

网络出版时间: 2020-12-25 11:23 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201224.1107.022.html>

SIRT1 基因沉默对鼻咽癌 CNE-1 细胞放射敏感性的影响

肖 宁¹, 李 彬², 冯 勇², 余晓旭², 何 刚², 马志跃²

摘要 目的 探究 SIRT1 基因沉默对人鼻咽癌细胞 CNE-1 放射敏感性的影响,为鼻咽癌临床治疗提供新的思路。方法

通过 Western blot 检测鼻咽癌组织及鼻咽癌细胞中 SIRT1 蛋白的表达情况。通过脂质体转染 SIRT1 siRNA 至 CNE-1 细胞;利用 CCK-8 法和流式细胞术检测不同剂量(0.2、4.6、8 Gy)的 X 射线放射处理对 CNE-1 细胞增殖和凋亡的影响。采用 Western blot 检测 SIRT1 沉默后, X 射线放射对凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和 Cleaved-Caspase3 表达的影响。**结果** 鼻咽癌组织和鼻咽癌细胞中 SIRT1 蛋白的表达量高于癌旁组织及鼻咽正常上皮细胞 NP69 中的表达量($P < 0.05$)。靶向 SIRT1 基因的 siRNA 转染能特异性的抑制细胞中 SIRT1 的表达($P < 0.05$);4.6、8 Gy 剂量的 X 射线放射处理能降低 SIRT1 siRNA 组 CNE-1 细胞增殖率,并增加凋亡率($P < 0.01$)。用 X 射线照射 SIRT1 基因沉默的 CNE-1 细胞,能增加促凋亡蛋白 Bax 和 Cleaved-Caspase3 表达量,降低抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量($P < 0.05$)。**结论** SIRT1 基因沉默可能通过抑制 CNE-1 细胞增殖,并诱导细胞发生凋亡,从而增强 CNE-1 细胞对放疗的敏感性, SIRT1 基因有望成为鼻咽癌治疗的新靶点。

关键词 鼻咽癌; SIRT1; 基因沉默; 放射敏感性; 凋亡

中图分类号 R 739.62

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0287-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.022

鼻咽癌是由 EB 病毒感染诱发的头颈部恶性肿瘤。中国是鼻咽癌的高发地区,约占全球总发病人数的 40%^[1]。目前,临床上针对鼻咽癌的治疗措施主要是放疗和化疗。然而,由于鼻咽癌发病隐匿,大多数患者被确诊时已进入晚期,放化疗效果有限,导致预后差。因此,提高鼻咽癌放射敏感性,改善患者预后,成为当前肿瘤学领域亟待解决的问题之一。

沉默信息调节因子 2 相关酶 1(sirtuin 1, SIRT1)是一种 NAD⁺ 依赖性去乙酰化酶,是 sirtuins

家族的重要成员之一,其作用涉及细胞代谢、细胞增殖分化、细胞周期调节和细胞凋亡等多个发育过程^[2]。SIRT1 在鼻咽癌^[3]、胃癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中高表达,且其表达水平与肿瘤的进程呈正相关。有研究报道,沉默 SIRT1 基因可抑制弥漫大 B 细胞淋巴瘤 DLBCL 细胞的增殖,并增加放疗敏感性^[4],也可促进肝癌细胞凋亡^[5],但其对人鼻咽癌放射敏感性的影响还未见报道。因此,该研究拟运用 RNA 基因干扰技术沉默人鼻咽癌 CNE-1 细胞的 SIRT1 基因表达后,观察其对细胞放射敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 标本与细胞 选取 2018 年 1 月 1 日—12 月 31 日于四川省人民医院行手术切除的 20 例鼻咽癌患者的鼻咽癌组织及其对应的癌旁组织,所有组织切除后迅速置于液氮,之后转移至 -80 °C 冰箱中保存,用于后期实验检测。所选的 20 例鼻咽癌患者标本均为鼻咽部活检组织,经病理学检查确诊,组织学分型为非角化性未分化型鳞癌,所有鼻咽癌患者在术前均未接受任何治疗。人鼻咽正常上皮细胞 NP69 和鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、HNE-1 和 HNE-2 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。该研究经四川省人民医院医学伦理委员会批准,编号:伦审(研)2017-171。

1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清、MEM 培养基(美国 Hyclone 公司)、CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、总 RNA 提取试剂盒(上海碧云天生物公司)、PrimeScriptTM RT reagent Kit(日本 Takara 公司)、Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)、SIRT1 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体、Cleaved-Caspase3 抗体和 β -actin 抗体(英国 Abcam 公司)。RT-PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3 SIRT1-siRNA 分子合成 根据 siRNA 设计原则,设计针对 SIRT1 基因的 siRNA 序列。SIRT1 siRNA 序列:上游引物 5'-CCAAGCAGCUAAGAGUAA UTT-3';下游引物 5'-AUUACUCUUAGCUGCUUGG

2020-08-16 接收

基金项目:四川省卫生与计划生育委员会项目(编号:18PJ077)

