

SNS-032对紫杉醇耐药乳腺癌细胞生长的抑制作用研究

谢闰娥¹,杜晶春¹,董桂兰²,徐霞¹

(1.广州医科大学金域检验学院,广东 广州 510182;

2.广州大学门诊部,广东 广州 510006)

【摘要】 目的 研究细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂SNS-032对人紫杉醇耐药MCF-7/TAX乳腺癌细胞生长的作用。方法 采用MTT试验检测MCF-7/TAX细胞对紫杉醇的耐药情况以及SNS-032对紫杉醇耐药MCF-7/TAX细胞生长的影响;采用Annexin V-FITC/PI双染试验检测SNS-032对MCF-7/TAX耐药细胞凋亡的诱导作用。结果 MCF-7/TAX细胞对紫杉醇耐药指数达19.39;而SNS-032能显著抑制MCF-7/TAX耐药细胞的增殖,且具有明显的浓度依赖性,对其作用48 h的IC₅₀为164.5 nmol/L, MCF-7/TAX对SNS-032的耐药指数仅为0.89。SNS-032作用后,Annexin V染色阳性的MCF-7/TAX细胞比例较对照明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 SNS-032能激活MCF-7/TAX耐药细胞凋亡的发生,从而对紫杉醇耐药MCF-7/TAX细胞的生长发挥高效抑制作用。

【关键词】 紫杉醇耐药; SNS-032; MCF-7/TAX; 凋亡

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2017)03-0345-03

Anti-proliferative effect of SNS-032 on taxol-resistant breast cancer cells. XIE Gui-e¹, DU Jing-chun¹, DONG Gui-lan², XU Xia¹. 1. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong, CHINA; 2. Outpatient Department, Guangzhou University, Guangzhou 510006, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 on the growth of taxol-resistant MCF-7/TAX breast cancer cells. **Methods** The resistance situation of MCF-7/TAX cells to paclitaxel and the effect of SNS-032 on the growth of taxol-resistant MCF-7/TAX cells were evaluated by MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. The effect of SNS-032 on apoptosis in MCF-7/TAX cells was analyzed by Annexin V-FITC/PI staining. **Results** The resistance index of MCF-7/TAX cells to paclitaxel was 19.39. After treatment with SNS-032 for 48 h, MCF-7/TAX cells displayed markedly inhibited growth in a dose-dependent manner, and calculated IC₅₀ was 164.5 nmol/L. SNS-032 decreased the resistance index of MCF-7/TAX from 19.39 to 0.89. The numbers of apoptotic MCF-7/TAX cells, as revealed by Annexin V binding, significantly increased upon SNS-032 treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** The results demonstrate that SNS-032 can induce apoptosis in MCF-7/TAX cells and consequently display potent cytotoxic effect on taxol-resistant MCF-7/TAX breast cancer cells.

【Key words】 Taxol resistance; SNS-032; MCF-7/TAX; Apoptosis

细胞周期是细胞生命活动中控制着细胞从静止期转向生长增殖期的重要过程,而细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, Cdk)是细胞周期进程中的核心调控分子^[1-2]。细胞周期调控异常与细胞癌变密切相关,在大多数恶性肿瘤中存在着Cdk的过度表达与活化,因此Cdk已成为当前肿瘤治疗的关键靶点^[1-3]。

作为一种新型Cdk抑制剂,SNS-032对Cdk2、Cdk7和Cdk9的活性同时具有很强的抑制作用^[4]。已有的研究报道表明SNS-032可用于多种肿瘤如急性粒细胞性白血病^[5]、慢性淋巴细胞性白血病^[6]、结肠癌^[7]及非小细胞肺癌^[8]等的治疗。在乳腺癌中,本课题组

前期研究表明,SNS-032在动物体内、体外均能高效抑制乳腺癌细胞的生长并诱导其发生凋亡^[9]。

本研究以紫杉醇耐药乳腺癌细胞系MCF-7/TAX为模型,研究SNS-032对紫杉醇耐药乳腺癌细胞的抗肿瘤活性,以期探讨该化合物在紫杉醇耐药乳腺癌治疗中的潜在应用价值。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人MCF-7紫杉醇耐药细胞系(MCF-7/taxol-resistant, MCF-7/TAX)购买自吉尼欧生物科技有限公司;人MCF-7乳腺癌细胞系购自ATCC; SNS-032为美国Selleck公司产品;紫杉醇、碘化丙啶(propidium iodide, PI)及二甲基亚砜(dimethyl

