

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.20.008

奥拉帕尼对黑素瘤细胞的作用及机制研究*

葛睿¹ 李盼² 周艳¹ 穆欣¹ 张健¹ 韩丹¹ 张子茜¹ 牟宽厚^{1Δ}

(1 西安交通大学第一附属医院皮肤科 陕西 西安 710061;

2 西安交通大学第一附属医院转化医学中心 陕西 西安 710061)

摘要 目的:探讨奥拉帕尼对黑素瘤细胞的作用及其机制。**方法:**应用不同浓度的奥拉帕尼处理黑素瘤细胞,利用 CCK8 检测肿瘤细胞活性。应用 Western blot 技术检测奥拉帕尼处理黑素瘤细胞后肿瘤细胞内凋亡及周期相关蛋白表达水平。**结果:**与对照组相比,5 μM 奥拉帕尼处理黑素瘤 A2058 细胞即可抑制肿瘤细胞活性(85.53±2.593)%。随着奥拉帕尼处理浓度倍增对黑素瘤细胞活性的抑制作用越强。在 10 μM、20 μM、40 μM、80 μM 奥拉帕尼处理浓度下,黑素瘤细胞活性分别是(68.88±1.484)%、(47.21±1.759)%、(33.04±1.261)%、(28.17±1.731)%。奥拉帕尼处理黑素瘤细胞后可促进肿瘤细胞内凋亡相关蛋白 PARP1 剪切体表达增加,并可抑制细胞周期相关蛋白 cyclin D1 的表达。**结论:**奥拉帕尼通过促进黑素瘤细胞凋亡及抑制肿瘤细胞周期蛋白表达的机制发挥抑制黑素瘤细胞活性的作用。

关键词:黑素瘤;奥拉帕尼;凋亡;细胞周期

中图分类号:R-33;R739.5;R96 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)20-3837-04

The Effect of Olaparib on Melanoma Cells and Its Mechanism*

GE Rui¹, LI Pan², ZHOU Yan¹, MU Xin¹, ZHANG Jian¹, HAN Dan¹, ZHANG Zi-xi¹, MOU Kuan-hou^{1Δ}

(1 Department of Dermatology, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 Center for Translational Medicine, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of olaparib on melanoma cells and its mechanism. **Methods:** CCK8 was used to detect the viability of melanoma cells after being treated with olaparib at different concentrations. Western blot was used to detect expression of proteins related with apoptosis and cell cycle in melanoma cells treated with olaparib. **Results:** Compared with the control group, 5 μM olaparib can inhibit the viability of melanoma cells (85.53±2.593)%. And the inhibitory effect of olaparib on the viability of melanoma cells was stronger as its concentration doubling. The viability of melanoma cells were changed to (68.88±1.484)%, (47.21±1.759)%, (33.04±1.261)%, (28.17±1.731)% after the treatment of olaparib at 10 μM, 20 μM, 40 μM, 80 μM concentrations respectively. Olaparib treatment can promote the expression of apoptosis-related cleaved-PARP1 and inhibit the expression of cell cycle-related cyclin D1 in melanoma cells. **Conclusion:** Olaparib play a role in inhibiting the viability of melanoma cells by promoting the apoptosis and inhibiting the expression of cell cycle protein.

Key words: Melanoma; Olaparib; Apoptosis; Cell cycle

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R739.5; R96 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)20-3837-04

前言

黑素瘤是具有高度侵袭性的皮肤恶性肿瘤^[1],中晚期黑素瘤患者预后差,5 年生存率仅为 16%^[2,3]。近年来,我们虽然在黑素瘤的治疗方面取得了一定进步,包括靶向药物及免疫治疗的发展等。但肿瘤细胞耐药的发生极大的限制了黑素瘤的治疗效果^[4,5]。因此,持续探索针对黑素瘤治疗的可能方案仍意义重大。

聚二磷酸腺苷核糖多聚酶(Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP)超家族包括至少 18 个成员,PARP1 是该家族中表达最高的成员之一^[6]。作为 DNA 损伤修复中的关键分子,PARP1 在

