

AKT抑制剂对鼻咽癌细胞株 CNE1 的放疗增敏作用

王汉渝, 卢泰祥*, 刘志刚, 李 丹, 吴晓琪, 韩 非

(中山大学肿瘤防治中心放疗科, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】探讨 Akt 抑制剂 124005 对人鼻咽癌细胞 CNE1 放射增敏效应及其潜在机制。【方法】CCK8 法检测不同浓度 124005 对人鼻咽癌 CNE1 细胞的抑制作用, 计算 IC_{50} 值, 选择低于 IC_{50} 的药物浓度作为增敏浓度。集落形成实验检测放射线加或不加 124005 以及 124005+放射线组联合或不联合自噬抑制剂 3-MA 对 CNE1 细胞生存曲线的影响。间接免疫荧光法检测 γ -H2AX 观察 DNA 损伤修复和 GFP-LC3 转染 CNE1 中自噬标志物 LC3 的聚集。流式细胞术检测细胞周期分布和凋亡。免疫印迹法(Western blot)检测 Caspase-3、PARP、Beclin 1 和 LC3-II 的表达, 并检测 AKT 及下游信号通路的表达, 探索 Akt 抑制剂 124005 放射增敏效应及其潜在机制。【结果】124005 对 CNE1 IC_{50} 值为 $30.5 \mu\text{mol/L}$ 。集落形成实验显示, DEF 值放疗+ $8 \mu\text{mol/L}$ 124005 持续用药组为 1.92, 放疗+ $12.5 \mu\text{mol/L}$ 124005 用药 72 h 组为 1.12, 共聚焦显微镜观察显示 124005 联合放疗显著增加了 CNE1 细胞照射后细胞核内 γ -H2AX 焦点的聚集和转染 GFP-LC3 质粒的 CNE1 细胞内 LC3 的点状聚集。流式检测 124005 可以明显提高放射线诱导的 CNE1 细胞凋亡, 凋亡率最高达 52.9%。Western blot 显示 124005 可以显著抑制放疗后 p-AKT 及下游 p-GSK-3 β 和 p-PRAS40 的表达, 增加放射引起的 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 以及 Beclin 1 和 LC3-II 的表达。应用 3-MA 可降低 124005 处理后 LC3-II 的表达水平。放疗+124005 再联用 3 mmol/L 3-MA 组的 DEF 值为 1.69, 明显低于单纯放疗+124005 组(DEF=1.97)。【结论】124005 通过对 AKT 以及下游通路的抑制, 抑制 DNA 损伤修复, 同时增加凋亡和自噬来起到对 CNE1 细胞株放射增敏的效应。

关键词: 鼻咽肿瘤; AKT 抑制剂; 放射增敏; 自噬; 凋亡

中图分类号: R739.63

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)03-0387-07

Radiosensitizing Effect of AKT Inhibitor on Nasopharyngeal Carcinoma Cell CNE1

WANG Han-yu, LU Tai-xiang*, LIU Zhi-gang, LI Dan, WU Xiao-qi, HAN Fei

(Department of Radiation Oncology, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the possibility that a AKT inhibitor-124005 enhance radiosensitivity and its potential mechanism. 【Methods】 CCK8 assay was conducted to determine the IC_{50} value of 124005 in CNE1 cell. The radiosensitizing effect of 124005 in CNE1 and the effect of 3-MA on survival curve after radiation were detected by cell colony assay. The DNA damage of CNE1 cell was examined by detection of histone variant H2AX (γ -H2AX) foci. GFP-LC3 was transfected into the cells to detect autophagy measuring by confocal microscopy. Flow cytometry with Annexin V-PI staining was used to assess the apoptosis and cell cycle arrest. The expression of related proteins such as p-Akt, p-GSK-3, p-PRAS40, cleaved Caspase-3, cleaved PARP, LC3-II, and Beclin 1 were detected by Western blot analysis. 【Results】 The IC_{50} value of 124005 in CNE1 was $30.5 \mu\text{mol/L}$. Colony assay showed that the DEF of radiation+ continuous $8 \mu\text{mol/L}$ 124005 was 1.92 and that of radiation+72h $12.5 \mu\text{mol/L}$ 124005 was 1.12 respectively in CNE1 cell. Twenty-four hours after radiation, γ -H2AX focus disappeared in radiation alone group, but the accumulation of γ -H2AX focus was observed in 124005+radiation group. Twenty-four hours after treatment of radiation+ $20 \mu\text{mol/L}$ 124005, ring-shaped structures were detected in the cytosol of CNE1 cell transfected by GFP-LC3 by confocal microscopy. Annexin V staining showed that 124005 significantly enhance apoptosis of CNE1 after radiation, the ratio reached 52.9%. Western blot showed that 124005 significantly down-regulated the expression of p-AKT, p-GSK-3 and p-PRAS40 and up-regulated the expression of

