

· 基础研究 ·

靶向干扰细胞周期检验点激酶 2 增强 5-氟尿嘧啶对鼻咽癌细胞 SUNE-1 的毒性作用研究

潘宇¹, 蔡飒², 朱杰宁¹, 林秋熊¹, 余细勇¹

(¹广东省人民医院, 广东省医学科学院医学研究中心, 广州 510080; ²深圳大学医学院组织胚胎学教研室, 深圳 518060)

【摘要】目的 探讨靶向抑制细胞周期检验点激酶 2 (Chk2) 对 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 抗鼻咽癌鳞状上皮细胞 SUNE-1 的增敏作用。**方法** 根据 Chk2 基因设计 siRNA 干扰序列, 在 mRNA 和蛋白水平检测其干扰效果; 通过细胞生长曲线观察 Chk2 siRNA 对 SUNE-1 细胞增殖能力的影响; 通过细胞毒性试验检测 Chk2 siRNA 是否影响 SUNE-1 细胞对代谢类抗肿瘤药 5-FU 的敏感性; 采用 Annexin V/PI 双染方法检测细胞凋亡的变化情况。**结果** 所采用的 siRNA 在 mRNA 和蛋白水平均显著降低 SUNE-1 细胞中 Chk2 表达, 验证了该 siRNA 的干扰效果; Chk2 siRNA 对 SUNE-1 细胞增殖能力无显著影响, 但能显著增强 5-FU 的细胞毒作用 ($P < 0.05$); 细胞凋亡检测结果显示, Chk2 siRNA 显著增加 5-FU 引起的 SUNE-1 细胞凋亡水平。**结论** 尽管 Chk2 对 SUNE-1 细胞生存和增殖不发挥关键作用, 但在 5-FU 引起的细胞损伤中对细胞起保护作用, 该作用与其抑制 5-FU 引起的细胞凋亡有关, 因此 Chk2 可成为在鼻咽癌治疗中增强 5-FU 的疗效的靶点。

【关键词】 抗肿瘤药; 鼻咽癌; 5-氟尿嘧啶; 细胞周期检验点激酶; RNA 干扰

【中图分类号】 R730.53

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2012.00053

Enhanced sensitivity of nasopharyngeal carcinoma SUNE-1 cells to 5-FU by Chk2 knockdown

PAN Yu¹, CAI Sa², ZHU Jiening¹, LIN Qiuxiong¹, YU Xiyong¹

(¹Research Center of Medical Sciences, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangdong General Hospital, Guangzhou 510080, China. ²Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

【Abstract】 Objective To investigate the chemosensitization of Chk2 inhibition to 5-FU against nasopharyngeal squamous epithelial cell line SUNE-1. **Methods** Chk2 siRNA was designed according to the mRNA sequence of Chk2, and its effect was confirmed by RT-PCR and Western blotting in SUNE-1 cells. Cell growth assay was evaluated to determine the impact of Chk2 siRNA on the proliferation ability of SUNE-1 cells and MTT assay was used to determine the chemosensitization of Chk2 siRNA to 5-FU. Finally, apoptotic cells was stained with Annexin V/PI and examined by flow cytometry. **Results** Chk2 siRNA significantly reduced mRNA and protein levels of Chk2 in SUNE-1 cells, which confirmed the knockdown effect of Chk2 siRNA. Cell growth assay showed that Chk2 siRNA did not influence the proliferation of SUNE-1 cells. However, Chk2 knockdown significantly enhanced the cytotoxicity and apoptosis of SUNE-1 cells caused by 5-FU. **Conclusion** Chk2 hinders the toxic effect of 5-FU on SUNE-1 cells, which can be enhanced by Chk2 inhibition. Therefore, Chk2 can be proposed as a target to increase the effect of chemotherapeutic agent, such as 5-FU, in clinical treatment on nasopharyngeal carcinoma.

【Key words】 antineoplastic agents; nasopharyngeal carcinoma; 5-FU; Chk2; RNA interference

This work was supported by National Natural Science Foundation of China(81000835, 81000011) and Natural Science Foundation of Guangdong Province(10451018201004913)

作为目前常用的广谱抗肿瘤药之一, 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 广泛用于治疗多种实体肿瘤, 如鼻咽癌、消化道肿瘤、乳腺癌、卵巢癌、膀

胱癌等。5-FU 属尿嘧啶抗代谢药, 其药理作用主要是通过抑制细胞 DNA 的合成, 引起 DNA 受损, 从而干扰肿瘤细胞的增殖。然而与多数肿瘤化疗药相

收稿日期: 2012-02-14; 修回日期: 2012-03-14

基金项目: 国家自然科学基金(81000835, 81000011); 广东省自然科学基金(10451018201004913)

