

# 格尔德霉素对肝癌细胞 Akt 磷酸化及细胞周期的影响

马 昕, 林菊生, 杨志芳, 黎培员, 宋东坡

马昕, 林菊生, 黎培员, 宋东坡, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030  
杨志芳, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030  
马昕, 女, 1979-01-04 生, 河北省秦皇岛市人, 汉族, 2001 年华中科技大学同济医学院本科毕业, 硕士研究生, 研究方向分子肝胆病学。  
项目负责人: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所。linjusheng2001@163.com  
电话: 027-83662578  
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-06

## Effects of geldanamycin on PKB/Akt phosphorylation and cell cycle in human hepatoma HepG2 cells

Xin Ma, Ju-Sheng Lin, Zhi-Fang Yang, Pei-Yuan Li, Dong-Po Song

Xin Ma, Ju-Sheng Lin, Pei-Yuan Li, Dong-Po Song, Institute of Liver Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Zhi-Fang Yang, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Disease, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. linjusheng2001@163.com  
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-03-06

### Abstract

AIM: To study the anti-proliferation effects of inhibitor of heat shock protein 90 (Hsp90), geldanamycin (GA), and its mechanism on human hepatoma HepG2 cells.

METHODS: MTT assay was used to detect the effect of growth inhibition of HepG2 cells. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry. Alteration of phosphorylated Akt was analyzed by Western blot assay.

RESULTS: GA significantly inhibited growth of HepG2 cells. After 24 or 48 h treatment with GA, the level of phosphorylated Akt was reduced significantly. It was about 66.0% (24 h) and 34.0% (48 h) compared to that of control cells. G2/M arrest was also prominent. The rate of apoptosis increased from 3.2% to 8.1% after 24 h treatment and from 4.0% to 11.42% after 48 h treatment, respectively.

CONCLUSION: The functional Hsp90 is important for the growth of hepatoma cells. It may be a promising way to cure liver cancer using the inhibitor of Hsp90.

Ma X, Lin JS, Yang ZF, Li PY, Song DP. Effects of geldanamycin on PKB/Akt phosphorylation and cell cycle in human hepatoma HepG2 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(8):1793-1795

### 摘要

目的: 研究热休克蛋白90抑制剂格尔德霉素(geldanamycin,

GA)对肝癌细胞生长的影响并探讨相关机制。

方法: 用MTT法检测药物对肝癌HepG2细胞的生长抑制作用, 并用流式细胞术分析细胞周期与凋亡状况。Western印迹杂交法检测细胞内蛋白激酶B/AKT磷酸化状态的变化。

结果: 400  $\mu\text{mol/L}$  浓度的GA处理细胞后, HepG2细胞胞内磷酸化 AKT 的水平明显下降(24 h 为对照组 66.03%, 48 h 为对照组 34.02%); GA 作用后细胞呈现 G2/M 期阻滞并伴有凋亡率增加; 同时MTT法显示GA对HepG2细胞有生长抑制作用, 用药时间越长抑制率越高, 24 h 和 48 h 的抑制率分别为 4.09% 和 21.74%。

结论: 通过GA抑制Hsp90的功能能够抑制肝癌细胞的生长并促进其凋亡, 这一效应与信号传导系统活化状态的改变有关。

马昕, 林菊生, 杨志芳, 黎培员, 宋东坡. 格尔德霉素对肝癌细胞Akt磷酸化及细胞周期的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(8):1793-1795  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1793.asp>

