

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2015.04.005

AKT 反馈激活拮抗 4EGI-1 对黑素瘤 A375 细胞的抑制作用

陈兰, 邓仁远, 涂云华, 叶振源, 薛月萃, 曹煜(贵阳医学院附属医院 皮肤科, 贵州 贵阳 550001)

[摘要] **目的:** 探索 4EGI-1 对黑素瘤 A375 细胞中 AKT 通路的激活作用及后者对 4EGI-1 抑制 A375 细胞增殖的影响。**方法:** 用 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 的 4EGI-1 处理黑素瘤 A375 细胞 12、24 h, Western blotting 检测 4EGI-1 对 A375 细胞中 AKT 磷酸化的影响; A375 细胞分别受 4EGI-1 (40 $\mu\text{mol/L}$)、BEZ235 (5 $\mu\text{mol/L}$)、4EGI-1 (40 $\mu\text{mol/L}$) + BEZ235 (5 $\mu\text{mol/L}$) 联合处理, CCK-8 实验和流式细胞术分别检测 4EGI-1、BEZ235 单独或联合处理对 A375 细胞增殖和细胞周期的影响, Western blotting 检测对细胞周期相关蛋白 CyclinD1 表达的影响。**结果:** 4EGI-1 促进 A375 细胞中 AKT 的磷酸化, 且具有剂量依赖性; 而 BEZ235 能够拮抗 4EGI-1 对 AKT 的促磷酸化作用。与 4EGI-1 组和 BEZ235 组相比, 联合组的 A375 细胞增殖抑制率显著升高 [24 h 时, 4EGI-1 组和 BEZ235 组抑制率分别为 (7.6 \pm 1.2)% 和 (2.4 \pm 3.1)% , 而联合组抑制率为 (19.8 \pm 4.3)% ; $P < 0.05$], S 期细胞比例显著降低 (4EGI-1 组和 BEZ235 组 S 期细胞比例分别为 25.65% 和 25.82% , 联合处理组细胞 S 期为 13.08% ; $P < 0.05$), CyclinD1 表达显著降低 (4EGI-1 组和 BEZ235 组 CyclinD1 相对表达值为 0.81 \pm 0.04 和 0.76 \pm 0.04 , 联合处理组细胞 CyclinD1 相对表达值为 0.25 \pm 0.03 ; $P < 0.05$)。**结论:** AKT 反馈激活拮抗 4EGI-1 对黑素瘤 A375 细胞的抑制作用, 联合使用 AKT 抑制药物能够增强 4EGI-1 对 A375 细胞的生长抑制作用。

[关键词] 黑素瘤; A375 细胞; AKT; 帽子依赖翻译; 4EGI-1

[中图分类号] R739.5; R730.59

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2015)04-0438-05

4EGI-1 induced AKT activation counteracts its growth inhibition on A375 cell

Chen Lan, Deng Renyuan, Tu Chunhua, Ye Zhenyuan, Xue Yuecui, Cao Yu(Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550001, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of 4EGI-1 on AKT activity in melanoma cell A375 and its role in 4EGI-1-induced growth inhibition of the cells. **Methods:** After treated with indicated concentrations of 4EGI-1 (20, 40, 60 $\mu\text{mol/L}$) for 12 h, A375 cells were lysed to analyze AKT phosphorylation by using immunoblotting. A375 cells were also treated with 4EGI-1 and BEZ235 alone or in combination to assess their effects on cell proliferation through the CCK-8 assay. Their influences on cell cycle were determined using flow cytometry and the expression of Cyclin D1 was examined by immunoblotting. **Results:** 4EGI-1 induced AKT phosphorylation in A375 cells dose-dependently. While the inhibition rates of 4EGI-1 and BEZ235 on A375 cells were (7.6 \pm 1.2)% and (2.4 \pm 3.1)% respectively, the rate increased significantly to (19.8 \pm 4.3)% when both compounds were used together. The percentage of cells in S phase cells were 25.65% and 25.82% after treated with 4EGI-1 or BEZ235. It decreased to 13.08% in A375 cells exposed to both 4EGI-1 and BEZ235, indicating that BEZ235 enhanced the inhibitory effect of 4EGI-1 on A375 growth. BEZ235 also enhanced the inhibitory effect of 4EGI-1 on cyclin D1 expression. The relative expression levels of cyclin D1 in 4EGI-1 group and BEZ235 group were 0.81 \pm 0.04 and 0.76 \pm 0.04 respectively, it was reduced to 0.25 \pm 0.03 when the cells were cultured in the presence of both compounds. **Conclusion:** Akt phosphorylation induced by 4EGI-1 counteracts its growth inhibition on A375 cell. Combination of 4EGI-1 and Akt inhibitor is a more effective strategy to inhibit the growth of A375 cells.

