

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.016

· 基础研究 ·

## PI3K/Akt 抑制剂渥曼青霉素对白血病细胞增殖和凋亡的影响

王晓南<sup>1</sup>, 吴青<sup>2</sup>, 张连生<sup>1</sup>, 吴一品<sup>2</sup>, 舒砚文<sup>2</sup>(1. 武汉科技大学医学院基础医学实验中心 湖北 武汉 430065; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所 湖北 武汉 430022)

**[摘要]** 目的: 研究 PI3K/Akt 抑制剂渥曼青霉素对白血病细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法: 以不同浓度的渥曼青霉素作用于人类髓细胞白血病细胞 K562, 采用 MTT 法检测细胞增殖活性, 单细胞凝胶电泳技术检测细胞 DNA 损伤形成的“彗星”样拖尾现象, Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞凋亡, Western blotting、RT-PCR 检测渥曼青霉素作用 K562 细胞后总 Akt 和磷酸化 Akt 以及 NF- $\kappa$ B 基因及蛋白表达水平的变化。结果: 渥曼青霉素以时间-剂量依赖性方式抑制 K562 细胞的增殖, 其 24 h 的 IC<sub>50</sub> 是 25 nmol/L。渥曼青霉素诱导 K562 细胞发生凋亡, 其作用呈明显剂量依赖性增强。渥曼青霉素作用后 K562 细胞 DNA 链断裂, 呈现“彗星”拖尾现象, 其尾长与拖尾率显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。渥曼青霉素能同时在蛋白和基因水平, 以剂量依赖性方式抑制磷酸化 Akt 以及 NF- $\kappa$ B 表达, 但对总 Akt 蛋白没有明显影响。结论: 渥曼青霉素以时间和剂量依赖方式明显抑制 K562 细胞的增殖及诱导其凋亡, 其机制可能与其下调磷酸化 PI3K/Akt 信号通路以及 NF- $\kappa$ B 蛋白表达有关。

**[关键词]** 渥曼青霉素; 白血病细胞; 转录核因子  $\kappa$ B; 磷酸化 Akt; 凋亡

**[中图分类号]** R733.7; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)07-0082-06

## Effect of PI3K/Akt inhibitor wortmannin on proliferation and apoptosis of leukemia K562 cells

WANG Xiao-nan<sup>1</sup>, WU Qing<sup>2</sup>, ZHANG Lian-sheng<sup>1</sup>, WU Yi-pin<sup>2</sup>, SHU Yan-wen<sup>2</sup>(1. Laboratory of Basic Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, Hubei, China; 2. Institute of Hematology, Affiliated Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of wortmannin (WM), a PI3K/Akt inhibitor, on the proliferation and apoptosis of leukemia cells and the possible mechanism. **Methods:** Human leukemia cell line K562 was treated with different concentrations of WM. The proliferation of K562 cells was examined by MTT assay. DNA damage in K562 cells was examined by single cell gel electrophoresis assay, and apoptosis of K562 cells was detected by Annexin V-FITC/PI double-staining. The expressions of total Akt, phosphate-Akt (p-Akt), and NF- $\kappa$ B p65 mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results:** WM inhibited the proliferation of K562 cells in a dose- and time-dependent manner, with the IC<sub>50</sub> value of 24 h being 25 nmol/L. WM also induced apoptosis of K562 cells in a dose-dependent manner. DNA damage in K562 cells was demonstrated by appearance of comet tail after treatment with WM, with the rate of DNA tail and the tail length being significantly higher than those in the control group ( $P < 0.01$ ). WM dose-dependently inhibited P-Akt and NF- $\kappa$ B p65, but not the total Akt, mRNA and protein expressions. **Conclusion:** WM can inhibit proliferation and induce apoptosis of K562 cells in a dose- and time-dependent manner, probably through down-regulation of phosphate PI3K/Akt signal pathway and NF- $\kappa$ B expression.

