

人類非小細胞肺癌細胞轉殖 $p21^{Cip1/WAF1}$ 促進玫瑰樹鹼的凋亡效應

林佳薇 林銘儀 路淑怡 黃慧滇 方剛*

國立臺灣師範大學生命科學系

(收稿日期：2007.6.5，接受日期：2007.7.6)

摘 要

轉殖p53所調控的下游基因 $p21^{Cip1/WAF1}$ (p21)至p53突變非小細胞肺癌細胞株H1437，將穩定成長之細胞以topoisomerase II抑制劑ellipticine處理後，其敏感率會增加，這個改變，是因為所細胞凋亡增加所致。因此未來可以發展藉外源性p21基因，增加對p53突變的癌細胞的藥物敏感性。

關鍵詞：人類非小細胞肺癌細胞、玫瑰樹鹼、凋亡

緒 言

化學藥物治療是目前癌症主要的醫療方式之一，利用抗癌藥物引發細胞凋亡已普遍應用於癌症的治療上，但非小細胞癌症對化療藥物卻普遍的具有抗藥性(Bosken *et al.*, 2002)。一般而言，癌細胞topoisomerase II活性皆較正常細胞高(Riou *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1986)，因此抑制topoisomerase II是治療癌症藥物發展目標藥物(drug targeting)的方向之一。癌細胞的抑癌基因p53表現在DNA受損時而增加，下游調控基因 $p21^{Cip1/Waf1}$ (p21)被p53誘導轉錄表現後，使cyclin與cyclin dependent kinase(cdk)結合，這種複合體讓細胞週期停滯在G₁期，以修補的DNA序列的損害。p21的活化，除了讓胞停止生長之外，亦能活化細胞凋亡相關一系列的調控基因，包括procaspase-9等(Dennis *et al.*, 2006)。在皮膚色素癌中，p21的表現也能帶動細胞凋亡的調控基因Bax的表現，造成細胞凋亡，達成抑制細胞生長的目標(Zhang *et al.*, 1999)。

由於活化的p21會讓細胞週期效應停滯，若能再持續抑制細胞內topoisomerase II活性，應該會讓細胞生長速率下降更趨明顯。本文即針對這項假說，利用由夾竹科玫瑰樹屬植物莫氏玫瑰樹的葉中所分離出的topoisomerase II抑制劑ellipticine(Goodwin *et al.* 1959; Acton *et al.*, 1994)為材料，處理具強烈抗藥性的肺癌細胞，觀察穩定轉殖p21與這個藥物生長交互效應，並作進一

步深入探討。

Ellipticine有強烈DNA嵌合力，是它能夠抑制topoisomerase II活性的主要原因。過去文獻報導ellipticine會有效抑制大腸癌細胞topoisomerase II，也有文獻報導指出，ellipticine也會有效抑制癌細胞的生長，也有研究報告顯示，ellipticine能夠調控野生型p53及p53突變位點癌細胞的生長(Garbett and Graves, 2004; Kuo *et al.*, 2005)。但ellipticine對肺癌細胞的生長效應與其機轉，卻沒有任何報導。

本文目的是瞭解外源p21對p53基因突變型肺癌細胞株對topoisomerase II抑制劑ellipticine所造成細胞表型變化，作深入的研究。實驗設計以p53突變而且有強烈抗藥性的人類非小細胞肺癌細胞H1437(R267P)為樣本，將p21轉殖至H1437細胞，建立穩定細胞株後，再以ellipticine處理後，觀察穩定細胞株的生長調控與細胞表型變化，並與轉殖空質體的母細胞H1437相比較。

材料與方法

轉殖p21細胞株(Hp21)之建立

將含有以cytomegalovirus啟動子驅動p21表現質體pIRES-p21-EGFP，含有neomycin基因，以lipofectamine(Invitrogen, Gaithersburg, MD)轉殖入含培養液DMEM的H1437細胞中，並添加10%的胎牛血清後，置於含5%二氧化碳及飽和濕度的37°C培養箱中培養，經過24小時後換新培養

*通訊作者：方剛(Kang Fang)；FAX：886-2-29312904；E-mail：kamgfang@ntnu.edu.tw

液，加入600 µg/ml G418 (Geneticin, Invitrogen)篩選，並且於每兩天換一次培養液，以維持培養液中G418的活性，確保留下的細胞含有轉入的質體，俟培養皿上會陸續出現細胞聚集的細胞株之後，將細胞株置換到30-mm的培養皿，等到細胞長滿後，再置換到60-mm培養皿，待長至70-80%覆蓋程度後，持續確認含轉入之質體，得穩定成長細胞株。

