

17-AAG 对 HeLa 细胞和 V79 细胞放射敏感性的影响

潘艳玲 洪承皎 张保国

(苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 为研究 17-AAG 对肿瘤细胞和正常细胞放射敏感性的影响,以人宫颈癌 HeLa 细胞和中国仓鼠肺成纤维细胞 V79 为研究对象,用克隆形成实验观察细胞的存活率。结果表明,17-AAG 能明显降低受 X 射线照射的 HeLa 细胞的存活率,而对 V79 细胞的存活率则无明显影响,表明 17-AAG 对 HeLa 细胞具有放射增敏作用,对 V79 细胞无放射敏感影响。

关键词 17-AAG, 放射敏感性, HeLa 细胞, V79 细胞

中图分类号 R811, R 811.5

热休克蛋白 90(Hsp90)是细胞内重要的分子伴侣蛋白。肿瘤细胞中与肿瘤细胞增殖、凋亡、信号传导相关的多种激酶蛋白(如 Bcr-Abl、Src、Akt)、生长因子受体(如 EGFR、ErbB2)及转录因子(突变型 P53、低氧诱导因子 HIF 等)等影响细胞放射敏感性的蛋白都是 Hsp90 的效应蛋白,这些蛋白的活性都依赖于 Hsp90 的分子伴侣功能^[1]。因此,可以通过抑制 Hsp90 的活性使效应蛋白降解,从而提高肿瘤细胞放射敏感性。格尔德霉素 (Geldanamycin, GA) 是 Hsp90 抑制剂,它能够阻止 Hsp90 发挥分子伴侣的功能^[2]。17-AAG 是 GA 的衍生物,毒性远小于 GA,且具有同样的活性^[3]。本实验以人宫颈癌 HeLa 细胞和中国仓鼠肺成纤维细胞 V79 为研究对象,用克隆形成实验法观察 17-AAG 对人宫颈癌 HeLa 细胞株和中国仓鼠肺成纤维细胞 V79 存活率的影响。

1 实验材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

17-AAG(Sigma 公司产品),将 58.5mg 17-AAG 溶解于 100 mL DMSO 中,抽滤除菌,-20℃保存备用。使用时用培养基稀释,细胞培养液中 DMSO 的浓度小于 0.01%。RPMI1640、DMEM 细胞培养基(Gibco)和胰酶购自华美生物工程公司;小牛血清购自上海微科公司;姬姆萨染剂及二甲亚砷均购自美国 Sigma 公司;60 mm 培养皿购自上海吉泰生物科技有限公司。主要的仪器有 5%CO₂ 培养箱(Thermo 公司 Forma 3111)、超净工作台(苏州净化设备厂)、

倒置相差显微镜(Olympus 公司 CK41)、电子分析天平(上海精科 FC204)、电热恒温鼓风干燥器(上海精宏 DHG-9246)和低温冰箱(Thermo Forma706)。

1.2 细胞及细胞培养

人宫颈癌 HeLa 细胞株为本实验室保存,置于含有 10%的小牛血清的 DMEM 培养基中,在 37℃、5%湿度 CO₂ 培养箱中培养,每 2 d 传代一次。V79 细胞购自上海细胞所细胞库,置于含有 10%的小牛血清的 RPMI16040 培养基中,在 37℃、5%湿度 CO₂ 培养箱中培养,每 2 d 传代一次。

取对数生长期的细胞,弃培养液,PBS 洗两次,加胰酶消化约 1 min,显微镜下观察到细胞变圆后,加少量培养液,吹打混匀成细胞悬液。

取少量细胞悬液,滴于血细胞计数板上,在显微镜下用 10×物镜观察计数细胞数。计数 8 个大格中的细胞数,根据以下公式计算细胞悬液浓度:

$$\text{细胞浓度 (个/mL)} = (\text{8大格细胞数之和}/8) \times 10^4$$

将细胞悬液稀释至所需浓度,按不同的照射剂量(0、2、4、6 和 8 Gy),取不同体积的细胞悬液接种于直径为 60 mm 的培养皿中,使接种的细胞密度分别为 500、500、2000、6000 和 10000 个/孔,每组每个剂量点设三个平行样,在 5%CO₂、37℃培养箱中过夜培养 24 h,使其贴壁。

细胞贴壁后,弃培养液,分别加入含不同浓度 17-AAG 的培养液,使其终浓度分别为 25、50 和 75nmol/L,照射对照组加入不含 17-AAG 的 DMSO。

