

· 基础研究 ·

PI3K/Akt 抑制剂对人食管癌 EC109 细胞的生长抑制及促凋亡作用研究*

尚观胜, 秦艺玮, 梁卫东, 何小平

(成都医学院第一附属医院胸外科/重症监护科, 成都 610500)

摘要:目的 探讨磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)特异性抑制剂 LY294002 对人食管癌 EC109 细胞生长抑制及凋亡的影响。方法 通过不同浓度的 LY294002 作用于人食管癌 EC109 细胞, MTT 法检测 EC109 细胞抑制率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Hoechst 荧光染色和倒置相差显微镜观察 EC109 细胞形态学变化。结果 经 LY294002 作用后, EC109 细胞凋亡率增加, 其生长明显受到抑制, 经 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 LY294002 作用 72 h 后, 荧光染色和相差显微镜观察到 EC109 细胞呈现典型细胞凋亡改变。且 LY294002 对食管 EC109 细胞的抑制率与 LY294002 的浓度及作用时间呈正相关(r 为 0.942、0.963, $P < 0.01$), 凋亡率亦与 LY294002 的浓度及作用时间均呈显著正相关(r 为 0.975、0.938, $P < 0.01$)。结论 LY294002 可抑制食管癌 EC109 细胞生长, 并诱导其凋亡。

关键词: LY294002; 食管肿瘤; 细胞凋亡; 生长抑制物

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.16.017

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)16-1841-03

Study of growth arrest and apoptosis of esophageal carcinoma EC109 cells induced by PI3K/Akt inhibitor*

Shang Guansheng, Qin Yiwei, Liang Weidong, He Xiaoping

(Department of Thoracic/ICU Surgery, the First Affiliated Hospital, Chengdu

Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China)

Abstract: Objective To explore the effect of LY294002 on growth arrest and apoptosis of human esophageal carcinoma EC109 cells. **Methods** EC109 cells were treated with LY294002 at a variety of different concentrations, The inhibition ratio was detected by methyl thiazolyltetrazolium (MTT) assay. Hoechst 33258 staining and phase contrast microscope were to observe the morphological change. **Results** After treated with LY294002, the cells apoptosis ratio increased, and the growth was inhibited obviously. Typical cells apoptosis was observed after treated with 40 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 for 72 h, through Hoechst 33258 staining and phase contrast microscope. Moreover, the effect of growth arrest had positive and significant correlation with the dosage and treating time ($r = 0.942, 0.963, P < 0.01$), and the apoptosis had the same trend ($r = 0.975, 0.938, P < 0.01$). **Conclusion** LY294002 can inhibit the EC109 cells growth, and enhance the effect of apoptosis.

Key words: LY294002; esophageal neoplasms; apoptosis; growth inhibitors

细胞内某些分子信号通路的高表达及连续激活, 是肿瘤细胞的重要生物学特性, 通过抑制这些重要分子通道的生物治疗, 在肿瘤学治疗中已越来越被重视^[1]。蛋白激酶 B(Akt, 也称为 PKB), 是原癌基因 C. akt 的表达产物, 磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)是细胞内磷脂的关键调节剂, Akt 是 PI3K 下游的直接靶蛋白, LY294002 是 PI3K/Akt 信号通路的特异抑制剂, 通过有靶向抑制 PI3K 催化亚基 p110 阻断其信号传导表达^[2]。PI3K/Akt 信号传导通路是恶性肿瘤发生、发展的重要通路之一^[3]。作者通过 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 干预食管癌 EC109 细胞, 观察其生长抑制及凋亡情况, 为食管癌的综合治疗提供体外实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 人食管癌 EC109 细胞株, 由中国医学科学院肿瘤医院研究所建立, 大坪医院食管功能实验室保种。EC109 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育, 细胞为贴壁生长, 每 3 天更换培养液, 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代。所有实验均在细胞对数生长期进行。

1.1.2 主要试剂与仪器 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 [22

(42 吗啉基)282 苯基 24 氢 212 苯并吡喃 242 酮]、胰蛋白酶、Hoechst 33258 染色剂、碘化丙啶 (PI) 均购于 Cell Signal 公司; 胎小牛血清购于四季青公司; DMEM 培养基购于 Gibco 公司, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购于 Amresco 公司; 其余试剂为国产分析纯。倒置相差显微镜、荧光显微镜为日本 Olympus 公司产品, 流式细胞仪为美国 Bro-Rad 伯乐公司产品, 低温冰箱, CO_2 恒温细胞培养箱, 超低温冰箱, 超净工作台, 自动酶标仪, 透射电镜。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 比色分析法测细胞抑制率 收集对数生长期的细胞, 制成单细胞悬液, $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。将细胞接种于 96 孔板, 培养 24 h。实验组加入 LY294002, 终浓度分别为 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$; 设空白组和对照组, 分别加入培养液和含有 $5 \times 10^5/\text{mL}$ EC109 细胞的培养液; 各组均设 6 个复孔。培养 24、48、72、96 h 后每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h, 倾去孔内液体, 加入 200 μL DMSO, 室温避光震荡 10 min, 酶联免疫检测仪检测 492 nm 波长 OD 值, 最后结果取 6 个复孔的均值, 重复 3 次。计算生长抑制率: 生长抑制率 (%) = (对照组 OD 均值 - 实验组 OD 均值) / 对照组 OD 均值 $\times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 平行接种细胞于培养瓶

