

卵巢癌细胞PI3K/AKT通路与肾上腺髓质素促迁移作用的相关性研究*

邓博雅^① 韩 壮^② 焦今文^③ 张 颐^① 温 放^① 尚 海^④

摘要 目的:检测PI3K/AKT信号通路在肾上腺髓质素(AM)促卵巢癌细胞HO8910迁移中的作用。方法:利用划痕实验检测外源性AM对卵巢癌细胞HO8910迁移功能的影响,并且检测PI3K抑制剂Wortmannin对AM促进卵巢癌细胞迁移功能的干扰。为进一步研究AM对AKT磷酸化的影响,应用蛋白印迹法检测细胞AKT蛋白磷酸化的表达,应用整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抑制性抗体(mAb)拮抗AM对卵巢癌细胞AKT磷酸化作用。结果:外源性AM处理的卵巢癌细胞12 h迁移率(62.83 ± 4.46)%明显高于正常卵巢癌细胞的迁移率(30.26 ± 1.55)%($P < 0.001$),PI3K抑制剂Wortmannin干扰1 h后再用Am处理12 h,细胞迁移率为(40.44 ± 0.88)%,明显低于单纯应用AM刺激的细胞($P = 0.001$)。AM可以促进卵巢癌细胞迁移($P < 0.001$),PI3K抑制剂Wortmannin可以拮抗AM的促迁移作用($P = 0.001$)。AM可以促进细胞AKT蛋白磷酸化,Wortmannin、整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抑制性抗体均可以干扰AM对AKT蛋白磷酸化作用。结论:在卵巢癌HO8910细胞中,PI3K/AKT的活化是AM促进卵巢癌细胞迁移重要机制,而整合素 $\alpha 5\beta 1$ 可能作为感受器参与AM促进细胞PI3K/AKT通路的活化。

关键词 卵巢癌 肾上腺髓质素 PI3K/AKT 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 迁移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.16.008

Function of AKT Phosphorylation in AM Promotion of HO8910 Migration

Boya DENG¹, Zhuang HAN², Jinwen JIAO³, Yi ZHANG¹, Fang WEN¹, Hai SHANG⁴

Correspondence to: Yi ZHANG; E-mail: syzi@163.com

¹Department of Gynecology, ²Department of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China

³Department of Gynecology, The Affiliated Hospital of Qingdao University School of Medicine, Qingdao 266000, China

⁴Department of Hepatobiliary Surgery, The Liaoning Tumor Hospital, Shenyang 110042, China

This work was supported by the Liaoning Natural Science Foundation (No. 2009225035), Liaoning Education Foundation (No. 2009A775), and Shenyang Science and Technology Foundation (No. F11-262-9-14) to Yi Zhang

Abstract Objective: This study aims to investigate the function of PI3K / AKT in the adrenomedullin (AM) promotion of ovarian cancer cell migration. **Methods:** AM and Wortmannin, as inhibitors of PI3K / AKT, were used to impede AM function on cell migration. Wound healing test was performed to illustrate the migration ability of ovarian cancer cells. Western blot analysis was performed to analyze AKT protein levels and its phosphorylation pattern in cells after providing AM, Wortmannin, and integrin $\alpha 5\beta 1$ blocking antibody. **Results:** AM significantly improved the migration of the ovarian cancer cells ($P < 0.001$). Wortmannin inhibited AM function in HO8910 cell migration ($P < 0.001$). AKT phosphorylation in cells was significantly increased at 15 min after the addition of AM. Wortmannin and integrin $\alpha 5\beta 1$ blocking antibody reduced AKT phosphorylation by AM. **Conclusions:** AM induces ovarian epithelial cancer cell migration by phosphorylating PI3K/AKT via integrin $\alpha 5\beta 1$ activation.

