

靶向沉默 *HIF-1 α* 和 *Survivin* 基因对鼻咽癌裸鼠移植瘤放疗敏感性的影响^{*}

向少龙¹, 刘娟娟¹, 赵 艳², 赵厚育^{3**}

(1. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学附院 耳鼻咽喉科, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨 RNAi 靶向沉默人鼻咽癌细胞株 CNE-2 细胞缺氧诱导因子-1 α (*HIF-1 α*) 和/或生存素 (*Survivin*) 基因对裸鼠移植瘤放疗敏感性的影响。方法: 设计合成靶向沉默 *HIF-1 α* 和/或 *Survivin* 的 microRNA 干扰质粒, 采用脂质体转染法将 *HIF-1 α* 和/或 *Survivin* 的 microRNA 干扰质粒转染到 CNE-2 细胞; 取 35 只 4~6 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠, 随机均分为 *HIF-1 α* 干扰组、*Survivin* 干扰组、*HIF-1 α* & *Survivin* 干扰组 (联合干扰组)、空载组和阴性对照组; 分别给予相应转染后的 CNE-2 细胞注射至裸鼠右侧腋窝皮下, 待各组裸鼠成瘤后, 给予 5 Gy X-射线照射, 每隔 3 d 放疗 1 次, 共 15 Gy X-射线, 观察各组裸鼠放疗前后的肿瘤体积, 照射结束 3 d 后处死裸鼠, 测量瘤体体积, 计算肿瘤体积增加率; RT-qPCR 法检测瘤体组织中的 *HIF-1 α* 和 *Survivin* mRNA 表达水平, Western Blot 法检测 *HIF-1 α* 和 *Survivin* 蛋白表达水平, TUNEL 试剂盒检测鼻咽癌裸鼠移植瘤中细胞凋亡。结果: *HIF-1 α* 干扰组、*Survivin* 干扰组与联合干扰组经过放射治疗后肿瘤体积增加率明显小于空载体组与阴性对照组 ($P < 0.05$); *HIF-1 α* 干扰组、*Survivin* 干扰组与联合干扰组瘤体组织中 *HIF-1 α* 、*Survivin* mRNA 和蛋白质表达水平显著低于空载体组与阴性对照组, 细胞凋亡率高于空载体组与阴性对照组 ($P < 0.05$); *HIF-1 α* 干扰组、*Survivin* 干扰组及联合干扰组瘤体组织中 *HIF-1 α* 、*Survivin* mRNA 和蛋白质表达水平及细胞凋亡率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 单独干扰 *HIF-1 α* 、*Survivin* 基因与联合干扰 *HIF-1 α* 和 *Survivin* 基因均能够增加鼻咽癌裸鼠移植瘤对放疗敏感性, 但联合干扰并没有进一步提高鼻咽癌裸鼠移植瘤放疗敏感性。

[关键词] 鼻咽肿瘤; 缺氧诱导因子-1 α ; 生存素; 放射疗法; 计算机辅助; 放疗敏感性

[中图分类号] R739.63; R96 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)04-0377-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.04.004

Effect of Targeted Silencing *HIF-1 α* and *Survivin* Gene on Radiation Sensitivity of Transplanted Nasopharyngeal Carcinoma in Nude Mice

XIANG Shaolong¹, LIU Juanjuan¹, ZHAO Yan², ZHAO Houyu³

(1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. The Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Otorhinolaryngology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Hypoxia inducible factor 1- α (*HIF-1 α*) and/or *Survivin* interference in human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 on the radiotherapy sensitivity of xenografted tumors in nude mice. **Methods:** The recombinant plasmids for *HIF-1 α* and/or *Survivin* interference were constructed. Then the plasmids were transfected into CNE-2 cells using lipofection; 35 female nude mice aged 4 to 6 weeks were randomly divided into *HIF-1 α* interference group, *Survivin* interference group, *HIF-1 α* & *Survivin* interference group, the empty carrier group, and negative control group in equal numbers. CNE-2 cells after transfection were injected to nude mice

^{*} [基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目 (81260353)