作者单位:四川省医学科学院·四川省人民医院(电子科技大学附属医院)¹ 健康管理中心、² 耳鼻喉头颈外科,成都 610072

作者简介:肖 宁,男,主治医师;

马志跃,男,副主任医师,责任作者, E-mail: Mazhiybiology@163.com

TT-3'。对照组用 Negative control (NC-siRNA) 经 BLAST 查询,以上序列不与人类任何基因序列同源。核苷酸分子均由上海吉玛制药技术有限公司合成有效 siRNA 干粉制剂。

1.4 细胞培养与转染 将 NP69、CNE-1、CNE-2、HNE-1 和 HNE-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下孵育,待细胞生长至对数期时,进行传代或实验。转染前 24 h 将 CNE-1 细胞以 1.5 ml/孔接种于 6 孔板(或 75 μl/孔接种于 96 孔板),待细胞生长至 50% ~ 60% 汇合时转染。转染前细胞培养基更换为无抗培养基。以无血清和无双抗的 MEM 培养基混悬 siRNA (A 液),以 Opti-MEM 混悬 Lipo2000 (B 液),A 液和 B 液混匀后加入 6 孔板。转染 6 h 后即更换正常培养基继续孵育。

1.5 Western blot 实验 收集细胞,提取各组细胞或癌组织总蛋白,BCA 法对蛋白质进行定量,并用蛋白上样缓冲液(5×)变性样品,样品于 -20 °C 保存备用。使用等量蛋白质上样,选择 10% 的 SDS-PAGE 进行分离,分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,封闭结束后按照实验目的结合一抗 (SIRT1、Bax、Bcl-2、Cleaved-Caspase3 和 β-actin 均按 1:400 稀释),4 °C 孵育过夜后 TBST 清洗,然后根据一抗来源选择合适的二抗(稀释比例均为 1:5 000),室温孵育 1 h, TBST 清洗, ECL 暗室显色。显色后的蛋白使用 Bio-Rad 全功能成像系统采集图像, Image-ProPlus 分析光密度,以 β-actin 为内参,计算各组细胞蛋白的相对表达量,实验重复 3 次。

1.6 RT-PCR 实验 收集细胞,使用总 RNA 提取试剂提取细胞 RNA,并使用逆转录试剂盒 Prime-Script™ RT reagent Kit 进行逆转录,制备 cDNA,各 cDNA 样品分别用下列引物进行 PCR 反应。SIRT1 上游引物: 5'-CCAGAACATAGACACGCTGGAAC-3', 下游引物: 5'-CTCCTCGTACAGCTTCACAGTCA-3'; β-actin 上游引物: 5'-GAAGATCAAGATCATTGCTC-CT-3', 下游引物: 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'。反应体系为: PCR mix 6.25 μl、上游引物 0.5 μl、下游引物 0.5 μl、DEPC 水 4.25 μl、cDNA 1 μl,体系为 12.5 μl。反应条件为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。以 β-actin mRNA 水平作为内参。PCR 结束后,用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶成像系统扫描分析各条带光密度值,以 β-actin mRNA 水平作

为内参,计算各组 mRNA 相对表达水平。

1.7 CCK-8 法检测放射敏感性 细胞转染 6 h 后,给予不同剂量 X 射线(0、2、4、6、8 Gy) 放射处理,继续培养 24 h 后,吸弃原培养基,新鲜培养基与 CCK-8 按 10:1 的比例混匀后每孔加入 100 μl,继续孵育 1 h 后放于酶标仪上检测(波长为 450 nm) 各孔吸光度(OD) 值。

1.8 PI 染色检测细胞周期 细胞转染 6 h 后,给予不同剂量 X 射线(0、2、4、6、8 Gy) 放射处理,继续培养 24 h 后,收集细胞,经 PBS 洗涤和胰蛋白酶消化后离心,用 70% 的乙醇 4 °C 固定过夜。加入 RNase 缓冲液 37 °C 孵育 30 min 后,加入 PI 工作液(50 μg/ml),轻轻混匀后常温避光染色 30 min。在 1 h 内用流式细胞仪检测 DNA 含量变化,实验重复 3 次。

1.9 Annexin V/PI 双染及流式细胞术检测细胞凋亡率 细胞转染 6 h 后,给予不同剂量 X 射线(0、2、4、6、8 Gy) 放射处理,继续培养 24 h 后,收集细胞,经 PBS 洗涤和胰蛋白酶消化后用结合缓冲液(1×)轻轻重悬细胞至细胞密度为 1×10⁶/ml,吸取 100 μl 的细胞悬液(约 1×10⁵ 个细胞)到 1.5 ml 离心管,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 染色液,轻轻混匀,室温避光孵育 15 min,孵育结束后每管继续加入 400 μl 缓冲液,在 1 h 内上机检测细胞凋亡率,实验重复 3 次。

