

## KU60019 抑制 ATM 对 HepG2 细胞辐射旁效应的调控

颜宇龙, 万丹婷, 周洁, 朱子豪, 邓蒸蒸, 黄波

( 南华大学衡阳医学院公共卫生学院, 湖南省衡阳市 421001 )

[关键词] 共济失调毛细血管扩张症突变; ATM 抑制剂 KU60019; 辐射旁效应; HepG2 细胞

[摘要] 目的 探讨 KU60019 抑制 ATM 对 HepG2 细胞辐射旁效应的调控作用。方法 使用 KU60019 抑制 ATM, 通过转移辐射条件刺激液构建 HepG2 细胞辐射旁效应模型。实验分为空白组 (NC 组)、辐射旁效应组 (ICM 组)、辐射旁效应+KU60019 组 (联合组)、单纯辐照组 (IR 组)。MTT 法检测细胞存活率; 生长曲线实验检测细胞增殖; 微板法检测细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、丙二醛 (MDA) 含量; 活性氧试剂盒检测细胞内活性氧 (ROS) 水平; 荧光分光光度法检测细胞线粒体膜电位 (MMP); 流式细胞术检测细胞凋亡率。结果 随着 KU60019 浓度增加, HepG2 细胞数量逐渐减少, 后续选择 7  $\mu\text{mol/L}$  KU60019 进行实验。与 NC 组比较, ICM 组、联合组与 IR 组的细胞存活率、增殖能力、SOD 活力、线粒体的膜电位逐渐降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率、ROS 与 MDA 含量逐渐升高 ( $P < 0.05$ )。结论 KU60019 抑制 ATM 能降低 HepG2 细胞抗氧化能力, 提高辐射敏感性。

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

### The regulation of KU60019 inhibiting ATM on radiation-induced bystander effects in HepG2 cells

YAN Yulong, WAN Danting, ZHOU Jie, ZHU Zihao, DENG Zhengzheng, HUANG Bo

(School of Public Health, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] ataxia-telangiectasia mutated; ATM inhibitor KU60019; radiation-induced bystander effects; HepG2 cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the regulation of KU60019 inhibiting ATM on radiation-induced bystander effects in HepG2 cells. **Methods** ATM protein kinase was inhibited by KU60019, and the radiation-induced bystander effect model was constructed by transferring radiative conditioned stimulation fluid to HepG2 cells. The experiment was divided

into NC group (NC group), radiation-induced bystander effect group (ICM group), radiation-induced bystander effect + KU60019 group (combined group) and simple irradiation group (IR group). Cell viability was detected by MTT assay. Cell proliferation was detected by growth curve experiment. The viability of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde content (MDA) in cells were detected by microplate method. The levels of reactive oxygen species (ROS) was detected by ROS kit. Mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by fluorescence spectrophotometry. Apoptosis was detected by flow cytometry.

**Results** As the concentration of KU60019 increased, the number of HepG2 cells gradually decreased, and 7  $\mu\text{mol/L}$  KU60019 concentration was selected for subsequent experiments. Compared with NC group, the cell survival rate, proliferative capacity, SOD activity and mitochondrial membrane potential of ICM group, combined group and IR group decreased gradually ( $P < 0.05$ ). The cell apoptosis rate, ROS and MDA content increased gradually ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Inhibition of ATM by KU60019 decreased the antioxidant capacity of HepG2 cells and increased the radiation sensitivity.

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球范围内第五大常见肿瘤, 在中国, 肝细胞癌的发病率排在肿瘤发病率中第 4 位, 病死率排第 2 位, 且

近 80% 患者症状晚期才发现<sup>[1]</sup>。目前肝细胞癌的治疗方法有肝移植、靶向药物治疗、手术切除、放疗和局部消融等。在患者肿瘤细胞进行放疗同时也

[收稿日期] 2021-10-16

[修回日期] 2022-03-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81272994); 湖南省教育厅科学研究重点项目 (19A429); 湖南省自然科学基金面上项目 (2021JJ30592)

[作者简介] 颜宇龙, 硕士研究生, 研究方向为放射医学, E-mail 为 1428526055@qq.com。通信作者黄波, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为放射医学, E-mail 为 huangbo0930@163.com。

