DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.21.025
第26卷第21期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 21
1944 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)21-1944-03

p53抑制剂PFT-α对热化疗所致肠上皮细胞损伤的保护效应

张安平[1],刘宝华[1],张连阳[1],王亚旭[1],熊仁平[2],周 萍[2],张胜本[1] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]普通外科;[2]分子生物中心,重庆 400042)

提 要:目的 探讨p53抑制剂PFT-α(p-fifty three inhibitor, PFT-α)对热化疗诱导原代培养肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)凋亡及p53靶基因Bax和MDM2表达的影响。方法 原代培养IECs分为正常对照组、热化疗组和PFT-α加热化疗组,运用顺铂联合温热(43 ℃)处理IECs 30 min,对比加入不同浓度的PFT-α后,Annexin V-FITC/PI染色,流式细胞仪检测细胞凋亡。MTT法分析PFT-α对热化疗杀伤DLD1的影响。Western blot检测IECs的p53、Bax和MDM2蛋白表达。结果 热化疗导致IECs发生凋亡,Bax和MDM2蛋白表达明显高于对照组。10、20、30、40 μmol/L PFT-α作用于顺铂联合温热处理IECs后,细胞凋亡率下降且呈剂量依赖性,p53在IECs胞核/胞浆表达比例下降,Bax和MDM2的表达随PFT-α的剂量升高而逐渐下降。热化疗杀伤肿瘤细胞的效应并未受到低剂量PFT-α影响。结论 PFT-α对热化疗损伤肠上皮细胞具有保护作用,其机制可能与改变p53核转位和抑制促凋亡基因Bax和MDM2的表达相关,抑制p53可作为克服热化疗抗肿瘤治疗副效应的新策略。

关键词:PFT-α;肠上皮细胞;热化疗
中图法分类号:R322.45;R329.25;R456.1 文献标识码:A

Protective effect of PFT-α on damages to intestinal epithelial cells induced by hyperthermic chemotherapy

ZHANG An-ping[1], LIU Bao-hua[1], ZhANG Lian-yang[1], WANG Ya-xu[1], XIONG Ren-ping[2], ZhOU Ping[2], ZHANG Sheng-ben[1]([1]Department of General Surgery, [2]Molecular Biology Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of PFT-α (p-53 inhibitor, PFT-α), a p53 specific inhibitor, on the apoptosis and p53 target gene (Bax and MDM2) expression in intestinal epithelial cells (IECs) induced by hyperthermic chemotherapy. **Methods** The primary cultured IECs were divided into 3 groups: control (CON), hyperthermic chemotherapy (HTC), and PFT-α plus hyperthermic chemotherapy (PFT-α plus HTC). IECs were treated with hyperthermic cisplatin (43 ℃, 10 mg/L) for 30 min, absence or presence of different dosages of PFT-α. The rate of apoptosis was detected by using FCM with Annexin V-FITC and PI double labeling method. The influence of antitumor potency of hyperthermic chemotherapy by PFT-α was analyzed with using methabenzthiazuron (MTT) assay. The expressions of p53, Bax and MDM2 were measured by Western blot. **Results** FCM analysis showed that apoptosis rate decreased after IECs were exposed to PFT-α in a does-dependent manner. Hyperthermic chemotherapy treatment resulted in the increase of nuclear-to-cytoplasmic p53 ratio. Western blot analysis revealed that PFT-α decreased the nuclear-to-cytoplasmic p53 ratio. The protein levels of Bax and MDM2 were elevated by hyperthermic chemotherapy in IECs, whereas PFT-α attenuated those levels after administration at the doses of 10, 20, 30, and 40 μmol/L. PFT-α at lower dosages did not interfere with the antitumor potency of hyperthermic chemotherapy. **Conclusion** PFT-α has the potential to protect cancer patients against side effects of anti-cancer hyperthermic chemotherapy. The mechanisms are most likely involved in the changes of p53 nuclear translocation and down-regulation of pro-apoptotic Bax and MDM2. Inhibition of p53 may be the new strategy for attenuating the side effects of hyperthermic chemotherapy.

