

胰岛素样生长因子 1 (IGF-I) 通过 PI-3K/Akt 途径对结肠癌细胞凋亡的影响 *

刘 洁 周国兴 刘求梅 徐筱红 刘晓敏

(湖南中医药高等专科学校 湖南 株洲 412012)

摘要 目的 探讨胰岛素样生长因子-1 (IGF-I) 通过磷酸酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B (PI-3K/Akt) 信号通路对结肠癌细胞株 SW480 凋亡率的影响及其凋亡抑制蛋白 survivin 表达水平的变化。方法 培养结肠癌 SW480 细胞株,实验分成三组:未加 IGF-I 空白组、IGF-I 刺激组、IGF-I+LY294002 阻断组,检测阻断剂 LY294002 是否阻断 PI-3K/Akt 通路 (Western Blot 检测三组 P-Akt 表达情况);Western Blot 及免疫荧光观察三组 survivin 蛋白表达变化;MTT 法检测细胞增殖活性;流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果:Western blot 结果显示 LY294002 可抑制 IGF-I 诱导的 p-Akt 的表达 ($P<0.05$) 阻断 IGF-I 诱导的 PI-3K/Akt 通路后 MTT 显示结肠癌细胞 SW480 增殖抑制率升高 ($P<0.05$), 流式细胞术分析显示凋亡率明显上升 ($P<0.05$);Western blot 及免疫荧光结果显示 LY294002 可抑制 IGF-I 诱导的 survivin 的表达 ($P<0.05$)。结论 IGF-I 可通过 PI-3K/Akt 通路诱导 survivin 表达,从而抑制结肠癌细胞 SW480 的凋亡。

关键词 IGF-I ;survivin ;p-Akt ;凋亡 ;结肠癌

中图分类号 R735.35 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 06-1078-05

Effect of Insulin-like Growth Factor-I on Apoptosis of Colon Cancer Cell Through Signaling Pathway of PI-3K/Akt*

LIU Jie, ZHOU Guo-xing, LIU Qiu-mei, XU Xiao-hong, LIU Xiao-min

(Hunan College of Chinese Medicine, Zhuzhou 410012, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of IGF-I on the apoptosis rate, and the expression of survivin through the signaling pathway of PI-3K/Akt in colon cancer cell line SW480. **Methods:** The experiment was divided into three groups: not-added IGF-I blank group, added IGF-I stimulate group, added IGF-I and the specific inhibitor LY294002 block group, detected the specific inhibitor LY294002 could inhibited the signaling pathway of PI-3K/Akt (Western blot was used to detecte the expression of P-Akt of three groups); Western blot and cell immunofluorescence were used to detecte the expression of survivin protein of three groups; SW480 cells proliferation was measured by MTT assay. The apoptosis rate was analyzed by flow cytometry (FCM). **Result:** When the signaling pathway of PI-3K/Akt was inhibited by specific inhibitor LY294002, the expression of p-Akt and survivin proteins were obviously lower than the IGF-I stimulate group ($P<0.05$); MTT showed that SW480 cells proliferation was significantly inhibited after the signaling pathway of PI-3K/Akt was inhibited ($P<0.05$), The flow cytometry indicated that the apoptosis rate of SW480 cells could markedly upgrade ($P<0.05$). **Conclusion:** IGF-I could induce survivin expression through the PI-3K/Akt in colon cancer line SW480, then lead to the inhibition of its apoptosis.

Key Words: IGF-I ;survivin ;p-Akt ;apoptosis ;colon cancer

Chinese Library Classification (CLC): R735.35 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1078-05

前言

结肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一。近年来我国结肠癌的发病率与病死率逐年上升。胰岛素样生长因子-1 (Insulin-like Growth Factor-I) 是一种多功能性细胞因子,当来自血浆或肿瘤间质以及肿瘤自身表达的 IGF-I 与广泛分布在间质组织的 IGF-IR 结合时,引起 IGF-IR 的酪氨酸 (Ty) 残基磷酸化,激活信号通路^[1-3],从而参与了肿瘤发生发展。IGF-I 与 IGF-IR 结合后,其激活的信号途径主要是两条:丝裂原激活的

蛋白激酶 (MAPK) 和磷酸酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B (PI-3K/Akt-I) 途径,如下图所示^[4]:

