

3-MA增强鼻咽癌细胞对Polo样激酶抑制剂敏感性的机制研究

袁叶琴^{1,2} 傅雨婷^{1,2} 杨汶峻^{1,2} 蒋斌元^{1,2*}

(¹南华大学附属长沙中心医院检验科, 长沙 410004; ²南华大学附属长沙中心医院中心实验室, 长沙 410004)

摘要 鼻咽癌高发于东南亚地区及中国南部省份, 在鼻咽癌晚期治疗中细胞周期类化疗药物多有应用, Polo样激酶抑制剂是一类新型的具有一定应用前景的细胞周期类化疗药物。该研究以鼻咽癌细胞5-8F、6-10B为模型对Polo样激酶1(Polo like kinase 1, PLK1)抑制剂的应用进行初步探索, 通过Cell Counting Kit-8实验、流式细胞术发现PLK1抑制剂GW843682X、BI2536与选择性磷酸肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)联合使用可显著增强PLK1抑制剂对鼻咽癌细胞的增殖抑制, 并诱导更多的鼻咽癌细胞死亡; 综合细胞周期及凋亡蛋白的检测结果, 认为3-MA可通过促进细胞周期蛋白依赖性激酶1/周期蛋白B1(cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1, CDK1/Cyclin B1)复合物的激活增强Polo样激酶抑制剂对鼻咽癌细胞的杀伤能力。综上所述, 3-MA可作为PLK1抑制类药物的增敏剂, 增强其对鼻咽癌细胞的抑制效果, 该研究为相关药物的临床应用与基础研究提供理论参考。

关键词 鼻咽癌; PLK1抑制剂; 3-MA; CDK1; 凋亡蛋白

The Mechanism of 3-MA Enhancing Sensitivity of Nasopharyngeal Carcinoma Cells to Polo-Like Kinase Inhibitors

YUAN Yeqin^{1,2}, FU Yuting^{1,2}, YANG Wenjun^{1,2}, JIANG Binyuan^{1,2*}

(¹The Department of Clinical Laboratory Affiliated Changsha Central Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Changsha 410004, China; ²Central Laboratory, Affiliated Changsha Central Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Changsha 410004, China)

Abstract The incidence of nasopharyngeal carcinoma is high in Southeast Asia and the southern provinces of China. Cell cycle chemotherapeutics are mostly used in the treatment of advanced nasopharyngeal carcinoma, and PLK1 (Polo-like kinase 1) inhibitors are a new type of cell cycle chemotherapeutics with certain application prospects. In this study, nasopharyngeal carcinoma cells 5-8F and 6-10B were used as models to preliminarily explore the application of Polo-like kinase inhibitors. Through Cell Counting Kit-8 experiment and flow cytometry, it was found that PLK1 inhibitors GW843682X or BI2536 combine with PI3K inhibitor 3-MA significantly enhance the proliferation inhibition of nasopharyngeal carcinoma cells and induce more nasopharyngeal carcinoma cell death. Based on the detection results of cell cycle and apoptotic proteins, it is believed that 3-MA enhances the killing ability of Polo-like kinase inhibitors on

收稿日期: 2022-10-20 接受日期: 2022-12-07

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 81802952)、湖南省教育厅科学研究项目(批准号: 21B0411)和长沙市中心医院科学研究项目(批准号: YNKY202201)资助的课题

*通讯作者. Tel: 13548622014, E-mail: jby2225859@126.com

Received: October 20, 2022 Accepted: December 7, 2022

This work was supported by the Youth Program of National Natural Science Foundation of China (Grant No.81802952), the Scientific Research Fund of Hunan Provincial Education Department (Grant No.21B0411), and the Scientific Research Project of Changsha Central Hospital (Grant No.YNKY202201)

*Corresponding author. Tel: +86-13548622014, E-mail: jby2225859@126.com

nasopharyngeal carcinoma cells by promoting the activation of CDK1/Cyclin B1 complex. In conclusion, 3-MA can be used as a sensitizer for PLK1 inhibitory drugs to enhance its inhibitory effect on nasopharyngeal carcinoma cells. This study also provides theoretical references for clinical applications and basic research on related drugs.

Keywords nasopharyngeal carcinoma; PLK1 inhibitor; 3-MA; CDK1; apoptosis related protein

鼻咽癌是位于鼻咽部黏膜的上皮性恶性肿瘤, EB病毒的感染、患者的遗传因素、生活环境均是重要的致病因素, 鼻咽癌相比于其他癌症具有更加显著的地域特征^[1]。据统计, 2018年全球新增12.9万例鼻咽癌病例(占全球癌症新增病例总数的0.7%), 其中超过70%发生在东南亚和东亚地区, 并且新增死亡病例80 008例(占全球癌症新增病例总数的0.8%)。局部晚期和转移鼻咽癌预后不良, 超过三分之一的患者会出现局部或转移性复发, 两年和五年的生存率分别为72%和63%^[4]。早期鼻咽癌患者的医治以放射治疗为主, 中晚期鼻咽癌患者则会增加化疗及免疫治疗来提高治疗效果^[5]。近年来在局部晚期鼻咽癌治疗中, 同步放化疗已是标准治疗方法, 但晚期鼻咽癌治疗效果依旧需要进一步提升^[6]。

Polo样激酶是丝氨酸/苏氨酸激酶家族的一种, 由五种亚型(PLK1、PLK2、PLK3、PLK4、PLK5)组成, 其中PLK1表达广泛且研究较多^[7]。PLK1是调节有丝分裂G₂期向M期转换的重要调节因子, 参与早期中心体的成熟以及纺锤体的建立^[8]。PLK1磷酸化激活细胞分裂周期蛋白25C(cell division cycle 25c, Cdc25c)等蛋白从而参与有丝分裂进程的调控, 抑制PLK1会使细胞周期阻滞并导致有丝分裂灾难的发生, 细胞将无法正确组装双极纺锤体, 染色体以无序状态排列在纺锤体周围^[9-10]。抑制PLK1的功能通过影响有丝分裂进程从而诱导细胞死亡, 是肿瘤治疗的潜在靶点。

研究表明, 细胞周期和细胞自噬之间的关系紧密且相互影响, 并存在许多未知细节有待探索^[11]。在细胞周期进程中细胞自噬除保障能量的供给外^[12], 还会清除细胞分裂完成后遗留的中心体环及微核等结构物质^[13]; 细胞分裂期会有序地减少自噬活动保护细胞器不被分解^[14]。反之, 自噬相关分子参与了细胞周期进程中决定细胞命运的信号通路, 如液泡分选蛋白34(vacuolar protein sorting 34, Vps34)、Beclin1、Vps15表达缺失会导致细胞分裂失败^[15]; 细胞周期阻滞过程中自噬相关蛋白5(autophagy-related gene 5, Atg5)入核后参与了有丝分裂灾难的触发和诱导细胞

死亡^[16]; DNA损伤过程中, 自噬行为与细胞衰老的发生有关, 减少Atg5和Atg7的表达会延缓受损细胞的衰老转化^[17]。肿瘤细胞多数存在异常的细胞周期及自噬行为, 相关研究可以帮助人们更好地理解肿瘤发生发展过程, 找到肿瘤治疗的一些突破口。

鉴于细胞周期进程中细胞自噬的精细时序性调控, 我们推测特定条件下干预细胞自噬可能会增加肿瘤细胞对周期类化疗药物的敏感性, 筛选自噬抑制剂后发现3-MA可在完全无细胞毒性的浓度下显著增加PLK1抑制剂对鼻咽癌细胞的杀伤能力。3-MA作为选择性的PI3K抑制剂可持续抑制PI3K γ 和短暂作用于Vps34抑制自噬体的形成。其中PI3K γ 属于IB类PI3K, 催化亚基p110 γ 分别与调节亚基p101或p87结合形成两种不同的异二聚体, 受G蛋白偶联受体选择性调控^[18]; Vps34则属于III类PI3K激酶, 在细胞内与调节亚基p150和Vps15结合, 参与细胞内吞、自噬等生物进程^[19]。

