

自噬活性的降低增加人鼻咽癌 CNE-2 细胞的放射敏感性

卢小迪 朱小东 赵伟 曲颂 梁霞 苏芳

【摘要】 目的 研究自噬与人鼻咽癌 CNE-2 细胞放射敏感性之间的关系。方法 采用慢病毒介导的 RNA 干扰技术建立稳定沉默自噬相关基因 ATG5 的人鼻咽癌 CNE-2 细胞系,实验分为未转染的 CNE-2 细胞组(对照组)、转染 NC-shRNA 的 CNE-2 细胞组(NC 组)及转染 ATG5-shRNA 的 CNE-2 细胞组(ATG5 组),应用 CCK-8 法、流式细胞术及克隆形成实验检测细胞增殖、凋亡及放射敏感性的变化。结果 CCK-8 实验结果显示,与对照组和 NC 组相比,各剂量点 ATG5 组的细胞存活率均显著降低($F = 3.755, 46.086, 8.609, 44.160, P < 0.05$),绘制细胞生存曲线可见下调 ATG5 的表达后可以增加 CNE-2 细胞的放射敏感性;流式细胞术结果显示,经 6 Gy X 射线照射后,ATG5 组细胞的凋亡率较 NC 组及对照明显升高($F = 394.876, P < 0.05$);克隆形成实验结果提示沉默 ATG5 基因可增加鼻咽癌 CNE-2 细胞的放射敏感性。结论 降低鼻咽癌 CNE-2 细胞的自噬活性可以增强其放射敏感性。

【关键词】 ATG5; 自噬; 鼻咽癌; 放射敏感性

Suppression of autophagy activity enhances the radiosensitivity of human nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells Lu Xiaodi, Zhu Xiaodong, Zhao Wei, Qu Song, Liang Xia, Su Fang. Department of Radiotherapy, The Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, 530021 Nanning, China
Corresponding author: Zhu Xiaodong, Email: zhuxiaodong83@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of autophagy in radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells. **Methods** The expression of ATG5 in CNE-2 cells was inhibited by lentiviral mediated RNA interference. The cells were divided into three groups; control group, NC group and ATG5 group. Cell proliferation, apoptosis and radiosensitivity were detected by CCK-8 method, flow cytometry and colony-forming assay, respectively. **Results** Compared with the NC group and control group, the survival of ATG5-interfected cells was reduced ($F = 3.755, 46.086, 8.609, 44.160, P < 0.05$). After 6 Gy X-ray irradiation, the apoptosis index of the ATG5 group significantly higher than that of NC group and control group ($F = 394.876, P < 0.05$). In addition, the radiosensitivity of ATG5 group was also higher than that of control cells. **Conclusions** Suppression of autophagy activity enhances the radiosensitivity of human nasopharyngeal carcinoma cells.

【Key words】 ATG5; Autophagy; Nasopharyngeal carcinoma; Radiosensitivity

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是我国常见的恶性肿瘤,放射治疗是最有效的治疗手段。然而,研究表明,鼻咽癌组织中存在一定比例的放射抗拒细胞,严重制约了鼻咽癌的放射治疗疗效和预后^[1]。自噬(autophagy)是细胞内物质代谢的一种方式,维持细胞内环境的稳定,被证实与多种肿瘤的发生发展密切相关^[2]。本课题组首次探讨自

噬与鼻咽癌的关系,并经过前期实验证实:射线可以引起鼻咽癌 CNE-2 细胞发生自噬现象,且利用自噬的化学抑制剂抑制自噬后,可以增加鼻咽癌 CNE-2 细胞的放射敏感性^[3-5]。基于前期基础,本研究采用慢病毒介导的 RNA 干扰方式沉默自噬相关基因 ATG5,以此降低鼻咽癌 CNE-2 细胞的自噬活性,进一步探讨自噬在射线所致鼻咽癌 CNE-2 细胞死亡过程中的作用,为提高鼻咽癌放射敏感性提供新的思路和理论基础。