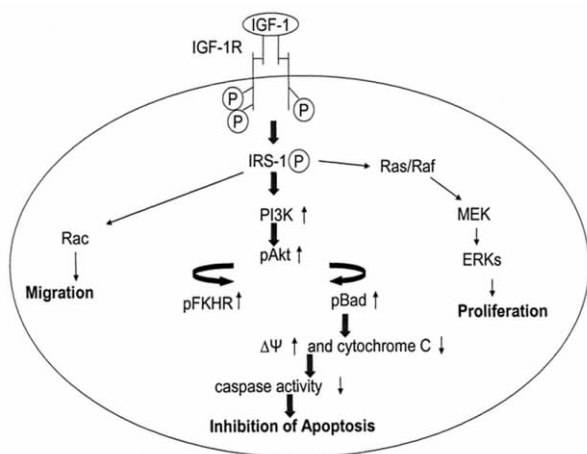
IGF-I 促进细胞增殖、抑制细胞凋亡的作用主要通过 PI-3K/Akt 信号通路^[5-7]。生成素 (survivin) 是凋亡抑制蛋白家族 (inhibitors of apoptosis, IAPs) 的成员,其特异性地在肿瘤细胞中表达。本试验以结肠癌细胞 SW480 为对象,探讨 PI-3K/Akt 信号通路在 IGF-I 诱导的结肠癌细胞中 survivin 表达中的作用,从而进一步阐明结肠癌细胞凋亡的部分机制。

* 基金项目 湖南省教育厅一般项目资助课题 (08C037)

作者简介 刘洁 (1981), 女,硕士,主要研究方向 消化道肿瘤病理研究,

电话: 13975332846, E-mail: kitty16@21cn.com

(收稿日期 2010-12-05 接受日期 2010-12-31)



1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源及培养 结肠癌细胞株 SW480 购自中国科学院上海细胞库。将 SW480 细胞用含 10% 新生牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37℃,含 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养,每 2~3 天传代十次。

1.1.2 抗体及其他试剂 人重组 IGF-I、抗-磷酸化 Akt 抗体、特异性抑制剂 LY294002 均购自 Cell Signaling Technology 公司;抗 survivin 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的处理 将对数生长期细胞 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于培养瓶,待达到 80% 融合时换成不含血清的 RPMI-1640 培养液饥饿 24h,使细胞同步化。前期实验已检测出以 100ng/mL IGF-I 刺激 SW480 细胞 12h 和 30min 为 survivin 及 Akt 蛋白表达最佳时间。细胞分别分成三组 未加 IGF-I 空白组,加 IGF-I 刺激组,加 IGF-I 和阻断剂 LY294002 组 (50μmol/L),按最佳时间点和浓度点将 IGF-I 加入已同步化处理的 SW480 细胞中进行处理。处理期间细胞置于细胞培养箱中,处理结束后提取蛋白。

1.2.2 流式细胞术分析 以 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化细胞,用含 1% 小牛血清的培养基洗脱细胞,1000rpm 离心 10min 收集细胞,PBS 洗涤 2 次,75% 乙醇 (冰预冷) 固定,流式细胞仪测定、Cell Quest 软件分析各组细胞的凋亡率。

1.2.3 MTT 法测定 取处于对数生长期的细胞进行实验。每组 SW480 细胞用 0.25% 的胰酶溶液消化,制成单细胞悬液,接种于 96 孔培养板 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12h,加入 MTT 液 (5mg/mL) 200μL,培养 4h 后,吸弃培养液,每孔加入 200μL DM-SO,振荡溶解结晶。置酶联免疫仪上测各孔吸光度,检测波长 570 nm,按下列公式计算抑制率。抑制率 (IR%) = (1 - 实验组 OD₅₇₀ 值 / 对照组 OD₅₇₀) × 100%。

1.2.4 Western blot (免疫印迹) 参照《分子克隆》实验步骤进行总蛋白的提取。BCA Protein Assay Reagent 定量 5% 脱脂奶粉封闭含目的条带区域的聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜 2h,加入一抗孵育,水杨酸对叔丁基苯酯 (TBS) 洗膜 10min × 3 加二抗 37℃ 孵育 2h,TBST 洗 10min × 3 次 二甲氨基偶氮苯 (DAB) 显色。

