

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.11.003

PI3K 通路抑制剂 LY294002 对人脑胶质瘤细胞株 U87 细胞衰老和凋亡的影响

赵兰夫 吕文海 陈 隆 张玉富 郑 涛 贺世明[△]

(第四军医大学唐都医院神经外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:PI3K/Akt 信号通路是与胶质瘤发生发展密切相关的核心通路之一,LY294002 是该通路的特异性抑制剂。本研究通过探讨 PI3K 通路抑制剂 LY294002 对 U87 胶质瘤细胞系细胞衰老及凋亡的影响,从而为胶质瘤患者治疗的新策略奠定理论基础。**方法:**将体外培养的人脑胶质瘤 U87 细胞株分为 DMSO 处理的对照组和 LY294002(100 μ M)处理的实验组,采用 β -半乳糖苷酶染色和流式细胞术的方法,分别检测并比较两组肿瘤细胞衰老和凋亡的情况。**结果:**LY294002 处理组 U87 胶质瘤细胞的衰老指数($32.20 \pm 4.46\%$)显著高于 DMSO 对照组($3.40 \pm 1.61\%$, $t=6.254$, $P<0.001$)。另外,与 DMSO 对照组相比,凋亡蛋白 caspase-3 mRNA 的表达在 LY294002 处理组胶质瘤细胞中显著上调($t=8.923$, $P<0.05$)。LY294002 处理组肿瘤细胞的凋亡指数($80.10 \pm 4.832\%$)明显高于 DMSO 对照组($4.260 \pm 1.073\%$, $t=8.923$, $P<0.05$)。**结论:**LY294002 既能够诱导肿瘤细胞衰老,又能够诱导肿瘤细胞凋亡,然而其诱导胶质瘤细胞凋亡的能力占据主导地位,为其发挥抗胶质瘤效应的主要途径。另外,在 LY294002 的持续作用下,部分衰老的肿瘤细胞或许会发生凋亡。这些结论为临床增强胶质瘤患者的联合化疗奠定了理论基础。

关键词:PI3K 通路;抑制剂;LY294002;细胞衰老;凋亡

中图分类号:R-332,Q95-3,R739.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)11-2011-04

Effect of PI3K pathway inhibitor LY294002 on cellular senescence and apoptosis of U87 human glioma cell line

ZHAO Lan-fu, LV Wen-hai, CHEN Long, ZHANG Yu-fu, ZHENG Tao, HE Shi-ming[△]

(Department of Neurosurgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: PI3K/Akt pathway plays important roles in the initiation and progression of gliomas, and LY294002 is the specific inhibitor of this pathway. In this study, we mainly investigate the effect of PI3K inhibitor LY294002 on cellular senescence and apoptosis in U87 human glioma cells to lay a foundation for new therapeutic strategies for glioma patients. **Methods:** U87 human glioma cells were divided into control group treated with DMSO and experimental group treated with LY294002 (100 μ M) in vitro. Using the methods of β -SA-Gal staining and flow cytometry, status of cellular senescence and apoptosis were detected and compared. **Results:** The senescence index of U87 glioma cells in LY294002 treated group ($32.20 \pm 4.46\%$) was significantly higher than that of the DMSO control group. In addition, comparing with the DMSO control group, expression of the apoptotic protein caspase-3 mRNA was significantly upregulated in LY294002 treated group ($t=8.923$, $P<0.05$). The apoptosis index of tumor cells in LY294002 treated group ($80.10 \pm 4.832\%$) was significantly higher than that of the DMSO control group ($4.260 \pm 1.073\%$, $t=8.923$, $P<0.05$). **Conclusion:** LY294002 can not only induce cellular senescence, but also induce apoptosis in tumor cells, while its potential to induce the apoptosis of glioma cells plays the dominant role, which is the main function to exert its anti-glioma effect. Furthermore, apoptosis might be induced in part of the senescent tumor cells under the sustained effect of LY294002. These results laid a theoretical foundation for the clinical enhancement of the combined chemotherapy in glioma patients.

