



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการบทบาทและกลไกของไนตริกออกไซด์ ในการ
ควบคุมความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอด

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิติ จันทร์วรโชติ

มิถุนายน 2556

สัญญาเลขที่ MRG5480105

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการบทบาทและกลไกของไนตริกออกไซด์ ในการ
ควบคุมความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอด

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิติ จันทรรวัชติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG5480105

(รหัสโครงการ)

Project Title : Regulatory role and mechanism of nitric oxide on lung cancer cell aggressiveness

(ชื่อโครงการ) บทบาทและกลไกของไนตริกออกไซด์ ในการควบคุมความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอด

Investigator : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศจักร ดร.ปิติ จันทรวรโชติ
(ชื่อนักวิจัย)

E-mail Address : pithi.c@chula.ac.th, pithi_chan@yahoo.com

Project Period : 2 ปี

(ระยะเวลาโครงการ)

The effect of extended exposure of the cancer cells to nitric oxide (NO), an endogenous mediator frequently found to be increased in a tumor area is largely unknown. We have reported herein that long-term NO exposure for 7-14 days rendered the lung cancer cells resistant to chemotherapeutic agents namely cisplatin, doxorubicin, and etoposide, and enhanced migratory activity of lung cancer cells. For chemotherapeutic resistance, the underlying mechanism was found to be involved with the adaptive responses of the cells by increasing their survival mechanisms including increase in the levels of caveolin-1 (Cav-1) and anti-apoptotic Bcl-2, and up-regulation of phosphorylated Akt. In addition, the present study found that long-term treatment of NO significantly enhances cell migration in dose- and time-dependent manners. The increased migratory action was associated with the increased levels of caveolin-1 (Cav-1) which in turn phosphorylated focal adhesion kinase (FAK) and ATP-dependent tyrosine kinase (Akt) pathways. These findings reveal the novel role of NO presenting in

the cancer environment in attenuating chemotherapeutic susceptibility and increased motility that may be beneficial in contriving strategies to treat the disease.

บทคัดย่อ

บทบาทของไนตริกออกไซด์ซึ่งเป็นสารที่พบได้ในสภาวะแวดล้อมของก้อนมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งปอดนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โครงการวิจัยนี้พบว่าการที่เซลล์มะเร็งได้รับไนตริกออกไซด์เป็นเวลานาน 7 และ 14 วันจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งปอดเกิดการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง ซิสพลาติน ด็อกโซรูบิซิน และอิโทโฟไซด์ได้ และยังส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์อีกด้วย ในด้านการดื้อต่อยาต้านมะเร็งนั้นการที่เซลล์มะเร็งได้รับไนตริกออกไซด์จะส่งผลให้เซลล์มีการเพิ่มระดับโปรตีน caveolin-1 โปรตีน Bcl-2 และ phosphorylated ATP-dependent tyrosine kinase (Akt) นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังทำให้ทราบว่า การที่เซลล์มะเร็งได้รับไนตริกออกไซด์จะส่งผลเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็ง ผ่านการเพิ่มระดับ phosphorylated focal adhesion kinase (FAK) และ ATP-dependent tyrosine kinase (Akt) pathway ผลจากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบบทบาทของไนตริกออกไซด์ในการควบคุมการดื้อต่อยาต้านมะเร็งและการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งซึ่งอาจนำไปใช้เพื่อพัฒนาวิธีการรักษาโรคได้

เนื้อหางานวิจัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ต่อการเปลี่ยนแปลงความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอด (cancer cell aggressiveness) เช่น การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) และการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง
2. เพื่อศึกษากลไกของ ไนตริกออกไซด์ในระดับเซลล์และโมเลกุล ในการควบคุมพฤติกรรมของเซลล์ ที่เกี่ยวข้องกับ การแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) และการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง

วิธีทดลอง

Cells and reagents

เซลล์มะเร็งปอดมาตรฐาน 2 ชนิด คือ H460 และ H23 จาก American Type Culture Collection (Manassas, VA). เลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 โดยเติม 5% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, และ 100 units/mL penicillin/streptomycin และเลี้ยงเซลล์ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมสภาวะ 5% CO₂ environment ที่อุณหภูมิ 37°C.

สารเคมี Lactacystin (LAC) MG 132 และ dimethylsulfoxide (DMSO) ซื้อจากบริษัท Sigma Chemical, Inc. (St. Louis, MO) สาร propidium iodide (PI) และ Hoechst 33342 ซื้อจากบริษัท Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) และ rabbit Cav-1 antibody rabbit Mcl-1 antibody mouse monoclonal ubiquitin antibody mouse monoclonal Cav-1 antibody และ peroxidase-conjugated secondary antibody ซื้อจากบริษัท Abcam (Cambridge, MA)

สาร MitoTracker Red CMXRos Alexa Fluor 350 goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) และ Lipofectamine 2000 ซื้อจากบริษัท Invitrogen (Carlsbad, CA) และ Antibody for ubiquitin protein G-agarose bead และ β -actin antibody ซื้อจากบริษัท Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

ขั้นตอนการวิจัย

1. ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารต่างๆที่ต้องการใช้ในการทดลองเพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์แต่ให้ผลในการเปลี่ยนแปลงระดับ ไนตริกออกไซด์ ได้อย่างเหมาะสม

โดยใช้ การวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยเทคนิค MTT assay ร่วมกับการดูการตายของเซลล์โดยใช้ annexin V-FITC และ propidium iodide (PI) และวัดผลโดยใช้เครื่อง fluorescence microscopy และ flow cytometer นอกจากนี้ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสีย้อม Hoechst 33342 apoptosis assay ทำการวิเคราะห์โดย fluorescence microscope โดยการถ่ายภาพนิวเคลียสของเซลล์และทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียสที่มีลักษณะ condensed หรือ fragmented nuclei ที่บ่งบอกถึงการตายแบบอะพอพโทซิส

2. ทำการศึกษาค่าผลของโปรตีนต่างๆต่อ cancer cell aggressiveness โดยการ transfection เพื่อให้ได้เซลล์มะเร็งปอดมาตรฐานที่มีระดับโปรตีน ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับ cancer cell aggressiveness ในระดับที่แตกต่างกันตามวิธีการดังนี้

ทำการ transfect เซลล์ด้วย expression plasmid ของโปรตีนต่างๆที่ต้องการศึกษา เช่น Caveolin-1 Bcl-2 และ Mcl-1 โดยการเลี้ยงเซลล์ให้ได้ 60-70% confluence และทำการ transfection โดยใช้ lipofectamin reagents เมื่อเซลล์ได้รับการ transfection ครบระยะเวลา 3 วันจะทำการคัดเลือกเพื่อให้ได้ Stable transfected cell lines โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผ่านการ transfection ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติม selective antibiotic ที่เฉพาะต่อ plasmid ที่ใช้ ทำการเลี้ยงเซลล์ในลักษณะดังกล่าวนาน 28 วัน เซลล์ที่ได้จะนำไปทำการวัดปริมาณโปรตีน โดย Western blot analysis เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีระดับ protein ชนิดนั้นๆมากกว่าเซลล์มาตรฐาน เพื่อการศึกษาค่าผลของโปรตีนนั้นๆต่อการ invasion, migration, chemotherapeutic resistance และ anchorage-independent growth ต่อไป

การวิเคราะห์ระดับโปรตีนด้วยวิธี Western blot analysis

เซลล์แต่ละชนิดที่ได้รับการ transfection และผ่านการคัดเลือกด้วยวิธีข้างต้น จะถูกแช่ใน lysis buffer ที่ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM sodium chloride, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a commercial protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) นาน 30 min บนน้ำแข็ง โปรตีนที่แยกได้จากเซลล์จะถูกนำมา denatured และใส่ Laemmli loading buffer ตามด้วยการ load ลง 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ทำการ separation และ โปรตีนจะถูก transfer ไปยัง 0.45 µM nitrocellulose membranes ทำการ block นาน 1 ชั่วโมง โดย 5% nonfat dry milk in TBST (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 0.05% Tween 20) และตรวจวัดโปรตีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ antibody ที่เฉพาะเจาะจง ในการตรวจและวัดโดย chemiluminescence method

4. ทำการศึกษาผลของไนตริกออกไซด์ ต่อการตายของเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับยาต้านมะเร็งชนิดมาตรฐานต่างๆ

เมื่อให้ไนตริกออกไซด์กับเซลล์ ทำการศึกษามีชีวิตรอดของเซลล์ที่เวลาต่างๆ เมื่อได้รับสารต้านมะเร็งที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยเทคนิค XTT หรือ MTT assay และวัดผลโดยเครื่อง microplate reader นอกจากนี้ตรวจสอบการตายของเซลล์โดยใช้ annexin V-FITC และ propidium iodide (PI) และวัดผลโดยใช้เครื่อง fluorescence microscopy และ flow cytometer นอกจากนี้ตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสีย้อม Hoechst 33342 apoptosis assay ทำการวิเคราะห์โดย fluorescence microscope

5. ทำการศึกษาระดับของโปรตีนชนิดต่างๆที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อได้รับไนตริกออกไซด์ โดยใช้ Western blotting

ทำการศึกษาระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ เช่น Bcl-2, Bcl-XL, Bax, p53, Mcl-1, cytochrome c และ caspases และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ invade เช่น MMP และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการ invade และ growth in detachment condition และโปรตีนใน signaling pathway อื่นๆที่เกี่ยวข้องกับ cancer cell aggressiveness โดยเมื่อทำการทดลองแล้ว เซลล์จะถูกแช่ใน lysis buffer ที่ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM sodium chloride, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a commercial protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) นาน 30 min โปรตีนที่แยกได้จะถูกนำมา denatured และใส่ Laemmli loading bufferตามด้วยการ load ลง 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ทำการ separation และ โปรตีนจะถูก transfer ไปยัง 0.45 μ M nitrocellulose membranes ทำการ block นาน 1 ชั่วโมง โดย 5% nonfat dry milk in TBST (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 0.05% Tween 20) และตรวจวัดโปรตีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ antibody ที่เฉพาะเจาะจง

6. ทำการศึกษากการ binding และ interaction ระหว่างโปรตีนโดยวิธี Immunoprecipitation

เมื่อทำการทดลองแล้ว เซลล์จะถูกแช่ใน lysis buffer ที่ประกอบด้วย 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM sodium chloride, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a commercial protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) นาน 30 min และ

supernatant จะนำมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนและแซ่กับ antibody ต่อโปรตีนที่สนใจที่เชื่อมต่อกับ protein G plus-agarose beads นาน 4 ชั่วโมง และ precipitated immune complexes จะถูกล้าง 5 ครั้งด้วย ice-cold lysis buffer และใส่ Laemmli sample buffer หลังจากนั้นทำการต้มที่ 95°C นาน 5 นาที และ Immune complexes ที่ได้นำไป separated โดย 10% SDS-PAGE และวิเคราะห์ด้วย Western blotting โดยใช้ antibody ของโปรตีนที่ต้องการศึกษา

7. ทำการศึกษาความสามารถในการเจริญของเซลล์มะเร็งโดย Colony formation assay

Anchorage-independent growth จะถูกทดสอบโดยการนำเซลล์มะเร็งที่ต้องการทดสอบมาเลี้ยงให้เจริญใน ภาวะ single-cell suspension ในอาหารแข็งที่ประกอบด้วย RPMI 10% FBS และ 0.6% low melting temperature agarose มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน 4 สัปดาห์และตรวจวิเคราะห์หา colony ของเซลล์ที่มีชีวิตรอด โดยการ ใช้ trypan blue staining assay

8. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีน ผ่านทางกระบวนการทำลายโปรตีน

ทำการศึกษาการทำลายโปรตีนผ่านกระบวนการ Ubiquitin- Proteasomal degradation ด้วยเทคนิค immunoprecipitation ดังที่กล่าวมาแล้ว และศึกษาการทำลายโปรตีนผ่านทาง lysosomal degradation pathway เพื่อหากลไกในการที่สารไนตริกออกไซด์ควบคุมระดับของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอด

9. Statistical analysis

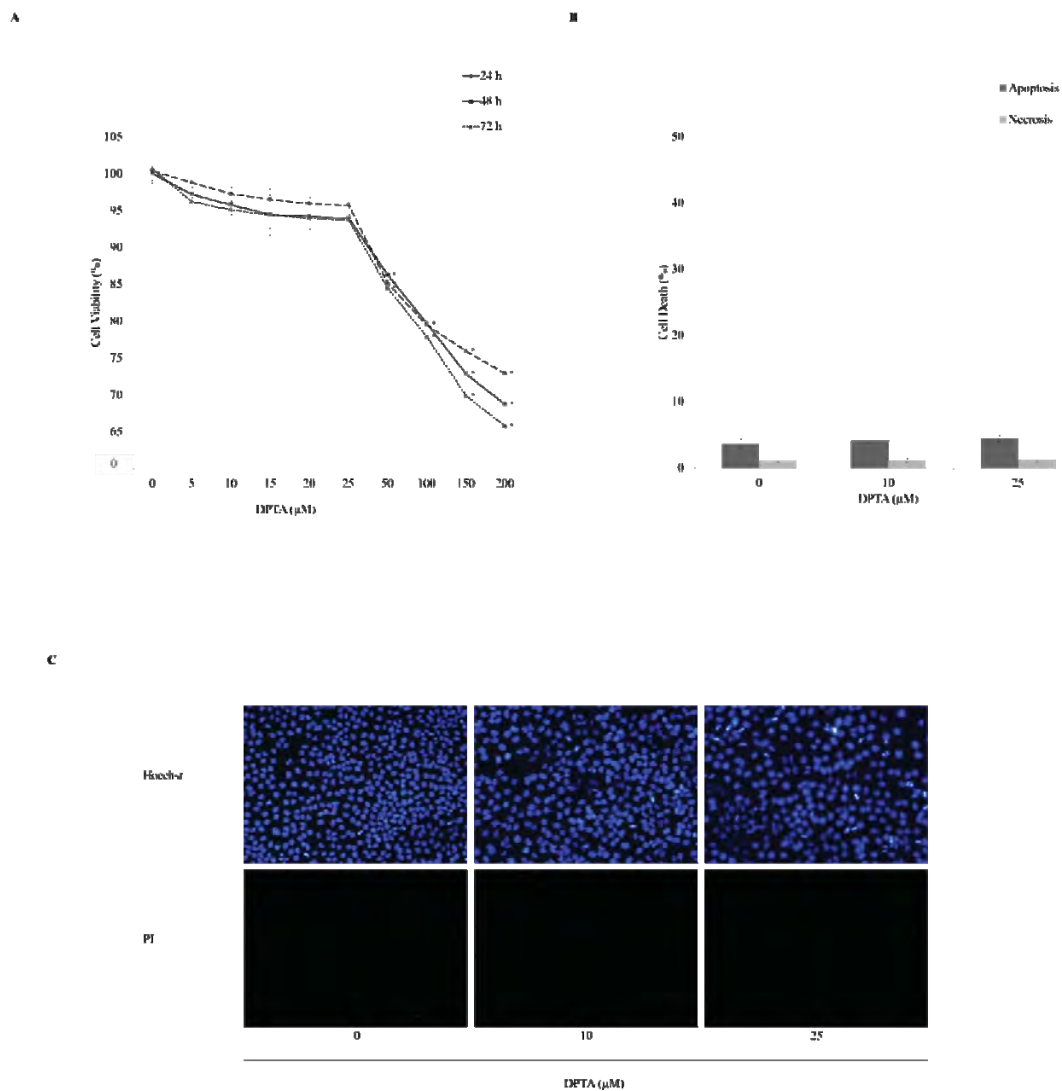
ผลที่ได้จาก Western Blot analysis จะใช้ค่า Mean densitometry data จากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้ง ส่วนผลการทดลองอื่นๆ จะนำค่า absorbance หรือ fluorescence intensity ที่วัดได้มาทำการหาค่า mean โดยเปรียบเทียบและ normalize ค่าที่ได้กับกลุ่มควบคุม และนำค่า mean ที่ได้จากการทดลองอย่างน้อย 3 ครั้งมา analyzed โดย the Student's t test โดยกำหนด significance level ที่ $p < 0.05$.

ผลการทดลอง

1. ผลของไนตริกออกไซด์ต่อการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง

1.1. การศึกษาฤทธิ์ของไนตริกออกไซด์ในระดับต่ำต่อการเกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด

โครงการวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาชีววิทยาของเซลล์มะเร็งที่ได้รับ ไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลาต่อเนื่องยาวนาน โดยระดับไนตริกออกไซด์ที่เซลล์มะเร็งได้รับนั้นต่อเนื่องไม่ก่อให้เกิดผลต่อเซลล์ทั้งในแง่การเร่งการเจริญ หรือการเกิดพิษต่อเซลล์ โดยให้เซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ได้รับสารให้ไนตริกออกไซด์ DETA NONOate ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0-200 ไมโครโมลาร์ (μM)) และทำการตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์เป็นระยะเวลา 3 วัน และตรวจหาการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis ผลการวิจัยทำให้ทราบว่าสารให้ไนตริกออกไซด์ DETA NONOate ในระดับความเข้มข้นที่ 0 – 25 ไมโครโมลาร์ ไม่ก่อให้เกิดพิษใดๆต่อเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 ในระยะเวลา 0-72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังไม่ส่งผลใดๆต่อ cell proliferation โดยดูจากค่า cell viability เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารให้ไนตริกออกไซด์ และเมื่อดูค่าการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis นั้นทำให้ทราบว่าสารให้ไนตริกออกไซด์ที่ความเข้มข้นและเวลาดังกล่าวนั้นไม่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการตาย เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของสารไนตริกออกไซด์แล้วจึงนำความเข้มข้นดังกล่าวมาใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 1 แสดงความเป็นพิษของสารไนไตริกออกไซด์ (DPTA NONOate) ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 μM เมื่อเป็นระยะเวลา 0-72 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์มะเร็งปอดชนิด H460

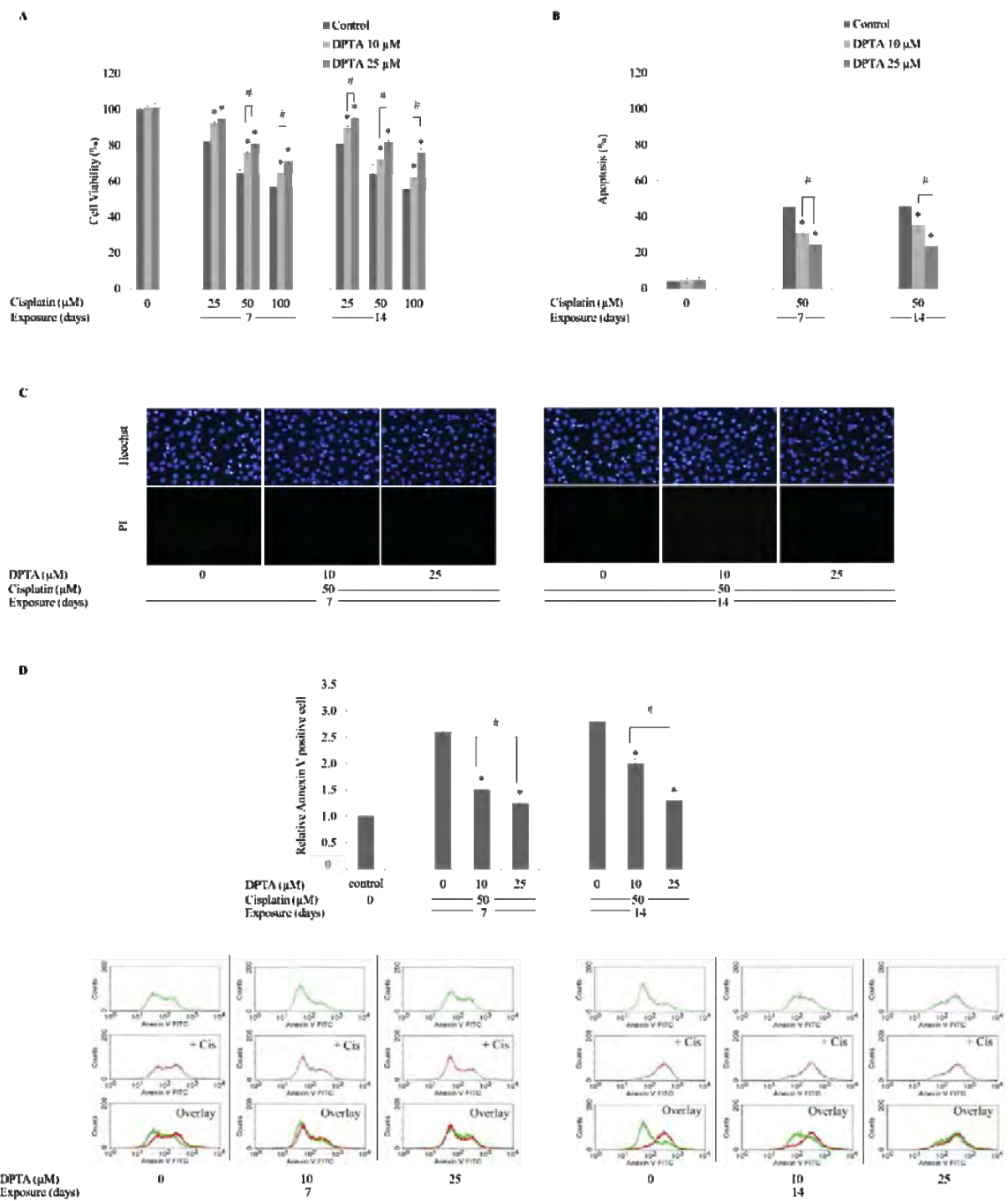
รูป A เป็นการตรวจวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์โดย MTT assay รูป B และ C เป็นการตรวจวิเคราะห์การตายของเซลล์โดย Hoescht 33342 และ PI staining assay

1.2 การศึกษาผลของไนตริกออกไซด์ต่อการดื้อต่อยาต้านมะเร็งชนิดต่างๆ

นำเซลล์มะเร็งมาเลี้ยงในภาวะควบคุม ที่มีการเติมสารให้ไนตริกออกไซด์พร้อมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 2 วัน เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน 7-14 วัน จากนั้นนำเซลล์ที่เลี้ยงได้ 7 วัน และ 14 วัน มาทดสอบการตอบสนองโดยการตายแบบ apoptosis และ necrosis เมื่อเซลล์ได้รับยาต้านมะเร็ง 3 ชนิดที่ใช้ในการรักษามะเร็งปอด คือ ยาต้านมะเร็ง Cisplatin Doxorubicin และ Etoposide โดยทดสอบนาน 24 ชั่วโมง โดยวิธีการต่างๆดังที่แสดงรายละเอียดในวิธีการวิจัย

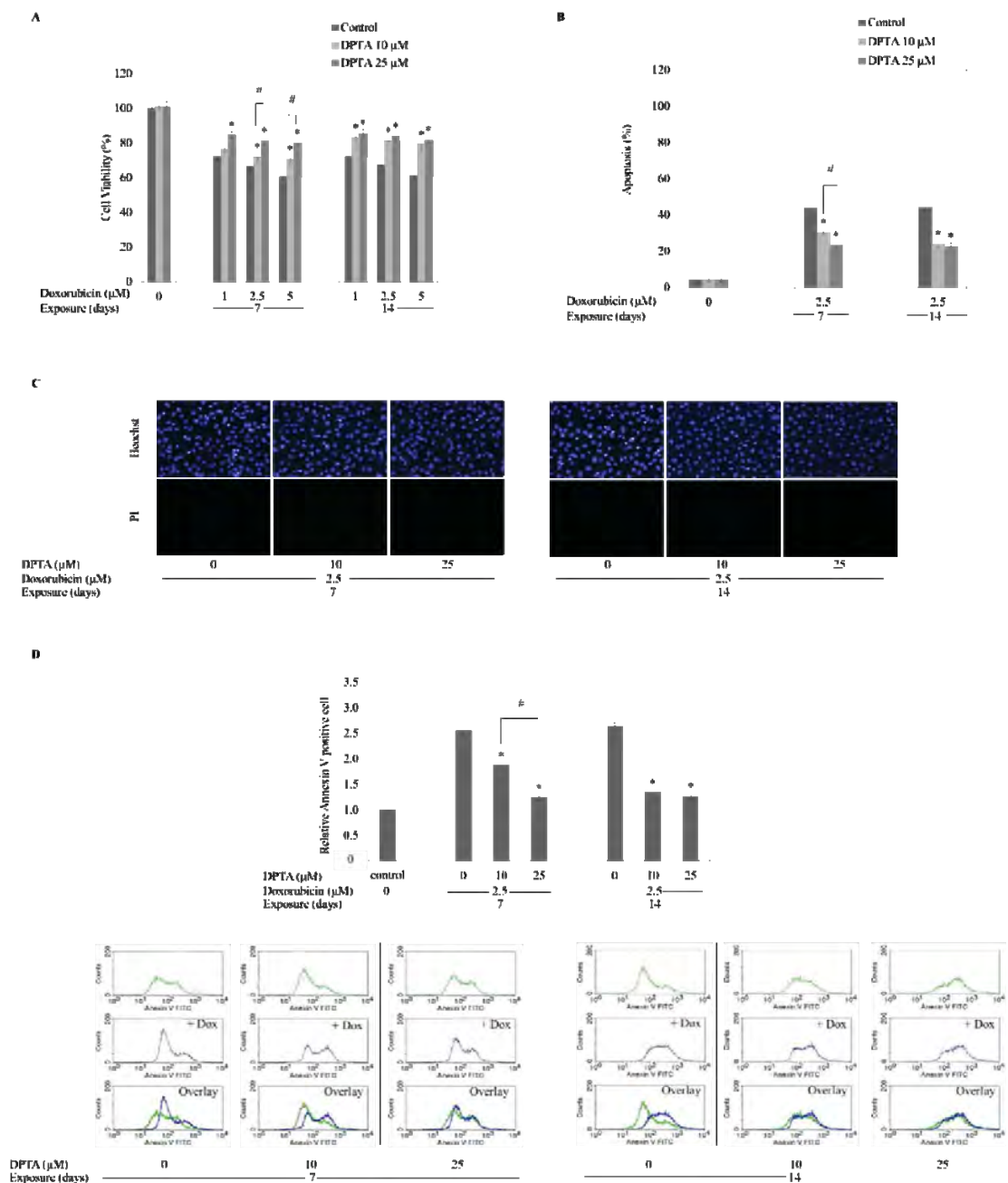
ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลานาน 7 วันและ 14 วันเกิดการดื้อต่อยาต้านมะเร็งทั้ง 3 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงทั้งค่า cytotoxicity และลดการเกิด apoptosis ลงเมื่อเซลล์ได้รับยา และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบค่าต่างๆที่ได้กับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยาต้านมะเร็ง และผลที่สังเกตได้เป็นไปตามความเข้มข้นของสารให้ไนตริกออกไซด์

สำหรับ Cisplatin นั้น เซลล์มะเร็งปอดที่ถูกเลี้ยงในภาวะที่มี สารให้ไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันและเซลล์มะเร็งปอดที่เลี้ยงในภาวะปกติ จะได้รับยาต้านมะเร็ง cisplatin ที่ขนาดความเข้มข้น 0-100 μM เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมงและทำการวัดการอยู่รอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay และวัดการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis โดยวิธี Hoechst33342/Propidium Iodide staining assay และ Annexin-V staining assay ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วย Flow cytometry ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลานานนั้นส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งดื้อยา cisplatin ได้ (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงผลของการได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันทำให้เซลล์เกิดการติดต่อด้านมะเร็ง cisplatin รูป A เป็นการตรวจวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์โดย MTT assay รูป B และ C เป็นการตรวจวิเคราะห์การตายของเซลล์โดย Hoechst 33342 และ PI staining assay รูป D แสดงการตรวจวิเคราะห์การตายแบบ apoptosis ด้วย Annexin-V staining และ flowcytometry

