

# 抑制 PI3 K/ Akt 通路提高 HeLa 细胞化疗效果的实验研究

夏 曙,于世英

Improving Chemotherapy Effect of HeLa Cells by Inhibiting PI3 K/ Akt Signal Transduction

XIA Shu, YU Shi-ying

Cancer Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

**Abstract:** **Objective** To explore the lethal effect role of the therapeutic alliance of inhibiting PI3 K/ Akt signal transduction and anticancer drugs in HeLa cells of cervix cancer. **Methods** Detect the inhibition ratio of celecoxib, DDP and docetaxel in HeLa or associated with PI3 K inhibitor-L Y294002 by Mono-nuclear cell direct cytotoxicity assay (MTT). Detect the apoptosis ratio of Celecoxib, DDP and Docetaxel in HeLa or associated with PI3 K inhibitor-L Y294002 by flow cytometer. **Results** 1. The inhibition ratio was enhanced significantly by the combination application of Celecoxib, DDP, Docetaxel with L Y294002; 2. The combination index of L Y294002 with Celecoxib, DDP or Docetaxel is below 1; 3. The apoptosis of HeLa cells is increased by the combination application of L Y294002. **Conclusion** The tumor cells lethal effect of Celecoxib, DDP or Docetaxel could be increased significantly by the combination application of inhibiting PI3 K signal transduction.

**Key words:** PI3 K/ Akt; Combination index; Apoptosis

**摘 要:** **目的** 探讨抑制 PI3 K/ Akt 信号转导通路提高抗癌药物对人宫颈癌 HeLa 细胞的杀伤作用。 **方法** 采用 MTT 法检测 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 单独或联合 PI3 K 抑制剂 L Y294002 对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制率;采用流式细胞技术检测药物单独或联合作用对 HeLa 细胞凋亡的影响。 **结果** (1)联合 L Y294002 能够显著提高 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 对 HeLa 细胞抑制率;(2)L Y294002 与 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 的协同治疗指数均小于 1,二者起协同治疗作用;(3)联合 L Y294002 能够增加 HeLa 细胞的凋亡水平。 **结论** 抑制 PI3 K/ Akt 信号转导通路能够显著提高 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 对 HeLa 细胞杀伤作用。

**关键词:** PI3 K/ Akt; 协同治疗指数; 细胞凋亡

中图分类号:R73-36+2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2006)03-0156-03

## 0 引言

近年的研究表明,磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinases, PI3 K)在肿瘤信号转导中起着重要的调节作用。细胞在一系列内外因素的作用下,通过启动 PI3 K/ Akt 信号转导通路,诱导细胞的增殖、分化,避免细胞发生凋亡。在肿瘤细胞逃避抗癌药物的杀伤过程中,PI3 K/ Akt 信号转导通路可能起了极其重要的作用,因此 PI3 K/ Akt 信号转导通路有望成为恶性肿瘤治疗的新靶点。我们进行了 PI3 K 抑制剂联合抗癌药物对肿瘤细胞杀伤作用的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人宫颈癌细胞系 HeLa 细胞为本研究室保存。PI3 K 抑制剂 L Y294002 购自美国 Cell Signaling 公司;多西紫杉醇(Docetaxel)由法国罗纳普朗克-乐安公司生产;顺铂(DDP)由江苏豪森药业股份有限公司生产;塞来西布(Celecoxib)由合肥森瑞化工有限公司生产。RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司。FACSsort 流式细胞仪为美国 Becton Dickson 公司产品。

### 1.2 细胞培养

HeLa 细胞由含有 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养液于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的细胞培养箱培养,实验使用细胞均为接种后 24h 处于对数生长期细胞。