Key words: PI3K pathway; inhibitor; LY294002; Cellular senescence; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-332, Q95-3, R739.4 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)11-2011-04

前言

胶质细胞瘤是中枢神经系统内发病率最高、恶性程度最高和死亡率最高的原发性恶性肿瘤,其发病率占所有脑肿瘤的70%以上^[1]。由于胶质瘤细胞浸润和侵袭的天性,使得单一的手

术治疗几乎不可能达到完全切除肿瘤的效果。因此,手术切除联合术后放/化疗是治疗这一恶性疾病主要的治疗手段^[2]。然而,胶质瘤细胞恶性程度高、增殖速度快、肿瘤异质性明显等特点导致该病对放疗、化疗极易产生耐受,使得联合化疗方案在这一恶性疾病的辅助治疗中显得尤为重要^[3]。磷脂酰肌醇-3激酶/丝-苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)信号传导通路的活化广泛存在于细胞中,在肿瘤细胞周期调控、增殖和分化、凋亡、蛋白质合成、细胞能量代谢等多种生命活动中发挥至关重要的作用,对肿瘤的发生发展亦起到核心的调控作用^[4-7]。近年多项研

作者简介:赵兰夫(1978-),男,硕士,研究方向:胶质瘤的诊断与治疗
[△]通讯作者:贺世明,157312514@qq.com,办公电话:029-84777735
(收稿日期:2013-10-25 接受日期:2013-11-25)

究证实,PI3K 特异性抑制剂 LY294002 能够诱导肿瘤细胞凋亡,在增强胶质瘤细胞对多种抗肿瘤药物的敏感性、减少肿瘤细胞对化疗药物的抵抗性中均发挥重要作用^[8-10]。然而,LY294002 对胶质瘤细胞衰老和凋亡的联合研究却未见报道。本研究以人脑胶质瘤细胞株 U87 为研究对象,通过 β -半乳糖苷酶染色和流式细胞术等方法,分别检测 LY294002 对 U87 细胞衰老和凋亡的影响,为临床增强胶质瘤的联合化疗奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

PI3K 通路特异性抑制剂 LY294002、二甲基亚砜(DMSO)和 Trizol 试剂均购自美国 Sigma 公司;细胞衰老 β -半乳糖苷酶(β -SA-Gal)染色试剂盒(C0602)购自中国上海碧云天生物技术有限公司;流式细胞术凋亡检测试剂盒购自美国 BioVision 公司;实时定量 PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司,由上海生工生物技术公司合成如下引物: β -actin 上游:5'-TGGCACCA-CACCTTCTACAA-3'; 下游:5'-GCAGCTCGTAGCTCTTC TCC-3'; caspase-3 上游:5'-CTGGTACAGATGTCGATGCAG-3'; 下游:5'-ATACAAGAAGTCGGCCTCCACT-3'。凝胶成像系统(GelDoc-IT TS2)购自美国 UVP 公司。人脑胶质瘤 U87 细胞株由第四军医大学唐都医院神经外科所保存。

1.2 细胞培养、处理因素及实验分组

U87 胶质瘤细胞株在含 10%胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液,以 37℃、5% CO₂ 的培养条件进行培养。取处于对数生长期的 U87 胶质瘤细胞并接种于十二孔板或 75 cm² 细胞培养瓶中,当细胞密度达 50%时,加入含 DMSO(对照组)或 100 μ M LY294002(实验组)的培养液。培养 48 h 后,分别利用 β -半乳糖苷酶染色或流式细胞术的方法检测细胞衰老和凋亡情况。

1.3 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老

将 1×10^5 个处于对数生长期的 U87 细胞接种于十二孔板中。当细胞密度达 50%时,以 DMSO 处理的 U87 细胞为对照组,以 100 μ M LY294002 处理的 U87 细胞为实验组,培养 48 h 后进行 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老情况。吸除细胞培养液,PBS 洗涤后,用 β -半乳糖苷酶染色固定液室温固定 15 min。吸除细胞固定液,PBS 洗涤后,每孔加入 500 μ l 的染色工作液,保鲜膜密封六孔板,37℃ 孵育过夜。吸除染色工作液,光学显微镜观察并拍照。衰老的阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 记为衰老指数(Senescence index, SI)。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

处理因素及实验分组同上。将 3×10^6 个处于对数生长期的 U87 细胞接种于 10 个 75 cm² 细胞培养瓶中(对照组和实验组各 5 瓶细胞, $n=5$),以 DMSO(对照组)或 100 μ M LY294002(实验组)处理 48 h,收集贴壁和悬浮的细胞。PBS 洗涤后,根据流式细胞技术商品化试剂盒的使用说明进行 Annexin V/PI 染色。凋亡细胞的百分率记为凋亡指数(Apoptosis index, AI)。

