基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0027-04

抑制 PI3K/Akt 信号通路对胃癌细胞转移和侵袭影响的研究

王艳丽[1],高 青[2]

(1.重庆市第三人民医院消化内科,重庆 400014;2.重庆医科大学附属第一医院消化外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 PI3K/Akt 信号通路对胃癌细胞转移和侵袭的影响。方法:选用 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 体外作用于胃癌细胞株 SGC-7901,Western blot 检查总 Akt 和 p-Akt^{ser473} 蛋白表达,细胞粘附实验观察细胞与基质的粘附力,Transwell 法检查细胞侵袭能力,RT-PCR 及免疫细胞化学法检查 E-cadherin mRNA 及蛋白表达。结果:经 LY294002 处理的 SGC-7901,总 Akt 表达无改变,p-Akt^{ser473} 蛋白表达下降;细胞与基质的粘附力及侵袭能力减弱;E-cadherin mRNA 及蛋白表达水平升高。结论:抑制 PI3K/Akt 信号通路可减弱胃癌细胞的转移、侵袭能力,其可能机制与上调 E-cadherin 表达相关。

【关键词】胃癌;转移;侵袭;钙黏蛋白 E

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2009-10-23

Effects of PI3K/Akt inhibition on the metastasis and invasion of human gastric carcinoma cell SGC-7901 and its mechanism

WANG Yan-li, et al

(*Department of Digestive Diseases, the Third People's Hospital of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the influence of PI3K/Akt on metastasis and invasion of human gastric carcinoma. *Methods*: Human gastric carcinoma cell line SGC-7901 was cultured with PI3K/Akt signaling pathway inhibitor LY294002 in vitro. The expression of total Akt and p-Akt^{ser473} were detected in protein level by Western blot, the cell-ground substance adhesion was tested by cell adherence assay and the invasion ability was measured with Transwell plate, the expression of E-cadherin in mRNA level and protein level were detected by RT-PCR and S-P immunohistochemistry. *Results*: The expression of total Akt was constant, but the protein level of p-Akt^{ser473} was down regulated after treatment with LY294002, the adhesion rate and the invasion ability were decreased, the expression of E-cadherin in mRNA and protein were positively regulated. *Conclusion*: The metastasis and invasion capacity of human gastric carcinoma cell could be decreased by inhibiting PI3K/Akt, perhaps the mechanism is associated with increasing of E-cadherin expression.

【Key words】gastric cancer; metastasis; invasion; e-cadherin

作者介绍:王艳丽(1982-),女,住院医师,硕士,
研究方向:胃肠道肿瘤。

通信作者:高 青,男,主任医师,Email:gaoqing27@yahoo.com.cn。

960(1-2):273-276.

[9] 徐叔云,卞如濂,陈 修,主编.药理实验方法学[M].第三版.北京:人民卫生出版社,2002.202-204.

[10] Dembo G, Park S B, Kharasch E D. Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans[J]. Anesthesiology, 2005, 102(2):409.

[11] van Lookeren Campagne M, Thomas G R, Thibodeaux H, et al. Secondary reduction in the apparent diffusion coefficient of water, increase in cerebral blood volume, and delayed neuronal death after middle cerebral artery occlusion and early re-perfusion in the rat[J]. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 1999, 19(12):1354-1364.

[12] Ahmad S, Ahmad A, Gerasimovskaya E, et al. Hypoxia protects human lung microvascular endothelial and epithelial-like cells against oxygen toxicity[J]. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2003, 28(2):179-187.

[13] Cheng Y, Austin S C, Rocca B, et al. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2[J]. Science's STKE, 2002, 296(5567):539.

[14] Jadhav V D, Jabre A, Lee T. Effect of phospholipase C blockade on cerebral vasospasm[J]. Cerebrovascular Diseases, 2008, 25(4):362-365.

[15] Solomon D H. Selective cyclooxygenase 2 inhibitors and cardiovascular events[J]. Arthritis and rheumatism, 2005, 52(7):1968-1978.

[16] 罗传铭,毕桂南,曹立梅,等.塞来昔布对大鼠局灶性脑缺血再灌注的保护作用及机制研究[J].中风与神经疾病杂志,2007,24(002):160-163.

[17] Halushka M K, Halushka P V. Why Are Some Individuals Resistant to the Cardioprotective Effects of Aspirin: Could It Be Thromboxane A2[J]. Circulation, 2002, 105(14):1620.

