

Akt特异性抑制剂MK-2206对SGC-7901胃癌细胞增殖的抑制作用研究[△]

张海东^{1*}, 张继国^{2#}(1.泰山医学院基础医学院, 山东泰安 271016; 2.泰山医学院药学院, 山东泰安 271016)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3460-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.02

摘要 目的:研究丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)抑制剂MK-2206对SGC-7901胃癌细胞增殖的抑制作用及其机制。方法:取对数生长期的SGC-7901胃癌细胞,采用MTT法分别检测0(未给药)、0.5、1.0、2.5、5.0、10、20、30 μmol/L的MK-2206作用24 h后细胞的增殖情况;采用流式细胞术分析0、2.5、5.0 μmol/L的MK-2206作用24 h后细胞的周期分布;检测0、2.5、10、20 μmol/L的MK-2206作用24 h后细胞的凋亡率和细胞周期相关蛋白p21、p27、Cyclin D1以及凋亡相关蛋白Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的表达。结果:与未给药比较,5.0、10、20 μmol/L的MK-2206均能明显抑制SGC-7901细胞的增殖($P<0.05$),且呈浓度依赖性;MK-2206阻滞细胞于G₁期。与未给药比较, MK-2206能抑制Cyclin D1表达,上调p21和p27表达,其中20 μmol/L的MK-2206作用最强($P<0.05$)。SGC-7901细胞经MK-2206作用后,细胞出现明显的凋亡现象,且细胞内Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9和PARP的表达均增加,其中20 μmol/L的MK-2206作用最强($P<0.05$)。结论:MK-2206对SGC-7901细胞的增殖具有明显的抑制作用,并通过调控Caspase家族成员的活性诱导细胞凋亡。

关键词 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶抑制剂MK-2206; SGC-7901胃癌细胞;增殖

Inhibitory Effects of Specific Akt Inhibitor MK-2206 on the Proliferation of SGC-7901 Gastric Cells

ZHANG Hai-dong¹, ZHANG Ji-guo²(1.School of Basic Medical Sciences, Taishan Medical University, Shandong Taian 271016, China; 2.School of Pharmacy, Taishan Medical University, Shandong Taian 271016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect and mechanism of serine threonine kinase inhibitor MK-2206 on the proliferation of SGC-7901 gastric cancer cells. METHODS: The proliferation of SGC-7901 cells at logarithmic growth phase were detected by MTT after treated with 0 (none administration), 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20 and 30 μmol/L MK-2206 for 24 h. The distribution of cell cycle was analyzed by flow cytometry after treated with 0, 2.5 and 5.0 μmol/L MK-2206 for 24 h. Apoptotic rate of SGC-7901 cells after treated with 0, 2.5, 10 and 20 μmol/L MK-2206 were detected. The expressions of p21, p27, Cyclin D1, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and PARP were determined. RESULTS: Compared with none administration, 5.0, 10 and 20 μmol/L MK-2206 can inhibited the proliferation of SGC-7901 significantly ($P<0.05$) in concentration-dependant manner. MK-2206 arrested cell cycle progression at the G₁ phase. Compared with none administration, MK-2206 inhibited the expression of Cyclin D1 and up-regulated the expressions of p21 and p27, especially by 20 μmol/L MK-2206 ($P<0.05$). MK-2206 treatment substantially induced the apoptosis of SGC-7901 cells and increased the expressions of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and PARP, especially by 20 μmol/L MK-2206 ($P<0.05$). CONCLUSIONS: MK-2206 can inhibit the proliferation of SGC-7901 cells significantly and induce cell apoptosis by regulating the activities of Caspase family.

