

文章编号:1000-5404(2013)07-0627-03

论著

## HSP90 抑制剂 17-DMAG 调控胰腺癌细胞 PANC-1 增殖及凋亡的初步研究

赖明广,姚君,王立生 (518020 广东深圳,暨南大学第二临床医学院消化内科)

**[摘要]** **目的** 探讨热休克蛋白 90 (HSP90) 功能特异性抑制剂 17-DMAG 对胰腺癌细胞 PANC-1 增殖与凋亡的影响。**方法** 体外培养胰腺癌细胞 PANC-1, 17-DMAG 处理 PANC-1 细胞后, CCK8 法测定细胞生长曲线, 观察细胞增殖的抑制情况, 流式细胞仪测定细胞凋亡率的变化, Jc-1 染色检测线粒体膜电位变化, RT-PCR 法测定 17-DMAG 处理 PANC-1 细胞前后 Bcl-2、Bax 表达变化。**结果** 17-DMAG 处理组 24 h 时  $D(490)$  值较对照组差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 48、72 h 后较对照组  $D(490)$  值分别减少  $(18.3 \pm 2.4)\%$ 、 $(21.5 \pm 3.2)\%$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。17-DMAG 处理组 48 h 时较对照组能显著地抑制 PANC-1 细胞增殖 ( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率  $[(22.4 \pm 2.4)\%]$  较对照组  $[(4.2 \pm 1.7)\%]$  显著增加 ( $P < 0.05$ ); 线粒体电位显著降低 ( $P < 0.05$ )。RT-PCR 结果显示, 17-DMAG 处理组抑制 Bcl-2 的表达, 促进 Bax 的表达。**结论** 17-DMAG 可抑制胰腺癌细胞 PANC-1 增殖并诱导其凋亡, 该效应可能是通过调控凋亡相关蛋白 Bcl-2 家族成员的表达实现。

**[关键词]** 17-DMAG; 增殖; 凋亡; PANC-1

**[中图分类号]** R73-361; R735.9; R979.14

**[文献标志码]** A

## Heat shock protein 90 inhibitor, 17-DMAG, suppresses proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells *in vitro*

Lai Mingguang, Yao Jun, Wang Lisheng (Department of Gastroenterology, Second Clinical College, Jinan University, Shenzhen, Guangdong Province, 518020, China)

**[Abstract]** **Objective** To determine the effect of 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-DMAG), a specific inhibitor of heat shock protein 90 (HSP90), on the proliferation and apoptosis in pancreatic cancer cell line PANC-1. **Methods** After PANC-1 cells were treated with 17-DMAG at the final dose of 500 nmol/mL, CCK8 assay was used to plot cell growth curve. Flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis. JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit was applied to detect mitochondrial membrane potential. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to detect the mRNA expression of Bcl-2 and Bax. **Results** 17-DMAG treatment for 24 h resulted in no significant difference in cell growth in PANC-1 cells ( $P > 0.05$ ), but when the treatment was prolonged to 48 and 72 h, the growth was decreased by  $(18.3 \pm 2.4)\%$  and  $(21.5 \pm 3.2)\%$ , respectively ( $P < 0.05$ ). After 17-DMAG treatment for 48 h, the proliferation was obviously inhibited in 17-DMAG group than in control group ( $P < 0.05$ ), with its apoptotic rate significantly higher  $[(22.4 \pm 2.4)\% \text{ vs } (4.2 \pm 1.7)\%, P < 0.05]$ , and the mitochondrial membrane potential significantly decreased ( $P < 0.05$ ). 17-DMAG down-regulated the mRNA level of Bcl-2, and consequently up-regulated that of Bax in PANC-1 cells. **Conclusion** 17-DMAG inhibits the proliferation and induces the apoptosis in PANC-1 cells by regulating apoptosis-related protein Bcl-2 family.