维持基因组稳定性中发挥重要作用^[7]。因此,PARP1 作为肿瘤治疗的潜在靶点而被广泛研究。目前 PARP1 抑制剂已被应用于存在 DNA 损伤修复缺陷肿瘤的治疗或与其他 DNA 损伤药物联合应用提高肿瘤治疗疗效^[8]。奥拉帕尼(olaparib)是首个 FDA 批准上市的 PARP1/2 抑制剂,主要用于治疗携带 BRCA 基因缺陷的卵巢癌患者^[9]。此外该药物用于治疗乳腺、胃、胰腺、前列腺等恶性实体肿瘤的研究也已进入临床试验阶段^[10]。然而,奥拉帕尼单药对黑素瘤是否具有治疗作用,其具体机制又是如何目前尚未完全阐明。本研究拟在以往研究的基础上,探讨奥拉帕尼对黑素瘤的治疗作用及其具体机制,为扩展治疗黑

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81802727);西安交通大学第一附属医院院基金项目(2016QN-07);

中央高校基本业务费暨西安交通大学校基金(xzy012019098)

作者简介:葛睿(1987-),博士,主要研究方向:黑素瘤,E-mail: green-0074@163.com

Δ 通讯作者:牟宽厚(1967-),主任医师,主要研究方向:黑素瘤及白癜风,E-mail: 18991232459@189.cn,电话:85324614

(收稿日期:2019-02-28 接受日期:2019-03-23)

素瘤的新方案提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人恶性黑色素瘤细胞 A2058 购自美国模式培养物集存库 (American type culture collection, ATCC); DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 Invitrogen; 奥拉帕尼购自 Selleck; DMSO 购自 Sigmaaldrich; PARP1/cleaved PARP1 抗体、cyclin D1 抗体、GAPDH 抗体购自 Cell Signaling Technology; CCK8 试剂盒购自生工生物。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 5% CO₂, 37℃ 培养。细胞系为贴壁生长, 待生长融合度达 80% 时, 用 2.5% 的胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.2.2 CCK8 实验 以 5×10^3 孔的密度将 A2058 细胞接种于 96 孔板中, 每组设 3 个复孔。24 h 后将不同浓度奥拉帕尼或 DMSO 加入 96 孔板, 继续 5% CO₂, 37℃ 培养 72 h。弃去 96 孔板中培养基, 像每孔中加入 100 μ L 检测液 (包含 10 μ L CCK8+90 μ L DMEM/F12 培养基), 37℃ 孵育 1 h。应用酶标仪检测 450 nm 波长下溶液的吸光度。

1.2.3 蛋白提取与 Western Blot 实验 以 5×10^5 孔的密度将 A2058 细胞接种于 6 孔板中。24 h 后弃去培养基, 将不同浓度奥拉帕尼或用于配置奥拉帕尼的 DMSO 作为对照加入 6 孔板, 继续 5% CO₂, 37℃ 培养 48 h。PBS 洗涤细胞上残留培养基, 加入 RIPA 裂解液 (RIPA:PMSF=100:1) 后冰上孵育 15 min。4℃ 12000 r/min 离心 20 min, 将上清转移至新的 1.5 mL EP 管中。每种样品取 1 μ L 用 BCA 蛋白定量试剂盒进行定量, 向剩余样品中加入 1/4 体积的 5 $\times$ 蛋白 loading, 混匀后 100℃ 加热 5 min, -20℃ 保存备用。蛋白按每孔 30-50 μ g 上样, 电泳结束后利用恒压系统进行蛋白转印, 将蛋白样品转印至 PVDF 膜上。转印后将 PVDF 膜放入 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h, 加入一抗后, 4℃ 孵育过夜。TBST 充分洗膜 3 次后, 加入二抗室温孵育 90 min。TBST 充分洗膜 3 次后, 进行发光分析。

1.3 统计学分析

利用 SPSS22.0 软件进行数据分析, 对照组与实验组数据采用 t 检验, P 值小于 0.05 为有显著差异。

2 结果

2.1 奥拉帕尼对黑色素瘤细胞活性的影响

应用不同浓度 (0 μ M、1 μ M、2.5 μ M、5 μ M、10 μ M、20 μ M、40 μ M、80 μ M) 的奥拉帕尼或 DMSO 处理黑色素瘤 A2058 细胞 72 小时。而后利用 CCK8 试剂盒检测细胞活性。结果显示与 DMSO 对照组相比 5 μ M 奥拉帕尼处理黑色素瘤 A2058 细胞即可抑制肿瘤细胞活性 (85.53 ± 2.593 %)。随着奥拉帕尼处理浓度倍增对黑色素瘤细胞活性的抑制作用越强。10 μ M、20 μ M、40 μ M、80 μ M 奥拉帕尼处理浓度下, 黑色素瘤细胞活性分别是 (68.88 ± 1.484)%、(47.21 ± 1.759)%、(33.04 ± 1.261)%、(28.17 ± 1.731)%(图 1)。

