

## 论 著

(基础研究)

## siRNA 沉默环指蛋白 8 基因对裸鼠人鼻咽癌移植瘤放疗增敏作用的实验研究

王茂鑫, 陈贤明, 龚宏勋, 陈十燕, 杨帆, 陈函

**【摘要】 目的** 探讨环指蛋白 8(RNF8)的放疗抵抗作用及沉默 RNF8 后对鼻咽癌的放疗增敏作用及其机制。

**方法** 分别将鼻咽癌 CNE-1 细胞株及稳定转染的 RNF8 沉默的 CNE-1 细胞株注射入裸鼠背部皮下,建立裸鼠鼻咽癌移植瘤模型。将肿瘤长至直径 8~10 mm 的裸鼠 30 只按随机数字法分为 RNF8 未沉默组(RNF8+组)和 RNF8 沉默组(RNF8-组),每组按放疗照射剂量的不同又分 5 个亚组,每个亚组 3 只,分别给予 0、4、8、12、16Gy 照射,其中 0 Gy 为对照亚组。采用局部分割照射,每次 2 Gy。照射完成 10 d 后杀鼠取瘤,称重观察抑瘤情况,计算抑瘤率;取 2 组 8Gy 剂量亚组肿瘤制成细胞悬液,应用流式细胞仪检测凋亡率,应用流式细胞仪检测 2 组 8 Gy 剂量亚组中 RNF8 和 DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位(DNA-PKcs)、共济失调毛细血管扩张症突变基因(ATM)的表达。 **结果** RNF8 在 RNF8-组中只有微量表达( $0.11 \pm 0.03$ ),而在 RNF8+组中表达明显升高( $1.18 \pm 0.23$ ),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。RNF8+组和 RNF8-组分别在 16 Gy 时抑瘤率最大。RNF8+组抑瘤率在各个剂量点均低于 RNF8-组,其中 8 Gy 时差异最大( $P < 0.01$ )。因此选择 RNF8+组 8 Gy 剂量亚组和 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组进行比较。RNF8+组 8 Gy 剂量亚组凋亡率明显低于 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组( $P < 0.05$ )。RNF8+组 8 Gy 剂量亚组中 ATM 表达( $49.3 \pm 5.3$ )较 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组( $23.4 \pm 2.6$ )明显升高( $P < 0.01$ ),而 DNA-PKcs 在组间表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。 **结论** RNF8 可以导致鼻咽癌细胞的放疗抵抗,其机制是通过激活以 ATM 为主的同源重组(HR)途径来修复损伤的肿瘤细胞 DNA,沉默 RNF8 可以增加鼻咽癌的放疗敏感性。

**【关键词】** 鼻咽癌;环指蛋白 8;放射治疗;小干扰 RNA;动物试验**【中图分类号】** R739.63 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2021)03-0244-05**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2021.03.005

## Silencing RNF8 by siRNA enhances the radiation sensitivity of NPC transplantation tumor in nude mice

WANG Mao-xin, CHEN Xian-ming, GONG Hong-xun, CHEN Shi-yan, YANG Fan, CHEN Han

(Otolaryngology Department, the 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force, PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the role of RNF8 in radioresistance of nasopharyngeal cancer (NPC) and the irradiation enhancement effect and mechanism to NPC when RNF8 was silenced. **Methods** CNE-1 cells and CNE-1 cells in which RNF8 was stably silenced by siRNA were injected to the back of nude mice subcutaneously, respectively. The model of NPC transplantation tumor in nude mice was established. Thirty nude mice with 8-10 mm transplanted tumor were divided to two groups: RNF8+ Group (RNF8 not silenced) and RNF8-Group (RNF8 silenced). Each group was divided to 4 sub-groups and 1 control group. Each sub-group had 3 mice. Tumor of mice in sub-groups received 4 Gy, 8 Gy, 12 Gy and 16 Gy irradiation, respectively. Mice in control groups were received 0 Gy. Local fractional irradiation was used for mice with 2 Gy each time. Mice were killed 10 days after irradiation, then tumors were taken out and weighed. Tumor inhibition rate was calculated. Tumors in 8 Gy sub-group of RNF8+ Group and 8 Gy sub-group of