收稿日期: 2012-01-11

基金项目: “985”国家重点实验室基金

作者简介: 王汉渝, 肿瘤学临床博士, 主治医师, 研究方向: 肿瘤放射治疗, E-mail: why716@21cn.com; * 通信作者: 卢泰祥, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤放射治疗, E-mail: Lutx@susucc.org.cn

cleaved caspase-3, cleaved PARP, Beclin 1 and LC3-II in CNE1 after radiation. 3 mmol/L 3-MA significantly inhibited the expression of LC3-II when combined with 124005 + radiation. Colony formation assay indicated that 3-MA significantly reduced cell death induced by radiation+124005. The value of DEF was lower in 3-MA absence group (1.69 VS 1.97).【Conclusion】 124005 inhibit the expression of AKT and its downstream pathway. It radiosensitize CNE1 cells by delaying DNA damage repair and inducing apoptosis and autophagy cell death. It deserves further investigation as a potential radiosensitizing strategy.

Key words: nasopharyngeal neoplasms; AKT inhibitors; radiosensitivity; autophagy; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3):387-393]

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)主要治疗手段为放射治疗。增强鼻咽癌对放疗的敏感性以提高鼻咽癌的放射治疗效果有重要临床意义。AKT 信号通路在凋亡和自噬这两种程序性死亡过程中发挥重要作用。研究发现 Akt 在人类多种肿瘤中存在过度表达或活性失调。Akt 抑制剂 124005 是一种新型 AKT 抑制剂,化学名为 1L-6-Hydroxymethyl-chiro-inositol 2(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate,化学式为 $C_{30}H_{58}O_{10}$,分子质量为 578.8 u,其选择性抑制 Akt 的 IC_{50} 值大约是 $5 \mu\text{mol/L}$,明显小于其抑制 PI3K 的 IC_{50} 值 $90 \mu\text{mol/L}$ ^[2]。体外实验发现 124005 可以通过增加凋亡来提高白血病细胞对放化疗的敏感性^[3],还可通过诱导自噬来增加胶质瘤细胞的放射敏感性。本课题选择 124005 作为鼻咽癌细胞株 CNE1 放射增敏的药物,并试图进一步阐述其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人鼻咽癌细胞株 CNE1 细胞,使用含 100 mL/L 胎牛血清、50 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素和 50 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素、2 mmol/L 谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养液培养。细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 和体积分数 5% CO_2 实验条件下培养。所有实验均在细胞处于对数生长期进行。

1.2 WST-8 法

取对数生长期的细胞加入 96 孔板中,每孔 8 000~10 000 个细胞,200 μL 每孔。实验组加入 124005,对照组加入使终浓度为 0.1%的 DMSO,每组设 4 个平行孔,置体积分数 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h 后,除去孔内培养液,每孔加工 100 μL 培养液,同时每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,微板振荡器振荡混匀,放入培养箱中继续培养 1 h, BIO-RAD 公司 Model 550 酶标仪检测各孔的吸光值。按下列公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率=(对照组吸光度-实验组吸光度)/对照组吸光

度 $\times 100\%$ 。

1.3 克隆形成实验方法

实验采用指数生长期的鼻咽癌细胞,细胞用 0.25%的胰酶消化后制成单细胞悬液,以 F34-I 型医用深部 X 线治疗机照射,依药物浓度及照射剂量的不同将不同数量的细胞分别接种到六孔板中,用不同药物浓度及不同照射处理后的细胞在 CO_2 孵箱内培养 6~8 d 后,用无水酒精固定,结晶紫染色,计数 ≥ 50 个细胞的克隆数。以克隆数计算细胞生存分数(SF)。根据各剂量点的存活分数绘制存活曲线。

1.4 γ -H2AX 免疫荧光法

细胞在 DNA 经电离辐射 DNA 双链断裂损伤后,在 DSBs 位点会出现由 γ -H2AX 形成的焦点。方法: 1×10^5 个/mL 细胞接种到 Nunc 培养皿内,培养 24 h 后照射。40 g/L 多聚甲醛溶液固定 20 min, PBS 洗涤, 0.2% Triton-X100 破膜 10 min, PBS 洗涤。牛血清工作液封闭 2 h, PBS 洗涤, 0.21 $\mu\text{g/mL}$ 兔 γ -H2AX 单克隆抗体 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBS 洗涤, FITC 标记山羊抗兔 IgG 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, PBS 洗涤, 1 $\mu\text{g/mL}$ DAPI 染色 15 min, PBS 洗涤, 90% 甘油封片,日本 OLYMPUS-L-70 型共聚焦显微镜下观察。采用图像软件分析,一个视野中的所有细胞(一般在 50 个以上)都进行统计 γ -H2AX 焦点。

