

干扰基因*BMI-1*表达对食管癌细胞放射敏感性的影响

杨兴肖¹, 李幼梅², 宋 姮², 刘志坤², 马 鸣³, 祝淑钗²

1. 河北医科大学第四医院感染管理科, 河北 石家庄 050011;
2. 河北医科大学第四医院放疗三科, 河北 石家庄 050011;
3. 河北医科大学第四医院检验科, 河北 石家庄 050011

[摘要] 背景与目的: B细胞特异性的莫洛尼白血病病毒插入位点1(B-cell-specific Moloney leukemia virus insertion site 1, *BMI-1*)期在放疗后DNA损伤中发挥重要作用。该研究采用siRNA干扰技术降低食管癌TE13细胞中*BMI-1*基因表达, 探讨*BMI-1*的表达对X射线照射后食管癌细胞放射敏感性的影响。方法: 针对*BMI-1* mRNA序列, 3对有效的干扰序列(siRNA1、siRNA2和siRNA3)和阴性对照序列由公司设计合成, 瞬时转染食管癌TE13细胞, 命名为*BMI-1* siRNA1、*BMI-1* siRNA2和*BMI-1* siRNA3共3组, 转染阴性对照序列组命名为NC组, 未转染组命名为对照组。采用反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和蛋白[质]印迹法(Western blot)检测TE13各组中*BMI-1*在mRNA和蛋白水平的表达。采用MTT法检测*BMI-1*基因转染对TE13细胞增殖能力的影响。克隆形成实验检测*BMI-1*对TE13放射敏感性的作用。流式细胞术测定siRNA干扰*BMI-1*基因对细胞周期和凋亡分布的影响。RT-PCR和Western blot检测细胞内*p16*、*CDK4*基因和蛋白表达水平。结果: 3对干扰序列使人*BMI-1*基因在mRNA和蛋白表达水平低于对照组和NC组, 尤以siRNA3组效果最明显。选择siRNA3作为干扰组进行MTT和流式细胞术。MTT结果表明, *BMI-1* siRNA3转染后*BMI-1*的低表达对细胞的增殖能力无明显影响; 克隆形成实验的结果显示, 空白对照组、NC组、干扰组的 D_0 分别为2.514、2.506和1.761 Gy; D_q 值分别为2.694、2.664和2.122 Gy; 外推数N值分别为2.920、2.895和3.336; SF2值分别为0.826 8、0.823 1和0.625 5, 可见对照组和空载组间放射敏感性差异无统计学意义($P>0.05$), 而干扰组细胞的放射敏感性高于对照组和NC组; 流式细胞术分析显示, 6 Gy照射后, *BMI-1* siRNA组 G_0/G_1 期比例明显高于对照组和空载组, G_2/M 期显著低于对照组和NC组, 而未照射时*BMI-1*的低表达对细胞周期无明显影响。干扰*BMI-1*基因后TE13细胞*p16*基因和蛋白水平升高($P<0.01$), *CDK4*基因和蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。结论: siRNA干扰技术有效地抑制了食管癌细胞TE13中*BMI-1*基因的表达, 联合X线照射后显著消除了细胞周期在 G_2/M 期的阻滞, 增加了食管癌的放射敏感性, 其诱导作用与*p16*和*CDK4*基因和蛋白表达有关。

[关键词] *BMI-1*基因; RNA干扰; X射线照射; 放射敏感性; *p16*基因; *CDK4*基因

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2016.09.007

中图分类号: R735.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)09-0763-07

Effect of RNAi targeting *BMI-1* gene on radiosensitivity of esophageal carcinoma cells YANG Xingxiao¹, LI Youmei², SONG Heng², LIU Zhikun², MA Ming³, ZHU Shuchai² (1. Department of Infection Management, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China; 2. Department of Radiation Oncology, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China; 3. Department of Laboratory, the Fourth Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China)

