

抑制 HSP90 对缺氧肿瘤细胞辐射敏感性的影响

王慧宇 洪承皎 张保国

(苏州大学放射医学与防护学院 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 为研究抑制 HSP90 对缺氧模拟剂 (CoCl_2) 处理的人宫颈癌 HeLa 细胞的辐射敏感性影响, 分别用不同浓度的 CoCl_2 处理 HeLa 细胞 24 h 进行模拟缺氧处理, 用不同浓度的 HSP90 特异性抑制剂 17-DMAG 预处理细胞 16 h, 应用 γ 射线照射细胞, 照射剂量分别为 2、4、6 和 8 Gy, 采用克隆形成实验观察细胞的存活率, 用 Western blot 实验检测 HIF-1 α 蛋白表达量变化, 用激光共聚焦显微镜观察细胞凋亡情况。结果显示: 用 CoCl_2 处理细胞可以诱导 HIF-1 α 蛋白过表达; 不同浓度 17-DMAG 处理组的 HeLa 细胞在不同照射组间的存活率差异具有显著性 ($p < 0.01$); 17-DMAG 预处理缺氧 HeLa 细胞后, HIF-1 α 蛋白表达随药物浓度增加受到显著抑制, 细胞早、晚期凋亡率随药物浓度增加而增加。结果表明: 17-DMAG 预处理模拟缺氧细胞可增加细胞辐射敏感性并促进细胞凋亡, 其机制可能是通过抑制 HIF-1 α 蛋白表达而发挥作用。

关键词 氯化钴, 17-DMAG, HIF-1 α , 细胞凋亡, 辐射敏感性

中图分类号 R811, R811.5

乏氧是多数实体肿瘤微环境的基本特征之一, 乏氧肿瘤细胞的辐射敏感性很差, 如何提高乏氧肿瘤的辐射敏感性一直是放射肿瘤治疗研究的重要课题。乏氧肿瘤细胞的辐射敏感性与乏氧肿瘤细胞对辐射损伤的响应有关^[1]。HIF-1 (Hypoxia inducible factor1, HIF-1) 是控制肿瘤细胞内多种乏氧相关生化事件的关键分子^[2], 直接影响乏氧肿瘤细胞的辐射敏感性, 它由 α 和 β 两个亚基组成的异源二聚体, HIF-1 β 呈组成性表达, HIF-1 α 是氧调节蛋白, 它决定 HIF-1 的活性^[3]。热休克蛋白 90 (Heat shock protein 90, HSP90) 是细胞内重要的分子伴侣蛋白^[4], 它与效应蛋白结合, 使这些蛋白保持正确的构象, 发挥它们正常的生物功能, 而 HIF-1 是 HSP90 的效应蛋白^[5], 抑制 HSP90 可以使 HIF-1 α 降解, 从而阻断细胞对乏氧信号的响应。现有研究已经发现 HSP90 的特异性抑制剂格尔德霉素 (Geldanamycin, GA) 及其衍生物^[6]可以特异性结合到肿瘤细胞上^[7], 抑制肿瘤的生长, 17-dimethylamonoethylamino-17-desmethoxygeldanamycin (17-DMAG) 是 GA 的衍生物, 其毒性很小且水溶性和生物活性好于 GA。本项研究中以人宫颈癌细胞 HeLa 为研究对象, 在 CoCl_2 模拟的乏氧条

件下培养细胞, 用热休克蛋白 90 的特异性抑制剂 17-DMAG 处理乏氧细胞, 研究 17-DMAG 对乏氧肿瘤细胞辐射敏感性的影响。

1 实验材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞来源及细胞培养 人宫颈癌 HeLa 细胞购自中科院上海细胞所细胞库, 用含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基, 于 37℃、5% 体积分数 CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养, 每 2 d 传代 1 次。

1.1.2 主要试剂及仪器 17-DMAG (Sigma 公司产品), 用二甲亚砜 (DMSO) 配成浓度为 0.001 mol/L 的储备液, 避光于 -20℃ 保存备用。使用时用培养基稀释, 细胞培养液中 DMSO 的浓度 $< 0.01\%$ 。氯化钴 (Sigma 公司产品), 用 0.9% 氯化钠配制成浓度为 0.01 mol/L 储备液, 4℃ 保存备用。DMEM 细胞培养基、小牛血清及胰酶均购自上海普飞生物公司; 青-链霉素溶液购自上海微科公司; 鼠抗人 HIF-1 α 多克隆抗体购自北京中杉生物公司; 羊抗小鼠 IgG-HRP 购自武汉博士德公司; 凋亡试剂盒购自凯基生物; 姬姆萨染剂及二甲亚砜均购自美国 sigma

