论著

文章编号:1000-5404(2006)21-2174-03

PFT-α对热化疗损伤结肠上皮细胞P53蛋白表达及亚细胞定位的影响

张安平,刘宝华,张连阳,童卫东,高 羽,何渝军,付 涛 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨p53特异性抑制剂PFT-α(p-fifty three inhibitor-alpha, PFT-α)对热化疗损伤结肠上皮细胞P53蛋白表达、亚细胞定位的影响,及其在保护结肠上皮细胞中的作用。**方法** 顺铂联合温热处理原代培养结肠上皮细胞30 min,对比加入不同浓度PFT-α后,分别运用免疫细胞化学和Western blot观察在不同处理条件下结肠上皮细胞p53亚细胞结构定位和蛋白表达,流式细胞仪检测细胞凋亡。**结果** PFT-α抑制热化疗诱导的结肠上皮细胞p53核转位,降低热化疗诱导的p53在细胞核中的蛋白表达水平。随PFT-α浓度增大,结肠上皮细胞的凋亡率逐渐降低。**结论** PFT-α通过抑制p53的核转位,使p53主要位于细胞质中,从而降低热化疗导致的结肠上皮细胞凋亡,发挥保护结肠上皮细胞的作用。

关键词:PFT-α;热化疗;p53;凋亡

中图法分类号:R322.45;R329.26;R730.5 **文献标识码**:A

Effects of PFT-α on subcellular localization and protein expression of p53 in large intestinal epithelial cells damaged by hyperthermic chemotherapy

ZHANG An-ping, LIU Bao-hua, ZHANG Lian-yang, TONG Wei-dong, GAO Yu, HE Yu-jun, FU Tao (Department of General Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of p-fifty three inhibitor-alpha (PFT-α) on the subcellular localization and protein expression of p53 after thermochemotherapy in large intestinal epithelial cells, and to probe this protective effect on large intestinal epithelial cells. **Methods** The large intestinal epithelial cells that pretreated with PFT-α or not were all treated with 10 mg/L cisplatin at 43 ℃ for 30 min. The changes in subcellular localization and protein expression of p53 after thermochemotherapy in the large intestinal epithelial cells pretreated with or without PFT-α of different concentration were observed by immunocytochemistry and Western blotting. The apoptotic rate was detected by flow cytometry. **Results** PFT-α treatment was associated with the decreased nuclear-to-cytoplasmic p53 ratio and suppressed the nuclear translocation of p53 induced by thermochemotherapy. In large intestinal epithelial cells treated with PFT-α and thermochemotherapy, the apoptotic rate was decreased with the increasing concentration of PFT-α. **Conclusion** PFT-α was associated with the decreased p53 protein expression in the nucleus and suppressed the nuclear translocation of p53 triggered by thermochemotherapy. PFT-α decreased the apoptotic rate of cells, and protected large intestinal epithelial cells against thermochemotherapy-induced damages.

Key words: PFT-α; hyperthermic chemotherapy; p53; apoptosis

p53特异性抑制剂PFT-α(p-fifty three inhibitor-alpha, PFT-α)是一种小分子化合物,具有特异性和可逆性抑制p53的功能。有研究报道PFT-α通过抑制p53而使小鼠能够耐受致死剂量的放疗,并且不会诱发新的肿瘤形成。PFT-α通过抑制p53依赖诱导的凋亡,成为治疗抗肿瘤副效应的手段而受到研究者的关注[1]。PFT-α对热化疗损伤结肠上皮细胞后p53表达及其亚细胞结构定位的影响如何,是否对热化疗损伤结肠上皮细胞具有保护作用则是本研究的主要问题。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PFT-α购自Calbiochem公司,Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自Roche公司。Western blot免疫印迹发光试剂、p53单

作者简介:张安平(1970-),男,陕西省汉阴县人,博士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤发生机制及肠上皮细胞保护方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68757248,E-mail:anping_zhang@163.com

收稿日期:2005-11-21;修回日期:2006-02-26

抗购自 Santa Cruz 公司。SABC 试剂盒、DAB-Ni 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。DMEM 培养液、胎牛血清购自 Hyclone 公司。其他试剂和药品为国产或进口分装。

