

LY294002 靶向抑制 PI3K/Akt 信号通路 干预 K562 细胞增殖的研究

耿英华^{1,2}, 武文娟³, 于北凯⁴, 夏瑞祥¹

摘要 目的 探讨 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 对慢性髓系白血病细胞株 K562 的增殖抑制作用及相关机制。方法 MTT 法检测 LY294002 对 K562 细胞增殖的抑制作用; 10、20 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 作用 K562 细胞 36 h, 流式细胞术观察细胞周期的变化, RT-PCR 法测定 LY294002 对 K562 细胞 Skp2 基因表达的影响, Western blot 法检测 Skp2 蛋白表达的变化。结果 LY294002 能够抑制 K562 细胞的生长, 该抑制作用具有浓度及时间依赖性 ($P < 0.05$)。LY294002 作用

K562 细胞 36 h, 随着浓度的增加, G₀/G₁ 期阻滞增强, S 期细胞减少 ($P < 0.05$)。Skp2 的 mRNA 表达量减少, Skp2 蛋白的表达量显著降低。结论 LY294002 能够抑制 K562 细胞的生长, 诱导细胞发生 G₀/G₁ 期阻滞, 这可能是通过 LY294002 影响了 Skp2 表达而实现的。

关键词 LY294002; PI3K/Akt; Skp2; K562

中图分类号 R 733.7; R 329.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)03-0295-05

2013-11-08 接收

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金项目(编号: KJ2011B098); 蚌埠医学院自然科学基金项目(编号: Byky1224)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院血液内科, 合肥 230022

² 蚌埠医学院第一附属医院血液内科, 蚌埠 233004

³ 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室、⁴ 临床检验诊断学实验中心, 蚌埠 233030

作者简介: 耿英华, 女, 副主任医师;

夏瑞祥, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: rxr2041@163.com

Akt 是一类调节细胞凋亡与存活的胞质信号转导蛋白, 生理状态下, Akt 以低活性存在于胞质中, 当各种因素刺激时, Akt 在 PI3K 作用下发生磷酸化而激活^[1]。活化的 Akt 可促进细胞的生存、增殖、转移以及血管的形成。研究^[2-3]表明, Akt 在人类多种肿瘤中常被过度活化, 如在胃肠道肿瘤、胰腺癌等组织中均高表达及活化。肿瘤细胞中 Akt 的活化与肿瘤细胞增殖、凋亡密切相关。Akt 磷酸化可被 PI3K 特异性抑制剂 LY294002^[4] 所抑制。该研究

A β 1-42 oligomers into right lateral cerebral ventricle. **Methods** After screening with Morris water maze, 60 rats with escape latency less than 60 s were randomly assigned equally into four groups: the naive group, PBS control group and A β 1-42 fiber group and A β 1-42 oligomers group. The rats in A β oligomers and fiber group were infused A β 1-42 oligomers or A β 1-42 fiber into right cerebral ventricle to establish Alzheimer's disease(AD) rat model; PBS control group received the same volume of PBS; naive group received no treatment. Four weeks after modeling, Morris water maze were performed to detect the changes in the ability of learning and memory in rats. RT-PCR assay was used to detect the expression of cortical Bcl-2 mRNA and Caspase-3 mRNA in AD rats. Western blot assay was carried out to investigate cortical Bcl-2 protein expression and activity of Caspase-3 protein. **Results** Compared with naive and PBS control group, the escape latency in A β 1-42 fiber group and A β 1-42 oligomers group were prolonged than before modeling ($P < 0.05$), the escape latency in A β 1-42 oligomers group was longer than in A β 1-42 fiber group; the cortical Bcl-2 mRNA expression in A β 1-42 fiber and oligomers group were decreased ($P < 0.05$), and the Caspase-3 mRNA expression and activity were increased ($P < 0.05$). The above-mentioned changes of Bcl-2 and Caspase-3 mRNA expression in A β 1-42 oligomers group were more prominent than that in A β 1-42 fiber group. **Conclusion** A β 1-42 fiber, A β 1-42 oligomers can all lead to cognitive dysfunction, up-regulating Caspase-3 mRNA expression, increasing the activity of Caspase-3 protein and inhibiting Bcl-2 expression in AD rats, but the effects of A β 1-42 oligomers on Caspase-3 and Bcl-2 mRNA expression are greater than in A β 1-42 fiber.