Correspondence to: ZHU Shuchai E-mail: sczhu1965@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** B cell-specific MLV integration site 1 (*BMI-1*) gene plays an important role in DNA damage after exposure to irradiation. The present study aimed to investigate the effect of *BMI-1* on radiosensitivity of esophageal carcinoma cell after down-regulation of *BMI-1* expression by silencing siRNA. **Methods:** Three pairs of siRNA based on the sequences of the *BMI-1* mRNA were synthesized (siRNA1, siRNA2 and siRNA3) by compa-

ny, and transfected into cultured TE13 cells as the *BMI-1* siRNA groups, and a negative one was synthesized to be used as the negative control (NC) group. The untransfected group was named as the control group. *BMI-1* mRNA and protein expression in esophageal cancer TE13 cells were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot in different groups. This study used flow cytometry assay to analyze cell cycle of transfected cells, and examined cellular growth and radiosensitivity *in vitro* by MTT and clone formation assay. mRNA and protein expression of p16 and CDK4 in esophageal cancer TE13 cells were detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** The results of RT-PCR and Western blot showed that the expressions of *BMI-1* at gene and protein levels were inhibited after silencing the *BMI-1* gene. The mRNA and protein expression of *BMI-1* in *BMI-1* siRNA3 group were both significantly lower than that in *BMI-1* siRNA1 and 2 groups. There was no significant difference in the cell proliferation among control, NC and *BMI-1* siRNA3 groups. The values of D_0 , D_{q_1} , and SF2 in *BMI-1* siRNA3 group were 1.761, 2.122 and 0.6255, respectively, obviously lower than those in control group (2.514, 2.694 and 0.8268) and those in NC group (2.506, 2.664 and 0.8231), while the value of N in *BMI-1* siRNA3 group (3.336) was higher than that in control group (2.92) and that in NC group (2.895), which showed higher radiosensitivity in *BMI-1* siRNA3 group. In addition, the cell cycle was arrested at G_2/M phase after irradiation in control and NC groups. The percentage of G_0/G_1 phase in *BMI-1* siRNA3 group was higher than that of control group and NC group, while the percentage of G_2/M phase was lower than those in the latter. The up-regulation of p16 and down-regulation of CDK4 at gene and protein levels were detected after knockdown of *BMI-1* expression by siRNA ($P < 0.01$). **Conclusion:** siRNA could inhibit *BMI-1* gene expression in esophageal cancer TE13 cells and enhance radiosensitivity, followed by eliminating the cell cycle arrest at G_2/M stage after irradiation *in vitro*, which is related to the regulation of the protein expression of p16 and CDK4.

[**Key words**] *BMI-1* gene; RNA interference; Irradiation; Radiosensitivity; p16 gene; CDK4 gene

食管癌是一种常见的具有高发病率和死亡率的恶性肿瘤, 每年全世界约有31.04万的新发病例。放疗是食管癌患者治疗的重要方法之一, 然而, 放射线照射后引起的细胞损伤会产生细胞周期阻滞, 为受损细胞的修复创造了条件, 同时也降低了放射线对肿瘤细胞的杀伤作用, 是肿瘤细胞产生放射抵抗的重要原因^[1]。B细胞特异性的莫洛尼白血病病毒插入位点1 (B-cell-specific Moloney leukemia virus insert site 1, *BMI-1*) 基因作为多梳基因家族成员之一, 在多种恶性肿瘤中高表达, 如B细胞非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、结肠癌、乳腺癌及胃癌等^[2], 并发现其在DNA损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡等方面起着重要作用^[3]。然而, *BMI-1*在食管癌放射治疗后的损伤修复中如何发挥调控作用, 目前国内鲜见相关报道。为了鉴定*BMI-1*在调控放射损伤修复中的重要作用, 本研究通过siRNA抑制*BMI-1*的表达以观察其对低分化食管癌TE13细胞增殖、周期及放射增敏作用的影响, 并检测了其p16/CDK4通路调节方面的作用, 为食管癌的临床治疗提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系及主要试剂

食管癌TE13细胞系河北医科大学第四医院科研中心提供。小片段siRNA购自美国Invitrogen公司。脂质体转染试剂LipofectamineTM RNAiMAX购自美国Invitrogen公司。兔抗人*BMI-1*单克隆抗体购自美国Abcam公司。兔抗p16和CDK4一抗均购自美国Sigma公司。碱性磷酸酶标记的IgG羊抗兔二抗购自北京博奥森生物公司。BCIP/NBT底物显色试剂盒购自美国Ameresco公司。单克隆抗体 β -actin购自美国Abcam公司。

