

抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 PI3K/AKT 信号通路的影响

赵冬耕, 孙佳, 王明艳, 赵凤鸣, 皮文霞, 叶丽红*
(南京中医药大学, 南京 210029)

[摘要] 目的:研究抗癌扶正方(KFP)对肝癌抑制作用的分子机制。方法:体外培养人肝癌细胞 SMMC-7721,分别予以 9.72,19.44,38.88 g·L⁻¹的 3 个质量浓度的 KFP 作用于细胞,采用 MTT 法检测 KFP 对人肝癌细胞 SMMC-7721 生长增殖的影响,并通过 Western Blot 法检测 KFP 对人肝癌细胞 SMMC-7721 PI3K/AKT 通路凋亡相关蛋白表达的影响。结果:KFP 以浓度及时间依赖的方式抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖;Western Blot 显示 KFP 作用于人肝癌细胞 SMMC-7721 后,人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN),caspase-9 的活性增强,p-AKT 的表达降低,且呈剂量依赖性。结论:KFP 能增加人肝癌细胞 SMMC-7721 PTEN 的表达,进而抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活,继之激活下游 caspase-9 促凋亡分子的表达,诱导人肝癌 SMMC-7721 发生凋亡。该研究表明 PI3K/AKT 信号通路在 KFP 诱导的人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡中起了重要作用。

[关键词] 抗癌扶正方(KFP); PI3K/AKT 信号通路; 凋亡; 人肝癌细胞 SMMC-7721

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)11-0136-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120327.2700.018 **[网络出版时间]** 2012-03-27 17:06

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120327.1706.018.html>

Effect of Kang'ai Fuzheng Prescription on PI 3k/AKT Pathway of Human Hepatoma Cells SMMC-7721

ZHAO Dong-geng, SUN Jia, WANG Ming-yan, ZHAO Feng-ming, PI Wen-xia, YE Li-hong*
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of our study was to investigate mechanism of action of Kang'ai Fuzheng Prescription (KFP) in the human hepatoma cells SMMC-7721. **Method:** The anti-proliferative potential of KFP was assessed using MTT assay. Cell apoptosis and the apoptosis-related protein activation of PI3K /AKT pathway in human hepatoma cells SMMC-7721 were evaluated by Western blot after treatment with KFP. **Result:** KFP suppressed the proliferation of human Hepatoma Cells SMMC-7721 in a time and dose-dependent manner. Western blot showed that the activation of caspase-9, upregulation of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) and downregulation of p-AKT in KFP-treated human Hepatoma Cells SMMC-7721 were observed. **Conclusion:** Our results showed that KFP may suppress constitutively activated targets of phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) and AKT, whereafter activate caspase-9 in the human Hepatoma Cells SMMC-7721 through increasing the activation of PTEN, which suggested that PI3K/AKT pathway plays an important roles in KFP-induced apoptosis of human Hepatoma Cells SMMC-7721.

[Key words] KFP; PI3K/AKT pathway; apoptosis; human Hepatoma Cells SMMC-7721

[收稿日期] 20111213(019)

[基金项目] 南京中医药大学基础研究与重点培育专项基金项目(10XJC03)

[第一作者] 赵冬耕, 硕士, 从事肿瘤内科疾病研究, Tel:13515128629, E-mail:zdg19851109@sina.com

[通讯作者] *叶丽红, 副教授, 副主任医师, 博士, 从事中医内科常见病多发病尤其是恶性肿瘤的教学与临床研究, Tel:13805151622, E-mail:cocolihongye@126.com

