

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2020.01.028

阿柔比星降低米托蒽醌引起的细胞死亡的机制

毛嘉, 周文娟, 潘洋, 刘岩

(四川大学生命科学院, 成都 610064)

摘要: 为了研究阿柔比星(Aclarubicin, 简称 ACL)和米托蒽醌(Mitoxantrone, 简称 MTX)联合作用的效果, 采用细胞存活率试剂盒和 Annexin V/PI 双染检测两种药物对 L929 细胞存活率的影响, 结果显示, ACL 能降低 MTX 引起的细胞死亡. 体内酶复合物检测结果显示, MTX 显著地促进了拓扑异构酶 2(TOP2)-DNA 复合物形成, 而 ACL 可以极大程度地降低该复合物的水平. Western-blotting 结果表明, 相比于 MTX 处理组细胞, ACL 和 MTX 联用能够显著降低 γ H2AX 蛋白的形成, 说明 ACL 能降低 MTX 造成的 DNA 损伤. 由此表明, ACL 是通过阻止 TOP2-DNA 复合物的形成来降低 MTX 引起的细胞死亡, 并暗示了联合使用时 ACL 可能会对 MTX 有拮抗作用.

关键词: 阿柔比星; 米托蒽醌; TOP2-DNA 复合物; DNA 损伤

中图分类号: Q279

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2020)01-0186-05

Study on the mechanism of Aclarubicin reducing Mitoxantrone-induced cell death

MAO Jia, ZHOU Wen-Juan, PAN Yang, LIU Yan

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: To explore the effect of Aclarubicin (ACL) and Mitoxantrone (MTX) combination, we detected the effects of the two drugs on the survival rate of the L929 cell line by cell survival kit and Annexin V/PI double staining. The results showed that ACL reduced MTX induced cell death. In vivo complex of enzyme assay (ICE assay) showed that MTX significantly promoted the formation of TOP2 -DNA complexes, but ACL significantly reduced the level of this complex. Western blotting showed that compared with MTX treated cells, the combination of ACL and MTX can significantly reduce the formation of γ H2AX protein, indicating that ACL can reduce MTX-induced DNA damage. This suggests that ACL countered MTX induced cell death via reducing TOP2-DNA formation, implicating that ACL might play an antagonistic role against MTX.

Keywords: Aclarubicin; Mitoxantrone; TOP2-DNA complexes; DNA damage

1 引言

在化疗过程中很多时候癌细胞会产生耐药性, 这对有效治疗癌症造成了极大的障碍^[1]; 为了克服

这种障碍, 临床上时常采用联合用药的方式. 但同时使用几种药物进行治疗时, 需要考虑药物之间的相互作用, 因为它们可能会改变药物的治疗效果.

米托蒽醌(Mitoxantrone, 简称 MTX)是 80 年

收稿日期: 2019-03-29

基金项目: 国家自然科学基金(81872447)

作者简介: 毛嘉(1995-), 女, 四川成都人, 硕士生, 研究方向为生物化学. E-mail: maojiamaojiamaojia@163.com

通讯作者: 刘岩. E-mail: yan.liu@scu.edu.cn

代研制出来的一种蒽环类广谱化疗药, 主要用于治疗急性髓系白血病(AML)、恶性淋巴瘤和乳腺癌^[2-3], 同时对神经系统疾病如多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)也有一定的疗效^[4]. 研究表明, MTX 是通过依赖于 TOP2 产生的双链 DNA 断裂引起细胞死亡. 简单地说, MTX 插入 DNA 双链的碱基对中, 促进 TOP2 和 DNA 形成稳定的复合物, 而该复合物的降解直接导致 DNA 双链断裂的产生, 最终引起细胞死亡^[5]. 如大多数化疗药一样, MTX 的治疗效果也受癌细胞耐药性的影响; 为了克服这个问题, 临床上尝试 MTX 与其他药物联用, 如 MTX 联合皮质类固醇激素治疗晚期前列腺癌比单独使用 MTX 有更好的疗效^[6].

