论著

文章编号:1000-5404(2014)12-1264-04

PI3K/Akt/FoxO3a 信号通路对人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞增殖及凋亡的影响

邱 权[1],叶 琳[2],皮静婷[1],陈黎黎[1],陈鸿雁[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:耳鼻咽喉科[1],胸心外科[2])

[摘要] **目的** 探讨 FoxO3a 对体外培养的人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞增殖及凋亡的影响是否是通过 PI3K/Akt 信号通路。**方法** 通过使用 LY294002 特异性抑制 PI3K 的活性,免疫印迹法检测 FoxO3a 及 p-Akt 蛋白在人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞的表达,免疫荧光化学检测 FoxO3a 在鼻咽癌细胞中的亚细胞定位,实时荧光定量 PCR 检测 FoxO3a 的 mRNA 表达水平,MTT 法检测鼻咽癌细胞的增殖抑制率,流式细胞术检测鼻咽癌细胞的凋亡率。**结果** 通过使用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002,FoxO3a 在实验组人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞中的蛋白和 mRNA 表达水平均高于对照组($P<0.05$),且在 CNE-1($P=0.004$)、CNE-2($P=0.001$)细胞核内的表达量高于对照组,FoxO3a 的上调可抑制人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞的增殖($P<0.05$),促进其凋亡($P<0.01$)。**结论** 通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的活性可上调人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞 FoxO3a 基因的表达,抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡,其机制可能与其对 FoxO3a 的调控有关。

[关键词] FoxO3a;PI3K/Akt 通路;人鼻咽癌;CNE-1;CNE-2;细胞增殖;细胞凋亡

[中图法分类号] R329.28;R730.23;R739.63 [文献标志码] A

FoxO3a drives proliferation and apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway in human nasopharyngeal carcinoma CNE-1 and CNE-2 cells

Qiu Quan[1], Ye Lin[2], Pi Jingting[1], Chen Lili[1], Chen Hongyan[1] ([1]Department of Otolaryngology, [2]Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effects of FoxO3a activation on the proliferation and apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway in human nasopharyngeal carcinoma (NPC) CNE-1 and CNE-2 cell lines. **Methods** Western blotting was used to test the protein expression of FoxO3a and p-Akt. Immunofluorescence staining was used to test the subcellular localization of FoxO3a in CNE-1 and CNE-2 cells. Real-time quantitative PCR was used to measure the mRNA level of Foxo3a in the NPC cells. MTT assay and flow cytometry were used to investigate the proliferation and apoptosis in the CNE-1 and CNE-2 cells. **Results** As compared to the control group, the protein and mRNA levels of FoxO3a were increased using PI3K-specific inhibitor LY294002 in CNE-1 and CNE-2 cells ($P<0.05$), while the nuclear accumulation of FoxO3a was increased significantly in CNE-1 cells ($P=0.004$) and CNE-2 cells ($P=0.001$). The activation of FoxO3a could inhibit cell proliferation ($P<0.05$) and promote apoptosis ($P<0.01$) of CNE-1 and CNE-2 cells. **Conclusion** PI3K/Akt signaling pathway inhibition reduces cell proliferation and induces apoptosis of CNE-1 and CNE-2 cells, possibly through the regulation of FoxO3a expression.

[**Key words**] FoxO3a; PI3K/Akt pathway; human nasopharyngeal carcinoma; CNE-1; CNE-2; cell proliferation; cell apoptosis

Supported by the Project of National Clinical Key Discipline Construction (2012-649) and the Project of Medical Scientific Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2012-1-001). Corresponding author: Chen Hongyan, Tel:86-23-89012758, E-mail: chenhongyan1963@hotmail.com

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目(2012-649);重庆市卫生局医学科研计划项目(2012-1-001)

[通信作者] 陈鸿雁,电话:(023)89012758,E-mail:chenhongyan1963@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1427.004.html(2014-01-02)

