

# 沉默*DEPDC1*基因表达对鼻咽癌细胞系HNE-1 生长和细胞周期的影响

何龙霞<sup>1</sup> 糜燕<sup>1</sup> 张春冬<sup>2</sup> 张莹<sup>2</sup> 蔡伟<sup>2</sup> 王义涛<sup>2</sup> 卜友泉<sup>2</sup> 朱江<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科, 重庆 400016; <sup>2</sup>重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

**摘要** 为探讨沉默*DEPDC1*基因表达对鼻咽癌细胞系HNE-1生长和细胞周期的影响, 该实验设计合成靶向*DEPDC1*的小分子干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)转染人鼻咽癌HNE-1细胞。转染后, 采用荧光定量PCR、免疫印迹、MTT及流式细胞术方法检测细胞内*DEPDC1*的表达量以及细胞周期、生长增殖、凋亡的变化及其可能机制。结果显示, 转染*DEPDC1* siRNA后, *DEPDC1*基因在mRNA及蛋白水平的表达量明显降低; 大量细胞被阻滞于G<sub>2</sub>/M期, 生长增殖减慢, 凋亡增加。荧光定量PCR结果表明, 抑制NF-κB激活的*A20*基因表达量明显上调, 受NF-κB调控的肿瘤相关靶基因的表达量下降, 包括*C-MYC*、*MMP9*、*ICAM-1*、*BCL-2*基因。由此说明, 沉默*DEPDC1*基因可以影响HNE-1细胞的周期, 抑制其生长增殖, 促进凋亡, 其机制可能与抑制NF-κB通路有关。

**关键词** *DEPDC1*; 鼻咽癌; siRNA; 细胞周期; 生长; 凋亡

## The Effects of *DEPDC1* Depletion on Growth and Cell Cycle in Nasopharyngeal Carcinoma Cell Line HNE-1

He Longxia<sup>1</sup>, Mi Yan<sup>1</sup>, Zhang Chundong<sup>2</sup>, Zhang Ying<sup>2</sup>, Cai Wei<sup>2</sup>, Wang Yitao<sup>2</sup>, Bu Youquan<sup>2</sup>, Zhu Jiang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Otorhinolaryngology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; <sup>2</sup>Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**Abstract** To investigate the potential role of *DEPDC1* in nasopharyngeal carcinoma, the specific siRNAs against *DEPDC1* was designed, synthesized and transiently transfected into the nasopharyngeal carcinoma cell line HNE-1. The results of RT-PCR and Western blot clearly demonstrated that the expression of *DEPDC1* was efficiently inhibited at both mRNA and protein levels. FACS (fluorescence activated cell sorter), MTT and apoptosis assays demonstrated that *DEPDC1* depletion resulted into the G<sub>2</sub>/M arrest, growth retardation and apoptosis. In addition, results of RT-PCR showed that *DEPDC1* depletion caused the upregulation of *A20* gene, an inhibitor of NF-κB activation, and the downregulation of several NF-κB target genes such as *C-MYC*, *MMP9*, *ICAM-1* and *BCL-2*. Taken together, our results suggested that siRNA-mediated *DEPDC1* depletion caused cell cycle arrest, led to growth inhibition induced apoptosis in the nasopharyngeal carcinoma cell line HNE-1, which were possibly mediated by the inactivation of NF-κB pathway.

收稿日期: 2013-09-30 接受日期: 2013-12-17

国家临床重点专科建设项目经费基金卫办医政[2012]649号和重庆市卫生局重点项目(批准号: 2013-1-004)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 023-89012951, E-mail: zhujiang163mail@163.com

Received: September 30, 2013 Accepted: December 17, 2013

This work was supported by the National Key Clinical Specialties Construction Program of China (Grant No.[2012]649) and the Key Projects of Chongqing Health Authority (Grant No.2013-1-004)

\*Corresponding author. Tel: +86-23-89012951, E-mail: zhujiang163mail@163.com

网络出版时间: 2014-03-04 09:51 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.03.0319.html>

**Key words** *DEPDC1*; nasopharyngeal carcinoma; siRNA; cell cycle; growth; apoptosis

鼻咽癌是来源于鼻咽上皮细胞癌变的肿瘤<sup>[1]</sup>, 在东南亚和中国南部最常见, 这些地区每年大约有 50 000 例新增病例<sup>[2]</sup>。目前为止, 鼻咽癌的致病因素还不太清楚, 一般认为与EBV(Epstein-Barr virus)感染、环境因素和遗传易感性有关<sup>[1-3]</sup>。尽管临床治疗手段不断增多和更新, 5年生存率有所提高, 但是其主要的治疗方式仍然为放、化疗, 放、化疗带来的副作用在某些方面对患者来说是极大的伤害, 如放疗可能造成新肿瘤的发生, 化疗可导致骨髓抑制、感染增加等, 而且仍有部分鼻咽癌患者出现局部复发、甚至远处转移等问题, 总体来说, 患者的生存质量欠佳, 鼻咽癌的整体疗效仍需提高<sup>[4-5]</sup>。因此结合飞速发展的最新的肿瘤分子生物学, 探索一种新的更有效的治疗方法具有重要意义。

