

沉默人乙酰转移酶样蛋白基因对结直肠癌 CL187 细胞 放射敏感性的影响

胡乐林^{1,2} 陶慧慧³ 杨阳丽¹ 陶欣荣³ 唐小龙³

¹ (安徽理工大学医学院第一临床学院 淮南 232001)

² (安徽理工大学第一附属医院肿瘤放疗科 淮南 232001)

³ (安徽理工大学医学院生物化学与细胞生物学教研室 淮南 232001)

摘要 探讨沉默人乙酰转移酶样蛋白 (Human acetyltransferase-like protein, hALP) 基因表达对结直肠癌 CL187 细胞放射敏感性的影响。通过临床数据库挖掘 hALP 基因在结肠癌组织的表达情况; CL187 细胞沉默 hALP 后接受递增剂量 (0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy) 射线照射, 运用克隆增殖实验和细胞存活率检测实验分析细胞放射敏感性变化; 结直肠癌 CL187 细胞沉默 hALP 后接受 8 Gy 射线照射, 使用流式细胞分析术检测细胞凋亡情况; CL187 细胞沉默 hALP 基因后接受 8 Gy 射线照射, 使用 Western blotting 检测 hALP 基因、P53 和 BAX 的蛋白表达水平。结果显示: CL187 细胞沉默 hALP 基因后接受 2 Gy 射线照射, 沉默 hALP 基因组与对照组的细胞存活分数分别是 0.63、0.5, 相对生物学效应 1.26; 沉默 hALP 基因后射线照射引起的细胞凋亡从 19.53% 增高到 36.49% ($p < 0.05$); 沉默 hALP 基因后射线照射引起 P53、BAX 表达水平进一步增高。结果提示, 沉默 hALP 基因表达提高了结直肠癌 CL187 细胞的放射敏感性。hALP 基因的表达水平与细胞放射敏感性之间存在相关性, 有可能是预测结直肠癌放射敏感性的分子靶标。

关键词 基因沉默, 人乙酰转移酶样蛋白 (hALP), 结直肠癌, 放射敏感性

中图分类号 R735.3

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2020.rj.38.010301

Effect of silencing human acetyltransferase-like protein on regulation of radiosensitivity in colorectal cancer CL187 cells

HU Lelin^{1,2} TAO Huihui³ YANG Yangli¹ TAO Xinrong³ TANG Xiaolong³

¹ (First Clinical Hospital, School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China)

² (Department of Radiation Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui University of Science and Technology,
Huainan 232001, China)

³ (Department of Cell Biology, School of Medicine, Anhui University of Science and Technology, Huainan 232001, China)

基金资助: 安徽省教育厅自然科学基金项目 (KJ2018A0096、KJ2018ZD011)、安徽理工大学引进人才科研启动基金和国家大学生创新创业训练计划项目 (201910361116) 资助

第一作者: 胡乐林, 女, 1979 年 9 月出生, 2017 年于北京大学医学部肿瘤学专业获博士学位, 现就职于安徽理工大学第一附属医院肿瘤放疗科, E-mail: hulelin1979@163.com

收稿日期: 初稿 2019-06-24; 修回 2019-09-02

Supported by the Natural Science Research Project of Education Department of Anhui Province (KJ2018A0096, KJ2018ZD011), Initiation Fund of Scientific Research for Introducing Talent of Anhui University of Science and Technology, and National Undergraduate Training Programs for Innovation and Entrepreneurship (201910361116)

First author: HU Lelin (female) was born in September 1979, and obtained her doctoral degree of oncology from Peking University. Now she is a physicist in Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Anhui Science and Technology University. E-mail: hulelin1979@163.com

Received 24 June 2019; accepted 02 September 2019

ABSTRACT To investigate the effect of human acetyltransferase-like protein(*hALP*) SiRNA on radiosensitivity of colorectal cancer CL187 cells. For this, the expression of *hALP* in colon cancer tissues was investigated, based on information available in clinical databases. After *hALP* knockdown, CL187 cells were irradiated with gradually increasing doses (0 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy and 8 Gy), and clonal proliferation and cell viability assays were used to detect radiosensitivity. After with the *hALP* SiRNA duplex, the percentage of cells in which apoptosis was induced by radiation at the dose of 8 Gy was detected by flow cytometric analysis, and the expression of *hALP*, P53, and BAX was examined by western blotting. Following irradiation, the ratios of surviving fraction between *hALP* SiRNA and negative control SiRNA groups were 0.63, 0.5, respectively, for total doses of 2 Gy(RBE=1.26). Silencing *hALP* enhanced the radiosensitivity of CL187 cells. Moreover, *hALP* knockdown increased the percentage of CL187 cells undergoing apoptosis from 19.53% to 36.49% ($p<0.05$). The expression of *hALP*, P53 and BAX induced by radiation further increased after *hALP* knockdown expression. Further, *hALP* knockdown expression increased radiosensitivity of CL187 cells. The expression of *hALP* associated with the radiosensitivity of colorectal cancer cells, which is beneficial to screen potential molecular targets and to provide indispensable experimental data for improving the efficacy of radiotherapy.

