

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.03.004

siRNA 沉默 ATM 增强 CpG ODN 7909 对肺癌 A549 细胞的放射增敏作用

袁素娟, 乔田奎, 刘小群, 陈伟(复旦大学附属金山医院 肿瘤科, 上海 200540)

[摘要] **目的:**研究 siRNA 沉默毛细血管扩张—共济失调突变(atxia-telangiectasia mutated, ATM)基因的表达增强胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸寡脱氧核苷酸(cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotide, CpG ODN) 7909 对人非小细胞肺癌 A549 细胞的放射增敏作用。**方法:**将 ATM-siRNA 转染至 A549 细胞中, Western blotting 检测 A549 细胞中 ATM 蛋白的表达。A549 细胞随机分为 6 组: 对照组、CpG 组、X 射线(IR)组、CpG + IR 组、ATM-siRNA + CpG + IR 组和 NC-siRNA + CpG + IR 组, 克隆形成分析法检测各组细胞克隆形成率, Graphpad prism 5.0 软件进行单击多靶模型和 L-Q 线性模型拟合辐射后 A549 细胞的生存曲线, 以 D_0 、 Dq 、 N 、 α/β 及 SF2 等参数分析 A549 细胞辐射损伤修复能力, 流式细胞术检测 A549 细胞的凋亡。**结果:** ATM-siRNA 转染可明显抑制 A549 细胞中 ATM 蛋白的表达($P < 0.01$)。X 射线可剂量依赖性抑制 A549 细胞的克隆形成能力($P < 0.05$); 且 CpG + IR 组 A549 细胞的克隆形成能力进一步降低($P < 0.01$); ATM-siRNA 转染后, CpG 处理的 A549 细胞克隆形成能力再度降低[10 Gy 时, $(0.05 \pm 0.00)\%$ vs $(0.71 \pm 0.00)\%$, $P < 0.01$]。辐射损伤剂量生存曲线结果显示, ATM-siRNA 转染后, ATM-siRNA + CpG + IR 组较 CpG + IR 组 A549 细胞的 α/β 值明显增大(1.48 vs 0.97, $P < 0.05$), 对放射损伤修复能力明显减弱。CpG + IR 组较 IR 组细胞凋亡率显著升高[$(9.18 \pm 0.16)\%$ vs $(6.56 \pm 0.33)\%$, $P < 0.01$]; ATM-siRNA + CpG + IR 组 A549 细胞凋亡率进一步升高[$(10.45 \pm 0.40)\%$ vs $(9.18 \pm 0.16)\%$, $P < 0.05$]。**结论:** siRNA 沉默 ATM 的表达可增强 CpG ODN 7909 对 A549 细胞的放射增敏作用, ATM 可作为肺癌治疗的潜在靶点。

[关键词] 非小细胞肺癌; 胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸寡脱氧核苷酸 7909; A549 细胞; 放射敏感性; ATM; 凋亡

[中图分类号] R734.2; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2013)03-0278-06

Silencing ATM by siRNA enhances the radiosensitization effect of CpG ODN 7909 on lung cancer A549 cells

Yuan Sujuan, Qiao Tiankui, Liu Xiaoqun, Chen Wei (Department of Oncology, Jinshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200540, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potentiation of silencing atxia-telangiectasia mutated (ATM) gene expression in the radiosensitization effect of cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotide (CpG ODN) 7909 on non-small cell lung cancer A549 cell line. **Methods:** ATM-siRNA was transfected into A549 cells, and the expression of ATM protein in A549 cells was examined by Western blotting. A549 cells were randomly classified into six groups: control group, CpG group, X-ray (IR) group, CpG + IR group, ATM-siRNA + CpG + IR group and NC-siRNA + CpG + IR group. Cell colony rates were evaluated by colony formation assay. One-hit multi-target model and linear quadratic model, which generated the radiation dose survival curve of the A549 cells, were fitted with Graphpad prism 5.0 software, and the parameters, including D_0 , Dq , N , α/β and SF2 were applied to analyze radiation damage repair capacity of A549 cells. The apoptosis of A549 cells was analyzed by flow cytometry. **Results:** ATM-siRNA transfection remarkably inhibited the expression of ATM protein in A549 cells ($P < 0.01$). X-ray radiation inhibited the colony formation capacity of A549 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Moreover, a further decrease of the colony formation capacity of A549 cells was found in CpG + IR radiation combined treatment group ($P < 0.01$). With the transfection of ATM-siRNA, the colony formation ca-

