

塞来昔布通过PI3K/Akt 通路调控胃癌细胞凋亡*

李春梅 陈兆峰 王丽娜 周永宁

摘要 目的:探讨塞来昔布通过PI3K/Akt信号通路调控胃癌细胞凋亡的机制。方法:塞来昔布体外处理人胃癌细胞株SGC-7901后,透射电镜观察细胞超微结构的改变,实时荧光定量RT-PCR法和Western Blot法检测蛋白激酶B(Akt)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)、Caspase-9的表达。结果:塞来昔布处理细胞后,透射电镜下观察到典型凋亡小体和自噬体;实验组Akt mRNA表达水平的改变无统计学意义,P-Akt蛋白的表达下调并呈时间和剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);Caspase-8 mRNA表达水平上调,呈时间和剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);Caspase-9 mRNA表达水平较对照组均上调,但125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用24 h组mRNA表达量与对照组相比差异无统计学意义,48 h和72 h组与对照相比差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。塞来昔布作用72 h后,75 $\mu\text{mol/L}$ 组Caspase-9 mRNA表达量与对照组相比差异无统计学意义,100 $\mu\text{mol/L}$ 和125 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照相比差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);procaspase-8和procaspase-9蛋白被活化,表达量下调,呈时间和剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:1)塞来昔布可能通过PI3K/Akt通路诱导细胞凋亡和细胞自噬两种程序性死亡方式导致细胞死亡。2)塞来昔布诱导胃癌细胞凋亡的分子机制为线粒体途径和死亡受体途径。

关键词 塞来昔布 胃癌细胞 凋亡 自噬 PI3K/Akt通路

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.15.004

COX-2 Regulation of Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells via the PI3K/Akt Signaling Pathway

Chunmei LI, Zhaofeng CHEN, Li'na WANG, Yongning ZHOU

Correspondence to: Yongning ZHOU, E-mail: yongningzhou@sina.com

Department of Gastroenterology, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30872478) and the Gansu Provincial Special Programs for Technical Research and Development (No.0912TCYA027)

Abstract Objective: To investigate the mechanism of celecoxib regulation on the apoptosis of human gastric cancer cell via the PI3K/Akt signaling pathway. **Methods:** After in vitro celecoxib treatment of the SGC-7901 cell line, transmission electron microscopy (TEM) was used to observe the morphologic changes in cellular ultrastructure. Real-time quantitative polymerase chain reaction and Western blot analysis were used to analyze the changes in the mRNA and the protein levels of Akt, caspase-8, and caspase-9 in SGC-7901 cells after celecoxib treatment. **Results:** Apoptotic changes, such as nuclear envelope subsidence, chromatin margination, crescent formation of the nucleus, apoptotic bodies, and autophagosomes, were observed under TEM. Interestingly, intense autophagic vacuolization and autophagosomes were detected in the regional cytoplasm of the affected cells. There was no statistically significant change in Akt mRNA and p-Akt protein expression in the experiment group. There was a decrease in p-Akt protein expression in a time-dose dependent manner. The changes were statistically significant ($P<0.05$ or $P<0.01$). Caspase-8 mRNA expression increased sharply in a time-dose dependent manner and the change was statistically significant ($P<0.05$ or $P<0.01$). Caspase-9 mRNA expression increased in the experimental group compared with the control; however, no statistically significant difference between the changes in caspase-9 mRNA levels in the group treated with 125 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib for 24 h and those in the control group. Significant differences were observed between the caspase-9 mRNA expression in the group treated with 125 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib for 48 h and 72 h and those in the control group ($P<0.05$ and $P<0.01$). At 72 h after celecoxib treatment, no statistically significant difference in caspase-9 mRNA expression was observed between the group treated with 75 $\mu\text{mol/L}$ and the control group. Significant differences were found between the caspase-9 mRNA expression in the groups treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ and with 125 $\mu\text{mol/L}$ and those in the control ($P<0.05$ and $P<0.01$). The procaspase-8 and procaspase-9 proteins were activated, and the protein expression decreased. The expression was affected in a time-dose dependent manner, with significant differences among the groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** 1) Celecoxib may result in cell death via two mechanisms, namely, apoptosis and autophagic cell death induced through the PI3K/Akt signaling pathway. 2) The mechanisms by which celecoxib induces apoptosis are the death-receptor pathway and the mitochondrial pathways.

