

水飞蓟宾抑制缺氧状态下胃癌细胞 mTOR 磷酸化及 HIF-1 α 表达

伍友兴¹, 桂若虎¹, 郑新平¹, 王晓洋¹, 王柏琦², 胡军² (1. 衡阳市中心医院 消化内科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学 附属第二医院 心胸外科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] **目的:** 探讨水飞蓟宾对胃癌细胞缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 表达的影响及其可能的分子机制。 **方法:** 低氧条件下体外培养胃癌细胞系 MGC803, 用不同浓度水飞蓟宾处理后, 分别采用 Real-time PCR 和 Western blotting 法检测 HIF-1 α mRNA、蛋白的表达以及 mTOR 和 Akt 的磷酸化水平, MTT 法检测水飞蓟宾对 MGC803 细胞增殖的影响。 **结果:** 细胞低氧状态下生长 4 h 后, 与正常氧浓度组相比, 细胞内 HIF-1 α 蛋白表达水平显著增高 [(0.94 \pm 0.16) vs (0.015 \pm 0.03), $P < 0.01$]; 经 250 μ mol/L 水飞蓟宾处理后, 与处理前相比, HIF-1 α 蛋白表达水平明显减少 [(0.24 \pm 0.09) vs (0.94 \pm 0.16), $P < 0.01$]。与正常氧浓度组相比, 低氧并不能增加 HIF-1 α mRNA 的表达 [(0.074 \pm 0.011) vs (0.07 \pm 0.02), $P > 0.05$], 即便加入 250 μ mol/L 水飞蓟宾处理对 HIF-1 α mRNA 的表达也无明显影响 [(0.081 \pm 0.011) vs (0.07 \pm 0.02), $P > 0.05$], 但水飞蓟宾能显著增加泛素化 HIF-1 α 蛋白的表达 [(0.94 \pm 0.16) vs (0.24 \pm 0.09), $P < 0.01$]; 水飞蓟宾处理后能明显抑制 mTOR 磷酸化水平 [(0.17 \pm 0.06) vs (0.53 \pm 0.14), $P < 0.05$], 并能明显抑制 MGC803 细胞的增殖 [(52.94 \pm 6.15) vs (100 \pm 3.22), $P < 0.05$]。与处理前相比, 50 和 100 μ mol/L 水飞蓟宾处理对 Akt 磷酸化无明显影响 [(0.16 \pm 0.09), (0.17 \pm 0.06) vs (0.11 \pm 0.04), $P > 0.05$], 但 250 μ mol/L 水飞蓟宾处理后, 细胞内 Akt 磷酸化水平明显增强 [(0.33 \pm 0.06) vs (0.11 \pm 0.04), $P < 0.05$]。 **结论:** 水飞蓟宾可能通过影响 mTOR 和 HIF-1 α 的表达水平而发挥抗肿瘤活性。

[关键词] 水飞蓟宾; 胃癌; 缺氧诱导因子 1 α

[中图分类号] R735.2; R730.54

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)01-0052-05

Silibinin inhibits mTOR phosphorylation and HIF-1 α expression in gastric carcinoma cells under hypoxic condition

WU Youxing¹, GUI Ruohu¹, ZHENG Xinping¹, WANG Xiaoyang¹, WANG Baiqi², HU Jun² (1. Department of Gastroenterology, Center Hospital of Hengyang, Hengyang 421001, Hunan, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Silibinin on hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) expression as well as its possible molecular mechanism. **Methods:** Gastric carcinoma cell line MGC803 was cultured *in vitro* under hypoxic condition. After treated with different concentration of Silibinin, the expression of HIF-1 α mRNA was detected by Real-time PCR; HIF-1 α protein level and phosphorylation of mTOR and Akt were detected by Western blotting. Effect of Silibinin on proliferation of MGC803 cell was analyzed by MTT assay. **Results:** After 4 h of incubation under hypoxia condition, the expression of HIF-1 α protein was significantly increased in MGC803 cells, as compared with the normoxia group [(0.94 \pm 0.16) vs (0.015 \pm 0.03), $P < 0.01$]. After treatment with 250 μ mol/L Silibinin, the expression of HIF-1 α protein was significantly inhibited as compared to pre-treatment [(0.24 \pm 0.09) vs (0.94 \pm 0.16), $P < 0.01$]. As compare with normoxia group, hypoxia couldn't increase expression of HIF-1 α mRNA [(0.074 \pm 0.011) vs (0.07 \pm 0.02), $P > 0.05$], even though treatment with 250 μ mol/L aqueous Silibinin also couldn't significantly affect expression of HIF-1 α mRNA [(0.081 \pm 0.011) vs (0.07 \pm 0.02), $P > 0.05$], but Silibinin could significantly increase the expression of ubiquitinated HIF-1 α protein [(0.94 \pm 0.16) vs (0.24 \pm 0.09), $P < 0.01$]. After incubation with Silibinin, phospho-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81372894)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 81372894)

