

网络出版时间: 2020-6-29 11:26 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.009.html>

CXCL12 调控 PI3K/AKT 信号通路抑制肝癌细胞 hepG2 凋亡

汪丹丹, 周伟杰, 王 雯, 蒋梦雅, 杨 梅, 陈镜宇, 魏 伟

摘要 目的 探讨 CXCL12 对肝癌 hepG2 细胞凋亡的影响及其分子机制。方法 采用流式细胞术(FCM)检测 CXCL12 对 hepG2 细胞凋亡的影响,采用 Western blot 及激光共聚焦(LSCM)检测 CXCL12 对 hepG2 细胞凋亡蛋白的影响及 PI3K 抑制剂 LY294002 的作用;采用 Western blot 检测 CXCL12 对 PI3K/AKT 信号通路的影响及 PI3K 抑制剂 LY294002 的作用。结果 100 ng/ml CXCL12 可抑制 hepG2 细胞的凋亡,下调 Bax 蛋白表达,上调 Bcl-2 蛋白的表达;100 ng/ml CXCL12 不影响 p110 β 、p85 及 AKT 蛋白的总表达,增加 p-p85、p-AKT (ser473) 蛋白的表达。PI3K 抑制剂 LY294002 可以阻断 CXCL12 抑凋亡的作用,上调 Bax 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白的表达;PI3K 抑制剂 LY294002 不影响 p110 β 、p85 及 AKT 蛋白的总表达,减少 CXCL12 诱导的 p-p85、p-AKT (ser473) 蛋白的表达。结论 CXCL12 可以上

调 Bcl-2/Bax 比值、抑制 hepG2 细胞的凋亡,其作用机制可能与活化 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词 肝癌; 凋亡; PI3K; CXCL12

中图分类号 R 364

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1029-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.009

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,死亡率仅次于肺癌和胃癌。在世界范围内,每年因 HCC 死亡的人数超过 74.5 万,而中国约占 5.5%^[1-3]。目前, HCC 最有效的治疗方法是手术治疗,但对于不能耐受手术、术后复发以及晚期有转移的患者,化疗仍是主要的治疗手段。细胞凋亡是正常机体细胞自主性、有序死亡的过程,而细胞的凋亡抵抗是导致肿瘤化疗效果差的主要原因。CXCL12 又被称为 SDF-1 (stromal cell-derived factor 1),是可与 CXCR4 (G 蛋白偶联受体)特异性结合的一种趋化因子,不仅可促进肿瘤细胞的迁移,还可以促进细胞存活,抑制细胞凋亡。在子宫内腺癌中, CXCL12 与 CXCR4 作用时可明显减少细胞的凋亡。PI3K β 属于 IA 型 PI3K,主要由催化亚基 p110 β 和调节亚基 p85 组成,与肿瘤发生密切相关。有文献表明 CXCL12 与 CXCR4 结合后可引起

2020-03-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81330081、81573443)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 汪丹丹, 女, 硕士研究生;

魏 伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

陈镜宇, 女, 博士, 副教授, 责任作者, E-mail: cjyanyi@126.com

(TNF- α) and interleukin-10 (IL-10). The biochemical methods were applied to determine activity levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and lactate dehydrogenase (LDH) in tissue homogenate of aortic vessel. The expression levels of FOXO1 and GLUT4 mRNA were detected by RT-PCR. **Results** Compared with healthy control group, expression of Caspase-3, Caspase-9 and FOXO1 protein, expression levels of TC, TG, LDL, IL-6, TNF- α and FOXO1 mRNA, activity of LDH and MDA were increased in model group ($P < 0.05$), while expression of GLUT4 protein, expression levels of HDL, IL-10, SOD and GLUT4 mRNA were decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, expression of Caspase-3, Caspase-9 and FOXO1 protein, expression levels of TC, TG, LDL, IL-6, TNF- α and FOXO1 mRNA, activity of LDH and MDA were decreased in all exercise groups ($P < 0.05$). And the above indexes were the lowest in medium-intensity exercise group, while GLUT4 protein expression, expression levels of HDL, IL-10, SOD and GLUT4 mRNA were increased ($P < 0.05$). And the above indexes were the highest in medium-intensity exercise group. **Conclusion** Exercise therapy can alleviate pathological injury of diabetes rats by increasing expression levels of skeletal muscle GLUT4 protein and mRNA, and decreasing expression levels of skeletal muscle FOXO1 protein and mRNA. The effect of middle-intensity exercise is the best.