材料与方法

1. 材料与试剂:人鼻咽癌 CNE-2 细胞购自中国

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5098.2015.06.005

基金项目:国家自然科学基金(81160285);广西壮族自治区自然科学基金(桂科自 2010gxnsfa013240)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学附属肿瘤医院 广西壮族

自治区肿瘤防治研究所放疗科

通信作者:朱小东,Email: zhuxiaodong83@163.com

科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;以 PGCSIL-GFP 为载体,针对 ATG5 基因(Gene ID:NM_004849.2)构建 shRNA 干扰的慢病毒重组质粒,并包装成 ATG5 shRNA 和阴性对照 shRNA(negative control shRNA,NC-shRNA)慢病毒。病毒载体的构建及包装交由上海吉凯基因化学技术有限公司负责。引物的设计与合成、RT-PCR 试剂盒均由日本 TaKaRa 公司提供;Odyssey 凝胶成像系统购自美国 LI-COR 公司;CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所;Annexin V-PE 凋亡检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司;兔抗人 ATG5 单克隆抗体、兔抗人 GAPDH 及抗兔红外荧光二抗均购自美国 CST 公司;兔抗人微 MAP1LC3 单克隆抗体(L7543)购自美国 Sigma 公司;Precise LINAC 高能直线加速器,购自瑞典 Elekta 公司。

2. 细胞培养与照射条件:鼻咽癌 CNE-2 细胞接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养;采用 6 MV X 射线进行体外照射,源靶距 SSD = 100 cm,剂量率 200 cGy/min。

3. RNA 提取及 RT-PCR:按说明提取细胞总 RNA,根据 RT-PCR 试剂盒说明,反转录成 cDNA,进行 PCR 扩增。ATG5 上游引物:5' GCTGCACTTTA TTACCAAGCCTCTG 3',下游引物:5' AGCGTACT CAAATGGGTCAACATTC 3',产物大小 119 bp;内参 β-肌动蛋白上游引物:5' ACCGAGCGCGCTACAGC 3',下游引物:5' CTCATGCCAATGGTGAT 3',产物大小 180 bp。PCR 反应条件为 95℃ 30 s,1 个循环;95℃ 5 s,62℃ 30 s,40 个循环;95℃ 5 s,60℃ 1 min,1 个循环;50℃ 30 s,1 个循环。

4. 慢病毒感染与分组:感染前 1 d,将 CNE-2 细胞以 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中,每孔分别加入 20 μl 病毒液、200 μl 的 Polybrene、780 μl 无血清的 RPMI 1640,充分混匀后放入细胞培养箱培养。病毒感染 8 h 后,吸去病毒液并加入 2 ml 完全培养基继续培养,48 h 后荧光显微镜下观察。流式细胞仪分选出 GFP(+) 细胞扩大培养。实验分为未转染的 CNE-2 细胞组(对照组)、转染 NC-shRNA 的 CNE-2 细胞组(NC 组)、转染 ATG5-shRNA 的 CNE-2 细胞组(ATG5 组),每处理组设 3 个平行组。

5. Western blot 实验:提取各实验组 CNE-2 细胞总蛋白,BCA 法测定总蛋白浓度。蛋白 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,目的蛋白湿转至 0.22 μm

PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入 1:1 000 稀释的 ATG5 一抗、MAP1LC3 一抗及 GAPDH 一抗,4℃ 孵育过夜,TBST 漂洗后二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,Odyssey 凝胶成像系统扫描成像,进行灰度分析。每个独立实验重复 3 次。

6. CCK-8 实验:取对数生长期的待测细胞,以 3.0 × 10³/孔密度接种于 96 孔板内,每组设 5 个复孔。培养 24 h 后接受 X 射线照射(0、2、4、6、8 Gy),照射后 48 h 吸去孔内培养液,用 PBS 溶液清洗细胞 3 次,然后每孔缓慢加入 100 μl RPMI 1640 和 10 μl CCK-8,置于细胞培养箱中培养 1 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度(A)值,计算出细胞存活率。细胞存活率(%) = (实验组 A 值/对照组 A 值) × 100%。