1.2.5 细胞免疫荧光 细胞爬片冰磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 1

次后,4% 冷多聚甲醛固定 20min,PBS 清洗 5min × 3 次 0.1% Triton X-100 破膜 10min,PBS 清洗 5min × 3 次;滴加 10% 正常羊血清,于 37℃ 培养箱孵育 30min 弃去血清,滴加 1:60 兔抗 survivin 多克隆抗体,置 37℃ 培养箱孵育 30min,4℃ 过夜 次日将玻片置室温下自然复温后,PBS 溶液洗涤 5min × 3 次;滴加 Cy3 (红色荧光) 标记的链亲和素,37℃ 培养箱孵育 30min,PBS 清洗 5min × 3 次 甘油封片,于倒置荧光显微镜下观察并摄片。判断标准 以细胞核和细胞浆内出现绿色荧光为阳性标准。采用 Breaslier 半定量公式判断染色结果:在每张切片上随机选取 10 个视野,根据细胞染色强度分为 4 级,并分别计分。阴性为细胞无着色 (0 分) 弱阳性为浅绿色 (1 分) 中度阳性为绿色 (2 分) 强阳性为亮绿色 (3 分)。计数每一强度的视野数,根据下列公式计算每张切片的平均染色强度 I_s (intensity score) = $\sum \{0 \times F_0 + [1 \times F_1] + [2 \times F_2] + [3 \times F_3]\}$,F= 每一强度的视野数 / 10 × 100%。

1.3 统计学处理

以 SPSS12.0 统计软件进行方差分析以及卡方检验。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 流式细胞术检测阻断 IGF-I 诱导 PI-3K/Akt 通路对 SW480 细胞凋亡率的影响

利用 FCM 检测未加 IGF-I 空白组、IGF-I 刺激组、IGF-I+LY294002 阻断组各组 SW480 细胞的凋亡率,分别为 $5.18 \pm 0.415\%$ 、 $0.85 \pm 0.052\%$ 、 $3.15 \pm 0.411\%$,各组之间有明显差别 ($P < 0.05$,见图 1、2、3)。

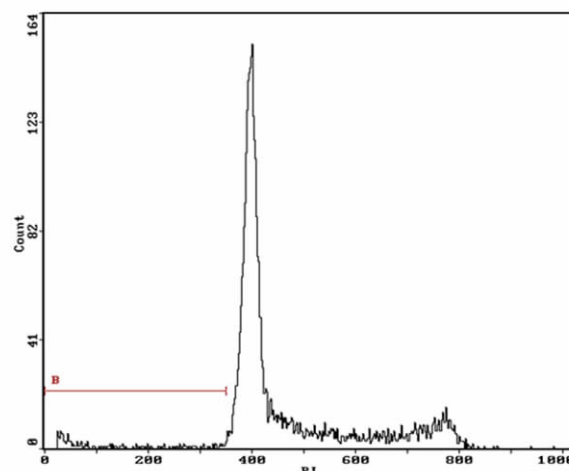


图 1 未加 IGF-I 空白组

Fig. 1 Blank group

2.2 MTT 检测阻断 IGF-I 诱导 PI-3K/Akt 通路对 SW480 细胞增殖的影响

利用 MTT 检测未加 IGF-I 空白组、IGF-I 刺激组、IGF-I+LY294002 阻断组各组 SW480 细胞的增殖抑制率分别为 $31.6 \pm 3.7\%$ 、 $16.8 \pm 4.8\%$ 和 $40.4 \pm 7.2\%$ ($P < 0.05$)。

