

双向调控 FAT10 表达对人宫颈癌 SiHa 细胞裸鼠移植瘤放射敏感度的影响

钱林华

摘 要 **目的** 经过临床病理学标本检测人宫颈癌组织 FAT10 蛋白异常高表达后,探讨上调和下调 FAT10 基因表达对宫颈癌细胞株 SiHa 细胞裸鼠移植瘤放射敏感性的影响。**方法** 采用 RT-PCR 法检测 30 例宫颈癌及癌旁组织中 FAT10 mRNA 的表达水平,FAT10 蛋白在人宫颈癌组织中的相对表达水平明显高于癌旁组织,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。通过电穿孔法分别将 FAT10 siRNA 和重组表达载体 pcDNA3.1-FAT10 转染宫颈癌 SiHa 细胞后,G418 筛选得到稳定转染细胞系。转染 48h 后,荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 法分别检测细胞中 FAT10 mRNA 和 FAT10 蛋白表达水平;CCK-8 检测细胞增殖,克隆形成实验观察上调和下调 FAT10 表达对宫颈癌细胞株 SiHa 的放射敏感度的影响;TUNEL 法检测细胞凋亡影响;裸鼠移植瘤实验检测上调和下调 FAT10 表达联合 X 线照射对宫颈癌细胞的生长抑制作用。**结果** FAT10 蛋白在人宫颈癌组织中的相对表达水平明显高于癌旁组织,且差异有统计学意义($P < 0.05$),FAT10 下调组宫颈癌 SiHa 细胞内 FAT10 基因表达明显降低,FAT10 上调组明显升高。FAT10 下调组宫颈癌 SiHa 细胞放射敏感度升高,FAT10 上调组宫颈癌 SiHa 细胞放射敏感度降低($P < 0.05$)。FAT10 下调组宫颈癌 SiHa 细胞增殖被抑制,细胞凋亡率增加($P < 0.05$);FAT10 上调组 SiHa 细胞增殖能力明显增强,细胞凋亡率降低($P < 0.05$),FAT10 下调组裸鼠移植瘤平均体积明显小于对照组($P < 0.05$);FAT10 上调组的瘤体平均体积大于对照组($P < 0.05$)。20Gy γ 射线照射后 FAT10 下调组瘤体平均体积较照射前明显减小($P < 0.05$);而上调组裸鼠皮下种植瘤平均体积较照射前无明显变化($P > 0.05$)。**结论** 下调 FAT10 表达能抑制人宫颈癌 SiHa 细胞裸鼠移植瘤的生长,增强瘤体的放射敏感度,上调 FAT10 表达则使肿瘤辐射抗拒。

关键词 宫颈癌 SiHa 细胞 FAT10 移植瘤 裸鼠

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.07.025

Effect of FAT10 Expression on the Radiation Sensitivity of Human Cervical Carcinoma SiHa Cells in Nude Mice. Qian Linhua. Department of Gynecology, Women's Hospital, Zhejiang University, Zhejiang 310000, China

Abstract Objective After the detection of FAT10 protein in human cervical cancer tissue behind clinical pathological examination, investigate the effect of up regulation and down regulating the expression of FAT10 gene on the radiation sensitivity of cervical cancer cell line SiHa cells in nude mice. **Methods** The expression levels of FAT10 mRNA in 30 cases cervical cancer and adjacent tissues were detected by RT-PCR, FAT10 siRNA and recombinant expression vector pcDNA3.1-FAT10 were respectively transfected into cervical cancer SiHa cells by electroporation, and stable transfection cell lines was obtained by G418 screening. After transfection 48h, the expression levels of FAT10 mRNA and protein were respectively detected by fluorescence quantitative RT-PCR and Western blot. Cell proliferation was detected with CCK-8. The effect of FAT10 expression on the radiation sensitivity of cervical cancer cell SiHa line was observed by the clonogenic experiment. The cell apoptosis was detected by TUNEL. The growth of cervical cancer cells was detected by Xenograft tumor assay combined with X-ray irradiation. **Results** The relative expression level of FAT10 protein in human cervical cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). The expression of FAT10 gene in cervical cancer SiHa cells was significantly lower in FAT10 down group, and the FAT10 up regulation group was significantly higher. The radiation sensitivity of cervical cancer SiHa cells was increased in the FAT10 down group, and the radiation sensitivity of SiHa cells was decreased in the FAT10 up regulation group ($P < 0.05$). FAT10 down group of cervical cancer SiHa cell proliferation was inhibited, the cell apoptosis rate was increased ($P < 0.05$). The proliferation ability of FAT10 cells was significantly enhanced, and the cell apoptosis rate was decreased in the FAT10 up regulation group ($P < 0.05$). The average volume of transplanted tumor in the FAT10 down group was significantly smaller than that of the control group ($P < 0.05$); the average volume of the tumor in the FAT10 up regulation group was larger than that of the control group ($P < 0.05$). The average volume of the tumor was significantly decreased in the FAT10 down group after irradiation of 20Gy gamma ray($P < 0.05$), and the average volume of subcutaneous implanted tumor in nude mice was

not significantly different ($P > 0.05$). **Conclusion** Downregulation of FAT10 expression can inhibit the growth of human cervical cancer SiHa cells in nude mice, enhance the radiation sensitivity of tumor cells, up regulation of FAT10 expression will make tumor radiation resistance.

