

下咽癌放疗抵抗细胞放疗抗性与 上皮-间质转化的关系

汪海燕^{1,2} 王志海¹ 胡国华^{1*}

(¹重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉头颈外科, 重庆 400016;

²成都市第五人民医院麻醉科, 成都 610000)

摘要 该文探讨了下咽鳞癌放疗抵抗细胞FaduRR发生放疗抵抗与上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的关系及可能的机制。课题组前期成功构建了放疗抵抗细胞株FaduRR。平板克隆形成实验、CCK8实验检测放疗抵抗性, 流式细胞术检测细胞凋亡、细胞划痕和Transwell侵袭迁移实验检测迁移侵袭能力, Western blot和qRT-PCR实验检测蛋白和mRNA的表达。与亲本细胞Fadu相比, FaduRR细胞的放疗敏感性明显降低, X线照射后第4天的存活率明显增高、细胞凋亡率降低、细胞形态呈现上皮间质化的改变、细胞迁移侵袭能力增强、E-cadherin的蛋白和mRNA表达水平显著下调, 而N-cadherin、Vimentin、p-Akt、p-GSK-3 β 、Snail的蛋白和mRNA表达水平显著上调, 但Akt和GSK-3 β 的表达无明显变化。以上结果提示, 下咽鳞癌放疗抵抗细胞株FaduRR发生了EMT改变, 其机制可能与Akt/GSK-3 β /Snail信号通路的激活有关。

关键词 下咽肿瘤; 放疗抵抗; 上皮-间质转化

The Relationship Between the Radioresistance of Hypopharyngeal Carcinoma Cells FaduRR and Epithelial Mesenchymal Transformation

WANG Haiyan^{1,2}, WANG Zhihai¹, HU Guohua^{1*}

(¹Department of Otorhinolaryngology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Department of Anesthesiology, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 610000, China)

Abstract The aim of this study was to explore the relationship between the radioresistance FaduRR cell and the EMT (epithelial-mesenchymal transformation) as well as its potential mechanism in hypopharyngeal squamous carcinoma. The radioresistant hypopharyngeal cancer cell FaduRR was previously established with a gradient cumulative irradiation dose. The radioresistance of FaduRR was measured by colony forming assay and CCK8 cell viability kits. The apoptosis rate was measured by flow cytometry. The migration and invasion abilities were investigated by wound healing assay and transwell assay. Moreover, the mRNA and protein levels were detected by Western blot and qRT-PCR assay. Compared with Fadu cells, FaduRR cells radiation sensitivity was significantly lower. The CCK8 cell viability kits results showed that the survival rate of FaduRR cells in different doses on the fourth day after irradiation were higher than that of parental cells, the apoptosis rate of FaduRR cells was lower. The radioresistant cells FaduRR demonstrated typical 'cobblestone' or spindle-like shape, with pseudopodia and enlarged intercellular space. The invasiveness and migration abilities of the FaduRR cells were enhanced. The mRNA

收稿日期: 2019-10-25 接受日期: 2019-12-26

*通讯作者。Tel: 023-89012945, E-mail: why1990why12@sina.com

Received: October 25, 2019 Accepted: December 26, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-23-89012945, E-mail: why1990why12@sina.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5199>

and protein expression levels of E-cadherin were significantly decreased, while the mRNA and protein expression levels of N-cadherin and Vimentin were markedly increased after as compared with parental cells. In the Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway, the protein levels of p-Akt, p-GSK-3 β and Snail were significantly increased, while the expression of Akt and GSK-3 β was not significantly changed. According to the results, the radioresistant hypopharyngeal cancer cell FaduRR can induce the epithelial mesenchymal transformation, and the specific mechanism may be related to the activation of Akt/GSK-3 β /Snail signaling pathway.

Keywords hypopharyngeal cancer; radioresistance; epithelial-mesenchymal transition

下咽癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一, 约94.9%的病理类型为鳞状细胞癌, 局部复发和远处转移是其极为常见的现象, 且伴有转移的患者一般预后较差^[1]。目前下咽癌的治疗方式主要有手术治疗、放射治疗以及手术治疗加同步放化疗, 放疗在下咽癌临床治疗中具有重要的作用, 是继手术之后的第二大治疗手段。对于早期下咽癌, 单纯放疗可取得和手术治疗一样的结果, 同时又完整地保留了患者的解剖结构, 提高了患者的生活质量^[2]。对于大多数中晚期下咽癌患者, 手术和放射治疗的综合治疗, 可以明显降低肿瘤的局部复发和远处转移的机率, 从而提高患者的生存率。然而放疗抵抗仍旧是下咽癌放射治疗中的一个难题^[3-5]。仅仅通过增大放射的剂量, 放射治疗也不一定能达到预期效果, 放疗抵抗严重影响下咽癌患者的临床治疗效果。因此探索放疗抵抗的具体分子机制进而设法逆转, 将可能提高下咽癌患者的预后。

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指具有极性的上皮细胞向具有移行能力的间质细胞转化的过程^[6]。已有研究发现, EMT与多种肿瘤细胞的浸润、转移、肿瘤干细胞及化疗抵抗性密切相关^[7-8]。最新研究表明, EMT可能在肿瘤的放疗过程中起重要作用, 可通过增加肿瘤细胞的迁移侵袭能力, 导致肿瘤细胞发生远处转移或局部复发^[9-10]。基于此, 本课题组历时8个月建立了下咽癌放疗抵抗细胞株(Fadu with radioresistance, FaduRR), 通过分析该细胞形态学及EMT相关分子标志物的改变情况, 探究其相关机制, 试图为减弱下咽癌放疗抵抗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