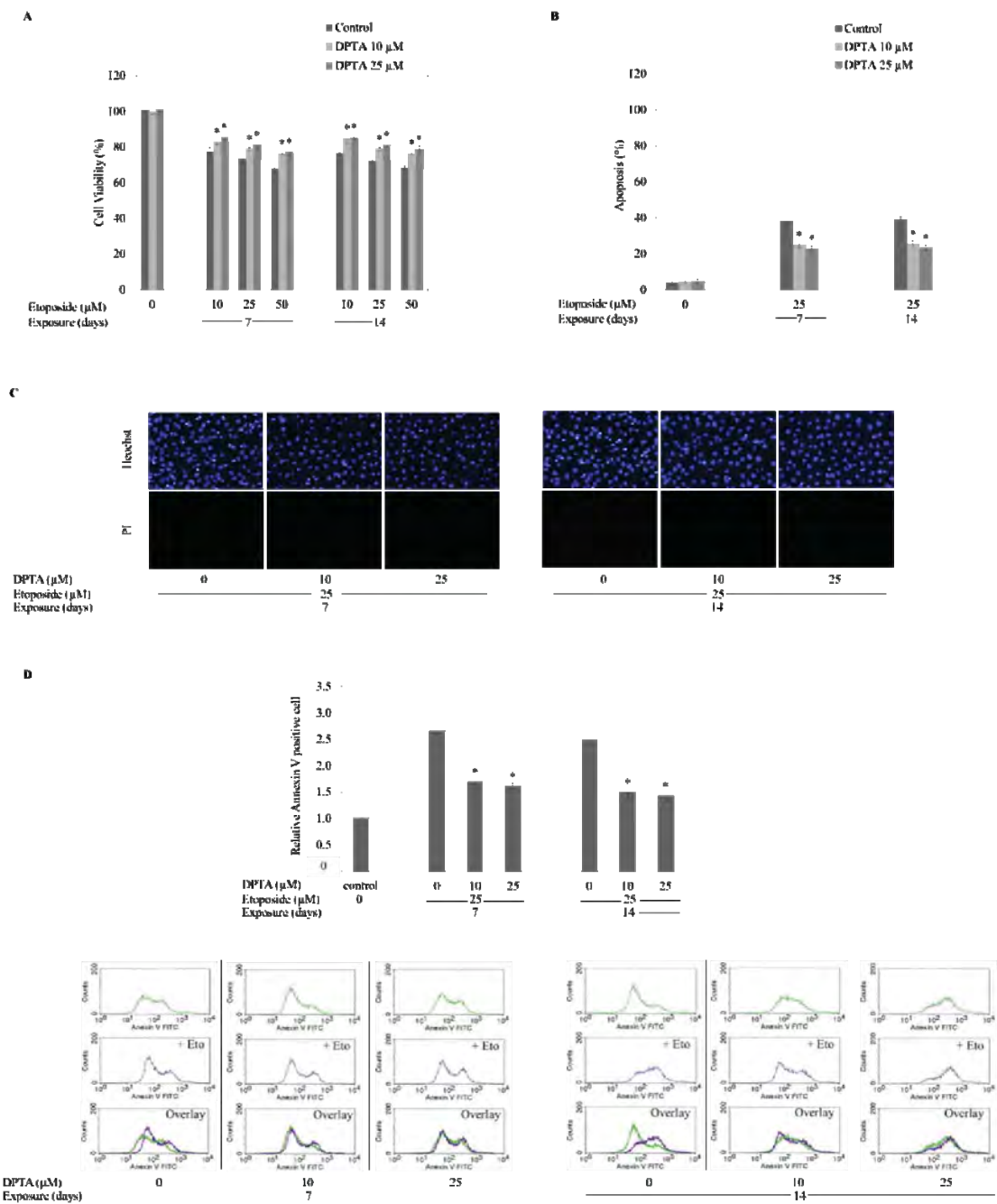
สำหรับยา Doxorubicin นั้น เซลล์มะเร็งปอดที่ถูกเลี้ยงในภาวะที่มี สารไนโตริกออกไซด์ เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันและเซลล์มะเร็งปอดที่เลี้ยงในภาวะปกติ จะได้รับยาต้านมะเร็ง Doxorubicin ที่ขนาดความเข้มข้น 0-5 μM เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมงและทำการวัดการอยู่รอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay และวัดการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis โดยวิธี Hoechst33342/Propidium Iodide staining assay และ Annexin-V staining assay ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วย Flow cytometry ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการได้รับไนโตริกออกไซด์ เป็นระยะเวลานานนั้นส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งต่อยา Doxorubicin ได้ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แสดงผลของการได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันทำให้เซลล์เกิดการต่อต้านมะเร็ง Doxorubicin

รูป A เป็นการตรวจวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์โดย MTT assay รูป B และ C เป็นการตรวจวิเคราะห์การตายของเซลล์โดย Hoechst 33342 และ PI staining assay รูป D แสดงการตรวจวิเคราะห์การตายแบบ apoptosis ด้วย Annexin-V staining และ flowcytometry

สำหรับยา Etoposide นั้น เซลล์มะเร็งปอดที่ถูกเลี้ยงในภาวะที่มี สารให้ไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันและเซลล์มะเร็งปอดที่เลี้ยงในภาวะปกติ จะได้รับยาต้านมะเร็ง Etoposide ที่ขนาดความเข้มข้น 0-50 μM เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมงและทำการวัดการอยู่รอดของเซลล์โดยวิธี MTT assay และวัดการตายของเซลล์ทั้งแบบ apoptosis และ necrosis โดยวิธี Hoechst33342/Propidium Iodide staining assay และ Annexin-V staining assay ซึ่งตรวจวิเคราะห์ด้วย Flow cytometry ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลานานนั้นส่งเสริมให้เซลล์มะเร็งดื้อยา Etoposide ได้ (รูปที่ 4)

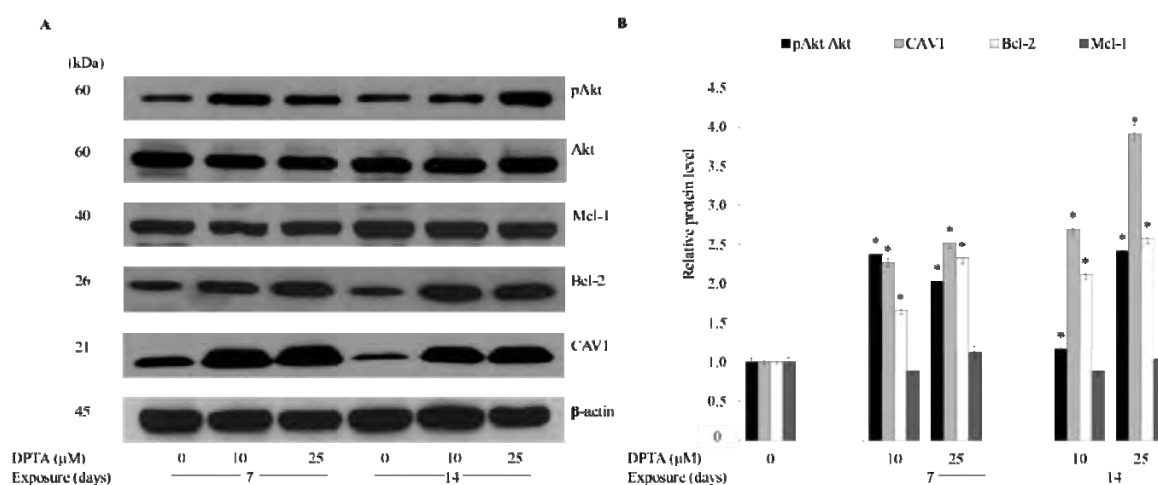


รูปที่ 4 แสดงผลของการได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันทำให้เซลล์เกิดการ ตื้อต่อยาต้านมะเร็ง Etoposide รูป A เป็นการตรวจวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์โดย MTT assay รูป B และ C เป็นการตรวจวิเคราะห์การตายของเซลล์โดย Hoechst 33342 และ PI staining assay รูป D แสดงการตรวจวิเคราะห์การตายแบบ apoptosis ด้วย Annexin-V staining และ flowcytometry

1.3 การศึกษาผลของการได้รับไนตริกออกไซด์ต่อกลไกในการต่อต้านมะเร็งชนิดต่าง ๆ

เมื่อนำเซลล์มะเร็งปอดที่ได้รับการเลี้ยงในภาวะที่เติมสารให้ไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7-14 วันมาทำการตรวจวิเคราะห์ ระดับของโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการตาย การอยู่รอดของเซลล์ และการต่อต้าน อันได้แก่ phosphorylated Akt total Akt Mcl-1 Bcl-2 และ Caveolin-1

ผลการวิจัยพบว่า การที่เซลล์มะเร็งได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 วันและ 14 วันนั้น ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มระดับของโปรตีนภายในเซลล์ที่ควบคุมกลไกการอยู่รอดของเซลล์ (survival pathway) คือ พบการเพิ่มขึ้นของระดับ Phosphorylated Akt ซึ่งเป็นโปรตีน Akt ที่เกิดการกระตุ้นให้มีการทำงาน (Activated Akt) ในขณะที่ระดับของโปรตีน Total Akt มีระดับเดียวกับเซลล์ที่ไม่ได้รับไนตริกออกไซด์ นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มระดับของโปรตีนที่ยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis คือ Bcl-2 โดยพบว่าเซลล์ที่ได้รับไนตริกออกไซด์จะมีระดับโปรตีน Bcl-2 สูงขึ้นอย่างมาก และยังพบการเพิ่มระดับโปรตีน Caveolin-1 ในเซลล์ที่ได้รับ ไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7-14 อีกด้วย (รูปที่ 5)

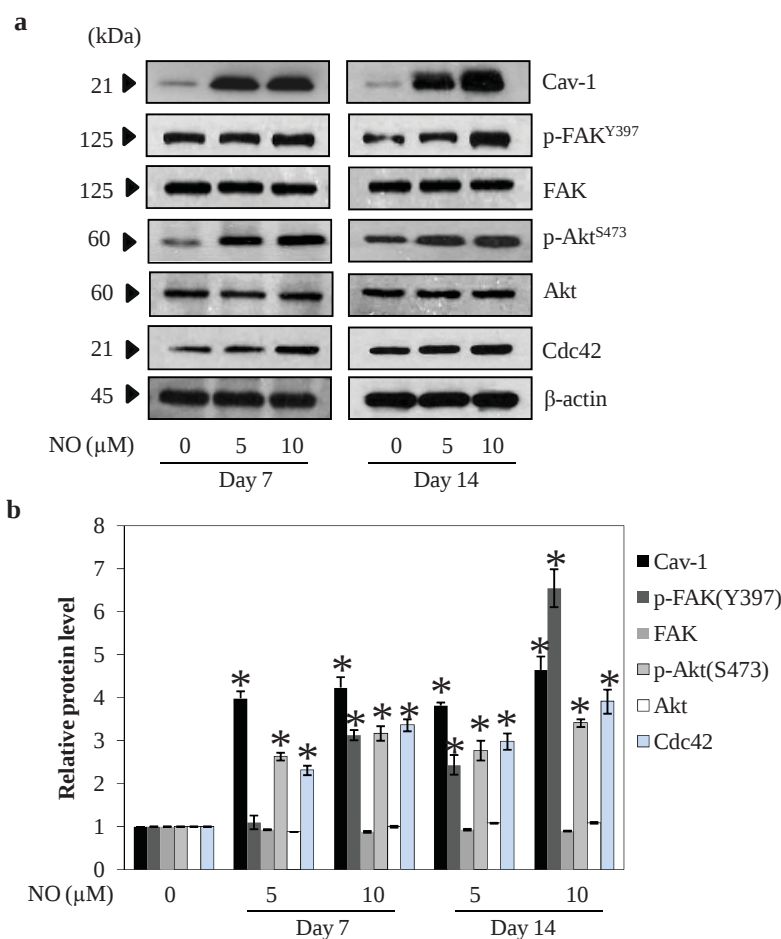


รูปที่ 5 แสดงผลของการได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis

รูปที่ 6 แสดงผลของการได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันทำให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่เร็วขึ้น

2.2 ผลของไนตริกออกไซด์ต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งปอด

เมื่อนำเซลล์มะเร็งปอดที่ได้รับการเลี้ยงในภาวะที่เติมสารให้ไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน มาทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับของโปรตีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งโดยวิธี western blot analysis ผลการทดลองพบว่า เซลล์ที่ได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 วันและ 14 วันนั้น มีระดับของโปรตีนที่ควบคุมกลไกการเคลื่อนที่ของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับระดับโปรตีนดังกล่าวในเซลล์ที่ไม่ได้รับไนตริกออกไซด์ คือ การเพิ่มขึ้นของระดับ Phosphorylated Akt และ Phosphorylated FAK ในขณะที่ โปรตีน Total Akt และ Total FAK มีระดับเดียวกับเซลล์ที่ไม่ได้รับไนตริกออกไซด์ และพบการเพิ่มระดับของโปรตีน Caveolin-1 และ Cdc42 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสัมพันธ์กับเซลล์มะเร็งในระยะที่มีการเคลื่อนที่สูง (motile stage) ในเซลล์ที่ได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7-14 อีกด้วย



รูปที่ 7 แสดงผลของการได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วันทำให้เซลล์เพิ่มโปรตีนที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์มากขึ้น

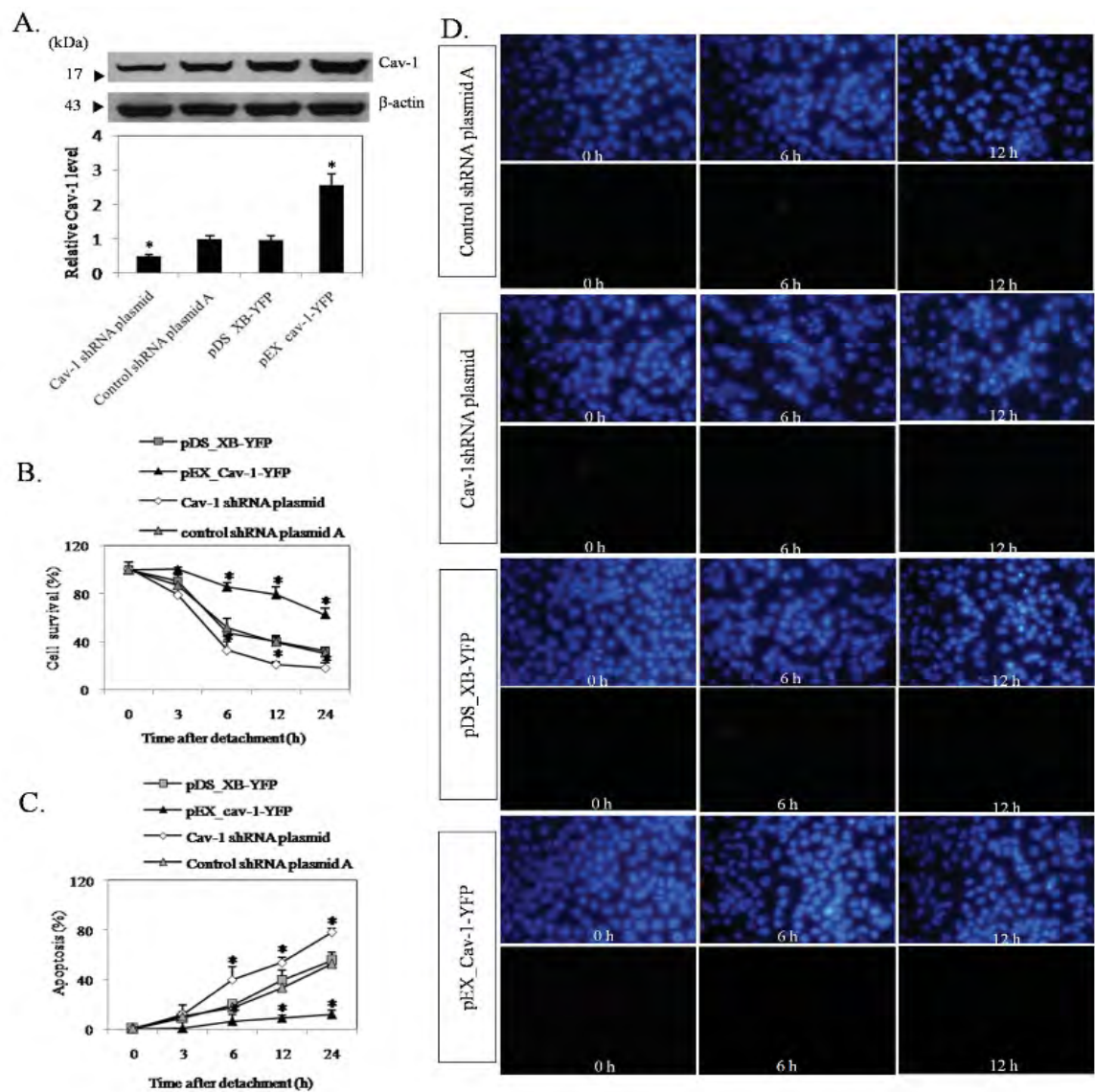
3. การศึกษาบทบาทของโปรตีน Caveolin-1 ต่อความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอดในแง่การต่อการตายของเซลล์แบบอะนอยด์คิสหลังการหลุดออกของเซลล์

3.1 บทบาทของโปรตีน Caveolin-1 ในการต่อการตายแบบอะนอยด์คิส

โปรตีน Caveolin-1 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญหลายประการต่อการทำงานของเซลล์ ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นบทบาทที่สำคัญอีกประการของโปรตีน Caveolin-1 ในการควบคุมความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอดในแง่การต่อการตายแบบอะนอยด์คิส โดยการการต่อการตายของเซลล์มะเร็งดังกล่าวจะส่งผลให้เซลล์มะเร็งรอดชีวิตหลังการหลุดรอดและแพร่กระจายเพิ่มมากขึ้นได้

การศึกษารolesของโปรตีน Caveolin-1 ในการควบคุมการตายของเซลล์แบบอะนอยด์คิส (anoikis) ทำได้โดยการ นำเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 มาทำการ transfection โดยใช้ Caveolin-1 overexpressing plasmid และ ShRNA-Caveolin-1 plasmid และ control plasmid เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีระดับโปรตีน มากกว่าระดับปกติ น้อยกว่าระดับปกติและระดับเทียบเท่า เซลล์มะเร็งปกติที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน และนำเซลล์ที่ได้มาทำให้หลุดลอก และติดตามการมีชีวิตรอดของเซลล์โดย XTT assay ที่เวลาต่างๆกันนาน 0-24 ชั่วโมง

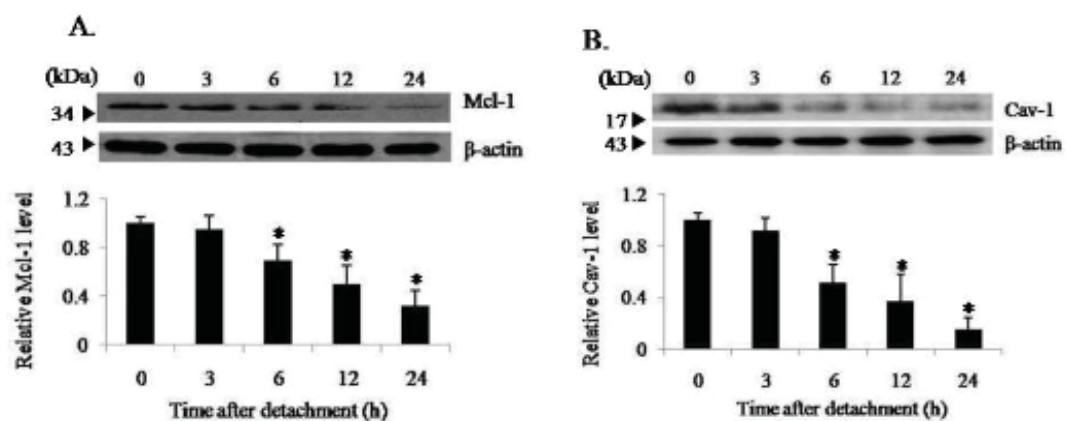
โดยพบว่าเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นให้อยู่ในภาวะหลุดออกและแขวนลอยเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 จะเกิดการตายแบบอะนอยด์คิส โดยเริ่มตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 6 ชั่วโมง หลังการหลุดลอก การที่เซลล์มีระดับโปรตีนเพิ่มขึ้นจากการ transfection ด้วย Caveolin-1 overexpressing plasmid จะทำให้เซลล์ต่อการตายแบบอะนอยด์คิสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เซลล์ที่มีระดับโปรตีน caveolin-1 ลดลงจากการ transfection ด้วย ShRNA Caveolin-1 plasmid จะเกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นบทบาทของ caveolin-1 ที่ชัดเจนในการยับยั้งตายของเซลล์แบบอะนอยด์คิส (รูปที่ 8)



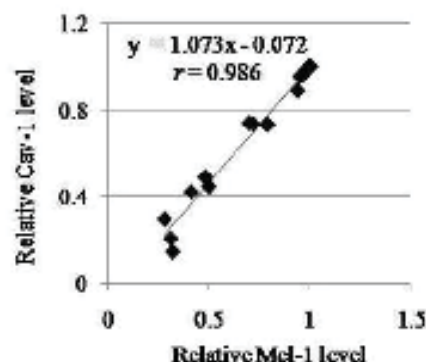
รูปที่ 8 ผลของโปรตีน Caveolin-1 ต่อการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งปอด H460 รูป A แสดงระดับของโปรตีน Caveolin-1 ภายในเซลล์เมื่อตรวจวัดด้วย western blot analysis รูป B และ C แสดงการอยู่รอดของเซลล์และการตายแบบ apoptosis ที่เกิดขึ้น ณ เวลาต่างๆ

3.2 โปรตีน Caveolin-1 ในที่เซลล์หลุดลอกมีการลดระดับสอดคล้องกับการลดระดับของโปรตีน Mcl-1

โปรตีน Mcl-1 เป็นโปรตีนที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นโปรตีนที่ทำหน้าสำคัญในการต่อต้านการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส เมื่อศึกษาาระดับของโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 โดยวิธี western blot analysis พบว่าการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสมีความสัมพันธ์กับโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 ที่ลดลงเมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 9) และเมื่อนำไปหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับที่ลดลงของโปรตีนทั้ง 2 พบว่าการลดลงของโปรตีนทั้ง 2 มีความสัมพันธ์กัน (รูปที่ 10)



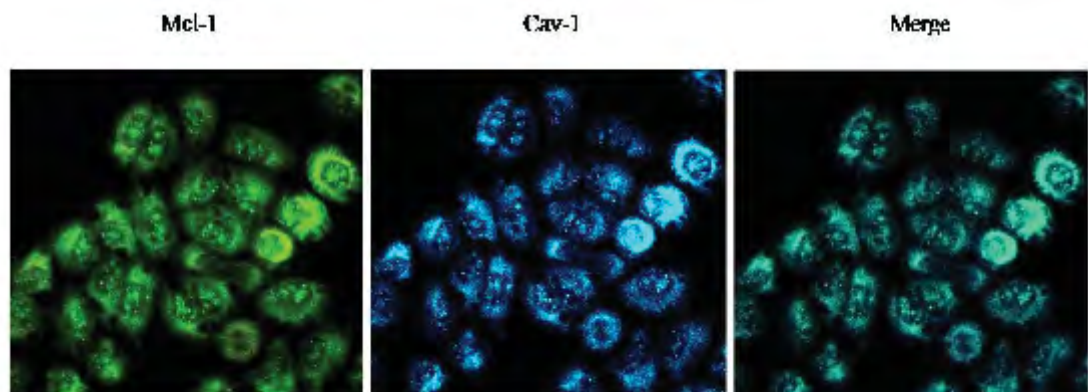
รูปที่ 9 ระดับของโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 ที่เปลี่ยนไปในระหว่างการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์มะเร็งปอด H460



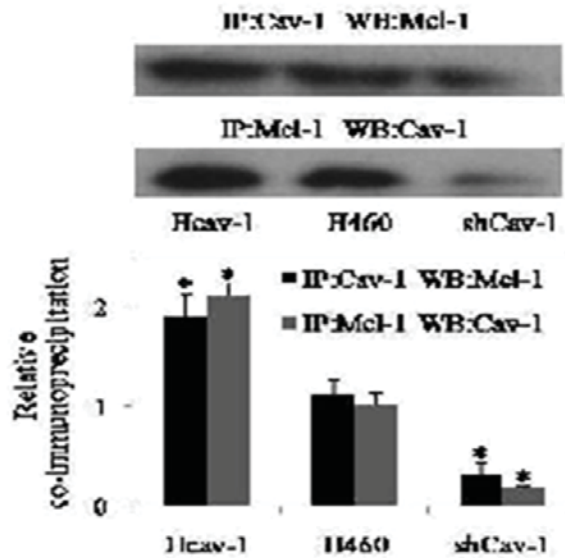
รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับของโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 ที่เปลี่ยนไปในระหว่างการตายแบบอะพอพโตซิสในเซลล์มะเร็งปอด H460

3.3 โปรตีน Caveolin-1 จับกับโปรตีน Mcl-1ภายในเซลล์

จากความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนทั้ง 2 ดังที่กล่าวไปแล้วในการทดลองก่อนหน้านี้ ประกอบกับระดับของโปรตีนทั้งสอง คือ Caveolin-1 และ Mcl-1 ที่เกิดการลดลงหลังเซลล์เกิดการหลุดลอกออกอย่างสัมพันธ์กัน และงานวิจัยก่อนหน้านี้ระบุว่าโปรตีน Caveolin-1 เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็น scaffolding protein ที่อาจจับกับโปรตีนชนิดอื่นและเปลี่ยนแปลงระดับ การทำลาย หรือหน้าที่ของโปรตีนนั้นๆได้ โดยที่ Mcl-1 นี้เองเป็น anti-apoptotic protein ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการตายแบบ anoikis เมื่อทำการวิจัยโดยใช้ immunoprecipitation assay และ immunocytochemistry ทำให้ทราบว่าโปรตีน caveolin-1 สามารถ interact กับโปรตีน Mcl-1 ได้ (รูปที่ 11 และ 12)



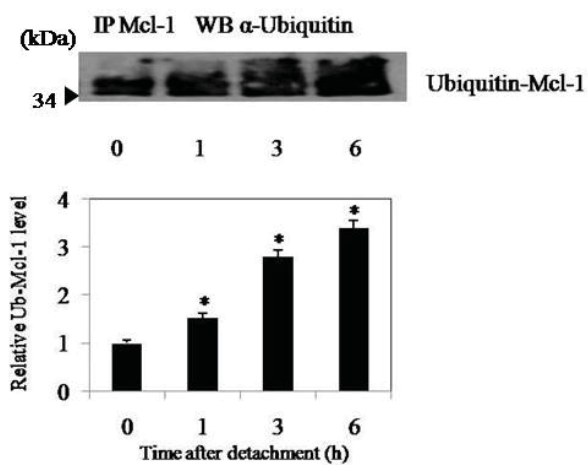
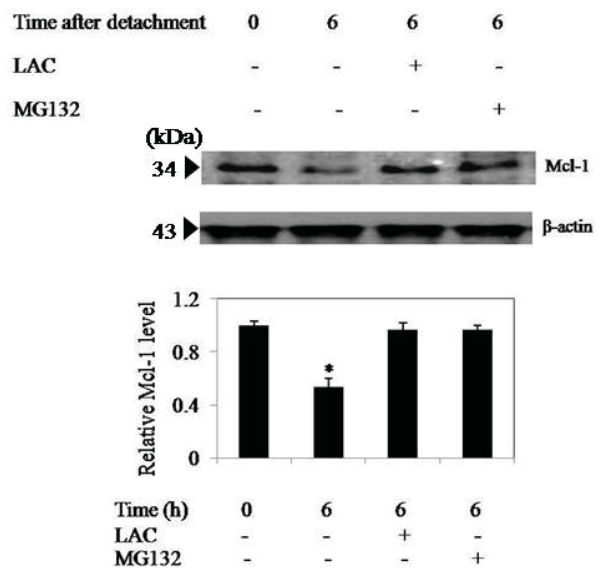
รูปที่ 11 การ co-localization ของโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 โดยวิธี immunocytochemistry



รูปที่ 12 การ Interaction ของโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย Immunoprecipitation assay

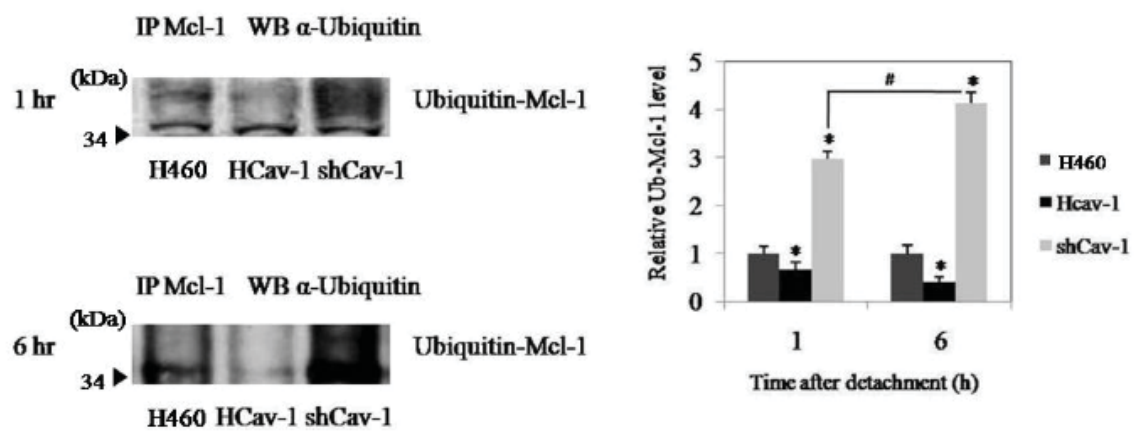
3.4 โปรตีน Caveolin-1 ยับยั้งการทำลายโปรตีน Mcl-1 ผ่านทาง ubiquitin-proteasomal degradation pathway

