恶性肿瘤的分子诊断 文章编号：0253-3626（2011）07-0782-03

17-丙烯胺基-17-去甲氧基格尔德霉素诱导鼻咽癌细胞凋亡的实验研究

赵菊梅[1]，刘 涛[2]

（1. 延安大学医学院药理教研室；2. 延安大学附属医院耳鼻咽喉科，延安 716000）

【摘 要】目的：研究 17-丙烯胺基-17-去甲氧基格尔德霉素（17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin，17-AAG）对人鼻咽癌细胞株（Human nasopharyngeal carcinoma cell line，HNE1）增殖抑制和诱导凋亡的作用，探讨 17-AAG 在鼻咽癌临床治疗中的意义。方法：采用噻唑蓝（Thiazolyl blue，MTT）检测 17-AAG 对 HNE1 细胞的增殖抑制作用，流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化，Hoechst33528 染色观察细胞的凋亡形态学变化并进行核碎片计数。结果：17-AAG 抑制 HNE1 的增殖，诱导了细胞的凋亡，抑制作用具有浓度和时间依赖性。结论：17-AAG 可诱导 HNE1 的凋亡，研究结果对药物治疗鼻咽癌有一定的临床指导意义。

【关键词】17-丙烯胺基-17-去甲氧基格尔德霉素；细胞凋亡；人鼻咽癌细胞株

【中国图书分类法分类号】R73-36 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-17

Heat shock protein inhibitor 17-AAG induces apoptosis of HNE1 cell line in human nasopharyngeal carcinoma

ZHAO Ju-mei[1], LIU Tao[2]

(1. Department of Pharmacological, Medical College of Yan'an University; 2. Department of Otorhinolaryngology, the Affiliated Hospital, Medical College of Yan'an University)

【Abstract】*Objective*: To observe the inhibitory effects of heat shock protein inhibitor 17-AAG on proliferation and induction of apoptosis of HNE1 cells in human nasopharyngeal carcinoma and investigate its clinical significance for the treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Methods*: MTT reduction assay was used to measure cell viability. Flow cytometry was used to detect apoptotic cells. Hoechst33528 staining and fluorescence microscopy was used for morphological observation of apoptotic cells and calculation of nuclear fragmentations. *Results*: 17-AAG inhibited proliferation and induce apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma HNE1 cell line in vitro. The inhibition of proliferation was in time and dose dependent manner. *Conclusion*: 17-AAG could induce human nasopharyngeal carcinoma cells to undergo apoptosis and can be a potential anti-cancer drug to treat nasopharyngeal carcinoma.

【Key words】17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin; apoptosis; human nasopharyngeal carcinoma cell line

中国是鼻咽癌的高发国之一，发病率已达到 15/10 万~30/10 万，且早期难以发现，一旦发现 70%左右已属晚期，目前的治疗以放化疗为主，但 5 年生存率一直未见提高，治疗失败的主要原因是局部未控、复发和远处转移，所以有待于更好的治疗方法，改善治疗效果，这是我国乃至世界性的主要问题。研究表明 17-丙烯胺基-17-去甲氧基格尔德（17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin，17-AAG）通过与 HSP90 特异性结合发挥抗肿瘤作用，HSP90 表达水平高的肿瘤细胞表现出对 17-AAG 敏感[1,2]。我们的前期实验，已经用免疫组化法检测到鼻咽癌组织中 hsp90 高表达，作为 hsp90 抑制剂的 17-AAG 是否可以通过抑制鼻咽癌组织中热休克蛋白的表达，诱导鼻咽癌细胞的凋亡是一个值得探讨的问题，对于鼻咽癌的治疗具有一定的意义，目前国内外尚无此方面的研究。

作者介绍：赵菊梅（1970-），女，副教授，博士，研究方向：肿瘤生物治疗基础与临床。

通信作者：刘 涛，男，副主任医师，Email：hxlt002@163.com。

基金项目：陕西省延安市 2007 科技项目。

1 材料与方法

1.1 材料

人鼻咽癌细胞株（Human nasopharyngeal carcinoma cell line，HNE1）由四川大学生物治疗国家重点实验室馈赠（本实验室保存），17-AAG 购自 Sigma 公司，细胞用 DMEM 培养基、胎牛血清（Fatal bovine serum，FBS）及细胞消化液胰酶（Tyrisin）

