

SP-141 抑制胃癌细胞增殖、迁移并促进凋亡

严冬琳, 王 强, 邱丹萍, 李爱萍, 周建伟*

(南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:探讨 MDM2 的新型小分子抑制剂 SP-141 对胃癌细胞株 MGC803 和 BGC823 增殖、凋亡以及迁移的影响。方法:胃癌细胞经 SP-141 处理后,采用 CCK-8 法、克隆形成实验、流式细胞术、Hoechst 染色法和划痕实验分别检测细胞存活率、细胞增殖、周期分布、凋亡以及迁移能力改变。Western blot 检测相关分子蛋白质表达水平。结果:TCGA 数据库中 32 对胃癌组织中的 MDM2 mRNA 表达水平高于癌旁组织($P<0.01$);5 种胃癌细胞株均检出 MDM2,表达水平差异不大;SP-141 抑制 MGC803 和 BGC823 的细胞存活率以及克隆形成,诱导其细胞周期阻滞在 G2/M 期;SP-141 增加细胞凋亡发生率,并下调 Bcl-2 同时上调 Bax、Caspase-3 剪切体、PARP 剪切体的蛋白表达;SP-141 抑制细胞迁移并伴有 FAK 蛋白表达量的下降。结论:MDM2 的新型小分子抑制剂 SP-141 可有效抑制胃癌细胞增殖、迁移并促进细胞凋亡。

[关键词] SP-141;胃癌;细胞增殖;凋亡;迁移

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)08-926-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20170802

SP-141 inhibits cell proliferation, migration, and promotes apoptosis in gastric cancer cells

Yan Donglin, Wang Qiang, Qiu Danping, Li Aiping, Zhou Jianwei*

(School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of MDM2 inhibitor SP-141 on proliferation, apoptosis and migration in MGC803 and BGC823 human gastric cancer cells. **Methods:** The cell viability, proliferation, cell cycle distribution, apoptosis and migration were detected by CCK-8 method, colony formation assay, flow cytometry analysis, Hoechst staining assay and wound-healing assay, respectively. Western Blot was performed to determine the levels of MDM2 and relative biomarkers in SP-141 treated MGC803 and BGC823 cells. **Results:** The mRNA expressions of MDM2 was significantly increased in gastric cancer tissues compared with adjacent non-cancerous tissues ($P<0.01$) in TCGA gastric cancer database. MDM2 expressions did not show obvious differences among five different human gastric cancer cell lines. SP-141 inhibited the cell viability and colony numbers in MGC803 and BGC823, and induced cell cycle arrest at G2/M phase. SP-141 induced cellular apoptosis with down-regulating Bcl-2 as well as up-regulating Bax, cleaved-Caspase-3 and cleaved-PARP1 expressions. SP-141 also suppressed the wound closure in MGC803 cells, and accompanied by the decreased FAK protein expression. **Conclusion:** The MDM2 specific inhibitor SP-141 effectively suppresses cell proliferation, migration, and promotes apoptosis in human gastric cancer cells.

[Key words] SP-141; gastric cancer; cell proliferation; apoptosis; migration

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):926-931]

鼠双微体同源基因 2 (mouse double minute-2 homolog, MDM2) 是功能强大的癌基因之一,在人类所发生的肿瘤中约 7% 有 MDM2 基因的扩增^[1]。近年来研究表明,MDM2 发挥其生物学功能主要通过

p53 依赖以及非依赖通路实现。在依赖 p53 的通路中,MDM2 作为 E3 泛素连接酶与 p53 蛋白结合,促进 p53 蛋白的泛素化降解,削弱 p53 介导的 DNA 分子修复、细胞周期阻滞、凋亡等生物学事件,导致恶性肿瘤的发生发展。依据这一原理设计合成的小分子抑制剂 Nutlin-3^[2]可阻断 MDM2 与 p53 之间的结合,解除对 p53 的泛素化降解,维持 p53 的蛋白水平,发挥 p53 抑制肿瘤恶性表型的生物学功能。但是

[基金项目] 国家自然科学基金(8151001113)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jwzhou@njmu.edu.cn