原发性肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,仅2008年1年新增病例就达到748 300人,而因肝癌死亡的患者更高达695 900人,其中约50%的患者和病死者均发生在我国^[1],且肝癌病死率在所有肿瘤致死原因中排名第3^[2]。肝癌属于中医学的“臌胀”、“积聚”等范畴,根据中医基础理论及临床观察的结果,多因相合,诸如湿热邪毒、气滞血瘀、湿浊痰凝等病理因素胶合而成的“癌毒”,是肝癌发生、发展、转移恶化的关键^[3]。据此,确立以抗癌扶正为治疗大法,强调祛邪为主、扶正固本为辅^[4]。抗癌扶正方(KFP)是根据周仲瑛教授在临床治疗中常用的药物及配伍,选用漏芦10 g,泽漆10 g,当归10 g等组成。作者在前期研究中,发现抗癌扶正方通过下调凋亡抑制基因突变型Bcl-2的表达而对体外培养的人肝癌细胞SMMC-7721具有抑制作用^[5-6]。近年来研究表明,组成性活化的PI3K/AKT信号通路在广泛的人类肿瘤谱中失调^[7],并且PI3K/AKT通路在肝癌细胞的生长、增殖及黏附分子表达方面具有重要的作用^[8],因此抑制该信号通路成为肝癌靶点治疗和预防转移和复发的关键。本研究将探讨KFP是否通过作用PI3K/AKT信号通路抑制人肝癌细胞SMMC-7721的生长及增殖,为临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞SMMC-7721购自中国科学院上海细胞所。

1.2 药物 药物均购自江苏省中医院,由南京中医药大学中药学院中药鉴定及药化实验室鉴定并制成抗癌扶正方药液。根据预实验的结果,将原配质量浓度 $0.7 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 配制成细胞培养所需的9.72, 19.44, 38.88 $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,高温灭菌后,置4℃冰箱中保存、备用。

化疗阳性组药物选顺铂(cisplatin, DDP): $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,南京制药厂有限公司,批号H20030675。

1.3 试剂 DMEM培养基(Hyclone公司),小牛血清(GIBCO, USA),消化剂为0.25%的胰蛋白酶(MERCK, USA),噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)及涉及所有抗体均为Cell Signaling Technology公司产品。

1.4 仪器 CO₂培养箱(SANYO, JAPAN),全自动酶标仪、蛋白电泳槽、电转移装置(BIO-RAD, USA),三洋超低温冰箱(JAPAN),三用电热恒温箱(国营江苏淮阴医疗器械厂),隔热恒温培养箱(上海跃进医疗器一厂),电热鼓风干燥箱(南京实验仪器厂),

TE300倒置相差显微镜(Nikon公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将人肝癌细胞SMMC-7721置于含10%小牛血清的DMEM培养液(10% FCS)中,37℃,5% CO₂及饱和湿度条件下细胞培养箱中培养。每2 d换一次液。待细胞长满单层铺满培养瓶后,用0.25%胰蛋白酶消化,2~3 min后,待镜下细胞圆缩时,用尖吸管吹打细胞使其悬于液体中,加10% FCS终止消化,分瓶,并加10% FCS培养。

2.2 噻唑蓝还原法(MTT)测定细胞抑制率 在无茵条件下,取对数生长期的人肝癌细胞SMMC-7721,用0.25%的胰蛋白酶消化制成单细胞悬液。将细胞浓度调整为 $1 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于96孔培养板,每孔加200 μL 10% FCS,置37℃,5% CO₂及饱和湿度的条件下培养过夜待其贴壁后,吸弃上清液,每组设6个复孔,正常对照组加入不含药物的10% FCS培养液200 μL ,余各孔加入10% FCS 180 μL ,实验组中的DDP组、KFP各药物剂量组加入不同质量浓度的药物,每孔各加20 μL ,达终浓度DDP为 $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,KFP为0.972, 1.944 4, 3.888 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。加药后继续培养24, 48 h后,每孔加入20 μL 质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MTT,继续培养4 h后,弃去上清,各孔加入150 μL 的DMSO,轻度振荡约10 min使其溶解,酶标仪于490 nm波长处测定吸光值(A),计算不同时间、不同质量浓度的KFP对人肝癌细胞SMMC-7721的增殖抑制率,试验重复3次。按下述公式计算:

$$\text{细胞生长抑制率(IR)} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{药物}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

