

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.07.004

丙酮酸乙酯通过下调蛋白激酶 B 通路抑制人胃癌细胞侵袭转移的研究

张 靖,朱金水,周 洲,陈维雄,陈尼维

Inhibitory Effects of Ethyl Pyruvate on Invasion and Metastasis of Human Gastric Cancer SGC-7901 Cells via Downregulation of Akt Pathway

Zhang Jing, Zhu Jinshui, Zhou Zhou, Chen Weixiong, Chen Niwei

Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Corresponding Author: Zhu Jinshui, E-mail: Zhujs1803@hotmail.com

Abstract: Objective To explore the effects and molecular mechanisms of ethyl pyruvate (EP) on invasion and metastasis of human gastric cancer SGC-7901 cells. **Methods** MTT assay was used to evaluate IC_{50} of EP on human gastric cancer SGC-7901 cell line. After different concentrations of EP (0, 10 mmol/L, 20 mmol/L and 40 mmol/L) were added into SGC-7901 cells, the expression levels of protein kinase B (Akt) and phosphorylated Akt (p-Akt) mRNA were identified by real-time PCR, and the expression levels of Akt, p-Akt, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 protein were detected by Western blot. The invasive and metastatic activities of gastric cancer cells were evaluated by wound-healing and Transwell assay. SGC-7901 xenograft tumor model was established, and the protein expression of Akt, p-Akt, MMP-2 and MMP-9 was further validated by immunohistochemical analysis. **Results** The IC_{50} of EP on human gastric cancer SGC-7901 cells was about 36.73 mmol/L. EP administration inhibited Akt mRNA expression, and down-regulated Akt, p-Akt, MMP-2 and MMP-9 protein expression. Wound-healing assay indicated that the migration and exercise capability of SGC-7901 cells was reduced obviously; Transwell assay showed, in comparison with the control group (93.33 ± 4.16), the number of invasive and metastatic cells infiltrated the matrigel in EP 10 mmol/L group (75.34 ± 4.73), EP 20 mmol/L group (61.34 ± 3.06) and EP 40 mmol/L group (39.00 ± 3.00) was respectively decreased (each $P < 0.001$). Immunohistochemical analysis further confirmed the expression levels of Akt, p-Akt, MMP-2 and MMP-9 protein shown by Western blot. **Conclusion** EP administration can inhibit the invasion and metastasis of human gastric cancer SGC-7901 cells via downregulation of Akt pathway, and it may play a crucial role in cancer therapy.

Key words: Ethyl pyruvate; Protein kinase B; Gastric cancer; Metastasis

摘要:目的 探讨丙酮酸乙酯(EP)对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移的抑制效果及机制。方法 噻唑蓝比色分析法(MTT法)测定 EP 在胃癌 SGC-7901 细胞中的半数抑制浓度(IC_{50})。不同浓度 EP 加入到胃癌细胞后,实时定量 PCR 检测蛋白激酶 B(Akt)的 mRNA 表达水平;Western blot 检测 Akt、p-Akt、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 MMP-9 的蛋白表达水平。划痕和 Transwell 实验评价胃癌细胞侵袭转移的能力。通过建立裸鼠皮下移植瘤模型,免疫组织化学进一步验证以上蛋白的表达水平。结果 EP 在胃癌 SGC-7901 细胞中的 IC_{50} 为 36.73 mmol/L。EP 抑制 Akt mRNA 的表达及下调 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达。划痕实验显示 EP 可抑制胃癌细胞的迁移运动能力;Transwell 显示,与对照组(93.33 ± 4.16)相比,EP 10 mmol/L 组(75.34 ± 4.73)、EP 20 mmol/L 组(61.34 ± 3.06)及 EP 40 mmol/L 组(39.00 ± 3.00)的侵袭转移细胞数明显减少(P 均 <0.001)。免疫组织化学进一步证实了 Western blot 的检测结果。结论 EP 通过下调 Akt 通路抑制人胃癌细胞的侵袭和转移,对癌症具有一定的治疗效果。

关键词: 丙酮酸乙酯;蛋白激酶 B;胃癌;转移

中图分类号:R735.2;R73-36 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)07-0776-04

