

S8 联合小分子化合物 Z18 的抗肿瘤效应研究

周翠红^{1,2,†}, 王晓奎^{3,†}, 周军^{1,2}, 毕得⁴, 邓小燕¹

1. 北京航空航天大学生物与医学工程学院;教育部生物力学重点实验室,北京 100191
2. 北京大学化学与分子工程学院;北京核磁共振中心,北京 100871
3. 军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850
4. 北京航空航天大学航空科学与工程学院人环与工程系,北京 100191

摘要 为了探讨 S8 联合小分子化合物 Z18 的抗肿瘤效应,本研究通过联合用药方式处理 HeLa 细胞后,采用台盼蓝染色和流式细胞仪对细胞死亡率和死亡方式进行检测。电镜实验证实 Z18 诱导细胞自噬,并利用 Western Blotting 检测联合用药后 LC3-II 的变化和使用转染了 GFP-LC3 或 mRFP-EGFP-LC3 的 HeLa 细胞检测联合用药对细胞自噬和自噬流的影响。最后通过 ATG5 siRNA 和 CQ 抑制自噬和自噬流,观察联合用药对细胞的自噬和死亡的变化,进一步研究 S8 对 Z18 的抗肿瘤作用的影响。结果显示,S8 联合用药后,细胞死亡率显著升高($P<0.05$),死亡方式主要以坏死为主。S8 明显地促进了 Z18 对 HeLa 细胞的毒性,其促进作用具有剂量依赖性。但联合用药并未降低 Z18 引起的自噬空泡集聚,LC3-II 蛋白表达也未发生变化。抑制自噬后,并未影响联合用药促进细胞死亡的结果。因此,Z18 在联合使用 S8 的情况下,细胞自噬水平没有发生明显变化,而细胞死亡比例明显升高,自噬并不影响联合用药诱导的细胞死亡。S8 可能通过调节细胞坏死的其他途径进而促进细胞对 Z18 的敏感性,并进一步使细胞发生坏死。

关键词 S8;Z18;联合用药;坏死;自噬

中图分类号 Q291

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.08.001

Synergistic Anticancer Effect of Z18 Combined with S8 *in vitro*

ZHOU Cuihong^{1,2,†}, WANG Xiaokui^{3,†}, ZHOU Jun^{1,2}, BI De⁴, DENG Xiaoyan¹

1. Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology of Ministry of Education, School of Biological Science and Biomedical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China
2. Beijing Nuclear Magnetic Resonance Center, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China
3. Institute of Pharmacology and Toxicology of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China
4. Department of Human Machine and Environment Engineering, School of Aeronautic Science and Engineering, School of Aeronautic Science and Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China

Abstract To study the synergistic anticancer effect of Z18 combined with S8 *in vitro* against HeLa cell, we firstly determined the cell death rate using the trypan blue exclusion method and the necrotic cell death was identified by flow cytometry. After being confirmed the autophagy induction in Z18-treated cells, we next analyzed LC3-II conversion by the western blotting and used GFP-LC3 or mRFP-EGFP-LC3 expressing cells to check the autophagic activity and the autophagic flux after the combination treatment. Finally, we inhibited the autophagic activity or the autophagic flux by using ATG5 siRNA or CQ and determined the cell death rate after the combination treatment. It is shown that the pharmacologic inhibitor of Fatty Acid Synthase (FAS) S8 would promote the Z18-mediated cell death in HeLa cells ($P<0.05$) with the increase of the concentration of S8 and the cell would die mainly as a result of necrotic processes. However, when Z18 is combined with S8, S8 has no effect on the autophagic activity induced by Z18, such as LC3-II

收稿日期:2012-02-17;修回日期:2012-03-07

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(81102309);国家自然科学基金项目(11072023,31170904)

作者简介:周翠红,博士研究生,研究方向为细胞分子生物学,电子信箱:zhoukelly@126.com;邓小燕(通信作者,中国科协所属全国学会个人会员登记号:S030001000M),教授,研究方向为生物力学血流动力学,电子信箱:dengxy1953@buaa.edu.cn;†:并列第一作者

conversion. Inhibited autophagic activity has no effect on the cell death after the combination treatment. It is suggested that S8 does not change the autophagic activity but increase the cell death rate in HeLa cells. The enhancement of Z18 anti-tumor activity by S8 may be through another pathway of cell necrosis, and is not related to the autophagy pathway.