Key words Alzheimer's disease; A β 1-42 fiber; A β 1-42 oligomers; Bcl-2; Caspase-3

以慢性髓系白血病细胞株 K562 为研究对象,观察 LY294002 对 K562 细胞增殖的影响并探讨其相关机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人慢性髓系白血病细胞株 K562 由蚌埠医学院临床检验诊断学实验中心冻存。培养条件:含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,同时加入 100 U/L 链霉素和 100 U/L 青霉素,于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。每 2~3 d 传代 1 次。实验时,取对数生长期细胞。

1.2 主要试剂 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);MTT、DMSO(美国 Sigma 公司);总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、PCR 试剂盒、DNA Marker(北京天根生化科技有限公司);LY294002、PI 单染周期检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);Skp2、GAPDH 引物(南京金斯瑞生物科技有限公司);β-actin、Skp2 鼠抗人单克隆抗体、山羊抗小鼠二抗(美国 Santa Cruz 公司);细胞培养板(美国 Corning 公司)。

1.3 MTT 比色法测定 取对数生长期 K562 细胞,调节细胞浓度为 5 × 10⁴ /ml,每孔 100 μl 种植于 96 孔培养板中。实验组 LY294002 终浓度分别为 2.5、5、10、20、40、60 μmol/L,每个浓度设 3 个复孔,同时设阴性对照组和空白调零组,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24、48 h 后,每孔加 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl,继续孵育 4 h 后终止培养,加 DMSO 150 μl/孔,室温振荡 10 min 后,于波长 570 nm 处读取吸光度(OD)值。取 3 孔 OD 值的均数按公式计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率(%) = (1 - OD_{实验组} / OD_{对照组}) × 100%

1.4 流式细胞术检测细胞周期 常规培养 K562 细胞,取对数生长期细胞调节细胞浓度为 5 × 10⁴ /ml,2 ml 每孔接种于 6 孔培养板,分对照组、LY294002 终浓度为 10、20 μmol/L 的实验组。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 36 h,收集细胞,预冷 PBS 洗涤 1 次,离心去除 PBS,加入预冷的 70% 乙醇溶液固定细胞 12~24 h,离心弃去固定液,PBS 洗涤 1 次后收集细胞于流式管,每管细胞样品中加入预先配置好的含有 RNase A 和 PI 的染色液 0.5 ml,缓慢并充分重悬细胞,37 °C 避光孵育 30 min,随后冰浴放置并用 BD 流式细胞仪在 488 nm 激发波长下

检测红色荧光和光散射情况,Flowjo 软件分析细胞周期。

1.5 RT-PCR 法检测 Skp2 mRNA 表达 取对数生长期 K562 细胞接种于 6 孔板,分对照组、LY294002 终浓度为 10、20 μmol/L 的实验组。用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养 36 h,收集细胞。按照试剂盒说明提取总 RNA,检测 RNA 提取纯度及浓度,每组取 2 μg RNA 进行逆转录,并对各组细胞的目的基因 Skp2 和内参基因 GAPDH 进行 PCR 扩增。扩增条件为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 45 s,32 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,BIO-RAD 凝胶成像仪检测条带并分析灰度值,计算各组 Skp2 mRNA 相对量。实验重复 3 次。见表 1。

表 1 待测基因的 PCR 引物序列及扩增片段长度

基因	引物序列	扩增长度 (bp)
Skp2	F: 5'-GTGATTCGCCTAGCGTCTG-3'	226
	R: 5'-TATGCCGTGGAGGGTGA-3'	
GAPDH	F: 5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'	496
	R: 5'-AGCCTTCTCCATGCTGGTGAAGAC-3'	

