

## 哌立福辛抑制胃癌细胞 SGC7901 增殖及其作用机制

谢海彬, 李 忠\*

(常州市第一人民医院胃肠外科, 江苏 常州 213003)

**[摘要]** 目的:探讨哌立福辛对体外培养的人胃癌 SGC7901 细胞生长增殖的影响并探讨其机制。方法:分别用不同浓度的哌立福辛 (0.125、0.250、0.500、0.750、1.500  $\mu\text{mol/L}$ ) 对 SGC7901 细胞进行干预后,采用磺酰罗丹明 B (SRB)法检测细胞增殖变化;平板克隆实验检测细胞克隆形成能力;Real-time PCR、Western blot 法检测癌症相关基因 eIF4E 及 AEG-1 mRNA 及蛋白表达。结果:哌立福辛呈时间及浓度依赖性抑制胃癌 SGC7901 细胞的增殖,并降低细胞的克隆形成能力;细胞内 AKT 信号通路中 AEG-1、eIF4E 的表达明显降低。结论:哌立福辛具有抑制胃癌 SGC7901 细胞增殖的作用;通过降低 AKT 信号通路中 AEG-1 和 eIF4E 的 mRNA 及蛋白表达可能是发挥增殖抑制作用的机制之一。

**[关键词]** 哌立福辛;胃癌;增殖;抑制

**[中图分类号]** R735.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)08-1077-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130810

## Inhibition of perifosine on proliferation of gastric cancer cell line SGC7901 *in vitro*

Xie Haibin, Li Zhong\*

(Department of Gastrointestinal Surgery, the First People's Hospital of Changzhou, Changzhou 213003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of perifosine on the growth of human gastric carcinoma cell line SGC7901. **Methods:** The inhibitory effect of perifosine on the growth of human gastric cancer cell line SGC7901 was observed at different concentrations (0.125, 0.250, 0.500, 0.750, 1.500)  $\mu\text{mol/L}$  by sulforhodamine B (SRB) assay. Plate colony formation assay was performed to detect the colony formation rate. The expression levels of eIF4E and AEG-1 were determined by Real-time PCR and Western blot. **Results:** Perifosine inhibited the growth of gastric cancer cell line SGC7901 in dose- and time-dependent manners. The cell colony formation rate was statistically decreased ( $P < 0.05$ ) as compared with those in the control. The mRNA and protein levels of eIF4E and AEG-1 were reduced gradually dose-dependently. **Conclusion:** Perifosine, an AKT inhibitor, inhibits the growth and the colony formation rate of human gastric cancer cell via downregulating the expression of eIF4E and AEG-1.

**[Key words]** perifosine; gastric carcinoma; proliferation; inhibition

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(8):1077-1080]

哌立福辛是新型的口服烷基磷脂化合物,它主要抑制 AKT 的活性,是公认的 AKT 抑制剂<sup>[1]</sup>,还可调节 MAPK、JNK、DR4 和 DR5 等信号分子<sup>[2-3]</sup>。在增殖因子的刺激下,PI3K 催化磷脂酰肌醇二磷酸(PIP2)转化为三磷酸肌醇酯(PIP3)、AKT 等蛋白激酶,利用它们的 PH 蛋白结构域与 PIP3 结合,浓集在细胞膜附近,在这里被其他激酶如 PDK1 磷酸化激活,并磷酸化下游的信号分子 GSK3 $\beta$ 、FOXO3a

(Forkhead box O 3a)等<sup>[4]</sup>,目前哌立福辛被用于乳腺癌、前列腺癌、肾癌等治疗,已进入临床 I/II 期试验,取得良好效果<sup>[5-7]</sup>,本研究旨在探讨哌立福辛对胃癌细胞 SGC7901 体外增殖的影响并阐明其作用机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

人胃癌细胞系 SGC7901 (中科院上海细胞库),哌立福辛(美国 Selleck Chemicals LLC),磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB, 美国 Sigma 公

**[基金项目]** 常州市卫生局重大项目(ZD200906)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:czyywcwk@163.com

司),鼠抗 AEG-1(北京中山金桥公司),兔抗 eIF4E 抗体(美国 Cell Signaling Technology),兔抗 GAPDH 抗体(美国 Bioworld Technology 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 细胞培养

SGC7901 细胞培养于含 10% 新鲜胎牛血清(美国 Gibco 公司)、50 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养基(美国 Gibco 公司)中,置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.2.2 SRB 法测定细胞存活率

