

ZNF488 对鼻咽癌细胞放疗敏感性的影响

陈涵波^{1,2}, 田晓康³, 宗丹¹, 何侠^{1,2,4}, 尹丽^{1,2}

(1. 江苏省肿瘤医院 & 南京医科大学附属肿瘤医院 & 江苏省肿瘤防治研究所, 江苏南京 210009; 2. 南京医科大学第四临床医学院, 江苏南京 210000; 3. 南京中医药大学附属南京中医院, 江苏南京 210001; 4. 徐州医科大学, 江苏徐州 221000)

摘要: [目的] 探究沉默 ZNF488 后鼻咽癌细胞的放射敏感性变化。[方法] 基于 GEPIA 和 UALCAN 数据平台, 检索 ZNF488 在头颈鳞状细胞癌中的数据信息。在鼻咽癌细胞系中沉默 ZNF488, 采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 ZNF488 siRNA 转染效率。在剂量梯度的电离辐射处理下, 进行克隆形成和 CCK-8 检测, 评估电离辐射对鼻咽癌细胞增殖能力和存活率的影响。[结果] 基于生信数据平台, 检测到 ZNF488 在头颈部鳞癌中高表达, 与预后较差相关, 且与 MAP3K14、NFKB2 存在相关性 (P 均 <0.05)。在细胞表型试验中, 通过 qRT-PCR 检测鼻咽癌细胞系中 ZNF488 siRNA (mRNA) 表达量, 从中选择两株表达水平相对较高的 SUNE-1 和 CNE-1。随后评估转染效率, 在转染 siRNA 的实验组, ZNF488 表达量明显低于对照组。降低 ZNF488 表达水平后接受 0Gy、2Gy、4Gy、6Gy、8Gy 剂量梯度的电离辐射, 克隆形成和 CCK-8 检测结果显示, 与对照组相比, 实验组的细胞增殖和存活分数显著下降 (P 均 <0.05)。[结论] 沉默 ZNF488 后鼻咽癌细胞的增殖能力和存活分数下降, 放射敏感性增加, ZNF488 可能与放疗敏感性相关。

关键词: 鼻咽肿瘤; ZNF488; 放射敏感性

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)10-0869-06

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.10.B004

Effect of ZNF488 on Radiosensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma Cells

CHEN Han-bo^{1,2}, TIAN Xiao-kang³, ZONG Dan¹, HE Xia^{1,2,4}, YIN Li^{1,2}

(1. Jiangsu Cancer Hospital & The Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University & Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009, China; 2. The Fourth School of Clinical Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210000, China; 3. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China; 4. Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of ZNF488 on radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. [Methods] Bioinformatics data of ZNF488 in head and neck squamous cell carcinoma were retrieved from GEPIA and UALCAN data platforms. Human NPC SUNE-1 and CNE-1 cells were transfected with ZNF488 siRNA. The transfection efficiency was determined by qRT-PCR and Western blot. The effects of radiation on proliferation and survival of nasopharyngeal carcinoma cells were evaluated by clone formation and CCK8 methods. [Results] Based on the bioinformation data platform, the expression level of ZNF488 was correlated with prognosis in head and neck squamous cell carcinoma, and was significantly correlated with expression of MAP3K14 and NFKB2 (all $P < 0.05$). In the siRNA transfected group, the expression level of ZNF488 was significantly lower than that of the control group. Transfected NPC cells were received radiation with a dose gradient of 0Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy and 8Gy. The results of clone formation and CCK8 methods showed that cell proliferation and survival scores of the experimental group were significantly decreased compared with the control group (all $P < 0.05$). [Conclusion] The proliferation and survival scores of nasopharyngeal carcinoma cells are decreased and the radiosensitivity is increased after ZNF488 silencing, indicating that ZNF488 may be associated with radiosensitivity of NPC cells.

