

人参皂苷Rh₂与PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002对乳腺癌细胞转移和侵袭的影响^Δ

朴丽花^{1*}, 蔡英兰¹, 张默函¹, 姜京植¹, 金政^{1#}, 许祖德^{2#}(1. 延边大学组织胚胎学教研室, 吉林延吉 133000; 2. 复旦大学附属华山医院病理科, 上海 200040)

中图分类号 R285;R655 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)43-4050-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.43.06

摘要 目的: 研究人参皂苷Rh₂(Gensenoside Rh₂)与磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)信号通路抑制剂LY294002对乳腺癌细胞转移和侵袭的影响。方法: 试验分为对照(空白培养液)组、人参皂苷Rh₂(80 μmol/L)组、LY294002(50 μmol/L)组与人参皂苷Rh₂(80 μmol/L)+LY294002(50 μmol/L)组。人参皂苷Rh₂与LY294002体外作用于人乳腺癌细胞MCF7/Adr, Western blot法检测细胞基质金属蛋白酶(MMP) 2、P-糖蛋白(P-gp)、丝苏氨酸蛋白激酶(AKT)、磷酸化丝苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)蛋白表达;黏附试验观察细胞与基底膜的黏附力, Transwell法观察细胞侵袭能力和迁移能力。结果: 与对照组比较, 人参皂苷Rh₂组、LY294002组与人参皂苷Rh₂+LY294002组p-AKT、P-gp、MMP-2蛋白表达显著减弱, 细胞与基底膜的黏附力、细胞迁移能力与侵袭能力显著减弱($P < 0.05$); 人参皂苷Rh₂+LY294002组与人参皂苷Rh₂组、LY294002组比较以上指标差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 抑制PI3K/AKT信号通路可有效降低MCF7/Adr侵袭迁移能力, PI3K/AKT通路是调控乳腺癌侵袭迁移的重要信号通路之一。

关键词 乳腺癌细胞; 人参皂苷Rh₂; 侵袭; 迁移; 磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶

Effects of Gensenoside Rh₂ Combined with PI3K/AKT Pathway Inhibitor LY294002 on Invasion and Migration of Breast Cancer Cells

PIAO Li-hua¹, CAI Ying-lan¹, ZHANG Mo-han¹, JIANG Jing-zhi¹, JIN Zheng¹, XU Zu-de²(1. Dept. of Histoembryology, Yanbian University, Jilin Yanji 133000, China; 2. Dept. of Pathology, Huashan Hospital Affiliated of Fudan University, Shanghai 200040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of ginsenoside Rh₂ and phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase (PI3K/AKT) pathway inhibitor LY294002 on invasion and migration of breast cancer cells. METHODS: Human breast cancer cell lines were divided into control group (blank culture), ginsenoside Rh₂ (80 μmol/L) group, LY294002 group (50 μmol/L) and ginsenoside Rh₂ (80 μmol/L)+LY294002 (50 μmol/L) group. Human breast cancer cell lines MCF7/Adr were cultured with ginsenoside Rh₂ and PI3K/Akt signaling pathway inhibitor LY294002 in vitro. The protein expressions of matrix metalloproteinases 2 (MMP-2), P-glycoprotein (P-gp), AKT and p-AKT were detected by Western blot. The cell-ground substance adhesion ability was tested by cell adherence assay; the cell invasion and migration were determined by Transwell chamber model. RESULTS: Compared with control group, the protein expressions of p-AKT, P-gp and MMP-2 were decreased in ginsenoside Rh₂ group, LY294002 group and ginsenoside Rh₂+LY294002 group; cell-ground substance adhesion ability and the cell invasion and migration were decreased significantly ($P < 0.05$). There was significant difference in above index among ginsenoside Rh₂+LY294002 group, ginsenoside Rh₂ group and LY294002 group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: The invasion and metastasis of MCF7/Adr can be reduced significantly through suppression of the PI3K/AKT signaling pathway. PI3K/AKT signaling pathway may be an important way to modulate invasion and metastasis of breast cancer.

