

NU7026 对肝癌细胞放射增敏作用及机制研究

黄波 龙颖 唐艳 肖方竹 让蔚清 周平坤

(南华大学公共卫生学院 衡阳 421001)

摘要 为给研制新的抗癌和放射增敏药物提供理论依据,采用 Western blot 检测 DNA-PKcs 在肝癌细胞中的表达水平及 NU7026 对 DNA-PKcs 活性的影响,以彗星实验表达检测细胞 DNA 受损的情况,微核实验观察染色体损伤,克隆形成实验观察对细胞株放射敏感性的影响。结果表明, DNA-PKcs 在肝癌细胞中呈高表达, NU7026 能抑制辐射所诱发的 p-DNA-PKcs/S2056 的活化,微核实验及彗星实验检测表明, NU7026 能有效延长辐照后细胞的修复时间,并能明显降低放射后细胞的克隆形成率。提示 NU7026 对肝癌细胞有放射增敏作用,其作用机制与抑制 DNA-PKcs 活性有关。

关键词 NU7026, 放射增敏, DNA-PKcs, DNA 修复

中图分类号 R735.7, TL71

肝癌是危害居民生命健康的前 3 位最主要恶性肿瘤之一^[1]。约 70%–80% 的肝癌患者需要接受放射治疗。肝癌恶性程度高,易转移、复发,手术切除的病人中约 50% 会出现复发或远处转移^[2]。提高肿瘤对放射治疗的敏感性,提高其治疗效果,成为肿瘤放射治疗研究领域中的重点。本工作主要研究 NU7026 对人肝癌细胞 HepG2 增殖、DNA-PKcs 表达及细胞放射敏感性的影响,为该化合物开发成为一种有效的抗癌和放射增敏药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞 (HepG2) 和正常肝细胞 (LO2) 由本实验室保存,在含 10% 胎牛血清的 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco 公司) 培养液中 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。NU7026 (C17H15NO3, 吗啡类物质, Sigma 公司)、DNA-PKcs 抗体 (Santa Cruz 公司)、DNA-PKcs (pS2056) (Abcam 公司)、H2AX (Ser139) (CST 公司)。

1.2 微核实验

实验分为未照射组 (HepG2)、照射组 (HepG2 + 4 Gy γ 射线辐照) 和加药照射组 (HepG2 在 4 Gy

γ 射线辐照前加入终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NU7026)。

将辐照后 12 h 的 3 组细胞常规消化后,吹打分散成单个细胞, 0.075 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 液低速离心,以甲醇:冰醋酸=3:1 固定 30 min,离心,弃上清,加入少许固定液,混匀细胞,滴 2–3 滴于玻片上,自然晾干,吉姆萨染色 5–30 min,冲洗后晾干,镜检。

1.3 Western Blot 检测 DNA-PKcs 蛋白表达

将指数生长的 LO2 和 HepG2 用 PBS 洗涤两次,常规消化细胞,离心后收集细胞 (约 1×10^6) 于 1.5 mL EP 管中,加入 100 μL 蛋白裂解液室温裂解 8 min 后, 13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清于 1.5 mL EP 管中, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

Western blot 检测 DNA-PKcs 蛋白表达,用 β -actin 作为内参。具体步骤:按每样本每孔 100 μg 总蛋白量上样,5% SDS-PAGE 凝胶电泳,80 V 恒压转膜 3 h,室温 TBST 洗膜 5 min,以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, TBST 洗膜 5 min 重复 3 次。根据蛋白 Marker 将膜剪成两部分,一部分用于检测 β -actin,另一部分用于 DNA-PKcs,用 TBST 分别按 1:1 000 稀释 β -actin 抗体和 DNA-PKcs 抗体,均为室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 8 min;用 TBST 按 1:4 000 稀释二抗,室温孵育 50 min,

基金项目: 国家 863 项目 (2012AA063501)、国家自然科学基金 (81272994) 和湖南省教育厅科研基金 12C0364 资助

第一作者: 黄波,男,1974 年 9 月出生,2005 年于南华大学获硕士学位,副教授,研究方向为放射医学防护

通讯作者: 周平坤,博士,教授, E-mail: zhoupk@bmi.ac.cn

收稿日期: 初稿 2013-04-24, 修回 2013-05-27

室温 TBST 洗膜 3 次, 每次 8 min, ECL 显色检测各细胞中 β -actin 蛋白和 DNA-PKcs 蛋白含量的变化。

1.4 检测 DNA-PKcs 磷酸化位点 S2056 的表达

HepG2 细胞在照射前 2 h 加入 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NU7026, 4 Gy γ 射线照射后 0.5 h 收取细胞, Western blot 检测 DNA-PKcs 磷酸化位点 S2056 的表达, 同时检测 β -actin 是否均一, 步骤同上。

