

PI3K/Akt信号通路抑制剂对人肝癌HepG2细胞的体外抑制作用及其机制

张萌, 彭利, 乔治斌, 何宏涛, 周焯, 徐卓

■背景资料

原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 侵袭性强、易复发、预后差, 深入研究其发生发展的机制有助于寻找新的有效的治疗靶点。PI3K/Akt通路是十分重要的“凋亡抑制”通路, 通过调控下游多种靶蛋白发挥效应, 但在肝癌细胞中该通路的具体作用机制尚未明确。

张萌, 彭利, 乔治斌, 何宏涛, 周焯, 徐卓, 河北医科大学第四医院肝胆外科 河北省石家庄市 050011

张萌, 博士, 副主任医师, 主要从事肝胆肿瘤的基础与临床研究。河北省普通高校强势特色学科建设基金资助项目, No. 2005(52)

河北省卫生厅基金资助项目, No. 06142

作者贡献分布: 本课题设计与审阅由彭利完成; 文章写作与修改由张萌与何宏涛完成; 统计分析由张萌与徐卓完成; 主要实验与资料整理由周焯与乔治斌完成。

通讯作者: 彭利, 教授, 主任医师, 050011, 河北省石家庄市健康路12号, 河北医科大学第四医院肝胆外科。pengli72@sina.com
电话: 0311-86095340

收稿日期: 2013-06-14 修回日期: 2013-07-08

接受日期: 2013-07-18 在线出版日期: 2013-08-18

Inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line HepG2

Meng Zhang, Li Peng, Zhi-Bin Qiao, Hong-Tao He, Ye Zhou, Zhuo Xu

Meng Zhang, Li Peng, Zhi-Bin Qiao, Hong-Tao He, Ye Zhou, Zhuo Xu, Department of Hepatobiliary Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Supported by: the Foundation of Strong Characteristic Subjects of Hebei University, No. 2005(52); the Foundation of Health Department of Hebei Province, No. 06142

Correspondence to: Li Peng, Professor, Chief Physician, Department of Hepatobiliary Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University, 12 Jiankang Road, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China. pengli72@sina.com

Received: 2013-06-14 Revised: 2013-07-08

Accepted: 2013-07-18 Published online: 2013-08-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of the PI3K/Akt signaling pathway inhibitor wortmannin on cell proliferation, apoptosis and expression of pAkt, Skp2 and P27^{kip1} in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2.

METHODS: After treatment with different concentrations of wortmannin (0, 10, 50, 100, 200 nmol/L) for different durations (3, 10, 24 h), proliferation of HepG2 cells was analyzed by

MTT assay, cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry, expression of pAkt, Skp2 and P27^{kip1} proteins was detected by Western blot, and the mRNA expression of Skp2 and P27^{kip1} was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction.

RESULTS: Wortmannin inhibited the proliferation of HepG2 cells in a dose- and time-dependent manner. The apoptosis rates of HepG2 cells significantly increased from 8.46% ± 1.17% to 28.03% ± 2.67% after treatment with wortmannin ($P < 0.05$). Wortmannin induced an increase in the percentage of cells in G₀/G₁ phase and a decrease in the percentage of cells in S phase cells (both $P < 0.05$). After treatment with wortmannin, the expression of pAkt and Skp2 proteins was down-regulated, while that of P27^{kip1} protein was up-regulated (all $P < 0.05$). In addition, Skp2 mRNA expression in HepG2 cells was significantly down-regulated ($P < 0.05$), although the expression of P27^{kip1} mRNA was not changed.

CONCLUSION: Wortmannin inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 possibly by regulating the expression of Skp2 and P27^{kip1}.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

Key Words: Phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B signaling pathway; Wortmannin; Hepatocellular carcinoma; Apoptosis; pAkt; S-phase kinase associated protein 2; P27^{kip1}

Zhang M, Peng L, Qiao ZB, He HT, Zhou Y, Xu Z. Inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(23): 2250-2257 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2250.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i23.2250>

摘要

目的: 研究磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶

■同行评议者

李胜, 研究员, 山东省肿瘤防治研究院肝胆外科

B(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路抑制剂渥曼青霉素对人肝癌HepG2细胞增殖、细胞周期与凋亡的影响以及相关基因*pAkt*、*Skp2*及*P27^{kip1}*表达的变化。

方法: 将不同浓度的渥曼青霉素(0、10、50、100、200 nmol/L)分别作用于对数生长期的人肝癌HepG2细胞3、10、24 h, MTT法测定细胞增殖抑制率, 流式细胞术检测细胞凋亡率及细胞周期的变化, Western blot检测*pAkt*、*Skp2*及*P27^{kip1}*蛋白表达变化, RT-PCR检测*Skp2*及*P27^{kip1}* mRNA表达变化。

结果: 渥曼青霉素可明显抑制HepG2细胞的增殖, 在一定范围内具有时间和浓度依赖性。渥曼青霉素可导致G₀/G₁期HepG2细胞比例明显升高, S期细胞比例明显降低($P<0.05$)。随着渥曼青霉素浓度的增加及作用时间的延长, HepG2细胞凋亡率逐渐升高($8.46\% \pm 1.17\%$ 至 $28.03\% \pm 2.67\%$)($P<0.05$)。Western blot结果显示渥曼青霉素可下调*pAkt*和*Skp2*蛋白的表达, 上调*P27^{kip1}*蛋白表达($P<0.05$)。RT-PCR结果显示渥曼青霉素可明显下调*Skp2* mRNA的表达, 而*P27^{kip1}* mRNA表达无明显变化。

