

干扰素调节因子5下调PARP-1抑制鼻咽癌细胞的侵袭力

李民英¹, 张健², 何秀芳³, 张健⁴, 郑斯明¹, 周嘉雄¹, 魏婷²
(中山市人民医院 1.肿瘤分院放疗二区, 3.耳鼻咽喉头颈外科, 4.介入室, 广东 中山 528403;
2.南方医科大学附属珠江医院肿瘤中心, 广东 广州 510282)

摘要:【目的】探讨干扰素调节因子5(IRF5)是否通过下调DNA修复酶PARP-1,进而抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。【方法】本研究使用的临床标本是经病理确诊的鼻咽癌患者组织标本46例和正常组织51例。免疫组化检测鼻咽癌组织和正常组织中IRF5和PARP-1的表达。构建IRF5过表达质粒,上调鼻咽癌细胞CNE-2中IRF5表达,荧光定量PCR(QPCR)和免疫印迹确定建立IRF5过表达细胞。上调IRF5表达后,划痕和transwell实验检测细胞侵袭能力的改变,QPCR和免疫印迹检测PARP-1表达量的变化。上调IRF5表达的同时加入PARP-1过表达质粒,观察PARP-1是否可逆转IRF5对侵袭能力的影响。【结果】免疫组化结果表明IRF5在癌组织中的表达量低于正常组织,而PARP-1则相反。QPCR和免疫印迹确定建立IRF5 mRNA和蛋白过表达的细胞株CNE-2/IRF5。细胞划痕实验显示CNE-2/IRF5愈合率较对照组降低($P<0.01$),transwell实验表明CNE-2/IRF5细胞穿过基底膜的数目小于对照组($P<0.01$),提示上调IRF5可抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。上调IRF5后,PARP-1 mRNA和蛋白的表达量降低($P<0.01$);上调IRF5表达的同时过表达PARP-1,可逆转单独上调IRF5对细胞侵袭能力的改变。提示IRF5可通过下调PARP-1进而抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。【结论】IRF5可通过下调PARP-1进而抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。本研究可能为降低鼻咽癌侵袭能力提供新的靶点。

关键词:鼻咽癌细胞;干扰素调节因子5;PARP-1;侵袭能力

中图分类号:R814

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2018)01-0101-06

Interferon Regulatory Factor 5 Inhibits Invasion Ability of Nasopharyngeal Carcinoma by Reducing PARP-1

LI Min-ying¹, ZHANG Jian², HE Xiu-fang³, ZHANG Jian⁴, ZHENG Si-ming¹, ZHOU Jia-xiong¹, WEI Ting²

(1. Department of Radiation Oncology, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528403, China; 2. Cancer Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510280, China; 3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, 4. Radiology Intervention Department, Zhongshan People's Hospital, Zhongshan 528403, China)

Corresponding to: WEI Ting, E-mail: 258077534@qq.com

Abstract: 【Objective】 To investigate whether IRF5 can inhibit invasion ability of nasopharyngeal carcinoma by reducing PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1). 【Methods】 Forty-six specimens of nasopharyngeal carcinoma and 51 specimens of normal tissue were confirmed by pathologically in this study. The expression of IRF5 and PARP-1 in nasopharyngeal carcinoma tissues and normal tissues was detected by immunohistochemistry. The IRF5 overexpression plasmid was transfected into the nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2, quantitative PCR and immunoblotting was used to value the expression of IRF5 after transfection. The wound healing and transwell assay was used to investigate the invasion ability. The expression of PARP-1 was valued by quantitative PCR and immunoblotting after over-expression of PFR5.

