

白藜芦醇通过 PI3K/Akt 信号通路诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡机制研究 *

负 洁¹, 胡晓佳¹, 段海婧², 龙凯花¹

(1. 西安培华学院医学院, 陕西 西安 710125; 2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 通过研究白藜芦醇诱导 Ishikawa 细胞凋亡的过程中对 PI3K/AKT 信号通路的影响,探讨白藜芦醇通过 PI3K/Akt 信号通路诱导子宫内膜癌细胞凋亡的机制。**方法** Ishikawa 细胞体外培养,经 25、50、100 μ M 白藜芦醇处理细胞 48h 后,倒置显微镜观察 Ishikawa 细胞生长变化;RT-PCR 及 Western-blot 检测相关 mRNA 和蛋白的表达。**结果** 随着白藜芦醇作用浓度的增加,Ishikawa 细胞数量逐渐减少,细胞凋亡率显著上升,与空白组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$);白藜芦醇作用于子宫内膜癌 Ishikawa 细胞 48 h 后,PI3K、Akt、Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达降低,Bax mRNA 和蛋白表达升高,与空白对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 白藜芦醇能够促进 Ishikawa 细胞的凋亡,其机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活,降低 Bcl-2 的表达,促进 Bax 的表达有关。

关键词: 子宫内膜癌; Ishikawa 细胞; 白藜芦醇; PI3K/Akt; Bcl-2; Bax

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2018)04-0013-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2018.04.003

子宫内膜癌多好发于围绝经期及绝经后女性,是女性最常见的生殖道恶性肿瘤之一,病死率高,其发病病因及机制尚不明确,目前临床以手术与化疗相结合综合治疗^[1]。临床上化疗药物多存在毒性大、易产生耐药性等缺点,寻找高效、低毒的治疗药物具有现实的意义^[2-3]。白藜芦醇是从虎杖、葡萄等药用和食用植物中提取的,具有抗炎、抗肿瘤、延缓心血管疾病等药理学作用^[4]。本实验观察 Ishikawa 细胞凋亡过程中对 PI3K/AKT 信号通路的影响,探讨白藜芦醇通过 PI3K/Akt 信号通路诱导子宫内膜癌细胞凋亡的机制,为白藜芦醇作为抗肿瘤药物用于子宫内膜癌的治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株,人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞(由北京大学人民医院惠赠) 将白藜芦醇(福建倍力生物科技有限公司)溶解到二甲基亚砜(DMSO)中,配制成浓度为 1 mM 原液备用,无菌过滤,分装,-20 $^{\circ}$ C 避光保存。实验时用 DMEM 培养液将原液稀释至所需浓

度,现配现用;DMEM 培养液由 10%灭活胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素配制而成。

1.1.2 试剂与仪器 DMEM 高糖培养液(Sigma 公司),胎牛血清(江苏宝来生物科技有限公司),胰蛋白酶(上海如吉生物科技有限公司),兔抗人 PI3K 多克隆抗体(Abcam 公司),Bax 兔单克隆抗体、兔抗人 Akt 多克隆抗体、Bcl-2 兔单克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司) β -actin(中杉金桥生物科技有限公司),二氧化碳细胞培养箱(Thermo 二氧化碳细胞培养箱 371 型),倒置显微镜(OLYMPUS 奥林巴斯显微镜 CX31),流式细胞分析仪(BD LSRFortessa 公司),高速冷冻离心机(Beckman 公司),蛋白电泳系统(北京六一仪器厂),荧光定量 PCR 仪(安诺论生物科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 、95%湿度条件下接种在 DMEM 高糖培养液中,置于含有 5% CO_2 、恒温恒湿(温度 37 $^{\circ}$ C,湿度 95%)的培养箱中培养,隔天更换培养液并注意

收稿日期: 2018-08-04

* 基金项目: 陕西省教育厅 2016 年度专项科学研究计划(16jk2134)

第一作者简介: 负洁(1988-),女,硕士,讲师,研究方向:中药药理与毒理。

观察。本实验采用对数生长期的 Ishikawa 细胞。

1.2.2 实验分组 将培养好的细胞分为空白对照组、白藜芦醇高中低剂量组（分别含有白藜芦醇 25 μM 、50 μM 、100 μM ）。

1.2.3 倒置相差显微镜下细胞形态学的变化 将子宫内癌 Ishikawa 细胞接种于 32 孔培养板中，分别加入不同浓度（0 μM 、25 μM 、50 μM 、100 μM ）的白藜芦醇，每组设 3 个平行复孔，继续置于含有 5% CO_2 ，恒温恒湿（温度 37 $^{\circ}\text{C}$ ，湿度 95%）的培养箱中培养，48h 后在倒置相差显微镜下观察各组子宫内癌 Ishikawa 细胞的形态，并拍照保存。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将对数生长期的 SGC7901 细胞接种到 32 孔板中，2 mL/孔，调整细胞密度，使每孔含 3×10^5 个细胞。按照分组加入不同浓度的白藜芦醇，培养 48 h，用 PBS 清洗细胞，常规消化、离心收获细胞。按照凋亡试剂盒说明，加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL 碘化丙啶(PI)并混匀，在常温、避光的条件下孵育 15 min。1 h 内用流式细胞仪检测细胞的凋亡率，用 flowjo 软件分析细胞凋亡百分比。

