

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.009

融合抗氧化酶 GS1XR 对鼻咽上皮细胞的放射防护效应

何火聪^{1,2a}, 韩亚南^{2b,2c}, 张紫怡^{2b,2c}, 潘剑茹^{2b,2c} (1. 福建医科大学肿瘤临床医学院/福建省肿瘤医院放射生物学研究室, 福建 福州 350014; 2. 福州大学 a. 化学学院; b. 生物科学与工程学院; c. 福建省海洋酶工程重点实验室 福建 福州 350108)

摘要 **目的:** 本研究旨在探讨融合抗氧化酶 GST-SOD1-X-R9 (GS1XR) 对正常鼻咽上皮细胞 NP69 的放射防护作用及其可能的机制。**方法:** 培养 NP69 细胞, 分为空白对照 (Untr) 组、EGFP-GS1 组、EGFP-GS1R 组和 EGFP-GS1XR 组, 检测 0.5 mg/mL 不同融合抗氧化酶的跨膜效应。用 CCK-8 法测定 3 种融合抗氧化酶在 0~1 mg/mL 质量浓度范围内的细胞毒性。以 DCFH-DA 荧光探针测定 0~6 Gy X 射线和不同剂量 (0~1 mg/mL) GS1XR 对 NP69 细胞内 ROS 水平的影响。进一步实验将 NP69 细胞分为 Untr 组、4 Gy X 射线单纯照射 Ctrl 组和照射前分别预处理 GS1、GS1R、GS1XR 及阿米福汀 (AMFT, 4 μg/mL) 组, 检测细胞内 ROS 水平, 流式细胞术检测细胞的凋亡率, 用 WB 法检测 Nrf2 入核量、抗氧化基因 GCLC 以及抗凋亡因子 Bcl-2 和凋亡因子 BAX 的表达。**结果:** 实验结果显示, EGFP-GS1 不具备跨膜能力, 而 EGFP-GS1R 和 EGFP-GS1XR 能够有效跨膜进入 NP69 细胞 ($P < 0.0001$)。经 24 h 处理后, 3 种融合抗氧化酶均使细胞活力保持在 80% 以上, 其中 GS1XR 处理组的细胞活力维持在 100% 以上。4 Gy X 射线照射显著增加细胞内 ROS 水平 ($P < 0.01$), GS1XR 以剂量依赖方式清除辐射诱导的 ROS。与 Ctrl 组相比, GS1XR 显著降低受照细胞内的 ROS 水平 ($P < 0.05$), 促进 Nrf2 的入核 ($P < 0.01$), 上调抗氧化基因 GCLC ($P < 0.0001$), 降低细胞的凋亡率 ($P < 0.0001$) 和抗凋亡因子 Bcl-2 ($P < 0.001$) 的表达, 并下调促凋亡因子 BAX 的表达 ($P < 0.05$)。GS1XR 的整体保护作用与 GS1R 相似, 且与阿米福汀效果相当。**结论:** 融合抗氧化酶 GS1XR 对 NP69 细胞具有显著的放射防护效应, 其机制可能与其可进入细胞清除受照细胞内 ROS, 激活 Nrf2 信号通路, 并调节 Bcl-2 和 BAX 的表达有关, GS1XR 有望成为一种新型的放射防护剂。

关键词 放射防护; 融合抗氧化酶; 鼻咽上皮细胞

[中图分类号] R735.7 [文献标识码] A [文章编号] 1007-385x(2024)11-1116-07

Radioprotective effect of fusion antioxidant enzyme GS1XR on nasopharyngeal epithelial cells

HE Huocong^{1,2a}, HAN Yanan^{2b,2c}, ZHANG Ziyi^{2b,2c}, PAN Jianru^{2b,2c} (1. Laboratory of Radiation Biology, Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fujian Cancer Hospital, Fuzhou 350014, Fujian, China; 2. a. College of Chemistry; b. College of Biological Science and Engineering; c. Key Laboratory of Marine Enzyme Engineering of Fujian Province, Fuzhou University, Fuzhou 350108, Fujian, China)

[Abstract] Objective: To investigate the radioprotective effects of the fusion antioxidant enzyme GST-SOD1-X-R9 (GS1XR) on normal nasopharyngeal epithelial cells (NP69) and its potential mechanisms. **Methods:** NP69 cells were cultured and divided into the following groups: untreated control (Untr) group, EGFP-GS1 group, EGFP-GS1R group, and EGFP-GS1XR group. The transmembrane effect of different fusion antioxidant enzymes was evaluated at a concentration of 0.5 mg/mL. The cytotoxicity of the three enzymes within a concentration range of 0 to 1 mg/mL was determined using the CCK-8 assay. ROS levels in NP69 cells were measured using a DCFH-DA fluorescent probe following exposure to 0~6 Gy X-ray and varying doses (0~1 mg/mL) of GS1XR. In further experiments, NP69 cells were divided into blank control (Untr) group, 4 Gy X-ray only group (Ctrl), and groups pre-treated with GS1, GS1R, GS1XR, or Amifostine (AMFT, 4 μg/mL) before X-ray exposure. ROS levels, apoptosis rate, Nrf2 nuclear translocation, and expression of antioxidant gene GCLC, anti-apoptotic factor Bcl-2, and pro-apoptotic factor BAX were evaluated using flow cytometry and WB analysis. **Results:** EGFP-GS1 lacked transmembrane ability, whereas EGFP-GS1R and EGFP-GS1XR efficiently crossed the NP69 cell membrane ($P < 0.0001$). After 24 hours of treatment, all three fusion antioxidant enzymes maintained cell viability above 80%, with the GS1XR-treated group maintaining cell viability above 100%. Exposure to 4 Gy X-ray significantly