收稿日期:2011-08-25;修回日期:2012-01-12

基金项目:上海市科委动物实验基金资助项目(10140902500);

上海交通大学医学院博士创新基金资助项目(BXJ201234)

作者单位:200233 上海,上海交通大学附属第六人民医院消化内科

通信作者:朱金水, E-mail: zhujs1803@hotmail.com

作者简介:张靖(1981-),男,博士在读,主要从事胃癌的基础与临床研究

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,死亡率在恶性肿瘤中排列第二位^[1],其中引起胃癌患者死亡的主要原因是肿瘤的侵袭和转移。因此,探索胃癌转移相关靶点的抑制策略具有重要的研究意义。研究显示,包括 NF- κ B 在内的多种通路参与

晚期胃癌的侵袭和转移,而 Park 等^[2]发现 EP 可通过抑制 NF- κ B 通路抑制肿瘤血管的形成和转移。因此,作为 NF- κ B 上游的 Akt 信号通路成为我们关注的焦点。EP 作为抗炎剂还能抑制脂多糖诱导的 MMP-9 上游 p38 MAPK、ERK 和 Akt 磷酸化,从而对小胶质细胞具有抗炎活性^[3]。而且,EP 还能诱导肿瘤细胞的凋亡,参与肿瘤生长的抑制作用^[4]。本研究旨在探讨 EP 对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移的抑制效果及作用机制,为胃癌的治疗提供新的方法和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

丙酮酸乙酯及其稀释液乳酸林格氏液购于美国 Sigma 公司。Real-time PCR 引物及 dsDNA Oligo 由美国 ABI 公司合成。DMEM 培养液和 10% 胎牛血清购于 Gibco 公司;胰蛋白酶购于 Invitrogen 公司。Transwell 小室购自美国 Costar 公司。Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。胃癌细胞株 SGC-7901 来源于上海第六人民医院消化疾病研究室。BALB/c-nu (无特定病原体级) 雌性裸鼠 (4~6 周龄,体重 15~22 g) 由中国科学院实验动物中心上海斯莱克斯实验动物有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 应用人胃癌 SGC-7901 细胞在 DMEM 完全培养液中常规培养,培养液中含有 10% 的胎牛血清。培养条件为湿润状态下 37°C 5% CO₂。当细胞生长到 60%~70% 时,将不同浓度的 EP (10、20 和 40 mmol/L) 及等体积的乳酸林格氏液加入到含有血清的培养液,每半小时轻微摇晃数次,24 h 后可进行后续实验。

1.2.2 MTT 法 EP 加入胃癌细胞 48 h 后,将浓度为 5 mg/ml 的 MTT 以每孔 20 μ l 加入待测的 96 孔板内,37°C 培养 4 h,弃上清液,每孔加 200 μ l DMSO 并振荡 20 min,最后用酶标仪 570 nm 波长测定各孔的吸光度 (OD 值),每个浓度梯度取 4 个复孔 OD 值的平均值。用未处理的细胞作为对照,求出 EP 对治疗组肿瘤细胞的抑制率。抑制率 = 1 - (治疗组 OD 值/对照组 OD 值)。

1.2.3 Real-time PCR 不同浓度的 EP 加入到 SGC-7901 细胞 24 h 后,提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA。其中,Akt 引物上游序列:5'-taggtgtg-gatgggtgcaga-3',下游序列:5'-ctcccacagaccagaacat-3'; GAPDH 引物上游序列:5'-caacgaatttgctacag-ca-3',下游序列:5'-agggtctacatggcaactg-3'。分别用上述引物于荧光定量 PCR 仪 (7500 型 ABI USA) 上进行 Real-time PCR 扩增,以 GAPDH 作参照。扩增体系 25 μ l: SYBR Green 12.5 μ l, ROX 0.5 μ l, ddH₂O 10 μ l, cDNA 1 μ l, 上游引物 0.5 μ l, 下游引物 0.5 μ l。反应条件:步骤 1:95°C 0.10 min (循

