基础研究 文章编号:0253-3626(2009)04-0405-04

# 糖原合酶激酶 3-β 对胃癌细胞生长周期和转移的影响

王艳丽,高 青,谢 霞
(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 GSK-3β 功能改变对胃癌细胞生长周期和转移的影响。方法:LY294002 单独或联合 LiCl 影响胃癌细胞株 SCG-7901 GSK-3β 活性,Western blotting 检测总 GSK-3β、p-GSK-3β$^{ser9}$ 表达,MTT 和 FCM 检测细胞增殖及周期分布,细胞免疫化学检测 E-cadherin、β-catenin 表达,细胞粘附实验观察细胞与基质的粘附力。结果:LY294002 干预细胞 72 h 后,总 GSK-3β 表达无改变,p-GSK-3β$^{ser9}$ 表达下降;增殖受抑制;细胞周期阻滞于 $G_0/G_1$ 期;E-cadherin 表达增高,β-catenin 表达下降;细胞与基质粘附力降低。LiCl 部分拮抗 LY294002 对细胞的生长抑制、周期阻滞及对 E-cadherin、β-catenin 表达的改变和细胞与基质粘附力的影响。结论:GSK-3β 可促进胃癌细胞 $G_1$-S 期周期阻滞、抑制细胞生长并可上调 E-cadherin 表达抑制细胞转移。

【关键词】糖原合酶激酶 3-β;胃癌;细胞周期;E-cadherin
【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-25

# Effect of GSK-3β on the cell cycle and metastasis of human gastric carcinoma cell

*WANG Yan-li, et al*
(*Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the effect of GSK-3β on the cell cycle and metastasis of human gastric carcinoma cell. *Methods*: Influencing the GSK-3β activity of human gastric carcinoma cell line SCG-7901 by LY294002 with or with not LiCl treatment. The expression of total GSK-3β and p-GSK-3β$^{ser9}$ were detected in protein level by western blotting, cell proliferation and cell cycle distribution were tested by MTT and FCM respectively, the expression of E-cadherin and β-catenin were measured with S-P immunohistochemistry and the cell-ground substance adhesion was tested by cell adherence assay. *Results*: The expression of total GSK-3β was constant and the protein level of p-GSK-3β$^{ser9}$ was down regulated after exposured to LY294002 by 72 h, the cell proliferation was inhibited, cell cycle was arrest at $G_0/G_1$ phase, the E-cadherin level was positively regulated, the expression of β-catenin and the adhesion rate were decreased. The effect on the proliferation, cell cycle, the expression of E-cadherin and β-catenin and the adhesion by the LY294002 were partially abrogated by lithium chloride. *Conclusion*: GSK-3β could negatively regulate the proliferation of human gastric carcinoma cell by leading cells to $G_1$-S arrest and inhibit its metastasis by positively regulating the expression of E-cadherin.

【Key Words】Glycogen synthase kinase-3β; Gastric carcinoma; Cell cycle; E-cadherin

糖原合酶激酶-3β(Glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)是一个多功能的丝氨酸/苏氨酸激酶,负性调节多条信号通路,影响细胞代谢、增殖、分化、运动等过程[1]。作为功能蛋白,GSK-3β 功能的发挥与自身活性有关。PI3K/Akt 是使 GSK-3β 失活最有特征的上游激酶[2],此激酶通过磷酸化 GSK-3β 的 ser9 位点生成无活性的 p-GSK-3βser9,抑制 GSK-3β 的活性。LY294002 为 PI3K 特异性抑制剂,通过抑制 PI3K/Akt 活性,减少 p-GSK-3βser9 的生成,相对增强 GSK-3β 活性[3]。氯化锂(Lithium chloride, LiCl)为 GSK-3β 特异性竞争性抑制剂,通过与 $Mg^{2+}$ 竞争抑制 GSK-3β 活性[4]。近来研究发现 GSK-3β 对肿瘤细胞生长及转移有影响,但结果并不一致。目前国内尚无关于 GSK-3β 对胃癌细胞生长和转移影响的报道。本研究以胃癌细胞株 SCG-7901 为研究对象,用 LY294002 和 LiCl 影响 GSK-3β 活性,初步研究 GSK-3β 对胃癌细胞生长周期及转移的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