Key words diabetes; skeletal muscle; exercise therapy; FOXO1; GLUT4

PI3K/AKT 的活化^[4],且 PI3K/AKT 的活化与胃癌、急性髓系白血病等肿瘤细胞凋亡密切相关^[5-6],但 CXCL12 对肝癌细胞凋亡的影响尚不明确。该研究探讨 CXCL12 对肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响及其与 PI3K/AKT 信号的关系,为肝癌细胞的凋亡及机制研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HepG2 购买自中科院上海细胞库。

1.1.2 试剂及仪器 鼠单克隆抗体 β -actin 和兔单克隆抗体 p110 β 购买自美国 Proteintech 公司;兔多克隆抗体 p85(phospho Y464) 购买自英国 Abcam 公司;兔单克隆抗体 p85、兔源 AKT 及 AKT(phospho Ser473) 均购买自美国 Cell Signaling Technology 公司;兔单克隆抗体 Bax、兔单克隆抗体 Bcl-2 均购买自美国 Bioworld Technology 公司;重组小鼠 SDF-1 α (CXCL12) 购买自美国 Peprotech 公司;胎牛血清和 DMEM 均购买自以色列 Biological Industries 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒购买自上海贝博生物科技有限公司;LY294002 购买自美国 APEX BIO Technology 公司;激光共聚焦显微镜(德国莱卡公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将人肝癌 HepG2 细胞置于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养,并用含有 10% 胎牛血清,1% 青-链霉素的培养基进行换液、传代。当培养瓶(皿)中细胞密度长至 80% 左右时开始进行相关实验。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 当细胞培养板中 HepG2 细胞密度长至 80% 左右时,加入 100 ng/ml CXCL12、20 μ mol/L PI3K 抑制剂(LY294002),作用不同时间后,用不含 EDTA 的胰酶进行消化,收集细胞,按照凋亡试剂盒说明书进行操作,用流式细胞仪进行检测。

1.2.3 Western blot 法检测 PI3K、AKT 及凋亡相关蛋白的表达 当细胞培养板中 HepG2 细胞密度长至 80% 左右时,加入 100 ng/ml CXCL12 作用 5 min、20 μ mol/L PI3K 抑制剂(LY294002) 作用 1 h,收集细胞,在冰上用细胞裂解液进行裂解,于离心机上 11 441 r/min 离心 15 min,取上清备用。在上清液中加入蛋白上样缓冲液,开水中煮沸 9 min 使其变性。进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭等操作,

之后分别加入相应的一抗(β -actin、p110 β 、p85、p-p85、AKT、p-AKT、Bax 和 Bcl-2) 4 °C 孵育过夜,加入相应二抗于 37 °C 孵育 2 h,通过化学发光成像仪进行结果检测。

1.2.4 激光共聚焦法检测凋亡相关蛋白的表达

将消化后的细胞接种在含有无菌载玻片的 24 孔板,培养待细胞贴壁后,加入 CXCL12 刺激 5 min,加入 LY294002 作用 1 h,用组织固定液对细胞进行固定,5% BSA 进行封闭,之后加入相应一抗(Bax 或 Bcl-2) 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,DAPI 通透 5 min,滴加少量防荧光淬灭剂进行封片,最后通过激光共聚焦显微镜进行拍片。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 6.01 软件进行统计学分析,多组间差异的比较采用单因素方差分析(ANOVA),两组之间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CXCL12 对 HepG2 细胞凋亡的影响 由图 1A、1B 可知,与 0 min 组(不加 CXCL12 刺激)相比,CXCL12(100 ng/ml) 作用 5、10、15、30、60 min 后,HepG2 细胞的凋亡比例均减少($F = 6.733$, $P < 0.05$),且不同时间点加入 CXCL12 作用组(实验处理组)与阴性对照组相比,细胞凋亡比例均减少($P = 0.0249$),见图 1C。由图 1D、1E 可知,与空白对照组相比,CXCL12(100 ng/ml) 刺激 5 min 后,HepG2 细胞凋亡比例下降($F = 80.84$, $P < 0.01$);在 100 ng/ml CXCL12 的体系中加入 PI3K 抑制剂(LY294002)时,HepG2 细胞的凋亡比例与 CXCL12 组相比升高($F = 80.84$, $P < 0.01$)。提示 CXCL12 可以抑制 HepG2 细胞凋亡,此作用可能与 PI3K 活化有关。

