

AS1411 对宫颈癌 HeLa 细胞放射敏感性的影响

李东梅 洪承皎 张保国

(苏州大学医学部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 以宫颈癌细胞株 HeLa 为研究对象, 采用 CCK-8 法检测 AS1411 对 HeLa 细胞生长的增殖-毒性作用, 并利用克隆形成实验观察 AS1411 对 HeLa 细胞放射敏感性的影响。结果表明: AS1411 的细胞毒性很小, 不同浓度 (0 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、250 nmol/L、500 nmol/L) AS1411 在 24 h、48 h、72 h 时间点的 HeLa 细胞存活率均>95%; 克隆形成实验显示 AS1411 联合 X 射线能够降低照射后 HeLa 细胞的存活率, 且 HeLa 细胞在药物浓度为 100 nmol/L、250 nmol/L、500 nmol/L 时的放射增敏比 (SER) 分别为 1.06、1.58 和 1.89。本实验研究证实 AS1411 对 HeLa 细胞具有放射增敏作用。

关键词 AS1411, 放射敏感性, HeLa 细胞

中图分类号 R811.5

核仁素是正常细胞细胞核中丰度最高的磷酸化蛋白, 它具有多种生物学功能: 调控核糖体的生物合成与成熟, 参与细胞增殖、生长、胚胎发生、胞质分裂、染色质复制、核仁的发生以及抗细胞凋亡作用, 可将配体从细胞表面运送到细胞核, 但它在转移性和快速分裂细胞的细胞质中过度表达并转移到细胞膜^[1,2]。AS1411 是核仁素的特异性适配体, AS1411 与核仁素结合, 可以抑制核仁素的功能。作为第一个进入临床肿瘤试验的适配体, 它已经应用于急性白血病和肾癌的临床二期试验, Paula 等^[3]认为, AS1411 能够用于急性白血病和肾癌的治疗是因为核仁素在 AS1411 的抗肿瘤作用中发挥了重要作用, AS1411 与肿瘤细胞表面核仁素结合, 被肿瘤细胞特异性吸收, 进入肿瘤细胞的 AS1411 引起与核仁素结合的 bcl-2mRNA 的减少, 最终导致肿瘤细胞的死亡。Athulya 等^[4]和 Sridharan 等^[5]也研究了 AS1411 的抗肿瘤作用, AS1411 与核仁素的结合能够抑制核仁素的多种功能, AS1411 能够抑制核仁素与 bcl-2mRNA 的结合, 引起抗-凋亡 bcl-2 蛋白表达量的减少进而促进细胞凋亡, 能够阻止 DNA 的复制、阻滞细胞周期并诱导细胞凋亡。由于 AS1411 具有亲和力强、特异性高、免疫原性小等优点, 已经被越来越多的应用于靶向肿瘤治疗及诊断领域^[6]。本研究以宫颈癌细胞 HeLa 为研究对象, 采用 CCK-8 法和克隆形成实验来观察 AS1411 联合

X 射线照射对肿瘤细胞放射敏感性的影响。

1 实验材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

AS1411 及其对照适配体 (cApt) (生工生物工程 (上海) 有限公司产品), AS1411 序列为 5'-T-(C6-S-S-C6)-TTG GTG GTG GTG GTT GTG GTG GTG GTG G-3', cApt 序列为 5'-T-(C6-S-S-C6)-TTC CTC CTC CTC CTT CTC CTC CTC CTC C-3', 所有的鸟嘌呤由胞嘧啶取代, 分别用去离子水配成浓度为 100 μ mol/L 的储存液, 4℃冰箱保存, 使用时用 DMEM 培养基稀释备用。细胞增殖及细胞毒性检测 (Cell Counting Kit-8) 试剂盒购自上海同仁化学研究所。Giemsa 染剂及 DMSO 均购自美国 Sigma 公司。CO₂ 培养箱 (Thermo Forma3111 水套式), 酶联免疫检测仪 (BIO-TEK 公司 powerwave xs), 倒置显微镜 (Olympus CK41)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 宫颈癌细胞株 HeLa 为本实验室保存, 置于含有 10% 的小牛血清的 DMEM 培养基中, 在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 每 2 d 传代一次。

