

肉桂酰胺格尔德霉素增强肿瘤细胞对力达霉素敏感度的研究

李 良 韩菲菲 甄永苏

摘 要 **目的** 研究肉桂酰胺格尔德霉素(CNDG)与力达霉素(LDM)联合对应用肿瘤细胞敏感度的影响,并探讨相关 DNA 损伤修复作用机制。**方法** 用 MTT 法检测 CNDG 联合 LDM 对肿瘤细胞存活率的影响;流式细胞术检测 CNDG 联合 LDM 对肿瘤细胞周期的影响;应用免疫荧光法和 Western blot 方法检测 CNDG 与 LDM 联合对肿瘤细胞 DNA 损伤修复相关信号转导分子和 DNA 双链断裂水平的影响。**结果** CNDG 与 LDM 联合给药可增强 LDM 对肿瘤细胞增殖抑制作用,且显示二者显示协同作用;LDM 和 CNDG 单药均可引起细胞的 G_2/M 期阻滞,二者联合用药后肿瘤细胞 G_2/M 期明显降低;Western blot 法检测与凋亡相关的 PARP 的切割水平,LDM 与 CNDG 两药联合显著提高肿瘤细胞 PARP 切割水平,CNDG 能够降低 LDM 引起的 ATRIP 高表达水平和 γ H2AX 阳性的细胞数量。**结论** CNDG 能够抑制 HSP90 活性,并降低 LDM 引起的肿瘤细胞 DNA 损伤后修复相关信号转导因子的蛋白水平,增强肿瘤细胞对 LDM 的敏感度。

关键词 HSP90 抑制剂 肉桂酰胺格尔德霉素 力达霉素 DNA 损伤修复

[中图分类号] R966

[文献标识码] A

17 - (6 - Cinnamamido - hexylamino -) - 17 - demethoxygeldanamycin Enhances the Chemosensitivity of Lidamycin in Cancer Cells. Li Liang, Han Feifei, Zhen Yongsu. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract Objective To investigate synergism from the combination of 17 - (6 - cinnamamido - hexylamino -) - 17 - demethoxygeldanamycin (CNDG) and lidamycin (LDM) in three human cancer cell lines including MCF - 7, A549 and Bel - 7402. The DNA repair mechanisms between CNDG and LDM was investigated. **Methods** MTT assay was used to examine the synergetic inhibitory effect of the combination of CNDG and LDM and combination index (CI) was calculated. Cell - cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Expression of DNA repair - related proteins was investigated by Western blot and immunofluorescent staining. **Results** CNDG showed synergistic effects on cell lethality with LDM. CNDG decreased G_2/M arrest induced by LDM. LDM up - regulated expression of DNA repair - related proteins such as ATRIP, but CNDG inhibited the up - regulation of these proteins and enhanced the DNA double stranded breaks induced by LDM. **Conclusion** The HSP90 inhibitor, CNDG, could decrease the expression level of DNA repair - related proteins induced by LDM and enhance the chemosensitivity of human cancer cells to LDM.

Key words HSP90 inhibitor;CNDG;Lidamycin;DNA damage repair

力达霉素(lidamycin, LDM)是利用精原细胞法从我国湖北省潜江县土壤中分离的链霉菌 *Streptomyces globisporus* C - 1027 中筛选得到的一种烯二炔类抗生素,全分子结构由 1 个 110 个氨基酸的酸性辅基蛋白(MW 10.5kDa)和 1 个含有九元环烯二炔结构的发色团(MW 843Da)通过非共价键结合而成^[1,2]。LDM 具有很强的细胞毒性,其主要机制是引起 DNA 分子断裂、损伤,LDM 与细胞 DNA 分子结合后,经伯

格曼环化反应生成双自由基中间体,所产生的自由基夺取核苷酸核糖骨架的氢原子进而引起细胞 DNA 断裂^[3,4]。LDM 对多种肿瘤细胞都具有明显的体内、体外抗肿瘤活性,其细胞水平的 IC_{50} 值均为纳摩尔水平,因此是研制新型高效抗肿瘤药物的理想候选药物。

