

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.23.007
文章编号: 1005-8982 (2018) 23-0031-05

BEZ235 联合 AZD6244 对宫颈癌 细胞增殖、迁移的影响 *

金万虎¹, 张平², 金铁峰³, 李春国⁴

(1. 延边大学附属医院 妇科, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学附属医院 疼痛科, 吉林 延吉 133000; 3. 延边大学 肿瘤研究中心, 吉林 延吉 133000; 4. 吉林省吉林市中心医院 肿瘤科, 吉林 吉林 132011)

摘要: 目的 探讨联合应用 PI3K 和 mTOR 双重靶向抑制剂 BEZ235 及上皮间质转换 (EMT) 抑制剂 AZD6244 对人宫颈癌细胞增殖、迁移能力的影响。**方法** 采用 MTT 法分析 BEZ235、AZD6244 对 HeLa 和 SiHa 细胞增殖能力的影响, 损伤愈合实验检测 BEZ235、AZD6244 对 HeLa 和 SiHa 细胞迁移能力的影响, Western blot 检测 BEZ235、AZD6244 对 EMT 相关标志物蛋白的表达变化。**结果** BEZ235、AZD6244 对宫颈癌细胞 HeLa 和 SiHa 的增殖有协同抑制作用; 联合应用 BEZ235、AZD6244 可以通过 EMT 途径抑制 HeLa 和 SiHa 细胞的侵袭、迁移。**结论** BEZ235、AZD6244 联合应用可体外抑制 HeLa 和 SiHa 细胞的增殖、迁移, 其部分机制是通过抑制 EMT 途径实现的。

关键词: BEZ235; AZD6244; 宫颈癌; 上皮-间质转化

中图分类号: R737

文献标识码: A

Effect of co-treatment with BEZ235 and AZD6244 on proliferation and migration of cervical cancer cells *in vitro**

Wan-hu Jin¹, Ping Zhang², Tie-feng Jin³, Chun-guo Li⁴

(1. Department of Gynaecology, 2. Department of Pain Management, Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China; 3. Cancer Research Center, Yanbian University, Yanji, Jilin 133000, China; 4. Department of Oncology, Central Hospital of Jilin City, Jilin, Jilin 132011, China)

Abstract: Objective To detect the effect of co-treatment with BEZ235 (inhibitor of PI3K and mTOR) and AZD6244 (inhibitor of EMT) on the proliferation and migration of human cervical carcinoma cell lines HeLa and SiHa. **Methods** Cell proliferation ability was detected by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay, and the capacity of cell migration was measured by wound healing assay. Western blot was used to detect the changes of the expressions of EMT-related proteins. **Results** The proliferation of HeLa and SiHa cells was effectively inhibited by co-treatment with BEZ235 and AZD6244. In addition, the combined treatment also synergically suppressed the invasion and migration of HeLa and SiHa cells through EMT pathway. **Conclusions** Combined treatment with BEZ235 and AZD6244 may synergically inhibit the proliferation and migration of cervical cancer cells *in vitro*, and part of the mechanism may be completed by weakening the EMT pathway.

Keywords: BEZ235; AZD6244; cervical cancer; epithelial-mesenchymal transition

收稿日期: 2018-02-16

[通信作者] 李春国, E-mail: xinfeifusu@163.com

宫颈癌是我国女性肿瘤发病率第 2 位的恶性肿瘤,近年来其发病率逐年升高^[1-2]。上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤在侵袭、浸润过程中的重要功能及形态学改变。有研究证实,宫颈癌常以 EMT 的形式发生间质浸润并向远处转移^[3-4]。有研究表明,PI3K 和 mTOR 双重靶向抑制剂 BEZ235 及 EMT 靶向抑制剂 AZD6244 具有一定的抗肿瘤作用^[5-6]。但用药过程中出现的毒副作用严重制约其疗效,且两药合用是否具有协同作用研究较少,故实验通过联合应用 BEZ235、AZD6244,探讨其抑制人宫颈癌的作用机制,为小分子靶向治疗药物治疗宫颈癌提供有效的实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料

人宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞株常规冻存于延边大学肿瘤研究中心,胎牛血清、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)等化学试剂购自北京华美公司,Western blot 检测相关试剂、MTT 试剂购自武汉博士德生物有限公司,EMT 标志物蛋白 E-cadherin、ZO-1、Vimentin 及 Snail 抗体购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 MTT 比色法