**[Key words]** wortmannin; NF- $\kappa$ B; phosphate-Akt; apoptosis; K562 cell

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 82-87]

**[基金项目]** 湖北教育厅科技基金资助项目(No. D200511008)。Project supported by the Education Foundation of Hubei Province (No. D200511008)

**[作者简介]** 王晓南(1958-),男,湖北省武汉市人,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事中西医结合肿瘤防治基础和临床的研究

**[通信作者]** 王晓南(WANG Xiao-nan, corresponding author), E-mail: wxnan@sina.com

白血病是起源于造血系统的恶性肿瘤,其发生机制与发展过程已经证实与多种遗传学因素相关。多种原因导致二类基因突变,其中细胞信号转导异常对白血病发生发展起着至关重要的作用。近年来,发现 PI3K 在许多肿瘤内异常表达,它的主要下调基因之一是 Akt。PI3K/Akt 信号转导通路在白血病的发生、发展中可能起着极其重要的作用<sup>[1-3]</sup>。研究<sup>[4-8]</sup>表明,许多肿瘤(肺癌、胃癌、前列腺癌、宫颈癌、血液系统肿瘤)中均发现 Akt 异常活化,因此 Akt 被认为可能与多种肿瘤的发生、发展密切相关。

渥曼青霉素(wortmannin, WM)是一种真菌代谢产物,其通过与磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)的催化亚单位 p110 结合,非竞争性和不可逆地抑制 PI3K 激酶活性,从而阻断 PI3K/Akt 信号通路,是 PI3K 的特异性抑制剂<sup>[8]</sup>。渥曼青霉素对多种进展期肿瘤如结肠癌、肺癌、胃癌、乳腺癌等都有治疗作用,尤其是胃癌的预防和治疗方面具有重大的应用前景。尽管如此,有关渥曼青霉素抗白血病效应的研究却鲜见报道。因此,本研究拟探讨渥曼青霉素对人髓系白血病细胞系 K562 的增殖、凋亡的作用及其可能的分子机制,为其临床应用提供更多的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

渥曼青霉素购自 Alexis 公司, RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司。鼠人 NF- $\kappa$ B p65 和兔抗人 B-肌动蛋白单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,鼠抗人单克隆 Phospho-Akt( Set473 )抗体、山羊抗 Akt1/2 多克隆抗体购于 Sigma 公司,HRP 标记的羊抗小鼠、抗兔 IgG 和二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均为瑞典 Amersham 公司。正常熔点琼脂糖(NMPA)、低熔点琼脂糖(LMPA)为进口分装试剂,溴化乙锭(EB)购自 Sigma 公司。荧光显微镜(Nikon, Japan)。

### 1.2 细胞系及细胞培养

人髓系白血病细胞 K562 为同济医学院免疫教研室惠赠。在含有 10% 的胎牛血清、青霉素 100 U/ml 及链霉素 100  $\mu$ g/ml 的 RPMI 1640 培养基中 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱内传代培养。

### 1.3 MTT 法检测渥曼青霉素对 K562 细胞增殖的影响

取对数生长期的 K562 细胞进行实验,细胞以每孔  $5 \times 10^5$ /ml 个细胞接种于 96 孔板中,每孔总体积 200  $\mu$ l,加入不同浓度的渥曼青霉素(3.125 ~ 100 nmol/L),以含等体积 DMSO 的培养液作为空白对

照,每种药物浓度为 1 组,各组设 3 复孔。上述 2 组处理的 K562 细胞置 5% CO<sub>2</sub>、37  $^{\circ}$ C 培养箱培养 0、24、48、72 h 后,每孔加 MTT 20  $\mu$ l,培养 4 h,弃 MTT,每孔加二甲亚砷 150  $\mu$ l,充分溶解。选择 490 nm 波长,酶联免疫检测仪上测定各孔 D 值。肿瘤细胞的生长抑制率(%) = (1 - 实验组平均 D 值/对照组平均 D 值)  $\times$  100%。