^{**} 通信作者 E-mail: zhaohouyujia@163.com

网络出版时间: 2017-04-19 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170419.1515.006.html>

respectively. Once xenografted tumors formed, each mouse would accept 5 Gy of X-ray radiations in every three days for a total 15 Gy of X-ray radiations. The volume of tumors would be observed at different times. The mice would be put to death three days later after radiation. Then the volume of tumors would be measured and the radiotherapy sensitivity would be calculated. Moreover, the mRNA expression levels and protein levels of HIF-1 α and Survivin in the xenografted tumors would be detected by RT-qPCR and Western blotting respectively. The cell apoptosis in xenografted tumors would be evaluated using TUNEL kit. **Results:** After radiation therapy, the increase rates of tumor volume ration in HIF-1 α interference group, Survivin interference group and HIF-1 α & Survivin interferences group were significantly lower than that in empty carrier group and the negative control group ($P < 0.05$). Furthermore, the mRNA and protein expression levels of HIF-1 α , Survivin mRNA and protein expression level in HIF-1 α , Survivin interference groups and HIF-1 α & Survivin interference group were significantly lower than that in the empty carrier group and the negative control group ($P < 0.05$). The cell apoptosis of tumors in HIF-1 α and / or Survivin interference groups were significantly higher than that in the empty carrier group and the negative control group ($P < 0.05$). However, there was no statistical significance for the mRNA and protein expression levels of HIF-1 α and Survivin and the cell apoptosis of tumors among HIF-1 α interference group, Survivin interference group and HIF-1 α & Survivin interferences group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Independently HIF-1 α interference, Survivin interference or HIF-1 α & Survivin interferences could increase the radiotherapy sensitivity of Nasopharyngeal carcinoma xenografted tumors in nude mice. However, HIF-1 α & Survivin interferences did not further improve radiotherapy sensitivity of Nasopharyngeal carcinoma xenografted tumors.

[**Key words**] nasopharyngeal carcinoma; hypoxia-inducible factor-1 α ; Survivin; radiotherapy, computer-assisted; radiotherapy sensitivity

鼻咽癌发病率居头颈部恶性肿瘤之首,是我国常见的恶性肿瘤之一,在我国南部及香港地区高发,并呈逐年升高趋势。近几年,调强放射治疗(intensity-modulated radiation therapy, IMRT)的出现使鼻咽癌的局部控制率和生存率得到大大提高,但放射治疗抵抗导致的鼻咽癌放疗失败仍是临床治疗的难点,如何提高鼻咽癌放疗的敏感性仍然是临床上需要攻克的难点和重点^[1]。多项研究表明,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1- α , HIF-1 α)与肿瘤的放射敏感性有关,抑制 HIF-1 α 的表达可以逆转缺氧肿瘤细胞的抗辐射性^[2-4]。HIF-1 α 在鼻咽癌中高表达,并与鼻咽癌的发生与预后有关^[5-6]。研究发现,鼻咽癌中生存素(Survivin)的表达水平与细胞的凋亡率及放疗敏感性成负相关^[7]。本课题组前期的体外研究发现,沉默 HIF-1 α 与 Survivin 基因后, CNE-2 细胞增殖被抑制,细胞凋亡增加,经放疗后凋亡更明显。本研究通过 siRNA 技术靶向沉默 CNE-2 细胞中 HIF-1 α 或(和) Survivin 基因,观察 CNE-2 裸鼠移植瘤对放疗的敏感性。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

鼻咽癌细胞株 CNE-2(低分化鼻咽鳞状细胞癌细胞系)由上海复旦大学亓立峰教授实验室赠与,胎牛血清(gibco,美国)、DMSO、质粒大提试剂盒、DH5 α 大肠杆菌感受态细胞及壮观霉素(Invitrogen,美国)、Trizol 试剂、逆转录试剂盒、Real-time PCR SYBER Green 试剂盒(Roche)及 miRNA 干扰质粒(pPG/miR/eGFP/Blasticidin-siRNA)由上海吉玛公司合成构建; Lipofectamine TM 2000. Opti-MEM 低血清培养基(Invitrogen) Western blot 相关试剂及蛋白提取试剂盒(Solarbio)、BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo,美国)、兔抗人 HIF-1 α 单克隆抗体、兔抗人 Survivin 单克隆抗体、鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体及羊抗兔二抗(Abcam)、4~6 周 BALB/C-nu/nu 雌性裸鼠 35 只(体质量 18~20 g),购自贵州医科大学动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人鼻咽癌细胞 CNE-2 用含有

10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养液,于 37 ℃ 5% CO₂ 恒温培养箱中常规培养,每 2 d 传代 1 次。

