

MEK 特异性抑制剂 U0126 对 A549 细胞的 放射增敏作用及机制研究

夏颖¹ 王叶¹ 薛莲² 于冬¹

¹ (苏州大学放射医学与防护学院 苏州 215123)

² (苏州大学公共卫生学院 苏州 215123)

摘要 采用克隆形成实验检测 U0126 对 A549 细胞的放射增敏作用; MTT 法检测 U0126 联合 X-射线对 A549 细胞的增殖抑制作用; 流式细胞术检测 U0126 联合 X-射线对 A549 细胞周期的影响; 蛋白免疫印迹杂交法检测 p-erk 蛋白在 A549 细胞中的表达; 衰老相关 β -半乳糖苷酶染色检测 A549 细胞衰老的变化。结果显示, U0126 使 p-erk 蛋白表达下降, 能够增加 A549 细胞的放射敏感性, 放射增敏比为 1.18。单纯使用 U0126 能明显抑制 A549 细胞的增殖, 诱导 G1 期细胞阻滞并具有时间依赖性和剂量依赖性。U0126 联合 X-射线也能抑制 A549 细胞的增殖, 增强 G1 期细胞阻滞现象和细胞衰老现象。以上结果表明, U0126 能增加 A549 细胞的放射敏感性, 其作用机制可能与细胞周期阻滞及细胞衰老增强有关。

关键词 抑制剂 U0126, A549 细胞, 放射增敏, 细胞周期阻滞, 衰老

中图分类号 R81, TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rj.32.040201

肺癌是最常见的严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤之一, 非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌病例的 80%^[1-2]。放射治疗是肺癌综合治疗的重要手段。但一定程度的放射抵抗性限制了放射治疗对 NSCLC 的效率。大量研究人员在寻找可能的放射增敏方法^[3-4]。

MEK-ERK (Methyl ethyl ketone-extracellular signal regulated kinase)通路是细胞中参与调节增殖、分化及凋亡等信号的重要转导通路, 其异常与多种肿瘤或增殖性疾病密切相关。在肺癌、大肠癌、胰腺癌等肿瘤细胞中均可检测到 ERK 的过表达^[5]。研究表明, 抑制 MEK-ERK 通路可以抑制 CyclinD1 和 DNA-PKcs 蛋白的表达, 从而增加横纹肌肉瘤的放射敏感性^[6]。但也有文献报道, 在克隆形成实验中, 单独使用 U0126 时 A549 细胞的克隆存活分数升高; 联合使用 U0126 和 PI3K 抑制剂 LY294002 时 A549 细胞的克隆存活分数降低^[7]。

细胞的放射敏感性与细胞周期、氧效应和 DNA 损伤修复能力等密切相关。处于不同周期的细胞对

射线的敏感性不同。通常, M 期和 G2 期的细胞对射线最为敏感, G1 期次之, 而 S 期的细胞最不敏感^[8-9]。衰老是一种不可逆性细胞周期阻滞现象, 可由射线照射等多种刺激引起。

本文使用 MEK 特异性抑制剂 U0126 阻断人 A549 细胞的 MEK/ERK 通路, 探索增加肺癌细胞的放射敏感性的可能性, 并从细胞周期和细胞衰老两方面来分析其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物和照射条件

A549 细胞购于中国科学院上海细胞库。细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中, 用含 10% 的胎牛血清的 DMEM 完全培养液培养。U0126 购自美国 Promega 公司, 1 mg U0126 粉末溶于 234 μ L DMSO 溶液中, 分装后于 -20 °C 保存, 加药组使用终浓度为 10 μ mol·L⁻¹。对照组加入 DMSO 溶液, 终浓度为 10 μ mol·L⁻¹。X-射线照射采用美国 Radsources 公司的 X-射线辐射仪, 剂量率为 1.18 Gy·min⁻¹。

基金项目: 国家自然科学基金(81102076)、江苏省自然科学基金(BK20131165)和江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)资助

第一作者: 夏颖, 女, 1988 年 3 月出生, 2011 年 7 月毕业于安徽省蚌埠医学院, 现就读于苏州大学医学部, 从事放射医学研究, E-mail: 429383684@qq.com

