

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.10.008

SHP-1/p21/CDK6/Cyclin D1 在不同放射敏感鼻咽癌细胞中的表达

彭纲,陈静,邹枕玮,曹如波,黄晶,丁乾

Expression and Significance of SHP-1/p21/CDK6/Cyclin D1 in Nasopharyngeal Carcinoma Cells with Different Radiosensitivity

Peng Gang, Chen Jing, Zou Zhenwei, Cao Rubo, Huang Jing, Ding Qian

Cancer Center of Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430023, China

Corresponding Author: Ding Qian, E-mail: dingqian75@163.com

Abstract: Objective To establish radiation-resistant nasopharyngeal carcinoma cell subline CNE-2S and reveal the relationship between expression levels of SHP-1/p21/CDK6/Cyclin D1 and radiation-resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** Radiation-resistant nasopharyngeal carcinoma cell subline was set up by X-ray hypofractionated radiotherapy. The differences on morphology and growth kinetics between different passagers were observed. The cell cycles of different passagers were analyzed. The protein levels in SHP-1/p21/CDK6/Cyclin D1 signaling pathway were examined in various clones of cells. **Results** The X-ray hypofractionated radiotherapy could build radioresistant subline of nasopharyngeal carcinoma. Meanwhile, the percentage of CNE-2S1 cells in S phase was significantly increased than that of CNE-2 cells, G₁ phase cells were decreased significantly, G₂-M phase cells had no obvious change. In addition, protein levels of SHP-1, CDK6, and CylinD1 in CNE-2S1 cells were significantly increased, but the expression of p21 was significantly reduced than that of CNE-2 cells. **Conclusion** SHP-1-p21-CyclinD1-CDK6 pathway may have a certain role in radiation sensitivity and cell cycle distribution of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: Radiation-resistant; Cell cycle; SHP-1; Nasopharyngeal carcinoma

摘要:目的 建立鼻咽癌放射抗拒亚系 CNE-2S, 研究 SHP-1/p21/CDK6/Cyclin D1 通路在鼻咽癌细胞系 CNE-2 和 CNE-2S 中表达的差异, 探讨鼻咽癌放射敏感度变化的分子机制。 **方法** 通过 X 线大剂量低分割照射技术建立鼻咽癌放射抗拒亚系(子代, CNE-2S1), 观察亲代(CNE-2)和子代细胞的形态学和生长动力学差异, 检测亲代及子代细胞系放射敏感度相关参数, 分析亲代及子代细胞系各自细胞周期分布, 同时检测亲代与子代细胞系 SHP-1/p21/CDK6/Cyclin D1 通路中各因子的蛋白质表达水平。 **结果** 通过 X 线大剂量低分割照射技术成功建立鼻咽癌放射抗拒亚系 CNE-2S1, 且 CNE-2 及 CNE-2S1 放射敏感度相关参数具有延续性。同时 CNE-2S1 细胞 S 期比例较 CNE-2 细胞明显增高, G₁ 期细胞明显减少, G₂-M 期细胞比例变化不明显。此外 SHP-1、CDK6 以及 CylinD1 在 CNE-2S1 细胞中的蛋白表达水平明显上调, p21 表达水平则明显下调, 其与 CNE-2 细胞之间的差异具有统计学意义。 **结论** SHP-1/p21/CDK6/Cyclin D1 通路可能在调控鼻咽癌放射敏感度和细胞周期分布方面发挥一定作用。

关键词: 放射抵抗; 细胞周期; SHP-1; 鼻咽癌

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)10-1193-04

0 引言

鼻咽癌是我国头颈部最常见的肿瘤之一, 放射治疗是其主要治疗手段。但由于肿瘤细胞异质性的存在, 组织学上分化相同的恶性细胞也会表

现出不同的放射敏感度, 其中对放射治疗相对抗拒的细胞亚系, 能够在放射治疗后继续存活, 导致鼻咽癌的局部复发。这种放射敏感度的差异受细胞耗氧水平、辐射致 DNA 损伤后的修复能力、分裂细胞数量、凋亡以及细胞周期中不同时相分布等影响, 其中细胞周期时相调控在此过程中可能起着主要作用。

研究表明蛋白质酪氨酸磷酸酶 SHP-1 同细胞周期调控相关^[1-3], 但 SHP-1 对鼻咽癌放射敏感度变化影响的具体分子机制尚不明确, 现拟建立鼻咽癌放射抗拒亚系 CNE-2S1, 研究 SHP-1/p21/

