

GW843682X 对鼻咽癌细胞中 PLK1 和 p53 表达的影响

宋启斌, 褚玉新, 胡伟国

(武汉大学人民医院, 湖北 武汉 430060)

摘要: [目的] 研究 Polo 样激酶(PLK)抑制剂 GW843682X 对鼻咽癌 5-8F 细胞中 PLK1 和 p53 表达水平的影响。[方法] 用不同浓度的 GW843682X 处理鼻咽癌 5-8F 细胞, 在不同时间点倒置显微镜下观察细胞形态, RT-PCR 及 Western blot 分别检测 PLK1 和 p53 的 mRNA 和蛋白表达水平的变化。[结果] GW843682X 能够显著抑制 5-8F 细胞的增殖, 呈剂量和时间依赖性。RT-PCR 结果表明 GW843682X 可下调 PLK1 和 p53 的 mRNA 表达水平。Western blot 结果显示 GW843682X 降低 PLK1 和 p53 的蛋白表达水平。[结论] GW843682X 抑制鼻咽癌 5-8F 细胞中 PLK1 和 p53 的表达。

关键词: GW843682X; 鼻咽肿瘤; Polo 样激酶(PLK); p53

中图分类号: R73-3; R739.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)07-0533-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.07.B001

Effect of GW843682X on PLK1 and p53 Expression in Nasopharyngeal Carcinoma Cells

SONG Qi-bin, CHU Yu-xin, HU Wei-guo

(Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of polo-like kinase(PLK) inhibitor GW843682X on PLK1 and p53 expression in nasopharyngeal carcinoma cell lines 5-8F. [Methods] Nasopharyngeal carcinoma 5-8F cells were treated with different concentrations of GW843682X. At different time points, cellular morphology was observed under inverted microscope. RT-PCR and Western blot were used to detect mRNA and protein expression of PLK1 and p53. [Results] GW843682X remarkably inhibited the proliferation of 5-8F cells in a dose-dependent and time-dependent manner with obvious morphologic changes. The results of RT-PCR indicated that GW843682X down-regulated the mRNA level of PLK1 and p53. The results of Western blot showed that GW843682X suppressed the protein level of PLK1 and p53. [Conclusion] GW843682X might inhibit PLK1 and p53 expression in 5-8F cell lines.

Subject words: GW843682X; nasopharyngeal neoplasms; polo-like kinase(PLK); p53

鼻咽癌是东南亚地区最常见的恶性肿瘤之一, 呈局部浸润性生长, 早期容易转移^[1]。鼻咽癌患者一旦转移或复发, 预后很差。因此深入了解鼻咽癌的发生机制, 以寻求更好的生物标志物用于鼻咽癌的早期诊断, 找出新的靶点用于鼻咽癌的治疗是目前亟待解决的问题。

细胞周期与肿瘤的关系是近年来生命科学研究中的热门课题之一, 目前的研究认为肿瘤是一类细

胞周期性疾病。Polo 样激酶(polo-like kinases, PLK)是广泛存在于真核生物中的一类高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶, 在很多肿瘤中高度表达。PLK1 在细胞有丝分裂的启动, 中心体成熟, 双极形成和分离, 有丝分裂中期到后期的过渡, 细胞质分离, 基因组稳定性的维持等方面发挥重要作用^[2]。PLK1 的表达以及高活性与癌细胞增殖密切相关。有研究显示, PLK1 在多种肿瘤中过度表达, 包括肺癌、乳腺癌、结肠癌、胰腺癌、前列腺癌、卵巢癌等, PLK1 高表达的患者一般预后较差^[3]。近些年来, 小分子 PLK 抑制剂用于诱导癌细胞凋亡, 阻滞癌细胞分裂, 产生抗肿瘤活性^[4]。

基金项目: 国家自然科学基金资助 (81372407)

通讯作者: 褚玉新, 技师, 硕士; 武汉大学人民医院肿瘤中心, 湖北省武汉市武昌区张之洞路 99 号 (430060); E-mail: 347952582@qq.com

