

Tat-SmacN7 诱导肿瘤细胞辐射敏感性的机理研究

王彦 杜利清 徐畅 曹嘉 王芹 陈凤华
付岳 郭艳婷 刘强 樊飞跃 樊赛军

(北京协和医学院 中国医学科学院放射医学研究所 天津市分子核医学重点实验室 天津 300192)

摘要 探讨 Tat-SmacN7 诱导食管癌细胞株 EC109 和非小细胞肺癌细胞株 NCL-H460 辐射敏感性的机制。采用体外培养 EC109 细胞和 NCL-H460 细胞, 实验分为对照组、单纯给药组、单纯照射组和给药联合照射组, 用 RT-PCR 检测 CAPS8、CASP9 和 CASP3 的转录水平, Fluorogenic caspase assay 试剂盒检测 Caspase -3、-8、和 -9 的活性, ELISA 方法检测 Caspase 活性。结果显示, 两种肿瘤细胞在使用 Tat-SmacN7 联合 Caspase 的抑制剂 z-VAD-fmk 后, 存活曲线较不使用抑制剂组均有明显上移; Caspase -3、-8、和 -9 的活性在 Tat-SmacN7 明显提高, 提示 Tat-SmacN7 可通过细胞凋亡线粒体途径发挥辐射增敏作用, 有望成为一种新的辐射增敏剂。

关键词 Tat-SmacN7, EC109, NCL-H460, 半胱天冬酶, 辐射敏感性

中图分类号 R811.5, TL71

肿瘤细胞区别于正常细胞主要特征为: 自给自足生长信号, 抗细胞凋亡, 潜力无限的复制能力; 持续的血管生成; 组织浸润和转移; 避免免疫摧毁; 促进肿瘤的炎症; 细胞能量异常; 基因组不稳定和突变^[1]。抗细胞凋亡在肿瘤发生发展中具有非常关键的作用, 肿瘤细胞内凋亡信号通路调控异常, 往往是肿瘤细胞对放射治疗诱导的凋亡产生耐受性的原因之一。肿瘤细胞内凋亡抑制蛋白家族 (IAPs) 的主要作用是通过与有活性的 Caspase-3、-7 和 -9 结合, 继而阻碍它们的功能, 最终抑制细胞的凋亡, 使肿瘤细胞产生辐射耐受性。Smac/DIABLO 是一种线粒体蛋白, 在凋亡刺激下可以从线粒体中释放, Smac 与 IAPs 通过特定的氨基末端残基相互作用, 这段结构域包括四个氨基酸残基组成, 丙氨酸-缬氨酸-脯氨酸-异亮氨酸^[2], 同时也证实两个蛋白是通过 Smac 的 AVPI 序列与 XIAP 的 BIR2 和 BIR3 结构域结合继而发挥作用的。通过这种机制, SMAC 促进 Caspases 发挥其促细胞凋亡的作用, 因此促进了细胞凋亡。由于 AVPI 序列可促进细胞凋亡, 因此目前有许多关于 Smac 肽模拟物的研究^[3-8],

SmacN7 是 Smac 蛋白促凋亡功能的最小活性肽段, 但是 SmacN7 不能穿透细胞膜, 本实验室前期工作在 SmacN7 上连接可以穿透细胞膜的引导肽 Tat 之后, 发现 Tat-SmacN7 融合肽可以发挥较明显的辐射增敏作用。本研究旨在探讨 Tat-SmacN7 在 EC109 细胞和 NCL-H460 细胞中的辐射增敏机理, 为临床提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

食管癌细胞株 EC109 和非小细胞肺癌细胞株 NCL-H460 为本实验室保存; 融合蛋白 SmacN7 及 Tat-SmacN7 由上海生工生物工程有限公司完成; 胰蛋白酶/EDTA 裂解液购自 Gibco 公司; WST-1 购自碧云天公司; Annexin V 凋亡试剂盒购自 BD 生物科学公司; 本实验所有一抗全部购自 ABCAM 公司; PrimeScript RT 试剂盒购自 TAKARA 生物公司; Ac-DEVD-AFC、Ac-IETD-AFC、Ac-LEHD-AFC 购自 BD 公司; 本实验所用无胸腺裸鼠购自北京 Vital River 公司。

基金项目: 卫生部卫生行业科研专项 (201002009)、国家自然科学基金项目 (31300695, 31200634, 31170804, 31240052)、天津市自然科学基金 (10JCZDJC16900, 11ZCGYSY02400, 12JCYBJC15300, 12JCYBJC32900)、教育部博士点基金 (20101106110046, 20121106120044, 20121106120043)、青年基金资助和中央高校基本科研业务费专项资金 (2012J05, 2012G01) 资助

