

蛋白激酶B抑制剂CCT128930对人骨肉瘤U2-OS细胞凋亡与自噬的影响^Δ

周运生^{1*}, 王凤泽^{2#}(1.泰安市中心医院放疗科, 山东泰安 271000; 2.泰山医学院生命科学学院, 山东泰安 271016)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)13-1767-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.13.11

摘要 目的:研究蛋白激酶B抑制剂CCT128930对人骨肉瘤U2-OS细胞凋亡与自噬的影响。方法:体外培养U2-OS细胞,经0(空白对照,下同)、10、20 μmol/L CCT128930作用24 h后采用DNA片段末端标记法观察U2-OS细胞的凋亡情况;经0、5、10、20 μmol/L CCT128930作用24 h后采用Western blot法检测细胞中半胱氨酸氨基转移酶3(Caspase-3)、Caspase-8、Caspase-9、Caspase切割底物PARP蛋白表达及自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I比例;将质粒绿色荧光蛋白-微管相关蛋白轻链3(GFP-LC3)转染U2-OS细胞,经0、5、10 μmol/L CCT128930作用24 h后采用荧光观察GFP-LC3融合蛋白在细胞内的表达;采用MTT法和Western blot法检测20 μmol/L氯喹、CCT128930及二者联合作用于细胞24 h后的细胞活力及Caspase-3、PARP蛋白的表达。结果:与空白对照比较,CCT128930作用后U2-OS细胞凋亡率升高($P<0.01$),Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、PARP蛋白表达增强,LC3-II/LC3-I比例升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),GFP-LC3融合蛋白表达增强;与氯喹联用后,使U2-OS细胞活力和Caspase-3、PARP蛋白表达均下降。结论:CCT128930可诱导U2-OS细胞发生凋亡和自噬,抑制自噬可能促进CCT128930对U2-OS细胞的毒性作用。

关键词 蛋白激酶B;CCT128930;细胞凋亡;细胞自噬;人骨肉瘤U2-OS细胞

Effects of Protein Kinase B Inhibitor CCT128930 on the Apoptosis and Autophagy of Human Osteosarcoma U2-OS Cells

ZHOU Yunsheng¹, WANG Fengze²(1.Dept. of Radiation Oncology, Tai'an Central Hospital, Shandong Tai'an 271000, China; 2.School of Life Sciences, Taishan Medical University, Shandong Tai'an 271016, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of protein kinase B inhibitor CCT128930 on the apoptosis and autophagy of human osteosarcoma U2-OS cells. **METHODS:** U2-OS cells were cultured *in vitro*, and the apoptosis of U2-OS cell was observed after treated with 0 (blank control, similarly hereinafter), 10 and 20 μmol/L CCT128930 for 24 h. After treated with 0, 5, 10 and 20 μmol/L CCT128930 for 24 h, the protein expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and Caspase cutting substrate PARP, the proportion of autophagy-related protein LC3-II/LC3-I were detected by Western blot method. Plasmid GFP-LC3 transfected U2-OS cells; after treated with 0, 5 and 10 μmol/L CCT128930 for 24 h, immunofluorescence was used to detect the expression of GFP-LC3 protein. MTT assay and Western blot assay were used to detect the viability, the expression of Caspase-3 and PARP protein of U2-OS cells after treated with 20 μmol/L chloroquine and CCT128930 alone or combination for 24 h. **RESULTS:** Compared with blank control, the apoptotic rate of U2-OS cells increased after CCT128930 treatment ($P<0.01$), and the expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and PARP protein increased; the proportion of LC3-II/LC3-I increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the expression of GFP-LC3 protein increased. CCT128930 combined with chloroquine reduced the viability of U2-OS cells, the protein expression of Caspase-3 and PARP. **CONCLUSIONS:** CCT128930 can induce the apoptosis and autophagy of U2-OS cells. Blocking autophagy can enhance the toxicity of CCT128930 to U2-OS cells.