胰酶消化 SGC7901 细胞后,按 100 μl/孔接种于 96 孔板,细胞密度 2 000 个/孔。24 h 后给予不同浓度哌立福辛处理,对照组加 PBS 连续 5 d,到指定时间收板进行 SRB 实验。加入 10% 的氯醋酸(TCA) 100 μl/孔,固定,洗涤,晾干。加入 10 mmol/L Tris 碱 100 μl/孔 5 min,用酶标仪在 500 nm 波长处测定吸光度值,各处理组数据经过调零孔修正后做定量分析,每个药物浓度抑制率做 3 个复孔测试。

### 1.2.3 平板克隆形成试验

将 SGC7901 按 100 个/孔分别接种到 6 孔板中,实验分 5 组,每组 3 个复孔,24 h 后用不同浓度哌立福辛处理,移至培养箱静置 12 d,直到板中出现肉眼可见的克隆时终止培养。采用甲醇溶液固定细胞,0.1% 结晶紫染色 10 min,倒置光学显微镜下计数>50 个细胞的克隆数。克隆形成率(%)=(细胞克隆数/每孔接种的细胞数)×100%。

### 1.2.4 Real-time PCR 检测 SGC7901 细胞 AEG-1、eIF4E mRNA 的表达

哌立福辛处理 SGC7901 48 h 后,细胞经 TRIzol 提取总 RNA,按步骤逆转录(RT)合成 cDNA。AEG-1、eIF4E 及 GAPDH 基因引物均由美国 Invitrogen 公司合成:AEG-1 上游引物:5'-ACGACCTGGC-CTTGCTGAAGAATCT-3',下游引物:5'-CGGTTG-TAAGTTGCTCGGTGGTAA-3';eIF4E 上游引物:5'-CCTACAGAACAG-ATGGGCACTC-3',下游引物:5'-GCCCAAAGTCTTCAACAGTATCA-3';GAPDH 上游引物 5'-A-TGGGGAAGGTGAAGGTCG-3',下游引物 5'-GGGTCATTGATG-GCAACAATA-3'。反应条件:95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环,用 96 孔板进行实时荧光定量 PCR 反应,每个体系做 3 个复孔测试,取平均 Ct 值,按照 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算基因的相对表达量。

### 1.2.5 Western blot 检测蛋白水平

用不同浓度哌立福辛处理 SGC7901 细胞 24 h

后裂解细胞提取总蛋白。12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜,含 5% 脱脂奶粉的 PBST 缓冲液中封闭,剪膜、洗膜后分别加入 AEG-1(1:1 000)、eIF4E (1:1 000)、GAPDH (1:5 000)抗体 4℃下摇匀过夜,以 HRP 标记的羊抗鼠、羊抗兔二抗孵育 2 h,ECL 化学发光,每个实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

所有数据都用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS18.0 软件进行分析,各组间均数的差异比较用单因素方差分析(Dunnett *t* 检验), $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 哌立福辛对 SGC7901 细胞增殖的抑制作用

SRB 法示 0.125、0.250、0.500、0.750 及 1.500 μmol/L 浓度的哌立福辛分别作用 SGC7901 细胞 24、48、72 h 后表现出抑制作用,且随着药物浓度的增加,对 SGC7901 细胞增殖抑制作用逐渐增强,作用关系呈时间及剂量依赖性。同时研究发现不同浓度组细胞增殖抑制率随着时间的延长有增高趋势(图 1)。

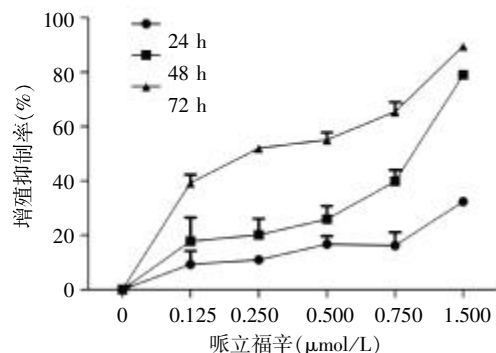


图 1 SRB 法检测哌立福辛对胃癌细胞 SGC7901 增殖的影响

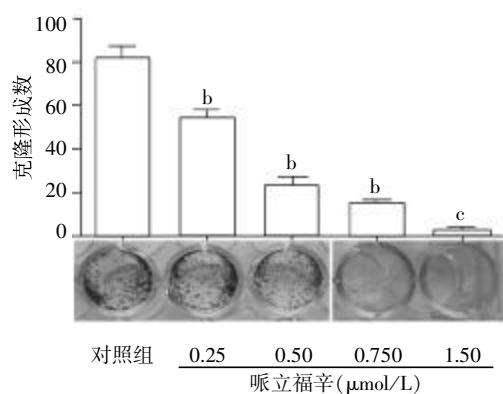
Figure 1 Effect of perifosine on proliferation in gastric carcinoma cell line SGC-7901