人下咽癌细胞株Fadu购自中国科学院标准细胞库, 放疗抵抗细胞株FaduRR成功构建并保存于实

验室; DMEM高糖培养基购自美国Hyclone公司; 胎牛血清、0.25%胰蛋白酶消化液购自美国Gibco公司; PBS粉末、小鼠抗人波形蛋白(Vimentin)单克隆抗体、小鼠抗人E-钙黏蛋白(E-cadherin)单克隆抗体、小鼠抗人N-钙黏蛋白(N-cadherin)单克隆抗体、兔抗人Snail单克隆抗体、兔抗人Akt单克隆抗体、兔抗人p-Akt单克隆抗体、兔抗人GSK-3 β 单克隆抗体、兔抗人p-GSK-3 β 单克隆抗体购自美国CST公司; CCK8检测试剂盒、BCA试剂盒、结晶紫染液购自中国碧云天生物技术研究所; 聚合酶链反应(PCR)引物购自上海生工生物工程有限公司; Trizol、反转录试剂盒、实时荧光定量qRT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司; 6孔板、Transwell共培养体系购自美国Corning公司; Matrigel胶购自美国BD公司。

1.2 细胞培养和细胞照射

人下咽癌Fadu细胞培养在含10%的胎牛血清的DMEM培养基中、置于37℃、5% CO₂细胞孵箱中孵育。待细胞生长至70%左右时, 更换培养基, PBS清洗, 0.25%的胰酶进行消化传代。实验所用细胞均选用对数期生长状况良好的细胞。本实验通过6 MeV X射线直线加速器进行电离辐射, 由重庆医科大学附属第一医院肿瘤科放射治疗室提供技术支持以及仪器平台, 源皮距为100 cm, 剂量率为200 cGy/min, 由上至下进行照射。

1.3 下咽癌放疗抵抗细胞株(FaduRR)的建立

Fadu细胞均匀种于75 cm²的培养瓶内。待细胞处于对数生长期时, 在上述照射条件下初次给予细胞单次剂量2 Gy射线照射, 将照射后的细胞置于37℃、5% CO₂细胞孵箱继续培养, 密切观察细胞生长状态, 及时换液。待细胞状态逐渐恢复, 并稳定传2~3代后, 再依次给予4 Gy、6 Gy、8 Gy射线照射, 直至细胞照射剂量达到10 Gy, 最后单次照射剂量为10 Gy, 照射总剂量为60 Gy, 直到建立具有稳定遗传能力的耐受放射线的下咽癌细胞株, 命名为FaduRR

细胞。照射过程中在倒置显微镜下观察细胞形态并检验细胞的放射抵抗性。

1.4 形态学观察

取处于对数生长期的Fadu和FaduRR细胞均匀地接种在细胞培养瓶中,置于37 °C、5% CO₂细胞孵箱中培育,倒置显微镜下对细胞形态进行观察并拍照。

1.5 平板克隆形成实验

取对数期生长状况良好的细胞,0.25%胰酶消化重悬细胞,按照不同的照射剂量(0、2、4、6、8、10 Gy)接种不同的细胞数量(500、1 000、2 000、3 000、4 000、5 000个/每孔),接种后轻轻摇晃6孔板使细胞均匀、分散。设置3个复孔,照射结束后,继续置于37 °C、含5% CO₂的孵箱中培养,15天后弃培养液,PBS冲洗2次,多聚甲醇固定20 min,0.25%结晶紫染色,PBS液洗去结晶紫染液,常温干燥后,显微镜下计克隆数(每个克隆≥50个细胞),按照以下公式计算克隆形成率和存活分数(survival fraction, SF),克隆形成率=细胞克隆数/接种细胞数×100%,SF=照射组细胞克隆形成率/对照组细胞克隆形成率×100%。所有数据用GraphPad Prism 5软件进行处理,用单击多靶模型拟合细胞存活曲线计算平均致死剂量(mean lethal dose,记作D₀)、准阈剂量(quasi-threshold dose,记作D_q)、2 Gy细胞存活分数(survival fraction, SF₂)。

1.6 CCK8实验检测细胞存活率

常规0.25%胰蛋白酶消化各组细胞,以每孔2 000个细胞接种于96孔板中,设置3个复孔。待细胞贴壁生长12 h后,分别用0、2、4、6、8 Gy的剂量同上述条件进行照射,第4天用CCK8试剂盒检测各组细胞的存活情况,每孔加入10 μg CCK8,37 °C孵育1 h,在M550酶标仪上以450 nm主波长、630 nm参比波长下测量板孔的吸光度值(D),按照该公式细胞存活率(%)=实验组D₄₅₀均值/对照组D₄₅₀均值×100%,计算出单次剂量照射后不同时间点细胞的存活率。实验重复3次。

1.7 流式细胞术

取对数细胞期的细胞,给予4 Gy射线照射后,置于37 °C、5% CO₂孵箱中继续培养24 h处理后的细胞,根据AnnexinV-FITC试剂盒说明进行处理并上机分析。实验重复3次。

1.8 细胞划痕实验

取处于对数期的细胞接种于6孔板,细胞密度

为5×10³个/孔,待细胞贴壁并生长成单层细胞时,用10 μL的枪头均匀划十字叉,用灭菌PBS洗去划下的细胞,更换成不含血清的培养基培养细胞,各组设置3个复孔,继续放置在37 °C、5% CO₂孵箱中培养。并在显微镜下拍下0、24、48 h划痕愈合的图片。图片使用Image pro plus软件测量划痕的迁移距离。迁移距离=0 h划痕距离-24 h划痕距离。

