

ICBP90 介导 PI3K/AKT 通路阻断剂 LY294002 抑制 Jurkat T 细胞增殖

郭中峰¹, 邢飞跃¹, 方志远¹, Christian Bronner²

(1. 暨南大学生命科学技术学院 组织移植与免疫实验中心, 广东 广州 510632;

2. 法国路易斯·巴斯德大学国家健康医学研究所, 法国 67404)

[摘要] 目的: 探讨磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路特异性抑制剂 LY294002 在 Jurkat T 细胞增殖中的作用。方法: 以急性 T 细胞白血病细胞(Jurkat T 细胞)为模型, PD98059 和阿霉素为阳性对照, 在倒置显微镜下观察 LY294002 对 Jurkat T 细胞的集落形成的影响, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 检测 LY294002 处理后 Jurkat T 细胞的增殖, 流式细胞术检测 LY294002 处理后 Jurkat T 细胞周期的变化, Western blotting 方法检测 Jurkat T 细胞中 ICBP90 蛋白的表达以确定其与 LY294002 抑制 Jurkat T 细胞增殖的关系。结果: LY294002 能够显著抑制 Jurkat T 细胞的集落形成和增殖, 使 Jurkat T 细胞停滞于 G₂/M 期, 导致 Jurkat T 细胞 ICBP90 蛋白的表达显著降低, LY294002 与阿霉素联合用药可产生一定的协同效应。结论: LY294002 通过下调 Jurkat T 细胞 ICBP90 蛋白的表达, 抑制 Jurkat T 细胞增殖。

[关键词] 2-(4-吗啉基)-8-苯基-4-氢-1-苯并吡喃-4-酮 (LY294002); CCAAT 盒结合蛋白 (ICBP90); 增殖; 细胞周期; 急性 T 细胞白血病细胞 (Jurkat T 细胞)

[中图分类号] R392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)04-0361-06

Inhibitor LY294002 of PI3K/AKT signal pathway mediated by ICBP90 inhibits proliferation of Jurkat T cell

GUO Zhong-feng¹, XING Fei-yue¹, FANG Zhi-yuan¹, Christian Bronner²

(1. Institute of Tissue Transplantation and Immunology, College of Life Science and Technology,
Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Institute National de la Sante et de la Recherche Medicale, Universite Louis Pasteur, Strasbourg 67404, France)

[Abstract] **Aim:** To investigate the role of LY294002 which is the inhibitor of PI3K/Akt signal pathway in proliferation of Jurkat T and expression level of ICBP90. **Methods:** Jurkat T cells were used as a suitable model for this study. The positive control was Adriamycin and PD98059. Inverted microscope was used to observe the colony formation of Jurkat T cells. The proliferation of cells treated by LY294002, PD98059, Adriamycin, LY294002 combining with Adriamycin and PD98059 combining with Adriamycin, respectively, was checked by MTT method. The effect of these drugs on the cell cycle distribution of Jurkat T cells was analyzed by flow cytometry. Western blotting was used to determine the level of ICBP90 expression in Jurkat T cells treated by the drugs. **Results:** The proliferation of Jurkat T cells was inhibited by LY294002. LY294002 can make Jurkat T cell arrest at G₂/M phase. The expression of ICBP90 declined in the group added LY294002. LY294002 combining with Adriamycin exerted the syn-

[收稿日期] 2008-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30471635); 广东省自然科学基金资助项目(04010451, 5006033)

[作者简介] 郭中峰(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤免疫

通讯作者: 邢飞跃, 男, 教授, 博士生导师, Tel: 020-33010358; E-mail: tfyxing@jnu.edu.cn

ergetic role to some extent. **Conclusion:** LY294002 can down-regulate expression of ICBP90 and inhibit Jurkat T cell proliferation, indicating that ICBP90 might mediate LY294002 to inhibit Jurkat T cell proliferation.

