

· 实验研究 ·

十八碳烯酸对人 SMMC-7721 细胞 PI3K-Akt 转导信号的影响

闫军钱¹, 谢泽慧¹, 俞发荣²

1. 兰州大学基础医学院临床医学系, 甘肃 兰州 730000;

2. 甘肃政法学院 甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室, 甘肃 兰州 730070

摘要: **目的** 观察十八碳烯酸对人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用,探讨其对磷酸酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸激酶 (PI3K/Akt) 转导信号的影响。**方法** 分别给予人 SMMC-7721 细胞 0.2、0.4、2.0 mg/L 十八碳烯酸(3 个十八碳烯酸组)和 10 mg/L 5-氟尿嘧啶 (5-FU 组)及 RPMI1640 培养液(对照组),培养 48 h;用噻唑蓝 (MTT)法检测十八碳烯酸对人 SMMC-7721 细胞的增殖抑制率;用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 SMMC-7721 细胞中环磷酸腺苷 (cAMP)、p53、PI3K、Akt 浓度。**结果** 给药后培养 48 h 检测,十八碳烯酸 0.2、0.4、2.0 mg/L 组和 5-FU 组人 SMMC-7721 细胞增殖抑制率分别升高为 25.88%、41.32%、65.90% 和 39.17%,均高于对照组,差异有统计学意义 (P 均 < 0.01);十八碳烯酸半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 0.79 mg/L,各给药组 cAMP 蛋白浓度均高于对照组, p53、PI3K、Akt 蛋白浓度均低于对照组 (P 均 < 0.05);且依十八碳烯酸浓度的递升 (0.2 mg/L \rightarrow 0.4 mg/L \rightarrow 2.0 mg/L),cAMP 蛋白浓度呈递增,p53、PI3K、Akt 蛋白浓度呈递减 (P 均 < 0.05)。**结论** 十八碳烯酸具有抑制人 SMMC-7721 细胞增殖的作用,其机制主要与升高 SMMC-7721 细胞内 cAMP 水平,降低 p53、PI3K 水平,抑制 PI3K/Akt 信号的活性有关。提示 PI3K、p53、Akt 或可作为肝癌治疗的潜在靶点。

关键词: 十八碳烯酸; 人 SMMC-7721 细胞; 磷酸酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸激酶转导信号; 细胞凋亡; 不饱和脂肪酸

中图分类号: R 979.1 文献标识码: B 文章编号: 1674-8182(2019)01-0043-03

Effects of octadecanoic acid on PI3K-Akt transduction signal of human SMMC-7721 cells

YAN Jun-qian*, XIE Ze-hui, YU Fa-rong

* Department of Clinical Medicine, School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730300, China

Corresponding author: YU Fa-rong, Email: tim9898@163.com

Abstract: Objective To study the inhibition effect of the octadecanoic acid on human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 cells proliferation and 3-phosphoinositide kinase protein kinase (PI3K-Akt) transmission signal. **Methods** The SMMC-7721 cells were respectively treated with 0.2, 0.4, 2.0 mg/L of octadecanoic acid (three Octadecanoic acid groups) and 10 mg/L of 5-FU (5-FU group) for 48 hours culture, and the SMMC-7721 cells cultured in RPMI1640 culture medium only were served as control group. Thiazolam blue (MTT) method was used to detect the inhibition effect of the octadecanoic acid on SMMC-7721 proliferation. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the concentrations of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), p53, 3-phosphoinositide kinase (PI3K) and serine/threonine-protein kinase (Akt) in SMMC-7721 cells. **Results** After 48 hours culture, the proliferation inhibition rates for octadecanoic acid 0.2, 0.4, 2.0 mg/L and 5-FU groups (25.88%, 41.32%, 65.90% and 39.17%) were significantly higher than that (0) for RPMI1640 (all $P < 0.01$), and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was 0.79 mg/L for octadecanoic acid. The concentrations of cAMP protein in each medication group were significantly higher than that in control group, and the concentrations of p53, PI3K and Akt proteins were significantly lower than that in control group (all $P < 0.05$). The concentrations of cAMP protein increased progressively, and the concentrations of p53, PI3K and Akt