江苏省高校优势学科建设项目 (PAPD) 资助

第一作者: 王慧宇, 女, 1984 年 10 月出生, 2008 年毕业于山西医科大学公共事业管理专业, 现为苏州大学放射医学专业在读硕士研究生

通讯作者: 张保国, Email: bgzhang@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2011-10-31, 修回 2011-12-28

公司。CO₂ 培养箱 (Thermo Forma3111 水套式)、倒置显微镜 (Olympus CK41)。

1.2 实验方法

1.2.1 Western-Blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达 取对数生长期细胞培养, 接种于 100 mL 的培养瓶中, 细胞贴壁后加入 50 μ mol/L、100 μ mol/L、150 μ mol/L、200 μ mol/L CoCl₂ 作用细胞 24 h 后收集细胞。细胞分组正常对照组 (A 组), 缺氧组 (B 组), 缺氧药物组 (C 组), B、C 组加入含有 200 μ mol/L 的 CoCl₂ 培养基作用 24 h 后, C 组换用含 50 nmol/L、100 nmol/L、150 nmol/L 17-DMAG 的 CoCl₂ 培养基继续培养 24 h 后, 收集细胞, 细胞裂解液裂解, 12 000 g 离心 10 min 后, 抽提上清液。每个样本取等量蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分离蛋白电转至 PVDF 膜上, 5% 牛奶封闭液封闭非特异性抗原结合位点后, 加入鼠抗人 HIF-1 α 多克隆抗体 (1:200) 4℃ 过夜, 洗膜后加入 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG (1:1 000), 室温脱色摇床震荡 1 h。洗膜后, 进行 ECL 显色。

1.2.2 克隆形成实验检测 17-DMAG 对细胞存活率影响 取对数生长期细胞常规消化计数, 以 500 个/孔密度接种于 60 mm 培养皿中, 贴壁 12 h 后, 加入 17-DMAG 使其终浓度为 25 nmol/L、50 nmol/L、75 nmol/L、100 nmol/L, 24 h 后换为完全培养基, 继续培养 10 d。固定染色后, 镜下计算超过 50 个细胞的克隆, 每组设 3 个平行样, 实验重复 3 次, 结果取平均值。

1.2.3 克隆形成实验检测细胞存活率 取对数生长期细胞常规消化计数, 随着照射剂量增高相应增加接种的细胞数。在照射剂量为 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy 时分别以 500 个/孔、500 个/孔、2 000 个/孔、6 000 个/孔、10 000 个/孔密度接种于 60 mm 培养皿中, 每组每个剂量点设 3 个平行样, 于 5% CO₂、37℃ 常规条件下培养 8 h, 细胞贴壁后弃培养基, 细胞分组正常对照组 (A 组), 缺氧组 (B 组), 缺氧药物组 (C 组), 缺氧药物照射组 (D 组), B、C、D 组加入含有 200 μ mol/L 的 CoCl₂ 培养基作用 24 h 后, C、D 组换用含 25 nmol/L、50 nmol/L 17-DMAG 的 CoCl₂ 培养基, 作用 16 h, D 组接受 2、4、6 和 8 Gy 不同剂量点 γ 射线照射, 剂量率为 63.5 cGy/min, 照射后 8 h 弃含药物培养基加入新鲜培养基继续培

养 10 d。固定染色后显微镜下计数 >50 个细胞的集落为一个克隆。结果分析: 细胞存活分数 (Survival fraction, SF) 按下式计算:

$$SF(\%) = (S_x/S_0) \times 100\%$$

式中, S_x 为受照细胞克隆形成率, S_0 为对照细胞克隆形成率。细胞克隆形成率 = 克隆形成数/接种细胞数。在单击多靶模型中, 细胞存活率 S 和照射剂量 D 的关系为: $S = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^N$ 。采用单击多靶模型拟合细胞存活曲线得出 D_0 和 N 计算出准阈剂量 D_q : $D_q = D_0 \ln N$ 。放射增敏比 SER 定义为达到相同生物效应时, 单纯照射的剂量与药物加照射组的剂量之比。根据 D_0 和 D_q 分别计算出 SER_{D_0} , SER_{D_q} 。