[Key words] LY294002; ICBP90; proliferation; cell cycle; Jurkat T cell

磷脂酰肌醇3-激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶B (phosphatidylinositol 3 kinase /serine/threonine kinase, PI3K/AKT) 信号转导通路是细胞中广泛存在且参与细胞生长增殖、分化调节的信号转导途径。细胞在一系列内外因素作用下,通过启动 PI3K/AKT 信号转导通路,诱导细胞增殖、分化,避免细胞发生凋亡^[1]。topo II α 基因启动子上 CCAAT 盒结合蛋白(CCAAT binding protein, ICBP90)是 Christian Bronner 等发现的一种核蛋白,其 cDNA 含有 2 379 个碱基,编码 793 个氨基酸,分子质量为 89 758 u,基因位于染色体的 19p13.3^[2-3]。ICBP90 蛋白表达在人体正常细胞的周期中 G₁ 和 G₂/M 期处于高峰,而在一些肿瘤细胞的整个周期中 ICBP90 蛋白的表达都很高^[4]。PI3K/AKT 信号通路的特异抑制剂 LY294002 能够完全抑制 PI3K 的活性,对其他 ATP 依赖性激酶无抑制作用^[5]。PI3K/AKT 信号通路可以调控细胞周期的 G₁/S、G₂/M 检验点的调控,其选择性阻断剂 LY294002 可使有些细胞停在 G₁ 期,有些停在 G₂ 期^[6-7]。ICBP90 作为细胞周期中的一个重要蛋白,本研究主要探讨其在 LY294002 抑制细胞增殖中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter, NC 膜)购自 Amersham 公司;BioRad 酶标仪、BioRad Mini 垂直电泳仪和 BioRad 电转移装置购自 BioRad 公司;低速冷冻离心机(3-16K 型)购自 Sigma 公司;流式细胞仪(FACS Calibur)购自 Becton Dickinson 公司;倒置显微镜(COIC XSZ-D₂ 型)和凝胶成像分析仪(FluorChem8000)购自 Alpha Innotech 公司;RPMI164 粉剂、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(methylthiazoletrazolium, MTT)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)和 L-谷氨酰胺购自 Sigma 公司;PD98058 购自 CALBIOCHEM 公司;LY294002 与 β -actin 一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Cell signaling 公司。购自 Cell Signaling 公司;阿霉素(adriamycin);鼠抗人 ICBP90 一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗

由法国路易斯·巴斯德大学国家健康医学研究所 Christian Bronner 教授惠赠。

1.2 细胞分组与处理

Jurkat T 细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心,用体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基进行培养,隔日传代,当细胞处于对数生长期时,取细胞,离心计数,按 1×10^6 /mL 细胞的密度铺板,根据用药的不同分为 LY294002(浓度为 30 μ mol/L)组、LY294002(浓度为 15 μ mol/L) + 阿霉素(质量浓度为 500 μ g/L)组、PD98059(浓度为 30 μ mol/L)组、PD98059(浓度为 15 μ mol/L) + 阿霉素(质量浓度为 500 μ g/L)组、阿霉素 1(质量浓度为 1 000 μ g/L)组、阿霉素 2(质量浓度为 2 000 μ g/L)组和空白对照组,37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 孵箱培养 24 h。

1.3 细胞增殖及集落形态观察

取对数生长期 Jurkat T 细胞按 1×10^5 /孔的浓度接种于 96 孔板中,每孔 200 μ L 体积分数为 10% 胎牛血清的培养基,按文献[8]选择阿霉素质量浓度为 1 000 μ g/L 和 2 000 μ g/L 及浓度为 30 μ mol/L PD98059^[9]作为阳性对照,按如上细胞分组加药,每组设 3 个复孔,放 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 下培养,24 h 后在倒置显微镜下观察形态学变化,并对各组进行照相;加入 5 mg/mL 的 MTT 液,每孔 20 μ L,继续培养 4 h;3 000 r/min 离心 5 min,去掉上清,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,使结晶物溶解,酶标仪下 570 nm 检测各孔的吸光值。通过计算各用药组细胞的生长指数来确定各组用药对细胞的影响程度。细胞的生长指数 = 用药后的细胞浓度/未用药的细胞浓度。

