

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000694

PI3K/AKT 信号通路在 SK-N-SH 细胞中对增殖和分化的影响

雷璐璐, 王 珊, 刘 苗, 冯瑞华

(重庆医科大学附属儿童医院肿瘤外科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)信号通路在人神经母细胞瘤 SK-N-SH(human neuroblastoma, SK-N-SH)细胞增殖和分化中的作用。**方法:**体外培养 SK-N-SH 细胞,取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板,将培养板中的细胞分为 A 组抑制剂 LY294002 组、B 组激动剂类胰岛素生长因子-1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)组、C 组二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)组(LY294002 阴性对照组)、D 组 ddH₂O 组(IGF-1 阴性对照组)和空白组 E、F 组(培养基组),24 h 后 A 组加入不同浓度的抑制剂 LY294002,终浓度为 20、40、50、60、100 $\mu\text{mol/L}$,B 组换用无血清 DMEM 继续培养 12 h 后加入不同浓度激动剂 IGF-1,终浓度为 25、50、100、150、200 ng/ml,阴性对照组分别加入与 LY294002 和 IGF-1 相同浓度的 DMSO 和 ddH₂O,空白组为 100 μl /孔 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂ 的孵箱中培养,用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)法检测 PI3K/AKT 特异性抑制剂 LY294002 和激动剂 IGF-1 对 SK-N-SH 细胞增殖影响,倒置相差显微镜下观察细胞形态学分化改变,荧光定量聚合酶链反应(fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)检测 SK-N-SH 细胞 TrkA mRNA 的表达与变化。**结果:**①MTT 检测结果显示,LY294002 明显抑制 SK-N-SH 细胞生长,LY294002 组(0.39 ± 0.17)细胞增值能力较阴性对照 DMSO 组(0.78 ± 0.21)减弱,差异有统计学意义($P=0.018$)。IGF-1 促进 SK-N-SH 生长,IGF-1 组(0.72 ± 0.14)细胞增值能力较阴性对照组(ddH₂O 组, 0.43 ± 0.08)增值能力更强,差异有统计学意义($P=0.004$)。②显微镜下观察 LY294002 组和 IGF-1 组细胞无明显分化形态学改变。③FQ-PCR 结果显示,LY294002 组(0.78 ± 0.05)酪氨酸蛋白激酶 A (tyrosine kinase receptor A, TrkA)信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)的表达与阴性对照组(1.56 ± 0.02)、空白组(1.66 ± 0.15)比较,组间差异有统计学意义($F=81.89, P=0.000$)。IGF-1 组、ddH₂O 阴性对照组和空白组 3 组间的 TrkA mRNA 的表达水平无统计学差异($F=0.27, P=0.770$)。**结论:**PI3K/AKT 信号通路可能参与了 SK-N-SH 增殖和分化过程,该通路关键基因有望成为临床治疗神经母细胞瘤的分子靶点。

【关键词】人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞;磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT);增殖;分化

【中图分类号】R730

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-04-12

作者介绍:雷璐璐, Email: 522152570@qq.com,

研究方向:儿童实体肿瘤方向。

通信作者:王 珊, Email: wangshan778@163.com。

基金项目:重庆市卫生局重点课题资助项目(编号:20111069);国家

临床重点专科建设经费资助项目(编号:2013544)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150709.1506.003.html
(2015-07-09)

is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts[J]. Cell Cycle, 2011, 10(11): 1772-1783.

[10] Matoba S, Kang JG, Patino WD, et al. p53 regulates mitochondrial respiration[J]. Science, 2006, 312(5780): 1650-1653.

[11] Semenza GL. Regulation of metabolism by hypoxia-inducible factor 1[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011. Doi: 10.1101/sqb.2011.76.010678. [Epub ahead of print].

[12] Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism[J]. J Biol Chem, 2006, 281(14): 9030-9037.

[13] Tang S, Yang L, Tang X, et al. The role of oxidized ATM in the regulation of oxidative stress-induced energy metabolism reprogramming of CAFs[J]. Cancer Lett, 2014. Doi: 10.1016/j.canlet.2014.07028.

[Epub ahead of print].