[作者简介] 伍友兴(1974-),男,湖南省新化县人,硕士生,副主任医师,主要从事消化系统肿瘤等疾病的临床诊断与防治研究, E-mail: hywuyouxing@126.com

[通信作者] 胡军(HU Jun, corresponding author), E-mail: hujun0207@sina.com

rylation of mTOR was significantly inhibited ($[0.17 \pm 0.06]$ vs $[0.53 \pm 0.14]$, $P < 0.05$), and proliferation of MGC803 cell was significantly inhibited ($[52.94 \pm 6.15]$ vs $[100 \pm 3.2]$, $P < 0.05$), as compared with pre-treatment. In contrast, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin had no obvious effect on phosphorylation of Akt ($[0.16 \pm 0.09]$, $[0.17 \pm 0.06]$ vs $[0.11 \pm 0.04]$, $P < 0.05$), but 250 $\mu\text{mol/L}$ Silibinin could significantly increase the phosphorylation of Akt in the cells ($[0.33 \pm 0.06]$ vs $[0.11 \pm 0.04]$, $P < 0.05$). **Conclusion:** Silibinin could exert antitumor action through to effect on expression of mTOR and HIF-1 α .

[**Key words**] silibinin; gastric carcinoma; hypoxia-inducible factor 1 α

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(1): 52-56. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.01.008]

缺氧是几乎所有实体肿瘤在生长过程中所面临的共同微生态特征。随着肿瘤细胞的异常增殖,局部血氧供应相对不足,为了适应该环境,肿瘤细胞内可活化一系列与代谢、血管发生相关的酶类与生长因子,从而维持肿瘤细胞的能量和血液供应^[1-2]。在一系列参与调节肿瘤细胞缺氧反应的因子中,以缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 最重要^[3]。HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 异二聚体组成的一种核转录因子。HIF-1 β 在细胞中恒定表达,不受细胞内氧分压 (PaO₂) 的影响。相比之下, HIF-1 α 与血氧饱和度密切相关。在正常 PaO₂ 状态下, HIF-1 α 亚基上的 402 和 564 位脯氨酸残基被脯氨酸羟化酶羟基化,并通过 VHL E3 泛素连接酶识别并泛素化,随后通过蛋白酶使其被快速降解^[4]。而在缺氧状态下,脯氨酸羟化酶处于失活状态, VHL E3 泛素连接酶活性降低,从而增加了 HIF-1 α 的稳定性,最终诱导肿瘤细胞中一系列糖酵解、血管生成因子、生长因子的转录与表达,参与肿瘤组织的生长增殖^[5-6]。

水飞蓟宾 (Silibinin) 是从菊科药用植物水飞蓟种子的种皮中提取出来的一种黄酮类化合物,其毒性低,临床上常用来治疗一些肝脏疾病。研究显示水飞蓟宾对多种肿瘤细胞具有较强的抗肿瘤和化学预防效应,并能影响 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活。然而,水飞蓟宾是否也能通过影响 PI3K/Akt/mTOR 而抑制缺氧状态下胃癌细胞 HIF-1 α 的表达,目前尚不清楚。本研究旨在探讨水飞蓟宾对 HIF-1 α 表达的影响及其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 HyClone 公司,水飞蓟宾、MG132 为 Sigma-Adrich 公司产品,抗 HIF-1 α 和 HIF-1 β 抗体购自 BD biosciences 公司, LY294002、雷帕霉素 (rapamycin)、抗磷酸化 Akt 和 mTOR 均购自 Cell Signaling 公司, RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司,蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自 Roche 公