[基金项目] 上海金山区科技创新基金资助项目(No. 2010-316)。Project supported by the Science and Technology Innovation Foundation from the Jinshan District of Shanghai (No. 2010-316)

[作者简介] 袁素娟(1980-),女,山东省菏泽市人,硕士,主治医师,主要从事胸部肿瘤的临床与基础研究。E-mail: wutongyehappy@126.com

[通信作者] 乔田奎(Qiao Tiankui, corresponding author), E-mail: qiaotk@163.com

[网络出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20130605.0923.005.html>

capacity of CpG-treated A549 cells was further decreased (10 Gy, [0.05 ± 0.00]% vs [0.71 ± 0.00]%, $P < 0.01$). Radiation damage dose survival curves demonstrated that the value of α/β was significantly increased (1.48 vs 0.97, $P < 0.05$) and the radiation damage repair capability was significantly decreased in ATM-siRNA + CpG + IR group compared with CpG + IR group. The apoptotic rate was significantly increased in CpG + IR group compared with IR radiation group ([9.18 ± 0.16]% vs [6.56 ± 0.33]%, $P < 0.01$). The apoptotic rate of A549 cells in ATM-siRNA + CpG + IR group was further increased ([9.18 ± 0.16]% vs [10.45 ± 0.40]%, $P < 0.05$). **Conclusion:** Silencing expression of *ATM* by siRNA can enhance the radiosensitization effect of CpG ODN 7909 on A549 cells. *ATM* may serve as a potential target for gene therapy of lung cancer.

[**Key words**] non-small cell lung cancer; cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotide (CpG ODN) 7909; A549 cell; radiosensitivity; *ATM*; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2013, 20(3): 278-283]

肺癌发病率和病死率在世界范围内均占恶性肿瘤的第一位,其中 80% 以上为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC), 70% ~ 80% 为晚期,放射治疗为晚期患者重要的局部治疗手段。而 NSCLC 是对放射线中度或低度敏感的肿瘤,尤其是高分化腺癌,由于其对射线不敏感,放射增敏剂的应用显得非常必要。DNA 双链断裂修复是癌细胞对电离辐射抵抗的重要原因^[1],其中毛细血管扩张—共济失调突变(atxia-telangiectasia mutated, *ATM*) 基因编码的蛋白参与了 DNA 双链断裂的修复过程^[2-4]。人工合成的含非甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸寡脱氧核苷酸(cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotide, CpG ODN) 的序列可单独杀伤肿瘤,还能与放疗及外科治疗联合应用,增强放疗和手术治疗的效果^[5-6]。本课题组前期实验观察到 CpG ODN 7909 可增强 X 射线对 A549 细胞的生长抑制作用^[7]。本研究通过 siRNA 干扰沉默 A549 细胞中 *ATM* 基因的表达,观察 *ATM* 基因在 CpG ODN 7909 对人非小细胞肺癌 A549 细胞的放射增敏中的作用,为进一步探讨 CpG ODN 7909 及 *ATM* 在肺癌治疗中的机制提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株及主要试剂

人非小细胞肺癌 A549 细胞株购自中国科学院细胞研究所, RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自法国 Biowest 公司, Annexin-V 凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司, β -actin 一抗购自美国 Cell Signaling 公司, 羊抗兔和兔抗鼠二抗购自碧云天生物技术有限公司, 特异性靶向 *ATM* 基因的小分子干扰 RNA (small interfering RNA against *ATM*, ATM-siRNA) 及随机小 RNA 皆购自美国 Cell Signaling 公司, 转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitro-

gen 公司。CpG ODN 7909 由上海生物工程有限公司合成,并溶于无菌蒸馏水中,存于 4 °C 冰箱中备用。CpG ODN 7909 的核苷酸序列为 5'-TCGT CGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'。

