

# VP-16 調控 Akt-Ser<sup>473</sup> 去磷酸化效應誘導 p53 突變 非小細胞肺癌細胞的凋亡

林佳薇 林銘儀 吳忠信 黃慧滇 方剛\*

國立臺灣師範大學生命科學系

(收稿日期: 2007.9.26, 接受日期: 2007.10.30)

## 摘要

本文藉轉殖突變及野生型p53至該基因缺失非小細胞肺癌細胞株H1299, 將穩定成長之細胞以 topoisomerase II 抑制劑VP-16處理後, 含有突變型p53於VP-16處理之後, 細胞的凋亡會增加, 但外源的野生型p53, 卻不會讓VP-16啟動細胞凋亡, 而前者是因為pAkt-Ser<sup>473</sup>去磷酸化所致, 而外源野生型p53, 卻不會讓pAkt-Ser<sup>473</sup>去磷酸化。因此可以推斷, VP-16對癌細胞的凋亡的生成與Akt去磷酸化與否有關, 抑制Akt去磷酸化, 降低VP-16所引發的細胞凋亡。

**關鍵詞:** 人類非小細胞肺癌、VP-16、Akt、細胞凋亡

## 緒言

### DNA topoisomerase II抑制劑用於癌細胞的生長調控

一般癌細胞 DNA topoisomerase II 活性皆高於正常細胞 (Riou *et al.*, 1985; Nelson *et al.*, 1986), 也是抑癌藥物主要發展方向之一。而抑制 topoisomerase II 活性抗癌藥物, 是讓生成迅速癌細胞複製之後的雙股 DNA 螺旋鏈結構, 無法分開, 達到抑制癌細胞生長的目的。利用抗癌藥物引發細胞凋亡已普遍應用於癌症的治療上。其中屬於 epipodophyllotoxin 的 etoposide (VP-16) 已被廣泛應用於治療人類癌症。它是由蔓陀草所萃取 podophyllotoxins 的衍生物 (Keller-Juslen *et al.*, 1971), VP-16 已被廣泛應用在各式腫瘤的治療包括攝護腺癌 (Kamradt and Pienta *et al.*, 2000)、血癌 (Cooper *et al.*, 2003; Edick *et al.*, 2003)、淋巴瘤 (Greco, 1999; Rigacci *et al.*, 2003) 與乳癌 (Braybrooke *et al.*, 2003; Neskovic-Konstantinovic *et al.*, 1996) 等。VP-16 抑制細胞 topoisomerase II 的活性之後, 致使雙股 DNA 螺旋鏈複製無法完全進行, 進而抑制細胞生長, 觸發細胞凋亡 (Froelich-Ammon *et al.*, 1995; Hande, 1998)。雖然 VP-16 在臨床使用已久, 與它相關機制的新發現, 依舊在持續中。

### p53與Akt調控細胞的凋亡

腫瘤抑制基因 (tumor suppressor gene) p53 座落在第十七對染色體上, 它是轉錄因子 (transcription factor) 的一種, 用來調控與其下游細胞週期基因的表現, 當DNA損壞時, p53會調節DNA的修補, 造成細胞週期停滯 (cell cycle arrest)、老化 (senescence)、分化 (differentiation)、或是細胞凋亡 (programmed cell death, apoptosis) (Cho *et al.*, 1994; Oren *et al.*, 2003)。因此, 當細胞遭受環境的壓力時, p53的形式與其表現程度, 是決定細胞凋亡產生的重要因素 (Hofseth *et al.*, 2004)。由於p53對細胞生長扮演重要的角色 (Martin *et al.*, 2002), 但是百分之五十以上的肺癌細胞都有突變的p53基因型, 突變p53基因是否影響癌細胞的細胞凋亡的產生? 是不是各種治療對不同基因型p53的癌細胞生長的影響與藥物敏感性? 一直是個重要的研究主題。

廣泛出現癌細胞內的Akt, 是Ser/Thr激酶的一種 (Osaki *et al.*, 2004), 它是調節細胞內存活的重要因子, 也是控制肺癌細胞存活訊息的重要因子之一 (Brognard *et al.*, 2001)。過量表現Akt基因可以促進癌細胞增生及拮抗細胞凋亡的訊息傳遞, 而且也被認為與癌細胞的增生相關密切 (Hill and Hemmings, 2002)。此外, Akt活性的指標, pAkt-Ser<sup>473</sup>與葡萄糖代謝、細胞增生及轉移等途徑相關。所以, 如何使用抗癌藥物以抑制Akt活性, 也就是有效讓pAkt-Ser<sup>473</sup>去磷酸化, 再引發