**[Key words]** 17-DMAG; proliferation; apoptosis; PANC-1

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (10151802001000002). Corresponding author: Wang Lisheng, Tel: 86-755-25533018-3322, E-mail: wangls168@163.com

**[基金项目]** 广东省自然科学基金(10151802001000002)

**[通信作者]** 王立生, 电话: (0755) 25533018-3322, E-mail: wangls168@163.com

**[优先出版]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130115.1727.006.html> (2013-01-15)

热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)是一组高度保守的分子伴侣,参与细胞内多种蛋白的折叠、装配及运转,对于保护蛋白质的正确空间结构、防止其意外降解和保护蛋白质功能方面有重要意义<sup>[1]</sup>。HSP90的底物蛋白很多,多涉及肿瘤的发生、发展过程,与肿瘤的侵袭也有相关性<sup>[2-3]</sup>。HSP90抑制剂17-DMAG(17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy geldanamycin)是一种水溶性的格尔德霉素(geldanamycin, GA)半合成衍生物,能够特异性地作用于HSP90氨基端的ATP/ADP结合位点,竞争性抑制HSP90的ATP酶活性,抑制其分子伴侣的功能,使底物蛋白稳定性降低并通过泛素-蛋白酶体途径进一步降解,阻断肿瘤赖以生存的信号网络而发挥抗肿瘤效应<sup>[4]</sup>。本实验以17-DMAG作用于人胰腺癌细胞PANC-1细胞,观察其对PANC-1细胞生长增殖的影响和诱导凋亡的作用,并对其作用机制进行初步探讨,为胰腺癌的治疗提供新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞与试剂

胰腺癌细胞系PANC-1细胞购于上海细胞库。RPMI1640培养基、无血清RPMI1640培养基自美国Hyclone公司,胎牛血清购自杭州四季青公司。PCR引物及探针采用TaqMan<sup>®</sup> MiRNA Assays(美国Ambion公司),RT-PCR试剂盒购自大连宝生物,碘化丙啶和膜联蛋白-V(Annexin V-PI)双染荧光标记凋亡试剂盒购自美国罗氏公司,JC-1线粒体膜电位检测试剂盒购自上海英骏生物技术公司。17-DMAG购自Sigma公司,CCK8试剂盒购自碧云天生物技术公司。

### 1.2 主要仪器

Beckman高速低温离心机,流式细胞仪(Beckman Coulter EpicsXL-4),GeneAmp 9700 PCR仪(美国ABI公司),Prism 7500型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。酶标仪,美国微量紫外/可见分光光度计,ImageReader LAS-4000发光成像分析仪。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞培养 PANC-1细胞在含10%灭活新生牛血清的RPMI1640完全培养液中,置37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,2~3d传代1次。17-DMAG处理组加入终浓度为500nmol/mL的17-DMAG,对照组不加17-DMAG。

1.3.2 CCK8比色法检测细胞增殖 在96孔板中加入100μL 2.5×10<sup>7</sup>/L的各组细胞悬液,将培养板在培养箱预培养(37℃,5%CO<sub>2</sub>的条件下)。分别于培养24、48、72h每孔加入10μL的CCK8溶液,再将培养板在培养箱内孵育2h,用酶标仪490nm处检测吸光度[D(490)]。每组设6个复孔,实验重复3次。抑制率=[1-实验组D(490)值/对照组D(490)值]×100%。

1.3.3 AnnexinV-PI双染流式细胞仪检测凋亡细胞 培养48h后,收集17-DMAG处理组和对照组细胞,PBS清洗后用预冷的75%的乙醇固定过夜,离心去上清,加入PBS清洗后加入RNase,室温避光保存,加入5μL,50μg/mL的PI,室温避光30min,上机检测细胞凋亡率。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP) 培养48h后,收集17-DMAG处理组和对照组细胞,按照试剂盒说明书以JC-1于37℃染色20min,流式细胞仪分析。

