

下调VEGF表达影响鼻咽癌细胞放射敏感度的机制

李欣, 杨丽, 尹宜发, 胡艳, 钱莉, 杨凡, 丰大利, 周海波

Down-regulating VEGF Expression Enhances Radiosensitivity of Human Nasopharyngeal Carcinoma Cells by RNA Interference

LI Xin, YANG Li, YIN Yifa, HU Yan, QIAN Li, YANG Fan, FENG Dali, ZHOU Haibo

The Second Hospital, Cancer Hospital of Yichang, Yichang 430023, China

Corresponding Author: ZHOU Haibo, E-mail: 276165915@qq.com

Abstract: Objective To investigate the effect and possible mechanism of vascular endothelial growth factor (VEGF) down-regulated by small interfering RNA-mediated RNA interference (SiRNAi) on the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line CNE-2. **Methods** pVEGF-siRNA (CNE-2 group), pNeg-siRNA (CNE-2/Neg-siRNA group), and CNE-2 cells transfected with VEGF and siRNA (CNE-2/VEGF-siRNA group) were constructed. Cell clonality was calculated by colony-forming unit assay after 6MV-X-ray irradiation with 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy respectively. The changes of cell cycle phase and apoptosis were determined using flow cytometry. Cyclin D1, Cyclin E, P16 and P53 were respectively measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Cell survival rate of CNE-2/VEGF-siRNA group was significantly decreased than those of CNE-2 and CNE-2/Neg-siRNA group after 6MV X-ray irradiation with 0, 2, 4, 6, 8, 10 Gy. All the values of radiobiological parameters including D₀, D_q and SF₂ in CNE-2/VEGF-siRNA group were respectively lower than those in CNE-2 and CNE-2/Neg-siRNA groups. Cell cycle in CNE-2/VEGF-siRNA group was arrested in the G₁/S phase. Both VEGF mRNA and protein expression were significantly decreased in the experimental group compared with controls ($P < 0.05$). The proliferation of treated CNE-2 cells was inhibited *in vitro*. Among Cyclin D1, Cyclin E, p16 and p53 gene, Cyclin D1 mRNA expression was increased significantly at 6, 12, and 24 h after irradiation. Western blot showed that Cyclin D1 protein expression was increased significantly at 24h after irradiation. **Conclusion** Down-regulating VEGF expression could enhance the radiosensitivity of NPC cells which mechanism might be arresting NPC cells in G₁/S phase through Cyclin D1 signaling pathway.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Vascular endothelial growth factor; RNA interference; Radiosensitivity

摘要: 目的 应用RNA干扰技术抑制人鼻咽低分化鳞状上皮细胞癌细胞株CNE-2中血管内皮生长因子(VEGF)表达, 研究阻断VEGF基因表达对鼻咽癌细胞放射敏感度的影响及机制。**方法** 构建针对VEGF的siRNA真核表达载体pU-VEGF-siRNA(CNE-2组)、1个阴性对照质粒(CNE-2/Neg-siRNA组)、经脂质体转染至CNE-2细胞(CNE-2/VEGF-siRNA组), 用平板克隆形成实验检测在6MV-X线0、2、4、6、8、10 Gy照射后克隆形成能力及通过单击多靶模型、线性二次模型拟合放射生物学参数, 流式细胞检测分析细胞周期和细胞凋亡的变化, 用RT-PCR定量分析三组细胞中Cyclin D1、Cyclin E、P16和P53的mRNA表达。**结果** 经6MV-X线0、2、4、6、8、10 Gy照射后细胞存活率显著下降, CNE-2/VEGF-siRNA组细胞经D₀和2 Gy照射后的存活分数明显低于CNE-2组、CNE-2/Neg-siRNA组; CNE-2/VEGF-siRNA组中G₁/S期细胞周期阻滞更为明显。在Cyclin D1、Cyclin E、p16和p53基因中, Cyclin D1 mRNA表达在放疗后6、12和24 h进行性升高, 差异有统计学意义, 而其他基因变化差异无统计学意义, Western blot检测显示Cyclin D1蛋白表达在放疗后24 h明显升高。**结论** 下调VEGF表达可增加鼻咽癌细胞的放射敏感度, 其机制可能是通过Cyclin D1信号通路途径使细胞周期发生G₁/S期阻滞。