采用 MTT 比色法检测细胞增殖能力。将宫颈癌细胞株 HeLa(腺癌)及 SiHa(鳞癌)接种于含 10% 胎牛血清、5% 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养基中,37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 常规培养,0.25% 胰酶消化并传代。将处于对数生长期的 HeLa 和 SiHa 细胞按 2×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后加入终浓度为 0.0、0.1、0.3、1.0、3.0、10.0、30.0 和 100.0 nmol/L 的 BEZ235 和 1、3、10、30、100、300 和 1 000 nmol/L 的 AZD6244,每种浓度分别设 3 个平行复孔,对照组加入等体积的培养液。72 h 后加入 50 μ l/孔 MTT,反应 4 h 后弃上清,加入 200 μ l/孔 DMSO,轻轻震荡数分钟,应用瑞士 Tecan 公司生产的全波长多功能酶标仪(型号 Infinite 200 PRO),在 570 nm 波长处测定其吸光值,并按公式计算细胞生存率。细胞生存率(%) = 实验组吸光值 / 对照组吸光值 \times 100%。

1.3 划痕愈合实验

采用划痕愈合实验检测细胞迁移能力。将密度为 5×10^5 个/ml 的 HeLa 和 SiHa 细胞接种于 6 孔板中,

2 ml/孔,孵育 24 h。待细胞完全贴壁,用 10 μ l 移液枪枪头在单层细胞上划一条直线,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 3 次,分别加入普通培养基、含 BEZ235 的培养液、含 AZD6244 的培养液,以及同时含 AZD6244、BEZ235 的培养液,24 h 后观察并拍照。

1.4 Western blot 检测

HeLa 和 SiHa 细胞经 BEZ235、AZD6244,以及 BEZ235 联合 AZD6244 作用 24 h,用 PBS 洗 2 次后提取总蛋白。采用 Bradford 法测定蛋白浓度,8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行蛋白分离,转至聚偏二氟乙烯膜上。室温下摇床封闭(TBST+5% 脱脂奶粉)2 h,加入兔抗人 E-cadherin、Vimentin 和 β -actin 的单克隆抗体,4℃过夜。室温下洗膜,加入辣根过氧化物酶偶联羊抗兔 IgG 二抗,孵育 2 h。采用增强化学发光法曝光,观察并拍照。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较用单因素方差分析,两两比较用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

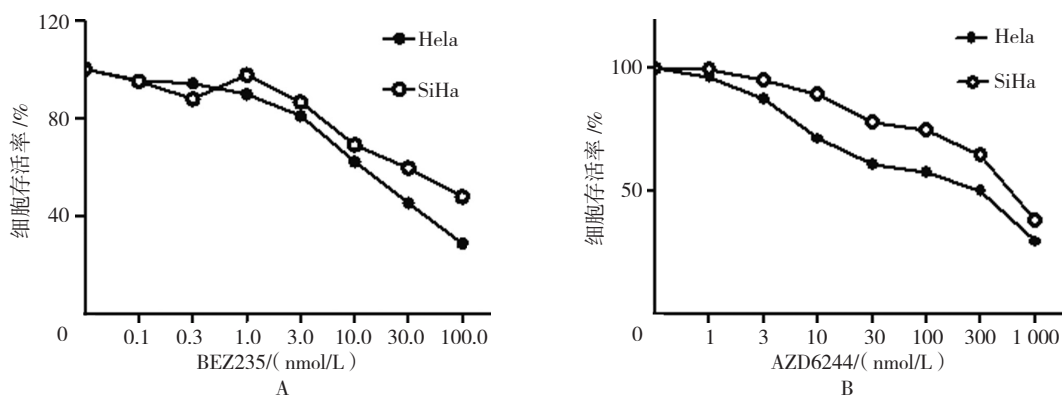
2 结果

2.1 BEZ235 联合 AZD6244 抑制 HeLa 和 SiHa 细胞增殖

BEZ235、AZD6244 单独或联合应用处理细胞 72 h。MTT 结果显示,BEZ235 对 HeLa 和 SiHa 细胞的半数抑制率(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)分别为 19.41 和 62.51 nmol/L。AZD6244 对 HeLa 和 SiHa 细胞的 IC₅₀ 分别为 302.31 和 511.04 nmol/L(见图 1)。两药联合应用协同抑制 HeLa 和 SiHa 细胞增殖,联合用药指数(combination index, CI)分别为 0.51 和 0.64,具有较好的协同抑制效果(见图 2)。

