

# 慢病毒载体介导的靶向沉默 *xrcc3* 基因对鼻咽癌细胞放疗增敏作用的影响

袁小龙<sup>1</sup>, 徐继飞<sup>1</sup>, 李文玉<sup>1</sup>, 方为扬<sup>1</sup>, 赵振峰<sup>1</sup>, 仲飞<sup>2</sup>, 王凡<sup>1</sup>, 童铸廷<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 X 射线修复交叉互补蛋白 3( XRCC3) 对鼻咽癌细胞放疗敏感性的影响。方法 利用平板克隆实验检测不同放疗剂量下鼻咽癌细胞 CNE2 的存活分数, 并计算放疗增敏比( SER); 流式细胞仪通过 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡, 并用 Western blot 检测凋亡蛋白的表达水平; 在免疫荧光染色下观察放疗前后 DNA 的损伤。结果 沉默 *xrcc3* 基因能够降低 CNE2 细胞放疗后的存活分数, SER = 1.232 3; 提高射线引起的细胞凋亡, 并增加细胞凋亡蛋白断裂带的产生; 增加射线诱导的 DNA 双链损伤修复聚焦点的形成。结论 XRCC3 可以通过降低鼻咽癌细胞放疗后 DNA 的损伤及细胞凋亡, 从而增加鼻咽鳞癌细胞对放疗的抵抗, *xrcc3* 可能作为一个提高鼻咽癌放疗敏感性的靶向基因。

**关键词** 鼻咽癌; XRCC3; 放疗; 凋亡; DNA 损伤

**中图分类号** R 739.6

**文献标志码** A **文章编号** 1000 - 1492( 2017) 05 - 0656 - 06  
**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2017.05.007

虽然鼻咽癌只占全球癌症总数的 0.7%, 但在中国南方和东南亚却是主要的癌症之一<sup>[1]</sup>。放疗是早期鼻咽癌治疗的主要方式, 其 5 年总体生存率可达到 85.8% 以上<sup>[2]</sup>。但仍有部分高危鼻咽癌患者在根治性放疗后会发生局部复发及转移, 放疗抵抗可能是导致其放疗失败的主要原因。单纯的提高放疗剂量会增加毗邻组织的损伤, 降低患者的生活质量<sup>[3]</sup>。因此, 提高鼻咽癌患者的放疗敏感性是一个很好的解决方案。

放疗引起的主要损伤是 DNA 双链的断裂, 然而肿瘤细胞有很强的修复 DNA 损伤的能力<sup>[4]</sup>。X 射线修复交叉互补基因 3( *xrcc3*) 是 Rad51 旁系同源基因家族的重要成员, 参与 DNA 双链损伤的同源重组

修复和维持染色体稳定中发挥着重要的作用<sup>[5]</sup>。已有研究<sup>[6]</sup>证实 XRCC3 表达的下调能够增加食管癌放疗敏感性。但在鼻咽癌中, 还没有关于 XRCC3 和放疗敏感性的相关研究。该研究旨在探讨 XRCC3 对鼻咽癌细胞放疗敏感性的影响, 希望能为将来的鼻咽癌治疗提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞及主要试剂** 人低分化鼻咽癌细胞株 CNE2 购自中科院上海细胞库; CNE2 的 *xrcc3* 稳定沉默细胞株( CNE2-sh*xrcc3*) 和对照细胞株( CNE2-sh*luc*) 由本课题组利用慢病毒干扰体系构建。兔抗人单克隆抗体 XRCC3 购自英国 Abcam 公司( ab133736); 兔抗人 Cleaved PARP 抗体( Asp214)、兔抗人 Cleaved Caspase-3 抗体( Asp175)、鼠抗人单克隆抗体 Phospho-Histone H2AX (  $\gamma$ -H2AX) 以及兔抗人 53BP1 抗体均购自美国 Cell signaling 公司; Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自南京 Vazyme 生物技术公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 人低分化鼻咽癌细胞株 CNE2 用含有 10% 胎牛血清( 美国 Gibco 公司) 的 RPMI 1640 培养基( 美国 Gibco 公司) 培养, 并置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的湿化培养箱中。

