

顺铂通过激活 p53 信号通路抑制人食管癌细胞的生存

古春萍¹, 阙富昌², 李亦蕾¹, 刘叔文², 余乐^{2*}(南方医科大学¹附属南方医院药学部,²药学院, 广州 510515)

摘要 研究顺铂抑制人食管癌细胞生存的作用及其机制。细胞活力实验检测顺铂对食管癌亲代细胞 EC109 及耐药细胞 EC109/CDDP 的杀伤作用。Western blot 检测顺铂处理后食管癌亲代细胞 EC109 及耐药细胞 EC109/CDDP 的 p53 和 Phospho-p53 (Ser15) 的蛋白表达。克隆存活实验检测顺铂单独及联合 p53 抑制剂 Pifithrin- α 对食管癌亲代细胞 EC109 及耐药细胞 EC109/CDDP 生存的影响。实验结果显示, 与亲代细胞 EC109 比较, 耐药细胞 EC109/CDDP 保持了对顺铂的耐药性, IC_{50} 分别是 $(20.4 \pm 4.4) \mu\text{mol/L}$ 和 $(5.7 \pm 0.1) \mu\text{mol/L}$ 。在亲代和耐药人食管癌细胞, 顺铂不改变 p53 蛋白的表达, 但增加了 p53 蛋白在 Ser15 位磷酸化水平。顺铂抑制了 EC109 及耐药细胞 EC109/CDDP 细胞的生存能力, 而 p53 抑制剂 Pifithrin- α 在亲代细胞和耐药细胞不同程度的拮抗了顺铂的这一作用。顺铂通过激活 p53 信号通路, 抑制了人食管癌细胞的生存。

关键词 顺铂; p53; 人食管癌细胞

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)01-0090-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160113

引用本文 古春萍, 阙富昌, 李亦蕾, 等. 顺铂通过激活 p53 信号通路抑制人食管癌细胞的生存[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(1): 90-94.
Cite this article as: GU Chunping, QUE Fuchang, LI Yilei, et al. Cisplatin inhibits survival of human esophageal squamous carcinoma cells via p53 activation[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(1): 90-94.

Cisplatin inhibits survival of human esophageal squamous carcinoma cells via p53 activation

GU Chunping¹, QUE Fuchang², LI Yilei¹, LIU Shuwen², YU Le^{2*}¹Department of Pharmacy, Nanfang Hospital;²School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract To study the mechanisms whereby cisplatin suppresses survival of human esophageal squamous carcinoma cells, the cytotoxicity of cisplatin in cisplatin-resistant cell line EC109/CDDP and its parental cell line EC109 was measured by cell viability assay. Western blot was used to investigate the protein expression of total p53 and phosphorylated p53 at Ser15. Colony formation assay was employed to evaluate the ability of cells to recover from treatments and form colonies. The results indicated that EC109/CDDP cells were more resistant to cisplatin-induced cytotoxicity than EC109 cells, with the IC_{50} values of $(20.4 \pm 4.4) \mu\text{mol/L}$ and $(5.7 \pm 0.1) \mu\text{mol/L}$, respectively. Although cisplatin did not alter the total protein level of p53, it obviously increased the phosphorylation of p53 at Ser15. Cisplatin inhibited survival of both EC109/CDDP and EC109. Notably, inhibition of p53 by Pifithrin- α significantly promoted the recovery of cisplatin-treated EC109 and EC109/CDDP cells in different degrees. In this respect, p53 signaling pathway was found to be activated in response to cisplatin treatment in both EC109/CDDP and EC109, which may contribute to the cytotoxic effect of cisplatin.

Key words cisplatin; p53; esophageal squamous carcinoma cell

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81273551)

