

去氢毛钩藤碱抗突变型 p53 (R273H) 结直肠癌的体外作用机制研究

任泽昊, 张彦, 刘东辉, 孔德新, 邱玉玲*

天津医科大学药学院, 天津 300070

摘要: **目的** 从抑制结直肠癌细胞 HT29 增殖角度研究去氢毛钩藤碱 (hirsuteine, HST) 对突变型 p53 (R273H) 结直肠癌的体外抗癌作用机制。 **方法** 采用 MTT 和平板克隆形成实验评价 HST 对 HT29 细胞增殖的影响; 流式细胞术和丹酰尸胺 (dansylcadaverine, MDC) 染色法检测细胞周期分布和自噬情况; Western blotting、qRT-PCR 分析细胞中 p53 蛋白、mRNA 表达水平和 p53 下游效应子的表达情况; 放线菌酮 (actidione, CHX)-chase 实验检测 p53 蛋白半衰期; 染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 实验检测 p53 与其下游靶基因 p21 启动子区的结合情况。 **结果** HST 显著抑制突变型 p53 (R273H) 结直肠癌 HT29 细胞增殖, 引起细胞周期阻滞, 诱导杀伤性细胞自噬, 缩短突变型 p53 (R273H) 蛋白半衰期, 诱导其发生 MDM2 介导的泛素-蛋白酶体降解, 增强其与 p21 启动子的结合, 并上调 p21 的 mRNA 表达。 **结论** HST 能够促进 HT29 细胞中突变型 p53 (R273H) 降解并恢复 p53 野生型转录激活功能, 其体外抗结直肠癌活性可能与 p53 通路密切相关。

关键词: 结直肠癌; 去氢毛钩藤碱; 突变型 p53 (R273H); 蛋白酶体降解; p53 野生型转录特性恢复

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)10-3354-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.10.014

In vitro anticancer mechanism of hirsuteine on mutant p53 (R273H) colorectal cancer

REN Zehao, ZHANG Yan, LIU Donghui, KONG Dexin, QIU Yuling

School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective** To study *in vitro* anticancer mechanism of hirsuteine (HST) on mutant p53 (R273H) colorectal cancer from a perspective of inhibiting colorectal cancer cell (HT29) proliferation. **Methods** MTT and plate clone formation assay were used to evaluate the effect of HST on proliferation of HT29 cells; Flow cytometry and dansylcadaverine (MDC) staining were used to detect cell cycle distribution and cell autophagy; The protein and mRNA expression levels of p53 and the expression of p53 downstream effectors were analyzed by Western blotting and qRT-PCR; Actidione (CHX)-chase assay was used to detect the half-life of p53; Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was used to detect the binding situation of p53 and its downstream target gene p21 promoter region. **Results** HST significantly inhibited cell proliferation, arrested cell cycle, and induced autophagy on mutant p53 (R273H) colorectal cancer HT29 cells. Meanwhile, HST shortened mutp53 (R273H) protein half-life, induced MDM2-mediated ubiquitin-proteasome degradation of mutp53 (R273H), increased the DNA binding ability of mutp53 (R273H) at the p21 promoter, and up-regulated p21 mRNA expression. **Conclusion** HST promotes mutp53 (R273H) degradation and restores its wild-type transcriptional activation function in HT29 cells. The *in vitro* anticancer effect of HST on mutant p53 (R273H) colorectal cancer might be closely related with p53 pathway.

Key words: colorectal cancer; hirsuteine; mutant p53 (R273H); proteasomal degradation; p53 wild-type-like transcriptional properties restoration

结直肠癌是结肠癌和直肠癌的统称, 根据近期的数据统计, 全球结直肠癌发病率在癌症中排名第 3, 死亡率排名第 2, 并且结直肠癌的发病率还在逐

年升高^[1]。目前结直肠癌的治疗策略依然是以手术治疗为主, 再以奥沙利铂、卡培他滨等辅助化疗。尽管已经开发出的西妥昔单抗、贝伐珠单抗等靶向

收稿日期: 2024-01-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973570)

作者简介: 任泽昊 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为民族药抗肿瘤药理。E-mail: 13753833420@163.com

*通信作者: 邱玉玲, 副教授, 研究方向为中药、民族药抗肿瘤药理。E-mail: qiuyuling@tmu.edu.cn

药物可以极大地改善结直肠癌患者的生存期,但是患者面临的高复发率和耐药性等问题亟待解决^[2]。肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53) 编码的野生型 p53 (wild-type p53, wtp53) 是一种重要的肿瘤抑制因子,通过对多个基因的转录调控来发挥抗肿瘤的作用。wtp53 的激活是正常细胞生存和抑制肿瘤发生的关键^[3]。然而,TP53 在人类大多数癌症中发生突变,最终产生突变型 p53 (mutant p53, mutp53),导致 wtp53 肿瘤抑制功能丧失,并且获得致癌功能^[4]。近些年的研究表明 TP53 基因突变或者失活的比例在各种癌症中都达到了 50%,而 50% 的结直肠癌患者存在 p53 突变^[5]。p53 突变肿瘤患者的恶性程度更高,表现为预后差、对化疗药敏感性差、容易复发等^[6]。因此,mutp53 已成为抗肿瘤药物研发的热门靶点。

在肿瘤组织中,错义突变是 TP53 常发生的突变形式,R175、G245、R248、R249、R273 和 R282 是较常见的 6 个突变热点^[7]。研究发现,这些热点突变可以分为 2 类,第 1 类是 DNA 接触突变体如 R273H 和 R248W。第 2 类是结构突变体如 R175H 等^[8]。研究表明,具有 p53 (R273H) 纯合子突变体的小鼠发生癌症转移的风险增加,且 p53 (R273H) 位点突变的结直肠癌的增殖活性、细胞干性和耐药性均有所增强^[9]。这揭示了 p53 (R273H) 突变密切参与了结直肠癌的病理过程。目前由于 DNA 接触突变型 p53 在肿瘤病理过程中的作用机制尚不明确,DNA 接触突变型 p53 的靶向药物研发进程缓慢。

