

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202322099

· 论著 ·

下调内质网相关降解蛋白-1对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞化疗敏感性的作用及机制

沈羿廷, 谭凤武, 邓亚萍, 黎可华

(株洲市中心医院耳鼻咽喉头颈外科, 湖南 株洲 412007)

摘要: **目的** 探讨下调内质网相关降解蛋白(Derlin-1)对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞株化疗敏感性的作用及机制。**方法** 收集10例鼻咽癌患者鼻咽癌组织及癌旁正常组织并通过实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法检测组织中 Derlin-1 mRNA 含量;本实验分组:空白对照组(control组)、阴性对照组(NC组)、敲低组(si-Derlin-1组)。RT-qPCR 法检测鼻咽癌 Derlin-1 mRNA 的表达;采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测不同顺铂浓度时3组细胞的增殖;Annexin V-FITC/PI 双染法检测顺铂浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时3组细胞的凋亡率;Transwell 检测顺铂浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时3组细胞的侵袭迁移能力;实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)法、Western blot 法检测 Bcl-2、Bax、基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9 mRNA 及蛋白相对表达量。**结果** RT-qPCR 结果显示,鼻咽癌组织中 Derlin-1 mRNA 相对表达量较癌旁正常组织显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$);si-Derlin-1 组 Derlin-1 mRNA 较 control 组、NC 组明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。MTT 法结果显示,与 control 组、NC 组相比,si-Derlin-1 组细胞增殖率明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Annexin V-FITC(绿色荧光)/PI(红色荧光)双染法结果可见,当 DDP 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,si-Derlin-1 组细胞凋亡率为 $(29.65 \pm 2.35)\%$,较 control 组 $(13.24 \pm 1.43)\%$ 、NC 组 $(15.09 \pm 1.32)\%$ 明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);Transwell 实验结果显示,当 DDP 浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,si-Derlin-1 组细胞迁移率、侵袭率分别为 $(20.15 \pm 2.20)\%$ 、 $(22.33 \pm 3.5)\%$,较对照组 $(100 \pm 1.3)\%$ 、 $(99 \pm 2.43)\%$ 以及 NC 组 $(96.72 \pm 3.22)\%$ 、 $(94.44 \pm 1.21)\%$ 明显降低,差异具有统计学意义($F_{\text{迁移率}} = 1080.610, P = 0.000$)、($F_{\text{侵袭率}} = 848.590, P = 0.000$);RT-qPCR 结果显示,相比 control 组、NC 组,si-Derlin-1 组凋亡抑制因子 Bcl-2 mRNA 的表达量下降,凋亡诱导因子 Bax mRNA 表达量上调;si-Derlin-1 组迁移相关因子 MMP2 与 MMP9 mRNA 相对表达量明显下降,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05);Western blot 结果显示,相比 control 组、NC 组,si-Derlin-1 组凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达量下降,凋亡诱导蛋白 Bax 表达量上调;si-Derlin-1 组迁移相关蛋白 MMP2 与 MMP9 蛋白相对表达量明显下降,差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** Derlin-1 在鼻咽癌中表达上调,下调 Derlin-1 可提高鼻咽癌 CNE-2Z 细胞化疗敏感性,机制可能与促进细胞凋亡、抑制迁移有关。

关键词: 鼻咽癌;内质网相关降解蛋白;化疗敏感性;凋亡;侵袭迁移

中图分类号:R739.63

The effect and mechanism of down-regulation of Derlin-1 on the chemosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell CNE-2Z

SHEN Yiting, TAN Fengwu, DENG Yaping, LI Kehua

(Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Zhuzhou Central Hospital, Zhuzhou 412007, China)

Abstract: **Objective** To explore effect and mechanism of down-regulation of Derlin-1 on the chemosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell (NPC) CNE-2Z. **Methods** The NPC tissues and adjacent normal tissues were collected from 10 NPC patients, and the content of Derlin-1 mRNA in the tissues was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The CNE-2Z cells were divided into blank control group (control group), negative control group (NC group), knockdown group (si-Derlin-1 group). RT-qPCR method was adopted to detect the expression of