[14] Lisanti MP, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F. Oncogenes induce the cancer-associated fibroblast phenotype: metabolic symbiosis and "fibroblast addiction" are new therapeutic targets for drug discovery[J]. Cell Cycle, 2013, 12(17): 2723-2732.

[15] Trimmer C, Sotgia F, Whitaker-Menezes D, et al. Caveolin-1 and mitochondrial SOD2 (MnSOD) function as tumor suppressors in the stromal microenvironment: a new genetically tractable model for human cancer associated fibroblasts[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(4): 383-394.

[16] Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Trimmer C, et al. Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors[J]. Cell Cycle, 2011, 10(15): 2504-2520.

(责任编辑:唐宗顺)

Role of PI3K/AKT signaling pathway in cell proliferation and differentiation in neuroblastoma

Lei Lulu, Wang Shan, Liu Miao, Feng Ruihua

(Department of Surgical Oncology, the Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

[Abstract]**Objectives:**To investigate the effects of phosphatidylinositol 3 kinase(PI3K) /protein kinaseB(AKT) signal pathway on cell proliferation and differentiation in human neuroblastoma SK-N-SH. **Methods:**Logarithmic phase SK-N-SH cells were subcultured into 96-well plates. The cells in 96-well plates were divided into inhibitor LY294002 group(A), agonist IGF-1 group(B), DMSO group(C), ddH₂O group(D), blank group(E) and serum group(F). After 24 h, different concentrations of inhibitor LY294002 were added into group A and the final concentrations were 20, 40, 50, 60, 100 μ mol/L, respectively. Group B was continued to be cultured with serum-free DMEM for 12 h, then treated with different concentrations(25, 50, 100, 150, 200 ng/ml) of agonist IGF-1 (which final concentrations were 25, 50, 100, 150, 200 ng/ml). The negative control group was added with DMSO or ddH₂O with the same concentration of LY294002 or IGF-1. The blank group was only added with medium(100 μ l/well). All cells were cultured in appropriate media at 37 $^{\circ}$ C in humidified, 5%CO₂ incubator. The effects of specific inhibitors LY294002 and PI3K/AKT agonist IGF-1 on cell proliferation were detected by MTT assay. Morphological changes were observed under inverted phase contrast microscope. mRNA expression of TrkA in SK-N-SH cells were detected using fluorescence quantitative polymerase chain reaction(FQ-PCR). **Results:**①MTT assay showed that the growth of SK-N-SH cells was dramatically inhibited by LY294002. Cell proliferation ability in LY294002 group (0.39 ± 0.17) was lower than that in negative control DMSO group (0.78 ± 0.21) ($F=3.395, P=0.018$). The growth of SK-N-SH cells was promoted by insulin-like growth factors-1 (IGF-1). Cell proliferation ability in IGF-1 group (0.72 ± 0.14) was higher than that in blank ddH₂O group (0.43 ± 0.08) ($F=9.480, P=0.004$). ②There was no significant difference in cell differentiation morphology change between LY294002 group and IGF-1 group by microscope observations. ③FQ-PCR results showed that the expression of TrkA mRNA in LY294002 group (0.78 ± 0.05) was lower than that in negative control group (1.56 ± 0.02) and blank group (1.66 ± 0.15) ($F=81.89, P=0.000$). There were no statistical difference in the TrkA mRNA expression between negative control group and blank group ($P=0.224$). And there were no statistical difference in the TrkA mRNA expression among IGF-1 group, ddH₂O negative control group and blank group ($F=0.27, P=0.770$). **Conclusion:**PI3K/AKT signal pathway may be involved in cell proliferation and differentiation of human neuroblastoma SK-N-SH cells. These findings propose the key gene of PI3K/AKT pathway as an expected molecular target for the therapy of human neuroblastoma.