为了发现更多可以加强 MTX 作用的辅助药物, 我们搜索了在临床上使用的化疗药, 我们的筛选条件是: (1) 待检药物和 MTX 的作用机制不同, (2) 待检药物可以加强 DNA 损伤或加强 DNA 损伤引起的细胞死亡. 其中阿柔比星(Aclarubicin, 简称 ACL)引起了我们的特别关注. ACL 属于第二代蒽环类药物, 临床上主要用于治疗 AML 和恶性淋巴瘤^[7]. 其作用机制与 MTX 有许多不同之处: (1) ACL 通过 TOP1 产生 DNA 损伤, 而 MTX 通过 TOP2^[5]; (2) ACL 的作用不受细胞周期的影响, 而 MTX 主要作用于 S 期和 G2 期的细胞^[8]; (3) ACL 还可以从染色体上踢走组蛋白, 从而使裸露 DNA 更容易遭受损伤^[9]. 虽然以上结果都暗示 ACL 可能会加强 MTX 的细胞毒性, 但另一方面, 有报道称 ACL 可以阻止 TOP2 和 DNA 的结合, 从而抑制依赖于 TOP2 的 DNA 损伤^[10]. 为了明确 ACL 和 MTX 联合使用效果, 为临床上是否可以联合使用 ACL 和 MTX 治疗癌症提供线索, 本研究探究了 ACL 和 MTX 单独使用或联合使用时对小鼠成纤维细胞 L929 细胞死亡水平的影响及背后的机制.

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验细胞株 小鼠成纤维细胞系 L929 购于中国科学院昆明细胞库.

2.1.2 主要试剂 Mitoxantrone(MTX)、DMSO 和 CsCl 均购自 Innochem, Aclarubicin(ACL) 购自 Santa Cruz, CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 试剂盒、DNA 定量试剂盒购自 Promega; AV/PI 凋亡检测试剂盒购自 Sangon

Biotech; DMEM、双抗、胰蛋白酶购自 Thermo Fisher; 胎牛血清购自 NATOCOR; γ H2AX、TOP2 抗体和荧光二抗均购自 Abcam.

2.2 方法

2.2.1 细胞存活率的检测 将 L929 细胞以 1:2 接种于 96 孔板(100 mL/孔), 培养 24 h 后, 细胞密度达到 90%; MTX 单独处理组每孔分别加入终浓度为 0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 μ mol/L 的 MTX, ACL 单独处理组每孔分别加入终浓度为 0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 μ mol/L 的 ACL, 联合用药组分别加入终浓度为 1 μ mol/L 的 MTX 和 0、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 μ mol/L 的 ACL, 对照组加入和实验组体积相同的 DMSO, 每种处理条件设置 3 个复孔. 处理 40~48 h 后, 按照 CellTiter-Glo[®] 发光法细胞存活率检测试剂盒的说明书进行检测.

2.2.2 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡 将 L929 细胞接种于 12 孔板中, 培养 12 h 后, 细胞密度达到 50%, 替换培养液为含有 MTX(5 μ mol/L) 和 ACL(5 μ mol/L) 的培养液, 阴性对照中加入含有等体积 DMSO 的培养液. 处理 30 h 后, 终止培养, 弃去培养液, 用 0.05% 的胰酶消化细胞. 37 $^{\circ}$ C 消化 3 min 后, 将细胞收集到装有培养液的 EP 管中, 800 g/min 离心 3 min 后, 弃上清. 用 500 μ L 的 PBS 洗一次, 1 000 g/min 离心 3 min 后, 弃上清. 每组加入 195 μ L 的 Binding buffer(1 \times) 和 5 μ L 的 Annexin V-FITC, 避光, 混匀, 室温孵育 10 min, 再加入 10 μ L Propidium Iodide, 用流式细胞仪检测细胞凋亡.

