

## 17-AAG 联合顺铂对人胃癌 SGC-7901 细胞株增殖和凋亡作用的影响

陈美霓<sup>1)</sup>, 郭 巍<sup>2)</sup>, 许静洪<sup>1)</sup>, 赵菊梅<sup>1)</sup>

(1) 延安大学医学院实验中心; 2) 延安大学医学院附属医院泌尿外科, 陕西 延安 716000)

**[摘要]** **目的** 探讨热休克蛋白 90 (HSP90) 抑制剂 17-AAG 联合顺铂对人胃癌细胞 SGC-7901 的抑制效应. **方法** 体外培养 SGC-7901, 采用四氮唑盐比色法测定不同浓度、不同时间 17-AAG、顺铂单药和联合处理后 SGC-7901 的生长抑制情况; 采用流式细胞术检测不同浓度 17-AAG 和顺铂单药、联合处理后对 SGC-7901 细胞的细胞周期变化及凋亡率变化. **结果** 2 种药物单用均对 SGC-7901 细胞有明显的生长抑制作用, 2 种药物联合后呈协同作用, 呈时间、剂量依赖性. 流式细胞仪细胞周期分析显示, 17-AAG 和顺铂单药处理 24 h 后, 17-AAG 阻滞 SGC-7901 细胞于 G2/M 期, 顺铂阻滞 SGC-7901 细胞于 S 期. 并都具有诱导 SGC-7901 细胞凋亡的作用, 其联合用药可显著增加 SGC-7901 的凋亡率. **结论** 17-AAG 和顺铂均可明显抑制 SGC-7901 的增殖、诱导细胞凋亡, 联合用药有一定的协同效应, 呈剂量依赖关系.

**[关键词]** HSP90; 17-AAG; 顺铂; SGC-7901; MTT 法

**[中图分类号]** R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 05 - 0054 - 04

## Effect of 17-AAG Combined with Cisplatin on Proliferation and Apoptosis of Human Gastric Cancer Cell Lines SGC-7901

CHEN Mei-ni<sup>1)</sup>, GUO Wei<sup>2)</sup>, XU Jing-hong<sup>1)</sup>, ZHAO Ju-mei<sup>1)</sup>

(1) Center of Medical Experiment, Yan'an Medical College; 2) Dept. of Urology, The Affiliated Hospital of Yan'an Medical College, Yan'an University, Yan'an Shanxi 716000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the inhibitory effect of a heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors 17-AAG combined with cisplatin on human gastric cancer cells SGC-7901. **Methods** SGC-7901 cells was cultured in vitro and treated with 17-AAG with different concentration and time, cisplatin and combined treatment, respectively. Then, the growth inhibition was determined using tetrazolium salt colorimetry (MTT assay). SGC-7901 cell cycle and apoptosis were measured with Flow cytometry. **Results** 17-AAG or cisplatin alone showed obvious growth inhibition effect on SGC-7901 cells. 17-AAG and cisplatin combination exhibited synergy, with time- and dose-dependence effect. Flow cytometric analysis of cell cycle showed that 17-AAG and cisplatin blocked SGC-7901 cells in G2/M phase and S phase after treated for 24 h, respectively. They both could induce apoptosis of SGC-7901 cells, and the combination of the two drugs could increase the apoptosis rate significantly. **Conclusion** 17-AAG and cisplatin can significantly inhibit the proliferation and induce the apoptosis of SGC-7901 cells. The combination of the two drugs may generate synergy, with dose-dependence effect.

**[Key words]** HSP90; 17-AAG; Cisplatin; SGC-7901; MTT assay

胃癌是常见恶性肿瘤, 顺铂 (cisplatin, DDP) 是治疗胃癌的常用化疗药物, 但毒副作用大、不良反应多、易耐药限制了它的临床应用. 故寻找高效低毒的抗肿瘤药物已成为当今研究热点.

