

片仔癀通过 PI3K/Akt 信号通路诱导人骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡*

林海英, 刘俊宁, 陈炳艺, 李楠, 张燕[△]

(福建中医药大学骨伤学院, 福建 福州 350122)

摘要:目的 探讨片仔癀诱导骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡与磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 途径的关系。方法 采用不同浓度片仔癀(0.4, 0.8, 1.2mg/mL)作用 U2OS 细胞, 采用 MTT 法检测片仔癀对 U2OS 细胞增殖的影响; Hoechst 333258 染色观察细胞凋亡情况; Western blot 检测 PI3K 调节亚基 p85 α (PI3K p85 α)、磷酸化 PI3K 调节亚基 p85 α (p-PI3K p85 α)、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化 Akt(p-Akt)、核多聚(ADP-核酶)聚合酶(PARP)、裂解 PARP (Cleaved PARP)等 PI3K/Akt 途径相关蛋白的表达。结果 片仔癀可明显抑制 U2OS 细胞的增殖, 呈时间和浓度依赖性, 诱导 U2OS 细胞凋亡; Western blot 显示 p-PI3K p85 α 、p-Akt 蛋白表达明显下调, Cleaved PARP 表达量增加, 与空白对照组相比有明显差异($P < 0.05$)。结论 片仔癀可通过抑制 PI3K/Akt 信号途径 PI3K p85 α 、Akt 磷酸化, 促进 PARP 裂解, 诱导骨肉瘤 U2OS 凋亡。

关键词: 片仔癀; 骨肉瘤; PI3K/Akt 信号通路; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)05-0007-05

骨肉瘤是一种好发于青少年的原发性骨源性恶性肿瘤^[1]。肿瘤生长迅速, 可早期发生肺转移, 同时还存在对化疗药物的多药耐药, 因此尽管近 30 年来化疗药物和手术方式已取得重大的进展, 骨肉瘤 5 年生存率并没有得到明显提高^[2-3]。探寻有助于提高疗效的药物对骨肉瘤的治疗有着积极的临床意义。

传统中药片仔癀主要成分为三七、牛黄、麝香、蛇胆等, 具有清热解毒, 消痈散结的功效。前期体内外实验证实片仔癀能够有效抑制骨肉瘤细胞的增殖, 诱导其凋亡, 抑制骨肉瘤肺转移^[4-6]。近年来发现磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (Phosphate-dayliositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 通路在骨肉瘤细胞的增殖、分化、存活和迁移等方面发挥作用, 是重要的凋亡抑制通路^[7]。本实验通过检测片仔癀在诱导骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡过程中, PI3K/Akt 信号途径相关蛋白的表达变化, 进一步探讨片仔癀诱导骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡的可能机制, 为临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 美国 Gibco 公司, 批号: 15121250); 兔抗人 Phospho-Akt (Thr473) 单克隆抗体(美国 CST 公司, 批号: 0019), 兔抗人 Akt 单克隆抗体(批号: 0017); 兔抗人 PARP 单克隆抗体(批号: 0007) 兔抗人 Cleave PARP 单克隆抗体(批号: 0006); PI3K 抗体试剂盒(批号: 0000); β -actin 抗体(批号: 0002) 均购于美国 CST 公司; 蛋白酶抑制剂 Protease inhibitor cocktail(德国 Merck Millipore 公司, 批号: D00155412), 磷酸酶抑制剂 Phosstop(瑞士 Roche 公司, 批号: 10995100); 高灵敏度化学发光底物 Super signal West Femto(美国 Thermo 公司, 批号: PH204945); Bio-Tex ELX 800 酶标仪(美国 BioTek 公司); Olympus IX70 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 株式会社); GEL DOC 2000 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 药物配置

片仔癀(漳州片仔癀药业股份有限公司, 规格:

* 基金项目: 国家自然科学基金(81373659)

收稿日期: 2015-07-27

作者简介: 林海英(1988-), 女, 福建福清人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 中医药治疗骨肉瘤研究。

