

网络出版时间:2018-1-8 11:43 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.001.html

◇基础医学研究◇

CT-1042 对 SGC-7901 人胃腺癌细胞抗癌效应的体外研究

杨 军^{1,2},袁守军^{1,2}

摘要 目的 探索 CT-1042 体外对人胃癌细胞 SGC-7901 的抗癌效应。方法 采用 MTT 法测定 CT-1042 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制效应; Hoechst 33342 染色观察 CT-1042 对细胞凋亡形态的影响; Annexin V 和 PI 双染检测 CT-1042 对细胞凋亡率的影响; JC-1 探针检测 CT-1042 对细胞线粒体膜电位的影响; 流式检测 CT-1042 对细胞周期分布的影响。结果

CT-1042 对受试细胞增殖具有良好的抑制作用,并能引起细胞核碎裂、浓缩; CT-1042 能够诱导受试细胞线粒体膜电位下降,导致细胞凋亡; CT-1042 能够抑制受试细胞的周期进展,使之停滞于 G2/M 期。结论 CT-1042 体外对人胃癌细胞 SGC-7901 具有很好的抑制作用,并能诱导其发生细胞凋亡和细胞周期阻滞发挥抗肿瘤作用。

关键词 CT-1042; SGC-7901; 细胞凋亡; 周期阻滞; 抗癌

中图分类号 R 979.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0001-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.001

胃癌是全球常见的恶性肿瘤,预后相对较差,严重威胁人类健康^[1]。正常体细胞中基因组一旦不稳定就会启动凋亡系统。然而,在肿瘤细胞中尽管基因组不稳定仍能保持存活并不断分裂增殖,原因在于肿瘤细胞存在能够抵抗凋亡的因子^[2],其中凋亡抑制蛋白家族(inhibitors of apoptosis, IAPs)发挥了重要的作用。人 IAPs 家族主要包括 8 个成员: cIAP-1、cIAP-2、XIAP、NAIP、Survivin、apollon、livin 以及 ILP-2^[3-4]。因此抑制 IAPs 的表达促进肿瘤细胞走向凋亡是癌症治疗的一大策略。

伊立替康是一种喜树碱类似物的抗肿瘤药物,其作用靶点为 DNA 拓扑异构酶 I,其通过与拓扑异构酶 I-DNA 复合物结合,阻止断裂单链的再连接,进而诱导细胞凋亡。赤峰赛林泰药业有限公司对于 IAPs 的研究已有多年的工作基础,通过对伊立替康

进行结构改造,筛选出一种既可以靶向作用于 Survivin 蛋白,又有很强活性的小分子候选药物—CT-1042(图 1A)。该研究通过体外一系列试验来评价 CT-1042 对人胃腺癌细胞 SGC-7901 的抗肿瘤作用,为其成药性提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人胃腺癌细胞 SGC-7901 购自北京协和细胞资源中心。

1.2 受试药及试剂 CT-1042 注射用浓溶液和 CT-1042 附加溶剂(赤峰赛林泰药业有限公司); 四氮唑蓝(北京经科宏达生物技术有限公司); RPMI 1640 细胞培养液(美国 Gibco 公司); Annexin V-FITC/PI、JC-1 试剂盒、Hoechst 33342 染色液(北京贝博生物公司); RNase(北京天根生化科技有限公司)。

1.3 主要仪器 CO₂ 气体培养箱(美国 Thermo 公司); XDS-1B 倒置显微镜(中国重光公司); SPEC-TROstar^{Nano} 酶标仪(德国 BMG LABTECH 公司); Guava easyCyte 流式细胞仪(德国 Millipore 公司); LumaScope 荧光显微镜(美国 Etaluma 公司)。

1.4 细胞培养 SGC-7901 人胃腺癌细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养液中(补充青链霉素原液 5 ml/500 ml),置于 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中,每 2 d 换液 1 次,用 0.25% 胰酶消化、传代和收集细胞。

1.5 细胞增殖抑制试验 将对数生长期细胞制成细胞悬液,活细胞计数后按每孔 3 000 个细胞(100 μl)加入到 96 孔板中。培养过夜后,每孔加入含不同浓度 CT-1042 的培养基 100 μl,浓度设置为 0.039 062 5、0.156 25、0.625、2.5、10、40 nmol/L,每个浓度 4 个平行孔。培养 72 h 后弃上清液,每孔加入 100 μl 新鲜配制的含 0.5 mg/ml 四氮唑蓝的无血清培养基,37 °C 培养 4 h 后弃上清液。每孔加 200 μl DMSO 溶解甲臞,轻度震荡 15 s 后,用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值。计算各浓度下 CT-1042 对 SGC-7901 细胞的生长抑制率,并用 Origin 8.5 绘图软件中的 Logistic 程序拟合细胞生长抑制曲线,得

