

· 基础研究 ·

乳香通过 PTEN/Akt/COX-2 通路诱导胃癌细胞 SGC7901 凋亡

孙梦雪, 何晓璞, 黄佩云, 刘高双, 吴胜男, 孙为豪*

(南京医科大学第一附属医院老年消化内科, 南京 210029)

【摘要】目的 研究乳香对人胃癌细胞 SGC7901 增殖、凋亡和迁移的影响及其可能的作用机制。**方法** 不同浓度乳香处理 SGC7901 细胞不同时间, 噻唑兰比色法检测乳香对 SGC7901 细胞增殖的影响, 流式细胞术分析乳香对 SGC7901 细胞凋亡的影响, 蛋白质印迹法 (Western blotting) 分析乳香对 SGC7901 细胞中同源磷酸张蛋白 (PTEN)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt)、蛋白激酶 B (PKB, 亦称 Akt) 和环氧化酶 2 (COX-2) 蛋白表达影响, 划痕实验检测细胞迁移能力, 裸鼠移植瘤实验验证乳香在裸鼠体内抑制肿瘤的效果。采用 Graphpad Prism 6.0 统计软件对数据进行分析。**结果** 乳香能够抑制 SGC7901 细胞的增殖和迁移能力, 呈现剂量依赖和时间依赖性。乳香诱导 SGC7901 细胞的凋亡, 呈现剂量依赖性。乳香能够诱导 SGC7901 细胞中 PTEN 的表达, 抑制 p-Akt 和 COX-2 的蛋白表达。此外, 乳香能够抑制裸鼠体内胃癌移植瘤的生长。**结论** 乳香可以抑制胃癌细胞 SGC7901 的增殖和迁移, 诱导细胞凋亡, 这可能与 PTEN/Akt/COX-2 信号通路相关。

【关键词】 胃肿瘤; 乳香; 增殖; 细胞凋亡; 同源磷酸张蛋白; 蛋白激酶 B; 环氧化酶 2

【中图分类号】 R573 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.11915/j.issn.1671-5403.2021.01.011

Frankincense induces apoptosis of gastric cancer SGC7901 cells through PTEN/Akt/COX-2 signaling pathway

SUN Meng-Xue, HE Xiao-Pu, HUANG Pei-Yun, LIU Gao-Shuang, WU Sheng-Nan, SUN Wei-Hao*

(Department of Geriatric Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of frankincense on the proliferation, apoptosis and migration of human gastric cancer SGC7901 cells and the possible mechanisms. **Methods** After the SGC7901 cells were treated with frankincense at different doses for different time periods, the proliferation of the cells was determined by MTT assay. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of the cells treated by 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 or 8.0 mg/ml frankincense for 24 h. Western blotting was employed to detect the expression of phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (PTEN), phosphatase Akt (p-Akt), protein kinase B (PKB, also named Akt), and cyclooxygenase-2 (COX-2) in the cells after frankincense treatment (0, 2 and 4 mg/ml) for 24 h. Wound-healing test was performed to assess the effect of frankincense on the migration of SGC7901 cells. A xenograft nude mice model of human gastric cancer was established to evaluate the anti-cancer effect of frankincense *in vivo*. Graphpad Prism 6.0 software was used to perform data analysis. **Results** Frankincense significantly inhibited the proliferation and migration of SGC7901 cells in a dose- and time-dependent manner. It also induced the apoptosis of the cells dose-dependently. Frankincense treatment resulted in the up-regulation of PTEN and down-regulation of p-Akt and COX-2 at a protein level. It could also inhibit the tumor growth in the xenograft nude mice model of human gastric cancer. **Conclusion** Frankincense may inhibit the proliferation and migration and promote the apoptosis of SGC7901 cells through the PTEN/Akt/COX-2 signaling pathway.

【Key words】 stomach neoplasms; frankincense; proliferation; apoptosis; phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten; protein kinase B; cyclooxygenase-2

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81372695) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province [BK20171508(DA17)].