KEYWORDS SiRNA, *hALP*, Colorectal cancer, Radiosensitivity

CLC R735.3

结直肠癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤。近年来, 由于肥胖、饮食结构和生活方式的改变, 我国结直肠癌的发病率持续上升。2015年, 我国新发病例 376 300 例, 居中国人群恶性肿瘤发病的第 5 位; 死亡病例 191 000 例, 居中国人群恶性肿瘤死因的第 5 位^[1]。不同于欧美国家, 我国直肠癌的发病率高于结肠癌, 且大多数直肠癌患者就诊时已处于局部进展期^[2]。手术是局部进展期直肠癌的重要治疗方式, 但是单纯的手术治疗疗效较差, 且局部复发率较高^[3]。

新辅助放化疗联合全直肠系膜切除术, 是目前国际推荐的进展期直肠癌的标准治疗方案。新辅助放化疗可以提高直肠癌的手术切除率、肿瘤局控率及保肛率^[4], 但放疗抵抗严重制约了新辅助治疗的临床疗效, 新辅助放化疗后只有约 20% 的患者达到病理完全缓解 (Pathologic complete response, PCR)^[5]。目前, 国内外尚缺乏能够准确评判结直肠癌放射敏感性的分子靶标, 因此, 明确结直肠癌放疗抵抗的机制和探索结直肠癌放疗敏感性的增敏因素, 对提高放疗患者的临床疗效至关重要。

有研究表明, 多种组蛋白乙酰转移酶在放射敏感性调节中起重要作用。近年来还发现, 多种组蛋白乙酰化酶抑制剂, 如 Anacardic acid、

Garcinol、Curcumin 等能增加多种肿瘤细胞的放疗敏感性^[6-8]。*hALP* (human acetyltransferase-like protein) 也称为 NAT10 (N-Acetyltransferase 10), 是一种乙酰转移酶, 在染色体有丝分裂期 *hALP* 与 *hsSUN1* (Sad1 unc-84 domain protein 1) 共同作用促进组蛋白 H2B 的 Lys15 和 H4 的 Lys8、Lys12、Lys16 乙酰化^[9]。*hALP* 是否参与放射敏感性的调节尚不明确。本研究通过转染 SiRNA (Small interfering RNA) 片段, 观察沉默 *hALP* 基因后结直肠癌细胞放射敏感性的改变, 为探讨结直肠癌放射抵抗机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 数据库

在 Oncomine microarray 数据库 (<http://www.oncomine.org>) 检测 *hALP* mRNA 在配对结直肠癌标本中的表达。以 “*hALP* 或 NAT10” 作为关键词, 使用 “Cancer vs. Normal analysis” 为初级过滤条件, 选择 “Colorectal cancer vs. Normal analysis” 作为分析类型。采用 Student *t* 检验计算各组 *p* 值。Oncomine 网站提供标准化、规范化的统计学计算。

1.2 细胞系和主要试剂

CL187 细胞购自美国 ATCC 细胞库; DMEM 培

养液和胎牛血清购自杭州四季青生物技术有限公司；hALP SiRNA 和阴性对照 SiRNA (Negative control, NC) 由上海吉玛制药技术有限公司设计并化学合成；脂质体转染试剂 Lipofectamine2000 购自美国 Life 公司；AnnexinV/PI (Propidium iodide) 双染凋亡试剂盒购自北京庄盟生物科技有限公司；hALP 抗体、P53 抗体、BAX (BCL2 associated X) 抗体、 β -actin 抗体购自武汉三鹰生物科技有限公司；CCK8 试剂盒购自合肥睿捷生物技术有限公司；ECL 显色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 SiRNA 序列

hALP SiRNA 序列：5'-CAGCACCACUGCUGAGAAUAAGA-3'；NC 序列：5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'由上海吉玛生物技术有限公司合成。

1.4 细胞培养和照射条件

CL187 细胞生长在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中，在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞传代选择 0.25% EDTA 的胰酶消化。照射方法为采用瓦里安 Trilogy 直线加速器 6 MV X 射线照射，源皮距 100 cm，照射野 20 cm×20 cm，剂量率 300 cGy/min。

1.5 转染 SiRNA 寡核苷酸

25 cm² 培养瓶中接种 0.8×10^6 个细胞，培养 24 h 后使细胞能够达到 80% 的汇合。取退火复性的 SiRNA 200 nmol/L，加无血清的 DMEM 培养基 200 μ L，混匀。取脂质体 14.25 μ L，加入 200 μ L 无血清的 DMEM 培养基混匀。在 5 min 中之内将以上两种溶液混合，室温静置 20 min。加入待转染的细胞，在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。转染 6 h 后，换上含有 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, FCS) 的 DMEM 培养基。转染 48 h 后细胞接受射线照射，剂量 8 Gy，24 h 后收集细胞利用蛋白印迹法检测蛋白的表达情况。

1.6 克隆存活分析实验

取合适数量的细胞接种于 35 mm 的细胞培养皿中（以最终每个培养皿中有 100 个大于 50 个细胞的克隆为宜），在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。细胞贴壁后给予射线照射，剂量分别为 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy。照射结束后，继续培养 12~14 d。0.02% 的亚甲蓝染色。计数每个培养皿中含 50 个细胞以上的克隆数。克隆形成率 = (克隆数/细胞接种数) × 100%；细胞存活分数 = 实验组克隆形成率 / 对照组克隆形成率。单机多靶模型拟合剂量存活曲线。相对生物学效应 = 对照组细胞存活分数 / 实验组细胞存活分数。

1.7 细胞存活率检测

CL187 细胞接受递增剂量的射线照射后，接种于 96 孔板，每孔接 10 000 个细胞，设 3 个复孔。96 孔板置于培养箱中继续培养 24 h 后每孔加入 10 μ L CCK8 溶液，置于培养箱内避光孵育 2 h。酶标仪于 450 nm 波长处测定吸光度值。细胞存活率 = (干扰组吸光度值/对照组吸光度值) × 100%。