1.5 激光共聚焦显微镜观察 GFP-LC3

以 1.5×10^5 个细胞/mL 密度,应用无抗 100 mL/L 胎牛血清 RPMI1640 培养液接种 CNE1 和 SUNE1 细胞于六孔板中培养,贴壁后以脂质体 lipfectmin2000 转染 GFP-LC3 质粒, G418 筛选稳定表达 GFP-LC3 的细胞,对照组加入使终浓度为 0.1%的 DMSO,加药组加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 124005 处理 36 h 后,倒去培养液,用 PBS 洗涤 2 次, OLYMPUS-L-70 型激光共聚焦荧光显微镜下观察、拍照。

1.6 免疫印迹法(Western blot assay)

取处于对数生长期的细胞,稀释成 $(3 \sim 5) \times 10^5$ 个/mL,接种于 25 mL 小培养瓶中培养,每瓶 4

mL, 不同浓度的药物同一时间或同一浓度药物不同时间处理后,收集细胞,PBS洗涤2次,加入细胞裂解液 100 μ L, 14 000 r/min ($r=?$ cm) 离心 10 min, 定量蛋白,取 40 μ g 蛋白,加入上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C下变性 10 min。聚丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳后,电转移至硝酸纤维膜上,5%脱脂牛奶封闭后依次加入第一、二抗体,在室温下孵育 2 h,TBST 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.1%Tween20)洗涤 3 次,每次 10 min,加入化学发光剂,放入暗盒中并压片,2~5 min 后显影、定影。

1.7 流式细胞仪检测 Annexin V-FITC/PI 染色

①将 124005 处理组和 control 组鼻咽癌细胞用冷 PBS 洗涤 2 次并在染色缓冲液(binding buffer)中以 1×10^6 个/mL 的浓度重悬。②吸取 100 μ L 的细胞(1×10^5)至试管中。③加入适量的荧光标记的 Annexin V 试剂和 PI。按照说明书提示浓度操作。Annexin V-FITC Apoptosis detection kit。④混匀后避光室温下孵育 15 min。⑤孵育后加入 400 μ L 染色缓冲液,立即上 FACS 流式细胞仪 488 nm 激发光分析。

2 结 果

2.1 124005 对 CNE1 细胞放射增敏作用

0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80 μ mol/L 124005 处理 CNE1 细胞 72 h,对 CNE1 细胞的生长抑制率分别为 6.9%、11.4%、13.1%、26.1%、36.3%、46.3%、57%和 76.7%,与对照组相比,该药能明显抑制 CNE1 细胞的增殖($P < 0.05$),并呈浓度依赖性,其 IC_{50} 为 30.5 μ mol/L (图 1A);所有实验数据均来

自 3 次不同的实验。

集落形成实验结果显示用 8 μ mol/L 的 124005 持续作用 CNE1 6~8 d 或 12.5 μ mol/L 的 124005 作用 CNE1 细胞 72 h 细胞联合放射(0、2、4、6、8 Gy)与单纯放疗组相比细胞形成克隆的能力明显下降。放疗+124005 不同用药时间组的 DEF 值均大于 1,放疗+8 μ mol/L 124005 持续用药组为 1.92,放疗+12.5 μ mol/L 124005 用药 72 h 组为 1.12,细胞存活分数(SF 值)持续用药组为 0.81,用药 72 h 组 SF 值为 0.83(图 1B)。流式细胞检测显示 124005 联合放射作用 72 h 没有影响 CNE1 细胞的细胞周期分布。

2.2 124005 延迟 CNE1 细胞放射后的 DNA 损伤修复

CNE1 细胞经 2Gy 放射后 1 h,共聚焦显微镜观察细胞核内出现 γ -H2AX 焦点聚集,呈现绿色荧光。DAPI 染色显示其定位于细胞核。20 μ mol/L 124005+2 Gy 放疗处理组, γ -H2AX 焦点数量及有 γ -H2AX 焦点生成的细胞数量均明显增加。上述处理 24 h 后,单纯放疗组 γ -H2AX 焦点消失,而联用 124005 处理组仍可观察到 γ -H2AX 焦点聚集。上述结果提示 124005 可延迟 CNE1 细胞放射后 DNA 损伤的修复(图 2A)。

2.3 124005 诱导 CNE1 细胞照射后发生凋亡

①流式细胞术检测细胞凋亡结果显示放射线处理可以诱导 CNE1 细胞凋亡,早期凋亡率(Annexin V+,PI-)为 24.6%,Akt 抑制剂 124005 联合放射可以明显提高放射线诱导的细胞凋亡,随着药物处理的时间的增加细胞的早期和晚期凋亡率和坏死率均增加。早期凋亡率最高达 52.9%。晚