ผลของการ interaction ระหว่างโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 ดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12 ทำให้สงสัยว่าโปรตีน Caveolin-1 อาจมีผลในการควบคุมระดับของโปรตีน Mcl-1 ได้ เนื่องจากโปรตีน Mcl-1 เป็นโปรตีนที่มี half-life สั้น โดยถูกทำลายผ่านกระบวนการ ubiquitin-proteasomal degradation อยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดสมมติฐานว่า Caveolin-1 อาจจับกับโปรตีน Mcl-1 และส่งผลยับยั้งการทำลายโปรตีนดังกล่าวได้ จึงได้ทำการวิเคราะห์ระดับการทำลายโปรตีน Mcl-1 ผ่านทาง proteasomal degradation pathway (รูปที่ 13) โดยพบว่าเมื่อใส่ proteasome inhibitor (Lactacystin (LAC) และ MG132) จะยับยั้งการลดระดับของโปรตีน Mcl-1 ที่กระตุ้นจากการหลุดลอกของเซลล์ได้ และผลการวิจัยยังแสดงให้เห็นระดับการทำลายโปรตีน Mcl-1 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์หลุดลอกออก โดยดูจาก Mcl-1-ubiquitin complex ที่เพิ่มขึ้นภายหลังการหลุดลอกของเซลล์



รูปที่ 13 การ Interaction ของโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 สามารถยับยั้งการทำลายโปรตีน Mcl-1 ผ่านทาง proteasomal pathway

เมื่อทำการทดลองโดยตรวจวิเคราะห์ระดับโปรตีน Mcl-1 และระดับการเกิดการเกิดการทำลายโปรตีน โดยดูจากระดับ Mcl-1-ubiquitin complex ในเซลล์ที่มีระดับ Caveolin-1 แตกต่างกัน ทั้งเซลล์ที่มี Caveolin-1 เพิ่มขึ้นผ่านการ transfection ด้วย Caveolin-1 – overexpressing plasmid และเซลล์ที่มีระดับโปรตีน Caveolin-1 ลดลงผ่านการ transfection ด้วย ShRNA-Caveolin-1 plasmid ทำให้ทราบว่า โปรตีน Caveolin-1 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมระดับโปรตีน Mcl-1 โดยที่โปรตีน Caveolin-1 สามารถจับกับโปรตีน Mcl-1 และยับยั้งการทำลายโปรตีนดังกล่าวผ่านกระบวนการ ubiquitin-proteasomal degradation ได้ และการที่มีระดับ Mcl-1 สูงในเซลล์มะเร็งปอดก็จะส่งผลให้เซลล์ต่อการตายแบบ anoikis นั้นเอง



รูปที่ 14 Caveolin-1 ส่งผลยับยั้งการทำลายโปรตีน Mcl-1

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาบทบาทของไนตริกออกไซด์ในแง่การควบคุมความรุนแรงของเซลล์มะเร็งต่อการเกิดโรคและการดำเนินไปของโรค จากรายงานของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศต่างๆทั่วโลก ทำให้ทราบว่า มะเร็งปอดเป็นโรคที่เป็นสาเหตุสำคัญของการตายของผู้ป่วยโรคมะเร็งทั่วโลก American Lung Association ระบุว่ามะเร็งปอดเป็นสาเหตุการตายหลักของผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมด โดยประมาณว่าในปี 2012 มีผู้ป่วยเสียชีวิตจากมะเร็งปอดมากถึงร้อยละ 28 ของผู้ป่วยมะเร็งทั้งหมดในประเทศสหรัฐอเมริกา (1) แม้วานักวิจัยทั่วโลกจะให้ความสำคัญต่อการพัฒนาคิดค้นยาใหม่มาใช้ในการรักษามะเร็งอย่างต่อเนื่องประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งชนิดนี้ยังคงอยู่ในระดับต่ำกว่าความคาดหมาย สาเหตุหลักของการตายในผู้ป่วยมะเร็งปอดพบว่าเกิดจากการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (metastasis) ซึ่งพบได้มากในมะเร็งชนิดนี้ การศึกษาเพื่อให้เข้าใจอย่างลึกซึ้งในด้านชีววิทยาของเซลล์มะเร็งโดยเฉพาะกลไกที่เซลล์ใช้ในการกระบวนการแพร่กระจายอาจเป็นหนทางหนึ่งที่สำคัญในการพัฒนาวิธีการรักษาใหม่ๆ หรือเป็นเป้าหมายใหม่ที่ใช้ในการออกแบบพัฒนายามาใช้ในการรักษา อีกทั้งความรู้ทางด้านนี้ยังเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งของนักวิจัยทั่วโลกที่สนใจศึกษาโรคมะเร็ง

ในกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งนั้น พบว่าการติดต่ออะนอยด์คิส (Anoikis) เป็นสิ่งสำคัญที่จะเอื้อให้เซลล์มีชีวิตรอดและแพร่กระจายไปได้ เนื่องจากอะนอยด์คิสเป็นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส (Apoptosis) ที่จะกระตุ้นเมื่อเซลล์หลุดลอกออก (Detachment) ซึ่งเป็นกระบวนการแรกๆก่อนที่เซลล์มะเร็งจะเข้าสู่กระแสเลือดหรือระบบน้ำเหลืองเพื่อกระจายไปสู่ส่วนต่างๆของร่างกาย (2) นักวิจัยทั่วโลกได้ให้ความสำคัญอย่างมากต่อกระบวนการอะนอยด์คิสว่าอาจเป็นหนทางสำคัญที่ใช้ยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (3)

ผลการศึกษาและรายงานผลงานวิจัยก่อนหน้าของผู้วิจัยและคณะทำให้ทราบว่าไนตริกออกไซด์มีบทบาทสำคัญต่อความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอดในแง่ต่างๆ โดยพบว่าการที่เซลล์มะเร็งปอดได้รับสารไนตริกออกไซด์ในระดับความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลาสั้นๆ (24 ชั่วโมง) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน Caveolin-1 ภายในเซลล์มะเร็งปอด โดยไนตริกออกไซด์ส่วนผลยับยั้งการทำลายของโปรตีน Caveolin-1 ผ่านทาง proteasomal degradation pathway ซึ่งงานวิจัยในส่วนนี้ผู้วิจัยได้ตีพิมพ์ผลงานวิจัยและเป็นส่วนหนึ่งของทุนพัฒนาศักยภาพการทำงานของอาจารย์รุ่นใหม่ในครั้งที่ 1 ไปแล้วนั้น ครั้งนี้ผู้วิจัยได้ต่อยอดงานวิจัยดังกล่าวโดยศึกษาผลของการที่เซลล์มะเร็งปอดได้รับสารไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลานาน (7-14 วัน) ในระดับต่างๆที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์

งานวิจัยของผู้วิจัยและคณะที่ผ่านมาประกอบกับผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้ ได้แสดงให้เห็นถึงกลไกที่สำคัญที่เซลล์มะเร็งปอดใช้ในการติดต่อการตายแบบอะนอยด์คิส ทั้งที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน Caveolin-1 (4-7) และ Mcl-1 (8) โดยผลการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า

โปรตีน caveolin-1 เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส โดยกลไกที่โปรตีน Caveolin-1 ควบคุมการตายของเซลล์แบบ anoikis นั้นพบว่าโปรตีนดังกล่าว ควบคุมผ่านการควบคุมระดับของโปรตีนอีกชนิดหนึ่งคือ Mcl-1 โดยพบว่าเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้น ให้อยู่ในภาวะแขวนลอยเซลล์มะเร็งปอดชนิด H460 จะเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยเริ่ม ตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 6 ชั่วโมง การที่เซลล์มีระดับโปรตีนเพิ่มขึ้นจากการ transfection ด้วย Caveolin-1 overexpression plasmid จะทำให้เซลล์ต่อต้านการตายแบบอะพอพโทซิส ในขณะที่เซลล์ที่มีระดับโปรตีน caveolin-1 ลดลงจากการ transfection ด้วย ShRNA Caveolin-1 plasmid จะเกิดการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นบทบาทของ caveolin-1 ที่ชัดเจนในการควบคุมการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส อันจะส่งเสริมให้เซลล์อยู่รอดในกระแส เลือดและน้ำเหลืองและเกิดก้อนมะเร็งใหม่ในกระบวนการแพร่กระจายได้

นอกเหนือจากวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกเชิงลึกของเซลล์ที่ควบคุมความรุนแรงของ เซลล์มะเร็งแล้วนั้น ผู้วิจัยยังได้เน้นศึกษากลไกของสารไนตริกออกไซด์อันเป็นสารที่สร้างขึ้น โดยเซลล์ต่างๆหลายชนิดรวมทั้งเซลล์มะเร็งเองก็สามารถสร้างไนตริกออกไซด์ได้ในระดับสูงอีก ทั้งระดับไนตริกออกไซด์ที่สูงขึ้นยังสามารถพบได้มากในบริเวณก้อนมะเร็งของเซลล์มะเร็งปอด (9-10) โดยผลจากงานวิจัยทำให้ทราบว่า การที่เซลล์มะเร็งได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลา ต่อเนื่อง นาน 7-14 วันจะส่งผลให้เกิดการเพิ่มระดับกลไกการอยู่รอดของเซลล์ขึ้น (cell survival mechanisms) เช่นการเพิ่มระดับโปรตีน phosphorylated Akt Bcl-2 และ caveolin-1 ซึ่งโปรตีน ต่างนั้นต่างมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการต่อต้านยาต้านมะเร็ง cisplatin doxorubicin และ etoposide อีกด้วย งานวิจัยนี้อาจมีความสำคัญต่อความเข้าใจในกระบวนการพัฒนาไปของโรค และการต่อต้านยาเคมีบำบัดเนื่องจากแสดงให้เห็นบทบาทที่สำคัญของสารที่เซลล์ผลิตขึ้นต่อการ เกิดการต่อต้านยาต้านมะเร็ง นอกเหนือจากนั้น ผลงานวิจัยที่ต่อเนื่องในโครงการดังกล่าว ยัง แสดงให้เห็นว่าการที่เซลล์มะเร็งได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลานานนั้น จะส่งผลต่อ เซลล์ให้เกิดการ migration และ invasion มากขึ้นด้วย และการที่การเคลื่อนที่และการรุกราน เนื้อเยื่อข้างเคียงของเซลล์มะเร็งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเร่งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง งานวิจัยต่อเนื่องในโครงการวิจัยยังทำให้ทราบว่าโปรตีน Caveolin-1 มีบทบาทสำคัญต่อการต่อต้านการตายของเซลล์แบบ apoptosis เมื่อเซลล์มะเร็งได้รับ oxidative stress โดยพบว่าเมื่อ เซลล์มะเร็งมีระดับของโปรตีน Caveolin-1 สูงขึ้นจากการ transfection ด้วย Caveolin-1 overexpressing plasmid นั้นจะต่อต้านการตายที่เหนี่ยวนำโดยสาร Hydrogen peroxide และ เมื่อลดระดับโปรตีนดังกล่าวโดยการทำให้ ShRNA Caveolin-1 transfection จะพบว่าเซลล์ที่มี ระดับโปรตีน caveolin-1 ต่ำจะมีความไวต่อการตายที่กระตุ้นโดยภาวะ oxidative stress มาก ขึ้น (11) ผลการทดลองในส่วนนี้อาจสามารถนำไปอธิบายการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งในภาวะ แวดล้อมที่มี reactive oxygen species สูงที่มักพบใน cancer microenvironment ได้

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ขยายงานวิจัยออกไปโดยเน้นดูปัจจัยอื่นๆที่อาจเพิ่มปริมาณ โปรตีน Caveolin-1 ในเซลล์มะเร็งปอดได้และพบว่า การที่เซลล์มะเร็งปอดได้รับยาต้านมะเร็ง Cisplatin ในระดับที่ต่ำและไม่สามารถฆ่าเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในกรณีที่ปริมาณ

ยาไม่เพียงพอต่อการฆ่าเซลล์มะเร็งนั้น หรือเซลล์อาจมีการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง cisplatin ที่เซลล์ได้รับจะกระตุ้นให้เซลล์สร้างสาร reactive oxygen species ต่างๆ และส่งผลให้ระดับโปรตีน caveolin-1 ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และการเพิ่มขึ้นของโปรตีนนี้เองจะทำให้เกิดการดื้อต่อการตายแบบ anoikis ในเซลล์ที่ได้รับยาได้ (12)

โดยสรุปโครงการวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงผลของการที่เซลล์มะเร็งปอดได้รับไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลานาน (7-14 วัน) เซลล์มะเร็งนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ pathway ต่างๆภายในเซลล์โดยเพิ่มระดับโปรตีนที่ทำหน้าที่ส่งเสริมการอยู่รอดของเซลล์ และทำให้เซลล์มะเร็งดื้อต่อยาต้านมะเร็งได้ นอกจากนี้การได้รับสารไนตริกออกไซด์เป็นระยะเวลานาน ยังส่งผลให้เซลล์เกิดการเคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้น และส่งเสริมการแพร่กระจายของเซลล์ไปยังส่วนอื่นของร่างกาย นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้แสดงให้เห็นถึงกลไกระดับโปรตีนและโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกันของโปรตีน Caveolin-1 และ Mcl-1 ที่จะส่งผลให้เซลล์ดื้อต่อการตายแบบอะพอพโทซิสและข้อมูลแวดล้อมอื่นๆที่ประกอบเข้าเพื่ออธิบายลักษณะทางชีววิทยาของเซลล์มะเร็งและกลไกการควบคุมพฤติกรรมความรุนแรงของเซลล์มะเร็ง ทั้งที่เกี่ยวข้องกับการดื้อต่อยาต้านมะเร็ง ดื้อต่อการตายที่เหนี่ยวนำด้วย oxidative stress และดื้อต่อการตายแบบอะพอพโทซิส โดยข้อมูลทั้งหมดนั้นเป็นข้อมูลที่ไม่ได้รายงานที่ได้มาก่อนและเป็นประโยชน์ต่อความเข้าใจในเชิงชีววิทยาของเซลล์มะเร็งอันจะนำไปสู่เป้าหมายและการพัฒนากรรมวิธีรักษามะเร็งปอดได้ในอนาคต

References

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures, 2012.
2. Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem Pharmacol* 76: 1352–1364, 2008.
3. Chanvorachote P, Chunhacha P, Pongrakhananon V. Editorial: Anoikis: a potential target to prevent lung cancer metastasis? *Lung Cancer Management*. In press.
4. Halim H, Luanpitpong S, Chanvorachote P. Acquisition of anoikis resistance up-regulates caveolin-1 expression in human non-small cell lung cancer cells. *Anticancer research* 2012; 32(5):1649-58.
5. Chunhacha P, Chanvorachote P. Roles of caveolin-1 on anoikis resistance in non small cell lung cancer. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 2012; 4(3):149-55.
6. Pimuma Rungtabnapa, Ubonthip Nimmannit, Hasseri Halim, Yon Rojanasakul, Pithi Chanvorachote. Hydrogen peroxide inhibits non-small cell lung cancer cell anoikis through the inhibition of caveolin-1 degradation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2011; 300(2):C235-45.

7. Chanvorachote P, Nimmannit U, Lu Y, Talbott S, Jiang BH, Rojanasakul Y. Nitric oxide regulates lung carcinoma cell anoikis through inhibition of ubiquitin-proteasomal degradation of caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(41):28476-84.
8. Chunhacha P, Pongrakhananon V, Rojanasakul Y, Chanvorachote P. Caveolin-1 regulates Mcl-1 stability and anoikis in lung carcinoma cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2012; 302(9):C1284-92.
9. Fujimoto H, Ando Y, Yamashita T, Terazaki H, Tanaka Y, Sasaki J, Matsumoto M, Suga M, and Ando M. *Japanese Journal of Cancer Research*.1997; 1190–1198
10. Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT, and Thompson TC. *Clinical Cancer Research*. 1998; 4, 1873–1880
11. Suchaoin W and Chanvorachote P. Caveolin-1 Attenuates Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage to Lung Carcinoma Cells. *Anticancer Research*. 2012; 32 (2): 483-490.
12. Songserm T, Pongrakhananon V, and Chanvorachote P. Sub-toxic Cisplatin Mediates Anoikis Resistance through Hydrogen peroxide-induced Caveolin-1 Up-regulation in Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Anticancer Research*. (2012) 32 (5): 1659-1669.

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยในอนาคตอาจมุ่งเน้นในส่วยที่เกี่ยวข้องกับ epithelial-mesenchymal transition (EMT) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่สำคัญอันจะส่งผลให้เซลล์อยู่ในภาวะที่เกิดการแพร่กระจายได้ง่ายขึ้น และอาจจะขยายงานวิจัยไปสู่สาร reactive oxygen species ชนิดต่างๆ นอกเหนือจากไนตริกออกไซด์ ที่จะส่งผลในการควบคุมการแพร่กระจายและความรุนแรงของเซลล์มะเร็งปอด เนื่องจากสารเหล่านั้นก็ได้รับรายงานว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมพฤติกรรมของเซลล์มะเร็งเช่นกัน

Keywords :

Lung cancer, Caveolin-1, nitric oxide, metastasis, anoikis, chemotherapeutic resistance มะเร็งปอด คาร์วีโอลิน-1 ไนตริกออกไซด์ การแพร่กระจาย อะนอยด์คิส การดื้อต่อยาต้านมะเร็ง

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ผลงานตีพิมพ์ที่ได้รับการสนับสนุนจากโครงการในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่มี ISI Impact factor รวมทั้งสิ้น 9 เรื่อง ดังนี้

1. **Pithi Chanvorachote** and Varisa Pongrakhananon*. Ouabain down-regulates Mcl-1 and sensitizes TRAIL-induced apoptosis in lung cancer cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology. (2013) 304(3): 263-272.
ISI Impact factor : 3.536
2. **Pithi Chanvorachote** and Preedakorn Chunhacha*. Caveolin-1 regulates endothelial adhesion of lung cancer cells via reactive oxygen species-dependent mechanism. Plos One. (2013) 8(2) : e57466.
ISI Impact factor: 4.092
3. Thitiporn Songserm, Varisa Pongrakhananon, and **Pithi Chanvorachote***. Sub-toxic Cisplatin Mediates Anoikis Resistance through Hydrogen peroxide-induced Caveolin-1 Up-regulation in Non-small Cell Lung Cancer Cells. Anticancer Research. (2012) 32 (5): 1659-1669.
ISI Impact factor 1.74
4. Wongsakorn Suchaooin, and **Pithi Chanvorachote***. Caveolin-1 Attenuates Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage to Lung Carcinoma Cells. Anticancer Research .(2012) 32 (2): 483-490.
ISI Impact factor 1.74
5. Preedakorn Chunhacha, Varisa Pongrakhananon, Yon Rojanasakul and **Pithi Chanvorachote***. Caveolin-1 regulates Mcl-1 stability and anoikis in lung carcinoma cells.(2012) 302: C1284–C1292.
ISI Impact factor 3.5
6. Hasseri Halim, Sudjit Luanpitpong, **Pithi Chanvorachote***. Acquisition of anoikis Resistance up-regulates caveolin-1 expression in human non-small cell lung cancer Cells. Anticancer research. (2012) (2012) 32 : 1649- 1658.
ISI Impact factor : 1.74

7. Hasseri Halim and **Pithi Chanvorachote***. Long-term hydrogen peroxide exposure potentiates anoikis resistance and anchorage-independent growth in lung carcinoma cells. Cell Biology International. 2012; 36: 1055–1066.
ISI Impact factor : 1.482
8. Kanuengnit Choochuay, Preedakorn Chunhacha, Varisa Pongrakhananon, Rataya Luechapudiporn, and **Pithi Chanvorachote***. Imperatorin sensitizes anoikis and inhibits anchorage-independent growth of lung cancer cells. Journal of Natural Medicines. (2012) In press.
ISI Impact factor : 1.389
9. Ekkarat Wongpankam, Preedakorn Chunhacha, Varisa Pongrakhananon, Boonchoo Sritulalak, and **Pithi Chanvorachote***. Artonin E Mediates MCL1 Down-regulation and Sensitizes Lung Cancer Cells to Anoikis. Anticancer Research. (2012) 32(12):5343-51. In press.
ISI Impact factor : 1.74

และผลงานวิจัยที่รอการพิจารณาตอบรับตีพิมพ์ จำนวน 2 เรื่อง

1. Piyaparisorn Wongvaranon, Varisa Pongrakhananon, Preedakorn Chunhacha, and Pithi Chanvorachote. Acquired Chemotherapeutic Resistance in lung cancer cells Mediated by Prolonged Nitric Oxide Exposure. (Submitted)
2. Thaniwan Cheun-Arom, Chanvorachote Pithi, Sirimangkalakitti Natchanun, Chuanasa Taksina, Saito Naoki, Suwanborirux Khanit. Journal of Natural Products. (Revision)

1. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
ผลงานวิจัยโดยรวมในเรื่องกลไกการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งปอด ได้รับการร้องขอให้เขียนบทความวิชาการ (Editorials) ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ Lung cancer management
- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
ใช้ในกระบวนการพัฒนานักวิจัยใหม่จำนวน 8 คน โดยแบ่งเป็นระดับปริญญาเอก 3 คนและ ปริญญาโท 5 คน ดังนี้
 1. Piyaparisorn Wongvaranon (ปริญญาโท)
 2. Ekkarat Wongpankam (ปริญญาโท)

- | | | |
|----|----------------------|-------------|
| 3. | Preedakorn Chunhacha | (ปริญญาเอก) |
| 4. | Thaniwan Cheun-Arom | (ปริญญาเอก) |
| 5. | Kanuengnit Choochuay | (ปริญญาโท) |
| 6. | Hasseri Halim | (ปริญญาเอก) |
| 7. | Wongsakorn Suchaoin | (ปริญญาโท) |
| 8. | Thitiporn Songserm | (ปริญญาโท) |

2. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

ระดับชาติ

1. เสนอผลงานในที่ประชุม นักวิจัยรุ่นใหม่..พบ..เมธีวิจัยอาวุโส สกว.ครั้งที่ 12
โรงแรมเดอะ รีเจนท์ชะอำปีช รีสอร์ทหัวหิน ชะอำ
การเสนอผลงานแบบบรรยาย หัวข้อเรื่อง Roles of Caveolin-1 on anoikis
resistance in Non Small Cell Lung Cancer.

ระดับนานาชาติ

2. เสนอผลงานวิจัย Invited speaker, the 4th International Conference on
Nutrition and Physical Activity (NAPA) in Aging, Obesity and Cancer. August
14 – 17, 2013 at Centara Grand Mirage Beach Resort, Pattaya, Thailand.
หัวข้อเรื่อง Anoikis: a potential target to prevent lung cancer metastasis?
3. เสนอผลงานวิจัย Invited speaker, 2nd International Postgraduate
Conference on Pharmaceutical Sciences (IPoPS) 2013. 4 - 5 September
2013 at UiTM Puncak Alam Campus, University of Technology MALA,
Malaysia.
หัวข้อเรื่อง Anoikis: a potential target to prevent lung cancer metastasis?

ภาคผนวก

Ouabain downregulates Mcl-1 and sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis

Pithi Chanvorachote and Varisa Pongrakhananon

Am J Physiol Cell Physiol 304:C263-C272, 2013. First published 21 November 2012;
doi: 10.1152/ajpcell.00225.2012

You might find this additional info useful...

This article cites 41 articles, 18 of which you can access for free at:
<http://ajpcell.physiology.org/content/304/3/C263.full#ref-list-1>

Updated information and services including high resolution figures, can be found at:
<http://ajpcell.physiology.org/content/304/3/C263.full>

Additional material and information about *American Journal of Physiology - Cell Physiology* can be found at:
<http://www.the-aps.org/publications/ajpcell>

This information is current as of March 25, 2013.

American Journal of Physiology - Cell Physiology is dedicated to innovative approaches to the study of cell and molecular physiology. It is published 24 times a year (twice monthly) by the American Physiological Society, 9650 Rockville Pike, Bethesda MD 20814-3991. Copyright © 2013 the American Physiological Society. ISSN: 1522-1563. Visit our website at <http://www.the-aps.org/>.

Ouabain downregulates Mcl-1 and sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis

Pithi Chanvorachote^{1,2} and Varisa Pongrakhananon^{1,2}

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand; and ²Cell-Based Drug and Health Product Development Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Submitted 5 July 2012; accepted in final form 19 November 2012

Chanvorachote P, Pongrakhananon V. Ouabain downregulates Mcl-1 and sensitizes lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C263–C272, 2013. First published November 21, 2012; doi:10.1152/ajpcell.00225.2012.—Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a prerequisite for cancer progression, and TRAIL resistance is prevalent in lung cancer. Ouabain, a recently identified human hormone, has shown therapeutic promise by potentiating the apoptotic response of metastatic lung cancer cells to TRAIL. Nontoxic concentrations of ouabain are shown to increase caspase-3 activation, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage, and apoptosis of H292 cells in response to TRAIL. While ouabain had a minimal effect on c-FLIP, Bcl-2, and Bax levels, we show that it possesses an ability to downregulate the antiapoptotic Mcl-1 protein. The present study also reveals that the sensitizing effect of ouabain is associated with its ability to generate reactive oxygen species (ROS), and hydrogen peroxide is identified as the principle ROS triggering proteasomal Mcl-1 degradation. In summary, our results indicate a novel function for ouabain in TRAIL-mediated cancer cell death through Mcl-1 downregulation, thereby providing new insight into a potential lung cancer treatment as well as a better understanding of the physiological activity of ouabain.

ouabain; lung cancer; TRAIL; Mcl-1

THE APOPTOSIS OF CANCER CELLS in response to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), also known as TNF10 and Apo-2 ligand, plays a key role in the inhibition of tumor initiation and disease progression (24). While preserving normal cells, TRAIL selectively induces apoptosis in tumor cells, thereby eliminating only the unwanted and harmful cells and thus gaining increasing interest in the cancer research field (1, 3, 12). This ligand is shown to bind with TRAIL-R1[or death receptor 4 (DR4)] and TRAIL-R2 (or DR5), and such binding turns on the apoptotic machinery of the cell through the activation of procaspases-8 and -10 (1, 8). Previous studies have noted that increases in TRAIL-R1 and TRAIL-R2 on the membranes of cancer cells are strongly associated with the rate of apoptosis, whereas the lack of such receptors facilitates malignancy (38).

However, a substantial number of cancer cells exhibit a low response to TRAIL, resulting in the progression of disease (18, 38). In addition, researchers have demonstrated that the repeated exposure of TRAIL-sensitive cancer cells to TRAIL can result in acquired resistance (36). In certain cancers, a very low level of TRAIL-R1 and TRAIL-R2 has been observed and is believed to be a cause of low cell susceptibility to TRAIL (39). Additionally, high levels of cellular antiapoptotic proteins have

been blamed for TRAIL resistance in several cancer models. An increase of c-FLIP protein was shown to suppress TRAIL-induced gallbladder cancer cell death (41) and a decrease in c-FLIP enhanced TRAIL-mediated apoptosis in breast cancer cells (7). Likewise, Bcl-2 family proteins, namely Bcl-2 and Mcl-1, exert their inhibitory functions on TRAIL-induced apoptosis (38, 40). Recently, Mcl-1 has gained increasing attention as many researchers have reported that decreasing Mcl-1 could sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis (13, 14). Moreover, there is evidence indicating that only Mcl-1 siRNA can sensitize cholangiocarcinoma cell lines to TRAIL, while downregulation of Bcl-2 and Bcl-XL has only a minimal effect (30).

Ouabain is a cardiac steroid that functions as a specific inhibitor of the Na⁺-K⁺-ATPase and is used in clinical practice for the treatment of several heart-related maladies, such as atrial fibrillation and heart failure (17, 32). As ouabain has been found in human plasma (6, 9, 19–20, 25–28) and identified as a human hormone (21, 26), information regarding other activities of this compound is of great interest and will benefit both physiological and pathological knowledge. Although some studies have reported the apoptotic induction property of ouabain in cancer cells (4, 11, 23, 35), the molecular basis of this induction and the precise role of this compound in TRAIL-mediated cancer cell death are not known. Therefore, in the present study, we demonstrate that administration of ouabain significantly accentuates TRAIL-induced apoptosis in lung cancer cells. The proposed mechanism of sensitization involves the ability of the compound to induce reactive oxygen species (ROS) generation and Mcl-1 downregulation. Our findings reveal the existence of a novel mechanism of action for ouabain in the regulation of Mcl-1 degradation and TRAIL sensitization, which could be important in the understanding of physiological and pathological mechanisms and in the development of cancer therapy.