KEYWORDS Protein kinase B; CCT128930; Apoptosis; Autophagy; Human osteosarcoma U2-OS cells

骨肉瘤是常见的原发性恶性肿瘤,其发病率在青少年及儿童的原发骨肿瘤中居首位,具有恶性程度高、易发生浸润转移等特点^[1-2]。磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K)/蛋白激酶B(Protein kinase B, PKB, 又称Akt)信号通路参与肿瘤细胞的增殖、凋亡和血管生成等生理病理过程,与骨肉瘤的浸润转移等密切相关^[3-5]。作为与PI3K相结合的下游分子,活化的Akt可以激活多种下游底物,调控细胞存

活和凋亡等生物学效应,抑制Akt的活性已成为临床肿瘤治疗的新靶点^[6]。CCT128930是一类新型的Akt抑制剂,对胶质母细胞瘤和肝癌细胞等表现出较强的抑制作用^[7-8]。本研究以人骨肉瘤U2-OS细胞为研究对象,观察CCT128930对U2-OS细胞凋亡和自噬的影响,为CCT128930未来的临床应用提供实验指导。

1 材料

1.1 仪器

3-30K型高速台式冷冻离心机(德国Sigma公司);iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司);Ti-S型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 药品与试剂

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81272683)

* 主管技师。研究方向:肿瘤放疗的基础及临床。电话:0538-6298409。E-mail:zhouys_1976@163.com

通信作者:教授,博士。研究方向:肿瘤分子生物学。电话:0538-6236991。E-mail:wfz221@sina.com

CCT128930(美国 Santa Cruz 公司,批号:E1413;纯度:≥98%);DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司);MTT、自噬抑制剂氯喹固体粉末(批号:C6628,纯度:≥98%)、鼠抗人 β -actin 抗体、兔抗人自噬相关蛋白 LC3- II 抗体(美国 Sigma Aldrich 公司);DNA 片段末端标记法(TUNEL)凋亡检测试剂盒(瑞士 Roche 公司);增强化学发光(ECL)试剂盒(美国 Thermo Scientific Pierce 公司);绿色荧光蛋白-微管相关蛋白轻链 3(GFP-LC3,由北京大学生命科学学院祝海川博士赠送);转染试剂 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司);兔抗人半胱氨酸氨基转移酶 3(Caspase-3)抗体、Caspase-8 抗体、Caspase-9 抗体和 Caspase 切割底物 PARP 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 细胞株

人骨肉瘤 U2-OS 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,生长于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 °C 和 5% CO₂ 条件下培养。

2 方法

2.1 TUNEL 法检测细胞凋亡

接种 5×10^3 个 U2-OS 细胞于 96 孔板中并过夜培养,加入 0(空白对照)、10、20 $\mu\text{mol/L}$ CCT128930 作用 24 h,接着用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,4% 甲醛溶液于 4 °C 固定细胞 1 h 后,PBS 洗涤细胞,用 0.1% 聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)打孔 2 min。然后按照 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书对细胞进行凋亡染色[4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染色和异硫氰酸荧光素(FITC)染色],倒置荧光显微镜观察细胞 TUNEL 染色结果,凋亡细胞核呈绿色荧光。试验重复 3 次。

2.2 免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达

2.2.1 凋亡相关蛋白 接种 2×10^5 个 U2-OS 细胞于 6 孔板中并过夜培养,加入 0(空白对照)、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ CCT128930 作用 24 h,接着用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液冰上裂解 20 min,4 °C 下 13 000 r/min(离心半径为 8.2 cm)离心 20 min,收集上清,用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量分析。取 20~30 μg 总蛋白进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),然后电转移至硝酸纤维素膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入鼠抗人 β -actin 抗体和兔抗人 PARP、Caspase-9、Caspase-8、Caspase-3 抗体,4 °C 孵育过夜;TBST 洗膜 3 次,分别加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h,最后用 ECL 试剂盒于暗室曝光显影,以相关蛋白与内参 β -actin 灰度值的比值评价各相关蛋白的表达水平。试验重复 3 次。