[基金项目] 国家自然科学基金 (No. 81974482); 福建省科技创新联合资金项目 (No. 2021Y9191); 福建省自然科学基金 (No. 2023J011238)

[作者简介] 何火聪 (1973—), 男, 硕士, 副主任技师, 主要从事肿瘤放射生物学研究。E-mail: hconghe@163.com

[通信作者] 潘剑茹, E-mail: panjr@fzu.edu.cn

increased intracellular ROS levels ($P < 0.01$), while GS1XR effectively reduced radiation-induced ROS in a dose-dependent manner. Compared to the Ctrl group, GS1XR significantly decreased intracellular ROS levels ($P < 0.05$), promoted Nrf2 nuclear translocation ($P < 0.01$), upregulated the expression of antioxidant gene GCLC ($P < 0.000 1$), and reduced the apoptosis rate ($P < 0.000 1$). Additionally, it increased the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 ($P < 0.001$) and downregulated pro-apoptotic factor BAX ($P < 0.05$). The overall protective effects of GS1XR were similar to those of GS1R and comparable to the effects of Amifostine. **Conclusion:** The fusion antioxidant enzyme GS1XR exhibits significant radioprotective effects on NP69 cells, likely through its ability to enter cells, eliminate radiation-induced ROS, activate the Nrf2 signaling pathway, and regulate the expression of Bcl-2 and BAX. GS1XR shows potential as a novel radioprotective agent.

[Key words] radioprotection; new fusion antioxidant enzyme; nasopharyngeal epithelial cell

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(11): 1116-1122. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.11.009]

放射治疗是治疗鼻咽癌等多种肿瘤的重要手段^[1-2]。电离辐射可直接对生物大分子DNA产生破坏作用,或通过辐解水产生大量活性氧自由基(ROS),这些ROS可杀伤肿瘤细胞,但也导致正常鼻咽组织细胞放射损伤,产生放射不良反应^[3-5],因此,对鼻咽癌患者进行放疗时保护鼻咽正常组织免受辐射损伤显得尤为重要。为了实现靶向防护正常细胞的放射损伤,笔者所在课题组根据大多数肿瘤细胞高表达基质金属蛋白酶-2/9(MMP-2/9)的特点,融合跨膜肽R9、MMP-2/9底物肽X、人超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)和人谷胱甘肽S转移酶(glutathione-S-transferase, GST),构建得到MMP-2/9敏感型融合抗氧化酶(GS1XR)^[6]。为探讨GS1XR对鼻咽正常上皮细胞NP69的放射防护作用,本研究建立正常鼻咽上皮细胞NP69的放射损伤模型,观察GS1XR对NP69细胞的跨膜效果,检测GS1XR对NP69细胞内ROS的清除效应,分析GS1XR对受照NP69细胞Nrf2-ARE通路及细胞凋亡的影响,以期为进一步将多功能抗氧化酶GS1XR开发为新型放射防护剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞株及抗氧化酶

人正常鼻咽上皮细胞NP69来自福建省肿瘤医院放射生物研究室。GS1XR、GS1(GST-SOD1)及GS1R(GST-SOD1-R9)等抗氧化酶由福州大学生物科学与工程学院表达、纯化及鉴定。

1.2 主要试剂与仪器

阿米福汀(amifostine, AMFT; 粉剂, 货号24010310)购自南京绿叶制药有限公司,实验时用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)溶解成400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 备用,BCA蛋白定量试剂盒、K-SFM(Defined Keratinocyte-SFM)培养液和HRP-羊抗兔二抗购自美国Thermo Fisher Scientific公司,胰酶和PBS购自上海源培生物科技股份有限公司,RIPA细胞裂解液、脱脂奶粉、ECL化学发光试剂、DAPI荧光染料、DCFH-DA荧光

探针和细胞增殖检测CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司,抗Nrf2和GCLC兔多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,抗BAX和Bcl-2兔多克隆抗体购自美国Abcam公司。Synergy 6 MV X射线直线加速器购自瑞典医科达(Elekta)公司,Annexin V-FITC细胞凋亡试剂盒和FACSCanto II流式细胞仪购自美国BD Bioscience公司。

1.3 细胞培养

人鼻咽上皮细胞NP69使用K-SFM细胞培养液,在CO₂体积分数为5%、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中进行培养。

1.4 细胞跨膜效应

实验细胞NP69分为空白对照(Untr)组(细胞+PBS)、EGFP-GS1组(细胞+EGFP-GS1)、EGFP-GS1R组(细胞+EGFP-GS1R)、EGFP-GS1XR组(细胞+EGFP-GS1XR),共4组。对数期NP69细胞消化后接种24孔板,每孔种植细胞数为 8×10^4 个,待细胞长至80%汇合度时,吸去旧培养液,PBS清洗后,EGFP-GS1组、EGFP-GS1R组和EGFP-GS1XR组的每孔加入0.5 mg/mL 的融合抗氧化酶,Untr组加入PBS作为对照,作用3 h后去除上清液,PBS清洗3次,一部分细胞使用倒置荧光显微镜观察融合抗氧化酶跨膜进入NP69细胞的效果,并拍照分析($\times 100$);余下部分每孔加入250 μL 细胞裂解液,多功能酶标仪检测荧光值,BCA法测定裂解液中蛋白的含量,计算每 mg 蛋白的荧光强度。

