

## NVP-BEZ235 对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡及侵袭转移的影响

210003 南京 东南大学附属第二医院肿瘤科 魏娟, 祁继平<sup>1</sup>, 郑勤<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 探讨 PI3K/Akt/mTOR 双靶点抑制剂 NVP-BEZ235 在体外对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡及侵袭转移的影响。方法 采用 0、0.01、0.1、1.0 μmol/L NVP-BEZ235 处理 HepG2 细胞, 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测不同浓度 NVP-BEZ235 处理 24、48、72 和 96h 的增殖抑制率, 流式细胞仪、Transwell 侵袭实验、荧光定量 PCR 及免疫印迹检测不同浓度 NVP-BEZ235 处理 48h 后的细胞周期分布、穿膜细胞数及基质金属蛋白酶 (MMP)-2 的 mRNA 和蛋白水平。结果 NVP-BEZ235 可呈剂量和时间依赖的方式升高增殖抑制率 ( $P < 0.05$ ); 除 0.01 μmol/L 处理 24h 的晚期凋亡率外, 0.01、0.1、1.0 μmol/L NVP-BEZ235 处理 24、48h 的早、晚期凋亡率均高于 0 μmol/L ( $P < 0.05$ ); 0.01、0.1、1.0 μmol/L NVP-BEZ235 处理 48h 的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例高于 0 μmol/L, 穿膜细胞数、MMP-2 mRNA 和蛋白水平及 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例均低于 0 μmol/L ( $P < 0.05$ ), 且各浓度间的差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 NVP-BEZ235 可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖及侵袭转移, 促进其凋亡和阻滞细胞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期并降低 MMP-2 表达。

**【关键词】** NVP-BEZ235; 肝癌; 增殖; 凋亡; 侵袭转移

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2014)07-0594-05

### Effect of NVP-BEZ235 on proliferation, apoptosis, invasion and metastasis of HepG2 cells

WEI Juan, QI Jiping, ZHENG Qin. Department of Oncology, the Second Affiliated Hospital of Southeast University, Nanjing 210003, China

Corresponding author: ZHENG Qin, E-mail: njzq83626472@sina.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of NVP-BEZ235 on the proliferation, apoptosis, invasion and metastasis of HepG2 Cells. **Methods** The HepG2 cells were treated with different concentrations of NVP-BEZ235 (0, 0.01, 0.1, 1.0 μmol/L). MTT was used to study the proliferation inhibition rates at 24, 48, 72 and 96h treated with different concentrations of NVP-BEZ235. Transwell assay was used to check the invasion and metastasis of HepG2 cells with NVP-BEZ235. The cycle distribution at 48h after treatment with NVP-BEZ235 was detected by flow cytometry. The RT-PCR and Western blotting were used to measure the change of MMP-2 expression. **Results** NVP-BEZ235 can increase the proliferation inhibition rates of HepG2 cell in a dose-and time-dependent manner. In addition to the late apoptosis rate of 0.01 μmol/L at 24h, the early and late apoptosis rates of the remaining concentrations were higher than those of 0 μmol/L at 24h and 48h ( $P < 0.05$ ). The proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of 0.01, 0.1 and 1.0 μmol/L NVP-BEZ235 were higher than those of 0 μmol/L, while the transmembrane cell number, the proportion of cells in G<sub>2</sub>/M and S phase, and the protein and mRNA levels of MMP-2 of 0.01, 0.1 and 1.0 μmol/L NVP-BEZ235 were lower than those of 0 μmol/L at 48h ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** NVP-BEZ235 effectively inhibits the abilities of proliferation, invasion and metastasis abilities of HepG2 cells, promotes the apoptosis, arrests cells at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and decreases the expression of MMP-2.