1.6 Western blot 法检测 Skp2 蛋白表达的变化 取对数生长期 K562 细胞接种于 6 孔板,分对照组、LY294002 终浓度为 10、20 μmol/L 的实验组,培养 36 h 后收集细胞,加蛋白裂解液冰上裂解 30 min,采用 BCA 法对各组蛋白进行定量检测。每组取 25 μg 蛋白,10% SDS-PAGE 电泳,转膜至 PVDF 膜,封闭液室温封闭 3 h;小鼠抗人 Skp2 一抗按 1:1 000 稀释,小鼠抗人 β-actin 一抗按 1:3 000 稀释,4 °C 摇床上孵育过夜;TBST 洗膜 10 min,重复 3 次;山羊抗小鼠二抗按 1:5 000 稀释,37 °C 孵育 2 h;TBST 洗膜 10 min,重复 3 次;最后用 ECL 发光试剂盒显影;BIO-RAD 凝胶成像仪检测条带并进行灰度值分析,计算各组 Skp2 蛋白相对量。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各处理组间差异采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法。

2 结果

2.1 不同浓度 LY294002 对 K562 细胞增殖抑制作用 MTT 法检测各组细胞的增殖抑制率的结果表

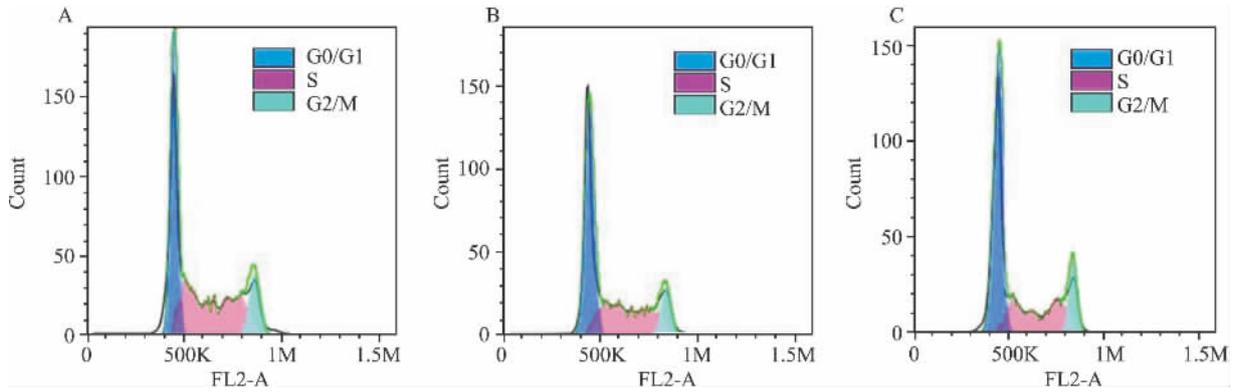


图1 流式细胞术检测 LY294002 作用 K562 细胞 36 h 后各组细胞周期分布情况

A: 对照组; B: 10 μmol/L LY294002; C: 20 μmol/L LY294002

明: 不同浓度 LY294002 对 K562 细胞的增殖均有抑制作用, 在相同作用时间下, 增殖抑制作用与 LY294002 浓度呈正比关系, 浓度越高, 抑制作用越强; 在同一浓度下, LY294002 作用时间越长, 细胞增殖抑制率越高, 表现出时间-剂量依赖性, 见表 2。

2.2 LY294002 对细胞周期的影响 LY294002 作用于 K562 细胞 36 h 后, 流式细胞术检测结果表明: LY294002 能显著改变 G0/G1 与 S 期细胞的比例。与对照组相比, 随着 LY294002 浓度的升高, S 期细胞比例逐渐减少, G0/G1 期细胞则呈现出逐渐增加的趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), G2/M 期细胞没有显著变化 ($P > 0.05$)。见图 1、表 3。

表 2 不同浓度 LY294002 作用不同时间后 K562 细胞的增殖抑制率 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