基金项目:国家自然科学基金(编号:81101682);广东省公益研究与能力建设专项资金(编号:2014A020212015)

通讯作者:徐霞。E-mail: xux2014@126.com

sulfoxide, DMSO)均为美国 Sigma 公司产品;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)产自美国 Hyclone 公司;DMEM 培养液、胰蛋白酶及 HEPES 缓冲液是美国 Gibco 公司产品;MTT 从美国 Genview 公司购买;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒从美国 Roche 公司购买;其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 培养于含有 10%FBS、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素及 100 IU/mL 青霉素的 DMEM 培养液中, MCF-7/TAX 紫杉醇耐药细胞培养在含 1.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 紫杉醇的上述培养液中以维持细胞的耐药表型,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。

1.2.2 MTT 比色法 取处于对数生长期的细胞消化后制成单细胞悬液,按照每孔 1×10^4 个细胞接种至 96 孔细胞培养板,24 h 后加入不同浓度的 SNS-032 (设置 7 个浓度:25 nmol/L、50 nmol/L、100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L、800 nmol/L 及 1600 nmol/L)或不同浓度的紫杉醇(设置 7 个浓度:0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、0.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 及 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$),每个浓度做 3 个平行孔,培养 48 h 后每孔加 20 μL 5 mg/mL 的 MTT,继续培养 4 h 后吸去培养液,加入 100 μL DMSO,振荡 10 min 使结晶完全溶解;用酶标仪检测 570 nm 波长处的吸光度(optical density, OD)值,按以下公式计算生长抑制率:抑制率%=(1-OD 加药组/OD 对照组) $\times 100\%$,并用 Bliss's 软件计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})。最后按以下公式计算耐药指数(resistance index, RI):RI=耐药细胞 MCF-7/TAX 的 IC_{50} /亲本细胞 MCF-7 的 IC_{50} 。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 双染法 取处于对数生长期的 MCF-7/TAX 细胞消化后接种至培养皿中培养过夜;第 2 天吸去培养液,加入含 400 nmol/L SNS-032 的新鲜培养液,8 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,制成单细胞悬液;磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后用 $1 \times$ binding buffer 将细胞重悬至 1×10^6 个/mL,取 100 μL 细胞悬液加入 10 μL PI 和 5 μL Annexin V-FITC,混匀后室温避光孵育 15 min;最后加 400 μL $1 \times$ binding buffer 混匀,在流式细胞仪上进行检测分析。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计量资料以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MCF-7/TAX 细胞对紫杉醇的耐药情况 采用不同浓度紫杉醇作用紫杉醇耐药细胞 MCF-7/TAX 及其亲本细胞 MCF-7,MTT 试验结果表明(图 1),作用 48 h 后,紫杉醇对 MCF-7 的 IC_{50} 是 1.07 $\mu\text{mol}/\text{L}$,而其对 MCF-7/TAX 细胞的 IC_{50} 是 20.75 $\mu\text{mol}/\text{L}$,MCF-7/

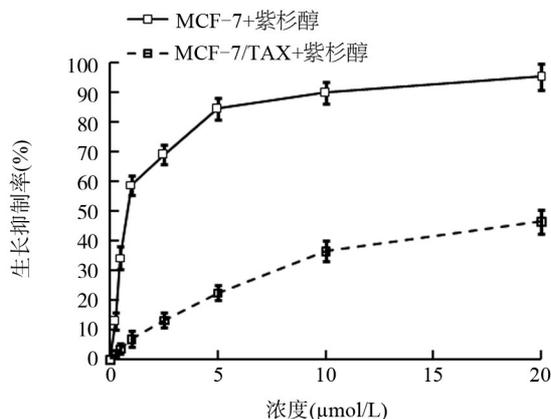


图1 MTT法分析MCF-7/TAX细胞对紫杉醇耐药情况

TAX对紫杉醇的耐药指数达 19.39 (表 1)。

2.2 SNS-032 对紫杉醇耐药 MCF-7/TAX 乳腺癌细胞的生长抑制情况 采用不同浓度 SNS-032 作用 MCF-7/TAX 及 MCF-7 细胞,MTT 试验结果显示(图 2),SNS-032 能显著抑制 MCF-7/TAX 紫杉醇耐药细胞的生长,且呈现明显的剂量依赖性,作用 48 h 后 IC_{50} 仅为 164.5 nmol/L;SNS-032 对 MCF-7 细胞作用 48 h 的 IC_{50} 是 184.0 nmol/L, MCF-7/TAX 细胞对 SNS-032 的耐药指数仅为 0.89 (表 1)。