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

細胞凋亡，也是抑制癌症的研究發展途徑之一。

相關文獻報導中也指出，*p53* 與 Akt 對調控細胞生長是互相拮抗的。抑制 Akt 的活性，會促進 *p53* 的轉錄功能，進而引發細胞的凋亡。此外活化的 Akt 也會促進細胞增生，如 glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) (Osaki *et al.*, 2004)。另外也有報導指出，Akt 會間接的調控 *p53*，Akt 活性的增加，會加速 *p53* 的降解 (Ogawara *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003)，但是 Akt 的調控對於突變 *p53* 對細胞生長是否有任何影響卻鮮有報導。

### Topoisomerase II 抑制劑 VP-16 影響癌細胞的增生

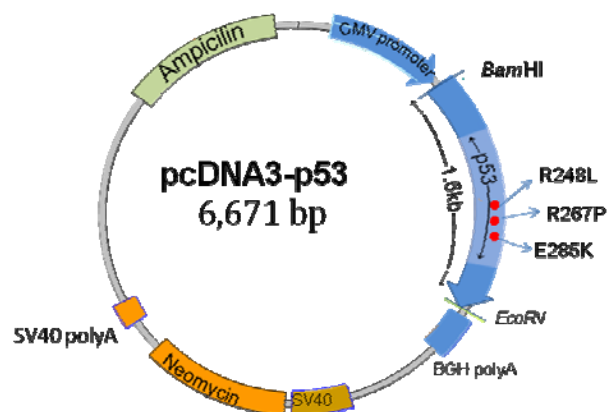
過去研究顯示 VP-16 會抑制腫瘤細胞的生長，生長抑制的主要原因是腫瘤細胞的細胞週期被藥物所停滯，進而引起細胞凋亡 (Boulares *et al.*, 2001)、細胞老化 (te Poele *et al.*, 2002) 或細胞死亡 (mitotic death) (Erenpreisa *et al.*, 2001)。過去研究也有報導，當不同 *p53* 突變基因型肺癌細胞株經 VP-16 處理之後，會造成細胞凋亡。這項研究使用的 *p53* 突變得細胞株，包括 H1299 (*p53*-null) (Chiu *et al.*, 2005a)，H1437 (R267P) (Chiu *et al.*, 2005b)，H1355 (E285K) 以及 H322 (R248L) 等，但是 VP-16 對野生型 *p53* 細胞株，如 A549 等，卻會讓細胞生長停滯至 G<sub>2</sub>/M 期，沒有出現任何凋亡 (Chiu *et al.*, 2005a, b)。為了深入瞭解 VP-16 對肺癌細胞的影響，是否與不同 *p53* 基因型有關，本研究選擇 H1299 (*p53* 缺失) 及轉殖不同突變位點 *p53* 質體轉殖至 H1299 所建立的穩定細胞株，再經由 VP-16 處理後，觀察這些細胞株的變化，並積極瞭解相關訊息傳導的機制以及和 *p53* 基因型的關聯性。

## 材料及方法

### 質體構築

#### pcDNA3-*p53* 質體的構築

利用 Bam HI 與 Sma I 限制酵素切出含有野生型 *p53* 的質體-pBS-*p53* (中研院生醫所謝小燕教授提供)，所獲得 1.6 kb，涵蓋 *p53* 蛋白質全長片段 1,302 bp (包括 434 個胺基酸)，利用 T4 DNA 接合酶，將此片段接入以限制酶切割位點為 Bam HI 與 EcoRV 後之 pcDNA3.1 載體上，經過篩選後，得到使用 CMV 啟動子驅動表現 *p53* 的質體- pcDNA3-*p53* (圖一)。



圖一、突變 *p53* 質體構築。將 CMV 啟動子驅動 pcDNA3-*p53* 之質體，以點突變的方式 (site-directed mutagenesis) 方式，建構不同 *p53* 的突變位點，構築 pcDNA3-*p53*(R267P)，pcDNA3-*p53*(E285K) 及 pcDNA3-*p53*(R248L) 等重組質體。構築的質體的序列皆由雙向定序確認，*p53* 突變位置以點狀顯示。

**Figure 1.** Preparation of *p53* construct. To make *p53* construct driven by CMV promoter, point mutations at codon 248, 267 and 285 were generated by site-directed mutagenesis as described in Material and Methods. The recombinant constructs, pcDNA3-*p53*(R267P), pcDNA3-*p53*(E285K) and pcDNA3-*p53*(R248L), were confirmed by DNA sequencing from both directions. The positions of mutated *p53* were shown in spots.