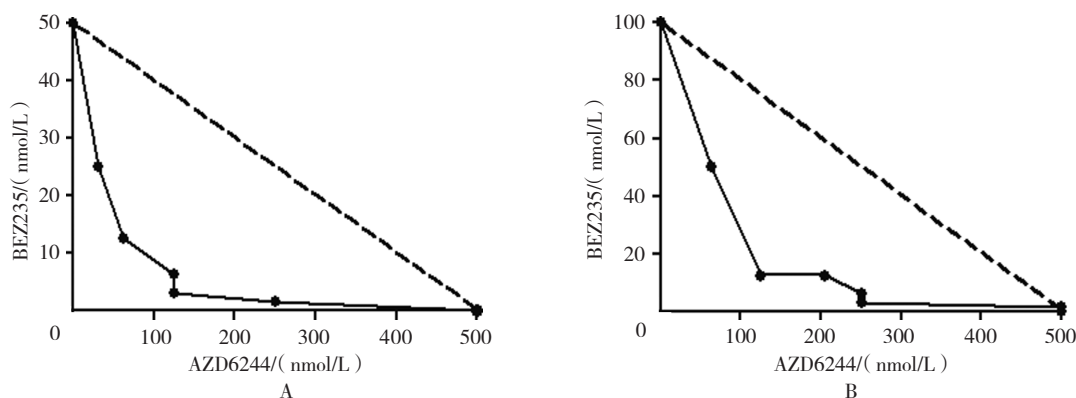
2.2 BEZ235 联合 AZD6244 对 HeLa 细胞迁移能力的影响

MTT 结果显示,BEZ235 联合 AZD6244 对 HeLa 细胞的协同作用更明显(CI_{HeLa} < CI_{SiHa})。笔者在体外培养的 HeLa 单层细胞上划痕致伤,分别以半数抑制率浓度的 BEZ235(20 nmol/L)和 AZD6244(300 nmol/L)联合作用 48 h。对照组、BEZ235 组、AZD6244 组、联合用药组的细胞迁移率分别为(83.88 \pm 1.48)%、(65.52 \pm 3.46)%、(75.50 \pm 3.72)% 和(50.82 \pm 1.95)%。



A: BEZ235 对 HeLa 和 SiHa 细胞的 IC₅₀ 值; B: AZD6244 对 HeLa 和 SiHa 细胞的 IC₅₀ 值

图 1 BEZ235、AZD6244 抑制 HeLa 和 SiHa 细胞增殖 ($\bar{x} \pm s$)



A: 联合应用 BEZ235、AZD6244 协同抑制 HeLa 细胞的 CI 值; B: 联合应用 BEZ235、AZD6244 协同抑制 SiHa 细胞的 CI 值

图 2 BEZ235 联合 AZD6244 协同抑制 HeLa 和 SiHa 细胞增殖 ($\bar{x} \pm s$)

经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 76.289$, $P = 0.000$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, 联合用