1.5 细胞活力检测

取对数期NP69细胞计数后接种96孔板,每孔接种体积为100 μL ,种植细胞数为 2×10^4 个。待细胞长至80%汇合度时,分别加入100 μL 的GS1、GS1R和GS1XR蛋白溶液,每种蛋白的终质量浓度分别为0、0.25、0.5、0.75和1 mg/mL ,作用24 h后弃培养上清液,每孔加入100 μL 含10% CCK-8溶液的完全培养液,37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO₂培养箱中温育40 min,酶标仪检测450 nm波长处的光密度(D)值,计算细胞活力。

1.6 细胞照射

用X射线对NP69细胞进行照射,照射野

40 cm × 40 cm, 剂量率 400 cGy/min, 源皮距 100 cm, 建成区 0.5 cm, 机架角 180 度。

1.7 细胞内 ROS 含量检测

按照 1.5 的种板方案将细胞接种 96 孔板。待细胞培养至 80% 汇合度时, 移除上清液。PBS 清洗后加入 DCFH-DA 探针温育 30 min。接着按照 1.6 方案进行照射 (0~6 Gy)。随后裂解细胞, 多功能酶标仪检测荧光值, 并使用 BCA 法测定蛋白质浓度, 以计算每毫克蛋白的荧光强度。

1.7.1 GS1XR 剂量效应

将细胞分为两大组: 无照射 Untr 组和 4Gy 照射 XRT 组, 其中 XRT 组再分为单纯照射 Ctrl 组、低浓度 GS1XR (0.5 mg/mL) 作用的 GS1XR-L 组、中浓度 GS1XR (0.75 mg/mL) 作用的 GS1XR-M 组和高浓度 GS1XR (1 mg/mL) 作用的 GS1XR-H 组。按照 1.5 的种板方案将细胞接种 96 孔板。待细胞长到 80% 汇合度时去除上清, GS1XR-L 组、GS1XR-M 组和 GS1XR-H 组的每孔加入 100 μ L GS1XR 蛋白溶液, 终质量浓度分别为 0.5、0.75 和 1 mg/mL, Untr 组和 Ctrl 组加 PBS 作为对照, 作用 3 h 后进行 4 Gy X 线照射, 照后用 PBS 清洗细胞, 加 DCFH-DA 探针温育 30 min, 其余处理同 1.7。

1.7.2 不同抗氧化酶的预处理效应

将细胞分为两大组: 无照射 Untr 组和 4Gy 照射 XRT 组; XRT 组再分为单纯照射 Ctrl 组、GS1 组、GS1R 组、GS1XR 组和 AMFT 组。按照 1.5 的种板方案将细胞接种 96 孔板。待细胞长到 80% 汇合度时去除上清, 每孔分别加入终质量浓度为 0.75 mg/mL 融合抗氧化酶 (GS1、GS1R 和 GS1XR) 预处理 3 h, Untr 组和单纯照射 Ctrl 组加 PBS 作为对照; 另外, AMFT 组于照射前每孔加入 100 μ L AMFT 溶液 (终质量浓度为 4 μ g/mL) 预处理 30 min, 处理后的细胞进行 4 Gy X 线照射。其余处理同 1.7.1。

1.8 WB 法检测

用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞, BCA 法蛋白定量后行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 恒流将蛋白转印至 NC 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.2, 150 mmol/L NaCl, 吐温 0.1% -20) 洗膜 3 次, 室温下一抗作用 3 h, 洗膜后二抗作用 1 h, 加 ECL 化学发光试剂于膜蛋白面上, 用多功能成像分析系统 (4000MM PRO, Carestream) 采集图像并分析数据。

1.8.1 Nrf2-ARE 通路激活检测

细胞分组同 1.7.2。取对数期细胞接种 6 孔板, 每孔 4×10^5 个细胞, 培养 24 h 后, 用 0.75 mg/mL 融合抗氧化酶或 4 μ g/mL 的 AMFT 对细胞进行预处理, Untr

组和单纯照射 Ctrl 组加 PBS 处理作为对照, 然后按照 1.6 方案进行照射, 照后继续培养 24 h, 然后刮下细胞, WB 法检测细胞核蛋白中 Nrf2 含量以及总蛋白中 GCLC 的表达水平。

1.8.2 细胞凋亡及其相关因子检测

根据 1.8.1 种板方案对细胞进行处理, 处理后, 继续培养 48 h, 一部分细胞按照试剂说明书使用 Annexin V -FITC 细胞凋亡试剂盒和流式细胞仪检测细胞凋亡, 即细胞经抗氧化酶等作用后接受 4 Gy 的 X 射线照射, 照后继续培养 48 h, 然后收集细胞用 Annexin V /碘化丙啶 (PI) 染色 15 min, 在流式细胞仪上检测细胞的凋亡率。收集另一部分细胞并用 RIPA 细胞裂解液进行裂解, 然后通过 WB 法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 BAX 的表达情况。