2017-09-26 接收

基金项目: 国家科技重大专项项目(编号: 2012ZX09301003-001)

作者单位: ¹ 安徽医科大学研究生学院,合肥 230032

² 军事医学科学院放射与辐射医学研究所,北京 100850

作者简介: 杨 军,男,硕士研究生;

袁守军,男,研究员,博士生导师,责任作者, E-mail: ysj_yuan@139.com

出半数有效抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 值。

1.6 Hoechst 33342 染色观察细胞凋亡形态变化

用 0、1、2、4 nmol/L 的 CT-1042 分别作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后, 去除上层培养基; 每孔加入 1 ml 4% 多聚甲醛避光固定 20 min, 去除固定液, PBS 洗 2 次; 每孔加入 1 ml Hoechst 33342 染色液 (3 μg/ml), 染色 10 min; 去除染色液, PBS 洗 2 次, 于荧光显微镜下观察各组细胞形态变化。

1.7 Annexin V 和 PI 双染检测药物对细胞凋亡率的影响

用 0、1、2、4 nmol/L 的 CT-1042 分别作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗 2 次, 离心; 每孔加入 100 μl 结合缓冲液, 加入 1 μl Annexin V, 再加入 2 μl PI, 避光反应 20 min; 离心, PBS 洗一遍, 离心, 每孔加入 400 μl 结合缓冲液, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.8 JC-1 探针检测药物对细胞线粒体膜电位的影响

用 0、0.5、1、2 nmol/L 的 CT-1042 分别作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗 2 次, 离心; 用事先配置好的 500 μl JC-1 染色工作液将细胞重悬, 于 CO₂ 培养箱孵育 15 min; 离心, 用 500 μl 事先配好且预热的孵育缓冲液将细胞重悬, 流式细胞仪检测各组细胞线粒体膜电位下降率。

1.9 药物对细胞周期分布的影响

用 0、0.5、1、2 nmol/L 的 CT-1042 分别作用于 SGC-7901 细胞 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗 2 次, 离心; 每孔加 500 μl PBS 重悬, 并加 500 μl 无水乙醇混合后, 冰浴 1 h; 离心, 去上清液, 每孔 800 μl PBS 重悬, 并加入 10 μl RNase (10 mg/ml), 37 °C 孵育 30 min; 离心, 去上清液, 加入 500 μl PBS 和 25 μl (1 mg/ml) PI, 避光反应 5 min, 流式细胞仪检测各组细胞周期分布, 并用

MODFIT 软件进行数据分析。

1.10 统计学处理 采用 Origin 8.5 软件和 Graph-Pad Prism 5 软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用单因素方差分析进行多组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CT-1042 对 SGC-7901 细胞增殖的影响

MTT 试验结果表明, CT-1042 在终浓度 0.039 062 5、0.156 25、0.625、2.5、10、40 nmol/L 时, 暴露于 SGC-7901 细胞 72 h 后, 对细胞生长抑制呈现良好的量效关系, 两次试验的 IC₅₀ 值分别为 (0.94 ± 0.06) nmol/L 和 (1.02 ± 0.04) nmol/L, 最大抑制率分别为 88.5% 和 84.5%, 所设药物浓度基本涵盖了药效作用窗口; 且 CT-1042 的体外活性相比盐酸伊立替康提高了 10 000 倍左右 ($P < 0.001$) (图 1B、表 1)。

表 1 两种药物对 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用 (n = 2)

CT-1042			盐酸伊立替康		
浓度 (nmol/L)	第 1 次 (%)	第 2 次 (%)	浓度 (μmol/L)	第 1 次 (%)	第 2 次 (%)
空白对照	-	-	空白对照	-	-
0.039 062 5	4.0	7.7	0.234 375	4.0	8.1
0.156 25	4.3	8.2	0.937 5	7.8	8.7
0.625	27.6	26.4	3.75	10.6	11.7
2.5	78.2	75.0	15	67.8	66.5
10	84.5	82.2	60	93.2	90.8
40	88.5	84.5	240	96.1	94.8