1.3.5 RT-PCR 引物由上海生工公司合成,Bax引物:正义链:5'-CCTTTTGCTTCAGGGTTTCAT-3',反义链:5'-AGTCTGTGTCACGGCG-3',PCR产物长度为188bp;Bcl-2正义链:5'-GTGGGATACTGGAGATGAAGACT-3',反义链:5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3',PCR产物长度为550bp;GAPDH正义链:5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCT-3',反义链:5'-CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC-3',PCR产物长度为864bp。

1.3.6 RT-PCR检测Bcl-2/Bax的表达 培养48h后,收集17-DMAG处理组和对照组细胞,Trizol试剂提取细胞总RNA,用5μg总RNA合成单链cDNA,RT-PCR扩增,反应结束后取产物用20g/L琼脂糖凝胶电泳,自动凝胶成像系统拍照。

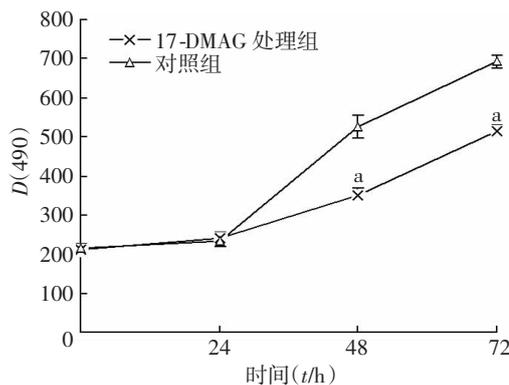
### 1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计软件,组间的比较采用独立样本t检验,多组之间的两两比较采用单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 17-DMAG对胰腺癌细胞生长的抑制作用

使用17-DMAG处理PANC-1细胞后,24h时17-DMAG处理组D(490)值与对照组比较,差异无统计学意义(P>0.05),而48、72h后17-DMAG组较对照组D(490)值分别减少(18.3±2.4)%、(21.5±3.2)%,差异具有统计学意义(P<0.05)。提示17-DMAG处理24h时PANC-1细胞增殖未受到显著影响,48、72h后细胞增殖则被显著抑制(P<0.05,图1)。



a: P<0.05, 与对照组比较

图1 17-DMAG对PANC-1细胞的增殖的影响

## 2.2 流式细胞术检测 PANC-1 细胞的凋亡

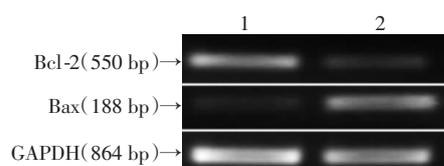
检测结果显示,经血清饥饿 48 h 诱导凋亡后 17-DMAG 处理组细胞凋亡率为  $(22.4 \pm 2.4)\%$ , 而对照组凋亡率为  $(4.2 \pm 1.7)\%$ , 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 17-DMAG 可显著诱导 PANC-1 细胞早期凋亡。

## 2.3 JC-1 染色流式细胞术线粒体膜电位的改变

17-DMAG 处理 48 h 后, PANC-1 细胞线粒体膜电位较对照组显著降低 [ $(4.30 \pm 1.12)$  vs  $(12.88 \pm 2.37)$ ,  $P < 0.05$ ]。

## 2.4 RT-PCR 检测 17-DMAG 对 Bcl-2/Bax mRNA 表达的影响

与对照组比较, 17-DMAG 处理 48 h 后 Bcl-2 表达下降 [ $(0.984 \pm 0.041)$  vs  $(0.356 \pm 0.099)$ ,  $P < 0.05$ ], Bax 表达上升 [ $(0.984 \pm 0.089)$  vs  $(6.040 \pm 1.006)$ ,  $P < 0.05$ , 图 2]。



