文章编号:1000-5404(2008)10-0953-04

论著

钾通道阻断剂四氨基吡啶增加宫颈癌细胞对中子照射的敏感性

林 爽[1],李 力[1],刘 媛[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]妇产科,[2]第三研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 研究钾通道阻断剂四氨基吡啶(4-amino-pynidine, 4-AP)对宫颈癌HeLa细胞中子照射的影响。**方法** 宫颈癌HeLa细胞分别设不同浓度(0、1、5、10、20 mmol/L)4-AP组,0.67 Gy ^{252}Cf中子照射后48 h,用MTT法和流式细胞仪检测各组细胞活性、凋亡率。0、20 mmol/L 4-AP组自照射后24、48、72 h分别用RT-PCR法、Western blot法检测HIF-1α mRNA及蛋白表达情况。**结果** 在中子照射48 h后,4-AP浓度为0、1、5、10、20 mmol/L时,对HeLa细胞增殖的抑制率分别为0、(38.81±3.45)%、(46.63±3.88)%、(63.58±6.19)%、(77.51±8.87)%,凋亡率(%)分别为(3.15±0.85)%、(8.01±1.19)%、(16.00±1.58)%、(47.20±3.18)%、(62.56±4.27)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明4-AP能抑制HeLa细胞的增殖,诱导凋亡,并呈现明显的剂量依赖性。当4-AP浓度大于5 mmol/L时,其作用明显($P<0.01$)。0.67 Gy ^{252}Cf中子照射0、24、48、72 h后,4-AP浓度为0 mmol/L组,HIF-1α mRNA/β-actin值分别为(0.423±0.116)、(0.464±0.111)、(0.487±0.121)、(0.415±0.099),Western blot灰度扫描结果HIF-1α/β-actin分别为(0.723±0.116)、(0.664±0.111)、(0.617±0.121)、(0.515±0.099),HIF-1α mRNA及蛋白表达均无明显降低,差异均无统计学意义($P>0.05$)。4-AP浓度为20 mmol/L组,HIF-1α mRNA/β-actin值分别为(0.401±0.121)、(0.364±0.142)、(0.257±0.137)、(0.165±0.099),Western blot灰度扫描结果HIF-1α mRNA/β-actin分别为(0.879±0.117)、(0.645±0.115)、(0.312±0.114)、(0.130±0.118),HIF-1α mRNA及蛋白表达均明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 钾通道阻断剂4-AP能降低中子放射治疗后缺氧诱导因子(HIF-1α)表达,降低HeLa细胞增殖,促进凋亡,提高HeLa细胞中子射线的敏感性。

关键词: 钾通道阻滞剂;四氨基吡啶;宫颈癌;^{252}Cf中子照射
中图法分类号: R730.55;R737.33;R965 **文献标识码:** A

Potassium channel blocker (4-AP) enhances the radiosensitivity of human cervical cancer cell line HeLa to ^{252}Cf neutron ray

LIN Shuang[1], LI Li[1], LIU Yuan[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 3, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the potential effect of 4-amino-pynidine (4-AP) on human cervical carcinoma cell line HeLa to ^{252}Cf neutron ray. **Methods** HeLa cells were treated with 4-AP(0, 1, 5, 10, 20 mmol/L, respectively) and then exposed to 0.67 Gy ^{252}Cf neutron ray. The effect of 4-AP on proliferation of HeLa cells was assessed by MTT assay. Cell apoptosis were detected by flow cytometry. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were used to investigate the levels of HIF-1α mRNA and protein of HeLa cells treated with 4-AP (0, 20 mmol/L) and 0.67 Gy ^{252}Cf neutron ray. **Results** After HeLa cells treated with 0, 1, 5, 10, 20 mmol/L 4-AP were exposed to 0.67 Gy ^{252}Cf neutron ray for 48 h, their inhibitory rate was 0, (38.81 ±3.45)%, (46.63±3.88)%, (63.58±6.19)%, (77.51±8.87)%, and their apoptotic rate was (3.15±0.85)%, (8.01±1.19)%, (16.00±1.58)%, (47.20±3.18)%, (62.56±4.27)%, respectively, suggesting 4-AP may inhibit the proliferation of HeLa cells and induce their apoptosis in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Of HeLa cells treated with 0 mmol/L 4-AP, the optical density ratio of HIF-1α mRNA/β-actin was (0.423±0.116), (0.464±0.111), (0.487±0.121), (0.415±0.099) after 24-, 48- and 72-hour exposure to 0.67 Gy ^{252}Cf neutron ray, while the optical density ratio of HIF-1α protein/β-actin was (0.723±0.116), (0.664±0.111), (0.617±0.121), (0.515±0.099) (both $P>0.05$). However, after treated with 20 mmol/L 4-AP and exposed to 0.67 Gy ^{252}Cf neutron ray for