1.4 细胞周期的检测

根据细胞增殖试验选择有效且细胞毒性较小的质量浓度为 1 000 μ g/L 阿霉素和浓度为 30 μ mol/L PD98059 作为阳性对照,取对数生长期细胞,按 4×10^5 /孔接种于 96 孔板中,再加适量的体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,使总体积 200 μ L,根据分组分别加药,每组设两个复孔,37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO₂ 下培养 48 h。48 h 后对细胞用 PBS 洗两遍,用体积分数为 70% 的酒精固定,在 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min,再加 RNase,37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,最后

加PI,避光染色15 min后在流式细胞仪上检测。用modfit软件分析各周期细胞的数目。

1.5 Western blotting 检测蛋白表达

取对数生长期的细胞,按 6×10^5 /孔的浓度接种于12孔板中,用体积分数为10%的胎牛血清培养基调整体积至600 μL ,根据分组分别加药,培养24 h,加细胞裂解液在冰上放置30 min裂解细胞,1 2000 r/min、20 min离心裂解完的细胞,提蛋白,进行定量确定上样量。将等量50 μg 蛋白和上样缓冲液混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min,冷却后加入各泳道。恒压电泳:浓缩胶60 V,分离胶100 V,约2 h。电泳结束后进行转膜,压膜顺序从下到上依次为海绵,3层滤纸,胶,NC膜,3层滤纸,海绵,350 mA转膜1.5 h,将转好的膜转移到质量分数为5%的脱脂奶粉中4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,第2天用TBS洗3遍,每遍5 min,加TBS稀释的一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,第2天用TBS洗膜3遍,每遍5 min,然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,

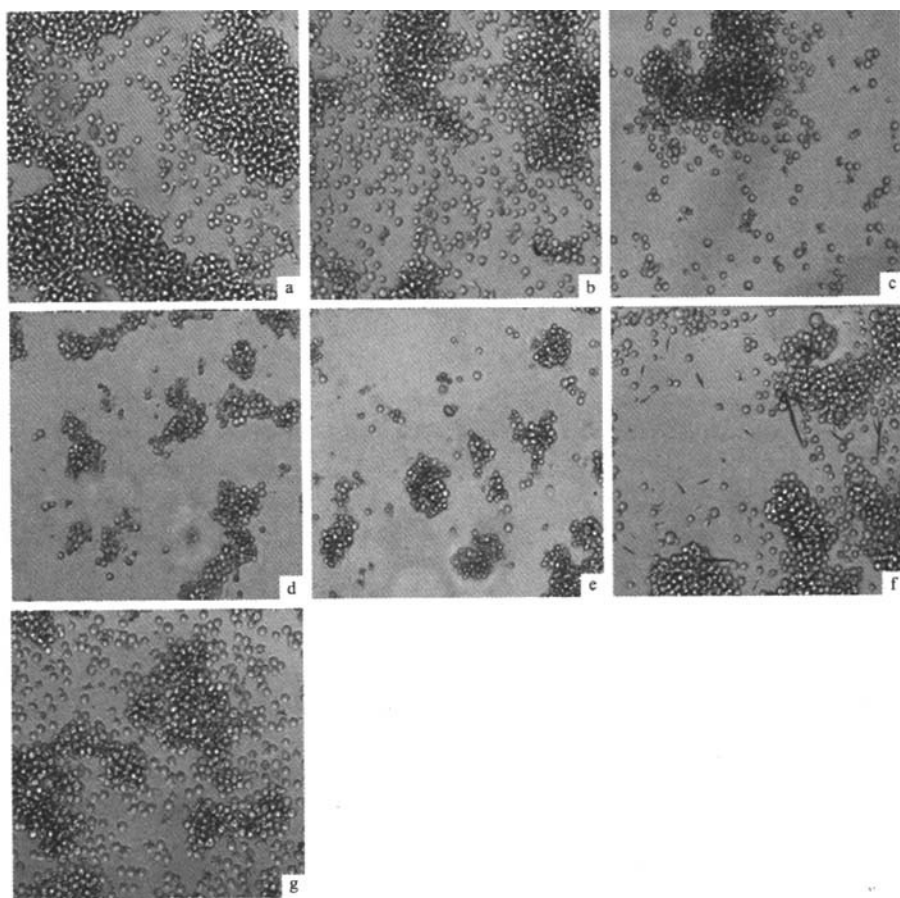
室温孵育1 h,TBS洗膜3遍,每遍5 min,加底物AB液,最后在暗室中曝光,显影2 min,定影5 min,观察实验结果。重复实验3次。对实验结果各组用药的蛋白相对表达量 = (实验组蛋白表达量/ β -actin蛋白表达量) $\times 100\%$ 。

