

低氧条件下 Akt 抑制剂 MK-2206 增强胰腺癌细胞对吉西他滨敏感性的作用研究

骆广涛¹, 汤为香², 裘正军³

摘要 目的 研究低氧条件下 Akt 抑制剂 MK-2206 与吉西他滨联用后对胰腺癌吉西他滨敏感性的影响。方法 通过物理低氧方法在体外建立胰腺癌细胞低氧模型。将胰腺癌细胞系置于低氧条件下(氧气浓度 1%) 培养 48 h, 以常氧条件下培养(氧气浓度 21%) 的细胞作为对照, 使用 Western blot 检测低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、p-Akt (Ser473) 及 Akt 蛋白表达改变。使用 Western blot 检测在常氧和低氧条件下 MK-2206 处理胰腺癌细胞(MIA PaCa-2 和 BxPC-3) 后 p-Akt (Ser473) 蛋白的表达改变; 使用 CCK-8 细胞毒性实验探讨低氧条件下 MK-2206 对胰腺癌细胞系(MIA PaCa-2 和 BxPC-3) 吉西他滨敏感性的影响。结果 Western blot 结果显示, 与常氧组细胞相比, 低氧条件下胰腺癌细胞 HIF-1 α 蛋白和 p-Akt (Ser473) 蛋白表达水平升高。常氧和低氧条件下 MK-2206 能有效抑制 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞 p-Akt (Ser473) 的表达。细胞毒性实验结果显示低氧条件下 MIA PaCa-2 细胞 MK-2206 (1 μ mol/L) 与吉西他滨 (10 μ mol/L) 联用组细胞活力低于 DMSO 与吉西他滨 (10 μ mol/L) 联用组, 差异有统计学意义 ($t = 12.107, P = 0.007$); BxPC-3 细胞 MK-2206 (1 μ mol/L) 与吉西他滨 (10 μ mol/L) 联用组细胞活力低于 DMSO 与吉西他滨 (10 μ mol/L) 联用组, 差异有统计学意义 ($t = 5.363, P = 0.033$)。结论 低氧条件下 MK-2206 能有效增强胰腺癌吉西他滨敏感性。

关键词 低氧; 胰腺癌; MK-2206; 吉西他滨

中图分类号 R 735.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)02-0166-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.003

胰腺癌是一种恶性程度极高、预后极差的消化系统肿瘤^[1-2]。吉西他滨是目前治疗中晚期胰腺癌的一线化疗药物, 但由于胰腺癌患者对吉西他滨存在固有及继发性耐药, 临床上吉西他滨的疗效并不令人满意。因此, 研究胰腺癌吉西他滨耐药的机制

并寻找新的靶向治疗药物具有重要的临床意义。

低氧微环境是胰腺癌的典型特征之一^[3]。有研究^[4-5]表明低氧条件下胰腺癌细胞中低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 蛋白累积和 Akt 信号通路活化, 导致胰腺癌细胞对吉西他滨耐药性增强。MK-2206 是近年来发现的一种具有生物活性的口服变构类 Akt 抑制剂^[6]。鉴于 Akt 信号通路在胰腺癌吉西他滨耐药中的重要作用, 该研究使用 MK-2206 与吉西他滨联合用于探讨低氧条件下胰腺癌细胞对吉西他滨敏感性的改变。

1 材料与方法

1.1 主要细胞系和试剂 人胰腺癌细胞系 MIA PaCa-2、BxPC-3、PANC-1、AsPC-1、CAPAN-2、HPAF-II 及 SW1990 由本课题组长期保存。DMEM、RPMI-1640 细胞培养基、磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 及胎牛血清 (FBS) 购于美国 Hyclone 公司。MK-2206 (货号: S1078) 及吉西他滨 (货号: S1149) 购于美国 SELLECK 公司。二甲基亚砜 (DMSO) 购于北京鼎国昌盛公司。PAGE 凝胶制备试剂盒购于上海熠晨公司。CCK-8 购于日本同仁公司。人 Total-Akt (Akt)、p-Akt (Ser473) 及 β -actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的兔二抗和鼠二抗购于美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司。低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 蛋白抗体购于美国 BD 公司。ECL 化学发光检测试剂盒购于美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MIA PaCa-2、PANC-1、CAPAN-2 及 SW1990 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中常规培养。HPAF-II 细胞在含 20% FBS 的 DMEM 培养基中培养。BxPC-3 和 AsPC-1 细胞在含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基中常规培养。常氧处理时, 胰腺癌细胞置于细胞培养箱, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、21% O_2 、5% CO_2 ; 低氧处理时, 胰腺癌细胞置于低氧培养箱, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、1% O_2 、5% CO_2 。

