

磷脂酰肌醇3-激酶抑制剂LY29400联合吲哚-3-甲醇对人甲状腺未分化癌细胞FRO增殖的抑制作用

王文斌^{1*}, 刘 杨¹, 黄 明¹, 陈大平¹, 任 平^{2#}(1.咸宁市中心医院甲乳外科, 湖北 咸宁 437100; 2.湖北科技学院药学院, 湖北 咸宁 437100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3089-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.20

摘要 目的:研究磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂LY29400(简称LY)联合吲哚-3-甲醇(I3C)对人甲状腺未分化癌细胞FRO增殖的抑制作用。方法:取对数生长期FRO细胞,分为空白对照组、I3C(250 μmol/L)组、LY(10 μmol/L)组和联用(I3C 250 μmol/L+LY 10 μmol/L)组,药物作用24、48、72 h。采用MTT法测定并计算各组细胞的增殖抑制率;流式细胞术检测作用48 h后的细胞凋亡率;Western blot法检测作用48 h后半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)蛋白的表达;免疫组化法检测作用48 h后Bcl-2、Bax蛋白的表达。结果:细胞增殖抑制率随药物作用时间的延长而明显升高,联用组各时间点间差异具有统计学意义($P<0.05$)。与I3C组和LY组比较,联用组细胞的增殖抑制率、细胞凋亡率和Caspase-3、Bax蛋白表达均增强,Bcl-2蛋白表达和Bcl-2/Bax均降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:LY与I3C联用对FRO细胞的增殖具有协同抑制作用,其机制可能与下调Bcl-2表达、上调Bax表达、激活Caspase级联反应诱导细胞凋亡有关。

关键词 磷脂酰肌醇3-激酶抑制剂;吲哚-3-甲醇;人甲状腺未分化癌细胞FRO;增殖抑制率;细胞凋亡

Inhibitory Effects of Phosphatidylinositol 3-kinase Inhibitor LY29400 Combined with Indole-3-carbinol on the Proliferation of Human Anaplastic Thyroid Carcinoma FRO Cells

WANG Wen-bin¹, LIU Yang¹, HUANG Ming¹, CHEN Da-ping¹, REN Ping²(1.Dept. of Thyroid and Breast Surgery, Xianning City Central Hospital, Hubei Xianning 437100, China; 2.School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Hubei Xianning 437100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY29400 ("LY") combined with indole-3-carbinol (I3C) on the proliferation of human anaplastic thyroid carcinoma FRO cells. METHODS: FRO cells in logarithmic growth phase were divided into blank control group, I3C (250 μmol/L) group, LY (10 μmol/L) group and combination (I3C of 250 μmol/L + LY of 10 μmol/L) group, which were subject to 24, 48 and 72 h drug action. MTT method was used to determine and calculate the inhibitory rates of the cells in all groups, flow cytometry assay to determine the apoptosis rates after 48 h action, Western blot method to determine the expressions of Caspase-3 proteins thereafter and immunohistochemical method to determine the expressions of Bcl-2 and Bax thereafter. RESULTS: The inhibitory rate obviously increased with the extension of drug action time, with statistical significance at each time point in combination group ($P<0.05$). Compared to I3C group and LY group, combination group had higher inhibitory rate, apoptosis rate and the expressions of Caspase-3 protein and Bax, and lower Bcl-2 expression and ratio of Bcl-2 to Bax, with statistical significance ($P<0.01$). CONCLUSIONS: LY combined with I3C has synergistic inhibitory effects on the proliferation of FRO cells by a mechanism which may be related to apoptosis induced by down-regulating Bcl-2 expression, up-regulating Bax expression and activating Caspase cascade reaction.

KEYWORDS Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor; Indole-3-carbinol; Human anaplastic thyroid carcinoma FRO cells; Inhibitory rate; Apoptosis

甲状腺癌(Thyroid cancer, TC)是内分泌系统最常见的恶性肿瘤,近几年发病率显著上升,其发生发展与雌激素密切相关。其临床病理分型有:甲状腺乳头状癌(PTC)、甲状腺滤泡状腺癌(FTC)、甲状腺未分化癌(ATC)及甲状腺髓样癌(MTC)。其中ATC仅占全部TC的10%左右,但其恶性程度最高,病死率达50%以上^[1]。目前ATC缺乏有效的治疗手段,其对放射性碘¹³¹I治疗抵抗、对传统的化疗和放疗不敏感^[2],因