RNF8-Group were made to cell suspension. The apoptosis rate were detected by flow cytometry. The expression of RNF8, DNA-PKcs and ATM was detected in the cell suspension by flow cytometry. **Results** RNF8 was higher expressed in

基金项目:福建省自然科学基金(2015J01485)

作者单位:350025 福州,联勤保障部队第九〇〇医院耳鼻咽喉头颈外科(王茂鑫、陈贤明、龚宏勋、陈十燕、杨帆、陈函)

RNF8+ Group ( $1.18 \pm 0.23$ ) than that in RNF8-Group ( $0.11 \pm 0.03$ ,  $P < 0.01$ ). Tumor inhibition rate was the highest when they received 16 Gy radiation in both groups. Tumor inhibition rate in RNF8-Group at every dose point was higher than that in RNF8+ Group, the largest gap was at 8 Gy dose point ( $P < 0.01$ ). The detection index of 8 Gy sub-group of RNF8+ Group was compared to that of 8 Gy sub-group of RNF8-Group. The apoptosis rate in 8 Gy sub-group of RNF8-Group was higher than that in 8 Gy sub-group of RNF8+ Group ( $P < 0.05$ ). The expression of ATM in 8 Gy sub-group of RNF8+ Group ( $49.3 \pm 5.3$ ) was significantly higher than that in 8 Gy sub-group of RNF8-Group [ $(23.4 \pm 2.6)$ ,  $P < 0.01$ ]. The expression of DNA-PKcs had no significant differences between both groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** RNF8, which can activate homologous recombination (HR) way to repair impaired DNA of cancer cells, mediates the radioresistance of NPC cells. Silencing RNF8 can enhance radiation sensitivity of NPC.

**[Key words]** nasopharyngeal cancer; RNF8; radiotherapy; siRNA; animal experiment

## 0 引言

鼻咽癌是头颈部常见恶性肿瘤之一,我国东南地区多发,近年来有增多趋势。放疗是鼻咽癌的首选治疗方法,但是鼻咽癌的放疗抵抗和复发仍是鼻咽癌治疗中的难点<sup>[1-3]</sup>。我们的前期工作已发现,抑制鼻咽癌细胞中环指蛋白 8 (ring finger protein 8, RNF8) 的表达能够提高肿瘤细胞对放射线的敏感性<sup>[4]</sup>。但有关干扰 RNF8 基因表达在体内是否会提高鼻咽癌的放疗敏感性,目前还未见报道。本实验采用小干扰 RNA (small RNA interference, siRNA) 沉默 CNE1 细胞的 RNF8 基因,筛选出稳定转染的细胞,注入裸鼠体内,建立移植瘤模型,探讨 RNF8 与鼻咽癌放疗抵抗的关系及沉默 RNF8 与鼻咽癌放疗敏感性之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞和主要试剂** 鼻咽癌 CNE-1 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。RNF8 沉默的 CNE-1 稳定转染细胞来自原福州总医院<sup>[1]</sup>。RNF8 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 共济失调毛细血管扩张症突变基因 (ataxia-telangiectasia mutate, ATM) 抗体 (美国 Biovision 公司), DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位 (DNA dependent protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs) 抗体 (美国 Thermo 公司), 异硫氰酸荧光素 (Fluorescein Isothiocyanate, FITC) 标记的兔抗鼠二抗 (美国 Sigma 公司)。AnnexinV-FITC (Abcam, Cambridge, UK)。

**1.1.2 动物** BALB/c 裸鼠 30 只购自军事医学科学院实验动物中心 (实验动物许可证号: 2019-0496); 本实验经联勤保障部队第九〇〇医院伦理委员会批准 (批准号: 2016-021)。鼠龄 3~4 周龄,

体重 12~18 g, 均为雄性, 在无特定病原体 (SPF)、恒定温度 (22~25 °C) 的无菌层流动物房内饲养, 经高压灭菌饲料和水供动物自由食用。

**1.1.3 主要仪器** 荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司), BCM-1000A 型生物洁净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司), 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), 流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson FAC Sort 公司), 2100C 型直线加速器 (美国 Varian 公司)。

**1.2 方法** 先用 Western blot 法检测沉默和未沉默 RNF8 的细胞中 RNF8 的蛋白表达, 用 Image J 软件分析条带灰度值, 计算与内参 GAPDH 灰度值的比值, 验证 siRNA 对 RNF8 的沉默效果。