作者简介:林 爽,女,河北省唐山市人,博士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究,发表论文5篇。电话:13110221225,E-mail: cqls2002@126.com
收稿日期:2007-11-07;修回日期:2008-01-29

24, 48 and 72 h, the optical density ratio of HIF-1α mRNA/β-actin of HeLa cells was (0.401 ± 0.121), (0.364 ± 0.142), (0.257 ± 0.137), (0.165 ± 0.099), while the optical density ratio of HIF-1α protain/β-actin were (0.879 ± 0.117), (0.645 ± 0.115), (0.312 ± 0.114), (0.130 ± 0.118), showing that the levels of HIF-1α mRNA and protein both declined ($P < 0.01$). **Conclusion** To HeLa cells exposed to ^{252}Cf neutron ray, potassium channel blocker (4-AP) pretreatment inhibits their HIF-1α expression and their proliferation and promote their apoptosis. The potassium channel blocker (4-AP) significantly enhances the sensitivity of HeLa cells to neutron radiotherapy.

Key words: potassium channel blocker; 4-amino-pynidine; cervical cancer; ^{252}Cf neutron

大部分实体瘤中存在缺氧区,研究表明缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)在缺氧肿瘤细胞中高表达可引起肿瘤细胞放化疗抵抗,最终导致治疗失败[1]。很多因素对其表达有调控作用,低氧是其表达的主要调控因素。近年来研究表明,肿瘤细胞表面的钾离子通道与低氧感受密切相关,钾离子通道的表达和激活在肿瘤细胞低氧信息传递中起重要的作用,现已证实在多种人类重要的肿瘤组织中均有钾离子通道表达。本研究以体外培养的人宫颈癌 HeLa 细胞为研究对象,观察钾通道阻断剂四氨基吡啶(4-amino-pynidine, 4-AP)对宫颈癌细胞中子放疗后细胞增殖、凋亡以及 HIF-1α mRNA 和蛋白表达的情况,以期寻找治疗宫颈癌低氧性放疗抵抗的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人宫颈癌细胞株为本室培养。4-AP 购自 Sigma 公司,噻唑蓝[3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium Bromid, MTT]购自华美生物工程公司,碘化丙啶(PI)购自 BD 公司。Trizol 试剂盒购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。HIF-1α 引物上游 5′-ATGGTCAGGTCGCTTCAAAAA-3′,下游 5′-CACCGTCAGGGCAATCATTA-3′,引物大小为 120 bp;β-actin 引物上游 5′-CACGGCTGCTTCCAGCTCCT-3′,下游 5′-CTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3′,引物大小为 300 bp。HIF-1α 抗体为 Santa Cruz 公司产品。

1.2 细胞准备

细胞复苏后用 DMEM 加 10% FCS 培养,3 d 传 1 代,取对数生长期细胞,0.25% Trypsin 消化后,完全培养基制成单细胞悬液,标准 CO_2 孵箱培养,待细胞长至约 80% 融合生长时,于密闭容器,以 5% CO_2、90% N_2、5% O_2 混合气体以 10 L/min 缺氧培养,容器内氧终浓度为 1%。