LY294002 购于美国 cayman 公司,用 DMSO 配成储液,DMSO 最大浓度为 0.4%;LiCl 购自 Sigma 公司;兔抗人 phosh-

作者介绍:王艳丽(1982- ),女,硕士,
研究方向:胃肠道肿瘤。
通讯作者:高 青,男,主任医师,E-mail:gaoqing27@yahoo.com.cn。

pho-GSK-3β$^{ser9}$ 多克隆抗体和鼠抗人 GSK-3β 多克隆抗体分别购于 Cell Signaling 公司和北京博奥森生物技术有限公司，鼠抗人 E-cadherin 多克隆抗体和鼠抗人 β-catenin 多克隆抗体为武汉博士德生物技术有限公司产品。

1.2 细胞培养

胃癌细胞株 SCG-7901 为本室传代保存。用含 10%小牛血清的 RPIM1640 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 blotting 检测 LY294002 对总 GSK-3β 和 p-GSK-3β$^{ser9}$ 蛋白表达影响

经 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 RPIA 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 GSK-3β 的兔多抗（1:1 000）、抗 p-GSK-3β$^{ser9}$ 的兔多抗（1:1 000）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，凝胶图象分析仪显影。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 MTT 法检测 LY294002 单独或联合 LiCl 对细胞增殖抑制变化

细胞浓度为 $1.5\times10^4$ 个 /ml，加入 96 孔培养板中，培养 24 h 后，每孔分别加入终浓度为 5～80 μmol/L 的 LY294002 及 10 mmol/L LiCl，设立细胞对照组和溶剂对照组，每组 3 个复孔，培养 72 h 后每孔加入 20μl MTT 液（5 mg/ml），混匀，用自动酶标仪在波长 570 nm 测吸光度值（A），计算不同浓度的 LY29400 单独或联合 LiCl 对细胞增殖的抑制率。选用金正均 Q 值法[5]判断联合用药对肿瘤细胞的抑制作用是否具有协同效应，若 Q 值＜0.85 表示两药合用有拮抗作用，若 Q 值在 0.85～1.15 范围内为两药合用单纯相加，Q 值＞1.15 则表示两药合用为协同作用。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

以 $10^5$ 个 /ml 接种细胞，分对照组、单药组（20 μmol/L LY294002）和联合用药组（20 μmol/L LY294002＋10 mmol/L LiCl）培养 72 h 后，消化、离心收集，70%乙醇于 4℃固定过夜，离心收集细胞，弃去乙醇，PBS 洗涤 1 遍，离心，最后加 0.5 ml PBS 重悬，再加入 1mg/ml 碘化丙啶和 10 mg/ml RNA 酶至终浓度分别为 10 μg/ml 和 100 μg/ml，4℃孵育 30 min 后用流式细胞仪（FACS Vantage SE）检测。

1.6 免疫细胞化学

细胞 $1.0\times10^4$ 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（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

1.7 细胞粘附实验检测细胞对基质的粘附力

按 1.5 分组，各组细胞培养 72 h 后以 $4\times10^5$ 个 /ml 接种于 96 孔板，组内设立 30 min 组、60 min 组、90 min 组、120min 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，按 1.4 中 MTT 法测吸光度值（A），细胞粘附率＝（各时间点平均 A 值 / 参照组平均 A 值）×100%。

