

[文章编号] 1674-8115(2011)12-1687-05

· 论 著 ·

17-丙烯胺-17去甲氧格尔德霉素对大鼠嗜铬细胞瘤细胞凋亡及血管内皮生长因子表达的影响

马 贵, 祝 宇, 吴瑜璇, 沈周俊, 盛佳燕, 徐云泽

(上海交通大学医学院附属瑞金医院泌尿外科, 上海 200025)

[摘要] **目的** 探讨热休克蛋白 90(HSP90)抑制剂 17-丙烯胺-17去甲氧格尔德霉素(17-AAG)对大鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 细胞生长及血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 将实验组 PC12 细胞分成两组:实验一组分别加入不同终浓度(0.005、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$) 17-AAG 培养液;实验二组分别加入 150 $\mu\text{g/L}$ VEGF(VEGF 组)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG(17-AAG 组)、0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG + 150 $\mu\text{g/L}$ VEGF(17-AAG + VEGF 组)培养液。另设 DMSO 组(阴性对照组)和空白对照组。采用 MTT 法检测细胞存活率;Wrights-Giemsa 染色观察细胞形态变化;流式细胞术检测细胞凋亡率;Western blotting 检测细胞中 VEGF-165 蛋白的表达。**结果** 17-AAG 呈时间、剂量依赖性抑制 PC12 细胞增殖($P < 0.05$);24 h 半数抑制浓度(IC_{50})为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 。0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG 作用于 PC12 细胞 6、12、24、48 h 的细胞凋亡率均明显高于空白对照组($P < 0.01$)。0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG 作用于 PC12 细胞 6、12、24、48 h, VEGF-165 蛋白表达逐渐降低;各时点 VEGF-165 蛋白表达量与阴性对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** HSP90 抑制剂 17-AAG 能抑制 PC12 细胞增殖,诱导细胞凋亡,抑制 VEGF 蛋白表达。**[关键词]** PC12 细胞;嗜铬细胞瘤;热休克蛋白 90;17-丙烯胺-17去甲氧格尔德霉素;血管内皮生长因子;细胞凋亡

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.12.006

[中图分类号] R736.6

[文献标志码] A

Effects of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin on apoptosis and expression of vascular endothelial growth factor in pheochromocytoma cells

MA Gui, ZHU Yu, WU Yu-xuan, SHEN Zhou-jun, SHENG Jia-yan, XU Yun-ze

(Department of Urology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), heat shock protein 90 (HSP90) inhibitor, on the growth and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pheochromocytoma cell line PC12 in rats. **Methods** PC12 cells in experiment group were divided into experiment group 1 and experiment group 2. PC12 cells in experiment 1 were treated with different concentrations (0.005 $\mu\text{mol/L}$, 0.025 $\mu\text{mol/L}$, 0.05 $\mu\text{mol/L}$, 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.25 $\mu\text{mol/L}$, 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ and 2.0 $\mu\text{mol/L}$) of 17-AAG culture fluid respectively, and those in experiment group 2 were treated with 150 $\mu\text{g/L}$ VEGF culture fluid (VEGF group), 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG culture fluid (17-AAG group) and 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG + 150 $\mu\text{g/L}$ VEGF culture fluid (17-AAG + VEGF group) respectively. Besides, DMSO group (negative control group) and blank control group were also established. Cell survival rate was measured by MTT assay, cell morphology was observed by Wrights-Giemsa staining, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and expression of VEGF-165 protein in cells was determined by Western blotting. **Results** 17-AAG significantly inhibited the growth of PC12 cells in time- and dose-dependent manners ($P < 0.05$), with 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.1 $\mu\text{mol/L}$. The apoptosis rates of PC12 cells after treatment with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG for 6 h, 12 h, 24 h and 48 h were significantly higher than that in blank control group ($P < 0.01$). The expression of VEGF-165 protein gradually decreased with treatment of PC12 cells with 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG for 6 h, 12 h, 24 h and 48 h, and the expression of VEGF-165 protein at each time point was significantly different from that in negative control group ($P < 0.05$). **Conclusion** 17-AAG, HSP90 inhibitor, can inhibit the proliferation of PC12 cells, induce cell apoptosis and inhibit the expression of VEGF protein.

