

PHA-767491 抑制肝癌细胞生长的研究

李 伟¹, 尚世强¹, 楼金吐¹, 陈黎勤¹, 李仲杰³, 魏旭斌²

(1. 浙江大学医学院附属儿童医院中心实验室, 杭州 310003; 2. 浙江理工大学生命科学院, 杭州 310018;
3. 浙江大学医学院, 杭州 310052)

摘 要: 利用不同浓度的 PHA-767491 对多种肝癌细胞株进行杀伤研究, 探讨 PHA-767491 对肝癌细胞的抑杀作用。MTT 实验结果表明, PHA-767491 能显著抑制多种肝癌细胞株的增殖。Hoechst 33342 染色结果也表明 PHA-767491 可以诱导肝癌细胞进入凋亡。表明 PHA-767491 对肝癌细胞具有较高的杀伤作用, 可能具有广阔的应用前景。

关键词: PHA-767491; 肝癌细胞; 凋亡

中图分类号: Q279 **文献标志码:** A

0 引 言

PHA-767491 (2-pyridin-4-yl-1, 5, 6, 7-tetrahydropyrrolo[3, 2-c]pyridin-4-one) 是最新发现的一种抗癌小分子化合物, 因其和 ATP 结构具有极相似空间构型, 能竞争性地与某些激酶结合从而发挥抑制激酶磷酸化功能^[1-3], 研究表明 PHA-767491 对细胞周期中关键因子 Cdc7 激酶具有极强的竞争性抑制作用, 而抑制 DNA 复制的起始^[2]。同时 PHA-767491 对细胞周期蛋白 Cdk9 也表现出了较强的抑制作用, Cdk9 被抑制后促使抗凋亡蛋白 Mcl1 和 Xiap 表达量明显下降, 多种凋亡蛋白如 γ -H2AX、caspase-3 剪切体、PARP (poly ADP-ribose Polymerase) 剪切体大量累积, 从而促进了肿瘤细胞的凋亡^[2]。前面的研究已表明 PHA-767491 对多种肿瘤细胞表现出了较强的杀伤力, 同时对肝正常细胞毒性极低^[4-5]。本研究将继续着重探讨 PHA-767491 对多种肝癌细胞系的杀伤能力, 为该药早日在肝癌的临床研究中提供实验参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

PHA-767491 购自 Tocris 公司, 四甲基偶氮唑

盐(MTT)购自 Sigma 公司, 二甲基亚砜(DMSO)购自无锡展望化工试剂有限公司, Hoechst 33342 购自 Amresco 公司, 小牛血清和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司, 硝酸纤维素膜购自 Millipore 公司, 肝癌细胞 Hep3B、Huh-7、SMMC7721、PLC 购自上海生命科学院细胞生物研究所。

1.2 细胞增殖检测

将肝癌细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 按 10^5 /mL 稀释后, 以每孔 100 μ L 的量接种到 96 孔板中, PHA-767491 按 0. 5、1、2. 5、5、10 μ mol/L 的 5 个浓度, 每个浓度设 6 个复孔, 另设细胞对照, 空白对照, 也设 6 个复孔。12h 后, 弃去培养液, 用 2% 的 DMEM 将 PHA-767491 稀释到正确浓度后以每孔 100 μ L 的量加入到孔中, 细胞对照孔和空白孔每孔加入 100 μ L 的 2% 的 DMEM。培养 48 h 后每孔加入 20 μ L 的 MTT (5 mg/mL), 37℃ 孵育 4 h, 吸去上清, 每孔加入 150 μ L 的 DMSO, 在摇床上摇育 20 min 后在 590 nm 下用酶标仪检测 A_{590} 值。相同实验重复 3 次。

1.3 细胞数量和形态学观测

将 3.5×10^5 个 Huh-7 细胞接种于 6 孔板中, 用 2 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养。

收稿日期: 2012-06-28

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y2100891); 浙江省“生物医学工程”重中之重学科开发基金(SWYX0917)

作者简介: 李 伟(1986-), 男, 安徽六安人, 硕士, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。

通信作者: 魏旭斌, 电子邮箱: liuli7001@yahoo. com. cn

贴壁培养 12 h 后,加药组 PHA-767491 按 0.5、1、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 5 个浓度加入到 6 孔板中,对照组加等量的 PBS,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养,培养 24 h 后,倒置光学显微镜下观察细胞数量和形态学的变化。