据文献报道,钩藤属植物具有潜在的抗肿瘤活性^[10]。Ciani 等^[11]发现毛钩藤水提物对鳞癌细胞具有抑制增殖和诱导凋亡作用。生物碱类化合物是钩藤属植物的特征性化学成分,其抗肿瘤作用也被广泛研究,其中的钩藤碱、异钩藤碱、去氢钩藤碱等对肝癌、乳腺癌均具有体外抗肿瘤作用^[10,12-14]。去氢毛钩藤碱(hirsuteine, HST)是从钩藤属植物中分离得到的一种吲哚生物碱,已有研究显示 HST 在肺癌和乳腺癌中展示出了良好的抗肿瘤活性^[15-16],课题组前期研究发现 HST 具有潜在的体外抗慢性粒细胞白血病活性^[17],但其抗结直肠癌活性及其作用机制目前仍不明确。本研究选取 mutp53 (R273H) 结直肠癌细胞 HT29,探究 HST 抗突变型 p53 (R273H) 结直肠癌活性和作用机制,为 HST 抗结直肠癌的进一步开发提供实验基础。

1 材料

1.1 细胞

HT29 细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 药品与试剂

HST (质量分数≥98%,批号 AF20080211) 购自成都埃法生物科技有限公司;PBS (批号 C3580-0500)、0.25%胰酶 (含 EDTA,批号 C3530-0500)、双抗 (批号 C3421-0100)、RPMI 1640 培养基 (批号 C3001-0500)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 C04001-500)、细胞冻存液 (批号 C3522-0100)、ECL 发光试剂 (批号 M5901-0500) 购自上海逍鹏生物科技有限公司;β-actin 抗体 (批号 8457S)、裂殖酵母 cdc2 基因编码的蛋白 (cdc2 protein, cdc2) 抗体 (批号 9116S)、细胞周期蛋白 B1 (Cyclin B1) 抗体 (批号 4138S)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 7074S)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号 7076S) 购自美国 CST 公司;p21 抗体 (批号 10355-1-AP)、微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain3, LC3) 抗体 (批号 14600-1-AP)、p53 抗体 (批号 10442-1-AP) 购自美国 Proteintech 公司;MTT、过硫酸铵 (ammonium persulphate, APS) 购自美国 Amresco 公司;十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS)、30%聚丙烯酰胺、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司;染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 试剂盒 (批号 P2078) 购自碧云天生物技术公司;丹酰尸胺 (dansylcadaverine, MDC) 试剂盒 (批号 DA0041) 购自北京雷根生物技术有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 23227) 购自美国 Pierce Biochemicals 公司;2×Real Star Green Fast Mix、Star Scrip II First-strand cDNA Synthesis Mix (批号 A236) 购自北京 GeneStar 公司;蛋白质合成抑制剂放线菌酮 (actidione, CHX, 批号 S741804)、蛋白酶体抑制剂硼替佐米 (bortezomib, PS341, 批号 S101318)、氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu, 批号 S120904)、自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA, 批号 S276713) 购自美国 Selleck 公司;wtp53 转录激活抑制剂 Pifithrin-α (PFT-α, 批号 HY-15484-13022)、MDM2 抑制剂 Nutlin-3a (批号 HY-10029-06213) 购自美国 MCE 公司。

1.3 仪器

Heracell™ Vios 160i CR 型 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BD Accuri™ C6 型流

式细胞仪(美国 BD 公司); ME204E 型精密分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); iMark-1681130 型全自动酶标仪、Mini-PROTEAN® Tetra 电泳仪、Chemidoc XRS+化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);微量可调移液器(德国 Eppendorf 公司); CKX31 型倒置显微镜、BX51 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HT29 细胞用含 10% FBS、1% 双抗的 RPMI 1640 完全培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

2.2 细胞活力测定

HT29 细胞以 4×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,给予 HST (0、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h;以 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,给予 HST (0、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$) 或 5-Fu (0、5、10、20、40、80、160、300 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h;每孔加入 5 mg/mL MTT,孵箱孵育 4 h 后使用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度(A)值,使用 GraphPad 软件计算半数抑制率(half inhibitory concentration, IC₅₀)。

HT29 细胞以 2×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,设置对照组、HST (20 $\mu\text{mol/L}$) 组、3-MA (100 $\mu\text{mol/L}$) 组和 HST+3-MA 组,给予药物处理 48 h,检测细胞活力,考察 HST、3-MA 单用或联用对细胞存活率的影响。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 平板克隆形成实验

HT29 细胞以 1 500 个/孔接种于 6 孔板中,设置对照组和 HST (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组,给予药物处理 48 h 后,更换为不含药物的完全培养基,继续培养 10 d,每 3 天更换 1 次新鲜培养基。菌落用 4% 多聚甲醛固定,用 0.25% 结晶紫染色,用 Image J 软件对菌落进行拍照和计数。

2.4 流式细胞术检测细胞周期分布

HT29 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,设置对照组和 HST (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组,给予药物处理 48 h 后,收集细胞,加入 75% 冰乙醇于 4 °C 固定过夜;加入碘化丙啶(propidium iodide, PI),4 °C 避光染色 30 min,用流式细胞仪分析细胞周期分布。

2.5 MDC 染色检测细胞自噬情况

按照“2.4”项下方法分组和给药,收集细胞,调整细胞悬液密度为 1×10^6 个/mL,加入 10 μL

MDC 染色液,室温避光染色 30 min。清洗细胞,重悬细胞后,取 10 μL 细胞悬液滴加于载玻片上,加盖盖玻片,于荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 Western blotting 检测相关蛋白表达