人源 *DEPDC1* (DEP domain containing 1) 基因位于染色体1p31.2, 全长约23 Kb, 在mRNA水平其有两个选择性剪接体, 分别含有12及11个外显子(第二个剪接体缺少第8个外显子), 对应编码的蛋白为DEPDC1-V1(93 kDa)和DEPDC1-V2(61 kDa), 均位于细胞核内。*DEPDC1* 基因可表达含有DEP结构域的蛋白, 据报道DEP(Dishevelled、EGL-10、Pleckstrin)结构域是由接近100个氨基酸组成的蛋白模序, 含有此结构域的蛋白能调节细胞的许多功能, 如细胞膜锚定、信号转导、细胞极性确立、小分子GTP酶活性的调节等<sup>[6-7]</sup>。此外, Kretschmer等<sup>[8]</sup>发现 *DEPDC1* 在乳腺癌中呈现过表达。Kanehira等<sup>[6]</sup>研究表明, *DEPDC1* 在膀胱癌中呈现过表达, 而在除睾丸以外的其他24种正常组织(如肺、卵巢、肾等)中未发现阳性表达。同时使用膀胱癌细胞系, 采用RNA干扰技术抑制 *DEPDC1* 的表达, 发现 *DEPDC1* 表达被抑制后, 膀胱癌细胞的生长增殖受到明显抑制, 导致大规模的细胞凋亡。

本实验以低分化的鼻咽癌鳞癌细胞系HNE-1为研究对象, 设计合成针对人 *DEPDC1* 基因的siRNA, 转染HNE-1细胞, 观察siRNA对 *DEPDC1* 基因的体外干扰效应及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验细胞和试剂

人鼻咽癌细胞系HNE-1为本实验室保存,

RPMI-1640培养基、胎牛血清、Lipofectamine RNAiMAX试剂购于Invitrogen公司; 总RNA提取试剂盒Total RNA Kit I购于Omega公司, 逆转录试剂盒PrimeScript RT reagent Kit、荧光定量PCR试剂盒SYBR Premix Ex Taq II均购于TaKaRa公司。细胞增殖检测试剂盒Cell Titer 96<sup>®</sup>Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay购于Promega公司。核蛋白-胞浆蛋白抽提试剂盒购于Thermo Fisher公司。蛋白酶抑制剂复合物购自Sigma公司, Immobilon<sup>™</sup>-P膜购自Millipore公司。阴性对照siRNA、*DEPDC1* siRNA购自上海吉玛制药技术有限公司。*DEPDC1* 抗体购自NOVUS公司, Histone H3抗体购自碧云天生物技术有限公司, HRP标记的二抗购自Cell Signaling Technology公司。

### 1.2 siRNA、引物序列及合成

*GAPDH*、*DEPDC1*、*A20*、*C-MYC*、*ICAM-1*、*MMP9*、*BCL-2*基因上下游引物均由上海生工生物工程公司合成。内参 *GAPDH* 基因上游引物: 5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3', 下游引物: 5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'; *DEPDC1* 基因上游引物: 5'-GGT GTG CCA TCC CTA GAA GA-3', 下游引物: 5'-CAT TGC TTC TTG GCC AAT TT-3'(上下游引物均可扩增 *DEPDC1* 基因的两个剪接体); *A20* 基因上游引物: 5'-ATG CAC CGA TAC ACA CTG GA-3', 下游引物: 5'-CAC AAG CTT CCG GAC TTC TC-3'; *C-MYC* 基因上游引物: 5'-TTC GGG TAG TGG AAA ACC AG-3', 下游引物: 5'-CAG CAG CTC GAA TTT CTT CC-3'; *ICAM-1* 基因上游引物: 5'-CAG AGG TTG AAC CCC ACA GT-3', 下游引物: 5'-CCT CTG GCT TCG TCA GAA TC-3'; *MMP9* 基因上游引物: 5'-TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG-3', 下游引物: 5'-TCA CGT CGT CCT TAT GCA AG -3'; *BCL-2* 基因上游引物: 5'-GGA TGC CTT TGT GGA ACT GT-3', 下游引物: 5'-AGC CTG CAG CTT TGT TTC AT-3'。

根据siRNA靶序列设计原则和方法, 设计针对 *DEPDC1* 基因的siRNA序列, 采用NCBI网站提供的BLAST检索, 确认所设计的siRNA序列的唯一性, 设计两条链, 正义链序列: 5'-GGA AGA UGU UGA AGA AGU UTT-3', 反义链序列: 5'-AAC UUC UUC