能对周围正常细胞或组织产生的损伤为辐射旁效应<sup>[2]</sup>(the radiation-induced bystander effect, RIBE)。RIBE 主要通过细胞间隙链接(Gap junction intercellular communication, GJIC)、活化细胞因子参与自噬、外泌体等三大途径发挥损伤作用,能导致基因不稳定、炎症反应、DNA 损伤、细胞凋亡、细胞生长异常等生物学效应<sup>[3]</sup>。共济失调毛细血管扩张症突变(ataxia-telangiectasia mutated, ATM)基因能识别 DNA 损伤位点,辐射损伤可活化 ATM 来识别和修复 DNA 损伤<sup>[4]</sup>。KU60019 是一种 ATM 激酶特异性的抑制剂,是高度有效的放射增敏剂。本研究探讨 ATM 在辐射旁效应中的调控作用及机制,为肝细胞癌放疗提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

人肝细胞癌细胞(HepG2)由中国军事医学科学院周平坤研究员惠赠。DMEM 培养基购自 Gibco 公司(USA);MTT、罗丹明 B、Giemsa 染液购自北京索莱宝科技有限公司;<sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线生物细胞辐照仪(型号为 HXFS-IA)购自中国核动力原设备制造厂。活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购自南京建成生物科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒购自南京 Vazyme 生物科技有限公司。

### 1.2 辐射旁效应细胞模型的构建

<sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线生物细胞辐照仪照射 HepG2 细胞,剂量率为 133.3 cGy/min,辐照总剂量为 8 Gy。通过刺激液模式构建辐射旁效应模型,8 Gy 辐照 1 h 后收集细胞培养液,1 000 r/min 离心 5 min,收集上清,用 0.22  $\mu$ m 过滤头过滤后构成条件培养基,将条件培养基加入到未受辐照细胞中,共同培养 1 h。

### 1.3 实验分组及处理

实验分为空白组(NC 组)、辐射旁效应组(ICM 组)、辐射旁效应+KU60019 组(联合组)及单纯辐照组(IR 组)。NC 组不做任何处理,新鲜普通培养基培养;ICM 组于 1.2 构成的旁效应培养基中培养;联合组培养液为旁效应培养基中加入 KU60019,使含 KU60019 旁效应培养基的终浓度为 7  $\mu$ mol/L;IR 组于新鲜普通培养基培养时单纯 8 Gy 辐照处理。

### 1.4 MTT 检测细胞存活率

将 HepG2 细胞以  $3.0 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板中,待细胞贴壁,各组实验处理后培养 24、48、72 h

后,每孔加入 10  $\mu$ L MTT 以及 90  $\mu$ L 培养基,于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 4 h,弃上清,每孔加入 110  $\mu$ L Formazan 溶液,室温下振荡仪振荡 10 min,酶联免疫检测仪测定 490 nm 波长处的光密度(OD),分析各组细胞存活率。

### 1.5 细胞生长曲线实验检测细胞增殖

将 HepG2 细胞以  $5.0 \times 10^3$  个/mL 接种于 24 孔板中,各组完成实验处理后,每 3 天更换相应的培养液,每隔 24 h 计数一次,连续计数 7 天。

### 1.6 细胞内 SOD 活力、MDA 含量、ROS 水平的测定

将 HepG2 细胞以  $2.0 \times 10^5$  个/mL 水平接种于 6 cm 皿中,完成各组处理因素 48 h 后收集细胞。提取蛋白,酶标仪 490 nm 处用 BCA 法测定各处理组样品蛋白的水平。按照试剂盒说明书检测细胞内 SOD 活力、MDA 含量、ROS 水平。

### 1.7 荧光分光光度法检测线粒体膜电位

按 1.6 方法收集细胞,1 mL 预先 4  $^{\circ}$ C 处理的杜氏磷酸盐缓冲液(DPBS)重悬细胞,每管加入 1  $\mu$ L 罗丹明 B,使溶液质量浓度为 100 mg/L,避光孵育 0.5 h,离心收集细胞,1 mL DPBS 重悬细胞,荧光分光光度计检测各组细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)。最佳激发波长 488 nm,发射波长为 525 nm。

### 1.8 流式细胞术检测细胞的凋亡

按 1.6 方法收集细胞,离心去上清,加入 100  $\mu$ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ L Propidium Iodide 混匀液孵育 5 min,最后加 400  $\mu$ L Binding Buffer 混匀,1 h 内流式细胞仪检测。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 21.0 统计软件分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,不同组实验数据采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 KU60019 浓度的确定

以 DMSO 作为 KU60019 溶剂,MTT 检测 DMSO,1、3、5、7、9  $\mu$ mol/L KU60019 作用于细胞后观察细胞的存活情况。结果表明,DMSO 对细胞存活无明显影响,24、48、72 h 后,7、9  $\mu$ mol/L KU60019 能明显抑制细胞增殖( $P < 0.05$ ;图 1),7  $\mu$ mol/L KU60019 对 HepG2 细胞毒性较 9  $\mu$ mol/L 更小,故后续选用 7  $\mu$ mol/L KU60019 进行实验。