1.2 细胞培养和照射

细胞贴壁生长在玻璃培养瓶, 加入含100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素以及10%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640培养基, 置于CO₂体积分数为5%, 饱和湿度的培养箱中培养, 每2~3 d传代1次。应用6-MV-X线直线加速器照射TE13食管癌细胞株, 取机架角180°, 源皮距100 cm, 照射面积20 cm × 20 cm, 培养瓶下置0.5 cm组织补偿膜, 室温下照射, 照射剂量为6 Gy。

1.3 细胞转染

当食管癌TE13细胞贴壁生长达到80%~90%融合时,采用脂质体Lipofectamine™ RNAiMAX包裹小片段siRNA并转染TE13细胞。细胞分为5组:空白对照组(未转染)、阴性对照序列(NC)组、BMI-1 siRNA1实验组、BMI-1 siRNA2实验组和BMI-1 siRNA3实验组。siRNA序列如下(只列出顺义链): BMI-1 siRNA1: 5'-UCCUCAUCCACAGUUUCCUCACAUU-3'; BMI-1 siRNA2: 5'-GGGUCAUCAGCAACUUCUUCUGGUU-3'; BMI-1 siRNA3: 5'-GCUUAUCCAUUGAAUUCUUUGACCA-3'; 阴性对照序列: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。转染24 h后收集细胞提取总RNA和蛋白,RT-PCR和Western blot分别检测BMI-1基因和蛋白表达,取干扰效果最佳序列的小片段siRNA进行后续实验。

1.4 反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测

由生工生物工程(上海)股份有限公司负责设计、合成引物, BMI-1引物序列的顺义链为: 5'-ATGATAAAAGATACTTACGATGCCCA G-3'; 反义链为: 5'-GAACTCTGTATTTCAATGGAAGTGGAC-3', 扩增大小207 bp。p16: 5'-ACCAGAGGCAGTAACCATGC-3'(顺义链), CDK4: 5'-CCCGAAGTTCTTCTGCAGT C-3'(顺义链)。GAPDH基因的上游引物序列: 5'-CGCTGAGTACGTCGTGGAGT C-3', 下游引物序列: 5'-GCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTC-3', 拟扩增的片段长度为172 bp。PCR反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 共30个循环; 72 °C终延伸5 min; 2%琼脂糖凝胶电泳, 紫外线下观察、拍照。

1.5 蛋白[质]印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达

根据蛋白提取试剂盒说明提取细胞总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度,用10%的SDS-PAGE分离,转膜、封闭,加入一抗BMI-1(1:10 000稀释)、抗p16(1:1 000)、抗

CDK4(1:1 000),4 °C温度过夜,碱性磷酸酶标记IgG二抗(1:10 000)于37 °C摇床温育1 h, TBST洗3次,每次5 min,然后用Odyssey红外成像系统拍照。 β -actin为内参。

1.6 MTT法检测转染对细胞增殖能力的影响

取对数生长期的TE13细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL。接种于96孔培养板,每孔100 μ L,于37 °C、CO₂体积分数为5%的饱和湿度条件下过夜,次日转染沉默BMI-1基因的最佳干扰小片段RNA,并将转染阴性对照序列及未转染的TE13作为阴性对照和空白对照,分别在转染后24、48和72 h收集细胞,采用MTT法检测各组细胞的增殖活性。每组设3个复孔。

1.7 细胞克隆形成实验检测细胞放射敏感性

取对数生长期的各组细胞,消化后计数,稀释后得到不同浓度的细胞。根据不同细胞数目给予不同的照射剂量。细胞个数分别为200、400、600、1 000和5 000个,相应照射剂量分别为0、2、4、6和8 Gy。每组照射剂量设3个平行孔。照射后培养14 d,甲醛固定,结晶紫染色,显微镜下计数大于等于50个细胞数的克隆数,计算克隆形成率。计算公式:接种效率(plating efficiency, PE)=对照组克隆数/细胞接种数 \times 100%,存活分数(surviving fraction, SF)=实验组克隆数/(细胞接种数 \times PE)。实验重复3次。在Graph Pad Prism 5.0软件中,使用单击多靶模型计算放射生物学参数并拟合剂量存活曲线。

