

# Akt1 在环氧合酶-2 抑制剂抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖中的作用

刘小叶,周建斌,李 婷,黄余良

(南华大学附属第二医院妇产科,湖南 衡阳 421001)

**摘要:** **目的** 研究 Akt1 在环氧合酶 2 抑制剂 NS398 抑制宫颈癌 Hela 细胞增殖过程中的作用。 **方法** 以不同浓度的 NS398 或 Akt1 选择性激动剂 IGF-1 与 NS398 共同处理 Hela 细胞,采用噻唑蓝(MTT)比色法分析细胞生长抑制率,Western blotting 免疫印迹技术分别检测 Akt1 蛋白表达的变化。 **结果** 与对照组比较,不同浓度的 NS398 处理 Hela 细胞后,细胞生长抑制率(IR)增加( $P < 0.05$ );NS398 呈浓度和时间依赖性下调 Hela 细胞 Akt1 蛋白质的表达( $P < 0.05$ );与单独用 NS398 组比较,Akt1 激动剂与 NS398 共同处理细胞后,细胞 IR 值逐渐下降,并且其作用呈浓度依赖和时间依赖性( $P < 0.05$ )。 **结论** NS398 呈剂量和时间依赖性抑制 Hela 细胞的增殖,其作用机制可能与下调 Akt1 蛋白的表达有关。

**关键词:** 环氧合酶 2 抑制剂; 宫颈癌; 蛋白激酶 B; 细胞增殖

中图分类号:R737.33 文献标识码:A

## Effect of Akt1 on Inhibition of Cervical Cance Hela Cell's Proliferation by Cyclooxygenase-2 Inhibitor

Liu Xiaoye, Zhou Jianbin, Li Ting, Huang Yuliang

(Department of Obstetrics and Gynaecology, the Second Affiliated Hospital,  
University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

**Abstract:** **Objective** Investigate to the effect of Akt1 on Inhibition of Cervical Cance Hela Cell Proliferation by Cyclooxygenase-2 inhibitor. **Methods** Hela cells were treated with NS398 and (or) Akt1 agonist IGF-1, then the growth inhibitory rate (IR) of cell was evaluated by MTT assay. The expressions of Akt1 were detected by Western Blotting. **Results** NS398 significantly increase the IR of Hela cells and down-regulate the Akt1 protein expression ( $P < 0.05$ ). Akt1 agonist IGF-1 decreased the IR of Hela cells compared with only treated with NS398 groups. These effects are dose-dependent manner. **Conclusion** NS398 inhibits Hela cell growth in a dose-dependent and time-dependent manners, and the mechanism may be related to down-regulate the expressions of Akt1.

**Key words:** cyclooxygenase-2 inhibitor; cervical cancer; Akt1; cell proliferation

宫颈癌是较为常见的女性生殖系统恶性肿瘤,据 WHO 统计,全球 80% 的宫颈癌患者集中在发展中国家,国内每年新增病例约 11 万以上<sup>[1]</sup>,对宫颈癌发病机制的研究越来越引起研究者的重视。环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素生物合成过程中重要的限速酶,COX-2 是其中的一种亚型,生长因子,促炎症

细胞因子等的激活可以促进 COX-2 的表达。大量的研究发现,COX-2 存在于许多恶性肿瘤中,如结肠癌、肺癌、乳腺癌、胰腺癌和宫颈癌等,可能通过影响肿瘤细胞的增殖,增强肿瘤侵袭力,促进肿瘤转移等机制与恶性肿瘤的不良预后及低生存率密切相关<sup>[2-3]</sup>。氮-2,环己氧-4,硝基苯-甲基磺胺(NS398)是 COX2 的特异性抑制剂,研究发现它可抑制肿瘤的增殖,促进肿瘤细胞的凋亡,但其具体机制尚不清楚。Akt1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,又称为蛋白激酶 B (protein kinase, PKB)。活化的 Akt1 可以抑制细胞的凋亡,促进细胞周

期运行,促进细胞侵袭和转移<sup>[4]</sup>。本研究以人宫颈癌细胞株(Hela 细胞)为研究对象,观察 NS398 对 Hela 细胞增殖的抑制作用及 Akt1 蛋白表达的变化,并采用 Akt1 激动剂活化 Akt1,进一步探讨 Akt1 在 NS398 抑制 Hela 细胞增殖过程中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

NS398 购自美国 Sigma 公司,溶解在 100% 二甲基亚砜(DMSO)溶剂中,配成 100 mmol/L 的液体,实验时稀释至不同浓度。IGF-1 购自澳大利亚 GroPep 公司,磷酸化 Akt1 单克隆抗体(即 p-Akt,为 Ser473 位点磷酸化)购自美国 Cell Signaling Technology 公司,Western blotting 免疫印迹所用二抗购自武汉博士德生物工程有限公司。DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司,BCA 蛋白检测试剂盒购自 Hyclone 公司,噻唑蓝(MTT)比色法试剂盒、丽春红染色剂及其它检测试剂盒均为国产试剂。