[Key words] PC12 cells; pheochromocytoma; heat shock protein 90; 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin; vascular endothelial growth factor; apoptosis

[基金项目] 上海市教委基金(11YZ58);上海市科委基金(09ZR1418500)(Shanghai Education Committee Foundation, 11YZ58; Shanghai Science and Technology Committee Foundation, 09ZR1418500)。

[作者简介] 马 贵(1985—),男,硕士生;电子邮箱:timothy8581@163.com。

[通信作者] 祝 宇,电子邮箱:zyyyhyq@126.com。

恶性嗜铬细胞瘤的治疗方法有限,手术很难达到痊愈,靶向治疗是目前恶性嗜铬细胞瘤治疗的研究热点。血管新生对肿瘤的生长及转移起到重要作用,抑制血管新生可作为干扰肿瘤的重要靶标^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前所知作用最强的促血管形成因子。近年来研究发现,体内作为分子伴侣的热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90)对肿瘤的发生和发展起着重要作用。HSP90 在大部分肿瘤细胞中呈过度表达,可以通过稳定异常的信号蛋白和干扰正常凋亡来维持细胞存活^[2]。

17-丙烯胺-17-去甲氧格尔德霉素(17-allyl-amino-17-demethoxygeldanamycin, 17-AAG)作为一种新的 HSP90 抑制剂,是格尔德霉素的衍生物。体内、体外实验均证明 17-AAG 有很强的抗肿瘤作用,且毒性较小。17-AAG 不仅可以抑制肿瘤细胞增殖,还可以抑制肿瘤的血管形成^[3]。对于 17-AAG 抑制血管新生的机制,可能通过两个途径:抑制 VEGF 的产生;抑制与新生血管相关的分子表达,如蛋白激酶 B (Akt)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)等^[4]。目前,尚未见报道探讨 17-AAG 在 PC12 细胞及嗜铬细胞瘤中可能的作用。本研究首次探讨 17-AAG 对大鼠嗜铬细胞瘤细胞(PC12 细胞)凋亡和 VEGF 表达的影响,初步探讨其可能的机制,从而探索 17-AAG 用于治疗恶性嗜铬细胞瘤的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要材料

①细胞:PC12 细胞株由上海交通大学医学院附属瑞金医院神经内科惠赠;②药物:HSP90 抑制剂 17-AAG (Cayman), VEGF 蛋白 (Roche);③试剂:兔抗大鼠 VEGF-165 抗体 (PeproTech), 罗丹明 123、碘化丙啶(propidium iodide, PI)、Wrights-Giemsa 染液、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO) (Sigma), DMEM 及胎牛血清(Gibco);④仪器:Z2 细胞计数仪(Beckman Coulter), 细胞离心涂片机(Shandon), 流式细胞仪 LSR II (BD Biosciences), 各种规格培养皿(Corning Costar)。

1.2 细胞培养

PC12 细胞接种于 96 孔板(MTT 法检测)或 6 cm 皿(细胞形态学检查、流式细胞仪和 Western blotting 检测), DMEM 基质, 10% 胎牛血清, 37 °C、5% CO₂ 恒

温孵育箱常规培养。细胞密度达 70%~80% 时用于实验。

1.3 MTT 法检测细胞存活率

实验分为三组:DMSO 组(阴性对照组)、空白对照组、17-AAG 组(实验组)。取对数生长期 PC12 细胞制成 1×10^4 /mL 细胞悬液,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中,培养 24 h 后换液。再将实验组分为两组:实验一组分别加入不同终浓度(0.005、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 μ mol/L) 17-AAG 培养液;实验二组分别加入 150 μ g/L VEGF (VEGF 组)、0.1 μ mol/L 17-AAG (17-AAG 组)、0.1 μ mol/L 17-AAG + 150 μ g/L VEGF (17-AAG + VEGF 组)培养液。空白对照组只加培养液不加细胞;阴性对照组加 100 μ L 细胞悬液和 DMSO, 周围磷酸盐缓冲液(PBS)填充。每孔设 5 个复孔。分别于药物作用后 12、24、48 h 后加 5% MTT 溶液 10 μ L/孔,继续培养 4 h 后吸去孔内液体,每孔加入 200 μ L DMSO, 摇床上 10 min 后用酶标仪检测 570 nm 吸光度(A)。实验重复 3 次,按以下公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = (实验组 A - 空白对照组 A) / (阴性对照组 A - 空白对照组 A) $\times 100\%$ 。

1.4 细胞形态观察

细胞培养 24 h 后制成细胞悬液,各组取 2×10^4 个细胞,细胞涂片仪离心(800 r/min, 5 min)涂片后, Wrights-Giemsa 染液染色 2 min, 光学显微镜下观察细胞形态。