2.3 细胞的形态学观察 取对数生长期人肝癌细胞SMMC-7721,按 $1 \times 10^4/\text{瓶}$ 接种于25 mL培养瓶中,培养过夜待其贴壁后,药物组分别加入4 mL 10% FCS, 1 mL各组药液;对照组加入5 mL的10% FCS,继续孵育培养48 h后,在倒置显微镜下观察细胞形态,并随机拍照。

2.4 Western blot检测凋亡相关蛋白表达 将人肝癌细胞SMMC-7721按 $1 \times 10^4/\text{瓶}$ 接种于25 mL培养瓶中,培养过夜待其贴壁后,药物组分别加入4 L 10% FCS, 1 mL各组药液;对照组加入5 mL的10% FCS,继续孵育培养48 h后,提取各组细胞的总蛋白,并用BCA法测定蛋白浓度,加热变性后-20℃保存。取各组细胞的总蛋白70 μg 进行SDS-PAGE凝胶电泳,将分离后的蛋白质电转移到PVDF,封闭液封闭滤膜4 h,按约 $0.1 \text{ mL} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的量加入封闭液和适量一抗caspase-9(1:500), p-AKT

(ser473), PTEN(1:1 000), 摇床摇荡孵育(4 ℃, 过夜)。PBST 漂洗滤膜 4 次, 每次 10 min。将膜与 HRP 结合的二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗兔, 二抗用封闭液稀释)(1:5 000)室温下摇荡孵育 2 h, 用 PBST 充分洗膜, 漂洗 4 次, 每次 10 min。按 0.1 mL·cm⁻² 显影液计算用量, 将显影液加于 NC 膜上, 室温放置 1 min。用保鲜膜将膜包好, 暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 光胶片上曝光, 洗片机中显影、洗像。调整曝光时间, 直至出现最佳条带。

3 结果

3.1 KFP 抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖 如图 1 所示, 空白组人肝癌细胞 SMMC-7721 体外生长较加药组明显活跃, 经 KFP 处理 24, 48 h 后, 细胞的生长呈现不同程度的抑制, 并且呈时间、浓度依赖性的特点。

表 1 KFP 对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	24 h	48 h
对照	-	0.572 7 ± 0.038 ²⁾	1.225 3 ± 0.038 ²⁾
顺铂	4	0.411 5 ± 0.027 ¹⁾	0.419 2 ± 0.014 ¹⁾
KFP	972	0.507 5 ± 0.017 ²⁾	0.982 5 ± 0.035 ^{1,2)}
	1 944	0.457 0 ± 0.014 ¹⁾	0.800 ± 0.037 ^{1,2)}
	3 888	0.419 7 ± 0.031 ¹⁾	0.589 8 ± 0.015 ¹⁾

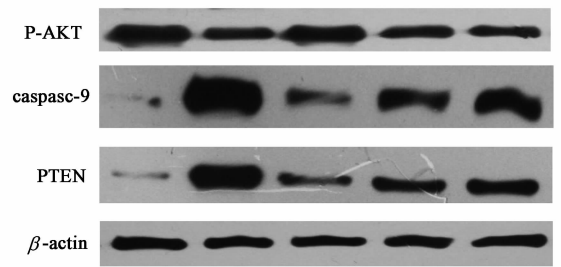
注: 对照组相比¹⁾ $P < 0.05$; 与顺铂组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 KFP 对培养的人肝癌细胞 SMMC-7721 形态学的影响 倒置相差显微镜可以观察到: 空白对照组的肝癌细胞 SMMC-7721 数目较多, 生长旺盛, 形态规则, 呈现单层、梭形贴壁生长, 胞膜完整, 轮廓清晰, 细胞间结构紧密, 透亮。随着 KFP 浓度的增加, 较对照组细胞数目明显减少, 细胞间隙变大, 细胞体积缩小, 某些细胞出现皱缩、变圆、甚至脱落现象。

3.3 KFP 对 PI3K/AKT 通路中凋亡相关蛋白表达的影响 人肝癌细胞 SMMC-7721 经过 KFP 作用 48 h 后, Western blot 分析表明, p-AKT(ser473) 水平显著降低, PTEN, caspase-9 表达水平显著升高, 且呈剂量依赖性。见图 1。