**【Key Words】** NVP-BEZ235; Hepatic cancer; Proliferation; Apoptosis; Invasion and metastasis

肝癌是临床最常见的恶性肿瘤之一, 在全世界范围内的发病率有逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。癌细胞的局部扩散和转移是肝癌致死的主要原因之一。肝

癌的侵袭转移过程中, 细胞外基质及基底膜降解是最重要一步<sup>[2]</sup>。细胞外基质的降解主要由肝内基质金属蛋白酶、透明质酸酶、弹性蛋白酶、组织蛋白

1 210003 南京市胸科医院药剂科

2 通讯作者, E-mail: njzq83626472@sina.com

酶和大量吞噬细胞来完成,在细胞外基质破坏中起重要作用的为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),其家族中 MMP-2 不但可降解细胞间基质成分,也是降解细胞外基质 IV 型胶原的主要酶<sup>[3-5]</sup>。NVP-BEZ235 属于 PI3K/Akt 信号通路抑制剂,是一种新近开发的靶向肿瘤药物,具有多种抗肿瘤生物活性<sup>[6]</sup>,此外,还可增强多种化疗药物的抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>,故推测 NVP-BEZ235 对肝癌的侵袭转移有一定的抑制作用。鉴于 NVP-BEZ235 具有广泛的抗癌效果,本研究以肝癌细胞株 HepG2 为对象,探讨其对 HepG2 细胞增殖、凋亡、侵袭转移及细胞 MMP-2 水平的影响,现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 肝癌 HepG2 细胞株由本实验室保存,NVP-BEZ235、四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司,RPMI 1640 及胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,Transwell 细胞培养小室、ECM gel 均购自美国 Corning Costar 公司,荧光定量 PCR(RT-PCR)引物由上海生工有限公司合成,逆转录试剂盒购自日本 TakaRa 公司。仪器:Multiskan Mk3 型酶标仪购自美国 Thermo 公司,FACS Calibur™ 流式细胞仪及流式细胞管购自美国 BD 公司,垂直电泳仪购自 BioRad 公司。

1.2 细胞培养 将 HepG2 细胞培养于 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内,培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,0.25% 胰蛋白酶消化传代,倒置显微镜下观察细胞生长状态。

1.3 MTT 法测定 HepG2 细胞增殖 取对数生长期 HepG2 细胞,制备单细胞悬液,以  $5 \times 10^4$  个/mL 的细胞接种于 96 孔培养板中,培养 24h 后加入 NVP-BEZ235 使终浓度分别为 0、0.01、0.1、1.0 μmol/L (0 μmol/L 设为对照组,其余为实验组),在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养 24、48、72 和 96h 后,每孔加入 10 μl 的 MTT 溶液(5 mg/mL),4h 后终止培养,采用酶标仪读取 492nm 各浓度的吸光值(A),根据公式计算增殖抑制率。增殖抑制率(%) = (1 - 实验组 A / 对照组 A) × 100%。实验重复 3 次。

1.4 细胞凋亡率及细胞周期检测 按  $1 \times 10^6$  /孔的密度将 HepG2 细胞接种 6 孔培养板中,加入 NVP-BEZ235 使终浓度分别为 0、0.01、0.1、1.0 μmol/L,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养 24h 后,依据凋亡检测试剂盒说明书操作,PBS 冲洗细胞 1 次,

并加入 Annexin V/FITC 和 PI,染色 15min 后采用流式细胞仪测定凋亡率及细胞周期。实验重复 3 次。

1.5 Transwell 法测定侵袭能力 收集不同浓度 NVP-BEZ235 处理 48h 后的 HepG2 细胞,以含 10% 胎牛血清的培养基重悬细胞至  $5 \times 10^5$  个/mL,Transwell 上室加 200 μl 细胞悬液,下室加入 600 μl 含 10% 胎牛血清的细胞培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱孵育 24h,棉签擦去上室上面细胞,移去 Transwell、倒置、风干,24 孔板中加入 500 μl 含 0.1% 结晶紫染色,将小室置于其中,37℃ 30min 后取出,PBS 清洗。直径上取 4 个视野,照相,计算穿膜细胞数。实验重复 3 次。

1.6 RT-PCR 检测 NVP-BEZ235 对 MMP-2 mRNA 表达的影响 收集不同浓度 NVP-BEZ235 处理 48h 后的 HepG2 细胞,按试剂盒说明书提取总 RNA,再进行逆转录,PCR 后经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后,采用凝胶成像储存实验结果。GAPDH 上游引物:5'-GTTTCGACAGTCAGCCGCATC-3',下游:5'-GGAA-TTTGCCATGGGTGGA-3',扩增长度 229bp;MMP-2 上游引物:5'-CCACGTGACAAGCCCATGGGGCCC-C-3',下游:5'-GCAGCCTAGCCAGTCGGATTTGATG-3',扩增长度 486bp。结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。