[△]通信作者: 张燕, E-mail: ykysy120@126.com

600mg/粒,批号:1101007),将片仔癀粉末溶于 PBS 溶液中,使终浓度为 30mg/mL,高压灭菌,-20℃保存,使用前用培养基稀释。

1.3 细胞系和细胞培养

人骨肉瘤细胞株 U2OS 由中国科学院上海生命科学研究院提供。人骨肉瘤 U2OS 细胞置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱,含有 10%的 FBS、100U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素 RPMI1640 培养基培养,待细胞生长密度达 80%~90%,0.25%的胰酶消化传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

对数生长期 U2OS 细胞,0.25%胰酶消化,按 1×10⁴/孔接种于 96 孔板,贴壁 24h 后,以不加药组为空白对照组,实验组加入不同浓度的片仔癀药液,每组设 6 个复孔。分别于干预 24,48,72h 后,去除含药培养基,每孔加入 100μL 含 MTT 的培养基(MTT 浓度为 0.5 mg/mL),孵育 4h 后弃 MTT,每孔加入 100μL DMSO,置于 37℃5%CO₂ 培养箱 15min,震荡使结晶充分溶解,酶标仪 490nm 波长处测定吸光度值。按照公式:抑制率=(1-药物组平均吸光值/对照组平均吸光值)×100%,计算每组的生长抑制率,实验重复 3 次。

1.5 Hoechst 33258 染色法观察细胞凋亡形态

对数生长期 U2OS 细胞,以 1×10⁵/孔接种于 12 孔板,贴壁 24h 后,加入不同浓度片仔癀溶液,并设空白对照组。干预 48h 后,弃培养基,PBS 洗涤 2 次,每次 3min,4%多聚甲醛室温固定 15min 后,去除固定液,PBS 洗涤 2 次,每次 3min。加入终浓度为 10μg/mL Hoechst 33258 避光染色 30min,再次用 PBS 洗涤 2 次,每次 3min,倒置荧光显微镜下观察细胞核形态的变化。

1.6 Western blot 法检测 PI3K p85α、p-PI3K p85α、Akt、p-Akt、PARP、Cleaved PARP 蛋白的表达

不同浓度片仔癀溶液干预 U2OS 细胞 48h,预冷 PBS 洗细胞 3 遍,尽量吸净 PBS 后加 300μL 配置好的 RIPA 裂解液 [1mL 的 RIPA 裂解液加 10μL PMSF (100×)、10μL Protease inhibitor cocktail (100×)、100μL Phosstop(10×),现配现用],提取总蛋白,BCA 法来测定蛋白浓度。5×蛋白上样缓冲液将蛋白样品变性,-20℃保存。每孔 20μg 蛋白上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转到 PVDF 膜上,

室温封闭 2 h,分别加入不同稀释比例的一抗,兔抗人 β-actin(1:1000)、PI3K p85α(1:1000)、p-PI3K p85α(1:1000)、Akt(1:1000)、p-Akt(Thr473)(1:2000)、PARP(1:1000)、Cleave PARP(1:1000),4℃侧摆摇床过夜;TBST 洗涤 3 遍,每遍 10min;加入二抗(1:2000 稀释),室温孵育 1.5h;TBST 洗涤 3 遍,每遍 10min;用 Super signal West Femto 最高灵敏度化学发光底物显色。Image Lab 3.0 软件分析软件进行灰度扫描,目标蛋白灰度值与 β-actin 灰度值之比,作为目的蛋白表达水平的相对值。实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

实验数据以 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用配对 *t* 检验和双因素方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 片仔癀对 U2OS 细胞增殖抑制作用

MTT 结果显示片仔癀作用时间相同时,细胞抑制率随着药物浓度的增加而增大;而相同浓度片仔癀干预细胞,随作用时间的延长,细胞抑制率逐渐增大,与对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.01),说明随着片仔癀浓度的不断增加,作用时间的不断延长,对 U2OS 细胞的增殖抑制率不断升高(表 1)。