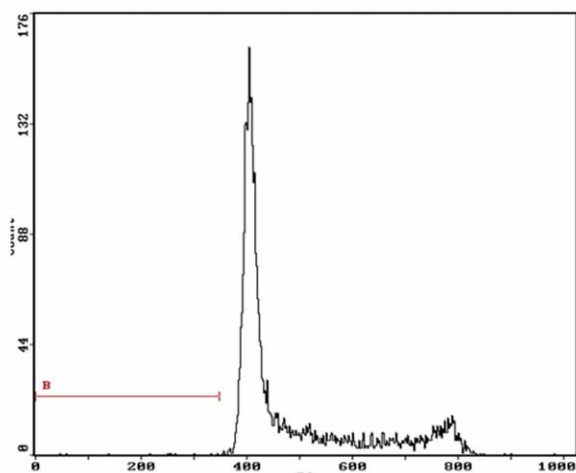


图2 IGF-I 刺激组

Fig. 2 IGF-I stimulate group

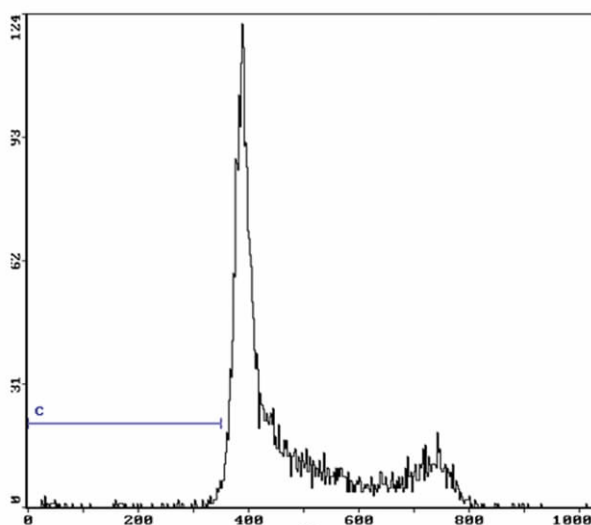


图3 IGF-I+LY294002 阻断组

Fig. 3 IGF-I+LY294002 block group

2.3 阻断 PI-3K/Akt 通路对 SW480 细胞中磷酸化 Akt 表达水平的影响

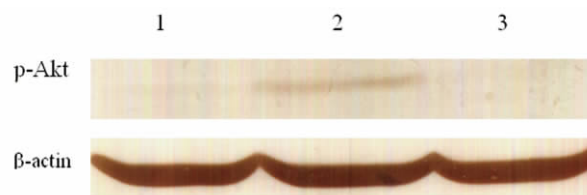
以 PI-3K/Akt 特异性阻断剂 LY294002 预孵育 SW480 细胞 1h 后,加入 100ng/mL IGF-I 刺激 SW480 细胞 30min,以 IGF-I 刺激组为对照组。Western blot 结果显示 LY294002 可抑制 IGF-I 诱导的 p-Akt 的表达 ($P<0.05$) (图 4)。

2.4 阻断 PI-3K/Akt 通路对 SW480 细胞中 survivin 表达水平的影响

以 PI-3K/Akt 特异性阻断剂 LY294002 预孵育 SW480 细胞 1h 后,加入 100ng/mL IGF-I 刺激 SW480 细胞 12h,以 IGF-I 刺激组为对照组。Western blot 结果显示 LY294002 可抑制 IGF-I 诱导的 survivin 的表达 ($P<0.05$) (图 5)。

以 LY294002 预孵育 SW480 细胞 1h 后,加入 100ng/mL IGF-I 刺激 SW480 细胞 12h,细胞免疫荧光结果显示 survivin 蛋白阳性染色定位于癌细胞浆和细胞核,以胞浆与胞核双阳性为主。以 IGF-I 刺激组为对照组,该组呈绿色荧光的细胞较多,

亮度较强,而未加 IGF-I 空白组和 IGF-I+LY294002 抑制组,呈绿色荧光的细胞,其数量和亮度均明显降低。空白组、IGF-I 刺激组和 IGF-I+LY294002 阻断组 survivin 蛋白的表达强度分别为 $(0.348 \pm 0.031) \%$, $(1.369 \pm 0.016) \%$, $(0.683 \pm 0.023) \%$ 。表明空白组和阻断组两组与对照组在 survivin 蛋白的表达强度有明显统计学差别 ($P<0.05$),而空白组和阻断组之间无统计学差别 ($P>0.05$) (图 6、7、8)。



1 未加 IGF-I 空白组 2 IGF-I 刺激组 3 IGF-I+LY294002 阻断组

图4 免疫印迹法检测 LY294002 阻断后对 SW480 细胞 p-Akt 蛋白表达的影响

Fig. 4 Expression of p-Akt in SW480 cells after they were treated with LY294002.

Line 1:Blank group Line 2 IGF-I stimulate group Line 3 : IGF-I+LY294002 block group



1 未加 IGF-I 空白组 2 IGF-I 刺激组 3 IGF-I+LY294002 阻断组

图5 免疫印迹法检测 LY294002 阻断后对 SW480 细胞 survivin 蛋白表达的影响

Fig. 5 Expression of survivin in SW480 cells after they were treated with LY294002.