收稿日期: 2014-02-07; **修回日期:** 2014-04-21

本实验主要研究新型 PLK 抑制剂 GW843682X 对鼻咽癌 5-8F 细胞的抑制作用, 及其与凋亡蛋白 p53 的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

鼻咽癌 5-8F 细胞系来自武汉大学人民医院中心实验室。DMEM 培养基购自吉诺生物医药技术有限公司, 胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司。GW843682X 购自 Tocris Bioscience 公司 (Catalog No. 2977)。

1.2 方法

1.2.1 GW843682X 抑制鼻咽癌 5-8F 细胞的时间效应观察

鼻咽癌 5-8F 细胞用含 10% 胎牛血清和双抗的 DMEM 培养基中, 5% CO₂, 37℃ 培养。将处于对数生长期的 5-8F 细胞 1×10⁶ cells 接种于单块培养皿中, 细胞贴壁后, 加入一定量的 GW843682X, 使药物在培养基中的终浓度为 500 nmol/L。分别于药物处理后 0、2、6、12、24 及 48 h 在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.2 GW843682X 抑制鼻咽癌 5-8F 细胞的剂量效应观察

将处于对数生长期的 5-8F 细胞按照 5×10⁵ cells/孔均等接种于 6 孔板中, 每孔培养基的体积均为 2 ml。将 1 μmol/L 的 GW843682X 按照不同体积加入各孔, 终浓度分别为 0、31.25、62.5、125、250、500 nmol/L; 药物作用 24 h 之后, 在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.3 RT-PCR

取 6 孔板, 将处于对数生长期的 5-8F 细胞按照 5×10⁵ cells/孔均等接种于 6 孔板中, 加入不同体积的 GW843682X 使药物浓度同上, 作用 24 h 之后, 收集细胞, 用 Invitrogen 公司的 Trizol 裂解细胞。用 Fermentas 公司的 RevertAid First strand cDNA synthesis 试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA。PCR 反应条件为: 95℃ 5 min 预变性; 95℃ 30 s 变性; 60℃ 30 s 退火; 68℃ 1 min 延伸, 循环 25 次。所得的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统下拍照记录实验结果。引物序列如下:

p53 F: 5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3';
p53 R: 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC-3';
PLK1 F: 5'-CCCCTCACAGTCCTCAATAA-3';
PLK1 R: 5'-TGTCCGAATAGTCCACCC-3';
β-actin F: 5'-GGCTACAGCTTCACCACCAC-3';
β-actin R: 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'。

1.2.4 Western blot

取 6 孔板, 将处于对数生长期的 5-8F 细胞按照 5×10⁵ cells/孔均等接种于 6 孔板中, 经 5 种不同浓度的 GW843682X 处理 24 h 之后, 收集细胞。用 PMSF 和 RIPA 裂解液按照 1:100 配置成工作液。按照 500 μl/孔加入裂解液, 冰上操作。12 000 r/min 离心 5 min 后取上清, 用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。将各管蛋白质样品经 100℃ 5 min 变性。取等量的蛋白质 80 μg 点样于 SDS-PAGE 胶中 (上层为 5% 的浓缩胶, 下层为 10% 的分离胶)。电泳分离之后, 再将蛋白质转移到 PVDF 膜上。将膜条浸泡于含 5% 的脱脂奶粉的 TBST (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) 中, 室温下摇床封闭 1 h。取出膜条, 用 TBST 稀释一抗 PLK1 (1:500), p53 (1:500), β-actin (1:1000), 4℃ 封闭过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。然后用 HRP 标记的二抗 (1:4000) 在室温下摇床 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min。向膜条上滴加 ECL 发光液, 到暗室中盖 X-光胶片, 曝光洗片。

1.3 统计学处理

采用 Image J 软件定量分析 RT-PCR 产物电泳条带和 Western blot 条带的灰度值。用 p53/β-actin 和 PLK1/β-actin 比值分别计算 p53 和 PLK1 的相对表达水平。SPSS 19.0 统计软件分析。两组之间的比较, 采用 Student's *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GW843682X 抑制鼻咽癌 5-8F 细胞生长的时间效应观察