人类约 50% 的肿瘤存在 p53 缺失或突变^[3],这一现象限制了 Nutlin-3 的临床应用。因此,急需发现新的针对不依赖 p53 的 MDM2 抑制剂。最新研究发现,依据 MDM2 的蛋白分子结构设计合成的小分子抑制剂 SP-141,能够直接作用于 MDM2 蛋白,促进其自身发生泛素化降解,可通过不依赖 p53 的信号通路发挥抑制乳腺癌增殖作用^[4],但是该小分子化合物在其他肿瘤中是否具有相似的效应尚不清楚。

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一^[5],我国胃癌发病率位居第 2 位,病死率位列第 3 位^[6]。尽管外科手术与药物治疗发展迅速,但对于晚期胃癌患者尚无有效的治疗方法或药物^[7]。急需新型治疗药物应用于胃癌的临床治疗,延长患者生存期。目前尚未见针对非依赖 p53 的抑制胃癌细胞 MDM2 的干预性研究报道。本研究旨在体外水平探究新发现的 MDM2 的小分子抑制剂 SP-141 是否对胃癌恶性生物学行为有影响及相关分子机制,为拓展 SP-141 潜在的临床应用价值提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

SP-141(分子式 $C_{22}H_{16}N_2O$,纯度>99%)由美国德州理工大学张瑞稳教授实验室合成后赠予。人胃癌细胞株 MGC803、BGC823(中国科学院上海细胞生物研究所),RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、磷酸缓冲盐溶液(PBS)(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(同仁化学研究所,日本),结晶紫染色液、细胞凋亡 Hoechst 染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、抗微管抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠/兔 IgG 抗体(南京碧云天生物技术有限公司),抗 MDM2 抗体(Calbiochem 公司,德国),凋亡相关蛋白抗体:抗 Bcl-2 抗体、抗 Bax 抗体(Proteintech 公司,美国),抗 Caspase-3 抗体、抗 PARP1 抗体(南京碧云天生物技术有限公司),抗黏着斑激酶(FAK)抗体(CST 公司,美国),ECL 化学发光检测试剂盒、伯乐凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,美国),多功能酶标仪(M200 PRO,TECAN 公司,瑞士),CO₂ 恒温培养箱(HERA CELL 公司,德国),倒置荧光显微镜(IX-70,Olympus 公司,日本)。其余均为美国 Sigma 公司试剂,由本实验室常规配制使用。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人胃癌细胞 MGC803、BGC823 用含有 10% 的

胎牛血清、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素的 RPMI1640 培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 条件的培养箱中常规培养。待细胞融合度达到 80%~90%后,用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代,取对数增长期的细胞用于后续实验。

1.2.2 细胞活性检测

取对数增长期的 MGC803 和 BGC823 细胞,以 5 000 个/孔的细胞量均匀种于 96 孔板内。待细胞贴壁后,分别加入相应剂量的 SP-141(0.00、0.10、0.20、0.25、0.30、0.40、0.50、0.80、1.00 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理 48 h,吸出孔中培养液,并于每孔加入 90 μL RPMI1640 培养液和 10 μL CCK-8 试剂,放置于培养箱中孵育 1 h。采用多功能酶标仪检测各孔在 450 nm 处的吸光度值。细胞存活率(%)=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值) \times 100%,每组设 3 个平行样。

1.2.3 克隆形成试验

将 MGC803 或 BGC823 细胞以 500 个/孔的细胞量均匀接种于 6 孔板内。待细胞贴壁后,分别加入 0.00、0.25、0.50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 SP-141 处理 24 h。每隔 2 d 更换新鲜 RPMI1640 培养液,待培养 14 d 后,用甲醇固定,结晶紫染色,拍照计算克隆团形成个数。

1.2.4 细胞周期检测

收集 SP-141 处理后的 MGC803 或 BGC823 细胞,经 75%乙醇固定过夜后,PBS 清洗 2 次,用结合液将细胞重悬并调整浓度为 1×10^6 个/mL,每组取 100 μL ,经 PI 染色,室温避光 15 min,采用流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.2.5 Hoechst 33258 染色实验

将细胞以一定密度接种于 12 孔板中,待细胞贴壁后,加入 0.00、0.25、0.50、1.00 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 SP-141 处理 24 h。经甲醇固定后,加入 Hoechst 33258 染色液染色 5 min,PBS 清洗 2 遍,滴入抗荧光淬灭剂于倒置荧光显微镜下观察拍照。

