

# 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 D0、Dq、N、SF2 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

食管癌是世界上最常见的肿瘤之一, 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

成单细胞悬液,计数后取含 200 ~ 1 000 个细胞的单细胞悬液,等密度稀释后接种在 6 孔培养板上,分别用 0、2、4、6、8 Gy 进行照射(照射参数: SAD 设为 100 cm,即从放射源到贴壁细胞的距离,剂量率为 200 cGy/min,源皮距: 100 cm,照射视野为 20 cm × 20 cm),照射后的细胞继续培养 10 ~ 14 d。待出现可见集落时终止培养,弃培养液,甲醛固定 20 min,结晶紫染色 30 min,计数细胞数 > 50 个以上的集落数,每个剂量设 3 个平行样本。按照单击多靶模型利用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制细胞存活曲线,存活分数(survival fraction, SF)  $SF = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$  进行数据拟合,得到放射生物学参数平均致死量( $D_0$ ),指曲线指数区存活分数下降 63% 所需的照射剂量; 准阈剂量( $D_q$ )反映肩区大小,表明细胞亚致死损伤修复能力; N 为外推数或靶数,反应肩区大小; SF2 为细胞受到 2 Gy 照射后的存活分数。

**1.2.3 MTT 法检测细胞株对化疗药物的敏感性药物敏感度** 分别取 100  $\mu$ l 含 2 000 个细胞的细胞悬液加入 96 孔板中(每组 3 孔),加入不同浓度化疗药顺铂(cisplatin, DDP)和 5-氟尿嘧啶(5-FU),药物浓度梯度见表 1, PBS 作为内参,化疗药作用 48 h 后,分别加入 MTT 37  $^{\circ}$ C 孵化 4 h,更换 150  $\mu$ l DM-SO。细胞存活数根据 450 nm 处吸光度值评估。利用 Msvbvm50 软件计算半数抑制浓度(inhibitory concentration 50%,  $IC_{50}$ ) 值。

表 1 DDP 和 5-FU 在不同食管鳞癌细胞株中设置的药物浓度梯度

化疗药物	KYSE-70	KYSE-450	TE-1
DDP( $\mu$ g/ml)	0.25、1.4、16.64	0.25、1.4、16.64	1.4、16.64、256
5-FU( $\mu$ g/ml)	0.25、1.4、16.64	6.25、25.100、400、1 600	125、500、2 000、8 000

**1.2.4 Western blot 法检测蛋白表达贴壁的细胞** 用冰冷的 PBS 冲洗 3 次后,收集细胞入 EP 管中,重悬,加入 1  $\times$  蛋白裂解液。将蛋白样品调整浓度后等量加入 12% 的 SDS-聚丙烯酰胺电泳分离。在 TanonEPS200 电转系统进行转膜,将样品蛋白电转至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。孵育一抗、二抗。然后转入暗室加 ECL 发光液,曝光显影,扫描灰度值。

**1.2.5 实时荧光定量 PCR TRIzol 法抽提样品总 RNA** 将得到的 RNA 反转录为 cDNA,使用 Quanti-Fast SYBR Green PCR Kit 进行 Real-time PCR。PCR 引物均由德国 QIAGEN 公司合成, Survivin 上游引物

为: 5'-GGCATGGGTGCCCCGACGTT-3', 下游引物为: 5'-AGAGGCCTCAATCCATGGCA-3'; MGMT 上游: 5'-TTGGAAAAATGGACAAGGATTG-3', 下游: 5'-AGACCCTGCTGACAACCAGA-3';  $\beta$ -actin 上游: 5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3', 下游: 5'-CTG-GAAGGTGGACAGCGAGG-3'。Real-time PCR 反应体系为: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 10 s; 60  $^{\circ}$ C 30 s; 40 个循环,溶解曲线温度 60 ~ 95  $^{\circ}$ C,所有样本做 3 个复孔,用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析各个基因的相对表达量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 统计软件分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。3 株食管鳞癌细胞系对化疗药物的  $IC_{50}$  值及 MGMT、Survivin 蛋白和 mRNA 的表达水平的比较均采用单因素方差分析。采用 GraphPad Prism 5.0 软件对克隆形成试验的放射生物学参数进行统计和处理。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 KYSE-450、KYSE-70、TE-1 细胞照射剂量存活曲线及其生物学参数** 采用 GraphPad Prism 5.0 进行细胞生存曲线的拟合,3 种食管鳞癌细胞株的细胞存活分数都随着照射剂量的增加而减少,见图 1,  $D_0$ 、 $D_q$ 、N 和 SF2 值见表 2。上述结果表明, KYSE-70 对放射线较为敏感, TE-1 和 KYSE-450 对放射线均较为耐受。