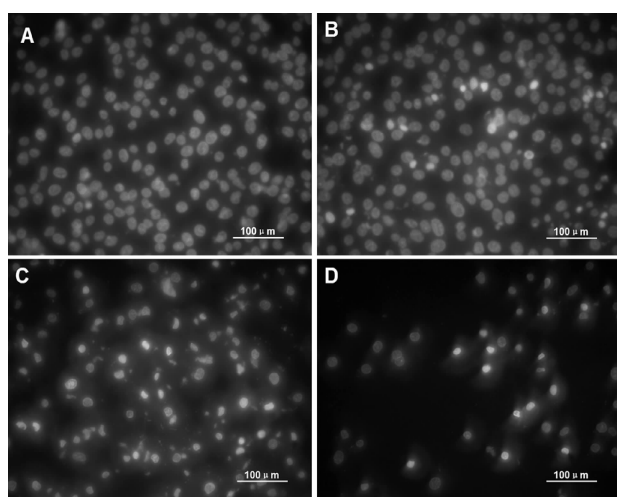
表 1 片仔癀对 U2OS 细胞的抑制率($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	抑制率/%		
	24h	48h	72h
空白对照组	0	0	0
0.4mg/mL 组	9.56±1.28*	10.00±1.47*	18.62±1.26* [△]
0.8mg/mL 组	18.45±3.26*	36.96±6.27* [▲]	50.39±7.15* [△]
1.2mg/mL 组	35.06±6.15*	50.97±1.24* [▲]	68.23±4.55* [△]

注:与对照组比较,**P*<0.01;与 24h 组比较,▲*P*<0.01;与 48h 组比较,△*P*<0.01

2.2 片仔癀对 U2OS 细胞凋亡的影响

不同浓度片仔癀干预 U2OS 细胞 48h 后,Hoechst 33258 染色后荧光显微镜下观察见对照组细胞核呈圆形均匀的蓝色荧光,片仔癀组表现为细胞核缩小,染色质浓缩等典型的细胞凋亡的表现,且随药物浓度的增大,凋亡细胞逐渐增多,细胞数目逐渐减少(图 1)。



A:空白对照组;B:0.4mg/mL组;C:0.8mg/mL组;D:1.2mg/mL组

图1 Hoechst 33258 染色观察片仔癀干预U2OS 细胞 48h 后凋亡形态

2.3 片仔癀对 U2OS 细胞 PI3K p85 α 、p-PI3K p85 α 、Akt、p-Akt、PARP、Cleaved PARP 蛋白表达的影响

蛋白质印迹方法检测 PI3K/Akt 信号途径相关蛋白的表达变化显示,不同浓度片仔癀干预骨肉瘤 U2OS 细胞 48h 后,p-PI3K p85 α 表达逐渐减少,0.8 和 1.2mg/mL 组与空白对照组比较差异有统计学意义(0.8mg/mL 组 $P<0.05$,1.2mg/mL 组 $P<0.01$),而 PI3K p85 α 基本保持不变;p-Akt 的表达随药物浓度的增加而减少,0.8 和 1.2mg/mL 组与空白对照组比较差异有统计学意义(0.8mg/mL 组 $P<0.05$,1.2mg/mL 组 $P<0.01$),Akt 的表达变化不明显;随着药物浓度的增加,PARP 的表达减少,尤其是 1.2mg/mL 组,同时 Cleaved PARP 表达量逐渐增多,与空白对照组比较差异有统计学意义(0.4,0.8mg/mL 组 $P<0.05$,1.2mg/mL 组 $P<0.01$)。提示片仔癀诱导骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡与减少 p-PI3K p85 α 、p-Akt 蛋白表达,上调 Cleaved PARP 表达量,调控 PI3K/Akt 信号途径有关(图 2)。

3 讨论

骨肉瘤属于中医“石痈”、“石疽”、“石岩”等范畴,多发于青少年,局部表现为肿块生长迅速,持续性疼痛,皮温高,静脉怒张,全身则有低热、贫血、乏力等。局部肿胀、静脉怒张为瘀血之征,肿胀灼痛,刺痛拒按,皮温升高,难消难溃,伴有发热,属痰瘀互结,热毒内蕴,故临床以“化瘀散结、清热解毒”之