通讯作者: 余细勇, Tel: 020-83827812, E-mail: yuxycn@hotmail.com

似, 5-FU 具有骨髓抑制等多种毒副作用, 可在用药期间诱发患者严重不良反应。如何增加恶性肿瘤细胞对于该类化疗药物敏感性、增强药效、减少用药剂量和毒副反应的发生一直是抗肿瘤治疗研究的重要课题^[1]。

细胞周期检验点是机体细胞应答 DNA 损伤的主要机制之一, 其作用是在细胞增殖周期中保证 DNA 的完整性。DNA 损伤可激活细胞周期检验点, 进而导致周期阻滞和 DNA 修复。对于恶性肿瘤细胞来说, 细胞周期检验点介导 DNA 损伤修复的作用可降低化疗药物对细胞的杀伤作用, 进而导致肿瘤耐药^[2-5]。因而, 以细胞周期检验点或 DNA 修复机制中关键蛋白为靶点的肿瘤治疗策略可克服细胞周期检验点对化疗药物作用的影响, 从而增加肿瘤对 DNA 损伤剂的敏感性^[6,7]。

细胞周期检验点激酶 2 (cell cycle checkpoint kinase 2, Chk2) 在细胞周期检验点中非常关键, 通常对于 DNA 双链断裂等类型的损伤有较明显的应答作用, 有关 Chk 抑制剂增加肿瘤细胞对 DNA 损伤剂敏感性的研究亦受到广泛关注^[8,9]。本文通过抑制 Chk2 表达, 观察其对 5-FU 抗鼻咽癌细胞的细胞毒性影响。

1 材料与方法

1.1 药品

5-FU 购于 Sigma 公司。鼻咽低分化鳞状上皮细胞癌细胞系 SUNE-1 由中山医科大学肿瘤研究所惠赠, 本室保存, 以含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 37℃、5% CO₂ 培养。

1.3 RNA 干扰序列设计

根据 GenBank 中提供的 Chk2 基因序列设计针对 Chk2 的 siRNA 序列 (广州锐博生物有限公司合成): 5'-GAACCTGAGGACCAAGAACdTdT-3'; 选择不针对任何基因的 siRNA 序列 (mock siRNA) 作为阴性对照: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGdTdT-3'。

1.4 细胞转染:

使用 Lipofect AMINETM2000 脂质体 (Life Technologies 公司, 美国) 进行转染, 所有操作按产品说明书进行。转染后 48h 进行基因干扰效果测定。

1.5 细胞生长抑制实验

采用磺酰罗丹明 B (Sulforhodamine, SRB) 法检测药物的细胞毒作用。将处于对数生长期的贴壁细胞以 200 μL/孔接种于 96 孔培养板, 贴壁生长 24h 后转染 siRNA, 后于 37℃、5% CO₂ 条件下培养 48h。

取出培养板, 每孔加入 50% (m/V) 的三氯乙酸 50 μL 固定细胞, 4℃放置 1h。弃固定液, 用蒸馏水洗涤 5 次, 空气中自然干燥。每孔加 SRB 溶液 100 μL, 室温下放置 10~30 min。去上清液, 1% 醋酸洗涤 5 次, 空气干燥。最后加入 150 μL/孔的 Tris 溶液, 于平板振荡器上振荡 5 min。酶联免疫检测仪 (Model 3550, Bio-Rad) 于 515 nm 处测定 OD 值。设置三个复孔。

1.6 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡

根据 Annexin V/PI 双染试剂盒说明书 (Biovision 公司, 美国) 进行操作, 流式细胞监测仪检测 Annexin V 阳性的凋亡细胞。

1.7 Western blot 方法检测 Chk2 表达

细胞转染 siRNA 48h 和 72h 后, 用 PBS 冲洗 2 遍, 加入细胞裂解液, 4℃裂解 20 min, 12 000 g 4℃离心 15 min, 收集上清液, Bradford 法测蛋白浓度。将样品加入到样品槽中, 进行电泳。电泳完毕后, 在半干转膜仪上转膜。之后, 依次室温振摇封闭 2h、一抗室温孵育 2h、相应的二抗孵育 1h。洗膜后化学发光增强剂进行显影。以 β-actin 作为内参对照。