Keywords S8; Z18; synergistic anticancer effect; necrosis; autophagy

0 引言

Z18 是靶向抗凋亡蛋白 Bcl-2/Bcl-XL 的小分子化合物抑制剂,能够诱导 HeLa 细胞发生自噬和死亡^[1]。Z18 诱导细胞自噬和死亡的机制不同于其他靶向 Bcl-2/Bcl-XL 小分子的机制,如 ABT-737 与 obatoclax 均是通过诱导细胞凋亡方式促进肿瘤细胞死亡^[2-3],Z36 诱导细胞发生自噬性死亡^[4],而本实验室前期结果表明,Z18 是通过诱导非经典的 Beclin1-independent 的自噬和坏死^[5]。目前,Z18 的抗肿瘤效果和机制还在进一步的研究,其原理有望得到揭示。

随着一系列具有高特异性和高选择性诱导凋亡的小分子化合物被发现,人们逐渐致力于在靶向小分子化合物中寻找新型的抗肿瘤药物。多种抗肿瘤药物的联合使用为人们寻找良好的抗肿瘤疗效提供了一种新的方法和思路。由于联合使用的药物具有不同的作用机制和毒性,因而在肿瘤的化疗中使用多种药物联合往往会具有协同作用。脂肪酸合成酶 (Fatty Acid Synthase, FAS) 是脂肪酸合成过程中的关键酶,其抑制剂可以特异性的抑制 FAS 的活性,不可逆地抑制内源性脂肪酸的合成,从而抑制肿瘤细胞的增殖并诱导细胞发生凋亡^[6-7]。脂肪酸合成酶抑制剂与抗肿瘤药物的联合用药正是该领域的研究热点^[8],通过该研究有望为癌症的治疗提供新的思路和策略。S8 是一种 FAS 的特异性抑制剂,S8 与 Z18 药物联用的抗肿瘤效应尚未阐明。本文通过联合使用 S8 和 Z18,与单独用药组的效果相比较,探讨 S8 药物联用对 Z18 诱导的细胞自噬和死亡的影响,以及联合用药后的抗肿瘤效应,揭示其联合用药的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM 培养基,购自 Hyaclon 公司;标准胎牛血清,购自旭日公司产品;Lipofectamine™2000, 购自 Invitrogen 公司;Staurosporine (STS), 购自碧云天生物科技公司;Chloroquine (CQ), 购自美国 Sigma 公司;RIPA 裂解液,购自碧云天生物科技公司;LC3 抗体,购自美国 Sigma 公司;Annex V-FIT C/PI 试剂盒, 购自美国 BD Biosciences Pharmingen 公司; β -actin, 购自 Santa Cruz 公司;Z18 由军事医学科学院合成^[1];GFP-LC3 购自 Addgene 公司;mRFP-EGFP-LC3 来源于日本教授 Tamotsu Yoshimori 的馈赠;ATG5 抗体, 购自 Cell Signaling 公司;ATG5 siRNA (CAA CUU GUU UCA CGC UAU A) 由 GeneChem 公司合成。

1.2 细胞培养和转染

取生长状况良好的对数生长期 HeLa 细胞,接种在培养

瓶中,用含有 10%胎牛血清-DMEM 培养基,其中含青霉素 (10U/mL)、链霉素 (0.1mg/mL),在含有 5%CO₂ 环境下的细胞培养箱中,37°C 进行培养。待细胞融合度达到 70%—80%时,按照 Lipofectamine™2000 转染试剂的步骤说明进行转染操作。转染后 24h,进行药物处理。

1.3 电镜观察

药物处理后,使用细胞刮刀收集细胞于离心管中,1000rpm/min 室温离心 10min,弃上清。沿着离心管壁缓慢加入新鲜的 2.5%戊二醛对细胞沉淀物进行固定。经丙酮逐级脱水,包埋和超薄切片等步骤,最后在透射电镜下观察自噬泡。

1.4 Western Bolt

收集经过药物处理的 HeLa 细胞,加入 100 μ L RIPA 细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂),反复吹打后冰浴 30min,16000rpm/min,4°C 离心 15min,取上清,测定蛋白质含量。然后分别取蛋白质 50 μ g 进行 SDS-PAGE 电泳,接着将目的蛋白转移至 NC 膜上,使用 5%脱脂奶粉封闭 1h,TBST 洗 3 次之后,结合 LC3 抗体(1:2000)或者 ATG5 抗体(1:1000),4°C 孵育过夜。TBST 洗 3 次,每次 5min,结合 HRP-山羊抗兔 IgG(1:2000)2h,TBST 洗 3 次。ECL 发光,暗室内 X 光片感光、显影、定影、观察。实验中的内参为 β -actin。