Line 1: Blank group Line 2 IGF-I stimulate group Line 3 : IGF-I+LY294002 block group.

3 讨论

IGF-I 是一种多功能细胞调控因子,它的大部分生物学效应是通过与 IGF-IR 相结合而发挥作用的。IGF-IR 在许多肿瘤中表达增高,并通过多方面参与肿瘤的发生发展^[8-12]。在肝癌、结肠癌、前列腺癌及胰腺癌细胞中通过降低 IGF-IR 的表达,从而抑制细胞的生长^[13-17]。IGF-I 与 IGF-IR 结合时,主要导致两条信号通路的活化即丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 和磷脂酰肌醇 3- 激酶 / 蛋白激酶 B (PI-3K/Akt) 途径^[18]。PI-3K/AKT 是多种信号转导途径的共同通路,其经磷酸化过程激活后,便可对下游蛋白进行调节,最终抑制细胞凋亡^[19]。Survivin 是迄今为止发现的最强的凋亡抑制因子之一,可抑制多种凋亡刺激因子引起的凋亡,它广泛表达于人类的胚胎组织和人类几乎所有常见恶性肿瘤组织。实验研究发现用不同途径阻断 IGF-IR-PI-3K/Akt 通路能够抑制肿瘤细胞中的 survivin 蛋白表

达^[20-21]。另外研究还发现在肾癌细胞、前列腺癌、甲状腺癌细胞、多发性骨髓瘤细胞和黑素瘤细胞中 IGF-I 能上调 survivin 蛋白的表达^[22-27]。Mitsiades 等^[27]在多发性骨髓瘤细胞中用特异性阻

断剂 LY294002 阻断 PI-3K 途径,发现它能抑制 IGF-I 诱导的 survivin 表达。提示 IGF-I 可能通过 PI-3K/Akt 通路调节凋亡抑制蛋白 survivin 的表达。

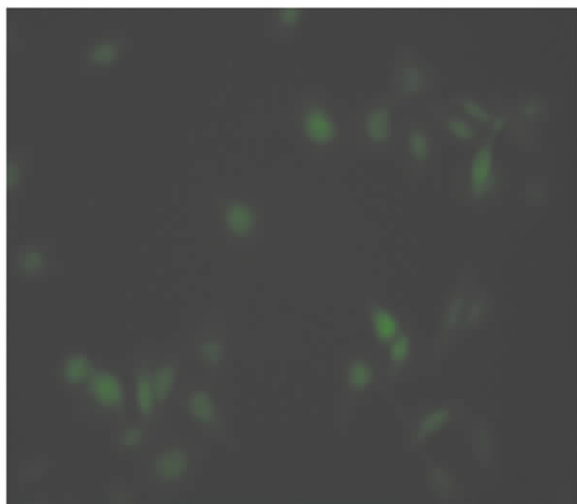


图6 SW480 细胞未受 IGF-I 处理时,survivin 的基础表达 (20× 10, SABC-Cy3 法) 绿色免疫荧光表明 survivin 蛋白阳性染色定位于癌细胞浆和细胞核

Fig. 6 The basal expression of survivin in SW480 cells that were not treated with IGF-I, the blue immuno-fluorescence indicated: the positive staining of survivin protein located in cytoplasm and cellular.(20× 10, SABC-Cy3)

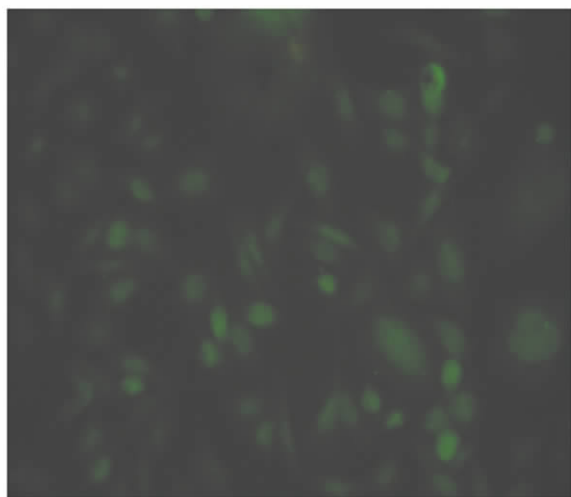


图7 100ng/mL IGF-I 处理后的 SW480 细胞 (20× 10, SABC-Cy3 法), 呈绿色荧光的细胞较多,亮度较强

Fig. 7 SW480 cells were treated with 100ng/ml IGF-I.(20× 10, SABC-Cy3)