1.2.4 激光共聚焦显微镜检测细胞凋亡 取对数生长期细胞制成单细胞悬液, 种植于培养皿中爬片, 培养至 8 h 细胞贴壁。细胞分组为 A、B、C、D 组 (同克隆形成实验), 培养至 16 h 时 D 组接受 2、4、6 和 8 Gy 不同剂量点 γ 射线照射, 照射后 8 h 弃药物培养基换新鲜培养基继续培养。培养至 24 h 后, 冷 PBS 洗涤细胞两次。在 100 μ L 的 Binding Buffer 中加入 1 μ L Annexin V-FITC, 1 μ L Propidium Iodide, 混匀。将上述溶液滴加于盖玻片表面, 室温避光反应 15 min 后, PBS 洗 1 次, 50% 甘油封片。立即进行激光共聚焦显微镜观察, 每个视野计数 300 个细胞, 并分别计数早、晚期凋亡数, 记录 3 个视野。

1.3 统计方法

采用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行 t 检验和单因素方差分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $p < 0.05$ 有统计学意义。

2 实验结果

2.1 17-DMAG 预处理缺氧 HeLa 细胞后 HIF-1 α 的表达情况

模拟缺氧条件下可诱导 HeLa 细胞 HIF-1 α 蛋白表达, 随着 CoCl₂ 浓度的增加蛋白表达量增加, 在浓度为 200 μ mol/L 时 HIF-1 α 蛋白表达量最强, 如图 1 和 2 所示。而用不同浓度 17-DMAG 预处理后, HIF-1 α 蛋白表达随药物浓度增加而受到显著抑制, 如图 3 和 4 所示。但在常氧培养条件下, 未观察到这种抑制现象。

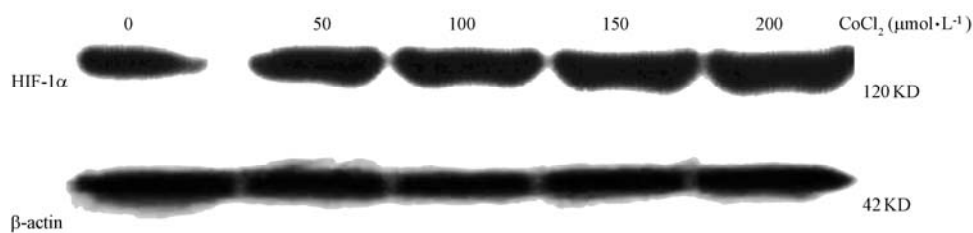


Fig.1 Expression of HIF-1 α treated with different concentration of CoCl₂

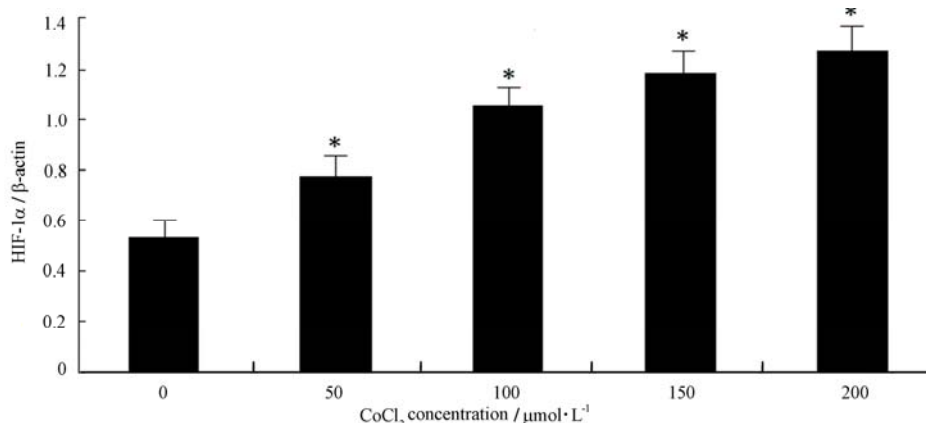
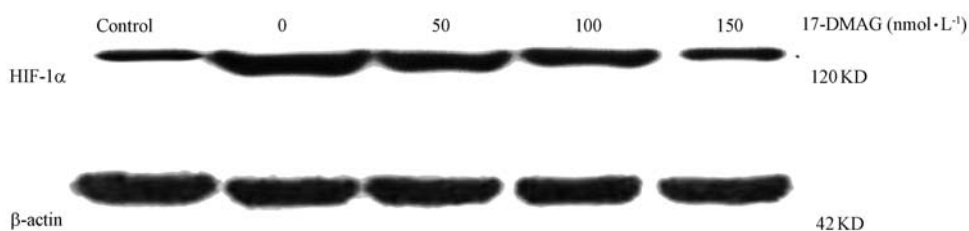