### 1.4 单细胞凝胶电泳法检测渥曼青霉素对 K562 细胞 DNA 的损伤效应

培养良好的 K562 细胞在指数生长期加渥曼青霉素,各瓶药物终浓度分别为 0、6.25、12.5、25 nmol/L,药物持续作用 24 h 后取细胞样品,采用单细胞凝胶电泳法检测细胞的 DNA 损伤修复情况,方法参见文献<sup>[9]</sup>。具体步骤为:(1)制板:于 40  $^{\circ}$ C 在磨砂载玻片上铺 1% 正常熔点琼脂(NMPA)凝胶 110  $\mu$ l 为第 1 层,待胶凝固后,去掉盖玻片,取 10  $\mu$ l 细胞悬液和 70  $\mu$ l 0.8% 低熔点琼脂糖(LMPA)凝胶( $\leq$ 37  $^{\circ}$ C)混匀,铺第 2 层,室温下 15 min。(2)裂解:取下盖玻片,将凝胶载玻片浸入新配制的裂解液中(2.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 1% 月桂酰肌氨酸钠, 1 mmol/L EDTA-Na, 在用之前加 1% Triton-100 和 10% DMSO),裂解 1 ~ 1.5 h。(3)解旋:从裂解液中取出载玻片用蒸馏水洗去多余的盐分,移入水平电泳槽解旋 20 ~ 30 min(1 mmol/L EDTA-Na, 300 mmol/L NaOH, pH 13)。(4)电泳:电压 20 V,电流 200 mA,低温避光,电泳 25 min。(5)染色和观察:0.4 mol/L Tris(pH 7.5)漂洗 3 次,每次 5 min,然后滴加 40 mg/L 溴化乙锭 20  $\mu$ l。放置 4  $^{\circ}$ C 避光保存,保持湿润。24 h 内观察,以防荧光淬灭。(6)观察:选择激发波长 400 nm,光栅波长 590 nm,视野 200 倍,135(ISO400)彩色胶片同步照相,测定细胞“彗星”样拖尾距离。

### 1.5 Annexin-V/PI 双染检测渥曼青霉素对 K562 细胞凋亡的影响

按试剂盒说明书进行操作,于 0、6.25、12.5、25 nmol/L 的渥曼青霉素和等体积 DMSO 作用 24 h 后,收集  $1 \times 10^7$  个细胞,冷 PBS 缓冲液洗 2 次,重悬于  $1 \times$  结合缓冲液,调整细胞密度为  $1 \times 10^7$ /ml。取 100  $\mu$ l 细胞悬液至 5 ml 试管中,加 5  $\mu$ l AnnexinV-FITC 标记液和 5  $\mu$ l PI(5 mg/L),混匀,室温避光孵育 15 min 后,加 500  $\mu$ l 结合缓冲液,4  $^{\circ}$ C 置 30 min,上流式细胞仪检测,用 MULTICYCLE 1.0 DNA 专用分析软件分析获得数据。

### 1.6 Western blotting 检测 K562 细胞总 Akt、p-Akt、NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达

离心收集  $1 \times 10^7$  个细胞,4 ℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 100  $\mu$ l 细胞裂解液冰浴 30 min,4 ℃ 12 000  $\times g$  离心 8 min。收集上清液,采用 Bradford 法进行蛋白定量。取 50  $\mu$ g 蛋白按比例加入 2  $\times$  SDS 上样缓冲液,沸水浴 5 min 变性蛋白质,每泳道 50  $\mu$ g 上样,采用 BIO-RAD 公司的垂直电泳装置经 SDS-PAGE 50 min,4 ℃ 110 V 转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 60 min,分别加入 NF- $\kappa$ B p65、NPM 及  $\beta$ -肌动蛋白一抗(稀释浓度为 1:2 000),4 ℃ 过夜,用含 0.05% Tween20 的 TBS 洗涤后,加入 1:2 000 二抗室温孵育 60 min,DAB 显色,数码照相保存 图像以 GDS 8000 图像分析系统分析。以相应蛋白条带的平均光密度值与  $\beta$ -肌动蛋白平均光密度值的比值表示各组蛋白表达水平。

