

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.021.html>

◇ 药学研究 ◇

吡啶类化合物 GY3 通过 AMPK/COX-2 信号通路诱导乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡

胡楚娇¹, 周波¹, 杨英¹, 杨付梅², 孙黔云², 汤磊¹

摘要 目的 探究吡啶类化合物 GY3 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的作用, 及其对腺苷酸活化蛋白激酶/环氧合酶-2 (AMPK/COX-2) 信号通路的影响。方法 以 AMPK 激活剂 5-氨基-4-甲酰胺咪唑核糖核苷酸 (AICAR) 和 COX-2 抑制剂塞来昔布为阳性对照药物, 利用 MTT 方法、流式细胞术检测不同浓度的 GY3、AICAR、塞来昔布及 AICAR + 塞来昔布联用对 MCF-7 细胞增殖和凋亡的影响; 用 Western blot 方法检测不同浓度 GY3 和 AMPK 抑制剂 Compound C 联用对 MCF-7 细胞乙酰辅酶 A 羧化酶、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶 (P-ACC)、COX-2 蛋白表达的影响。结果 GY3 可上调 P-ACC 的表达、下调 COX-2 的表达 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 同时显著降低 MCF-7 细胞的活力 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 抑制 MCF-7 细胞的增殖, 诱导 MCF-7 细胞发生凋亡 ($P < 0.05$), 并且呈现一定的浓度依赖性; Compound C 可有效地阻断 GY3 对 AMPK 的激活和 COX-2 的抑制作用, 其作用与 AICAR、塞来昔布及 AICAR + 塞来昔布联用的比较显示 GY3 的抑癌活性较高。结论 GY3 能有效抑制乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖, 诱导其凋亡, 其机制与激活 AMPK、抑制 COX-2 的表达有关。

关键词 吡啶类化合物; 乳腺癌; AMPK; COX-2; 凋亡

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1674-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.021

乳腺癌是严重危害女性健康的主要恶性肿瘤之一。2012 年全球约 170 万人被诊断为乳腺癌, 约有 50 万人死于该病, 是发展中国家主要致死原因之

一^[1-2]。乳腺癌具有高度异质性, 容易出现化疗耐药和复发转移。所以寻找高效、低毒且广谱的抗乳腺癌药物具有重要的研究意义。

研究^[3]显示环氧合酶 2 (cyclo-oxygenase, COX-2) 在乳腺癌组织中高表达, 抑制 COX-2 的表达可抑制乳腺癌细胞增殖、诱导细胞凋亡。腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 激活可以通过抑制 COX-2 的表达, 从而抑制肿瘤细胞的增殖, 并促进细胞凋亡。GY3 是该课题组前期研发的一种 AMPK 激活剂, 其可以通过激活 AMPK 从而发挥调节糖脂代谢的作用^[4], 同时课题组还显示 GY3 具有较强的 COX-2 抑制活性。该研究推测 GY3 可能通过激活 AMPK 和抑制 COX-2 在乳腺癌中发挥治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂 人乳腺癌细胞株 (michigan cancer foundation-7, MCF-7) 由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室提供; DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司; 青霉素、链霉素购自上海生物工程技术服务有限公司; COX-2 羊抗人多克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology Inc 公司; 乙酰辅酶 A 羧化酶磷酸化后的产物 (acetyl-coa carboxylase product of phosphorylation, ACC) (Ser79)、磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶 (phosphorylated acetyl-Co A carboxylase, P-ACC) 兔抗人多克隆抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 生物公司; β -actin 兔抗人单克隆抗体购自美国 Abcam 生物公司; 兔抗羊二抗、羊抗兔二抗均购自北京中山生物技术有限公司; 受试品 GY3 由贵州医科大学汤磊教授提供; 对照品 AICAR 和塞来昔布均购自阿拉丁化学试剂有限公司; Compound C 购自德国 Merck 公司; MTT、Annexin-FITC 购自贵阳明涵生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌 MCF-7 细胞培养于