Fig.2 Quantitative analysis of HIF-1 α protein expression. The blots were reprobed with human β -actin antibodies. Histogram represents the average densitometric ratio of HIF-1 α to β -actin of three independent experiments. (* $p \leq 0.05$, vs. $0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)



Control: Normal culture; with 0–150 different concentrations of 17-DMAG combined with pretreatment of CoCl₂ ($200\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig.3 The effect of the HeLa cell HIF-1 α protein expression after treated with different concentration of 17-DMAG

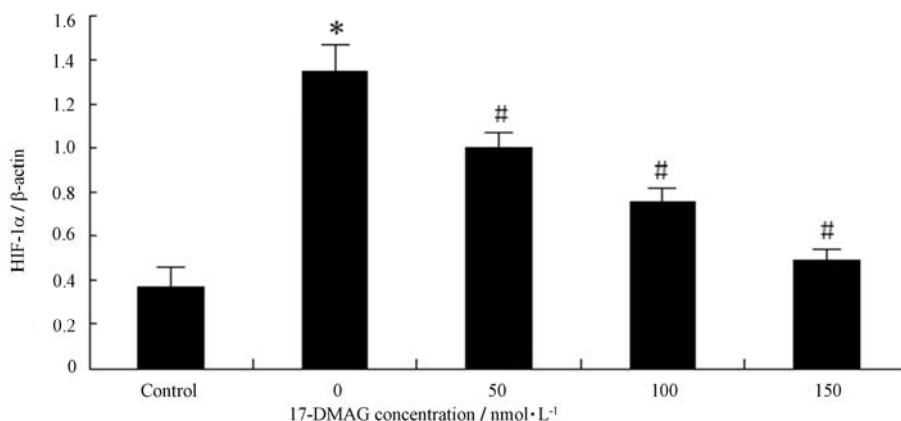


Fig.4 Quantitative analysis of HIF-1 α protein expression. The blots were reprobed with human β -actin antibodies. Histogram represents the average densitometric ratio of HIF-1 α to β -actin of three independent experiments. (* $p \leq 0.05$ vs. control, # $p \leq 0.05$, vs. $0\mu\text{mol/L}$)

2.2 17-DMAG 对 HeLa 细胞存活率的影响

克隆形成实验结果见图 5, 17-DMAG 75 nmol/L 和 100 nmol/L 浓度组 HeLa 的生存率分别下降为 78%

和 72%。结果表明, 17-DMAG 对 HeLa 细胞有一定的毒性, 根据实验结果确定 17-DMAG 预处理的浓度为 25 nmol/L 和 50 nmol/L。

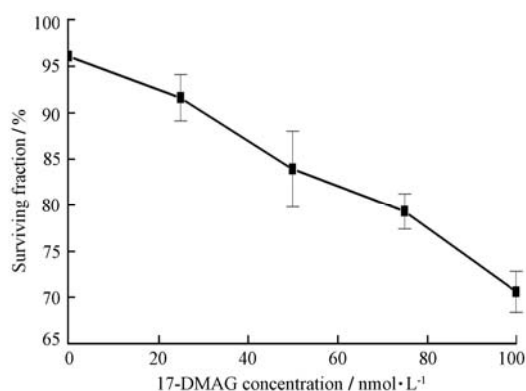


Fig.5 The surviving fraction of HeLa treated with 17-DMAG

2.3 17-DMAG 对射线照射诱导的 HeLa 细胞存活率的影响

单纯缺氧组细胞存活率明显高于正常对照组 ($p < 0.01$)。不同浓度 17-DMAG 处理组的 HeLa 细胞在不同照射剂量组间的存活率差异具有显著性 ($p < 0.01$)。在相同药物浓度下 (0 nmol/L、25 nmol/L、50 nmol/L)，随着照射剂量的增加，HeLa 细胞克隆存活率均降低。相同照射剂量下，药物组的细胞克隆存活率均低于单纯缺氧组 ($p < 0.05$)，辐照剂量—

细胞存活曲线见图 6。使用多靶单击模型拟合细胞存活曲线，得出的 D_0 、 D_q 值见表 1。以 D_0 、 D_q 值计算放射增敏比。结果显示，单纯缺氧组 D_0 、 D_q 值均高于正常对照组， $SER_{D_0}=1.64$ ， $SER_{D_q}=1.33$ 。缺氧药物组 D_0 、 D_q 值均低于单纯缺氧组， SER_{D_0} ， SER_{D_q} ，随 17-DMAG 浓度的增加而显著增加，提示经过 17-DMAG 预处理后，缺氧 HeLa 细胞放射敏感性增加。

