

## 自噬抑制剂 3-MA 联合 PI3K/mTOR 双重抑制剂 NVP-BEZ235 促进宫颈癌细胞凋亡的实验研究

郭苏阳, 杨波, 刘红丽, 邵均均, 张庆松

(蚌埠医学院第一附属医院肿瘤妇科, 安徽 蚌埠 233003)

**摘要:**目的 分析 PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 与自噬抑制剂 3-MA 对人宫颈癌 Si Ha 细胞凋亡的协同作用。方法 将人宫颈癌 Si Ha 细胞分别采用 PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235、自噬抑制剂 3-MA、NVP-BEZ235 联合 3-MA 进行处理, 比较细胞的生存水平、凋亡水平、相关凋亡蛋白的表达水平。结果 人宫颈癌 Si Ha 细胞经不同浓度的 NVP-BEZ235 处理 1 d 后, 细胞增殖率下降, 而细胞凋亡率升高, 且呈现剂量依赖性。Western blot 结果显示 NVP-BEZ235 处理呈剂量依赖性地下调 Bcl-2 表达, 同时上调了 Bax 表达。与对照组相比, 3-MA 单独处理对细胞的增殖, 凋亡及凋亡蛋白表达无显著影响。与 NVP-BEZ235 组相比, 3-MA 联合 NVP-BEZ235 处理导致细胞增殖率下降, 细胞凋亡率提高, Bcl-2 表达降低, 而 Bax 表达升高。结论 3-MA 联合 NVP-BEZ235 可进一步抑制细胞增殖, 促进宫颈癌细胞凋亡。本研究为宫颈癌的治疗提供一种潜在的联合治疗方案。

**关键词:** 自噬; PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235; 3-MA; 凋亡; 宫颈肿瘤

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1001-5817(2019)06-0614-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2019.06.004

### Experimental study of autophagy inhibitor 3-MA combined with PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 promote apoptosis of cervical cancer cells

Guo Suyang, Yang Bo, Liu Hongli, Shao Junjun, Zhang Qingsong

(Department of Oncologic Gynecology, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233003, Anhui, China)

**Abstract:** **Objective** To analyze the synergistic effect of PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 and autophagy inhibitor 3-MA on the apoptosis of human cervical cancer Si Ha cells. **Methods** Human cervical cancer Si Ha cells were treated with PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235, autophagy inhibitor 3-MA, and NVP-BEZ235 combined with 3-MA, respectively. The cell survival level, cell apoptosis level and expressions of related apoptotic proteins were compared. **Results** Human cervical cancer Si Ha cells were treated with different concentrations of NVP-BEZ235 for 1 day, the cell proliferation rate decreased, while the cell apoptosis rate increased in a dose-dependent manner. Western blot results showed that NVP-BEZ235 treatment decreased the expression of Bcl-2 and up-regulated the expression of Bax in a dose-dependent manner. Compared with the control group, 3-MA treatment alone had no significant effect on cell proliferation, apoptosis and apoptotic protein expression. Compared with NVP-BEZ235 group, 3-MA combined with NVP-BEZ235 treatment resulted in decreased cell proliferation rate, increased cell apoptosis rate, decreased Bcl-2 expression and increased Bax expression. **Conclusion** 3-MA combined with NVP-BEZ235 can further inhibit cell proliferation and promote

基金项目: 蚌埠医学院科技发展基金项目(BYKF1767)

第一作者简介: 郭苏阳(1980-), 女, 硕士, 副主任医师、讲师, 研究方向: 宫颈癌, E-mail: xingfu666999@sina.com

apoptosis of cervical cancer cells. This study provides a potential combination therapy for the treatment of cervical cancer.