**1.2.2 *xrcc3* 基因慢病毒干扰体系以及 XRCC3 稳定干扰 CNE2 细胞株的构建** 构建干扰 XRCC3 shRNA 的靶序列为: 5'-TTCATCGAGCACGTGGC-CGAT-3'<sup>[6]</sup>。本研究将 XRCC3 shRNA 干扰序列构建入慢病毒包装的重组质粒 LUNIG 中, 此转移载体含有新霉素筛选标记, 并且含有启动 shRNA 表达的 U6 启动子。将携带有 XRCC3 shRNA 转移质粒的 LUNIG 与三质粒包装载体( pMDLg/Prre、pRSV-REV、pCMV-VSVG) 按一定比例转染到 293FT 细胞中, 72 h 后, 收集病毒上清液。用超高速离心机在 23 000 r/min 4 °C 离心 2.5 h 浓缩病毒液。将病毒浓缩液感染指数生长期的鼻咽癌 CNE2 细胞。3 d 后进行传代, 并用遗传霉素( 400  $\mu$ g/ml) 持续筛选 3

2017 - 02 - 05 接收

基金项目: 国家自然科学基金( 编号: 81201743); 中国教育部博士基金( 编号: 2012 3420120008); 安徽省博士后科学基金资助项目( 编号: 2015B053)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院<sup>1</sup> 肿瘤放疗科、<sup>2</sup> 肿瘤内科, 合肥 230022

作者简介: 袁小龙, 男, 硕士研究生;

童铸廷, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 593077136@qq.com

周时间。遗传霉素抗性克隆将用 Western blot 检测病毒的沉默效率。

**1.2.3 Western blot** 取对数生长期的细胞用 RIPA 细胞裂解液裂解提取细胞总蛋白。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后,采用 SDS-PAGE 电泳分离总蛋白后,湿转印至 PVDF 膜上,使用 BSA 溶液室温封闭 30 min 后,一抗 4 °C 孵育过夜;PVDF 膜以 TBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min 后,二抗室温孵育 1 h;TBST 溶液洗膜 3 次,每次 5 min 后,采用 ECL 发光试剂盒显色,X 线片压片后曝光成像。

**1.2.4 克隆形成实验及线性二次(Linear-Quadratic, L-Q)模型曲线的拟合** 将 XRCC3 稳定沉默的 CNE2 及其对照细胞株按一定数量接种于 6 孔板中,贴壁 24 h 后,按 0、2、4、6、8、10 Gy 设 6 个照射剂量组,每一剂量组设 3 个复孔。照射条件为:源皮距 = 100 cm、剂量率 = 200 cGy/min、瓦里安 23EX 加速器 6 MV X 线。照射后的细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养至出现肉眼可见克隆时,终止培养,甲醇固定,1% 结晶紫乙醇溶液染色。显微镜下计数含 50 个细胞以上的克隆数,计算克隆形成率(planting efficiency, PE),  $PE(\%) = \text{克隆数} / \text{接种细胞数} \times 100\%$  和存活分数(surviving fraction, SF),  $SF(\%) = \text{受照射细胞 PE} / \text{对照细胞 PE} \times 100\%$ 。以 3 次照射的存活分数均值进行分析,运用 GraphPad Prism 5.0 软件进行 L-Q 模型曲线拟合,绘制剂量存活曲线,并得出 L-Q 模型参数  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\alpha/\beta$ 。运用 2 Gy 照射下细胞的存活分数(SF<sub>2</sub>) 计算放射增敏比(sensitization enhancement ratio, SER) = 沉默前组 SF<sub>2</sub> / 沉默后组 SF<sub>2</sub>。

**1.2.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡** 将 CNE2-shluc 和 CNE2-shxrcc3 细胞株接种在 6 孔板中,每组设 3 个复孔,24 h 贴壁后给予 3 Gy 放疗剂量照射;48 h 后用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化细胞并收集细胞,用 PBS 清洗 2 次后,离心(1 500 r/min, 5 min) 收集细胞;加入 100  $\mu$ l 结合缓冲液重悬细胞后,加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ l PI 染液混匀,室温避光孵育染色 10 min 后,加入 300  $\mu$ l 结合缓冲液轻轻重悬细胞,加入 10  $\mu$ l PI 混匀,于 1 h 内用流式细胞仪检测分析(BD FACSCanto II Flow Cytometer)。

**1.2.6 细胞免疫荧光实验** 将射线照射处理后 36 h 后盖玻片上的两组细胞用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,用 PBS 清洗掉多余的多聚甲醛;后用 0.5% Triton-X 100 溶液通透细胞 1 h;10% 正常山羊血清