Corresponding author: SUN Wei-Hao, E-mail: weihs_1@163.com

胃癌是全球范围内最常见的消化系统肿瘤之一。目前胃癌的主要治疗方法包括手术、放疗和化疗, 但是预后均较差^[1]。因此, 继续寻找有效的天然抗肿瘤药物并探究其作用机制具有重要意义。乳

收稿日期: 2020-02-06; 接受日期: 2020-04-20

基金项目: 国家自然科学基金 (81372695); 江苏省自然科学基金 [BK20171508(DA17)]

通信作者: 孙为豪, E-mail: weihs_1@163.com

香是乳香树或同属植物树皮渗出树脂的活性成分。现已证实,乳香中分离纯化的乳香酸在肝癌、前列腺癌、结肠癌和恶性胶质瘤等肿瘤中具有抗癌功效^[2]。胃癌被认为是与幽门螺旋杆菌感染相关的炎症性疾病,之前研究表明,乳香可以通过其抗炎机制抑制幽门螺旋杆菌感染,诱导胃癌细胞凋亡,从而阻止胃癌的进展^[3]。

环氧化酶 2(cyclooxygenase-2, COX-2) 是肿瘤预防和治疗的靶点。COX-2 参与胃癌发生发展的相关过程,如血管生成、侵袭和免疫逃避等^[4]。COX-2 受多种因素和信号通路的调控,在所有的上游调控因子中,PI3K/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB, 亦称 Akt) 通路的激活对 COX-2 的调控非常重要^[5-7]。同源性磷酸酶张力蛋白(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN) 是第一个被发现的具有磷酸化酶功能的抑癌基因,在许多肿瘤组织中都存在 PTEN 缺乏^[8]。PTEN 拮抗 Akt 信号通路,当 PTEN 基因突变或丢失时, Akt 信号通路被激活,导致细胞无限增殖形成肿瘤。

本研究以 COX-2 高表达的人胃癌细胞株 SGC7901 为研究对象,旨在确定乳香是否能通过 PTEN/Akt 途径下调胃癌细胞 COX-2 的表达,从而阻止胃癌的发生和发展。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂及仪器

胃癌细胞 SGC7901(中国科学院上海细胞生物学研究所,上海);乳香(南京大学分子医学重点实验室,南京),配制过程详见文献^[9]描述;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青/链霉素[以色列 Biological Industries(BioInd)公司,以色列];二甲基亚砜、噻唑兰(MTT)、凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,上海);PTEN、p-Akt、Akt、COX-2、GAPDH 抗体(Abcam 公司,英国);裸鼠(南京青龙山动物场,南京);CO₂ 细胞培养箱(Heraeus 公司,德国);流式细胞仪(Becton Dickinson 公司,美国);蛋白免疫印迹系统(Bio-rad 公司,美国)。

1.2 建立人胃癌裸鼠移植瘤模型

所有实验动物的使用均符合南京医科大学动物保护与使用委员会制定的规程。

12 只无胸腺裸鼠:雄性,5 周龄,体质量 18~22 g,无特定病原体级。在(24±2)℃、湿度 60%~80%和照明 12 h 光/暗循环条件下饲养,提供标准的裸鼠饲料及蒸馏水,7 d 后开始实验。调整 SGC7901 细胞浓度为 1×10⁷ 个/ml,每只裸鼠的右侧腋窝皮下接

种 0.2 ml。在胃癌细胞植入 7 d 后(肿瘤体积达到 0.1 cm×0.1 cm×0.1 cm),将所有裸鼠随机分成 2 组,每组 6 只。实验组裸鼠灌胃乳香 80 mg/(kg·d),连续灌胃 14 d。对照组裸鼠每日用等体积的生理盐水灌胃。每隔 2 d 记录裸鼠的体质量,测量肿瘤体积(0.5×最短直径²×最长直径)。

1.3 细胞培养与细胞传代

复苏胃癌 SGC7901 细胞后,用含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 RPMI-1640 培养基常规培养。细胞贴壁生长融合至 70%~80% 时,用胰酶消化及传代,接种于新培养皿中继续培养。

1.4 MTT 检测乳香对细胞增殖的影响

调整 SGC7901 细胞浓度为 4×10⁴ 个/ml 接种于 96 孔板,每孔 100 μl。不同浓度的乳香 0.0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 mg/ml 分别处理细胞 12、24 和 48 h,以只含培养基无细胞为空白对照组。检测时每个孔中加入 200 μl MTT(0.5 mg/ml),4 h 后加入 200 μl 二甲基亚砜避光 15~20 min。酶标仪检测 570 nm 波长处各孔的吸光度值(A_{570nm})。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