KEY WORDS Breast cancer cells; Ginsenoside Rh₂; Invasion; Metastasis; PI3K/AKT

人参皂苷Rh₂(Gensenoside Rh₂)是从人参中提取的天然活性成分, 分子式为C₃₆H₆₂O₈H₂O, 分子质量622, 化学名为20(S)-人参二醇-3-氧-β-D-吡喃葡萄糖苷, 以往研究已经证实了它能在多个环节上抑制多种肿瘤细胞的增殖、促进肿瘤细胞凋亡

等^[1-3]。在对阿霉素(ADM)的前期试验中也发现人参皂苷Rh₂能显著增强人乳腺癌MCF7/Adr细胞对ADM的敏感性, 提高ADM在细胞内的聚积, 同时人参皂苷Rh₂也能明显抑制ADM对细胞P-糖蛋白(P-gp)水平的上调, 从而证实人参皂苷Rh₂确实具有耐药逆转作用^[4]。近年来研究显示, 磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)信号通路参与并促进了肿瘤的侵袭与转移。联合治疗已成为当今抗肿瘤研究的重要手段^[5-6], 两种药物协同作用有助于放大较弱的细胞信号。因此, 本研究笔者用PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002联合人参皂苷Rh₂处理MCF7/Adr细胞, 以观察其对乳腺癌细胞侵袭和迁移的影响。

Δ 基金项目: 延边大学科研启动基金资助项目(No. 950010003)

* 副教授, 博士。研究方向: 中草药基础。电话: 0433-2431523。

E-mail: piaolihua2004@yahoo.com.cn

#a 通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 中草药基础研究。电话: 0433-2435121。E-mail: jinzheng@ybu.edu.cn

#b 通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 肿瘤病理学。电话: 021-54237537。E-mail: zdxu@shmu.edu.cn

1 材料

1.1 仪器

PROTEAN3型垂直式电泳仪、SD型半干转印槽(美国Bio-Rad公司);Avanti30型低温高速离心机(美国Beckman Coulter公司);Vmax型酶标仪(美国Molecular Device公司);TS100型倒置显微镜(日本Nikon公司)。

1.2 药品与试剂

人参皂苷Rh₂(上海融禾医药科技发展有限公司,纯度:>98%);DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国Invitrogen公司);MTT、鼠抗β-actin单克隆抗体(美国Sigma公司);基底膜、Transwell室(美国BD公司);LY294002(美国Alexis Biochemicals公司);兔抗基质金属蛋白酶(MMP)2多抗、AKT、磷酸化丝苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);鼠抗P-gp单克隆抗体(德国Calbiochem公司);二抗羊抗兔、羊抗鼠(美国Rockland公司)。

1.3 细胞株

人乳腺癌MCF7/Adr细胞株购自中国科学院上海细胞研究所。

2 方法

2.1 细胞培养

MCF7/Adr细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基置于37℃、5%CO₂、95%空气饱和湿度培养箱培养,每2d更换培养液,0.25%胰蛋白酶消化传代。选用对数生长期MCF7/Adr细胞,实验分为四组,即对照(空白培养液)组、人参皂苷Rh₂(80 μmol/L)组、LY294002(50 μmol/L)组、人参皂苷Rh₂(80 μmol/L)+LY294002(50 μmol/L)组。

2.2 Western blot检测^[7]

当细胞生长融合至30%~40%时,MCF7/Adr细胞的培养液加入不同药物作用24h后,细胞裂解液提取细胞总蛋白,定量后取等量样本行SDS-PAGE电泳分离,然后将蛋白转移至PVDF膜上。将膜在封闭液中封闭2h,分别与P-gp、MMP-2、AKT、p-AKT、β-actin的一抗置4℃孵育过夜。洗膜后再与二抗室温孵育1h;TBST室温洗膜5min×3次;将膜转入新鲜配制的化学发光(ECL)孵育液中,室温孵育5min;转入X光暗盒中曝光3min,显影,定影。试验重复3次。