1.10 统计学处理 用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理分析,结果数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,三组及以上之间比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌组织中 SIRT1 蛋白的表达量 与癌旁组织比较,鼻咽癌组织中 SIRT1 蛋白表达量升高,差异有统计学意义 [(1.07 ± 0.85) vs (1.24 ± 0.14), *F* = 0.241, *t* = -3.188, *P* < 0.05], 提示 SIRT1 在鼻咽癌组织中高表达。见图 1。

2.2 鼻咽癌细胞中 SIRT1 蛋白的表达量 鼻咽正常上皮细胞 NP69 和鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、HNE-1 和 HNE-2 中 SIRT1 蛋白表达如图 2 所示。与鼻咽正常上皮细胞 NP69 比较,鼻咽癌细胞 CNE-1、CNE-2、HNE-1 中 SIRT1 蛋白表达水平增加,差异有统计学意义 (*F* = 27.180, *P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 提示 SIRT1 在鼻咽癌细胞中高表达。而鼻咽癌细胞 CNE-1 中 SIRT1 蛋白表达最高,故选择 CNE-1 细胞

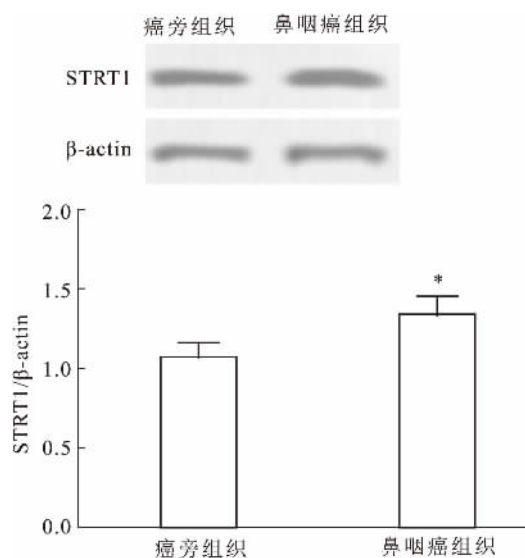


图1 鼻咽癌组织和癌旁组织中 SIRT1 蛋白表达量与癌旁组织比较: * $P < 0.05$

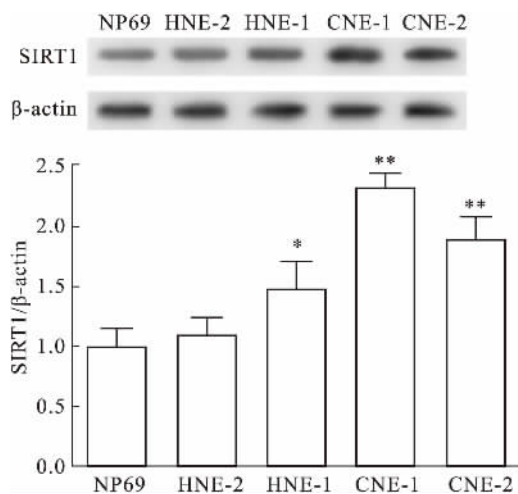


图2 人鼻咽正常上皮细胞 NP69 和鼻咽癌细胞 HNE-2、HNE-1、CNE-1 和 CNE-2 中 SIRT1 蛋白表达水平与 NP69 细胞比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

进行 SIRT1 作用效果及机制的后续研究。

2.3 SIRT1 基因沉默效果检测结果 用 SIRT1 siRNA 转染 CNE-1 细胞 6 h 后,换液继续培养 24 h,提取细胞总 RNA 和总蛋白分别进行 qRT-PCR 和 Western blot 实验,结果见图 3。与 NC-siRNA 组和 Control 组比较,SIRT1-siRNA 组的 SIRT1 mRNA 和 SIRT1 蛋白相对表达量均降低,差异有统计学意义 ($F = 5.648, F = 70.193, P < 0.01$),表明转染 SIRT1 siRNA 能抑制 CNE-1 细胞中 SIRT1 的表达。

