土槿皮乙酸作用 PI_3K/Akt 通路诱导 HeLa 细胞凋亡

任 姿[1], 方 莉[2], 沈宏伟[3], 闻安民[1], 杨越波[2], 李小毛[2], 舒益民[4], 曾海涛[2]
(1. 广东省人民医院妇产科, 广东 广州 510080; 2. 中山大学附属第三医院妇产科, 广东 广州 510630;
3. 中山大学附属第一医院妇产科, 广东 广州 510080; 4. 斯坦福大学医学中心妇产科, 美国 加利福利亚)

摘 要:【目的】探讨土槿皮乙酸对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和增殖的作用。【方法】通过 Hoechst 33342 荧光染色等观察细胞核固缩和染色体碎片等形态学变化,MTT 法测定土槿皮乙酸对 HeLa 细胞的生长抑制作用,采用流式细胞仪和免疫印迹实验检测 HeLa 细胞的生长凋亡情况及其相关蛋白的表达变化。【结果】土槿皮乙酸对宫颈癌 HeLa 细胞具有明显的生长抑制作用,并能诱导细胞发生凋亡,随着药物浓度的增加和作用时间的延长,细胞的生长抑制率及细胞凋亡率均明显升高。土槿皮乙酸抑制细胞生长及诱导细胞发生凋亡的过程中,细胞磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(Akt)、糖原合酶激酶 3(GSK3)、FKHRL (Forkhead like family)表达水平及活性显著降低,导致抑制凋亡抑制因子 bcl-2 受到表达抑制,同时 Bax 表达增加。【结论】土槿皮乙酸能够通过多条信号途径促进人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡, 通过抑制 PI_3K/Akt 的活性是其体外诱导人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡和抑制增值的重要作用机制。

关键词: 宫颈癌; 土槿皮乙酸; 凋亡; Akt
中图分类号:R714 **文献标识码**:A **文章编号**:1672-3554(2008)06-0659-05

Pseudolaric Acid B Induces Apoptosis Via PI_3K/Akt Pathway in Cervical Carcinoma HeLa Cells

REN Zi[1], FANG Li[2], SHEN Hong-wei[3], WEN An-min[1], YANG Yue-bo[2], LI Xiao-mao[2], SHU Yi-min[4], ZENG Hai-tao[2]
(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 4. Department of Gynecology and Obstetrics, Stanford University Medical Center, Palo Alto, CA 94304, USA)

Abstract:【Objective】To investigate the apoptosis-inducing effect of pseudolaric acid B in the human cervical carcinoma HeLa cell line.【Method】A morphological analysis, nuclear condensation, and fragmentation of chromatin were monitored using Hoechst 33342 staining. Cell viability was assessed using MTT assay. Cell apoptosis and the apoptosis-related activation in the HeLa cell line were evaluated by flow cytometry and Western blotting.【Result】Pseudolaric acid B suppressed the proliferation of the HeLa cell line in a dose- and time-dependent manner. The obvious inhibiting effect of pseudolaric acid B on Hela cells viability and its apoptosis-inducing effect were observed. Pseudolaric acid B treatment downregulated the activation of protein kinase B (Akt) and the expression of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) and Forkhead like family (FKHRL). In addition, pseudolaric acid B treatment of cervical carcinoma Hela cell line down-regulated the expression of the inhibitor of apoptosis protein bax, and increase apoptosis protein bcl-2.【Conclusion】Our results showed that pseudolaric acid B-induced apoptosis involved several molecular pathways. Pseudolaric acid B may suppress constitutively activated targets of phosphatidylinositol-

收稿日期:2008-06-09
基金项目:国家自然科学基金(30571956);广东省自然科学基金博士启动项目(8451008901001302)
作者简介:任姿(1980-),女,江西宜春人,博士,E-mail:zi-ren80@yahoo.com.cn;曾海涛,通讯作者, 博士,E-mail:zenghaitao@163.com

3-kinases (PI_3K) and Akt in the HeLa cell line, inhibiting the proliferation and induction of apoptosis.

