

# LY294002阻断PI3k/Akt信号通路逆转肝癌细胞对索拉菲尼耐药的研究

王清清 刘俊 曹浩强 张浩

**[摘要]** **目的** 研究PI3k/Akt信号通路在肝癌细胞对索拉菲尼耐药中作用机制, 评估PI3k抑制剂LY294002逆转肝癌细胞对索拉菲尼耐药作用。**方法** Western blot检测不同措施处理后索拉菲尼耐药肝癌细胞PI3k/Akt信号通路蛋白、EMT标记蛋白及凋亡相关蛋白Bax表达。CCK-8 实验及Transwell实验检测低浓度索拉菲尼联合LY294002作用后Huh7R细胞增殖活力及迁移、侵袭能力。**结果** 与亲本Huh7细胞相比, Huh7R的PI3k和p-Akt表达量升高, PTEN表达量下降, 同时上皮标记蛋白E-cadherin表达下降, 间质标记蛋白N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug表达增加。LY294002作用后, EMT标志相关蛋白Snail、Slug、Vimentin、N-cadherin的表达量呈时间依赖性和浓度依赖性下降。低浓度索拉菲尼联合LY294002使Huh7R细胞增殖活力明显下降, 同时抑制索拉菲尼耐药肝癌细胞迁移、侵袭能力。**结论** 长期索拉菲尼暴露诱导肝癌细胞PI3k/Akt信号通路活化及促进肝癌细胞上皮间质变; LY294002通过抑制PI3k/Akt信号通路活化从而逆转索拉菲尼耐药肝癌上皮间质变作用; LY294002联合低浓度索拉菲尼可以协同作用逆转肝癌对索拉菲尼耐药, 抑制索拉菲尼耐药肝癌细胞的迁移、侵袭能力。

**[关键词]** 肝癌; 索拉菲尼; 上皮间质变; 信号通路; 耐药

**Research about the sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells reversed by LY294002 through blocking PI3k/Akt pathway** WANG Qingqing, LIU Jun, CAO Haoqiang, et al. Department of General Surgery, the First Hospital of Jiaxing, Jiaxing 314000, China

**[Abstract] Objective** To explore the mechanism of PI3k/Akt signal pathway activation in sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma (HCC) and evaluate the reversal effect of PI3k inhibitor LY294002. **Methods** The PI3k/Akt signaling pathway molecules, epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers and Bax expression in sorafenib resistant HCC cells were detected by western blot after different measures. CCK-8 and Transwell assay was used to detect the Huh7R cell proliferation activity, migration and invasion ability after dealt with low concentrations of sorafenib combined with LY294002. **Results** Compared with the parental Huh7 cells, the PI3k and p-Akt expression of Huh7R was significantly increased, the expression of PTEN was significantly decreased. The epithelial marker E-cadherin expression was decreased, while the mesenchymal markers as N-cadherin, vimentin, snail, slug expression were increased. After dealing with LY294002, the expression of Snail, Slug, Vimentin and N-cadherin were decreased in time and dose dependence. Low concentrations of sorafenib combined with LY294002 decreased Huh7R cell viability and inhibited the migration and invasion potential of Huh7R. **Conclusion** Long-term sorafenib exposure induce PI3k/Akt signaling pathway activation and promote EMT in

HCC. LY294002 reverse EMT in Huh7R through inhibiting PI3k/Akt signal pathway activation. LY294002 can synergize with low concentration of sorafenib to reverse HCC sorafenib resistance and inhibit Huh7R migration and invasion.

**[Key words]** hepatocellular carcinoma; sorafenib; epithelial-mesenchymal transition; signal pathway; drug resistance

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2016.06.004

基金项目:浙江省“十二五”基层卫生适宜技术成果转化工程重大项目(2013T301-12、2013T301-15)、嘉兴市科技计划项目(2013AY21042-5)、嘉兴市重点科技创新团队项目(2013-03)

