

## D-鼠李糖 $\beta$ 常春藤甙通过抑制 PI3K/AKT 信号通路诱导乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 凋亡

成琳,夏添松,周文斌,梁秀清,薛金秋,石靓,王莹,丁强\*

(南京医科大学第一附属医院乳腺外科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:观察 D-鼠李糖  $\beta$  常春藤甙(简称 D 药)对乳腺癌细胞的杀伤作用,通过研究其对 PI3K/AKT 信号通路的影响,探索其抗肿瘤机制。方法:不同浓度 D 药作用于乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 48 h 后,流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率,Western blot 法检测 D 药作用 MCF-7、MDA-MB-231 后 PI3K/AKT 信号通路相关分子的蛋白表达。结果:20、30、40  $\mu\text{g/ml}$  D 药作用细胞 48 h 后可以诱导细胞凋亡,凋亡率随浓度升高而增加。20  $\mu\text{g/ml}$  D 药作用细胞 48 h 后,p-PI3K、p-AKT 蛋白表达减少,而总 PI3K、总 AKT 蛋白的表达量无明显变化。PI3K 抑制剂 LY294002 通过抑制细胞 p-AKT 的表达,从而增加 D 药引起的细胞凋亡。结论:D 药可以通过抑制 PI3K 的磷酸化,进而影响磷酸化 AKT 的表达,最终诱导乳腺癌细胞凋亡。

**[关键词]** D-鼠李糖  $\beta$  常春藤甙;乳腺癌;凋亡;PI3K/AKT

**[中图分类号]** R737.9

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)04-446-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140409

## D-Rhamnose $\beta$ hederin induces apoptosis of breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 by inhibiting PI3K/AKT signaling pathway

Cheng Lin, Xia Tiansong, Zhou Wenbin, Liang Xiuqing, Xue Jinqiu, Shi Liang, Wang Ying, Ding Qiang\*

(Department of Breast Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of D-Rhamnose  $\beta$  hederin on the apoptosis of breast cancer cells and its effect on PI3K/AKT signaling pathway to explore its antineoplastic mechanisms. **Methods:** Breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 were treated with D-Rhamnose  $\beta$  hederin at different concentrations. Apoptosis rate of MCF-7 and MDA-MB-231 after treated with D-Rhamnose  $\beta$  hederin for 48 h were analyzed by AnnexinV/PI double staining of flow cytometry. Protein expression of PI3K/AKT signaling pathway related molecules after treated with D-Rhamnose  $\beta$  hederin were detected by Western blot. **Results:** D-Rhamnose  $\beta$  hederin with dosage of 20, 30, 40  $\mu\text{g/ml}$  effectively induced cell apoptosis and the apoptosis rate was increased with the rising concentration. After treatment with 20  $\mu\text{g/ml}$  D-Rhamnose  $\beta$  hederin for 48 h, the protein expressions of p-PI3K and p-AKT were decreased, but the total expressions of PI3K and AKT were not significantly changed. Furthermore, PI3K inhibitor LY294002 enhanced D-Rhamnose  $\beta$  hederin-induced apoptosis through inhibition of p-AKT. **Conclusion:** D-Rhamnose  $\beta$  hederin could effect on the expression of AKT phosphorylation and significantly induce the apoptosis of breast cancer cells by inhibiting the phosphorylation of PI3K.

**[Key words]** D-Rhamnose  $\beta$  hederin; breast cancer; apoptosis; PI3K/AKT

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04): 446-451]

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>,我国乳腺癌发病率和死亡人数均位于女性恶性肿瘤的前

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81272916);江苏省自然科学基金资助(BK2011855)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: dingqiang@njmu.edu.cn

列<sup>[2]</sup>。乳腺癌在以手术为主联合化疗、放疗、内分泌治疗的综合治疗策略下,疗效取得了显著进步,但是由于化疗失败而导致的乳腺癌复发、转移等情况仍然是临床亟待解决的问题<sup>[3-4]</sup>。因此,探寻疗效确切且高效、低毒的抗肿瘤药物成为当前乳腺癌治疗学研究的热点之一。

