

Serabelisib 抗人肝母细胞瘤 HepG2 细胞的作用及其机制探讨



全文二维码 开放科学码

黎明 李勇 黄召 唐湘莲
刘赞 周宇翔 文佳冰 向强兴

【摘要】目的 探讨小分子抑制剂 Serabelisib 抑制 PI3K-Akt 信号通路活性及对人肝母细胞瘤细胞系增殖、凋亡的效应作用及其相关机制。 **方法** 采用不同浓度的小分子抑制剂 Serabelisib (0 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$ 、8 $\mu\text{mol/L}$) 处理人肝母细胞瘤细胞 HepG2 细胞,通过四氮唑盐比色法检测 Serabelisib 对细胞增殖的抑制作用,采用流式细胞仪检测细胞凋亡变化情况,采用蛋白质免疫印迹检测 Serabelisib 处理后 HepG2 细胞中 PI3K 信号通路活性及凋亡相关蛋白表达变化情况。 **结果** 当 Serabelisib 浓度 $\geq 4 \mu\text{mol/L}$ 时,对人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞增殖具有显著抑制作用,随着 Serabelisib 浓度增加,其对 HepG2 细胞增殖的抑制率逐渐增大,具有剂量和时间依赖性。随着 Serabelisib 浓度增加,HepG2 细胞凋亡率明显升高,同样具有剂量依赖性。蛋白质免疫印迹检测发现 Serabelisib 处理后的 HepG2 细胞中 PI3K 信号通路中关键激酶 Akt 磷酸化水平降低,促凋亡蛋白 PARP 89KD 裂解片段表达增加。 **结论** Serabelisib 通过抑制 PI3K/Akt 信号转导通路,抑制人肝母细胞瘤 HepG2 细胞增殖,并诱导凋亡。

【关键词】 肝肿瘤; PI3K; Serabelisib; HepG2; 细胞增殖; 细胞凋亡

【中图分类号】 R726 R735.7

Effect of Serabelisib on human hepatoblastoma HepG2 cells and its mechanisms. Li Ming, Li Yong, Huang Zhao, Tang Xianglian, Liu Zan, Zhou Yuxiang, Wen Jiabing, Xiang qiangxing. Department of General Surgery, Hunan Children's Hospital, Changsha 41007, China.

【Abstract】Objective To explore the inhibitory effect of small molecule inhibitor Serabelisib on the activity of PI3K Akt signaling pathway and its mechanism on the proliferation and apoptosis of human hepatoblastoma cell line. **Methods** Different concentrations of Serabelisib (0, 2, 4, 8 $\mu\text{mol/L}$) were employed for treating cells. The inhibition of cellular proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). The changes of apoptosis were detected by flow cytometry. The cellular activity of PI3K signaling pathway and the cellular expression of apoptosis-related proteins were detected by Western blot. **Results** A concentration of Serabelisib $\geq 4 \mu\text{mol/L}$ had a significant inhibitory effect on cellular proliferation. With a rising concentration of Serabelisib, its inhibitory rate on cellular proliferation gradually increased in a dose/time-dependent manner while cellular apoptotic rate rose significantly in a dose-dependent manner. Western blot indicated that the phosphorylation of Akt, a key kinase in PI3K signaling pathway, decreased and the expression of PARP 89kd fragment spiked in Serabelisib-treated HepG2 cells. **Conclusion** Serabelisib can inhibit the proliferation and apoptosis by inhibiting PI3K/Akt signal transduction pathway in HepG2 cells.

【Key words】 Liver Neoplasms; PI3K; Serabelisib; HepG2; Cell Proliferation; Apoptosis

肝母细胞瘤 (hepatoblastoma, HB) 是婴幼儿最常见的胚胎源性肝脏肿瘤,多发生于 3 岁以下婴幼儿,

占儿童原发肝脏恶性肿瘤的 80%^[1]。该病发展迅速,瘤体生长迅速,恶性程度高,易发生浸润和侵袭转移,目前多采用手术联合化疗的多学科综合治疗方案^[2]。由于术后残留、复发,对化疗药物的不耐受及耐药性等问题一直未得到有效解决,因此寻找安全、低毒的化疗药物是目前国内外研究热点之一^[3]。目前有关 PI3K 激酶小分子抑制剂的研究已

DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2020.05.007

基金项目:湖南省卫生健康委课题(编号:C2019021);湖南省出生缺陷协同防治科技重大专项(编号:2019SK1010)

作者单位:湖南省儿童医院普外二科(湖南省长沙市,410007), Email: dawn1212@sina.com

经成为肿瘤学研究的热点,但是有关靶向亚型的小分子抑制剂对肝母细胞瘤效应的研究较少。因此,本研究将采用新型的小分子抑制剂 Serabelisib,通过靶向 PI3K/Akt 信号通路,探讨其对于肝母细胞瘤细胞增殖、凋亡的作用,同时检测相关的分子机制,为肝母细胞瘤的治疗寻找新的药物和途径,并为 Serabelisib 治疗肝母细胞瘤的临床前研究提供实验依据和理论基础。

材料与方法

一、细胞系与试剂

人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 由本实验室保存^[4]。Serabelisib、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国 Selleck 公司;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;DMEM 高糖培养基、胰酶购自美国 HyClone 公司;四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自美国 Sigma 公司,PBS 缓冲液配制成为 5 mg/mL 储存液,0.22 μM 滤膜过滤除菌,分装后于 -20°C 避光保存;Annexin V-FITC/PI apoptosis kit 购自联科生物公司;FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司;针对 89KD PARP 裂解片段的 cleaved-PARP 抗体、Akt 抗体及 p-Akt 抗体购自美国 Cell Signaling 公司; β -Actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate kit (34079)购自美国 Thermo 公司。显影剂、定影剂和 X 光片均购自日本柯达公司。

二、实验方法

(一)HepG2 细胞培养及 Serabelisib 的配制

HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中,于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。细胞经 0.25% 胰酶消化传代,取对数生长期的细胞进行培养。Serabelisib 先用 DMSO 配成原液,分装冻存,临用时细胞培养基稀释成所需浓度,DM-SO 终浓度为 0.1%。

(二)MTT 比色法

调整处于对数期细胞悬液的浓度,将 HepG2 细胞接种在 96 孔板上(每孔 100 μL),12 h 后加入不同浓度 Serabelisib 并处理不同时间;加入 MTT(每孔 10 μL), 37°C 、5% CO_2 培养 4 h;1 800 rpm 离心 5 min,小心弃上清,加入 DMSO 溶解各孔 MTT 代谢产物,酶标仪内震荡孵育 10 min,检测 492 nm 波长下吸光度值(A)。细胞生长抑制率($\%$) = $[1 - (\text{处理组 A 均值}/\text{对照组 A 均值})] \times 100\%$;细胞活性

($\%$) = $(\text{处理组 A 均值}/\text{对照组 A 均值}) \times 100\%$ 。重复实验 3 次,取平均值,计算标准差。

(三)细胞凋亡测定

将 HepG2 细胞接种在 6 孔板上,12 h 后加入不同浓度 Serabelisib 处理 48 h 后,使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒。收集细胞于离心管中,1 000 rpm 离心 5 min,加入 500 μL 1 \times 结合缓冲液,5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 混匀,避光孵育 20 min,流式细胞仪进行检测,使用 Cellquest 软件进行结果分析。

(四)Western blot 检测相关蛋白

HepG2 细胞以不同浓度 Serabelisib 处理 48 h 后,以蛋白裂解液裂解细胞,提取上清液即为总蛋白,按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。 99°C 、10 min 加热变性后,进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳。然后将蛋白质转移置 PVDF 膜上,封闭、孵育一抗、二抗,X 光片曝光、显影、定影显示目标条带。使用 NIH ImageJ 软件对条带进行密度分析。

三、统计学处理

应用 SPSS16.0 对数据进行统计分析。所有服从正态分布的计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均数独立样本采用单因素方差分析,两样本均数间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、Serabelisib 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用

为证实小分子抑制剂 Serabelisib 对人肝母细胞瘤细胞株的抑制作用,以不同浓度 Serabelisib (0 $\mu\text{mol/L}$, 2 $\mu\text{mol/L}$, 4 $\mu\text{mol/L}$, 8 $\mu\text{mol/L}$)处理人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞 24 h、48 h、72 h,以 MTT 法检测细胞活性,并计算细胞生存率。结果显示随着浓度的升高,Serabelisib 对于细胞增殖的抑制作用增强,且抑制作用呈剂量和时间依赖性(图 1)。