购自 Gibco BRL 公司，二甲基亚砜（Dimethyl sulfoxide，DMSO）、噻唑蓝（Thiazolyl blue，MTT）、碘化丙啶（Propidium iodide，PI）、Hochest33528 试剂盒购自 Sigma 公司。流式细胞仪使用美国 BD 公司产品，荧光倒置显微镜及倒置显微镜均使用 OLYMPUS 产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏培养 从液氮中取出冻存保种的HNE1，迅速置于 37℃水浴融化，用培养基洗涤 1 次。将细胞培养于含 10%FBS、100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素 DMEM 培养基中，于 37℃、5% CO_2 饱和湿度无菌条件下常规培养，每隔 2~3 d 更换培养基 1 次。

1.2.2 MTT 法检测 17-AAG 对 HNE1 细胞的生长抑制实验

将处于对数生长期的 HNE1，用 l ml 0.25%胰酶消化，加入 2 ml 完全培养基吹打并收集细胞，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，10%小牛血清的 DMEM 培养基重悬，并将细胞浓度调整为 1×10^5 个/ml。96 孔培养板中每孔加入细胞悬液 100 μl，置 37℃、5% CO_2 培养箱中培养，24 h 后弃去培养液加入 17-AAG，使实验组各孔药物终浓度分别为 100、500、1 000 nmol，并设空白对照组（0 nmol），同一浓度设 3 个复孔。于 24、48、72 h 后终止培养，每孔加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT 溶液，放入 37℃，5%的 CO_2 孵箱，孵育 4 h。弃上清，每孔内加入 DMSO 150 μl，水平振荡器缓慢振荡 10 min，使结晶充分溶解，酶标仪上于 570 nm 波长处测定 OD 值，按下面公式计算细胞生长抑制率：细胞生长抑制率=（1-实验组 OD 值/对照组 OD 值）×100%，以上实验重复 3 次，结果取平均值。

1.2.3 PI 染色法检测细胞凋亡率的变化 取处于对数生长期的 HNE1 细胞，以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板。待细胞贴壁良好后，弃去原细胞培养液，加入 17-AAG 使药物终浓度分别为 100、500、1 000 nmol，并设立空白对照组（0 nmol）。继续培养 24、48、72 h 后，收集细胞，500~1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，磷酸盐缓冲液（Phosphate buffered solution，PBS）洗 2 次。加入 500 μl 冰预冷的 70%乙醇 4℃固定 1 h，离心弃固定液 PBS 3 ml 重悬细胞，分别加入 PI 溶液 1 ml、充分混匀、避光室温孵育 30 min，流式细胞仪检测细胞凋亡率的变化。

1.2.4 Hoechst 33528 染色观察细胞凋亡的形态学变化 将 HNE1 细胞以 1×10^5 个/ml 的密度接种 2 ml 于 6 孔培养板中，用 1.2.3 所述浓度和方法处理细胞，处理后 500~1 000 r/min 离心 5 min，弃去培养液，2 ml PBS 洗 1 次，按照试剂盒说明书进行固定染色处理后，倒置荧光显微镜观察细胞核的形态改变，并进行核碎片计数，至少 400 个细胞计算碎片所占百分率。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 11.5 软件对数据进行统计学处理，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 17-AAG 对鼻咽癌 HNE1 细胞的增殖抑制作用

MTT 检测结果显示 17-AAG 抑制了 HNE1 细胞的增殖活性，不同浓度（100、500、1 000 nmol 组）、不同时间组之间 OD 值，经统计学分析（$P<0.05$）差异有统计学意义，而且随着药物浓度的增加和作用时间的延长细胞生长抑制率表现出增高的趋势。表明 17-AAG 对 HNE1 细胞生长抑制作用呈时间、剂量依赖性，随药物浓度的升高和作用时间延长，抑制作用增强，结果见表 1、图 1。