LY294002 浓度 (μmol/L)	24 h	48 h
2.5	3.04 ± 0.51	13.15 ± 1.32* #
5	12.41 ± 1.27*	23.31 ± 2.15* #
10	17.80 ± 2.31*	36.65 ± 3.31* #
20	26.99 ± 4.12*	50.93 ± 3.72* #
40	36.28 ± 3.15*	64.57 ± 4.07* #
60	51.91 ± 4.29*	75.80 ± 3.51* #

与对照组(0 μmol/L LY294002) 比较: * $P < 0.05$; 与同一浓度的 24 h 实验组比较: # $P < 0.05$

表 3 LY294002 对 K562 细胞周期分布的影响 (% $\bar{x} \pm s$)

LY294002 浓度 (μmol/L)	G0/G1	S	G2/M
0	45.21 ± 2.11	43.35 ± 2.34	12.97 ± 1.02
10	53.71 ± 2.52*	35.79 ± 1.98*	13.05 ± 0.95
20	61.74 ± 3.21* #	27.51 ± 2.65* #	11.89 ± 1.53

与对照组(0 μmol/L LY294002) 相比: * $P < 0.05$; 与 10 μmol/L LY294002 组比较: # $P < 0.05$

2.3 LY294002 对 Skp2 mRNA 表达的影响 RT-PCR 法结果显示: 与对照组相比, 10、20 μmol/L LY294002 作用 K562 细胞 36 h 后, Skp2 mRNA 的表达受影响, 相对表达量分别为 0.367 ± 0.035 、 0.242 ± 0.025 , 与对照组 (0.476 ± 0.027) 相比, 表达量明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

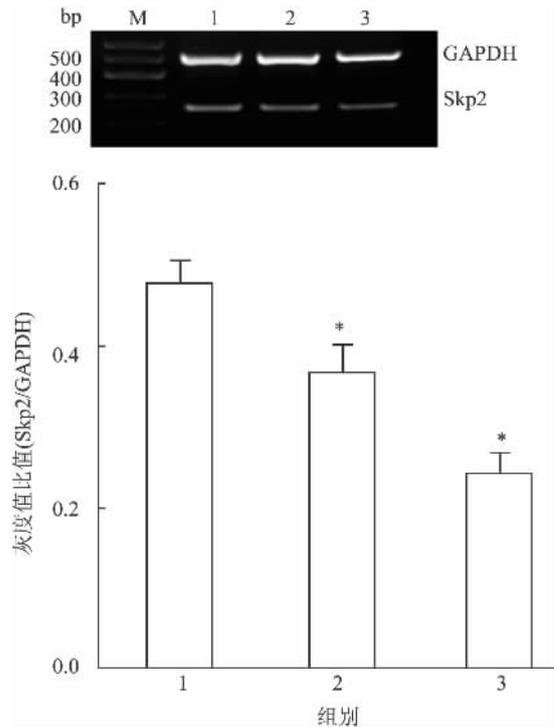


图 2 LY294002 作用于 K562 细胞 36 h 后 Skp2 mRNA 的表达变化 M: Marker; 1: 对照组; 2: 10 μmol/L LY294002 组; 3: 20 μmol/L LY294002 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 LY294002 对 Skp2 蛋白表达的影响 Western blot 法结果表明, 经 LY294002 作用 36 h 后, Skp2 蛋白的表达量显著降低, 10、20 μmol/L LY294002 实验

组 Skp2 蛋白相对表达量分别为 0.528 ± 0.091 和 0.349 ± 0.067 ,与对照组 (0.695 ± 0.077) 比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 。见图 3。