**1.2.1 裸鼠成瘤** 取沉默和未沉默 RNF8 的 CNE-1 细胞进行实验, CNE-1 细胞制成单细胞悬液 (台盼蓝拒染法计数活细胞数占 95% 以上), 用 RPMI-1640 培养液调细胞悬液为  $2 \times 10^6$  个/0.2 mL, 于每只裸鼠背部皮下接种细胞悬液 0.2 mL, 2 周后待肿瘤直径达 8~10 mm 时进行实验。

**1.2.2 成瘤裸鼠放疗** 将成瘤裸鼠 30 只按随机数字法分为 RNF8 未沉默组 (RNF8+组) 和 RNF8 沉默组 (RNF8-组), 每组按放疗照射剂量的不同又分 5 个亚组, 每个亚组 3 只, 分别给予 0、4、8、12、16 Gy 照射, 其中 0 Gy 为对照亚组。采用局部分割照射, 裸鼠均放入特制容器固定, 放置于放疗机, 照射肿瘤局部, 以 1 cm 厚铅板防护动物其余部位, 照射距离为 100 cm, 照射野为 4 cm×4 cm, 剂量率为 78 cGy/min。每次 2 Gy。照射完成 10 d 后杀鼠取瘤, 称重观察抑瘤情况, 计算抑瘤率, 公式为:

$$\text{抑瘤率} = \left[ \frac{(\text{对照亚组平均瘤重} - \text{每个剂量亚组平均瘤重})}{\text{对照亚组平均瘤重}} \right] \times 100\%$$

**1.2.3 将放疗后的肿瘤制成单细胞悬液** 取 2 组 8 Gy 剂量亚组肿瘤组织各约 100 mg, 在 120 目的

不锈钢网下方置一平皿,用眼科小剪刀将肿瘤组织剪碎,再用镊子轻轻在网上搓组织块,边搓边用等渗盐水冲洗,直至将组织搓完为止。将平皿中的细胞混悬液用 300 目铜网过滤,收集细胞悬液,以 800 r/min 离心沉淀 2 min(离心半径 15 cm)。调整细胞数至  $1 \times 10^6/\text{mL}$ ,取 0.1 mL 细胞悬液,用专用磷酸盐缓冲液[0.01% 磷酸盐缓冲液(PBS)+0.5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)]+2 mmol/L 的乙二胺四乙酸(EDTA)洗涤,重悬。

**1.2.4 Annexin V/propidium iodide (PI) 双染检测 RNF8+组 8 Gy 剂量亚组和 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组及其对照亚组凋亡率** 取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液加入 10  $\mu\text{L}$  AnnexinV-FITC,轻轻摇晃,冰上避光孵育 15 min,再加入 10  $\mu\text{L}$  PI 冰上避光孵育 5 min,然后加入 400  $\mu\text{L}$  专用缓冲液制成单细胞悬液,流式细胞仪检测。空白对照不加 Annexin V-FITC+PI。

**1.2.5 应用流式细胞仪检测 DNA-PK、ATM 的表达** 100  $\mu\text{L}$  的 RNF8+组 8 Gy 剂量亚组和 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组细胞悬液加入 FC 受体 10  $\mu\text{L}$  孵育,加入抗体(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 10  $\mu\text{L}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h,0.01% PBS 洗涤,离心,再加入 FITC 标记二抗,4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min,1% 多聚甲醛固定,500 目滤网过滤,重悬,空白对照不加一抗,流式细胞仪检测。

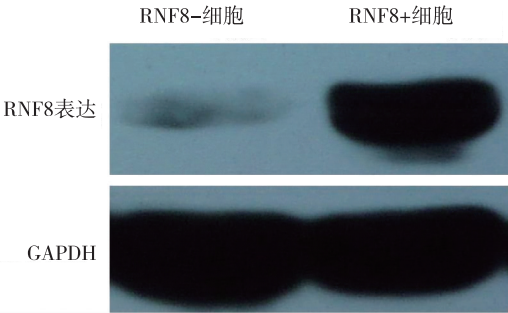
**1.3 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组之间的比较用  $t$  检验。不同剂量的抑瘤率的比较用方差分析。以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