**Key words:** autophagy; PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235; 3-MA; apoptosis; uterine cervical neoplasms

临床中严重威胁女性生命健康的恶性肿瘤包括宫颈癌,近年来,其发病趋势较为年轻化,自噬 (autophagy) 属于普遍存在于真核细胞内,由特定基因调节的进化上保守的溶酶体依赖性降解方式<sup>[1-2]</sup>。核心负调控因子 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 属于非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,该激酶所在信号通路可有效调节多项细胞功能<sup>[3-4]</sup>。且该功能与肿瘤的产生具有密切关联,PI3K/Akt/mTOR 信号通路属于 mTOR 重要的上游信号通路,本文旨在研究 NVP-BEZ235 对诱发宫颈癌 Si Ha 细胞株死亡,抑制自噬进而提升 NVP-BEZ235 效果方面的影响进行研究,以此为宫颈癌的治疗方式方法上建立一个新的指路标。

## 1 资料与方法

1.1 实验试剂及材料来源 ①本项研究由美国 Sigma 公司购进自噬抑制剂 3-MA 试剂盒,PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 于 LC Laboratories 公司购买,噻唑蓝 MTT、DAPI 染液、Annexin V/PI 双染凋亡试剂盒、鼠抗人  $\beta$ -actin 单抗均从 Santa Cruz 公司购买,从 SC 公司购买兔抗人 bcl-2、bax 多抗,本研究使用的 ECL 显色液,由国外的 Thermo Scientific 公司提供。②细胞株。本研究所用的人宫颈癌 Si Ha 细胞系均为由北京协和医院细胞资源中心提供的贴壁细胞。在实验室内进行传代保存,培养环境为培养箱,培养条件为 37℃、5% 浓度 CO<sub>2</sub>。研究细胞选取处于生长期至对数生长期进行实验。

### 1.2 方法

1.2.1 分组 将细胞系进行分组,共分为常规组、3-MA 组、NVP-BEZ235 组、NVP-BEZ235+3-MA 组。

1.2.2 检测方法 ①MTT 法检测细胞的增殖率<sup>[5]</sup>。将生长状态相对较好的对数期人宫颈癌 Si Ha 细胞,按照每 96 孔板中放置 Si Ha 细胞,各孔的细胞数量为 8000 个,添加后静置 1 d,待细胞完全贴壁后,更换培养液,按一定梯度更改培养液的浓度和药物,每孔添加含量为 200  $\mu$ l,持续 1 d 后,按 20  $\mu$ l 的剂量向每孔中添加噻唑蓝 MTT,保证每毫升 5  $\mu$ l,重新放入孵箱中,进行 5 h 的连续培育,运用波长为 490 nm 的酶标仪,对各个孔处的吸光水平进行检测,并依据检测获得的资料对细胞的存活水平进行统计。②运用流式细胞仪手段,对细胞的凋亡水平进行检测<sup>[6]</sup>。将发育状况较好的对数期人宫颈癌 Si Ha 细胞,各个孔内均含有 5

$\times 10^5$  个细胞,在 6 个孔板内,展开细胞的孵育工作,时间为 1 d,当细胞贴壁后,将各浓度药物的培养液进行替换,持续 1 d 后,对贴壁细胞采用胰酶进行处理,获取细胞并添加合适的 Annexin V/PI 试液,静置于室温中,躲避光源,培养 15 min 左右;通过细胞仪来测试细胞的死亡率,为了避免实验偶然性,每组均重复操作 3 次以上。③Western blotting 检测<sup>[4]</sup> 凋亡蛋白表达水平。从处于对数生长期并且生长状况良好的人宫颈癌 Si Ha 细胞中选取适量细胞,以  $5 \times 10^5$  每孔的间距,置入 75 ml 细胞培养皿中,静置 24 h 放入细胞培养箱中,等待细胞贴壁之后,更换成其他药物浓度的培养液,获取贴壁及悬浮细胞,离心之后,置于 PBS 溶液中冲洗,重复 2 次以上,将 RAPI 裂解液加入到 PBS 溶液内,并将其中细胞蛋白提炼出来,运用 SDS-PAGE 胶展开电泳操作,电压为 110 V,时间为 130 min,在 PVDF 膜上电移植上蛋白,然后采用浓度为 5% 的脱脂牛奶,对溶液进行密封处理,在室温环境下放置 2~3 h,继续添加浓度适宜的一抗,在 5℃ 温度下孵育过夜,置于 PBST 溶液中重复清洗 3 次,分别在 15 min、5 min、5 min 后,置入对应的辣根过氧化物酶标记的二抗,滞留 2 h 后,使用 PBST 清洗 3 次,然后通过 ECL 显色。④形态学观察细胞凋亡。将发育状况较好的对数期人宫颈癌 Si Ha 细胞,将选取细胞按照 8000 个/孔密度在 96 孔板上进行接种,静置 24 h,观察细胞贴壁情况并在细胞全部贴壁时更换培养液,按照每孔 200  $\mu$ l 剂量添加,24 h 之后,使用胰酶处理贴壁细胞,获得细胞,使用胰酶消化贴壁细胞,加入一定量的 DAPI 或 Annexin V-FITC 和 PI 染液进行染色,并且使用荧光显微镜,对比常规组,检验不同药物浓度处理细胞和细胞死亡之间的联系。