細胞存活率

將 5×10^4 細胞培養於12-well的孔盤內，培養隔夜待細胞黏附後，分別加入濃度2及5 µM的ellipticine，分別培養24及48小時後，以trypsin-EDTA沖洗下細胞，加入trypan blue，利用細胞計數器，算出存活細胞數目。

細胞週期與DNA含量分析

種殖 5×10^5 的細胞於60-mm細胞培養盤，經20小時培養後，以2及5 µM的ellipticine處理，分別經過24、48及72小時後，以trypsin-EDTA取下，經離心2,000 rpm之後，以1 ml PBS打散細胞，再加入等體積70%的酒精，於-20°C固定16小時後，加入含5 µg/ml propidium iodide (PI) (Sigma; St. Louis, MO)、10 µg/ml RNase A (ICN Pharmaceutical; Costa Mesa, CA)的PBS於室溫下避光反應15分鐘。並以流式細胞分析儀(FACScan flow cytometry, Becton-Dickinson; Mountain View, CA)偵測細胞中PI的螢光強度(激發光源波長: 488 nm; 散射光源波長: 620 nm)，估算各個細胞內DNA的含量，以決定細胞於各階段週期之分佈(小於2N定為sub-G₀，2N為G₀/G₁期，4N為G₂/M期，2N到4N間為S期)，並利用Modfit LT Ver 2.0及Cell Quest分析軟體(Becton-Dickinson)，計算各週期所佔細胞的比例之後，分析作圖。

細胞染色

H1437、Hp21細胞株，加入濃度為5 µM的ellipticine，各經24及48小時，吸去培養液，以PBS清洗，再加入3.7%的甲醛固定細胞半小時，次以含2%血清的培養液blocking 1小時，再加入p21抗體16小時，次加入DAPI以及二級抗體1小時後，於螢光顯微鏡下觀察p21表現位置。

西方墨點轉漬法

取10 µg蛋白質加入樣品緩衝液(350 mM Tris-HCl, pH 6.8; 12% SDS; 0.02% bromophenol

blue; 35% glycerol; 30% β-mercaptoethanol)後加熱5分鐘，以SDS-PAGE (10或15% running gel)先以電壓60伏特進行30分鐘後，將電壓調至120伏特再進行電泳70分鐘。以transfer unity裝置(HOEFER; Amersham Pharmacia)於固定電壓40伏特40分鐘，將蛋白質由膠體轉移到硝化纖維膜(nitrocellulose, BioRad)後，將膜取出並浸泡於blocking solution (含5% 脫脂奶粉的PBS-tween)，室溫下作用1小時後，加入1:5,000稀釋的一級抗體，室溫下作用1小時後，加入1:2,000稀釋的二級抗體，於室溫下作用1小時後，最後用ECL Chemiluminescent Western System (Amersham; Arlington Height, IL)試劑組加在膜上，避光反應約5分鐘後，以冷光儀顯影。

結 果

Ellipticine調控細胞的生長

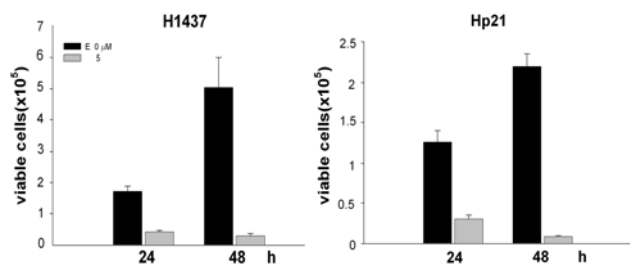
實驗結果顯示，以空質體轉殖H1437細胞數目較轉殖p21細胞生長速度為多。利用5 µM ellipticine處理的H1437細胞，於24及48小時之後，細胞總數與為原來接種細胞數目相近。但是以5 µM處理的轉殖p21的穩定細胞株Hp21，於24小時之後，細胞數目降為原來接種細胞的80%，但是於48小時之後，以5 µM處理的細胞數目僅為原來轉殖Hp21細胞的20%(圖一)。實驗數據也顯示ellipticine處理的Hp21細胞株，生長速率會顯著降低，但ellipticine對H1437細胞僅會抑制生長速率，細胞數目既未增加，也不會降低。