1.6 统计学方法

数据以(平均值 \pm 标准差) ($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验分析, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

(1)LY294002对Jurkat T细胞集落形成的影响
阿霉素组、PD98059组及PD98059和阿霉素联合用药组对Jurkat T细胞的增殖与对照组相比有着不同的抑制作用,而LY294002组对Jurkat T细胞的增殖抑制效果比较明显,LY294002组与LY294002和阿霉素联合用药组作用后细胞形成的集落团块小,细胞数目也比其他各用药组少(图1)。



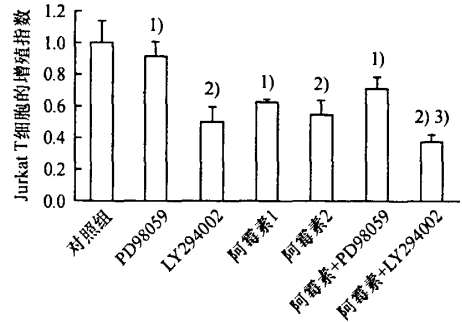
a:对照组; b:1 000 $\mu\text{g/L}$ 阿霉素; c:2 000 $\mu\text{g/L}$ 阿霉素; d:LY294002; e:阿霉素+LY294002; f:PD98059; g:阿霉素+PD98059

图1 LY294002对Jurkat T细胞集落形成的影响($\times 100$)

(2) LY294002 对 Jurkat T 细胞增殖的影响
用 MTT 法检测不同用药组对 Jurkat T 细胞增殖 24 h 的影响(图 2), LY294002 组与 LY294002 和阿霉素联合用药组对 Jurkat T 细胞的增殖抑制作用比较显著, 尽管 LY294002 和阿霉素联合用药组中各药用量仅仅是单独用量的一半, 但联合用药组(增殖指数为 0.377)反而比单独用药组(1 000 $\mu\text{g/L}$ Adriamycin 作用的细胞增殖指数为 0.626)的抑制效果更好($P < 0.01$), 同时联合用药组 Jurkat T 细胞的增殖指数 0.373 低于 2 000 $\mu\text{g/L}$ 阿霉素单独用药组细胞的增殖指数 0.550 和 LY294002 单独用药组细胞的增殖指数 0.500, 但没有统计学差异。

(3) LY294002 对 Jurkat 细胞周期的影响
与 Control 组相比各用药组均使 G_2/M 期的 Jurkat T 细胞不同程度增多(图 3), 但 LY294002 或 LY294002 和阿霉素联合用药组效果最为明显。LY29400 组或 LY294002 和阿霉素联合用药组与对照组相比,

在正常细胞中 G_1 期和 S 期的细胞百分比都明显减少, 而 G_2/M 期的却明显上升, LY294002 和阿霉素联合用药组与 LY294002 单独用药组相比 G_2/M 期细胞百分比含量有所提高, 但无统计学差异, 用 modfit 软件分析细胞周期图所得数据(表 1)。



