

# 组蛋白去乙酰酶阻滞剂的放射增敏作用

丛征 郭傲 郭阳

**【摘要】** 放射治疗是肿瘤的重要治疗手段之一, 辐射可以导致细胞 DNA 双链断裂。细胞主要通过同源重组修复和非同源末端连接修复方式修复 DNA 双链断裂。随着对双链 DNA 损伤修复机制认识的深化, 组蛋白去乙酰酶 (HDAC) 阻滞剂成为提高放射敏感性的一种新策略。HDAC 可分为 4 类。HDAC 阻滞剂可非特异性地或特异性地阻滞这 4 类 HDAC, 使组蛋白乙酰化水平提高, 染色体解螺旋, 核小体结构改变。一方面使 DNA 更易受到辐射的影响; 另一方面通过降低 E2F1 转录因子活性抑制损伤修复蛋白 Ku80、Rad51 等的表达, 使其不能募集 DNA 损伤修复蛋白, 且不能形成相应的蛋白复合物, 使同源重组修复和非同源末端连接修复作用延缓, 在伴有或不伴有肿瘤细胞凋亡增加的情况下, 提高放射敏感性。现已有一些临床试验在进行中, 并取得了初步的结果。

**【关键词】** 辐射耐受性; 组蛋白去乙酰酶阻滞剂

**Enhancement of radiation response by histone deacetylase inhibitor** CONG Zheng\*, GUO Ao, GUO Yang. \*Department of Radiotherapy, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China  
Corresponding author: GUO Yang, Email: yangguo622003@yahoo.com.cn

**【Abstract】** Radiotherapy is an essential part of cancer treatment, which leads to DNA double strains break. Homogeneous recombination and heterogeneous end conjunction are the main ways which can repair DNA double strains break in the cells. It is a novel strategy, which as recognize as the mechanism of damage to DNA strains, that radiosensitivity is enhanced by histone deacetylase (HDAC) inhibitor. HDAC inhibitor is able to antagonize specifically or nonspecifically HDAC whom is forming as four various sorts, as a consequence enhancing level of histone deacetylase, decoilization of chromosome and alternation on molecular structure of nucleolus. Firstly DNA is simply influenced by radioactivity due to HDAC inhibitor, and then HDAC inhibitor effects on decline activity of E2F1 transcript factors, which cause directly expressional inhibition on the repair proteins including Ku80, Rad51, thus the molecules are unable to recruited and polymerized into correspond protein compound, as a result of HDAC inhibitor the function of homogeneous recombination and heterogeneous end conjunction becomes minimized. As the circumstances are shown involving augment or non-augment of apoptosis among cancer cells, HDAC inhibitor enhance the radiosensitivity eventually, which has been applied into clinical trials and obtain primary achievement.

**【Key words】** Radiation tolerance; Histone deacetylase inhibitors

提高肿瘤细胞的放射敏感性以提高放射治疗的效果, 一直是临床放射治疗追求的目标之一。提高放射敏感性的策略, 已从最初的提高细胞氧合水平, 逐步发展到阻断放射引起的 DNA 双链断裂修复方向上。细胞主要通过同源重组修复和非同源末端连接修复的方式修复 DNA 双链断裂。阻断 DNA 双链断裂修复已成为提高放射敏感性的一个新的靶

点和新的治疗策略。随着对放射导致的 DNA 双链断裂修复机制认识的深化, 各种阻断修复的药物得到了开发并进入临床试验阶段。最近, 组蛋白去乙酰酶 (histone deacetylase, HDAC) 阻滞剂因其细胞毒性小, 且在正常细胞和肿瘤细胞之间的阻滞作用差别大, 而成为广泛研究的药物, 提示在未来的肿瘤治疗中具有重要作用。

## 1 HDAC 阻滞剂

### 1.1 组蛋白乙酰化与基因表达

表观遗传学研究表明, 蛋白转录后修饰对蛋白的功能有一定影响。组蛋白的乙酰化是最早进行表

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2013.02.013

作者单位: 300060, 天津市环湖医院放射治疗科(丛征, 郭阳); 211198 南京, 中国药科大学 2009 级生命科学与技术人才培养基地班(郭傲)