### 1.3 细胞抑制率测定

采用 MTT 法检测 HeLa 细胞的抑制率。取对

收稿日期:2005-04-01;修回日期:2005-05-26

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤中心

作者简介:夏曙(1974-),男,博士在读,住院医师,主要从事肿瘤多药耐药及放射生物学研究

数生长期细胞消化制成细胞悬液,按  $10^3 \sim 10^4$ /孔,每孔 200 $\mu$ l 接种 96 孔细胞培养板。37、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养 24h 后,加入不同浓度药物,每个样本设 8 个平行孔。L Y294002 的终浓度为 5,10,20,40,80 $\mu$ M,DDP 的终浓度为 5,10,20,40,80 $\mu$ g/ml,Celecoxib 的终浓度为 80,100,120,140,160 $\mu$ mol/L,Docetaxel 的终浓度为 0.1,0.5,1,5,10 $\mu$ g/ml。两药合用(DDP + L Y294002, Celecoxib + L Y294002, Docetaxel + L Y294002) 药物浓度采用 1:1 方案。设空白孔对照,给药后继续置于 37、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养 24h,每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml) 20 $\mu$ l 培养 4h,彻底吸去培养液,加入二甲基亚砜 150 $\mu$ l/孔,震荡 10min,酶标仪 492nm 激光检测吸光度。计算细胞抑制率(抑制率 = 1 - 加药物孔的吸光度值/未加药物孔的吸光度值  $\times 100\%$ )。实验重复 3 次。

1.4 结果判定

根据周廷潮等<sup>[1]</sup>药物效应中效方程式  $f_a/f_u = (D/D_m)^m$ ,进行中效作图  $y = \log f_a/f_u, x = \log D, y = ax + b$ ( $f_a$  为效应,  $f_u = 1 - f_a$ ,  $D$  为药物浓度,  $D_m$  为中效剂量,即 0.5 效应时的药物浓度,  $m$  为斜率)。计算两药单用及合用时的中效浓度(IC<sub>50</sub>)。然后根据公式计算合用指数(combination index, CI)  $CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + [(D)_1(D)_2] / [(D_x)_1(D_x)_2]$ ,  $(D)_1$ 、 $(D)_2$  为联合用药达到某一效应时药物 1 和药物 2 的浓度,  $(D_x)_1$ 、 $(D_x)_2$  为单独用药达到某一效应时药物 1 和药物 2 的浓度,  $CI = 1$  为两种相互非排斥性药物,  $CI = 0$  为两种相互排斥性药物。 $CI < 1$  协同,  $CI = 1$  相加,  $CI > 1$  拮抗。

1.5 细胞凋亡检测

分别 Celecoxib 80 $\mu$ mol/L, DDP 10 $\mu$ g/ $\mu$ l, Docetaxel 1 $\mu$ g/ $\mu$ l, L Y294002 20 $\mu$ M 单独及两药联合(Celecoxib 80 $\mu$ mol/L + L Y294002 20 $\mu$ M, DDP 10 $\mu$ g/ml + L Y294002 20 $\mu$ M, Docetaxel 1 $\mu$ g/ml + L Y294002 20 $\mu$ M) 作用细胞 24h 后,制成细胞悬液 1000r/min 离心 5min 收集细胞,0.01 mol/l PBS 液冲洗 2 次,用 20-80%乙醇固定细胞,细胞悬液 1000r/min 离心 5min,去掉乙醇固定液,PBS 液洗涤 2 次,调整细胞浓度为  $5 \times 10^5$ /ml,加入 PI 染液 1ml (50 $\mu$ g/ml PI, 100 $\mu$ g/ml RNase, 0.1% Triton-100), 4 孵育 60min, 200 目钢筛过滤,流式细胞术分析细胞周期和凋亡。