二、Serabelisib 对 HepG2 细胞凋亡的影响

不同浓度 Serabelisib (0 $\mu\text{mol/L}$, 2 $\mu\text{mol/L}$, 4 $\mu\text{mol/L}$, 8 $\mu\text{mol/L}$)处理人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞 48 h 后,以 Annexin V-FITC/PI 双标法检测细胞早期凋亡率和晚期凋亡率。发现 HepG2 细胞早期和晚期凋亡率均随 Serabelisib 浓度增加而增加,呈明显剂量依赖性(图 2),实验重复 3 次,取均值和标准差。细胞凋亡趋势与 MTT 结果相一致。提示 Serabelisib 对人肝母细胞瘤细胞具有抑制作用,可能与其诱导细胞凋亡有关。

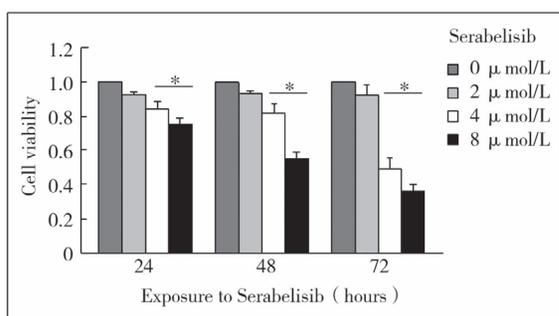


图1 Serabelisib抑制人肝母细胞瘤细胞系的增殖。HepG2细胞以 10^4 个细胞/孔种植于96孔板,不同浓度Serabelisib(0 μmol/L,2 μmol/L,4 μmol/L,8 μmol/L)处理不同时间(24 h,48 h,72 h)后,以MTT法检测细胞活性。平行3孔,柱状图表示生存率和标准差。*表示与对照组(0 μmol/L)相比 $P < 0.05$

Fig.1 Serabelisib inhibited cellular growth of human hepatoblastoma cell lines

三、Serabelisib抑制HepG2细胞中Akt磷酸化及促进PARP的裂解

Akt的本质是大小为56kD的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,处于PI3-K信号转导通路的核心部位。Akt

在PI3-K等作用下发生磷酸化后充分活化,其磷酸化水平反映信号通路活化水平。PARP (polyADP-ribose polymerase)是一种DNA修复酶,为Caspase的催化底物,可被催化为89KD和24KD的裂解产物而失活,其裂解片段是细胞凋亡的分子标志之一。为进一步证明Serabelisib可以抑制PI3K-Akt信号通路并且诱导HepG2细胞凋亡,我们用Western印迹检测了Serabelisib作用下HepG2细胞株Akt蛋白磷酸化水平及PARP裂解产物水平的变化。结果显示,Serabelisib抑制Akt激酶磷酸化水平存在剂量依赖性,提示该小分子抑制剂可以抑制PI3K/Akt信号通路活性;而PARP 89KD裂解片段随Serabelisib浓度增加而增加,呈剂量依赖性(图3)。

