

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.05.004

◇ 药学研究 ◇

极光激酶 A 抑制剂 MLN8237 对宫颈鳞状细胞癌细胞 顺铂化疗敏感性的影响

马玉花^{1,2}, 张泽高³, 马苗苗³, 热伊拉·麦买提伊敏³, 开丽曼·阿不都巴热³, 杨杰³, 祁小丽³作者单位:¹克拉玛依市中心医院病理科,新疆维吾尔自治区 克拉玛依 834000;²同济大学附属东方医院病理科,上海 200092;³新疆维吾尔自治区人民医院放疗二科,新疆维吾尔自治区 乌鲁木齐 830001

通信作者:杨杰,女,主任医师,硕士生导师,研究方向为妇科恶性肿瘤和消化道恶性肿瘤治疗,E-mail: 13579879118@163.com

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2017D01C149)

摘要:目的 探讨极光激酶 A(Aurora-A, Aurora A)抑制剂 MLN8237 对人宫颈鳞状细胞癌细胞(HCC94)顺铂(cisplatin)化疗敏感性的影响。**方法** 采用不同浓度 MLN8237 联合顺铂在不同时间作用于 HCC94 细胞,用四唑盐(MTT)比色法观察药物对细胞生长的抑制,蛋白质印迹法(Western Blotting)分析胞质内 P21wip1、P53、P(S315)-P53、Aurora A 和 P(T288)-Aurora A 蛋白的表达;用流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** MLN8237(10~160 $\mu\text{mol/L}$)或顺铂(10~160 $\mu\text{mol/L}$)均明显抑制 HCC94 细胞的生长($P < 0.05$),并引起细胞凋亡;小剂量 MLN8237(5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)和顺铂(2.5、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$)联合应用,与单用顺铂比较,可明显增加细胞增殖抑制率和细胞凋亡率(均 $P < 0.05$)。与对照组比较,MLN8237 处理组 P21wip1 和 P53 表达显著增高,P(S315)-P53 和 P(T288)-Aurora A 表达显著降低,Aurora A 表达不改变。与对照组比较,顺铂组 P21wip1/Cip1 和 P53 表达轻微增高,P(S315)-P53 表达轻微降低,Aurora A 和 P(T288)-Aurora A 蛋白表达不改变。与各单药组和对照组比较,联合组对以上各种蛋白的影响作用显著加强。**结论** 小剂量 MLN8237 可增强宫颈鳞状细胞癌细胞 HCC94 对顺铂的敏感性,增强化疗疗效。

关键词: 宫颈肿瘤; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 极光激酶 A; MLN8237; 顺铂; 细胞增殖; 细胞凋亡; 体外研究

Effect of aurora A inhibitor MLN8237 on chemosensitivity of cervical squamous cell carcinoma cells to cisplatin

MA Yuhua^{1,2}, ZHANG Zegao³, MA Miaomiao³, REYILA·Maimaitiyimin³, KAILIMAN·Abudubare³,
YANG Jie³, QI Xiaoli³

*Author Affiliation:*¹Department of Pathology, Karamay Central Hospital of Xinjiang Karamay, Karamay, Xinjiang Uygur Autonomous Region 834000, China; ²Department of Pathology, Oriental Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200092, China; ³Radiotherapy Second Branch, The People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumchi, Xinjiang Uygur Autonomous Region 830001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of MLN8237, an inhibitor of Aurora-A (Aurora A), on the sensitivity of human cervical squamous cell carcinoma line HCC94 to cisplatin chemotherapy and its possible mechanisms. **Methods** Different concentrations of MLN8237 combined with cisplatin were used to treat HCC94 cells at different times. MTT assay was used to observe the inhibitory effect on cell growth. The expression of P21wip1, P53, P(S315)-P53, Aurora A and P(T288)-Aurora A protein expression in the cytoplasm were analyzed by Western Blotting. Flow cytometry was used to detect apoptosis. **Results** Both MLN8237 (10~160 $\mu\text{mol/L}$) and cisplatin (10~160 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the growth of HCC94 cells ($P < 0.05$), and induced apoptosis. Combination of low dose MLN8237(5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$) and cisplatin (2.5, 5, 10 and 20 $\mu\text{mol/L}$) resulted in more significant inhibition on growth and apoptosis of HCC94 cells than cisplatin alone (all $P < 0.05$). Compared with the control group, the MLN8237 treatment group showed significantly higher expression of P21wip1 and P53, significantly lower expression of P(S315)-P53 and P(T288)-Aurora A, and no change in Aurora A. Compared with the control group, P21wip1/Cip1 and P53 was decreased, and P(S315)-P53 expression was decreased. The expression of Aurora A, P(T288)-Aurora A protein was not changed in the cisplatin group. Compared with the single drug group and the control group, the effect of the combination group on the above proteins was significantly enhanced. **Conclusion** Low dose of MLN8237 can enhance the sensitivity of cervical squamous cell carcinoma cells to cisplatin, thus enhancing the curative effect and provide reference for further research.