7. 细胞凋亡检测:取 0、6 Gy 照射处理后的各实验组细胞,用 PBS 洗 1 次,加入胰酶(不含 EDTA)消化、重悬、计数,2 000 r/min,1 800 × g 离心 5 min,收集 1.0 × 10⁶ 个细胞,用 PBS 洗一遍后用 1 × 结合缓冲液再洗 1 次,100 μl 细胞悬液加入 5 μl ANNEXIN V,室温孵育 10 ~ 15 min 后用 1 × 结合缓冲液清洗细胞,再用 200 μl × 结合缓冲液重悬细胞,加入 5 μl 7-AAD,4 h 内流式细胞仪检测,避光保存于 2 ~ 8℃。

8. 克隆形成实验:取对数生长期待测细胞,胰酶消化后计数,将不同数目的细胞种植于 6 孔细胞培养板,每孔 2 ml 单细胞悬液。根据不同细胞数目给予不同的吸收剂量(种植的细胞数分别为 200、200、400、600、1 000、5 000,吸收剂量分别对应为 0、1、2、4、6、8 Gy),照射后培养 14 d。14 d 后弃去培养液,蒸馏水冲洗 2 次,甲醇固定 30 min,姬姆萨溶液染色 30 min,计数所形成的集落数(≥50 个细胞数的集落为有效的集落),计算存活分数 SF 和集落形成率 PE。SF(%) = 实验组集落形成率/对照组集落形成率,PE(%) = 形成集落数/种植细胞数。在 GraphPad Prism 5.0 软件中,使用线性二次模型 $y = \exp[-(\alpha x + \beta x^2)]$ 计算放射生物学参数并拟合剂量存活曲线。

9. 统计学处理:采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 慢病毒感染对 ATG5 mRNA 和蛋白表达的影响:RT-PCR 结果见图 1。ATG5 组与对照组、NC 组

相比,ATG5mRNA 的表达受到了明显的抑制,抑制率为 72.5% ($F = 37.501, P < 0.05$),而 NC 组和对照组间差异无统计学意义。ATG5 蛋白的表达情况如图 2 所示,ATG5 组细胞中 ATG5 蛋白表达量上较对照组、NC 组细胞组亦明显下降 ($F = 23.097.179, P < 0.05$)。由此可见,自噬相关基因 ATG5 被明显抑制,慢病毒表达载体构建成功。

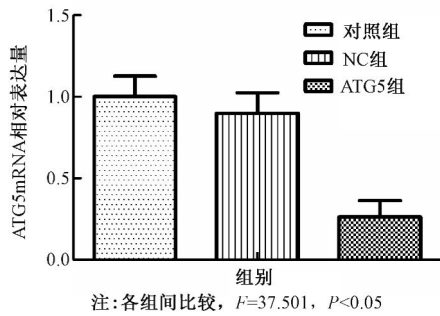


图 1 RT-PCR 检测各组 ATG5mRNA 相对表达量

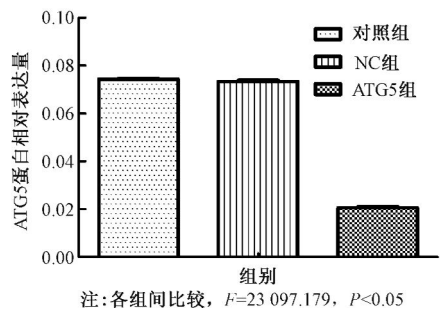


图 2 各组 ATG5 蛋白的表达情况

2. 自噬活性的降低对鼻咽癌 CNE-2 细胞增殖的影响:对照组、NC 组及 ATG5 组分别接受 0、2、4、6、8 Gy 的 X 射线照射,应用 CCK-8 实验检测细胞射线照射前后的增殖与存活情况。结果发现,随着照射剂量的增加,CNE-2 细胞的存活率是随之下降的,比较各个剂量点 3 组细胞的存活率可发现,与未转染的对照组和阴性对照 NC 组相比,射线照射后 ATG5 组的细胞存活率明显降低 ($F = 3.755、46.086、8.609、44.160, P < 0.05$,表 1),以细胞在不同剂量的存活率绘制细胞生存曲线(图 3),可见下调 ATG5 的表达后可以增加鼻咽癌 CNE-2 细胞的放