[Key words]human neuroblastoma SK-N-SH cells; phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B; proliferation; differentiation

神经母细胞瘤是最常见的中枢神经系统外的小儿实体肿瘤之一,起源于原始神经嵴,发生部位较广,临床表现多样,早期易转移,恶性度高,是自行分化率最高的肿瘤之一^[1]。目前在常用的手术、化疗、放疗、介入等多种方法综合治疗下,总体疗效仍然较差,5年生存率仅为20%~30%,迫切需要探讨更为有效的治疗策略。

磷脂酰肌醇3激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路属于酪氨酸激酶受体介导的信号传导系统^[2],与肿瘤细胞的增殖、存活、浸润、转移等调控过程密切相关^[3]。体外实验证实PI3K/AKT信号通路可以通过表皮生长因子、血管内皮生长因子等促进肿瘤细胞增殖^[2],且其通路抑制剂LY294002可抑制维甲酸诱导

神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞的分化^[4],提示PI3K/AKT通路在维甲酸诱导神经母细胞瘤分化过程中起重要作用。本实验以神经母细胞瘤SK-N-SH为研究对象,采用PI3K/AKT信号通路的抑制剂LY294002和激动剂类胰岛素生长因子-1(insulin-like growth factors-1, IGF-1)分别干预细胞,从分子生物水平了解该通路在神经细胞瘤增殖和分化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞购自中国医学科学院肿瘤医院细胞库;胎牛血清、0.25%胰蛋白酶均为Hyclone公司产品;改良的DMEM培养基(dulbecco's modified eagle medium,

DMEM);二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)为重庆凯基公司提供;PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 购自 Selleck 公司;PI3K/AKT 信号通路激动剂 IGF-1 购自 PEPROTECH 公司;RNA 提取试剂盒购自北京百泰克公司;RNA 逆转录试剂盒、荧光染料 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)购自宝生物工程大连有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SK-N-SH 细胞用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37 ℃,含 5%CO₂ 的孵箱中培养,每 2 d 换液 1 次,贴壁细胞面积覆盖瓶底 80%以上时 0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 实验分组 取对数生长期 SK-N-SH 细胞,0.25%胰蛋白酶消化离心,细胞计数后配置成(1~5)×10⁵ 个/ml 单细胞悬液,接种于 96 孔(100 μl/孔)培养板,将培养板中的细胞分为 A 组抑制剂 LY294002 组、B 组激动剂 IGF-1 组、C 组 DMSO 组(LY294002 阴性对照组)、D 组 ddH₂O 组(IGF-1 阴性对照组)和空白组 E、F 组(培养基组),每组设 5 个复孔,置于 37 ℃、含有 5%CO₂ 的细胞孵箱中孵育 24 h;24 h 后 A 组加入不同浓度的抑制剂 LY294002,终浓度为 20、40、50、60、100 μmol/L, B 组换用无血清 DMEM 继续培养 12 h 后加入不同浓度激动剂 IGF-1,终浓度为 25、50、100、150、200 ng/ml,阴性对照组分别加入与 LY294002 和 IGF-1 相同浓度的 DMSO 和 ddH₂O,空白组为 100 μl/孔培养基,置于 37 ℃,5%CO₂ 的孵箱中培养。

1.2.3 MTT 法检测 SK-N-SH 细胞增殖能力 A 组抑制剂 LY294002 组、C 组 DMSO 组(LY294002 阴性对照组)及空白组培养 24、48 h 后,B 组激动剂 IGF-1 组、D 组 ddH₂O 组(IGF-1 阴性对照组)及空白组孵育 12、24 h 后,每孔加入 50 μl MTT,继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入 150 μl 的 DMSO,低速摇床震荡 10 min,酶标仪检测波长 550 nm 处各孔的吸光度 A 值。每组设 5 个复孔,细胞存活率%=(实验组吸光度 A 值/阴性对照组吸光度 A 值)×100%。

1.2.4 细胞形态学观察 用作分化研究的细胞以(1~5)×10⁶ 个/ml 浓度接种于 6 孔培养板,2 ml/孔,置于 37 ℃,含有 5% CO₂ 的细胞孵箱中孵育 24 h。24 h 后 A 组加入 50 μmol/L 的抑制剂 LY294002,B 组换用无血清 DMEM 继续培养 12 h 后加入 100 ng/ml 激动剂 IGF-1,在孵箱中分别孵育 12、48 h 后倒置相差显微镜下观察有无分化的形态学改变。