铁线莲属于毛茛科,全世界共约 355 种。中国有 155 种,其中约 70 种在传统中药中广泛使用<sup>[5]</sup>。在前期工作中,本课题组从铁线莲中提取出的三萜类化合物 D-鼠李糖  $\beta$  常春藤甙(简称 D 药),对乳腺癌细胞 MCF-7 及 MDA-MB-231 有明显的增殖抑制作用<sup>[6]</sup>。

PI3K/AKT 通路是一条重要的信号转导系统,它与众多致癌基因和受体以及多种细胞基本功能相关,并且是在肿瘤中常见的异常激活的信号通路<sup>[7-8]</sup>。PI3K/AKT 信号通路的活化有利于细胞增殖,AKT 作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是该信号通路的关键节点,其被磷酸化后活化和去磷酸化后失活,活化后有利于细胞增殖,失活后则作用相反<sup>[9]</sup>。AKT 可以抑制凋亡,是细胞增殖信号通路的中心调节因子。下调 PI3K 可以使下游的 AKT 失活。实际上,AKT 在多种癌症包括乳腺癌中过表达。因此,PI3K/AKT 是研究抗癌药物的靶点<sup>[10]</sup>。

鉴于从铁线莲中提取出的 D 药对乳腺癌细胞的作用及其机制鲜有研究,本实验以乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 为研究对象,观察 D 药诱导乳腺癌细胞凋亡的作用,重点研究 D 药对 PI3K/AKT 信号通路的影响,以进一步阐明其抗肿瘤机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株及其培养

乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 (本实验室保存) 在含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

#### 1.1.2 药物准备

D 药的提取和纯化见文献<sup>[6]</sup>,化学结构见图 1。将其溶于 100% DMSO 中,存放于 -20 $^{\circ}$ C。使用前,将药物溶于培液中,至终浓度为 10、20、30、40  $\mu$ g/ml。以 DMSO 处理的细胞作为实验对照,为了避免溶剂的细胞毒性,DMSO 的终浓度不超过 0.1% (V/V)。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

DMEM (Hyclone 公司,美国)、胎牛血清 (Gibco 公司,美国)、胰蛋白酶、二甲基亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT,上海碧云天公司)、磷酸化蛋白提取试剂盒 (南京凯基公司)、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (Bender Medsystems 公司,美国)。目的抗

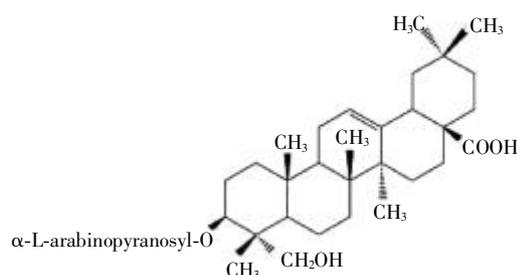


图 1 D-鼠李糖  $\beta$  常春藤甙化学结构

Figure 1 Structure of D-Rhamnose  $\beta$  hederin

体均购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司,一抗包括总 PI3K、磷酸化 PI3K (p-PI3K) (Tyr458)、总 PDK1、磷酸化 PDK1 (p-PDK1) (Ser241)、总 AKT、磷酸化 AKT (p-AKT) (Ser473)。PI3K 抑制剂 LY294002 (美国 CST 公司)。二抗为 HPR-goat anti rabbit IgG。内参为 GAPDH (上海碧云天公司)。ECL 发光试剂盒购自美国 Pierce 公司,PVDF 膜购自美国 Millipore 公司。酶标仪 Model 680 (美国 Bio-Rad 公司),流式细胞仪 FACS Aria (美国 BD 公司),凝胶成像分析系统 Model 680 (美国 Bio-Rad 公司),倒置荧光显微镜 X71 (日本 Olympus 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡率

分别收集 D 药 (0、20、30、40  $\mu$ g/ml) 和 (或) PI3K 抑制剂 LY294002 作用 48 h 后的细胞,按照试剂盒说明,胰酶消化收集细胞,PBS 清洗后弃去上清,再用 100  $\mu$ l 结合缓冲液重悬。每管加入 4  $\mu$ l Annexin V-FITC,5  $\mu$ l PI 双染,避光孵育 15 min 后流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 1.2.2 Western blot 检测细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达