收稿日期:2017-10-17

基金项目:中山市科技攻关计划项目(2014A1FC063)

作者简介:李民英,博士,主任医师,研究方向:鼻咽癌放疗基础与临床,E-mail:13928197276@163.com。魏婷,通信作者,医学博士,

E-mail:258077534@qq.com

【Results】The results showed that the expression of IRF5 in cancer tissues was lower than that in normal tissues, but the PARP-1 expression was opposite. The IRF5 overexpressing cell line CNE-2/IRF5 was established. The healing rate of CNE-2/IRF5 cells was lower than that of the control cells ($P<0.01$). Transwell experiments revealed that the number of CNE-2/IRF5 cells passing through the basement membrane was smaller than that of the control group ($P<0.01$), suggesting that up-regulation of IRF5 could inhibit the invasiveness of nasopharyngeal carcinoma cells. Over-expression of IRF5 led to reduced PARP-1 mRNA and protein ($P<0.01$). Besides, elevation of PARP-1 can prevent IRF5-induced changes of invasion ability. 【Conclusion】Therefore, we speculated that IRF5 can inhibit invasion ability of nasopharyngeal carcinoma by reducing the expression of PARP-1. This study provided a new target for inhibiting the invasion ability of nasopharyngeal carcinoma based on IRF5.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; IRF5; PARP-1; invasion ability

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(1): 101-106]

鼻咽癌在我国华南、西南地区的发病率极高,其5年生存率约50%~70%,严重影响我国南方地区人民生活质量^[1-2]。鼻咽癌是一种高侵袭性和转移性的头颈部恶性肿瘤,约30%~40%的进展期病人会发生远处转移^[3-4]。因此,寻找抑制鼻咽癌细胞侵袭能力的分子标志物,对于提高患者的生存率具有重要的意义。干扰素调节因子5(interferon regulatory factor 5, IRF5)定位于7q32,编码498个氨基酸组成的蛋白质。它可诱导I型干扰素(IFN- α 、IFN- β)的产生,还可通过阻滞细胞周期、介导凋亡、激发免疫活性等通路诱导由DNA损伤引起的细胞凋亡,在多种肿瘤中扮演抑癌基因的重要角色^[5-6]。目前,尚未有研究报道IRF5与鼻咽癌的关系,其高表达是否可抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力有待探讨。为探讨IRF5是否参与调节鼻咽癌细胞的侵袭能力,我们利用IRF5过表达质粒上调鼻咽癌细胞CNE-2中IRF5的表达,观察其对细胞侵袭能力的影响。接着,通过功能回复实验探讨IRF5是否通过调节DNA损伤修复关键基因PARP-1进而抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。本研究可能寻找到抑制鼻咽癌侵袭能力的有效新靶点。

1 材料与方法

1.1 临床标本

本研究使用的临床标本来源于中山市人民医院,2014年4月至2016年3月经病理科病理确诊的鼻咽癌患者组织标本(经该院伦理委员会批准)。

1.2 免疫组化

组织标本玻片脱蜡后放入盛有10 g/L柠檬酸

溶液中,在微波炉中进行抗原修复。每张玻片加1滴过氧化氢酶阻断剂,室温下孵育12 min,1×PBS冲洗3次,间隔5 min。每张玻片加1滴正常非免疫动物血清,室温下孵育10 min。除去血清,阳性对照组每张玻片加1滴IRF5或PARP1一抗(1:100,抗体稀释液稀释),阴性对照组则加入1×PBS,放入湿盒内4℃孵育12 h。1×PBS冲洗3次,每次5 min,每张玻片加1滴生物素标记的羊抗兔二抗,室温下孵育40 min,1×PBS冲洗3次,间隔5 min。每张玻片加1滴链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下孵育30 min,1×PBS冲洗3次,间隔5 min。每张玻片加2滴新鲜配制的DAB溶液,显微镜下观察5 min。自来水冲洗去DAB溶液,苏木素复染10 s,盐酸酒精分化,氨水返蓝。梯度酒精脱水干燥,吹风机吹干玻片,中性树脂胶封固。结果判定IRF5、PARP1阳性染色在胞核,呈棕黄色。

1.3 细胞培养和转染

人鼻咽癌细胞株CNE-2培养于RPMI 1640+100 mL/L的胎牛血清中,37℃,体积分数为5%CO₂,2~3 d传代1次。

1.4 荧光定量PCR

用Trizol提取细胞总RNA,根据TAKARA公司荧光定量PCR试剂盒说明进行产物合成。所用的PCR仪为ABI7000。反应条件为:95℃预变性30 s,PCR:94℃5 s、60℃30 s,共40个循环,溶解曲线:95℃0 s、65℃60 s、95℃0 s。基于目的基因和看家基因实时荧光定量扩增曲线得到Ct(C为Cycle, t为threshold)值,用Folds=2^{- $\Delta\Delta C_t$} 表示实验组目的基因与对照组目的基因表达量的倍比关系。实验重复例数为3。