1.2　人结肠上皮细胞的培养和鉴定

我科住院经病理证实确诊为大肠癌的患者，术前征询患者的同意，术中取距离肿瘤至少 10 cm 的正常结肠黏膜组织，参照文献[2]进行培养。CK-18 免疫细胞化学鉴定显示细胞的纯度达 99% 以上。

1.3　实验分组及处理

将对数生长期细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化后，每孔 5×10^4 个细胞接种于 6 孔培养板培养 24 h 后，将培养细胞分为 3 组：①正常对照组；②热化疗组：顺铂溶于 DMSO 中，终浓度为 10 mg/L 加入培养板中，在 43 ℃恒温水浴中处理 30 min 后，用 PBS 洗细胞两次后，加入培养基将细胞放入孵箱培养 2 h；③ PFT-α + 热化疗组：PFT-α 在临用前溶解于 DMSO，以 10、20、30、40 μmol/L 在热化学处理前 4 h 加入培养板中，然后处理同热化疗处理组，在热化疗处理完毕后用 PBS 洗细胞 2 次，再重新加入上述 PFT-α 后将细胞放入孵箱培养 2 h。

1.4　免疫细胞化学检测

结肠上皮细胞接种于盖玻片上，于 6 孔培养板中培养。取出玻片，PBS 冲洗 3 次，4% 多聚甲醛固定 30 min，PBS 漂洗 5 min×2。3% 过氧化氢 37 ℃孵育 10 min，封闭内源性的过氧化物酶，PBS 冲洗 5 min×3。5% 正常山羊血清室温封闭 10 min。倾去血清，加入 1∶100 稀释的 p53 一抗，湿盒内 4 ℃冰箱过夜。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。PBS 冲洗，5 min×3。滴加生物素标记兔抗山羊 IgG，37 ℃，15 min，PBS 冲洗。滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液，37 ℃，15 min，PBS 冲洗。DAB-Ni 显色剂显色，复染，脱水，透明，中性树脂封片观察。阴性对照不染色。DAB-Ni 染色呈淡蓝色为 p53 表达阳性。

1.5　Wesrtern blot 检测

提取细胞核和细胞质蛋白，Bradford 法测定蛋白浓度后上样，10% SDS-PAGE 胶电泳后行半干转膜至 PVDF 膜上，封闭液封闭后依次加入 p53 突变型单抗（一抗 1∶200）和辣根过氧化物酶标记的 IgG（二抗 1∶2 500）室温孵育，再加入化学发光试剂与 PVDF 膜共孵育后进行显影。用扫描分析软件系统（Labwork 4.0）测量积分光密度值（IOD），以正常对照组实际 IOD 值为参照，其他组别的 IOD 与之相比的相对积分光密度（RIOD）为蛋白的表达量。

1.6　细胞凋亡的流式细胞仪检测

按照实验分组进行处理后收集细胞，2 000 r/min，4 ℃离心 5 min 后，弃上清，冷 PBS 重悬，离心，弃上清，再次重悬离心，加入 Annexin V-FITC 溶液 5 μl 和 PI 2.5 μl 到 100 μl 细胞悬浮液中，混匀后避光反应 10 min，加 150 μl 样品稀释液到样品中，混匀后立即上机检测。

1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件进行 t 检验和单因素方差分析。

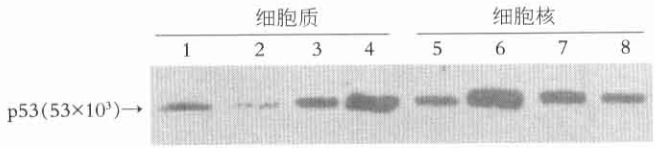
2　结果

2.1　PFT-α 对 p53 在结肠上皮细胞亚细胞结构表达定位的影响

正常情况下 p53 主要在结肠上皮细胞的细胞质中表达，细胞核表达低。当结肠上皮细胞受到热化疗损伤后，主要表现为细胞核染色显著加深，细胞质染色减少，显示 p53 在细胞受到热化疗损伤后出现核转位，在运用 10 μmol/L PFT-α 予以保护后，细胞核染色则降低，细胞质染色增强，这种变化在 PFT-α 为 40 μmol/L 时更为显著，细胞核几乎无 p53 的表达，实验显示 PFT-α 可抑制热化疗损伤诱导的 p53 核转位。