AAC AUC UUC CTT-3'。相同方法构建阴性对照组的无关干扰序列, 正义链序列: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'; 反义链序列: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3', 与任何编码序列无同源性, 提交上海吉玛制药技术有限公司合成。

### 1.3 细胞培养和瞬时转染

人鼻咽癌HNE-1细胞株常规培养于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中, 培养条件为温度37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 定期观察细胞生长情况, 每2~3 d用0.25%的胰酶消化, 进行传代培养。

取处于对数生长期的HNE-1细胞, 采用Lipofectamine RNAiMAX试剂, 将siRNA转染HNE-1细胞, 具体方法参见Lipofectamine RNAiMAX使用说明书。实验分组: 阴性对照组(Control siRNA组)和实验组(DEPDC1 siRNA组), 转染后72 h收集细胞, 提取细胞总RNA或蛋白等进行后续实验。

### 1.4 荧光定量PCR

**1.4.1 RNA提取** 参照OMEGA总RNA提取试剂盒说明书, 将经实验处理的细胞分别提取总RNA, 紫外分光光度计定量并计算 $D_{260}/D_{280}$ 比值。

**1.4.2 反转录** 采用TaKaRa公司的逆转录试剂盒PrimeScript RT reagent Kit进行反转录: 取5 μg总RNA, 依次加入2 μL 5×PrimeScript Buffer、0.5 μL Oligo dT Primer、0.5 μL Random 6 mers、0.5 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I, 最后加入RNase Free dH<sub>2</sub>O至总体积为10 μL。于PCR仪上采用37 °C 15 min, 85 °C 5 s的条件进行反应, cDNA产物稀释20倍用作PCR模板。

**1.4.3 PCR** 以GAPDH基因作为内参对照, 检测DEPDC1、A20、C-MYC、BCL-2、MMP9、ICAM-1基因的表达水平。参照TaKaRa公司的SYBR Premix Ex Taq II说明书, PCR反应体系为5 μL SYBR Premix Ex Taq II (2×)、0.4 μL PCR Forward Primer、0.4 μL PCR Reverse Primer, 稀释20倍的cDNA模板0.8 μL, 灭菌双蒸水补足至10 μL。扩增反应条件为: 95 °C预变性2 min, 然后用逐步程序95 °C 10 s、55 °C 15 s、72 °C 15 s完成40个循环。扩增结束后, PCR仪自动绘制熔解曲线, 判读产物的特异性。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组DEPDC1 mRNA的相对表达量, 循环阈值(CT, cycle threshold): 即PCR扩增反应过程中产物的荧光信号达到设定的阈值所经

过的循环数。

### 1.5 蛋白印迹(Western blot)

参照Thermo Fisher公司的核蛋白-胞浆蛋白抽提试剂盒说明书抽提核蛋白: 消化、离心收集细胞, 用1×PBS洗涤细胞2次, 依次加入胞浆和核蛋白裂解缓冲液, 先后抽提出胞浆蛋白和核蛋白, 采用BCA蛋白浓度测定法测定核蛋白浓度。取适量细胞核蛋白裂解液, 按照4:1的体积比, 混合蛋白样品和蛋白上样缓冲液(5×), 于100 °C加热5~10 min, 以使蛋白充分变性。采用浓度为10% SDS-PAGE进行蛋白质的分离, 然后采用恒流250 mA湿转至PVDF膜, 含5%脱脂奶粉的TBST封闭液于室温封闭2 h。TBST洗膜后加入适量一抗, 4 °C孵育过夜, 再加入适量二抗室温孵育, TBST洗膜。最后采用化学发光法检测DEPDC1-V1和DEPDC1-V2蛋白的表达情况, 以Histone H3作为内参蛋白。

### 1.6 流式细胞术分析细胞周期

采用流式细胞仪检测细胞周期, 步骤如下: 收集细胞及上清液, 适量PBS洗涤2次, 加入预冷的3 mL 70%乙醇重悬, 4 °C低温放置4 h以上或过夜。离心、收集细胞沉淀, PBS洗涤, 依次加入适量FACS缓冲液(1×PBS, 0.1% BSA, 0.01% NaN<sub>3</sub>)、Rnase(10 mg/mL)、碘化丙啶(1 mg/mL), 避光、室温静置15 min, 流式细胞仪分析。

### 1.7 细胞生长分析

采用Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay试剂盒检测DEPDC1基因表达抑制后对鼻咽癌细胞生长增殖的影响。方法如下: 将细胞转染siRNA并以适当密度接种于96孔板上, 分别在0, 24, 48, 72 h(每个观测点3个复孔)加入适量Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution, 细胞于培养箱中继续孵育2 h后, 酶标仪检测各组细胞的490 nm吸光度值, 以吸光度比值为纵坐标(各时间点吸光度平均值/0 h吸光度平均值, 用Fold Increase表示), 以时间点为横坐标绘制细胞生长曲线。