1.5 免疫印迹

提取总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度,吸取50 μg 总蛋白,去离子水补至20 μg ,加入等体积2 \times 上样buffer煮沸7 min,离心后吸取30 μL 上样,经不连续SDS-PAGE电泳分离后,用湿转将蛋白转移至PVDF膜上,7%脱脂奶粉+3%的BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2 h, TBST洗膜后用加入IFR5或者PARP-1一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后加入HRP标记的二抗,室温孵育1 h,洗膜后用化学发光成像系统获取条带,用目的蛋白/GAPDH代表目的蛋白的相对表达量。每组重复例数为3。

1.6 细胞划痕实验

在孔中加入 5×10^5 细胞,待融合率达到100%时,利用枪头垂直划线。PBS清洗细胞,去除划下的细胞,加入无血清培养基,37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数为5% CO_2 中培养。在0、6、12、18、24 h拍照,计算出细胞划痕愈合率。每组重复例数为3。

1.7 细胞侵袭实验

每个Transwell上室加入50 μL Matrigel胶,37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min凝固。取对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$,上室每室加入200 μL 细胞悬

液,下室每室加500 μL 含100 mL/L新生牛血清的RPMI-1640培养液,37 $^{\circ}\text{C}$,体积分数为5% CO_2 培养48 h。取出上室,擦去膜上室面的Matrigel胶和细胞,40 g/L多聚甲醛固定膜下室面的细胞,中性树脂封固。细胞侵袭性结果表示为同时穿过Matrigel胶和聚碳酸酯膜的细胞数。每组重复例数为3。