结论: PI3K/Akt信号通路抑制剂渥曼青霉素可抑制人肝癌HepG2细胞的增殖, 引发G₀/G₁期阻滞并诱导其凋亡, 其机制可能与PI3K/Akt信号通路参与*Skp2*及*P27^{kip1}*调控有关。

© 2013年版权归Baishideng所有。

关键词: 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B; 渥曼青霉素; 肝细胞癌; 凋亡; *pAkt*; S期激酶相关蛋白2; *P27^{kip1}*

核心提示: 阻断磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)信号通路可抑制人肝癌HepG2细胞的增殖, 引发细胞周期阻滞并诱导凋亡, 其机制可能与PI3K/Akt信号通路参与*Skp2*及*P27^{kip1}*的调控有关。这一研究结果为以PI3K/Akt信号通路为靶点的肝细胞癌临床辅助治疗提供了一定的实验基础及理论依据。

张萌, 彭利, 乔治斌, 何宏涛, 周烨, 徐卓. PI3K/Akt信号通路抑制剂对人肝癌HepG2细胞的体外抑制作用及其机制. 世界华人消化杂志 2013; 21(23): 2250-2257 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2250.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i23.2250>

0 引言

原发性肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 其中90%为肝细胞癌, 发病率居全世界恶性肿瘤的第5位, 每年死亡病例约69.6万, 居肿瘤相关死因的第3位^[1]。我国是肝癌发病率最高的国家, 每年新发病例数占全球总数的55%, 在我国肿瘤相关死因中仅次于肺癌, 位居第2位^[2]。肝细胞癌侵袭性强、易复发、预后差, 是我国恶性肿瘤防治研究的重点。目前研究发现, 多条信号通路参与肿瘤的恶性生物学行为^[3], 其中磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)通路在调控肿瘤细胞的增殖、分化、存活和迁移等方面发挥功能, 是十分重要的凋亡抑制通路, 以这条通路为靶点的肿瘤治疗策略正在广泛研究中^[4,5]。*P27^{kip1}*蛋白为细胞周期依赖性蛋白激酶抑制剂Cip/Kip蛋白家族的重要成员, 研究发现几乎所有人类恶性肿瘤中均存在*P27^{kip1}*蛋白的表达下调或缺失, 是公认的抑癌蛋白^[6]。而S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase associated protein 2, *Skp2*)参与*P27^{kip1}*的降解, 使细胞周期调节失控, 最终导致癌变的发生^[7]。我们的前期研究发现, 在肝细胞癌组织中也存在PI3K/Akt通路的异常激活, 同时伴有*Skp2*及*P27^{kip1}*蛋白的表达失调, 并且与患者的预后密切相关^[8]。目前有关肝细胞癌中PI3K/Akt通路与*Skp2*及*P27^{kip1}*关系的报道较少。本实验选取体外培养的人肝癌HepG2细胞为研究对象, 加入PI3K/Akt信号通路抑制剂渥曼青霉素, 观察HepG2增殖、细胞周期与凋亡的变化, 检测*pAkt*、*Skp2*和*P27^{kip1}*蛋白及mRNA的表达, 进一步研究PI3K/Akt信号通路的作用机制, 为临床治疗肝细胞癌提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系HepG2由河北医科大学第四医院科研中心提供。渥曼青霉素购自美国Sigma公司, 分子量428.43, 纯度>99%, 用二甲基亚砜(DMSO)配置成储存液, 过滤除菌后分装, 置-20℃冰箱保存、备用。RT-PCR试剂盒购自北京华美公司, *GAPDH*、*Skp2*和*P27^{kip1}*基因引物由上海生工生物工程公司合成。鼠抗人β-actin和*P27^{kip1}*单克隆抗体及兔抗人*Skp2*多克隆抗体均购自美国Santa Cruz公司, 兔抗人*pAkt*单克隆抗体购自美国Epitomics公司。四甲基偶氮唑蓝[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra-

■研究前沿

PI3K/Akt通路在肿瘤细胞增殖、凋亡和放、化疗抵抗方面起重要作用, 目前以这条信号通路为靶点的肿瘤治疗策略正在广泛的研究中, 有关*Skp2*及*P27^{kip1}*在该通路中发挥的作用报道较少。

■相关报道

Ecker等研究表明PI3K/Akt信号通路可通过控制转录因子*E2F1*与*Skp2*启动子的结合调节*Skp2*基因的表达,还可以直接磷酸化激活*Skp2*调控其稳定性,从而减少*Skp2*的降解,因此认为*Skp2*为PI3K/Akt信号通路的下游底物。