2.2 CT-1042 对 SGC-7901 细胞凋亡形态的影响

不同浓度 CT-1042 (0、1、2、4 nmol/L) 作用于 SGC-7901 细胞 24 h。结果显示, 随着药物浓度的增高, 细胞数目逐渐减少, 且细胞核固缩、碎裂增多以及部分可见细胞核中染色体汇集于两端, 呈剂量依赖效

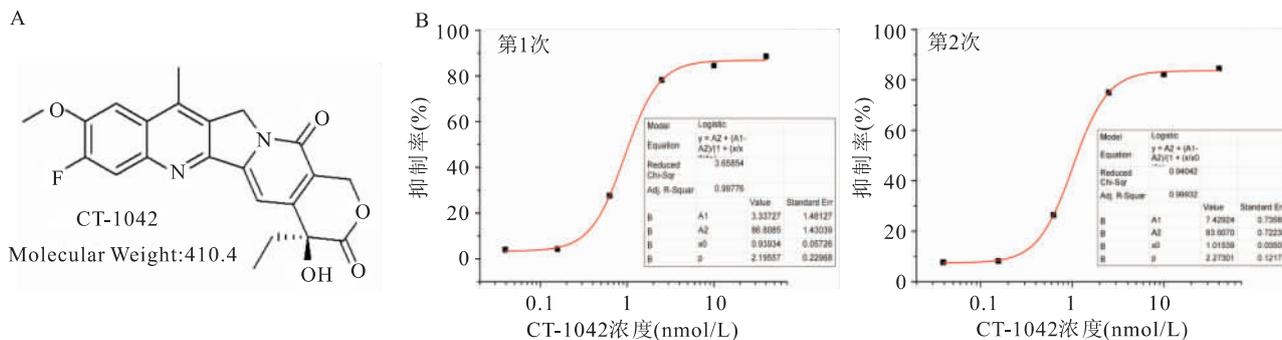


图 1 细胞增殖抑制
A: CT-1042 分子式; B: SGC-7901 细胞的增殖曲线

应,如红色箭头所示。提示受试细胞发生了凋亡,且受试药物对于细胞周期分布可能具有一定的影响(图2)。

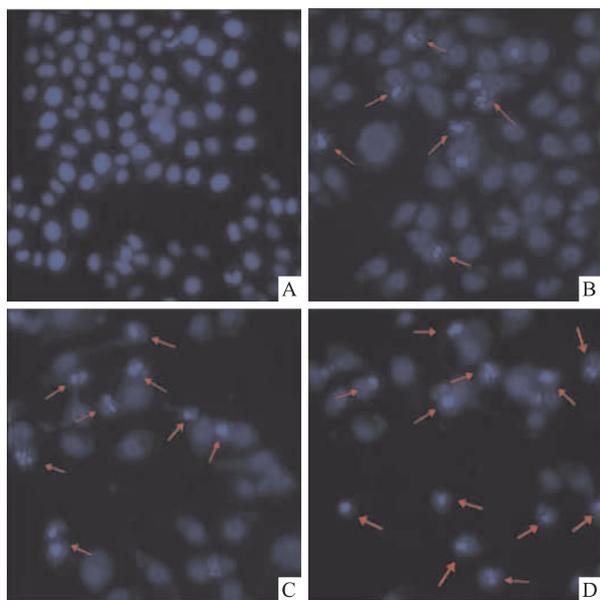


图2 CT-4042对SGC-7901细胞凋亡形态的影响 Hoechst x40
注:红色箭头所指为阳性染色细胞;A:空白对照组;B~D:1、2、4 nmol/L CT-4042

2.3 CT-4042对SGC-7901细胞凋亡率的影响

不同浓度CT-4042(0、1、2、4 nmol/L)作用于SGC-7901细胞24 h,Annexin V标记早期凋亡细胞,PI标记晚期凋亡和死亡的细胞。结果显示,凋亡细胞的比例(早期+晚期)呈现浓度依赖性升高,空白、低、中和高剂量的凋亡率分别为(1.36%+2.82%)、(4.03%+20.41%)、(10.16%+32.89%)和(14.38%+35.41%),可见受试药中高剂量组的凋亡率显著高于空白对照组,说明CT-4042能诱导SGC-7901细胞发生凋亡($P < 0.001$)。见图3。