通讯作者: 于冬, 博士, 教授, E-mail: byudong@gmail.com

收稿日期: 收稿 2014-04-08; 修回 2014-04-27

1.2 克隆形成实验

取对数生长期的细胞,以 $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 浓度接种于 60 mm 培养皿中。待细胞贴壁后, +DMSO 组和 +U0126 组分别加入 DMSO 和 U0126 作用 24 h。0.25%胰蛋白酶消化并制成细胞悬液,分别依据照射剂量不同接种不同数量的细胞。每个剂量 3 个复皿。分别予以 0、2、4 和 6 Gy 的 X-射线照射。继续培养 10–14 d。观察至克隆形成停止培养。细胞用无水甲醛室温固定 10 min。1 mL 0.25%结晶紫染色 30 min,流水缓慢洗去染液,空气干燥。计数含有大于或等于 50 个细胞数的集落数目,并计算接种效率(Plating efficiency, PE)和存活分数(Surviving fraction, SF):

接种效率=0 Gy 对照组形成的集落数/接种细胞数;

存活分数=某一剂量照射后形成的集落数/接种细胞数/PE。

应用单击多靶模型 $SF=1-(1-e^{-D/D_0})^N$ 拟合细胞存活曲线,计算各组放射性敏感性参数 D_q 、SF2 和 SER 值。其中, D 为吸收剂量(Gy), D_0 代表平均致死照射剂量(曲线指数下降 63%所需的剂量。 D_0 值越小,放射敏感性越高), D_q 为准域剂量(代表细胞累积亚致死性损伤的能力,为克服肩区所需的剂量), $D_q=D_0 \times \ln N$, N 为外推值。SF2 为 2 Gy 时的存活分数。放射增敏比(Sensitizer enhancement ratio, SER)=对照组 D_0 /加药组 D_0 。

1.3 MTT 实验

取对数生长期细胞制成 $0.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔含 5000 个细胞。待细胞贴壁后+DMSO 组和+U0126 组分别加入 DMSO 和 U0126,继续培养 0–120 h。或待细胞贴壁后+DMSO+4 Gy 组和+U0126+4 Gy 组分别加入 DMSO 和 U0126 作用 24 h,予以 4 Gy X-射线照射换液并继续培养 0–120 h。

培养后每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 液于 37°C 孵育 4 h。加入 MTT 三联溶解液(10% SDS+ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl+ 5% 异丙醇)孵育 8 h,待结晶物充分溶解后用酶联免疫检测仪以波长 570 nm 测定各孔吸光度(OD)值。

1.4 蛋白免疫印迹杂交法

取对数生长期细胞,以 $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 浓度接种于

60 mm 培养皿中。待细胞贴壁后, +DMSO 组和 +U0126 组分别加入 DMSO 和 U0126,作用 24 h。+6 Gy 组给予 6 Gy X-射线照射后换液并继续培养 30 min。培养结束后,细胞用 $100\text{--}120 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液于冰上裂解 30 min 并收集, 4°C 、 $10,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后收集上清液。采用 Thermo pierce BCA 蛋白定量试剂盒测定细胞蛋白浓度。计算含有 $25 \mu\text{g}$ 蛋白的溶液体积为上样蛋白体积。上样的总体积为 $18 \mu\text{L}$ 。1.5 mL 的 EP 管中依次加入双蒸水、 $3 \mu\text{L}$ $6 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液和样品。上样前将样品于 100°C 煮沸 10 min,使蛋白变性。制备 SDS-PAGE 胶,常规电泳、转膜、封闭、一抗 4°C 孵育过夜和二抗室温孵育, ECL 化学发光法显色并使用化学发光仪检测结果。

1.5 流式细胞仪分析细胞周期

取对数生长期的细胞,以 $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 浓度接种于 60 mm 培养皿中。待细胞贴壁后加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ U0126 作用 0–72 h。或待细胞贴壁后加入 $0\text{--}30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ U0126 作用 24 h。或待细胞贴壁后+U0126+4 Gy 组和+DMSO+4 Gy 组分别加入 U0126 和 DMSO 作用 24 h,予以 4 Gy X-射线照射换液并继续培养 0–48 h。

培养结束后,收集细胞于离心管内, PBS 洗涤细胞一次。逐滴加入预冷的 70% 乙醇溶液 2 mL,吹散细胞, -20°C 固定过夜。PBS 洗涤细胞一次。加入 PI 染液($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ PI+ $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNA 酶+ 0.5% Triton X-100+ $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 枸橼酸钠) 1 mL 并制成单细胞悬液, 4°C 避光孵育 30 min 后使用流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.6 衰老相关 β -半乳糖酶染色实验

