doi:10.11659/jjssx.08E022029

·基础研究·

聚ADP-核糖聚合酶-1在喉鳞状细胞癌细胞DNA氧化损伤及凋亡中的作用

宿伟鹏[1],赵化荣[1],刘 攀[1],张 洋[1],王 松[2] (1.新疆医科大学第一附属医院肿瘤中心,新疆 乌鲁木齐 830011;2.新疆医科大学第一附属医院耳鼻喉科,新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘 要] **目的** 探究聚ADP-核糖聚合酶-1(PARP1)在喉鳞状细胞癌(LSCC)中的表达及其对LSCC细胞DNA氧化损伤与凋亡的影响。**方法** 收集40例患者的LSCC组织及癌旁组织样本,采用免疫组化染色和qRT-PCR检测LSCC组织与癌旁组织中PARP1的表达。采用不同浓度Menadione诱导LSCC细胞系Hep-2,MTT法检测不同浓度诱导下细胞增殖抑制率。将Hep-2细胞随机分为对照组(正常培养)、Men组(20 μmol/L Menadione处理)、Men+PARP1抑制剂组(20 μmol/L Menadione+10 μmol/L PARP1抑制剂Olaparib共处理)。MTT法计算各组细胞增殖抑制率;流式细胞术检测各组细胞内活性氧(ROS)水平;细胞免疫荧光染色观察各组细胞DNA损伤标记分子γ-H2AX焦点生成情况;Western blot测定各组细胞γ-H2AX、DNA-PKcs、BRCA1、LIG4、Caspase-3及Caspase-9蛋白表达;Hoechst33258染色观察各组细胞凋亡情况。**结果** LSCC组织中PARP1阳性表达率及PARP1 mRNA表达均明显高于癌旁组织($P<0.01$)。Hep-2细胞经不同浓度Menadione诱导后,细胞增殖抑制率均升高($P<0.05$)。与对照组比较,Men组和Men+PARP1抑制剂组的细胞增殖抑制率升高,细胞ROS水平升高,γ-H2AX焦点形成明显增加,γ-H2AX蛋白表达上调,DNA-PKcs、BRCA1、LIG4蛋白表达均下调,细胞出现浓缩、碎裂的蓝色凋亡体,Caspase-3和Caspase-9蛋白表达上调,差异均有统计学意义($P<0.05$),且Men+PARP1抑制剂组以上变化较Men组更明显($P<0.05$)。**结论** PARP1在LSCC组织中高表达,抑制其表达能够进一步加重Menadione诱导的Hep-2细胞DNA氧化损伤,并促进细胞凋亡。

[关键词] 喉鳞状细胞癌;聚ADP-核糖聚合酶-1;DNA氧化损伤;凋亡
[中图分类号] R739.8 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-08-04

The role of poly ADP-ribose polymerase-1 in oxidative DNA damage and apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma cells

SU Wei-peng[1], ZHAO Hua-rong[1], LIU Pan[1], ZHANG Yang[1], WANG Song[2] (1. Tumor Center, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011, China; 2. Department of Otolaryngology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang 830011, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of poly ADP-ribose polymerase-1 (PARP1) in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and its effect on DNA oxidative damage and apoptosis of LSCC cells. **Methods** LSCC tissue and paracancerous tissue samples from 40 patients were collected. Immunohistochemical staining and qRT-PCR were used to detect the expression of PARP1 in LSCC tissue and paracancerous tissue. LSCC cell line Hep-2 was induced by different concentrations of Menadione, and the inhibition rate of cell proliferation was detected by MTT assay. The Hep-2 cells were randomly divided into the control group (normal culture), Men group (treated with 20 μmol/L Menadione), Men+PARP1 inhibitor group (co-treated with 20 μmol/L Menadione and 10 μmol/L PARP-1 inhibitor Olaparib), the inhibition rate of cell proliferation was calculated by MTT assay, the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in each group was detected by flow cytometry, the focus formation of DNA damage marker γ-H2AX in each group was observed by immunofluorescence staining, the protein expression of γ-H2AX, DNA-PKcs, BRCA1, LIG4, Caspase-3 and Caspase-9 in each group were determined by Western blot, the apoptosis in each group was observed by Hoechst33258 staining. **Results** The positive expression rate of PARP1 and the relative expression of PARP1 mRNA in LSCC tissues were significantly higher than those in paracancerous tissue ($P<0.01$). The proliferation inhibition rates of Hep-2 cells after induced by different concentration of Menadione were increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the inhibition rates of cell proliferation in the Men group and the Men+PARP1 inhibitor group were increased, the levels of ROS were increased, the formations of γ-H2AX foci were significantly increased, and the relative protein expression of γ-H2AX protein were up-regulated, the relative protein expression of DNA-PKcs, BRCA1 and LIG4 were all down-regulated, the cells appeared condensed and fragmented blue apoptotic bodies appeared in cells, the relative protein expression of Caspase-3 and Caspase-9 were down-regulated, the differences were statistically significant ($P<0.05$); and the above changes were more significant in the Men+PARP1 inhibitor group than in

[基金项目] 国家重点实验室开放课题(SKL-HIDCA-2021-6)
[通信作者] 赵化荣,E-mail:xydyfyzhr@163.com

the Men group (P<0.05). **Conclusion** PARP1 is highly expressed in LSCC tissue, which can further aggravate Menadione-induced DNA oxidative damage of Hep-2 cells and promote apoptosis after inhibited.