1.9 统计学处理

所有实验独立重复 3 次。符合正态分布的计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Microsoft Excel 365 和 GraphPad Prism 10.0 软件进行数据处理分析。多组数据之间的比较采用 One-way ANOVA 法, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GS1R 和 GS1XR 能跨膜进入 NP69 细胞内

本研究首先使用融合了增强型绿色荧光蛋白 EGFP 的 3 种融合抗氧化酶来检测它们跨膜进入 NP69 细胞的能力, 结果如图 1 所示。由图 1A 可知, 未经抗氧化酶处理 Untr 组细胞镜检无荧光, 无跨膜肽的 EGFP-GS1 预处理的细胞中也基本无荧光, 经 EGFP-GS1R 或 EGFP-GS1XR 预处理的细胞中则显现出大量的绿色荧光, 这表明 EGFP-GS1R 或 EGFP-GS1XR 均可跨膜进入 NP69 细胞。荧光定量分析结果 (图 1B) 也表明, EGFP-GS1 无跨膜进入 NP69 细胞能力, 与 Untr 相比, EGFP-GS1R 或 EGFP-GS1XR 的跨膜进入细胞的量明显增加 ($P < 0.0001$)。

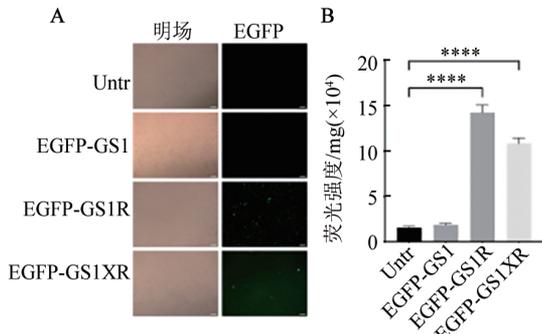
2.2 融合抗氧化酶对 NP69 细胞活力的无明显影响

随后探究不同剂量的 3 种融合抗氧化酶对 NP69 细胞活力的影响, 结果如图 2 所示, 由图 2 可知, 3 种融合抗氧化酶在 0~1 mg/mL 的剂量范围内, 细胞活力均在 80% 以上, 其中 GS1XR 处理的细胞的活力维持在 100% 以上, 提示 GS1XR 对 NP69 细胞未见明显的细胞毒性。

2.3 4 Gy 照射能显著升高 NP69 细胞中 ROS 含量

以 DCFH-DA 荧光探针定量分析不同照射剂量对受照 NP69 细胞胞内 ROS 含量的影响, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 与未受照组 (0 Gy 组) 细胞相比, 2~6 Gy 照射均可使细胞胞内 ROS 含量上升, 但仅 4 Gy 照射诱发的胞内 ROS 含量最高, 且差异具有统

计学意义 ($P < 0.01$), 因此, 后期实验中 NP69 的照射剂量定为 4 Gy。



A: 荧光显微镜观察(100×); B: 荧光定量分析。
Untr: 空白对照组。**** $P < 0.0001$ 。

图1 融合抗氧化酶 GS1XR 穿过 NP69 细胞跨膜的能力

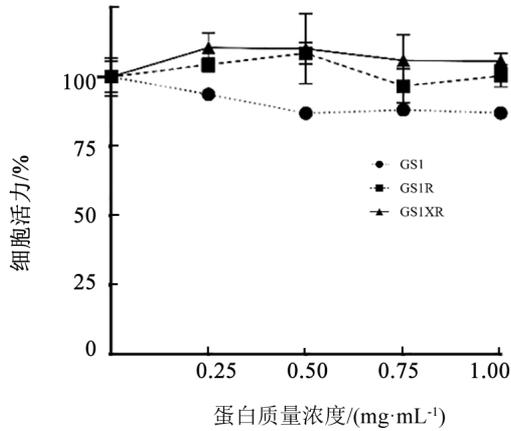


图2 3种融合抗氧化酶对 NP69 细胞活力的影响

2.4 GS1R 和 GS1XR 能显著抑制受照 NP69 细胞内

ROS 的含量

如图4A所示, 与单纯照射 Ctrl 组相比较, 预给予不同剂量的 GS1XR 可显著降低受照 NP69 细胞 ROS 含量, 且 ROS 的清除效果具有剂量依赖性。考虑到高剂量 GS1XR 预处理会使细胞胞内的 ROS 远低于正常细胞的 ROS 水平, 因此本研究采用中剂量 (0.75 mg/mL) 的 GS1XR 进行后续实验, 为比较不同融合抗氧化酶效应的差异, 作为对照的 GS1 及 GS1R 蛋白也使用相同的剂量。