Key words: cervical carcinoma; pseudolaric acid B; apoptosis; Akt

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2008,29(6):659-663]

中药以其有效低毒的优势作为治疗肿瘤的替代疗法日益得到人们的重视，在美国草药及自然产物正被应用于肿瘤治疗的临床实验中[1-2]。土槿皮乙酸(pseudolaric acid B)是从松科植物金钱松的根皮(土槿皮)中分离出的有效成分。近年研究表明土槿皮乙酸对黑色素瘤、纤维肉瘤、乳腺癌等多种细胞株均具有明显的的体外抗肿瘤作用，对骨髓、肝、肾等低毒低。研究表明它具有抑制 HeLa 细胞生长的作用[3-5]，但对其抑制 HeLa 生长的作用机制目前尚不明。磷酸肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide-3-kinese/protein kinase B，PI_3K/Akt)信号通路的发现已有十几年的历史，其在细胞代谢、细胞周期调控、血管生成等方面发挥重要作用。研究表明，PI_3K/Akt 通路与肿瘤的发生发展、转移、治疗耐药性密切相关，细胞在一系列内外因素的作用下，通过 PI_3K/Akt 信号转导通路，诱导细胞的增殖、分化，避免细胞发生凋亡[6]。子宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一，在发展中国家尤为常见，是妇科第二大常发恶性肿瘤[7]。因此本研究将探讨土槿皮乙酸是否通过作用 PI_3K/Akt 信号转导通路在抑制宫颈癌 HeLa 细胞的生长。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与转染

人宫颈癌 Hela 细胞株购自上海科学院细胞中心。HeLa 细胞由含有 10%新生牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱培养，实验使用细胞均为接种后 24 h 处于对数生长期细胞。采用 Welfect-Explus 试剂盒(Welgene，Deaegu，Korea) 对 HeLa 细胞进行 pECE-Myr-HA-Akt 转染[8]，将 HeLa 细胞放入含 10 μg pECE-Myr-HA-Akt DNA 质粒和 Welfect-Explus 转染试剂的 MEM 培养液中于 37 ℃、体积分数为 5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱培养 4 h，转染后再在 10% FBS-RPMI 培养液中继续培养 24 h。

1.2 诱导细胞凋亡的形态学观察及测量

将细胞用 0.25%胰蛋白酶消化，接种至 24 孔板中，每孔含细胞数 4×10^4 个，每孔 0.5 mL 的完全培养液中，置 37℃、体积分数为 5%的 CO_2 培养 24 h，更换新鲜培养基。加入土槿皮乙酸，使药物终浓度分别为 1、5、10、25、50 μmol/L，继续培养 48 h，加 5%多聚甲醛(PBS，pH 7.2) 4 mL，固定 20 min。加入 Hoechst 33342，使终浓度为 5 mg/L，室温暗处静置，去上清液，加 PBS (pH 7.2)洗 2 次，在多功能倒置显微镜(Nikon TE300)下观察，并用 Leica DC200 拍照。

1.3 细胞生长率测定

采用 MTT 法检测 HeLa 细胞的生长率。取对数生长期细胞，用完全培养液调整细胞数为 1×10^4 个/mL，接种于 96 孔板，24 h 后分别加入终浓度为：1、5、10、25、50 μmol/L 的土槿皮乙酸作用 24 h，同时设置正常对照组(加实验组等体积培养液做对照)，每组 6 复孔，取药物作用 24 h 后，每孔加入 5 mg/mL MTT 10 μL，摇床混匀后，继续培养 4 h，每孔吸出 100 μL 上清液，同时每孔加入国产 DMSO 100 μL，摇床混匀 15 min，室温静置 20 min后，在酶标仪(波长 = 495 nm/530 nm)测吸光度值 A，计算细胞生长率：细胞生长率=($A_{处理组}$/$A_{正常对照组}$)×100%。并且采用上述方法检测 25.0 μmol/L 的土槿皮乙酸作用 0，6，12，24 h 后 HeLa 细胞的细胞生长率。

1.4 流式细胞仪检测 HeLa 细胞凋亡率

将 HeLa 细胞按 1×10^4 个/mL 置于 100 mL 培养瓶中，分对照组和药物组，药物组为 25.0 μmol/L 的土槿皮乙酸，分别作用 0，6，12，24 h 后用于流式细胞仪检测，每组 6 复孔。细胞凋亡检测：收集对照组和药物组各 2 万个细胞，PBS 液洗涤，加入碘化丙啶(PI)工作液 0.5 mL (浓度为 10 μg/mL，北京岳泰生物公司)，室温避光 30 min，FACScan 流式细胞仪分析和处理数据。