#### 突變型 *p53* 質體- pcDNA3-*p53*(R267P)，pcDNA3-*p53*(E285K) 及 pcDNA3-*p53*(R248L) 的構築

將含有全長 pcDNA3-*p53* 質體，利用 Quick Change II (Clontech) 方式，進行 site-directed mutagenesis，分別製備位於 codon 248, 267 與 284 突變點之 *p53*，並轉形入大腸桿菌後，經酵素切割及雙向 DNA 序列分析，確定選殖質體的正确性，得 pcDNA3-*p53*(R267P)，pcDNA3-*p53*(E285K) 及 pcDNA3-*p53*(R248L) 的重組質體。

### 穩定轉殖株之建立

#### 細胞培養

非小細胞肺癌 (NSCLC) 肺癌腺細胞 (adenocarcinoma) H1299 是培養於 DMEM (Invitrogen, Gaithersburg, MD) 培養液中，並添加 10% 去活化的胎牛血清 (fetal bovine serum)、1% 麩胺酸 (L-glutamine)、100 units/ml 青黴素 (penicillin) 及 100 µg/ml 鏈黴素 (streptomycin)，置於 37°C 並含 5% 二氧化碳及飽和濕度的培養箱培養。

### 轉殖重組基因載體與穩定細胞株篩選

分別取 pcDNA3-*p53*、pcDNA3-*p53*(R267P) 與 pcDNA3-*p53*(E285K) pcDNA3-*p53*(R248L) 質體各與 Opti-MEM 混勻後，加入已均勻混合好含 lipofectamine (Invitrogen) 之 Opti-MEM 中，於室溫下靜置 30 分鐘，再加入已接種  $2 \times 10^5$  H1299 的培養盤中，培養於 DMEM 培養液中，並添加 10 % 的胎牛血清，置於 37°C，含 5 % 二氧化碳及飽和濕度的培養箱中培養，經過 24 小時後換新培養液並加入 G418 (Geneticin, Invitrogen, Gaithersburg, MD) 進行篩選，確保留下的細胞含有轉入 pcDNA3-*p53*、pcDNA3-*p53*(R267P)、pcDNA3-*p53*(E285K)、pcDNA3-*p53*(R248L) 之質體，持續一至兩星期後將細胞株置換到 12 孔的培養皿，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，確認含轉入之質體，持續培養，得穩定細胞株 H1299/*p53*、H1299/*p53*(R267P)、H1299/*p53*(E285K) 及 H1299/*p53*(R248L)。

### 反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)

為合成 cDNA，實驗是將 total RNA 加入 random hexamer primer (Promega; Madison, WI)，加熱至 70°C、5 分鐘後，加入 reverse transcriptase buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT)、dNTP、recombinant RNase inhibitor 及 100 U MMLV reverse transcriptase (Invitrogen; Gaithersburg, MD)，混合均勻後靜置於 37°C 並作用 1 小時，以進行，然後加熱至 95°C，5 分鐘以停止 cDNA 的合成反應，立即放冰上冷卻，保存至 -20°C。利用 PCR 方式放大外源性突變的 *p53* 片段以及 GAPDH 片段，取 cDNA 混合物，加入 10 × buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8; 500 mM KCl; 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1% Triton-100)，去離子水、dNTP、2 μl 細胞外源性突變 *p53* 全長引子 (5'-CAT ATG TGG TAC CGA GCT CGA TGG AGG AGC C-3'; 5'-AAG CTT GCC ACT GTG CTG GAA TTG CAA GCA A -3') 或 GAPDH 引子 (5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3'; 5'-TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3')，利用 Taq DNA polymerase 進行 PCR，大量複製外源性突變 *p53* 片段 (1,306 bp) 與 GAPDH 片段 (236 bp)。其反應過程簡述如下：反應混合液先至 95°C 熱浴 10 分鐘，再於 95°C 進行第一階段裂解反應 1.5 分鐘，之後進行 59°C 作用 1.5 分鐘黏合反應；第三階段則於 72°C 進行 2.5 分鐘之延伸，如此重覆此 3 階段反應共 35 個週期，最末追加 72°C 延伸反應 10 分鐘後，於 4°C 終止反應。放大的片段為，以 6%