17-AAG 是一种热休克蛋白 90 (HSP90) 抑制剂, HSP90 是众多热休克蛋白的一种, 是细胞内最活跃的分子伴侣蛋白之一, 在应激条件下维持细胞必需的蛋白质空间构象保护细胞生命活动, 它具

**[基金项目]** 陕西省教育厅科学研究基金资助项目 (12JK0713); 延安大学自然科学专项基金资助项目 (ydz2012-03)

**[作者简介]** 陈美霓 (1979~), 女, 陕西城固县人, 医学硕士, 实验师, 主要从事抗肿瘤药物药理研究工作.

**[通讯作者]** 赵菊梅. E-mail:360831860@qq.com

有特殊的分子伴侣功能<sup>[1,2]</sup>, 在蛋白质的聚集、折叠、装配、运输转位、降解及细胞骨架稳定等基本功能发挥着重要调节作用. Hsp90 已经成为肿瘤治疗的新靶点<sup>[3]</sup>, 近年来研究表明, 17-AAG 对多种肿瘤细胞具有抑制肿瘤细胞生长、抑制血管生成等方面作用. 本实验通过细胞体外培养, 检测 17-AAG、顺铂单药和联合用药对人胃癌 SGC-7901 细胞的抑制作用和是否有协同作用, 为胃癌临床治疗提供理论依据和实验依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验中人胃癌细胞株 SGC-7901 为购自西安交通大学医学院消化实验研究院, 由延安大学医学院中心实验室保存. 17-AAG、氮唑蓝 (MTT) 及胎牛血清购自美国 Sigma 公司, RPMI-1640 培养基购自赛默飞世尔公司.

### 1.2 方法

$$\text{细胞增殖抑制率} = \frac{\text{对照组 A 值} - \text{实验组 A 值}}{\text{对照组 A 值}} \times 100\%$$

以上实验结果重复 3 次后取平均值. 联合用药是否具有协同作用采用金正均法判断, 公式:

$$q = (Ea+b) \frac{Ea + (1-Ea)}{Eb}$$

公式中 (Ea+b) 为联合用药的抑制率, Ea, Eb 分别为 DDP 和 17-AAG 单药的抑制率.  $q=0.85 \sim 1.15$  表示两药作用相加,  $q < 0.85$  表示两药有拮抗作用,  $q > 0.85$  表示两药有协同作用.

**1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率** 取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 胰酶消化后收集细胞、离心、加培养液调整细胞浓度为  $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ , 每孔加 2 mL 单细胞悬液于 6 孔培养板内, 24 h 贴壁后弃去原培养液, 加入含药培养基, 并设对照组. 培养 48 h 后, 用胰酶消化后收集细胞, 800 rpm 离心 5 min 弃上清, 用 PBS 离心洗涤 3 次. 加 RNA 酶 50  $\mu\text{L}$  (浓度为 0.5 mg/mL), 移至恒温培养箱 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min. 加入 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的碘化丙啶 (PI) 染色液 100  $\mu\text{L}$ , 微量微量振荡器上振荡混匀, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内避光染色 30 min. 上流式细胞仪检测. 重复实验 3 次.

### 1.3 统计学处理

所得数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 各组数据比较用完全随机的方差分析, 统计学处理采用 SPSS 统计软件包,  $P < 0.05$  为差异有统计学意

**1.2.1 实验分组** (1) 空白组: 只加培养液无细胞; (2) 对照组: 不加药物只加培养液; (3) 单药实验组: 17-AAG 的浓度分别为 5、2.5、1.25、0.625、0.312  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , DDP 的浓度分别为 4、2、1、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; (4) 联合组: DDP 为单药浓度梯度, 联合 17-AAG 浓度 0.625  $\mu\text{mol}/\text{L}$ .

**1.2.2 MTT 比色法检测药物抑制效应** 收集生长良好、对数生长期的 SGC-7901 细胞, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 96 孔培养板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  单细胞悬液, 移至于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h. 实验设实验组、对照组和空白组, 每组设 5 个复孔, 每孔均为 200  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h、48 h、72 h 后每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20  $\mu\text{L}$  继续孵育 4 h, 弃孔内上清液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ , 在微量振荡器上振荡 10 ~ 15 min, 使还原产物充分溶解. 使用酶标仪测定各孔吸光度, 选择 490 nm 波长, 空白组调零, 记录对照组、实验组结果, 计算细胞增殖抑制率.