1) 与对照组相比, $P < 0.05$; 2) 与对照组相比, $P < 0.01$; 3) 与阿霉素 1 组相比, $P < 0.01$

图2 LY294002 对 Jurkat T 细胞增殖的影响

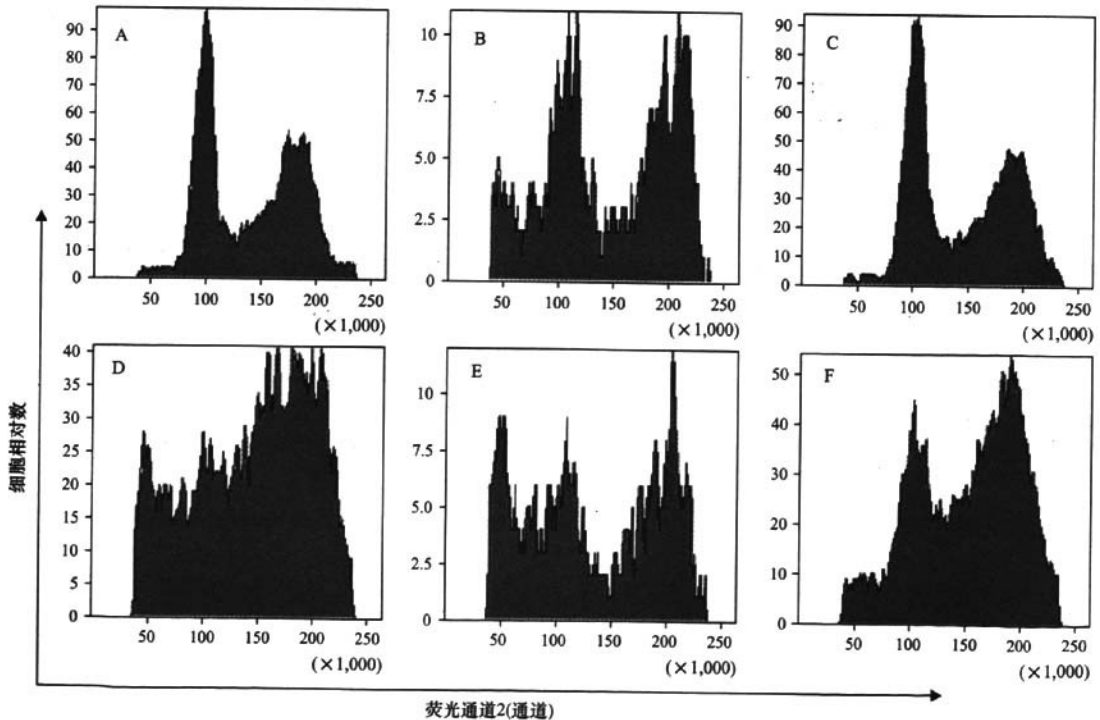


图3 LY294002 对 Jurkat T 细胞周期影响的流式图

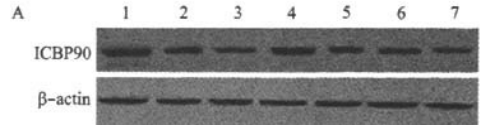
表1 LY294002对Jurkat T细胞周期($\bar{x} \pm s$)的影响

分组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	30.96 ± 2.04	61.60 ± 2.95	7.44 ± 3.10
LY294002	15.88 ± 1.04 ²⁾	45.80 ± 2.39 ²⁾	38.31 ± 3.42 ²⁾
PD98059	32.14 ± 1.32	52.34 ± 2.40 ¹⁾	15.52 ± 3.72 ¹⁾
阿霉素	7.60 ± 1.00 ²⁾	65.19 ± 2.06	27.88 ± 2.24 ²⁾
阿霉素+LY294002	9.87 ± 1.08 ²⁾	50.72 ± 2.86 ¹⁾	39.41 ± 3.93 ²⁾
阿霉素+PD98059	11.38 ± 0.52 ²⁾	68.14 ± 2.82 ¹⁾	20.48 ± 3.34 ²⁾