polyacrylamide 電泳分析 PCR 產物。

### 西方轉漬法偵測

以西方轉漬法 (Western blot) 鑑定細胞週期調控蛋白表現變化，包括 *p53*、AKT 及 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) 的調控情形。轉殖細胞經 5 μM VP-16 處理後，分別處理 2、4、8、16、24 及 48 小時後，吸除培養液，再用 PBS (phosphate-buffered saline; 0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 清洗細胞兩次，加入 RIPA 裂解緩衝液 (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% triton X-100, 5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 μg/ml leupeptin, 20 mM sodium phosphate, pH 7.0) 溶解後，使用細胞刮取器取下所有的溶解液，離心 (10,000 rpm, 30 分鐘, 4°C) 取得上清液以利用 Pierce 蛋白質定量試劑測定萃取蛋白質之濃度，並分裝後保存於 -20°C。電泳是利用相同重量蛋白質加入樣品緩衝液 (3 × sample buffer, 350 mM Tris-HCl, pH 6.8; 12% SDS; 0.02% bromophenol blue; 35% glycerol; 30% β-mercaptoethanol) 後煮沸 5 分鐘，以 SDS-PAGE (5% stacking gel 與 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。次以 transfer unit 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 blotting membrane, BioRad) 後，將膜取出並浸泡於 blocking solution (5% 脫脂奶粉 in PBS-T)，室溫下作用 1 小時後，以 PBS-T (PBS-0.5% Tween-20) 清洗 2 次，加入 1:5,000 稀釋的一級抗體，室溫下作用 1 小時後，以 PBS-T 清洗 3 次，並加入 1:2,000 稀釋的二級抗體，於室溫下作用 1 小時後，以 PBS-T 清洗 3 次，最後用 ECL Chemiluminescent system (Amersham; Arlington Height, IL) 試劑組加在膜上，避光反應 5 分鐘後，以冷光儀顯影。

### 細胞週期與 DNA 含量分析

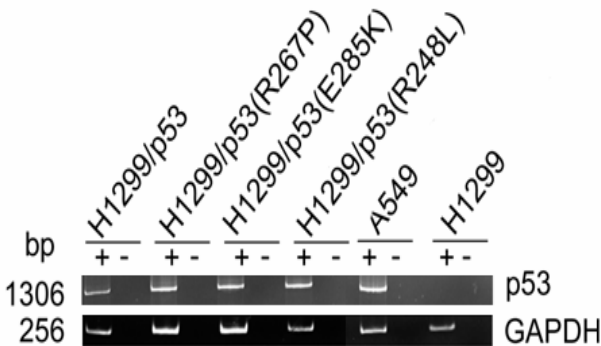
接種  $5 \times 10^5$  的細胞於 60-mm 細胞培養盤，經 20 小時培養後，以 5 μM 的 VP-16 處理 48 小時後，將細胞以 trypsin-EDTA 取下，經離心 2000 rpm 之後，先以 PBS 打散細胞，再加入等體積溶於 PBS 的 70% 酒精，於 -20°C 固定 16 小時後，加入含 5 μg/ml propidium iodide (Sigma; St. Louis, MO) 10 μg/ml RNase A (ICN Pharmaceutical; Costa Mesa, CA) 的 PBS 於室溫下避光反應 15 分鐘。並以流式細胞分析儀 (FACScan 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, 來界定細胞週期的各個階段(小於2N定為sub-G<sub>1</sub>, 2N為G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 4N為G<sub>2</sub>/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; Mountain View, CA), 計算各週期所佔的比例。

## 結果

### 建立不同p53基因型肺癌細胞株

將構築完成, 並經定序確認後pcDNA3-p53各式質體, 轉殖送入H1299細胞(p53-null), 並且篩選出含有外源p53的細胞株, 持續培養成穩定細胞株。將細胞萃取RNA之後, 利用反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)技術, 由所得到的cDNA, 分別以p53或GAPDH引子複製放大, 由電泳分離得到的片段, 決定p53表現與否。實驗結果顯示, 除了母細胞H1299之外, 所有轉殖野生型 p53、p53(R267P), p53(E285K)及p53(R248L)等肺癌細胞株之細胞株內皆表現完整長度 p53 RNA (圖二)。