1.5 克隆形成率

取对数生长的 HepG2 细胞, 常规消化, 将细胞悬液作梯度倍数稀释, 按每皿含 600 和 2 000 个细胞的梯度密度分别接种于含 5 mL 预温 37°C 培养液的 60 mm 培养皿中; 使细胞分散均匀并分为 3 组: 未照射组、照射组 (4 Gy γ 射线辐照) 和加药照射组 (4 Gy γ 辐照前 2 h 加入 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NU7026); 辐照后, 将培养皿移入 CO_2 孵箱, 在 37°C 、5% CO_2 及饱和湿度环境下, 静止培养 2–3 周; 当培养皿中出现肉眼可见的克隆时终止培养, 以 PBS 浸洗 2 次, 加入甲醇: 乙酸 (3:1) 固定 15 min, 弃去固定液, 加入适量姬姆萨应用液染色 10–30 min, 洗去染色液, 室温晾干, 计数大于 50 个细胞的克隆数, 计算克隆形成率:

克隆形成率 (%) = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 中性单细胞凝胶电泳实验

实验分组同 1.2 节。3 组细胞接受 4 Gy γ 射线辐照后分别收集 0.5 h 和 4 h 时间点的细胞制成悬

液; 取 $100 \mu\text{L}$ 1% 正常熔点琼脂糖滴至磨砂玻片上, 4°C 冷却 10 min; 取 $10 \mu\text{L}$ $5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 细胞悬液与 $60 \mu\text{L}$ 低熔点的琼脂糖混匀滴在第一层琼脂糖上, 4°C 冷却 10 min; 在第二层上再滴上 $60 \mu\text{L}$ 低熔点的琼脂糖, 放于 4°C 冷却 10 min; 将玻片放入 4°C 细胞裂解液中裂解 2 h; 用 0.5% TBE ($\text{pH}=8.2\text{--}8.5$) 漂洗 3 次, 每次 1 h; 玻片置于中性缓冲液中, 4°C 电泳 30 min (25 V , 5 mA); PI 染色 15 min, OLYMPUS 荧光显微镜绿色激发光下观察并拍照; 用 CASP. EXE 软件分析彗星细胞, 分析尾长、尾部 DNA 百分含量、尾距。每组分析 200 个细胞, 重复 3 次。

1.7 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理分析, 结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组资料比较采用单因素方差分析, 两组资料比较采用两独立样本 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $p<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 微核实验结果

从表 1 中可以看出, HepG2 接受 4 Gy γ 射线辐照后, 诱发染色物质损伤导致微核细胞数增高至 481.75‰, 与未照射组相比有差异。由于 NU7026 的作用, 加药照射组的微核率高至 713.00‰与照射组相比具有统计学差异 ($p<0.05$), 表明 NU7026 具有较强的辐射增敏作用。

表 1 NU7026 对辐射诱发 HepG2 细胞微核细胞数的影响
Table 1 Effect of NU7026 on micronucleus cell induced by radiation in HepG2 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别 Group	计数细胞数 Counting cells	微核细胞数 Number of micronuclei	微核率 / % Micronuclei rate
未照射组 Non-irradiated group	1000	7.00 ± 1.63	7.00 ± 1.63
照射组 Irradiated group	1000	$481.75 \pm 39.92^*$	481.75 ± 39.92
加药照射组 Dosing irradiated group	1000	$713.00 \pm 43.95^{**}$	713.00 ± 43.95

注: * 与未照射组比较, $p<0.05$; ** 与照射组比较, $p<0.05$ 。

Note: * Compared with non-irradiated group, $p<0.05$; ** with irradiated group, $p<0.05$.