综上所述, 本文以鼻咽癌细胞5-8F、6-10B为模型探索了Polo样激酶抑制剂对鼻咽癌细胞的抑制作用, 发现PLK1抑制剂GW843682X、BI2536与PI3K抑制剂3-MA联合使用可显著增强其对鼻咽癌细胞的增殖抑制及诱导细胞死亡, 并对相关分子机制进行了初步探讨, 希望能为临床治疗鼻咽癌提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 鼻咽癌细胞系5-8F和6-10B由中南大学肿瘤研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂耗材 3-MA、GW843682X、BI2536购自美国MedChemExpress公司; Cell Counting Kit-8购自上海Yeasen生物公司; 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒购自大连美仑生物公司; GAPDH一抗、MCL-1一抗、PARP一抗、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗均购自美国Cell Signaling Technology公司; Cyclin D1、Cyclin A2、Cyclin B1、Cyclin E1、CDK1、Phospho-CDK1(Thr14)、Phospho-CDK1(Tyr15)、Phospho-CDK1(Thr161)、Aurora A、Aurora B一抗、Hoechst

33342活细胞染料均购自上海碧云天生物技术有限公司; ECL化学发光检测试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司; 细胞培养瓶及孔板购自NEST生物公司; 青-链霉素、DMEM高糖培养基购自美国Biological Industries公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用含有10% FBS和1%青-链霉素的DMEM培养基, 于37 °C、5% CO₂条件下培养细胞。

1.2.2 CCK-8(Cell Counting Kit-8)细胞活力检测 96孔板每孔接种12 000个细胞, 加入药物后在培养箱中培养24 h或48 h后检测细胞增殖情况。弃去孔中废液后, 每孔加入100 μL含10 μL CCK-8试剂的培养基, 37 °C孵育1 h, 酶标仪检测450 nm处的吸光度(*D*)值。

1.2.3 显微镜检测细胞形态变化 将鼻咽癌细胞以每孔 1×10^5 个的密度铺于24孔板内, 待细胞贴壁密度达到80%时, 添加药物在培养箱中培养16 h。在倒置光学显微镜(Leica Microsystems)下观察细胞形态并拍摄图像, 计算五个随机视野(放大倍数, $\times 200$)中圆形细胞与总细胞的比率; 每孔加入200 μL Hoechst 33342染液标记细胞核, 37 °C孵育10 min, 室温下PBS洗涤3遍, 每次5 min, 荧光显微镜(BioTek Lionheart)观察细胞核状态并拍照。

1.2.4 细胞周期检测 将鼻咽癌细胞以每孔 5×10^5 个的密度铺于6孔板内, 待细胞贴壁密度达到80%时, 添加药物后培养箱中培养24 h; 收集细胞后于75%酒精中4 °C固定24 h; 4 °C、500 $\times g$ 离心5 min去除75%酒精, 预冷的PBS洗涤2遍; 加入碘化丙啶(终浓度50 μg/mL)和RNase(终浓度50 μg/mL)室温避光孵育15 min; 流式细胞仪(BD Accuri C6)检测细胞周期结果并分析。

1.2.5 细胞凋亡检测 将鼻咽癌细胞以每孔 2×10^5 个的密度铺于12孔板内, 待细胞贴壁密度达到80%时, 添加药物在培养箱中培养48 h; 收集细胞用预冷的PBS洗涤2遍, 4 °C、500 $\times g$ 离心5 min, 弃上清; 每管加入100 μL 1 \times 结合缓冲液(含5 μL Annexin V-FITC, 10 μL PI)重悬细胞, 室温避光孵育15 min, 加入400 μL 1 \times 结合缓冲液完成染色; 使用流式细胞仪(BD Accuri C6)检测细胞凋亡结果并分析。

1.2.6 Western blot 使用RIPA(强)裂解液处理所收集的细胞, 冰上孵育10 min后12 000 r/min离心10 min, 取

上清; 按比例加入5 \times 蛋白上样缓冲液, 混匀后100 °C加热5 min, 置于冰上待用。蛋白样品依次上样, 完成SDS-PAGE电泳后200 mA转膜40 min, 5%脱脂奶粉的PBST室温封闭1 h; 一抗(1:1 000)4 °C孵育过夜; PBST洗涤3遍, 每次10 min; 二抗(1:1 000)室温孵育1 h, PBST洗涤3遍, 每次5 min; ECL化学发光进行显影, 化学发光成像仪进行拍照。

1.2.7 实验结果统计 数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。作图、统计分析采用GraphPad Prism 8软件, 组间比较采用单因素方差分析或具有多重比较的双向方差分析作为Tukey的事后检验或Dunnnett的事后检验(视情况而定)分析数据, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

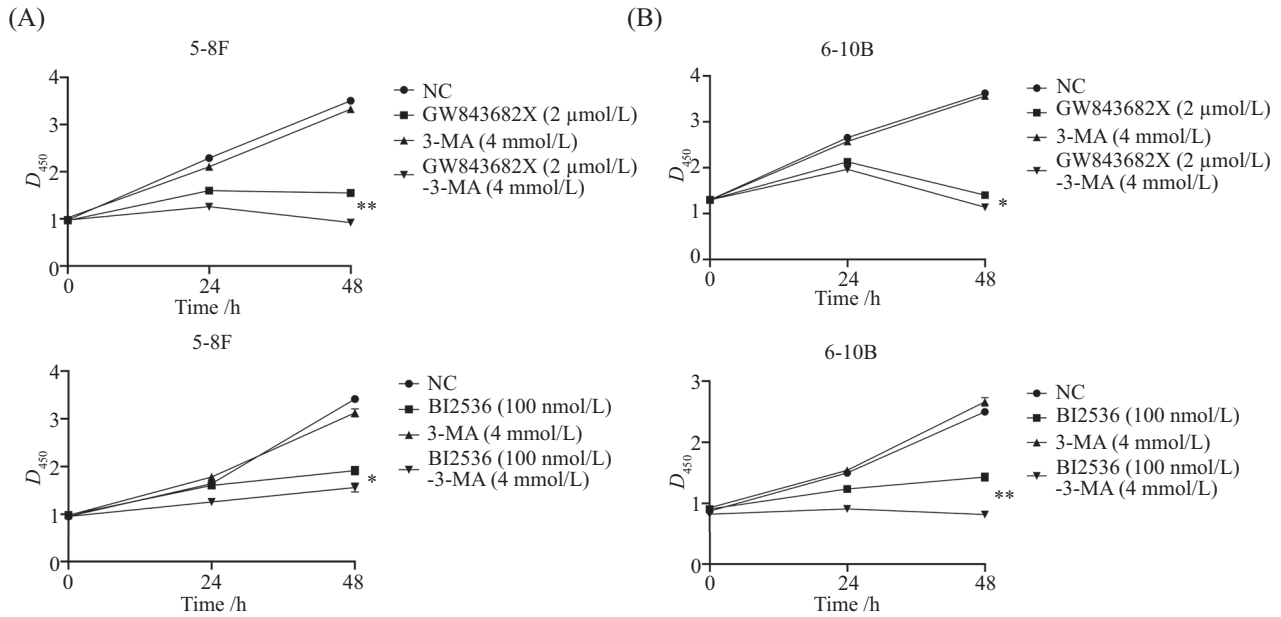
2 结果

2.1 3-MA增强GW843682X、BI2536对鼻咽癌细胞的增殖抑制

采用CCK-8实验检测3-MA与PLK1抑制剂处理鼻咽癌细胞后对其增殖的影响。相较于无药物处理组, PLK1抑制剂GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)单独处理组的5-8F和6-10B细胞增殖显著抑制, 3-MA(4 mmol/L)单独处理组的鼻咽癌细胞增殖无抑制; GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)分别与3-MA(4 mmol/L)联合处理组对鼻咽癌细胞增殖的抑制效果较GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)单独处理组明显增强(图1A和图1B)。以上结果提示3-MA可显著增强GW843682X、BI2536对鼻咽癌细胞的增殖抑制作用。

