

· 基础研究 ·

人宫颈癌获得性放射抗拒细胞株 (Hela-R) DNA 修复能力的观察

刘 晨, 庞学利[△]

(第三军医大学西南医院肿瘤科, 重庆 400038)

摘要:目的 观察人宫颈癌获得性放射抗拒细胞株(Hela-R)与其亲本细胞(Hela)DNA 修复能力的差异。方法 采用克隆形成实验测定细胞的放射敏感性;CCK-8 细胞增殖实验检测增殖情况,流式细胞术检测凋亡及周期变化,彗星实验及 5-乙基-2'-脱氧尿苷(EdU)掺入检测 DNA 的修复能力。结果 Hela-R 细胞株的平均致死剂量显著高于 Hela 细胞株。X 射线照射后,Hela-R 细胞株早、晚期凋亡率均低于 Hela 细胞。24、48、72 h Hela 和 Hela-R 细胞株的光密度值(OD)值分别为 1.13 ± 0.12 、 1.46 ± 0.13 ($P < 0.05$); 1.34 ± 0.07 、 1.20 ± 0.07 ($P < 0.05$); 1.58 ± 0.07 、 1.48 ± 0.07 ($P < 0.05$)。Hela-R 细胞株放疗后 12~48 h G₂ 期细胞显著增多。Hela-R 细胞株放疗后 24 h 与 48 h,彗星尾长均短于 Hela 细胞株。X 射线照射 1 h 后,Hela-R 细胞株 EdU 荧光强度为 121.32 ± 39.67 ($P < 0.01$),高于 Hela 细胞株。结论 Hela-R 较 Hela 细胞株具有显著的放射抗拒性,DNA 损伤修复能力的增强是其产生的重要机制之一。

关键词: 宫颈肿瘤;放射抗拒细胞株;DNA 修复

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)12-1370-04

Observation of the DNA repair capability of acquired radioresistant cell line from human cervical carcinoma cells

Liu Chen, Pang Xueli[△]

(Department of Oncology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the difference of DNA repair capability between the radioresistant cell (Hela-R) line and its parents cell (Hela) line. **Methods** The radiosensitivity was measured with colony formation. CCK-8 cell proliferation assay was used to detect proliferation after radiation. Flow-cytometry was used to detect the change of apoptosis and cell cycle after radiation. Comet assay and incorporation of ethynyl deoxyuridine were used to detect DNA repair capability. **Results** The mean lethal dose of Hela-R was significantly superior to its parental cell (Hela). After irradiation, Hela-R cell line's early apoptotic rate and late apoptotic rate were significantly less than the Hela cells. CCK-8 proliferation experiment showed that Hela and Hela-R cell's OD value, respectively, in 24, 48 and 72 hours, were 1.13 ± 0.12 and 1.46 ± 0.13 ($P < 0.05$); 1.34 ± 0.07 and 1.20 ± 0.07 ($P < 0.05$); 1.58 ± 0.07 and 1.48 ± 0.07 ($P < 0.05$). Hela-R's G₂ phase rate was significantly higher than Hela in 24 to 48 hours after radiation. After irradiation, Hela-R's comet tail length were significantly shorter than the same period of Hela. In 1 hour after irradiation, incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU) showed that Hela-R's fluorescence intensity were 121.32 ± 39.67 ($P < 0.01$). They were significantly higher than the same period of Hela. **Conclusion** The radioresistant effect is significant strong in Hela-R than Hela. The increase of DNA repair capability is an important mechanism of radioresistance after radiotherapy in recurrent cervical cancer.