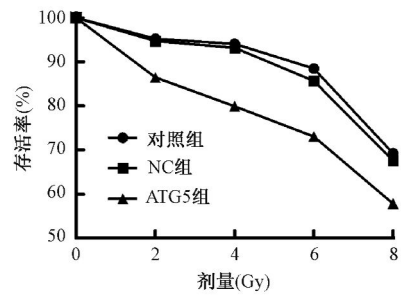


图 3 不同剂量照射后各实验组细胞的生存曲线

射敏感性。

3. 流式细胞术检测 ATG5 沉默后鼻咽癌 CNE-2 细胞的凋亡变化情况:对照组、NC 组及 ATG5 组分别接受 0、6 Gy 的 X 射线照射,应用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。结果显示,未照射时,对照组、NC 组、ATG5 组细胞凋亡率分别是 $7.60\% \pm 1.23\%、8.63\% \pm 0.68\%、9.67\% \pm 1.50\%$,各实验组间比较,差异无统计学意义。而经 6 Gy 射线照射后,对照组、NC 组、ATG5 组细胞凋亡率分别是: $12.13\% \pm 0.67\%、11.07\% \pm 1.46\%、30.1\% \pm 0.20\%$,可见与 NC 组及对照组相比,ATG5 组凋亡率明显升高 ($F = 394.876, P < 0.05$),提示射线照射时抑制自噬相关基因 ATG5 的表达可以促进鼻咽癌 CNE-2 细胞发生凋亡(图 4)。

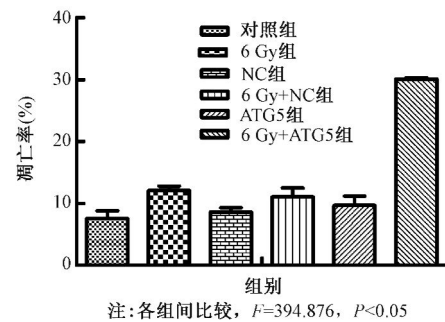


图 4 X 射线照射前后各实验组细胞凋亡率

4. 克隆形成实验检测转染前后 CNE-2 细胞的放射敏感性:各组细胞分别接受 0、1、2、4、6、8 Gy 的 X 射线照射,培养 14 d 后观察细胞克隆形成情况,在 GraphPad Prism 5.0 软件中,使用线性二次模型

表 1 CCK-8 法检测不同射线照射后各实验组细胞的存活率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
对照	5	1.00 ± 0.02	0.96 ± 0.03	0.95 ± 0.02	0.89 ± 0.76	0.70 ± 0.03
NC	5	1.00 ± 0.29	0.93 ± 0.05	0.91 ± 0.43	0.85 ± 0.09	0.66 ± 0.02
ATG5	5	1.00 ± 0.30	0.86 ± 0.09	0.80 ± 0.01	0.73 ± 0.01	0.58 ± 0.01
F 值		0.045	3.755	46.086	8.609	44.160
P 值		0.957	0.048	0.000	0.003	0.000

计算放射生物学参数并拟合剂量存活曲线,分别求出放射生物学参数 α 、 β 、 α/β 和 SF_2 值。通常应用 SF_2 和 α/β 比值来衡量放射敏感性和照射细胞生物学效应的指标。 SF_2 值越小,细胞对射线越敏感。 α/β 比值越大,细胞修复能力越弱,对射线越敏感。结果显示,对照组、NC 组及 ATG5 组的 SF_2 值分别是 0.606、0.595、0.386; α/β 比值分别是 4.038、4.175、18.107。与对照组和 NC 组相比,ATG5 组 SF_2 值明显降低 ($F = 51.244, P < 0.05$)、 α/β 比值增高 ($F = 17.184, P < 0.05$)。拟合剂量存活曲线如图 5 所示,抑制自噬相关基因 ATG5 的表达,降低了自噬活性,可以提高鼻咽癌 CNE-2 细胞的放射敏感性。