中,至细胞对数生长期加入 LY294002,各瓶浓度分别为 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$,同时设对照组,加入 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的 EC109 细胞培养液。培养 24、48、72 h 后收集细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 2 次,加入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的 75% 乙醇,摇匀,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜。再次离心去掉乙醇,PBS 漂洗 2 次,调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$,加入 PI 染色液 1 mL,4 $^\circ\text{C}$ 冰箱培养 60 min,200 目钢筛过滤,流式细胞仪分析细胞凋亡率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计学方法采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LY294002 对人食管癌 EC109 细胞的抑制作用 经 MTT 法测定不同浓度 LY294002 对人食管癌 EC109 细胞作用不同时间的抑制率(表 1),各实验组均呈现出不同程度的细胞抑制作用,实验组与对照组抑制率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),且相关分析显示 LY294002 处理后的人食管癌 EC109 细胞抑制率与药物浓度及作用时间呈显著正相关(r 为 0.942、0.963, $P < 0.01$)(图 1),LY294002 药物浓度增加,抑制率升高,同时随着作用时间延长,抑制率亦升高。

表 1 各实验组不同时间 EC109 细胞抑制率比较($\bar{x} \pm s$)

作用时间(h)	LY294002 浓度($\mu\text{mol/L}$)			
	5	10	20	40
24	5.4 \pm 0.9	9.2 \pm 1.0	14.6 \pm 1.3	22.5 \pm 1.2
48	10.3 \pm 0.7	17.0 \pm 1.1	22.1 \pm 1.3	29.5 \pm 1.0
72	15.4 \pm 0.9	19.9 \pm 1.3	28.1 \pm 1.1	37.4 \pm 0.8
96	18.1 \pm 0.8	30.8 \pm 0.9	43.2 \pm 1.3	50.3 \pm 1.1

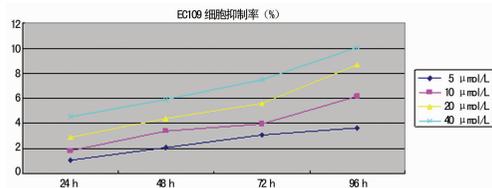


图 1 各实验组抑制率与 LY294002 浓度及作用时间相关折线图(%)

2.2 LY294002 对人食管癌 EC109 细胞的促凋亡作用 采用流式细胞仪技术测定不同浓度 LY294002 对人食管癌 EC109 细胞作用不同时间的凋亡率(表 2),各实验组细胞均呈现出不同程度的凋亡作用,实验组与对照组凋亡率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),且相关分析显示 LY294002 处理后的人食管癌 EC109 细胞凋亡率与药物浓度及作用时间呈显著正相关(r 为 0.975、0.938, $P < 0.01$)(图 2),LY294002 药物浓度增加,凋亡率升高,同时随着作用时间延长,凋亡率亦升高。

表 2 各实验组不同时间 EC109 细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

作用时间(h)	LY294002 浓度($\mu\text{mol/L}$)		
	10	20	40
24	1.199 8 \pm 0.012 8	1.798 5 \pm 0.012 5	2.486 7 \pm 0.027 2
48	2.346 5 \pm 0.030 4	2.738 8 \pm 0.0129 6	6.500 1 \pm 0.016 0
72	7.152 4 \pm 0.012 5	7.658 6 \pm 0.016 6	14.353 5 \pm 0.025 1

2.3 细胞形态学观察

2.3.1 相差显微镜下形态变化 至细胞对数生长期,实验组

加入 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 LY294002,同时设对照组,加入 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的 EC109 细胞培养液。培养 72 h 后收集细胞,固定 2 h 后将细胞团块用丙酮脱水、浸透、包埋后制成超薄切片,染色后在透射电镜下观察细胞形态。对照组食管 EC109 细胞生长良好,呈纺锤形或多梭状,形态多不规则,可融合形成巢状集落结构,细胞核较大,核异型明显,核质比高;实验组细胞形态发生明显变化,胞浆浑浊,可出现细胞碎片,大量的空泡状改变(图 3),核质比下降,明显增多的悬浮细胞,细胞核紧缩、碎裂,呈相对规则圆形(图 4),细胞核内染色质贴边靠近核膜下,整个视野细胞密度明显降低,死亡细胞明显增多。