1.8 RT-PCR 方法检测 Chk2 mRNA 水平

细胞转染 siRNA 48h 和 72h 后, 采用 TRIzol (Invitrogen 公司, 美国) 提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和质量。采用 Super-Script™ 一步法 RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen 公司, 美国) 对 mRNA 水平进行检测。反应体系为 25 μL, 扩增反应时加入总 RNA 1 μg 作为模板。反应条件如下: 50℃×30 min 反转录, 之后 94℃×30 s, 56℃×30 s, 72℃×45 s, 39 个循环, 最后延伸反应 72℃×10 min。以 GAPDH 作为内参对照。反应完成后将产物进行琼脂糖电泳, 凝胶成像仪照相并分析结果。RT-PCR 引物如下: GAPDH 上游引物 5'-CGGAGTCAACGGA-TTTGGTCGTAT-3', GAPDH 下游引物 5'-GTCTT-CACCACCATGGAGAAGGCT-3'; Chk2 上游引物 5'-ATGTCTCGGGAG TCGGATGT-3', Chk2 下游引物 5'-TCTTGCTGTATGTTTCGGTAT-3'。

1.9 统计学处理

采用 SPSS12.0 软件进行单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SUNE-1 细胞中 Chk2 siRNA 干扰效果检测

将 Chk2 siRNA 转染 SUNE-1 细胞, 48h 后通过 RT-PCR 方法检测细胞内 Chk2 mRNA 水平, Western Blot 法检测蛋白的表达水平, 从而明确干扰效果。

结果表明, Chk2 siRNA 序列可显著降低细胞中 Chk2 的 mRNA 与蛋白水平, 而 mock siRNA 不影响细胞内 Chk2 水平 (图 1)。

2.2 Chk2 siRNA 对 SUNE-1 细胞增殖的影响

将 siRNA 转染后的细胞接种到 24 孔板中, 设置三个复孔, 每天计数各组细胞数, 至转染后 6d。结果显示, Chk2 siRNA 对细胞增殖能力无显著影响 ($P > 0.05$; 图 2)。

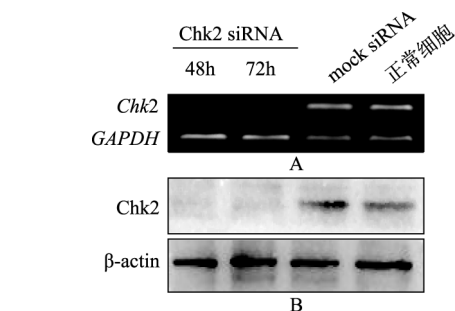


图 1 Chk2 siRNA 干扰效果检测
Figure 1 Knockdown effect of Chk2 siRNA
A: Chk2 mRNA; B: Chk2 蛋白

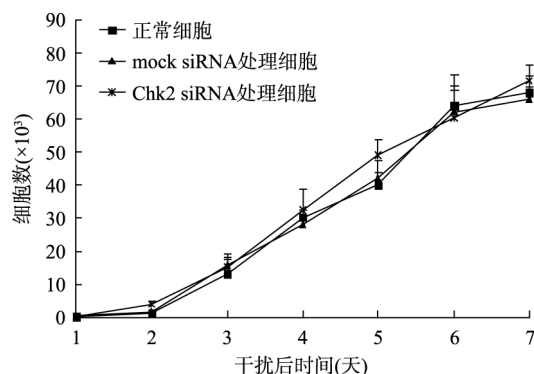


图 2 Chk2 siRNA 对 SUNE-1 细胞增殖作用的影响
Figure 2 Effect of Chk2 siRNA on proliferation of SUNE-1

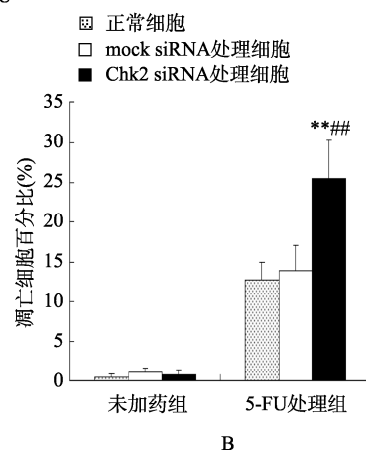
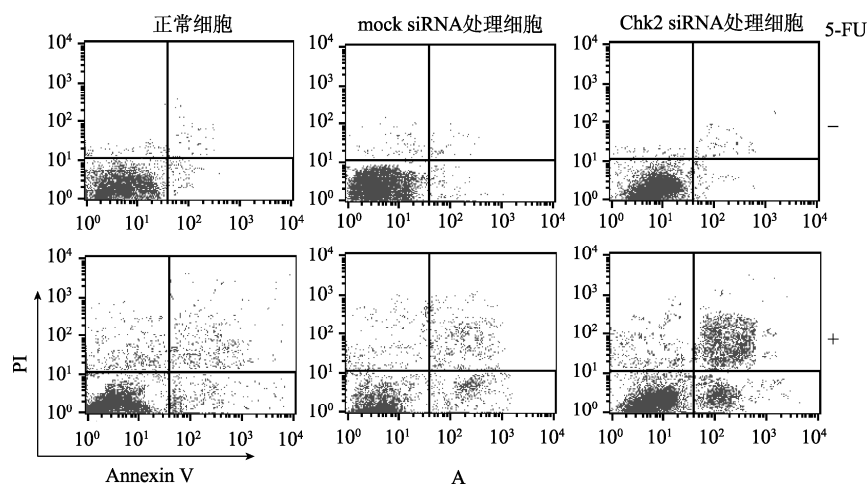