1.2.2 *HIF-1α* 和 (或) *Survivin* 干扰质粒转染 CNE-2 细胞 根据转染质粒不同,将 CNE-2 细胞分为 *HIF-1α* 干扰组(转染 pPG/miR/eGFP/Basticidin-*HIF-1α* 质粒)、*Survivin* 干扰组(转染 pPG/miR/eGFP/Basticidin-*Survivin* 质粒)、联合干扰组(转染 pPG/miR/eGFP/Basticidin-*HIF-1α* & *Survivin* 质粒)、空载组(转染 pPG/miR/eGFP/Basticidin 空载体)及阴性对照组(未转染的鼻咽癌 CNE-2 细胞)。转染过程:制备鼻咽癌 CNE-2 单细胞悬液,按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板,待细胞完全贴壁生长到 60% ~ 70% 融合状态时进行转染,转染 6 h,更换无双抗的培养基,继续培养 48 h,荧光显微镜下观察其荧光效应,计算转染率;提取各组细胞总 RNA,1% 的琼脂糖凝胶电泳观察 RNA 的完整性,取完整的 RNA 逆转录为 cDNA。采用 RT-qPCR 法检测各组细胞中 *HIF-1α* 和 *Survivin* 基因的沉默效应,计算细胞的干扰效率。

1.2.3 裸鼠皮下移植瘤模型的构建 各组裸鼠在 SPF 级条件下饲养,随机均分为 5 组,分别为 *HIF* 干扰组、*Survivin* 干扰组、联合干扰组、空载组及阴性对照组。分别于各组裸鼠右腋皮下注射处于对数生长期的上述相应转染后的 CNE-2 细胞 0.2 mL,浓度均为 1.5×10^{10} /L。待 5 组裸鼠接种细胞后,每天观察裸鼠的精神、饮食、排便和活动等情况,记录裸鼠的体重变化及成瘤情况;待长出瘤块后每隔 3 d 测量 1 次瘤块的长、短径,计算瘤块的体积。裸鼠均成瘤 3 d 时,每组随机抽取 5 只裸鼠进行放疗,每只每次接受 5 Gy X-射线照射,每隔 3 d 放疗 1 次,共 15 Gy X-射线,仪器为德国西门子医用直线加速器(6 MV X-射线垂直照射,照射靶距 100 cm,剂量率 2 Gy/min);照射期间观察各组裸鼠治疗后不同时点肿瘤体积;放疗完成 3 d 后处死动物,迅速剥离瘤体测量体积,观察放射治疗对肿瘤的抑制作用,计算 5 组裸鼠肿瘤平均体积,比较未经过放射治疗时各组肿瘤平均体积,分析 *HIF-1α* 和 *Survivin* 基因沉默对肿瘤放射敏感性的影响。

1.2.4 *HIF-1α* 和 *Survivin* mRNA 表达水平 采用 RT-qPCR 法,按照 Trizol 试剂盒提取瘤体组织总 RNA,采用 Roche 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,用 SYBER Green 法在 Step-one plus 型实时荧光定量 PCR 仪(ABI)上检测各组转染后的鼻咽癌 CNE-2

细胞和裸鼠瘤体组织中 *HIF-1α* 和 *Survivin* mRNA 的相对表达量。引物由上海生工合成,*HIF-1α* 上游引物序列为 5'-CCATTAGAAAGCAGTTCCGC-3',*HIF-1α* 下游引物序列为 5'-TGGGTAG-GAGATGGAGATGC-3';*Survivin* 上游引物序列为 5'-ACCGCATCTCTACATTCAAG-3',*Survivin* 下游引物序列为 5'-TTGAAGCAGAAGAAACACTG-3';内参基因 *GAPDH* 上游引物序列为 5'-ACCTGAC-CTGCCGTCTAGAA-3',内参基因 *GAPDH* 下游引物序列为 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。*HIF-1α* 基因产物长度 194 bp,*Survivin* 基因产物长度 136 bp,内参 *GAPDH* 产物长度 247 bp。PCR 反应体系为 MIX 10 μL、上下游引物各 0.5 μL、cDNA 模板 2 μL、去离子水补足至 20 μL。反应条件为 94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s、60 ℃ 延伸 30 s,共 40 个循环。使用融解曲线监测各样本 PCR 反应的特异性,相对标准曲线计算 PCR 反应的扩增效率,每个样本 3 个复孔。计算公式: $\Delta Ct = \text{待测基因 } Ct \text{ 值} - \text{GAPDH } Ct \text{ 值}$, $\Delta \Delta Ct = \text{实验组 } \Delta Ct - \text{对照组 } \Delta Ct$, 相对表达量 = $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 。基因的抑制率 = $(1 - \text{干扰组 } 2^{-\Delta \Delta Ct} \text{ 值} / \text{阴性对照组 } 2^{-\Delta \Delta Ct} \text{ 值}) \times 100\%$ 。