鼻咽癌是好发于我国南方及东南亚的常见肿瘤之一,呈地理及人种族分布特点[1]。放疗为主的综合治疗为目前治疗鼻咽癌的主要手段[2],5年生存率约为60%,局部复发和远处转移是鼻咽癌致死的主要病因。认识鼻咽癌的生长及分子机制,寻求新的治疗靶点成为目前研究的热点之一。FoxO3a(FKHRL1)是Forkhead转录因子家族成员中的一员,它在细胞生物学功能调节中具有重要的作用,包括细胞周期阻滞、凋亡、DNA损伤修复、应激保护等作用[3]。近来普遍认为FoxO3a是一个抑癌基因,与肿瘤的发生、发展密切相关,许多化疗药物均通过FoxO3a发挥抑制肿瘤的作用。本课题组前期研究亦发现FoxO3a在鼻咽癌组织中呈现低表达[4],提示与鼻咽癌的发生、转移密切相关。本研究进一步探讨PI3K/Akt/FoxO3a通路对人鼻咽癌CNE-1、CNE-2细胞增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人鼻咽癌CNE-1细胞株购于中国科学院上海细胞库,CNE-2细胞株购于中国典型培养物保藏中心(武汉大学保藏中心),胎牛血清购于北京元亨生物公司,RPMI1640培养基购于美国HyClone公司,LY294002购于江苏碧云天公司,FoxO3a抗体购于美国Immunoway公司,p-Akt抗体购于美国Abcam公司,β-actin购于北京康为世纪公司,山羊抗兔IgG-FITC购于北京中杉金桥公司,PrimerScript RT逆转录试剂盒及QPCR SYBR Green Mix购于大连TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人鼻咽癌CNE-1、CNE-2细胞均用含10%体积分数已灭活胎牛血清的RPMI1640培养基,置于37 ℃、5% CO_2孵箱中培养,实验用对数生长期的细胞。

1.2.2 蛋白质提取和Westen blot分析 用不同浓度的LY294002(0、20、40 μmol/L)处理CNE-1、CNE-2细胞24 h后,细胞裂解液(RIPA:PMSF =100:1)冰上裂解30 min,4 ℃离心12 000 r/min后留含全蛋白的上清液,用BCA试剂盒测定蛋白浓度。取各组等量蛋白50 μg进行8% SDS-PAGE电泳,电转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭1.5 h,加一抗FoxO3a(1∶1 000)或p-Akt(1∶1 400)4 ℃过夜孵育,TBST洗膜,加入相应的IG-HRP二抗孵育2 h,用增强化学发光剂(ECL)化学发光法检测。

1.2.3 免疫荧光化学 取对数生长期的CNE-1、CNE-2细胞均匀接种于放有小玻片的24孔板,使浓度为2×10^4/mL,予以LY294002(0、40 μmol/L)处理细胞,继续培养24 h后用无水乙醇在-20 ℃固定10 min,0.1% Triton X-100破膜5min,PBS清洗后5%山羊血清封闭30 min,依次加一抗FoxO3a(1∶200)4 ℃过夜孵育,再加山羊抗兔IgG-FITC(1∶200)于37 ℃烤箱1.5 h,50%甘油封片。图像采集及荧光定量分析采用激光扫描共聚焦显微镜及其分析软件(Leica公司,TCS-SP2,德国)。

1.2.4 实时荧光定量PCR 用不同浓度的LY294002(0、20、40 μmol/L)处理CNE-1、CNE-2细胞24 h后,TRIzol试剂用于细胞总RNA的提取,然后用紫外分光光度计测量样品在260 nm的光密度,确定RNA的质量。取1 μg RNA样品用PrimerScript RT试剂盒逆转录得到反转录产物cDNA。引物(由大连TaKaRa公司设计并合成)如下:FoxO3a上游引物5′-AAACCCTCTCGGACTCTCTCTC-3′,下游引物5′-TAAAATCCAACCCCATCAGCATC-3′;GAPDH上游引物5′-CAGCGACACCCACTCCTC-3′,下游引物5′-TGAGGTCCACCACCCTGT-3′。取12.5 μL QPCR SYBR GreenMix,0.4 μL对应的引物,1 μL cDNA,再加QH_2O至25 μL得到反应混合物。采用CFX96™ Real-time System(Bio-Rad,美国)行实时荧光定量PCR反应,用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算mRNA表达的相对变化。