zolium bromide, MTT]及PI染液购自美国Sigma公司。细胞蛋白提取试剂盒、Bradford法蛋白定量试剂盒购自北京索莱宝有限公司。DAB试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。RPMI 1640培养基和TRIzol总RNA提取试剂购自美国Gibco公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 用含有100 U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素, 不含胎牛血清的RPMI 1640培养基在5%CO₂、37 °C恒温培养箱中培养人肝癌细胞系HepG2。每2-3 d传代1次, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 MTT法检测细胞增殖: 将对数生长期的HepG2细胞按 1×10^4 个/孔接种于96孔培养板, 孵育24 h待细胞贴壁后加入以DMSO溶解的渥曼青霉素(终浓度分别为0、10、50、100、200 nmol/L), 每组设6个复孔, 设阴性对照(只加等量DMSO)及空白对照(只加培养液)。分别培养3、10、24 h后, 每孔加入MTT 20 μ L (5 mg/mL), 继续孵育4 h, 弃上清液, 每孔加入100 μ L DMSO, 振荡10 min待结晶充分溶解后在酶标仪490 nm波长处测定每孔吸光度(A)值。计算细胞增殖抑制率, 抑制率 = (对照组A值-试验组A值)/(对照组A值-空白组A值) \times 100%。实验重复3次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期的变化: 取对数生长期的HepG2细胞(5×10^5 个/培养瓶), 经渥曼青霉素(终浓度分别为0、50、100、200 nmol/L)作用10 h后收获细胞。另取细胞经终浓度为100 nmol/L的渥曼青霉素分别作用3、10、24 h后收获细胞。用预冷700 mL/L乙醇固定12 h。离心弃固定液, PBS重悬5 min后300目筛网过滤, 加入PI染液, 4 °C避光染色30 min, 采用美国Beckman公司的Epics-XL II型流式细胞仪, 分析细胞周期和细胞凋亡的变化。实验重复3次。

1.2.4 Western blot检测蛋白表达变化: 按照方法1.2.3进行细胞培养和分组, 收集细胞, 按照细胞蛋白质提取试剂盒的步骤提取细胞总蛋白。Bradford比色法检测蛋白浓度。取50 μ g样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将凝胶中分离的蛋白转印PVDF膜。5%脱脂牛奶封闭2 h后, 分别加入1:200稀释的鼠抗人 β -actin单克隆抗体、兔抗人*Skp2*多克隆抗体、鼠抗人P27^{kip1}单克隆抗体及1:150稀释的兔抗人pAkt单克隆抗体, 4 °C孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的相应二抗溶液, 37 °C孵育2 h, 洗膜后DAB显色, β -actin为内参照。条带进行光密度值分析, 将目标条带与

β -actin条带的灰度值之比作为其蛋白表达水平的参数。实验重复3次。

1.2.5 RT-PCR检测mRNA表达变化: 按照方法1.2.3进行细胞培养和分组, 收集细胞, 提取各组细胞的总RNA, 进行RNA完整性及纯度的鉴定。使用一步法反转录试剂盒, 合成cDNA。以GAPDH为内参照, GAPDH上游引物序列: 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGT-3', 下游引物序列: 5'-CCTGGAAGATGGTGATGGG-3', 扩增产物大小为250 bp。Skp2上游引物序列: 5'-GACAGTGAGAACATCCCCC-3', 下游引物序列: 5'-GAGAGACAGTATGCCGTGGA-3', 扩增产物大小为476 bp。P27^{kip1}上游引物序列: 5'-CCGACGATTCTTCTACTC-3', 下游引物序列: 5'-CTGATAACAAGGAAACATA-3', 扩增产物大小为165 bp。扩增条件: 95 °C预变性5 min, 94 °C变性30 s, 相应退火温度(55 °C-62 °C)30 s, 72 °C延伸30 s, 30个循环; 72 °C延伸7 min。产物在1.5%琼脂糖凝胶中电泳, 紫外凝胶成像仪拍照。条带进行光密度值分析, 将目标条带与GAPDH条带的光密度值之比作为其mRNA表达水平的参数。实验重复3次。

统计学处理 实验数据采用SPSS17.0统计软件进行分析。计量资料以mean \pm SD表示, 多组间均数比较采用 χ^2 分析, 其中两两比较用S-N-K检验。两组均数比较用t检验, $P < 0.05$ 时被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 渥曼青霉素对HepG2细胞增殖的抑制作用 MTT结果显示, 渥曼青霉素能够明显抑制HepG2细胞的增殖, 且具有一定的时间及浓度依赖性(图1)。50 nmol/L渥曼青霉素作用3 h后, HepG2细胞的抑制率为(20.13% \pm 2.52%), 而200 nmol/L渥曼青霉素作用24 h后抑制率可达到(74.93% \pm 3.25%, $P < 0.05$, 表1)。

2.2 渥曼青霉素对HepG2细胞凋亡及细胞周期的影响 流式细胞检测结果显示, 渥曼青霉素可诱导HepG2细胞发生凋亡, 随着药物浓度增加及作用时间延长, HepG2细胞凋亡率逐渐升高, 呈现明显的时间和浓度依赖性($P < 0.05$)。同时HepG2细胞周期进程有所改变, 表现为G₀/G₁期细胞比例显著升高, S期细胞比例显著降低, 且呈时间及浓度依赖性($P < 0.05$) (表2, 图2)。

2.3 渥曼青霉素对HepG2细胞pAkt, Skp2和P27^{kip1}蛋白表达的影响 Western blot结果显示: 随着药

表 1 渥曼青霉素对HepG2细胞的增殖抑制作用 ($n = 6$, mean \pm SD)