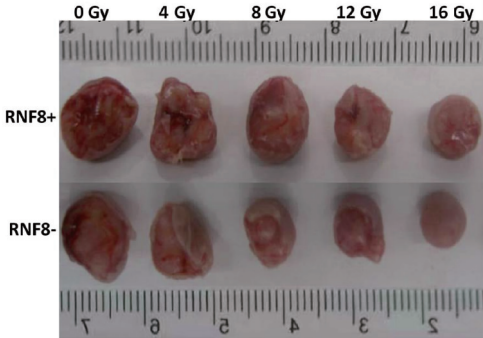
**2.1 RNF8 沉默效果的验证结果** RNF8 在 RNF8-组中只有微量表达( $0.11 \pm 0.03$ ),而在 RNF8+组中表达明显升高( $1.18 \pm 0.23$ ),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图 1。

**2.2 放疗后 2 组细胞在各个剂量点抑瘤率的比较** 随着放疗剂量的增高,2 组的肿瘤均有所缩小,见图 2。RNF8+组抑瘤率在各个剂量点均低于

RNF8-组,其中,在 8 Gy 和 12 Gy 剂量点差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),但其中 RNF8+组 8 Gy 剂量亚组和 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组差异最大( $P < 0.01$ ),见表 1。



图示 RNF8+组的 RNF8 表达明显高于 RNF8-组  
图 1 Western blot 法检测 RNF8 沉默效果

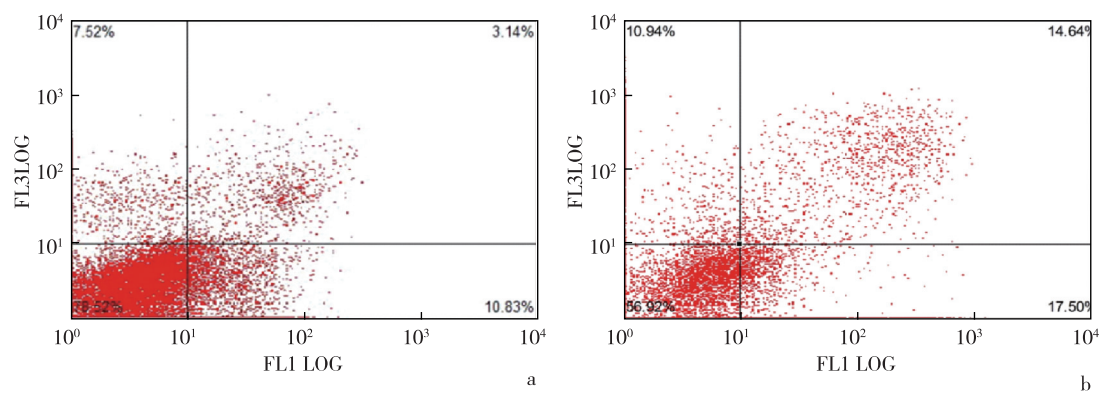


图示 RNF8+组形成的肿瘤在各个剂量放疗后均大于 RNF8-组  
图 2 RNF8 未沉默与沉默成瘤裸鼠在各个放疗剂量后的肿瘤大小比较

表 1 RNF8 未沉默与沉默成瘤裸鼠在各个放疗剂量点的抑瘤率比较( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	抑瘤率			
	4 Gy	8 Gy	12 Gy	16 Gy
RNF8+组	29.4 $\pm$ 4.6	43.0 $\pm$ 5.5	51.6 $\pm$ 5.9	63.7 $\pm$ 5.6
RNF8-组	35.5 $\pm$ 4.8	59.2 $\pm$ 4.7	63.6 $\pm$ 4.5	74.3 $\pm$ 8.7
$t$ 值	1.589	3.878	2.801	1.774
$P$ 值	0.187	0.008	0.048	0.151