2.2 3-MA促进PLK1抑制剂诱导的鼻咽癌细胞形态学改变

有丝分裂灾难的发生伴随细胞形态的改变和细胞核的凝聚, 并且最终绝大多数细胞会进入周期阻滞性死亡。使用光学显微镜观察3-MA与PLK1抑制剂处理鼻咽癌细胞16 h后的形态变化。其中3-MA(4 mmol/L)未引起鼻咽癌细胞形态改变; 与无药物处理组相比, PLK1抑制剂GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)处理组的圆形细胞数量占比明显增加; 而与PLK1抑制剂单独处理组相比, 3-MA(4 mmol/L)与GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)的联合处理组圆形细胞数量占比进一步显著增加(图2A和图2B)。Hoechst染色观察细胞核形态变化, 发现3-MA(4 mmol/L)与GW843682X(2 μmol/L)



A、B: 用PLK1抑制剂、3-MA或PLK1抑制剂与3-MA联合处理5-8F、6-10B细胞, CCK-8实验检测各实验组细胞的增殖情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 代表在48 h与PLK1抑制剂单独处理组相比具有统计学意义。

A,B: 5-8F and 6-10B cells were treated with PLK1 inhibitor, 3-MA or PLK1 inhibitor combined with 3-MA, and the cell proliferation was detected by CCK-8 assay at 48 h. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, representatives were statistically significant compared to the PLK1 inhibitor alone treatment group at 48 h.

图1 3-MA增强PLK1抑制剂对鼻咽癌细胞的增殖抑制

Fig.1 3-MA enhances the proliferation inhibition of nasopharyngeal carcinoma cells by PLK1 inhibitor

L)、BI2536(100 nmol/L)联合处理组相较于单独GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)处理组有更多的细胞核发生凝聚(图2C和图2D)。

2.3 PLK1抑制剂诱导鼻咽癌细胞周期阻滞在G₂/M期

PLK1参与细胞有丝分裂进程调控,抑制PLK1功能会使细胞周期阻滞在G₂/M期^[20]。使用流式细胞仪检测药物处理24 h后的细胞周期变化,与无药物处理组相比,GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)单独处理组、3-MA(4 mmol/L)与GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)联合处理组均使G₂/M期细胞占比显著增加(图3A和图3B)。综合相关文献及细胞形态观测结果,推测3-MA与PLK1抑制剂的联合使用成功将细胞阻滞在G₂/M期后加速了鼻咽癌细胞进入细胞周期阻滞性死亡^[21]。

2.4 3-MA增加PLK1抑制剂诱导的鼻咽癌细胞死亡

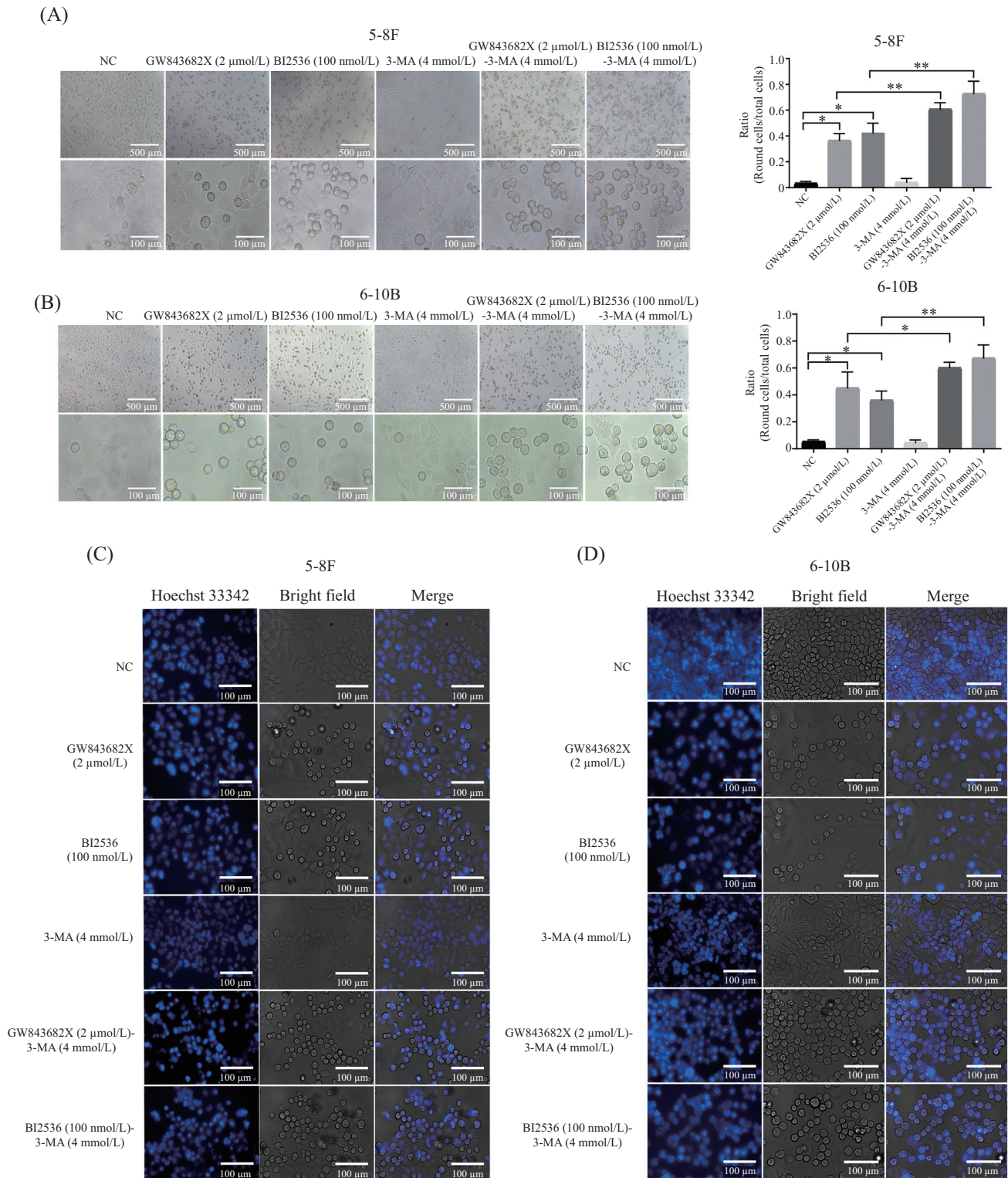
进一步使用流式细胞仪检测鼻咽癌细胞的Annexin V-FITC染色结果,确定PLK1抑制剂、3-MA及联合使用处理鼻咽癌细胞48 h后各组细胞死亡的情况。结果显示,与无药物处理组相比,3-MA未引起细胞死亡比例的增加,PLK1抑制剂GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)可显著增加死亡细

胞比例(图4A和图4B);相较于PLK1抑制剂单独处理组,PLK1抑制剂与3-MA联合处理组的死亡细胞比例显著增加(图4A和图4B),提示3-MA显著增强了PLK1抑制剂诱导的鼻咽癌细胞死亡。