室温封闭 30 min;加入鼠抗人单克隆抗体 Phospho-Histone H2AX( $\gamma$ -H2AX) 以及兔抗人 53BP1 抗体湿盒中 4 °C 孵育过夜,经 PBS 清洗 2 次后,加入 DyLight 549 标记的羊抗兔 IgG 抗体(美国 Proteintech 公司)及 Alexa Fluor 488 标记的羊抗鼠 IgG(美国 Invitrogen 公司)荧光二抗(1:100),然后用 DAPI 染核;封片后在共聚焦显微镜下观察并拍照。分别计数 0、36 h 时 53BP1 和  $\gamma$ -H2AX 融合共阳性(黄色)焦点形成的个数,之后统计学比较分析。

**1.3 统计学处理** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,两样本均数的比较采用两独立样本的 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 XRCC3 沉默后增强鼻咽癌细胞体外放疗敏感性** 为了阐明 XRCC3 对鼻咽癌细胞放疗敏感性的影响,本研究利用慢病毒干扰体系构建了人鼻咽癌细胞 CNE2 的 XRCC3 CNE2-shxrcc3 和 CNE2-shluc,并用 Western blot 检测了慢病毒干扰的效率,见图 1。克隆形成实验证实干扰内源性的 *xrcc3* 基因后,CNE2 的存活分数明显降低,见图 2。利用线性二次模型拟合的存活曲线求出的参数,计算出 CNE2-shluc 组和 CNE2-shxrcc3 组的 SF<sub>2</sub> 分别为 0.888 9 和 0.721 3。进而求出 CNE2 细胞中沉默 *xrcc3* 基因后的 SER = 1.232 3,见表 1。

**2.2 沉默 *xrcc3* 基因增强射线引起的细胞凋亡** 为了证明 XRCC3 对鼻咽癌细胞放疗增敏效应是否

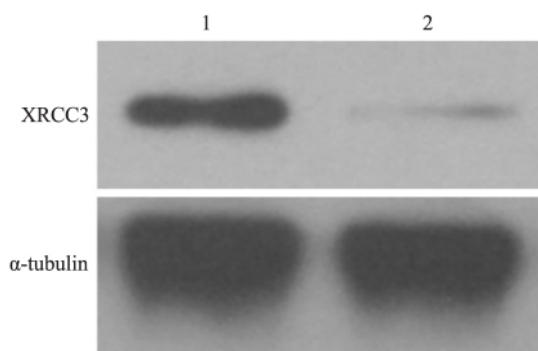


图 1 CNE2-shxrcc3 组和 CNE2-shluc 组 XRCC3 的表达水平  
1: CNE2-shxrcc3 组; 2: CNE2-shluc 组

表 1 CNE2 细胞中 XRCC3 沉默前后  
放射生物学参数比较(L-Q 模型)

组别	$\alpha$ 值 ( $\text{Gy}^{-1}$ )	$\beta$ 值 ( $\text{Gy}^{-2}$ )	$\alpha/\beta$ 值 (Gy)	SF <sub>2</sub>	SER
CNE2-shluc	-0.044 8	0.051 9	-0.864 6	0.888 9	1.232 3
CNE2-shxrcc3	-0.053 3	0.108 3	-0.491 9	0.721 3	

是通过增强射线引起的细胞凋亡实现的,本研究用 Annexin-V/PI 双染法分析比较了沉默 *xrcc3* 基因对射线引起 CNE2 细胞凋亡比例的影响。结果显示在没有射线的处理下,单纯沉默 *xrcc3* 基因并不能引起 CNE2 细胞的凋亡;而经射线处理后,抑制内源性 XRCC3 的表达能较 CNE2-shluc 组明显提高细胞凋亡的比例(  $11.64 \pm 3.43$  vs  $23.89 \pm 5.63$ ,  $t = 3.218$ ,  $P = 0.0323$ ),见图 3。

**2.3 沉默 *xrcc3* 基因增强射线诱导的细胞凋亡蛋白断裂带的产生** 用 Western blot 检测细胞凋亡相关蛋白 PARP 及 Caspase-3 的变化。结果与 Annexin-V/PI 双染法观察到的结果相一致,在无射线处理的情况下,单纯干扰 XRCC3 并不能诱导 CNE-shluc 组和 CNE2-shEZH2 组细胞凋亡蛋白(剪切体 PARP 及剪切体 Caspase-3)的产生;而在 3 Gy 的 X 射线处理后,干扰 XRCC3 的表达能明显增强射线诱导的细