2.3 细胞黏附人工重组基底膜试验

96孔培养板每孔预铺基底膜10 μg/50 μl,置超净台内风干;培养板用2%牛血清白蛋白(BSA)封阻,置37℃孵育1h,PBS冲洗并弃去;收集对数生长期的MCF7/Adr细胞,终细胞密度为6×10⁵/ml,每孔加入100 μl,并设DMEM培养基调零孔,37℃培养1h;弃培养液,以PBS液轻轻冲洗3次除去未黏附细胞;弃去PBS,每孔加入100 μl DMEM培养基和50 μl MTT,继续培养4h。弃去MTT,每孔加入150 μl DMSO溶解,振荡15min,在570nm波长处测定其吸光度(OD)。每组平行设3个孔,试验重复3次。抑制率(%)=(1-用药组黏附细胞OD均值)/对照组黏附细胞OD均值×100%。

2.4 细胞体外侵袭试验^[8]

MCF7/Adr细胞接种于覆盖基底膜的Transwell室的上室,用含0.5%胎牛血清的DMEM培养基培养,下室加入含10%胎牛血清的DMEM培养基;48h后弃培养液,用棉签轻柔拭去膜上细胞,经HE染色后在倒置显微镜下计数。

2.5 细胞体外迁移试验

除Transwell室底部膜的内表面上未铺基底膜,其余操作同“2.4”项下方法。

2.6 统计学方法

用SPSS16.0软件完成统计学处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Western blot检测P-gp、MMP-2、AKT、p-AKT蛋白的表达

与对照组比较,人参皂苷Rh₂组、LY294002组、人参皂苷Rh₂+LY294002组AKT蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),人参皂苷Rh₂组、LY294002组、人参皂苷Rh₂+LY294002组P-gp、MMP-2、p-AKT蛋白表达显著减弱($P < 0.05$);与人参皂苷Rh₂组、LY294002组比较,人参皂苷Rh₂+LY294002组AKT蛋白表达显著减弱($P < 0.05$)。P-gp、MMP-2、AKT、p-AKT蛋白的表达见图1。

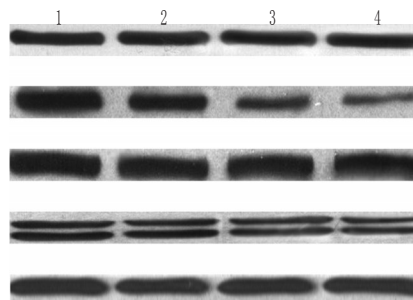


图1 P-gp、MMP-2、AKT、p-AKT蛋白的表达

1.对照组;2.人参皂苷Rh₂组;3.LY294002组;4.人参皂苷Rh₂+LY294002组

Fig 1 Expression of P-gp, MMP-2, AKT and p-AKT

1.control group; 2.ginsenoside Rh₂ group; 3. LY294002 group; 4. ginsenoside Rh₂+LY294002 group

3.2 人参皂苷Rh₂、LY294002、人参皂苷Rh₂+LY294002对MCF7/Adr细胞黏附的影响

与对照组比较,人参皂苷Rh₂组、LY294002组、人参皂苷Rh₂+LY294002组细胞对基质的黏附力能力显著降低($P < 0.05$)。MCF7/Adr细胞黏附试验结果见表1(黏附抑制率越高表明其黏附力越小)。

表1 MCF7/Adr细胞黏附试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Results of tests for cell-ground substance adhesion test of MCF7/Adr cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度, μmol/L	黏附细胞OD值	黏附抑制率, %
对照组		74.51 ± 3.65	
人参皂苷Rh ₂ 组	80	61.42 ± 4.46*	17.5*
LY294002组	50	60.68 ± 2.37*	18.7*
人参皂苷Rh ₂ +LY294002组	80+50	42.17 ± 3.82*	43.7*

