

NVP - BEZ235 调节肿瘤细胞 DNA 辐射损伤修复作用研究进展

孙婉君 张 恒 王 辉

摘 要 放射治疗是治疗恶性肿瘤的重要手段之一,但辐射抵抗严重制约其疗效,是亟需解决的难题。目前认为,DNA 损伤修复是辐射抵抗的重要原因,对修复途径进行抑制有助于增加肿瘤细胞的辐射损伤。NVP - BEZ235 是 $PI_3K/mTOR$ 双靶点抑制剂,在结直肠癌等多瘤种的体外/异种移植瘤研究中,通过抑制 $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路、非同源末端结合修复途径、同源重组修复途径有效抑制细胞 DNA 损伤修复反应,增加肿瘤细胞辐射损伤。本文综述了肿瘤细胞经辐射诱导后的 DNA 损伤修复机制,和 NVP - BEZ235 对该机制的抑制作用。

关键词 电离辐射 $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路 非同源末端结合修复 同源重组修复 NVP - BEZ235

中图分类号 R815 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.05.002

放射治疗是治疗恶性肿瘤的重要手段之一,但辐射抵抗依旧是困扰肿瘤科医生的难题。在对放射生物学的探索中,Withers 于 1975 年提出临床放射生物学中的“4R”理论,即:细胞放射损伤修复(repair)、细胞周期再分布(reassortment)、氧效应及缺氧细胞再氧合(reoxygenation)和细胞再群体化(repopulation)。在此基础上,Steel 于 1989 年提出第 5“R”,即放射敏感度(radiosensitivity)。多项研究着眼于调节以上不同途径,以期增加肿瘤细胞的辐射损伤。 $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路是肿瘤发生、发展过程中的经典信号通路,经电离辐射诱导,该通路异常激活,可通过促进 DNA 损伤修复等机制,表达辐射抗性。NVP - BEZ235 是一种 $PI_3K/mTOR$ 双重抑制剂,多项体外/异种移植瘤研究已证明 NVP - BEZ235 可特异性阻断 $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路,进而调节 DNA 损伤修复途径,增加肿瘤细胞的辐射损伤。

一、NVP - BEZ235 抑制 $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路

根据放射生物学相关研究发现,治疗剂量的高能 X 射线通过在细胞内激发活性氧,造成对肿瘤细胞 DNA 的持续损伤,其中 DNA 双链断裂(double-strand break,DSB)是最致命的 DNA 损伤类型,会导致细胞凋亡、衰老或失去增殖能力^[1]。细胞为保持

基因组的稳定性,进化出一套有效的应激反应机制——DNA 损伤反应(DNA damage response,DDR),包括细胞周期检查点阻滞和 DNA 损伤修复,对 DSB 进行有效修复,避免细胞凋亡。其中修复方式主要有两种,即非同源末端结合修复(non-homologous end-joining,NHEJ)和同源重组修复(homologous recombination,HR),这也是目前认为导致肿瘤细胞辐射抵抗的重要原因之一^[2]。

$PI_3K/Akt/mTOR$ 通路在诸多基本细胞过程中起中心作用,与多条通路存在交互作用,电离辐射诱导后活化异常,多项研究证明,参与激活下游细胞周期蛋白和 DNA 修复途径蛋白,启动 DDR 途径,是肿瘤细胞表达辐射抗性的主要机制^[3]。该通路活化,由雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mTOR complex 1,mTORC1)介导磷酸化下游真核起始因子 4E 结合蛋白 1[eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF-4E) - binding protein 1,4E - Bp1]和核糖体蛋白质 S6 激酶 1(ribosomal protein S6 kinase 1,S6K1),使其分别与 eIF - 4E 和真核起始因子 3(eukaryotic initiation factor 3,eIF - 3)解离,促进翻译起始复合物的形成。S6K1 磷酸化 eIF - 4E 和核糖体蛋白 S6(ribosomal protein S6,S6),启动翻译,并磷酸化真核延伸因子 2 激酶(eukaryotic elongation factor 2 kinase,eEF - 2K),使翻译延长。研究发现,mTORC1 介导合成的蛋白主要参与调控细胞侵袭、转移、DNA 损伤修复过程^[4]。因此,抑制 $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路可以减少 DNA 损伤修复相关原料生成,间接抑制细胞的自我

