科学通报 2012 年 第 57 卷 第 7 期：529 ~ 533
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

Nutlin-3a 可降低野生型 p53 肿瘤细胞对紫杉醇的敏感性

申洪昌, 董伟, 高东伟, 王光辉, 马国元, 刘奇*, 杜贾军*

山东大学附属山东省立医院胸外科, 济南 250021
* 联系人, E-mail: dujiajun66@tom.com; liuqi66@sdu.edu.cn

2011-04-14 收稿, 2011-07-27 接受
国家高技术研究发展计划(2007AA021802)和山东省自然科学基金(ZR2010HM067, ZR2011HM077)资助

摘要 p53 通路在细胞周期停滞和细胞凋亡中起重要作用. p53 的下降可增加肿瘤细胞对化疗或放疗的耐药性. 小鼠双微蛋白 2 (murine double minute 2, MDM2)可与 p53 结合, 调节其转录活性和稳定性. 本研究旨在观察 MDM2 拮抗剂 Nutlin-3a 在非小细胞肺癌野生型 p53+/+ A549 细胞及 p53–/– H1299 细胞对紫杉醇的反应中的作用. 研究发现, Nutlin-3a 联合紫杉醇可使 A549 细胞 G0-G1 和 G2-M 期明显增多, S 期显著减少; 凋亡百分率显著低于单紫杉醇处理组与 p53–/–的 H1299 细胞组. 总之, Nutlin-3a 联合紫杉醇大大减少了野生型 p53+/+的 A549 细胞对紫杉醇的敏感性, Nutlin-3a 对紫杉醇毒性的调控依赖于 p53 的状态, 它可以保护野生型 p53 细胞免受有丝分裂抑制药物紫杉醇的杀伤.

关键词
非小细胞肺癌
p53
MDM2 拮抗剂
紫杉醇

肺癌是世界上癌症相关死亡的首要原因, 因肺癌死亡的人数每年超过 118 万[1]. 由于 65%的肺癌患者诊断时已是中晚期, 并且约 80%的肺癌为非小细胞癌(non-small cell carcinomas, NSCLC), 化疗是主要的治疗方法. 然而, 非小细胞肺癌更易产生化疗耐药[2,3]. 因此, 开发新的高效的化疗增敏剂迫在眉睫.

p53 途径在细胞周期停滞和细胞凋亡中起重要作用. p53 网络的缺陷被认为与许多肿瘤的发生相关[4,5], 相反, p53 途径的恢复会引起肿瘤细胞凋亡. 此外, 降低 p53 的水平已被证明可以增加细胞对化疗或放疗的耐受[6,7]. 因此, p53 是一个寻找新的抗癌治疗策略的有吸引力的靶点. 小鼠双微蛋白 2 (murine double minute 2, MDM2)是主要的 p53 的负调控因子[8], 是一种 E3 泛素连接酶, 将 p53 转运到细胞质, 促进 p53 的泛素化和降解. 在增殖细胞中, p53 的表达严格受 MDM2 调控, 通过结合 p53 而调节其转录活性和稳定性[9~11], MDM2 和 p53 形成一个负反馈环路[12]. 因此, 可通过抑制 MDM2 从而激活 p53 途径.

最近发现, MDM2 的小分子抑制剂 Nutlins 可与 MDM2 高亲和力结合, 阻断 MDM2-p53 环路[13~15]. Nutlins 可激活野生型细胞的 p53 通路, 使细胞周期停滞和细胞凋亡. Nutlin-3a 可提高 H460 和 Val138 细胞的放射敏感度[16], 增加某些化疗药物敏感性, 如顺铂、依托泊苷[17]. 然而, 有研究发现, Nutlins 可以保护非恶性细胞和组织[18,19]. Nutlin-3a 是否增加或降低常用化疗药物紫杉醇对野生型 *p53* 和 *p53* 基因缺陷的肿瘤细胞的敏感性, 目前不是很清楚.

本研究明确了 NSCLC 细胞 A549 和 H1299 中 Nutlin-3a 对常用化疗药物紫杉醇的作用, 对肺癌基础研究及临床研究具指导作用.