药组比对照组、BEZ235 组、AZD6244 组抑制 HeLa 细胞迁移能力更强 ($P < 0.05$)。见图 3、4。

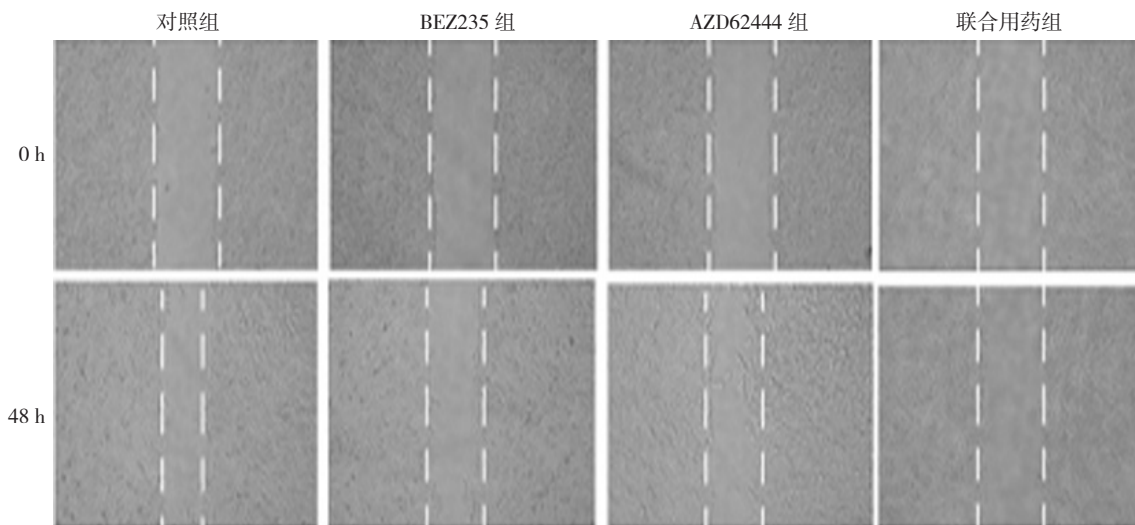
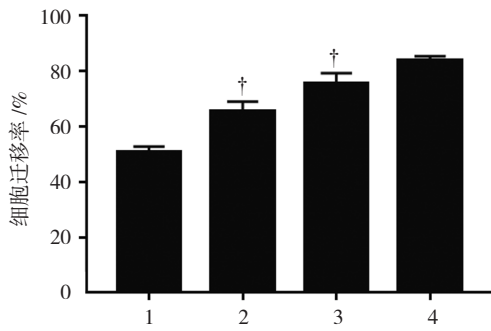


图 3 BEZ235、AZD6244 协同抑制 HeLa 细胞迁移



1: 联合用药组; 2: BEZ235 组; 3: AZD62444 组; 4: 对照组。
†与联合用药组比较, $P < 0.05$

图 4 各组 Hela 细胞迁移率比较 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 BEZ235、AZD6244 对 EMT 相关标志蛋白表达的影响

20 nmol/L BEZ235 和 300 nmol/L AZD6244 分别单独或联合作用于 Hela 细胞 48 h 后, 与单独用药组及未加药对照组比较, 宫颈癌细胞由三角形或多角形变为长梭形。对照组、BEZ235 组、AZD6244 组、联合用药组的 E-cadherin 蛋白相对表达量分别为 (22.04 ± 0.58) 、 (98.42 ± 3.86) 、 (51.33 ± 5.22) 、和 (33.61 ± 3.67) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 9.164, P = 0.012$); 对照组、BEZ235 组、AZD6244 组、联合用药组的 ZO-1 蛋白相对表达量分别为 (38.86 ± 3.08) 、 (28.44 ± 1.12) 、 (39.93 ± 5.23) 和 (58.10 ± 3.26) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 37.311, P = 0.000$); 对照组、BEZ235 组、

AZD62444 组、联合用药组的 Vimentin 蛋白相对表达量分别为 (28.60 ± 1.33) 、 (21.05 ± 0.88) 、 (30.67 ± 1.64) 和 (10.15 ± 1.08) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 11.051, P = 0.006$); 对照组、BEZ235 组、AZD62444 组、联合用药组的 Snail 蛋白相对表达量分别为 (10.63 ± 0.96) 、 (6.32 ± 0.43) 、 (5.2 ± 0.88) 和 (1.22 ± 0.12) , 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 94.783, P = 0.000$)。进一步两两比较经 SNK- q 检验, 联合用药组较 BEZ235 组 E-cadherin、ZO-1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Snail、Vimentin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 联合用药组较 AZD6244 组 E-cadherin、ZO-1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Snail、Vimentin 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。联合用药组相对于 BEZ235 组、AZD6244 组抑制 EMT 的能力更强。见图 5、6。