1.9 Transwell迁移侵袭实验

细胞侵袭和迁移实验均采用Transwell小室检测,侵袭实验前把稀释后的Matrigel胶60 μL添加到小室的上室内,37 °C、5% CO₂孵箱中过夜,迁移实验不需要使用Matrigel胶,其余步骤均相同。简述如下,用0.25%胰酶消化处于对数期生长的细胞,并制成单细胞悬液(用不含血清的培养基悬浮)。向上室中加入1×10⁴个细胞(迁移实验)和2×10⁴个细胞(侵袭实验),下室中加入600 μL10%胎牛血清培养基,均设置3个复孔,37 °C、5% CO₂孵箱培养,第2天取出小室,多聚甲醛固定20 min,0.25%结晶紫染色,显微镜下随机选5个视野拍照并计算细胞数量。

1.10 Western blot蛋白印迹实验

提取细胞总蛋白,用RIPA裂解液裂解,BCA蛋白检测试剂盒测定细胞总蛋白浓度。总蛋白变性处理后,进行10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳。蛋白电泳分离后转胶至PVDF膜上,5%脱脂牛奶封闭2 h。加入一抗E-cadherin单克隆抗体(1:1 000)、N-cadherin单克隆抗体(1:1 000)、Vimentin单克隆抗体(1:1 000)、Akt单克隆抗体(1:1 000)、p-Akt单克隆抗体(1:1 000)、Snail单克隆抗体(1:1 000)、GSK-3β单克隆抗体(1:1 000)、p-GSK-3β单克隆抗体(1:1 000),4 °C冰箱摇床孵育过夜,次日,PBS 10 min/次×3次,二抗室温孵育1.5 h,PBS 10 min/次×3次,曝光。

1.11 RNA提取及qRT-PCR实验

qRT-PCR方法检测E-cadherin、N-cadherin、Vimentin的mRNA水平,根据Trizol说明书提取Fadu、FaduRR细胞总RNA,并反转录成cDNA。采用10 μL体系进行qRT-PCR(内参为GAPDH)。PCR引物序列见表1。

1.12 统计学方法

实验数据均以均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,数据统计分析使用Graphpad prism 6.0软件,实验均重复3次。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FaduRR细胞株放疗抵抗性的验证

本课题组前期已经成功探索了建立下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR的方法, 平板克隆形成实验检测其放疗抵抗性, 如图1A所示, 与Fadu细胞相比, FaduRR细胞的克隆体积更大、数量更多。如图1B和表2所示, 由单击多靶模型拟合的细胞存活曲线看, 与Fadu细胞相比, FaduRR细胞D0、Dq、SF2增加($P<0.01$)、剂量存活分数曲线下降趋势较慢, 放疗增敏比的两个参数(SERD0、SERDq)降低($P<0.01$)。同时CCK8实验结果表明, 通过不同剂量的射线照射后的细胞, 与亲本细胞Fadu细胞相比, 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR在4、6、8 Gy表现出更高的细胞存活率($P<0.01$, 图1C), 差异具有统计学意义。以上结果提示, FaduRR细胞的放射抗拒性明显高于Fadu细胞, 且FaduRR细胞的放射抵抗性具有遗传性。

2.2 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR显示出典型的EMT形态学的变化

如图2所示, 与下咽癌Fadu细胞相比, 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR细胞伸出伪足, 细胞变狭长, 细胞之间的间隙增大, 而未经照射的下咽癌Fadu细胞呈路砖形, 细胞连接紧密, 没有伪足。经X射线照射建立的下咽癌抵抗细胞株FaduRR细胞形态的改变类似于上皮间质化的改变, 与EMT的典型细胞形态类似, 由此我们推测, 在建立抵抗细胞株的过程中发生了EMT的改变。

2.3 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR凋亡率降低

如图3所示, 通过流式细胞术检测, 结果显示, 经过4 Gy放射线照射后, 与亲本细胞Fadu相比, 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR的凋亡率显著减少($P<0.05$), 差异具有统计学意义。

2.4 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR体外迁移侵袭能力增加

如图4A和图4B所示, 与未接受照射的细胞Fadu相比, 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR 24 h和48 h细胞迁移的距离增加($P<0.05$), 可见FaduRR较Fadu体外迁移能力明显增强。如图4C和图4D所示: Transwell实验结果与划痕实验结果一致, 与未照射组Fadu细胞比较, 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR细胞24 h穿过Transwell膜和Matrigel胶细胞数量增加($P<0.001$), 体外侵袭能力明显增强。

2.5 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR发生典型的EMT相关标志物的改变

如图5A和图5B所示, Western blot实验结果显示, 与未进行照射的Fadu细胞比较, 下咽癌放疗抵抗FaduRR细胞E-cadherin蛋白表达水平显著降低($P<0.001$), N-cadherin、Vimentin蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。qRT-PCR实验结果如图5C所示: 与下咽癌未接受照射的Fadu细胞比较, 放疗抵抗FaduRR细胞E-cadherin mRNA的表达显著减少($P<0.01$), N-cadherin、Vimentin mRNA的表达显著增加($P<0.01$)。

2.6 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR Akt/GSK-3 β /Snail信号通路发生改变

如图6所示, Western blot实验结果显示, 与未进行照射的Fadu细胞比较, 下咽癌放疗抵抗细胞FaduRR Snail、p-Akt、p-GSK-3 β 蛋白表达显著增加($P<0.05$), 而Akt、GSK-3 β 表达水平没有明显改变。