Keywords: laryngeal squamous cell carcinoma; poly ADP-ribose polymerase-1; DNA oxidative damage; apoptosis

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma,LSCC)是一种常见的头颈部恶性肿瘤,起源于喉黏膜上皮细胞。LSCC约占所有系统性恶性肿瘤的2.4%,每年约有95 000例患者死于这类疾病[1]。LSCC起病隐匿,约60%的患者在确诊时已处于癌症晚期,且LSCC易发生局部浸润和颈部淋巴结转移,使得患者生存率较低[2-3]。据统计,LSCC是近年来为数不多的患者生存率下降的肿瘤之一,在过去的四十几年中,LSCC患者的5年生存率从66%降至63%[4],主要原因是其发病机制尚不明确。因此,揭示LSCC的发病机制并确定其诊断的特异性生物标志物,从而找到有效的治疗靶点具有重要意义。

聚ADP-核糖聚合酶-1 [poly (ADP-ribose) polymerase-1,PARP1]的酶促功能可消耗辅因子β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+),以催化聚ADP核糖基化(PARylation),进而介导蛋白质翻译后的修饰[5]。PARP1在调节细胞各种应激反应中发挥重要作用,其介导的PARylation与DNA损伤密切相关。在出现DNA损伤后,PARP1会迅速激活,消耗NAD^+并将大量PAR链募集到DNA损伤处,启动DNA损伤修复过程[6]。已有研究表明,PARP1参与肿瘤的发生发展,与肿瘤细胞DNA修复、基因的转录和转录后调节、蛋白质降解等过程密切相关,且PARP1在急性髓性白血病、恶性淋巴瘤、乳腺癌、结肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌等多种肿瘤中过表达[7-10]。但PARP1在LSCC中的表达尚未见研究报道,而了解其在LSCC中的表达及作用可为LSCC的临床诊断与治疗提供潜在靶点。因此,本研究通过检测LSCC中PARP1的表达,并采用Menadione诱导建立LSCC细胞系Hep-2的DNA氧化损伤模型,探讨抑制PARP1对Hep-2细胞DNA氧化损伤与凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 标本

收集2021年1~12月在我院行手术切除的40例LSCC患者的肿瘤组织及癌旁组织标本,其中男23例,女17例;年龄42~68岁,中位年龄48(43,57)岁。所有患者临床资料完善,术前未接受过放化疗、免疫治疗等,且无严重并发症及其他恶性肿瘤。患者及家属均对本研究知情同意。所有肿瘤标本均经病理检查证实为LSCC,将样本清洗后,一部分置于4%多聚甲醛中固定,另一部分置于液氮迅速冷冻后保存于-80 ℃冰箱中。

1.2 主要材料与试剂

人LSCC细胞系Hep-2由中国科学院上海细胞生物学研究所提供。氧化应激诱导剂Menadione(英国Biorbyt公司),PARP1抑制剂Olaparib(美国Abbexa公司),胎牛血清(杭州四季青),青霉素-链霉素双抗液、RPMI 1640培养基及胰酶(美国Sigma公司),山羊血清(北京索莱宝科技有限公司),TRizol试剂盒(北京凯诗源生物科技有限公司),反转录及荧光定量检测试剂盒(日本Takara公司),DAB显色试剂盒、MTT检测试剂盒、DCFH-DA活性氧荧光探针(北京百奥博莱科技公司),Triton X-100、DAPI染料、RIPA裂解液、BCA蛋白测定试剂盒及ECL化学试剂液(上海碧云天生物研究所),Hoechst33258染色试剂盒(上海酶联生物科技有限公司),PARP1兔多克隆抗体、γ-H2AX兔多克隆抗体、DNA-PKcs兔多克隆抗体、BRCA1兔单克隆抗体、LIG4兔单克隆抗体、Caspase-3兔多克隆抗体、Caspase-9兔多克隆抗体、GAPDH兔多克隆抗体、Alexa Fluor®488荧光二抗及辣根过氧化物酶标记的二抗(英国Abcam公司)。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 免疫组化染色 将LSCC组织及癌旁组织标本取出,脱水透明,常规石蜡包埋,按照4 μm厚度连续切片,在37 ℃温箱内烤片。取出后脱蜡至水,加入柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液加热煮沸,保持2 min进行抗原修复,室温冷却,PBS清洗切片,3% H_2O_2溶液水浴10 min消除内源性过氧化物酶。将切片与10%山羊血清在室温下共孵育30 min以封闭非特异性抗原。加入PARP1兔多克隆抗体(1∶200)4 ℃孵育过夜,次日PBS清洗后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶1 000),室温继续孵育1 h,PBS再次清洗,DAB显色,苏木素进行复染,反复冲洗切片后,滴加中性树胶封固,自然干燥。光学显微镜下观察切片染色情况,棕黄色至棕褐色染色即为蛋白阳性表达,并拍摄图片。镜下随机选择5个视野,观察染色强度,统计该视野下阳性细胞数并计算阳性细胞率,结果以染色强度与阳性细胞率进行综合评定,两者之和<2分为阴性,≥2分为阳性。染色强度评分:未着色记0分,黄色记