1.7 Western blotting 测定 MMP-2 蛋白表达 收集不同浓度 NVP-BEZ235 处理 48h 后的 HepG2 细胞,提取蛋白,经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 100V 恒压电泳分离,按照凝胶面积以 0.65 mA/cm<sup>2</sup> 恒流电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2h 后,加入 1:200 稀释的 MMP-2 一抗 4℃ 孵育过夜,封闭液漂洗后加入 1:2000 稀释的二抗室温孵育 2h,漂洗后 ECL 检测,曝光、显影。采用图像分析系统检测各条带的吸光度,以目的条带与内参吸光度的比值作为相对表达量。实验重复 3 次。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 16.0 版软件分析。所有数据均采用均数 ± 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 NVP-BEZ235 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

采用 0、0.01、0.1、1.0 μmol/L NVP-BEZ235 处理 HepG2 细胞 24、48、72 和 96h 后,MTT 实验发现 NVP-BEZ235 可抑制 HepG2 细胞增殖,且在同一作用时间下,随浓度增加,细胞增殖抑制率升高,呈剂

量依赖方式 ( $P < 0.05$ ) ; 而在同一药物浓度下, 随作用时间延长, 细胞增殖抑制率亦升高, 呈时间依赖方式 ( $P < 0.05$ ) 。见图 1。

2.2 NVP-BEZ235 对 HepG2 细胞凋亡的影响 采用 0、0.01、0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$  NVP-BEZ235 处理 HepG2 细胞 24、48h 后, 采用 Annexin-FITC/PI 双染法检测发现, 除 0.01 $\mu\text{mol/L}$  处理 24h 的晚期凋亡率外, 0.01、0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$  NVP-BEZ235 处理 24、48h 的早、晚期凋亡率均高于 0 $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$ ) ; 0.01、0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$  NVP-BEZ235 处理 48h 的凋亡率均高于 24h ( $P < 0.05$ ) 。见表 1、图 2。

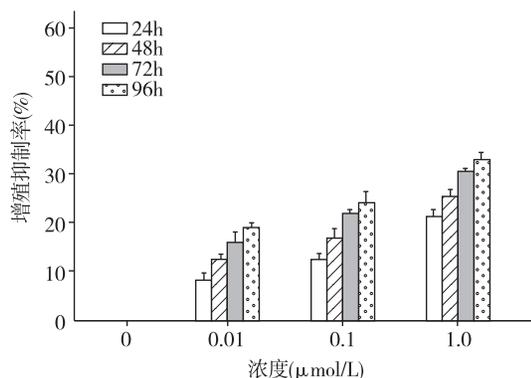
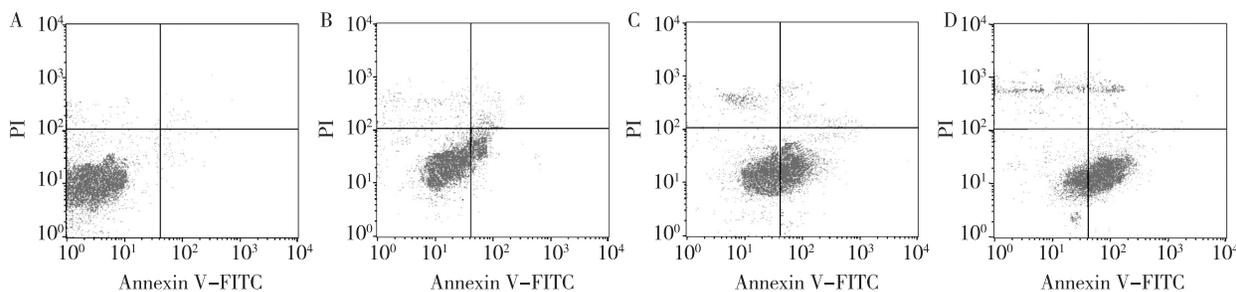