Keywords Ovarian cancer; Adrenomedullin; PI3K / AKT; Integrin $\alpha 5\beta 1$; Migration

肾上腺髓质素(Adrenomedullin, AM)是由日本学者Kitattrra等^[1]于1993年自人肾上腺髓质嗜铬细胞瘤中发现并分离出来的一种多肽类物质,具有提高血小板cAMP生成和持续降压的作用,因其在肾上腺髓质中的含量高,故被称为肾上腺髓质素。AM在体内分布广泛,有多种生物学效应,可作为循环激素、旁分泌

激素及自分泌激素参与体内多种生理、病理过程^[2]。大量研究证明肿瘤细胞可以自分泌或旁分泌AM,且对肿瘤的发生、发展起着重要的作用^[3]。卵巢癌为高侵袭性的妇科肿瘤,出现症状时大多为晚期,盆腹腔广泛转移病灶,实施理想的减瘤术有一定的困难,其5年生存率仅25%~30%。研究报道,整合素 $\alpha 5\beta 1$ 可

作者单位:①中国医科大学附属第一医院妇科(沈阳市110001);②中国医科大学附属第一医院骨科;③青岛大学医学院附属西海岸医院妇科;④辽宁省肿瘤医院肝胆胰外科

* 本文课题受辽宁省科技厅社会发展攻关计划项目(编号:2009225035)、辽宁省教育基金项目(编号:2009A775)、沈阳市科学技术计划项目(编号:F11-262-9-14)资助

通信作者:张颐 syzi@163.com

以通过 c-Met/FAK/Src 信号传导通路促进卵巢癌细胞的侵袭转移^[4]。本实验组前期结果发现 AM 高表达的卵巢癌组织 FIGO 分期晚,外源性给予 AM 可以增加整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的表达,激活下游蛋白 FAK、paxillin,从而促进卵巢癌肿瘤细胞 HO8910 迁移^[5]。目前对 AM 促迁移作用的细胞内信号传导通路研究尚不完善。本实验旨在进一步检测 PI3K/AKT 信号传导通路对 AM 促细胞迁移的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 HO8910 细胞系(购于中国武汉典藏细胞库)用含 10%胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基培养,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中培养。70%融合度后以 AM(100 nM)处理。在抑制实验中,事先加入 Wortmannin(1 μ M)或整合素 $\alpha 5\beta 1$ 阻断性抗体(5 g/mL)1 h,再给予 AM(100 nM)刺激 12 h。

1.1.2 主要试剂 AM(Phoenix 公司); Wortmannin(Santa Cruz 公司);整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抑制性抗体(mAb)(BD 公司);抗兔抗人 AKT,鼠抗人磷酸化 AKT(santa cruz 公司);山羊抗鼠 IgG,山羊抗兔 IgG 均来自北京中杉金桥生物技术公司;RPMI1640(Gibico 公司)。

1.2 方法

1.2.1 划痕实验 采用划痕实验检测细胞的迁移能力,具体方法参照文献[6],简述如下:HO8910 细胞消化后计数,接种于 24 孔板,每孔 5×10^4 个细胞,培养 10 h 至细胞基本长满。10 μ L 枪头轻柔划出划痕,设计 3 个复孔,PBS 清洗细胞一遍后加入含 AM(100 nM)的 RPMI 1640 培养基。于 12 h 后镜下观察原来划痕的愈合情况,记录愈合面积,实验重复 3 次。愈合率=

(D1-D2)/D1 $\times 100\%$ (D1 为划痕后 0h 的划痕面积,D2 为愈合 12 h 后的划痕面积)。

1.2.2 Western blot 法检测 AKT、p-AKT 蛋白表达 实验组细胞给予 AM(100 nM)作用不同时间后收集各组细胞,用 PBS 缓冲液洗 3 次,细胞刮全面刮下细胞,加入 50 μ L 蛋白裂解液;4 $^{\circ}$ C,15 000 rpm 离心 30 min,收集上清,检测蛋白浓度,相应加入上样缓冲液,99 $^{\circ}$ C 5 min 煮沸。用 10%聚丙烯酰胺凝胶 120 V 恒压电泳分离,经 55 V 150 min 稳压转至硝酸纤维素膜,用抗 AKT、抗磷酸化 AKT 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗膜后用二抗室温孵育 2 h,纤维素膜用发光液作用 5 min,ECL 化学发光显影。而在抑制性实验中,提前 1 h 加入 5 μ g/mL 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抑制性抗体,或者 1 μ M Wortmannin 后,加入 AM(100 nM)作用 1 h,收集细胞提取蛋白。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件,应用 *t* 检验比较不同处理细胞之间的差异,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Wortmannin 抑制 AM 促卵巢癌细胞迁移作用