基金项目:湖南省卫生健康委科研计划项目(202107010022)。

第一作者简介:沈羿廷,男,主治医师。

通信作者:黎可华,Email: 2729684243@qq.com

Derlin-1 mRNA in NPC, the tetramethylazazole blue (MTT) method to detect the proliferation of cells of the three groups at different cisplatin concentrations, Annexin V-FITC/PI double staining method to detect the apoptotic rate of cells of the three groups at cisplatin concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$, Transwell to detect cell invasion and migration ability of the three groups at the cisplatin concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$. RT-qPCR, Western blot were used to detect relative mRNA and protein expressions of Bcl-2, Bax, matrix metalloproteinase (MMP) 2, and MMP9. **Results** RT-qPCR results showed that the relative expression of Derlin-1 mRNA in NPC tissues was significantly lower than that in adjacent normal tissues, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group and NC group, Derlin-1 mRNA in the si-Derlin-1 group was significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The results of MTT method revealed that the cell proliferation rate in the si-Derlin-1 group was significantly lower than those of the control group and NC group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Annexin V-FITC/PI double staining showed that the apoptosis rate of si-Derlin-1 group was $(29.65 \pm 2.35)\%$ when the cisplatin concentration was 5 $\mu\text{mol/L}$, which was elevated compared with the control group $(13.24 \pm 1.43)\%$ and the NC group $(15.09 \pm 1.32)\%$, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). The cell migration rate and invasion rate in the Derlin-1 group were $(20.15 \pm 2.20)\%$ and $(22.33 \pm 3.5)\%$ respectively, which were significantly decreased compared with those of the control group [$(100 \pm 1.3)\%$, $(99 \pm 2.43)\%$] and the NC group [$(96.72 \pm 3.22)\%$, $(94.44 \pm 1.21)\%$], and the differences were statistically significant (F migration rate = 1080.610, $P = 0.000$), (F invasion rate = 848.590, $P = 0.000$). RT-qPCR results showed that compared with the control group and NC group, the expression of mRNA of the apoptosis inhibitor Bcl-2 in the si-Derlin-1 group decreased, the expression of mRNA of apoptosis-inducing factor Bax was up-regulated, and the relative expressions of mRNA of migration-related factors MMP2 and MMP9 were significantly decreased, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$); Western blot results showed that compared with the control group and NC group, the expression of apoptosis-inhibiting protein Bcl-2 in si-Derlin-1 group was decreased, and the expression of apoptosis-inducing protein Bax was up-regulated, the relative expression of MMP9 protein was significantly decreased, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Nasopharyngeal carcinoma; Derlin-1; Chemosensitivity; Apoptosis; Invasion and migration

Keywords: Nasopharyngeal carcinoma; Derlin-1; Chemosensitivity; Apoptosis; Invasion and migration

鼻咽癌是一种头颈部癌症,起源于鼻咽上皮^[1]。Epstein-Barr病毒(EBV)感染是鼻咽癌肿瘤发生的主要危险因素^[2],由于鼻咽癌的位置隐蔽,鼻咽癌是对放射线相对敏感的癌症,非转移性鼻咽癌的主要治疗方法是放疗。但在新诊断的鼻咽癌患者中,70%以上的患者属于局部晚期鼻咽癌。放化疗联合,以同步放化疗为主,无或配合辅助化疗,在晚期鼻咽癌的治疗中起着不可或缺的作用^[3]。然而,治疗耐受性和治疗毒性仍然限制了化疗在鼻咽癌中的作用,在包括诱导化疗和联合化疗在内的各种鼻咽癌化疗方案中,化疗耐药性被认为是导致治疗失败的最关键因素^[4]。顺铂是当今应用最广泛的化疗药物之一,顺铂耐药性是当前治疗策略中的主要问题。顺铂是一种广泛用于各种癌症的化疗药物,包括鼻咽癌^[5]。然而,鼻咽癌顺铂的耐药性是近年来出现的,之前已经部分探索了顺铂耐药性,但很少在鼻咽癌中进行探索。在头颈癌中,顺铂治疗

的有效性受到其毒性的限制,尤其是在需要更高剂量时,以及可能发生顺铂耐药性。

内质网相关降解蛋白(Derlin-1)编码的蛋白是一种内质网相关蛋白,参与内质网相关降解反应和未折叠蛋白反应^[6]。内质网应激和未折叠蛋白反应可在各种肿瘤中可见,在肿瘤发生中发挥重要作用,与肿瘤细胞存活、肿瘤血管生成和凋亡密切相关^[7]。在内质网应激过程中,Derlin-1的表达水平上调,并可抑制内质网应激诱导的细胞凋亡。有研究证实,Derlin-1蛋白在肿瘤细胞中可以从内质网渗透到细胞膜,并在多种癌组织中均高表达^[8]。实体肿瘤经历缺氧诱导的内质网应激,需要一个完整的错误折叠蛋白消除机制。因此,Derlin-1在人类癌症的进展中起着重要作用^[9]。目前尚无Derlin-1在鼻咽癌顺铂耐药中的研究,本实验旨在探讨Derlin-1能否影响鼻咽癌CNE-2Z细胞化疗敏感性及机制,为鼻咽癌顺铂耐药的治疗提供一定实验基础。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