第一作者: 王彦, 女, 1975 年 9 月出生, 1997 年毕业于中国协和医科大学, 副研究员, 主要从事放射医学研究

通讯作者: 刘强, 研究员, E-mail: liuqiang@irm-cams.ac.cn

收稿日期: 初稿 2013-06-28, 修回 2013-07-8

1.2 多肽合成以及多肽的细胞渗透试验

为了观察该融合蛋白是否具有细胞渗透功能,在其羧基端用 FITC 进行标记。其氨基酸序列分别为 SmacN7: H-AVPIAQK-OH 和 Tat-SmacN7: H-RKKRRQRRRPVPIAQK-OH。

取生长状态良好肿瘤细胞弃去培养基,用冰冷的 PBS 清洗两遍,常规消化收集细胞。用含 10% FBS RPMI1640 制备细胞悬液,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 。取 200 μL 滴加到置于六孔板的载玻片中,24 h 后待细胞贴壁,弃去培养液,加入相应浓度目标药。继续培养 2–24 h 后,正置荧光显微镜观察药物进入细胞情况。

1.3 RT-PCR 检测

细胞生长至 80% 铺满瓶底时收集细胞,Trizol 法提取总 RNA,逆转录试剂盒(日本 Takara 公司)逆转为 cDNA,Real-time PCR 试剂盒为 Fast Start Universal SYBR Green Master (Rox)(roche 公司)。引物为上海生工生物有限公司合成: CASP3, 5'-ATCACAGCAAAAGGAGCAGTTT-3' (forward) 和 5'-ACACCACTGTCTGTCTCAATGC-3' (reverse); CAPS8, 5'-TAGGG ACAGG AATGGAACACA-3' (forward) 和 5'-TGGG AGAGG ATACAGCAGATG-3' (reverse); CASP9, 5'-TCTGG AGG ATTTGG TGATGTC-3' (forward) 和 5'-CATTTTCTTGG CAGTCAGG TC-3' (reverse); GAPDH, 5'-ATGACATCAAGAAGG TGG TG-3' (forward) 和 5'-CATACCAGG AAATGAGCTTG-3' (reverse)。

1.4 Caspase 活性分析

细胞分别给予不同的处理:空白对照组、给药组(Tat-SmacN7, $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、单纯照射组(2 Gy)和联合处理组。细胞收集按照 Fluorogenic caspase assay 试剂盒说明书操作,细胞生长至 80% 铺满瓶底时进行收集,裂解液裂解细胞,加入 Ac-DEVD-AFC, Ac-IETD-AFC 和 Ac-LEHD-AFC 作为底物,多功能酶标仪测定相应吸光值,结果与对照组比较。

1.5 Caspase 阻断实验

实验中,将细胞分为对照组、Tat-SmacN7 组和 Tat-SmacN7 + z-VAD-fmk 组。对照组采用 10% FBS

RPMI1640 处理。Tat-SmacN7 的浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, z-VAD-fmk 的浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 每组吸收剂量分为 0、2、4 和 6 Gy。待铺板后第 2 天上午给予药物治疗,先将 Tat-SmacN7 + z-VAD-fmk 组给予 z-VAD-fmk 处理 2 h 后,对照组加入 10% FBS RPMI1640 培养基 2 mL, Tat-SmacN7 实验组加培养基稀释的药物溶液,加药后重新置于 37°C , 5% CO_2 细胞培养箱中培养,培养 4 h 后按照设计好的剂量辐照。吸收剂量为 0、2、4 和 6 Gy,将处理完毕后的六孔板于 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养至 10–14 d。待显微镜下观察克隆形成较好,可以固定、染色和计数克隆。使用 CELSURad98 软件,运用二元线性方程计算存活曲线和照射剂量的理论灭活均值, Tat-SmacN7 治疗组和 Tat-SmacN7 + z-VAD-fmk 组与对照组比较,计算药物增敏比(SER),绘制细胞存活曲线。

1.6 统计学分析

各实验中设 3 个平行样,实验重复 3 次,采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tat-SmacN7 融合蛋白体外细胞渗透性实验