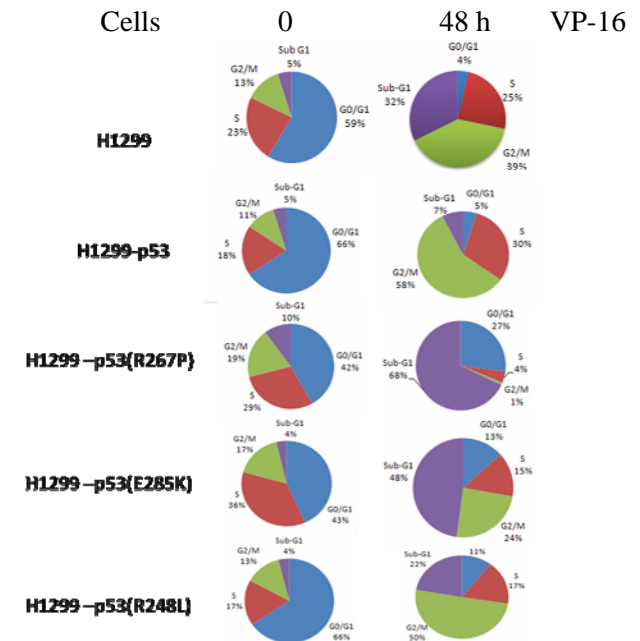


圖二、不同突變位點的p53基因細胞株p53表現。將培養後H1299, A549及H1299/p53、1299/p53(R267P)、H1299/p53(E285K)、H1299/p53(R248L), 萃取RNA之後, 分別以p53 primers及GAPDH primers檢測轉殖細胞株內含外源p53基因。

**Figure 2.** RNA expression with stably expressed p53 variants in H1299 cells. The extracted RNA from the stable clones H1299/p53, H1299/p53(R267P), H1299/p53(E285K) and H1299/p53(R248L) as well as the parental cells, H1299 along with wild-type lung epithelial cells A549 were reversely transcribed and amplified for determining the expression of p53 as described in Materials and Methods. The inclusion of GAPDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) is used as internal control.

### VP-16對轉殖細胞株細胞週期的變化

由流式細胞儀分析VP-16對細胞生長週期的變化及各相位所佔的比例, 結果顯示轉殖野生型p53質體, 轉移至H1299的穩定細胞株H1299/p53, 當加入5 μM VP-16處理48小時之後, 約58%細胞會停滯於G<sub>2</sub>/M期, 但無明顯sub-G<sub>1</sub>細胞群會由流式細胞儀所測到。但以5 μM VP-16處理之轉殖突變p53(R267P), p53(E285K)及p53(R248L)等肺癌細胞株, 經VP-16處理48小時後, 細胞凋亡sub-G<sub>1</sub>細胞的比例會增至48%以上, 此外p53缺失的H1299細胞, sub-G<sub>1</sub>細胞的比例也到達32%。顯示含有缺失或接受外源突變p53的穩定細胞對VP-16敏感度增加, 引發細胞的凋亡, 但是如果加入外源野生型p53至H1299所建立穩定細胞株, 於藥物處理之後, 細胞卻反而會被保護, 不致引發細胞凋亡(圖三)。