2.2 CXCL12 对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与空白对照组相比,CXCL12(100 ng/ml) 上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达($F_{WB} = 48.67$ 、 $F_{IF} = 26.29$, $P < 0.01$);与 CXCL12 组相比,PI3K 抑制剂 LY294002 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 2A、2B、2E、2G。与空白对照组相比,100 ng/ml CXCL12 下调促凋亡蛋白 Bax 的表达($F_{WB} = 24.61$ 、 $F_{IF} = 12.05$, $P < 0.01$);与 CXCL12 组相比,PI3K 抑制剂 LY294002 上调促凋亡蛋白 Bax 的表达($P < 0.01$),见图 2C、2D、2F、2H。

2.3 CXCL12 对 PI3K/AKT 通路活化的影响 与空白对照组相比,100 ng/ml CXCL12 可以上调

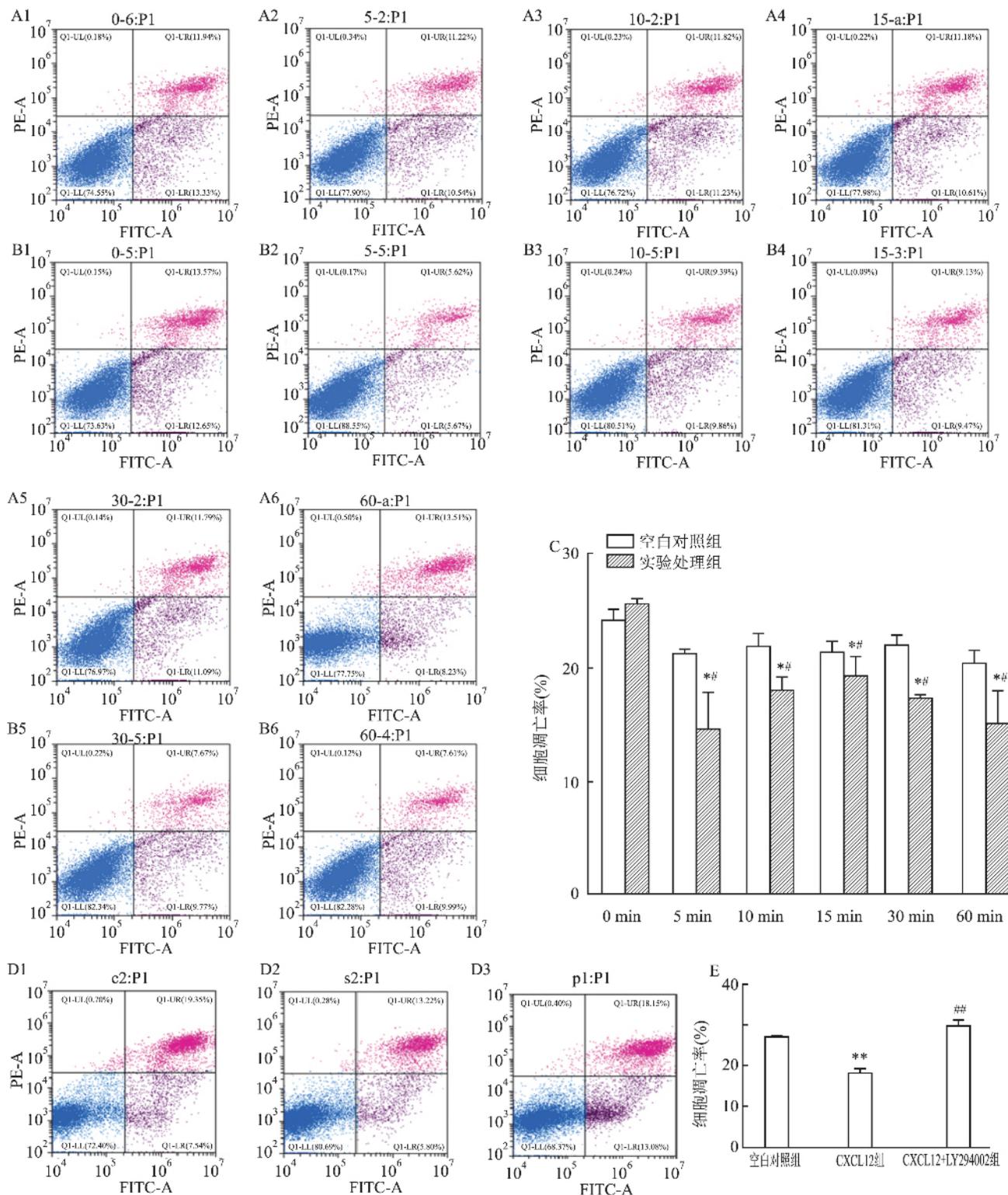


图1 CXCL12对 hepG2 细胞凋亡的影响

A: 阴性对照组流式细胞术检测不同时间 hepG2 细胞凋亡的影响; B: 实验处理组流式细胞术检测 CXCL12 刺激不同时间对 hepG2 细胞凋亡的影响; 1: 0 min; 2: 5 min; 3: 10 min; 4: 15 min; 5: 30 min; 6: 60 min; C: CXCL12 不同时间点刺激对 hepG2 细胞凋亡影响柱状统计图; 与阴性对照组比较: * $P < 0.05$; 与 0 min 组比较: # $P < 0.05$; D: 流式细胞术检测 hepG2 细胞凋亡; 1: 空白对照组; 2: 100 ng/ml CXCL12 刺激 5 min 组; 3: 100 ng/ml CXCL12 的体系中加入 PI3K 抑制剂(LY294002) 作用 1 h 组; E: PI3K 抑制剂对 hepG2 细胞凋亡影响柱状统计图; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 CXCL12 组比较: ## $P < 0.01$

