

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.15.049

靶向 Rad51 与肿瘤治疗的研究进展 *

冯书云 杜鸿志 黄悦 侯晓莹 伍瑶 林森森 袁胜涛[△] 孙立[△]

(中国药科大学 江苏省新药筛选重点实验室 江苏 南京 210009)

摘要: DNA 损伤反应在维持细胞基因组稳定性和机体存活发挥重要作用。DNA 双链断裂(Double strand breaks, DSBs)是 DNA 损伤最严重的形式。同源重组修复是体内参与 DSBs 损伤修复的重要机制之一,其中 Rad51 是体内参与同源重组性 DNA 修复的关键因子。Rad51 在人类的多种肿瘤组织中高表达,如乳腺癌、非小细胞肺癌、前列腺癌等,与肿瘤的转移和恶化相关。如何有效下调肿瘤组织中的 Rad51 的水平,降低肿瘤细胞的 DNA 损伤修复能力,从而提高肿瘤治疗的疗效具有潜在的临床应用价值。本文对近年来的一个研究热点靶向 Rad51 在肿瘤治疗研究中的应用进行综述。

关键词: Rad51; 同源重组; 肿瘤; 联合治疗

中图分类号: R730.58 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)15-2993-03

Relationship between Targeting Rad51 and Cancer Treatment*

FENG Shu-yun, DU Hong-zhi, HUANG Yue, HOU Xiao-ying, WU Yao, LIN Sen-sen, YUAN Sheng-tao[△], SUN Li[△]

(Jiangsu Key Laboratory of Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, 210009, China)

ABSTRACT: The DNA damage response performs an vital role in maintaining genomic stability and cell survival. DNA double-strand breaks (DSBs) is the most severe form of DNA damage. The homologous recombination (HR) pathway displays an essential role in repairing DSBs. Rad51 is a key component of HR and is overexpressed in a variety of cancer cells, such as breast cancer, non-small-cell lung cancer, prostate cancer. Elevated RAD51 expression is associated with migration and deterioration of cancer. At present, How to regulate RAD51 to normal levels may sensitize these tumours to DNA damaging treatments. In this review, We examine the latest development of cancer therapy by targeting RAD51.

Key words: RAD51, Homologous recombination, Cancer, Combination therapy

Chinese Library Classification(CLC): R730.58 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)15-2993-03

前言

电离辐射、遗传毒性化学物质、化疗药物等均可导致 DSBs,它是 DNA 损伤中最严重的形式^[1,2]。若 DSBs 不能修复则可能导致染色体的断裂以及细胞死亡;修复不当可导致基因组不稳定,表现为染色体重排或染色体缺失,最终导致肿瘤的发生^[3]。DSBs 的主要修复方式有同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)和非同源末端连接修复^[3,4]。HRR 是 DSBs 修复系统中的关键通路,高度保真的 HR 对维持基因的稳定性起着至关重要的作用,而 Rad51 被认为是体内参与 HRR 的关键因子^[5]。研究发现在 HR 缺失的肿瘤细胞中,过表达 Rad51 可以维持基因的稳定性。Rad51 的高表达增强 DNA 损伤修复能力,引起肿瘤的恶化和对放疗、化疗的抵抗性增强^[6]。本文回顾 Rad51 蛋白与肿瘤发展的关系及其在同源重组中的作用,并对近年来靶向 Rad51 在肿瘤治疗研究中的进展进行综述。

1 Rad51 及其生物学功能

Rad51 是 1993 年首次被 ogawaH 等人克隆,是真核生物体内的一种 DNA 重组酶。Rad51 基因位于染色体 15q15.1 上,有 9 个外显子和 8 个内含子,编码一条由 399 个氨基酸组成的多肽^[7]。Rad51 的 5 个同系物 RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 and XRCC3, 与 Rad51 有 20%~30% 的氨基酸序列相似度,共同参与了 HR 的过程。