Key words: uterine cervical neoplasms; radioresistant cell line; DNA repair

宫颈癌是严重危害妇女健康的恶性肿瘤,死亡率约为 50%^[1]。目前主要通过手术、放疗、化疗等手段综合治疗,其中中晚期宫颈癌多以放疗为主。根治性放疗后仍有部分治疗失败,其中超过 50% 为盆腔内复发,且多发生在治疗后两年内。放疗后复发癌治疗困难,部分患者仍需接受再次放疗,然而平均 5 年生存率不到 20%^[2]。一般认为放疗后复发的肿瘤细胞对放疗敏感性降低,盲目提高照射剂量往往无法消除肿瘤,更可能损伤正常组织。关于放疗后诱导及复发肿瘤放疗抗拒的机制,目前仍不十分明确。本研究通过对本室建立的人宫颈癌获得性放射抗拒细胞株(Hela-R)的放射生物学特性进行研究,模拟临床宫颈癌放疗后获得的放射抗拒,着重观察了 DNA 损伤修复的指标,希望能揭示 DNA 修复能力在放疗抵抗产生中的作用。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器 宫颈癌细胞 Hela 细胞株为本科室培养保

存,Hela-R 细胞株为本室诱导的放射抗拒细胞株;Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒、细胞周期试剂盒购自上海贝博(Best-Bio)生物公司;低熔点琼脂糖和琼脂糖购自 Sigma 公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂购自 DOJINDO 公司;EdU 试剂盒购自锐博生物科技有限公司;放疗设备为美国瓦里安公司的 Varian2300C/D 直线加速器;流式细胞仪为美国 BD 公司的 FACS Aria™ II 型流式细胞仪;荧光显微镜为 Olympus 公司 IX71 型荧光显微镜。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养^[3] 将 Hela 细胞株呈贴壁生长,培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 完全培养液,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 诱导放射抗拒株的照射条件与诱导方法 常规分割法依据单次照射剂量与照射次数分为 4 个组。单次剂量 2 Gy,

照射次数分为 15、20、25、30 次照射后,传代至细胞形态、增殖状态稳定,冻存备用;亚致死剂量法:取对数生长期细胞,分别给予 2、4、6、8、10 Gy X 射线照射。确定 6 Gy 为 HeLa 细胞株单次照射的亚致死剂量,并传代至细胞形态,增殖稳定,冻存备用。

1.2.3 克隆形成实验 制备单细胞悬液后,利用流式细胞仪接种于 24 孔板内,每孔接种 800 个细胞。待细胞贴壁并状态稳定后,应用 6 MV X 射线给予 0、2、4、6、8、10 Gy 照射。常规培养 10 d 后,结晶紫染色,计数所形成的集落(≥ 50 个细胞数的集落);应用 Graphpad 5.0 绘制并拟合单击多靶模型曲线。

1.2.4 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测 取对数生长期细胞,消化成单细胞悬液。取 5 万~10 万个细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 400 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 5 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀后,室温(20~25 $^{\circ}$ C)避光孵育 10 min。加入 10 μ L 碘化丙啶(PI)染色液,用流式细胞仪检测。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞,以 2 000 个细胞每孔接种于 96 孔培养板内。培养 24 h 后,给予 6 Gy X 射线处理。24、48、72 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液作用 2 h。酶联免疫检测仪 450 nm 处检测各孔光密度值(OD 值)。

1.2.6 细胞周期检测 取对数生长期细胞,制成细胞悬液,滴加到 70% 预冷乙醇中,4 $^{\circ}$ C 固定 24 h 以上。PBS 洗涤去乙醇,1 000 r/min 离心 5 min,洗 2 遍,0.5 mL PBS 重悬细胞,加入 PI 和核糖核酸酶 A(RNaseA)至终浓度 50 μ g/mL,37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min,用流式细胞仪测定周期。

1.2.7 彗星实验^[4] 放射处理后的细胞悬液,加入 200 μ L 0.7% 低熔点琼脂糖凝胶(LMPA)混匀,滴于预先处理好的琼脂糖胶片上,盖上盖玻片。4 $^{\circ}$ C 避光,固化 10 min。玻片浸于新鲜配制并预冷的细胞裂解液中,4 $^{\circ}$ C 避光 1 h。取出玻片,加新鲜配制的电泳缓冲液至高于玻片表面,4 $^{\circ}$ C 避光,解旋 20 min。调节电压 25 V,调整液面高度使电流达到 300 mA,避光,电泳 20 min。取出玻片,中和缓冲液浸泡 5 min,2~3 次。EB 染色后荧光显微镜下观察,随机取 50 个细胞,用 CASP 分析软件进行分析。