1.5 流式细胞仪检测细胞死亡率和死亡方式

死亡方式:HeLa 细胞消化成单细胞悬液,以 1×10^6 细胞数接种于 12 孔板中,24h 后按照实验分为 4 组,分别为正常对照组,S8 组,Z18 组和 S8+Z18 联合组,分别培养 12h 后,收集细胞,PBS 洗 2 遍,弃上清,分别加入 PI 和 Annexin V 避光孵育 15min,PBS 洗 2 遍,通过流式细胞仪检测细胞凋亡率和坏死率。每组实验重复 3 次。

死亡率:收集细胞同上,然后进行 PI 染色,通过流式细胞仪检测,统计 PI 阳性细胞比例。

1.6 自噬抑制实验

细胞接种同上,CQ 用无菌水溶解,制备成 10mg/L 的母液。在 Z18 和 S8 药物处理前,先用终浓度为 15 μ g/L 的 CQ 进行预处理 3h,然后分别对细胞进行 Z18 处理和 Z18 与 S8 药物联用处理,并对细胞死亡进行检测和分析。

ATG5 siRNA 实验:根据 Lipofectamine™2000 转染试剂的步骤说明进行转染操作。

2 结果与分析

2.1 单独用药和联合用药的对细胞死亡的影响

单独的 Z18 具有细胞毒性,与 S8 联合用药的效果比单独用药效果更明显。结果表明,Z18 单独用药时,10 μ mol/L 以上的

处理,能观察到 Z18 具有明显的细胞毒性。而 5 $\mu\text{mol/L}$ 以下的 Z18 处理 8h,并未诱导 HeLa 细胞的死亡(图 1(a))。根据 S8 的细胞毒性实验,30 $\mu\text{mol/L}$ 以下的 S8 处理对细胞没有明显的毒性,实验选取无毒性的低浓度 S8 进行药物联用处理(图 1(b))。然而,当 Z18 分别与 15 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 两个低浓度的 S8

联合处理后,Z18 的毒性明显增强,细胞死亡率显著升高,并且这种由 Z18 和 S8 联合用药死亡率的增高呈剂量依赖性。随着 Z18 浓度和 S8 浓度的升高,死亡率也显著升高(图 1(c)和(d))。流式细胞仪检测结果表明,S8+Z18 联合用药和 Z18 单独用药均诱导细胞发生坏死,死亡方式一致(图 2(a)–(c))。