### 1.2 细胞株及培养条件

人宫颈癌细胞株(Hela 细胞)购自中科院上海细胞生物研究所。细胞贴壁生长于含双抗(青霉素和链霉素)及 10% 小牛血清的 DMEM 中,置 37 °C、5% 的 CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,以 0.25% 胰酶和 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)1:1(V/V)混合的消化液进行传代换液,各组实验分别取对数生长期的细胞进行。

细胞在给 NS398 和 IGF-1 前无血清培养基饥饿过夜,使细胞处于相同增殖状态。NS398 用 DMSO 配制成 50mmol/L 的贮存液(使用时培养液中 DMSO 浓度不超过 0.1%), -80 °C 保存,使用时用无血清培养基稀释成所需要的工作浓度。

### 1.3 MTT 比色法检测细胞的生长

取对数生长期的培养细胞,传代并接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,以无血清培养液处理 24 h,然后换含不同处理因素的培养液分别分组处理细胞,每组设 5 个复孔,分别培养相应的时间后,加入新鲜配制的 MTT,再继续培养 4h 后,弃去培养液,加入二甲基亚砜(DMSO),10 min 后在全自动酶标仪上测定 570 nm 处吸光度(A 值),以 A<sub>570 nm</sub> 值代表细胞活力。细胞生长抑制率(IR)按如下公式计算:生长抑制率(%) = (对照组 A 值 - 实验组 A 值) / 对照组 A 值 × 100%。

### 1.4 Western blotting 免疫印迹检测蛋白质的表达

采用悬浮缓冲液裂解细胞,常规提取细胞总蛋白。经 BCA 法蛋白定量后,各组分别取 50 μg 蛋白进行电泳,转 PVDF 膜后用丽春红染色检测转膜效果,再用 10% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜,然后依次孵育一抗(4 °C 孵育过夜)、TBST 液洗涤(三次,共 15 min)、二抗(室温孵育 1 h),经 TBST 液洗涤(三次,共 15 min)后,以 Western 免疫荧光检测试剂盒激发荧光,于暗室中显示于 X 光片,结果用凝胶图像分析系统对胶片扫描进行相对灰度分析。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件处理数据。实验结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两两之间比较采用 *t* 检验,多组间数据的比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 被认为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 环氧合酶抑制剂 NS398 对 Hela 细胞增殖的影响

为了解 NS398 对 Hela 细胞增殖的影响,采用 MTT 法检测细胞的吸光度,计算 IR 值后显示,不同浓度(0、50、100、150、200 μmol/L) NS398 分别处理细胞 0、12、24、36、48 h 后,细胞代谢 MTT 的能力明显降低,IR 值逐渐上升,这表明 NS398 可明显抑制 Hela 细胞的生长,并且其抑制作用呈浓度依赖性和时间依赖性(*P* < 0.05)(图 1)。

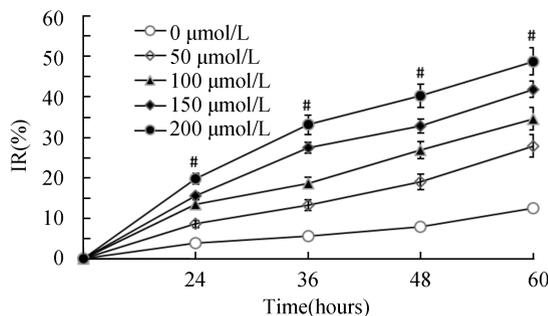


图 1 MTT 法分析不同浓度的 NS398 对 Hela 细胞生长抑制率的影响 #表示同一个浓度组内分别与 0 h 组比较,同一时间组内分别与 0 μmol/L 组比较,*P* < 0.05, *n* = 5

### 2.2 环氧合酶抑制剂 NS398 对 Hela 细胞 p-Akt1 蛋白表达的影响

为观察环氧合酶抑制剂 NS398 对 Hela 细胞 p-Akt1 蛋白质表达的影响,采用不同浓度(0、50、100、

150、200  $\mu\text{mol/L}$  NS398 处理 HeLa 细胞 24 h 后,以 Western blotting 免疫印迹法检测 p-Akt1 蛋白质的表达,结果显示,随着 NS398 浓度的增加,细胞中 p-Akt1 蛋白的表达逐渐下调,其效应呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