Keywords Celecoxib; Gastric cancer; Apoptosis; Autophagy; PI3K/Akt pathway

作者单位:兰州大学第一医院消化科(兰州市730000)

* 本文课题受国家自然科学基金(编号:30872478)和甘肃省技术与开发专项计划基金(编号:0912TCYA027)资助

通信作者:周永宁 yongningzhou@sina.com

环氧化酶(COX)又称前列腺素过氧化物合成酶,是催化花生四烯酸转化为前列腺素的限速酶。COX-2是一种与炎症疾病和肿瘤密切相关的诱导酶。我们在前期实验中发现胃癌组织中COX-2和Akt表达明显高于周围非癌组织,选择性COX-2抑制剂塞来昔布可以诱发肿瘤细胞凋亡^[1-2]。还有实验表明COX-2抑制剂可通过影响Akt蛋白磷酸化,激活Akt信号转导通路影响细胞凋亡^[2-3]。因此我们设想选择性COX-2抑制剂塞来昔布通过PI3K/Akt信号通路调控胃癌细胞凋亡。本实验以COX-2高表达的胃癌细胞株SGC-7901为研究对象,观察选择性COX-2抑制剂塞来昔布体外诱导细胞凋亡,并检测相关基因Akt、Caspase-8、Caspase-9在mRNA及蛋白水平上的变化,以探讨塞来昔布通过PI3K/Akt信号通路调控凋亡的机制以及细胞具体的凋亡途径。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株SGC-7901购自中国科学院上海生命科学研究所;塞来昔布纯品由香港大学医学院馈赠;RPMI 1640培养基购自Gibco公司;新生小牛血清购自四季青公司;RNA提取试剂盒购自上海生工公司;实时荧光PCR试剂盒,蛋白提取试剂盒购自TAKARA公司;Caspase-8、Caspase-9多克隆抗体购自Abcam公司;p-Akt(T308)多克隆抗体购自Bioss公司。

1.2 透射电镜观察超微结构

取对数生长期的SGC-7901细胞,常规培养24 h后,加入终浓度为125 $\mu\text{mol/L}$ 含塞来昔布的培养液培养细胞72 h,收集细胞置于3%戊二醛中固定、PBS洗涤、1%锇酸固定、梯度乙醇丙酮脱水、包埋、聚合、超薄切片、铅染后观察。

1.3 分组

常规培养细胞用塞来昔布处理,A组为空白对照组、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布培养细胞72 h组。B组为空白对照组、125 $\mu\text{mol/L}$ 的塞来昔布培养细胞24、48、72 h组。

1.4 实时荧光定量RT-PCR法检测Akt、Caspase-8、Caspase-9的表达

用柱式RNA提取试剂盒提取RNA,逆转录成cDNA。以cDNA为模板,进行实时荧光PCR反应;人类Akt基因片段扩增的引物序列为F:5'-GTG GCA GCA CGT GTA CGA GAA3',R:5'-GTG ATC ATC TGG GCC GTG AA3',扩增片段长度为108 bp;人类Caspase-8基因片段扩增的引物序列F:5'-CCC ATA TGA TCG AGG ACA TCC A3',R:5'-ACA ACT TTG CTG CTT GCC TGT TAG3',扩增片段长度为186 bp;人类

Caspase-9基因片段扩增的序列为F:5'-GGT ACA TCC AGT CAC TTT GCC AGA3',R:5'-GTT CAC TTC AGT CAG GAT GGT GAG A3',扩增片段长度为83 bp。PCR反应体系为:SYBR Premix Ex Taq 12.5 μL 、引物各1 μL 、DNA模板2 μL 、dH₂O 8.5 μL 。反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$,5 s;62 $^{\circ}\text{C}$,30 s;40个循环。样本中目的基因的相对总量为 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 。

1.5 Western blot法检测细胞中p-Akt、Caspase-8、Caspase-9蛋白的表达

用试剂盒提取蛋白后,采用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度。取25 μg 变性的蛋白进行SDS-PAGE电泳,蛋白分离后转至PVDF膜上。室温下BSA封闭过夜,用一抗孵育膜(Caspase-8 1:2500、Caspase-9 1:2000、p-Akt 1:800)2 h,洗涤后换二抗孵育2 h。采用ECL显影,暗室压片。

1.6 统计学方法

本实验结果重复3遍,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,所有数据用SPSS 11.0软件分析。组间均数比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电镜观察

用125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理SGC-7901细胞72 h后,呈现典型的凋亡特征:核内染色质高度凝聚,边缘化呈新月体形(图1a),晚期核裂解为碎片,产生凋亡小体。同时发现典型的自噬改变:在胞浆的多个位置发现自噬空泡和自噬体(图1b)。