1 材料与方法

(ⅰ) 细胞培养. 人肺腺癌 A549 细胞在含 10% 胎牛血清(fetal calf serum, FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA)的 RPMI-1640 培养液(Gibco)中, 37℃, 5% CO_2 条件下常规培养. H1299 细胞在含 10% FBS 的

英文版见: Shen H C, Dong W, Gao D W, et al. MDM2 antagonist Nutlin-3a protects wild-type p53 cancer cells from paclitaxel. Chin Sci Bull, 2012, 57, doi: 10.1007/s11434-012-4984-7

DMEM 培养液(HyClone, Logan, UT, USA)中, 37℃, 5% CO_2 条件下培养.

(ⅱ) 试剂. 将 20 mg/mL Nutlin-3a (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)溶解于二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO), –20℃保存. 紫杉醇购自海南顺园化学技术有限公司, –20℃保存. MDM2 抗体(SMP14)与 p53 抗体(DO-1)购自 Santa Cruz 生物技术公司(Santa Cruz, CA, USA), β-actin (AC-15)抗体购自 Sigma 公司.

(ⅲ) Western blot. 细胞常规培养于 10% FBS 的培养液中, 分别用 10 μmol/L Nutlin-3a, 10 nmol/L 紫杉醇, 以及 10 μmol/L Nutlin-3a 联合 10 nmol/L 紫杉醇处理细胞 8 h 后, 使用蛋白裂解液(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取细胞总蛋白. 蛋白样品均匀点样于 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)上, 100 V 电泳 2 h, 随后 100 V 转膜 1 h, 转至硝酸纤维素膜(nitrocellulose, NC; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)上. NC 膜与一抗按以下比例在 4℃孵育过夜: p53 (1∶500; Santa Cruz Biotechnology), MDM2 (1∶500; Santa Cruz Biotechnology)和β-actin (AC-15, Sigma-Aldrich). 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗后, 同辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠二抗(1∶2000, Sigma-Aldrich)常温孵育 1 h. 经 PBS 充分清洗后, 使用 ECL 化学发光免疫蛋白检测剂(Amersham Biosciences)检测蛋白表达. 蛋白表达量用目标蛋白与内参β-actin 光密度值的比值表示.

(ⅳ) 细胞周期检测. A549 和 H1299 细胞分别用 DMSO (对照), 5 μmol/L Nutlin-3a, 10 nmol/L 紫杉醇以及 5 μmol/L Nutlin-3a 联合 10 nmol/L 紫杉醇处理 48 h. 然后, 采用 0.25%胰蛋白酶(Gibco)收获细胞, 并用 0.01 mol/L PBS 清洗 2 次, 2000 r/min 离心 5 min 后, 用 PBS 重悬浮细胞, 用冰冷酒精(70%, v/v)于 4°C 固定过夜. 然后, 加入 1 mL 碘化丙啶复合液(propidium iodide, PI; 50 μg/mL PI, 100 μg/mL RNAase A, 10 mmol/L EDTA, 0.5% Triton X-100) (Sigma-Aldrich), 于 4℃暗室中, 细胞染色 30 min. 采用 FACScan 流式细胞仪(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)上样检测, 采用 ModFit 和 CellQuEST 软件(Becton, Dickinson and Company)分析细胞周期的分布.

(ⅴ) 细胞凋亡检测. 细胞分别用 DMSO (对照), 5 μmol/L Nutlin-3a, 10 nmol/L 紫杉醇以及 5 μmol/L Nutlin-3a 联合 10 nmol/L 紫杉醇处理 48 h. 随后, 0.25%胰蛋白酶收获细胞, 并用 0.01 mol/L PBS 清洗 2 次. 在 2000 r/min 离心 5 min 后, 用 Flow Cytometry Buffer (Sigma-Aldrich)重悬浮细胞, 并调整细胞浓度至 1×10^6 个/mL. 在 100 μL 细胞混悬液中, 加入 5 μL AnnexinV/FITC (Sigma-Aldrich)与 10 μL PI, 在暗室处理 15 min. 上样检测, 细胞凋亡用 WinMDI2.9 软件(Becton, Dickinson and Company)分析.

