

CDK 抑制剂 SNS-032 联合 AD55-Apoptin 对肝癌细胞 Huh-7 的体外抗癌作用

孙笑竹,吕春伟,秦云,韩建翠,王毅刚

(浙江理工大学生命科学学院,杭州 310018)

摘要:通过 CDK 抑制剂 SNS-032 联合 AD55-Apoptin 处理肝癌 Huh-7 细胞,以探究两者联合作用的体外抗癌作用。采用 MTT 法分别检测 SNS-032、AD55-Apoptin 以及 SNS-032 与 AD55-Apoptin 联合对肝癌细胞株 Huh-7 生长的抑制作用;利用 Hoechst33342 染色观察所处理细胞的凋亡形态学变化,采用流式细胞术对凋亡进行量化,Western Blot 检测凋亡相关蛋白表达情况。结果表明:10MOI 的 AD55-Apoptin 联合 100ng/mL 的 SNS-032 处理 96h 后,Huh-7 细胞的存活率仅为 4%,而 10 MOI 的 AD55-Apoptin 和 100ng/mL SNS-032 分别单独处理后细胞存活率为 60%和 8%($P<0.05$);Hoechst33342 染色、流式检测及 Western Blot 结果表明,联合处理组细胞凋亡现象更明显。实验结果证明 SNS-032 联合 AD55-Apoptin 能有效的抑制肝癌细胞 Huh-7 生长,并诱导其凋亡。

关键词:CDK 抑制剂(SNS-032);AD55-Apoptin;肝癌;体外;抗癌作用

中图分类号:Q26 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-3851(2016)02-0290-07 **引用页码:**030704

0 引言

抗肿瘤研究的难点是如何找到一种治疗手段,在杀伤癌症细胞的同时,对正常组织产生的影响尽量小。然而,常用的放化疗手段都会对正常机体产生很大的毒副作用,因此,新的治疗手段成为癌症治疗方向的研究热门^[1]。近年来,中科院刘新垣院士提出的肿瘤的靶向基因-病毒治疗策略(cancer targeting gene-viro-therapy)已经成为一个研究热点^[2]。该课题组利用基因工程技术,对 5 型腺病毒进行改造,得到的病毒称作 ZD55^[3-4]。本课题所使用的病毒由 Zhang 等提供,其将 ZD55 的 E1A 区启动子改造为肝癌特异性启动子甲胎蛋白启动子 AFP,并由其启动插在 E1B 处外源基因 Apoptin 的表达,成为产物 AD·AFP·E1A·E1B(△55)·Apoptin,改造后的病毒简称为 AD55-Apoptin。体内实验及体外实验结果均表明,携带抑癌基因的重组腺病毒 AD55-Apoptin 具有更高的抗肿瘤效应和更低的毒副作用。

Apoptin 是一种可以特异性诱导肿瘤细胞凋亡而对正常细胞不产生影响的蛋白^[5],其通过在细胞中定位不同来诱导细胞凋亡。Apoptin 蛋白主要定位于肿瘤细胞的细胞核中,正常细胞的细胞质中^[6]。Apoptin 可不依赖于 p53 基因诱导肿瘤细胞凋亡^[7],并且其诱导肿瘤细胞的凋亡不受 Bcl-2 家族影响,而是受线粒体释放的细胞色素 c 和激活的 caspase-3 和 caspase-7 影响^[8],有研究认为该机制是通过调节鞘磷脂-神经酰胺的作用来实现的^[9]。尽管 Apoptin 诱导细胞凋亡的机制还不是完全清楚,但其自身特性和低毒性使其成为理想的肿瘤基因治疗药物^[10]。一些研究表明,Apoptin 有良好的抗癌效果和安全性^[11-14]。

SNS-032 是一种对细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶(CDK)有抑制作用的新型胺嘧啶化合物,其主要通过抑制 CDK2、7、9 发挥作用^[15]。这种化合物因其选择性抑制 Cdk2 活性及较低的蛋白结合能力而进入临床研究^[16]。在恶性血液细胞中,其通过抑制

收稿日期:2015-04-28

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LY13H080005);浙江省科技计划项目(2014C37101);浙江理工大学科研启动基金项目(14040365-J)