胞凋亡蛋白(剪切体 PARP 及剪切体 Caspase-3)的产生,见图 4。

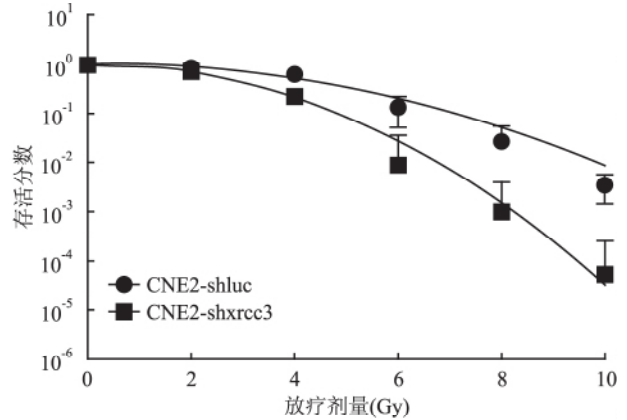


图 2 CNE2 细胞中 XRCC3 干扰前后在不同放疗剂量下细胞存活曲线

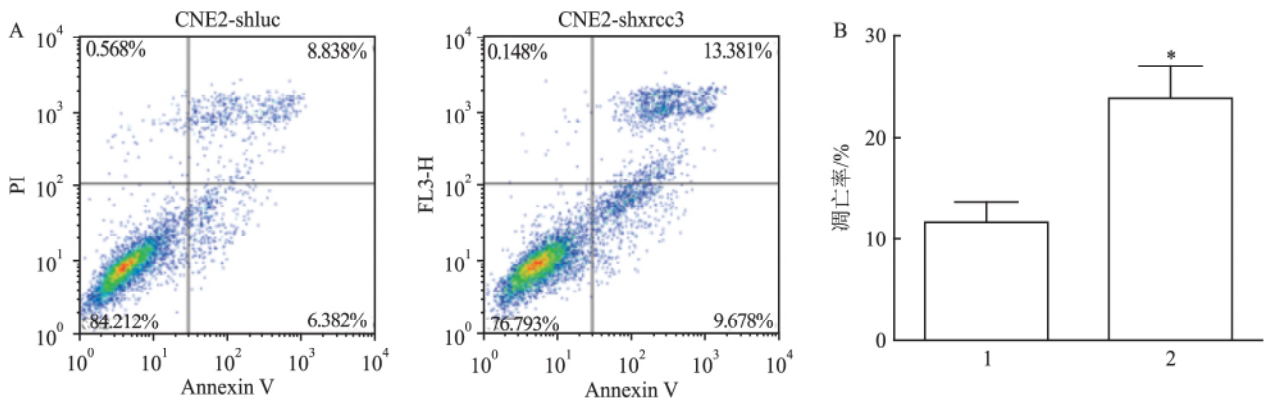


图 3 干扰 XRCC3 的表达对放疗所致鼻咽癌细胞凋亡的影响

A: 3 Gy 外照射 48 h 后 CNE2-shxrcc3 组和 CNE2-shluc 组细胞的凋亡比例; B: 抑制内源性 XRCC3 的表达; 1: CNE2-shluc 组; 2: CNE2-shxrcc3 组; 与 CNE2-shluc 组比较: \*  $P < 0.05$