作者单位:314000 浙江嘉兴,嘉兴市第一医院肝胆外科  
通讯作者:张浩, Email: changgung1@163.com

本课题组在前期研究中发现长期低剂量索拉菲尼暴露增加肝癌细胞侵袭转移潜能,可能与索拉菲尼诱导肝癌细胞上皮间质变(epithelial-mesenchymal transition, EMT)有关。为进一步研究索拉菲尼耐药肝癌细胞 EMT 形成机制,本次研究探讨 PI3k/Akt 信号通路在肝癌索拉菲尼耐药中作用,评估 PI3k 抑制剂 LY294002 对肝癌侵袭转移影响,为临床克服索拉菲尼耐药的肝癌提供潜在治疗方法。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 索拉菲尼由德国 Bayer 公司生产; Huh7 人肝癌细胞株购自于中国科学院细胞库; Huh7 索拉菲尼耐药肝癌细胞株(sorafenib resistant Huh7 cells, Huh7R) 由本课题组实验室建立并保存; 胎牛血清、胰酶由美国 Gibco 公司生产; DMEM 培养基由美国 Hyclone 公司生产; 二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)由美国 Sigma 公司生产; 细胞增殖检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)由日本同仁化学研究所生产; 用于 Western blot 实验抗体(PI3k, p-Akt, Akt, p-ERK1/2, ERK1/2, PTEN, E-cadherin, N-cadherin, Snail, Slug, Vimentin 及 GAPDH)及 PI3k 抑制剂 LY294002 均由美国 Cell Signaling Technology 公司生产; 用于 Transwell 侵袭实验的小室由美国 Corning 公司生产。实验时间为 2013 年 8 月至 2014 年 9 月。

### 1.2 实验方法

1.2.1 索拉菲尼药物的配制 将 200 mg 甲苯磺酸索拉菲尼片溶于 15.7 ml 无菌 DMSO 中, 配制浓度为  $2 \times 10^4 \mu\text{mol/L}$  索拉菲尼贮藏液, 分装,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。

1.2.2 细胞培养 将 Huh7 人肝癌细胞培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中, Huh7R 培养于含 10%胎牛血清及最大耐受浓度索拉菲尼 DMEM 培养液中, 在  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  浓度的培养箱中孵育, 待细胞密度长到 70%~80%时进行胰酶消化传代, 并取对数生长期细胞用于实验。

1.2.3 CCK-8 实验 每种细胞设空白组(培养液+CCK-8)、实验组(Huh7R 细胞+培养液+LY294002 联合不同浓度索拉菲尼+CCK-8)、对照组(Huh7R 细胞+培养液+CCK-8), 取生长良好的对数生长期 Huh7R 细胞按每孔  $5 \times 10^3$  细胞/100  $\mu\text{l}$  接种于 96 孔板培养, 孵育过夜, 除去旧培养液, 实验组加入 LY294002 联合不同浓度索拉菲尼(0、1  $\mu\text{mol/L}$ 、2  $\mu\text{mol/L}$ 、4  $\mu\text{mol/L}$ 、6  $\mu\text{mol/L}$ 、8  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$ 、

12  $\mu\text{mol/L}$ )的含 5% 胎牛血清的培养液, 孵育 48 h; 按体积 1:10 配制 CCK-8 和无血清培养基混合液, 然后每孔加入 100  $\mu\text{l}$  混合液, 孵育 1 h, 酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度值(A), 记录结果。按以下公式计算在 LY294002 和索拉菲尼作用下, 肿瘤细胞的生存率, 并计算出其半数抑制浓度(the half-maximum inhibitory concentration, IC50)值。

细胞生存率 = (实验组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值)  $\times 100\%$

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western blot)实验 不同措施处理的 Huh7R 细胞于提取前在无索拉菲尼药物的培养基中培养 24 h, 配制蛋白裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的混合液, 加入待检测细胞并于冰上放置 30 min, 然后在 12 000 r/min、 $4^\circ\text{C}$  条件下离心 15 min, 取其上清液。将细胞裂解物用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)定量。加入  $5 \times \text{SDS}$  上样缓冲液, 煮沸 10 min,  $-20^\circ\text{C}$  保存备用。每孔加入 20~30  $\mu\text{l}$  目的蛋白样品, 将十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶在 60V 电压下电泳, 然后在 300 mA 电流下湿转到聚偏氟乙烯膜上。脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜, PBST 漂洗 15 min, 共 3 次, 加入对应的二抗室温孵育 1 h, 然后再 PBST 漂洗 15 min, 共 3 次, 加入 ECL 发光液后显影拍照。