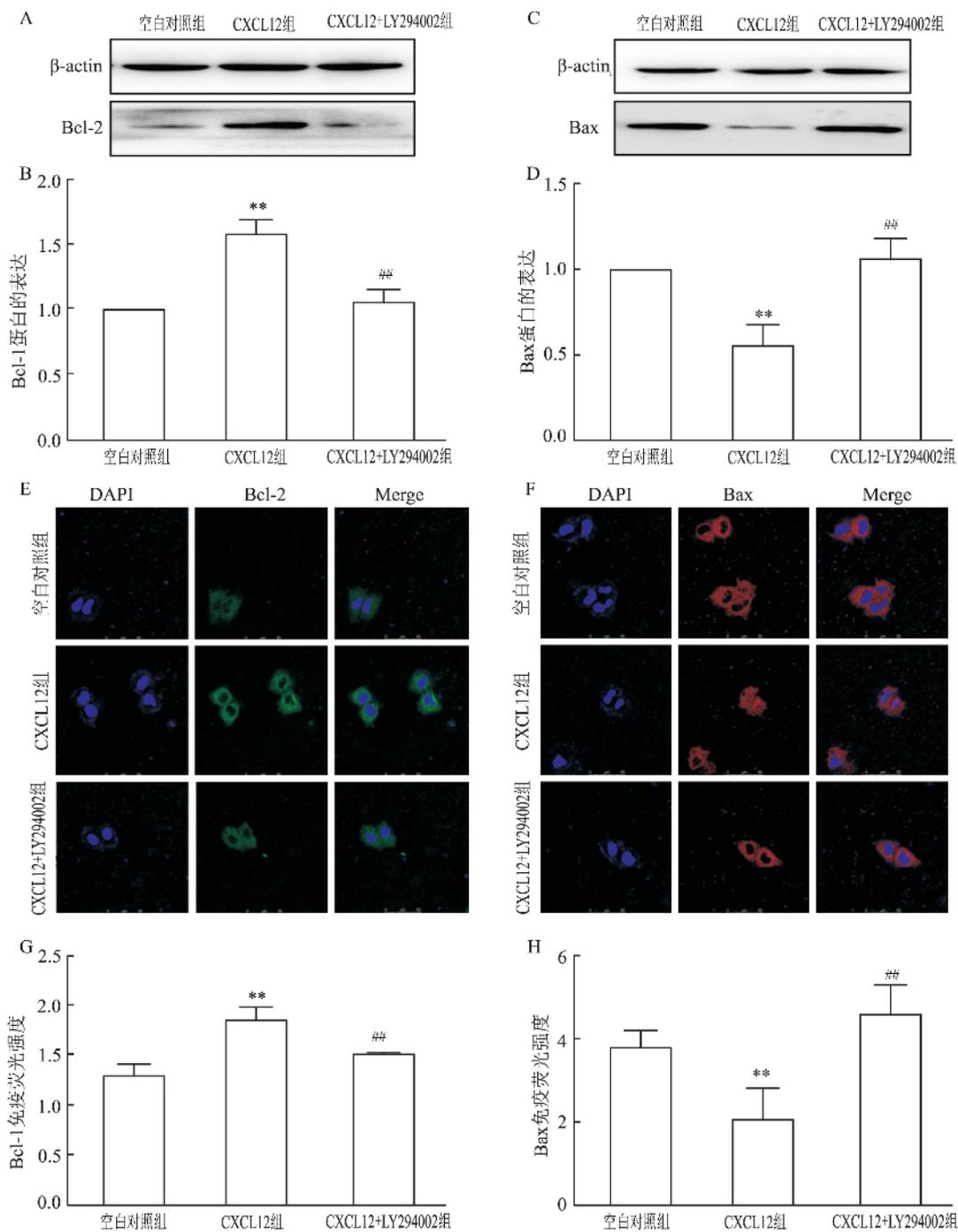


图2 CXCL12(100 ng/ml)对 hepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 Bcl-2 蛋白表达; B: Western blot 检测 Bcl-2 蛋白柱状统计图; C: Western blot 检测 Bax 蛋白表达; D: Western blot 检测 Bax 蛋白柱状统计图; E: 激光共聚焦检测 Bcl-2 蛋白表达; F: 激光共聚焦检测 Bax 蛋白表达; G: 激光共聚焦检测 Bcl-2 蛋白柱状统计图; H: 激光共聚焦检测 Bax 蛋白柱状统计图; 与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 CXCL12 组比较: ## $P < 0.01$

p-p85 ($F = 18.77$) 和 p-AKT ($F = 18.63$) 蛋白的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后可以下调 p-p85 和 p-AKT 蛋白的表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3A、3C 和 3D。与空白对照组相比, 100 ng/ml CXCL12 不影响

p110 β 、p85 及 AKT 总蛋白的表达 ($F_{p110\beta} = 0.05154$ 、 $F_{p85} = 0.2990$ 、 $F_{AKT} = 2.197$ $P > 0.05$) 差异无统计学意义; 加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后, 不影响 p110 β 、p85 及 AKT 总蛋白的表达, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3A、3B。提示 CXCL12 可以诱