1.5 Real-time PCR

胶质瘤细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR 反应分别按照 Trizol 说明书和 Taraka 公司 Real-time PCR 说明书的操作流程进行。反应体系见表 1。反应条件:首先 95℃ 预变性 5 min,依次

95℃ 20 s, 60℃ 20 s, 72℃ 10 s, 39 个循环, 72℃ 延伸 3 min 后结束反应。将 PCR 反应产物进行 2%的琼脂糖凝胶电泳,应用凝胶成像扫描仪进行分析并拍照。

表 1 RT-PCR 反应体系

Table 1 Reaction system of RT-PCR

Reaction components	volume
cDNA	2.5 μ l
Forward primer(5 μ M)	0.5 μ l
Reverse primer(5 μ M)	0.5 μ l
Taq mix DNA polymerase	0.5 μ l
dNTP Mixture(5mM)	0.5 μ l
10 $\times$ PCR Buffer	2.5 μ l
ddH ₂ O	18 μ l
Total	25 μ l

1.6 统计学分析

所有统计学数据利用 SPSS13.0 软件进行分析,所有实验数据均使用 $\bar{x} \pm S$ 表示。其中,LY294002 处理组与 DMSO 对照组之间肿瘤细胞衰老指数和凋亡指数的统计学差异均采用 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 定义为具有统计学意义。

2 结果

2.1 LY294002 对 U87 细胞衰老的影响

倒置显微镜下,对照组(DMSO 处理)U87 细胞呈单层贴壁生长,生长密度大,胞体呈梭型或菱形,细胞突触细长,并且可见核分裂相(图 1A)。LY294002 处理后,U87 胶质瘤细胞密度变少,部分细胞胞体增大,呈扁平的三角形,颗粒感增强,可见空泡样的形态,表现为细胞衰老的形态学特征。利用 β -半乳糖苷酶染色,检测 U87 细胞的衰老情况。染色结果表明,经 LY294002 处理后,该部分胞体增大且扁平的肿瘤细胞显示为蓝色,其衰老特异性标记 SA- β -Gal 呈阳性表达,为衰老的肿瘤细胞(图 1B)。统计学分析结果表明,DMSO 对照组肿瘤细胞 β -半乳糖苷酶的阳性表达率为 $3.40 \pm 1.61\%$,而 LY294002 处理组肿瘤细胞 β -半乳糖苷酶的阳性表达率为 $32.20 \pm 4.46\%$ 。LY294002 处理组肿瘤细胞的衰老指数显著高于 DMSO 对照组,两者间的差异具有统计学意义(图 2, $t=6.254$, $P < 0.001$),说明特异性 PI3K 通路抑制剂 LY294002 能够诱导胶质瘤细胞衰老。

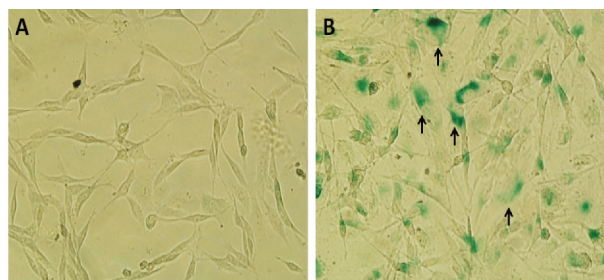


图 1 β -半乳糖苷酶染色法检测 DMSO(A)和 LY294002(B)处理的 U87 细胞衰老(400 $\times$)

Fig. 1 Cellular senescence detection of U87 cells treated with DMSO and LY294002 by s- β -Gal staining(400 $\times$)

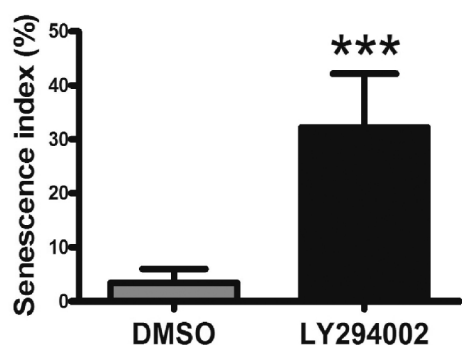


图2 DMSO(A)和 LY294002(B)处理对 U87 细胞衰老的影响

Fig. 2 Effect of treatment with DMSO (A) and LY294002 (B) on cellular senescence of U87 cells