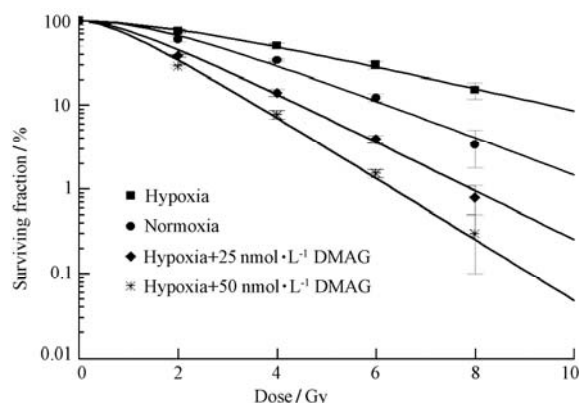


Fig.6 The effects of 17-DMAG combined with rays irradiation on HeLa radio-sensitivity

Table 1 Effect of 17-DMAG on radio-sensitivity enhancement ratio

Group	D_0/Gy	D_q/Gy	SER_{D_0}	SER_{D_q}
Normoxia	1.95	1.79	—	—
Hypoxia	3.20	2.37	1.64	1.33
Hypoxia +25 nmol/L DMAG	1.50	1.04	2.13	2.28
Hypoxia +50 nmol/L DMAG	1.20	0.77	2.67	3.08

2.4 17-DMAG 对射线照射诱导的 HeLa 细胞凋亡情况影响

应用 Annexin V-FITC 联合 PI 双染色法染色，激光共聚焦扫描显微镜观察，早期凋亡细胞，细胞膜呈绿色 (FITC-偶联的 Annexin V) 荧光；晚期凋亡细胞，细胞膜呈绿色荧光，细胞核呈红色 (PI) 荧光。17-DMAG 对射线照射诱导的 HeLa 细胞凋亡情况影响结果见表 2—表 4。对 HeLa 细胞早期凋亡率与 17-DMAG 药物浓度、照射剂量、氯化钴作多重线性回归分析，多重线性回归方程为：

$$y = -1.2403 + 0.6874x_1 + 5.1031x_2 - 0.0172x_3$$

分析发现，拟合的回归方程具有统计学意义，但对偏回归系数检验结果在 $\alpha=0.05$ 水平上 17-DMAG 药物浓度和照射剂量有统计学意义，由标准偏回归系数绝对值排序，照射剂量对 HeLa 细胞早期凋亡率的作用大于 17-DMAG 药物浓度对早期

凋亡率的影响。对 HeLa 细胞晚期凋亡率与 17-DMAG 药物浓度、照射剂量、氯化钴作多重线性回归分析，多重线性回归方程为：

$$y = -0.1897 + 0.2682x_1 + 2.0969x_2 - 0.0162x_3$$

分析发现，拟合的回归方程具有统计学意义，但对偏回归系数检验结果在 $\alpha=0.05$ 水平上 17-DMAG 药物浓度和照射剂量有统计学意义，由标准偏回归系数绝对值排序，照射剂量对 HeLa 细胞早期凋亡率的作用大于 17-DMAG 药物浓度对早期凋亡率的影响。结果显示：缺氧环境下的 HeLa 细胞对射线照射具有耐受性，可以保护 HeLa 细胞因射线导致的细胞凋亡。随药物浓度的增加细胞早、晚期凋亡率明显增加，并与照射剂量增高呈正相关。因此，可以推测 17-DMAG 能够促进辐射诱导的缺氧 HeLa 细胞凋亡。

Table 2 The effect of different concentration of 17-DMAG on Hela cell apoptosis (%) , $\bar{x} \pm s$			
Grouping	Sample size	Early apoptosis rate	Late apoptosis rate
Normoxia	3	4.33±1.01	0
Hypoxia	3	1.56±1.20	0
Hypoxia +25 nmol/L DMAG	3	11.11±4.52*	2.67±0.72
Hypoxia +50 nmol/L DMAG	3	19.22±5.67*	5.78±2.04*

Note: Compared to the hypoxia group, * $p<0.05$.

Table 3 The effect of treatment by 17-DMAG combined with the radiation / 4Gy on Hela cell apoptosis (%) , $\bar{x} \pm s$			
Grouping	Sample size	Early apoptosis rate	Late apoptosis rate
Normoxia	3	17.22±4.74	8.67±1.96
Hypoxia	3	12±1.76	4.22±1.22*
Hypoxia +25 nmol/L DMAG	3	40.11±5.50*	14.44±1.67*
Hypoxia +50 nmol/L DMAG	3	48.78±7.01*	18.45±4.08*

Note: Compared to the hypoxia group, * $p<0.05$.