### 1.8 Annexin V-FITC/PI双标记法检测细胞凋亡

采用Annexin V-FITC/PI双标记法检测细胞凋亡, 步骤如下: 收集细胞及上清液, 适量PBS洗涤2次, 加入Annexin V-FITC结合缓冲液混匀, 室温孵育15 min, 离心, PBS洗涤细胞2次, 再用缓冲液重悬细胞, 碘化乙啶(PI)染色, 流式细胞仪分析, Annexin

V-FITC为绿色荧光, PI为红色荧光。

## 1.9 统计分析

实验结果采用SPSS 18.0统计软件分析, 组间数据差异分析采用配对样本 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 认为有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 siRNA转染HNE-1细胞后DEPDC1的表达情况

转染后72 h, 荧光定量PCR结果表明(图1A), 与Control siRNA组相比, DEPDC1 siRNA组DEPDC1基因在mRNA水平表达量明显降低, 抑制率达到80%左右, 差异显著( $P < 0.05$ )。Western blot也出现一致的结果, 与Control siRNA组相比, DEPDC1 siRNA组内参蛋白Histone H3无明显变化, 而DEPDC1-V1和DEPDC1-V2蛋白的表达量均降低(图1B)。由此说明本研究所用的DEPDC1 siRNA能够特异且有效地抑制鼻咽癌细胞系HNE-1内源性DEPDC1基因的表达。

### 2.2 DEPDC1表达抑制对细胞周期的影响

为分析沉默DEPDC1基因后对HNE-1细胞周期的影响, 转染72 h后, 同时收集各组细胞及细胞上清液, 采用流式细胞术分析细胞周期的变化, 结果显示(图2), DEPDC1 siRNA组中处于G<sub>2</sub>/M期细胞比Control siRNA组明显增多, 大约增加了13%, 由此提示DEPDC1基因沉默后, 导致大量的细胞停滞于G<sub>2</sub>/M期时相, 从而使细胞不能完成正常的有丝分裂。

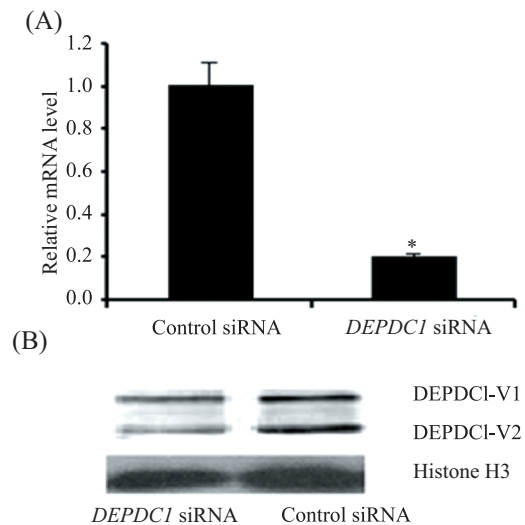
### 2.3 siRNA转染后细胞生长增殖变化情况

siRNA转染后, 在0, 24, 48, 72 h四个不同的时间点分别检测96孔板中各组细胞的生长增殖情况。与

Control siRNA组相比, DEPDC1 siRNA组细胞的生长增殖减慢, 在24 h即开始出现增殖抑制, 且随着时间的延长其抑制效应越发明显( $P < 0.05$ )。由此表明, 沉默DEPDC1基因可以减慢HNE-1细胞的增殖速率, 抑制其生长(图3)。

### 2.4 DEPDC1表达抑制对细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI双标记法检测细胞凋亡(右下角表示凋亡细胞), 结果显示(图4), DEPDC1基因表达抑制后鼻咽癌HNE-1细胞凋亡率增加, 由6.59%提高到11.68%, 与实验过程中观察转染72 h后, Control siRNA组中的细胞仍然保持正常贴壁、密集汇集合生长的特点, 而DEPDC1 siRNA组中许多细



A: 荧光定量PCR检测DEPDC1在mRNA水平的表达; B: Western blot检测DEPDC1在蛋白水平的表达。

A: determination of DEPDC1 mRNA level by Real-time PCR; B: determination of DEPDC1 protein level by Western blot.