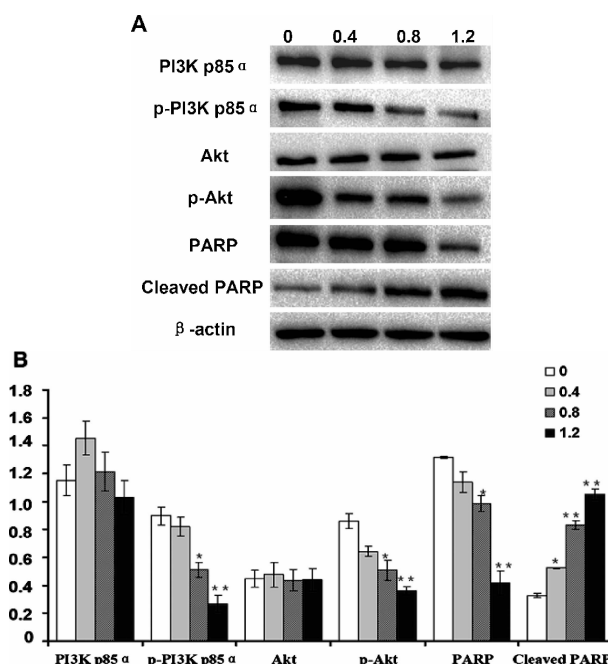


图 A: 片仔癀(0,0.4,0.8,1.2mg/mL)干预 U2OS 细胞 48h 对 PI3K p85 α 、p-PI3K p85 α 、Akt、p-Akt、PARP、Cleaved PARP 蛋白表达的影响;图 B: 片仔癀干预 48h 后 U2OS 细胞中 PI3K p85 α 、p-PI3K p85 α 、Akt、p-Akt、PARP、Cleaved PARP 蛋白相对 β -actin 的表达量,与对照组比较 * $P<0.05$,** $P<0.01$

图2 片仔癀对骨肉瘤 U2OS 细胞 PI3K/Akt 信号途径 相关蛋白的影响

法治疗^[8]。片仔癀由蛇胆、牛黄、三七、麝香等中药组成,具有清热解毒,消痈散结的功效,片仔癀治疗恶性肿瘤具有明显疗效^[9-10]。

PI3K/Akt 信号途径是近年来发现的细胞内重要信号转导通路之一,该信号途径的异常激活存在于多种人类肿瘤中,具有促进肿瘤细胞增殖和存活,抑制肿瘤细胞凋亡的作用^[11-12]。研究证实骨肉瘤中存在着 PI3KCA 基因突变,从而激活 PI3K 通路,与骨肉瘤恶性程度相关^[13];Fukaya 也发现骨肉瘤组织存在着 Akt 的过度表达和活化^[14];王恒^[15]研究发现通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,能够抑制骨肉瘤 U2OS 的增殖、侵袭及迁移等肿瘤恶性特征,认为 PI3K/Akt 通路在骨肉瘤细胞的恶性表型中起到十分重要的作用。Perry 等^[16]检测了 59 例骨肉瘤及正常组织的全外显子组、全基因组测序,通过分析基因组对骨肉瘤生存率的影响,发现 PI3K/Akt 通路是骨肉瘤治疗的一个关键点。

在 PI3K 家族中, I A 型 PI3K 是由调控亚基

p85 和催化亚基 p110 组成的异二聚体,是目前研究最多,功能最广泛,被认为与肿瘤的发生关系最为密切的 PI3K^[17]。p85 调节亚基能够稳定 p110 催化亚基,是 I A 型 PI3K 激活所必须的。p85 调节亚基包括 p85 α 、p85 β 、p85 γ 三种,其中 PI3Kp85 α 是 PI3K 中含量最丰富的调节亚基。在生长因子和激素刺激下,PI3Kp85 α 通过其 SH2 区域在细胞质中与受体酪氨酸激酶磷酸化酪氨酸残基结合,释放出 p110,活化的 p110 催化磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸(PIP2)转变为 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3),而 PIP3 作为细胞内的第二信使,是 Akt 转位于胞膜并被活化所必需的,从而促使 Akt 持续磷酸化。Akt 的活化可以激活下游靶蛋白如 Bcl-2 家族、细胞凋亡抑制蛋白,抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶家族成员的活化,从而抑制细胞凋亡。

