

多梳基因蛋白 EZH2 对 NK/T 淋巴瘤细胞放化疗敏感性的影响

蔡露青¹, 袁小龙², 童铸廷², 夏瑞祥¹

摘要 目的 探讨多梳基因蛋白 EZH2 对鼻腔 NK/T 淋巴瘤细胞放化疗敏感性的影响。方法 采用 MTS 实验测定 NK/T 淋巴瘤细胞株 SNK6 对吉西他滨的半数抑制浓度 (IC₅₀), 利用线性二次模型拟合测定干扰 EZH2 对 SNK6 细胞的放疗增敏比 (SER); 通过流式细胞仪 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡, 并用 Western blot 法检测凋亡蛋白 caspase-3 和 PARP 的断裂带的水平; 用免疫荧光检测 EZH2 干扰后对放射引起的 DNA 损伤的影响。结果 干扰 EZH2 降低吉西他滨的 IC₅₀ 约为 2.54 倍, 并提高吉西他滨药物引起的凋亡。沉默 EZH2 能够提高 SNK6 细胞的放疗敏感性, SER = 5.855; 提高射线引起的细胞凋亡, 并增加细胞凋亡蛋白断裂带的产生; 增加射线诱导的 DNA 损伤。结论 EZH2 可以提高 NK/T 淋巴瘤细胞的放化疗敏感性。

关键词 鼻腔 NK/T 淋巴瘤; EZH2; 放化疗敏感性; 细胞凋亡; DNA 损伤

中图分类号 R 733.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)08-1147-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.011

人类 NK/T 淋巴瘤具有高度侵袭性, 预后差, 尚缺乏有效的治疗手段, 且对其病理生理状态研究较少^[1]。目前 NK/T 淋巴瘤的治疗方式主要包括化疗, 放疗以及放化疗相结合的综合治疗, 化疗、放疗和综合治疗的 5 年生存率分别为: 45%、64% 和 86%; 但仍有 57% 的患者在治疗后半年内复发^[2]。目前推测: 化疗药物耐药以及放疗抵抗是肿瘤复发

的重要影响因素。因此, 阐明 NK/T 淋巴瘤的化疗药物和放疗抵抗的分子机制, 将为临床上提高 NK/T 淋巴瘤的放化疗敏感性提供重要的参考价值。EZH2 是多梳基因蛋白复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 的一个核心组份, 其具有组蛋白 H3 第 27 位酪氨酸 (histone H3 lysine 27 methylation, H3K27) 特异性的组蛋白三甲基化转移酶的活性, 可使抑癌基因转录抑制, 进而引起肿瘤的发生和发展^[3-4]。近来的研究^[5-7]显示, 果蝇 zeste 基因增强子同源物 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 蛋白在人类的很多肿瘤中存在过表达现象, 例如前列腺癌、乳腺癌、B 细胞淋巴瘤、鼻咽癌等, 且 EZH2 的表达水平与肿瘤的预后和进展密切相关。最近的研究^[8]显示: EZH2 可促进 NK/T 淋巴瘤细胞的增殖与进展。然而, 关于 EZH2 与 NK/T 淋巴瘤放化疗敏感性的关系尚未有相关报道。因此, 该研究通过建立 EZH2 的鼻腔 NKT 淋巴瘤细胞株 SNK-6 细胞株的稳定沉默株, 运用 MTT、线性二次模型、Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡等实验方法初步阐明 EZH2 对于 NK/T 淋巴瘤细胞放化疗敏感性的影响, 为 NK/T 淋巴瘤治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 兔抗人单克隆抗体 EZH2G (ab133736) 购自美国 Abcam 公司; 兔抗人 Cleaved PARP Antibody (Asp214)、兔抗人 Cleaved Caspase-3 (Asp175) 抗体、鼠抗人单克隆抗体 Phospho-Histone H2AX (γ -H2AX)、兔抗人 p53 结合蛋白 1 (p53 binding protein 1, 53BP1) 抗体均购自美国 Cell signaling technology 公司; AnnexinV-FITC Apoptosis detection kit 购自南京 Vazyme Biotech 公司; Aqueous One Solution MTS assay 购自美国 Promega 公司。

2017-03-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81201743); 中国教育部博士基金(编号: 20123420120008); 安徽省博士后科学基金资助项目(编号: 2015B053)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 血液内科、² 放疗科, 合肥 230022

作者简介: 蔡露青, 女, 硕士研究生;

夏瑞祥, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xrx2041@163.com

($t = 7.040, 11.900, P < 0.05, 0.001$). SB203580 alone had no effect on the expression of p-p38 and TRB3, when compared to the control group, there was not statistically significant. **Conclusion** Levels of TRB3 protein increase in LPS-induced acute lung injury, and is regulated by p38-MAPK pathway.