(责任编辑:关蕴良)

胃癌是常见的恶性肿瘤，其死亡率高，仅次于肺癌，居第二位[1]。胃癌易发生淋巴道及血道转移，一旦转移则难以治疗，成为患者失去手术机会及放、化疗失败的重要原因，也是患者死亡的主要原因。有关胃癌转移、侵袭的相关机制研究是目前胃癌防治工作的热点。PI3K/Akt 信号通路是一条与肿瘤发生、发展密切相关的信号通路，研究发现[2,3]，抑制此信号通路参与抑制胃癌细胞增殖，促进胃癌细胞凋亡，但对胃癌细胞转移、侵袭影响的相关研究尚少见。本研究选用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002[4]处理胃癌细胞株 SGC-7901，观察抑制 PI3K/Akt 信号通路对 SGC-7901 转移、侵袭能力的影响并探讨其可能的机制。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

LY294002 购于美国 cayman 公司；兔抗人 phoshpho-Akt^{ser473} 多克隆抗体和鼠抗人 Akt 多克隆抗体分别购于 Cell Signaling 公司和北京中杉生物技术有限公司，鼠抗人 E-cadherin 多克隆抗体为武汉博士德生物技术有限公司产品；Matrigel 膜购自美国 BD 公司；E-cadherin 引物和内参 β-actin 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.2　细胞培养

胃癌细胞株 SGC-7901 购自重庆医科大学基础研究所。用含 10%小牛血清的 RPIM-1640 培养液于 37℃、5%CO_2 培养箱中培养。实验选用对数生长期细胞。

1.3　Western blot 检测 LY294002 对总 Akt 和 p-Akt^{ser473} 蛋白表达影响

经不同浓度 LY294002 处理的细胞用 4℃预冷 PBS 洗涤并置于冰上，刮取后离心收集，加入 RIPA 细胞裂解液及 1 mmol/L NaF，1 mmol/L Na_3VO_4 和 1 mmol/L PMSF 提取细胞总蛋白，用 BCA 试剂盒进行蛋白测定。每孔上样 40 μg 蛋白，10%十二烷基磺酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，电转至 PDVF 膜。在含 5%脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 h，抗总 Akt 的鼠多抗（1:1 000）、抗 p- Akt^{ser473} 的兔多抗（1:2 000）和抗 actin 的鼠单抗（1:2 000）4℃过夜，HRP 标记的抗兔和抗鼠 IgG（1:2 000）室温反应 2 h，加 ECL 试剂，凝胶图像分析仪显影。Quantity One 软件分析结果，以目的蛋白灰度值/对应的 β-actin 灰度值的比值进行统计学分析。

1.4　细胞粘附实验检测细胞对基质的粘附力

用 10、20 μmol/L 的 LY294002 培养细胞 72 h，同时设立对照组，细胞消化、离心，以 4×10^5 个/ml 接种于 Matrigel 包被的 96 孔板，组内设立 30 min 组、60 min 组、90 min 组、120 min 组及参照组，每组 3 个复孔，分别于各时间点吸出细胞悬液，PBS 轻洗 1 次，加入无血清的 RPMI-1640 培养基，最后将 96 孔板离心，每孔加入 20 μl MTT 液（5 mg/ml），置培养箱孵育 4 h，弃去上清，加入 200 μl DMSO，混匀，用自动酶标仪在波长 570 nm 测吸光度值（A），细胞粘附率＝（各时间点平均 A 值/参照组平均 A 值）×100%。

1.5　Transwell 法检查细胞侵袭能力

在 8 μm 孔径的聚碳酸酯微孔滤膜上平铺一层 1:5 的人工基底膜 Matrigel，37℃放置 3 h 后转至室温过夜干燥。下室加入 200 μl 无血清培养的 NIH3T3 细胞上清液作为趋化因子，上室加入 LY294002 处理后的 1.0×10^5 个/ml 细胞悬液 500 μl，每组设 3 个复空，37℃、5%CO_2 培养箱培养 24 h，取出膜，拭去膜上剩余细胞，甲醇固定，HE 染色，高倍镜下计数膜背面的细胞数。

1.6　PT-PCR 检测钙黏蛋白 E（E-cadherin）mRNA 的表达

按 Trizol 试剂说明提取细胞总 RNA，逆转录合成 cDNA，再取等体积 RT 产物进行 PCR 扩增。E-cadherin 引物序列为：上游引物 5'-GGGTCTTGCTATGTTGCC -3'，下游引物 5'-CCCAGAACGATACAACGG-3'，产物长度 437 bp；以 β-actin 为内参，引物序列：上游引物 5'-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3'，物 5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3'，产物长度为 272 bp。产物在 2%琼脂糖胶上分离，凝胶图象分析仪显影。Quantity One 软件测定目的蛋白灰度值/对应的 β-actin 灰度值的比值。