以 0.5 μmol/L 的 GW843682X 处理鼻咽癌 5-8F 细胞之后, 随着时间的延长, 细胞逐渐肿胀, 贴壁性减弱, 悬浮, 碎裂, 凋亡 (Figure 1)。

2.2 GW843682X 抑制鼻咽癌 5-8F 细胞生长的剂量效应观察

GW843682X 处理鼻咽癌 5-8F 细胞 48 h 之后,

随着剂量的加大,越来越多的细胞出现肿胀,不贴壁,悬浮,凋亡,碎裂等形态变化(Figure 2)。

2.3 鼻咽癌 5-8F 细胞中 *PLK1* 和 *p53* 的 mRNA 水平
琼脂糖凝胶电泳及灰度分析结果显示,当

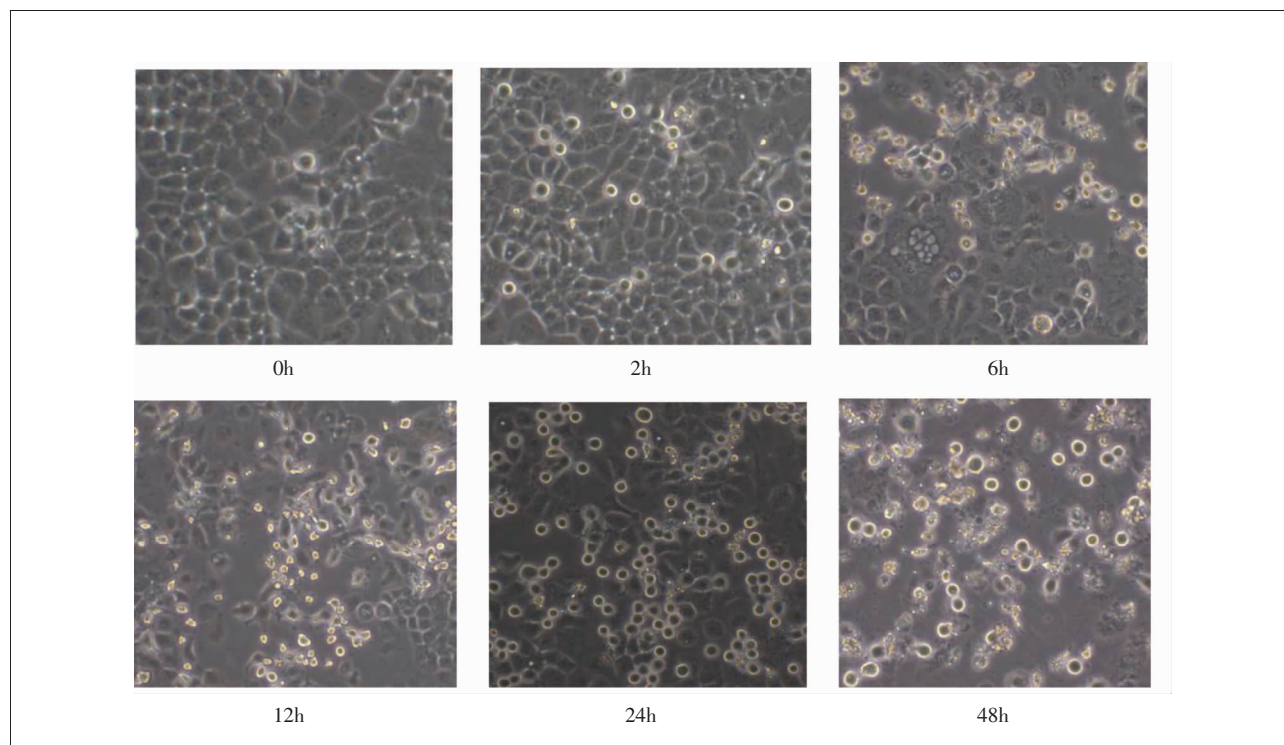


Figure 1 The proliferation of 5-8F cells was inhibited by GW843682X in a time-dependent manner

