

基础医学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000664

MUC1胞内段抑制剂 GO-201 对人肺腺癌 A549 放射敏感性作用研究

杨文影¹, 吴永忠², 犖伟奇², 郭启帅², 易守会¹, 陈晓品¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科, 重庆 400016; 2. 重庆市肿瘤医院肿瘤科, 重庆 400011)

【摘要】目的:研究 MUC1 胞内段(MUC1-CT)抑制剂 GO-201 对人肺腺癌 A549 细胞放射敏感性影响。**方法:**MTT 检测不同剂量以及不同时间 GO-201 对肺腺癌 A549 细胞的增殖抑制率;克隆形成实验检测 GO-201 对 A549 细胞放射增敏作用,单击多靶模型拟合细胞存活曲线并计算 Dq、D0、SF2 值和放疗增敏比(sensitizing enhancing ratio, SER);流式细胞术检测各实验组细胞活性氧水平,Western blot 法检测锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)表达变化。**结果:**MUC1-CT 抑制剂 GO-201 可抑制肺腺癌 A549 细胞的增殖,其作用 24、48、72 h IC₅₀ 值分别是 30.79、23.32、13.60 μmol/L。并且对肺腺癌 A549 细胞具有放射增敏作用,其放疗增敏比 SER 为 1.14;联合照射组中, A549 细胞活性氧水平明显升高($F=12.019, P=0.008$), Mn-SOD 蛋白表达量明显下降($F=5.465, P=0.048$), 与对照组比较差异具有统计学意义。**结论:**MUC1-CT 抑制剂 GO-201 可增加人肺腺癌 A549 细胞的放射敏感性。

【关键词】肺癌; GO-201; MUC1 胞内段; 活性氧; 放射敏感性**【中图分类号】**R734.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2015-03-26

Effect of MUC1 cytoplasmic domain inhibitor on the radiosensitivity of lung cancer cells

Yang Wenyong¹, Wu Yongzhong², Nian Weiqi², Guo Qishuai², Yi Shouhui¹, Chen Xiaopin¹

(1. Department of Oncology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Oncology, Chongqing Cancer Hospital)

【Abstract】Objective: To explore the radiosensitive effect of GO-201 on lung cancer cell line A549 cultured *in vitro*. **Methods:** MTT assay was used to detect the growth inhibition rate; the radiosensitive effect was detected by clone formation test. Cell survival curve was fitted by multitarget one-hit model and Dq, D0, SF2, sensitizing enhancing ratio (SER) was calculated. Additionally, flow cytometry and Western blot were also conducted to observe the influence of GO-201 and radiation on cell reactive oxygen species and the expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) protein. **Results:** GO-201 could inhibit the proliferation of lung cancer cell (IC₅₀ value were 30.79 μmol/L, 23.32 μmol/L, 13.60 μmol/L after 24, 48, 72 h) and enhance radiosensitivity of A549 cells; the SER was 1.14. Reactive oxygen level of A549 cell was increased ($F=12.019, P=0.008$) and the expression of MnSOD protein was decreased ($F=5.465, P=0.048$) in combination group than in control group. **Conclusion:** Inhibiting MUC1 cytoplasmic domain can improve the radiosensitivity of lung cancer cell.

【Key words】lung cancer; GO-201; MUC1 cytoplasmic domain; reactive oxygen species; radiosensitivity

MUC1 是一种异质二聚体跨膜糖蛋白, 在超过 80% 非小细胞肺癌中的腺癌亚型中, 呈异常过表达

状态, 表达水平与无病生存期及总体生存率呈负相关^[1]。异常高表达的 MUC1 作为癌基因导致正常细胞恶性转化以及肿瘤的发生与发展, 并可对化疗药物、射线诱导的凋亡产生抵抗^[2-5]。MUC1 癌基因功能被认为是 MUC1 胞内段(MUC1-CT)与多种信号分子相互作用的结果^[6]。GO-201 是一种小分子抑制剂, 其可抑制 MUC1-CT 二聚体化, 阻滞 MUC1-CT 转位

作者介绍: 杨文影, Email: 912332974@qq.com,

研究方向: 肿瘤基因放疗增敏。

通信作者: 陈晓品, Email: cyp640910@163.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2013yykfA10004)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150617.2233.004.html>

(2015-06-17)

