

## 选择性 Bcl-2 抑制剂 ABT-199 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的放疗增敏作用

钱振珏<sup>1</sup>, 牛 伶<sup>2</sup>, 鲍扬漪<sup>2</sup>, 刘 柳<sup>3</sup>, 童斯浩<sup>2</sup>, 龚 理<sup>2</sup>, 胡长路<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究 ABT-199 对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的放疗增敏作用,并探讨其作用机制。方法 取对数期生长的 MDA-MB-231 细胞分成对照组、药物组、照射组及联合组(照射+ABT-199)。四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测不同剂量单纯照射和 ABT-199 分别作用不同时间对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响并计算 20% 抑制浓度(IC<sub>20</sub>);流式细胞术检测 ABT-199 对 MDA-MB-231 细胞周期和凋亡的影响;

Caspase 活性试剂盒检测细胞 Caspase-3 活性变化;Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Bcl-xl 的表达。结果 ABT-199 对 MDA-MB-231 细胞有增殖抑制作用且有时间和浓度依赖性,随着 ABT-199 浓度的升高,MDA-MB-231 细胞发生不同程度的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞。联合组较照射组细胞凋亡率明显增高(16.9% vs 84.5%),Bcl-2 表达水平明显下调( $P < 0.05$ ),Bcl-xl 变化不明显,同时 Bax 水平和胞内 Caspase-3 活性增高( $P < 0.05$ )。结论 选择性 Bcl-2 抑制剂 ABT-199 可有效抑制人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 增殖,诱导细胞发生 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞及凋亡。IC<sub>20</sub> 浓度的 ABT-199 可明显提高 MDA-MB-231 细胞对放疗的敏感性。

**关键词** MDA-MB-231; ABT-199; Bcl-2 抑制剂; 放疗; 协同效应

**中图分类号** R 73-35

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1237-06

2015-06-03 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:12010402123)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学附属省立医院肿瘤科,合肥 230001

<sup>2</sup>安徽医科大学第三附属医院肿瘤科,合肥 230061

<sup>3</sup>合肥市滨湖医院院士工作站,合肥 230061

作者简介:钱振珏,女,硕士研究生;

胡长路,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:13955116061@139.com

## The effect of endothelium-derived hyperpolarizing factor on rat cerebral artery subjected to cerebral ischemia/reperfusion

Tong Xiaoqin, Zhou Fangjie, Cai Shengnian et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the dilation and hyperpolarization induced by endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) in middle cerebral artery of rats subjected to cerebral ischemia/reperfusion (I/R). **Methods**

The model of focal cerebral I/R injury in rat was established by middle cerebral artery occlusion (MCAO). Hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) level in the cerebrum was detected, and the dilation and resting membrane potential of VSMC induced by EDHF in MCA subjected to cerebral I/R were observed. RT-PCR method was used to detect the expression of cystathionine-γ-lyase (CSE) mRNA in the endothelial cells of rat MCA. **Results** Compared with the control group, the contents of H<sub>2</sub>S increased in the cerebrum of rat subjected to cerebral I/R. After 30 minutes perfusion with PSS containing L-NAME ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L) and Indo ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), the relaxant effects of ACh ( $10^{-7} \sim 10^{-4.5}$  mol/L) on isolated rat MCAs subjected to cerebral I/R were more obvious by vasomotoricity experiment *in vitro*, namely, the vasodilatation induced by EDHF in cerebral I/R MCAs increased. In the presence of L-NAME ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L) and Indo ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L), ACh ( $10^{-7} \sim 10^{-4.5}$  mol/L) had stronger concentration dependent hyperpolarizing effect on the resting membrane potential of VSMC of cerebral I/R MCAs than the normal group. During cerebral I/R, the expression of CSE mRNA in rat MCAs endothelial cells was upregulated. **Conclusion** EDHF enhances dilation and hyperpolarization of VSMC in rat MCA subjected to cerebral I/R injury.