2.5 PLK1抑制剂与3-MA联用减少CDK1抑制性磷酸化位点的表达

细胞有丝分裂进程伴随着周期蛋白的时序性表达,周期蛋白Cyclin A2促进S期发展,参与G₂/M期转换;周期蛋白Cyclin D1调节G₀/G₁期的转变并参与细胞代谢,在整个细胞周期都有表达;周期蛋白Cyclin E1在G₁/S期表达并发挥作用,促进细胞进入S期;周期蛋白Cyclin B1和CDK1则在S期开始升高,参与G₂/M期转换及相关调控^[22];以及在G₂/M期表达的有丝分裂相关激酶Aurora A可促进中心体成熟和有丝分裂纺锤体组装,Aurora B则参与染色体与着丝点的结合和染色体分离过程^[23]。

为探索3-MA增强PLK1抑制剂诱导鼻咽癌细胞周期阻滞及死亡的相关机制,对鼻咽癌细胞经药物处理24 h后周期相关蛋白的表达情况进行检测。与无药物处理组相比,GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)单独处理组及与3-MA(4 mmol/L)联合处理组的Cyclin E1表达显著减少,Cyclin

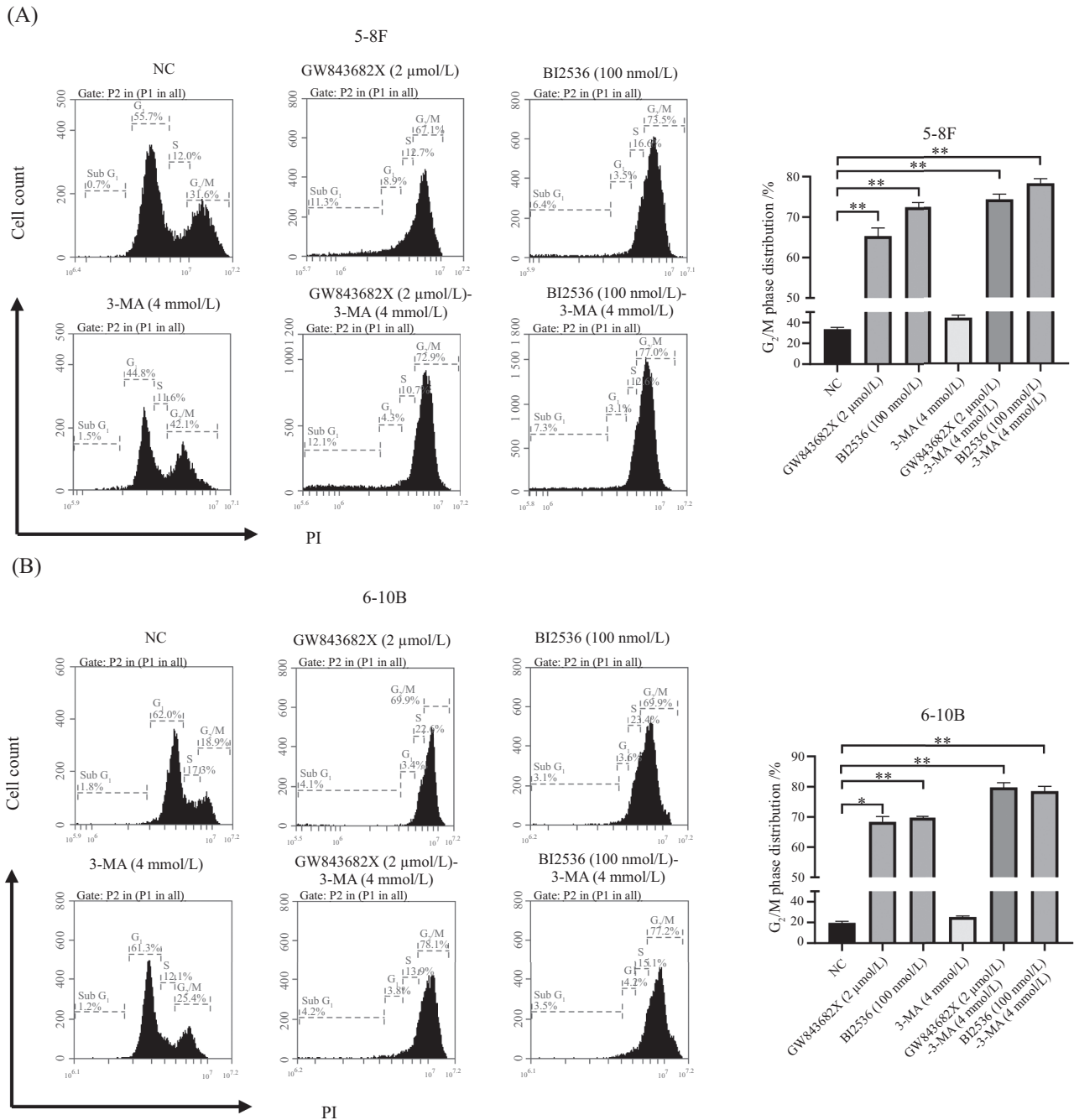


A, B: 用PLK1抑制剂、3-MA或PLK1抑制剂与3-MA联合处理5-8F、6-10B细胞16 h, 光镜观测细胞变圆情况。C、D: 用PLK1抑制剂、3-MA或PLK1抑制剂与3-MA联合处理5-8F、6-10B细胞16 h, 活细胞染色观测细胞核形态改变。 $*P<0.05$, $**P<0.01$ 。

A,B: 5-8F and 6-10B cells were treated with PLK1 inhibitor, 3-MA or PLK1 inhibitor combined with 3-MA for 16 h, and the rounding of cells was detected by light microscope. C,D: the 5-8F and 6-10B cells were treated with PLK1 inhibitor, 3-MA or PLK1 inhibitor combined with 3-MA for 16 h, and the changes of nuclear morphology were detected by live cell staining. $*P<0.05$, $**P<0.01$.

图2 3-MA促进PLK1抑制剂诱导的鼻咽癌细胞形态学改变

Fig.2 3-MA increases PLK1 inhibitor-induced morphological changes in nasopharyngeal carcinoma cells



A、B: 用PLK1抑制剂、3-MA或PLK1抑制剂与3-MA联合处理5-8F、6-10B细胞24 h, 流式细胞仪检测细胞周期改变情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
A,B: 5-8F and 6-10B cells were treated with PLK1 inhibitor, 3-MA or PLK1 inhibitor combined with 3-MA for 24 h, and the cell cycle changes were detected by flow cytometry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图3 PLK1抑制剂诱导鼻咽癌细胞周期阻滞在G₂/M期