分别应用 D 药 (0、10、20  $\mu$ g/ml) 和 (或) PI3K 抑制剂 LY294002 处理细胞,作用 48 h 后,收集不同组细胞,按磷酸化蛋白提取试剂盒说明书提取蛋白。用二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量法进行蛋白定量后,加入 5  $\times$  Protein Loading Buffer,煮沸 5 min,使蛋白充分变性,-70 $^{\circ}$ C 保存。用 GAPDH (1:1 000) 进一步调整上样量,每个泳道 40  $\mu$ g 蛋白量上样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),行湿转转移到 PVDF 膜上,室温封闭 1 h,一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;洗膜 5 min  $\times$  3 次;二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h;洗膜 5 min  $\times$  3 次;加电致发光 (ECL) 液后进行曝光显影。

## 1.3 统计学方法

使用 SPSS20.0 统计软件,数据结果用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,运用单因素方差分析 (One-Way

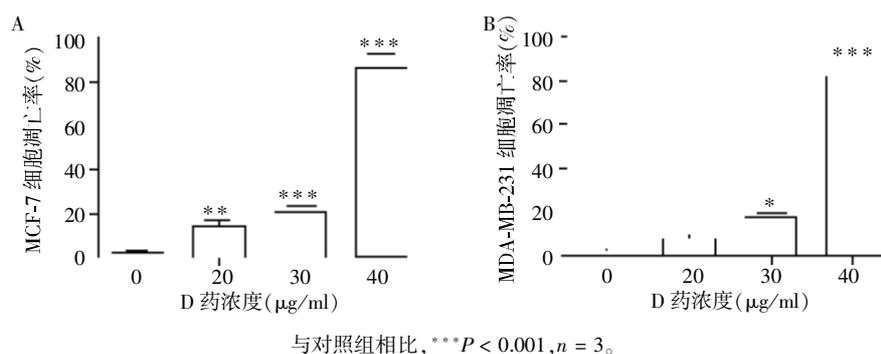
ANOVA)比较组间差异,再进行组间两两比较, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 D-鼠李糖 $\beta$ 常春藤甙诱导 MCF-7、MDA-MB-

### 231 细胞凋亡

0、20、30、40  $\mu\text{g/ml}$  D 药作用于 MCF-7、MDA-MB-231 48 h 后,流式细胞仪检测细胞凋亡率,结果显示 D 药可以诱导细胞凋亡,以早期凋亡为主,且随着浓度升高而增加(图 2)。



与对照组相比,\*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 3$ 。

图 2 D 药诱导 MCF-7(A)、MDA-MB-231(B) 细胞早期凋亡  
Figure 2 D-Rhamnose  $\beta$  hederin induced apoptosis of MCF-7(A) and MDA-MB-231 cells(B)

### 2.2 D 药对 MCF-7、MDA-MB-231 细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的影响

与对照组相比,20  $\mu\text{g/ml}$  D 药作用 48 h 后, MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞内 p-PI3K、p-AKT 明显减少,而总 PI3K 和总 AKT 蛋白的表达量无明显变化,p-PDK1 和 PDK1 无明显变化。10  $\mu\text{g/ml}$  D 药作用 48 h 后,细胞内上述蛋白的表达量无明显变化(图 3)。

### 2.3 PI3K 抑制剂 LY294002 通过抑制 p-AKT 的表达从而增加 D 药引起的细胞凋亡

PI3K 可以调节 AKT 的活性,我们检测了 PI3K 抑制剂 LY294002 对 MCF-7、MDA-MB-231 细胞 AKT 磷酸化的影响。LY294002(10  $\mu\text{mol/L}$ )处理细胞 48 h 后可以抑制细胞 p-AKT 的表达。而且在 D 药处理细胞前 1 h,加入 PI3K 抑制剂 LY294002(10  $\mu\text{mol/L}$ ),48 h 后提取细胞蛋白进行 Western blot,与单用 D 药或者单用 LY294002 处理的细胞相比,两者共同作用的细胞 p-AKT 的表达显著降低(图 4A、B)。