Subject words: nasopharyngeal carcinoma; ZNF488; radiosensitivity

基金项目: 国家青年科学基金项目 (81702693); 医院科研基金项目 (ZK201602)

通信作者: 何侠, 副院长, 教授, 主任医师, 博士生导师, 博士; 江苏省肿瘤医院放疗科, 江苏省南京市玄武区百子亭 42 号 (210009); E-mail: hexiabm@163.com

尹丽, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师; 江苏省肿瘤医院放疗科, 江苏省南京市玄武区百子亭 42 号 (210009); E-mail: yinli_2012@126.com

收稿日期: 2020-06-08; **修回日期:** 2020-08-26

鼻咽癌(NPC)地域分布差异显著,诱因包括爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)感染。分化差的鼻咽癌是临床上最常见的类型,超过90%的鼻咽癌患者被诊断为Ⅱ型或Ⅲ型未分化和非角化性癌,具有高度侵袭性和转移性。由于特殊的解剖位置及病理特点,放射治疗(RT)为主要治疗手段。由于放疗技术的发展和化疗的广泛应用,在过去的三十年中,鼻咽癌的局部控制和生存率有了显著提高^[1]。一些患者在放疗后出现肿瘤残存或短期内病情进展,对放射线抵抗是治疗失败的主要原因^[2]。放射敏感性代表细胞、组织或器官对电离辐射有害作用的相对敏感性,决定了治疗效果。考虑到剂量的增加会加重放疗相关不良反应,探究合适的放射增敏靶标和放射增敏剂成为当前治疗放疗抵抗患者的有效方法。

肿瘤放疗抵抗与多种因素相关,包括肿瘤乏氧、DNA损伤修复、细胞增殖、凋亡及细胞周期等^[3]。目前,基因增敏是重要的研究发展方向。近年来对放疗抵抗的分子机制有了一些深入研究,p53、DNA依赖蛋白激酶(DNA-PK)、共济失调-毛细血管扩张症突变基因(ATM)、X线修复交叉互补基因(XRCC)、人端粒酶亚单位(hTERT)及乏氧靶向性自杀基因等^[4-5]。

锌指蛋白(ZNF)是最大的序列特异性DNA结合蛋白家族,由2%的人类基因编码。最近研究发现ZNF蛋白与人类癌症紧密联系在一起,其异常表达在不同方面促进了肿瘤的发生^[6-7]。ZNF488已被证明是一种致癌基因,通过激活Wnt/ β -catenin途径在鼻咽癌中诱导EMT来促进侵袭和肿瘤发生^[8]。研究发现ZNF488 siRNA可以抑制鼻咽癌细胞接受电离辐射后诱发的侵袭迁移能力^[9]。基于当前大数据挖掘和生物信息学分析,我们发现头颈部鳞癌组织中ZNF488与放疗增敏基因具有相关性,且表达水平显著高于正常组织,与预后有关。据我们所知,尚无关于ZNF488影响鼻咽癌细胞的放射敏感性方面的研究。本研究的目的是探究ZNF488对接受电离辐射鼻咽癌细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 鼻咽癌细胞株培养

人鼻咽癌细胞株均来自南京医科大学附属肿瘤医院。人鼻咽癌细胞解冻需经过37℃水浴复苏,后

培育在37℃室温、5% CO₂的温箱中。采用RPMI-1640培养基(含有10%胎牛血清),定期用PBS冲洗漂浮细胞。

1.2 ZNF488 siRNA 转染

转染过程在6孔板中进行,待转染的细胞密度达70%。先用1.5ml/孔的Lipoti-MEMI Reduced Serum Medium换液,暂置于温箱中。同时配置混合液,将5 μ l Lipo-fectamin2000、10 μ l ZNF488 siRNA和10 μ l siRNA Ctrl用250 μ l Lipoti-MEMI Reduced Serum Medium稀释,冰上静置5min,把含有5 μ l Lipofectamin2000混合液分别与含有10 μ l ZNF488 siRNA和10 μ l siRNA Ctrl混合液混合、摇匀。静置20min后,在6孔板中加入500 μ l/孔混合液,温箱培养4~6h。将培养液换为含血清的完全培养基,48h后转染完成。

1.3 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

使用Trizol试剂从培养的细胞株中提取总RNA,用Nanodrop 100分光光度计测定提取的RNA的浓度和质量。根据逆转录试剂盒说明书反转录成cDNA,稀释后作为模板进行qRT-PCR。使用SYBR green(Applied Biosystems),将ZNF488和 β -actin分别设为引物,作用条件是95℃ 5min、95℃ 40个循环15s、60℃ 1min。每个样品一式三份制备,并且实验重复3次。ZNF488引物序列为:5'-GAAAACAGAT-GGCGACTTAGCG-3'和5'-CTGCCGGTC-CTTCATCCTC-3'; β -actin为:5'-GGA-CTTCGAGCAA-GAGATGG-3'和5'-AGCACTGTGTT-GGCGTACAG-3'。