1.3 实验分组

将细胞分为低氧 +4-AP +0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射组(4-AP 剂量为 0、1、5、10、20 mmol/L)。中子照射源应用我院中子后装治疗机,锎-252(^{252}Cf)中子源平均能量为 2.3 MeV,半衰期为 2.645 年,^{252}Cf 有效范围为 1.4 mm × 9.0 mm,体积强度为 500 μg,中子发射率为 2.3×10^6/(s · μg),γ 射线发射率为 1.3×10^7/(s · μg),空气中距离放射源 1 cm 处的中子剂量当量率为 23.4 mSv · h^{-1} · mg^{-1},γ 射线剂量当量率为 1.6 mGy · h^{-1} · mg^{-1},等效生物剂量(DGy-eq)按照[中子相对生物效应(RBE)值 × 中子剂量 + γ 射线 RBE × γ 射线剂量]进行计算。照射后 48 h 分别检测各组细胞活性、凋亡率,0、20 mmol/L 组自照射后 24、48、72 h 分别检测 HIF-1α mRNA 及蛋白表达情况。

1.4 MTT 法检测细胞活性

在中子照射 48 h 后,每孔加 MTT 20 μl,振荡摇匀,使孔内蓝紫色结晶充分溶解,酶标仪(λ = 490 nm)测吸光度值[D(490)]。

细胞抑制率(%) = [对照组 D(490)值 − 实验组 D(490)值]/对照组 D(490)值 × 100%

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集各组细胞,经胰酶消化收集细胞,PBS 冲洗后以 80% 冰乙醇固定,−20 ℃过夜,PBS 冲洗细胞去除乙醇,调整细胞数为 1×10^6 ml^{-1},加入 PI 染色液(终浓度为 50 mg/L),室温避光染色 30 min,流式细胞仪检测,每份样品检测 2×10^4 个细胞,重复测 6 次,CellQuest 软件分析细胞凋亡。

1.6 RT-PCR 法检测 HIF-1α mRNA 表达

取(0.5 ~ 1) × 10^7 细胞,按 Trizol 试剂盒说明提取总 RNA,按反转录试剂盒说明进行逆转录反应。HIF-1α mRNA 的 PCR 反应条件为 94 ℃变性 30 s,55 ℃ HIF-1α 退火 30 s,72 ℃ 2 min,最后 72 ℃延伸 10 min。琼脂糖电泳测定 HIF-1α mRNA 表达,拍照。每 1 组检测 6 瓶细胞。

1.7 Western blot 鉴定细胞 HIF-1α 蛋白表达

提取细胞核蛋白,SDS-PAGE 电泳、转膜、免疫反应一抗为 HIF-1α 抗体(1∶200)。β-actin 作内参,ECL 显色,X 线底片感光成像。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件,进行单因素方差分析,组间差异采用 LSD 法检验。

2 结果

2.1 0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射后 HeLa 细胞增殖的抑制效应

MTT 实验结果显示,给予相同的低氧条件,在相同放射剂量的照射下,4-AP 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用具有剂量相关的特点,差异有统计学意义($P < 0.05$);当 4-AP 浓度≥5 mmol/L 时,对 HeLa 细胞增殖的抑制效应明显($P < 0.01$)。见表 1。

2.2　0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射后 HeLa 细胞凋亡率

实验结果显示,给予相同的低氧条件,在相同放射剂量的照射下,随 4-AP 浓度增加,HeLa 细胞凋亡率明显升高,具有浓度依赖性,组间比较有统计学差异($P<0.01$)。见表 1。

表 1　相同低氧条件及中子照射剂量下,不同浓度 4-AP 对 HeLa 细胞增殖抑制和凋亡的影响($n=6$)