Key words Cervical cancer; SiHa cell; FAT10; Transplanted tumor; Nude mice

宫颈癌位居女性肿瘤疾病的第2位,且近年来呈年轻化态势,对女性的健康造成严重的威胁^[1-3]。目前,对于该病主要有手术、化疗和放疗等治疗手段,其中疾病的早期主要采用手术进行治疗,中晚期阶段以放疗及化疗为主,而局部的晚期患者则主要采用放疗^[4-10]。放疗的疗效主要由放射敏感度来决定,不同类型的肿瘤以及组织器官在接受照射后会出现不同的反应程度^[11]。对于肿瘤细胞而言,其病理类型及不同的增殖阶段均影响放射敏感度,即增殖活跃、分化程度低的细胞放射敏感度更好,反之越差。此外,肿瘤细胞的含氧量亦能够产生直接影响,例如,肿瘤早期体积小、血运好、乏氧细胞少时,疗效好,而随着疾病的进展,到达晚期阶段,肿瘤体积增大、血运差,甚至出现坏死时,则敏感度降低。

FAT10为凋亡抑制蛋白家族的新成员,在健康成人的组织以及器官中可检测到其表达,此外,其在几种传代细胞系中亦可被检测到^[12,13]。已有研究显示,FAT10能够利用蛋白酶使底物蛋白进行快速的降解^[14,15]。其功能还涉及蛋白移位、细胞程序性死亡、信号转导及细胞周期调节等多个方面^[16-18]。近年来研究发现,FAT10与肝癌的发生有密切联系,大约90%的肝癌中能检测到其过表达,而在邻近的组织中无论是在基因转录还是蛋白表达水平均检测不到^[19]。还有研究发现,FAT10在80%以上的乳腺癌、乳头状甲状腺癌、结肠癌等多种肿瘤中会发生高表达^[20-23]。目前,关于FAT10和宫颈癌的关系的尚不明确。因此,本研究通过电转染FAT10 siRNA和pcDNA3.1-FAT10至人宫颈癌SiHa细胞,研究其表达情况的变化与癌症发生的关系,为该病的预防和治疗提供新思路。

材料与方法

1. 实验细胞及组织:宫颈癌组织均来自笔者医院妇产科2015年4月~2016年6月收治住院并接受手术的切除的新鲜标本,且所有患者术前均未接受化疗或者放疗。立即将每例癌组织及周围正常组织(癌缘5cm)放于液氮中保存备用。所有病例均行病理证实,病理类型均为宫颈鳞状细胞癌。其中I B2期14例、II A期16例。参加该研究的患者均知情同意并

签字,该研究通过笔者医院伦理委员会批准。

2. 主要材料及来源:实验动物: BALB/c 裸小鼠由浙江省实验动物中心提供。实验动物使用许可证号: SCXK(浙)2008-0118, 21只,雌性未孕,成熟健康,鼠龄5~8周,体质量18~25g, SPF级,在温州医科大学动物实验中心屏障系统内饲养。所有进入屏障系统的饲料、水、空气、铺垫及各种用品均经过高温高压等灭菌处理;所有进入实验室的人、动物均需经过严格的微生物控制。材料及来源: 1%青霉素及链霉素的MEM培养液(美国HyClone公司); Super ECL Plus超敏发光液、PVDF膜(美国Millipore公司); RIPA细胞裂解液、山羊抗兔二抗(碧云天公司); RNAiso Plus总RNA提取试剂、5×PrimeScrip RT Master Mix、SYBR Green(日本TaKaRa公司)。PMI 1640培养基、胎牛血清和胰酶(美国Gibco公司); Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司); 反转录试剂盒FSQ-101(日本Toyobo公司); DMEM培养基和胎牛血清(美国Hyclone公司); FAT10 siRNA, FAT10抗体(美国Santa Cruz公司); TUNEL试剂盒(瑞士Roche公司); DAB显色试剂盒(中杉金桥公司); 直线加速器(美国Varian公司)。

3. RT-PCR、Western blot法检测30例宫颈癌及癌旁组织中FAT10 mRNA与蛋白的表达: (1) RT-PCR检测宫颈癌及癌旁组织中FAT10 mRNA的表达: 于子宫颈癌及癌旁的正常黏膜处各取100mg组织,将其放入液氮中进行研磨,直至呈粉末状,向其中添加Trizol裂解液1ml,静置10min,依据Trizol说明书对总RNA进行提取。依据所用反转录试剂盒说明书将得到的总RNA进行反转录合成cDNA。RT-PCR反应体系: 1μl反转录的cDNA(终浓度为5mg), 0.5μmol/L上游引物, 10μl 2×SYBR Premix Ex TaqTM II Mix, 0.5μmol/L下游引物, 8μl DEPC H₂O, 总体积20μl。FAT10-F: 5'-CAATGCTTCCTGCCTCTGTG-3'; FAT10-R: 5'-TGCCTCTTTGCTCATCACC-3'。反应条件: 95℃ 30s, 95℃ 5s, 60℃ 15s, 72℃ 20s连续操作35次。内参选用GAPDH, GAPDH-F: 5'-CGCCTGGTCACCAGGGCTG-3'; GAPDH-R: 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTG-3'。对