关键词: 鼻咽癌; 血管内皮生长因子; RNA干扰; 放射敏感度

中图分类号: R739.63 文献标识码: A

收稿日期: 2013-12-12; 修回日期: 2014-05-07

作者单位: 443000 湖北宜昌, 宜昌市第二人民医院·肿瘤医院

通信作者: 周海波, E-mail: 276165915@qq.com

作者简介: 李欣(1968-)男, 本科, 副主任医师, 主要从事头颈部肿瘤癌变机制与防治研究

0 引言

目前放射治疗为鼻咽癌的主要治疗手段, 放疗后局部区域复发是治疗失败的重要原因。鼻咽癌存在放射敏感度的个体差异^[1-2], 影响鼻咽癌放

射敏感度的主要因素包括肿瘤细胞乏氧、DNA损伤修复、细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期等^[3], 有文献报道血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 也在鼻咽癌中有不同程度表达, 并与鼻咽癌分期和放射敏感度密切相关^[4]。本研究的前期实验结果提示: 通过RNAi技术阻断VEGF的表达可改变鼻咽癌细胞的生长、增殖、迁徙等生物学行为^[5], 改变VEGF水平可能影响鼻咽癌细胞的放射敏感度, 但其分子机制尚不清楚^[6]。本研究进一步探讨VEGF表达水平与鼻咽癌细胞放疗敏感性的分子机制^[7], 为鼻咽癌的个体化治疗提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 稳定转染鼻咽癌细胞的构建

人鼻咽癌低分化上皮细胞株CNE-2, 细胞来源、真核表达载体pU-VEGF-siRNA的构建、基因转染与稳定筛选、鉴定方法详见文献^[5]。构建针对VEGF的siRNA真核表达载体pU-VEGF-siRNA细胞系, 分别设定CNE-2细胞实验组 (CNE-2组)、1个阴性对照质粒 (CNE-2/Neg-siRNA组) 和脂质体稳定转染VEGF的CNE-2细胞 (CNE-2/VEGF-siRNA组)。

1.2 平板克隆形成实验检测细胞存活分数和放射生物学参数

将对数生长期的3组细胞分别以2.5 g/L胰蛋白酶消化成单个细胞悬液, 并作梯度倍比稀释, 将不同剂量所对应的细胞数种植到直径100 mm的培养皿中 (0、2、4 Gy照射组接种200个细胞, 6 Gy照射组接种400个细胞, 8 Gy照射组接种600个细胞, 10 Gy照射组接种1000个细胞), 每皿生长约50~100个克隆的密度。每组各重复3次。待细胞贴壁后分别接受0、2、4、6、8、10 Gy单次照射 (6 MV-X射线, 剂量率为300 cGy/min)。静止培养2~3周, 当培养板出现肉眼可见的克隆时终止培养。PBS清洗后加甲醇1 ml固定15 min, 吉姆萨液染色。将培养皿置于低倍显微镜下标记大于50个细胞的克隆, 肉眼计数克隆数。以0 Gy组计算种植率: 种植率(%) = 克隆数/接种数×100%。并计算存活分数SF, $SF = \text{照射后形成克隆数} / (\text{接种细胞数} \times \text{细胞种植率})$ 。以SigmaPlot软件, 根据单击多靶模型 $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线, 得出 D_0 、 N 、 D_q 和2 Gy照射后的细胞存活分数 (surviving fraction after 2 Gy, SF2) 等参数; 根据线性二次模型 (L-Q模型) $SF = e^{-\alpha D - \beta D^2}$ 拟合曲线