1.2.8 5-乙基-2'-脱氧尿苷(EdU)掺入实验 将细胞接种于 96 孔培养板内,每孔 2 000 个,培养过夜。给予 6 Gy X 射线处理,培养 1 h 后,每孔加入 100 μ L 50 μ mol/L EdU 培养基孵育 2 h。4% 多聚甲醛固定后,每孔加入 100 μ L 的 Apollo 染色反应液孵育 30 min。每孔加入 100 μ L 的 Hoechst 反应液孵育 30 min。采用荧光显微镜获取荧光图片。每组分别从 5 个不同视野中选取 50 个非 S 期细胞(紫色箭头),利用 Image-pro plus 软件分析相对荧光强度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析;计数资料采用率表示,组间采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 克隆形成实验 本实验采用常规分割与亚致死剂量法诱导选出 5 组获得性放射抗拒细胞,2 Gy/20 次组未能稳定传代、成系,最终成功建系 4 组。采用克隆形成实验,比较各组与亲本细胞的放疗敏感性;并以多靶单击模型拟合存活曲线。见表 1、图 1。本研究发现单次 2 Gy,照射 25 次后的细胞放疗抗拒性最强(平均致死剂量 $D_0 = 4.812$),为亲本的 1.76 倍,差异

有统计学意义($P < 0.01$),将其命名为 HeLa-R。

2.2 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测 HeLa 与 HeLa-R 细胞株在给予 6 MV 6 Gy X 射线照射后 24 h,早期凋亡率分别为 2.32%、1.76%,差异有统计学意义($P < 0.01$);晚期凋亡率分别为 12.14%、5.73%,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 CCK-8 细胞增殖实验 HeLa 与 HeLa-R 细胞株在以 6 MV 6 Gy X 射线照射后 24、48、72 h 后,检测各组 OD 值分别为 1.13 ± 0.12 、 1.46 ± 0.13 ($P < 0.05$); 1.34 ± 0.07 、 1.20 ± 0.07 ($P < 0.05$); 1.58 ± 0.07 、 1.48 ± 0.07 ($P < 0.05$)。在放疗后 24 h 内 HeLa-R 细胞株增殖速度明显超过其亲本细胞($P < 0.05$),但在 48 h 与 72 h 后被亲本赶超($P < 0.05$)。见图 3。

表 1 各组多靶单击模型参数

组别	平均致死剂量(D_0)	阈值剂量(D_q)	外推数(N)	2 Gy 存活分数(SF2)
HeLa 细胞未照射组	2.719	0.589	1.242	0.552
HeLa 细胞 X 射线照射组				
2 Gy 15 次	3.521	2.784	2.205	0.805
2 Gy 20 次(缺失)	—	—	—	—
2 Gy 25 次(HeLa-R)	4.812	2.950	1.846	0.857
2 Gy 30 次	1.881	4.712	12.250	0.949
6 Gy 1 次	2.718	3.710	3.915	0.830