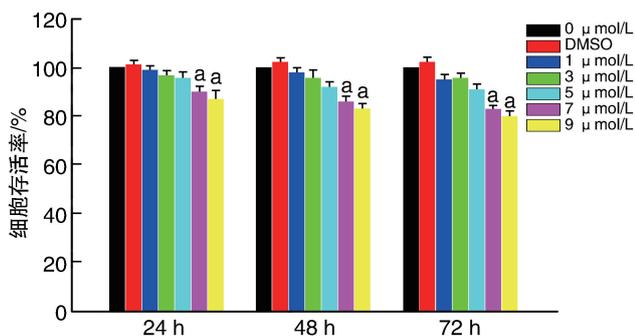


图1 MTT 检测不同浓度 KU60019 对细胞存活率的影响  
a 为  $P < 0.05$ , 与 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较。

### 2.2 KU60019 抑制 ATM 后降低细胞存活率

ICM 组、联合组、IR 组细胞存活率低于 NC 组 ( $P < 0.05$ ), 联合组、IR 组细胞存活率明显低于 ICM 组 ( $P < 0.05$ ; 图 2)。

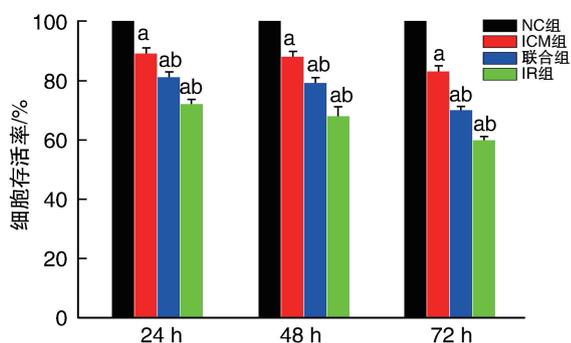


图2 KU60019 抑制 ATM 后降低细胞存活率  
a 为  $P < 0.05$ , 与 NC 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ICM 组比较。

### 2.3 KU60019 抑制 ATM 后降低细胞增殖能力

IR 组、联合组细胞从第 5 天开始生长缓慢, 细胞数明显低于 NC 组和 ICM 组 ( $P < 0.05$ ); ICM 组、联合组、IR 组细胞生长能力明显低于 NC 组 ( $P < 0.05$ ; 图 3)。

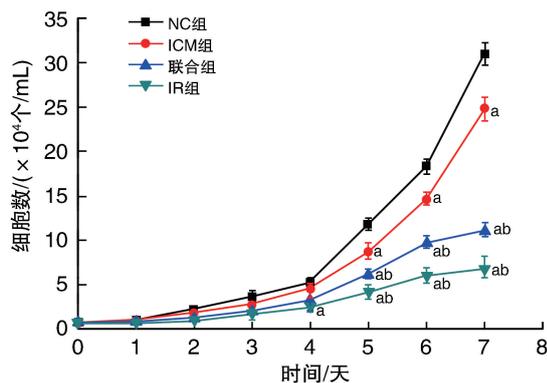


图3 KU60019 抑制 ATM 后降低细胞增殖能力  
a 为  $P < 0.05$ , 与 NC 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ICM 组比较。

### 2.4 KU60019 抑制 ATM 后对细胞内 SOD、MDA、ROS 的影响

与 NC 组比较, ICM 组、联合组、IR 组细胞内 SOD 活力下降, MDA 含量和 ROS 水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 ICM 组比较, 联合组、IR 组细胞内 SOD 活力下降, MDA 含量和 ROS 水平升高 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

表1 KU60019 抑制 ATM 后对细胞内 SOD、MDA、ROS 的影响

分组	SOD/(U · mg)	MDA/(nmol/L)	ROS/(A. U.)
NC 组	92.67 ± 1.82	3.92 ± 0.61	12 674.70 ± 1 012.72
ICM 组	74.66 ± 2.32 <sup>a</sup>	6.14 ± 0.50 <sup>a</sup>	26 731.87 ± 2 190.48 <sup>a</sup>
联合组	66.28 ± 2.27 <sup>ab</sup>	7.65 ± 0.53 <sup>ab</sup>	40 290.31 ± 1 551.83 <sup>ab</sup>
IR 组	54.08 ± 2.45 <sup>ab</sup>	9.59 ± 0.66 <sup>ab</sup>	48 575.48 ± 1 594.61 <sup>ab</sup>