渥曼青霉素(nmol/L)	抑制率(%)		
	3 h	10 h	24 h
0	—	—	—
10	14.46 \pm 2.35	21.84 \pm 5.22 ^g	30.33 \pm 1.53 ⁱ
50	20.13 \pm 2.52 ^a	30.37 \pm 2.33 ^{ag}	39.72 \pm 6.08 ^{ai}
100	28.44 \pm 3.77 ^c	45.88 \pm 9.70 ^{cg}	56.07 \pm 3.06 ^{ci}
200	37.59 \pm 2.37 ^e	58.02 \pm 4.16 ^{eg}	74.93 \pm 3.25 ^{ei}

^a $P < 0.05$ vs 10 nmol/L; ^c $P < 0.05$ vs 10, 50 nmol/L; ^g $P < 0.05$ vs 10, 50, 100 nmol/L; ⁱ $P < 0.05$ vs 3 h; ^j $P < 0.05$ vs 3, 10 h.

表 2 渥曼青霉素对HepG2细胞周期及凋亡的影响 ($n = 3$, mean \pm SD)

分组	凋亡率(%)	细胞周期分布 (%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
处理10 h浓度(nmol/L)				
0(Control)	2.10 ± 0.12	33.77 ± 2.93	50.90 ± 5.52	15.33 ± 2.60
50	8.46 ± 1.17 ^a	42.20 ± 4.11 ^a	39.93 ± 3.92 ^a	17.90 ± 0.50
100	13.76 ± 2.47 ^c	55.23 ± 3.90 ^c	31.87 ± 2.31 ^a	12.90 ± 1.64
200	28.03 ± 2.67 ^e	71.00 ± 5.17 ^e	17.17 ± 1.86 ^e	11.80 ± 3.90
浓度100 nmol/L处理时间(h)				
3	3.95 ± 1.07	41.17 ± 4.71	39.80 ± 4.16 ^a	19.03 ± 0.78
24	26.34 ± 3.25 ^g	68.10 ± 5.42 ^g	19.67 ± 3.87 ^g	12.23 ± 1.79

^a $P < 0.05$ vs 10 nmol/L; ^c $P < 0.05$ vs 10, 50 nmol/L; ^e $P < 0.05$ vs 10, 50, 100 nmol/L; ^g $P < 0.05$ vs 3 h; ^j $P < 0.05$ vs 3, 10 h.

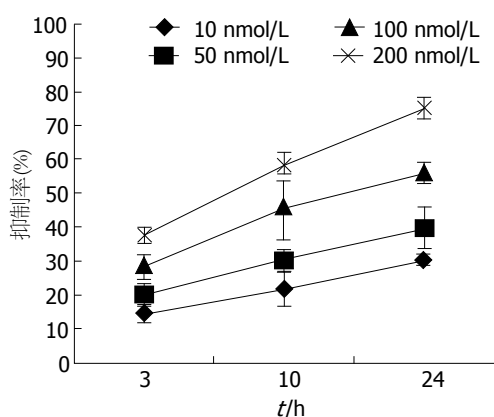


图 1 渥曼青霉素对HepG2细胞的增殖抑制作用.

物浓度的增加和作用时间的延长, pAkt和Skp2蛋白的表达水平逐渐降低, P27^{kip1}蛋白的表达水平逐渐升高, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$) (图3).

2.4 渥曼青霉素对HepG2细胞Skp2和P27^{kip1} mRNA表达的影响 RT-PCR检测结果显示: 随

着药物浓度的增加和作用时间的延长, Skp2 mRNA表达水平逐渐降低, 组间差异有统计学意义($P < 0.05$), 而P27^{kip1} mRNA表达水平无明显变化(图4).

3 讨论

PI3K/Akt信号通路在广泛的人类肿瘤中表达失调, 如胃癌、前列腺癌、卵巢癌及乳腺癌等^[9-12]. 目前认为, Akt的活性调节主要依赖于PI3K, Ser473和Thr308位点的磷酸化是Akt激活的必要条件, 磷酸化Akt(pAkt)是PI3K/Akt信号通路的效应核心^[13], 而且pAkt处于细胞内多种信号途径的交汇点, 通过激活或抑制下游30余种靶蛋白, 参与多种细胞活动、物质代谢调节, 尤其是与促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、调控细胞周期等有密切关系^[14]. 渥曼青霉素分离自丝状真菌, 通过与PI3K的催化亚基p110结合, 不可逆的抑制PI3K的激酶活性, 从而阻断PI3K/Akt信号通路^[15]. 本实验发现, 渥曼青霉素可抑制HepG2细

■创新盘点

本实验证实阻断PI3K/Akt通路可导致肝癌细胞的增殖抑制并引发周期阻滞及凋亡, 并从mRNA及蛋白水平分析了Skp2及P27^{kip1}在其中发挥的作用, 发现PI3K/Akt信号通路直接或间接的参与Skp2及P27^{kip1}的调控.