中国是食管癌的高发地区,2008 年新发食管癌病例(25.8 万)和死于食管癌患者人数(21 万)分别占全球新发食管癌病例(48.1 万)和死于食管癌患者人数(40.6 万)的半数以上^[1]。顺铂是临床上广泛使用的可用于治疗各种实体瘤的抗肿瘤药物^[2],也是食管癌治疗的基本化疗药物。顺铂先将所含之氯解离,与 DNA 上的核碱基鸟嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶形成 DNA 单链内两点的交叉联结,也可能形成双链间的交叉联结,从而破坏 DNA 的结构和功能。本课题组此前研究发现介导顺铂进入细胞的转运蛋白是决定食管癌细胞对顺铂敏感性的关键因素^[3]。顺铂可诱导多种肿瘤细胞发生自噬,自噬发挥的作用是促进生存从而参与食管癌细胞对顺铂的耐药^[4]。联用自噬抑制剂能够增强顺铂的抗肿瘤作用,而且顺铂的抗肿瘤机制是通过激活 ERK 通路诱导敏感和耐药细胞发生不同程度的凋亡和衰老。而与凋亡和衰老密切相关的 p53 蛋白是否也参与了顺铂的抗食管癌过程,目前并未见文献报道。

p53 基因是抑癌基因,该基因编码一种相对分子质量为 53 kD 的蛋白质,由 393 个氨基酸组成,具有特异的转录调控作用。p53 通路是机体应对 DNA 损伤的天然防护屏障,具有修复缺陷、防止癌变的功能。在各种应激包括 DNA 损伤时,p53 可以被不同的信号通路激活并稳定,通过激活其下游多种基因的转录而引起细胞周期阻滞、凋亡或衰老,保持细胞基因组的完整性并清除损伤细胞^[5]。但是,对于 p53 是否参与顺铂抗人食管癌中的作用,还没有明确阐述。本研究选用对顺铂耐药的人食管癌细胞及其亲代细胞,观察顺铂处理后耐药细胞和亲代细胞中 p53 蛋白变化,阐明 p53 在顺铂发挥细胞毒作用引起 DNA 损伤中的作用及其机制。

1 材 料

1.1 试 剂

RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清、青霉素、链霉素和胰酶(美国 Invitrogen 公司);CellTiter-Glo 活细胞检测试剂盒(美国 Promega 公司);p53 抑制剂 Pifithrin- α 、SDS、Tris 碱和甘氨酸(美国 Sigma 公司);无水乙醇、APS 和 PBS 粉末(广州展晨生物技术有限公司);Tris、Tris-HCl、SDS、丙烯酰胺溶液(30%,29:1)、蛋白检测染色试

剂、催化剂 TEMED、(美国 Bio-Rad 公司);脱脂奶粉(广州奇华盛生物技术有限公司);ECL 化学发光试剂盒、鼠抗鼠 p53 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);兔抗鼠 β -actin、Phospho-p53 (Ser15)、兔二抗羊抗兔 IgG 和鼠二抗羊抗鼠 IgG 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司)。

1.2 仪 器

680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);倒置显微镜(日本 Nikon 公司);Genios Pro 型 Tecan 酶标仪(美国 Tecan 公司);台式高速离心机(德国 Eppendorf 公司);水平电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);转膜电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);BP211D 十万分之一电子天平(德国 Mettler-Toledo 公司);pH 计(德国 Mettler-Toledo 公司)。

1.3 细胞株

人食管癌细胞株 EC109 由中国医学科学院肿瘤医院中心馈赠。顺铂耐药细胞株 EC109/CDDP 由中山大学肿瘤防治中心傅剑华教授馈赠。EC109 和 EC109/CDDP 细胞是用 RPMI-1640 培养基培养,在含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的培养基中,在 37 $^{\circ}$ C,含有 5% CO₂,95% 空气饱和湿度培养箱中培养,0.25% 胰酶消化传代。

2 方 法

2.1 细胞活力实验检测顺铂对细胞的杀伤作用

CellTiter-Glo 活细胞检测试剂盒采用荧光素酶作为检测物,发光信号和体系中 ATP 量成正比,而 ATP 又和活细胞数正相关。取对数生长期的敏感细胞 EC109 和对顺铂耐药细胞 EC109/CDDP,以每孔 2 000 个细胞接种于 96 孔板中,培养 24 h,吸弃培养基,加入不同浓度的顺铂(0,0.78,1.56,3.125,6.25,12.5,25,50,100 μ mol/L)孵育 48 h。吸弃含药培养基,每孔加入 PBS 50 μ L,再加入 CellTiter-Glo 检测试剂 50 μ L,在 37 $^{\circ}$ C 孵箱中继续培养 30 min 后,转移至白板中,酶联免疫检测仪检测荧光值。半数抑制浓度 IC₅₀通过 Prism 5.0 统计软件计算。