宫晨等^[18]实验研究显示 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 可明显抑制人骨肉瘤 MG63 类肿瘤干细胞的增殖,其作用可能通过抑制 PI3K 进而抑制 Akt 的磷酸化有关。4-HNE 可以改变 Bcl-2/Bax 的比例,激活 caspase-3 诱导骨肉瘤 MG63 细胞凋亡,这一作用与抑制 Akt 的活性密切相关^[19]。从川续断根中提取的 ADAPW 可通过下调人骨肉瘤 HOS 细胞 PI3K 和 Akt 磷酸化蛋白的表达,抑制 PI3K/Akt 信号通路,诱导其凋亡^[20]。

前期研究表明片仔癀能够有效抑制骨肉瘤 U2OS 细胞的增殖,降低线粒体跨膜电位,改变线粒体通透性,增加 Caspase-9、Caspase-3 的活性,下调 Bcl-2 的表达促进其凋亡^[21]。本实验通过检测 PI3K p85 α 、p-PI3K p85 α 、Akt、p-Akt 蛋白的表达,以观察片仔癀对 PI3K/Akt 信号途径活性的影响。结果显示片仔癀可浓度依赖性抑制骨肉瘤 U2OS 细胞 p-PI3K p85 α 的表达,从而抑制了 PI3K/Akt 信号途径的激活,同时 p-Akt 表达的下降进一步印证了这一点。抑制 PI3K/Akt 信号途径,可诱导骨肉瘤细胞凋亡,我们在 Hoechst 33258 染色观察片仔癀干预 U2OS 细胞 48h 后凋亡状况中可以看到随着药物浓度的增加,细胞凋亡增加。核多聚(ADP-核糖)聚合酶 PARP,参与环境胁迫应答中的 DNA 修复,协助细胞维持生存能力,PARP 的裂解促进细胞崩解并可以作为细胞凋亡的标记物。通过检查测 PARP、

Cleaved-PARP 蛋白的表达,可以看到片仔癀可明显促进 Cleaved-PARP 蛋白的表达。

综上所述,片仔癀可通过抑制 PI3K p85 α 、Akt 蛋白磷酸化,抑制 PI3K/Akt 信号途径的激活,促进 PARP 的裂解,诱导骨肉瘤 U2OS 细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

参考文献:

- [1] Robl B, Pauli C, Botter SM, et al. Prognostic value of tumor suppressors in osteosarcoma before and after neoadjuvant chemotherapy[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 379.
- [2] Allison DC, Carney SC, Ahlmann ER, et al. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era[J]. Sarcoma, 2012; 704872.
- [3] Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology and end results program [J]. Cancer, 2009, 115(7): 1531-1543.
- [4] 张俐, 于波, 林建华. 中药片仔癀胶囊对骨肉瘤细胞诱导凋亡的作用[J]. 中国骨伤, 2009, 22(4): 265-268.
- [5] 张燕, 王琪鸿, 张俐, 等. 片仔癀对人骨肉瘤细胞 U2OS 细胞周期的影响 [J]. 江西中医学院学报, 2012, 24 (5): 61-63.
- [6] 杨德建. 片仔癀对裸鼠原位移植骨肉瘤的作用及机制研究[D]. 福州: 福建中医药大学, 2013.
- [7] Niu NK, Wang ZL, Pan ST, et al. Pro-apoptotic and pro-autophagic effects of the Aurora kinase A inhibitor alisertib (MLN8237) on human osteosarcoma U-2 OS and MG-63 cells through the activation of mitochondria-mediated pathway and inhibition of p38 MAPK/PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 1555-1584.
- [8] 王辉, 孙桂芝. 孙桂芝治疗骨肉瘤经验 [J]. 世界中医药, 2012, 7(1): 21-22.
- [9] 孟丽萍, 顾雪峰. 片仔癀联合治疗毒热瘀结型原发性肝癌免疫指标变化的临床观察[J]. 九江医学, 2008, 23(1): 31-37.
- [10] 黄震, 瞿英, 陆红. XELOX 化疗方案联合片仔癀治疗毒热瘀结型晚期结肠癌疗效观察[J]. 福建中医药, 2014, 45 (5): 30-31.
- [11] Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review [J]. Ann Med, 2014, 46(6): 372-383.
- [12] Kuijjer ML, van den Akker BE, Hilhorst R, et al. Kinome and mRNA expression profiling of high-grade osteosarcoma cell lines implies Akt signaling as possible target for therapy[J]. BMC Med Genomics, 2014, 7: 4.

