

抑制磷酸腺苷激活的蛋白激酶活性增强人鼻咽癌细胞放射敏感性*

卢小迪,朱小东[△],赵伟,曲颂,梁霞,苏芳,马慧

(广西医科大学附属肿瘤医院/广西壮族自治区肿瘤医院放疗科,南宁 530021)

摘要:目的 研究磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)活化程度对人鼻咽癌(NPC)细胞放射敏感性的影响。方法 应用 AMPK 活化抑制剂 Compound C(CC)处理人 NPC CNE-2 细胞 1 h 后,给予 X 线照射,48 h 后 Western blot 检测总 AMPK(t-AMPK)、磷酸化 AMPK(p-AMPK)及自噬标志物 MAP1LC3 的变化;透射电子显微镜检测自噬小体形成情况。经不同药物干预后的 CNE-2 细胞给予 X 线照射 48 h 后四甲基偶氮唑盐(MTT)和流式细胞技术检测两组细胞活力和凋亡变化。结果 CNE-2 细胞经 CC 干预后 t-AMPK 未发生明显变化($P>0.05$),而活化状态的 AMPK,即 p-AMPK 表达显著降低($P<0.01$),且自噬标志物 MAP1LC3 的表达量显著降低($P<0.05$),自噬小体数量明显减少($P<0.05$);CNE-2 细胞经 CC 干预后进行 X 线照射可明显抑制其增殖并促进细胞凋亡($P<0.05$)。结论 CC 可通过抑制细胞自噬来增强放射线对 NPC CNE-2 细胞增殖抑制和凋亡促进作用,从而增强 NPC 的放射敏感性。

关键词:AMPK;抑制剂;鼻咽癌;放射敏感性;自噬

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)22-2900-03

Suppression of Amp activated protein kinase activity enhance the radiosensitivity of human nasopharyngeal carcinoma cells*

Lu Xiaodi, Zhu Xiaodong[△], Zhao Wei, Qu Song, Liang Xia, Su Fang, Ma Hui

(Department of Radiotherapy, Cancer Hospital of Guangxi Medical University & Cancer Institute of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Amp activated protein kinase(AMPK)activity in radiosensitivity of human nasopharyngeal carcinoma cells. **Methods** Human nasopharyngeal carcinoma cells, CNE-2, were treated with AMPK inhibitor, Compound C(CC), for 1 h. Then cells were explored in X-ray. The expression of total AMPK(t-AMPK), phosphorylation AMPK(p-AMPK), and MAP1LC3 were detected by Western blot. The number of autophagosomes were observed and calculated by transmission electron microscope(TEM). Cells processed with CC were explored in X-ray. MTT assay was used to detect the difference of two groups in cell proliferation. Cell apoptosis were assayed by flow cytometry. **Results** The expression of p-AMPK in CC group cells were significantly downregulated compared to the negative control group cells($P<0.01$), while no significant change of t-AMPK expression were found($P>0.05$). The expression of MAP1LC3 and the number of autophagosomes in CC group cells were significantly decreased compared to the control group cells($P<0.05$). Correspondingly, the cell proliferation rate in CC group was lower than in control group, and the percent of apoptosis cells was higher in CC group than in control group($P<0.05$). **Conclusion** Suppression of AMPK activity could inhibited autophagy induced by decreasing the degree of p-AMPK, then enhanced the effect of proliferation inhibition and apoptosis promotion in CNE-2 cells. The AMPK inhibitor, CC, can serve as an effective assistant treatment of radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma.

