论著

文章编号:1000-5404(2010)14-1520-04

渥曼青霉素联合丝裂霉素对人肝癌 HepG-2 细胞增殖和凋亡的影响

张 健[1],王洪林[1],张 潜[1],赵 媛[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院 肝胆外科[1],眼科[2])

[摘要] 目的 研究渥曼青霉素(Wortmannin)联合丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC)对肝癌 HepG-2 细胞增殖、凋亡及相关基因 Cyclin D_1、Bad 表达的影响。方法 实验分 4 组,对照组:未处理的 HepG-2 细胞;Wortmannin 组:用终浓度为 25、50、100、200、400 nmol/L Wortmannin 处理的 HepG-2 细胞;MMC 组:用终浓度为 1.875、3.75、7.5、15、30 nmol/L MMC 处理的 HepG-2 细胞;联合用药组:同时用 Wortmannin 和 MMC 处理 HepG-2 细胞,终浓度为 26.875、53.75、107.5、215、430 nmol/L。MTT 比色法检测细胞增殖状态;Hoechst 33258 荧光染色观察凋亡细胞核形态学变化,流式细胞术检测肿瘤细胞周期和凋亡;逆转录聚合酶联反应及 Western blot 检测 PI3K/Akt 信号传导通路相关基因和蛋白的表达。结果 联合用药组的细胞增殖抑制率显著高于单独用药组($P<0.05$);联合用药作用 24 h 后流式细胞术显示细胞明显阻滞于 G_0/G_1期;细胞凋亡率由处理前的(3.23±1.32)%提高到(14.82±1.36)%($P<0.01$);荧光显微镜下可见典型的细胞凋亡形态学改变;联合用药后细胞 p-Akt 活化程度降低,Cyclin D_1表达量减少,Bad 表达量增加($P<0.05$)。结论 渥曼青霉素与丝裂霉素联合应用,具有协同抗肿瘤效应。

[关键词] 肝癌;渥曼青霉素;丝裂霉素;凋亡;PI3K/Akt 信号通路
[中图法分类号] R735.7;R73-361;R978.1 [文献标志码] A

Effects of Wortmannin combined with mitomycin C on proliferation and apoptosis of HepG-2 cells

Zhang Jian[1], Wang Honglin[1], Zhang Qian[1], Zhao Yuan[2] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, [2]Department of Ophthalmology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of Wortmannin combined with mitomycin C (MMC) on the proliferation, apoptosis and expressions of related genes Cyclin D_1 and Bad in liver cancer cell line HepG-2. **Methods** HepG-2 cells (10^4/ml) were treated with 0, 25, 50, 100, 200 or 400 nmol/L Wortmannin, 0, 1.75, 3.75, 7.5, 15 or 30 nmol/L MMC, or combined concentrations (0, 26.875, 53.75, 107.5, 215 or 430 nmol/L) respectively. Cell suppression rate were detected by MTT assay. Nucleus apoptosis of HepG-2 cells were examined by Hochest 33258 fluorescent staining. Change of cell cycle and apoptosis in HepG-2 cells were detected by flow cytometry (FCM). Expressions of PI3K/Akt signaling transduction pathway related genes and proteins were tested by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis. **Results** The inhibition ratio of cell proliferation was significant higher in combined groups than in either single groups ($P<0.05$). FCM showed HepG-2 cells were arrested at G_0/G_1 phrase, and apoptotic rate were increased from (3.23±1.32)% in control to (14.82±1.36)% in combined use of Wortmannin and MMC for 24 h ($P<0.01$). Typical changes in apoptotic morphology of HepG-2 cells were observed by fluorescence microscopy. Activation of p-Akt was inhibited, and mRNA and protein levels of Cyclin D_1 were decreased, but those of Bad were increased. **Conclusion** Combined use of Wortmannin and MMC has a synergic antineoplastic effect on HepG-2 cells.