收集 2019 年 3 月—2021 年 5 月在本院耳鼻咽喉头颈外科经免疫组化确诊为鼻咽癌的 10 例患者的癌组织及其癌旁正常组织,其纳入标准为未经化疗、放疗、内分泌等其他治疗。本实验遵守《赫尔辛基宣言》,所有患者及家属均已签署手术知情同意书。

本实验所用鼻咽癌细胞 CNE-2Z 购自上海细胞库(经细胞遗传质量鉴定合格),使用含有 10% 胎牛血清的培养基培养于 5% CO₂、37 °C 培养箱条件中。阴性对照组(NC 组)、Derlin-1 敲低试剂盒由上海吉玛制药技术有限公司合成;Trizol 试剂盒、实时荧光定量(RT-qPCR)检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;四甲基偶氮唑盐(tetramethylazolum salt, MTT)试剂、Annexin V-FITC(绿色荧光)PI/(红色荧光)双染细胞凋亡检测试剂盒、基质胶、结晶紫染料均购自上海碧云天生物技术有限公司;顺铂购自美国 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记二抗山羊抗兔抗体均购自中国武汉三英有限公司。

1.2 细胞分组

本实验分为 3 组:空白对照组(control 组)、阴性对照组(NC 组)、敲低组(si-Derlin-1 组)。将 CNE-2Z 细胞培养到 70% 的融合度,并按照转染试剂说明书,使用脂质体 2 000 转染 NC 组和 si-Derlin-1 组。8 h 然后换成正常培养基继续培养 24 h 用于后续试验;control 组不转染任何试剂,只使用正常培养基培养。

1.3 RT-qPCR 法检测鼻咽癌 Derlin-1 mRNA 的表达

将鼻咽癌患者的癌组织和癌旁组织收取完成后,使用 TRIzol 试剂提取组织的总 RNA。使用 cDNA 合成试剂盒逆转录合成 cDNA。使用 RT-qPCR 分析癌组织和癌旁组织 Derlin-1 mRNA 的表达。采用 2^{-ΔΔCt}法计算分析 mRNA 相对表达水平。引物如下:Derlin-1 正向序列:5'-CCCAAGCTTATCTCGGACATCGGG-3',反向序列:5'-GCTCTAGACTGTCTC-CAAGTCG-3';使用 U6 作为参照,正向序列:5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3',反向序列:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.4 MTT 法检测不同顺铂浓度下 3 组细胞的增殖

3 组细胞接种于 96 孔板,每孔 5 000 个细胞,待细胞贴壁后吸去原培养液加入 100 μL 顺铂(0、5、10、20 μmol/L)溶液,每组浓度设置 3 个副孔。24 h

后加入 15 μL MTT(5 g/L)溶液,培养 4 h 加入 150 μL 二甲基亚砷溶液后,检测 490 nm 波长处吸光度值(OD490)。计算细胞存活率:细胞存活率(%) = 实验组 OD490/对照组 OD490 × 100%。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

将 3 组细胞种植于 6 孔板,每孔 2 × 10⁵ 个。待细胞贴壁后,加入 2 mL 顺铂,按照 MTT 法结果,选取合适顺铂浓度加入,继续培养 24 h 后收取细胞。PBS 清洗,加入 200 μL Annexin V-FITC 缓冲液后,加入 1.5 μL Annexin V-FITC 染色液和 1.5 μL PI 染色液后静置 5 min,加入 200 μL Annexin V-FITC 结合液后检测细胞凋亡率。

1.6 Transwell 检测细胞侵袭迁移能力

迁移实验:将 3 组细胞用含 5 μmol/L 顺铂的培养液培养 24 h 后,使用不含胎牛血清的细胞培养液重悬后接种于上层小室,每个小室 2 × 10⁵ 个,每组 3 个副孔。在下层小室中加入含有 20% 胎牛血清的培养液 500 μL。培养 24 h 后,4% 多聚甲醛溶液固定,0.1% 晶体染色紫溶液染色。PBS 清洗。随机选取 4 个视野拍照。侵袭实验:50 μL 基质胶稀释液加入上层小室中,待基质胶凝固后重复迁移实验步骤。

1.7 RT-qPCR 法检测一定顺铂浓度下 Bcl-2、Bax、MMP2、MMP9 mRNA 相对表达量

将 3 组细胞收取完成后,使用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA。使用 cDNA 合成试剂盒逆转录合成 cDNA。使用 RT-qPCR 分析 3 组细胞 Bcl-2、Bax、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 2、MMP9 mRNA 的表达。采用 2^{-ΔΔCt}法计算分析 mRNA 相对表达水平。引物如下:Bcl-2 正向序列:5'-CAACTCCCAATACTGGCTCT-3',反向序列:5'-CGGACTTCGGTCTCCTAAA-3';Bax 正向序列:5'-ATCCAGGATCGAGCAGGGCG-3',反向序列:5'-ACTCGCTCAGCTTCTTGGTG-3';MMP2 正向序列:5'-TGGGACAAGAACCAGATCAC-3',反向序列:5'-TGGGACAAGAACCAGATCAC-3';MMP9 正向序列:5'-ATGAGTTCGGCGCGCTG-3',反向序列:5'-TC-CGGTCCACCTCGCTGGCGG-3';使用 U6 作为参照。