2.4 CT-4042对SGC-7901细胞线粒体膜电位的影响

不同浓度CT-4042(0、0.5、1、2 nmol/L)作用于SGC-7901细胞24 h。结果显示,细胞线粒体膜电位随药物浓度的升高呈依次下降趋势,空白对照组的下降比例为6.67%,而在2 nmol/L时,比例已经上升到35.28%($P < 0.01$)。提示此时细胞已发生早期凋亡,这与2.3的结果相一致。见图4。

2.5 CT-4042对SGC-7901细胞周期分布的影响

不同浓度CT-4042(0、0.5、1、2 nmol/L)作用于SGC-7901细胞24 h。结果显示,正常的SGC-7901细胞G0/G1期、S期、G2/M期分布比例分别为57.78%、28.12%和14.10%;随着药物浓度的增

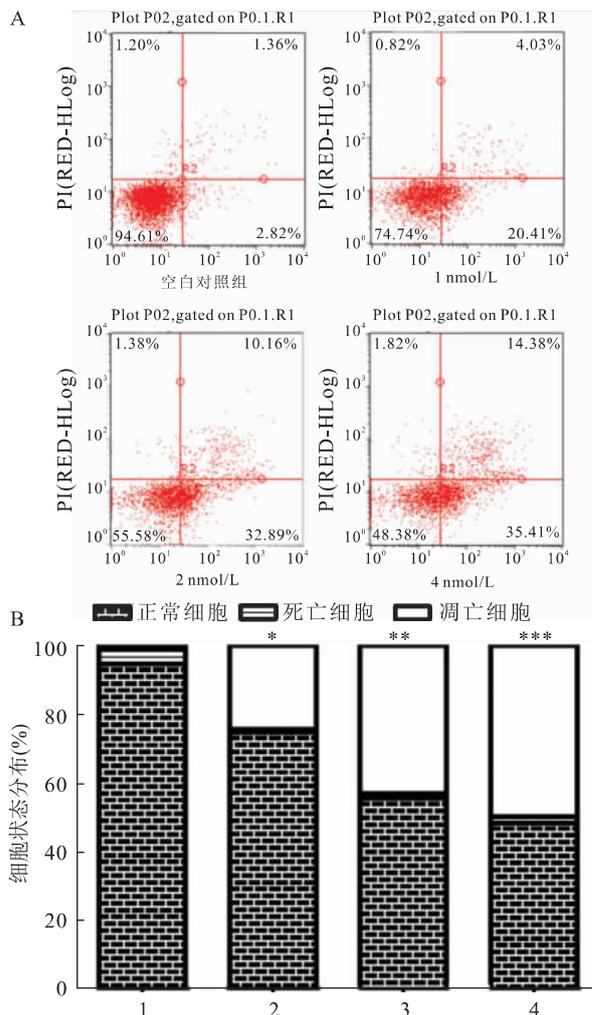


图3 细胞凋亡

A: CT-4042对SGC-7901细胞凋亡率的影响; B: SGC-7901细胞状态分布图; 1: 空白对照组; 2: 1 nmol/L; 3: 2 nmol/L; 4: 4 nmol/L; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

高,受试药组G0/G1期细胞的比例在逐渐减少,G2/M期的比例在逐渐升高,且在2 nmol/L时,G0/G1期、S期、G2/M期分布比例分别为0、9.54%和90.46%($P < 0.001$)。说明CT-4042能有效诱导细胞产生G2/M期阻滞,呈现一定剂量效应关系。提示细胞的周期阻滞进而诱导凋亡可能是其抗肿瘤的机制之一。见图5。

3 讨论

全球超过70%的胃癌新发病例发生在发展中国家,约50%的病例发生在亚洲东部,主要集中在我国,胃癌目前已经成为我国第三大常见肿瘤,并且是严重危害中国居民健康的主要疾病^[5-6]。因此,迫切需要一种新型抗胃癌药物的出现。凋亡是细胞程序性死亡,是最具有特性化的细胞死亡过程之一,