到细胞核及线粒体从而影响其信号传导功能^[7]。体内外实验发现 GO-201 可通过阻滞 MUC1-CT 活化 PI3K-AKT 信号通路,抑制细胞增殖、导致肿瘤退化^[8]。本实验探讨 MUC1-CT 抑制剂 GO-201 与射线联合对人肺腺癌 A549 细胞的放疗敏感性影响,以期临床肺腺癌放射治疗增敏提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

人肺腺癌 A549 细胞株由重庆医科大学附属第一医院肿瘤分子与表观遗传学实验室馈赠。鼠抗人 MUC1 单克隆抗体 (CD227)、同型对照小鼠 IgG 抗体购于 BD 公司。GO-201 购于 Sigma 公司,MTT 购于 Amresco 公司。胎牛血清,1640 培养基购于 Hyclone。X 线直线加速器:美国 Varian 23EX。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌 A549 细胞株在含 10% 灭活胎牛血清的 PRMI1640 培养基中,于 37℃,5% CO₂ 饱和湿度条件下传代培养。细胞生长至对数期进行后续实验。

1.2.2 流式细胞仪检测肺腺癌 A549 细胞 MUC1 表达 收集细胞,调整细胞浓度至 1×10^7 个/ml,取 100 μ l 于 EP 管内,分别加入 1 μ g Alex-488 标记 MUC1 抗体和 2 μ l 同型对照小鼠 IgG 抗体,4℃避光孵育 30 min;加入 PBS 洗涤 3 次,2 500 r/min 离心 5 min。加入 400 μ l PBS 重悬细胞;流式细胞仪检测 A549 细胞 MUC1 表达。

1.2.3 细胞照射条件 6MV-X 线等中心照射,机架旋转 180°,源皮距(SSD)100 cm,剂量率 300 cGy/min。照射时培养板下放置 1.5 cm 厚等效组织填充物,以使射线分布均匀。

1.2.4 MTT 实验检测细胞存活率 细胞经胰酶消化离心、计数,每孔接种 4 000 个细胞于 3 块 96 孔板中,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。24 h 后,弃去旧培养液,加入含 GO-201 浓度为 0.0(对照组)、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0 μ mol/L 培养液 100 μ l,每组 3 个复孔,于 37℃培养箱中分别继续培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 20 μ l,37℃培养箱继续培养 4 h 后终止。加入 150 μ l DMSO,室温状态下振荡 10 min,待结晶溶解,酶标仪检测其在 490 nm 波长处的吸光(absorbance,A)值。计算各实验组细胞生长抑制率:细胞生长抑制率=(A_{对照组值}-A_{实验组值})/A_{对照组值}×100%,实验重复 3 次,取平均值,计算 IC₅₀ 值。

1.2.5 平板克隆形成实验 实验分组:溶剂对照组;单独射线组(2、4、6、8 Gy 照射剂量);单独药物组(5 μ mol/L GO-201 组);联合组(5 μ mol/L GO-201 作用 48 h 后,再用 2、4、6、8 Gy 射线照射)。继续培养 13~14 d,待长至肉眼可见的克隆时,停止细胞培养。甲醇固定 15 min,结晶紫染色,空气中自然干燥,计数>50 个细胞所形成的克隆数。实验独立重复 3 次。集落形成率(PE)=对照组细胞所形成的集落数/对照组接种细胞个数×100%;存活分数(SF)=每亚剂量射线组所形成

的集落数/(该组细胞接种个数×PE)。药物与射线联合作用组存活分数均用单独药物组存活分数进行校正,以消除药物对细胞存活分数的影响。计算放射敏感性指标,并绘制细胞存活曲线。

1.2.6 流式检测细胞内活性氧水平 实验分为对照组(不加 GO-201)、药物组(5 μ mol/L GO-201)、4 Gy 射线组、联合组(5 μ mol/L GO-201 作用 48 h+4 Gy 射线),24 h 后弃去细胞培养液,加入探针 DCFH-DA,37℃孵育 40 min,无血清细胞培养液充分洗涤细胞 3 次,收集细胞,流式检测各组细胞荧光强度值,实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 检测细胞内锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase,MnSOD)蛋白水平 细胞分组及处理同 1.2.6。采用全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,并进行定量。按照每孔 50 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后蛋白转印到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗(MnSOD 1:1 000)4℃过夜,二抗(β -actin 1:2 000)37℃孵育 1 h,ECL 化学发光,Bio-Rad 凝胶成像系统采集图像,Quantity One 软件进行灰度值分析,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 22.0 统计软件进行数据处理,计量资料采用均数±标准差的形式表示。重复测量资料采用重复测量方差分析,完全随机设计资料采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD-*t* 法两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。应用 Graphpad Prism6.0 软件拟合细胞存活曲线,计算放射敏感性参数。