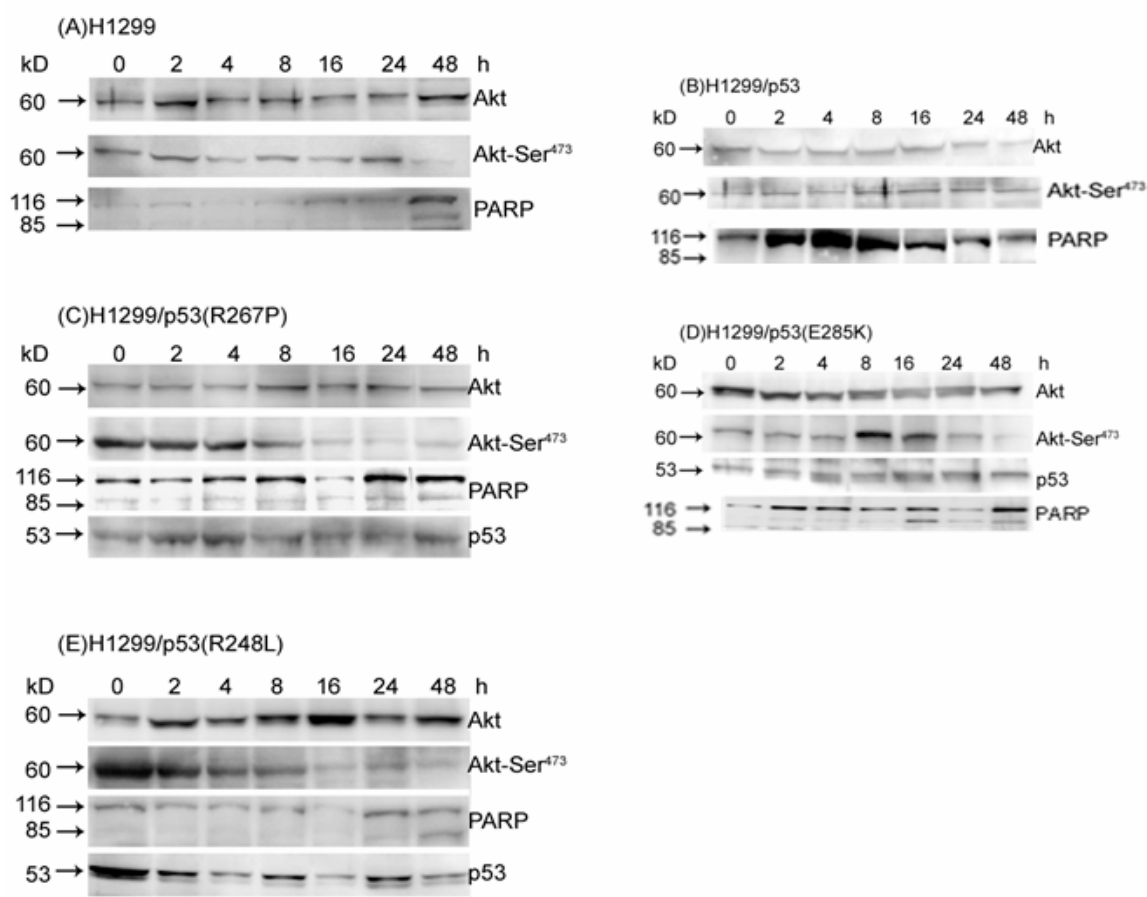
圖三、VP-16對細胞週期的影響。分別接種5×10<sup>5</sup>的細胞株於60 mm的細胞培養盤上, 待細胞貼附後, 加入5 μM之VP-16, 處理0及48小時後, 以trypsin收集所有細胞, 再以PI (propidium iodide)染色, 並使用流式細胞儀來鑑定細胞週期的變化及其所佔的比例, 細胞分佈圖是三個重複實驗之一。

**Figure 3.** The effects of cell cycle histograms by VP-16. A total of 5×10<sup>5</sup> cells were cultured in 60-mm plates. A concentration of 5 μM VP-16 was added in the adherent cells for 0 and 48 h, respectively. The trypsinized cells were stained with PI (propidium iodide) and analyzed by flow cytometry and the cell cycle distribution histograms determined. The results were the representative of three experiments.

### VP-16對細胞凋亡或細胞生存相關調控因子的影響

分別以5  $\mu$ M之VP-16處理H1299(圖四,A)、H1299/p53(圖四,B)、H1299/p53(R267P)(圖四,C)、H1299/p53(E285K)(圖四,D)、H1299/p53(R248L)(圖四,E)細胞株之後，於不同時間收集及定量蛋白質，再用西方轉漬分析p53、Akt、pAkt-Ser<sup>473</sup>及PARP等相關調控因子。實驗結果顯示，H1299、H1299/p53(E285K)、H1299/p53(R267P)及H1299/p53(R248L)細胞株，都會表現穩定Akt，而磷酸化之pAkt-Ser<sup>473</sup>隨著VP-16處理時間的增加，磷酸化降低程度越見明顯，而且在處理

48小時後，DNA修補酶PARP會逐漸被切割成85 kD的片段。相反的，H1299/p53細胞株，雖然細胞表現穩定的Akt，磷酸化之pAkt-Ser<sup>473</sup>卻未見降低，而且PARP也為被切割成85 kD的片段。此外轉殖野生型p53，雖然有持續表現RNA，但是未能偵測任何p53訊息，由於p53的代謝速率(turn-over rate)很快(Yee and Vousden, 2005)，因此可以推測不能藉由西方轉漬偵測到穩定的蛋白質，但是轉殖細胞確有穩定的RNA。其它轉殖突變p53細胞株，可以在各個時間點檢測出穩定p53蛋白質的訊息。



**圖四**、以西方轉漬法檢測VP-16對細胞凋亡相關蛋白質的影響。將轉殖細胞(A)H1299、(B)H1299/p53、(C)H1299/p53(R267P)、(D)H1299/p53(E285K)、(E)H1299/p53(R248L)培養24小時，加入VP-16後，於不同時間點，利用RIPA萃取細胞蛋白質，使用SDS-PAGE轉漬到Nitro-cellulose transfer membrane上，以p53、Akt、pAkt-Ser<sup>473</sup>、PARP抗體雜交，以goat-anti-rabbit二級抗體雜交，再以ECL呈色並以冷光儀顯示。

**Figure 4.** Western blotting. A total of  $5 \times 10^5$  cells were cultured in 60-mm plates. A concentration of 5  $\mu$ M VP-16 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 p53, PARP, Akt or pAkt-Ser<sup>473</sup>, followed hybridization with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. The blots were further developed by ECL illumination kit.