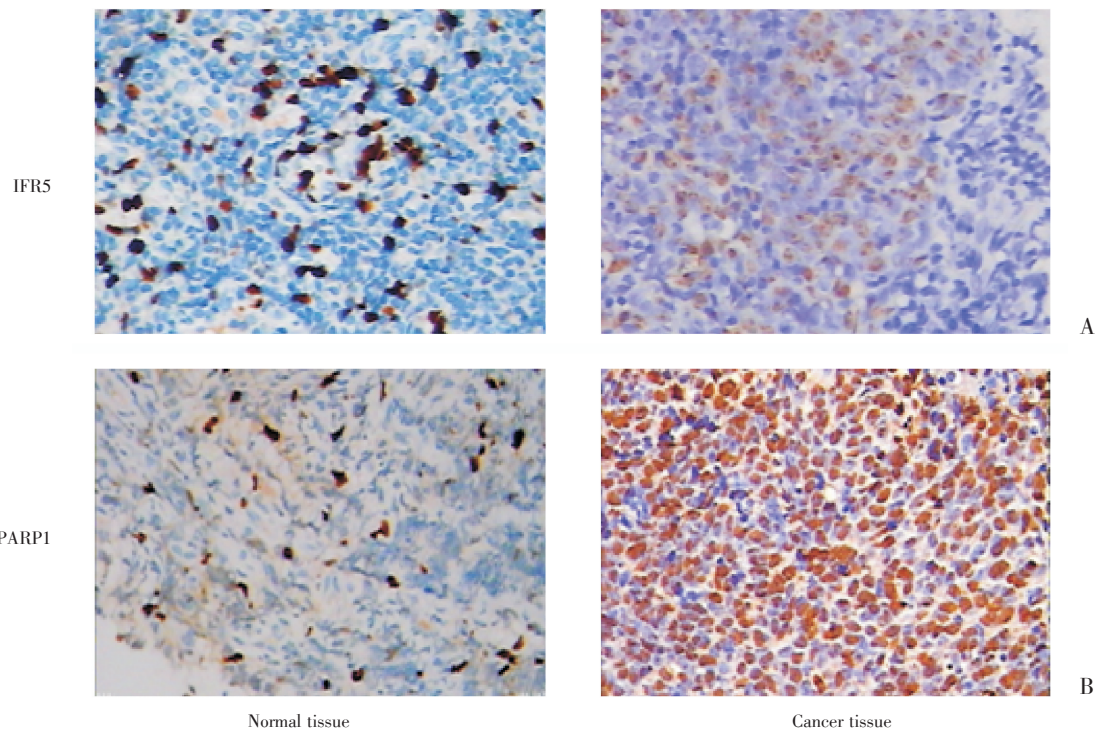
1.8 统计学分析

所有结果均经SPSS16.0统计软件统计。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组之间比较采用单样本 t 检验。多组间的比较采用one-way ANOVA(方差齐时)或Welch法(方差不齐时),多重比较采用Dunnnett法(方差齐时)或Dunnnett's T3法(方差不齐时)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测鼻咽癌组织和正常组织中IRF5和PARP-1的表达

免疫组化结果表明IRF5在鼻咽癌组织中的表达量低于正常组织(图1A),而PARP-1在鼻咽癌组织中的表达量则高于正常组织(图1B)。



A: The expression of IRF5 in nasopharyngeal carcinoma tissue is lower than normal tissue; B: The expression of PARP-1 in nasopharyngeal carcinoma tissue is higher than normal tissue. $\times 200$

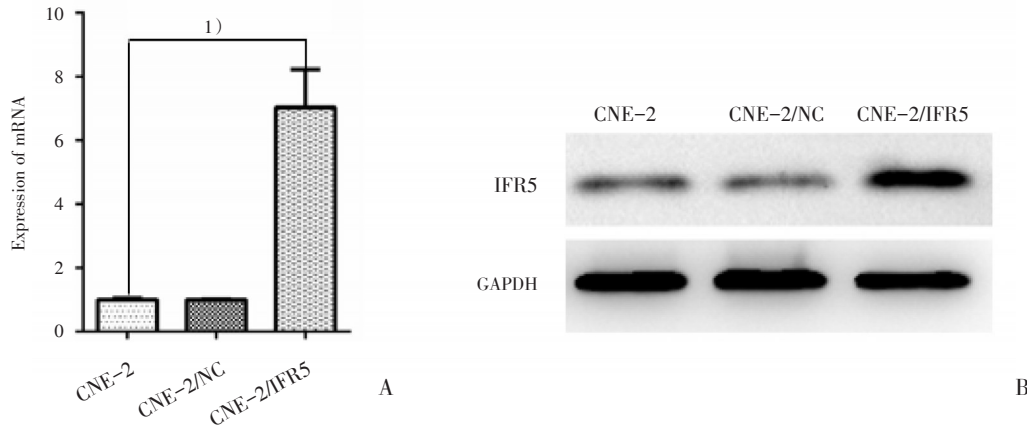
图1 免疫组化检测鼻咽癌组织和正常组织中IRF5、PARP-1的表达

Fig.1 The expression of IRF5 and PARP-1 in nasopharyngeal carcinoma tissues and normal tissues was detected by immunohistochemistry

2.2 建立稳定高表达 IFR5 的鼻咽癌细胞 CNE-2/IFR5

用 IFR5 过表达质粒上调鼻咽癌细胞 CNE-2 中 IFR5 表达, 荧光定量 PCR 发现 CNE-2/IFR5 细胞

中 IFR5 mRNA 的表达量是对照组的(7.00±0.04)倍(图 2A)。免疫印迹显示细胞中 IFR5 蛋白的表达量是对照组的(6.00±0.12)倍(图 2B)。从而建立了稳定高表达 IFR5 的细胞株 CNE-2/IFR5。



A: The mRNA levels of IFR5 in CNE-2/IFR5 cells was higher than that in control group, 1) $P < 0.01$, $F = 221.34$; B: The protein levels of IFR5 in CNE-2/IFR5 cells increased compared with the control group.