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81972847);天津市人民医院院级基金资助项目(2017YJZD004)

作者单位:300193 天津中医药大学(孙婉君);300121 天津市人民医院肿瘤科(张恒、王辉)

通信作者:王辉,电子信箱:wanghui2@umc.net.cn

修复。

目前已发现多种 PI_3K 和 $mTOR$ 抑制剂,其中 $NVP - BEZ235$ 是咪唑喹啉类化合物,一种强效的双泛 I 类 PI_3K 和 $mTOR$ 抑制剂,通过竞争 ATP 结合位点,可逆地抑制 PI_3K I 类和 $mTOR$ 复合物的催化活性^[5]。较 $mTOR$ 单靶点抑制剂,可消除通路内反馈机制,更有效的抑制 $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路活化,使 $4E - BP1$ 和 $eIF - 4E$ 、 $S6K1$ 和 $eIF - 3$ 维持结合状态,抑制翻译起始复合物形成,减少 DNA 修复过程原料蛋白的合成,以抑制 DNA 损伤修复,达到增加辐射损伤的结果。

二、 $NVP - BEZ235$ 抑制非同源末端结合修复途径

非同源末端结合修复 (NHEJ) 途径是 DSB 的主要修复途径,由以 DNA 依赖性蛋白激酶 (DNA dependent protein kinase, DNA - PK) 为关键酶的多酶复合物执行,将断裂的 DNA 链末端连接在一起,可以发生在细胞周期中的所有阶段。随着生物进化复杂程度的提高,NHEJ 在 DDR 中所占的比重逐渐增加,因此有效抑制 NHEJ 途径对于抑制 DNA 损伤修复作用至关重要^[6]。

DNA - PK 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,含有 DSB 特异性末端结合蛋白 Ku (Ku70/Ku80 异源二聚体) 和 DNA 依赖的蛋白激酶催化亚基 (DNA - dependent protein kinase catalytic subunit, DNA - PKcs)。当 DSB 发生时,Ku 蛋白对 DNA 末端进行识别,将其穿入蛋白二聚体的孔中,通过 Ku80 羧基末端结构域将 DNA - PKcs 连接到 Ku DNA 结合结构域。DNA - PKcs 在多个丝氨酸、苏氨酸位点被磷酸化激活,进一步激活 Ku70、Ku80、Artemis、XRCC4、XRCC4 样因子 (XRCC4 - like factor, XLF) 和 DNA 连接酶 IV (DNA Ligase IV, Lig4)。XRCC4 和 XLF 具有相似的二聚体结构,在 Lig4 羧基端的 BRCT 重复序列介导下,与 Lig4 相互作用,将 DNA 片段进行连接。在 NHEJ 修复结束或过程中,Ku 蛋白被 E3 连接酶 RNF8 泛素化降解。

有研究表明, $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路中的关键蛋白 Akt 参与激活 DNA - PKcs,进而启动 NHEJ 途径^[7]。Akt 包括 Akt1 (PKB α)、Akt2 (PKB β) 和 Akt3 (PKB γ) 3 个亚型,其中 Akt1 亚型在全身广泛表达,与辐射诱导后的 DNA 损伤修复相关,是肿瘤的不良预后因素^[8]。经辐射诱导,异常激活的 PI_3K 促使磷脂酰肌醇二磷酸酯 (PIP2) 磷酸化产生 PIP3,进而在 Thr 残基磷酸化激活 Akt 异构体 (PKB $\alpha - Thr308$ 、