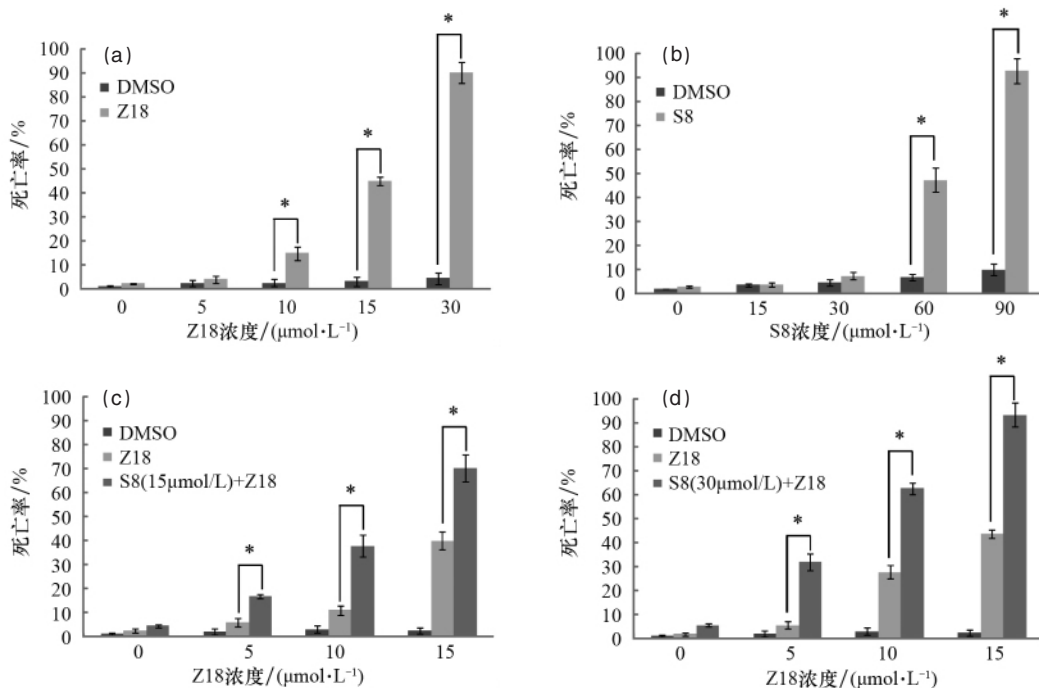


图 1 S8 与 Z18 联合用药对 HeLa 细胞死亡的影响

Fig. 1 Combined effect of S8 and Z18 in HeLa cell death

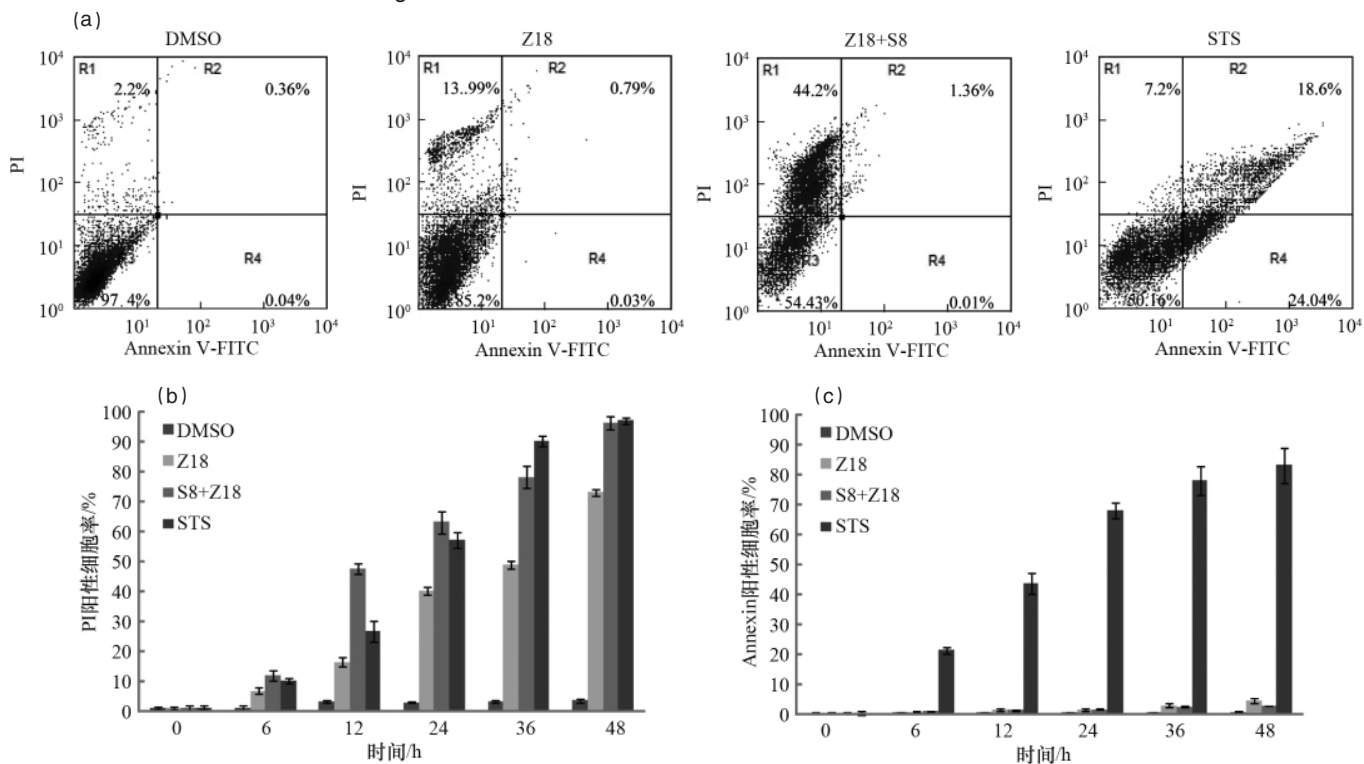
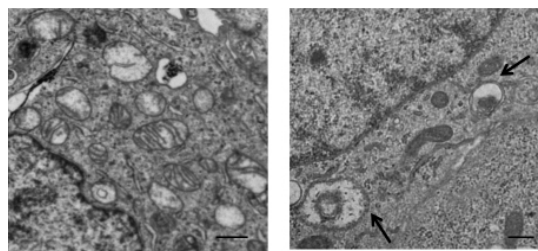