Key words: AMPK; inhibitor; nasopharyngeal carcinoma; radiosensitivity; autophagy

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma, NPC)是一种鼻咽部上皮细胞来源的恶性肿瘤,恶性程度较高^[1]。目前公认和有效的治疗手段为放射治疗,或以放疗为主的综合治疗^[2]。然而, NPC 组织中存在一定比例的放射抗拒细胞^[3],放射抗拒已严重制约了鼻咽癌的疗效。磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是细胞内的重要的能量感受酶,它可以敏感地发现细胞内三磷酸腺苷(ATP)水平的降低,并发生磷酸化成为活化状态的 AMPK^[4]。研究发现^[5],增强 AMPK 的活化程度可增强肿瘤细胞的自噬(autophagy),以保障肿瘤细胞在恶劣环境下的生长繁殖,其结果使肿瘤细胞对放疗的抵抗作用增强,出现肿瘤耐药等表现^[6-7]。前期实验已证明,照射可诱导鼻咽癌细胞发生自噬^[8]。本研究采用

AMPK 特异性活化抑制剂 Compound C(CC)处理人鼻咽癌 CNE-2 细胞,检测细胞自噬状态的变化,进而研究联合 AMPK 活化抑制剂及放射线对 CNE-2 细胞的生物学作用和分子机制,为提高鼻咽癌放射敏感性提供新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人 NPC CNE-2 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;RPMI-1640 培养基及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购自美国 Gibico 公司;Compound C(CC, 171260)购自美国 Merck 公司;四甲基偶氮唑盐[3-(4,5)-dimethylthiaziazol(4-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]以及二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 Roche 公司;异硫氰酸荧光素标记重组粘连蛋白-5(人)蛋白抗体(An-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160285);广西壮族自治区自然科学基金资助项目(桂科自 2010gxnsfa013240);2012 年广西研究生创新计划项目(YCBZ2012017)。作者简介:卢小迪(1982-),博士,住院医师,主要从事鼻咽癌放射治疗的基础与临床方向研究。△ 通讯作者, Tel:13978873616; E-mail:zhuxiaodong83@163.com。

nexin V-FITC) 凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 兔抗人 AMPK α 单克隆抗体(23A3)、兔抗人磷酸化 p-AMPK α (T172) 单克隆抗体(40H9)、兔抗人 β -actin 单克隆抗体(13E5) 及抗兔红外荧光二抗均购自美国 CST 公司; 兔抗人微 MAP1LC3 单克隆抗体(L7543) 购自美国 Sigma 公司; RIPA 蛋白裂解液试剂盒及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; Precise LINAC 高能直线加速器, 购自瑞典 Elekta 公司; H-600IV 透射电子显微镜购自日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 CNE-2 细胞接种于含 10% 胎牛血清(FBS) 的 RPMI-1640 培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 饱和湿度培养箱中培养, 稳定传代 2~3 代后, 取对数生长期细胞进行下一步实验。

1.2.2 药物干预 采用 AMPK 活化抑制剂 CC 处理 CNE-2 细胞。前期实验证实, 采用终浓度为 20 μ mol/L 的 CC 处理 CNE-2 细胞 1 h, 可有效降低 AMPK α 的磷酸化水平。实验分组: (1)CC 组: 加入 DMSO 溶解的 CC 及培养液; (2)对照组: 加入 DMSO 及培养液。实验步骤: 用无抗菌药物、含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液将细胞接种于培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养至细胞融合度达到 70%, 0.01 mol PBS 清洗 2 次后更换无抗菌药物、无血清的 RPMI-1640 培养液。CC 组加入 DMSO 溶解 CC 至终浓度为 20 μ mol/L; 对照组加入等量 DMSO。两组细胞均于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 饱和湿度培养箱中培养 1 h。

1.2.3 Western blot 检测 取处理后的 CNE-2 细胞, 弃去培养基, 用 0.01 mol 的 PBS 缓冲液漂洗细胞 3 次, 加入预混的 RIPA 裂解液置于冰上 30 min 充分裂解细胞, 收集裂解液于 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min 后取上清, BCA 法测定总蛋白浓度。电泳前将蛋白样品按 4 : 1 比例加入 5 \times Loading Buffer, 100 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后即 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE) 凝胶电泳, 湿转至 0.22 μ m 聚偏氟乙烯(PVDF) 膜。TBST 溶解的 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入 1 : 1 000 稀释的 t-AMPK α 一抗、p-AMPK α 一抗、MAP1LC3 一抗及 β -actin 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次(5 min/次) 后加入适当(1 : 5 000) 浓度的二抗, 室温孵育 1 h。TBST 漂洗 3 次(5 min/次)。Odyssey 凝胶成像系统(美国 LI-COR 公司) 扫描成像, 进行灰度分析。每个独立实验重复 3 次。