2.2 LY294002 对 U87 细胞凋亡的影响

倒置显微镜下,胶质瘤细胞经 LY294002 处理后,部分肿瘤细胞体积变小,颗粒感增强,胞质透明度下降,胞核呈固缩状,细胞突触回缩变短,并且脱落的悬浮细胞较多,表明细胞形态遭受破坏。实时定量 PCR 检测 DMSO 对照组和 LY294002 处理组 U87 胶质瘤细胞中 caspase-3 mRNA 的表达,结果表明 LY294002 处理组 U87 胶质瘤细胞中 caspase-3 mRNA 的表达量显著高于 DMSO 对照组,两组间 caspase-3 mRNA 表达量的差异具有统计学意义(图 3, $t=8.923$, $P<0.05$)。利用流式细胞术的方法检测肿瘤细胞凋亡,结果表明 LY294002 处理组 U87 胶质瘤细胞的凋亡率为 $80.10\pm 4.832\%$,DMSO 对照组 U87 胶质瘤细胞的凋亡率为 $4.260\pm 1.073\%$ (图 4)。LY294002 处理组 U87 胶质瘤细胞的凋亡指数显著高于 DMSO 对照组(图 5),两组间肿瘤细胞凋亡率的差异具有统计学意义 ($t=8.923$, $P<0.05$)。

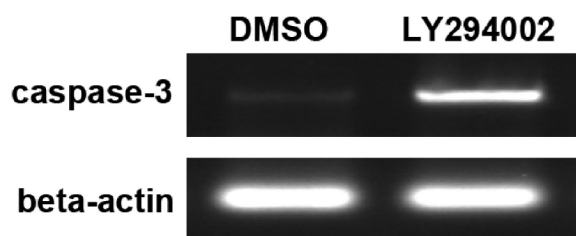


图3 实时定量 PCT 检测 DMSO 和 LY294002 处理的 U87 细胞 caspase-3mRNA 的表达

Fig. 3 Detection of caspase-3 mRNA expression in U87 cells treated with DMSO and LY294002 by real-time PCR

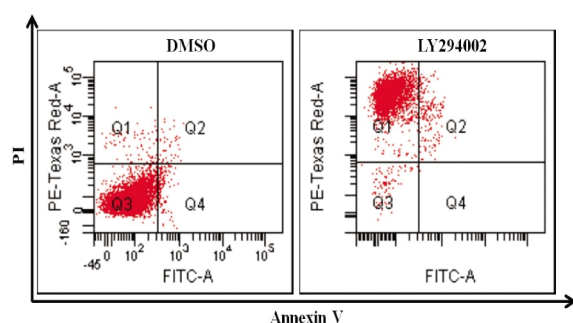


图4 流式细胞术检测 DMSO 和 LY294002 处理的 U87 细胞的凋亡

Fig. 4 Apoptosis detection of U87 cells treated with DMSO and LY294002 by flow cytometry

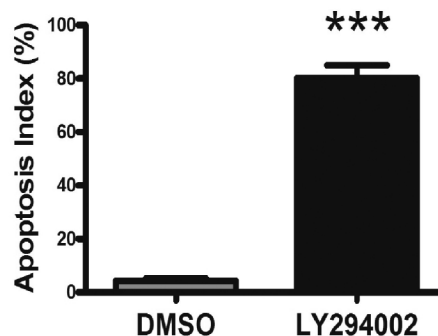


图5 DMSO 和 LY294002 处理对 U87 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of treatment with DMSO and LY294002 on apoptosis of U87 cells

3 讨论

尽管近年来如神经导航技术和显微外科手术等针对胶质瘤治疗的多种策略取得了长足发展,但是胶质瘤患者的临床预后却并未得到显著的改善^[1]。目前,恶性胶质瘤治疗最有意义的突破为新一代烷化剂替莫唑胺的引入,然而却只将该病的总生存期从 12 个月延长至 15 个月,并且生存期达 2 年的患者不足 10%^[2]。肿瘤异质性能诱导肿瘤细胞对化疗药物产生固有性或获得性的化疗耐受,这也是包括烷化剂在内的所有化疗药物治疗失败的主要原因^[3]。因此,新分子靶向药物的研发与应用对临床药物的优化、联合化疗方案的选择与建立以及改善肿瘤患者的生存期都具有非常重要的意义。