Key words lipopolysaccharide; vascular endothelial cell; TRB3; p38-mitogen-activated protein kinase

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人NK/T淋巴瘤细胞株SNK-6细胞株用含有10%人AB血清和浓度为700 IU/ml重组人白介素-2的RPMI 1640培养基培养,并置于37℃、5% CO₂的湿化培养箱中。

1.2.2 EZH2慢病毒干扰体系构建 慢病毒载体的构建具体步骤及干扰序列参照本课题组之前发表的文献^[7]。

1.2.3 EZH2稳定干扰SNK-6细胞株的构建 将SNK-6以 1×10^6 /ml的密度接种于细胞培养瓶中,将病毒浓缩液感染指数生长期的SNK-6细胞,同时添加多聚葡胺至8 μg/ml,感染12 h后换液,37℃、5% CO₂继续培养3 d后进行传代,并用Western blot检测病毒的沉默效率。

1.2.4 细胞半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)的测定 细胞活力用A QueousOne Solution MTS试剂盒(美国Promega公司)测定。取对数生长期的细胞消化并计数接种96孔板中,密度约 2×10^5 /孔。培养24 h后加入一定浓度梯度的吉西他滨药物继续培养24 h。继续培养24 h后,每孔各加入20 μl MTS试剂培养3 h后以酶标仪检测各孔450 nm波长的吸光度(absorbance, A)值。EZH2稳定沉默细胞株(SNK6-shEZH2)和对照细胞株(SNK6-shluc)两组细胞每组各设置只有培养基的调零孔(无细胞)和不加吉西他滨的对照孔,每个浓度梯度分别设6个复孔。增殖抑制率(%) = $[1 - (A_{\text{吉西他滨}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})] \times 100\%$,使用Graphpad Prim 5.0拟合曲线并计算两细胞株IC₅₀。

1.2.5 Western blot 用RIPA细胞裂解液裂解提取细胞总蛋白。用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后,采用SDS-PAGE电泳分离总蛋白后,湿转印至PVDF膜上,使用BSA溶液室温封闭30 min后,一抗4℃孵育过夜;PVDF膜以TBST溶液洗涤3次,每次5 min,二抗室温孵育1 h;TBST溶液洗膜3次,每次5 min,采用ECL发光试剂盒显色,X线片曝光成像。

1.2.6 克隆形成实验及线性二次模型曲线(Linear-Quadratic Model)的拟合 SNK6-luc和SNK6-shEZH2细胞按一定数量接种于6孔板中,用含有1%甲基纤维素(德国Sigma公司)的RPMI 1640培养基培养(含10%人AB血清和700 IU/ml重组人

白介素-2)培养24 h后,按0、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4 Gy设9个照射剂量组,每一剂量组设3个复孔。照射条件为:源皮距=100 cm,剂量率=400 cGy/min,瓦里安23EX加速器6 Mv X线。照射后的细胞置于37℃、5% CO₂培养箱内培养至出现肉眼可见克隆时,终止培养。显微镜下计数含50个细胞以上的克隆数,计算克隆形成率(planting efficiency, PE)和存活分数(surviving fraction, SF), $PE(\%) = \text{克隆数} / \text{接种细胞数} \times 100\%$, $SF = \text{受照射细胞的PE} / \text{对照细胞的PE} \times 100\%$ 。以3次照射的SF均值进行分析,运用GraphPad Prism 5.0软件绘制剂量存活曲线,并采用最小二乘法进行L-Q模型曲线 $[SF = \exp(-\alpha D - \beta D^2)]$ 的拟合,并得出L-Q模型参数 α 、 β 、 α/β 。标化2Gy照射后的细胞存活分数(survival fraction at 2Gy, SF2)计算放射增敏比(sensitization enhancement ratio, SER) = 沉默前组SF2/沉默后组SF2。具体方法参考文献^[9]。

1.2.7 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡 将SNK6-shlu和SNK6-shEZH2细胞株接种在6孔板中,每组设3个复孔24 h贴壁后给予1.5 Gy放疗剂量照射或者浓度为0.02 μg/ml的吉西他滨处理;36 h后用不含EDTA的胰酶消化细胞收集细胞,用PBS清洗2次后,离心(1 000 r/min, 5 min)收集细胞;加入100 μl结合缓冲液重悬细胞后,加入5 μl Annexin V-FITC和5 μl PI染液(Vazyme Biotech)混匀,室温避光孵育染色10 min后,加入300 μl结合缓冲液轻轻重悬细胞,加入10 μl PI,混匀,于1 h内用流式细胞仪检测分析(BD FACSCanto II Flow Cytometer)。