1.8 流式细胞术分析各组照射前、后食管癌细胞周期分布

取上述各组细胞在照射后24、48 h收集,用PBS洗涤3遍,并重新悬浮于预冷的70%乙醇中,4 °C固定2 h;以1 000 r/min的速率离心5 min弃固定液,用PBS悬浮细胞5 min后于300目筛网过滤;加入PI(propidium iodide)染液,室温反应10 min,4 °C避光染色30 min,用流式细胞仪(美国Beckman公司)和Single Histogram Statistic分析软件测定各实验组食管癌细胞周期的变化。

1.9 统计学处理

所有数据采用SPSS 13.0统计学软件进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用重复测

量设计资料方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 食管癌细胞株TE13转染前、后BMI-1 mRNA和蛋白的表达

分别提取瞬时转染的siRNA组(BMI-1 siRNA1、BMI-1 siRNA2和BMI-1 siRNA3)和NC组、空白对照组细胞总RNA和蛋白, 对各组BMI-1基因和蛋白进行检测。RT-PCR检测结果发现, 3个靶向siRNA序列的BMI-1 mRNA相对表达量较空白对照组均有不同程度的下降, 尤以BMI-1 siRNA3组下降最为明显($P < 0.01$), NC组和空白对照组之间BMI-1 mRNA的相对表达量的差异无统计学意义($P > 0.05$, 图1)。同时, Western blot检测结果显示, 与空白对照组相比, siRNA1、siRNA2和siRNA3组的BMI-1蛋白表达的干扰效率分别为10.27%(0.672 ± 0.071 vs 0.603 ± 0.049)、71.43%(0.672 ± 0.071 vs 0.192 ± 0.029)、73.36%(0.672 ± 0.071 vs 0.179 ± 0.0218), siRNA2、siRNA3与空白对照组、NC组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 而NC组与空白对照组相比(0.672 ± 0.071 vs 0.668 ± 0.068), 差异无统计学意义($P > 0.05$, 图2)。

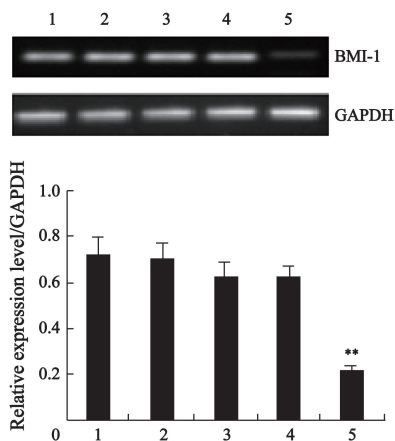


图1 RT-PCR检测转染后各组TE13细胞中BMI-1 mRNA的表达

Fig. 1 The mRNA expression of BMI-1 after transient transfection in TE13 cells

1: Control group; 2: NC group; 3: siRNA1 group; 4: siRNA2 group; 5: siRNA3 group. **: $P < 0.01$, as compared with control group

2.2 BMI-1 siRNA3转染对TE13细胞增殖能力的影响

采用MTT法检测空白对照组、NC组、BMI-1 siRNA3组食管癌细胞在转染后24、48、72 h的D值, 结果显示, 各组的D值基本一致, 组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 提示BMI-1 siRNA转染对食管癌细胞的增殖未见明显影响(表1)。

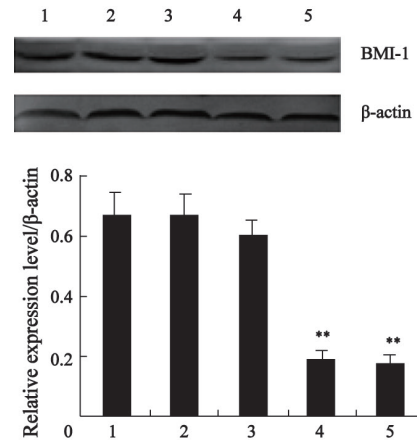


图2 Western blot检测转染后各组TE13细胞中BMI-1蛋白的表达

Fig. 2 The protein expression of BMI-1 after transient transfection in TE13 cells detected by Western blot