■应用要点

本实验发现PI3K/Akt通路抑制剂渥曼青霉素具有一定的抑癌作用,并初步分析了其作用机制。为以PI3K/Akt信号通路为靶点的肝癌临床辅助治疗提供了一定的实验基础及理论依据。

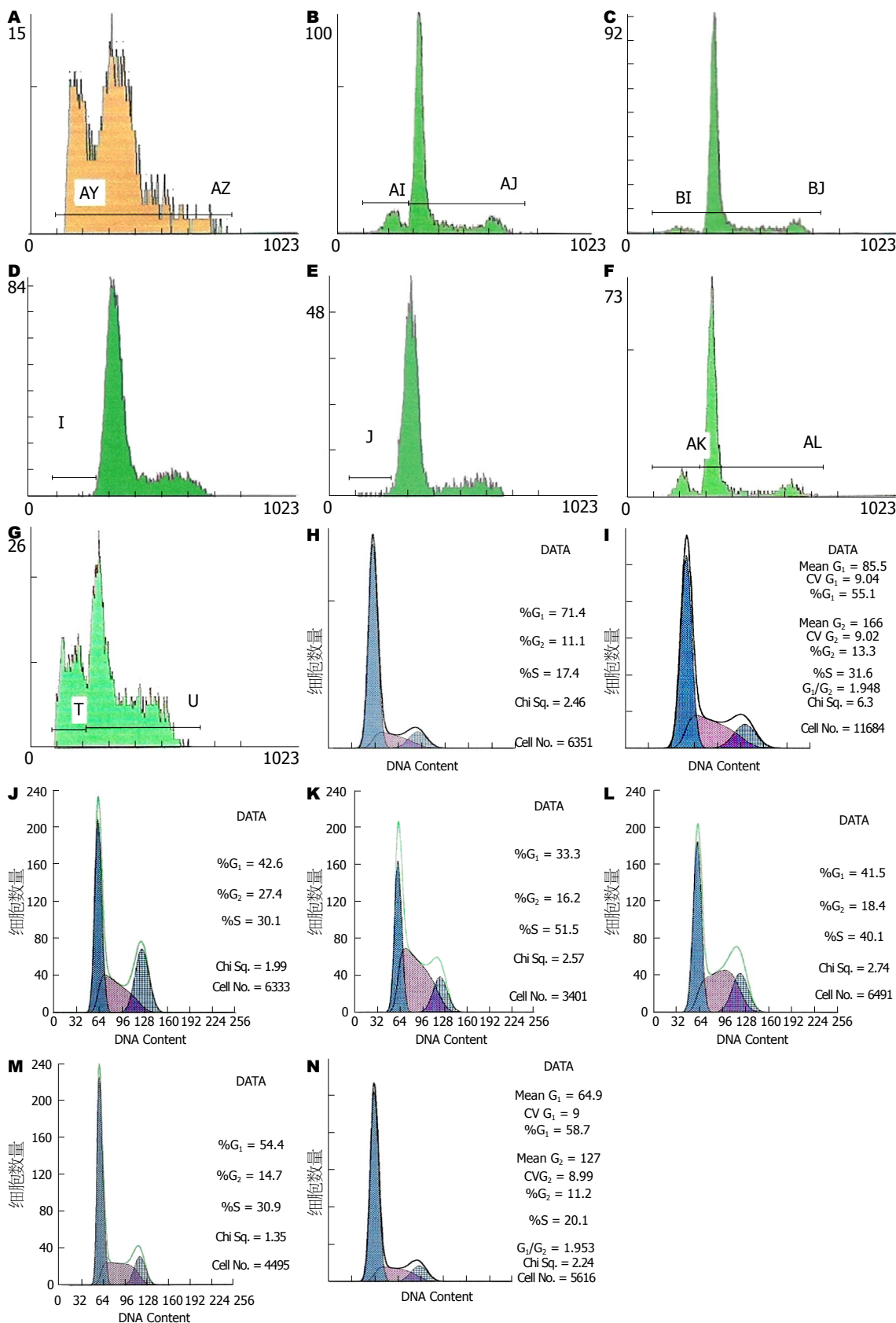


图2 渥曼青霉素对HepG2细胞周期及凋亡的影响。A: 200 nmol/L 10 h; B: 100 nmol/L 10 h; C: 50 nmol/L 10 h; D: 0(Control); E: 100 nmol/L 3 h; F: 100 nmol/L 10 h; G: 100 nmol/L 24 h; H: 200 nmol/L 10 h; I: 100 nmol/L 10 h; J: 50 nmol/L 10 h; K: 0(Control); L: 100 nmol/L 3 h; M: 100 nmol/L 10 h; N: 100 nmol/L 24 h。

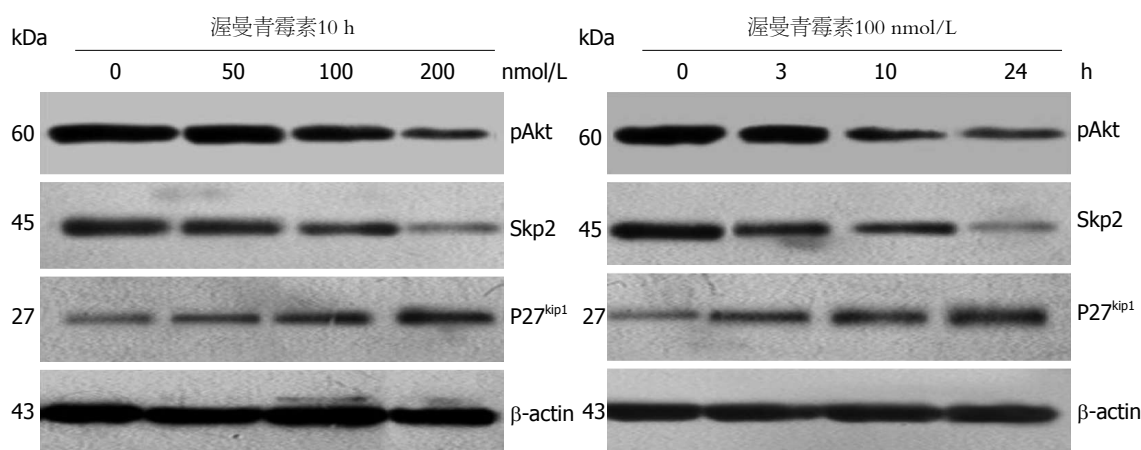


图 3 渥曼青霉素对HepG2细胞pAkt, Skp2和P27^{kip1}蛋白表达的影响.