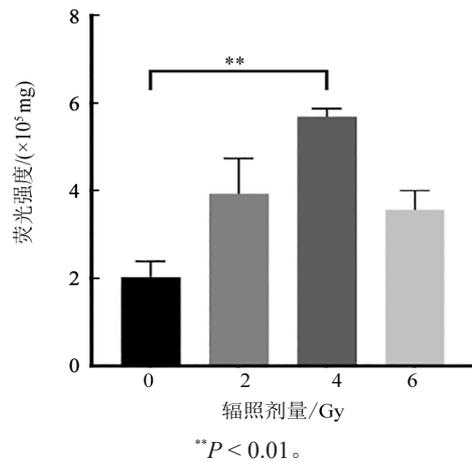
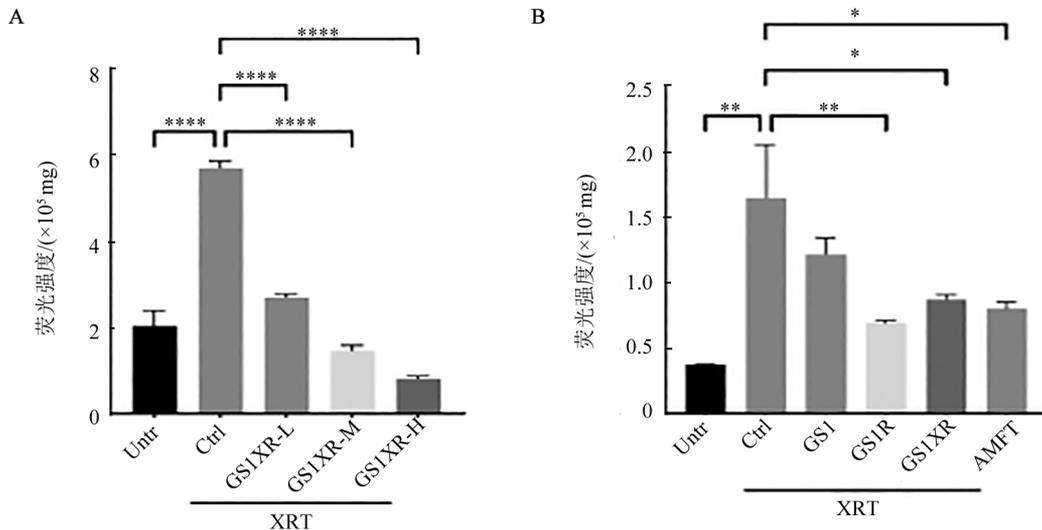


图3 照射剂量对受照 NP69 细胞内 ROS 含量的影响

3种融合抗氧化酶对受照细胞内 ROS 含量的影响如图4B所示, 与 Untr 组相比, Ctrl 组细胞胞内 ROS 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与 Ctrl 组相比, GS1 组细胞胞内 ROS 含量虽有下降, 但差异无统计学意义; 预给予 GS1R、GS1XR 及 AMFT 处理则均可使受照 NP69 细胞胞内 ROS 含量显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



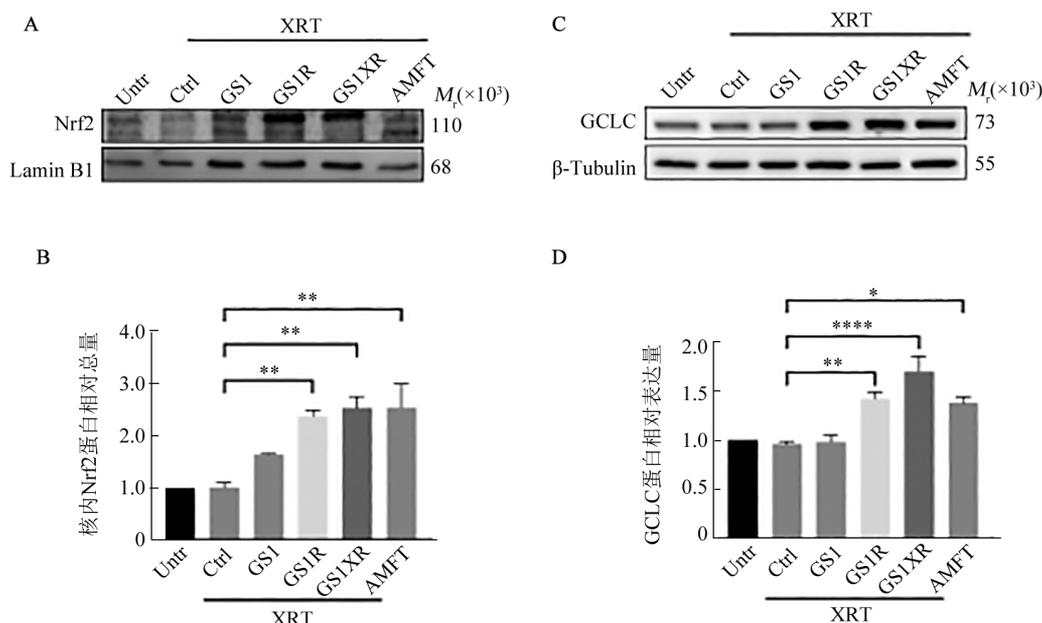
A: GS1XR 对受照 NP69 细胞胞内 ROS 的剂量效应; B: 3种融合抗氧化酶对受照 NP69 细胞内 ROS 的清除效应。XRT: 4 Gy 照射; Untr: 空白对照组; Ctrl: 单纯照射组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图4 融合抗氧化酶 GS1XR 对受照 NP69 细胞胞内 ROS 的清除效应

2.5 GS1R 和 GS1XR 能显著提升受照 NP69 细胞中 Nrf2 和 GCLC 的表达

如图 5A-5B 所示, WB 实验结果表明, 与 Untr 组比较, Ctrl 组细胞核内 Nrf2 的含量没有发生变化; 与 Ctrl 组比较, GS1 组细胞核内 Nrf2 的含量虽有上升, 但差异无统计学意义; 预给予 GS1R、GS1XR 及 AMFT 则均可使受照细胞 NP69 细胞核内 Nrf2 的含量增加 ($P < 0.01$)。