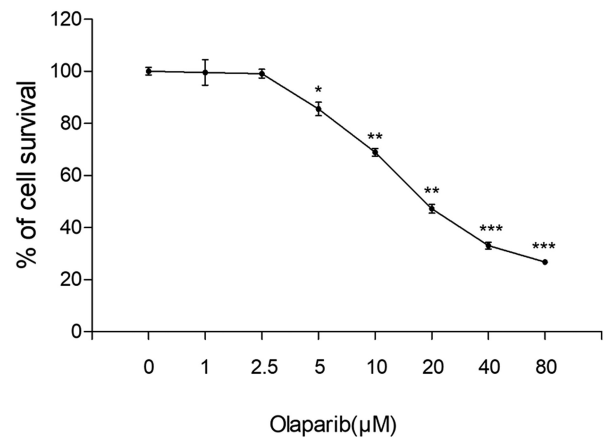


图 1 奥拉帕尼可抑制 A2058 细胞活性

Fig.1 The cell viability of A2058 cells was inhibit by olaparib

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm$ SEM, $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, compared with group 0 μ M.

2.2 奥拉帕尼对黑色素瘤细胞凋亡相关蛋白的影响

应用不同浓度 (5 μ M、10 μ M、20 μ M) 的奥拉帕尼或 DMSO 处理黑色素瘤 A2058 细胞 48 小时, 提取细胞蛋白进行 Western Blot 检测。结果显示与对照组相比, 奥拉帕尼并不影响 PARP1 的表达水平, 但可促进凋亡相关蛋白 PARP1 剪切体 (cleaved-PARP1) 的表达水平增加, 且不同浓度组中奥拉帕尼较 DMSO 对照相比均具有显著差异 (图 2)。

2.3 奥拉帕尼对黑色素瘤细胞周期相关蛋白的影响

应用不同浓度 (5 μ M、10 μ M、20 μ M) 的奥拉帕尼或

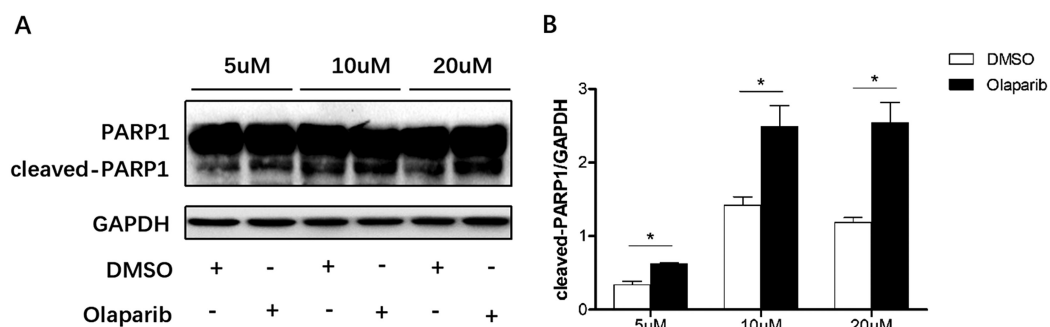


图 2 奥拉帕尼可促进 A2058 细胞中 PARP1 剪切体表达

Fig.2 The expression of cleaved-PARP1 in A2058 cells was promoted by olaparib

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm$ SEM, $n=3$. * $P < 0.05$, compared with DMSO group.