1.8 细胞凋亡分析

将贴壁细胞用胰酶消化，尽量使细胞呈单个状脱落。加入含 10% FCS 的 DMEM 终止胰酶的作用，并将细胞吹打散，转移到离心管中，常温 1 000 r/min，离心 5 min。用 4 °C 预冷的 1×磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 遍。每次洗之前，先用残留的 PBS 将细胞沉淀弹开，防止细胞结块。用 1×PBS 重新悬浮细胞，并计数。取 5×10^5 细胞悬浮液，1 000 r/min，离心 5 min 后弃上清，加入 500 μ L 的 1×Binding buffer 重悬细胞。加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC，轻轻混匀。在室温下，避光反应 15 min。上机前 1 min 再加入 2 μ L，PI，在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

1.9 Western blotting 检测

放射免疫沉淀测定法 (Radio-immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液裂解细胞，提取细胞总蛋白。测蛋白浓度后，加 SDS-

PAGE 蛋白上样缓冲液, 95 °C 变性 5 min 后上样。按照每块胶 15 mA 的电流进行恒流电泳, 转至 PVDF 膜, 在 5% 脱脂奶粉的 TBS 封闭液中室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜。TBS-T 洗膜, 每次 5 min, 洗 4 次。二抗按比例稀释 (山羊抗兔 HRP 抗体: 1 : 5 000; 山羊抗鼠 HRP 抗体: 1 : 4 000), 室温孵育 1 h。弃掉二抗, 用 TBS-T 洗膜, 每次 5 min, 洗 4 次。按说明书用 ECL 试剂发光, X 光片压片、显影、定影, 清水漂洗后自然晾干, 观察实验结果并做好相关记录。

1.10 数据统计分析

所有实验至少重复 3 次, 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。实验数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用两样本独立 t 检验比较两组间的差异, 双侧 $p < 0.05$ 认为统计学差异有意义。使用 GraphPad Prism 软件进行数据作图。

2 结果

2.1 临床数据库挖掘 hALP 在各种肿瘤组织中的表达情况

2.1.1 Oncomine 分析 hALP 在肿瘤中的表达概况

利用 Oncomine 数据库在数据集中查询 hALP 在肿瘤中的表达概况。红色方块表示 hALP 过表达, 蓝色方块表示 hALP 低表达。表达水平基于基因的百分等级。根据 $p < 0.0001$, 表达异常倍数大于 2 倍的限定条件, 选择正常组织与肿瘤组织的对比数据, 结果如图 1 所示 (图中左向箭头为蓝色方向, 右向箭头为红色方向)。Oncomine 数据库中共收集了 360 个不同类型的研究结果, 关于 hALP 表达有统计学差异的研究结果有 10 个, 其中 8 个研究显示 hALP 在结直肠癌 (包括结直肠癌和结直肠腺瘤) 中高表达, 1 个研究显示 hALP 在乳腺癌中高表达, 1 个研究显示 hALP 在白血病中高表达。

2.1.2 Oncomine 分析 hALP 在结直肠肿瘤组织表达水平

在 Oncomine 数据库的 10 个数据集共收集了 hALP 表达有统计学差异的研究结果 21 个, 对研究结果进行 Meta 分析 (见图 2), 明确结直肠肿瘤 (包括结直肠癌和结直肠腺瘤) 临床标本 hALP

mRNA 的表达水平。红色方块表示结直肠肿瘤临床标本 hALP mRNA 的表达比正常结肠组织标本高, 红色强度越强提示 hALP mRNA 表达水平越高。研究结果显示, 中位秩 = 666, $p = 7.40 \times 10^{-9}$, 结直肠肿瘤组织 hALP mRNA 表达水平显著高于正常结肠组织标本。右边的表格描述的这些数据集中的名称和每个数据集对应的患者样本数。Oncomine 分析显示 hALP 在结直肠肿瘤组织表达水平显著高于正常结直肠组织标本。

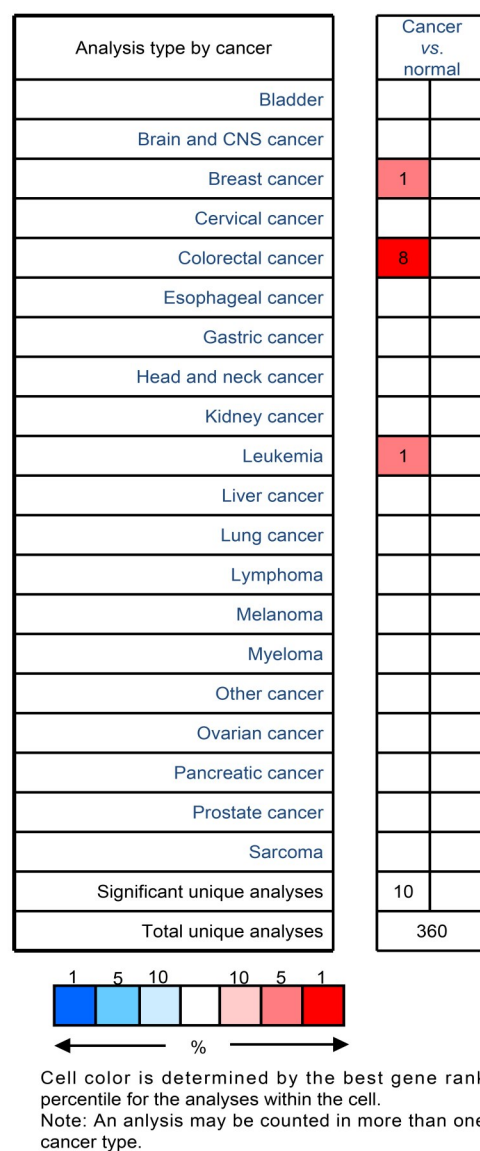


图1 Oncomine 数据库分析 hALP 在肿瘤中的表达 (彩色见网络版)