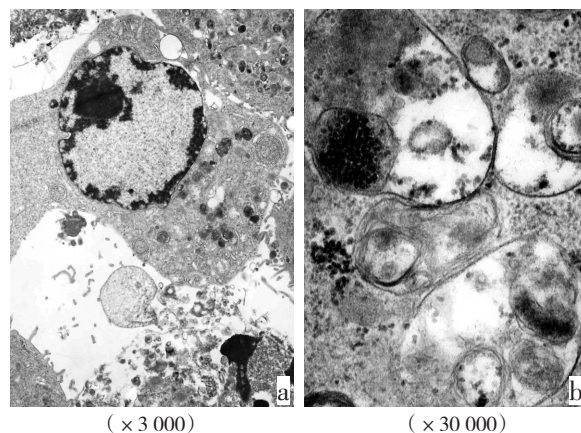


图1 125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理人胃癌细胞SGC-7901 72 h细胞超微结构的变化

Figure 1 Morphologic changes in the cells, as observed under TEM after treatment with 125 $\mu\text{mol/L}$ celecoxib for 72 h.

2.2 实时荧光定量RT-PCR

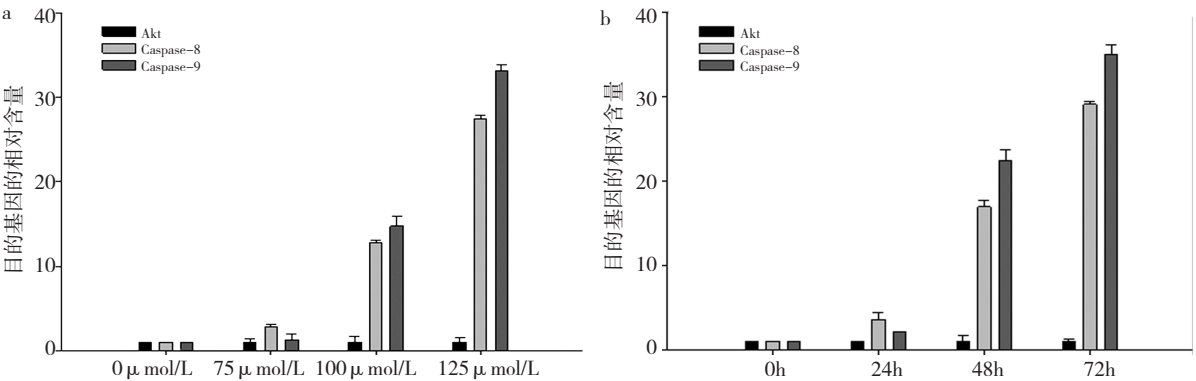
塞来昔布干预后,Akt在mRNA水平的改变与对照组相比无统计学意义;Caspase-8的mRNA表达量显著上调,呈时间和剂量依赖性,差异有统计学意义($P<0.05$)。

或 $P<0.01$);125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布作用后,Caspase-9的mRNA表达量高于对照组,24 h组Caspase-9的mRNA表达量虽上调,但与对照组相比,差异无统计学意义,48 h和72 h组与对照相比有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。塞来昔布作用72 h后,75 $\mu\text{mol/L}$ 组Caspase-9的mRNA表达量上调,但与对照组相比,无统计学意义,100 $\mu\text{mol/L}$ 和125 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照相比差异有统计

学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(图2)。

2.3 Western blot

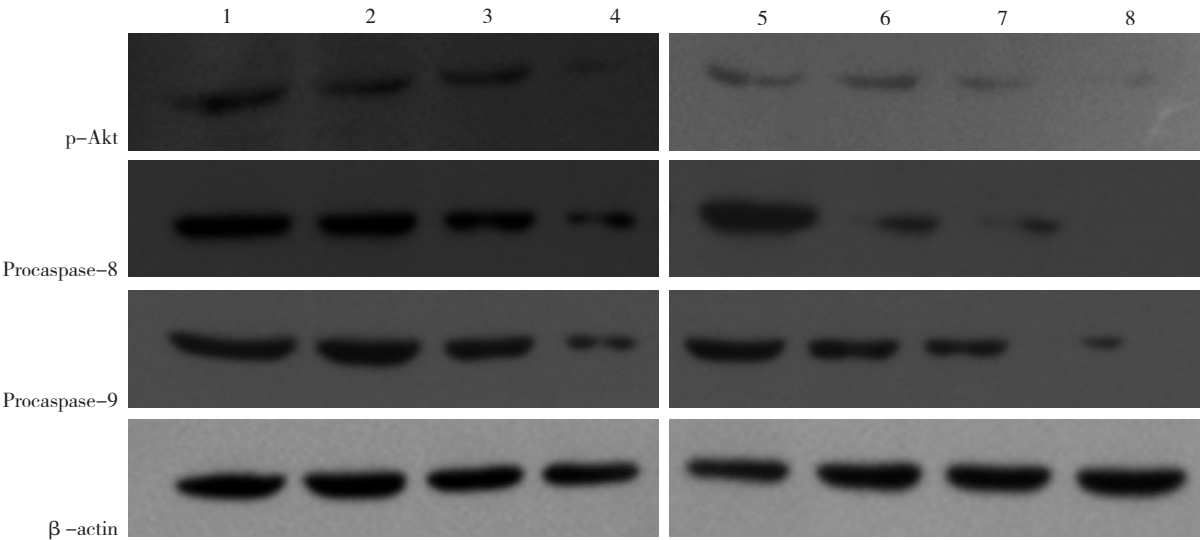
塞来昔布干预后,p-Akt蛋白表达水平与对照组相比下调,组间差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),呈时间和剂量依赖性;Procaspase-8,Procaspase-9蛋白表达低于对照组,组间差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),呈时间和剂量依赖性(图3)。