1.2.8 细胞免疫荧光实验 将射线照射处理后36 h后两组细胞离心,用PBS离心洗涤细胞3次,在EP管中用4%多聚甲醛室温固定30 min,用PBS清洗掉多余的多聚甲醛;后用0.5% Triton-X 100溶液通透细胞1 h;PBS离心清洗2次,用一抗稀释液重悬细胞,加入鼠抗人单克隆抗体Phospho-Histone H2AX (γ-H2AX)以及兔抗人53BP1抗EP管中4℃孵育过夜,经PBS清洗2次后,加入DyLight 549标记的Goat anti-rabbit IgG(广州proteintech公司)及Alexa Fluor 488标记的Goat anti-mouse IgG(美国Invitrogen公司)荧光二抗(1:100),然后用DAPI染核;PBS离心洗涤3次后用PBS重悬细胞,吸取40~50 μl细胞悬液滴到载玻片上,盖玻片封片后在共

聚焦显微镜下观察并拍照。分别计数 0、36 h 时 53BP1 和 γ -H2AX 融合共阳性(黄色)焦点形成的个数,之后统计学比较分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用两独立样本的 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EZH2 沉默后增强 NK/T 淋巴瘤细胞体外化疗敏感性 首先,在 EZH2 高表达 SNK-6 细胞株中利用慢病毒干扰体系构建了 SNK6-shEZH2 和 SNK6-shluc,并用 Western blot 检测了慢病毒干扰的效率(图 1)。MTS 分析结果表明 SNK6-shluc 细胞对吉西他滨 IC_{50} 为 $0.033 \mu\text{g/ml}$, 95% CI: $0.027 \sim 0.040 \mu\text{g/ml}$; SNK6-shEZH2 细胞对吉西他滨的 IC_{50} 为 $0.013 \mu\text{g/ml}$, 95% CI: $0.011 \sim 0.016 \mu\text{g/ml}$; SNK6-shluc 的 IC_{50} 约为 SNK6-shEZH2 的 2.54 倍(图 2)。SNK6-shEZH2 较 SNK6-shluc 细胞 IC_{50} 的显著降低,证实了抑制 EZH2 的表达显著提高了 SNK6 细胞株对吉西他滨的敏感性。

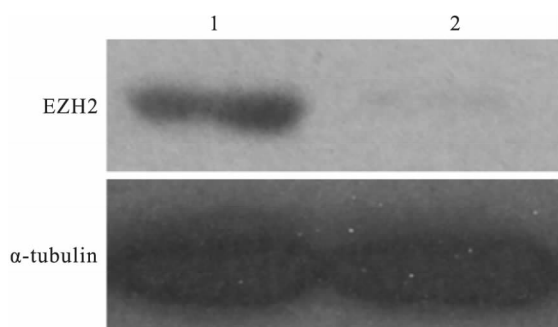


图 1 慢病毒沉默 EZH2 的干扰效率

1: SNK6-shluc; 2: SNK6-shEZH2

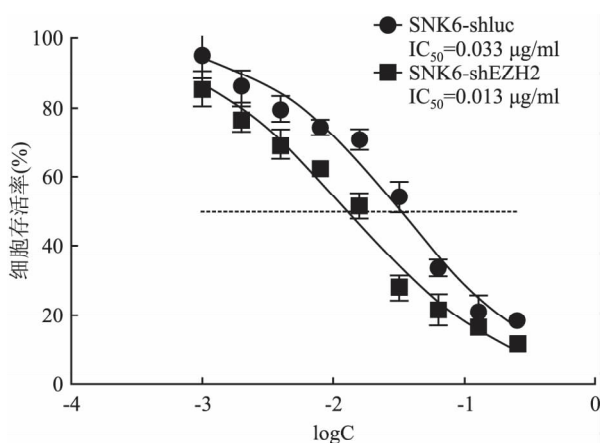


图 2 干扰 EZH2 后 SNK6 细胞的 IC_{50} 值的变化

2.2 沉默 EZH2 基因增加 NK/T 淋巴瘤细胞对化疗药物引起的细胞凋亡 本研究进一步运用 Annexin-V/PI 双染法分析比较了抑制 EZH2 的表达对吉西他滨引起 SNK6 细胞凋亡比例的影响。结果显示:在没有运用吉西他滨药物处理下的情况下,单纯的干扰 EZH2 基因的表达并不能引起 SNK6 细胞的凋亡;而在经吉西他滨药物处理后,干扰内源性 EZH2 的表达能较 SNK6-shluc 明显提高细胞凋亡的比例(13.340 ± 2.330 vs 20.780 ± 3.830 , $t = 2.950$, $P < 0.05$),见图 3。