1.5 Western blotting 检测 PI3K、Akt、bax、cyto C 的表达

25.0 μmol/L 土槿皮乙酸处理 HeLa 细胞后，按常规方法裂解细胞，考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。用 12%十二烷基硫酸钠 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS2PA GE)分离蛋白，电转移至 PVDF 膜。用含 50 g/L 脱脂奶 Tris 缓冲液封闭膜上的非蛋白结合点，4 ℃过夜。分别加入 1:200 稀释的鼠抗人Anti-

phospho-PI_3K 抗体、Anti-PI_3K、Akt、GSK、FKHRL 抗体(Cell Signaling Technologies, Beverly, MA)和Anti-Bax、bcl-2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA),室温作用 4 h。漂洗 3 次后加第二抗体(辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体)室温作用 2 h,漂洗 3 次。加发光剂(Lumi GLO),置感光盒中感光,显影,定影。实验重复 3 次。

1.6　统计处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 10.0 进行数据处理,组间数据采用 t 检验或秩和检验。

2　结　果

2.1　土槿皮乙酸诱导细胞凋亡的形态变化

在相差显微镜下,对照组细胞界限清晰,胞浆丰富,饱满;在荧光显微镜下,胞核圆形或椭圆形,染色质均匀分布,少见强荧光的胞核(处于染色体聚集的有丝分裂细胞核呈强蓝荧光)。HeLa 细胞被土槿皮乙酸处理 24 h 后, 凋亡细胞脱落悬浮于孔板底部; 土槿皮乙酸终浓度 5 μmol/L 时, 细胞变圆,体积缩小,核呈强荧光的凋亡细胞明显多于对照组;当终浓度 25 μmol/L 时,细胞变圆,体积缩小,表面粗糙,胞核缩小,呈强蓝色荧光,可见染色质浓缩呈斑块状,出现凋亡小体,呈典型的凋亡细胞形态(图 1);当终浓度 25 μmol/L 时,同时加入 myr-Akt 处理,染色质浓缩和凋亡小体明显减少。

2.2　土槿皮乙酸抑制 HeLa 细胞生长

HeLa 细胞经不同浓度的土槿皮乙酸处理 24 h 后,HeLa 细胞数生长受到抑制,5 μmol/L 的土槿皮乙酸时,细胞的生长率为 77.4% ± 6.2%, 25 μmol/L 的土槿皮乙酸时, 细胞的生长率为 24.9% ± 4.3%,50 μmol/L 的土槿皮乙酸时, 细胞的生长率为 18.9% ± 4.1%, 结果表明 25 μmol/L 为体外最佳浓度,其抑制 HeLa 细胞生长的效应达到平台期,见图 2A。与此同时,25.0 μmol/L 的土槿皮乙酸作用 6 h 后 HeLa 细胞的生长受到明显抑制,12 h 其抑制 HeLa 细胞生长的效应达到平台期(图 2B)。

2.3　土槿皮乙酸诱导 HeLa 细胞凋亡

不同浓度的土槿皮乙酸作用 HeLa 细胞 6、12、24 h 后, 细胞出现不同程度的亚 G1 峰(凋亡峰), 作用 12 h 后诱导 HeLa 细胞凋亡明显增加(图 3)。

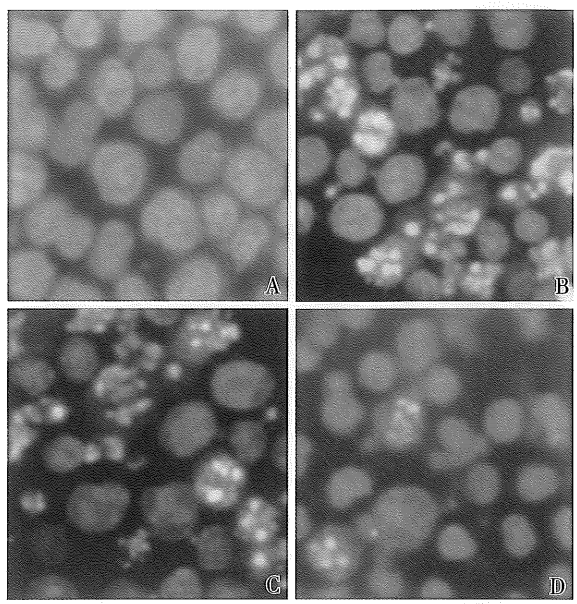


图 1　采用 Hoechst 33342 染色观察 HeLa 细胞核固缩和染色质的形态学变化

Fig.1　Nuclear condensation, and fragmentation of chromatin of HeLa cells were monitored using Hoechst 33342 staining