肉桂酰胺格尔德霉素[17 - (6 - cinnamamido - hexylamino -) - 17 - demethoxygeldanamycin, CNDG]是本实验室在前期工作中合成的具有肉桂酰胺结构的格尔德霉素衍生物,其作用靶点是热休克蛋白 90 (heat shock protein, HSP90)。HSP90 是一种有管家基因表达的分子伴侣蛋白,主要功能维持细胞内蛋

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项基金资助项目(2010zx09401 - 407)

作者单位:100050 北京,中国医学科学院医药生物技术研究所

通讯作者:甄永苏,电子信箱:zhenys@public.bta.net.cn

白质正确构象的形成^[5]。HSP90 在许多肿瘤中都存在过表达的现象,而且许多与肿瘤细胞分化、增生、侵袭密切相关的靶点分子均受 HSP90 调控,如 BCR-ABL、EGFR、Her-2 等^[6-9]。目前,正处于临床研究阶段的 HSP90 抑制剂主要包括 17-AAG、17-DMAG、IPI-504 和 SNX2112 等^[10, 11]。近来有研究报道,HSP90 抑制剂有增强化疗药物尤其是 DNA 损伤药物抗肿瘤活性的作用,这一作用可能与 DNA 损伤修复相关信号转导分子受 HSP90 调控有关^[12]。本研究拟利用 HSP90 抑制剂 CNDG 与 LDM 联合应用,抑制 LDM 引起 DNA 断裂后所激活的 DNA 损伤修复信号转导途径,从而增强其抗肿瘤活性。

材料与方法

1. 试剂与细胞株:力达霉素与肉桂酰胺格尔德霉素由本实验室制备。人乳腺癌细胞 MCF-7、人肝癌细胞 Bel-7402、人肺癌细胞 A549 有实验室保存。MTT 购自美国 Sigma 公司,ECL 发光试剂盒购自美国 Millipore 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司,细胞培养基购自美国 Invitrogen 公司、所有抗体均为 Cellsignal 公司产品。

2. 方法:(1) MTT 法测定 CNDG 联合 LDM 对肿瘤细胞存活率的影响:取对数生长期细胞,以 4000~5000/孔接种于 96 孔细胞培养板。24h 后加入不同浓度的药物处理(LDM (0.05、0.1nmol/L),CNDG (0.5、1、5 μ mol/L)),设至少 3 个平行孔。48h 后向每孔加入 5mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l,37 $^{\circ}$ C 温育 4h。吸出上清液,加入 150 μ l DMSO,振荡 10min,使结晶物充分溶解。用酶标仪在 570nm 处测定每个孔的吸光度(A)值。将各测试孔的 A 值减去本底 A 值,各平行孔的 A 值取平均数。细胞的存活率以 T/C(%)表示,T 为加药组细胞的 A 值,C 为对照组细胞的 A 值。细胞存活率(%)=(T-本底 A 值)/(C-本底 A 值) $\times$ 100%。两药联合指数(combination index, CI)= $V_{\text{comb}}/(V_{\text{LDM}} \times V_{\text{CNDG}})$, V_{comb} 为联合给药组 T/C 比值, V_{LDM} 、 V_{CNDG} 为单药组 T/C 比值。CI<1 表示有协同作用,CI=1 表示有相加作用,CI>1 表示有拮抗作用。(2) CNDG 联合 LDM 对肿瘤细胞周期的影响:接种细胞于 6 孔细胞培养板,CNDG 联合 LDM 药物处理细胞,继续培养 24h。收集细胞,1000r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10min。重悬细胞,乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定。PI 染色前,细胞用 PBS 洗两遍,然后重悬于 PI 染液中,37 $^{\circ}$ C 避光染色 30min。细胞经过滤后用流式细胞仪测定 DNA 含量并分析细胞周期分布。(3) Western blot 法检测 CNDG 联合 LDM 对肿瘤细胞 ATRIP、c-PARP 水平的影响:取药物处理后细胞株,根据不同实验要求在不同时间收集培养细胞。提取细胞总蛋白并用 BCA 试剂盒测定蛋白含量。SDS-PAGE 电泳后取出凝胶,转 PVDF 膜。1% BSA 封闭 2h,加入 1:1000 稀释的一抗,室温孵育 2~3h,TBST 洗膜 3 次;加入 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,室温孵育 2~3h,TBST 洗膜 6 次。以 ECL 试剂盒检测蛋白条带,凝胶成像系统照相并保存