1.2.2 Western blot 法检测胰腺癌细胞低氧标志分子 HIF-1 α 、p-Akt (Ser473) 及 Akt 蛋白的表达改变

2019-11-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81372640)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 普外科、² 麻醉科, 合肥 230022

³ 上海市第一人民医院普外科, 上海 200080

作者简介: 骆广涛, 男, 医师;

裘正军, 男, 主任医师, 教授, 责任作者, E-mail: qiuizdoctor@sina.com

① 首先课题组拟通过三气培养箱建立低氧微环境。将胰腺癌细胞系(MIA PaCa-2、BxPC-3、PANC-1、CA-PAN-2 及 SW1990、HPAF-II 及 AsPC-1 细胞)在低氧条件下(氧气浓度 1%)培养 48 h,并以常氧条件培养(氧气浓度 21%)的细胞作为对照,使用 Western blot 检测 HIF-1 α 蛋白表达改变;② 为检测低氧条件下胰腺癌细胞中 Akt 信号通路的表达改变,本课题组将 MIA PaCa-2、BxPC-3 及 PANC-1 细胞置于常氧和低氧条件下培养 48 h,使用 Western blot 检测 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞中 p-Akt(Ser473) 和 Akt 表达改变。③ 为探讨常氧及低氧条件下 MK-2206 对 Akt 信号通路的影响,本课题组查阅文献后选择 1 μ mol/L MK-2206 处理胰腺癌细胞(MIA PaCa-2 及 BxPC-3)。常氧和低氧条件下使用 1 μ mol/L MK-2206 分别处理 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞 48 h,使用 Western blot 检测 p-Akt(Ser473)、Akt 的表达改变。

Western blot 实验步骤如下:配制 SDS-PAGE 胶,分离胶浓度为 10%,浓缩胶浓度为 5%。用移液枪将蛋白样品缓慢加入到 SDS-PAGE 胶孔内进行电泳。电泳结束后,卸下胶板并组装“三明治”转膜装置开始转膜。转膜条件为 300 mA、100 min。转膜结束后配制 5% 脱脂牛奶,常温摇床封闭膜 1 h。封闭结束用 TBS 轻轻洗涤 1 次,4 $^{\circ}$ C 摇床用一抗(一抗浓度 HIF-1 α 1:1 000, p-Akt 1:1 000, Akt 1:1 000, β -actin 1:3 000)孵育过夜。次日回收一抗,TBS 洗 10 min,共 3 次。常温摇床用二抗(1:5 000)孵育 1 h,TBS 洗 10 min,共 3 次。ECL 显影液 A 液和 B 液 1:1 混合后,均匀铺在膜上,显影并保存曝光结果。

1.2.3 CCK-8 细胞毒性实验 常氧和低氧条件下 MK-2206 与吉西他滨联合处理胰腺癌细胞后使用 CCK-8 细胞毒性实验检测胰腺癌细胞对吉西他滨敏感性的改变。对数生长期细胞消化后离心,加入 2 ml 培养基重悬并进行细胞计数。用多通道移液枪斜贴着培养板加入 100 μ l 细胞悬液(MIA PaCa-2 细胞每孔种 5 000 个细胞,BxPC-3 细胞每孔种 10 000 个细胞),置于培养箱培养 24 h。按照实验设定分为 DMSO 组、MK-2206 组、吉西他滨组和 MK-2206 + 吉西他滨组。根据实验分组向 96 孔板加入 DMSO、MK-2206(1 μ mol/L)、吉西他滨(10 μ mol/L)和 MK-2206(1 μ mol/L) + 吉西他滨(10 μ mol/L),并设定空白对照和阴性对照,每个浓度 3 个复孔。细胞培养板置于常氧和低氧培养箱中孵育 48 h 后,每孔加

入 10 μ l CCK-8 试剂,孵育 1 h 后使用酶标仪测定 450 nm 处的光密度(optical density,OD)值。根据以下公式计算细胞活力,细胞活力 = (实验组平均 OD 值 - 空白对照组平均 OD 值) / (阴性对照组平均 OD 值 - 空白对照组平均 OD 值)。

