

· 基础研究 ·

## Flavopiridol 通过调节 CDK4/CDK6/cyclinD1 复合物表达抑制肝癌细胞增殖

车宇芳<sup>1</sup>, 叶飞<sup>2</sup>, 张泳<sup>2</sup>, 姜泊<sup>3</sup>, 吴本俨<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>解放军总医院南楼临床部消化内科, 北京 100853; <sup>2</sup>美国西奈山医学院, 纽约 10029; <sup>3</sup>南方医科大学附属南方医院消化内科, 广州 510515)

**【摘要】**目的 研究 flavopiridol 对肝癌细胞 Huh7 增殖、凋亡和细胞周期的影响。方法 Flavopiridol 处理 Huh7 细胞后, 检测细胞增殖和凋亡, 进行细胞周期分析。Western blot 检测 flavopiridol 对 CDK4/CDK6/cyclinD1 复合物表达的影响。结果 Flavopiridol 可显著抑制 Huh7 细胞增殖; Flavopiridol 可剂量依赖性导致 Huh7 细胞发生凋亡, 空白对照组凋亡细胞 2.65%, 550nmol/L 剂量处理组凋亡细胞 14.17%; Flavopiridol 可剂量依赖性引起 Huh7 细胞 G1 期阻滞, 空白对照组 G1 期细胞 51.06%, 550nmol/L 剂量处理组 G1 期细胞 57.53%; Flavopiridol 可抑制 Huh7 细胞 G1 期相关的蛋白细胞周期素依赖激酶 (CDK) 4, CDK6, 细胞周期素 D1 (cyclinD1) 的表达。结论 Flavopiridol 通过抑制肝癌细胞 G1 期 CDK4/CDK6/cyclinD1 蛋白复合物表达, 引起细胞 G1 期阻滞并发生凋亡, 从而抑制细胞增殖。

**【关键词】** flavopiridol; 周期素依赖激酶 4; 周期素依赖激酶 6; 细胞周期素 D1; 肝癌细胞; 增殖

**【中图分类号】** R57

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2012.00094

## Flavopiridol inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation via regulating expression of CDK4/CDK6/cyclinD1 complex

CHE Yufang<sup>1</sup>, YE Fei<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup>, JIANG Bo<sup>1</sup>, WU Benyan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Geriatric Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China; <sup>2</sup>Mount Sinai School of Medicine, New York 10029, USA; <sup>3</sup>Nanfeng Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effects of flavopiridol on growth, cell apoptosis, and cell cycle of hepatocellular carcinoma cell(HCC) Huh7. **Methods** Huh7 cells were treated with flavopiridol, then cell proliferation, cell apoptosis and cell cycle were assessed. Protein expression of CDK4/CDK6/cyclinD1 complex was determined by western blot. **Results** Flavopiridol inhibited Huh7 cell growth. Flavopiridol induced dose-dependent cell apoptosis in Huh7 cells. Percentage of apoptotic cells increased from 2.65% in control cells to 14.17% in flavopiridol treating(550nmol/L) cells. Flavopiridol significantly blocked Huh7 cell cycle at G1 phase and percentages of cell arrested at G1 phase increased from 51.06% in control cells to 57.53% in cells treated with 550 nmol/L of flavopiridol. Flavopiridol can inhibit protein expressions of CDK4, CDK6 and cyclinD1 in Huh7 cells. **Conclusion** Flavopiridol inhibits cell proliferation through regulating expressions of G1 phase protein complex CDK4/CDK6/cyclinD1, which lead to G1 phase arrest and apoptosis in HCC cells.

**【Key words】** flavopiridol; CDK4; CDK6; cyclinD1; hepatocellular carcinoma cell; proliferation

肝癌是成人最常见的一种肝脏恶性疾病, 是目前世界上第五常见的实体肿瘤疾病, 并且高居癌症死亡的第三位<sup>[1]</sup>。尽管临床上有众多的肝癌治疗方法, 包括肝脏移植、外科切除、局部治疗, 但是仍有 >70% 肝癌患者的预后不是很理想<sup>[2]</sup>。几乎 85% 肝癌患者在确诊时已经不能进行根治性治疗, 而只能给予保守治疗, 比如肝动脉插管化疗、射频治疗、化