1.4 Western 免疫印迹

用PBS洗涤处理后的细胞,加入RIPA裂解缓冲液。在4℃下,离心20min获得上清液中的总蛋白。通过BCA蛋白测定试剂盒进行定量,在98℃下变性10min。随后,通过6%~12%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的蛋白质,并转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。将PVDF封闭在5%脱脂牛奶中2h,后加入一抗、二抗孵育。结束后使用发光剂显色,在凝胶成像仪中采集图像,用 β -actin作为内参照,观察PVDF膜上的条带。

1.5 CCK-8

按照制造商的协议进行CCK-8检测,收集转染后的细胞,胰酶消化后接种于96孔板,密度为2 $\times$ 10³/孔。将其置于培养箱中进一步培养,在不同时间

点,每孔分别加入 10ml CCK-8 溶液和 100ml 1640-混合液,在 37℃ 5%CO₂ 孵育 1h 后,测定 450 nm 光密度下的吸光度(OD 值)。

1.6 生信分析

GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) 可以基于癌症基因组图谱(TCGA)和 GTEx 数据,提供并输出曲线图和表格^[10]。UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 利用 TCGA 转录组和临床患者数据,研究人员能够研究基因的表达水平,并与临床数据相关联^[11]。本研究中,数据分析通过 UALCAN 中的“Expression”模块,以及 GEPIA 中的“Survival Plots”和“Correlation Analysis”模块获得。

1.7 统计学处理

数据表示为来自三个独立实验的平均值±标准差(SD),所有测量至少重复 3 次。使用 *t* 检验比较两组之间差异,使用 One-way ANOVA 比较多组之间差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZNF488 在头颈部鳞癌中的表达谱分析

通过 GEPIA 和 UALCAN 平台,首先获得头颈部鳞癌(HNSC)中肿瘤组织与正常组织的 ZNF488 表达情况。TCGA 和 GTEx 数据库来源的 519 例肿瘤组织和 44 例正常组织被纳入分析。结果显示,在肿瘤组织中 ZNF488 表达比正常组织高 (Figure 1A)。ZNF488 表达水平与生存预后相关 (Figure 1B)。相关性分析显示,ZNF488 与 MAP3K14、NFKB2 具有相关性($P<$