1分,棕黄色记2分,棕褐色记3分。阳性细胞率评分:<5%为0分,5%~<26%为1分,26%~<51%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分。

1.3.2 qRT-PCR 将于-80 ℃冰箱中保存的LSCC组织及癌旁组织标本取出,在无菌环境下剪碎,加入液氮研磨后,TRizol法提取总RNA,具体按照试剂盒说明书操作,将获得的总RNA通过Nano Drop2000仪测定纯度与浓度。去除总RNA样品中的gDNA,反转录合成cDNA,以cDNA为模板,进行qRT-PCR扩增,检测PARP1 mRNA表达。参照试剂盒说明书配制扩增反应体系,在Bio-CFX96系统上进行检测,反应条件:95 ℃ 3 min,1次循环;95 ℃ 20 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 45 s,45次循环,实验重复3次。内参基因为β-actin,根据$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算PARP1 mRNA相对表达量。各基因引物序列如下:PARP1上游引物5′-CAGGCAAGCAAGGCGGCGGC-3′,下游引物5′-CGCCCACTCTTAGCATACTC-3′;β-actin上游引物5′-CCCCATTGAACATGGCATTG-3′,下游引物5′-ACGACCAGAGGCATACAGG-3′。

1.3.3 细胞培养与分组 将冻存的Hep-2细胞复苏,添加含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基(含100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素),于37 ℃、5%CO_2中培养,以0.25%胰酶消化,常规传代。取对数生长期的Hep-2细胞,以2×10^3个/孔的密度接种于96孔板中,分别使用浓度为0、10、20、30、40、50 μmol/L的Menadione诱导Hep-2细胞,建立氧化损伤模型。孵育24 h后,采用MTT法计算不同浓度处理下细胞增殖抑制率。再将培养的Hep-2细胞以2×10^4个/孔的密度接种于24孔板中,并将其分为对照组(正常培养)、Men组(20 μmol/L Menadione处理)、Men+PARP1抑制剂组(20 μmol/L Menadione+10 μmol/L PARP1抑制剂Olaparib共处理),24 h后收集各组细胞进行后续研究。

1.3.4 MTT法 收集不同浓度Menadione处理后及对照组、Men组、Men+PARP1抑制剂组Hep-2细胞,在每孔细胞内加入20 μL的MTT试剂液(5 mg/mL),每组设置6个复孔,于37 ℃、5%CO_2中孵育4 h,加入150 μL DMSO溶液,摇床振荡至蓝紫色结晶甲瓒完全溶解。使用酶标仪测定各孔细胞在490 nm波长处的吸光度(absorbance, A)值,计算细胞增殖抑制率,增殖抑制率=(1-实验组A值/对照组A值)×100%。

1.3.5 流式细胞术 收集各组Hep-2细胞后离心,调整密度,以2×10^4个/孔的密度接种于96孔板中,添加终浓度为5 μmol/L的DCFH-DA荧光探针,于37 ℃、5%CO_2下避光孵育20 min,晃动3次,使细胞充分吸取探针。PBS清洗细胞,常规消化,离心弃上清液,PBS重悬细胞。流式细胞仪检测各孔细胞内活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平,实验重复3次。

1.3.6 细胞免疫荧光染色 将处理后的各组细胞分别以1×10^4个/孔的密度接铺到含盖玻片的24孔板上,预冷的4%多聚甲醛固定15 min,PBS清洗,添加含0.1% Triton X-100的PBS封闭液,置于室温封闭30 min,弃封闭液后清洗干净,加入γ-H2AX兔多克隆抗体(1∶200),使盖玻片上的细胞面浸入到一抗液中,4 ℃孵育过夜。次日,PBS清洗,滴加Alexa Fluor®488荧光二抗(1∶500)于盖玻片的细胞面上,室温避光孵育1 h,PBS再次清洗,DAPI染核10 min,滴加抗荧光淬灭封片液封固,自然干燥,通过荧光显微镜观察各组细胞内γ-H2AX焦点形成情况,并拍摄图片,Image-Pro Plus 6.0软件分析各组细胞的荧光强度。