2 结果

2.1 单药及两药合用细胞抑制率改变

表 1 HeLa 细胞药物单独及联合作用对细胞半数抑制浓度的影响

组别	IC <sub>50</sub>	CI	细胞凋亡率
单独作用			
Celecoxib	185.74 $\pm$ 46.62 $\mu$ mol/L		7.15 $\pm$ 2.31
DDP	12.04 $\pm$ 2.58 $\mu$ g/ml		8.60 $\pm$ 1.96
Docetaxel	8.82 $\pm$ 2.36 $\mu$ g/ml		9.24 $\pm$ 2.84
L Y294002	24.23 $\pm$ 13.88 $\mu$ M		4.42 $\pm$ 1.2
联合作用			
Celecoxib + L Y294002 组		0.68	19.74 $\pm$ 4.25
Celecoxib	83.01 $\pm$ 0.18 $\mu$ mol/L		
L Y294002	5.53 $\pm$ 0.07 $\mu$ M		
DDP + L Y294002 组		0.94	28.39 $\pm$ 4.96
DDP	8.59 $\pm$ 3.03 $\mu$ g/ml		
L Y294002	8.59 $\pm$ 3.03 $\mu$ M		
Docetaxel + L Y294002 组		0.60	20.23 $\pm$ 4.21
Docetaxel	3.02 $\pm$ 0.85 $\mu$ g/ml		
L Y294002	7.26 $\mu$ M		

联合用药组 L Y294002 联合 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 的半数细胞抑制浓度(IC<sub>50</sub>) 均显著高于单独用药组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。所有联合用药组 CI 均  $< 1$ ,说明 L Y294002 与 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 起协同作用,见表 1。

2.2 单药及两药合用细胞对细胞凋亡的影响

联合用药组 L Y294002 联合 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 引起的细胞凋亡改变均显著高于单独用药组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。其中 L Y294002 联合 Celecoxib、DDP 能够显著引起人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡,见表 1、图 1。

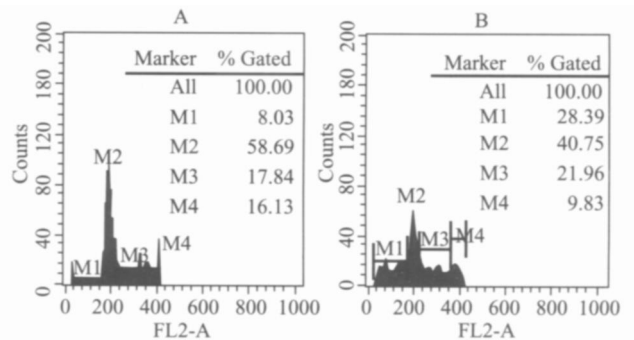


图 1 HeLa 细胞抗肿瘤药物单独和与 LY294002 联合应用细胞凋亡变化

A: 单独应用 DDP 作用; B: DDP 与 LY294002 联合作用。M1 细胞凋亡比例; M2 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例; M3 S 期细胞比例; M4 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例。

3 讨论

化疗是目前治疗恶性肿瘤的重要手段,但是肿瘤细胞通过一系列适应性反应逃避抗肿瘤药物对其的杀伤作用。引起肿瘤细胞耐药的机制很多,其中磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinases, PI3K)起了非常重要的作用。作为细胞生长、增殖

和抗凋亡的重要调节因素,PI3 K/AKT 信号转导通路在引起恶性肿瘤化学治疗和放射治疗抗拒中起着非常重要的作用。研究发现,PI3 K/AKT 的抑制因子 PTEN 突变或缺失的胰腺癌细胞对放化疗敏感性差<sup>[2]</sup>。Clark 等<sup>[3]</sup>在乳腺癌的研究中发现,化疗药物和 Tamoxifen 均能显著通过激活 PI3 K 提高活化的 AKT 的水平,导致细胞对化疗药物和 Tamoxifen 产生抗拒。Shingu 等<sup>[4]</sup>对恶性胶质瘤的研究中也发现,PI3 K/AKT 通路的激活使胶质瘤细胞产生明显的放化疗抗拒。