作者简介:孙笑竹(1989-),女,辽宁锦州人,硕士研究生,主要从事癌症的靶向基因-病毒疗法方面的研究。

通信作者:王毅刚,E-mail:ygwang@zstu.edu.cn

血小板源生长因子受体而发挥作用^[17]。SNS-032 可通过同时抑制 cFlip 和 Mcl-1 来克服 TRAIL 抗性^[18]。SNS-032 可用于多种肿瘤的治疗,包括急性粒细胞性白血病(acute myelogenous leukemia, AML)、慢性淋巴性白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)、多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)、结肠癌、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)^[19-20]等的治疗,目前该药物已处于 CLL、MM 及其转移性难治性实体瘤的 I 期临床试验阶段^[21-22]。

癌症细胞由于其代谢信号纷繁复杂且具有多基因遗传特性,因此,单一药物对其治疗效果有限,药物联用可以取得更好的治疗效果,一直是抗癌研究的热点。本课题组之前的研究表明,AD55-Apoptin 相对于 ZD55,AD55 有更好的安全性以及对肝癌不同细胞株的杀伤能力,且 SNS-032 对部分肿瘤细胞有良好的抑制生长作用,将两者联合期待达到更好的对 Huh-7 细胞的杀伤作用。本研究证明 SNS-032 联合 AD55-Apoptin,对肝癌细胞株 Huh-7 具有更强的杀伤作用,为病毒基因治疗药物与化疗药物联合治疗癌症的进一步研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

MTT、Hoechst33342 凋亡试剂购于 Sigma 公司,PVDF 膜购自 Millipore 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自上海国药,病毒 AD55-Apoptin 为本实验室所有,HEK293 细胞、肝癌 Huh-7 细胞、肝正常 L-02 细胞、肺癌 A549 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞、胰腺癌 PANC-1 细胞、结肠癌 SW620 细胞都来自于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库,Caspase-3、7、8 以及 PARP、XIAP、GAPDH 抗体均购自 CST 公司,二抗购自 Santa Cruz。蛋白胶配制相关溶液均购自碧云天公司,Thermo 超净台,DK-8D 型电热恒温水槽(上海一恒科技有限公司),XDS-1B 倒置生物显微镜(Olympus 公司),BD Accuri C6 型号的流式细胞仪(BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HEK293 细胞、Huh-7 细胞、L-02 细胞、A549 细胞、MCF-7 细胞、PANC-1 细胞、SW620 细胞用含 10%胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养,2~3 d 传代,取对数生

长期细胞进行实验。

1.2.2 AD55-Apoptin 的靶向复制能力分析

将对数生长期的肝正常细胞 L-02 及肝癌细胞 Huh-7 按 1×10^5 /孔密度接种到 24 孔板中,待细胞贴壁后加入 10MOI 鉴定好的溶瘤腺病毒 AD55-Apoptin,72h 后用移液器将细胞吹打下来,之后收集培养液与细胞于离心管中,反复冻融 3 次彻底裂解细胞,2000 r/min 离心 3min,取上清。TCID₅₀ 法测量病毒滴度。

1.2.3 AD55-Apoptin 的安全性分析

向 96 孔板中按照 5×10^3 /孔的密度接种肝正常细胞 L-02,待其贴壁后分别加入 0.1 MOI、1 MOI、10 MOI 溶瘤腺病毒 AD55-Apoptin,每组设置 6 个复孔。不加细胞组为调零组,不加 AD55-Apoptin 组为对照组,按照上述培养条件培养 96h。向每个孔中加入预先配置好的 MTT(5mg/mL)溶液 20 μ L,继续培养 4h。用真空泵小心吸去上清,每孔加入 150 μ L 的 DMSO 溶液,摇床震荡 15min,甲瓚晶体完全溶解后,利用酶标仪测 570nm 吸光值(A₅₇₀)。按照公式计算细胞存活率,重复 3 次。

1.2.4 MTT法分析不同处理组对肝癌细胞株 Huh-7 的体外抑制作用

向 96 孔板中按照 5×10^3 /孔的密度接种肝癌细胞 Huh-7,待其贴壁后分别加入不同浓度待测药物,每组设置 6 个复孔。不加细胞组为调零组,不加药物组为对照组,按照上述培养条件培养 24、48、72、96 h。向每个孔中加入预先配置好的 MTT(5 mg/mL)溶液 20 μ L,继续培养 4h。用真空泵小心吸去上清,每孔加入 150 μ L 的 DMSO 溶液,摇床震荡 15 min,甲瓚晶体完全溶解后,利用酶标仪测 570 nm 吸光值(A₅₇₀)。按照公式计算细胞存活率,重复 3 次。