1.2.4 透射电子显微镜下观察 CNE-2 细胞经照射处理后, 用 0.25% 胰酶消化, 800 r/min 离心 5 min, 然后用 0.01 mol PBS 洗 2 次, 用 3% 戊二醛 PBS, 4 $^{\circ}$ C 下前固定 24 h, 再用 1% 锇酸 PBS 作用后固定。30%~100% 乙醇逐级脱水处理(70% 乙醇含 3% 醋酸双氧铀), 环氧树脂包埋, 超薄切片, 再用醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色。透射电子显微镜观察不同处理组的 CNE-2 细胞的自噬现象, 选取 1 个视野随机计数 6~8 个细胞内的自噬体的数量, 并计算每个细胞内的自噬体的平均数。每个独立实验重复 3 次。

1.2.5 射线干预 经 CC 处理 1 h 后的 CNE-2 细胞, 采用 6 MV X 射线照射, 源靶距(SSD)=100 cm, 剂量率 200 cGy/min, 照射后更换新鲜无抗菌药物、含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液。

1.2.6 细胞凋亡检测 取照射后的 CNE-2 细胞, 用 0.01 mol PBS 洗涤细胞 1 次, 再用 0.25% 胰酶消化液解离细胞, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液收集细胞。用 PBS 重新悬浮细胞,

并计数。每组取(1~5) $\times 10^5$ 细胞悬浮液并设 3 个重复, 800 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 加入 500 μ L 的 1 \times Binding Buffer。加入 5 μ L Annexin V-FITC, 再加入 10 μ L Propidium Iodide, 轻轻吹打混匀。在室温下, 避光反应 15 min 后进行流式细胞仪检测。每个独立实验重复 3 次。

1.2.7 MTT 检测 收集对数期 CNE-2 细胞, 用 RPMI-1640 培养基重悬, 调整细胞密度约为 2 $\times 10^5$ /mL, 以 200 μ L/孔接种于 96 孔板中, 贴壁后 CC 组加入 CC 至终浓度为 20 μ mol/L, 对照组加入等体积 DMSO, 培养 1 h 后, 6 MV X 射线照射, 源靶距(SSD)=100 cm, 剂量率 200 cGy/min。96 孔板的左上孔为空白孔, 只加培养基, 不加 MTT 及细胞, 每组设 6 个复孔。每孔加 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 继续避光培养 4 h, 弃上清液, 每孔加 DMSO 150 μ L, 37 $^{\circ}$ C 振荡孵育 20 min 至颗粒溶解。于酶标仪上测定各孔 570 nm 处吸光度 OD 值, 计算各处理组细胞活性: 细胞活性=实验组 OD 均值/对照组 OD 均值 $\times 100\%$ 。每个独立实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CC 降低 CNE-2 细胞内 AMPK α 的活化水平 CC 组经 CC 处理后, 其细胞内 t-AMPK α 与对照组比较无明显变化($P > 0.05$), 而 p-AMPK α 的表达水平显著降低($P < 0.01$)。见图 1A。

2.2 降低 p-AMPK α 表达可抑制 CNE-2 细胞自噬作用 为研究 p-AMPK α 的表达与 CNE-2 细胞自噬的关系, 本实验采用 Western blot 检测了细胞自噬的分子标志物 MAP1LC3 的表达, 并应用透射电子显微镜观察细胞内自噬小体的数量。结果显示, 与对照组相比, 经 CC 处理的 CNE-2 细胞, 其自噬标志物 MAP1LC3 的表达水平明显降低($P < 0.05$), 并伴随细胞内自噬小体的数量明显减少(5.1 ± 0.79 vs 8.6 ± 1.02), $P < 0.05$ 。见图 1B、图 2。