1.3 统计学处理 所有结果经 Excel 2010 及 SPSS 17.0 软件进行数据分析。使用 Image J 软件对 Western blot 条带进行灰度值分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用双侧 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧处理胰腺癌细胞后 HIF-1 α 蛋白表达变化 结果显示常氧培养的 MIA PaCa-2 细胞中 HIF-1 α 蛋白几乎不表达,而低氧培养 MIA PaCa-2 细胞 48 h 后 HIF-1 α 蛋白出现累积,为常氧组 HIF-1 α 蛋白表达水平的 3.55 倍(经 β -actin 归一化),差异有统计学意义($t = 13.614, P = 0.005$);BxPC-3 细胞在常氧条件下 HIF-1 α 蛋白出现少量累积,而低氧条件下培养 BxPC-3 细胞 48 h 后 HIF-1 α 蛋白表达水平为常氧组 HIF-1 α 蛋白的 3.86 倍(经 β -actin 归一化),差异有统计学意义($t = 15.195, P = 0.004$)。此外, PANC-1、AsPC-1、CAPAN-2、HPAF-II 及 SW1990 等常见的胰腺癌细胞系在低氧条件下培养 48 h 后 HIF-1 α 蛋白累积增加:其中低氧条件下 PANC-1 细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平是常氧的 2.41 倍($t = 5.455, P = 0.032$);AsPC-1 细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平是常氧的 1.58 倍($t = 4.376, P = 0.048$);CAPAN-2 细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平是常氧的 2.14 倍($t = 11.549, P = 0.007$);HPAF-II 细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平是常氧的 3.37 倍($t = 11.103, P = 0.008$);SW1990 细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平是常氧的 2.15 倍($t = 7.452, P = 0.018$)。见图 1。上述结果表明通过三气培养箱成功构建起低氧微环境模型。

2.2 低氧条件下胰腺癌细胞 Akt 信号通路表达改变 如图 2 所示,低氧条件下 MIA PaCa-2 细胞 p-Akt(Ser473) 表达水平升高;p-Akt(Ser473)/Akt 的相对表达量(经 β -actin 归一化)是常氧环境的 2.43 倍,差异有统计学意义($t = 7.544, P = 0.017$)。BxPC-3 细胞在低氧条件下培养 48 h 后 p-Akt(Ser473) 的表达水平升高;p-Akt(Ser473)/Akt 的相对表达量(经 β -actin 归一化)是常氧条件的 3.24 倍,差异有统计学意义($t = 4.821, P = 0.040$)。此外,在 PANC-1