A: Control group; B: 5 μmol/L pseudolaric acid B group; C: 25 μmol/L pseudolaric acid B group; D: 25 μmol/L pseudolaric acid B+myr-Akt group; × 400

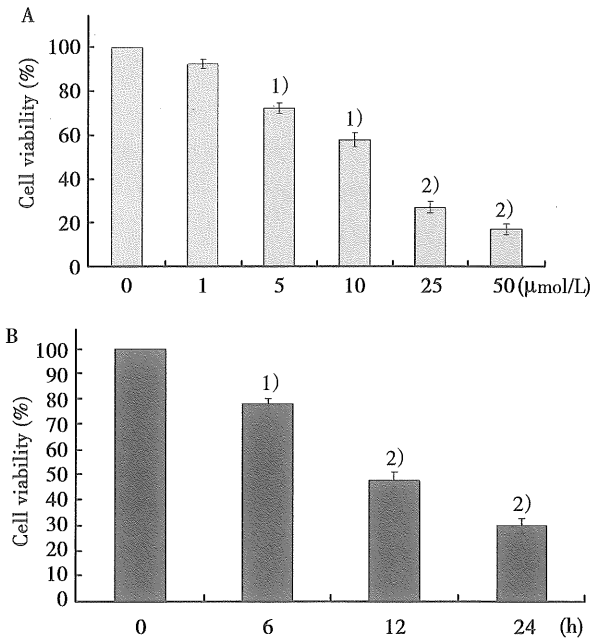


图 2　土槿皮乙酸抑制 HeLa 细胞生长的作用

Fig.2　The inhibiting effect of pseudolaric acid B on the HeLa cell viability

A: relationship of the dose of pseudolaric acid B and its inhibiting effect on Hela cells viability; B: relationship of the acting time of pseudolaric acid B and its inhibiting effect on Hela cells viability; 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.01$

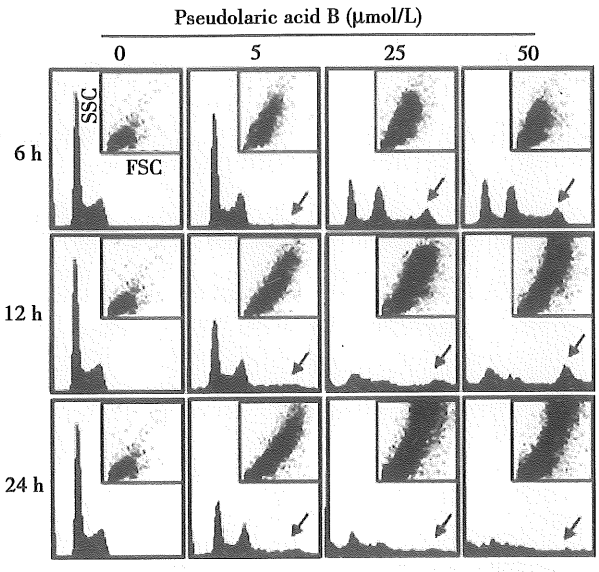


图 3 采用流式细胞仪检测土槿皮乙酸诱导 HeLa 细胞凋亡的作用

Fig.3 Cell apoptosis in Hela cell line induced by pseudolaric acid B were evaluated by flow cytometry

2.4 土槿皮乙酸对 PI_3K、Akt、bax、cyto C 表达和活性的影响

HeLa 细胞经过 25.0 μmol/L 的土槿皮乙酸作用 0、6、12、24 h 后，Western blotting 分析表明，见图 4，Hela 细胞的 PI_3K、Akt、bcl-2、GSK、FKHRL 表达水平及活性显著降低($P < 0.05$)，Bax 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。而同时进行 myr-Akt 转染处理，Akt 活性恢复，bcl-2、GSK、FKHRL 和 Bax 的表达不受土槿皮乙酸的影响。