1.7　免疫细胞化学检测 E-cadherin 的表达

细胞以 1.0×10^4 个/ml 接种于含有无菌盖玻片的 24 孔培养板中，每孔 1 ml，按 1.5 分组培养 72 h 后，PBS 洗涤 3次。取出盖玻片，常规 SP 法免疫化学染色，DAB 显色。用 Image-Pro Plus 5.0 软件分析每个视野的积分光密度值（Intergrated optical density，IOD）和相应的面积（Area），每个视野平均光密度值＝IOD/Area。以平均光密度值衡量蛋白表达水平。

1.8　统计学方法

采用 SSPS10.0 软件进行统计学分析，数据以（$\bar{x}\pm s$）表示，两组间比较选用 t 检验，多组间比较选用 SNK 法，以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2　结　果

2.1　LY294002 对总 Akt 和 p-Akt^{ser473} 蛋白表达的影响

以 β-actin 蛋白条带为内参，LY294002 处理细胞 72 h 后，总 Akt 表达无明显变化，而 p-Akt^{ser473} 反应条带逐渐减弱（$P<0.05$），与药物浓度成依赖关系（图 1）。0、10、20 μmol/L 的 LY294002 干预细胞后，总 Akt 与对应的 β-actin 灰度值之

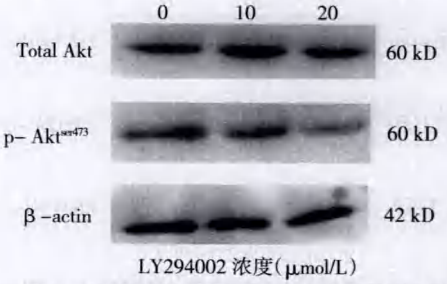


图 1　LY294002 对 SGC-7901 细胞总 Akt 和 p-Akt^{ser473} 蛋白表达影响

表 1 LY294002 对 SGC-7901 细胞与基质间粘附力的影响

	对照组		10 μmol/L LY294002 组		20 μmol/L LY294002 组	
	A 值	粘附率(%)	A 值	粘附率(%)	A 值	粘附率(%)
参照组	1.762 ± 0.082		1.811 ± 0.064		1.855 ± 0.081	
30 min	0.168 ± 0.011	9.53	0.175 ± 0.010	9.69	0.155 ± 0.009	8.36
60 min	0.419 ± 0.024	23.77	0.395 ± 0.015	21.83	0.378 ± 0.014	20.40
90 min	0.713 ± 0.015	39.87	0.658 ± 0.021	36.33	0.539 ± 0.012	$29.06^{\triangle\#}$
120 min	0.891 ± 0.013	50.72	0.795 ± 0.018	43.92^{*}	0.641 ± 0.019	$34.56^{\triangle\#}$

注：$^{*}P<0.05$ 与对照组比较；$^{\triangle}P<0.01$ 与对照组比较；$^{\#}P<0.01$ 与 10 μmol/L LY294002 组比较

比分别为 0.578 ± 0.020、0.607 ± 0.021、0.561 ± 0.025，各组间差异无统计学意义（$P>0.05$）；p-Akt^{ser473} 与对应的 β-actin灰度值之比分别为 0.304 ± 0.020、0.237 ± 0.024、0.125 ± 0.015，各组间差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.2 LY294002 对细胞与基质间粘附力的影响

10 μmol/L 和 20 μmol/L 的 LY294002 作用细胞 72 h 后，通过细胞粘附实验检测发现细胞对基质的粘附力较对照组减弱，且 20 μmol/L LY294002 对细胞粘附能力的影响更明显（表 1），差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