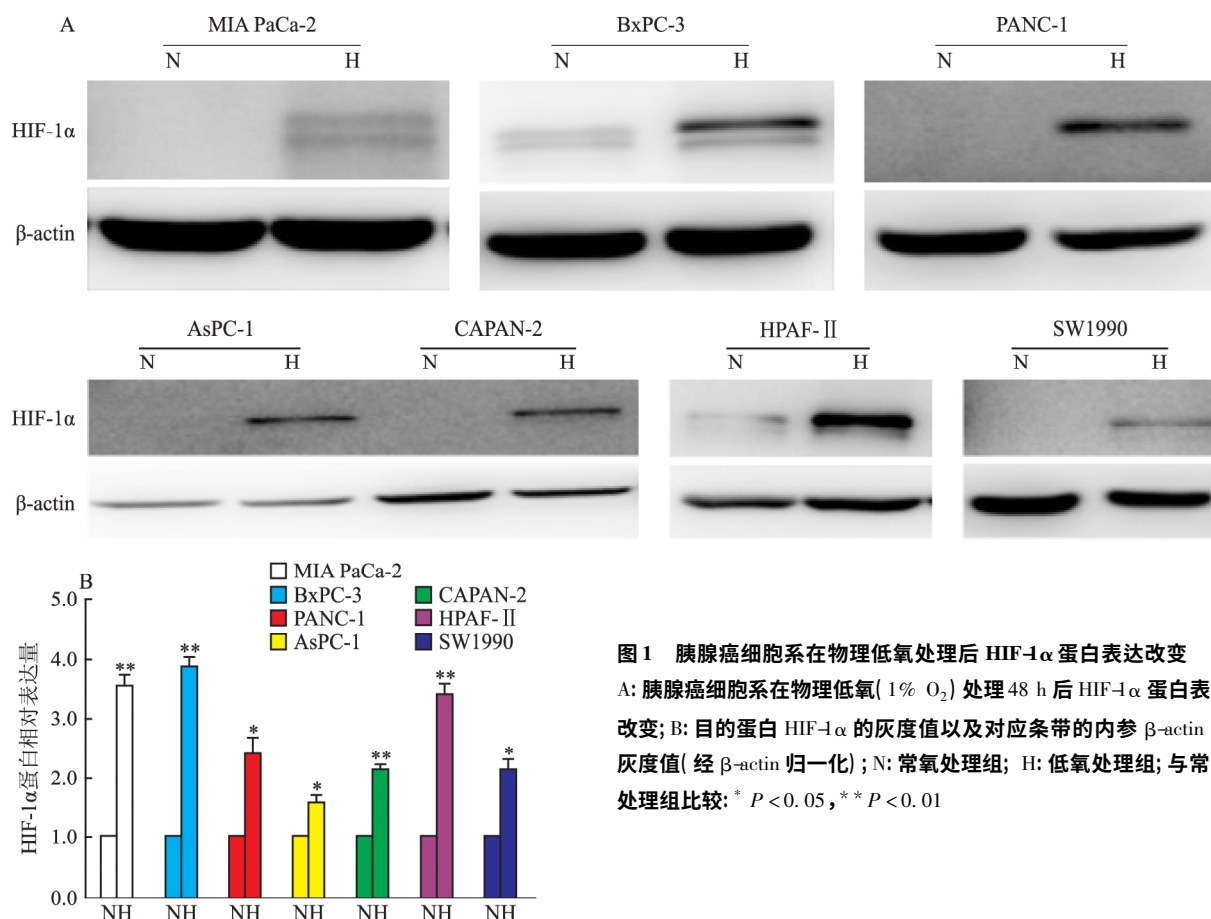


图1 胰腺癌细胞系在物理低氧处理后 HIF-1 α 蛋白表达改变

A: 胰腺癌细胞系在物理低氧(1% O₂) 处理48 h后 HIF-1 α 蛋白表达改变; B: 目的蛋白 HIF-1 α 的灰度值以及对应条带的内参 β -actin 的灰度值(经 β -actin 归一化); N: 常氧处理组; H: 低氧处理组; 与常氧处理组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

细胞中同样发现低氧条件下 p-Akt (Ser473) 表达水平较常氧增高,其 p-Akt(Ser473)/Akt 的相对表达量是常氧环境的 31.33 倍,差异有统计学意义($t = 19.318, P = 0.003$),见图 2。上述结果表明,胰腺癌细胞中 Akt 信号通路在低氧环境中活化。

2.3 低氧条件下 MK-2206 抑制胰腺癌细胞 Akt 信号通路活化 如图 3 所示,常氧和低氧条件下 1 $\mu\text{mol/L}$ MK-2206 能抑制 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞 p-Akt(Ser473) 的活化。常氧状态下 MIA PaCa-2 细胞经 MK-2206 处理后 p-Akt(Ser473)/Akt 的相对表达量(经 β -actin 归一化)是 DMSO 组的 0.05 倍,差异有统计学意义($t = 4.185, P = 0.000$);低氧条件下 MIA PaCa-2 细胞经 MK-2206 处理后 p-Akt(Ser473)/Akt 的相对表达量(经 β -actin 归一化)是 DMSO 组的 0.03 倍,差异有统计学意义($t = 5.553, P = 0.000$),见图 3A、3C。BxPC-3 细胞在常氧条件下经 MK-2206 处理后 p-Akt(Ser473)/Akt 的相对表达量(经 β -actin 归一化)是 DMSO 组的 0.17 倍,差异有统计学意义($t = 2.103, P = 0.001$);低氧条件下 BxPC-3 细胞经 MK-2206 处理后 p-Akt(Ser473)/Akt 的相对表达量(经 β -actin 归一化)是 DMSO 组的

0.07 倍,差异有统计学意义($t = 3.464, P = 0.000$),见图 3B、3D。上述结果表明,在常氧和低氧条件下 MK-2206 能有效抑制胰腺癌细胞 Akt 信号通路活化。