取对数生长期的细胞,以 $0.3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的浓度接种于 30 mm 培养皿中。待细胞贴壁后, +DMSO+4 Gy 组和+U0126+4 Gy 组分别加入 DMSO 和 U0126 作用 24 h,给予 4 Gy X-射线照射后换液,继续培养 72 h。培养结束后,吸除原培养液,加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液,室温固定 10 min。吸除固定液,用 PBS(pH=6.0)洗涤细胞 3 次,每次 3 min。吸除 PBS,每皿加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色工作液。 37°C 避光孵育 20 min 至 2 h,直至部分细胞的颜色变蓝。普通光学显微镜下观察并计数衰老细胞比例。

1.7 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用独立样本 t 检验分析, $p < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。其中, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ 。

2 结果

2.1 U0126 对 A549 细胞的放射增敏作用

剂量-细胞存活曲线见图 1a, 随着剂量的增加,细胞的存活分数明显下降。与对照组相比, U0126 联合 X-射线照射可以使 A549 细胞的存活率明显降低。单击多靶模型的主要放射敏感性参数见表 1。

结果显示, U0126 处理后细胞平均致死剂量 (D_0 值) 减低, 存活曲线肩区 (D_q 值) 变小, 放射增敏比为 1.18, 表明 U0126 对 A549 细胞有放射增敏作用。如图 1c 所示, U0126 能明显抑制 A549 细胞的增殖。随着作用时间的延长, U0126 对 A549 细胞的增殖抑制作用越显著。如图 1d, U0126 联合 X-射线对 A549 细胞的增殖也具有明显的抑制作用。随着时间的延长, 对 A549 细胞的增殖抑制作用越显著。图 1e 表明, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ U0126 作用 24 h 后能明显抑制 A549 细胞 p-erk 蛋白的表达。所以, U0126 通过抑制 MEK-ERK 信号通路, 能明显抑制细胞增殖, 并且 U0126 增加 A549 细胞的放射敏感性。

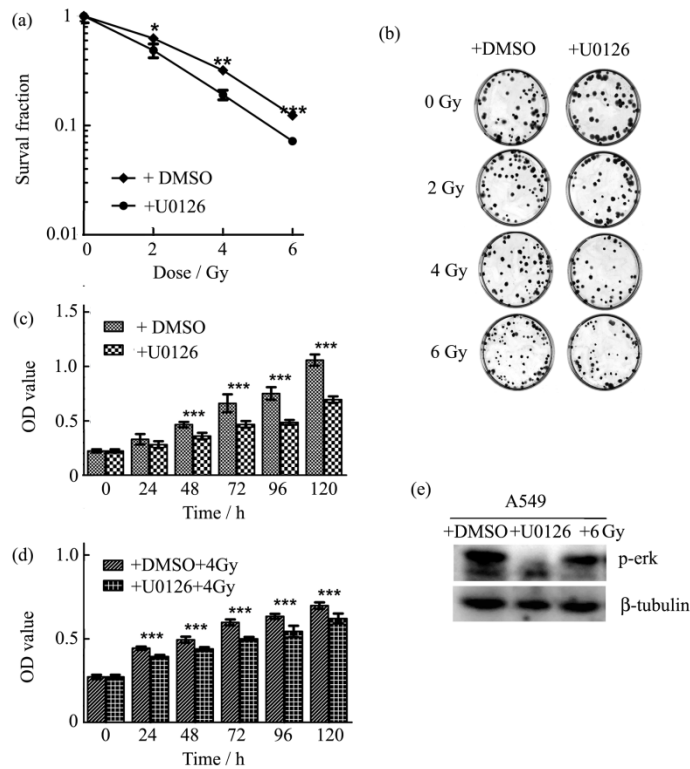


图 1 U0126 对 A549 细胞的放射增敏作用: (a)剂量-细胞存活曲线; (b)克隆形成实验的典型图片; (c) $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ U0126 作用 0-120 h, MTT 实验测定细胞增殖; (d) $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ U0126 联合 X-射线对细胞增殖的影响; (e) $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ U0126 作用 24 h 后蛋白免疫印迹杂交实验检测 p-erk1/2 蛋白表达