图2 建立稳定高表达 IFR5 的细胞株 CNE-2/IFR5

Fig.2 The IRF5 over-expression cells were development named as CNE-2/IFR5

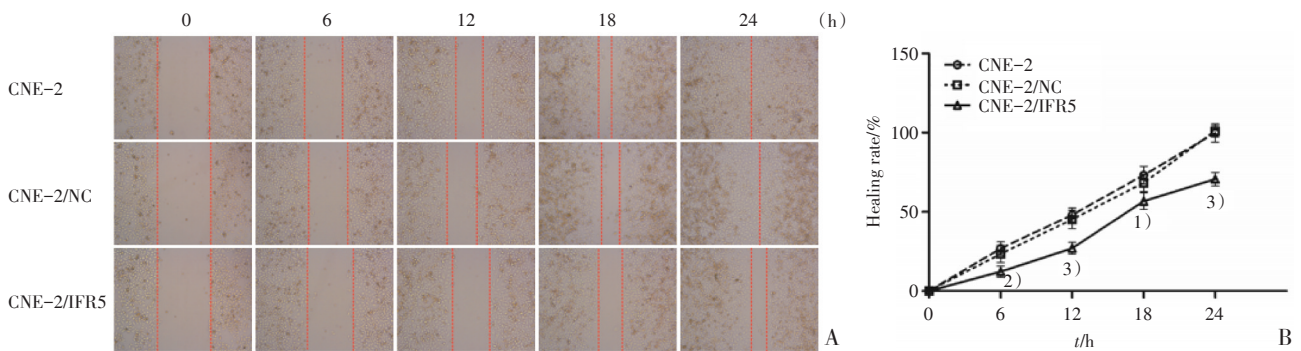
2.3 上调 IFR5 可抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力

上调 IFR5 的表达后, 细胞划痕实验检测细胞划痕愈合率的改变, transwell 实验检测细胞穿过基底膜数量的改变。结果表明: CNE-2/IFR5 细胞的划痕愈合率较对照组降低(图 3A, B); CNE-2/IFR5 细胞穿过基底膜的数目为 39.00 ± 0.15 , 而 NC 组为 122 ± 1.12 (图 4C)。上调 IFR5 的表达后划痕愈合率降低, 穿过基底膜的细胞数减少。以上研究提示上调 IFR5 可抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。

鼻咽癌细胞的侵袭能力

荧光定量 PCR 和免疫印迹检测 CNE-2/IFR5 细胞中 DNA 损伤修复关键基因 PARP-1 mRNA 和蛋白。发现上调 IFR5 的表达后, PARP-1 mRNA 和蛋白的表达量增加(图 4A, B); 上调 IFR5 的同时过表达 PARP-1, 细胞穿过基底膜的数量较单独上调 IFR5 时明显增加(图 4C)。提示过表达 PARP-1 可逆转 IFR5 对侵袭能力的影响, IFR5 可能通过下调 PARP-1 的表达抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。