1: 对照组; 2: 17-DMAG 处理组

图 2 17-DMAG 对 PANC-1 细胞凋亡相关基因表达的影响

## 3 讨论

17-DMAG 作为新型的 HSP90 靶向抑制剂, 目前已经进入了 II 期临床试验, 对多种肿瘤具有抗肿瘤活性<sup>[5]</sup>。目前其对胰腺癌的抗肿瘤效应的研究开展较少。为了观察其对胰腺癌的抗肿瘤效应, 将 17-DMAG 处理胰腺癌细胞, 发现 PANC-1 细胞的增殖受到显著抑制 ( $P < 0.05$ ), 提示 17-DMAG 可通过抑制胰腺癌细胞增殖而发挥抗肿瘤效应。为了分析 17-DMAG 的抗肿瘤效应是否与诱导胰腺癌细胞凋亡有关, 在血清饥饿条件下观察 PANC-1 细胞的凋亡情况。流式细胞术结果提示 17-DMAG 可使 PANC-1 细胞对血清饥饿诱导的凋亡明显增加 ( $P < 0.05$ )。线粒体通路是肿瘤细胞主要的凋亡通路之一。而代表线粒体功能改变的早期指标是线粒体膜电位, 大多数凋亡信号通过诱导线粒体膜通透性转运通道开放或线粒体肿胀导致线粒体膜电位下降, 并通过多种信号途径直接或间接地激活半胱天冬酶导致细胞凋亡<sup>[6]</sup>。为了进一步阐明 17-DMAG 诱导凋亡的分子机制, 本研究检测了 17-DMAG 对线粒体膜电位的影响, 结果提示 17-DMAG 可使得 PANC-1 细胞线粒体膜电位降低、凋亡率显著增加。

Bcl-2 蛋白家族成员是影响线粒体外膜通透性而导致线粒体膜电位改变的最重要调节蛋白<sup>[7]</sup>。Bcl-2 家族包括抑凋亡和促凋亡两大类: 前者包括 Bcl-2、Bcl-2xL 等, 后者包括 bax、bid 等<sup>[8]</sup>。Bcl-2 可与 Bax 形成稳定的异源二聚体而抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。因此, 我们推测 17-DMAG 的促凋亡效应可能与调控 Bcl-2 家族成员的表达而影响线粒体膜电位相关。RT-PCR 结果提示 17-DMAG 处理 PANC-1 细胞后, Bcl-2 mRNA 表达下降, Bax 的表达升高。这提示 17-DMAG 可通过调控 Bcl-2 家族成员的表达来影响线粒体膜电位而诱导胰腺癌细胞凋亡。

本研究证明 17-DMAG 可通过诱导胰腺癌细胞早期凋亡、抑制细胞增殖而发挥抗肿瘤效应, 该效应可通过调控凋亡相关蛋白 Bcl-2 家族成员的表达而实现。本研究为靶向抑制剂 HSP90 治疗胰腺癌提供了新的理论依据。

## 参考文献:

- [1] McClellan A J, Xia Y, Deutschbauer A M, et al. Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches[J]. Cell, 2007, 131(1): 121-135.
- [2] Wang R E. Targeting heat shock proteins 70/90 and proteasome for cancer therapy[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(27): 4250-4264.
- [3] 邓华瑜, 罗红霞, 范维珂. HSP90 表达对乳腺癌细胞侵袭转移能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(5): 458-460.
- [4] Didelot C, Lanneau D, Brunet M, et al. Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins [J]. Curr Med Chem, 2007, 14(27): 2839-2847.
- [5] Robles A I, Wright M H, Gandhi B, et al. Schedule-dependent synergy between the heat shock protein 90 inhibitor 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin and doxorubicin restores apoptosis to p53-mutant lymphoma cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(21): 6547-6556.
- [6] Wang C, Youle R J. The role of mitochondria in apoptosis[J]. Annu Rev Genet, 2009, 43: 95-118.
- [7] Reed J C. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(8): 1378-1386.
- [8] Estaquier J, Vallette F, Vayssières J L, et al. The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 942: 157-183.
- [9] Low I C, Kang J, Pervaiz S. Bcl-2: a prime regulator of mitochondrial redox metabolism in cancer cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(12): 2975-2987.

(收稿: 2012-11-10; 修回: 2012-12-31)

(编辑 王红)