分析结果。(4) 免疫荧光检测 CNDG 联合 LDM 对肿瘤细胞 γ H2AX 水平的影响:在不同时间用药物处理细胞,LDM 和 CNDG 单独或联合处理;细胞经药物处理后用 4% 多聚甲醛固定 30min,用 PBS 洗 3 次,0.1% NP-40 PBS-T 打孔 30min,1% BSA 封闭 1h,一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜,用 PBS 洗 3 次,加入荧光标记的二抗 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h,Hoechst33258 复染,50% 甘油-PBS 封片以防荧光淬灭,荧光显微镜下观察、拍照。

结 果

1. CNDG 增强 LDM 对肿瘤细胞增生抑制作用:MTT 法检测 CNDG 与 LDM 联合应用对人乳腺癌 MCF-7、人肝癌 Bel-7402、人肺癌 A549 细胞增生的影响,并计算联合指数。结果表明,CNDG 1、5 μ mol/L 能明显增强 LDM 对肿瘤细胞增生抑制作用,CNDG 与 LDM 0.05nmol/L 联合给药对 3 种肿瘤细胞的 CI 值<1,显示协同作用(图 1)。

2. CNDG 改变 LDM 对肿瘤细胞周期的阻滞作用:LDM 给药 24h 作用后对肿瘤细胞的 G₂/M 期阻滞显著,MCF-7 细胞从 3.14% 升高至 47.76%,加入 CNDG 后 G₂/M 期从 47.76% 下降到 30.28%,G₁ 期细胞增加。Bel-7402 细胞从 80.61% 下降到 60.43%。A549 细胞从 24.86% 下降到 8.29%(图 2)。

3. CNDG 与 LDM 联合影响肿瘤细胞 DNA 损伤修复相关信号转导分子蛋白水平:Western blot 法检测与凋亡相关的 PARP 的切割水平,LDM 与 CNDG 两药单药 PARP 的切割水平变化不明显,两种药物联合 PARP 切割水平显著提高。另外,LDM 单药可增加 MCF-7 细胞 ATRIP 的水平,与 CNDG 联合应用使 ATRIP 蛋白水平显著下降(图 3)。

4. CNDG 与 LDM 联合对肿瘤细胞 γ H2AX 的影响: γ H2AX 是细胞 DNA 损伤后可迅速聚集于细胞核 DNA 损伤部位的蛋白因子,其磷酸化水平反应细胞 DNA 损伤程度。 γ H2AX 常用来表示 DNA 双链断裂程度。用免疫荧光的方法检测 A549 细胞经过 CNDG 和 LDM 处理后细胞内 γ H2AX 水平以测定细胞内的 DNA 双链断裂水平,LDM 给药 1h 后 γ H2AX 阳性的细胞比例升高,经 CNDG 预处理的细胞 γ H2AX 的荧光强度增强,表明 DNA 双链断裂水平增加(图 4)。

讨 论

LDM 属于九元环烯二炔类抗生素,具有高效细胞毒活性,其体内、体外抗肿瘤活性明显。这些作用均源于 LDM 与细胞 DNA 结合后自由基对 DNA 的断裂作用。肿瘤细胞经放疗、化疗等作用于 DNA 的治疗方式后可引起 DNA 损伤后修复,而这一过程可能