调整细胞悬液浓度为 1×10⁵/ml 接种于 6 孔板中,每孔 2 ml。用不同浓度的乳香(0.0、0.5、1.0、2.0、4.0 和 8.0 mg/ml)处理细胞 24 h。用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化后收集细胞,预冷磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)漂洗细胞 2 次,1 ml 的结合缓冲液将细胞重悬,加入 10 μl 的 Annexin V 异硫氰酸荧光素和 10 μl 碘化丙啶(propidium iodide, PI),避光孵育 20 min,1 h 内完成检测。

1.6 Western blotting 检测细胞中相关蛋白的表达

用不同浓度的乳香(0.0、2.0、4.0 mg/ml)处理 SGC7901 细胞 24 h 后收集细胞。加入裂解液冰上裂解 30 min。4℃,14000 转/min 离心 30 min 后收上清液。BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳后将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜,室温下 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,4℃一抗孵育过夜。抗体:PTEN(1:10000),p-Akt(1:1000),Akt(1:1000),COX-2(1:2000)和 GAPDH(1:10000)。4℃二抗孵育 2 h,ECL 发光试剂盒显影。

1.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

在 6 孔板底外用记号笔画 3 条间隔为 0.5 cm 的水平直线,将浓度为 4×10⁵/ml 的细胞悬液接种于 6 孔板中,每孔 2 ml,常规培养至 90% 融合状态。用 10 μl 微量移液器枪尖在细胞板上划垂直于水平线的划痕。PBS 清洗 2 次后,在每个孔中加入浓度为 0.0、2.0、4.0 mg/ml 的乳香培养 48 h。于划痕后

0、24、48 h 用显微镜(原始放大倍数 100 倍)拍摄相同部位的图像。

1.8 统计学处理

采用 GraphPad Prism 6.0 统计软件进行数据分析,所有数据分析结果均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。2 组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,每组试验重复 3 次。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳香对细胞增殖的影响

MTT 法检测乳香对细胞增殖的影响,结果详见图 1。乳香以剂量依赖性和时间依赖性抑制胃癌细胞 SGC7901 的增殖(*P*<0.05)。

2.2 乳香对细胞凋亡的影响

统计 Q3 象限(Annexin V+/PI-)的早期凋亡细胞和 Q2 象限(Annexin V+/PI+)的晚期凋亡细胞。分析发现,乳香能以剂量依赖性诱导胃癌细胞凋亡(图 2)。

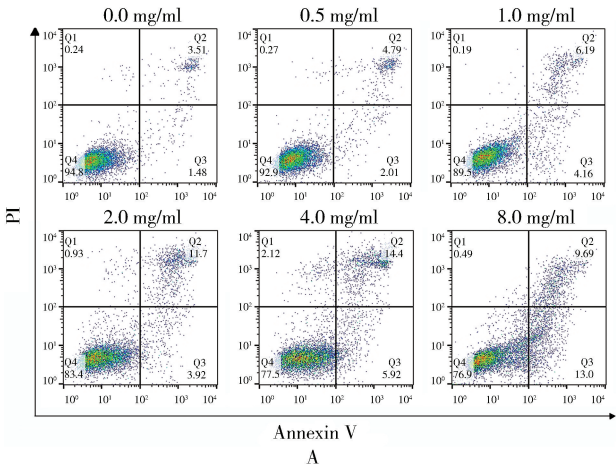


图 2 乳香对 SGC7901 细胞凋亡的影响

Figure 2 Frankincense induces apoptosis of SGC7901 cells

A:flow cytometry-based annexin V-FITC/PI labeling of apoptotic cells;B:statistical analysis.

Compared with 0.0 mg/ml, **P*<0.01. FITC: fluorescein isothiocyanate isomer; PI: propidium iodide.

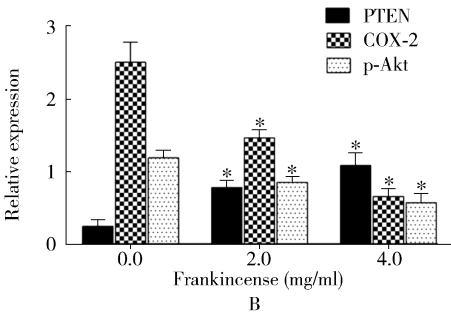
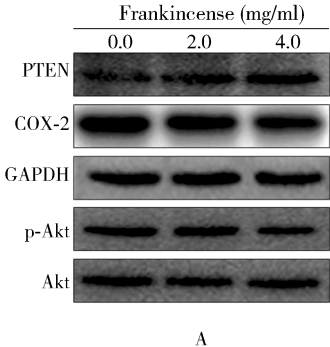


图 3 乳香对胃癌 SGC7901 细胞中 PTEN、COX-2 and p-Akt 蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of frankincense on expression levels of PTEN, COX-2 and p-Akt in SGC7901 cells

A:Western blotting;B:statistical analysis. PTEN: phosphatase and tensin homolgy deleted on chromosome ten; COX-2: cyclooxygenase-2; Akt: protein kinase B; p-Akt: phosphatased Akt. Compared with 0.0 mg/ml, **P*<0.01.