图1 siRNA介导的DEPDC1表达抑制

Fig.1 siRNA-mediated DEPDC1 depletion

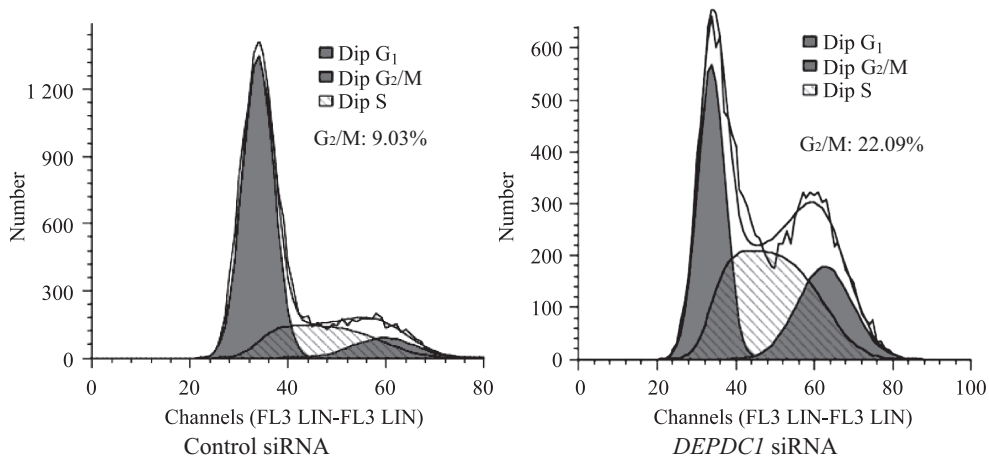


图2 DEPDC1沉默对细胞周期的影响

Fig.2 Influence of cell cycle with DEPDC1 RNAi

胞变圆脱离培养皿底壁, 成漂浮状态相一致(结果未示)。由此说明, 抑制DEPDC1基因可以促进鼻咽癌HNE-1细胞凋亡。

## 2.5 沉默DEPDC1基因后, NF- $\kappa$ B通路中相关分子的变化

siRNA转染72 h后, 提取各组细胞的总RNA, 采用荧光定量PCR检测相关分子的变化情况, 结果表明(图5,  $P < 0.05$ ), 抑制NF- $\kappa$ B激活的A20基因表达量明显上调, 受NF- $\kappa$ B调控的肿瘤相关靶基因的表达量下降, 包括C-MYC、BCL-2、MMP9、ICAM-1基因。由此推测, 沉默DEPDC1基因可能是通过抑制NF- $\kappa$ B通路来调节HNE-1细胞的增殖、凋亡。

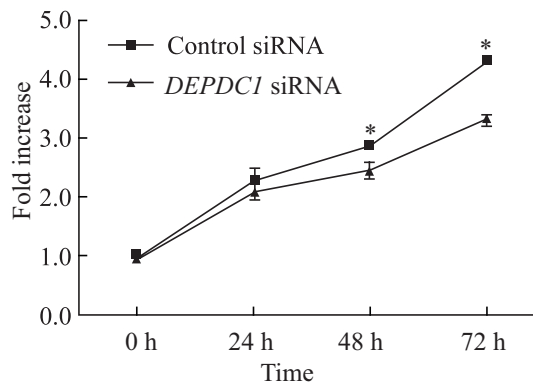


图3 DEPDC1沉默对HNE-1细胞生长的影响

Fig.3 Effect of DEPDC1 RNAi on HNE-1 cells growth

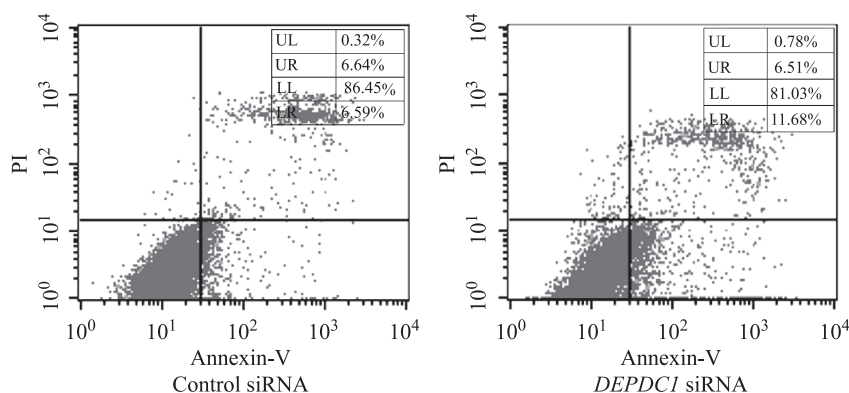


图4 DEPDC1沉默对HNE-1细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of DEPDC1 RNAi on HNE-1 cells apoptosis