环数 1)。步骤 2:95°C 0.05 min, 60°C 0.34 min (循环数 40)。S 步骤 3:95°C 0.15 min, 60°C 1.00 min, 95°C 0.15 min (循环数 1)。Real-time PCR 结果判定: Δ Ct = CT 目的基因 - CT 内参 (GAPDH), $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct 处理组 - Δ Ct 对照组, RQ (Relative Quantitation)_{处理组} = 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}, 其中对照组 RQ 值设为 1。

1.2.4 蛋白印迹 将 5 \times 10⁷/L 待检验细胞培养过夜后,裂解收获蛋白,4°C 12 000 r/min 离心 15 min, 20 μ l 上样量进行电泳。电转至 PVDF 膜 (Millipore) 后封闭。Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 一抗、辣根过氧化物酶标记二抗。化学发光底物加于 PVDF 膜上,凝胶成像系统照像,GAPDH 二次杂交。70°C 水浴洗膜 30 min 后用同法以肌动蛋白检测作为内对照,用 UV 光密度扫描仪检测出 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 与 GAPDH 每个杂交图像峰面积值,以峰面积值的比值代表蛋白的表达量。

1.2.5 划痕实验 将不同浓度的 EP 加入到 SGC-7901 细胞后,用 200 μ l 微量移液头在 6 孔板内垂直划痕,磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 2 次后加入无血清培养液,连续培养 72 h 相差显微镜下观察细胞迁移情况。

1.2.6 Transwell 侵袭实验 应用 12 孔 Transwell 侵袭小室进行侵袭实验。上室的聚碳酸酯膜-Matrigel (5 μ g/ μ l) 在 37°C 聚合后,在上室孔中分别准确加入 EP 处理组和对照组的 SGC-7901 细胞 1 \times 10⁵ 个/孔 (无血清培养液的单细胞悬液),下室中加入趋化因子 600 μ l (NIH3T3 细胞 48 h 无血清的条件培养液),培养 24 h。待培养时间结束后将 Transwell 上室的附着细胞用湿棉签擦去、苏木精染色,封片后显微镜下 (\times 200) 直接观察穿过膜的细胞数。每张膜中央部分和周围部分各随机取 3 个视野,计数每个视野内的穿过微孔的细胞数,每组重复 3 次。

1.2.7 免疫组织化学法 将常规体外培养的 SGC-7901 细胞用胰蛋白酶消化后,1 \times 10⁸ 个细胞植入裸鼠双侧腹股沟部皮下,全部成瘤。待瘤体长至 5 mm³ 后将其剪碎至 1~2 mm³ 大小,植入 21 只裸鼠腹股沟部皮下,大约 2 周后瘤体增至约 5 mm³ 时,随机分为 3 组,每组 7 只。治疗组分别腹腔注射 EP 40 mg/kg ($n=7$) 和 80 mg/kg ($n=7$),对照组注射等体积的 PBS ($n=7$)。于第 2 周末处死裸鼠,取下肿瘤组织,10% 甲醛固定、包埋制成蜡块,常规 4 μ m 切片。采用半定量免疫组织化学法检测 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达。阳性产物为棕黄色或呈棕褐色。图像采集后测定免疫组织化学图像中阳性比率。每组 5 张切片,每张切片至少分析 3 个视野 (\times 200)。

1.3 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, IC₅₀ 值采用 SPSS 11.5 统计软件的 Probit 求解, χ^2 检验进行统计学处理。方差分析进行各组间的显著性检验。

2 结果

2.1 EP 在胃癌 SGC-7901 细胞中的 IC₅₀

不同浓度 EP 加入到胃癌 SGC-7901 细胞 48 h 后, MTT 测定对照组、EP 10 mmol/L 组、EP 20 mmol/L 组和 EP 40 mmol/L 组的 OD 值分别是 (1.17 ± 0.04)、(0.97 ± 0.02)、(0.85 ± 0.02) 及 (0.54 ± 0.03)。EP 浓度与胃癌细胞抑制率的曲线见图 1。EP 在一定程度上抑制胃癌细胞的增殖。回归方程经拟合优度检验 $\chi^2 = 1.736, P = 0.42$, 说明曲线拟合良好。可计算出 EP 在人胃癌细胞中的 IC₅₀ 值为 36.73 mmol/L。