2.4 低氧条件下 MK-2206 增强胰腺癌细胞对吉西他滨敏感性 如图 4A 所示,低氧条件下 MIA PaCa-2 细胞 MK-2206(1 $\mu\text{mol/L}$) 与吉西他滨(10 $\mu\text{mol/L}$) 联用组细胞活力为 0.549 ± 0.001 ,低于 DMSO 与吉西他滨(10 $\mu\text{mol/L}$) 联用组 0.632 ± 0.017 ,差异有统计学意义($t = 12.107, P = 0.007$);而常氧条件下 MIA PaCa-2 细胞 MK-2206(1 $\mu\text{mol/L}$) 与吉西他滨(10 $\mu\text{mol/L}$) 联用组细胞活力为 0.610 ± 0.033 ,与 DMSO 和吉西他滨(10 $\mu\text{mol/L}$) 联用组 0.556 ± 0.018 ,差异无统计学意义($t = 2.525, P = 0.128$),见图 4A。在 BxPC-3 细胞中同样发现与 DMSO 和吉西他滨(10 $\mu\text{mol/L}$) 联用组(细胞活力为 0.594 ± 0.106)相比,低氧条件下 MK-2206(1 $\mu\text{mol/L}$) 与吉西他滨(10 $\mu\text{mol/L}$) 联用组细胞活力降低(细胞活力为 0.508 ± 0.041),差异有统计学意义($t = 5.363, P = 0.033$),见图 4B。综上所述表明,低氧条件下使用 MK-2206 抑制 Akt 信号通路后能

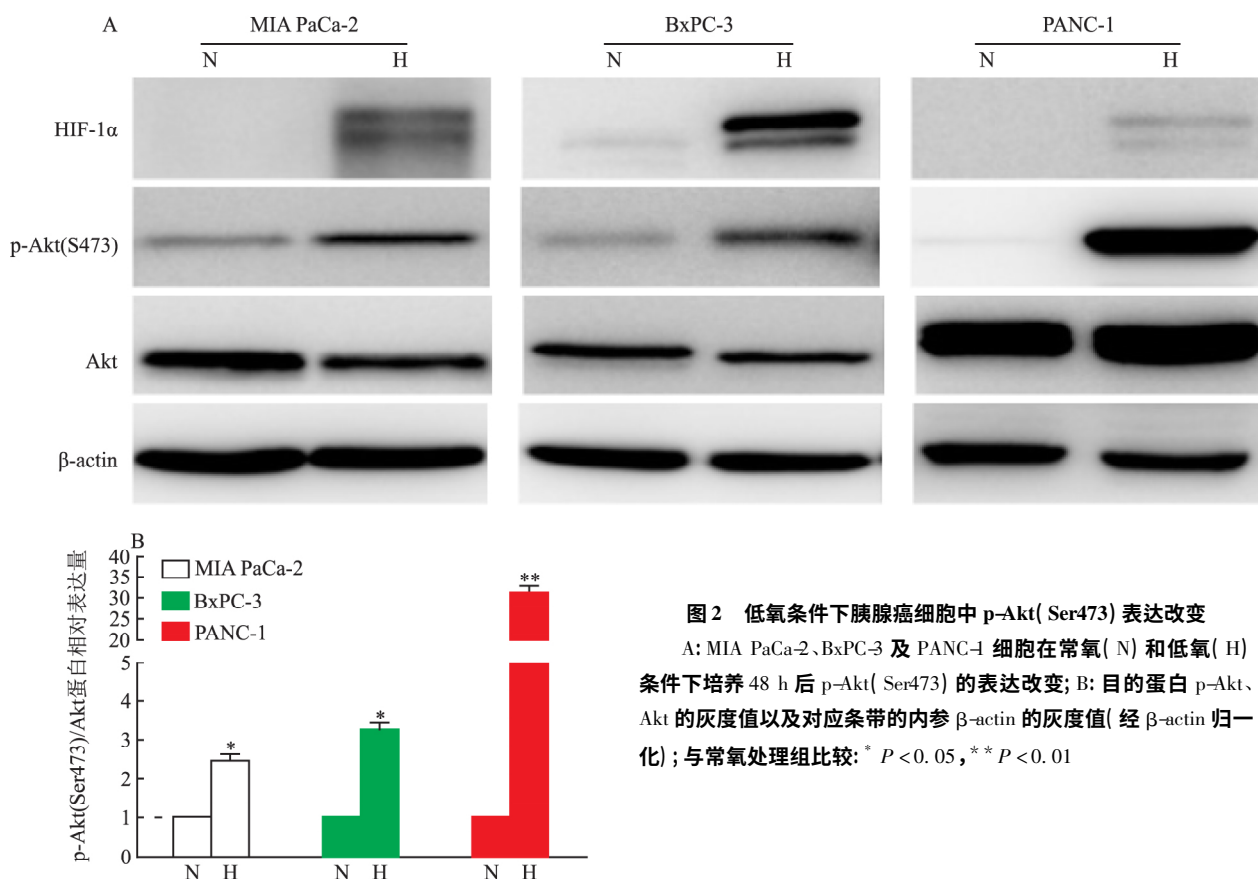


图2 低氧条件下胰腺癌细胞中 p-Akt(Ser473) 表达改变

A: MIA PaCa-2、BxPC-3 及 PANC-1 细胞在常氧(N) 和低氧(H) 条件下培养 48 h 后 p-Akt(Ser473) 的表达改变; B: 目的蛋白 p-Akt、Akt 的灰度值以及对应条带的内参 β -actin 的灰度值(经 β -actin 归一化); 与常氧处理组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