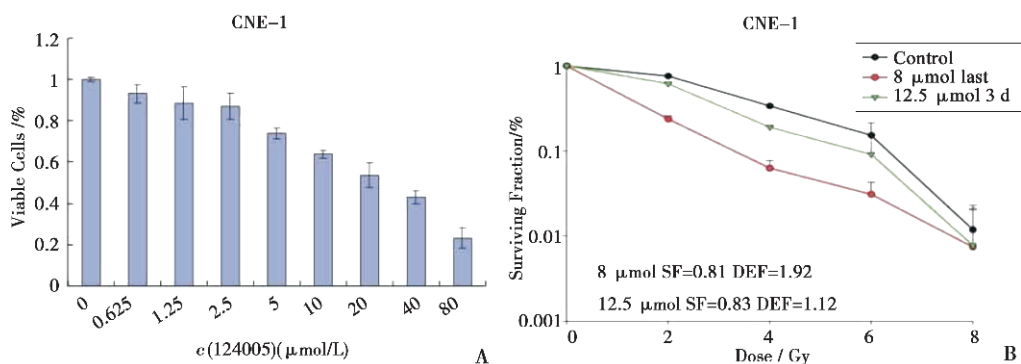


图 1 124005 对 CNE1 细胞的生长抑制作用和放射增敏作用

Fig.1 The inhibition rate and radiosensitizing effect of 124005 in CNE1 cells

A: Inhibition rate of 124005 in CNE1 cells detected by CCK8 assay; B: Radiosensitizing effect of 124005 on CNE1 cells detected by colony assay

期凋亡和细胞坏死率 (Annexin V+, PI+) 高达 43.7% (图 2B)。②124005 显著增加 CNE1 细胞照射后 caspase-3 和 PARP 蛋白的剪切。单纯以 2 Gy 放射或 15 $\mu\text{mol/L}$ 的 124005 处理 CNE1 细胞 24 h, 或二者联合作用 24 h, Western blot 检测可见单纯放射组和单纯加药组均出现 caspase-3 和 PARP 的断裂片段, 而 124005 联合放射可以显著增加 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 的表达。以上结果提示 124005 联合放射可以进一步提高放射线诱导的细胞凋亡 (图 2C)。

2.4 124005 诱导 CNE1 细胞照射后发生自噬

①应用与绿色荧光蛋白 (GFP) 结合的 GFP-LC3, 即可实现对自噬体的检测。共聚焦显微镜观

察可见 124005+2 Gy 照射 24 h 后的稳定转染 GFP-LC3 质粒的 CNE1 细胞内, LC3 呈现明显的点状聚集, 主要集中在胞浆部位该结果提示 124005 能够诱导 CNE1 细胞照射后发生自噬 (图 3A)。

2.4.1 124005 显著增加 CNE1 细胞照射后胞浆中 LC3-II 的表达 Western blot 检测 124005 处理 CNE1 细胞后, LC3-II 蛋白的表达情况。结果显示, 单纯放射组和单纯加药组均出现自噬标志物 LC3 由 I 型向 II 型的转化, 而 124005+2 Gy 放射 24 h 后可以进一步增加 LC3-II 的表达 (图 3B)。

2.4.2 124005 上调 CNE1 细胞照射后 Beclin1 的表达 Western blot 检测可见单纯放射及单纯用药均可诱导 Beclin 1 的表达水平增高, 而 124005+放