—:表示无数据。

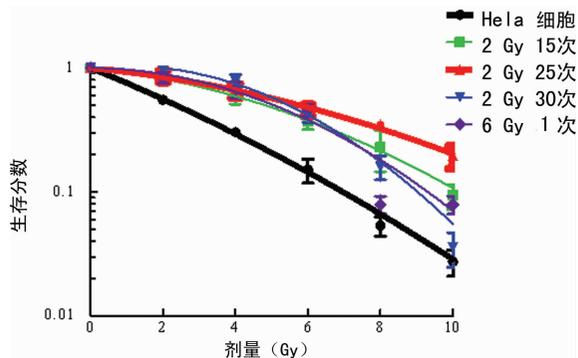


图 1 多靶单击模型拟合存活曲线

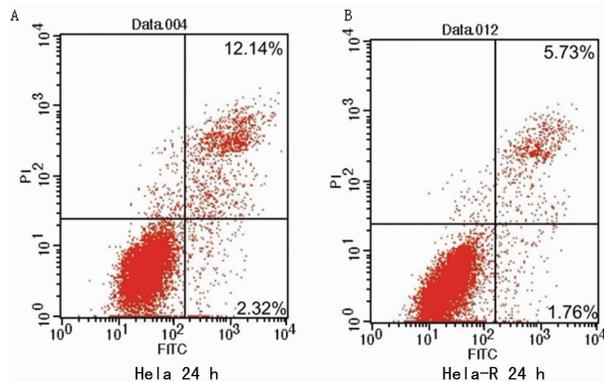


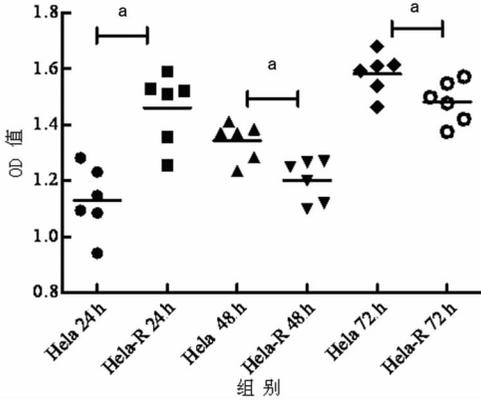
图 2 X 射线照射后流式细胞仪检测 HeLa 和 HeLa-R 细胞株的凋亡情况

2.4 细胞周期检测 HeLa 细胞株在以 6 MV 6 Gy X 射线照射后 1、4 h, S 期分别为 49.63%、42.42%,在 X 射线照射后 12、24、48 h, G_2 期比率分别为 60.80%、71.26%、39.56%。

Hela-R 细胞株在相同 X 射线照射后 1、4 h 后, S 期比率分别为 54.87%、53.92% ($P < 0.01$), 在 X 射线照射后 12、24、48 h, G_2 期比率分别 82.50%、85.15%、54.07% ($P < 0.01$)。Hela-R 细胞株的 S 期比率在放疗后 1、4 h, G_2 期比率在放疗后 12、24、48 h, 均明显高于 Hela 细胞株。见图 4。

(46.00 ± 12.42) μm 、(29.48 ± 10.25) μm 、(21.48 ± 7.75) μm , 其中 12、24、48 h 尾长明显短于 Hela 细胞株, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 5、6。

2.6 EdU 掺入实验 Hela-R 与 Hela 细胞株在 X 射线照射 1 h 后, 掺入 EdU 荧光强度分别为 121.32 ± 39.67 、 45.22 ± 10.09 , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 7、8。



^a: $P < 0.05$.

图 3 X 射线照射后 Hela 和 Hela-R 细胞株的 OD 值

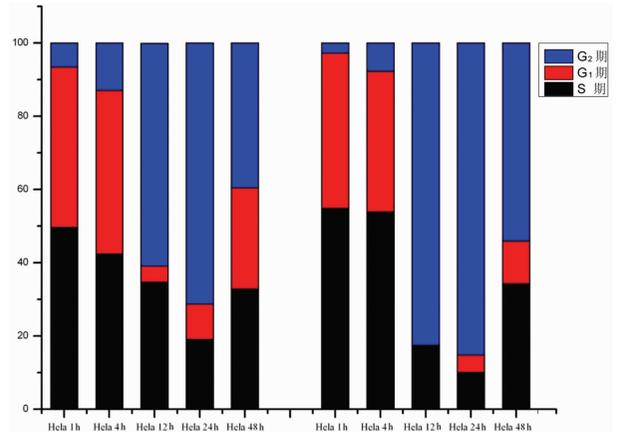
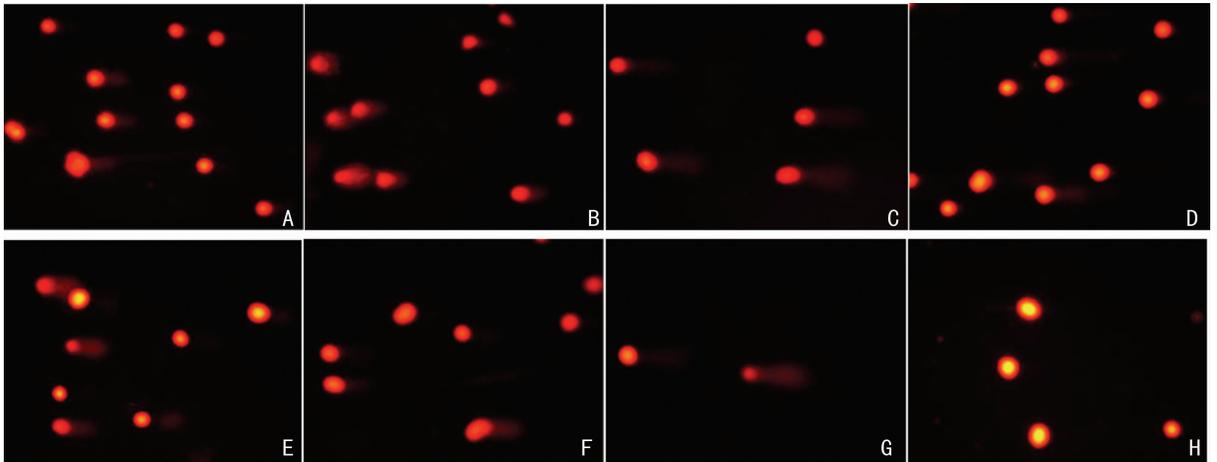