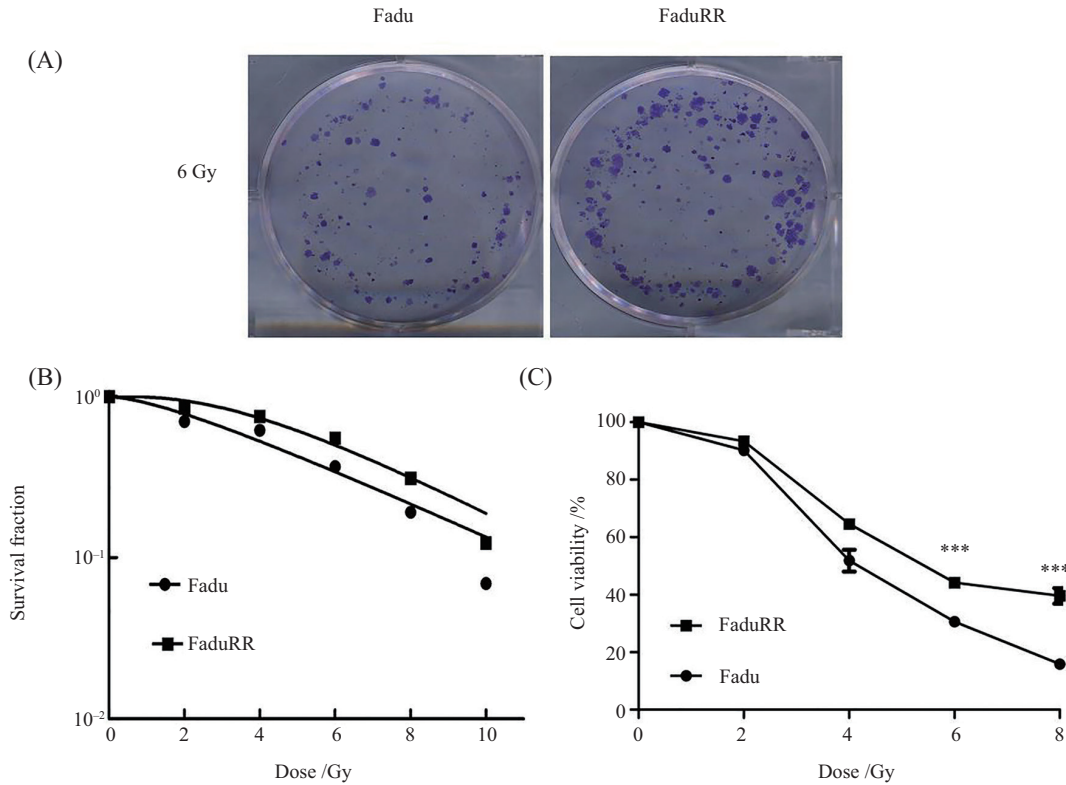
3 讨论

下咽癌属于头颈部恶性肿瘤, 起源于喉黏膜组

表1 引物序列

Table 1 Prime sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
<i>E-cadherin</i>	F: 5'-GCT CTT CCA GGA ACC TCT GTG ATG-3' R: 5'-AAG CGA TGG CGG CAT TGT AGG-3'
<i>N-cadherin</i>	F: 5'-AAG GTG GAT GAA GAT GGC ATG GTG-3' R: 5'-TGC TGA CTC CTT CAC TGA CTC CTC-3'
<i>Vimentin</i>	F: 5'-TTG CCG TTG AAG CTG CTA ACT ACC-3' R: 5'-AAT CCT GCT CTC TCC TCG CCT TCC-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-CCG GGA AAC TGT GGC GTG ATG G-3' R: 5'-AGG TGG AGG AGT GGG TGT CGC TCT-3'



A、B: Fadu和FaduRR细胞平板克隆实验结果以及单击多靶模型拟合生存曲线图; C: CCK8检测细胞存活率结果。*** $P < 0.001$, 与Fadu细胞组比较。

A,B: the results of colony forming assay and click on the multi-target model to fit the survival curve. C: the cell survival rate was measured by CCK8. *** $P < 0.001$ vs Fadu group.

图1 下咽癌放疗抵抗细胞FaduRR放射抵抗性的验证
Fig.1 Verification of radioresistance in FaduRR cells

表2 下咽癌Fadu细胞和FaduRR细胞放射生物学参数
Table 2 The radiobiology parameters of Fadu and FaduRR cells

组别 Group	SF2	D0 /Gy	Dq /Gy	N	SERD0	SERDq
Fadu	0.77±0.02	3.51±0.08	2.13±0.19	1.84±0.11	1.00	1.00
FaduRR	0.86±0.03**	4.77±0.32**	3.37±0.38**	2.05±0.24	0.73±0.03**	0.63±0.01**

平均值±标准差, ** $P < 0.01$ 与Fadu组比较。

$\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.01$ vs Fadu group.