与对照组比较: * $P < 0.05$

vs. control group: * $P < 0.05$

3.3 人参皂苷Rh₂、LY294002、人参皂苷Rh₂+LY294002对MCF7/Adr细胞侵袭的影响

与对照组比较,人参皂苷Rh₂组、LY294002组、LY294002+Rh₂组穿过微孔滤膜的细胞数显著减少($P < 0.05$);与人参皂苷Rh₂组、LY294002组比较,人参皂苷Rh₂+LY294002组穿过微孔滤膜的细胞数显著减少($P < 0.05$)。MCF7/Adr细胞侵袭试验结果见表2(过膜细胞数越少表明迁移能力越弱)。

3.4 人参皂苷Rh₂、LY294002、人参皂苷Rh₂+LY294002对

MCF7/Adr 细胞迁移的影响

与对照组比较,人参皂苷 Rh₂组、LY294002组、人参皂苷 Rgh₂+LY294002组穿过未铺基底膜微孔滤膜的细胞数显著减少 ($P<0.05$);与人参皂苷 Rh₂组、LY294002组比较,人参皂苷 Rgh₂+LY294002组穿未铺基底膜微孔滤膜的细胞数显著减少 ($P<0.05$)。MCF7/Adr 细胞迁移试验结果见表2(过滤细胞数越少表明侵袭能力越弱)。

表2 MCF7/Adr 细胞侵袭和迁移试验结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Results of invasion and metastasis tests of MCF7/Adr cells($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	浓度, $\mu\text{mol/L}$	穿膜细胞数	
		侵袭试验	迁移试验
对照组		60.26 \pm 5.36	65.14 \pm 3.38
人参皂苷 Rh ₂ 组	80	44.31 \pm 3.65*	47.31 \pm 6.21*
LY294002组	50	34.47 \pm 5.46*	45.47 \pm 4.55*
人参皂苷 Rh ₂ +LY294002组	80+50	27.84 \pm 7.24**	36.21 \pm 8.51**

与对照组比较: * $P<0.05$; 与人参皂苷 Rh₂组或 LY294002组比较: # $P<0.05$

vs. control group: * $P<0.05$; vs. ginsenoside Rh₂ group or LY294002 group: # $P<0.05$

4 讨论

近年来,乳腺癌的发病率逐年上升,严重威胁着女性的健康,病死率居世界癌症的第2位^[9]。化疗是治疗恶性肿瘤的传统方法,但肿瘤的多药耐药与复发转移是导致患者预后不良的重要原因之一。克服肿瘤细胞的耐药性,抑制转移是目前临床上亟需解决的问题。传统中草药提取的单体或有效成分,既保持有其天然温和的特性,又减轻了毒副作用,具有很大的优势^[10-11]。

临床研究发现,乳腺癌的耐药和转移之间存在一定相关性^[12],P-gp的高表达除了与多药耐药相关外,还与肿瘤的侵袭转移密切相关。研究发现,P-gp表达的增加,同时伴有MMP-2表达的增加。PI3K/AKT介导的信号通路是细胞内重要的信号转导通路,在多种肿瘤组织及细胞中PI3K/AKT信号通路参与调控P-gp与MMP-2的表达,从而调控肿瘤的多药耐药和侵袭转移^[13-16]。此外,PI3K/AKT信号通路抑制剂LY294002或Wortmanin则可以抑制肿瘤细胞的转移^[17]。本研究中笔者发现,经LY294002、Rh₂、人参皂苷 Rh₂+LY294002处理模型MCF7/Adr细胞后,P-gp、MMP-2、p-AKT蛋白表达减弱,人参皂苷 Rh₂+LY294002组与人参皂苷 Rh₂组、LY294002组比较上述指标差异具有统计学意义($P<0.05$)。推测PI3K/AKT信号通路可能是通过调控P-gp与MMP-2的表达从而调节肿瘤的多药耐药和侵袭转移。在肿瘤的临床治疗中,联合应用能靶向抑制PI3K/AKT通路的药物可能会有效抑制肿瘤的侵袭转移。