DMSO 处理黑素瘤 A2058 细胞 48 小时, 提取细胞蛋白进行 Western Blot 检测。结果显示与对照组相比, 奥拉帕尼可抑制细

胞周期相关蛋白 cyclin D1 的表达水平, 且不同浓度组中奥拉帕尼较 DMSO 对照相比均具有显著差异(图 3)。

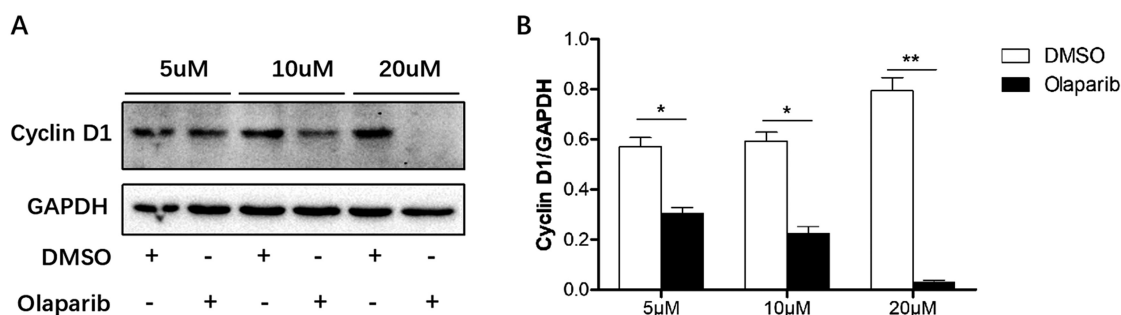


图 3 奥拉帕尼可抑制 A2058 细胞中 cyclin D1 表达

Fig.3 The expression of cyclin D1 in A2058 cells was inhibit by olaparib

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with DMSO group.

3 讨论

PARP1 是一种分子量为 113kDa 的核蛋白, 其功能多种多样主要与 DNA 损伤修复、染色质重构、基因调节等生物学过程相关^[1]。作为 DNA 损伤修复中的重要分子 PARP1 可识别受损的 DNA 并将损伤信号与 DNA 修复相关联。PARP1 的蛋白结构由 N 端的 DNA 结合结构域(DNA binding domain, DBD), 中央的自体修饰结构域 (automodification domain, AMD) 以及 C 端催化结构域(catalytic domain, CD)组成^[2]。通过 DBD 结构域 PARP1 可识别单链 DNA 损伤并与之结合, 进一步激活 C 端催化结构域。一旦被激活后, 其 C 端催化结构域可以酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)为供体, 催化核糖二磷酸腺苷(adenosine diphosphate ribose, ADPR)共价结合至自身或其他受体蛋白上形成多聚核糖二磷酸腺苷(Poly(adenosine diphosphate-ribose), PAR)^[6]。PARP1 介导的 PAR 基化过程促使受损的 DNA 结构打开, 并进一步招募其他分子修复受损 DNA^[13-15]。由此可见, PARP1 的酶活性在单链 DNA 损伤修复中发挥重要作用, 而抑制肿瘤细胞内 PARP1 的酶活性则可增加基因组的不稳定性导致肿瘤细胞死亡的发生。因此, 对于 PARP1 酶抑制剂的的研究已逐渐成为肿瘤治疗领域中的热点。

奥拉帕尼为最早研究的 PARP1 酶活性抑制剂之一, 可与 PARP1 催化结构域结合并抑制其 PAR 基化活性。因此, 奥拉帕尼可抑制 PARP1 介导的单链 DNA 损伤修复, 导致在 DNA 复制时由单链断裂转变为双链断裂^[6]。除了抑制 PARP1 的损伤修复作用外, 研究发现奥拉帕尼还可将失活的 PARP1 限制在受损的 DNA 上形成 PARP1-DNA 复合体进一步导致双链 DNA 损伤的发生^[7]。DNA 双链损伤可激活毛细血管扩张性共济失调突变基因(ataxia telangiectasia mutated, ATM)-BRCA 依赖的同源重组(Homologous recombination, HR)修复途径。当 HR 修复通路中的 ATM 或 BRCA 等基因存在缺陷时, DNA 的双链损伤则主要由非同源的末端结合(nonhomologous end joining, NHEJ)、单链退火(single-strand annealing, SSA)、微同源介导的末端结合(microhomology-mediated end joining, MMEJ)等机制进行修复。值得注意的是, 这些非 HR 的损伤修复机制非常容易导致错误的发生, 进而影响基因组稳定性导致细胞凋