Table 4 The effect of treatment by 17-DMAG combined with the radiation / 8Gy on Hela cell apoptosis (%) , $\bar{x} \pm s$			
Grouping	Sample size	Early apoptosis rate	Late apoptosis rate
Normoxia	3	36±6.56	16.11±2.68
Hypoxia	3	24.22±2.21	8.44±1.39
Hypoxia +25nmol/L DMAG	3	66.44±4.33*	22.33±3.89*
Hypoxia +50nmol/L DMAG	3	72.89±4.43*	28.67±1.9*

Note: Compared to the hypoxia group, * $p<0.05$.

3 讨论

缺氧的微环境可以使肿瘤细胞发生生物学改变，包括：基因组和蛋白质组改变，生长受限，细胞周期停滞，凋亡和坏死，对放化疗产生耐受性等。目前的研究表明，HIF-1 在细胞对低氧的反应中处于中央调控地位^[8]，对维持肿瘤细胞的能量代谢、新生血管生成以及促进肿瘤的增殖生长、侵袭和转移及肿瘤耐药方面起着重要作用^[9]。下调 HIF 的基因表达、或促进他的降解、抑制他的调节功能等，可以阻断肿瘤生长所必需的缺氧诱导反应，达到抑制肿瘤生长的效果。

实验性缺氧方法有两种，一种是在低氧环境中培养实验细胞或组织，称为环境缺氧；另一种是在细胞或组织培养液中加入铁的螯合剂如 CoCl₂，也称为细胞缺氧。环境缺氧方法由于需要特殊的培养设备和低氧浓度的混合气体，限制了其在实验室中

的应用。而 CoCl₂ 能在体外培养的细胞中产生类似缺氧状态，细胞对 CoCl₂ 刺激和缺氧刺激具有相同的氧感受、信号转导和转录调节机制，同样可诱导细胞中 HIF 及其调控基因的表达，因此 CoCl₂ 模拟的体外缺氧与体内缺氧状态下的研究具有很强的可比性^[10]。所以本实验中应用 CoCl₂ 化学模拟细胞缺氧，通过钴离子与 Fe²⁺置换使低氧诱导因子 1 α 的降解受阻，从而使 HIF-1 α 水平上调。组织低氧的最重要和直接表现是低氧诱导因子 1 α 的水平上调。已有报道指出^[11]，在一定范围内（终浓度 200 μ mol/L 时间 24 h），HIF-1 α 在 Hela 细胞中的表达与 CoCl₂ 浓度正向平行，在 200 μ mol/L 时达高峰，但在 400 μ mol/L 时 HIF-1 α 出现下调。其中可能存在增加低氧刺激所促发的负反馈效应。所以本实验采用 CoCl₂ 浓度为 200 μ mol/L 作为模拟缺氧条件。

热休克蛋白（Heat shock protiens, HSPs）是生物体在不良环境因素如热损伤、缺血、氧化应激、

紫外线、电离辐射等损伤因素作用下所产生的一组具有高度保守性的应激蛋白。肿瘤细胞的辐射敏感性与肿瘤细胞对辐射损伤的响应有关,细胞辐射响应有关的信号传导过程都需要 HSPs 的参与^[12,13],如在肿瘤细胞辐射响应中起关键作用的 PI3K/Akt、Ras/Raf、NF- κ B 等都必须与 HSPs 组成复合体才能保持稳定,不被降解^[14]。HIF1- α 是 HSP90 的效应蛋白^[5],HIF1- α 与 HSP90 结合才能不被降解,因此抑制 HSP90 的分子伴侣功能,可以使 HIF1- α 降解,从而阻断 HIF-1 通路,同时也阻断多个细胞辐射响应信号通路。HSPs 另一主要功能是抑制细胞凋亡^[15],HSP27、HSP70、HSP90 均可抑制细胞凋亡。细胞凋亡有两种主要通路:由线粒体释放细胞色素 c 诱导的凋亡和由死亡受体诱导的细胞凋亡。HSPs 可以抑制内部通路(线粒体通路)和外部通路(死亡受体通路)诱导的凋亡。通过抑制 HSPs,可以阻断乏氧信号传导通路,解除对肿瘤细胞凋亡的抑制,从而提高肿瘤细胞的辐射敏感性。格尔德霉素(GA)是 HSP90 的特异性抑制剂,17-DMAG^[6]是 GA 的衍生物,它比 GA 的肝毒性小且生物活性更好,并且可以特异性结合到肿瘤细胞上^[7]。动物实验表明^[16]:给药 24 h 后除肿瘤组织外,其它正常组织中已测量不到 17-DMAG,对正常细胞辐射敏感性影响很小,17-DMAG 是比较理想的 HSP90 抑制剂。已有报道表明 17-DMAG 抑制多种肿瘤细胞的增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,且呈时间-剂量依赖性。另有报道指出 17-DMAG 在结肠癌中可以增加肿瘤细胞对药物的敏感性,使肿瘤细胞耐药性降低。