图 1 MTT 法检测 NVP-BEZ235 对 HepG2 细胞增殖的影响

表 1 不同浓度 NVP-BEZ235 对细胞凋亡的影响 ( $\%$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	24h		48h	
	早期凋亡	晚期凋亡	早期凋亡	晚期凋亡
0	3.47 $\pm$ 0.62	1.28 $\pm$ 0.84	5.34 $\pm$ 1.58	2.39 $\pm$ 0.95
0.1	6.71 $\pm$ 1.90	3.26 $\pm$ 1.28	12.67 $\pm$ 2.80 <sup>ab</sup>	6.45 $\pm$ 1.37 <sup>ab</sup>
0.01	12.08 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>	8.39 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	22.49 $\pm$ 4.73 <sup>ab</sup>	9.32 $\pm$ 1.79 <sup>a</sup>
1.0	19.62 $\pm$ 3.54 <sup>a</sup>	12.41 $\pm$ 2.96 <sup>a</sup>	27.82 $\pm$ 5.44 <sup>ab</sup>	15.63 $\pm$ 2.72 <sup>ab</sup>

注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$  比较, <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ; 与 24h 比较, <sup>b</sup>:  $P < 0.05$



A 至 D 依次为: 0、0.01、0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$  NVP-BEZ235

图 2 不同浓度 NVP-BEZ235 处理 48h 后细胞凋亡的流式细胞检测情况

2.3 NVP-BEZ235 对 HepG2 细胞周期的影响 0.01、0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$  NVP-BEZ235 处理 48h 后的  $G_0/G_1$  期细胞比例高于 0 $\mu\text{mol/L}$ , S 期和  $G_2/M$  期细胞比例均低于 0 $\mu\text{mol/L}$  ( $P < 0.05$ ) , 且各浓度间的差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 。见表 2、图 3。

2.4 NVP-BEZ235 对 HepG2 侵袭能力的影响 0、0.01、0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$  NVP-BEZ235 处理 48h 后穿膜细胞数分别 539 $\pm$ 17、369 $\pm$ 15、191 $\pm$ 11 和 176 $\pm$ 21 个, 且随浓度升高, 穿膜细胞数减少, 组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 。见图 4。

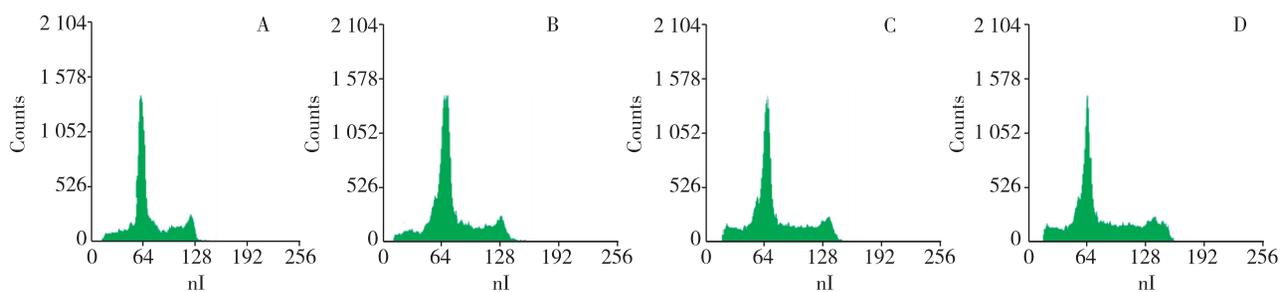
2.5 NVP-BEZ235 对 HepG2 细胞 MMP-2 表达的影响 0、0.01、0.1、1.0 $\mu\text{mol/L}$  NVP-BEZ235 处理 48h

表 2 不同浓度 NVP-BEZ235 作用 48h 后细胞周期分布情况 ( $\%$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

浓度 ( $\mu\text{mol/L}$ )	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
0	41.76 $\pm$ 5.59	38.57 $\pm$ 4.64	18.42 $\pm$ 3.14
0.1	49.21 $\pm$ 4.34	32.82 $\pm$ 3.72	13.68 $\pm$ 4.05
0.01	62.15 $\pm$ 4.72 <sup>a</sup>	26.58 $\pm$ 1.84 <sup>a</sup>	8.21 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>
1.0	69.82 $\pm$ 5.48 <sup>a</sup>	22.10 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	5.42 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>