本实验研究发现,联合 L Y294002 和 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 能够显著地提高 DDP、Celecoxib 及 Docetaxel 对人宫颈癌 HeLa 细胞的抑制效率,同时联合作用能够增加 HeLa 细胞的凋亡。这说明抑制 PI3 K/AKT 信号转导途径可以增强 Celecoxib、DDP 及 Docetaxel 对人宫颈癌 HeLa 细胞的杀伤作用,PI3 K/AKT 信号转导途径的活化可能是导致肿瘤细胞发生耐药的一个重要原因。目前研究推测原因可能为:(1)化疗药物诱导肿瘤细胞中的 ras 癌基因表达增加,ras 蛋白激活 PI3 K/AKT 通路,使细胞产生化疗抗拒<sup>[5]</sup>;(2)化疗药物激活细胞蛋白酪氨酸激酶受体家族(包括 EGF 受体家族、PDGF 受体家族、VEGF 受体家族)和 NF 受体家族、IGF 受体家族,活化 PI3 K/AKT 通路,使细胞产生放化疗抗拒,抑制 IGF 受体家族能够减少 PI3 K/AKT 通路的活化,增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[6]</sup>。

PI3 K/Akt 信号转导途径抗细胞凋亡作用可能与下面几种机制有关:调节 bcl-2 家族成员的活性,促进 bcl-2 发挥抗凋亡作用<sup>[7]</sup>;抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族成员的活化;抑制 FKHR 进入细胞核诱导 FasL 的表达,从而抑制细胞凋亡<sup>[8]</sup>;防止线粒体释放细胞色素 C 及凋亡因子<sup>[9]</sup>。本研究中也发现,联合应用 L Y294002 能够显著地增加宫颈癌 HeLa 细胞的凋亡率,这说明抑制 PI3 K/Akt 信号转导途径能够有效地提高药物诱导的肿瘤细胞的凋亡。

近年来的研究认为,多途径多步骤的杀伤肿瘤

细胞和抑制肿瘤的生长是提高肿瘤治疗效果的重要方法。由于 PI3 K/Akt 信号转导通路在恶性肿瘤细胞中的过度活化,因此抑制 PI3 K/Akt 信号转导通路联合抗肿瘤药物提高肿瘤细胞化疗效果的有效方法及其机制是值得继续研究的。

#### 参考文献:

- [1] 周廷潮,韩锐,胥彬.多种药物协同及拮抗作用地定量分析原理在化疗中的应用[A].见:韩锐主编.肿瘤化学预防及药物治疗[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1991.315-320.
- [2] Bondar VM, Sweeney-Gotsch B, Andreeff M, et al. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(12): 989-997.
- [3] Clark AS, West K, Streicher S, et al. Constitutive and inducible AKT activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells[J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(9): 707-717.
- [4] Shingu T, Yamada K, Hara N, et al. Synergistic augmentation of antimicrotubule agent-induced cytotoxicity by a phosphoinositide 3-kinase inhibitor in human malignant glioma cells[J]. Cancer Res, 2003, 63(14): 4044-4047.
- [5] Gupta AK, Bakanauskas VJ, Cerniglia GJ, et al. The Ras radiation resistance pathway[J]. Cancer Res, 2001, 61(10): 4278-4282.
- [6] Sakuntala WG, Julie L, Elisabeth B, et al. The Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Kinase Inhibitor, NVP-ADW742, Sensitizes Small Cell Lung Cancer Cell Lines to the Effects of Chemotherapy[J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11(15): 1563-1571.
- [7] Gibson EM, Henson ES, Haney N, et al. Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release[J]. Cancer Res, 2002, 62(2): 488-496.
- [8] Bartling B, Tostlebe H, Darmer D, et al. Morawietz H. Shear stress-dependent expression of apoptosis-regulating genes in endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 278(3): 740-746.
- [9] Gibson EM, Henson ES, Haney N, et al. Epidermal growth factor protects epithelial-derived cells from tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by inhibiting cytochrome c release[J]. Cancer Res, 2002, 62(2): 488-496.

[编辑:安 凤]