2.2　PFT-α 对结肠上皮细胞细胞核和细胞质 P53 蛋白表达的影响

Western blot 分析显示热化疗损伤结肠上皮细胞后 p53 主要在细胞核表达，细胞核/细胞质比为 13.22。10 μmol/L PFT-α 作用后其细胞质表达升高，细胞核表达减少，细胞核/细胞质比下降至 0.80，40 μmol/L PFT-α 作用后这种变化更显著。与热化疗组相比，p53 细胞核/细胞质表达比差异非常显著（$P<0.01$），见图 1。



1、5：正常对照组；2、6：热化疗组；3、7：10 μmol/L PFT-α + 热化疗组；4、8：40 μmol/L PFT-α + 热化疗组

图 1　结肠上皮细胞细胞质和细胞核 P53 蛋白表达

2.3　结肠上皮细胞的凋亡率变化

结肠上皮细胞的自然凋亡率为（2.88 ± 0.44）%，在热化疗损伤后，结肠上皮细胞的凋亡率升高至（27.22 ± 2.09）%。PFT-α 联合热化疗处理结肠上皮细胞后，细胞的凋亡率逐渐下降，由（14.83 ± 1.51）% 降至（3.75 ± 0.33）%，与热化疗组比较，存在非常显著性差异（$P<0.01$）。当 PFT-α 达到 40 μmol/L 时，细胞的凋亡率为（3.75 ± 0.33）%，与正常对照组比较，已无统计学意义（$P>0.05$）。

3　讨论

目前研究认为 p53 是联系不同遗传应激和细胞应答的中间环节，离子辐射、化疗药物及异常的细胞生长信号均能刺激 p53 的表达，其功能主要表现在阻滞细胞周期、促进细胞凋亡、维持基因组稳定性和抑制肿瘤血管生成四个方面[3]。在人类大部分肿瘤中存在 p53 的缺失或变异。p53 的缺失可导致基因不稳定、肿瘤转化加快、以及抗肿瘤治疗产生耐受等。因此通常认为 p53 的失活可能是有害的，在抗肿瘤治疗中更多的是如何恢复 p53 的功能，但是 p53 不仅限于杀伤肿瘤细胞，许多正常组织如淋巴结、造血器官、肠上皮细胞

和睾丸组织等也存在 p53 表达，抗肿瘤治疗对这些组织或器官同样造成一定程度损害。有研究报道肿瘤的化疗、放疗和腹腔温热灌注化疗常导致严重的副效应而降低其抗肿瘤治疗效应，这种副效应由 p53 介导的凋亡所引起[4-6]。在治疗 p53 缺失的肿瘤中，暂时性抑制 p53 可以作为减轻对正常组织损害的治疗策略[7]。

细胞在受到各种应激损伤后，可导致 p53 在细胞质中聚集和稳定性升高，通过特异性抑制靶基因的转录激活导致细胞周期停滞或发生凋亡。p53 可在细胞核和细胞质之间转位[8]，p53 在细胞核和细胞质之间转位通过内核定位信号（nuclear localization signal，NLS）而实现 p53 在细胞核停滞。Culmsee 等[9]在观察 PFT-α 对 DNA 损伤成分诱导的神经元凋亡的保护作用时发现，PFT-α 可通过降低喜树碱诱导神经元的 p53 结合活性，而完全抑制喜树碱诱导的神经元凋亡，同时 PFT-α 可降低喜树碱导致的神经元 Bax 表达，而对 p53 蛋白的表达水平无影响。PFT-α 对于 p53 诱导的 $p21^{WAF1/CIP1}$ 蛋白在细胞核和细胞质中的表达比率无任何影响，认为 PFT-α 可能改变 p53 在细胞核的转出和/或转入，或者降低细胞核中 p53 的稳定性而发挥保护效应[9]。本实验显示结肠上皮细胞在受到热化疗损伤后出现 p53 在细胞核内的聚集，P53 蛋白在细胞核中的表达升高，而在运用 PFT-α 保护结肠上皮细胞后，细胞质中的 P53 蛋白表达随 PFT-α 浓度的升高而增强，因此认为 PFT-α 可能具有抑制 p53 从细胞质向细胞核转位的作用，或者使 p53 的细胞核转出净增加的作用。