1.3.7 Western blot 分别收集处理后的各组细胞,加入预冷的RIPA裂解液于冰上充分裂解,以12 000 r/min离心5 min,弃沉淀取上清,BCA法测定上清蛋白浓度。上样缓冲液与蛋白混匀,100 ℃金属浴变性10 min,制备10%聚丙烯酰胺凝胶,取等量蛋白上样至凝胶孔,通过电泳分离蛋白,并电转至PVDF膜上,TBST洗膜,将膜在5%山羊血清中室温封闭2 h,清洗后加入γ-H2AX兔多克隆抗体、DNA-PKcs兔多克隆抗体、BRCA1兔单克隆抗体、LIG4兔单克隆抗体、Caspase-3兔多克隆抗体、Caspase-9兔多克隆抗体及GAPDH兔多克隆抗体(稀释比均为1∶1 000),于4 ℃孵育过夜。次日,TBST洗膜,加入对应辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶5 000),室温孵育2 h,TBST再次洗膜,ECL显影,以GAPDH为内参,Image-Pro Plus 6.0软件分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋白相对表达量(目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值之比)。

1.3.8 Hoechst33258染色 收集处理后的各组细胞,分别以1×10^4个/孔的密度接铺到含盖玻片的6孔板上,预冷的4%多聚甲醛固定10 min,PBS清洗,加入5 mg/L Hoechst33258染液,轻轻晃动使染液分布均匀,于37 ℃、5%CO_2下避光染色5 min,PBS再次清洗,滴加抗荧光淬灭封片液封固,自然晾干,在荧光显微镜下观察各组细胞的形态,并拍摄图片。

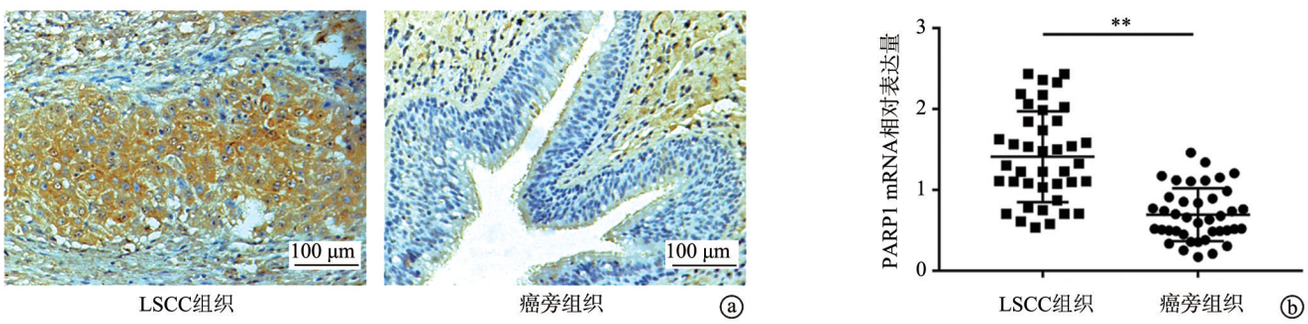
1.4 统计学分析

采用SPSS 23.0统计学软件分析数据,GraphPad Prism 8.30软件绘制统计图,符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用配对t检验,多组间数据比较采用单因素方差分析(*ANOVA*),进一步两两比较采用*LSD-t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　PARP1在LSCC组织及癌旁组织中的表达

LSCC组织及癌旁组织中染色程度不同，LSCC组织内染色较深（图1a）；LSCC组织的PARP1阳性表达率（92.5%）显著高于癌旁组织（10.0%），差异有统计学意义（$P<0.01$）。qRT-PCR结果显示，LSCC组织中PARP1 mRNA表达显著高于癌旁组织（$P<0.01$），见图1b。

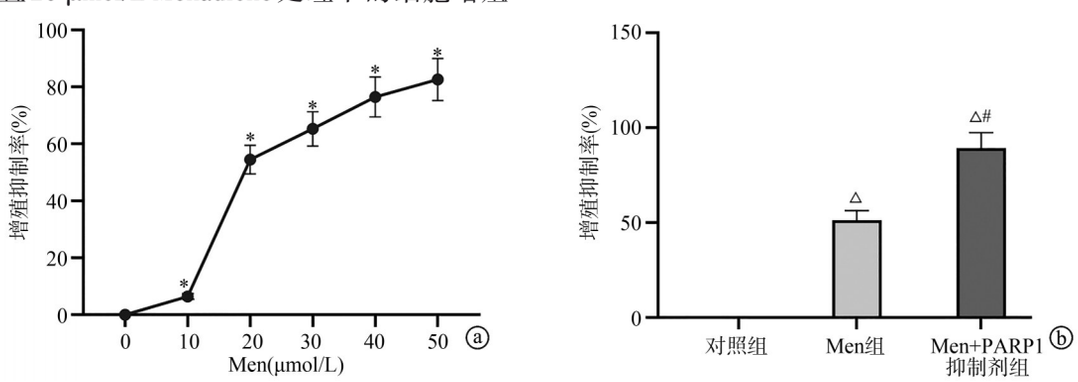


a：免疫组化染色；b：qRT-PCR检测PARP1 mRNA表达　**：$P<0.01$

图1　LSCC组织及癌旁组织中PARP1的表达

2.2　抑制PARP1对Menadione诱导的Hep-2细胞增殖的影响

与0 μmol/L比较，经10、20、30、40、50 μmol/L Menadione处理的Hep-2细胞增殖抑制率均升高（$P<0.05$），且20 μmol/L Menadione处理下的细胞增殖抑制率接近50%，见图2a。与对照组比较，Men组和Men+PARP1抑制剂组细胞增殖抑制率均升高（$P<0.05$），且Men+PARP1抑制剂组高于Men组（$P<0.05$），见图2b。



a：不同浓度Menadione处理的Hep-2细胞增殖抑制率；b：各组Hep-2细胞增殖抑制率　*：与0 μmol/L比较，$P<0.05$；△：与对照组比较，$P<0.05$；#：与Men组比较，$P<0.05$