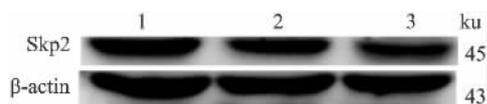


图3 LY294002 作用于 K562 细胞 36 h 后 Skp2 蛋白的表达
1: 对照组; 2: 10 μmol/L 组; 3: 20 μmol/L 组

3 讨论

白血病是一类造血干细胞的恶性克隆性疾病,是最常见的血液系统恶性疾病。当前临床使用的治疗药物多数为细胞毒类药物,此类药物一般抑制细胞的 DNA 和蛋白质合成等基本机能,所以对正常细胞也有毒性,从而引起一系列的毒副作用等。20 世纪末以来,分子靶向抗癌药物成为肿瘤治疗研究最活跃的领域之一。此类药物一般作用于肿瘤细胞的特定分子靶点,利用肿瘤细胞与正常细胞在基因、酶、信号转导等方面的异常,选择性抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移等恶性生物行为,从而产生抗肿瘤作用,而对正常细胞的副作用较小。因此分子靶向抗癌药物很少产生传统化疗的毒副作用。

PI3K 为一类脂激酶,主要催化磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸(PIP2)磷酸化形成磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸(PIP3),继而激活下游的 Akt(蛋白激酶 B)等促进细胞的生存、增殖、转移以及血管生成。生理状态下,Akt 以低活性存在于细胞质中,当各种因素刺激时,Akt 在 PI3K 作用下发生磷酸化而激活。PI3K/Akt 信号通路诱导细胞的增殖、分化,避免细胞发生凋亡,此信号通路作为细胞生长增殖的重要转导通路,在维持细胞恶性生物学特性中起重要作用^[5]。因此抑制该信号通路成为肿瘤治疗靶点之一。LY294002 改造自槲皮素,是经典的 PI3K 抑制剂,其可以在上游非特异性地阻断 PI3K/Akt 信号通路,诱导肿瘤细胞凋亡^[6-7]。在细胞增殖实验中发现 LY294002 体外作用 K562 细胞后,细胞增殖抑制率随着作用时间和作用浓度的增加而逐渐增强,为明确 LY294002 抑制白血病细胞增殖的机制,本研究选取 36 h 这个时间点通过细胞周期实验和检测细胞周期中重要的调节因子 Skp2 做进一步的探究。细胞周期调控与细胞增殖密切相关,在细胞周期调

控中其增殖的速度是由 G1 期的长短决定的,当处于 G0/G1 细胞越多,S 期细胞越少时细胞的增殖速度就会越低,这也是很多抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞增殖的机制之一,该研究显示在不同浓度 LY294002 作用下,S 期细胞比例减少,G0/G1 期细胞增加,即表现为细胞被阻滞于 G0/G1 期,且这种阻滞效应随着 LY294002 浓度的升高而更加明显,而 G2/M 期变化不大。这与李焘等^[8]在脑胶质瘤 U87 细胞株的研究结果相近。因此可以认为 LY294002 的使用产生了周期阻滞,抑制了 K562 细胞的增殖过程。

Skp2 是细胞周期中重要的调节因子,能特异性识别磷酸化底物并介导其泛素化降解,许多细胞周期调控因子如 p27、P21、cyclinE、cyclinD 和 C-myc 等都是 Skp2 依赖性泛素蛋白酶体途径底物。研究^[9-11]表明,Skp2 能够负调控细胞周期调节因子 p27,下调的 p27 能够使细胞顺利通过 G1-S 期调控点,完成 G1→S 期的转变。Skp2 在肿瘤细胞中异常高表达,与多种恶性肿瘤的发生和发展密切相关^[12]。Skp2 的表达降低能够抑制肿瘤细胞的周期转换,从而影响肿瘤细胞增殖^[13]。本研究结果表明 LY294002 作用 K562 细胞 36 h 后 Skp2 mRNA 和 Skp2 蛋白水平随药物浓度增加而显著下降,使细胞周期不能顺利通过 G1-S 期的调控点,阻滞在 G0/G1 期,S 期细胞减少。由此推测,阻断 PI3K/Akt 通路的抗肿瘤细胞增殖效应可能是通过下调 Skp2 的表达来实现的。

综上所述,LY294002 能够通过抑制 Skp2 的表达,使 K562 细胞的生长周期受影响,无法顺利通过 G1-S 期限制点,形成 G0/G1 期阻滞,从而抑制 K562 细胞的增殖,为 PI3K/Akt 信号通路成为白血病治疗靶点奠定理论与实验基础。