Key words: PFT-α; intestinal epithelial cell; hyperthermic chemotherapy

作者简介:张安平(1970-),男,陕西省汉阴县人,博士,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤发生分子机制方面的研究。电话:(023)68757248
通信作者:刘宝华,电话:(023)68757268
收稿日期:2004-09-13;修回日期:2004-10-11

胃肠道肿瘤术后常因腹腔内残留游离癌细胞或残余微小癌灶导致复发,温热化疗可有效杀灭游离癌细胞或残余微小癌灶,预防复发和提高术后生存率。但是温热化疗在杀伤肿瘤细胞的同时对增生活跃的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

IECs 产生损伤, 导致抗肿瘤副效应, 这种副效应常因 p53 激活诱导 IECs 凋亡引起[1,2]。p53 特异性抑制剂 PFT-α 可以阻断阿霉素、紫杉醇、γ 射线等诱导的 p53 激活, 降低正常组织的凋亡[3,4]。我们探讨通过 PFT-α 暂时抑制 p53, 观测其对顺铂联合温热损伤 IECs 的影响及可能的机制。

1　材料和方法

1.1　材料

参照文献[5] 进行结肠上皮细胞体外培养。PFT-α 为 Calbiochem 公司产品, 顺铂、MTT、PI 为 Sigma 公司产品, Western Blot 发光试剂盒、p53 单抗、Bax 单抗均购自 Santa Cruz 公司, Annexin-V-FITC 购自 BD 公司。

1.2　分组及处理

将培养的结肠上皮细胞分为 3 组: ①正常对照组(control group, CON); ②热化疗组(hyperthermic chemotherapy group, HTC): 顺铂溶于 DMSO 中, 终浓度为 10 mg/L 加入培养板中, 在 43 ℃恒温水浴箱中处理 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; ③PFT-α 加热化疗组(PFT-α plus hyperthermic chemotherapy group, PFT-α+HTC): 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 洗细胞两次, 再重新加入上述 PFT-α 后将细胞放入孵箱培养 2 h。

1.3　细胞凋亡检测

收集各组细胞, 2 000 r/min, 4 ℃离心 5 min 后, 冷 PBS 重悬, 离心, 弃上清再次重悬离心, 加 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, 混匀后上机检测。

1.4　MTT 分析

对数生长期的 DLD1 细胞以 4×10^3/孔接种于 96 孔培养板培养 24 h 后, 吸除培养液后加入含 0.4% 血清的 RPMI1640 同步化细胞 48 h, 分别加入含 PFT-α 5、10、20、30、40、50、60 μmol/L 的 RPMI1640 培养液 180 ml 孵育 4 h 后进行热化疗处理, 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。另 1 组只加入上述不同剂量 PFT-α 而不进行热化疗处理。每组 6 个复孔培养 24 h 后, 每孔加 MTT 溶液(5 g/L) 20 ml 继续培养 4 h 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 DMSO 150 ml 振荡 10 min 使结晶充分溶解, 用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔的吸光度值。

1.5　Wesrtern blot 检测

提取 IECs 胞浆、胞核和总蛋白, Bradford 法测定蛋白浓度后上样, 11%SDS-聚丙稀酰胺凝胶电泳后行半干转膜至 PVDF 膜上, 封闭液封闭后依次加入 p53 单抗、Bax 单抗(一抗 1∶400)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 膜共孵育后进行自显影。用扫描分析软件(Labwork4.0)测量 Western blot 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　统计学处理

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析。

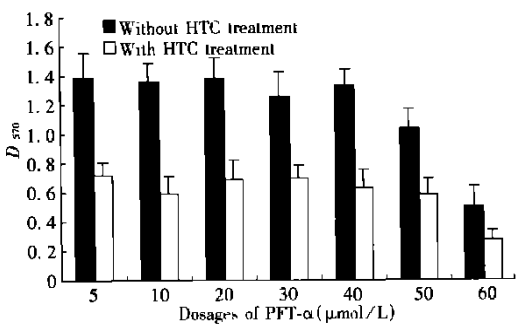
2　结果

2.1　PFT-α 对热化疗诱导 IECs 凋亡的影响

IECs 的自然凋亡率在(2.88±0.44)%, 热化疗损伤后其凋亡率达(27.03±2.07)%, PFT-α 抑制热化疗诱导 IECs 的凋亡, 且呈剂量依赖性, 凋亡率由(14.83±1.51)% 逐渐下降至(3.75±0.33)%, 与热化疗组相比凋亡率显著下降($F=7.38$, $P=0.000$)。