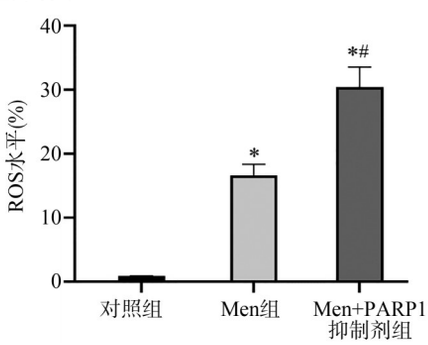
图2　MTT法检测Hep-2细胞增殖抑制率

2.3　抑制PARP1对Menadione诱导的Hep-2细胞ROS的影响

Men组和Men+PARP1抑制剂组Hep-2细胞内ROS水平高于对照组（$P<0.05$），且Men+PARP1抑制剂组ROS水平高于Men组（$P<0.05$），见图3。

2.4　抑制PARP1对Menadione诱导的Hep-2细胞DNA氧化损伤的影响

荧光显微镜下观察到各组Hep-2细胞绿色荧光强度不一，说明γ-H2AX焦点形成情况不同。与对照组比较，Men组和Men+PARP1抑制剂组细胞内γ-H2AX焦点形成明显增加，平均荧光强度均升高（$P<0.05$）；与Men组比较，Men+PARP1抑制剂组细胞内γ-H2AX焦点形成更多，平均荧光强度更强（$P<0.05$），见图4。

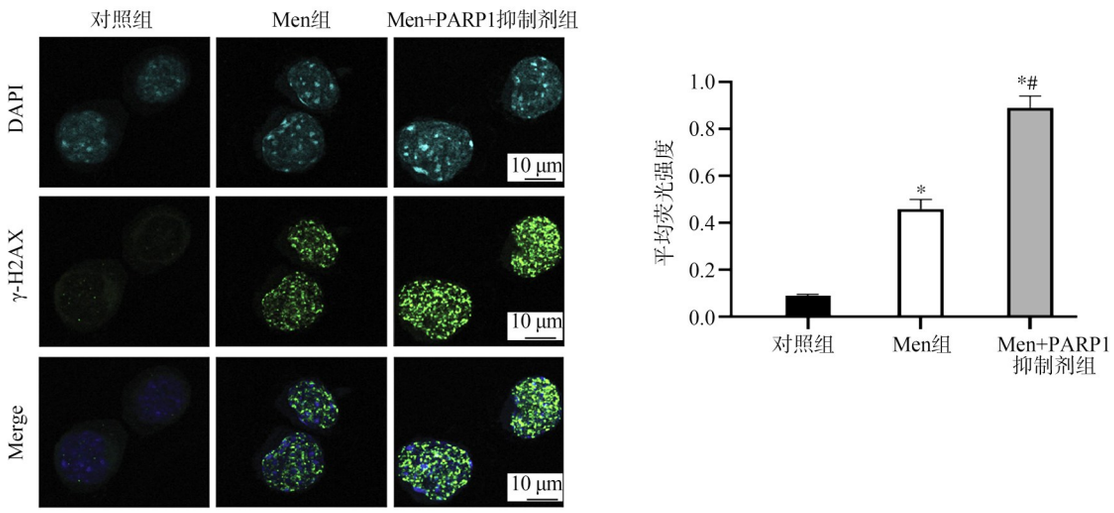


*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与Men组比较，$P<0.05$

图3　各组Hep-2细胞内ROS检测

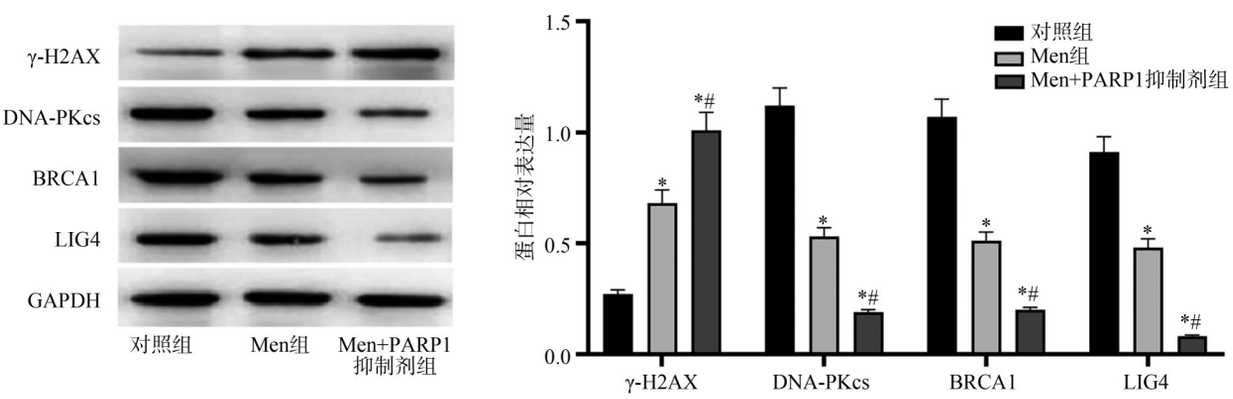
Men组和Men+PARP1抑制剂组中γ-H2AX蛋白表达高于对照组（$P<0.05$），且Men+PARP1抑制剂组

