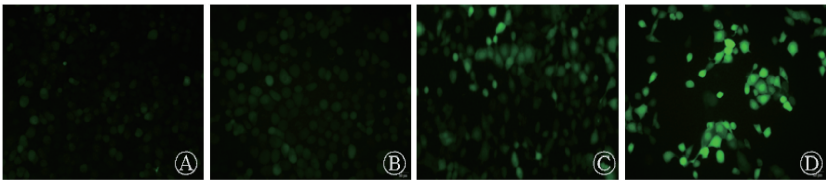


Figure 4 Fluorescence images of ROS in each group (540 nm, ×200) A. NC group; B. shTUT4 group; C. 6 Gy group; D. 6 Gy + shTUT4 group

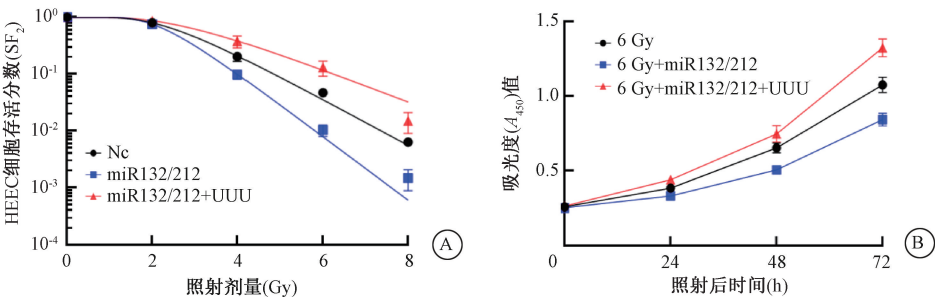


Figure 5 Effect of miR132/212 and miR212+UUU over expression on radio sensitivity of HEEC. A. Survival curves of HEEC; B. CCK8 assay of cell proliferation in three indicated groups

表 2 4 组细胞照射后不同时间吸光度 (A450) 的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 CCK8 assay of cell proliferation in four indicated groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	0 h	24 h	48 h	72 h
6 Gy 组	3	0.258±0.09	0.410±0.01	0.753±0.04	1.142±0.03
6 Gy+TUT4 组	3	0.280±0.04	0.341±0.03	0.543±0.02	0.790±0.02
6 Gy+TUT4+miR132/212 组	3	0.288±0.04	0.318±0.01	0.392±0.07a	0.603±0.05a
6 Gy+TUT4+miR132/212+UUU 组	3	0.277±0.05	0.408±0.02	0.607±0.02	1.066±0.03b

注：与 6 Gy+TUT4 组同时间比较,^a*t*=4.76, 7.65, *P*<0.05；与 6 Gy+TUT4 组同时间比较,^b*t*=7.22, *P*<0.05

讨 论

放射性食管炎是一种无菌性炎症，抗生素治疗疗效甚微，因此应用中医药来缓解患者的症状是目前主要的临床治疗手段^[12-17]。目前放射性食管炎的基础研究报道甚少，电离辐射损伤食管上皮细胞的分子机制和相关通路仍有待研究。TUT4 是一种末端尿苷基转移酶，被证明可能是多种癌症治疗干预的分子靶点，且与 TUT4 密切相关的 LIN28/let-7 通路可能与电离辐射和几种一线化疗药物的耐受有关^[18-22]。基于 TUT4 与电离辐射的关联性，本研究验证了 TUT4 与食管上皮细胞放射损伤密切相关，其可调控 miR132/212 的尿苷化作用对食管上皮细胞的放射敏感性，为减轻胸部肿瘤的食管放射损伤提供了研究依据。