疗等<sup>[3]</sup>。耐受性好、效率高的治疗方法将是未来肝癌治疗发展的新方向<sup>[4]</sup>。

在肿瘤细胞中, 细胞周期素依赖激酶 (cyclin dependent kinase, CDK) 功能的失调是一种常见的现象。鉴于这种原因, 影响 CDK 表达的化合物 flavopiridol 和其他一些新兴化学合成物得到了很好的发展<sup>[5]</sup>。Flavopiridol 是来源于 *Amoora rohituka* 和 *Dysoxylum*

*binectariferum*根茎的一种半合成黄酮类物质<sup>[6]</sup>,它可以有效抑制人癌细胞株中CDK1、CDK2、CDK4、CDK7的表达,并且引起一系列细胞毒性,导致细胞周期G1-S和G2-M期阻滞<sup>[7,8]</sup>。最近,flavopiridol对慢性淋巴细胞白血病治疗已经进入了II期临床试验<sup>[9,10]</sup>,但是关于其在肝癌治疗方面的报道却很少。本次研究目的在于了解flavopiridol是否可以影响肝癌细胞的增殖、凋亡和细胞周期,从而为其将来应用于肝癌治疗奠定生物学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要实验材料和试剂

细胞培养试剂DMEM细胞培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素双抗均购自Invitrogen公司;flavopiridol购自Sigma-Aldrich公司;CDK4抗体,CDK6抗体,cyclinD1抗体, $\alpha$ -tubulin抗体购自Santa Cruz公司;羊抗兔和羊抗鼠HRP抗体购自Bio-Rad公司;BCA蛋白检测试剂盒购自Pierce公司;细胞计数试剂盒购自碧云天生物公司;细胞周期试剂盒购自凯基生物公司;TACS<sup>TM</sup> Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自R&D公司;蛋白提取液购自Sigma公司;Super Signal<sup>R</sup> West Pico Trial化学发光检测试剂盒购于Pierce公司,细胞培养孔板均购自Corning公司;其余化学试剂均为国产分析纯和生物化学试剂。

### 1.2 细胞培养

肝癌Huh7细胞株购自ATCC细胞库,为南方医院消化病研究所细胞培养室保存。细胞株37℃,5% CO<sub>2</sub>培养于含有10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基中。

### 1.3 细胞增殖分析

96孔板每孔加入Huh7细胞2000个/100 $\mu$ l,培养过夜后,给予flavopiridol 150, 250, 350, 450, 550nmol/L进行处理,分别孵育24, 48h后,每孔加入10 $\mu$ l CCK-8溶液,在细胞培养箱内继续孵育1h,450nm测定吸光度。实验设置3个复孔。

### 1.4 细胞凋亡分析

6孔板种植Huh7细胞,培养过夜后使得细胞融合度达到30%~50%,给予flavopiridol 150, 350, 550nmol/L,处理24h后收集细胞,PBS离心洗涤2次,弃去上清,将细胞沉淀悬于200 $\mu$ l Annexin-V-Fluorescein标记液中,并转移到流式细胞仪试管中,室温下避光孵育15min,流式细胞仪收集细胞。运用CellQuest Program进行细胞凋亡分析,实验重复3次。

### 1.5 细胞周期分析

6孔板种植Huh7细胞,培养过夜后使细胞融合度

达到30%~50%,给予flavopiridol 150, 350, 550nmol/L,处理24h后收集细胞,PBS离心洗涤2次,弃去上清,于细胞沉淀中加入200 $\mu$ l碘化丙啶溶液混匀,室温下避光孵育30min;利用流式细胞仪进行样品收集,运用CellQuest Program进行细胞周期分布的分析,实验重复3个复孔。

## 1.6 Western-blot检测

1.6.1 细胞总蛋白的提取和定量 对Huh7细胞分别给予flavopiridol 150, 350, 550nmol/L剂量处理,处理后提取细胞蛋白;应用BCA法测定蛋白浓度。

1.6.2 Western-blot检测 5%脱脂奶粉/TBS-T稀释 $\alpha$ -tubulin抗体(1:1000)、cyclinD1抗体(1:500)、CDK4抗体(1:500)、CDK6抗体(1:500),与PVDF膜4℃孵育过夜,TBS洗涤3 $\times$ 3min,TBS-T洗涤2 $\times$ 3min。加入相应二抗,与PVDF膜室温孵育1h,TBS-T洗涤3 $\times$ 5min,TBS洗涤3 $\times$ 8min。SuperSignal<sup>R</sup> West Pico Trial化学发光检测试剂盒进行蛋白信号的检测。