Fig 1 Effects of U0126 on radiosensitivity of A549 cells: (a) survival curves of colony formation assay; (b)representative image of colony formation assay; (c) viability measured by MTT assay with cells incubated with $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ U0126 from 0 to 120h; (d) effects of U0126 combined with X-rays on cell viability of A549 cells; (e) The expression of p-erk1/2 in cells of U0126-treated for 24 h on Western Blot assay

表 1 单击多靶模型的放射敏感性生物学参数及增敏比
Table 1 Radiosensitivity parameters of one-hit multi-target formula and SER

细胞 Cell	分组 Groups	D_0	D_q	N	SF2	SER
A549	+DMSO	2.36	1.37	1.78	0.63	—
	+U0126	2.01	0.74	1.45	0.49	1.18

2.2 U0126 对 A549 细胞的细胞周期和衰老现象的影响

MEK-ERK 信号通路与细胞周期 G1/S 转换关系密切, 所以用流式细胞术检测 U0126 对 A549 细胞的细胞周期分布的影响。如图 2a, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 作用 24 h 后 G1 期细胞比例明显增加, 说明 U0126 将 A549 细胞阻滞于 G1 期, 并且随着 U0126 作用时间的延长和 U0126 作用浓度的升高, G1 期阻滞现象愈显著。如图 2c, 当给予 X-射线照射后, +DMSO+4 Gy 组 G2/M 期细胞增多, 于 12 h 出现明

显的 G2/M 期阻滞, 而+U0126+4 Gy 组持续存在 G1 期细胞阻滞现象。如图 2d 和 2e, 单纯使用 U0126 对细胞的衰老无影响。+DMSO+4 Gy 组和+U0126+4 Gy 组 72 h 后衰老细胞百分比分别为 $(23.3 \pm 0.008)\%$ 和 $(27.2 \pm 0.008)\%$, A549 细胞的衰老现象明显增加。以上结果说明, U0126 可以将细胞阻滞于 G1 期, 当联合 X-射线时 G1 期阻滞现象愈显著, 并且细胞衰老现象明显增加。所以, U0126 提高 A549 细胞的放射敏感性可能与 G1 期阻滞和细胞衰老现象正相关。