为了进一步确认融合抗氧化酶 GS1XR 可促进受照细胞抗氧化通路的激活, 本研究检测了 Nrf2 下游抗氧化蛋白 GCLC 的表达量, 结果如图 5C-5D 所示。由图可知, 与 Untr 组相比, Ctrl 组和 GS1 组受照细胞 GCLC 表达量基本没有变化; 与 Ctrl 组相比较, GS1XR 预处理的细胞中抗氧化蛋白 GCLC 的表达量明显上调 ($P < 0.01$)。以上结果表明 GS1XR 可激活受照细胞的 Nrf2-ARE 抗氧化通路。



A-B: 核内 Nrf2 蛋白总量; C-D: GCLC 蛋白的表达。XRT: 4 Gy 照射; Untr: 空白对照组; Ctrl: 单纯照射组。与 Ctrl 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。

图 5 融合抗氧化酶 GS1XR 对受照 NP69 细胞 Nrf2-ARE 通路的影响

2.6 GS1R 和 GS1XR 能显著抑制受照 NP69 细胞凋亡及促进 Bcl-2、抑制 BAX 蛋白的表达

结果如图 6 所示, 与未照射的 Untr 组相比, 单纯照射 Ctrl 组的细胞凋亡显著上升 ($P < 0.0001$); 与单纯照射 Ctrl 组相比, 经 GS1R、GS1XR 和 AMFT 作用的细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.001$) (图 6A-B)。接着从分子水平探讨靶向性抗氧化酶 GS1XR 防护 NP69 细胞的抵抗放射的作用, 结果见图 6C-6E, 与 Untr 组相比, Ctrl 组 Bcl-2 表达量显著降低 ($P < 0.0001$), BAX 表达量差异无统计学意义; 与 Ctrl 组相比, GS1 组 Bcl-2 与 BAX 的表达量差异均无统计学意义, GS1R、GS1XR 和 AMFT 组的 Bcl-2 表达显著升高 ($P < 0.001$), BAX 表达下调 ($P < 0.05$), 提示融合抗氧化酶 GS1XR 可通过上调 Bcl-2 的表达以及降低 BAX 的表达来降低照射损伤 NP69 细胞的凋亡。

3 讨论

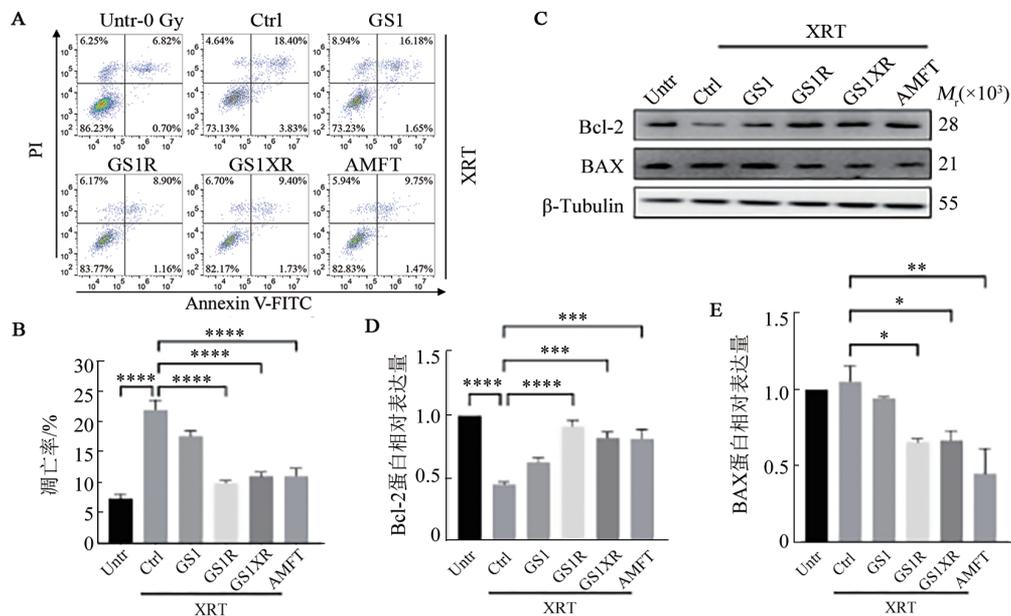
放疗是鼻咽癌主要的治疗方式, 但即使采用了

调强放疗技术, 仍有部分鼻咽癌患者在治疗后出现吞咽功能障碍^[7-8]。吞咽功能障碍严重程度与生活质量下降相关。急性放射损伤通常发生在放疗期间或放疗后数周内出现的放射治疗相关不良反应, 它主要发生在快速增殖和代谢的细胞中, 例如对辐射产生的 ROS 很敏感的上皮细胞和黏膜细胞^[9-10]。为此, 本研究建立了鼻咽上皮细胞 NP69 放射损伤模型来考察融合抗氧化酶 GS1XR 的放射防护效应。

核 DNA 被公认为是辐射诱导细胞死亡或损伤的主要靶标。辐射处理对 DNA 的损害主要由两种不同的机制引发: 一是直接效应, 即 DNA 分子受电离作用导致; 二是间接效应, 即通过水的辐解过程介导。对于低传能线密度 (linear energy transfer, LET) 辐射, 其直接作用在 DNA 损伤中约占 30%, 而间接作用则约占 70%^[11]。在放疗中常使用的 X 射线和 γ 射线属于低 LET 辐射, 因此, 辐射产生的 ROS 是放疗抑制肿瘤的主要因素。然而, ROS 同时也是正常细胞组织受损的原因。辐射引发的 ROS 可使受照细胞凋亡^[12],