1.2.5 MTT法分析不同处理组对不同肿瘤细胞系的体外抑制作用

向 96 孔板中按照 5×10^3 /孔的密度接种对数生长期的肺癌细胞 A549,乳腺癌细胞 MCF-7,胰腺癌细胞 PANC-1,结肠癌细胞 SW620,肝癌细胞 Huh-7,待其贴壁后分别加入不同浓度待测药物,每组设置 6 个复孔。不加细胞组为调零组,不加药物组为对照组,按照上述培养条件培养 24、48、72、96 h。向每个孔中加入预先配置好的 MTT(5 mg/mL)溶液 20 μ L,继续培养 4h。用真空泵小心吸去上清,每孔加入 150 μ L 的 DMSO 溶液,摇床震荡 15 min,甲瓚晶体完全溶解后,利用酶标仪测 570 nm

吸光值(A_{570})。按照公式计算细胞存活率,重复3次,计算各组对不同细胞系的抑制作用。

1.2.6 Hoechst33342 染色荧光显微镜下观察细胞形态

向24孔板中按照 1×10^5 /孔的密度接种对数生长期的 Huh-7 细胞,细胞贴壁后,加入100 ng/mL 的 SNS-032 或/和 10 MOI AD55-APOPTIN,按照上述条件培养48h后,加入5 μ L Hoechst33342 (1 mg/mL)染料,避光孵育30min,荧光显微镜下检测细胞核变化。

1.2.7 流式细胞术检测肿瘤细胞凋亡率

6孔板以 5×10^5 的密度接种 Huh-7 细胞,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养24h后,加药组加入100 ng/mL 的 SNS-032 或/和 10 MOI AD55-APOPTIN,对照组中加入等体积的 PBS,继续培养48h。之后按照凯基流式凋亡试剂盒说明书操作。

1.2.8 Western Blot 检测凋亡相关蛋白

6孔板以 5×10^5 的密度接种 Huh-7 细胞,37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养24h后,加药组加入100 ng/mL 的 SNS-032 或/和 10 MOI AD55-APOPTIN,对照组中加入等体积的 PBS,继续培养。48h后将6孔板置于冰上,吸去培养基,用预冷的 PBS 洗两次,每组加入100 μ L 含 PMSF 的 IP 裂解液,冰上静置30min,用细胞刮将其收集起来,12000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心10min,取上清,加入5 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 煮沸10min。用 BCA 试剂盒定量上述蛋白,之后每孔加入25 mg 总蛋白进行15%聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后利用半干转将蛋白转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭2h, TBST 洗膜3次,每次15min。按照说明书稀释一抗,一抗孵育过夜, TBST 洗膜3次,每次15min,加入稀释好的二抗,避光孵育2h, TBST 洗膜3次,每次15min,加入显色液,扫膜,检测目的蛋白的表达。

1.2.9 统计学处理

所有实验数据使用 Microsoft office 2007 及 Graph Pad Prism5.0 处理,以 $MEAN \pm SD$ 表示, $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结 果

2.1 AD55-Apoptin 的靶向复制能力分析

肝正常细胞株 L-02 和肝癌细胞株 Huh-7 经 10MOI 溶瘤腺病毒 AD55-Apoptin 感染72h后,收集培养液和细胞,反复冻融3次,2000r/min 离心3min

取上清,TCID₅₀ 法测病毒滴度(图1)。如图1所示,改造后的溶瘤病毒在肿瘤细胞株 Huh-7 中的复制能力远远大于在肝正常株 L-02 中的复制能力,这说明启动子 AFP 的改造可增强其对 Huh-7 细胞株的靶向性。