1.7 RT-PCR 检测 K562 细胞 p-Akt、NF- $\kappa$ B p65 基因转录水平

应用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA,按说明书操作。每  $1 \times 10^7$  细胞加入 1 ml TRIzol,吹打裂解细胞,室温放置 5 min,加入 0.2 ml 氯仿,震荡,4 ℃、12 000  $\times g$  离心 15 min,把上层水相转移至新的 EP 管中;加入 0.5 ml 异丙醇,充分混匀,室温放置 10 min。4 ℃、10 000  $\times g$ ,离心 15 min,弃上清。加入 75% 乙醇(用 0.01% DEPC 水配制)1 ml,悬起沉淀物,4 ℃、7 500  $\times g$  离心 10 min,去上清室温干燥。加适量 RNA 酶抑制剂和去离子水溶解,取 1~2  $\mu$ l 稀释后测定 RNA 的纯度和浓度。调整终浓度至 5~10 mg/L 进行 RT-PCR。用通用引物(表 1)进行逆转录反应,PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳,EB 染色。用凝胶成像分析仪摄像分析,PCR 产物量以光密度 INT  $\times$  面积表示,计算与内参的比值。

表 1 RT-PCR 的引物  
Tab.1 Primers of RT-PCR

Primer	DNA sequence	Size (bp)
NF- $\kappa$ B	F: 5'-ATGCTTACTGGGTGCCAAAC-3' R: 5'-GGCAAGTCACTCAGCCTTTC-3'	265
p-Akt	F: 5'-ATGAATGAGGTGTCTGTATCAAAGAAGGC-3' R: 5'-TGCTTGAGGCTGTTGGCGACC-3'	330
$\beta$ -actin	F: 5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' R: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'	163

1.8 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,

*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 渥曼青霉素以剂量和时间依赖方式抑制 K562 细胞的增殖

由表 2 可见,分别以 3.125、6.25、12.5、25、50 和 100 nmol/L 渥曼青霉素作用 K562 细胞 24~72 h 后,各细胞组的细胞增殖活性均低于空白对照组细胞;但在浓度低于 6.25 nmol/L 时,渥曼青霉素对 K562 细胞细胞的增殖活性影响较小;而当浓度达到 12.5 nmol/L 时,其增殖抑制活性明显增强,具有统计学差异(*P* < 0.01)。并且,随着渥曼青霉素药物浓度的增加和作用时间的延长,这种增殖抑制作用明显增强,呈现明显的时效和量效关系。其 24 h 的 IC<sub>50</sub> 值为 (25.1  $\pm$  0.15) nmol/L,48 h 的 IC<sub>50</sub> 为 (12.5  $\pm$  0.11) nmol/L。

表 2 渥曼青霉素以剂量和时间依赖的方式抑制 K562 细胞的增殖(*n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ , %)

Tab.2 WM inhibited proliferation of K562 cells in a dose- and time-dependent manner(*n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ , %)

WM ( <i>c</i> <sub>B</sub> /nmol · L <sup>-1</sup> )	24 h	48 h	72 h
Control	1.1 $\pm$ 0.01	3.2 $\pm$ 0.01	8.1 $\pm$ 0.03
3.125	6.0 $\pm$ 0.01	19.4 $\pm$ 0.01**	26.1 $\pm$ 0.01**
6.25	13.3 $\pm$ 0.03**	32.1 $\pm$ 0.03**	40.5 $\pm$ 0.03**
12.5	26.9 $\pm$ 0.01**	40.2 $\pm$ 0.02**	44.1 $\pm$ 0.05**
25	43.4 $\pm$ 0.04**	51.0 $\pm$ 0.03**	59.7 $\pm$ 0.04**
50	48.5 $\pm$ 0.01**	55.3 $\pm$ 0.02**	62.6 $\pm$ 0.04**
100	51.8 $\pm$ 0.03**	59.3 $\pm$ 0.01**	78.9 $\pm$ 0.02**

\*\* *P* < 0.01 vs Control

2.2 渥曼青霉素致 K562 细胞 DNA 损伤产生“彗星”样拖尾效应

分别以 0、6.25、12.5、25 nmol/L 渥曼青霉素与 K562 细胞共同孵育 24 h 后,应用单细胞凝胶电泳法检测渥曼青霉素对 K562 细胞 DNA 损伤所致效应。如图 1 所示,与正常对照细胞相比,经 25 nmol/L 渥曼青霉素处理 24 h 后的细胞出现明显的核 DNA 断裂,所致的“彗尾”拖尾图像。用图像分析软件进行定量分析发现,分别以 6.25、12.5、25 nmol/L 渥曼青霉素与 K562 细胞共同孵育 24 h 后,尾矩和 Olive 尾矩值分别为(24.38  $\pm$  2.1)、(43.3  $\pm$  3.0);(59.18  $\pm$  1.2)、(57.39  $\pm$  3.4)和(69.27  $\pm$