Key words: Uterine cervical neoplasms; Protein-serine-threonine kinases; Aurora A; MLN8237; Cisplatin; Cell proliferation; Apoptosis; In vitro

宫颈癌是世界女性第二大恶性肿瘤,也是第二大最常见恶性肿瘤死亡原因^[1]。发展中国家宫颈癌晚期病例更常见,包括 I B2~IV A 期^[2]。顺铂对晚期宫颈癌化疗有效,但容易产生耐药,且耐药的机制尚未定论^[3]。极光激酶 A(Aurora A)在细胞周期进展的调节中起关键作用,是体内肿瘤形成的必需条件^[4]。有报道 Aurora A 抑制剂 MLN8237 在顺铂(DDP)耐药的胃癌细胞系中可逆转其耐药性^[5],但在宫颈癌中尚缺乏相关研究。本研究自 2017 年 11 月至 2018 年 11 月探讨极光激酶 A 抑制剂与顺铂在体外宫颈癌细胞系联合应用的效果,为临床应用提供依据。

1 资料与方法

1.1 主要试剂与药品 兔抗人 P(T288)-Aurora A 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,兔抗人 P53(9282)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗人 P(S315)-P53(2528)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗人 P21WAP1/cip1(2947)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。碱性磷酸酶标记的 IgG 羊抗兔二抗购自北京钟彬中桥生物公司,顺铂购自中国齐鲁制药有限公司,MLN8237 购自美国 Selleck 公司,细胞凋亡(556547)检测试剂盒购自美国 BD 公司。

1.2 细胞系 宫颈鳞状细胞癌 HCC94 细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 研究方法

1.3.1 细胞培养 细胞贴壁生长在 25 cm² 培养瓶中,加入 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素及 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,置于 37 ℃、二氧化碳体积分数 5% 及饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 天传代一次。

1.3.2 四唑盐(MTT)法检测 MLN8237 对细胞增殖能力的影响取对数生长期 HCC94 细胞,细胞密度为 5×10^4 /mL,于前一天下午接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L,置于 37 ℃、二氧化碳体积分数为 5%、饱和湿度的培养箱中培养过夜。至细胞单层铺满孔底,加入浓度梯度的药物,次日上午加药,每孔 100 μ L。设 6~7 个梯度,5 个复孔。以终浓度 MLN8237 为 5、10、20、40、80 和 160 μ mol/L,DDP 2.5、5、10、20、40、80 和 160 μ mol/L 加入药物。对照孔加入相同浓度的药物溶解介质二甲基亚砜(DMSO)。另设只加培养液的调零孔。联合作用组以小剂量进行联合作用,同时加入联合作用药物。药物浓度分别以 MLN8237 为 5、10、20 μ mol/L,DDP 2.5、5、10、20 μ mol/L。分别在给药 24 h 和 48 h 后每孔加入 5 g/L MTT 20 μ L,继续培养 4~6 h,吸弃培养液加入 DMSO

150 μ L,振荡 15 min,酶标仪 570 nm 波长,比色测定 OD 值。实验重复 3 次。计算肿瘤细胞存活率(%):=(实验组 OD 值-调零孔 OD 值/对照组 OD 值-调零孔 OD 值)×100%。