1.2.5 RT-PCR 检测各组 mRNA 相对表达量 取对数生长期的 Ishikawa 细胞株接种于 25 cm 的培养瓶中，分别加入不同浓度（0 μM 、25 μM 、50 μM 、100 μM ）的白藜芦醇，48h 后，用 PBS 将细胞清洗 3 次，收集细胞。采用 Trizol[®] Reagent 试剂盒进行总 RNA 提取。逆转录合成 cDNA，在 95 $^{\circ}\text{C}$ 、45s，95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s 的条件下进行 PCR 扩增，共 40 个循环。PI3K 上游引物：5'-CATCACTTCCTCCTGCTCTAT-3'，下游引物：5'-CAGTTGTTGGCAATCTTCTTC-3'；Akt 上游引物：5'-GGACAACCGCCATCCAGACT-3'，下游引物：5'-GCCAGCGACCTCCATCTC-3'；Bcl-2 上游引物：5'-ATGGCAAATGACCAGCAGA-3'，下游引物：5'-

CAGTTGTTGGCAATCTTCTTC-3'；Bax 上游引物：5'-GGATGCGTCCACCAAGAA-3'，下游引物：5'-GCACTCCCGCCACAAAGA-3'； β -action 上游引物：5'-TGTTTGAGACCTTGAACACCC-3'，下游引物：5'-AGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'。用图像分析仪扫描凝胶密度，GelworksID 软件分析各组 mRNA 的相对表达量。

1.2.6 Western blot 印迹分析各组蛋白相对表达量 取对数生长期的 Ishikawa 细胞株接种于 25 cm 的培养瓶中，分别加入不同浓度（0 μM 、25 μM 、50 μM 、100 μM ）的白藜芦醇，作用细胞 48 h 后，将细胞清洗 3 次，收集细胞，通过 RIPA 裂解液的方法获得各组细胞蛋白；在酶标仪上，用 BCA 试剂盒检测，计算出各组蛋白的浓度，采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）电泳的方法转膜。5%脱脂奶粉常温封闭 1 h，4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用相应的一抗孵育过夜；常温条件下再经二抗（1:10 000）孵育 1 h，ECL 显色，在化学发光成像系统中拍摄照片。

1.3 统计学方法 应用 SPSS11.5 软件对数据进行统计分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较在方差齐时用方差分析，两两比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义， $P < 0.01$ 为差异有极显著性意义。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察检测 Ishikawa 细胞形态变化 不同浓度的白藜芦醇作用于子宫内癌 Ishikawa 细胞 48 h 后，倒置显微镜观察下 Ishikawa 细胞形态学变化。结果显示，空白对照组子宫内癌 Ishikawa 细胞均贴壁生长，紧密接触，未见脱落或变形细胞。随着白藜芦醇浓度的增加，细胞数量逐渐减少，发亮的悬浮死细胞增多，细胞代谢物增多，培养液浑浊。见图 1。

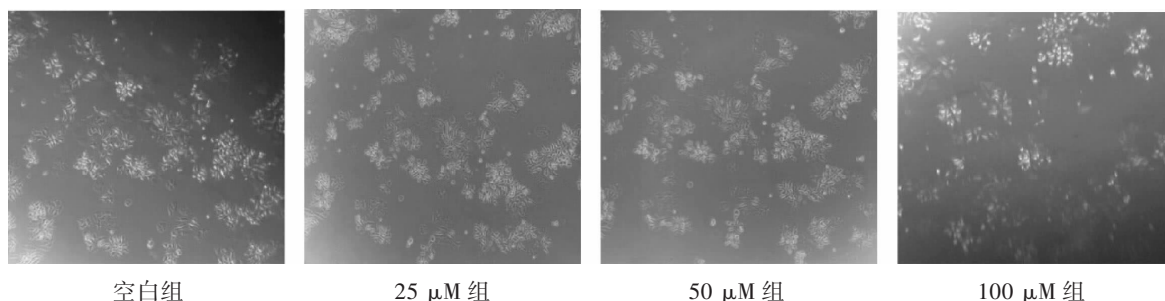


图 1 不同浓度白藜芦醇对 Ishikawa 细胞形态的影响 ($\times 100$)