## 討 論

化學藥物治療是目前癌症主要的醫療方式之一，非小細胞癌症對化療藥物卻容易產生抗藥性，這種現象常見於p53突變之細胞(Bosken *et al.*, 2002)。過去研究有許多結果顯示，p53突變的細胞，也可以有效促成細胞凋亡，達到控制細胞生長的效果 (Janicek *et al.*, 1997)。也有文獻報導，VP-16會引發p53缺失的H1299細胞株的凋亡 (Chiu *et al.*, 2005a)。而本研究也進一步證明，低劑量的VP-16處理H1299細胞株之後，其生長速率明顯的下降，細胞內DNA修補酶PARP也被切成85 kD片段，進一步顯示VP-16確實能誘導H1299細胞引發細胞凋亡，另外VP-16處理轉殖突變型p53細胞株後，被切出85 kD的PARP片段也十分明顯，證實突變型p53細胞株，也會被VP-16引發細胞凋亡，與過去使用的細胞株結果一致。

隨著VP-16處理時間的增加，Akt於serine-473磷酸化的趨勢也遞減。但是這些現象在轉殖野生型p53的H1299細胞皆未能偵測到，因此可以推論外來的野生型p53會抑制磷酸化Akt的降解，讓細胞凋亡不至於發生。可以推論VP-16影響細胞存活是與Akt磷酸化效應的降解有關。這項研究也更進一步顯示，VP-16所引發非小細胞肺癌細胞凋亡的機制，不受突變型p53的影響，反而與磷酸化Akt的降解與否有關，而野生型p53拮抗pAkt-Ser<sup>473</sup>磷酸化的降解，使得細胞不能進入凋亡的途徑 (Oren, 2003)。為了要證實這種說法，日後宜再做更深入研究。例如，可以轉殖dominant-negative pAkt-Ser<sup>473</sup>質體至H1299細胞或其他突變型p53細胞之後，觀察VP-16對細胞生長變化是否受到影響，持續證實磷酸化Akt對藥物敏感的重要性。

過去研究認為，p53與細胞凋亡的產生有直接關係，但愈來愈多的數據顯示，p53會整合細胞所有的功能，不一定直接引發細胞凋亡，它會調整細胞整體功能，包括葡萄糖代謝增加及自體吞噬(autophagy)等(Green and Chiupak, 2006)，本文結果提供未來更進一步實驗的方向。

## 參考文獻

- Bosken CH, Wei Q, Amos CI and Spitz, M. R. 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.
- Boulares AH, Zoltoski AJ, Yakovlev A, Xu M, and Smulson ME. 2001. Roles of DNA fragmentation factor and poly(ADP-ribose) polymerase in an amplification phase of tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 276: 38185-38192.
- Braybrooke JP, Levitt NC, Joel S, Davis T, Madhusudan S, Turley H, Wilner S, Harris AL, and Talbot DC. 2003. Pharmacokinetic study of cisplatin and infusional etoposide phosphate in advanced breast cancer with correlation of response to topoisomerase II alpha expression. *Clin Cancer Res.* 9: 4682-4688.
- Brogna J, Clark AS, Ni Y, and Dennis PA. 2001. Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Res.* 61: 3986-97.
- Chiu CC, Lin CH, Fang K. 2005a. Etoposide (VP-16) sensitizes p53-deficient human non-small cell lung cancer cells to caspase-7-mediated apoptosis. *Apoptosis.* 10:643-50.
- Chiu CC, Li CH, Ung MW, Fuh TS, Chen WL, Fang K. 2005b. Etoposide (VP-16) elicits apoptosis following prolonged G<sub>2</sub>-M cell arrest in p53-mutated human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 223: 249-58.
- 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.
- Cooper BW, Donaher E, Lazarus HM, Green SB, Gosky DM, Rosenthal NS, Berger S J, Li X, Ingalls ST, Hoppel CL, and Gerson SL. 2003. A phase I and pharmacodynamic study of sequential topotecan and etoposide in patients with relapsed or refractory acute myelogenous and lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 27: 35-44.
- Edick MJ, Gajjar A, Mahmoud HH, van de Poll ME, Harrison PL, Panetta JC, Rivera GK, Ribeiro RC, Sandlund JT, Boyett JM, Pui CH, and Relling MV. 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of oral etoposide in children with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 21: 1340-1346.
- Erenpreisa J, and Cragg MS. 2001. Mitotic death: a mechanism of survival? A review. *Cancer*