1.3.3 流式细胞术检测 MLN8237 联合顺铂对 HCC94 细胞凋亡的影响 MLN8237(终浓度 2 μ mol/L)、顺铂(终浓度 1 μ mol/L),分别单独作用和联合作用 48 h,收获细胞,制成单细胞悬液,分别按细胞凋亡试剂盒说明书操作,实验重复 3 次。结果分析采用 ModFit 软件。

1.3.4 Western 印迹方法 用 MLN8237(终浓度 2 μ mol/L),顺铂(终浓度 1 μ mol/L)和 MLN8237(2 μ mol/L)加顺铂(终浓度 1 μ mol/L)培养 HCC94 细胞(5×10^6 /mL)48 h 收获细胞。按说明书提取蛋白,进行定量,取 25 μ g 蛋白上样。10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,12%分离胶,转印到 PVDF 膜,将膜移至含有 QuickBlock™ Western 封闭液的平皿中,室温封闭 20 min。适当浓度一抗孵育 4 ℃ 过夜,辣根过氧化物酶羊抗兔二抗孵育 1~2 h,Western 洗涤液洗涤,ECL 显色液显色,放入 BIO-RAD 凝胶成像分析系统,得到印迹图像。

1.4 统计学方法 实验重复 3 次,收集数据,取平均值。采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。药物相互作用分析采用两因素多水平析因设计,统计分析采用析因设计方差分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MLN8237 处理后细胞形态变化 采用倒置显微镜观察,传代细胞接种过夜后,贴壁良好,1~2 d 后进入对数生长期,3~4 d 后贴满瓶壁,各组细胞培养基均清亮。对照组细胞生长密集,贴壁良好,表面清晰,大小一致,折光度均一,细胞呈椭圆形,细胞界限清晰,核仁多,胞质丰富。各加药组细胞增殖明显变慢,集落形成减少,密度均较对照组为低,MLN8237 作用组细胞体积逐渐增大,出现较多空泡,细胞内颗粒增多,折光率降低,部分细胞变圆脱落,漂浮细胞增多,细胞间出现间隙,细胞形态改变,随药物浓度增高,作用时间延长更加明显(图 1)。

2.2 顺铂、MLN8237 及两者联合对 HCC94 细胞生长的影响 MTT 法检测结果显示,顺铂、MLN8237 ≥ 10 μ mol/L 时均明显抑制 HCC94 细胞的生长,且随药物浓度加大和作用时间延长,抑制作用都得到加强(图 2)。

2.3 MLN8237 和顺铂不同浓度联合应用对 HCC94 细胞增殖的影响 选择具有抑制作用,但单独作用

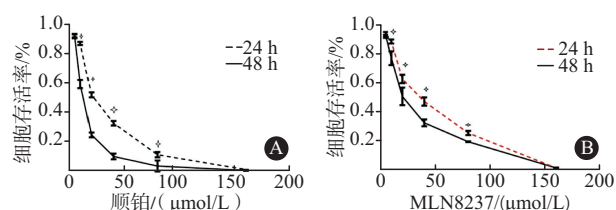


图2 顺铂(A)和MLN8237(B)对HCC94细胞生长的抑制

不明显的 MLN8237 浓度 5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$, 顺铂 2.5、5、10 和 20 $\mu\text{mol/L}$, 时间点 24 h 用于后续实验。多因素方差分析显示, 顺铂不同剂量抑制 HCC94 细胞增殖效果不同 ($F = 393.11, P < 0.01$), MLN8237 不同剂量抑制 HCC94 细胞增殖效果不同 ($F = 335.85, P < 0.01$), 顺铂和 MLN8237 有交互作用 ($F = 7.99, P < 0.01$)。顺铂 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 MLN8237 20 $\mu\text{mol/L}$ 联合应用, 对 HCC94 细胞增殖抑制效果最好。两两比较, 均差异有统计学意义 (均 $P < 0.01$), 见表 1, 图 3。

表1 MLN8237和顺铂不同浓度联合应用对HCC94细胞增殖的影响/(%, $\bar{x} \pm s$)