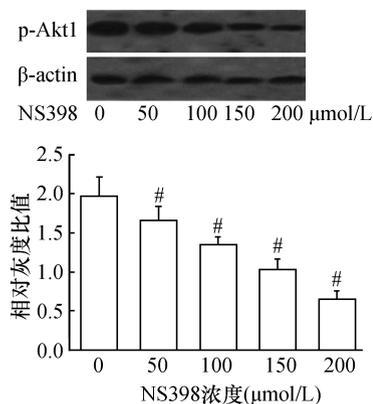


图 2 不同浓度 NS398 处理 HeLa 细胞 24 h 后 p-Akt1 蛋白质表达的变化 #与 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$

此外,为观察环氧合酶抑制剂 NS398 对 HeLa 细胞 p-Akt1 蛋白质表达的影响的时效性,采用 150  $\mu\text{mol/L}$  的 NS398 处理 HeLa 细胞不同时间 (0, 12, 24, 36, 48 h),以 Western blotting 免疫印迹法检测 p-Akt1 蛋白质的表达,结果显示,随着 NS398 处理时间的增加,细胞中 p-Akt1 蛋白的表达逐渐下调,其效应呈时间依赖性 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

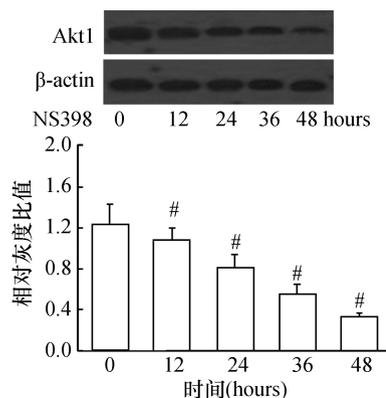


图 3 NS398 (150  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 HeLa 细胞不同时间后 p-Akt1 蛋白质表达的变化 #与 0 h 组比较,  $P < 0.05$ ,  $n = 3$

### 2.3 Akt1 激动剂 IGF-1 在 NS398 抑制 HeLa 细胞增殖过程中的作用

为进一步探讨 Akt1 在环氧合酶抑制剂 NS398

影响 HeLa 细胞增殖过程中的作用,在 150  $\mu\text{mol/L}$  NS398 处理细胞的基础上,同时结合不同浓度的 Akt1 激动剂 IGF-1 (50, 100, 150 ng/ml) 处理 HeLa 细胞 0, 12, 24, 36, 48 h,经 MMT 法检测细胞的吸光度并计算 IR 值后显示, Akt1 激动剂处理后, HeLa 细胞代谢 MTT 的能力明显增强,其 IR 值逐渐下降,这表明 Akt1 活性增强可以在一定程度上逆转 NS398 对 HeLa 细胞增殖的抑制作用,并且其作用呈浓度依赖性和时间依赖性 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

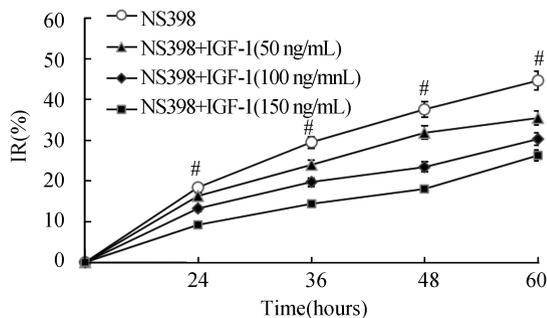


图 4 不同浓度 IGF-1 对 NS398 (150  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用下的 HeLa 细胞生长抑制率的影响 #表示不同处理组内分别与 0 h 组比较,同一时间组内分别与仅用 NS398 处理组比较,  $P < 0.05$ ,  $n = 5$

## 3 讨 论

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤,发病率居女性生殖道肿瘤的首位,近年来其发病率有逐年上升和发病年轻化的趋势<sup>[5]</sup>,但目前宫颈癌的发病机制尚未完全阐述清楚。NS398 是环氧合酶-2 (Cyclooxygenase 2, COX-2) 的选择性抑制剂,属磺胺类制剂的衍生物,是非甾体类抗炎药物之一<sup>[6]</sup>。近年来,大量的研究表明 NS398 除特异性地抑制 COX-2 的表达之外,还可以抑制肿瘤细胞的增殖,诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>。有研究发现,NS398 可呈浓度依赖性抑制舌鳞癌细胞株 Tca8113 细胞中 MMP2 的表达,抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭<sup>[9]</sup>。邹明英等<sup>[5]</sup>研究发现,NS398 抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖及 MMP2 的表达。这些研究说明 NS398 可以抑制宫颈癌的发展,但其具体分子机制尚未研究清楚。我们在实验中也发现,NS398 可呈浓度依赖性和时间依赖性抑制 HeLa 细胞的增殖。