增强胰腺癌细胞对吉西他滨敏感性。

3 讨论

Akt 信号通路的异常活化与胰腺癌吉西他滨耐药密切相关^[9]。因此,针对 Akt 信号通路所研发的靶点抑制剂被认为是具有潜在逆转吉西他滨耐药作用,具有巨大的研究价值以及良好的临床应用前景。MK-2206 是近年来发现的一种新型具有生物活性口服变构类 Akt 抑制剂。在本研究中课题组发现 MK-2206 可在体外有效抑制胰腺癌细胞 Akt 信号通路的活化;此外本课题组还发现 MK-2206 能抑制胰腺癌细胞增殖(本文未显示相关数据)。这与文献^[8]报道 MK-2206 可以抑制肿瘤细胞增殖结论相符,即 MK-2206 能有效抑制肿瘤细胞内 Akt 信号通路活化,发挥抗肿瘤增殖效应。

已经证实低氧恶劣环境下 Akt 信号通路参与到肿瘤细胞上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、侵袭转移以及化疗耐药过程^[5,9-10]。Yokoi et al^[8]首次发现低氧条件下胰腺癌细胞对吉西他滨耐药性增强。本课题组前期研究^[11]证实低氧条件下胰腺癌细胞对吉西他滨耐药性增强,这与 Yokoi et al^[8]的研究结果相符。Yokoi

et al^[8]进一步研究表明其可能的机制是由于低氧激活了 PI3K/Akt 信号通路;使用 PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 能逆转胰腺癌细胞对吉西他滨的耐药性。在本研究中本课题组发现低氧条件下胰腺癌细胞中 Akt 信号通路活化;此外,低氧条件下 MK-2206 能有效抑制 Akt 信号通路的活化并能增强胰腺癌细胞对吉西他滨的敏感性。

已经有文献^[12-13]表明 MK-2206 能作为肿瘤细胞化疗增敏剂发挥作用。Jin et al^[13]发现 MK-2206 能有效抑制胃癌细胞内 Akt 信号通路活化,并抑制细胞增殖;进一步研究发现 MK-2206 与阿霉素或 5-氟尿嘧啶(5-Fu) 联用能增强胃癌细胞对阿霉素及 5-Fu 的敏感性。Whicker et al^[13]发现 MK-2206 能抑制顺铂诱导的卵巢癌细胞 Akt 信号通路活化而发挥化疗增敏剂的作用。上述研究均为 MK-2206 成为未来临床肿瘤化疗辅助药物提供了有力支持。

尽管本研究显示低氧条件下 MK-2206 能抑制 Akt 信号通路活化及增强胰腺癌细胞化疗敏感性,但其作用于体内还应考虑很多因素,例如药物吸收、分布及代谢等。因此, MK-2206 能否用于胰腺癌患者目前还不能确定。此外,本研究仅选用了药物的单一浓度(MK-2206 浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$; 吉西他滨浓