2.2 流式细胞仪检测各组 Ishikawa 细胞凋亡率 不同浓度白藜芦醇对 4 组 Ishikawa 细胞凋亡率的影响, 各组凋亡率分别为空白组(2.260 ± 0.1041)、25 μM 组(11.47 ± 0.484)、50 μM 组(22.33 ± 2.333)、100 μM 组(33.67 ± 1.764)。与空白组相比较, 经过白藜芦醇干预之后, 随着白藜芦醇浓度的升高, 细胞的凋亡率逐渐上升, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 白藜芦醇对 4 组 Ishikawa 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	凋亡率
空白组	3	2.260 ± 0.1041
25 μM 组	3	11.47 ± 0.484**
50 μM 组	3	22.33 ± 2.333**
100 μM 组	3	33.67 ± 1.764**

注:与空白组比较, ** $P<0.05$

2.3 RT-PCR 检测各组 Ishikawa 细胞 mRNA 相对表达量 通过 RT-PCR 实验显示, 不同浓度的白藜芦醇干预 Ishikawa 细胞 48 h 后, 随着白藜芦醇浓度的增加, Ishikawa 细胞中 PI3K、AKT、Bcl-2 mRNA 相对表达量逐渐降低, Bax mRNA 相对表达量逐渐升高。与空白组比较, 差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表 2。

2.4 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达 Ishikawa 细胞经过不同浓度的白藜芦醇干预 48h 后, Western blot 结果显示随着白藜芦醇干预浓度的增加, Ishikawa 细胞中 PI3K、AKT、Bcl-2 蛋白相对表达量均有不同程度的降低, Bax 蛋白相对表达量逐渐升高。与空白组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$)。如图 2、表 3。

表 2 白藜芦醇对 4 组 mRNA 相对表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K	AKT	Bcl-2	Bax
空白组	1.020 ± 0.042	1.070 ± 0.029	1.230 ± 0.059	0.983 ± 0.015
25 μM 组	0.873 ± 0.034	1.013 ± 0.026	1.107 ± 0.013	1.273 ± 0.057**
50 μM 组	0.763 ± 0.020**	0.853 ± 0.067*	0.987 ± 0.050*	1.367 ± 0.032**
100 μM 组	0.647 ± 0.020**	0.793 ± 0.043**	0.850 ± 0.055**	1.690 ± 0.044**

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表 3 白藜芦醇对 4 组相关蛋白相对表达量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	PI3K	AKT	Bcl-2	Bax
空白组	2.010 ± 0.040	2.387 ± 0.041	1.430 ± 0.026	0.573 ± 0.015
25 μM 组	1.893 ± 0.049	2.220 ± 0.026*	0.897 ± 0.023*	0.680 ± 0.012*
50 μM 组	1.850 ± 0.095	1.800 ± 0.012**	0.577 ± 0.015**	0.870 ± 0.012**
100 μM 组	1.633 ± 0.044**	1.320 ± 0.021*	0.493 ± 0.015**	1.203 ± 0.012**

注:与空白组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

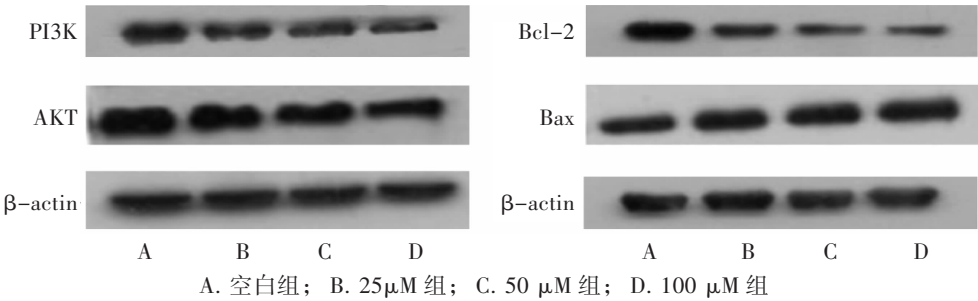


图 2 不同浓度白藜芦醇对 Ishikawa 细胞蛋白表达量的影响

3 讨论

子宫内膜癌是女性生殖道最为常见恶性肿瘤之一, 占女性生殖道恶性肿瘤的 20%~30%, 近年来发病

率处于上升趋势^[5-6]。白藜芦醇是一种多酚类化合物, 广泛存在于蓼科植物虎杖的根茎与根, 豆科植物花生的种子, 葡萄科植物葡萄果实的皮与籽等。国内外研

究表明白藜芦醇具有抗炎、抗血小板凝集、抗肿瘤促进肿瘤细胞凋亡、抗动脉粥样硬化等多种生物学功能^[7-8]。本研究结果显示,Ishikawa 细胞经过白藜芦醇干预 48h 之后,细胞数量逐渐减少,发亮的悬浮死细胞增多,细胞代谢物增多,培养液浑浊。经过流式细胞仪检测之后,与空白组相比较,白藜芦醇干预之后细胞凋亡率显著上升,说明白藜芦醇具有明确的促进肿瘤细胞凋亡的作用,这与王清莹等人的研究结果相一致^[9]。