1.2.6 Western blot 检测

使用蛋白裂解液裂解 SP-141 处理后的细胞,提取蛋白。采用 BCA 蛋白浓度测定法确定蛋白样品浓度。取等量的蛋白样品 40 μg ,经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,并转移至 PVDF 膜,于室温下 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h。第一抗体按抗体说明书进行稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 与 PVDF 膜共同孵育过夜,TBST(含有 0.1% Tween-20)洗涤 3 次,加入 HRP 标记的二抗(1:1 000),置于摇床室温下孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,用 ECL 化学发光液进行显影。采用 Adobe Photoshop 软件

扫描图片记录条带灰度值。蛋白表达相对比=目的条带灰度值/对应的内参灰度值 $\times 100\%$ 。相对灰度值=处理组蛋白表达相对比/对照组蛋白表达相对比。

1.2.7 细胞划痕实验

将细胞以 80% 的密度均匀接种于 6 孔板中,待细胞完全贴壁,换无血清培养液培养过夜。使用 10 μL 的白色枪头在孔内划相互垂直的 2 条线,PBS 洗去脱落的细胞,并于划痕旁做标记,分别加入含有 0.0、0.1、0.2 $\mu\text{mol/L}$ SP-141 的无血清培养基处理,于 0、12、24 h 时间点观察拍照。

1.3 统计学方法

每组实验均独立重复 3 次。采用 SPSS18.0 统计分析软件进行数据分析。统计结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)的方式表示。TCGA 数据库中胃癌组织与癌旁组织 MDM2 mRNA 表达水平资料采用配对 t 检验分析,多组计数资料采用单因素方差分析,其中组间两两比较采用的 Dunnett's t 检验法。半数抑制浓度(IC_{50})采用非线性回归模型进行计算。 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDM2 在胃癌组织与癌旁组织中的表达

分析 TCGA 数据库中 32 对胃癌组织以及癌旁组织的 MDM2 mRNA 表达水平,发现在胃癌组织中 MDM2 表达水平明显高于癌旁组织,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 1A)。

2.2 MDM2 在人胃癌细胞株中的表达

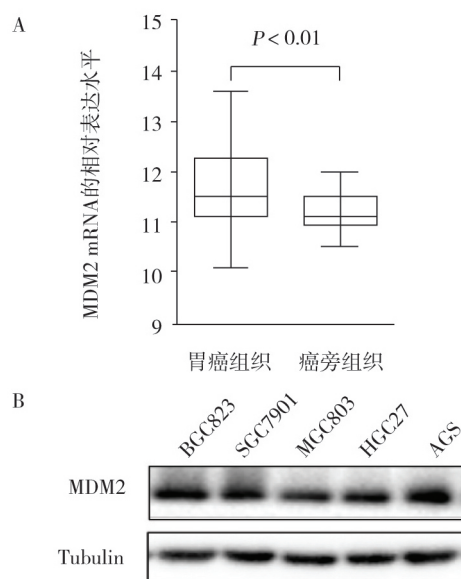
Western blot 检测人胃癌细胞株 BGC823、SGC7901、MGC803、HGC27 以及 AGS 中 MDM2 蛋白表达水平,结果显示 5 种细胞株均有较高水平的 MDM2 表达,细胞株之间表达水平差异不大。选择 MDM2 蛋白相对高表达的 BGC823 和相对低表达的 MGC803 用于后续实验(图 1B)。

2.3 SP-141 对胃癌细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法检测细胞存活情况,处理 48 h 后,随着 SP-141 剂量的增加,胃癌细胞 MGC803 和 BGC823 的存活率逐渐下降;同时计算得到 SP-141 对 MGC803 和 BGC823 的 48 h IC_{50} 值分别为 0.62 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.60 $\mu\text{mol/L}$ (图 2A)。克隆形成实验结果表明,0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 SP-141 能够显著抑制 MGC803 和 BGC823 的克隆形成,并随着 SP-141 剂量增加抑制效果增强(图 2B、C)。

2.4 SP-141 对胃癌细胞周期的影响

采用流式细胞法检测细胞周期分布。与未处理



A:TCGA 数据库中胃癌组织以及癌旁组织的 MDM2 的 mRNA 表达水平;B:Western blot 检测 5 株人胃癌细胞株的 MDM2 蛋白表达水平。