## 0 引言

热休克蛋白 90(heat shock protein 90, Hsp90)是一种分子伴侣(chaperone)<sup>[1]</sup>, 在保护蛋白质的正确空间结构、防止蛋白质意外降解、保证其功能方面有重要的意义<sup>[2-3]</sup>。Hsp90 在多种肿瘤组织中表达明显增高<sup>[3-4]</sup>, 并对肿瘤的发生发展有重要意义, 目前已成为抗肿瘤研究的热门靶点<sup>[5]</sup>。格尔德霉素(geldanamycin, GA)属于苯醌安莎霉素类抗生素, 是一种天然存在的 Hsp90 功能抑制剂<sup>[6]</sup>, 能够阻止 Hsp90 发挥分子伴侣的功能, 是一种有望应用于临床的抗癌新药<sup>[7]</sup>。我们的实验研究了GA对肝癌细胞生长的影响, 并对其机制进行了初步探讨, 以便为GA的临床应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 材料 GA 为 Alexis 公司产品, 用 DMSO(Sigma 公司产品)溶解, 保存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。氮蓝四唑盐(MTT)、碘化丙啶(PI)为 Biomol 公司产品, 分别用磷酸盐缓冲液溶解成 5 g/L 和 65 mg/L, 避光储存于  $4^{\circ}\text{C}$ 。兔抗磷酸化 AKT 单克隆抗体(Ser-473)购自 CST 公司, 二抗 HRP 标记羊抗兔 IgG、化学发光(ECL)底物购自 Santa Cruz 公司。人肝癌细胞株 HepG2 购自武汉大学中国典型生物保藏中心, 高糖型 DMEM 培养基为 GibcoBRL 公司产品, 胎牛血清购自四季青公司。其余试剂均为市售分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与 MTT** 人肝癌细胞株 HepG2 用含 10 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液培养于 37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱中. 收集对数生长期的细胞, 调整密度, 5 000 个/孔接种于 96 孔培养板. 继续培养 24 h 后加入 GA 储存液至终浓度为 0.4 μmol/L, 等量 DMSO 为空白对照, 每组设 4 个复孔. 药物作用 24 h 或 48 h 后每孔加入预先配好的 MTT 溶液 10 μL, 再培养 4 h, 弃去上清液, 用 DMSO 150 μL 溶解沉淀, 微型振荡仪振荡 10 min 混匀, 用酶标以测定波长 490 nm 的吸光度 (A), 细胞抑制率 = (1 - 试验孔 A / 对照孔 A) × 100%. 实验重复 3, 取平均值.

**1.2.2 流式细胞术** 4 μmol/L GA 处理 24 或 48 h 后收集细胞, 用 -20 °C 预冷的 80 mL/L 乙醇固定过夜. 固定后细胞用 PBS 洗涤 2 次, 用 10 mg/L PI 和 1 g/L Rnase A, 在室温下避光进行 DNA 染色 20 min. 采用 FACS Sort 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期, 数据采用 ModFit 软件分析.

**1.2.3 蛋白提取与 Western 印迹杂交** 0.4 μmol/L GA 处理 24 h 后的细胞用冰 PBS 洗涤 2 次, 加入裂解液(见参考文献[8]), 冰上静置 10 min, 离心取上清, 采用 Bradford 法测定蛋白质浓度. 电泳前加 4 × SDS 缓冲液, 100 °C 水浴 10 min, 取 40 μg 蛋白进行 120 g/L SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白分离后, 电泳转至硝酸纤维素膜, 室温封闭 2 h, 一抗(1:1 000) 4 °C 过夜, 二抗室温反应 2 h, 采用增强化学发光法(ECL)显影, 暗室压片. 胶片结果经英国 UVP 公司 GDS8000 型凝胶成像分析系统分析处理数据, 计算灰度值. 以 β-actin 为内参.

**统计学处理** 采用 SAS for Windows 6.22 软件进行统计学分析,  $P < 0.05$  有统计学意义

## 2 结果

**2.1 GA 对 HepG2 细胞的生长抑制作用** 用 MTT 法测定 GA 对 HepG2 细胞的生长抑制作用, 随用药时间的延长抑制作用增强. 药物作用 24 h 抑制率为 4.1%, 48 h 抑制率为 21.7%.

**2.2 GA 对 HepG2 细胞凋亡及细胞周期的影响** 流式细胞术分析表明, 0.4 μmol/L 的 GA 作用 24 h 后细胞呈现 G2/M 期阻滞, 此时 G2/M 细胞占 26.9%, 凋亡率为 8.1%; 48 h 后 G2/M 期细胞进一步上升达 71.8%, 凋亡率上升为 11.4%(图 1, 表 1).