(ⅵ) MTT 检测. 本实验采用 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-zoliumbromide, Sigma)检测试剂, 定量比色检测细胞增殖与生存情况. 将细胞按 3×10^3 个/孔接种至 96 孔板(Costar, Corning, NY, USA), 常规培养 24 h. 随后, 加入不同浓度的紫杉醇(0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 nmol/L)和 Nutlin-3a (0, 5, 10, 15 μmol/L)处理细胞 72 h; 以及加入 10 nmol/L 紫杉醇和(或)5 μmol/L Nutlin-3a, 在不同时间(0, 24, 48, 72 h)处理细胞. 实验设阴性对照及 DMSO 对照组. 处理完毕后, 每孔加入 20 μL MTT, 37℃孵育 4 h; 轻轻吸取培养液, 每孔加入 150 μL DMSO; 室温震荡 15 min, 随后在 490 nm 波长下读取吸光值.

(ⅶ) 统计学方法. 数据用均值±标准差表示. 组间数据用 Levene test 检测方差齐性, 随后, 采用多因素方差分析及 Student-Newman-Keuls multiple comparisons test (q test)比较组间差异. 所有统计分析均采用 SPSS13.0 统计软件(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)完成, $P<0.05$ 被认为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 p53 和 MDM2 蛋白表达情况

p53 和 MDM2 蛋白的表达情况如图 1 所示. p53 在 A549 细胞中有表达, 但在 H1299 细胞中无表达; MDM2 在 A549 及 H1299 细胞均有表达. 当用 Nutlin-3a 处理细胞时, A549 细胞的 p53 及 MDM2 表达增加, 而 H1299 细胞无明显改变. 当单独用 Nutlin-3a 或者紫杉醇处理细胞时, p53 及 MDM2 的表达仅有轻微的增加, 但是当两者联合处理时, 有显著增加; 在 H1299 细胞中, p53 及 MDM2 的表达几乎没有改变.