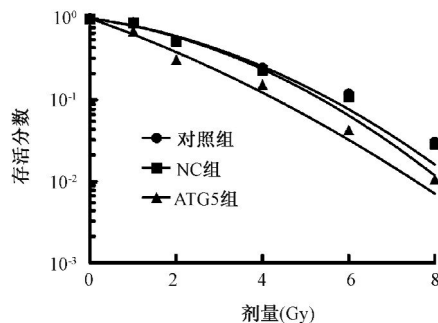


图 5 各组细胞的剂量存活曲线

讨 论

鼻咽癌是来源于鼻咽上皮细胞的恶性肿瘤,病理类型多为低分化鳞状细胞癌,放射治疗是目前最有效的治疗手段。然而,单纯放射治疗局部晚期鼻咽癌的 5 年生存率只有 32% ~ 52%^[6-7]。研究发现,放射抗拒是鼻咽癌残留及局部复发的主要原因之一^[8]。因此,有关放射抗拒的研究即成为众多肿瘤放射治疗学者研究的重点。自噬是细胞内初级溶酶体降解内源性底物的生理过程,是近年来研究的热点,其被认为不仅可以通过清除细胞内的废物、维持细胞内环境的稳定而影响细胞的生长发育,而且参与了多种疾病及肿瘤的发生、发展过程^[9]。研究证实,在多种人类肿瘤中均存在自噬活性的改变^[10]。然而,目前对于自噬与肿瘤发生、发展之间的关系尚无统一结论。部分学者认为,自噬的降解作用可以清除肿瘤细胞因代谢应激,如饥饿、电离辐射、药物等应激条件刺激下引起的基因组异常、受损的线粒体或大分子,从而减缓基因突变的速率,阻断线粒体的凋亡信号传导,保证癌细胞的生长^[11]。而另一部分学者则认为,自噬可清除

受损的细胞器,或者通过抑制细胞生长,诱发凋亡性细胞死亡来抑制肿瘤的发生。

本课题组预探讨自噬在鼻咽癌放射治疗过程中的作用,并经过前期实验证实,电离辐射可以诱导鼻咽癌 CNE-2 细胞发生自噬现象,并且通过自噬化学抑制剂 CDP 降低自噬活性后,可以增加鼻咽癌 CNE-2 细胞的放射敏感性^[3-5]。本研究基于前期基础,从基因水平进一步验证自噬与鼻咽癌 CNE-2 细胞放射敏感性之间的关系。目前为止,科学家们已发现不少于 34 个自噬相关基因 (autophagy-related gene, ATG),它们广泛地参与了自噬的各个不同阶段,在自噬这一现象中扮演着非常重要的角色,调控着自噬的发生发展过程。在众多的自噬相关基因中,ATG5 被证实是一个非常重要的角色。研究发现,ATG5 与 ATG12 在自噬体形成前期共同形成了自噬共轭连接体 ATG12-ATG5,进而促进了自噬体膜结构的延伸和自噬体的形成^[12-13]。本研究选取自噬相关基因 ATG5 为切入点,通过慢病毒介导的 RNA 干扰技术沉默 ATG5 基因,并通过实验证明了 ATG5 基因沉默可以降低自噬标志物 LC3 II 蛋白的表达,降低自噬活性^[14],从而进一步研究自噬对鼻咽癌 CNE-2 细胞放射敏感性的影响。其中,应用 CCK-8 实验检测细胞经不同剂量射线照射前后的增殖与存活情况,结果显示,抑制自噬相关基因 ATG5 的表达后,与未转染的对照组和阴性对照 NC 组相比,CNE-2 细胞的存活率明显降低,以细胞在不同剂量的存活率绘制细胞生存曲线,也可见下调 ATG5 的表达后可以增加鼻咽癌 CNE-2 细胞的放射敏感性。另外,流式细胞术检测各实验组细胞照射前后的凋亡情况,可知经 6 Gy 射线照射后,与 NC 组及对照组相比,ATG5 组凋亡率明显升高,提示 6 Gy 照射时抑制 ATG5 表达促进了 CNE-2 细胞凋亡,即降低 ATG5 的表达可以增加射线所致的细胞凋亡。克隆形成实验结果也提示,在各照射剂量点,沉默自噬相关基因 ATG5 可以增加鼻咽癌 CNE-2 细胞的放射敏感性。这一结果与课题组前期结果相符,从而可初步推断,自噬在射线所致的鼻咽癌 CNE-2 细胞死亡过程中起保护性作用。

