

• 基础研究 •

时钟基因 Bmal1 对鼻咽癌移植瘤放疗敏感性的影响*

孟熙^① 李媛媛^② 蒋子庆^② 陈越^① 黎小梅^① 贺前勇^② 张蓬新^② 赵朝芬^② 唐雅雪^① 甘加应^② 周建奖^③
周定安^④ 金风^{①②}

摘要 目的:探讨双向调控时钟基因 Bmal1 (brain and muscle arnt-like 1) 对鼻咽癌 CNE1 裸鼠移植瘤生长的影响及与放疗敏感性的关系。方法:采用慢病毒感染方法,构建 Bmal1 基因 CNE1OE (过表达组)、CNE1OENC (过表达对照组)、CNE1sh3 (低表达组)、CNE1shNC (低表达对照组) 4 株细胞, Western blot 验证各组细胞 Bmal1 蛋白表达情况; 4 株细胞分别皮下注射相应的 4 组裸鼠, 移植瘤生长后测量其体积; 给予 6-MeV 电子线 15 Gy 照射裸鼠移植瘤, 观察放疗后各组移植瘤体积变化情况。剥离移植瘤, RT-PCR 及 Western blot 分别检测 Bmal1、P53、P21 mRNA 及蛋白表达情况。结果: Western blot 结果提示, 与各自对照组对比, CNE1OE 组 Bmal1 蛋白过表达, CNE1sh3 组 Bmal1 蛋白低表达, 表明细胞转染成功。成功构建裸鼠移植瘤模型, CNE1OE 组裸鼠移植瘤体积明显小于 CNE1OENC 组, CNE1sh3 组体积明显大于 CNE1shNC 组 ($P<0.05$)。放疗后, CNE1OE、CNE1OENC、CNE1shNC 组裸鼠移植瘤体积均缩小 ($P<0.05$), 其中 CNE1OE 组缩小最明显。CNE1sh3 组放疗前后自身体积变化差异无统计学意义。Bmal1 基因、P53 及 P21 的 mRNA 及蛋白相对表达量在 CNE1OE 组明显高于 CNE1OENC 组 ($P<0.05$), CNE1sh3 组则明显低于 CNE1shNC 组 ($P<0.05$)。结论: Bmal1 基因过表达能抑制鼻咽癌 CNE1 裸鼠移植瘤生长, 增强其放疗敏感性, 可能与 P53、P21 蛋白上调相关; 敲低则促进移植瘤生长, 导致其辐射抗拒, 可能与 P53、P21 蛋白下调相关。

关键词 鼻咽癌 Bmal1 基因 裸鼠 移植瘤 放疗敏感性

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2020.01.327

Effect of Bmal1 expression on radiotherapy sensitivity of nasopharyngeal carcinoma xenograft

Xi Meng¹, Yuanyuan Li², Jieqing Jiang², Yue Chen¹, Xiaomei Li¹, Qianrong He², Pengxin Zhang², Chaofen Zhao², Yaxue Tang¹, Jiaying Gan², Jianjiang Zhou³, Ding'an Zhou⁴, Feng Jin^{1,2}

Correspondence to: Jinjin Feng; E-mail: f8865@yeah.net

¹Clinical Medical College of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; ²Department of Oncology of the Guizhou Cancer Hospital Affiliated to Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China; ³Key Laboratory of Molecular Biology of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; ⁴Clinical Medicine Research Center of the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81560437) and Guizhou Education Department Innovation Group Major Research Project (No. 2017[038])

Abstract Objective: To explore the effects of up- and down-regulation of circadian clock gene Bmal1 on the growth and radiation sensitivity of nasopharyngeal carcinoma after CNE1 xenograft in nude mice. **Methods:** We produced four groups of cells using lentiviral transfection: cells overexpressing CNE1 (CNE1OE), negative control in which there was no overexpression of CNE1 (OENC), cells with short hairpin RNAi (CNE1sh3), and RNAi negative cells (CNE1shNC). We investigated the expression of Bmal1 protein in the aforementioned groups with Western blot. After subcutaneously injecting the four groups of cells in nude mice, the size of the xenograft was measured. Subsequently, the xenografts were irradiated with 15 Gy at 6 MeV, and variation in the xenograft volume was recorded. mRNA and protein expression levels of Bmal1, p53, and p21 in the xenograft were measured with RT-PCR and Western blot, respectively. **Results:** The CNE1OE group highly expressed Bmal1 protein whereas the CNE1sh3 group was silenced by RNAi as shown with the Western blot, indicating successful transfection. The xenograft in the nude mice developed well. The CNE1OE xenograft volume was lower than that of the CNE1OENC xenograft, whereas the CNE1sh3 xenograft was larger than the CNE1shNC xenograft ($P<0.05$). CNE1OE, CNE1OENC, and CNE1shNC xenograft volumes shrank after being irradiated ($t=4.32, 5.38, 5.16$, respectively; $P<0.05$) and the effect was the highest in the CNE1OE group. However, there was almost no variation in xenograft volume in the CNE1sh3 group. The