2.2 Western blot 检测 p53 和 Phospho-p53(Ser15)蛋白

取对数生长期 EC109 和 EC109/CDDP,以每孔 2×10^5 个细胞接种于 60 mm 培养皿中,培养 24 h,吸弃培养基,加入顺铂(3 μ mol/L)作用 0,1,3,

6, 12, 24 和 48 h 后提取蛋白, 先用 PBS 洗 3 遍后, 用 RIPA 缓冲液(含 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mol/L NaCl, 0.5% 胆酸, 0.1% SDS, 2 mmol/L EDTA, 1% Triton, 10% 甘油, pH 7.5)裂解细胞提取总蛋白。裂解细胞前, RIPA 缓冲溶液要加入蛋白酶抑制剂(苯甲基磺酰氟、亮抑蛋白酶肽、抑肽酶、胃蛋白酶抑制剂)和蛋白磷酸酶抑制剂混合液。提取总蛋白后, 用 BCA 测定蛋白浓度并使蛋白量归一化, 用金属浴 100 °C 变性 10 min, 以统一蛋白总量, 上样后跑 SDS-PAGE 电泳, 然后用湿法转膜转印至醋酸纤维素膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, Phospho-p53, p53 和 β -actin 单克隆抗体 4 °C 孵育过夜, 洗膜, 加二抗 IgG 室温孵育 1 h, 洗膜, ECL 发光, 显影, 定影。

2.3 克隆存活实验检测食管癌细胞对顺铂的反应

克隆存活实验(colony formation assay)是一种长时间的检测实验, 本研究用其检测细胞经顺铂或/和 p53 抑制剂处理后的克隆生长和恢复能力。采用敏感细胞 EC109 以及对顺铂耐药细胞 EC109/CDDP 展开研究。取对数生长期 EC109 和 EC109/CDDP 细胞, 以每孔 1×10^5 个细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 吸弃培养基, 加入顺铂($3 \mu\text{mol/L}$)和/或 p53 抑制剂 Pifithrin- α ($20 \mu\text{mol/L}$) 孵育 48 h。吸弃含药培养基, 用不含血清的培养基冲洗 1 遍, 加入 0.25% 胰酶消化, 离心沉淀取细胞, 以每孔 3 000 个细胞接种于 6 孔板中, 培养 10 d 至两周, 再进行苏木精-伊红(HE)染色。

2.4 统计学分析

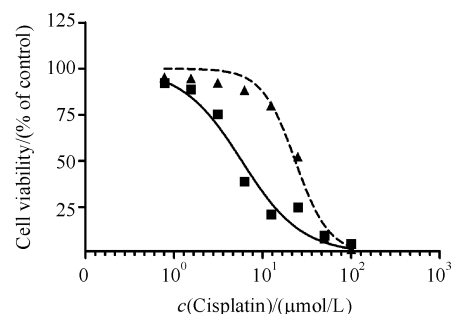
采用 GraphPad Prism 5.0 软件包进行数据分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 先采用 One-way ANOVA 用于多个样本均数比较, 再采用 Tukey 检验用于组内不同药物处理组之间的相互比较, 两不同处理组之间均数比较采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学显著性差异。

3 结果

3.1 顺铂对耐药细胞 EC109/CDDP 及其亲代细胞 EC109 的细胞毒作用

EC109/CDDP 是通过顺铂间歇处理(pulse treatment)人食管癌细胞 EC109 而获得的耐药细胞株^[6]。本研究检测了顺铂对耐药细胞 EC109/CDDP 及其亲代细胞 EC109 的细胞毒作用, IC_{50} 分

别是 (20.4 ± 4.4) 和 $(5.7 \pm 0.1) \mu\text{mol/L}$ (图 1), 耐药倍数达 3.6 倍。以上结果表明, 顺铂明显抑制了 EC109 细胞活力, 而耐药细胞 EC109/CDDP 却表现出对顺铂的耐药作用。



—■—EC109; —▲—EC109/CDDP

Figure 1 Cell viability curves of EC109/CDDP and EC109 cells following a 48 h cisplatin exposure determined by cell viability assay