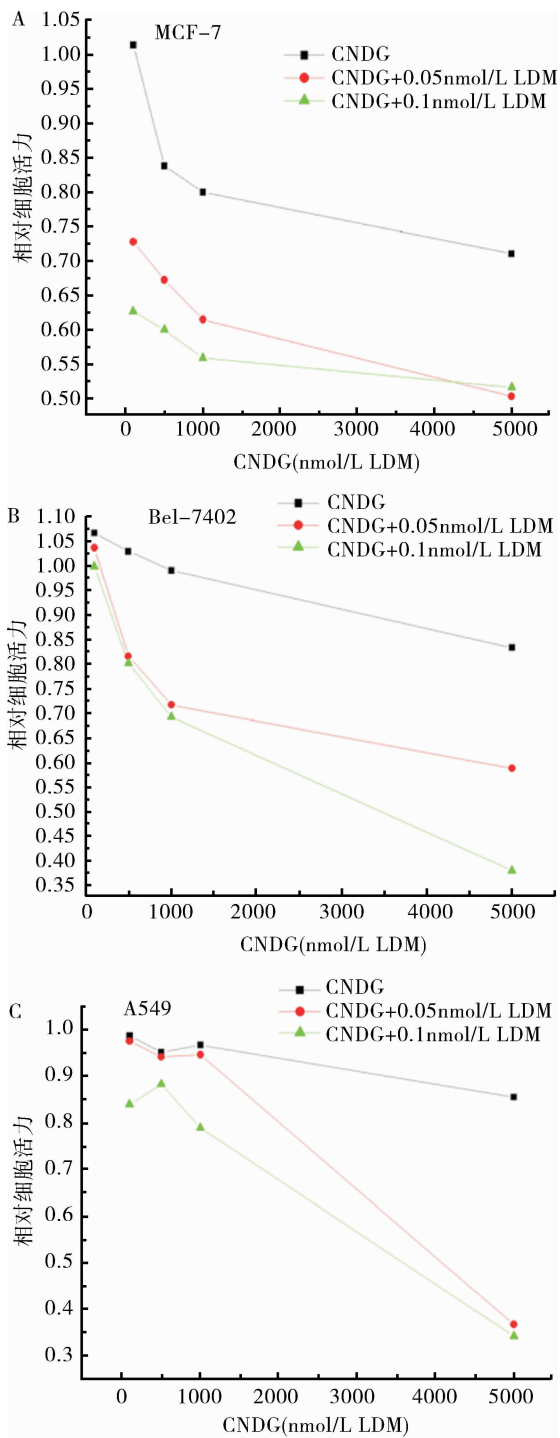


图1 CNDG与LDM联合给药对MCF-7、Bel-7402、A549肿瘤细胞增殖抑制作用

A. MCF-7; B. Bel-7402; C. A549

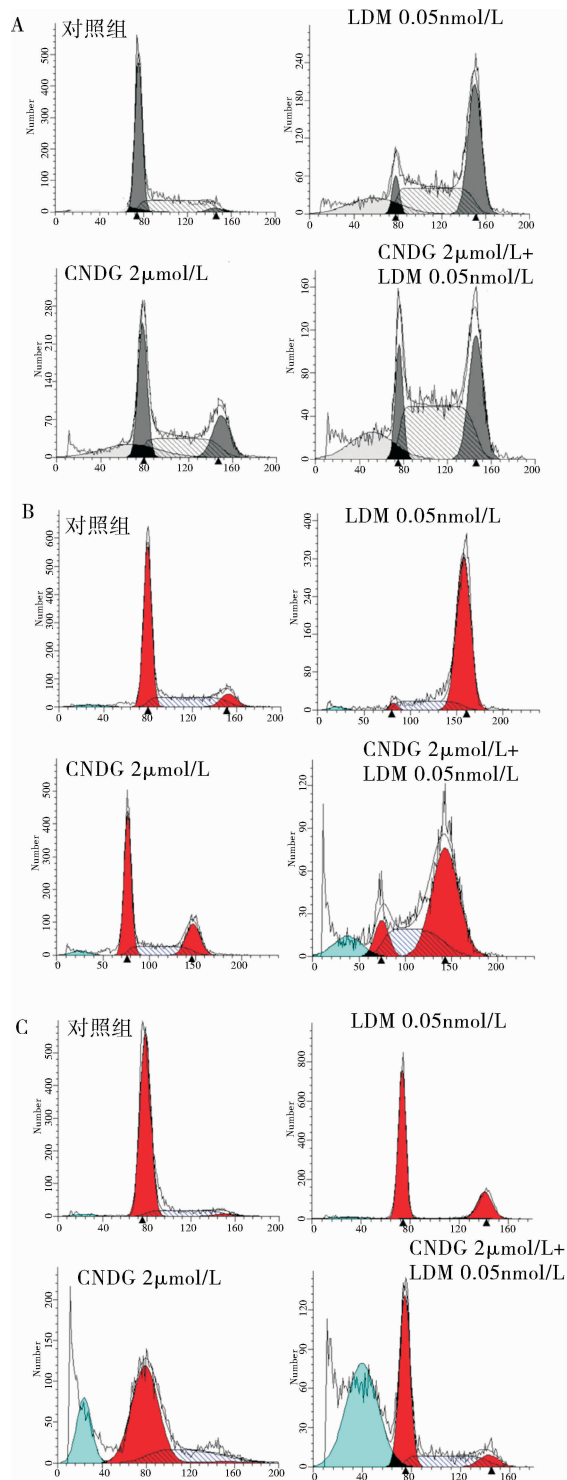


图2 CNDG联合LDM影响肿瘤细胞周期

A. MCF-7; B. Bel-7402; C. A549

会引起肿瘤细胞耐药。因此寻找靶向DNA损伤修复的药物是对抗肿瘤细胞耐药、增敏化疗药物的有效策略。DNA损伤后修复是细胞DNA受损后的自发反应,其中ATM/ATR信号转导途径发挥重要作用,ATM和ATR通过对下游信号分子的一系列磷酸化触

发DNA修复^[13]。作用于DNA的药物通过ATM、ATR等信号转导途径使肿瘤产生G₂/M期阻滞,在此阻滞期细胞对受损DNA进行修复。这一机制对细胞的存活有重要的意义,低剂量DNA损伤药物或低剂