本研究首先验证了电离辐射可以诱导 TUT4 的表达，下调 TUT4 表达可降低食管上皮细胞的放射敏感性，接下来从细胞周期、细胞线粒体膜电位、氧自由基生成角度探究 TUT4 对食管放射损伤的影响。电离辐射对于细胞损伤的直接分子机制是 DNA 链的损伤，这会造成真核生物细胞周期中检查点 G₂/M 检验点的阻滞，从而引起细胞周期中各部分细胞比例的变化。本研究细胞周期实验的结果显示下调 TUT4 表达下调照射后细胞的 S 期比例，而有相关研究表明 TUT4 相关 LIN28/let-7 通路中的 let7 可以直接调节细胞周期中几个关键的原癌基因从而控制细胞增殖阻滞期 G1 细胞向 S 期转变^[23-25]。因此，TUT4 可能通过影响 LIN28/let-7 通路而影响食管上皮细胞的细胞周期。电离辐射可造成部分细胞不可逆的 DNA 损伤后启动凋亡，而线粒体跨膜电位的下降被认为是细胞凋亡级联反应中最早发生的事件，其发生在细胞核凋亡特征（染色质浓缩、DNA 断裂）出现之前。当细胞受到辐射时，射线直接攻击线粒体，导致线粒体膜结构、通透性发生改变，膜电位下降，一旦线粒体跨膜电位崩溃，细胞凋亡则不可逆转^[26-28]。本研究结果表明下调 TUT4 表达会通过增加线粒体膜电

位下降程度而增加辐射后 HEEC 细胞的早期凋亡。电离辐射作用于正常组织时会产生大量的活性氧自由基（ROS），过量的氧自由基会攻击脂肪酸、蛋白质和核酸，产生膜流动性降低、渗透率增加，线粒体肿胀、溶酶体释放等一系列氧化性应激反应，导致细胞内 DNA、蛋白质和脂质的氧化以及某些特定氧化还原敏感信号通路的激活，进而导致细胞和组织损伤，引起并加重炎症反应，是诱发辐射损伤的主要机制之一^[29-31]。本研究表明下调了 TUT4 表达的食管上皮细胞在接受照射后的 ROS 水平增加。以上实验证明了 TUT4 在食管上皮辐射损伤中的保护作用。

为了进一步探究 TUT4 的影响机制，本研究从 TUT4 的生物学功能角度出发探索了可以被 TUT4 尿苷化的 miR132/212 基因簇。miR132/212 在神经系统中的研究较为成熟，同时存在许多癌症中失调，被认为可能是一种新的肿瘤抑制 miRNA。其被证明在化疗药物敏感性和肺癌细胞的放射敏感性方面发挥作用，并且其在大鼠放射食管损伤的表达谱中存在差异表达^[31-37]。本研究验证了 miR-212/132 可影响食管上皮细胞的放射敏感性，并且 miR-212/132 是否尿苷化对放射线敏感的影响不同。TUT4 作为其尿苷化作用的主要催化酶，可通过影响其尿苷化程度从而影响食管上皮细胞的放射敏感性。

本研究从 TUT4 调控 miRNA 尿苷化的角度揭示了影响食管上皮细胞放射敏感性的新机制，为预防和治疗放射性食管损伤提供了新靶点或新思路。然而本研究仍存在一些不足之处有待弥补，比如需完善电离辐射后食管上皮细胞中 TUT4 蛋白水平的表达结果；完善上调 TUT4 表达后的食管上皮细胞的细胞周期、损伤、凋亡结果；通过食管组织水平及动物水平的实验进一步验证已有结论等，并且 TUT4 调控 miR132/212 影响下游靶基因的具体机制仍待探索。本课题组目前正继续完善以上相关内容，致力于阐明放射性食管上皮细胞的放射敏感性的影响机制，最终为放疗患者的临

床治疗做出贡献。

利益冲突 本研究由署名作者按以下贡献声明独立开展，不涉及任何利益冲突，排名无争议

作者贡献声明 韩阳负责实验操作、数据分析和论文撰写；罗居东负责实验的设计和指导及文章的审阅及修改；于静萍和孙志强参与统计分析、指导论文撰写

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. DOI: 10. 3322/caac. 21492.

[2] Hirota S, Tsujino K, Endo M, et al. Dosimetric predictors of radiation esophagitis in patients treated for non-small-cell lung cancer with carboplatin/paclitaxel/radiotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001, 51 (2): 291-295. DOI: 10. 1016/ s0360-3016 (01) 01648-0.

[3] Zhang Z, Xu J, Zhou T, et al. Risk factors of radiation-induced acute esophagitis in non-small cell lung cancer patients treated with concomitant chemoradiotherapy[J]. Radiat Oncol, 2014, 9: 54. DOI: 10. 1186/1748-717X-9-54.