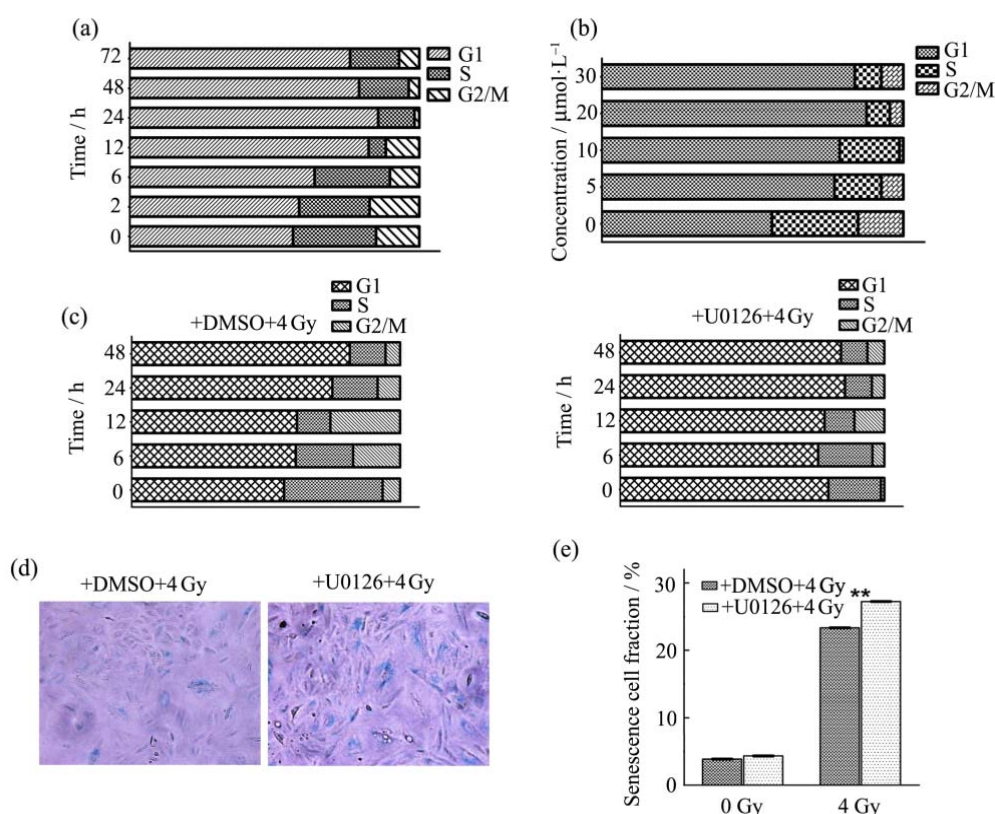


图 2 U0126 对 A549 细胞的细胞周期和衰老现象的影响: (a) $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 作用不同时间后细胞周期的变化; (b) 不同浓度 U0126 作用 24 h 后的细胞周期的变化; (c) $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 或 DMSO 作用于 A549 细胞 24 h, 继续给予 4 Gy X-射线照射后的 0-48 h 内细胞周期的变化; (d) 衰老现象的典型图片; (e) $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 或 DMSO 作用于 A549 细胞 24 h, 继续给予 4 Gy X-射线照射, 培养 72 h 后检测细胞衰老现象变化

Fig 2 Effects of U0126 on cell-cycle progression and IR-induced senescence of A549 cells: (a) changes in cell-cycle progression of cells treated with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 from 0 to 72 h; (b) changes in cell-cycle progression of cells treated with 0-30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 for 24 h; (c) analysis of changes in cell-cycle progression from 0 to 48 h with cells treated with $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 for 24 h before 4 Gy X-ray irradiation; (d) representative image of SA-β-gal positive senescent cells; (e) cells were cultured for 72 h post-irradiation and measured with SA-β-gal staining after being treated with U0126 for 24 h

3 讨论

随着电离辐射技术在医学领域的快速发展和放射增敏机制的深入研究, 射线照射联合化学药物的放射增敏方法越来越受到人们的重视。本文以 A549

细胞为研究对象, 对 MEK 特异性抑制剂 U0126 作为肺癌治疗的放射增敏剂的可行性进行研究, 并探索其相关机制。

MEK-ERK 通路是细胞中广泛存在的参与细胞生长、增殖、分化调节等的信号转导通路。抑制

剂 U0126 进入细胞内, 结合在 MEK 的特定位点上, 修饰改变 MEK 的三维结构, 使其 ATP 结合位点不能被上游激酶磷酸化, 从而抑制磷酸基转移到 ERK 的活性位点, 有效抑制 MEK/ERK 信号通路。据研究, 在 IGF-1R 缺失的小鼠胚胎成纤维母细胞中, 当高表达 MEK/ERK 信号通路时, 细胞具有一定的放射抵抗性^[10]。单独使用 MEK 抑制剂或者 PI3K 抑制剂时 A549 细胞的 SF 值升高; 联合使用 MEK 抑制剂和 PI3K 抑制剂时 A549 细胞的 SF 值降低。而对于不含 K-12 GGT→AGT 的 K-RAS 突变的 HNCUM-02T 细胞, 单独使用 MEK 抑制剂 U0126 即可明显降低其存活分数^[7]。细胞内的 DSBs 修复机制是影响放射敏感性的重要方面。应用 siERK 技术抑制 ERK 表达后, 采用流式细胞仪检测 A549 细胞, 其非同源末端连接修复能力明显降低^[11]。

在本实验研究中, 克隆形成实验证实抑制剂 U0126 增加 A549 细胞的放射敏感性, 根据单击多靶模型拟合剂量-存活曲线, 其放射增敏 (SER) 比为 1.18。+U0126+4Gy X-射线明显抑制细胞增殖, G1 期细胞比例明显增高, 衰老细胞比例增加。虽然单纯+U0126 处理也使 G1 期细胞比例增高, 但其总体周期分布规律与+U0126+4 Gy X-射线组是不同的。单纯+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 作用 24 h 后主要使细胞从 S 期和 G2/M 期趋向于 G1 期。撤除药物后细胞从 G1 期进入 S 期和 G2/M 期, G1 期细胞比例减少, S 期和 G2/M 期细胞比例增加 (数据未显示)。即使 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 持续作用至 48 和 72 h, 亦未见 G1 期细胞比例继续增加, 而是 G1 期细胞比例逐渐减少, S 期和 G2/M 期细胞比例分别增加。在+U0126+4 Gy X-射线组, 当 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 处理 24 h G1 期细胞比例为 78.9%时, 联合应用 X-射线照射后, G1 期细胞比例继续增加, 主要是细胞从 S 期趋向于 G1 期, 直至联合作用后的第 48 h。并且在+U0126+4 Gy X-射线联合作用的 72 h 的衰老相关 β -半乳糖苷酶染色实验显示, 衰老细胞比例明显增加。

