

• 论 著 •

干扰 LINC00857 的表达促进鼻咽癌细胞放疗敏感及其作用机制*

李其银¹,宗桃梅¹,付茂月²,陈红江³

宜宾市第二人民医院/四川大学华西医院宜宾医院:1. 耳鼻喉科;2. 肿瘤科,四川宜宾 644000;
3. 中国科学院大学重庆医院/重庆市人民医院耳鼻喉科,重庆 400013

摘要:**目的** 研究 LINC00857 在鼻咽癌(NPC)组织中的表达水平及对 NPC 细胞放疗敏感性的作用机制。**方法** 收集 NPC 和慢性鼻炎组织,采用逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 LINC00857 的表达水平,分析 LINC00857 的表达与 NPC 患者放疗敏感性及预后的关系。采用 RT-qPCR 检测 LINC00857 在 NPC 细胞系中的表达水平。LINC00857 siRNA 转染 NPC 细胞,分为 si-NC 组和 si-LINC00857 组。CCK8 实验和平板克隆实验检测各组细胞增殖能力及对放疗敏感性的影响。si-NC 组和 si-LINC00857 组细胞放疗照射后,流式实验检测各组细胞周期和凋亡能力。Western blot 检测各组细胞中蛋白激酶 B(AKT)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路关键蛋白 pAKT、pmTOR 的表达及下游周期相关蛋白 cyclin D1,凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 蛋白表达。**结果** LINC00857 在 NPC 组织中的表达高于在慢性鼻咽黏膜组织中的表达,差异有统计学意义($t=3.726, P<0.001$)。LINC00857 高表达组预后比 LINC00857 低表达组预后较差($\chi^2=8.831, P=0.003$)。LINC00857 在 NPC 细胞中的表达高于在鼻咽上皮细胞系 NP69 中的表达。与 si-NC 组相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞增殖能力降低,放疗敏感性增加($P<0.05$); AKT/mTOR 信号通路关键蛋白 pAKT、pmTOR 表达降低及下游周期相关蛋白 cyclin D1 表达降低,凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达降低,Bax 蛋白表达增加($P<0.05$)。**结论** LINC00857 调控 AKT/mTOR 信号通路促进鼻咽癌细胞放疗抵抗,是治疗鼻咽癌放疗抵抗的潜在分子靶点。

关键词:鼻咽癌; LINC00857; 放疗抵抗
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.06.019 **中图法分类号:**R739.63
文章编号:1673-4130(2023)06-0734-06 **文献标志码:**A

Interfering LINC00857 promotes radiotherapy sensitivity of nasopharyngeal carcinoma and its mechanism*

LI Qiyin¹, ZONG Taomei¹, FU Maoyue², CHEN Hongjiang³

1. Department of Otorhinolaryngology; 2. Department of Oncology, Yibin Second People's Hospital/West China Hospital of Sichuan University Yibin Hospital, Yibin, Sichuan 644000, China; 3. Department of Otorhinolaryngology, Chongqing Hospital of Chinese Academy of Sciences/Chongqing People's Hospital, Chongqing 400013, China

Abstract: Objective To investigate the expression level of LINC00857 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissues and its mechanism of action on the radiosensitivity of NPC cells. **Methods** NPC and chronic rhinitis tissues were collected, and the expression level of LINC00857 was detected by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and the relationship between LINC00857 expression and radiotherapy sensitivity and prognosis of NPC patients was analyzed. The expression level of LINC00857 in NPC cell lines was detected by RT-qPCR. NPC cells transfected with LINC00857 siRNA were divided into si-NC group and si-LINC00857 group. CCK8 assay and plate cloning assay were used to detect the proliferative ability of cells and their effects on radiotherapy sensitivity. After si-NC group and si-LINC00857 group radiotherapy, the cell cycle and apoptosis capacity of each group were detected by flow cytometry. The expressions of key proteins pAKT and pmTOR of protein kinase B(AKT)/target of rapamycin (mTOR) signaling pathway, downstream cyclin D1, apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. **Results** The expression of LINC00857 in NPC tissues was higher than that in chronic nasopharyngeal mucosa tissues, the difference was statistically significant ($t=3.726, P<0.001$). The prognosis of LINC00857 group

* 基金项目:四川省卫生健康委员会科研课题(19PJ062)。
作者简介:李其银,男,主治医师,主要从事鼻咽癌研究。

with high expression was worse than that of LINC00857 group with low expression ($\chi^2=8.831, P=0.003$). The expression of LINC00857 in NPC cells was higher than that in nasopharyngeal epithelial cell line NP69. Compared with the si-NC group, the proliferation ability of NPC cells in the si-LINC00857 group was decreased, and the sensitivity to radiotherapy was increased ($P<0.05$). The expressions of key proteins pAKT and pmTOR of AKT/mTOR signaling pathway and downstream cyclin D1 were decreased, while the expressions of apoptosis-related protein Bcl-2 were decreased, and the expressions of Bax were increased ($P<0.05$).