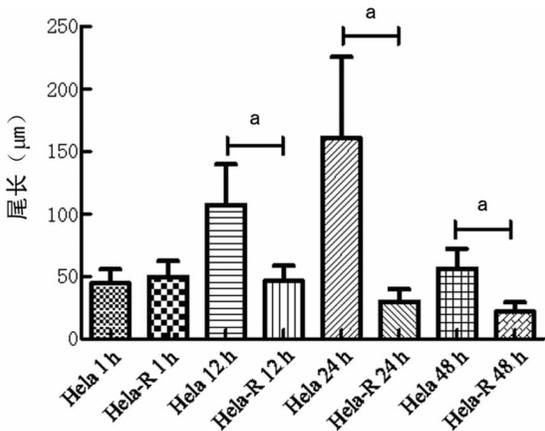
图 4 X 射线照射后 Hela 与 Hela-R 细胞株的细胞周期情况

2.5 彗星实验 Hela-R 细胞株的彗星荧光图像在 1、12、24、48 h 时, 尾长 (Tail length) 分别为 (49.42 ± 12.99) μm 、



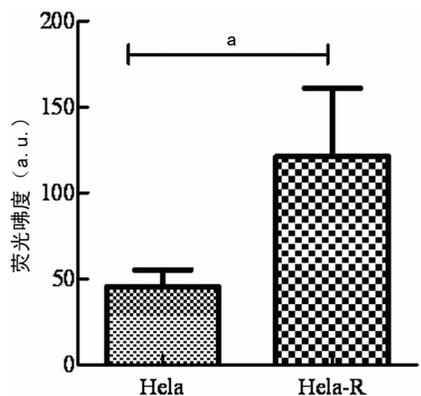
A: Hela X 射线照射 1 h 后; B: Hela-R X 射线照射 1 h 后; C: Hela X 射线照射 12 h 后; D: Hela-R X 射线照射 12 h 后; E: Hela X 射线照射 24 h 后; F: Hela-R X 射线照射 24 h 后; G: Hela X 射线照射 48 h 后; H: Hela-R X 射线照射 48 h 后。