**Key words** endothelium-derived hyperpolarizing factor; H<sub>2</sub>S; focal cerebral ischemia; MCA; vasodilation; hyperpolarization

乳腺癌是威胁女性生命健康的常见恶性肿瘤,近年来我国乳腺癌发病率逐年上升且呈年轻化趋势。三阴乳腺癌(triple receptor negative breast cancer, TNBC)雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)表达均呈阴性,内分泌治疗及HER-2靶向药物对其均无效;化疗是主要治疗方式,但易发生复发、耐药和转移,效果多不理想。乳腺癌术后放疗也是一种重要的治疗手段。然而肿瘤细胞本身对放疗敏感性差,放疗治疗中存在的放疗抵抗影响了放疗疗效<sup>[1]</sup>。Bcl-2家族是重要的细胞凋亡调节因子,其成员间的相互作用对线粒体介导的凋亡途径起调控作用。研究<sup>[2-3]</sup>表明Bcl-2表达升高与肿瘤细胞放、化疗抵抗有关。ABT-499是一种选择性Bcl-2抑制剂,对Bcl-2的结合力远大于Bcl-xl,能够促进Bcl-2高表达细胞的凋亡,同时不引起凝血功能障碍<sup>[4]</sup>。目前ABT-499治疗多发性骨髓瘤的临床研究已进入I期临床研究阶段,但其治疗乳腺癌的研究尚不多见。该实验探讨ABT-499对TNBC细胞MDA-MB-231的放疗增敏作用,为乳腺癌的综合治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 乳腺癌MDA-MB-231细胞株购自中国科学院上海细胞库;高糖DMEM培养基、青霉素-链霉素双抗、EDTA-胰酶、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国Gibco公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;ABT-499购自美国Selleck Chemicals公司;Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、Caspase-3活性检测试剂盒购自上海贝博公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国Sigma公司;兔抗人Bcl-2、Bcl-xl、Bax单克隆抗体购自美国Abcam公司;兔抗人 $\beta$ -actin单克隆抗体、羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.2 细胞培养及药物配制** 人乳腺癌细胞MDA-MB-231细胞接种于含10%胎牛血清、1%双抗(100  $\mu$ g/ml的青霉素和链霉素)的高糖DMEM培养液中,置于37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub>饱和湿度培养箱中培养。细胞贴壁至70%~80%融合时胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。实验用药ABT-499以生理盐水、DMSO辅助溶解,配成0.1 mol/L的原液;分装放置于-80  $^{\circ}$ C储存,实验时将原液配制成相应的

工作液(DMSO终浓度 $\leq$ 0.1%)。

**1.3 细胞照射** 采用德国Siemens Primus直线加速器6MV-X线室温下照射,机架角度180 $^{\circ}$ ,剂量率200 cGy/min,源皮距(SSD)100 cm,照射野10 cm  $\times$  10 cm,加1.5 cm等效组织(培养皿细胞面朝上倒置于治疗床,并在皿上覆盖1.5 cm厚等效有机玻璃板)。

**1.4 MTT法检测单纯照射和ABT-499分别对MDA-MB-231细胞株的增殖抑制效应** 取对数生长期细胞,调整细胞密度为 $4 \times 10^4$ 个/ml;100  $\mu$ l每孔接种于96孔板,37  $^{\circ}$ C孵育;4~6 h待细胞贴壁后换液。照射组分别接受0、2、4、6、8、10 Gy照射剂量干预,ABT-499分别以2、4、6、8、10  $\mu$ mol/L加入相应的药物组孔,对照组加入培养液;每一浓度设置4个复孔,培养12、24、48 h后检测。每孔加入10  $\mu$ l MTT(5 g/L),继续孵育4 h,弃上清液;每孔加入DMSO 100  $\mu$ l,室温振荡10 min,酶标仪检测490 nm波长下相应的吸光度(optical density, OD)值。细胞存活率(%)=(照射组或药物组OD值/对照组OD值) $\times$ 100%;计算ABT-499的20%抑制浓度(20% inhibitory concentration, IC<sub>20</sub>)作为后续实验的放疗增敏浓度,实验重复3次。

**1.5 流式细胞术检测ABT-499对乳腺癌细胞周期影响** 取对数生长期MDA-MB-231,调整细胞密度至 $3 \times 10^4$ 个/ml,每孔2 ml接种于6孔板;药物组和对照组均设两个复孔。ABT-499分别以2、4、6  $\mu$ mol/L加入药物组孔,继续培养24 h,收集细胞;PBS洗涤两遍,加入2 ml预冷70%乙醇4  $^{\circ}$ C下固定过夜。去固定液,加入400  $\mu$ l碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液,4  $^{\circ}$ C避光孵育40 min,流式细胞仪检测细胞周期,实验重复3次。