1.2.2 辐照条件 采用 RS2000PRO 型 X 射线照射仪产生的 160kVX 射线照射, 剂量率为 1.15 Gy/min。

江苏省高校优势学科建设项目 (PAPD) 资助

第一作者: 李东梅, 女, 1984 年 7 月出生, 2008 年毕业于新乡医学院高级护理专业, 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, E-mail: bgzhang@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2013-04-07, 修回 2013-04-28

1.2.3 体外增殖-毒性试验 CCK-8 实验:取对数生长期的 HeLa 细胞,用 0.25%胰酶消化后制成单细胞悬液,细胞浓度调整为 $0.6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,接种于 96 孔板,每孔 100 μL 。细胞贴壁 24 h 后加入 AS1411 10 μL ,使其终浓度分别为 0 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、250 nmol/L、500 nmol/L,对照组为不加 AS1411 的含细胞培养基,空白组为培养基,每组设 6 个平行样。分别继续培养 24 h、48 h、72 h 后,向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液。将培养板在培养箱内孵育 1 h—4 h,观察颜色的变化,当颜色开始变深时用酶标仪测定在 450 nm 参比波长为 630 nm 处的吸光度,重复实验 3 次。分别计算 24 h、48 h、72 h 时间点检测不同浓度 AS1411 对 HeLa 细胞存活率。对照适配体 (cApt) CCK-8 实验步骤同 AS1411。细胞存活率 (%) = (实验组 OD 值-空白组 OD 值) / (对照组 OD 值-空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞放射敏感性试验 克隆形成实验:取对数生长期细胞制成单细胞悬液,随着剂量增高相应增加接种的细胞数。在吸收剂量为 0 Gy、2 Gy、4 Gy、6 Gy、8 Gy 时分别以 500 个/孔、500 个/孔、2000 个/孔、6 000 个/孔、10 000 个/孔密度种入直径为 60 mm 培养皿中,每组每个剂量点设 3 个平行样,于 5%CO₂、37℃ 常规条件培养 24 h,使其贴壁。贴壁后,加入 AS1411 使其终浓度分别为 0 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、250 nmol/L 和 500 nmol/L,24 h 后接受相应剂量的 X 射线照射。12 h 后换为新鲜培养基,继续培养 14 d 后, PBS 洗、甲醇固定, Giemsa 染色,镜下计算超过 50 个细胞的克隆,实验重复 3 次,结果取平均值。按下列公式计算细胞

存活率 (Survival fraction, SF): 细胞存活率=某一剂量照射实验组的克隆数/ (该组细胞种植数 $\times$ PE); PE=未照射细胞克隆形成数/细胞种植数 $\times 100\%$; 在单击多靶模型中: 细胞存活率 S 与照射剂量 D 的关系为:

$$S=1-(1e^{-D/D_0})^N$$

采用单击多靶模型拟合细胞存活曲线得出 D_0 和 N ,再由 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 值分别计算出 SER_{D_0} , SER_{D_q} 。放射增敏比 SER_{SF2} 定义为: 照射剂量 2 Gy 时,对照组细胞存活率/药物处理加照射组细胞存活率。对照适配体 (cApt) 克隆形成实验步骤同 AS1411。

1.2.5 统计学分析 实验时设 3 个平行样,实验重复 3 次。应用 SAS8.0 统计软件进行分析。实验结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用方差分析。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS1411 对 HeLa 细胞存活率的影响

表 1 为 CCK-8 实验得到的不同浓度的 AS1411、不同处理时间对宫颈癌细胞株 HeLa 细胞存活率的实验结果,AS1411 对宫颈癌细胞株 HeLa 细胞与药物浓度和作用时间没有明显的相关性,表明 AS1411 的细胞毒性很小。

表 1 AS1411 对 HeLa 细胞存活率的影响
Table 1 The effects of AS1411 on HeLa cell survival rate

($\bar{x} \pm s$)

AS1411 / nmol·L ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
	OD	存活率/% Survival rate	OD	存活率/% Survival rate	OD	存活率/% Survival rate
I 0	0.539±0.028	100	0.525±0.016	100	0.539±0.039	100
II 50	0.557±0.015	104±2.7	0.448±0.021	95.8±4.6	0.529±0.025	98.5±4.7
III 100	0.549±0.014	102±2.5	0.533±0.015	105±2.8	0.537±0.015	100±2.8
IV 250	0.553±0.021	103±3.7	0.550±0.020	104±3.6	0.525±0.026	96.8±4.9
V 500	0.521±0.028	95.9±5.4	0.483±0.012	92.4±2.5	0.563±0.019	106±3.4

注:与第 I 组相比, $p > 0.05$ 。
Note: Compared with I, $p > 0.05$.