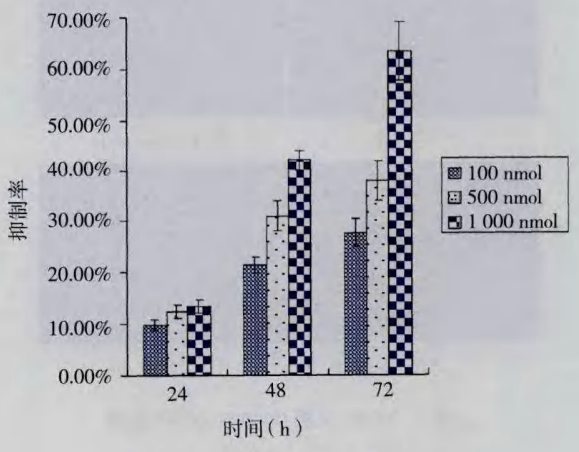


图 1 17AAG 抑制 HNE1 增殖

2.2 流式细胞术检测 HNE1 细胞的凋亡率的变化

PI 染色法检测结果显示，17-AAG 处理细胞后，各组细胞的凋亡率分别为，48 h 对照组凋亡率为 1.2%，100、500、1 000 nmol 浓度药物组为 26.4%、40.2%、52.8%；72 h 对照组凋亡率为 0.5%，100、500、1 000 nmol/L 药物组分别为 13.5%、19.8%、24.3%，各组与对照组比较差异有统计学意义（图 2 为不同浓度处理 48 h 流式细胞图），表明 17-AAG 具有诱导 HNE1 细胞凋亡作用。

表 1 17-AAG 对 HNE1 的增殖抑制作用（$x\pm s$）

浓 度（nmol/L）	24 h		48 h		72 h	
	OD值	抑制率	OD值	抑制率	OD值	抑制率
0	0.616 ± 0.02		0.823 ± 0.018		0.968 ± 0.043	
100	0.556 ± 0.016	9.7 ± 1.10	0.646 ± 0.013	21.5 ± 1.62	0.702 ± 0.032	27.51 ± 2.74
500	0.540 ± 0.012	12.3 ± 1.32	0.508 ± 0.020	31.0 ± 3.05	0.601 ± 0.038	37.92 ± 3.89
1 000	0.532 ± 0.014	13.42 ± 1.30△	0.478 ± 0.016	41.9 ± 1.90*△	0.356 ± 0.049	63.22 ± 5.68△

注：不同浓度组间比较，*，$P<0.05$；不同时间组建比较，△，$P<0.05$

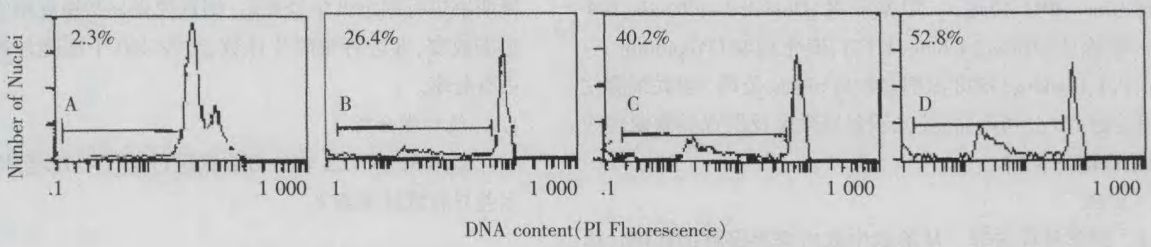
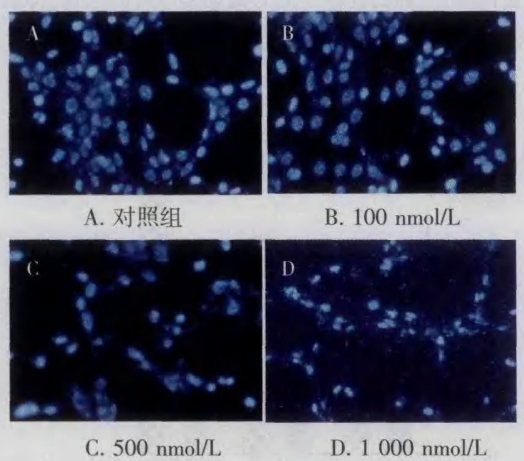


图 2　不同浓度 17AAG 处理 48 h 对鼻咽癌细胞 HNE1 凋亡率的影响

2.3　Hochest 33528 染色后荧光显微镜分析

经 Hochest 33528 染色后细胞核在荧光显微镜下显示为蓝色，17-AAG 作用 HNE1 细胞 48 h 后，不同浓度药物组可见细胞核固缩，染色不均匀，核碎片，蓝色荧光增强等细胞凋亡的形态学改变。不同浓度（100、500、1 000 nmol）处理时，出现不同程度的核碎裂现象，表明 17-AAG 具有诱导 HNE1 凋亡作用（见图 3、4）。