2.3 干扰 EZH2 基因增强化疗药物诱导的细胞凋亡蛋白断裂带的产生 随后的 Western blot 得到的结果与 Annexin-V/PI 双染法观察到的结果相类似。如图 4 所示:在无吉西他滨药物处理的情况下,单纯干扰 EZH2 并不能诱导 SNK6 细胞产生细胞凋亡蛋白断裂带(cleaved PARP 及 cleaved Caspase-3);而用吉西他滨药物($0.02 \mu\text{g/ml}$)处理后,沉默 EZH2 蛋白能明显提高吉西他滨药物诱导的细胞凋亡蛋白断裂带(cleaved PARP 及 cleaved Caspase-3)的产生。

2.4 抑制内源性 EZH2 基因的表达能提高 NK/T 淋巴瘤细胞的体外放疗敏感性 由于 NK/T 淋巴瘤是放疗较为敏感的肿瘤,因此本研究采用克隆形成实验观察 EZH2 对 NK/T 淋巴瘤细胞株放疗敏感性的影响。结果显示:在沉默 EZH2 基因后,SNK6 的 SF 明显降低(图 5)。利用线性二次模型拟合的存活曲线求出的相关的参数见表 1。计算出 SNK6-shluc 和 SNK6-shEZH2 的 SF2 分别为:0.086、0.015,进而求出沉默 EZH2 基因后对 SNK6 的 SER 为 5.855。

表 1 利用线性二次模型拟合出的各参数数值

组别	α 值 (Gy ⁻¹)	β 值 (Gy ⁻²)	α/β 值 (Gy)	SF2	SER
SNK6-shluc	-0.571	0.897	-0.636	0.086	5.855
SNK6-shEZH2	-0.326	1.217	-0.268	0.015	-

2.5 抑制 EZH2 基因提高射线诱导的细胞凋亡蛋白断裂带的产生 为了证明 EZH2 对 NK/T 淋巴瘤细胞放疗增敏效应是否是通过增强射线引起的细胞凋亡实现的,本研究用 Western blot 检测了 EZH2 对细胞凋亡相关蛋白 PARP 及 Caspase-3 的影响。与图 3 结果相类似,在无射线处理的情况下,仅仅干扰内源性 EZH2 基因的表达并不能诱导 SNK6 细胞凋

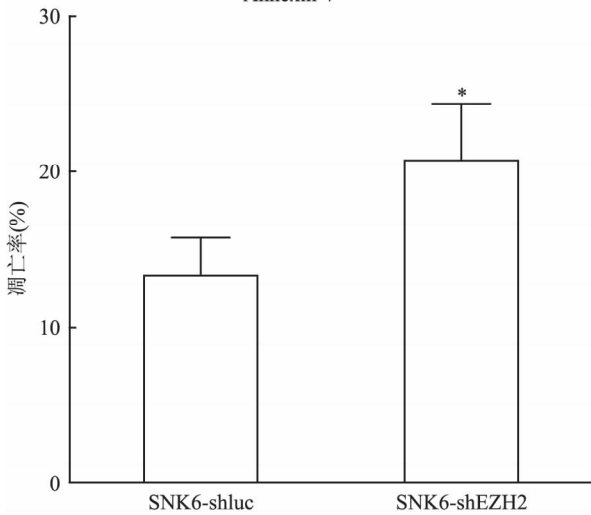
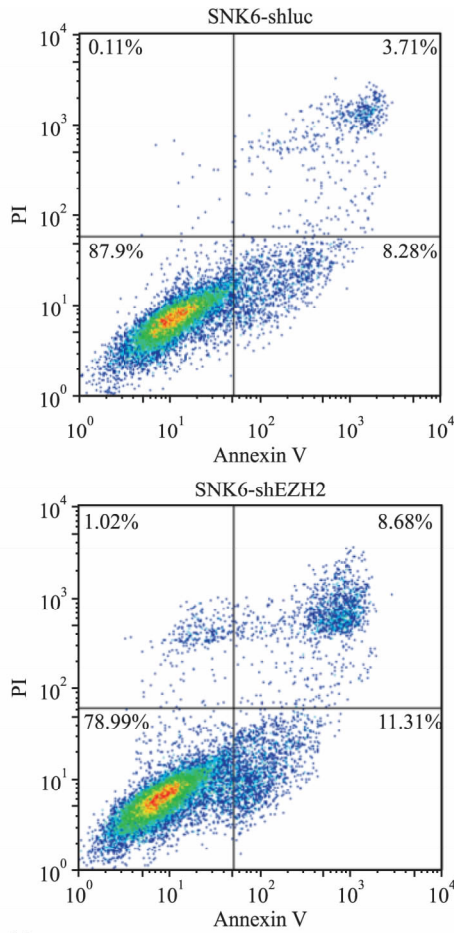