2.2 Nutlin-3a 与紫杉醇对 A549 细胞周期的影响

细胞周期分布如图 2(a)所示, Nutlin-3a 处理的

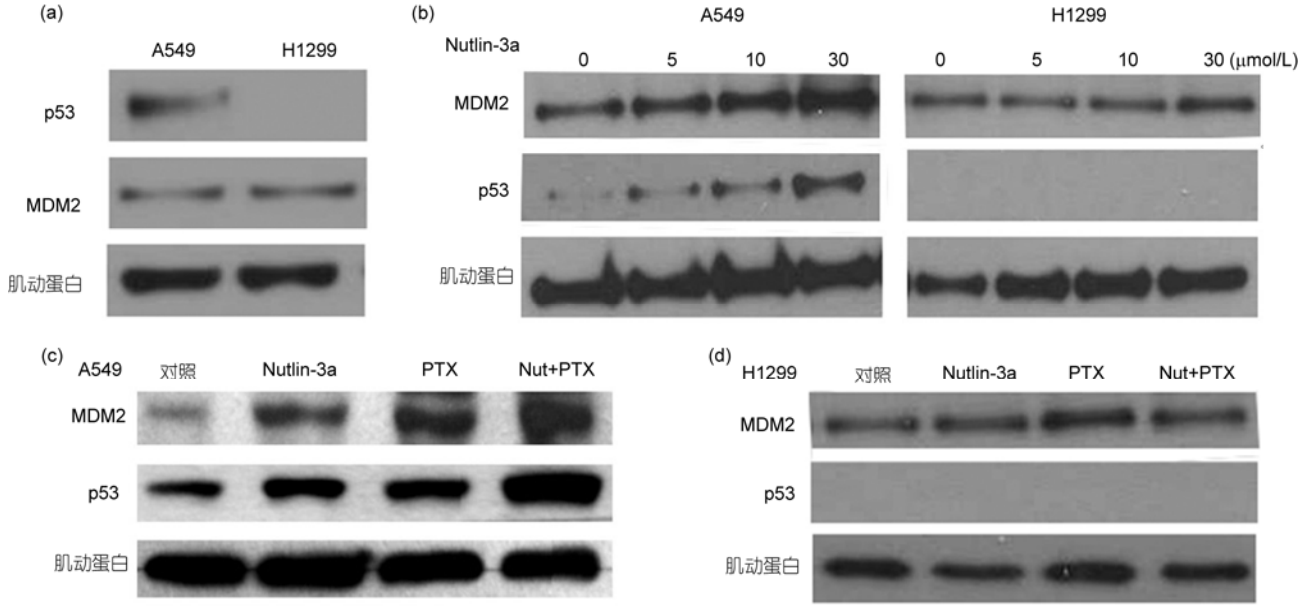

图 1　p53 与 MDM2 蛋白在 A549 与 H1299 细胞中的表达

(a) Western blot 检测 p53 与 MDM2 蛋白的表达. (b) 不同浓度(0, 5, 10, 30 μmol/L)的 Nutlin-3a 对 A549 和 H1299 细胞 p53 与 MDM2 蛋白表达的影响. (c), (d) A549 与 H1299 细胞分组于 25 cm^2 培养瓶中, 培养 8 h. 从左至右依次为: 对照组; 10 μmol/L Nutlin-3a; 10 nmol/L 紫杉醇; 10 μmol/L Nutlin-3a 联合 10 nmol/L 紫杉醇. PTX, 紫杉醇; Nut, Nutlin-3a

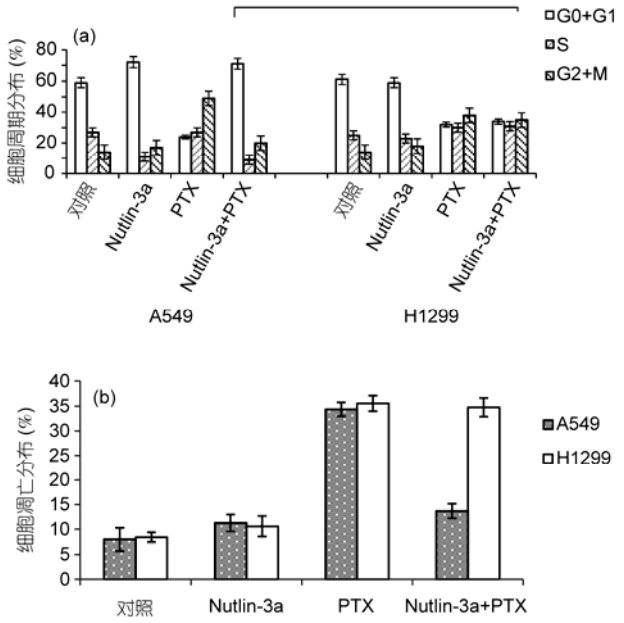

图 2　细胞周期分布及凋亡率检测

(a) Nutlin-3a 与紫杉醇对细胞周期的影响. 细胞分组处理 24 h: DMSO (对照组), 5 μmol/L Nutlin-3a, 10 nmol/L 紫杉醇以及 5 μmol/L Nutlin-3a 联合 10 nmol/L 紫杉醇. 细胞周期分布采用流式细胞仪检测. (b) 细胞凋亡检测. 将 A549 细胞分为 4 组: 对照组, 5 μmol/L Nutlin-3a, 10 nmol/L 紫杉醇以及 5 μmol/L Nutlin-3a 联合 10 nmol/L 紫杉醇, 处理 48 h 后, 细胞凋亡情况用流式细胞仪检测. * $P<0.05$

A549 细胞, 处于 S 期的比例(11.4%, 对照为 27%)下降, G0-G1 期的比例(72.1%, 对照为 59%)显著增加, G2-M 期仅有轻微的改变; Nutlin-3a 联合紫杉醇共同处理的 A549 细胞, 处于 G0-G1 期(71.7%)与 G2-M 期(20.9%)的细胞显著增加, S 期细胞所占比例(7.4%)显著降低. 相反, 在 H1299 细胞中, Nutlin-3a 和(或)紫杉醇对细胞周期的分布几乎无影响.