**2.3 放疗后 2 组细胞的 8 Gy 剂量亚组凋亡率的比较** 放疗后 RNF8+组 8 Gy 剂量亚组和 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组凋亡率均较各自的对照亚组升高,且 RNF8+组 8 Gy 剂量亚组凋亡率明显低于 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组( $P < 0.05$ )。见图 3。



a;RNF8+组;b;RNF8-组

图示 8 Gy 放疗后 RNF8-组凋亡率较 RNF8+组明显升高

图 3 流式细胞仪检测 8 Gy 放疗后 RNF8 未沉默与沉默裸鼠肿瘤凋亡情况

**2.4 放疗后 2 组细胞的 8 Gy 剂量亚组的 ATM 和 DNA-PKcs 表达水平的比较** 放疗后 RNF8+组 8 Gy 剂量亚组 ATM 的表达明显高于 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组,差异具有统计学意义( $P<0.01$ );RNF8+组 8 Gy 剂量亚组 DNA-PKcs 的表达亦高于 RNF8-组 8 Gy 剂量亚组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 2。

表 2 8 Gy 放疗后 RNF8 未沉默与沉默裸鼠移植瘤的 ATM、DNA-PKcs 的表达比较( $\bar{x}\pm s$ , %)

组别	ATM	DNA-PKcs
RNF8+组 8 Gy 剂量亚组	49.3±5.3	40.6±3.1
RNF8-组 8 Gy 剂量亚组	23.4±2.6	33.6±2.7
<i>t</i> 值	6.234	2.430
<i>P</i> 值	0.003	0.072

3 讨 论

鼻咽癌的放疗后残留和复发与多种因素有关,如肿瘤的分期、大小、侵犯范围、病理类型有关,但鼻咽癌细胞对放射线的抵抗亦是重要因素。而这种抵抗是通过对损伤的肿瘤细胞 DNA 进行修复实现的。放射线导致细胞 DNA 损伤,此时肿瘤细胞可以激活多种蛋白来修复损伤的 DNA,从而使肿瘤细胞存活下来,放疗停止后,肿瘤细胞可以再次增殖导致复发。研究表明,细胞主要通过非同源性末端连接(DNA nonhomologous end-joining, NHEJ)和同源重组(homologous recombination, HR)两种途径来修复损伤的 DNA, DNA 依赖蛋白激酶(DNA-dependent

protein kinase, DNA-PK)是前者关键酶,ATM 是后者关键酶<sup>[5-8]</sup>。而 RNF8 是一个包含环指结构的 E3 泛素连接酶家族成员,在细胞受到电离辐射时,RNF8 泛素化多种底物并募集多种因子至 DNA 损伤部位,进行 DNA 的修复<sup>[9-13]</sup>。Lu 等<sup>[14]</sup>发现 RNF8 泛素化多种蛋白使 Nijmegen 断裂综合征 1(Nijmegen break-age syndrome, Nbs1)等分子聚集在 DNA 损伤位点,通过 HR 途径修复 DNA。Wu 等<sup>[15]</sup>发现 RNF8 与 FHA 和环指检查点(checkpoint with FHA and ring finger, Chfr)共同调控 ATM 的活性,进而调节 ATM 依赖的 DNA 损伤应答。我们前期从细胞和分子水平的研究表明,RNF8-的鼻咽癌细胞比 RNF8+细胞对放射线更加敏感,凋亡率更高,即 RNF8+细胞的抵抗力更强,表明 RNF8 参与 DNA 的损伤修复。而放疗后 RNF8+细胞 ATM 的表达较 RNF8-细胞高,表明 RNF8 激活 ATM 为主的 HR 途径,导致放疗抵抗<sup>[4]</sup>。本研究还从人鼻咽癌标本中检测 RNF8 的表达,发现 RNF8 阳性者残留和复发的发生率升高,生存率降低,提示 RNF8 参与鼻咽癌放疗抵抗<sup>[16]</sup>。

我们在活体内试验结果也得出类似结论。本研究通过对裸鼠移植瘤的研究发现,RNF8-组肿瘤较 RNF8+组放疗后的生长抑制率高,提示 RNF8-组更容易受到放射线损伤,而 RNF8+组有放疗抵抗,由此可以推论 RNF8 参与 DNA 的损伤修复。在检测凋亡率的实验中,RNF8 沉默后,放疗后肿瘤细胞凋亡率较 RNF8+组明显升高,进一步证实了这一点,即缺少了 RNF8,肿瘤细胞更容易被放射线杀伤,表明 RNF8 在肿瘤细胞的放疗抵抗中具有重要作用。进一步的研究显示,RNF8+组放疗后 ATM