[基金项目] 贵州省中药现代化专项项目资助(No. 20125018)。Project supported by the Modernization of Traditional Chinese Medicine Special Project of Guizhou Province(No. 20125018)

[作者简介] 陈兰(1987-), 女, 贵州省毕节地区人, 硕士, 主要从事皮肤肿瘤基础及临床研究, E-mail: cl542111@163.com

[通信作者] 曹煜(Cao Yu, corresponding author), E-mail: caoyu7099@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20150728.1343.010.html>

[**Key words**] melanoma; A375 cell; AKT; cap-dependent mRNA translation; 4EGI-1

[Chin J Cancer Biother, 2015, 22(4): 438-442]

帽子依赖翻译(cap-dependent mRNA translation)的异常与肿瘤的发生发展密切相关^[1]。eIF4F 蛋白复合物通过增强 mRNA 的 5' 端帽子结构与核糖体结合进而促进帽子依赖翻译的起始,其异常激活增强了一系列癌基因的表达,如细胞周期蛋白 D1 (*CyclinD1*)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, *Bcl-2*)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*)和基质金属蛋白酶 9(matrix metalloprotein 9, *MMP9*),进而促进肿瘤细胞的增殖、存活和迁移^[2]。eIF4F 蛋白复合物由帽子结合蛋白(cap-binding protein)eIF4E、RNA 解旋酶 eIF4A 和支架蛋白 eIF4G 组成,eIF4E 在结肠癌^[3-4]、乳腺癌^[5]、肺癌^[6]、前列腺癌^[7]和非霍奇金淋巴瘤^[8]等多种肿瘤中过表达,导致 eIF4F 蛋白复合物的异常激活。在黑素瘤组织中也检测到 eIF4E 过表达,进一步研究^[9-10]证实了黑素瘤细胞中的 eIF4E 能够促进肿瘤细胞的增殖和存活。

4EGI-1 能够通过阻断 eIF4E 和 eIF4G 之间的相互作用,从而抑制 eIF4F 蛋白复合物的形成,进而能够抑制受 eIF4F 蛋白复合物调控的癌基因的表达^[11]。在体外,4EGI-1 能够抑制多发性骨髓瘤细胞的增殖和促进多发性骨髓瘤细胞的凋亡^[12];在体内,4EGI-1 能够抑制乳腺癌肿瘤细胞在裸鼠体内的成瘤能力^[13]。这些研究均说明 4EGI-1 具有抑制肿瘤的作用,但 4EGI-1 对黑素瘤细胞的作用目前尚未报道。由于 AKT 通路的激活在黑素瘤耐药中发挥着重要的作用,本研究探索 4EGI-1 对黑素瘤细胞中 AKT 激活的影响,并进一步协同抑制 AKT 的激活检测 4EGI-1 对黑素瘤细胞的生长及细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

黑素瘤细胞株 A375 由本研究室保存。4EGI-1 购自 Calbiochem 公司,双重 ATP 竞争性 PI3K 和 mTOR 抑制剂 BEZ235 购自 Selleck 公司,蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)、pAKT (S473)、pAKT (T308)和 CyclinD1 抗体购自 CST 公司,Tubulin 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 Western blotting 检测 4EGI-1 对 A375 细胞中 AKT 磷酸化水平的影响

A375 细胞以 3×10^5 /孔接种至六孔板中,在 37 °C 培养 24 h 后加入 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 4EGI-1,对照组加

入等体积 DMSO,12、24 h 时收集蛋白,用 BCA 法定量后行 SDS-PAGE。电泳结束后,将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入 5% 脱脂奶粉稀释的一抗(AKT 抗体 1:1 000 稀释,pAKT (S473)抗体 1:500 稀释,pAKT (T308)抗体 1:500 稀释,Tubulin 抗体 1:2 000 稀释)在 4 °C 冰箱中孵育过夜,1 \times TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶偶联的二抗(羊抗兔二抗 1:5 000 稀释,羊抗鼠二抗 1:5 000 稀释),室温轻摇孵育 1 h 后用 1 \times T TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。化学发光法显色 3 min 后压片显影,以 Tubulin 为内参照,检测 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 4EGI-1 处理 12、24 h 对 A375 细胞 AKT、p-AKT-473、p-AKT-380 表达水平的影响。另外,用 DMSO 和不同浓度的 4EGI-1 (30、40、50 $\mu\text{mol/L}$)处理 A375 细胞 12 h,Western blotting 检查不同浓度 4EGI-1 处理 12、24 h 对 A375 细胞 AKT、p-AKT-473、p-AKT-380 表达水平的影响。