表 2 3 株食管鳞癌细胞株  $D_0$ 、 $D_q$ 、N、SF2 值的比较( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

细胞系	$D_0$	$D_q$	N	SF2
KYSE-450	3.48	0.46	1.39	0.68 $\pm$ 0.04
KYSE-70	2.36	0.53	1.44	0.56 $\pm$ 0.03
TE-1	2.68	1.58	2.11	0.73 $\pm$ 0.06

**2.2 KYSE-450、KYSE-70、TE-1 细胞在不同浓度 DDP 和 5-FU 中的剂量存活曲线及其  $IC_{50}$  值** 如图 2 和表 3 所示, DDP 和 5-FU 作用 48 h, 食管鳞癌细胞株 KYSE-450、KYSE-70、TE-1 在不同浓度化疗药物中细胞存活率具有明显差异,说明其对不同浓度化疗药物的耐受能力具有明显不同,而根据  $IC_{50}$  计算软件计算出不同细胞株相对不同化疗药物的  $IC_{50}$  值,也证实了食管鳞癌细胞株 TE-1 对化疗药物 DDP (TE-1 细胞对 DDP 的  $IC_{50}$  值约是 KYSE-70 的 9 倍) 和 5-FU (TE-1 细胞对 5-FU 的  $IC_{50}$  值约是 KYSE-70 的 133 倍) 较为耐受。与 TE-1 细胞的  $IC_{50}$  值比较,差异均有统计学意义( $F = 199.9、157.9, P < 0.05$ )。

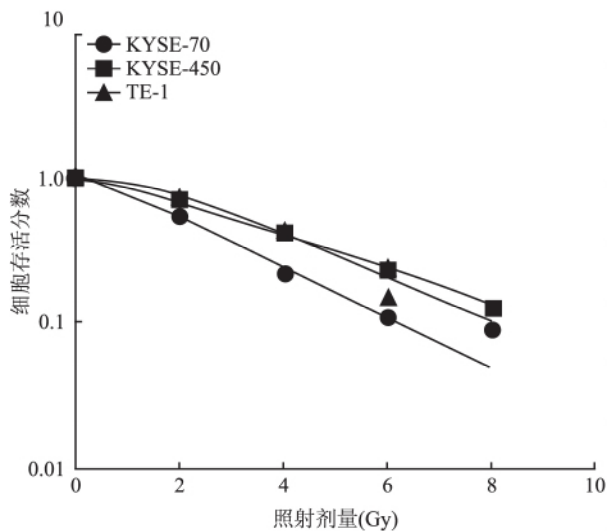


图1 放射线照射后食管鳞癌细胞的存活曲线

表3 食管鳞癌细胞株 KYSE-450、KYSE-70、TE-1 在化疗药物中 IC<sub>50</sub> 值 (n = 3  $\bar{x} \pm s$ )

药物	KYSE-450	KYSE-70	TE-1
DDP	6.670 ± 0.207	2.280 ± 0.017	18.900 ± 0.943
5-FU	92.010 ± 1.042	1.500 ± 0.030	200.000 ± 2.062