Rad51 介导的链侵入和修复性合成是 HRR 的关键步骤^[8]。HRR 的分子机制:在 DSBs 发生时,断裂末端处在 MRE11/RAD50/NBS1(MRN)三元复合物中的 MRE11 的作用下,沿着 5'→3' 方向的切割,暴露了与复制蛋白 A(replication protein A, RPA)分子结合的 3' 单链 DNA 末端^[9]。RAD51 竞争性置换 RPA 并与单链 DNA 3' 末端上结合,形成连续的 Rad51-单链 DNA 复合物,即 "核蛋白丝"。Rad51 置换 RPA 需要 "多种重组调节蛋白" 调控,如:Rad51B, BRCA2, Rad51C, Rad51D 等。同时还有多种 "重组共调节蛋白",如 BRCA1, PALB2, CHK2。随后,RAD51 识别同源 DNA 模板,催化 DNA 链的配对、延伸和形成 Holliday 联结^[10]。最后在核酸酶和连接酶的作用下,Holli-

* 基金项目:国家自然科学基金项目(2014AA022208);国家高技术研究发展计划(863)(81302794, 81573456)

作者简介:冯书云(1988-),硕士研究生,从事肿瘤药理学研究,电话:13770992528, E-mail: fengshuyun88@163.com

[△] 通讯作者:袁胜涛,男,博士,研究员,从事肿瘤微环境的研究, E-mail: cpuyuanst@163.com;

孙立,女,博士,副研究员,从事肿瘤微环境的研究, E-mail: sunli@cpu.edu.cn

(收稿日期:2016-11-04 接受日期:2016-11-30)

day 联结形成完整的双链 DNA 分子。

2 Rad51 与肿瘤的发生发展

2.1 Rad51 与肿瘤的发生

Rad51 的缺失会导致小鼠的胚胎死亡^[11]。目前有关 Rad51 基因 135G/C 单核苷酸多态性的报道很多。Jakubowska 等^[12]发现,携带 BRCA1 突变的波兰妇女中, Rad51 仅 "G" 等位基因的乳腺癌和(或)卵巢癌的发病风险比基因 "C" 等位基因增加了 2 倍。

2.2 Rad51 与肿瘤的转移、恶化相关

肿瘤组织中, 激活后的 Rad51 的蛋白和 mRNA 的最高表达水平是正常组织的 4~6 倍, 其活性增加至少 840 倍^[13]。应用免疫组织化学染色(Immunohistochemistry, IHC) EnvisionTM 两步法检测胃癌, 结直肠癌, 肺癌, 前列腺癌, 舌鳞癌等癌症组织和正常组织部位的 Rad51 的表达, 并分析其于临床病理特征的关系, 结果显示: 肿瘤组织中的 Rad51 的蛋白表达水平明显高于正常组织, Rad51 的阳性高表达与肿瘤的病理分级、淋巴结的转移和临床分期有关, 随肿瘤恶性程度的增高而上升, 上皮性卵巢癌 Rad51 蛋白的表达明显高于非上皮性卵巢癌^[14]。

综上所述, Rad51 与肿瘤的发生发展相关。

3 靶向 Rad51 的抑制剂

研究发现, 降低 Rad51 的表达提高肿瘤治疗效果, 如增强肿瘤细胞的增殖抑制、增强周期阻滞、促进凋亡最终导致肿瘤细胞的死亡^[15]。目前靶向 Rad51 的抑制剂主要是抑制 Rad51 的生物活性, 如小分子抑制剂; 其次是降低它的表达, 如 RNA 干扰沉默 Rad51, 组蛋白去乙酰化酶抑制剂和酪氨酸受体激酶抑制剂等。

3.1 Rad51 的小分子抑制剂

Rad51 的小分子抑制剂是通过高通量筛选的方法筛选化合物库确定的^[16]。目前处于发展阶段的 Rad51 的小分子抑制剂包括: halenaquinone, B02, RI-1 和 IBR2^[17]。