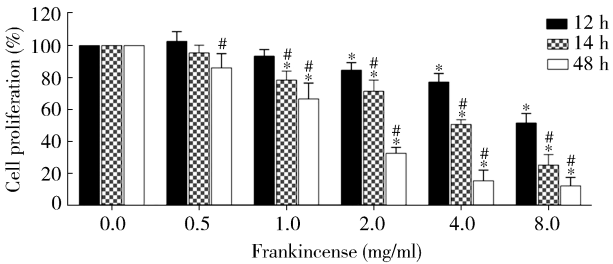


图 1 乳香对 SGC7901 细胞增殖的影响

Figure 1 Effect of frankincense on proliferation of SGC7901 cells

Compared with 0.0 mg/ml, **P*<0.01; compared with 12 h, #*P*<0.01.

2.3 乳香对胃癌细胞中 PTEN、p-Akt 和 COX-2 蛋白表达的影响

不同浓度的乳香(0.0、2.0、4.0 mg/ml)干预细胞 24 h 后,PTEN 表达上调,p-Akt 和 COX-2 表达下调,且呈剂量依赖性(图 3)。

2.4 乳香对细胞迁移能力的影响

乳香以剂量依赖性和时间依赖性抑制胃癌细胞 SGC7901 的迁移(*P*<0.05;图 4)。

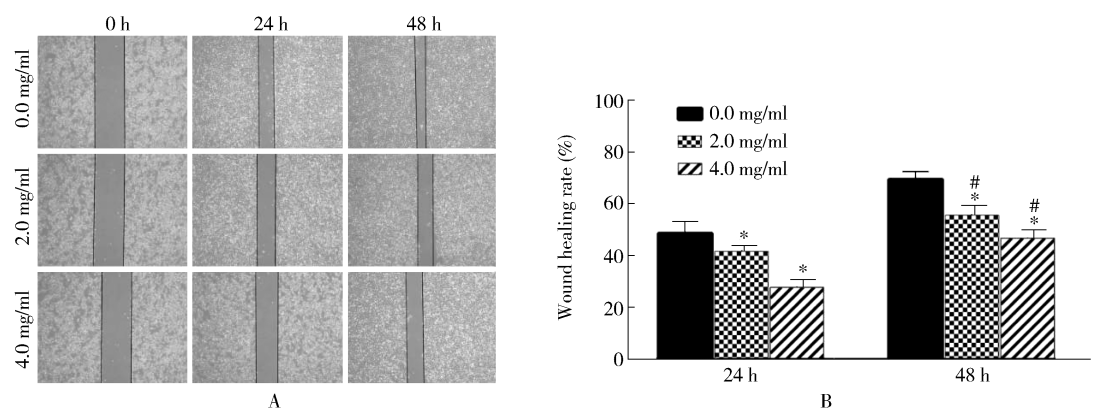


图 4 乳香对 SGC 7901 细胞迁移的影响

Figure 4 Effect of frankincense on migration of SGC7901 cells

A: phase micrographs of SGC7901 cells at various times after monolayer wounding ($\times 100$); B: quantification analysis of cell migration Compared with 0.0 mg/ml, * $P < 0.01$; compared with 24 h, # $P < 0.01$.

2.5 乳香对裸鼠皮下移植瘤生长的影响

实验组裸鼠的肿瘤体积明显小于对照组 ($P < 0.05$; 图 5A)。乳香灌胃 6 d 后, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 5B)。实验组与对照组的裸鼠体质量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 5C)。本实验中未出现裸鼠的死亡。研究结果显示, 乳香能够抑制胃癌移植瘤的生长。