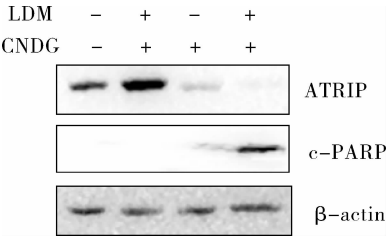


图 3 CNDG 与 LDM 联合对肿瘤细胞 DNA 损伤修复相关 c-PARP 和 ATRIP 的影响

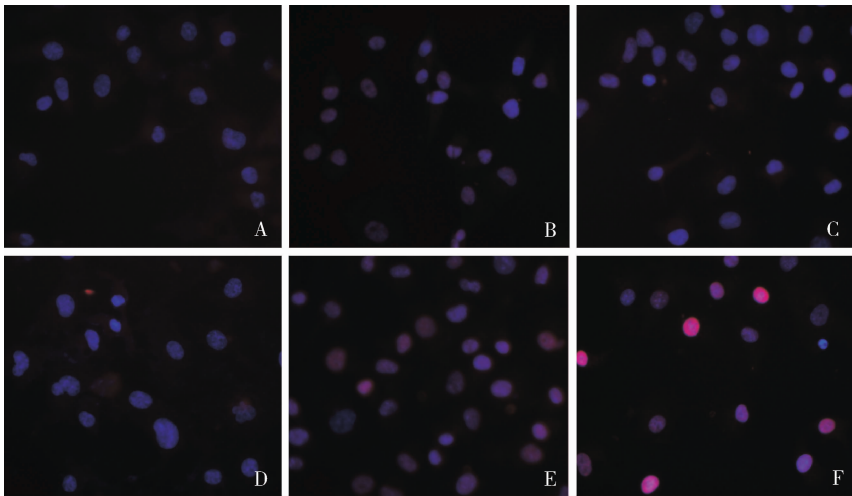


图 4 用 γ H2AX 分析 A549 细胞对 DNA 双链断裂的修复水平

细胞核为蓝色; γ H2AX 为红色;红色荧光强度代表细胞 DNA 双链损伤程度,CNDG 能够明显增加 LDM 对肿瘤细胞的 DNA 断裂水平
A. 对照组;B. LDM (1h);C. LDM (6h);D. CNDG 2 μ mol/L;E. CNDG 2 μ mol/L + LDM (1h);F. CNDG 2 μ mol/L + LDM (6h)