收稿日期: 2012-03-30; 修回日期: 2012-07-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2011JC074)

作者单位: 430023 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心

通信作者: 丁乾, E-mail: dingqian75@163.com

作者简介: 彭纲(1977-), 男, 博士, 主治医师, 主要从事头颈部肿瘤的研究

CDK6/Cyclin D1 在鼻咽癌细胞系 CNE-2 和鼻咽癌放射抗拒细胞亚系 CNE-2S1 中表达的差异,探讨鼻咽癌放射敏感度变化的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人鼻咽癌细胞株 CNE-2 由华中科技大学同济医学院附属协和医院肿瘤中心实验室保存。RPMI 1640 培养液和 G418 购自美国 Gibco 公司;新生胎牛血清购自杭州四季青公司;胰蛋白酶粉剂、碘化丙锭(PI)、RNA 酶购自美国 Sigma 公司;蛋白分子量标准标志物购自美国 Fermentas 公司;蛋白裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购自武汉碧云天生物技术研究;蛋白酶抑制剂购自瑞士 Roche 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;兔抗人 SHP-1、p21、CDK6 以及 CylinD1 单克隆抗体购自美国 Cell Signal Technology 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 IgG 购自北京中杉金桥公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 鼻咽癌细胞放射抗拒亚系的建立

采用德国西门子 Primus H 高能直线加速器发出的 6MV X 线照射细胞,照射野 10 cm × 10 cm,波皮距(sonrce skin distance, SSD) 100 cm,吸收剂量率为 2Gy/min,培养瓶上覆盖 1.5 cm 厚的补偿块。取对数生长期亲本 CNE-2 细胞,随机分为两组(A 组和 B 组),每组 3 瓶。A 组照射剂量为每次 6 Gy, B 组为每次 2 Gy,照射后继续培养。待细胞再次达对数生长期末时,0.25%胰酶消化细胞,将适量细胞接种传代,次日再照射相同剂量。重复以上过程, A 组照射 5 次, B 组照射 15 次,共 30 Gy。然后对存活细胞单克隆化,得到 2 个细胞克隆, A 组中细胞命名为 CNE-2S1, B 组中细胞命名为 CNE-2S2,在不照射的情况下连续传代 3 月,观察其放射敏感度。

1.3 克隆形成实验测定放射敏感度

我们参照 Hamburger 和 Salmon 的方法^[4],取对数生长期的细胞,0.25%胰蛋白酶消化,制成细胞密度为每毫升 5×10^3 个单细胞悬液,取 2 ml 接种于 6 孔板中,贴壁 12 h 后,单次剂量照射分别为 0、2、4、6、8 和 10 Gy,同时设置对照组(单纯培养),继续培养 2 周,4%多聚甲醛固定、Giemsa 染色。倒置显微镜下计数细胞集落数(>50 个细胞的集落),并计算接种效率(PE)和细胞存活分数(SF)(PE = 对照组集落数/细胞接种数 × 100%, SF = 实验组集落数/细胞接种数 × PE)。然后绘制细胞存活曲线。应用 Sigma Plot2001 Demo 版软件,以多靶单击模型 $S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线,计算放射生物学参数平均致死剂量值(D_0)、准阈剂量值(D_q)和靶数值(N)。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期

取对数期生长的亲代和子代细胞,0.25%胰酶消化制成单细胞悬液,加入到预冷的 75%冰乙醇中, -20℃固定过夜;次日弃乙醇, PBS 冲洗重悬, RNA 酶消化后加入 PI,使其终浓度约为 60 μg/ml,避光孵育后流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次。

1.5 Western blot 检测

取对数期生长的 CNE-2、CNE-2S1、CNE-2S2 细胞,消化后接种于 6 孔板中,待细胞 90%~95% 融合,继续培养 24 h 后提取细胞蛋白。每组设 3 个复孔。采用 Bradford 法将所有蛋白含量调整至相同浓度,行 SDS-PAGE 电泳,然后采用电转移法转移至甲醛处理过的 PVDF 膜,封闭 2 h,加入一抗(兔抗人 SHP-1、p21、CDK6 以及 CylinD1 单克隆抗体, 1:500), TBST 漂洗 40 min。HRP 标记的二抗(1:1 500)孵育 1 h,漂洗 45 min。暗室中行化学发光显影、扫描图像,用凝胶图像处理系统分析各条带的灰度值,根据相对灰度值进行统计分析。

1.6 统计学方法

所有实验数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行处理,两个均数之间的比较用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CNE-2S1 和 CNE-2S2 放射敏感度的变化