讨论

肝母细胞瘤(hepatoblastoma, HB)是婴幼儿最常见的胚胎源性肝脏肿瘤,其主要形成机制是在胚

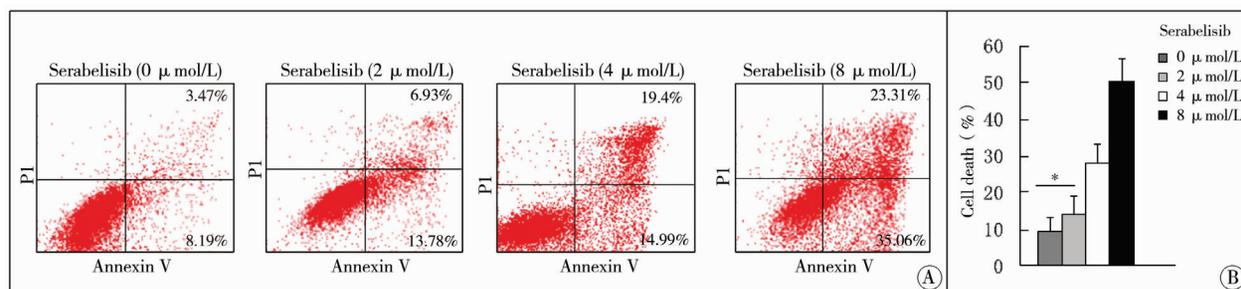


图2 Serabelisib诱导HepG2细胞系凋亡,呈明显剂量依赖性 注 A:HepG2细胞以不同浓度Serabelisib处理48 h后,Annexin V和PI染色后,流式细胞仪检测细胞凋亡率。本组图片为其中1次检测结果,分别标识早期凋亡(Annexin V-FITC+/PI-)和晚期凋亡(Annexin V+/PI+)和完全坏死细胞(Annexin V-FITC-/PI+)比例;B:柱状图表示早期凋亡和晚期凋亡细胞总比例,为3次实验平均值,bar表示标准差。*表示与对照(0 μmol/L)相比 $P < 0.05$

Fig.2 The apoptosis of HepG2 cell line was induced by Serabelisib in a dose-dependent manner

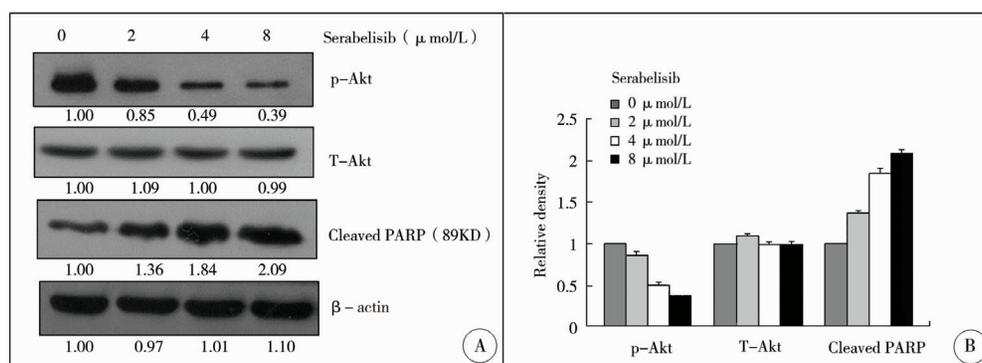


图3 Serabelisib抑制人肝母细胞瘤细胞PI3K/Akt信号通路活性及促进凋亡相关蛋白表达 注 A:HepG2细胞以不同浓度Serabelisib(0 μmol/L,2 μmol/L,4 μmol/L,8 μmol/L)处理48 h后,提取细胞总蛋白,Western blot检测p-Akt、T-Akt及PARP 89KD裂解产物,以β-actin作为上样量参照。条带使用ImageJ软件进行扫描并分析;B:采用NIH ImageJ软件分析各条带灰度值,并与β-actin进行比较

Fig.3 Serabelisib inhibited the activity of PI3K/Akt signaling pathway and promoted the expression of apoptosis-related proteins in HepG2 cells

胎发育期间,由肝脏内的多能干细胞分化增殖产生恶性肿瘤细胞,多发生于3岁以下婴幼儿,占儿童原发性肝脏恶性肿瘤的80%^[1,2]。目前的治疗手段主要是手术联合化疗。HB治愈率在80%左右,而剩余20%的侵袭性更强的肿瘤对化疗基本没有反应,这些患者的预后很差,但是由于术后残留、复发,患者对化疗药物的不耐受及耐药性等负面效应一直存在^[3,5]。

目前HB的发病机制尚不清楚,除了肿瘤遗传学事件的发生,肝母细胞瘤的发生、增殖、侵袭与转移同样离不开环境中的各种生物信号,信号转导通路的异常也被认为是肝母细胞瘤的发病机制之一。近期研究表明,PI3K-Akt通路是一个经典的促增殖、抑凋亡的信号转导途径,在促进肿瘤细胞的生长、增殖,抑制细胞凋亡,促进细胞侵袭和转移,促进血管生成,抵抗化疗和放疗中细胞的凋亡上均发挥重要作用,该信号通路的所有成员(包括Akt)被认为是单一治疗或联合治疗的靶点用于治疗各种癌症,阻断PI3K/Akt信号转导通路的异常活化成为肿瘤治疗的新靶点^[6-10]。