PKB $\beta - Thr309$ 、PKB $\gamma - Thr305$)。雷帕霉素靶蛋白复合物 2 ($mTOR$ complex 2, $mTORC2$) 在 Ser 残基磷酸化 Akt 异构体 (PKB $\alpha - Ser473$ 、PKB $\beta - Ser474$ 、PKB $\gamma - Ser472$),使 Akt 的活性最大化。磷酸化的 Akt1 促进 DNA - PKcs 与 Ku 蛋白结合以及在 DNA 损伤位点的积累,并使 DNA - PKcs 于 Ser2056 位点自磷酸化激活^[9]。 $NVP - BEZ235$ 作为一种 $PI_3K/mTOR$ 双重抑制剂,同时作用于 PI_3K 和 $mTORC2$,与单靶 PI_3K 或 $mTORC1$ 抑制剂比较,Akt 的两个磷酸化位点均被有效抑制,消除相应的反馈机制,对 $PI_3K/Akt/mTOR$ 通路以及下游 DNA - PK 表现出更强的抑制效果,达到增加辐射损伤的结果。

另有研究认为,Akt 与 DNA - PKcs 的层级关系尚存在争议,DNA - PKcs 在 Ser473 位点磷酸化激活 Akt,反之不然,但 $NVP - BEZ235$ 仍对 NHEJ 途径表现出有效的抑制作用。Ser2056 和 Thr2609 位点磷酸化是 DNA - PKcs 表达激酶活性不可缺少的条件,其中 Ser2056 由 DNA - PKcs 进行自体磷酸化,Thr2609 则由共济失调毛细血管扩张症突变激酶 (ataxia - telangiectasia mutated, ATM) 介导磷酸化^[10]。DNA - PK 和 ATM 均属于磷酸酰基醇 3 激酶相关激酶 (phosphatidylinositol 3 - kinase - related kinase, PIKK) 家族,与 PI_3K 高度同源,为 PI_3K 抑制剂同时抑制 DNA - PK、ATM 提供了生物学基础^[11]。由此, $NVP - BEZ235$ 可以直接抑制 DNA - PK 和 ATM 的活性,从而抑制 NHEJ 途径,增加细胞辐射损伤。

三、 $NVP - BEZ235$ 抑制同源重组修复 (HR) 途径

同源重组修复 (HR) 途径使用姐妹染色单体作为模板进行修复,是高度保守的 DSB 修复方式,发生在细胞周期中的 S 期和 G_2 期。当 DSB 发生时,DNA 损伤传感器 ATM 磷酸化激活,乳腺癌 1 型易感蛋白 (breast cancer type 1 susceptibility protein, BRCA1) 被 ATM 直接或通过检查点激酶 2 (checkpoint kinase 2, CHK2) 间接磷酸化激活,同时也可被细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin - dependent kinases, CDK1) 磷酸化激活。BRCA1 与 CtBP 相互作用蛋白 (CtBP - interacting protein, CtIP) 结合,竞争性地从 DSB 位点去除 p53 结合蛋白 1 (p53 - binding protein 1, 53BP1),将双链 DNA 切除为两条 3 (单链 DNA (single - stranded DNA, ssDNA),复制蛋白 A (replication protein A, RPA) 对 ssDNA 进行快速包被和保护。BRCA1 与 BRCA2 伴侣及定位蛋白 (partner and localizer

BRCA2, PALB2) 结合在 DSB 位点招募乳腺癌 2 型易感蛋白 (breast cancer type 2 susceptibility protein, BRCA2)。继而将 RAD51 募集至 ssDNA 周围, 去除 RPA, 形成均聚物纤维并连接同源染色单体。DNA 聚合酶将损伤 DNA 的 3' 端拉长, 然后进行 DNA 连接。

