

4-氨基-1,8-萘二胺对三氧化二砷在肝癌细胞中的增敏作用研究*

李 洋¹, 罗擎英¹, 邓建军², 张遵真^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 环境卫生与职业医学系(成都 610041);

2. 四川省绵阳市 404 医院 检验科(绵阳 621000)

【摘要】 目的 探讨聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1(PARP-1)抑制剂 4-氨基-1,8-萘二胺(4-AN)对三氧化二砷(ATO)治疗肝癌的敏感性影响及其相关机制。**方法** 培养人肝癌细胞 HepG₂, 分为单独 ATO 用药组和联合用药组(4-AN+ATO), 采用 MTT 实验、群体倍增实验和克隆形成实验比较两组细胞存活、增殖情况; 应用 ELISA、单细胞凝胶电泳(彗星实验)及微核实验分别检测细胞内 8-羟基鸟嘌呤(8-OH-dG)含量, DNA 链断裂、修复以及染色体损伤情况。**结果** 当 ATO 浓度为 2~10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 联合用药组细胞存活率和集落形成率低于 ATO 组($P<0.05$), ATO 2~50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 联合用药组细胞群体倍增时间高于 ATO 组($P<0.05$); 在 ATO 2~20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 彗星细胞尾长(L-Tail)、尾距(OTM)和 8-OH-dG 含量较 ATO 组高, 差异均有统计学意义(P 均 <0.05); 彗星实验检测损伤修复结果显示, 联合用药组细胞的 DNA 损伤修复效率低于 ATO 组($P<0.05$); 微核实验结果显示当 ATO 浓度为 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 联合用药组微核细胞率高于 ATO 组($P<0.05$)。**结论** PARP-1 抑制剂 4-AN 能显著增强 ATO 杀伤肝癌细胞的敏感性, 其机制与抑制肝癌细胞 DNA 损伤修复有关。

【关键词】 肝细胞癌 三氧化二砷 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1 4-氨基-1,8-萘二胺

4-amino-1,8-naphthalimide on the Sensitive Effect of Arsenic Trioxide in Hepatocellular Carcinoma Cells LI Yang¹, LUO Qing-ying¹, DENG Jian-jun², ZHANG Zun-zhen^{1△}. 1. Department of Environmental Health & Occupational Medicine, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, China

△ Corresponding author, E-mail: zhangzunzhen@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect and mechanism of 4-amino-1,8-naphthalimide (4-AN) on the sensitive effect of arsenic trioxide (ATO) in hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Hepatocellular carcinoma HepG₂ cells were divided into two groups according to whether they were treated with 4-AN or not. Cell viability was evaluated by MTT assay, population doubling experiment and colony formation assay; genic mechanism was explored by 8-OH-dG assay, single cell gel electrophoresis (comet assay) and micronucleus test. **Results** At 2-10 $\mu\text{mol/L}$ concentration of ATO, the cell viability and colony formation efficiency of the combination group (4-AN+ATO) were significantly lower than that of the ATO group ($P<0.05$); moreover, the tail-length (L-Tail) and olive tail moment (OTM) in comet assay were notably higher than that of the ATO group ($P<0.05$). At 2-20 $\mu\text{mol/L}$ concentration of ATO, the population doubling time and 8-OH-dG in combination group were significantly higher than that of ATO group ($P<0.05$). Results from DNA damage repair assay showed that the efficiency of DNA damage repair in combination group was remarkably lower than that of ATO group ($P<0.05$). At 5-20 $\mu\text{mol/L}$ concentration of ATO, the frequency of micronucleated cells in combination group was significantly higher than that of ATO group ($P<0.05$). **Conclusion** 4-AN can significantly increase the sensitivity of ATO in treatment with hepatocellular carcinoma cells and prevent DNA damage repair may be a primary mechanism for this effect.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma Arsenic trioxide Poly (ADP-ribose) polymerase-1
4-amino-1,8-naphthalimide

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是人类最常见的恶性肿瘤之一,致死率高,预后差。索

拉非尼、奥沙利铂等是目前治疗肝细胞癌的传统化疗药物,但治疗效果和预后都不甚满意^[1]。三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)作为世界上最古老的药物之一,已于上世纪 70 年代被成功用于血液系统肿瘤的治疗,引起了国际肿瘤学界的关注^[2]。此后,