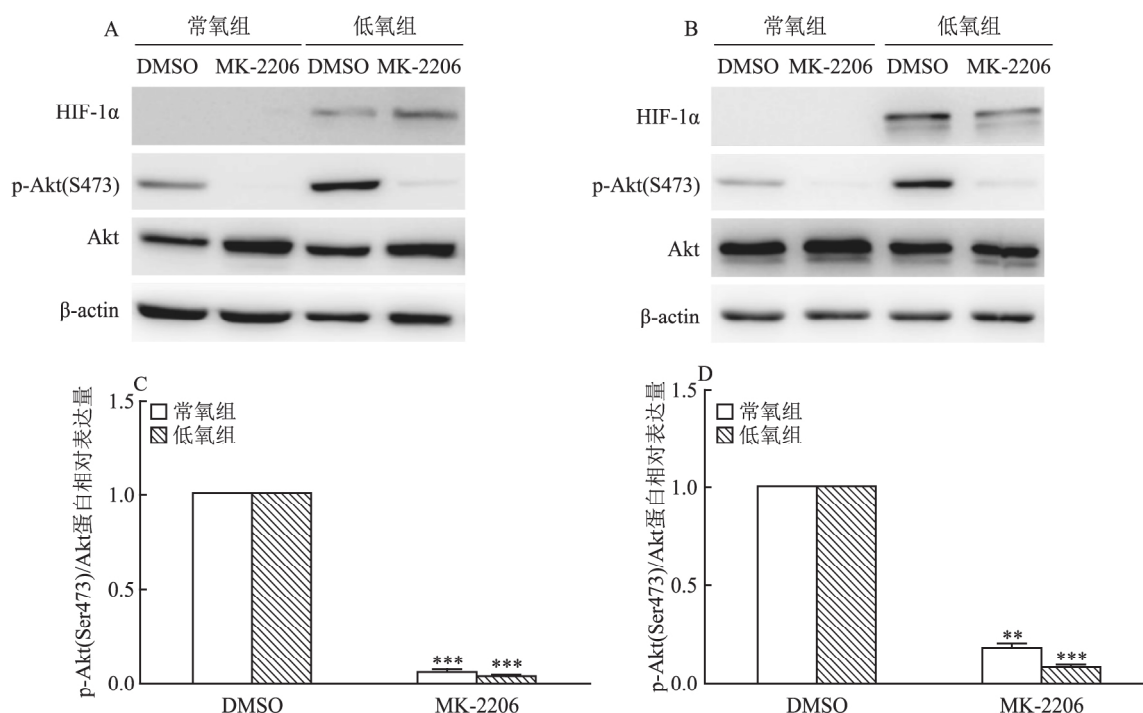


图3 常氧和低氧条件下 MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞经 MK-2206 处理后 p-Akt 的表达改变

A、B: MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞经 1 μ mol/L MK-2206 处理后置于常氧和低氧条件下培养 48 h 后 p-Akt、Akt 和 HIF-1 α 蛋白表达; C、D: MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞中目的蛋白 p-Akt、Akt 的灰度值以及对应条带的内参 β -actin 的灰度值(经 β -actin 归一化);与 DMSO 处理组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

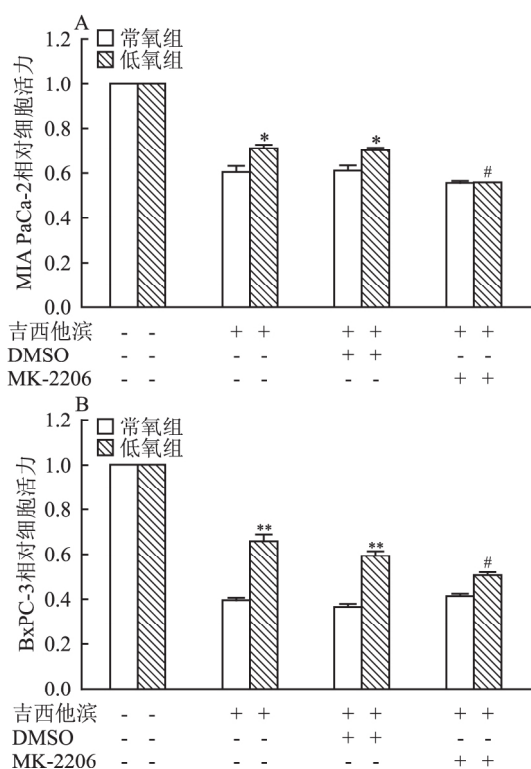


图4 MK-2206 和吉西他滨联用后增强

MIA PaCa-2 和 BxPC-3 细胞对吉西他滨敏感性

A: MIA PaCa-2 细胞; B: BxPC-3 细胞; 与常氧处理组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DMSO 处理组比较: # $P < 0.05$

度为 10 μ mol/L), 未进行 MK-2206 与吉西他滨联合比例的实验研究。在未来的研究中本课题组将通过体内实验进一步探讨 MK-2206 对胰腺癌吉西他滨敏感性的影响。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Kamisawa T, Wood L D, Itoi T, et al. Pancreatic cancer [J]. Lancet, 2016, 388(10039): 73-85.
- [3] Erkan M, Kurtoglu M, Kleeff J. The role of hypoxia in pancreatic cancer: a potential therapeutic target? [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 10(3): 301-6.
- [4] Shukla S K, Purohit V, Mehla K, et al. MUC1 and HIF-1 α signaling crosstalk induces anabolic glucose metabolism to impart gemcitabine resistance to pancreatic cancer [J]. Cancer Cell, 2017, 32(1): 71-87.
- [5] Yokoi K, Fidler I J. Hypoxia increases resistance of human pancreatic cancer cells to apoptosis induced by gemcitabine [J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(7): 2299-306.
- [6] Ma C X, Sanchez C, Gao F, et al. A phase I study of the AKT inhibitor MK-2206 in combination with hormonal therapy in postmenopausal women with estrogen receptor - positive metastatic breast cancer [J]. Clin Cancer Res, 2016, 22(11): 2650-8.
- [7] Rajabpour A, Rajaei F, Teimoori-Toolabi L. Molecular alterations