图 4 Chk2 siRNA 对 5-FU 致 SUNE-1 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of Chk2 siRNA on SUNE-1 apoptosis induced by 5-FU

A: 流式细胞仪检测细胞凋亡; B: 细胞凋亡百分比。与正常细胞比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 mock siRNA 处理细胞比较, $#P < 0.05$, $##P < 0.01$

2.3 Chk2 siRNA 增加 SUNE-1 细胞对 5-FU 的敏感性

将 siRNA 转染 SUNE-1 细胞后, 用不同浓度 5-FU (0.05, 0.25, 1.25, 6.25 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞后 48 h 收集细胞, 检测不同 siRNA 对 5-FU 细胞毒性的影响。结果显示, Chk2 干扰可增强 5-FU 对 SUNE-1 细胞的细胞毒作用。说明 Chk2 在 5-FU 诱导激活的 DNA 损伤应答中发挥重要作用, 抑制 Chk2 可增加 SUNE-1 细胞对 5-FU 的敏感性 (图 3)。

2.4 Chk2 siRNA 增加 5-FU 引起的 SUNE-1 细胞凋亡

将 siRNA 转染 SUNE-1 细胞后, 以 5-FU 处理细胞, 48h 后收集细胞, 进行 Annexin V /PI 双染检测细胞凋亡水平。结果显示, Chk2 siRNA 单独处理并不引起 SUNE-1 细胞发生细胞凋亡, 但是可以显著增强 5-FU 引起的细胞凋亡水平 (图 4)。

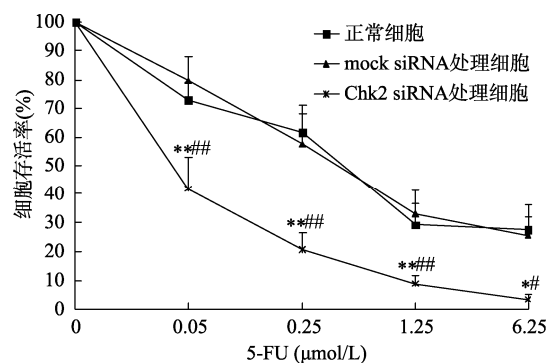


图 3 Chk2 siRNA 显著增强 SUNE-1 对 5-FU 的敏感性
Figure 3 Chk2 siRNA significantly enhanced sensibility of SUNE-1 to 5-FU

与正常细胞比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 mock siRNA 处理细胞比较, $#P < 0.05$, $##P < 0.01$

3 讨 论

细胞对 DNA 损伤的应答主要是通过 ATR/ATM-Chk1/2 细胞周期检验点通路来调节^[3]。ATM 和 ATR 是周期检验点网络中主要的上游信号传递分子,属于 PI3K 类激酶(phosphoinositide 3-kinase-like kinase, PI3K)家族成员。活化的 ATM 进一步激活 Chk1/2 及其下游激酶,进而导致周期阻滞。作为细胞周期检验点中的关键激酶,Chk1 和 Chk2 在细胞 DNA 损伤的应答反应中具有重要作用,因此抑制其功能有利于提高 DNA 损伤剂对于细胞的杀伤毒性^[7-9]。然而,Chk 抑制剂对特定 DNA 损伤剂是否具有增敏作用与 DNA 损伤剂类型、肿瘤细胞系等多种因素有关^[10-15]。5-FU 作为一种抗代谢类抗肿瘤药,在多种肿瘤细胞中被证明可激活 Chk2,因此我们选择 5-FU 来研究抑制 Chk2 对其的增敏作用。