2 结果

2.1 肺腺癌 A549 细胞 MUC1 的表达

MUC1 作为癌蛋白和肿瘤抗原,表达于大多数上皮来源的腺癌细胞和部分血液系恶性肿瘤细胞表面,为研究肺腺癌 A549 细胞 MUC1 表达情况,利用鼠抗人 MUC1 单克隆抗体(CD227)通过流式细胞仪检测肺腺癌 A549 细胞 MUC1 表达,结果显示 MUC1 在 A549 细胞中高表达(图 1)。

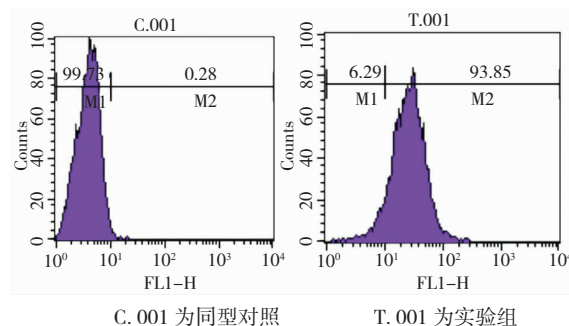


图 1 MUC1 在 A549 细胞中的表达

Fig.1 Expression of MUC1 in A549 cells

2.2 GO-201 对肺腺癌 A549 细胞抑制率

经重复测量方差分析,时间因素($F=1.743, P=0.201$)对细

胞抑制无统计学意义,浓度因素($F=3.364, P=0.040$)对细胞抑制有统计学意义,时间和浓度之间不存在交互作用($F=0.474, P=0.860$),组间 LSD- t 法分析表明 GO-201 浓度在 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 之间对 A549 细胞的抑制作用,随着浓度升高,抑制作用增强($P<0.001$)(图 2)。不同浓度 GO-201 对肺腺癌 A549 细胞各时间的抑制率见表 1。24、48、72 h GO-201 对肺腺癌 A549 细胞的 IC_{50} 值分别是 30.79、23.32、13.60 $\mu\text{mol/L}$ 。

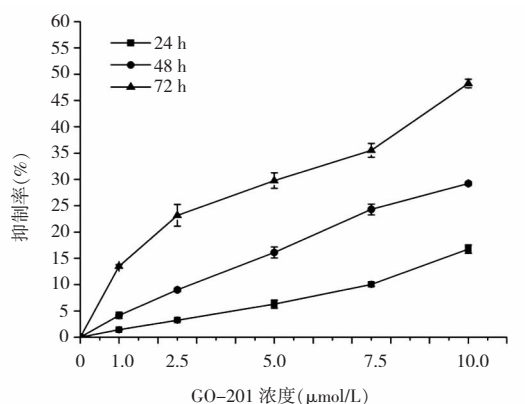


图 2 GO-201 对 A549 细胞增殖抑制作用

Fig.2 Growth inhibition of GO-201 on A549 cells

表 1 不同浓度及时间 GO-201 对 A549 细胞增殖抑制率

Tab.1 Effect of GO-201 on the proliferation inhibition rate of the A549 cells

浓度	24 h	48 h	72 h
1.0 $\mu\text{mol/L}$	1.42 ± 0.14	4.16 ± 0.58	13.49 ± 0.30
2.5 $\mu\text{mol/L}$	3.22 ± 0.18^a	8.99 ± 0.37^a	23.16 ± 2.07^a
5.0 $\mu\text{mol/L}$	6.30 ± 0.78^{ab}	16.11 ± 1.05^{ab}	29.78 ± 1.48^{ab}
7.5 $\mu\text{mol/L}$	10.03 ± 0.31^{abc}	24.29 ± 1.02^{abc}	35.53 ± 1.31^{abc}
10.0 $\mu\text{mol/L}$	16.75 ± 0.82^{abcd}	29.21 ± 0.34^{abcd}	48.23 ± 0.81^{abcd}

注:采用 LSD- t 法比较不同浓度间结果, a 表示与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 比较差异有统计学意义; b 表示与 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 比较差异有统计学意义; c 表示与 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 比较差异有统计学意义; d 表示与 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 比较差异有统计学意义。