[4] Lee M, Kim B, Kim VN. Emerging roles of RNA modification; m (6) A and U-tail [J]. Cell, 2014, 158 (5): 980-987. DOI: 10. 1016/j. cell. 2014. 08. 005.

[5] Lim J, Ha M, Chang H, et al. Uridylation by TUT4 and TUT7 marks mRNA for degradation[J]. Cell. 2014, 159 (6): 1365-1376. DOI: 10. 1016/j. cell. 2014. 10. 055.

[6] Thornton JE, Du P, Jing L, et al. Selective microRNA uridylation by Zcchc6 (TUT7) and Zcchc11 (TUT4) [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (18): 11777-11791. DOI: 10. 1093/nar/gku805.

[7] Menezes MR, Balzeau J, Hagan JP. 3´ RNA uridylation in epitranscriptomics, gene regulation, and disease[J]. Front Mol Biosci, 2018, 5: 61. DOI: 10. 3389/fmolb. 2018. 00061.

[8] De Almeida C, Scheer H, Zuber H, et al. RNA uridylation: a key posttranscriptional modification shaping the coding and noncoding transcriptome[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2018, 9 (1): . DOI: 10. 1002/wrna. 1440.

[9] Heo I, Joo C, Kim YK, et al. TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation[J]. Cell, 2009, 138 (4): 696-708.

[11] Jiang X, Chen X, Chen L, et al. Upregulation of the miR-212/ 132 cluster suppresses proliferation of human lung cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 33 (2): 705-712. DOI: 10. 3892/ or. 2014. 3637.

[12] Bar-Ad V, Ohri N, Werner-Wasik M. Esophagitis, treatment-related toxicity in non-small cell lung cancer[J]. Rev Recent Clin Trials, 2012, 7: 31 - 5. DOI: 10. 2174/157488712799363235

[13] 黄从书, 朱贵花, 谢光辉. 中医药防治放射性皮肤损伤的

研究进展[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2021, 41 (3): 229-233. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-5098. 2021. 03. 013.

Huang CS, Zhu GH, Xie GH. Research progress of traditional Chinese medicine in prevention and treatment of radiation-induced skin injury [J]. Chin J Radiol Med Prot, 2021, 41 (3): 229-233. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-5098. 2021. 03. 013.

[14] Li Y, Lin J, Xiao J, et al. Therapeutic effects of Co-VenenumBufonis Oral Liquid on radiation-induced esophagitis in rats [J]. Exp Anim, 2020, 69 (3): 354-362. DOI: 10. 1538/expanim. 19-0142.

[15] Shen L, Li X, Shan B, et al. Therapeutic effect of compound of white peony root oral liquids on radiation-induced esophageal toxicity via the expression of EGF and TGF-β1[J]. Biomed Rep, 2013, 1 (2): 308-314. DOI: 10. 3892/br. 2012. 51.

[16] Coskun H, Andic F, Daghoglu YK, et al. Lycopene in the prevention of radiation-induced esophagitis [J]. Nutr Cancer, 2017, 69 (2): 319-329. DOI: 10. 1080/01635581. 2017. 1265133.

[17] Fountain MD, Abernathy LM, Lonardo F, et al. Radiation-induced esophagitis is mitigated by Soy isoflavones [J]. Front Oncol, 2015, 5: 238. DOI: 10. 3389/fonc. 2015. 00238.

[18] Minoda Y, Saeki K, Aki D, et al. A novel Zinc finger protein, ZCCHC11, interacts with TIFA and modulates TLR signaling[J]. BiochemBiophys Res Commun, 2006, 344 (3): 1023-1030. DOI: 10. 1016/j. bbrc. 2006. 04. 006.

[19] Munoz-Tello P, Rajappa L, Coquille S, et al. Polyuridylation in eukaryotes: a3´-end modification regulating RNA life[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 968127. DOI: 10. 1155/2015/968127.

[20] Morgan M, Much C, DiGiacomo M, et al. mRNA 3´ uridylation and poly (A) tail length sculpt the mammalian maternal transcriptome [J]. Nature, 2017, 548 (7667): 347-351. DOI: 10. 1038/nature23318.