## 2 结果

### 2.1 MTT 实验结果

17-AAG、顺铂对 7901 的抑制作用 MTT 法测定结果表明, 与对照组相比, 不同浓度的 17-AAG、DDP 均对 SGC-7901 细胞作用 24 h、48 h、72 h 后均有抑制作用, SGC-7901 细胞生长抑制作用随着 17-AAG、顺铂药物浓度增加, 作用时间延长, 其产生的抑制作用越明显, 呈现出时间、剂量依赖性关系. 不同浓度组、不同时间组之间抑制率相比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1、2.

17-AAG、顺铂联合用药对 7901 的抑制作用 0.625  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 17-AAG 与不同浓度的 DDP 联合均对 SGC-7901 细胞的增殖有抑制作用, 其联合用药组抑制作用明显强于单药组 ( $P < 0.01$ ), 按照联合用药公式推算, 17-AAG 与 DDP 联合  $q$  大于 1.14, 两者之间呈协同作用, 见表 3.

### 2.2 流式细胞仪检测结果

17-AAG、顺铂单药及联合对胃癌细胞周期的细胞周期的影响 细胞周期分析结果显示, 17-AAG 以 0.625  $\mu\text{mol}/\text{L}$  浓度作用 SGC-7901 细胞 24 h 后,

能使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞减少, G<sub>2</sub>/M 期细胞增加, 表明 17-AAG 阻滞 SGC-7901 细胞于 G<sub>2</sub>/M 期. DDP 以 4.0 mg/L 浓度作用 SGC-7901 细胞 24 h 后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞下降, S 期细胞增加, 表明 DDP 阻滞 SGC-7901 细胞于 S 期. 17-AAG 联合 DDP 作用 24 h 后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期与 G<sub>2</sub>/M 期细胞下降, S 期细胞增加, 表明 17-AAG 与 DDP 联合用药使 SGC-7901 细胞阻滞于 G<sub>2</sub>/M 期和 S 期. 与对照组比较具有显著性, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 4.

17-AAG、顺铂单药及联合对胃癌细胞周期的细胞凋亡率的影响 流式细胞仪结果显示, 17-AAG 组、DDP 组及联合组作用 GC-7901 细胞 24 h 后的凋亡率分别为 4.52%、10.91%、29.88%, 均明显高于对照组 1.32%, 联合用药后, 可形成明显的凋亡峰, 显著高于单药组, 表明 17-AAG、DDP 均可以有效诱导 SGC-7901 的凋亡率, 联合用药可显著增加 SGC-7901 的凋亡率. 且各个组别的细胞凋亡率有显著差异 ( $P < 0.01$ ), 见表 4.

表 1 不同浓度的 17-AAG 对人胃癌 SGC-7901 细胞生长的抑制率 [ $(\bar{x} \pm s)$ , %]

Tab. 1 The growth inhibition ratio of SGC-7901 cells treated with 17-AAG in different concentrations [ $(\bar{x} \pm s)$ , %]

药物浓度( $\mu\text{mol/L}$ )	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
0.312 5	6.78 $\pm$ 1.84	10.24 $\pm$ 2.57	16.31 $\pm$ 2.81
0.625 0	9.49 $\pm$ 2.87	13.44 $\pm$ 3.04 <sup>△</sup>	24.97 $\pm$ 2.48
1.250 0	18.17 $\pm$ 2.65*	30.75 $\pm$ 3.12 <sup>△</sup>	39.40 $\pm$ 3.67
2.500 0	23.49 $\pm$ 3.19*	35.21 $\pm$ 3.44*	48.62 $\pm$ 2.95 <sup>△</sup>
5.000 0	33.59 $\pm$ 2.94 <sup>△</sup>	42.52 $\pm$ 3.78	65.02 $\pm$ 2.69*

各实验组与对照组比较, \* $P < 0.05$ , 同一实验组不同作用时间比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

表 2 不同浓度的顺铂对人胃癌 SGC-7901 细胞生长的抑制率 [ $(\bar{x} \pm s)$ , %]

Tab. 2 The growth inhibition ratio of SGC-7901 cells treated with cisplatin in different concentrations