1.3 4EGI-1、BEZ235 单独或联合作用对 A375 细胞内 AKT 磷酸化和 CyclinD1 表达的影响

A375 细胞以 3×10^5 /孔接种至六孔板中,在 37 °C 培养 24 h,分为 4 组:对照组(加入 DMSO)、4EGI-1 (40 $\mu\text{mol/L}$)组、BEZ235 (5 $\mu\text{mol/L}$)组、4EGI-1 (40 $\mu\text{mol/L}$)和 BEZ235 (5 $\mu\text{mol/L}$)联合组,加入相应药物后处理 24 h,行 Western blotting 分析,以 Tubulin 为内参,检测 AKT、p-AKT-473、p-AKT-380、CyclinD1 和 Tubulin 的表达。采用 Image J 软件对条带进行灰度分析,对 CyclinD1 表达水平进行相对定量分析。

1.4 CCK-8 法检测 4EGI-1 对 A375 细胞增殖的影响

利用 CCK-8 法检测药物对细胞生长的抑制作用。96 孔板中接种 1 500 个细胞,24 h 后分别用 DMSO、4EGI-1 (40 $\mu\text{mol/L}$)、BEZ235 (5 $\mu\text{mol/L}$)、4EGI-1 (40 $\mu\text{mol/L}$) + BEZ235 (5 $\mu\text{mol/L}$)联合处理 24、36 和 48 h。每孔加入 15 μl CCK-8 溶液,37 °C 孵育 2 h 后,使用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度(*D*)值。增殖抑制率(%) = (对照组 *D* 值 - 实验组 *D* 值) / 对照组 *D* 值 \times 100%。每个时间点平行做 3 个孔,实验重复 3 次。

1.5 流式细胞术检测检测 4EGI-1 对 A375 细胞周期的影响

A375 细胞分别用 DMSO (对照组)、4EGI-1 (40 $\mu\text{mol/L}$)、BEZ235 (5 $\mu\text{mol/L}$)、4EGI-1 (40 $\mu\text{mol/L}$) + BEZ235 (5 $\mu\text{mol/L}$)联合处理 24 h 后收集细胞,

PBS 洗后加入 75% 乙醇在 -20 °C 冰箱中固定过夜。细胞用冰冷的 PBS 洗涤两次, 加入 100 μg/ml 的 RNA 酶消化 30 min 后加入 50 μg/ml 的 PI 避光反应 15 min, 用流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用 SAS9.2 统计学软件, 采用 *t* 检验进行组间比较, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 4EGI-1 促进 A375 细胞中 AKT 的磷酸化

Western blotting 检测结果(图 1A)显示, 4EGI-1 处理 12、24 h 时, A375 细胞中 AKT 的 308 位点和 473 位点磷酸化程度均较对照组显著升高, 说明 4EGI-1 能够增强黑素瘤细胞中 AKT 的活性; 但处理时间对 AKT 磷酸化影响差异不明显, 因此后续研究选择处理时间为 12 h。用不同浓度的 4EGI-1 (30、40、50 μmol/L) 处理 A375 细胞 12 h 后收集蛋白检测 AKT 的 308 位点和 473 位点的磷酸化, 显示 4EGI-1 能够以剂量依赖的方式增强 AKT 的磷酸化(图 1B)。由于 40 μmol/L 的 4EGI-1 能够显著激活 AKT 的磷酸化且对细胞生长影响不显著, 所以后续实验均采用 40 μmol/L 的 4EGI-1 处理细胞。

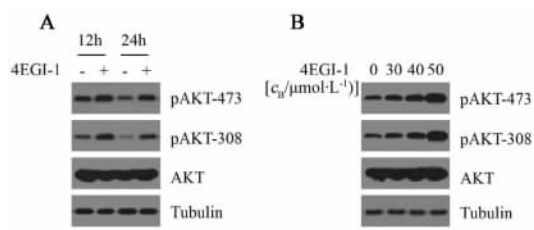


图 1 4EGI-1 以剂量依赖的方式增强 A375 细胞中 AKT 的磷酸化

Fig. 1 4EGI-1 increases AKT phosphorylation of A375 cells in a dose dependent manner