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81172632)资助

△ 通讯作者, E-mail: zhangzunzhen@163.com

ATO 被引入包括肝细胞癌在内的多种实体肿瘤治疗的研究,并取得了可喜的成果^[3,4]。大量基础研究已证实 ATO 可通过促进细胞 DNA 氧化损伤,诱导凋亡以杀伤肝癌细胞^[5],在此基础上,ATO 治疗肝癌的临床试验已在国内开展多中心协作研究。然而,越来越多的临床研究表明:与治疗血液系统肿瘤相比,单独应用 ATO 治疗肝癌需要较高剂量才具有明显效果,而这样的高剂量会产生不可忽视的毒副作用,如恶心呕吐、骨髓抑制等^[6],因此如何降低 ATO 在肝癌中的治疗剂量以减少其毒副作用成为学者们思考并关注的新问题。已有研究提示聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1 [poly (ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1] 抑制剂可通过抑制 DNA 损伤修复以提高多种抗癌药物的疗效,因而最有可能成为 ATO 肝癌治疗增敏的新策略^[7,8],目前尚未见相关报道。为此,本研究选择人肝癌细胞株 HepG₂ 细胞为研究对象,以多种细胞生存实验观察经典的 PARP-1 抑制剂 4-氨基-1,8-萘二胺(4-amino-1,8-naphthalimide, 4-AN)对 ATO 在肝癌细胞的增敏作用,同时从 DNA 损伤修复机制方面探讨 4-AN 在 ATO 对肝癌细胞增敏作用的相关机制,为临床应用 ATO 治疗肝癌提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

4-AN 购于美国 Alexis Biochemicals 公司; ATO 注射液(伊泰达亚砷酸氯化钠注射液)由黑龙江哈尔滨医大药业有限公司生产(批号:20110102);噻唑蓝(MTT)购于瑞士 Fluka Chemical 公司;8-羟基鸟嘌呤酶联免疫 ELISA(EIA)检测试剂盒购于美国 Cayman Chemical 公司;DMEM 细胞培养液: Gibco;吖啶橙(acridine orange, AO):Sigma;酶联免疫检测仪: Thermo Scientific Multiskan GO; DMLB2 型荧光显微镜:Leica。

1.2 肝癌细胞株与细胞培养

HepG₂ 购于中国典型培养物保藏中心(CCTCC, 武汉),细胞采用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。

1.3 4-AN 对 ATO 处理后 HepG₂ 细胞生长、增殖及集落形成的影响

采用 MTT 比色实验检测 4-AN 对 ATO 处理后 HepG₂ 细胞存活的影响。取对数生长期状态良好的 HepG₂ 细胞,以 1×10^4 /孔的密度接种于 96 孔

板,细胞贴壁后,分为 ATO 组(终浓度为 0、2、5、10、20、50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO)和联合用药组(相同浓度 ATO+终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-AN 的 DMEM 培养液),每个浓度设 8 个平行孔。染毒 24 h 后,弃去培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗细胞 2 次,每孔加入含 0.5 mg/mL MTT 的培养液 100 μL ,继续在 37℃ 培养 4 h,弃去含 MTT 的培养液,每孔加入 150 μL 二甲亚砜(DMSO),并设 DMSO 为调零孔。摇床震荡 2 min 使蓝紫色结晶甲瓚完全溶解,用酶标仪在波长 570 nm 处测定吸光度值(A_{570}),计算细胞存活率。细胞存活率(%)=(联合组 A_{570} / ATO 组 A_{570}) $\times 100\%$ 。

采用群体倍增实验检测 4-AN 对 ATO 处理后 HepG₂ 细胞增殖的影响。将处于良好生长状态的 HepG₂ 细胞用胰蛋白酶消化计数后,按 2×10^4 /孔接种于 24 孔板,培养过夜使其贴壁。ATO 组加入终浓度为 0、2、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ATO,联合用药组为相同浓度 ATO+终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-AN 的混合液,每个浓度设置 3 复孔,染毒 24 h。染毒结束后,弃去含受试物的培养液,PBS 洗涤细胞 2 次,DMEM 培养基培养 24 h 后终止培养,0.25% 胰蛋白酶消化后立即于光学显微镜下计数活细胞数,每孔计数 2 次,求平均值。按照下述公式计算细胞群体倍增时间(T_D)。 $T_D = t \times \frac{\lg 2}{\lg N_t - \lg N_0}$,式中, t 代表细胞培养时间, N_0 及 N_t 分别代表接种时的细胞数及培养 t 时间后的细胞数。