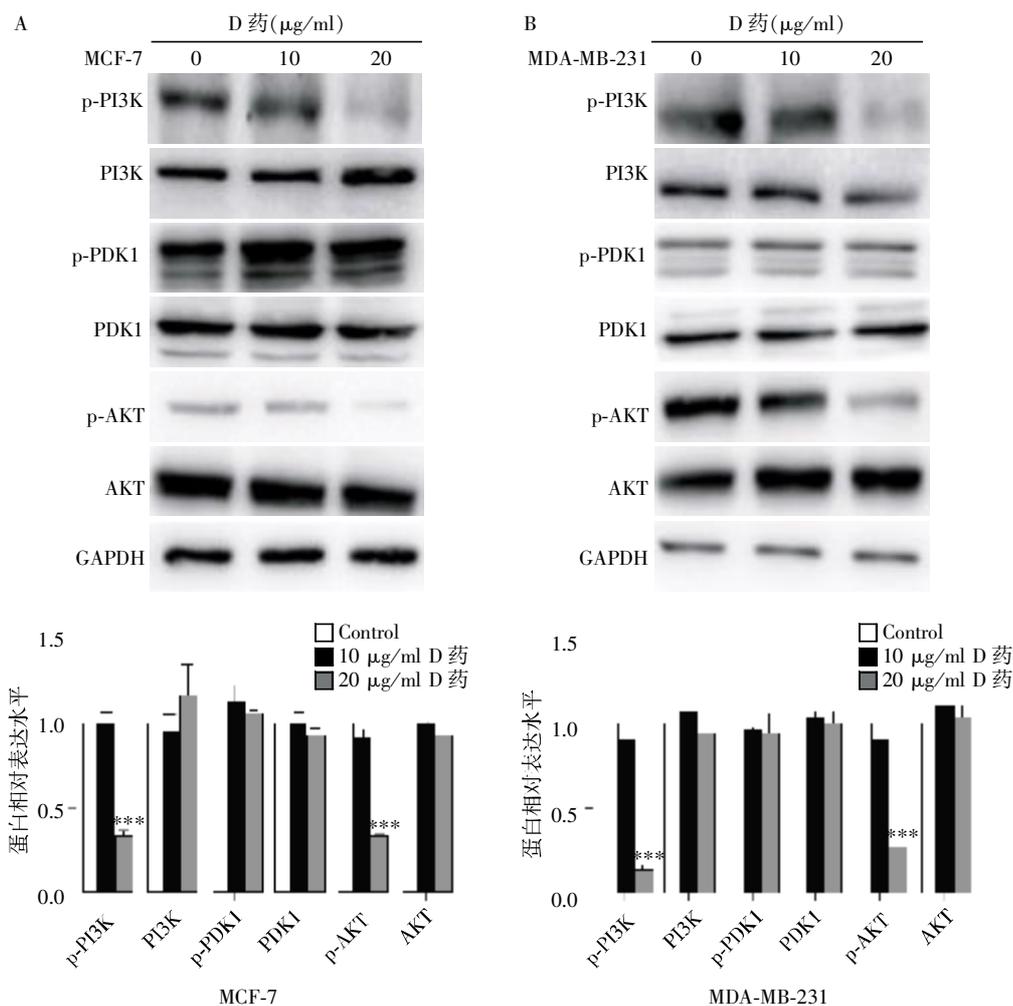
该结果可以通过流式细胞仪检测细胞凋亡率得到进一步证实。LY294002 可以增加 D 药引起的细胞凋亡。在 D 药处理 MCF-7、MDA-MB-231 细胞前 1 h,加入 PI3K 抑制剂 LY294002(10  $\mu\text{mol/L}$ ),48 h 后用流式细胞仪检测细胞凋亡率,与单用 D 药或者单用 LY294002 处理的细胞相比,两者共同作用的细胞凋亡率(早期凋亡)显著增加(图 4C、D)。