2.2 BEZ235 抑制 4EGI-1 对 A375 细胞 AKT 磷酸化的促进作用

Western blotting 检测结果(图 2)显示, 与对照组相比, 4EGI-1 组 AKT 的 308 位点(2.08 ± 0.18 vs 1 ± 0.11, $P < 0.05$)和 473 位点(1.97 ± 0.13 vs 1 ± 0.08, $P < 0.05$)磷酸化水平显著升高; 而添加 BEZ235 后 4EGI-1 对 AKT 的 308 位点和 473 位点磷酸化的促进作用被显著抑制 ($P < 0.05$)。

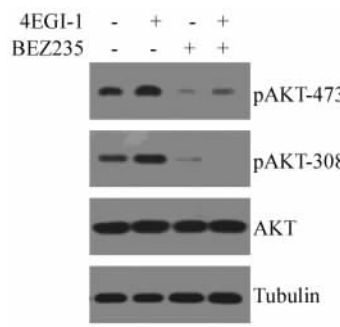


图 2 BEZ235 抑制 4EGI-1 对 A375 细胞中 AKT 的促磷酸化作用

Fig. 2 BEZ235 inhibited the phosphorylation of AKT induced by 4EGI-1 in A375 cells

2.3 BEZ235 增强 4EGI-1 对 A375 细胞的增殖抑制作用

CCK-8 法检测结果(图 3)显示, 单独使用 4EGI-1 处理 A375 细胞 24、36、48 h 后, 4EGI-1 对 A375 细胞生长的抑制率分别为(7.6 ± 1.2)%、(21 ± 1.7)%和(25.9 ± 2)%; 当用 BEZ235 阻断 4EGI-1 介导的 AKT 激活后, 能够明显增强 4EGI-1 对 A375 细胞的增殖抑制作用, 4EGI-1 和 BEZ235 联合处理 24、36、48 h 后, 对细胞的增殖抑制率分别为(19.8 ± 4.3)%、(46.1 ± 1.8)%和(54.7 ± 5.9)%。

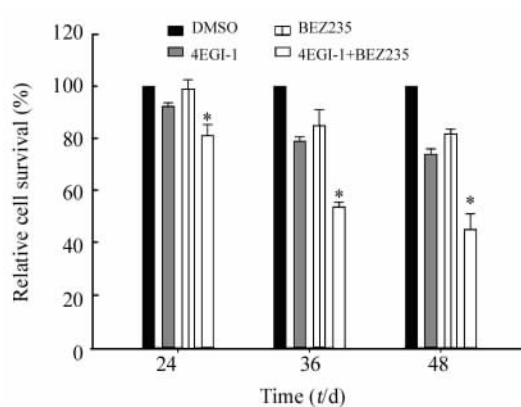


图 3 BEZ235 增强 4EGI-1 对 A375 细胞增殖的抑制作用

Fig. 3 BEZ235 enhances the inhibitory effect of 4EGI-1 on A375 cells proliferation

* $P < 0.05$ vs 4EGI-1 group or BEZ235 group

2.4 BEZ235 增强 4EGI-1 对 A375 细胞周期的阻滞

细胞周期检测分析(图 4)发现, DMSO 组细胞 S 期比例为 30.9%, 4EGI-1 和 BEZ235 单独处理组细胞 S 期比例分别为 25.65% 和 25.82%, 而 4EGI-1 和 BEZ235 联合处理组细胞 S 期比例显著降低。

