

ABT737 通过延迟宫颈癌细胞放射后 DNA 损伤修复及诱导凋亡而增敏放疗

王 焕, 杨越波, 李 田, 叶敏娟, 李文薇

(中山大学附属第三医院妇产科, 广东 广州 510630)

摘 要:【目的】探讨类似 BH-3 的小分子物质 ABT737 诱导增敏放疗的作用及其分子机制。【方法】噻唑蓝法(MTT)检测不同浓度 ABT737 对 HeLa 细胞的生长抑制作用;细胞克隆形成实验检测 ABT737 联合放疗对放疗的增敏作用;免疫荧光法检测 γ -H2AX 观察 DNA 损伤修复情况;流式细胞术检测细胞凋亡;免疫印迹法检测 Caspase-3、PARP 的表达观察凋亡。【结果】与对照组相比,ABT737 能显著抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖($P < 0.05$),并呈浓度依赖性,其 IC50 为 15.7 $\mu\text{mol/L}$ 。体外培养克隆形成实验结果显示放疗+ABT737 不同用药时间组的 DEF 值均大于 1, 放疗+8 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 持续用药组为 1.88,放疗+12 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 用药 72 h 组为 1.13,细胞存活分数(SF 值)持续用药组为 0.84,用药 72 h 组 SF 值为 0.82;免疫荧光结果显示 ABT737 联合放疗处理 HeLa 细胞 1 h 后,放射线导致的 γ -H2AX 聚焦点数量及有 γ -H2AX 聚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 ABT737 处理组仍可观察到 γ -H2AX 焦点聚集。流式细胞术结果显示,单纯放疗组早期凋亡率(Annexin V+, PI-)为 23.3%,ABT737 联合放疗可以明显提高放射线诱导的细胞凋亡,早期凋亡率最高达 50.3%。免疫印迹结果显示 10 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 与 2 Gy 放射联合作用于 HeLa 细胞后,凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 与 cleaved PARP 的表达较单纯放疗组增加。【结论】ABT737 对宫颈癌 HeLa 细胞具有放疗增敏作用,其机制与 ABT737 可延迟宫颈癌细胞放疗后 DNA 损伤修复及诱导凋亡有关。

关键词: ABT-737; 细胞凋亡; 放疗增敏; DNA 损伤

中图分类号: R737.33

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2013)01-0083-06

Effect of ABT737 on Radiation Sensitivity of HeLa Cells via Delaying DNA Damage Repair after Radiation and Inducing Apoptosis

WANG Huan, YANG Yue-bo, LI Tian, YE Ming-juan, LI Wen-wei

(Department of Obstetrics and Gynecology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the pivotal role of ABT737, a BH3 mimetic small molecule inhibitor, in enhancing radiosensitivity and its mechanism. 【Methods】 MTT assay was conducted to determine the inhibition rate of ABT737 in HeLa cells. The radiosensitizing effect of ABT737 in HeLa cells was detected by cell colony assay. The DNA damage of HeLa cells was examined by detection of histone variant H2AX (γ -H2AX) foci using indirect immunofluorescence. Flow cytometry with Annexin V-PI staining was used to assess the apoptosis. The expression of apoptotic proteins caspase-3 and PARP were detected using Western blot analysis. 【Results】 ABT737 significantly inhibited cell growth of HeLa cells with IC50 value of 15.7 $\mu\text{mol/L}$. Result of the colony formation assay indicated that the clonogenic survival of HeLa cells was decreased after combining the radiation. The DEF values for both combination groups were over one: 1.88 for the group treated with 8 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 and 1.13 for the group treated with 12 $\mu\text{mol/L}$ ABT-737. The survival fraction (SF) values for the group treated with 8 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 and the group treated with 12 $\mu\text{mol/L}$ were 0.84 and 0.82, respectively. ABT737 increased the number of γ -H2AX foci and the cells that detected γ -H2AX foci in HeLa cells exposed radiation. After 24 h, γ -H2AX foci disappeared in radiation group, but the accumulation of γ -H2AX foci was also observed after combining ABT737. The expression levels of both cleaved-Caspase-3 and cleaved-PARP and the apoptotic rate of HeLa cells

收稿日期: 2012-07-17

基金项目: 广州市科技计划项目(2012K972)

作者简介: 王焕, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 妇科肿瘤, E-mail: wangh020@163.com

were increased in the combination group comparing to those in the groups that were treated with only ABT-737 or radiation.