A. 对照组　　B. 100 nmol/L

C. 500 nmol/L　　D. 1 000 nmol/L

图 3　HNE1 细胞 Hochest 33528 染色

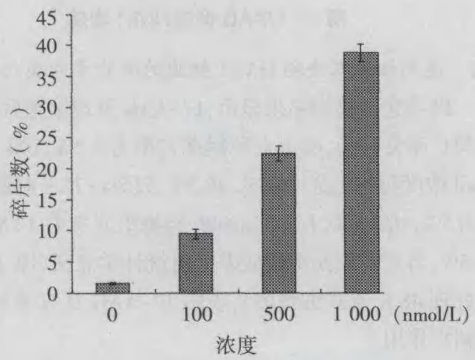


图 4　HNE1 细胞 Hochest 33528 染色核碎裂计数

3　讨　论

17-AAG 在肿瘤治疗方面已经有较多的报道，如在乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、白血病等方面的研究[1-4]。我们的研究通过 MTT 试验检测了 17-AAG 对鼻咽癌细胞的生长抑制作用，并采用流式细胞术检测了不同浓度处理不同时间后的细胞凋亡情况、同时采用 Hochest 33528 染色发检测了不同浓度 17-AAG 处理细胞后引起细胞凋亡的形态学改变，并进行了核碎裂计数，结果表明 17-AAG 可以诱导 HNE1 的凋亡，同时其作用具有浓度和时间依赖性，为晚期鼻咽癌的治疗提供了新的思路。

目前，我们的研究尚不能阐明热休克蛋白抑制剂17-AAG 诱导 HNE1 细胞凋亡的机制，但是有研究表明 hsp90 可以通过阻止 Apaf-1 与 procaspase-9 凋亡体的结合而抑制凋亡发生[5]。另外，hsp90 还与细胞周期，肿瘤的新生血管生成、侵袭和转移有关，抑制 hsp90 可以抑制 HGF/SFMET 信号通路，使细胞运动能力和侵袭能力减弱[6]，因此 hsp90 已成为抗肿瘤的新靶点，并且一些天然产物所具有的抗肿瘤活性也是针对hsp90 这个分子靶点。17-AAG 作为热休克蛋白的抑制剂可作用于 hsp90 导致突变型 p53 基因失稳，恢复野生型 p53 基因正常的转录活性，引起细胞周期抑制和诱导细胞凋亡[7]；17-AAG 还可以使细胞中细胞色素 C 和线粒体源性的胱蛋白酶蓄积，激活线粒体依赖的细胞凋亡途径[8]，Nguyen DM[9] 等认为 17-AAG 可以增加 E 钙粘连蛋白的表达，抑制金属蛋白酶 9 和血管内皮生长因子[10-12]，抑制肿瘤细胞新生血管的生成和转移能力，因此热休克蛋白及其抑制剂是目前抗肿瘤研究的热点和前沿。

另外，有研究报道 17-AAG 可以增强放疗和化疗耐药肿瘤细胞的敏感性[13]，因此下一步的实验中我们将探讨 17-AAG 对放疗的增敏作用，对放疗耐受的鼻咽癌患者提供有效的治疗方法。

参　考　文　献

[1]　Beliakoff J，Whitesell L.Hsp90：an emerging target for breast cancer therapy[J].Anticancer Drugs，2004，15(7)：651-662.

[2]　Chiosis G，Timaul M N，Lucas B，et al.A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells[J].ChemBiol，2001，8(3)：289-299.

[3]　Williams C R，Tabios R，Linehan W M，et al.Intratumor injection of the Hsp90 inhibitor 17AAG decreases tumor growth and induces apoptosis in a prostate cancer xenograft model[J].J Urol，2007，178(4)：1528-1562.