KEY WORDS Serine threonine kinase inhibitor MK-2206; SGC-7901 gastric cells; Proliferation

胃癌的发病率和死亡率居于我国恶性肿瘤的首位。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)信号通路参与细胞的增殖、凋亡和血管生成等过程,在肿瘤的发生发展中起着重要的作用^[1-2]。Akt是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是PI3K的主要下游效应分子之一,与肿瘤细胞的增殖、存活和耐药性关系密切。研究^[3-4]发现,抑制PI3K/Akt途径的活化可诱导细胞程序性死亡和抑制肿瘤的生长,因此,PI3K/Akt已经成为一个很有希望的抗肿瘤治疗靶点。MK-2206是人工合成的靶向Akt的小分子化合物,表现出良好的抑制多种实体瘤活性^[5-6]。本研究以SGC-7901胃癌细胞为研究对象,考察了Akt特异性抑制剂MK-2206对细胞增殖的抑制作用及其机制,为胃癌的临床用

药提供参考。

1 材料

1.1 仪器

高速台式离心机(德国Sigma公司);310型CO₂培养箱(美国Thermo公司);蛋白电泳及电转系统、680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);倒置相差显微镜(日本Nikon公司);Biosciences FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 药品与试剂

MK-2206粉末(美国Selleck Chemicals公司,批号:S1078,纯度:99%);RPMI 1640培养基和胎牛血清(美国Gibco公司);MTT(美国Sigma公司分装,批号:M2128);膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物有限公司,批号:KGA107);ECL化学发光检测试剂盒(美国Thermo Scientific Pierce公司);兔抗人Caspase-3抗体、Caspase-8抗体、Caspase-9抗体和多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)抗体由美国Cell Signaling Technology公司提

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30800422)

* 副教授,硕士。研究方向:应用解剖学。电话:0538-6229803。

E-mail:hdzhang@tsmc.edu.cn

通信作者:教授,硕士。研究方向:药理学。电话:0538-6229836。E-mail:jgzhang@tsmc.edu.cn

供; β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Sigma公司);鼠抗人细胞周期素(Cyclin)D1抗体、p21抗体和p27抗体由美国Santa Cruz公司提供;辣根过氧化物酶标记的人山羊抗鼠二抗和山羊抗兔二抗均由北京中杉金桥生物科技有限公司提供。

1.3 细胞

人胃癌SGC-7901细胞株由中国科学院上海分院细胞库提供。

2 方法

2.1 细胞培养

取SGC-7901细胞于37℃和5%CO₂条件下用含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基培养,当细胞融合度到80%~90%时开始传代,细胞进入对数生长期后,开始试验。

2.2 细胞增殖检测

采用MTT法,取SGC-7901细胞胰酶消化后接种于96孔板中,加入0(未加药)、0.5、1.0、2.5、5.0、10、20、30 μ mol/L的MK-2206继续培养24 h,培养终止前4 h加20 μ l MTT(5 mg/ml)于各个孔中,吸除培养液并加入150 μ l的二甲基亚砜(DMSO),室温振荡10 min后490 nm波长处测各孔的光密度(OD),同法测定6个平行孔,对结果统计分析。细胞增殖以光密度的平均值进行计算,光密度越大,表明细胞增殖越明显。

2.3 细胞周期分布检测

采用流式细胞术,取细胞经0、2.5、5.0 μ mol/L的MK-2206作用24 h后,75%乙醇4℃下固定过夜,加入终浓度为50 mg/L的核糖核酸酶A(RNase A),37℃培养30 min,加入终浓度为50 mg/L的碘化丙啶(PI),4℃闭光染色20 min后上机检测。用Cell Quest软件分析细胞周期分布和各期细胞所占的比例。

2.4 细胞凋亡检测

细胞凋亡检测按Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明处理细胞,流式细胞术测定细胞经0、2.5、10、20 μ mol/L的MK-2206作用24 h后的凋亡率,试验重复3次。