【Conclusion】 Our data imply that ABT-737 can enhance radiosensitizing effects in human cervical cancer HeLa cells via delaying DNA damage repair after radiation and inducing apoptosis.

Key words: ABT-737; apoptosis; radiosensitizing; DNA damage

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(1):83-88]

宫颈癌的治疗方案目前以手术和放射治疗为主。宫颈癌放疗始于本世纪初,至今仍为治疗子宫颈癌的基本手段。增强宫颈癌对放疗的敏感性以提高宫颈癌的放射治疗效果有重要临床意义。由于细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的过表达与肿瘤的形成密切相关,因此,阻断 Bcl-2 的活性发挥成为可能的肿瘤治疗措施。Bcl-2 蛋白家族可分为三个亚家族。一是抗凋亡蛋白亚家族(亚家族 1),包括 Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1;二是促凋亡蛋白亚家族(亚家族 2),包括 Bax、Bak,它们结构中都有 Bcl-2 同源结构域 3(Bcl-2 homology domain 3, BH3);三是仅含 BH3 区域的促凋亡蛋白亚家族。Bcl-2 家族通过形成同源和异源二聚体对细胞凋亡进行调控,这些蛋白二聚体可作为在细胞死亡信号通路上的分子开关。ABT-737 是一种小分子多肽,具有与 BH3-Only 蛋白(如 Bad)相似的活性,与 Bcl-XL($K_i = 36 \text{ nmol/L}$)及 Bcl-2($K_i = 433 \text{ nmol/L}$)具有高亲和力,能特异性结合 Bcl-2/Bcl-XL 疏水口袋状结构,拮抗 Bcl-2/Bcl-XL 功能,从而破坏它们的抗凋亡活性促进细胞凋亡^[1]。ABT737 由美国 Abbott 公司研发^[2],目前处于临床前研究阶段^[3]。本研究拟探讨 ABT737 作为放射增敏剂在杀伤肿瘤细胞中发挥的作用及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞株 HeLa 使用含体积分数 10%的 FBS、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 DMEM 培养液培养。细胞在 37℃和体积分数 5%的 CO₂ 实验条件下培养。所有实验均在细胞处于对数生长期进行。ABT737 购自于 Biochempartner 公司。Caspase-3、PARP 抗体为 Santa Cruz 公司产品。噻唑蓝(MTT)为 Sigma 公司产品,用磷酸盐缓冲液(PBS)配制成 5 mg/mL 的工作液。AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit 购自 Calbiochem 公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法 取对数生长期的细胞加入 96 孔板中,每孔 4000 个细胞及 195 μL 细胞培养液。实验组加入 ABT737,对照组加入使终浓度为 0.1%的 DMSO,每组设 5 个复孔,置于 37℃、体积分数 5%的 CO₂ 培养箱培养 72 h,实验终止前 4 h 加入 10 μL 5 mg/mL MTT 液,再培养 4 h,去掉培养液加入 100 μL DMSO,用酶标仪检测 570 nm 波长下每孔的吸光度值(D),按下列公式求出细胞增殖抑制率和细胞活性。再用 CalcuSyn1 软件求出半数抑制率。最终结果来自于 3 次平行实验。细胞增殖抑制率 $=[(1-D \text{ 用药组}/D \text{ 对照组})]/D \text{ 对照组} \times 100\%$;细胞存活率 $=D \text{ 用药组}/D \text{ 对照组} \times 100\%$ 。

1.2.2 体外培养克隆形成实验 实验采用对数生长期的宫颈癌细胞,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 CO₂ 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。

1.2.3 γ -H2AX 聚焦点分析 用免疫荧光法:将已处理好的细胞用 40 g/L 多聚甲醛液固定 15 min;1 $\times$ PBS 洗 3 次,每次 5 min;0.25%Triton 破膜打孔 10 min;5% BSA 封闭液封闭 30 min;用封闭液稀释 γ -H2AX(1:400),4℃孵育过夜;用封闭液稀释荧光二抗(1:400),室温孵育 1 h;1 $\times$ PBS 洗 3 次,每次 5 min;DAPI 室温孵育 5 min,1 $\times$ PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加抗荧光淬灭封片剂,封片,激光共聚焦显微镜下观察拍照。用 pImageTool 软件计数 γ -H2AX 阳性的细胞(胞内 γ -H2AX 聚焦点 > 10 个为阳性细胞),每组至少计数 200 个细胞。