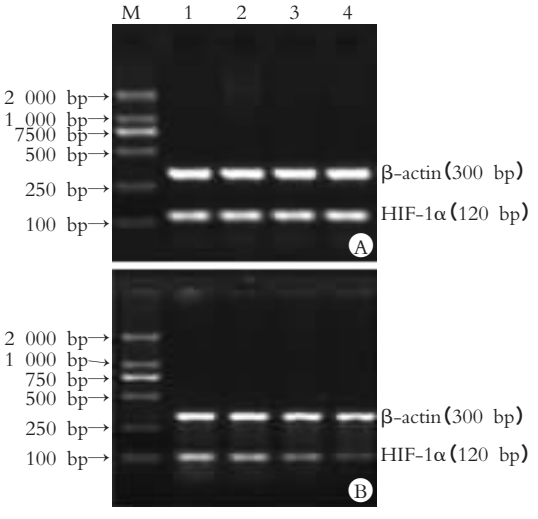
4-AP 浓度(mmol/L)	增殖抑制效应		凋亡率(%)
	D(490)	增殖抑制(%)	
0	0.782 ± 0.037	12.26	2.27 ± 0.04
1	0.714 ± 0.035	14.34^{e}	8.11 ± 0.02^{e}
5	0.651 ± 0.021	24.53^{ab}	16.58 ± 0.03^{ab}
10	0.472 ± 0.017	45.67^{abc}	47.63 ± 0.04^{abc}
20	0.243 ± 0.015	64.32^{abcd}	62.07 ± 0.02^{abcd}

a: $P<0.01$, e: $P<0.05$, 与 0 mmol/L 组比较; b: $P<0.01$,与 1 mmol/L 组比较; c: $P<0.01$,与 5 mmol/L 组比较; d: $P<0.01$, 与 10 mmol/L 组比较

2.3　0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射后 HeLa 细胞 HIF-1α mRNA 表达改变

0 mmol/L 4-AP 组,0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射后 0、24、48、72 h HIF-1α mRNA/β-actin 值为(0.423 ± 0.116)、(0.464 ± 0.111)、(0.487 ± 0.121)、(0.415 ± 0.099),表明中子照射后 HIF-1α mRNA 及蛋白表达无明显降低,差异无统计学意义($P>0.05$,图 1A)。

20 mmol/L 4-AP 组,0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射后 0、24、48、72 h HIF-1α mRNA/β-actin 值为(0.401 ± 0.121)、(0.364 ± 0.142)、(0.257 ± 0.137)、(0.165 ± 0.099),表明 20 mmol/L 4-AP 组中子照射后,HIF-1α mRNA 及蛋白表达明显降低,差异有显著统计学意义($P<0.01$,图 1B)。



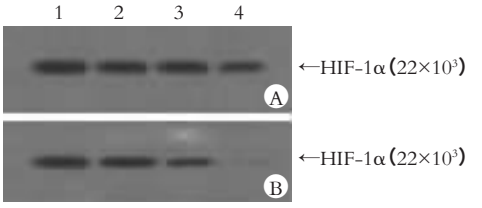
A: 0 mmol/L; B: 20 mmol/L　M: 标准; 1: 0 h; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h

图 1　不同剂量 4-AP 组各时相点 HeLa 细胞 HIF-1α mRNA 表达

2.4　0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射后 HeLa 细胞 HIF-1α 蛋白表达改变

0 mmol/L 4-AP 组 0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射后 0、24、48、72 h HIF-1α 蛋白/β-actin 值为(0.723 ± 0.116)、(0.664 ± 0.111)、(0.617 ± 0.121)、(0.515 ± 0.099),随时间延长,表达无明显降低,差异无统计学意义($P>0.05$,图 2A)。

20 mmol/L 4-AP 组 0.67 Gy ^{252}Cf 中子照射后 0、24、48、72 h HIF-1α 蛋白/β-actin 值为 HIF-1/B-ACTIN 分别为(0.879 ± 0.117)、(0.645 ± 0.115)、(0.312 ± 0.114)、(0.130 ± 0.118),随时间延长,表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$,图 2B)。