1.2.5 Transwell 小室侵袭实验 取对数生长期细胞消化离心后加入无血清培养液吹打均匀, 取  $5 \times 10^4$  细胞加入小室上层, 下层加入含 10%胎牛血清的培养液。孵育 48 h, 用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min, 0.1%结晶紫染色 2 h, 用棉签擦去上室细胞。在 100 倍显微镜下随机计数 5 个视野取平均值。侵袭实验将 50 mg/L 的 Matrigel 胶  $4^\circ\text{C}$  融化, 用无血清培养液将其 1:8 稀释混匀, 取 100  $\mu\text{l}$  放于小室上层, 其余步骤和迁移实验一样。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 均数比较采用 *t* 检验, 设  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 PI3k/Akt 信号通路蛋白及 EMT 标记蛋白表达见图 1、2

由图 1 可见, 与亲本 Huh7 细胞相比, Huh7R 的 PI3k 和 P-Akt 表达量升高, PTEN 表达量下降。由图 2 可见, 上皮标记蛋白 E-cadherin 表达下降, 间质标记蛋白 N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug 表达增加。

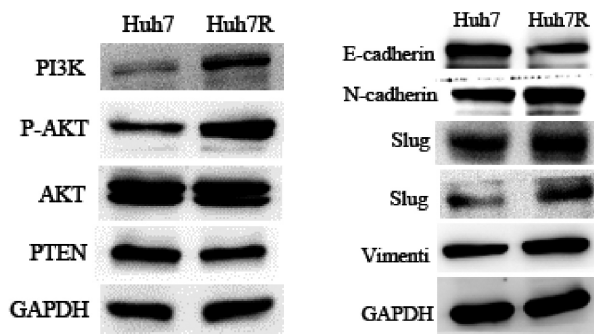


图1 Huh7R和Huh7的PI3k/Akt 信号通路蛋白表达情况

图2 Huh7R和Huh7的 EMT标记蛋白表达情况

### 2.2 Huh7R 的 EMT 标记相关蛋白表达与 LY294002 的关系见图 3、4

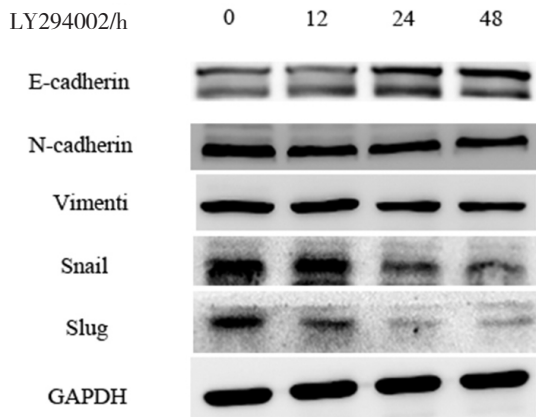


图3 LY294002作用后不同时间点Huh7R 的EMT标记相关蛋白的表达

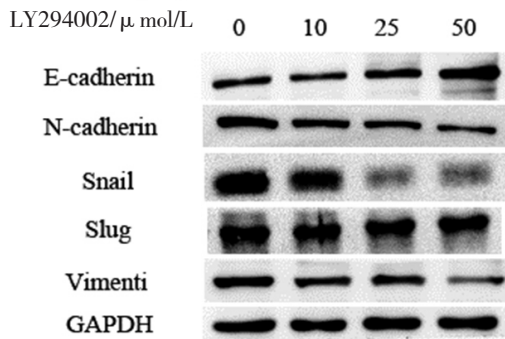


图4 不同浓度LY294002作用后Huh7R 的EMT标记相关蛋白的表达

由图 3、4 可见, Huh7R 加入 LY294002 作用后, EMT 标志相关蛋白 Snail、Slug、Vimentin、N-cadherin 的表达量呈时间依赖性和浓度依赖性下降, E-cadherin 表达量呈时间依赖性和浓度依赖性增加。