作者单位: ①贵州医科大学临床医学院 (贵阳市 550004); ②贵州医科大学附属医院, 贵州省肿瘤医院肿瘤科; ③贵州医科大学分子生物学重点实验室; ④贵州医科大学附属医院临床医学研究中心

*本文课题受国家自然科学基金项目 (编号: 81560437) 和贵州省教育厅创新群体重大研究项目 (编号: 黔教合 KY 字 [2017] 038) 资助

通信作者: 金风 jinf8865@yeah.net

relative amounts of mRNA and protein of Bmal1, P53, and P21 were higher in the CNE1OE group than in the CNE1OENC group, while they were lower in the CNE1sh3 group compared to the CNE1shNC group ($P<0.05$). **Conclusions:** Overexpression of Bmal1 inhibited the growth of the CNE1 xenograft in nude mice and enhanced its radiation sensitivity whereas silencing the Bmal1 gene by RNAi promoted the growth of the xenograft and led to radiation resistance. We believe that Bmal1 overexpression leads to P53 and P21 overexpression, thereby inhibiting the growth of the xenograft.

Keywords: nasopharyngeal carcinoma, Bmal1 gene, nude mice, xenograft, radiation sensitivity

鼻咽癌治疗失败的主要原因是局部复发和远处转移,导致局部复发的常见原因是肿瘤辐射抗性细胞的产生,如何增强鼻咽癌放疗敏感性为当前研究热点之一。Elshazley等^[1]研究发现恶性胸膜间皮瘤细胞 Bmal1 基因(brain and muscle arnt-like1)是一个促癌基因。然而 Jung 等^[2]发现 Bmal1 基因在肺癌和胶质瘤细胞是抑癌基因。Zeng 等^[3]研究发现 Bmal1 基因在结直肠癌细胞是抑癌基因,并且可增加结直肠癌对化疗药物奥沙利铂的敏感性。以上研究表明,Bmal1 基因与肿瘤的关系复杂,具有促癌作用或抑癌作用。针对 Bmal1 基因在鼻咽癌的发生发展中产生何种作用,能否增强鼻咽癌细胞的放疗敏感性等问题,本课题组前期体外细胞研究发现^[4],鼻咽癌细胞株过表达 Bmal1(H-ARNTL)基因能抑制肿瘤生长,增加肿瘤细胞的放射敏感性。Bmal1 基因可能通过降低 S 期比例、增加 G₂/M 期阻滞,从而增加放疗后细胞凋亡,增强放射敏感性。然而,体外环境与体内环境差别较大,本研究采用慢病毒感染方法,研究 Bmal1 基因过表达和低表达时对鼻咽癌 CNE1 裸鼠移植瘤生长及放疗敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 鼻咽癌细胞 CNE1 来自于中山大学附属肿瘤医院。

1.1.2 主要试剂 PCR 试剂 Primer 购自上海生工公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 GK2042-500 购自上海 Generay 公司;T4DNA ligase 购自立陶宛 Fementas 公司;琼脂糖购自上海前生公司;Positive clone 测序由美国 Invitrogen 公司完成。高纯度质粒抽提试剂盒购自德国 QIAGEN 公司。限制性内切酶(BamH I、EcoR I)购自立陶宛 Fermentas 公司。兔多抗 Bmal1 购自英国 Abcam 公司,兔多抗 GAPDH 购自杭州贤至生物公司,兔多抗 P53、P21 购自武汉三鹰生物公司,HRP 标记羊抗兔二抗购自武汉博士德生物公司。

1.1.3 实验动物 SPF 级 BALB/c 裸鼠,雌性,4~6 周龄,共 20 只,购自江苏集萃药康生物科技有限公司。动物合格证号:SCXK(苏)2018-0008。本实验符合国家有关实验动物保护规范和管理条例。

1.2 方法

1.2.1 Bmal1 基因过表达慢病毒载体的构建 根据 NCBA 中 Bmal1 基因序列,设计合成引物。引物序列为:上游引物:5'-CCGGAATTCGCCACCATGGCAGACCAGAGATGGACATTTCTTC-3';下游引物:5'-CCGGGATCCTTACACGGGCCATGGCAAGTC-3'。在 T4DNA 连接酶的作用下,将慢病毒载体 PGMLV-PA6 与 Bmal1 片段进行连接;将连接产物加入感受态大肠杆菌细胞中,热休克促进连接产物转化。培养后送测序公司进行测序鉴定。