HT29 细胞以 3×10^5 个/mL 接种于 10 cm 细胞培养皿中,按“2.4”项下方法分组和给药,或给予 HST (40 $\mu\text{mol/L}$) 分别处理 0、12、24、48 h,收集细胞,加入细胞裂解液提取总蛋白,使用 BCA 定量法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于脱脂牛奶中封闭后,分别加入一抗和二抗孵育,使用 ECL 检测试剂盒通过化学发光凝胶成像系统进行显影。

设置对照组、HST (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、PS341 (2 $\mu\text{mol/L}$) 组和 HST+PS341 组,HST 处理细胞 42 h 再加入 PS341 处理细胞 6 h 后,检测 p53 蛋白表达。设置对照组、HST (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、Nutlin-3a (15 $\mu\text{mol/L}$) 组和 HST+Nutlin-3a 组,给予药物处理 48 h 后,检测 p53 蛋白表达。设置对照组、HST (40 $\mu\text{mol/L}$) 组、PFT- α (10 $\mu\text{mol/L}$) 组和 HST+PFT- α 组,给予药物处理 48 h 后,检测 p21 蛋白表达。

2.7 qRT-PCR 检测 p53、p21 mRNA 表达

HT29 细胞以 3×10^5 个/mL 接种于 10 cm 细胞培养皿中,按“2.4”项下方法分组和给药,收集细胞,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列:p53 上游引物 5'-TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC-3',下游引物 5'-AGGACAGGCACAAACACGCACA-3';p21 上游引物 5'-TGTCCGTCAGAACCCATGC-3',下游引物 5'-AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)上游引物 5'-CATGAGAA-GTATGACAACAGCCT-3',下游引物 5'-AGTCCT-TCCACGATACCAAAGT-3'。

2.8 CHX-Chase 实验检测 HST 对 HT29 细胞 mutp53 (R273H) 蛋白半衰期的影响

HT29 细胞以 3×10^5 个/mL 接种于 10 cm 细胞培养皿中,单独给予 CHX (100 $\mu\text{mol/L}$) 或联合给予 HST (40 $\mu\text{mol/L}$) 分别处理 0、3、6、12 h,收集细胞,采用 Western blotting 检测 p53 蛋白表达。

2.9 ChIP 实验检测 HST 对 mutp53 (R273H) 富集 p21 启动子的影响

HT29 细胞以 3×10^5 个/mL 接种于 10 cm 细胞培养皿中,给予 HST (40 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 后用 1%

甲醛固定细胞，甘氨酸溶液处理终止交联。收集细胞，加入含 1% PMSF 的裂解缓冲液裂解，对细胞进行超声破碎后，取出 40 μL 样品作为 Input，其他分为实验组和对照组。向实验组中加入 p53 抗体，对照组加入等量 IgG，4 $^{\circ}\text{C}$ 翻转混匀过夜。第 2 天，加入 60 μL Protein A+G，4 $^{\circ}\text{C}$ 混匀 1 h，以沉淀一抗识别的蛋白。清洗沉淀。样品用 5 mol/L NaCl 处理，65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 4 h，然后用蛋白酶 K 处理，45 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h。用 PCR 纯化试剂盒纯化染色质复合物。PCR 检测纯化的免疫沉淀 DNA，用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算 p21 启动子上 p53 的占位率。p21 引物序列为上游引物 5'-GTTCCCAGCACTTCCTCTCC-3'，下游引物 5'-GAAGCAGGCAGCATAGGGAT-3'。

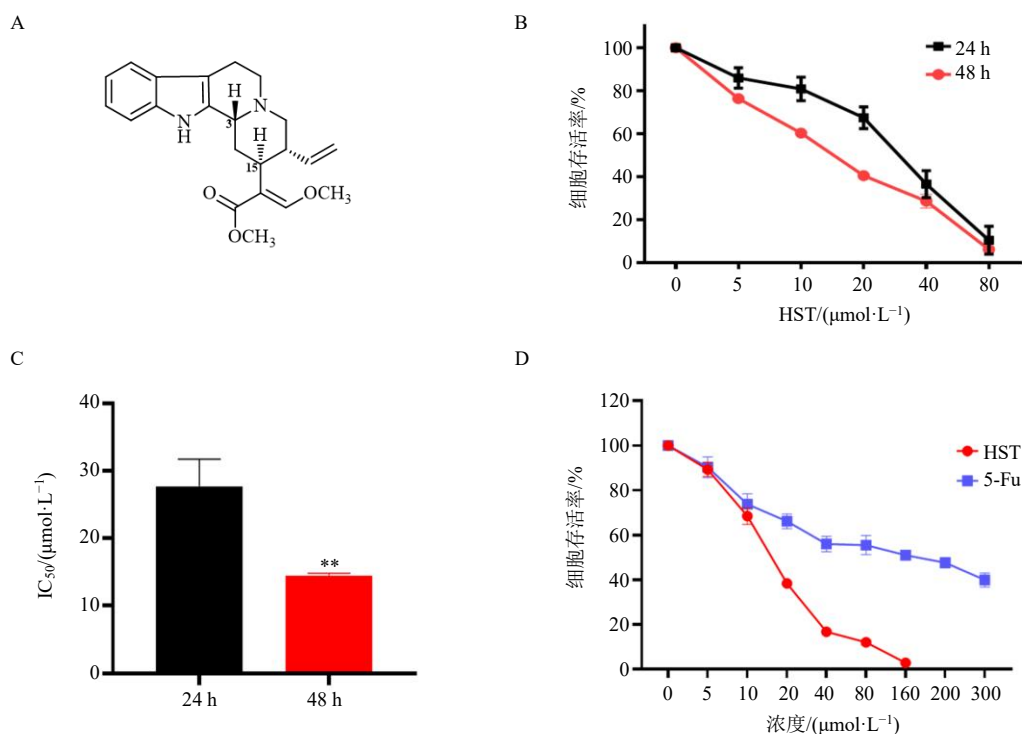
2.10 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，实验结果应用 GraphPad Prime 5 软件进行 t 检验或者单因素方差分析。