图 1 胃癌组织和细胞中 MDM2 表达水平

Figure 1 mRNA and protein expression of MDM2 in human gastric cancer

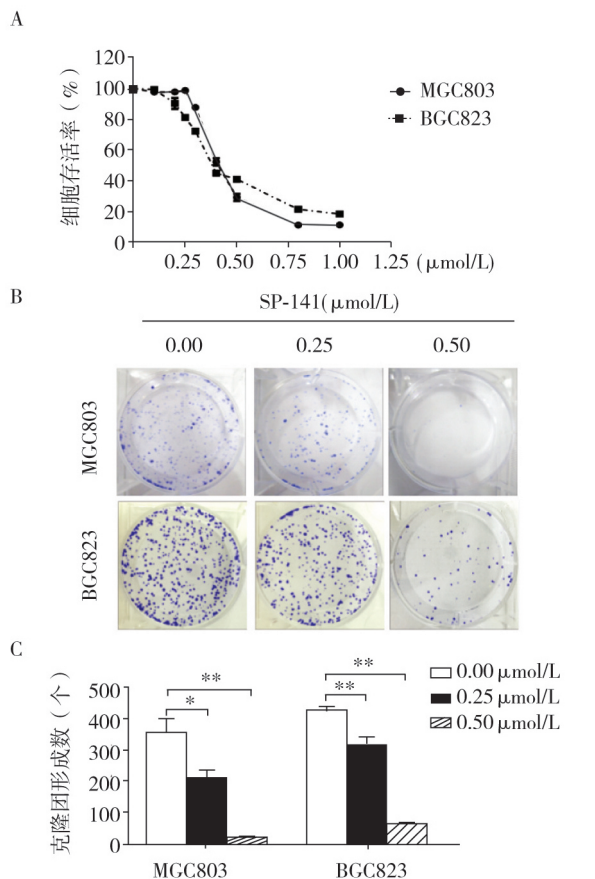
对照组相比,经 SP-141 处理 24 h 后,MGC803 和 BGC823 在 G2/M 期的细胞分布比例显著增加,且呈现剂量依赖关系(图 3),表明 SP-141 使胃癌细胞阻滞在 G2/M 期而发挥抑制细胞增殖的效应。

2.5 SP-141 对胃癌细胞凋亡的影响

Hoechst 染色实验结果表明,当 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 SP-141 处理 MGC803 细胞 24 h 后,其凋亡率升高($P < 0.01$,图 4);当 SP-141 剂量增加到 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 后,与对照组相比,MGC803 和 BGC823 的凋亡发生率明显增高,差异存在统计学意义($P < 0.001$,图 4)。采用 Western blot 检测凋亡相关分子改变发现,随着 SP-141 剂量的增加,MDM2 的蛋白表达水平降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白量随之下调,而促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3 剪切体、PARP 剪切体蛋白量随之上调(图 5)。这些结果均提示 SP-141 处理可以促进胃癌细胞的凋亡。

2.6 SP-141 对胃癌细胞迁移的影响

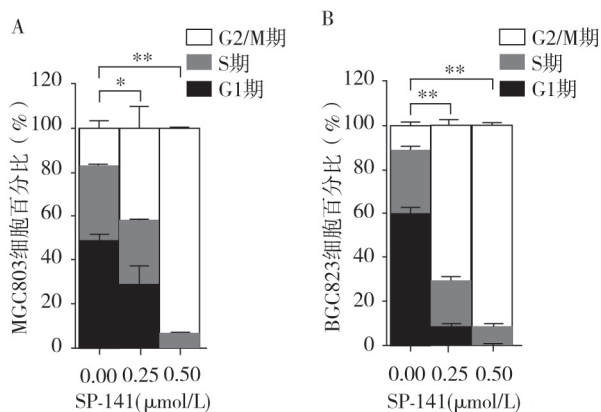
细胞划痕实验结果表明,SP-141 处理 12 h 和 24 h 后,MGC803 细胞迁移率随 SP-141 剂量的增加而下降,差异存在统计学意义(图 6A、B)。从迁移机制分析,SP-141 可能通过降低 MDM2 的蛋白水平,进一步减少 FAK 蛋白表达(图 6C、D)。