1.2.2 Bmal1 基因慢病毒干扰载体的构建 针对目的基因 Bmal1 基因序列,设计合成 shRNA 寡聚单链 DNA,序列为(5' to 3'): Bmal1sh3T: GATCCGCACGCGATAGATGGAAAGTTCTCGAGAACTTTCCATCTATCGCGTGCCTTTTT; Bmal1sh3B: AATTAAAAAAGCACGCGATAGATGGAAAGTTCTCGAGAACTTTCCATCTATCGCGTGCg。将其退火形成双链结构,在 T4DNA 连接酶作用下,将 RNAi 慢病毒载体 PGMLV-SB3 与引物连接;后续步骤同 1.2.1。

1.2.3 慢病毒的包装和病毒滴度的测定 将构建成功的慢病毒过表达质粒、干扰质粒、包装质粒用质粒抽提试剂盒进行提取;293T 细胞培养,细胞长至 70%~80% 时行慢病毒感染;将 DMEM、质粒、Lenti-HG mix、HG TransGene reagent 混匀配置感染体系;将感染体系滴加到 293T 细胞培养皿中;换液后,吸取细胞上清离心,用滤器过滤上清液后将滤液转移至浓缩装置中,离心,收集病毒浓缩液。病毒保存于 -80℃ 冰箱。

将 HEK293T 细胞进行培养;冻存病毒液冰浴融化,用细胞培养液进行梯度稀释;慢病毒稀释液均匀滴加到 HEK293T 细胞进行感染;慢病毒感染成功后,提取细胞 RNA 行 RT-PCR;PCR 反应条件:预变性,95℃,45 s;PCR 循环 95℃、15 s,60℃、60 s,40 个循环;融解曲线:60℃→95℃。

1.2.4 慢病毒感染目的细胞 接种 CNE1 细胞于培养皿中,将冻存病毒原液冰浴融化,按合适的 MOI 值稀释病毒原液,吸出对照组和处理组原有培养基,将慢病毒稀释液及慢病毒阴性对照稀释液分别滴加到处理组和对照组细胞中。用嘌呤霉素进行稳转株细

胞筛选。

1.2.5 Western blot 验证稳转 CNE1 细胞中 Bmal1 蛋白的表达 将 Bmal1 基因过表达、Bmal1 基因干扰稳转株细胞进行培养,去除培养液,IP 裂解液冰上裂解细胞,提取蛋白后将蛋白样品上样至 SDS-PAGE 胶加样孔,按电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、化学发光、显影、定影步骤进行。

1.2.6 裸鼠饲养及接种 裸鼠饲养在贵州医科大学临床医学研究中心 SPF 级饲养室。裸鼠的饮水、饲料、垫料均高压灭菌,12 h 光照、12 h 黑夜交替;20 只裸鼠按随机数字表法随机分为 4 组,5 只/组。每组裸鼠分别接种细胞 CNE1OE (Bmal1 基因过表达组)、CNE1OENC (过表达对照组)、CNE1sh3 (低表达组)、CNE1shNC (低表达对照组)。用接种细胞命名相应的裸鼠组别。细胞活力 98%,细胞密度为 2.5×10^7 个/mL,每只裸鼠接种 PBS 细胞悬液 0.2 mL,接种细胞个数为 5×10^6 个,接种部位右上肢腋下皮下注射。裸鼠成瘤率 100%,无自然死亡。

1.2.7 肿瘤体积测量与计算 裸鼠移植瘤接种后 3 天开始用游标卡尺测量移植瘤大小,每 3 天测量 1 次。测量移植瘤长径 a 和短径 b。根据公式 $V = 1/2 \times a \times b^2$ 计算肿瘤体积^[5-6]。肿瘤体积缩小比例 = $(V_{\text{放疗前}} - V_{\text{放疗后}}) / V_{\text{放疗前}} \times 100\%$ 。

1.2.8 裸鼠移植瘤放疗 移植瘤种植后第 23 天 CNE1OE 组裸鼠移植瘤最大长径为 10.94 mm, CNE1sh3 组最大长径为 19.20 mm,予放疗。采用瑞典医科达 Synergy 型医用直线加速器行裸鼠移植瘤放疗。用自制装置固定裸鼠,给予 6-MeV 电子线照射,放疗剂量为 15 Gy;剂量率 600 cGy/min;源皮距(SSD)100 cm;用 1.0 cm 铅块遮挡裸鼠正常组织,照射野 2.5 cm×2.0 cm;瘤体表面垫 0.5 cm 蜡块作为补偿;放疗后第 12 天 CNE1OE 组最大长径为 7.70 mm, CNE1sh3 组最大长径为 21.22 mm,次日采用颈椎脱位处死裸鼠。

1.2.9 RT-PCR 检测裸鼠移植瘤 Bmal1、P53、P21 mRNA 表达水平 用 Trizol 法提取移植瘤组织 RNA,用微量分光光度计测定其浓度及纯度。将总 RNA 反转录为 cDNA。每个待测样品设置 3 个平行样。RT-PCR 反应条件为:50℃、2 min、95℃、10 min;95℃、30 s、60℃、30 s,40 个循环。引物序列:GAPDH 上游 5'-TCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG-3',下游 5'-TCAAAGGTGGAGGAGTGGGT-3';Bmal1 上游 5'-GGATGTGACCGAGGGAAGAT-3',下游 5'-ATAATCGAGATGGCCAGCG-3';P53 上游 5'-AGGTGGCTCTGACTGTACC-3',下游 5'-GATTCCTTCCTCTGTGCGC-3';P21 上游 5'-CACCGAGACACACTGGAG-3',下游 5'-AGGCACAAGGTTACAAGACA-3'。