参考文献

- [1] Polak R, Buitenhuis M. The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia[J]. *Blood*, 2012, 119(4): 911-23.
- [2] Almhanna K, Strosberg J, Malafa M. Targeting AKT protein kinase in gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(12): 4387-92.
- [3] Dery M C, Chaudhry P, Lebaanc V, et al. Oxytocin increases invasive properties of endometrial cancer cells through phosphatidylinositol 3-kinase/AKT dependent up regulation of cyclooxygenase-1, 2, and X-linked inhibitor of apoptosis protein[J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(6): 1133-42.
- [4] Liu Y Y, Zhang X, Ringel M D, et al. Modulation of sodium io-

- dide symporter expression and function by LY294002, Akt1/2 and rapamycin in thyroid cells[J]. *Endocr Relat Cancer* 2012, 19(3): 291–304.
- [5] 黄成, 李俊, 马陶陶. PI3K/Akt 信号通路与肝纤维化[J]. *中国药理学通报* 2011, 27(8): 1037–41.
- [6] Hu L, Zaloudek C, Mills G B, et al. *In vivo* and *in vitro* ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3 kinase inhibitor (LY294002) [J]. *Clin Cancer Res* 2009, 15(3): 880–6.
- [7] Itoh N, Semba S, Ito M, et al. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma[J]. *Cancer* 2002, 94(12): 3127–34.
- [8] 李焘, 王雄伟, 曾晖, 等. LY294002 联合多柔比星对脑胶质瘤 U87 细胞株增殖的影响[J]. *广东医学* 2012, 33(15): 2223–5.
- [9] Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, et al. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer [J]. *Clin Invest* 2002, 110(5): 633–41.
- [10] Sutterlüty H, Chatelain E, Marti A, et al. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells[J]. *Nat Cell Biol* 1999, 1(4): 207–14.
- [11] Carrano A C, Eytan E, Hershko A, et al. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27 [J]. *Nat Cell Biol* 1999, 1(4): 193–9.
- [12] Zhu L. Skp2 knockout reduces cell proliferation and mouse body size and prevents cancer [J]. *Cell Res* 2010, 20(6): 605–7.
- [13] Su Y, Wang F, Qi H, et al. Small interfering RNA targeting of S-phase kinase-interacting protein 2 inhibits cell proliferation of pterygium fibroblasts [J]. *Mol Vis* 2011, 17(1): 247–56.

LY294002 targeting PI3K/Akt signal pathway inhibit the proliferation of K562 cells

Geng Yinghua^{1,2}, Wu Wenjuan³, Yu Beikai⁴, et al

(¹Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Hematology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004;

³Dept of Biochemistry and Molecular Biology, ⁴Research Center of Clinical Laboratory Science, Bengbu Medical College, Bengbu 233030)

Abstract Objective To explore the inhibition effects of LY294002 (PI3K/Akt inhibition) on the proliferation and correlated regulatory factors of chronic myeloid leukemia cell line K562. **Methods** The effect of LY294002 on the proliferation of K562 cells were evaluated by MTT assays. K562 cells were cultured with 10–20 μmol/L LY294002 for 36 h. Flow cytometry analysis was used to determine the cell cycle. RT-PCR was applied to measure the expression of S phase kinase associated protein 2 (Skp2) mRNA. Western blot was used to analyze Skp2 phenotypes. **Results** Administered with LY294002, the proliferation of K562 cells were inhibited, the inhibition was in dose and time dependent manners ($P < 0.05$). The G0/G1 period rate of K562 cells gradually raised and S period obviously decreased ($P < 0.05$). The expression of Skp2 mRNA down-regulated, after K562 cells treated by LY294002 for 36 h. Compared with normal control group, the expression of Skp2 protein was significantly lower. **Conclusion** LY294002 can inhibit proliferation of K562 cells, induce G0/G1 period arrest, which possibly through the regulation of Skp2 expressions.

Key words LY294002; PI3K/Akt; Skp2; K562