A: 0 mmol/L; B: 20 mmol/L　1:0 h; 2: 24 h; 3: 48 h; 4: 72 h

图 2　不同剂量 4-AP 组各时相点 HeLa 细胞 HIF-1α 蛋白表达

3　讨论

宫颈癌(cervical cancer, CC)是妇科三大恶性肿瘤之一。中、晚期患者主要以放射治疗为主[1],我院主要采用^{252}Cf 中子放射治疗。^{252}Cf 中子属于高直线能量转换(linear energy transfer, LET)射线,直接破坏细胞内 DNA 分子,造成 DNA 双链断裂(DSB)比例高,同时还破坏细胞其他结构,导致复杂的 DNA 损伤群,细胞难于修复。中子射线一次性杀伤能力较 X、γ 射线强,它对细胞杀伤主要是单击致死性损伤,瘤细胞修复的机会少。由于^{252}Cf 治疗无或很少有亚致死性损伤的修复(SLDR)及致死性损伤的修复(PLDR),且具有相对生物效应(RBE)高、对乏氧细胞敏感和对细胞周期依赖性小的生物学特性,近年广泛应用于中、晚期宫颈癌治疗[2],使宫颈癌患者的生存率大大提高,但是,由于放、化疗抵抗所致的肿瘤转移和复发,仍使全球妇女的病死率居高不下,全球大约每年仍有 20 0000 人死于宫颈癌的转移和复发。肿瘤内部乏氧区的存在是引起放、化疗抵抗的主要原因。研究表明肿瘤内部 HIF-1α 表达增高是导致肿瘤患者对放疗产生抵抗的主要原因之一,与患者预后呈明显负相关,导致患者 5 年生存率降低[3]。

缺氧诱导因子(HIF-1)是在缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的一种核转录因子。在缺氧的条件下其激活翻译基因编码促红细胞生成素、葡萄糖载体、糖酵解酶、血管内皮生长因子(VEGF)等多种靶基因的表达,以提高机体运输氧的能力和新陈代谢的能力,使机体适应缺氧的环境[4]。HIF-1 因其表达升高与肿瘤侵袭、转移、放化疗抵抗密切相关而受到广泛重视。

影响 HIF-1 表达的因素有很多,乏氧是其中最主

要的影响因素,这些影响因素能通过 HIF-1 这条共同的信号传导途径起到改变肿瘤生物学特性的目的。细胞膜钾离子通道参与细胞多种不同的生理活动如兴奋、收缩、细胞分裂周期和新陈代谢[5-8],在肿瘤细胞感受低氧过程中起重要作用。目前已证实多种肿瘤组织中有钾通道高表达。经典的思路是缺氧诱导细胞膜去极化,调节外向 K^+ 电流,激活第二信使 Ca^{2+},进一步激活 HIF-1α 表达,引起机体的一系列反应。实验中未加钾通道阻断剂组,给予 0.67 Gy ^{252}Cf(相当于 2 Gy X 线小剂量照射)中子照射后 24、48、72 h HIF-1α mRNA 及蛋白表达均无明显降低。而相同照射条件下,加入钾通道阻断剂 20 mmol/L 组,24、48、72 h 后 HIF-1α mRNA 和蛋白表达明显下调,说明钾离子通道在肿瘤细胞感受缺氧过程中起重要的作用,钾离子通道阻断剂 4-AP 能明显降低 HIF-1α 表达,降低 HIF-1α 高表达所致的肿瘤低氧性放疗抵抗。

凋亡能力的显著减弱和恶性肿瘤等疾病有密切关系。恶性肿瘤可以理解为细胞过度增殖和凋亡受到异常抑制的一种疾病,K^+ 通道在调节肿瘤细胞增殖和凋亡过程中也起重要作用[9-11]。由于钾离子通道阻断剂可以引起肿瘤细胞的凋亡,并具有抑制肿瘤生长的作用,因此认为钾离子通道阻断剂可以作为肿瘤放化疗的增敏剂[12,13]。钾通道在调节肿瘤细胞增殖和凋亡过程中起重要作用。Gomez 等[14]发现钾通道与细胞增殖分化密切相关,钾通道阻滞剂可促进肿瘤细胞凋亡。Coiret 等[15]的研究也表明,在乳腺癌 MCF-7 细胞中存在 K^+ 电流,电压激活型 K^+ 通道在细胞增殖过程中起重要作用,钾通道阻滞剂对细胞的增殖有抑制作用。K^+ 的跨膜转运对细胞增殖和凋亡的平衡有重要的调节作用,它的变化可以影响细胞周期,参与细胞有丝分裂过程,在肿瘤细胞的发生、发展过程中起重要的作用[16]。本实验在相同中子照射条件下,给予不同浓度钾通道阻断剂 4-AP,用 MTT 法和流式细胞仪分别对低氧培养的人宫颈癌 HeLa 细胞中子放射处理后的增殖抑制率和凋亡率进行检测,发现随 4-AP 剂量的增加,不同组宫颈癌细胞中子照射后增殖的抑制率和凋亡率均明显增加,具有明显的浓度依赖性。结果显示 4-AP 能抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖,促进调亡,合并中子照射能增强 HeLa 细胞的中子放疗效果。