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2019.01.010

基金项目: 甘肃省高校科技创新团队项目 (2016C-09); 甘肃省科技计划项目 (17JR5RA158); 兰州市人才创新创业项目 (2016-RC-85)

通讯作者: 俞发荣, E-mail: tim9898@163.com

proteins decreased progressively with the increase of octadecanoic acid concentrations (0.2 mg→0.4 mg→2.0 mg/L) (all $P < 0.05$). **Conclusions** Octadecanoic acid has the inhibitory effect on human smmc-7721 cell proliferation, and its mechanism is mainly related to the increase of cAMP level, the decrease of p53 and PI3K levels in SMMC-7721 cells, and inhibition of activity of PI3K/Akt signal. It is prompted that p53, PI3K and Akt maybe served as the potential targets for treatment of liver cancer.

Key words: Octadecanoic acid; Human SMMC-7721 cells; PI3K-Akt transduction signal; Cell apoptosis; Unsaturated fatty acids

Fund program: Science and Technology Innovation Team Project of Colleges and Universities in Gansu Province (2016C-09); Science and Technology Project of Gansu Province (17JR5RA158); Lanzhou Talent Innovation and Entrepreneurship Project (2016-RC-85)

不饱和脂肪酸具有明显的细胞毒性^[1]和抗肿瘤作用^[2]。但不饱和脂肪酸对人肝癌细胞株(SMMC-7721)细胞磷酸酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸激酶(PI3K/Akt)转导信号的作用尚未见报道。PI3K-Akt 是调控细胞生存与凋亡的重要信号物质之一,它能够影响下游多种效应分子的活化状态,在细胞内发挥着抑制细胞凋亡、促进细胞增殖的作用,并与人类多种肿瘤的发生和发展密切相关。对其与细胞凋亡关系进行研究不但有利于理解细胞凋亡机制,还可以指导开发新型的抗癌活性物质^[3]。本实验给予人 SMMC-7721 细胞不同浓度的十八碳烯酸,观察分析其对 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用及对 PI3K-Akt 转导信号的影响,以期对 PI3K-Akt 信号通路中关键分子为靶点的肿瘤治疗研究提供参考^[4]。

1 材料与方法

1.1 材料 十八碳烯酸:由兰州大学天然植物研究所将甘肃地产猫儿眼采用“溶剂极性依次递增分离法”进行分离提取制得,实验时,用二甲基亚砜(DMSO)助溶加 RPMI1640 培养液配制成所需浓度(DMSO 含量为 30 $\mu\text{l/L}$)。5-氟尿嘧啶(5-FU):每支 5 ml,上海旭东海普药业生产,批号 20170609。胎牛血清:中美合资兰州民海生物工程生产。噻唑蓝(MTT):上海生工生物工程技术服务提供。酶联免疫检测仪:购于上海雷勃分析仪器。96 孔板:Costar 3599, Corning, NY14831 (USA), cAMP、p53、PI3K、Akt 试剂盒:购于上海生物科技。人 SMMC-7721 细胞:由甘肃省医学科学研究所毒理室惠赠。

1.2 人 SMMC-7721 细胞培养 将复苏的人 SMMC-7721 细胞置于内含 10% 胎牛血清、2 mmol/L 谷氨酰胺以及 1×10^5 U/L 青霉素、 1×10^5 U/L 链霉素的 RPMI1640 培养液,5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$, 饱和湿度条件中传代培养。

1.3 人 SMMC-7721 细胞分组、给药和检测 取人 SMMC-7721 细胞以 2×10^8 个/L 密度分别接种于 96

孔板,其中 2 孔只加 RPMI1640 培养液,每孔 100 μl ,作空白对照;其余每孔各加细胞悬液 90 μl 。十八碳烯酸组:设 3 个浓度,十八碳烯酸用 DMSO 稀释成 0.2、0.4、2.0 mg/L,每孔加药 10 μl ;5-FU 组:每孔加 5-FU (10 mg/L) 10 μl ;溶剂对照组:加等量 DMSO。每组设 4 个重复孔。置 5% CO_2 孵育箱中 37 $^\circ\text{C}$, 饱和湿度条件培养 48 h,加 MTT,每孔 10 μl ,孵育 4 h。移入 0.5 ml 离心管,1 000 rpm 离心 5 min,弃去上清液,每孔加 DMSO 100 μl ,置入气浴恒温振荡器 37 $^\circ\text{C}$ 振荡 10 min,用酶标仪在 450 nm 处测其光密度(OD 值),按增殖抑制率($\text{IR}\%$) = $(1 - \text{药物组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ 公式计算细胞增殖抑制率;用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞中环磷酸腺苷(cAMP)、p53、PI3K、Akt 浓度。