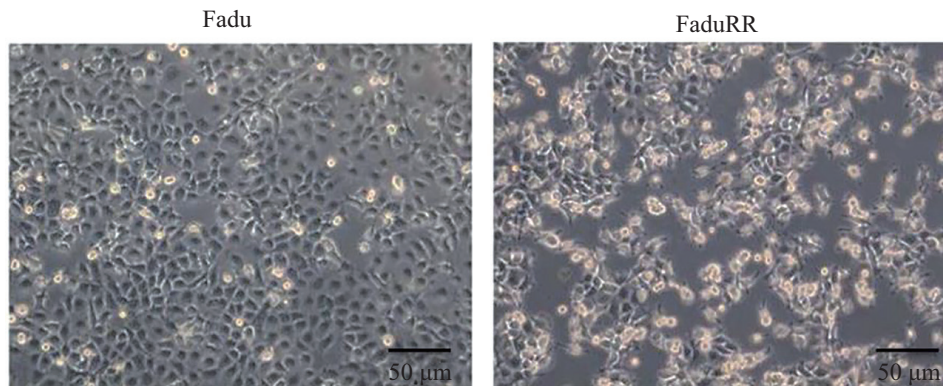
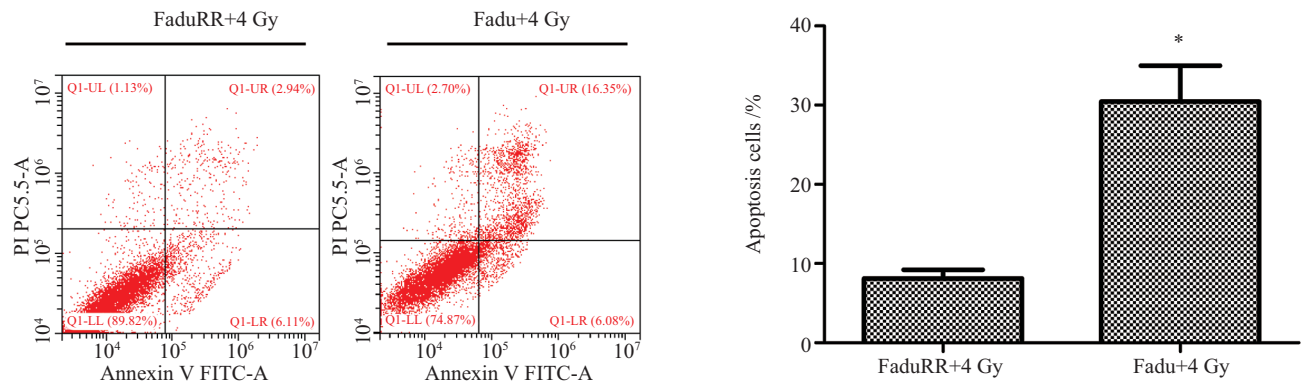


图2 倒置相差显微镜下细胞形态学观察
Fig.2 Morphology observation of Fadu and FaduRR cells

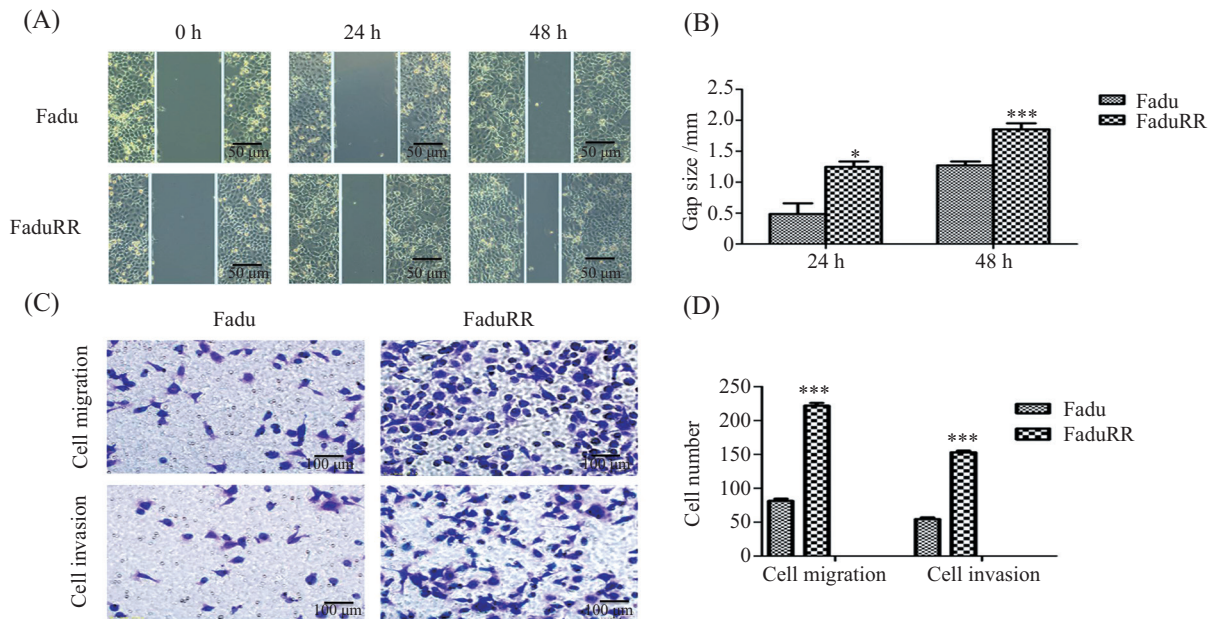


4 Gy射线照射后, 下咽癌放射抵抗细胞FaduRR凋亡表达情况, $*P<0.05$, 与Fadu细胞组比较。

The apoptosis rates of Fadu and FaduRR cells after treated with 4 Gy, $*P<0.05$ vs Fadu group.