图3 抑制内源性 EZH2 提高吉西他滨药物诱导的 SNK6 细胞凋亡与 SNK6-shluc 比较: * P < 0.05

亡蛋白断裂带(cleaved PARP 及 cleaved Caspase-3) 的产生; 而在经 1.5 Gy 的 X 射线处理后, SNK6-shEZH2 较 SNK6-shluc 的细胞凋亡蛋白断裂带 (cleaved PARP 及 cleaved Caspase-3) 明显增多(图 6) 。

2.6 沉默 EZH2 基因的表达提高 NK/T 淋巴瘤细胞射线诱导的双链 DNA 断裂 (double strand break, DSB) 修复聚焦点的形成 本研究进一步运

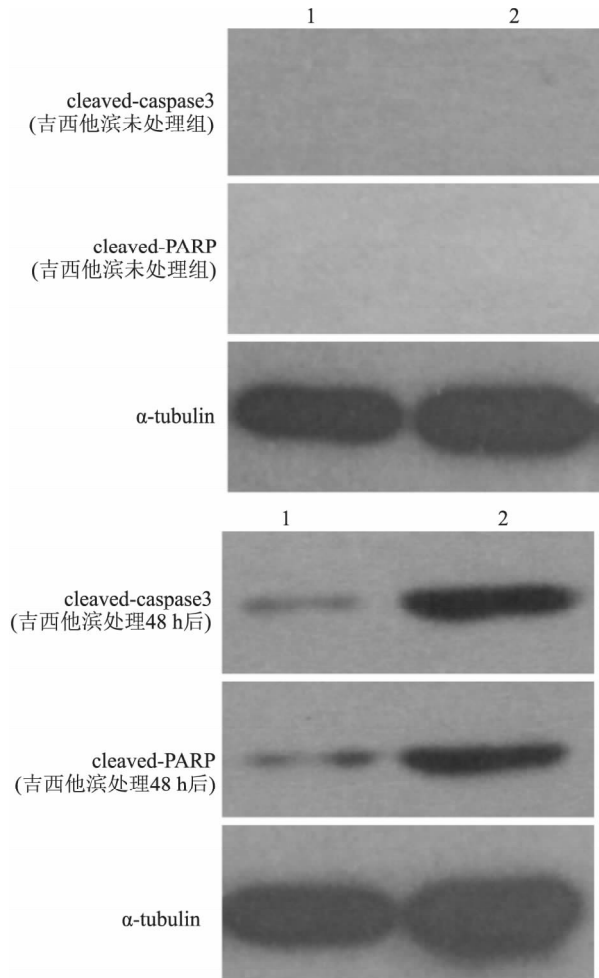


图4 干扰 EZH2 蛋白显著提高吉西他滨药物诱导的凋亡断裂带的产生
1: SNK6-shluc; 2: SNK6-shEZH2

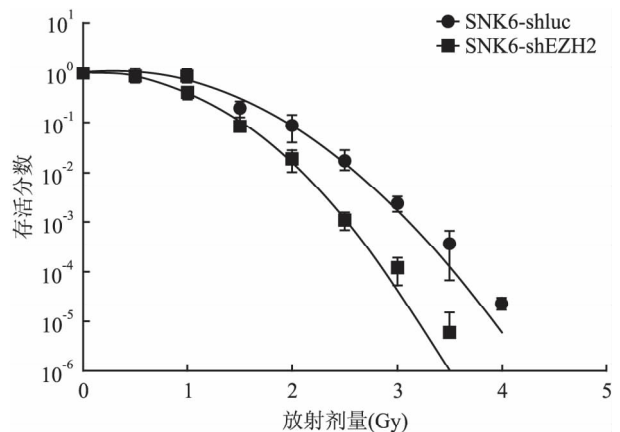


图5 SNK6-shluc 和 SNK-shEZH2 在同射线剂量下的存活曲线

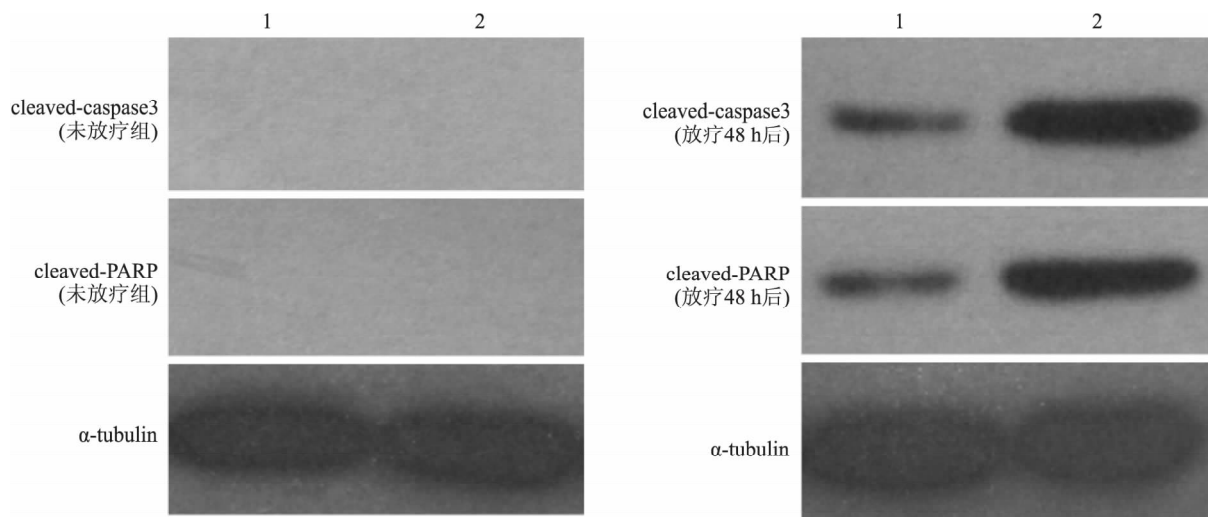


图6 干扰 EZH2 蛋白明显增强射线诱导的细胞断裂带的产生
1: SNK6-shluc; 2: SNK6-shEZH2

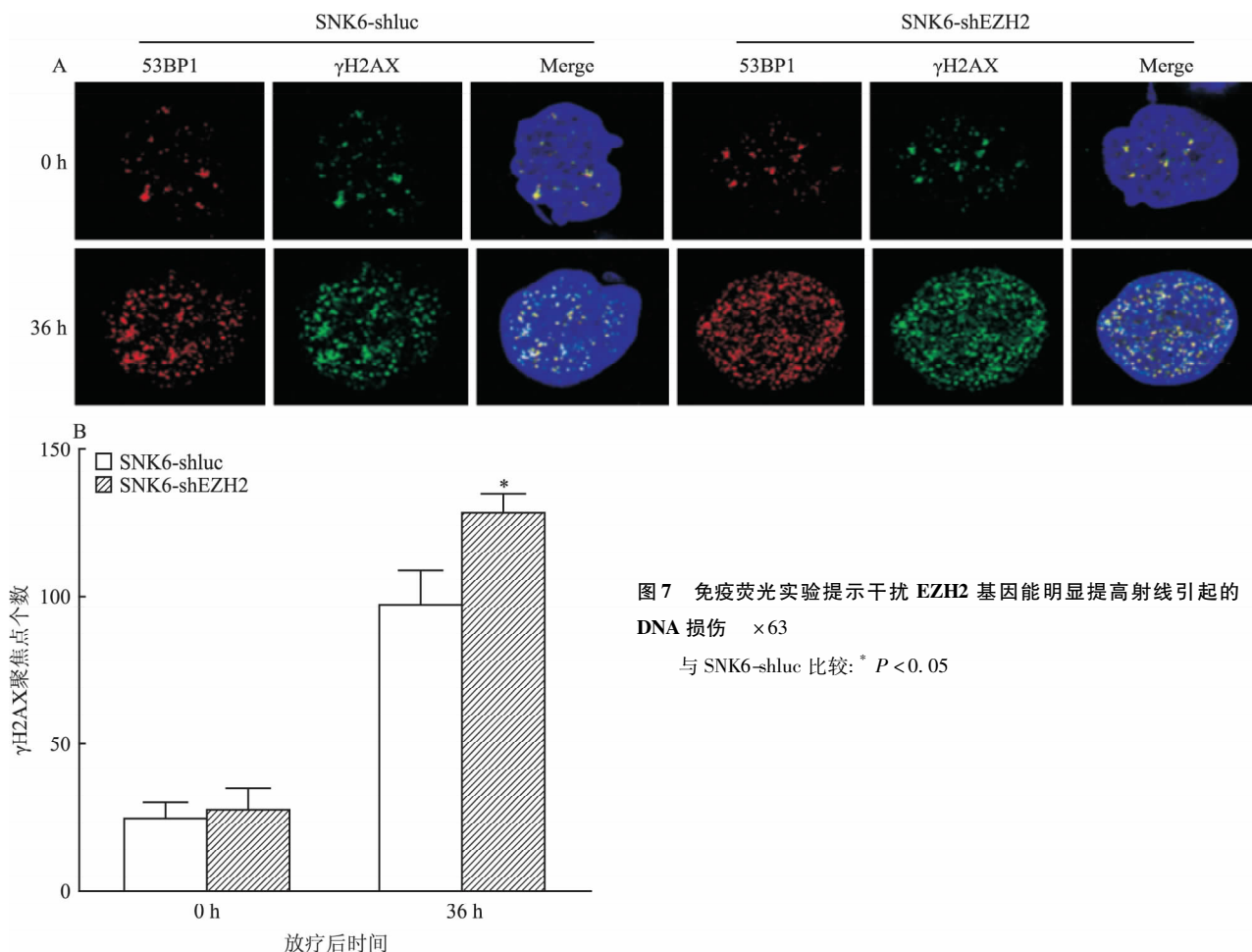


图7 免疫荧光实验提示干扰 EZH2 基因能明显提高射线引起的 DNA 损伤 ×63
与 SNK6-shluc 比较: * $P < 0.05$