1.2.10 Western blot 检测裸鼠移植瘤 Bmal1、P53、P21

蛋白表达 处死裸鼠后剥离移植瘤组织,提取组织蛋白后把蛋白样品上样至 SDS-PAGE 胶加样孔,余步骤同 1.2.5 行 Western blot 检测。

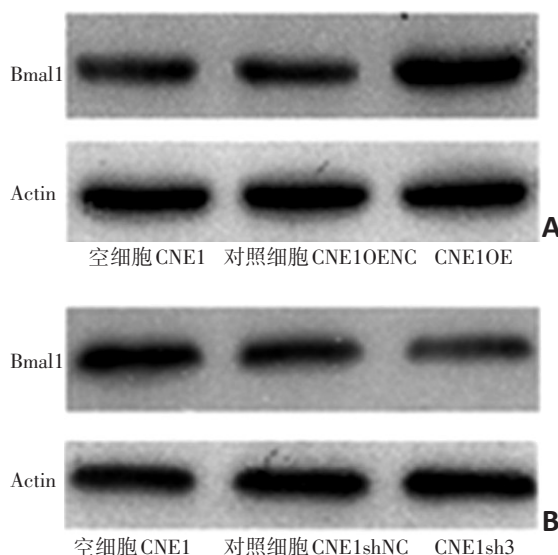
1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件对多组样本均数间比较行方差分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐者组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐者组间两两比较采用 Dunnett's T3 法。每组裸鼠放疗前后体积变化行自身配对 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 验证 CNE1 细胞 Bmal1 基因过表达及干扰效果

CNE1OE 组 Bmal1 蛋白免疫印迹条带较 CNE1OENC 组明显增强,说明细胞感染后 CNE1OE 组能高效表达 Bmal1 mRNA 和蛋白;CNE1sh3 组 Bmal1 蛋白免疫印迹条带较 CNE1shNC 组显著减弱,说明细胞感染后 CNE1sh3 组 Bmal1 mRNA 和蛋白的表达受到明显抑制(图 1)。



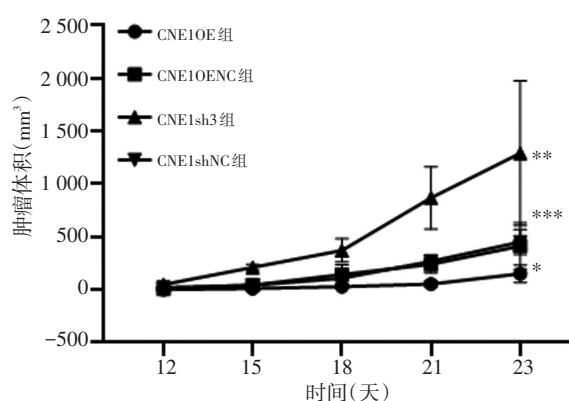
A: 过表达组 Bmal1 蛋白的表达量; B: 低表达组 Bmal1 蛋白的表达量

图 1 Western blot 验证细胞感染后 Bmal1 蛋白表达

2.2 构建移植瘤模型后肿瘤生长情况

CNE1OE、CNE1OENC、CNE1sh3、CNE1shNC 组移植瘤体积在第 12 天分别为 (2.47 ± 2.40) 、 (7.17 ± 8.81) 、 (49.17 ± 23.19) 、 (20.75 ± 8.67) mm³;第 15 天分别为 (10.34 ± 7.21) 、 (44.71 ± 26.30) 、 (211.84 ± 27.36) 、 (40.16 ± 17.63) mm³,第 18 天分别为 (28.16 ± 13.75) 、 (142.91 ± 94.23) 、 (372.05 ± 110.72) 、 (109.91 ± 49.63) mm³;第 21 天分别为 (54.90 ± 26.47) 、 (240.80 ± 81.43) 、 (868.49 ± 294.54) 、 (269.18 ± 52.88) mm³;第 23 天分别为 (151.00 ± 81.69) 、 (413.32 ± 220.27) 、 (1291.14 ± 686.10) 、 (451.38 ± 100.00) mm³。

117.29) mm³。结果表明,与对照组 CNE1OENC、CNE1shNC 组相比,CNE1OE 组裸鼠移植瘤生长最慢、体积最小($F=20.06, P<0.05$);CNE1sh3 组生长最快、体积最大($F=19.60, P<0.05$)。CNE1OENC 与 CNE1shNC 组肿瘤体积比较差异无统计学意义($P>0.05$,图 2)。