凋亡是细胞程序化死亡的过程,发生在细胞老化过程中,在正常组织的动态平衡和发育中起着重要作用^[11]。细胞凋亡是一种重要的抗肿瘤途径,多种抗肿瘤药物通过诱导细胞凋亡在肿瘤中发挥重要作用,在癌变过程中诱导细胞凋亡被认为能有效减缓癌症的进展^[12,13]。PARP(polyADP-ribose polymerase)是一种DNA修复酶,为Caspase的催化底物,可被催化为89KD和24KD的裂解产物而失活,其裂解片段也是细胞凋亡的分子标志之一^[14]。Akt是大小为56kD的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,处于PI3-K信号转导通路的核心部位。Akt在PI3-K等作用下发生磷酸化后充分活化,其磷酸化水平反映了信号通路活化水平^[15]。细胞凋亡的激活受多种信号通路的调控,其中PI3K/AKT通路是最重要的信号通路之一^[16]。

研究表明,PI3K/Akt信号通路异常活化在肝母细胞瘤的发生发展中起着重要作用^[17,18]。有研究表明肝母细胞瘤中存在PI3K α 亚基突变,从而导致激酶活性增加。通过PI3K体外抑制和随后的Akt和GSK3 β 磷酸化的减少证实PI3K/Akt信号通路的异常活化是肝母细胞瘤细胞存活的关键^[17]。

Serabelisib (INK-1117, mLN-1117, TAK-117)是一种新型的、有效的、具有高度选择性并且可采用口服的PI3K α 抑制剂^[19]。Serabelisib可有效抑制

PI3K α 的活性,其选择性比其他I类PI3K家族成员高100倍以上。对携带有PI3K α 突变的肿瘤细胞系进行Serabelisib处理,细胞内PI3K信号通路被有效抑制,细胞增殖阻滞并引起细胞凋亡,并且有效抑制肿瘤细胞的增殖,抑制胞内Akt的磷酸化和活性。Serabelisib单用或者与其他抑制剂联合应用已经在非血液系统恶性肿瘤、胃癌、乳腺癌、肾肿瘤及非小细胞肺癌在内的实体瘤中进行了体外及临床研究,疗效得到了肯定^[9,19,20]。

目前PI3K激酶小分子抑制剂的研究已经成为肿瘤学研究的热点,但是靶向亚型的小分子抑制剂对于肝母细胞瘤效应的研究较少。本研究发现,PI3K α 特异性的小分子抑制剂Serabelisib可以抑制肝母细胞瘤细胞系细胞的增殖,诱导其凋亡,并呈剂量依赖性,其分子机制涉及到抑制PI3K/Akt信号通路及PARP的裂解失活;后续我们将在其他HB细胞系及体内实验进一步验证该小分子抑制剂的作用,为Serabelisib用于肝母细胞瘤治疗的临床前研究提供实验依据和理论基础。

参考文献

- 1 金晟,施诚仁. 儿童肝母细胞瘤研究现状[J]. 临床儿科杂志,2014,32(10):988-992. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3606.2014.10.31.
Jin S, Shi CR. Current research status of pediatric hepatoblastoma[J]. Journal of Clinical Pediatrics, 2014, 32(10): 988-992. DOI:10.3969/j.issn.1000-3606.2014.10.31.
- 2 Lim I, Bondoc AJ, Geller JI, et al. Hepatoblastoma—the evolution of biology, surgery, and transplantation [J]. Children (Basel), 2018, 6(1): E1. DOI: 10.3390/children6010001.
- 3 Trobaugh-Lotrario AD, Katzenstein HM. Chemotherapeutic approaches for newly diagnosed hepatoblastoma: past, present, and future strategies [J]. Pediatr Blood Cancer, 2012, 59(5): 809-812. DOI: 10.1002/pbc.24219.
- 4 李勇,肖雅玲,陈朝晖,等. 姜黄素对人肝母细胞瘤细胞株HepG2增殖和转移的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(1): 117-120. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.023.
Li Y, Xiao YL, Chen ZH, et al. Effects of Curcumin on proliferation and metastasis of human hepatoblastoma cell line HepG2 in vitro [J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(1): 117-120. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.023.
- 5 Marin J, Briz O, Herraez E, et al. Molecular bases of the poor response of liver cancer to chemotherapy [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2018, 42(3): 182-192. DOI: 10.1016/j.