2017-06-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81360470); 贵州省科技计划项目 (编号: 黔科合 [2016] 平台人才 5402); 贵州省普通高等学校工程研究中心建设任务 (编号: 黔教合 KY 字 [2014] 219 号)

作者单位: ¹ 贵州医科大学贵州省化学合成药物研发利用工程技术研究中心, 贵阳 550004

² 贵州医科大学药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550004

作者简介: 胡楚娇, 女, 硕士研究生;

汤磊, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: tlei1974@gmc.edu.cn

DMEM 培养基(含 10^5 U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素)中, 于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的孵箱中贴壁培养, 隔天换液, 显微镜下观察待融合度达到 90% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% 二乙烯四乙酸二钠)消化传代。

1.2.2 细胞活性检测 人乳腺癌 MCF-7 细胞传代 3 代后, 将处于对数生长期的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 计数, 以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板内, 培养 24 h, 待细胞完全贴壁后, 分别加入阳性对照药 2 mmol/L AICAR、0.1 mmol/L 塞来昔布、2 mmol/L AICAR + 0.1 mmol/L 塞来昔布联用和 GY3, GY3 加入的终浓度分别为 20、30、50、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$; 对照组加入 DMEM 培养基, 每组平行设 6 个复孔, 培养 48 h, 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μl , 在 37°C 培养箱中孵育 4 h, 加入 DMSO 150 μl , 振荡仪上室温振摇 10 min, 使结晶物充分溶解, 在自动酶标仪波长 570 nm 处测定各孔吸光度值, 以上实验重复 3 次。计算不同药物及不同浓度药物对 MCF-7 细胞株的生长抑制率。生长抑制率(%) = (对照组吸光度值 - 实验组吸光度值) / 对照组吸光度值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 细胞凋亡测定 取对数生长期的 MCF-7 细胞传代接种于 6 孔板中, 培养 24 h 待细胞完全贴壁后, 分别加入阳性对照药 2 mmol/L AICAR、0.1 mmol/L 塞来昔布、2 mmol/L AICAR + 0.1 mmol/L 塞来昔布联用和不同浓度的 GY3(100、50、25 $\mu\text{mol/L}$) 48 h 后, 用胰蛋白酶(不含二乙烯四乙酸二钠)消化后收集不同组药物处理后的细胞置离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 500 μl 的 $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞至 $1 \sim 5 \times 10^5$ 个/ml, 加入 5 μl AnnexinV-FITC 混匀后, 加入 5 μl PI 混匀, 室温、避光、染色 15 min 后, 在 1 h 内流式细胞仪测定细胞凋亡率。早期凋亡细胞 AnnexinV-FITC(+) PI(-), 晚期凋亡细胞 AnnexinV-FITC(+) PI(+)

1.2.4 Western blot 检测 ACC 作为 AMPK 的下游直接效应靶蛋白, P-ACC 被认为是观察 AMPK 激活的最佳指标^[5]。故收集浓度为 100、50、25 $\mu\text{mol/L}$ 的 GY3 孵育 48 h 的 MCF-7 细胞, 利用蛋白裂解液冰上裂解 30 min, 蛋白定量后取 50 μg 蛋白样品上样, 用湿转法将 SDS-PAGE 凝胶上蛋白质转移到 PVDF 膜上, PVDF 膜用封闭液室温封闭 1 h 后, 加入一抗(P-ACC, ACC, COX-2, β -actin 均按 1:1 000 稀释) 4°C 过夜孵育, 用 TBST 洗膜 3~5 次, 每次 5