司,细胞总蛋白提取试剂盒购自 Novagen 公司。

1.2 细胞培养与处理

人胃癌细胞系 MGC803 (ATCC) 购自中科院上海细胞库,在含 10% 胎牛血清、青霉素 (100 U/ml) 和链霉素 (100 $\mu\text{g/ml}$) 的 DMEM 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 浓度下培养。待培养的细胞密度达到 1×10^6 个时调整胎牛血清浓度为 3%, 随后将培养板置于 O₂ 调节器中 (COY Labs), 根据氧浓度测定仪上显示值,调整充入气体气流量,最终使 CO₂ 和 N₂ 的比例分别为 5% 和 95%, 备用。

1.3 MTT 法检测水飞蓟宾处理对 MGC803 细胞增殖的影响

将 100 μl MGC803 细胞 (约 1×10^5 个) 接种于 96 孔板中培养 12 h 后换成含 5% 胎牛血清和青霉素 (100 U/ml)、链霉素 (100 $\mu\text{g/ml}$) 的培养基。加入 0 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾后继续培养 72 h (其中对照组给予等体积培养基), 培养结束前 4 h 各孔加入 MTT 溶液 20 μl (5 g/L), 弃上清, 并加入 200 μl 二甲基亚砜, 充分混匀, 用酶标仪在 570 nm 波长下测定各孔的光密度 (D) 值, 并计算细胞增殖抑制率。抑制率 (%) = $[(\text{对照组 } D \text{ 值} - \text{实验组 } D \text{ 值}) / (\text{对照组 } D \text{ 值})] \times 100\%$ 。

1.4 Real-time PCR 法检测水飞蓟宾处理对 HIF-1 α mRNA 表达的影响

MGC803 细胞处理完毕后, 根据试剂盒操作步骤提取细胞总 RNA, 并取 3 μg RNA 进行逆转录, 将获得的 cDNA 进行实时定量 PCR。HIF-1 α 上游引物序列为 5'- 50-CGTTGTGAGTGGTATTATTCAGCA', HIF-1 α 下游引物序列为 5'- CAGTTTCTGTGTCGTTGCTGCC-3'; 以 GAPDH 为内参, 上游引物序列为 5'- AGTGGGGTGATGCTGGTGCTG-3', 下游引物序列为 5'- CGCCTGCTTCACCACCTTCTT -3', 在 LightCycler 96 定量 PCR 仪 (Roche) 上按以下程序扩增: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 共 40 个循环。PCR 结束后采用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算各处理组中 HIF-1 α 蛋白的相对表达量, 计算公式: $\Delta\text{Ct} =$

$Ct_{HIF-1\alpha} - Ct_{GAPDH}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ 。实验重复3次。

1.5 Western blotting 法检测水飞蓟宾处理对 HIF-1 α 蛋白表达的影响

MGC803 细胞在 2% O₂ 浓度下分别用 100 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白酶体抑制剂 MG132、20 nmol/L mTOR 抑制剂雷帕霉素或 10 $\mu\text{mol/L}$ PI3K 抑制剂 LY294002 处理 1 h 后, 用 0 ~ 250 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾处理 4 h。随后细胞用预冷 PBS 漂洗 2 次, 加入含蛋白酶抑制剂 (Cocktail) 的细胞裂解液充分裂解细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\times g$ 离心 10 min。根据细胞总蛋白提取试剂盒说明书操作。将获取的蛋白经 10% ~ 12% 的 SDS-PAGE、转膜, 放入 5% 脱脂奶粉中封闭 1 h; 洗涤后, 加入抗 HIF-1 α 或抗 Akt、mTOR 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 多次洗涤后, 加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗小鼠二抗 (1:2 000) 孵育膜 1 h。ECL 法发光、显影。采用 Image J 1.49 软件对条带进行灰度分析, 并以 GAPDH 作为内参, 蛋白的相对表达丰度以目的蛋白与 GAPDH 灰度的比值表示。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

应用 GraphPadPrizm 6.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水飞蓟宾明显抑制 MGC803 细胞的增殖