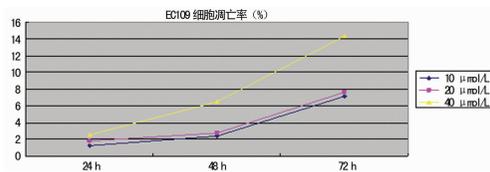


图 2 各实验组抑制率与 LY294002 浓度及作用时间相关折线图(%)

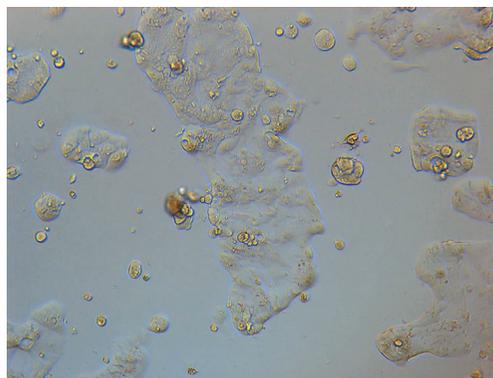


图 3 实验组 EC109 细胞相差显微镜下影像学表现(1)

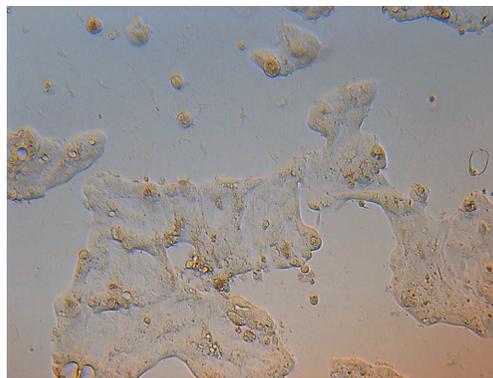


图 4 实验组 EC109 细胞相差显微镜下影像学表现(2)

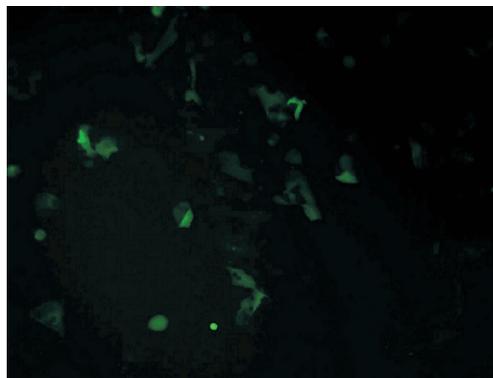


图 5 实验组 EC109 细胞荧光染色镜下影像学表现(1)

2.3.2 荧光染色后镜下形态变化 对照组加入 5×10^5 /mL 的 EC109 细胞培养液,待细胞长至约 80% 时加入 $40 \mu\text{mol/L}$ 的 LY294002,72 h 后终止培养。常规收集细胞,PBS 洗 2 次,4% 的多聚甲醛固定 15 min,离心,去掉固定液,细胞悬浮于 $200 \mu\text{L}$ 的 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 的 Hoechst 33258 中,室温避光染色 15 min,PBS 洗 2 次,滴片后于 Olympus 显微镜下观察细胞核形态。对照组 EC109 细胞大小基本一致,核染色后呈现均匀分布的高密度荧光;实验组则可见胞体缩小,染色质多呈多巢状,胞质浓缩,细胞核变小固缩(图 5),胞核表现为较明亮的浓缩致密荧光,较多的细胞核碎片,典型的凋亡小体出现(图 6)。

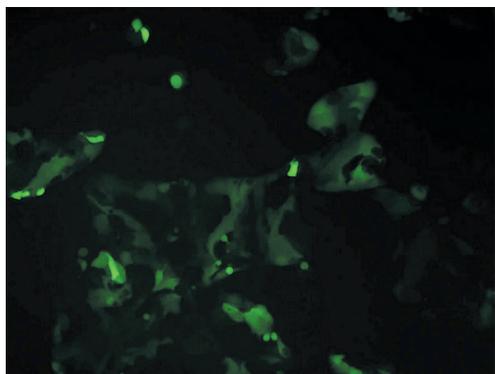


图 6 实验组 EC109 细胞荧光染色镜下影像学表现(2)

3 讨论

目前,食管癌是国内常见的消化道恶性肿瘤,严重降低患者生活质量及生存率,且病理分期 I ~ II 期者症状往往不典型,外科手术虽然是食管癌治疗最主要且有效的手段,但单纯手术治疗效果仍不理想,尤其上段及中段病变较长者,手术切除率低,术后并发症多,术后生存期短^[4]。目前,国内部分地区自然 5 年生存率不足 11%^[5],大面积普查食管癌 5 年生存率仅约 13% 左右^[6]。术后化疗和放疗等辅助治疗往往在取得疗效的同时也给患者带来较大的不良反应,多数肿瘤对不同药物存在交叉耐药性。近年来,随着医学分子生物学技术和理论的突破性进展,分子靶向药物治疗作为生物治疗的重要部分越来越受到重视,采取分子生物靶向药物治疗癌症已经成为新的发展趋势。