Conclusion LINC00857 regulates AKT/mTOR signal pathway to promote nasopharyngeal carcinoma cell radiotherapy, it is a potential molecular target for the treatment of radiotherapy of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; LINC00857; radiotherapy resistance

鼻咽癌(NPC)是一种来自鼻咽上皮细胞的恶性肿瘤,具有高度转移性和侵袭性特征,NPC具有显著的地域特性,我国南部地区 NPC 发病率较高^[1]。目前,放射疗法(简称放疗)是 NPC 的主要治疗方式,然而约 70% 的 NPC 患者诊断时已处于晚期阶段,并存在放疗抵抗,使得 NPC 放疗失败,是 NPC 患者预后不良的重要障碍^[2]。因此,鉴定 NPC 放疗抵抗的分子机制至关重要。LINC00857 是一种长的非编码 RNA,已经明确其与实体瘤及血液系统等多种恶性肿瘤的发生发展密切相关^[3-6]。在结直肠癌、卵巢癌和肺腺癌等常见恶性实体肿瘤中,LINC00857 促进肿瘤的恶性进展,发挥促癌作用^[3-5]。LINC00857 在鼻咽癌中的作用未知。WANG 等^[5]报道在肺腺癌细胞中沉默 LINC00857 的表达,促进肺腺癌细胞对放疗的敏感性,可作为肺腺癌治疗的潜在分子靶点。蛋白激酶 B(AKT)/雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是调节肿瘤细胞增殖、凋亡和细胞周期分布的重要信号通路,并且该信号传导途径的过度激活促进恶性肿瘤的放疗抵抗性^[7]。有研究提示 LINC00857 与肿瘤放疗抵抗相关^[5]。因此本研究对 LINC00857 在 NPC 患者放疗抵抗中作用及与 AKT / mTOR 信号通路关系进行了研究,并对其机制进行了初步探讨,以期发现 NPC 放疗抵抗新的分子机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015—2018 年宜宾市第二人民医院接受鼻咽检查的 81 例 NPC 患者和 30 例慢性鼻咽患者作为研究对象。NPC 患者男性 55 例、女性 26 例,平均年龄为(63.57±15.39)岁。慢性鼻咽患者男性 14 例、女性 16 例,平均年龄为(55.02±18.46)岁。NPC 患者纳入标准:(1)患者在接受活检并确诊为 NPC^[8];(2)未患有其他类型肿瘤;(4)患者均接受放疗,放疗的总剂量为 68~72 Gy,每周 3 次,每次 2 Gy,治疗 3 个月通过磁共振成像评估治疗效果。根据评估实体肿瘤临床疗效的方法评估 NPC 患者治疗效果,并将完全缓解(CR)和部分缓解(PR)定义为放疗敏感,收集放疗敏感患者的肿瘤组织为本研究的放疗敏感组织,而疾病稳定(SD)和疾病进展(PD)定义为放疗抵抗,收集放疗抵抗患者的肿瘤组织为本研究的放疗抵抗组织并随访 3 年 NPC 患者的预后^[8];(5)

所有患者均签署了知情同意书。慢性鼻炎患者纳入标准:(1)符合文献[9]中慢性鼻炎的诊断标准;(2)除了患有慢性鼻炎外,未患有其他疾病。本研究由医院伦理委员会批准,符合《赫尔辛基宣言》的伦理学准则。

1.2 试剂来源 NPC 细胞系 CNE1、CNE2、C666-1、HNE1 和鼻咽上皮细胞系 NP69 购自中国上海科学院细胞库;RPMI 1640 培养基、FBS 和胰酶均购自美国 Hyclone 公司;Trizol 试剂和逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂盒均购自美国 Invitrogen 公司;LINC00857 引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 试剂公司;LINC00857 siRNA 购于上海瑞博生物技术有限公司;CCK8 试剂购于美国 sigma 试剂公司;细胞周期检测试剂盒和 RIPA 裂解液均购自中国上海碧云天生物试剂有限公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自中国南京凯基生物试剂有限公司;BCA 蛋白质浓度检测试剂盒和 PVDF 膜购于美国 Promega 公司;AKT、mTOR、pAKT、pmTOR、cyclin D1、Bcl-2、Bax、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗购于英国 Abcam 公司。