1.2.5 *HIF-1α* 和 *Survivin* 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测,取各组裸鼠瘤体组织提取总蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,取总蛋白 25 μg 上样,分别用 12% 与 8% 十二烷基酸-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶进行电泳 100 ~ 120 min 分离 *Survivin* 与 *HIF-1α* 蛋白,切胶转 PVDF 膜 2 h,5% 脱脂奶封闭 2 h;兔抗人 *HIF-1α* 单克隆抗体(1:2 000)或兔抗人 *Survivin* 单克隆抗体(1:5 000)为一抗,4 ℃ 孵育过夜;二抗用羊抗兔(1:7 500),以 *GAPDH*(一抗 1:2 000,二抗 1:10 000)为内参,二抗室温孵育 1 h,1 × TBST 洗涤,用 ECL 试剂行化学发光法曝光,结果用 image-J 图像分析系统测定各条带的灰度值。以目的条带与内参条带的平均灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.2.6 移植瘤中细胞凋亡检测 采用 TUNEL 法检测。瘤体取出后常规固定脱水包埋切片,全部染色步骤按照试剂盒说明书进行。光学显微镜摄片,选取 5 个随机视野计数 TUNEL 染色阳性细胞数,以细胞核出现棕褐色颗粒为阳性,计算各组阳性细胞数均值与标准差。

1.3 统计学方法

数据采用统计学软件 SPSS 22.0 进行统计分

析,所有资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,裸鼠肿瘤生长曲线结果采用单因素方差分析 (one-way ANOVA);多样本均数两两比较,先对多组数据进行方差分析,方差齐则采用 *Dunnnett-t* 法,行双侧检验,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染效率与 CNE-2 细胞中的基因沉默效率

质粒的转染效率达 90% 以上 (图 1),RT-qPCR 法检测各组细胞中 *HIF-1 α* 和 *Survivin* 基因的相对表达量,*HIF-1 α* 和 *Survivin* 的沉默效率均达到 85% 以上,表示转染后基因沉默效应好,可以用于裸鼠成瘤造模。

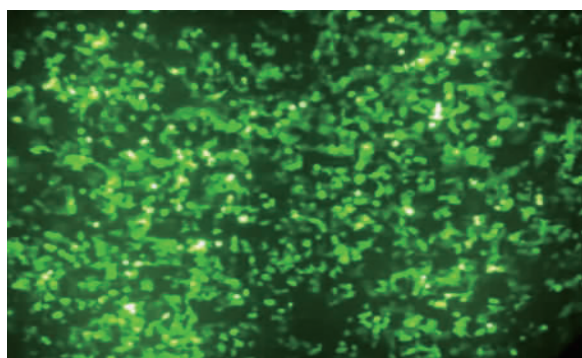


图 1 转染干扰质粒后 CNE-2 细胞的荧光染色结果 (100 \times)

Fig. 1 Fluorescence of cell after liposome transfection

2.2 裸鼠皮下移植瘤的成瘤及放射治疗效果

各组鼻咽癌 CNE-2 细胞均能很好的成瘤,阴性对照组和空载组裸鼠在注射 CNE-2 细胞第 3 天开始出现肿块,肿块软;HIF-1 α 干扰组、Survivin 干扰组在注射第 4 天开始出现肿块,联合干扰组在第 6 天开始出现肿块,成瘤后阴性对照组和空载组肿块最大 (图 2)。第 3 次放疗时,HIF-1 α 干扰组与 Survivin 干扰组有 1 只裸鼠肿块已吸收,联合干扰组有 2 只裸鼠肿块吸收。如图 3 的生长曲线所示,HIF-1 α 与 Survivin 干扰组裸鼠的移植瘤体积增加变化明显低于阴性对照组和空载组,HIF-1 α 干扰组、Survivin 干扰组、联合干扰组裸鼠移植瘤的放疗敏感性为 91.1%、87.6% 及 90.5%。HIF-1 α 干扰组、Survivin 干扰组及联合干扰组的瘤体体积变化率显著低于阴性对照组 ($P < 0.05$);HIF-1 α 干