a:空白对照、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理胃癌SGC-7901细胞72 h;b:空白对照、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理胃癌SGC-7901细胞24、48、72 h

图2 塞来昔布处理人胃癌细胞SGC-7901后Akt、Caspase-8、Caspase-9 mRNA的表达

Figure 2 Expression of Akt, caspase-8, and caspase-9 mRNAs after treatment with celecoxib at different time points and doses



1~4:空白对照、75、100、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理胃癌SGC-7901细胞72 h;5~8:空白对照、125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理胃癌SGC-7901细胞24、48、72 h

图3 塞来昔布处理人胃癌细胞SGC-7901后p-Akt、Procaspase-8、Procaspase-9、 β -actin蛋白的表达

Figure 3 Expression of p-Akt, procaspase-8, and procaspase-9 proteins after treatment with celecoxib at different time points and doses

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,死亡率居恶性肿瘤之首。术后5年的死亡率很高,因此寻找手术以外的治疗方法成为焦点。目前非细胞毒性药物COX-2抑制剂塞来昔布在肿瘤治疗中的作用被广泛关注。COX 又称前列腺素过氧化物合成酶,在哺乳

动物体内有三种同工酶COX-1、COX-2、COX-3。诱导型COX-2在多数正常组织中不表达或者低表达,在肿瘤促进因子、炎症细胞因子、生长因子的作用下,表达增高^[4]。COX-2通过促进肿瘤细胞增殖、逃避宿主免疫监视、促进肿瘤浸润转移等多方面参与肿瘤的发生发展^[1,5]。我们在前期实验中发现选择性

COX-2 抑制剂塞来昔布降低 SGC-7901 细胞中 COX-2 的表达水平并且诱导细胞发生凋亡,并通过流式细胞术选择最佳浓度 125 $\mu\text{mol/L}$ 和最佳时间 72 h。本实验用 125 $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布处理 SGC-7901 细胞 72h 后,透射电镜下细胞呈现典型的凋亡改变和自噬改变。因此我们认为塞来昔布可以诱导 SGC-7901 细胞发生凋亡和自噬性细胞死亡。

塞来昔布诱导凋亡的机制尚不清楚。有实验表明 COX-2 抑制剂通过影响 p-Akt/GSK3 β 通路,上调 Caspase-9 诱导胃癌 AGS 细胞凋亡^[2]。Liu 等^[6]的实验说明 COX-2 抑制剂通过抑制 PI3K/Akt 通路,调节 bcl-2 家族活性,活化 Caspase-9, Caspase-3 诱导骨肉瘤细胞凋亡。这表明 COX-2 通过诱导 Akt 磷酸化,激活 PI3K/Akt 信号转导途径,调控细胞凋亡。

PI3K/Akt 信号通路广泛存在于细胞中调节细胞的生长、增殖、分化,在许多恶性肿瘤中被异常激活。Akt 是该通路中与人类恶性肿瘤相关的下游主要靶基因^[3]。在依赖 PI2P3 的蛋白激酶 1 的催化下, Akt 激酶活性区中的 Thr308 位点发生磷酸化,再在 PDK2 或整合素连接激酶的作用下,羧基端尾区的 Ser473 位点也发生磷酸化,即 Akt 成为有活性的激酶^[7]。它作用于多种下游分子来调节细胞的凋亡、生存、增殖、代谢。我们着重探讨 PI3K/Akt 通路下游分子中凋亡的关键酶 Caspase。Caspase-8 是经典的死亡受体途径的启动者, Caspase-9 是经典的线粒体途径的启动者。正常情况下 Caspase-8 和 Caspase-9 是以前体的形式存在,在受到体内外刺激后,凋亡的启动者被活化,激活凋亡的执行人,最后引起 PARP 的裂解和细胞凋亡^[8-9]。本实验中 Akt 在 mRNA 水平的改变无统计学意义,有活性的蛋白 p-Akt 表达下调, Caspase-8, Caspase-9 mRNA 表达上调,蛋白被激活, procaspase-8、procaspase-9 蛋白表达下调。综上所述,塞来昔布可能通过抑制 PI3K/Akt 通路的活化,激活下游分子 Caspase-8、Caspase-9,启动死亡受体途径和线粒体途径的细胞凋亡。