2.3　Nutlin-3a 降低紫杉醇诱导的野生型 p53 细胞凋亡

在 10 μmol/L Nutlin-3a 联合 10 nmol/L 紫杉醇处理后, A549 凋亡细胞的百分比为 13.7±1.67%, 显著低于 H1299 细胞(34.8±3.52%), $P<0.05$, 如图 2(b)所示.

2.4　Nutlin-3a 降低野生型 p53 细胞对紫杉醇的敏感性

如图 3 所示, 细胞暴露于不同浓度的紫杉醇和(或)Nutlin-3a 72 h 后, Nutlin-3a 联合紫杉醇组显著减低 A549 细胞对紫杉醇的敏感性, 同 H1299 细胞相比, 差异有统计学意义($P<0.05$). 另外, Nutlin-3a 预处理细胞 24 h, 10 nmol/L 紫杉醇处理 24, 48 和 72 h 后,

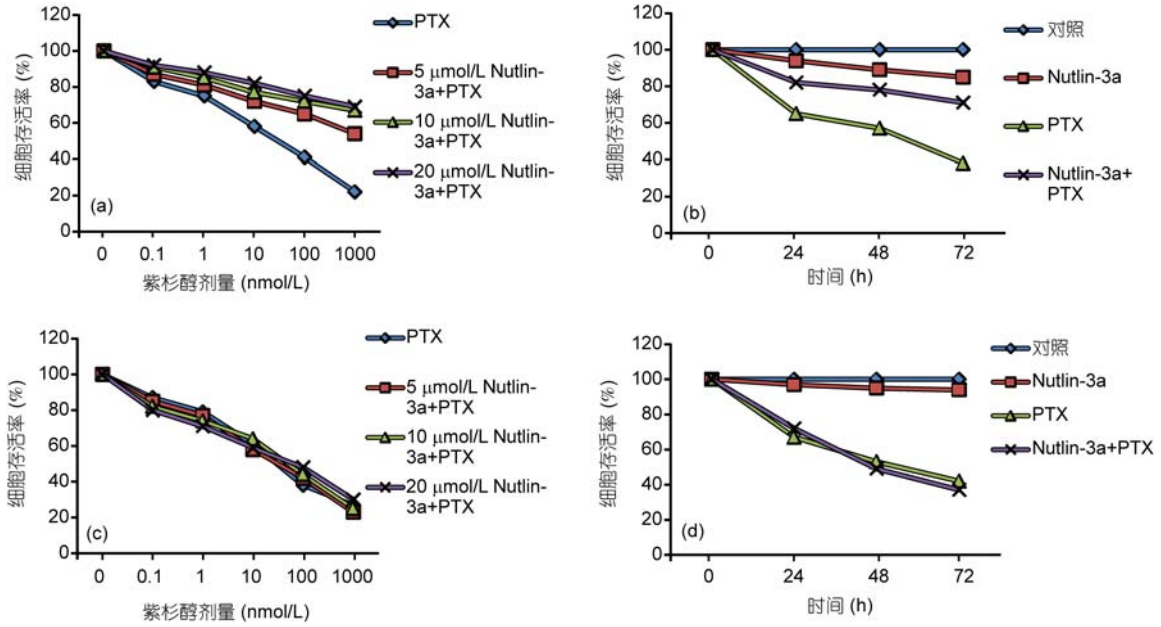

图 3 MTT 法检测细胞生存率

(a), (c) 不同浓度的紫杉醇和(或)5, 10 和 20 μmol/L Nutlin-3a 分别处理 A549 与 H1299 细胞后, 对细胞生存率的影响. Nutlin-3a 保护 A549 细胞免受紫杉醇的细胞毒作用, 同 H1299 相比, 差异有统计学意义($P<0.05$). (b), (d) 10 μmol/L Nutlin-3a 预处理细胞 24 h, 再用紫杉醇处理 24, 48 和 72 h 后, 细胞生存率的变化

Nutlin-3a 也显示出保护 A549 细胞免受紫杉醇细胞毒性的作用.