1: Control group; 2: NC group; 3: siRNA1 group; 4: siRNA2 group; 5: siRNA3 group; **: $P < 0.01$, as compared with control group

表1 MTT检测各组细胞转染后的增殖情况

Tab. 1 The proliferation activity of cells in different groups after transfection by MTT assay

| Group | Relative expression level/ β -actin | | |
|---------------|---|-------------------|-------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| Control group | 1.096 \pm 0.014 | 1.216 \pm 0.012 | 1.339 \pm 0.012 |
| NC group | 1.096 \pm 0.011 | 1.216 \pm 0.014 | 1.332 \pm 0.015 |
| BMI-1 siRNA3 | 1.077 \pm 0.013 | 1.210 \pm 0.017 | 1.298 \pm 0.015 |

2.3 各组细胞照射后克隆形成实验

克隆形成实验结果显示, 空白对照组、NC组和BMI-1 siRNA3组的 D_0 值分别为2.514、2.506和1.761 Gy; D_q 值分别为2.694、2.664和2.122 Gy; 外推数N值分别为2.920、2.895和3.336; SF_2 值分别为0.826 8、0.823 1和0.625 5。由此得出, 空白对照组和NC组之间放射敏感性未见明显差异, 而BMI-1 siRNA3干扰组的放射敏感性显著高于空白对照组和空载组(图3)。

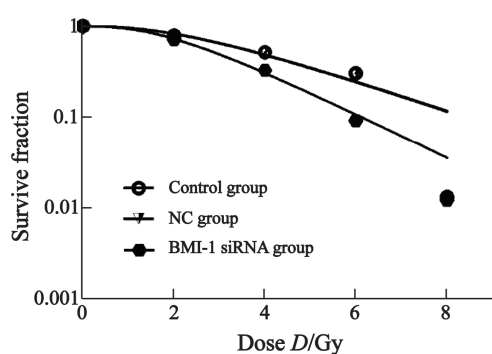


图3 克隆形成实验检测BMI-1对细胞增殖的影响

Fig. 3 Clonogenic survival curves of different cell types measured with clone conformal assay after irradiation

2.4 BMI-1 siRNA转染对照射前、后食管癌细胞周期的影响

照射后24 h, 空白对照组、NC组和BMI-1 siRNA组细胞中G₀/G₁期的比例均较未照射组下降, 差异有统计学意义(P<0.05), 且空白对照组和NC组比BMI-1 siRNA组G₀/G₁期比例下降的更明显, 差异有统计学意义(P<0.05); 而照射后BMI-1 siRNA组G₂/M期比例明显低于空白对照组和NC组(P<0.05); 照射前各组处于S期的细胞比例差异无统计学意义(P>0.05), 照射后干扰组S期细胞明显高于空白对照组和NC组(P<0.05)。照射前、后各组细胞的凋亡差异无统计学意义(P>0.05, 表2)。

照射前的空白对照组、NC组和BMI-1 siRNA组细胞中处于G₀/G₁期、G₂/M期和S期的比例差异无统计学意义(P>0.05); 而6 Gy放射线照射后处于G₀/G₁期细胞的比例均明显低于相应未照射组(P<0.05), 且BMI-1 siRNA组处于G₀/G₁期的比例均明显高于照射后的空白对照组和NC组(P<0.05); 照射后各组处于G₂/M期的比例均明显高于相应未照射组(P<0.05), 且BMI-1 siRNA组处于G₂/M期的比例均明显低于照射后的空白对照组、NC组(P<0.05)。照射前后各组处于S期的细胞比例差异无统计学意义(P>0.05)。与24 h不同的是, 照射前各组细胞的凋亡仍无明显变化(P>0.05), 但照射后干扰组细胞的凋亡指数明显高于对照组和NC组, 且高于其相应照射前水平(P<0.05, 表3)。