肿瘤细胞侵袭或迁移过程中的关键步骤是穿过基底膜,这个过程包括通过细胞的表面受体黏附到基底膜上,分泌多种酶降解邻近的基底膜组织,在化学趋化物的作用下穿透移动到目标组织。本研究证实了人参皂苷 Rh₂对MCF7/Adr细胞的侵袭和迁移有明显的抑制作用,经人参皂苷 Rh₂和LY294002处理的细胞黏附力、侵袭力和迁移力明显降低,进而抑制了乳腺癌细胞的侵袭和迁移。

综上所述,本研究证明抑制PI3K/AKT信号通路可有效降低MCF7/Adr侵袭、迁移能力,PI3K/AKT通路是调控乳腺癌侵袭、迁移的重要信号通路之一。

参考文献

- [1] 胡硕,余建英,熊玲静,等. Rh₂逆转耐药细胞对顺铂抗性作用的机制[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(7): 264.
- [2] 吴歌,李红,杨世杰. 人参皂苷单体 Rh₂抑制小鼠前胃癌系细胞增殖及其机制[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 101.
- [3] 岳峰,周进朝. 人参皂苷 Rh₂对人食管癌 Eca-109 细胞 TFPI-2 表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(21): 2304.
- [4] 朴丽花,金政,蔡英兰,等. 人参皂苷 Rh₂抗乳腺癌细胞侵袭和转移的实验研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 27(11): 867.
- [5] Arafa el-SA, Zhu Q, Barakat BM, et al. Tangeretin sensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer cells through downregulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(23): 8910.
- [6] Li Y, Rory Goodwin C, Sang Y, et al. Camptothecin and Fas receptor agonists synergistically induce medulloblastoma cell death: ROS-dependent mechanisms [J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(9): 770.
- [7] 常和平,王思明,霍长虹,等. 木果楝内酯化合物抑制人肺肿瘤细胞增殖活性及作用机制的研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(6): 807.
- [8] 王燕燕,周政涛,崔向军,等. 蛋白激酶 C 抑制剂星形孢菌素对肺腺癌 A549 细胞侵袭力的影响研究[J]. 中国药房, 2010, 21(25): 2336.
- [9] 张众,李连宏, Xiao Gray Guishan, 等. MicroRNA 与乳腺癌侵袭转移的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 2012, 28(7): 713.
- [10] 刘晓霞,张永泽,李振红,等. 宝藜苷-I 对人食管癌细胞 Eca-109 Wnt/ β -catenin 信号转导通路的影响[J]. 中草药, 2011, 42(1): 124.
- [11] 朴丽花,蔡英兰,张默函,等. 人参皂苷 Rg₂在体外对肝癌细胞生长和凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(9): 659.
- [12] 卢烈盛,宋科瑛,王瑞涛,等. 乳腺癌原发灶和淋巴结转移灶 MDR1 mRNA 表达及与临床指标的相关性分析[J]. 肿瘤, 2009, 29(3): 276.
- [13] Yu P, Zhou L, Ke W, et al. Clinical significance of pAKT and CD44v6 Overexpression with breast cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(8): 1283.
- [14] Liu F, Liu S, He S, et al. Survivin transcription is associated with P-glycoprotein/MDR1 overexpression in the multidrug resistance of MCF-7 breast cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(5): 1469.
- [15] Tian T, Nan KJ, Guo H, et al. PTEN inhibits the migration and invasion of HepG₂ cells by coordinately decreasing MMP expression via the PI3K/Akt pathway[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(6): 1593.
- [16] Urso L, Muscella A, Calabriso N, et al. Effects of cisplatin on matrix metalloproteinase-2 in transformed thyroid cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(6): 810.
- [17] 王艳丽,高青. 抑制 PI3K/Akt 信号通路对胃癌细胞转移和侵袭影响的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(1): 27.

(收稿日期:2013-01-24 修回日期:2013-03-15)