MATERIALS AND METHODS

Cells and reagents. NCI-H292 and H460 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, and 100 U/ml penicillin/streptomycin in a 5% CO₂ environment at 37°C. Cell permeable glutathione monoethyl ester (GSH), catalase, Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid)porphyrin chloride (MnTBAP), MG123, concanamycin A, ouabain, dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), and 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Antibodies for Mcl-1, Bcl-2, Bax, c-FLIP, caspase-3, and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) as well as peroxidase-conjugated secondary antibodies were

Address for reprint requests and other correspondence: V. Pongrakhananon, Dept. of Pharmacology and Physiology, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Pathumwan, Bangkok, Thailand 10330 (e-mail: iamrisa@gmail.com).

obtained from Cell Signaling (Danvers, MA). The β -actin antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The transfecting agent Lipofectamine 2000 was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA).

Plasmid and transfection. The Mcl-1 expression plasmid (pcDNA3.1-hMcl-1) was obtained from Addgene (Cambridge, MA). The Mcl-1 knockdown plasmid (shMcl-1) and control plasmid were obtained from Santa Cruz Biotechnology. Stable transfection of Mcl-1 was established by culturing cells in a six-well plate until they reached 60–70% confluence. Fifteen microliters of Lipofectamine 2000 reagent and 2 μ g of Mcl-1, shMcl-1, or control plasmid were used to transfect the cells in the absence of serum. After 12 h, the medium was replaced with culture medium containing 10% fetal bovine serum. Approximately 2 days after the beginning of transfection, the cells were digested with 0.025% trypsin, plated onto 75-cm² culture flasks, and cultured for 30 days with antibiotic selection. The stable transfectants were pooled, and the expression of Mcl-1 protein in the transfectants was confirmed by Western blotting. The cells were cultured in G418-free RPMI 1640 medium for at least two passages before use in each experiment.

Cell viability and apoptosis assays. Cell viability was evaluated using the MTT assay. After the indicated treatments, cells were incubated with 500 μ g/ml of MTT at 37°C for 4 h. An intensity reading of the MTT product was measured at 550 nm using a microplate reader, and the percentage of viable cells was calculated relative to control cells. Apoptosis was determined by Hoechst 33342/PI staining and DNA content analysis. Cells were washed and incubated with 10 μ g/ml Hoechst 33342 and 5 μ g/ml PI for 30 min. Nuclei condensation and DNA fragmentation of apoptotic cells and PI-positive necrotic cells were visualized and scored by fluorescence microscopy (Olympus IX51 with DP70). In the case of sub-G₀ DNA content analysis, after the specified treatment, cells were trypsinized, washed with PBS, and fixed in 70% ethanol at 37°C for 3 h. After being washed with PBS, cells were incubated in PI solution containing 0.1% Triton-X, 1 μ g/ml RNase, and 1 mg/ml PI at room temperature for 30 min. DNA content was analyzed using flow cytometry (FACSsort; Becton Dickinson, Rutherford, NJ).

ROS detection. Intracellular ROS were determined using DCFH₂-DA as a specific ROS probe. After specific treatments, cells were incubated with 10 μ M of DCFH₂-DA for 30 min at 37°C, after which they were washed, trypsinized, resuspended in PBS, and immediately analyzed for fluorescence intensity using a microplate reader.

Western blotting. Cells were incubated in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM sodium chloride, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) for 40 min on ice. The cell lysates were collected, and the protein content was determined using the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Equal amounts of protein from each sample (60 μ g) were denatured by heating at 95°C for 5 min with Laemmli loading buffer and subsequently loaded onto a 10% SDS-PAGE. After separation, proteins were transferred onto 0.45 μ M nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The transferred membranes were blocked for 1 h in 5% nonfat dry milk in TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) and incubated with the appropriate primary antibodies at 4°C overnight. Membranes were washed twice with TBS-T for 10 min and incubated with horseradish peroxidase-coupled isotype-specific secondary antibodies for 1 h at room temperature. The immune complexes were detected by enhancement with a chemiluminescent substrate (Supersignal West Pico; Pierce, Rockford, IL) and quantified using analyst/PC densitometry software (Bio-Rad).

Immunoprecipitation. Cells were washed after treatments and lysed in lysis buffer at 4°C for 20 min. After centrifugation at 14,000 g for 15 min at 4°C, the supernatants were collected and assayed for protein content. Cleared lysates were normalized, and 60 μ g of each protein were incubated with an anti-Mcl-1 antibody conjugated to protein G

plus-agarose beads (Santa Cruz) for 4 h at 4°C. The precipitated immune complexes were washed five times with ice-cold lysis buffer, resuspended in 2 $\times$ Laemmli sample buffer, and boiled at 95°C for 5 min. Immune complexes were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using an anti-ubiquitin antibody.

Statistical analysis. Mean densitometry data from independent experiments were normalized to results of the control cells. The data are presented as the means $\pm$ SD from three or more independent experiments. Statistical differences between the means were determined using an ANOVA and post hoc test at a significance level of $P < 0.05$.

RESULTS

TRAIL-mediated apoptosis in H292 lung cancer cells. TRAIL-induced cell death is accepted as an important inhibitory mechanism against cancer progression in most cancers. To explore the sensitizing effect of ouabain, prerequisite information about TRAIL-mediated death characteristics is crucial. Human lung carcinoma H292 cells were treated with various doses of TRAIL (0–80 ng/ml) for 14 h, and apoptosis and cell viability were analyzed using Hoechst 33342 staining, sub-G₀ DNA content analysis, and MTT assays. Figure 1A shows that TRAIL treatment caused a concentration-dependent increase in apoptosis that was detected in ~25 and 50% of cells in response to 20 and 80 ng/ml of TRAIL, respectively. DNA content analysis showed an increase in the population of cells in the sub-G₀ phase in response to TRAIL treatment (20–40 ng/ml), whereas the sub-G₀ phase was not altered in the 10 ng/ml TRAIL-treated cells compared with control nontreated cells (Fig. 1B). Analysis of cell viability further showed that TRAIL caused a decrease in cell survival in a dose-dependent fashion (Fig. 1C). This result suggests that the mode of cell death in TRAIL-treated cells was mainly apoptosis.

Western blot analyses of cells in response to TRAIL strongly supported apoptotic pathway induction in such cells. An increase in activated caspase-3 and the cleavage of PARP in response to TRAIL at concentrations of 20 and 40 ng/ml was consistent with the increase in apoptotic cells presented in Fig. 1, A and B (Fig. 1D).

Oubain sensitizes cells to TRAIL-mediated apoptosis. Ouabain-mediated cancer cell death has been reported in some cancers (4, 11, 23, 35), and we have found that ouabain at concentrations of 5–10 nM causes a significant increase in apoptosis compared with nontreated control cells (Fig. 2A). Our analysis of sub-G₀ DNA content supported that apoptosis was the primary mode of cell death (Fig. 2B), and the accompanying viability assay indicated that at concentrations >5 nM ouabain induces cytotoxic effects in H292 cells (Fig. 2C). Figure 2D further confirms that the reduction of cell viability as well as the presence of apoptosis in ouabain-treated cells is elicited through a caspase-3-dependent mechanism that could be detected at concentrations >5 nM. Interestingly, ouabain at concentrations of 0–0.5 nM, which are comparable to the level of ouabain in human plasma (9, 20, 29), had only a minimal effect on cell viability.

The effects of nontoxic and physiological concentrations of ouabain on TRAIL-induced apoptosis were further evaluated. H292 cells were incubated with various concentrations of TRAIL (0–40 ng/ml) in the presence or absence of 0.5 nM ouabain. Cell viability and apoptosis were evaluated as described after 14 h. Figure 2E shows that the administration of

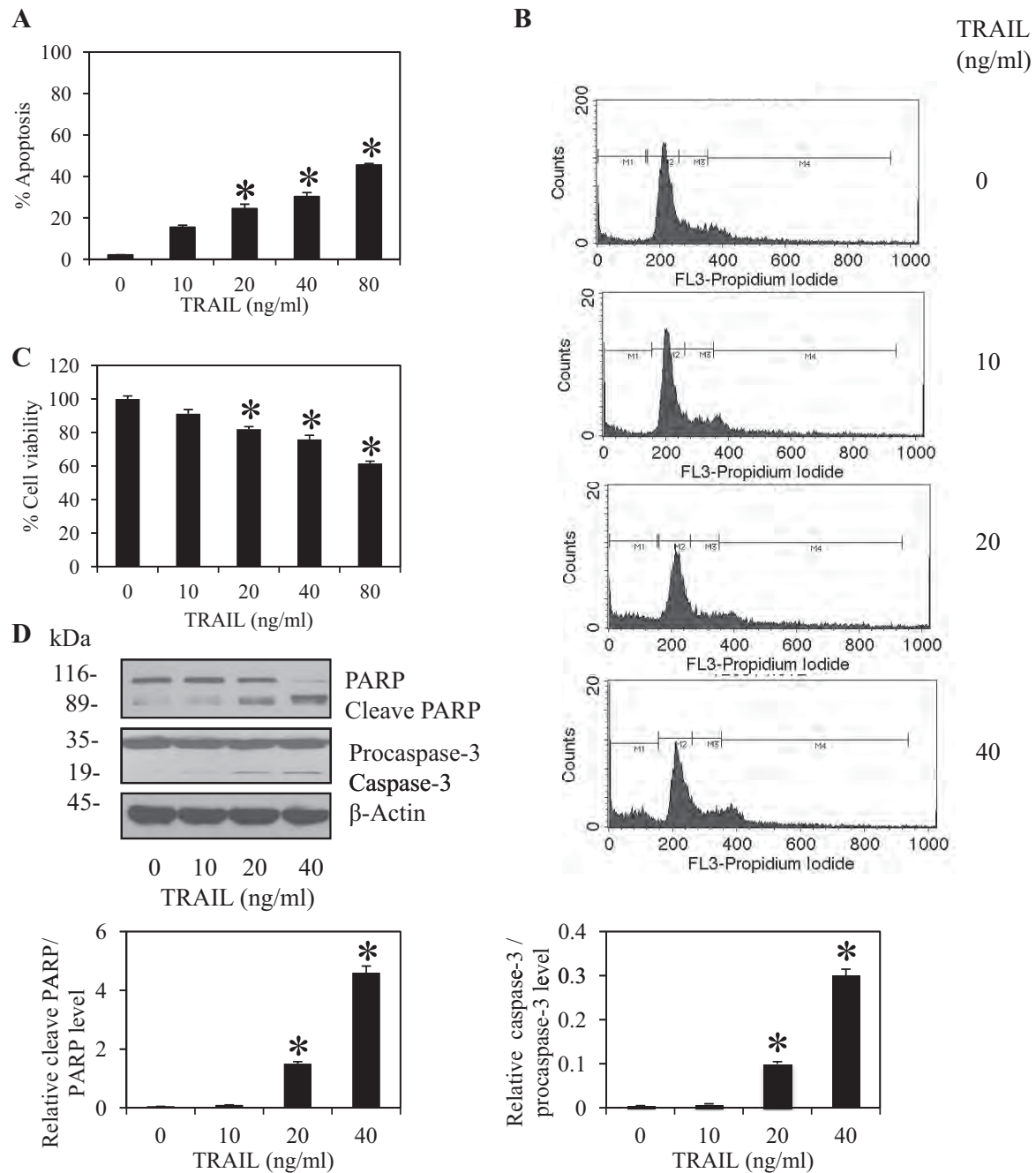


Fig. 1. Apoptosis-inducing effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in H292 human lung cancer cells. H292 cells were treated with TRAIL (0–80 ng/ml) for 14 h. **A**: apoptotic cell death was evaluated using Hoechst 33342/propidium iodide (H33342/PI) staining. **B**: cellular apoptosis was determined by DNA content analysis using flow cytometry. **C**: cell survival was determined by 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Viability of nontreated cells was considered as 100%. **D**: after the indicated treatment, cells were collected and analyzed for caspase-3 and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) expression levels by Western blotting. Blots were reprobed with a β -actin antibody to confirm equal loading of samples. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Data represent the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells.

ouabain significantly enhanced the apoptotic response of H292 cells to TRAIL. Sub- G_0 DNA content analysis also supported the apoptosis sensitization effect of ouabain in TRAIL-treated cells (data not shown). Furthermore, viability assays revealed the same trend as mentioned above, with the addition of ouabain sensitizing the cells to TRAIL-induced toxicity in which $\sim 40\%$ of cells remained viable in the presence of 0.5

nM ouabain compared with 80–90% viability in the groups receiving TRAIL treatment alone (Fig. 2F). Concurrently, Western blot analyses also exhibited that caspase-3 and PARP were remarkably activated in response to TRAIL in the presence of ouabain compared with only TRAIL treatment (Fig. 2G). These results support the potential role of ouabain in the enhancement of apoptosis.

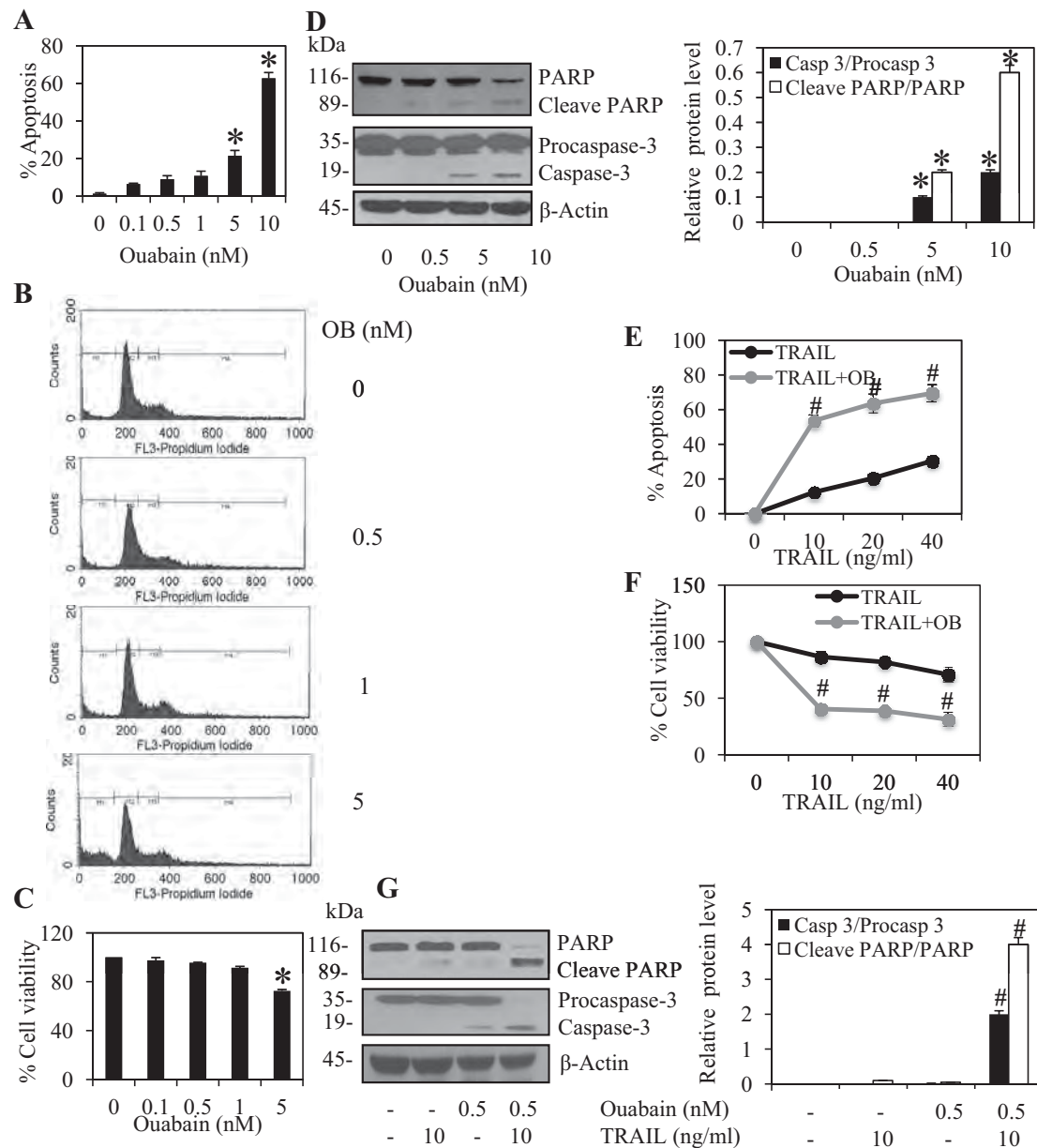


Fig. 2. Ouabain sensitizes H292 human lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **A:** apoptosis-inducing effects of ouabain in H292 cells was determined by treating the cells with 0–10 nM of ouabain (OB) for 14 h. Apoptotic and necrotic cell death were evaluated using H33342/PI staining. Data represent the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. **B:** cellular apoptosis and necrotic cell death were determined by DNA content analysis using flow cytometry. **C:** cell survival was determined by MTT assay. Viability of nontreated cells was considered as 100%. Data represent the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. **D:** after the indicated treatment, cells were collected and analyzed for caspase-3 (Casp-3) and PARP expression levels by Western blotting. Blots were reprobated with a β -actin antibody to confirm equal loading of samples. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. **E:** cells were pretreated with 0.5 nM of ouabain before incubation with 0–40 ng/ml of TRAIL for 14 h. Apoptotic cells were determined by H33342/PI staining. Data represent means $\pm$ SD ($n = 4$). # $P < 0.05$ vs. TRAIL-treated cells. **F:** cell viability was evaluated by MTT assay. Viability of nontreated cells was considered as 100%. Data represent the mean $\pm$ SD ($n = 4$). # $P < 0.05$ vs. TRAIL-treated cells. **G:** caspase-3 and PARP expression levels were analyzed by Western blotting as described in MATERIALS AND METHODS. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and the mean data from independent experiments were normalized to the results. Data represent the means $\pm$ SD ($n = 4$). # $P < 0.05$ vs. TRAIL-treated cells.

Mcl-1 downregulation is crucial for the sensitizing effect of ouabain. Recent evidence has indicated that Mcl-1 plays an important role in attenuating TRAIL-mediated cancer cell death (10, 14, 30). To provide supporting evidence for the role of Mcl-1 in the TRAIL-mediated death of H292 cells, we evaluated the expression profile of Mcl-1 after cellular expo-

sure to TRAIL. Cells were incubated with 0–40 ng/ml of TRAIL and analyzed for Mcl-1 expression by Western blotting. Figure 3A shows that such treatment caused a gradual decrease in Mcl-1 protein expression in a dose-dependent manner. However, the noncytotoxic concentration of TRAIL (10 ng/ml) caused no change in Mcl-1 protein level in these

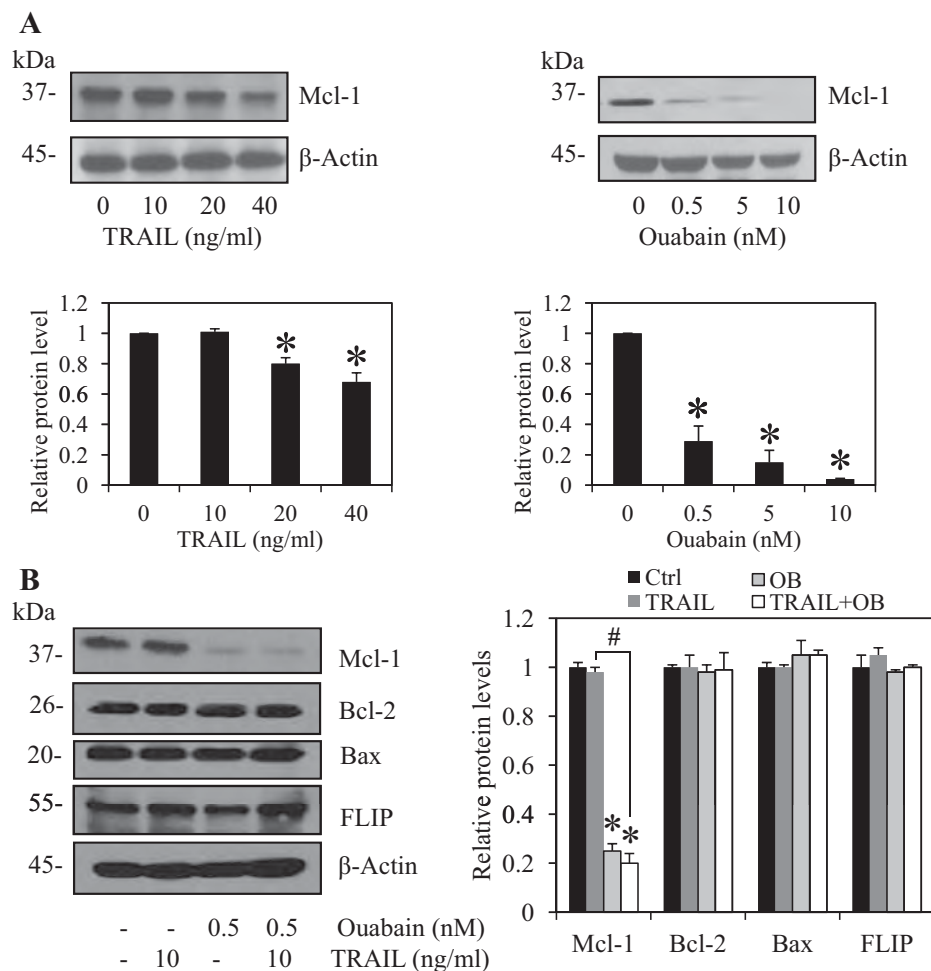


Fig. 3. Ouabain sensitizes cells to TRAIL-induced apoptosis through Mcl-1 downregulation. **A:** H292 cells were treated with either TRAIL (0–40 ng/ml) or ouabain (0–10 nM) for 14 h. Cells were collected and analyzed for Mcl-1 expression by Western blotting. Blots were re-probed with β-actin to confirm equal loading. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. **B:** cells were treated with 10 ng/ml of TRAIL in the presence or absence of 0.5 nM ouabain for 14 h or left untreated as control cells. Cells were collected and analyzed for protein expression levels by Western blotting as described in MATERIALS AND METHODS. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 3$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. # $P < 0.05$ vs. TRAIL-treated cells.

cells. Mcl-1 modulation was also evaluated in response to ouabain treatment. These results indicated that ouabain treatment caused a significant decrease of Mcl-1 protein. It is noteworthy that even at the nontoxic concentration ouabain significantly suppressed Mcl-1 protein levels. The above findings suggest that Mcl-1 downregulation might be a possible mechanism in the ouabain-sensitized TRAIL response in these lung cancer cells.

To provide support to the data mentioned above, other proteins that have been identified as key players in the regulation of TRAIL-mediated death, either as inhibitors or promoters, were detected in the cells treated with ouabain and TRAIL. Figure 3B shows that the expression levels of the antiapoptotic Bcl-2 and c-FLIP proteins and the proapoptotic Bax protein were not altered in response to ouabain and TRAIL treatments, while the reduction of Mcl-1 was consistently detected. These data provide evidence that ouabain enhances the cellular response to TRAIL via a Mcl-1 downregulating pathway.

Ouabain enhances TRAIL-induced apoptosis through a hydrogen peroxide-dependent pathway. It has been demonstrated in several cell models that ouabain treatment results in ROS induction (11, 31). We analyzed cellular ROS in cells exposed to ouabain and TRAIL using a fluorescence microplate reader with DCFH₂-DA as a fluorescent probe. Figure 4A shows that ouabain, but not TRAIL, induced an increase in cellular ROS

in a dose-dependent manner. A significant increase of the cellular ROS level was observed as early as 1 h after treatment and peaked at 2 h (data not shown).

To identify the specific ROS responsible for the sensitizing activity of ouabain, cells were pretreated with various known ROS scavengers, including GSH, MnTBAP (superoxide anion scavenger), catalase (hydrogen peroxide scavenger), and deferoxamine (hydroxyl radical inhibitor), followed by treatment with TRAIL in the presence of ouabain. Intracellular ROS levels were determined using a fluorescence microplate reader with DCFH₂-DA as an oxidative probe. Results showed that treatment of the cells with GSH and catalase inhibited the cellular fluorescence intensity, whereas deferoxamine and MnTBAP had no inhibitory effect (Fig. 4B). These results suggest that hydrogen peroxide is the primary ROS generated under these conditions.

We next evaluated the role of ROS on ouabain's sensitizing activity; cells were pretreated with the mentioned ROS scavengers and treated with TRAIL and ouabain. Cell viability and apoptosis were determined after 14 h of treatment. Results indicated that in response to TRAIL and ouabain cell apoptosis significantly increased (Fig. 4C) in accordance with the decrease in cell viability (Fig. 4D). In the presence of the antioxidants GSH and catalase, the cytotoxic effect of TRAIL and ouabain was significantly suppressed, whereas MnTBAP

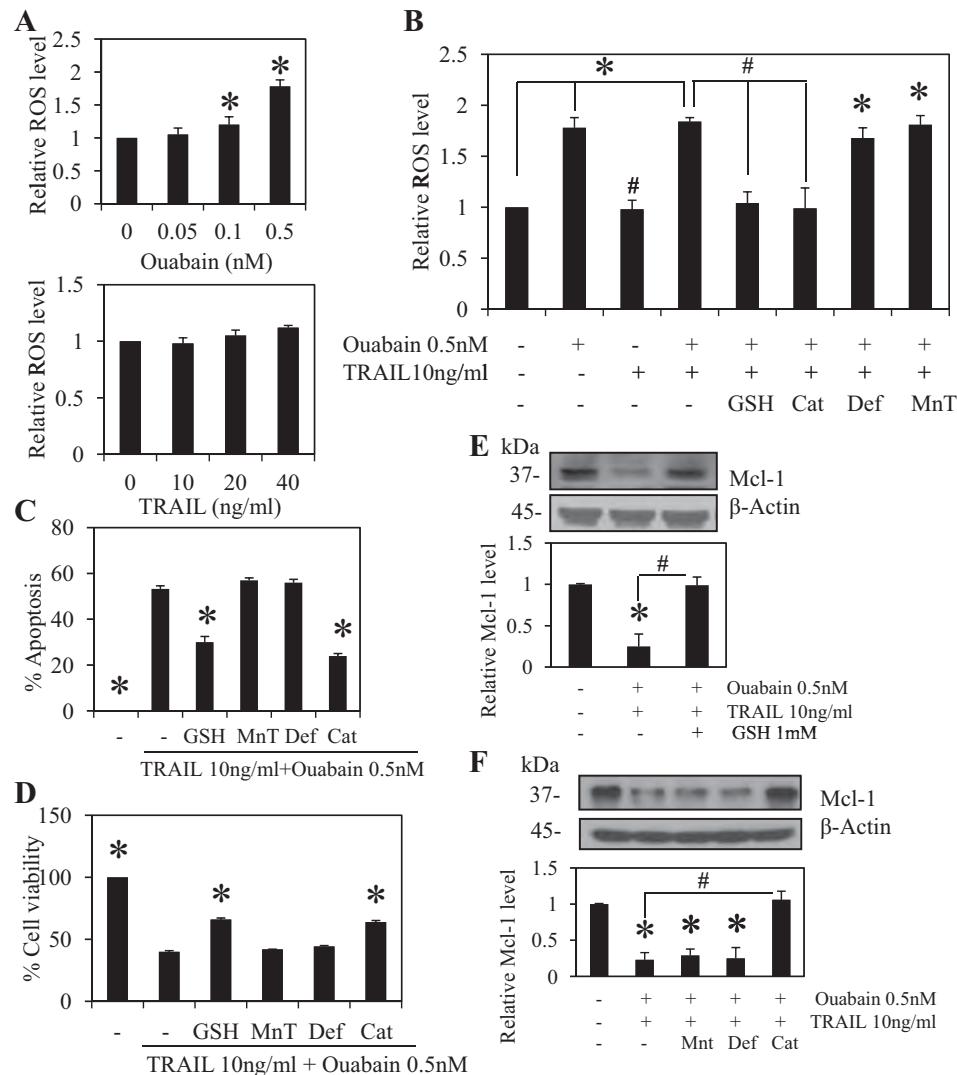


Fig. 4. Ouabain sensitizes cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species (ROS) generation. **A:** H292 cells were treated with either ouabain (0–0.5 nM) or TRAIL (0–40 ng/ml) for 2 h. Cells were incubated with dichlorofluorescein (DCFH₂-DA) for 30 min, and fluorescence intensity was analyzed by microplate reader. Mean intensity was normalized against nontreated control cells and represented as relative ROS level. Data points are the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. **B:** cells were pretreated with the specific ROS modulators 1 mM glutathione (GSH), 15,000 units catalase (Cat), 1 mM deferoxamine (Def), or 50 μ M MnTBAP (MnT) for 30 min before treatment with 10 ng/ml TRAIL in the presence or absence of 0.5 nM ouabain for 2 h. Cells were incubated with DCFH₂-DA for 30 min, and fluorescence intensity was analyzed using a microplate reader. Mean intensity was normalized with nontreated control cells and represented as relative ROS level. Data represent the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. # $P < 0.05$ vs. ouabain and TRAIL-cotreated cells. **C:** cells were pretreated with the specific ROS modulators 1 mM glutathione, 15,000 U catalase, 1 mM deferoxamine, or 50 μ M MnTBAP for 30 min before treatment with 10 ng/ml TRAIL and 0.5 nM ouabain for 14 h. Apoptosis was determined by H33342/PI staining. Data represent the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. ouabain and TRAIL-cotreated cells. **D:** cell viability was evaluated by MTT assay. Viability of nontreated cells was considered as 100%. Data represent means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. ouabain and TRAIL-cotreated cells. **E:** cells were pretreated with the ROS scavenger 1 mM glutathione for 30 min before treatment with 0.5 μ M ouabain and 10 ng/ml TRAIL for 14 h. Cells were collected and analyzed for Mcl-1 expression by Western blotting. Blots were reprobbed with β -actin to confirm equal loading. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. # $P < 0.05$ vs. ouabain and TRAIL-cotreated cells. **F:** cells were pretreated with the following specific ROS modulators: 15,000 U catalase, 1 mM deferoxamine, or 50 μ M MnTBAP for 30 min before treatment with 10 ng/ml TRAIL and 0.5 nM ouabain for 14 h. Cells were collected and analyzed for Mcl-1 expression by Western blotting. Blots were reprobbed with β -actin to confirm equal loading. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. nontreated control cells. # $P < 0.05$ vs. ouabain and TRAIL-cotreated cells.

and deferoxamine exhibited insignificant effects. Together, these results strongly support the earlier findings that hydrogen peroxide is a key ROS involved in the TRAIL-sensitizing mechanism of ouabain.