MGC803 和 BGC823 经不同剂量的 SP-141 处理, A: 48 h 后, CCK-8 法检测细胞存活情况; B: 24 h 后, 观察克隆形成情况; C: 克隆团形成数的定量分析, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 2 SP-141 抑制胃癌细胞增殖

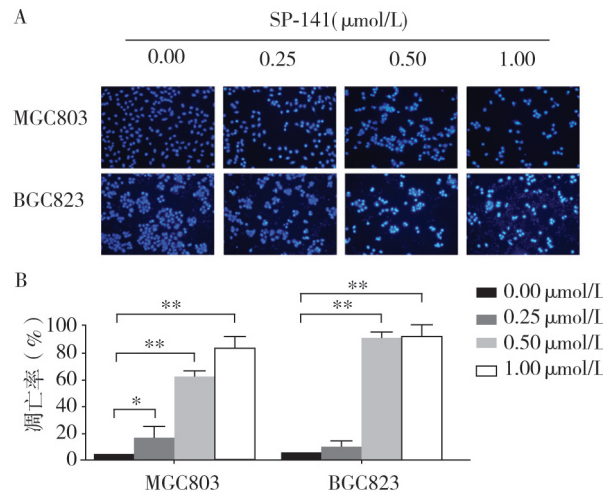
Figure 2 SP-141 inhibits proliferation in MGC803 and BGC823 cells



MGC803(A)和 BGC823(B)经不同剂量的 SP-141 处理 24 h 后, 流式细胞法检测细胞周期分布。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 3 SP-141 增加胃癌细胞 G2/M 期阻滞

Figure 3 SP-141 increases G2/M phase arrest in MGC803 and BGC823 cells



A: MGC803 和 BGC823 经不同剂量的 SP-141 处理 24 h 后, Hoechst 染色法检测细胞凋亡情况; B: 细胞凋亡比例的定量分析, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 4 SP-141 促进胃癌细胞凋亡

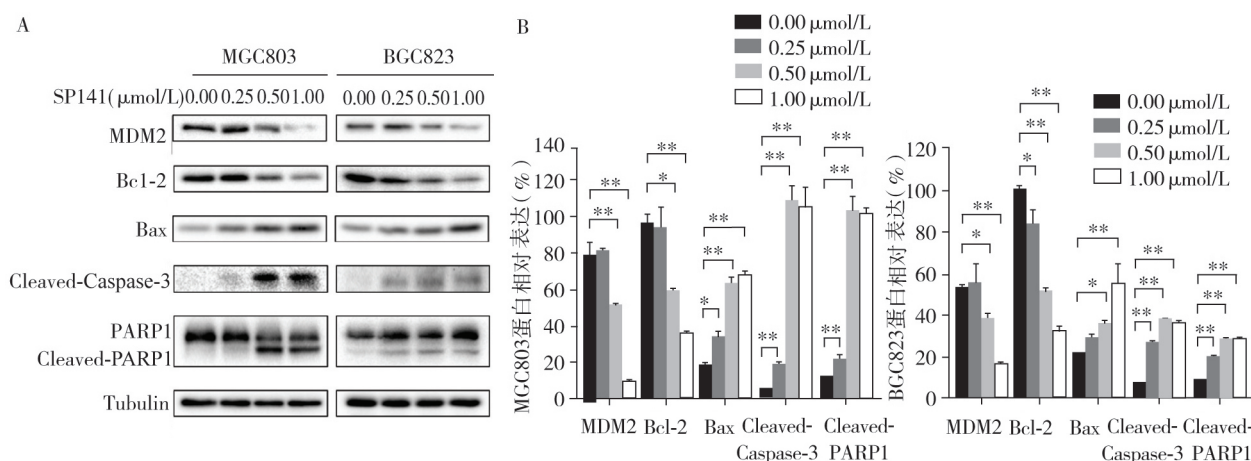
Figure 4 SP-141 treatment increases apoptosis in MGC803 and BGC823 cells