研究表明,缺氧微环境是肿瘤细胞获得恶性行为能力的重要因素,而 PI3K/Akt 信号通路是与胶质瘤发生发展密切相关的核心通路之一,能够调控肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、迁移和扩散等多种重要的恶性行为,在恶性肿瘤化学治疗和放射治疗的耐受中亦起到至关重要的作用^[5-7,14-19]。近期,大规模基因组学分析表明抑癌基因 PTEN (phosphate and tension homology deleted on chromosome 10) 的突变或丢失是存在于胶质瘤发生发展过程中最显著的分子学特征之一。此外,抑癌基因 PTEN 又是抑制 PI3K/Akt 信号传导通路活性最重要的调控因子。因此,近年来胶质瘤分子靶向治疗的研究中,PI3K/Akt 信号传导通路成为备受瞩目的靶点^[10]。LY294002 能够显著地抑制 Akt 的磷酸化,是 PI3K/Akt 信号传导通路的特异性抑制剂。由于其分子量小,能够轻易的穿过血脑屏障,目前已成为该通路在胶质瘤发生发展中作用机制的研究热点^[20]。近年来,多项研究表明 LY294002 具有增强多种肿瘤细胞毒性药物的敏感性、减少化疗耐受的作用^[8]。但是 LY294002 对人胶质瘤 U87 细胞衰老及凋亡的影响却少有报道。

本研究首先通过β-半乳糖苷酶染色的方法检测 U87 胶质瘤细胞衰老的情况,结果表明:肿瘤细胞在 LY294002 的作用下能够进入衰老状态(图 1)。该抑制剂作用于人脑胶质瘤 U87 细胞后,其衰老指数($32.20\pm 4.46\%$)显著高于 DMSO 处理的胶质瘤细胞 ($3.40\pm 1.61\%$, $t=6.254$, $P<0.001$, 图 2)。同时 real-time PCR 的结果说明 LY294002 能够诱导胶质瘤细胞凋亡蛋白 caspase-3 的表达。与 DMSO 对照组相比,凋亡蛋白 caspase-3 mRNA 在 LY294002 处理组胶质瘤细胞中的表达显著

上调($t=8.923, P<0.05$,图3)。最终流式细胞仪检测也观察到 LY294002 可诱导胶质瘤细胞的凋亡(图4);LY294002 处理组的细胞凋亡指数 ($80.10\pm 4.832\%$) 明显高于 DMSO 对照组 ($4.260\pm 1.073\%, t=8.923, P<0.05$,图5)。总的来说,这些结果与之前文献报道一致,提示 LY294002 既能够诱导肿瘤细胞衰老,又能够诱导肿瘤细胞的凋亡,对胶质瘤细胞恶性行为与化疗耐受均起重要的调控作用^[4-11,13,14,20]。然而,LY294002 处理组 U87 细胞的凋亡指数 ($80.10\pm 4.832\%$) 却显著高于衰老指数 ($32.20\pm 4.46\%, t=7.289, P<0.001$)。这一结论可能提示:第一,相比于诱导细胞衰老的能力,LY294002 诱导胶质瘤细胞凋亡的能力占据主导地位,其发挥抗肿瘤效应的主要途径即为诱导肿瘤细胞的凋亡;第二,LY294002 或许能够逆转胶质瘤细胞的衰老状态,使其进入凋亡途径,从而发挥抗胶质瘤的效应。凋亡前期,肿瘤细胞会进入细胞周期阻滞的状态,从而激活由 p53 诱导的凋亡途径。衰老的肿瘤细胞虽具有生命活力并未凋亡,却不能进行有丝分裂进行增殖。因此,细胞衰老与细胞周期阻滞的状态相似,区别为衰老的肿瘤细胞并不存在诱导凋亡途径的激活。LY294002 处理组肿瘤细胞的凋亡指数显著高于衰老指数,这一结果强烈提示部分衰老的肿瘤细胞在 LY294002 的持续作用下可能会发生凋亡,而这一结论的证实还有待于进一步的研究。