1.8 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 $P<0.05$ 为有显著性差异。

## 2 结 果

2.1 Western blotting 检测 LY294002 对总 GSK-3β 和 p-GSK-3β$^{ser9}$ 蛋白表达的影响

不同浓度的 LY294002 处理细胞 72 h 后，提取细胞总蛋白，以 β-actin 蛋白条带为标准，各浓度处理后总 GSK-3β 表达无明显变化，而 p-GSK-3β$^{ser9}$ 反应条带逐渐减弱（$P<0.05$），与药物浓度成依赖关系（图 2）。0 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、40 μmol/L 的 LY294002 干预细胞后，每组总 GSK-3β 与对应的 β-actin 灰度值之比分别为 0.781 ± 0.020、0.794 ± 0.031、0.774 ± 0.025、0.745 ± 0.012，差异无显著性（$P>0.05$）。各组 p-GSK-3β$^{ser9}$ 与对应的 β-actin 灰度值之比分别为 0.529 ± 0.020、0.432 ± 0.024、0.278 ± 0.019、0.135 ± 0.015，差异具有显著性（$P<0.01$）。

2.2 MTT 检测 LY294002 单独或联合 LiCl 对细胞的抑制作用

不同浓度的 LY294002 单独或联合 10 mmol/L LiCl 作用细胞 72 h，联合用药组对细胞的抑制率低于单药组（表 1），差异有显著性（$P<0.05$）。联合用药组中除 80 μmol/L LY294002＋10 mmol/L LiCl 组外，Q 值均小于 0.85，说明 LY294002 与 LiCl 具有拮抗作用。

2.3 FCM 检测 LY294002 单独或联合 LiCl 对细胞周期分布的影响

单用 20 μmol/L LY294002 处理 SCG-7901 细胞 72 h 后，与对照组相及联合用药组相比，均有 $G_0/G_1$ 期细胞数增加，S 期细胞数下降，差异具有显著性（$P<0.01$）。

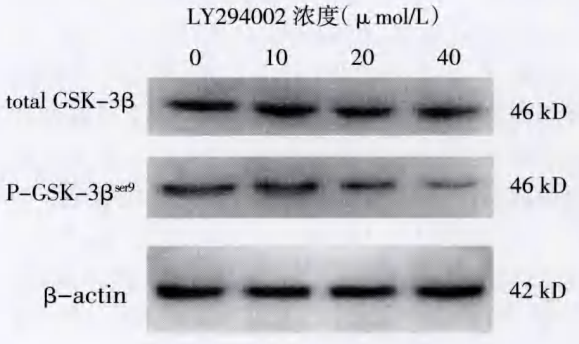



**图 1 LY294002 对 SCG-7901 细胞总 GSK-3 和 p-GSK-3$^{ser9}$ 蛋白表达影响**

2.4 细胞免疫组化检测 LY294002 单独或联合 LiCl 对 E-cadherin、β-catenin 表达变化

分对照组，单药组（20 μmol/L LY294002），联合用药组（20 μmol/L LY294002＋10 mmol/L LiCl）培养细胞 72 h，每组 E-cadherin 胞浆平均光密度值分别为 0.104 ± 0.009、0.148 ± 0.011、0.115 ± 0.008，每组 β-catenin 胞浆平均光密度值分别为 0.299 ± 0.010、0.159 ± 0.009、0.285 ± 0.010，胞核平均光密度值分别为 0.117 ± 0.009，0.058 ± 0.008，0.107 ± 0.009（图 2）。LY294002 使 E-cadherin 表达升高、β-catenin 表达下降，与对照组及联合用药组相比，差异均有显著性（$P<0.01$）。