1.2.5 MTT法 CNE-1、CNE-2细胞分别计数后接种于96孔板,每孔细胞数为4×10^4,在37 ℃、5% CO_2孵箱中培养24 h后,将原培养基替换为不同浓度的LY294002(0、20、40、50 μmol/L)的培养基,继续培养24 h,加入5 mg/mL的MTT 20 μL于各孔中,再培养4 h后吸尽培养液,每孔加150 μL二甲基亚砜(DMSO),用酶标仪(波长570 nm)测定各孔的光密度值,每个浓度组设6个复孔,计算抑制率。抑制率=[1-实验组D(570)值/对照组D(570)值]×100%。

1.2.6 流式细胞术 CNE-1、CNE-2细胞分别计数后接种于6孔板,使浓度为1×10^5/mL,并予以不同浓度的LY294002(0、20、40 μmol/L)处理细胞,培养24 h后收集细胞,用PBS洗涤2次,制成单细胞悬液。取100 μL细胞悬液加入5 μL AnnexinV/FITC和10 μL碘化丙锭(PI)溶液,采用流式细胞仪(BD公司,Franklin Lakes,美国)CellQuest软件进行分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行重复实验数据的统计学分析,不同浓度组之间FoxO3a的蛋白和mRNA表达水平、对鼻咽癌细胞增殖和凋亡的影响的差异采用单因素方差分析,CNE-1和CNE-2两种细胞之间FoxO3a的蛋白表达水平的差异采用t检验。

2 结果

2.1 抑制PI3K对鼻咽癌细胞FoxO3a蛋白表达的影响

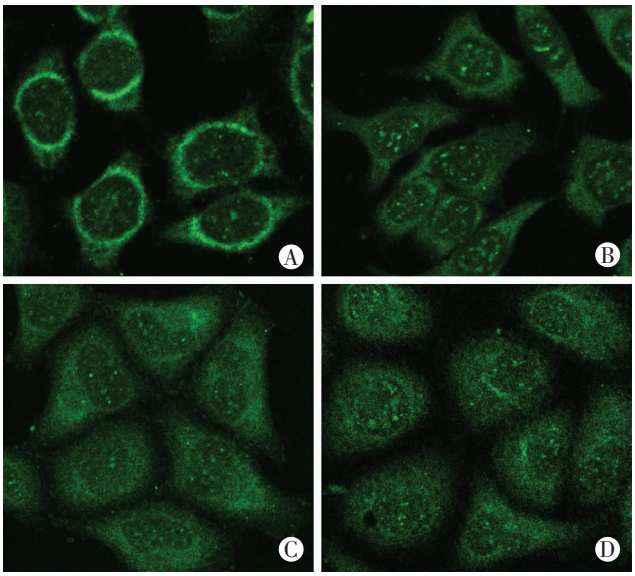
采用细胞免疫荧光检测FoxO3a在人鼻咽癌CNE-1、CNE-2细胞中的亚细胞表达定位,结果显示(图1),FoxO3a主要在细胞质表达,细胞核内亦有少量表达,细胞经处理后,实验组FoxO3a由细胞质向细胞核内移动,增加其在细胞核内的表达,细胞核内FoxO3a的量在CNE-1细胞中从[(15.72±1.73)增加到(25.65±2.29),$P=0.004$],在CNE-2细胞中从[(21.31±0.68)增加到(29.60±1.22),$P=0.001$],差异有统计学意义。

Western blot结果显示(图2),FoxO3a在CNE-2细胞中的表达量明显高于CNE-1细胞,细胞经处理后,实验组FoxO3a蛋白表达水平较对照组明显上调($P<0.05$),Akt磷酸化水平被抑制($P<0.01$)。