3 讨论

化疗是多数非小细胞肺癌患者的主要治疗方法, 但是化疗副作用明显, 且剂量相关, 如可引起血液学毒性、胃肠道反应、第二原发癌及药物过敏等, 迫切需要开发化疗增敏剂来降低化疗药物的使用量, 减少化疗副作用. 然而, 选择增敏剂时需谨慎, 针对不同化疗药物、患者的不同情况选择特异的增敏剂, 才能达到个体化治疗的目的. 否则, 可能适得其反.

p53 作为抑癌基因参与了多种生物过程的基因调控, 如细胞衰老、细胞周期停滞以及凋亡等[20]. *p53* 在转录依赖的、或非转录依赖的肿瘤形成中扮演重要角色, 其主要功能是转录激活 p21, 进而激活细胞周期 G1-S 与 G2-M 期的检查点[21]. *p53* 也可通过直接激活 Bax 或 Bak, 或者同 Bcl-2 或 Bcl-XL 结合, 使线粒体外膜通透性增加, 从而诱发凋亡. 野生型 p53 存在于大多数非小细胞肺癌中[22], 有可能成为一个潜在有效的治疗靶点.

作为肿瘤发生发展的重要调节因子, MDM2 可抑制野生型 p53 的表达[23,24], 这使得在非小细胞肺癌中, 通过抑制 MDM2 来增强 p53 的功能成为可能. MDM2 与 p53 形成一个负反馈环路, 该环路对肿瘤发生发展起重要作用. 如果我们用 Nutlin-3a 干扰该环路, 肿瘤细胞将会发生凋亡. 研究表明, Nutlin-3a 是一个有效的诱导细胞凋亡及周期停滞的药物, 并且还可增加非小细胞肺癌细胞系 H460 与 Val138 的放射敏感性[16], 以及增强某些化疗药物的敏感性, 如顺铂、依托波苷等[17]. 对于临床常用的紫杉醇, Nutlin-3a 是否为有效的化疗增敏剂, 目前相关研究很少.

本研究检测了紫杉醇或紫杉醇联合 Nutlin-3a 对 MDM2 与 p53 蛋白在 A549 与 H1299 细胞中表达的影响. 研究发现, 表达野生型 p53 的 A549 细胞, 在紫杉醇联合 Nutlin-3a 处理后, MDM2 与 p53 蛋白有显著增加. 但是, 在 p53 缺失的 H1299 细胞中, 则无明显变化. 这些结果表明, Nutlin-3a 能有效抑制 MDM2 活性, 增强 p53 的功能, 并且在野生型 p53 细胞中, Nutlin-3a 同紫杉醇在细胞周期阻滞方面有协同作用.

紫杉醇是细胞周期依赖的化疗药物, 对分裂期的细胞有效. 在本实验中, Nutlin-3a 处理的 A549 细

胞在 G0-G1 期明显增多; Nutlin-3a 联合紫杉醇使得 G0-G1 及 G2-M 期的细胞明显增多, S 期细胞明显减少. Nutlin-3a 可使细胞周期停滞在 G0-G1 及 G2-M 期, 因此, Nutlin-3a 可保护野生型 p53 细胞免受紫杉醇的细胞毒作用, 但却对 p53 缺失的 H1299 细胞无作用. 细胞增殖实验也表明, Nutlin-3a 可减低野生型 p53 细胞对紫杉醇细胞毒作用的敏感性, 但却对 p53 缺失的 H1299 细胞无影响. 总之, Nutlin-3a 可干扰 MDM2-p53 的反馈环路, 影响下游基因的表达, 如 *p21*, *BCL-2*, *BAX* 等, 使细胞周期停滞在 G0-G1 与 G2-M 期, 该期细胞对分裂期的化疗药物如紫杉醇是不敏感的. 因此, 分裂期化疗药物联合 Nutlin-3a 治疗野生型 p53 的癌症并非明智的选择. 相反, 该联合对 p53 缺失的肿瘤是有益的.