国家自然科学基金(10275083)资助

第一作者:潘艳玲,女,1984年8月出生,现为苏州大学医学部放射医学与公共卫生学院 03 级放射医学专业七年制学生

通讯作者:张保国, E-mail: bgzhang@suda.edu.cn

收稿日期:初稿 2009-12-10, 修回 2010-02-01

继续置于5%CO₂、37℃培养箱中培养16 h。

1.3 细胞照射

用西门子PRIMUS型电子直线加速器产生的6MV X射线,对上述各组细胞进行照射,照射吸收剂量分别为0、2、4、6和8 Gy。X射线剂量率为200cGy/min,培养皿距源100 cm。照射后细胞继续培养8 h。

1.4 样品制备

将上述各组细胞弃培养液,分别加入适量不含17-AAG的新鲜培养液,继续置于5%CO₂、37℃培养箱中培养10 d。弃去培养液,PBS洗两次,加适量甲醇液固定0.5 h。弃去甲醇液,加适量Giemsa染液染色0.5 h,流水缓慢冲去染色液,室温下空气中晾干。显微镜下进行细胞克隆计数,多于50个细胞的集落作为一个克隆。

1.5 结果分析

1.5.1 细胞存活率 细胞存活分数(Survival fraction, SF)按下式计算:

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×PE)

PE=未照射细胞克隆形成数/细胞种植数
×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:

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

采用单击多靶模型拟合细胞存活曲线得出 D_0 和 N ,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:吸收剂量 2 Gy 时,对照组细胞存活率/药物处理加照射组细胞存活率。

1.5.2 统计学分析 实验中设 3 个平行样,实验重复 3 次,实验结果用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。应用 SPSS 统计软件进行分析,实验组和对照组之间的比较采用独立样本的 t 检验。

2 结果

图 1 和图 2 分别为用克隆形成实验得到的 HeLa 细胞与 V79 细胞的吸收剂量-存活率曲线。HeLa 细胞在相同吸收剂量、不同浓度 17-AAG 作用下,

各组细胞的存活率随药物浓度的升高明显降低 ($p < 0.01$); 在相同药物浓度作用下,随照射剂量的增加,细胞存活率明显降低 ($p < 0.01$)。对于 V79 细胞,不同药物浓度组间细胞存活率的差异无统计学意义 ($p > 0.05$),但各组细胞的存活率也随照射剂量的增加而明显降低 ($p < 0.01$)。

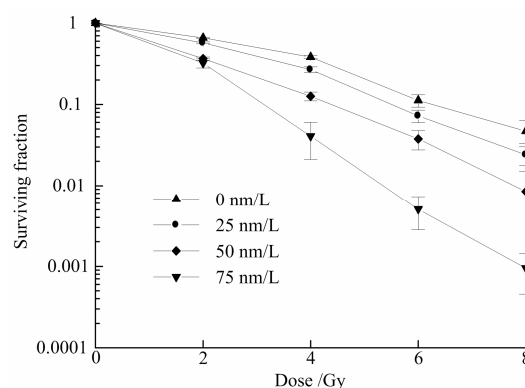


Fig.1 The effects of 17-AAG on HeLa cell radio-sensitivity

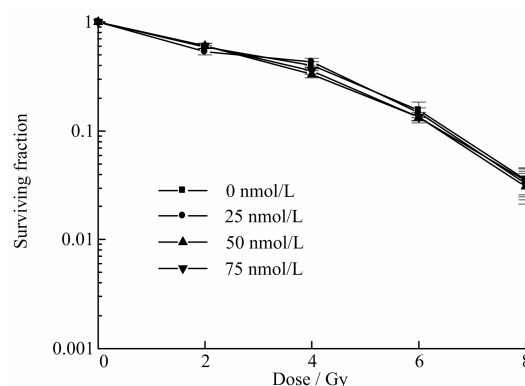


Fig.2 The effects of 17-AAG on V79 cell radio-sensitivity

用多靶单击模型拟合 HeLa 细胞的剂量-存活率曲线,得出的 D_0 、 D_q 值见表 1。从表 1 中的拟合结果可以看出,随着 17-AAG 浓度的增加,HeLa 细胞的 D_0 和 D_q 值逐渐降低,表明细胞的放射敏感性相应增强,并表现出一定的剂量依赖性。HeLa 细胞在药物浓度为 25、50 及 75 nm/L 时的 SER 分别为 1.17、1.84 和 2.10;由此可以看出 17-AAG 对 HeLa 细胞有明显的放射增敏作用。