*CNE1OE 组与 CNE1OENC 组相比, $P<0.05$; **CNE1sh3 组与 CNE1shNC 组相比, $P<0.05$; ***CNE1OENC 组与 CNE1shNC 组相比, $P>0.05$

图 2 建模后移植瘤生长曲线

2.3 放疗后裸鼠移植瘤生长情况

CNE1OE、CNE1OENC、CNE1sh3、CNE1shNC 组移植瘤体积在放疗后第 4 天分别为(106.62±90.71)、(518.74±320.97)、(1 394.00±557.23)、(421.83±99.00) mm³,第 7 天分别为(64.45±37.22)、(403.19±281.38)、(1 108.75±431.32)、(339.25±102.95) mm³,第 10 天分别为(37.52±23.91)、(301.14±222.35)、(1 103.26±471.56)、(294.36±93.16) mm³,第 12 天分别为(34.93±23.23)、(312.84±220.74)、(1 218.34±649.92)、(304.13±105.67) mm³。结果表明,CNE1OE 组($t=4.32, P<0.05$)、CNE1OENC 组($t=5.38, P<0.05$)、CNE1shNC 组($t=5.16, P<0.05$)放疗后肿瘤体积均缩小,CNE1OE 组缩小比例最大,为 77.2%±7.4%,CNE1OENC、CNE1shNC 组缩小比例分别为 29.2%±18.5%、33.8%±14.4%($F=17.45, P<0.05$)。然而,CNE1sh3 组放疗前后自身体积变化差异无统计学意义($t=0.63, P>0.05$)。提示 CNE1OE 组放疗敏感性增强,而 CNE1sh3 组表现为辐射抗拒(图 3)。

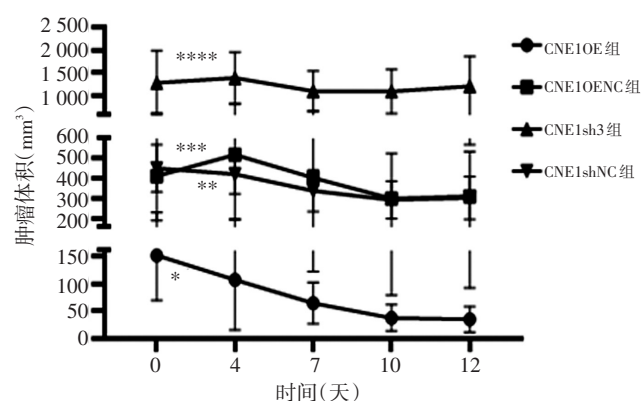
2.4 RT-PCR 检测 Bmal1、P53、P21 mRNA 的相对表达

处死裸鼠后剥离移植瘤,行 RT-PCR 检测结果提示,CNE1OE、CNE1OENC、CNE1sh3、CNE1shNC 组 Bmal1 mRNA 相对表达量分别为 4.38±1.04、1.07±0.28、0.56±0.12、1.05±0.25,行单因素方差分析($F=50.03, P<0.05$);P53 mRNA 相对表达量分别为 3.90±0.79、1.12±0.23、0.63±0.16、1.18±0.27($F=56.28, P<0.05$);P21 mRNA 相对表达量分别为 2.74±0.41、1.10±0.24、0.63±0.16、1.12±0.21,差

异有统计学意义($F=57.77, P<0.05$)。CNE1OENC 组与 CNE1shNC 组相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。上述结果表明,与对照组相比,CNE1OE 组移植瘤 Bmal1、P53、P21 mRNA 表达上调,CNE1sh3 组则下调(图 4)。

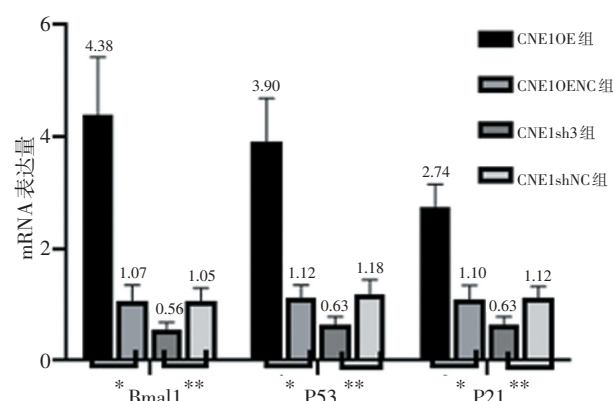
2.5 Western blot 检测移植瘤 Bmal1、P53、P21 蛋白的相对表达