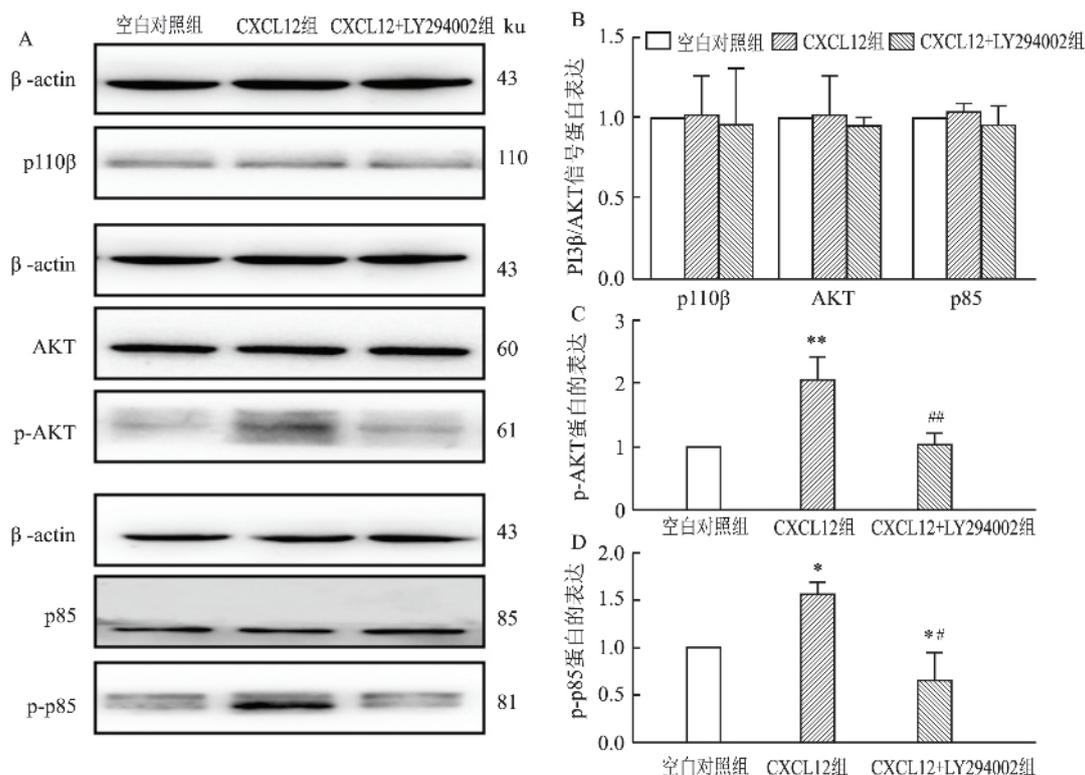


图3 CXCL12(100 ng/ml)对PI3K/AKT通路相关蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 p110β、p85、p-p85、AKT 及 p-AKT 蛋白的表达; B: p110β、AKT 和 p85 蛋白表达柱状统计图; C: p-AKT 蛋白表达柱状统计图; D: p-p85 蛋白表达柱状统计图; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 CXCL12 组比较: ## $P < 0.01$

导 p85 和 AKT 的磷酸化, 活化 PI3K/AKT 通路。

3 讨论

凋亡是细胞程序性死亡的一种方式, 对正常组织的发育与稳态平衡起着重要作用, 凋亡功能的紊乱可以促进肿瘤细胞的生长。CXCL12/CXCR4 信号与肿瘤细胞的凋亡密切相关。有研究表明, CXCR4 在白血病、淋巴瘤、乳腺癌、肝癌、肺癌及前列腺癌细胞中表达升高^[7]; 在 CXCR4 阳性的肿瘤细胞中, CXCL12 可以减少无血清培养时肿瘤细胞的凋亡; 恶性胶质瘤细胞中, CXCL12 激活可以减少喜树碱诱导的细胞凋亡^[8]。此外, 在非小细胞肺癌中, CXCL12 也可通过激活 JAK2/STAT3 通路抑制顺铂诱导的细胞凋亡^[9]。与上述研究结果相一致, 该研究结果显示 CXCL12 可以抑制肝癌细胞 hepG2 的凋亡。