Fig.1 Analysis of hALP expression in tumors using Oncomine database (color online)

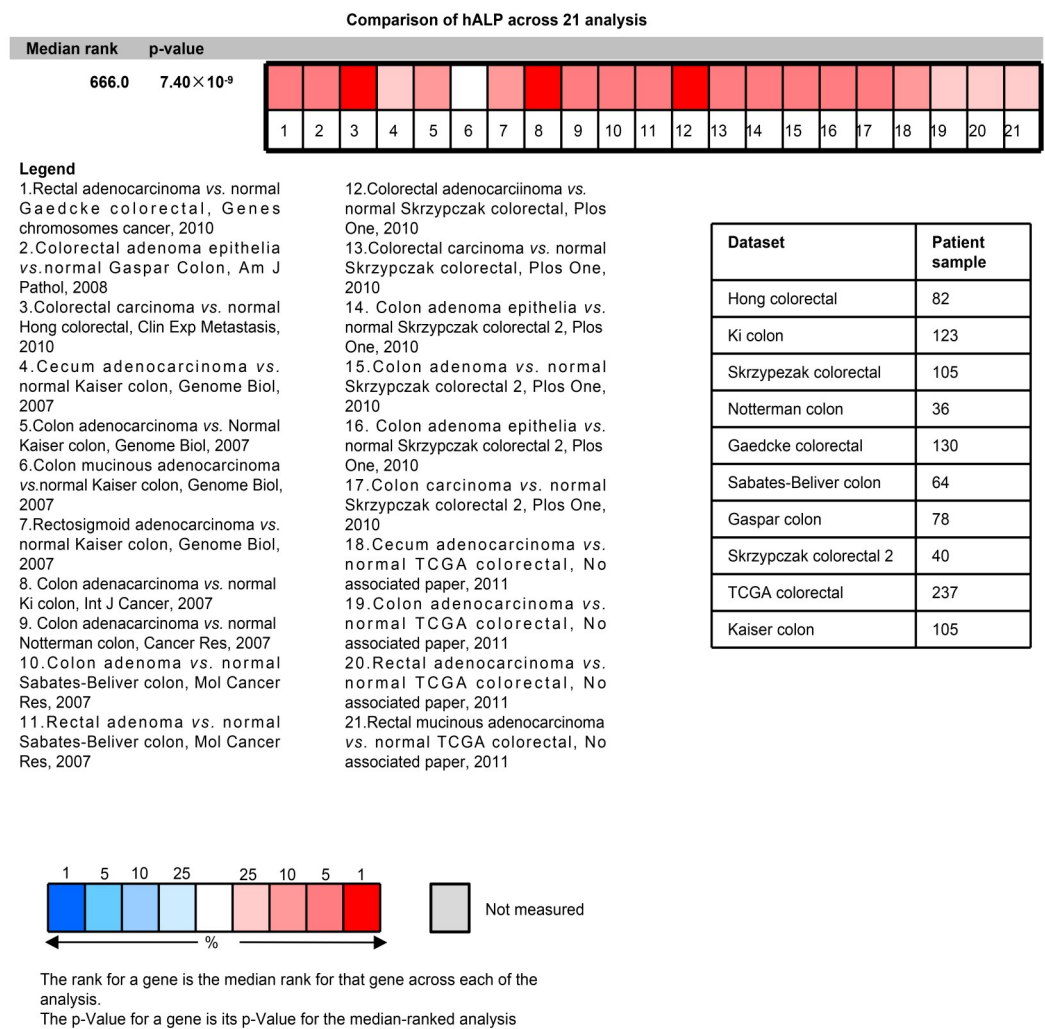
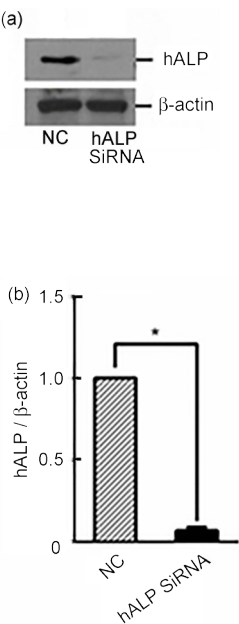


图2 Oncomine 数据库分析结直肠肿瘤组织中 hALP 表达水平(彩色见网络版)
Fig.2 Analysis of hALP expression in colorectal tumor sample using Oncomine database(color online)

2.2 结直肠癌 CL187 细胞沉默 hALP 基因后放射敏感性

CL187 细胞转染 hALP SiRNA 或阴性对照 SiRNA 后 48 h, Western blotting 检测 hALP 蛋白的表达情况。结果显示 hALP SiRNA 靶向沉默 hALP 基因(图 3 (a)、(b))。沉默 hALP 基因后取合适数量的 CL187 细胞接种于 35 mm 的细胞培养皿中, 并给予细胞射线照射, 剂量分别为 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy。单机多靶模型拟合剂量存活曲线(图 3 (c))。计算 RBE, 即 $RBE = SF2 \text{ (对照组)} / SF2 \text{ (沉默 hALP 基因组)}$ 。对照组, 沉默 hALP 基因组的 SF2 分别是 0.63、0.5。RBE 为 1.26。沉默 hALP 基因组结直肠癌 CL187 细胞放射敏感性增加。