2.3 GO-201 的放射增敏作用

根据细胞克隆形成实验,单击多靶模型绘制细胞存活曲线结果得出 GO-201 联合射线组的 D_0 、 D_q 、 N 值以及 SF2 值分别为 2.10、0.80、1.47、0.51,均小于单独照射组的 2.39、1.43、

1.82 以及 0.65,放疗增敏比 $\text{SER}=1.14$ 。图 3 可以看出联合组的存活曲线较对照组整体下移,各亚剂量点的存活分数均低于单独射线组。

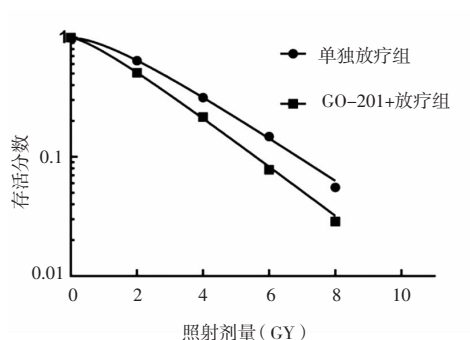


图 3 细胞单独照射与联合照射细胞存活曲线

Fig.3 Cell survival curve in radiation group and combination group

2.4 各实验组细胞内活性氧水平检测

细胞经 GO-201、放射线以及 GO-201+放射线处理后,细胞内活性氧相对含量均较对照组升高,差异具有统计学意义($F=105.072, P=0.000$)。且 GO-201+放射线组细胞内活性氧含量较 GO-201 组、放射线组升高,差异具有统计学意义($P=0.000$)(图 4、表 2)。

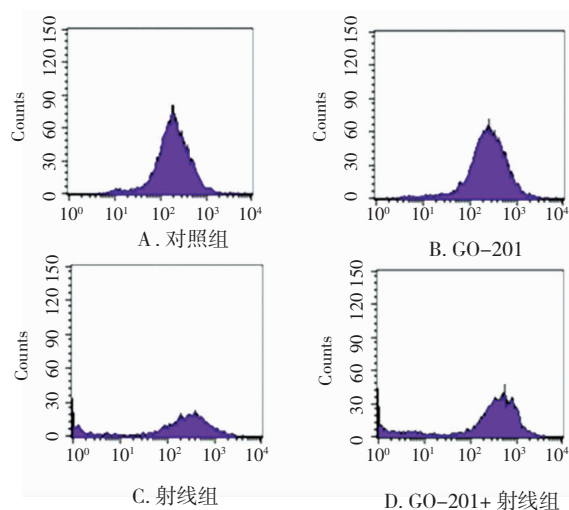


图 4 流式检测各实验组活性氧含量

Fig.4 Ros content in each group detected by FCM

表 2 各实验组细胞内活性氧含量及 MnSOD 蛋白表达量

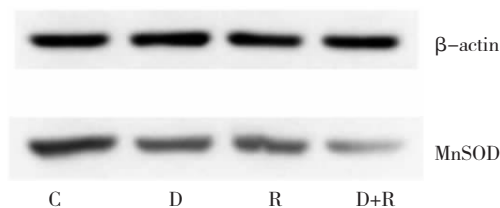
Tab.2 Ros content and MnSOD expression in each group

组别	对照组	GO-201组	射线组	GO-201+射线组	F 值	P 值
活性氧含量	1.00 ± 0.00	1.31 ± 0.11^a	1.43 ± 0.06^a	2.02 ± 0.07^{abc}	105.072	0.000
MnSOD表达量	1.12 ± 0.20	0.61 ± 0.04^a	0.56 ± 0.07^a	0.35 ± 0.02^{abc}	29.173	0.000

注:采用 LSD- t 法比较, a 表示与对照组比较差异有统计学意义; b 表示与 GO-201 组比较差异有统计学意义; c 表示与射线组比较差异有统计学意义

2.5 各处理组细胞内蛋白水平表达变化

Western blot 显示,细胞经 GO-201、放射线以及 GO-201+放射线处理后,MnSOD 蛋白表达量均较对照组降低(图 5),差异具有统计学意义($F=29.173, P=0.000$)。且 GO-201+放射线组蛋白表达水平较 GO-201 组以及放射线组降低,差异具有统计学意义(P 值分别为 0.000、0.009)(表 2)。