4 讨论

恶性肿瘤的治疗是临床医学迫切需要解决的问题, 也是医学研究最活跃的领域之一。目前肝癌治疗, 手术治疗是首选, 还有放射治疗、化学治疗、生物免疫治疗和中医药治疗。近年研究发现, 中药抗肿瘤作用具有多靶点、多环节、多效应的特点, 许多中药可以通过多种因素干扰肿瘤的生长、代谢及增殖过程, 最终能使肿瘤细胞发生死亡或凋亡^[9-10], 同时发挥整体调节作用, 对免疫、内分泌、基因等进行综



A. 正常组; B. 顺铂组; C. KFP 低剂量;
D. KFP 中剂量; E. KFP 高剂量

图 1 KFP 对 PI3K/AKT 通路中凋亡相关蛋白表达的影响

合调控^[11-13], 从而减轻患者的各种症状, 提高患者的免疫功能, 提高患者的生存质量, 减轻化学治疗、放射治疗的毒副作用, 提高化学治疗和放射治疗的效果, 抑制或延缓肿瘤的生长, 促进患者术后康复, 减少复发转移, 延长患者生存期^[14]。因此, 从天然动、植物中寻找毒性低、疗效高的抗肿瘤药物已成为当前国内外研究的热点和共识。

抑癌基因 PTEN, 是继 p53 基因发现之后的又一个重大发现。不仅在细胞周期阻滞、细胞凋亡中起重要作用, 在细胞黏附、转移及分化的调节等细胞生理方面也有重要作用。据相关文献报道, PTEN 基因作为唯一一种能使脂类去磷酸化的抑癌基因, 在人体正常组织细胞中广泛表达, 通过多种途径发挥肿瘤抑制作用^[15], 其中最重要的就是通过抑制 PI3K/AKT 信号通路发挥作用^[16]。当 PTEN 基因突变或缺失时, 丧失对磷脂酰肌醇激酶 PI3K 的拮抗作用, 细胞正常的物质代谢、增殖和分化等生理活动即会紊乱, 导致细胞过度增殖, 易于发生恶性转化。PI3K/AKT 通路的异常活化被认为对于恶性肿瘤细胞的逃避凋亡、异常增殖以及肿瘤血管新生等机制具有重要的意义^[17]。

蛋白激酶 AKT 是 PI3K 信号转导途径重要的信号分子, 其可被 PI3K 激活成为具有磷酸激酶活性的 p-AKT^[18]。而在研究中人们又发现 p-AKT 通过磷酸化作用激活或抑制其多种下游靶蛋白, 比如 Bad, caspase-9, NF- κ B, mTOR, P21 及 eNOS 等蛋白或酶。如 PI3K/AKT 通路的激活, 可诱发下游一系列底物改变, 诱导细胞死亡信号通路酶 caspase-9 的前体第 196 位 Ser 磷酸化, 阻止 caspase-9 对 A paf-1 的结合与活化作用, 使其失活, 从而阻断内源性凋亡途径^[19-20]。此外, AKT 还可通过活化核转录因子 NF- κ B 促进抑制凋亡基因 c-Yaps, Bcl-2, Bal-XL 等表达, 从而能促进肝癌、肺癌等肿瘤细胞的存活和阻遏细胞的凋亡, 是重要的抗凋亡调节因子^[21]。

细胞凋亡是一个非常复杂的过程,其中 caspase 家族的激活在细胞凋亡中发挥重要作用^[22]。Caspase-9 是内源性凋亡通路中关键蛋白酶,处在 caspase 瀑布式活化的顶端因此,它的活化对于整个内源性凋亡通路的激活尤为重要。当存在于细胞膜表面死亡受体与相应的配体结合后,作为起始凋亡蛋白的 caspase-9 被激活,进一步激活下游的 caspase-3 蛋白,最终引发细胞凋亡^[23]。