剥离移植瘤行 Western blot 检测,结果提示 CNE1OE、CNE1OENC、CNE1sh3、CNE1shNC 组 Bmal1 蛋白相对表达量分别为 0.74±0.07、0.50±0.07、0.32±0.04、0.48±0.08,行单因素方差分析($F=36.08, P<0.05$);P53 蛋白相对表达量分别为 0.63±0.06、0.41±0.06、0.30±0.09、0.44±0.04($F=21.39, P<0.05$);P21 蛋白相对表达量分别为 0.39±0.04、0.25±0.02、0.16±0.03、0.25±0.02,差异有统计学意义($F=51.94, P<0.05$)。CNE1OENC 组与 CNE1shNC 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。上述结果表明,与对照组相比,CNE1OE 组移植瘤 Bmal1、P53、P21 蛋白表达上调,CNE1sh3 组则下调(图 5)。



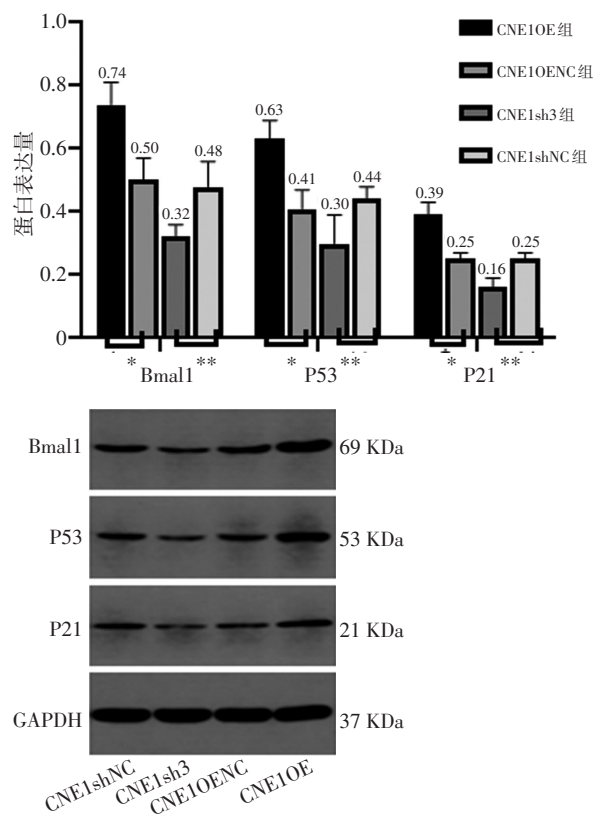
*CNE1OE 组 $t=4.32, P<0.05$; **CNE1shNC 组 $t=5.16, P<0.05$; ***CNE1OENC 组 $t=5.38, P<0.05$; ****CNE1sh3 组 $t=0.63, P>0.05$

图 3 放疗后移植瘤生长曲线



*CNE1OE 组与 CNE1OENC 组相比, $P<0.05$; **CNE1sh3 组与 CNE1shNC 组相比, $P<0.05$

图 4 RT-PCR 检测移植瘤 Bmal1、P53、P21 mRNA 表达



*CNE1OE组与CNE1OENC组相比, $P < 0.05$; **CNE1sh3组与CNE1shNC组相比, $P < 0.05$

图5 Western blot检测移植瘤Bmal1、P53、P21蛋白表达

3 讨论

时钟基因是有机体调控系统多反馈环的基本组成元件^[7],与有机体的各种生命活动如激素分泌、细胞代谢等密切相关^[8]。目前已发现的时钟基因有Per1、Per2、Per3、Cry1、Cry2、Clock、Bmal1、TIM、CK1 ϵ 、NPAS2、REV-ERBs、Dec1、Dec2和RORs^[4,9-10]。Bmal1基因又称为ARNTL(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like)基因,是哺乳动物生命活动中重要的中央时钟元件,位于11号染色体短臂,编码蛋白质Bmal1,属于bHLH-PAS结构域转录因子家族^[11]。Bmal1基因在生物节律中起着重要的调控作用,其发生突变或缺失时可导致机体节律紊乱,并引起一系列的病变。敲除小鼠视交叉上核中Bmal1基因,其昼夜节律会丧失^[12]。

研究表明,Bmal1基因与肿瘤的发生发展有密切关系。Elshazley等^[1]研究发现,在恶性胸膜间皮瘤的发生发展中,Bmal1基因起着促癌作用。然而,He等^[13]研究发现,鼻咽癌组织中Bmal1基因的表达量明显低于正常组织,表明Bmal1基因可能抑制鼻咽癌的发生发展。Jung等^[2]发现Bmal1基因可抑制肺癌和神经胶质瘤细胞的发生发展。Hsu等^[14]发现头颈鳞癌组织中Bmal1基因表达水平明显低于正常组织,Bmal1基因在头颈鳞癌可能是一个抑癌基因。Jiang等^[16]发现Bmal1基因在胰腺癌组织中呈低表达。