2.4 X 射线对 SIRT1 基因沉默细胞增殖的影响 CCK-8 结果显示,与未接受 X 射线放射处理的 Control 组比较,放射剂量为 4、6、8 Gy 时,Control 组细胞

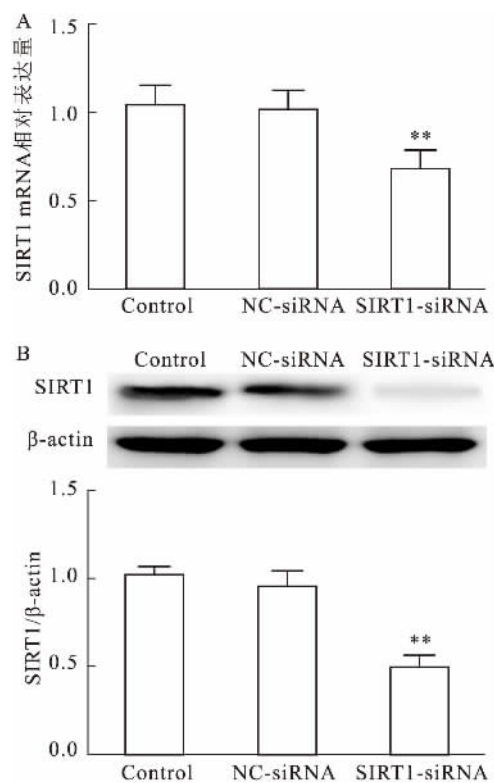


图3 SIRT1 基因沉默效果

A: SIRT1 mRNA 表达水平; B: SIRT1 蛋白表达水平; 与 Control 组及 NC-siRNA 组比较: ** $P < 0.01$

的增殖能力降低,差异有统计学意义 ($F = 37.372, P < 0.01$),表明放疗能抑制细胞的增殖;与 Control 组比较,不同放射剂量的 SIRT1-siRNA 组细胞增殖能力均被抑制,差异有统计学意义(X 射线放射剂量为 0、2、4、6、8 Gy 时对应 F 值分别为 66.513、127.544、60.581、107.137 和 64.029, $P < 0.01$),表明 SIRT1 沉默能抑制 CNE-1 细胞的增殖;与未接受 X 射线放射处理的 SIRT1-siRNA 组比较,放射剂量为 4、6、8 Gy 时,SIRT1-siRNA 组细胞的增殖能力被抑制,差异有统计学意义 ($F = 15.592, P < 0.01$),具体见图 4。结果提示放疗能有效抑制鼻咽癌 CNE-1 细胞的增殖活性,且呈剂量依赖性,放疗剂量越高,抑制效果越高,而沉默 SIRT1 可有效增加 CNE-1 细胞的放疗敏感性。

2.5 X 射线对 SIRT1 基因沉默细胞凋亡的影响

流式细胞术结果见图 5,与未接受 X 射线放射处理的 Control 组比较 [凋亡率为 $(4.38 \pm 0.50)\%$],当 X 射线放射剂量为 4、6、8 Gy 时,Control 组细胞凋亡率升高,差异有统计学意义 [凋亡率分别为 $(11.30 \pm 0.74)\%$ 、 $(14.69 \pm 1.31)\%$ 、 $(23.77 \pm 2.32)\%$, $F = 98.549, P < 0.01$],提示放疗能诱导鼻咽癌

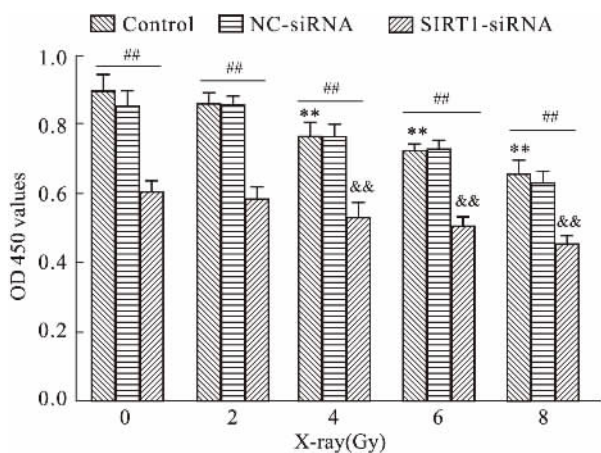


图4 SIRT1 基因沉默对 X 射线抑制细胞增殖的影响

与 Control 组比较: ## $P < 0.01$; 与 Control (0 Gy) 组比较: ** $P < 0.01$; 与 SIRT1-siRNA (0 Gy) 组比较: && $P < 0.01$

CNE-1 细胞发生凋亡。与 Control 组比较,不同剂量 X 射线放射下,SIRT1-siRNA 组细胞凋亡率均升高,

差异有统计学意义(X 射线放射剂量为 0、2、4、6、8 Gy 时对应 F 值分别为 512.163、115.340、341.758、225.237 和 90.523, $P < 0.01$),表明 SIRT1 基因沉默能诱导 CNE-1 细胞发生凋亡。

此外,SIRT1-siRNA 组细胞随着放射剂量的增加,其细胞凋亡率也逐渐升高,与未接受 X 射线放射处理的 SIRT1-siRNA 组细胞比较,SIRT1-siRNA 组细胞在放射剂量为 4、6、8 Gy 时,凋亡率明显增加,差异有统计学意义[凋亡率分别为 $(26.66 \pm 2.46)\%$ 、 $(32.79 \pm 1.63)\%$ 、 $(35.00 \pm 1.50)\%$, $F = 50.476$, $P < 0.01$],提示放疗能诱导 CNE-1 细胞发生凋亡,且放疗剂量越高,细胞凋亡率越高,而 SIRT1 基因沉默能有效增加放疗对 CNE-1 细胞凋亡的诱导作用。