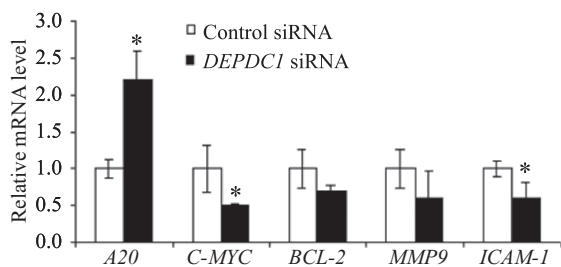


图5 沉默DEPDC1基因后NF- $\kappa$ B通路相关分子的表达

Fig.5 Effect of DEPDC1 RNAi on molecules in NF- $\kappa$ B pathway

## 3 讨论

鼻咽癌是头颈部最常见的肿瘤之一, 经相关研究表明, 鼻咽癌是多因素作用、多基因参与、经过多个阶段所导致的。在鼻咽癌的癌变过程中, 癌基因和抑癌基因的表达失调进而诱发的细胞生长失控, 凋亡减少在其发生发展中起着至关重要的作用。

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是向细胞中导入与内源性靶基因mRNA编码区同源的双链RNA, 使靶基因mRNA发生降解而导致基因表达沉

默。RNAi现象广泛存在于各种物种中, 与基因本身及转录并无任何关系, 属于转录后水平的基因沉默机制, 此方法具有特异性高、效果显著等特点, 被广泛用于基因功能分析、基因治疗、寻找信号转导通路的新途径等方面的研究<sup>[9]</sup>。July等<sup>[10]</sup>发现, 使用特异性的siRNA能够抑制Clusterin基因的过表达, 使肺癌细胞对化疗的敏感性增加。Fu等<sup>[11]</sup>研究表明, 作用于癌基因Bcl-2的siRNA能诱导Hela细胞的凋亡。

Obara等<sup>[12]</sup>采用DEPDC1基因的衍生多肽, 通过临床试验证实这些多肽可以引起膀胱癌患者体内特异性的细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)反应, 且未出现严重的副作用, 说明构建DEPDC1衍生多肽可能为膀胱癌治疗的新方法。Okayama等<sup>[13]</sup>研究表明, DEPDC1的高表达与非小细胞肺癌、膀胱癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、胶质瘤、黑色素瘤的预后成负相关, 其有可能作为多种肿瘤诊断和治疗的一个新靶点。Kanehira等<sup>[6]</sup>和Harada等<sup>[14]</sup>发现, DEPDC1蛋白通过与转录抑制蛋白ZNF224结合抑

制*A20*基因的表达,促进IKB- $\alpha$ 蛋白的磷酸化和降解,从而NF- $\kappa$ B与IKB- $\alpha$ 分离激活,向细胞核转位,并与其下游肿瘤相关靶基因的DNA位点结合,从而激活这些促进肿瘤发生发展的基因,导致细胞生长失控,发生膀胱癌,通过抑制*DEPDC1*的表达可以抑制膀胱癌细胞的生长,促进凋亡。由此表明,*DEPDC1*不仅参与肿瘤的发生发展,而且也是一个新的潜在的肿瘤治疗靶点。

结合临床鼻咽癌以低分化鳞癌多见的情况,我们选择低分化的鳞癌细胞株HNE-1作为实验细胞,采用RNA干扰技术探讨沉默*DEPDC1*基因后对鼻咽癌的影响及其可能的机制。

我们设计针对*DEPDC1*的靶向siRNA,通过高效的Lipofectamine RNAiMAX试剂介导其转染入HNE-1细胞,转染72 h后,荧光定量PCR及Western blot检测,两者结果均表明,*DEPDC1*基因在mRNA及蛋白水平都被明显抑制,说明我们设计的*DEPDC1* siRNA是有效的。在此基础上,我们采用流式细胞术检测细胞的周期变化,结果表明*DEPDC1*的表达被抑制后,大量HNE-1细胞停滞于G<sub>2</sub>/M期,细胞不能顺利完成正常的有丝分裂。同时我们采用MTT及Annexin V-FITC/PI双标记法检测细胞的增殖和凋亡,结果显示细胞的生长受到显著抑制,凋亡明显增加。为进一步探讨其可能的机制,我们采用荧光定量PCR检测*DEPDC1*基因沉默72 h后相关细胞因子的变化情况,结果显示NF- $\kappa$ B通路中与肿瘤相关的多个细胞分子出现了变化。据报道,*A20*基因可通过泛素化及脱泛素化双重作用抑制NF- $\kappa$ B激活,从而可能达到抑制肿瘤的作用<sup>[15]</sup>。本实验中PCR结果提示沉默*DEPDC1*基因后,*A20*基因的表达量明显上调,从而我们推测上调的*A20*可能会抑制NF- $\kappa$ B的激活。为进一步证明,NF- $\kappa$ B的激活受抑制,我们进一步检测下游受NF- $\kappa$ B调控的相关分子的表达情况,包括*C-MYC*、*BCL-2*、*MMP9*、*ICAM-1*<sup>[16-19]</sup>,荧光定量PCR结果显示,以上多个基因的表达量均下降。而以上多个基因均与肿瘤细胞的增殖生长、凋亡相关。已有研究发现,*C-MYC*基因连续表达于细胞各个时期,其表达异常导致了一系列的肿瘤,通过抑制其表达,可以使食管癌细胞、乳腺癌细胞的生长减慢,凋亡增加<sup>[20-22]</sup>。*BCL-2*首先在恶性的非霍奇金淋巴瘤中发现,可通过阻止染色体的浓缩及DNA降解等抑制细胞凋亡<sup>[23]</sup>。基质金属蛋