1.8 蛋白免疫印迹(Western blot)法分析蛋白相对表达量

将 3 组细胞种植于培养皿,待细胞贴壁后加入 2 mL 顺铂,浓度为 5 μmol/L,继续培养 24 h 后收取细胞。使用含 PMSF 的裂解液裂解细胞后提取蛋白。使用 BCA 试剂盒测出蛋白浓度,进行蛋白凝胶

电泳,待溴酚蓝到达分离胶的底部后终止。将蛋白转移至 PVDF 膜。使用 5% 脱脂奶粉封闭。按 1:1 000 的比例稀释 β -actin、Bcl-2、Bax、RIP1、RIP3 一抗,辣根过氧化物酶标记二抗山羊抗兔孵育 2 h, ECL 发光试剂盒显影。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析,所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用 t 检验或单因素方差分析来评估两组之间的差异, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌组织 Derlin-1 表达上调

RT-qPCR 法结果显示,鼻咽癌组织中 Derlin-1 mRNA 相对表达量为 1.45 ± 0.02 ,与癌旁组织 1.01 ± 0.14 相比明显上升,差异具有统计学意义 ($t = -9.038, P = 0.001$)。这表明鼻咽癌组织中 Derlin-1 表达增加,免疫组化结果也显示,鼻咽癌组织中 Derlin-1 蛋白表达较癌旁组织大。见图 1。

2.2 RT-qPCR 法检测 3 组细胞 Derlin-1 mRNA 的表达情况

RT-qPCR 法结果显示,control 组、NC 组、si-Derlin-1 组中 Derlin-1 mRNA 相对表达量分别为 1.04 ± 0.07 、 1.00 ± 0.07 、 0.36 ± 0.05 ,si-Derlin-1 组较其他 2 组相比明显下降,差异具有统计学意义 ($F = 108.299, P = 0.000$)。这表明细胞转染成功。见图 2。

2.3 MTT 法检测结果显示下调 Derlin-1 可抑制细胞增殖

MTT 法检测结果显示,control 组、NC 组、si-Derlin-1 组细胞随着顺铂浓度的增高,细胞存活率逐渐降低,差异均具有统计学意义 ($F = 225.306, P = 0.000$)。而顺铂为 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 时,si-Derlin-1 组细胞存活率较相同顺铂浓度 control 组、NC 组,细胞存活率明显降低,差异具有统计学意义 ($F_{0 \mu\text{mol/L}} = 189.498, P = 0.000$)、($F_{5 \mu\text{mol/L}} = 268.395, P = 0.000$)、($F_{10 \mu\text{mol/L}} = 245.542, P = 0.000$)、($F_{20 \mu\text{mol/L}} = 257.308, P = 0.000$)。表明下调 Derlin-1 可抑制细胞增殖率。见图 3。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测一定顺铂浓度下细胞凋亡率

根据流式细胞仪检测的凋亡数据显示,当顺铂浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,si-Derlin-1 组细胞凋亡率为 $(29.65 \pm 2.35)\%$,较 control 组 $(13.24 \pm 1.43)\%$ 、

NC 组 $(15.09 \pm 1.32)\%$ 明显升高,差异具有统计学意义 ($F = 161.855, P = 0.000$),相同顺铂浓度时,表明下调 Derlin-1 细胞凋亡率增高,其对顺铂敏感性增高。见图 4。

2.5 Transwell 检测一定顺铂浓度下细胞侵袭迁移能力

Transwell 结果表明,当顺铂浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,si-Derlin-1 组细胞迁移率、侵袭率分别为 $(20.15 \pm 2.20)\%$ 、 $(22.33 \pm 3.50)\%$,较对照组的 $(100.00 \pm 1.34)\%$ 、 $(99.00 \pm 2.43)\%$ 以及 NC 组 $(96.72 \pm 3.22)\%$ 、 $(94.44 \pm 1.21)\%$ 明显降低,差异具有统计学意义 ($F_{\text{迁移率}} = 1080.610, P = 0.000$)、($F_{\text{侵袭率}} = 848.590, P = 0.000$)。表明相同顺铂浓度时,下调 Derlin-1 细胞侵袭迁移能力减弱,其对顺铂敏感性增高。见图 5。