2.3 LY294002 对细胞侵袭能力的影响

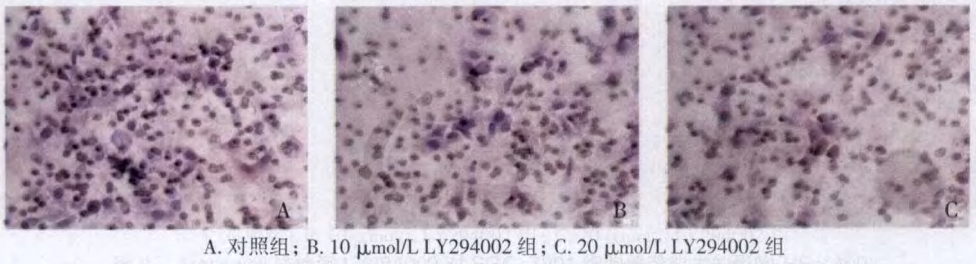
Transwell 法检测发现 LY294002 处理组穿过微孔滤膜的细胞数明显低于对照组（图 2），对照组、10 μmol/L LY294002 组及 20 μmol/L LY294002 组的侵袭细胞数分别为 67.00 ± 8.26、46.60 ± 6.33、37.80 ± 4.61，各组间细胞数差异有统计学意义（$P<0.05$）。

2.4 LY294002 对 E-cadherin mRNA 表达水平的影响

以 β-actin mRNA 表达条带作为内参，LY294002 处理细胞 72 h 后，E-cadherin mRNA 表达水平下降（图 3）。对照组、10 μmol/L LY294002 组及 20 μmol/L LY294002 组的 E-cadherin mRNA 与对应的 β-actin mRNA 灰度值之比分别为 0.187 ± 0.010、0.236 ± 0.013、0.288 ± 0.012，各组间差异具有统计学意义（$P<0.05$）

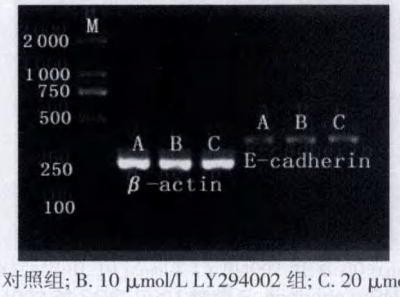
2.5 LY294002 对 E-cadherin 表达水平的影响

LY294002 处理细胞后 E-cadherin 表达水平增高（图4），对照组、10 μmol/L LY294002 组及 20 μmol/L LY294002 组的 E-cadherin 胞浆平均光密度值分别为 0.104 ± 0.009、0.122 ± 0.009、0.148 ± 0.011，各组间差异具有统计学意义（$P<0.05$）。



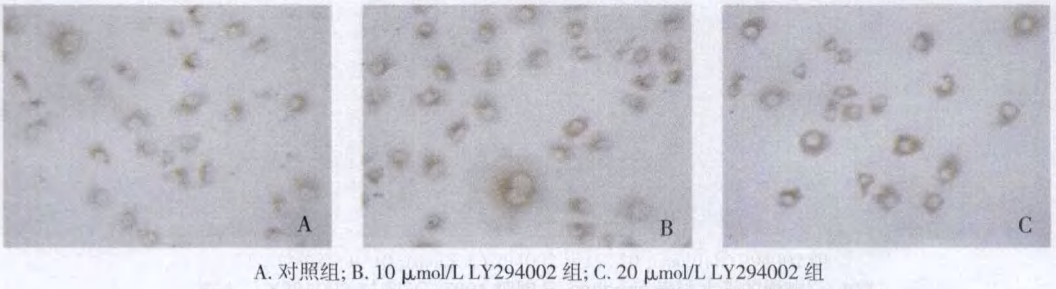
A. 对照组；B. 10 μmol/L LY294002 组；C. 20 μmol/L LY294002 组

图 2 Transwell 法检测 LY294002 对 SGC-7901 细胞侵袭能力的影响(HE × 400)



M. marker; A. 对照组; B. 10 μmol/L LY294002 组; C. 20 μmol/L LY294002 组

图 3 LY294002 对 SGC-7901 细胞 E-cadherin mRNA 的表达的影响



A. 对照组; B. 10 μmol/L LY294002 组; C. 20 μmol/L LY294002 组

图 4 LY294002 对 SGC-7901 细胞 E-cadherin 表达水平的影响(× 400)