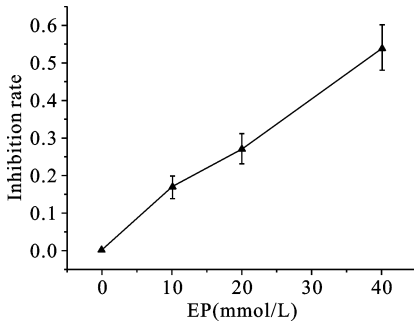
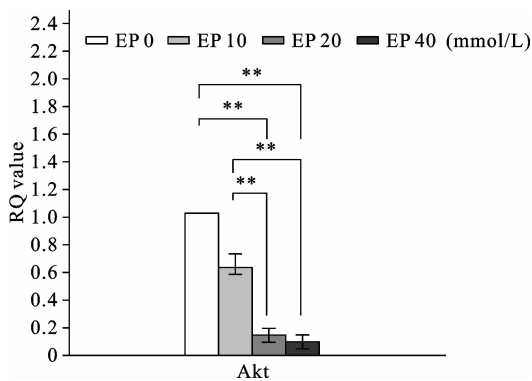


图 1 EP 浓度与胃癌细胞抑制率
Figure 1 Different concentrations of EP and inhibition rate of gastric cancer cells

2.2 不同浓度 EP 抑制胃癌细胞中 Akt mRNA 表达

将不同浓度 EP 加入到胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 后, 实时定量 PCR 判定基因 Akt 的 mRNA 表达水平。统计结果显示, EP 10 mmol/L 组、EP 20 mmol/L 组和 EP 40 mmol/L 组的 Akt 的 ΔC_t 值分别是 (4.45 ± 0.23)、(6.68 ± 0.69) 和 (7.45 ± 0.16), 比 EP 0 mmol/L 对照组 (3.86 ± 0.27) 明显增高 ($F = 38.369, P = 0.002$)。同样以 PCR 的扩增指数 RQ 值为纵坐标作图也反映了这样的结果, 见图 2。可见不同浓度 EP 可抑制胃癌细胞中 Akt 的 mRNA 表达, 并且具有剂量依赖性。



** : $P < 0.01$

图 2 不同浓度 EP 抑制胃癌细胞中 Akt 的表达
Figure 2 Inhibition of Akt mRNA expression by different concentrations of EP

2.3 不同浓度 EP 抑制胃癌细胞中 Akt、p-Akt、

MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达

对以上蛋白进行定量研究发现, 与对照组比较, EP 10 mmol/L 组、EP 20 mmol/L 组和 EP 40 mmol/L 组的 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平分别下调了 (29.2%, 64.7%, 68.6%)、(48.2%, 60.8%, 80.7%)、(35.4%, 41.4%, 75.9%) 和 (43.3%, 11.8%, 74.8%), 差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.001), 见图 3。可见不同浓度 EP 下调胃癌细胞中 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达, 并具有一定的剂量依赖性。

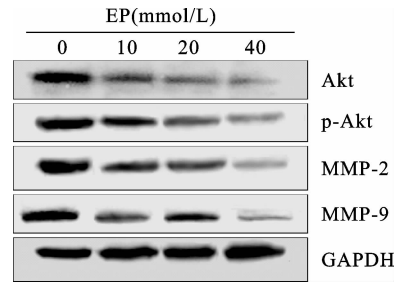


图 3 不同浓度 EP 抑制胃癌细胞中 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达
Figure 3 Inhibition of Akt, p-Akt, MMP-2 and MMP-9 protein expression by different concentrations of EP

2.4 EP 抑制胃癌细胞迁移运动的能力

划痕实验显示, 划线 0 h 后边缘整齐锐利, 24 h 后细胞开始向线内生长且边缘不整齐, 48 h 后对照组划线两侧细胞大部分已经开始融合, EP 治疗组趋势并不明显, 见图 4。