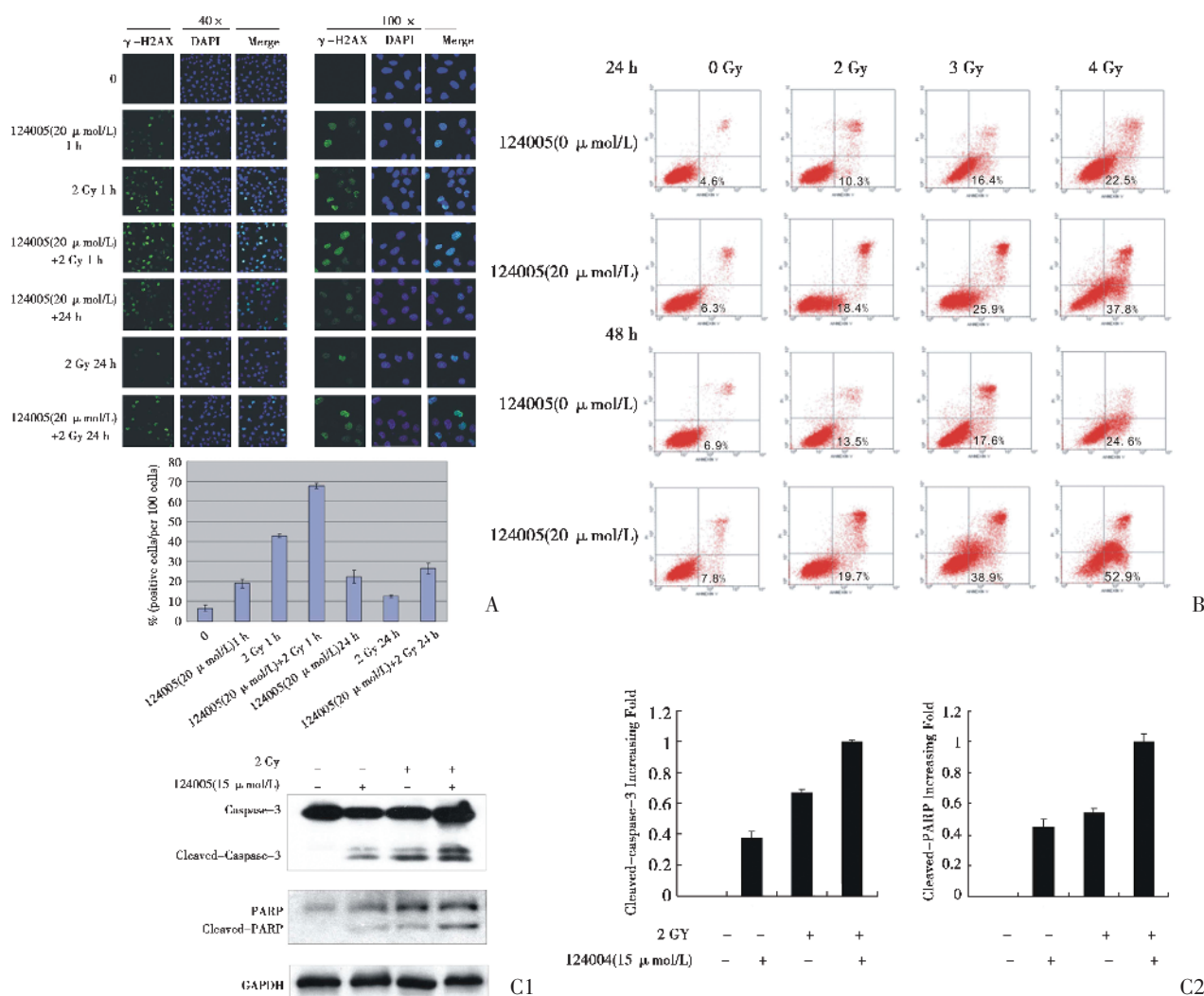


图 2 124005 延迟 CNE1 细胞放射后的 DNA 损伤修复并诱导 CNE1 细胞照射后发生凋亡

Fig.2 124005 delay the repair of DNA damage and induce apoptosis of CNE1 cells after radiation

A: 124005 caused accumulation of γ -H2AX foci and delay its disappearance in CNE1 cells after radiation; B: Annexin V staining showed that 124005 can up-regulate apoptosis in CNE1 cells caused by radiation; C1: Expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP in CNE1 cells treated with 124005 and radiation detected by western blotting; C2: Primary histogram of western blotting

射 24 h 可以观察到 Beclin 1 的表达进一步增加(图 3C)。

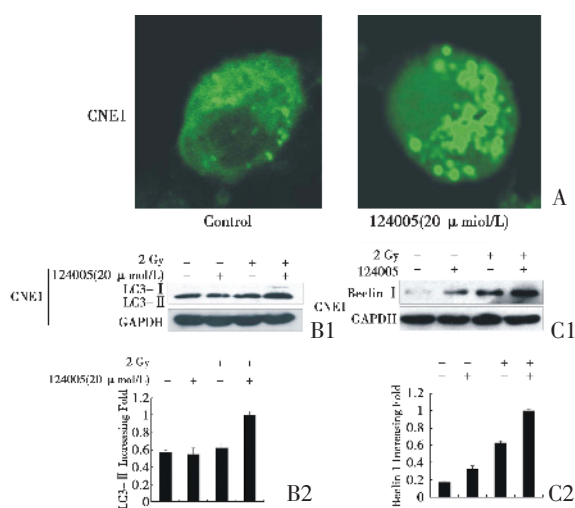


图3 124005 诱导 CNE1 细胞放射后发生自噬并上调其 Beclin 1 的表达

Fig.3 124005 enhance autophagy and up-regulate expression of Beclin 1 in CNE1 cells after radiation

A: Ring-shaped structures of GFP-LC3 detected by confocal microscopy in CNE1 cells 24h after 124005 + radiation; B1: Up-regulation of LC3II in CNE1 cells after 124005 + radiation detected by western blotting; B2: Primary histogram of LC3II western blotting; C1: Up-regulation of Beclin 1 in CNE1 cells after 20 μmol/L 124005 + 2 Gy radiation detected by western blotting; C2: Primary histogram of Beclin 1 western blotting