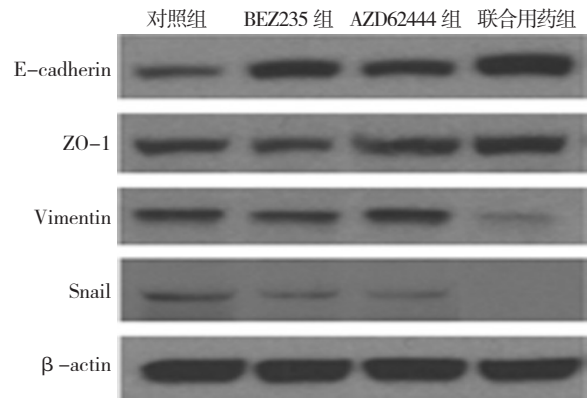
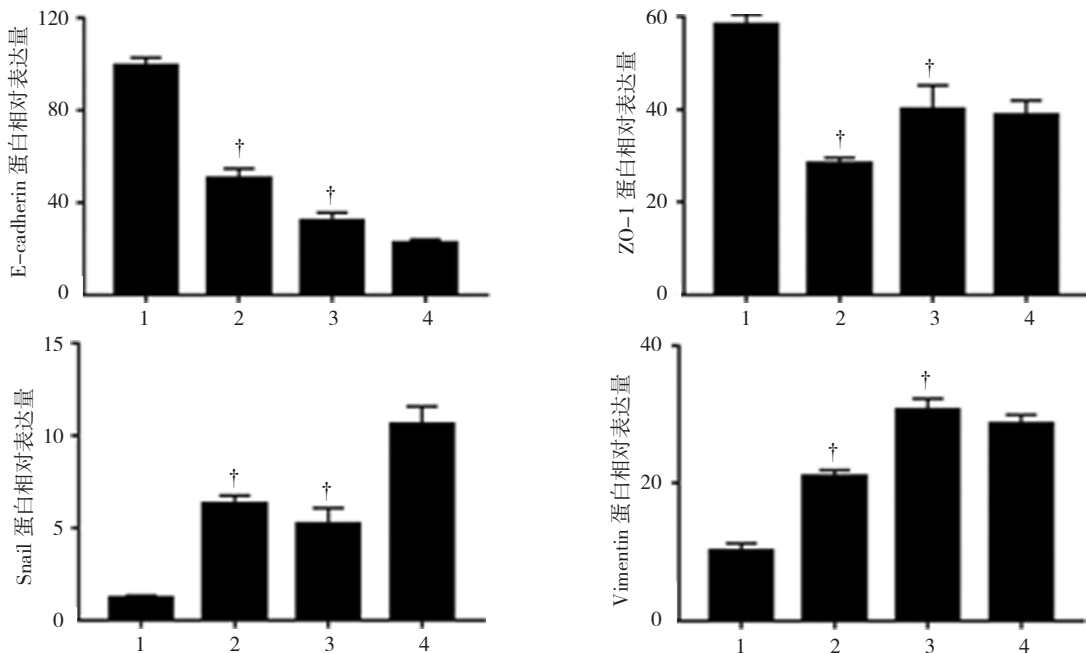


图 5 各组 EMT 相关标志蛋白的表达



1: 联合用药组; 2: BEZ235 组; 3: AZD62444 组; 4: 对照组。†与联合用药组比较, $P < 0.05$

图 6 BEZ235 与 AZD6244 协同抑制 Hela 细胞 EMT 形成 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

癌细胞的侵袭及转移是导致宫颈癌预后差, 难以治愈的重要因素^[7]。PI3K-Akt 和 EMT-ERK 信号通路是 EGFR 下游经典信号通路, 在肿瘤发生、发展过程中起到非常重要的作用。PI3K-Akt 和 EMT-ERK 信号通路被激活后, 产生一系列的连锁反应, 包括细胞增殖能力、血管新生能力、炎症反应等均得到增强。因此, 通过抑制 PI3K 信号通路的活性, 从而达到攻克肿瘤的目的一直是肿瘤研究领域的重量级课题^[8-9]。大量研究证实, 单独阻断 PI3K/Akt 或 EMT/ERK 信号通路虽然可以部分抑制肿瘤生长, 但是肿瘤细胞仍可以通过其他信号通路途径增殖及发生转移。多信号通路阻断剂联合应用可以弥补该不足^[10-11]。EMT 是肿瘤细胞突破基底膜向间质浸润和远处转移的早期事件, 有众多基因及信号通路参与其中^[12]。EMT 过程中, 上皮标志物 E-cadherin、ZO-1 等表达下调, 而间质标志物 vimentin、Snail 等表达上调, 使肿瘤细胞脱离原发病灶, 突破基底膜最终形成远隔转移^[13]。