### 2.2 哌立福辛显著降低 SGC7901 细胞的克隆形成能力

不同浓度哌立福辛培养 SGC7901 细胞后,阳性克隆计数统计结果表明:哌立福辛处理组细胞集落形成数与空白对照组比较,随着哌立福辛浓度的升高,集落形成数逐渐降低,差异有统计学意义(图 2)。

### 2.3 哌立福辛下调 AEG-1 和 eIF4E mRNA 表达

用一定浓度哌立福辛处理 SGC7901 不同时间后,real-time PCR 检测结果显示 eIF4E 和 AEG-1 的表达逐渐下降(图 3),差异具有统计学意义。



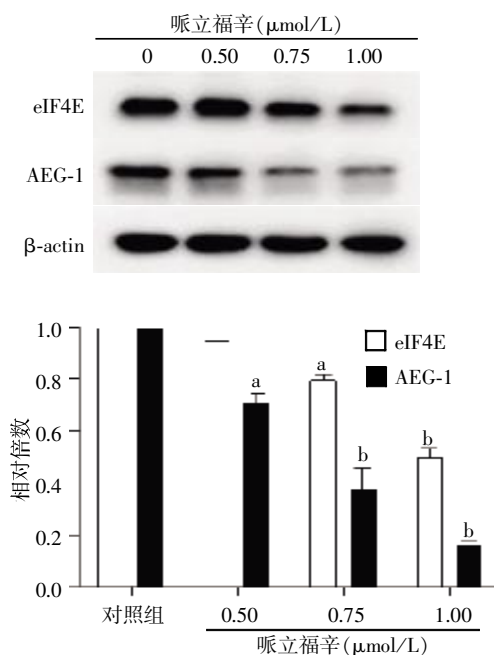
与未加哌立福辛的对照组相比,  $^bP < 0.01$ ,  $^cP < 0.001$ 。

图 2 平板克隆形成实验检测不同浓度哌立福辛对 SGC7901 克隆形成的影响

Figure 2 Effect of perifosine at different concentrations on colony formation of gastric carcinoma cell line SGC-7901 by plate colony formation assay

#### 2.4 哌立福辛降低 AEG-1 和 eIF4E 的蛋白表达

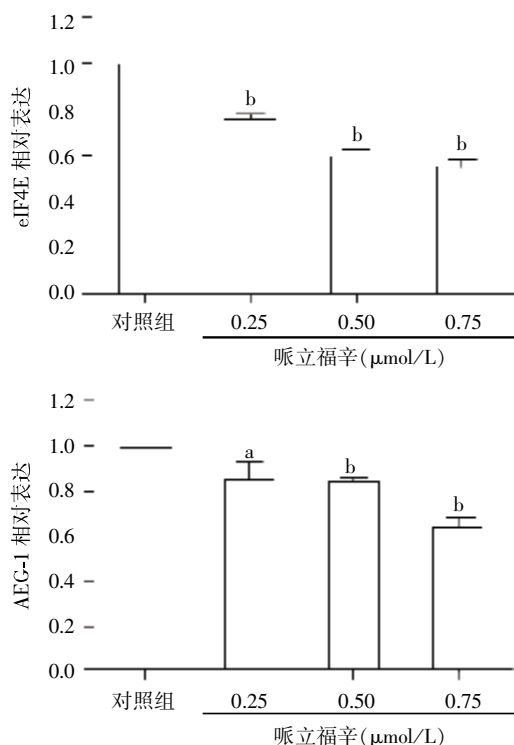
Western blot 法检测不同剂量哌立福辛作用一定时间 AEG-1 和 eIF4E 蛋白的变化发现, 哌立福辛 (10 μmol/L) 作用 SGC7901 细胞 24 h 后细胞内的 AEG-1 和 eIF4E 蛋白表达水平显著下降(图 4)。



与未加哌立福辛的对照组相比,  $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$ 。

图 4 哌立福辛对胃癌细胞 SGC7901 中 eIF4E 及 AEG-1 蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of perifosine on expression of eIF4E and AEG-1 protein in gastric carcinoma cell line SGC-7901



与未加哌立福辛的对照组相比,  $^aP < 0.05$ ,  $^bP < 0.01$ 。

图 3 哌立福辛对胃癌细胞 SGC7901 中 eIF4E 及 AEG-1 mRNA 表达的影响

Figure 3 Effect of perifosine on expression of eIF4E and AEG-1 mRNA in gastric carcinoma cell line SGC-7901