2.4.3 自噬抑制剂 3-MA 减少 124005+放射后 LC3- II 的表达并提高 CNE1 细胞的存活率。① Western blot 检测可见应用 3 mmol/L 3-MA 可降低 20 μmol/L 124005+2 Gy 照射 24 h 后 LC3- II 的表达水平(图 4B)。②集落形成实验分析显示,放射+124005 联用 3 mmol/L 3-MA 组的 DEF 值为 1.69,明显低于无 3-MA 处理组(1.97);细胞存活率(SF 值)分别为 0.95 和 0.87,说明自噬的抑制可降低 Akt 抑制剂 124005 的放疗增敏作用(图 4C)。

2.5 124005 抑制 CNE1 细胞照射后 p-Akt 及其下游的 p-GSK-3β 和 p-PRAS40 的表达

Western blot 检测结果显示单纯放射、单纯药物作用及药物增敏照射 24 h 后 Akt、GSK-3β 和 PRAS40 的总蛋白表达水平没有明显改变;与单照组和单药组相比,药物联合放射组 p-Akt、p-GSK-3β 和 p-PRAS40 的表达更为减少(见图 4A)。

3 讨论

本研究发现 124005 对 CNE1 的 IC₅₀ 值为 30.5 μmol/L,相对较高,这说明 CNE1 对 124005 相对耐受,需要较高浓度才能起到抑瘤作用。本研究采用了显著低于 CNE1 的 IC₅₀ 值的浓度作为放疗增敏及其后续研究的浓度,排除了高浓度药物本身的高抑瘤率对实验结果的混杂影响。本研究示,与单放组相比,加药组形成克隆的能力明显下降,说明 124005 有显著放疗增敏作用。8 μmol/L 持续用药组为 DEF 值 1.92 高于 12.5 μmol/L 124005 用药 72 h 组的 1.12。说明持续低浓度用药组增敏效果更好,放疗增敏效果呈用药时间依赖性。

肿瘤细胞在 G1/S 期边界及 G2/M 期放射敏感性最高,而 S 期尤其是晚 S 期敏感性最低,G1 期有一定的抗拒性。某些增敏剂通过将肿瘤细胞阻滞于 G2/M 期或 G1/S 期边界起到放疗增敏作用^[4]。本研究流式细胞检测结果显示 124005 未对 CNE1 细胞周期产生影响。显然 124005 不是通过对细胞周期捕获发挥放疗增敏作用的。本研究显示 124005 联合放疗可以显著增加 γ-H2AX 焦点聚集,且经过 24 h 后单放组 γ-H2AX 焦点基本消失,而用药组仍明显可见。结果说明 124005 显著增加 CNE1 细胞放疗后 DNA 的损伤并阻止延迟其修复。因此我们推测,当持续给药时,124005 可以持续发挥抑制 DNA 修复的作用,更好地起到放疗增敏作用;这解释了为何低浓度 124005 持续用药的增敏效果好于高浓度短时间用药。

本研究 Annexin V+检测结果显示 124005 显著增加了放疗后 CNE1 细胞早、晚期凋亡以及坏死的发生率,并且与用药时间呈正相关。Western blot 检测表明 124005 可以显著增加放疗后 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 的表达。这两项结果均提示诱导凋亡可能是 124005 放疗增敏的重要机制之一;且增加用药时间可能进一步增加凋亡的发生率,这可能是持续用药增敏效果更好的机理之一。

自噬与肿瘤的发生、发展密切相关。目前对于化疗药物和放射线杀伤诱导的自噬究竟是瘤抑制其死亡还是促进其死亡,尚存在争议。Ito 等^[5]发现通过自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤和巴弗洛霉素-A1 抑制自噬,可以放疗增敏恶性胶质瘤 U373-MG