2.2　PFT-α 对热化疗抗肿瘤细胞能力的影响

PFT-α 低于 50 μmol/L 对于 DLD1 细胞的生长不产生影响, 不影响热化疗对肿瘤细胞杀伤力, 当达到 60 μmol/L 时则对 DLD1 细胞具有毒性作用, 并使热化疗对肿瘤细胞的杀伤力升高, 见图 1。



*: $P<0.01$, *vs* treatment at other concentrations of PFT-α in the same group

图 1　PFT-α 对热化疗抗肿瘤的影响

Fig 1　Effects of PFT-α on the anti-tumor potency of hyperthermic chemotherapy

2.3　PFT-α 对 IECs 胞核和胞浆 p53 表达的影响

Western blot 分析显示热化疗损伤后 p53 主要在细胞核表达, 胞核/胞浆比为 13.22。10 μmol/L PFT-α 作用后其胞浆表达升高, 胞核表达减少, 胞核/胞浆比下降至 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 胞核/胞浆表达比存在差异显著性($F=13.64$, $P=0.000$), 见表 1。

表 1　p53 在 IECs 胞核和胞浆表达变化

Tab 1　Changes of p53 expression in the nucleus and cytoplasm of IECs

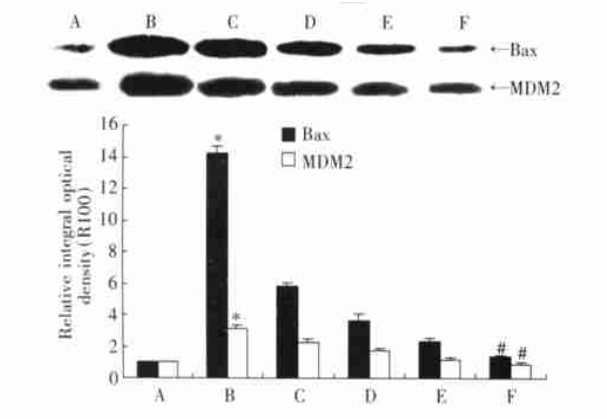
Group	Nucleus	Cytoplasm	Nucleus/Cytoplasm
CON	1.35±0.10	1.00±0.00	1.35
HTC	3.97±0.41	0.29±0.01	13.22**
10 μmol/L PFT-α+HTC	1.70±0.87	2.16±0.13	0.80##
40 μmol/L PFT-α+HTC	1.29±0.08	3.24±0.25	0.40##

**: $P<0.01$, *vs* CON; ##: $P<0.01$, *vs* HTC

2.4　PFT-α 对 IECs Bax 和 MDM2 表达的影响

IECs 在受到热化疗损伤后 Bax 和 MDM2 表达显著增强, 在运用 PFT-α 后 Bax 和 MDM2 表达逐渐降低, 在 PFT-α 为 10 μmol/L 时即可观察到这种抑制效应, 并呈现剂量依赖性抑制, 见图 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



*：$P<0.01$，*vs* CON；#：$P<0.01$，*vs* HTC；A：CON；B：HTC；C：10 μmol/L PFT-α＋HTC；D：20 μmol/L PFT-α＋HTC；E：30 μmol/L PFT-α＋HTC；F：40 μmol/L PFT-α＋HTC