- clinre. 2017. 12. 006.
- 6 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2 (7): 489-501. DOI: 10. 1038/nrc839.
 - 7 Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. Apoptosis, 2004, 9 (6): 667-676. DOI: 10. 1023/B: APPT. 0000045801. 155 85. dd.
 - 8 Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression[J]. Cell Cycle, 2003, 2(4): 339-345.
 - 9 Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15 (5): 273-291. DOI: 10. 1038/nrclinonc. 2018. 28.
 - 10 Alzahrani AS. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in cancer: At the bench and bedside[J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 125-132. DOI: 10. 1016/j. semcancer. 2019. 07. 009.
 - 11 Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology[J]. Int Rev Exp Pathol, 1991, 32 (32): 223-254. DOI: 10. 1016/b978-0-12-364932-4. 50010-1.
 - 12 Rybczynska AA, Boersma HH, de Jong S, et al. Avenues to molecular imaging of dying cells: Focus on cancer[J]. Med Res Rev, 2018, 38 (6): 1713-1768. DOI: 10. 1002/med. 21495.
 - 13 Ucker DS, Levine JS. Exploitation of apoptotic regulation in cancer[J]. Front Immunol, 2018, 27 (9): 241. DOI: 10. 3389/fimmu. 2018. 00241.
 - 14 Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2020, 1867 (6): 118688. DOI: 10. 1016/j. bbamcr. 2020. 118688.
 - 15 Rai N, Sarkar M, Raha S. Piroxicam, a traditional non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) causes apoptosis by ROS mediated Akt activation[J]. Pharmacol Rep, 2015, 67 (6): 1215-1223. DOI: 10. 1016/j. pharep. 2015. 05. 012.
 - 16 Jiang C, Ma S, Hu R, et al. Effect of CXCR4 on apoptosis in osteosarcoma cells via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46 (6): 2250-2260. DOI: 10. 1159/000489593.
 - 17 Hartmann W, Kuchler J, Koch A, et al. Activation of phosphatidylinositol-3'-kinase/AKT signaling is essential in hepatoblastoma survival[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15 (14): 4538-4545. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-08-2878.
 - 18 Xia Z, Zhang N, Ding D. Proliferation and migration of hepatoblastoma cells are mediated by IRS-4 via PI3K/Akt pathways[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7 (10): 3763-3769.
 - 19 Juric D, de Bono JS, LoRusso PM, et al. A first-in-human, phase I, dose-escalation study of TAK-117, a selective PI3K α isoform inhibitor, in patients with advanced solid malignancies[J]. Clin Cancer Res, 2017, 23 (17): 5015-5023. DOI: 10. 1158/1078-0432. CCR-16-2888.
 - 20 Patel CG, Rangachari L, Patti M, et al. Characterizing the sources of pharmacokinetic variability for TAK-117 (Serabelisib), an investigational phosphoinositide 3-kinase alpha inhibitor: a clinical biopharmaceutics study to inform development strategy[J]. Clin Pharmacol Drug Dev, 2019, 8 (5): 637-646. DOI: 10. 1002/cpdd. 613.

(收稿日期: 2020-03-18)

本文引用格式:黎明, 李勇, 黄召, 等. Serabelisib 抗人肝母细胞瘤 HepG2 细胞的作用及其机制探讨[J]. 临床小儿外科杂志, 2020, 19(5): 410-414. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2020. 05. 007.

Citing this article as: Li M, Li Y, Huang Z, et al. Effect of Serabelisib on human hepatoblastoma HepG2 cells and its mechanisms[J]. J Clin Ped Sur, 2020, 19 (5): 410-414. DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-6353. 2020. 05. 007.

本刊对更改作者的要求

在稿件处理期间,因故增减作者或必须更改作者署名顺序者,需由第一作者出具书面说明,变更前后所有作者签名,由原出具投稿推荐信的单位证明,并加盖公章。

论文若属国家自然科学基金项目或军队、部、省级以上重点课题,请写出课题号,并附由推荐单位加盖公章的基金证书复印件。