HR 途径在哺乳动物细胞 DNA 损伤修复中仅占 30% 左右, 然而一些研究认为, HR 对细胞存活的意义较 NHEJ 更大, 这可能是因为 DSB 更容易发生在 G₂ 期, 可能是因为 HR 途径精确的复制方式, 也可能是因为 HR 途径在 DNA 复制中的作用^[12]。其中 RAD51 是 HR 途径的核心蛋白, 表达量随 HR 途径周期性变化, 在 S 期和 G₂ 期最高^[13]。肿瘤细胞中 RAD51 高表达提示预后不良。除此之外, 细胞复制过程中, 暂时被解开的 DNA 双螺旋结构极易受到核溶解攻击, 同样可引发 DSB, RAD51 在维持复制叉稳定性的过程中起到重要作用, 这对肿瘤细胞的增殖至关重要^[14]。

BRCA1 和 BRCA2 突变与乳腺癌、结直肠癌等多个瘤种易感性相关, 在 HR 途径中同样扮演重要角色^[15]。研究发现, 在辐射诱导下, BRCA1 可以抑制细胞内活性氧的产生, 减少 DSB, 并且具有 E3 连接酶活性, 差异性泛素化 DNA 损伤修复蛋白及细胞周期相关蛋白, 参与调控细胞周期。BRCA2 可通过招募 RAD51 维持 DNA 复制叉稳定性, 保护端粒完整性, 并促进 HR 途径。BRCA1 和 BRCA2 还在调控细胞自噬、基因转录、染色质重塑等方面发挥作用^[16]。

多项研究在探索 PI₃K/Akt/mTOR 通路对 HR 途径的调控作用^[17]。目前已知, 活化的 Akt 可上调 RAD51 表达, 直接磷酸化 BRCA1, 并促进 BRCA1 - RAD51 核定位, 激活 HR 途径^[18]。NVP - BEZ235 可通过对 Akt 的抑制作用, 抑制 BRCA1 活性, 以及 BRCA2、RAD51 的补充, 减少 RAD51 蛋白合成并损伤其核定位, 并由于 BRCA1 的泛素化作用, 间接影响 CtIP、γH2AX 等蛋白与 DNA 结合。如前文所述, ATM 属于 PIKK 家族, NVP - BEZ235 可直接抑制 ATM 活性, 从而抑制 HR 途径, 增加细胞辐射损伤。

四、NVP - BEZ235 抑制细胞周期进程

在肿瘤细胞中, PI₃K/Akt/mTOR 通路异常激活造成的细胞周期检查点失控, 使细胞处于持续增殖状态。当 DSB 发生时, ATM 激活下游 CHK2, 然后在 Ser216 位点磷酸化 Cdc25, 这是一种蛋白磷酸酶, 可

以使 CDK1 于 Tyr15 位点磷酸化, 抑制 CDK1/Cyclin B1 复合物活性, 使细胞周期在 G₂/M 检查点暂时停滞, 为 HR 途径提供充分的作用时间^[19]。待 DNA 损伤修复完成或耐受, CDK1 的 Tyr15 位点去磷酸化, 激活 CDK1/Cyclin B1 复合物活性, 解除细胞周期 G₂ 期阻滞。

但研究表明, NVP - BEZ235 在细胞 G₀/G₁ 期表达出更明显的放射增敏效果, 主要抑制 NHEJ 途径^[20]。Cyclin D 和 Cyclin E 为 G₁ ~ S 期细胞周期进程的重要调控因子, 由 mTOR 在翻译水平上对其进行调控, 其表达上调是肿瘤预后不良的标志。NVP - BEZ235 通过抑制 mTOR 活性, 下调 S6K 和 eIF - 4E 磷酸化水平, 减少 Cyclin D 和 Cyclin E 的表达, 并通过糖原合成酶激酶 - 3β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3β) 介导, 促进蛋白降解, 使细胞出现 G₀/G₁ 期阻滞。另外, NVP - BEZ235 通过抑制 Akt 活性, 上调下游 p21 表达。p21 是一种周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 依赖于 GSK3β/β - catenin/p21 级联反应, 抑制 Cyclin E/Cdk2 复合物活性, 诱导细胞 G₀/G₁ 期阻滞。