3 结果

3.1 HST 对 HT29 细胞增殖的影响

3.1.1 MTT 检测 HST 对 HT29 细胞的增殖抑制活性 HST 的化学结构见图 1-A，采用 MTT 检测 HST 干预 24、48 h 对 HT29 细胞活力的影响，如图 1-B 所示，HST 呈浓度相关性地抑制 HT29 细胞增殖，且药物的 IC_{50} 值在 48 h 显著低于 24 h ($P < 0.01$ ，图 1-C)，因此选择 HST 干预 HT29 细胞 48 h 开展后续实验。以 5-Fu 作为阳性对照，HST 对 HT29 细胞作用 48 h 的增殖抑制活性优于 5-Fu (图 1-D)。



A-HST 的化学结构；B-不同浓度的 HST 干预 24、48 h 对 HT29 细胞增殖的影响；C-HST 干预 HT29 细胞不同时间的 IC_{50} 值；D-HST 或 5-Fu 干预 48 h 对 HT29 细胞增殖的影响；与 24 h 干预组比较：** $P < 0.01$ 。

A-chemical structure of HST; B-effect of HST at different concentrations for 24, 48 h on proliferation of HT29 cells; C- IC_{50} values of HST intervention on HT29 cells at different times; D-effect of HST or 5-Fu intervention for 48 h on proliferation of HT29 cells; ** $P < 0.01$ vs 24 h treatment group.

图 1 HST 抑制 HT29 细胞增殖 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

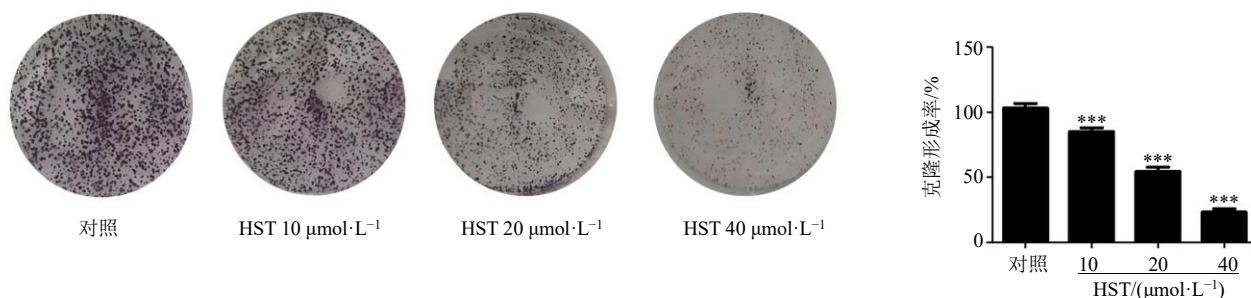
Fig. 1 HST inhibits HT29 cell proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.1.2 平板克隆形成实验检测 HST 对 HT29 细胞成瘤性的影响 采用平板克隆形成实验进一步检测 HST 对 HT29 的增殖抑制活性，如图 2 所示，HST 显著抑制 HT29 细胞克隆形成 ($P < 0.001$)。

3.2 HST 对 HT29 细胞周期分布和自噬的影响

3.2.1 HST 对 HT29 细胞周期分布的影响 HST 作

用于 HT29 细胞 48 h 后，流式细胞术检测结果显示，处于 G_2/M 期的细胞数量明显增多 ($P < 0.001$ ，图 3-A、B)，Western blotting 结果显示，细胞中 Cyclin B1 和 cdc2 蛋白表达受到抑制 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$ ，图 3-C、D)，说明 HST 可以诱导 HT29 细胞 G_2/M 期周期阻滞。