1.4 直线回归方程制作 取不同浓度的标准品 50 μl 加入酶标板,用酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值,分别以标准液浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,做标准曲线和标准曲线 OD 值的直线回归方程。

1.5 统计学处理 实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行处理分析。十八碳烯酸对人 SMMC-7721 细胞的增殖抑制率及 cAMP、p53、PI3K、Akt 水平的影响程度用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及两两比较的 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 十八碳烯酸对人 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用 分别给予人 SMMC-7721 细胞 0.2、0.4、2.0 mg/L 十八碳烯酸和 5-FU,人 SMMC-7721 细胞的增殖抑制率分别为 $(25.88 \pm 0.03)\%$ 、 $(41.32 \pm 0.03)\%$ 、 $(65.90 \pm 0.03)\%$ 和 $(39.17 \pm 0.02)\%$,对照组为 0,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。十八碳烯酸半数抑制浓度(IC_{50})为 0.79 mg/L。

2.2 十八碳烯酸对人 SMMC-7721 细胞中 cAMP、p53、PI3K、Akt 蛋白浓度的影响 用 cAMP、p53、PI3K、Akt 标准液浓度为横坐标,OD 值为纵坐标做标

准曲线的直线回归方程。cAMP 标准曲线的直线回归方程为: $Y = 2.0 \times 10^{-4}x + 2.49 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9989$; p53 标准曲线的直线回归方程为: $Y = 3.9 \times 10^{-2}x + 7.2 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9981$; PI3K 标准曲线的直线回归方程为: $Y = 9.25 \times 10^{-2}x + 4.4 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9976$; Akt 标准曲线的直线回归方程为: $Y = 1.39 \times 10^{-2}x + 6.04 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9983$ 。

分别将各组细胞吸光度代入标准曲线的直线回归方程,结果显示,各给药组 cAMP 蛋白浓度均高于对照组, p53、PI3K、Akt 蛋白浓度均低于对照组 (P 均 < 0.05); 且依十八碳烯酸浓度的递增 (0.2 mg/L \rightarrow 0.4 mg/L \rightarrow 2.0 mg/L), cAMP 蛋白浓度呈递增, p53、PI3K、Akt 蛋白浓度呈递减 (P 均 < 0.05)。见表 2。

表 1 十八碳烯酸对人 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	吸光度	增殖抑制率 (%)
对照组	28.62 \pm 0.02	0
5-FU	17.42 \pm 0.02 *	39.17 \pm 0.02
十八碳烯酸		
0.2 mg/L	21.24 \pm 0.03 *	25.88 \pm 0.03
0.4 mg/L	16.82 \pm 0.03 *	41.32 \pm 0.03
2.0 mg/L	9.61 \pm 0.02 *	65.90 \pm 0.03
P 值	< 0.01	< 0.01

注:与对照组比: * $P < 0.01$ 。

表 2 十八碳烯酸对人 SMMC-7721 细胞中 cAMP、p53、PI3K、Akt 蛋白浓度的影响 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	cAMP (pg/L)	p53 (pg/L)	PI3K (pg/L)	Akt (ng/L)
对照组	2.33 \pm 0.02	5.86 \pm 0.02	3.17 \pm 0.02	5.36 \pm 0.03
5-FU	3.64 \pm 0.02 **	3.27 \pm 0.03 **	2.06 \pm 0.02 **	4.27 \pm 0.02 **
十八碳烯酸				
0.2 mg/L	2.88 \pm 0.02 *	4.13 \pm 0.02 *	2.32 \pm 0.03 **	4.82 \pm 0.03 **
0.4 mg/L	3.16 \pm 0.02 **	3.46 \pm 0.02 **	2.11 \pm 0.02 **	3.18 \pm 0.03 **
2.0 mg/L	4.26 \pm 0.03 **	2.32 \pm 0.03 **	1.63 \pm 0.02 **	2.06 \pm 0.02 **
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