注: a 为  $P < 0.05$ , 与 NC 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ICM 组比较。

### 2.5 KU60019 抑制 ATM 后降低细胞线粒体膜电位

与 NC 组比较, ICM 组、联合组、IR 组细胞线粒体膜电位降低 ( $P < 0.05$ ); 与 ICM 组比较, 联合组、IR 组细胞线粒体膜电位降低 ( $P < 0.05$ ; 图 4)。

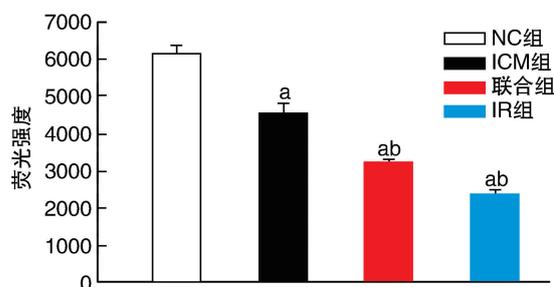


图4 KU60019 抑制 ATM 后降低线粒体膜电位  
a 为  $P < 0.05$ , 与 NC 组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 ICM 组比较。

### 2.6 KU60019 抑制 ATM 后促进细胞凋亡

与 NC 组比较, ICM 组、联合组、IR 组细胞凋亡率增加 ( $P < 0.05$ ); 与 ICM 组比较, 联合组、IR 组细胞凋亡率增加 ( $P < 0.05$ ; 图 5)。

## 3 讨论

目前, 放射治疗是肝细胞癌治疗的主要方法之一, 肿瘤细胞有不同程度的辐射抗性, 肿瘤细胞生长速度快、增殖能力强, 其增殖与凋亡失衡是肿瘤细胞抵抗辐射的重要原因<sup>[5-6]</sup>。本研究结果表明, 当未施加任何处理因素时, 空白组肝细胞癌细胞增殖能力强, 生长速度快, 且均高于其他处理组, IR 和辐射刺激作用后能对 HepG2 细胞存活产生明显抑制。ATM 是 DNA 损伤修复治疗靶点, 正常情况下 ATM 以无活性的二聚体形式存在, 当细胞受到辐

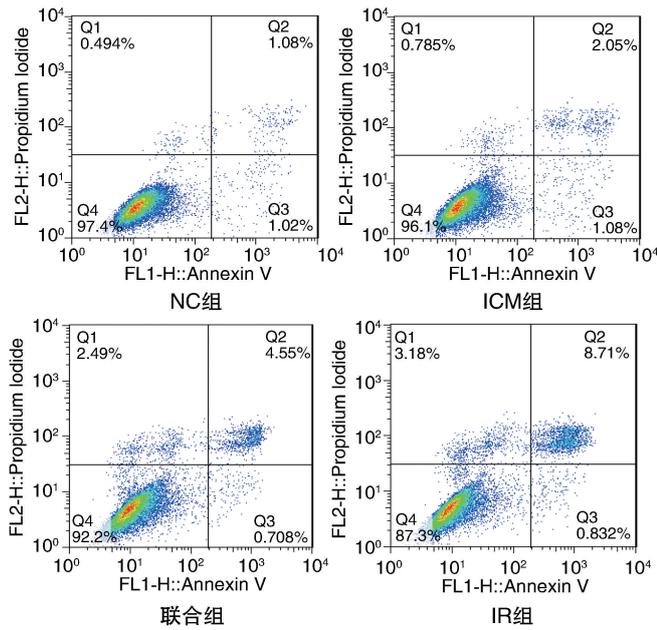


图5 KU60019抑制ATM后促进细胞凋亡

a为 $P < 0.05$ ,与NC组比较;b为 $P < 0.05$ ,与ICM组比较。

射损伤时,ATM可活化介导细胞凋亡与增殖等生物学通路,激活细胞周期检查点,进行细胞自我损伤修复或导致凋亡发生<sup>[7-8]</sup>。本研究发现KU60019作用于HepG2细胞抑制ATM蛋白激酶表达后能明显抑制HepG2细胞存活,且联合组细胞存活率与增殖能力明显低于ICM组。这说明KU60019抑制ATM能降低细胞增殖能力,促进细胞凋亡。