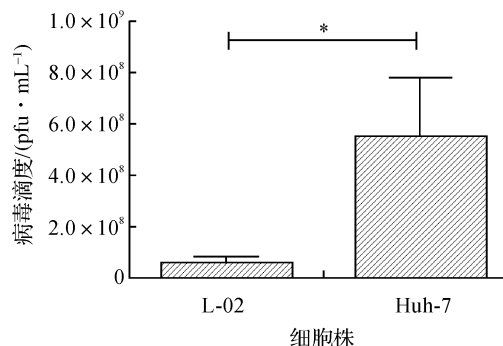


图1 AD-Apoptin 的靶向复制能力分析

2.2 AD55-Apoptin 的安全性分析

分别用 0.1、1.0、10.0 MOI AD55-Apoptin 感染 L-02 细胞或 Huh-7 细胞96h,根据测量出的 OD 值计算细胞存活率,结果如图2。图2显示,AD55-Apoptin 对肿瘤细胞株 Huh-7 的杀伤效果明显高于正常细胞株 L-02,说明其安全性良好。

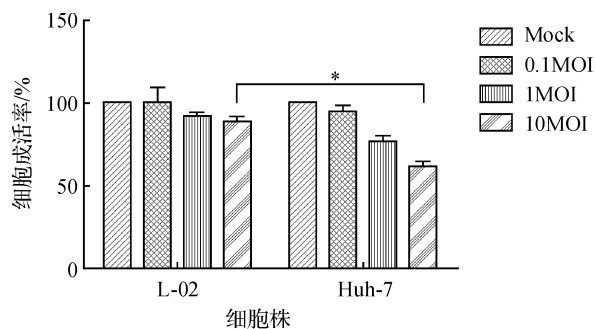


图2 AD55-Apoptin 的安全性分析

2.3 MTT 分析不同处理组对肝癌细胞株 Huh-7 的体外抑制作用

分别用 5、25、50、100 ng/mL 的 SNS-032 处理 Huh-7 细胞,48、72、96h 检测细胞存活率。分别用 0.1、1.0、10.0 MOI 的病毒感染细胞,24、48、72、96h 后测量细胞存活率。根据两者单独作用的实验结果,选用 10 MOI 的病毒与 100 ng/mL 的化疗药物 SNS-032 联合处理 Huh-7 细胞,结果如图3。图3显示, SNS-032 对肿瘤细胞的杀伤效果不是时间依赖而是剂量依赖的,选择合适的用药量, SNS-032 可明显增强 AD55-Apoptin 对肝癌细胞株 Huh-7 的杀伤作用。