图 2 S8 与 Z18 联合用药促进 HeLa 发生坏死

Fig. 2 Combined treatment of S8 and Z18 promotes HeLa cell necrosis

2.2 单独用药和联合用药对细胞自噬的影响

前期研究发现 Z18 既能诱导 HeLa 细胞死亡, 也能诱导 HeLa 细胞发生自噬。从电镜结果可证明, Z18 处理后, HeLa 细胞内形成包含有部分细胞质的双层膜自噬囊泡结构 (图 3)。为了研究 S8 处理对 Z18 引起的细胞自噬的影响, 实验进一步观察联合用药后细胞自噬情况。在转染了 GFP-LC3 的 HeLa 细胞中, S8 与 Z18 联合用药和 Z18 单独用药的细胞中均能观察到 GFP-LC3 点状聚集的发生 (图 4(a)), 用 Western Bolt 检测 S8 与 Z18 联合用药和 Z18 单独用药处理 HeLa 细胞后 LC3-I 向 LC3-II 的转变, 结果表明, 两组细胞中均能检测到明显的 LC3-I 向 LC3-II 的转变, 并且两组间无明显差别 (图 4(b))。两组细胞在 GFP-LC3 点状聚集的细胞比例和单



(a) 对照组 (a) Control
(b) Z18 (b) Z18

图 3 Z18 诱导 HeLa 细胞自噬

Fig. 3 Z18 induced autophagy in HeLa cell

细胞内 GFP-LC3 的点状聚集数量上均无显著差异 (图 4(c) 和(d))。

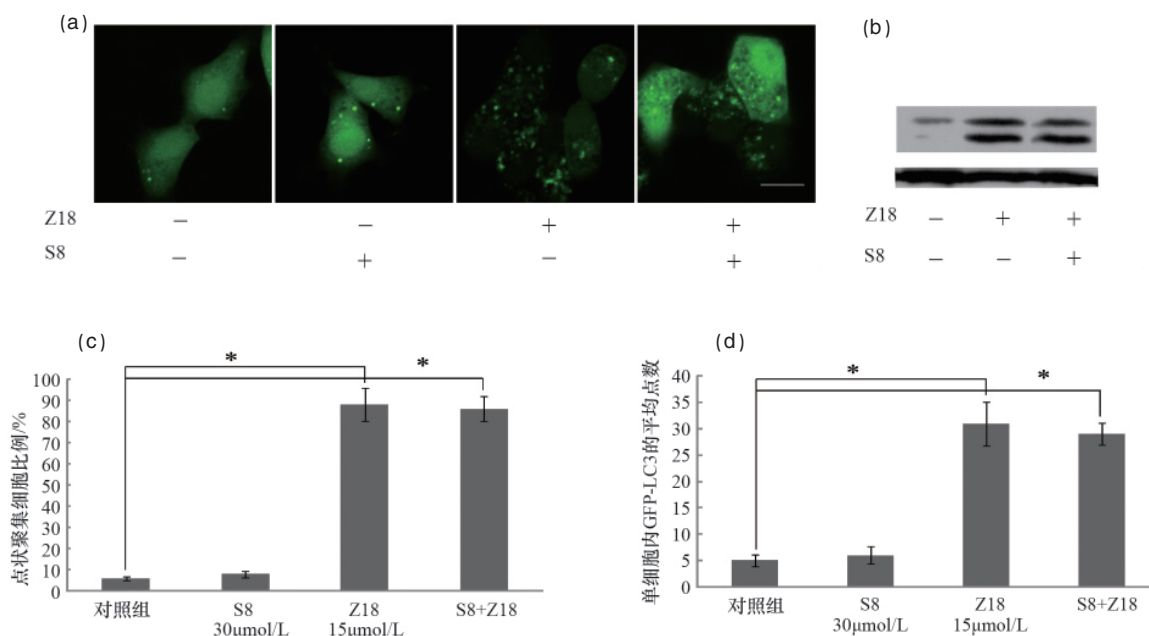


图 4 S8 与 Z18 联合用药对 HeLa 细胞自噬的影响

Fig. 4 Combined effect of S8 and Z18 in HeLa cell autophagy

进一步利用 mRFP-GFP-LC3 串联荧光标签对细胞内形成的自噬流进行检测, 发现联合用药后细胞内自噬流并没有受到影响 (图 5)。以上结果说明, S8 与 Z18 的联合用药并未影响 Z18 诱导的细胞自噬水平。