[4]　Schmitt E，Maingret L，Puig P E，et al.Heat shock protein 70 neu-

恶性肿瘤的分子诊断 文章编号：0253-3626（2011）06-0785-05

硼替佐米诱导 TF-1 细胞凋亡及其对 SALL4 基因表达的影响

王 兰，喻依川，傅雷华，胡成琳，陈 林
（重庆医科大学附属第二医院血液科，重庆 400010）

【摘 要】目的：探讨蛋白酶体抑制剂硼替佐米（Bortezomib）诱导人红系白血病细胞株 TF-1 凋亡的作用，及其对 Sall4 基因表达水平的影响。方法：（1）MTT 法检测细胞增殖抑制率。（2）光学显微镜观察细胞的形态学改变。（3）电镜观察超微结构变化。（4）流式细胞仪检测 Annexin V-FITC 细胞凋亡率。（5）流式细胞仪分析细胞周期。（6）RT-PCR 检测 Sall4 mRNA 的表达水平。结果：（1）硼替佐米呈时间和剂量依赖性抑制 TF-1 细胞生长，与对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.05$）。24 h 和 48 h 的药物半数抑制浓度（Halfmaximal inhibitory concentration of a substance，IC_{50}）分别为 52 nmol/L 和 27 nmol/L。（2）显微镜下观察细胞皱缩变小，细胞密度明显下降。（3）电镜下观察可见凋亡小体。（4）Annexin V-FITC 检测显示随着硼替佐米作用浓度的增加，凋亡率增加，呈剂量依赖关系（$P<0.05$）。（5）流式细胞仪分析细胞周期，随着硼替佐米作用时间的增加，G_2/M 期细胞比例逐渐增高，而 G_0/G_1 和 S 期细胞比例则逐渐减少，呈时间依赖关系（$P<0.05$）。（6）RT-PCR 结果示 Sall4 基因在 TF-1 细胞上高表达，并随着硼替佐米作用浓度和时间的增加，Sall4 mRNA 与 β-actin mRNA 表达量的积分光密度比值（Integral optical density ratio，V/B）水平下降（$P<0.05$）。结论：硼替佐米能抑制 TF-1 细胞增殖，诱导其凋亡，呈时间-剂量依赖关系。Sall4 基因在 TF-1 细胞株上高表达，并随着硼替佐米作用浓度和时间的增加表达水平下降，呈时间-剂量依赖关系。

【关键词】硼替佐米；TF-1 细胞株；细胞凋亡；Sall4 基因
【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-27

作者介绍：王 兰（1984-），女，硕士，
研究方向：白血病的靶向治疗。
通信作者：陈 林，女，副教授，Email：chenlincq@sina.com。
基金项目：重庆市卫生局科研资助项目（编号：2009-2-21）。

tralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma[J].Cancer Res,2006,66(8):4191-4197.

[5] Pandey P,Saleh A,Nakazawa A,et al.Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90[J].Embo J,2000,19(16):4310-4322.

[6] Webb C P,Hose C D,Koochekpour S,et al.The geldanamycins are potent inhibitors of the hepatocyte growth factor/scatter factor-met-urokinase plasminogen activator-plasmin proteolytic network[J].Cancer Res,2000,60:342-349.

[7] Blagosklonny M V.p53 from complexity to simplicity:mutant p53 stabilization,gain-of-function,and dominant-negative efect[J].Faseb J,2000,14(13):1901-1907.

[8] Nimmanpalli R,O'Bryan E,Kuhn D,et al.Regulation of 17-AAG induces apoptosis:role of Bcl-2,Bcl-xL,and Bax downstream of 17-AAG mediated down-regulation of Akt,Raf-1,and Src kinases[J].Blood,2003,102(1):269-275.

[9] Nguyen D M,Desai S,Chen A,et al.Modulation of metastasis phenotypes of non-small cell lung cancer cells by 17-allylamino 17-demethoxy geldanamycin[J].Ann Thorac Surg,2000,70(6):1853-1860.

[10] Newcomb E W,Lukyanov Y,Schnee T,et al.The geldanamycin analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin inhibits the growth of GL261 glioma cells in vitro and in vivo[J].Anticancer Drugs,2007,18(8):875-882.

[11] Hawkins L M,Narendran A.The geldanamycin derivative 17-AAG decreases VEGF secretion and leukemia growth support by trisomy 8 myelodysplastic syndrome bone marrow stromal cells[J].Pediatric Hematology-Oncology,2005,22(2):115-125.

[12] Miao R Q,Fontana J,Fulton D,et al.Dominant-negative Hsp90 reduces VEGF-stimulated nitric oxide release and migration in endothelial cells[J].Am Heart Assoc,2008,25:105.

[13] Ramanathan R K,Trump D L,Eiseman J,et al.Phase Ⅰ pharmacokinetic-pharmacodynamic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG,NSC 330507),a novel inhibitor of heat shock protein90,in patients with refractory advanced cancers[J].Clin Cancer Res,2005,11(9):3385-3391.

（责任编辑：张学颖）