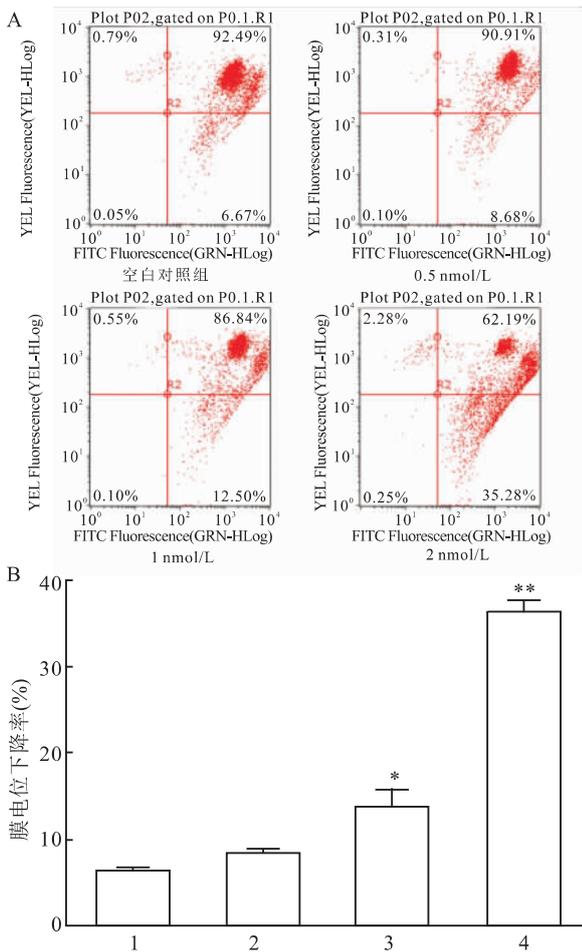


图4 线粒体膜电位

A: CT-1042 对 SGC-7901 细胞线粒体膜电位的影响; B: SGC-7901 线粒体膜电位下降率变化; 1: 空白对照组; 2: 0.5 nmol/L; 3: 1 nmol/L; 4: 2 nmol/L; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

细胞增殖和凋亡的平衡失调被看成是一种促进肿瘤形成的信号^[7-9]。凋亡性细胞死亡作为天然屏障在维持组织稳态方面发挥重要的作用^[10]。一旦组织稳态被打破,则会出现器官形态及功能的异常,肿瘤发生较为常见^[2]。肿瘤细胞之所以能够保持存活并不断分裂增殖,和其强大的抗凋亡能力分不开。降低肿瘤细胞抗凋亡能力,已经极大地激起人们的研究兴趣,如干预 BCL-2 家族^[11-12] 和 IAPs,共同的目的是促使肿瘤细胞走向凋亡。赤峰赛林泰药业有限公司提供的 CT-1042 注射液能靶向抑制 Survivin,降低受试细胞的抗凋亡能力,在体外能有效抑制 SGC-7901 细胞的增殖作用,平均 IC_{50} 值为 0.98 nmol/L。

本研究采用 Annexin V 和 PI 双染检测细胞凋亡情况,结果显示,在药物浓度为 4 nmol/L 时,可以诱导 SGC-7901 细胞发生显著凋亡,凋亡诱导率为

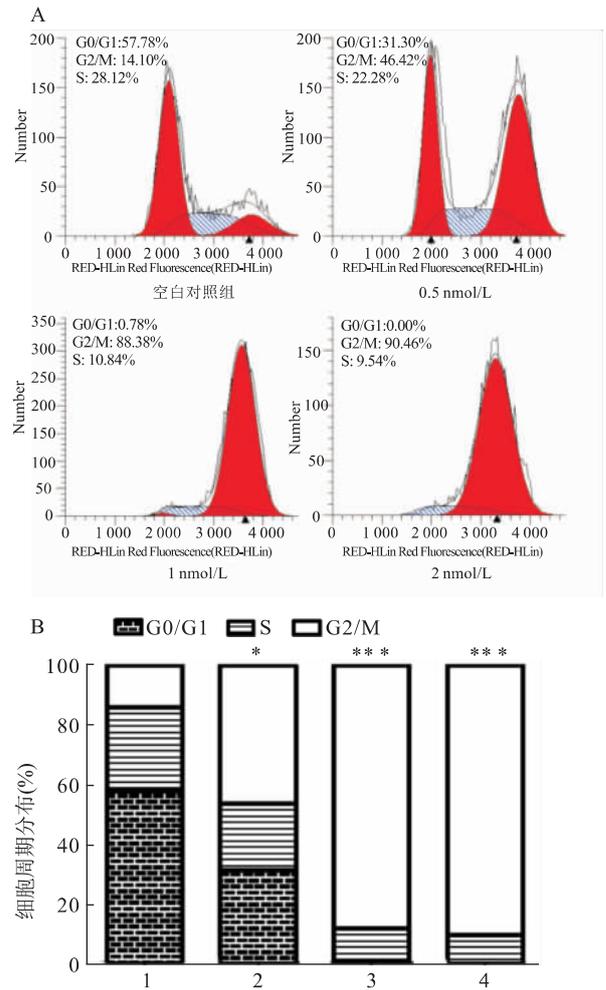


图5 周期分布

A: CT-1042 对 SGC-7901 细胞周期分布的影响; B: SGC-7901 细胞周期分布图; 1: 空白对照组; 2: 0.5 nmol/L; 3: 1 nmol/L; 4: 2 nmol/L; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