采用集落形成实验观察 4-AN 对 ATO 处理后 HepG₂ 细胞集落形成的影响。对数生长期状态良好的 HepG₂ 细胞用胰蛋白酶消化后以 200 细胞/孔的密度接种于 24 孔板,培养 24 h 使其贴壁。分组及浓度设置与群体倍增实验相同,每个浓度设 3 个平行孔,染毒培养 24 h 后,细胞用 PBS 洗涤 2 次,再于新鲜配置的 DMEM 培养液中继续培养 12 d(每隔 3 d 更换 1 次培养液),弃去培养液,用甲醇固定 15 min,10% Giemsa 染色 15 min,自然风干后于解剖显微镜下计数每孔细胞中的集落数(含 50 个细胞以上的为 1 个集落),计算集落形成率。集落形成率(%)=(各组平均集落形成数/接种细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.4 4-AN 对 ATO 诱导细胞 DNA 氧化损伤的影响

为了解 HepG₂ 细胞在 4-AN 和 ATO 作用下的 DNA 氧化损伤情况,我们检测了 DNA 氧化损伤的

标志物——8-羟基鸟嘌呤(8-OH-dG)。将 HepG₂ 细胞以 1×10⁶/孔接种于 6 孔板,于 37 ℃、5% CO₂ 条件下培养 24 h 后,ATO 组加入终浓度 0、2、5、10、20 μmol/L ATO,联合用药组分别为相同浓度 ATO+终浓度为 10 μmol/L 4-AN 的混合液。染毒 24 h 后继续培养过夜,按照 8-OH-dG 酶联免疫 ELISA 检测试剂盒的说明,分别设空白孔、标准孔、待测样品孔,经过加样、洗涤、显色、终止等步骤,以空白孔调零,用酶标仪在 412 nm 波长处测量各孔的吸光度(A),8-OH-dG 浓度(pg/5×10⁵ 细胞)通过试剂盒提供的标准浓度梯度绘制的标准曲线计算得到。

1.5 4-AN 对 ATO 诱导的细胞 DNA 损伤 DNA 链断裂的影响

采用单细胞凝胶电泳实验(彗星实验)进一步检测由细胞 DNA 碱基损伤积累所导致的 DNA 链断裂情况。将对数生长期 HepG₂ 细胞以 1×10⁵/孔的密度接种于 24 孔板,在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养过夜,细胞贴壁后,分组及浓度设置与细胞 8-OH-dG 含量检测实验相同,培养处理 24 h,胰酶消化并制成细胞悬液,3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收获的细胞用 PBS 洗涤 2 次。按照本实验室常规描述的彗星实验方法^[9]进行后续的制片、裂解、解旋以及电泳。电泳完成后用蒸馏水漂洗 3 次,随后用 20 μg/mL 溴化乙锭 30 μL 染色,于荧光显微镜 200 倍放大倍数下观察结果。每个浓度设 2 个平行对照,每张玻片用彗星图像分析软件 CASP 分析 30 个彗星细胞的尾长(L-Tail)和尾距(OTM)。

1.6 体外细胞微核实验

通过微核实验了解 4-AN 是否可以促进 ATO 诱导的 DNA 损伤发展为不可逆的染色体断裂。生长良好的细胞用胰蛋白酶消化后调整细胞密度为 1×10⁶/孔接种于 6 孔板中培养贴壁。ATO 组浓度为 0、2、5、10、20 μmol/L,相应 ATO 浓度和 4-AN (浓度为 10 μmol/L)的混合液为联合用药组,处理细胞 24 h,PBS 洗涤后收获细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,细胞沉淀用 0.075 mol/L KCl 溶液低渗处理 5 min,以体积比为 3:1 的甲醇冰醋酸溶液 2.5 mL 反复固定细胞 3 次,再用 1%(体积比)的甲醇冰醋酸溶液重悬细胞,取 0.5 mL 滴于预先冰冻的玻片上,每个剂量设 3 张复片,室温晾干后用 40 μg/mL 吖啶橙染色,立即在荧光显微镜 200 倍放大倍数下观察结果。每张片子随机计数 1 000 个细胞,计算含有微核的细胞个数,求得微核细胞率〔微

核细胞率(‰)=(含有微核的细胞个数/1 000)×1 000‰〕。

1.7 4-AN 对 ATO 诱导细胞 DNA 损伤修复的影响

采用改良彗星实验检测 4-AN 存在下 HepG₂ 细胞 DNA 损伤修复情况。将处于对数生长期的 HepG₂ 细胞以 1×10⁵/孔接种于 24 孔板,待细胞贴壁后,以终浓度为 20 μmol/L 的 ATO 与 4-AN 联合处理作为实验组,以不加 4-AN 的 ATO 作为 ATO 组处理 24 h,用 PBS 清洗细胞两次,加入 DMEM 培养基继续培养 1 h 和 4 h 后收获细胞,按上述彗星实验方法进行后续实验。每张玻片用 CASP 分析 30 个彗星细胞的 OTM 反映不同时间点的 DNA 修复情况。