表 1 格尔德霉素对 HepG2 细胞细胞周期的影响

分 组	细胞周期(%)			凋亡率(%)
	G0-G1	G2/M	S	
对照组(24 h)	72.11	0.63	27.26	3.22
实验组(24 h)	45.73	26.86	27.41	8.08
对照组(48 h)	73.93	15.81	10.26	4.00
实验组(48 h)	11.31	71.80	16.90	11.42

**2.3 GA 下调 HepG2 细胞中磷酸化 AKT 的水平** Western 印记杂交结果表明, GA 作用 24 及 48 h 后 HepG2 细胞中 AKT 的磷酸化水平下降, 用药时间越长 P-AKT 水平越低, 分别为对照组的 66.0% 和 34.0%(图 2).

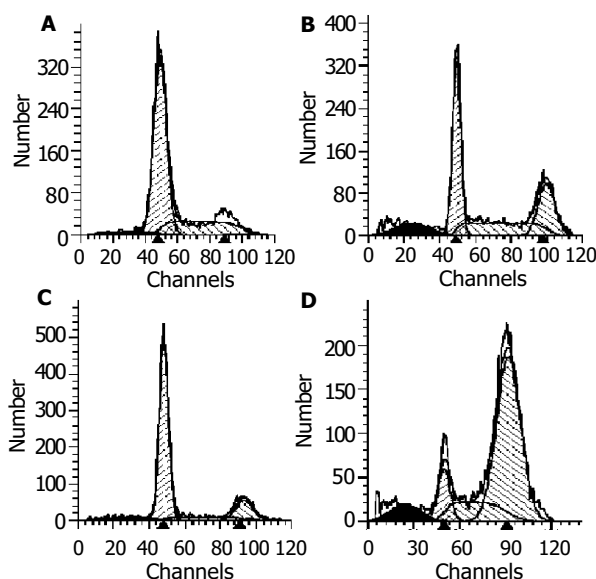


图 1 流式细胞术分析细胞周期及凋亡. A: 对照组 24 h; B: 实验组 24 h; C: 对照组 48 h; D: 实验组 48 h.

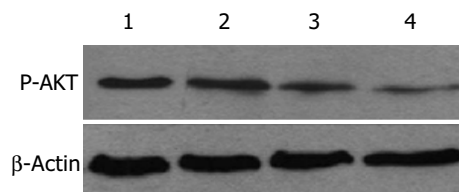


图 2 Western-blot 检测结果 1: 对照组 24 h; 2: 对照组 48 h; 3: 实验组 24 h; 4: 实验组 48 h.

## 3 讨论

分子伴侣是一种与其他蛋白质不稳定构象结合并使之稳定的蛋白, 具有帮助蛋白质分子正确折叠、促进新生肽链成熟、维持蛋白质活性构象的功能, 他们的作用在细胞生命活动中必不可少<sup>[9]</sup>. 其中热休克蛋白 90(Hsp90)近年来在肿瘤研究领域广受关注. Hsp90 的“底物”蛋白质主要是信号转导系统的激酶分子以及一些突变蛋白质如 Raf-1<sup>[10]</sup>, ErbB-2<sup>[11]</sup>, Scr<sup>[12]</sup>, Akt<sup>[13]</sup>以及 Bcr-Abl<sup>[14]</sup>, 突变型 P53 等<sup>[15-16]</sup>, 而这些信号传导分子的过表达或过度激活是肿瘤发生发展中重要的分子事件. Hsp90 在肿瘤中表达明显升高, 肝癌组织中 Hsp90α 的表达与肿瘤的分化程度以及肿瘤大小密切相关<sup>[17]</sup>, Liu *et al*<sup>[18]</sup>报道 Hsp90 反义寡核苷酸转染肝癌 SMMC7721 细胞可以抑制其生长并增强细胞对常用化疗药的敏感性. 因此 Hsp90 很有可能在肝癌的发生发展中起一定的作用, 干扰 Hsp90 的功能可能有助于抑制肿瘤的恶性生物学行为.