[21] Faehnle CR, Walleshauser J, Joshua-Tor L. Multi-domain utilization by TUT4 and TUT7 in control of let-7 biogenesis[J]. Nat Struct Mol Biol, 2017, 24 (8): 658-665. DOI: 10. 1038/nsmb. 3428.

DOI: 10. 1016/j. cell. 2009. 08. 002.

[22] Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D. Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications[J]. Protein Cell, 2016, 7 (2): 100-113. DOI: 10. 1007/s13238-015-0212-y.

[23] 刘春旭, 刘建香. microRNAs 和电离辐射诱导的细胞周期阻滞[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2014, 34 (10): 793-796. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-5098. 2014. 10. 019.

Liu CX, Liu JX. MicroRNAs and ionizing radiation induced cell cycle arrest [J]. Chin J Radiol Med Prot, 2014, 34 (10): 793-796. DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 0254-5098. 2014. 10. 019.

[24] Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53 [J]. Oncogene, 2001, 20 (15): 1803-1815. DOI:

10.1038/sj. onc. 1204252.

[25] Balzeau J, Menezes MR, Cao S, et al. The LIN28/let-7 pathway in cancer [J]. Front Genet, 2017, 8: 31. DOI: 10.3389/fgene. 2017.00031.

[26] Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 460 (1), 72-81. DOI: 10.1016/j.bbrc. 2015.01.137.

[27] Kuwahara Y, Roudkenar MH, Suzuki M, et al. The involvement of mitochondrial membrane potential in cross-resistance between radiation and docetaxel[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2016, 96 (3): 556-565. DOI: 10.1016/j.ijrobp. 2016.07.002.

[28] Bertero E, Maaack C. Calcium signaling and reactive oxygen species in mitochondria[J]. Circ Res, 2018, 122 (10), 1460-1478. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA. 118.310082.

[29] 张海东, 王仁生. 放射治疗所致活性氧簇对正常组织的损伤及其防治 [J]. 广东医学, 2010, 31 (20): 2728-2729. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-9448.2010.20.054.

Zhang HD, Wang RS. ROS damage by radiotherapy and its prevention and treatment [J]. Guangdong Med J, 2010, 31 (20): 2728-2729. DOI: 10.3969/j. issn. 1001-9448.2010.20.054.

[30] Farhood B, Ashrafizadeh M, Khodamoradi E, et al. Targeting of cellular redox metabolism for mitigation of radiation injury [J]. Life Sci, 2020, 250, 117570. DOI: 10.1016/j.lfs. 2020.117570.

[31] Khodamoradi E, Hoseini-Ghahfarokhi M, Amini P, et al. Targets for protection and mitigation of radiation injury [J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77 (16), 3129-3159. DOI: 10.1007/s00018-020-03479-x.

[32] Kim HR, Hwang SJ, Shin CH, et al. SRSF3-regulated miR-132/212 controls cell migration and invasion by targeting YAP1 [J]. Exp Cell Res, 2017, 358 (2): 161-170. DOI: 10.1016/j.yexcr. 2017.06.009.

[33] Luo J, Meng C, Tang Y, et al. miR-132/212 cluster inhibits the growth of lung cancer xenografts in nude mice [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7 (11): 4115-4122.

[34] Hatakeyama H, Cheng H, Wirth P, et al. Regulation of heparin-binding EGF-like growth factor by miR-212 and acquired cetuximab-resistance in head and neck squamous cell carcinoma [J]. PLoS One, 2010, 5 (9): e12702. DOI: 10.1371/journal.pone.0012702.

[35] Im HI, Hollander JA, Bali P, et al. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212 [J]. Nat Neurosci, 2010, 13 (9): 1120-1127. DOI: 10.1038/nn.2615.

[36] Rui W, Bing F, Hai-Zhu S, et al. Identification of microRNA profiles in docetaxel-resistant human non-small cell lung carcinoma cells (SPC-A1) [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14 (1-2): 206-214. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00964.x.

[37] Luo J, Zhang C, Zhan Q, et al. Profiling circRNA and miRNA of radiation-induced esophageal injury in a rat model [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 14605. DOI: 10.1038/s41598-018-33038-1.

(收稿日期: 2021-05-18)