2.2.3 体内酶复合物检测(In vivo Complex of Enzyme Assay, ICE assay) 将 L929 细胞接种于 10 cm 培养板上, 用 ACL(5 μ mol/L) 预处理细胞 2 h, MTX 单独处理组和联合用药组再加入 MTX(5 μ mol/L), 对照组用等体积的 DMSO 处理 1 h 后, 吸出培养液, 在培养板中加入 2 mL 1% sarkosyl 缓冲液, 用 18G 针头抽吸细胞裂解液 3 次. 在离心管中制作 CsCl 梯度, 从管底部到顶部的浓度: 1.45、1.50、1.72、1.82 g/mL, 6 mL/层. 将裂解的细胞直接加到 CsCl 梯度上并用石蜡油覆盖. 在 20 $^{\circ}$ C 条件下以 125 000 g 离心 22 h. 利用蠕动泵通过在离心管底部穿孔收集超离心组分: 500 μ L/份(DNA 通常为第 10~20 组份). 用 Nanodrop 检测每个组分的 DNA 浓度并且用 DNA 定量试剂盒进行准确定量. 将每个处理条件的 DNA 调整为 500 和 1 000 ng(用磷酸钠缓冲液调整体积至 100 μ L),

通过真空转移到硝酸纤维素膜上,每个处理条件设置 3 个重复.用强度为 $120\ 000\ \mu\text{J}/\text{cm}^2$ 的紫外线固定转移到硝酸纤维素膜上的 DNA,然后将膜放在含有 5% 脱脂奶粉的 TBS 溶液中封闭 1 h, $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜孵育 TOP2 抗体.第 2 d 用 TBS-T 洗 2 次,每次 5 min.二抗室温孵育 1 h;然后再用 TBS-T 洗 2 次,每次 5 min;最后用 TBS 洗 1 次,5 min.使用 Azure C500 凝胶成像系统成像并做灰度值分析.

2.2.4 Western-blotting(WB)检测 $\gamma\text{H}2\text{AX}$ 表达水平 将 L929 细胞接种在 6 孔板内,当细胞密度达到 90% 时,用 ACL($5\ \mu\text{mol}/\text{L}$) 预处理细胞 1 h

后,MTX 单独处理组和联合用药组再加入 MTX ($5\ \mu\text{mol}/\text{L}$) 处理细胞 1 h.用 $200\ \mu\text{L}$ 的 Bio-rad Laemmli sample buffer 裂解细胞,然后用 12% SDS-PAGE 对蛋白进行电泳分离,然后用 $\gamma\text{H}2\text{AX}$ 作 WB 定量检测,采用 $\alpha\text{-Tubulin}$ 作为上样内参.重复 3 次实验并做灰度值分析.

2.2.5 统计学分析 采用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析,*表示两组之间相比 $P < 0.05$,**表示两组之间相比 $P < 0.01$,***表示两组之间相比 $P < 0.001$.