2.6 RT-qPCR 法检测 Bcl-2、Bax、MMP2、MMP9 mRNA 相对表达量

通过 RT-qPCR 法分析 si-Derlin-1 组凋亡和迁移的相关机制,由结果可得知,相比对照组,si-Derlin-1 组凋亡抑制因子 Bcl-2mRNA 的表达量下降,凋亡诱导因子 Bax mRNA 表达量上调;si-Derlin-1 组迁移相关因子 MMP2 与 MMP9 mRNA 相对表达量明显下降,差异均具有统计学意义 ($F_{\text{Bcl-2}} = 165.333, P = 0.001$)、($F_{\text{Bax}} = 259.249, P = 0.000$)、($F_{\text{MMP2}} = 125.528, P = 0.001$)、($F_{\text{MMP9}} = 214.376, P = 0.000$)。见图 6。

2.7 Western blot 法分析凋亡蛋白、迁移蛋白相对表达量

通过 Western blot 法分析凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 和迁移相关蛋白 MMP2 与 MMP9 相对表达量可知,相比对照组,si-Derlin-1 组凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的表达量下降,凋亡诱导蛋白 Bax 表达量上调;si-Derlin-1 组迁移相关蛋白 MMP2 与 MMP9 蛋白相对表达量明显下降,差异均具有统计学意义 ($F_{\text{Bcl-2}} = 178.257, P = 0.000$)、($F_{\text{Bax}} = 202.457, P = 0.000$)、($F_{\text{MMP2}} = 195.567, P = 0.000$)、($F_{\text{MMP9}} = 204.639, P = 0.000$)。见图 7。

3 讨论

耐药性是化疗治疗策略发展的关键障碍之一,顺铂是标准有效的抗癌药物,然而,近年来,专门对头颈部癌症的顺铂治疗的耐药性变得更加普遍,一些患者不能耐受副作用或表现出耐药性,顺铂耐药

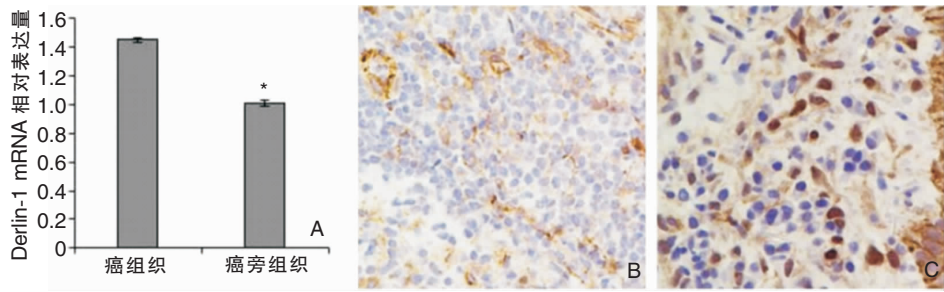


图 1 鼻咽癌癌组织及癌旁组织 Derlin-1 表达 A: Derlin-1 mRNA 相对表达量,与对照组相比, * $P < 0.05$; B:鼻咽癌癌组织 Derlin-1 蛋白表达 (免疫组化 $\times 400$); C:癌旁组织 Derlin-1 蛋白表达 (免疫组化 $\times 400$)

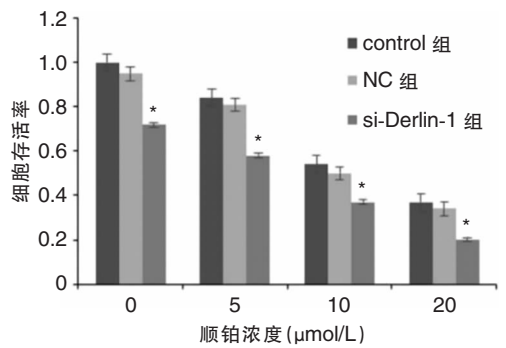
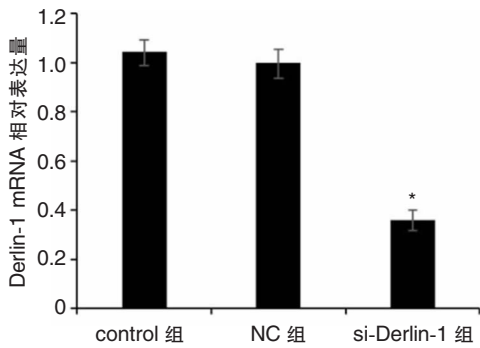


图 2 RT-qPCR 法检测 3 组细胞中 Derlin-1 mRNA 相对表达量,与对照组相比, * $P < 0.05$ 图 3 MTT 法检测不同浓度顺铂下 3 组细胞的细胞存活率,与对照组相比, * $P < 0.05$