表达升高,而 RNF8-组放疗后的 ATM 表达无明显变化,即肿瘤的 RNF8 表达受抑制后,接受射线照射其 ATM 表达也受抑制,表明 ATM 的表达是受 RNF8 调节或控制的,提示 RNF8 通过调节 ATM,通过 HR 途径修复损伤的 DNA。而 DNA-PKcs 在放疗后的 RNF8-组和 RNF8+组均有所升高,提示 DNA-PK 可能也参与了 DNA 的修复,但组间无明显差异,表明 DNA-PK 并不受 RNF8 的调节,与我们之前的研究结果有较好的一致性<sup>[4]</sup>。

总之,RNF8 通过激活以 ATM 为主的 HR 途径来修复肿瘤细胞 DNA,从而导致肿瘤的放疗抵抗。但鼻咽癌的放疗抵抗机制非常复杂,RNF8 激活 HR 途径修复损伤的 DNA 只是其中的一个方面,这就需要更加深入地研究鼻咽癌的放疗抵抗机制,从而采取针对性的措施,减少放疗抵抗,提高肿瘤的放疗敏感性,进而提高患者生存率。

#### 【参考文献】

- [1] 周方正,陈洁,王小聪,等.鼻咽癌初治患者实施调强放疗的远期疗效及预后影响因素[J].中国临床研究,2018,31(1):81-84.
- [2] 邱元正,刘超,李果.鼻咽癌放射治疗的现状与对策[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,2015,21(6):435-438.
- [3] 张攀,张迪,戴晓波.复发鼻咽癌再程放射治疗的研究进展[J].实用肿瘤学杂志,2019,33(1):92-96.
- [4] Wang M, Chen X, Chen H, *et al.* RNF8 plays an important role in the radioresistance of human nasopharyngeal cancer cells in vitro[J]. *Oncol Rep*, 2015,34(1): 341-349.
- [5] Du J, Yin N, Xie T. *et al.* Quantitative assessment of HR and NHEJ activities via CRISPR/Cas9-induced oligodeoxynucleotide-mediated DSB repair[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2018, 70(10): 67-71.
- [6] Santivasi W, Xia F. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(2): 251-259.
- [7] Jachimowicz RD, Goergens J, Reinhardt HC. DNA double-strand break repair pathway choice - from basic biology to clinical exploitation[J]. *Cell Cycle*, 2019,18(13):1423-1434.
- [8] Jin MH, Oh DY. ATM in DNA repair in cancer[J]. *Pharmacol Ther*,2019, 203(11):107391.
- [9] Zhou T, Yi F, Wang Z,*et al.* The functions of DNA damage factor RNF8 in the pathogenesis and progression of cancer[J]. *Int J Biol Sci*,2019, 15(5):909-918.
- [10] Tsai LJ, Lopezcolorado FW, Bhargava R,*et al.* RNF8 has both KU-dependent and independent roles in chromosomal break repair[J]. *Nucleic Acids Res*,2020, 48(11):6032-6052.
- [11] Li F, Liu B, Zhou X,*et al.* Silencing of E3 Ubiquitin Ligase RNF8 Enhances Ionizing Radiation Sensitivity of Medulloblastoma Cells by Promoting the Deubiquitination of PCNA [J]. *Oncol Res*, 2018, 26(9):1365-1373.
- [12] Zhou T, Yi F, Wang Z, *et al.* The Functions of DNA Damage Factor RNF8 in the Pathogenesis and Progression of Cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2019,15(5):909-918.
- [13] Tan Q, Niu K, Zhu Y, *et al.* RNF8 ubiquitinates RecQL4 and promotes its dissociation from DNA double strand breaks[J]. *Oncogenesis*,2021,10(3):24.
- [14] Lu C, Truong L, Aslanian A, *et al.* The RING finger protein RNF8 ubiquitinates Nbs1 to promote DNA double-strand break repair by homologous recombination[J]. *J Biol Chem*,2012, 287(52): 43984-43994.
- [15] Wu J, Chen Y, Lu L, *et al.* Chfr and RNF8 synergistically regulate ATM activation [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2011, 18(7): 761-768.
- [16] 王茂鑫,陈贤明,张贤,等.环指蛋白 8 在鼻咽癌组织中的表达及其与预后的关系[J].东南国防医药,2019,21(2):147-151.

(收稿日期:2020-10-07; 修回日期:2021-02-23)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一起)