**1.6 流式细胞术检测ABT-499对MDA-MB-231细胞放疗增敏作用** ABT-499以IC<sub>20</sub>即5  $\mu$ mol/L为实验浓度。取对数期生长MDA-MB-231细胞接种于培养皿中,培养至贴壁面70%~80%融合时,对照组及照射组更换培养液;药物组和联合组更换含5  $\mu$ mol/L ABT-499的培养液,照射组和联合组接受6 Gy照射剂量干预后,4组继续培养24 h,收集细胞(包括上清液);调整细胞密度至 $1 \times 10^6$ 个/ml,取60  $\mu$ l细胞悬液加入流式;加10  $\mu$ l Annexin V和5  $\mu$ l PI标记,震荡混匀后室温避光孵育15 min, PBS洗涤两遍后加鞘液400  $\mu$ l;流式细胞仪检测细胞凋亡率,Annexin V和PI标记的细胞即为凋亡细胞。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数 $\times$ 100%。

实验重复 3 次。

**1.7 Caspase-3 活性检测** 实验分组同上,以同样方式培养细胞 24 h 后收集细胞。吸尽上清液,加入裂解液 100  $\mu$ l,重悬沉淀,冰浴裂解 15 min。4  $^{\circ}$ C 16 000 r/min 离心 10 min。转移上清液至预冷的离心管中,加入 Ac-DEVD-pNA (2 mol/L) 后混匀。37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,发现颜色变化比较明显时即可上酶标仪检测 405 nm 波长下相应的 OD 值。

**1.8 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达** 实验分组同上,以同样方式培养细胞 24 h 后收集细胞。蛋白裂解液冰上裂解 30 min,4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 30 min 提取总蛋白。BCA 法蛋白定量后按照 30  $\mu$ g 每孔上样,12% SDS-PAGE 凝胶电泳,恒压 80 V 电泳至分离胶;恒压 120 V 至电泳结束,电转印至甲醇激活的硝酸纤维素膜 (PVDF) 上 (220 mA、120 min);TBST 配制 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入抗  $\beta$ -actin、抗 Bcl-2、抗 Bax、抗 Bcl-xl 一抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h,TBST 冲洗 3 次,每次 10 min;二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h,TBST 冲洗 3 次,每次 10 min;ECL 显影,暗室曝光成像。标记胶片,拍照后用 Image J 1.48 软件对各蛋白条带进行灰度值定量分析,用各目的蛋白条带灰度值同内参蛋白条带灰度值比较得到的比值统计分析各蛋白的相对表达水平。实验重复 3 次。

**1.9 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示;多组间数据比较采用方差分析,两组间比较采用  $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 ABT-499 对乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的增殖抑制效应** MTT 检测结果显示,不同剂量单纯照射和 ABT-499 分别作用于 MDA-MB-231 细胞不同时间后均产生明显增殖抑制效应并呈剂量依赖性;与对照组相比,MDA-MB-231 细胞存活率明显下降,分别做 24 h 方差分析,差异有统计学意义 ( $F = 824.7, 387.0, P < 0.05$ )。经计算单纯照射对 MDA-MB-231 细胞 24 h 的  $IC_{20}$  为  $(5.70 \pm 0.45)$  Gy (图 1),ABT-499 对 MDA-MB-231 细胞 24 h 的  $IC_{20}$  为  $(5.30 \pm 0.28)$   $\mu$ mol/L (图 2)。

**2.2 流式细胞术检测不同浓度 ABT-499 处理后乳腺癌细胞周期变化** 不同浓度 ABT-499 作用于 MDA-MB-231 细胞 24 h 后, $G_0/G_1$  期细胞比例从  $(31.70 \pm 2.03)\%$  增加到  $(52.10 \pm 1.64)\%$ ,而 S 期细胞比例从  $(42.80 \pm 1.96)\%$  下降到  $(23.60 \pm$

$0.98)\%$ , $G_2/M$  期细胞比例变化不大,细胞发生  $G_0/G_1$  期阻滞,有剂量依赖性;与对照组相比,差异有统计学意义 ( $F = 85.284, P < 0.05$ ) (图 3)。