顺铂	MLN8237			
	0 $\mu\text{mol/L}$	5 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$
0 $\mu\text{mol/L}$	100.00 $\pm$ 0.00	94.74 $\pm$ 2.21	86.59 $\pm$ 1.25	65.48 $\pm$ 2.53
2.5 $\mu\text{mol/L}$	95.54 $\pm$ 1.35	85.26 $\pm$ 3.51	78.65 $\pm$ 2.36	56.84 $\pm$ 2.54
5 $\mu\text{mol/L}$	91.93 $\pm$ 1.84	67.43 $\pm$ 4.23	59.65 $\pm$ 4.53	48.46 $\pm$ 3.87
10 $\mu\text{mol/L}$	85.73 $\pm$ 2.55	54.62 $\pm$ 3.26	42.32 $\pm$ 3.96	36.62 $\pm$ 4.53
20 $\mu\text{mol/L}$	52.16 $\pm$ 4.68	41.97 $\pm$ 5.21	29.65 $\pm$ 5.18	19.26 $\pm$ 5.26

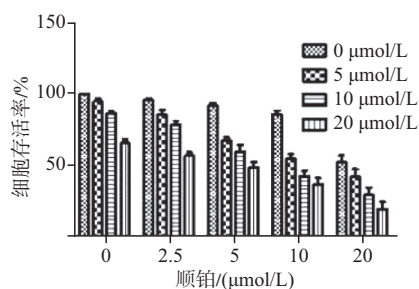


图3 顺铂和MLN8237联合作用对HCC94细胞生长的抑制作用

2.4 流式细胞术检测顺铂、MLN8237 处理后细胞凋亡的变化 MLN8237 处理组凋亡率较对照组显著增高, 早期凋亡为主, 少量晚期凋亡; 顺铂组早期

凋亡率较对照组有增高, 主要为早期凋亡; 联合组早期、晚期凋亡率均较各单药组加强, 均差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$), 见表 2, 图 4。

表2 不同药物处理 48 h 后 HCC94 细胞凋亡情况/ $\bar{x} \pm s$

组别	早期凋亡	晚期凋亡
对照组	0.04 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.07
MLN8237	20.42 $\pm$ 4.68 ^a	4.45 $\pm$ 1.27 ^a
DDP	12.61 $\pm$ 3.42 ^a	0.41 $\pm$ 0.34 ^a
MLN8237+DDP	36.52 $\pm$ 4.82 ^{ab}	11.94 $\pm$ 3.76 ^{ab}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与各单药组比较, ^b $P < 0.05$, DDP 为顺铂

2.5 蛋白印迹结果 MLN8237 处理组 P21wip1/Cip1 和 P53 表达较对照组显著增高, P(S315)-P53 和 P(T288)-Aurora A 表达显著降低, Aurora A 表达不改变。顺铂组 P21wip1/Cip1 和 P53 表达较对照组轻微增高, P(S315)-P53 表达轻微降低, Aurora A 和 P(T288)-Aurora A 蛋白表达不改变。联合组对以上各种蛋白的影响作用较各单药组加强 (图 5)。

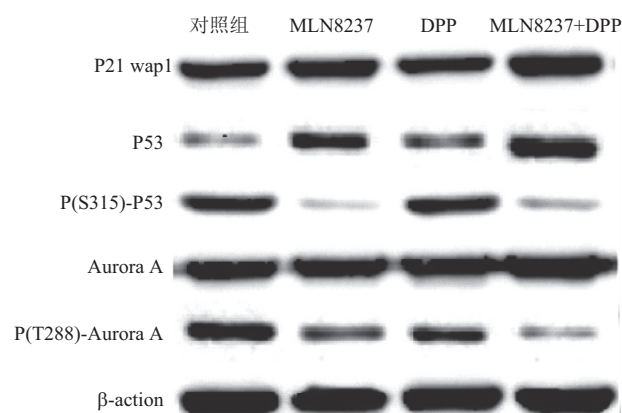


图5 不同药物处理HCC94细胞48 h后蛋白表达变化情况

3 讨论

虽然为了提高宫颈癌患者的预后, 目前有很多治疗方法在不断探索中^[6-7]。但最新 NCCN 指南仍推荐, 以 DDP 为基础的同期放化疗为目前中晚期宫颈癌的一线治疗方案。DDP 也被认为是晚期和复发宫颈癌的标准化疗方案^[8]。但顺铂化疗可引起消化