1.8 统计学方法

所有实验独立重复 3 次,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,微核实验两组间微核细胞率的比较采用 *U* 检验,其余实验数据经方差齐性检验和正态性检验符合要求后,两组间的比较采用 Student's-*t* 检验,多组间的比较采用单因素方差分析,相关关系研究采用线性回归统计分析。 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 4-AN 对 ATO 处理后 HepG₂ 细胞生长、增殖及集落形成的影响

如图 1 所示,在 ATO 组,HepG₂ 细胞存活率随着 ATO 浓度的增加而降低,呈明显剂量-反应关系($R^2=0.978\ 2, P<0.05$)。在实验剂量范围内,加入 4-AN 的联合用药组细胞存活率与 ATO 组相比均有不同程度的下降,其中 ATO 浓度在 2~10 μmol/L 时,两组细胞存活率差异有统计学意义($P<0.05$)。说明 4-AN 能增加 ATO 抑制 HepG₂ 细胞生长的作用。

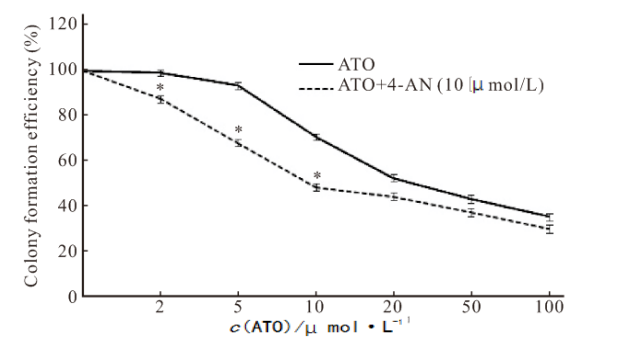


图 1 4-AN 对 ATO 抑制 HepG₂ 细胞存活率的影响
Fig 1 Effect of 4-AN on the cell viability of ATO-treated HepG₂ cells
* $P<0.05$, vs. the same concentration ATO group

由图 2 可见,联合用药组细胞群体倍增时间(T_D)在实验剂量范围内均高于 ATO 组,在 ATO 2~50 $\mu\text{mol/L}$ 时,两组间差异有统计学意义($P<0.05$);联合用药组 ATO 为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞群体倍增时间与 ATO 组相比无明显差异($P>0.05$),提示 4-AN 自身没有抑制 HepG₂ 细胞增殖的能力,但可以协助 ATO 有效抑制肝癌细胞的增殖。

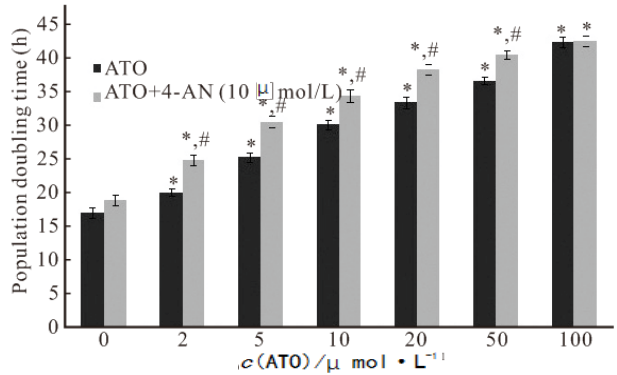


图 2 4-AN 对 ATO 作用下细胞群体倍增时间的影响
Fig 2 Effect of 4-AN on the population doubling time of ATO-treated cells

* $P<0.05$, vs. 0 $\mu\text{mol/L}$ ATO + 4-AN group; # $P<0.05$, vs. the same concentration ATO group

如图 3 所示,在 ATO 组,细胞集落形成率随着 ATO 浓度的升高而降低,呈现一定剂量-效应关系

附表 4-AN 对 ATO 诱导的细胞 DNA 和染色体损伤的影响($n=30, \bar{x} \pm s$)