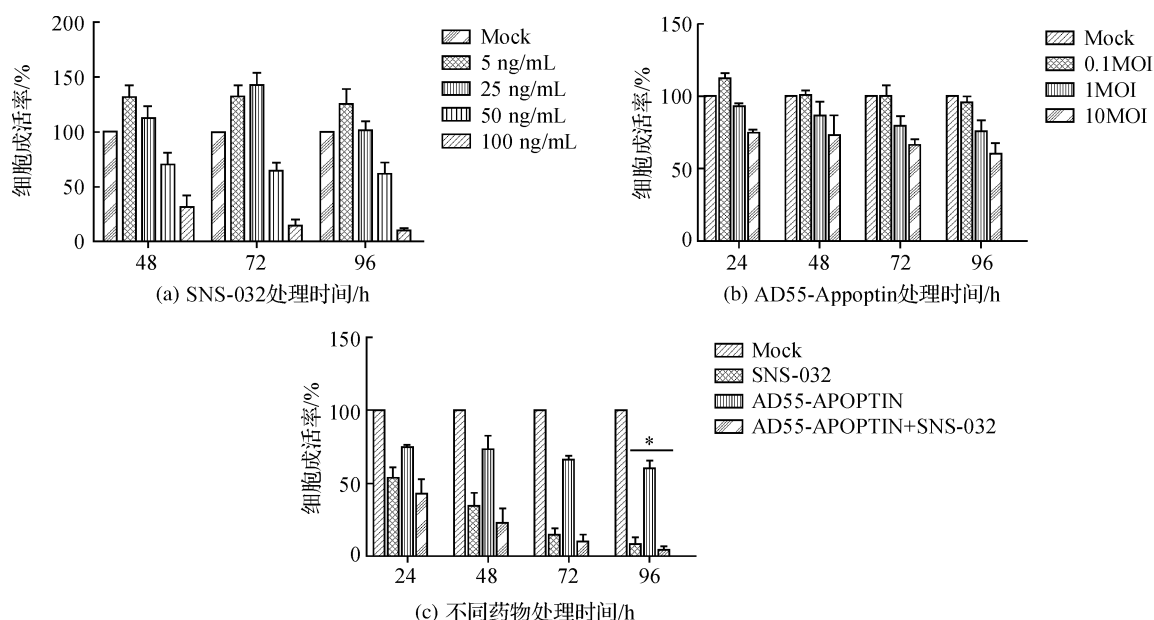


图3 MTT 分析细胞存活率

注:a)分别用浓度为 5、25、50、100 ng/mL 的 SNS-032 处理 48、72、96 h 后 Huh-7 细胞的存活率; b)分别用 0.1、1、10 MOI 的 AD55-Apoptin 处理 24、48、72、96 h 后 Huh-7 细胞的存活率;c)100 ng/mL 的 SNS-032 或/和 10 MOI 的 AD55-Apoptin 处理 24、48、72、96 h 后 Huh-7 细胞的存活率, * $P < 0.05$ 。

2.4 MTT 分析不同处理组对不同肿瘤细胞系的体外抑制作用

用 10 MOI 的病毒或/和 100 ng/mL 的化疗药物 SNS-032 联合处理肺癌细胞 A549, 乳腺癌细胞 MCF-7, 胰腺癌细胞 PANC-1, 结肠癌细胞 SW620 及 Huh-7 细胞 96 h。结果如图 4 所示, SNS-032 对不同癌细胞均可不同程度增强 AD55-Apoptin 的抗癌作用, 说明其对癌症治疗具有普遍意义。

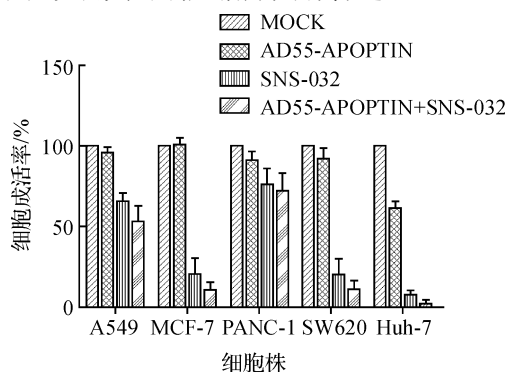


图4 特异性分析

2.5 Hoechst33342 染色观察各处理组细胞核形态

各组处理 Huh-7 细胞 48h 后, 加入 Hoechst 33342 避光染色 30 min, 之后在荧光显微镜下观察各组细胞核形态。从图 5 可以看出, 单独用药组与联合用药组的 Huh-7 细胞都有不同程度的凋亡。

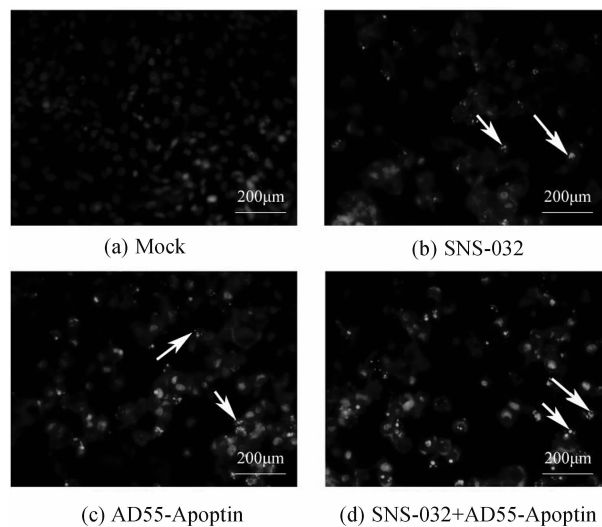


图5 Hoechst 染色检测各处理组导致的 Huh-7 细胞凋亡
注:箭头表示凋亡细胞,标尺为 200 μ m。

2.6 Annexin V/PI 法检测 Huh-7 细胞早晚期凋亡

根据凋亡检测试剂盒说明, 对 Huh-7 细胞的凋亡情况进行检测, 检测结果见图 6, 图 6(a)中右上象限与右下象限分别代表晚期凋亡与早期凋亡。将两象限显示的百分比加和即为发生凋亡的细胞比率, 见图 6(b), 结果显示, SNS-032 或 AD55-Apoptin 单独用药组凋亡率分别为 10.5% 和 19.4%, 联合用药组凋亡率为 26.3%, 与单独用药组相比有明显的提高。