2.2 AS1411 对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响

吸收剂量—细胞存活曲线如图 1 所示, HeLa 细胞在接受相同剂量、不同浓度 AS1411 作用下, 各组细胞的存活率随药物浓度的升高而降低 ($p<0.05$); 在相同药物浓度作用下, 随吸收剂量的增加, 细胞存活率降低明显 ($p<0.05$)。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 2。以 D_0 、 D_q 值和临床常用吸收剂量 2 Gy 的存活分数 (SF2) 为标准计算放射增敏比, 结果显示经不同浓度 AS1411 处理后 SF2、 D_0 、 D_q 均低于对照组 ($p<0.05$), SER_{D_0} 、 SER_{D_q} 和 SER_{SF2} 随 AS1411 浓度的增加而增加 (见表 2), AS1411 的浓度在 500 nmol/L 时, 增敏比可以达到 1.56, 这表明 AS1411

可以较明显增加 HeLa 细胞的放射敏感性。

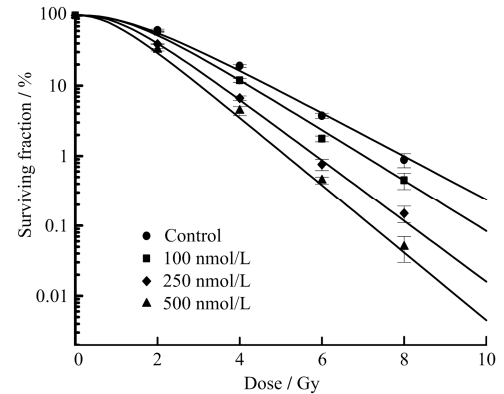


图 1 AS1411 对 HeLa 细胞放射敏感性的影响
Fig.1 Effects of AS1411 on HeLa cell radiosensitivity

表 2 AS1411 在放射敏感性增强率中的影响
Table 2 Effect of AS1411 on radiosensitivity enhancement ratio

Group	D_0 /Gy	D_q /Gy	SF2/%	SER_{D_0}	SER_{D_q}	SER_{SF2}
Control	1.40	1.54	61.72	-	-	-
100 nmol/L	1.20	1.50	58.08	1.17	1.03	1.06
250 nmol/L	1.05	1.15	38.97	1.33	1.34	1.58
500 nmol/L	0.90	1.13	32.58	1.56	1.36	1.89

2.3 cApt 对 HeLa 细胞存活率的影响

表 3 为 CCK-8 实验得到的不同浓度的 cApt、不同处理时间对宫颈癌细胞株 HeLa 细胞存活率的

实验结果, cApt 对宫颈癌细胞株 HeLa 细胞与药物浓度和作用时间没有明显的相关性, 同时也表明 cApt 的细胞毒性很小。

表 3 cApt 对 HeLa 细胞存活率的影响
Table 3 The effects of cApt on HeLa cell survival rate

($\bar{x} \pm s$)

AS1411/ nmol·L ⁻¹		24 h		48 h		72 h	
		OD	存活率/% Survival rate	OD	存活率/% Survival rate	OD	存活率/% Survival rate
I	0	0.546±0.024	100	0.611±0.036	100	0.6298±0.093	100
II	50	0.555±0.033	102.99±5.9	0.615±0.034	100.79±5.5	0.637±0.033	103.56±5.1
III	100	0.536±0.012	97.59±2.2	0.644±0.014	107.2±2.2	0.631±0.028	101.7±4.4
IV	250	0.536±0.023	98.2±4.3	0.616±0.039	101.58±6.3	0.619±0.026	99.14±4.2
V	500	0.519±0.023	93.58±4.4	0.605±0.023	99.3±3.8	0.598±0.022	98.99±3.6

注: 与第 I 组相比, $p>0.05$ 。
Note: Compared with I, $p>0.05$.