本实验通过干预钾通道活性,削弱 HIF-1α,提高宫颈癌 HeLa 细胞放疗敏感性,降低宫颈癌细胞增殖、促进其凋亡,最终达到增强肿瘤放疗效果的目的,从而为进一步探讨宫颈癌有效治疗提供一些实验和理论指导依据。

参考文献:

[1] Geisler J P, Manahan K J, Rippy J K. 5-Fluorouracil cardiotoxicity complicating treatment of stage IIB cervical cancer--case report[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2007, 28(3): 235.

[2] 卿 毅, 王 东, 仲召阳, 等. pSilence APE1 联合中子射线治疗骨肉瘤的体外实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(7): 722-725.

[3] Magnon C, Opolon P, Ricard M, *et al*. Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1alpha-mediated tumor apoptotic switch[J]. J Clin Invest, 2007, 117(7): 1844-1855.

[4] Wincewicz A, Sulkowska M, Koda M, *et al*. Cumulative expression of HIF-1-alpha, Bax, Bcl-xL and P53 in human colorectal cancer[J]. Pathology, 2007, 39(3): 334-338.

[5] Kung A, Zabludoff S, France D, *et al*. Small molecule blockade of transcriptional coactivation of the hypoxia-inducible factor pathway[J]. Cancer Cell, 2004, 6(1): 33-43.

[6] Swinson D E, Jones J L, Cox G, *et al*. Hypoxia-inducible factor-1 alpha in non small cell lung cancer: relation to growth factor, protease and apoptosis pathways[J]. Int J Cancer, 2004, 111(1): 43-50.

[7] Kelly B D, Hackett S F, Hirota k, *et al*. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1[J]. Circ Res, 2003, 93(11): 1074-1081.

[8] Zhong H, Semenza G L, Simons J W, *et al*. Up-regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is an early event in prostate carcinoma[J]. Cancer Detect Prev, 2004, 28(2): 88-93.

[9] Bachtiary B, Schindl M, Potter R, *et al*. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(6): 2234-2240.

[10] Vordermark D, Brown J M. Endogenous markers of tumor hypoxia predictors of clinical radiation resistance[J]. Strahlenther Onkol, 2003, 179(12): 801-811.

[11] Zhang L, Barritt G J. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? [J]. Endocr Relat Cancer, 2006, 13(2): 27-38.

[12] Arcangeli A. Expression and role of hERG channels in cancer cells [J]. Novartis Found Symp, 2005, 266(5): 225-232.

[13] Debes J, Roberts R, Jacobson D, *et al*. Inverse association between prostate cancer and the use of calcium channel blockers[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004, 13(1): 255-259.

[14] Gomez-Varela D, Zwick-Wallasch E, Knotgen H, *et al*. Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity[J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7343-7349.

[15] Coiret G, Borowiec A S, Mariot P, *et al*. The antiestrogen tamoxifen activates BK channels and stimulates proliferation of MCF-7 breast cancer cells[J]. Mol Pharmacol, 2007, 71(3): 843-851.

[16] Misaki N, Mao X, Lin Y F, *et al*. Iptakalim, a vascular ATP-sensitive potassium (KATP) channel opener, closes rat pancreatic beta-cell KATP channels and increases insulin release[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 322(2): 871-878.

(编辑 王 红)