扰组、Survivin 干扰组及联合干扰组两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

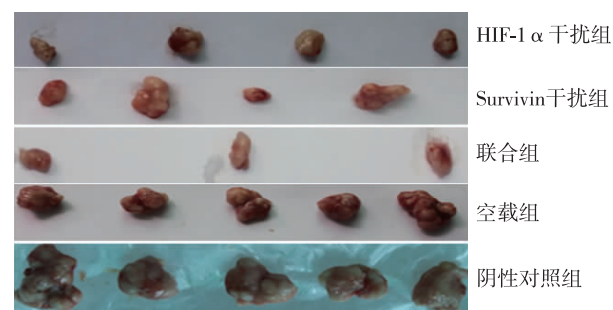
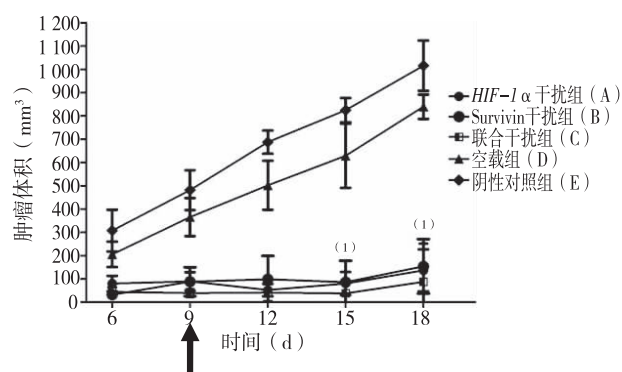


图 2 各组裸鼠右侧腋窝皮下移植瘤

Fig. 2 Subcutaneous tumor of each group

2.3 *HIF-1 α* 和 *Survivin* mRNA 的蛋白表达水平

提取各组裸鼠瘤体组织总 RNA,A260/280 比值均在 1.8 ~ 2.0,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,显示 RNA 28 s 与 18 s 的比值在 1.5 ~ 2.0,表明提取的 RNA 质量较好。与空载组和阴性对照组比较,HIF-1 α 或 Survivin 干扰组及联合干扰组裸鼠移植瘤体积 HIF-1 α 或 *Survivin* mRNA 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$),见图 4、图 5。单基因干扰组基因抑制率达 73% 以上,联合干扰组达 80% 以上,裸鼠造模基因干扰成功。



(1) 与 D 组或 E 组比较, $P < 0.05$

图 3 各组裸鼠右侧腋窝皮下移植瘤的生长曲线

Fig. 3 Subcutaneous tumor growth curves of each group

2.4 裸鼠移植瘤细胞凋亡

TUNEL 染色结果显示,与空载组和阴性对照组比较,HIF-1 α 干扰组、Survivin 干扰组与联合干扰组裸鼠移植瘤中的凋亡细胞数增多 ($P < 0.05$);但 HIF-1 α 干扰组、Survivin 干扰组与联合干扰组间两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 6、图 7。

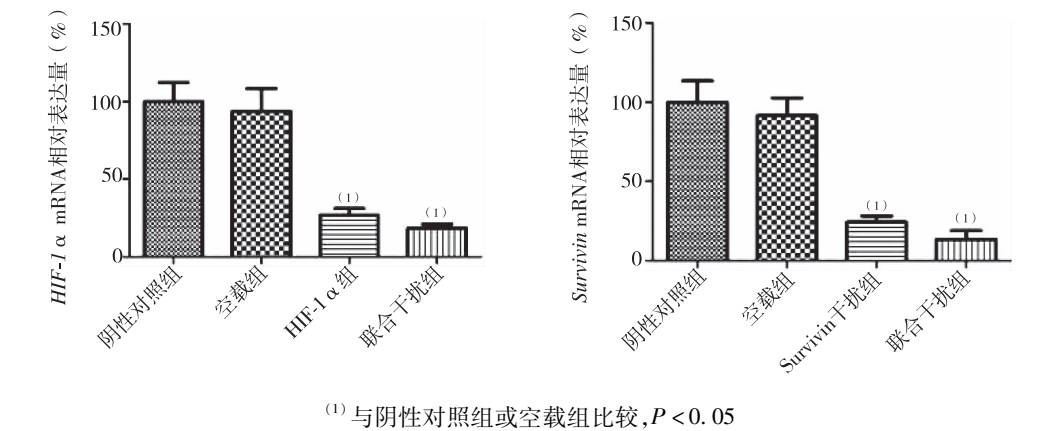


图 4 各组裸鼠移植瘤体组织中 *HIF-1α* 和 *Survivin* mRNA 的表达 (%)

Fig. 4 HIF-1 alpha and Survivin mRNA expression levels of each group in nude mice tissues