亡的发生^[18]。因此, 奥拉帕尼主要应用于存在 HR 修复通路相关基因缺陷的肿瘤治疗中或与其他化疗、放疗等 DNA 损伤疗法联合以提高疗效。2014 年奥拉帕尼被 FDA 批准用于存在 BRCA 突变的卵巢癌患者。同年, 欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)批准奥拉帕尼作为单药可用于治疗对铂类药物敏感的具有 BRCA 突变的复发性上皮性卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌。2017 年 FDA 额外批准奥拉帕尼可用于卵巢癌、输卵管癌、原发性腹膜癌的治疗, 不论这些患者是否携带 BRCA 突变。此外 FDA 还批准奥拉帕尼可用于 BRCA 突变、HER2 阴性转移性乳腺癌以及 BRCA 或 ATM 突变去势疗法抵抗的前列腺癌患者^[10]。在临床研究方面, 一项 II 期的随机双盲临床观察发现, 在低表达 ATM 的转移性胃癌患者中, 奥拉帕尼联合紫杉醇组较安慰剂联合紫杉醇组相比可显著提高总生存率^[19]。在基础研究方面发现, 奥拉帕尼联合顺铂可显著提高低表达 ERCC1 组非小细胞肺癌的治疗效果^[20]。由此可见奥拉帕尼作为有效的治疗方案已成为一些肿瘤的主要治疗手段, 此外其还可作为增敏剂提高一些癌症原有治疗方法的疗效。那么奥拉帕尼单药对黑素瘤是否具有治疗作用及其具体机制又是如何, 对这些问题的探讨有助于为黑素瘤的治疗提供新的思路, 可能为治疗抵抗的黑素瘤提供新的联合方案。

我们研究发现奥拉帕尼单药处理黑素瘤细胞可显著抑制黑素瘤细胞活性, 且呈一定浓度依赖趋势。以往研究发现 PARP1 除了在单链 DNA 损伤修复中发挥重要作用外, 还可通过其酶活性介导对自身及其他多种损伤修复分子进行 PAR 基化, 从而促进损伤修复分子的招募及活化, 在核苷酸切除修复(nucleotide excision repair, NER)、错配修复(mismatch repair, MMR)、HR、NHEJ 等 DNA 损伤修复通路中也发挥一定作用^[21-24]。以上证据提示奥拉帕尼可通过抑制多种修复通路促进肿瘤细胞凋亡的发生。虽然黑素瘤 A2058 细胞系中不存在 HR 修复通路中相关的 BRCA 或 ATM 等基因缺陷, 我们研究发现奥拉帕尼处理黑素瘤细胞后可促进凋亡相关蛋白 PARP1 剪切体表达增加且与奥拉帕尼的作用浓度呈正相关。说明奥拉帕尼可通过抑制多种修复通路促进黑素瘤细胞凋亡的发生。这也提示奥拉帕尼与造成不同类型 DNA 损伤修复的化疗药物包括造成 NER 修复的铂类化疗药物^[25], 造成 MMR 修复的替莫唑胺

等甲基化化疗药物^[26]联合应用都可能起到更好的治疗效果。此外,在乳腺癌的研究中发现 PARP1 作为 cyclin D1 的转录激活子可调控 cyclin D1 的表达。干扰 PARP1 表达,可通过抑制 cyclin D1 表达从而抑制肿瘤细胞增殖^[27]。与之类似,我们研究发现奥拉帕尼可抑制黑素瘤细胞中 cyclin D1 表达水平且与奥拉帕尼作用浓度呈正相关。说明奥拉帕尼还可通过抑制细胞周期蛋白来抑制黑素瘤细胞活性。提示奥拉帕尼与黑素瘤治疗中常用的 MAPK 通路抑制剂联合应用可能会起到更好的治疗效果。综上所述,我们研究发现奥拉帕尼单药可通过促进黑素瘤细胞凋亡及抑制肿瘤细胞周期蛋白表达的机制起到治疗黑素瘤的作用。该研究的发现为奥拉帕尼治疗黑素瘤的临床研究提供了理论依据,为奥拉帕尼联合其他药物治疗黑素瘤提供了实验基础。

参考文献(References)