Akt1 在组织中分布广泛,是 Akt 的亚型之一,也是 PI3K/Akt 通路下游的主要作用靶点。它作为细胞信号网络中的中枢环节,对细胞增殖、分化及存

活等多种生物学过程起重要的调节作用,参与调节肿瘤、糖尿病、炎症和动脉粥样硬化等疾病的发生。研究发现,Akt可磷酸化Caspase-9前体,抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>;上调抑癌基因c-Myc的表达,调节细胞周期,促进细胞的增殖<sup>[11]</sup>;Akt稳定转染的细胞株能诱导上皮间质转换且E-钙黏素表达下调,细胞黏附性降低,促进细胞的侵袭和转移,从而在肿瘤的发生发展中起着重要的作用<sup>[12]</sup>。此外,国内研究也发现,磷酸化Akt(p-Akt)特异性过表达于子宫内膜样癌中,与其侵袭、转移等恶性生物学行为密切相关<sup>[13]</sup>。

本研究采用环氧合酶抑制剂NS398处理宫颈癌Hela细胞后,发现p-Akt1蛋白质表达下调,并且NS398的作用效应呈浓度依赖性和时间依赖性,这提示NS398抑制宫颈癌细胞增殖的作用可能与p-Akt1表达的下调有关。为明确Akt1在其中的作用,我们采用了不同浓度的Akt1激动剂IGF-1与NS398共同处理Hela细胞,结果发现,Akt1激动剂可以在一定程度上逆转NS398对Hela细胞增殖的抑制作用,并且其作用效应也呈浓度依赖性和时间依赖性。本实验表明,Akt1参与了NS398抑制宫颈癌Hela细胞增殖的作用,NS398可能是通过抑制Akt1的表达而影响Hela细胞的增殖。

总之,本研究证实了p-Akt1表达的变化能影响NS398对Hela细胞增殖的抑制作用,表明Akt1与宫颈癌的发生发展有着较为密切的关系,可能是环氧合酶-2抑制剂抗宫颈癌的可能作用机制之一。

#### 参考文献:

[1] 肖和龙, 琚雄飞, 马剑玲, 等. 惠州市成年女性HPV感染及其基因型分布[J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(4): 361-364.

[2] Kargi A, Uysal M, Bozcuk H, et al. The importance of COX-2 expression as prognostic factor in early breast cancer [J]. JBUON, 2013, 18(3): 579-584.

[3] Schildberg C, Abbas M, Merkel S, et al. COX-2, TFF1, and Src define better prognosis in young patients with gas-

tric cancer [J]. J Surg Oncol, 2013, 108(6): 409-413.

- [4] Cariaga-Martinez AE, Lopez-Ruiz P, Nombela-Blanco MP, et al. Distinct and specific roles of Akt1 and AKT2 in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells [J]. Cell Signal, 2013, 25(7): 1586-1597.
- [5] 邹明英, 周菊香, 曾希, 等. NS398抑制宫颈癌Hela细胞增殖及MMP2的表达[J]. 现代生物医学进展, 13(25): 4940-4943.
- [6] Qiu R, Chen J, Sima J, et al. NS398 induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2012, 138(1): 119-124.
- [7] Lee SJ, Hwang JW, Yim H, et al. Synergistic effect of simvastatin plus NS398 on inhibition of proliferation and survival in hepatocellular carcinoma cell line [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, 29(6): 1299-1307.
- [8] 胡孙宽, 周琴, 林铁素, 等. 选择性环氧合酶2抑制剂NS-398对胃癌细胞AGS增殖的抑制作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(1): 72-76.
- [9] 余先麟, 郝艳梅, 司晨晨, 等. NS-398对舌鳞癌基质金属蛋白酶2蛋白表达的影响[J]. 江苏医药, 2012, 38(2): 140-141.
- [10] Quan JH, Cha GH, Zhou W, et al. Involvement of PI 3 kinase/Akt-dependent Bad phosphorylation in Toxoplasma gondii-mediated inhibition of host cell apoptosis [J]. Exp Parasitol, 2013, 133(4): 462-471.
- [11] Radke J, Bortolussi G, Pagenstecher A. Akt and c-Myc induce stem-cell markers in mature primary p53(-)/(-) astrocytes and render these cells gliomagenic in the brain of immunocompetent mice [J]. PloS One, 2013, 8(2): e56691.
- [12] Fenouille N, Tichet M, Dufies M, et al. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion [J]. PloS One, 2012, 7(7): e40378.
- [13] 陈红霞, 尹春华, 陶雪勤. 子宫内膜样癌组织中p-Akt表达变化及意义[J]. 山东医药, 2013, 53(32): 40-43.

(此文编辑:秦旭平)