此迫切需要寻找一种安全、有效的防治ATC的药物。吲哚-3-甲醇(Indole-3-carbinol, I3C)是从十字花科蔬菜如西兰花、萝卜、花椰菜等提取得到的具有抗肿瘤活性的物质。国内外许多研究发现,I3C能有效地预防雌激素相关的不同癌症,如乳腺癌、TC、子宫内膜癌和宫颈癌等^[3]。近年来研究表明,ATC中磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)α亚单位突变率明显高于PTC及ATC,存在着在PI3K信号通路的异常激活^[4-5]。目前联合治疗已成为肿瘤治疗的重要手段,两种药物协同作用有助于放大较弱的细胞信号。因此在本研究中,笔者用PI3K抑制剂LY29400(简称LY)联合I3C处理人ATC细胞FRO,观察其对FRO细胞增殖的抑制作用,并初步探讨其作用机制。

* 主治医师,硕士。研究方向:甲状腺乳腺肿瘤。电话:0715-8896318。E-mail:80022501@qq.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:肿瘤药理。电话:0715-8272135。E-mail:381575489@qq.com

1 材料

1.1 仪器

MCO-15AC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司);SW-CJ-1FD型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);XDS-1B型倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司);Mini-PROTEAN4型蛋白电泳仪/小型垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司);MicroChemi化学发光型凝胶成像系统(以色列DNR公司);ELX-800型通用酶标仪(美国Bio-Tek公司);FACSCanto型流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 药品与试剂

LY(美国Sigma-Aldrich公司,纯度:≥98%);高糖DMEM培养基和胎牛血清(英国Invitrogen公司);青霉素/链霉素浓缩液(上海北诺生物科技有限公司);胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)消化液(北京冬歌生物科技有限公司);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);MTT(武汉谷歌生物科技有限公司);β-actin、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)、山羊抗兔和山羊抗小鼠二抗(美国圣克鲁斯生物技术公司);蛋白预染标志物(Marker,美国Bio-Rad公司);二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(北京庄盟科技有限公司);SP免疫组化二抗试剂盒(通用型)、二氨基联苯胺(DAB)显色剂(武汉谷歌生物科技有限公司)。

1.3 细胞

FRO细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。

2 方法

2.1 细胞培养

FRO细胞在37℃、5%CO₂下,于含10%胎牛血清和1×青霉素/链霉素的RPMI1640培养基上常规培养,取对数生长期细胞进行试验。

2.2 细胞增殖抑制率的检测

采用MTT比色法,取对数生长期的FRO细胞接种到96孔板中,每孔4×10³个细胞,培养24h后,分为空白对照组、I3C(250 μmol/L)组、LY(10 μmol/L)组和联用(I3C 250 μmol/L+LY 10 μmol/L)组。除空白对照组细胞不加药外,其余各组细胞加入相应药物,每组均设3个复孔,分别作用24、48、72h后,每孔加入10 μl的5 mg/ml MTT试剂,继续培养4h后每孔再加入100 μl 二甲基亚砷(DMSO),室温震荡15 min。酶标仪检测570 nm波长处的光密度(OD),按公式计算细胞增殖抑制率=(1-受试组OD/空白对照组OD)×100%。

2.3 细胞凋亡率的检测

采用流式细胞术,取对数生长期的FRO细胞分别接种于6孔板,培养24h后,按“2.2”项下方法分组、给药,作用48h。磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞后用500 μl结合缓冲液(Binding buffer)×1重悬细胞,然后加入5 μl Annexin-V/FITC和5 μl PI染液,混匀后室温避光孵育5 min,以流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.4 细胞中Caspase-3蛋白表达的检测

采用Western blot法。取对数生长期的FRO细胞分别接种于6孔板,培养24h后,按“2.2”项下方法分组、给药,作用48

h。收集细胞并提取蛋白进行蛋白定量。取40 μg蛋白上样,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,转膜后,5%脱脂牛奶封闭1h,然后用Caspase-3一抗稀释液在4℃孵育过夜,TBST缓冲液洗涤3次,相应二抗室温孵育1h,TBST缓冲液洗涤3次。以β-actin为内参,采用电化学发光(ECL)显色剂在MicroChemi化学发光型凝胶成像系统显影。