## 1.7 统计学处理

所有结果均经SPSS12.0统计软件统计。细胞增殖、凋亡、周期实验采用单向方差分析方法进行比较,方差不齐时用Welch校正。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Flavopiridol对Huh7细胞增殖的影响

Flavopiridol 150, 250, 350, 450, 550nmol/L处理Huh7细胞24h和48h后,结果显示,随着flavopiridol处理剂量的增加,细胞数目逐渐减少;处理24h和48h不同剂量组间差异均有统计学意义( $P < 0.001$ ),说明flavopiridol可以显著抑制Huh7细胞增殖(图1)。

### 2.2 Flavopiridol促Huh7细胞凋亡的作用

Flavopiridol 150, 350, 550nmol/L处理Huh7细胞24h后,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果表明,flavopiridol可以引起Huh7细胞发生凋亡,凋亡细胞从空白对照组的2.65%升高到550nmol/L剂量处理组的14.17%( $P < 0.01$ ;图2)。

### 2.3 Flavopiridol对Huh7细胞周期的作用

Flavopiridol 150, 350, 550nmol/L处理Huh7细胞24h后,流式细胞仪检测细胞周期分布情况,结果表明,flavopiridol可以引起Huh7细胞G1期阻滞,G1细胞从空白对照组51.06%升高到550nmol/L剂量处理组的57.53%( $P < 0.01$ ;图3)。

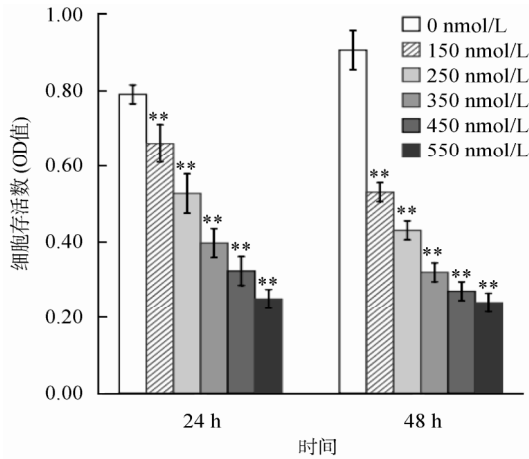


图1 不同浓度 flavopiridol 处理 Huh7 细胞不同时间点后对细胞增殖率的影响

Figure 1 Huh 7 cells viability after flavopiridol treatments at different concentration and time points with 0 nmol/L flavopiridol group compared, \*\* $P < 0.01$

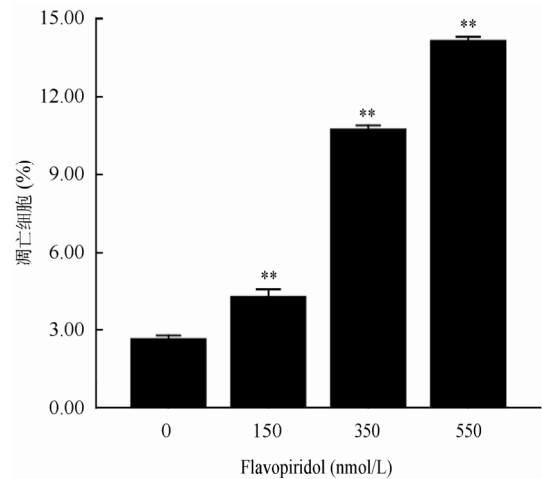


图2 不同浓度 flavopiridol 处理 Huh7 细胞 24h 后细胞凋亡情况

Figure 2 Huh7 cells apoptosis after flavopiridol treatment at different concentration with 0 nmol/L flavopiridol group compared, \*\* $P < 0.01$