白酶9(matrix metalloproteinases 9, MMP9),可以降解基膜和细胞间介质从而促进肿瘤细胞的迁移侵袭,而近来已有研究发现,肿瘤细胞过度分泌的MMP9可以为癌细胞的增殖创造良好的微环境,从而促进肿瘤的生长<sup>[24]</sup>。Liu等<sup>[25]</sup>发现,细胞间黏附分子*ICAM-1*是肝癌细胞的标志物,通过抑制其表达,可减慢肝癌在裸鼠体内的形成和转移。由此可知,通过抑制*DEPDC1*基因,可抑制NF- $\kappa$ B激活,从而抑制受NF- $\kappa$ B调控的肿瘤相关基因,进而抑制鼻咽癌细胞的生长增殖、促进凋亡,此研究结果和Kanehira等<sup>[6]</sup>和Harada等<sup>[14]</sup>的研究发现一致。同时我们推测HNE-1细胞周期阻滞于G<sub>2</sub>/M期也可能与NF- $\kappa$ B通路受抑制有关。虽然,许多报道称NF- $\kappa$ B主要与细胞周期G<sub>1</sub>/S相关,但近来已有相关研究表明,NF- $\kappa$ B与细胞周期G<sub>2</sub>/M相关。其中,Wong等<sup>[26]</sup>发现,采用药物DHMEQ直接抑制NF- $\kappa$ B激活,可以导致鼻咽癌细胞HNE-1及HK-1的细胞周期阻滞在G<sub>2</sub>/M期。Cude等<sup>[27]</sup>研究表明,NF- $\kappa$ B通过有丝分裂原活化蛋白激酶ERK5调节细胞周期G<sub>2</sub>/M期。Ozeki等<sup>[28]</sup>研究表明,NF- $\kappa$ B与*CCNBI*基因的内含子结合,从而调节G<sub>2</sub>/M期。但本实验中NF- $\kappa$ B是通过何种机制参与到鼻咽癌HNE-1细胞G<sub>2</sub>/M期的调节,仍需进一步研究。综上所述,我们推测沉默*DEPDC1*基因后,鼻咽癌HNE-1细胞呈现细胞周期停滞、生长抑制、凋亡增加,其机制可能与NF- $\kappa$ B通路受抑制有关。

尽管我们已经对*DEPDC1*基因在低分化的鼻咽癌HNE-1细胞中的作用有了初步认识,但仍需在其他鼻咽癌细胞中进行扩大研究,如高分化的鼻咽癌细胞HK-1、CNE-1等,以便更深入地了解*DEPDC1*基因在鼻咽癌中的作用及其可能的分子机制,为临床鼻咽癌的治疗提供坚实的理论依据和实验基础。

## 参考文献 (References)

- 1 Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma. Lancet 2005; 365(9476): 2041-54.
- 2 Lo KW, To KF, and Huang DP. Focus on nasopharyngeal carcinoma. Cancer Cell 2004; 5(5): 423-8.
- 3 Lo KW, Chung GT, To KF. Deciphering the molecular genetic basis of NPC through molecular, cytogenetic, and epigenetic approaches. Semin Cancer Biol 2012; 22(2): 79-86.
- 4 Hughes J, Alusi G, Wang Y. Gene therapy and nasopharyngeal carcinoma. Rhinology 2012; 50(2): 115-21.
- 5 Xu Y, Li P, Zhang X, Wang J, Gu D, Wang Y. Prognostic implication of neuropilin-1 upregulation in human nasopharyngeal carcinoma. Diagn Pathol 2013; 8: 155.