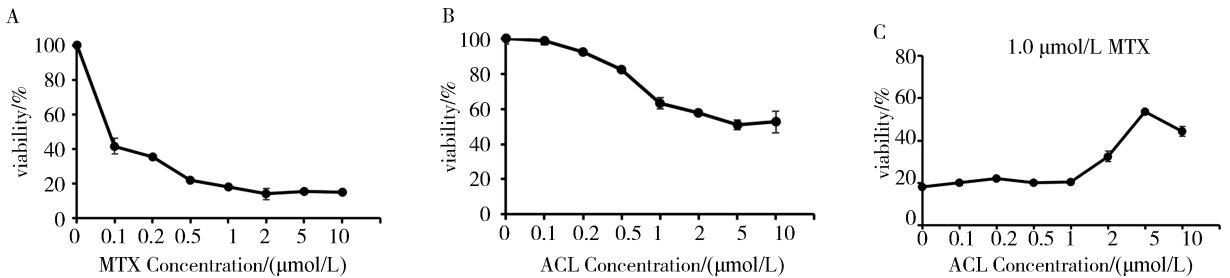


图 1 ACL 和 MTX 对细胞存活率的影响

Fig. 1 The effect of ACL and MTX on cell viability

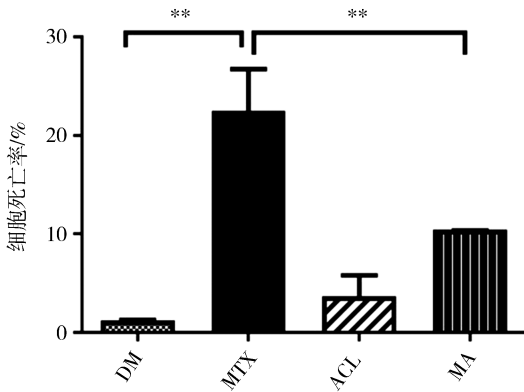


图 2 ACL 和 MTX 单独或联合使用时对细胞死亡率的影响

DM: 对照组, MTX: MTX 单独处理组, ACL: ACL 单独处理组, MA: MTX+ACL 联合处理组

Fig. 2 The effect of ACL and/or MTX on the rate of cell death

3 实验结果

3.1 ACL 降低 MTX 引起的细胞死亡

为了研究 ACL 和 MTX 联合使用的效果,我们分别检测了单独使用 MTX, ACL 及 MTX/ACL 联合使用时对 L929 细胞存活率的影响.结果表明,单独使用 MTX(图 1A)和 ACL(图 1B)时,细胞存活率都随着药物浓度升高而降低,但 ACL 的杀伤

效果低于 MTX.但当固定 MTX 浓度($1\ \mu\text{mol}/\text{L}$)时,ACL 在一些浓度(尤其是 5 和 $10\ \mu\text{mol}/\text{L}$)下表现出明显的保护作用(之后的实验如无特殊说明,所用 ACL 浓度均为 $5\ \mu\text{mol}/\text{L}$).为了进一步验证这一结果,我们采用 Annexin V/PI 双染法检测了 ACL, MTX 和 MTX/ACL 引起的细胞死亡水平^[11].值得注意的是,由于 ACL 在荧光素通道会产生自发荧光,在用流式细胞术分析时,我们扣除了 ACL 产生的荧光值^[12].流式细胞计数结果显示:阴性对照组(DM)细胞死亡率为 1.22% , MTX 处理组细胞死亡率为 22.5% , ACL 处理组细胞死亡率为 3.66% ,而 ACL 和 MTX 联用组细胞死亡率为 10.4% (图 2).以上结果清晰表明 ACL 可以抑制 MTX 诱导的细胞死亡.

3.2 ACL 降低 MTX 诱发的 TOP2-DNA 复合物水平

MTX 主要通过促进 TOP2-DNA 复合物形成进一步产生 DNA 双链断裂(DSBs)而引起细胞死亡^[5].因为有研究报道 ACL 可以阻止 TOP2 和 DNA 的结合,从而抑制依赖于 TOP2 的 DNA 损伤^[10],所以我们用 ICE assay 检测了细胞内 TOP2-DNA 复合物的水平.如图 3 所示,MTX 显著地促进了 TOP2-DNA 复合物的形成,而 ACL 可以极大

程度地降低该复合物的水平。

3.3 ACL 能降低 MTX 造成的 DNA 损伤

MTX 促进 TOP2-DNA 复合物形成后会造成 DSBs^[13]; 在 DSBs 产生后, 组蛋白 H2AX 的 C 末端 139 位丝氨酸位点会被磷酸化形成 γ H2AX, 并

且其水平与 DSBs 水平成正相关, 故常用来检测 DSBs^[14]。结果表明, 相比于 MTX 处理组细胞, ACL 和 MTX 联用能够显著降低 γ H2AX 蛋白的形成(图 4), 表明 ACL 能够降低由 MTX 造成的 DSBs。