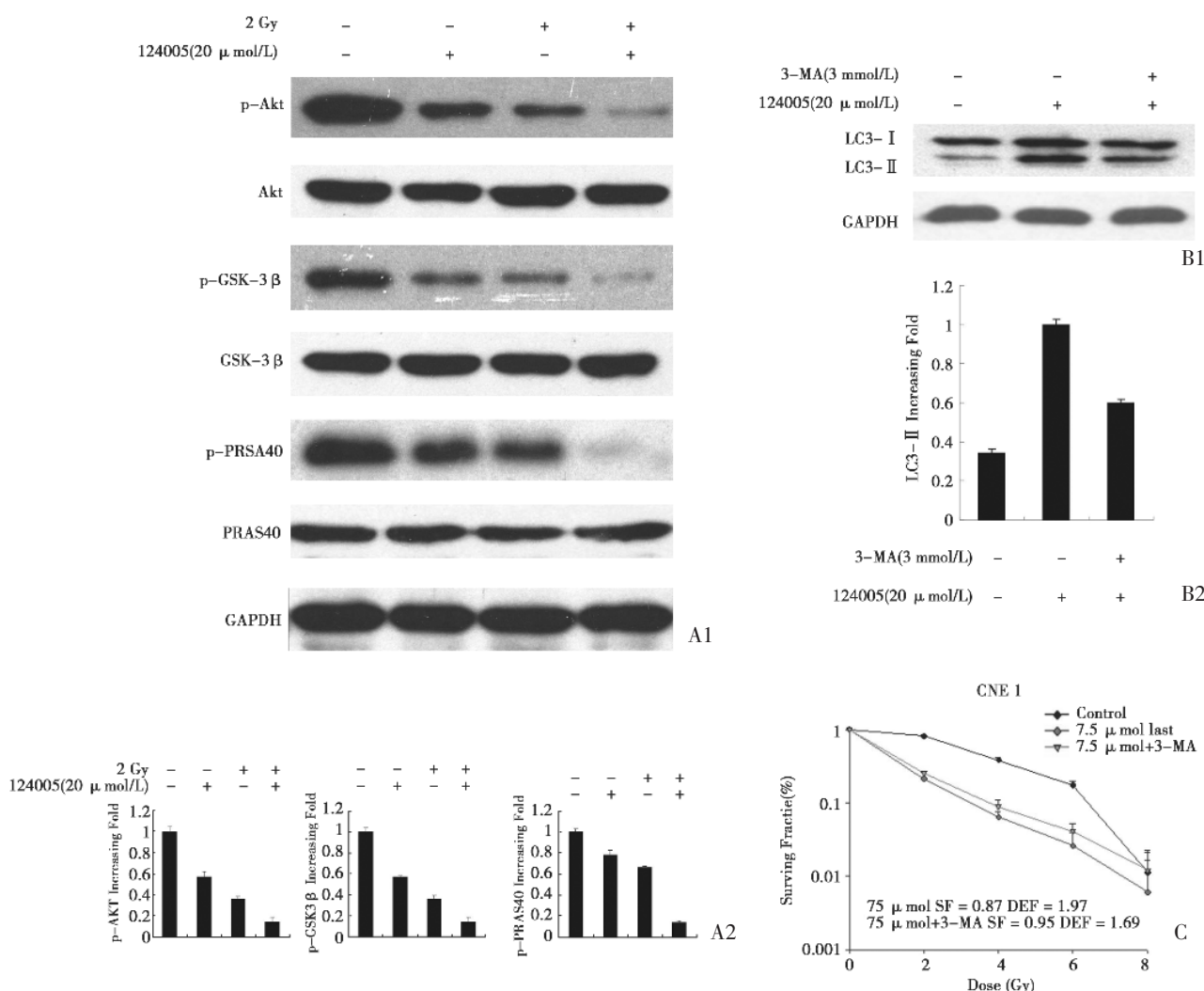


图 4 124005 对 AKT 通路表达的影响和 3-MA 对 LC3-II 表达及付诸集落形成的影响

Fig.4 124005 influence expression of p-AKT and its downstream protein as well as 3-MA down-regulate expression of LC3-II and inhibit the radiosensitizing effect of 124005

A1; Expression of p-Akt, p-GSK-3β and p-PRSA40 in CNE1 cells treated with 124005 and radiation detected by Western blotting; A2; Primary histogram of p-Akt, p-GSK-3β and p-PRSA40 Western blotting; B1; Expression of LC3-II in CNE1 cells treated with 3-MA+124005+ radiation detected by Western blotting; B2; Primary histogram of LC3-II Western blotting; C; Enhancement of SF value in CNE1 cells treated with 3-MA+124005+ radiation detected by colony assay.

细胞,另有文献报道,通过相关 Atg 沉默或利用氯喹类自噬抑制剂,可提高胃肠间质瘤(GIST)细胞的在体和离体的死亡率^[6]。这些报道似乎证明抑制自噬可以导致肿瘤的死亡,但另有文献持相反的观点。环孢素 A 与三氧化二砷联合作用胶质瘤细胞,可显著增加细胞内酸性自噬泡的形成,并且使 Beclin1 和 LC3-II 蛋白表达明显上调,最终增强肿瘤细胞的自噬性死亡^[7]。有文献报道 124005 通过抑制 AKT 通路,诱发自噬来发挥对胶质瘤细胞株 U87-MG 放射增敏的作用^[8]。在许多

情况下,凋亡性死亡、自噬性死亡可并存于同一细胞中^[9]。

自噬相关基因 Beclin 1 参与自噬体的形成,与肿瘤的发生发展存在密切关系。Beclin 1 基因敲除的小鼠^[10],可表现出严重的自噬功能缺陷表型,并会出现自发性肿瘤。在人类和老鼠中的研究发现,Beclin 1 与抗凋亡蛋白 bcl-2 家族中的 Bcl-2, Bcl-XL、Bcl-w 和 Mcl-1 都能相互作用,参与自噬与凋亡的调控。Beclin 1 被认为是联系自噬与凋亡的关键性蛋白。本实验结果显示 124005 联合照射