结果的分析应用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。(2) Western blot 法检测宫颈癌及癌旁组织中 FAT10 蛋白的表达:对宫颈癌及癌旁的正常黏膜组织中的总蛋白参照说明书进行提取,对蛋白样品依据 BCA 蛋白浓度检测法进行定量。清洗玻璃板,进行灌胶上样,并进行电泳,将蛋白采用印迹法取 50 μ g 总蛋白于 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳。取纤维膜用半干式电印迹将蛋白进行转膜,37 $^{\circ}$ C 温育 2h,加入一抗后过夜,次日洗膜后加入二抗,再次进行上述温育及洗膜处理,用显色剂进行显色。重复以上操作步骤 3 次。用 Quantity one 处理系统进行结果的处理。

4. 人宫颈癌 SiHa 细胞体外培养建立实验模型及实验分组:(1)体外培养建立实验模型:配制含 1% 青霉素及链霉素的 MEM 培养液,将其添加到宫颈癌 SiHa 细胞中,随后放在培养箱中,隔天对培养液进行替换。对其进行观察,将对数生长期的细胞在下面各实验中使用。(2)实验分组:依据 FAT10 siRNA 和 pcDNA3.1-FAT10 转染与否,将细胞分为对照组、FAT10 下调组(转染 FAT10 siRNA)、FAT10 上调组(转染 pcDNA3.1-FAT10)。

5. 采用电穿孔法进行基因转染并筛选细胞:(1)基因转染:将人宫颈癌 SiHa 细胞培养 24h。将对数生长期的细胞,调整为单细胞悬液,PBS 进行冲洗后,胰酶进行消化,离心,完毕后对细胞进行收集。添加电穿孔缓冲液使其重悬,再次进行离心、静置、冲洗。再次离心,添加到电转液中使其重悬,将得到的悬液置于电击杯内,添加质粒 DNA 20 μ g,轻轻混匀,放于冰上 30min,毕后行电穿孔,其中电穿孔参数设置为 0.9ms、350V/cm、25 μ F。将转染后的 SiHa 细胞在室温中放置 30min,随后移植入高糖型 DMEM 培养液中,放在培养箱中进行培养。(2)G418 筛选细胞系:对细胞进行观察,待融合至 85% 时,将所含旧培养基清除,PBS 进行冲洗,向其中添加胰酶消化,随后将其放于光学显微镜下观察;当细胞体积发生变化时使消化终止;按照 1:3 的比例将细胞传代至 96 孔培养板中,随后将其放在 37 $^{\circ}$ C 条件下继续培养,并添加 1mg/ml 的 G418 连续 10~15 天进行加压筛选,之后对单克隆细胞株进行挑选并扩大培养,并进行保种传代后的细胞。

6. 转染 48h 后,荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 法检测 FAT10 mRNA 和蛋白的表达:应用荧光定量 RT-PCR 检测转染后 FAT10 mRNA 的表达情况。对各组细胞总 RNA 进行收集。随后进行反转录。于

人宫颈癌及癌旁的正常黏膜处各取 100mg 组织,将其放入液氮中进行研磨,直至呈粉末状,向其中添加 Trizol 裂解液 1ml,静置 10min,依据 Trizol 说明书对总 RNA 进行提取。依据所用反转录试剂盒说明书将得到的总 RAN 进行反转录合成 cDNA。转染 48h 后 FAT10 蛋白的表达情况采用 Western blot 法进行测定。对宫颈癌及癌旁的正常黏膜组织中的总蛋白参照说明书进行提取,对蛋白样品依据 BCA 蛋白浓度检测法进行定量。清洗玻璃板,进行灌胶上样,并进行电泳,将蛋白采用印迹法取 50 μ g 总蛋白于 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳。对各组细胞中的总蛋白进行收集,并检测。

7. CCK8 试剂盒检测细胞的增殖:将各组宫颈癌细胞进行收集并接种到培养板中,4 $\times 10^3$ 个/孔,随后继续培养 48h。设置复孔 3 个,按 20 微升/孔的标准加入 CCK-8 溶液,随后继续进行培养。1h 后应用酶标仪对其进行检测,记录读数。由于再添加 CCK-8 时可能在枪头上沾染而造成误差,因此可以先将 CCK-8 进行稀释后再进行加样。