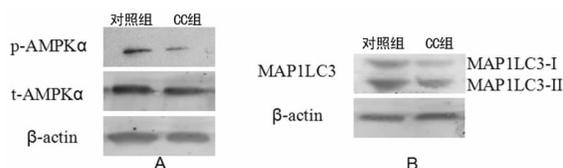
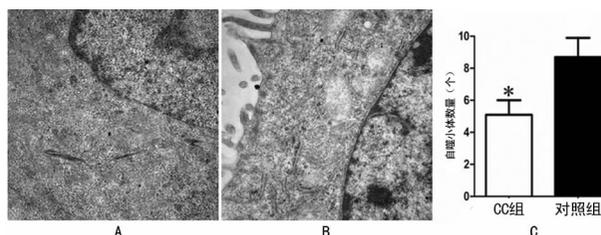


图 1 不同干预措施对 p-AMPK α 、t-AMPK α 、MAP1LC3 表达的影响



A: CC 组($\times 40 000$); B: 对照组($\times 40 000$); C: 两组自噬小体形成数量分析图。

图 2 不同干预措施对自噬小体形成数量的影响

2.3 CC 增强放射线抑制 CNE-2 细胞增殖作用 为验证 CC 对放射线抑制 CNE-2 细胞增殖的调控作用, 可采用 MTT 试验检测处理后 24、48、72 h 细胞增殖率变化, 结果显示, CC 干预后的 CNE-2 细胞, 在经放射线照射后, 其增殖能力较对照组

细胞显著降低($P < 0.05$)。见图 3A。

2.4 CC 增强放射线诱导 CNE-2 细胞凋亡作用 为进一步研究 CC 与放射线对诱导 CNE-2 细胞凋亡是否有协调作用,通过流式细胞仪检测了处理 48 h 后的凋亡细胞比例。结果显示,CC 干预后的 CNE-2 细胞,在经放射线照射后,其凋亡细胞比例较对照组细胞显著升高(17.38 ± 0.76 vs 26.93 ± 2.07), $P < 0.05$ 。见图 3B。

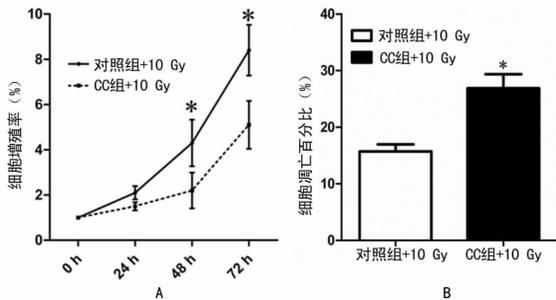


图3 不同干预措施对 CNE-2 细胞增殖和凋亡的影响

3 讨论

鼻咽癌是来源于鼻咽上皮细胞的恶性肿瘤,其分布具有鲜明的地域性,在中国南方、东南亚、北非发病率极高^[9],尤其在广东,男女发病率均较高,因此鼻咽癌又有“广东瘤”之称^[10]。鼻咽癌是恶性程度极高的恶性肿瘤,形态多样,绝大多数为低分化鳞癌^[11],并易于临近及远处器官转移,难以行手术根治,预后较差,严重危害人民群众健康。目前,放射治疗是鼻咽癌的主要治疗手段,近年来尽管放疗设备和方法不断得到改进,但鼻咽癌的放疗效果仍未得到明显改善。放射抗拒是鼻咽癌治疗失败的主要原因之一^[12]。研究其放射抗拒的具体分子机制,探明如何提升鼻咽癌的放射敏感性,显得尤为重要。

自噬是细胞内一种进化上高度保守的蛋白质降解过程^[13]。自噬是机体应对各种外界刺激,维持细胞代谢稳定的重要机制之一,但在肿瘤中表现出双刃剑效应:一方面,对实验动物进行自噬基因的敲除或应用自噬抑制药物后出现自发肿瘤增多,肿瘤恶性生物学行为增强等表现;但另一方面,自噬水平的降低,却可以增加肿瘤细胞对放射治疗的敏感性,提高肿瘤的治疗效果。本课题组前期研究也提示了自噬与放射敏感性的关系,实验结果显示,射线联合自噬抑制剂 CDP 显著增加了鼻咽癌 CNE-2 细胞株对射线的敏感性^[14]。