得到各细胞的 α 、 β 、SF2值。

1.3 流式细胞技术分析细胞周期分布和细胞凋亡的影响

对数生长期的细胞用胰酶消化后, 以 1.0×10^5 /ml的密度传代、接种, 贴壁后加入RPMI 1640培养液培养24 h, 加入新培养液。培养至72 h, 胰酶消化成单细胞悬液, 冰PBS洗涤2次, $1\ 000\ g$ 离心5 min。弃上清液, 缓慢加入-20℃预冷的75%乙醇, 4℃保存。取细胞悬液, PBS洗涤, $2\ 000\ g$ 离心5 min后, 弃上清液。PI染液1.0 ml染30 min, 488 nm激发波长测定样品, 620 nm带通滤片检测PI荧光。每样本收集多于10 000个荧光信号, 得出各期细胞数占细胞总数的百分率^[5]。每组重复3次。

1.4 反转录PCR(RT-PCR)定量

CNE-2组、CNE-2/Neg-siRNA组和CNE-2/VEGF-siRNA组细胞分别以每孔 3×10^6 个细胞接种于6孔板, 细胞贴壁后予4 Gy照射剂量 (6 MV X射线), 以RT-PCR法分别检测照射前 (0 h) 及照射后6、12、24 h 4个时间点的三组细胞细胞周期相关调控因子的相对表达量^[5-8]。TRIzol试剂提取各组细胞总RNA, 使用紫外分光光度计调整RNA浓度为1 g/L, 以 β -actin为内参照, 在25 μ l体系中加入VEGF上下引物0.5 μ l, TaqDNA聚合酶1 μ l, 95℃预变性5 min后, 按94℃ 30 s, 58℃ 40 s, 72℃ 30 s, 扩增39个循环, 72℃延伸7 min。人VEGF、 β -actin引物由上海生工生物工程公司合成, VEGF上游引物为5'-ATGAACCTTCTGCTGTCTTGCG-3', 下游引物为5'-TCACCGCCTCGGCTTGTCACATC-3', 扩增产物片段长为576 bp。 β -actin上游引物为5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 下游引物为5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3', 扩增产物片段长为226 bp。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外灯下拍照, 根据各条带吸光度, 采用GEL-Pro Analyzer软件分析VEGF mRNA的表达水平。

1.5 Western blot分析

取对数生长期的CNE-2、CNE-2/Neg-siRNA和CNE-2/VEGF-siRNA细胞, 消化接种于6孔板, 待90%~95%的细胞融合后继续培养24h再提取蛋白。用Bradford法将所有蛋白调整至相同浓度性SDS-PAGE电泳, 电转移法转至经甲醛处理的PVDF膜中, 封闭2 h加入一抗 (兔抗人SHP-1、p53、Cyclin E和Cyclin D1单克隆抗体), TBST漂洗40 min, HRP标记的二抗孵育1 h漂洗45 min。暗室中行化学发光显影扫描图、用凝胶图像处理系统分析各条带的灰度值, 并根据相对灰度值进行统计分析^[5,8]。上述实

验独立重复3次。

1.6 统计学方法

以SPSS13.0软件进行统计分析,所有计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用t检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成率

3组细胞分别接受0、2、4、6、8、10 Gy单次照射,培养2周后均有克隆形成,其克隆形成率见表1。CNE-2/VEGF-siRNA组克隆形成率较对照组明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$),CNE-2组与CNE-2/Neg-siRNA组对比无明显差异。

2.2 放射生物参数计算结果

计算出不同剂量下的细胞存活率,经单击多靶模型拟合曲线显示,CNE-2组与CNE-2/Neg-siRNA组的放射生物学参数 D_0 、 N 、 D_q 和SF2值相似,见表2,而CNE-2/VEGF-siRNA组的上述参数均降低;同时从生存曲线上观察到CNE-2/VEGF-siRNA组的斜率较另二组明显增加,“肩宽”明显缩小变窄,各个剂量点存活分数均低于CNE-2组和CNE-2/Neg-siRNA组,而CNE-2组和CNE-2/Neg-siRNA组差异不明显,见图1。