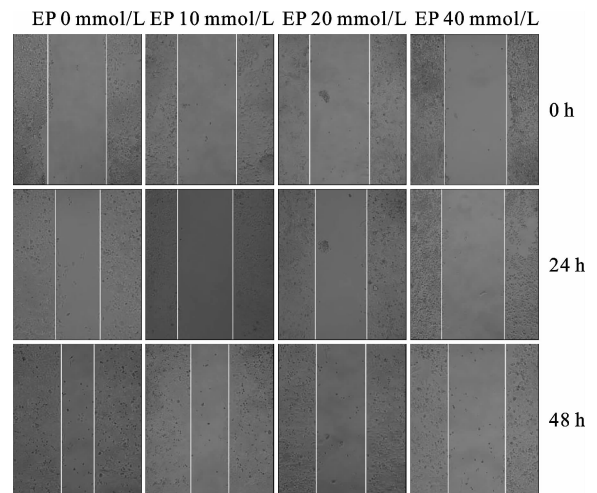


图 4 划痕试验显示 EP 对胃癌细胞迁移运动能力的抑制作用 ($\times 200$)

Figure 4 Inhibition of migration and exercise capability of SGC-7901 cells by EP indicated by wound-healing assay ($\times 200$)

2.5 EP 抑制胃癌细胞的侵袭转移

Transwell 实验显示, 与对照组穿过小室的细胞数 (93.33 ± 4.16) 相比, EP 10 mmol/L 组 (75.34 ± 4.73)、EP 20 mmol/L 组 (61.34 ± 3.06) 及 EP 40 mmol/L 组 (39.00 ± 3.00) 的侵袭转移细胞数明显

减少(P 均 <0.001),见图 5。

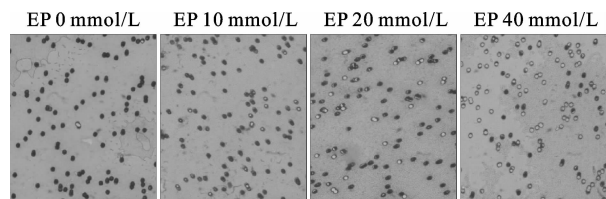


图 5 Transwell 实验显示 EP 对胃癌细胞侵袭转移的抑制作用($\times 200$)

Figure 5 Inhibition of invasion and metastasis of SGC-7901 cells by EP indicated by Transwell assay($\times 200$)

2.6 EP 抑制 SGC-7901 移植瘤组织中蛋白的表达

免疫组织化学染色显示,与 PBS 组比较,EP 40 mg/kg 组和 EP 80 mg/kg 组的 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 棕黄色细胞数及阳性率明显降低。EP 40 mg/kg 组和 EP 80 mg/kg 组之间除 Akt 蛋白差异无统计学意义外,其他指标差异均有统计学意义,见表 1。

表 1 EP 对 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 蛋白阳性率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 1 Influence of EP on positive rate of Akt, p-Akt, MMP-2 and MMP-9 protein($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	n	Akt	p-Akt	MMP-2	MMP-9
PBS	5	34.62 \pm 10.02	47.44 \pm 8.94	32.98 \pm 4.46	12.68 \pm 0.54
EP 40 mg/kg	5	17.80 \pm 1.30*	28.40 \pm 2.30*	23.46 \pm 2.69*	10.36 \pm 0.75*
EP 80 mg/kg	5	13.82 \pm 1.05*	15.00 \pm 2.12*▲	11.66 \pm 1.44*▲	4.98 \pm 1.83*▲

Note: * : $P < 0.01$, vs. PBS group; ▲: $P < 0.01$, vs. EP 40 mg/kg group

3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,在我国居恶性肿瘤之首。肿瘤的侵袭和转移是导致胃癌患者死亡的主要原因。胃癌还是一种多基因疾病,不同基因在诱发肿瘤发生过程中涉及不同的通路,针对这些通路的关键靶点进行基因干预治疗已成为肿瘤治疗的热点^[5]。研究表明,Akt 与肿瘤的侵袭和转移关系密切,作为多种信号转导通路的焦点,它调节了包括侵袭和转移在内肿瘤细胞的多种生物学进程。Nam 等^[6]对 311 例胃癌组织检测发现有 74% 存在 Akt 过表达,78% 存在 p-Akt 过表达,并且 Akt 的激活与胃癌淋巴结的侵袭和转移关系密切。在我们前期工作中,我们利用 RNA 干扰技术靶向敲低了 Akt 在胃癌细胞的表达,发现 Akt 下调通过抑制 MMP-2 和 MMP-9 的表达抑制胃癌细胞的侵袭和转移^[7]。