[**Key words**] liver cancer, Wortmannin, mitomycin C; apoptosis; PI3K/Akt signaling pathway

Corresponding author: Wang Honglin, Tel: 86-23-89107534, E-mail: whlcqykd@163.com

信号转导通路的异常改变是肿瘤细胞的重要生物学特性,其中磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(protein kinase B, Akt)在肿瘤信号传导中起重要的调节作用。细胞在一系列内外因素的作用下,通过启动 PI3K/Akt 信号转导通路,诱导细胞的增殖、分化,避免细胞发生凋亡,在维持肿瘤细胞恶性生物学特性中起重要作用[1]。PI3K 激酶抑制剂渥曼青霉素(Wortmannin)联合化疗药物丝裂霉素(mitomycin C, MMC)在体外作用肝癌

[通信作者] 王洪林,电话:(023)89107534,E-mail:whlcqykd@163.com

HepG-2 细胞的研究少见报道。本研究采用 Wortmannin 与 MMC 联合处理肝癌 HepG-2 细胞，观察它们对 HepG-2 细胞增殖能力和凋亡抗性改变的协同作用，并初步探讨其可能机制，为肝癌的治疗探寻新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌 HepG-2 购自中科院上海细胞所，Wortmannin 和 Bad 单抗购自 Sigma 公司，丝裂霉素（国药准字 H33020786）购自浙江海正药业股份有限公司，RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司，p-PI3K 单抗、Akt 单抗、p-Akt 单抗、Cyclin D 单抗购自 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HepG-2 细胞接种于 50 ml 培养瓶，培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI1640，置于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度细胞培养箱中培养。实验时取对数生长期细胞。

1.2.2 实验分组 实验分 4 组。将 HepG-2 细胞浓度调至 10^4/ml，每孔接种 200 μl，37 ℃，5% CO_2 培养 24 h，分别加入终浓度为 25、50、100、200、400 nmol/L Wortmannin（Wortmannin 组）和 1.75、3.75、7.5、15、30 nmol/L MMC（MMC 组）的培养液。联合用药组（Wortmannin + MMC）：同时加入 Wortmanin 和 MMC，使终浓度分别为 26.75、53.75、107.5、215、430 nmol/L。对照组为 0 nmol/L Wortmannin 及 0 nmol/L MMC 处理的 HepG-2 细胞。

1.2.3 MTT 法检测 Wortmannin 与 MMC 对肝癌细胞增殖的抑制作用 空白对照组为不含细胞的培养液，每组设 5 个复孔。分别继续培养 24、48、72 h 后，每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl，继续培养 4 h，吸弃孔内培养液，加 DMSO 150 μl。酶标仪测定光密度值[D(570)]。细胞生长抑制率 = [1 − 处理组D(570)/对照组 D(570)] × 100%。分别计算出 2 个单药及联合用药的 24 h 的 IC_{50}，以下实验均以 IC_{50} 的浓度作为实验浓度。

1.2.4 Hoechst 33258 荧光染色 各组细胞培养 24 h，4 ℃固定细胞 5 min 加入 Hoechst 33258 荧光染料，室温下避光染色10 min；抗荧光淬灭封片剂封片后在荧光显微镜下观察凋亡细胞核。

1.2.5 流式细胞术测定细胞周期 各组细胞培养 24 h，2.5 g/L 胰蛋白酶溶液消化细胞，PBS 1 ml 重悬细胞，70% 冰乙醇固定细胞过夜，加入 RNAase A 至终浓度 50 mg/L，37 ℃ 恒温水浴 1 h，加碘化丙啶染色液至终浓度为 50 mg/L，4 ℃避光染色 1 h，流式细胞仪测定细胞周期变化。实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞术测定细胞凋亡 各组细胞培养 24 h，2.5 g/L 胰蛋白酶溶液消化后 800 r/min 离心，将细胞转入流式管，用结合缓冲液重悬细胞至（3 ~ 5）× 10^5/ml，取上液 195 μl，加入 FITC 标记的 Annexin-V（20 μg/ml）5 μl，室温避光 10 min，800 r/min 离心，用 190 μl 结合缓冲液重悬细胞，再加入 PI（50 μg/ml）10 μl，避光反应 5 min 后，加入 200 μl 结合缓冲液，立即用 FACScan 进行流式细胞术定量检测，以对照组细胞不加 Annexin-V FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。