1.3 细胞培养、分组及转染 鼻咽癌细胞系 CNE1、CNE2、C666-1、HNE1 和鼻咽上皮细胞系 NP69 均采用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养基培养,放置在 5% CO₂、37℃ 的饱和湿度培养箱中。细胞贴壁后及时更换培养基,长满后采用胰酶消化传代细胞。

1.4 RT-qPCR 检测 采用 Trizol 试剂从液氮中冻存的组织和细胞中提取总 RNA。将 RNA 样品用无 RNA 酶的水稀释 20 倍。使用紫外分光光度计检测 RNA 样品的浓度与纯度,吸光度(A)₂₆₀/A₂₈₀ 在 1.7~2.1 时被认为是高纯度。采用 PCR 逆转录试剂盒,将 5 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA,并以 cDNA 用作模板进行 RT-qPCR。反应体系为 2 μL cDNA,10 μL PCR 缓冲液,200 μmol/L dNTPs 1 μL,80 pmol/L PCR 正向引物 0.32 μL,无 RNA 酶的水补足最终体积 20 μL。反应条件为 95℃ 的预先饱和度 3 min,然后在 94℃ 下进行 30 个变性循环 30 s,在 55℃ 下退火 30 s,在 72℃ 下延伸 30 s。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 公式计算

LINC00857 的相对表达水平, $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ 实验组 - ΔCT 对照组, $\Delta CT = Ct$ 靶基因 - Ct 内参。Ct 是指反应实时荧光强度达到设定阈值且扩增呈对数增长时的扩增循环。所用引物序列为: LINC00857 正向引物 5'-CCCCTGCTTCATTGTTTCCC-3' 和反向引物 5'-AGCTTGTCTTCTTGGGTACT-3'; GAPDH 正向引物 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' 和反向引物 5'-AATGAAGGGGTCATTGATGG-3'。其中高于 NPC 患者中的 LINC00857 平均表达水平的为 LINC00857 高表达组, 其余为 LINC00857 低表达组。

1.5 细胞转染 采用 RT-qPCR 检测鼻咽癌细胞系 CNE1、CNE2、C666-1 及 HNE1 中 LINC00857 的表达水平, 选取表达 LINC00857 最高的细胞以 2×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中, 随机分为 si-NC 组和 si-LINC00857 组。细胞完全贴壁后, 采用 lipofectamine 2000 试剂盒进行细胞 siRNA 的转染。100 pmol 的 NC siRNA 和 LINC00857 siRNA 分别采用无血清培养基稀释至终浓度为 50 nmol/L, 在室温下静置 5 min 后与 5 μ L Lipofectamine 溶液混合, 室温孵育 20 min 后分别加入各组细胞中。在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中培养 6~8 h 后, 更换新鲜培养基进一步培养 48 h, 收集细胞后采用 RT-qPCR 检测各组细胞转染效果, 用于后续实验。

1.6 平板克隆和 CCK8 实验检测细胞增殖能力、细胞放疗敏感性 si-NC 组和 si-LINC00857 组细胞以 300 个/孔接种到 6 孔板中, 每组包括 3 个重复孔, 放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中。并且每间隔 24 h 更换一次新鲜培养基。待细胞克隆团(>50 个细胞)形成时, 终止细胞培养, PBS 洗 3 次后, 加入甲醇溶液固定细胞 10 min, 弃掉甲醇, 加入结晶紫染色 20 min, 双蒸水清洗干燥后, 扫描并计数各组细胞克隆团形成数目。si-NC 组和 si-LINC00857 组细胞以 2×10^3 个/孔接种到 96 孔板中, 每组包括 6 个重复孔, 放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中。培养 0、24、48 和 72 h 后, 各细胞孔中加入 10 μ L CCK8 试剂, 在培养箱中孵育 1 h 后, 通过酶标仪测量在 450 nm 的激发波长下每个样品孔的 A 值。