1.2 针对 *ATM* 基因的 siRNA 设计和合成

参考 GenBank 中 *ATM* 基因序列,根据 Ambion 公司在线 siRNA 设计软件确定特异性针对 *ATM* 的 siRNA 靶序列(ATM-siRNA),经预实验选取抑制效率最高的序列,正义序列: 5'-GUGAUAGAUAACAAG-GAUATT-3', 反义序列: 5'-UAUCCUUGUUAUCUAU-CACTT-3'。另设计合成一阴性对照序列(NC-siRNA), 正义序列: 5'-UUCUCCGAACGUGUCACG UTT-3', 反义序列: 5'-ACGUGACACGUUCGGAGA ATT-3';并经过 BLAST 比对,避免与其他的内源性基因有同源性。序列送美国 Cell Signaling 公司合成。

1.3 *ATM*-siRNA 瞬时转染 A549 细胞

人非小细胞肺癌 A549 细胞株采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养。将处于对数生长期的人非小细胞肺癌 A549 细胞按每孔 1 × 10⁵ 个接种于 6 孔板中,观察细胞汇合度达到 50% 时进行转染。1.5 ml RPMI 1640 无血清无双抗的培养基中加入 2 μ l ATM-siRNA 寡聚物,轻轻混匀,再加入 5 μ l LipofectamineTM 2000,室温孵育 20 min;将复合物加入培养板中,37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 6 h 后更换为含有双抗的 RPMI 1640 培养基,共培养 24 h 后用于后续实验。

1.4 Western blotting 检测 *ATM*-siRNA 转染后 A549 细胞中 *ATM* 的表达

采用 T-PER 组织蛋白提取试剂提取 ATM-siRNA 转染后 A549 细胞的总蛋白,离心 5 min 后,吸取上清转移至新离心管中,BCA 试剂分析测定蛋白浓度。经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至

PVDF膜。用含3% BSA的TBST室温封闭1 h, 经一抗(抗 ATM 和 β -actin 抗体)和酶标二抗作用后, 用 DAB 底物溶液显色。

1.5 放射增敏实验的分组

用瑞典 ELEKTA 直线加速器照射细胞, X 射线能量为 6 MV, 源靶距为 100 cm, 吸收剂量率为 2 Gy/min。接种在 6 孔板中的 A549 细胞随机分为 6 组: (1) 对照组; (2) CpG 组; (3) IR 组; (4) CpG + IR 组; (5) ATM-siRNA + CpG + IR 组; (6) NC-siRNA + CpG + IR 组。其中 CpG 组、CpG + IR 组、ATM-siRNA + CpG + IR 组、NC-siRNA + CpG + IR 组均加 CpG ODN 7909 使其终质量浓度为 10 mg/L, 继续培养 24 h 后, IR 组、CpG + IR 组、ATM-siRNA + CpG + IR 组、NC-siRNA + CpG + IR 组细胞稀释成 1×10^2 、 8×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 个/ml 不同密度梯度, 接种于 6 孔板中, 均给予 0、2、4、6、8、10 Gy X 射线照射。每个剂量点设 3 个平行样本, 每组实验重复 3 次。

1.6 克隆形成法检测细胞克隆形成率

A549 细胞按上述分组接受照射后, 立即将细胞用胰酶消化, 吹打成细胞悬液, 计数后接种在直径为 6 cm 的培养皿中继续培养, 第 5 天时更换 RPMI 1640 培养液。培养至第 10 天时, 弃培养液, PBS 洗 2 遍, 加入甲醇固定 2 h, 吉姆萨染色, 倒置相差显微镜下计数含 50 个细胞以上的细胞克隆。克隆形成率(plating efficiency, PE; %) = 各组克隆数/接种细胞数 $\times 100$ %^[8]。