- [13] Choy E, Hornicek F, MacConaill L, et al. High-throughput genotyping in osteosarcoma identifies multiple mutations in phosphoinositide-3-kinase and other oncogenes [J]. *Cancer*, 2012, 118(11):2905-2914.
- [14] Fukaya Y, Ishiguro N, Senga T, et al. A role for PI3K-Akt signaling in pulmonary metastatic nodule formation of the osteosarcoma cell line, LM8 [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(4): 847-852.
- [15] 王恒. FASN 和 PI3K/Akt 反馈调节信号通路在骨肉瘤细胞 U2OS 恶性表型中的研究[D], 南昌: 南昌大学, 2014.
- [16] Perry JA, Kiezun A, Tonzi P, et al. Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(51):E5564-5573.
- [17] Mellor P, Furber LA, Nyarko JN, et al. Multiple roles for the p85 α isoform in the regulation and function of PI3K signaling and receptor trafficking[J]. *Biochem J*, 2012, 441(1):23-27.
- [18] 宫晨. LY294002 对人骨肉瘤类肿瘤干细胞的影响及其作用机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [19] Ji GR, Yu NC, Xue X, et al. 4-Hydroxy-2-nonenal Induces Apoptosis by Inhibiting AKT Signaling in Human Osteosarcoma Cells[J]. *The Scientific World Journal*, 2014: 873525.
- [20] Chen J, Yao D, Yuan H, et al. Dipsacus asperoides polysaccharide induces apoptosis in osteosarcoma cells by modulating the PI3K/Akt pathway[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 95(2):780-784.
- [21] 张燕, 王琪鸿, 牛素生, 等. 片仔癀诱导 U2OS 细胞凋亡与线粒体膜电位的关系[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(8): 2571-2574.

(编辑: 杨阳)

Pien Tze Huang Induces Apoptosis of Human Osteosarcoma Cell Line U2OS via PI3K/Akt Signaling Pathway

LIN Haiying, LIU Junning, CHEN Bingyi, LI Nan, ZHANG Yan[△]

(College of Osteopahty and Traumatology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of phosphate-dayliositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway on Pien Tze Huang induced apoptosis of human osteosarcoma cell line U2OS. **Methods** U2OS cells were treated by different concentrations of Pien Tze Huang (0.4, 0.8, 1.2mg/mL). The anti-proliferative effect of Pien Tze Huang on U2OS cells was measured by MTT. The apoptosis was detected by Hoechst 33258 staining. The expression levels of the regulatory subunit of PI3K p85 α (PI3K p85 α), phospho-PI3K p85 α (p-PI3K p85 α), protein kinase B (Akt), phospho-Akt (p-Akt), Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), the cleavage of PARP (Cleaved PARP) were analyzed by Western blot. **Results** Pien Tze Huang suppressed the proliferation of U2OS cells in a time and dose-dependent manner. Topical morphological changes were observed by Hoechst 33258 staining. The expressions of p-PI3K p85 α , p-Akt were reduced and Cleaved PARP expression was increased while indicating a statistically significant difference as compared with the blank control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Pien Tze Huang induces apoptosis of human osteosarcoma cell line U2OS through inhibiting PI3K p85 α and Akt phosphorylation in PI3K/Akt signaling pathway and increasing the expression of Cleaved PARP.

KEY WORDS: Pien Tze Huang; osteosarcoma; PI3K/Akt signaling pathway; apoptosis