克隆形成实验测定 CNE-2、CNE-2S1 和 CNE-2S2 细胞受照射后的存活分数,制作细胞存活曲线,如图 1, X 射线对其呈指数性杀灭。各种细胞放射敏感度参数 D_0 、 D_q 及 N 值见表 1。CNE-2S1 细胞 D_0 、 D_q 及 N 值均增大,细胞存活曲线肩区增宽,提示比其亲代更具放射抗性,而 CNE-S2 的放射敏感度与亲代细胞相比却没有呈现明显的变化, D_0 、 D_q 及 N 值的差异无统计学意义。由此我们可以看出大剂量低分割照射能够诱导形成放射抗拒的鼻咽癌细胞系,其具有较高的放射抗拒性。

表 1 不同细胞系放射敏感度参数

Table 1 Radiosensitivity parameters of different cell lines

Radiosensitivity parameters	CNE-2 cell	CNE-2S1 cell	CNE-2S2 cell
D_0	1.76	2.01	1.65
D_q	1.54	1.98	1.44
N	2.90	4.31	2.38

2.2 CNE-2 细胞放射敏感度变化

CNE-2 细胞及 CNE-2S 细胞培养 3 月后,克隆形成实验测定照射后的存活分数,拟合细胞存活曲线,见图 2。放射敏感度参数 D_0 、 D_q 及 N 值见表 2,结果提示 CNE-2S1 细胞与 CNE-2 相比,在细胞传代 3 月后,仍保持放射抗性。

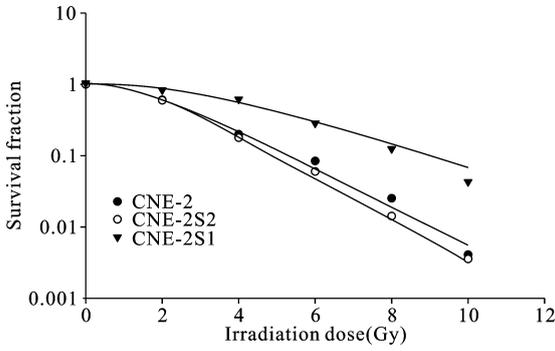


图 1 多靶单击模型拟合的 CNE-2、CNE-2S1 以及 CNE-2S2 细胞的存活曲线比较

Figure 1 Comparison of the cell survival curves of CNE-2, CNE-2S1 and CNE-2S2 cells plotted by the multi-target single-hit model

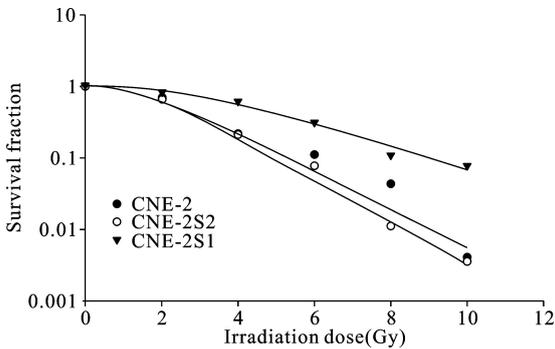


图 2 多靶单击模型拟合的培养 3 月后不同细胞的存活曲线比较

Figure 2 Comparison of the cell survival curves of CNE-2, CNE-2S1 and CNE-2S2 cells plotted by the multi-target single-hit model after 3 months of culture

表 2 培养 3 月后不同细胞放射敏感度参数

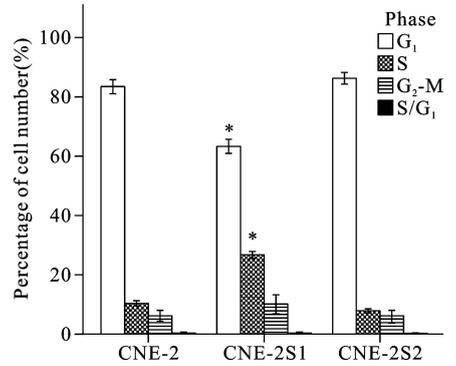
Table 2 Radiosensitivity parameters of different cell lines after 3 months of culture

Radiosensitivity parameters	CNE-2 cell	CNE-2S1 cell	CNE-2S2 cell
D_0	1.45	2.11	1.43
D_q	1.55	2.37	1.65
N	2.31	4.32	2.43