~10 min。再加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次后, 利用 ECL 发光液进行显影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GY3 对 MCF-7 细胞活力的影响 如图 1 所示, 不同浓度 GY3 对 MCF-7 细胞均有抑制作用, 并且 GY3 对 MCF-7 的生长抑制作用呈现一定的量效关系, 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 抑制作用最高, 抑制率为 $(65.50 \pm 2.85)\%$, 与其余各组相比差异有统计学意义($F = 429.4$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。与阳性对照药物 AICAR 和塞来昔布相比, 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 对 MCF-7 细胞的抑制率均显著高于 AICAR $[(32.87 \pm 2.54)\%$, $F = 310.6$, $P < 0.05$] 和塞来昔布 $[(42.07 \pm 1.74)\%$, $P < 0.05$], 而与 AICAR 和塞来昔布联合处理组 $(66.27 \pm 1.15)\%$ 相比差异无统计学意义, 见图 2。

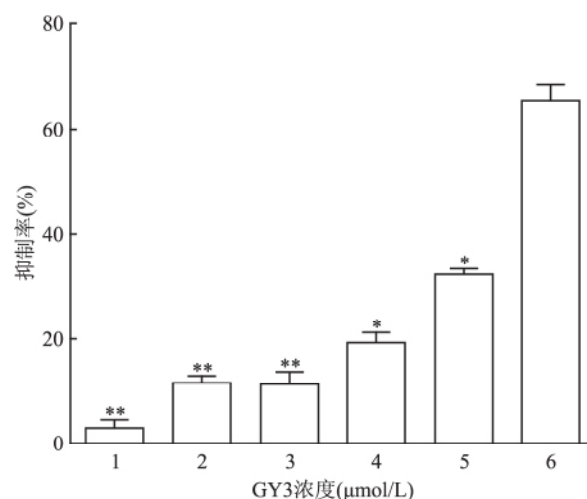


图1 不同浓度 GY3 对 MCF-7 细胞的抑制作用

1: 20 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 2: 30 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 4: 60 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 5: 80 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 6: 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 GY3 诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用 各组化合物处理后, 流式细胞术检测各组细胞的凋亡率如图 3 所示, 不同浓度 GY3 均可诱导 MCF-7 细胞发生凋亡, 且呈现一定的剂量依赖性, 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组凋亡率最高 $(63.57 \pm 0.91)\%$, 与 50 $\mu\text{mol/L}$ $(16.26 \pm 2.31)\%$ 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 组 $(8.68 \pm 1.87)\%$ 和对照组 $(5.84 \pm 0.83)\%$ 差异均有统计学意义

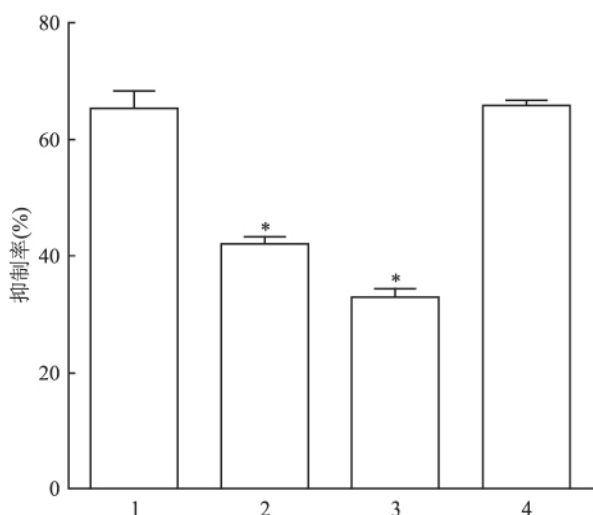


图2 GY3与阳性对照药对MCF-7细胞抑制率比较

1: 100 μmol/L GY3 组; 2: 0.1 mmol/L 塞来昔布组; 3: 2 mmol/L AICAR 组; 4: AICAR 和塞来昔布联合处理组; 与 100 μmol/L GY3 组比较: * $P < 0.05$

($F = 153.2$, $P < 0.05$)。100 μmol/L GY3 组 MCF-7 细胞的凋亡率显著高于 AICAR、塞来昔布以及 AIC-

AR 和塞来昔布联合处理组 [(9.91 ± 0.68) %、(27.01 ± 1.56) %、(36.26 ± 1.32) % $P < 0.05$], 见图 4。