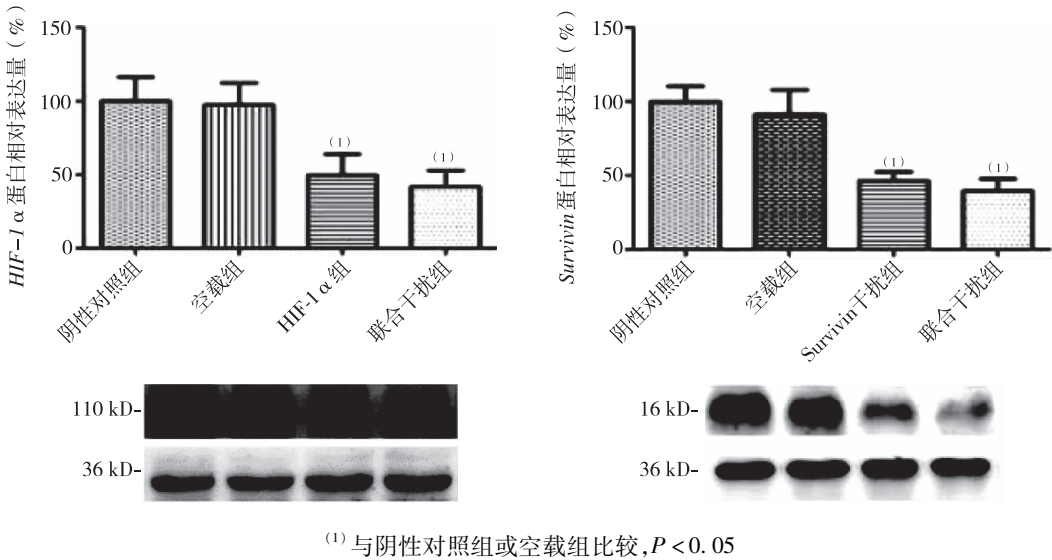
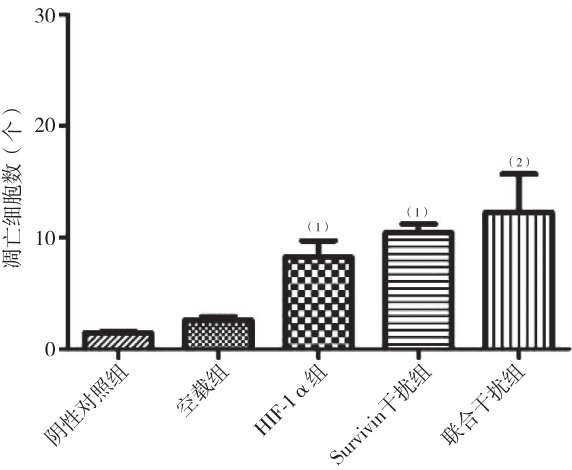


图 5 各组裸鼠移植瘤体组织中 *HIF-1α* 和 *Survivin* 蛋白表达

Fig. 5 HIF-1 1α and Survivin protein expression levels of each group in nude mice tissues



与阴性对照组或空载组比较, ⁽¹⁾ $P < 0.05$, ⁽²⁾ $P < 0.01$

图 6 各组裸鼠组织中凋亡细胞数

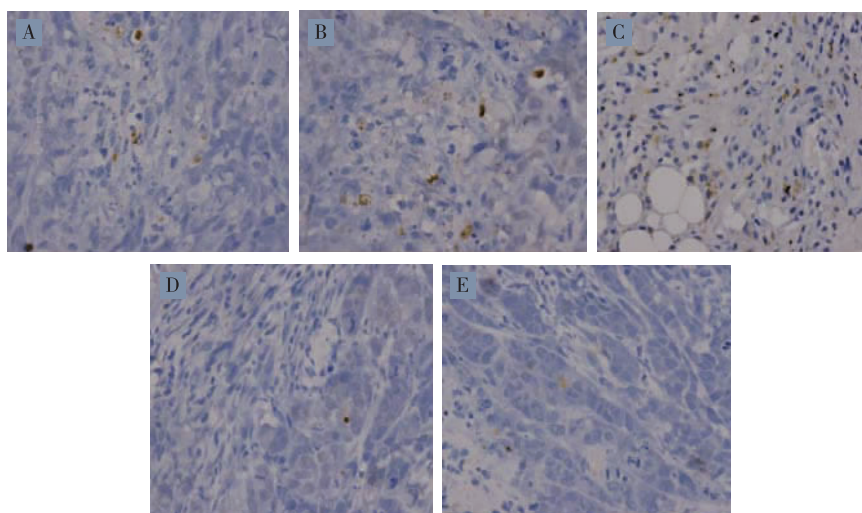
Fig. 6 Number of apoptosis in each group