注:与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

有研究表明,不饱和脂肪酸具有诱导多种肿瘤细胞凋亡^[5]、抑制肿瘤细胞增殖^[6]、转移^[7]等作用,并能抑制相关癌症基因编码蛋白的表达^[8],调控信号传导通路^[9],降低癌细胞的侵袭力^[10],起到抗肿瘤的作用^[11]。Akt 是真核细胞中参与细胞信号转导的关键分子,在人类肿瘤、代谢紊乱及精神障碍等疾病中发挥着重要的作用^[12],抑制 Akt 活性^[13],就可能抑制肿瘤细胞增殖^[14],促进肿瘤细胞凋亡^[15]。本实验

结果发现,给予人 SMMC-7721 细胞不同浓度的十八碳烯酸,细胞增殖抑制率和 cAMP 蛋白浓度随给药浓度的递增而递升,而 p53、PI3K、Akt 蛋白浓度随给药浓度的递增而递降。结果显示,十八碳烯酸对人 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用主要与抑制 PI3K 的活性,使人 SMMC-7721 细胞内 p53、Akt 蛋白浓度降低, p53 蛋白降解,细胞内转导信号 PI3K-Akt 通路关闭有关,提示,PI3K、p53、Akt 或可作为肝癌治疗的潜在靶点。

参考文献

- [1] 俞发荣,连秀珍,谢明仁,等. 2-十二烯酸对人肝癌细胞毒性作用研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2014, 30(12): 1108 - 1110, 1123.
- [2] 俞发荣,张诗爽,张璟,等. 十二碳烯酸对人乳腺癌细胞株 BT-20 环磷酸腺苷、环磷酸鸟苷水平的影响[J]. 中国临床研究, 2016, 29(4): 482 - 484.
- [3] 刘玉梅,祖桂芳,赵晓红,等. Akt/PKB 抗凋亡机制与天然活性物质的抗肿瘤作用[J]. 生命科学, 2011, 23(1): 1 - 6.
- [4] 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, 21(3): 331 - 336.
- [5] 王迎春,王金华. ω -3 多不饱和脂肪酸对肿瘤细胞侵袭转移的影响及机制研究进展[J]. 肿瘤学杂志, 2016, 22(3): 236 - 241.
- [6] 童茜茜,徐嘉杰,王峰,等. 小球藻精油对人结肠癌细胞增殖和凋亡的作用[J]. 中国食品学报, 2016, 16(5): 25 - 31.
- [7] 梁盈,刘颖,王荣,等. 米糠油不饱和脂肪酸对肝癌细胞 HepG2 克隆及迁移能力的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(11): 7 - 12, 50.
- [8] 薛山. N-3PUFA 的抗癌功效及其生物学作用机制[J]. 中国食品添加剂, 2016(7): 200 - 206.
- [9] 耿丽晶,曲兴源,孙竹萍,等. 海洋多不饱和脂肪酸 DHA 抑制肿瘤机制的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 34(22): 385 - 391.
- [10] 王莉梅,刘睿杰,金青哲,等. 多不饱和脂肪酸在癌症发生中的作用机制研究进展[J]. 中国油脂, 2014, 39(8): 37 - 41.
- [11] 朱文劲,许庆文,鲁钰,等. ω -3 多不饱和脂肪酸对大鼠结直肠癌的影响及与脂质代谢相关基因的研究[J]. 黑龙江医学, 2015, 39(4): 346 - 349.
- [12] 范亮亮,马立宁,彭元亮,等. PI3K/AKT 信号通路与心力衰竭[J]. 生命科学研究, 2015, 19(1): 85 - 90.
- [13] Piao Y, Li Y, Xu Q, et al. Association of MTOR and AKT gene polymorphisms with susceptibility and survival of gastric cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0136447.
- [14] 费洪荣,陈洪蕾,辛晓明,等. Akt 抑制剂 perifosine 抑制胃癌细胞增殖并诱导凋亡的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(6): 1084 - 1089.
- [15] Yu R, Yu BX, Chen JF, et al. Anti-tumor effects of Atractylenolide I on bladder cancer cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35: 40.

收稿日期: 2018 - 06 - 30 修回日期: 2018 - 07 - 28 编辑: 王国品