1.2.5 荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 SK-N-SH 细胞 TrkA mRNA 的表达细胞以(1~5)×10⁶ 个/ml 浓度接种于 6 孔板,2 ml/孔,置于 37 ℃,含有 5%CO₂ 的细胞孵箱中孵育 24 h。24 h 后 A 组加入 50 μmol/L 的抑制剂 LY294002,B 组换用无血清 DMEM 继续培养 12 h 后加入 100 ng/ml 激动剂 IGF-1, C 组加入与 LY294002 相同浓度的 DMSO,D 组加入与 IGF-1 相同浓度的 ddH₂O,A、C 及空白组在孵箱中孵育 48 h,B、D 及空白组在孵箱中孵育 12 h 后提取各组细胞总 RNA,蛋白核酸定量仪测定 RNA 浓度,逆转录时调整各组 RNA 浓度一致,依照逆转录试剂盒操作说明进行逆转录反应。引物由上海 BIOLIGO 公司和上海生工公司合成,扩增引物序列如

下:GAPDH 上游:5'-ATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3', GAPDH 下游:5'-TCAAAGGTGAGGAGCTGGGTGTC-3',TrkA 上游:5'-TGCAGTGTTCATGGGCAAG-3',TrkA 下游:5'-GA-GAAGGGGATGCACCACT-3'。PCR 反应体系为 25 μl,反应条件为:95 ℃,30 s 预变性,扩增 95 ℃,5 s,60 ℃退火 30 s, 40 个循环。

1.3 统计学方法

统计软件为 SPSS 20.0,数据描述以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,重复测量资料的比较采用重复测量的方差分析,多组间差异性比较采用单因素方差分析,多个独立样本两两比较采用 LSD 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MTT 检测抑制剂 LY294002 对 SK-N-SH 细胞增殖活性的影响

不同浓度 LY294002 作用 SK-N-SH 细胞不同时间吸光度 A 值变化,与 DMSO 阴性对照组相比明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),随着 LY294002 时间变化、浓度增加,吸光度 A 值逐渐降低(表 1)。

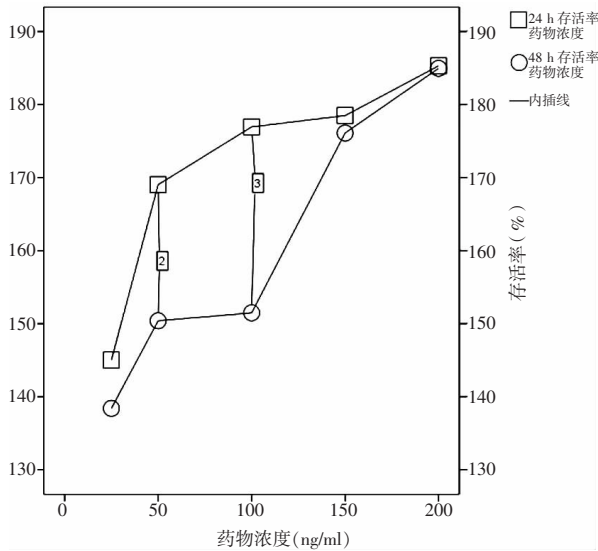
表 1 MTT 检测不同浓度 LY294002 作用 SK-N-SH 细胞 24 h、48 h 后各组细胞吸光度 A 值($\bar{x} \pm s, n=25$)

Tab.1 Absorbance value in each group at 24 h and 48 h after treatment of different concentrations of LY294002 in SK-N-SH cells detected by MTT ($\bar{x} \pm s, n=25$)

分组 ^a	LY294002 浓度 ^b (μmol/L)	时间	
		24 h	48 h
A 组(LY294002 组)	20 ^c	0.61 ± 0.03	0.6 ± 0.06
	40	0.50 ± 0.05	0.37 ± 0.08
	50 ^c	0.47 ± 0.07	0.23 ± 0.11
	60 ^c	0.42 ± 0.05	0.16 ± 0.03
	100 ^c	0.28 ± 0.09	0.09 ± 0.01
C 组(DMSO 组)	20 ^c	0.83 ± 0.06	0.90 ± 0.09
	40	0.78 ± 0.07	0.81 ± 0.12
	50	0.79 ± 0.09	0.76 ± 0.29
	60 ^c	0.73 ± 0.08	0.70 ± 0.1
	100 ^c	0.64 ± 0.10	0.74 ± 0.16