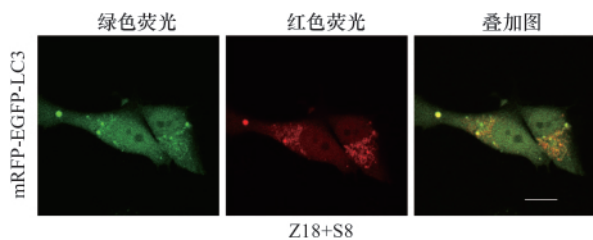


图 5 S8 与 Z18 联合用药对 HeLa 细胞自噬流的影响

Fig. 5 Combined effect of S8 and Z18 on autophagy flux in HeLa cells

2.3 细胞自噬被抑制后, 药物联用引起的细胞死亡变化

首先, 通过 Western Bolt 方法检测 ATG5 敲除的情况 (图 6(a))。在 ATG5 敲除的情况下, 细胞内自噬显著减少 (图 6(b))。Z18 单独用药后细胞内死亡也显著减少, 而联合用药的细胞死亡率与对照组 Z18 相比并无明显变化 (图 6(c))。接下来用 CQ 进行自噬晚期抑制处理, 首先利用 mRFP-EGFP-LC3 串联荧光标签的 LC3 对 CQ 预处理, 对 S8 与 Z18 联合用药引起的细胞自噬流进行检测。结果显示自噬流被阻断 (图 7(a)), 说明自噬晚期被抑制。进一步检测细胞死亡情况, 发现自噬晚期被抑制后, Z18+S8 联合用药与 CQ+Z18+S8 联合用药所引起的细胞死亡率在各个浓度下均无明显变化 (图 7(b))。这说明将细胞自噬抑制以后, 并不影响 S8 与 Z18 的联合用药诱导的细胞死亡, 联合用药促进细胞死亡的结果与自噬无关。

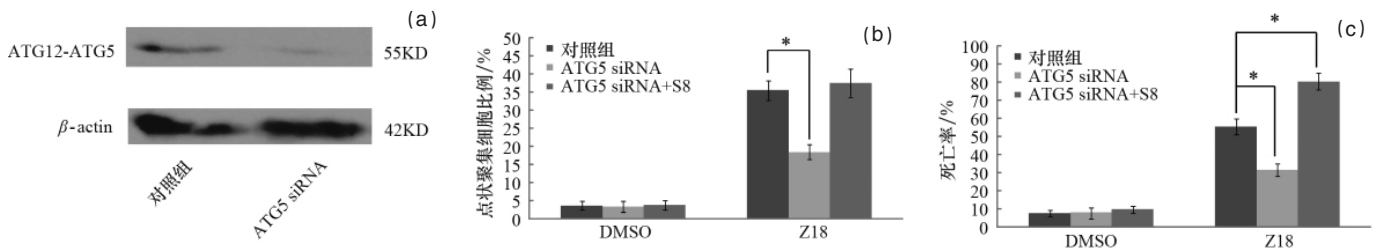


图6 ATG5 siRNA抑制自噬对S8与Z18联合用药诱导HeLa死亡的影响

Fig. 6 The role of ATG5 siRNA mediated-autophagy inhibition in HeLa cell death induced by S8 and Z18 combined treatment