高于Men组($P<0.05$)；Men组和Men+PARP1抑制剂组DNA-PKcs、BRCA1及LIG4蛋白表达低于对照组($P<0.05$)，且Men+PARP1抑制剂组低于Men组($P<0.05$)，见图5。



*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与Men组比较，$P<0.05$

图4 各组Hep-2细胞内γ-H2AX表达(免疫荧光染色)



*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与Men组比较，$P<0.05$

图5 各组Hep-2细胞中相关蛋白表达水平比较

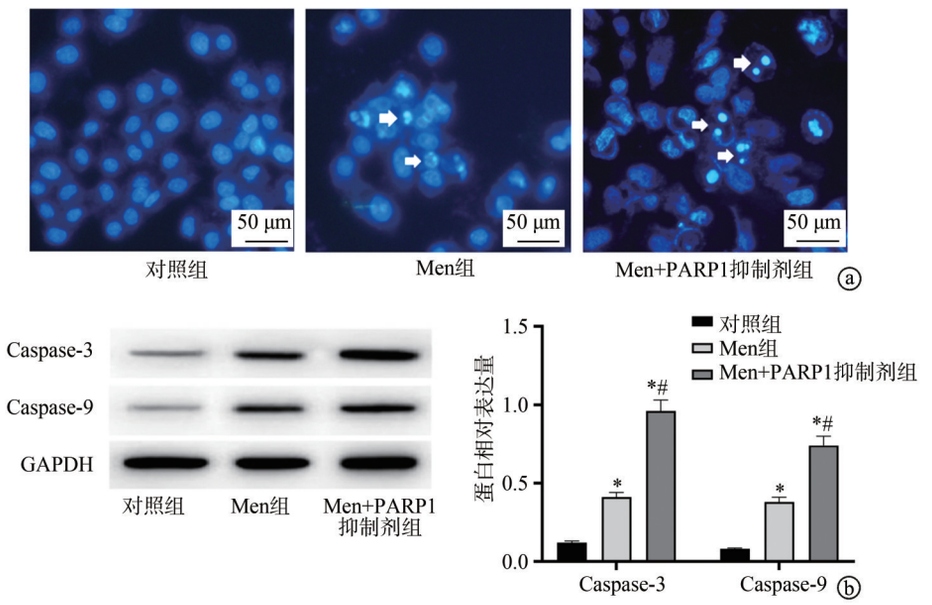
2.5 抑制PARP1对Menadione诱导的Hep-2细胞凋亡的影响

荧光显微镜下各组Hep-2细胞内均可见蓝色荧光，对照组胞核外围轮廓清晰，细胞形态、大小基本一致，无明显核浓缩现象；Men组部分细胞出现浓缩、碎裂的蓝色凋亡体，说明有较多的细胞凋亡，而在Men+PARP1抑制剂组中这些现象更明显，见图6a。Men组和Men+PARP1抑制剂组中Caspase-3和Caspase-9蛋白表达高于对照组($P<0.05$)，且Men+PARP1抑制剂组高于Men组($P<0.05$)，见图6b。

3 讨论

目前，LSCC的治疗主要为手术、放疗、化疗及全身治疗，在疾病早期可取得良好的治疗效果，但是由于缺乏明显的特异性症状，LSCC的早期筛查较为困难，导致肿瘤不断生长并扩散，因而多数患者在确诊时已处于晚期，全喉切除术可能是唯一的选择，但手术导致患者发声、呼吸和吞咽等重要生理功能严重受损，从而降低了生活质量[2]。研究表明，LSCC的发生发展可能与饮酒、吸烟、HPV感染有关，其发病机制复杂，可能涉及多种分子及信号通路的变化[11]。因此，探索适合早期临床筛查和治疗的新型标志物对LSCC的诊治有重要意义。

已有大量临床前或临床研究发现，PARP1在各种癌症中过表达，抑制PARP1可以抑制肿瘤生长和转移。Ji等[12]研究发现，PARP1在神经内分泌宫颈癌中过表达，并且与肿瘤的高侵袭性相关；Dutta等[13]研究显示，三阴性乳腺癌细胞系中PARP1表达升高，敲低PARP1表达后，CCL2的转录水平降低，从而抑制细胞侵袭；Kupczyk等[14]研究表明，PARP1在黑色素瘤细胞系及皮肤黑色素瘤组织中均过表达，且PARP1的表达升高与无病生存期缩短及肿瘤转移密切相关，推测基



a: Hoechst33258染色(箭头所示为凋亡小体);b: Caspase-3和Caspase-9蛋白表达 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与Men组比较,$P<0.05$