Halenaquinone 有效破坏 D-loop(Rad51 与 DNA 结合的功能性实验)的形成和抑制同源重组修复。SPR (Surface plasmon resonance) 分析发现 Halenaquinone 以剂量依赖的方式与 RAD51 的结合, 由于其毒性大尚未应用于肿瘤临床治疗。B02 在 D-loop 实验中的 IC₅₀ 为 27.4 μM, B02 妨碍核蛋白丝形成中 Rad51 与 DNA 单链的结合, 并使 Rad51-DNA 复合物不稳定, 抑制 Rad51 相关的 ATP 酶活性, 进而抑制 HRR。B02 与化疗药物的联合广泛应用于临床前动物模型研究, 具有潜在的开发应用前景。RI-1 主要作用机制是阻止 Rad51 与 DNA 单链的结合和形成核蛋白丝, 其作用的可逆性导致达不到临床相关 IC₅₀ 治疗浓度^[18,19]。IBR2 可以重复结合 Rad51, 并涉及到 BRCA2 与 Rad51 的结合。IBR2 有效抑制多种肿瘤细胞的生长, 包括 K562, HeLa, MDA-MB-468, MDA-MB-435, MCF-7 和 T47D, 且 IC₅₀ 在 11.5~16.0 M^[20]。综上, Rad51 的小分子抑制剂具有开发为 DNA 损伤化疗药物的潜力。

3.2 RNA 干扰 Rad51 的表达

RNA 干扰 Rad51 病毒转染技术沉默 Rad51 后可以提高多种肿瘤对化疗药物的敏感性。HeLa S-3, A549, PANC-1 和 As-

PC-1 沉默 Rad51 后对铂类抗肿瘤药物的敏感性升高, 而人类的正常成纤维细胞敲除 Rad51 后, 对铂类抗肿瘤药物的敏感性并未增加, 表明了临床上特殊靶向的 Rad51 无潜在的明显不良反应。体内移植瘤模型显示, 敲除 Rad51 的小鼠黑色素瘤的生长受到明显的抑制^[21]。

内源性 MicroRNA 同样可以引起 RNA 干扰^[22]。异常表达的 MicroRNA 也是肿瘤细胞的特征, 与引起 DNA 损伤的肿瘤放疗、化疗的获得性抵抗有关, 研究发现, miR-96, -99, -107, -222 and -155 可以与 Rad51 结合, 并抑制 HR。miRNA-96, miRNA-107 和 miRNA-122 通过靶向 Rad51 增强肿瘤细胞对放疗和 PARPi 的敏感性^[23,24]。因 RNA 干扰技术的维持时间短, 需要重复的和长期的 RNA 干扰来维持模型的建立。

3.3 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitors, HDACi) 下调 Rad51 的表达

在肿瘤的发生和发展过程中, 组蛋白修饰是表观遗传学修饰的主要方式之一^[25]。HDACs 将组蛋白 N-端赖氨酸残基侧链上的 ε-氨基去乙酰化, 带有负电荷的 DNA 聚体富集, 促进组蛋白与 DNA 链之间的相互作用, 影响染色质结构及基因的表达^[26]。文献报道, HDACi 通过减少转录因子 E2F1 的募集而抑制 Rad51 的表达。Adimoolam S 等^[27]研究发现, HDACi PCI-24781 在体内外通过下调 RAD51, BRCA1 和 BRCA2 损伤 HR 通路。PCI-24781 与 PARPi 或放疗联合应用表现出协同效应, Rad51 和 BRCA2 的转录水平降低了 80%, Rad51 的蛋白水平降低了 53%, IR 辐射后 Rad51 的聚焦也受到了抑制。HDACi 下调 Rad51 的表达表现出有效的临床治疗, 缺点是靶点非特异性, 对实体瘤疗效差。

3.4 其它

慢性粒细胞白血病的一线治疗药物, 酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼可减少 Rad51 的表达, 对正常的成纤维细胞没有影响。伊马替尼和放疗联合应用与单用放疗相比可以更好的抑制肿瘤的生长^[28]。另外细胞毒药物甲氨蝶呤也可以降低 Rad51 的表达^[29]。