注:时间效应($F=5.857, P=0.02$);时间×分组效应($F=6.615, P=0.014$);时间×浓度效应($F=3.395, P=0.018$);a,表示分组因素有统计学差异($F=196.39, P=0.000$);b,表示浓度因素有统计学差异($F=17.11, P=0.000$);c,浓度间两两比较 $P<0.05$

细胞存活率(%)=(实验组吸光度 A 值/阴性对照组吸光度 A 值)×100%,以 LY294002 浓度为横轴,存活率为纵轴,绘制细胞存活率曲线。24、48 h 后 LY294002 对细胞存活率随药物浓度增加及作用时间的延长逐渐下降,在 50 μmol/L 时细胞作用较强且毒性较小,选取 50 μmol/L 为下一步的作用浓度(图 1)。



注:图中连线标出的 2、3、4、5 组组间比较有统计学差异

图 1 不同浓度、不同时间 LY294002 对 SK-N-SH 细胞存活率 (%,n=25)

Fig.1 Changes of cell survival rate treated by LY294002 on SK-N-SH cell at different concentrations and time (%,n=25)

2.2 MTT 检测激动剂 IGF-1 对 SK-N-SH 细胞增殖活性的影响

不同浓度的 IGF-1 作用 SK-N-SH 细胞不同时间后, IGF-1 组吸光度 A 值较 ddH₂O 阴性对照组增高, 差异有统计学意义($P<0.05$) (表 2)。

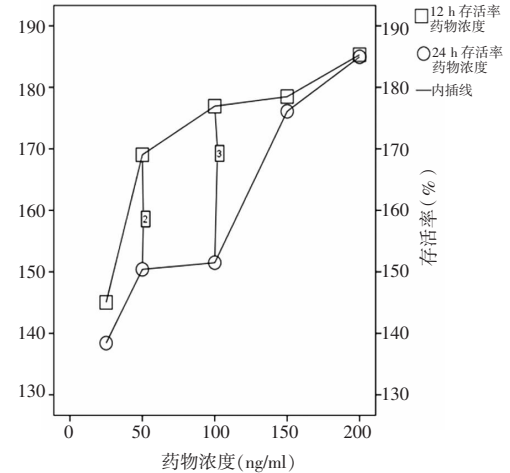
表 2 MTT 法检测不同作用浓度 IGF-1 作用 SK-N-SH 细胞 12、24 h 后各组细胞吸光度 A 值 ($\bar{x} \pm s$, n=25)

Tab.2 Absorbance value in each group at 12 h and 24 h after treatment of different concentrations of IGF-1 in SK-N-SH cells detected by MTT ($\bar{x} \pm s$, n=25)

分组 ^a	IGF-1 浓度 ^b (ng/ml)	12 h	24 h
B 组 (IGF-1 组)	25 ^c	0.55 ± 0.07	0.68 ± 0.07
	50 ^c	0.59 ± 0.07	0.74 ± 0.10
	100 ^c	0.62 ± 0.08	0.77 ± 0.08
	150 ^c	0.67 ± 0.06	0.82 ± 0.07
	200 ^c	0.68 ± 0.08	0.85 ± 0.15
D 组 (ddH ₂ O 组)	25 ^c	0.40 ± 0.05	0.48 ± 0.04
	50 ^c	0.38 ± 0.06	0.48 ± 0.05
	100 ^c	0.38 ± 0.05	0.50 ± 0.08
	150	0.41 ± 0.08	0.47 ± 0.08
	200 ^c	0.42 ± 0.01	0.47 ± 0.07

注:时间效应 ($F=87.918, P=0.000$); 时间×分组效应 ($F=9.480, P=0.004$); a, 表示分组因素有统计学差异 ($F=366.62, P=0.000$); b, 表示浓度因素有统计学差异 ($F=5.95, P=0.000$); c, 表示浓度间两两比较 $P<0.05$