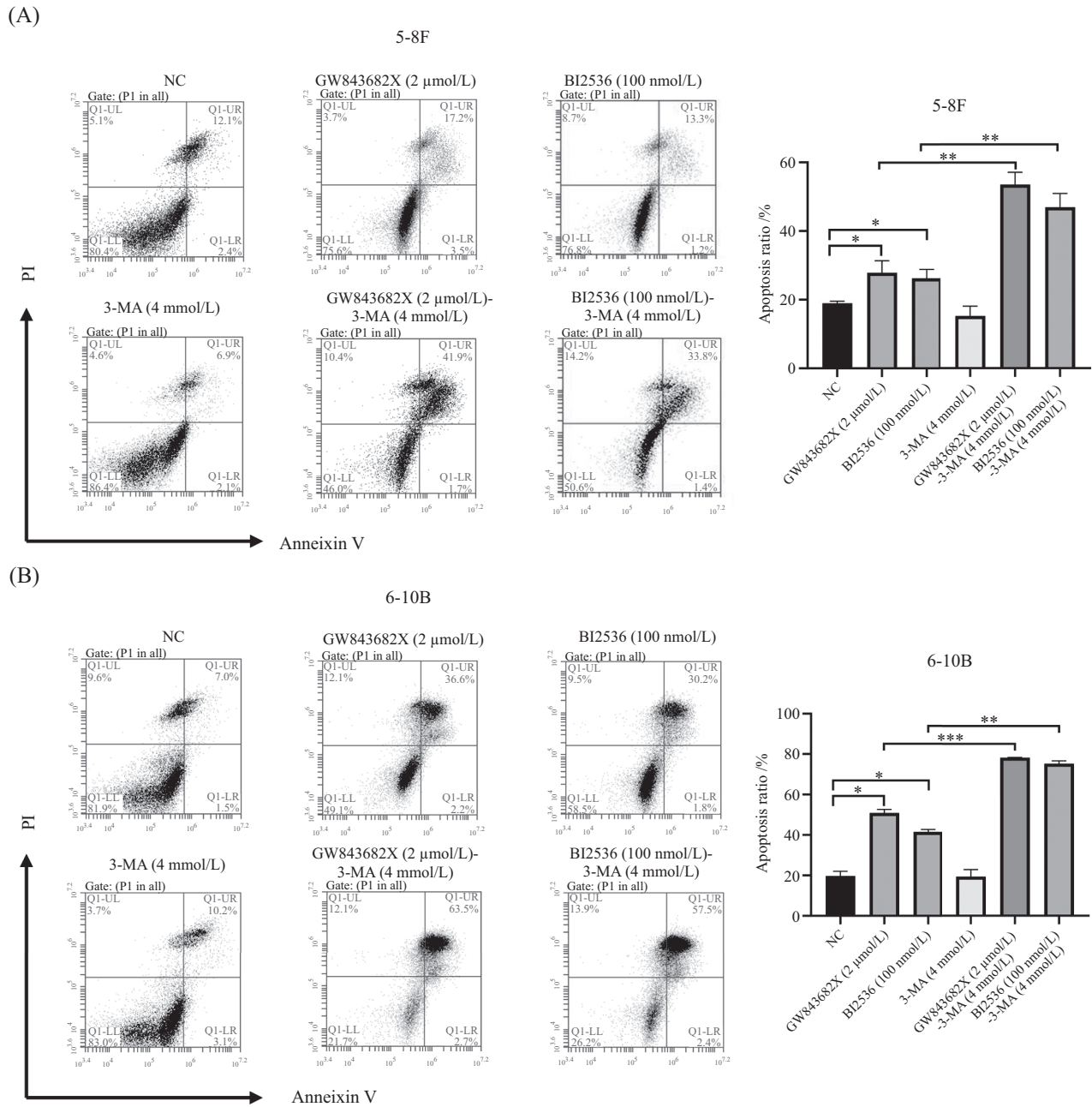
Fig.3 PLK1 inhibitor induces cycle arrest in G₂/M phase of nasopharyngeal carcinoma cells

B1、Aurora A、Aurora B表达显著增加(图5A和图5B), 呈现G₂/M期周期蛋白表达特征。值得注意的是GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)与3-MA(4 mmol/L)联合处理组中CDK1激酶的抑制性磷酸化位点 Thr14表达较GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)单独处理组显著降低(图5A和图

5B), 提示3-MA增强PLK1抑制剂诱导的鼻咽癌细胞死亡可能与CDK1的激活有关。

2.6 3-MA增强PLK1抑制剂对鼻咽癌细胞G₂/期阻滞时CDK1激酶活化

CDK1/Cyclin B1复合物是G₂/M期转换的重要调节因子, CDK1激酶活性与自身磷酸化状态相关,



A、B: 用PLK1抑制剂、3-MA或PLK1抑制剂与3-MA联合处理5-8F、6-10B细胞48 h, 流式细胞仪检测细胞凋亡改变情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A,B: 5-8F and 6-10B cells were treated with PLK1 inhibitor, 3-MA or PLK1 inhibitor combined with 3-MA for 48 h, and the changes of apoptosis were detected by flow cytometry. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

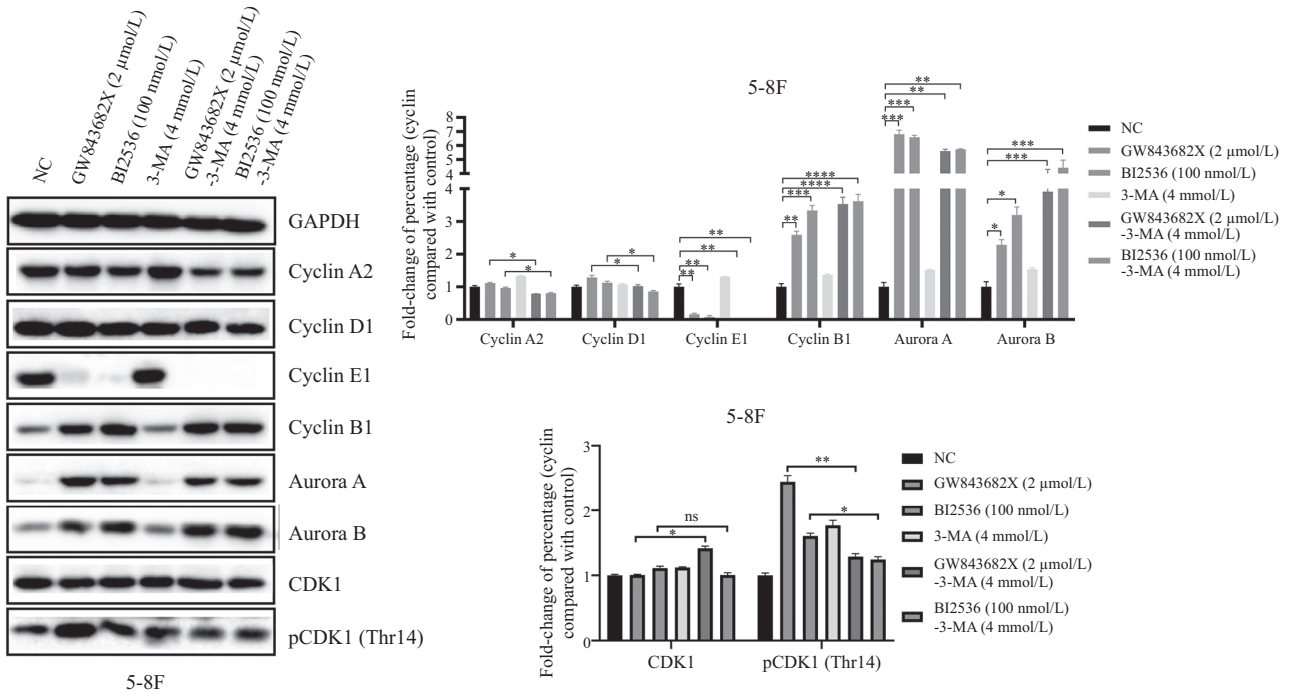
图4 3-MA促进PLK1抑制剂诱导的鼻咽癌细胞凋亡

Fig.4 3-MA increases PLK1 inhibitor-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells

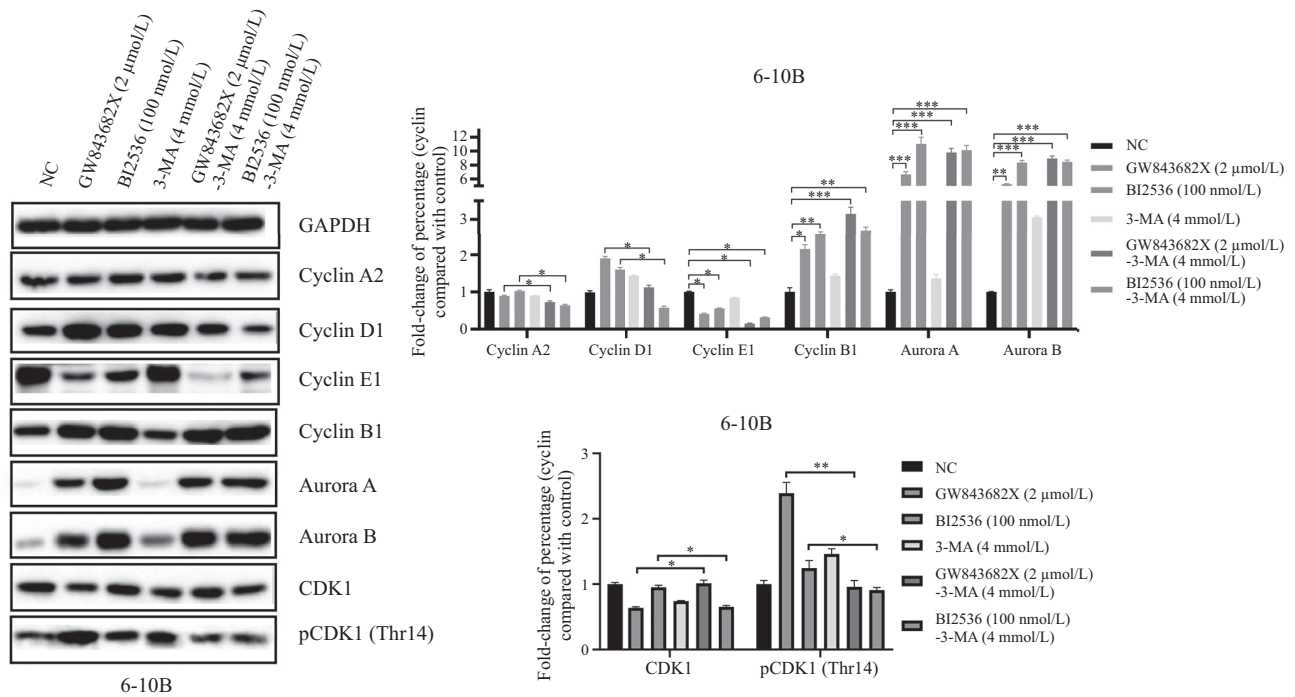
Phospho-CDK1(Thr14)和Phospho-CDK1(Tyr15)去磷酸化以及Phospho-CDK1(Thr161)的磷酸化是激活CDK1的必要条件^[24]。检测鼻咽癌细胞中周期蛋白Cyclin B1、CDK1及其磷酸化位点在药物处理16 h、24 h时的表达情况。药物处理16 h时, PLK1抑制剂(GW843682X或BI2536)单独处理组、3-MA与PLK1

抑制剂(GW843682X或BI2536)共同处理组的Cyclin B1、CDK1蛋白开始累积, 并伴随CDK1磷酸化位点Thr14、Tyr15和Thr161的表达(图6A和图6B); 药物处理24 h时, CDK1磷酸化位点Thr14和Tyr15的表达开始减少, 而Thr161的表达开始增加, 相较于PLK1抑制剂(GW843682X或BI2536)单独处理组, 3-MA

(A)



(B)

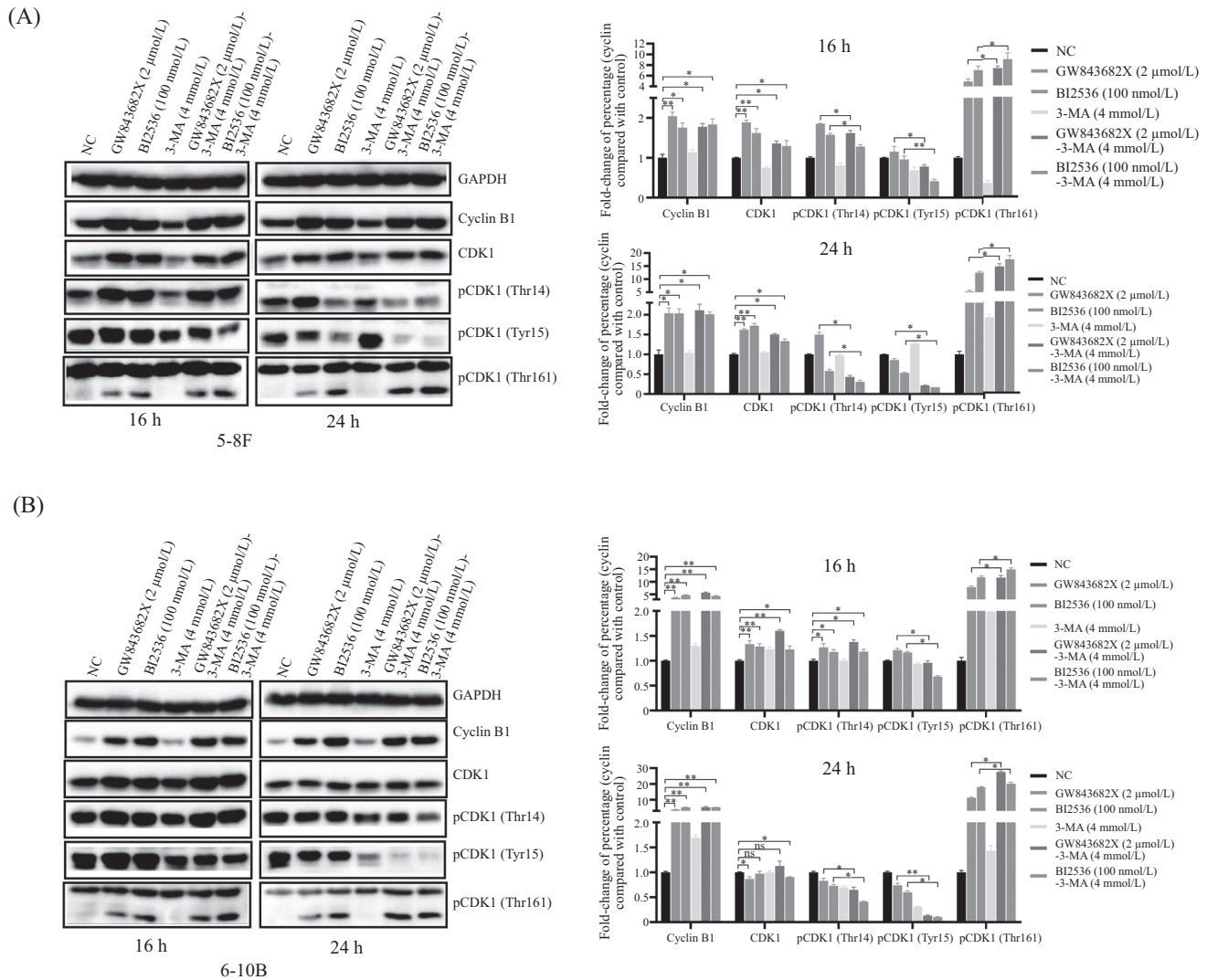


A、B: 用PLK1抑制剂、3-MA或PLK1抑制剂与3-MA联合处理5-8F、6-10B细胞24 h, Western blot检测Cyclin A2、Cyclin D1、Cyclin E1、Cyclin B1、Aurora A、Aurora B、CDK1以及Phospho-CDK1(Thr14)的蛋白质表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns: 无统计学差异。

A,B: 5-8F and 6-10B cells were treated with PLK1 inhibitor, 3-MA or PLK1 inhibitor combined with 3-MA for 24 h, and Western blot was used to detect Cyclin A2, Cyclin D1, Cyclin E1, Cyclin B1, Aurora A, Aurora B, CDK1 and the protein expression level of Phospho-CDK1 (Thr14). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ns: no statistical difference.