MTT 法检测结果显示, 0 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾对细胞增殖无明显影响 ($P > 0.05$); 与对照组相比, 当水飞蓟宾浓度增高至 100、250 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可明显抑制 MGC803 细胞的增殖 [(82.25 \pm 4.35)、(67.74 \pm 8.26)、(52.94 \pm 6.15) vs (100 \pm 3.22), $P < 0.05$], 并呈一定的剂量依赖性。

2.2 低氧状态下水飞蓟宾对 MGC803 细胞 HIF-1 α mRNA 的表达无显著影响

为观察低氧条件下水飞蓟宾对 MGC803 细胞 HIF-1 α mRNA 表达的影响, 细胞分别置于正常氧浓度 (21% O₂) 及低氧浓度 (2% O₂) 下孵育 4 h。Real-time PCR 检测结果显示, 与 21% 氧浓度的对照组相比, 氧浓度为 2% 情况下, 以 0、50、100 和 250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的水飞蓟宾处理 MGC803 细胞后, 其 HIF-1 α mRNA 的相对表达量差异无统计学意义 [(0.074 \pm 0.011)、(0.084 \pm 0.013)、(0.077 \pm 0.009)、(0.081 \pm 0.011) vs (0.07 \pm 0.02), $P > 0.05$]。提示低氧状态下水飞蓟宾并不能上调 HIF-

1 α mRNA 的表达水平。

2.3 低氧状态下水飞蓟宾显著降低 MGC803 细胞 HIF-1 α 蛋白总量并降低其泛素化蛋白水平

Western blotting 法检测结果 (图 1) 显示, MGC803 细胞低氧状态下 (2% O₂) 生长 4 h 后, 与正常氧浓度 (21% O₂) 组相比, 细胞内 HIF-1 α 蛋白表达水平显著增高 [(0.94 \pm 0.16) vs (0.015 \pm 0.03), $P < 0.01$]。而经 250 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾处理后, 与低氧条件下未处理组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, 可显著抑制缺氧诱导下 HIF-1 α 蛋白的含量 [(0.24 \pm 0.09) vs (0.94 \pm 0.16), $P < 0.01$]; 相比之下, HIF-1 β 蛋白在缺氧前后以及 0 ~ 250 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾处理前后表达量恒定 (图 1A)。为了证实水飞蓟宾下调 HIF-1 α 蛋白的表达是否与抑制其蛋白合成有关, 随后 MGC803 细胞经 100 $\mu\text{mol/L}$ 蛋白酶抑制剂 MG132 处理 1 h 后, 与低氧条件下未处理组相比, 可显著增加低氧状态下泛素化 HIF-1 α 蛋白的表达水平 [(0.86 \pm 0.14) vs (0.027 \pm 0.08), $P < 0.05$]。而同时给予 250 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾处理后, 与 MG132 处理组相比, 泛素化蛋白含量明显降低 [(0.48 \pm 0.12) vs (0.86 \pm 0.14), $P < 0.05$] (图 1B)。以上结果表明水飞蓟宾通过影响蛋白质的合成从而抑制 HIF-1 α 蛋白的表达。实验重复 3 次。

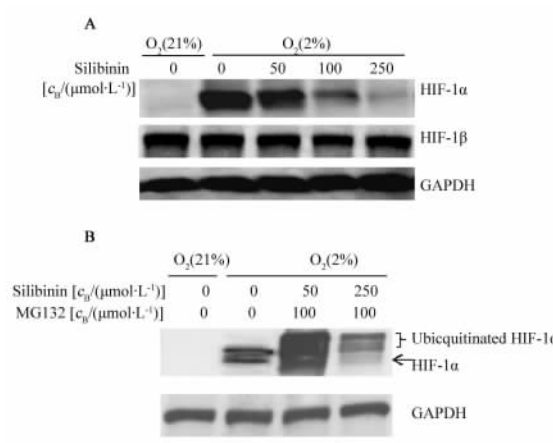


图 1 水飞蓟宾诱导 MGC803 细胞表达 HIF-1 α 总蛋白及泛素化蛋白

Fig. 1 Expression of total HIF-1 α protein and ubiquitinated HIF-1 α protein in MGC803 cells induced with Silibinin

A: Silibinin induces total HIF-1 α protein expression;