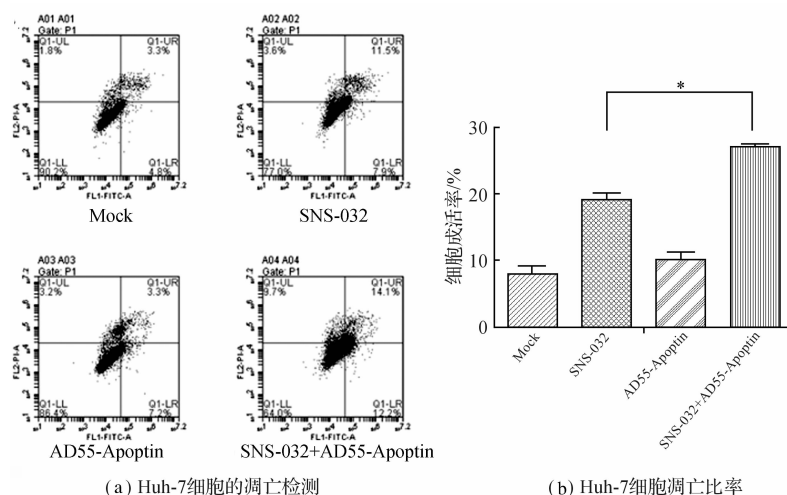


图6 流式细胞术检测 Huh-7 细胞凋亡率

2.7 Western Blot 检测凋亡相关蛋白

为进一步研究 SNS-032 联合 AD55-Apoptin 是如何在分子水平上诱导 Huh-7 细胞凋亡的,本实验检测了凋亡相关蛋白的表达水平。如图 7 所示,联合用药组 Caspase-3、8 的表达量比各单独处理组明显增加,各单独处理组 Caspase-3、8 的表达量比 Mock 组明显增加;Caspase-7 表达量与 AD55-Apoptin 单独处理变化不明显,SNS-032 单独处理组 Caspase-7 表达量与 Mock 组相差也不明显;这说明 SNS-032 主要通过增加 Caspase-8 的表达量来促进肿瘤细胞凋亡,AD55-Apoptin 主要通过增加 Caspase-7、8 的表达量来促进肿瘤细胞凋亡,二者联合使得下游 Caspase-3 表达量明显增加。此外,SNS-032 联合 AD55-Apoptin 可显著增强 PARP 前体的剪切,下调抗凋亡蛋白 XIAP 的表达量,证明联合处理组可增强 Huh-7 细胞的凋亡,且具有更好的抗癌作用。

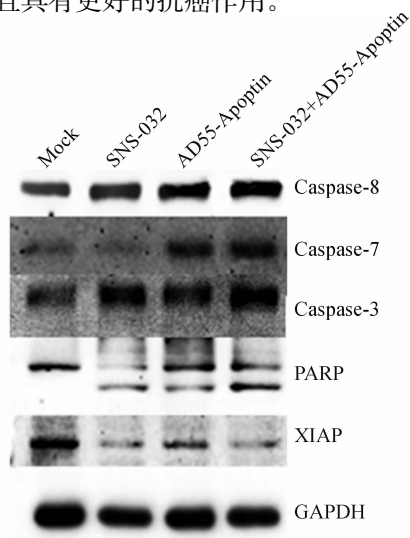


图7 Western Blot 检测凋亡相关蛋白

3 讨论

目前溶瘤病毒治疗肿瘤的研究已重视携带抗癌基因,以进一步提高其抗癌效果,并希望增强其安全性。癌症的靶向基因-病毒治疗策略是指通过生物技术手段改造病毒,增强其在肿瘤细胞内的靶向复制能力从而使肿瘤细胞裂解对其产生杀伤作用,且随着病毒的复制,其携带的抗癌基因也在肿瘤细胞内成千上万倍的复制,从而数百倍乃至上万倍提高抗癌基因的表达量^[23]。本课题所用的 AD55-Apoptin 是本课题组在 ZD55 的基础上,将其天然 E1A 的启动子改造成肝癌特异性启动子 AFP,从而提高其对肝癌的靶向性和安全性^[24],携带的抗癌基因 Apoptin,可特异性引起肿瘤细胞凋亡,而不影响正常细胞。