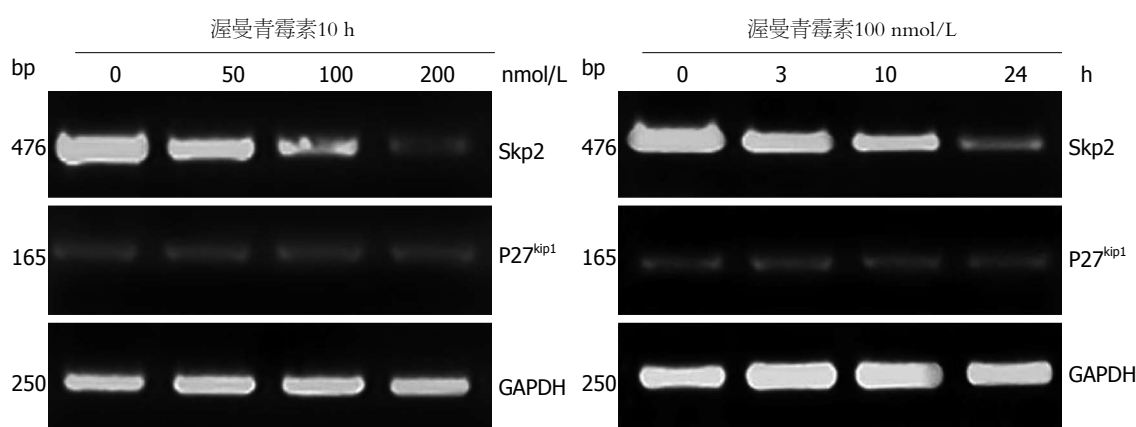


图 4 渥曼青霉素对HepG2细胞Skp2和P27^{kip1} mRNA表达的影响.

胞的增殖、诱导凋亡并导致细胞发生G₀/G₁期阻滞,同时伴有pAkt蛋白表达水平明显下调,且此效应一定范围内具有明显的时间及浓度依赖性,说明人肝癌HepG2细胞中存在PI3K/Akt信号通路,渥曼青霉素的上述作用与阻断PI3K/Akt信号通路有关. Yun等^[16]将渥曼青霉素作用于人乳腺癌MCF-7细胞,也得出了与本实验一致的结论.

P27^{kip1}是细胞周期负性调控因子,主要抑制CyclinE-CDK2和CyclinD-CDK4等G₁期激酶复合物活性,使细胞停滞于G₁期,防止细胞过度增殖,并与细胞凋亡有着密切的关系^[17]. 本实验经流式细胞学检测发现,渥曼青霉素引发了HepG2细胞的G₀/G₁期阻滞,同时细胞凋亡率也明显升高,故此我们考虑P27^{kip1}可能参与其中. 我们进一步以浓度和时间两种方式研究了经渥曼青霉素处理后HepG2细胞P27^{kip1}的表达变化,发现P27^{kip1}在mRNA水平无明显变化,而蛋白表达水平明显升高,此结果提示阻断PI3K/Akt信号通路引发的效应与P27^{kip1}蛋白水平上调有关. 许多研

究发现,大多数肿瘤中P27^{kip1}很少发生基因缺失或突变,转录水平也很少发生改变,对P27^{kip1}的调控主要发生在翻译后水平^[18,19]. 我们的实验也发现P27^{kip1}在转录水平未受到渥曼青霉素的影响. P27^{kip1}蛋白在肿瘤组织中的表达下调或缺失主要为其降解加速所致. 虽然目前对于P27^{kip1}蛋白降解的机制尚未完全明了,但一般认为其主要的负性调节方式为Skp2介导的泛素-蛋白酶体途径^[20]. G₁晚期P27^{kip1}第187位苏氨酸被磷酸化,随后被包括Skp2在内的泛素连接酶复合体(SCFSkp2)结合,泛素化的P27^{kip1}在蛋白酶体内降解,细胞由G₁期进入S期,其中Skp2的参与是P27^{kip1}的泛素化和降解所必需的^[21].

人正常细胞中Skp2蛋白的表达水平是较低的,而在绝大多数恶性肿瘤如大肠癌^[22]、前列腺癌^[23]、胃癌^[24]及肝细胞癌^[8]中表达明显增高,与肿瘤的恶性生物学行为密切相关,提示预后不良,并且大都同时伴有P27^{kip1}蛋白的负性表达变化^[25]. 近期研究发现,PI3K/Akt信号通路可通

同行评价

本实验通过研究不同浓度的渥曼青霉素(0、10、50、100、200 nmol/L)分别作用于对数生长期的肝癌HepG2细胞,观察细胞凋亡率及细胞周期的变化,得出渥曼青霉素抑制人肝癌HepG2细胞的增殖,有一定科学价值.