本实验采用慢病毒感染方法,构建了Bmal1基因过表达、过表达对照、低表达、低表达对照4株鼻咽癌CNE1细胞,Western blot验证Bmal1蛋白表达量提示细胞感染成功,成功构建裸鼠移植瘤模型。剥离移植瘤行RT-PCR及Western blot检测结果提示,CNE1OE组Bmal1 mRNA及蛋白表达量高于CNE1OENC组,CNE1sh3组则低于CNE1shNC组,差异有统计学意义,提示CNE1OE组裸鼠移植瘤Bmal1表达明显上调,CNE1sh3组裸鼠移植瘤Bmal1表达明显下调。

裸鼠移植瘤生长过程显示,与对照组相比,CNE1OE组肿瘤成瘤时间最晚,生长最慢,移植瘤种植后第15天,CNE1OE组肿瘤体积为 $(10.34 \pm 7.21) \text{ mm}^3$,CNE1OENC组肿瘤体积为 $(44.71 \pm 26.30) \text{ mm}^3$,CNE1OE组肿瘤体积小于CNE1OENC组,差异具有统计学意义。CNE1sh3组移植瘤生长最快,第15天其体积为 $(211.84 \pm 27.36) \text{ mm}^3$,CNE1shNC组体积为 $(40.16 \pm 17.63) \text{ mm}^3$,CNE1sh3组肿瘤体积大于CNE1shNC组,差异具有统计学意义。CNE1OENC组与CNE1shNC组体积相比差异无统计学意义。造移植瘤模型后肿瘤生长情况表明,Bmal1基因过表达能抑制鼻咽癌CNE1移植瘤的生长,而低表达则促进其生长,这证明在鼻咽癌的发生发展中,Bmal1基因是一个抑癌基因,与He等^[13]研究结果一致。

本研究发现,放疗后CNE1OENC组、CNE1shNC组缩小比例分别为 $29.2\% \pm 18.5\%$ 、 $33.8\% \pm 14.4\%$,CNE1OE组肿瘤缩小比例为 $77.2\% \pm 7.4\%$,差异具有统计学意义,CNE1OE组肿瘤缩小最明显。然而CNE1sh3组肿瘤体积放疗前后自身配对 t 检验提示差异无统计学意义。本研究推测,CNE1OE组肿瘤由于Bmal1基因过表达,抑制放射线所致DNA损伤的修复,进一步导致肿瘤细胞凋亡,增加肿瘤细胞对放疗的敏感性。表明CNE1sh3组肿瘤呈现辐射抗拒。推测CNE1sh3组由于Bmal1基因低表达,导致放疗后DNA损伤修复较快,肿瘤对放射线的损伤敏感性较差。

Zeng等^[3]研究发现,Bmal1基因可增加结直肠癌细胞对化疗药物奥沙利铂的敏感性,可能的机制是Bmal1基因通过ATM信号通路调控G₂/M期阻滞,诱导细胞凋亡。Jung等^[2]发现,Bmal1可能通过阻断PI3K-Akt-MMP-2途径,抑制基质金属蛋白酶MMP-2的表达,进一步抑制肺癌和神经胶质瘤细胞的转移。

Slat等^[16]研究发现,替莫唑胺诱导肿瘤细胞凋亡的活性依赖于Bmal1基因。Sakamoto等^[17]研究发现,在结直肠癌中Bmal1基因能够通过促进p53基因表达,增加癌细胞凋亡起到抑癌基因的作用。Zeng等^[3]研究发现,Bmal1基因过表达直肠癌细胞株中,ATM、p53、Wee1的表达明显上调。

p53基因全长约20 kb,定位于人类染色体17p13.1,

人类肿瘤约 50% 以上与 p53 基因变异有关^[18-20]。p21 基因是位于 p53 基因下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子^[15,21-23]。本研究处死裸鼠后剥离移植瘤进行 RT-PCR 及 Western blot 检测, 结果发现 CNE1OE 组 P53、P21 mRNA 及蛋白表达量明显高于 CNE1OENC 组, CNE1sh3 组明显低于 CNE1shNC 组, 差异具有统计学意义; CNE1OENC 组与 CNE1shNC 组相比则差异无统计学意义。Mullenders 等^[24]采用大规模的 shRNA 测序, 表明 Bmal1 可正调控 p53 基因。Jiang 等^[15]研究发现, Bmal1 过表达的胰腺癌细胞 P21 表达增加, 发生了 G₂/M 期阻滞, 该研究探索了 Bmal1 基因诱导 p53 依赖性细胞凋亡和 G₂/M 期细胞周期阻滞的机制。本研究发现, Bmal1 基因过表达时 P53、P21 mRNA 及蛋白表达上调, 推测 Bmal1 基因抑制肿瘤生长、增强放疗敏感性的机制可能与 P53、P21 蛋白表达上调有关, 通过体内实验揭示了 Bmal1 基因与鼻咽癌 CNE1 生长及与放射敏感性的初步关系, 为进一步研究 Bmal1 基因如何通过其反馈环及通路对肿瘤的影响奠定了良好的实验基础。