本研究通过 β -半乳糖苷酶染色和流式细胞术等方法证实,LY294002 既能够诱导胶质瘤细胞发生细胞衰老,又能够诱导细胞凋亡,但其诱导细胞凋亡的能力占据主导地位。另外,我们首次预测在 LY294002 的持续作用下,部分衰老的肿瘤细胞中可能存在凋亡途径的激活,从而进一步诱导凋亡的发生。总之,胶质瘤细胞的恶性行为及化疗耐受多种因素的影响和多条信号传导通路的调控。PI3K/Akt 信号通路在胶质瘤发生发展中发挥重要作用,而本研究结果为 LY294002 联合化疗增敏机制的临床研究奠定理论基础,相信在未来,以 PI3K/Akt 信号通路为靶点的化疗增敏剂将有望在胶质瘤的临床治疗中发挥重要作用。

参考文献(References)

- [1] Schneider T, Mawrin C, Scherlach C, et al. Gliomas in adults[J]. Dtsch Arztebl Int, 2010,107(45):799-807
- [2] DeAngelis LM. Brain tumors[J]. N Engl J Med, 2001, 344(2):114-123
- [3] Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors[J]. Methods Mol Biol, 2009, 472:323-442
- [4] Jacques-Silva MC, Bernardi A, Rodnight R, et al. ERK, PKC and PI3K/Akt pathways mediate extracellular ATP and adenosine-induced proliferation of U138-MG human glioma cell line [J]. Oncology-Basel, 2004, 67(5-6):450-459
- [5] Qiao J, Paul P, Lee S, et al. PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(3):421-426
- [6] Feng Y, Huang J, Ding Y, et al. Tamoxifen-induced apoptosis of rat C6 glioma cells via PI3K/Akt, JNK and ERK activation [J]. Oncol Rep, 2010, 24(6):1561-1567
- [7] Kang MJ, Ryu BK, Lee MG, et al. NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling, to promote gastric tumorigenesis[J]. Gastroenterology, 2008, 135(6):2030-2042
- [8] Bar J, Lukaschuk N, Zalcenstein A, et al. The PI3K inhibitor LY294002 prevents p53 induction by DNA damage and attenuates chemotherapy-induced apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2005, 12(12): 1578-87
- [9] Wu D, Tao J, Xu B, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 suppresses proliferation and sensitizes doxorubicin chemotherapy in bladder cancer cells [J]. Urol Int, 2011, 87 (1): 105-113
- [10] Iwanaga K, Yang Y, Raso MG, et al. Pten inactivation accelerates oncogenic K-ras-initiated tumorigenesis in a mouse model of lung cancer[J]. Cancer Res, 2008, 68(4):1119-1127
- [11] Holsinger FC, Piha-Paul SA, Janku F, et al. Biomarker-directed therapy of squamous carcinomas of the head and neck: targeting PI3K/PTEN/mTOR pathway[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(9):e137-e140
- [12] Chamberlain MC. Temozolomide: therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas [J]. Expert Rev Neurother, 2010, 10(10):1537-1544
- [13] Nakdimon I, Walser M, Frohli E, et al. PTEN negatively regulates MAPK signaling during Caenorhabditis elegans vulval development [J]. PLoS Genet, 2012, 8(8):e1002881
- [14] Mulholland DJ, Kobayashi N, Ruscetti M, et al. Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells [J]. Cancer Res, 2012, 72(7):1878-1889
- [15] Huang L, Zhang Z, Zhang S, et al. Inhibitory action of Celastrol on hypoxia-mediated angiogenesis and metastasis via the HIF-1alpha pathway[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(3):407-415
- [16] Rezvani H.R, Ali N, Nissen L.J, et al. HIF-1alpha in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders[J]. J Invest Dermatol, 2011, 131(9):1793-1805
- [17] Jandial R, Chen M.Y, Ciacci J, et al. HIF-1alpha potentiates mesenchymal stem cell mediated osteogenesis by coupling to angiogenesis[J]. Neurosurgery, 2011, 69(4):N13-N14
- [18] Jensen R.L. Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target [J]. J Neurooncol, 2009, 92(3):317-335
- [19] Rankin E.B, Rha J, Unger T.L, et al. Hypoxia-inducible factor-2 regulates vascular tumorigenesis in mice[J]. Oncogene, 2008, 27(40): 5354-5358
- [20] Chen L, Han L, Shi Z, et al. LY294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI3K/Akt pathway[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(2):575-579