Group	8-OH-dG (pg/ 5×10^5 cells)	L-Tail	OTM	Micronucleus cell rate (%)
ATO				
0 $\mu\text{mol/L}$	78.02 $\pm$ 7.53	4.52 $\pm$ 0.54	0.15 $\pm$ 0.12	19.52 $\pm$ 0.83
2 $\mu\text{mol/L}$	131.52 $\pm$ 4.06 *	5.91 $\pm$ 0.32	1.76 $\pm$ 0.17 *	24.04 $\pm$ 0.97
5 $\mu\text{mol/L}$	145.71 $\pm$ 10.40 *	21.42 $\pm$ 1.98 *	5.28 $\pm$ 0.75 *	30.49 $\pm$ 0.61 *
10 $\mu\text{mol/L}$	166.73 $\pm$ 12.06 *	53.21 $\pm$ 2.01 *	9.28 $\pm$ 0.49 *	37.53 $\pm$ 0.43 *
20 $\mu\text{mol/L}$	216.19 $\pm$ 13.27 *	96.65 $\pm$ 2.02 *	15.23 $\pm$ 0.99 *	58.12 $\pm$ 1.05 *
10 $\mu\text{mol/L}$ 4-AN+ATO				
0 $\mu\text{mol/L}$	82.12 $\pm$ 7.89	4.64 $\pm$ 0.56	0.21 $\pm$ 0.02	19.25 $\pm$ 0.58
2 $\mu\text{mol/L}$	166.69 $\pm$ 10.62 *·#	8.54 $\pm$ 0.43 *·#	4.87 $\pm$ 0.58 *·#	26.53 $\pm$ 0.46
5 $\mu\text{mol/L}$	216.21 $\pm$ 12.06 *·#	31.23 $\pm$ 0.89 *·#	7.98 $\pm$ 0.26 *·#	37.12 $\pm$ 0.47 *·#
10 $\mu\text{mol/L}$	294.93 $\pm$ 10.328 *·#	72.23 $\pm$ 1.03 *·#	15.76 $\pm$ 0.99 *·#	50.03 $\pm$ 0.99 *·#
20 $\mu\text{mol/L}$	371.83 $\pm$ 13.57 *·#	98.12 $\pm$ 1.45 *	21.34 $\pm$ 1.06 *·#	79.52 $\pm$ 0.63 *·#

* $P<0.05$, vs. 0 $\mu\text{mol/L}$ ATO group; # $P<0.05$, vs. the same concentration ATO group

2.3 4-AN 对 ATO 诱导的细胞 DNA 损伤的影响

彗星实验结果(附表)显示,当 ATO 单独作用时,彗星细胞 L-Tail 和 OTM 均随着 ATO 浓度的增加而增加;加入 4-AN 后,联合用药组 L-Tail 和 OTM 在 ATO 为 2~10 $\mu\text{mol/L}$ 时,较 ATO 组高($P<0.05$)。仅有 4-AN 作用时,L-Tail 和 OTM 与

($R^2=0.951, P<0.05$);联合组细胞的集落形成率在实验剂量范围内较 ATO 组均有降低,在 ATO 浓度为 2~10 $\mu\text{mol/L}$ 的范围内,两组的细胞集落形成率差异具有统计学意义($P<0.05$)。

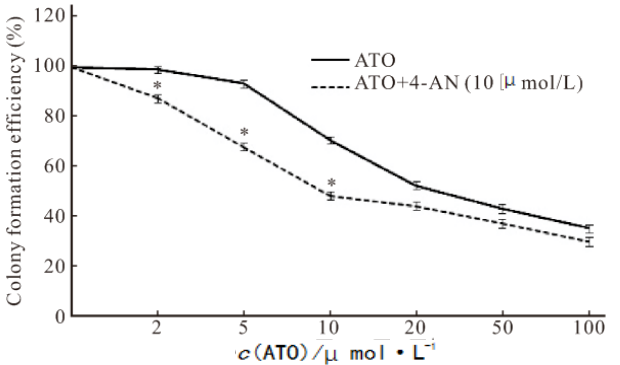


图 3 4-AN 对 ATO 抑制 HepG₂ 细胞克隆形成率的影响
Fig 3 Effect of 4-AN on the colony formation efficiency of ATO-treated cells

* $P<0.05$, vs. the same concentration ATO group

2.2 4-AN 对 ATO 存在下细胞 DNA 氧化损伤能力的影响

由附表可见,ATO 可增加细胞内 8-OH-dG 的含量,呈剂量反应关系($P<0.05$)。加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-AN 后,在所检测 ATO 浓度范围下,均能提高细胞内 8-OH-dG 的含量($P<0.05$)。提示 4-AN 可增强 ATO 引起 HepG₂ 细胞 DNA 碱基氧化损伤的能力。