化疗药物治疗作为目前肿瘤治疗中最有效的疗法之一,其优点是可以透过血液循环作用于全身,对扩散到全身各处的肿瘤细胞都有作用。若肿瘤细胞对该药物敏感,则其能取得良好的疗效。但在实际应用中,发现对所有肿瘤细胞都有良好治疗效果的化疗药物并不多,很多肿瘤细胞对化疗药物敏感度不高,在这种情况下,即使加大药量,延长用药时间,治疗效果并不理想,甚至会对人体产生强烈的毒副作用^[25]。此外化疗效果有限,不能从根本上治愈且具有强烈的副作用,临床上应用的化疗药物常使癌症病人痛苦不堪。实验过程中我们观察到 SNS-032 能明显抑制 Huh-7 细胞生长并诱导其凋亡,且这种杀伤作用是剂量依赖的。

本实验利用 CDK 抑制剂 SNS-032 联合癌症的靶向基因-病毒治疗药物 AD55-Apoptin 处理肝癌细胞株 Huh-7。携带 Apoptin 基因的溶瘤腺病毒

AD55-Apoptin 具有良好的靶向肿瘤细胞的能力,良好的生物安全性,MTT 实验结果表明,联合用药对肝癌 Huh-7 细胞株的抑制作用要强于 SNS-032 或 AD55-Apoptin 单独用药,即使是对 AD55-Apoptin 不敏感的细胞株,联合用药组都在一定程度上强于单独用药组,流式结果表明 SNS-032 联合 AD55-Apoptin 可在更大程度上促进 Huh-7 细胞的凋亡。Western Blot 实验从分子水平上证明了联合处理组可增强 Huh-7 细胞的凋亡,且具有更好的抗癌作用。本实验结果证明,SNS-032 联合 AD55-Apoptin 具有更强的抗癌效果,且这种增强效应具有一定的广谱性,理论上可在降低用药剂量的同时达到相同甚至更好的效果,为病毒基因治疗药物与化疗药物联合治疗癌症奠定基础。

参考文献:

- [1] PETRELLI A, GIORGANO S. From single-to multi-target drugs in cancer therapy: when aspecificity becomes an advantage [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15(5):422-432.
- [2] LIU X Y, LI H G, ZHANG K G, et al. Strategy of cancer targeting gene-viro-therapy(CTGVT) a trend in both cancer gene therapy and cancer virotherapy[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2012, 13(9): 1761-1767.
- [3] ZHANG Z L, ZOU W G, LUO CX, et al. An armed oncolytic adenovirus system, ZD55-gene, demonstrating potent antitumoral efficacy[J]. *Cell Research*, 2003, 3(6):481-489.
- [4] 湛贺宽子, 梁天祥, 仇庆, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 SAHA 联合溶瘤腺病毒 ZD-55-IL-24 诱导 SW480 细胞凋亡[J]. *中国细胞生物学学报*, 2012, 34(1): 54-60.
- [5] ZHOU S, ZHANG M, ZHANG J, et al. Mechanisms of apoptin-induced cell death[J]. *Medical Oncology*, 2012, 29(4): 2985-2991.
- [6] 姚站馨, 吕茂民, 章金刚. Apoptin 与肿瘤细胞凋亡[J]. *生物技术通讯*, 2007, 18(3): 490-492.
- [7] ZHANG S M, SHVARTS A, ORMONDT H, et al. Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells[J]. *Cancer Research*, 1995, 55:486-489.
- [8] BUREK M, MADDIKA S, BUREK C J, et al. Apoptin-induced cell death is modulated by Bcl-2 family members and is Apaf-1 dependent[J]. *Oncogene*, 2006, 25(15): 2213-2222.
- [9] LIU X, ZEIDAN Y H, ELOJEIMY S, et al. Involvement of sphingolipids in apoptin-induced cell killing[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2006, 14(5): 627-636.
- [10] DANEN-VAN OORSCHOT A D, FISCHER D F, GRIMBERGEN J M, et al. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells[J]. *Medical Sciences*, 1997, 94:5843-5847.
- [11] LI Q, ZHANG H, TAN C, et al. AdHu5-apoptin induces G2/M arrest and apoptosis in p53-mutated human gastric cancer SGC-7901 cells [J]. *Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 2013, 34(6): 3569-3577.
- [12] QI Y, GUO H, HU N, et al. Preclinical pharmacology and toxicology study of Ad-hTERT-Ela-Apoptin, a novel dual cancer-specific oncolytic adenovirus [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 280(2): 362-369.
- [13] STEFAN G. *Advances in Experimental Medicine and Biology*[M]. London: Springer-Verlag, 2014:50-54.
- [14] KOCHNEVA G, ZONOV E, GRAZHDANTSEVA A, et al. Apoptin enhances the oncolytic properties of vaccinia virus and modifies mechanisms of tumor regression[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(22): 11269-11282.
- [15] CHEN R, CHUBB S, CHENG T, et al. Responses in mantle cell lymphoma cells to SNS-032 depend on the biological context of each cell line [J]. *Cancer Research*, 2010, 70(16): 6587-6597.
- [16] CHEN R, WILLIAM G W, SHERRI C, et al. Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia[J]. *Blood*, 2009, 113(19):4637-4645.
- [17] WU Y, CHEN C, SUN X, et al. Cyclin-dependent kinase 7/9 inhibitor SNS-032 abrogates FIP1-like-1 platelet-derived growth factor receptor alpha and bcr-abl oncogene addiction in malignant hematologic cells [J]. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 2012, 18(7): 1966-1978.
- [18] LEMKE J, VON KARSTEDT S, ABDEL H, et al. Selective CDK9 inhibition overcomes TRAIL resistance by concomitant suppression of cFlip and Mcl-1[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2014, 21(3): 491-502.