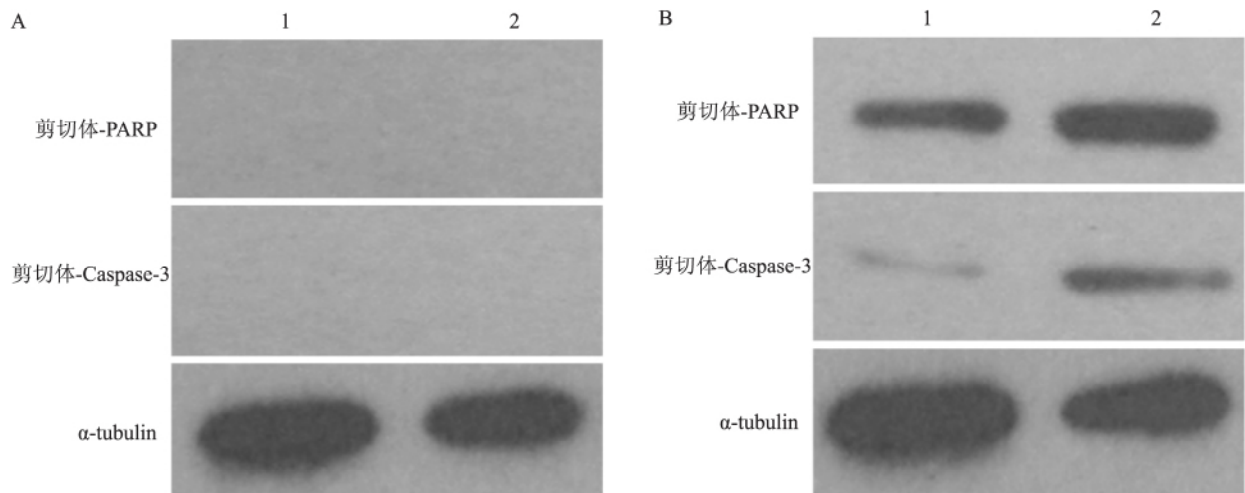


图 4 干扰 XRCC3 的表达对放疗作用下鼻咽癌细胞凋亡相关蛋白表达的影响

A: 未接受射线处理时,CNE2-shxrcc3 组和 CNE2-shluc 组细胞凋亡蛋白的表达水平; B: 放疗 48 h 后,两组细胞凋亡蛋白的表达水平; 1: CNE2-shluc 组; 2: CNE2-shxrcc3 组