在本研究中,通过体外实验观察了 KFP 对人肝癌细胞 SMMC-7721PTEN,PI3K/AKT 信号转导通路相关蛋白的表达的影响。研究结果发现,KFP 有抑制抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的作用。而通过 Western blot 法发现,KFP 促进人肝癌 SMMC-7721PTEN 及 caspase-9 蛋白的表达,抑制磷酸化 AKT 蛋白的表达。可见,KFP 可能是通过促进人肝癌细胞 SMMC-7721PTEN 的表达,抑制 PI3K/AKT 信号转导途径激活,降低 p-AKT 蛋白的表达,从而促进 A paf-1 结合 caspase-9 并进一步切断 caspase-3 前体使其成为有活性形式而导致细胞凋亡,进而发挥抗肿瘤作用。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*,2011,61(2):69.

[2] Ferlay J,Shin H R,Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008[J]. *Int J Cancer*,2010,127(12):2893.

[3] 叶丽红,章永红,吴勉华,等.原发性肝癌的临床特征研究(附 52 例报告)[J]. *中华现代中西医杂志*,2003,6(1):531.

[4] 叶丽红,程海波,章永红,等.原发性肝癌的中医治则与治法探讨[J]. *南京中医药大学学报*,2010,26(1):10.

[5] 叶丽红,皮文霞,程海波,等.抗癌扶正方及含药血清对人肝癌细胞 SMMC-7721 生长的抑制作用[J]. *中华中医药杂志*,2011,26(3):588.

[6] 叶丽红,皮文霞,程海波,等.抗癌扶正方对人肝癌细胞 SMMC-7721 的 Bcl-2 基因表达的调控作用[J]. *中药新药与临床药理*,2010,21(4):372.

[7] 黄秀兰,崔国辉.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.

[8] 富翠芹,王沁,尹蓉,等.PI3K/AKT 信号转导通路在肝癌细胞生长和黏附中的作用[J]. *世界华人消化杂志*,2008,16(14):1493.

[9] Ebina T, Ogama N, Shimanuki H, et al. Life-prolonging effect of immunocell BAK (BRM-activated killer)

therapy for advanced solid cancer patients: prognostic significance of serum immunosuppressive acidic protein levels [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2003, 52(9):555.

[10] 陈武,陈鹏英,刘鹏,等.巴豆生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bax,Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2011,17(11):200.

[11] Wheeler D W, Baigrie R J. Palliative surgery for acute bowel obstruction caused by Kaposi's sarcoma in a patient with AIDS [J]. *Int J Clin Pract*, 2003, 57(4):347.

[12] 陈涛,付亚玲,巩仔鹏,等.中药有效成分组方联合顺铂抑制小鼠肝癌血管生成的机制研究[J]. *中国实验方剂学杂志*,2010,16(5):157.

[13] 王付,谢新年.四逆散合方辨治肝胆病证[J]. *中国实验方剂学杂志*,2011,17(19):300.

[14] 李京.扶正固本中药对晚期恶性肿瘤放疗、化疗增效减毒作用的临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*,1994,14(6):364.

[15] Leslie N R, Yang X, Downes C P, et al. The regulation of cell migration by PTEN [J]. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33:1507.

[16] Capodanno A, Camerini A, Orlandini C, et al. Dysregulated PI3K/Akt/PTEN pathway is a marker of a short disease-free survival in node-negative breast carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40:1408.

[17] Jiang B H, Liu L Z. AKT signaling in regulating angiogenesis [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(1):19.

[18] 夏曙,于世英.PI3K/Akt 信号转导通路在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *肿瘤*,2006,26(6):576.

[19] Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival [J]. *Cell Mol Med*, 2005, 9(1):59.

[20] Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer [J]. *Curr Pharm Des*,2010,16(1):34.

[21] Kong D, Yamori T. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy [J]. *Cancer Sci*,2008,99(9):1734.

[22] Choi B H, Kim W, Wang Q C, et al. Kinetin riboside preferentially induces apoptosis by modulating Bcl-2 family proteins and caspase-3 in cancer cells [J]. *Cancer Lett*,2008,261:37.

[23] Allan L A, Clarke P R. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation [J]. *FEBS J*, 2009, 276(21):6063.

[责任编辑 邹晓翠]