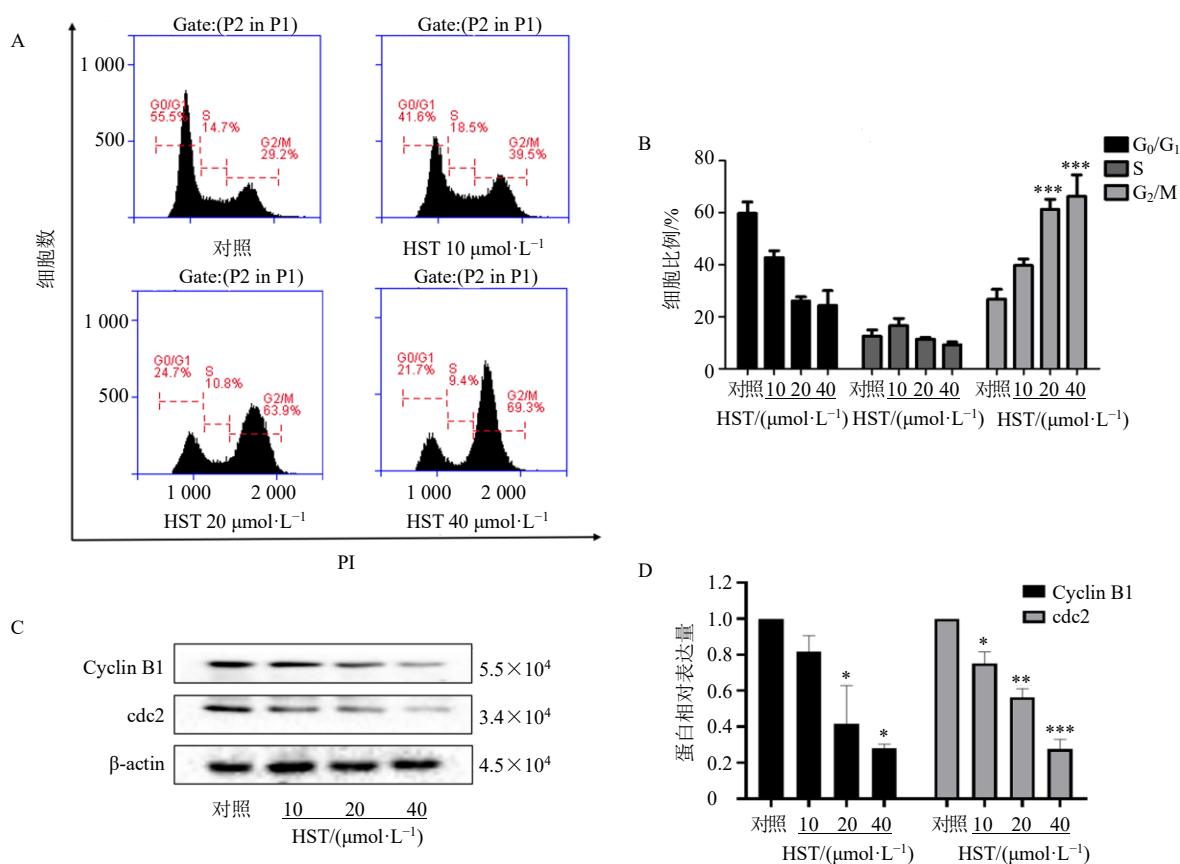


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below figures.

图 2 HST 抑制 HT29 细胞克隆形成 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 HST inhibits clone formation of HT29 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-流式细胞术检测细胞周期分布; B-HST 干预后 HT29 细胞周期分布统计; C-HST 对细胞周期相关蛋白表达的影响; D-周期相关蛋白的相对表达量。

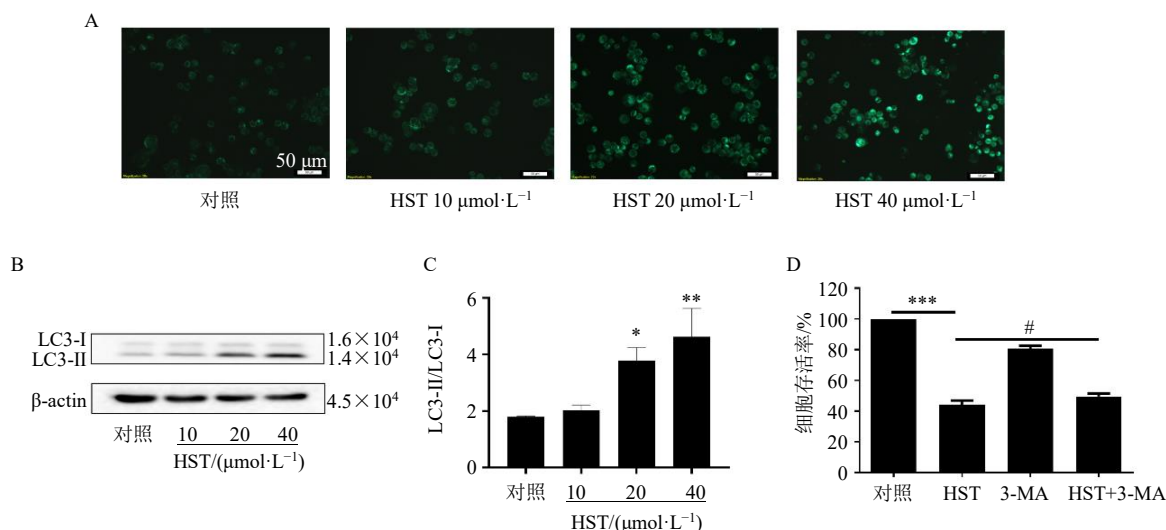
A-cell cycle distribution detected by flow cytometry; B-statistics of cell cycle distribution in HT29 after HST treatment; C-effect of HST on cell cycle related proteins expressions; D-relative expression level of cell cycle related proteins.

图 3 HST 阻滞 HT29 细胞周期 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 HST induces HT29 cell cycle arrest ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2.2 HST 对 HT29 细胞自噬的影响 MDC 染色结果显示, HST 引起 HT29 细胞中自噬小体增多 (图 4-A), Western blotting 结果也发现了 HST 引起 LC3-II/LC3-I 值增加 ($P < 0.05, 0.01$, 图 4-B、C), 说明

HST 诱导 HT29 细胞自噬发生。而自噬抑制剂 3-MA 可以减弱 HST 对 HT29 细胞的增殖抑制活性 ($P < 0.05$, 图 4-D), 表明 HST 在 HT29 细胞中诱导自噬小体生成是其发挥抗结直肠癌作用的重要因素之一。



A-MDC 染色检测细胞自噬；B-Western blotting 检测 HST 对自噬相关蛋白表达的影响；C-自噬相关蛋白的相对表达量；D-MTT 检测 HST、3-MA 单用或联用对细胞存活率的影响；与 HST 给药组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ，下同。

A-cell autophagy detected by MDC staining; B-effect of HST on autophagy related protein expressions detected by Western blotting; C-relative expression level of autophagy related protein; D-effect of HST, 3-MA alone or in combination on cell viability detected by MTT; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs HST group, same as below figures.