Ellipticine促使Hp21 sub-G₀細胞百分比增加

由流式細胞儀鑑定細胞週期的變化及其所佔的比例，結果顯示H1437細胞株，加入5 µM之ellipticine處理48小時之後，約50%細胞會停滯於S及G₂/M期，但未出現明顯的sub-G₀細胞。但以5 µM ellipticine處理之Hp21細胞，於24至48小時後，sub-G₀的比例由11%增至26%，顯示穩定外源p21的細胞對ellipticine的敏感度增加，引發細胞的凋亡(圖二)。

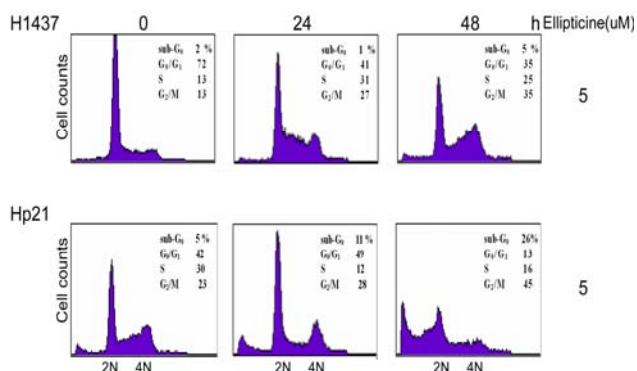
Ellipticine誘導Hp21活化細胞凋亡調節因子

以5 µM之ellipticine處理H1437及Hp21細胞株，經過24及48小時後，利用西方墨點轉漬法檢測細胞凋亡相關蛋白質PARP的變化。PARP在轉殖空質體的H1437，於不同時間點的數量都無顯



圖一、Ellipticine 影響細胞的生長。接種 5×10^4 的H1437、Hp21細胞至12孔盤，俟細胞黏附後，加入 $5 \mu\text{M}$ 的ellipticine，於24及48小時收取細胞，計算細胞存活之數目。Error bars表示三次獨立實驗所得之標準誤差 (standard errors)。

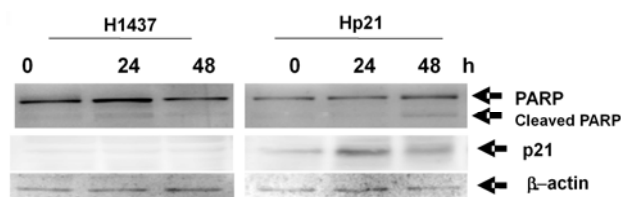
Figure 1. Ellipticine affects cell growth rates. A total of 5×10^4 cells of H1437 or Hp21 were cultured in 12-well plates. A concentration of $5 \mu\text{M}$ ellipticine was added in the adherent cells for 24 and 48 h, respectively. The trypsinized cells were counted by trypan blue exclusion assay to determine the numbers of cells. The error bars stand for standard errors of three experiments.



圖二、Ellipticine 對細胞週期的影響。分別接種 5×10^5 的H1437、Hp21細胞株於60 mm的細胞培養盤上，待細胞貼附後，加入 $5 \mu\text{M}$ 之ellipticine，處理24及48小時後，以trypsin收集所有細胞，再以PI(propidium iodide)染色，並使用流式細胞儀來鑑定細胞週期的變化及其所佔的比例。

Figure 2. The affects of cell cycle histograms by ellipticine. A total of 5×10^5 cells of H1437 or Hp21 were cultured in 60-mm plates. A concentration of $5 \mu\text{M}$ ellipticine was added in the adherent cells for 24 and 48 h, respectively. The trypsinized cells were stained with PI (propidium iodide) and analyzed by flow cytometry and the cell cycle distribution was determined.