2.2.2 自噬相关蛋白 按“2.2.1”项下方法检测 0(空白对照)、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ CCT128930 作用 24 h 后细胞中自噬相关蛋白 LC3- II / LC3- I 比例。试验重复 3 次。

2.3 荧光检测 GFP-LC3 融合蛋白表达

接种 1×10^5 个 U2-OS 细胞于 12 孔板中过夜培养,将纯化的 GFP-LC3 质粒和转染试剂 Lipofectamine 2000 以适当的比例稀释于无血清 Opti-MEM 培养基中,混匀;室温孵育 20 min 后,缓慢加入 U2-OS 细胞中,放置培养箱中培养。转染 6 h 后,换完全培养基继续培养 24 h,接着加入 0(空白对照)、5、10 $\mu\text{mol/L}$ CCT128930 作用 24 h,于倒置荧光显微镜下观察并拍照,观察 GFP-LC3 融合蛋白在 U2-OS 细胞内的表达(绿色荧光斑点的

数量)。

2.4 MTT 法测定细胞活力及相关蛋白检测

将 U2-OS 细胞接种于 96 孔板中,然后进行分组,即氯喹组(20 $\mu\text{mol/L}$)、CCT128930 组(20 $\mu\text{mol/L}$)、联用组(氯喹 20 $\mu\text{mol/L}$ +CCT128930 20 $\mu\text{mol/L}$)和对照组(二甲基亚砜)。按分组加药,加入 CCT128930 前先加入氯喹预处理 1 h,接着联合 CCT128930 共同作用 24 h。终止培养前 4 h 加 MTT 于各个孔中,吸去培养液并加二甲基亚砜振荡混匀,用酶标仪在 490 nm 波长下测定光密度(OD),计算细胞活力=给药组 OD 值/对照组 OD 值 \times 100%。按“2.2.1”项下方法测定上述各组 U2-OS 细胞中 Caspase-3、PARP、LC3- II、LC3- I 蛋白表达情况。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较,先用单因素法分析其正态分布,后以 LSD 法进行统计。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞凋亡情况

TUNEL 试验中 DAPI 染色标记细胞核用以明确细胞个数;FITC 染色标记用以明确凋亡细胞。结果显示,U2-OS 细胞经 10、20 $\mu\text{mol/L}$ CCT128930 作用 24 h 后,细胞发生明显的凋亡现象。不同浓度 CCT128930 对 U2-OS 细胞凋亡的影响见图 1,凋亡率的检测结果见表 1。

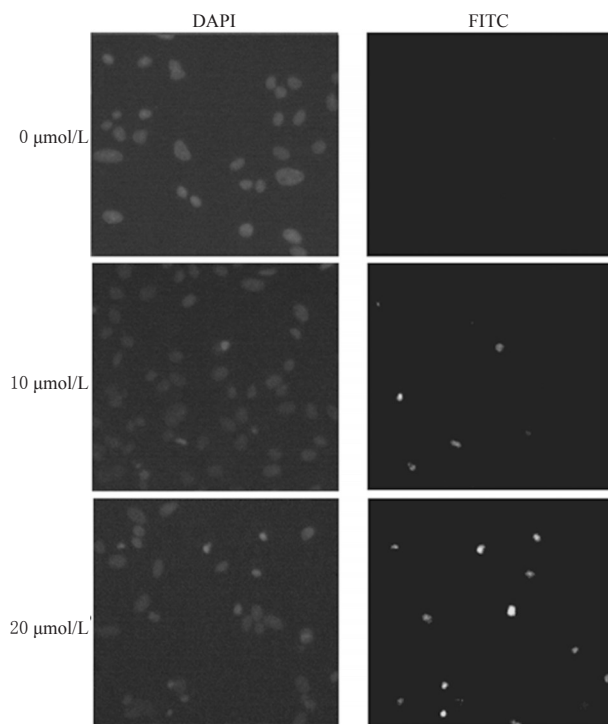


图 1 不同浓度 CCT128930 对 U2-OS 细胞凋亡的影响

Fig 1 Effects of different concentrations of CCT128930 on the apoptosis of U2-OS cells