C: 对照组; D: GO-201; R: 射线组; D+R: GO-201+ 射线组

图 5 Western blot 检测细胞内 MnSOD 蛋白表达

Fig.5 MnSOD expression in A549 cells detected by Western blot

3 讨论

肺癌是世界范围内最为常见的恶性肿瘤之一,其治疗需要采用综合治疗手段,放疗作为肺癌治疗的一种重要手段,可用于早期、局部晚期以及晚期患者的姑息减症治疗。但临床上常遇到某些患者由于肿瘤体积过大,血供不良,导致肿瘤细胞缺氧,对射线表现出抗拒,限制放疗疗效的进一步提高。因此,寻找一种理想的放疗增敏剂以增加肿瘤细胞对射线的敏感性,成为当前抗肿瘤研究的热点。

MUC1 属于黏蛋白家族成员之一,在乳腺癌、肺癌、胰腺癌、前列腺癌及某些血液系统恶性肿瘤中异常过表达,可通过激活多种信号传导通路以促进细胞生长及肿瘤进展^[9]。MUC1-CT 中的 CQC 区域二聚体化是其转位到胞核及线粒体发挥癌基因功能的前提,GO-201 是一种含有 CQC 区域的小分子短肽抑制剂,具有与 MUC1-CT 的 CQC 区域竞争性结合、阻滞 MUC1-CT 二聚体化及其下游信号通路传导功能^[7]。

有研究报导 GO-201 可通过阻止 MUC1-CT 介导的 PI3K-AKT^[8]、STAT3^[10] 信号通路的激活,从而抑制细胞生长、促进细胞死亡、导致肿瘤退化。本研究通过 MTT 细胞增殖实验及平板克隆形成实验发现 MUC1-CT 抑制剂 GO-201 可明显抑制体外培养的人肺腺癌 A549 细胞增殖能力,表现出时间与剂量

依赖性;且与射线联用在抑制肿瘤细胞集落形成率上具有协同作用,联合组的存活曲线较对照组整体下移,各亚剂量点的存活分数均低于单独射线组,表现出放疗增敏作用。

正常细胞在代谢过程中可产生活性氧,其可介导某些生长因子以及活化的 Ras 所诱导的细胞有丝分裂作用。当细胞内活性氧水平升高超过细胞还原能力时,将会对细胞内 DNA、蛋白质以及脂质造成损伤。放射生物学研究发现组织在有氧的条件下照射时可以产生过氧化物自由基,后者攻击生物靶分子,阻止靶分子损伤的修复,从而提高靶分子对射线的敏感性,加重机体的放射损伤效应。细胞内存在着抗氧化酶(如超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶 GPX)以及非酶(如还原性谷胱甘肽 GSH)防护机制来清除代谢过程中不断产生的活性氧以维持氧化还原平衡。其中,MnSOD 被认为是一种比较重要的酶,在抵抗由电离辐射产生的活性氧所诱导的细胞致死性损伤中发挥着重要作用。

本实验流式及 Western blot 结果表明细胞经 GO-201 与射线联合作用后,活性氧水平较对照组明显升高,MnSOD 表达明显降低。Ahmad 等的研究^[11]发现 MUC1-CT 可占据 NF-KB 抑制剂 IKBα 结合位点,促使 NF-KB 活化入核及其下游基因转录,且抑制 MUC1-CT 二聚体化可阻滞 NF-KB 信号通路的活化;而 NF-KB 的活化可激活 MnSOD 基因转录^[12],由此推测 MUC1-CT 可能通过激活 NF-KB 信号通路上调 MnSOD 的表达,降低细胞内活性氧水平;而 GO-201 可通过抑制 MUC1-CT 二聚体化,阻滞 NF-KB 活化入核及其下游信号传导,继而影响细胞内活性氧水平,发挥其放射增敏作用。

综上所述 MUC1-CT 胞内段抑制剂可通过下调 MnSOD 蛋白表达,升高细胞内活性氧水平,进而增加射线对体外培养的人肺腺癌 A549 细胞的杀伤作用。至于涉及的具体基因调节过程及信号传导通路需要进一步探讨。本研究需体内实验进一步验证,以期临床肺腺癌治疗提供一种新的思路。

参 考 文 献

- [1] Situ D, Wang J, Ma Y, et al. Expression and prognostic relevance of MUC1 in stage IB non-small cell lung cancer [J]. Med Oncol, 2011, 28 (s1): 596-604.