通信作者: 郭阳 (Email: yangguo622003@yahoo.com.cn)

观遗传学研究的一个方面。异构的组蛋白八聚体和 DNA 组成核小体。组蛋白氨基端保守的赖氨酸残基是其主要的乙酰化部位。组蛋白乙酰化酶使该部位乙酰化,组蛋白负电荷降低,降低了其与 DNA 的结合,便于 DNA 转录。而 HDAC 则使该部位去乙酰化,组蛋白负电荷升高,提高了其与 DNA 的结合,不便于 DNA 转录。组蛋白乙酰化酶和 HDAC 保持动态平衡,共同调节基因的表达。HDAC 阻滞剂可以阻断 HDAC,提高组蛋白的乙酰化水平。HDAC 可分为 4 类。HDAC 阻滞剂可非特异性地或特异性地阻滞这 4 类 HDAC<sup>[1]</sup>。有研究认为,HDAC 阻滞剂可以恢复部分表达降低的抑癌基因,但对大多数基因的作用的研究尚不充分<sup>[2]</sup>。HDAC 阻滞剂还影响染色质和核小体的结构<sup>[3]</sup>,也被称为广泛乙酰化,它降低了核内异染色质区域的浓缩程度,使得染色体解螺旋、核小体解聚,进而导致 DNA 暴露,更易受到辐射和药物的影响。

## 1.2 对 DNA 的影响

一些研究发现,HDAC 阻滞剂可以产生氧自由基,直接造成 DNA 双链断裂<sup>[4]</sup>。Wang 等<sup>[5]</sup>利用彗星分析和磷酸化组蛋白 2A 变异体(phosphorylated histone family 2A variant,  $\gamma$ H2AX)检测技术发现,HDAC 阻滞剂可通过阻断硫氧化蛋白还原酶的作用,产生氧自由基,造成 DNA 双链断裂。HDAC 阻滞剂还可特异性地诱导 P53 的 18 位苏氨酸的磷酸化,活化 P53/P21 路径。而 Lee 等<sup>[6]</sup>的研究表明,HDAC 阻滞剂引起的 DNA 双链断裂在正常细胞中可以得到修复,在转化的肿瘤细胞中则不能修复,或修复延迟。以上研究表明,HDAC 阻滞剂作用对 DNA 的影响与辐射相同,可以认为 HDAC 阻滞剂与辐射对 DNA 的影响具有叠加作用,而正常细胞和肿瘤细胞对反应的差别则更有利于临床应用。

## 2 HDAC 阻滞剂放射增敏的机制

### 2.1 核小体结构改变

改变染色质和核小体结构,使 DNA 直接暴露于射线下,进而增加 DNA 双链断裂,是 HDAC 阻滞剂的作用之一。Falk 等<sup>[7]</sup>率先在直视下观察到染色体不同的功能和结构区域的 DNA 双链断裂,发现辐射诱导的基因非活化染色体浓缩区域的 DNA 双链断裂远少于基因表达的去浓缩化区域。而在异染色质区,

辐射引起的 DNA 双链断裂不仅与染色体浓缩有关,还与存在的大量蛋白有关。Storch 等<sup>[8]</sup>的三维培养试验表明,染色质密度的变化影响到了细胞的放射敏感性,组蛋白 H3 去乙酰酶可以提高染色质的浓缩,并诱导异染色质 1 $\alpha$  蛋白的表达,减少 DNA 双链断裂。I、II 类 HDAC 阻滞剂则能降低染色质的浓缩,从而增加辐射导致的 DNA 双链断裂<sup>[8]</sup>。其他研究者也发现,HDAC 阻滞剂可通过调节和改变染色质和核小体结构,增加 DNA 双链断裂<sup>[9]</sup>。