丙酮酸乙酯是丙酮酸的衍生物,但比其更稳定。EP 是机体内氧化反应产物的“清道夫”,能够抑制病理状态下的过氧化反应。在内毒素刺激的 RAW264.7 巨噬细胞,EP 可抑制肿瘤坏死因子的释放及 p38 丝裂原激活蛋白激酶和 NF- κ B 信号通路的活化。EP 除了具有抗炎特性外,还有强大的抗血管生成活性。它通过下调 NF- κ B 信号通路抑制血管生长的级联放大,包括血管生长、侵袭、迁移

和管状形成。因此,EP 作为一种多功能候选药物可能具有抗血管生成和肿瘤治疗的潜力^[2]。Liang 等^[8]还发现,经 EP 治疗小鼠肝肿瘤后,EP 能减少肿瘤早期 NK 细胞、单核细胞和 T、B 淋巴细胞的浸润和白介素-6、高迁移率组蛋白 B1 水平的明显下调,并诱导肿瘤凋亡细胞的增加。因此,EP 通过诱导肿瘤细胞凋亡和减少宿主炎症反应,抑制肝肿瘤的生长,EP 结合其他治疗方法可能在癌症的治疗中发挥作用。

在本研究中,我们将不同浓度的 EP 加入到胃癌 SGC-7901 细胞中,探讨 EP 对人胃癌细胞侵袭和转移的抑制效果和机制。结果发现,EP 能抑制胃癌细胞中 Akt mRNA 和蛋白的表达,下调 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平,进而抑制胃癌细胞的侵袭转移。免疫组织化学进一步证实了 EP 对胃癌移植瘤组织中 Akt、p-Akt、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的抑制作用。众所周知,MMP-2 和 MMP-9 是与肿瘤侵袭转移密切相关的细胞因子,它们通过刺激血管增生和降解细胞外基质促进肿瘤细胞的扩散和转移。而 Akt 通路通过调节 MMP-2 和 MMP-9 的表达参与胃癌的侵袭和转移。所以,EP 通过下调胃癌细胞中 Akt 通路的表达,抑制人胃癌细胞的侵袭转移。EP 结合其他治疗方法可能在癌症的治疗中发挥更大作用,这为癌症的治疗提供了新的方法和策略。

参考文献:

- [1] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002 [J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] Park SY, Yi EY, Jung M, et al. Ethyl pyruvate, an anti-inflammatory agent, inhibits tumor angiogenesis through inhibition of the NF- κ B signaling pathway [J]. Cancer Lett, 2011, 303(2): 150-4.
- [3] Lee EJ, Kim HS. Inhibitory mechanism of MMP-9 gene expression by ethyl pyruvate in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells [J]. Neurosci Lett, 2011, 493(1-2): 38-43.
- [4] Lim SC, Choi JE, Kim CH, et al. Ethyl pyruvate induces necrosis-to-apoptosis switch and inhibits high mobility group box protein 1 release in A549 lung adenocarcinoma cells [J]. Int J Mol Med, 2007, 20(2): 187-92.
- [5] Pai SI, Lin YY, Macaes B, et al. Prospects of RNA interference therapy for cancer [J]. Gene Ther, 2006, 13(6): 464-77.
- [6] Nam SY, Lee HS, Jung GA, et al. Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis [J]. APMIS, 2003, 111(12): 1105-13.
- [7] Zhang J, Zhang QY, Fu YC, et al. Expression of p-Akt and COX-2 in gastric adenocarcinoma and adenovirus mediated Akt1 and COX-2 shRNA suppresses SGC-7901 gastric adenocarcinoma and U251 glioma cell growth in vitro and in vivo [J]. Technol Cancer Res Treat, 2009, 8(6): 467-78.
- [8] Liang X, Chavez AR, Schapiro NE, et al. Ethyl pyruvate administration inhibits hepatic tumor growth [J]. J Leukoc Biol, 2009, 86(3): 599-607.

[编辑:周永红;校对:黄园玲]