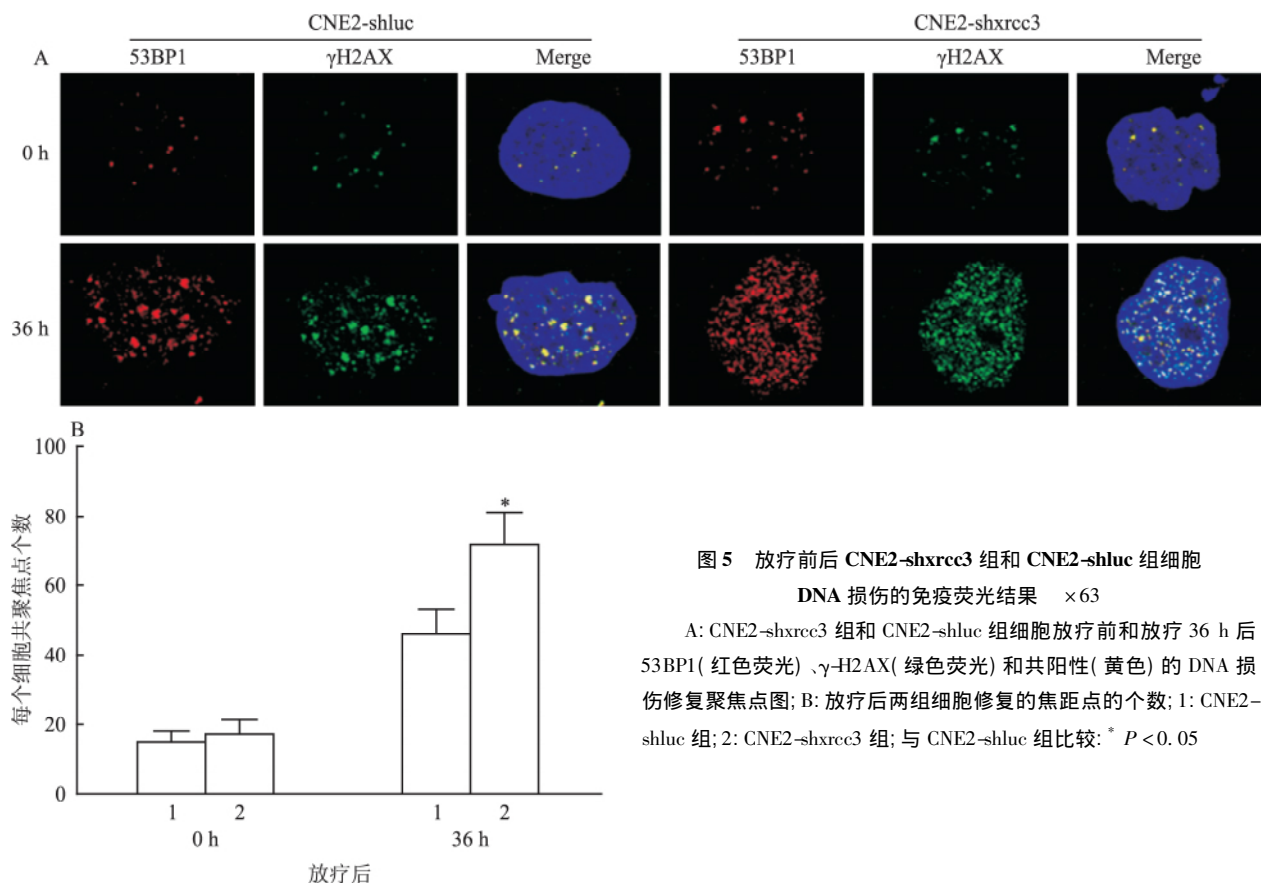


图5 放疗前后 CNE2-shxrc3 组和 CNE2-shluc 组细胞

DNA 损伤的免疫荧光结果 ×63

A: CNE2-shxrc3 组和 CNE2-shluc 组细胞放疗前和放疗 36 h 后 53BP1(红色荧光)、 $\gamma$ -H2AX(绿色荧光)和共阳性(黄色)的 DNA 损伤修复聚焦点图; B: 放疗后两组细胞修复的焦距点的个数; 1: CNE2-shluc 组; 2: CNE2-shxrc3 组; 与 CNE2-shluc 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 干扰 XRCC3 增强射线诱导的 DNA 双链损伤修复聚焦点的形成** 抑制 DNA 双链损伤的修复被认为是提高放疗敏感性的一个重要机制。DNA 双链损伤的早期修复包括  $\gamma$ H2AX 的快速磷酸化和 P53 结合蛋白(53BP1)的在 DNA 损伤部位募集形成聚焦点。本研究运用免疫荧光实验检测射线处理 CNE2-shluc 组和 CNE2-shxrc3 组细胞 0 h 和 36 h 后 53BP1(红色荧光标记)和  $\gamma$ -H2AX(绿色荧光标记)共阳性(黄色)的 DNA 损伤修复聚焦点的数量情况。结果显示在射线处理的开始阶段(0 h), CNE2-shxrc3 组细胞共阳性的 DNA 损伤修复聚焦点的个数与 CNE2-shluc 组细胞无明显差异( $15.00 \pm 3.00$  vs  $17.00 \pm 4.00$ ,  $t = 0.693$ ,  $P = 0.5265$ ); 而射线处理 36 h 后, CNE2-shxrc3 组共阳性的 DNA 损伤修复聚焦点的个数显著多于 CNE2-shluc 组细胞( $46.00 \pm 7.00$  vs  $72.00 \pm 9.00$ ,  $t = 3.950$ ,  $P = 0.0168$ ), 见图 5。

### 3 讨论

DNA 损伤的主要修复方式包括易错的非同源末端连接和高保真的同源重组, 两种机制相互协调共同修复受损的 DNA 以维持基因组的完整性<sup>[7-8]</sup>。

*xrcc3* 基因作为同源基因家族的重要成员之一, 首先在中国仓鼠卵巢细胞 CHO 衍生细胞株 irs1SF 细胞的研究<sup>[9]</sup>中显示, 该基因位于人染色体 14q32.3。缺失 *xrcc3* 基因的 Irs1SF 细胞对辐射和 DNA 化学交联剂的敏感性明显高于其母株 CHO 细胞<sup>[10]</sup>。已有研究<sup>[6, 11]</sup>证实, 干扰 XRCC3 的表达能抑制乳腺癌细胞 MCF7 的增殖, 增加食管癌细胞 TE-1、Kyse 30 对放疗的敏感性。同样, 本研究显示在鼻咽癌细胞 CNE2 中通过慢病毒载体介导的靶向沉默 *xrcc3* 基因后, 细胞放疗后的 DNA 损伤和凋亡较对照组有明显增加。

电离辐射导致肿瘤细胞死亡的主要原因是其能直接损伤肿瘤细胞的 DNA。真核生物的染色体是由 DNA 及缠绕其外围的组蛋白组成。当 DNA 发生损伤的同时, 组蛋白 H2AX 会磷酸化形成  $\gamma$ -H2AX<sup>[12]</sup>。因此,  $\gamma$ -H2AX 广泛应用于辐射或化学物所致的 DNA 损伤的检测。53BP1 是肿瘤抑制基因 p53 的转录激活物, DNA 受到损伤时, 53BP1 会发生磷酸化, 并由细胞核内的弥散分布状态迅速聚集到 DNA 受损位点<sup>[13]</sup>。本实验显示 CNE2-shxrc3 组和 CNE2-shluc 组细胞在放疗前 DNA 损伤修复聚焦点( $\gamma$ -H2AX 和 53BP1 共阳性)的个数无明显差