2.3 CNE-2 亲代细胞和 CNE-2S1、CNE-2S2 的细胞周期特征变化

细胞周期结果见图 3, CNE-2 细胞的细胞周期中 G_1 期、S 期和 G_2 -M 期细胞分别占 $(83.21 \pm 3.75)\%$ 、 $(10.00 \pm 1.19)\%$ 和 $(6.79 \pm 0.81)\%$, CNE-2S1 细胞分别为 G_1 期 $(63.73 \pm 2.78)\%$ 、 $(26.76 \pm 1.54)\%$ 和 $(9.51 \pm 0.79)\%$, 可以看出 CNE-2S1 细胞中的 G_1 期细胞明显减少, 而 S 期细胞明显增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。然而 CNE-2S2 细胞中 G_1 期、S 期和 G_2 -M 期分别是: $(86.62 \pm 2.53)\%$ 、 $(7.92 \pm 0.87)\%$ 和 $(5.46 \pm 2.04)\%$, 与 CNE-2 细胞相比, 其 S 期细胞数与 G_1 期细胞数的比例有所减少, 但差异无统计学

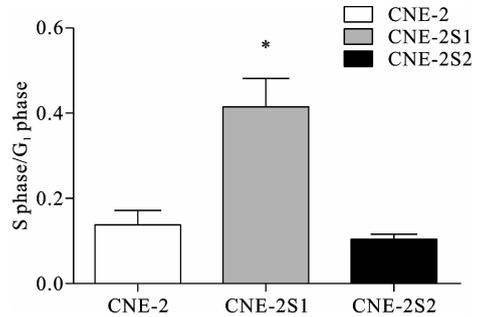
意义 ($P > 0.05$), 见图 4。



* : compared with CNE-2, the difference is significant ($P < 0.05$)

图 3 流式检测细胞周期变化

Figure 3 Cell cycle analysis of the three groups



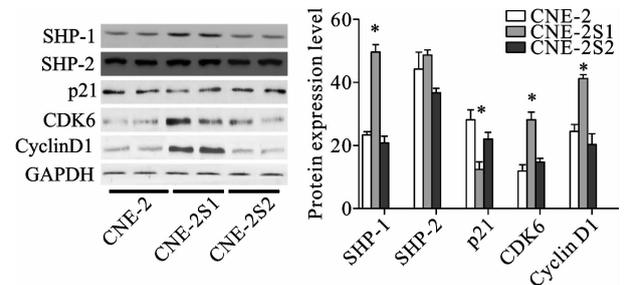
* : compared with CNE-2, the difference is significant ($P < 0.05$)

图 4 CNE-2、CNE-2S1 和 CNE-2S2 细胞系 S 期细胞数与 G_1 期细胞数的比例

Figure 4 Percentage of cells in S/ G_1 phase of CNE-2S1 and CNE-2S2

2.4 CNE-2 亲代细胞和 CNE-2S1、CNE-2S2 的 SHP-1/2、p21、CDK6、Cyclin D1 蛋白表达水平变化

SHP-1、CDK6 以及 Cyclin D1 在 CNE-2S1 细胞中的表达水平明显上调, p21 表达水平则明显下调, 其与 CNE-2 细胞之间的差异具有统计学意义, 见图 5。



* : compared with CNE-2, the difference is significant ($P < 0.05$)

图 5 Western blot 检测 CNE-2、CNE-2S1 和 CNE-2S2 细胞系各蛋白表达水平

Figure 5 Expression levels of SHP-1, SHP-2, p21, CDK6 and Cyclin D1 in CNE-2, CNE-2S1 and CNE-2S2 cell lines

3 讨论

本实验成功建立了鼻咽癌细胞放射抗拒亚系 CNE-2S1, 并以两种分割方式照射得到了两个 CNE-2 细胞亚系。目前国际上关于辐射引起放射抗拒的最佳照射剂量及分割方式尚无定论。有研究报告^[5]的 3~5 个分割, 每次 6 Gy 的方式可以迅速筛选出放射抗拒的细胞亚系。故而, 本实验采用这种每次 6 Gy, 照射 5 次, 总剂量 30 Gy 的方式, 产生的细胞亚系命名作 CNE-2S1。此外, 对照组采用常规分割, 即针对 CNE-2 细胞给予每次 2 Gy, 共计 15 次照射, 总剂量也为 30 Gy, 该细胞亚系命名为 CNE-2S2。本实验发现 CNE-2S1 放射抗拒性显著提高, 而 CNE-2S2 细胞则放射敏感度未见显著性增强。