## 3 讨论

近年来肿瘤发病机制的基础研究取得了很大的发展,恶性肿瘤的形成是一个与基因密切相关的多步骤的过程,在这过程中,细胞逃避凋亡是一个很重要的环节,几乎所有的恶性肿瘤都具有该特性<sup>[11-12]</sup>。因此,进一步研究凋亡在肿瘤中的作用机制,阐明肿瘤凋亡的信号转导途径并发现新的靶点,成为肿瘤治疗的重要研究内容,对发现新的安全有效的抗肿瘤药物具有重要意义。

中草药是我国传统医学的巨大宝库,其中不乏抗肿瘤的种属。近期有研究发现,从铁线莲属植物中提取的单体成分对恶性肿瘤有抑制增殖、促进凋亡的作用,如 *Clematis montana* lectin 可诱导 L929 细胞凋亡,并呈剂量相关性<sup>[13]</sup>。*Polygo natum* cyrtone-ma lectin(PCL)在黑素瘤 A375 中通过线粒体介导的 ROS-p38-p53 途径诱导凋亡和自噬<sup>[14]</sup>。铁线莲皂苷通过影响 NF- $\kappa$ B 的表达诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡<sup>[15]</sup>。本研究观察了铁线莲中提取的三萜皂甙类化合物 D-鼠李糖  $\beta$  常春藤甙对人乳腺癌细胞凋亡的影响,初步探讨其可能的作用机制。

PI3K/AKT 通路是肿瘤常见激活的通路,与乳腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胃癌、肺癌等恶性肿瘤的发生发展密切相关<sup>[16]</sup>。PI3K 可以磷酸化 PIP2 的 3-OH 位点,使之成为 PIP3。PIP3 可以通过 PDK1 促进 AKT 的磷酸化,从而间接或者直接抑制促凋亡因子



与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=3$ 。

图 3 D 药对 MCF-7(A)、MDA-MB-231(B) 细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的影响

Figure 3 D-Rhamnose β hederin regulated the PI3K/AKT pathway in MCF-7(A) and MDA-MB-231 cells(B)

的表达, 比如 Bim 和 Bad<sup>[17-18]</sup>, 进而参与细胞增殖、凋亡及分化等过程。

目前, 已有许多作用于该通路的靶向抗肿瘤药物处于研究阶段<sup>[19]</sup>。例如, PI3K 抑制剂 wortmannin 和 LY2940002, 均能有效抑制体内外肿瘤的生长, 与其对 PI3K 及其下游的抑制有关<sup>[20-21]</sup>。将 wortmannin 或 LY2940002 与化疗药物联用更加有效并且能降低毒性, PI3K 抑制剂与传统化疗药物的联用为治疗对化疗药物产生耐药性的患者提供了新的选择<sup>[22]</sup>。但是, 尽管 wortmannin、LY2940002 以及 AKT 抑制剂 perifosine 抗肿瘤活性很好, 但是它们水溶性差且不良反应大, 限制了其成为临床用药<sup>[23-25]</sup>。所以, 研究高效低毒的 PI3K/AKT 靶向抗肿瘤药物具有很好的应用前景。