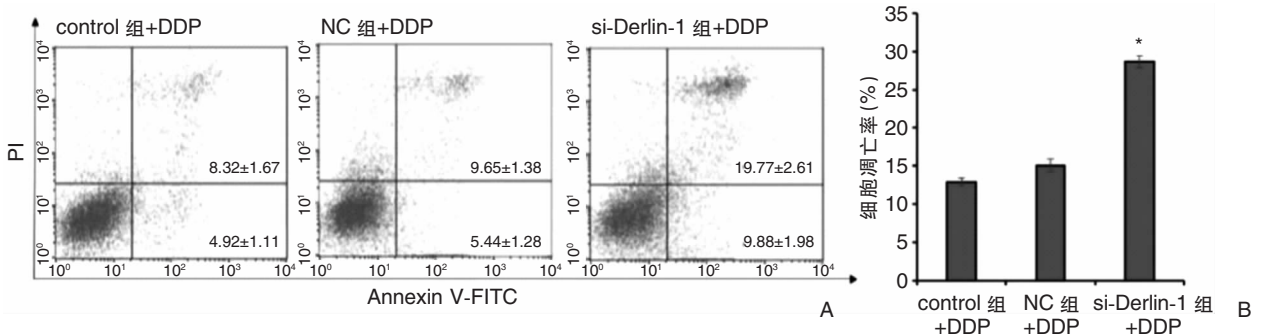


图 4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 3 组(A)细胞凋亡率,B;3 组细胞凋亡率柱状图,与对照组相比, * $P < 0.05$ 注:DDP 为顺铂,浓度为 $5 \mu\text{mol/L}$ 。下同。

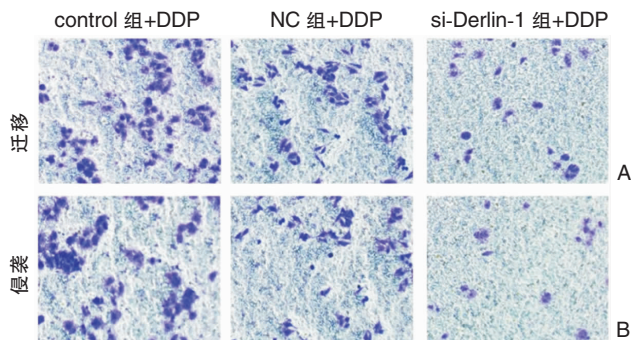


图 5 Transwell 法检测 3 组细胞的侵袭(A)和迁移(B) (结晶紫染色 $\times 100$)

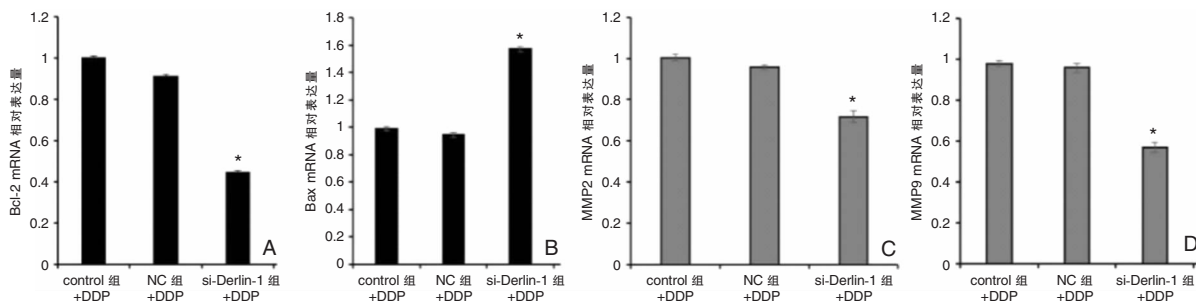


图 6 RT-qPCR 法检测 Bcl-2(A)、Bax(B)、MMP2(C)、MMP9 mRNA(D) 相对表达量;与对照组相比, * $P < 0.05$ 注:MMP(基质金属蛋白酶)。下同。