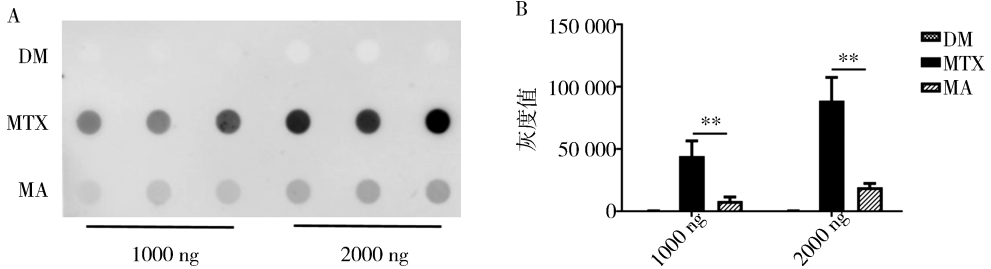


图 3 ACL 对 MTX 促进的 TOP-DNA 复合物水平的影响

A. ICE 结果; B. 灰度值分析

Fig. 3 The effect of ACL on MTX induced TOP2-DNA complex formaion

A. ICE results B. Qunatifaicon of gray value

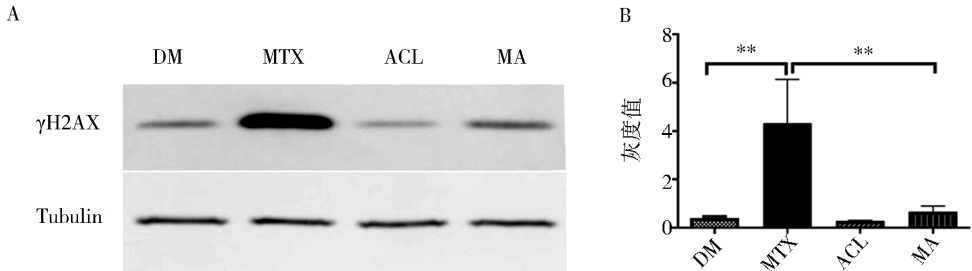


图 4 ACL 和 MTX 单独或联合使用时对 γ H2AX 表达的影响

A. WB 结果; B. 灰度值分析

Fig. 4 The effect of ACL on MTX induced H2Ax phosphorylation

A. TheWB results; B. Qunatifaicon of gray value.

4 讨论

在癌症治疗中, 联合用药的策略在减少化疗药物毒副作用的同时可以提高治疗效果, 也减少了对单个药物产生耐药性的可能性。但药物-药物反应不但有累加、协同作用, 还可能有拮抗作用^[15-16], 因而潜在的联合用药方案, 都必须经过严格的实验验证。

MTX 是一种具有广谱抗肿瘤活性的蒽环类药物, 用于治疗乳腺癌、前列腺癌、急性白血病、淋巴瘤等^[17-18]。ACL 是一种同属蒽环家族的化疗药物, 应用于急性髓系白血病(AML)和恶性淋巴瘤的治疗, 在尝试治疗其他实体瘤时, 也取得了一定的效果^[19]。但如众多化疗药一样, ACL 和 MTX 都面临癌细胞产生抗药性的影响。因为它们通过不同的机制造成 DNA 损伤, 因而我们猜测 MTX 和 ACL 联用时可能有更好的效果; 但还有研究表明 ACL 可以插入 DNA 碱基对之间, 阻止 TOP2 和 DNA 的结合^[5]。因为 TOP2 和 DNA 的结合是形

成 TOP2-DNA 复合物的先决条件, 暗示了 ACL 可以通过这种机制拮抗 MTX 引起的细胞死亡。

为了明确 ACL 和 MTX 联合使用的作用, 我们在小鼠成纤维细胞 L929 中检测了单独或联合使用 ACL 和 MTX 时对细胞存活率和死亡率的影响。我们的实验结果清晰地表明 ACL 可以抑制 MTX 引起的细胞死亡(图 1, 2), 进一步研究揭示 ACL 通过降低 MTX 诱发的 TOP2-DNA 复合物形成(图 3)和之后的 DNA 双链断裂(图 4)起到了细胞保护作用。综上, 本研究结果暗示了在临床上 ACL 或许不能和 MTX 联合使用。

参考文献:

[1] Vittorio O, Le Grand M, Makharza S A, et al. Doxorubicin synergism and resistance reversal in human neuroblastoma BE (2) C cell lines; an in vitro study with dextran-catechin nanohybrids [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2018, 122: 176.