B: Silibinin induce subiquitinated HIF-1 α protein expression

2.4 水飞蓟宾明显下调 MGC803 细胞 HIF-1 α 蛋白的表达

Western blotting 法检测结果 (图 2) 显示, 低氧

状态下采用 50、100 和 250 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾处理细胞后,与处理前相比,磷酸化 mTOR 水平明显降低 [(0.34 \pm 0.08)、(0.22 \pm 0.05)、(0.17 \pm 0.06) vs (0.53 \pm 0.14), $P < 0.05$] (图 2A)。为进一步观察 mTOR 磷酸化与 HIF-1 α 表达的关系,采用 20 nmol/L mTOR 抑制剂雷帕霉素处理 MGC803 细胞后,与处理前相比,HIF-1 α 蛋白的表达水平明显降低 [(0.25 \pm 0.06) vs (0.96 \pm 0.158), $P < 0.05$],此外,同时采用 250 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾联合 20 nmol/L 雷帕霉素处理细胞后,与处理前相比,HIF-1 α 蛋白的表达水平显著降低 [(0.06 \pm 0.04) vs (0.96 \pm 0.158), $P < 0.01$, 图 2B)]。结果提示,水飞蓟宾下调 HIF-1 α 蛋白的表达与抑制 mTOR 的磷酸化有关。

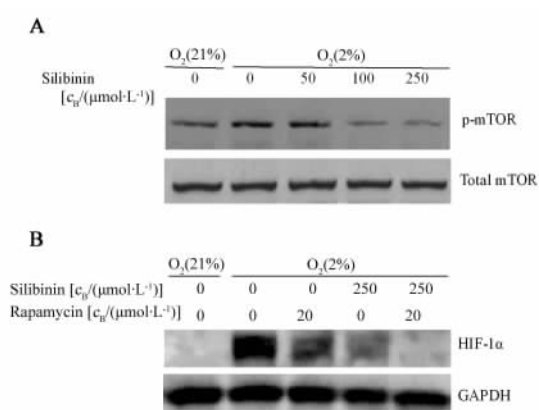


图 2 水飞蓟宾和雷帕霉素对 mTOR 磷酸化及 HIF-1 α 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of Silibinin and Rapamycin on phosphorylation of mTOR and expression of HIF-1 α

A: Silibinin inhibits phosphorylation of mTOR ;

B: Rapamycin abrogates expression of HIF-1 α

2.5 水飞蓟宾上调 Akt 磷酸化水平

Western blotting 检测结果(图 3)显示,50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾处理 MGC803 细胞后,与对照组相比,磷酸化 Akt 水平均无明显变化 [(0.16 \pm 0.09)、(0.17 \pm 0.06) vs (0.11 \pm 0.04), $P > 0.05$]; 当水飞蓟宾浓度达到 250 $\mu\text{mol/L}$ 时,磷酸化 Akt 水平明显增高 [(0.33 \pm 0.06) vs (0.11 \pm 0.04), $P < 0.05$] (图 3A)。为了研究低氧条件下 PI3K/Akt 与 HIF-1 α 表达的关系,采用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 处理 MGC803 细胞,结果显示,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002 处理后,HIF-1 α 表达水平明显降低 [(0.18 \pm 0.05) vs (0.82 \pm 0.16), $P < 0.05$]。此外,采用 250 $\mu\text{mol/L}$ 水飞蓟宾和 10 $\mu\text{mol/L}$

LY294002 共同处理 MGC803 细胞后,HIF-1 α 水平几乎消失 [(0.08 \pm 0.07) vs (0.82 \pm 0.16), $P < 0.01$] (图 3B)。以上结果表明水飞蓟宾下调 HIF-1 α 的表达与 Akt 的磷酸化有关。

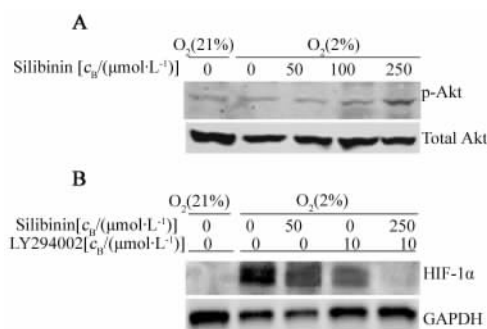


图 3 水飞蓟宾与 LY294002 对 Akt 磷酸化及 HIF-1 α 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Silibinin and LY294002 on phosphorylation of Akt and expression of HIF-1 α