胞 S 期比例为 13.08%。与 4EGI-1 和 BEZ235 单独处理细胞相比,4EGI-1 和 BEZ235 联合处理明显增强

了对细胞 S 期的抑制作用。

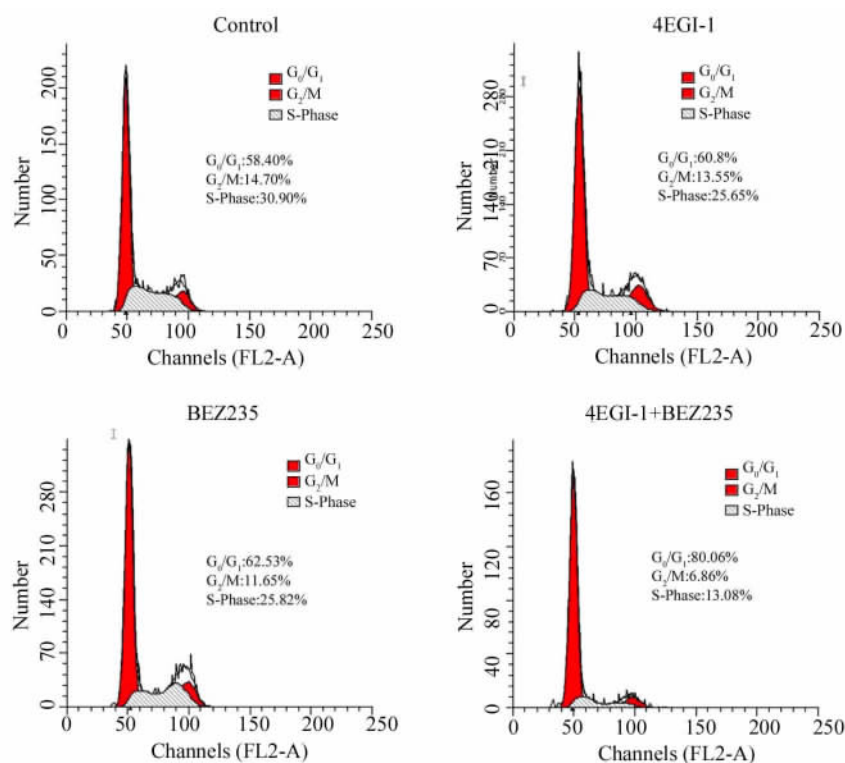


图 4 BEZ235 增强 4EGI-1 对 A375 细胞 S 期的抑制作用

Fig. 4 BEZ235 enhances the inhibition of S-phase of A375 cells in response to 4EGI-1 treatment

2.5 BEZ235 增强 4EGI-1 对 CyclinD1 表达的抑制作用

Western blotting 检测结果(图 5)显示,与 DMSO 相比,4EGI-1 和 BEZ235 分别单独处理对 CyclinD1 的表达有一定的抑制作用,而与 4EGI-1 和 BEZ235 单独处理相比,4EGI-1 和 BEZ235 联合处理组显著抑制了 CyclinD1 表达(0.25 ± 0.03 vs 0.81 ± 0.04 、 0.76 ± 0.04 , $P < 0.05$)。

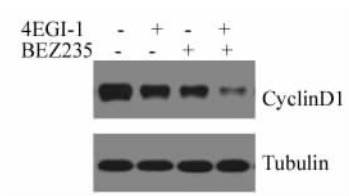


图 5 BEZ235 增强 4EGI-1 对 CyclinD1 表达的抑制作用

Fig. 5 BEZ235 enhances the inhibitory effect of 4EGI-1 on the CyclinD1 expression of A375 cells

3 讨论

eIF4F 蛋白复合物包含帽子结合蛋白 eIF4E、

RNA 解旋酶 eIF4A 和支架蛋白 eIF4G。该复合物通过能够介导 mRNA 和核糖体 40S 亚基之间的相互作用,促进 5 端含有复杂结构的 mRNA 起始帽子依赖的翻译,主要包括:细胞周期促进基因(*MYC*, *CCND1* 和 *ODC1*)、血管发生促进基因(*VEGFA* 和 *FGF2*)、细胞存活促进基因(*Mcl1*, *Bcl2* 和 *survivin*) 和细胞迁移促进基因(*MMP9*)^[14]。因此 eIF4F 蛋白复合物的异常激活与肿瘤的发生发展密切相关。4EGI-1 是一种新发现的小分子化合物,能够通过特异地阻断 eIF4F 蛋白复合物的生成进而抑制帽子依赖的翻译从而抑制肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞的凋亡。由于 eIF4E 蛋白在黑素瘤组织中过表达且能够促进黑素瘤细胞的增殖和存活,提示帽子依赖的翻译的增强时黑素瘤发生发展的重要原因。PI3K/AKT 通路在黑素瘤组织中异常激活,且研究发现 PI3K 的负调控分子 PTEN 在黑素瘤组织缺失或低表达是导致 PI3K/AKT 通路在黑素瘤组织中异常激活的重要原因^[15-17]。进一步的研究发现,PI3K/AKT 通路的异常激活与黑素瘤的恶性进展和放疗、化疗耐受密切相关^[18-19]。