用多靶单击模型拟合 V79 细胞的剂量-存活率曲线,得出的 D_0 、 D_q 值见表 2。从拟合结果可以看出,随着 17-AAG 浓度的增加,HeLa 细胞的 D_0 和 D_q 值基本不变,这表明 17-AAG 对 V79 细胞的放射敏感性没有影响。

Table 1 Effect of 17-AAG on HeLa cells radio-sensitivity enhancement ratio

Group	D_0 / Gy	D_q / Gy	SF2 / %	SER D_0	SER D_q	SERS F2
Control	2.31	1.68	67.7	—	—	—
25 nmol/L	2.03	1.26	58.0	1.14	1.33	1.17
50 nmol/L	1.79	1.16	36.7	1.29	1.49	1.84
75 nmol/L	0.97	1.08	32.2	2.38	1.56	2.10

Table 2 Effect of 17-AAG on V79 cells radio-sensitivity enhancement ratio

Group	D_0 / Gy	D_q / Gy	SF2 / %	SER D_0	SER D_q	SER SF_2
Control	1.80	2.33	60.4	—	—	—
25 nmol/L	1.78	2.23	56.4	1.01	1.04	1.07
50 nmol/L	1.75	2.25	59.3	1.03	1.03	1.02
75 nmol/L	1.76	2.20	60.1	1.02	1.06	1.01

3 讨论

肿瘤是严重威胁人类健康的疾病, 放射治疗是肿瘤治疗最重要的手段之一。肿瘤细胞的辐射敏感性影响肿瘤治疗的效果, 肿瘤细胞的辐射敏感性与肿瘤细胞对辐射损伤的响应密切相关。研究表明, 肿瘤细胞辐射损伤响应相关的多种激酶蛋白(如 Bcr-Abl、Src、Akt)、生长因子受体(如 EGFR、ErbB2)及转录因子(如突变型 P53, Raf-1、低氧诱导因子 HIF)等有关, 抑制这些分子的活性, 可以提高肿瘤细胞的辐射敏感性^[4-6]。在细胞辐射损伤响应通路中起重要作用的这些蛋白属于 Hsp90 的效应蛋白, 这些蛋白的功能都依赖于 Hsp90 的分子伴侣功能, 通过抑制 Hsp90 功能就可以同时清除多种蛋白或灭活其激酶活性, 从多个靶点阻止肿瘤细胞对辐射的相应, 提高肿瘤细胞的辐射敏感性。由于肿瘤的复杂性和多样性, 作用于单一靶点的辐射增敏剂的应用受到限制, Hsp90 抑制剂作为辐射增敏药物无疑具有明显的优势。并且理想的辐射增敏剂应增强肿瘤细胞的辐射敏感性, 而对正常细胞的辐射敏感性无影响。

格尔德霉素 (Geldanamycin, GA) 是 Hsp90 的一种天然抑制剂, 它能够阻止 Hsp90 发挥分子伴侣的功能, 但它具有明显的肝毒性, 限制其临床应用。17-丙炔胺基-17-去甲氧基格尔德霉素 (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-AAG) 是 GA 的衍生物, 它比 GA 的毒性低得多且具有同样的活性^[7], 17-AAG 可以与 ATP 竞争性结合该位点, 从而阻断 Hsp90 与 ATP 的结合, 抑制其分子伴侣功能。因此, 我们选择 17-AAG 作为 Hsp90 特异性, 选择肿瘤细胞 HeLa 细胞和正常的细胞 V79 细胞作为研究对象, 观察不同浓度的 17-AAG 联合 X 射线照射对人宫颈癌 HeLa 细胞和中国仓鼠成纤维

V79 细胞的存活率的影响。研究抑制 Hsp90 的功能对肿瘤细胞和正常细胞辐射敏感性的影响。

“多靶单击模型”拟合经典的细胞存活曲线, 其参数 D_0 值为平均致死剂量, 是一次照射能杀灭 63% 的细胞或 37% 细胞存活的剂量; D_q 值是肩宽参数, 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 17-AAG 对离体宫颈癌细胞的放射增敏作用。提示 17-AAG 可能通过抑制 HeLa 细胞的修复而起到放射增敏作用。并且用 75nmol/L 浓度的 17-AAG 处理 HeLa 细胞, 放射增敏比可以达到 2.10。因此, 我们的实验结果证实槲皮素对人宫颈癌细胞 HeLa 有明显的放射增敏作用。已有一些研究报告表明^[8-13]: 17-AAG 作为一种 Hsp90 抑制剂可以增强神经胶质瘤、前列腺癌、脊神经根肿瘤及肺鳞状细胞癌等的辐射敏感性。我们的研究结果与他人结果是一致的。