1.2.7 RT-PCR 检测 各组细胞培养 24 h，按 Trizol RNA 抽提试剂盒说明书分别提取各组细胞总 RNA。提取样本经紫外分光光度计测得 D(570) 在 1.8 ~ 2.0。逆转录反应按试剂盒说明书操作。分别检测实验组和对照组肝癌细胞 p-PI3K、p-Akt，Cyc-lin D_1、Bad 基因的表达。PCR 引物用 Primer Premier 5.0 软件设计，由上海生工合成，p-PI3K 上游 5′-AAACCTGAACAGGCTATG-3′，下游 5′-GCACCACCTCAATAAGTC-3′，产物大小为 775 bp；p-Akt 上游 5′-CTGGGTCAAAGAAGTCA-AAGG-3′，下游 5′-CAGTCTGGATGGCGGTTG-3′，产物大小为 455 bp；Cyclin D_1 上游 5′-GTCCCACTCCTACGATACG-C-3′，下游 5′-GTTGGCACCAAAGGATTCC-3′，产物大小为 487 bp；Bad 上游：5′-GCATGTTCCAGATCCCAGAGT-3′，下游：5′-GGATGTGGAGCGAAGGTCA-3′，产物大小为 525 bp。β-actin 上游：5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′，下游 5′-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3′，产物大小为 272 bp，PCR 反应条件：95 ℃ 5 min；92 ℃ 30 s，（p-PI3K，47 ℃，p- Akt、Cyclin D_1、Bad、β-actin 57 ℃）退火 40 s，72 ℃ 1 min，扩增 30 个循环；72 ℃ 10 min。2.0 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳，Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片，结果采用 Quantity One 软件进行灰度值分析，实验重复 3 次。

1.2.8 Western blot 检测 各组细胞培养 24 h，加入适量的 RIPA 裂解液冰浴中裂解细胞，BCA（Pierce）法进行蛋白定量，取等量蛋白（50 μg）进行 SDS-PAGE 电泳分离，经 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转移到 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后，加入一抗 p-PI3K、Akt、p-Akt 与 Cyclin D_1、Bad（抗体稀释度为 1∶500）。加入二抗 HRP 标记的山羊抗兔 IgG（抗体稀释度为 1∶1 000），β-actin 作为内参照，用 ELC 发光试剂盒（美国 Amersham 公司）检测杂交信号，Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片，结果采用 Quantity One 软件进行灰度值分析，实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件，组间多重比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

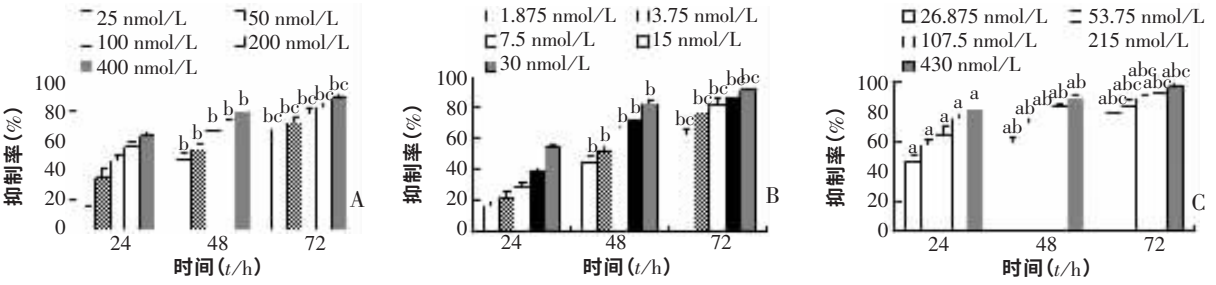
2.1 Wortmannin、MMC 对 HepG-2 细胞的生长抑制作用

不同浓度 Wortmannin、MMC 单用或联用，对 HepG-2 细胞均有不同程度的生长抑制作用，且各组随剂量和作用时间的增加，抑制效果有增强趋势（$P < 0.05$）。联合用药组较单药组抑制更明显（图 1）。提示 Wortmannin 联合 MMC 具有协同抑制 HepG-2 细胞增殖的作用。

2.2 Wortmannin、MMC 对 HepG-2 细胞凋亡的影响

2.2.1 细胞核形态学观察 凋亡细胞的细胞核呈致密浓染，荧光亢进呈亮蓝色，核染色质边集或呈碎片状、团块状分布。正常的活细胞细胞核形态规则，发出均匀的荧光。镜下观察，对照组细胞核形态规则，荧光均匀，未见明显凋亡，Wortmannin、MMC 作用后可见核染色质浓集，形状不规则，荧光呈亮蓝色，大量细胞呈凋亡细胞形态学改变。联合用药组 HepG-2 细胞核染色质更加浓集，形状更加不规则，亮蓝色荧光更加明显，见图 2。