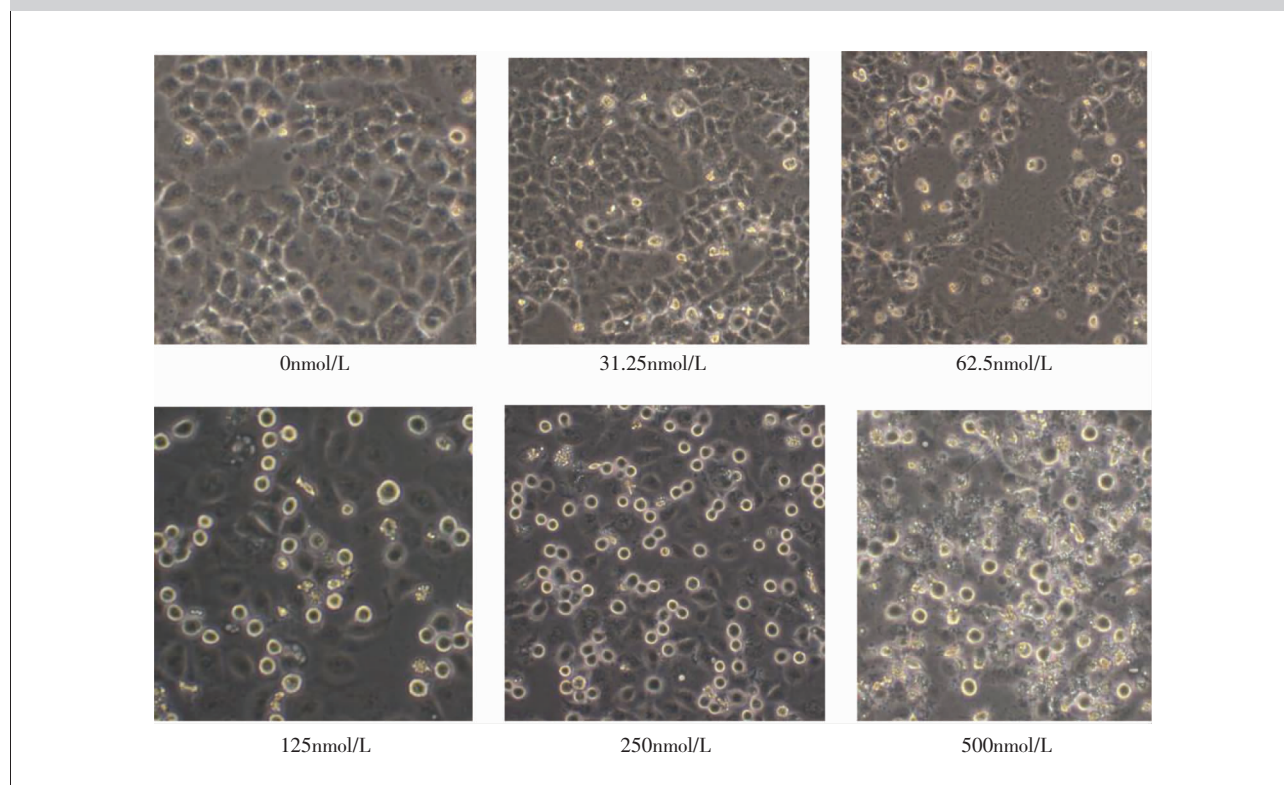


Figure 2 The proliferation of 5-8F cells was inhibited by GW843682X in a dose-dependent manner

GW843682X 的浓度在 0~62.5nmol/L 时,PLK1 和 p53 在 mRNA 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。而当 GW843682X 的浓度在 125~500nmol/L 时,随着 GW843682X 剂量的加大,5-8F 细胞中 PLK1 和 p53 的 mRNA 水平逐渐下降,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)(Figure 3,Table 1)。