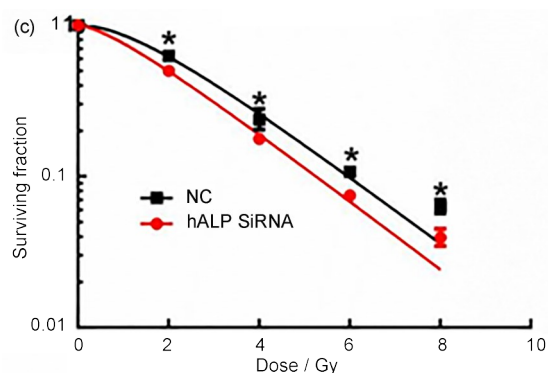


图3 (a) Western blotting 检测 hALP 蛋白的表达情况; (b) Photoshop 软件分析 hALP 和 β -actin 条带的灰度值; (c) 克隆增殖实验计算细胞的存活分数, *与对照组比较, $p < 0.05$

Fig.3 (a) Western blotting was performed to assess the expression of hALP 48 h after transfection; (b) the expression of hALP was quantified using Photoshop software; (c) cell survival fraction was calculated by clonal proliferation assay, *compared with the control group, $p < 0.05$

2.3 结直肠癌 CL187 沉默 hALP 基因后接受射线照射细胞死亡比例

结直肠癌 CL187 沉默 hALP 基因后, 接受射线照射, 剂量分别为 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy, 照射后接种于 96 孔板继续培养 24 h, 利用 CCK8 试剂盒检测 CL187 细胞的存活率, 结果显示 (图 4) 沉默 hALP 基因组 CL187 细胞接受递增剂量射线照

射后细胞死亡比例较对照组显著增加 ($p < 0.05$), 具体见图 4。

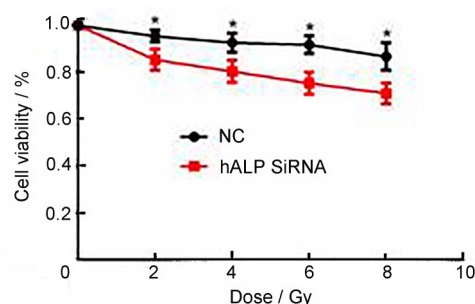


图4 CCK8 试剂盒检测 CL187 细胞的存活率 *与对照组相比, $p < 0.05$

Fig.4 CCK8 kit was used to detect the cell viability of CL187 cells, *compared with the control group, $p < 0.05$

2.4 结直肠癌 CL187 沉默 hALP 基因后接受射线照射细胞凋亡比例

CL187 细胞沉默 hALP 基因后接受射线照射, 剂量 8 Gy, 照射后 24 h 收集细胞, Annexin V 和 PI 双染色, 流式细胞检测术检测 CL187 细胞的凋亡比例。结果如图 5 所示, 结直肠癌 CL187 沉默 hALP 基因后接受射线照射, 细胞凋亡比例从 19.53% 增高到 36.49% ($p < 0.05$)。

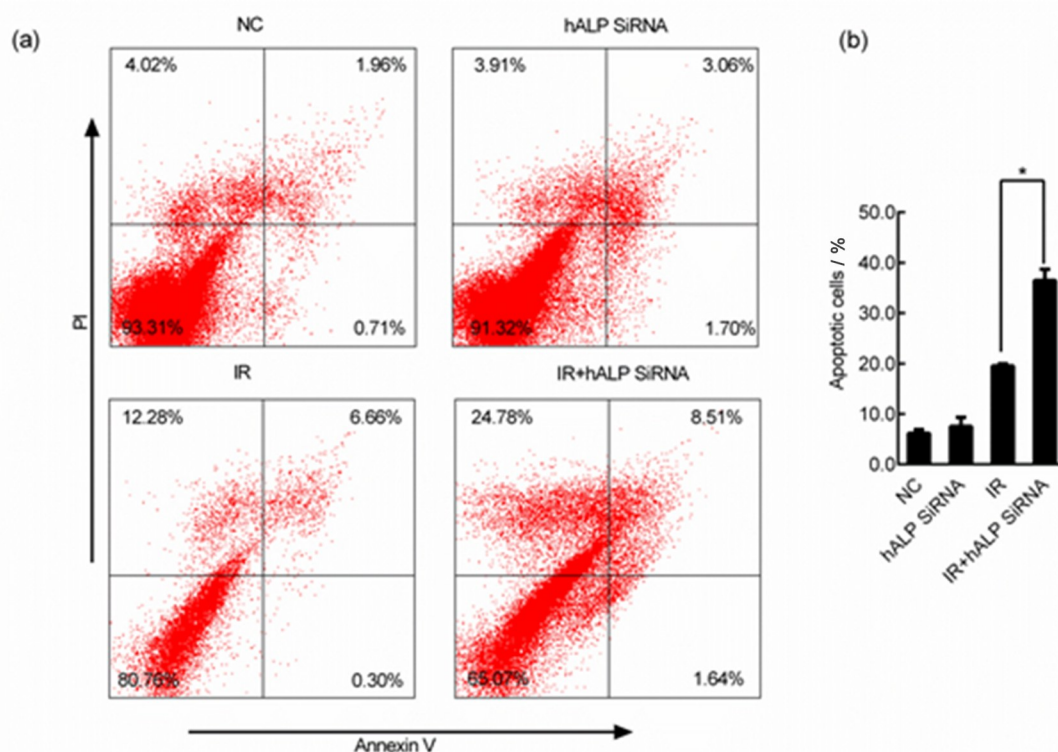


图5 (a) 流式细胞分析术检测 CL187 细胞的凋亡情况; (b) 统计学分析凋亡细胞百分比的改变 *与对照组相比, $p < 0.05$

Fig.5 (a) Flow cytometry was used to detect the apoptosis of CL187 cells; (b) statistical analysis of changes in percentage of apoptotic cells, *compared with the control group, $p < 0.05$