过控制转录因子*E2F1*与*Skp2*启动子的结合调节*Skp2*基因的表达,还可以通过直接磷酸化激活*Skp2*调控其稳定性,从而减少*Skp2*的降解^[26,27];因此可以将*Skp2*定义为PI3K/Akt信号通路的下游底物^[28]。我们进一步研究也证实,阻断PI3K/Akt信号通路可以在mRNA水平及翻译后水平同时下调HepG2细胞中*Skp2*的表达,说明*Skp2*为pAkt下游的靶基因,同时提示我们阻断PI3K/Akt信号通路可能通过下调*Skp2*间接上调P27^{kip1}蛋白的表达水平。Ho等^[29]在乳腺癌的研究中发现,钙蛋白酶2缺失导致的Akt活性降低,可通过叉头转录因子FoxO上调P27^{kip1}蛋白的表达。也有研究发现在肝癌细胞中pAkt可磷酸化P27^{kip1}蛋白的多个位点,其中第157位苏氨酸位于P27^{kip1}的核内定位信号区域,被磷酸化后P27^{kip1}将无法进入细胞核内发挥细胞周期调控的作用^[30]。这就说明P27^{kip1}蛋白功能的发挥不但与其表达水平有关,而且与其亚细胞定位有关,PI3K/Akt信号通路可直接参与P27^{kip1}蛋白功能的调控。

总之,PI3K/Akt信号通路抑制剂渥曼青霉素可抑制人肝癌HepG2细胞的增殖,引发G₀/G₁期阻滞并诱导其凋亡,其机制可能与PI3K/Akt信号通路参与*Skp2*及P27^{kip1}调控有关。本实验也为以PI3K/Akt信号通路为靶点的肝细胞癌临床辅助治疗提供了一定的理论依据。

4 参考文献

- 1 Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010; 127: 2893-2917 [PMID: 21351269 DOI: 10.1002/ijc.25516]
- 2 袁新雷, 秦叔逵. 原发性肝癌的分子靶向治疗研究新进展. *临床肿瘤学杂志* 2008; 13: 1-10
- 3 张文杰, 禄韶英. 肝细胞癌的分子靶向治疗. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 331-337
- 4 Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 2008; 27: 6473-6488 [PMID: 18955974 DOI: 10.1038/onc.2008.313]
- 5 De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2012; 16 Suppl 2: S17-S27 [PMID: 22443084 DOI: 10.1517/14728222.2011.639361]
- 6 Borriello A, Bencivenga D, Criscuolo M, Caldarelli I, Cucciolla V, Tramontano A, Borgia A, Spina A, Oliva A, Naviglio S, Della Ragione F. Targeting p27Kip1 protein: its relevance in the therapy of human cancer. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15: 677-693 [PMID: 21355788 DOI: 10.1517/14728222.2011]
- 7 Barré B, Perkins ND. The Skp2 promoter integrates signaling through the NF-kappaB, p53, and Akt/GSK3beta pathways to regulate autophagy and apoptosis. *Mol Cell* 2010; 38: 524-538 [PMID: 20513428 DOI: 10.1016/j.molcel.2010.03.018]
- 8 张萌, 彭利, 乔治斌, 何宏涛, 周焯, 徐卓, 杨涛, 梁占强. pAkt、Skp2和P27kip1蛋白在肝细胞癌中的表达及意义. *肿瘤防治研究* 2011; 38: 1283-1287
- 9 周晓东, 陈红霞, 关润年, 吕农华. Akt的活化对胃癌血管新生的促进作用. *世界华人消化杂志* 2011; 19: 744-748
- 10 Priulla M, Calastretti A, Bruno P, Azzariti A, Paradiso A, Cinti G, Nicolin A. Preferential chemosensitization of PTEN-mutated prostate cells by silencing the Akt kinase. *Prostate* 2007; 67: 782-789 [PMID: 17373720]
- 11 Huang J, Zhang L, Greshock J, Collignon TA, Wang Y, Ward R, Katsaros D, Lassus H, Butzow R, Godwin AK, Testa JR, Nathanson KL, Gimotty PA, Coukos G, Weber BL, Degenhardt Y. Frequent genetic abnormalities of the PI3K/AKT pathway in primary ovarian cancer predict patient outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2011; 50: 606-618 [PMID: 21563232 DOI: 10.1002/gcc.20883]
- 12 Foubert E, De Craene B, Berx G. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. The Snail1-Twist1 conspiracy in malignant breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2010; 12: 206 [PMID: 20594364 DOI: 10.1186/bcr2585]
- 13 Almhanna K, Strosberg J, Malafa M. Targeting AKT protein kinase in gastric cancer. *Anticancer Res* 2011; 31: 4387-4392 [PMID: 22199303]
- 14 Mosca E, Barcella M, Alfieri R, Bevilacqua A, Cinti G, Milanesi L. Systems biology of the metabolic network regulated by the Akt pathway. *Biotechnol Adv* 2012; 30: 131-141 [PMID: 21856401 DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.004]
- 15 Workman P, Clarke PA, Raynaud FI, van Montfort RL. Drugging the PI3 kinome: from chemical tools to drugs in the clinic. *Cancer Res* 2010; 70: 2146-2157 [PMID: 20179189 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4355]
- 16 Yun J, Lv YG, Yao Q, Wang L, Li YP, Yi J. Wortmannin inhibits proliferation and induces apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Eur J Gynaecol Oncol* 2012; 33: 367-369 [PMID: 23091892]
- 17 Mitrea DM, Yoon MK, Ou L, Kriwacki RW. Disorder-function relationships for the cell cycle regulatory proteins p21 and p27. *Biol Chem* 2012; 393: 259-274 [PMID: 23029651 DOI: 10.1515/hsz-2011-0254]
- 18 Lee J, Kim SS. The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp Mol Med* 2009; 41: 765-771 [PMID: 19887899 DOI: 10.3858/em.2009.41.11.102]
- 19 Yoon MK, Mitrea DM, Ou L, Kriwacki RW. Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins p21 and p27. *Biochem Soc Trans* 2012; 40: 981-988 [PMID: 22988851]
- 20 Herskho DD. Oncogenic properties and prognostic implications of the ubiquitin ligase Skp2 in cancer. *Cancer* 2008; 112: 1415-1424 [PMID: 18260093 DOI: 10.1002/cncr.23317]
- 21 Kitagawa K, Kotake Y, Kitagawa M. Ubiquitin-mediated control of oncogene and tumor suppressor gene products. *Cancer Sci* 2009; 100: 1374-1381 [PMID: 19459846 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01196.x]
- 22 孙立春, 隋广杰, 刘亚琴. SKP2在大肠癌组织中的表达及预后意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2516-2520
- 23 Wang Z, Gao D, Fukushima H, Inuzuka H, Liu P, Wan L, Sarkar FH, Wei W. Skp2: a novel potential therapeutic target for prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1825: 11-17 [PMID: 21963805 DOI: 10.1016/j.bbcan.2011.09.002]
- 24 Wei Z, Jiang X, Liu F, Qiao H, Zhou B, Zhai B, Zhang