图 4 HST 诱导 HT29 细胞自噬 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

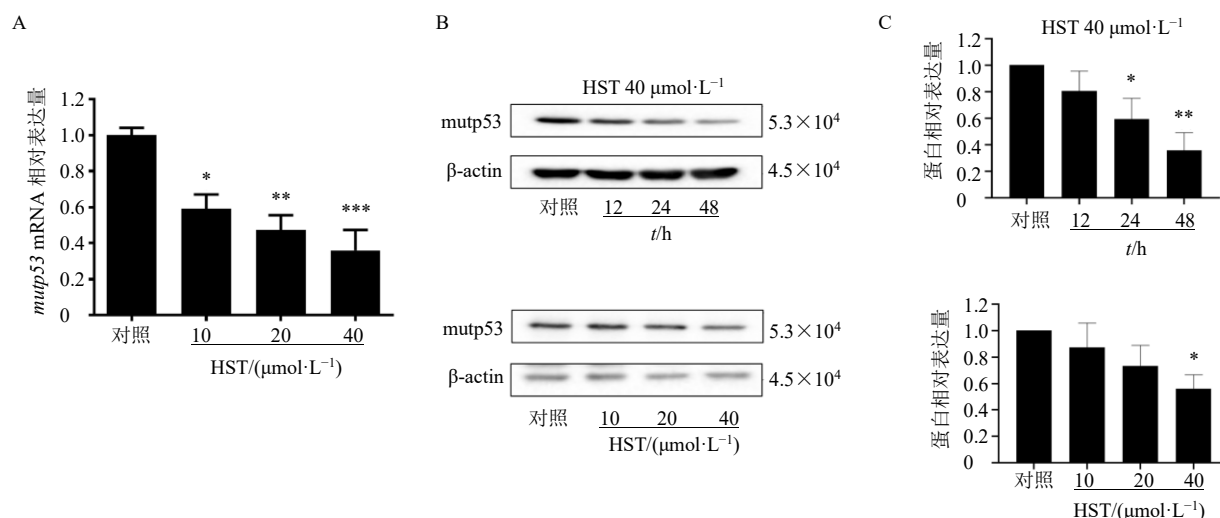
Fig. 4 HST induces HT29 cells autophagy ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 HST 降低 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 表达水平，并恢复其野生型转录功能

3.3.1 HST 降低 HT29 细胞 mutp53 (R273H) 表达 qRT-PCR 检测结果显示，HST 能抑制 mutp53 (R273H) 的 mRNA 表达 ($P<0.05$ 、0.01、0.001，图 5-A)。Western blotting 检测结果显示，HST 呈剂

量和时间相关性地抑制 mutp53 (R273H) 蛋白表达 ($P<0.05$ 、0.01，图 5-B、C)。

3.3.2 HST 诱导 HT29 细胞 mutp53 (R273H) 发生泛素-蛋白酶体降解 CHX-chase 实验结果显示，HST 引起 mutp53 (R273H) 蛋白半衰期缩短 (图 6-A)。蛋白酶体抑制剂 PS341 和 MDM2 抑制剂 Nutlin-3a 能够

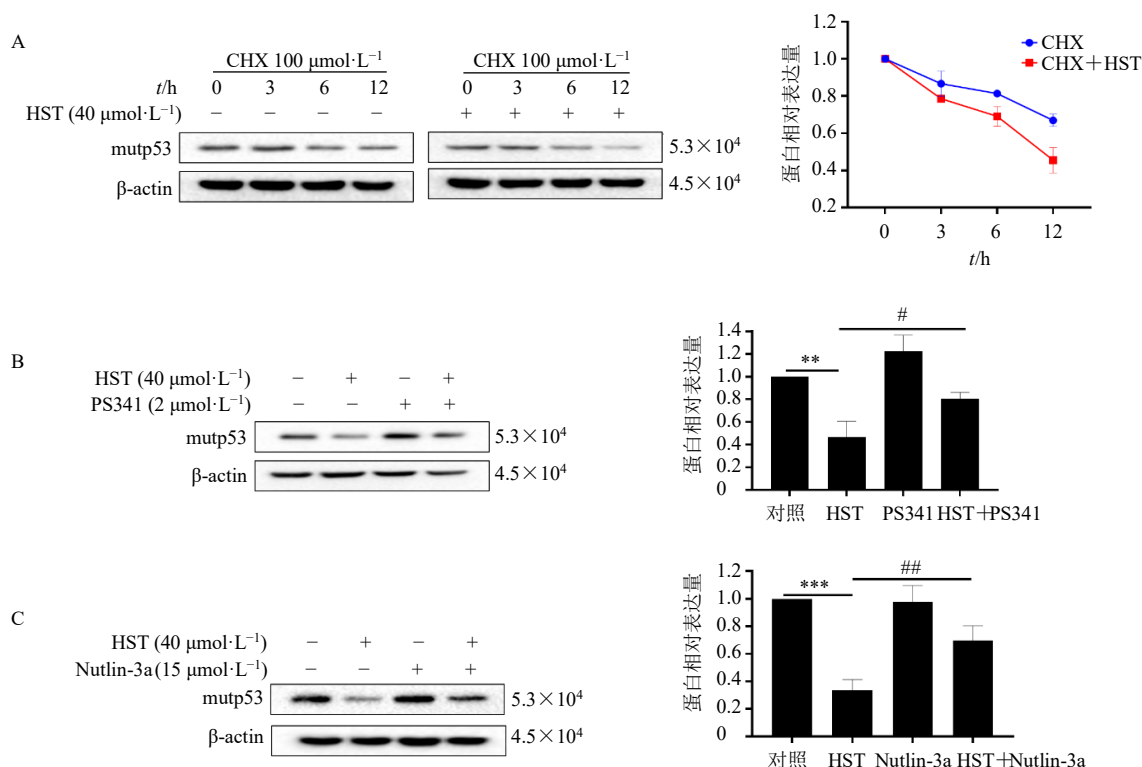


A-qRT-PCR 检测 mutp53 (R273H) 的 mRNA 表达水平；B-Western blotting 检测 HST 对 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 蛋白表达的影响；C-mutp53 (R273H) 的蛋白相对表达量。

A-mRNA expression level of mutp53 (R273H) detected by qRT-PCR; B-effect of HST on mutp53 (R273H) protein expression in HT29 cells detected by Western blotting; C-relative expression level of mutp53 (R273H) protein.

图 5 HST 降低 HT29 细胞 mutp53 (R273H) 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 HST decreases mutp53 (R273H) expression in HT29 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-CHX-chase 实验检测 HST 对 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 蛋白半衰期的影响; B-HST、PS341 单用或联用对 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 蛋白表达的影响; C-HST、Nutlin-3a 单用或联用对 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 蛋白表达的影响。

A-effect of HST on half-life of mutp53 (R273H) protein in HT29 cells detected by CHX-chase assay; B-effect of HST, PS341 alone or in combination on mutp53 (R273H) protein expression in HT29 cells; C-effect of HST, Nutlin-3a alone or in combination on mutp53 (R273H) protein expression in HT29 cells.