- [1] Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma[J]. Lancet, 2014, 383(9919): 816-827
- [2] Moran B, Silva R, Perry AS, et al. Epigenetics of malignant melanoma [J]. Semin Cancer Biol, 2018, 51: 80-88
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30
- [4] Testori A, Ribero S, Bataille V. Diagnosis and treatment of in-transit melanoma metastases[J]. Eur J Surg Oncol, 2017, 43(3): 544-560
- [5] Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2017, 14(8): 463-482
- [6] Ray CA, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(10): 610-621
- [7] Wang L, Liang C, Li F, et al. PARP1 in Carcinomas and PARP1 Inhibitors as Antineoplastic Drugs[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10)
- [8] Rajawat J, Shukla N, Mishra DP. Therapeutic Targeting of Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP1) in Cancer: Current Developments, Therapeutic Strategies, and Future Opportunities [J]. Med Res Rev, 2017, 37(6): 1461-1491
- [9] Deeks ED. Olaparib: first global approval [J]. Drugs, 2015, 75(2): 231-240
- [10] Bochum S, Berger S, Martens UM. Olaparib [J]. Recent Results Cancer Res, 2018, 211: 217-233
- [11] Zhu X, Ma X, Hu Y. PARP1: A Promising Target for the Development of PARP1-based Candidates for Anticancer Intervention[J]. Curr Med Chem, 2016, 23(17): 1756-1774
- [12] Steffen JD, Brody JR, Armen RS, et al. Structural Implications for Selective Targeting of PARPs[J]. Front Oncol, 2013, 3: 301
- [13] Dantzer F, de La Rubia G, Menissier-De MJ, et al. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly (ADP-ribose) polymerase-1[J]. Biochemistry-U S, 2000, 39(25): 7559-7569
- [14] Caldecott KW. Single-strand break repair and genetic disease[J]. Nat Rev Genet, 2008, 9(8): 619-631
- [15] Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, et al. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly (ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents[J]. J Biol Chem, 2007, 282(22): 16441-16453
- [16] Evers B, Drost R, Schut E, et al. Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(12): 3916-3925
- [17] Scott CL, Swisher EM, Kaufmann SH. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors: recent advances and future development [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(12): 1397-1406
- [18] Fong PC, Yap TA, Boss DS, et al. Poly (ADP)-ribose polymerase inhibition: frequent durable responses in BRCA carrier ovarian cancer correlating with platinum-free interval[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(15): 2512-2519
- [19] Bang YJ, Im SA, Lee KW, et al. Randomized, Double-Blind Phase II Trial With Prospective Classification by ATM Protein Level to Evaluate the Efficacy and Tolerability of Olaparib Plus Paclitaxel in Patients With Recurrent or Metastatic Gastric Cancer[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(33): 3858-3865
- [20] Cheng H, Zhang Z, Borczuk A, et al. PARP inhibition selectively increases sensitivity to cisplatin in ERCC1-low non-small cell lung cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(4): 739-749
- [21] Fischer JM, Popp O, Gebhard D, et al. Poly(ADP-ribose)-mediated interplay of XPA and PARP1 leads to reciprocal regulation of protein function[J]. FEBS J, 2014, 281(16): 3625-3641
- [22] Liu Y, Kadyrov FA, Modrich P. PARP-1 enhances the mismatch-dependence of 5'-directed excision in human mismatch repair in vitro [J]. DNA Repair (Amst), 2011, 10(11): 1145-1153
- [23] Bryant HE, Petermann E, Schultz N, et al. PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination[J]. Embo J, 2009, 28(17): 2601-2615
- [24] Wang M, Wu W, Wu W, et al. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(21): 6170-6182
- [25] Liu YB, Mei Y, Tian ZW, et al. Downregulation of RIF1 Enhances Sensitivity to Platinum-Based Chemotherapy in Epithelial Ovarian Cancer (EOC) by Regulating Nucleotide Excision Repair (NER) Pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(5): 1971-1984
- [26] Kadyrova LY, Dahal BK, Kadyrov FA. The Major Replicative Histone Chaperone CAF-1 Suppresses the Activity of the DNA Mismatch Repair System in the Cytotoxic Response to a DNA-methylating Agent[J]. J Biol Chem, 2016, 291(53): 27298-27312
- [27] Shan L, Li X, Liu L, et al. GATA3 cooperates with PARP1 to regulate CCND1 transcription through modulating histone H1 incorporation[J]. Oncogene, 2014, 33(24): 3205-3216