- L, Zhang X, Han L, Jiang H, Krissansen GW, Sun X. Downregulation of Skp2 inhibits the growth and metastasis of gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Tumour Biol* 2013; 34: 181-192 [PMID: 23229098 DOI: 10.1007/s13277-012-0527-8]
- 25 Wang G, Chan CH, Gao Y, Lin HK. Novel roles of Skp2 E3 ligase in cellular senescence, cancer progression, and metastasis. *Chin J Cancer* 2012; 31: 169-177 [PMID: 22200179 DOI: 10.5732/cjc.011.10319]
- 26 Chan CH, Lee SW, Wang J, Lin HK. Regulation of Skp2 expression and activity and its role in cancer progression. *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 1001-1015 [PMID: 20526532 DOI: 10.1100/tsw.2010.89]
- 27 Lin HK, Wang G, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Liu Y, Chan CH, Yang WL, Erdjument-Bromage H, Nakayama KI, Nimer S, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 420-432 [PMID: 19270694 DOI: 10.1038/ncb1849]
- 28 Ecker K, Hengst L. Skp2: caught in the Akt. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 377-379 [PMID: 19337320 DOI: 10.1038/ncb0409-377]
- 29 Ho WC, Pikor L, Gao Y, Elliott BE, Greer PA. Calpain 2 regulates Akt-FoxO-p27(Kip1) protein signaling pathway in mammary carcinoma. *J Biol Chem* 2012; 287: 15458-15465 [PMID: 22427650 DOI: 10.1074/jbc.M112.349308]
- 30 He S, Lu M, Xue W, Wang Y, Zhao Y, Gao S, Ke Q, Liu Y, Li P, Cui X, Cheng C, Shen A. Phosphorylated p27Kip1 on Thr157 is an important prognosis in human hepatocellular carcinoma in vivo and in vitro. *Med Oncol* 2011; 28: 94-104 [PMID: 20108172 DOI: 10.1007/s12032-009-9408-4]

编辑 黄新珍 电编 鲁亚静



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 2013年版权归Baishideng所有

• 消息 •

中国科技信息研究所发布《世界胃肠病学杂志(英文版)》 影响因子 0.873

本刊讯 一年一度的中国科技论文统计结果2012-12-07由中国科技信息研究所(简称中信所)在北京发布。《中国科技期刊引证报告(核心版)》统计显示, 2011年《世界胃肠病学杂志(英文版)》总被引频次6 979次, 影响因子0.873, 综合评价总分88.5分, 分别位居内科学类52种期刊的第1位、第3位、第1位, 分别位居1998种中国科技核心期刊(中国科技论文统计源期刊)的第11位、第156位、第18位; 其他指标: 即年指标0.219, 他引率0.89, 引用刊数619种, 扩散因子8.84, 权威因子2 144.57, 被引半衰期4.7, 来源文献量758, 文献选出率0.94, 地区分布数26, 机构分布数1, 基金论文比0.45, 海外论文比0.71。

经过多项学术指标综合评定及同行专家评议推荐,《世界胃肠病学杂志(英文版)》再度被收录为“中国科技核心期刊”(中国科技论文统计源期刊)。根据2011年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD 2011)统计结果,《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获2011年“百种中国杰出学术期刊”称号。