2.3 不同浓度 GY3 对 MCF-7 细胞 P-ACC、ACC、COX-2 表达的影响 如图 5 所示, 经浓度分别为 100、50、25 μmol/L 的 GY3 孵育后, 与对照组相比, 100、50 μmol/L 的 GY3 孵育后 P-ACC 蛋白表达水平上升 ($F = 169.2$, $P < 0.01$, $P < 0.05$) 25 μmol/L 的 GY3 组与对照组差异无统计学意义。各浓度 GY3 处理后 ACC 总蛋白的表达与对照组比较差异均无统计学意义。100、50、25 μmol/L 的 GY3 处理后 25 μmol/L GY3 对 COX-2 蛋白无明显影响, 而 50、100 μmol/L GY3 能够显著下调 COX-2 的表达 ($F = 629.0$, $P < 0.05$)。

2.4 Compound C 联合 GY3 对 MCF-7 细胞 P-ACC、ACC、COX-2 蛋白表达的影响 与对照组比较, 100 μmol/L GY3 组 P-ACC 显著升高, Compound C 及 GY3 联合 Compound C 组显著降低了 P-ACC 的表达 ($F = 394.3$, $P < 0.05$), 表明 Compound C 可以

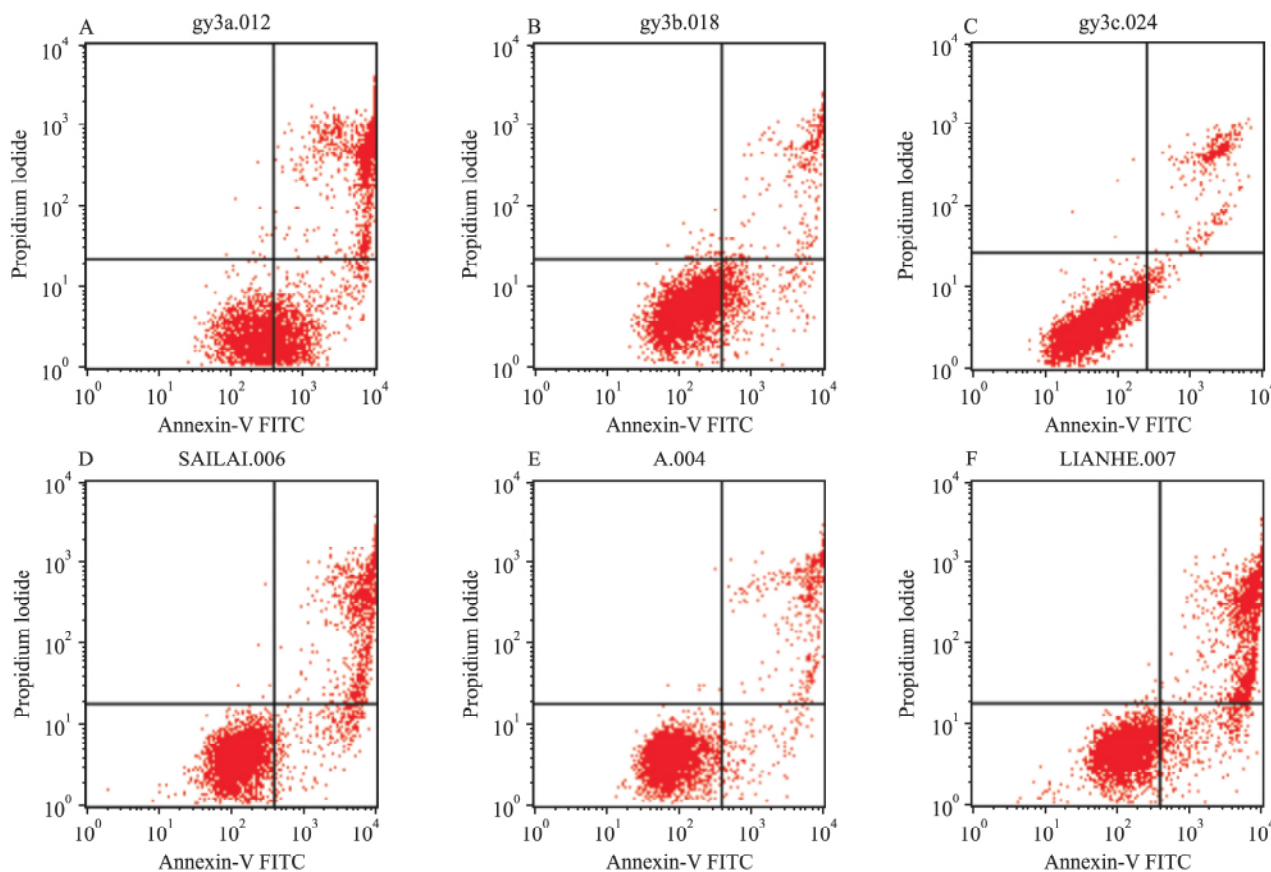


图3 MCF-7 细胞凋亡的流式细胞术检测结果

A: 100 μmol/L GY3 组; B: 50 μmol/L GY3 组; C: 25 μmol/L GY3 组; D: 0.1 mmol/L 塞来昔布组; E: 2 mmol/L AICAR 组; F: AICAR 和塞来昔布联合处理组

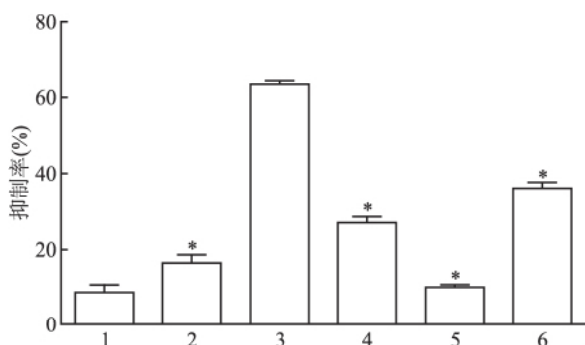


图4 各组化合物诱导 MCF-7 细胞凋亡率比较