基于此,本课题首先检测了 4EGI-1 对黑素瘤细胞中 AKT 磷酸化的影响,发现 4EGI-1 能够增强 AKT 的磷酸化,进一步研究发现 PI3K 和 mTOR 抑制剂 BEZ235 能够拮抗 4EGI-1 引起的 AKT 磷酸化,因此推测 4EGI-1 的促 AKT 磷酸化作用是依赖于 PI3K 和 mTORC2 的。随后发现 BEZ235 能够协同 4EGI-1 抑制 A375 细胞的增殖,同时阻滞其细胞周期于 S 期。BEZ235 增强 4EGI-1 对 A375 细胞 S 期的抑制作用是由于增强了 4EGI-1 对 CyclinD1 表达的抑制作用导致的。

本研究发现了 AKT 的反馈激活能够拮抗 4EGI-1 对黑素瘤细胞的增殖抑制作用,提示我们在将来的用药中可以采用 4EGI-1 和 BEZ235 联合用药的方式来增强 4EGI-1 的抗肿瘤作用。

[参 考 文 献]

[1] Bhat M, Robichaud N, Hulea L, et al. Targeting the translation machinery in cancer [J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(4): 261-278.

[2] Pelletier J, Graff J, Ruggero D, et al. eIF4E expression and its role in malignancies and metastases [J]. Cancer Res, 2015, 75(2):250-263.

[3] Pettersson F, Del Rincon SV, Miller WH Jr. Eukaryotic translation initiation factor 4E as a novel therapeutic target in hematological malignancies and beyond [J]. Expert Opin Ther Targets. 2014,18(9):1035-1048.

[4] Rosenwald IB, Chen JJ, Wang S, et al. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis [J]. Oncogene, 1999, 18(15):2507-2517.

[5] Kerekatte V, Smiley K, Hu B, et al. The proto-oncogene/translation factor eIF4E: A survey of its expression in breast carcinomas [J]. Int J Cancer, 1995, 64(1): 27-31.

[6] Wang R, Geng J, Wang JH, et al. Overexpression of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and its clinical significance in lung adenocarcinoma [J]. Lung Cancer, 2009, 66(2):237-244.

[7] Graff JR, Konicek BW, Lynch RL, et al. eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival [J]. Cancer Res, 2009, 69(9):3866-3873.

[8] Wang S, Rosenwald IB, Hutzler MJ, et al. Expression of the eukaryotic translation initiation factors 4E and 2alpha in non-Hodgkin's lymphomas [J]. Am J Pathol, 1999; 155(1):247-255.

[9] Yang SX, Hewitt SM, Steinberg SM, et al. Expression levels of eIF4E, VEGF, and cyclin D1, and correlation of eIF4E with VEGF and cyclin D1 in multi-tumor tissue microarray [J]. Oncol Rep, 2007, 17(2):281-287.

[10] Jiang CC, Croft A, Tseng HY, et al. Repression of microRNA-768-3p by MEK/ERK signalling contributes to enhanced mRNA translation in human melanoma [J]. Oncogene, 2014, 33(20): 2577-2588.

[11] Moerke NJ, Aktas H, Chen H, et al. Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G [J]. Cell, 2007, 128(2):257-267.

[12] Descamps G, Gomez-Bougie P, Tamburini J, et al. The cap-translation inhibitor 4EGI-1 induces apoptosis in multiple myeloma through Noxa induction [J]. Br J Cancer, 2012, 106(10):1660-1667.

[13] Chen L, Aktas BH, Wang Y, et al. Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation [J]. Oncotarget, 2012, 3(8):869-881.

[14] Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(4): 254-266.

[15] Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: A clinicopathologic study of 292 cases [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(7): 1473-1482.

[16] Dhawan P, Singh AB, Ellis DL et al. Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression [J]. Cancer Res, 2002, 62(24):7335-7342.

[17] Bircck A, Ahrenkiel V, Zeuthen J et al. Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies [J]. J Invest Dermatol, 2000, 114(2):277-280.

[18] Granville CA, Memmott RM, Gills JJ, et al. Handicapping the race to develop inhibitors of the phosphoinositide 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(3):679-689.

[19] Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: Molecular pathogenesis and therapeutic management [J]. Mol Cell Pharmacol, 2014, 6(3): 228.

[收稿日期] 2015 -03 -10 [修回日期] 2015 -06 -28
 [本文编辑] 黄静怡

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

上海细胞治疗工程技术研究中心有限公司 后插页一

金佳禾生物医药 后插页二