综上, 与 HDACi 和酪氨酸激酶抑制剂相比, Rad51 的小分子抑制剂可以更好的增强肿瘤细胞对引起 DNA 损伤的放疗和化疗药物的敏感性, 具有潜在的临床应用意义。

4 靶向 Rad51 的临床治疗应用

临床肿瘤治疗中, Rad51 作为 DNA 损伤的治疗和预后的标志物。如 Rad51 的表达量作为预测女性乳腺癌患者的治疗疗效、结直肠癌预后状况的标志物^[5,6]。靶向 Rad51 主要与其它放疗、化疗联合应用, 以提高抗肿瘤治疗效果。如沉默 Rad51 增强肝癌、肺癌对放射治疗、顺铂的敏感性; 在 PARP 抑制剂联合 MMS 诱导的 DNA 损伤的治疗中, 加入 B02 可以增强肿瘤细胞对 PARP 的敏感性, 而单用 B02 不能改变细胞的存活率。Konstantinopoulos 等^[30]发现组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 与 PARP 抑制剂 olaparib 联合使用可妨碍卵巢癌的 HR 通路。当前由于缺乏 Rad51 蛋白的完整晶体, 限制了 Rad51 抑制剂的发展, 然而我们已经从酵母中获得了越来越多的信息, 靶向 Rad51 抑制剂具有潜在的临床应用价值。

5 结语与展望

Rad51 的生物学功能已有很多报道,是体内参与 HRR 的关键因子。Rad51 在多种肿瘤组织中高表达,与肿瘤表型的恶化和放、化疗的治疗抵抗相关。目前,靶向 Rad51 的抗肿瘤治疗在 DNA 损伤反应治疗中已成为关注的靶点之一,且靶向 Rad51 抑制剂与传统药物或新型的 PARP 抑制剂联合已有报导,具有潜在的临床治疗开发价值。值得注意的是,Rad51 基因作为 DNA 修复基因,对维持细胞基因的稳定性和机体存活起着关键性的作用。Rad51 基因的突变在多种肿瘤的发生、发展过程中起着重要作用,Rad51 的不表达可能导致胚胎的死亡。因此衡量正常人体内 Rad51 量的范围有待进一步探索。

参考文献(References)