1: 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 2: 50 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 3: 25 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 4: 0.1 mmol/L 塞来昔布组; 5: 2 mmol/L AICAR 组; 6: AICAR 和塞来昔布联合处理组; 与 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组比较: * $P < 0.05$

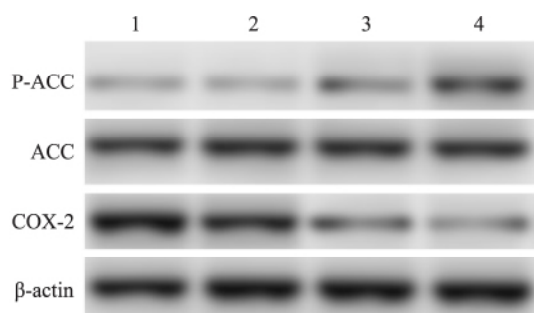


图5 不同浓度 GY3 对 MCF-7 细胞 P-ACC、ACC、COX-2 表达的影响

1: 对照组; 2: 25 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 4: 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 与 P-ACC 对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 COX-2 对照组比较: # $P < 0.05$

抑制 GY3 对 AMPK 的激活作用; GY3 组 COX2 显著降低 ($F = 346.0$, $P < 0.05$), Compound C 单独处理组 COX2 显著升高 ($P < 0.05$), GY3 联合 Compound C 处理, 较单用 GY3 组 COX-2 表达上调 ($P < 0.05$), 但 COX-2 仍显著低于对照组 ($P < 0.05$)。总蛋白 ACC 在各组之间差异无统计学意义。见图 6。