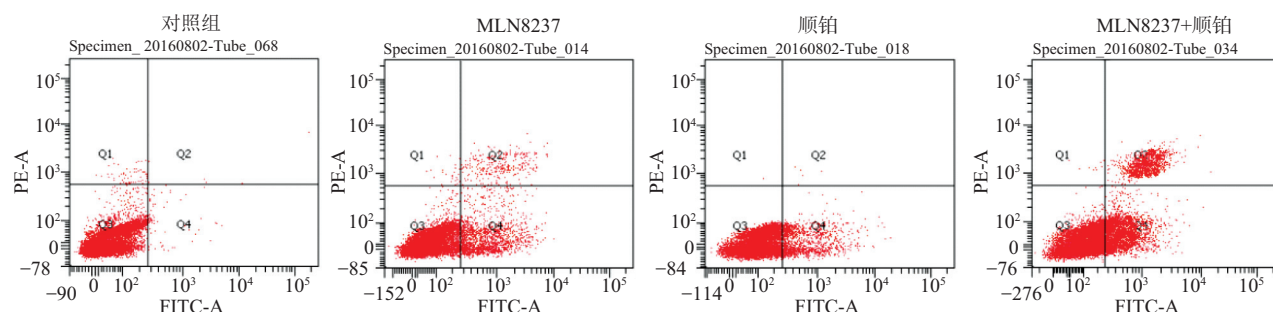


图4 不同药物处理48 h后HCC94细胞的凋亡情况

道反应,很多患者不能耐受;且顺铂化疗抗拒也影响了治疗效果,使顺铂使用受到极大限制。因此,在提高早期检出率的同时,有必要筛选有效的治疗靶点,并在不增加顺铂化疗药物剂量或不良反应的前提下提高疗效。

人体细胞通过有丝分裂进行增殖分化,有丝分裂进展准确,对于维持染色体稳定性至关重要^[9]。通过及时准确调节多种激酶活性,才可确保有丝分裂顺利进展。丝氨酸/苏氨酸激酶 Aurora A 表达或功能异常,都会导致遗传物质分配紊乱,出现非整倍体^[10]。不稳定非整倍体形成,是肿瘤的成因。有研究发现,头颈部鳞状细胞癌中 Aurora A 高表达患者预后差,减少其表达,可抑制细胞增殖和增加凋亡^[11];增加其表达,可促进肿瘤增殖^[10]。Aurora-A 抑制剂 MLN8237 是抗肿瘤治疗的有效策略^[12], I 期、II 期临床试验显示,其效果及安全性良好,目前已进入 III 期临床试验。我们前期研究已证实极光激酶可预测宫颈癌放疗抵抗和预后不良,其小分子抑制剂可逆转放疗抵抗^[13],以顺铂为基础的同期放化疗又是目前中晚期宫颈癌的一线治疗方案,如果极光激酶 A 抑制剂对顺铂有显著化疗增敏作用,那么将为临床推广应用提供更有利的依据。

本研究采用 MLN8237 联合顺铂处理 HCC94 细胞,结果表明,两药低浓度联合应用,会明显抑制细胞增殖,显著提高凋亡率。蛋白印迹显示经 MLN8237 处理后, P53 的 Ser315 位点磷酸化表达降低, P53 表达增高。P53 的 Ser315 位点磷酸化,可促进 MDM2 介导的 P53 降解。本研究提示 Aurora A 抑制剂 MLN8237 减少 P53 的 Ser315 位点磷酸化,抑制 MDM2 介导的 P53 降解。DNA 损伤后, P53 蛋白水平明显升高,启动下游细胞修复机制,如 P21 Waf1/Cip1 蛋白表达上调,细胞周期停滞于 G1 期,对损伤的 DNA 进行修复。如修复成功,则细胞周期进入 S 期,失败则损伤细胞进入细胞程序性死亡,即凋亡阶段。本研究中, P21 waf1 蛋白经 MLN8237 处理,表达明显增高, DPP 处理组未见明显变化,联合组表达显著增高,与相关研究结果一致。本研究还显示, MLN8237 不改变 Aurora A 表达,但降低 P(T288)-Aurora A 表达。