1.3)、(72.7 ± 3.7),均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ,表3),表明渥曼青霉素对人白血病 K562 细胞造成

的 DNA 损伤可能是其能抗肿瘤活性的机制之一。

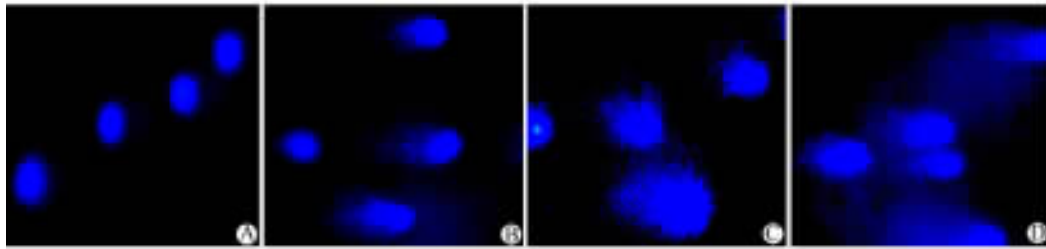


图1 单细胞凝胶电泳检测渥曼青霉素诱导 K562 细胞 DNA 损伤所致的“慧星”拖尾现象 (×400)  
Fig.1 WM induced DNA damage of K562 cells as detected by single cell gel electrophoresis (×400)

A: Ctrl; B: 6.25 nmol/L WM ; C: 12.5 nmol/L WM ; D: 25 nmol/L WM

表3 渥曼青霉素对 K562 细胞 DNA 损伤的所致“慧星”拖尾的影响

Tab.3 Effect of different concentrations of WM on comet tail of K562 cells caused by DNA damage

WM ( $c_B/nmol \cdot L^{-1}$ )	Tail length ( $L/\mu m$ )	Tail intensity (%)	Tail moment (%)
Control	17.33 ± 3.0	12.42 ± 0.18	16.3 ± 4.5
6.25	24.38 ± 2.1**	31.18 ± 2.59**	43.3 ± 3.0
12.5	59.18 ± 1.2**	60.10 ± 3.22**	57.4 ± 3.4
25	69.27 ± 1.3**	78.26 ± 5.20**	72.7 ± 3.7

\*\*  $P < 0.01$  vs Control

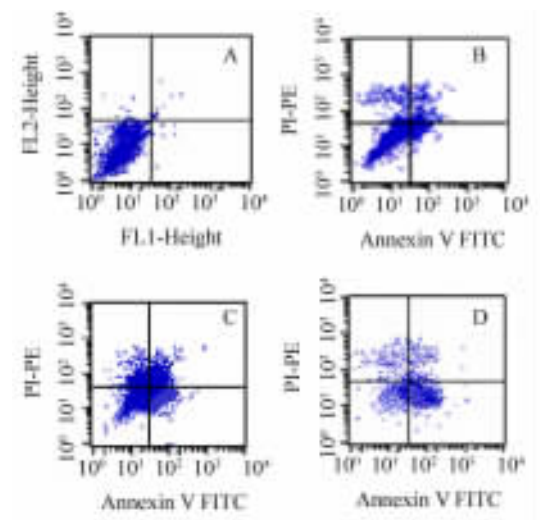


图2 流式细胞术检测渥曼青霉素诱导 K562 细胞凋亡  
Fig.2 WM induced apoptosis of K562 cells as detected by flow cytometry

A: Control; B: 6.25 nmol/L WM;  
C: 12.5 nmol/L WM; D: 25 nmol/L WM

2.3 渥曼青霉素诱导 K562 细胞凋亡增加

Annexin-V-FITC/PI 双染后流式细胞术检测结果(图2)显示,以6.25、12.5、25 nmol/L 渥曼青霉素作用 K562 细胞 24 h 后, K562 细胞的凋亡率逐步增加,从(7.69 ± 0.40)% 增至(30.17 ± 0.12)%、再增至(45.56 ± 0.32)%,不仅比对照组细胞凋亡率[(0.23 ± 0.02)%]均有显著增加 ( $P < 0.01$ ),而且呈现一定的剂量效应关系。