2.2.2 细胞周期变化 Wortmannin 作用 24 h，可使 S 期细胞明显降低（$P < 0.01$），G_0/G_1 期细胞比例明显升高（$P < 0.01$），即引起 HepG-2 细胞阻滞于 G_0/G_1 期，从而抑制其增殖；MMC 作用于 HepG-2 细胞，主要引起细胞阻滞于 G_2/M 期（$P <$

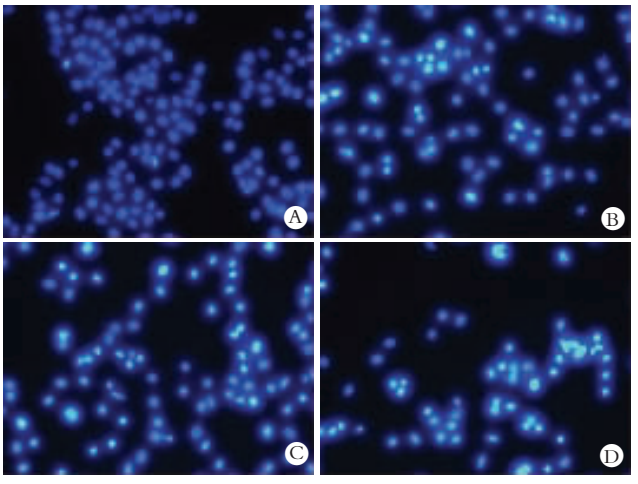


a：$P<0.05$，与对应 Wortmannin 组和 MMC 组比较；b：$P<0.05$，与同组 24 h 比较；c：$P<0.05$，与同组 48 h 比较

A：Wortmannin 组；B：MMC 组；C 联合用药组

图 1　Wortmannin、MMC、联合用药对肝癌 HepG-2 细胞的生长抑制作用

0.01）；Wortmannin 与 MMC 联合作用 HepG-2 细胞后，G_0/G_1 期细胞比例明显升高（$P<0.01$），而 S 期细胞明显降低（$P<0.01$），G_2/M 期细胞也有所降低，但变化不显著（$P>0.05$）。与对照组比较，Wortmannin 作用后，细胞凋亡率明显增加（$P<0.05$）；MMC 作用后，凋亡率也有所增加，但变化不显著（$P>0.05$）；联合用药后，凋亡率增加最明显（$P<0.01$）。见表 1。



A 对照组；B：Wortmannin 组；C：MMC 组；D 联合用药组

图 2　Wortmannin、MMC、联合用药作用 HepG-2 细胞前后的荧光染色（Hoechst 33258 ×200）

表 1　Wortmannin、MMC 及联合用药处理前后 HepG-2 细胞周期分布的改变［$n=3$，$(\bar{x}\pm s)\%$］

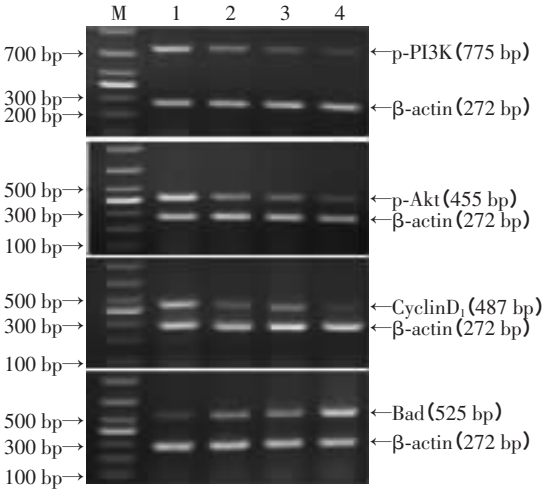
组别	G_0/G_1	G_2/M	S	凋亡率
对照组	61.67±1.21	11.29±2.68	27.04±1.15	1.77±0.93
Wortmannin 组	70.33±0.19^b	9.53±0.14	20.14±0.82^b	8.51±1.29^a
MMC 组	59.93±1.34	38.7±1.33^b	1.37±1.04^b	5.84±1.63
联合用药组	80.77±1.37^b	11.35±2.21	7.88±0.88^b	39.36±5.12^b

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

2.2.3　细胞凋亡的变化　当 Wortmannin 或 MMC 单独处理 HepG-2 细胞后，细胞凋亡比例［分别为（9.17±1.78）%、（9.00±2.00）%］较对照组［（3.23±1.32）%］有增高趋势；当二者联合应用时凋亡率［（14.82±1.36）%］明显高于对照组（$P<0.01$）。提示 Wortmannin 联合 MMC 对 HepG-2 细胞凋亡具有协同促进作用。