用免疫荧光实验分析 EZH2 对 SNK6 细胞射线诱导的 DSB 损伤修复能力的影响。53BP1 蛋白和 γ -H2AX 蛋白分别应用红色荧光标记和绿色荧光标

记,共阳性的焦点(黄色)即为 DSB 损伤修复聚焦点。如图 7 显示:在射线处理的开始阶段(0 h),SNK6-shEZH2 的 DNA 损伤修复聚焦点的个数与

SNK6-shluc 细胞差异无统计学意义; 而射线处理 36 h 后, SNK6-shEZH2 的 DNA 损伤修复聚焦点的个数显著的多于 SNK6-shluc 细胞 (97.000 ± 12.000 vs 128.000 ± 7.000 , $t=3.865$, $P=0.018$)。

3 讨论

NK/T 细胞淋巴瘤是较不常见的一类肿瘤, 其发病率不到非霍奇金淋巴瘤的 10%^[10]; 且难以获得高质量的组织穿刺标本用于 NK/T 细胞淋巴瘤的研究, 因此, 对于 NK/T 细胞淋巴瘤发病的分子机制和病理状态目前知之甚少。NK/T 细胞淋巴瘤具有恶性度高、发病进展快、预后差的特点。其对于常规的化疗方案抗拒, 虽然 NK/T 淋巴瘤对于放疗相对比较敏感, 但是 NK/T 细胞淋巴瘤体中仍有一群肿瘤细胞对于放射治疗表现出抵抗, 往往是造成肿瘤复发的根源。近年来, 随着肿瘤分子生物学发展, 从分子水平上认识和改善肿瘤的放化疗敏感性, 进而增加肿瘤的治疗控制率, 这一富有前景的治疗思路已经成为目前肿瘤治疗的一个新的趋势。

PRC2 是胚胎发育和肿瘤发生的一个重要的表观遗传水平的调控因子, 其核心组份包括 EZH2、SUZ12 和 EED 3 个蛋白。而 EZH2 蛋白是 PRC2 复合物组份中唯一具有组蛋白 H3K27 三甲基化催化活性的蛋白。因而, 其表达水平的高低或催化活性的改变将可能诱发肿瘤的发生和发展^[11]。