本实验中首先应用不同浓度的 CoCl₂ 处理 HeLa 细胞 24 h 后检测 HIF-1 α 蛋白表达如图 2 所示,浓度为 200 μ mol/L 时 HIF-1 α 蛋白表达量最强,与文献[17]结果一致。因此,我们选取浓度为 200 μ mol/L CoCl₂ 对细胞进行缺氧处理。克隆形成实验结果见图 5,17-DMAG 75 nmol/L 和 100nmol/L 浓度组 HeLa 的生存率分别下降为 78%和 72%,结果说明 17-DMAG 对 HeLa 细胞有一定的毒性,根据实验结果确定 17-DMAG 预处理的浓度为 25 nmol/L 和 50 nmol/L。乏氧肿瘤细胞辐射敏感性差不仅在于氧可以固定射线对 DNA 的损伤,诱导细胞死亡,还与乏氧微环境中相关基因的表达与调控密切相关。 γ 射线氧增强比(OER)值在 2.5—3.5 之间。在克隆存活率实验中结果表明,单纯缺氧组 D_0 、 D_q 值均高于正常对照组, SER_{D_0} =1.64, SER_{D_q} =1.33,比 OER 值低,HeLa 处于模拟缺氧状态,不是真正处于缺氧状态,HeLa 细胞辐射敏感性的差异是由于模拟缺氧

诱导 HIF-1 α 过表达所引起的。实验结果显示 HeLa 细胞预先缺氧培养后,经不同浓度的 17-DMAG 联合不同剂量的射线照射处理后,缺氧药物组 D_0 、 D_q 值均低于单纯缺氧组, SER_{D_0} , SER_{D_q} 随 17-DMAG 浓度的增加而显著增加(见表 1),并且具有剂量-效应关系。这是由于 17-DMAG 抑制 HSP90 的分子伴侣功能,使 HIF1 等很多蛋白不能发挥正常功能,从而提高了细胞辐射敏感性。由此结果提示:17-DMAG 联合射线照射同时应用可以提高射线对缺氧肿瘤细胞的杀伤效应,两者具有协同作用,即 17-DMAG 能够提高模拟缺氧条件下 HeLa 细胞放射敏感性,这与初步的设想一致。为进一步研究 17-DMAG 辐射增敏作用的机制,观察了它对 HIF-1 α 蛋白表达及对细胞凋亡情况影响。Western blot 实验结果显示: HIF-1 α 蛋白随药物浓度的增加表达受到明显的抑制,表达量随药物浓度的增加而不断减少(见图 4),这是由于 HSP90 功能受到抑制导致其效应蛋白 HIF-1 α 表达量降低,本实验证实了 17-DMAG 是通过抑制 HIF-1 α 蛋白的表达而发挥其辐射增敏作用。细胞凋亡实验结果(表 2—4)显示:缺氧环境下的 HeLa 细胞对射线照射具有耐受性,可以保护 HeLa 细胞因射线导致的细胞凋亡。随药物浓度的增加细胞早、晚期凋亡率明显增加,并与照射剂量增高呈正相关。本实验可得出结论:17-DMAG 可以促进乏氧细胞的凋亡,对缺氧条件下的肿瘤细胞的辐射增敏作用与其促进细胞凋亡作用有关。这些研究为宫颈癌的放射治疗提供了新的思路,但其确切的增敏机制是否通过影响细胞周期及其 DNA 双链断裂修复等方面而发挥作用,还需要开展进一步研究证实。

参考文献

- 1 Harada H. How can we overcome tumor hypoxia in radiation therapy? [J]. Radiat Res (Tokyo), 2011, **52**(5): 545-56
- 2 Nakayama K. Cellular signal transduction of the Hypoxia response. J Biochem, 2009, **146**(6): 757-765
- 3 Kizaka-Kondoh S, Tanaka S, Harada H, *et al.* The HIF-1-active microenvironment: an environmental target for cancer therapy. Adv Drug Deliv Rev, 2009, **61**(7-8): 623-632
- 4 Fukumoto R, Kiang J G. Geldanamycin analog 17-DMAG limits apoptosis in human peripheral blood cells by inhibition of p53 activation and its interaction with heat-shock protein 90 kDa after exposure to ionizing radiation. Radiat Res, 2011, **176**(3): 333-345
- 5 Schofield C J, Ratcliffe P J. Signalling hypoxia by HIF