AMPK 是存在于所有真核细胞中高度保守的异质三聚体,其功能是作为细胞内能量感受器,通过感受细胞内 AMP/ATP 比值来调节一系列代谢反应,从而维持细胞内能量稳态^[15]。本研究应用 AMPK 活化抑制剂 CC 处理人鼻咽癌 CNE-2 细胞,特异性降低磷酸化 AMPK 的表达水平,成功实现了对 AMPK 信号通路的功能性抑制。通过检测发现,降低 AMPK 的活化水平后,CNE-2 细胞的自噬现象明显减弱,包括自噬标志物 MAP1LC3 的表达减低及自噬小体形成数量的减少。在此基础上,进一步采用放射线照射 CNE-2 细胞,体外模拟肿瘤放疗过程。通过 MTT 及流式细胞技术检测发现,降低 AMPK 的活化水平能够增强放射线对 CNE-2 细胞增殖抑制和凋亡促进作用。

综上所述,通过实验可推测 AMPK 活化抑制剂 CC 通过抑制磷酸化 AMPK 的形成而降低 CNE-2 细胞的自噬作用,进而打破了 CNE-2 细胞在放射线干预条件下的能量稳态,导致

细胞增殖能力受到抑制,并启动细胞凋亡过程,从而提高了 CNE-2 细胞对放射的敏感性。

参考文献:

- 项红霞,黎静.鼻咽癌淋巴结转移诊断标准的研究进展[J].现代肿瘤医学,2013,21(5):1140-1142.
- 高云生,应红梅,熊小鹏,等.局部晚期鼻咽癌放疗与化疗综合治疗的生存分析[J].中华放射肿瘤学杂志,2007,16(4):241-244.
- 葛永斌,张宏,谢强,等.甲基转移酶与鼻咽癌放疗敏感性的相关性研究[J].南方医科大学学报,2010,30(3):620-621.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint[J]. Molecular Cell, 2008, 30(2):214-226.
- Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism[J]. Nature Cell Biology, 2011, 13(9):1016-1023.
- Chen S, Rehman SK, Zhang W, et al. Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1806(2):220-229.
- Kuwahara Y, Oikawa T, Ochiai Y, et al. Enhancement of autophagy is a potential modality for tumors refractory to radiotherapy[J]. Cell Death Dis, 2011, 2(6):e177.
- 潘海燕,朱小东,赵伟,等.不同浓度二磷酸氯喹和雷帕霉素对 CNE-2 细胞自噬的影响[J].中国癌症防治杂志, 2011, 3(4):280-283.
- Fandi A, Altun M, Azli N, et al. Nasopharyngeal cancer: epidemiology, staging, and treatment[J]. Semin Oncol, 1994, 21(3):382-397.
- 韦正波,黄光武,温文性,等.鼻咽癌患者外周血对突状细胞体外扩增及生物学特征的研究[J].临床耳鼻咽喉杂志, 2005, 19(23):1068-1071.
- Yang L, Parkin DM, Whelan S, et al. Statistics on cancer in China: cancer registration in 2002[J]. Eur J Cancer Prev, 2005, 14(4):329-335.
- Pearce AG, Segura TM, Rniala AC, et al. The generation and characterization of a radiation-resistant model system to study radioresistance in human breast cancer cells[J]. Radiat Res, 2001, 156(6):739-750.
- Mauthe M, Jacob A, Freiberger S, et al. Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation[J]. Autophagy, 2011, 7(12):1448-1461.
- 周支瑞,朱小东,赵伟,等.自噬抑制剂磷酸氯喹增加鼻咽癌 CNE-2 细胞株的放射敏感性[J].中华放射医学与防护杂志, 2012, 32(5):449-454.
- 耿琛琛,李丹妮,李丰.一磷酸腺苷激酶在肿瘤细胞增殖及自噬中的研究进展[J].解剖科学进展, 2010, 16(6):578-580.