Bcl-2家族中的抗凋亡因子Bcl-2与促凋亡因子BAX是细胞凋亡的重要调控因子,前者表达上调时,细胞

凋亡被抑制,而后的过度表达则可促进细胞凋亡^[13-14]。



A, B: 流式细胞术检测细胞的凋亡率。C-E: Bcl-2和BAX的蛋白表达。XRT: 4 Gy照射; Untr: 空白对照组; Ctrl: 单纯照射组。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图6 GS1XR对受照NP69细胞凋亡相关调节因子表达量的影响

本研究结果表明,GS1XR对鼻咽上皮细胞没有明显的细胞毒性,它能穿过细胞膜进入NP69细胞,并降低受照细胞内ROS的过量积聚,同时上调受照细胞内抗凋亡因子Bcl-2的表达,并下调促凋亡因子BAX的表达。其效果与GS1R以及临床用药AMFT相当,无跨膜能力的GS1则未观察到有效的作用。

转录因子E2相关因子2-抗氧化反应元件(Nuclear factor-erythroid 2-related factor antioxidant response element, Nrf2-ARE)信号通路对机体抗氧化应激非常重要^[15-16]。当机体受到外界刺激后,结构发生改变的李rf2会从Keap1上解离下来,活化后的Nrf2移位进入细胞核,形成二聚体,然后与细胞核内的ARE元件结合,激活下游靶基因的表达,从而调控II相代谢酶、抗氧化酶等的转录活性,清除细胞内多余的ROS,发挥抗氧化作用,维护细胞稳态^[17-18]。

本研究还发现,预给予GS1XR、GS1R或AMFT可使受照细胞NP69细胞核内Nrf2的含量显著增加,上调抗氧化蛋白GCLC的表达量,但GS1则无显著作用。这表明,可跨膜的抗氧化酶或抗氧化剂不仅可以直接清除受照细胞内的ROS,还可以通过激活Nrf2抗氧化通路进一步激活其下游抗氧化蛋白的表达,从而增强抗氧化作用。

对于肿瘤放疗而言,必须在保护正常组织的同时不影响射线对肿瘤的杀伤作用,以免降低放疗的抗肿瘤效果。因此,具有正常细胞靶向性的防护剂

才具有临床应用潜力。

目前,AMFT是唯一经美国FDA批准用于头颈癌放射治疗引起的口干症的放射防护剂,其是一种磷酸化的氨基硫醇前药,经碱性磷酸酶去磷酸化后转化为活性自由基清除剂WR-1065^[19]。由于肿瘤细胞中碱性磷酸酶水平较低,因此其主要作用是保护正常组织。然而,研究^[20]发现,AMFT也可能会缓慢扩散到恶性组织中。此外,临床上AMFT因严重毒性而使其应用受到限制,例如呕吐和低血压。

笔者所在团队的先前研究^[21-22]表明,融合了跨膜肽的抗氧化酶能够穿过细胞膜,清除受照正常细胞内的ROS,从而预防放射损伤,然而,跨膜肽没有细胞特异性,因此融合了跨膜肽的抗氧化酶对肿瘤细胞也表现出一定的保护作用。为了使可穿膜抗氧化酶的保护作用具有靶向性,将融合抗氧化酶GST-SOD1与R9跨膜肽之间插入了可被MMP-2/9识别并水解的X肽,从而得到了MMP-2/9敏感型的融合抗氧化酶GS1XR。在没有MMP-2/9的正常细胞微环境中,GS1XR能够穿越细胞膜进入正常细胞。然而,在表达MMP-2/9的肿瘤细胞微环境中,GS1XR由于X肽被MMP-2/9酶解而失去了R9跨膜肽,导致剩余的GST-SOD1无法进入肿瘤细胞,而是留存在肿瘤细胞的胞外基质中^[6]。因此,GS1XR不会保护受照的肿瘤细胞。