si-NC 组和 si-LINC00857 组细胞以 300 个/孔接种到 6 孔板中, 每组包括 3 个重复孔, 放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中。细胞贴壁后分别采用 0、2、4 和 8 Gy 的放疗剂量辐射各组细胞, 并且每间隔 24 h 更换一次新鲜培养基。待细胞克隆团(>50 个细胞)形成时, 终止细胞培养, PBS 洗 3 次后, 加入甲醇溶液固定细胞 10 min, 弃掉甲醇, 加入结晶紫染色 20 min, 双蒸水清洗干燥后, 扫描并计数各组细胞克隆团形成数目。si-NC 组和 si-LINC00857 组细胞以 2×10^3 个/孔接种到 96 孔板中, 每组包括 6 个重复孔, 放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中。细胞贴壁后分别采用 0、2、4 和 8 Gy 的放疗剂量辐射各

组细胞, 培养 48 h 后, 各细胞孔中加入 10 μ L CCK8 试剂, 在培养箱中孵育 1 h 后, 通过酶标仪测量在 450 nm 的激发波长下每个样品孔的 A 值。

1.7 流式细胞实验检测细胞周期 si-NC 组和 si-LINC00857 组细胞以 2×10^5 个/孔接种到 6 孔板中, 每组包括 3 个重复孔, 放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中。细胞贴壁后, 采用 4 Gy 的放疗剂量辐射各组细胞, 放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中继续培养。48 h 后采用胰酶消化收集细胞, 离心采用 PBS 洗 3 次后, 加入 500 μ L 缓冲液重悬细胞, 并加入 50 μ L 的 PI 染液、12.5 μ L 的 RNase A 试剂混匀, 放置 37 $^{\circ}C$ 中避光孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测各样品荧光强度, 并分析各组细胞周期(G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期)所占比率。

1.8 流式细胞实验检测细胞凋亡 si-NC 组和 si-LINC00857 组细胞以 2×10^5 个/孔接种到 6 孔板中, 每组包括 3 个重复孔, 放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中。细胞贴壁后, 采用 4 Gy 的放疗剂量辐射各组细胞, 放置在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的饱和湿度培养箱中继续培养。48 h 后采用无乙二胺四乙酸的胰酶消化收集各组细胞, 离心采用 PBS 洗 3 次后, 加入 500 μ L 缓冲液重悬细胞, 并加入 10 μ L PI 试剂和 5 μ L Annexin V-FITC 试剂混匀, 放置室温中避光孵育 30 min, 采用流式细胞仪检测各样品荧光强度, 并分析各组细胞凋亡情况。

1.9 Western blot 实验检测细胞周期和凋亡蛋白表达 当 si-NC 组和 si-LINC00857 组细胞增长约 90% 时, 使用 RIPA 裂解溶液裂解细胞, 用离心管收集, 并使用超声裂解。使用 BCA 法测定蛋白质浓度。用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 然后转移到聚偏二氟化乙烯膜中。在室温下用封闭液封闭膜 1 h, 随后在 4 $^{\circ}C$ 下与待检测一抗抗体(稀释比均为 1:500)孵育过夜。使用 Tris 缓冲盐水, Tween 20(TBST)洗涤膜, 然后与二抗孵育, TBST 洗涤 3 次。通过增强化学发光试剂盒曝光蛋白条带。通过 image J 扫描, 并且确定灰度值。以 GAPDH 用作内参蛋白。

1.10 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行数据分析。对所有数据进行正态分布和偏态分布检验, 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验分析。Kaplan-Meier 绘制生存曲线, log-rank 分析 LINC00857 的表达对鼻咽癌患者预后的影响。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组织中 LINC00857 表达比较 LINC00857 在 NPC 组织中的表达(1.64 ± 0.42)高于在慢性鼻咽黏膜组织中的表达(1.01 ± 0.33), 差异有统计学意义($t = 10.615, P < 0.001$)。LINC00857 在 NPC 患者放疗抵抗组织中的表达(1.95 ± 0.61)高于在 NPC 患

者放疗敏感组织中的表达(1.37 ± 0.44),差异有统计学意义($t=4.959, P<0.001$)。

2.2 LINC00857 表达与 NPC 患者预后的关系 绘制 Kaplan-Meier 生存曲线,分析 LINC00857 对 NPC 患者预后的影响。81 例 NPC 患者 5 年总体生存率为 50.62%(41/81)。LINC00857 高表达组患者 5 年总体生存率为 35.14%(13/37),LINC00857 低表达组患者 5 年总体生存率为 63.64%(28/44)。LINC00857 高表达组预后比 LINC00857 低表达组预后较差($\chi^2=8.831, P=0.003$)。见图 1。