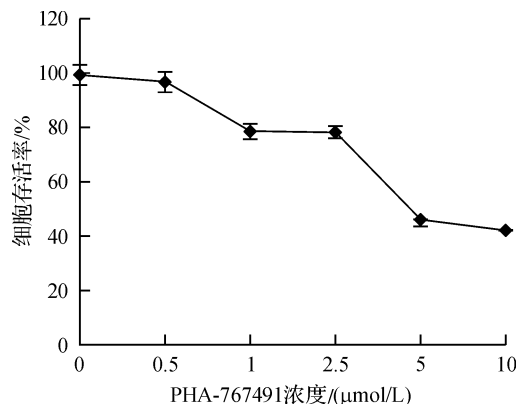
1.4 Hoechst 33342 荧光检测

将 2.5×10^5 Huh-7 细胞接种于 12 孔板中,用 1 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液培养 12 h 后,加药组加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 PHA-767491,对照组加等体积的磷酸缓冲液 PBS。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,在 48 h 吸尽培养液,加入 0.5 mL 固定液,固定 10 min 后去固定液,用磷酸缓冲液 PBS 或 0.9% NaCl 洗 2 遍,每次 3 min,吸尽液体,加入 0.5 mL 的 Hoechst 33342 染色液,染色 5 min,用磷酸缓冲液 PBS 或 0.9% NaCl 洗 2 遍,每次 3 min。滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上,盖上贴有细胞的盖玻片,使细胞接触封片液。荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核,激发波长在 350 nm 左右,发射波长在 460 nm 左右。

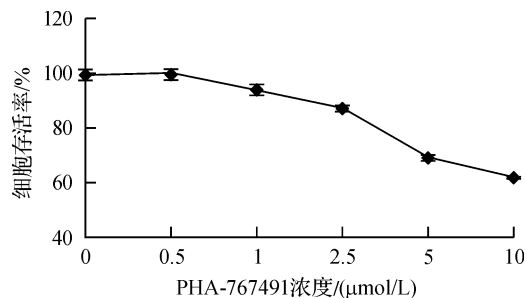
2 结果与讨论

2.1 细胞存活实验

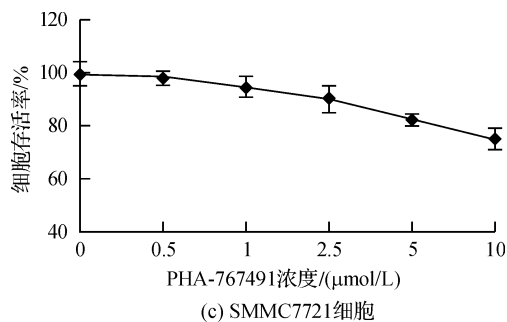
利用 MTT 法检测细胞存活率,计算方法为(加药组—空白组)/(对照组—空白组) $\times 100\%$,如图 1 所示,PHA-767491 对肝癌细胞显示出了较强的杀伤力。随着药物浓度的增加,肝癌细胞存活率逐渐降低,其中 Huh-7 和 Hep3B 细胞对 PHA-767491 表现



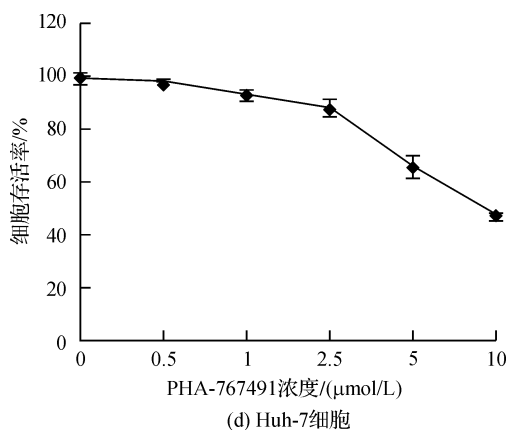
(a) Hep3B 细胞



(b) PLC 细胞



(c) SMMC7721 细胞



(d) Huh-7 细胞

图 1 PHA-767491 对肝癌细胞的抑制作用 ($P < 0.05$) 出来较高的敏感性。细胞拍照图也显示随着药物浓度的增加 Huh-7 细胞数目逐渐减少,多数细胞出现了皱缩现象,凋亡细胞显著增多(图 2)。

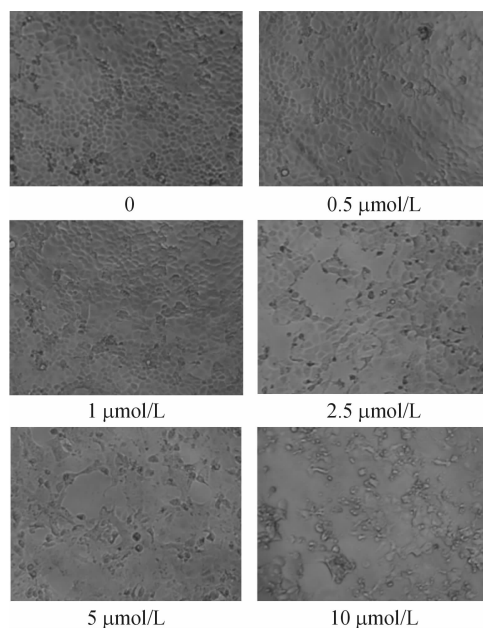


图 2 不同浓度 PHA-767491 处理 Huh-7 后的细胞形态(放大倍数:200)