24 h 后稳定转染 GFP-LC3 质粒的 CNE 1 细胞胞浆内,LC3 呈现明显的点状聚集,提示 124005 能够诱导 CNE1 细胞照射后发生自噬。而 Western blot 结果显示 124005 显著增加了放射后 LC3-II 的表达,并上调了照射后 Beclin1 蛋白的表达,进一步证实了 124005 显著增加了照射后自噬的发生。

如果细胞死亡是自噬引起的,通过药物或反义基因阻断自噬可避免细胞的死亡。3-MA,在自噬囊泡起始形成阶段以及转运胞内容物至溶酶体的运输(CVT 途径)过程中,发挥遏止作用,抑制自噬发生^[11]。本研究 western blot 结果显示,3 mmol/L 3-MA 可降低 124005 联合照射 24 h 后 LC3 的表达水平,表明 3-MA 显著抑制了放射和 124005 诱导的自噬。集落形成实验显示,放射+124005 联用 3 mmol/L 3-MA 组的 DEF 值为 1.69,明显低于无 3-MA 处理组;细胞存活率(SF 值)分别为 0.95 和 0.87,说明自噬的抑制可降低 Akt 抑制剂 124005 对 CNE1 细胞的放射增敏作用。由此可以反证自噬可能是 124005 放射增敏的另一个机制。

AKT 及其下游信号通路与凋亡和自噬均密切相关。活化的 AKT 即 p-AKT 可以通过磷酸化 BAD 的 Ser136 位点,BAX 的 Ser184 位点,caspase-9 的 Ser196 位点以及结合并磷酸化 Par-4,抑制肿瘤细胞凋亡。Akt 还能通过激活 mTOR 或 FOXO1 等信号通路抑制细胞自噬,从而促进肿瘤细胞的生长、增殖,增加肿瘤对化疗和放疗的抵抗。124005 是 AKT 通路的特异性抑制剂,western-blot 结果显示 124005 联合放射组较单放组或单药组对 p-Akt 及其下游的 p-GSK-3 β 和 p-PRAS40 的表达的抑制更为显著,说明 124005 可能是通过对 AKT 通路的抑制进一步诱导凋亡和自噬来发挥对 CNE1 细胞放射增敏作用的。

总之,本研究结果显示 124005 对 CNE1 细胞有明显放射增敏作用,呈用药时间依赖性,其可能机制是通过抑制 AKT 及其下游信号通路,阻止延迟 DNA 损伤修复,诱导凋亡和自噬来放大射线对 CNE1 细胞的杀伤作用。这将为鼻咽癌放射增敏提供一个新的靶点。但其诱导凋亡和自噬的具体分子机制及其相互之间的内在关系,尚需进一步实验探讨研究。

参考文献:

- [1] Heng DM, Wee J, Fong KW, et al. Prognostic factors in 677 patients in Singapore with nondisseminated nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer*, 1999, 86(10): 1912-1920.
- [2] Hu Y, Qiao L, Wang S, et al. 3-(Hydroxymethyl)-bearing phosphatidylinositol ether lipid analogues and carbonate surrogates block PI3-K, Akt, and cancer cell growth[J]. *J Med Chem*, 2000, 43(16): 3045-3051.
- [3] Martelli AM, Tazzari PL, Tabellini G, et al. A new selective AKT pharmacological inhibitor reduces resistance to chemotherapeutic drugs, TRAIL, all-trans-retinoic acid, and ionizing radiation of human leukemia cells[J]. *Leukemia*, 2003, 17(9): 1794-1805.
- [4] Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004, 59(4): 928-934.
- [5] Ito H, Daido S, Kanzawa T, et al. Radiation-induced autophagy is associated with IC3 and its inhibition sensitizes malignant glioma cells[J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(5): 1401-1404.
- [6] Gupta A, Roy S, Lazar AJ, et al. Autophagy inhibition and antimalarials promote cell death in gastrointestinal stromal tumor (GIST)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(32): 14333-14338.
- [7] 张萍,陈菲,卞维鹏,等.环孢素 A 增强三氧化二砷诱导的胶质瘤细胞 U87-MG 自噬性死亡 [J]. *肿瘤*, 2009, 29(8): 727-730.
- [8] Fujiwara K, Iwado E, Mills GB, et al. Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(4): 753-760.
- [9] Kourtis N, Tavernarakis N. Autophagy and cell death in model organisms[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(1): 21-30.
- [10] Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin1 autophagy gene[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(12): 1809-1820.
- [11] Schultz PH, Zarate M, Hames W, et al. A 3,3-Ma impact in argentina and possible consequences [J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2061-2063.
- [12] 李宇清,杨惠玲.鼻咽癌组织中 P-Akt 的表达及其临床意义[J]. *中国全科医学*, 2010, 13(5): 538-540.

(编辑 张恩健)