多项研究表明 PI3K/Akt 信号转导通路在肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移以及对放疗的拮抗等方面起重要作用。体外研究证实 PI3K 和它的下游分子 Akt 等具有癌基因的作用。PI3K 除激活 Akt 外,还活化 RAC-1。RAC-1 在生长因子或原癌基因 Ras 诱导的肌动蛋白细胞骨架重组中起关键作用^[7]。亦有研究证实 Akt 在多种肿瘤组织中高表达,如卵巢癌、食管癌、前列腺癌、多发性骨髓瘤、乳腺癌、胰腺癌、肺癌、子宫内膜癌等癌组织中都有 Akt 的过度表达及活化。PI3K/Akt 在非小细胞肺癌中发现总表达率为 67.4%,在鳞癌和腺癌中的表达率分别为 68.2% 和 61.5%。也有报道 PI3K/Akt 在小细胞肺癌(SCLC)中表达率为 62%^[8]。LY294002 是 PI3K/Akt 信号通路的抑制剂,靶向抑制 PI3K 催化亚基 p110,进而阻断下游靶蛋白与 PI3K 的信号传导,通过这一机制对肿瘤细胞的生物活性产生影响。

2004 年,Nguyen 等^[9]应用 PI3K 抑制剂 LY294002 作用于体外肺癌和食管癌细胞,发现 Akt 的活性降低。有研究者将 LY294002 和化疗药物共孵育或与放疗结合,结果表明 LY294002 在 Akt 高表达的细胞株中显著促进化疗药物诱导

的凋亡,而在 Akt 低表达的细胞株中这种促进作用不明显。有研究证实 LY294002 可明显抑制宫颈癌细胞 Akt 磷酸化,促进其对化疗药物顺铂的敏感性,可明显提高宫颈癌的放疗效果^[10]。Ghayad 等^[11]报道了 LY294002 对胸部恶性肿瘤具有明显抑制生长作用。较多研究也证实了 LY294002 对舌鳞状细胞癌、肺小细胞癌、胃癌、大脑胶质细胞瘤等的生长抑制或化疗增敏作用^[12-13]。

参考文献:

- [1] Sarker D, Reid AH, Yap TA, et al. Targeting the PI3K/Akt pathway for the treatment for prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(35): 4799-4805.
- [2] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway[J]. Science, 2002, 296(15): 1655-1657.
- [3] Oliver D, Ali HB. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells[J]. Stem Cell Reviews, 2007, 3(1): 7-17.
- [4] 邵令方,高宗人.食管癌和贲门癌的外科治疗[J].中华外科杂志,2001,39(1):44-46.
- [5] 丁璐璐,陈永胜.启东市 2001~2007 年食管癌生存率分析[J].中国肿瘤,2011,20(5):341-344.
- [6] 赵平,陈万青.中国癌症登记地区 2006 发病死亡[M].北京:军事医学科学出版社,2010:1-31.
- [7] Akashi T, Nishimura Y, Wakatabe R, et al. Proteomics-based identification of biomarkers for predicting sensitivity to a PI3K-kinase inhibitor in cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 352(4): 514-521.
- [8] Taso AS, McDonnell T, Lam S, et al. Increased phosphorakt(ser473) expression in bronchial dysplasia: implications for lung cancer prevention studies[J]. Cancer Epidemiol Biomarker Prev, 2003, 12(7): 660-664.
- [9] Nguyen DM, Chen CA, Reddy R. Potentiation of paclitaxel cytotoxicity in lung and esophageal cancer cells by pharmacologic inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B(Akt)-mediated signaling pathway[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 127(2): 365-375.
- [10] Liu Y, Cui B, Qiao Y, et al. Phosphoinositide-3-kinase inhibition enhances radiosensitization of cervical cancer in vivo[J]. Int J Gynecol Cancer, 2011, 21(1): 100-105.
- [11] Ghayad SE, Cohen PA. Inhibitors of the PI3K/Akt/mTOR pathway: new hope for breast cancer patients[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2010, 5(1): 29-57.
- [12] Yu HG, Ai YW, Yu LL, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death[J]. Int J Cancer, 2008, 122(2): 433-443.
- [13] Jean LN, Amelia K, Ntis DA, et al. PI3K/Akt mediates radiosensitization by the signaling inhibitor LY294002 in human malignant gliomas[J]. J Neuro Oncol, 2005, 71(3): 215-222.