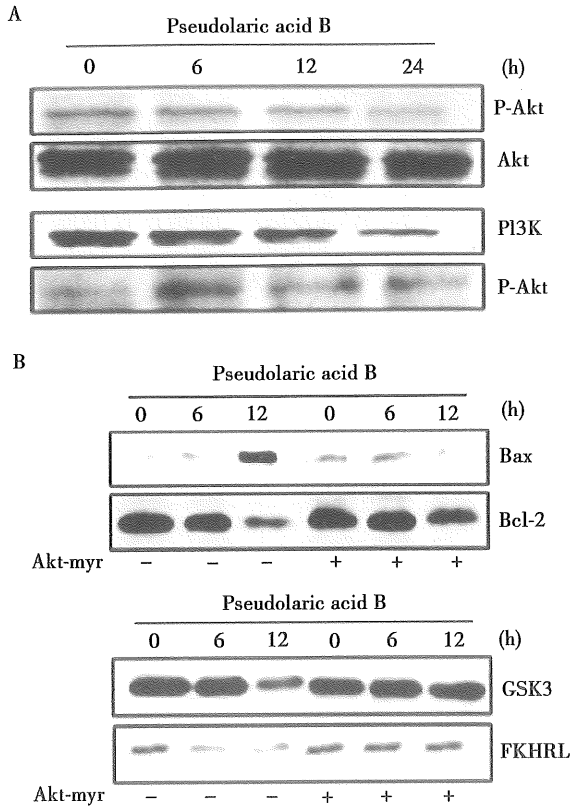


图 4 免疫印迹实验检测土槿皮乙酸诱导 HeLa 细胞凋亡蛋白的表达

Fig.4 Cell apoptosis-related proteins in Hela cell line induced by pseudolaric acid B were evaluated by Western blotting

3 讨 论

细胞凋亡是受特定基因调控的主动性细胞自我消亡的过程，具有独特的形态和生化特征，包括质膜的改变，如细胞膜不对称性和细胞附着消失，胞浆和细胞核固缩，核内裂解。我们使用土槿皮乙酸对宫颈癌 HeLa 细胞的作用表明，25 μmol/L 以上的土槿皮乙酸对宫颈癌 HeLa 细胞具有明显的生长抑制作用，并能诱导细胞发生凋亡，随着药物浓度的增加和作用时间的延长，细胞的生长抑制率及细胞凋亡率均明显升高，土槿皮乙酸抑制细胞生长及诱导细胞发生凋亡的过程中，细胞端粒酶 Akt、Bcl-2、FKHRL、GSK3 表达水平及活性显著降低，这在既往尚未见资料报道。

PI_3K 是与细胞内信号传导有关的脂类第二信使，Akt 是其主要效应分子。PI_3K/Akt 的信号传导通路在细胞分化、细胞凋亡和肿瘤发生中有重要作用。激活后的 Akt 主要通过对含有丝氨酸 & 苏氨酸残基的底物磷酸化而发挥广泛的生物学效应，包括抗凋亡、促细胞生存功能[8]。

细胞凋亡是机体细胞在正常生理或病理状态下发生的一种自发的、程序化的死亡过程，它的发生受到机体的严密调控。目前认为，细胞内的基因直接控制着细胞凋亡的发生和发展，而细胞外部因素通过信号转导影响这些细胞内基因的表达或其表达产物的活化，从而间接地调控细胞凋亡。在诸多的传导途径中，PI_3K/Akt 通路被认为是癌细胞存活的首要通路。近年来研究表明，PI_3K-Akt 能经多种途径抑制细胞凋亡，促进细胞存活。PI_3K-Akt 信号通路抗细胞凋亡的机制主要有：①直接调节作用。Akt 是强有力的 BAD 激酶，活化的 Akt 可以使 BAD 的 Ser136 位点磷酸化，有效阻断 BAD 诱导的细胞凋亡。当用特异的 PI3K 抑制剂