1.5 细胞凋亡检测

收集细胞于流式管中(每管至少 2×10^5 个细胞),离心去上清后各加 100 μ L PBS, 2 μ L 罗丹明 123 标注混匀。室温避光孵育 30 min 后, 2 mL PBS 清洗 2 遍,加 400 μ L PBS。上机检测前 5 min 加入 5 μ L PI (50 μ g/ μ L), 混匀,流式细胞仪计数 10 000 个细胞,检测细胞凋亡情况。

1.6 Western blotting 法检测 VEGF-165 蛋白

收集处理后的细胞,于冰上加入 PIPA、PMSF 和 Cocktail (90:1:10), 超声破碎细胞, 4 °C 下离心 (12 000 r/min, 30 min), 收集上清, 定量后 $4 \times$ Loading 煮沸, -20 °C 保存。取蛋白加样于 10% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳,转膜后以 5% 脱脂奶粉 + TBST 封闭 1 h, 与含 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释的一抗 4 °C 过夜。TBST 洗涤 3 次后与含 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释的二抗 (0.2 μ g/mL) 作用 1 h, 机器显影。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 17-AAG 对 PC12 细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测结果显示,实验一组中 17-AAG 呈时间、剂量依赖性抑制 PC12 细胞增殖。其中,17-AAG 作用 24 h 的细胞存活率明显低于 12 h ($P < 0.01$),17-AAG 作用 48 h 的细胞存活率明显低于 24 h ($P < 0.05$) (图 1)。24 h 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.1 $\mu\text{mol/L}$,用于后续实验。实验二组中,VEGF 组、17-AAG + VEGF 组 PC12 细胞存活率均明显高于 17-AAG 组 ($P < 0.01$),但 17-AAG + VEGF 组细胞存活率明显低于 VEGF 组 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.2 细胞形态观察

Wrights-Giemsa 染色结果 (图 3) 显示:实验一组 17-AAG 作用 PC12 细胞后,细胞体积变化不明显,细胞膜出现芽状突起,胞质中出现空泡,细胞核染色不均匀,核变形及固缩,且出现多核细胞;阴性对照组和空白对照组细胞中未见明显核固缩现象,细胞核规则,呈圆形,染色均匀。

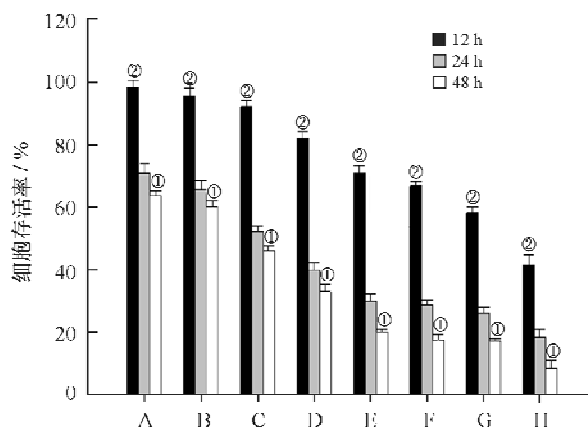
2.3 细胞凋亡率

2.3.1 实验一组细胞凋亡率 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG 作用于 PC12 细胞后,分别于 6、12、24、48 h 检测细胞凋亡率,结果 (图 4) 显示:各时间点的细胞凋亡率 ($Q1 + Q3$) 均明显高于空白对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3.2 实验二组细胞凋亡率 17-AAG + VEGF 组细胞凋亡率为 12.3%,明显低于 17-AAG 组 (22.9%),差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 5)。

2.4 Western blotting 检测 VEGF-165 蛋白表达

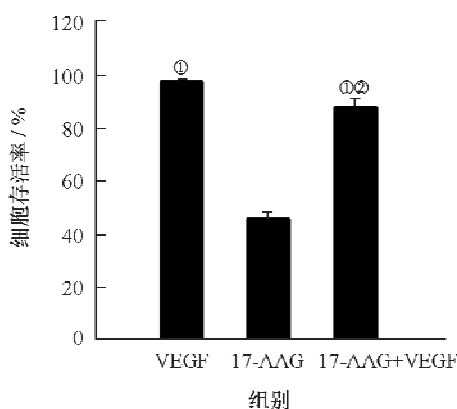
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG 作用于 PC12 细胞 6、12、24、48 h, VEGF-165 蛋白表达逐渐降低;各时点 VEGF-165 蛋白表达量与阴性对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 6、7)。