2.2 LO2 与 HepG2 DNA-PKcs 表达的测定结果

由图 1 可知, HepG2 中 DNA-PKcs 表达呈强阳性, 而 LO2 中 DNA-PKcs 蛋白表达水平呈弱阳性, 表明 DNA-PKcs 在肝癌细胞呈高表达, 是一个较好的靶标。

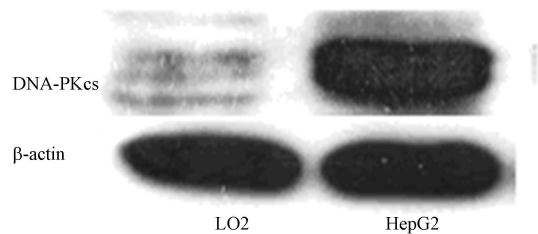


图 1 Western blot 检测正常肝细胞 LO2 和肝癌细胞 HepG2 中的 DNA-PKcs 及 β -actin 表达

Fig.1 Expression of DNA-PKcs and β -actin in LO2 cells and HepG2 cells detected by Western blot

2.3 NU7026 对 DNA-PKcs 的活性抑制作用

由图 2 可知, HepG2 细胞在照射后造成 DNA 双链断裂, 诱发 p-DNA-PKcs/S2056 表达量的增加, 而 2 h 前加入 DNA-PKcs 特异抑制剂 NU7026 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 两组细胞的 DNA-PKcs 无区别, 表明对 DNA-PKcs 的表达没有影响, β -actin 表达量一致

表明上样量均一。

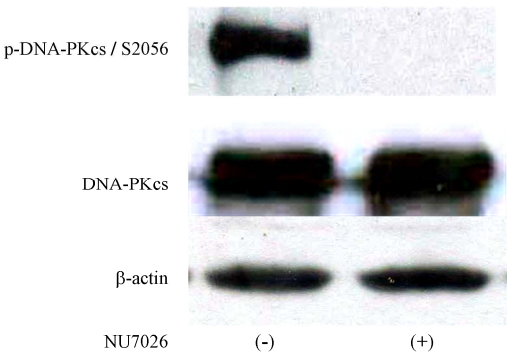


图 2 Western blot 检测 NU7026 对 DNA-PKcs、p-DNA-PKcs / S2056 表达量的影响

Fig.2 Inhibition effect of NU7026 on activity of DNA-PKcs and p-DNA-PKcs / S2056, detected by Western blot

2.4 克隆形成率

由表 2 看出各组细胞, 接种的细胞密度越大, 细胞的克隆数越多; 在同一接种的密度下, 未照射组的细胞克隆数最多, 加药照射组的细胞克隆数次之, 照射组的细胞克隆数最少。且未照射组与照射组有统计学差异 ($p<0.05$), 加药照射组与照射组也有统计学差异 ($p<0.05$)。这表明辐照诱发加入 NU7026 后降低了细胞的克隆形成率。

表 2 NU7026 对辐照诱发 HepG2 细胞细胞克隆数和克隆形成率的影响

Table 2 Effect of NU7026 on number of clones and cloning efficiency of HepG2 cells induced by radiation ($\bar{x} \pm s, n=4$)

	接种细胞数 (600) Number of cell seeding (600)		接种细胞数 (2000) Number of cell seeding (2000)	
	克隆数 Number of clone	克隆形成率 / % Cloning efficiency	克隆数 Number of clone	克隆形成率 / % Cloning efficiency
未照射组 Non-irradiated group	185.33±10.50	30.89±1.75	627.33±61.13	31.35±3.06
照射组 Irradiated group	18.66±2.08*	3.11±0.35*	56.33±6.66*	2.82±0.33*
加药照射组 Dosing irradiated group	8.33±0.58**	1.39±0.10**	30.67±1.53**	1.53±0.08**

注: * 与未照射组相比较, $p<0.05$; ** 与照射组相比较, $p<0.05$ 。
Note: * Compared with non-irradiated group, $p<0.05$; ** with irradiated group, $p<0.05$.