1.2.4 检测细胞凋亡 用流式细胞术(flow cytometry,FCM)检测:收集用药物处理过的细胞,PBS 洗涤 2 次,离心。加入 1 $\times$ 结合缓冲液调整细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取 0.5 mL 细胞悬液,加入

1.25 μL AnnexinV-FITC,避光,室温($18 \sim 24^{\circ}\text{C}$)静置 15 min 后离心,吸弃上层液体。再加 0.5 mL 1 $\times$ 结合缓冲液重悬细胞,加入 10 μL 碘化丙啶(PI, 10 mg/L)染色 10 min,避光。立即将标本置于冰块中,1 h 内用流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)检测。

1.2.5 免疫印迹法(Western blot assay) 收集经处理后的细胞,PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液 100 μL ,14 000 r/min($r = 17 \text{ cm}$)离心 15 min,取上清。定量蛋白,取 40 μg 蛋白,加入上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 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。

1.3 统计学处理

每组设 4 个平行样本,实验重复 3 次。实验数据采用 SPSS 11.0 统计软件包分析,组间均数比较采用 t 检验,多组间均数比较采用方差分析,组间率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ABT737 可抑制人宫颈癌 HeLa 细胞的增殖

用 MTT 的方法检测 ABT737 对人宫颈癌细胞

Hela 的生长抑制。以 2.5、5、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ ABT-737 处理 HeLa 细胞 24 h,出现明显的增殖抑制作用,且呈浓度依赖性;不同浓度的 ABT-737 处理组与对照组相比,均具有统计学意义($P < 0.01$),其 IC_{50} 为 15.7 $\mu\text{mol/L}$ 。上述结果说明 ABT737 能明显抑制 HeLa 细胞的增殖(图 1A)。

2.2 ABT737 对 HeLa 细胞的放疗增敏作用

集落形成实验结果显示用 8 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABT737 持续作用 HeLa 6~8 d 或 12 $\mu\text{mol/L}$ 的 ABT737 作用 HeLa 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+ABT737 不同用药时间组的 DEF 值均大于 1,放疗+8 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 持续用药组为 1.88,放疗+12 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 用药 72 h 组为 1.13,细胞存活分数(SF 值)持续用药组为 0.84,用药 72 h 组 SF 值为 0.82。以上结果显示 ABT737 可以提高放疗增敏作用,并且放疗增敏效果呈时间依赖性(图 1B)。

2.3 ABT737 可延迟 HeLa 细胞放射后的 DNA 损伤修复

HeLa 细胞经 2 Gy 放射后 1 h,共聚焦显微镜观察细胞核内出现 $\gamma\text{-H2AX}$ 焦点聚集,DAPI 染色显示其定位于细胞核。10 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 联合放疗作用于 HeLa 细胞后, $\gamma\text{-H2AX}$ 焦点数量及有 $\gamma\text{-H2AX}$ 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 $\gamma\text{-H2AX}$ 焦点消失,而联用 ABT737 处理组仍可观察到 $\gamma\text{-H2AX}$ 焦点聚集(图 2)。上述结果提示 ABT737 可延迟 HeLa 细

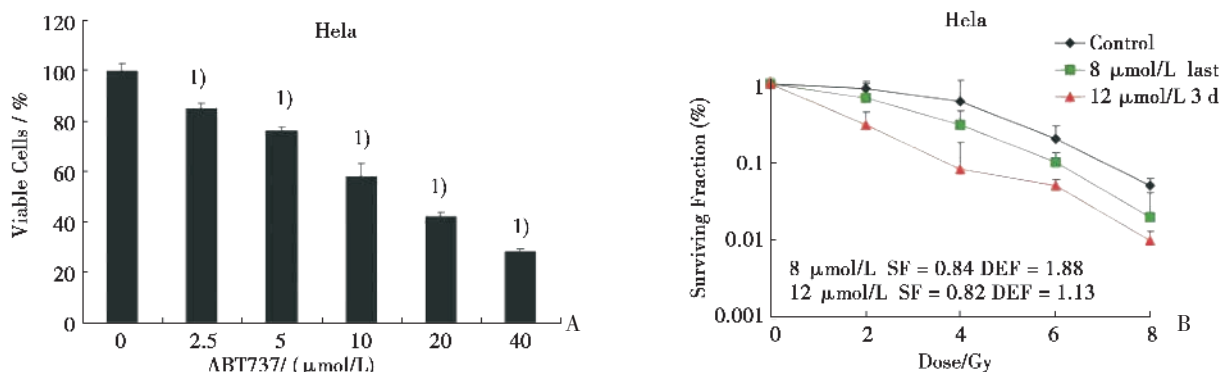


图1 ABT737 联合放射对人宫颈癌细胞 HeLa 的生长抑制

Fig.1 ABT737 inhibited cell growth and reduced clonogenic survival of HeLa cells after irradiation