### 3 讨论

胃癌在全球范围内是第四大常见恶性肿瘤, 在男女癌症病死率中分别居于第 3、5 位<sup>[8]</sup>。研究发现 AKT 信号通路与肿瘤的增殖、凋亡和代谢等生命过程密切相关, 该途径中多个基因在肿瘤中发生突变, 与肿瘤的发生发展有着密切的联系<sup>[9]</sup>。

目前化疗仍然是胃癌综合治疗的主要手段之一, 哌立福辛是新型的口服烷基磷脂化合物, 可影响细胞膜的渗透性、膜脂质的构成以及膜磷脂的代谢, 从而影响肿瘤细胞间生长信号的转导。目前研究发现哌立福辛能增强胆管癌细胞的 5-Fu 的化疗敏感性, 增加对胆管癌细胞的抑制作用<sup>[10]</sup>, 也可以通过激活 GSK3β 抑制雷帕霉素耐药的非小细胞肺癌细胞的生长<sup>[11]</sup>。本研究通过 SRB 法及克隆形成实验发现哌立福辛对胃癌细胞具有明显的增殖抑制作用, 细胞存活率随着哌立福辛作用时间及剂量的增加而降低, 呈一定的时间与剂量依赖性。

为了进一步阐明哌立福辛抑制胃癌细胞 SGC7901 增殖的分子机制, 本文采用 real-time PCR 和 Western blot 法分析了哌立福辛对细胞内信号分子 AEG-1 和 eIF4E 的影响, AEG-1 和 eIF4E 是 AKT

信号通路中重要的信号分子,参与多种肿瘤的发生发展。真核细胞起始因子 eIF4E 与肿瘤关系密切,在其过度表达的情况下,某些在正常情况下不被翻译的含长 5'-UTR mRNA 的基因产物上调,这些基因产物中包括一些原癌基因及一些重要的细胞生长调节因子,对细胞恶性转化和分裂有重要影响<sup>[12]</sup>。AEG-1 也被称为 Lyric 或 Metadherin,是克隆发现的一个新的基因,它被认为是肿瘤恶性行为的关键调节因子和肿瘤发生复杂网络的关键节点<sup>[13]</sup>。本实验表明,哌立福辛作用 SGC7901 后,AEG-1 和 eIF4E mRNA 及蛋白的表达受到了抑制,这些作用机制是其发挥抗增殖作用的分子基础,其调节作用以及作用机制仍有待进一步阐明。

本研究通过体外实验初步证实哌立福辛可以抑制胃癌细胞 SGC7901 的生长增殖能力,并探索了可能的分子机制,而其作为治疗胃癌药物的应用前景尚需体内试验进一步证实。

#### [参考文献]

- [1] Gills JJ, Dennis PA. Perifosine; update on a novel Akt inhibitor[J]. *Curr Oncol Rep*, 2009, 11(2): 102-110
- [2] Chiarini F, Del Sole M, Mongiorgi S, et al. The novel Akt inhibitor, perifosine, induces caspase-dependent apoptosis and downregulates P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human T-acute leukemia cells by a JNK-dependent mechanism[J]. *Leukemia*, 2008, 22(6): 1106-1116
- [3] David E, Sinha R, Chen J, et al. Perifosine synergistically enhances TRAIL-induced myeloma cell apoptosis via up-regulation of death receptors [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(16): 5090-5098
- [4] Li Z, Tan F, Liewehr DJ, et al. In vitro and in vivo inhibition of neuroblastoma tumor cell growth by AKT inhibitor perifosine[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(11): 758-770
- [5] Leighl NB, Dent S, Clemons M, et al. A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2008, 108(1): 87-92
- [6] Chee KG, Longmate J, Quinn DI, et al. The AKT inhibitor perifosine in biochemically recurrent prostate cancer: a phase II California/Pittsburgh cancer consortium trial [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2007, 5(7): 433-437
- [7] Cho DC, Hutson TE, Samlowski W, et al. Two phase 2 trials of the novel Akt inhibitor perifosine in patients with advanced renal cell carcinoma after progression on vascular endothelial growth factor-targeted therapy [J]. *Cancer*, 2012, 118(24): 6055-6062
- [8] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29
- [9] De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(Suppl 2): S17-27
- [10] 董光辉, 罗璇, 翟溯澜, 等. 哌立福辛通过激活 GSK3 $\beta$  抑制雷帕霉素耐药细胞的生长[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(4): 389-392
- [11] 王保臣, 张弛, 孙伟, 等. 哌立福辛增强胆管癌细胞化疗敏感性的实验研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(20): 2370-2374
- [12] De Benedetti A, Graff JR. eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases [J]. *Oncogene*, 2004, 23(18): 3189-3199
- [13] Yoo BK, Emdad L, Lee SG, et al. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 130(1): 1-8

[收稿日期] 2012-12-19