3 讨论

以往研究已知 MDM2 是与胃癌预后有关的生物标志物。胃癌中的 MDM2 蛋白水平明显高于癌旁组织, MDM2 高表达的患者预后差于 MDM2 低表达的患者^[8]。本研究通过对 TCGA 数据库分析发现, 胃癌组织中 MDM2 的 mRNA 水平显著高于癌旁组织。这一结果与先前的研究结果一致, 均为本研究在体外模型中观察用 SP-141 抑制 MDM2 表达影响胃癌恶性生物学表型提供了依据。

本研究选取了常见的 5 株人胃癌细胞系, 采用 Western blot 检测其本底 MDM2 的表达情况, 发现 5 种细胞均表达 MDM2, 且表达水平较接近。其中以 BGC823 的 MDM2 表达水平较高, 而 MGC803 的 MDM2 表达水平较低。用 SP-141 处理上述 2 株胃癌细胞, 发现细胞存活率均下降, 计算得到 48 h 的 IC_{50} 值 MGC803 和 BGC823 分别为 $0.62 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.60 \mu\text{mol/L}$ 。先前 SP-141 在乳腺癌细胞以及胰腺癌细胞的研究结果显示^[4,9], 其 IC_{50} 值均 $< 1 \mu\text{mol/L}$ 。本研究结果显示胃癌细胞 MGC803 和 BGC823 对 SP-141 的敏感性与乳腺癌和胰腺癌细胞接近。

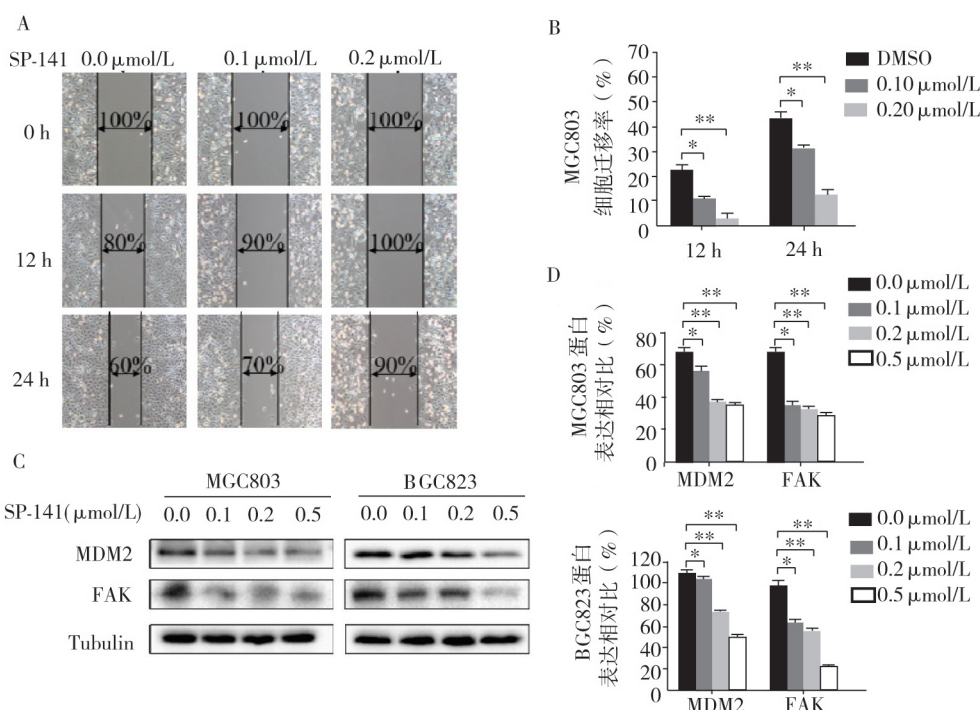
为进一步研究 SP-141 在胃癌临床治疗中的价值, 观察了 SP-141 对胃癌细胞增殖、细胞周期、凋亡以及迁移表型的影响。众所周知, 细胞周期失控导致细胞过度增殖^[10], 是胃癌进展的重要原因之一。本研究结果显示, SP-141 能够诱导 MGC803 和 BGC823



A: MGC803 和 BGC823 经相应剂量的 SP-141 处理 24 h, Western blot 检测凋亡相关蛋白表达水平; B: 蛋白表达水平的定量分析, * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 5 SP-141 处理后的凋亡相关蛋白改变

Figure 5 Expression of apoptosis-related protein after SP-141 treatment in MGC803 and BGC823 cells