3 讨论

本研究结果发现乳香能够通过下调胃癌细胞 COX-2 的表达, 从而诱导胃癌细胞凋亡, 抑制胃癌细胞增殖, 这可能与 PTEN/Akt 信号通路有关。COX-2 是一种前列腺素过氧化物合成酶, 在炎症细胞和多种肿瘤组织中呈过表达^[10]。COX-2 过表达与胃癌的发生发展和预后密切相关, 抑制 COX-2 的表达能有效诱导胃癌细胞凋亡^[11]。Akt 通路能够调控 COX-2 的表达, 它是重要的细胞凋亡通路, 对癌症细胞的增殖和凋亡具有重要的调控作用^[12,13]。PTEN 可负性调节 Akt 通路。本研究结果发现, 乳香能够通过下调人胃癌 SGC7901 细胞中的 COX-2 的表达而诱导胃癌细胞凋亡。本研究在体外检测了 PTEN/Akt 通路相关蛋白的表达, Western blotting 结果显示乳香能上调 PTEN 的表达, 下调 p-Akt 和 COX-2 的表达。

在体外实验中, 本研究采用 MTT 法和细胞划痕实验分别检测了乳香对胃癌细胞株 SGC7901 的增殖能力和迁移能力的抑制作用。结果表明: 随着给药剂量增加及药物作用时间的延长, 乳香对胃癌细胞株 SGC7901 增殖和迁移的抑制作用逐渐增强。流式细胞术观察到乳香作用于 SGC7901 细胞后, 细胞凋亡率均升高, 且呈剂量依赖性, 与 MTT 结果一

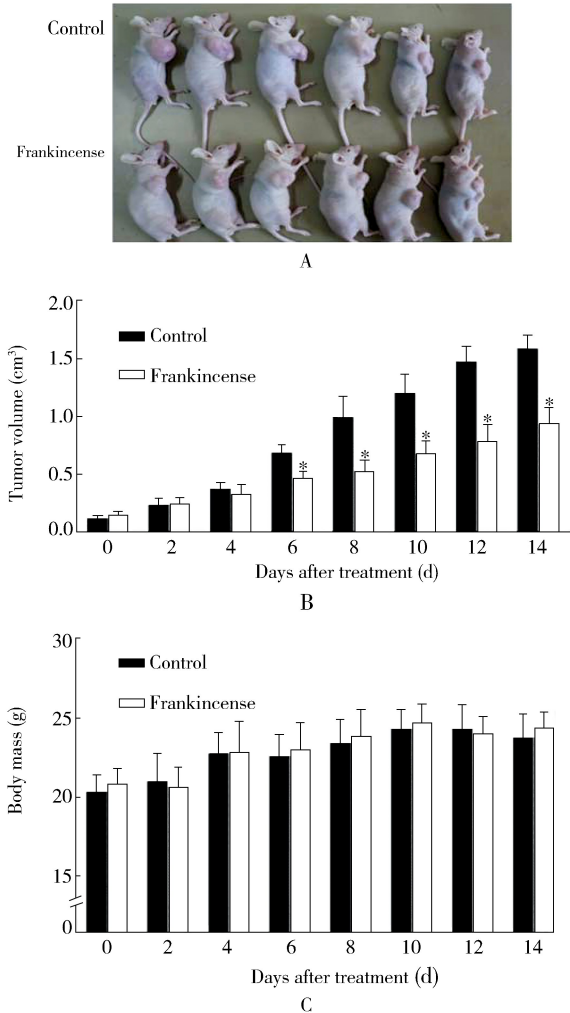


图 5 乳香抑制裸鼠体内移植瘤生长

Figure 5 Frankincense inhibits gastric tumor growth *in vivo*

A: gastric cancer xenograft tumor growth *in vivo*; B: tumor volume change; C: body mass change. Compared with control group, * $P < 0.01$

致。既往研究已经证实,乳香能够抑制裸鼠体内乳腺癌^[14]、前列腺癌^[15]、肝癌^[2]、恶性胶质瘤^[16]等肿瘤的生长。为了检测乳香在体内的抗胃癌作用,本研究建立了人胃癌细胞 SGC7901 移植瘤裸鼠模型,与之前的研究^[2,14-16]结果一致,本研究结果同样证明了乳香在裸鼠体内对胃癌具有抗肿瘤作用。乳香灌胃处理的裸鼠与对照裸鼠相比,肿瘤明显较小。乳香能抑制肿瘤的生长,且不会引起裸鼠体重明显减轻、精神状态及活动度变差等。若要将研究结果推广到人体,我们仍需对乳香进行进一步的安全性分析与剂量研究。

综上,由于细胞信号转导机制十分复杂,乳香抑制胃癌细胞 COX-2 表达也可能受其他通路调控,不同信号通路之间也会相互影响,要想全面了解调控 COX-2 表达的作用机制还需要更深入的研究。