IGF-I 在不同类型肿瘤中抑制凋亡的机制并不完全相同。我们以往的研究发现 IGF-I 能激活 PI-3K 途径,诱导 SW480 细胞中 survivin 蛋白的表达并具有剂量和时间依赖性。本研究结果用特异性阻断剂 LY294002 阻断 IGF-I 激活的 PI-3K/Akt 信号通路后,明显抑制了 survivin 表达,并能抑制结肠癌细胞 SW480 的增殖和提高其凋亡率。提示在结肠癌细胞中 IGF-I 可

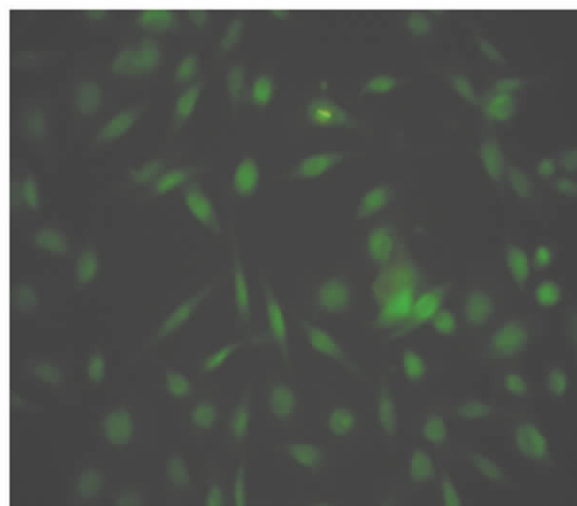


图8 IGF-I+ LY294002 阻断 PI-3K/Akt 信号通路后的细胞 (20× 10, SABC-Cy3 法),呈绿色荧光的细胞明显减少,荧光明显减弱

Fig. 8 SW480 cells were treated by IGF-I+ LY294002 to block PI-3K/Akt signaling pathway.(20× 10, SABC-Cy3)

通过 PI-3K/Akt 信号通路诱导结肠癌细胞 survivin 的表达,抑制肿瘤细胞的凋亡。

参考文献(References)

- [1] Yakar S, Sun H, Zhao H, et al. Metabolic effects of IGF-I deficiency: lessons from mouse models [J]. *Pediatr Endocrinol Rev*, 2005,3(1): 11-19
- [2] Patrice Delafontaine, Yao-Hua Song, Yangxin Li. Expression, Regulation, and Function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 Binding Proteins in Blood Vessels [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004,24 (3) : 435-444
- [3] Ada Girmata, Leonard Girmata, Fabrizio del Prete, et al. Cyclolignans as Inhibitors of the Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor and Malignant Cell Growth[J]. *Cancer Res*, 2004,64(1):236-242
- [4] Eivers E, McCarthy K, Glynn C, et al. Insulin-like growth factor(IGF) signalling is required for early dorso-anterior development of the zebrafish embryo[J]. *Int J Dev Biol*, 2004,48(10):1131-1140
- [5] Ma J, Sawai H, Matsuo Y, et al. IGF-1 mediates PTEN suppression and enhances cell invasion and proliferation via activation of the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway in pancreatic cancer cells [J]. *J Surg Res*, 2010,160(1):90-101
- [6] Matthews LC, Taggart MJ, Westwood M. Modulation of caveolin-1 expression can affect signalling through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and cellular proliferation in response to insulin-like growth factor I[J]. *Endocrinology*, 2008 ,149(10):5199-2008
- [7] Gentilini A, Lottini B, Brogi M, et al. Evaluation of intracellular signalling pathways in response to insulin-like growth factor I in apoptotic-resistant activated human hepatic stellate cells [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2009 ,2(1):1
- [8] Kim JH, Cho YH, Park YL, Sohn JH, et al. Prognostic significance of