GA 为苯醌安莎霉素类抗生素, 与根壳霉素(radicalin)、除莠霉素(herbimycin A)一样是由霉菌中分离得到的天然的 Hsp90 抑制剂<sup>[19]</sup>. 其分子中的安莎环可以插

入Hsp90肽链N端ADP/ATP结合位点,抑制Hsp90的弱ATP酶活性,妨碍其分子伴侣功能的发挥<sup>[20-21]</sup>。Hsp90失活后,信号传导系统的众多成员将难以稳定存在,从而产生抑制增生、诱导凋亡的效应<sup>[22-23]</sup>。我们采用MTT法和流式细胞术法检测发现,GA作用后肝癌细胞发生明显的G2/M期阻滞,并在此基础上产生凋亡增加、生长抑制的效应。目前应用GA衍生物17-AAG治疗癌症的临床试验已取得一定成果<sup>[24]</sup>,因此,通过GA或其衍生物抑制Hsp90对治疗肝癌也有一定帮助。

为进一步研究GA的作用机制,我们采用Western印记杂交法检测了胞内蛋白激酶B/Akt磷酸化状态的变化。Akt是PI3K/PIP3信号通路的关键下游分子<sup>[25]</sup>,在受Hsp90调控的众多蛋白质中,他对于肿瘤的发生发展起重要作用<sup>[26]</sup>。Akt活化后可磷酸化多个下游底物如Bad, Forkhead家族转录因(FKH-TFs)、NF- $\kappa$ B、mdm2等从而发挥抑制细胞凋亡,刺激细胞增生的效应<sup>[27]</sup>。Liu *et al*<sup>[28]</sup>运用基因芯片技术发现与正常肝组织相比,肝癌细胞系HLE中Akt的表达上升。还有研究者发现Akt活性的下降与药物引起的肿瘤细胞生长抑制有关<sup>[29]</sup>。Akt经磷酸化(Ser-473)后被激活,而磷酸化Akt的水平与Hsp90的功能有很大关系:一方面,Akt是Hsp90的“底物”蛋白质,需要Hsp90的辅助方能保持在可被活化的状态;另一方面,Akt的激活物PDK的稳定存在也受Hsp90调控<sup>[30]</sup>。本研究发现,GA作用后肝癌细胞中磷酸化Akt的水平明显下调,这是Akt蛋白质的含量下降以及其磷酸化水平降低的共同结果。Okumura *et al*<sup>[31]</sup>报道,被Akt磷酸化后Wee家族的蛋白激酶Myt1失活,从而改变细胞中cdc25c与Myt1活性的平衡,促使细胞进入有丝分裂期,因此Akt被看作是一种G2/M期促进因子。本实验中GA引起的G2/M期阻滞很有可能是因为磷酸化Akt水平的下降所引起的。

总之,Hsp90的功能对肝癌细胞的生长必不可少,运用GA抑制Hsp90的功能将导致信号转导系统的关键分子Akt磷酸化水平的下调,从而产生抑制肝癌细胞生长,诱导凋亡的效应。这也提示,Hsp90抑制剂在治疗肝癌方面具有应用前景。