- hydroxylases. *Biochem Biophys Res Comm*, 2005, **338**(1): 617-626
- 6 Blagg B, Kerr T. Hsp90 Inhibitor :Small molecules that transform the hsp90 protein folding machinery into a catalyst for protein degradation. *Med Res Rev*, 2006, **26**(3): 310-338
 - 7 Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, *et al.* A high-affinit conformation of Hsp90 confer tumor selectivity on Hsp90 inhibitor. *Nature*, 2003, **425**(6956): 407-410
 - 8 Sarah R Walmsley, Edwin R Chilvers, Moira K B Whyte. Hypoxia.hypoxia inducible factor and myeloid cell function [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, **11**(2): 219-225
 - 9 Guan Y, Ramasamy Reddy K, Zhu Q, *et al.* G-rich oligonucleotides inhibit HIF-1 alpha and HIF-2 alpha and block tumor growth [J]. *Mol Ther*, 2010, **18**(1): 188-197
 - 10 Piret J P, Mottet D, Raes M, *et al.* CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma Cell line HepG2 [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2002, **973**(9): 443-447
 - 11 韩建群, 余明华, 戴旻, 等. 氯化钴化学模拟低氧对肿瘤细胞增殖及凋亡的影响. *基础医学与临床*, 2008, **28**(8): 867-872
 - HAN Jianqun, YU Minghua, DAI Min, *et al.* Influence of chemical hypoxia induced by cobalt chloride on the proliferation and apoptosis of tumor cells. *Basic Clinical Medicine*, 2008, **28**(8): 867-872
 - 12 Calderwood S K, Khaleque M A, Sawyer D B, *et al.* Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006, **31**(3): 164-172
 - 13 Chiosis G. Targeting chaperones in transformed systems-a focus on Hsp90 and cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 2006, **10**(1): 37-50
 - 14 Caphausen K, Tofilon P J. Inhibition Hsp90: A Multitarget Approach to Radiosensitization. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(15 Pt 1): 4326-4330
 - 15 Takayama S, Reed J C, Homma S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene*, 2003, **22**(56): 9041-9047
 - 16 Hervouet E, Pecina P, Demont J, *et al.* Inhibition of cytochrome c oxidase subunit 4 precursor processing by the hypoxia mimic cobalt chloride [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **344**(4): 1086-1093
 - 17 Williams K J, Telfer B A, Xenaki D, *et al.* Enhanced response to radiotherapy in tumours deficient in the function of hypoxia-inducible factor-1. *Radiotherapy and Oncology*, 2005, **75**(1): 89-98

The effect of inhibition HSP90 on radio-sensitization of hypoxic cancer cells

WANG Huiyu HONG Chengjiao ZHANG Baoguo

(School of Radiation Medicine and Protection of Soochow University, The Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection of Jiangsu Province, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT To investigate the radio-sensitization impact of 17-DAMG on hypoxic human HeLa cells, CoCl₂ with different concentration was used to treat the cells for 24 h, then the cells were exposed to 17-DAMG of different density for 16 h and irradiated with different doses of 2, 4, 6, 8 Gy γ -rays. The HIF-1 α protein level was determined by Western blot analysis, the radiation-sensitization was detected by cloned assay and the Laser Confocal Scanning Microscope was used to test cell apoptosis. The results showed that the HIF-1 α protein was over-expressed when the concentration of CoCl₂ was set at 200 μ mol/L, the cell survival rate was significant decreased ($p < 0.01$) when HeLa cells were cultured in different concentration of 17-DAMG and exposed to different doses irradiation; After 17-DAMG pretreatment HIF-1 α protein expression was inhibited significantly and the apoptosis rate of hypoxic HeLa cells in early and late stages significant increased with the increment of drug concentration ($p < 0.01$). The results indicate that 17-DAMG pretreatment can improve the radio-sensitization of hypoxic HeLa cells through the cell apoptosis as HIF-1 α protein expression can be inhibited by 17-DAMG.

KEYWORDS Cobalt chloride, 17-DAMG, Hypoxia-inducible factor-1, Apoptosis, Radiosensitization

CLC R811, R811.5