- insulin growth factor-I receptor and insulin growth factor binding protein-3 expression in primary breast cancer[J]. *Oncol Rep*, 2010,23(4): 989-95
- [9] Sichani MM, Yazdi FS, Moghaddam NA, et al. Prognostic value of insulin-like growth factor-I receptor expression in renal cell carcinoma [J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2010,21(1):69-74
- [10] An Y, Cai L, Wang Y, Zhu D, et al. Local expression of insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I receptor, and estrogen receptor alpha in ovarian cancer[J]. *Onkologie*, 2009,32(11):638-44
- [11] Gualco E, Wang JY, Del Valle L, et al. IGF-IR in neuroprotection and brain tumors[J]. *Front Biosci*, 2009,1:14:352-75
- [12] 孙维佳,张翼,黄之果,等.IGF-IR 在胰腺癌中的表达及临床意义[J].*中国普通外科杂志*,2009,18(6) 639-641
- [13] 牛坚,刘斌,于彬,等.靶向沉默 IGF1R 基因 miR302shRNA 慢病毒的构建及其抗肝癌细胞生长 [J]. *中国普通外科杂志*,2009,18(7):703-707
- [14] Yavari K, Taghikhani M, Ghannadi Maragheh M, et al. Downregulation of IGF-IR expression by RNAi inhibits proliferation and enhances chemosensitization of human colon cancer cells [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, Jan;25(1):9-16
- [15] Yavari K, Taghikhani M, Maragheh MG, et al. Knockdown of IGF-IR by RNAi inhibits SW480 colon cancer cells growth in vitro [J]. *Arch Med Res*, 2009,40(4):235-40
- [16] Shukla S, Gupta S. Apigenin suppresses insulin-like growth factor I receptor signaling in human prostate cancer: an in vitro and in vivo study[J]. *Mol Carcinog*, 2009,48(3):243-52
- [17] Moser C, Schachtschneider P, Lang SA, et al. Inhibition of insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) using NVP-AEW541, a small molecule kinase inhibitor, reduces orthotopic pancreatic cancer growth and angiogenesis[J]. *Eur J Cancer*, 2008,44(11):1577-86
- [18] Eivers E, McCarthy K, Glynn C, et al. Insulin-like growth factor(IGF) signalling is required for early dorso-anterior development of the zebrafish embryo[J]. *Int J Dev Biol*, 2004,48(10):1131-1140
- [19] 王佳贺, 阙亮, 舒林华等.PI3 K/ AKT 途径在大肠埃希菌诱导 U937 细胞凋亡中的作用 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2009,18(4):377-380
- Wang Jiahe, Kan Liang, Shu Linhua, et al. Role of PI3K/ AKT in the signal transduction of apoptosis of U937 cell lines induced by E. COLI[J]. *Chinese Journal Of Histochemistry And Cytochemistry*, 2009,18(4):377-380
- [20] Morgillo F, Kim WY, Kim ES, et al. Implication of the insulin-like growth factor-IR pathway in the resistance of non-small cell lung cancer cells to treatment with gefitinib [J]. *Clin Cancer Res*, 2007,13(9): 2795-803
- [21] Oh SH, Jin Q, Kim ES, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signaling pathway induces resistance to the apoptotic activities of SCH66336 (lonafarnib) through Akt/mammalian target of rapamycin-mediated increases in survivin expression [J]. *Clin Cancer Res*, 2008,14(5):1581-9
- [22] Sato A, Oya M, Ito K, et al. survivin associates with cell proliferation in renal Cancer cells: regulation of survivin expression by insulin-like growth factor-I, interferon-gamma and a novel NF-kappaB inhibitor [J]. *Int J Oncol*, 2006,28(4):841-6
- [23] Zhang M, Latham DE, Delaney MA, et al. Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2005,24(15):2474-2482
- [24] Vaira V, Lee CW, Goel HL, et al. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling[J]. *Oncogene*, 2007,26(19):2678-84
- [25] Poulaki V, Mitsiades CS, Kotoula V, et al. Regulation of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in thyroid carcinoma cells[J]. *Am J Pathol*, 2002,161(2):643-654
- [26] Hilmi C, Larribere L, Giuliano S, et al. IGF1 promotes resistance to apoptosis in melanoma cells through an increased expression of BCL2, BCL-X(L), and survivin[J]. *J Invest Dermatol*, 2008,128(6): 1499-505
- [27] Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications[J]. *Oncogene*, 2002,21(37):5673-5683