同一细胞当处于不同细胞周期时相的时候, 各自的放射敏感度不尽相同。一般说来, 细胞处于 S 期时放射抗拒, G_0 - G_1 期相对敏感, 而 G_2 -M 期则对辐射最为敏感。本实验结果显示 CNE-2S1 细胞 S 期比例较其 CNE-2 细胞明显增高, 而 G_1 期细胞明显减少, 而 G_2 -M 期细胞比例变化则不明显。此外, CNE-2S2 细胞各期细胞比例变化均不明显。因此我们推测, 可能是细胞周期时相的变化引起了 CNE-2S1 的放射抗拒, 即本实验再次证实了体外经过大剂量低分割反复照射可以致使细胞发生放射抗拒, 并且这一放射抗拒的形成与肿瘤细胞的周期分布之间存在联系, 这与既往大部分研究结果一致。

细胞周期是生命活动的基本过程, 经历增殖、分化、衰老和凋亡, 整个过程中受多种周期调控因子(主要包括细胞周期蛋白 Cyclin、细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白 CKI 以及磷酸化酶)的调节, 若细胞周期调控异常, 细胞将进入病理状态, 参与肿瘤的发生。

CyclinD1 主要在 G_1 期发挥作用, 通过与 CDK4 或 CDK6 结合形成复合物, 使细胞由 G_1 期进入 S 期, 启动细胞增殖。而 p21 与 CyclinD 竞争结合 CDK4 或 CDK6, 使细胞周期停留在 G_1 期, 从而抑制细胞的增殖。p21、CyclinD1 以及 CDK4 任一失常均可导致肿瘤的发生。

蛋白质酪氨酸磷酸酶 SHP-1 是调节细胞内磷酸化水平的关键性调控因子, 基因全长 17kb, 含 17 个外显子, 活化的 SHP-1 能够催化 JAKs 或其他酪

氨酸激酶(如 Src、c-fms 等)的酪氨酸去磷酸化, 使这些激酶的活性降低或丧失, 从而负性调控细胞信号转导作用, 抑制细胞增殖^[6-9]。近期研究表明 SHP-1 与细胞周期调控也密切相关。本实验中, 我们初步观察到 SHP-1、CDK6 以及 CyclinD1 蛋白表达水平在 CNE-2S1 细胞中明显上调, p21 表达水平则明显下调, 说明 SHP-1/p21/CyclinD1/CDK6 通路可能在调控放射敏感度和细胞周期分布方面发挥了一定作用。在后续的实验, 我们将通过对 SHP-1/2 进行干预, 以明确 SHP-1/2 在 p21- CyclinD1-CDK6 通路在影响肿瘤细胞放射敏感度方面的具体作用。

参考文献:

- [1] López-Ruiz P, Rodríguez-Ubreva J, Cariaga AE, et al. SHP-1 in cell-cycle regulation[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2011, 11(1): 89-98.
- [2] Rodríguez-Ubreva FJ, Cariaga-Martínez AE, Cortés MA, et al. Knockdown of protein tyrosine phosphatase SHP-1 inhibits G1/S progression in prostate cancer cells through the regulation of components of the cell-cycle machinery[J]. *Oncogene*, 2010, 29(3): 345-55.
- [3] Ketrroussi F, Giuliani M, Bahri R, et al. Lymphocyte cell-cycle inhibition by HLA-G is mediated by phosphatase SHP-2 and acts on the mTOR pathway[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e22776.
- [4] Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells[J]. *Science*, 1977, 197(4302): 461-3.
- [5] Pearce AG, Segura TM, Rintala AC, et al. The generation and characterization of a radiation-resistant model system to study radioresistance in human breast cancer cells[J]. *Radiat Res*, 2001, 156(6): 739-50.
- [6] Zhang Y, Hagedorn CH, Wang L. Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(8): 893-908.
- [7] Mittal Y, Pavlova Y, Garcia-Marcos M, et al. Src Homology Domain 2-containing Protein-tyrosine Phosphatase-1 (SHP-1) Binds and Dephosphorylates G{alpha}-interacting, Vesicle-associated Protein (GIV)/Girdin and Attenuates the GIV-Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-Akt Signaling Pathway[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(37): 32404-15.
- [8] Beyaert R. SHP works a double shift to control TLR signaling [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8): 725-7.
- [9] Prasad S, Pandey MK, Yadav VR, et al. Gambogic acid inhibits STAT3 phosphorylation through activation of protein tyrosine phosphatase SHP-1: potential role in proliferation and apoptosis[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2011, 4(7): 1084-94.

[编辑校对: 安 凤]