目前,有关自噬在肿瘤放射治疗中作用的研究受到关注,自噬的作用也被认为具有双向性。一方面,干扰自噬现象可以提高肿瘤细胞的放射敏感性^[15-16]。Chen 等^[17]发现,应用自噬抑制剂 3-MA 联合放疗可以增加食管癌细胞的凋亡,抑制自噬可以

增加放疗引起的食管癌细胞毒性作用,并且使细胞周期停滞在 G₂/M 期,进而增加了食管癌的放射敏感性;另一方面,研究显示,自噬表现更多的是具有杀伤细胞的潜能^[18]。Cao 等^[19]发现,通过 mTOR 抑制剂雷帕霉素和 RAD001 可以提高乳腺癌细胞的放疗疗效。本研究的实验结果与 Chen 等^[17]的结果一致,但仍需后期的体内实验、临床实验等反复论证。期待通过系统严谨的研究,可以揭示自噬与鼻咽癌放射治疗间的关系,使其成为提高临床鼻咽癌放射治疗疗效的方法之一。

参 考 文 献

- [1] 高云生,应红梅,熊小鹏,等. 局部晚期鼻咽癌放疗与化疗综合治疗的生存分析[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2007, 16(4):241-244.
- [2] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.
- [3] 潘闻燕,朱小东,赵伟,等. 不同浓度二磷酸氯喹和雷帕霉素对 CNE-2 细胞自噬的影响[J]. 中国癌症防治杂志, 2011, 3(4):280-283.
- [4] 周支瑞,朱小东,赵伟,等. 自噬抑制剂磷酸氯喹增加鼻咽癌 CNE-2 细胞株的放射敏感性[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2012, 32(5): 449-454
- [5] 朱小东,潘闻燕,赵伟,等. 细胞自噬在照射所致 CNE-2 细胞凋亡过程中的作用[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2012, 21(3):221-222.
- [6] Al-Sarraf M, Leblanc M, Giri PG, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099[J]. J Clin Oncol, 1998, 16(4): 1310-1317.
- [7] Baujat B, Audry W, Bourhis J, et al. Chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: An individual patient data meta-analysis of eight randomized trials and 1753 patients[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2006, 64(1): 47-56.
- [8] Wu P, Zhang H, Qi L, et al. Identification of Erp29 as a biomarker for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy[J]. Oncol Rep, 2012, 27(4): 987-994.
- [9] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2):124-131.
- [10] Ogier-Denis E, Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1603(2): 113-128.
- [11] Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes[J]. J Cell Biol, 1962, 12(1):198-202
- [12] Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F. ATG systems from the protein structural point of view [J]. Chem Rev, 2009, 109(4): 1587-1598.
- [13] Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy[J]. Dev Cell, 2004, 6(4):463-477.
- [14] 卢小迪,朱小东,赵伟,等. 自噬相关基因 ATG5 沉默增加鼻咽癌裸鼠移植瘤的放射敏感性[J]. 上海医学, 2015, 38(2):151-154.
- [15] Apel A, Herr I. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy [J]. Cancer Res, 2008, 68(5): 1485-1494.
- [16] Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, et al. The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells[J]. Int J Cancer, 2009, 125(3):717-722.
- [17] Chen YS, Song HX, Lu Y, et al. Autophagy inhibition contributes to radiation sensitization of esophageal squamous carcinoma cells[J]. Dis Esophagus, 2011, 24(6):437-443.
- [18] Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy [J]. Apoptosis, 2009, 14(4):376-391.
- [19] Cao C, Subhawong T, Albert JM, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2006, 66(20): 10040-10047.

(收稿日期:2014-11-17)

欢迎投稿 欢迎订阅

www.cjrmp.net

北京市德外新康街 2 号

邮编:100088

邮箱:cjrmp@cjrm.p.sina.net

电话:010-62389620

邮发代号:18-93