总之, Nutlin-3a 介导的紫杉醇的细胞毒作用, 依赖于 p53 的状态. 对于野生型的 p53 细胞, Nutlin-3a 降低了分裂期细胞毒化疗药物的敏感性. 在选择化疗辅助药物时应足够谨慎, 真正实现个体化治疗.

参考文献

1 Parkin D M, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, 2005, 55: 74–108

2 Paredes L A, Blanco G C, Echenique E M, et al. Expression of proteins associated with multidrug resistance and resistance to chemotherapy in lung cancer. Arch Bronconeumol, 2007, 43: 479–484

3 Sörenson S, Glimelius B, Nygren P, et al. A systematic overview of chemotherapy effects in non-small cell lung cancer. Acta Oncol, 2001, 40: 327–339

4 Lowe S W, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. Nature, 2004, 432: 307–315

5 Vogelstein B, Lane D, Levine A J. Surfing the p53 network. Nature, 2000, 408: 307–310

6 Oliner J D, Kinzler K W, Meltzer P S, et al. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. Nature, 1992, 6381: 80–83

7 Vogelstein B, Kinzler K W. p53 function and dysfunction. Cell, 1992, 4: 523–526

8 Bond G L, Hu W, Levine A J. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. Curr Cancer Drug Targets, 2005, 5: 3–8

9 Oliner J D, Pietenpol J A, Thiagalingam S, et al. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. Nature, 1993, 362: 857–860

10 Freedman D A, Wu L, Levine A J. Functions of the *MDM2* oncoprotein. Cell Mol Life Sci, 1999, 55: 96–107

11 Momand J, Jung D, Wilczynski S, et al. The *MDM2* gene amplification database. Nucleic Acids Res, 1998, 26: 3453–3459

12 Michael D, Oren M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. Semin Cancer Biol, 2003, 13: 49–58

13 Espinoza-Fonseca L M. Targeting MDM2 by the small molecule RITA: Towards the development of new multi-target drugs against cancer. Theor Biol Med Model, 2005, 2: 1–6

14 Fry D C, Graves B, Vassilev L T. Development of E3-substrate (MDM2-p53) binding inhibitors: Structural aspects. Methods Enzymol, 2005, 399: 622–633

15 Fry D C, Vassilev L T. Targeting protein-protein interactions for cancer therapy. J Mol Med, 2005, 83: 955–963

16 Cao C, Shinohara E T, Subhawong T K, et al. Radiosensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. Mol Cancer Ther, 2006, 5: 411–417

17 Barbieri E, Mehta P, Chen Z, et al. MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. Mol Cancer Ther, 2006, 5: 2358–2365

18 Jiang M, Pabla N, Murphy R F, et al. Nutlin-3 protects kidney cells during cisplatin therapy by suppressing Bax/Bak activation. J Biol Chem, 2007, 282: 2636–2645

19 Carvajal D, Tovar C, Yang H, et al. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. Cancer Res, 2005, 65: 1918–1924

20 Harris S L, Levine A J. The p53 pathway: Positive and negative feedback loops. Oncogene, 2005, 24: 2899–2908

21 Iliakis G, Wang Y, Guan J, et al. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. Oncogene, 2003, 22: 5834–5847

22 Dworakowska D, Gózdz S, Jassem E, et al. Prognostic relevance of proliferating cell nuclear antigen and p53 expression in non-small cell lung cancer. Lung Cancer, 2002, 35: 35–41

23 Shangary S, Wang S. Targeting the MDM2-p53 interaction for cancer therapy. Clin Cancer Res, 2008, 14: 5318–5324

24 Patel S, Player M R. Small-molecule inhibitors of the p53-HDM2 interaction for the treatment of cancer. Expert Opin Investig Drugs, 2008, 17: 1865–1882