3 讨 论

肿瘤的转移、侵袭是癌细胞与宿主细胞及基质相互作用的连续过程，包括肿瘤细胞从原发部位的脱落、迁入，降解细胞外基质与基底膜及向周围组织浸润等过程[5]，故肿瘤细胞粘附、侵袭能力的改变是恶性肿瘤转移、侵袭的前提，但其确切机制尚不明。PI3K/Akt 信号通路属于酪蛋白激酶型受体型转导途径，其 Akt 磷酸化的程度可反映此信号通路的激活程度，近年来研究提示此信号通路参与促进肿瘤转移、侵袭[6]。在胃癌方面，Kobavashi 等[7]研究显示 p-Akt^{ser473} 蛋白在胃癌组织中的阳性表达率为 57%，其表达的程度与胃癌组织中 VEGF 蛋白及血管生成密度显著相关，提示 p-Akt^{ser473} 蛋白的高表达可能参与促进胃癌细胞的侵袭转移。在本研究中，选用 PI3K/Akt 信号通路特异性抑制剂 LY294002 处理胃癌细胞株 SGC-7901，Western blot 证实其可抑制 p-Akt^{ser473} 蛋白的表达，而细胞粘附实验及侵袭实验的结果提示 LY294002 处理后的胃癌细胞与基质间的粘附能力及侵袭能力下降。故抑制 PI3K/Akt 信号通路可减弱胃癌细胞的转移、侵袭能力，与 Liu 等[8]的实验结果相一致。

目前，国内对胃癌转移、侵袭机制的研究多从 MMP 家族、VEGF、COX-2 等方面进行探讨。在本研究中，我们选择 E-cadherin 作为研究对象。E-cadherin 是钙黏附素中的一个重要成员，此蛋白对维持上皮组织的完整，防治肿瘤细胞扩散、脱落起重要作用。Ray 等[9]通过体外实验证明 E-cadherin 表达的丧失是肿瘤细胞获得去分化和侵袭力表型的第一步，并证明 E-cadherin 的确有抑制肿瘤转移的功能，其机制与上皮细胞间质转型（Epithelial-mesenchymal transitions，EMT）相关。EMT 是新近提出的一个与肿瘤细胞侵袭和转移相关的观点[10]，其定义为具有极性的上皮细胞转换成具有活动能力、能够在细胞基质间自由移动的间质细胞的过程，它以上皮细胞极性的丧失及间质特性的获得为重要特征，E-cadherin 表达的下调或缺失是 EMT 的主要机制。在本研究中，用 LY294002 抑制 PI3K/Akt 信号通路，发现 E-cadherin mRNA 水平及胞浆蛋白表达水平均有所提高，且与药物的浓度呈依赖关系，提示抑制胃癌细胞的 PI3K/Akt 信号通路，可上调 E-cadherin 表达，并可能通过抑制 EMT 的形成，减弱胃癌细胞与基质间的粘附力，降低胃癌细胞的侵袭能力，参与抑制胃癌细胞的转移和侵袭能力。

本研究在体外初步观察了 PI3K/Akt 信号通路对胃癌细胞转移和侵袭的影响，发现抑制此信号通路可以抑制胃癌细胞的转移、侵袭能力，其可能机制与上调 E-cadherin 表达相关。

参 考 文 献

[1] Crew K D, Neququt A I. Epidemiology of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(3):354-362.

[2] Xing C G, Zhu B S, Liu H H, et al. LY294002 induces p53-dependent apoptosis of SGC7901 gastric cancer cells [J]. Acta Pharmmacol Sin, 2008, 29(4):489-498.

[3] Han Z, Wu K, Shen H, et al. Akt1/protein kinase B alpha is involved in gastric cancer progression and cell proliferation [J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(7):1801-1810.

[4] Vlahos C J, Matter W F, Hui K F, et al. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one(LY294002)[J].J Biol Chem, 1994, 269(7):5241-5248.

[5] Eble J A, Haier J. Integrins in cancer treatment[J].Curr Cancer Drug Targets, 2006, 6(2):89-105.

[6] Jiang B H, Liu L Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigensis[J]. Adv Cancer Res, 2009, 102:19-65.

[7] Kobavashi I, Semba S, Matsuda Y, et al. Significance of Akt phosphorylation on tumor growth and vascular endothelial growth factor expression in human gastric carcinoma [J]. Pathobiolgy, 2006, 73(1):8-17.

[8] Lin H L, Yang M H, Wu C W, et al. 2-Methoxyestradiol attenuates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway-mediated metastasis of gastric cancer[J]. Int J Cancer, 2007, 121(11):2547-2555.

[9] Ray M E, Mehra R, Sander H M, et al. E-cadherin protein expression predicts prostate cancer salvage radiotherapy outcomes[J].J Urol, 2006, 176(4 Pt 1):1409-1414.

[10] Hugo H, Ackland M L, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and Epithelial-mesenchymal transitions in carcinoma progression[J].J Cell Physiol, 2007, 213(2):374-383.

（责任编辑：关蕴良）