2.5 NU7026 对辐照诱发彗星细胞的影响

经 4 Gy 辐照后的 HepG2 细胞彗星测定结果如表 3 所示。可以看出, 经过辐照后各组拖尾细胞数量、尾长、尾距都较对照组明显增加, 与未辐照组

相比具有差异 ($p<0.05$)。表明辐照可造成细胞的 DNA 损伤。经过 4 h 的修复, 照射组彗星细胞各指标有明显的降低, 而加药照射组彗星细胞各指标虽有降低, 但与照射组相比仍有明显的差异 ($p<0.05$)。

表 3 NU7026 对辐射诱发 HepG2 细胞彗星细胞的影响
Table 3 Effect of NU7026 on comet cells induced by radiation

($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

	计数细胞数 Counting cells	拖尾细胞数 Number of tail cell	尾长 Tail length	尾距 Tail moment
未照射组(0.5 h) Non-irradiated group(0.5 h)	200	8.52±1.26	62.14±5.54	15.98±3.56
照射组(0.5 h) Irradiated group(0.5 h)	200	165.52±3.89*	265.42±13.66*	89.85±10.54*
加药照射组(0.5 h) Dosing irradiated group(0.5 h)	200	172.33±5.68	292.38±23.55	92.68±9.58
未照射组(4 h) Non-irradiated group(4 h)	200	9.56±2.56	65.65±8.68	14.89±5.54
照射组(4 h) Irradiated group(4 h)	200	65.25±12.25*	84.88±6.37*	23.67±7.78*
加药照射组(4 h) Dosing irradiated group(4 h)	200	136.56±7.72**	265.56±28.87**	88.65±11.22**

注: * 与未照射组相比较, $p<0.05$; ** 与辐照组相比较, $p<0.05$ 。

Not e: * Compared with non-irradiated group, $p<0.05$; ** with irradiated group, $p<0.05$.

3 讨论

目前, 肿瘤的发病率呈上升趋势, 70%左右的肿瘤都采用了放射疗法, 肝癌是威胁人类健康最严重的癌症之一, 占全部恶性肿瘤死亡人数的 18.8%, 仅次于胃癌^[3]。放射治疗是治疗肝癌的一种重要方法, 由于肝癌细胞的 DNA 修复能力较强, 即使接受高剂量照射后仍不能得到满意效果。而正常组织又限制了放疗剂量的增加影响了放疗的效果, 导致复发率很高。提高肿瘤辐射敏感性, 加强放疗效果, 成为放射医学研究领域中的重点^[4]。在尚无治疗肿瘤特效药物的情况下, 肿瘤综合治疗是当今肿瘤防治研究的热点, 研制高效的放射增敏剂将有助于提高肿瘤的治愈率, 并将产生较大的社会和经济效益。

放射增敏剂是指通过应用化学或生物手段来增加肿瘤细胞对放射治疗的敏感性, 但不明显增加正常组织的放射敏感性。理想的放射增敏剂应具备以下的条件: (1) 能在肿瘤组织中达到足够的浓度并选择性的作用于肿瘤组织; (2) 放射增敏剂本身及放疗的毒性很低或者对增加的毒性可以逆转。目前的放射增敏剂存在毒性高, 特异性差的缺点。寻找低毒、具有分子靶向性放射增敏剂将是亟待解决的问题^[5-6]。

DNA 损伤在恶性肿瘤放射治疗中起重要作用, 放疗后肿瘤细胞 DNA 双链断裂 (DNA DSB), DNA 依赖蛋白激酶催化亚单位 (DNA-PKcs) 可对其进行修复^[7]。肿瘤细胞对放疗后的 DNA 高修复性, 也

是肿瘤细胞单纯放疗效果差的原因。从文献[8]及本文结果可以看出, DNA-PKcs 在肝癌细胞中高表达, 而在正常细胞中低表达, 且参与 DNA 双链断裂的修复, 由于大多数抗肿瘤药物通过损伤肿瘤细胞 DNA 发挥作用, DNA-PKcs 高表达后修复能力的增强可使细胞对抗癌治疗产生抵抗作用, 故 DNA-PKcs 是放射增敏剂一个较好的基因靶点。

NU7026 是 DNA-PKcs 的特异性抑制剂, 肝癌细胞经辐照后, 导致 DNA-PKcs 活化, 表现为 p-DNA-PKcs/ S2056 高表达, 而 NU7026 能有效地降低 S2056 的表达, 抑制 DNA-PKcs 的活性, 抑制 DNA 损伤的修复, 表现为加药照射组的克隆形成率、彗星、微核等指标伤害程度高于单纯照射组、修复时间也较长。从而增加肝癌细胞对放射的敏感性, 以达到提高治疗的效果。

由此可见, DNA-PKcs 是肿瘤放疗一个较好的靶标, NU7026 通过抑制 DNA-PKcs 的活性达到放射增敏, 具有开发为一种有效的放射增敏药物的价值。