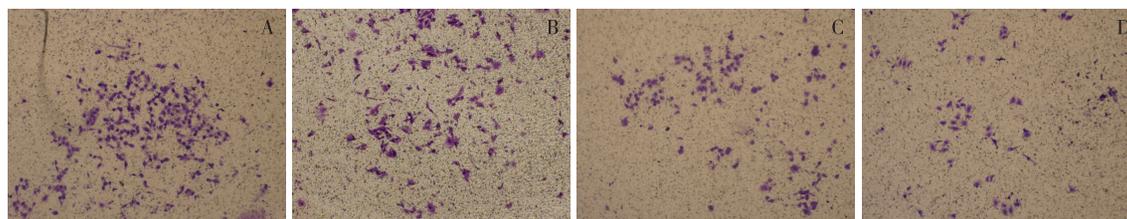
注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$  比较, <sup>a</sup>:  $P < 0.05$

后的 MMP-2 蛋白水平分别为 (0.937 $\pm$ 0.013)、(0.783 $\pm$ 0.010)、(0.516 $\pm$ 0.009) 和 (0.354 $\pm$ 0.006); 以 0 $\mu\text{mol/L}$  的 mRNA 表达量为 1.000, 0.01、0.1 及 1.0 $\mu\text{mol/L}$  的表达量依次为 (0.693 $\pm$



A 至 D 依次为:0,0.01,0.1,1.0μmol/L NVP-BEZ235

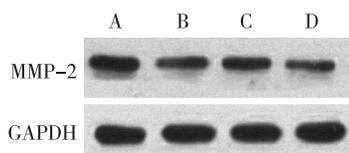
图 3 不同浓度 NVP-BEZ235 处理 48h 后流式细胞周期检测情况



A 至 D 依次为:0,0.01,0.1,1.0μmol/L NVP-BEZ235

图 4 NVP-BEZ235 对 HepG2 细胞迁移、侵袭的影响

0.042)、(0.513±0.038)和(0.435±0.033)。随着 NVP-BEZ235 浓度增加,其蛋白和 mRNA 水平均减少( $P<0.05$ )。见图 5。



A 至 D 依次为:0,0.01,0.1,1.0μmol/L NVP-BEZ235

图 5 不同浓度 NVP-BEZ235 对 MMP-2 蛋白表达的影响

### 3 讨论

我国是肝癌的高发国家,每年约占全球 55% 的新发病例,且死亡率极高,居恶性肿瘤第 3 位<sup>[1]</sup>。肝癌起病隐匿,确诊时大多已为晚期,对放化疗不敏感,因此急需探讨除手术及放化疗外的新治疗策略。肝癌的发病机制是一个多步骤、多因素参与的复杂过程,包括细胞增殖和凋亡能力失常、原癌基因激活、侵袭转移及细胞周期异常等。PI3K/Akt/mTOR 信号通路激活常见于多种恶性肿瘤中,参与了肿瘤细胞的恶性转化,抑制该通路激活表现出较好的抗肿瘤效果<sup>[8-9]</sup>。多项研究指出,PI3K/Akt/mTOR 信号通路可作为恶性肿瘤治疗的靶点,如高

莹莹等<sup>[6]</sup>发现 NVP-BEZ235 可抑制 CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>髓系白血病干细胞增殖、细胞周期和集落形成能力,赵陈琛等<sup>[7]</sup>指出 NVP-BEZ235 可增强表阿霉素抑制 Jurkat 细胞增殖并诱导凋亡的作用,故推测 NVP-BEZ235 在抑制肝癌细胞的恶性转化上也有效果。

细胞增殖和凋亡的异常调控是恶性肿瘤进展的重要生物学特征。本研究发现 NVP-BEZ235 可明显抑制 HepG2 细胞增殖,且呈时间和剂量依赖方式,具体表现在随作用浓度和时间的增加,HepG2 细胞的增殖抑制率升高,这与 NVP-BEZ235 在其他肿瘤细胞上的结果一致<sup>[6,8]</sup>。同时 NVP-BEZ235 可抑制 HepG2 细胞的凋亡,以上提示 NVP-BEZ235 可抑制 HepG2 细胞的增殖和凋亡。有研究提示细胞增殖和凋亡失控是由细胞周期调控紊乱造成的,也是肿瘤恶性转变的一个重要方面<sup>[10-11]</sup>。本研究进一步发现,NVP-BEZ235 可影响 HepG2 细胞的细胞周期,如将细胞阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,降低 G<sub>2</sub>/M 期和 S 期细胞比例。