本研究中,我们通过 siRNA 干扰有效地抑制了 Chk2 在人鼻咽癌鳞状上皮细胞癌细胞株 SUNE-1 中的表达。Chk2 干扰并未显著影响细胞的增殖速度和细胞增殖能力,亦未导致细胞凋亡,这与其他成体细胞中的结果相符^[16-18],说明 Chk2 在细胞正常增殖过程中并不发挥主要作用,因此,对 Chk2 的抑制性治疗不会对正常细胞产生危害,为这种治疗策略提供了支持。而 Chk2 干扰明显增加了 SUNE-1 细胞对 5-FU 的敏感性,且该作用与 5-FU 所致的细胞凋亡诱导抑制有关,这可能是因为 Chk2 抑制造成细胞周期检验点异常,使之不能有效修复 5-FU 造成的 DNA 损伤,从而导致细胞对 DNA 损伤敏感性增强,这说明,Chk2 在 5-FU 引起的细胞损伤中对细胞起保护作用,而 Chk2 可成为鼻咽癌治疗中增强 5-FU 疗效的靶点。本研究为以细胞周期检验点蛋白为靶点的 5-FU 抗肿瘤增敏疗法提供了依据,为提高该类化疗药物的疗效、减少毒副反应奠定了分子生物学基础。

【参考文献】

- [1] Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(3): 188-200.
- [2] Kohn KW, Jackman J, O'Connor PM. Cell cycle control and cancer chemotherapy[J]. *J Cell Biochem*, 1994, 54(4): 440-452.
- [3] Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer[J]. *Science*, 1994, 266(5192): 1821-1828.
- [4] Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 316-323.
- [5] Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective[J]. *Nature*, 2000, 408(6811): 433-439.
- [6] 潘宇,邵荣光. 靶向细胞周期检验点的肿瘤治疗[J]. *解放军医学杂志*, 2008, 33(11): 1397-1399.
- [7] Pan Y, Ren KH, He HW, *et al.* Knockdown of Chk1 sensitizes human colon carcinoma HCT116 cells in a p53-dependent manner to lidamycin through abrogation of a G2/M checkpoint and induction of apoptosis[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(16): 1559-1566.
- [8] Helleday T, Petermann E, Lundin C, *et al.* DNA repair pathways as targets for cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(3): 193-204.
- [9] Ashwell S, Zabludoff S. DNA damage detection and repair pathways--recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(13): 4032-4037.
- [10] Mukhopadhyay UK, Senderowicz AM, Ferbeyre G. RNA silencing of checkpoint regulators sensitizes p53-defective prostate cancer cells to chemotherapy while sparing normal cells[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2872-2881.
- [11] Flatten K, Dai NT, Vroman BT, *et al.* The role of checkpoint kinase 1 in sensitivity to topoisomerase I poisons[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(14): 14349-14355.
- [12] Carrassa L, Brogini M, Erba E, *et al.* Chk1, but not Chk2, is involved in the cellular response to DNA damaging agents: differential activity in cells expressing or not p53[J]. *Cell Cycle*, 2004, 3(9): 1177-1181.
- [13] Playle LC, Hicks DJ, Qualtrough D, *et al.* Abrogation of the radiation-induced G2 checkpoint by the staurosporine derivative UCN-01 is associated with radiosensitisation in a subset of colorectal tumour cell lines[J]. *Br J Cancer*, 2002, 87(3): 352-358.
- [14] Sugiyama K, Shimizu M, Akiyama T, *et al.* UCN-01 selectively enhances mitomycin C cytotoxicity in p53 defective cells which is mediated through S and/or G(2) checkpoint abrogation[J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(5): 703-709.
- [15] Karnitz LM, Flatten KS, Wagner JM, *et al.* Gemcitabine-induced activation of checkpoint signaling pathways that affect tumor cell survival[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(6): 1636-1644.
- [16] Zachos G, Rainey MD, Gillespie DA. Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects[J]. *EMBO J*, 2003, 22(3): 713-723.
- [17] Chen Z, Xiao Z, Chen J, *et al.* Human Chk1 expression is dispensable for somatic cell death and critical for sustaining G2 DNA damage checkpoint[J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2(6): 543-548.
- [18] Zhang WH, Poh A, Fanous AA, *et al.* DNA damage-induced S phase arrest in human breast cancer depends on Chk1, but G2 arrest can occur independently of Chk1, Chk2 or MAPKAPK2[J]. *Cell Cycle*, 2008, 7(11): 1668-1677.

(编辑:任开环)