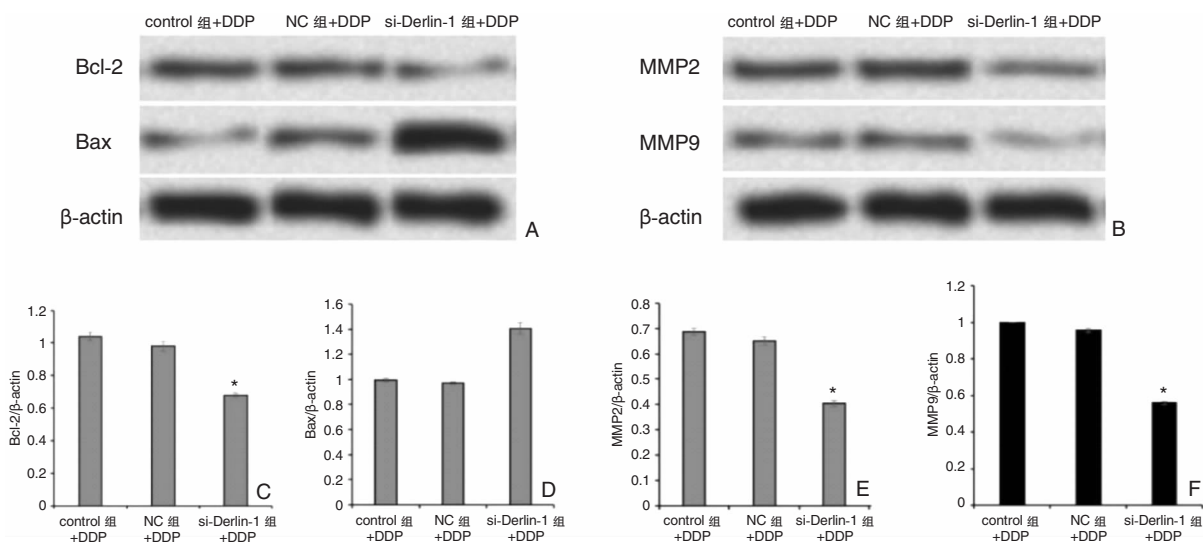


图 7 Western blot 法检测 Bcl-2、Bax(A)、MMP2、MMP9 蛋白(B) 相对表达量,3 组细胞柱状图(C ~ F) 与对照组相比, * $P < 0.05$

性的鼻咽癌患者可能需要额外的治疗方法^[10-12],辅助治疗可能会降低有效剂量、减少副作用、解决耐药性并改善总体生存结果,特别是对于难以治疗的肿瘤患者^[13]。本研究侧重于将顺铂与下调 Derlin-1 联合作为鼻咽癌的辅助疗法,提高低剂量顺铂的治疗效果。

Derlin-1 作为一种参与内质网应激的相关蛋白,近年来在肿瘤中的重要作用已逐渐被认识到。Derlin-1 在多种恶性肿瘤中表达上调,已有多篇文章报道了其在肿瘤中的重要作用^[14-16]。最近的一项研究表明,Derlin-1 在膀胱癌中通过 PI3K/AKT/和 ERK 通路过表达并促进恶性表型^[17]。因此靶向 Derlin-1 被认为是癌症管理中的一种潜在的治疗策略。然而,其在 Derlin-1 人类鼻咽癌中的表达和功能尚不清楚。在本研究中首次发现与癌旁组织相比,鼻咽癌组织中 Derlin-1 表达显著增加。为了阐明 Derlin-1 的对鼻咽癌特异性功能,我们抑制了 Derlin-1 在人鼻咽癌细胞系 CNE-2Z 细胞中的表达。

结果显示,control 组、NC 组、si-Derlin-1 组细胞随着顺铂浓度的增高,细胞存活率逐渐降低,而相同顺铂浓度组,si-Derlin-1 组细胞存活率较 control 组、NC 组,细胞存活率明显降低,表明下调 Derlin-1 可增强顺铂对 CNE-2Z 细胞增殖抑制效果。研究发现,干扰 Derlin-1 表达可显著阻断细胞增殖迁移,在非小细胞肺癌中,Derlin-1 通过 EGFR/ERK 介导的上调 MMP2 和 MMP9 来促进肿瘤细胞的侵袭。过表达 Derlin-1 后,细胞的增殖和迁移能力显著增加,而细胞凋亡的数量显著减少^[18]。我们的结果同样证明当在顺铂存在时,下调 Derlin-1, CNE-2Z 细胞凋亡率较对照组明显升高,表明下调 Derlin-1 能够增加顺铂诱导 CNE-2Z 细胞凋亡作用,通过 Western blot 法分析凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 相对对照组,si-Derlin-1 组抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量下降,凋亡诱导蛋白 Bax 表达量上调;表明下调 Derlin-1 增加顺铂诱导 CNE-2Z 细胞凋亡率的机制可能与促进 Bax 表达和抑制 Bcl-2 的表达有关。之后研究 Derlin-1 对

CNE-2Z 细胞侵袭迁移的影响,Transwell 结果表明,当顺铂浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,si-Derlin-1 组细胞迁移率、侵袭率均较对照组明显降低,表明相同顺铂浓度时,下调 Derlin-1 细胞侵袭迁移能力减弱,其对顺铂敏感性增高,由 si-Derlin-1 组迁移相关蛋白 MMP2 与 MMP9 相对表达量较对照组明显下降可知,表明下调 Derlin-1 增加顺铂抑制 CNE-2Z 细胞侵袭迁移其机制可能与抑制 MMP2 与 MMP9 的表达有关。