[ $(\bar{x} \pm s)$ , %]

药物浓度(mg/L)	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
0.5	4.33 $\pm$ 0.56	5.99 $\pm$ 3.38	15.79 $\pm$ 2.78 <sup>△</sup>
1.0	11.03 $\pm$ 1.79 <sup>△</sup>	17.41 $\pm$ 2.65 <sup>△</sup>	47.75 $\pm$ 1.33*
2.0	14.16 $\pm$ 1.65*	39.50 $\pm$ 2.30	70.03 $\pm$ 1.78
4.0	24.80 $\pm$ 2.37	59.82 $\pm$ 3.53 <sup>△</sup>	89.18 $\pm$ 3.77*

各实验组与对照组比较, \* $P < 0.05$ , 同一实验组不同作用时间比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

表 3 17-AAG 联合顺铂对人胃癌 SGC-7901 细胞生长的抑制率 [ $(\bar{x} \pm s)$ , %]

Tab. 3 The growth inhibition ratio of SGC-7901 cells treated with 17-AAG and cisplatin combination [ $(\bar{x} \pm s)$ , %]

DDP (mg/L)	17-AAG( $\mu\text{mol/L}$ )	24 h	q	48 h	q
对照组	0	0	0	0	0
0.5	0.625	13.64 $\pm$ 2.48 <sup>△</sup>	1.38	29.35 $\pm$ 1.10	2.09
1.0	0.625	16.35 $\pm$ 1.75*	1.54	44.40 $\pm$ 2.78 <sup>△</sup>	2.79
2.0	0.625	22.27 $\pm$ 2.12*	2.03	60.62 $\pm$ 3.31*	2.81
4.0	0.625	38.65 $\pm$ 1.33 <sup>△</sup>	3.10	83.54 $\pm$ 2.99 <sup>△</sup>	2.61

各实验组与对照组比较, \* $P < 0.05$ , 同一实验组不同作用时间比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ .

表 4 17-AAG、顺铂对人胃癌 SGC-7901 凋亡率和细胞周期的影响  $[(\bar{x} \pm s), \%$ Tab. 4 Effect of 17-AAG and cisplatin on SGC-7901 cell cycle and apoptosis  $[(\bar{x} \pm s), \%$ 

组 别	凋亡率	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S 期	G <sub>2</sub> /M 期
对照组	1.32 ± 0.37	72.12 ± 2.71	12.93 ± 1.05	9.95 ± 0.86
17-AAG	4.52 ± 1.98*	64.75 ± 1.37	11.43 ± 1.69	16.53 ± 1.56
DDP	10.91 ± 1.62*	40.55 ± 2.64*	47.41 ± 1.57	9.24 ± 2.74*
17-AAG & DDP	29.88 ± 2.31*	32.37 ± 1.91	40.44 ± 2.85	7.95 ± 2.05*

与对照组比较, \* $P < 0.05$ .

### 3 讨论

中国是胃癌发病率和死亡率最高的国家之一. 化疗是治疗胃癌的重要方法. 顺铂具有较强的广谱抗癌作用, 其主要作用靶点为 DNA, 作用于 DNA 链间及链内交链, 形成 DDP ~ DNA 复合物, 干扰 DNA 复制, 或与核蛋白及胞浆蛋白结合, 最终导致癌细胞的死亡. 但其副作用大并易产生耐药性限制了顺铂的临床应用.

17-AAG 是一种 HSP90 抑制剂, 与 HSP90 的 ATP / ADP 位点特异性地结合, 使 HSP90 不能形成 HSP90 多分子伴侣复合物从而失去稳定性导致效应蛋白失活. 近年来研究表明, 17-AAG 在肺腺癌<sup>[4]</sup>、甲状腺癌<sup>[5]</sup>、胆管癌<sup>[6]</sup>及乳癌<sup>[7]</sup>等实验研究中具有抑制肿瘤细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 并在增加药物敏感性<sup>[8]</sup>、降低肿瘤耐药<sup>[9]</sup>和提高肿瘤细胞的辐射敏感性<sup>[10]</sup>等方面也发挥重要作用.