但最新研究^[8]证明, EZH2 在 61% 的 NK/T 细胞淋巴瘤组织中表达上调, 但是 EZH2 并非通过经典的 H3K27 三甲基化以表观遗传学的形式调控 NK/T 细胞淋巴瘤增殖活性, 而是作为一个转录激活因子直接调控相关的靶基因进而调控 NK/T 淋巴瘤细胞的增殖和侵袭活性, DNA 损伤修复能力以及肿瘤干细胞表型。由于 NK/T 细胞淋巴瘤是以放化疗为主要治疗手段的恶性肿瘤, 因此本实验在此研究基础上采用慢病毒介导的 RNA 干扰技术进一步分析 EZH2 对于 NK/T 细胞淋巴瘤放化疗敏感性的影响。

在化疗敏感性方面, 本研究结果显示: 单纯干扰 EZH2 并不能激活凋亡通路, 但是其可以提高化疗药物诱导的细胞凋亡强度。在放疗敏感性方面, 本研究结果证明: 沉默 EZH2 基因显著提高射线诱导的细胞凋亡蛋白断裂带的产生。最近 Alimova et al^[12] 在非典型型畸胎瘤样/横纹肌样瘤的研究中发现, 干扰 EZH2 与 EZH2 的抑制剂 (DZNep) 联合作

用可以诱导 BT12 的凋亡, 这一研究与本研究的研究结果类似, 进一步说明 EZH2 对于肿瘤细胞的放疗敏感性具有调控作用。

当射线引起 DNA 发生损伤后, 会诱导组蛋白 H2AX 发生磷酸化形成 γ -H2AX^[13]。同时也会诱导 53BP1 发生磷酸化, 并迅速聚集到 DNA 受损位点形成 DNA 损伤修复聚焦点。因此, 计数 γ -H2AX 和 53BP1 共阳性聚焦点的个数可以反应射线诱导的 DNA 损伤的大小^[14]。本研究的实验结果提示: EZH2 基因可能是通过调控射线照射后 DNA 损伤的修复聚焦点的形成机制, 进而调控 NK/T 淋巴瘤细胞放疗敏感性。