- [1] Groesser T, Cooper B and Rydberg B. Lack of bystander effects from high-LET radiation for early cytogenetic end points [J]. *Radiat Res*, 2008, 170(6): 794-802
- [2] Matsuo M. Hydrophilic antimutagens in fermented defatted soybeans with *Neurospora intermedia* (D-oncom) [J]. *J Nutr Sci Vitaminol* (Tokyo), 2004, 50(6): 426-430
- [3] Gonzalez F, Georgieva D, Vanoli F, et al. Homologous recombination DNA repair genes play a critical role in reprogramming to a pluripotent state[J]. *Cell Rep*, 2013, 3(3): 651-660
- [4] Felgentreff K, Du L, Weinacht KG, et al. Differential role of nonhomologous end joining factors in the generation, DNA damage response, and myeloid differentiation of human induced pluripotent stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(24): 8889-8894
- [5] Tennstedt P, Fresow R, Simon R, et al. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(9): 2118-2126
- [6] Wigmans AP, Al-Ejeh F, Chee N, et al. Rad51 supports triple negative breast cancer metastasis[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(10): 3261-3272
- [7] Shinohara A, Ogawa H, Matsuda Y, et al. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA [J]. *Nat Genet*, 1993, 4(3): 239-243
- [8] Suwaki N, Klare K and Tarsounas M. RAD51 paralogs: roles in DNA damage signalling, recombinational repair and tumorigenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 22(8): 898-905
- [9] Mimitou EP and Symington LS. DNA end resection: many nucleases make light work[J]. *DNA Repair* (Amst), 2009, 8(9): 983-995
- [10] Liu Y, Masson JY, Shah R, et al. RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells[J]. *Science*, 2004, 303(5655): 243-246
- [11] Lim DS and Hasty P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53[J]. *Mol Cell Biol*, 1996, 16(12): 7133-7143
- [12] Jara L, Acevedo ML, Blanco R, et al. RAD51 135G>C polymorphism and risk of familial breast cancer in a South American population[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 178(1): 65-69
- [13] Hine CM, Li H, Xie L, et al. Regulation of Rad51 promoter [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(13): 2038-2045
- [14] 闫芸芳, 龙腾飞, 周家德. 卵巢癌中 Rad51 蛋白表达的意义 [J]. *安徽医学*, 2014(01): 23-26
Yan Yun-fang, Long Teng-fei, Zhou Jia-de. Association between Rad51 protein expression and metastasis of ovarian cancer [J]. *Anhui Medical*, 2014, 35(1): 23-26
- [15] Gasparini P, Lovat F, Fassan M, et al. Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(12): 4536-4541
- [16] Huang F, Motlekar NA, Burgwin CM, et al. Identification of specific inhibitors of human RAD51 recombinase using high-throughput screening[J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 6(6): 628-635
- [17] Ward A, Khanna KK. Targeting homologous recombination, new pre-clinical and clinical therapeutic combinations inhibiting RAD51 [J]. *Cancer Treat Rev*, 2015, 41(1): 35-45
- [18] Huang F and Mazin AV. A small molecule inhibitor of human RAD51 potentiates breast cancer cell killing by therapeutic agents in mouse xenografts[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100993
- [19] Takaku M, Kainuma T, Ishida-Takaku T, et al. Halenaquinone, a chemical compound that specifically inhibits the secondary DNA binding of RAD51[J]. *Genes Cells*, 2011, 16(4): 427-436
- [20] Zhu J, Zhou L, Wu G, et al. A novel small molecule RAD51 inactivator overcomes imatinib-resistance in chronic myeloid leukaemia[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(3): 353-365
- [21] Ito M, Yamamoto S, Nimura K, et al. Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(8): 1044-1052
- [22] 刘浩, 尹华斌, 纪方. MicroRNA 与肿瘤的相关研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(07): 1388-1390
Liu Hao, Yin Hua-bin, Ji Fang. The progression of microRNA and tumor's research [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2012, 12(07): 1388-1390
- [23] Neijenhuis S, Bajrami I, Miller R, et al. Identification of miRNA modulators to PARP inhibitor response[J]. *DNA Repair* (Amst), 2013, 12(6): 394-402
- [24] Wang Y, Huang JW, Calses P, et al. MiR-96 downregulates REV1 and RAD51 to promote cellular sensitivity to cisplatin and PARP inhibition[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(16): 4037-4046
- [25] 赵欣, 李媛媛, 曹丁丁. 肿瘤表观基因组学研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(01): 172-175+183
Zhao Xin, Li Yuanyuan, Cao Dingding et al. Research progress of cancer epigenomics [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2016, 16(01): 172-175+183
- [26] De Andrade PV, Andrade AF. The histone deacetylase inhibitor PCI-24781 as a putative radiosensitizer in pediatric glioblastoma cell lines[J]. *Cancer Cell Int*, 2016, 16: 31
- [27] Adimoolam S, Sirisawad M, Chen J, et al. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (49): 19482-19487
- [28] Tibes R, Fine G, Choy G, et al. A phase I, first-in-human dose-escalation study of amuvatinib, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(2): 463-471
- [29] Al-Kaabi MM, Alshareeda AT. Checkpoint kinase1 (CHK1) is an important biomarker in breast cancer having a role in chemotherapy response[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(5): 901-911
- [30] Konstantinopoulos PA, Wilson AJ, Saskowski J, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances olaparib activity by targeting homologous recombination DNA repair in ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(3): 599-606