2.5 细胞中Bcl-2、Bax蛋白表达的检测

采用免疫组化法。消毒盖玻片并经多聚赖氨酸处理后置于6孔板,然后取对数生长期的FRO细胞分别接种于6孔板中,培养24h后,按“2.2”项下方法分组、给药,作用48h。取出盖玻片用4%多聚甲醛固定,置于PBS室温10 min复水;滴加复合消化液,4℃下放置30 min,PBS洗涤3次;染色后3% H₂O₂避光10 min,PBS洗涤3次,接着羊血清孵育15 min;然后加入Bcl-2和Bax单克隆抗体(1:50),于4℃在湿盒中孵育过夜,第2天PBS洗涤3次,加入生物素化二抗(1:300)室温孵育30 min后PBS洗涤3次;DAB溶液避光孵育5 min,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。空白对照组以PBS代替一抗。胞浆中出现黄色或黄棕色的染色为阳性细胞。检测各组细胞中Bcl-2、Bax的光密度(OD)。

2.6 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率

与I3C组和LY组比较,联用组各时间点细胞的增殖抑制率升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);同组内随着作用时间延长,细胞的增殖抑制率升高($P < 0.05$)。各组细胞作用不同时间的细胞增殖抑制率测定结果见表1。

表1 各组细胞作用不同时间的细胞增殖抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Determination results of inhibitory rates of the cells in all groups at different time($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

| 组别 | 干预时间 | | |
|------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| I3C组 | 10.3±0.95 | 12.9±1.00 | 25.7±1.06 |
| LY组 | 26.9±1.00 | 32.3±1.12 | 66.6±1.10 |
| 联用组 | 36.1±1.05 ^{**} | 43.4±0.97 ^{**#} | 89.6±1.28 ^{**□} |

注:与I3C组比较,* $P < 0.01$;与LY组比较,[#] $P < 0.01$;与24h比较,[△] $P < 0.05$;与48h比较,[□] $P < 0.05$

Note: vs. I3C group,* $P < 0.01$; vs. LY group,[#] $P < 0.01$; vs. 24 h,[△] $P < 0.05$; vs. 48 h,[□] $P < 0.05$

3.2 细胞凋亡率

结果显示,空白对照组、I3C组、LY组和联用组细胞的凋亡率分别为(2.8±0.9)%、(19.9±2.1)%、(10.6±1.3)%、(54.8±3.9)%。与I3C组和LY组比较,联用组细胞的凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

3.3 细胞中Caspase-3蛋白表达

结果显示,与I3C组和LY组比较,联用组细胞中Caspase-3蛋白表达增强,表明LY联合I3C可促进FRO细胞凋亡。各组细胞中Caspase-3蛋白表达的电泳图见图1。

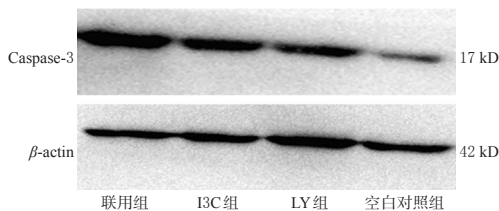


图1 各组细胞中Caspase-3蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretograms of Caspase-3 protein expressions in the cells of all groups

3.4 细胞中Bcl-2、Bax蛋白表达

与空白对照组比较,其余各组细胞中Bcl-2蛋白表达降低、Bax蛋白表达增强、Bcl-2/Bax降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与I3C组和LY组比较,联用组细胞中Bcl-2蛋白表达降低、Bax蛋白表达增强、Bcl-2/Bax降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。各组细胞中Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax蛋白表达的测定结果见表2。

表2 各组细胞中Bcl-2、Bax、Bcl-2/Bax蛋白表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Tab 2 Determination results of protein expression of Bcl-2, Bax and Bcl-2/Bax in the cells of all groups($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | Bcl-2的OD | Bax的OD | Bcl-2/Bax |
|-------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白对照组 | 2.56 ± 0.56 | 0.48 ± 0.16 | 5.08 ± 0.89 |
| I3C组 | 1.13 ± 0.24* | 0.98 ± 0.15* | 1.38 ± 0.21* |
| LY组 | 1.57 ± 0.43* | 1.08 ± 0.16* | 1.08 ± 0.16* |
| 联用组 | 0.37 ± 0.05** ^Δ | 1.88 ± 0.16** ^Δ | 0.38 ± 0.02** ^Δ |

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与LY组比较,[#] $P < 0.01$;与I3C组比较,^Δ $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.01$; vs. LY group, [#] $P < 0.01$; vs. I3C group, ^Δ $P < 0.01$