A: HeLa cells were plated at the density of 5000 cells/well in a 96-well plate. The stock of ABT737 was added to wells. Cells were cultured for 3 days. Thereafter, MTT assay was conducted. 1) $P < 0.01$. B: HeLa cells were treated with DMSO control, ABT737 (8 $\mu\text{mol/L}$ for 8 days or 12 $\mu\text{mol/L}$ for 3 days) and radiation. After 8 d, colonies were stained and the scored colonies were graphed.

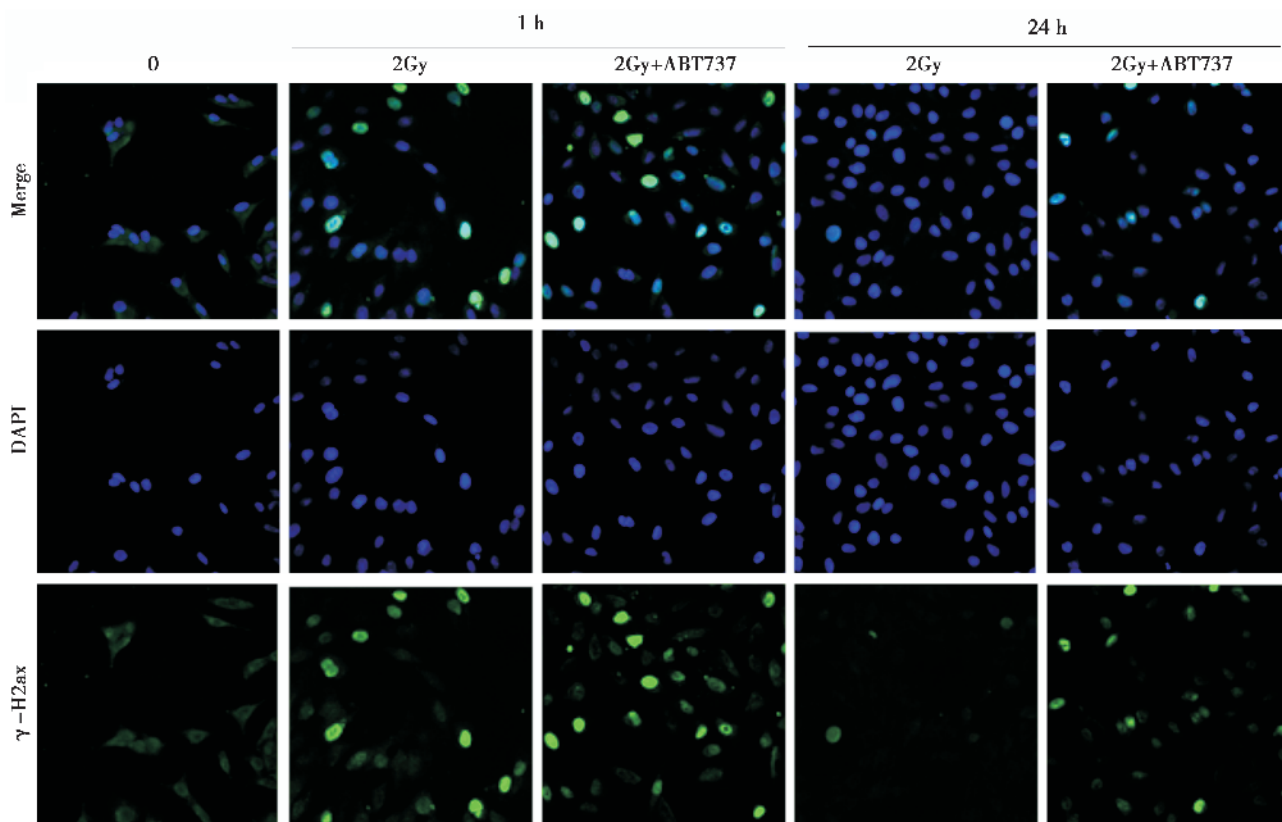


图 2 ABT737 延迟 HeLa 细胞放射后 DNA 损伤的修复

Fig.2 ABT737 delayed DNA damage repair after radiation in HeLa cells

Representative photomicrographs showing accumulation of γ -H2AX as a marker of DNA damage under indicated treatment.