2.5 BMI-1 siRNA转染对食管癌细胞TE13中p16、CDK4 mRNA和蛋白表达的影响

RT-PCR结果显示, BMI-1 siRNA组中p16 mRNA表达明显升高, 与对照组相比, 差异有统计学意义(P<0.01); BMI-1 siRNA组中CDK4 mRNA的表达显著低于对照组和NC组(P<0.01), 而NC组与空白对照组之间差异无统计学意义(P>0.05, 图4)。Western blot检测结果显示, 与空白对照组和NC组相比, BMI-1 siRNA组中p16蛋白表达水平明显升高, 而CDK4蛋白表达水平显著降低(P<0.01, 图5)。

表2 6 Gy X射线照射24 h后各组细胞周期和凋亡分布

Tab. 2 Distribution of cell cycle and apoptosis of cells in different groups before and 24 h after irradiation by 6 Gy

| Group | Dose D/Gy | G ₀ /G ₁ | G ₂ /M | S | PI |
|--------------------|-----------|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------|
| (x̄±s) | | | | | |
| Before irradiation | | | | | |
| Control | 0 | 66.34±4.25 | 12.19±2.23 | 21.47±3.76 | 2.87±0.76 |
| NC | 0 | 64.08±4.11 | 12.66±2.01 | 22.39±3.64 | 3.29±0.81 |
| BMI-1 siRNA | 0 | 62.79±4.77 | 9.12±2.01 | 28.54±3.22 | 3.33±0.72 |
| After irradiation | | | | | |
| Control | 6 | 22.60±2.38* | 60.02±4.57* | 17.38±3.02 | 3.05±0.22 |
| NC | 6 | 14.86±2.38* | 67.19±5.27* | 18.45±3.06 | 3.31±0.54 |
| BMI-1 siRNA | 6 | 52.82±3.98* [△] | 14.96±2.88* [△] | 31.22±3.71 [△] | 3.37±0.41 |

*: P<0.05, as compared with corresponding unirradiated groups; [△]: P<0.05, as compared with control group or NC group after irradiation

表 3 6 Gy X射线照射48 h后各组细胞周期和凋亡分布

Tab. 3 Distribution of cell cycle and apoptosis of cells in different groups before and 48 h after irradiation by 6 Gy

| Group | Dose D/Gy | G ₀ /G ₁ | G ₂ /M | S | PI |
|--------------------|-----------|--------------------------------|--------------------------|------------|-------------------------|
| Before irradiation | | | | | |
| Control | 0 | 57.86±3.79 | 15.22±2.08 | 25.66±3.84 | 2.98±0.79 |
| NC | 0 | 54.49±3.54 | 16.13±2.42 | 27.67±3.27 | 3.25±0.21 |
| BMI-1 siRNA | 0 | 53.88±3.41 | 11.24±2.51 | 31.62±3.16 | 3.39±0.87 |
| After irradiation | | | | | |
| Control | 6 | 31.08±2.17* | 45.89±4.67* | 25.07±2.84 | 3.48±0.76 |
| NC | 6 | 29.43±2.12* | 42.55±4.74* | 27.18±3.44 | 3.54±0.14 |
| BMI-1 siRNA | 6 | 46.32±3.77* [△] | 24.48±2.23* [△] | 30.58±3.43 | 5.27±0.36* [△] |

*: $P < 0.05$, as compared with corresponding unirradiated groups; Δ : $P < 0.05$, as compared with control group or NC group after irradiation