图 5 X 射线照射后 Hela 与 Hela-R 细胞株的彗星荧光图像



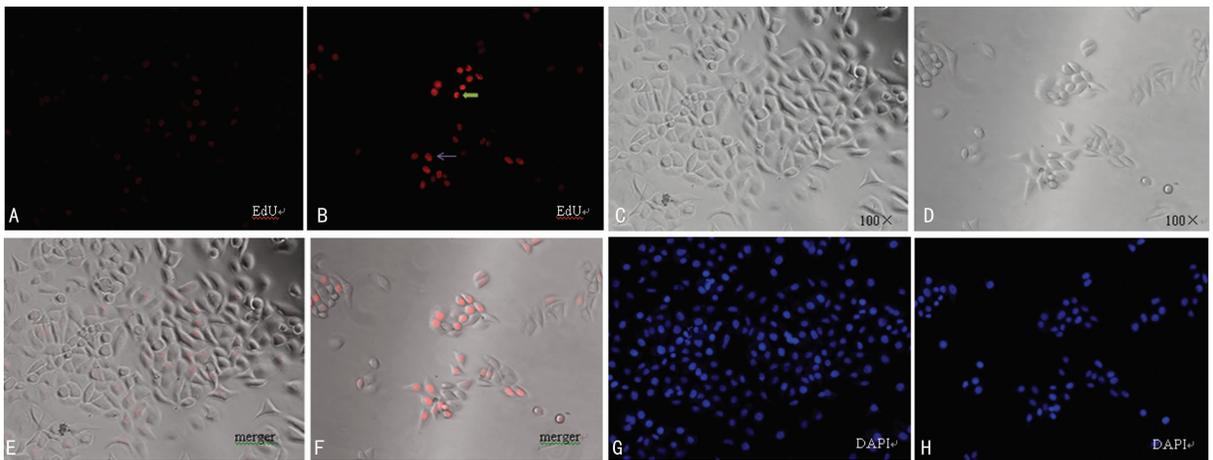
^a: $P < 0.01$.

图 6 X 射线照射后 Hela 与 Hela-R 细胞株的彗星尾长



^a: $P < 0.01$.

图 7 X 射线照射后 Hela 与 Hela-R 细胞株的 EdU 掺入荧光强度



A: HeLa X 射线照射 1 h 后 EDU 染色; B: HeLa-R 射线照射 1 h 后 EDU 染色; C: HeLa X 射线照射 1 h 后光镜形态; D: HeLa-R X 射线照射 1 h 后光镜形态; E: HeLa X 射线照射 1 h 后融合; F: HeLa-R X 射线照射 1 h 后融合; G: HeLa X 射线照射 1 h 后 DAPI 染色; H: HeLa X 射线照射 1 h 后 DAPI 染色。

图 8 X 射线照射后 HeLa 与 HeLa-R 细胞株的 EdU 掺入图像

3 讨论

宫颈癌治疗放射治疗失败的主要原因为肿瘤未控与局部复发。目前认为放疗未控与放射后肿瘤细胞后期加速增殖相关,而对于局部复发的解释存在多种假说,其中以“肿瘤放疗筛选”与“辐射致肿瘤突变”学说影响较大^[5-6]。这两个学说均认为放疗后产生了不同于亲本的异质细胞,称之为获得性放疗抗拒细胞。

目前国内外学者针对头颈部鳞癌、非小细胞肺癌、食道癌、鼻咽癌等多种恶性肿瘤^[7-10],都有建立获得性放疗抗拒细胞株的报道。本文以宫颈癌 HeLa 细胞株系常规剂量多次筛选法建株,通过放射后细胞的克隆形成能力判断放射抗拒性。经 2 Gy 25 次诱导建立的 HeLa-R, 2 Gy 照射后克隆形成能力为亲本的 1.55 倍。流式细胞仪检测显示,在给予 6 Gy X 射线照射后 24 h, HeLa-R 细胞株的早、晚期凋亡率都明显少于亲本细胞,提示 X 射线对 HeLa-R 细胞株的杀伤作用相对较弱,而杀伤效果与放疗后 DNA 损伤修复密切相关。

本研究细胞周期检测的结果显示, HeLa-R 细胞株在放疗(6 Gy) 12~48 h 内出现了强烈的 G₂ 期阻滞。进一步通过 CCK-8 观察放疗(6 Gy)后 72 h 的增殖变化,本研究发现放疗后 HeLa 细胞株的增殖从未停止,而 HeLa-R 细胞株在 48 h 与 24 h 相比,出现了增殖的负增长。而 72 h 又恢复了增殖,但没有亲本的速度快,表现为“先快、中退、后慢”。上述结果提示, HeLa-R 细胞在放疗后的 G₂ 期阻滞,导致了其 48 h 时增殖抑制。目前研究认为在抑癌基因 P53 功能缺失的细胞中^[11], DNA 损伤 G₁ 期检查点缺失, DNA 损伤只能依靠 G₂ 期检查点,所以存在 DNA 损伤的细胞大量停滞于 G₂ 期,进行 DNA 损伤的修复。这就说明 HeLa-R 细胞株通过 G₂ 期阻滞,获得了 DNA 损失的修复时间。