胞放射后 DNA 损伤的修复。

2.4 ABT737 可诱导 HeLa 细胞发生早期凋亡增敏放疗

应用流式细胞术检测不同处理组的细胞凋亡率,结果显示,放射线处理可以诱导 HeLa 细胞凋亡,早期凋亡率 (Annexin V+,PI-) 为 23.3%,ABT737 联合放疗可以明显提高放射线诱导的细胞凋亡,早期凋亡率达 50.3%。上述结果提示 ABT737 可进一步提高放射线诱导的细胞凋亡(图 3)。

2.5 ABT737 可引起 HeLa 细胞中 caspase-3 和 PARP 蛋白的剪切从而增敏放疗

用 10 μ mol/L ABT737 与 2 Gy 放射联合作用于 HeLa 细胞,Western blot 检测凋亡通路相关蛋白的表达。由图 4 可见,联用 ABT737 的处理组与单用放射处理组相比,凋亡蛋白 cleaved Caspase-3 与 cleaved PARP 表达均明显增加,以上结果提示 ABT737 联合放射可以进一步提高放射线诱导的细胞凋亡。

3 讨论

美国 Abbott 公司采用基于 NMR 的筛选技术、平行合成以及结构设计的方法,得到 ABT737,作为 Bcl-XL、Bcl-2 和 Bcl-w 蛋白的抑制剂。荧光偏振竞争性结合 (FP) 测试结果显示,ABT737 在体外与 Bcl-XL、Bcl-2 和 Bcl-w 结合的抑制常数 K_i 值均小于 1 nmol/L,具有高亲和力。但 ABT-737 与 Mcl-1、Bcl-B 及 A1 的亲合力较低,其与前者结合的抑制常数 K_i 值为 (0.46 ± 0.11) μ mol/L,与后两者结合的抑制常数 K_i 值均大于 1 μ mol/L。临床前研究显示,ABT-737 单用能杀死某些癌细胞,包括淋巴瘤细胞^[4]和小细胞肺癌细胞^[5],还能增强化疗和放疗的疗效^[6-7]。近期研究发现,ABT737 能增加儿童急性淋巴母细胞白血病传统疗法的效果,并且能将其对机体产生的毒性及不良反应降至最低^[8]。但 ABT737 是否对宫颈癌细胞起到杀伤作用及放疗增敏作用,目前国内外还未见类似报到。