著變化，但是Hp21於加入ellipticine處理於48小時後，130 kD的PARP密度明顯降低，而且被切出長度約85kD的片段密度逐漸上升(圖三)。顯示Hp21對ellipticine處理後敏感度增加，切出調控細胞凋亡蛋白PARP的片段。

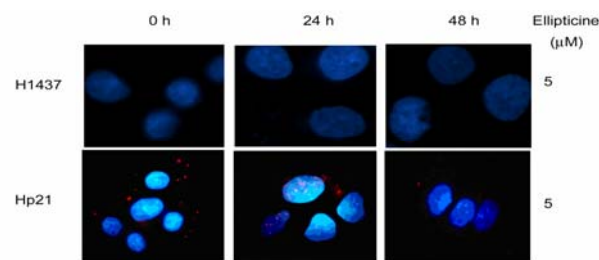


圖三、西方墨點轉漬法。將轉殖細胞Hp21與H1437細胞加入ellipticine培養24及48小時後，於不同時間點，利用RIPA萃取細胞蛋白質，使用SDS-PAGE轉漬到nitrocellulose transfer membrane上，以p21、β-actin及PARP抗體雜交後，以含有horseradish peroxidase之二級抗體雜交，再以ECL呈色並以冷光儀呈色。

Figure 3. Western blotting. A total of 5×10^5 cells of H1437 or Hp21 were cultured in 60-mm plates. A concentration of $5 \mu\text{M}$ ellipticine was added in the adherent cells for 24 and 48 h, respectively. The trypsinized cells were dissolved in RIPA buffer and separated by SDS-PAGE. The gels were transferred to nitrocellulose prior to hybridizing with antibodies against p21, PARP or β-actin, followed hybridization with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. The blots were further developed by ECL illumination kit.

利用免疫螢光染色檢測p21的細胞位置變化

分別以相同濃度ellipticine處理H1437及Hp21細胞，經24及48小時，由螢光顯微鏡下觀察p21表現。實驗顯示加入ellipticine處理48小時後，p21未進入H1437細胞核中。而Hp21細胞株中，加入ellipticine處理24小時後，即有大量p21進入核內，持續至48小時後，則逐漸消失(圖四)。



圖四、Ellipticine 對p21細胞內分佈的影響。細胞株H1437及Hp21，分別以 $5 \mu\text{M}$ 之ellipticine處理，經24及48小時，於螢光顯微鏡下觀察p21表現，藍色部份為DAPI染出的細胞核，紅色部分則為p21抗體標示部分 (TRITC標示之二級抗體)。

Figure 4. Ellipticine affects cellular distribution of p21. A total of 5×10^5 cells of H1437 or Hp21 were cultured in 60-mm plates. A concentration of $5 \mu\text{M}$ ellipticine was added in the adherent cells for 24 and 48 h, respectively. The samples were further incubated with TRITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (red) plus DAPI (blue) and examined by fluorescence microscopy.

討 論

當細胞受到壓力導致DNA損害時，細胞內p53會調節眾多種類的下游基因，其中之一是細胞修復，若是損害廣泛無法修復時，則會誘導凋亡。本研究是導入p53之下游基因p21至p53突變的細胞，期望彌補p53突變所造成缺失 (Zhang *et al.*, 1999)。實驗結果顯示母細胞H1437在加入ellipticine處理後，細胞生長雖然降低，但細胞數目仍與原本接種數相近，而細胞週期在48小時後依舊停滯於G₂/M期。由西方墨點轉漬法的分析發現，當加入ellipticine後，p21表現也未增加，且停留在細胞質內。文獻報導也指出，當p21在細胞質內表現時，細胞會拮抗細胞凋亡，當p21進入細胞核內，則會活化細胞凋亡的機制(Zhou, *et al.*, 2001)。進一步由細胞染色結果也發現，經過48小時之後，p21仍停留於H1437細胞質內，而細胞也滯留於S及G₂/M期，顯示細胞仍在拮抗凋亡狀態。但是對含有穩定表現外源基因p21的抗藥細胞株中，經過ellipticine處理48小時後，細胞生長明顯受到抑制，細胞數目只剩下原本接種細胞的20%，而且停滯於sub-G₀期細胞數目明顯增加，大量p21於24小時之內進入細胞核內，並於48小時後完全消失，顯示啟動凋亡細胞抑制細胞生長，與p21的移動有關。因此可以推論p53突變的細胞，若能調節p53的下游基因，如p21等，對抗癌藥物敏感性的改變，應有重要的影響。