8. 克隆形成实验观察上调和下调 FAT10 表达对宫颈癌细胞株 SiHa 的放射敏感度:对转染后的各组细胞进行观察,当处于对数生长期时,给予 X 线进行照射,随后消化,计数,并按照每 200 个接种到一个培养皿中。每种处理均设 3 个重复样。于培养箱中放置 14 天。去除旧培养基,甲醛固定,吉姆萨染色 10min,放在显微镜下进行观察,对 >50 个的细胞克隆进行记录。依据克隆形成实验得到的细胞存活分数拟合细胞存活曲线,并对放射增敏比(SER)进行计算。照射方法:将转染处理 48h 后的细胞,应用直线加速器 6MV X 线进行照射,皮源距设 100cm,剂量分别为 0、2、4、6、8、10Gy,之后更换新的培养基进行培养。

9. TUNEL 法检测细胞凋亡的影响:将从各组收集的细胞进行爬片,向其中添加 TUNEL 反应液 50 μ l,将其放在培养箱中进行避光温育 1h,取出向其添加 Converter-POD 50 μ l,再次进行温育,同样避光条件。用 DAB 对其进行显色,用显微镜进行观察以掌握反应时间,用苏木素对其染色。将镜头调至 $\times 200$ 的高倍镜视野,再此条件下选取视野 10 个,对每个视野内的细胞进行计数,共 200 个,计算其凋亡数,并计算出平均值。最后进行 AI 的计算。

10. 检测上调和下调 FAT10 表达联合 X 线照射对宫颈癌细胞的生长抑制作用:建立裸鼠移植瘤模

型:将 21 只裸小鼠随机平分为对照组、FAT10 上调组和下调组,于小鼠的颈部皮下注入 0.2ml 各组稳定转染的 SiHa 细胞悬液。次日对小鼠的成瘤状况进行比较,15 天后测定肿瘤的长短径。裸鼠照射:接种 3 周后开始对各组小鼠进行照射。应用专用固定架对小鼠的头部及四肢进行固定,应用上述 6MV X 线,皮源距(SSD)为 100cm,照射野为 2cm × 2cm,吸收剂量率 200cGy/min,2Gy/次,1 次/天,5 次/周,总剂量 20Gy。进行肿瘤放疗反应的观察:各组小鼠接受上述放疗期间,隔天观察其效果。结束后的 3 天将小鼠处死,分离肿瘤,进行称重,计算抑瘤率及瘤体体积^[23]。

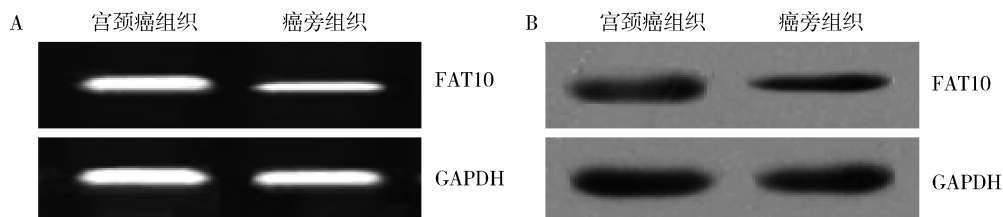


图 1 人宫颈癌组织和癌旁组织中 FAT10m RNA 与蛋白的表达

A. RT-PCR 检测 FAT10 mRNA 表达水平;B. Western blot 法检测 FAT10 蛋白表达水平

2. 转染 48h 后, FAT10 mRNA 和蛋白的表达:采用不同的干预方法处理后,与对照组比较,对两组细胞进行观察显示, FAT10 下调组较 FAT10 上调组 mRNA 和蛋白表达都明显下降 ($P < 0.05$)。提示采

11. 统计学方法:应用 SPSS 19.0 软件包对数据进行统计分析,所有数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组定量数据的比较采用两独立样本 t 检验,3 组间定量资料的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1.30 例宫颈癌及癌旁组织中 FAT10 mRNA 与蛋白的表达:采用 RT-PCR 及 Western blot 法测定 FAT10 mRNA 及蛋白表达水平:与癌旁组织相比,人宫颈癌组织中 FAT10 的表达量显著升高,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

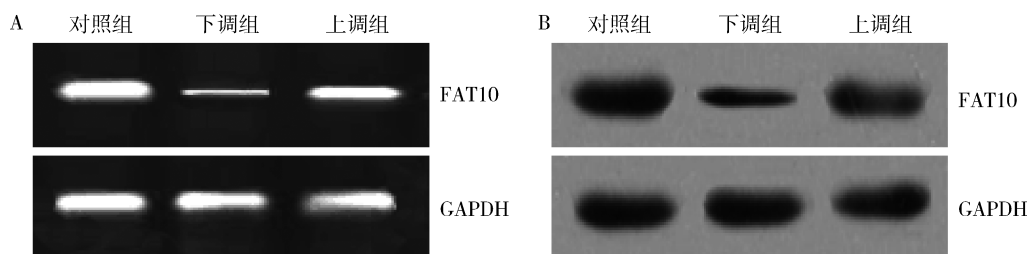


图 2 RT-PCR 及 Western blot 法检测转染后 FAT10 mRNA 和蛋白表达情况

A. RT-PCR 检测 FAT10 mRNA 表达水平;B. Western blot 法检测 FAT10 蛋白表达水平

3. 细胞的增殖:应用 CCK-8 法对各组细胞增殖能力进行测定,分别对转染 48、72、96、120h 进行测定,结果显示,72、96、120h FAT10 下调组宫颈癌细胞的增殖能力较转染前明显降低 ($P < 0.05$); FAT10 上调组转染 pcDNA3.1-FAT10 后,增殖能力明显升高。由此推算,基因沉默 FAT10 可以使人宫颈癌细胞的增殖活性受抑制,而促进 FAT10 则可以提升其活性,详见表 1 和图 3。