1.7 单击多靶模型和 L-Q 线性模型拟合曲线检测 A549 细胞辐射损伤修复能力

由各组细胞的克隆形成率得出各组细胞存活分数。细胞存活分数(survival fraction, SF; %) = 处理组 PE/对照组 PE $\times 100$ %^[9]。对存活分数进行均数分析, 采用 GraphPad 公司的 Prism 5.0 软件进行单击多靶模型和 L-Q 线性模型曲线拟合。根据单击多靶模型计算细胞放射敏感性(cellular radiosensitivity, D_0)、准阈剂量(the capacity for sublethal damage repair, D_q)、外推数(extrapolation number, N), 其中 $\log N = D_q/D_0$ ^[10]。根据线性二次模型求出常数 α 、 β 、 α/β 值及照射剂量为 2 Gy 时的存活分数(survival fraction after 2-Gy irradiation, SF2)。

1.8 流式细胞术检测 A549 细胞的凋亡

人非小细胞肺癌 A549 细胞照射后继续培养 24 h, 用胰酶消化和收集细胞(包括上清液中的细胞), 预冷 PBS 洗 2 遍后, 加入 100 μ l 结合缓冲液重悬, 再加入 5 μ l Annexin-V 和 5 μ l PI 溶液, 轻轻混

匀, 室温避光反应 15 min, 再加入 300 μ l 结合缓冲液混匀, 进行流式细胞仪检测。Annexin-V 标记的细胞即凋亡细胞。细胞凋亡率(%) = (凋亡细胞数/总细胞数) $\times 100$ 。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS20.0 统计软件, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组资料之间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ATM-siRNA 沉默 A549 细胞中 ATM 蛋白表达

Western blotting 检测结果(图 1)显示, 转染 ATM-siRNA 24 h 后, A549 细胞中 ATM 蛋白表达量明显减低($P < 0.01$), 而转染 NC-siRNA 的 A549 细胞 ATM 蛋白表达量无明显变化($P > 0.05$)。由此表明, ATM-siRNA 已被转染进入细胞并得到高效表达, 并且能显著抑制 ATM 蛋白的表达。

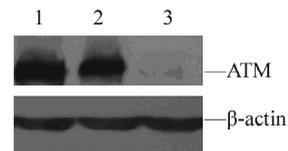


图 1 ATM-siRNA 转染抑制 A549 细胞中 ATM 的表达

Fig 1 ATM-siRNA transfection inhibited ATM protein expression in A549 cells

1: Control; 2: NC-siRNA; 3: ATM-siRNA

2.2 ATM-siRNA、CpG ODN 7909、X 射线单独或联合作用对 A549 细胞克隆形成的影响

各组 A549 细胞的克隆形成结果(表 1)显示, X 射线可剂量依赖性抑制 A549 细胞的克隆形成能力($P < 0.05$), 且 CpG ODN 7909 联合 IR 组 A549 细胞的克隆形成能力进一步降低($P < 0.01$), 提示 CpG ODN 7909 可提高 A549 细胞对 X 射线的敏感性, 具有放射增敏作用。此外, ATM-siRNA 转染沉默 A549 细胞 ATM 表达后, CpG ODN 7909 对 A549 细胞的放射增敏作用进一步增强, 表现为与 NC-siRNA + CpG + IR 组相比, ATM-siRNA + CpG + IR 组 A549 细胞的克隆形成能力显著降低[如 10 Gy 时, (0.05 ± 0.00)% vs (0.71 ± 0.00)% , $P < 0.01$]。结果表明, CpG ODN 7909 可协同 X 射线抑制 A549 细胞的克隆形成能力, ATM-siRNA 转染沉默 ATM 的表达后, 可进一步增强 CpG ODN 7909 的协同作用。

表 1 ATM-siRNA、CpG ODN 7909、X 射线单独或联合作用对 A549 细胞克隆形成的影响($\bar{x} \pm s, \%$)Tab. 1 Effect of ATM-siRNA, CpG ODN 7909 and X-ray treated alone or in combination on the colony formation of A549 cells ($\bar{x} \pm s, \%$)