2.5 粘附实验检测 LY294002 单独或联合 LiCl 对细胞与基质间粘附力的影响

单用 LY294002 作用细胞 72 h 后，细胞对基质的粘附力较对照组及联合用药组相比均下降，差异具有显著性（$P<0.05$）。

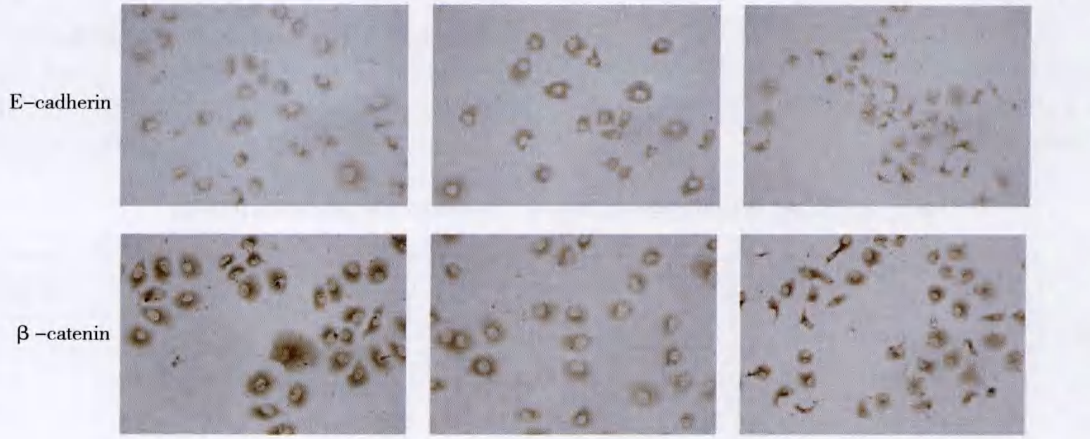



**图 2 LY294002 单独或联合 LiC 对 SCG-7901 细胞 E-cadherin、β-catenin 的表达变化（×400）**

表 1 LY294002 单独或联合 LiCl 对 SCG-7901 细胞的抑制作用

| 组别 | LY294002（μumol/L） | 单用 LY294002 | | LY294002 联合 10mmol/L LiCl | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 吸光度 A 值 | 抑制率（%） | 吸光度 A 值 | 抑制率（%） | Q 值 |
| 细胞对照 | — | 0.724 ± 0.021 | | 0.725 ± 0.080 | | |
| 处理组 | 0 | 0.725 ± 0.016 | | 0.709 ± 0.016 | 2.23 | |
| | 5 | 0.640 ± 0.017 | 11.67 | 0.699 ± 0.023 | 3.63* | 0.266 |
| | 10 | 0.608 ± 0.018 | 16.10 | 0.665 ± 0.011 | 8.27* | 0.460 |
| | 20 | 0.533 ± 0.023 | 26.33 | 0.614 ± 0.019 | 15.40* | 0.551 |
| | 40 | 0.375 ± 0.027 | 47.11 | 0.473 ± 0.014 | 34.85* | 0.722 |
| | 80 | 0.299 ± 0.033 | 58.68 | 0.345 ± 0.026 | 52.49△ | 0.881 |

注：*$P<0.01$ 与单用 LY294002 组比较；△$P<0.05$ 与单用 LY294002 组比较

## 3 讨 论

GSK-3β 是 Wnt、PI3K/Akt、NF-κB 等系统的重要组成部分，这些信号系统在肿瘤细胞中往往是异常激活的，故 GSK-3β 在肿瘤的发生发展中起重要的作用。目前 GSK-3β 对肿瘤究竟是抑癌作用还是促癌作用尚无定论。Tsuchiya 等[6]在结肠癌研究中证实 GSK-3β 通过降解 β-catenin蛋白发挥抑制肿瘤生长作用；Thiel 等[7]研究认为 GSK-3β 被抑制后诱导胃癌细胞 COX-2mRNA 表达及促使其活性增高，促进胃癌的发生发展。但 Shakoori[8]等研究表明 GSK-3β 的表达和激活是维持结肠癌生长和生存的必要前提；Ougolkov 等[9]研究发现在胰腺癌中，GSK-3β 通过 NF-κB 的介导促使肿瘤细胞增殖抑制肿瘤细胞凋亡。