#### 4 参考文献

- 1 刘炎,左俊. 分子伴侣功能的研究进展. 国外医学遗传学分册 2002;25:70-73
- 2 Pratt WB. The Hsp90-based chaperone system: involvement in signal transduction from a variety of hormone and growth factor receptors. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217:420-434
- 3 Richter K, Buchner J. Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* 2001;188:281-290
- 4 Cornford PA, Dodson AR, Parsons KF, Desmond AD, Woolfenden A, Fordham M, Neoptolemos JP, Ke Y, Foster CS. Heat shock protein expression independently predicts clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2000;60:7099-7105
- 5 Zuo DS, Dai J, Bo AH, Fan J, Xiao XY. Significance of expression of heat shock protein90alpha in human gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2616-2618
- 6 Neckers L, Schulte TW, Mimnaugh E. Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Invest New Drugs* 1999;17:361-373

- 7 Blagosklonny MV. Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. *Leukemia* 2002;16:455-462
- 8 Weng LP, Brown JL, Eng C. PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet* 2001;10:599-604
- 9 郝美容,杨铭. 蛋白质分子伴侣和以其为靶的药物作用机制. 国外医学药学分册 2001;28:129-132
- 10 Kim S, Kang J, Hu W. Geldanamycin decreases Raf-1 and Akt levels and induces apoptosis in neuroblastomas. *Int J Cancer* 2003;103:352-359
- 11 Supino-Rosin L, Yoshimura A, Yarden Y. Intracellular retention and degradation of the epidermal growth factor receptor, two distinct processes mediated by benzoquinone ansamycins. *J Biol Chem* 2000;275:21850-21855
- 12 Xu Y, Singer MA, Lindquist S. Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:109-114
- 13 Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10832-10837
- 14 Immanapalli R, O'Bryan E, Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res* 2001;61:1799-1804
- 15 Blagosklonny MV, Toretsky J, Bohan S, Neckers L. Mutant conformation of p53 translated in vitro or in vivo requires functional Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8379-8383
- 16 Workman P. Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Lett* 2004;206:149-157
- 17 吴胜利,潘承恩,牛新捷,耿智敏,官惠琳,杨威. 原发性肝癌中HSP90 $\alpha$ 的表达及意义. 中华肝胆外科杂志 2003;9:88-90
- 18 Liu XL, Xiao B, Yu ZC, Guo JC, Zhao QC, Xu L, Shi YQ, Fan DM. Down-regulation of Hsp90 could change cell cycle distribution and increase drug sensitivity of tumor cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:199-208
- 19 Uehara Y. Natural product origins of Hsp90 inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3:325-330
- 20 Workman P. Pharmacogenomics in cancer drug discovery and development: inhibitors of the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Detect Prev* 2002;26:405-410
- 21 Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* 1999;42:260-266
- 22 Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 1997;89:239-250
- 23 Hostein I, Robertson D, DiStefano F, Workman P, Clarke PA. Inhibition of signal transduction by the Hsp90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin results in cytostasis and apoptosis. *Cancer Res* 2001;61:4003-4009
- 24 Sausville EA, Tomaszewski JE, Ivy P. Clinical development of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin. *Curr Cancer Drug Targets* 2003;3:377-383
- 25 Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathways. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 8):1439-1445
- 26 Testa JR, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10983-10985
- 27 Li Q, Zhu GD. Targeting serine/Threonine protein Kinase B/Akt and cell-cycle checkpoint kinase for treating Cancer. *Curr Top Med Chem* 2002;2:939-971
- 28 Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Zhang WH, Qi SY, Hu J, Wang XQ, Wu M. Gene expression profiles of hepatoma cell line HLE. *World J Gastroenterol* 2003;9:683-687
- 29 Gao S, Yu BP, Li Y, Dong WG, Luo HS. Antiproliferative effect of octreotide on gastric cancer cells mediated by inhibition of Akt/PKB and telomerase. *World J Gastroenterol* 2003;9:2362-2365
- 30 Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003;63:2139-2144
- 31 Okumura E, Fukuhara T, Yoshida H. Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol* 2002;4:111-116