3 讨论

AMPK 是细胞能量代谢的调节器, 可以促进

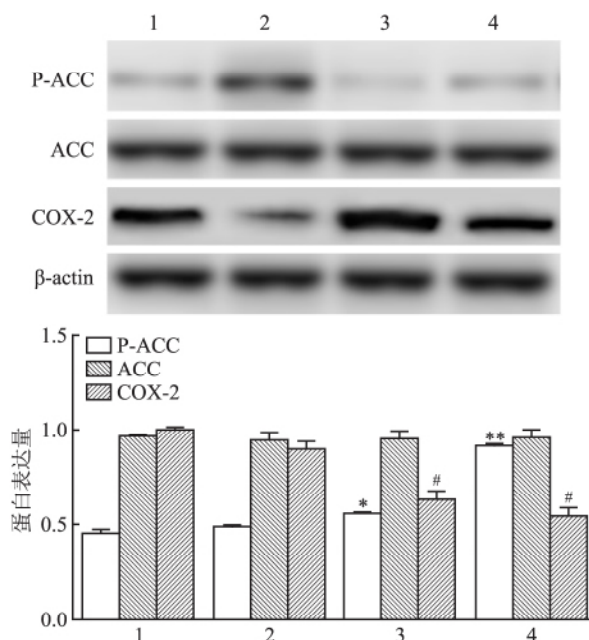


图6 Compound C 联合 GY3 对 MCF-7 细胞 P-ACC、ACC、COX-2 蛋白表达的影响

1: 对照组; 2: 100 $\mu\text{mol/L}$ GY3 组; 3: 10 $\mu\text{mol/L}$ Compound C 组; 4: GY3 + Compound C 组; 与 P-ACC 对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 COX-2 对照组比较: # $P < 0.05$

ATP 的产生和调控代谢的能量。AMPK 的激活被证实可以缓解 2 型糖尿病和代谢综合征的症状^[6-7], 最近的研究^[8]表明 AMPK 可能作为肿瘤代谢的抑制因子以及肿瘤预防和治疗的靶点, 可以通过调控 LKB1、p53、COX-2、ACC 和 mTOR 的表达来调节炎症、对抗肿瘤发生过程中的代谢变化并直接抑制细胞增殖和诱导细胞周期阻滞。Cheng et al^[9]发现 LKB1-AMPK 信号通路可以直接影响肝癌的细胞增殖, 且 LKB1 和 AMPK 的丢失与肝癌的预后密切相关。阿司匹林通过 AMPK-mTORC2-Akt/ERK 通路抑制 MCL-1 的表达, 从而促进肝癌和结肠癌细胞的凋亡^[10]。

COX-2 属于诱导酶, 当有生长因子、细胞因子、促癌剂等刺激时, COX-2 的表达会迅速上调。COX-2 在多种肿瘤组织中呈高表达, 如胃癌、结肠癌和非小细胞肺癌等, 研究^[11]表明 COX-2 在肿瘤的发生和发展中起促进作用, 并且与肿瘤预后具有相关性。在通常情况下, COX-2 在乳腺癌患者中也具有较高的表达, 且与预后密切相关^[3]。COX-2 具有抗肿瘤凋亡作用, 被认为是促进肿瘤发生的重要原因, COX-2 可以增加抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 增强 AKT 激酶介导通路或 NF- κ B 通路抑制细胞凋亡, 通

过减少细胞色素 C 的释放抑制细胞凋亡,降低肿瘤上皮细胞生长抑制因子受体表达水平下降,使肿瘤细胞凋亡减少^[12]。因此,COX-2 成为乳腺癌等多种肿瘤的治疗靶点。