wortmannin 和 LY294002 处理后,Akt 引起的 BAD 磷酸化受阻。Akt 也能磷酸化 Bcl-2 家族成员 BAX 的 Ser184 位点负调控促凋亡功能[9]。②通过直接或间接影响转录因子家族(Forkhead、NF-κB、p53 等) 发挥细胞存活调控作用。叉头转录因子(Forkhead or FoxO)家族成员的 4 个亚型(FKHR/FoxO1、FoxO2、FKHRL1/FoxO3 和 AFX/FoxO4)均能被 Akt 直接磷酸化,磷酸化后的 Forkhead 蛋白能抑制促凋亡基因的转录功能,负调节凋亡促进信号,促进细胞存活。Forkhead 蛋白的靶基因是包括胞外的配体 FasL、TRAIL、TRADD 和胞内的凋亡组分 Bim、Bcl-6[10]。磷酸化的 Forkhead 家族转录因子能降低 FasL 的表达,从而减少细胞凋亡。在肿瘤细胞中,NF-κB 的典型功能是抗凋亡,从而赋予肿瘤细胞存活的优势。NF-κB 的活性依赖于IκB 激酶(IKK)复合体的磷酸化和 IκB 的失调。Akt 能够直接或间接调节 IKK 的活性,导致 NF-κB 的核转位、活化和 NF-κB 依赖的促进存活基因的转录。Akt 使 NF-κB 磷酸化后,激活它的转录功能,使促进细胞存活的 Bc1-2 家族成员 Bcl-xl 表达增强,从而促进细胞存活[9-10]。

本研究发现应用土槿皮乙酸可抑制 HeLa 细胞中 Akt 和 p-Akt 蛋白的表达,而且其表达呈浓度依赖性降低,提示土槿皮乙酸可通过抑制 PI3K 活性,抑制 Akt 的表达及活化,使 Akt 和 p-Akt 蛋白的表达降低。FKHRL(Forkhea like family)受 PI_3K/Akt 通路的调节,对某些抗凋亡或促凋亡基因有调节作用,进而诱导细胞凋亡[11-12]。本研究发现应用土槿皮乙酸可抑制 HeLa 细胞中 FKHRL 蛋白的表达,而且其表达呈浓度依赖性降低,提示抑制 FKHRL 活性可能是土槿皮乙酸抑制 PI_3K 活性促进 HeLa 细胞凋亡的作用途径之一。

本研究结果表明土槿皮乙酸能够通过诱导人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡而发挥抑制 HeLa 细胞生长作用;抑制 PI_3K/Akt 和 GSK3 的激活是土槿皮乙酸体外诱导人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡的重要作用机制之一,从而调整细胞增殖与凋亡间的平衡。

参考文献

[1] Vapiwala N, Mick R, Hampshire MK, et al. Patient initiation of complementary and alternative medical therapies (CAM) following cancer diagnosis[J]. Cancer J, 2006,12(6):467-474.

[2] Cassileth BR, Chapman CC. Alternative and complementary cancer therapies[J]. Cancer, 1996,77(6):1026-1034.

[3] Yu JH, Cui Q, Jiang YY, et al. Pseudolaric acid B induces apoptosis, senescence, and mitotic arrest in human breast cancer MCF-7[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007,28(12):1975-1983.

[4] Wu WY, Guo HZ, Qu GQ, et al. Mechanisms of pseudolaric Acid B-induced apoptosis in bel-7402 cell lines[J]. Am J Chin Med, 2006,34(5):887-899.

[5] Gong XF, Wang MW, Tashiro S, et al. Pseudolaric acid B induces apoptosis through p53 and Bax/Bcl-2 pathways in human melanoma A375-S2 cells[J]. Arch Pharm Res, 2005,28(1):68-72.

[6] Chen YL, Law PY, Loh HH. Inhibition of PI_3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy[J]. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2005,5(6):575-589.

[7] duPont NC, Monk BJ. Chemotherapy in the management of cervical carcinoma [J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2006,4(4):279-286.

[8] Kim D, Kim S, Koh H, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production[J]. FASEB J, 2001,15(11):1953-1962.

[9] Wu C, Huang J. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer[J]. J Biol Chem, 2007,282(6):3571-3583.

[10] Ciechomska I, Pyrzynska B, Kazmierczak P, et al. Inhibition of Akt kinase signalling and activation of Forkhead are indispensable for upregulation of FasL expression in apoptosis of glioma cells[J]. Oncogene, 2003,22 (48):7617-7627.

[11] 沈宏伟,胡红珍,曾海涛,等. 冬凌草甲素作用 PI_3K/AKT 通路诱导 HeLa 细胞凋亡[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2007,28(5):506-510.

[12] Redaelli C, Granucci F, De Gioia L, et al. Synthesis and biological activity of Akt/PI_3K inhibitors[J]. Mini Rev Med Chem, 2006,6(10):1127-1136.

(编辑　徐　杰)