X-ray (D/Gy)	Control	CpG	IR (X-ray)	CpG + IR	ATM-siRNA + CpG + IR	NC-siRNA + CpG + IR
0	84.07 ± 0.91	83.30 ± 0.98	84.07 ± 0.91	83.30 ± 0.98	83.30 ± 0.98	83.27 ± 0.58
2			71.50 ± 1.25 *	63.97 ± 1.56 [△]	37.23 ± 0.75 ^{▲▲}	64.17 ± 1.19
4			55.26 ± 1.60 ^{**}	27.90 ± 1.15 ^{△△}	6.45 ± 0.22 ^{▲▲}	27.87 ± 1.17 ^{▽▽}
6			20.50 ± 2.06 ^{**}	8.17 ± 0.25 ^{△△}	0.89 ± 0.11 ^{▲▲}	8.19 ± 0.12 ^{▽▽}
8			7.33 ± 0.65 ^{**}	1.59 ± 0.12 ^{△△}	0.30 ± 0.00 ^{▲▲}	1.57 ± 0.14 ^{▽▽}
10			1.50 ± 0.13 ^{**}	0.70 ± 0.00 ^{△△}	0.05 ± 0.00 ^{▲▲}	0.71 ± 0.00 ^{▽▽}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$ vs IR group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs CpG + IR group;

^{▽▽} $P < 0.01$ vs ATM-siRNA + CpG + IR group

2.3 ATM-siRNA 增强 CpG ODN 7909 对 A549 细胞辐射损伤修复能力的抑制作用

由单击多靶模型拟合的剂量存活曲线(图 2)得出放射生物学参数 D_0 、 D_q 、 N 值。L-Q 线性曲线模型拟合得出各放射生物学参数值 α 、 β 、 α/β 及 SF2 值(表 2)。结果表明,CpG ODN 7909 可降低 A549 细胞对放射损伤的修复能力,表现为与 IR 组相比,CpG + IR 组 D_0 、 D_q 、 N 、SF2 减小, α/β 值增大($P < 0.05$)。ATM-siRNA 转染沉默 A549 细胞中 ATM 的表达后,A549 细胞对放射损伤的修复能力进一步减弱,表现为与 NC-siRNA + CpG + IR 组相比,ATM-siRNA + CpG + IR 组 D_0 、 D_q 、 N 、SF2 减小, α/β 值增大($P < 0.05$)。结果提示,抑制 ATM 蛋白的表达后,A549 细胞的损伤修复能力下降。以上结果表明,CpG ODN 7909 可增强 X 射线抑制 A549 细胞的放射损伤修复能力,ATM-siRNA 转染沉默 ATM 的表达后,可进一步促进 CpG ODN 7909 的这种增敏作用。

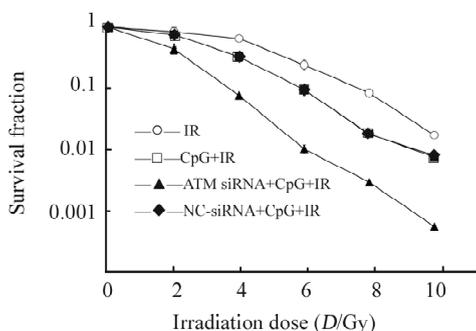


图 2 A549 细胞在各种放射条件下的剂量生存曲线
Fig. 2 Dose-survival curves of A549 cells under various radiation conditions

表 2 ATM-siRNA、CpG ODN 7909、X 射线单独或联合作用对 A549 细胞放射损伤修复能力的影响

Tab. 2 Effect of ATM-siRNA, CpG ODN 7909 and X-ray treated alone or combination on radiation damage repair capability of A549 cells

Parameter	IR	CpG + IR	ATM-siRNA + CpG + IR	NC-siRNA + CpG + IR
D_0	2.006	1.588 *	1.047 [△]	1.590
D_q	1.570	1.357 *	0.378 [△]	1.340
N	5.927	4.412 *	3.729 [△]	4.524
α/β	0.707	0.970 *	1.482 [△]	0.893
SF2	0.860	0.760 *	0.440 [△]	0.763

* $P < 0.05$ vs IR group; [△] $P < 0.05$ vs CpG + IR or NC-siRNA + CpG + IR group