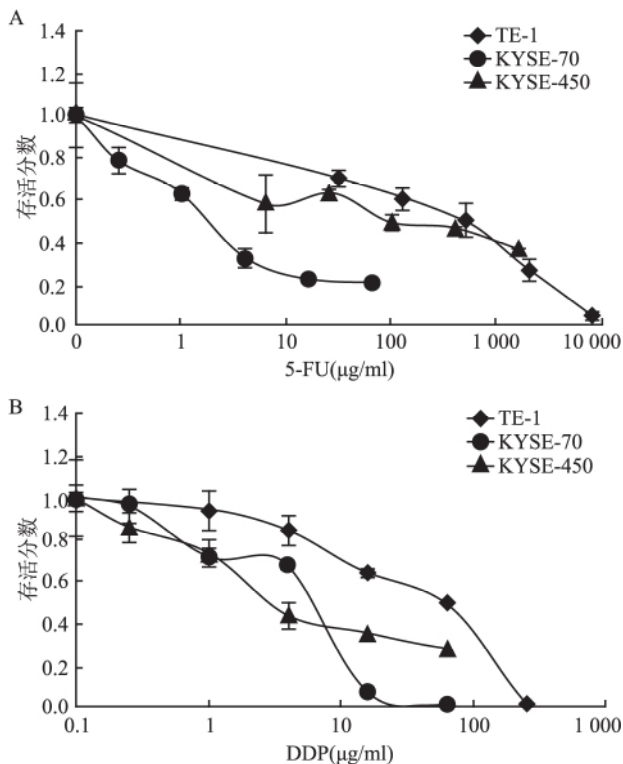


图2 不同质量浓度的 DDP 和 5-FU 作用 48 h 后细胞的存活率  
A: 5-FU; B: DDP

2.3 MGMT 和 Survivin 蛋白在 KYSE-450、KYSE-70、TE-1 细胞系中的表达 TE-1 细胞 MG-

MT 蛋白和 Survivin 蛋白表达最高,其次是 KYSE-70、KYSE-450。与 TE-1 细胞 MGMT 蛋白和 Survivin 蛋白表达水平比较,差异均有统计学意义 (F = 367.7、213.5 P < 0.05)。见图 3。

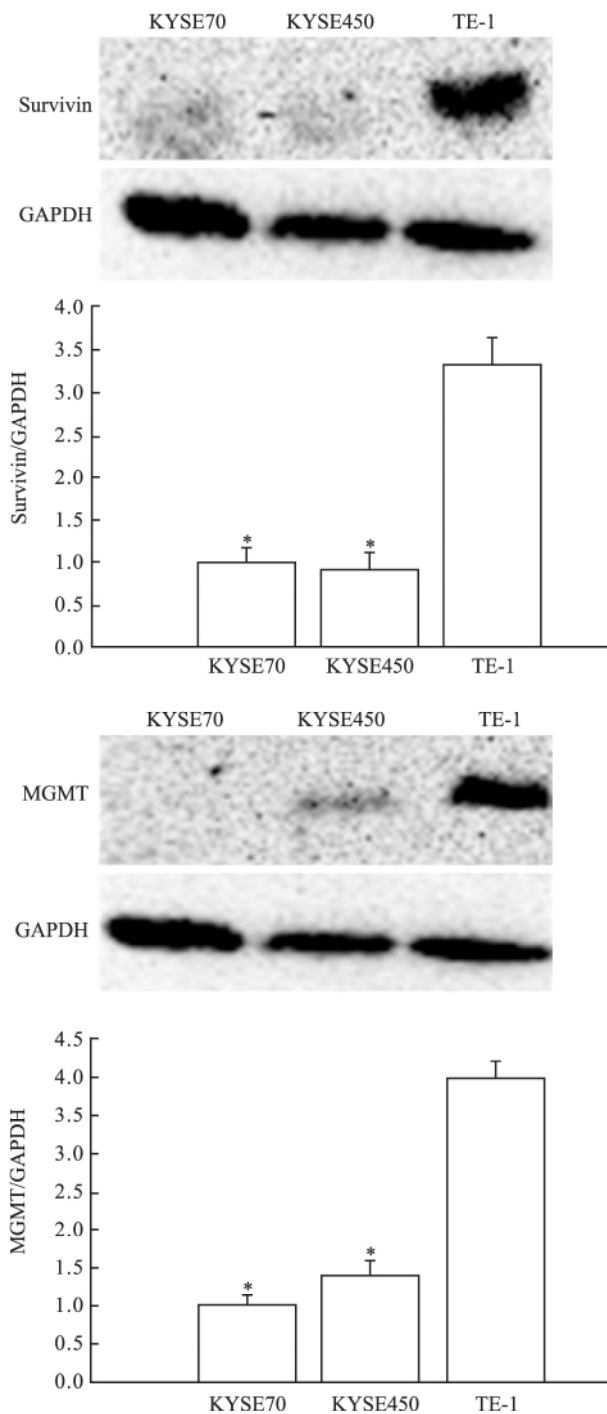


图3 食管鳞癌细胞株 KYSE-450、KYSE-70、TE-1 中 MGMT、Survivin 的表达  
与 TE-1 比较: \* P < 0.05

2.4 实时荧光定量 PCR 验证 针对 MGMT 和 Survivin 在 TE-1 (耐受细胞株) 和 KYSE-70 (敏感细

胞株) 中的表达情况,  $\beta$ -actin 作为内参对照, 使用 Real-time PCR 对其表达差异进行验证。MGMT 在 TE-1 细胞中, 与 KYSE-70 相比表达高 ( $5.47 \pm 0.32$ ) 倍; Survivin 在 TE-1 细胞中, 与 KYSE-70 相比表达高 ( $2.73 \pm 0.26$ ) 倍, 差异有统计学意义 ( $t = 24.633, 6.839, P < 0.05$ )。见图 4。