图3 4 Gy射线照射后, 亲本细胞Fadu和下咽癌放射抵抗细胞FaduRR的凋亡情况

Fig.3 The apoptosis rates of Fadu and FaduRR cells after treated with 4 Gy



A、B: 细胞划痕实验检测下咽癌Fadu细胞以及抵抗细胞株FaduRR的迁移能力, $**P<0.01$, $*P<0.05$, 与Fadu细胞组比较; C、D: Transwell迁移侵袭实验检测下咽癌Fadu细胞以及抵抗细胞株FaduRR的迁移侵袭能力, $***P<0.001$, 与Fadu细胞组比较。

A,B: the abilities of migration were measured by Wound-healing assay in Fadu and FaduRR cells, $**P<0.01$, $*P<0.05$ vs Fadu group. C,D: the abilities of invasion were measured by Transwell assay in Fadu and FaduRR cells, $***P<0.001$ vs Fadu group.

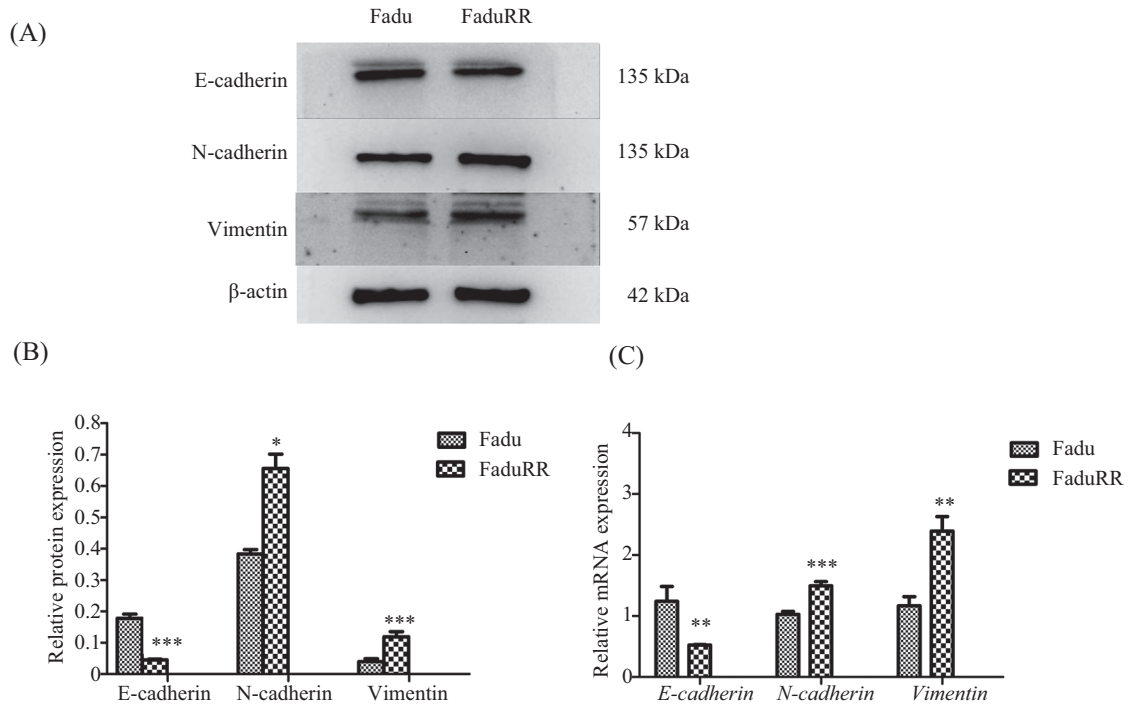
图4 下咽癌Fadu细胞以及抵抗细胞株FaduRR的侵袭迁移能力的变化

Fig.4 Changes in invasion and migration ability of Fadu and FaduRR cells

织, 目前治疗方式仍以手术为主, 最新的研究认为, 放射治疗和联合化疗等方法能够提高晚期患者的治疗效果^[11]。而放疗面临的主要问题是下咽癌细胞对放射治疗产生的放疗抵抗。目前肿瘤细胞对放射线的抵抗主要归结于肿瘤细胞通过DNA修复基因蛋白表达量增高, 细胞乏氧效应和放疗后促血管生成效应等^[12-16]。关于下咽癌细胞放疗抵抗及其具体机制尚不明确, 目前对其研究也较少。

EMT主要是指具有极性的上皮细胞转变为移

形能力较强的间质细胞的过程。在EMT发生过程中伴随着转录诱导因子(Snail、Slug等)及间质表型标志物(Vimentin、N-cadherin)的上调, 同时伴随着上皮表型标志物E-cadherin表达的下调。目前研究证实, 肿瘤细胞发生EMT后, 其侵袭转移能力增强^[7], 同时EMT在肿瘤的多种恶性生物学行为进展中扮演着重要的角色^[17]。研究证实, 在肺癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞中, EMT增强能增加肿瘤细胞化疗抵抗性, 通过逆转EMT可以减弱化疗抵抗性^[18-19]。JIANG等^[20]