【参考文献】

- [1] Wu W, Yang Z, Xiao X, *et al.* A thioredoxin reductase inhibitor ethaselen induces growth inhibition and apoptosis in gastric cancer[J]. J Cancer, 2020, 11(10): 3013–3019. DOI: 10.7150/jca.40744.
- [2] Wang S, Wang H, Sun B, *et al.* Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid triggers premature senescence *via* induction of DNA damage accompanied by impairment of DNA repair genes in hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2020, 34(1): 65–76. DOI: 10.1111/fcp.12488.
- [3] Zhang YS, Xie JZ, Zhong JL, *et al.* Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid (AKBA) inhibits human gastric carcinoma growth through modulation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(6): 3604–3615. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.03.003.
- [4] Ye Y, Liu M, Yuan H, *et al.* COX-2 regulates Snail expression in gastric cancer *via* the Notch1 signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(2): 512–522. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3011.
- [5] Wang YX, Li YZ, Zhang ZY, *et al.* HPV16 E6 promotes breast cancer proliferation *via* upregulation of COX-2 expression[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017(5): 1–12. DOI: 10.1155/2017/2948467.
- [6] Kuang W, Deng Q, Deng C, *et al.* Hepatocyte growth factor induces breast cancer cell invasion *via* the PI3KAkt and p38 MAPK signaling pathways to up-regulate the expression of COX-2[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(8): 3816–3826.
- [7] Jia H, Wang H, Yao Y, *et al.* MiR-136 inhibits malignant pro-

- gression of hepatocellular carcinoma cells by targeting cyclooxygenase 2[J]. Oncol Res, 2018, 26(6): 967–976. DOI: 10.3727/096504018X15148192843443.
- [8] Zhu Q, Huang C, Meng X, *et al.* CYP1A2 contributes to alcohol-induced abnormal lipid metabolism through the PTEN/AKT/SREBP-1c pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 513(2): 509–514. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.034.
- [9] Xu C, Lu X, Liu W, *et al.* CD8(+) T cells mediate the anti-tumor activity of frankincense and myrrh in hepatocellular carcinoma[J]. J Transl Med, 2018, 16(1): 132–144. DOI: 10.1186/s12967-018-1508-5.
- [10] Hu H, Han T, Zhuo M, *et al.* Elevated COX-2 expression promotes angiogenesis through EGFR/p38-MAPK/Sp1-dependent signalling in pancreatic cancer[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 470–480. DOI: 10.1038/s41598-017-00288-4.
- [11] Han H, Lim JW, Kim H. Lycopene inhibits activation of epidermal growth factor receptor and expression of cyclooxygenase-2 in gastric cancer cells[J]. Nutrients, 2019, 11(9): 2113–2130. DOI: 10.3390/nu11092113.
- [12] Yang MY, Wu CH, Hung TW, *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced resistance to doxorubicin is reversed by mulberry leaf polyphenol extract in hepatocellular carcinoma through inhibition of COX-2[J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(1):26–31. DOI: 10.3390/antiox9010026.
- [13] Ma NX, Sun W, Wu J, *et al.* Compound Wumei powder inhibits the invasion and metastasis of gastric cancer *via* COX-2/PGE2-PI3K/AKT/GSK3beta/beta-catenin signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017(1): 1–16. DOI: 10.1155/2017/3039450.
- [14] Schmiech M, Lang SJ, Ulrich J, *et al.* Comparative investigation of frankincense nutraceuticals: correlation of boswellic and lupeolic acid contents with cytokine release inhibition and toxicity against triple-negative breast cancer cells[J]. Nutrients, 2019, 11(10): 1–18. DOI: 10.3390/nu11102341.
- [15] Liu YQ, Wang SK, Xu QQ, *et al.* Acetyl-11-keto-beta-boswellic acid suppresses docetaxel-resistant prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* by blocking Akt and Stat3 signaling, thus suppressing chemoresistant stem cell-like properties[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(5): 689–698. DOI: 10.1038/s41401-018-0157-9.
- [16] Li W, Liu J, Fu W, *et al.* 3-O-acetyl-11-keto-beta-boswellic acid exerts anti-tumor effects in glioblastoma by arresting cell cycle at G2/M phase[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 132–147. DOI: 10.1186/s13046-018-0805-4.

(编辑:兆瑞臻)