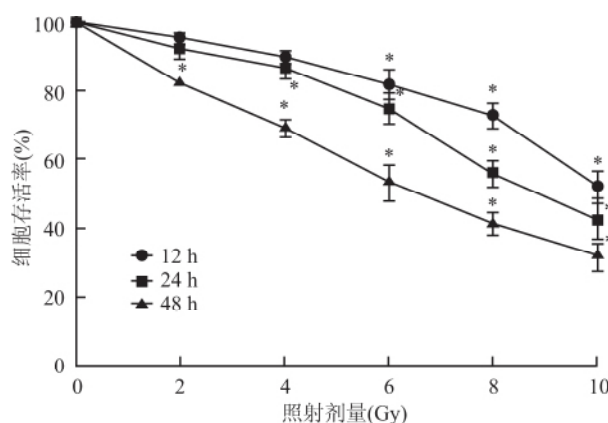


图 1 单纯照射对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖抑制作用  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$

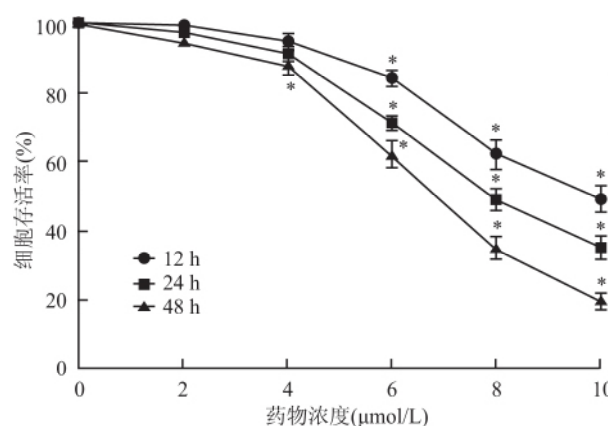


图 2 ABT-499 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖抑制作用  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.3 流式细胞术检测细胞凋亡** 不同组作用 24 h 后,光镜下观察,对照组细胞正常贴壁生长,轮廓清晰;而照射组、药物组和联合组细胞出现不同程度的体积缩小、轮廓不清、贴壁不紧、间隙增加,甚至漂浮 (图 4)。流式细胞术结果显示 ABT-499 单药可引起促凋亡作用,导致  $(44.5 \pm 1.89)\%$  的 MDA-MB-231 细胞发生凋亡,联合组凋亡细胞凋亡率达到  $(84.5 \pm 2.65)\%$ ;与对照组相比,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );同照射组和药物组相比,联合组效果更明显,差异有统计学意义 ( $F = 1.55E3, P < 0.05$ ) (图 5)。

**2.4 Caspase 活性检测试剂盒检测 Caspase-3 活性** 不同组作用 24 h 后,以对照组为 1 倍,照射组、药物组和联合组的 Caspase-3 活性分别为  $(1.8 \pm 0.16)$  倍、 $(3.0 \pm 0.31)$  倍与  $(6.6 \pm 0.13)$  倍,与对照