先前實驗結果顯示，將突變位點p53基因轉入癌細胞，會改變細胞對藥物後敏感性（本實驗室未發表結果）。若p53的突變發生在核心區域，會改變蛋白質和DNA結合的能力，進而影響下游蛋白質p21的轉錄能力(Cho *et al.*, 1994)，因此推斷如果能夠於突變p53癌細胞株轉入p21基因，對於癌細胞應該抗癌藥物的敏感度會增加。因此，這種基因轉殖方式增加藥物敏感度，是否對所有p53突變形細胞都能夠導致細胞的凋亡，仍需要做更深入實驗確認。過去也有研究結果顯示p21抑制效應，得靠Mdm2的活化，才會讓細胞生長停滯(Zhou *et al.*, 2001; Blundel *et al.*, 2004; Giono and Manfredi, 2007)。如要深入瞭解這種以基因轉殖增加抗癌藥物的療效，這種使用p53的下游基因如ellipticine如何對p21基因的調節產生影響與其反應詳細機制，是未來需要持續研究的重點。

參考文獻

- Acton EM, Narayanan VL, Risbood PA, Shoemaker, RH, Vistica DT and Boyd MR. 1994. Anticancer specificity of some ellipticinium salts against human brain tumors in vitro. *J Med Chem.* 37:2185–2189.
- Bosken CH, Wei Q, Amos CI and Spitz MR. 2002. An analysis of DNA repair as a determinant of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 94: 1091-1099.
- Blundell R, Harrison DJ and O'Dea S. 2004. p21(Waf1/Cip1) regulates proliferation and apoptosis in airway epithelial cells and alternative forms have altered binding activities. *Exp Lung Res.* 30:447-464.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD and Pavletich NP. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265:346-355.
- Dennis S, Frank E, Schulze-Osthoff K and Reiner UJ. 2006. p21 blocks irradiation-induced apoptosis downstream of mitochondria by inhibition of cyclin-dependent kinase-mediated caspase-9 activation. *Cancer Res* 66:11254-11262.
- Garbett NC and Graves DE. 2004. Extending nature's leads: the anticancer agent ellipticine. *Curr. Med. Chem.* 4: 149-172.
- Giono LE and Manfredi JJ. 2007. Mdm2 is required for inhibition of Cdk2 activity by p21, thereby contributing to p53-dependent cell cycle arrest. *Mol Cell Biol.* 27:4166-4178.
- Goodwin S, Smith AF and Horning EC. 1959. Alkaloids of *Ochrosia elliptica* Labill, *J Am. Chem.* 81: 1903-1908.
- Kuo PL, Hsu YL, Chang CH and Lin CC. 2005. The mechanism of ellipticine-induced apoptosis and cell cycle arrest in human breast MCF-7 cancer cells. *Cancer Lett.* 223: 293-301.
- Nelson WG, Liu LF and Coffey DS, 1986. Newly-replicated DNA is associated with DNA topoisomerase II incultured rat prostatic adenocarcinoma cells. *Nature.* 322: 187-189.
- Riou G, Gabillot M, Barrois M, Breitburd F and Orth G. 1985. A type II DNA topoisomerase and a catenating protein from the transplantable VX2 carcinoma. *Eur. J Biochem.* 146: 483-488.

- Zhang Y, Fujita N and Tsuruo T. 1999. p21^{Waf1/Cip1} acts in synergy with bcl-2 to confer multidrug resistance in a camptothecin-selected human lung-cancer cell line. *Int J Cancer*. 83:790-797.
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Spohn B and Hung MC. 2001. Cytoplasmic localization of p21^{Cip/WAF1} by Akt-induced phosphorylation in *HER-2/neu*-overexpressing cells. *Nature Cell Biol.* 3:245-252.

Ellipticine-induced Apoptosis in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells with Ectopic Expression of $p21^{Cip1/WAF1}$

Chia-Wei Lin, Ming-Yi Lin, Shu-Yi Lu, Hwei-tein Huang, Kang Fang*

Department of Life Science, National Taiwan Normal University
Taipei, Taiwan

(Received: 5 June 2007, accepted: 6 July 2007)

ABSTRACT

Topoisomerase II inhibitor ellipticine-induced apoptosis in human non-small cell lung cancer cells H1437 with ectopic expression of $p21^{Cip1/Waf1}$ ($p21$), that is distinct from the parental cells that are drug resistant. The enhanced cytotoxic effect can be achieved through apoptosis. The results indicated that the sensitivity of ellipticine in p53-mutated NSCLC cells can be enhanced through introduction and nuclear migration of downstream of p53 regulator, $p21$.

Key words: human non-small cell lung cancer cells, ellipticine, apoptosis

*Corresponding author: Kang Fang; FAX: 886-2-29312904; E-mail: kangfang@ntnu.edu.tw