2.6 SIRT1 基因沉默联合放疗对细胞凋亡相关蛋白的影响

各组细胞中凋亡相关蛋白表达情况见图

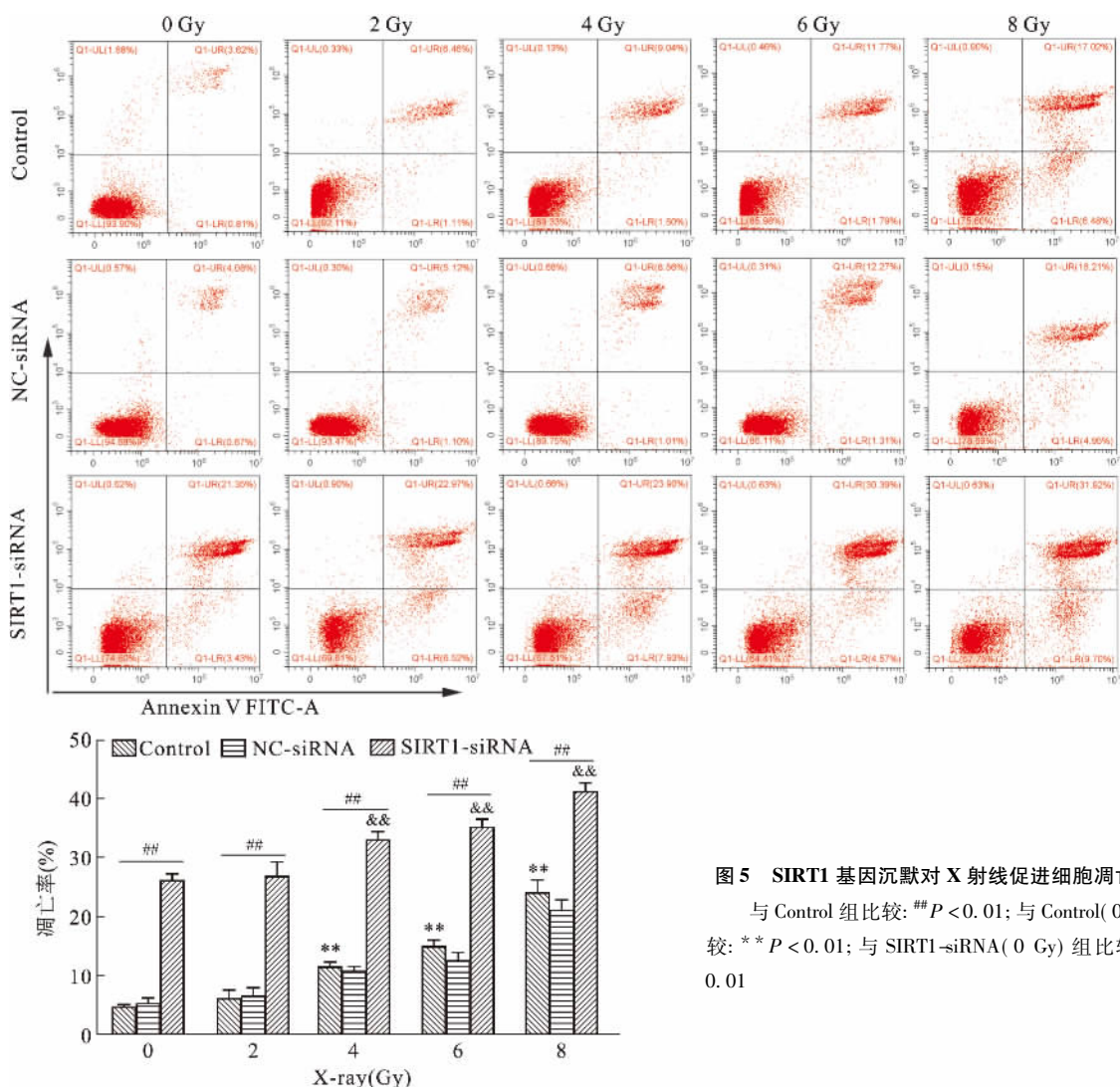


图5 SIRT1 基因沉默对 X 射线促进细胞凋亡的影响

与 Control 组比较: ## $P < 0.01$; 与 Control (0 Gy) 组比较: ** $P < 0.01$; 与 SIRT1-siRNA (0 Gy) 组比较: && $P < 0.01$