NVP - BEZ235 在抑制细胞增殖能力的同时, 压缩 HR 途径作用时间, 并延长了利于增加细胞辐射损伤的细胞时相。

五、展 望

综上所述, 在细胞复杂的通路网络中, 存在着多重交互作用。NVP - BEZ235 作为 PI₃K/mTOR 双重抑制剂, 可通过对 PI₃K/Akt/mTOR 通路的有效抑制作用, 下调 NHEJ 和 HR 途径活性, 同时可由于 PIKK 家族内蛋白结构的相似性, 直接抑制 NHEJ 和 HR 途径, 增加肿瘤细胞的辐射损伤。并有研究发现, DNA 损伤修复途径的选择处在动态变化之中, 当其中一条 DNA 损伤修复途径 (NHEJ/HR) 被抑制时, 会出现另一条途径 (HR/NHEJ) 的增强。NVP - BEZ235 同时作用于 NHEJ 和 HR 途径中的多个蛋白靶点, 效果优于 mTOR、DNA - PKcs 或 ATM 单靶点抑制剂, 在增加细胞辐射损伤的探索中展现出更丰富的前景。

目前 NVP - BEZ235 与放射敏感性相关的研究尚停留在体外/异种移植瘤阶段, 仅有数项与化疗敏感度相关研究进入 I/II 期临床研究阶段, 且结果尚不理想, 其体内作用机制仍需更多的研究与验证。

(下转第 113 页)

9 Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, *et al.* Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J]. *Science*, 2013, 341: 231–240

10 Hjorth MF, Blædel T, Bendtsen LQ, *et al.* Prevotella – to – Bacteroides ratio predicts body weight and fat loss success on 24 – week diets varying in macronutrient composition and dietary fiber: results from a post – hoc analysis[J]. *Int J Obesit*, 2019, 431(1): 149–157

11 Sorbara MT, Littmann ER, Fontana E, *et al.* Functional and genomic variation between human – derived isolates of lachnospiraceae reveals inter – and intra – species diversity[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 5(5): 134–146

12 Benítez – Púez A, Gómezdel – Pugar EM, López – Almela I, *et al.* Depletion of blautia species in the microbiota of obese children relates to intestinal inflammation and metabolic phenotype worsening [J]. *mSystems*, 2020, 5(2): 857–869

13 Lopategi A, López – Vicario C, Alcaraz – Quiles J, *et al.* Role of bio-

active lipid mediators in obese adipose tissue inflammation and endocrine dysfunction[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 419: 44–59

14 Jung MK, Hur JH, Kim KE, *et al.* Insulin resistance is elevated in girls with precocious puberty [J]. *Pediatric Endocrinology I (posters)*, Endocrine Society, 2016: 27–37

15 Jansen EC, Marin C, Mora – Plazas M, *et al.* Higher childhood red meat intake frequency is associated with earlier age at menarche [J]. *J Nutr*, 2016, 146(4): 792–798

16 Chenchen ZH, Andra B, Kayie C, *et al.* Impact of a vegetarian diet on the gut microbiota and immune [J]. *Front Immunol*, 2018, 9(908): 1–13

17 刘言, 杨明喆, 段若男, 等. 成都市儿童青少年饮食行为现状及其与青春期发育的关系 [J]. *中国学校卫生*, 2015, 36(8): 1126–1129

(收稿日期: 2021–09–28)
(修回日期: 2021–10–30)

(上接第9页)

参考文献

1 王依朝, 樊丽, 王红霞, 等. γ H2AX、53BP1 及 RAD51 焦点用于分析 DNA 双链断裂损伤[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(1): 16–19