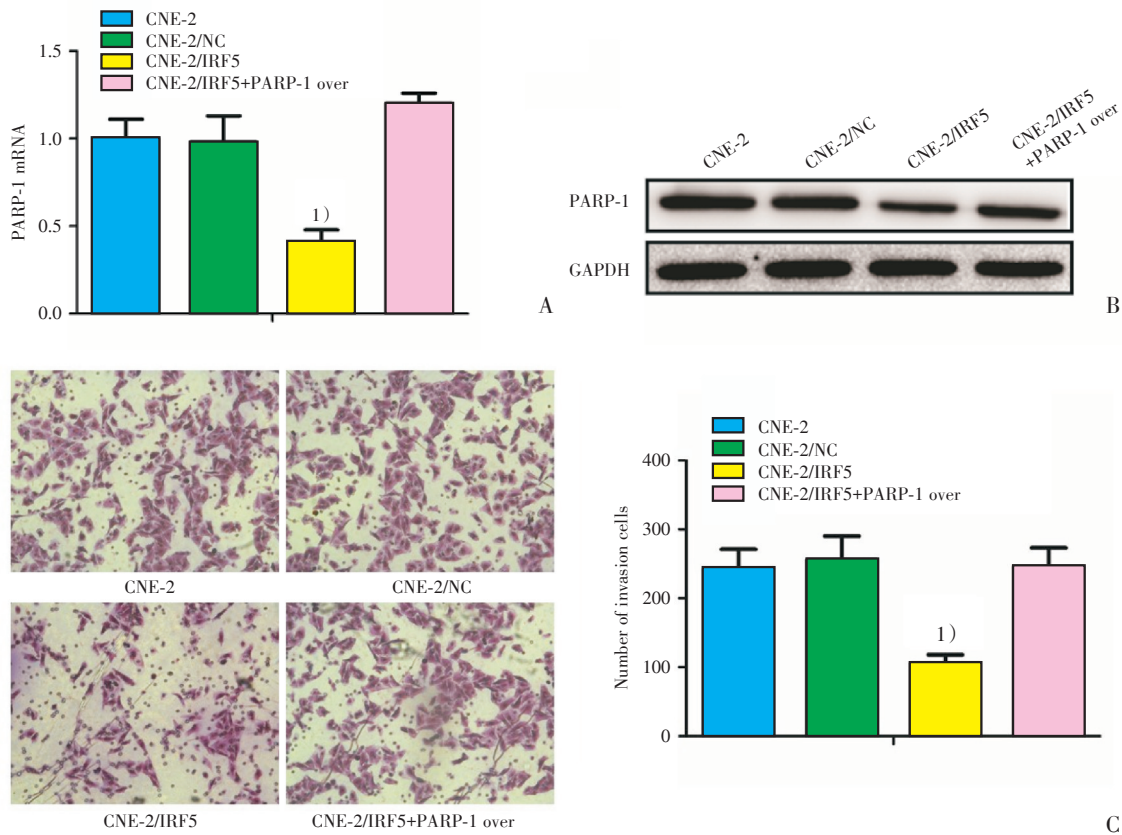
2.4 IFR5 可能通过下调 PARP-1 的表达抑制鼻



A: Wound healing assays observed cells at 0, 6, 12, 18 and 24 h; B: Cell healing rates at 0, 6, 12, 18 and 24 h. 1) $P < 0.05$, $F = 9.42$; 2) $P < 0.01$, $F = 15.68$; 3) $P < 0.01$, $F_{12h} = 20.84$, $F_{24h} = 31.79$.

图3 划痕实验检测上调 IFR5 对细胞划痕愈合率的影响

Fig.3 The effect of IRF5 on wound healing rates were detected by wound healing assays



A: Upregulation of IFR5 expression decreased the mRNA expression of PARP-1; upregulation of IFR5 expression and PARP-1 overexpression can reverse IFR5-induced mRNA expression of PARP-1. $P < 0.01$; B: Upregulation of IFR5 expression decreased the protein expression of PARP-1 protein; upregulation of IFR5 expression and PARP-1 overexpression can reverse IFR5-induced protein expression of PARP-1; C: Upregulation of IFR5 expression decreased the number of cells crossing the basement membrane ($\times 200$); upregulation of IFR5 expression and PARP-1 overexpression led to an increase in the number of cells crossing the basement membrane compared to the only IFR5 overexpression. 1) $P < 0.01$, $F = 128.21$.

图4 IFR5可能通过下调PARP-1的表达抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力

Fig.4 IRF5 inhibited the invasion ability by reducing the expression the PARP-1

3 讨论

免疫防御系统对肿瘤的侵袭和转移具有重要意义。IRF5作为机体免疫防御系统的重要组成部分,通过调节细胞周期、凋亡和激发免疫活性等通路参与调节肿瘤的发生、发展^[7-8]。研究表明IRF5表达缺陷的小鼠胚胎成纤维细胞可降低多种因素诱导的细胞凋亡^[9]。在许多血液系统的恶性肿瘤中IRF5的表达都受抑制^[10]。还有研究发现在乳腺癌患者组织标本中,IRF5的表达也被抑制;在乳腺癌细胞株中过表达IRF5,可抑制细胞的增殖和侵袭能力^[11]。综上所述IRF5扮演着抑癌基因的重要角色。本项目组首次探讨了IRF5与鼻咽癌细胞侵袭能力的关系。我们利用IRF5