2.2 抑制PI3K对鼻咽癌细胞FoxO3a mRNA水平的影响

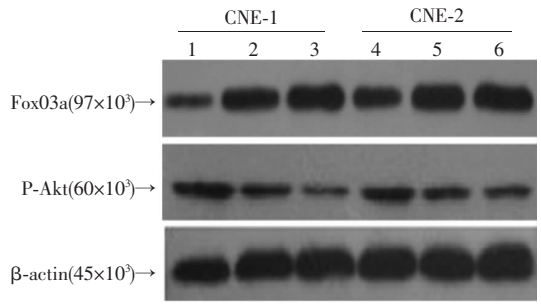
QRT-PCR结果显示(图3),该信号通路抑制处理后,实验组FoxO3a mRNA表达水平明显上调,并随着抑制剂的浓度增

加而呈增高趋势($P<0.05$)。



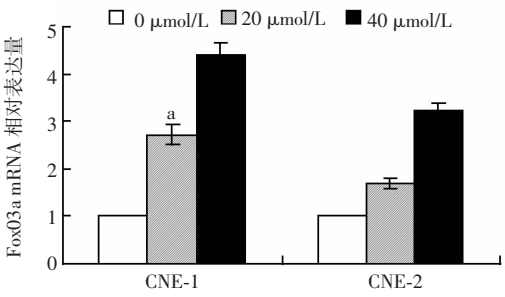
A、B:CNE-1 细胞;C、D:CNE-2 细胞;A、C:0 μmol/L(对照组);B、D:40 μmol/L

图1 免疫荧光检测 FoxO3a 在人鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞中的亚细胞表达定位 (×800)



1,4:0 μmol/L 对照组;2,5:20 μmol/L 对照组;3,6: 40 μmol/L

图2 Western blot 检测不同浓度的 LY294002 处理鼻咽癌细胞后 FoxO3a、p-Akt 蛋白的表达

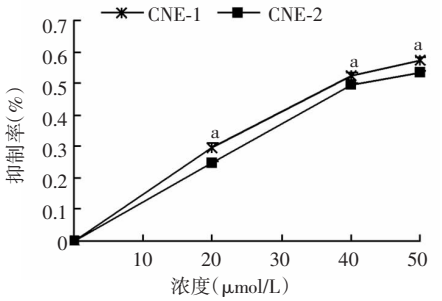


a: $P<0.05$,与对照组(0 μmol/L)比较

图3 QRT-PCR 检测不同浓度的 LY294002 对鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞 FoxO3a mRNA 的表达

2.3 抑制 PI3K 对鼻咽癌细胞生长抑制的影响

经不同浓度的 LY294002 处理 CNE-1、CNE-2 细胞 24 h 后,在 20~50 μmol/L 的范围内,随着抑制剂剂量的增加,2 种鼻咽癌细胞的生长抑制作用逐渐明显(图 4),各浓度之间的抑制率差异具有统计学意义($P<0.05$)。