[2] Benetatos L. miR-29b: a new demethylator in mul-

- tiple myeloma [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12: 3718.
- [3] Roccaro A M, Sacco A, Thompson B, *et al.* MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma [J]. *Blood*, 2009, 113: 6669.
- [4] Fenu G, Loreface L, Frau F, *et al.* Induction and escalation therapies in multiple sclerosis [J]. *Anti-inflamm Antiallergy Agents Med Chem*, 2015, 14: 26.
- [5] Nitiss J L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9:338.
- [6] Ndibe C, Wang C G, Sonpavde G. Corticosteroids in the management of prostate cancer: a critical review [J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2015, 16: 320.
- [7] Takahashi I, Hara M, Adachi T, *et al.* Treatment of refractory acute leukemia with aclacinomycin-A [J]. *Acta Med Okayama*, 1980, 34: 349.
- [8] Bridewell D J, Finlay G J, Baguley B C. Differential actions of aclarubicin and doxorubicin: the role of topoisomerase I [J]. *Oncol Res*, 1997, 9: 535.
- [9] Pang B, Qiao X, Janssen L, *et al.* Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1908.
- [10] Jensen P B, Sørensen B S, Demant E J, *et al.* Antagonistic effect of aclarubicin on the cytotoxicity of etoposide and 4'-(9-Acridinylamino)methanesulfonm-anisidide in human small cell lung cancer cell lines and on topoisomerase II-mediated DNA cleavage [J]. *Cancer Res*, 1990, 50: 3311.
- [11] 舒月悦, 卢秋霞, 孙意冉, 等. 藏药材纤毛婆婆纳乙酸乙酯提取物的抗癌活性及其机制研究[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2018, 55: 1097.
- [12] Iihoshi H, Ishihara T, Kuroda S, *et al.* Aclarubicin, an anthracycline anti-cancer drug, fluorescently contrasts mitochondria and reduces the oxygen consumption rate in living human cells [J]. *Toxicol Lett*, 2017, 277: 109.
- [13] Evison B J, Sleebs B E, Watson K G, *et al.* mitoxantrone, more than just another topoisomerase II poison [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36: 248.
- [14] Rogakou E P, Pilch D R, Orr A H, *et al.* DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 5858.
- [15] Nakagawa M, Ikeuchi M, Morimoto M, *et al.* Phase II study of S-1 combined with low-dose docetaxel as neoadjuvant chemotherapy for operable breast cancer patients (N-1 Study) [J]. *Clin Breast Cancer*, 2019, 19: 10.
- [16] Schelker R C, Herr W, Reichle A, *et al.* Low-dose trofosfamide plus rituximab is an effective and safe treatment for diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a single center experience [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18: 1000.
- [17] Durr F E, Wallace R E, Citarella R V. Molecular and biochemical pharmacology of mitoxantrone [J]. *Cancer Treat Rev*, 1983, 10: 3.
- [18] Shenkenberg T D, Von Hoff D D. Von. Mitoxantrone: a new anticancer drug with significant clinical activity [J]. *Ann of Intern Med*, 1986, 105: 67.
- [19] Neri A, Comis M, Brugiattelli M, *et al.* Aclacinomycin, cytosine arabinoside and thioguanine in relapsed or resistant acute myeloid leukemia [J]. 1989, 74: 113.

引用本文格式:

中文: 毛嘉, 周文娟, 潘洋, 等. 阿柔比星降低米托蒽醌引起的细胞死亡的机制[J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2020, 57: 186.

英文: Mao J, Zhou W J, Pan Y, *et al.* Study on the mechanism of Aclarubicin reducing Mitoxantrone-induced cell death [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2020, 57: 186.