### 2.2 对 DNA 双链断裂修复的影响

众多的研究表明,HDAC 阻滞剂可以阻断 DNA 双链断裂修复,且这种抑制作用较持久,无论是对体外细胞试验,还是对动物模型的体内试验来说,均可以提高细胞的放射敏感性<sup>[9-19]</sup>,这一机制被众多研究人员认为是提高放射敏感性的主要原因。众多试验资料表明,在不同的细胞系和动物模型中,HDAC 阻滞剂可通过阻断同源重组修复或(和)非同源末端连接修复,提高放射敏感性<sup>[18-19]</sup>。Adimoolam 等<sup>[9]</sup>的实验表明,在体外实验和动物体内实验中,HDAC 阻滞剂 3-[(二甲基胺)甲基]-N-[2-[4-[(羟胺)羧基]苯氧基]乙基]-2-苯甲咪唑羧胺对细胞作用 24 h 后,仍可降低与同源重组相关基因的表达,由于持续的同源重组修复受到抑制,细胞死亡增多。Chinnaiyan 等<sup>[10]</sup>研究发现,丙戊酸可使辐射导致的  $\gamma$ H2AX 的蛋白水平升高,在照射后 24 h 时仍可检测到,而对照组在 12 h 时已恢复到基线水平。这些结果提示,HDAC 阻滞剂的作用较持久。Baschnagel 等<sup>[12]</sup>在照射前 16 h,将脑转移的乳腺癌细胞暴露并保持在伏立诺他中,结果发现,此方法可提高癌细胞的放射敏感性,剂量增强因子达到 1.57,在动物模型中,则发现此方法可使辐射导致的肿瘤生长延迟时间得到延长。Zhang 等<sup>[11]</sup>发现,HDAC 阻滞剂视黄酸和曲古菌素 A 可以使放射抵抗性的非小细胞肺癌细胞系 A549 和 H1650 在受照后的 Ku70、Ku80 蛋白和 DNA-依赖蛋白激酶催化亚基水平下调,DNA 修复受损。Kuribayashi 等<sup>[13]</sup>使用曲古菌素 A 和 <sup>3</sup>H-苯并[d,e]异喹啉基-N-羟基-1,3-二羧基-2(<sup>3</sup>H)-己胺在放射抵抗性的头颈部鳞癌细胞系 SQ-20B 中检测到  $\gamma$ H2AX 的蛋白水平升高,放射敏感性增加,但他们发现 <sup>3</sup>H-苯并[d,e]异喹啉基-N-羟基-1,3-二羧基-2(<sup>3</sup>H)-己胺仅抑制了 Ku80 的表达,而 Ku70 未受抑制。Adimoolam 等<sup>[9]</sup>认为,

HDAC 阻滞剂可明显降低包括 Rad51 在内的同源重组基因的表达。在前列腺癌中,一种金刚烷基氧肟酸盐 HDAC 抑制剂 H6CAHA,可抑制 DNA 损伤修复基因毛细血管扩张共济失调突变基因、乳腺癌易感基因 1 和乳腺癌易感基因 2 的表达,并可在 60 d 内完全阻断前列腺癌 PC3 细胞在动物体内的生长<sup>[17]</sup>。在神经母细胞瘤中,伏立诺他以下调 DNA 修复酶 Ku86 的表达<sup>[18]</sup>。其他研究大多也表明 HDAC 阻滞剂可下调 DNA 修复蛋白的表达,并通过同源重组修复或(和)非同源末端连接修复通路达到提高放射敏感性的作用<sup>[16,18-19]</sup>。Kachhap 等<sup>[19]</sup>的研究则表明,多个 DNA 损伤反应和修复通路的下调(其中乳腺癌易感基因 1 通路的同源重组基因下调)是经由 E2F1 转录因子介导的,该过程中转录因子 E2F1 募集降低,而转录因子 E2F1 的活化未受到抑制。另外,Deorukhkar 等<sup>[14]</sup>发现,辐射可以诱导上皮生长因子受体和核受体  $\kappa$ B 通路的过表达,继而产生放射抵抗性,HDAC 阻滞剂可以抑制它们的表达。总之,实验结果表明,抑制 DNA 损伤修复蛋白的募集,使其不能形成相应的蛋白复合物,使同源重组修复和非同源末端连接修复作用延缓,是提高放射敏感性的重要机制之一。