异,放疗后 36 h 两组却差异有统计学意义,说明 *xrcc3* 基因可能是通过调控射线照射后 DNA 损伤的修复聚焦点的形成,进而影响鼻咽癌细胞对放疗的敏感性。电离辐射会导致细胞 DNA 的损伤若没有被及时修复,会导致细胞在下一个分裂周期或多个分裂周期后发生凋亡。本研究进一步通过流式细胞仪检测放疗前后细胞凋亡比例,结果显示在放疗前 CNE2-sh*xrcc3* 组和 CNE2-sh*luc* 组细胞的凋亡数目没有明显差异,而放疗后 48 h 显示 CNE2-sh*xrcc3* 组的细胞凋亡数目较 CNE2-sh*luc* 组有明显提高。这一结果与本研究后续检测凋亡相关蛋白 PARP 及 Caspase-3 的结果相一致。这两个结果说明, *XRCC3* 高表达引起的放疗抵抗的原因之一可能是通过抑制细胞凋亡通路的激活来阻止细胞的凋亡。

综上所述,本研究的实验结果显示通过沉默 *xrcc3* 基因能够增加鼻咽癌细胞放疗后凋亡,从而增强细胞的放疗敏感性。其机制可能是,干扰 *XRCC3* 的表达能增加电离辐射引起的 DNA 损伤和凋亡通路的激活。因此,通过靶向沉默 *xrcc3* 基因可改善鼻咽癌细胞的放疗抵抗,可能为将来的鼻咽癌治疗提供一定的参考。

### 参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Su S F, Han F, Zhao C, et al. Long-term outcomes of early-stage nasopharyngeal carcinoma patients treated with intensity-modulated radiotherapy alone[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 82(1): 327-33.
- [3] Lu H, Yao M. The current status of intensity-modulated radiation therapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(1): 27-36.
- [4] Sakata K, Someya M, Matsumoto Y, et al. Ability to repair DNA double-strand breaks related to cancer susceptibility and radiosensitivity[J]. *Radiat Med*, 2007, 25(9): 433-8.
- [5] Griffin C S, Simpson P J, Wilson C R, et al. Mammalian recombination-repair genes *XRCC2* and *XRCC3* promote correct chromosome segregation[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(10): 757-61.
- [6] Cheng J, Liu W, Zeng X, et al. *XRCC3* is a promising target to improve the radiotherapy effect of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(12): 1678-86.
- [7] Carvalho J F, Kanaar R. Targeting homologous recombination-mediated DNA repair in cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014, 18(4): 427-58.
- [8] Griffin C S, Simpson P J, Wilson C R, et al. Mammalian recombination-repair genes *XRCC2* and *XRCC3* promote correct chromosome segregation[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(10): 757-61.
- [9] Tebbs R S, Zhao Y, Tucker J D, et al. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the *XRCC3* DNA repair gene[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(14): 6354-8.
- [10] Bishop D K, Ear U, Bhattacharyya A, et al. *Xrcc3* is required for assembly of Rad51 complexes *in vivo*[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(34): 21482-8.
- [11] Xu Z Y, Loignon M, Han F Y, et al. *Xrcc3* induces cisplatin resistance by stimulation of Rad51-related recombinational repair, S-phase checkpoint activation, and reduced apoptosis[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314(2): 495-505.
- [12] Taneja N, Davis M, Choy J S, et al. Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 2273-80.
- [13] Tartier L, Gilchrist S, Burdak-Rothkamm S, et al. Cytoplasmic irradiation induces mitochondrial-dependent 53BP1 protein relocalization in irradiated and bystander cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5872-9.

## Lentiviral-mediated silencing of *xrcc3* enhances nasopharyngeal carcinoma cells radiosensitivity

Yuan Xiaolong, Xu Jifei, Li Wenyu, et al

(Dept of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the effect of *xrcc3* on nasopharyngeal carcinoma cells radiosensitivity. **Methods** Colony formation assay was used to calculate the survival fraction under different radiation dose, and the sensitization enhancement ratio (SER) was also calculated. Cell apoptosis was examined by flow cytometry and Western blot was used to detect apoptosis proteins. DNA damage was determined by immunofluorescence. **Results** The results indicated that nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells deficient in *xrcc3* exhibited increased clonogenic survival in response to ionizing radiation (IR) compared with control cells, and the SER = 1.232 3. Silence of *xrcc3* in