卵巢癌细胞 HO8910 在划痕后 12 h 的愈合率为 (30.26 \pm 1.55)%,应用 PI3K 抑制剂 Wortmannin(1 μ M) 处理后的愈合率为 (26.85 \pm 5.70)%,应用 AM(100 nM) 的细胞愈合率达 (62.83 \pm 4.46)%,同时应用 Wortmannin(1 μ M) 和 AM(100 nM) 的细胞愈合率为 (40.44 \pm 0.88)% (图 1、2)。提示 AM 有效促进卵巢癌细胞的迁移作用 ($P < 0.001$),并且 Wortmannin 抑制 AM 的促细胞迁移作用 ($P = 0.001$)。单纯应用 Wortmannin 并不影响 HO8910 细胞的迁移 ($P = 0.374$,图 1、2)。

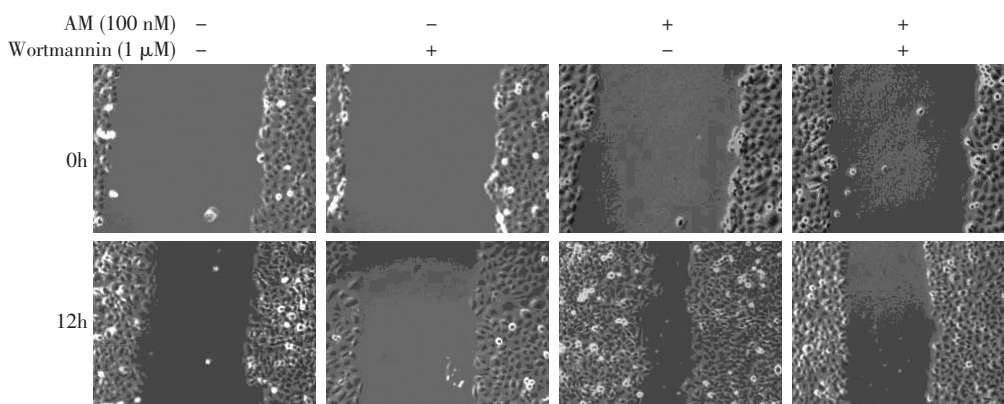
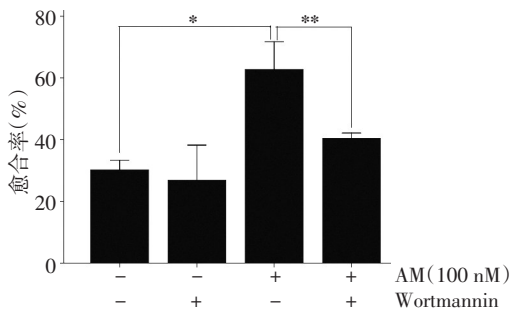


图1 划痕实验检测不同药物处理后细胞迁移能力($\times 100$)

Figure 1 Migration ability of HO8910 was measured using the wound healing test AM promoted HO8910 migration, while Wortmannin reduced the function of AM in cell migration ($\times 100$)



*:与对照组相比,AM处理后的HO8910细胞迁移能力增加($P<0.001$);
**:应用Wortmannin可拮抗AM对HO8910的促迁移作用($P=0.001$),愈合率为三次重复实验的平均值

图2 AM与Wortmannin对细胞迁移能力的影响

Figure 2 Effects of AM and Wortmannin treatments on cell migration

2.2 AM对AKT磷酸化的影响

Western blot法检测结果显示,外源性AM(100 nM)可以促进AKT的磷酸化,并且在AM作用15 min后即可以见到明显增高的磷酸化AKT,促磷酸化作用随AM作用时间的延长而加强,但AM对AKT总蛋白量无影响(图3)。而提前1h应用PI3K抑制剂Wortmannin可以拮抗AM促AKT的磷酸化作用(图4)。

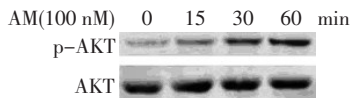


图3 AM对卵巢癌细胞HO8910的AKT磷酸化影响

Figure 3 AM promoted the AKT phosphorylation of HO8910 cells

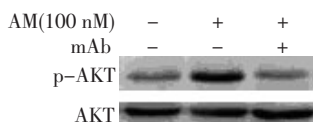


图4 Wortmannin抑制AM对卵巢癌细胞AKT磷酸化的影响

Figure 4 Wortmannin inhibited the AKT phosphorylation of HO8910 cells promoted by AM