图5 PLK1抑制剂与3-MA联用减少CDK1抑制性磷酸化位点的表达

Fig.5 Combination of a PLK1 inhibitor with 3-MA reduces the expression of CDK1 inhibitory phosphorylation sites



A, B: 用PLK1抑制剂、3-MA或PLK1抑制剂与3-MA联合处理5-8F、6-10B细胞16 h、24 h, Western blot检测Cyclin B1、CDK1、Phospho-CDK1(Thr14)、Phospho-CDK1(Tyr15)以及Phospho-CDK1(Thr161)的蛋白质表达水平。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, ns: 无统计学差异。

A, B: 5-8F and 6-10B cells were treated with PLK1 inhibitor, 3-MA or PLK1 inhibitor combined with 3-MA for 16 h and 24 h, and Western blot was used to detect Cyclin B1, CDK1, Phospho-CDK1(Thr14), Phospho-CDK1(Tyr15) and the protein expression levels of Phospho-CDK1(Thr161). $*P<0.05$, $**P<0.01$, ns: no statistical difference.

图6 3-MA增强鼻咽癌细胞G₂/M期阻滞时CDK1激酶的活化

Fig.6 3-MA enhances activation of CDK1 kinase during G₂/M arrest in nasopharyngeal carcinoma cells

与PLK1抑制剂(GW843682X或BI2536)共同处理组的CDK1磷酸化位点Thr14和Tyr15的表达显著减少, Thr161的表达则显著增加(图6A和图6B), 提示3-MA与PLK1抑制剂(GW843682X或BI2536)共同处理组CDK1激酶的抑制减弱。

2.7 CDK1激酶的活化伴随鼻咽癌细胞凋亡信号的增强

抗凋亡蛋白MCL-1是CDK1的直接底物, CDK1磷酸化MCL-1使其进入泛素化降解途径。药物处理鼻咽癌细胞24 h、48 h时, 相较于GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)单独处理组, 3-MA(4

mmol/L)与GW843682X(2 μmol/L)、BI2536(100 nmol/L)联合处理组的抗凋亡蛋白MCL-1的表达水平显著降低, 凋亡蛋白Cleaved-PARP显著升高(图7A和图7B), 提示3-MA与PLK1抑制剂联用使CDK1/Cyclin B1-MCL1-PARP凋亡信号轴提前激活。

3 讨论

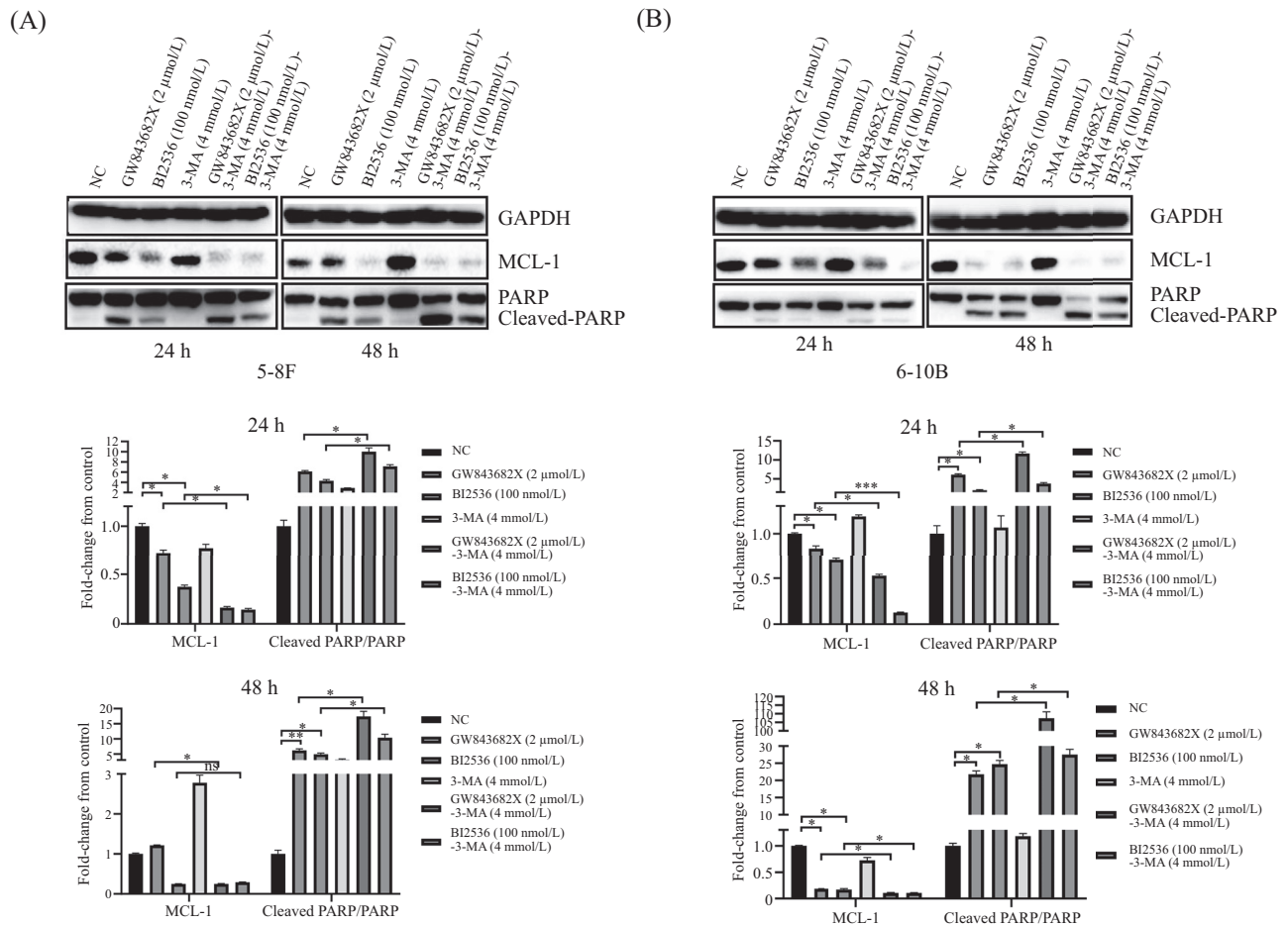
鼻咽癌的生理部位手术难度高且风险大, 晚期鼻咽癌患者中15%~30%会发生局部复发或远处转移^[25], 大多数鼻咽癌晚期患者接受过放射治疗, 后续治疗选择受限, 治疗方案的改进充满挑战。化疗方

案探索是改进晚期鼻咽癌治疗方案的一种可选途径,减小化疗药物的毒副作用可提高晚期鼻咽癌患者的生活质量,综合看来治疗效果明显且毒副作用小的化疗方案具有良好的医疗和人文价值^[26]。

PLK1抑制剂是一种细胞周期类药物,相较于紫杉醇类药物与微管蛋白的不可逆结合,同样作用于细胞周期的PLK1抑制剂副作用更小,但对肿瘤的杀伤力可能稍微减弱。本研究相关实验选择PLK1抑制剂GW843682X、BI2536开展相关研究,在此期间发现这两个PLK1抑制剂与无毒剂量的3-MA联合使用时可显著增强对鼻咽癌细胞的增殖抑制和杀伤效果。检测相关周期和凋亡蛋白的表达发现3-MA与PLK1抑制剂联用可使CDK1提前激活,增加48 h内PLK1抑制剂诱导的鼻咽癌细胞死亡数量。CDK1/Cyclin B1复合物是重要的G₂/M期调节分子,修复有丝分裂异