国外研究者发现顺铂常引起耳蜗和前庭感觉毛细胞的损害而导致不可逆转的听力丧失和平衡障碍[10]，对新生小鼠的前庭和耳蜗进行器官培养，在顺铂处理的耳蜗和前体中加入 PFT-α，可以使毛细胞的生存率增加且呈剂量依赖性。通过抑制 p53 表达，使顺铂诱导耳蜗和前庭毛细胞的 caspase-1、caspase-3 活性降低，明显降低对毛细胞的损害，减轻顺铂引起的耳毒性、前庭毒性和神经毒性。Liu 等[11]研究了 PFT-α 对阿霉素诱导心肌细胞凋亡和心功能损害的保护效应。在给予阿霉素前 30 min 和给药后 3 h 使用 PFT-α，心肌细胞 Bax 和 MDM2 mRNA 水平下降，表明 PFT-α 有效抑制阿霉素诱导的心肌细胞凋亡，减轻阿霉素的心脏毒性。笔者在以往的研究中发现当 PFT-α 的浓度低于 40 μmol/L，PFT-α 对于结肠上皮细胞的增殖和热化疗杀伤肿瘤细胞的作用均无影响[12]。当热化疗损伤结肠上皮细胞时运用 PFT-α 后发现细胞凋亡减少，实验表明 PFT-α 可显著减轻热化疗导致的结肠上皮细胞的损害。

本研究显示 PFT-α 通过抑制热化疗诱导结肠上皮细胞 p53 信号激活，降低 p53 细胞核与细胞质的表达比，促使 P53 蛋白主要在细胞质中表达，抑制热化疗诱导的结肠上皮细胞凋亡而发挥保护效应，这为临床上通过暂时抑制 p53 启动的细胞凋亡而减轻抗肿瘤治疗副效应提供新思路。但其保护机制需进一步深入研究。

参考文献：

[1] KOMAROVA E A, GUDKOV A V. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors [J]. Biochem Pharmacol, 2001, 62(6): 657-667.

[2] GROSSMANN J, WALTHER K, ARTINGER M, *et al*. Progress on isolation and short-term ex-vivo culture of highly purified non-apoptotic human intestinal epithelial cells (IEC) [J]. Eur J Cell Biol, 2003, 82(5): 262-270.

[3] WU Z, WU L, LI L, *et al*. p53-mediated cell cycle arrest and apoptosis induced by shikonin *via* a caspase-9-dependent mechanism in human malignant melanoma A375-S2 cells[J]. J Pharmacol Sci, 2004, 94(2): 166-176.

[4] WU Y J, MULDOON L L, NEUWELT E A. The chemoprotective agent N-acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(2): 424-431.

[5] CAMPHAUSEN K, MOSES M A, MENARD C, *et al*. Radiation abscopal antitumor effect is mediated through p53[J]. Cancer Res, 2003, 63(8): 1990-1993.

[6] KUDO M, ASAO T, HASHIMOTO S, *et al*. Closed continuous hyperthermic peritoneal perfusion model in mice with peritoneal dissemination of colon 26[J]. Int J Hyperthermia, 2004, 20(4): 441-450.

[7] STADLER P, GROSU A L, MOLLS M. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer treatment[J]. Strahlenther Onkol, 2000, 176(2): 98.

[8] OBRATE A, GIANNAKAKOU P. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? [J]. Drug Resist Updat, 2003, 6(6): 313-322.

[9] CULMSEE C, ZHU X, YU Q S, *et al*. A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide[J]. J Neurochem, 2001, 77(1): 220-228.

[10] ZHANG M, LIU W, DING D, *et al*. Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis[J]. Neuroscience, 2003, 120(1): 191-205.

[11] LIU X, CHUA C C, GAO J, *et al*. Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(3): H933-H939.

[12] 张安平，刘宝华，张连阳，等. p53 抑制剂 PFT-α 对热化疗所致肠上皮细胞损伤的保护效应[J]. 第三军医大学学报，2004，26(21)：1944-1946.

（编辑 汪勤俭）