注: A ~ H 分别表示 0.005、0.025、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG; ① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$ 与 24 h 比较。

图 1 不同浓度 17-AAG 作用不同时间后的 PC12 细胞存活率

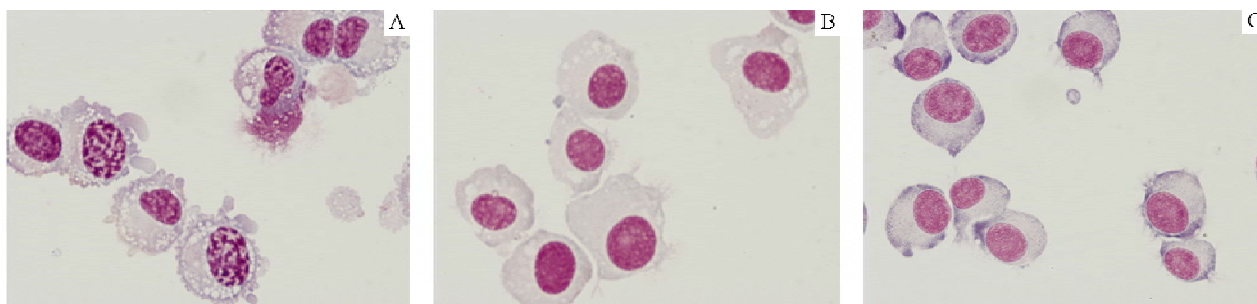
Fig 1 Survival rates of PC12 cells after treatment with different concentrations of 17-AAG for different time



注: ① $P < 0.01$ 与 17-AAG 组比较; ② $P < 0.05$ 与 VEGF 组比较。

图 2 实验二组中各亚组间存活率的比较

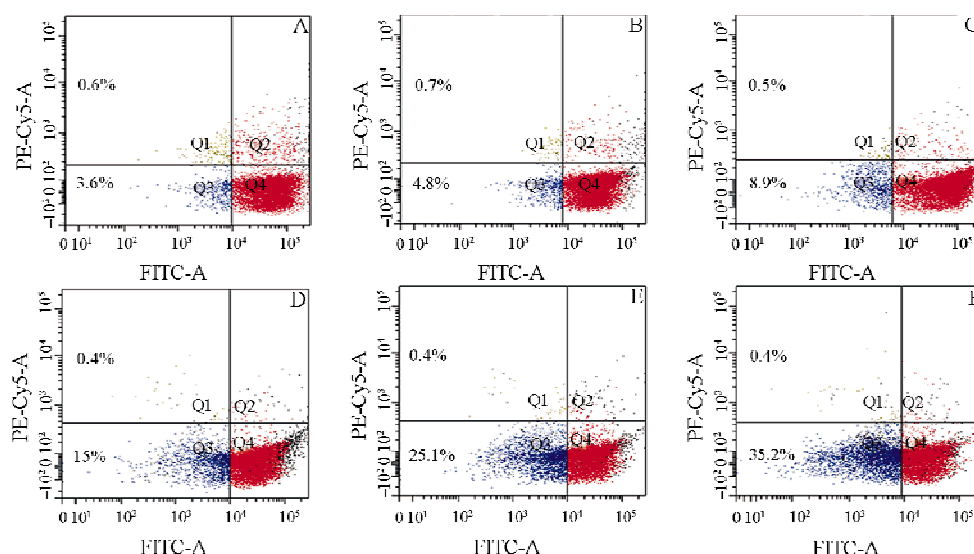
Fig 2 Comparison of survival rates among subgroups in experiment group 2



A. 实验一组 24 h; B. 阴性对照组; C. 空白对照组。

图 3 Wrights-Giemsa 染色观察 PC12 细胞形态 $\times 100$

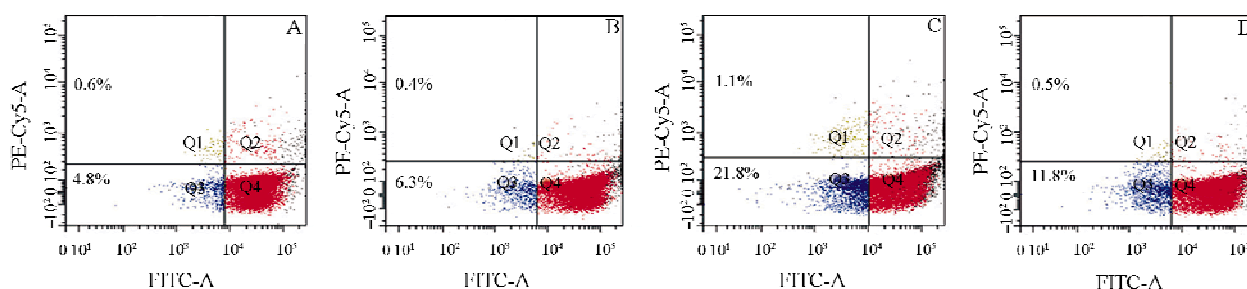
Fig 3 Morphology of PC12 cells observed with Wright-Giemsa staining $\times 100$