常失败的时候CDK1/Cyclin B1复合物会激活并磷酸化抗凋亡蛋白MCL-1的Ser64和Thr92位点,促进E3泛素酶后期促进复合物(anaphase-promoting complex, APC/C)(Cdc20)介导的MCL-1降解并启动细胞凋亡^[27],3-MA的联用加速了PLK1抑制剂诱导的细胞死亡。

根据本文研究结果及相关文献,我们计划把3-MA增加肿瘤细胞PLK1抑制剂敏感性的研究焦点锁定在CDK1这个关键激酶,CDK1在有丝分裂过程中还涉及到纺锤体的动态调节、自噬的调控、线粒体的分裂等关键过程。在有丝分裂过程中CDK1磷酸化Vps34的Thr159位点使其进入泛素化降解途径,实现细胞分裂期的自噬抑制^[28];推测Vps34功能的抑制与CDK1之间存在一个停止修复细胞周期分裂错误的负反馈信号,3-MA抑制Vps34可使CDK1提前触发细胞凋亡。此外有意思的是,在细胞分裂



A、B: 用PLK1抑制剂、3-MA或PLK1抑制剂与3-MA联合处理5-8F、6-10B细胞24 h、48 h, Western blot检测MCL-1、PARP的蛋白质表达水平。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: 无统计学差异。

A,B: The 5-8F and 6-10B cells were treated with PLK1 inhibitor, 3-MA or PLK1 inhibitor combined with 3-MA for 24 h and 48 h, and the protein expression levels of MCL-1 and PARP were detected by Western blot. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: no statistical difference.

图7 CDK1激酶的活化伴随鼻咽癌细胞凋亡信号的增强

Fig.7 Activation of CDK1 kinase is accompanied by enhanced apoptotic signaling in nasopharyngeal carcinoma cells

过程中PLK1可通过磷酸化Cdc25c减弱Wee1和Myt1对CDK1的抑制, 激活CDK1活性使细胞进入有丝分裂^[29]; 而本研究发现, 细胞分裂阻滞性死亡过程中CDK1的激活是在PLK1被抑制的条件下发生的, 凋亡途径中CDK1的激活可能并不需要PLK1的作用。推测在不同的细胞生物进程中CDK1能通过多种途径影响细胞命运的走向, 相关细节较复杂且有待进一步研究。

综合相关文献及本研究的实验结果, 我们推测促进CDK1/Cyclin B1复合物的激活是3-MA增加PLK1抑制剂对鼻咽癌细胞抑制效果的关键因素, 并且鉴于3-MA对鼻咽癌细胞毒性微弱, 我们认为其可作为PLK1抑制剂类药物的增敏剂, 增加疗效的同时可减少毒副作用。本研究的相关内容可为鼻咽癌的治疗及相关药物的应用提供论参考。

参考文献 (References)

- [1] WANG H Y, CHANG Y L, TO K F, et al. A new prognostic histopathologic classification of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Chin J Cancer*, 2016, 35(6): 30-45.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] CHEN Y P, CHAN A T, LE Q T, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80.
- [4] KAZEMIAN A, GHALEHTAKI R, FARAZMAND B, et al. Long-term survival rates of patients with nasopharyngeal carcinoma treated by radiochemotherapy: a retrospective cohort study [J]. *Egypt J Otolaryngol*, 2022, 38(1): 1-7.
- [5] LAM K O, LEE A W, NG W T, et al. The International Atomic Energy Agency global initiatives on nasopharyngeal cancer treatment [J]. *Chin Clin Oncol*, 2016, 5(2): 27.
- [6] GUAN S, WEI J, HUANG L, et al. Chemotherapy and chemoresistance in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 207: 112758.
- [7] STREBHARDT K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(8): 643-60.
- [8] ALFARO E, LÓPEZ-JIMÉNEZ P, GONZÁLEZ-MARTÍNEZ J, et al. PLK1 regulates centrosome migration and spindle dynamics in male mouse meiosis [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(4): e51030.
- [9] LIU K, ZHENG M, LU R, et al. The role of CDC25C in cell cycle regulation and clinical cancer therapy: a systematic review [J]. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 1-16.
- [10] SCHMIT T L, ZHONG W, SETALURI V, et al. Targeted depletion of Polo-like kinase (Plk) 1 through lentiviral shRNA or a small-molecule inhibitor causes mitotic catastrophe and induction of apoptosis in human melanoma cells [J]. *J Invest Dermatol* 2009, 129(12): 2843-53.
- [11] MATHIASSEN S G, DE ZIO D, CECCONI F. Autophagy and the cell cycle: a complex landscape [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 51.
- [12] VAZQUEZ-MARTIN A, OLIVERAS-FERRAROS C, MENENDEZ J A. The active form of the metabolic sensor AMP-activated protein kinase α (AMPK α) directly binds the mitotic apparatus and travels from centrosomes to the spindle midzone during mitosis and cytokinesis [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(15): 2385-98.
- [13] POHL C, JENTSCH S. Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(1): 65-70.
- [14] ESKELINEN E L, PRESCOTT A R, COOPER J, et al. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells [J]. *Traffic*, 2002, 3(12): 878-93.
- [15] THORESEN S B, PEDERSEN N M, LIESTØL K, et al. A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, Beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic [J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(20): 3368-78.
- [16] MASKEY D, YOUSEFI S, SCHMID I, et al. ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy [J]. *Nat Commun*, 2013, 4(1): 1-14.
- [17] YOUNG A R, NARITA M, FERREIRA M, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(7): 798-803.
- [18] NÜRNBERG B, BEER-HAMMER S. Function, regulation and biological roles of PI3K γ variants [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(9): 427.
- [19] FUNDERBURK S F, WANG Q J, YUE Z. The Beclin 1-VPS34 complex: at the crossroads of autophagy and beyond [J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(6): 355-62.
- [20] WEIB L, EFFERTH T. Polo-like kinase 1 as target for cancer therapy [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2012, 1(1): 1-6.
- [21] VAKIFAHMETOGLU H, OLSSON M, ZHIVOTOVSKY B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(7): 1153-62.
- [22] WOLGEMUTH D J, MANTEROLA M, VASILEVA A. Role of cyclins in controlling progression of mammalian spermatogenesis [J]. *Int J Dev Biol*, 2013, 57(2/3/4): 159-68.
- [23] WILLEMS E, DEDOBBELEER M, DIGREGORIO M, et al. The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review [J]. *Cell Div*, 2018, 13(1): 1-17.
- [24] ENSERINK J M, KOLODNER R D. An overview of Cdk1-controlled targets and processes [J]. *Cell Div*, 2010, 5(1): 1-41.
- [25] LEE A, MA B, NG W T, et al. Management of nasopharyngeal carcinoma: current practice and future perspective [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(29): 3356-64.
- [26] XU J Y, WEI X L, WANG Y Q, et al. Current status and advances of immunotherapy in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2022, doi: 10.1177/17588359221096214.
- [27] MILLMAN S E, PAGANO M. MCL1 meets its end during mitotic arrest [J]. *EMBO Rep*, 2011, 12(5): 384-5.
- [28] FURUYA T, KIM M, LIPINSKI M, et al. Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation [J]. *Mol Cell*, 2010, 38(4): 500-11.
- [29] PARRILLA A, CIRILLO L, THOMAS Y, et al. Mitotic entry: the interplay between Cdk1, Plk1 and Bora [J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(23): 3177-82.