3 讨论

鼻咽癌由于解剖结构限制、局部浸润生长特性而不宜手术治疗,治疗首选放疗,而临床上由于存在放疗抵抗导致鼻咽癌治愈率大大降低。在实体瘤中,随着肿瘤的增大,局部往往处于缺血缺氧状态,众多研究证实,多种恶性肿瘤中 *HIF-1α* 蛋白过度表达^[9]。*HIF-1α* 过表达通过启动血管发生和调节细胞代谢以克服缺氧的作用,极大地参与促进肿瘤生长和转移,同时肿瘤微环境中的缺氧条件,又促进 *HIF-1* 的过表达^[10-11]。因此 *HIF-1α* 被认为是对放射治疗,化学疗法和死亡率增加的预测和预后标记物^[12-15]。*Survivin* 是凋亡抑制剂 (IAP) 家族的成员,其功能是通过抑制半胱天冬酶的活化,对凋亡或程序性细胞死亡进行负调节;通过破坏存活蛋白诱导途径,导致凋亡增加和肿瘤生长减

少^[16]。因此 Survivin 被认为是癌基因, Survivin 在大多数癌细胞中的异常过表达有助于增加肿瘤对

凋亡刺激和化学治疗的抗性,从而有助于肿瘤细胞的持续存活^[17]。



注: A 为 HIF-1 α 干扰组, B 为 Survivin 干扰组, C 为联合干扰组, D 为空载组, E 为阴性对照组

图 7 各组裸鼠移植瘤细胞凋亡(TUNEL, $\times 400$)

Fig. 7 Apoptosis of tumor cells in each group

本课题组在前期研究中已经证实,体外实验沉默 HIF-1 α 、Survivin 基因能够抑制 CNE-2 细胞增殖,促进凋亡,增强对放射线的敏感性^[18],但针对体内移植瘤的研究较少,因此本次研究选择的是与放射敏感性密切相关的 HIF-1 α 及 Survivin 基因,用 RNA 干扰技术成功构建了 HIF-1 α 、Survivin 基因以及联合沉默 HIF-1 α 与 Survivin 基因的裸鼠移植瘤模型,结果发现各组裸鼠均能很好的形成移植瘤,并且基因干扰后的裸鼠移植瘤体积较空载组及阴性对照组显著下降($P < 0.05$),且对放疗的敏感性较空载组及阴性对照组均有很大的提高($P < 0.05$)。随后对取出的瘤体组织分别进行 RT-qPCR 及 Western Blot 检测,结果显示 HIF-1 α 干扰组、Survivin 干扰组、联合干扰组的 mRNA 和蛋白质表达量较空载组与阴性对照组显著降低($P < 0.01$),提示沉默 HIF-1 α 、Survivin 基因能够减缓人鼻咽癌裸鼠移植瘤的生长。此外 TUNEL 试剂盒检测各组瘤体的凋亡后发现,接受放射线治疗后的 HIF-1 α 干扰组、Survivin 干扰组、联合干扰组的凋亡细胞数较空载组与阴性对照组显著升高($P < 0.05$),结合瘤体生长的结果,提示沉默 HIF-1 α 、Survivin 可能通过增加瘤体对放疗的敏感性,并促进肿瘤细胞的凋亡,从而抑制移植瘤的生长。

许多国内学者,通过沉默 HIF-1 α 与 Survivin 基因在其他的细胞株上得到了相互佐证的结果^[19-20]。结合本课题组的体外研究,提示沉默 HIF-1 α 与 Survivin 基因能够抑制肿瘤的生长,增加

对放射治疗的敏感性,但是具体沉默后的作用机制,仍有待进一步的研究阐明。

4 参考文献

- [1] 赵明,王喆,王福光,等. IGF-1R 抑制剂 OSI-906 对鼻咽癌细胞 SUNE-1 放射增敏作用的研究[J]. 现代肿瘤医学, 2017(2):167-171.
- [2] Moeller BJ, Dewhirst MW. HIF-1 and tumour radiosensitivity[J]. British Journal of Cancer, 2006(1):1-5.
- [3] Moon SY, Chang HW, Roh JL, et al. Using YC-1 to overcome the radioresistance of hypoxic cancer cells[J]. Oral Oncology, 2009(10):915-919.
- [4] Staab A, Fleischer M, Loeffler J, et al. Small interfering RNA targeting HIF-1 α reduces hypoxia-dependent transcription and radiosensitizes hypoxic HT 1080 human fibrosarcoma cells in vitro[J]. Strahlentherapie und Onkologie, 2011(4):252-259.
- [5] 景绍武,赵志军,景尚华,等. 低氧诱导因子-1 α 与鼻咽癌临床病理特征相关性 Meta 分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015(7):548-554.
- [6] Kitagawa N, Kondo S, Wakisaka N, et al. Expression of seven-in-absentia homologue 1 and hypoxia-inducible factor 1 alpha: novel prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Lett, 2013(1):52-57.
- [7] Fu SM, Xu MX, Lin SM, et al. Association of cyclin D1 and survivin expression with sensitivity to radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Genetics & Molecular Research Gmr, 2014(15):3502-3509.