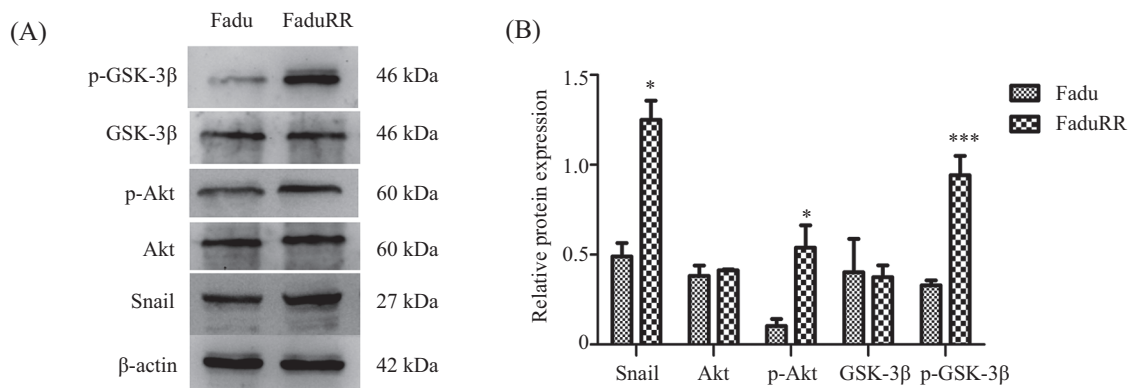


A、B: FaduRR和Fadu细胞中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin蛋白水平的表达情况, $*P<0.05$, $***P<0.001$, 与Fadu细胞组比较; C: FaduRR和Fadu细胞中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin mRNA水平的表达情况, $**P<0.01$, $***P<0.001$, 与Fadu细胞组比较。

A,B: the proteins expressions of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin in FaduRR cells, $*P<0.05$, $***P<0.001$ vs Fadu group; C: the mRNA expressions of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin in FaduRR cells, $**P<0.01$, $***P<0.001$ vs Fadu group.

图5 下咽癌Fadu以及放射抵抗细胞株FaduRR中EMT表达的情况

Fig.5 The relative proteins expressions of EMT in Fadu and FaduRR cells



A、B: Western blot检测放疗抵抗细胞株FaduRR细胞中Akt/GSK-3β/Snail的表达情况, $*P<0.05$, $***P<0.001$, 与Fadu细胞组比较。

A,B: expression levels of Akt, GSK-3β and Snail were determined by Western blot, $*P<0.05$, $***P<0.001$ vs Fadu group.

图6 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR Akt/GSK-3β/Snail信号通路

Fig.6 The relative protein expressions of Akt/GSK-3β/Snail signaling pathway in FaduRR cells

研究表明, 胰腺癌放疗抵抗细胞株可促进EMT的发生, ZANG等^[21]研究也发现, 放疗抵抗的食管癌细胞株EMT表型较亲本细胞株增强, 同时通过抑制食管癌耐放疗细胞株的EMT可以增加肿瘤细胞的放疗敏感性, 这些研究均提示, EMT在放疗抵抗中可能发生了重要的作用, 但目前关于下咽癌放疗抵抗现象与EMT的关系的研究较少。

本课题组前期采用单次剂量分割照射的照射方法, 成功构建了下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR, 在总剂量达到60 Gy后, 通过CCK8实验、克隆形成实验, 验证了FaduRR细胞株较亲本细胞Fadu具有更强的放疗抵抗性。通过倒置相差显微镜我们观察到放疗抵抗细胞株FaduRR的细胞形态由路砖形向细长梭形转化, 细胞间隙变大、连接疏松, 同时出

现伪足。其形态改变与EMT典型改变类似, 通过划痕实验和Transwell侵袭迁移实验, 我们发现, 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR较亲本细胞具有更强的迁移侵袭能力, 进一步通过Western blot和qRT-PCR实验从蛋白和mRNA层面检测EMT相关表面标志物的表达情况, 结果显示, 与Fadu细胞相比, FaduRR细胞Vimentin和N-cadherin表达水平均显著升高, 而E-cadherin表达水平明显降低, 呈现EMT典型的分子标志物的表现。由此可见, 在下咽癌细胞放疗抵抗性增加的过程中, 细胞逐渐发生了EMT的改变, 该实验研究提示, 放疗抵抗的下咽癌细胞表现出了间质细胞的表型, 并且伴随其迁移侵袭能力的增强。但关于放疗抗性与EMT是否存在关系目前还不清楚。

Snail是调控上皮间质转变的重要转录因子, 通过生物学作用调控肿瘤细胞的发展, 作为EMT的关键转录因子, Snail与肿瘤的浸润、侵袭、转移密切相关。研究表明, Snail与人乳腺癌细胞远处转移具有相关性^[22], Snail是膀胱癌、胃癌、肝癌等肿瘤的不良预后因素之一, 所以抑制Snail可能对抑制肿瘤的发展具有一定的作用。上皮-间质转化由许多的信号通路调节转录因子完成, PI3K/Akt/GSK-3 β 是重要的信号通路之一, HE等^[9]和MA等^[23]研究结果表明, 食管癌放疗抵抗细胞通过激活Akt/GSK-3 β /Snail信号通路发生EMT的改变。SHIMURA等^[24]研究表明, 电离辐射(ionizing radiation, ir)能激活Akt/GSK3 β /cyclinD1通路, 进而使肿瘤细胞获得放疗抵抗。

为了进一步探索下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR发生EMT的具体机制, 我们采用Western blot实验检测了Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、Snail的蛋白水平的表达, 结果显示, p-Akt、p-GSK-3 β 、Snail表达增加, 而Akt、GSK-3 β 表达并无明显差异。有研究表明, 磷酸化的Akt可通过直接上调转录因子表达或间接促进金属蛋白酶表达等多种途径降低E-cadherin表达, 引起EMT进程, 使肿瘤细胞的侵袭能力增强^[25]。由此可见, 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR建立过程中可能通过激活Akt/GSK-3 β /Snail信号通路, 促使FaduRR细胞发生EMT现象。