图6 各组Hep-2细胞凋亡形态观察及蛋白表达情况

于靶向抑制PARP1的治疗在皮肤黑色素瘤中具有潜在作用。本研究发现,PARP1在LSCC组织中表达显著上调,提示PARP1异常高表达可能与LSCC的发生发展相关,其可能是LSCC临床筛查与诊断的潜在靶点。因此,PARP1作为抗癌治疗靶点具有很大潜力。目前,已有多种PARP1抑制剂被批准用于人类恶性肿瘤治疗或临床药物研究中,并在单独化疗、联合放化疗方面取得了一定进展。恶性肿瘤的治疗策略之一是诱导肿瘤细胞持续性DNA损伤,从而促使肿瘤细胞衰老或凋亡。目前,许多抗癌药物通过在肿瘤细胞中诱导氧化应激造成其DNA损伤,从而促进细胞凋亡[15]。鉴于基因组的不稳定性可能有害,肿瘤细胞可能通过增强抗氧化代谢和提高DNA修复机制及功能来抵御氧化应激损伤,导致肿瘤细胞对DNA氧化损伤产生一定的耐受力。而PARP1作为一种感知DNA链断裂并协调其修复的蛋白,在肿瘤细胞修复DNA氧化损伤中具有重要作用。Menadione是一种常用的氧化应激诱导剂,可引起线粒体DNA突变导致功能受损,加速细胞内ROS过度积累,进一步造成细胞DNA氧化损伤[16]。Olaparib作为PARP1抑制剂已被美国食品药品监督管理局批准用于治疗BRCA突变的卵巢癌,在其他肿瘤的治疗中也显示出良好的效果[17]。本研究结果显示,经不同浓度Menadione处理的Hep-2细胞增殖抑制率升高,且Menadione与PARP1抑制剂Olaparib联合处理的Hep-2细胞增殖抑制率进一步升高,提示抑制PARP1能够提高Menadione对Hep-2细胞增殖的抑制效果。

本研究结果显示,通过使用PARP1抑制剂Olaparib处理Menadione诱导的Hep-2细胞后,细胞内ROS水平进一步升高,γ-H2AX焦点形成明显增加;同时,细胞内γ-H2AX蛋白表达升高,而DNA-PKcs、BRCA1及LIG4蛋白表达降低。组蛋白变体H2AX是核小体的重要组成部分,负责启动DNA修复过程的早期步骤,通过促进DNA双链断裂修复的信号级联来维持基因组的稳定性。在DNA双链断裂后,位于丝氨酸139位C-端保守区域内的H2AX磷酸化形成γ-H2AX,γ-H2AX招募修复蛋白并在DNA双链断裂周围形成焦点,因此,γ-H2AX是DNA损伤程度的标志物[18-19]。非同源末端连接(non-homologous end joining,NHEJ)机制可通过DNA双链断裂末端连接来介导修复,这也是哺乳动物体内DNA损伤修复的主要方式。DNA-PKcs作为NHEJ修复机制的核心成员,其表达受到抑制会严重影响NHEJ通路的修复能力[20]。BRCA1通过同源重组促进DNA双链断裂修复,并对DNA复制起到保护作用;LIG4也是NHEJ修复途径的关键组成分子,是末端连接形成的必需物,当LIG4活性受阻时会影响NHEJ通路的修复能力和效果[21]。因此,抑制PARP1促进Menadione诱导的Hep-2细胞DNA氧化损伤的作用可能与其调控NHEJ修复机制有关。

Caspases依赖性凋亡途径在程序性细胞死亡中发挥重要作用,能够切割细胞内许多其他关键功能的蛋白质,从而导致细胞凋亡。Caspase-3和Caspase-9是

该蛋白酶家族的主要成员,细胞毒药物、放疗或免疫疗法等抗癌疗法都是通过激活Caspase-3导致肿瘤细胞凋亡[22],Caspase-9可通过外在的死亡配体依赖机制和内在的线粒体依赖途径特异性触发肿瘤细胞凋亡[23]。本研究结果显示,在经PARP1抑制剂Olaparib处理Menadione诱导的Hep-2细胞中核浓缩、碎裂的现象更为明显,Caspase-3和Caspase-9蛋白表达显著上调,由此说明抑制PARP1能够进一步促进Menadione诱导的Hep-2细胞凋亡。

综上,PARP1在LSCC组织中过表达,且使用PARP1抑制剂处理经Menadione诱导的Hep-2细胞能够促进ROS介导的氧化损伤,降低NHEJ途径对DNA双链断裂的修复能力,促进细胞凋亡,为治疗LSCC提供了潜在的靶点,也为LSCC的筛查与诊断提供了一定的理论依据。但本研究仅初步阐释了PARP1在Hep-2细胞DNA氧化损伤及凋亡中的作用,其在LSCC中的具体作用机制尚不清楚,有待后续进一步研究。

[参考文献]

[1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.