Ouabain enhances the TRAIL-mediated downregulation of Mcl-1 through a hydrogen peroxide-dependent mechanism. Ouabain was earlier shown to promote TRAIL-induced apoptosis

through the downregulation of Mcl-1, and this apoptosis-sensitizing effect was mediated by hydrogen peroxide generation. To investigate the linkage between these two events, H292 cells were pretreated with the ROS scavengers described above and treated with TRAIL in the presence of ouabain. Western blot analysis revealed that the reduction of Mcl-1 expression in response to ouabain and TRAIL treatments was

significantly inhibited in cells pretreated with glutathione and catalase (Fig. 4, *E* and *F*), whereas protective effects of other antioxidants were not observed. These findings support that hydrogen peroxide is a key mediator responsible for Mcl-1 downregulation and, hence, the apoptosis-sensitizing effect of ouabain.

Ouabain enhances Mcl-1 degradation through the ubiquitin-proteasomal pathway. Having shown that Mcl-1 downregulation in the ouabain-treated cells is involved with TRAIL sensitization, the present study further investigated the mechanism by which ouabain treatment induced the decrease in Mcl-1 levels. It is known that the Mcl-1 protein has a short half-life and that its expression level is controlled by proteasomal degradation (2, 22). To test whether the downregulation of Mcl-1 in cells treated with TRAIL and ouabain was consistent in these contexts, cells were treated with TRAIL and ouabain in the presence of the specific proteasomal inhibitor MG132. Figure 5A indicates that the decrease in Mcl-1 levels was consequently inhibited in the proteasome-suppressed cells, revealing the involvement of proteasomal degradation in response to TRAIL and ouabain treatment. In addition, the lysosomal inhibitor concanamycin A was also used in this experiment, and the results demonstrated that the lysosomal pathway had no effect on Mcl-1 downregulation under these conditions. Because ubiquitination is a critical prerequisite process before proteasomal cleavage, Mcl-1-ubiquitin complexes in response to TRAIL and ouabain treatment were detected by immunoprecipitation. Figure 5B shows that the cells treated with TRAIL and ouabain exhibited a significant increase in Mcl-1-ubiquitin complexes, revealing that the treatment increased the degradation rate of Mcl-1.

Ouabain enhances TRAIL-induced apoptosis in Mcl-1-overexpressed cells. Amplification or overexpression of Mcl-1 has been tightly related to TRAIL resistance in many cancer cells (13, 30, 34). To test whether Mcl-1 expression might determine cell death after TRAIL treatment, we stably transfected the cells with Mcl-1, shRNA Mcl-1, or control plasmid and evaluated the effects on TRAIL-induced apoptosis. Because Western blotting revealed the substantial modulation of Mcl-1 as indicated in Fig. 6A, cells were cultured, exposed to various doses of TRAIL (0–40 ng/ml) for 14 h, and assayed for apoptosis. The Mcl-1-transfected cells exhibited less apoptosis than the control cells when treated with TRAIL, whereas shRNA-Mcl-1-transfected cells showed a greater number of apoptotic cells (Fig. 6B). These results indicated that Mcl-1 plays a negative regulatory role in the TRAIL-mediated death of these cells.

Further, the effect of ouabain on these Mcl-1 transfectants was investigated. Our results indicated that ouabain administration significantly enhanced the apoptotic response of all Mcl-1-modulated cells to TRAIL (Fig. 6B). Notably, the degree of ouabain sensitization correlated well with the levels of basal Mcl-1 in these cells. The shMcl-1 cells possess the lowest level of Mcl-1 and displayed the most ouabain sensitization, while Mcl-1-overexpressing cells contained the highest level of Mcl-1 and showed less response to ouabain. Mcl-1 expression levels were also decreased in response to the presence of ouabain pretreatment in Mcl-1 transfectants incubated with TRAIL (0–40 ng/ml; Fig. 6C).

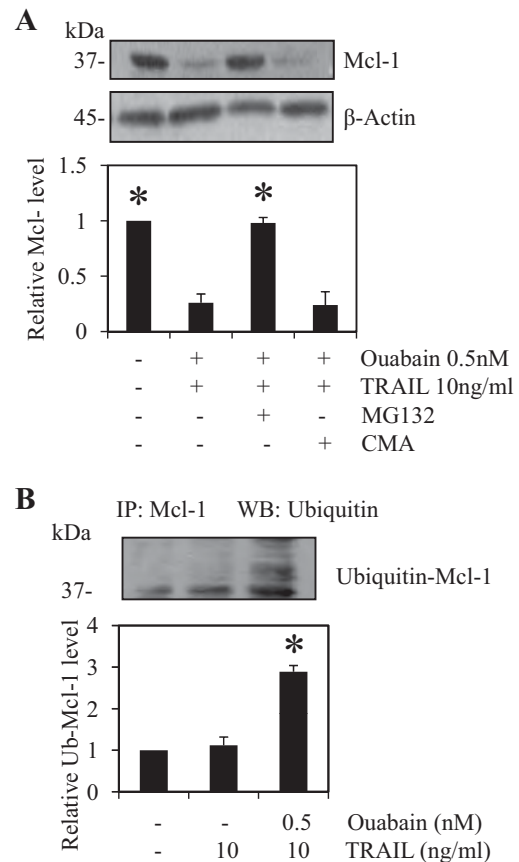
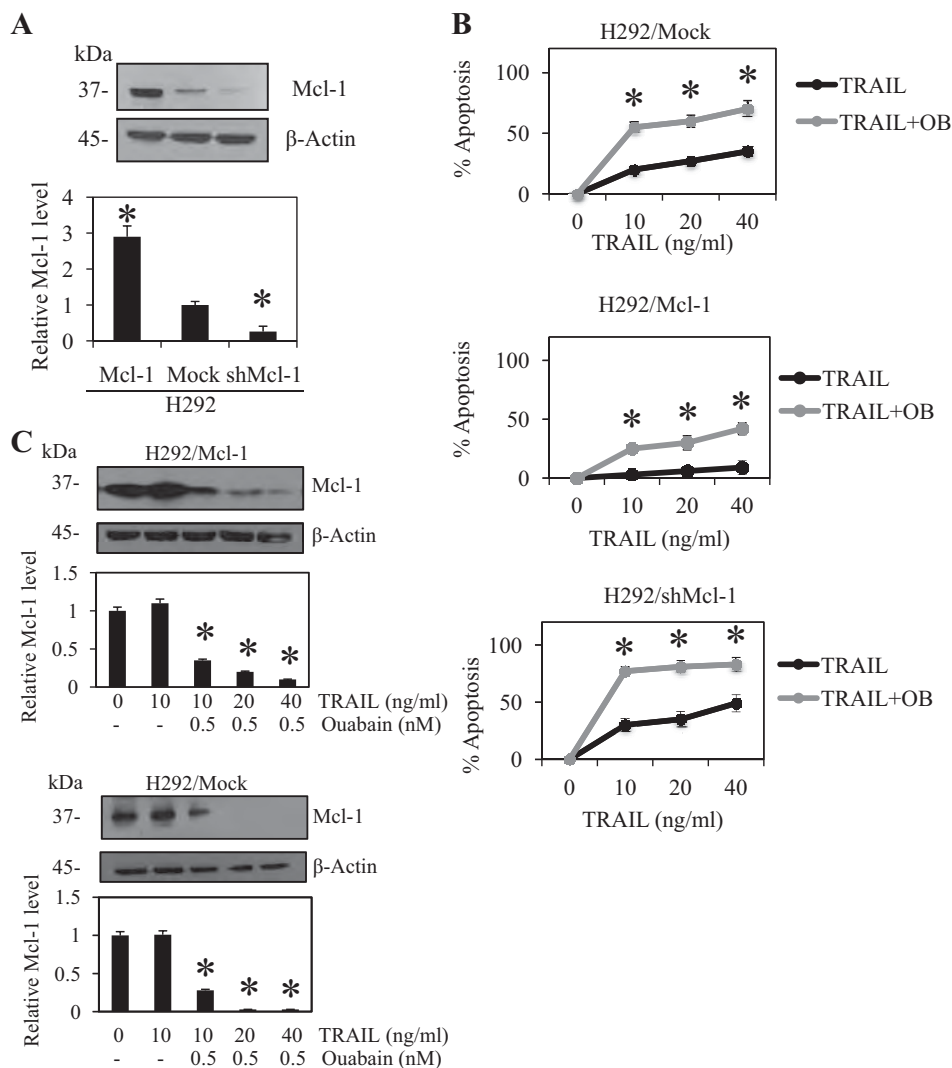


Fig. 5. Ouabain sensitizes cells to TRAIL-induced apoptosis through the Mcl-1 degradation pathway. *A*: H292 cells were pretreated with either the proteasomal inhibitor MG132 or the lysosomal inhibitor concanamycin A (CMA) for 30 min before treatment with 10 ng/ml TRAIL and 0.5 nM ouabain for 14 h. Mcl-1 expression was analyzed by Western blotting (WB) as described under MATERIALS AND METHODS. Immunoblot signals were quantified, normalized with β -actin, and represented as relative values compared with the nontreated control. Data are the means $\pm$ SD ($n = 4$). * $P < 0.05$ vs. ouabain and TRAIL cotreated cells. *B*: cells were treated with 10 ng/ml TRAIL in the presence or absence of 0.5 nM ouabain or left untreated for 2 h. The resulting immunocomplexes were analyzed for ubiquitin by Western blotting using an anti-ubiquitin antibody as described under MATERIALS AND METHODS. Immunoblot signals were quantified by densitometry and represented as relative values compared with nontreated cells. Data are the means $\pm$ SD ($n = 4$). IP, immunoprecipitation. * $P < 0.05$ vs. TRAIL-treated cells.

Ouabain sensitizes H460 human lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. To test whether ouabain could play a sensitizing role in the TRAIL-induced apoptosis of other lung cancer cells, the H460 human lung cancer cell line was stably transfected with Mcl-1, shMcl-1, or control plasmids as described in MATERIALS AND METHODS. After selection, the cells were analyzed for Mcl-1 expression and apoptotic responses to TRAIL in the presence or absence of ouabain. Figure 7, *A* and *B*, shows that the Mcl-1-transfected H460 cells exhibiting the highest level of Mcl-1 protein expressed the highest TRAIL resistance, whereas the shMcl-1-transfected cells exhibited the lowest Mcl-1 level and degree of TRAIL resistance. In ouabain-treated groups, a significant accentuated effect on TRAIL-induced apoptosis was observed in all tested cells (Fig. 7B). Ouabain was also able to decrease Mcl-1 expression levels in TRAIL-resistant, Mcl-1-overexpressing cells (Fig. 7C). The above results are consistent with the earlier findings in H292

Fig. 6. Ouabain sensitizes Mcl-1-overexpressing and knockdown H292 cells to TRAIL-induced apoptosis. **A:** H292 cells were transfected with either mock, Mcl-1 or shMcl-1 plasmids, and Mcl-1 expressions were analyzed by Western blotting. Blots were reprobed with β -actin as loading control. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 3$). $*P < 0.05$ vs. mock-transfected cells. **B:** transfected cells were treated with 10 ng/ml TRAIL in the presence or absence of 0.5 nM ouabain pretreatment. Apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining. Data are the means $\pm$ SD ($n = 4$). $*P < 0.05$ vs. TRAIL-treated cells. **C:** transfected cells were treated with 0–40 ng/ml TRAIL in the presence or absence of a 0.5 nM ouabain pretreatment. Mcl-1 expression levels were analyzed by Western blotting. Blots were reprobed with β -actin as a loading control. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 4$). $*P < 0.05$ vs. 10 ng/ml TRAIL-treated cells.



cells and indicate the general role of Mcl-1 and ouabain in TRAIL sensitization in lung cancer cells.

DISCUSSION

TRAIL-induced apoptosis in cancerous cells plays an important role in controlling carcinogenesis and the progression of such disease. Resistance of the cancer cells by either the induction of antiapoptotic proteins or defects in apoptosis pathways often allows the cancer to progress. Even though previous studies have demonstrated that high concentrations of ouabain could induce apoptosis in some cancer cells (4, 11, 23, 35), the effects of noncytotoxic concentrations of such compounds, which may be linked to biological functions, are unknown. Initiating from the discovery of endogenous ouabain and related compounds in human plasma and tissue, the roles of ouabain in the regulation of physiological functions as well as in pathological conditions have been intensively investigated. Indeed, evidence has indicated that the plasma ouabain concentration increases in certain pathological conditions including hypertension and cardiac and renal failure (4, 16); however, the function of ouabain in immune-related reaction processes is still largely unknown. Our study suggests for the

first time that endogenous ouabain might play a role in rendering an immune defense against cancers. We found that ouabain at a concentration of 0.5 ng/ml (~ 0.85 nM), which is comparable to the human plasma concentrations (0.16–0.77 nM) (9), played an important role in sensitizing lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis.

A recent study presented that ouabain regulates the interaction of Src and the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, which results in Src activation and consequently enhances cell growth, as well as increases intracellular calcium and promotes myocyte contraction (16, 31, 37, 30). Conversely, our data demonstrated that the number of apoptotic cells in response to a Src inhibitor in TRAIL and ouabain cotreated cells was not significantly altered compared with TRAIL and ouabain cotreated control cells (data not shown). It was reported that the effect of the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ was cell specific due to the expression of various enzyme subunits in different cell types (5, 16). Although the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Src pathway was activated in response to ouabain treatment, the dominant mechanism of “ouabain-enhanced TRAIL-induced apoptosis” may not be involved.

Previous studies have revealed that ouabain induces the generation of ROS and apoptosis in human neuroblastoma cells

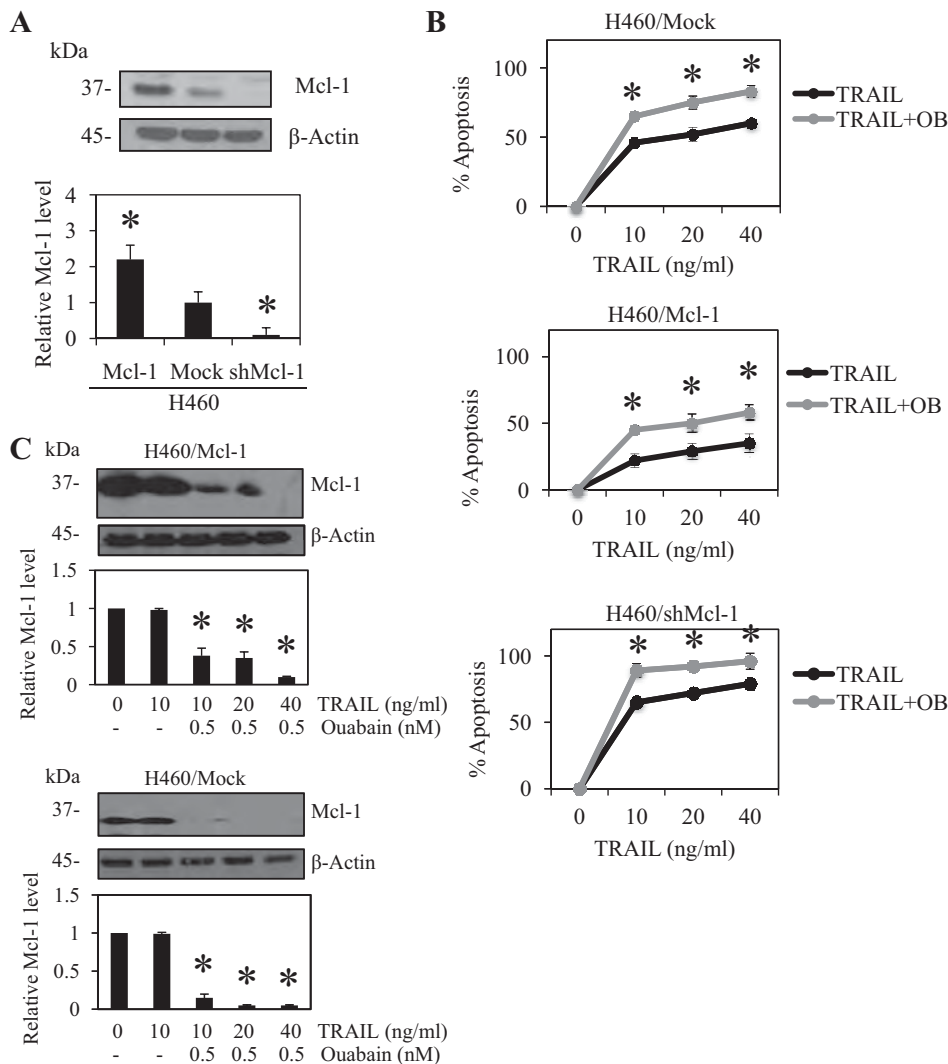


Fig. 7. Ouabain sensitizes Mcl-1-overexpressing and knockdown H460 cells to TRAIL-induced apoptosis. **A**: H460 cells were transfected with either mock, Mcl-1, or shMcl-1 plasmids, and Mcl-1 expression levels were analyzed by Western blotting. Blots were re-probed with β -actin as a loading control. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 3$). $*P < 0.05$ vs. mock-transfected cells. **B**: transfected cells were treated with 10 ng/ml TRAIL in the presence or absence of 0.5 nM ouabain pretreatment. Apoptosis was determined by Hoechst 33342 staining. Data are the means $\pm$ SD ($n = 4$). $*P < 0.05$ vs. TRAIL-treated cells. **C**: transfected cells were treated with 0–40 ng/ml TRAIL in the presence or absence of 0.5 nM ouabain pretreatment. Mcl-1 expression levels were analyzed by Western blotting. Blots were re-probed with β -actin as a loading control. Immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Bars are the means $\pm$ SD ($n = 4$). $*P < 0.05$ vs. 10 ng/ml TRAIL-treated cells.

(11, 15). Consistently, we found ROS induction in response to ouabain treatment in H292 lung cancer cells, while TRAIL treatment caused only an insignificant effect on cellular ROS level. Hydrogen peroxide was identified as a key ROS present in the treated condition. Hydrogen peroxide, a relatively stable ROS, was shown to function in controlling the degradation of several death-related molecules including the anti-apoptotic Bcl-2 protein (33). The present study found that an increase in cellular hydrogen peroxide, in response to TRAIL and ouabain treatment, mediated Mcl-1 degradation through the proteasomal pathway. Western blotting demonstrated that in the cells treated with TRAIL and ouabain the administration of glutathione or catalase, antioxidants for hydrogen peroxide, could sustain the level of Mcl-1, suggesting the essential role of hydrogen peroxide in Mcl-1 downregulation (Fig. 4F).

TRAIL-mediated Mcl-1 downregulation was previously reported to be important for the induction of apoptosis, and the reduction of cellular Mcl-1 level has been accepted as a very promising mechanism for TRAIL sensitization (13–14, 34). Our results strongly support these notions, as the Mcl-1-overexpressing H292 cells exhibited dramatic resistance to TRAIL-induced cell death while Mcl-1 knockdown cells

showed the opposite effect (Fig. 6B). Such an effect of Mcl-1 was consistent in the H460 human lung cancer cell model (Fig. 7B). In addition, we found that ouabain enhanced TRAIL-mediated cell death in both H292 and H460 cells.

In conclusion, our current study reveals novel findings regarding ouabain's sensitizing activity on TRAIL-induced apoptosis in lung cancer cells. The sensitizing effect of ouabain was found to be associated with the hydrogen peroxide-dependent degradation of Mcl-1 via the ubiquitin-proteasome pathway. We also showed for the first time that ouabain at physiological concentrations may play a role in enhancing the cancer cell response to TRAIL-induced apoptosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Khanit Suwanborirux, Dr. Yon Rojanasakul, and Krich Rajprasit.

GRANTS

This research was supported by Grants for the Development of New Faculty and Staff, Chulalongkorn University (to V. Pongrakhananon), Thailand Research Fund (to P. Chanvorachote; MRG5480105) and Ratchadaphiseksomphot endowment fund.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: P.C. and V.P. performed experiments; P.C. and V.P. analyzed data; P.C. and V.P. interpreted results of experiments; P.C. and V.P. drafted manuscript; P.C. and V.P. edited and revised manuscript; V.P. conception and design of research; V.P. prepared figures; V.P. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. Abdulghani J, El-Deiry WS. TRAIL receptor signaling and therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 14: 1091–1108, 2010.
2. Adams KW, Cooper GM. Rapid turnover of mcl-1 couples translation to cell survival and apoptosis. *J Biol Chem* 282: 6192–6200, 2007.
3. Anel A, Martinez-Lostao L. APO2L/TRAIL: new insights in the treatment of autoimmune disorders. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 5: 184–199, 2011.
4. Ark M, Ozdemir A, Polat B. Ouabain-induced apoptosis and Rho kinase: a novel caspase-2 cleavage site and fragment of Rock-2. *Apoptosis* 15: 1494–506, 2010.
5. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: F633–F650, 1998.
6. Blaustein MP. Endogenous ouabain: role in the pathogenesis of hypertension. *Kidney Int* 49: 1748–1753, 1996.
7. Day TW, Sinn AL, Huang S, Pollok KE, Sandusky GE, Safa AR. c-FLIP gene silencing eliminates tumor cells in breast cancer xenografts without affecting stromal cells. *Anticancer Res* 29: 3883–3886, 2009.
8. Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 1462–1475, 2007.
9. Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated concentrations of endogenous ouabain in patients with congestive heart failure. *Circulation* 86: 420–425, 1992.
10. Han J, Goldstein LA, Gastman BR, Rabinowich H. Interrelated roles for Mcl-1 and BIM in regulation of TRAIL-mediated mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* 281: 10153–10163, 2006.
11. Huang YT, Chueh SC, Teng CM, Guh JH. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Biochem Pharmacol* 67: 727–733, 2004.
12. Kassouf N, Thornhill MH. Oral cancer cell lines can use multiple ligands, including Fas-L, TRAIL and TNF- α , to induce apoptosis in Jurkat T cells: possible mechanisms for immune escape by head and neck cancers. *Oral Oncol* 44: 672–682, 2008.
13. Kim SH, Ricci MS, El-Deiry WS. Mcl-1: a gateway to TRAIL sensitization. *Cancer Res* 68: 2062–2064, 2008.
14. Kobayashi S, Werneburg NW, Bronk SF, Kaufmann SH, Gores GJ. Interleukin-6 contributes to Mcl-1 up-regulation and TRAIL resistance via an Akt-signaling pathway in cholangiocarcinoma cells. *Gastroenterology* 128: 2054–2065, 2005.
15. Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A, Scheiner-Bobis G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1691–1702, 2007.
16. Li Z, Xie Z. The Na/K-ATPase/Src complex and cardiotonic steroid-activated protein kinase cascades. *Eur J Physiol* 457: 635–644, 2009.
17. Lingrel JB. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu Rev Physiol* 72: 395–412, 2010.
18. Malhi H, Gores GJ. TRAIL resistance results in cancer progression: a TRAIL to perdition? *Oncogene* 25: 7333–7335, 2006.
19. Manunta P, Ferrandi M, Bianchi G, Hamlyn JM. Endogenous ouabain in cardiovascular function and disease. *J Hypertens* 27: 9–18, 2009.
20. Nesher M, Dvula M, Igboke VU, Rosen H, Lichtstein D. Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H2026–H2034, 2009.
21. Nicholls MG, Lewis LK, Yandle TG, Lord G, McKinnon W, Hilton PJ. Ouabain, a circulating hormone secreted by the adrenals, is pivotal in cardiovascular disease. Fact or fantasy? *J Hypertens* 27: 3–8, 2009.
22. Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17: 1475–1486, 2003.
23. Ozdemir T, Nar R, Kilinc V, Alacam H, Salis O, Duzgun A, Gulten S, Bedir A. Ouabain targets the unfolded protein response for selective killing of HepG2 cells during glucose deprivation. *Cancer Biother Radiopharm* 27: 457–463, 2012.
24. Sayers TJ. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 60: 1173–1180, 2011.
25. Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. *Am J Cardiovasc Drugs* 7: 173–189, 2007.
26. Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer. *Semin Nephrol* 25: 343–351, 2005.
27. Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C509–C536, 2007.
28. Schoner W. Endogenous cardiotonic steroids. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47: 273–280, 2001.
29. Selden R, Smith TW. Ouabain pharmacokinetics in dog and man. Determination by radioimmunoassay. *Circulation* 45: 1176–1182, 1972.
30. Tanai M, Grambihler A, Higuchi H, Werneburg N, Bronk SF, Farrugia DJ, Kaufmann SH, Gores GJ. Mcl-1 mediates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand resistance in human cholangiocarcinoma cells. *Cancer Res* 64: 3517–3524, 2004.
31. Tian J, Gong X, Xie Z. Signal-transducing function of Na⁺-K⁺-ATPase is essential for ouabain's effect on [Ca²⁺]_i ion in rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1899–H1907, 2001.
32. Walther JU. Letter: ouabain in heart failure. *Br Med J* 1: 515, 1975.
33. Wang L, Chanvorachote P, Toledo D, Stehlik C, Mercer RR, Castranova V, Rojanasakul Y. Peroxide is a key mediator of Bcl-2 downregulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 73: 119–127, 2008.
34. Wang X, Chen W, Zeng W, Bai L, Tesfaigzi Y, Belinsky SA, Lin Y. Akt-mediated eminent expression of c-FLIP and Mcl-1 confers acquired resistance to TRAIL-induced cytotoxicity to lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7: 1156–1163, 2008.
35. Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, Mityk W. Apoptosis-mediated cytotoxicity of ouabain, digoxin and proscillaridin A in the estrogen independent MDA-MB-231 breast cancer cells. *Arch Pharm Res* 30: 1216–1224, 2007.
36. Yoshida T, Zhang Y, Rivera Rosado LA, Zhang B. Repeated treatment with subtoxic doses of TRAIL induces resistance to apoptosis through its death receptors in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 7: 1835–1844, 2009.
37. Xie Z. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann NY Acad Sci* 986: 497–503, 2003.
38. Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 12: 228–237, 2005.
39. Zhang Y, Zhang B. TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res* 6: 1861–1871, 2008.
40. Zitzmann K, de Toni E, von Rüden J, Brand S, Göke B, Laubender RP, Auernhammer CJ. The novel Raf inhibitor Raf265 decreases Bcl-2 levels and confers TRAIL-sensitivity to neuroendocrine tumour cells. *Endocr Relat Cancer* 18: 277–285, 2011.
41. Zong H, Yin B, Chen J, Ma B, Cai D, He X. Over-expression of c-FLIP confers the resistance to TRAIL-induced apoptosis on gallbladder carcinoma. *Tohoku J Exp Med* 217: 203–208, 2009.

Caveolin-1 Regulates Endothelial Adhesion of Lung Cancer Cells via Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism

Pithi Chanvorachote, Preedakorn Chunhacha*

Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, and Cell-based Drug and Health Product Development Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Abstract

The knowledge regarding the role of caveolin-1 (Cav-1) protein on endothelium adhesion of cancer cells is unclear. The present study revealed that Cav-1 plays a negative regulatory role on cancer-endothelium interaction. Endogenous Cav-1 was shown to down-regulate during cell detachment and the level of such a protein was conversely associated with tumor-endothelial adhesion. Furthermore, the ectopic overexpression of Cav-1 attenuated the ability of the cancer cells to adhere to endothelium while shRNA-mediated Cav-1 knock-down exhibited the opposite effect. We found that cell detachment increased cellular hydrogen peroxide and hydroxyl radical generation and such reactive oxygen species (ROS) were responsible for the increasing interaction between cancer cells and endothelial cells through vascular endothelial cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). Importantly, Cav-1 was shown to suppress hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation by sustaining the level of activated Akt which was critical for the role of Cav-1 in attenuating the cell adhesion. Together, the present study revealed the novel role of Cav-1 and underlying mechanism on tumor adhesion which explain and highlight an important role of Cav-1 on lung cancer cell metastasis.