在分子水平上,LDM 单药组 γ H2AX 的水平降低,双链断裂较少,而 CNDG 预处理组的 γ H2AX 则显著增加,这一结果表明 CNDG 可以增强力达霉素对 DNA 的双链断裂作用。有研究报道,细胞接触 LDM 后即会同时激活 ATM、ATR 两条通路,与其他药物作用机制略有不同,LDM 对两条通路可同时激活,且没有优先次序^[15]。因此,只要二者之一激活的情况下即可诱导 DNA 的损伤后的细胞周期阻滞和 DNA 修复。单独抑制 ATM 或 ATR 通路并不能有效抑制肿瘤细胞的 DNA 修复。而 CNDG 可能通过抑制 HSP90 的活性进而抑制 ATM/ATR 两条通路以降低 DNA 的损伤后修复能力,增强肿瘤细胞对 LDM 的敏感度,因为 ATM、ATR 的活性均受 HSP90 调控。ATRIP 在 DNA 损伤后修复应答过程中同样具有重要作用,ATR 发挥功能需要与 ATRIP 形成复合物。在本研究中,肿瘤细胞经 CNDG 处理后,ATRIP 的水平显著下降,CNDG 可以降低 ATRIP 的总蛋白水平,从而影响 ATR 通路的活性,降低了 LDM 作用后肿瘤细胞的 DNA 修复能力。

综上所述,本研究结果表明 HSP90 抑制剂 CNDG 能够明显增强肿瘤细胞对烯二炔类抗生素 LDM 的敏感度,作用机制可能与 HSP90 被抑制后 DNA 损伤修复相关信号转导因子蛋白水平及生物活性降低有关。同时针对 DNA 损伤修复机制研究新型抗肿瘤药物有可能是一种有效的抗肿瘤药物研究策略。

参考文献

- 1 Hu JL, Xue YC, Xie MY, *et al.* A new macromolecular antitumor antibiotic, C - 1027. I. Discovery, taxonomy of producing organism, fermentation and biological activity[J]. J Antibiot (Tokyo), 1988, 41 (11): 1575 - 1579
- 2 Otani T, Minami Y, Marunaka T, *et al.* A new macromolecular anti-tumor antibiotic, C - 1027. II. Isolation and physico - chemical properties[J]. J Antibiotics, 1988, 41 (11): 1580 - 1585
- 3 Shao RG, Zhen YS. Enediyne anticancer antibiotic lidamycin: chemistry, biology and pharmacology[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2008, 8 (2): 123 - 131
- 4 Nicolaou K, Smith A, Yue E. Chemistry and biology of natural and designed enediynes[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90 (13): 5881 - 5888
- 5 Taldone T, Gozman A, Maharaj R, *et al.* Targeting HSP90: small -