表2 3组细胞单击多靶模型及线性二次模型拟合的相关参数
Table2 Radiobiological parameters from single hit multi-target model and linear-quadratic model in three groups

Groups	D_0	N	D_q	SF2
CNE-2	2.59	3.71	1.47	0.90
CNE-2/Neg-siRNA	2.49	3.90	1.41	0.89
CNE-2/VEGF-siRNA	1.60	3.33	0.84	0.68

2.3 细胞周期和细胞凋亡改变

通过流式细胞技术分析不同细胞组的细胞周期和细胞凋亡的影响,三组细胞中 G_0/G_1 、 G_2/M 和M期相对含量见表3。与CNE-2组、CNE-2/Neg-siRNA组相比,CNE-2/VEGF-siRNA组 G_0/G_1 其细胞含量明显增加,而M期细胞明显减少。三组细胞凋亡检测见图2,三组之间无明显差别。

2.4 细胞周期调控相关因子RT-PCR和Western blot检测

表1 三组细胞接受不同剂量照射后克隆形成率 ($\bar{x}\pm s, \%$)

Table1 Cloning efficiency of three groups after receiving different doses of radiation ($\bar{x}\pm s, \%$)

Groups	Radiation doses(Gy)					
	0	2	4	6	8	10
CNE-2	91.33 $\pm$ 3.21	79.00 $\pm$ 2.65	56.67 $\pm$ 4.25	30.58 $\pm$ 1.46	10.67 $\pm$ 2.25	7.63 $\pm$ 1.02
CNE-2/Neg-siRNA	89.33 $\pm$ 1.26	74.67 $\pm$ 1.52	54.33 $\pm$ 5.01	26.43 $\pm$ 2.46	7.06 $\pm$ 1.29	3.96 $\pm$ 0.67
CNE-2/VEGF-siRNA	84.50 $\pm$ 4.50	57.17 $\pm$ 4.37*	21.17 $\pm$ 5.35*	6.67 $\pm$ 1.84**	1.61 $\pm$ 0.25*	0.13 $\pm$ 0.05*

Notes: *: CNE-2/VEGF-siRNA group, the cloning efficiency after receiving 2, 4, 6, 8, 10 Gy radiation were markedly lower than others groups ($P<0.05$)

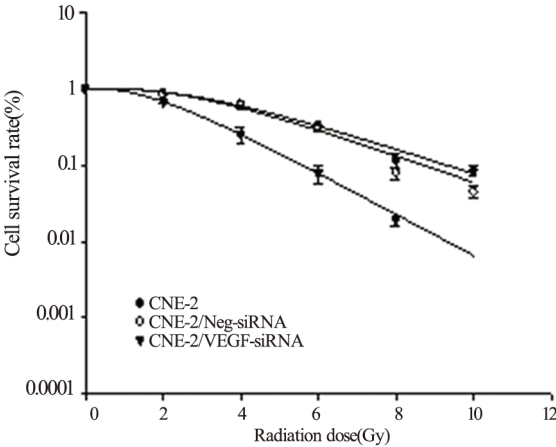


图1 CNE细胞系不同剂量照射后的存活曲线
Figure1 Cell survival curves of CNE cell lines after receiving different doses of radiation

表3 流式细胞技术分析三组细胞周期相对表达量 (%)
Table3 Cell expression in different cell cycles detected by flow cytometry (%)

Groups	G_0/G_1	G_2/M	M
CNE-2	40.00	14.95	44.96
CNE-2/Neg-siRNA	44.84	27.14	28.02
CNE-2/VEGF-siRNA	70.71	19.59	9.70