Citation: Chanvorachote P, Chunhacha P (2013) Caveolin-1 Regulates Endothelial Adhesion of Lung Cancer Cells via Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism. PLoS ONE 8(2): e57466. doi:10.1371/journal.pone.0057466

Editor: Chih-Hsin Tang, China Medical University, Taiwan

Received: October 18, 2012; **Accepted:** January 21, 2013; **Published:** February 27, 2013

Copyright: © 2013 Chanvorachote, Chunhacha. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work is supported by grants from the Thailand Research Fund (P. Chanvorachote) and postdoctoral fellowship (Ratchadaphiseksompot Endowment Fund, Chulalongkorn University). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Preedakorn.chun@gmail.com

Introduction

Recently, roles of caveolin-1 (Cav-1) in regulation of cancer progression and metastasis in various types of cancer have been revealed [1–4] and such a protein perhaps received the most attention in cancer-related research. Although some studies suggested that Cav-1 may play a role in inhibiting cancer progression in certain cancers [5], in lung cancer, Cav-1 potentiates cancer aggressiveness as well as metastasis [6]. Together with the fact that Cav-1 expression in lung cancer was shown to relate to poor prognosis [2], and most of the cancer-related death in this cancer was shown to link with metastasis, it is of great interest to investigate the entire regulatory role of this protein on cancer metastasis [7]. Metastasis is a multi-step process of cancer cells spreading from their original locations to the distant secondary sites. Starting with the cancer cell detachment from their primary tumor, the cells invade vascular wall, travel in the circulatory system, and adhere to the endothelium to form the secondary tumors. Although roles of Cav-1 on lung cancer cell behaviors have been intensively explored, the role of such a protein on lung cancer cell adhesion to endothelium surface is largely unknown. We and others have suggested the important role of Cav-1 in rendering cancer cells resistant to anoikis after cell detachment [6,8,9,10], enhancing invasion and migration [11], and facilitating growth in anchorage-independent manner [12]. Endogenous Cav-1 level was shown in the previous studies to be

controlled by the reactive oxygen species (ROS). In detached cell condition, hydrogen peroxide was shown to increase the cellular level of Cav-1 by inhibiting its degradation [6]. While in the adherent cells, hydroxyl radical was shown to be a key player in up-regulating Cav-1 expression and increased cell migration [11]. These findings highlighted the regulatory role of ROS on Cav-1 expression and their accompany roles on cancer metastasis.

In biology, negative feedback regulations exist to prevent the excessive stimulations. Likewise, Cav-1 protein was shown to suppress oxidative stress caused by hydrogen peroxide exposures [13]. However, it remains unknown whether Cav-1 regulates ROS level in detached cells and such regulation is critical for cancer adhesive property. Using pharmacological and genetic approaches, the present study revealed that Cav-1 plays a key role in inhibition of cancer-endothelium adhesion by attenuating hydrogen peroxide and hydroxyl radical generations after cell detachment. The present study also found that Cav-1 suppressed such ROS formation through Akt-dependent mechanism. Along with the observation that Cav-1 decreased in a time-dependent fashion after cell detachment, we found that at later-time points, cancer-endothelium adhesion significantly increased the concomitant of that Cav-1 depletion. Thus, our study revealed the existence of a novel mechanism of cancer cell adhesion regarding Cav-1 which might be exploited in metastasis and drug design.

Materials and Methods

Cells and Reagents

Non small lung cancer cell (NSCLC)-H460 and Vascular endothelium Human (HUV-EC-C) cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). H460 cells were cultured in RPMI 1640 while HUV-EC-C cells were cultured in M199 medium. RPMI 1640 was supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 100 units/mL penicillin/streptomycin. M199 was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 mM L-glutamine, and 100 units/mL penicillin/streptomycin, 0.1 mg/ml heparin, 0.05 mg/ml endothelial cell growth supplement (ECGS). All of the culture was incubated in a 5% CO₂ environment at 37°C. 2', 7'-dichloro-fluorescein diacetate (DCFH₂-DA), Dimethylsulfoxide (DMSO), caveolae isolation kit, Calcein AM, Heparin sodium were obtained from Sigma Chemical, Inc. (St. Louis, MO); Rabbit caveolin-1 antibody and peroxidase-conjugated secondary antibody from Abcam (Cambridge, MA); Hydrophenyl fluorescein (HPF), LY294002, Amplex Red, Lipofectamine 2000 were from Invitrogen (Carlsbad, CA); Antibody for β -actin from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); Antibody for pan-Akt, p473-Akt, PTEN, EGFR, Phospho-PTEN (Ser380/Thr382/383) were from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA); Endothelial cell growth supplement was from Millipore Corporation (Billerica, MA).

Plasmid and Transfection

The Cav-1 expression plasmid pEX_Cav-1 and its control vector; pDS_XB-YFP were acquired from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and Cav-1 knockdown plasmid shRNA-Cav-1 and its control vector; control shRNA plasmid A were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Stable transfections of Cav-1 expression plasmid or Cav-1 knockdown plasmid were generated by culturing H460 cells in a 6-well plate until they reached 60% confluence. 15 μ l of Lipofectamine reagent and 2 μ g of Cav-1, and shRNA-Cav-1 plasmid were used to transfect the cells in the absence of serum. After 12 h the medium was replaced with culture medium containing 5% fetal bovine serum. Approximately 36 h after the beginning of transfection, the cells were digested with 0.03% trypsin, and the cell suspensions were plated onto 75-ml culture flasks and cultured for 24 to 28 days with G418 or puromycin for selection of Hcav-1 and shCav-1, respectively. The stable transfectants were pooled and the expression of Cav-1 protein in the transfectants was confirmed by western blotting. The cells were cultured in antibiotic free RPMI 1640 medium for at least two passages before used in each experiment.

ROS Detection

Intracellular ROS were determined by flow cytometry using DCFH₂-DA as a fluorescent probe. Briefly, cells were incubated with 10 μ M DCFH-DA, HPF for 30 min at 37°C, after which they were washed, trypsinized, resuspended in phosphate-buffered saline, and immediately analyzed for fluorescence intensity by FACScan flow cytometer (Beckton Dickinson, Rutherford, NJ) using a 488-nm excitation beam and a 538-nm band-pass filter. Median fluorescence intensity was quantified by CellQuest software (Becton Dickinson) analysis of the recorded histograms.

H₂O₂ was determined by Amplex Red reagent (Invitrogen). Briefly, the reaction mixture containing 50 μ M Amplex Red reagent and 0.1 U/ml HRP in Krebs-Ringer phosphate (KRPG) was added into each microplate well. Subsequently, 20 μ l of 1.5×10^4 H460 cells suspended in KRPG was added to the

reaction mixture. After 30 min incubation, the fluorescence signal obtained from the fluorescence microplate reader equipped for excitation in the range of 530–560 nm and emission detection at 590 nm was monitored and measured over the 3 h post-detachment.

Monolayer Cell Adhesion Assay

HUV-EC-C were stimulated with 10 ng/ml IL-1 β for 0–4 h. H460 cells (2.5×10^4 cells/ml) were stained with 15 μ M of calcein AM (Sigma) for 45 min at 37°C and 5% CO₂, then added onto a semi-confluent monolayer culture of HUV-EC-C, incubated for 20 min at 37°C with rotation at 120 rpm, and washed extensively to exclude nonspecific cell attachment. The number of attached cells was counted directly under a fluorescence microscope as reported previously [14]. For antibody mediated blocking of cell adhesion, the IL-1 β -stimulated HUV-EC-C were incubated with antibody to VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin (at a final dilution of 1:400 for every antibodies) for 3 h at 37°C in humidified CO₂ incubator, and then H460 cells were added.

Caveolae Isolation

Caveolae were isolated from shCav-1, H460 and Hcav-1 cells by using a caveolae isolation kit (Sigma). ShCav-1, H460 and Hcav-1 cells were collected and lysed with lysis buffer containing 1% Triton X-100. The lysates were centrifuged at 10,000 *g* for 15 min. Detergent-resistant membrane fractions were isolated on OptiPrep Density Gradient Medium (0, 20, 25, 30, and 35%). Caveolae were collected from caveolin-1-enriched fractions, which has been used for the investigation of Cav-1 and PTEN expression.

Western Blotting

After specific treatments, cells were incubated in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 150 mM sodium chloride, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a commercial protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals) for 30 min on ice. Cell lysates were collected and determined for protein content using the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Equal amount of proteins of each sample (40 μ g) were denatured by heating at 95°C for 5 min with Laemmli loading buffer, and subsequently loaded on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. After separation, proteins were transferred onto 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The transferred membranes were blocked for 1 hour in 5% nonfat dry milk in TBST (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 0.05% Tween 20) and incubated with the appropriate primary antibodies at 4°C overnight. Membranes were washed twice with TBST for 10 min and incubated with horseradish peroxidase-coupled isotype-specific secondary antibodies for 1 hour at room temperature. The immune complexes were detected by enhanced with chemiluminescence substrate (Supersignal West Pico; Pierce) and quantified using analyst/PC densitometry software (Bio-Rad).

Statistical Analysis

Mean data from independent experiments were normalized to result from cells in the control. All the experiments were repeated at least three times. A statistical analysis between two groups was verified by Student's *t* test, in comparison to multiple groups, an analysis of variant (ANOVA) with post hoc test was conducted. The strength of relationships, correlation coefficient (*r*), between each protein level after detachment was determined with SPSS

version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A P-value of less than 0.05 would be considered as statistically significant.

Results

Caveolin-1 Depletion after Cell Detachment Enhances Tumor-endothelial Cell Adhesion

Cav-1 was shown to associate with metastatic potentials of lung cancer cells [6,12], while its role on cancer cell adhesion is still unclear. To study the role of Cav-1 protein on cancer cell adhesion, we first detached the cancer cells to mimic the early step of metastasis, and evaluated the expression profile of Cav-1 after cell detachment over times. Lung cancer H460 cells cultured in ultralow attachment plates were analyzed for Cav-1 protein expression by western blotting at indicated time points. Figure 1A shows that after cell detachment, Cav-1 gradually decreased in a time-dependent fashion and the significant decrease was detected as early as 6 h after cell detachment. Next, the suspended cells at concurrent time points were subjected to the monolayer cell adhesion assay as described in *Materials and Methods*. Figures 1A and B show that after cell detachment, Cav-1 expression gradually decreased over time concomitant with the increase of cancer cell adhesion on endothelial surfaces, suggesting the potential role of Cav-1 in cancer adhesive regulation. We further supported such a correlation, by generating a correlation plot between Cav-1 expression and cancer cell adhesion (Fig. 1 C). Not only did the reduction of these proteins correlate well with the enhanced ability of cancer cells to adhere on endothelium surfaces, but the plot also revealed a highly correlated profile with the correlation coefficient of 0.922.

To confirm that Cav-1 attenuates cancer cell adhesion to endothelial cells, we explored the effect of different ectopic Cav-1 expression levels on H460 cells adhesion to endothelium. We established Cav-1 overexpressing (Hcav-1) cells, short-hairpin (sh)-mediated Cav-1 knockdown (shCav-1) cells by stable transfection. The transfectant clones were analyzed for Cav-1 expression compared to their parental H460 cells by western blotting (Fig. 1D). It is noteworthy that the control transfected cells generated from control plasmids, pDS_XB-YFP and control shRNA plasmid A, were also evaluated for Cav-1 expression, however; the level of the protein was comparable to that of H460 cells (data not shown). Cav-1 overexpressed, Cav-1 knockdown, and H460 cells were detached and subjected to endothelial adhesion assay and the cancer cells adhering on the HUV-EC-C endothelial cells were observed. As expected, analysis of cell adhesion showed that Cav-1 overexpressed cells exhibited the lowest ability to adhere to the HUV-EC-C cells, while the shCav-1 cells had the highest ability. Also, the vector transfected cells were similarly evaluated for adhesive capability and we found no significant alteration in comparison to that of parental cells (data not shown). This indicates that Cav-1 negatively regulates cancer cell adhesion to vascular endothelium.

Caveolin-1 Suppresses Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radical Generation after Cell Detachment

Our previous study has shown that in the adhered condition, Cav-1 function in attenuating oxidative stress caused by hydrogen peroxide treatment [13]. Therefore, it is possible that Cav-1 protein may function to regulate redox status of the cancer cells during metastasis. To study the effect of Cav-1 protein on detachment-induced ROS generation, Cav-1 overexpressed (Hcav-1), Cav-1 knock-down (shCav-1), and control cells (H460) were detached and incubated in adhesion-resistant plates until specific time points. The suspended cells were then analyzed for

intracellular ROS levels by flow cytometry using DCFH₂-DA as a fluorescent probe. Figure 2A shows that cell detachment induced an increase in cellular ROS in a time-dependent manner which aligned with our previous report [6]. The present study revealed for the first time that Cav-1 functioned in attenuating the detachment induced ROS in these cells. ShCav-1 cells possessing the lowest Cav-1 expression was shown to exhibit the highest ROS induction and such an induction could be detected as early as 1 h after detachment (Fig. 2A), whereas cellular ROS in Cav-1 overexpressed (Hcav-1) cells was not altered in response to cell detachment.

Further, the specific ROS inhibitors were used to evaluate specific ROS which were up-regulated in these cells. Cav-1 overexpressed, Cav-1 knock down, and H460 cells were pretreated with specific ROS inhibitors which were MnTBAP (a superoxide anion inhibitor), catalase (a hydrogen peroxide inhibitor), deferoxamine (a hydroxyl radical inhibitor), and sodium formate (a hydroxyl radical scavenger), and the ROS levels after detachment for 0–3 h were determined. Figure 2B indicates that treatment with catalase, sodium formate, and deferoxamine could block the induction of ROS in these cells, suggesting that hydrogen peroxide and hydroxyl radical were primary specific ROS up-regulated after cell detachment.

The effect of Cav-1 on hydrogen peroxide and hydroxyl radical produced by these cells was next evaluated. Amplex red, a specific detection probe for hydrogen peroxide, and HPF, a specific detection probe for hydroxyl radical, were used to determine such specific ROS in the detached cells. Figures 2C and D indicate that cell detachment increased the signals of hydrogen peroxide and hydroxyl radical specific probes in a time-dependent manner. Importantly, the signal of either hydrogen peroxide or hydroxyl radical was barely detectable in Cav-1 overexpressed cells, whereas such ROS signals were potentiated in the cells expressing a low level of Cav-1. These results indicated that Cav-1 attenuated hydrogen peroxide and hydroxyl radical generations in suspended lung cancer cells.

Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radical Regulate Cancer Cell Adhesion to Endothelial Cells via VCAM-1-dependent Mechanism

ROS were shown in many studies to play a key role in the regulation of cancer cell behaviors [11]. Together with the above finding indicating that Cav-1 attenuated hydrogen peroxide and hydroxyl radical formations during cell detachment, we investigated whether hydrogen peroxide and hydroxyl radical play a role in regulating cancer cell adhesion. Lung cancer cells were incubated with various known specific ROS modulating agents as described and the cells were subjected to the adhesion assays. Figure 3A indicates that treatment of the cells with a superoxide inhibitor MnTBAP had only a minimal and insignificant effect on cancer cell adhesive activity, whereas the addition of catalase, deferoxamine, and sodium formate significantly inhibited the adhesion of H460 cells to endothelium surface. These results suggested that hydrogen peroxide and hydroxyl radical but not superoxide anion are the ROS that potentiate adhesive capability of these cancer cells to vascular endothelial cells.

Evidences have suggested that endothelial cell adhesion molecules (ECAMs) play an important role on cancer-endothelial cell interaction [15]. Activation of endothelial cells by IL-1 β induced the expression of ECAMs namely VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin on endothelial cell surfaces, and these proteins facilitated the binding of cancer cells [15]. To confirm the role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical on cancer-endothelial cell interaction and to define the affected adhesion molecules, we

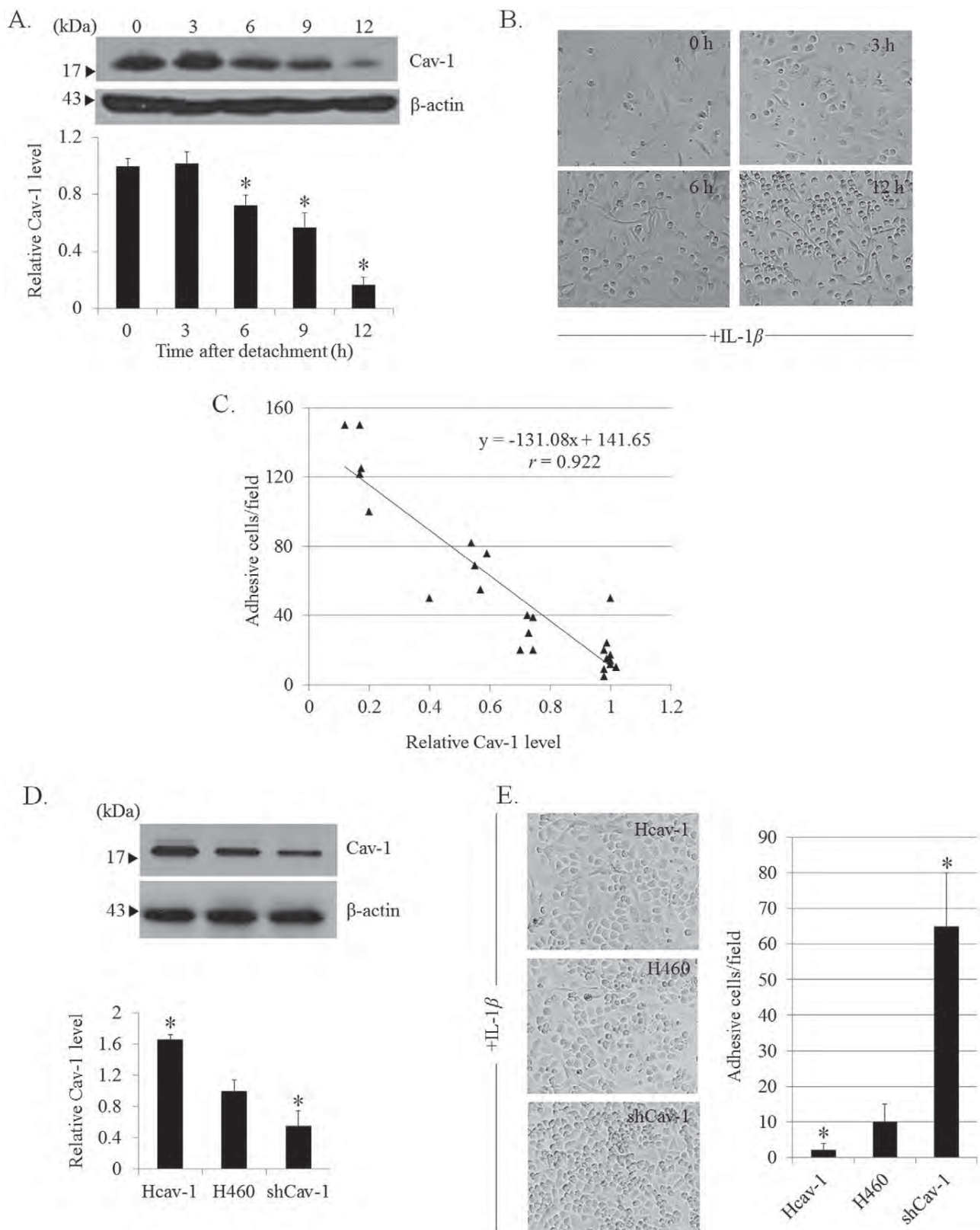


Figure 1. Caveolin-1 inhibits cancer cell adhesion to HUV-EC-C endothelial cells. A: H460 cells were suspended in poly-HEMA-coated plates for various times (0–12 h) and Cav-1 expression was analyzed by western blotting. Columns are means $\pm$ SD ($n = 5$). * $P < 0.05$ vs. time 0. B: Detached H460 cells were subjected to a monolayer culture of HUV-EC-C. The interaction of H460 and HUV-EC-C cells was examined in the presence of IL-1 β (10 ng/ml). Phase-contrast microscopic pictures of representative experiments are shown. C: Correlation analysis of cellular Cav-1 level versus H460-

HUV-EC-C adhesion ($n = 5$). *D*: Cav-1 overexpressed Hcav-1 or short hairpin Cav-1-transfected shCav-1 cells were constructed and analyzed for Cav-1 expression by Western blotting. Blots were re-probed with β -actin antibody to confirm equal loading of samples. The immunoblot signals were quantified by densitometry, and mean data from independent experiments were normalized to the results. Columns are means $\pm$ SD ($n = 3$), * $P < 0.05$ vs. H460 cells. *E*: Hcav-1, H460, and shCav-1 cells were detached for 3 h and added onto a culture of HUV-EC-C. Columns are means $\pm$ SD ($n = 3$), * $P < 0.05$ vs. H460 cells.

doi:10.1371/journal.pone.0057466.g001

blocked the endothelial surfaces with specific antibodies against VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin, prior to cancer cell adhesion. Also, the cancer cells were treated with exogenous hydrogen peroxide in the absence or presence of ferrous sulfate to confirm the role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical, respectively.

Figure 3B indicates that hydrogen peroxide and hydroxyl radical significantly enhanced cancer cell adhesion to endothelial cells, confirming the role of mentioned ROS on cancer cell adhesion. Interestingly, blocking endothelium with the VCAM-1 antibodies could abolish the effect of hydrogen peroxide and ferrous sulfate on the adhesive property of these cancer cells while antibodies against ICAM-1 and E-selectin had no significant effects. These results indicated that hydrogen peroxide and hydroxyl radical may, at least in part, regulate the interaction of the cancer cells to endothelial surface through VCAM-1-dependent mechanism. Also, Cav-1 may decrease the adhesive property of the cancer cells by attenuating hydrogen peroxide and hydroxyl radical.

Cav-1 Suppresses ROS Generation after Cell Detachment through PI3K/Akt Pathway

Having shown that Cav-1 attenuated cancer ability to adhere to an endothelium by decreasing cellular hydrogen peroxide and hydroxyl radical up-regulations, and evidence indicated that Cav-1 regulates several cell behaviors during cell detachment through PI3K/Akt pathway [11]. To further confirm the role of Cav-1 on Akt signaling, we monitored the Akt activation in terms of phosphorylated (serine 473) Akt. In agreement with previous finding [16], we found the increased level of Akt activation in Hcav-1 cells in comparison to that of H460 and shCav-1 cells (Fig. 4A). Also, we found that cell detachment significantly decreased the level of activated Akt in almost all cells. While phosphorylated (serine 473) Akt in shCav-1 cells found to be most affected by such a cell detachment, the level of activated Akt in Hcav-1 was barely altered (Fig. 4A).

Since phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) is a major negative regulator of the PI3K/Akt signaling pathway, we also performed the experiment to elucidate the role of Cav-1 on PTEN. Our results indicated that PTEN was up-regulated in the cytoplasmic portion (C) but down-regulated in the caveolae microsomal fraction (M) in Cav-1 overexpressed (Hcav-1) cells in comparison with those of H460 cells (Fig. 4B). In contrast, Cav-1-knock down cells exhibited the opposite profiles, suggesting that Cav-1 regulated the compartmentalization of PTEN. In order to assess the activity of PTEN, the western blot analysis of the C-terminal phosphorylated PTEN at Ser380, Thr382, and Thr383 that promote PTEN stability but decrease PTEN activities [17], was performed. Figure 4B shows that activated PTEN was significantly reduced in the Hcav-1 cells with the observations that the phosphorylated PTEN (at Ser380, Thr382, and Thr383) were significantly increased. Together with the finding indicating that the phosphorylation of such a protein in ShCav-1 cells was decreased, Cav-1 was demonstrated in the presence study that negatively regulated activated status of PTEN and such regulation may, at least in part, sustained the level of phosphorylated Akt.

To test whether the alteration in phosphorylated Akt affects the cellular oxidative stress, a PI3K inhibitor LY294002 was used to suppress Akt activation. H460 cells were incubated with PI3K inhibitor LY294002 at the concentrations of 10 and 50 μ M, and Akt and phosphorylated-Akt levels were determined by western blotting (Fig. 4C). LY294002 at 10 and 50 μ M were able to reduce p473-Akt (Fig. 4C). The effect of LY294002 on ROS induced by cell detachment was monitored by DCFH₂-DA, HPF and Amplex red. Apparently, PI3K inhibitor was able to increase cellular oxidative stress as indicated by the significant increase of DCF fluorescence signal. Moreover, the specific ROS, namely hydroxyl radical and hydrogen peroxide, were found to be significantly increased in response to the treatment of PI3K inhibitor in H460 cells (Fig. 4D).

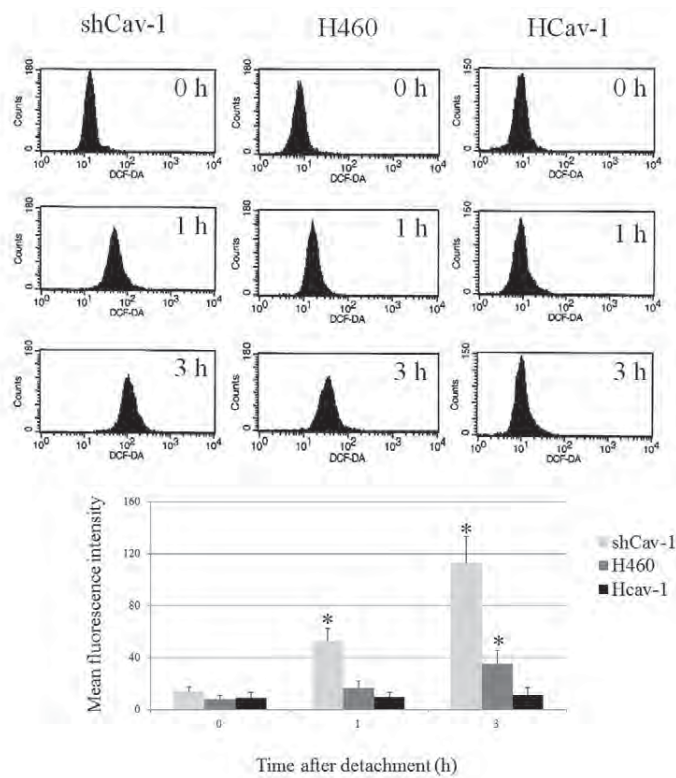
Interestingly, the treatment of LY294002 at 10 and 50 μ M could reverse to effect of Cav-1 in suppressing ROS reduction in Hcav-1 cells. Figure 4E shows that ROS signal in Hcav-1 cells treated with LY294002 was remarkably increased, compared to that of non-treated Hcav-1 cells. In contrast, ROS level in shCav-1 cells were barely affected by the treatment of LY294002. Taken together, these findings suggested that Cav-1 regulate ROS formation after cell detachment by sustaining the activation of PI3K/Akt pathway.

Discussion

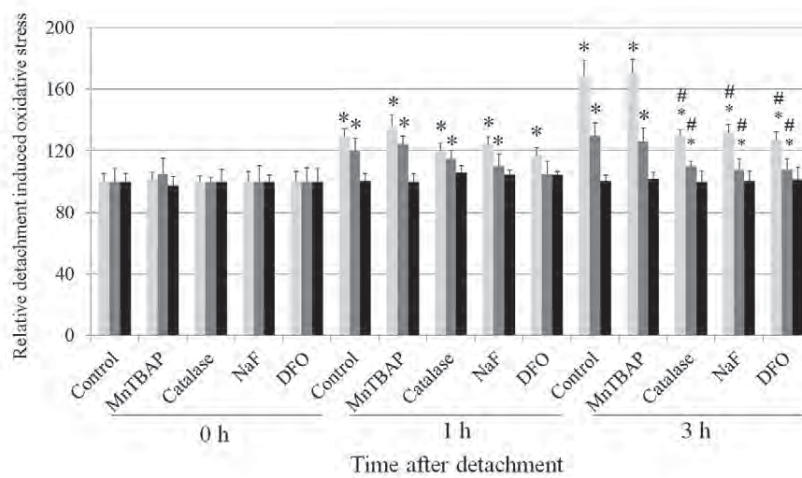
So far, a number of cancer-related proteins have been identified and used for specific applications, including biomarkers for the early detection, prognosis, and molecular targets for anti-cancer design [18]. According to the widely accepted hypothesis that not all primary tumors are able to adhere on the endothelial surfaces, but certain cancer cells possessing an innate or adaptive ability are able to adhere on the surface of vascular endothelial cells and to form metastases [19]. Many regulatory proteins were identified as tumor suppressor or tumor promoter proteins; however, in the case of Cav-1, both functions were reported. Cav-1 was first described as a tumor suppressor protein since the down-regulation of Cav-1 was found during cell transformation [7]. In contrast, Cav-1 was shown to potentiate cancer progression and increasing evidence has indicated its role as a cancer promoter [20]. Cav-1 was shown to function as an important mediator for multiple pro-survival signaling pathways [21–23]. In addition, Cav-1 expression was shown to increase in several types of human cancers, including lung, breast, prostate, and pancreas cancers, and this up-regulation was associated with a high degree of metastasis [20,24–28]. Even though Cav-1 was shown to potentiate lung cancer metastasis by enhancing anoikis resistance [9] and invasion and migration [11], the present study provided the inhibitory effect of Cav-1 on cancer-endothelium adhesion which has not been demonstrated.