- molecule inhibitors and their clinical development[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8 (4): 370 - 374
- 6 Blagosklonny MV. HSP 90 - associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs[J]. *Leukemia*, 2002, 16 (4): 455 - 462
 - 7 Wu L X, Xu J H, Zhang K Z, *et al.* Disruption of the Bcr - Abl/HSP90 protein complex: a possible mechanism to inhibit Bcr - Abl - positive human leukemic blasts by novobiocin[J]. *Leukemia*, 2008, 22 (7): 1402 - 1409
 - 8 Sawai A, Chandarlapaty S, Greulich H, *et al.* Inhibition of HSP90 down - regulates mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and sensitizes EGFR mutant tumors to paclitaxel[J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (2): 589 - 596
 - 9 Pedersen NM, Madhus IH, Haslekås C, *et al.* Geldanamycin - induced down - regulation of ErbB2 from the plasma membrane is clathrin dependent but proteasomal activity independent [J]. *Molecular Cancer Research*, 2008, 6 (3): 491 - 500
 - 10 Heath EI, Hillman DW, Vaishampayan U, *et al.* A phase II trial of 17 - allylamino - 17 - demethoxygeldanamycin in patients with hormone - refractory metastatic prostate cancer[J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14 (23): 7940 - 7946
 - 11 Cao X, Bloomston M, Zhang T, *et al.* Synergistic antipancreatic tumor effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor[J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14 (6): 1831 - 1839
 - 12 Ha K, Fiskus W, Rao R, *et al.* HSP90 Inhibitor - mediated disruption of chaperone association of ATR with HSP90 sensitizes cancer cells to DNA damage[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2011, 10 (7): 1194 - 1206
 - 13 Smith E, Dejsuphong D, Balestrini A, *et al.* An ATM - and ATR - dependent checkpoint inactivates spindle assembly by targeting CEP63 [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11 (3): 278 - 285
 - 14 Moran DM, Gawlak G, Jayaprakash MS, *et al.* Geldanamycin promotes premature mitotic entry and micronucleation in irradiated p53/p21 deficient colon carcinoma cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27 (42): 5567 - 5577
 - 15 Kennedy DR, Beerman TA. The radiomimetic enediyne C - 1027 induces unusual DNA damage responses to double - strand breaks[J]. *Biochemistry*, 2006, 45 (11): 3747 - 3754

(收稿日期:2014 - 01 - 17)

(修回日期:2014 - 04 - 16)

多壁碳纳米管抑制 RAW264.7 巨噬细胞的吞噬功能

李 慧 祝 红 闫 莉 谷婧丽 郝 维 曹济民

摘 要 **目的** 观察多壁碳纳米管(MWCNT)对巨噬细胞吞噬功能的影响。**方法** 采用常规细胞培养技术培养 RAW264.7 巨噬细胞;用流式细胞术定量检测 RAW264.7 巨噬细胞吞噬异硫氰酸荧光素标记的大肠杆菌(FITC - tagged *E. coli* k - 12)的情况。**结果** MWCNT 剂量依赖性地抑制 RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌,随着 MWCNT 浓度的增加,RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌的量(用平均荧光强度表示)降低。此外,MWCNT 抑制 RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌亦呈时间依赖性:用 MWCNT (75 μg/ml)孵育 RAW264.7 细胞 12h 后,RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌的量与对照组相比降低了约 70.4% ($P < 0.01$),同时参与吞噬活动的 RAW264.7 细胞的百分比也从对照组的 98.6% 降低到了 92.4% ($P < 0.05$)。即使用低剂量的 MWCNT (25 μg/ml)孵育 RAW264.7 细胞较长时间(24h)后,RAW264.7 细胞吞噬大肠杆菌的量与对照组相比仍降低了约 77.1% ($P < 0.01$),同时参与吞噬活动的 RAW264.7 细胞的百分比也从 71.2% 降低到了 43.4% ($P < 0.01$)。用脂多糖(LPS,10 μg/ml)激活 RAW264.7 细胞后,其吞噬能力明显增强,而 MWCNT 仍可剂量依赖性地抑制 LPS 激活的 RAW264.7 细胞的吞噬能力,与 LPS 组相比,MWCNT (75 μg/ml)和 LPS 共孵育组吞噬大肠杆菌的量降低了 70.9% ($P < 0.01$)。**结论** MWCNT 可明显抑制 RAW264.7 巨噬细胞的吞噬功能。

关键词 多壁碳纳米管 巨噬细胞 吞噬 大肠杆菌 流式细胞术

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Multi - walled Carbon Nanotube Suppresses the Phagocytotic Function of RAW264.7 Macrophages. Li Hui, Zhu Hong, Yan Li, *et al.* Department of Physiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

基金项目:科技部“973”基金资助项目(2011CB933500)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学系

通讯作者:曹济民,电子信箱:caojimin@126.com