2.5 射线促进结直肠癌细胞 hALP、P53、BAX 的表达

CL187 细胞接受 0 Gy、2 Gy、4 Gy、8 Gy 递增剂量的射线照射后，置于培养箱继续培养 24 h，

利用 Western blotting 技术检测 hALP、P53、BAX 蛋白的表达情况。结果显示，随着吸收剂量的增加，CL187 细胞内 hALP、P53、BAX 蛋白的表达水平增高（图 6）。

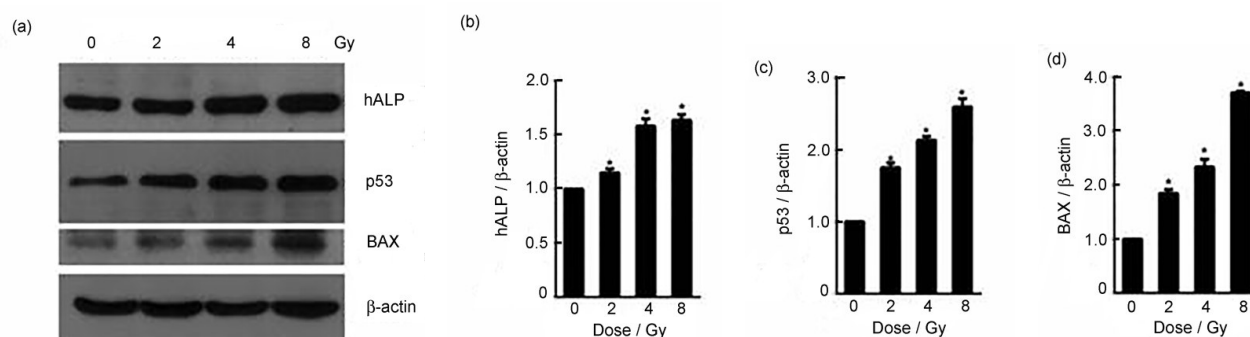


图 6 (a) Western blotting 检测 hALP、P53、BAX 和 β -actin 的蛋白表达；(b~d) Photoshop 软件分析 hALP、P53、BAX 和 β -actin 条带的灰度值，以 β -actin 灰度值为对照，统计学分析 hALP(b)、P53(c) 和 BAX(d) 与 β -actin 灰度值的比，所有数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示；*与对照组相比， $p < 0.05$

Fig.6 (a) The protein expressions of hALP, P53, BAX and β -actin were determined using western blotting, (b~d) expression of hALP (b), P53 (c), and BAX (d) was quantified using Photoshop software. The data are normalized to the β -actin and presented as $\bar{x} \pm s$, *compared with the control group, $p < 0.05$

2.6 沉默 hALP 基因后 CL187 细胞接受射线照射，P53、BAX 表达水平

CL187 细胞转染 200 nmol/L 的 hALP SiRNA 沉默 hALP 基因后，接受射线照射，剂量 8 Gy，照射

后细胞置于培养箱继续培养 24 h，Western blotting 检测 hALP、P53、BAX 蛋白的表达情况。结果显示射线照射后 P53、BAX 表达水平增高，沉默 hALP 基因后射线引起 P53、BAX 表达水平进一步增高（图 7）。

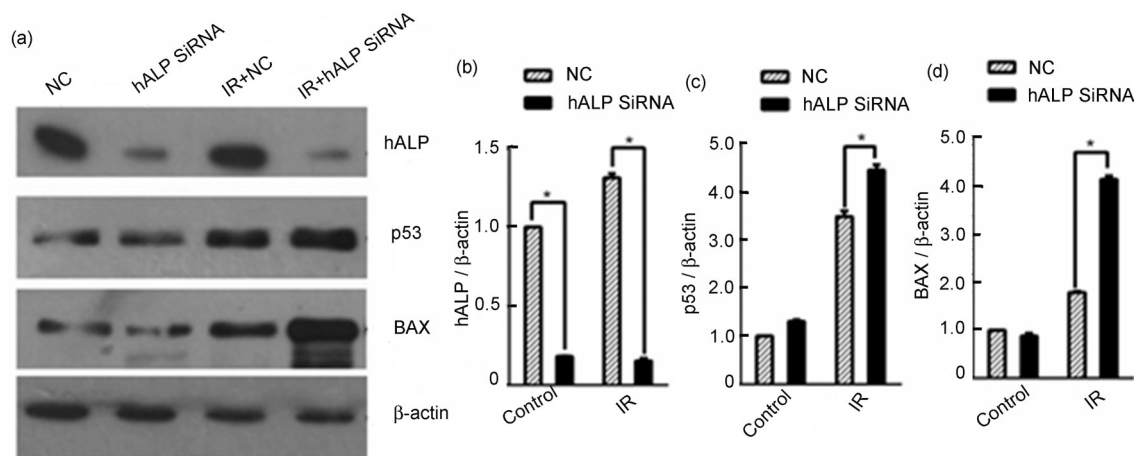


图 7 (a) Western blotting 检测 hALP、P53、BAX 和 β -actin 的蛋白表达；(b~d) Photoshop 软件分析 hALP(b)、P53(c)、BAX(d) 和 β -actin 条带的灰度值；*与对照组相比， $p < 0.05$

Fig.7 (a) Western blotting was used to detect the protein expressions of hALP, P53, BAX and β -actin; (b~d) the expression of hALP (b), P53 (c), and BAX (d) was quantified using Photoshop software; *compared with the control group, $p < 0.05$