2.4 ATM-siRNA 协同 CpG ODN 7909 促进 X 射线诱导的 A549 细胞的凋亡

采用流式细胞仪检测 10 Gy 照射后各组细胞的凋亡情况,结果(图 3)显示了各实验组肿瘤细胞凋亡率:对照组为(4.23 ± 0.25)%、CpG 组为(4.49 ± 0.25)%、IR 组为(6.56 ± 0.33)%、CpG + IR 组为(9.18 ± 0.16)%、ATM-siRNA + CpG + IR 组为(10.45 ± 0.40)%、NC-siRNA + CpG + IR 组为(9.15 ± 0.14)%。与对照组相比,IR 组及 CpG + IR 组 A549 细胞凋亡率增加,且后者增加更明显($P < 0.01$)。ATM-siRNA + CpG + IR 组同 CpG + IR 组相比,细胞凋亡率增加($P < 0.01$);而 NC-siRNA + CpG + IR 组与 CpG + IR 组相比,细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$)。结果说明,CpG ODN 7909 可协同 X 射线诱导 A549 细胞凋亡,ATM-siRNA 转染沉默 ATM

的表达后,可进一步增强 CpG 的这种协同作用。

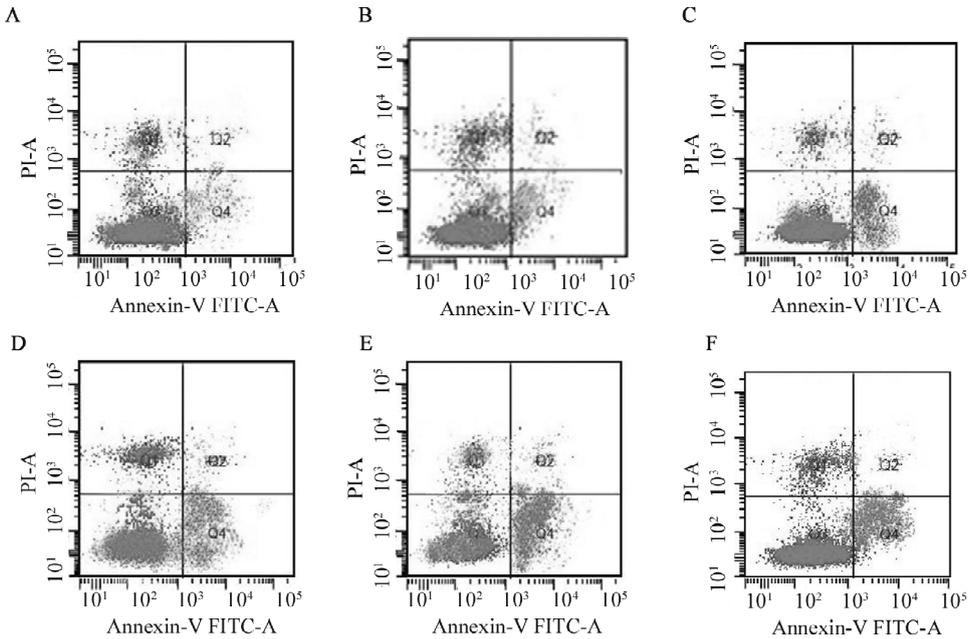


图3 ATM-siRNA 增强 CpG ODN 7909 对 X 射线诱导 A549 细胞凋亡的促进作用

Fig. 3 ATM-siRNA enhanced the apoptosis-promoting effect of CpG ODN 7909 on A549 cells induced by X-irradiation

A: Control group; B: IR group; C: CpG group; D: CpG + IR group;

E: ATM-siRNA + CpG + IR group; F: NC-siRNA + CpG + IR group

3 讨论

对于恶性肿瘤的治疗,主要采取以手术、放、化疗等相结合的综合治疗方法。如何增加肿瘤的放疗、化疗敏感性及增敏剂的使用一直是抗肿瘤研究中备受关注的问题。CpG ODN 由细胞吞后,可与 Toll 样受体 9 (Toll-like receptor 9, TLR9) 结合激活多种免疫细胞,分泌多种细胞因子,诱导 Th1 型免疫应答,产生较强的体液免疫和细胞免疫效应。国内外研究^[11-12]表明,CpG ODN 还具有增强放、化疗和抗肿瘤效应的的作用。*ATM* 基因编码的蛋白参与辐射损伤后识别 DNA 损伤以及促进 DNA 双链断裂的修复。电离辐射将引起细胞的 DNA 双链断裂,*ATM* 蛋白被磷酸化激活,其二聚体分离,蛋白表达水平上调,同时激活下游多个分子,如 p53、细胞周期检查点激酶 2 (checkpoint kinase 2, CHK2)、乳腺癌易感基因 1 蛋白 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)、DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK),其中 DNA-PK 及 Ku 蛋白结合到 DNA 双链断裂部位,启动双链修复^[13-18]。