### 2.3 对细胞凋亡的影响

另一个与放射敏感性相关的方面是肿瘤细胞的凋亡。Zhang 等<sup>[11]</sup>发现,曲古菌素 A 可以导致非小细胞肺癌细胞系 A549 的凋亡增多,并检测到当 P21 被裂解成相对分子质量为 15 000 的蛋白时,细胞色素 c 和含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 的表达显著升高,提示细胞凋亡由线粒体通路介导。Blattmann 等<sup>[15]</sup>发现,HDAC 阻滞剂辛二酰苯胺异羟肟酸可以诱导骨肉瘤细胞的凋亡增多,但却不能诱导横纹肌肉瘤细胞凋亡的增多。Deorukhkar 等<sup>[14]</sup>研究表明,HDAC 阻滞剂可以提高肿瘤的放射敏感性,但受照射的胰腺癌细胞的凋亡并未增多。由此可以推测,HDAC 阻滞剂在部分细胞中可以通过增加细胞凋亡的方式来提高放射敏感性;而在另一些细胞中则是通过其他类型的细胞死亡方式(很可能是细胞自吞噬形式)来提高放射敏感性。在这方面可以进行更广泛的探索。

### 3 临床试验

现在有一些联合 HDAC 阻滞剂与放射治疗的

I 期临床试验,对象包括脑肿瘤、胰腺癌、肺癌和消化道肿瘤。Ree 等<sup>[20]</sup>于 2010 年报道的 HDAC 阻滞剂伏立诺他与姑息性短期盆腔放射治疗结合治疗消化道肿瘤的结果显示,伏立诺他的最大耐受剂量为 300 mg/次,每日一次,放射剂量则为 2 周内给予 30 Gy,在可评价的 16 例患者中,未出现 4 级不良反应,但 16 例患者均有 3 级不良反应。而肿瘤体积缩小方面,则变异非常大。提示尚需做更多的研究。

### 4 小结

放射增敏一直是放射生物学的一个研究重点。HDAC 阻滞剂对基因表观遗传学具有一定的影响,通过提高组蛋白乙酰化水平,调节 DNA 的转录,进而调控 DNA 双链断裂的修复。随着对 HDAC 阻滞剂和 DNA 损伤修复相关蛋白研究的深入,有可能揭示出 HDAC 阻滞剂放射增敏的机制,为肿瘤放射治疗提供新的策略。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Marks PA, Richon VM, Miller T, et al. Histone deacetylase inhibitors. *Adv Cancer Res*, 2004, 91: 137-168.
- [ 2 ] Nalabothula N, Carrier F. Cancer cells' epigenetic composition and predisposition to histone deacetylase inhibitor sensitization. *Epigenomics*, 2011, 3(2): 145-155.
- [ 3 ] Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, et al. Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res*, 2005, 65(9): 3815-3822.
- [ 4 ] Rajendran P, Ho E, Williams DE, et al. Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clin Epigenetics*, 2011, 3(1): 4.
- [ 5 ] Wang H, Zhou W, Zheng Z, et al. The HDAC inhibitor depsipeptide transactivates the p53/p21 pathway by inducing DNA damage. *DNA Repair (Amst)*, 2012, 11(2): 146-156.
- [ 6 ] Lee JH, Choy ML, Ngo L, et al. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(33): 14639-14644.
- [ 7 ] Falk M, Lukásová E, Kozubek S. Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(12): 2398-2414.
- [ 8 ] Storch K, Eke I, Borgmann K, et al. Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification. *Cancer Res*, 2010, 70(10): 3925-3934.
- [ 9 ] Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, et al. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(49): 19482-19487.
- [ 10 ] Chinnaiyan P, Cerna D, Burgan WE, et al. Postirradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Clin Cancer*