3.2 凋亡相关蛋白表达

试验结果发现,CCT128930 能够促进 U2-OS 细胞中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 和 PARP 的活性剪切(蛋白表达增强),表明 CCT128930 可能通过激活 Caspase 家族成员诱导 U2-OS 细胞发生凋亡。不同浓度 CCT128930 对 U2-OS 细胞中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、PARP 蛋白表达的影响见图 2。

表1 不同浓度 CCT128930 作用后 U2-OS 细胞凋亡率的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Results of the apoptotic rate of U2-OS cells after treated with different concentrations of CCT128930 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| CCT128930 浓度, $\mu\text{mol/L}$ | 凋亡率, % |
|---------------------------------|-------------------|
| 0(空白对照) | 2.26 \pm 1.06 |
| 10 | 11.95 \pm 2.83* |
| 20 | 26.29 \pm 4.57* |

注:与空白对照比较, * $P < 0.01$

Note: vs. blank control, * $P < 0.01$

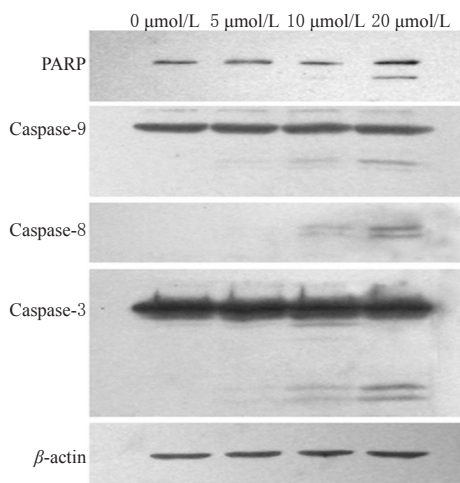


图2 不同浓度 CCT128930 对 U2-OS 细胞中 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、PARP 蛋白表达的影响

Fig 2 Effects of different concentrations of CCT128930 on the expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and PARP protein in U2-OS cells

3.3 自噬相关蛋白表达

试验结果显示, U2-OS 细胞经不同浓度 CCT128930 作用 24 h 后, 细胞中 LC3- II 蛋白表达水平增强, LC3- II / LC3- I 比例增加。不同浓度 CCT128930 作用后 U2-OS 细胞中 LC3- II、LC3- I 蛋白表达的电泳图见图 3, LC3- II / LC3- I 比例的检测

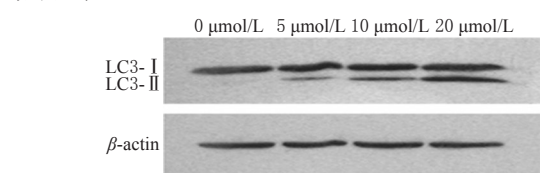


图3 不同浓度 CCT128930 作用后 U2-OS 细胞中 LC3- II、LC3- I 蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of the expression of LC3- II and LC3- I protein in U2-OS cells after treated with different concentrations of CCT128930

3.4 GFP-LC3 融合蛋白表达

CCT128930 处理 GFP-LC3 转染的 U2-OS 细胞 24 h 后, 荧光显微镜观察 GFP-LC3 融合蛋白在细胞中的表达, 发现随 CCT128930 浓度的增加, 细胞中 GFP-LC3 融合蛋白表达逐渐增强; 而空白对照细胞 GFP-LC3 融合蛋白呈弥散分布。不同浓度 CCT128930 作用后 U2-OS 细胞中 GFP-LC3 融合蛋白