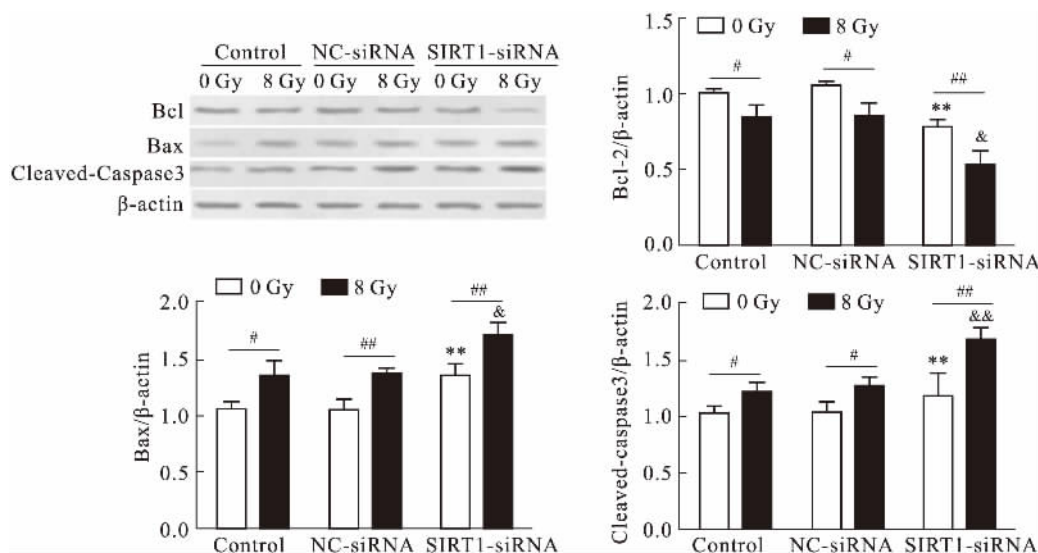


图6 SIRT1 基因沉默联合放疗对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与 Control 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 Control (0 Gy) 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Control (8 Gy) 组比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.01$

6, 与未接受 X 射线放射处理的细胞比较, 经 8 Gy 放射处理后, Control 组、NC-siRNA 组、SIRT1-siRNA 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达均降低, 差异有统计学意义 (F 分别为 7.727、6.943、2.833, $P < 0.05$), 而 Bax 和 Cleaved-Caspase3 蛋白相对表达量增加, 差异均有统计学意义 (Bax: F 分别为 1.873、0.502、0.848, $P < 0.05$; Cleaved-Caspase3: F 分别为 1.469、0.259、0.591, $P < 0.05$)。与未接受 X 射线放射处理的 Control 组细胞比较, 经放射处理后 SIRT1-siRNA 组细胞 Bcl-2 蛋白表达降低, 差异有统计学意义 ($F = 51.93$, $t = 8.467$, $P < 0.05$), 而 Bax 和 Cleaved-Caspase3 蛋白表达量升高, 差异有统计学意义 ($F = 2.794$, $t = -2.321$; $F = 1.469$, $t = -4.772$, $P < 0.05$)。与放疗的 Control 组细胞比较, SIRT1-siRNA 组细胞放疗后 Bcl-2 蛋白降低 ($F = 5.050$, $P < 0.05$), 而 Bax 和 Cleaved-Caspase3 蛋白表达升高 ($F = 7.436$, $P < 0.05$; $F = 29.387$, $P < 0.01$)。研究结果提示, SIRT1 基因沉默能增加放疗对 Bcl-2 蛋白表达的抑制作用和对 Bax 和 Cleaved-Caspase3 蛋白表达的促进作用。

3 讨论

SIRT1 基因是一种酵母沉默信息调控因子 SIRT2 的同源基因, 共 33 kb 个碱基, 是重要的肿瘤调控基因^[6]。已有研究发现, SIRT1 基因在前列腺癌、乳腺癌、皮肤癌等多种肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用。如 Lian et al^[7] 报道, miR-128 可通过

抑制 SIRT1 促进结直肠癌细胞增殖。在乳腺癌中沉默 SIRT1 基因可抑制 p53 和激活 POLD1 蛋白, 从而抑制乳腺癌细胞的增殖和转移^[8]。Yeung et al^[9] 研究发现上调 SIRT1 能抑制 NF- κ B 的功能, 从而促进肺癌细胞发生凋亡。由此可见, SIRT1 在不同肿瘤中发挥着不同的生物学功能。然而, SIRT1 在鼻咽癌组织中的表达和潜在作用鲜有报道。为了探究 SIRT1 在鼻咽癌组织中的表达, 我们用 Western blot 技术分别在鼻咽癌组织及癌旁组织, 以及人鼻咽上皮细胞和鼻咽癌细胞中检测了 SIRT1 蛋白的表达情况, 实验结果发现, SIRT1 蛋白在鼻咽癌组织中表达量高于对应癌旁组织。SIRT1 蛋白在鼻咽癌细胞中的表达量也高于人鼻咽上皮细胞中的表达量。由此推测, SIRT1 基因在鼻咽癌中高表达, 其可能在鼻咽癌的发生发展中扮演着促癌基因的作用。王芳等^[10] 报道, SIRT1 基因表达水平与胃癌恶性表型呈负相关, 可以作为预后良好的一个重要指标。因此, SIRT1 基因也可能是鼻咽癌预后的生物标志物和治疗靶点, 沉默或敲低 SIRT1 基因可能是一种有效的控制鼻咽癌发生发展的治疗手段。

为了进一步探究 SIRT1 基因在鼻咽癌发生发展中的作用, 我们通过 RNA 干扰技术建立 SIRT1 基因沉默细胞株。首先, 合成 SIRT1 基因的特异性 siRNA 片段, 通过 Lip 2000 作为转染媒介将 siRNA 片段转染到 CNE-1 细胞, 最后通过 RT-qPCR 和 Western blot 法验证转染效率, 结果显示本次实验设计的 siRNA 片段能有效抑制 CNE-1 细胞中 SIRT1 mRNA