- contributing to pancreatic cancer chemoresistance [1]. *Pancreatol-ogy*, 2017, 17(2): 310–20.
- [8] Al-Saffar N M S, Troy H, Te Fong A C W, et al. Metabolic biomarkers of response to the AKT inhibitor MK-2206 in pre-clinical models of human colorectal and prostate carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2018, 119(9): 1118–28.
- [9] Song Y, Zheng S, Wang J, et al. Hypoxia-induced PLOD2 promotes proliferation, migration and invasion *via* PI3K/Akt signaling in glioma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 41947–62.
- [10] Chae Y C, Vaira V, Caino M C, et al. Mitochondrial Akt regulation of hypoxic tumor reprogramming [J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(2): 257–72.
- [11] Luo G, Xia X, Wang X, et al. MiR-301a plays a pivotal role in hypoxia-induced gemcitabine resistance in pancreatic cancer [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 369(1): 120–8.
- [12] Jin P, Wong C C, Mei S, et al. MK-2206 co-treatment with 5-fluorouracil or doxorubicin enhances chemosensitivity and apoptosis in gastric cancer by attenuation of Akt phosphorylation [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 4387–96.
- [13] Whicker M E, Lin Z P, Hanna R, et al. MK-2206 sensitizes BRCA-deficient epithelial ovarian adenocarcinoma to cisplatin and olaparib [J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 550.

Mechanism of Akt inhibitor MK-2206 in enhancing the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine under hypoxia

Luo Guangtao¹, Tang Weixiang², Qiu Zhengjun³

(¹Dept of General Surgery, ²Dept of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ³Dept of General Surgery, Shanghai General Hospital, Shanghai 200080)

Abstract Objective To explore the mechanism of Akt inhibitor MK-2206 in enhancing the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine under hypoxia. **Methods** Hypoxic microenvironment was established using physical hypoxia *in vitro*. The pancreatic cancer cell lines were cultured under hypoxia conditions (oxygen concentration 1%) for 48 h, and cancer cells cultured under normoxia (oxygen concentration 21%) were used as control. Western blot was used to detect the expression changes of hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), p-Akt (Ser473) and Akt in pancreatic cancer cells under normoxia and hypoxia. Effect of MK-2206 on p-Akt (Ser473) of pancreatic cancer cells (MIA PaCa-2 and BxPC-3) was detected by Western blot under normoxia and hypoxia. Effect of MK-2206 on gemcitabine sensitivity of pancreatic cancer cells (MIA PaCa-2 and BxPC-3) was investigated by CCK-8 cytotoxicity test under hypoxia. **Results** The results of Western blot showed that hypoxia microenvironment promoted accumulation of HIF-1 α , as well as increased phosphorylation of Akt (Ser473) in pancreatic cancer cells. In addition, MK-2206 inhibited p-Akt (Ser473) in pancreatic cancer cells under normoxia and hypoxia. Cytotoxicity test results showed that the relative cell viability of co-treatment with MK-2206 (1 μ mol/L) and gemcitabine (10 μ mol/L) group (0.549 $\pm$ 0.001) was lower than that of co-treatment with DMSO and gemcitabine (10 μ mol/L) group (0.632 $\pm$ 0.017) in MIA PaCa-2 cells under hypoxia, and the difference was statistically significant ($t = 12.107, P = 0.007$). Furthermore, the relative cell viability of co-treatment with MK-2206 (1 μ mol/L) and gemcitabine (10 μ mol/L) group (0.508 $\pm$ 0.041) was lower than co-treatment with DMSO and gemcitabine (10 μ mol/L) group (0.594 $\pm$ 0.106) in BxPC-3 cells under hypoxia, and the difference was statistically significant ($t = 5.363, P = 0.033$). **Conclusion** MK-2206 could enhance the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine under hypoxic microenvironment.

Key words hypoxia; pancreatic cancer; MK-2206; gemcitabine