为观察 SmacN7 和 Tat-SmacN7 融合肽穿透细胞的能力,用 FITC 标记两种多肽的末端,用培养基配成 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度,观察 EC109 和 NCL-H460 两种不同细胞在加药后 2 和 24 h,两个时间点,药物进入细胞的能力。用 DAPI 溶液染色,在荧光显微镜镜下观察,如图 1。两种细胞用 DAPI 染色都可以看到细胞核,但是 SmacN7 在加药后的两个时间点染色都看不到绿色荧光,说明 SmacN7-FITC 没有进入细胞。Tat-SmacN7 加药后在两个时间点均可观察到绿色荧光,说明 Tat-SmacN7 在两个时间点都进入了细胞。和 DAPI 染色相比,2 和 24 h 两个时间点在两种细胞内都有足够浓度的蓄积,2 h 就基本进入全部细胞,分布在细胞质和细胞核,24 h 后 SmacN7 仍存在于整个细胞内。可以进一步证实,SmacN7 单独不能穿透细胞膜,Tat 作为转导肽,能成功地将 SmacN7 转至不同的两种细胞。另外,由于下一步我们要观察加药后肿瘤细胞对辐射敏感性的改变,必须保证 SmacN7 进入细胞内再给予照射,所以本实验选取了加药后 24 h 再进行照射。

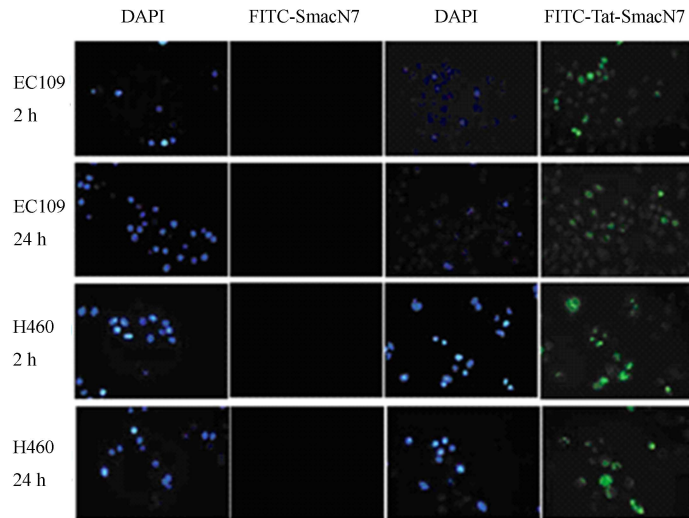


图 1 SmacN7 和 Tat-SmacN7 的细胞渗透染色图
Fig.1 Cell dyeing picture for permeability of SmacN7 and Tat-SmacN7

2.2 Tat-SmacN7 融合蛋白对 Caspase 活性的影响

通过 ELISA 方法分析 Caspase-3、-8 和 -9 的活性, RT-PCR 分析 Caspase-3、-8 和 -9 的 mRNA 表达。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果如图 2 所示。非小细胞

肺癌 NCL-H460 细胞和食管癌 EC109 细胞在经过联合处理后, Caspase-3、-8 和 -9 的活性明显高于 Tat-SmacN7 组和照射组, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。