组相比差异有统计学意义 ( $F = 739.21$ ,  $P < 0.05$ ) (图6)。

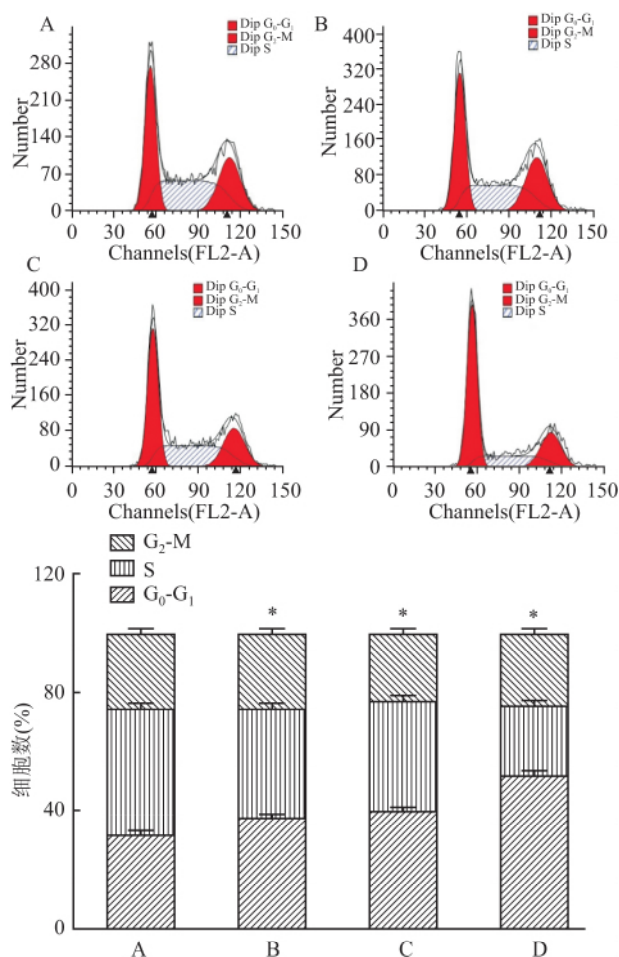


图3 不同浓度 ABT-199 对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 周期的影响  
A: 对照组; B: 2 μmol/L ABT-199; C: 4 μmol/L ABT-199; D: 6 μmol/L ABT-199; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

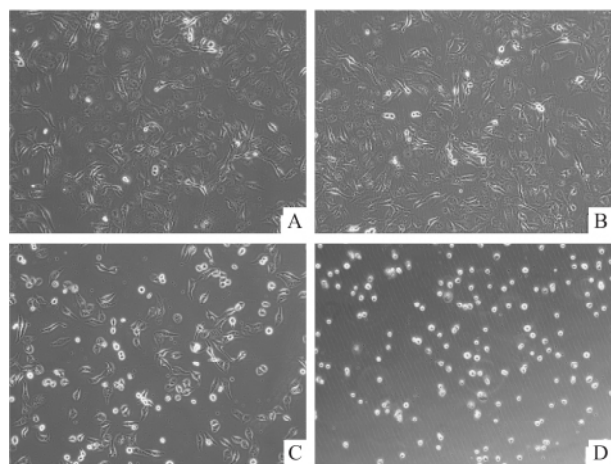


图4 各组作用 24 h 后乳腺癌 MDA-MB-231 细胞形态学变化 SP × 200  
A: 对照组; B: 照射组; C: 药物组; D: 联合组

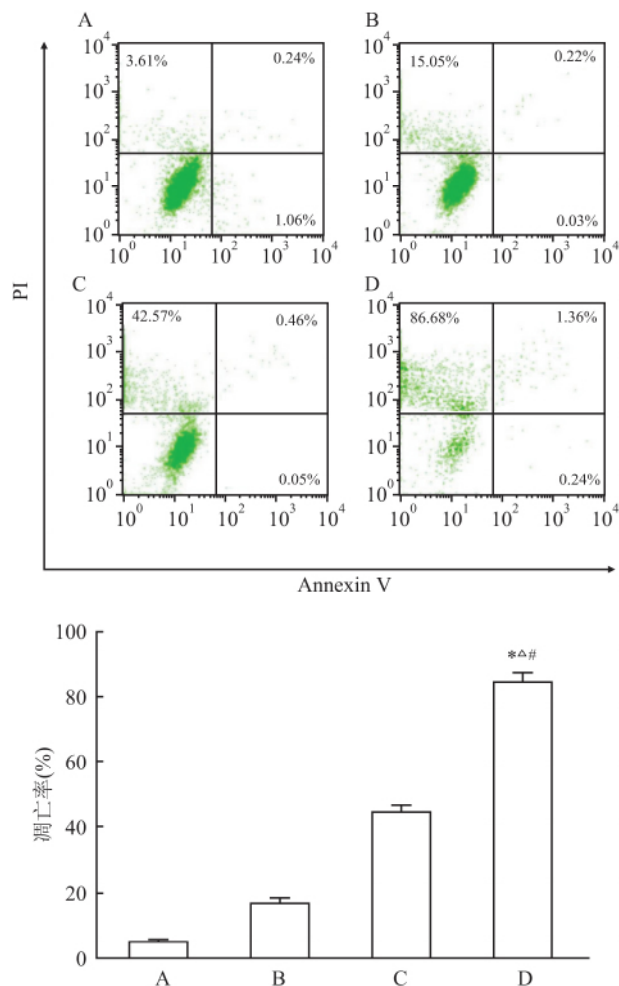


图5 各组作用 24 h 后对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响  
A: 对照组; B: 照射组; C: 药物组; D: 联合组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与照射组比较: Δ  $P < 0.05$ ; 与药物组比较: #  $P < 0.05$