AMPK 和 COX-2 表现为反向协同作用,为近来研究热点之一的选择性 AMPK 激活剂和 COX-2 抑制剂的抗肿瘤机制提供了新的视角。目前越来越多研究^[13-14]表明 AICAR 作为 AMPK 选择性的激活剂已被广泛用于肿瘤治疗研究。而塞来昔布作为 COX-2 抑制剂也广泛用于肿瘤治疗研究^[15]。前期研究^[4]表明新型吲哚类衍生物 GY3 可激活 AMPK 下游蛋白 P-ACC,下调 COX-2 的表达,从而有效调节糖脂代谢,提示 GY3 可能通过激活 AMPK,下调 COX-2 发挥抗肿瘤作用。故本研究以 AMPK 激活剂 AICAR 和 COX-2 抑制剂塞来昔布为阳性工具药,并通过 MTT 实验和流式细胞术考察了 GY3 对人乳腺癌 MCF-7 细胞的活性,结果表明该化合物能显著抑制 MCF-7 的细胞活力和诱导 MCF-7 细胞凋亡,并且与阳性药物 AICAR、塞来昔布相比较,GY3 对乳腺癌 MCF-7 的抑制活性较高,而与 AICAR + 塞来昔布联用时活性相当,这表明了 GY3 具有较好的抑癌活性。同时本研究深入探讨了 GY3 诱导 MCF-7 细胞凋亡的可能机制,进一步的研究结果显示,GY3 在人乳腺癌 MCF-7 细胞中能够上调 P-ACC,诱导 AMPK 磷酸化,抑制 COX-2 表达,而当 GY3 激活的 AMPK 被 AMPK 抑制剂 Compound C 抑制,则逆转了 GY3 对 COX-2 表达的抑制作用,提示 AMPK 是 COX-2 的上游激酶,进一步明确 AMPK/COX-2 信号通路在 GY3 诱导的人乳腺癌细胞凋亡中所起的作用。

综上所述,GY3 对人乳腺癌 MCF-7 细胞具有明显的生长抑制作用,并且通过激活 AMPK 进而抑制 COX-2 的表达,从而诱导 MCF-7 细胞的凋亡。但是由于细胞内信号转导机制十分复杂,GY3 抑制 MCF-7 细胞 COX-2 表达及诱导 MCF-7 细胞凋亡可能存在其他通路,也可能存在不同通路之间交叉对话等,未来仍然需要对 GY3 的其他作用机制作更深入更全面的研究。

参考文献

[1] Nadia H, Michael G. Breast cancer [J]. *Lancet*, 2016, 389

(100074): 1134 - 50.

- [2] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87 - 108.
- [3] Sun L, Yu D H, Sun S Y, et al. Expressions of ER, PR, HER-2, COX-2, and VEGF in primary and relapsed/metastatic breast cancers [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 68(3): 511 - 6.
- [4] Si M, Yan Y, Tang L, et al. A novel indole derivative compound GY3 improves glucose and lipid metabolism *via* activation of AMP-activated protein kinase pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 698 (1 - 3): 480 - 8.
- [5] Shaw R J. Glucose metabolism and cancer [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(6): 598 - 608.
- [6] O'Neill L A, Hardie D G. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation [J]. *Nature*, 2013, 493 (7432): 346 - 55.
- [7] 顾俊菲. 二甲双胍对糖尿病相关肿瘤的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(4): 557 - 60.
- [8] Amilcar R R, Linette C P, Yamil G, et al. Anti-breast cancer potential of quercetin *via* the Akt/AMPK/Mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade [J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157251.
- [9] Cheng J, Huang T, Li Y, et al. AMP-activated protein kinase suppresses the *in vitro* and *in vivo* proliferation of hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93256.
- [10] Gao M, Kong Q, Hua H, et al. AMPK-mediated up-regulation of mTORC2 and MCL-1 compromises the anti-cancer effects of aspirin [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(13): 16349 - 61.
- [11] Qin G, Xu F, Qin T, et al. Palbociclib inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer *via* c-Jun/COX-2 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 41794 - 808.
- [12] Tian J, Hachim M Y, Hachim I Y, et al. Cyclooxygenase-2 regulates TGF β -induced cancer stemness in triple-negative breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40258.
- [13] Zhao J, Zeng D, Liu Y, et al. Selenadiazole derivatives antagonize hyperglycemia-induced drug resistance in breast cancer cells by activation of AMPK pathways [J]. *Metallomics*, 2017, 9(5): 535 - 45.
- [14] Nemec M J, Kim H, Marcianite A B, et al. Polyphenolics from mango (*Mangifera indica* L.) suppress breast cancer ductal carcinoma *in situ* proliferation through activation of AMPK pathway and suppression of mTOR in athymic nude mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 41: 12 - 9.
- [15] Tury S, Becette V, Assayag F, et al. Combination of COX-2 expression and PIK3CA mutation as prognostic and predictive markers for celecoxib treatment in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 85124 - 41.