氧化应激的介入可介导辐射旁效应,氧化还原稳态是维持细胞正常增殖的重要因素之一,ATM活化后可以降低体内活性氧水平,激活PI3K/Akt信号通路,增强细胞抗氧化损伤能力<sup>[9-10]</sup>。黄越等<sup>[11]</sup>发现组织受到损伤后,ATM被活化,能产生ROS、SOD等副产物,导致组织氧化还原系统失衡,发生氧化应激损伤。本文ICM组与IR组较NC组细胞ROS、MDA含量上升,SOD活力下降;当抑制ATM蛋白激酶表达,联合组较ICM组细胞ROS、MDA含量上升,SOD活力下降,这提示ATM参与此次辐射旁效应氧化损伤过程。

线粒体能调节凋亡信号通路,线粒体内膜含有很多带有负电荷的糖蛋白,这些糖蛋白可引起线粒体膜电位发生变化<sup>[12]</sup>,从而细胞色素C可随膜电位进入细胞,参与细胞凋亡,介导辐射旁效应早期生物效应<sup>[13]</sup>。本文ICM组与IR组较NC组细胞凋亡率增加,线粒体膜电位下降,联合组较ICM组细胞凋亡率增加、线粒体膜电位下降。

综上所述,ATM在辐射损伤调控作用中起到不可替代的作用,抑制ATM蛋白激酶表达,能使细胞

对辐射旁效应敏感性增加,氧化还原系统失衡,细胞抗氧化损伤能力降低,能阻碍细胞进行自我损伤修复,使细胞增殖受到抑制,发生凋亡。这为提高肝细胞癌细胞的放射敏感性、进一步阐明辐射旁效应的机制提供了基础。

#### [参考文献]

- [1] 吴添雨,黄玲俐,颜新建,等. 苯乙双胍通过激活AMPK抑制肝癌细胞增殖、集落形成及侵袭[J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(3): 290-294, 299.
- [2] YANG X, MA L, YE Z, et al. Radiation-induced bystander effects may contribute to radiation-induced cognitive impairment[J]. Int J Radiat Biol, 2021, 97(3): 329-340.
- [3] HEERAN A B, BERRIGAN H P, O'SULLIVAN J. The radiation-induced bystander effect (RIBE) and its connections with the hallmarks of cancer[J]. Radiat Res, 2019, 192(6): 668-679.
- [4] IPPEN F M, GROSCH J K, SUBRAMANIAN M, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway with the pan-Akt inhibitor GDC-0068 in PIK3CA-mutant breast cancer brain metastases [J]. Neuro Oncol, 2019, 21(11): 1401-1411.
- [5] 徐振华,易峰涛,黄颖. 鼻咽癌根治性放疗后出现单个器官寡转移后手术干预治疗的疗效观察[J]. 实用肿瘤杂志, 2020, 35(2): 185-186.
- [6] ZQ W, CAI Q, HU L, et al. Long noncoding RNA UCA1 induced by SP1 promotes cell proliferation via recruiting EZH2 and activating Akt pathway in gastric cancer[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(6): e2839.
- [7] ZHAO YY, WU Q, WU ZB, et al. Microwave hyperthermia promotes caspase3-dependent apoptosis and induces G2/M checkpoint arrest via the ATM pathway in nonsmall cell lung cancer cells[J]. Int J Oncol, 2018, 53(2): 539-550.
- [8] GUAN R, CAI Z, WANG J, et al. Hydrogen sulfide attenuates mitochondrial dysfunction-induced cellular senescence and apoptosis in alveolar epithelial cells by upregulating sirtuin 1[J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(24): 11844-11864.
- [9] TANG S, HOU Y, ZHANG H, et al. Oxidized ATM promotes abnormal proliferation of breast CAFs through maintaining intracellular redox homeostasis and activating the PI3K-Akt, MEK-ERK, and Wnt- $\beta$ -catenin signaling pathways[J]. Cell Cycle, 2015, 14(12): 1908-1924.
- [10] LI R, LUO X, ZHU Y, et al. ATM signals to AMPK to promote autophagy and positively regulate DNA damage in response to cadmium-induced ROS in mouse spermatocytes[J]. Environ Pollut, 2017, 231(Pt2): 1560-1568.
- [11] 黄越,陈乃耀,赵雪聪,等. 氧化应激参与放射性脑损伤的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(2): 221-224.
- [12] SHA H, ZHANG Y, WANG Y, et al. Electroluminescent aptasensor based on RuSiO<sub>2</sub> nanoparticles for detection cytochrome c using ferrocene as quenching probe[J]. Biosensors Bioelectron, 2019, 132: 203-209.
- [13] POUGET J P, GEORGAKILAS A G, RAVANAT J L, et al. Targeted and off-target (bystander and abscopal) effects of radiation therapy: redox mechanisms and risk/benefit analysis[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(15): 1447-1487.

(此文编辑 蒋湘莲)