1.3 统计学方法 本研究选用 SPSS 20.0 统计分析软件分析数据。计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,检验方式为 *t* 检验,以  $P < 0.05$ ,差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同 NVP-BEZ235 浓度对 Si Ha 细胞增殖率的影响 采用不同 NVP-BEZ235 浓度处理 Si Ha 细胞 24 h。结果显示,NVP-BEZ235 可显著降低 Si Ha 细胞增殖率。而且,细胞增殖率随浓度增加而不断降低。结果表明,NVP-BEZ235 可剂量依赖性地抑制 Si Ha 细胞增殖。见表 1。

表1 不同NVP-BEZ235浓度对Si Ha细胞增殖率的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

浓度(nM)	n	增殖率
0	3	92.1±0.13
50	3	81.3±0.11 <sup>a</sup>
100	3	68.3±0.22 <sup>a</sup>
200	3	56.3±0.21 <sup>a</sup>

注:与0 nM组比较,a:  $P < 0.05$

2.2 不同NVP-BEZ235浓度对Si Ha细胞凋亡率的影响 采用不同NVP-BEZ235浓度处理Si Ha细胞24 h。结果显示,NVP-BEZ235可显著提高Si Ha细胞凋亡率。而且,细胞凋亡率随浓度增加而增加。结果表明,NVP-BEZ235可剂量依赖性地促进Si Ha细胞凋亡。见表2。

表2 不同NVP-BEZ235浓度对Si Ha细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

浓度(nM)	n	凋亡率
0	3	54.3±0.03
50	3	61.3±0.11 <sup>a</sup>
100	3	88.3±0.25 <sup>a</sup>
200	3	96.3±0.33 <sup>a</sup>

注:与0 nM组比较,a:  $P < 0.05$

2.3 不同NVP-BEZ235浓度对Si Ha细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的影响 采用Western blot方法检测凋亡相关蛋白Bcl-2及Bax的蛋白表达水平。结果显示,NVP-BEZ235可显著抑制Bcl-2蛋白的表达而促进Bax蛋白的表达,且随着浓度增加,诱导效应加强。见表3。

表3 不同NVP-BEZ235浓度下Si Ha细胞Bcl-2、Bax蛋白的水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

浓度(nM)	n	Bcl-2	Bax
0	3	1.25±0.05	0.89±0.07
50	3	1.12±0.04 <sup>a</sup>	1.27±0.11 <sup>a</sup>
100	3	1.08±0.03 <sup>a</sup>	1.66±0.13 <sup>a</sup>
200	3	0.61±0.02 <sup>a</sup>	1.97±0.14 <sup>a</sup>

注:与0 nM组比较,a:  $P < 0.05$

2.4 3-MA联合NVP-BEZ235处理对Si Ha细胞增殖率的影响 与对照组相比,3-MA对Si Ha细胞的增殖率无显著影响。与NVP-BEZ235组相比,3-MA联合NVP-BEZ235处理组的细胞增殖率显著下降。结果表明,3-MA促进了NVP-BEZ235诱导的细胞增殖率下降。见表4。

表4 3-MA联合NVP-BEZ235对Si Ha细胞的增殖率影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	增殖率
对照组	3	91.8±0.52
3-MA组	3	91.3±0.33
NVP-BEZ235组	3	89.7±0.49 <sup>a</sup>
3-MA+NVP-BEZ235组	3	72.3±0.69 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,a:  $P < 0.05$ ;与NVP-BEZ235组比较,b:  $P < 0.05$