1)与对照组相比, $P < 0.05$; 2)与对照组相比, $P < 0.01$

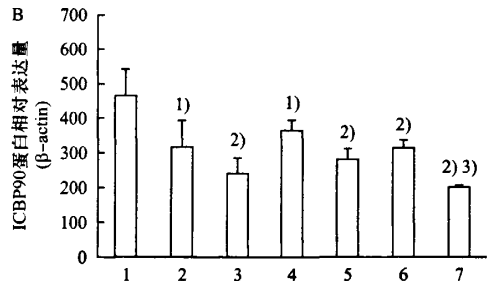
(4)LY294002对Jurkat T细胞中ICBP90蛋白表达的影响 各药品作用细胞24 h后,各用药组对细胞ICBP90蛋白表达的结果(图4A)为一次实验LY294002及其它药品对Jurkat T细胞中ICBP90蛋白表达的影响,多次实验进行半定量后的与 β -actin表达量的比值(图4B)。与对照组相比,LY294002组与LY294002和阿霉素联合用药组对Jurkat T细胞中ICBP90表达下调效果明显,LY294002和阿霉素联合用药组与LY294002单独用药组相比似更显著,但没有统计学差异;阿霉素组中的两个浓度可以发现浓度高的阿霉素2用药组要比阿霉素1用药组下调ICBP90蛋白明显,说明阿霉素在下调ICBP90

蛋白表达中有一定的剂量依赖关系;PD98059和阿霉素联合用药组与阿霉素单独用药组相比抑制效果明显($P < 0.05$),与PD98059单独用药组没有统计学差异。



A为一次实验ICBP90蛋白表达

1)与对照组相比, $P < 0.05$; 2)与对照组相比, $P < 0.01$;
3)与阿霉素1组相比, $P < 0.01$



1:对照组; 2:PD98059; 3:LY294002; 4:阿霉素1; 5:阿霉素2;
6:PD98059+阿霉素; 7:LY294002+阿霉素

B为多次实验进行半定量后的与 β -actin表达量的比值

图4 LY294002抑制Jurkat T细胞ICBP90蛋白表达

3 讨论

PI3K/AKT信号通路是参与细胞生长、增殖,分化调节的信号转导途径,具有抗凋亡作用^[1],该信号通路的异常是一些肿瘤发生的原因之一,其选择性阻断剂LY294002可以阻断PI3K信号通路,阻碍细胞的生长和增殖。PI3K信号通路选择性阻断剂LY294002作用的细胞,可使一些细胞停滞于G₁期^[6-7],如LY294002处理的C81,MT-2,HUT102细胞会在G₁期增多^[10],一些细胞停在G₂/M期如HEK293细胞^[11]。从Jurkat T细胞的集落形成和增殖指数的观察,我们发现LY294002单独用药组或LY294002和阿霉素联合用药对Jurkat T增殖的抑制作用最为明显;通过流式细胞仪检测各药物在Jurkat T细胞周期分布中的作用,LY294002单独用药组S期下降明显,G₂/M期各用药组都明显升高,LY294002单独用药组或LY294002和阿霉素联合用药组效果最为明显,说明使Jurkat T细胞停滞在了G₂/M期,G₀/G₁期除PD98059组似有增加但没有统计差异外,各组都有不同程度的下降;ICBP90

在正常细胞的周期中G₁期和G₂/M期表达较高,对G₁/S和G₂/M的转型起着一定作用,如果用p53/p21^{Cip1/WAF1}下调ICBP90蛋白的表达会使细胞停留在转型关键点的前一期^[8],ICBP90蛋白的高表达可以使细胞通过那些细胞周期检测点,因此在生长比较快的肿瘤细胞中ICBP90的表达要比正常细胞高出很多。为探讨ICBP90在PI3K信号通路中的作用,本实验用Western blotting方法检测出LY294002单独用药组与LY294002和阿霉素联合用药组与其它用药组相比可以明显降低Jurkat T细胞中ICBP90蛋白的表达,可见LY294002可能是通过下调ICBP90蛋白在Jurkat T细胞中的表达使细胞停在了G₂/M期。