49.79%; 并且相应浓度下,细胞核发生固缩、碎裂的情况大量增加。此外,线粒体膜电位的下降是细胞发生早期凋亡的一个标志性事件^[13],JC-1 是一种检测线粒体膜电位的理想荧光探针,对于正常细胞,JC-1 聚集在线粒体基质中发出红色荧光,但随着线粒体膜电位的下降会逐渐发出绿色荧光。本研究采用 JC-1 荧光探针来检测受试药对 SGC-7901 细胞线粒体膜电位的影响,研究显示在药物浓度为 2 nmol/L 时,已有 35.28% 的细胞发生线粒体膜电位的下降,指示早期凋亡的发生。并且通过流式细胞仪分析细胞周期分布,显示随着药物浓度的增加,CT-1042 逐渐阻滞细胞的周期进展,使之停滞于 G2/M 期。提示该化合物可能是通过将细胞阻滞在 G2/M 期而干扰细胞周期的正常进行,进而启动凋亡机制,导致细胞的凋亡。

受试药 CT-1042 体外对人胃腺癌细胞 SGC-7901 有很强的抑癌活性,在伊立替康的基础上提高了 10 000 倍左右,并能通过诱导肿瘤细胞发生凋亡和阻滞肿瘤细胞的周期进展来发挥抗肿瘤作用。本文只对 CT-1042 注射液进行了初步的研究,对于其促凋亡的分子机制还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等.中国胃癌流行病学现状[J].中国肿瘤临床,2017,44(1):52-8.
- [2] 袁宏中,曹玉婷,李琳娜,等.SM-1 通过激活前胱天蛋白酶-3 诱导人胃腺癌 BGC-823 细胞凋亡发挥抗肿瘤作用[J].军事医学,2016,40(4):326-30.
- [3] Budhidarmo R, Day C L. IAPs: Modular regulators of cell signaling[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 39: 80-90.
- [4] Silke J, Vucic D. IAP family of cell death and signaling regulators[J]. *Methods Enzymol*, 2014, 545: 35-65.
- [5] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-86.
- [6] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-32.
- [7] Ghobrial I M, Witzig T E, Adjei A A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(3): 178-94.
- [8] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere J L, et al. The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942: 157-83.
- [9] Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(5): 513-20.
- [10] Hu K, Yang M, Xu Y Y, et al. Cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy induced by chabamide in human leukemia cells[J]. *Chinese Herbal Medicines*, 2016, 8(1): 30-8.
- [11] Vogler M. Targeting Bcl2-proteins for the treatment of solid tumours[J]. *Adv Med*, 2014, 2014: 943648.
- [12] Siddiqui W A, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update[J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(3): 289-317.
- [13] Lopez J, Tait S W. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within[J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(6): 957-62.

Anti-cancer effect of CT-1042 on SGC-7901 human gastric cancer cell *in vitro*

Yang Jun^{1,2}, Yuan Shoujun^{1,2}

¹Graduate School, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

Abstract Objective To investigate the anti-cancer effect of CT-1042 on human gastric cancer cells SGC-7901 *in vitro*. **Methods** The inhibitory effect of CT-1042 on proliferation of SGC-7901 cells was evaluated by MTT method, Hoechst 33342 staining was performed to observe the influence of CT-1042 on cell apoptosis morphology. The cell apoptosis rate was detected by Annexin V and PI double dye. JC-1 probe was conducted to detect the CT-1042 effects on mitochondrial membrane potential. Flow cytometry was used to determine the cell cycle distribution. **Results** CT-1042 could significantly inhibit the proliferation of the subject cells, and induce the nuclear fragmentation, chromatin shrinkage. CT-1042 could induce subject cells mitochondrial membrane potential decreased, lead to cell apoptosis. CT-1042 could arrest the cycle progression of the subject cells in the G2/M phase. **Conclusion** CT-1042 has a significant inhibitory effect on human gastric cancer cell SGC-7901 *in vitro*, and the mechanism underlying may contribute to induce cell apoptosis and cycle arrest.

Key words CT-1042; SGC-7901; cell apoptosis; cycle arrest; anti-cancer