值得注意的是,通过透射电镜观察细胞超微结构的改变,我们发现塞来昔布可以同时诱导细胞发生凋亡和自噬性细胞死亡,这与目前的一些研究进展一致。Wang 的研究表明,黄连素的提取物抑制 Akt 的活化、激活 Caspase-3, Caspase-9 诱导肝癌细胞凋亡的同时发生自噬性细胞死亡^[10]。Liu 的实验也表明多花黄精的植物凝集素通过抑制 PI3K/Akt 信号通路诱导鼠纤维肉瘤细胞发生凋亡和自噬性细胞死亡^[11]。自噬性的细胞死亡是一种不同于凋亡的程序性细胞死亡,它是一种进化上很保守的过程,它在多种动物生长发育过程中出现,但是具体机制还不清楚^[12]。

自噬和凋亡这两种不同的程序性死亡方式可以通过 P53、PI3K/Akt、Bcl2-Bec1-1 相互调节^[13],这就提示我们,塞来昔布可能通过 PI3K/Akt 信号通路同时调控胃癌细胞的凋亡和自噬性细胞死亡,这为塞来昔布的抗肿瘤机制提供了新的理论基础;PI3K/Akt 信号通路将凋亡和自噬性细胞死亡两种不同的程序性细胞死亡方式联系起来,为肿瘤的治疗提供了新的靶点。

参考文献

- 1 冉俊涛,周永宁,唐承薇,等.塞来昔布诱导人胃癌细胞凋亡抑制新生血管形成[J].中华肿瘤杂志,2008,30(6):448-451.
- 2 Kim N, Kim CH, Ahn DW, et al. Anti-gastric cancer effects of celecoxib, a selective COX-2 inhibitor, through inhibition of Akt signaling[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(3): 480-487.
- 3 Pang RP, Zhou JG, Zeng ZR, et al. Celecoxib induces apoptosis in COX-2 deficient human gastric cancer cells through Akt/GSK3 β /NAG-1 pathway[J]. Cancer Lett, 2007, 251(2): 268-277.
- 4 Saukkonen K, Rintahaka J, Sivula A, et al. Cyclooxygenase-2 and gastric carcinogenesis[J]. APMIS, 2003, 111(10): 915-925.
- 5 Wang L, Chen W, Xie X, et al. Celecoxib inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic implantation tumor model of human colon cancer[J]. Exp Oncol, 2008, 30(1): 42-51.
- 6 Liu B, Shi ZL, Feng J, et al. Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 via down-regulation of PI3K/Akt[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(5): 494-501.
- 7 Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, et al. PI3K/Akt signaling pathway and cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2004, 30(2): 193-204.
- 8 谢松强,吴英良,刘广超,等.新型多胺缀合物 NNAMB 诱导 K562 细胞凋亡及其机制[J].中华肿瘤杂志,2008,30(7):490-493.
- 9 陆春伟,佟海侠,张继红,等. TRAIL 诱导神经母细胞瘤细胞凋亡中 Caspase-8 活性的变化[J].中国肿瘤临床,2007,34(14):781-784.
- 10 Wang N, Feng Y, Zhu M, et al. Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: the cellular mechanism[J]. J Cell Biochem, 2010, 111(6): 1426-1436.
- 11 Liu B, Wu JM, Li J, et al. Polygonatum cyrtonema lectin induces murine fibrosarcoma L929 cell apoptosis and autophagy via blocking Ras-Raf and PI3K-Akt signaling pathways[J]. Biochimie, 2010, 92(12): 1934-1938.
- 12 Brech A, Ahlquist T, Lothe RA, et al. Autophagy in tumor suppression and promotion[J]. Mol Oncol, 2009, 3(4): 366-375.
- 13 Liu JJ, Lin M, Yu JY, et al. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics[J]. Cancer Lett, 2011, 300(2): 105-114.

(2011-02-24 收稿)

(2011-05-25 修回)

(杨红欣校对)