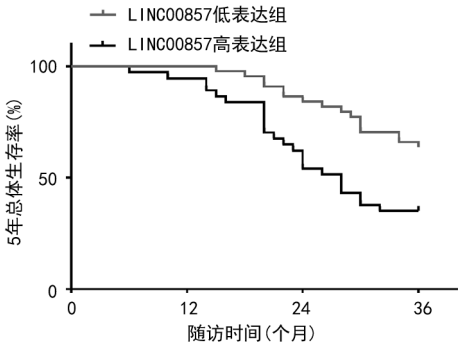


图 1 Kaplan-Meier 生存曲线分析 LINC00857 对 NPC 患者预后的影响

2.3 LINC00857 在 NPC 细胞系中表达 LINC00857 在 NPC 细胞系 CNE1、CNE2、C666-1、HNE1 和鼻咽上皮细胞系 NP69 中的表达分别为 3.78 ± 1.08 、 2.76 ± 0.55 、 4.08 ± 0.98 、 8.46 ± 0.63 和 1.00 ± 0.02 ,LINC00857 在 NPC 细胞系中的表达均高于在鼻咽上皮细胞系 NP69 中的表达,在 HNE1 中的表达最高($P<0.05$)。采用 LINC00857 siRNA 转染 HNE1 细胞,LINC00857 在 si-LINC00857 组 HNE1 细胞中的相对表达水平(0.38 ± 0.08)低于在 si-NC 组 HNE1 细胞中的相对表达水平(1.00 ± 0.03),差异有统计学意义($t=12.970, P=0.002$)。

2.4 LINC00857 siRNA 对 NPC 细胞增殖能力和放疗敏感性的影响 平板克隆实验结果显示,si-NC 组和 si-LINC00857 组 NPC 细胞克隆形成数目分别为

(78.33 ± 7.86)个、(32.67 ± 6.21)个,与 si-NC 组相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞克隆形成数目降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。CCK8 实验检测结果显示,与 si-NC 组 NPC 细胞存活能力相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞存活能力[第 24 小时: (0.33 ± 0.05) vs. (0.50 ± 0.06);第 48 小时: (0.47 ± 0.07) vs. (0.79 ± 0.08);第 72 小时: (0.64 ± 0.12) vs. (1.06 ± 0.17)]降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。平板克隆实验和 CCK8 实验结果表明,与 si-NC 组 NPC 细胞增殖能力相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞增殖能力降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。放疗线处理 NPC 细胞后,平板克隆实验显示,与 si-NC 组 NPC 细胞克隆形成数目相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞克隆形成数目[0 Gy: (47.33 ± 4.38)个 vs. (96.33 ± 6.57)个;2 Gy: (36.33 ± 3.89)个 vs. (70.67 ± 5.09)个;4 Gy: (22.67 ± 2.77)个 vs. (52.67 ± 5.23)个;8 Gy: (6.67 ± 1.09)个 vs. (46.33 ± 3.07)个]降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。CCK8 实验检测结果显示,与 si-NC 组细胞增殖活性相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞增殖活性[细胞存活百分比为 2 Gy: (40.00 ± 7.00)% vs. (75.33 ± 5.51)%;4 Gy: (31.67 ± 8.50)% vs. (62.00 ± 14.73)%;8 Gy: (23.33 ± 3.51)% vs. (50.67 ± 9.87)%]降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 si-NC 组 NPC 细胞放疗敏感性相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞放疗敏感性增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。

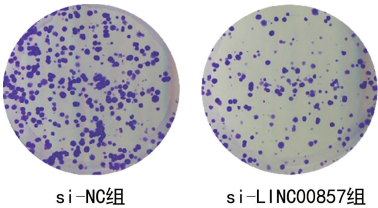


图 2 si-NC 组和 si-LINC00857 组 NPC 细胞克隆形成数目比较($\times 40$)