### 2.3 LY294002 抑制 Huh7R 迁移与侵袭见封三图 1 及图 2

由封三图 1 及图 2 可见, LY294002 作用后, 索拉菲尼耐药的肝癌细胞迁移和侵袭通过小室膜的细胞数量明显减少。

### 2.4 低浓度索拉菲尼联合 LY294002 拮抗肝癌细胞对索拉菲尼耐药

#### 2.4.1 低浓度索拉菲尼联合 50 μmol/L LY294002 对 Huh7R 毒性影响见图 5

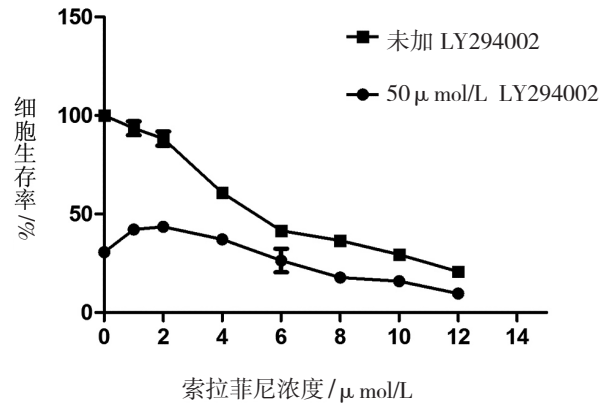


图5 低浓度索拉菲尼联合50 μmol/L LY294002 对Huh7R毒性影响线图

由图 5 可见, Huh7R 在低浓度索拉菲尼和低浓度的 LY294002 的联合作用下, 细胞毒性显著增强。与单独索拉菲尼组相比, 联合 LY294002 组在索拉菲尼浓度为 2 μmol/L、4 μmol/L、6 μmol/L、8 μmol/L、10 μmol/L、12 μmol/L 均增加了 Huh7R 对索拉菲尼药物敏感性 ( $t$  分别 = 17.71、11.29、6.80、11.56、6.60、9.81,  $P$  均 < 0.05)。

#### 2.4.2 低浓度索拉菲尼 (2 μmol/L) 联合不同浓度 LY294002 对 Huh7Rp-Akt 及 p-ERK 的表达见图 6

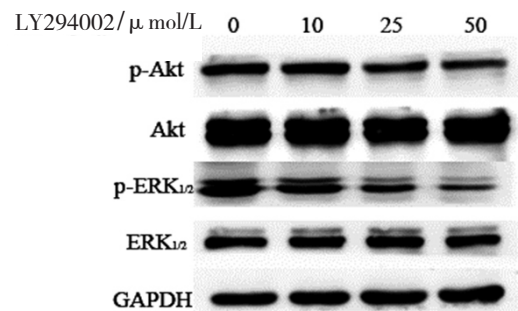


图6 2 μmol/L 索拉菲尼联合不同浓度 LY294002 对 Huh7Rp-Akt 及 p-ERK 表达

由图 6 可见, Western blot 结果显示, 低浓度索拉菲尼 (2 μmol/L) 联合不同浓度的 LY294002 处理 Huh7R 48 h 后, Huh7R 的 p-Akt、p-ERK 表达呈浓度依赖性下降。

#### 2.4.3 低浓度索拉菲尼 (2 μmol/L) 联合 50 μmol/L



LY294002 对 Huh7R p-Akt 及 p-ERK 表达的影响见图 7

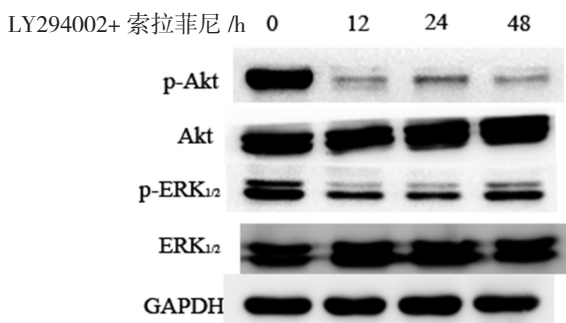


图7 2 μmol/L 索拉菲尼联合 50 μmol/L LY294002 后不同时间点 Huh7R p-Akt 及 p-ERK 表达

由图 7 可见,Western blot 结果显示,低浓度索拉菲尼(2 μmol/L)联合 50 μmol/L LY294002 处理 Huh7R 12 h、24 h、48 h,Huh7R 的 p-Akt、p-ERK 表达呈时间依赖性下降。

2.4.4 低浓度索拉菲尼(2 μmol/L)联合 50 μmol/L LY294002 对 Huh7R Bax 表达的影响见图 8

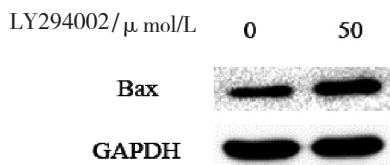


图8 低浓度索拉菲尼(2 μmol/L)单用或联合 50 μmol/L LY294002 对 Huh7R Bax 表达

由图 8 可见,低浓度索拉菲尼(2 μmol/L)联合 50 μmol/L LY294002 处理 Huh7R 细胞 48 h 后,凋亡蛋白 Bax 表达明显增加。