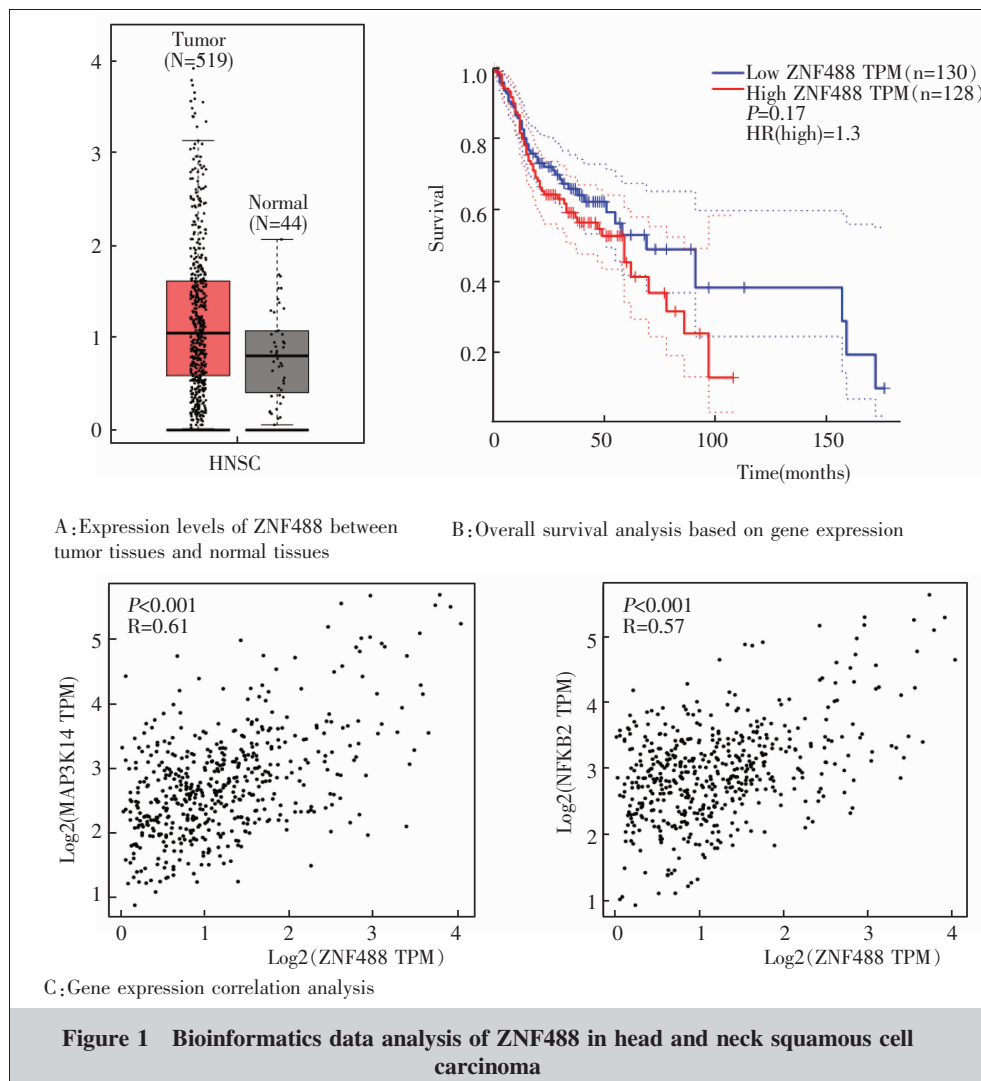
0.05)(Figure 1C)。

2.2 ZNF488 在 NPC 中表达上调

本实验中,使用了人鼻咽癌细胞系 SUNE-1、CNE-1、CNE-2、5-8F、HNE-1、6-10B 和人正常鼻咽细胞系 NP69。首先,用 qRT-PCR 检测这些细胞系中 ZNF488 的 mRNA 表达 (Figure 2A)。结果表明,在鼻咽癌细胞系中,ZNF488 在 mRNA 中的表达水平平均高于正常细胞。选择表达量相对较高的细胞系 SUNE-1 和 CNE-1 进行转染。在鼻咽癌细胞株中进行 ZNF488 沉默实验,通过 Western 免疫印迹验证转染效率 (Figure 2B~E)。

2.3 克隆形成

为评估 ZNF488 对 NPC 细胞放射敏感性的影响,用不同剂量的电离辐射处理转染后的细胞,进行克隆形成实验。沉默 ZNF488 后,SUNE-1 和 CNE-1