和蛋白的表达,说明我们成功构建了 SIRT1 基因沉默的鼻咽癌细胞。

放射治疗是鼻咽癌最重要的治疗方式之一,其能有效延长患者的生存时间。但是,鼻咽癌对放射敏感性存在很大的个体差异,部分患者的放疗效果并不理想,影响了治疗效果。因此,提高鼻咽癌的放疗敏感性是目前需要攻克的主要难题。Zhu et al^[11]报道,沉默 RelB 基因的表达可以增加前列腺癌患者的放疗敏感性。Zhou et al^[12]报道,用 RNAi 技术沉默 RNF8 基因可以增强非小细胞肺癌 A549 的辐射敏感性。此外,抑制蛋白质激酶 CK2 也可增强非小细胞肺癌的放疗敏感性^[13]。以上研究表明,部分癌基因沉默能提高肿瘤细胞对放疗的敏感性,这为肿瘤的放射治疗提供了新思路。但在鼻咽癌中,SIRT1 基因对放疗敏感性的影响还未被报道。为了探究 SIRT1 基因沉默对放疗的增敏效果,我们首先通过 CCK-8 法检测了 SIRT1 基因沉默及放疗对鼻咽癌细胞 CNE-1 增殖活性的影响,实验结果发现,SIRT1 基因沉默和放射治疗均能有效抑制 CNE-1 细胞的增殖能力,且 SIRT1 基因沉默能增加 X 射线照射对细胞增殖的抑制作用,提示 SIRT1 基因沉默能增加鼻咽癌细胞的放射敏感性。然而,最新研究证实,SIRT1 激活剂能增加乳腺癌细胞对化疗药物和放射的敏感度^[14]。这也正如前文所述,SIRT1 在不同的肿瘤中作用效果不同,进一步表明其在肿瘤发生发展中的复杂作用。

细胞凋亡是肿瘤放射治疗的主要机制。放射敏感性的增加往往伴随着细胞凋亡的发生。为了进一步探究 SIRT1 基因沉默对放疗诱导鼻咽癌细胞发生凋亡的影响,通过流式细胞术检测各组细胞的凋亡情况。研究结果发现,SIRT1 基因沉默和 X 线放射均能诱导 CNE-1 细胞的凋亡,且当 SIRT1 基因沉默的鼻咽癌细胞被剂量为 4、6、8 Gy 的 X 射线放射处理后,细胞凋亡率增加。本研究中 CNE-1 细胞的存活率在 SIRT1 基因沉默后降低,其趋势符合细胞凋亡的改变。以上结果表明,SIRT1 基因沉默能增加 X 射线放射对鼻咽癌细胞凋亡的诱导作用,是促进鼻咽癌细胞死亡的有效方式。

细胞凋亡的发生受多个基因调控。Feng et al^[15]发现当转移性颈淋巴源性头颈鳞状细胞癌 HSC-4 细胞的 FANCD2 基因沉默后,放射治疗明显增加了 HSC-4 细胞凋亡率,其机制涉及抑凋亡基因 Bcl-2 的下调及促凋亡基因 Bax、Caspase3 的上调。Bcl-2 家族是已知细胞凋亡中最重要的调控因子,其

成员之间特殊的比值在细胞凋亡过程中起关键性作用。Bax 具有促细胞凋亡作用,而 Bcl-2 具有抑制细胞凋亡的作用。Bcl-2/Bax 的比值降低导致线粒体膜电位下降,线粒体膜完整性和功能被破坏,从而导致细胞色素 C 等凋亡因子释放,激活下游 Caspase3。Caspase3 作为关键的凋亡执行蛋白,其活性形式 Cleaved-Caspase3 表达量能反映细胞的凋亡水平^[12,15]。为了进一步验证 SIRT1 基因沉默对 X 射线放射诱导鼻咽癌细胞凋亡的促进作用和可能机制,我们用 Western blot 检测了各组细胞中 Bcl-2、Bax 和 Cleaved-Caspase3 蛋白的表达,发现用 8 Gy 的 X 射线放射处理 SIRT1 基因沉默的 CNE-1 细胞,促凋亡基因 Bax 和 Cleaved-Caspase3 增加,抑凋亡基因 Bcl-2 表达降低,说明 Caspases 级联反应被激活。以上结果表明 SIRT1 沉默可能通过活化 Caspase 级联反应来促进 CNE-1 细胞的凋亡。但 SIRT1 沉默对凋亡的调控具体机制还有待进一步研究。

综上所述,SIRT1 基因沉默后,鼻咽癌 CNE-1 细胞对放射的敏感性得到显著提高,说明 SIRT1 基因与鼻咽癌 CNE-1 细胞对放射的敏感性有密切的关系,这为鼻咽癌治疗靶点开发提供了新思路。