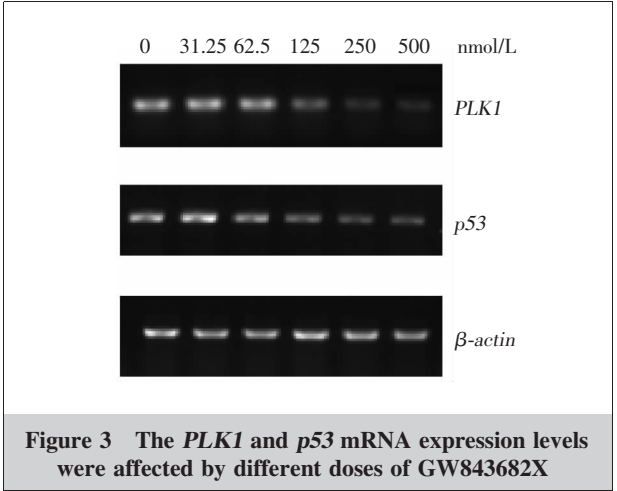


Figure 3 The PLK1 and p53 mRNA expression levels were affected by different doses of GW843682X

Table 1 Gray ratio analysis of PLK1 and p53 mRNA levels affected by different doses of GW843682X

GW843682X (ng/ml)	PLK1/ β -actin	p53/ β -actin
0	0.876	0.898
31.25	0.854	1.086
62.5	0.792	0.907
125	0.483	0.516
250	0.217	0.391
500	0.053	0.218

2.4 鼻咽癌 5-8F 细胞中 PLK1 和 p53 的蛋白水平
经 Image J 软件做灰度分析发现,当 GW843682X 浓度在 62.5~500nmol/L 时,随着 GW843682X 剂量的逐渐升高,5-8F 细胞中 PLK1 的蛋白水平逐渐下降,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。而 GW843682X 浓度在 125~500nmol/L 时,随着 GW843682X 剂量的逐渐升高,5-8F 细胞中 p53 的蛋白水平逐渐下降,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$)(Figure 4,Table 2)。

3 讨论

鼻咽癌是我国南方地区常见的头颈部恶性肿瘤,其 5 年生存率不到 70%^[5]。尽管随着放疗技术的进步,鼻咽癌的局部控制得到改善,然而,仍有 30%

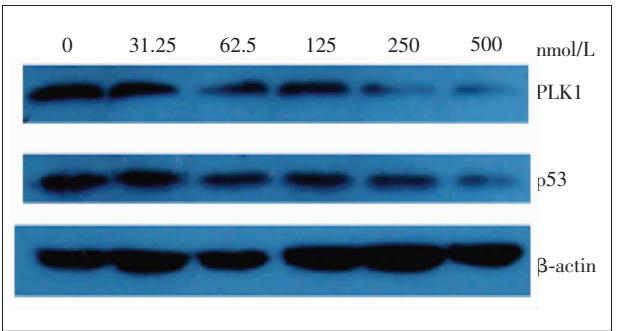


Figure 4 The PLK1 and p53 protein levels were affected by different doses of GW843682X

Table 2 Gray ratio analysis of PLK1 and p53 protein levels affected by different doses of GW843682X

GW843682X (ng/ml)	PLK1/ β -actin	p53/ β -actin
0	0.984	0.925
31.25	0.803	0.894
62.5	0.612	0.714
125	0.673	0.686
250	0.187	0.253
500	0.094	0.109

~40% 的患者会在 4 年内出现远处转移^[6],因此,深入研究鼻咽癌的发生机制,探索新的治疗方法非常必要。最近有研究报道指出 70% 的鼻咽癌患者过表达 PLK1,其高表达与鼻咽癌的复发关系密切。

PLK1 在细胞周期进程中发挥重要作用,尤其在有丝分裂 G₂~M 期。同时 PLK1 是丝/苏氨酸蛋白激酶,因此具有蛋白激酶的活性,PLK1 通过磷酸化被激活,同时也通过磷酸化下游底物而发挥作用。PLK1 可以对多种蛋白、蛋白激酶、细胞因子、酶类、癌基因、抑癌基因磷酸化,通过活化或抑制这些底物而调节细胞周期进程^[7]。PLK1 最新的研究发现,PLK1 有诱导 DNA 合成、DNA 完整性的检修以及防止细胞凋亡的作用。PLK1 还能通过磷酸化 p53 而抑制其转录活性,进而抑制 p53 发挥检验点蛋白和诱导细胞凋亡的功能^[8]。