用 siRNA 干扰技术沉默 FAT10,可以减少 FAT10 mRNA 和蛋白的表达,上调 FAT10 时则表达增加,详见图 2。

表 1 各组细胞增殖率的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	48h	72h	96h	120h
对照组	0.71 ± 0.07	1.34 ± 0.41	1.67 ± 0.39	1.98 ± 0.22
FAT10 下调组	0.70 ± 0.22	1.15 ± 0.29*	1.36 ± 0.28*	1.60 ± 0.26*
FAT10 上调组	0.72 ± 0.17	1.78 ± 0.32*	2.49 ± 0.37*	2.93 ± 0.39*

与对照组比较, * $P < 0.05$

4. 宫颈癌细胞株 SiHa 的放射敏感度:当给予 2Gy 照射时,各组之间克隆形成率差异无统计学意义

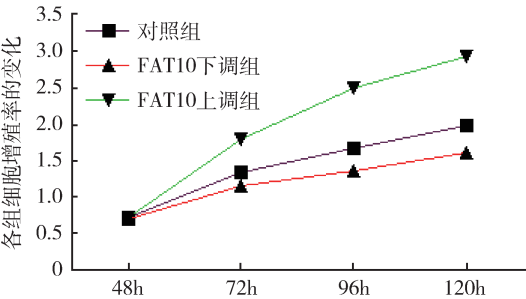


图 3 各组转染前后增殖率的变化

($P > 0.05$);随着照射剂量的增加,2 组之间的差异逐渐增大,表现为 FAT10 下调组的克隆形成率较上调组降低,且放射敏感度高($P < 0.05$,表 2、图 4)。FAT10 下调组宫颈癌 SiHa 细胞放射敏感度升高,FAT10 上调组宫颈癌 SiHa 细胞放射敏感度降低($P < 0.05$)。这提示,下调 FAT10 表达能增强 SiHa 细胞的放射敏

表 2 宫颈癌细胞株 SiHa 的放射敏感性 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	D0	N 值	SF2
对照组	0.56 ± 0.16	1.44 ± 0.19	0.75 ± 0.22
FAT10 下调组	$0.42 \pm 0.18^*$	$1.06 \pm 0.20^*$	$0.54 \pm 0.20^*$
FAT10 上调组	$0.64 \pm 0.17^*$	$2.72 \pm 0.33^*$	$1.07 \pm 0.26^*$

与对照组比较,* $P < 0.05$

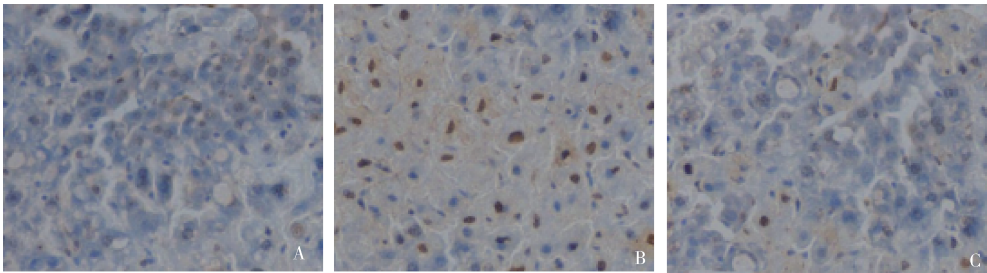


图 5 TUNEL 法染色细胞凋亡图($\times 200$)

A. 对照组;B. FAT10 下调组;C. FAT10 上调组

6. X 线照射对宫颈癌细胞的作用:如表 3、图 6 所示,FAT10 下调组裸鼠移植瘤平均体积明显小于对照组($P < 0.05$);FAT10 上调组的瘤体平均体积大于

表 3 X 线照射对宫颈癌细胞的作用 ($\bar{x} \pm s$)		
组别	照射前移植瘤	20Gy γ 射线照射
	体积(cm^3)	后移植瘤体积(cm^3)
对照组	4.11 ± 0.86	4.01 ± 0.67
FAT10 下调组	$2.32 \pm 0.47^*$	$1.63 \pm 0.22^*$
FAT10 上调组	$4.68 \pm 1.05^*$	$4.66 \pm 1.03^*$