3.2 顺铂促进耐药细胞 EC109/CDDP 及其亲代细胞 EC109 p53 的磷酸化

顺铂能够破坏 DNA 结构和功能^[4], DNA 损伤会诱导 p53 被磷酸化、泛素化和乙酰化等翻译后修饰而活化^[7], 本研究通过 Western blot 的方法检测了顺铂处理不同时间点后细胞中 p53 的磷酸化情况及其总蛋白水平。如图 2-A 所示, 顺铂处理 3 h 后, p53 蛋白在丝氨酸 15 位的磷酸化水平升高, 显著高于对照组 ($P < 0.001$), 在之后 6 ~ 48 h, p53 蛋白在 Ser15 位的磷酸化水平持续升高, 都显著高于对照组 ($P < 0.001$)。在耐药食管癌细胞 EC109/CDDP 也可以得到类似结果, 如图 2-B 所示。而 p53 总蛋白没有发生变化。以上结果说明顺铂诱导 p53 蛋白在 Ser15 位发生磷酸化激活 p53 通路, 从而抑制人食管癌细胞的生存。

3.3 p53 抑制剂减弱了顺铂对耐药细胞 EC109/CDDP 及其亲代细胞 EC109 克隆存活的抑制作用

早期通过克隆存活实验发现, 顺铂在 $2.5 \mu\text{mol/L}$ 时, 耐药细胞 EC109/CDDP 有 56% 细胞保存了克隆存活能力, 而亲代细胞 EC109 完全丧失了克隆存活能力^[4]。因此本研究选用 $3 \mu\text{mol/L}$ 顺铂做进一步的研究。通过克隆存活实验, 对于亲代细胞 EC109, 顺铂 ($3 \mu\text{mol/L}$) 处理后只有 1.5% 的细胞保持了克隆存活能力; 而对于耐药细胞 EC109/CDDP, 有 63.9% 的细胞保持了克隆存活能力。本研究发现, 在亲代细胞 EC109 中, 联用 p53 抑制剂 Pifithrin- α ($20 \mu\text{mol/L}$) 后, 保持克

隆存活能力的细胞比例升高至 12.5% ($P < 0.01$, 图 3-A); 在耐药细胞 EC109/CDDP 中, 联用 Pifithrin- α (20 $\mu\text{mol/L}$) 后, 保持克隆存活能力的细胞比例升高至 94.2% ($P < 0.01$, 图 3-B)。而且, 单用 Pifithrin- α (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理敏感细胞 EC109 后, 细胞的克隆存活数目与空白对照组没有显著性差异; 同样单用 Pifithrin- α (20 $\mu\text{mol/L}$) 处理耐药细胞 EC109/CDDP, 细胞的克隆存活数目与空白对照组也没有显著性差异, 更重要的是, 联用

Pifithrin- α (20 $\mu\text{mol/L}$) 和顺铂后, 耐药细胞的克隆数目能恢复到与空白对照组一样的水平, 没有显著性差异。实验结果表明, Pifithrin- α 作为 p53 的抑制剂能增强顺铂处理后的食管癌细胞的克隆存活能力, 而且抑制 p53 使顺铂耐药的食管癌细胞 EC109/CDDP 的克隆存活细胞比例增长更大。以上结果提示顺铂可能通过诱导 p53 通路从而抑制人食管癌细胞的生存。