LY294002和阿霉素联合用药组中各药的用量分别是500 μ g/L和15 μ mol/L,虽用量是各单独用药(低剂量组)的一半,对Jurkat T细胞的增殖抑制作用(增殖指数为0.377)却比1000 μ g/L阿霉素单独用药组(细胞增殖指数为0.626)更有效($P <$

0.01),与LY294002单独用药组(细胞的增殖指数0.500)相比抑制作用似有增强,但无统计学差异。综合以上分析认为LY294002和阿霉素联合用药存在一定的协同作用。

有文献报道Akt能通过磷酸化P53结合蛋白MDM2影响P53的活性,磷酸化的MDM2转位到细胞核与P53结合,通过增加P53蛋白的降解而影响细胞存活^[12],PI3K/AKT信号通路选择性阻断剂LY294002可以使P53、P21活化。P53和P21可以下调ICBP90蛋白的表达^[8],从而使细胞的生长周期发生停止,因此LY294002可能是通过P53、P21下调ICBP90的表达,从而抑制Jurkat T细胞的增殖,为防止细胞的过度增殖,探索肿瘤的发生与防治提供一个新线索。

[参考文献]

- [1] 夏 曙,于世英. 抑制PI3K/AKT提高药物对Hela细胞放射增敏作用的研究[J]. 中华放射肿瘤学, 2006, 15(5): 419-422.
- [2] HOPFNER R, MOUSLI M, JELTSCH J M, et al. ICBP90, a novel human CCAAT binding protein, involved in the regulation of topoisomerase II expression[J]. Cancer Res, 2000, 60(1): 121-128.
- [3] HOPFNER R, MOUSLI M, JELTSCH J M, et al. Genomic structure and chromosomal mapping of the gene coding for ICBP90, a protein involved in the regulation of topoisomerase IIa gene expression[J]. Gene, 2001, 266(1-2): 15-23.
- [4] MOUSLI M, HOPFNER R, ABBADY A Q, et al. ICBP90 belongs to a new family of proteins with an expression that is deregulated in cancer cells[J]. Br J Cancer, 2003, 89(1): 120-127.
- [5] VLAHOS C J, MATTER W F, HUI K, et al. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)[J]. J Biol Chem, 1994, 269(7): 5241-5248.
- [6] CASAGRANDE F, BACQUEVILLE D, PILLAIRES M J, et al. G₁ phase arrest by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 is correlated to up-regulation of p27Kip1 and inhibition of G₁ CDKs in choroidal melanoma cells[J]. FEBS Lett, 1998, 422(3): 385-390.
- [7] LE X F, VADLAMUDI R, MCWATTERS A, et al. Differential signaling by an anti-p185(HER2) antibody and heregulin[J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3522-3531.
- [8] YOSHIMI A, TORU H, CHRISTIAN B, et al. Down-regulation of nuclear protein ICBP90 by p53/p21Cip1/WAF1-dependent DNA-damage checkpoint signals contributes to cell cycle arrest at G₁/S transition[J]. Genes Cells, 2004, 9(2): 131-142.
- [9] XING F, LIU J, MO Y, et al. Lysophosphatidylcholine up-regulates human endothelial nitric oxide synthase gene transactivity by c-Jun N-terminal kinase signaling pathway. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2008, Jun 20 [编号: 18624763].
- [10] SOO-JIN J, ARINDAM D, KYUNG-JIN J, et al. PI3K/AKT inhibition induces caspase-dependent apoptosis in HTLV-1-transformed cells[J]. Virology, 2008, 370(2): 264-272.
- [11] EUGENE S, KANDEL, JENNIFER SKEEN, et al. Activation of Akt/Protein Kinase B Overcomes a G₂/M Cell Cycle Checkpoint Induced by DNA Damage[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(10): 7831-7841.
- [12] 孙晓杰,黄常志. PI3K-Akt信号通路与肿瘤[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(3): 306-311.

[责任编辑:朱颖娜]