表1 SNS-032及紫杉醇对MCF-7/TAX细胞及其亲本细胞MCF-7作用的 IC_{50} 值及RI

细胞系	紫杉醇		SNS-032	
	IC_{50} ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	RI	IC_{50} (nmol/L)	RI
MCF-7	1.07	-	184.0	-
MCF-7/TAX	20.75	19.39	164.5	0.89

2.3 SNS-032 诱导 MCF-7/TAX 紫杉醇耐药细胞凋亡 Annexin V-FITC/PI 染色试验结果表明(图 3),不加 SNS-032 的对照 MCF-7/TAX 凋亡细胞比率仅为 $(1.12 \pm 0.44)\%$;400 nmol/L SNS-032 作用 8 h 后, MCF-7/TAX 凋亡细胞比率达 $(25.55 \pm 1.93)\%$,较对照显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

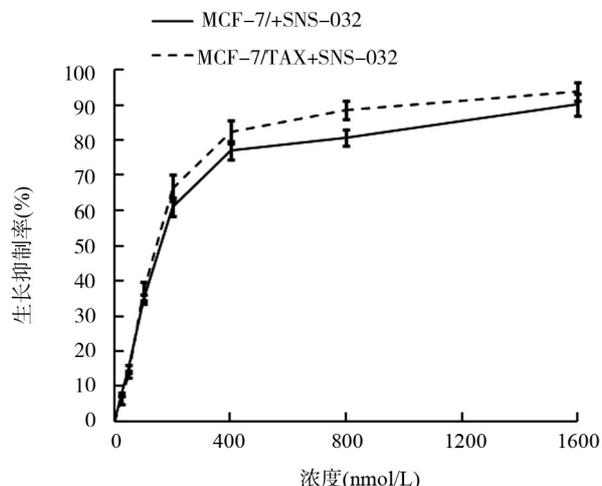


图2 SNS-032对MCF-7/TAX细胞生长抑制曲线

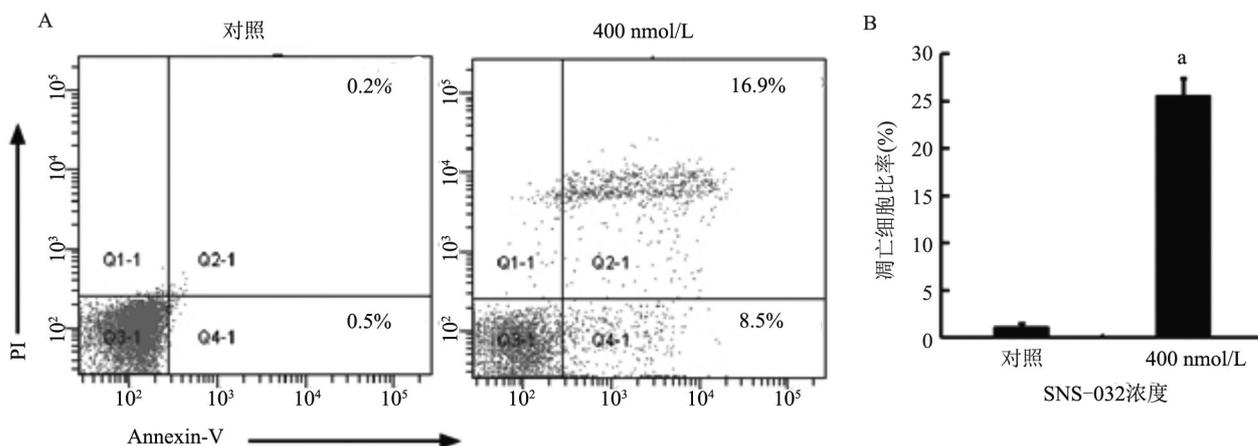


图3 Annexin V-FITC/PI染色检测SNS-032对MCF-7/TAX细胞凋亡的诱导作用

注:A: Annexin V-FITC/PI染色流式细胞分析图;B: 凋亡细胞比率统计图。与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

Cdks是当前治疗肿瘤的热门靶点,一些Cdk抑制剂已进入临床试验并显示出良好的应用前景。I期临床试验表明Cdk抑制剂能安全地用于晚期癌症患者,安全性较高,增加剂量即可达到较理想的药物动力学效果。II期临床研究表明,一些Cdk抑制剂具有一定的抗癌作用,而将Cdk抑制剂与细胞毒性化疗药物联合起来作用肿瘤细胞更是显示出良好的前景^[10]。