PI3K/Akt 信号通路在生命活动中发挥着极其重要的作用,PI3K 介导的信号传递调节细胞的分裂、分化、凋亡等活动,在子宫内膜癌的发生发展中起着重要的作用^[10-11]。Bcl-2 蛋白家族主要参与细胞的内源性凋亡途径完成对细胞凋亡的调控,是 PI3K/Akt 下游蛋白,包括 Bcl-2 类和 Bax 类,Bax 是最重要的促进凋亡基因,而 Bcl-2 是抑凋亡基因。PI3K/Akt 信号通路可直接促进抑凋亡蛋白 Bcl-2 的表达和抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达,从而抑制凋亡^[12-13]。

本研究结果显示,shikawa 细胞经过白藜芦醇干预 48 h 之后,随着白藜芦醇浓度的升高,细胞中 PI3K、AKT、Bcl-2 mRNA 相对表达量逐渐降低,Bax mRNA 相对表达量逐渐升高;PI3K、AKT、Bcl-2 蛋白相对表达量逐渐降低,Bax 蛋白相对表达量逐渐升高。与空白组比较,差异有统计学意义。由于 Bcl-2 是重要的抗凋亡基因,BAX 是重要的促凋亡基因,因此 Bax 过表达会抑制 Bcl-2 的作用,而促使细胞凋亡^[14]。实验结果提示,白藜芦醇可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,促进 Bax 过表达,抑制 Bcl-2 的作用,从而促进 shikawa 细胞的凋亡。

综上,白藜芦醇促进促进 shikawa 细胞凋亡的机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活,降低 Bcl-2 的表达,促进 Bax 的表达有关,但其更深层次的机制有待进一步研究。白藜芦醇抑制生长促进凋亡的作用,和其无毒副作用的优势,有望成为新一代的抗肿瘤药物。

参考文献:

[1] 冯文,孙敏,张吉瑞,等.二甲双胍联合顺铂对孕激素耐药子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖、凋亡的影响及机制[J].山

东医药,2018,58(25):39-43.

- [2] PAUTIER P, POMMERENT F. Systemic therapy for advanced endometrial cancer [J]. Bull Cancer, 2017, 104(12): 1046-1053.
- [3] ETHIER J L, DESAUTELS D N, AMIR E, et al. Is hormonal therapy effective in advanced endometrial cancer? A systematic review and meta-analysis[J]. Gynecol Oncol, 2017, 147(1): 158-166.
- [4] HSIEH T C, WU J M. Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule [J]. Biofactors, 2010, 36(5): 360-369.
- [5] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.
- [6] 林琼燕, 生秀杰, 刘娟, 等. 顺铂通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞自噬[J]. 肿瘤预防与治疗, 2017, 30(5): 337-342.
- [7] SINGH C K, NDIAYE M A, AHMAD N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation [J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(6): 1178-1185.
- [8] 张朋, 孙媛, 姚媛媛, 等. 白藜芦醇对女性生殖系统恶性肿瘤作用的研究进展 [J]. 大连医科大学学报, 2015, 37(4): 403-407.
- [9] 王清莹, 姜飞洲, 庄玉玉, 等. 白藜芦醇对人子宫内膜癌细胞系 AN3CA 增殖和凋亡效应及其机制探讨[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(13): 2401-2404.
- [10] 刘俐伶, 植枝福, 庞丽红. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在常见妇科疾病中的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(9): 59-62.
- [11] 张志芳, 王志莲, 郝敏. PI3K/AKT/mTOR 信号通路在妇科恶性肿瘤中的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(18): 85-87.
- [12] 姚亮, 柏凌, 何娜, 等. PI3K/Akt/Bcl-2 信号通路在原发性翼状胬肉中的机制研究 [J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(5): 441-444.
- [13] 杨雪松, 邓显忠, 鲜述彦, 等. PI3K/AKT/Bcl-2 信号通路介导人前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及苦参碱的干预效果分析[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(15): 2266-2269.
- [14] 张元浩, 闫斌, 王靖博, 等. 胰岛素对高糖培养海马神经元凋亡及 IRS/PI_3K/AKT 信号通路、Bcl-2 与 Bax 蛋白表达的影响[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(3): 60-65.