3 讨论

hALP 基因位于 11 号染色体 (11p13)，全长 2.5 kb，编码 834 个氨基酸，分子量 94 kD。hALP 蛋白是乙酰基转移酶家族成员之一。hALP 蛋白包

含 N 端乙酰转移酶功能区、ATP 酶功能区和 C 端赖氨酸富集区 3 个保守结构域^[10]。在细胞有丝分裂间期 hALP 定位于核仁，在细胞分裂末期 hALP 定位于中间体^[11]。研究表明 hALP 的表达水平和亚细胞定位与多种肿瘤的发展、转移以及预后密切相

关^[12-15]。Shen等^[11]运用免疫组化和组织芯片技术对155例肉瘤, 28例软组织良性肿瘤或软组织肿瘤样病变组织进行研究, 发现hALP在多种软组织肉瘤中高表达, 并且hALP的表达水平与肿瘤的组织分级密切相关。Zhang等^[12]对17例肝癌患者的新鲜肝癌组织和癌旁组织进行Real-time PCR分析, 并对186例肝癌患者的肝癌组织和癌旁组织石蜡标本进行免疫组化分析, 发现在肝癌组织中hALP的表达水平高于癌旁组织, hALP是肝癌预后不良的标志。Ma等^[14]使用Remodelin (hALP的抑制剂)以及基因干扰技术降低hALP的表达, 肝癌细胞的转移力和侵袭力都降低。韩斐等^[16]应用免疫组化技术对80例鼻腔鼻窦黏膜黑色素瘤患者的石蜡标本进行免疫组化分析, 发现hALP的表达与肿瘤淋巴结转移有关。梁佩淇等^[17]应用实时荧光定量PCR技术对48例急性髓细胞白血病患者及20例非恶性血液疾病患者或健康人的骨髓单个核细胞进行检测, 发现急性髓细胞白血病患者hALP mRNA表达水平高于对照组, 并且hALP mRNA的高表达与急性髓细胞白血病预后不良密切相关。Zhang等^[15]对结直肠癌组织进行免疫组化分析时发现, 在正常结直肠组织中hALP定位于核仁, 在结直肠癌组织中hALP向胞浆和细胞膜等亚细胞器重新分布, hALP的亚细胞定位与结直肠癌的预后密切相关。尚不明确hALP是否参与结直肠癌的发生发展, 为探讨hALP在结直肠癌的发生发展中的作用, 我们通过对临床数据库挖掘, 发现hALP在结直肠癌组织标本中表达量显著高于正常结直肠组织标本(图1、2), 提示hALP在结直肠癌的发生发展中起重要作用。hALP是否参与结直肠癌细胞的放射敏感性调控尚不明确。

SiRNA是一种小的核苷酸片段, 能通过碱基互补识别特异的靶mRNA, 并与之结合并引起靶mRNA的降解, 从而抑制靶基因表达^[18]。本研究利用hALP的特异SiRNA序列干扰hALP的表达, 观察其对细胞放射敏感性的影响。克隆形成实验发现, CL187细胞沉默hALP基因组克隆形成率较其对照组明显降低(图3), 表明抑制细胞内hALP蛋白的表达后, 对射线照射诱导结直肠癌细胞克隆形成率下降有促进作用。CCK8试剂盒检测细胞存活率分析发现, CL187细胞沉默hALP基因组接受递增剂量射线照射后细胞死亡比例较对照组显著增加(图4), 这与图3的结果一致, 证明沉默hALP基因增加结直肠癌CL187细胞的放射敏感性。

肿瘤细胞的放射敏感性受多种因素的影响, 细胞凋亡是影响肿瘤细胞放射敏感性的重要因素^[19]。为探讨沉默hALP基因是否通过影响结直肠癌CL187细胞凋亡的比例而影响肿瘤的放射敏感性, 本研究利用流式细胞分析术检测发现, hALP沉默组CL187细胞接受射线照射引起的细胞凋亡比例增加(图5), 提示hALP基因影响结直肠癌CL187细胞凋亡参与肿瘤的放射敏感性的调控。P53和BAX蛋白在细胞凋亡中起重要的调控作用^[20]。hALP是否通过P53、BAX调控细胞凋亡参与了结直肠癌细胞的放射敏感性的调控尚不明确。本研究利用Western blotting证实, 随着剂量的增加, hALP和凋亡相关蛋白P53、BAX表达水平增高(图6), 提示hALP极有可能通过影响P53、BAX的表达, 参与了结直肠癌细胞的放射敏感性的调控。为进一步明确hALP是否通过P53、BAX调控细胞凋亡参与了结直肠癌细胞的放射敏感性的调控, CL187细胞沉默hALP基因后接受射线照射(8 Gy), Western blotting检测hALP、P53、BAX蛋白的表达情况。结果显示射线照射后P53、BAX表达水平增高, 沉默hALP基因后射线引起P53、BAX表达水平进一步增高(图7)。这些研究表明, P53、BAX在hALP对结直肠癌细胞的放射敏感性的调控中起重要作用。

综上所述, 我们的研究表明, hALP可能通过P53、BAX调控细胞凋亡参与结直肠癌细胞的放射敏感性的调控; 但hALP对结直肠癌放射抗拒调控网络中的作用及其具体分子机制仍不清楚, 需要进一步研究。研究结直肠癌放疗敏感性的调节机制, 有助于阐明hALP在结直肠癌放射敏感性中的地位, 有利于在hALP差异表达的结直肠癌患者中筛选放射治疗的潜在获益人群。

参考文献

- 1 Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- 2 刘鲁迎, 朱远. cT3期直肠癌是否都需要放疗[J]. 中华结直肠疾病电子杂志, 2015, 4(4): 21-23. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2015.04.06.
LIU Luying, ZHU Yuan. Does all cT3 rectal cancer need radiotherapy? [J]. Chinese Journal of Colorectal Diseases (Electronic Edition), 2015, 4(4): 21-23. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3224.2015.04.06.
- 3 纪晓萌, 韩真真, 袁胜利. 直肠癌放疗治疗研究进展[J].