2.3 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抑制性抗体(mAb)对AM促AKT磷酸化作用

提前1h应用整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的抑制性抗体可以阻断AM(100 nM)的促AKT磷酸化的作用,而单纯应用整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抑制性抗体并不影响AKT的磷酸化(图5)。

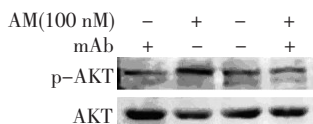


图5 整合素 $\alpha 5\beta 1$ 阻断性抗体对AM促AKT活化的影响

Figure 5 Integrin $\alpha 5\beta 1$ blocking antibody inhibits the phosphorylation of AKT activated by AM

3 讨论

肾上腺髓质素(AM)可以与AM特异性受体、

CGRP受体或降钙素受体样受体(CRLR)结合,通过特异性的具有单一跨膜功能的受体活性修饰蛋白而产生多种生物学效应^[7]。AM受体活化后主要通过激活Gs蛋白促进cAMP的生成,进一步激活PKA,此外PI3K/AKT、蛋白激酶C(PKC)和ATP依赖的K⁺通路等也参与AM生物学作用的发挥^[8-9]。前期利用细胞迁移实验证明了AM可以促进卵巢癌细胞HO8910的迁移^[5],本实验旨在研究AM促进卵巢癌细胞迁移的细胞内传导机制。

PI3K/AKT做为细胞内信号传导经典通路,可以被多种生长因子、细胞因子以磷酸化的形式激活,参与调节细胞周期、促增殖与分化^[10],AKT是PI3K/AKT信号通路关键分子,活化的AKT可以通过影响下游多种效应分子在肿瘤的发生发展过程中发挥作用。在卵巢癌的研究中,活化AKT的表达与卵巢癌FIGO分期呈正相关,对卵巢癌患者的预后有重要的意义^[10]。Kobayashi等^[11]发现AKT的活化明显促进卵巢癌细胞的侵袭转移。在本实验中检测到外源性AM可以在不干扰非磷酸化蛋白总量的前提下,促进卵巢癌细胞AKT磷酸化。随着作用时间延长,磷酸化AKT蛋白逐渐增加(最长检测时间为1h)。由于检测时间内未观察到AM促进AKT磷酸化作用的降低,所以AM促AKT磷酸化作用持续时间还有待后续研究。本次实验中我们应用PI3K通路抑制剂Wortmannin干扰后,发现可以有效拮抗外源性AM的促卵巢癌细胞迁移作用,提示AM可以通过活化AKT来促卵巢癌细胞的转移。Wortmannin还可以抑制AM的促AKT磷酸化作用,本试验证明PI3K/AKT是AM促卵巢癌细胞的迁移过程中的重要信号传导通路。这与AM通过活化AKT促进人脐静脉血管内皮细胞迁移机制相似^[9]。

PI3K/AKT通路在恶性肿瘤侵袭转移中起着重要的细胞内信号调控作用。而作为细胞基质的受体,整合素在肿瘤细胞侵袭转移的过程中则起到了“感受器”的作用。整合素 $\alpha 5$ 与 $\beta 1$ 形成特异性二聚体,作为纤维连接蛋白的特异性受体,与配体结合后可以通过促进FAK、paxillin的蛋白磷酸化,激活细胞内信号传导通路参与细胞的多种功能^[12-13]。抑制整合素 $\alpha 5\beta 1$ 的病毒重组蛋白可以有效的下调MMP-2,抑制卵巢癌细胞侵袭^[14]。在前期试验中发现外源性AM可以上调卵巢癌细胞的整合素 $\alpha 5$ 的表达,并可以激活整合素 $\alpha 5\beta 1$ 下游效应蛋白FAK、paxillin^[5]。为了进一步了解整合素在AM促卵巢癌细胞迁移信号传导中的作用机制,在本试验中应用了整合素 $\alpha 5\beta 1$ 抑制性抗体,发现AM促AKT磷酸化作用被整合素抑制性抗体所拮抗,提示整合素 $\alpha 5\beta 1$ 作为AM激活后的感受器可能参与到AM对AKT信号通路活化作用中,