A: 细胞划痕实验检测 SP-141 处理后的 MGC803 细胞迁移能力; B: 细胞迁移率的定量分析; C: Western Blot 检测 FAK 蛋白改变; D: 蛋白表达水平的定量分析。* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图 6 SP-141 抑制胃癌细胞迁移及 FAK 蛋白表达水平

Figure 6 SP-141 treatment suppresses migration in MGC803 cells and FAK expression in MGC803 and BGC823 cells

的细胞周期发生 G2/M 期阻滞, 从而可有效抑制胃癌细胞增殖。细胞凋亡受凋亡相关分子精确调控, 并且促进肿瘤细胞凋亡与肿瘤临床治疗效果相关 [11]。本研究发现, SP-141 处理后 MGC803 和 BGC823 的凋亡比例增加, 证明 SP-141 能显著诱导

胃癌细胞凋亡。Western blot 的结果进一步表明 SP-141 可直接作用于 MDM2 蛋白, 使其蛋白表达水平下降, 随之出现凋亡相关分子, 包括 Bcl-2、Bax、Caspase-3 剪切体和 PARP1 剪切体的改变, 这些证据进一步支持 SP-141 可促进胃癌细胞凋亡。

肿瘤转移是造成癌症患者死亡的主要原因^[12],而肿瘤细胞的迁移是肿瘤转移中的重要环节^[13]。本研究发现 SP-141 减慢 MGC803 的划痕愈合,抑制其细胞迁移。本研究从机制探讨发现 SP-141 通过降低 MDM2 蛋白表达,进而下调 FAK 蛋白表达水平。FAK 在肿瘤的发生、发展以及迁移中具有重要作用^[14],其可促进肿瘤进展和转移^[15]。有研究显示 FAK 与 MDM2 蛋白之间存在相互作用^[16],但 MDM2 如何调控 FAK 需要进一步研究。

综上所述,SP-141 有效抑制胃癌细胞的增殖、迁移,并促进胃癌细胞凋亡。本研究结果为从非 p53 依赖通路入手通过抑制 MDM2 治疗胃癌提供了新的学术依据,表明 MDM2 小分子抑制剂 SP-141 具有潜在的治疗胃癌的转化应用价值。

[参考文献]

[1] Momand J, Jung D, Wilczynski S, et al. The MDM2 gene amplification database[J]. *Nucleic Acids Res*, 1998,26(15):3453-3459

[2] Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 [J]. *Science*, 2004,303(5659):844-848

[3] Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009,9(10):749-758

[4] Wang W, Qin JJ, Voruganti S, et al. The pyrido[b]indole MDM2 inhibitor SP-141 exerts potent therapeutic effects in breast cancer models[J]. *Nat Commun*, 2014,5:5086

[5] Wadhwa R, Song S, Lee JS, et al. Gastric cancer-molecular and clinical dimensions[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013,10(11):643-655

[6] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in

China, 2015[J]. *CA Cancer J clin*, 2016,66(2):115-132

[7] Corso S, Giordano S. How can gastric cancer molecular profiling guide future therapies[J]. *Trends Mol Med*, 2016,22(7):534-544

[8] Ye Y, Li X, Yang J, et al. MDM2 is a useful prognostic biomarker for resectable gastric cancer[J]. *Cancer Sci*, 2013,104(5):590-598

[9] Wang W, Qin JJ, Voruganti S, et al. Identification of a new class of MDM2 inhibitor that inhibits growth of orthotopic pancreatic tumors in mice[J]. *Gastroenterology*, 2014,147(4):893-902

[10] Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017,17(2):93-115

[11] Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016,16(8):539-548

[12] Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside[J]. *Tumour Biol*, 2014,35(9):8483-8523

[13] Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic[J]. *Nat Med*, 2013,19(11):1450-1464

[14] 赵美娜,陈公琰. FAK 在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2016,30(2):162-166

[15] Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014,14(9):598-610

[16] Golubovskaya VM, Palma NL, Zheng M, et al. A small-molecule inhibitor, 5'-O-tritylthymidine, targets FAK and Mdm-2 interaction, and blocks breast and colon tumorigenesis in vivo[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013,13(4):532-545

[收稿日期] 2017-03-19

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部
荣获第八届江苏省科技期刊“金马奖”创新团队奖!