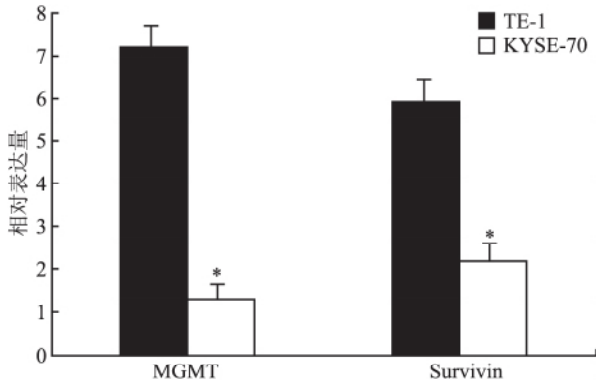


图 4 MGMT 和 Survivin 在两株细胞中的相对表达水平与 TE-1 比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

放化疗是食管癌的主要治疗手段。如何提高食管癌细胞对放射治疗和化学药物治疗的敏感性一直是研究的热点。本研究依据克隆形成试验和 MTT 试验来评估食管鳞癌细胞株的对放射线和化疗药物的敏感性。克隆形成试验在评估放射线对细胞的毒性时仍广泛被认为是最可靠的体外检测方法<sup>[4]</sup>, 而在食管癌治疗过程中, 顺铂和氟尿嘧啶作为化疗方案经常被采用, 因此利用 MTT 试验检测食管鳞癌细胞株对顺铂和氟尿嘧啶的化疗敏感性显得尤为必要。本研究显示 KYSE-70 较 TE-1 对化疗药物和放射线都更为敏感。

MGMT 是一种 DNA 损伤修复蛋白, 其功能丢失会导致 DNA 修复能力改变, 进而导致肿瘤发生过程中突变率的增加<sup>[5]</sup>。MGMT 蛋白的表达与肿瘤的耐药性有关, 是造成肿瘤耐药的主要原因, 在胶质瘤中, 化疗药物替莫唑胺的有效性与 MGMT 的活动性密切相关。MGMT 的甲基化与很多肿瘤的发生发展有密切关系, 如胃癌、食管癌、肺癌、结直肠癌、肝癌<sup>[6-7]</sup>。在东北印度的食管鳞癌患者中, Das et al<sup>[8]</sup> 运用甲基化特异性聚合酶链式反应技术 (MSP) 检测出患者中 MGMT 基因启动子甲基化高达 70%。有研究<sup>[9]</sup> 表明, 放化疗敏感患者的 MGMT 的甲基化水平明显偏低 (相对于放化疗不敏感的患者), 并且相

对于放化疗不敏感的患者, 放化疗敏感患者的 MGMT 的甲基化水平明显偏低, 表明该基因可能参与调控食管癌的放化疗敏感性。

Survivin 作为至今发现抗凋亡作用最强的基因, 主要通过直接抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性而阻断细胞凋亡过程。在生理状态下, Survivin 仅表达于胚胎中, 在成人已分化组织中呈低表达或不表达, 但在病理状态下, Survivin 广泛表达于人类各种恶性肿瘤组织中, 如胃癌、食管癌、结直肠癌、肝癌、乳腺癌、宫颈癌、III ~ IV 期神经母细胞瘤等。有研究<sup>[10]</sup> 表明, 紫杉醇、顺铂、阿霉素、丝裂霉素、氟尿嘧啶等均可诱导肝癌组织中 Survivin 表达上调, 降低化疗药物对细胞的毒性, 致使化疗敏感性降低。Sato et al<sup>[11]</sup> 报道 Survivin 在食管癌中高表达 (相对于 5 种正常器官组织中 Survivin 表达水平)。更多研究<sup>[12]</sup> 证实 Survivin 是食管癌患者独立的预后因素, 在食管癌细胞系中, Survivin 的过表达可以减少由于放射线诱导所致的细胞凋亡。

本研究表明在对放射线和化疗药物敏感的食管鳞癌细胞株中 MGMT 和 Survivin 蛋白的表达显著减少, 提示食管鳞癌对放射线和化疗药物的敏感性可能与 MGMT 和 Survivin 蛋白的表达有一定联系, 但是其具体机制有赖于进一步研究证实。总之, 目前研究提示 MGMT 和 Survivin 蛋白对放射线和化疗药物敏感的食管鳞癌细胞株中表达水平较低, 但尚未对 MGMT 和 Survivin 基因是否直接影响食管鳞癌细胞株的放射线和化疗药物敏感性, 且影响其敏感性的内在生物学机制也尚不明确; 而且 MGMT 和 Survivin 在食管癌组织的表达情况有待进一步研究, 其临床应用前景有待进一步考察。故下一步需就这些问题进行探讨, 这对于提高食管癌放射治疗疗效、为患者制定合理有效的治疗方案具有重要的临床意义。