2.5 3-MA联合NVP-BEZ235处理对Si Ha细胞凋亡率的影响 与对照组相比,3-MA对Si Ha细胞的凋亡率无显著影响。与NVP-BEZ235组相比,3-MA联合NVP-BEZ235处理组的细胞凋亡率显著升高。结果表明,3-MA联合NVP-BEZ235更进一步促进细胞的凋亡。见表5。

表5 3-MA联合NVP-BEZ235处理对Si Ha细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )

组别	n	凋亡率
对照组	3	2.1±0.01
3-MA组	3	2.3±0.12
NVP-BEZ235组	3	7.3±0.11 <sup>a</sup>
3-MA+NVP-BEZ235组	3	12.1±0.07 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,a:  $P < 0.05$ ;与NVP-BEZ235组比较,b:  $P < 0.05$

2.6 3-MA联合NVP-BEZ235处理对Si Ha细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与对照组相比,3-MA对凋亡相关蛋白Bcl-2及Bax的表达无显著影响。与NVP-BEZ235组相比,3-MA联合NVP-BEZ235处理组Bcl-2表达显著降低( $P < 0.05$ ),而Bax表达显著提高( $P < 0.05$ )。见表6。

表6 3-MA联合NVP-BEZ235处理对Si Ha细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	Bcl-2	Bax
对照组	3	1.25±0.05	0.89±0.07
3-MA组	3	1.19±0.04	0.91±0.08
NVP-BEZ235组	3	0.62±0.03 <sup>a</sup>	1.66±0.13 <sup>a</sup>
3-MA+NVP-BEZ235组	3	0.53±0.02 <sup>b</sup>	1.97±0.14 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,a:  $P < 0.05$ ;与NVP-BEZ235组比较,b:  $P < 0.05$

### 3 讨论

3.1 疾病现状 目前,宫颈癌的发病率和死亡率在稳步上升,已成为世界上最常见的恶性肿瘤之一。随着

人们生活方式和饮食习惯的改变,其发病率在中国恶性肿瘤中排名第三,而且这一趋势按一定幅度逐年增长,对我国国民的生命健康造成严重影响,并且不利于我国整体健康水平的提升,该疾病在一定程度上增加我国的医疗负担。PI3K/Akt 是主要的信号通路,在包括宫颈癌在内的许多癌症中都发挥着重要作用。靶向 PI3K/Akt/mTOR 已在宫颈癌中进行了广泛研究。该通路还与细胞对药物的化学治疗耐受性有关。NVP-BEZ235 是一种有希望的新型 PI3K/mTOR 抑制剂,可强烈抑制 PI3K 和 mTOR 活性。最近的研究表明<sup>[7]</sup>,NVP-BEZ235 对 PI3K3CA 突变以及未突变宫颈癌均有效。因此,NVP-BEZ235 已迅速成为治疗宫颈癌的有前途的药物。

**3.2 不同 NVP-BEZ235 PI3K/mTOR 抑制剂浓度对细胞凋亡率影响** 在本次研究中,NVP-BEZ235 按照 0、50、100、200 nM 浓度对细胞进行干预,持续 1 d 后,相比于常规组,数据显示出随药物浓度增加,细胞凋亡率出现相应增加,该结果证实细胞凋亡与药物浓度间存在依赖性。5 nM 的 3-MA+100 nM NVP-BEZ235 组的细胞处理 1 d 后,3-MA 组细胞未发生生存率明显上升的情况,3-MA+NVP-BEZ235 组的细胞生存率显著降低,该组远低于单加 NVP-BEZ235 组的细胞生存率,证实 PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 以剂量依赖的方式有效地抑制人宫颈癌细胞的增殖,并诱导细胞发生凋亡。而 3-MA 可进一步促进 NVP-BEZ235 诱导细胞增殖率下降以及凋亡率升高。