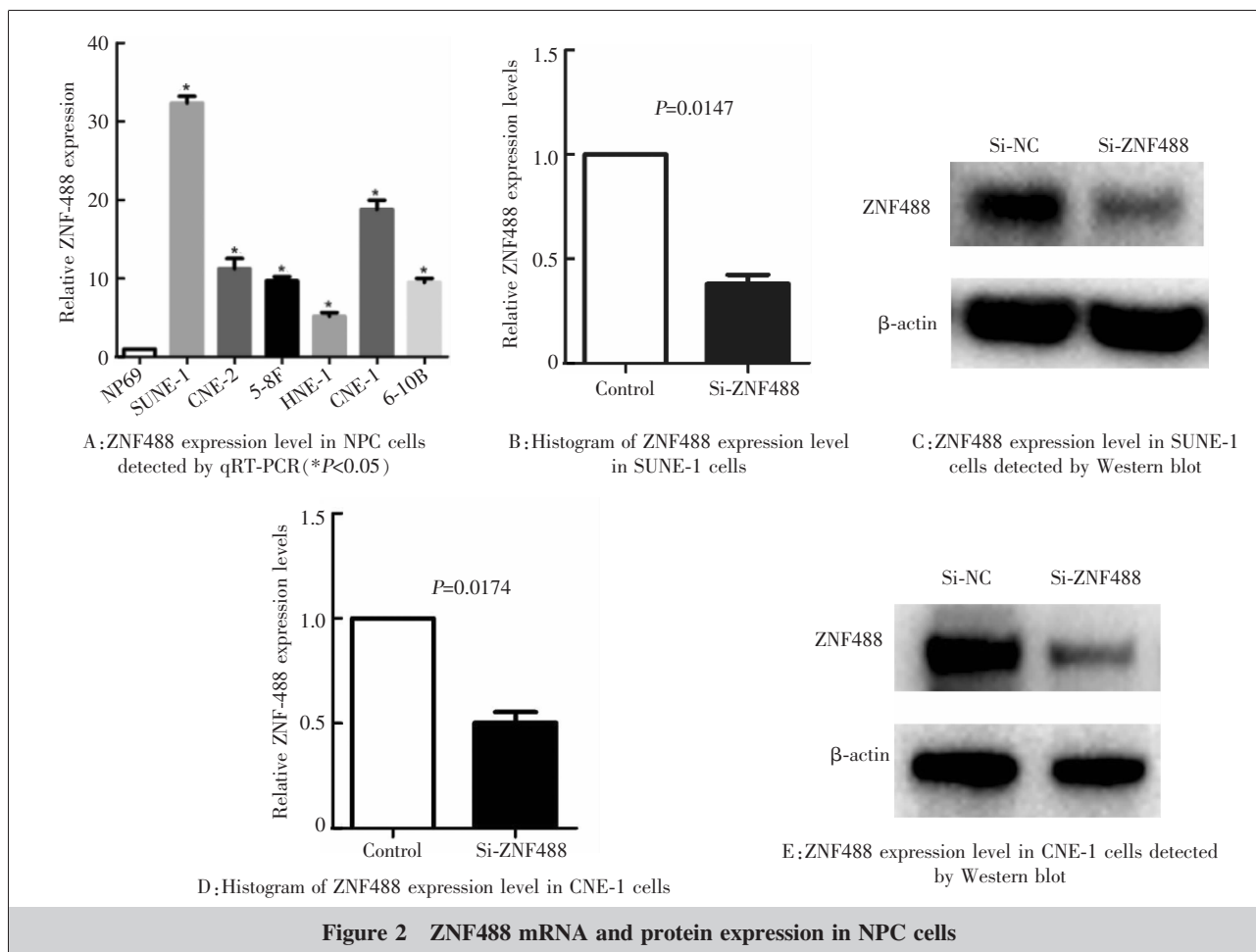


Figure 2 ZNF488 mRNA and protein expression in NPC cells

细胞中集落形成显著减少(Figure 3A、3B)。随着剂量增加,照射后实验组的存活分数下降,两株细胞在4Gy及以上照射强度时差异有统计学意义($P < 0.05$),放射敏感性增加(Figure 3C、3D)。

2.4 CCK-8 检测

经过剂量梯度的电离辐射后,CCK-8 检测结果显示实验组的细胞增殖能力减弱,放射敏感性增加,在SUNE-1和CNE-1细胞中,6Gy及以上照射强度组差异有统计学意义($P < 0.05$)(Figure 4A、4B)。

3 讨论

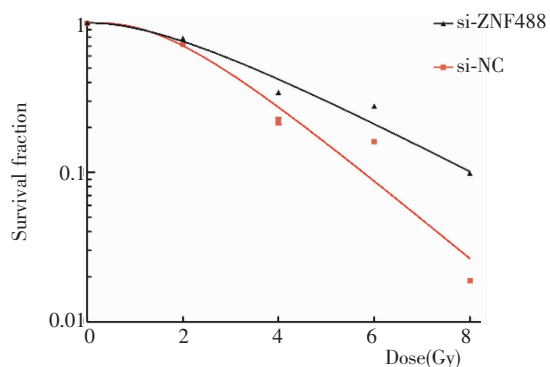
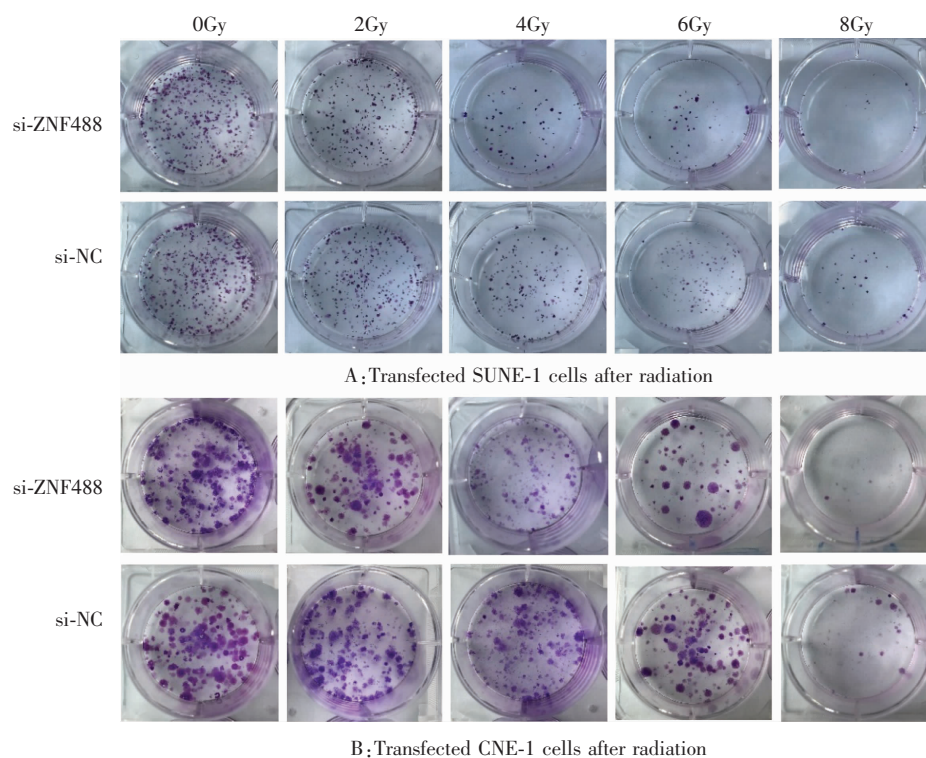
随着基因检测技术的发展,治疗策略逐渐实现个体化。本研究中发现沉默ZNF488可增强NPC细胞的放射敏感性,提示其与放疗敏感性密切相关。因此,ZNF488有潜力成为提高疗效的靶标基因。