[2] Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, et al. An update on larynx cancer[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 31-50. doi: 10.3322/caac.21386.

[3] Farlow JL, Brenner JC, Lei YL, et al. Immune deserts in head and neck squamous cell carcinoma: a review of challenges and opportunities for modulating the tumor immune microenvironment[J]. Oral Oncol, 2021, 120: 105420. doi: 10.1016/j.oraloncology.

[4] Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33. doi: 10.3322/caac.21654.

[5] Kim C, Chen C, Yu Y. Avoid the trap: targeting PARP1 beyond human malignancy[J]. Cell Chem Biol, 2021, 28(4): 456-462. doi: 10.1016/j.chembiol.2021.02.004.

[6] Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(10): 610-621. doi: 10.1038/nrm.2017.53.

[7] Kontandreopoulou CN, Diamantopoulos PT, Tiblalexi D, et al. PARP1 as a therapeutic target in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome[J]. Blood Adv, 2021, 5(22): 4794-4805. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004638.

[8] Zhang X, Wang Y, A GR, et al. Pan-cancer analysis of PARP1 alterations as biomarkers in the prediction of immunotherapeutic effects and the association of its expression levels and immunotherapy signatures[J]. Front Immunol, 2021, 12: 721030. doi: 10.3389/fimmu.2021.721030.

[9] Rajawat J, Shukla N, Mishra DP. Therapeutic targeting of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) in cancer: current developments, therapeutic strategies, and future opportunities[J]. Med Res Rev, 2017, 37(6): 1461-1491. doi: 10.1002/med.21442.

[10] Manchana T, Phoolcharoen N, Tantbirojn P. BRCA mutation in high grade epithelial ovarian cancers[J]. Gynecol Oncol Rep, 2019, 29: 102-105. doi: 10.1016/j.gore.2019.07.007.

[11] Tumban E. A current update on human papilloma virus-associated head and neck cancers[J]. Viruses, 2019, 11(10): 922. doi: 10.3390/v11100922.

[12] Ji X, Sui L, Song K, et al. PD-L1, PARP1, and MMRs as potential therapeutic biomarkers for neuroendocrine cervical cancer[J]. Cancer Med, 2021, 10(14): 4743-4751. doi: 10.1002/cam4.4034.

[13] Dutta P, Paico K, Gomez G, et al. Transcriptional regulation of CL2 by PARP1 is a driver for invasiveness in breast cancer[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(5): 1317. doi: 10.3390/cancers12051317.

[14] Kupczyk P, Simiczyjew A, Marczuk J, et al. PARP1 as a marker of an aggressive clinical phenotype in cutaneous melanoma: a clinical and an in vitro study[J]. Cells, 2021, 10(2): 286. doi: 10.3390/cells10020286.

[15] de Almeida LC, Calil FA, Machado-Neto JA, et al. DNA damaging agents and DNA repair: from carcinogenesis to cancer therapy[J]. Cancer Genet, 2021, 252/253: 6-24. doi: 10.1016/j.cancergen.2020.12.002.

[16] Majiene D, Kuseliauskyte J, Stimbirys A, et al. Comparison of the effect of native 1, 4-Naphthoquinones plumbagin, menadione, and lawsone on viability, Redox status, and mitochondrial functions of C6 glioblastoma cells[J]. Nutrients, 2019, 11(6): 1294. doi: 10.3390/nu11061294.

[17] Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers[J]. N Engl J Med, 2009, 361(2): 123-134. doi: 10.1056/NEJMoa0900212.

[18] Noubissi FK, McBride AA, Leppert HG, et al. Detection and quantification of γ-H2AX using a dissociation enhanced lanthanide fluorescence immunoassay[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 8945. doi: 10.1038/s41598-021-88296-3.

[19] 王丽娜,罗 志,张 立. DNA损伤及其标志物γ-H2AX检测的研究进展[J]. 分析试验室, 2020, 39(10): 1131-1136. doi: 10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2020.060402.

[20] Yang H, Yao F, Marti TM, et al. Beyond DNA repair: DNA-PKcs in tumor metastasis, metabolism and immunity[J]. Cancers (Basel), 2020, 12(11): 3389. doi: 10.3390/cancers12113389.

[21] Martinez AR, Kaul Z, Parvin JD, et al. Differential requirements for DNA repair proteins in immortalized cell lines using alternative lengthening of telomere mechanisms[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2017, 56(8): 617-631. doi: 10.1002/gcc.22465.

[22] Cartwright IM, Liu X, Zhou M, et al. Essential roles of Caspase-3 in facilitating Myc-induced genetic instability and carcinogenesis[J]. Elife, 2017, 6: e26371. doi: 10.7554/eLife.26371.

[23] Zhang J, Kodali S, Chen M, et al. Maintenance of germinal center B cells by Caspase-9 through promotion of apoptosis and inhibition of necroptosis[J]. J Immunol, 2020, 205(1): 113-120. doi: 10.4049/jimmunol.2000359.

(编辑:魏 源)