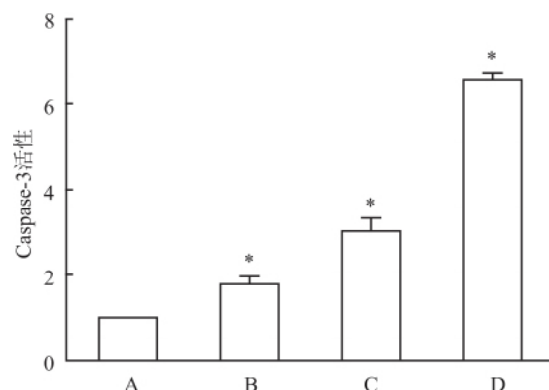


图6 ABT-199 单药和联合放疗作用后乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的 Caspase-3 活性改变

A: 对照组; B: 照射组; C: 药物组; D: 联合组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

2.5 Western blot 检测凋亡相关蛋白表达 结果显示 ABT-199 5 μmol/L 作用于 MDA-MB-231 细胞后, Bcl-xl 变化不大, 与对照组相比, 差异无统计学

意义 ( $F = 2.299$ )。与对照组相比,照射组和药物组都能下调 Bcl-2 蛋白,联合组对 Bcl-2 的下调比照射组更显著 ( $F = 174.436$ ,  $P < 0.05$ )。促凋亡蛋白 Bax 表达上调,与对照组相比,差异有统计学意义 ( $F = 146.104$ ,  $P < 0.05$ )。见图 7。

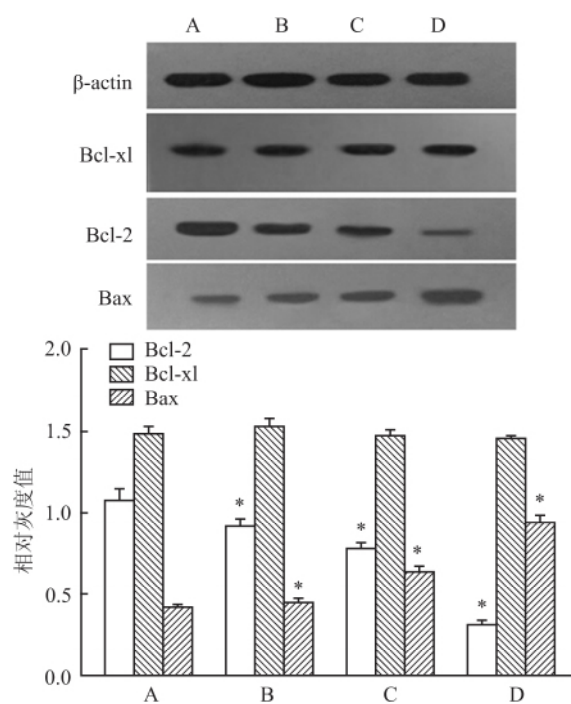


图 7 Western blot 检测相关凋亡蛋白表达的改变

A: 对照组; B: 照射组; C: 药物组; D: 联合组; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

TNBC 是指 PR/ER/HER-2 表达均呈阴性的乳腺癌类型,约占所有乳腺癌的 15%;与其他类型乳腺癌相比,侵袭性强、愈后差、易复发和远处转移;其对内分泌治疗无效,治疗方式多以化疗为主,但是化疗伴随的耐药现象及频发副作用限制了化疗的临床应用<sup>[5]</sup>。早期乳腺癌保乳术后放疗作为重要的补充治疗方式,研究<sup>[6]</sup>证实早期 TNBC 患者乳房切除术后接受标准辅助化疗加放疗较单纯化疗更有效。提高乳腺癌细胞对放射敏感性为乳腺癌治疗提供了新思路。

Bcl-2 蛋白家族是细胞凋亡过程的关键调节因子,包括抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白:① Bcl-2 亚家族 (Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、Mcl-1 和 A1 等),含 BH1-4 结构域,通过与家族中促凋亡成员结合行使抗凋亡功能;② Bax 亚家族 (Bax 和 Bak),含 BH1-3 结构域,可以直接导致线粒体外膜通透性增高,有促凋亡作用;③ BH3 only 蛋白亚家族,仅含一个 BH3 结