### 3 讨论

索拉菲尼是迄今为止唯一一个被美国食品药品监督管理局批准在临床上用于治疗晚期肝癌的靶向药物,它主要通过抑制Raf/MEK/ERK 信号传导来发挥抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>。大样本临床随机试验证明索拉菲尼治疗能够延长肝癌病人将近 3 个月的存活时间,这些临床治疗结果令人鼓舞<sup>[2-4]</sup>。然而长期索拉菲尼治疗产生的继发性耐药已成为限制索拉菲尼疗效进一步提高的瓶颈<sup>[5-7]</sup>。目前没有针对索拉菲尼耐药患者的标准治疗方案。因此,深入了解肝癌对索拉菲尼耐药机制,并进行针对性的分子靶向干预具有十分重要的意义。

本次研究证实长期索拉菲尼培养促进了肝癌细胞的耐药形成,诱导耐药细胞发生 EMT,这一改变与 PI3k/Akt 信号通路的激活诱导肿瘤细胞 EMT 密切相关。EMT 是指在特定的生理或病理情况下,

具有极性的上皮表型细胞发生细胞骨架重塑,上皮细胞标志物 E-cadherin 及间质细胞标志物N-cadherin 表达改变,转化为具有活动能力的间质表型细胞的过程。在这一过程中,上皮细胞获得成纤维细胞样特性并呈现细胞间黏附的下降及运动的增加,从而增强了耐药细胞的迁移、侵袭能力。研究表明,EMT 与肿瘤耐药、肿瘤细胞的原位侵袭和远处转移密切相关<sup>[8,9]</sup>。因此,进一步了解肝癌对索拉菲尼耐药过程中 EMT 分子调控机制,并进行针对性干预,有望为索拉菲尼耐药肝癌的治疗提供新方向。

PI3k/Akt 信号通路作为肿瘤细胞内重要的信号传导通路之一,通过影响下游多种效应分子的活化状态,控制着众多在肿瘤发生、发展中至关重要的细胞生物学过程,包括细胞增殖、凋亡、转录、翻译、代谢、新生血管生成以及细胞周期的调控<sup>[10-12]</sup>。本次研究发现耐药肝癌细胞在 PI3k 和 P-Akt 表达量较亲本细胞明显升高的同时,上皮标记蛋白 E-cadherin 表达下降,而间质标记蛋白 N-cadherin 及 Vimentin 表达上调,Snail 家族中 E-钙粘蛋白转录抑制因子 Snail 及 Slug 表达也明显升高,提示 PI3k/Akt 信号通路通过诱导 Snail 及 Slug 表达促进肝癌细胞上皮间质变,从而促进肿瘤细胞耐药及迁移侵袭能力增强。

LY294002 是一种常用的 PI3K 抑制剂。它可以通透细胞,抑制 PI3K/Akt 信号途径,包括抑制下游常见的 Akt 磷酸化等,不但抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡,还抑制肿瘤细胞 EMT 发生,从而降低肿瘤细胞转移潜能。本次研究构建的 Huh7R 索拉菲尼耐药肝癌细胞株 PI3k/Akt 信号通路处于激活状态,LY294002 特异性抑制该信号通路后,P-Akt 和 Snail/Slug 的表达量呈时间依赖性和浓度依赖性下降,说明 LY294002 抑制 Huh7R PI3k/Akt 信号通路活化,抑制 E-cadherin 表达的转录因子 Snail、Slug 表达减少,进而阻止 EMT 形成。本次研究 Transwell 小室侵袭实验检测 LY294002 作用耐药细胞 48 h 后其侵袭迁移能力明显下降,说明 LY294002 具有通过抑制 PI3k/Akt/Snail 信号通路活化从而逆转索拉菲尼耐药肝癌的 EMT 作用,同时减弱耐药肝癌细胞的迁移、侵袭能力。

本次研究的前期研究发现,在索拉菲尼耐药肝癌细胞 PI3k/Akt 信号通路激活的同时,ERK 也处于激活状态,而通过 LY294002 抑制 PI3k/Akt 信号通路活化的同时,磷酸化 ERK 表达也显著下调,表明 PI3k/Akt 信号通路可能促进 MAPK/ERK 信号通路