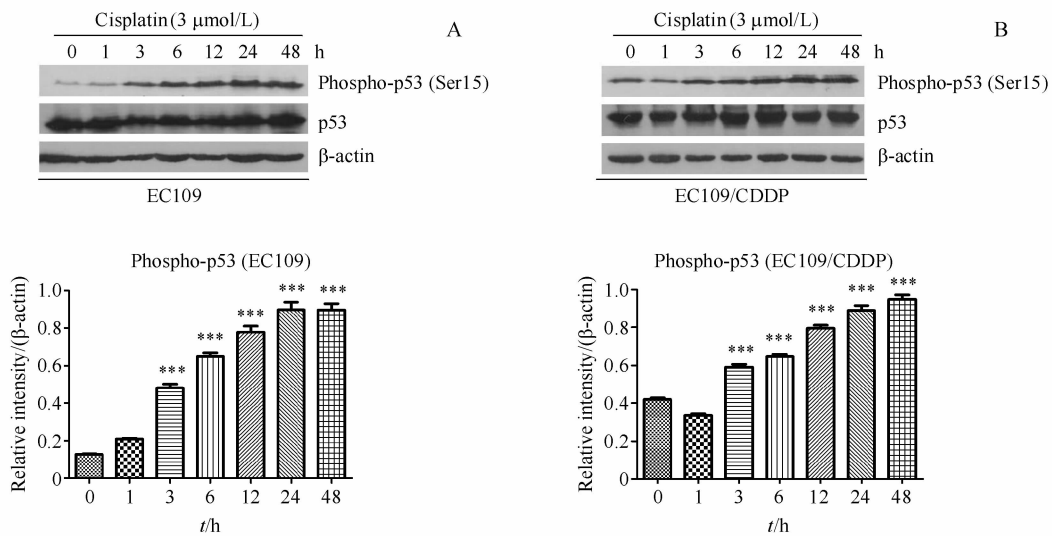


Figure 2 Phosphorylation of p53 at Serine 15 in EC109 (A) and EC109/CDDP (B) induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

*** $P < 0.001$ vs 0 h group

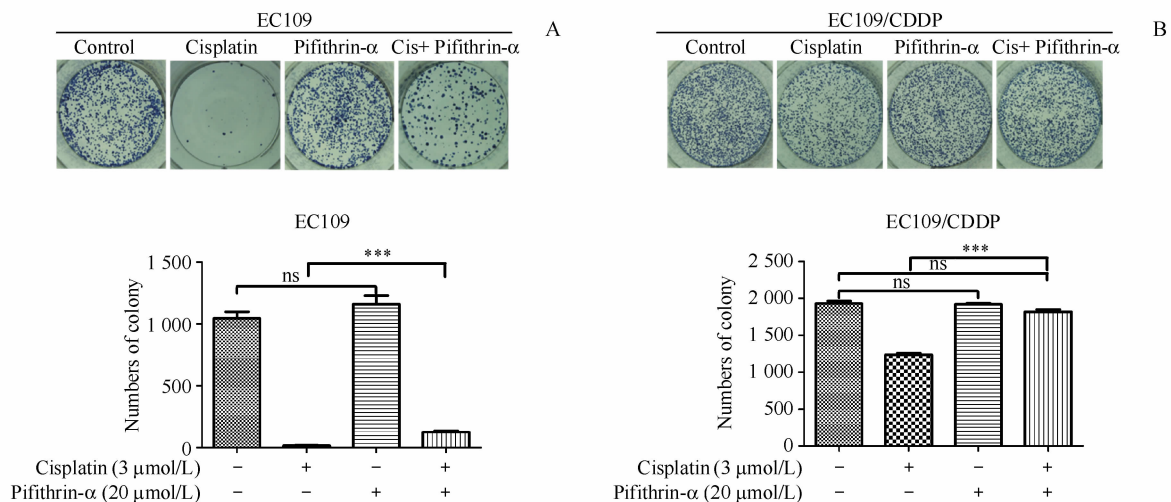


Figure 3 Ability of EC109 (A) and EC109/CDDP (B) cells to recover after treatment of cisplatin or Pifithrin- α or cisplatin combination with Pifithrin- α was assessed with colony formation assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

*** $P < 0.001$. ns; no significant difference

4 讨 论

人食管癌顺铂耐药细胞株 EC109/CDDP 是一株对顺铂、卡铂、氟尿嘧啶、紫杉醇、长春瑞滨、伊利替康和依托泊苷多药耐药的稳定人食管癌细胞株, 耐药倍数从 1.0 至 4 609 倍不等^[8], 可用于细胞毒性和耐药性产生机制的研究。

本研究在前期研究^[4]的基础上, 选用 3 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂做进一步的研究。实验结果表明, 6 孔板铺板、细胞数为每孔 3 000 个、细胞对顺铂比较敏感, 药物的抑制作用体现得更明显。而细胞活力实验得出, 96 孔板铺板, 细胞数为每孔 2 000 个, 在细胞呈聚集生长的状态下, 顺铂也能达到约 10% 的抑制率。