- Cell Int. 1: 1.
- Froelich-Ammon SJ, and Osheroff N. 1995. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism. *J Biol Chem.* 270: 21429-21432.
- Greco FA. 1999. Oral etoposide in lymphoma. *Drugs.* 3: 35-41.
- Green DR, and Chipuk JE. 2006. p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell.* 126: 30-32.
- Hande KR. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer.* 34: 1514-1521.
- Hill MM, and Hemmings BA. 2002. Inhibition of protein kinase B/Akt: implications for cancer therapy. *Pharmacol and Therap.* 93: 243-251.
- Hofseth LJ, Hussain SP, and Harris CC. 2004. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 25: 177-181.
- Janicek MF, Angioli R, Unal AD, Sevin BU, Madrigal M Estape R, and Averette H E. 1997. p53 interference and growth inhibition in p53-mutant and overexpressing endometrial cancer cell lines. *Gynecol Oncol.* 66: 94-102.
- Kamradt JM, and Pienta KJ. 2000. Etoposide in prostate cancer. *Expert Opin. Pharmacother.* 1: 271-275.
- Keller-Juslen C, Kuhn M, Stahelin H, and von Wartburg A. 1971. Synthesis and antimetabolic activity of glycosidic lignan derivatives related to podophyllotoxin. *J Med Chem.* 14: 936-940.
- Martin AC, Facchiano AM, Cuff AL, Hernandez-Boussard T, Olivier M, Hainaut P, and Thornton JM. 2002. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum Mutat.* 19: 149-164.
- 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.
- Neskovic-Konstantinovic ZB, Bosnjak SM, Radulovic SS, and Mitrovic LB. 1996. Daily oral etoposide in metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs.* 7: 543-547.
- Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama N, and Gotoh Y. 2002. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem.* 277: 21843-21850.
- Oren, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *cell death and differentiation* (2003) 10: 431-442.
- Osaki M, Oshimura M, Ito H. 2004. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis.* 9: 667-76.
- Peng Y, Li C, Chen L, Sebti S, and Chen J. 2003. Rescue of mutant p53 transcription function by ellipticine. *Oncogene.* 22: 4478-87.
- Rigacci L, Carpaneto A, Alterini, Carrai V, Bernardi F, Bellesi G, Longo G, Bosi A, and Rossi-Ferrini P. 2003. Treatment of large cell lymphoma in elderly patients with a mitoxantrone, cyclophosphamide, etoposide, and prednisone regimen: long-term follow-up results. *Cancer.* 97: 97-104.
- 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. Z Biochem.* 146: 483-488.
- te Poele RH, Okorokov A, Jardine L, Cummings J, and Joel S. P. 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 62: 1876-1883.
- Yee KS, Vousden KH. 2005. Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis.* 26: 1317-22.

## VP-16-mediated Akt-Ser<sup>473</sup> Dephosphorylation Induces Apoptosis in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells with Mutated *p53*

Chia-Wei Lin, Ming-Yi Lin, Chung-Hsin Wu, Hwei-tein Huang, Kang Fang\*  
Department of Life Science, National Taiwan Normal University  
Taipei, Taiwan

(Received: 26 September 2007, accepted: 30 October 2007)

### ABSTRACT

In this work, constructs of both wild type and mutated *p53* were transfected into *p53*-deficient human non-small cell lung cancer cells, H1299. Treatment with topoisomerase inhibitor VP-16 induced apoptosis by dephosphorylating pAkt-Ser<sup>473</sup> in cells of stable clones expressing mutant *p53*, whereas those with exogenous wild type *p53* were arrested at G<sub>2</sub>/M phase without apparent apoptotic phenotype and phosphorylated pAkt-Ser<sup>473</sup> level remained intact. Thus, it is reasonable to conclude that VP-16 induced apoptosis in human lung cancer cells by modulating pAkt-Ser<sup>473</sup> phosphorylation and exogenous wild-type *p53* reversed the progression.

**Key words:** human non-small cell lung cancer, VP-16, Akt, apoptosis

---

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