克隆形成实验是测定细胞的放射敏感性和细胞存活的可靠方法。本实验通过克隆形成实验并进行

单击多靶和 L-Q 模型拟合,分析了 A549 细胞中 *ATM* 基因沉默前后的放射敏感性变化以及 *ATM* 基因沉默在 CpG ODN 7909 对 A549 细胞增敏作用中的影响。结果表明,CpG ODN 7909 可增加 A549 细胞的放射敏感性;*ATM* 基因表达沉默后 A549 细胞的放射敏感性进一步明显增加。 D_0 反映细胞在相对高剂量区对射线的敏感性, D_0 值越大,细胞对放射越抗拒; D_q 表明亚致死损伤修复能力的大小, D_q 小则细胞对亚致死损伤修复能力弱^[19]。本实验结果显示,CpG ODN 7909 作用后,A549 细胞的 D_0 和 D_q 值都减小,证明细胞的放疗敏感性增加,而亚致死损伤修复能力减小;*ATM* 沉默后 D_0 和 D_q 值都进一步减小,证明 *ATM* 基因沉默后细胞的放疗敏感性进一步增加,而亚致死损伤修复能力进一步减小。 α/β 反映了细胞的损伤修复能力^[19], α/β 值越低,对损伤修复能力越强;反之, α/β 值越高,对损伤修复能力越弱。CpG ODN 7909 作用后,A549 细胞的 α/β 值较前明显增大,对放射损伤修复能力减弱;*ATM* 基因沉默后,A549 细胞的 α/β 值较沉默前进一步明显增大,对放射损伤修复能力进一步减弱,说明抑制 *ATM* 表达后,A549 细胞的损伤修复能力较 *ATM* 沉默前下降。SF2 也是评价恶性肿瘤细胞放射

敏感性指标之一。CpG ODN 7909 作用后, A549 细胞的 SF2 较前显著下降 ($P < 0.01$); ATM 基因沉默后 A549 细胞的 SF2 较 ATM 基因沉默前也显著下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。以上结果都表明, CpG 可协同 X 射线抑制 A549 细胞的克隆形成和放射损伤修复能力, ATM-siRNA 转染沉默 ATM 的表达后, 可进一步增强 CpG 的这种放射增敏作用。

细胞凋亡是放射线杀死肿瘤细胞的一条重要途径, 放射诱导的凋亡也可用于衡量细胞的放射敏感性, 凋亡率增加提示细胞有更大的放射敏感性^[20]。研究^[21-23]发现, ATM-p53 信号通路在 X 射线诱导的细胞凋亡过程中发挥重要作用。本研究应用小分子 RNA 干扰技术对 ATM 的表达进行了暂时性抑制后, CpG ODN 7909 增加了 X 射线诱导的细胞凋亡; 在 ATM 蛋白的表达被抑制后, A549 细胞的凋亡率也升高。提示 CpG ODN 7909 对 X 射线诱导的人非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡的增强作用可能与 ATM 表达的降低有关。

总之, 抑制 ATM 的表达能改变 A549 细胞的放射敏感性, 提高 X 射线在 CpG ODN 7909 增敏作用下对细胞 DNA 的损伤, 抑制细胞 DNA 损伤后的再修复。因此, ATM 表达的抑制能明显提高 CpG ODN 7909 的放射增敏效果, 但抑制 ATM 表达提高 CpG ODN 7909 放射增敏效果的分子机制仍需进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Martin NM. DNA repair inhibition and cancer therapy [J]. J Photochem Photobiol B, 2001, 63(1/3): 162-170.