作为一种新型Cdk抑制剂,SNS-032对Cdk2、Cdk7和Cdk9的活性同时具有很强的抑制作用。与第一个进入临床试验并显示出良好应用前景的Cdk抑制剂flavopiridol比较,SNS-032展现出更强的体外肿瘤细胞杀伤作用,并具有更高的肿瘤细胞选择性和较小的毒副作用^[6]。现有研究表明SNS-032对多种血液恶性肿瘤及实体瘤具有抗肿瘤活性^[5-8]。本课题组前期对SNS-032在乳腺癌中的作用展开了研究,结果表明SNS-032也能高效抑制乳腺癌细胞的生长并诱导其发生凋亡^[9]。

紫杉醇广泛应用于包括乳腺癌在内的临床各类肿瘤的化疗,然而肿瘤对紫杉醇耐药性的发生严重影响了临床治疗效果^[11],开发对耐药肿瘤细胞也敏感的新型化疗药物迫在眉睫。为此,在课题组前期首次报道SNS-032能高效抑制乳腺癌细胞生长的研究基础上,本研究进一步探讨SNS-032对紫杉醇耐药乳腺癌细胞的抗肿瘤活性。MTT试验表明,MCF-7/TAX紫杉醇耐药细胞对紫杉醇的耐药指数达19.39;而SNS-032处理MCF-7/TAX耐药细胞48h后的 IC_{50} 仅为164.5 nmol/L,MCF-7/TAX对SNS-032的耐药指数仅为0.89,说明SNS-032能抵抗紫杉醇耐药乳腺癌细胞的耐药性,对其生长发挥显著抑制作用。

细胞凋亡抵抗是肿瘤发生、发展的关键因素之一,也是引发肿瘤化疗耐药的一个重要机制。激活肿瘤细胞凋亡发生的能力,是肿瘤治疗的有效方法^[12]。本研究Annexin V-FITC/PI双染法结果显示,经SNS-032处理后,Annexin V-FITC阳性的MCF-7/TAX细胞比率显著升高,说明SNS-032能克服凋亡抵抗,激活MCF-7/TAX紫杉醇耐药细胞凋亡的发生。

本研究结果证实,SNS-032能激活MCF-7/TAX细胞发生凋亡,从而对紫杉醇耐药MCF-7/TAX乳腺癌细胞的生长发挥高效抑制作用,这将为探索SNS-032在紫杉醇耐药乳腺癌治疗中的应用提供实验依据。

参考文献

- [1] Gallorini M, Cataldi A, di Giacomo V. Cyclin-dependent kinase modulators and cancer therapy [J]. *Bio Drugs*, 2012, 26(6): 377-391.
- [2] Canavese M, Santo L and Raje N: Cyclin dependent kinases in cancer: potential for therapeutic intervention [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(7): 451-457.
- [3] Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8(7): 547-566.
- [4] Conroy A, Stockett DE, Walker D, et al. SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2009, 64(4): 723-732.
- [5] Walsby E, Lazenby M, Pepper C, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 has single agent activity in AML cells and is highly synergistic with cytarabine [J]. *Leukemia*, 2011, 25(3): 411-419.
- [6] Chen R, Wierda WG, Chubb S, et al. Mechanism of action of SNS-032, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2009, 113(19): 4637-4345.
- [7] Boquoi A, Chen T, Enders GH. Chemoprevention of mouse intestinal tumorigenesis by the cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009, 2(9): 800-806.
- [8] Kodym E, Kodym R, Reis AE, et al. The small-molecule CDK inhibitor, SNS-032, enhances cellular radiosensitivity in quiescent and hypoxic non-small cell lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*, 2009, 66(1): 37-47.
- [9] Xie G, Tang H, Wu S, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor SNS-032 induces apoptosis in breast cancer cells via depletion of Mcl-1 and X-linked inhibitor of apoptosis protein and displays antitumor activity *in vivo* [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(2): 804-812.
- [10] 付文锋, 刘天初. 细胞周期抑制剂治疗肿瘤的进展[J]. *实用临床医学*, 2015, 16(10): 97-101.
- [11] Fojo T, Menefee M. Mechanisms of multidrug resistance: the potential role of microtubule-stabilizing agents [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18 (Suppl 5): v3-8.
- [12] Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy [J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(3): 178-194.

(收稿日期:2016-09-09)