本实验通过 MTT 法检测 17-AAG 及联合用药对 SGC-7901 细胞生长、增殖的影响, 结果显示不同浓度的 17-AAG、顺铂对 SGC-7901 细胞作用 24 h、48 h、72 h 后均有抑制作用, 随着 17-AAG 药物浓度增加, 作用时间延长, 抑制作用明显增强, 呈现出时间、剂量依赖性关系. 不同浓度的顺铂与 0.625  $\mu\text{mol/L}$  的 17-AAG 联合用药组抑制作用明显强于单药组, 有显著的协同作用, 提示顺铂与低浓度的 17-AAG 联合用药时对 SGC-7901 细胞有较好的杀伤作用.

本实验通过流式细胞仪检测细胞周期和凋亡, 结果显示 17-AAG 阻滞 SGC-7901 细胞于 G<sub>2</sub>/M 期. 其机制与 17-AAG 通过抑制恶性肿瘤的 Ras/Raf/MEK/ERK 信号传导通路, 使肿瘤细胞发生 G<sub>2</sub> 期生长抑制有关. 顺铂阻滞 SGC-7901 细胞于 S 期. 其机制与顺铂干扰 DNA 复制, 抑制 DNA 合成, 使其阻滞与 S 期有关. 17-AAG 和顺铂联合用药与顺铂单药组比较, 使 SGC-7901 细胞的 G<sub>2</sub>/M 期有所下降, 说明 17-AAG 可以增加顺铂组 G<sub>2</sub>/M

期的敏感性. 17-AAG 通过构象的特异性与突变型 p53 结合, 使突变型 p53 失稳导致野生型 p53 恢复正常的转录活性<sup>[11]</sup>, 还使 Akt 发生蛋白酶体降解并使细胞中细胞色素 C 和线粒体源性的胱蛋白酶蓄积<sup>[12]</sup>, 从而诱导细胞凋亡, 发挥其抗肿瘤的作用. 本实验结果显示 17-AAG、顺铂均可诱导 SGC-7901 的凋亡, 联合用药的凋亡率均高于同一浓度单独用药的凋亡率. 表明 17-AAG 可以协同顺铂阻滞 SGC-7901 于 G<sub>2</sub>/M 期和 S 期, 并增强顺铂凋亡的途径, 发挥 17-AAG 增强顺铂的抑制 SGC-7901 细胞生长, 促进凋亡的作用.

综上所述, HSP90 抑制剂 17-AAG 作为一类新型抗肿瘤药物, 具有抑制 SGC-7901 细胞增殖和促进其凋亡的作用, 小剂量的 17-AAG 与顺铂联用还可以增强顺铂对 SGC-7901 细胞的杀伤作用, 增加顺铂的敏感性. 这为胃癌治疗联合用药提供实验依据, 为治疗胃癌提供了一条新的思路.

### [参考文献]

- [1] ZHANG H, NEELY L, LUNDGREN, et al. BIIB021, a synthetic Hsp90 inhibitor, has broad application against tumors with acquired multidrug resistance [J]. *INT J Cancer*, 2010, 126(5):1 226 - 1 234.
- [2] ZHANG, L., YI, Y., GUO, Q. et al. Hsp90 interacts with AMPK and mediates acetyl-CoA carboxylase phosphorylation [J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24 (4): 859 - 865.
- [3] SOROKA, J. WANDINGER, S. K. MAUSBACHER, N. et al. Conformational Switching of the Molecular Chaperone Hsp90 via Regulated Phosphorylation [J]. *Molecular cell*, 2012, 45(4): 517 - 528.
- [4] MIN-SHAO TSAI, SHAO-HSING WENG, HUANG-JEN CHEN, et al. Inhibition of p38 MAPK-dependent excision repair cross-complementing 1 expression decreases the DNA repair capacity to sensitize lung cancer cells to etoposide [J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2012, 11 (3): 561 - 571.
- [5] 王任飞, 谭建, 李玮, 等. 17-AAG 对转染 NIS 基因的未分化甲状腺癌摄碘动力学的影响 [J]. *中华核医学与分*

(下转第 64 页)