Hydrogen peroxide and hydroxyl radical previously shown to be generated during cell detachment [6] were demonstrated herein to be critical for adhesive action of cancer cells to endothelial surfaces (Fig. 3B). Such a finding has strengthened the role of ROS, especially hydroxyl radical in the regulation of cancer-endothelial interaction since hydroxyl radical was reported to enhance cancer cell adhesion by affecting the surface of endothelial cells [29]. Our finding was added to the growing list of

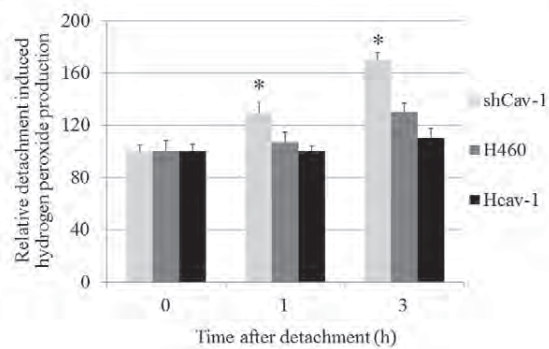
A.



B.



C.



D.

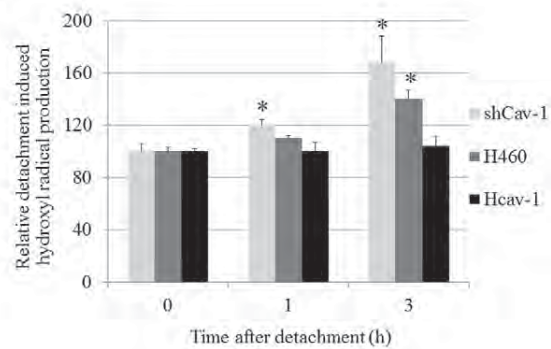


Figure 2. Caveolin-1 suppressed cell detachment-induced ROS generation. A: Cellular ROS level of detached H460, shCav-1, and Hcav-1 cells was determined by flow cytometry using H₂DCF-DA as a fluorescence probe. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. time 0. B: H460, shCav-1, and Hcav-1 cells were treated with Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP, 50 μ M), Catalase (Cat, 7,500 U/ml), Sodium formate (NaF, 2.5 mM), or Deferoxamine (DFO, 1 mM). The intracellular ROS level of these cells was determined by H₂DCF-DA probe. Columns are means $\pm$ SD ($n=5$), $*P<0.05$ vs. attached control (time 0), and $\#P<0.05$ vs. non-treated control at corresponding time. C: Hydrogen peroxide level of the cells was determined by microplate reader using Amplex Red. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. control cells at time 0. D: Hydroxyl radical induction was determined by HPF. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. control cells at time 0. doi:10.1371/journal.pone.0057466.g002

the functions of specific ROS in regulating cellular pathologic events.

Cell adhesion molecules (CAMs), such as vascular endothelial cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), and E-selectin, have been shown to be essential for endothelial cells in interaction with the cancer cells

[15]. Such CAMs were shown to be up-regulated when endothelial cells were exposed to inflammatory cytokines, namely interleukin-1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) [15]. Among them, VCAM-1 has garnered increasing attention in the anti-cancer field and recognized as a potential therapeutic target in metastasis [30]. In the present study, the regulatory role

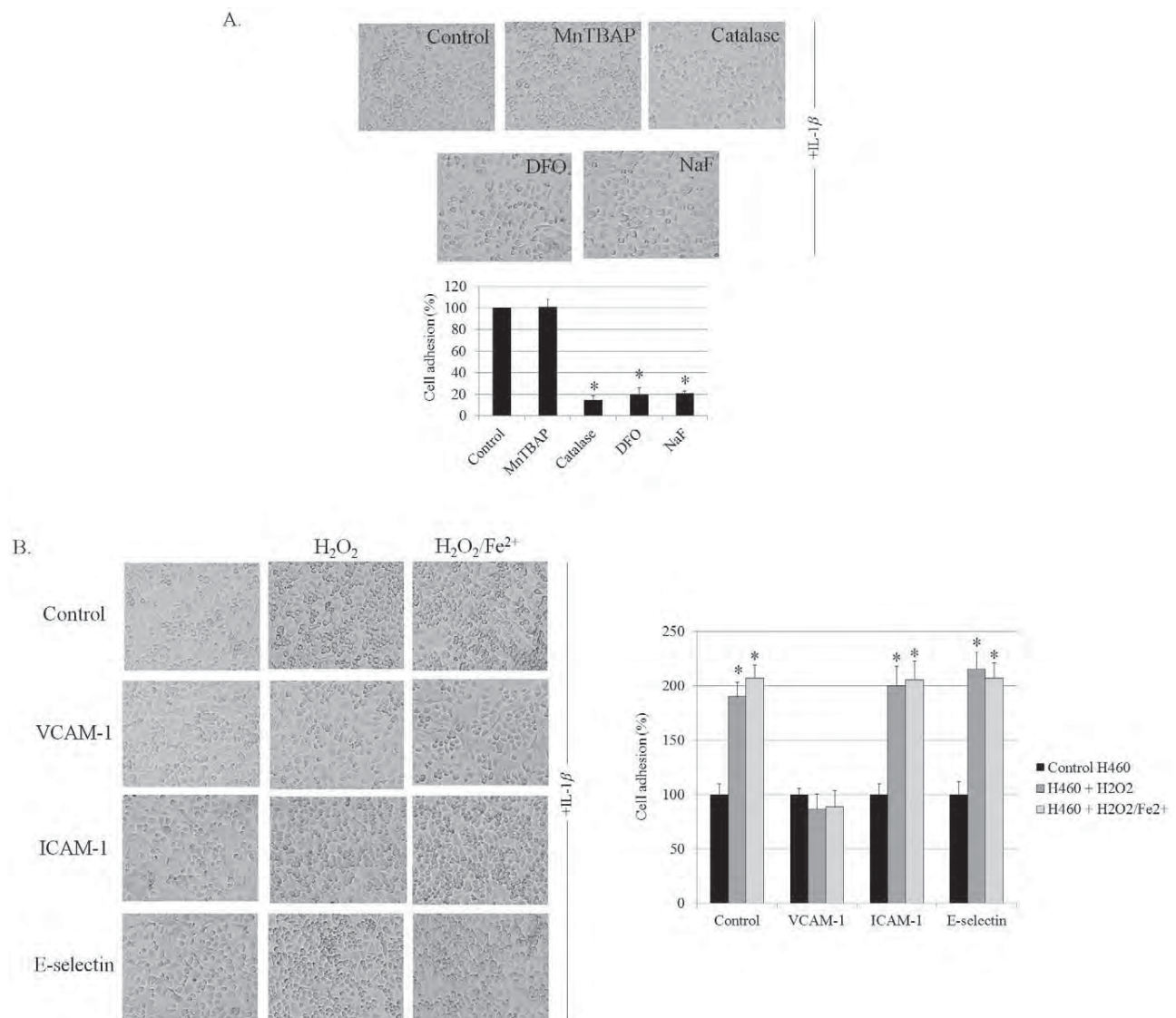


Figure 3. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical enhance H460 cell adhesion to HUV-EC-C via VCAM-1. A: H460 cells were left untreated or pretreated with Mn(III)tetrakis(4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP, 50 μ M), Catalase (Cat, 7,500 U/ml), Sodium formate (NaF, 2.5 mM), or Deferoxamine (DFO, 1 mM) then detached for 3 h prior to adhesion assay. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. non-treated control. B: H460 cells were treated with 100 μ M H₂O₂ or 100 μ M H₂O₂ and 50 μ M FeSO₄ and subjected to the HUV-EC-C surface which was blocked by VCAM-1, ICAM-1, or E-selectin antibodies. Phase-contrast microscopic pictures of representative experiments are shown. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. non-treated control. doi:10.1371/journal.pone.0057466.g003

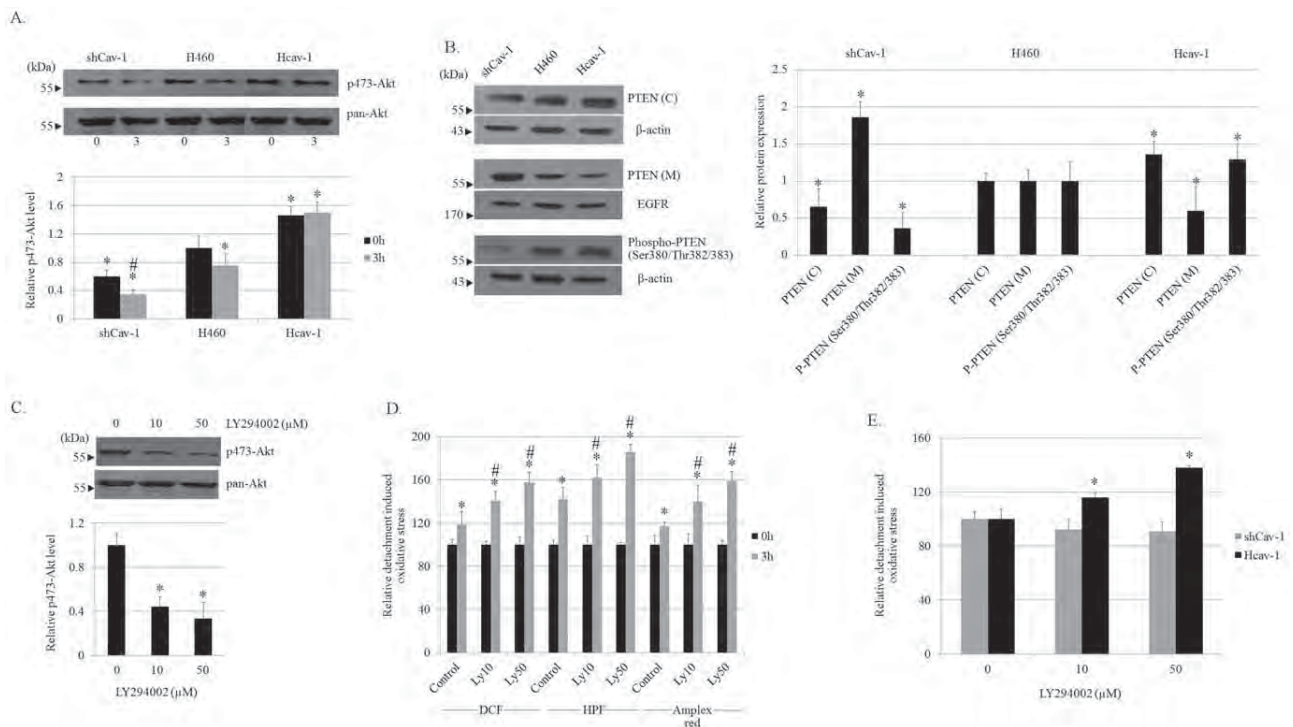


Figure 4. Caveolin-1 suppresses hydrogen peroxide and hydroxyl radical inductions through PI3K/Akt pathway. A: H460, shCav-1, and Hcav-1 cells were detached and suspended in poly-HEMA-coated plates for 0–3 h. p473-Akt and pan-Akt level in these cells was determined by antibodies specific to p473-Akt and pan-Akt. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. H460 cells at time 0, $\#P<0.05$ vs. corresponding control cells at time 0. B: Lysate of H460, shCav-1, and Hcav-1 cells were used for the investigation of PTEN, phospho-PTEN (Ser380/Thr382/383) expression. Caveolae microsomal fraction (M) was prepared as described in materials and methods and used for the investigation of PTEN (M). EGFR was used as a marker for the caveolae fraction. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. H460 cells. C: H460 cells were left untreated or pretreated for 2 h with 10 and 50 μ M LY294002 then the cells were detached for 3 h and analyzed for p473-Akt and Akt levels. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. non-treated control. D: H460 cells were treated with LY294002 and determined for ROS, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide production by DCFH₂-DA, HPF, Amplex Red, respectively. Columns are means $\pm$ SD ($n=4$), $*P<0.05$ vs. non-treated control at time 0, $\#P<0.05$ vs. non-treated control at 3 h. E: ShCav-1 and Hcav-1 cells were treated with LY294002 and analyses for cellular ROS using DCFH₂-DA. Columns are means $\pm$ SD ($n=3$), $*P<0.05$ vs. non-treated control. doi:10.1371/journal.pone.0057466.g004

of hydrogen peroxide and hydroxyl radical was found to be associated with the expression of VCAM-1 on the endothelial cells (Fig. 3B). Blocking VCAM-1 on the endothelium surface but not ICAM-1 and E-selectin was shown to abolish the effect of such ROS on cancer cell binding, implying that ROS mediates cancer cell adhesion via VCAM-1-dependent mechanism. Since VCAM-1 is an endothelial ligand for interacting with β 1 sub family of integrins [31], we hypothesized that hydrogen peroxide and hydroxyl radical probably affected the expression level and/or function of integrins on cancer cell surfaces.

The down-regulation of Cav-1 in lung cancer cells was shown to be dependent on the cellular redox status [6]. However, the feedback mechanism of Cav-1 on ROS regulation has not been reported elsewhere. We found that Cav-1 suppressed the formation of ROS in response to cell detachment and the inhibition of hydrogen peroxide and hydroxyl radical was essential for anti-adhesive role of Cav-1. The ectopic overexpression of Cav-1 significantly attenuated ROS, including hydrogen peroxide and hydroxyl radical generations induced by cell detachment, while the transfection with shRNA mediating Cav-1 down-regulation showed the opposite effect (Fig. 2A–D). Further, we showed that Cav-1 plays a role in regulating ROS after cell detachment through PI3K/Akt pathway. Considering the fact that Cav-1 was shown to reduce overtimes after cell detachment and this reduction was associated with the increase of cancer cell

adhesion (Fig. 1B), at later time the metastatic cells may adhere and form secondary tumors. Also, Cav-1 was shown to reduce anoikis response that allows cancer cells expressing high Cav-1 to survive for long time and adhered to the distant sites (Fig. 5).

Although activated status of Akt was shown to be regulated by several mechanisms, several cancer-related studies suggested that PTEN play a dominant role in attenuating Akt functions [32–33]. Indeed, phosphatase activity of PTEN turns phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP₃), an activator of Akt, into PIP₂, resulting in Akt suppression [32]. In the present study, PTEN expression was found in the caveolin-1 rich domains and was down-regulated in such a cell compartment in the Cav-1-overexpressed cells (Fig. 4B). In contrast, the level of PTEN was found to be increased in cytoplasmic portion of the cells. These results suggested that both Cav-1 and PTEN shared the same localization in these cells. In terms of PTEN function, we found that phosphorylated PTEN was significantly up-regulated in Cav-1-overexpressed cells, while the Cav-1-knock down cells exhibited the opposite results (Fig. 4B). Although further investigations on the underlying mechanisms that Cav-1 regulates PTEN are needed, our findings indicate that Cav-1 sustained the activity of Akt by suppressing PTEN activation.

In summary, the present study has revealed a novel finding on the cancer-endothelium regulatory effect of Cav-1 in human lung carcinoma H460 cells. This effect of Cav-1 involves its ability to

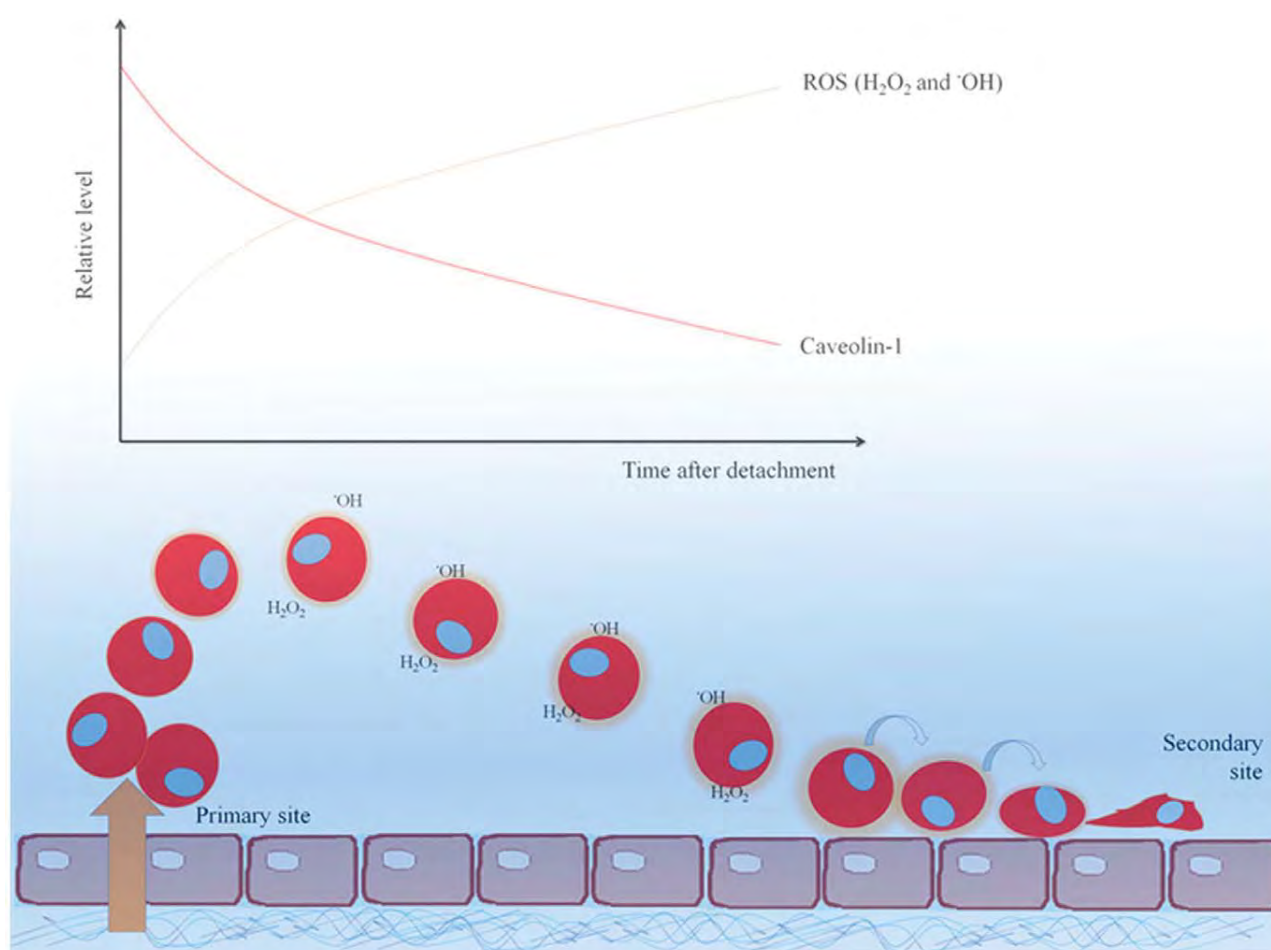


Figure 5. The scheme represents the dynamic alterations of cellular Cav-1 and ROS levels and their possible effect on cancer cell adhesion to vascular endothelium. The present study reveals that Cav-1 inhibits cancer-endothelium interaction. During detachment, the decrease of Cav-1 resulted in the increase of hydrogen peroxide and hydroxyl radical along with enhanced cancer-endothelium adhesion. doi:10.1371/journal.pone.0057466.g005

suppress hydrogen peroxide and hydroxyl radical generation by sustaining phosphorylated Akt levels. Because cancer adhesion to endothelial cells is crucial for cancer metastasis, the findings of this study could be beneficial to the understating of cancer metastasis and development of cancer therapy.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: P. Chanvorachote P. Chunhacha. Performed the experiments: P. Chanvorachote P. Chunhacha. Analyzed the data: P. Chanvorachote P. Chunhacha. Contributed reagents/materials/analysis tools: P. Chanvorachote P. Chunhacha. Wrote the paper: P. Chanvorachote P. Chunhacha.

References

- Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M (1998) Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells. *J Biol Chem* 273: 32380–32383.
- Ho CC, Kuo SH, Huang PH, Huang HY, Yang CH, et al. (2007) Caveolin-1 expression is significantly associated with drug resistance and poor prognosis in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy. *Lung Cancer* 59: 105–110.
- Tahir SA, Yang G, Ebara S, Timme TL, Satoh T, et al. (2001) Secreted caveolin-1 stimulates cell survival/clonal growth and contributes to metastasis in androgen insensitive prostate cancer. *Cancer Research* 61: 3882–3885.
- Sunaga N, Miyajima K, Suzuki M, Sato M, White MA, et al. (2004) Different Roles for Caveolin-1 in the Development of Non-Small Cell Lung Cancer versus Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research* 64: 4277–4285.
- Sloan EK, Stanley KL, Anderson RL (2004) Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis. *Oncogene* 23(47): 7893.
- Rungtabnapa P, Nimmannit U, Halim H, Rojanasakul Y, Chanvorachote P (2011) Hydrogen peroxide inhibits non-small cell lung cancer cell anoikis through the inhibition of caveolin-1 degradation. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C235–C245.
- Lloyd PG, Hardin CD (2011) Caveolae in cancer: two sides of the same coin? Focus on “Hydrogen peroxide inhibits non-small cell lung cancer cell anoikis through the inhibition of caveolin-1 degradation”. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C232–C234.
- Chanvorachote P, Nimmannit U, Lu Y, Talbott S, Jiang BH, et al. (2009) Nitric oxide regulates lung carcinoma cell anoikis through inhibition of ubiquitin-proteasomal degradation of caveolin-1. *J Biol Chem* 284: 28476–28484.
- Chunhacha P, Pongrakhananon V, Rojanasakul Y, Chanvorachote P (2012) Caveolin-1 regulates Mcl-1 stability and anoikis in lung carcinoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C1284–C1292.
- Loza-Coll MA, Perera S, Shi W, Filmus J (2005) A transient increase in the activity of Src-family kinases induced by cell detachment delays anoikis intestinal epithelial cells. *Oncogene* 24: 1727–1737.
- Luanpitpong S, Talbott SJ, Rojanasakul Y, Nimmannit U, Pongrakhananon V, et al. (2010) Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1. *J Biol Chem* 285: 38832–38840.
- Halim H, Luanpitpong S, Chanvorachote P (2012) Acquisition of anoikis resistance up-regulates caveolin-1 expression in human non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Res* 32: 1649–1658.

13. Suchaoin W, Chanvorachote P (2012) Caveolin-1 attenuates hydrogen peroxide induced oxidative damage to lung carcinoma cells. *Anticancer Res* 32: 483–490.
14. Tozawa K, Sakurada S, Kohri K, Okamoto T (1995) Effects of anti-nuclear factor κ B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells *Cancer Research* 55: 4162–4167.
15. Kobayashi K, Matsumoto S, Morishima T, Kawabe T, Okamoto T (2000) Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. *Cancer Research* 60: 3978–3984.
16. Li L, Ren CH, Tahir SA, Ren C, Thompson TC (2003) Caveolin-1 Maintains Activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biol* 23: 9389–9404.
17. Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR (2000) Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 20: 5010–5018.
18. Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, et al. (2001) Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 412: 822–826.
19. Kobayashi H, Boelte KC, Lin PC (2007) Endothelial cell adhesion molecules and cancer progression. *Curr Med Chem* 14: 377–386.
20. Williams TM, Lisanti MP (2005) Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: 494–506.
21. Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M (2002) Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 21: 2365–2375.
22. Fra AM, Masserini M, Palestini P, Sonnino S, Simons K (1995) A photoreactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21-caveolin on the cell surface. *FEBS Lett* 375: 11–14.
23. Frisch SM, Francis H (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124: 619–626.
24. Frisch SM, Screaton RA (2001) Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13: 555–562.
25. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, Sessa WC (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6448–6453.
26. Hampton MB, Orrenius S (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 414: 552–556.
27. Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70.
28. Hileman OE, Liu J, Albitar M, Keating MJ, Huang P (2004) Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity. *Cancer Chemother Pharmacol* 53: 209–219.
29. Suzuki K, Eguchi H, Koh YH, Park YS, Taniguchi N (1999) Acceleration of adhesion of cancer cells and neutrophils to endothelial cells in the absence of de novo protein synthesis: possible implication for involvement of hydroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 214–217.
30. Chen Q, Massagué J (2012) Molecular pathways: vcam-1 as a potential therapeutic target in metastasis. *Clin Cancer Res* 18: 5520–5525.
31. Newham P, Craig SE, Seddon GN, Schofield NR, Rees A, et al. (1997) Alpha4 integrin binding interfaces on VCAM-1 and MAdCAM-1. Integrin binding footprints identify accessory binding sites that play a role in integrin specificity. *J Biol Chem* 272: 19429–19440.
32. Georgescu MM (2010) PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* 1(12): 1170–1177.
33. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF (2008) The PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 8(3): 187–198.

Sub-toxic Cisplatin Mediates Anoikis Resistance through Hydrogen Peroxide-induced Caveolin-1 Up-regulation in Non-small Cell Lung Cancer Cells

THITIPORN SONGSERM, VARISA PONGRAKHANANON and PITHI CHANVORACHOTE

*Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand*

Abstract. *Background:* Exposure to inadequate chemotherapy may alter cancer cell behavior including their metastatic potential. Because the molecular basis of such a phenomenon is largely unclear, we investigated the possible impact of cisplatin on anoikis response on human lung carcinoma cells. *Materials and Methods:* Using molecular and pharmacological tools, Caveolin-1 (CAV1) overexpressing and knock-down H460 cells were generated by stable transfection. The levels of CAV1 were determined by western blotting and reactive oxygen species (ROS) were detected by specific probes. *Results:* Sub-toxic concentrations of cisplatin suppressed anoikis response in H460 cells. The anoikis attenuation observed, was found to be caused by CAV1 up-regulation. Exposure to cisplatin induced superoxide anion and hydrogen peroxide generation; however, only hydrogen peroxide was found to be responsible for the CAV1 elevation. *Conclusion:* Exposure to cisplatin at sub-toxic concentrations induced hydrogen peroxide generation and the subsequent increase of ROS further regulated CAV1 levels and anoikis resistance. Our findings demonstrate a novel effect of cisplatin treatment on cancer cells which may lead to a better understanding of cancer biology and in the improvement of chemotherapy.

Among various chemotherapeutic agents, cisplatin [cis-diamminechloroplatinum (II)] has been used and recognized as a potent effective drug for treatment of various solid tumors including ovarian, bladder, cervical, and lung cancer (1-4). Unfortunately, in some patients, the cancer relapses (5, 6) and acquires resistance to chemotherapy (7-10), or metastasis occurs (11). An effort has been made in

determining the possible mechanisms regarding the control of tumor relapse and drug resistance. Studies have reported that cancer resists cisplatin through the induction of intracellular antioxidant activities, the attenuation of drug uptake, the alteration of drug detoxification and the increase of drug efflux (12-15). However, the mechanisms facilitating cancer metastasis are still largely unknown.

Cancer metastasis is a multi-step process involving cell invasion, dissemination and migration, by which the survival of the detached cells in circulation is an important step in determining the fate of metastatic cancer. Anoikis is a cellular mechanism of detachment-induced apoptosis, inhibiting cancer cells from successful metastasis; tolerance to this mechanism facilitates cancer cell survival during systemic circulation and the formation of secondary tumor distant sites (16-19). Several molecular signaling molecules have been found to regulate anoikis mechanism including caveolin-1 (CAV1) (20). CAV1, a 21-24 kDa structural protein in the plasma membrane, has been shown to be involved in cancer progression as a tumor promoter protein (21, 22). The elevation of CAV1 in several types of cancer, including lung, breast, prostate, and pancreatic cancer was strongly associated with the metastatic potential of cancer (23-27). It has been reported that CAV1 enhances anchorage-independent growth of non-small cell lung cancer cells, a crucial mechanism which provides survival of metastatic cancer cells (20).

Reactive oxygen species (ROS), namely superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical, have been shown to regulate several cellular behaviors (28-31). The aggressiveness of cancer, such as invasion, migration and resistance to detachment-induced apoptosis has been reported to be tightly associated with the oxidative status of cancer cells (32-34). Recently, we showed that hydrogen peroxide produced during cell detachment plays a role in rendering lung carcinoma cells resistant to anoikis (20). Interestingly, the mechanism of hydrogen peroxide-mediated anoikis resistance was found to involve the up-regulation of the cellular protein CAV1.