2.5 相关蛋白检测

采用免疫印迹分析,取“2.4”项下作用后的细胞,用预冷的RIPA细胞裂解液冰上裂解20 min,4℃下13 000 \times g离心20 min并收集上清定量。取30 μ g总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试验,转移至PVDF膜上并用5%脱脂奶粉封闭,接着分别加入细胞周期相关蛋白鼠抗人Cyclin D1抗体、p21抗体、p27抗体和凋亡相关蛋白兔抗人Caspase-3抗体、Caspase-8抗体、Caspase-9抗体和PARP抗体,室温孵育3 h,然后加入辣根过氧化物酶标记的人山羊抗鼠二抗和山羊抗兔二抗室温孵育1 h;暗室曝光显影,试验重复3次。用BandScan 4.50软件扫描胶片,以 β -actin为内参,以目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为指标进行评价。

2.6 统计学方法

应用SPSS 13.0软件行统计学分析处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析加两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖情况

0、0.5、1.0、2.5、5.0、10、20、30 μ mol/L的MK-2206作用后SGC-7901细胞的光密度分别为 1.026 ± 0.042 、 1.015 ± 0.056 、 0.970 ± 0.039 、 0.919 ± 0.043 、 0.847 ± 0.036 、 0.702 ± 0.032 、 0.515 ± 0.040 、 0.337 ± 0.033 。MK-2206呈浓度依赖性抑制SGC-7901细胞的增殖。与未给药比较,5.0、10、20、30 μ mol/L的MK-2206均明显抑制细胞的增殖($P<0.05$)。

3.2 细胞周期分布

SGC-7901细胞经MK-2206作用24 h后,随着MK-2206浓度的增加,G₁期细胞的比例逐渐增加,表明MK-2206能够使SGC-7901细胞阻滞于G₁期。不同浓度MK-2206作用后细胞周期分布情况见表1。

表1 不同浓度MK-2206作用细胞周期分布情况

Tab 1 Distribution of cell cycle after treated with different concentrations of MK-2206

药物浓度, μ mol/L	G ₁ , %	S, %	G ₂ , %
0	49.26	37.34	13.40
2.5	66.89	23.40	9.71
5.0	71.15	19.69	9.16

3.3 细胞凋亡情况

0、2.5、10、20 μ mol/L的MK-2206作用后SGC-7901细胞的凋亡率分别为 $(7.07 \pm 1.17)\%$ 、 $(7.98 \pm 1.57)\%$ 、 $(13.39 \pm 2.39)\%$ 、 $(49.17 \pm 7.31)\%$ 。随着MK-2206浓度的增加,细胞凋亡率逐渐增加,其中10、20 μ mol/L时增加明显($P<0.05$)。

3.4 相关蛋白表达情况

与未给药比较, MK-2206能抑制细胞中Cyclin D1表达,上调p21和p27表达,其中20 μ mol/L MK-2206的作用最强($P<0.05$)。不同浓度MK-2206作用后细胞周期相关蛋白表达的电泳图见图1,表达量见表2。

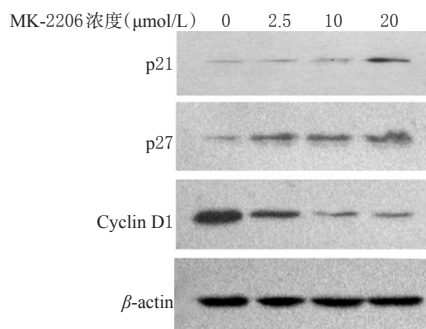


图1 不同浓度MK-2206作用后细胞周期相关蛋白表达的电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of the expression of cell cycle related protein after treated with different concentrations of MK-2206

表2 不同浓度MK-2206作用后细胞周期相关蛋白的表达量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 The expression of cell cycle related protein after treated with different concentrations of MK-2206($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物浓度, μ mol/L	p21/ β -actin	p27/ β -actin	Cyclin D1/ β -actin
0	0.114 ± 0.027	0.191 ± 0.018	0.986 ± 0.067
2.5	0.123 ± 0.038	0.259 ± 0.022	$0.577 \pm 0.033^*$
10	0.185 ± 0.051	$0.276 \pm 0.029^*$	$0.218 \pm 0.025^*$
20	$0.268 \pm 0.036^*$	$0.317 \pm 0.055^*$	$0.207 \pm 0.034^*$