A: Effect of Silibinin on phosphorylation of Akt;

B: LY294002 inhibits expression of HIF-1 α

3 讨论

研究^[7]显示,HIF-1 α 在胃癌细胞中过度表达,并与其转移、血管发生及耐药等密切相关。因此任何能影响 HIF-1 表达的方法均有可能成为胃癌治疗的靶点^[8]。本研究首先观察水飞蓟宾对 MGC803 细胞的生长增殖情况,实验结果显示,低浓度的水飞蓟宾对细胞增殖无明显影响($P > 0.05$)。当其浓度增高至 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上时,能以剂量依赖性方式抑制 MGC803 细胞增殖,这与国内外相关研究报道相类似^[9]。本实验随后探讨了水飞蓟宾对 HIF-1 α 表达的影响,结果发现水飞蓟宾能显著下调低氧条件下 MGC803 细胞中 HIF-1 α 蛋白表达水平($P < 0.05$),但不能影响其 mRNA 转录($P > 0.05$)。通过采用蛋白酶抑制剂 MG132 处理后发现,泛素化蛋白显著增多($P < 0.05$)。而同时给予水飞蓟宾和 MG132 处理后,泛素化 HIF-1 α 蛋白再次明显降低($P < 0.05$)。以上结果提示水飞蓟宾不能直接影响 HIF-1 α 的转录,但能影响 HIF-1 α 蛋白转录后修饰。

HIF-1 α 的表达主要受 PI3K/Akt/mTOR 调控^[10-11]。mTOR 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,它可磷酸化其下游核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)和真核起始因子 4E-结合蛋白 1(4E-BP1),最终促进蛋白质的合成^[12]。本研究采用水飞蓟宾处理后,缺氧条件下 mTOR 的磷酸化水平明显降低,与 HIF-1 α 的表达

呈一定的负相关。有研究^[13]发现,水飞蓟宾处理宫颈癌细胞后,可通过 mTOR/p70S6K/4E-BP1 途径下调 HIF-1 α 的表达。因此,水飞蓟宾下调 HIF-1 α 的表达可能与 mTOR 去磷酸化有关。但本研究在对比 mTOR 抑制剂雷帕霉素和水飞蓟宾对 HIF-1 α 的抑制作用时发现,水飞蓟宾对 HIF-1 α 的影响强于雷帕霉素,这表明水飞蓟宾除了影响 mTOR 磷酸化外,可能还存在其他机制,但这有待进一步研究。

PI3K/Akt 是促进细胞增长的重要激酶。本研究发现水飞蓟宾能激活 Akt,但一般认为,Akt 的激活可诱导下游 mTOR 磷酸化,这种看似矛盾的现象与经典的理论不符,与国外研究^[14-15]结果类似,其原因可能是水飞蓟宾抑制 mTOR 的活性后,可同时诱导 Akt 第 473 位丝氨酸磷酸化。事实上,mTOR 在细胞内可形成两种复合物,包括 mTOR 复合物 1 (mTORC1)和 mTOR 复合物 2(mTORC2),分别参与不同的信号转导。其中 mTORC1 对雷帕霉素敏感,主要由 mTOR、Raptor 和 mLST8 等亚基组成。mTORC1 通过 p70S6K 和 4E-BP1 调节核糖体装配以及蛋白的翻译。此外,p70S6K 也能磷酸化 IRS1 而抑制 PI3K/Akt 的激活^[16]。因此,水飞蓟宾有可能是在抑制 mTORC1 的同时,降低了 p70S6K 的负反馈作用而导致 Akt 激活;这意味着临床上采用 mTOR 抑制剂用于肿瘤治疗时,也有可能反馈性激活 Akt 而增加药物的毒副作用。

综上,本研究首次证实,水飞蓟宾可抑制胃癌 MGC803 细胞 mTOR 的活性,并下调 HIF-1 α 的表达,这可能是其抗肿瘤的新机制,对进一步明确水飞蓟宾的抗肿瘤机制,并对 PI3K/Akt 抑制剂的联合用药具有一定的指导价值。