综上所述, Bmal1 基因与鼻咽癌细胞 CNE1 的生长有密切关系, 且能增强鼻咽癌细胞 CNE1 对放疗的敏感性, 将为鼻咽癌复发及远处转移治疗靶点的研究提供一定的实验理论及数据。

参考文献

- [1] Elshazley M, Sato M, Hase T, et al. The circadian clock gene BMAL1 is a novel therapeutic target for malignant pleural mesothelioma[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(12):2820-2831.
- [2] Jung CH, Kim EM, Park JK, et al. Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-Akt-MMP-2 signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6):2109-2113.
- [3] Zeng ZL, Luo HY, Yang J, et al. Overexpression of the circadian clock gene bmal1 increases sensitivity to oxaliplatin in colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(4):1042-1052.
- [4] 陈越, 金凤. 生物钟 Bmal1 基因与肿瘤治疗的研究进展及未来新思路[J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(10):518-523.
- [5] 刚小青, 吴衡慧, 周文磊. 白桦脂醇通过抑制 PI3K/AKT 途径抑制宫颈癌小鼠移植瘤增殖[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(10):1227-1231.
- [6] 何鑫, 游建, 肖定, 等. 维生素 K2 对人肝癌裸鼠移植瘤生长及肝癌衍生生长因子表达的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2019, 36(10):1752-1754.
- [7] Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock[J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(3):164-179.
- [8] Zhao N, Tang H, Yang K, et al. Circadian rhythm characteristics of oral squamous cell carcinoma growth in an orthotopic xenograft model[J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6:41-46.
- [9] 孟熙, 金凤. 时钟基因与肿瘤转移的研究进展[J]. *中国癌症防治杂志*, 2019, 11(4):341-345.
- [10] 岳敏, 杨禹, 秦曦明, 等. 哺乳动物生物钟的遗传和表观遗传研究进展[J]. *遗传*, 2017, 39(12):1122-1137.
- [11] 王钧左, 陈励, 张斌, 等. 时钟基因 Bmal1 在昼夜节律行为调节中的研究进展[J]. *军事医学*, 2019, 43(4):301-304.
- [12] Izumo M, Pejchal M, Schook AC, et al. Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain Bmal1 mutant[J]. *Elife*, 2014, 3(8):e04617.
- [13] He QY, Jin F, Li YY, et al. Prognostic significance of downregulated BMAL1 and upregulated Ki-67 proteins in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chronobiol Int*, 2018, 35(3):348-357.
- [14] Hsu CM, Lin SF, Lu CT, et al. Altered expression of circadian clock genes in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2012, 33(1):149-155.
- [15] Jiang WL, Zhao SL, Jiang XH, et al. The circadian clock gene bmal1 acts as a potential anti-oncogene in pancreatic cancer by activating the p53 tumor suppressor pathway[J]. *Cancer Lett*, 2016, 371(2):314-325.
- [16] Slat EA, Sponagel J, Marpegan L, et al. Cell-intrinsic, bmal1-dependent circadian regulation of temozolomide sensitivity in glioblastoma[J]. *J Biol Rhythms*, 2017, 32(2):121-129.
- [17] Sakamoto W, Takenoshita S. Overexpression of both clock and bmal1 inhibits entry to S phase in human colon cancer cells[J]. *Fukushima J Med Sci*, 2015, 61(2):111-124.
- [18] 田艳, 朱军. P53rs1625895 基因多态性与弥漫大 B 细胞淋巴瘤预后相关性分析[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2019, 51(5):791-796.
- [19] 郝欣, 王荣升, 李建辉. p53 基因第 72 密码子基因多态性与胃溃疡患者 Hp 易感性、预后的关系[J]. *山东医药*, 2019, 59(1):16-19.
- [20] 李平, 陈敏斌. P53 基因在宫颈癌发病中的意义及对放射敏感性的影响[J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2017, 26(5):593-597.
- [21] 吴明彩, 蒋明, 董婷, 等. CHD5 基因启动子甲基化调控 P19Arf/p53/p21Cip1 信号通路促进急性髓系白血病发病的研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2019, 27(4):1001-1007.
- [22] 王志红, 林芸, 苏婉婷, 等. 骨髓间充质干细胞尾静脉注射治疗大鼠肝损伤的效果及机制[J]. *山东医药*, 2017, 57(3):42-44.
- [23] 张妍, 张艳君, 张业. 结肠癌细胞 HCT116 中 P53 的 R213 突变对靶基因 P21 表达的影响[J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(5):663-667.
- [24] Mullenders J, Fabius AW, Madiredjo M, et al. A large scale shRNA barcode screen identifies the circadian clock component ARNTL as putative regulator of the p53 tumor suppressor pathway[J]. *PLoS One*, 2009, 4(3):e4798.

(2019-12-05 收稿)

(编辑: 邢颖 校对: 张侃)

作者简介

孟熙 专业方向为头颈部肿瘤研究。

E-mail: 3299184176@qq.com