尾细胞增多,联合用药组拖尾细胞 L-Tail 和 OTM 值在 ATO 为 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 处均高于

ATO 组(附表及图 4B、4C、4E、4F)。
2.4 4-AN 对 ATO 作用下染色体损伤的影响

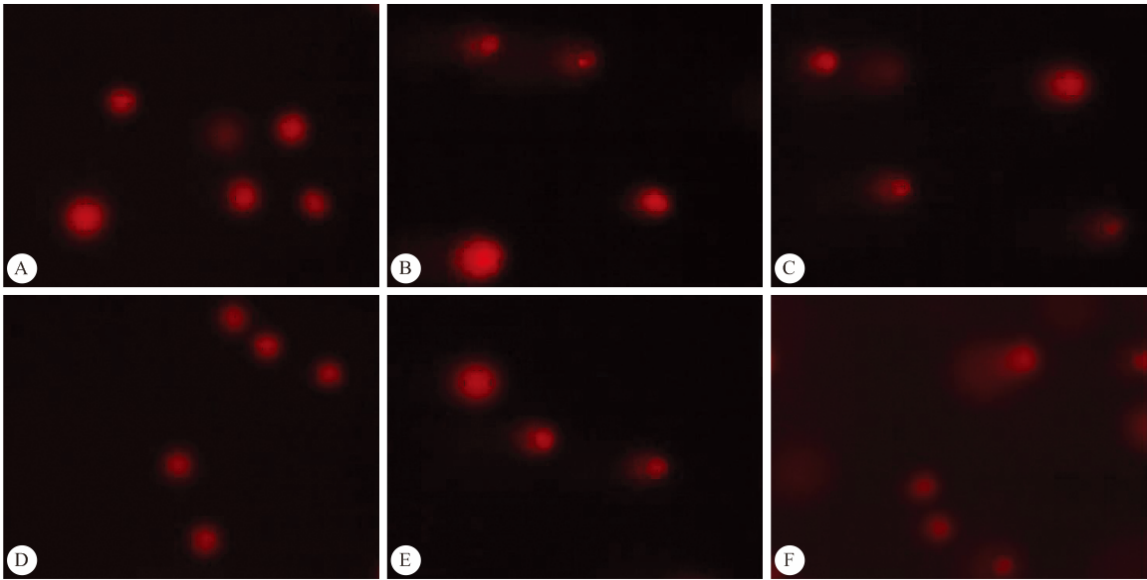


图 4 ATO 及 4-AN 作用下 HepG₂ 细胞的彗星图像。×200
Fig 4 Comet images induced by ATO and 4-AN on HepG₂ cells. ×200

A-C: HepG₂ cells exposed to 0, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ ATO; D-F: HepG₂ cells exposed to 0, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ ATO with 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-AN
由附表可见,随着 ATO 浓度的增加,联合用药组和 ATO 组的微核细胞率均有不同程度的增加。在 ATO 浓度为 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 时,联合用药组的微核细胞率高于 ATO 组($P<0.05$)。说明 4-AN 可增强 ATO 对 HepG₂ 细胞的染色体损伤效应。微

核细胞吖啶橙染色,经荧光显微镜观察,可见细胞形态为圆形,胞核和胞质显色清晰。当 ATO 为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时,联合用药组细胞和 ATO 组细胞出现微核极少(图 5A、5C),随着 ATO 浓度增加,两组细胞均出现微核,如箭头所示(图 5B、5D)。

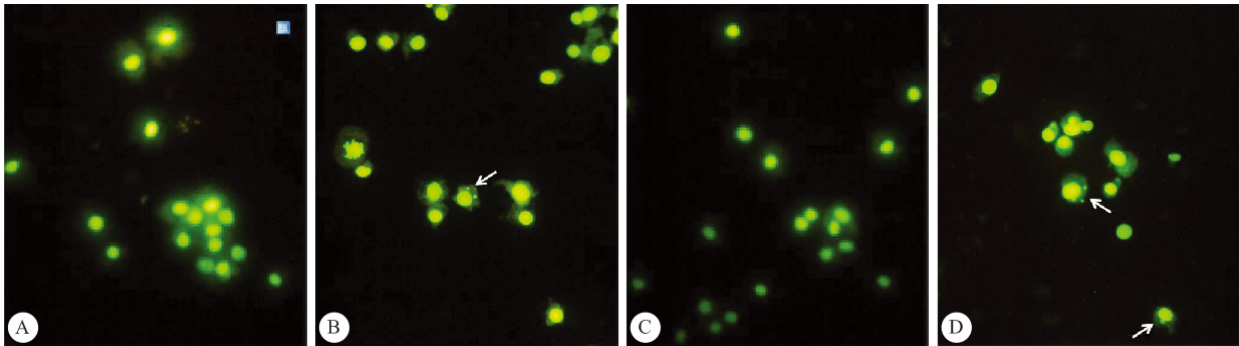


图 5 ATO 及 4-AN 作用下 A549 细胞的微核图像。×200
Fig 5 Micronucleus images induced by ATO and 4-AN on HepG₂ cells. ×200