2.2 Hoechst 33342 荧光检测

细胞在凋亡过程中,会出现染色体固缩,细胞核发生核小体间的断裂,荧光染料 Hoechst 33342 可作为荧光探针与 DNA 分子结合,可见细胞核片发

生段化。从图3可以看出空白组未出现凋亡细胞,而加药组明显出现了凋亡现象,且随着药物浓度的增加,凋亡细胞数目明显增多(均为随机拍照图)。

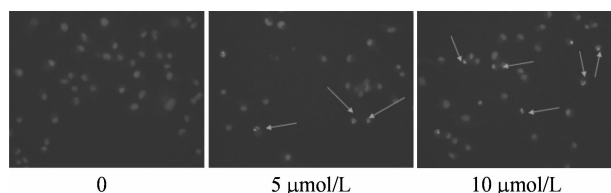


图3 Hoechst 染色检测细胞凋亡(箭头所指为凋亡细胞,放大倍数:200)

Cdc7 是细胞周期蛋白 MCM 家族的重要调控因子,研究表明 Cdc7 在多种肿瘤细胞中出现过度表达的现象,其和肿瘤的增殖及转移密切相关。SiRNA 干扰 Cdc7 后,肿瘤细胞生长明显减缓^[6],这也提示我们 Cdc7 可以作为肿瘤治疗的一个靶点。PHA-767491 是 ATP 的类似物,其具有和 Cdc7 结合的最佳空间构型而竞争性的抑制 Cdc7 和 ATP 的结合^[3]。PHA-767491 处理肿瘤细胞后,显著抑制多种肿瘤细胞增殖,并通过诱导 caspase-3 和 PARP 的剪切促使肿瘤进入凋亡^[2]。

3 结 语

本文通过研究进一步发现 PHA-767491 对多种肝癌细胞具有较高的杀伤力,结合其对肝正常细胞具有较高的安全性,可见抗癌新药 PHA-767491

在今后的肝癌治疗中具有潜在的应用价值。同时,研究表明 Cdc7 可以通过调控 chk1 而提高肿瘤的耐药能力,我们接下来将利用 PHA-767491 联合抗肿瘤药物对肝癌细胞进行杀伤研究,以期通过 PHA-767491 提高肿瘤细胞的敏感性而实现药物治疗的协同作用。

参考文献:

- [1] 李 伟,田雪君,刘 立,等. huCdc7 激酶及其与肿瘤的关系[J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(7): 810-816.
- [2] Montagnoli A, Valsasina B, Croci V, et al. A Cdc7 kinase inhibitor restricts initiation of DNA replication and has anti-tumor activity[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(6): 357-365.
- [3] Vanotti E, Amici R, Bargiotti A, et al. Cdc7 kinase inhibitors: pyrrolopyridinones as potential antitumor agents. 1. Synthesis and structure-activity relationships[J]. J Med Chem, 2008, 51(3): 487-501.
- [4] 李 伟,张 静,胡徐旁,等. PHA-767491 抑制多种肿瘤细胞生长[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(5): 455-461.
- [5] 李 伟,张 静,骆菁菁,等. PHA-767491 联合 IL-24 基因对肝癌细胞的杀伤研究[J]. 浙江理工大学学报, 2010, 27(4): 641-644.
- [6] Montagnoli A, Tenca P, Sola F, et al. Cdc7 inhibition reveals a p53-dependent replication checkpoint that is defective in cancer cells[J]. Cancer Res, 2004, 64(19): 7110-7116.

Study on Inhibition of Hepatoma Carcinoma Cell Growth by PHA-767491

LI Wei¹, SHANG Shi-qiang¹, LOU Jin-tu¹, CHEN Li-qin¹, LI Zhong-jie³, WEI Xu-bin²

(1. Central Laboratory of Childrn's Hospital Affiliated to School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 2. School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 3. School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310052, China)

Abstract: This paper studies the killing ability of PHA-767491 with different concentrations for multiple hepatoma carcinoma cell lines and discusses the inhibition function of PHA-767491 for hepatoma carcinoma cell. MTT experimental result shows that PHA-767491 can significantly inhibit the proliferation of multiple hepatoma carcinoma cell lines. Hoechst33342 dyeing results show that PHA-767491 can induce apoptosis of hepatoma carcinoma cell. Therefore, the result of this research indicates that PHA-767491 has a high killing ability for hepatoma carcinoma cell and might have a wide application prospect.

Key words: PHA-767491; hepatoma carcinoma cell; apoptosis

(责任编辑: 许惠儿)