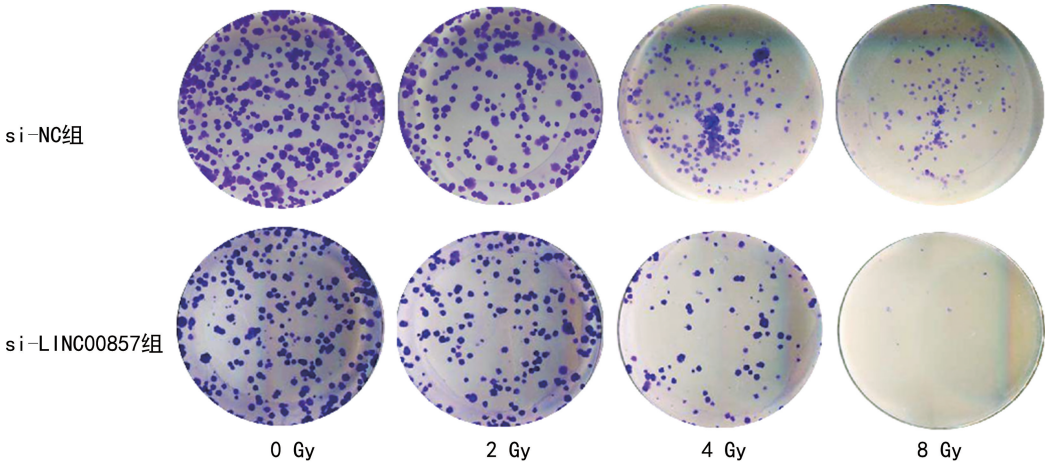


图 3 si-NC 组和 si-LINC00857 组 NPC 细胞在不同放疗剂量下细胞克隆形成数目比较($\times 40$)

2.5 LINC00857 siRNA 对放疗 NPC 细胞周期的影响 放射线处理 si-NC 组和 si-LINC00857 组 NPC 细胞后,流式细胞实验显示 si-NC 组和 si-LINC00857 组 NPC 细胞 G₀/G₁ 期细胞百分比分别为 (43.34 ± 2.74)%、(38.60 ± 4.75)%,S 期细胞百分比分别为 (24.07.93 ± 2.04)%、(21.49 ± 3.84)%,G₂/M 期细胞百分比分别为 (32.93 ± 1.28)%、(40.58 ± 1.53)%。与 si-NC 组相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞 G₂/M 期细胞百分比增加,差异有统计学意义($t = 6.647, P = 0.003$)。

2.6 LINC00857 siRNA 对放疗 NPC 细胞凋亡的影响 放射线处理 NPC 细胞后,流式细胞实验显示,si-NC 组和 si-LINC00857 组 NPC 细胞细胞凋亡率分别为 (8.95 ± 2.01)%、(20.47 ± 4.63)%,与 si-NC 组相比,si-LINC00857 组 NPC 细胞凋亡率增加,差异有统

计学意义($t = 3.953, P = 0.011$)。

2.7 LINC00857 siRNA 对放疗 NPC 细胞 AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响 Western blot 实验检测结果显示,与 si-NC 组相比,si-LINC00857 组细胞中 AKT/mTOR 信号通路关键蛋白 pAKT (0.15 ± 0.03 *vs.* 0.42 ± 0.04)、pmTOR (0.14 ± 0.03 *vs.* 0.31 ± 0.02) 表达降低 ($P < 0.05$),而总蛋白 AKT (0.92 ± 0.04 *vs.* 0.98 ± 0.09)、mTOR (0.63 ± 0.04 *vs.* 0.62 ± 0.03) 的表达无明显变化;AKT/mTOR 信号通路下游周期相关蛋白 cyclin D1 (0.32 ± 0.02 *vs.* 0.79 ± 0.03) 表达降低,凋亡相关蛋白 Bcl-2 (0.31 ± 0.04 *vs.* 0.78 ± 0.03) 表达降低、Bax 蛋白 (0.10 ± 0.02 *vs.* 1.19 ± 0.06) 表达增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4。