细胞存活率 (%) = (实验组吸光度 A 值 / 阴性对照组吸光度 A 值) × 100%, 以 IGF-1 浓度为横轴, 存活率值为纵轴, 绘制细胞存活率曲线。由图得知, 在 100 ng/ml 时 IGF-1 对 SK-N-SH 细胞作用较强且毒性较小, 选取 100 ng/ml 为下一步的作用浓度 (图 2)。



注:图中连线标出的 2、3 组组间比较有统计学差异

图 2 不同浓度、不同时间 IGF-1 对 SK-N-SH 细胞存活率 (%,n=25)

Fig.2 Changes of cell survival rate treated by IGF-1 on SK-N-SH cell at different concentrations and time (%,n=25)

2.3 倒置相差显微镜下观察细胞分化形态学改变

倒置相差显微镜下观察, 空白组的 SK-N-SH 细胞一般呈梭形类纤维细胞样, 突起长度一般不超过胞体。经药物处理后, 若出现 1 个或 1 个以上细胞轴突长度超过细胞胞体直径的 2 倍以上, 可判断为神经母细胞瘤细胞分化。本实验观察发现, 与对照组相比, LY294002 处理 48 h、IGF-1 处理 12 h 后, SK-N-SH 细胞表现为细胞数目的减少和增多, 未观察到明显的 SK-N-SH 细胞形态学上的分化改 (图 3、图 4)。

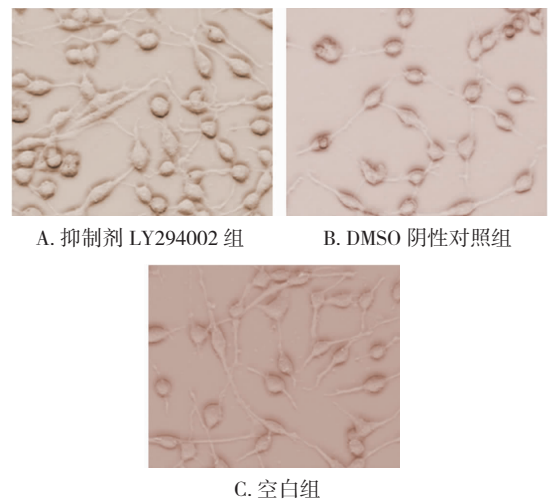


图 3 观察 48 h 后 SK-N-SH 形态变化 (倒置显微镜, 400 ×)

Fig.3 SK-N-SH morphology after 48 hours (inverted microscope, 400 ×)

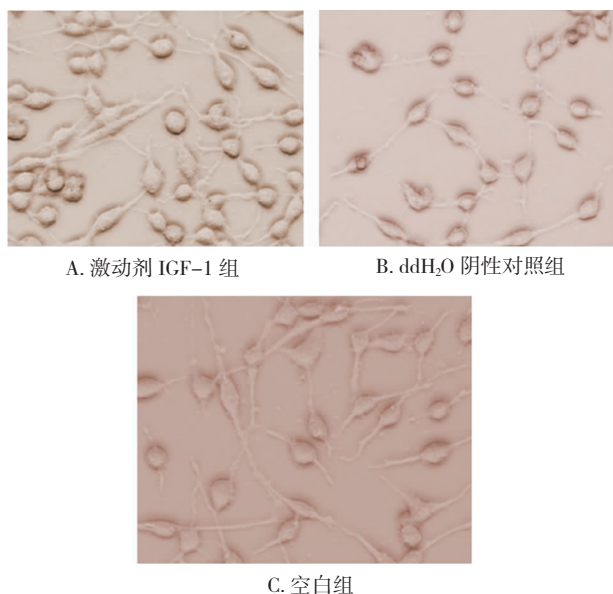


图 4 观察 12 h 后 SK-N-SH 形态变化 (倒置显微镜, 400 ×)

Fig.4 SK-N-SH morphology after 48 hours
(inverted microscope, 400 ×)