与对照组比较,* $P < 0.05$

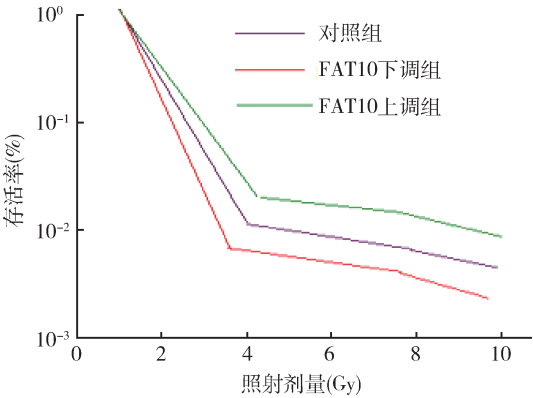


图 4 细胞克隆形成实验检测宫颈癌 SiHa 细胞放射敏感度

感度,克隆形成能力减弱;而上调后则相反。各组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

5. 细胞凋亡:本实验采用 TUNEL 染色法检测细胞凋亡情况发现,FAT10 上调组呈现淡蓝色,细胞核较大而疏松;FAT10 下调组经 siRNA 干扰技术沉默 FAT10 后,对细胞进行观察发现,细胞可见到不同程度的凋亡,凋亡细胞核体积较小而致密。差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。与对照组比较,FAT10 下调组宫颈癌 SiHa 细胞凋亡率增加($P < 0.05$);FAT10 上调组 SiHa 细胞凋亡率降低($P < 0.05$)。

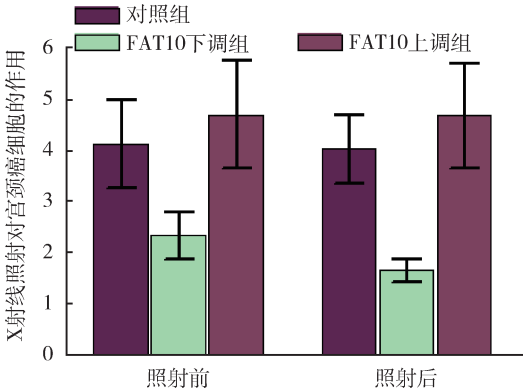


图 6 X 线照射对宫颈癌细胞的作用

对照组($P < 0.05$)。20Gy γ 射线照射后 FAT10 下调组瘤体平均体积较照射前明显减小($P < 0.05$);各组间比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而上调组裸鼠皮下种植瘤平均体积较照射前无明显变化($P > 0.05$)。

讨 论

宫颈癌以手术为基础治疗,但为降低复发率,术后有高危因素的患者需给予补充放疗,尤其在中晚期宫颈癌治疗中,放疗更显其优越性,能够更好的控制局部病灶,防止远处转移,延长生存期。随着科技的发展,宫颈癌的基因治疗成为医学领域研究的热点,从基因水平上达到治疗肿瘤的目的,其远期疗效也受到越来越多医学工作者的重视。FAT10 为癌基因的一种,参与胚胎发育、DNA 损伤修复、信号转导等多种重要的生命活动^[24]。无疑,FAT10 的异常能够诱导恶性肿瘤的发生和演进。分子机制研究则表明,FAT10 为 p53 下游重要的靶基因;亦可在细胞有丝分裂中与纺锤体检测点蛋白 MAD2 以非共价键的形式结合,使染色体的稳定性下降,从而导致肿瘤的发生及进展。对 FAT10 在 HBV 相关性肝癌中研究发现,其表达水平明显高于癌旁组织,且与复发及预后关系密切;其表达异常可使细胞增殖率提高、凋亡率下降、细胞周期进展等^[25]。本研究发现,FAT10 在人宫颈癌组织中表达明显上调,提示其表达的改变可能与该病的发生中扮演重要角色。为了探讨 FAT10 在宫颈癌中的调节作用,笔者将 FAT10 siRNA 和 pcDNA3.1-FAT10 分别转染至人宫颈癌 SiHa 细胞,并进行了一系列的实验。

本研究利用 FAT10 干扰宫颈癌 SiHa 细胞,并上调及下调其表达,观察其生物学行为的改变,结果显示 FAT10 下调后 mRNA 及蛋白表达均下降。通过 CCK-8 测定细胞的增殖活力,发现转染 FAT10 siRNA 的细胞增殖受到显著的抑制,这提示下调 FAT10 的表达能够抑制肿瘤细胞的生长,与食管癌等的研究相符。在肿瘤的演进过程中,异常增殖虽起作用,但地位更突出的是凋亡减少。研究发现,抑制 FAT10 表达后 48h,细胞的凋亡比例较高。这表明 FAT10 表达的下调使细胞增长受抑制的可能机制是通过促进凋亡实现。而促进 FAT10 基因表达后,应用上述方法再次对细胞的表达、增殖、凋亡进行测定,则得到与 FAT10 siRNA 完全相反的结果。为研究 FAT10 对宫颈癌的放射敏感度,给以 FAT10 siRNA 进行干预,结果显示细胞的敏感度升高,而促进 FAT10 表达后则