与未给药比较: * $P<0.05$

vs. none administration: * $P<0.05$

与未给药比较, MK-2206作用后细胞内Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9和PARP的表达均增加,其中20 μ mol/L的MK-2206作用最强($P<0.05$)。不同浓度MK-2206作用后细胞凋亡相关蛋白表达的电泳图见图2,表达量见表3。

4 讨论

胃癌是常见的消化道肿瘤,其发生、发展不仅与肿瘤细胞异常分化、过度增殖有关,而且与细胞凋亡减少有关,故诱导

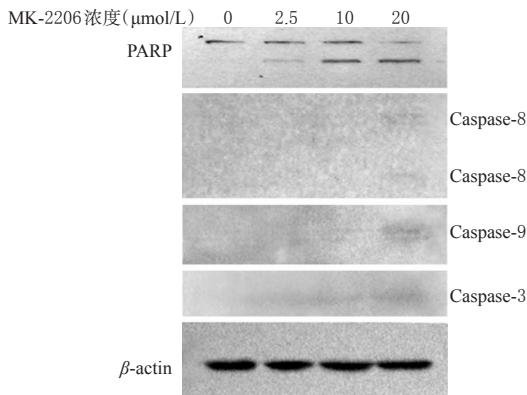


图2 不同浓度MK-2206作用后细胞凋亡相关蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of the expression of apoptosis related protein after treated with different concentrations of MK-2206

表3 不同浓度MK-2206作用后细胞凋亡相关蛋白的表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 The expression of apoptosis related protein after treated with different concentrations of MK-2206 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物浓度, μ mol/L	PARP/ β -actin	Caspase-8/ β -actin	Caspase-9/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
0	0.053 \pm 0.016	0.015 \pm 0.013	0.016 \pm 0.012	0.011 \pm 0.009
2.5	0.111 \pm 0.019	0.013 \pm 0.015	0.019 \pm 0.011	0.027 \pm 0.013
10	0.161 \pm 0.028*	0.023 \pm 0.021	0.026 \pm 0.019	0.105 \pm 0.028*
20	0.226 \pm 0.027*	0.152 \pm 0.033*	0.157 \pm 0.025*	0.149 \pm 0.030*

与未给药比较: * $P < 0.05$

vs. none administration: * $P < 0.05$

肿瘤细胞凋亡将成为肿瘤治疗的新途径。PI3K/Akt信号通路的异常激活刺激了肿瘤细胞恶性增殖和血管形成,并增强肿瘤细胞的侵袭转移能力。有研究^[7]报道在胃癌中PI3K/Akt信号途径与肿瘤组织的增殖和转移密切相关,而且Akt的蛋白表达和激酶活性在胃癌组织中均升高。因此,开发设计PI3K/Akt信号通路的特异性抑制剂对胃癌癌症的临床治疗具有重要的意义。本研究选取Akt特异性抑制剂MK-2206,体外检测其对SGC-7901胃癌细胞的抑制作用。

MTT试验结果显示,MK-2206能明显抑制SGC-7901细胞增殖,且抑制作用呈浓度依赖性。本研究采用流式细胞术检测了MK-2206对胃癌细胞周期的影响,发现SGC-7901细胞经MK-2206作用后,诱导细胞阻滞于G₁期。

磷脂酰丝氨酸(PS)是一种带负电荷的磷脂,正常主要存在于细胞膜的内面,在细胞发生凋亡时PS暴露在细胞膜外。Annexin V是一种Ca依赖的磷脂结合蛋白,对PS有高度的亲和性,因此,Annexin V可充当一种用于检测暴露在细胞膜表面的PS的敏感探针。