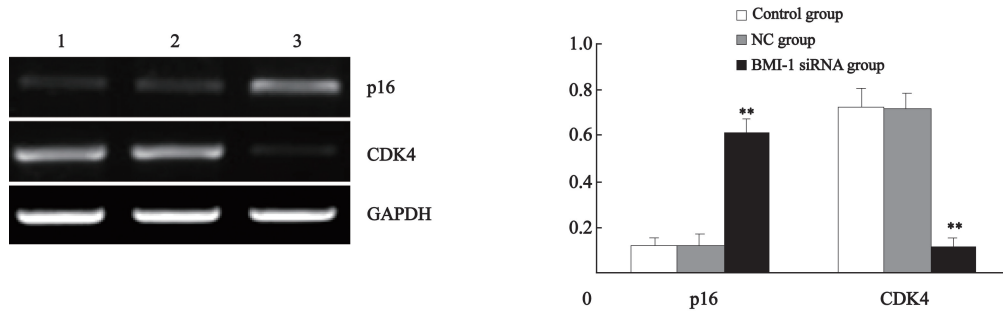


图 4 BMI-1对TE13细胞p16、CDK4 mRNA表达的影响

Fig. 4 Effect of BMI-1 on mRNA expressions of p16 and CDK4 in TE13 cells

1: Control group; 2: NC group; 3: BMI-1 siRNA group; **: $P < 0.01$, as compared with control group

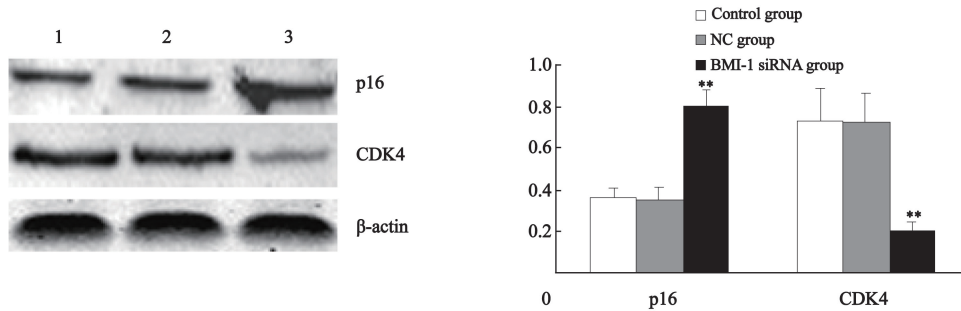


图 5 BMI-1对TE13细胞p16、CDK4蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of BMI-1 on protein expressions of p16 and CDK4 in TE13 cells

1: Control group; 2: NC group; 3: BMI-1 siRNA group; **: $P < 0.01$, as compared with control group

3 讨 论

BMI-1基因位于人类10号染色体短臂1区3带(10p13), 其cDNA全长3 203 bp, 其开放阅读框能编码一种由326个氨基酸组成的蛋白质。BMI-1基因的突变和失活致使细胞基因不稳定、DNA双链断裂修复受损, 出现对放射线的高度敏感, 因此抑制肿瘤细胞内BMI-1蛋白的

表达可显著增强肿瘤细胞对放射治疗的敏感性, 增强放射治疗的疗效^[4]。

本研究针对BMI-1基因的不同位点设计合成了3个siRNA序列, 通过RT-PCR和Western blot检测食管癌细胞中BMI-1在mRNA和蛋白水平的表达, 结果发现3对干扰序列对BMI-1的表达均有不同程度的抑制作用, 尤其是siRNA3抑制作用更加明显。此外, MTT结果显示, 空白对照

组、NC组和干扰组细胞的增殖能力差异无统计学意义,说明采用的转染方法安全可靠。

为了检测转染后对肿瘤细胞放射敏感性的影响,本研究采用了克隆形成实验来验证细胞的存活能力。 D_q 值表示细胞对亚致死损伤修复能力大小, D_q 值越小,表明细胞的亚致死损伤修复能力越弱,放射线对细胞的杀伤力越大。结果发现,干扰组细胞的 D_q 值明显小于空白对照组和NC组的 D_q 值。外推数N值代表存活曲线肩区宽度,反映细胞内所含的放射敏感区域。本研究中干扰组的N值明显大于空白对照组和NC组的N值,且干扰后, D_q 显著降低,表明干扰食管癌细胞中*BMI-1*基因能有效地抑制细胞的亚致死性损伤修复能力,并促进了其放射增敏作用。