[2] 蔚殷伯. 肿瘤放射治疗学 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008: 302-306.

[3] Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2008, 60(7): 795-804.

[4] Zhang Z, Yang Z, Jaamaa S, et al. Differential epithelium DNA damage response to ATM and DNA-PK pathway inhibition in human prostate tissue culture [J]. Cell Cycle, 2011, 10(20): 3545-3553.

[5] Mutwiri G. TLR9 agonists: Immune mechanisms and therapeutic potential in domestic animals [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2012, 148(1/2): 85-89.

[6] Holtick U, Scheulen ME, von Bergwelt-Baildon MS, et al. Toll-like receptor 9 agonists as cancer therapeutics [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2011, 20(3): 361-372.

[7] Yuan S, Qiao T, Chen W. CpG oligodeoxynucleotide 1826 enhances the lewis lung cancer response to radiotherapy in murine tumor [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2011, 26(2): 203-208.

[8] 黄靖然, 彭永排, 周晖, 等. 放疗耐受性宫颈癌 Hela 细胞的生物学特性 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2012, 33(1): 16-22.

[9] 刘小群, 乔田奎, 陈伟, 等. CpG ODN7909 对 X 射线诱导人肺腺癌 A549 细胞 G₂/M 期阻滞和凋亡的影响与 ATM 激酶的关系 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 2012, 32(3): 50-54.

[10] 孙权权, 刘雄, 刘英, 等. shRNAmir 慢病毒载体沉默环氧合酶-2 对鼻咽癌细胞放疗敏感性的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(4): 599-603.

[11] Wang H, Rayburn ER, Wang W, et al. Chemotherapy and chemosensitization of non-small cell lung cancer with a novel immunomodulatory oligonucleotide targeting Toll-like receptor 9 [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(6): 1585-1592.

[12] Rayburn ER, Wang W, Zhang R, et al. Experimental therapy for colon cancer, anti-cancer effects of TLR9 agonism, combination with other therapeutic modalities, and dependence upon p53 [J]. Int J Oncol, 2007, 30(6): 1511-1519.

[13] Kawasaki H, Taira K. Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA (Val) promoter significantly induce RNAi mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(2), 700-707.

[14] Lavin MF, Khanna KK. ATM: The protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia [J]. Int J Radiat Biol, 1999, 75(10): 1201-1214.

[15] Pardo B, Gomez-Gonzalez B, Aguilera A. DNA double-strand break repair: How to fix a broken relationship [J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(6): 1039-1056.

[16] Chen BP, Li M, Asaithamby A. New insights into the roles of ATM and DNA-PKs in the cellular response to oxidative stress [J]. Cancer Lett, 2012, 327(1/2): 103-110.

[17] Lundholm L, Haag P, Zong D, et al. Resistance to DNA-damaging treatment in non-small cell lung cancer tumor-initiating cells involves reduced DNA-PK/ATM activation and diminished cell cycle arrest [J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e478-e486.

[18] Zhao J, Tang J, Men W, et al. FBXW7-mediated degradation of CCDC6 is impaired by ATM during DNA damage response in lung cancer cells [J]. FEBS Lett, 2012, 586(24): 4257-4263.

[19] 沈瑜, 糜福顺. 肿瘤放射生物学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社出版, 2001: 65-68.

[20] Vellanki SH, Grabrucker A, Liebau S, et al. Small-molecule XIAP inhibitors enhance-irradiation-induced apoptosis in glioblastoma [J]. Neoplasia, 2009, 11(8): 743-752.

[21] Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53 [J]. Science, 1998, 281(5383): 1677-1679.

[22] Feng J, Zou J, Li L, et al. Antisense oligodeoxynucleotides targeting ATM strengthen apoptosis of laryngeal squamous cell carcinoma grown in nude mice [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30(1): 43-50.

[23] Kabacik S, Ortega-Molina A, Efeyan A, et al. A minimally invasive assay for individual assessment of the ATM/CHEK2/p53 pathway activity [J]. Cell Cycle, 2011, 10(7): 1152-1161.

[收稿日期] 2013-02-08

[修回日期] 2013-04-25

[本文编辑] 周玲琳