2.3　各组 HepG-2 细胞 p-PI3K、p-Akt、Cyclin D_1 和 Bad mRNA 的表达

与对照组相比，Wortmannin 组和 MMC 组肝癌细胞 p-PI3K、p-Akt、Cyclin D_1 mRNA 表达量均下降（$P<0.05$），Bad mRNA 表达量增加（$P<0.05$）；联合用药组变化更加显著。见图 3。

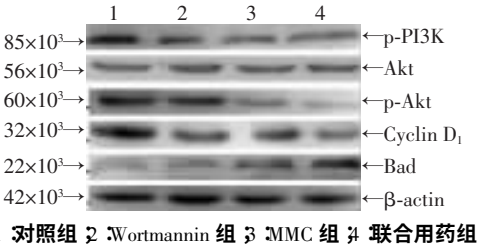


M：DNA 标准（DL 1 000）；1：对照组；2：Wortmannin 组；3：MMC 组；4：联合用药组

图 3　各组 HepG-2 细胞p-PI3K、p-Akt、Cyclin D_1、Bad mRNA 的表达

2.4　各组 HepG-2 细胞 p-PI3K、p-Akt、Akt、Cyclin D_1 和 Bad 蛋白的表达

与对照组相比，Wortmannin、MMC 及联合用药处理肝癌细胞后，p-PI3K、p-Akt、Cyclin D_1 蛋白表达量均下降（$P<0.05$），Bad 蛋白表达量增加（$P<0.05$）。见图 4。



1：对照组；2：Wortmannin 组；3：MMC 组；4：联合用药组

图 4　各组 HepG-2 细胞 p-PI3K、p-Akt、Akt、Cyclin D_1、Bad 蛋白表达的改变

3　讨论

Wortmannin 是一种霉菌代谢产物，其通过与磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）的催化亚单位 p110 结合，非竞

争性和不可逆的抑制 PI3K 的激酶活性，从而阻断 PI3K/Akt 信号通路，是 PI3K 的特异性抑制剂[2]。MMC 是从头状链霉菌培养液中分离提取的一种广谱抗肿瘤抗生素，对多种实体肿瘤有效，已经用于临床多种肿瘤的治疗。其作用机制是通过烷化基团和 DNA 螺旋形成交联，破坏 DNA 和 RNA 的结构而引起肿瘤细胞周期阻滞，同时引起细胞凋亡[3]。Ohta 等[4]研究发现 PI3K 通路抑制剂能抑制卵巢癌细胞增殖；Katayose 等[5]研究显示 Wortmannin 可阻断胰腺癌细胞中 PI3K/Akt 信号通路，下调 Bcl-2 基因表达，上调 Bad 等基因的表达，从而抑制细胞增殖，诱导细胞凋亡。本研究用 Wortmannin、MMC 及联合用药作用 HepG-2 细胞 24、48、72 h 后，发现对 HepG-2 细胞增殖均有抑制作用，并具有量效与时效关系。联合用药的中效浓度小于二者单用时的中效浓度，即抑制相同数量的肿瘤细胞生长联合用药只需要 Wortmannin 的 3/25，MMC 的 27/50，表明两种药物合用对肝癌细胞生长的抑制效果明显优于单独应用，充分说明联合用药只需小剂量即可达到高效应，这可以降低化疗药物对机体的不良反应及肿瘤细胞的耐药性。流式细胞术结果显示联合用药使 HepG-2 细胞明显阻止在 G_0/G_1 期，其可能的机制是抑制与增殖相关的 Cyclin D_1 基因的表达，与 Ouyang 等[6]研究结果相似。Hoechst33258 荧光活染结果显示：Wortmannin 与 MMC 作用后出现少量的细胞凋亡形态学改变，联合用药后可见大量的细胞出现凋亡形态学改变；Annexin-V/PI 双染法检测发现联合用药细胞凋亡率较 Wortmannin、MMC 单用明显增大。RT-PCR 及 Western blot 检测结果显示，联合用药组 Bad 基因及蛋白表达水平明显高于 Wortmannin、MMC 单用组。