(下转第 388 页)

- [14] Xie F, Shi Q, Wang Q, et al. CD40 is a regulator for vascular endothelial growth factor in the tumor microenvironment of glioma [J]. *Journal of Neuroimmunology*, 2010(1):62–69.
- [15] Chen P, Zhu J, Liu DY, et al. Over-expression of survivin and VEGF in small-cell lung cancer may predict the poorer prognosis [J]. *Medical Oncology*, 2014(1):775.
- [16] Wu CJ, Guo J, Luo HC, et al. Association of CD40 polymorphisms and haplotype with risk of systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatology International*, 2016(1):45–52.
- [17] Chen X, Hu Z, Li W, et al. Synergistic combined effect between CD40 – 1C > T and CTLA – 4 + 6230G > A polymorphisms in Graves' disease [J]. *Gene*, 2015(2):154–158.
- [18] Lee, Zhou G, Wang Y, et al. CD40 – 1C > T polymorphism and the risk of lung cancer in a Chinese population [J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015(11):15163–15169.
- [19] Roman – Fernandez IV, Avila – Castillo DF, Cerpa – Cruz S, et al. CD40 functional gene polymorphisms and mRNA expression in rheumatoid arthritis patients from western Mexico [J]. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 2016(4):560.
- [20] Chen F, Hou S, Jiang Z, et al. CD40 polymorphisms in Han Chinese patients with Fuch uveitis syndrome [J]. *Molecular Vision*, 2011(17):2469–2472.
- [21] Wang M, Li Y, Li W, et al. The CD40 gene polymorphism rs1883832 is associated with risk of acute coronary syndrome in a Chinese case – control study [J]. *DNA and Cell Biology*, 2011(3):173–178.
- [22] Yun Y, Ma C, Ma X. The SNP rs1883832 in CD40 gene and risk of atherosclerosis in Chinese population: a meta – analysis [J]. *PloS One*, 2014(5):e97289.
- [23] Inal EE, Rustemoglu A, Inanir A, et al. Associations of rs4810485 and rs1883832 polymorphisms of CD40 gene with susceptibility and clinical findings of Behcet's disease [J]. *Rheumatology International*, 2015(5):837–843.
- [24] Shuang C, Dalin L, Weiguang Y, et al. Association of CD40 gene polymorphisms with sporadic breast cancer in Chinese Han women of Northeast China [J]. *PloS One*, 2011(8):e23762.

(2017-02-15 收稿, 2017-03-21 修回)

中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 苏晓庆

(上接第 382 页)

- [8] 曾谷清, 黄丽芳, 廖力. 鼻咽癌放疗抵抗的分子机制研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2016(3):82–86.
- [9] Mo JH, Choi IJ, Jeong WJ, et al. HIF-1 α and HSP90: target molecules selected from a tumorigenic papillary thyroid carcinoma cell line[J]. *Cancer Science*, 2012(3):464–471.
- [10] Bos R, Van d GP, Greijer AE, et al. Levels of hypoxia – inducible factor – 1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2003(6):1573–1581.
- [11] Semenza GL. Targeting HIF – 1 for cancer therapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003(10):721–732.
- [12] Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 2001(4):266–276.
- [13] Birner P, Schindl M, Obermair A, et al. Expression of hypoxia – inducible factor 1 α in epithelial ovarian tumors: its impact on prognosis and on response to chemotherapy[J]. *Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2001(6):333–339.
- [14] Bos R, Van d GP, Greijer AE, et al. Levels of hypoxia – inducible factor – 1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2003(6):1573–1581.
- [15] Aebersold DM, Burri P, Beer KT, et al. Expression of hypoxia – inducible factor – 1 α : a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer[J]. *Cancer Research*, 2001(7):2911–2916.
- [16] Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin[J]. *Cancer Letters*, 2007(2):164–171.
- [17] Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003(1):46–54.
- [18] 邓雯, 孙茂钢, 赵艳, 等. 纳米载体介导沉默 Survivin 基因对鼻咽癌细胞增殖凋亡及放疗敏感性的影响[J]. *贵阳医学院学报*, 2016(4):377–381.
- [19] 李洁清, 于金明, 宋现让, 等. HIF-1 α 基因沉默对裸鼠人肺癌移植瘤放射敏感性影响的观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011(21):1665–1668.
- [20] 杨巍, 孙婷, 曹建平, 等. 沉默乏氧诱导因子-1 α 和生存素基因联合放疗对裸鼠移植人肝癌的抑瘤效应[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2010(4):239–244.

(2017-01-06 收稿, 2017-02-18 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵 毅