放射治疗通过直接和间接作用来达到细胞毒性

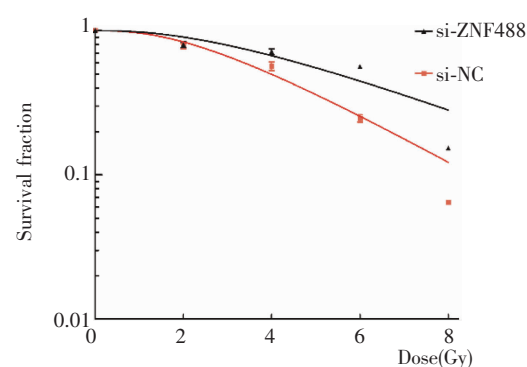
损伤的目的,辐射介导的DNA断裂和活性氧(ROS)损伤的积累最终导致细胞死亡。增加放疗敏感性成为未来发展的方向,其中基因增敏具有重要的临床应用价值。越来越多的证据表明,基因差异导致肿瘤细胞对放射线不同的反应,并且与细胞存活率有关。

ZNF488是锌指蛋白亚家族的成员,在多种人类组织中表达。本次研究中通过TCGA和GTEx数据库分析发现ZNF488在头颈部肿瘤组织中也存在过表达。之前研究发现,与正常组织相比,NPC组织中的ZNF488表达水平与较低的OS和PFS显著相关^[8]。而参与肿瘤恶性进展的基因,同样也在调控肿瘤治疗反应中起到关键作用。

肿瘤的放疗抵抗与细胞内信号转移通路的异常激活密切相关,其中NF- κ B通路在诱导放疗抵抗过程中起重要作用^[12]。有研究报道,游离NF- κ B通过核膜进入细胞核,并与其特定的DNA序列结合,诱导其下游细胞存活和抗凋亡靶基因的高表达,降低



C: Down-regulation of ZNF-488 expression level can enhance radiosensitivity in SUNE-1 cell line



D: Down-regulation of ZNF-488 expression level can enhance radiosensitivity in CNE-1 cell line