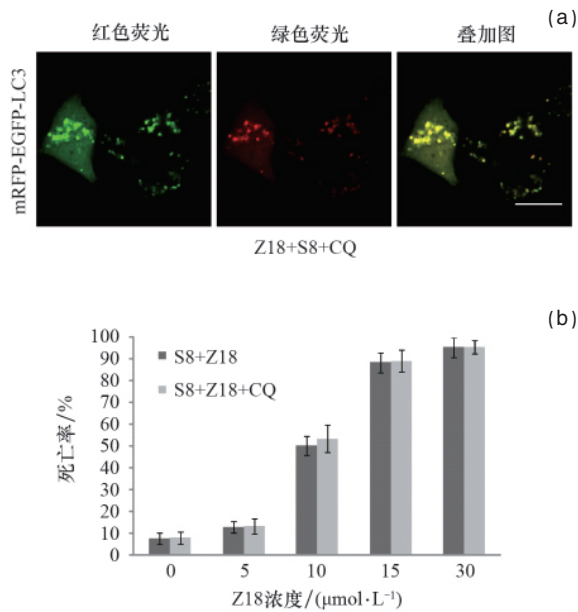


图7 CQ抑制自噬对S8与Z18联合用药诱导HeLa死亡的影响
Fig. 7 The role of CQ mediated-autophagy inhibition in HeLa cell death induced by S8 and Z18 combined treatment

3 讨论

根据以往的报道,靶向抗凋亡蛋白 Bcl-2/Bcl-XL 的小分子化合物往往会诱导细胞发生凋亡^[2,3,9],但是 Z18 则是诱导细胞发生自噬和坏死。在早期报道中,Z18 单独用药后,在 ATG5 敲除情况下,细胞内自噬显著减少,而此时细胞内死亡也显著减少,而用 CQ 进行自噬抑制处理后,Z18 诱导细胞内死亡增加^[1]。这说明 Z18 诱导的细胞自噬对细胞死亡具有一定的影响,并且抑制早期和晚期的自噬对其诱导的细胞死亡具有不同的效果^[1]。在本实验中,S8 与 Z18 的联合用药使得细胞对 Z18 的敏感性明显提高,具体表现在 Z18 对细胞的毒性显著增强,并且这种增效效果具有 S8 的剂量效应。但是,自噬实验表明,S8 并没有影响或者参与到 Z18 诱导的细胞自噬途径中,并且无论对细胞自噬进行早期或者晚期的抑制,对 S8+Z18 联合用药诱导的细胞死亡率均无明显影响。因而,我们推测,在联合用药过程中,S8 可能通过与自噬无关的其他通路促进 Z18 诱导的细胞发生坏死,这种联合用药的机制可能更为复杂。目前 S8 和 Z18 联合用药的方式和分子机制还

有待进一步的研究。

4 结论

Z18 是特异性结合 Bcl-2/Bcl-XL 的靶向小分子化合物,能够诱导 HeLa 细胞发生自噬和坏死。Z18 与脂肪酸合成酶抑制剂 S8 联合处理后,尽管未能调节 Z18 诱导的细胞自噬,但是 S8 能显著提高 Z18 对细胞的毒性,促进 Z18 诱导的肿瘤细胞发生坏死。在 S8 与 Z18 联合用药过程中,S8 可能通过与自噬无关的其他通路促进 Z18 诱导的细胞发生坏死。随着分子靶向的新型药物的开发,联合用药对药物抗肿瘤的机制和疗效需要进一步的探讨和研究,药物之间的联合使用也需要更加深层次的设计和考虑。

参考文献 (References)

- [1] Tian S, Lin J, Zhou J, *et al.* Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18 [J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1032-1041.
- [2] van Delft M F, Wei A H, Mason K D, *et al.* The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(5): 389-399.
- [3] Romani A A, Desenzani S, Morganti M M, *et al.* The BH3-mimetic ABT-737 targets the apoptotic machinery in cholangiocarcinoma cell lines resulting in synergistic interactions with zoledronic acid [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 67(3): 557-567.
- [4] Lin J, Zheng Z, Li Y, *et al.* A novel Bcl-XL inhibitor Z36 that induces autophagic cell death in HeLa cells[J]. *Autophagy*, 2009, 5(3): 314-320.
- [5] Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, *et al.* Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(11): 5934-5940.
- [6] Zecchin K G, Rossato F A, Raposo H F, *et al.* Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis [J]. *Laboratory Investigation*, 2011, 91(2): 232-240.
- [7] Zhou W, Simpson P J, Mcfadden J M, *et al.* Fatty acid synthase inhibition triggers apoptosis during S phase in human cancer cells[J]. *Cancer Research*, 2003, 63(21): 7330-7337.
- [8] Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2010, 120(1): 142-156.
- [9] Konopleva M, Watt J, Contractor R, *et al.* Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain -3 mimetic GX15-070 (obatoclax)[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(9): 3413-3420.

(责任编辑 吴晓丽)