以上结果表明,Derlin-1 在调节鼻咽癌的进展中发挥了重要作用,敲低 Derlin-1 可增加顺铂抑制 CNE-2Z 细胞的增殖、侵袭和迁移的能力,并促进 CNE-2Z 细胞凋亡。下调 Derlin-1 增加顺铂诱导 CNE-2Z 细胞凋亡的机制可能与其能够促进 Bax 表达和抑制 Bcl-2 的表达有关,侵袭迁移机制可能与抑制 MMP2 与 MMP9 的表达有关。

参考文献:

[1] Tang Z, Zeng X, Li J, et al. LncRNA HOXC-AS1 promotes nasopharyngeal carcinoma (NPC) progression by sponging miR-4651 and subsequently upregulating FOXO6 [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 147(3): 284–293.

[2] Tay J, Siow C, Goh H, et al. A comparison of EBV serology and serum cell-free DNA as screening tools for nasopharyngeal cancer: Results of the Singapore NPC screening cohort [J]. *Int J Cancer*, 2020, 146(10): 2923–2931.

[3] Mané M, Benkhaled S, Dragan T, et al. Meta-analysis on induction chemotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma [J]. *Oncologist*, 2021, 26(1): e130–e141.

[4] Zhang L, Cui J, Tan H, et al. Efficacy and safety of two different adjuvant chemotherapy regimens in combination with concurrent chemoradiotherapy in treating patients with advanced nasopharyngeal carcinoma: A protocol for randomized controlled trial [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(21): e25980.

[5] Li S, Shen L. The change in tumor volume after induction chemotherapy with docetaxel plus cisplatin in 259 nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2021, 278(8): 3027–3035.

[6] Liu Y, Wang Z, Liu H, et al. Derlin-1 functions as a growth promoter in breast cancer [J]. *Biol Chem*, 2020, 401(3): 377–387.

[7] Zeng J, Tian Q, Zeng Z, et al. Derlin-1 exhibits oncogenic activities and indicates an unfavorable prognosis in breast cancer [J]. *Cell Biol Int*, 2020, 44(2): 593–602.

[8] Fan J, Tian L, Huang S, et al. Derlin-1 promotes the progression of human hepatocellular carcinoma via the activation of AKT pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5407–5417.

[9] Dong Q, Fu L, Zhao Y, et al. Derlin-1 is a target to improve radiotherapy effect of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(33): 55135–55146.

[10] Guan H, He Y, Su Y, et al. Assessment of different induction chemotherapy regimens in locally advanced nasopharyngeal carcinoma: Meta-analysis [J]. *Head Neck*, 2021, 43(8): 2332–2341.

[11] Fei Q, Chen H, Zhang C, et al. The efficacy and safety of gemcitabine-based induction chemotherapy for locally advanced nasopharyngeal carcinoma treated with concurrent chemoradiation: A meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(14): e25398.

[12] Lu Y, Hua J, Yan F, et al. Combined radiotherapy and chemotherapy versus radiotherapy alone in elderly patients with nasopharyngeal carcinoma: A SEER population-based study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(29): e26629.

[13] Zheng Z, You H, Feng Y, et al. LncRNA KCNQ1OT1 is a key factor in the reversal effect of curcumin on cisplatin resistance in the colorectal cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(7): 2575–2585.

[14] Park A, Ra EA, Lee TA, et al. HCMV-encoded US7 and US8 act as antagonists of innate immunity by distinctively targeting TLR-signaling pathways [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4670.

[15] Yang F, Wei K, Qin Z, et al. MiR-598 suppresses invasion and migration by negative regulation of derlin-1 and epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(1): 245–256.

[16] Mao M, Zhang J, Jiang J. Overexpression of Derlin-1 is associated with poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(1): 29–34.

[17] Dong Q, Fu L, Zhao Y, et al. Derlin-1 overexpression confers poor prognosis in muscle invasive bladder cancer and contributes to chemoresistance and invasion through PI3K/AKT and ERK/MMP signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(10): 17059–17069.

[18] Dong Q, Wang Y, Tang Z, et al. Derlin-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and promotes cancer cell invasion via EGFR-ERK-Mediated up-regulation of MMP-2 and MMP-9 [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(3): 954–964.

(收稿日期:2022-03-25;网络首发:2022-11-14)

本文引用格式:沈羿廷,谭凤武,邓亚萍,等.下调内质网相关降解蛋白-1对鼻咽癌 CNE-2Z 细胞化疗敏感性的作用及机制 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2023, 29(1): 97–103. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202322099

Cite this article as: SHEN Yiting, TAN Fengwu, DENG Yaping, et al. The effect and mechanism of down-regulation of Derlin-1 on the chemosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell CNE-2Z [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2023, 29(1): 97–103. DOI: 10.11798/j.issn.1007-1520.202322099