A. 空白对照组; B. 阴性对照组; C. 实验一组 6 h; D. 实验一组 12 h; E. 实验一组 24 h; F. 实验一组 48 h。

图 4 流式细胞术检测实验一组 PC12 细胞凋亡

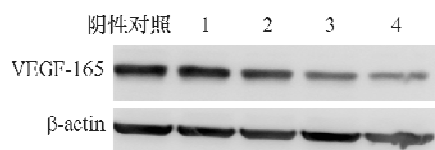
Fig 4 Apoptosis of PC12 cells in experiment group 1 detected by flow cytometry



A. VEGF 组; B. 阴性对照组; C. 17-AAG 组; D. 17-AAG + VEGF 组。

图 5 流式细胞术检测实验二组 PC12 细胞凋亡

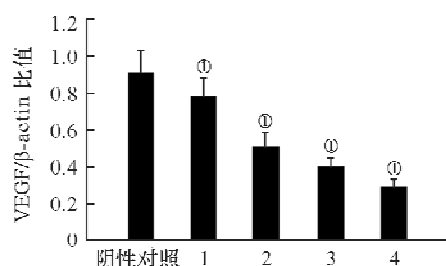
Fig 5 Apoptosis of PC12 cells in experiment group 2 detected by flow cytometry



注: 1~4 分别表示 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG 作用 6、12、24、48 h。

图 6 Western blotting 检测 PC12 细胞 VEGF-165 蛋白表达

Fig 6 Expression of VEGF-165 protein in PC12 cells detected by Western blotting



注: 1~4 分别表示 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG 作用 6、12、24、48 h; $^{\text{①}}P < 0.01$ 与阴性对照组比较。

图 7 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG 对 PC12 细胞 VEGF-165 蛋白表达的影响
Fig 7 Effects of 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 17-AAG on expression of VEGF-165 protein in PC12 cells

3 讨论

HSP90 是热休克蛋白家族成员中最重要的分子,有其专一的一系列客户蛋白,HSP90 维持这些蛋白的结构稳定及功能发挥。其中,多种客户蛋白与肿瘤的发生和发展密切相关,在促进肿瘤细胞增殖、转移及抑制肿瘤细胞凋亡的信号转导过程中起到重要作用^[5]。17-AAG 是 HSP90 的特异性抑制剂,能够通过竞争性地结合 ATP 位,抑制 HSP90 的分子伴侣功能^[6]。国外有研究^[7-9]报道,17-AAG 可抑制多种肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,且呈时间-剂量依赖关系。

Kaur 等^[10]发现 17-AAG 抑制内皮细胞增殖、迁移、侵入及诱导凋亡均直接通过血管生成路径。Nguyen 等^[7]体外观察 H358 细胞及大鼠肿瘤细胞,17-AAG 均可明显抑制 VEGF 的生成,证实了 17-AAG 是抑制 VEGF 分泌的有效药物,并通过负面作用于调节 VEGF 基因表达的 erbB 信号转导路径起到

作用。此外, Hur 等^[11]也证明了 17-AAG 可通过抑制 VEGF 的基因表达来减少肿瘤的血管生成。缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)是转录因子,主要有 HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α , 异常升高的 HIF 将上调一系列下游基因,包括 VEGF、VEGF 受体、转化生长因子 α 等,而 HSP90 通过 HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α 共有的 PAS-B 基团直接与之结合并与其他共作用蛋白一起形成复合物,调节 HIF 的功能状态与稳定。因此,通过 HSP90 的特效抑制剂 17-AAG 抑制 HSP90,使之不能成为 HIF 的分子伴侣,从而减少 VEGF 的表达^[12]。