域,可以感受细胞应激并诱导细胞凋亡,Bcl-2 家族各成员间的相互作用决定了细胞是朝着抗凋亡还是促凋亡的方向发展<sup>[7]</sup>。当 Bcl-2 亚家族蛋白表达增高,充分结合 Bax 亚家族和 BH3 only 蛋白,使其失去促凋亡活性,细胞就出现抗凋亡作用,肿瘤细胞对放化疗耐受而得以存活<sup>[8]</sup>。Caspase-3 是多种凋亡途径的共同下游效应部分,活化的 Caspase-3 剪切聚腺苷二磷酸核糖聚合酶、DNA 依赖性蛋白激酶等,从而影响细胞 DNA 的复制、转录及修复过程。Bcl-2、Bax 与 Caspase-3 可互为彼此的上游调控机制,调节细胞凋亡<sup>[9-10]</sup>。研究<sup>[11]</sup>显示,Bcl-2 高表达与早期乳腺癌患者局部复发风险增高有密切联系。靶向结合 Bcl-2 家族抗凋亡蛋白能增加肿瘤细胞对放疗的敏感<sup>[12]</sup>。

利用 Bcl-2 抗凋亡活性开发出的一系列小分子 BH3 类似物如 ABT-737 和 ABT-263 (navitoclax) 能够模拟 BH3-only 蛋白,选择性与 Bcl-2 抗凋亡家族蛋白结合,促进肿瘤细胞凋亡<sup>[13]</sup>。其中 ABT-263 (navitoclax) 已进入白血病和淋巴瘤的临床研究<sup>[14]</sup>,显示其对慢性淋巴细胞性白血病有一定效果。但因 ABT-263 既能结合 Bcl-2 又能结合 Bcl-xl,临床应用时容易导致血小板减少症,限制了 ABT-263 作为一种临床用药的应用前景<sup>[15]</sup>。ABT-199 是一种新型小分子 Bcl-2 选择性抑制剂,对 Bcl-2 的抑制能力 ( $K_i < 0.01$  nmol/L) 远大于 Bcl-xl ( $K_i = 48$  nmol/L) 和 Mcl-1 ( $K_i > 444$  nmol/L),从而在不影响血小板的情况下获得潜在抗肿瘤效应<sup>[4]</sup>。

本实验结果显示 ABT-199 可以在体外显著抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖,增殖抑制率呈时间和剂量依赖性。流式结果显示 2、4、6  $\mu$ mol/L 的 ABT-199 可使 MDA-MB-231 细胞发生  $G_0/G_1$  期阻滞且呈剂量依赖性。ABT-199 单独作用或联合照射均可使 MDA-MB-231 细胞发生凋亡,其联合照射后的细胞凋亡率显著高于药物组和照射组,证明 ABT-199 可以在较低浓度下实现增敏放疗效应。Western blot 结果显示,同对照组相比,药物组和联合组 MDA-MB-231 细胞内抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平下调明显,与此同时 Bcl-xl 未发现有明显变化,促凋亡蛋白 Bax 上调,Caspase-3 活性增加。本实验表明,ABT-199 可通过调节乳腺癌细胞内凋亡相关蛋白的水平与放疗发挥协同效应,为进一步研究 ABT-199 在抗肿瘤治疗中的作用提供了依据。