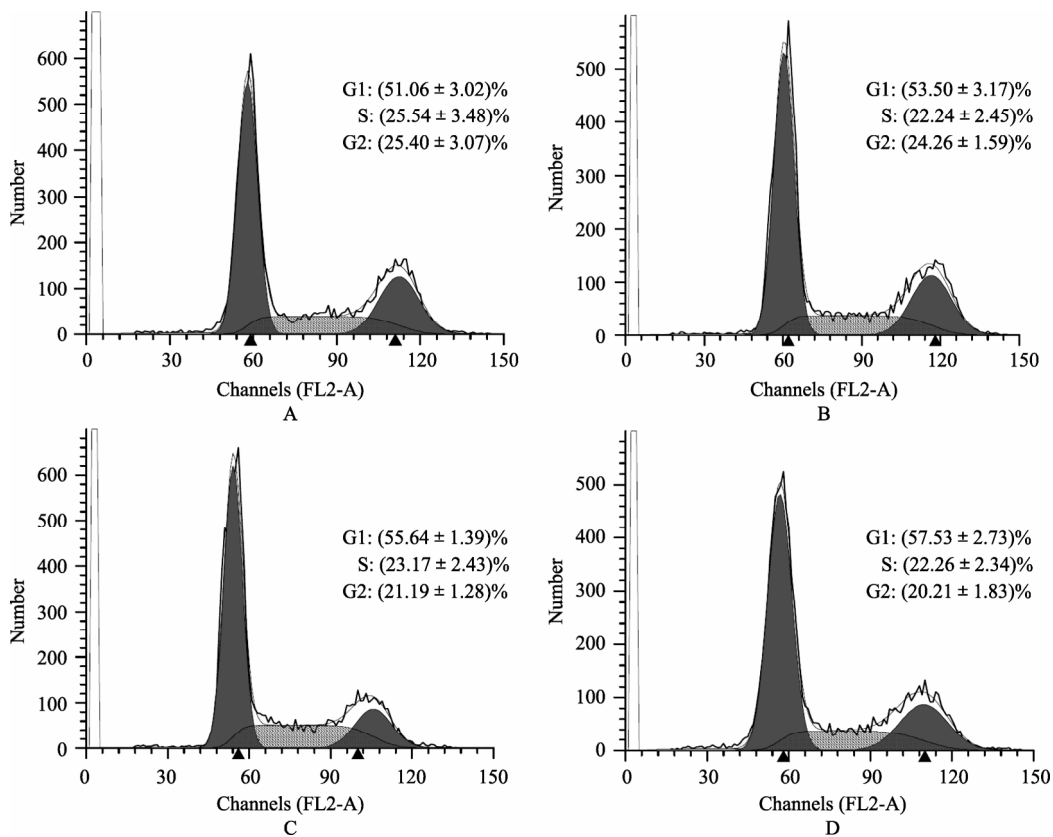


图3 不同浓度 flavopiridol 处理 Huh7 细胞 24h 后的细胞周期分布情况

Figure 3 Cell cycle distribution of Huh7 cells after flavopiridol treatment at different concentration A: 空白对照组; B: 150nmol/L flavopiridol 组; C: 350nmol/L flavopiridol 组; D: 550nmol/L flavopiridol 组

#### 2.4 Flavopiridol 抑制细胞 CDK4, CDK6 和 cyclinD1 表达

Flavopiridol 150, 350, 550nmol/L 处理 Huh7 细胞后收集细胞, 提取蛋白, Western blot 方法检测 CDK4、CDK6 和 cyclinD1 的表达情况。结果表明, flavopiridol 可抑制 CDK4, CDK6 和 cyclinD1 表达, 并且呈现剂量依赖效应, 表明 flavopiridol 可能是通过下

调 CDK4, CDK6 和 cyclinD1 表达而引起细胞 G1 期阻滞, 从而抑制 Huh7 细胞增殖 (图 4)。

### 3 讨论

肝癌是最常见的癌症之一, 每年大约有 50 万到 100 万患者死于肝癌<sup>[11]</sup>。虽然外科手术切除和肝脏移植被视为根治性的治疗方法, 但是 80%肝癌

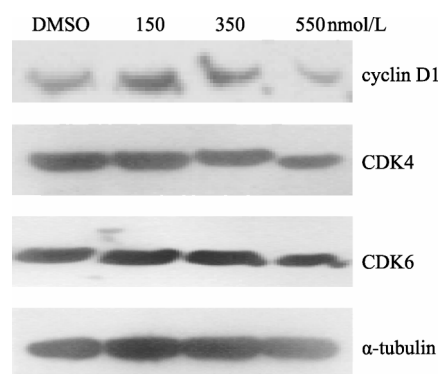


图4 不同浓度 flavopiridol 处理 Huh7 细胞 24h 后 CDK4, CDK6, cyclinD1 的表达

Figure 4 Protein level of CDK4, CDK6 and cyclinD1 in Huh 7 cells after flavopiridol treatment at different concentration