A, B: HepG₂ cells exposed to 0 and 20 $\mu\text{mol/L}$ ATO; C, D: HepG₂ cells exposed to 0 and 20 $\mu\text{mol/L}$ ATO with 10 $\mu\text{mol/L}$ 4-AN
2.5 4-AN 对 ATO 存在下细胞 DNA 损伤修复能力的影响

结果显示,ATO 组在修复 1 h 和 4 h 后的 OTM 值(6.87±0.54,1.12±0.23)均小于联合组(17.96±0.76,14.23±0.34, $P<0.05$);联合组和 ATO 组 OTM 的变化趋势均呈明显剂量-反应关系(R^2 值分别为 0.937 5 和 0.921 2),其中联合组斜率(修复效率)的绝对值为 1.654 2,显著低于 ATO

组(3.155 8),说明 4-AN 可以显著降低 HepG₂ 细胞对 ATO 诱导的 DNA 损伤的修复效率。

3 讨论

大量研究显示 ATO 主要是通过增加细胞内活性氧水平,导致 DNA 氧化损伤,从而诱导凋亡以杀伤包括肝癌细胞在内的多种实体肿瘤细胞^[10],然而肿瘤细胞固有的高效 DNA 修复能力使得细胞能够

及时修复 ATO 诱导的 DNA 损伤,从而躲避死亡,因此如何减少肝癌细胞 DNA 损伤修复是增加肝癌细胞对 ATO 敏感性的关键。PARP 是存在于真核细胞中催化聚 ADP 核糖化的细胞核酶,在 DNA 损伤修复和维持基因组稳定性方面发挥重要作用^[11]。其中,PARP-1 是 PARP 家族的主要成员,可被 DNA 损伤激活,随后催化尼克酰二核苷酸(NAD⁺)的降解,招募 DNA 修复蛋白以启动 DNA 修复系统^[12]。研究发现,PARP-1 与肿瘤的发生发展密切相关,在中枢神经系统肿瘤、皮肤恶性黑色素瘤、结直肠癌、卵巢肿瘤等恶性肿瘤中都发现 PARP-1 高表达。更重要的是,研究表明选择性抑制 PARP-1 能有效抑制该类肿瘤的生长^[13],提示抑制 PARP-1 可能是一种治疗恶性肿瘤的有效手段。事实上,以 PARP-1 为靶点的药物研究在 30 年前就已开始,目前已有几种 PARP-1 抑制剂已进入 II 期临床试验,取得了令人鼓舞的效果^[7]。已有研究发现 PARP-1 在人肝癌组织及肝癌细胞株 HepG₂ 中表达增高,提示 PARP-1 抑制剂很有可能通过抑制 PARP-1 介导的 DNA 损伤修复,从而提高 ATO 杀伤肝癌细胞的效率^[14,15]。然而,应用 PARP-1 抑制剂增敏 ATO 治疗肝癌的相关研究未见报道,因此,我们选择人肝癌细胞 HepG₂ 为研究对象,观察经典的 PARP-1 抑制剂 4-AN 是否能够增加 ATO 对肝癌细胞的敏感性,同时探讨其机制。

本研究 MTT 实验、群体倍增实验和集落形成实验结果显示,4-AN 在一定剂量浓度范围内可显著增强 ATO 对 HepG₂ 细胞的杀伤作用,且随着 ATO 剂量的增加呈现增强效应,提示 4-AN 对于 ATO 抑制肝癌细胞 HepG₂ 的生长、增殖具有一定的增敏作用。在此基础上,我们采用一系列遗传毒性实验深入探讨了 4-AN 增敏 ATO 杀伤肝癌细胞的分子机制。大量研究显示 8-OH-dG 是公认的 DNA 氧化损伤标志物^[16],本研究结果显示联合用药组 8-OH-dG 含量明显高于 ATO 组,提示 4-AN 能增强 ATO 引起的肝癌细胞 DNA 碱基氧化损伤能力。为验证 DNA 碱基氧化损伤能否进一步导致 DNA 链断裂,我们采用单细胞凝胶电泳实验检测了细胞总的 DNA 损伤,结果表明,在一定剂量范围内,4-AN 能增强 ATO 导致的肝癌细胞 DNA 链断裂水平,并且 DNA 损伤修复实验结果显示,与 ATO 组相比,联合用药组显著抑制了肝癌细胞的 DNA 修复水平,从而引起 DNA 链断裂程度的增高。在此基础上,我们采用目前国际上公认的筛选