近些年来,PLK1 抑制剂逐渐成为研究关注的焦点,主要包括 siRNA 干扰技术、小分子 PLK1 抑制剂 BI 2536、BI 6727、GSK461364、ON 019190.Na、HMN-214、ZK-thiazolidinone、NMS-1、CYC-800、DAP-81、LC-445 等^[4]。GW843682X 是近些年来新研发出的一种 PLK1 抑制剂,Spaniol 等^[9]报道 GW843682X 在小儿恶性肿瘤中发挥较强的抗癌活性。本实验研究 GW843682X 对鼻咽癌 5-8F 细胞的抑制作用,实

验结果表明 GW843682X 抑制 5-8F 细胞存在时间效应和剂量效应,随着作用时间的延长,剂量的加大,5-8F 细胞肿胀、凋亡、碎裂的形态逐渐明显。已有研究认为 PLK 与 p53 的关系复杂^[10]。Lin 等^[11]用 p21^{Waf1} 抑制 PLK1 之后,出现 p53 依赖的细胞凋亡。McKenzie 等^[12]研究发现 HCT116 肝癌细胞依赖 p53 抑制 PLK1 的表达。为了探究 GW843682X 抑制 5-8F 细胞生长可能的机制,本实验用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测了细胞中 PLK1 和 p53 在 mRNA 和蛋白水平的变化,以阐明细胞生长受抑制与 p53 的关系。我们的研究发现,GW843682X 在鼻咽癌 5-8F 细胞中不仅下调了 PLK1 的表达,同时也下调了 p53 的表达,GW843682X 可能以抑制 PLK1 和 p53 的方式抑制鼻咽癌 5-8F 细胞的增殖。

参考文献:

- [1] He ML, Luo MX, Lin MC, et al. MicroRNAs: potential diagnostic markers and therapeutic targets for EBV-associated nasopharyngeal carcinoma [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(1): 1-10.
- [2] Beria I, Bossi RT, Brasca MG, et al. NMS-P937, a 4,5-dihydro-1H-pyrazolo [4,3-h]quinazoline derivative as potent and selective Polo-like kinase 1 inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(10): 2969-2974.
- [3] Chopra P, Sethi G, Dastidar SG, et al. Polo-like kinase inhibitors; an emerging opportunity for cancer therapeutics [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(1): 27-43.
- [4] Patrick Schöffski P. Polo-like kinase (PLK) inhibitors in preclinical and early clinical development in oncology [J]. *Oncologist*, 2009, 14(6): 559-570.
- [5] Lee AW, Yau TK, Wong DH, et al. Treatment of stage IV (A-B) nasopharyngeal carcinoma by induction concurrent chemoradiotherapy and accelerated fractionation [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 63(5): 1331-1338.
- [6] Le QT, Tate D, Koong A, et al. Improved local control with stereotactic radiosurgical boost in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, 56(4): 1046-1054.
- [7] Van de Weerd BC, Littler DR, Klompmaaker R, et al. Polo-box domains confer target specificity to the Polo-like kinase family [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(6): 1015-1022.
- [8] Sun T. p53 and its downstream proteins as molecular targets of cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2006, 45(6): 409-415.
- [9] Spaniol K, Boos J, Lanvers-Kaminsky C. An in-vitro evaluation of the polo-like kinase inhibitor GW843682X against paediatric malignancies [J]. *Anticancer Drugs*, 2011, 22(6): 531-542.
- [10] McInnes C, Wyatt MD. PLK1 as an oncology target: current status and future potential [J]. *Drug Discov Today*, 2011, 16(13-14): 619-625.
- [11] Lin YC, Sun SH, Wang FF. Suppression of Polo like kinase 1 (PLK1) by p21^{Waf1} mediates the p53-dependent prevention of caspase-independent mitotic death [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(11): 1816-1823.
- [12] McKenzie L, King S, Marcar L, et al. p53-dependent repression of polo-like kinase-1 (PLK1) [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(20): 4200-4212.