图 6 HST 诱导 mutp53 (R273H) 发生泛素-蛋白酶体降解 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 HST induces mutp53 (R273H) degradation through ubiquitin proteasome pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

削弱 HST 引起的 mutp53 (R273H) 蛋白降解 ($P < 0.05$ 、 0.01 , 图 6-B、C), 表明 HST 能够诱导 mutp53 (R273H) 发生 MDM2 介导的泛素-蛋白酶体降解。

3.3.3 HST 恢复 HT29 细胞 mutp53 (R273H) 野生型转录功能 ChIP 实验结果显示, HST 能增强 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 与 p21 启动子结合 ($P < 0.05$, 图 7-A)。qRT-PCR 检测结果显示, 给予 HST 后, p21 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$, 图 7-B), 而 wtp53 转录激活抑制剂 PFT- α 能显著削弱 HST 对 p21 蛋白的上调作用 ($P < 0.01$, 图 7-C)。以上结果表明, HST 能够诱导 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 蛋白降解, 恢复其野生样转录活性。

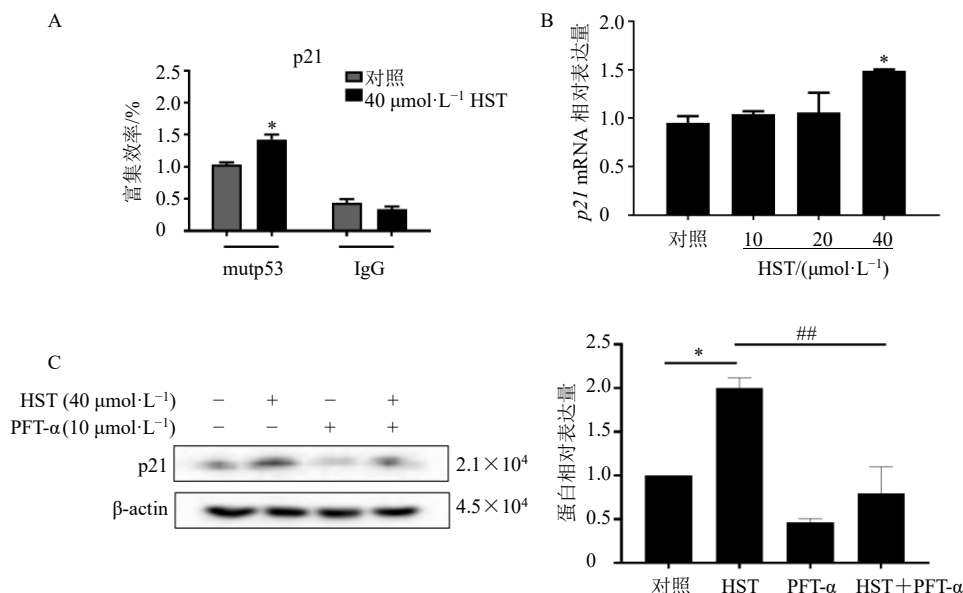
4 讨论

结直肠癌是一种常见的消化道肿瘤, 在所有癌症中发病率和死亡率均位于前列。目前手术治疗仍然是主要临床治疗策略, 同时会采用奥沙利铂等药物辅助化疗。但是临床上, 患者对化疗药物产生了不同程度的耐药^[2], 而 p53 突变的结直肠癌患者的

耐药性和复发性更强^[18], 因此寻找一种可以靶向突变型 p53 的药物或许对患者的生存更加有利。迄今为止, 中药来源的天然产物在癌症治疗方面表现出巨大的开发潜力。本研究选取 DNA 接触型 mutp53 (R273H) 结直肠癌细胞, 评价了 HST 的抗结直肠癌活性和作用机制。

本研究结果显示, HST 可以抑制 HT29 细胞增殖, 表明 HST 具有抗 mutp53 (R273H) 型结直肠癌活性。诱导细胞周期阻滞是治疗肿瘤的有效策略之一^[19]。细胞周期有 G₁/S、S、G₂/M、M4 个检查点。其中 Cyclin B 和 cdc2 是 G₂/M 期的总开关, 调控 G₂/M 期转化^[20]。本研究中, HST 能诱导 HT29 细胞 G₂/M 期周期阻滞, 发挥抗结直肠癌作用。

自噬对癌症进展发挥着双刃剑的作用。一方面, 自噬可以促进肿瘤细胞死亡, 另一方面肿瘤细胞通过自噬分解蛋白等物质可以为自身提供生长所需要的养料^[21-22]。本研究中, HST 促进了 HT29 细胞自噬小体形成, 而 HST 和 3-MA 共同作用, 相比于



A-ChIP 实验检测 HST 对 mutp53 (R273H) 富集 p21 启动子的影响; B-qRT-PCR 检测 HST 对 HT29 细胞中 p21 mRNA 表达的影响; C-HST、PFT- α 单用或联用对 HT29 细胞中 p21 蛋白表达的影响。
A-effect of HST on DNA binding ability of mutp53 (R273H) at p21 gene promoter detected by ChIP assay; B-effect of HST on p21 mRNA expression in HT29 cells detected by qRT-PCR; C-effect of HST, PFT- α alone or in combination on p21 protein expression in HT29 cells.