过表达质粒上调鼻咽癌细胞CNE-2中IRF5的表达,发现细胞的侵袭能力降低。提示IRF5在鼻咽癌细胞可能也扮演着抑癌基因的角色。我们进一步对IRF5调节鼻咽癌侵袭能力的机制进行探讨。聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1)是存在于真核细胞中催化聚ADP核糖化的细胞核酶,在DNA修复中发挥至关重要的作用^[12]。2012年刊登在Science上的一项研究阐明癌症细胞依赖于PARP-1所进行的DNA修复,当这种酶被抑制后,可以有效抑制肿瘤的生长^[13]。目前已有PARP-1抑制剂如奥拉帕尼运用于携带BRCA种系或体系基因突变的晚期卵巢癌患者中。目前尚未有研究报道IRF5与PARP-1之间是否存在调节关系。而我们则发现在鼻咽癌细胞CNE-2中,IRF5与PARP-1的表达关系密

切。上调IFR5可抑制PARP-1的表达,上调IFR5的同时过表达PARP-1,则细胞穿过基底膜的数量较单独上调IFR5表达时增加,表明PARP-1可逆转IFR5对细胞侵袭能力的影响。进而提示在鼻咽癌细胞中,IFR5可能通过下调PARP-1的表达进而抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。

综上所述,我们发现了IFR5可能通过下调PARP-1的表达进而抑制鼻咽癌细胞的侵袭能力。本课题组后续将需要在动物体内和临床样本中进一步验证。为寻找到降低鼻咽癌侵袭能力的靶点提供新的实验依据。

参考文献

- [1] Wei KR, Zheng RS, Zhang SW, et al. Nasopharyngeal carcinoma incidence and mortality in China in 2010 [J]. *Chin J Cancer*, 2014, 33(8): 381-387.
- [2] Razak AR, Siu LL, Liu FF, et al. Nasopharyngeal carcinoma: The next challenges [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(11): 1967-1978.
- [3] Kamran SC, Riaz N, Lee N. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2015, 24(3): 547-561.
- [4] Chee J, Loh KS, Tham I, et al. Prognostic stratification of patients with metastatic nasopharyngeal carcinoma using a clinical and biochemical scoring system [J]. *J Cancer Res Clin Onco*, 2017, 143(12): 2563-2570.
- [5] Zervou MI, Dorschner JM, Ghodke-Puranik Y, et al. Association of IRF5 polymorphisms with increased risk for systemic lupus erythematosus in population of Crete, a southern-eastern European Greek island [J]. *Gene*, 2017, 610: 9-14.
- [6] Hu G, Mancl ME, Barnes BJ. Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16): 7403-7412.
- [7] Pimenta EM, Barnes BJ. A conserved region within interferon regulatory factor 5 controls breast cancer cell migration through a cytoplasmic and transcription-independent mechanism [J]. *Mol Cancer*, 2015, 14(1): 32.
- [8] Dong SM, Lee HG, Cho SG, et al. Hypermethylation of the interferon regulatory factor 5 promoter in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma [J]. *J Microbiol*, 2015, 53(1): 70-76.
- [9] Yanai H, Chen HM, Inuzuka T, et al. Role of IFN regulatory factor 5 transcription factor in antiviral immunity and tumor suppression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9): 3402-3407.
- [10] Yang L, Zhao T, Shi X, et al. Functional analysis of a dominant negative mutation of interferon regulatory factor 5 [J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5500.
- [11] Bi X, Hameed M, Mirani N, et al. Loss of interferon regulatory factor 5 (IRF5) expression in human ductal carcinoma correlates with disease stage and contributes to metastasis [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(6): R111.
- [12] Yan S, Liu L, Ren F, et al. Sunitinib induces genomic instability of renal carcinoma cells through affecting the interaction of LC3-II and PARP-1 [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2988.
- [13] Langelier MF, Planck JL, Roy S, et al. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1 [J]. *Science*, 2012, 336(6082): 728-732.

(编辑 徐杰)