参考文献

- 1 陈建国, 张思维, 陈万青. 中国 2004-2005 年全国死因回顾抽样调查肝癌死亡率分析 [J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(5): 383-389
CHEN Jianguo, ZHANG Siwei, CHEN Wanqing. Analysis of liver cancer mortality in the national retrospective sampling survey of death causes in China

- 2004-2005 [J]. *Chin J Prev Med*, 2010, **44**(5): 383-389
- 2 罗政, 饶建, 殷蔚伯. 放疗在原发性肝癌治疗中的地位
和现状 [J]. *中华放射肿瘤学杂志*, 2006, **15**(4): 345-346
LUO Zheng, RAO Jian, YIN Weibo. The position and
status of radiotherapy in the treatment of primary liver
cancer [J]. *Chin J Radiat Oncol*, 2006, **15**(4): 345-346
- 3 CHEN Jianguo, ZHANG Siwei. Liver cancer epidemic in
China: past, present and future [J]. *Semin Cancer Biol*,
2011, **21**(1): 59-69
- 4 董志伟, 乔友林, 李连弟, 等. 中国癌症控制策略研究
报告 [J]. *中国肿瘤*, 2002, **11**(5): 250-260
DONG Zhiwei, QIAO Youlinli, LI Liandi, *et al.* Report of
chinese cancer control strategy [J]. *Bull Chin Cancer*,
2002, **11**(5): 250-260
- 5 唐丕斌. 肿瘤放射增敏剂的研究现状和应用进展 [J].
疑难病杂志, 2007, **6**(5): 310-312
TANG Pibin. Research progress of sensitizer and
application of tumor radiotherapy [J]. *Chin J Difficult*
Complic Cases, 2007, **6**(5): 310-312
- 6 高春玲, 高春丽, 宋维芳, 等. 放射增敏剂的增敏机制
[J]. *现代肿瘤学*, 2007, **15**(6): 890-892
GAO Chunling, GAO Chunli, SONG Weifang, *et al.* The
radiosensitization mechanism of radiosensitizing agent [J].
J Modern Oncol, 2007, **15**(6): 890-892
- 7 ZENG Fushang, BO Huang, QIN Zhixu, *et al.*
Inactivation of DNA-PKcs leads to spindle disruption and
mitotic catastrophe correlated with attenuated
phosphorylation of CHK2 in response to DNA damage [J].
Cancer Res, 2010, **70**(9): 3657-66
- 8 王万鹏, 宋德霸, 赵龙栓, 等. DNA-PKcs 蛋白和
MGMT 蛋白在肝癌组织中的表达及意义 [J]. *山东医药*,
2010, **50**(7): 70-71
WANG Wanpeng, SONG Deba, ZHAO Longshuan, *et al.*
Expression and significance of DNA- PKcs and MGMT-
in hepatocellular carcinoma tissues [J]. *Shandong Med J*,
2010, **50**(7): 70-71

Study on radiosensitization effects and mechanisms of NU7026 on hepatocellular carcinoma cells

HUANG Bo LONG Ying TANG Yan XIAO Fangzhu RANG Weiqing ZHOU Pingkun
(School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT We aim to study the effect of NU7026 on the proliferation and radiosensitivity of HepG2 cells, and to provide experimental data and advanced evidence for exploring anticancer and radiation sensitizing new drugs. Western blot was used to detect expression level of DNA-PKcs in HepG2 cells and the activity of p-DNA-PKcs/S2056 inhibited by NU7026. The DNA damage was judged by the expression level of γ -H2AX. The micronucleus experiment was taken to observe chromosome damage; clonogenic assay was performed to determine the radiosensitizing effect of NU7026. The results show that DNA-PKcs is highly expressed in HepG2 cells, NU7026 reduce the expression of p-DNA-PKcs/S2056 micro nuclear test and γ -H₂AX test shows NU7026 could effectively prolong the time of DNA repair after irradiation, and significantly reduce cloning efficiency of cells induced by radiation. It can be concluded that NU7026 can enhance the radiation sensitivity of HepG2 cells and its mechanism may be related to inhibition of DNA-PKcs activity.

KEYWORDS NU7026, Radiosensitization, DNA-PKcs, DNA repair

CLC R735.7, TL71