综上所述, 抑制剂 U0126 的放射增敏作用的机制可能是通过改变细胞周期分布, 促使 G1 期细胞阻滞现象持续存在, 使细胞衰老增多。本研究为临床的非小细胞肺癌放射治疗和 U0126 的联合应用提供了实验依据。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. CA: a cancer journal for clinicians [J]. *Cancer statistics*, 2012, **62**(1): 10-29.
- 2 Ministry of health. China health statistics year book [M]. Beijing: Beijing Union Medical University Press, 2012.
- 3 Wang M, Morsbach F, Sander D, *et al.* EGF receptor inhibition radiosensitizes NSCLC cells by inducing senescence in cells sustaining DNA double-strand breaks [J]. *Cancer research*, 2011, **71**(19): 6261-6269.
- 4 Ji Ning, ZHU Huixia, Ji Bin. Experimental study of increased radiosensitivity of Eddy injection on lung cancer cell A549 [J]. *Journal of Practical Tumor Magazine*, 2010, **25**(1): 60-64.
- 5 Hoshino R, Chatani Y, Yamori T, *et al.* Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors [J]. *Oncogene*, 1999, **18**(3): 813-822.
- 6 Marampon F, Gravina G L, Di Rocco A, *et al.* MEK/ERK inhibitor U0126 increases the radiosensitivity of rhabdomyosarcoma cells in vitro and in vivo by downregulating growth and DNA repair signals [J]. *Molecular cancer Therapeutics*, 2011, **10**(1): 159-168.
- 7 Affolter A, Drigotas M, Fruth K, *et al.* Increased radioresistance via G12S K - Ras by compensatory up regulation of MAPK and PI3K pathways in epithelial cancer [J]. *Head & Neck*, 2013, **35**(2): 220-228.
- 8 Legrys G A, Hall E J. The oxygen effect and X-ray sensitivity in synchronously dividing cultures of Chinese hamster cells [J]. *Radiation Research*, 1969, **37**(1): 161-172.
- 9 König K, Baisch H. DNA synthesis and cell cycle progression of synchronized L-cells after irradiation in various phases of the cell cycle [J]. *Radiation and Environmental Biophysics*, 1980, **18**(4): 257-266.
- 10 Yu D, Watanabe H, Shibuya H, *et al.* Redundancy of radioresistant signaling pathways originating from insulin-like growth factor I receptor [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **278**(9): 6702-6709.
- 11 Kriegs M, Kasten-Pisula U, Rieckmann T, *et al.* The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining [J]. *DNA Repair*, 2010, **9**(8): 889-897.

The radiosensitizing effects of MEK inhibitor U0126 on A549 cells and its molecular mechanism

XIA Ying¹ WANG Ye¹ XUE Lian² YU Dong¹

¹ (School of Radiological Medicine and Protection of Soochow University, Suzhou 215123, China)

² (School of Public Health of Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT The radiosensitizing effects of MEK inhibitor U0126 on A549 cells were determined by colony forming assay. A549 cells were exposed to X-ray with or without U0126 treatment. MTT assay was used to evaluate the cell viability. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Expression of p-erk protein was confirmed by Western Blot. SA- β -gal assay was used to measure the phenomenon of senescence. The results showed that U0126 could decrease the expression of p-erk protein while enhance the radiosensitivity of A549 cells, and the SER was 1.18. ERK inhibition significantly suppressed cell viability and induced G1-phase arrest. After treatment of U0126 combined with X-ray irradiation, the phenomenon of G1-phase arrest and senescence appeared more obvious. U0126 can enhance the radiosensitivity of A549 cells. The radiosensitizing effects of U0126 on A549 cells may contribute to the increase in phenomenon of G1-phase arrest and senescence.

KEYWORDS MEK inhibitor U0126, A549 cells, Radiosensitization, Cell cycle arrest, Senescence

CLC R81, TL71