PI3K 是磷脂酰肌醇依赖激酶家族成员，参与一系列细胞功能的调节，在肿瘤的发生、发展过程中起重要作用，包括细胞生长、增殖和凋亡，细胞运动和侵袭，转移，细胞周期调控，端粒酶活性，血管生成等[7,8]。Akt 是 PI3K 最主要的靶酶，与多种细胞活动、物质代谢调节有密切关系。在 PI3K 途径中，当上游信号刺激细胞膜表面时，穿膜受体酪氨酸激酶自磷酸化或磷酸化其他底物后，可在细胞膜内表面产生 PI3K 结合位点，PI3K 结合后可产生一些磷脂，激活其下游的 Akt，活化的 Akt 可介导各种类型的细胞生长和分化[9]。如可以使促凋亡基因 Bad 的 Ser136/Ser112 残基磷酸化，从而阻断 Bad 与 Bcl-2/或 Bcl-xl 形成二聚体，Bad 再与抗凋亡蛋白 14-3-3 相结合，使 Bad 不能发挥促细胞凋亡作用[10,11]。Akt 通过调节细胞周期影响细胞增殖，Cyclin D_1 水平对细胞周期 G_1/S 的转换至关重要，GSK3β 通过磷酸化作用促进泛素介导的 Cyclin D_1 的降解，Akt 通过直接磷酸化抑制 GSK3β 的激酶活性从而阻止 Cyclin D_1 的降解[12]。为此，我们用 RT-PCR 及 Western blot 检测了 p-PI3K、p-Akt 基因及其蛋白表达。结果发现联合用药组 p-PI3K、p-Akt 表达下降程度明显大于 Wortmannin、MMC 单用组。提示联合用药可能通过增强抑制 PI3K/Akt 信号通路从而使通路下游与细胞增殖相关的周期素 Cyclin D_1 降低和促凋亡基因 Bad 表达增高有关，而使 HepG-2 细胞增殖减少，凋亡增加，为临床肝癌的治疗提供了新的药物和治疗位点。

参考文献：

[1] Olsen B B, Bjorling-Poulsen M, Guerra B. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway：a study on its mechanism of action[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(1)：227－237.

[2] Wipf P, Halter R J. Chemistry and biology of wortmannin[J]. Org Biomol Chem, 2005, 3(11)：2053－2061.

[3] Isbarn H, Budaus L, Pichlmeier U, *et al*. Comparison of the effectiveness between long-term instillation of mitomycin C and short-term prophylaxis with MMC or bacille Calmette-Guerin. Study of patients with non-muscle-invasive urothelial cancer of the urinary bladder[J]. Urologe A, 2008, 47(5)：608－615.

[4] Ohta T, Ohmichi M, Hayasaka T, *et al*. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in *in vivo* ovarian cancer models[J]. Endocrinology, 2006, 147(4)：1761－1769.

[5] Katayose K, Seki T, Ohba N, *et al*. Growth-inhibitory effect of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor on human pancreatic cancer cells and expression of Bcl-2 family [J]. Anticancer Res, 2003, 23(3B)：2383－2387.

[6] Ouyang W, Li J, Ma Q, *et al*. Essential roles of PI-3K/Akt/IKKbeta/NFkappaB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 Cl41 cells [J]. Carcinogenesis, 2006, 27(4)：864－873.

[7] Nicholson K M, Anderson N G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy [J]. Cell Signal, 2002,14(5)：381－395.

[8] Tsao A S, McDonnell T, Lam S, *et al*. Increased phospho-AKT(Ser(473)) expression in bronchial dysplasia：implications for lung cancer prevention studies[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003, 12(7)：660－664.

[9] 杨大志，姬长友. PI3K、p-Akt 蛋白在喉鳞癌中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报，2007，29(10)：935－937.

[10] Furuya F. Lu C, Willingham M C, *et al*. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase delays tumor progression and blocks metastatic spread in a mouse model of thyroid cancer[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(12)：2451－2458.

[11] Henshall D C, Araki T, Schindler C K, *et al*. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death[J]. J Neurosci, 2002, 22(19)：8458－8465.

[12] Saitoh M, Ohmichi M, Takahashi K, *et al*. Medroxyprogesterone acetate induces cell proliferation through up-regulation of cyclin D1 expression *via* phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor-kappaB cascade in human breast cancer cells[J]. Endocrinology, 2005, 146(11)：4917－4925.

（收稿：2009-12-21 修回：2010-01-20）
（编辑 王小寒）