2.4 荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测 TrkA mRNA 的表达

抑制剂 LY294002 组、DMSO 阴性对照组和空白组培养 48 h 后, FQ-PCR 结果显示: LY294002 组 TrkA mRNA 的表达低于阴性对照组和空白组 ($P < 0.05$), 而阴性对照组与空白组间无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 3。

IGF-1 组、ddH₂O 阴性对照组和空白组培养 12 h 后, 组间的 TrkA mRNA 的表达水平无明显的统计学差异, 见表 3。

表 3 FQ-PCR 检测 12、48 h 后细胞 TrkA mRNA 的相对表达量
($\bar{x} \pm s, n=25$)Tab.3 Relative expression of TrkA mRNA in cells at 12, 48 h
after detection by FQ-PCR ($\bar{x} \pm s, n=25$)

组别	48 h TrkA	12 h TrkA
A组 (LY294002 组)	0.78 ± 0.06^a	1.65 ± 0.09
B组 (IGF-1 组)	1.53 ± 0.06^c	1.59 ± 0.13
C组 (DMSO 组)	1.55 ± 0.12	1.51 ± 0.10
F 值	81.89	0.270
P 值	0.000	0.770

注: a, 与 DMSO 组(阴性对照组)比较, $P=0.000$; b, 与空白组比较, $P=0.000$; c, 与空白组比较, $P=0.224$

3 讨 论

PI3K 是一类催化细胞质膜磷脂磷酸化的蛋白激酶。PI3K 最重要的底物是 AKT 激酶。而 AKT 激酶可将信号传至雷帕霉素靶蛋白(mammalian target

of rapamycin, mTOR), 重要的抑癌基因(gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN)是 PI3K 的负调节因子^[5]。PI3K/AKT 信号通路与多种恶性肿瘤的形成及发生发展密切相关, 在肿瘤细胞内通路中具有重要作用, 对信号传导通路之间的“交叉对话”起到了纽带作用^[6]。在多种人类肿瘤组织中 PI3K/AKT/mTOR 传导通路异常激活或基因突变常见^[5]。其与下游的 TSC1/2、mTOR 所组成的信号通路参与增殖、凋亡等多种细胞功能的调节, 近年发现, 这一信号通路与细胞的分化也密切相关^[7]。

IGF-1 是一种可调节细胞增殖的多功能调控因子, 主要通过 IGF-1R 结合发挥生物学作用^[8]。Parizats 等^[9]研究发现, 给予适当剂量的 IGF-1 能阻止去除血清引起的 PC12 细胞凋亡, 而 PI3K 的抑制剂 LY294002 可抑制 IGF-1 的抗凋亡作用, 表明 IGF-1 通过 PI3K 信号途径抑制细胞凋亡。LY294002 通过作用于 PI3K 的催化亚基 p110, 可以抑制 Hep-2 细胞凋亡^[10], 逆转微囊藻毒素的引起的侵袭性增强和 MMP-2/-9 过度表达, 从而降低黑色素瘤 MDA-MB-435 细胞的侵袭能力^[11]。

本实验通过 MTT 法检测不同浓度 PI3K/AKT 信号通路的抑制剂 LY294002 和激动剂 IGF-1 作用 SK-N-SH 细胞不同时间 A 值变化发现, LY294002 可明显抑制 SK-N-SH 细胞增殖(48 h 内, 浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 内观察), IGF-1 可促进 SK-N-SH 细胞增殖。LY294002 及 IGF-1 对神经母细胞瘤增殖的作用可能是通过激活或抑制 PI3K, 从而引起 AKT 的磷酸化或去磷酸化, 继而通过激活或抑制下游的 TSC1/2 以及其他的传导通路起作用, 或者通过直接调节凋亡通路的相关信号因子和通过降低细胞周期抑制剂的作用直接影响细胞增殖。