2.4 渥曼青霉素对 K562 细胞总 Akt、P-Akt 及 NF-κB p65 蛋白和基因的调控作用

分别以 0、6.25、12.5、25 nmol/L 渥曼青霉素与 K562 细胞共同孵育 24 h 后,应用 Western blotting 检测渥曼青霉素对 K562 细胞总 Akt、P-Akt 及 NF-κB p65 蛋白的调节变化。结果显示,其蛋白表达水平呈浓度依赖性地下降, ( $P < 0.05$ ,图3)。进一步以 RT-PCR 检测基因转录水平 mRNA 含量的变化。结果同样显示, mRNA 亦呈明显的时间、剂量依赖性下降 ( $P < 0.05$ ),但总 Akt 未见明显变化(图4)。

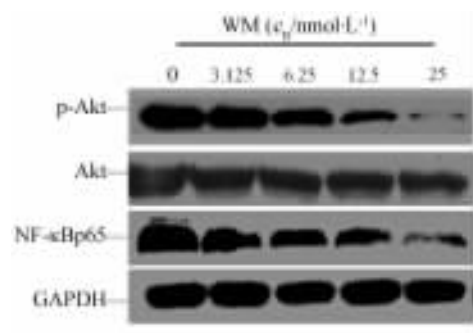


图3 渥曼青霉素对 K562 细胞 Akt、p-Akt 及 NF-κB P65 蛋白水平的影响

Fig.3 Effects of WM on Akt, p-Akt and NF-κB p65 protein expressions in K562 cells

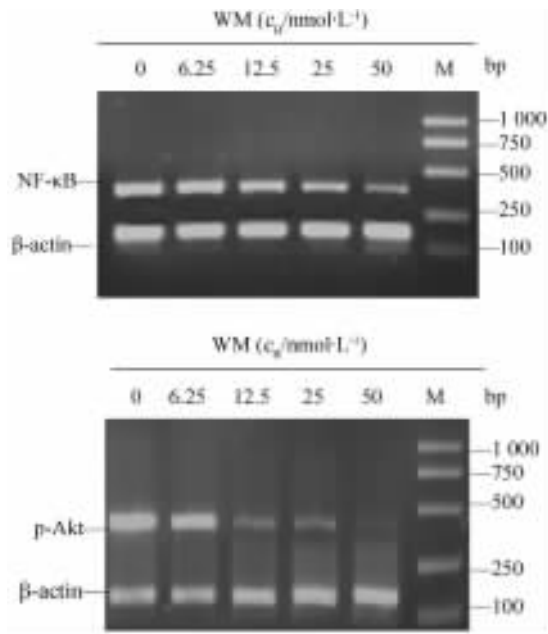


图4 渥曼青霉素对 K562 细胞 P-Akt 及 NF-κB p65 mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of WM on P-Akt and NF-κB p65 mRNA expressions in K562 cells

### 3 讨论

白血病的发病机制复杂,是多因素、多基因共同参与的结果。其中细胞信号转导对白血病的发生、发展起着至关重要的作用。信号转导通路的异常改变是肿瘤细胞的重要生物学特性,其中磷脂酰肌醇-3 激酶在肿瘤信号转导中起着重要的调节作用。细胞在一系列内外因素的作用下,通过启动 PI3K/Akt 信号转导通路。诱导细胞的增殖、分化,避免细胞发生凋亡,在维持细胞恶性生物学特性中起重要作用。在肿瘤细胞逃避抗癌药物的杀伤过程中, PI3K/Akt 信号转导通路可能起了极其重要的作用<sup>[10-12]</sup>,因此通过调节 Akt 基因表达从而调整细胞增殖与凋亡的平衡,达到抑制肿瘤生长的目的<sup>[13]</sup>。