2 刘昕, 向翠芳, 赵梓璐, 等. 同源重组和非同源末端连接修复参与黄芩素诱导的 DNA 损伤耐受机制研究[J]. *华西药理学杂志*, 2021, 36(3): 280–283

3 Mukherjee B, Tomimatsu N, Amancherla K, *et al.* The dual PI3K/mTOR inhibitor NVP – BEZ235 is a potent inhibitor of ATM – and DNA – PKCs – mediated DNA damage responses [J]. *Neoplasia*, 2012, 14(1): 34–43

4 Hsieh AC, Liu Y, Edlind MP, *et al.* The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis [J]. *Nature*, 2012, 485(7396): 55–61

5 Lang F, Wunderle L, Badura S, *et al.* A phase I study of a dual PI3 – kinase/mTOR inhibitor BEZ235 in adult patients with relapsed or refractory acute leukemia [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2020, 21(1): 70

6 Wassing IE, Esashi F. RAD51: beyond the break [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2021, 113: 38–46

7 Toulany M, Maier J, Iida M, *et al.* Akt1 and Akt3 but not Akt2 through interaction with DNA – PKcs stimulate proliferation and post – irradiation cell survival of K – RAS – mutated cancer cells [J]. *Cell Death Discov*, 2017, 3: 17072

8 Balasuriya N, Davey NE, Johnson JL, *et al.* Phosphorylation – dependent substrate selectivity of protein kinase B (AKT1) [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(24): 8120–8134

9 Toulany M, Lee KJ, Fattah KR, *et al.* Akt promotes post – irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA – PKcs – dependent DNA double – strand break repair [J]. *Mol Cancer Res*, 2012, 10(7): 945–957

10 Oeck S, Al – Refae K, Riffkin H, *et al.* Activating Akt1 mutations alter DNA double strand break repair and radiosensitivity [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42700

11 Strzeszewska A, Alster O, Mosieniak G, *et al.* Insight into the role of PIKK family members and NF – small ka, CyrillicB in DNAdamage – induced senescence and senescence – associated secretory phenotype of colon cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 44

12 Shibata A. Regulation of repair pathway choice at two – ended DNA double – strand breaks [J]. *Mutat Res*, 2017, 803–805: 51–55

13 King HO, Brend T, Payne HL, *et al.* RAD51 is a selective DNA repair target to radiosensitize glioma stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2017, 8(1): 125–139

14 Ma CJ, Gibb B, Kwon Y, *et al.* Protein dynamics of human RPA and RAD51 on ssDNA during assembly and disassembly of the RAD51 filament [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(2): 749–761

15 嵯昌龙, 陈维艳, 龙琦, 等. 同源重组修复通路基因遗传变异与结直肠癌易感性的关联研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(18): 1769–1775

16 Gorodetska I, Kozerska I, Dubrovska A. BRCA genes: the role in genome stability, cancer stemness and therapy resistance [J]. *J Cancer*, 2019, 10(9): 2109–2127

17 钟振兴, 彭鑫, 孔德新. 靶向同源重组修复的抗肿瘤研究进展 [J]. *药学报*, 2020, 55(11): 2535–2548

18 Mueck K, Rebholz S, Harati MD, *et al.* Akt1 stimulates homologous recombination repair of DNA double – strand breaks in a Rad51 – dependent manner [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11): 2473

19 Peng Y, Fu S, Hu W, *et al.* Glutamine synthetase facilitates cancer cells to recover from irradiation – induced G2/M arrest [J]. *Cancer Biol Ther*, 2020, 21(1): 43–51

20 Schotz U, Balzer V, Brandt FW, *et al.* Dual PI3K/mTOR Inhibitor NVP – BEZ235 Enhances Radiosensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) Cell Lines Due to Suppressed Double – Strand Break (DSB) Repair by Non – Homologous End Joining [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(2): 467

(收稿日期: 2021–12–07)
(修回日期: 2021–12–09)