此外,细胞跨膜肽可使与之融合蛋白跨越血-脑脊液屏障^[23-24],且抗氧化酶的作用具有高度的

特异性,因此,与AMFT相比,融合抗氧化酶GS1XR显然具有更大的临床应用潜力。本研究为鼻咽癌放疗患者的正常组织损伤的防治提供了新的思路和方向,为融合抗氧化酶GS1XR的应用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] CHEN Y P, CHAN A T C, LE Q T, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)30956-0.
- [2] WONG K C W, HUI E P, LO K W, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma: an evolving paradigm[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(11): 679-695. DOI: 10.1038/s41571-021-00524-x.
- [3] NIKITAKI Z, MAVRAGANI I V, LASKARATOU D A, *et al.* Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: a new ‘old’ paradigm of how the bystanders and distant can become the players [J]. *Semin Cancer Biol*, 2016, 37/38: 77-95. DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.02.002.
- [4] MAVRAGANI I V, NIKITAKI Z, KALOSPYROS S A, *et al.* Ionizing radiation and complex DNA damage: from prediction to detection challenges and biological significance[J/OL]. *Cancers*, 2019, 11(11): 1789[2024-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6895987/>. DOI: 10.3390/cancers11111789.
- [5] BARAZZUOL L, COPPES R P, VAN LUIJK P. Prevention and treatment of radiotherapy-induced side effects[J]. *Mol Oncol*, 2020, 14(7): 1538-1554. DOI: 10.1002/1878-0261.12750.
- [6] 何火聪, 林丽香, 李玲玲, 等. 基质金属蛋白酶-2/9敏感型可跨膜融合抗氧化酶的表达、纯化和表征[J]. *生物工程学报*, 2022, 8(9): 3515-3527.
- [7] NICOL A J, CHING J C F, TAM V C W, *et al.* Predictive factors for chemoradiation-induced oral mucositis and dysphagia in head and neck cancer: a scoping review[J/OL]. *Cancers*, 2023, 15(23): 5705[2024-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10705154/>. DOI: 10.3390/cancers15235705.
- [8] MAO Y P, WANG S X, GAO T S, *et al.* Medial retropharyngeal nodal region sparing radiotherapy versus standard radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma: open label, non-inferiority, multicentre, randomised, phase 3 trial[J/OL]. *BMJ*, 2023, 380: e072133 [2024-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9900470/>. DOI: 10.1136/bmj-2022-072133.
- [9] CHIU Y H, TSENG W H, KO J Y, *et al.* Radiation-induced swallowing dysfunction in patients with head and neck cancer: a literature review[J]. *J Formos Med Assoc*, 2022, 121(1 Pt 1): 3-13. DOI: 10.1016/j.jfma.2021.06.020.
- [10] BOOTHE P F, KUMAR V P, KONG Y L, *et al.* Radiation induced skin fibrosis (RISF): opportunity for angiotensin II-dependent intervention[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(15): 8261. DOI: 10.3390/ijms25158261.
- [11] LI Q, ZHAO G P, HAN W, *et al.* Radiation target: moving from theory to practice[J/OL]. *Nucl Anal*, 2022, 1(2): 100024[2024-09-19]. <https://doi.org/10.1016/j.nucana.2022.100024>. DOI: 10.1016/j.nucana.2022.100024.
- [12] SRINIVAS U S, TAN B W Q, VELLAYAPPAN B A, *et al.* ROS and the DNA damage response in cancer[J/OL]. *Redox Biol*, 2019, 25: 101084[2024-09-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30612957/>. DOI: 10.1016/j.redox.2018.101084.
- [13] CZABOTAR P E, GARCIA-SAEZ A J. Mechanisms of Bcl-2 family proteins in mitochondrial apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(10): 732-748. DOI: 10.1038/s41580-023-00629-4.
- [14] ROSA N, SPEELMAN-ROOMS F, PARYS J B, *et al.* Modulation of Ca²⁺ signaling by antiapoptotic Bcl-2 versus Bcl-xL: from molecular mechanisms to relevance for cancer cell survival[J/OL]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2022, 1877(6): 188791[2024-09-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36162541/>. DOI: 10.1016/j.bbcan.2022.188791.
- [15] DESHMUKH P, UNNI S, KRISHNAPPA G, *et al.* The Keap1-Nrf2 pathway: promising therapeutic target to counteract ROS-mediated damage in cancers and neurodegenerative diseases[J/OL]. *Biophys Rev*, 2017, 9(1): 41-56[2024-09-19]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5425799/>. DOI: 10.1007/s12551-016-0244-4.
- [16] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, *et al.* Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-733. DOI: 10.1016/j.bbamer.2018.02.010.
- [17] LIU S N, PI J B, ZHANG Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway[J/OL]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102389[2024-09-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35792437/>. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102389.
- [18] LU Z G, ZHAO R C, LI Y, *et al.* Smart antioxidant function enhancing (SAFE) nucleic acid therapy for ROS-related chronic diseases and comorbidities[J]. *Bioact Mater*, 2024, 31: 509-524. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.09.004.
- [19] KAMRAN M Z, RANJAN A, KAUR N, *et al.* Radioprotective agents: strategies and translational advances[J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(3): 461-493. DOI: 10.1002/med.21386.
- [20] ORONSKY B, GOYAL S, KIM M M, *et al.* A review of clinical radioprotection and chemoprotection for oral mucositis[J]. *Transl Oncol*, 2018, 11(3): 771-778. DOI: 10.1016/j.tranon.2018.03.014.
- [21] PAN J R, HE H C, SU Y, *et al.* GST-TAT-SOD: cell permeable bifunctional antioxidant enzyme-a potential selective radioprotector [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 5935080[2024-09-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27313832/>. DOI: 10.1155/2016/5935080.
- [22] PAN J R, HE H C, SU Y, *et al.* *In vivo* radioprotective activity of cell-permeable bifunctional antioxidant enzyme GST-TAT-SOD against whole-body ionizing irradiation in mice[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 2689051[2024-09-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28804533/>. DOI: 10.1155/2017/2689051.
- [23] KHAN M M, FILIPCZAK N, TORCHILIN V P. Cell penetrating peptides: a versatile vector for co-delivery of drug and genes in cancer[J]. *J Control Release*, 2021, 330: 1220-1228. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.11.028.
- [24] WANG C H, WANG B, ZHANG Q, *et al.* Tumor microenvironment-responsive cell-penetrating peptides: Design principle and precision delivery[J/OL]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2024, 242: 114100[2024-09-19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39024717/>. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2024.114100.

[收稿日期] 2024-05-20

[修回日期] 2024-09-20

[本文编辑] 黄静怡