### 参考文献

[1] Langlands F E, Horgan K, Dodwell D D, et al. Breast cancer sub-

- types: response to radiotherapy and potential radiosensitisation [J]. *Br J Radiol* 2013 ,86( 1023 ) :20120601.
- [2] Tsang T Y ,Tang W Y ,Chan J Y ,et al. P-glycoprotein enhances radiation-induced apoptotic cell death through the regulation of miR-16 and Bcl-2 expressions in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Apoptosis* 2011 ,16( 5 ) :524 – 35.
- [3] Qiu T ,Zhou L ,Wang T ,et al. miR-503 regulates the resistance of non-small cell lung cancer cells to cisplatin by targeting Bcl-2 [J]. *Int J Mol Med* 2013 ,32( 3 ) :593 – 8.
- [4] Souers A J ,Levenson J D ,Boghaert E R ,et al. ABT-199 , a potent and selective Bcl-2 inhibitor , achieves antitumor activity while sparing platelets [J]. *Nat Med* 2013 ,19( 2 ) :202 – 8.
- [5] De Laurentiis M ,Cianniello D ,Caputo R ,et al. Treatment of triple negative breast cancer ( TNBC ) : current options and future perspectives [J]. *Cancer Treat Rev* 2010 ,36 Suppl 3 :S80 – 6.
- [6] Wang J ,Shi M ,Ling R ,et al. Adjuvant chemotherapy and radiotherapy in triple-negative breast carcinoma: a prospective randomized controlled multi-center trial [J]. *Radiother Oncol* 2011 ,100( 2 ) :200 – 4.
- [7] Xu C ,Xu W ,Palmer A E ,et al. BI-4 regulates endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins [J]. *J Biol Chem* 2008 ,283( 17 ) :11477 – 84.
- [8] Letai A ,Bassik M C ,Walensky L D ,et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis , serving as prototype cancer therapeutics [J]. *Cancer Cell* 2002 ,2( 3 ) :183 – 92.
- [9] Ricci J E ,Muñoz-Pinedo C ,Fitzgerald P ,et al. Disruption of mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain [J]. *Cell* 2004 ,117( 6 ) :773 – 86.
- [10] Guo J ,Zhang K ,Ji Y ,et al. Effects of ethyl pyruvate on myocardial apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax proteins after ischemia reperfusion in rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 2008 ,28( 3 ) :281 – 3.
- [11] Wang Y ,Wang X ,Zhao H ,et al. Clusterin confers resistance to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in breast cancer cells through NF- $\kappa$ B activation and Bcl-2 overexpression [J]. *J Chemother* , 2012 ,24( 6 ) :348 – 57.
- [12] Loriot Y ,Mordant P ,Dugue D ,et al. Radiosensitization by a novel Bcl-2 and Bcl-XL inhibitor S44563 in small-cell lung cancer [J]. *Cell Death Dis* 2014 ,5 :e1423.
- [13] Chen L ,Willis S N ,Wei A ,et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function [J]. *Mol Cell* 2005 ,17( 3 ) :393 – 403.
- [14] Roberts A W ,Seymour J F ,Brown J R ,et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease [J]. *J Clin Oncol* 2012 ,30( 5 ) :488 – 96.
- [15] Vogler M ,Furdas S D ,Jung M ,et al. Diminished sensitivity of chronic lymphocytic leukemia cells to ABT-737 and ABT-263 due to albumin binding in blood [J]. *Clin Cancer Res* 2010 ,16( 16 ) :4217 – 25.

## Radiosensitization of breast cancer cells MDA-MB-231 with the selective Bcl-2 inhibitor ABT-199

Qian Zhenjue<sup>1</sup> , Niu Ling<sup>2</sup> , Bao Yangyi<sup>2</sup> , et al

(<sup>1</sup>Dept of Oncology , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001;

<sup>2</sup>Dept of Oncology , The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230061)

**Abstract Objective** To study the radiosensitization effect of selective Bcl-2 inhibitor , ABT-199 in breast cancer cells MDA-MB-231 and to explore its possible mechanism. **Methods** The MDA-MB-231 cells in logarithmic phase were divided into control group , drug group , radiation group and combination group ( radiation + ABT-199 ) . The anti-proliferative effects of radiation and ABT-199 in MDA-MB-231 were measured respectively with MTT assay and the value of IC<sub>20</sub> was calculated. The cell cycle arresting and apoptosis of MDA-MB-231 cells were measured by flow cytometry. Caspase-3 activity was assayed by caspase activity assay kit. The Bcl-2 , Bax , Bcl-xl expression were detected by western blot. **Results** ABT-199 inhibited the proliferation of MDA-MB-231 in a time-dependent and dose-dependent manner. With the increasing of ABT-199 concentrations , MDA-MB-231 cells were blocked in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. The apoptosis rate in combination group was significantly higher than radiation group ( 16.9% vs 84.5% ) . Compared with the radiation group , Bcl-2 expression of the combination group were significantly reduced (  $P < 0.05$  ) and Bcl-xl expression showed no significant change , while its Bax expression and Caspase-3 activity increased (  $P < 0.05$  ) . **Conclusion** Bcl-2 selective inhibitor ABT-199 can effectively inhibit the proliferation of human breast cancer cell line MDA-MB-231 and induce cell G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase arrest and apoptosis. ABT-199 can significantly improve the radiosensitivity of MDA-MB-231.

**Key words** MDA-MB-231; ABT-199; Bcl-2 inhibitor; radiotherapy; synergistic effect