4 讨论

ATC恶性程度高、预后差、病死率高,一直是临床治疗的难题,不仅传统的手术、放疗、化疗均不能挽救或延长患者的生命,而且对ATC的研究目前相对较少^[2],因此迫切需要新的治疗方法以有效对抗ATC。

已有研究表明,TC的发生与体细胞突变、基因表达模式改变、微小RNA表达异常和基因异常甲基化相关,这些遗传学的改变为ATC的治疗提供了有效的靶点研究方向^[6]。有文献报道,丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT)活化后能抑制线粒体释放细胞色素C,抑制凋亡级联反应的发生,促进肿瘤细胞的增殖、转移,因此靶向于该通路能有效抑制ATC细胞的增殖^[4-5]。近年来研究发现,雌激素E2通过G蛋白偶联受体(GPER)激活ERK1/2、PI3K-AKT途径促进FRO细胞增殖^[7]。因此PI3K抑制剂与抗雌激素药物联合应用理论上可以增强抗TC疗效。

I3C及其在胃中形成的3,3'-二吡啶基甲烷(3,3'-diindolylmethane, DIM)可多途径地产生抗雌激素生物效应^[8],通过调控雌激素介导的pAKT和ERK信号转导途径的活性,从而抑制甲状腺增生,减少雌激素诱导的基质金属蛋白酶2(MMP-2)和MMP-9的分泌,抑制TC细胞的附着、迁移和侵

袭^[9]。本研究结果显示,I3C与LY联合应用较两者单用对于FRO细胞有更强的增殖抑制效应。

为了进一步确定I3C和LY联用的作用机制,笔者通过流式细胞术检测药物处理后的凋亡率,结果发现联用组与I3C组或LY组相比,凋亡率分别增加了约1.8倍或4.2倍。在细胞凋亡的分子机制研究中,Bcl-2/Bax基因家族是与细胞凋亡密切相关的一组基因。Bcl-2和Bax调节细胞凋亡,不仅取决于自身表达的高低,还与Bcl-2/Bax的比值有关,二者之间的比例决定了是抑制细胞凋亡还是促进细胞凋亡。当细胞内Bax高表达时形成同源二聚体Bax/Bax,诱导细胞凋亡;而当细胞内Bcl-2高表达时形成异源二聚体Bcl-2/Bax,抑制细胞凋亡^[10-11]。本研究结果显示,与I3C组或LY组相比,联用组可明显下调Bcl-2蛋白表达水平,上调Bax的表达;Western blot结果也显示细胞内Caspase-3蛋白表达明显增强。这提示两者合用促进细胞凋亡是通过调控Bcl-2、Bax表达水平,激活Caspase-3,启动Caspase级联反应而实现的。

参考文献

- [1] 李媛,霍真,陈杰.甲状腺癌病理诊断中的若干问题[J].中华病理学杂志,2014,43(5):348.
- [2] 朱文博.雷公藤内酯醇抗未分化型甲状腺癌的血管生成和侵袭的作用及机制[D].广州:中山大学,2010.
- [3] 孙超,贾玉萍,袁栋栋,等.吡啶三甲醇的研究进展[J].海峡药学,2014,26(7):16.
- [4] Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, et al. Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(11):4 885.
- [5] 连丽新,刘晓莉,赵银龙,等. PI3K-AKT-mTOR信号通路调控剂联合放射性核素治疗甲状腺癌研究进展[J]. 中华放射医学与预防杂志, 2014, 34(6):477.
- [6] Liu M, Ruan M, Chen LB. Update on the molecular diagnosis and targeted therapy of thyroid cancer[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(6):973.
- [7] 吴婷婷,龙方懿,贾朝莉,等. G蛋白偶联受体在雌激素诱导人甲状腺未分化癌FRO细胞增殖中的作用及其机制[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2):164.
- [8] 王溪,王战建.雌激素及抗雌激素药物与甲状腺癌[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(12):1 128.
- [9] Aggarwal BB, Ichikawa H. Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives[J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(9):1 201.
- [10] 陈芳,杨李,王晓昆,等.半夏生物碱对人肝癌细胞Bel-7402增殖的影响[J]. 中国药房, 2011, 22(4):4 048.
- [11] Teijido O, Dejean L. Upregulation of Bcl2 inhibits apoptosis-driven BAX insertion but favors BAX relocalization in mitochondria[J]. *FEBS Letters*, 2010, 584(15):3 305.

(收稿日期:2015-01-18 修回日期:2015-03-30)

(编辑:邹丽娟)