# 不同放化疗敏感性的食管癌细胞株中 MGMT 和 Survivin 的表达

程旭<sup>1</sup>, 钱立庭<sup>2</sup>, 赵于飞<sup>2</sup>, 丁伯金<sup>3</sup>

**摘要** 目的 比较 3 株食管鳞癌细胞株对放化疗的敏感性, 并检测 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT) 和生存蛋白(Survivin) 在其中的表达情况。方法 MTT 实验检测 3 株细胞系在不同浓度顺铂和氟尿嘧啶药物中的存活分数, 并利用半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>) 值评估细胞株对化疗药物的耐受性; 克隆形成实验检测 3 株细胞系在不同剂量照射后的存活分数, 并利用单击多靶模型拟合剂量存活曲线计算放射生物学参数 D<sub>0</sub>、D<sub>q</sub>、N、SF<sub>2</sub> 以评价 3 株细胞系对放射线的敏感性; Western blot 和 qRT-PCR 检测 3 株细胞系中 MGMT 和 Survivin 的表达。结果 TE-1 在顺铂和氟尿嘧啶中的 IC<sub>50</sub> 值高于 KYSE-70; TE-1 较 KYSE-70 对放射线耐受( $P < 0.05$ )。Western blot 和 qRT-PCR 显示 MGMT 和 Survivin 的表达在 TE-1 中均高于 KYSE-70, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 MGMT 和 Survivin 在对化疗和放疗耐受的细胞株中表达水平较高, 在对化疗和放疗敏感的细胞株中表达较低, 这为更好地研究食管鳞癌放化疗耐受机制提供了实验依据。

**关键词** 食管鳞癌; 放化疗敏感性; MGMT; Survivin

中图分类号 R 73

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)05-0661-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.05.008

食管癌是最常见的肿瘤之一, 而我国是食管癌的高发地区, 占全球每年新发食管癌病例约为 22.3%<sup>[1-3]</sup>。我国亦是世界上食管癌病死率较高的国家之一, 食管癌年平均病死率达 0.02% (18.6/10 万), 其中 90% 以上的病例为食管鳞癌<sup>[2]</sup>。食管癌的治疗目前仍以手术为主, 再辅以放

化疗、免疫治疗等。但是在放化疗过程中, 治疗效果不佳的主要原因往往是由于肿瘤细胞对放射治疗和化学治疗敏感性变差, 并逐渐产生抗拒。故研究其抗拒机制、寻找放射和化疗药物增敏途径是提高治愈率的途径之一。该课题通过筛选对放射线和化疗药物敏感和耐受的食管癌细胞株, 研究 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT) 和凋亡蛋白(Survivin) 在对放射线与化疗药物敏感性和耐受的食管鳞癌细胞株中的表达差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株** 高分化人食管鳞癌细胞株 KYSE-450、低分化人食管鳞癌细胞株 KYSE-70、高分化人食管鳞癌细胞株 TE-1 均购自中国科学院上海细胞库。

**1.1.2 试剂及仪器** FBS、Lipofectamine2000 试剂(美国 Invitrogen 公司); RPMI Medium-1640(美国 Gibco 公司); MTT(美国 Sigma 公司); 鼠抗人 MGMT 单克隆抗体、兔抗人 Survivin 单克隆抗体、小鼠抗人 GAPDH 抗体(美国 Abgent 公司); 增强化学发光剂(ECL) A 液、B 液(美国 Pierce 公司); 美国瓦里安高能直线加速器(CX-SN5340, 美国 VARIAN 公司, 瓦里安 X-ray generator)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人食管鳞癌细胞株 KYSE-450、KYSE-70、TE-1 用含有 10% FBS 的 RPMI Medium-1640 培养基培养, 生长环境为 5% CO<sub>2</sub>、100% 的湿度、37 °C。

**1.2.2 克隆形成试验检测细胞株对放射线的敏感性** 取上述指数生长期细胞, 用 0.25% 的胰酶消化

2017-02-05 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1508085SMH233)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学附属省立医院肿瘤放疗科, 合肥 230001

安徽省肿瘤医院<sup>2</sup> 放疗科、<sup>3</sup> 放疗治疗室, 合肥 230088

作者简介: 程旭, 女, 硕士研究生;

钱立庭, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-

mail: money2004@sina.com

CNE2 cells increased radiation-induced DNA damage and apoptosis. **Conclusion** The findings show that *xrcc3* may increase nasopharyngeal carcinoma cells radiation sensitivity by decreasing radiation-induced DNA damage and apoptosis. Therefore, *xrcc3* might be a promising therapeutic gene for nasopharyngeal carcinoma.

**Key words** nasopharyngeal carcinoma; XRCC3; radiotherapy; apoptosis; DNA damage