目前的观点^[15-16]推测, 肿瘤干细胞的存在是引起人类肿瘤治疗过程中化疗和放疗抵抗的一个重要机制, 而 EZH2 蛋白已经被证明参与了多种肿瘤干细胞信号通路的调控, 因此, EZH2 蛋白可能通过对肿瘤干细胞信号通路的调控, 进而参与了肿瘤放化疗抵抗的形成。

综上所述, 本课题的研究结果显示: 干扰 EZH2 基因能够增加 NK/T 淋巴瘤细胞化疗诱导的凋亡, 从而增加 NK/T 淋巴瘤细胞的化疗敏感性; 并且抑制 EZH2 可以通过增强射线诱导的凋亡和增加射线诱导的 DNA 损伤来提高 NK/T 淋巴瘤细胞对射线的敏感性。因此, 靶向沉默 EZH2 基因可改善 NK/T 淋巴瘤细胞的放化疗敏感性, 本研究可能为将来 NK/T 淋巴瘤细胞治疗策略提供一定的参考价值。

参考文献

- [1] Bachy E, Urb M, Chandra S, et al. CD1d-restricted peripheral T cell lymphoma in mice and humans [J]. J Exp Med, 2016, 213(5): 841-57.
- [2] Avilés A, Neri N, Fernández R, et al. Combined therapy in untreated patients improves outcome in nasal NK/T lymphoma: results of a clinical trial [J]. Med Oncol, 2013, 30(3): 637.
- [3] Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3 [J]. Curr Opin Genet Dev, 2004, 14(2): 155-64.
- [4] Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life [J]. Nature, 2011, 469(7330): 343-9.
- [5] Ren G, Baritaki S, Marathe H, et al. Polycomb protein EZH2 regulates tumor invasion via the transcriptional repression of the metastasis suppressor RKIP in breast and prostate cancer [J]. Cancer Res, 2012, 72(12): 3091-104.
- [6] Morin R D, Johnson N A, Severson T M, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lym-

- phomas of germinal-center origin [J]. *Nat Genet*, 2010, 42(2): 181–5.
- [7] Tong Z T, Cai M Y, Wang X G, et al. EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin [J]. *Oncogene*, 2012, 31(5): 583–94.
- [8] Yan J, Ng S B, Tay J L, et al. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity [J]. *Blood*, 2013, 121(22): 4512–20.
- [9] Xiao W, Graham P H, Power C A, et al. CD44 is a biomarker associated with human prostate cancer radiation sensitivity [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2012, 29(1): 1–9.
- [10] Vose J, Armitage J, Weisenburger D, et al. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(25): 4124–30.
- [11] Bracken A P, Dietrich N, Pasini D, et al. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(9): 1123–36.
- [12] Alimova I, Birks D K, Harris P S, et al. Inhibition of EZH2 suppresses self-renewal and induces radiation sensitivity in atypical rhabdoid teratoid tumor cells [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(2): 149–60.
- [13] Taneja N, Davis M, Choy J S, et al. Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3): 2273–80.
- [14] Tartier L, Gilchrist S, Burdak-Rothkamm S, et al. Cytoplasmic irradiation induces mitochondrial-dependent 53BP1 protein relocalization in irradiated and bystander cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5872–9.
- [15] Chang C J, Yang J Y, Xia W, et al. EZH2 promotes expansion of breast tumor initiating cells through activation of RAF1- β -catenin signaling [J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(1): 86–100.
- [16] Suvà M L, Riggi N, Janiszewska M, et al. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(24): 9211–8.

Effect of EZH2 on chemoradiotherapy sensitivity of NK/T lymphoma cell

Cai Luqing¹, Yuan Xiaolong², Tong Zhuting², et al

(¹Dept of Haematology, ²Dept of Radiotherapy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of EZH2 on chemoradiotherapy sensitivity of NK / T lymphoma cells. **Methods** MTS assay was used to determine the gemcitabine IC₅₀ of SNK6 cell line. Apply linear quadratic model to value SER of SNK6 cells. Annexin V/PI double staining was used to detect apoptosis. Western blot was used to measure the amount of cleaved band of caspase-3 and PARP protein. Immunofluorescence was applied to confirm the influence on DNA damage induced by irradiation. **Results** Knockingdown EZH2 decreased the IC₅₀ of gemcitabine about 2.54 times when compared with control cells, and it also increased the apoptosis induced by gemcitabine. Silence the express of EZH2 improved the radio sensitivity of SNK6 cell line, the sensitization enhancement ratio was 1.659. It also enhanced the apoptosis caused by IR, and it increased the amount of apoptosis protein induced by IR. **Conclusion** Suppress the express of EZH2 can improve the radiation and chemotherapy sensitivity of NK/T lymphoma cell.

Key words NK/T lymphoma; EZH2; chemoradiotherapy sensitivity; apoptosis; DNA damage