本研究结果表明, HSP90 抑制剂 17-AAG 可引起 PC12 细胞增殖抑制和促进凋亡,且呈时间-剂量依赖关系,即时间越长,剂量越大,细胞存活率越低,凋亡率越高。此结果与相关研究结果相近,如 17-AAG 作用于骨髓基质细胞^[13]、神经胶质瘤细胞和结肠癌细胞^[14],均表现出对肿瘤细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用。

为进一步明确 17-AAG 对 PC12 细胞的生长抑制作用及促凋亡作用是否与 VEGF 相关,本研究采用 Western blotting 法检测 VEGF-165 蛋白的表达,结果显示:随时间变化, VEGF-165 的表达量逐渐降低。此结果与 Nguyen^[15]、Mabjeesh^[16]和 Hawkins 等^[13]分别在非小细胞肺癌细胞、前列腺癌细胞和骨髓基质细胞中的研究结果相近。在恶性嗜铬细胞瘤中, VEGF 呈高度表达^[17,18]。鉴于 17-AAG 对 PC12 细胞的增殖抑制作用、促凋亡作用及对 VEGF 表达的抑制作用, HSP90 有望成为治疗恶性嗜铬细胞瘤的新靶点。

【参考文献】

- [1] Sanderson S, Valenti M, Gowan S, et al. Benzoquinone ansamycin heat shock protein 90 inhibitors modulate multiple functions required for tumor angiogenesis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(3): 522-532.
- [2] Richardson PG, Mitsiades GS, Lanbach JP, et al. Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers[J]. *Br J Haematol*, 2011, 152(4): 367-379.
- [3] Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13 Suppl 1: S125-135.
- [4] Lang SA, Klein D, Moor C, et al. Inhibition of heat shock protein 90 impairs epidermal growth factor mediated signaling in gastric cancer cells and reduces tumor growth and vascularization *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(3): 1123-1132.
- [5] Solit DB, Rosen N. Hsp90: a novel target for cancer therapy[J]. *Curr Top Med Chem*, 2006, 6(11): 1205-1214.
- [6] Workman P. Pharmacogenomics in cancer drug discovery and development: inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone[J]. *Cancer Detect Prev*, 2002, 6(6): 405-410.
- [7] Nguyen DM, Lorang D, Chen GA, et al. Enhancement of paclitaxel-mediated cytotoxicity in lung cancer cells by 17-allylamino geldanamycin: *in vitro* and *in vivo* analysis[J]. *Ann Thorac Surg*, 2001, 72(2): 371-378.
- [8] Sauvageot GM, Weatherbee JL, Kesari S, et al. Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells[J]. *Neuro Oncol*, 2009, 11(2): 109-121.
- [9] Roforth MM, Tan C. Combination of rapamycin and 17-allylamino-17-deme-thoxygeldanamycin abrogates Akt activation and potentiates mTOR blockade in breast cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2008, 19(7): 681-688.
- [10] Kaur G, Belotti D, Burger AM, et al. Antiangiogenic properties of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin: an orally bioavailable heat shock protein 90 modulator[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(14): 4813-4821.
- [11] Hur E, Kim HH, Choi SM, et al. Reduction of hypoxia-induced transcription through the repression of hypoxia-inducible factor-1 α /aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator DNA binding by the 90-kDa heat-shock protein inhibitor radicicol[J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62(5): 975-982.
- [12] Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery[J]. *Exp Biol Med*, 2003, 3(3): 213-217.
- [13] Hawkins LM, Narendran A. The geldanamycin derivative 17-AAG decreases VEGF secretion and leukemia growth support by trisomy 8 myelodysplastic syndrome bone marrow stromal cells[J]. *Pediatr Hematol Oncol*, 2005, 22(2): 115-125.
- [14] Cortés-González GC, Ramírez-González V, Ariza A, et al. Functional significance of heat shock protein 90[J]. *Rev Invest Clin*, 2008, 60(4): 311-320.
- [15] Nguyen DM, 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.
- [16] Mabjeesh NJ, Post DE, Willard MT, et al. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1 α protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9): 2478-2482.
- [17] 祝宇, 金晓龙, 芮文斌, 等. 血管内皮生长因子在恶性嗜铬细胞瘤中的表达及与 MVD 的关系[J]. *现在泌尿外科杂志*, 2008, 13(3): 167-169.
- [18] Zielke A, Middeke M, Hoffmann S, et al. VEGF-mediated angiogenesis of human pheochromocytomas is associated to malignancy and inhibited by anti-VEGF antibodies in experimental tumors[J]. *Surgery*, 2002, 132(6): 1056-1063.

【收稿日期】2011-07-17

【本文编辑】吴 洋