分布的荧光图见图 4。

表2 不同浓度 CCT128930 作用后 U2-OS 细胞中 LC3- II / LC3- I 比例的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Results of the proportion of LC3- II / LC3- I in U2-OS cells after treated with different concentrations of CCT128930 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| CCT128930 浓度, $\mu\text{mol/L}$ | LC3- II / LC3- I, % |
|---------------------------------|---------------------|
| 0(空白对照) | 2.66 \pm 0.37 |
| 5 | 10.17 \pm 2.08* |
| 10 | 36.79 \pm 4.20** |
| 20 | 91.22 \pm 6.88** |

注:与空白对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

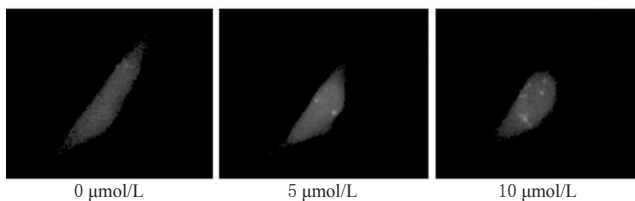


图4 不同浓度 CCT128930 作用后 U2-OS 细胞中 GFP-LC3 融合蛋白分布的荧光图

Fig 4 Immunofluorescence of the distribution of GFP-LC3 fusion protein in U2-OS cells after treated with different concentrations of CCT128930

3.5 细胞活力和 Caspase-3、PARP 蛋白表达

与 CCT128930 组和氯喹组比较, 联用组 U2-OS 细胞的细胞活力、Caspase-3、PARP 蛋白表达降低($P < 0.01$), LC3- II / LC3- I 比例升高, 表明 CCT128930 可诱导 U2-OS 细胞发生保护性自噬。各组 U2-OS 细胞活力的测定结果见表 3, Caspase-3、PARP 蛋白表达的电泳图见图 5。

表3 各组 U2-OS 细胞活力的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Results of the viability of U2-OS cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | 作用浓度 | 细胞活力, % |
|-------------|---|-------------------|
| 对照组 | 0 $\mu\text{mol/L}$ | 100 |
| 氯喹组 | 20 $\mu\text{mol/L}$ | 93.09 \pm 6.83 |
| CCT128930 组 | 20 $\mu\text{mol/L}$ | 53.61 \pm 4.78 |
| 联用组 | 20 $\mu\text{mol/L}$ + 20 $\mu\text{mol/L}$ | 36.28 \pm 5.92* |

注:与氯喹组和 CCT128930 组比较, * $P < 0.01$

Note: vs. chloroquine group and CCT128930 group, * $P < 0.01$

4 讨论

PI3K/Akt 信号通路是治疗肿瘤的常见靶点, 与肿瘤的发生发展、侵袭转移密切相关^[9]。本研究结果发现, Akt 抑制剂 CCT128930 能够降低 U2-OS 细胞的细胞活力, 诱导 U2-OS 细胞发生凋亡与自噬; 抑制细胞的自噬可促进 CCT128930 的抗肿瘤活性。

在细胞发生自噬的过程中, LC3- II 通常被看作是自噬的标志蛋白, LC3- II 与 LC3- I 的比例反映了自噬的发生程度^[10-11]。本研究结果发现, U2-OS 细胞经 CCT128930 作用 24 h 后, GFP-LC3 融合蛋白在细胞内呈点状分布, 提示 CCT128930 对自噬具有诱导作用; 同时细胞内 LC3- II 的表达水平升高, LC3- II / LC3- I 的比例升高, 进一步证实了 CCT128930 可促进细胞

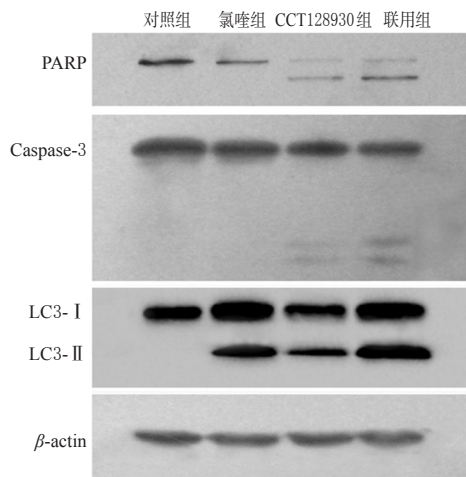


图5 各组U2-OS细胞中Caspase-3、PARP蛋白表达的电泳图
Fig 5 Electrophoretogram of the expression of Caspase-3 and PARP protein in U2-OS cells of each group