本研究结果表明在对放射线和化疗药物敏感的食管鳞癌细胞株中 MGMT 和 Survivin 蛋白的表达显著减少, 提示 MGMT 和 Survivin 可能共同参与调控食管鳞癌对放射线和化疗药物的敏感性, 并可能与 MGMT 和 Survivin 蛋白的表达有一定联系, 但是其具体机制有待于进一步研究证实。下一步的研究重点是敲除或过表达 MGMT 和 Survivin 是否直接影响食管鳞癌各个细胞株对放射线和化疗药物的敏感性, 同时寻找在食管鳞癌细胞系中调节 MGMT 和 Survivin 基因并作进一步的机制研究。下一步需就这些问题进行探讨, 这对于提高食管癌放射治疗疗

效、为患者制定合理有效的治疗方案具有重要的临床意义。

### 参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359–86.
- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin* 2015, 65(2): 87–108.
- [3] Gupta B, Kumar N. Worldwide incidence, mortality and time trends for cancer of the oesophagus[J]. *Eur J Cancer Prev* 2016, 26(2): 107–18.
- [4] Abazeed M E, Adams D J, Hurov K E, et al. Integrative genomic profiling of squamous cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(20): 6289–98.
- [5] Du L, Wang H, Xiong T, et al. The polymorphisms in the MGMT gene and the risk of cancer: a meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2013, 34(5): 3227–37.
- [6] Chen J, Huang Z J, Duan Y Q, et al. Aberrant DNA methylation of P16, MGMT, and hMLH1 genes in combination with MTHFR C677T genetic polymorphism and folate intake in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(10): 5303–6.
- [7] Gao S, Ding L H, Wang J W, et al. Diet folate, DNA methylation and polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase in association with the susceptibility to gastric cancer[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(1): 299–302.
- [8] Das M, Sharma S K, Sekhon G S, et al. Promoter methylation of MGMT gene in serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma in north east india[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(22): 9955–60.
- [9] Hamilton J P, Sato F, Greenwald B D, et al. Promoter methylation and response to chemotherapy and radiation in esophageal cancer[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006, 4(6): 701–8.
- [10] Chao J I, Kuo P C, Hsu T S, et al. Down-regulation of survivin in nitric oxide-induced cell growth inhibition and apoptosis of the human lung carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(19): 20267–76.
- [11] Sato F, Abraham J M, Yin J, et al. Polo-like kinase and survivin are esophageal tumor-specific promoters[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(2): 465–71.
- [12] Zhu H, Wang Q, Hu C, et al. High expression of survivin predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma following radiotherapy[J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(6): 1147–53.

## Expression of MGMT and Survivin in esophageal squamous cancer cell lines susceptible to chemo-radiosensitivity

Cheng Xu<sup>1</sup>, Qian Liting<sup>2</sup>, Zhao Yufei<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Radiotherapy and Oncology The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University Hefei 230001;

<sup>2</sup>Dept of Radiotherapy and Oncology Anhui Provincial Cancer Hospital Hefei 230088)

**Abstract Objective** To detect the radiosensitivity and chemosensitivity in different esophageal squamous cancer cells and compare the MGMT and Survivin protein expression. **Methods** MTT assay was used to detect the viability of three cell lines in different concentrations of cisplatin and fluorouracil, and IC<sub>50</sub> value was used to evaluate the tolerance of the cell lines to chemotherapeutic drugs. Clone formation assay was used to evaluate the radiosensitivity of three cell lines to the radiation by the radiation biological parameters of D0, Dq, N, SF2 of the multiple target model. Western blot and qRT-PCR was used to detect the expression of three cell lines. **Results** IC<sub>50</sub> value of TE-1 was higher than that of KYSE-70 in cisplatin and 5-fluorouracil. TE-1 was more tolerant of radiation compared with KYSE-70 ( $P < 0.05$ ). Western blot and qRT-PCR showed that the expression of MGMT and Survivin in TE-1 were higher than that of KYSE-70 ( $P < 0.05$ ). The difference was statistically significant. **Conclusion** The expression of MGMT and survivin in chemotherapy-resistant and radiotherapy-resistant cell lines is higher than that in the chemotherapeutic and radiotherapy-sensitive cell lines, which provide a better way to study the chemoradiation tolerance mechanism of esophageal squamous cell carcinoma.

**Key words** esophageal squamous cell carcinoma; radiosensitivity and chemosensitivity; MGMT; Survivin