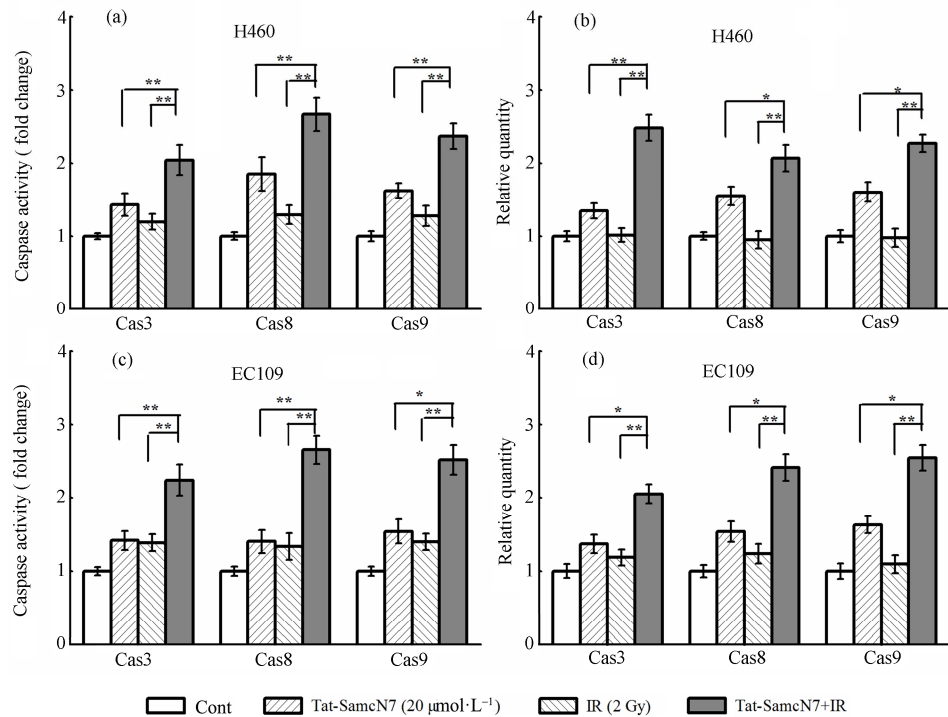


图 2 Tat-SmacN7 融合蛋白对 Caspase 活性及转录水平的影响: a&b, NCL-H460 细胞不同处理组 Caspase-3、-8 和 -9 的活性和 mRNA 表达; c&d, EC109 细胞不同处理组 Caspase-3、-8 和 -9 的活性和 mRNA 表达, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$
Fig.2 Effect of Tat-SmacN7 on Caspase activity and transcriptional level: Caspase-3, -8 and -9 activity and mRNA expression of a&b, NCL-H460 cells in different groups; Caspase-3, -8 and -9 activity and mRNA expression of c&d, EC109 cells in different groups. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; $n = 3$

2.3 Caspase 阻断实验评价 Tat-SmacN7 联合照射后诱导细胞凋亡的机理

为了研究 Tat-SmacN7 增加细胞辐射敏感性的机理是通过 Caspase 诱导细胞凋亡途径实现的, 本实验采用了 Caspase 阻断剂-z-VAD-抑制 Caspase 的活性, 观察细胞辐射敏感性的变化。结果显示, 两种肿瘤细胞在使用 Tat-SmacN7 联合 Caspase 的抑制剂 z-VAD-fmk 后, 存活曲线较不使用抑制剂组均有明显上移; 并且非小细胞肺癌 NCL-H460 细胞的增敏比从 1.63 降到 1.17($p<0.05$); 食管癌 EC109 细胞的增敏比从 1.51 降到 1.09 ($p<0.05$), 见图 3。

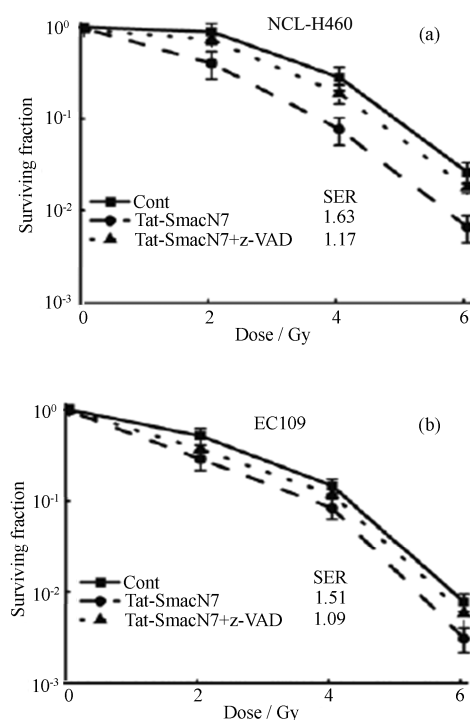


图3 Caspase 阻断实验中的存活曲线
(a) NCL-H460; (b) EC109

Fig.3 Surviving curves of NCL-H460 (a) and EC109 (b) in caspase blocked experiment

3 讨论

目前研究表明, 许多肿瘤的治疗效果和癌症患者生存率的提高很大程度上取决于肿瘤细胞的靶向治疗和新型抗癌药物的识别^[9], 其主要机制就是促进肿瘤细胞的凋亡, 包括化疗、放疗、免疫治疗和细胞因子治疗。然而具有治疗抗性的肿瘤细胞其凋亡程序可能会受到阻断, 但其机制尚不明确, 因此, 找到一种可以通过促进细胞凋亡而提高辐射敏感性的途径至关重要。在我们的前期研究中发现