- Res, 2008, 14(17): 5410-5415.
- [11] Zhang F, Zhang T, Teng ZH, et al. Sensitization to gamma-irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer(NSCLC) cells. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(9): 823-831.
- [12] Baschnagel A, Russo A, Burgan WE, et al. Vorinostat enhances the radiosensitivity of a breast cancer brain metastatic cell line grown in vitro and as intracranial xenografts. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(6): 1589-1595.
- [13] Kuribayashi T, Ohara M, Sora S, et al. Scriptaid, a novel histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to radiation. *Int J Mol Med*, 2010, 25(1): 25-29.
- [14] Deorukhkar A, Shentu S, Park HC, et al. Inhibition of radiation-induced DNA repair and prosurvival pathways contributes to vorinostat-mediated radiosensitization of pancreatic cancer cells. *Pancreas*, 2010, 39(8): 1277-1283.
- [15] Blattmann C, Oertel S, Ehemann V, et al. Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 78(1): 237-245.
- [16] Kachhap SK, Rosmus N, Collis SJ, et al. Downregulation of homologous recombination DNA repair genes by HDAC inhibition in prostate cancer is mediated through the E2F1 transcription factor. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11208.
- [17] Konsoula Z, Cao H, Velen A, et al. Adamantanyl-histone deacetylase inhibitor H6CAHA exhibits favorable pharmacokinetics and augments prostate cancer radiation sensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 79(5): 1541-1548.
- [18] Mueller S, Yang X, Sottero TL, et al. Cooperation of the HDAC inhibitor vorinostat and radiation in metastatic neuroblastoma: efficacy and underlying mechanisms. *Cancer Lett*, 2011, 306(2): 223-229.
- [19] Koprinarova M, Botev P, Russev G. Histone deacetylase inhibitor sodium butyrate enhances cellular radiosensitivity by inhibiting both DNA nonhomologous end joining and homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*, 2011, 10(9): 970-977.
- [20] Ree AH, Dueland S, Folkvord S, et al. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, combined with pelvic palliative radiotherapy for gastrointestinal carcinoma: the Pelvic Radiation and Vorinostat (PRAVO) phase 1 study. *Lancet Oncol*, 2010, 11(5): 459-464.

(收稿日期: 2012-09-25)

(上接第 106 页)

- [18] 徐超, 殷俊杰, 赵保路. 用定点自旋标记的方法研究天青蛋白疏水区的结构及其与 p53 蛋白的相互作用. *中国科学: 生命科学*, 2011, 41(1): 30-37.
- [19] Lu JF, Yang ZH, Chen LX, et al. EPR spectra study on human gallstones. *Chinese Sci Bull*, 1992, 37(17): 1474-1474.
- [20] 赵保路, 忻文娟, 陈雨亭, 等. 用电子自旋共振(ESR)研究肾缺血移植和再灌注过程产生的自由基. *生物物理学报*, 1994, 10(1): 171-173.
- [21] Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 1982, 47(5): 412-426.
- [22] 吴可. 电子顺磁共振成像及其生物医学应用. *国外医学: 生物医学工程分册*, 1999, 22(6): 334-340.
- [23] Guanglong HE, Samouilov A, Kuppasamy P, et al. In vivo imaging of free radicals: Applications from mouse to man. *Mol Cell Biochem*, 2002, 234-235(1): 359-67.
- [24] Kuppasamy P, Afeworki M, Shankar RA, et al. In Vivo Electron Paramagnetic Resonance Imaging of Tumor Heterogeneity and Oxygenation in a Murine Model. *Cancer Res*, 1998, 58(7): 1562-1568.
- [25] Kuppasamy P, Chzhan M, Samouilov A, et al. Mapping the spin-density and lineshape distribution of free radicals using 4D spectral-spatial EPR imaging. *J Magn Reson B*, 1995, 107(2): 116-125.
- [26] Zweler JL, Chzhan M, Samouilov A. Electron paramagnetic resonance imaging of the rat heart. *Phys Med Biol*, 1998, 43(7): 1823-1835.
- [27] Nie Z, Liu KJ, Zhong CJ, et al. Enhanced radical-scavenging activity by antioxidant-functionalized gold nanoparticles: A novel inspiration for development of new artificial antioxidant. *Free Rad Biol Med*, 2007, 43(9): 1229-1230.
- [28] 卢景雾, 古力努尔, 李廷凤. 基于 EPR 方法的天然产物抗氧化性能研究. *波谱学杂志*, 2010, 27(1): 22-31.
- [29] Li XJ, Zhao BL, Liu GT, et al. Scavenging effects on active oxygen radicals by Schizandrins with different structures and configurations. *Free Radic Biol Med*, 1990, 9(2): 99-104.

(收稿日期: 2012-09-18)