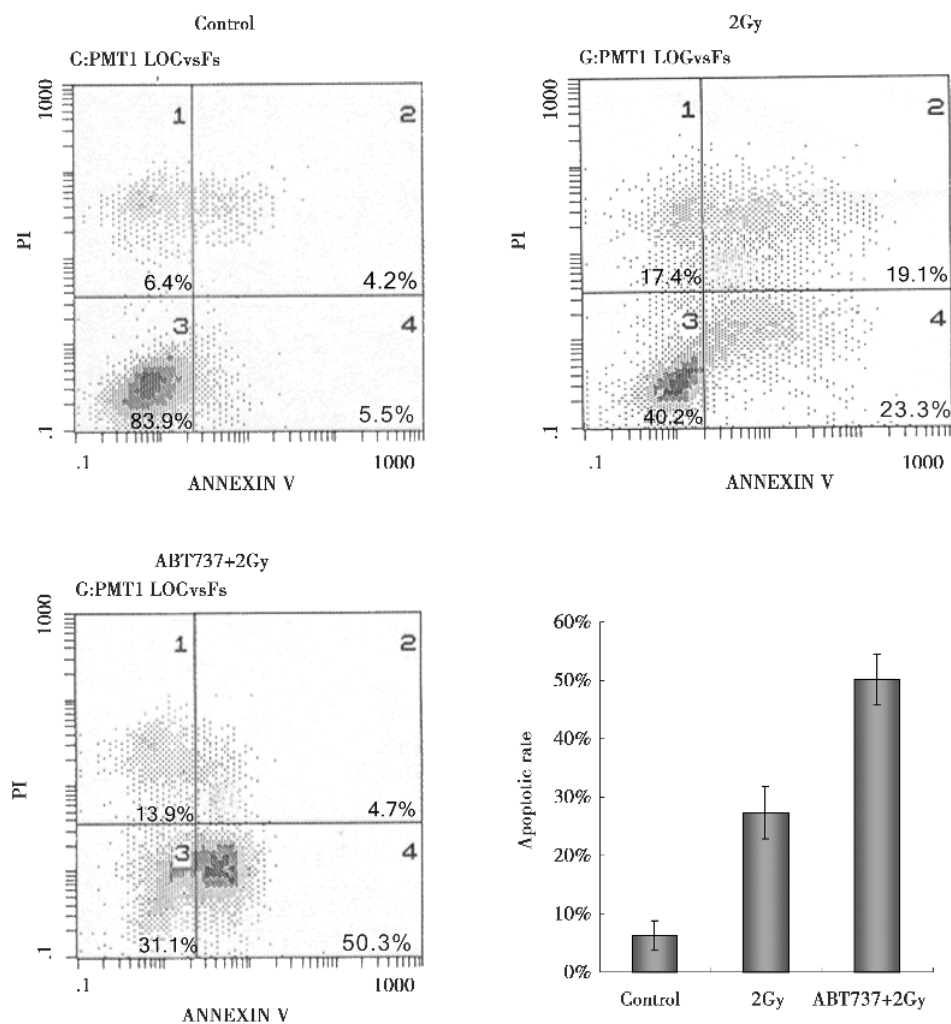


图 3 ABT737 进一步提高放射线诱导的细胞凋亡

Fig.3 ABT737 increased the apoptotic rate in HeLa cells after radiation treatment

HeLa cells treated with 2 Gy or 2 Gy combination of ABT737 for 24 h. The cells were collected sequentially and stained with AnnexinV and PI and then analyzed by flow cytometry. The cells in the down right quadrant (AnnexinVt/PI₋) were early apoptotic cells. The experiment was repeated 3 times.

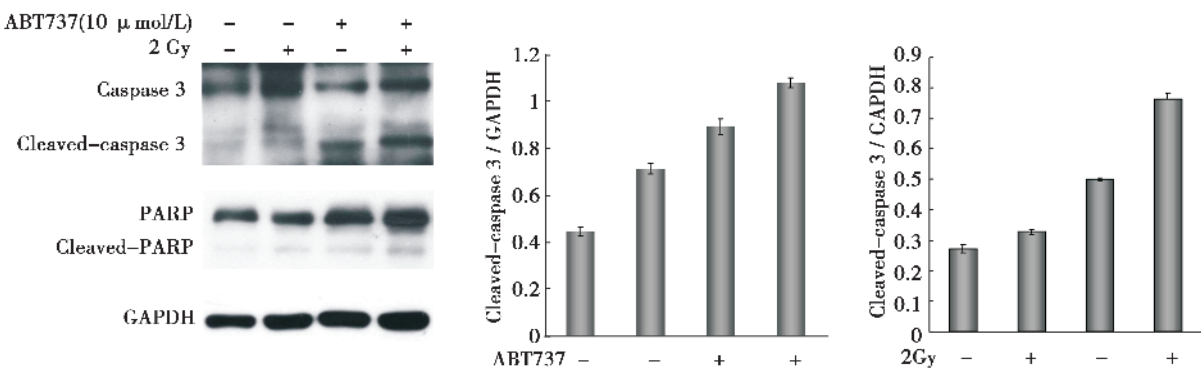


图 4 ABT737 联合增强 Hela 细胞 Caspase-3 和 PARP 的表达

Fig.4 ABT737 enhanced caspase-3 and PARP cleavage induced by radiation in HeLa cells

Western blot analysis of caspase-3 and PARP in HeLa cell treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ ABT737 and/or 2 Gy radiation for 24 h. The experiment was performed 3 times.