本研究表明,加入 Akt 抑制剂渥曼青霉素后,能显著抑制细胞增殖,且抑制作用药物浓度呈正相关,并诱导细胞发生凋亡。而单细胞电泳(彗星实验)是一种能在单细胞水平检测 DNA 损伤的技术,有简便、快速、灵敏、需样少和对环境诱变剂及致癌剂的灵敏性高等优点,常采用尾长和尾相来表示 DNA 的损伤程度,而且适用于任何类型的真核细胞<sup>[14-15]</sup>。本实验通过该方法发现不同浓度的渥曼

青霉素作用 K562 细胞 24 h 后,可以引起 K562 细胞不同程度的 DNA 损伤,采用多项评价指标尾矩、Olive 尾矩值和尾部的 DNA 含量观察,渥曼青霉素不同浓度组与对照组比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 3);同时,损伤程度也随着渥曼青霉素浓度的增加而增加,呈现出良好的剂量-效应关系。另外,流式细胞术凋亡百分率的检测及单细胞电泳实验进一步证实,MTT 所示的细胞增殖受抑可能与渥曼青霉素诱导的 K562 细胞凋亡有关,且在低浓度时诱导凋亡能力并不明显,但随渥曼青霉素处理浓度加大凋亡百分率明显增加,这与文献报道一致<sup>[16]</sup>。本研究发现, K562 细胞中活性形式的 Akt 即磷酸化的 Akt (p-Akt) 蛋白表达水平较高,渥曼青霉素能够显著降低 K562 细胞 p-Akt 表达,并随药物浓度的增加出现下调。另外,渥曼青霉素在诱导 p-Akt 表达下调的同时,也诱导 p-Akt mRNA 表达的下调。提示 K562 细胞存在 PI3K/Akt 信号途径的异常活化,并与药物的剂量有关。渥曼青霉素对 K562 细胞总 Akt 蛋白水平无明显影响,说明非磷酸化 AKT 不具有生物学活性,故推测渥曼青霉素的抗增殖活性与 PI3K/Akt 信号转导途径活化有关。

NF-κB 目前被认为是调节癌基因表达的关键分子,可抑制肿瘤细胞的凋亡和促进转移以及肿瘤细胞耐药性的产生<sup>[17]</sup>。同时, NF-κB 是细胞信号转导通路中的重要环节,也是预防癌症以及增强化疗敏感性的一个理想的治疗靶位点<sup>[18]</sup>。本研究表明,渥曼青霉素能下调 K562 细胞中的 NF-κB mRNA 和蛋白的水平,即渥曼青霉素可降低 K562 细胞磷酸化 Akt 及磷酸化 NF-κB 的表达水平,影响 Akt/NF-κB 信号转导通路的活性,但对非磷酸化的 Akt 未见明显变化,提示该信号通路可能参与了渥曼青霉素诱导 K562 细胞的凋亡作用,并与白血病恶性生物学行为有关。这种可能的机制也在最近国外文献中得到证实。Poh 等<sup>[19-20]</sup>研究渥曼青霉素对 PI3K/Akt 通路的作用,结果显示渥曼青霉素能负调控 PI3K/Akt 通路中的多种分子,包括 PI3K 和 mTOR,使 Akt 去磷酸化而下调 Akt 激酶活性。

总之,渥曼青霉素能够明显抑制 K562 细胞的增殖,并诱导其凋亡;PI3K/Akt 信号转导通路对肿瘤生物学行为的影响表明,可以通过抑制其表达来抑制肿瘤细胞的生长,促进肿瘤细胞分化或凋亡,降低其侵袭性,本研究为抗肿瘤靶向治疗和药物筛选奠定了良好的基础。

[ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] Olsen BB, Bjørling-Poulsen M, Guerra B. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: a study on its mechanism of action [ J ]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39( 1 ): 227-237.

[ 2 ] Rudelius M, Pittaluga S, Nishizuka S, Pham TH, Fend F, Jaffe ES, *et al*. Constitutive activation of Akt contributes to the pathogenesis and survival of mantle cell lymphoma [ J ]. *Blood*, 2006, 108( 5 ): 1668-1676.