- 6 Kanehira M, Harada Y, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, *et al.* Involvement of upregulation of *DEPDC1* (DEP domain containing 1) in bladder carcinogenesis. *Oncogene* 2007; 26(44): 6448-55.
- 7 王晓江, 廖之君, 林德馨. DEP结构域的功能研究进展. 医学综述(Wang Xiaojiang, Liao Zhijun, Lin Dexin. The advancement of DEP domain function. *Medical Recapitulate*) 2011; 17(12): 1772-4.
- 8 Kretschmer C, Sterner-Kock A, Siedentopf F, Schoenegg W, Schlag PM, Kemmner W. Identification of early molecular markers for breast cancer. *Mol Cancer* 2011; 10(1): 15.
- 9 宋方洲. 基因组学. 北京: 军事医学科学出版社, 2011, 262-85.
- 10 July LV, Beraldi E, So A, Fazli L, Evans K, English JC, *et al.* Nucleotide-based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(3): 223-32.
- 11 Fu GF, Lin XH, Han QW, Fan YR, Xu YF, Guo D, *et al.* RNA interference remarkably suppresses bcl-2 gene expression in cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(8): 822-9.
- 12 Obara W, Ohsawa R, Kanehira M, Takata R, Tsunoda T, Yoshida K, *et al.* Cancer peptide vaccine therapy developed from oncoantigens identified through genome-wide expression profile analysis for bladder cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2012; 42(7): 591-600.
- 13 Okayama H, Kohno T, Ishii Y, Shimada Y, Shiraishi K, Lwakawa R, *et al.* Identification of genes upregulated in ALK-positive and EGFR/KRAS/ALK-negative lung adenocarcinomas. *Cancer Res* 2012; 72(1): 100-11.
- 14 Harada Y, Kanehira M, Fujisawa Y, Takata R, Shuin T, Miki T, *et al.* Cell-permeable peptide DEPDC1-ZNF224 interferes with transcriptional repression and oncogenicity in bladder cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70(14): 5829-39.
- 15 Heyninck K, Beyaert R. *A20* inhibits NF- $\kappa$ B activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci* 2005; 30(1): 1-4.
- 16 Duyao MP, Buckler AJ, Sonenshein GE. Interaction of an NF-KB-like factor with a site upstream of the c-myc promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(12): 4727-31.
- 17 Bond M, Fabunmi RP, Baker AH, Newby AC. Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokines: An absolute requirement for transcription factor NF- $\kappa$ B. *FEBS Lett* 1998; 435(1): 29-34.
- 18 van de Stolpe A, Caldenhoven E, Stade BG, Koenderman L, Raaijmakers JA, Johnson JP, *et al.* 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and tumor necrosis factor alpha-mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone. Functional analysis of the human intercellular adhesion molecular-1 promoter. *J Biol Chem* 1994; 269(8): 6185-92.
- 19 Chou J, Lin YC, Kim J, You L, Xu Z, He B, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma-review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head Neck* 2008; 30(7): 946-63.
- 20 Sumitani K, Kamijo R, Nagumo M. Cytotoxic effect of sodium nitroprusside on cancer cells: Involvement of apoptosis and suppression of c-myc and c-myc proto-oncogene expression. *Anticancer Res* 1997; 17(2A): 865-71.
- 21 Zhao X, Wang X, Zhou C, Peng R, Yan S, Wu M. Abrupt reduction of c-myc expression by antisense RNA inducing terminal differentiation and apoptosis of a human esophageal cancer cell line. *Sci China B* 1995; 38(5): 580-9.
- 22 Fornari FA Jr, Jarvis WD, Grant S, Orr MS, Randolph JK, White FK, *et al.* Induction of differentiation and growth arrest associated with nascent (nonoligosomal) DNA fragmentation and reduced c-myc expression in MCF-7 human breast tumor cells after continuous exposure to a sub-lethal concentration of doxorubicin. *Cell Growth Differ* 1994; 5(7): 723-33.
- 23 Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124(1/2): 1-6.
- 24 Zou L, Yang R, Chai J, Pei G. Rapid xenograft tumor progression in beta-arrestin1 transgenic mice due to enhanced tumor angiogenesis. *FASEB J* 2008; 22(2): 355-64.
- 25 Liu S, Li N, Yu X, Xiao X, Cheng K, Hu J, *et al.* Expression of intercellular adhesion molecule 1 by hepatocellular carcinoma stem cells and circulating tumor cells. *Gastroenterology* 2013; 144(5): 1031-41.
- 26 Wong JH, Lui VW, Umezawa K, Ho Y, Wong EY, Ng MH, *et al.* A small molecule inhibitor of NF- $\kappa$ B, dehydroxymethylepoxyquinomycin(DHMEQ), suppresses growth and invasion of nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells. *Cancer Lett* 2010; 287(1): 23-32.
- 27 Cude K, Wang Y, Choi HJ, Hsuan SL, Zhang H, Wang CY, *et al.* Regulation of the G<sub>2</sub>-M cell cycle progression by the ERK5-NF $\kappa$ B signaling pathway. *J Cell Biol* 2007; 177(2): 253-64.
- 28 Ozeki M, Tamae D, Hou DX, Wang T, Lebon T, Spitz DR, *et al.* Response of cyclin B1 to ionizing radiation: Regulation by NF- $\kappa$ B and mitochondrial antioxidant enzyme MnSOD. *Anticancer Res* 2004; 24(5A): 2657-63.