上述流式细胞技术细胞周期分布表明CNE-2/VEGF-siRNA组细胞发生 G_1/S 阻滞,因此选择参与 G_1/S 调控因子Cyclin D1、Cyclin E、p16和p53基因探讨可能信号通路。在这4个基因中Cyclin D1的灰度值在放疗后6、12和24 h进行性升高,并且差异有统计学意义,其他基因变化差异无统计学意义,见图3。通过Western blot检测提示Cyclin D1在照射后24 h明显升高,而Cyclin E和p53无明显变化,见图4。

3 讨论

放射抗拒是鼻咽癌治疗局部区域失败的原因之一,其抗拒的发生机制目前仍不清楚,寻找增加放射敏感度的方法是提高治愈率的途径之一。用肿瘤细胞内在放射敏感度的生物标志来预测鼻咽癌放疗的可治愈性是当前的研究热点。已有的研究表明肿瘤细胞乏氧相关因子(如乏氧诱导因子-1、血红素加氧酶1)、DNA损伤修复相关因子(如DNA依赖性蛋白激酶)、细胞增殖相关因子

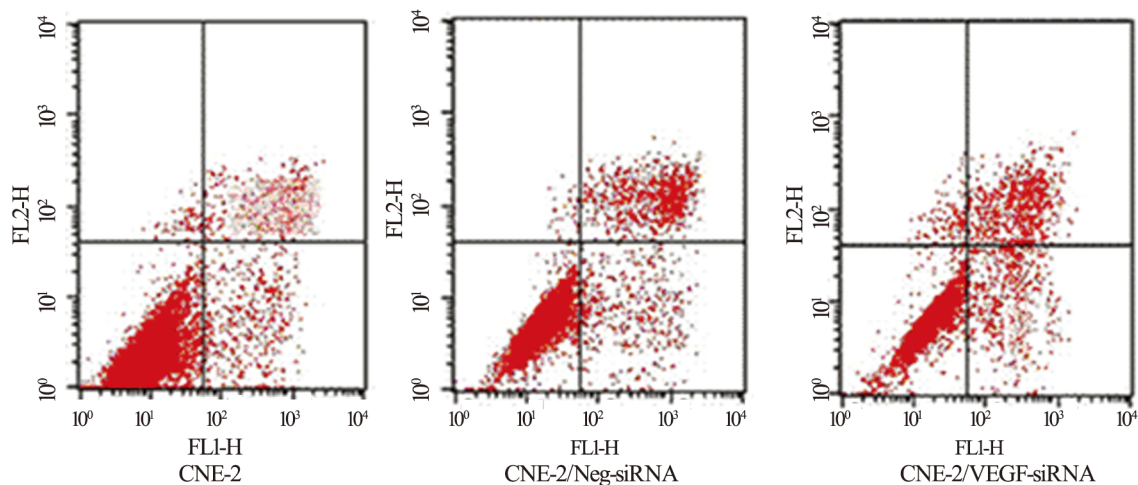
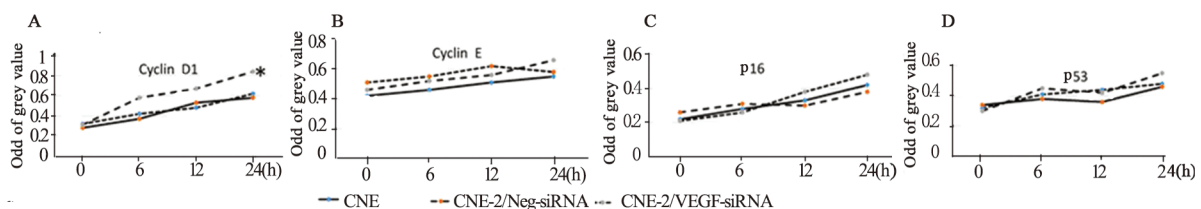


图2 CNE细胞系照射后流式细胞检测细胞凋亡

Figure2 Cell apoptosis of CNE cell line measured by flow cytometry after receiving various doses of radiation