侵袭转移是肝癌治疗失败的主要原因,其中最为关键一步是降解肿瘤细胞周围的细胞外基质和基底膜。IV 型胶原蛋白是构成细胞外基质和基底膜的主要成分,对抑制肿瘤细胞的浸润和转移具有重要作用。MMP-2 是降解 IV 型胶原蛋白的主要酶。相关研究证明,肝癌中 MMP-2 及其 mRNA 呈过度

表达,且 MMP-2 呈高表达者预后较低表达者差<sup>[12]</sup>。MMP-2 基因的过度表达及 MMP-2 活性增强与肝癌肿瘤血管形成、侵袭及转移等密切相关<sup>[13]</sup>。本研究发现 NVP-BE235 可抑制 HepG2 细胞的侵袭转移,且随着 NVP-BE235 浓度的增加,其对肝癌 HepG2 细胞的侵袭、转移抑制作用增强,同时 NVP-BE235 可在 mRNA 和蛋白水平上降低 MMP-2 水平。

综上所述,NVP-BE235 可抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖及侵袭转移,促进其凋亡和阻滞细胞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期并降低 MMP-2 表达,预示着可以利用 NVP-BE235 来间接抑制肝癌的复发和转移,我们也将进一步研究其作用机制,为肝癌的诊疗及预后提供实验基础。

### 参考文献

- [ 1 ] Song P, Feng X, Zhang K, et al. Screening for and surveillance of high-risk patients with HBV-related chronic liver disease: promoting the early detection of hepatocellular carcinoma in China [J]. *Biosci Trends*, 2013, 7(1):1-6.
- [ 2 ] Shi MD, Liao YC, Shih YW, et al. Nobiletin attenuates metastasis via both ERK and PI3K/Akt pathways in HGF-treated liver cancer HepG2 cells [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(8-9):743-752.
- [ 3 ] 张淑敏,王丹云,李雪婷,等.白桦酯醇对卵巢癌裸鼠皮下移植瘤组织中 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响及意义[J].*临床肿瘤学杂志*,2013,18(1):6-9.
- [ 4 ] Zhang H, Shen B, Swinarska JT, et al. 9-Hydroxyphorbide  $\alpha$ -mediated photodynamic therapy induces matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 down-regulation in Hep-2 cells via ROS-mediated suppression of the ERK pathway [J].*Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2014, 11(1):55-62.
- [ 5 ] Łukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Guzińska-Ustymowicz K, et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and their tissue inhibitor 2 (TIMP-2) in gastric cancer patients [J]. *Adv Med Sci*, 2013, 58(2):235-243.
- [ 6 ] 高莹莹,胡亮杉,韩慧娟,等.NVP-BE235 抑制 CD34+CD38- 急性髓系白血病干细胞的增殖和集落形成 [J].*中国实验血液学杂志*,2013,21(2):334-338.
- [ 7 ] 赵陈琛,顾康生.PI3K/Akt/mTOR 在表阿霉素抑制 Jurkat 细胞增殖和诱导凋亡中的作用 [J].*临床肿瘤学杂志*,2012,17(9):780-784.
- [ 8 ] Hou X, Zhao M, Wang T, et al. Upregulation of estrogen receptor mediates migration, invasion and proliferation of endometrial carcinoma cells by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(3):1175-1182.
- [ 9 ] Li YC, He SM, He ZX, et al. Plumbagin induces apoptotic and autophagic cell death through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2):239-259.
- [ 10 ] Kuo HS, Hsu FN, Chiang MC, et al. The role of Cdk5 in retinoic acid-induced apoptosis of cervical cancer cell line [J]. *Chin J Physiol*, 2009, 52(1):23-30.
- [ 11 ] Zhao B, Li L, Liu J, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate in utero reduces testosterone production in rat fetal Leydig cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1) [2014-03-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891643>.
- [ 12 ] 孙涛,孙保存,赵秀兰,等.肝细胞肝癌组织中 Bcl-2 核表达及 MMP-2 和 MMP-9 表达与术后复发转移及预后的关系 [J].*中国肿瘤临床*,2012,39(11):769-771,776.
- [ 13 ] 李登欣,李石.E-钙粘素、 $\gamma$ -连环素及基质金属蛋白酶-9 的表达与原发肝癌侵袭转移的关系 [J].*胃肠病学和肝病学杂志*,2011,20(9):852-854.

收稿日期:2014-03-31; 修回日期:2014-04-28