本研究中,我们首先用 MTT 法检测了 ABT737 对 HeLa 细胞的细胞毒作用。结果可见 ABT737 对 HeLa 细胞的 IC₅₀ 值分别 15.7 $\mu\text{mol/L}$,并呈现明显的剂量效应关系。为了使其放射增敏作用有意义,我们选取低于 IC₅₀ 值的药物浓度来进行后续试验。

在放射生物学的研究中细胞死亡的特点是细胞受到电离辐射后,细胞形态完整,也许依然能够合成蛋白质,并可能进行一次或几次有丝分裂,然而这种细胞由于失去了无限增殖的能力,其后代肯定是死亡的。细胞集落克隆形成实验计算细胞存活率,绘制细胞存活曲线是放射生物研究领域定量研究细胞—辐射生物效应的经典方法,它能够较好的反应细胞增殖性死亡的特点。我们用克隆形成实验证实 ABT737 可以提高放疗增敏作用,并且放疗增敏效果呈药物作用时间及浓度依赖性。

电离辐射可以引起 DNA 损伤已经被许多研究证实。 γ -H2AX 是迄今所研究的最重要的 DNA 损伤感应分子,它可结合在 DNA 双链损伤部位,募集多种信号和/或修复蛋白分子,形成所谓的“焦点”(foci)结构,因此 γ -H2AX 诱导的“焦点”数量和 DNA 损伤修复存在一一对应关系。在本研究中我们观察到放射线可以引起 HeLa 细胞 DNA 损伤。但经过 24 h 后,对照组中 γ -H2AX 焦点已经基本消失,表明受损伤的细胞 DNA 已基本被修复。而联用 ABT737 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多于对照组。因此我们认为 ABT737 可延迟 HeLa 细胞放射后 DNA 损伤的修复,从而引起诱导细胞走向凋亡或其他形式的死亡。

ABT737 是类似 BH-3 的小分子物质,当其与 Bcl-2 结合后,可能导致促凋亡蛋白的活性增高,Bax、Bak、Bik 和 Bim 等促凋亡蛋白能促进 Cyt-c 从线粒体释放到胞浆中。在 Cyt-c 和 ATP 存在条件下,胞浆中凋亡蛋白酶激活因子(apoptotic protease activating factor -1, Apaf -1)即可与 caspase-9 结合并激活后者。激活的 caspase-9 继而切断并活化 caspase-3 等下游蛋白酶级联。Caspases 活化后通过剪切 PARP,导致 PARP 氨基酸的羧基端的两个催化结构域分离而失去完整功能,引起 DNA 断裂,诱发细胞凋亡。我们的研究发现,ABT737 联合放射可以进一步提高放射线诱导的细胞凋亡。Bcl-2 家族蛋白调控的线粒体凋亡途

径在此发挥重要作用。

以上结果充分表明,ABT737 能延迟放射后 DNA 损伤的修复及诱导细胞凋亡从而增敏放疗。宫颈癌是极大危害女性健康的恶性肿瘤,化疗疗效差,放疗是其主要治疗手段之一,我们发现 Bcl-2 小分子抑制剂 ABT737 能增敏放疗,表明 ABT737 有可能作为放疗增敏剂应用于临床治疗。本实验为更好地研究 Bcl-2 小分子抑制剂在抗肿瘤治疗中的作用提供了进一步的佐证,并为以后的宫颈癌临床放射增敏治疗提供了一类具有良好发展前景的药物。

参考文献:

- [1] Maldonado V, Melendez-Zajgla J, Ortega A. Modulation of NF- κ B, and Bcl-2 in apoptosis induced by cisplatin in HeLa cells [J]. *Mutat Res*, 1997, 381(1): 67-75.
- [2] Petros AM, Dinges J, Augeri DJ, et al. Discovery of a potent inhibitor of the antiapoptotic protein Bcl-xL from NMR and parallel synthesis[J]. *J Med Chem*, 2006, 49(2): 656-663.
- [3] Azmi AS, Wang Z, Philip PA, et al. Emerging Bcl-2 inhibitors for the treatment of cancer [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2011, 16(1): 59-70.
- [4] Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, et al. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(1): 112-121.
- [5] Tahir SK, Yang X, Anderson MG, et al. Influence of Bcl-2 family members on the cellular response of small-cell lung cancer cell lines to ABT-737[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1176-1183.
- [6] Oltsersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, et al. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours[J]. *Nature*, 2005, 435(7042): 677-681.
- [7] Trudel S, Stewart AK, Li Z, et al. The Bcl-2 family protein inhibitor, ABT-737, has substantial antimyeloma activity and shows synergistic effect with dexamethasone and melphalan [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(2 Pt 1): 621-629.
- [8] Kang MH, Kang YH, Szymanska B, et al. Activity of vincristine, L-ASP, and dexamethasone against acute lymphoblastic leukemia is enhanced by the BH3-mimetic ABT-737 in vitro and in vivo[J]. *Blood*, 2007, 110(6): 2057-2066.

(编辑 张恩健)