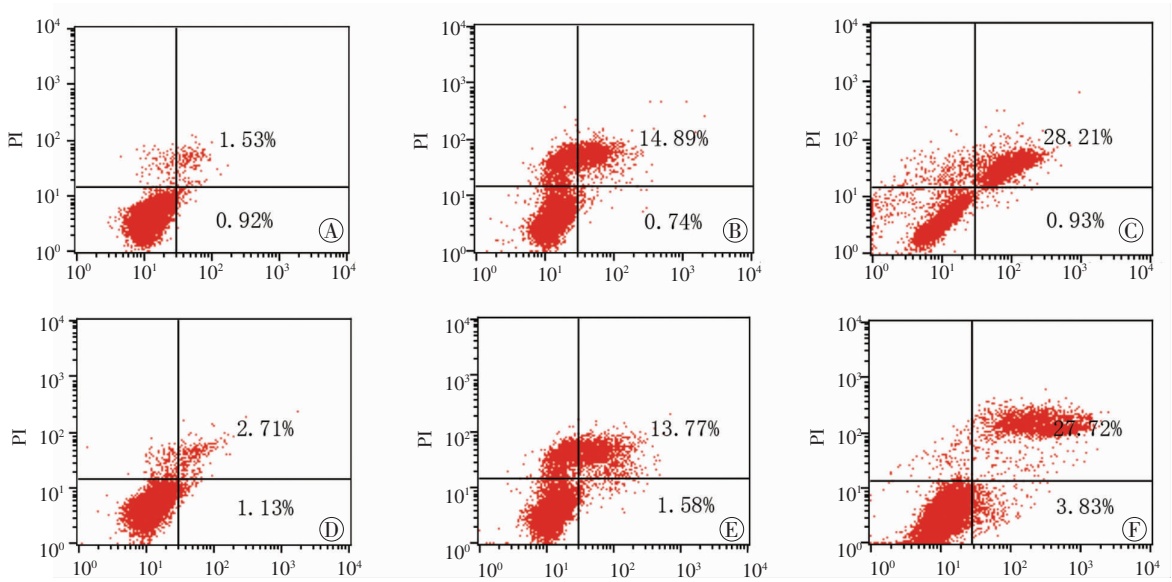


a: $P<0.05$,与对照组(0 μmol/L)比较

图4 MTT 法检测不同浓度 LY294002 对鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞增殖的抑制作用

2.4 抑制 PI3K 对鼻咽癌细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示(图 5),随着 LY294002 作用浓度的增加,细胞凋亡率亦逐渐增加,呈剂量依赖性,各浓度之间差异具有统计学意义($P<0.01$)。



A~C:CNE-1 细胞;D~F:CNE-2 细胞;A、D:对照组(0 μmol/L);B、E:20 μmol/L;C、F:40 μmol/L

图5 流式细胞术检测不同浓度 LY294002 作用 24 h 后鼻咽癌 CNE-1、CNE-2 细胞的凋亡率

3 讨论

随着对肿瘤发生、发展机制的不断深入认识,分子靶向治疗技术以其理论上特异性强、疗效显著以及毒性低等优点成为研究肿瘤治疗的热点。PI3K是肿瘤发生、发展过程中一个重要的调节生长因子活性的因子,参与调控细胞的代谢、分化、增殖、凋亡等重要活动。Akt主要是通过PI3K的调节使Thr308和Ser473位点磷酸化而激活。近来研究发现PI3K/Akt信号通路在多种肿瘤中处于异常活化状态,其中包括鼻咽癌[5-6]。PI3K/Akt信号通路通过磷酸化多种底物,改变细胞的活动,从而促进肿瘤细胞的生长、增殖,抑制细胞凋亡。

FoxO3a是PI3K/Akt信号通路下游一个重要的因子,目前较多的研究证明它是肿瘤凋亡、周期调控的关键因子之一,活化FoxO3a可上调细胞凋亡因子,同时调节细胞周期因子,从而促进细胞凋亡和周期阻滞,抑制肿瘤的发生和发展[7]。PI3K/Akt信号通路是调节FoxO3a的最主要途径,Akt直接磷酸化FoxO3a的磷酸化位点后,与14-3-3蛋白结合形成复合物,使FoxO3a从细胞核内向细胞胞质移动并积累,从而导致其失活[8]。本研究结果发现,FoxO3a的表达在鼻咽癌CNE-1和CNE-2细胞株中与p-Akt的表达水平密切相关,应用PI3K抑制剂LY294002后,FoxO3a的蛋白表达和mRNA表达水平明显增强,而p-Akt蛋白的表达明显减少,同时亦发现抑制PI3K后FoxO3a蛋白在细胞核内的表达明显增加,提示FoxO3a在鼻咽癌细胞中的核内积聚与PI3K的抑制有关。以上结果表明,Akt磷酸化FoxO3a后使FoxO3a表达下调或在细胞质内异常高表达而导致其失活,提示PI3K/Akt信号通路在鼻咽癌细胞中对FoxO3a起着重要的调控作用,支持被公认的PI3K/Akt/FoxO3a信号通路模型。另外,本研究还发现FoxO3a在部分鼻咽癌细胞核内有表达,以CNE-2细胞明显,提示FoxO3a的核内积聚可能还存在其他的信号通路,因此需要更深入的研究来探讨FoxO3a在鼻咽癌发生、发展过程中的作用。