- [19] WALSBY E, LAZENBY M, PEPPER C, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 has single agent activity in AML cells and is highly synergistic with cytarabine[J]. *Leukemia*, 2011, 25(3): 411-419.
- [20] BOQUOI A, CHEN T, ENDERS G H. Chemoprevention of mouse intestinal tumorigenesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 [J]. *Cancer Prevention Research*, 2009, 2(9): 800-806.
- [21] CONROY A, STOCKETT D E, WALKER D, et al. SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2009, 64(4): 723-732.
- [22] HEATH E I, BIBLE K, MARTELL R E, et al. A phase 1 study of SNS-032 (formerly BMS-387032), a potent inhibitor of cyclin-dependent kinases 2, 7 and 9 administered as a single oral dose and weekly infusion in patients with metastatic refractory solid tumors[J]. *Investigational New Drugs*, 2008, 26(1):59-65.
- [23] RANCOURT C, CURIEL D. Conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 27(1):67-81.
- [24] ZHANG K J, QIAN J, WANG S B, et al. Targeting gene-viro-therapy with AFP driving Apoptin gene shows potent antitumor effect in hepatocarcinoma[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2012, 19(1):20-32.
- [25] 谭渊, 李喜英, 席璐, 等. 二氯乙酸钠对溶瘤腺病毒 ZD55-Smac 抑制肝癌细胞生长的影响[J]. *浙江理工大学学报*, 2010, 27(5):789-794

In-vitro Antitumor Effect of Combining CDK Inhibitor SNS-032 with AD55-Apoptin on Liver Carcinoma Cell Huh-7

SUN Xiaozhu, LÜ Chunwei, QIN Yun, HAN Jiancui, WANG Yigang

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: CDK Inhibitor SNS-032 and AD55-Apoptin were combined to treat Huh-7 to explore the in-vitro antitumor effect of the combination. MTT method was used to respectively detect inhibiting effects of SNS-032, AD55-Apoptin, the combination of SNS-032 and AD55-Apoptin on the growth of hepatoma cell line Huh7. The characteristic morphology of apoptosis cells were observed by Hoechst 33342 staining, flow cytometry was used to quantify the apoptosis, and Western Blot was used to detect the expression of apoptosis-related proteins. The results show that after treatment with the combination of 10MOI AD55-Apoptin and 100ng/mL SNS-032, the Huh-7 cell survival rate is only 4%, while in 10 MOI AD55-Apoptin and 100ng/mL SNS-032 separately treated cells, the survival rates are 60% and 8% ($P < 0.05$) respectively. Hoechst 33342 staining, flow cytometry and Western Blot demonstrate that there are more apoptotic cells in the combined group. As shown in the experimental result, the combination of SNS-032 and AD55-Apoptin can effectively inhibit the growth of hepatoma carcinoma cell Huh-7 and induce it to get apoptotic.

Key words: cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor (SNS-032); AD55-Apoptin; liver carcinoma; in vitro; antitumor effect

(责任编辑: 许惠儿)