随后,彗星实验更直接地观察了 DNA 损伤修复的情况。在放疗(6 Gy)后 1、12、24、48 h 4 个观察时间点上,本文分析了 HeLa 与 HeLa-R 细胞株的彗星尾长,结果显示 HeLa-R 细胞株随着时间的变化,尾长明显缩短。EdU 是一种胸腺嘧啶核苷酸类似物,能够在 DNA 损伤后代替胸腺嘧啶(T)掺入正在修复的 DNA 分子中,利用 EdU 与 Apollo 荧光染料的特异性反

应检测 DNA 损失的修复^[12]。本研究在检测过程中排除了处于 DNA 合成期的细胞(图 7B 中绿色粗箭头)。统计结果显示, HeLa-R 细胞株在放疗 1 h 后,吸收了更多的 EdU 用于 DNA 的修复。以上实验结果,说明 HeLa-R 细胞株在 DNA 损伤修复能力上优于其亲本细胞。

综上,本研究成功建立了人宫颈癌放射抗拒细胞,为宫颈癌获得性放射抗拒研究提供了良好的细胞模型,其放射抗拒性的产生与 G₂ 期阻滞、DNA 损伤修复密切相关。这些现象为进一步探讨宫颈癌细胞获得性放射抗拒提示了路径与方向。

参考文献:

- [1] 李小梅,焦顺昌,王景文. 哈里森肿瘤学手册[M]. 北京:人民军医出版社,2010:542.
- [2] 殷蔚伯,谷铎之. 肿瘤放射治疗学[M]. 4 版. 北京:中国协和医科大学出版社,2007:1007-1045.
- [3] 姚莉. 脂质体联合超声介导质粒 R-Caspase3 转染宫颈癌细胞的实验研究[J]. 激光杂志,2010,31(2):71-72.
- [4] 陈媛媛,汤金梁,龙海霞,等. 低剂量超微分割与常规分割放疗对脑胶质瘤细胞的生物学效应比较[J]. 第三军医大学学报,2012,34(11):1026-1030.
- [5] Perarce AG, Segura TM, Rintala AC, et al. The generation and characterization of a radiation-resistant model system to study radioresistance in human breast cancer cells [J]. Radiat Res, 2001, 156(6):739-750.
- [6] Wei K, Kodym R, Jin C. Radioresistant cell strain of human fibrosarcoma cells obtained after long-term exposure to x-rays [J]. Radiat Environ Biophys, 1998, 37(2):133-137.
- [7] Skvortsov S, Jimenez CR, Knol JC, et al. Radioresistant head and neck squamous cell carcinoma cells: intracellular signaling, putative biomarkers for tumor recurrences and possible therapeutic targets [J]. Radiother Oncol, 2011, 101(1):177-182.
- [8] Lee YS, Oh JH, Yoon S, et al. Differential(下转第 1376 页)

3 讨 论

流行病学调查和实验研究证实,蔬菜、水果等植物性食物的摄入量与许多慢性病特别是肿瘤的发病率呈负相关,这使得人们认识到,存在于这些食物中的某些活性成分对于人类健康极为重要^[8],植物类黄酮就是这些重要活性化合物中的一类。植物类黄酮为一大类天然植物多酚化合物,种类繁多,但这些化合物分子结构中都具有 C6-C3-C6 碳架的基本结构特征^[9]。乳腺癌是世界范围内导致女性死亡的主要癌症,探讨如何通过膳食营养途径有效防治乳腺癌,对于维护女性生命健康具有积极意义。