发生自噬。

自噬在肿瘤发生发展中具有双重作用,表现在自噬既能抑制细胞凋亡,又能在某些情况下促进细胞发生凋亡^[12-13]。为了探讨CCT128930诱导的U2-OS细胞自噬与细胞活力的相关性,笔者用自噬抑制剂氯喹来观察自噬对CCT128930抑制细胞活力的影响。从表3可见,经氯喹预处理后,CCT128930对细胞活力的抑制作用明显增强,表明CCT128930诱导的自噬对U2-OS细胞起保护作用。接着用免疫印迹试验检测了氯喹与CCT128930联用对细胞凋亡相关的PARP和Caspase-3活性的影响,发现抑制自噬促进了PARP和Caspase-3的切割,进一步证实CCT128930诱导的自噬对U2-OS细胞有保护作用。

综上所述,CCT128930抑制U2-OS细胞的活性与其诱导细胞凋亡相关;CCT128030在诱导U2-OS细胞凋亡的同时,也诱导了保护性自噬,抑制自噬的发生能增强CCT128930对U2-OS细胞的杀伤作用。CCT128930与自噬抑制剂氯喹的联合应用可能为骨肉瘤的临床治疗提供新策略。

参考文献

[1] Szewczyk M, Lechowski R, Zabielska K. What do we know about canine osteosarcoma treatment? Review[J]. *Vet Res Commun*, 2015, 39(1):61.
[2] 梁福东,狄淑芳,常云峰,等.冬凌草甲素联合塞来昔布对人骨肉瘤MG-63细胞增殖及凋亡的影响[J].*肿瘤*, 2015, 35(3):260.
[3] Hou CH, Lin FL, Tong KB, *et al.* Transforming growth factor alpha promotes osteosarcoma metastasis by ICAM-

1 and PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 89(4):453.

[4] Guo YS, Zhao R, Ma J, *et al.* β ig-h3 promotes human osteosarcoma cells metastasis by interacting with integrin α 2 β 1 and activating PI3K signaling pathway[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(3):e90 220.
[5] 张海东,张继国. 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[J].*中国药房*, 2013, 24(37):3 460.
[6] Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer[J]. *Front Oncol*, 2014, doi: 10.3389/fonc.2014.00064.
[7] Yap TA, Walton MI, Hunter LJ, *et al.* Preclinical pharmacology, antitumor activity, and development of pharmacodynamic markers for the novel, potent Akt inhibitor CCT128930[J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(2):360.
[8] Wang FZ, Chang ZY, Fei HR, *et al.* CCT128930 induces cell cycle arrest, DNA damage, and autophagy independent of Akt inhibition[J]. *Biochimie*, 2014, doi: 10.1016/j.biochi.2014.04.008.
[9] 朴丽花,蔡英兰,张默函,等.人参皂苷Rh2与PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002对乳腺癌细胞转移和侵袭的影响[J].*中国药房*, 2013, 24(43):4 050.
[10] Jutten B, Rouschop KM. EGFR signaling and autophagy dependence for growth, survival, and therapy resistance [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(1):42.
[11] Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(10):722.
[12] Roy R, Singh SK, Chauhan LK, *et al.* Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis by enhancement of autophagy via PI3K/Akt/mTOR inhibition[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 227(1):29.
[13] Wu G, Li H, Ji Z, *et al.* Inhibition of autophagy by autophagic inhibitors enhances apoptosis induced by bortezomib in non-small cell lung cancer cells[J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(6):1 171.

(收稿日期:2015-09-14 修回日期:2015-11-09)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