综上所述, 本研究结果证实, 与下咽癌亲本细胞Fadu相比, 下咽癌放疗抵抗细胞株FaduRR发生了EMT的改变, 并且具有更强的侵袭迁移能力, 其机制可能与激活Akt/GSK-3 β /Snail信号通路有关。但是关于下咽癌放疗抵抗细胞的放疗抗性与EMT的相关

性, 以及能否通过逆转EMT达到增加下咽癌细胞的放疗敏感性, 尚待进行进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] AHN D, KIM J H, SOHN J H, et al. Laryngeal preservation in stage III/IV resectable laryngo-hypopharyngealsquamous cell carcinoma following concurrent chemoradiotherapy with capecitabine/cisplatin [J]. *Mol Clin Oncol*, 2013, 1(4): 685-91.
- [2] MENDENHALL W M, AMDUR R J, MORRIS CG, et al. T1-T2 N0 squamous cell carcinoma of the glottic larynx treated with radiation therapy [J]. *Clin Oncol*, 2001, 19: 4029-36.
- [3] BUSSINK J, VAN DER KOGEL A J. Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9: 288-96.
- [4] BIAU J, CHAUTARD E, Miroir J. Radioresistance parameters in head and neck cancers and methods to radiosensitize [J]. *Cancer Radiother*, 2015, 19: 337-46.
- [5] NIX P A, GREENMAN J, CAWKWELL L. Defining the criteria for radioresistant laryngeal cancer [J]. *Clin Otolaryngol Allied Sci*, 2004, 29(6): 705-8.
- [6] GONZALEZ D M, MEDICI D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344): e8.
- [7] THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. *Cell*, 2009, 139(5): 871-90.
- [8] ELASKALANI O, RAZAK N B, FALASCA M, et al. Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for overcoming chemoresistance in pancreatic cancer [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2017, 9(1): 37-41.
- [9] HE E, PAN F, LI G, et al. Fractionated ionizing radiation promotes epithelial-mesenchymal transition in human esophageal cancer cells through FFEN deficiency-mediated akt activation [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e126149.
- [10] SU H, JIN X, ZHANG X, et al. FH535 increases the radiosensitivity and reverses epithelial to mesenchymal transition of radioresistant esophageal cancer cell line KYSE [J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1): 104.
- [11] DU W, PANG C, XUE Y, et al. Dihydroartemisinin inhibits the Raf/ERK/MEK and PI3K/AKT pathways in glioma cells [J]. *Onco Let*, 2015, 10(5): 3266-70.
- [12] FENG X P, YI H, LI M Y, et al. Identification of biomarkers for predicting nasopharyngeal carcinoma response to radiotherapy by proteomics [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9): 3450-62.
- [13] HARADA H, KIZAKA-KONDOH S, LI G, et al. Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 7508-16.
- [14] EYLER C E. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis [J]. *Clin Oncol*, 2008, 26: 2839-45.
- [15] RAJUROHIT YS. Characterization of a DNA damage-inducible membrane protein kinase from *Deinococcus radiodurans* and its role in bacterial radioresistance and DNA strand break repair [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 77: 1470-82.
- [16] GUSEV O, NAKAHARA Y, VANYAGINA V, et al. Anhydrobiogenesis-associated nuclear DNA damage and repair in the sleeping

- chironomid: linkage with radioresistance [J]. PLoS One, 2010, 5: e14008.
- [17] 余韬, 吕飒丽, 李岩. 上皮间质转化及相关因子在胚胎形成和肿瘤发生发展中的作用[J]. 中华病理学杂志(YU T, LÜ S L, LI Y. The role of epithelial mesenchymal transformation and related factors in embryonic formation and tumorigenesis [J]. Chinese Journal of Pathology), 2017, 46 (3): 209-212.
- [18] SHINTANI Y, OKIMURA A, SATO K, et al. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity to chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer [J]. Ann Thorac Surg, 2011, 92(5): 1794-804.
- [19] WANG Z, LI Y, KONG D, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway [J]. Cancer Res, 2009, 69(6): 2400-7.
- [20] 姜燕慧, 游凯云, 毕卓菲, 等. 胰腺癌细胞sw1990放疗抵抗性与其发生上皮间质转化的关系[J]. 中华医学杂志(JIANG Y H, YOU K Y, BI Z F, et al. The relationship between the radioresistance of pancreatic cancer cell SW1990 and the induction of the epithelial-mesenchymal transition: an *in vitro* study [J]. Chinese Medical Journal), 2018, 98(12): 939-43.
- [21] ZANG C, LIU X, LI B, et al. IL-6/STAT3/TWIST inhibition reverses ionizing radiation-induced EMT and radioresistance in esophageal squamous carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(7): 11228-38.
- [22] OLMEDA D, MORENO-BUENO G, M FLORES J, et al. SNAIL1 is required for tumor growth and lymph node metastasis of human breast carcinoma MDA-MB-231 cells [J]. Cancer Res, 2007, 67: 11721-31.
- [23] MA J, GUO X, ZHANG J, et al. PTEN gene induces cell invasion and migration via regulating AKT/GSK-3 β / β -Catenin signaling pathway in human gastric cancer [J]. Dig Dis Sci, 2017, 62: 3415-25.
- [24] SHIMURA T, KAKUDA S, OCHIAI Y, et al. Targeting the AKT/GSK3 β /cyclin D1/Cdk4 survival signaling pathway for eradication of tumor radioresistance acquired by fractionated radiotherapy [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2011, 80(2): 540-8.
- [25] ZHANG H Y, WANG Z Q, LI Y Y, et al. Transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in human esophageal squamous cell carcinoma via the PTEN /PI3K signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2014, 32(5): 2134-42.