*: $P < 0.05$

图3 RT-PCR检测CNE-2细胞系中的Cyclin D1、Cyclin E、p16和p53的灰度值

Figure3 The odds of gray value of Cyclin D1,Cyclin E , p16, and p53 in different CNE-2 lines measured by RT-PCR

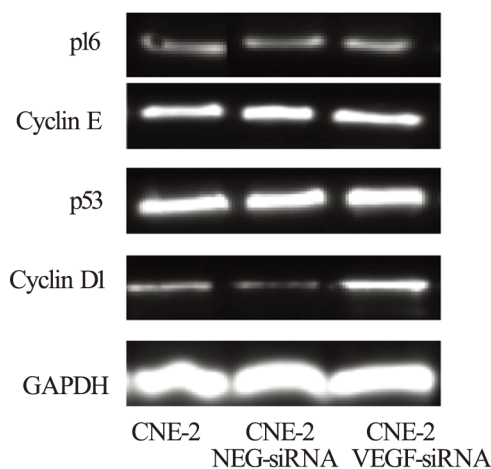


图4 Western blot检测CNE-2细胞系中的Cyclin D1,p16, Cyclin E和p53照射后24 h的表达

Figure4 Expression of Cyclin D1, p16, Cyclin E and p53 in CNE-2 cell line detected by Western blot after receiving irradiation for 24 h

(如增殖细胞核抗原、p53)、细胞凋亡相关因子(如Bcl-2和survivin)、细胞周期调控相关基因(如细胞周期素和细胞周期激酶等)与鼻咽癌的放射敏感性密切相关^[3]。实际上,肿瘤细胞对电离辐射反应呈现分子网络式的特点,网络通过相应节点密切联系且相互调控^[3],如与放射敏感性相关的某些信号通路发生改变,则可能影响这些信号

通路活化及其相关基因的表达。本研究通过下调VEGF的表达,探索VEGF参与鼻咽癌放射敏感度的分子生物学机制。

血管内皮生长因子在肿瘤血管生成方面有重要作用,有研究表明肿瘤组织的VEGF表达水平与放射敏感性呈负相关^[6-7]。对鼻咽癌、口腔癌、肺癌、食管癌、脑胶质瘤和黑色素瘤等的研究表明,阻滞VEGF的表达可增加射线对肿瘤细胞的杀伤力,即增加放射敏感性^[7]。本研究证实阻断VEGF表达提高了鼻咽癌的放射敏感性,阻断鼻咽癌细胞VEGF的表达导致其癌细胞发生细胞周期G₁/S阻滞。

细胞内存在一系列严密的调控机制确保细胞周期严格按照时相转换有序进行。已发现的与细胞周期调控有关的分子很多,主要包括细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子。此外,细胞周期检验点在肿瘤细胞和正常细胞中存在差异,细胞周期调控分子在癌症发生、发展过程中均起着重要作用^[8-9]。目前研究表明细胞主要存在G₁/S、S期和G₂/M三个检验点^[9],本研究表明VEGF与放射敏感度的关系主要是G₁/S检验点。本研究中主要检测了参与G₁/S细胞周期调控相关的因子Cyclin D1、Cyclin E、p16

和p53基因, 阻断VEGF表达后Cyclin D1在RNA和蛋白质水平上均有不同程度的升高, 而其他基因或蛋白如Cyclin E、p16和p53基因则无明显差别, 因此提示VEGF参与鼻咽癌放射敏感度的调控与Cyclin D1在RNA和蛋白质水平变化相关。