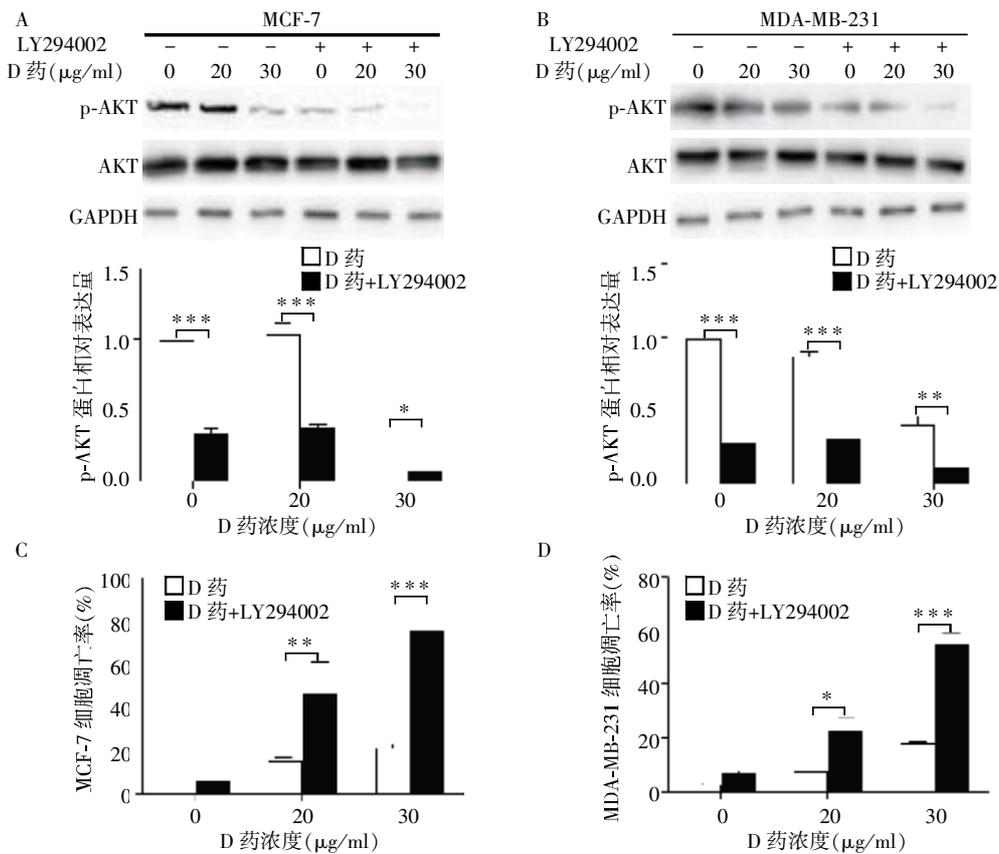
本研究结果显示 D 药能诱导乳腺癌细胞株 MCF-7、MDA-MB-231 凋亡, 以早期凋亡为主, 并且

呈浓度依赖性。该药能下调 p-PI3K、p-AKT 蛋白的表达, 而总 PI3K、AKT 蛋白的表达量无明显变化。但是该药对 p-PDK1、PDK1 的表达无明显影响, 提示该药物通过抑制 PI3K 的磷酸化直接作用于 AKT, 而不影响 PDK1 的磷酸化。PI3K 抑制剂 LY294002 通过抑制 p-AKT 的表达从而增加 D 药引起的细胞凋亡。这一结果进一步提示了 D 药对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用, 并且该抑制作用与药物诱导细胞凋亡的作用有关。

综上所述, 铁线莲提取物 D-鼠李糖 β 常春藤甙对乳腺癌细胞有诱导凋亡的作用, 其机制与药物抑制 PI3K/AKT 信号通路相关。本研究为 D-鼠李糖 β 常春藤甙可能的临床应用前景提供了证据。

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277-300



A:LY294002 可增强 D 药抑制 MCF-7 细胞 p-AKT 的表达;B:LY294002 可增强 D 药抑制 MDA-MB-231 细胞 p-AKT 的表达;C:LY294002 可增加 D 药引起 MCF-7 细胞凋亡;D:LY294002 可增加 D 药引起 MDA-MB-231 细胞凋亡。与 D 药单独作用组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ , $n = 3$ 。

图 4 PI3K 抑制剂 LY294002 通过抑制 p-AKT 的表达从而增加 D 药引起的 MCF-7、MDA-MB-231 细胞凋亡

Figure 4 PI3K inhibitor LY294002 enhanced D-Rhamnose  $\beta$  hederin-induced apoptosis by inhibition of p-AKT

[2] 杨玲,李连弟,陈育德,等. 中国乳腺癌发病死亡趋势的估计与预测[J]. 中华肿瘤杂志,2006,28(6):438-440

[3] Johnson KA,Brown PH. Drug development for cancer chemoprevention:focus on molecular targets [J]. Semin Oncol,2010,37(4):345-358

[4] Król M,Pawłowski KM,Maichrzak K,et al. Why chemotherapy can fail? [J]. Pol J Vet Sci,2010,13(2):399-406

[5] Jiang N,Guan K,Wang Z. Species diversity and geographical distribution of Clematis (Ranunculaceae)in Yunnan[J]. Acta Bot Yun,2007,29(2):145