再次激活,LY294002 具有通过抑制 PI3k/Akt 信号通路活化间接抑制 MAPK/ERK 信号通路再次激活作用;同时,CCK-8 毒性实验提示低浓度索拉菲尼联合 LY294002 作用后,细胞毒性显著增强。因此,本次研究提出低浓度索拉菲尼联合 LY294002 在部分抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路基础上进一步通过抑制 PI3k/Akt 信号通路逆转肝癌对索拉菲尼的耐药性,提示低浓度索拉菲尼联合 LY294002 可以协同作用逆转肝癌细胞对索拉菲尼耐药。

综上所述,PI3k/Akt/snail 信号通路在长期索拉菲尼诱导促进肝癌耐药及上皮间质变过程中发挥重要作用,LY294002 具有通过抑制该信号通路活化从而逆转索拉菲尼耐药肝癌上皮间质变作用,LY294002 联合低浓度索拉菲尼可以协同作用逆转肝癌细胞对索拉菲尼耐药、减弱耐药肝癌细胞的迁移、侵袭能力,这种联合治疗方法为克服肝癌对索拉菲尼耐药提供了一种有效的新的治疗思路。

#### 参考文献

- Pascual S, Herrera I, Irurzun J. New advances in hepatocellular carcinoma[J]. World J Hepatol, 2016, 8(9): 421-438.
  - Rimassa L, Santoro A. Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial[J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2009, 9(6): 739-745.
  - Cheng AL, Kang YK, Chen Z, et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(1): 25-34.
  - Kim DY, Kim HJ, Han KH, et al. Real-life Experience of sorafenib treatment for hepatocellular carcinoma in Korea: from GIDEON data [J]. Cancer Res Treat, 2016, 48 (4): 1243-1252.
  - Chen J, Jin R, Zhao J, et al. Potential molecular, cellular and microenvironmental mechanism of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2015, 367(1): 1-11.
  - Makarova AS, Lazarevich NL. Deregulation of signaling pathways involved in sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma[J]. Klin Lab Diagn, 2013, (10): 66-68, 34-67.
  - Nishida N, Kitano M, Sakurai T, et al. Molecular mechanism and prediction of sorafenib chemoresistance in human hepatocellular carcinoma [J]. Dig Dis, 2015, 33 (6): 771-779.
  - Thiery JP, Aceloque H, Huang RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890.
  - Ombrato L, Malanchi I. The EMT universe: space between cancer cell dissemination and metastasis initiation[J]. Crit Rev Oncog, 2014, 19(5): 349-361.
  - Polivka J, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Pharmacol Ther, 2014, 142(2): 164-175.
  - Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review[J]. Ann Med, 2014, 46(6): 372-383.
  - Xia P, Xu XY. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application[J]. Am J Cancer Res, 2015, 5(5): 1602-1609.  
(收稿日期 2016-06-22)  
(本文编辑 蔡华波)
- 
- (上接第 611 页)
- Hughes D J, Hlavata I, Soucek P, et al. Variation in the vitamin D receptor gene is not associated with risk of colorectal cancer in the Czech Republic[J]. J Gastrointest Cancer, 2011, 42(3): 149-154.
  - Sarkissyan M, Wu Y, Chen Z, et al. Vitamin D receptor FokI gene polymorphisms may be associated with colorectal cancer among African American and Hispanic participants[J]. Cancer, 2014, 120(9): 1387-1393.
  - Takehige N, Yin G, Ohnaka K, et al. Associations between vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and colorectal cancer risk and effect modifications of dietary calcium and vitamin D in a Japanese population[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(5): 2019-2026.
  - Gandini S, Gnagnarella P, Serrano D, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2014, 810(1): 69-105.
  - Serrano D, Gnagnarella P, Raimondi S, et al. Meta-analysis on vitamin D receptor and cancer risk: focus on the role of Taq I, Apa I, and Cdx 2 polymorphisms [J]. Eur J Cancer Prev, 2016, 25(1): 85-96.
  - Hubner R A, Muir K R, Liu J F, et al. Dairy products, polymorphisms in the vitamin D receptor gene and colorectal adenoma recurrence[J]. Int J Cancer, 2008, 123(3): 586-593.  
(收稿日期 2016-03-14)  
(本文编辑 蔡华波)