在本研究中，LY294002 作用胃癌 SCG-7901 细胞 72 h 后，在蛋白表达方面通过抑制 PI3K/Akt 信号通路使磷酸化的 p-GSK-3β$^{ser9}$（无活性形式）表达下降但对总 GSK-3β 表达并无影响，故非磷酸化的 GSK-3β（活性形式）表达是增多的，GSK-3β 蛋白活性较对照组相比有所提高；在肿瘤细胞生长方面则表现为抑制细胞生长，且呈浓度依赖关系，说明非磷酸化的 GSK-3β（活性形式）参与抑制肿瘤细胞生长，GSK-3β 活性增强可抑制肿瘤细胞生长。而选用 GSK-3β 抑制剂 LiCl 联合 LY294002 作用胃癌 SCG-7901 细胞 72 h 与单用 LY294002 相比，细胞增殖抑制率下降，进一步说明具有活性的 GSK-3β 与肿瘤细胞增殖有关，抑制 GSK-3β 活性可抑制肿瘤细胞凋亡。

细胞增殖依赖于周期的顺利进行，该过程受 $G_1$/S，$G_2$/M 两个关键点调控。本研究结果显示 LY294002 在使胃癌 SCG-7901 细胞 p-GSK-3β$^{ser9}$ 表达下降的同时使细胞阻滞

表 2 LY294002 单独或联合 LiCl 对 SCG-7901 细胞周期分布的影响

| 分组 | 细胞周期分布(%) | | |
|---|---|---|---|
| | $G_0/G_1$ | S | $G_2/M$ |
| A | 38.09 ± 1.77 | 39.23 ± 1.03 | 22.56 ± 0.93 |
| B | 60.25 ± 1.57*# | 25.27 ± 1.68*# | 14.21 ± 1.01 |
| C | 49.44 ± 0.91 | 32.57 ± 1.21 | 17.98 ± 1.10 |

A. 对照组;B. 20 μmol/L LY294002 组;C. 20 μmol/L LY294002+10 mmol/L LiCl 组;*$P$<0.01 与对照组比较;#$P$<0.01 与 20 μmol/L LY294002+10mmol/LLiCl组比较

于 $G_0/G_1$ 期并诱导细胞凋亡,但 LY294002 联合 LiCl 后,$G_0/G_1$ 期细胞数下降,S 期细胞数增加,说明非磷酸化的 GSK-3β (活性形式)抑制细胞增殖的机制与其使胃癌细胞发生 $G_1$-S 期阻滞有关。此结果与 GSK-3β 可增强由雷帕霉素作用,促使乳腺癌细胞周期阻滞于 $G_1$ 期,最终抑制乳腺癌细胞增殖相一致[10]。GSK-3β 促使细胞 $G_1$-S 期阻滞可能与 β-catenin 相关。β-catenin 为原癌基因,胞质内异常表达的 β-catenin蛋白相互聚集,并可转入细胞核内与 T 细胞因子 / 淋巴增强因子(Tcf/Lef)结合,促进 CyclinD1、c-Myc 等靶基因的转录,进而促进细胞增殖;GSK-3β 通过磷酸化 β-catenin 使其被蛋白酶体所降解,从而抑制增殖信号的传递,导致 $G_1$-S 期阻滞[11]。

肿瘤转移包括细胞从原发部位脱落和向周围组织浸润,

表 3 LY294002 单独或联合 LiCl 对 SCG-7901 细胞与基质间粘附力的影响

| | 对照组 | | 20μmol/L LY294002 | | 20μmol/L LY294002+10mmol/L LiCl | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | A 值 | 粘附率(%) | A 值 | 粘附率(%) | A 值 | 粘附率(%) |
| 参照组 | 1.762 ± 0.082 | | 1.855 ± 0.081 | | 1.774 ± 0.051 | |
| 30min | 0.168 ± 0.011 | 9.53 | 0.155 ± 0.009 | 8.36 | 0.161 ± 0.010 | 9.06 |
| 60min | 0.419 ± 0.024 | 23.77 | 0.378 ± 0.014 | 20.40*# | 0.409 ± 0.015 | 23.05 |
| 90min | 0.713 ± 0.015 | 39.87 | 0.539 ± 0.012 | 29.06*# | 0.621 ± 0.015 | 35.01 |
| 120min | 0.891 ± 0.013 | 50.72 | 0.641 ± 0.019 | 34.56*# | 0.789 ± 0.020 | 44.44 |