参与调控细胞周期的关键因子包括Cyclin、细胞周期依赖性激酶(Cyclins-dependent kinase, CDK)和细胞周期依赖性激酶抑制因子(Cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI),其中Cyclins和CDK对细胞周期进行正性调控,而CDKI则进行负性调控^[8]。为了进一步阐明MK-2206诱导SGC-7901细胞G₁阻滞的分子机制,本试验检测了参与调控细胞G₁/S检查点的Cyclin D1、p21和p27。Cyclin D1主要调节细胞从G₁期向S期转变,能够与CDK4、CDK6结合形成Cyclin D1-CDK4/CDK6复合物并激活CDK^[9]。活化的CDK磷酸化视网膜母细胞瘤蛋

白(pRB),进而促进细胞越过G₁/S检查点进入S期。CDKI作为CDK的抑制因子包括两类家族:一类是可以特异性结合Cyclin D1-CDK4/CDK6复合物的INK4家族,如p15和p16等;另一类是包括p21和p27的CIP/KIP家族,不但可以与Cyclin D1-CDK4/CDK6结合,还可以结合CyclinA/E-CDK2^[10]。本试验结果表明,MK-2206能够促进SGC-7901细胞内p21和p27的蛋白表达并抑制Cyclin D1的蛋白表达。

肿瘤的发生发展与细胞的凋亡受阻也密切相关,诱导肿瘤细胞凋亡也成为化合物抗癌活性的一个重要指标。本试验发现MK-2206能诱导SGC-7901细胞的凋亡。在已知的3条凋亡途径(死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径)中,Caspase家族的作用至关重要。Caspase家族通常以低活性或无活性的酶原形式存在,当受到凋亡信号刺激后,能够通过不同方式被激活,并特异性地裂解相关底物诱导细胞发生凋亡^[11]。本试验结果显示,MK-2206促进了SGC-7901细胞中Caspase-9、Caspase-3和Caspase-8的表达,并促进了Caspase-3下游底物分子PARP的剪切,提示MK-2206促进胃癌细胞的凋亡与Caspase家族关键成员的活化密切相关。

参考文献

- [1] Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, *et al.* The emerging multiple roles of nuclear Akt[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(12): 2168.
- [2] 黄秀兰,崔国辉,周克元.PI3K-Akt信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J]. *癌症*, 2008, 27(3): 331.
- [3] Fei HR, Chen G, Wang JM, *et al.* Perifosine induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines by blockade of Akt phosphorylation[J]. *Cytotechnology*, 2010, 62(5): 449.
- [4] Wang FZ, Peng J, Yang NN, *et al.* PF-04691502 triggers cell cycle arrest, apoptosis and inhibits the angiogenesis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 220(2): 150.
- [5] Simioni C, Neri LM, Tabellini G, *et al.* Cytotoxic activity of the novel Akt inhibitor, MK-2206, in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. *Leukemia*, 2012, 26(11): 2336.
- [6] Sangai T, Akcakanat A, Chen H, *et al.* Biomarkers of response to Akt inhibitor MK-2206 in breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(20): 5816.
- [7] Matsuoka T, Yashiro M, Nishioka N, *et al.* PI3K/Akt signalling is required for the attachment and spreading, and growth in vivo of metastatic scirrhous gastric carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2012, 106(9): 1535.
- [8] David M, Petit D, Bertoglio J. Cell cycle regulation of Rho signaling pathways[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(16): 3003.
- [9] Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, *et al.* Cyclin D as a therapeutic target in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(8): 558.
- [10] Yoon MK, Mitrea DM, Ou L, *et al.* Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27[J]. *Biochem Soc Trans*, 2012, 40(5): 981.
- [11] 姚金成,刘颖,胡领,等.雷公藤甲素对Caspase导人肝细胞L-02凋亡机制的研究[J]. *中国药房*, 2012, 23(43): 4036.

(收稿日期:2013-06-24 修回日期:2013-07-18)