**3.3 3-MA 与 PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 联用对自噬及细胞凋亡的作用** 据报道<sup>[8]</sup>,PI3K/Akt/mTOR 通路在癌症细胞中可对诱导自噬发生过程产生显著抑制作用。有研究表明<sup>[9]</sup>,mTOR 通过下游基因 ULK 磷酸化对自噬产生调控作用。证实 mTOR 可有效抑制诱导自噬发生的过程。现有文献发现<sup>[10]</sup>,PI3K/Akt/mTOR 通路诱导发生的自噬对细胞死亡存在一定影响。据报道,自噬在药物耐受中可具有一定保护效果,表明自噬可在一定程度上发挥保护宫颈癌的作用。通过以上的叙述可知,对细胞的自噬进行阻抑,能够加强癌症细胞内 PI3K/mTOR 抑制剂的衰亡速率,效果十分理想。分析本研究资料可知,分别 3-MA 以及 3-MA+PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 处理的两组 24 h 后结果与常规组作比较,3-MA 组凋亡相关蛋白的表达呈明显变化趋势;对比单加 NVP-BEZ235 组,3-MA 联合 NVP-BEZ235 处理组明显下调 Bcl-2 表达,上调 Bax 表达,证实将自噬反应抑制剂 3-MA 与 PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235

联用,能够增加细胞的毒性,进而诱导人宫颈癌 Si Ha 细胞凋亡。

总之,PI3K/mTOR 抑制剂 NVP-BEZ235 在诱导人宫颈癌 Si Ha 细胞凋亡周期缩减方面具有显著效果,但在一定程度上其诱导的自噬,从而对癌症细胞产生保护作用。NVP-BEZ235 对人宫颈癌 Si Ha 细胞具有一定杀伤作用,使用自噬抑制剂 3-MA 可加强杀伤效果,从而提升人宫颈癌 Si Ha 细胞对 NVP-BEZ235 的敏感性。自噬抑制剂 3-MA 联合 NVP-BEZ235 PI3K/mTOR 抑制剂治疗在提升宫颈癌疗效方面具有较高可行性及有效性,应进一步挖掘其临床应用价值。本研究为宫颈癌的治疗提供一种潜在的联合治疗方案。

#### 参考文献:

- [1] 尚颖.自噬抑制剂 3-MA 增强顺铂对神经母细胞瘤化疗效果及其分子机制的研究[D].石家庄:河北医科大学,2017.
- [2] 郑雪兰.NVP-BEZ235 联合自噬抑制剂对人胃癌 AGS 细胞增殖、凋亡的影响[D].福州:福建医科大学,2017.
- [3] 陈梦月.子宫内膜 Dnm3a 条件性敲除对围产床期早孕小鼠子宫内膜功能的影响[D].重庆:重庆医科大学,2018.
- [4] Shin Daiha, Kim Eun Hye, Lee Jaewang, et al. RITA plus 3-MA overcomes chemoresistance of head and neck cancer cells via dual inhibition of autophagy and antioxidant systems[J]. Redox biology, 2017, 13: 219-227.
- [5] Bao Jinfang, Shi Yingfeng, Tao Min, et al. Pharmacological inhibition of autophagy by 3-MA attenuates hyperuricemic nephropathy[J]. Clinical science(London, England; 1979), 2018, 132(21): 2299-2322.
- [6] Dong Y, Wu Y, Zhao GL, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA promotes hypoxia-induced apoptosis in human colorectal cancer cells[J]. European review for medical and pharmacological sciences, 2019, 23(3): 1047-1054.
- [7] Jichen Li, Dezhao Yang, Wei Wang, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances IL-24-induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2015, 34: 97.
- [8] Yichao Jin, Jin Lei, Yingying Lin, et al. Autophagy inhibitor 3-MA weakens neuroprotective effects of post-traumatic brain injury moderate hypothermia[J]. World Neurosurgery, 2015, 88: 433-446.
- [9] 陈旭,徐松,黄丹,等.雷帕霉素对人角质形成细胞系 HaCaT 细胞自噬诱导效应及其分子机制的初步研究[J].临床皮肤科杂志,2014,43(5):267-271.
- [10] 冯楠楠,王冰洁,朱启航,等.玉米赤霉烯酮通过 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导大鼠睾丸支持细胞自噬及对细胞周期分布的影响[J].南京农业大学学报,2018,41(4): 708-714.

收稿日期:2019-09-23;修回日期:2019-10-21