[6] Ding Q,Yang LX,Yang HW,et al. Cytotoxic and antibacterial triterpenoids derivatives from Clematis ganpiniana [J]. J Ethnopharmacol,2009,126(3):382-385

[7] Liu P,Cheng H,Roberts T M,et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer [J]. Nat Rev Drug Discov,2009,8(8):627-644

[8] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer:opportunities,challenges and limitations[J]. Nat Rev Cancer,2009,9(8):550-562

[9] Osaki M,Oshimura M,Ito H. PI3K-Akt pathway:its functions and alterations in human cancer [J]. Apoptosis,2004,9(6):667-676

[10] Di Cosimo S,Baselga J. Targeted therapies in breast cancer:where are we now? [J]. Eur J Cancer,2008,44(18):2781-2790

[11] Hanahan D,Weinberg RA. The hallmarks of cancer [J]. Cell,2000,100(1):57-70

[12] 初钊辉,梁晓华,周鑫莉,等. 鱼藤素对乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖和凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 中西医结合学报,2011,9(5):533-538

[13] Peng H,Lv H,Wang Y,et al. Clematis montana lectin,a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities [J]. Peptides,2009,30(10):1805-1815

[14] Liu B,Cheng Y,Zhang B,et al. Polygonatum cyrtoneuma lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway [J]. Cancer Lett,2009,275(1):54-60

- [15] 戴伟,方申存,刘平.铁线莲皂苷对人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及 NF- $\kappa$ B 表达的影响 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(8):1074-1078
- [16] Vivanco I,Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2002,2(7):489-501
- [17] Chakraborty A,Koldobskiy MA,Bello T,et al. Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain [J]. Cell,2010,143(6):897-910
- [18] Grant S. Cotargeting survival signaling pathways in cancer [J]. J Clin Invest,2008,118(9):3003
- [19] Shen Y,Wu XF,Tan NH,et al. Plant cyclopeptide RA-V kills human breast cancer cells by inducing mitochondria-mediated apoptosis through blocking PDK1 - AKT interaction[J]. Toxicol App Pharm,2013,267:95-103
- [20] Lemke LE,Paine-Murrieta GD,Taylor CW,et al. Wortmannin inhibits the growth of mammary tumors despite the existence of a novel wortmannin-insensitive phosphatidylinositol-3-kinase [J]. Cancer Chemoth Pharm, 1999,44(6):491-497
- [21] Hu L,Zaloudek C,Mills G B,et al. In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002)[J]. Clin Cancer Res, 2000,6(3):880-886
- [22] Hu L,Hofmann J,Lu Y,et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models [J]. Cancer Res, 2002,62(4):1087-1092
- [23] Kondapaka SB,Singh SS,Dasmahapatra GP,et al. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation[J]. Mol Cancer Ther,2003,2(11):1093-1103
- [24] Crul M,Rosing H,De Klerk GJ,et al. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine(D-21266)in patients with advanced solid tumours[J]. Eur J Cancer,2002,38(12):1615-1621
- [25] 张超,杨娜,章雄文,等.靶向 PI3K-Akt-mTOR 信号通路抑制剂的研究进展[J]. 中国癌症杂志,2006,16(12):1064-1070

[收稿日期] 2013-10-10

(上接第 445 页)  
2031-2040

- [17] Wang LW,Li ZS,Zou DW,et al. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. World J Gastroenterol,2008,14(47):7192-7198
- [18] Frid A,Sterner GN,Londahl M,et al. Novel assay of metformin levels in patients with type 2 diabetes and varying levels of renal function: clinical recommendations [J]. Diabetes Care,2010,33(6):1291-1293
- [19] Graefe-Mody EU,Padula S, Ring A,et al. Evaluation of the potential for steady-state pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between the DPP-4 inhibitor linagliptin and metformin in healthy subjects [J]. Curr Med Res Opin,2009,25(8):1963-1972
- [20] Ashinuma H,Takiguchi Y,Kitazono S,et al. Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines [J]. Oncol Rep,2012,28(1):8-14

[收稿日期] 2013-11-22