同时 17-AAG 对中国仓鼠成纤维细胞 V79 的细胞联合 X 线照射结果显示, 不同浓度 17-AAG 处理细胞后, 其 D_0 、 D_q 值基本不变, 表明 17-AAG 并不能增加其辐射敏感性。这一结果存在潜在的临床应用价值, 在相同的治疗剂量, 17-AAG 可以增加肿瘤细胞的辐射敏感性而对正常细胞没有太大的影响。这与已报道的 17-AAG 对人成纤维细胞株的辐射敏感性无影响^[9-13]的研究结果是一致的。

17-AAG 对正常细胞与肿瘤细胞辐射敏感性影响的差异很可能与 17-AAG 与 Hsp90 的亲合力有关, 肿瘤细胞中 Hsp90 与 17-AAG 的亲合力要比正常细胞中的 Hsp90 与 17-AAG 的亲合力大得多^[14]。根据本实验的研究结果和已报道的研究结果, 可以初步认为: 17-AAG 可以增强肿瘤细胞的辐射敏感性, 而对正常细胞的辐射敏感性没有影响。但要证明 17-AAG 是一种较为理想得辐射增敏剂, 还需要

用更多种类的肿瘤细胞和正常细胞进行实验,才能得到科学的结论,为其在临床的应用提供实验证据。

参考文献

- 1 Isaacs J S, Xu W, Neckers L. *Cancer Cell*, 2003, **3**(3): 213-217
- 2 Ochel H J, Schulte T W, Nguyen P, *et al.* *Mol Genet Metab*, 1999, **66**(1): 24-30
- 3 Goetz M P, Toft D O, Ames M M, *et al.* *Ann Oncol*, 2003, **14**(8): 1169-1176
- 4 Camphausen K, Tofilon P J. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**: 4326-4330
- 5 Bull E E, Dote H, Brady K J, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2004, **10**: 8077-8084
- 6 Dote H, Burgan W E, Camphausen K. *Cancer Res*, 2006, **66**: 9211-9220
- 7 Schulte T W, Neckers L M. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998, **42**: 273-279
- 8 Wright L, Barril X, Dymock B, *et al.* *Chem Biol*, 2004, **11**: 775-785
- 9 Bisht K S, Bradbury C M, Mattson D, *et al.* *Cancer Res*, 2003, **63**: 8984-8995
- 10 Enmon R, Yang W H, Ballangrud A M, *et al.* *Cancer Res*, 2003, **63**: 8393-8399
- 11 Harashima K, Akimoto T, Tsuzuki K, *et al.* *Int J Radiat Biol*, 2005, **81**: 63-76
- 12 Russell J S, Burgan W, Oswald K A, *et al.* *Clin Cancer Res*, 2003, **9**: 3749-3755
- 13 Noguchi M, Yu D, Hirayama R, *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **351**: 658-663
- 14 Kamal A, Thao L, Sensintaffar, *et al.* *Nature*, 2003, **425**: 407-410

Effect of 17-AAG on radio-sensitivity of HeLa and V79 cells

PAN Yanling HONG Chengjiao ZHANG Baoguo

(School of Radiation Medicine and Public Health, Medical College of Soochow University, Jiangsu Provincial key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT In order to investigate the radio-sensitizing effect of 17-AAG, an inhibitor of Heat Shock Protein 90, on human Uterine Cervix Cancer HeLa and V79 cells, Clonogenic assay was used to observe the cell survival rate. The results show that 17-AAG can decrease obviously ($p < 0.01$) the clonogenic survival rate of HeLa cells irradiated by X-rays but not the V79 cells ($p > 0.05$). This indicates that 17-AAG may enhance the radio-sensitivity of the HeLa cell line and has no effect on the V79 cell line.

KEYWORDS 17-AAG, Cell Radio-sensitivity, HeLa Cell, V79 Cell

CLC R811, R 811.5