Figure 3 Colony formation in NPC cells after radiation in a dose gradient

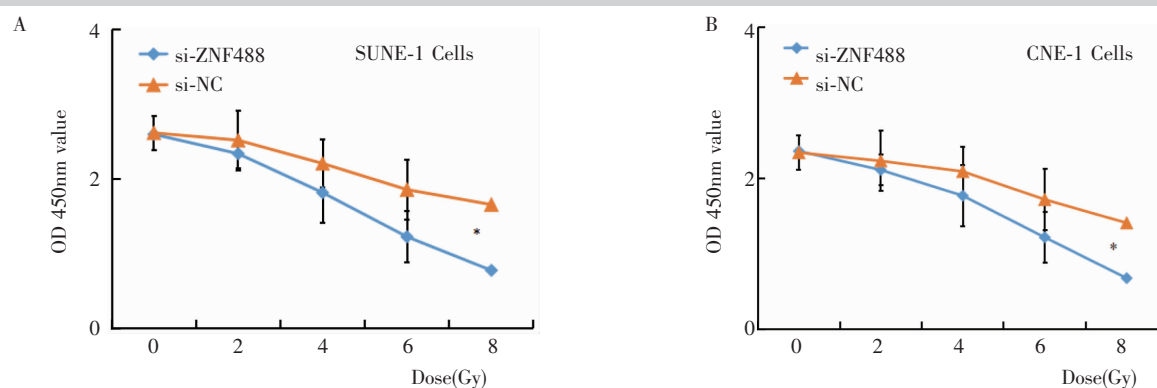


Figure 4 CCK-8 assay in NPC cells after radiation in a dose gradient (*: $P < 0.01$)

肿瘤细胞对放射治疗的敏感性^[13-14]。基因相关性分析结果显示, ZNF488 与 MAP3K14、NF- κ B2 相关性明显。MAP3K14 是一种 NF- κ B 途径的主要激活剂, 该途径通过将 NF- κ B 因子 p100 磷酸化, 从而将其蛋白水解过程诱导为活性形式 p52^[15]。NF- κ B2 蛋白同样是 NF- κ B 家族的成员^[16]。提示 ZNF488 对放射敏感性的影响可能是通过 NF- κ B 信号通路来发挥功能的, 起到放射抗性的作用。

本研究进一步丰富了 ZNF488 的生物学功能, 对放疗抵抗的分子机制进行探讨, 为鼻咽癌放疗抵抗人群的早期预警和放疗增敏提供新靶标。

参考文献:

- [1] Chen YP, Chan ATC, Le QT, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. *Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80.
- [2] Li Z, Li N, Shen L. MAP2K6 is associated with radiation resistance and adverse prognosis for locally advanced nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 6905-6912.
- [3] Alfonso JCL, Berk L. Modeling the effect of intratumoral heterogeneity of radiosensitivity on tumor response over the course of fractionated radiation therapy[J]. *Radiat Oncol*, 2019, 14(1): 88.
- [4] Gridley DS, Slater JM. Gene therapy: A possible aid to cancer radiotherapy[J]. *Discov Med*, 2004, 4(24): 408-414.
- [5] Sun X, Xing L, Deng X, et al. Hypoxia targeted bifunctional suicide gene expression enhances radiotherapy in vitro and in vivo[J]. *Radiother Oncol*, 2012, 105(1): 57-63.
- [6] Lupo A, Cesaro E, Montano G, et al. KRAB-Zinc finger proteins: a repressor family displaying multiple biological functions[J]. *Curr Genomics*, 2013, 14(4): 268-278.
- [7] Jen J, Wang YC. Zinc finger proteins in cancer progression[J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23(1): 53.
- [8] Zong D, Yin L, Zhong Q, et al. ZNF488 enhances the invasion and tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma via the Wnt signaling pathway involving epithelial mesenchymal transition[J]. *Cancer Res Treat*, 2016, 48(1): 334-344.
- [9] Ding K, Yin L, Gu JJ, et al. Effect of ZNF488 on ionizing irradiation-induced migration and invasiveness of nasopharyngeal cancer CNE1 cells[J]. *China Cancer*, 2017, 26(5): 395-399. [丁凯, 尹丽, 顾佳佳, 等. ZNF488 对电离辐射诱发的鼻咽癌细胞 CNE1 侵袭迁移能力的影响[J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(5): 395-399.]
- [10] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W98-W102.
- [11] Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, et al. UALCAN: a portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses [J]. *Neoplasia*, 2017, 19(8): 649-658.
- [12] Kozakai N, Kikuchi E, Hasegawa M, et al. Enhancement of radiosensitivity by a unique novel NF-kappaB inhibitor, DHMEQ, in prostate cancer[J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(4): 652-657.
- [13] Mulero MC, Huxford T, Ghosh G. NF-kappaB, IkappaB, and IKK: integral components of immune system signaling [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1172: 207-226.
- [14] Soleimani A, Rahmani F, Ferns GA, et al. Role of the NF-kappaB signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer[J]. *Gene*, 2020, 726: 144132.
- [15] Otto C, Giefing M, Massow A, et al. Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma[J]. *Br J Haematol*, 2012, 157(6): 702-728.
- [16] Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage[J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(11): 866-871.