顺铂与 DNA 嘌呤碱基亲核的 N7 位结合形成链内和链间的交叉联接, 从而破坏 DNA 的结构和功能^[9]。DNA 损伤会引起 p53 蛋白发生翻译后修饰, 如磷酸化和乙酰化, 进而介导促凋亡蛋白 Bax 和 PUMA 表达升高, 诱导凋亡发生^[10]。本研究进一步检测了 p53 蛋白的活化情况。研究发现, 顺铂促进耐药细胞 EC109/CDDP 及其亲代细胞 EC109 的 p53 蛋白发生 Ser15 位的磷酸化, 激活了 p53。在 p53 翻译后修饰中, 磷酸化是 p53 稳定的第 1 个关键步骤, 而其中 N 端丝氨酸 15 位的磷酸化通过抑制 p53 与 Mdm2 的相互作用从而稳固 p53。DNA 损伤能够诱导 p53 蛋白 N 端丝氨酸 15 位发生磷酸化^[11–14]。耐药细胞与敏感细胞 p53 磷酸化情况没有显著差异, 即 p53 的磷酸化水平在耐药细胞和敏感细胞都一致。本研究结果证实了顺铂通过激活 p53 通路抑制人食管癌细胞的存活, 发挥其抗肿瘤作用。

本研究通过克隆存活实验检测顺铂处理后人食管癌细胞的克隆存活能力。顺铂联用 p53 抑制剂 Pifithrin- α 后, 耐药食管癌细胞 EC109/CDDP 细胞的克隆存活与对照相比没有显著差异, 而敏感细胞 EC109 细胞的克隆存活与对照仍有显著差异, 提示耐药细胞主要依赖 p53 信号通路介导顺铂的作用, 而在敏感细胞中, 除了 p53 外还有其他通路参与介导顺铂的作用。因此在耐药细胞中缺失哪些通路, 激活 p53 通路是否增强顺铂在耐药细胞的抗肿瘤作用值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Center MM, Santis CD, et al. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, **19**(8): 1893–1907.
- [2] Mezencev R. Interaction of cisplatin with non-DNA targets and their influence on anticancer activity and drug toxicity: the complex world of the platinum complex [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2015, **14**(9): 794–816.
- [3] Yu L, Chen MH, Li ZJ, et al. Celecoxib antagonizes the cytotoxicity of cisplatin in human esophageal squamous cell carcinoma cells by reducing intracellular cisplatin accumulation [J]. *Mol Pharmacol*, 2011, **79**(3): 608–617.
- [4] Yu L, Gu CP, Zhong DS, et al. Induction of autophagy counteracts the anticancer effect of cisplatin in human esophageal cancer cells with acquired drug resistance [J]. *Cancer Lett*, 2014, **355**(2014): 34–45.
- [5] Marcel V, Catez F, Diaz JJ. p53, a translational regulator: contribution to its tumor-suppressor activity [J]. *Oncogene*, 2015, **34**(44): 5513–5523.
- [6] Wen J, Zheng B, Hu Y, et al. Establishment and biological analysis of the EC109/CDDP multidrug-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell line [J]. *Oncol Rep*, 2009, **22**(1): 65–71.
- [7] Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis [J]. *Trends Mol Med*, 2010, **16**(11): 528–536.
- [8] Wen J, Zheng B, Hu Y, et al. Establishment and biological analysis of the EC109/CDDP multidrug-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell line [J]. *Oncol Rep*, 2009, **22**(1): 65–71.
- [9] Rebillard A, Lagadic-Gossman D, Dimanche-Boitrel MT. Cisplatin cytotoxicity: DNA and plasma membrane targets [J]. *Curr Med Chem*, 2008, **15**(26): 2656–2663.
- [10] Kim CW, Lu JN, Go S, et al. p53 restoration can overcome cisplatin resistance through inhibition of Akt as well as induction of Bax [J]. *Int J Oncol*, 2013, **43**(0): 1495–1502.
- [11] Speidel D. The role of DNA damage responses in p53 biology [J]. *Arch Toxicol*, 2015, **89**(4): 501–517.
- [12] Wu Y, Lin JC, Piluso LG, et al. Phosphorylation of p53 by TAF1 inactivates p53-dependent transcription in the DNA damage response [J]. *Mol Cell*, 2014, **53**(1): 63–74.
- [13] Tollini LA, Jin A, Park J, et al. Regulation of p53 by Mdm2 E3 ligase function is dispensable in embryogenesis and development, but essential in response to DNA damage [J]. *Cancer cell*, 2014, **26**(2): 235–247.
- [14] Shieh SY, Ahn J, Tamai K, et al. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites [J]. *Genes Dev*, 2000, **14**(3): 289–300.