图2 IECs 的 Bax 和 MDM2 蛋白表达

Fig 2 Protein expressions of Bax and MDM2 in IECs

3 讨论

p53 特异性抑制剂 PFT-α 是一种小分子化学合成物，可使经 γ 射线致死剂量照射 C57BL 和 BALB/c 两系小鼠的存活达 60%，在照射后 7 个月并无新发肿瘤，认为 PFT-α 通过抑制 p53 的激活而能够抑制抗肿瘤治疗的副效应[6]。腹腔内温热灌注化疗是腹腔肿瘤播散有效的治疗措施，但同时对于增生活跃的正常组织如肠上皮细胞、毛囊细胞和造血干细胞等也产生损伤，顺铂作为常用的抗肿瘤药物，可以与 DNA 结合形成交链，抑制 DNA 合成而导致细胞周期停滞和凋亡发生，而温热可增加细胞对顺铂的摄取，增强顺铂的抗肿瘤效应[7~9]。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，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[10]。通过抑制 p53 的表达，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，为减轻顺铂引起的耳毒性、前庭毒性和神经毒性副作用提供新的方法。Javelaud 等[11] 发现 PFT-α 可以减轻柔红霉素诱导的 HCT116p21WAF1-/-细胞的凋亡，PFT-α 抑制 p53 而使 Bcl-2 的表达水平升高，Bax 的表达水平下降，恢复 Bax/Bcl-2 比率，其作用与 p21WAF1 反义寡核苷酸相似。Liu 等[12] 报道了 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。阿霉素上调 Bax 和 MDM2mRNA 水平，通过 p53 在丝氨酸 15 的磷酸化水平提高上调 p53 蛋白水平，诱导心肌细胞凋亡导致阿霉素的心脏毒性、超微结构改变和心功能障碍。在给予阿霉素前 30 min 和给药后 3 h 使用 PFT-α，则心肌细胞 Bax 和 MDM2mRNA 水平下降，实验表明 PFT-α 可有效抑制阿霉素诱导的心肌细胞凋亡，减轻阿霉素抗肿瘤治疗中对心脏的损伤。

笔者采用原代结肠上皮细胞为研究对象，顺铂联合温热处理可导致 IECs 发生凋亡，p53 蛋白向细胞核内聚集，Bax 和 MDM2 的表达显著升高。通过运用 PFT-α 阻断 p53 由细胞浆向胞核转运，降低 Bax 和 MDM2 的表达，而使 MDM2 与 p53 结合减少，并抑制 Bax 启动子上的 p53 反应元件，发挥保护 IECs 的功能，提高细胞的生存力。实验还显示 PFT-α 低于 50 μmol/L 时对于热化疗抗肿瘤能力没有任何影响。本研究认为 PFT-α 抑制热化疗诱导结肠上皮细胞凋亡，降低对细胞的损伤，为以后通过抑制 p53 而减轻抗肿瘤副效应提供了新的思路，但 PFT-α 发挥保护作用的机制还有待深入研究。

参考文献：

[1] van der Vange N, van Goethem A R, Zoetmulder F A, *et al*. Extensive cytoreductive surgery combined with intra-operative intraperitoneal perfusion with cisplatin under hyperthermic conditions (OVHIPEC) in patients with recurrent ovarian cancer: a feasibility pilot[J]. Eur J Surg Oncol, 2000, 26(7): 663－668.

[2] Shen P, Levine E A, Hall J, *et al*. Factors predicting survival after intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C after cytoreductive surgery for patients with peritoneal carcinomatosis[J]. Arch Surg, 2003, 138(1): 26－33.

[3] Komarov P G, Komarova E A, Kondratov R V, *et al*. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy[J]. Science, 1999, 285(5434): 1733－1737.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Komarova E A, Gudkov A V. Suppression of p53: a new approach to overcome side effects of antitumor therapy[J]. Biochemistry (Mosc), 2000, 65(1): 41－48.

[7] Ryu K S, Kim J H, Ko H S, *et al*. Effects of intraperitoneal hyperthermic chemotherapy in ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2004, 94(2): 325－332.

[8] Piso P, Dahlke M H, Loss M, *et al*. Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer[J]. World J Surg Oncol, 2004, 2(1): 21.

[9] Hall J J, Loggie B W, Shen P, *et al*. Cytoreductive surgery with intraperitoneal hyperthermic chemotherapy for advanced gastric cancer[J]. J Gastrointest Surg, 2004, 8(4): 454－463.

[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] Javelaud D, Besancon F. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis *via* an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio[J]. J Biol Chem, 2002, 277(40): 37949－37954.

[12] 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): H933－939.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net