2.4 cApt 对 HeLa 细胞辐射敏感性的影响

克隆形成实验结果如图 2 所示, 从图 2 可

以看出, HeLa 细胞的存活率与 cApt 的浓度没有关系。

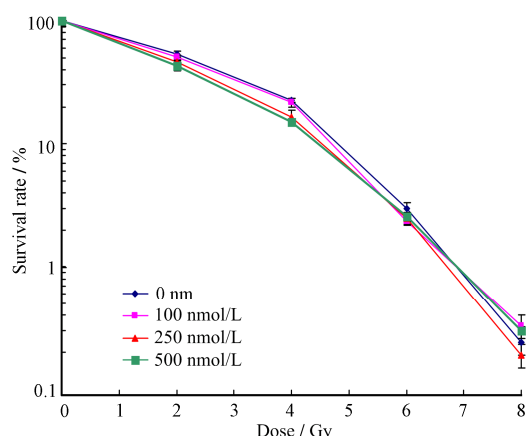


图2 cApt 对 HeLa 细胞放射敏感性的影响
Fig.2 Effects of cApt on HeLa cell radiosensitivity

3 讨论

宫颈癌是目前病因明确的妇科恶性肿瘤，是世界范围内女性常见恶性肿瘤之一，主要分布在发展中国家。宫颈癌主要依靠手术及放射治疗，并辅助化学治疗，但 I b 期以上多采用放射治疗方法。虽然放射治疗是治疗宫颈癌的主要方法之一，但这种方法 5 年内复发率较高。临床上使用的化疗药物有顺铂、环磷酰胺等，由于化疗药物在杀死肿瘤细胞的同时对正常细胞的毒性作用也较大，且与放射治疗的副反应有协同作用，病人一般难以忍受。因此，研究宫颈癌的放射敏感性有着重要的意义。随着靶向治疗学的进步，肿瘤靶向治疗作为肿瘤生物学的一个重要方向正在快速发展。AS1411 是核仁素的一种特异性适配体，核酸适配体 AS1411 近来已经成为首选化合物应用于肿瘤靶向诊断和治疗，它具有多种优越性能：亲和力强、特异性高、制备廉价高效快速、高稳定性、尺寸小、易于修饰、免疫原性小、渗透性好、与目标靶分子的结合特异且条件可控、靶分子范围广、应用领域多等^[7,8]。Paula 等^[3]研究并证实：对于 80 多种人类细胞株（其中包括 HeLa 细胞），AS1411 都显示出抗肿瘤细胞增殖的特性。本实验希望证实用 AS1411 抑制核仁素的功能，可以提高肿瘤细胞的放射敏感性。

本研究结果证明 AS1411 的细胞毒性很小，HeLa 细胞的增殖与 AS1411 的浓度及作用时间无关，与之前报道的 AS1411 无特异性细胞毒性相符^[9]。本研究通过细胞克隆形成实验直接观察 AS1411 对 HeLa 细胞存活率的影响，AS1411 100 nmol/L 组、250 nmol/L 组、500 nmol/L 组与 AS1411 0 nmol/L 组相比，细胞克隆存活率降低，实验数据曲线的斜率增大，并且各剂量点的存活率均低于 AS1411 0 nmol/L 组 ($p < 0.05$)，具有较明显的剂量-效应关

系，且 AS1411 的对照序列 cApt 的克隆形成实验得到细胞存活率与 cApt 的浓度没有关系，实验结果证明 AS1411 对宫颈癌细胞具有较明显的放射增敏作用。

“多靶单击模型”拟合细胞存活曲线，其参数 D_0 为平均致死剂量，是一次照射能杀灭 63% 的细胞或 37% 细胞存活的剂量； D_q 值是肩区参数，它表明细胞亚致死损伤修复能力的大小。 D_q 值小，表明细胞对亚致死损伤的修复能力较弱。本实验存活曲线参数证实了 AS1411 对宫颈癌 HeLa 细胞的放射增敏作用。提示 AS1411 可能通过抑制 HeLa 细胞的修复而起到放射增敏作用。并且用 500 nmol/L 浓度的 AS1411 处理 HeLa 细胞，放射增敏比可以达到 1.56。因此，我们的实验结果证明 AS1411 对宫颈癌细胞 HeLa 有较明显的放射增敏作用。