参考文献

- [1] 黄祥,曲超,姜新,等.鼻咽癌的治疗进展[J].中国老年学杂志,2015,35(11):3159-61.
- [2] Golson M L, Kaestner K H. Fox transcription factors: from development to disease [J]. *Development*, 2016, 143(24):4558-70.
- [3] 邵志伟. FOXG1 的表达与人恶性神经胶质瘤的相关性研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2015.
- [4] 康议心,高社干,郭艳珍,等. SIRT1 基因沉默对 DLBCL 细胞放射敏感性影响[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2017, 26(6):687-90.
- [5] Gao L, Shan W, Zeng W, et al. Carnosic acid alleviates chronic alcoholic liver injury by regulating the SIRT1/ChREBP and SIRT1/p66shc pathways in rats [J]. *Mol Nut Food Res*, 2016, 60(9):1902-11.
- [6] Liarte S, Alonso-romero J L, Nicolas F J. SIRT1 and estrogen signaling cooperation for breast cancer onset and progression [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9:552.
- [7] Lian B, Yang D, Liu Y, et al. miR-128 targets the SIRT1/ROS/DR5 pathway to sensitize colorectal cancer to TRAIL-induced apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6):2151-62.
- [8] Xu Y, Qin Q, Chen R, et al. SIRT1 promotes proliferation, migration, and invasion of breast cancer cell line MCF-7 by upregulating DNA polymerase delta1 (POLD1) [J]. *Biochem Bioph Res Commun*, 2018, 502(3):351-7.
- [9] Yeung F, Hoberg J E, Ramsey C S, et al. Modulation of NF-kap-

- paB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase [J]. *EMBO J*, 2004, 23(12) : 2369 – 80.
- [10] 王 芳, 张 冯. 胃癌组织中 SIRT1、Noxa 的表达及其临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(9) : 1019 – 23.
- [11] Zhu H C, Qiu T, Dan C, et al. Blockage of RelB expression by gene silencing enhances the radiosensitivity of androgenindependent prostate cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2) : 1167 – 73.
- [12] Zhou H, Mu X, Chen J, et al. RNAi silencing targeting RNF8 enhances radiosensitivity of a non-small cell lung cancer cell line A549 [J]. *Inter J Rad Biol*, 2013, 89(9) : 708 – 15.
- [13] Li Q, Li K, Yang T, et al. Association of protein kinase CK2 inhibition with cellular radiosensitivity of non-small cell lung cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1) : 16134 – 47.
- [14] Masoumi H, Soltani A, Ghatrehsamani M. The beneficial role of SIRT1 activator on chemo- and radiosensitization of breast cancer cells in response to IL-6 [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(1) : 129 – 39.
- [15] Feng H J, Bao Y L, Liang Z P, et al. Silencing of FANCD2 enhances the radiosensitivity of metastatic cervical lymph node-derived head and neck squamous cell carcinoma HSC-4 cells [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50: 1241 – 50.

Effect of SIRT1 gene silencing on radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma CNE-1 cells

Xiao Ning¹, Li Bin², Feng Yong², et al

(¹Health Management Center & Physical Examination Center, ²Dept of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Sichuan Academy of Medical Sciences and Sichuan Provincial People's Hospital, The Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072)

Abstract Objective To investigate the effect of silencing SIRT1 gene by RNA interference on the radiosensitivity of human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-1, and to provide a new idea for clinical treatment of human nasopharyngeal carcinoma (PCN). **Methods** SIRT1 protein in NP69 and CNE-1 cells was detected by Western blot assay. The SIRT1-siRNA interference sequence was transfected into CNE-1 cells. The ability of cell proliferation was evaluated by CCK-8 assay. The cell apoptosis rate was detected by flow cytometry assay. The protein levels of Bcl-2, Bax, and Cleaved-Caspase3 were tested by Western blot assay. **Results** The results showed that the expression of SIRT1 protein in nasopharyngeal carcinoma tissues and cells was significantly higher than that of para-carcinoma tissues and NP69 cells ($P < 0.05$). The expression levels of SIRT1 gene and SIRT1 protein in the cells of the transfection groups were significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The results showed after X-ray radiation of 4, 6 and 8 Gy on CNE-1 cells, the ability of cell proliferation in the SIRT1 siRNA groups was obviously lower than that in the control group ($P < 0.01$), and the cell apoptosis rate in the SIRT1 silence groups was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). Meanwhile, compared with the control group, the protein levels of Bax and Cleaved-Caspase3 significantly reduced, Bcl-2 expression significantly increased in SIRT1 siRNA group ($P < 0.05$). **Conclusion** Silence of SIRT1 gene may enhance the sensitivity of CNE-1 cells to radiotherapy by inhibiting the proliferation and inducing apoptosis of CNE-1 cells, and SIRT1 gene may be a potential target for the treatment of nasopharyngeal carcinoma cancer.

Key words nasopharyngeal carcinoma; SIRT1; gene silencing; radiosensitivity; apoptosis