有研究和我们结果一致, Aurora A 是非小细胞肺癌患者中不良预后和顺铂治疗抵抗的生物标志物,并通过构建过表达和敲低表达体系,为其成为治疗靶点和逆转顺铂药物耐药提供了潜在证据^[14]。Aurora A 抑制剂 VX680 与顺铂对 HepG2 细胞以剂量和时间依赖性方式协同抑制增殖^[15]。

综上所述, MLN8237 作为 Aurora A 的小分子选

择性抑制剂,不仅逆转宫颈癌放疗抵抗,而且也是一线同步化疗方案以及晚期和复发宫颈癌标准化疗方案——顺铂的良好增敏剂。本研究提供了抗宫颈癌治疗的新方法新思路,为其进一步临床推广提供了依据。

(本文图 1 见插图 5-1)

参考文献

- [1] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] MOORE MA, ATTASARA P, KHUHPREMA T, et al. Cancer epidemiology in mainland South-East Asia - past, present and future [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2010, 11 Suppl 2: 67-80.
- [3] ZHU H, LUO H, ZHANG W, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 1885-1895.
- [4] DE CASTRO I P, AGUIRRE-PORTOLÉS C, FERNÁNDEZ-MIRANDA G, et al. Requirements for Aurora-A in tissue regeneration and tumor development in adult mammals [J]. Cancer Res, 2013, 73(22): 6804-6815.
- [5] WANG L, ARRAS J, KATSHA A, et al. Cisplatin-resistant cancer cells are sensitive to Aurora kinase A inhibition by alisertib [J]. Mol Oncol, 2017, 11(8): 981-995.
- [6] 马益民, 程靖辉, 朱菊盼. 基于患者为中心的介入治疗与放射治疗联合疗法在中晚期宫颈癌治疗中的效果分析[J]. 安徽医药, 2018, 22(5): 889-893.
- [7] 范素香. 新辅助化疗对早期局部肿块型宫颈癌手术疗效的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(8): 1585-1587.
- [8] LORUSSO D, PETRELLI F, COINU A, et al. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer[J]. Gynecol Oncol, 2014, 133(1): 117-123.
- [9] ASTERITI IA, DE MATTIA F, GUARGUAGLINI G. Cross-talk between AURKA and Plk1 in mitotic entry and spindle assembly[J]. Front Oncol, 2015, 5: 283.
- [10] MAIA AR, VAN HEESBEEN RG, MEDEMA RH. A growing role for Aurora A in chromosome instability[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(8): 739-741.
- [11] MEHRA R, SEREBRIISKII IG, BURTNESS B, et al. Aurora kinases in head and neck cancer[J]. Lancet Oncol, 2013, 14(10): e425-435. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70128-1.
- [12] 于洋, 于丽娜, 谢萍, 等. 人源极光激酶 A 在毕赤酵母和 MCF-7 细胞中的表达及纯化[J]. 吉林大学学报(医学版), 2017, 43(2): 266-270.
- [13] HILTON JF, SHAPIRO GI. Aurora kinase inhibition as an anticancer strategy[J]. J Clin Oncol, 2014, 32(1): 57-59.
- [14] KUANG P, CHEN Z, WANG J, et al. Characterization of aurora a and its impact on the effect of cisplatin-based chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. Transl Oncol, 2017, 10(3): 367-377.
- [15] YAO R, ZHENG J, ZHENG W, et al. VX680 suppresses the growth of HepG2 cells and enhances the chemosensitivity to cisplatin[J]. Oncol Lett, 2014, 7(1): 121-124.

(收稿日期: 2019-01-27, 修回日期: 2019-03-23)