图 7 HST 恢复 HT29 细胞 mutp53 (R273H) 野生型转录功能 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

Fig. 7 HST restores wild-type-like transcriptional properties of mutp53 (R273H) in HT29 cells ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

HST 单用组, 细胞存活率有所恢复, 表明 HST 诱导 HT29 细胞自噬是其发挥抗结直肠癌作用的重要因素之一。但其对自噬溶酶体功能、自噬流的作用及分子机制还有待进一步阐明。

与 wtp53 相比, mutp53 的一个显著特点是半衰期长, 这可能是由于 mutp53 泛素化降解受到抑制所引起^[23]。MDM2 是 E3 泛素化连接酶, 可以诱导 p53 发生泛素蛋白酶体降解。在正常细胞中, p53 与 MDM2 之间存在负反馈调节。当 p53 发生突变时, 由于 p53 不能激活 MDM2 而失去了反馈调节机制, 这可能也是 mutp53 蛋白在细胞内不断累积并且获得促肿瘤能力的潜在原因之一^[24]。本研究中, HST 缩短了 HT29 细胞 mutp53 (R273H) 的半衰期, 下调了 mutp53 (R273H), 蛋白酶体抑制剂 PS341 和 MDM2 抑制剂 Nutlin-3a 均能削弱 HST 该活性, 表明 HST 能诱导 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 发生 MDM2 介导的泛素化蛋白酶体降解。由于 p53 突变位点通常位于其 DNA 结合结构域上, 导致 mutp53 蛋白失去其野生型转录活性, 从而失去肿瘤抑制功能。本研究发现 HST 能增强 HT29 细胞中 mutp53 (R273H) 与 p21 启动子结合, 恢复野生样转录活性。因此, HST 对 HT29 细胞的抗结直肠癌作用机制可

能是基于 HST 促进 mutp53 (R273H) 蛋白降解并恢复野生型转录功能。

综上, HST 可能通过促进 mutp53 (R273H) 蛋白降解并恢复野生型转录功能而对 mutp53 (R273H) 型结直肠癌细胞发挥抗癌作用, 本研究为进一步开发 HST 为抗结直肠癌药物先导物提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dekker E, Tanis P J, Vleugels J L A, *et al.* Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [2] Piawah S, Venook A P. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer [J]. *Cancer*, 2019, 125(23): 4139-4147.
- [3] Hernández Borrero L J, El-Deiry W S. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2021, 1876(1): 188556.
- [4] Sabapathy K, Lane D P. Therapeutic targeting of p53: All mutants are equal, but some mutants are more equal than others [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018, 15(1): 13-30.

- [5] Pfister N T, Prives C. Transcriptional regulation by wild-type and cancer-related mutant forms of p53 [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7(2): a026054.
- [6] Thant A A, Wu Y Y, Lee J, *et al.* Role of caspases in 5-FU and selenium-induced growth inhibition of colorectal cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(6A): 3579-3592.
- [7] Leroy B, Anderson M, Soussi T. TP53 mutations in human cancer: Database reassessment and prospects for the next decade [J]. *Hum Mutat*, 2014, 35(6): 672-688.
- [8] Malami I, Muhammad A, Etti I C, *et al.* An *in silico* approach in predicting the possible mechanism involving restoration of wild-type p53 functions by small molecular weight compounds in tumor cells expressing R273H mutant p53 [J]. *EXCLI J*, 2017, 16: 1276-1287.
- [9] Zhao Y C, Li Y R, Sheng J, *et al.* P53-R273H mutation enhances colorectal cancer stemness through regulating specific lncRNAs [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 379.
- [10] Munggar I P, Kurnia D, Deawati Y, *et al.* Current research of phytochemical, medicinal and non-medicinal uses of *Uncaria gambir* Roxb.: A review [J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6551.
- [11] Ciani F, Tafuri S, Troiano A, *et al.* Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* aqueous extract in squamous carcinoma cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 211: 285-294.
- [12] Huang B Y, Zeng Y, Li Y J, *et al.* *Uncaria* alkaloids reverse ABCB1-mediated cancer multidrug resistance [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(1): 257-268.
- [13] Qin N, Lu X, Liu Y J, *et al.* Recent research progress of *Uncaria* spp. based on alkaloids: Phytochemistry, pharmacology and structural chemistry [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 210: 112960.
- [14] 于潇, 祝琳琳, 刘婕, 等. 钩藤中单萜吲哚类生物碱成分及其药理活性的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(19): 6052-6065.
- [15] Yun X L, Qin H L, Du B, *et al.* Inhibitory effect and mechanism of hirsuteine on NCI-H1299 lung cancer cell lines [J]. *Oncol Lett*, 2023, 25(5): 202.
- [16] Meng J, Yuan Y, Li Y Y, *et al.* Effects of hirsuteine on MDA-MB-453 breast cancer cell proliferation [J]. *Oncol Lett*, 2023, 25(1): 4.
- [17] Gao S, Guo T T, Luo S Y, *et al.* Growth inhibitory and pro-apoptotic effects of hirsuteine in chronic myeloid leukemia cells through targeting sphingosine kinase 1 [J]. *Biomol Ther*, 2022, 30(6): 553-561.
- [18] Hu J H, Cao J S, Topatana W, *et al.* Targeting mutant p53 for cancer therapy: Direct and indirect strategies [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 157.
- [19] Suski J M, Braun M, Strmiska V, *et al.* Targeting cell-cycle machinery in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(6): 759-778.
- [20] Shen Y Q, Sherman J W, Chen X Y, *et al.* Phosphorylation of CDC25C by AMP-activated protein kinase mediates a metabolic checkpoint during cell-cycle G₂/M-phase transition [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(14): 5185-5199.
- [21] Pietrocola F, Pol J, Vacchelli E, *et al.* Autophagy induction for the treatment of cancer [J]. *Autophagy*, 2016, 12(10): 1962-1964.
- [22] Li X H, He S K, Ma B Y. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12.
- [23] Duffy M J, Synnott N C, O'Grady S, *et al.* Targeting p53 for the treatment of cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 79: 58-67.
- [24] Chen X H, Zhang T T, Su W, *et al.* Mutant p53 in cancer: From molecular mechanism to therapeutic modulation [J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(11): 974.

[责任编辑 李亚楠]