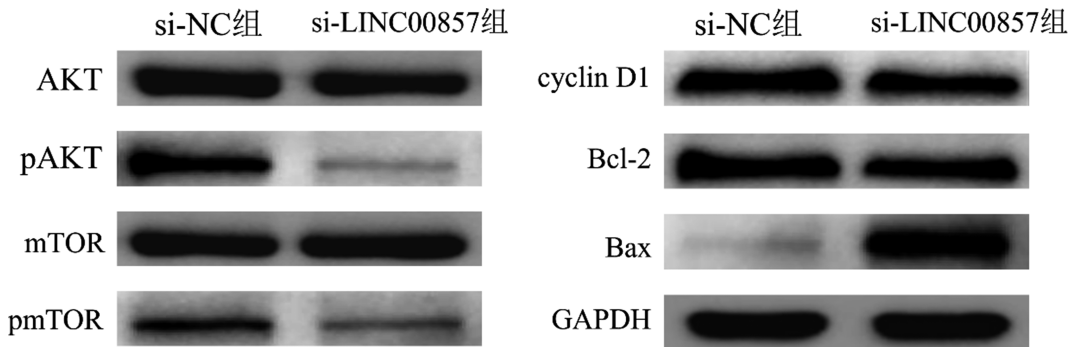


图 4 LINC00857 siRNA 对放疗 NPC 细胞 AKT/mTOR 信号通路蛋白表达的影响

3 讨 论

长链非编码 RNA (LncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的 RNA 分子,研究表明 LncRNA 可以通过包括染色质修饰、转录和转录调控等几种不同的机制调节基因表达发挥促癌或抑癌作用^[10]。NPC 中异常表达的 LncRNA 逐渐被发现,同时其在 NPC 放疗抵抗中也发挥重要作用,如 LINC00312 通过靶向 DNA-PKcs 和抑制 DNA 损伤修复来抑制 NPC 的放疗抗性^[11]。LNCRNA CASC19 通过调控 AMPK/mTOR 信号途径促进自噬增强 NPC 的放疗敏感性^[12]。表明研究 NPC 放疗抵抗中异常表达并发挥重要生物学功能的 LncRNA 具有重要意义。

LINC00857 是新近发现的肿瘤相关 LncRNA 之一,研究显示在结直肠癌中表达显著上调,LINC00857 敲低显著抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,同时诱导细胞的凋亡^[3]。胰腺导管腺癌中 LINC00857 高表达与其患者预后不良呈正相关,LINC00857 的上调促进胰腺导管腺癌细胞的增殖和克隆形成能力^[13]。LINC00857 在 NPC 中的表达情况未见有报道,本研究采用 RT-qPCR 检测显示 LINC00857 在 NPC 组织中的表达显著高于在慢性鼻咽黏膜组织中的表达,提示 LINC00857 在 NPC 中可

能发挥促癌作用。有研究报道干扰 LINC00857 的表达增强肺腺癌细胞的放疗敏感性,高表达 LINC00857 通过靶向 miR-1179 抑制胰腺癌细胞的放疗敏感性^[5,14]。本研究发现,与放疗敏感组织相比,LINC00857 在 NPC 患者放疗抵抗的组织中表达上调。LINC00857 高表达的患者预后比 LINC00857 低表达的患者预后较差 ($\chi^2 = 8.831, P = 0.003$),与文献^[13]报道结果相似。为了进一步证实 LINC00857 在 NPC 放疗抵抗中发挥重要生物学功能,本研究结果显示 LINC00857 在 NPC 细胞系中的表达显著增加,与在 NPC 组织中的表达水平具有一致性。干扰 HNE1 细胞中 LINC00857 的表达后,HNE1 细胞的增殖和放疗敏感性增加,表明 LINC00857 具有促进 NPC 放疗抵抗的作用,与 WANG 等^[5]的报道结果相似。

LINC00857 在 NPC 放疗抵抗中发挥功能的作用机制仍需进一步探讨。有研究报道 LINC00857 在恶性肿瘤中发挥促癌作用的机制较多,包括在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中 LINC00857 通过调节 miR-370-3p/CBX3 轴促进细胞增殖^[6]。LINC00857 通过调控 Hippo 信号通路促进卵巢癌细胞增殖、迁移、侵袭和糖酵解,抑制细胞凋亡^[4]。而恶性肿瘤放疗抵抗的重要作用机制包括调控细胞周期促进肿瘤细胞的恶性

增殖及抑制其凋亡^[15],有研究显示 LINC00857 在卵巢、肺癌等恶性肿瘤中可以调控细胞周期和凋亡^[4,16]。本研究发现,接受辐射的 NPC 细胞在干扰 LINC00857 的表达后,NPC 细胞周期阻滞在 G₂/M 期,细胞凋亡增加。有研究发现,抑制 AKT/mTOR 信号传导途径可以增加放疗诱导的细胞凋亡或细胞周期阻滞以增强 NPC 对放疗的敏感性^[7]。本研究检测发现抑制 LINC00857 的表达后,受辐射的 NPC 细胞 AKT/mTOR 信号途径关键蛋白 pAKT 和 pmTOR 的表达均显著降低。同时 AKT/mTOR 信号通路下游与细胞周期相关蛋白 cyclinD1 和凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,Bax 蛋白表达增加。cyclinD1 促进从 G1 至 S 期的细胞周期转变,而 cyclinD1 的下调可以在肿瘤细胞中诱导 G₂/M 期阻滞^[17]。Bax 和 Bcl-2 属于 Bcl-2 家族蛋白质,Bax 促进细胞凋亡,而 Bcl-2 抑制细胞凋亡^[18]。结果表明 LINC00857 通过调控 AKT/mTOR 信号途径促进 NPC 放疗抵抗。