从而构成由整合素 $\alpha 5\beta 1$ 介导的AM促PI3K/AKT信号通路活化,促进卵巢癌细胞的转移。其中的机制可能与Morozevich等^[15]在乳腺癌细胞中的研究相似:活化的整合素 $\alpha 5\beta 1$ 可以通过磷酸化AKT来激活下游金属基质蛋白MMP-2,促进肿瘤细胞的侵袭转移。

在本实验中发现PI3K抑制剂Wortmannin并未完全阻断AM的促卵巢癌迁移作用,说明PI3K/AKT并不是AM唯一的细胞信号传导通路,提示AM促卵巢癌细胞迁移过程中还可能存在着更多的分子机制,需要进一步的研究。

综上所述,本实验提出了一个新的卵巢癌细胞迁移的信号传导通路:AM可能通过活化PI3K/AKT通路,刺激卵巢癌细胞的迁移,而整合素 $\alpha 5\beta 1$ 可能作为AM信号感受器参与此通路的活化。

参考文献

- 1 Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. Adrenomedullin—A novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 192(2): 553—560.
- 2 Ishizaka Y, Tanaka M, Kitamura K, et al. Adrenomedullin stimulates cyclic AMP formation in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 200(1): 642—646.
- 3 Ramachandran V, Arumugam T, Hwang RF, et al. Adrenomedullin is expressed in pancreatic cancer and stimulates cell proliferation and invasion in an autocrine manner via the adrenomedullin receptor, AMR[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2666—2675.
- 4 Mitra AK, Sawada K, Tiwari P, et al. A novel, ligand independent activation of c-Met by alpha 5 beta 1—integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(2): 181—181.
- 5 Deng BY, Zhang SY, Miao Y, et al. Adrenomedullin expression in epithelial ovarian cancers and promotes HO8910 cell migration associated with upregulating integrin $\alpha 5\beta 1$ and phosphorylating FAK and paxillin[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1): 19.
- 6 Wang J, Stockton DW, Ittman M. The fibroblast growth factor receptor—4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(18): 6169—6178.
- 7 Kusano S, Kukimoto—Niino M, Hino N, et al. Structural basis for extracellular interactions between calcitonin receptor and receptor activity—modifying protein 2 for adrenomedullin—specific binding[J]. *Protein Sci*, 2012, 21(2): 199—210.
- 8 Hiradate Y, Ohtake J, Hoshino Y, et al. Adrenomedullin: a possible regulator of germinal vesicle breakdown[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 415(4): 691—695.
- 9 Pan CS, Jin SJ, Cao CQ, et al. The myocardial response to adrenomedullin involves increased cAMP generation as well as augmented Akt phosphorylation[J]. *Peptides*, 2007, 28(4): 900—909.
- 10 Guo RX, Qiao YH, Zhou Y, et al. Increased staining for phosphorylated AKT and nuclear factor—kappa B p65 and their relationship with prognosis in epithelial ovarian cancer[J]. *Pathol Int*, 2008, 58(12): 749—756.
- 11 Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, et al. Genetic down—regulation of phosphoinositide 3—kinase by bikunin correlates with suppression

- of invasion and metastasis in human ovarian cancer HRA cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(8): 6371—6379.
- 12 Sil H, Sen T, Chatterjee A. Fibronectin—Integrin (alpha 5 beta 1) Modulates Migration and Invasion of Murine Melanoma Cell Line B16F10 by Involving MMP—9[J]. *Oncol Res*, 2011, 19(7): 335—348.
 - 13 Jin YJ, Park AI, Hong IK, et al. Fibronectin and vitronectin induce AP—1—mediated matrix metalloproteinase—9 expression through integrin alpha(5)beta(1)/alpha(v)beta(3)—dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(1): 125—134.
 - 14 Peng JM, Chen YH, Hung SW, et al. Recombinant viral protein promotes apoptosis and suppresses invasion of ovarian adenocarcinoma cells by targeting $\alpha 5\beta 1$ integrin to down—regulate Akt and MMP—2[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(2): 479—493.
 - 15 Morozevich G, Kozlova N, Cheglakov I, et al. Integrin alpha 5 beta 1 controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP—2 collagenase activity[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(14): 2219—2225.

(2012—03—22收稿)

(2012—06—21修回)

(本文编辑:郑莉)