作为多种生长因子的下游信号通路,PI3K/Akt/FoxO3a在多种细胞周期调控过程中均有异常表达。在大多数细胞中,FoxO3a的激活导致细胞周期阻滞,即使伴随Akt失活亦不足以致细胞凋亡[9]。Burgering等[10]和Tran等[11]研究发现FoxO转录因子是引起细胞周期阻滞或者细胞凋亡与哺乳动物细胞的生理条件和细胞类型有关。Jiang等[12]发现应用LY294002抑制PI3K/Akt信号通路后可导致细胞G1周期阻滞,最终促进细胞凋亡。本研究结果发现,抑制PI3K/Akt信号通路而导致的FoxO3a上调可抑制鼻咽癌CNE-1和CNE-2细胞增殖,并促进细胞凋亡。但亦有研究表明,细胞核内的FoxO3a通过上调Cyclin A1的表达促进细胞周期进程并促进人未分化甲状腺癌细胞的增殖[13]。

综上所述,本研究证实LY294002作为PI3K特异性抑制剂在体外可有效抑制鼻咽癌癌细胞增殖并诱导其凋亡,说明PI3K/Akt信号转导通路与鼻咽癌细胞增殖及凋亡密切相关,其机制系通过活化FoxO3a实现。本研究结果为PI3K/Akt/FoxO3a信号通路成为鼻咽癌治疗的潜在靶点提供了理论依据。

参考文献:

[1] Chan A T. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Ann Oncol, 2010, 21(Suppl 7): vii308-vii312.

[2] 谢岳云, 王仁生, 王鸿智. 介入联合同期放化疗治疗局部晚期鼻咽癌的初步比较[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20): 2251-2253.

[3] Yang J Y, Hung M C. A New fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(3): 752-757.

[4] Shou Z, Lin L, Liang J, *et al*. Expression and prognosis of FoxO3a and HIF-1α in nasopharyngeal carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(4): 585-593.

[5] Chou C C, Chou M J, Tzen C Y. PIK3CA mutation occurs in nasopharyngeal carcinoma but does not significantly influence the disease-specific survival[J]. Med Oncol, 2009, 26(3): 322-326.

[6] Yip W K, Leong V C, Abdullah M A, *et al*. Overexpression of phospho-Akt correlates with phosphorylation of EGF receptor, FKHR and BAD in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncol Rep, 2008, 19(2): 319-328.

[7] Fu Z, Tindall D J. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis[J]. Oncogene, 2008, 27(16): 2312-2319.

[8] Brunet A, Bonni A, Zigmond M J, *et al*. Akt promotes cell survival by phophorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor[J]. Cell, 1999, 96(6): 857-868.

[9] Medema R H, Kops G J, Bos J L, *et al*. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1[J]. Nature, 2000, 404(6779): 782-787.

[10] Burgering B M, Kops G J. Cell cycle and death control: long live Forkheads[J]. Trends Biochem Sci, 2002, 27(7): 352-360.

[11] Tran H, Brun*et al*, Griffith E C, *et al*. The many forks in FOXO's road[J]. Sci STKE, 2003, 2003(172): RE5.

[12] Jiang H, Fan D, Zhou G, *et al*. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor(Ly294002) induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma *in vitro* and *in vivo*[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2010, 29: 34.

[13] Marlow L A, von-Roemeling C A, Cooper S J, *et al*. FoxO3a drives proliferation in anaplastic thyroid carcinoma through transcriptional regulation of cyclin A1: a paradigm shift that impacts current therapeutic strategies[J]. J Cell Sc, 2012, 125(Pt 18): 4253-4263.

(**收稿**:2013-10-30;**修回**:2013-12-15)

(编辑 张 维)