- 临床医学进展, 2018, **8**(1): 59-63. DOI: 10.12677/ACM.2018.81011.
- Ji Xiaomeng, HAN Zhenzhen, YUAN Shengli. Advances in radiotherapy for locally advanced rectal cancer[J]. Advances in Clinical Medicine, 2018, **8**(1): 59-63. DOI: 10.12677/ACM.2018.81011.
- 4 胡克, 肖毅. 直肠癌新辅助短程放疗和长程放疗的利弊[J]. 中华胃肠外科杂志, 2017, **7**(20): 773. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2017.07.013.
- HU Ke, XIAO Yi. Advantages and disadvantages of neoadjuvant short-term radiotherapy and long-term radiotherapy for rectal cancer[J]. Chinese Journal of Gastrointestinal Surgery, 2017, **7**(20): 773. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2017.07.013.
- 5 Krishnan S, Janjan N A, Skibber J M, *et al.* Phase II study of capecitabine (Xeloda) and concomitant boost radiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer[J]. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 2006, **66**(3): 762-771. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2006.05.063.
- 6 Sandur S K, Deorukhkar A, Pandey M K, *et al.* Curcumin modulates the radiosensitivity of colorectal cancer cells by suppressing constitutive and inducible NF- κ B activity[J]. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 2009, **75**(2): 534-542. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.06.034.
- 7 Oike T, Ogiwara H, Torikai K, *et al.* Garcinol, a histone acetyltransferase inhibitor, radiosensitizes cancer cells by inhibiting non-homologous end joining[J]. International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 2012, **84**(3): 815-821. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2012.01.017.
- 8 Sun Y L, Jiang X F, Chen S J, *et al.* Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation[J]. FEBS Letters, 2006, **580**(18): 4353-4356. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.092.
- 9 Grunstein M. Histone acetylation in chromatin structure and transcription[J]. Nature, 1997, **389**(6649): 349-352. DOI: 10.1038/38664.
- 10 Lv J J, Liu H J, Wang Q A, *et al.* Molecular cloning of a novel human gene encoding histone acetyltransferase-like protein involved in transcriptional activation of hTERT[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, **311**(2): 506-513. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.09.235.
- 11 Shen Q, Zheng X Z, McNutt M A, *et al.* NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules[J]. Experimental Cell Research, 2009, **315**(10): 1653-1667. DOI: 10.1016/j.yexcr.2009.03.007.
- 12 Zhang X M, Liu J M, Yan S, *et al.* High expression of N-acetyltransferase 10: a novel independent prognostic marker of worse outcome in patients with hepatocellular carcinoma[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015, **8**(11): 14765-14771.
- 13 Liu X F, Tan Y Q, Zhang C F, *et al.* NAT 10 regulates P53 activation through acetylating p53 at K₁₂₀ and ubiquitinating Mdm2[J]. EMBO Reports, 2016, **17**(3): 349-366. DOI: 10.15252/embr.201540505.
- 14 Ma R, Chen J, Jiang S J, *et al.* Up regulation of NAT10 promotes metastasis of hepatocellular carcinoma cells through epithelial-to-mesenchymal transition[J]. American Journal of Translation Research, 2016, **8**(10): 4215-4223.
- 15 Zhang H, Hou W, Wang H L, *et al.* GSK-3 beta-regulated N-acetyltransferase 10 is involved in colorectal cancer invasion[J]. Clinical Cancer Research, 2014, **20**(17): 4717-4729. DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-13-3477.
- 16 韩斐, 刘洪芹, 王舒宜. CD117、MITF 及 NAT10 在鼻腔鼻窦黏膜黑色素瘤中的表达及预后意义[J]. 中华病理学杂志. 2018, **47**(12): 931-935. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.12.007.
- HAN Fei, LIU Hongqin, WANG Shuyi. Expression of CD117, MITF and NAT10 and their prognostic values in sinonasal mucosal melanoma[J]. Chinese Journal of Pathology, 2018, **47**(12): 931-935. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2018.12.007.
- 17 梁佩淇. N-乙酰基转移酶 10 在急性髓细胞白血病中的作用及机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- LIANG Peiqi. The effect of N-acetyltransferase 10 in acute myeloid leukemia and its related mechanisms[D]. Shenyang: China Medical University, 2018.
- 18 殷勤伟. siRNA 介导的基因沉默[J]. 生物物理学报, 2004, **20**(2): 85-95. DOI: 10.3321/j.issn:1000-6737.2004.02.001.
- YIN Qinwei. siRNA-mediated gene silencing[J]. Acta Biophysica Sinica, 2004, **20**(2): 85-95. DOI: 10.3321/j.issn:1000-6737.2004.02.001.
- 19 尹丽, 朱广迎. 肿瘤放射敏感性影响因素的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, **19**(8): 629-633.
- YIN Li, ZHU Guangying. Advances of study in affecting factors of tumor radiosensitivity[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2012, **19**(8): 629-633. DOI:10.16073/j.cnki.cjcp.2012.08.001.
- 20 Ramadan M A, Shawkey A E, Rabeh M A, *et al.* Expression of P53, BAX, and BCL-2 in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma cells after tea tree oil treatment *in vitro*[J]. Cytotechnology, 2019, **71**(1): 461-473. DOI: 10.1007/s10616-018-0287-4.