Correspondence to: Pithi Chanvorachote, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phatumwan, Bangkok, Thailand 10330. Tel: +66 812075039, e-mail: pithi_chan@yahoo.com; pithi.c@chula.ac.th

Key Words: Cisplatin, caveolin-1, hydrogen peroxide, anoikis, H460, lung cancer cells.

Cisplatin treatment resulted in an induction of cellular oxidative stress leading to cell apoptosis (35-38). However, whether or not the sub-toxic concentrations of this drug affect the cellular ROS production and the cell behavior is largely unknown. It remains to be further investigated whether the sub-toxic cisplatin treatment could have an effect in facilitating cancer cell metastasis by making cells resistant to anoikis. Using pharmacological approaches, we investigated the effect of cisplatin exposure on anoikis resistance in H460 non-small cell lung cancer cells.

Materials and Methods

Cells and reagents. H460 Human lung carcinoma cells were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were cultured in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mmol/L L-glutamine, and 100 units/ml penicillin/streptomycin in a 5% CO₂ environment at 37°C. Cisplatin, N-acetylcysteine (NAC), reduced glutathione (GSH), sodium pyruvate, catalase, Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin chloride (MnTBAP), deferoxamine (DFO), hydrogen peroxide (H₂O₂), ferrous sulfate (FeSO₄), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA), propidium iodide (PI) and Hoechst 33342 were obtained from Sigma Chemical, Inc. (St. Louis, MO, USA). Dihydroethidium (DHE) and 3'-(p-hydroxyphenyl) fluorescein (HPF) were purchased from Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA). Resazurin was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). A specific antibody for CAV1 and a peroxidase-conjugated secondary antibody were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA), and a specific antibody for β -actin was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Plasmids and transfection. CAV1 plasmids were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), and CAV1 knockdown shRNACAV1 plasmids were purchased from Santa Cruz Biotechnology. CAV1 overexpressing (H460/CAV1) and CAV1 knockdown (H460/shCAV1) cells were established by transfection of the H460 cells with CAV1 overexpressing or CAV1 knockdown shRNACAV1, respectively, according to the manufacturer's instructions. Briefly, H460 cells at 60% confluence were incubated with 15 μ l of Lipofectamine 2000 reagent and 2 μ g of CAV1 or shRNA-CAV1 plasmids. After 16 h, the medium was replaced with culture medium containing 10% fetal bovine serum. Approximately two days after the beginning of the transfection, the single-cell suspensions were plated onto 75-ml culture flasks and were cultured for 60 days with antibiotic selection. The expression of CAV1 protein in the transfectants was quantified by western blot analysis.

Cytotoxicity assay. Cells were seeded in 96-well plates and allowed to attach for 24 h. After specific treatments, cells were incubated with 1:50 resazurin for 1 h at 37°C. Fluorescence intensity of resazurin product (resorufin) was measured at 530 nm (excitation wavelength) and at 590 nm (emission wavelength) using a microplate reader. Cell viability was calculated as a percentage relative to that of non-treated cells. All analyses were performed for at least three independent replicate experiments.

Apoptosis and necrosis assay. Apoptotic and necrotic cell death was evaluated by Hoechst 33342 and PI co-staining. After specific treatments, cells were incubated with 10 μ M of Hoechst 33342 and

5 μ g/ml PI dye for 30 min at 37°C. Apoptotic cells having condensed chromatin, fragmented nuclei and PI-positive necrotic cells were visualized and scored under a fluorescence microscope (Nikon Inverted Microscope Eclipse Ti-U).

Anoikis assay. H460 cells were seeded in 6-well plates and treated with different concentrations (0-1 μ M) of cisplatin for 24 h. Adherent cells were then detached and seeded in 6-well ultra low-attached plates in RPMI medium at a density of 40,000 cells/well. Suspended cells were incubated under normal culturing condition at 37°C for different times up to 24 h. Cells were harvested, washed and incubated with 1:50 resazurin for 1 h at 37°C, and the fluorescence intensity of the resazurin product (resorufin) was measured at 530 nm (excitation wavelength) and at 590 nm (emission wavelength) using a microplate reader. Relative cell viability was calculated as a percentage relative to that of non-treated cells. All analyses were performed for at least three independent replicate cultures.

ROS detection. Intracellular ROS were determined using the fluorescent probe DCFH₂-DA, superoxide anion was determined by DHE, and hydroxyl radical was determined by HPF. Cells were incubated with 10 μ M of DCFH₂-DA, HPF, or DHE for 30 min at 4°C, after which they were washed and were immediately analyzed for fluorescence intensity by a fluorescence microplate reader (SpectraMax M5; Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA) using a 480-nm excitation beam and a 530-nm bandpass filter for detecting DCF fluorescence, or a 490-nm excitation beam and a 515-nm band-pass filter for HPF, or by using a 488-nm excitation beam and a 610-nm band-pass filter for DHE, and were visualized under fluorescence microscopy (Nikon Inverted Microscopy Eclipse Ti-U).

Western blot analysis. After specific treatments, the cells were incubated in a lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% TritonX-100, 150 mM sodium chloride, 10% glycerol, 1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a commercial protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) for 30 min on ice. Cell lysates were collected and determined for protein content using the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal amounts of proteins from each sample (40 μ g) were denatured by heating at 95°C for 5 min with Laemmli loading buffer and were subsequently loaded onto 10% SDS polyacrylamide gel for electrophoresis (PAGE). After separation, the proteins were transferred onto 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The then membranes were blocked for 1 h in 5% nonfat dry milk in TBST [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 0.05% Tween 20] and were incubated with the appropriate primary antibodies at 4°C overnight. Membranes were washed twice with TBST for 10 min and were incubated with horseradish peroxidase-coupled isotype-specific secondary antibodies to anti-CAV1 antibodies for 1 h at room temperature. The immune complexes were detected by enhanced chemiluminescence substrate (Supersignal West Pico; Pierce, Rockford, IL, USA) and were quantified using analyst/PC densitometry software (Bio-Rad).

Statistical analysis. Mean data from at least three independent experiments were normalized to the results of the non-treated controls. Statistical differences between means were determined using an analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* tests at a significance level of $p < 0.05$, and results are presented as the mean $\pm$ SD.

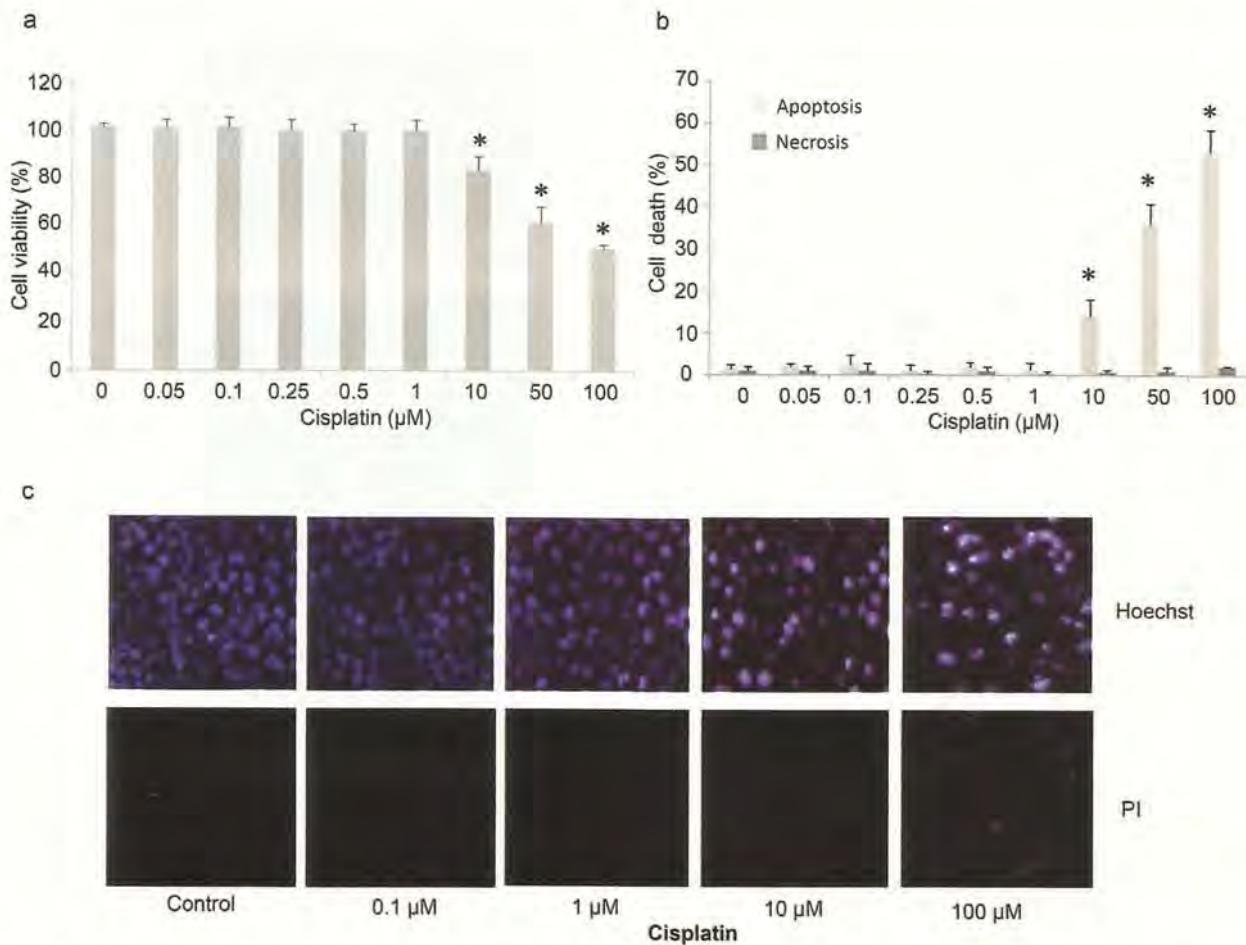


Figure 1. Cisplatin mediates cytotoxicity in lung carcinoma H460 cells. *a*: Subconfluent (90%) monolayers of H460 cells were treated with doses (0-100 μM) of cisplatin for 24 h and the cell viability was determined by the resazurin cytotoxicity assay. *b*: Apoptotic and necrotic cell death was determined by Hoechst 33342/propidium iodide (PI) staining. Values are means±S.D. (n=3); **p*<0.05 versus non-treated control. *c*: Morphology of apoptotic and necrotic cells was visualized under fluorescence microscopy.

Results

Sub-toxic concentrations of cisplatin mediate anoikis resistance in lung carcinoma cells. In order to investigate whether sub-toxic concentrations of cisplatin could play a significant role on lung cancer cell anoikis resistance, we first characterized the cisplatin-mediated cytotoxicity in H460 cells and determined the sub-toxic doses of cisplatin. Cells were seeded in 96-well plates, were treated with various concentrations of cisplatin (0-100 μM) for 24 h, and were analyzed for cell viability by the resazurin cytotoxicity assay. Figure 1a shows that no significant decrease of cell viability was detected as a response to cisplatin, in concentrations ranging from 0.05 to 1 μM, while cisplatin at the concentrations of 10, 50 and 100 μM caused significant reduction in viable cells with approximately 83,

62 and 57% of the cells remaining alive, respectively. In addition, cells were similarly treated with cisplatin as above, and apoptotic and necrotic cell death was determined by staining with Hoechst 33342 and PI. Consistent with the above finding, Hoechst-positive cells containing condensed or fragmented nuclear fluorescence were not found in the cells treated with 0-1 μM cisplatin. As the dose of drug increased to 10, 50, and 100 μM, cisplatin-mediated apoptosis increased to 15%, 37%, and 52%, in a dose-dependent manner (Figure 1b and c). In the present study, necrotic PI-positive cells were barely detected at all cisplatin concentrations.

In order to determine the effect of sub-toxic cisplatin exposure on anoikis susceptibility of the cells, H460 cells were seeded in 6-well plates, and were treated with different sub-toxic doses of cisplatin (0-1 μM) for 24 h. Cells were then

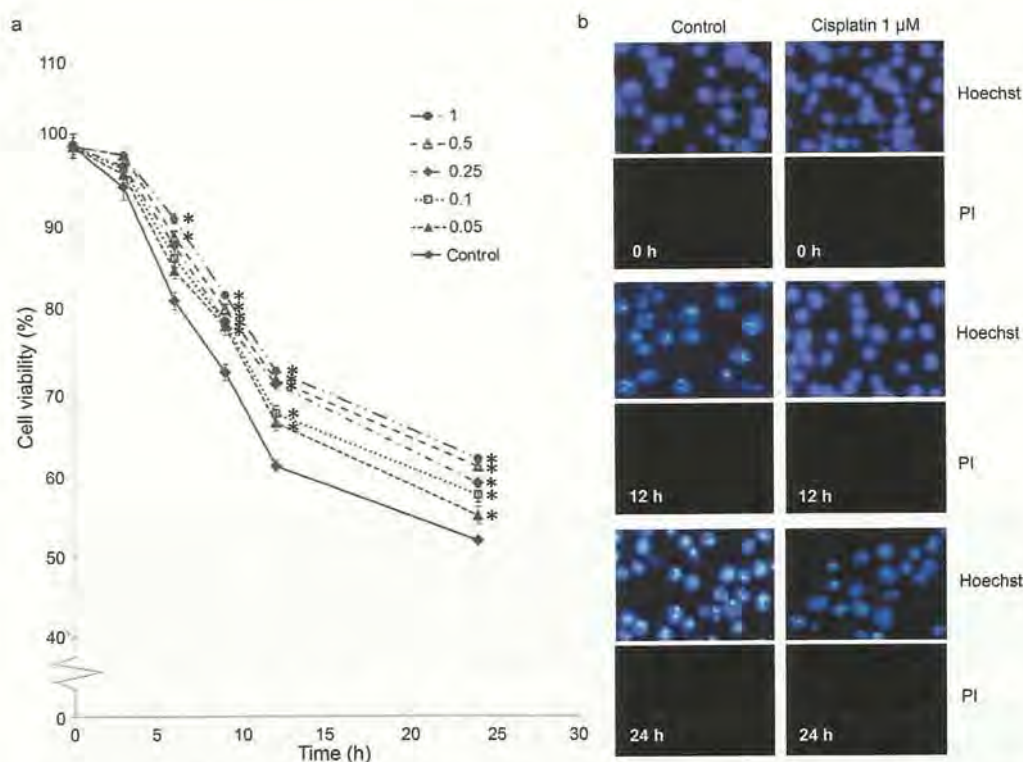


Figure 2. Sub-toxic concentrations of cisplatin attenuate anoikis susceptibility. a: Sub-confluent (90%) monolayers of H460 cells were treated with (0-1 μ M) of cisplatin for 24 h, and the cells were suspended in ultra low-attached plates for different times (0-24 h). The cell survival was determined at the indicated times by the resazurin cytotoxicity assay. The viability of cells is presented as cell viability relative to that of non-detached controls. Values are means $\pm$ S.D; (n=3); * p <0.05 versus non-treated control. b: Cells' nuclei stain with Hoechst 33342 and propidium iodide (PI) was visualized under fluorescence microscopy.

detached and incubated in ultra low-attached plates for various times (0-24 h) and cell viability was determined. Figure 2a shows that cisplatin treatment prior to cell detachment significantly rendered cells resistant to anoikis in a dose-dependent manner. Such alteration in anoikis sensitivity was apparent as early as 6 h after cell detachment, with approximately 89% and 91% of viable cells being detected in cells treated with 0.5 and 1 μ M of cisplatin respectively, in comparison to 81% of viable cells in non-treated controls (Figure 2a). Figure 2b shows the characteristic morphology of detachment-induced apoptosis and further confirms the effect of cisplatin exposure on the inhibition of H460 cells anoikis. It is worth noting that nuclear PI fluorescence was not detectable in this experiment.

CAVI mediates anoikis resistance. CAV1 has been demonstrated to regulate cancer cell aggressiveness and metastasis in various types of cancer (21, 22). In particular, our previous study indicated the role of CAV1 in the inhibition of cell anoikis resistance (20). Cells were stably transfected with CAV1, shRNACAV1, or control plasmids.

After selection and propagation, CAV1- and shCAV1-transfected cells and control cells were subjected to anoikis assay and western blot analysis as described in the Materials and Methods. Western blotting with the use of anti-CAV1 antibodies showed substantial elevation of CAV1 levels in the cells stably transfected with CAV1 plasmids, while significantly reduced CAV1 levels were detected in shCAV1-transfected cells (Figure 3a). In order to confirm the correlation of CAV1 levels and anoikis resistance, the cell viability after detachment was evaluated. Figure 3b shows that CAV1-transfected cells exhibited higher (~80%) of cell survival at 0-24 h after detachment compared with control cells (~40%), whereas cell viability of shRNACAV1-transfected cells was reduced to ~20% (Figure 3b). Hoechst33342 assay also showed an increase in nuclear fluorescence and chromatin condensation of the detached cells over time in all cells analyzed, with the highest proportion of anoikis being observed in shRNACAV1-transfected cells (Figure 3c). In contrast, no detectable change in nuclear PI fluorescence was identified during the period of detachment.

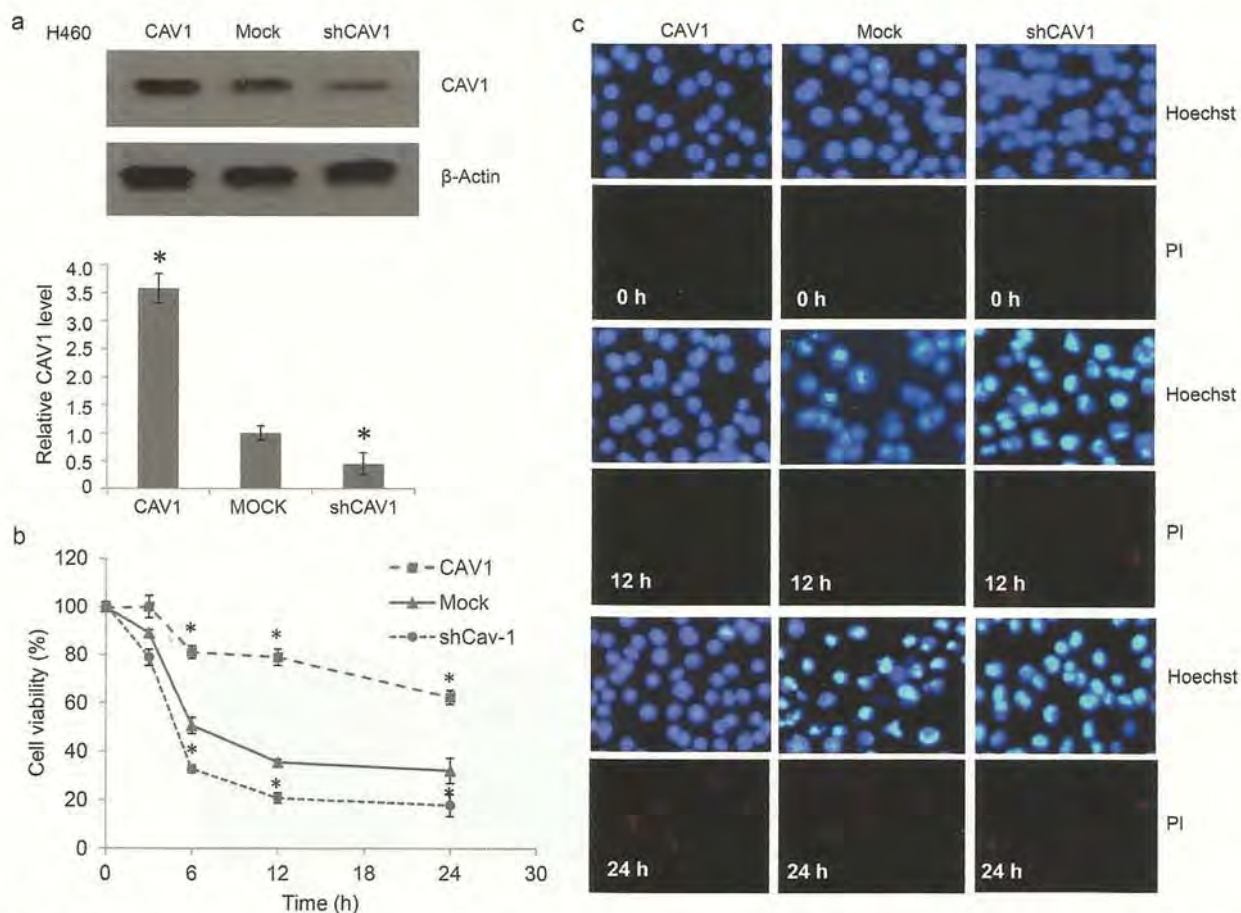


Figure 3. Caveolin-1 (CAV1) promotes anoikis resistance in H460 cells. *a*: Cells were stably transfected with mock, CAV1, or shRNACAV1 plasmids, and were analyzed for CAV1 expression levels by western blotting. Values are means $\pm$ S.D. ($n=3$); * $p<0.05$ versus control-transfected cells. *b*: Cells were detached and were suspended in ultra low-attached plates for different times (0-24 h). After the indicated times, cell survival was evaluated by the resazurin cytotoxicity assay. Values are means $\pm$ S.D. ($n=3$); * $p<0.05$ versus control-transfected cells. *c*: Apoptotic and necrotic cells were determined by Hoechst 33342 and propidium iodide (PI) staining, and visualized under fluorescence microscopy.

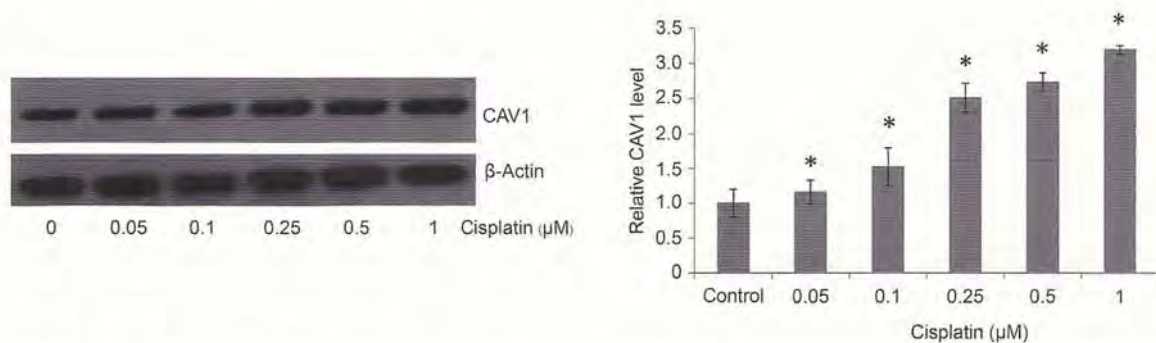


Figure 4. Sub-toxic concentrations of cisplatin induce caveolin-1 (CAV1) up-regulation. H460 cells were treated with cisplatin (0-1 μ M) for 24 h, and CAV1 expression levels were then determined by western blotting. Blots were re-probed with β -actin antibody to confirm equal sample loading. Immunoblot signals were quantified by densitometry and mean data from independent experiments were normalized to that of non-treated cells. Values are means $\pm$ S.D. ($n=3$); * $p<0.05$ versus non-treated control cells.

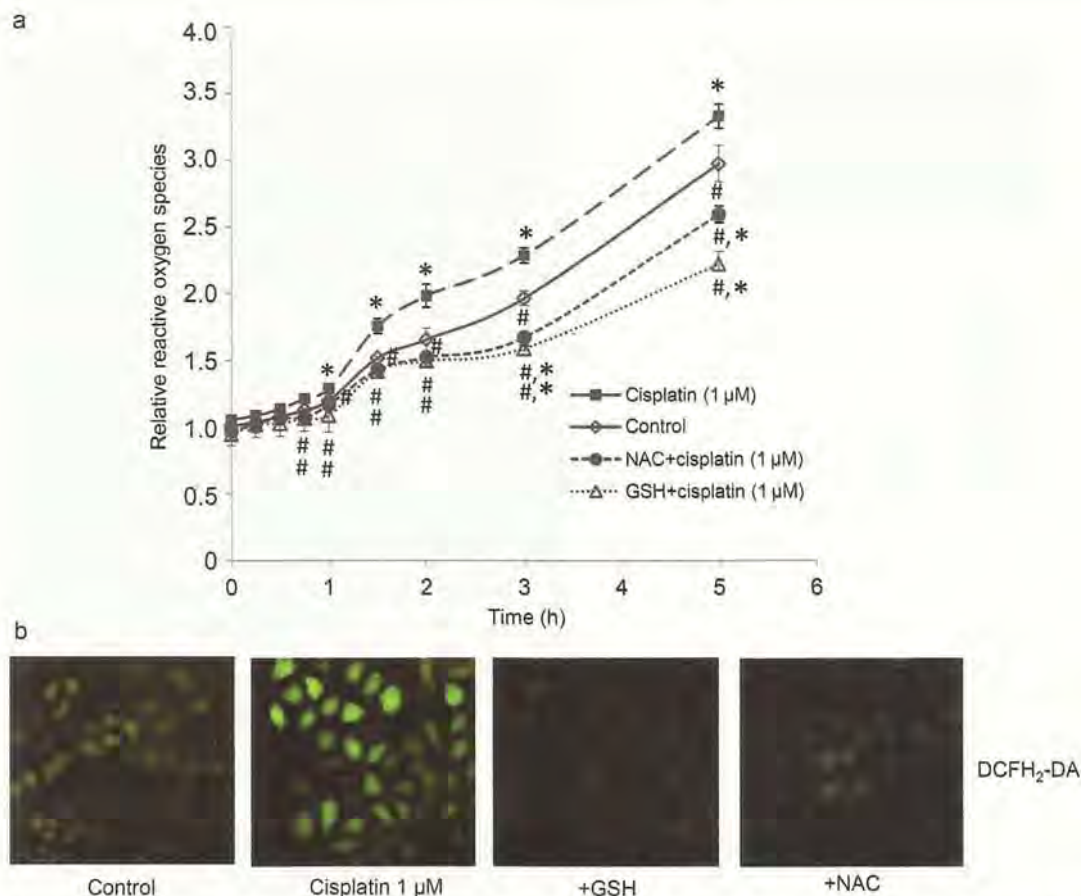


Figure 5. Sub-toxic concentrations of cisplatin induced reactive oxygen species (ROS) generation. H460 cells were pre-treated with 1 mM reduced glutathione (GSH) or 1 mM N-acetyl cysteine (NAC) for 30 min, prior to cisplatin treatment (1 μ M). After treatment with cisplatin, cells were incubated with 10 μ M of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) for 30 min. a: ROS generation was determined by a fluorescence microplate reader. Values are means $\pm$ S.D. (n=3); *p<0.05 versus non-treated controls; #p<0.05 versus cisplatin-treated cells. b: Cellular ROS signal at 3 h after cisplatin treatment was visualized under fluorescence microscopy.

Sub-toxic concentrations of cisplatin up-regulate CAV1 levels through a ROS-dependent mechanism. Having shown that CAV1 plays a crucial role in attenuating the anoikis response of H460 cells, we next determined the effect of sub-toxic cisplatin exposure on cellular CAV1 levels. Cells were treated with cisplatin (0-1 μ M) for 24 h, and its effects on the CAV1 expression was evaluated by western blot analysis. The results clearly show that cisplatin at concentrations ranging from 0.05 to 1 μ M significantly increased the CAV1 levels in a dose-dependent manner (Figure 4). These results revealed that exposure to sub-toxic cisplatin was able to elevate the CAV1 levels and subsequently the mediated anoikis resistance.

Cisplatin-induced cellular ROS generation has been widely accepted as a mechanism generated in the mode of action of cisplatin. It is very interesting to examine whether cisplatin at low concentrations, causing no cytotoxic effects, could modulate cellular ROS and affect, cell behavior. We, thus,

incubated the cells with a sub-toxic dose of cisplatin (1 μ M) and determined the intracellular ROS over time. Cells were pre-incubated with a specific ROS probe (DCFH₂-DA) for 30 min prior to cisplatin treatment. Accumulation of intracellular ROS inside these cells was evaluated by a fluorescence microplate reader and the results indicated that cisplatin did indeed cause a significant increase in ROS production in the cells as early as 1.5 h, when compared to non-treated control (Figure 5a).

In order to confirm the results of ROS induction by cisplatin, known antioxidants NAC and GSH were added to the cell cultures before cisplatin treatment. Administration of such antioxidants dramatically inhibited both base-line ROS production and cisplatin-mediated ROS up-regulation in these cells, thus confirming the effect of cisplatin on the cellular ROS profile (Figure 5b). Furthermore, we identified specific species of ROS induced by cisplatin using specific ROS probes and scavengers, and evaluated the fluorescence