本研究通过对比分析发现, BEZ235、AZD6244 联合应用可以在体外协同抑制宫颈癌细胞的增殖及迁移。MTT 比色法观察 BEZ235、AZD6244 联合用药对人宫颈癌细胞株 Hela 和 SiHa 的生长抑制情况, 发现联合用药组较 BEZ235 组、AZD6244 组、对照组抑制作用更强。笔者在划痕实验中发现, 用药 48h 后 BEZ235 联合 AZD6244 显著抑制 Hela 细胞的迁移。为进一步探明 BEZ235、AZD6244 协同抑制宫颈癌细胞迁移的分子机制, 用 Western blot 检测 EMT 相关信号通路蛋白表达的影响, 发现联合应用 BEZ235、AZD6244, Hela 细胞上皮表型明显增强, 而间质表型受到抑制, 提示 BEZ235、AZD6244 联合应用抑制宫颈癌细胞的迁移可能是通过抑制其 EMT 途径而实现的。

本研究结果证实, BEZ235 联合 AZD6244 可以在体外协同抑制宫颈癌细胞增殖, 并通过抑制 EMT 途径抑制宫颈癌细胞的迁移, 因此本研究对临床治疗宫颈癌提供了新的理论依据及实验基础。

参 考 文 献:

[1] THOMAKOS N, TRACHANA S P, DAVIDOVIC-GRIGORAKI M,

et al. Less radical surgery for early-stage cervical cancer: to what extent do we justify it? Our belief[J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2016, 55(4): 495-498.

- [2] OH J K, WEIDERPASS E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases[J]. Annals of Global Health, 2014, 80(5): 384-392.
- [3] QURESHI R, ARORA H, RIZVI M A. EMT in cervical cancer: its role in tumour progression and response to therapy[J]. Cancer Lett, 2015, 356 (2 Pt B): 321-331.
- [4] LAMOUILLE S, XU J, DERYNCK R, et al. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. Nature Molecular Cell Biol, 2014, 15(3): 178-196.
- [5] VÁZQUEZ-MARTÍN A, OLIVERAS-FERRAROS C, MARTÍN-CASTILLO B, et al. mTOR inhibitors and the anti-diabetic biguanide metformin: new insights into the molecular management of breast cancer resistance to the HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib (Tykerb)[J]. Clin Transl Oncol, 2009, 11(7): 455-459.
- [6] KIM J Y, WELSH E A, FANG B, et al. Phosphoproteomics reveals MAPK inhibitors enhance MET- and EGFR-driven AKT signaling in KRAS-mutant lung cancer[J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(10): 1019-1029.
- [7] ECCLES S A, WELCH D R, et al. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies[J]. Lancet, 2007, 369(9574): 1742-1745.
- [8] TSAI W B, AIBA I, LONG Y, et al. Activation of Ras/PI3K/ERK pathway induces c-Myc stabilization to upregulate argininosuccinate synthetase, leading to arginine deiminase resistance in melanoma cells[J]. Cancer Res, 2012, 72(10): 2622-2633.
- [9] BOHNACKER T, PROTA A E, BEAUFILS F, et al. Deconvolution of Buparlisib's mechanism of action defines specific PI3K and tubulin inhibitors for therapeutic intervention[J]. Nat Commun, 2017, 9, 8: DOI: 10.1038/ncomms14683.
- [10] FAZIO N, BUZZONI R, BAUDIN E, et al. A Phase II study of BEZ235 in patients with everolimus-resistant, advanced pancreatic neuroendocrine tumours[J]. Anticancer Res, 2016, 36(2): 713-719.
- [11] LI S, CHEN S, JIANG Y, et al. Synergistic interaction between MEK inhibitor and gefitinib in EGFR-TKI-resistant human lung cancer cells[J]. Oncol Lett, 2015, 10(4): 2652-2656.
- [12] MANI S A, GUO W, LIAO M J, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells[J]. Cell, 2008, 133(4): 704-715.
- [13] ZHOU X M, ZHANG H, HAN X. Role of epithelial to mesenchymal transition proteins in gynecological cancers: pathological and therapeutic perspectives[J]. Tumour Biol, 2014, 35(10): 9523-9530.

(童颖丹 编辑)