综上所述,LINC00857 在 NPC 组织中高表达,与患者放疗抵抗和不良预后相关,干扰 LINC00857 的表达促进 NPC 放疗敏感性,其作用机制可能是通过调控 AKT/mTOR 信号途径,但是 LINC00857 直接作用的靶点本文未进行深入研究,后续会进一步探讨。

参考文献

- [1] CHEN Y P, CHAN A T C, LE Q T, et al. Nasopharyngeal carcinoma[J]. *Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80.
- [2] LEE A W M, NG W T, CHAN J Y W, et al. Management of locally recurrent nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Treat Rev*, 2019, 79(1): 101890.
- [3] ZHOU D, HE S, ZHANG D, et al. LINC00857 promotes colorectal cancer progression by sponging miR-150-5p and upregulating HMGB3 (high mobility group box 3) expression[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 12107-12122.
- [4] LIN X, FENG D, LI P, et al. LncRNA LINC00857 regulates the progression and glycolysis in ovarian cancer by modulating the Hippo signaling pathway [J]. *Cancer Med*, 2020, 9(21): 8122-8132.
- [5] WANG L, CAO L, WEN C, et al. LncRNA LINC00857 regulates lung adenocarcinoma progression, apoptosis and glycolysis by targeting miR-1179/SPAG5 axis[J]. *Hum Cell*, 2020, 33(1): 195-204.
- [6] HUANG Y, LIN Y, SONG X, et al. LINC00857 contributes to proliferation and lymphomagenesis by regulating miR-370-3p/CBX3 axis in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(5): 733-741.
- [7] 王欢, 万佳, 施明, 等. 细胞角蛋白 13 通过 PTEN 抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路增强鼻咽癌 HNE1 细胞放疗敏感性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2021, 28(1): 31-36.
- [8] GUO Z, WANG Y H, XU H, et al. LncRNA linc00312 suppresses radiotherapy resistance by targeting DNA-PKcs and impairing DNA damage repair in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 69.
- [9] 田勇全. 耳鼻咽喉头颈外科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 129.
- [10] 熊雨, 邹攀, 何迎春, 等. 长链非编码 RNA 与鼻咽癌的关系[J]. *广西医学*, 2021, 43(7): 863-867.
- [11] GUO Z, WANG Y H, XU H, et al. LncRNA linc00312 suppresses radiotherapy resistance by targeting DNA-PKcs and impairing DNA damage repair in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 69.
- [12] LIU H, ZHENG W, CHEN Q, et al. LncRNA CASC19 contributes to radioresistance of nasopharyngeal carcinoma by promoting autophagy via AMPK-mTOR pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1407.
- [13] LI T, ZHAO H, ZHOU H, et al. LncRNA LINC00857 strengthens the malignancy behaviors of pancreatic adenocarcinoma cells by serving as a competing endogenous RNA for miR-340-5p to upregulate TGFA expression [J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0247817.
- [14] 龚爵, 牛天峰, 杨焱, 等. LncRNA LINC00857 通过靶向 miR-1179 对胰腺癌细胞放射敏感性的影响及机制[J]. *中国现代普通外科进展*, 2021, 24(11): 841-846.
- [15] SHEN X, CAO H, ZHU Y, et al. B-Myb participated in ionizing radiation-induced apoptosis and cell cycle arrest in human glioma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 573(1): 19-26.
- [16] WANG L, HE Y, LIU W, et al. Non-coding RNA LINC00857 is predictive of poor patient survival and promotes tumor progression via cell cycle regulation in lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 11487-11499.
- [17] ZHAO S, WANG L, ZHANG C, et al. Inhibitor of growth 3 induces cell death by regulating cell proliferation, apoptosis and cell cycle arrest by blocking the PI3K/AKT pathway[J]. *Cancer Gene Ther*, 2018, 25 (9/10): 240-247.
- [18] EDLICH F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(1): 26-34.

(收稿日期: 2022-05-31 修回日期: 2023-02-03)