核仁素是真核细胞核仁中最主要的一种蛋白质，与正常细胞相比在一些肿瘤细胞的细胞膜上过量表达，核仁素的过量表达与细胞增殖有关，它可以作为各种不同生长因子的受体。核仁素的配体有 F3 多肽、核酸适配体 AS1411 等。AS1411 的与核仁素亲和力高且结合牢固。AS1411 与核仁素的结合能够阻止核仁素的多种功能，AS1411 能够抑制 NF- κ B 信号通路从而阻止 DNA 的复制、阻滞细胞周期并诱导细胞凋亡，AS1411 能够抑制核仁素与 bcl-2 mRNA 的结合，引起抗-凋亡 bcl-2 蛋白表达量的减少进而促进细胞凋亡^[10,11]。从 AS1411 和其对照序列 cApt 的实验结果可以看出，AS1411 的放射敏感性可能与其抑制核仁素的功能有关，但其确切的增敏机理还需要进一步的研究。本实验研究首次证明，AS1411 可以提高 HeLa 细胞的放射敏感性，增强肿瘤放射治疗的效果，这为进一步研究利用 AS1411 进行放射治疗宫颈癌提供了实验依据，并且有望成为肿瘤细胞放射增敏剂的候选者。

参考文献

- 1 Dam D H M, Lee J H, Sisco P N, *et al.* Direct observation of nanoparticle cancer cell nucleus interactions [J]. *ACS nano*, 2012, 6(4): 3318-3326
- 2 贺欣, 宋娜玲, 孟爱民. 穿梭蛋白核仁素的多种生物学功能[J]. *医学综述*, 2012, 18(13): 1961-1964
HE Xin, SONG Naling, MENG Aimin. Biological functions of shuttling protein-nucleolin [J]. *Med Recapitulate*, 2012, 18(13): 1961-1964
- 3 Bates P J, Laber D A, Miller D M, *et al.* Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer [J]. *Exp Mol Pathol*, 2009,

- 86(3): 151-164
- 4 Aravind A, Veerananarayanan S, Poullose A C, *et al.* Aptamer-functionalized silica nanoparticles for targeted cancer therapy [J]. *Bio Nano Sci*, 2012, **2**(1): 1-8
- 5 Soundararajan S, Wang L, Sridharan V, *et al.* Plasma membrane nucleolin is a receptor for the anticancer aptamer AS1411 in MV4-11 Leukemia Cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2009, **76**(5): 984-991
- 6 Barbas A S, Mi J, Clary B M, *et al.* Aptamer applications for targeted cancer therapy [J]. *Future Oncol*, 2010, **6**(7): 1117-1126
- 7 Kanwar J R, Roy K, Kanwar R K. Chimeric aptamers in cancer cell-targeted drug delivery [J]. *Crit Rev Biochem* Mol Biol, 2011, **46**(6): 459- 477
- 8 Khati M. The future of aptamers in medicine [J]. *J Clin Pathol*, 2010, **63**(6): 480-487
- 9 Tan L, Neoh K G, Kang E T, *et al.* PEGylated anti-MUC1 aptamer-doxorubicin complex for targeted drug delivery to MCF7 breast cancer cells [J]. *Macromol Biosci*, 2011, **11**(10): 1331-1335
- 10 Ozaalp V C, Eyidogan F, Oktem H A. Aptamer-gated nanoparticles for smart drug delivery [J]. *Pharm*, 2011, **4**(8): 1137-1157
- 11 Aravind A, Varghese S H, Veerananarayanan S, *et al.* Aptamer-labeled PLGA nanoparticles for targeting cancer Cells [J]. *Cancer Nano*, 2012, **3**(1): 1-12

Effect of AS1411 on radiosensitivity of uterine cervix cancer HeLa cells

LI Dongmei HONG Chengjiao ZHANG Baoguo

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

ABSTRACT To investigate the effects of AS1411 on cell proliferation-toxic and radiosensitivity on cervical cancer HeLa cells, CCK-8 assay was used to determine cell proliferation-toxic effects on HeLa cells, and the effect of AS1411 on the radiosensitivity of the cells was observed by clonogenic assay. The results showed that the cell toxicity of AS1411 was very small, and all the survival rates of HeLa cells were more than 95% under the condition of different concentration of AS1411 (0 nmol/L, 50 nmol/L, 100 nmol/L, 250 nmol/L and 500 nmol/L) and the cells for 24 h, 48 h and 72 h, respectively. Clonogenic assay result shows that AS1411 combined with X ray irradiation can decrease the clonogenic survival rate of HeLa cells, and the sensitive enhancement ratio (SER) of HeLa cells are 1.06, 1.58 and 1.89, respectively with different drug concentrations of 100 nmol/L, 250 nmol/L and 500 nmol/L. This study proves AS1411 might enhance the radiosensitivity of the HeLa cells.

KEYWORDS AS1411, Radiosensitivity, HeLa cell

CLC R811.5