[ 3 ] Tazzari PL, Cappellini A, Ricci F, Evangelisti C, Papa V, Grafone T. Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide-3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts [ J ]. *Leukemia*, 2007, 21( 3 ): 427-433.

[ 4 ] Priulla M, Calastretti A, Bruno P, Azzariti A, Paradiso A, Canti G, *et al*. Preferential chemosensitization of PTEN-mutated prostate cells by silencing the Akt kinase [ J ]. *Prostate*, 2007, 67( 7 ): 782-789.

[ 5 ] Martelli AM, Nyäkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, *et al*. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia [ J ]. *Leukemia*, 2006, 20( 6 ): 91-98.

[ 6 ] Tang JM, He QY, Guo RX, Chang XJ. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis [ J ]. *Lung Cancer*, 2006, 51( 2 ): 181-191.

[ 7 ] Wu H, Weng D, Xing H. Reversal of multidrug resistance and inhibition of phosphorylation of AKT in human ovarian cancer cell line by wild-type PTEN gene [ J ]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007, 27( 6 ): 713-716.

[ 8 ] Zhang D, Fan D. Multidrug resistance in gastric cancer: recent research advances and ongoing therapeutic challenges [ J ]. *Exp Rev Anticancer Ther*, 2007, 7( 10 ): 1369-1378.

[ 9 ] Wang XF, Xing ML, Shen Y, Zhu X, Xu LH. Oral administration of Cr( VI ) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice [ J ]. *Toxicology*, 2006, 228( 1 ): 16-23.

[ 10 ] 黄秀兰, 崔国辉, 周克元. PI3K/Akt 信号通路 with 肿瘤细胞凋亡关系的研究进展 [ J ]. *癌症*, 2008, 27( 3 ): 331-336

[ 11 ] WU C, HUANG J. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer [ J ]. *J Biol Chem*, 2007, 282( 6 ): 3571-3583.

[ 12 ] 曾慧敏, 王丹红, 刘文贤. PDK/Akt 通路与肿瘤治疗 [ J ]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15( 2 ): 82-85.

[ 13 ] Wang Y, Jiang XY, Liu L, Jiang HQ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates hepatic stellate cell apoptosis [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14( 33 ): 5186-5191.

[ 14 ] 梁正林, 邝晓聪, 温冠媚, 李立平, 何少健. 大鼠急性肾功能衰竭中细胞凋亡的实验观察及其意义 [ J ]. *广西医科大学学报*, 2008, 25( 1 ): 25-26.

[ 15 ] 刘凤超, 贺永文, 喻佛定. 天晴甘平减轻急性肝衰竭小鼠肝细胞损伤的机制 [ J ]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17( 10 ): 1014-1017.

[ 16 ] 谢 霞, 高 青, 王艳丽, 田 翀. 抑制 PI3K/PKB 信号通路提高胃癌细胞化疗敏感性的研究 [ J ]. *中国药理学通报*, 2008, 24( 12 ): 1666-1670.

[ 17 ] Han Z, Hong L, Han Y, Wu K, Han S, Shen H. *et al*. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gP, Bcl-2 and Bax [ J ]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007, 26( 2 ): 261-268.

[ 18 ] Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy [ J ]. *Biofactors*, 2007, 29( 1 ): 19-35.

[ 19 ] Ohta T, Ohmichi M, Hayasaka T, Mabuchi S, Saitoh M, Kawagoe J, *et al*. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in *in vitro* ovarian cancer models [ J ]. *Endocrinology*, 2006, 147( 4 ): 1761-17179.

[ 20 ] Poh TW, Pervaiz S. LY294002 and LY303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogenperoxide production independent of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway [ J ]. *Cancer Res*, 2005, 65( 14 ): 6264-6274.

[ 收稿日期 ] 2009 - 10 - 30 [ 修回日期 ] 2009 - 12 - 10  
 [ 本文编辑 ] 王 莹

本期广告目次

沈阳三生制药有限责任公司 ..... 封二  
 德国美天旎生物技术有限公司 ..... 封三  
 碧迪医疗器械有限公司 ..... 封四  
 上海先声药业有限公司 ..... 前插页 I  
 上海医元生物基因发展有限公司 ..... 前插页 II