【参考文献】

- [1] MUJICIC H, HILL R P, KORITZINSKY M, et al. Hypoxia signaling and the metastatic phenotype [J]. *Curr Mol Med*, 2014, 14(5): 565-579. DOI: 10.2174/1566524014666140603115831.
- [2] DUECHLER M, PECZEK L, SZUBERT M, et al. Influence of hypoxia inducible factors on the immune microenvironment in ovarian cancer [J]. *Anti Cancer Res*, 2014, 34(6): 2811-2819. PMID:24922644.
- [3] SENA J A, WANG L, HEASLEY L E, et al. Hypoxia regulates alternative splicing of HIF and non-HIF target genes [J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(9): 1233-1243. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0149.
- [4] WU Y, LUCIA K, LANGE M, et al. Hypoxia inducible factor-1 is involved in growth factor, glucocorticoid and hypoxia mediated regulation of vascular endothelial growth factor-A in human meningiomas [J]. *J Neurooncol*, 2014, 119(2): 263-273. DOI: 10.1007/s11060-014-1503-5.
- [5] HUANG M, CHEN Q, XIAO J, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor-1 alpha is a predictor of poor prognosis in cervical cancer: a clinicopathologic study and a meta-analysis [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2014, 24(6): 1054-1064. DOI: 10.1097/IGC.000000000000162.
- [6] ZHAO H, IWASAKI M, YANG J, et al. Hypoxia-inducible factor-1: a possible link between inhalational anesthetics and tumor progression? [J]. *Acta Anaesthesiol Taiwan*, 2014, 52(2): 70-76. DOI: 10.1016/j.aat.2014.05.008.
- [7] ZHU H, WANG D, ZHANG L, et al. Upregulation of autophagy by hypoxia-inducible factor-1alpha promotes EMT and metastatic ability of CD133⁺ pancreatic cancer stem-like cells during intermittent hypoxia [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(3): 935-942. DOI: 10.3892/or.2014.3298.
- [8] HSIAO H T, XING L, DENG X, et al. Hypoxia-targeted triple suicide gene therapy radiosensitizes human colorectal cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(2): 723-729. DOI: 10.3892/or.2014.3238.
- [9] WANG Y X, CAI H, JIANG G, et al. Silibinin inhibits proliferation, induces apoptosis and causes cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via STAT3 pathway inhibition [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(16): 6791-6798. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.16.6791.
- [10] LEE S H, JEE J G, RYU K, et al. A Group of novel HIF-1alpha inhibitors, glyceollins, blocks HIF-1alpha synthesis and decreases its stability via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and Hsp90 binding [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(4): 853-862. DOI: 10.1002/jcp.24813.
- [11] BEFANI C D, VLACHOSTERGIOS P J, HATZIDAKI E, et al. Bortezomib represses HIF-1alpha protein expression and nuclear accumulation by inhibiting both PI3K/Akt/TOR and MAPK pathways in prostate cancer cells [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(1): 45-54. DOI: 10.1007/s00109-011-0805-8.
- [12] ISHIKAWA D, TAKEUCHI S, NAKAGAWA T, et al. mTOR inhibitors control the growth of EGFR mutant lung cancer even after acquiring resistance by HGF [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e62104. DOI: 10.1371/journal.pone.0062104.
- [13] LONG S H, HE Y, CHEN M H, et al. Activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway triggered by PTEN downregulation in the pathogenesis of Crohn's disease [J]. *J Dig Dis*, 2013, 14(12): 662-669. DOI: 10.1111/1751-2980.12095.
- [14] PAL S K, QUINN D I. Differentiating mTOR inhibitors in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2013, 39(7): 709-719. DOI: 10.1016/j.ctrv.2012.12.015.
- [15] EYRE T A, COLLINS G P, GOLDSTONE A H, et al. Time now to TORC the TORC? New developments in mTOR pathway inhibition in lymphoid malignancies [J]. *Br J Haematol*, 2014, 166(3): 336-351. DOI: 10.1111/bjh.12945.
- [16] SARBASSOV D D, GUERTIN D A, ALI S M, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex [J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098-1101. DOI: 10.1126/science.1106148.

【收稿日期】 2015-10-20

【修回日期】 2015-12-14

【本文编辑】 阮芳铭