患者在确诊时病灶已经扩散,不能进行外科治疗<sup>[12]</sup>。所以,进行有效的化疗,是提高肝癌患者预后的重要方法之一;而研发新的、有效的化疗药物将是未来肝癌治疗发展的方向。

Flavopiridol,是一种半合成黄酮类物质,可以在许多人类癌细胞株中引起细胞G1-S期和G2-M期阻滞,在慢性淋巴细胞白血病治疗方面已经进入了II期临床实验<sup>[7-10]</sup>。但是,对于flavopiridol是否可以应用于肝癌患者的治疗仍不是很清楚。在本研究中,应用flavopiridol处理Huh7细胞,观察其对细胞生物学特性的影响,可为未来肝癌治疗提供新的方向。

本次研究提示,应用 flavopiridol 处理 Huh7 细胞株,可剂量依赖性抑制肝癌细胞增殖;细胞凋亡和周期检测显示,flavopiridol 处理 Huh7 细胞后,可显著引起细胞凋亡和细胞周期 G1 期阻滞,这与近来 flavopiridol 可引起细胞凋亡和 G1 期阻滞的研究一致<sup>[13,14]</sup>;另外,在 flavopiridol 处理 Huh7 细胞后,我们进行了细胞周期 G1 期相关蛋白 CDK4, CDK6 和 cyclinD1 表达检测,结果发现,flavopiridol 可以抑制 CDK4, CDK6, cyclinD1 的蛋白表达。

总之,本研究证明,flavopiridol 可能通过抑制肝癌细胞 CDK4/CDK6/cyclinD1 复合物表达水平,引起细胞 G1 期阻滞,同时促进细胞凋亡,从而抑制了肝癌细胞的增殖。未来可以将 flavopiridol 应用于肝癌患者治疗的生物学研究当中,进而为肝癌治疗提供新的发展方向。

【参考文献】

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.

[2] Thomas MB, Jaffe D, Choti MM, et al. Hepatocellular carcinoma: consensus recommendations of the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(25): 3994-4005.

[3] Hagymási K, Tulassay Z. New possibilities of targeted therapy in the treatment of hepatocellular carcinoma with the help of molecular biology[J]. Orv Hetil, 2010, 151(43): 1763-1768.

[4] Simonetti RG, Liberati A, Angiolini C, et al. Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials[J]. Ann Oncol, 1997, 8(2):117-136.

[5] Rizzolio F, Tuccinardi T, Caligiuri I, et al. CDK inhibitors: from the bench to clinical trials[J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(3): 279-290.

[6] Klasa RJ, List AF, Cheson BD. Rational approaches to design of therapeutics targeting molecular markers[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2001, 2001(1): 443-462.

[7] Litz J, Carlson P, Warshamana-Greene GS, et al. Flavopiridol potently induces small cell lung cancer apoptosis during S phase in a manner that involves early mitochondrial dysfunction[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(12): 4586-4594.

[8] Jiang J, Matranga CB, Cai D, et al. Flavopiridol-induced apoptosis during S phase requires E2F-1 and inhibition of cyclin A-dependent kinase activity[J]. Cancer Res, 2003, 63(21): 7410-7422.

[9] Shah MA, Kortmansky J, Motwani M, et al. A phase I clinical trial of the sequential combination of irinotecan followed by flavopiridol[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(10): 3836-3845.

[10] Thomas SL. New agents in chronic lymphocytic leukemia[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2010, 5(1): 29-34.

[11] Befeler AS, Di Bisceglie AM. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment[J]. Gastroenterology, 2002, 122(6): 1609-1619.

[12] Lin TY, Lee CS, Chen KM, et al. Role of surgery in the treatment of primary carcinoma of the liver: a 31-year experience[J]. Br J Surg, 1987, 74(9): 839-842.

[13] Gomez LA, de Las Pozas A, Perez-Stable C. Sequential combination of flavopiridol and docetaxel reduces the levels of X-linked inhibitor of apoptosis and AKT proteins and stimulates apoptosis in human LNCaP prostate cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(5): 1216-1226.

[14] Zhai S, Senderowicz AM, Sausville EA, et al. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development[J]. Ann Pharmacother, 2002, 36 (5): 905-911.

(编辑:任开环)