TrkA 是神经生长因子(nerve growth factor, NGF)的功能受体, 与 NGF 结合后具有诱导轴突生长等多种生物学功能, 可作为神经母细胞瘤分化的标志性因子, 神经母细胞瘤细胞高分化时 TrkA 表达增高^[12]。本实验通过体外实验用 LY294002 和 IGF-1 分别作用 SK-N-SH 细胞后, 倒置相差显微镜下未观察到明显的分化的形态学改变; 进一步检测 TrkA mRNA 表达水平发现, LY294002 较对照组 DMSO 组和空白组 TrkA 的表达水平降低, IGF-1 组、ddH₂O 阴性对照组和空白组 3 组间的 TrkA 表达水平无明显统

计学差异。

在神经母细胞瘤早期有 TrkA 高表达 NB 细胞能很好地分化,而晚期的神经母细胞瘤细胞 TrkA 表达下调,不表现细胞分化,本研究结果提示 PI3K/AKT 信号通路抑制剂 LY294002 可能抑制神经母细胞分化,Qiao 等^[4]的研究结果也支持了这一观点。

本实验结果显示 PI3K 的抑制剂 LY294002 可明显抑制神经母细胞瘤细胞增殖,即对肿瘤有抑制作用,但 LY294002 又可降低神经母细胞瘤预后良好相关因子 TrkA 的表达,对肿瘤分化可能有抑制作用。本研究认为,信号通路是一个体系庞大的涉及很多上下游分子的系统,下游关键靶点的改变可能是引起这种现象的原因。

综上所述,PI3K/AKT 通路与神经母细胞瘤的发展侵袭密切相关,本实验初步证实 PI3K/AKT 信号通路可能参与了神经母细胞瘤细胞增殖和分化过程,该通路可以作为多种恶性肿瘤的治疗靶点。如能找到抑制 PI3K/AKT 活化的药物,就可能找到治疗神经母细胞瘤的切入口。因此,本实验研究旨在为神经母细胞瘤治疗的可行性提供基础的研究参考,对防治神经母细胞瘤的侵袭转移进行干预,寻找更好的临床治疗神经母细胞瘤的方法,提高患者的生存率,但其作用具体机制及影响机制仍有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Westermarck UK, Wilhelm M. The MYCN oncogene and differentiation in neuroblastoma[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2011, 21(4): 256–266.
- [2] Westhoff MA, Faham N, Marx D, et al. Sequential dosing in chemosensitization; targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in neuroblastoma[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83128.
- [3] 黄秀兰, 崔国辉, 周克元. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J]. *癌症*, 2008(3): 331–336.
- [4] Qiao J, Paul P, Lee S, et al. PI3K/AKT and ERK regulate retinoic acid-induced neuroblastoma cellular differentiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 424(3): 421–426.
- [5] Wang D, Chen J, Chen H, et al. Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/AKT/mTOR signalling pathway[J]. *J Biosci*, 2012, 37(1): 91–101.
- [6] Park JH, Lee JY, Shin DH, et al. Loss of Mel-18 induces tumor angiogenesis through enhancing the activity and expression of HIF-1 α mediated by the PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. *Oncogene*, 2011, 5(23): 1038–1040.
- [7] Qi L, Toyoda H, Shankar V, et al. Heterogeneity of neuroblastoma cell lines in insulin-like growth factor 1 receptor/Akt pathway-mediated cell proliferative responses[J]. *Cancer Science*, 2013, 104(9): 1162–1171.
- [8] Bharti Balhara, Madhusmita Misra, Lynne L. Levitsky, et al. Recombinant human IGF-1 (Insulin-like growth factor) therapy: where do we stand today?[J]. *Indian J Pediatr*, 2012, 79(2): 244–249.
- [9] Párrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(1): 154–161.
- [10] 宋 岩, 刘秀萍, 白伟良, 等. LY294002 联合顺铂阻断 PI3K-Akt 通路诱导喉癌 Hep-2 细胞凋亡研究[J]. *实用肿瘤杂志*, 2013, 28(2): 132–134.
- [11] Xu P, Zhang XX, Miao C, et al. Promotion of melanoma cell invasion and tumor metastasis by microcystin-LR via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(15): 8801–8808.
- [12] 刘 璇, 曹方方, 张 男, 等. 全反式维甲酸诱导神经母细胞瘤分化及 TrkA 剪接异构体表达的研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2011, 19(11): 2161–2165.

(责任编辑:唐宗顺)