检测染色体损伤的主要手段——体外细胞微核实验验证了 DNA 链的断裂能否最终引起 HepG₂ 细胞染色体的不可逆损伤,从而达到真正抑制肝癌细胞的作用,实验结果提示 4-AN 与 ATO 联用明显增强了肝癌细胞染色体损伤程度,从而不可逆地杀伤肝癌细胞。

综上所述,PARP-1 抑制剂 4-AN 在适宜浓度下能显著增强 ATO 杀伤肝癌细胞的敏感性,其作用机制与抑制肝癌细胞 DNA 损伤修复并最终引起染色体不可逆损伤有关,提示 PARP-1 抑制剂与 ATO 联用对临床肝癌治疗具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 樊嘉,王征.原发性肝癌综合治疗新进展.国际消化病杂志,2013;33(2):73-74.
- 2 张亭栋,张鹏飞,王守仁等.“癌灵注射液”治疗 6 例白血病初步临床观察.黑龙江医药,1973;3:66-67.
- 3 刘欢,那仁满都拉.三氧化二砷治疗癌症机制研究进展.中国现代应用药学,2013;30(3):338-342.
- 4 Lin LM, Li BX, Xiao JB, *et al.* Synergistic effect of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on growth inhibition and apoptosis in human hepatoma, breast cancer, and lung cancer cells *in vitro*. World J Gastroenterol, 2005;11(36):5633-5637.
- 5 杨幼林,徐洪雨,高媛媛等.三氧化二砷对人肝癌细胞株的影响.世界华人消化杂志,2000;8(12):1422-1423.
- 6 Liu JX, Zhou GB, Chen SJ, *et al.* Arsenic compounds: revived ancient remedies in the fight against human malignancies. Curr Opin Chem Biol, 2012;16(1-2):92-98.
- 7 张可辉,张亮仁,张礼和. PARP-1 抑制剂在抗肿瘤方面的研究进展.中国药理学杂志,2010;45(22):1689-1694.
- 8 王哲,李燕,吕树卿等. PARP-1 与 NF- κ B 在卵巢上皮性肿瘤组织中的表达及意义.实用妇产科杂志,2013;29(9):676-679.
- 9 Chen C, Jiang X, Hu Y, *et al.* The protective role of resveratrol in the sodium arsenite-induced oxidative damage via modulation of intracellular GSH homeostasis. Biol Trace Elem Res, 2013;155(1):119-131.
- 10 Ma ZB, Xu HY, Jiang M, *et al.* Arsenic trioxide induces apoptosis of human gastrointestinal cancer cells. World J Gastroenterol, 2014;20(18):5505-5510.
- 11 Curtin NJ, Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond. Mol Aspects Med, 2013;34(6):1217-1256.
- 12 睦文妍,陈春燕,罗招阳等. PARP-1 和 Caspase-3 在乳腺癌组织中的表达及临床意义.南华大学学报(医学版),2010;38(2):210-213.
- 13 Shi Y, Zhou F, Jiang F, *et al.* PARP inhibitor reduces proliferation and increases apoptosis in breast cancer cells. Chin J Cancer Res, 2014;26(2):142-147.
- 14 Wielgos M, Yang ES. Discussion of PARP inhibitors in cancer therapy. Pharm Pat Anal, 2013;2(6):755-766.
- 15 Shah GM, Robu M, Purohit NK, *et al.* PARP inhibitors in cancer therapy: magic bullets but moving targets. Front Oncol, 2013 Nov 14; 3:279. doi: 10.3389/fonc.2013.0027.eCollection 2013.
- 16 Liu HH, Lin MH, Liu PC, *et al.* Health risk assessment by measuring plasma malondialdehyde (MDA), urinary 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG) and DNA strand breakage following metal exposure in foundry workers. J Hazard Mater, 2009;170(2-3):699-704.

(2014-09-14 收稿, 2014-11-30 修回)

编辑 沈进