出现相反结果,这表明下调 FAT10 表达可以增强该病的放射敏感度,对治疗起到积极作用。

将 FAT10 干预的 SiHa 细胞移植入小鼠体内,进行模型的构建,对其生长状态进行观察发现,21 只小鼠的成瘤率为 100%,未出现自然死亡者,3 组的成瘤率无差异,提示转染 FAT10 后的细胞在成瘤性上无影响。此外,FAT10 下调组小鼠瘤体体积比对照组小,而上调组体积明显增大。从而证明降低 FAT10 的表达可减慢肿瘤的生长,而升高 FAT10 表达后则出现完全相反的结果。为进一步观察 FAT10 表达的变化对宫颈癌放疗敏感度的影响,本实验以瘤体放疗前后体积变化及放疗后体质量设为评估标准,与对照组比较发现,FAT10 下调组瘤体体积降低的量更大,而上调组则较小。照射完毕后 FAT10 下调组体质量小于对照组,而上调组则大于对照组,这说明下调 FAT10 表达对该病的放射增敏作用确实存在,而上调其表达后则使放射抗拒。

综上所述,下调 FAT10 表达有抗肿瘤的效果,对瘤体的生长及对放射损伤的修复起到抑制功效,同时有放射增敏作用,而上调 FAT10 表达则使肿瘤的放射抗拒增加,不能达到较好的治疗效果。本实验为宫颈癌相关研究的后续工作,为临床上该病的治疗提供了一种新的方法。和其他研究者一般均从组织水平进行验证报道相比,本研究分别从组织、分子、细胞及动物的大体水平进行验证,为后期宫颈癌的靶向治疗研究奠定了坚实的基础。

参考文献

- 1 Seoud M, Tialma WA, Ronsse V. Cervical adenocarcinoma: moving towards better prevention[J]. Vaccine, 2011, 29(49): 9148-9158
- 2 Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis[J]. Semin Cancer Biol, 2014, 26: 13-21
- 3 柳晓春, 邓凯贤, 郑玉华, 等. hTERC 和高危 HPV 及细胞学联合检测在宫颈癌筛查中的价值[J]. 肿瘤预防与治疗, 2015, 27(1): 12-15, 23
- 4 Akila N, Viswanathan, Carien L, et al. International brachytherapy practice patterns: a survey of the genecologic cancer intergroup (GCIG)[J]. Radiation Oncology Biol Phys, 2012, 82(1): 250-255
- 5 孙菲, 李艳芳, 刘继红, 等. 208 例低危型宫颈癌患者的辅助治疗及预后相关因素分析[J]. 南方医科大学学报, 2014, 10(3): 401-405
- 6 Thompson S R, Delaney GP, Gabriel GS, et al. Patterns of care study of brachytherapy in New South Wales: cervical cancer treatment quality depends on caseload[J]. Contemp Brachyther, 2014, 6(1): 28-32
- 7 王宁, 魏丽春, 李国围, 等. 243 例 II 期宫颈癌术前同期放疗化疗加根治术与根治性放疗同期化疗预后比较[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2013, 22(4): 274-277

(转第 61 页)

综上所述,由于目前对于单次剂量超过($>8\text{Gy}$)是否可以应用 L-Q 模型计算 BED 存在争议,因而本试验采取在相同照射剂量对裸鼠 MDA-MB-231 乳腺癌移植瘤采用不同照射方式,结果显示了单次大剂量放射治疗对于移植瘤的生长的抑制更为明显,PET/CT 显像扫描及移植瘤 Ki-67 阳性细胞检测结果也印证这一结果。本实验研究提示,在同等剂量条件下,单次大剂量照射对于肿瘤增殖的抑制要好于常规分割照射,为临床应用提供了一定的理论基础。与此同时 PET/CT 对受照后裸鼠移植瘤的扫描,结果提示在移植瘤出现明显生长差异之前,PET/CT 可以发现不同照射方式造成的肿瘤增殖差异,为早期评估不同放疗方式对肿瘤治疗效果,具有积极的意义。

参考文献

- 1 Ferlay J, Shin H, Bray F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010,127(12):2893-2917
- 2 Houssami N, Macaskill P, Marinovich M L, *et al.* Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy ☆ [J]. *Eur J Cancer*, 2010,46(18):3219-3232
- 3 Js H, Jr O, Ja D, *et al.* The UK Standardisation of Breast Radiotherapy (START) trials of radiotherapy hypofractionation for treatment of early breast cancer: 10-year follow-up results of two randomised