细胞的放射敏感性与细胞周期关系密切^[5]。有研究发现,*BMI-1*的高表达会引起G₂/M期增加^[6],而敲低*BMI-1*表达会诱导宫颈癌细胞G₁期比例增加,G₂/M期降低。本研究中X线照射后24、48 h均引起了细胞G₂/M期阻滞,而干扰组细胞G₂/M期比例显著低于空白对照组和NC组,提示干扰*BMI-1*的表达在一定程度上消除了周期阻滞,促进了放射线的杀伤力,增加了细胞凋亡,从而提高了放射敏感性;但在照射48 h后干扰组细胞凋亡比例明显高于空白对照组和NC组,而24 h时各组间细胞凋亡比例差异并不明显,表明细胞凋亡存在一定的程序性和时间依赖性^[7]。其机制可能是RNA干扰*BMI-1*基因的表达,当放射线照射引起DNA损伤后,其接受损伤信号的能力下降,不能及时向下游传递损伤信号,细胞周期阻滞功能受损,下游基因损伤修复能力下降,进而诱导细胞凋亡的发生,从而增强了放射敏感性^[8]。为了进一步探讨*BMI-1*对食管癌细胞周期调控的相关机制,本研究中分别采用RT-PCR和Western blot方法检测了各组细胞中*p16*、*CDK4*基因和蛋白的表达。有研究证明,*BMI-1*基因缺失时,其对下游细

胞周期调控蛋白*p16*的抑制作用减弱,*p16*蛋白表达增强,通过与*CDK*竞争性结合*Cyclin D*,而阻碍形成*CDK-Cyclin D*复合物,使*Cyclin D/CDK*激酶失活,从而使细胞周期阻滞,并抑制细胞增殖^[9]。本研究与该研究结果一致。

综上所述,本实验结果证实,干扰技术抑制*BMI-1*的表达,对食管癌TE13细胞的增殖能力没有显著影响,并一定程度上消除了G₂/M周期的阻滞,增强了放射敏感性,其分子机制可能与抑制*p16/CDK4*通路有关。

[参 考 文 献]

- [1] 刘志坤,祝淑钗,苏景伟,等.靶向沉默人基因*MDC1*表达对食管癌细胞放射敏感增敏作用的实验研究[J].南方医科大学学报,2010,30(8):1830-1834.
- [2] ROUHIGHARABAEI L, FERREIRO J F, PUT N, et al. *BMI-1*, the polycomb-group gene, is recurrently targeted by genomic rearrangements in progressive B-cell leukemia/lymphoma [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2013, 52(10): 928-944.
- [3] YADIRGI G, LEINSTER V, ACQUATI S, et al. Conditional activation of *BMI-1* expression regulates self-renewal, apoptosis, and differentiation of neural stem/progenitor cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Stem Cells*, 2011, 29(4): 700-712.
- [4] CHEN Y C, CHANG C J, HSU H S, et al. Inhibition of tumorigenicity and enhancement of radiochemosensitivity in head and neck squamous cell cancer-derived ALDH1-positive cells by knockdown of *BMI-1* [J]. *Oral Oncol*, 2010, 46(3): 158-165.
- [5] XU X H, LIU X Y, SU J. ShRNA targeting *BMI-1* sensitizes CD44+ nasopharyngeal cancer stem-like cells to radiotherapy [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(2): 764-770.
- [6] XU Z, LIU H, LV X, et al. Knockdown of the *BMI-1* oncogene inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis and is involved in the decrease of Akt phosphorylation in the human breast carcinoma cell line MCF-7 [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(2): 409-418.
- [7] 李曙光,祝淑钗,刘志坤,等. RNA干扰抑制*STAT1*基因表达对食管癌细胞放射生物效应影响[J].中华放射肿瘤学杂志,2013,22(1): 53-57.
- [8] 刘志坤,祝淑钗,杨洁,等. RNA干扰*53BP1*基因表达对食管癌放射敏感性的影响[J].中国癌症杂志,2012,22(3): 189-195.
- [9] 张绪慧,郑堰心,张丽,等.氧化苦参碱对人结肠癌SW620细胞*p16/cyclinD1/CDK4*通路的影响[J].中草药,2014,45(15): 2201-2205.

(收稿日期: 2015-09-09 修回日期: 2015-11-13)