尽管本研究在RNA和蛋白水平上证实VEGF参与鼻咽癌放射敏感度的调控过程, 但是本研究尚存在以下不足之处: (1) 本研究仅为体外研究, 和体内的放射敏感度调节过程可能存在一定差异, 因此需进一步在临床上研究VEGF生物标志物及VEGF抑制剂对鼻咽癌疗效的影响; (2) VEGF参与鼻咽癌的放射敏感度的调控通路可能有多条, 本研究仅仅探讨了VEGF与鼻咽癌细胞周期的关系, 但是否参与其他通途如血管生成、肿瘤乏氧等尚需进一步探索; (3) 调控细胞周期的机制也十分复杂, 本研究的结果提示Cyclin D1是VEGF调控鼻咽癌的放射敏感度的因素之一, 但是否还有其他分子生物学机制仍需进一步研究。

总之, 本研究通过RNAi干扰技术阻断鼻咽癌细胞系CNE-2的VEGF表达, 表明鼻咽癌细胞中VEGF的表达增加了其放射敏感度, 可能通过细胞周期调控蛋白Cyclin D1的细胞周期调控信号通路发挥作用, 并发生了细胞G₁/S周期阻滞。研究结果为如何减低鼻咽癌放疗的放射抗拒、增加放射敏感度提供了一个参考。

参考文献:

- [1] Lee AW, Lin JC, Ng WT. Current management of nasopharyngeal cancer[J]. *Semin Radiat Oncol*, 2012, 22(3): 233-44.
- [2] Lee AW, Ng WT, Chan YH, *et al*. The battle against nasopharyngeal cancer[J]. *Radiother Oncol*, 2012, 104(3): 272-8.
- [3] Qu S. Advances in the molecular biological research on the radio-sensitivity of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Zhongguo Zhong Liu Lin Chuang*, 2012, 39(24): 2040-3. [曲颂. 鼻咽癌放射敏感性的分子生物学研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(24): 2040-3.]
- [4] Li YM, Lin XG, Luo M. Relationship of VEGF expression and MVD in TNM staging of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2009, 36(11): 973-5. [刘宜敏, 林显敢, 罗铭. 血管内皮生长因子表达及微血管密度与鼻咽癌TNM分期的关系[J]. *肿瘤防治研究*, 2009, 36(11): 973-5.]
- [5] Zhou Haibo, Wu Guang, Peng Gang, *et al*. Suppression of VEGF via RNA interference modulates the biological features of human nasopharyngeal carcinoma CEN-2 cell line[J]. *Lin Chuang Zhong Liu Xue Za Zhi*, 2008, 13(6): 485-90. [周海波, 伍钢, 彭纲, 等. siRNA抑制VEGF基因表达对鼻咽癌细胞生物学行为的影响[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2008, 13(6): 485-90.]
- [6] Ye WJ, Min HQ, Cao XP, *et al*. Correlations of bimolecular markers, such as P53 protein and vascular endothelial growth factor, to radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Ai Zheng*, 2006, 25(9): 1168-72. [叶伟军, 闵华庆, 曹新平, 等. P53蛋白、血管内皮生长因子等生物分子指标与鼻咽癌放射敏感性的关系[J]. *癌症*, 2006, 25(9): 1168-72.]
- [7] Yin L, Zhu GY. Advances of study in affecting factors of tumor radiosensitivity[J]. *Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi*, 2012, 19(8): 629-33. [尹丽, 朱广迎. 肿瘤放射敏感性影响因素的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2012, 19(8): 629-33.]
- [8] Peng G, Chen J, Zou ZW, *et al*. Expression and significance of SHP-1/p21/CDK6 /Cyclin D1 in nasopharyngeal carcinoma cells with different radiosensitivity[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2012, 39(10): 1193-6. [彭纲, 陈静, 邹枕玮, 等. SHP-1/p21/CDK6/Cyclin D1在不同放射敏感度鼻咽癌细胞中的表达[J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(10): 1193-6.]
- [9] Wang X. Research on the control of cell cycle and carcinogenesis[J]. *Zhongguo Min Kang Yi Xue*, 2010, 22(16): 2135-6. [王昕. 细胞周期调控与肿瘤发生的研究[J]. *中国民康医学*, 2010, 22(16): 2135-6.]

[编辑: 安 凤; 校对: 邱颖慧]