Tat-SmacN7 可以有效的提高细胞的辐射敏感性。

本研究显示, 在两种细胞系中, NCL-H460 要比 EC109 细胞具有更强的辐射抗性, Tat-SmacN7 作为 XIAP 的抑制剂, 在两种细胞系中均有增敏效应, 这种效应在辐射抗性的肿瘤细胞中更加明显, 这表明 Tat-SmacN7 可以作为一种有效的辐射增敏剂, 尤其对辐射抗性的细胞更为合适, 这与最近的一些研究结果一致, 如: Smac 蛋白本身的过表达增强辐射诱导多种癌细胞系细胞凋亡, 包括神经母细胞瘤、胶质母细胞瘤和胰腺癌头颈部鳞癌细胞^[10]。这很好的证明了在人类细胞中, 细胞凋亡是通过胞内的线粒体途径或胞外死亡受体途径的信号级联来活化 Caspase-3、7 实现的^[11-12]。本研究还证明了, Tat-SmacN7 的放射增敏的机制主要是通过提高 Caspase 的转录水平而增强其诱导凋亡的活性。这一结论在本实验中通过加入 Caspase 抑制剂 Z-VAD 即可阻止 Tat-SmacN7 的增敏作用得以证实。因此, 在两种类型的细胞中, Caspase 活化在 Tat-SmacN7 诱导细胞凋亡中起着关键作用。

总之, 本研究发现 Tat-SmacN7 是一种有效的辐射增敏剂, 其增敏作用主要通过 Caspase 的活化进一步诱导细胞凋亡来实现。可以预期通过 Tat-SmacN7 提高肿瘤患者放射治疗的敏感性, 并且为 Tat-SmacN7 或其他的 Smac 模拟物作为一种新型的肿瘤治疗药物提供理论基础。

参考文献

- 1 Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000, **100**: 57-70
- 2 Wu G, Chai J, Suber T L, *et al.* Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO [J]. Nature, 2000, **408**: 1008-1012
- 3 Giagkousiklidis S, Vogler M, Westhoff M A, *et al.* Sensitization for gamma-irradiation-induced apoptosis by second mitochondria-derived activator of caspase [J]. Cancer Res, 2005, **65**: 10502-10513
- 4 Giagkousiklidis S, Vellanki S H, Debatin K M, *et al.* Sensitization of pancreatic carcinoma cells for gamma-irradiation-induced apoptosis by XIAP inhibition [J]. Oncogene, 2007, **26**: 7006-7016
- 5 Vellanki S H, Grabrucker A, Liebau S, *et al.* Small-molecule XIAP inhibitors enhance

- gamma-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma [J]. *Neoplasia*, 2009, **11**: 743-752
- 6 Lu J, Bai L, Sun H, *et al.* a novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP [J]. *Cancer Res*, 2008, **68**: 9384-9393
- 7 Sun H, Nikolovska-Coleska Z, Lu J, *et al.* Design, synthesis and characterization of a potent, nonpeptide, cell-permeable, bivalent Smac mimetic that concurrently targets both the BIR2 and BIR3 domains in XIAP [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**: 15279-15294
- 8 Yang J, McEachern D, Li W, *et al.* Radiosensitization of head and neck squamous cell carcinoma by a SMAC-mimetic compound, SM-164, requires activation of caspases [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, **10**: 658-669
- 9 Lowe S W, Lin A W. Apoptosis in cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2000, **21**: 485-495
- 10 Fulda S, Wick W, Weller M, *et al.* Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo [J]. *Nat Med*, 2002, **8**: 808-815
- 11 Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, **407**: 770-776
- 12 Tait S W, Green D R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, **11**: 621-632

Mechanisms of radiosensitization induced by Tat-SmacN7 in tumor cells

WANG Yan DU Liqing XU Chang CAO Jia WANG Qin CHEN Fenghua FU Yue
GUO Yanting LIU Qiang FAN Feiyue FAN Saijun
(Tianjin Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT To explore the mechanisms of Tat-SmacN7 in radiosensitization by the activation of caspases and induction of apoptosis pathway in EC109 and NCL-H460 cancer cells. The cells were divided into four groups: the control group, the Tat-SmacN7 group, the radiation group, the combined Tat-SmacN7 with radiation group. The transcriptional level of caspase-3, -8 and -9 were fitted by RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative real-time PCR. The activity of caspase-3, -8 and -9, was analyzed using a fluorogenic caspase assay with Ac-DEVD-AFC, Ac-IETD-AFC, Ac-LEHD-AFC as substrates, respectively. z-VAD-fmk treatment completely blocked apoptotic combination of Tat-SmacN7 and radiation in both EC109 and H460 cells. The activity and mRNA expression of caspase-3, -8 and -9 were found increased significantly in Tat-SmacN7 group. Tat-SmacN7 increases tumor radiosensitivity through mitochondria pathway of apoptosis, which is expected to be a new radiosensitization agent in the future.

KEYWORDS Tat-SmacN7, EC109, NCL-H460, Caspase, Radiosensitivity

CLC R811.5, TL71