- controlled trials [J]. *Lancet Oncol*, 2013,14(11):605-611
- 4 Veldwijk MR, Zhang B, Wenz F, *et al.* The biological effect of large single doses: a possible role for non-targeted effects in cell inactivation. [J]. *PLoS One*, 2014,9(1):e84991
- 5 Veronesi U, Orecchia R, Maisonneuve P, *et al.* Intraoperative radiotherapy versus external radiotherapy for early breast cancer (ELIOT): a randomised controlled equivalence trial [J]. *Lancet Oncol*, 2013,14(13):1269-1277
- 6 万晓莉,兰洁,陈永顺,等. 单次大剂量照射对 Lewis 肺癌移植瘤的放射生物学效应 [J]. *四川大学学报:医学版*, 2014(2):179-184
- 7 Dandekar M, Tseng JR, Gambhir SS. Reproducibility of 18F-FDG microPET studies in mouse tumor xenografts [J]. *J Nucl Med*, 2007,48(4):602-607
- 8 Zheng QH, Stone KL, Mock BH, *et al.* [^{11}C]Choline as a potential PET marker for imaging of breast cancer athymic mice [J]. *Nucl Med Biol*, 2002,29(8):803-807
- 9 Quon A, Gambhir SS. FDG-PET and beyond: molecular breast cancer imaging [J]. *J Clin Oncol*, 2005,23(8):1664-1673
- 10 Smith IC, Welch AE, Hutcheon AW, *et al.* Positron emission tomography using [^{18}F]-fluorodeoxy-D-glucose to predict the pathologic response of breast cancer to primary chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2000,18(8):1676-1688
- 11 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown [J]. *J Cell Physiol*, 2000,182(3):311-322
- 12 Wojnar A, Pula B, Piotrowska A, *et al.* Correlation of intensity of MT-1/II expression with Ki-67 and MCM-2 proteins in invasive ductal breast carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2011,31(9):3027-3033

(收稿日期:2016-11-05)

(修回日期:2016-11-09)

(接第 106 页)

- 8 任宏剑,张志娟. II b ~ III a 期宫颈癌术前同期放化疗加根治术+术后调强放疗治疗方式的疗效 [J]. *中国实用医刊*, 2016,43(15):101-102
- 9 李朔. 宫颈癌术后并发症及术后放射治疗对卵巢功能的影响 [J]. *中国实用医刊*, 2016,43(7):96-97
- 10 张冰雅,王铁君,刘忠山,等. 局部中晚期宫颈癌的治疗进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2016,36(10):2562-2565
- 11 林晓丹,周同中,石兴源,等. 同步放化疗治疗中晚期宫颈癌的临床分析及感染因素 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2011,21(18):3876-3877
- 12 李岩松,赵庆楠. 人类白细胞抗原 F 介导转录因子 10 在甲状腺瘤细胞 TPC-1 增殖和凋亡中的作用及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2016,33(5):1308-1311
- 13 黄健,李德怀. 舌癌组织双泛素 mRNA 表达与临床病理特征关系的研究 [J]. *口腔颌面外科杂志*, 2010,20(6):394-397
- 14 Yuan R, Wang K, Yan C, *et al.* Ubiquitin-like protein FAT10 promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by modifying β -catenin degradation [J]. *Cancer Res*, 2014,74(18):5287-5300
- 15 Schmidtke G, Aichele A, Groettrup A, *et al.* FAT10ylation as a signal for proteasomal degradation [J]. *Biochimica et biophysica acta*, 2014,1843(1):97-102
- 16 Yuan J, Tu Y, Mao X, *et al.* Increased expression of FAT10 is correlated with progression and prognosis of human glioma [J]. *Pathol Oncol Res*, 2012,18(4):833-839

- 17 Bucjsbaum S, Bercovicj B, Ciecjamover A. FAT10 is a proteasomal degradation signal that is itself regulated by ubiquitination [J]. *Mol Biol Cell*, 2012,23(1):225-232
- 18 Aicjem A, Kalveram B, Spimmemjirm V, *et al.* The proteomic analysis of endogenous FAT10 substrates identifies p62/SQSTM1 as a substrate of FAT10ylation [J]. *J Cell Sci*, 2012,125(19):4576-4585
- 19 Liu L, Dong Z, Liang J, *et al.* As an independent prognostic factor, FAT10 promotes hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma progression via Akt/GSK3 β pathway [J]. *Oncogene*, 2014,33(7):909-920
- 20 郭慧,谭平萍. FAT10 表达与乳腺浸润性导管癌生物学行为的关系 [J]. *中南大学学报:医学版*, 2014,39(11):1125-1130
- 21 高雪莹,高芸. TNF- α 和 IFN- γ 诱导人乳头状甲状腺瘤细胞 FAT10 过表达及染色体和异常 [J]. *现代肿瘤医学*, 2014,22(7):1501-1503
- 22 Qing X, French BA, Oliva J, *et al.* Increased expression of FAT10 in colon benign, premalignant and malignant epithelial neoplasms [J]. *Exp Mol Pathol*, 2011,90(1):51-54
- 23 刘冬梅,吴慧,马艳会,等. 双向调控 Cox-2 表达对人食管癌 EC9706 细胞裸鼠移植瘤放射敏感性的影响 [J]. *中华放射医学与放射杂志*, 2015,35(10):734-737
- 24 张春阳,王娟,王星,等. FAT10 在乳腺癌中的表达及其临床病理意义 [J]. *现代预防医学*, 2015,42(6):1009-1011,1022
- 25 周享芳,邱波,唐晶,等. 双泛素蛋白诱导自噬对肝癌放射敏感度的影响 [J]. *肿瘤防治研究*, 2015,42(11):1081-1085

(收稿日期:2016-10-18)

(修回日期:2016-11-15)