*$P$<0.05 与 20 μmol/L LY294002 组比较;#$P$<0.05 与 20 μmol/L LY294002+10 mmol/L LiCl 组比较

这与肿瘤细胞间粘附功能下降及肿瘤细胞-基质间粘附力增强有关。E-cadherin 是钙粘附素中的一个重要成员,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[12]。其机制与 E-cadherin 与 β-catenin 形成 E-cad/β-cat 复合体从而影响细胞粘附力及运动性有关,E-cadherin 下调或 β-catenin 自身功能变化都可造成 E-cad/β-cat 复合体功能下降及丧失,促进肿瘤细胞侵袭及转移。在本研究中,免疫细胞化学发现对照组和联合用药组中E-cadherin 低表达,β-catenin 高表达且有胞核异常表达;单用 LY294002 与对照组和联合用药组相比,E-cadherin 表达升高,β-catenin 表达下降。进一步通过粘附实验发现单用 LY294002 组与对照组和联合用药组相比细胞与基质粘附力的确有所下降。推测此结果与 GSK-3β 活性改变有关,增强 GSK-3β 活性可通过促进 β-catenin 的降解减少其胞核的异常表达,抑制促癌基因转录及表达,进而可能上调 E-cadherin 表达,最终抑制肿瘤细胞转移。

本实验初步观察了 GSK-3β 对胃癌细胞周期及转移的影响,发现具有活性的 GSK-3β 参与 $G_1$-S 期周期阻滞抑制肿瘤细胞增殖并可能通过上调 E-cadherin 表达抑制细胞转移,为进一步深入了解 GSK-3β 的生物学特征打下了一定基础。

## 参 考 文 献


[1] Frame S,Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery [J]. Biochem J,2001,359(Pt 1):1-16.

[2] Cross D A,Alessi D R,Cohen P,et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B[J]. Nature,1995,378(6559):785-789.

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

[4] Ryves W J,Harwood A J. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001,280(3):720-725.

[5] 金正均.合并用药中的相加[J]. 中国药理学通报,1980,1(2):70.

[6] Tsuchiya K,Nakamura T,Okamoto R,et al. Reciprocal targeting of Hath 1 and beta-catenin by Wnt glycogen synthase kinase 3beta in human colon cancer [J]. Gastroenterology,2007,132(1):208-220.

[7] Thiel A,Heinonen M,Rintahanka J,et al. Expression of cycooxy genase-2 is regulated by glycogen synthase kinase-3beta in gastric cancer cells [J]. J Biol Chem,2006,281(8):4564-4569.

[8] Shakoori A,Ougolkov A,Yu Z W,et al. Deregulated GSK-3beta activity in colorectal cancer: its asscocitation with tumor cell survival and proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,334(4):1365-1373.

[9] Ougolkov A V,Fernandez-Zapico M E,Savoy D N,et al. Glycogen synthase kinase-3beta participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells[J]. Cancer Res,2005,65(6):2076-2081.

[10] Dong J,Peng J,Zhang H,et al. Role of glycogen synthase kinase 3beta in rapamycin-mediated cell cycle regulation and chemosensitivity[J]. Cancer Res,2005,65(5):1961-1972.

[11] 林 晓,李 昱,张 雄.Beta-Catenin,APC 蛋白,C-myc 及 Cyclin D1 在卵巢上皮肿瘤中的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报,2006,31(1):50-55.

[12] 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.


(责任编辑:冉明会)