MicroRNAs 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链小 RNA 分子,它可以与其靶 mRNA 的 3' 端非特异区结合,并招募相关活性蛋白质,进而引起靶 mRNA 降解,抑制靶基因的蛋白质翻译,发挥转录后基因表达调控作用。越来越多的研究显示,miRNAs 在众多细胞生命过程中发挥重要作用,对于细胞周期调控、细胞增殖、分化、凋亡以及干细胞特性等都具有显著影响,而 microRNA 的异常表达和调控在很多疾病特别是肿瘤的发生、发展过程中发挥明显作用,因此成为近期肿瘤研究中的一个热点。某些 microRNAs 在多种肿瘤组织中显著高表达,发挥癌基因作用,目前对于 miR-21 的研究广受关注,miR-21 在乳腺癌、肺癌、直肠癌等多种癌组织细胞中高表达,特别是在乳腺癌发生、发展过程中,miR-21 的过量表达发挥着显著癌基因效应^[10-11],但其详细作用机制尚需要深入研究。植物黄酮化合物抗肿瘤研究一直备受关注,但其作用机制是否涉及对关键 microRNA 的影响研究较少。本研究结果表明,miR-21 在木犀草素诱导乳腺癌细胞凋亡过程中发挥重要作用,木犀草素至少部分是通过抑制 miR-21 的表达水平发挥促凋亡作用的。木犀草素是如何抑制 miR-21 的表达,其抗肿瘤作用机制是否还涉及对其他关键 microRNAs 的影响等,尚需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Kyle JA, Sharp L, Little J, et al. Dietary flavonoid intake and colorectal cancer: a case-control study[J]. *Br J Nutr*, 2010, 103(3): 429-436.
 - [2] Rao PS, Satelli A, Moridani M, et al. Luteolin induces apoptosis in multidrug resistant cancer cells without affecting the drug transporter function; Involvement of cell line-specific apoptotic mechanisms[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(11): 2703-2714.
 - [3] Zhao Y, Yang G, Ren D, et al. Luteolin suppresses growth and migration of human lung cancer cells[J]. *Mol Biol Reports*, 2011, 38(2): 1115-1119.
 - [4] Huang S, Guo W, Tang Y, et al. miR-143 and miR-145 inhibit stem cell characteristics of PC-3 prostate cancer cells[J]. *Oncology Reports*, 2012, 28(5): 1831-1837.
 - [5] Tang F, Zhang R, He Y, et al. MicroRNA-125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells[J]. *PloS one*, 2012, 7(5): e35435.
 - [6] 陈卫群, 孔德勇, 王卉, 等. 淋巴瘤患者循环 microRNA-21 的检测及其临床意义[J]. *重庆医学*, 2012, 41(6): 535-536.
 - [7] Chen Y, Liu W, Chao T, et al. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G[J]. *Cancer Lett*, 2008, 272(2): 197-205.
 - [8] Wang L, Lee IM, Zhang SM, et al. Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89(3): 905-912.
 - [9] Fink BN, Steck SE, Wolff MS, et al. Dietary flavonoid intake and breast cancer risk among women on Long Island[J]. *Am J Epidemiol*, 2007, 165(5): 514-523.
 - [10] Vicinus B, Rubie C, Faust SK, et al. MiR-21 functionally interacts with the 3'UTR of chemokine CCL20 and down-regulates CCL20 expression in miR-21 transfected colorectal cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2012, 316(1): 105-112.
 - [11] Yao Q, Xu H, Zhang QQ, et al. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4(PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 388(3): 539-542.
- (上接第 1373 页)
- gene expression profiles of radioresistant non-small-cell lung cancer cell lines established by fractionated irradiation; tumor protein p53-inducible protein 3 confers sensitivity to ionizing radiation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 77(3): 858-866.
- [9] 王艳, 吴清明, 童强, 等. 食管癌放射抗拒细胞 P-gp 和 GST- π 表达的研究[J]. *重庆医学*, 2008, 37(8): 825-827.
 - [10] 苏芳, 朱小东, 曲颂, 等. 人鼻咽癌放射抗拒细胞株建立及其细胞周期的观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(16): 1221-1224.

- [11] Kuntz K, O'Connell MJ. The G(2) DNA damage checkpoint; could this ancient regulator be the Achilles heel of cancer? [J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(15): 1433-1439.
- [12] Limsirichaikul S, Niimi A, Fawcett H, et al. A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(4): e31.

(收稿日期: 2012-12-02 修回日期: 2013-02-19)

(收稿日期: 2012-10-28 修回日期: 2013-02-23)