Bcl-2 家族成员是细胞凋亡线粒体途径的重要调节器, 其家族成员主要包括 Bcl-2、Bcl-XL、Bax 及 Bad 等。Bcl-2 蛋白作为抗凋亡调节子广泛的参与细胞活动, Bax 蛋白是一种促凋亡蛋白, 通过与 Bcl-2 的同源二聚化和异源二聚化作用诱导细胞的死

亡。文献^[10]报道细胞中 Bcl-2 蛋白的表达与肿瘤的分化及各种组织病理学高危因素具有显著相关性。肝癌细胞中 Bcl-2/Bax 比值的升高可使细胞凋亡减少, 加速肝癌细胞生长。此外, Bcl-2 蛋白表达的增加还与肝癌化疗药物索拉菲尼耐药性有关。该研究结果显示, CXCL12 可以上调肝癌细胞 hepG2 的抗凋亡蛋白 Bcl-2 水平, 下调促凋亡蛋白 Bax 的水平, 这提示 CXCL12 可以上调 Bcl-2/Bax 比值进而减少 hepG2 细胞凋亡。

PI3K 是一种广泛表达的重要的磷脂蛋白激酶, 在细胞内主要介导 G 蛋白偶联受体和酪氨酸激酶信号的转导^[11]。当 CXCL12 与其特异性受体 CXCR4 结合时可引起下游信号分子 PI3K/AKT 的活化。研究^[12]表明肝癌的生长与 PI3K/AKT 信号的活化有关, 并且该通路在 30% ~ 50% 肝癌患者中被激活。Rab31 可通过激活 PI3K/AKT 信号通路上调肝癌细胞 Bcl-2/Bax 的比值, 减少细胞凋亡, 进而加速癌细胞的生长; 柳穿鱼素可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路, 抑制肝癌细胞活性, 引起凋亡; 此外, 抑制 PI3K/AKT 信号通路还可降低肝癌细胞的多药耐药性。本研究结果提示 CXCL12 可以增加 p-p85 及 p-