Indole compound GY3 induces cell apoptosis of breast cancer MCF-7 through AMPK /COX-2 pathway

Hu Chujiao, Zhou Bo, Yang Ying, et al

(Guizhou Chemical Drug Research and Development Engineering

Technical Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To investigate the effect of compound GY3 (GY3) on proliferation and apoptosis of breast cancer Michigan cancer foundation-7 (MCF-7) cells, and regulating downstream factors of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/cyclooxygenase-2 (AMPK/COX-2) signal pathway. **Methods** MTT assay was used to measure the inhibition rate of different concentration of GY3, 5-minoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR), celecoxib and AICAR combined with celecoxib on MCF-7 cells. Cell apoptosis rate was detected by FCM assay. The expressions of acetyl-coa carboxylase product of phosphorylation, phosphorylated acetyl-CoA carboxylase (P-ACC) and COX-2 were assayed in MCF-7 cells cultured with different concentration of GY3 and GY3 + Compound C by Western blot. **Results** GY3 inhibited MCF-7 cell growth in a concentration dependent manner ($P < 0.01$, $P < 0.05$). GY3 induced apoptosis of MCF-7 cells ($P < 0.05$). GY3 could increase P-ACC and down-regulate COX-2 expression ($P < 0.01$, $P < 0.05$). AMPK inhibitor Compound C could restore activation of AMPK and inhibition of COX-2 by GY3. **Conclusion** GY3 could inhibit COX-2 expression by activating AMPK, and subsequently induce apoptosis of MCF-7 cells.

Key words indole derivative compound; breast cancer; AMPK; COX-2; apoptosis

(上接第 1673 页)

[15] Foster J G, Blunt M D, Carter E, et al. Inhibition of PI3K signaling spurs new therapeutic opportunities in inflammatory/autoimmune disease and hematological malignancies [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(4): 1024–54.

[16] Chen B C, Kang J C, Lu Y T, et al. Rac1 regulates peptidoglycan-induced nuclear factor- κ B activation and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(6): 1179–88.

Effect of cadmium on PI3K/AKT signal pathway in mouse leydig cells

Ji Yanli^{1,2}, Liu Hongmao¹, Mu Kehan¹, et al

(¹Dept of Occupational and Environmental Health, ²Dept of Inspection and Quarantine Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effects of cadmium on phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signal pathway in mouse leydig cells. **Methods** TM3 cells (mouse leydig cell line) were incubated with 20 μ mol/L CdCl₂ and collected cells at 4 h and 8 h after cadmium exposure. The control group was incubated with corresponding volume PBS and collected cells after 8 h. The mRNA expression levels of interleukin (IL)-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 and cyclooxygenase (COX)-2 were detected by RT-PCR; the protein expression levels of COX-2, AKT and p-AKT were measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, cadmium significantly increased the mRNA expression levels of IL-6 and TNF- α ($P < 0.01$); the mRNA expression level of MCP-1 was also increased at 4 h group after cadmium exposure ($P < 0.01$), however, cadmium did not affect the mRNA expression level of MCP-1 at 8 h group after cadmium exposure. No significant differences on the mRNA expression levels of MIP-1 and MIP-2 were observed between the control group and cadmium groups. Cadmium markedly up-regulated the mRNA and protein levels of COX-2 in TM3 cells ($P < 0.01$). In addition, compared with the control group, the protein expression of p-AKT also was significantly increased in cadmium groups ($P < 0.01$). **Conclusion** These results suggest that cadmium could activate PI3K/AKT signal pathway which might partially contribute to cadmium-induced the secretion of some inflammatory cytokines in mouse testicular leydig cells.

Key words cadmium; leydig cell; inflammation; PI3K/AKT