AKT 蛋白的表达,因而诱导 PI3K/AKT 信号通路的活化,此作用可能与其抑制 hepG2 细胞凋亡有关。

综上所述,CXCL12 可以上调 Bcl-2/Bax 比值,抑制 hepG2 细胞的凋亡,其作用机制可能与 PI3K/AKT 信号通路的活化有关。CXCL12 作为一种多功能的趋化因子,可以参与细胞的迁移、增殖、凋亡及血管生成等过程,其对肿瘤细胞的影响及机制还需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 许智婷,丁红. 肝细胞癌(HCC)靶向治疗的研究进展[J]. 复旦学报(医学版),2019,46(2):276-80.
- [2] 范洁,张磊,王喙. 人参皂苷 Rk3 对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报,2016,51(11):1604-8.
- [3] Peng W T, Sun W Y, Li X R, et al. Emerging roles of G protein-coupled receptors in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(5):1366.
- [4] De Francesco E M, Sotgia F, Clarke R B, et al. G protein-coupled receptors at the crossroad between physiologic and pathologic angiogenesis: old paradigms and emerging concepts[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12):2713.
- [5] Xu Y, Deng N, Wang X, et al. RKTG overexpression inhibits proliferation and induces apoptosis of human leukemia cells *via* suppression of the ERK and PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Onco*
- [6] Ao R, Guan L, Wang Y, et al. Silencing of COL1A2, COL6A3, and THBS2 inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion while promoting apoptosis through the PI3k-Akt signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(6):4420-34.
- [7] Liang J X, Gao W, Liang Y. Chemokine receptor CXCR4 expression and lung cancer prognosis: a meta-analysis[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4):5163-74.
- [8] Xu D, Li R, Wu J, et al. Drug design targeting the CXCR4/CXCR7/CXCL12 pathway[J]. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16(13):1441-51.
- [9] Wang M, Lin T, Wang Y C, et al. CXCL12 suppresses cisplatin-induced apoptosis through activation of JAK2/STAT3 signaling in human non-small-cell lung cancer cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10:3215-24.
- [10] Singh L, Pushker N, Saini N, et al. Expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins in human retinoblastoma[J]. *Clin Exp Ophthalmol*, 2015, 43(3):259-67.
- [11] Wang D D, Zhou W J, Chen J Y, et al. Upstream regulators of phosphoinositide 3-kinase and their role in diseases[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(9):1-13.
- [12] Rahmani F, Ziaemehr A, Shahidsales S, et al. Role of regulatory miRNAs of the PI3K/AKT/mTOR signaling in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2020 235(5):4146-52.

CXCL12 regulates PI3K/AKT signaling pathway to inhibit liver cancer cell hepG2 apoptosis

Wang Dandan, Zhou Weijie, Wang Wu, et al

(*Institute of Clinical Pharmacology Anhui Medical University; Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine Ministry of Education; Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-Inflammatory and Immune Medicine Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the role of CXCL12 on hepG2 cells apoptosis and its molecular mechanism. **Methods** hepG2 cells apoptosis was detected by flow cytometry (FCM), protein expression involving hepG2 apoptosis was detected by Western blot and laser scanning confocal microscopy (LSCM), protein expression of PI3K/AKT signaling pathway was detected by Western blot. **Results** 100 ng/ml CXCL12 had an ability in inhibiting hepG2 cells apoptosis, down-regulating the protein expression of Bax, up-regulating the protein expression of Bcl-2, p-p85 and p-AKT(ser473), while had no effect on the protein expression of p110 β , p85 and AKT. The inhibitor of PI3K(LY294002) blocked the anti-apoptosis effect of CXCL12, increased the protein expression of Bax, decreased the protein expression of Bcl-2, p-p85 and p-AKT(ser473), while had no effect on the protein expression of p110 β , p85 and AKT. **Conclusion** CXCL12 can increase the ratio of Bcl-2/Bax, inhibit hepG2 cells apoptosis, and the potential mechanism may be related to the activation of PI3K/AKT signaling pathway.

Key words hepatocellular carcinoma; apoptosis; PI3K; CXCL12