

- [21] HWANG HS, KIM HA. Chondrocyte apoptosis in the pathogenesis of osteoarthritis [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (11) : 26035-26054.
- [22] TONG P, XU S, CAO G, et al. Chondroprotective activity of a detoxicated traditional Chinese medicine (Fuzi) of Aconitum carmichaeli Debx against severe-stage osteoarthritis model induced by mono-iodoacetate[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(1):740-744.
- [23] ZHANG MQ, WANG TX, LI R, et al. Helicid alleviates pain and sleep disturbances in a neuropathic pain-like model in mice [J]. J Sleep Res, 2017, 26(3):386-393.
- [24] CHEN J, GU YT, XIE JJ, et al. Gastrodin reduces IL-1 β -induced apoptosis, inflammation, and matrix catabolism in osteoarthritis chondrocytes and attenuates rat cartilage degeneration in vivo[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 97:642-651.
- (收稿日期:2020-09-09,修回日期:2020-09-19)

引用本文:王书芬,倪猛,薛萌.生长抑素联合人转录因子叉头框蛋白D1通过磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B通路调控胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究[J].安徽医药,2022,26(10):1919-1924.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.10.003.



◇ 药学研究 ◇

生长抑素联合人转录因子叉头框蛋白D1通过磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B通路调控胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究

王书芬^a,倪猛^b,薛萌^b

作者单位:南阳市中心医院,^a西药药理学部,^b消化内科一病区,河南 南阳 473000

基金项目:南阳市科技攻关项目(192102310326)

摘要: 目的 探讨生长抑素联合人转录因子叉头框蛋白D1(FOXD1)通过磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)通路调控胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的机制研究。**方法** 研究于2018年12月至2019年12月进行,通过体外培养PANC-1细胞,经过不同浓度(0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L)的生长抑素(SST)处理细胞,记为生长抑素各剂量组,其中0 mg/L和400 mg/L的生长抑素作为对照组(Control)和生长抑素组(SST);将过表达载体(pcDNA)和过表达FOXD1(FOX D1)转染至PANC-1细胞,经过400 mg/L的生长抑素及20 mol/L的PI3K抑制剂LY294002处理细胞,记为SST+pcDNA组、SST+FOX D1组和SST+FOX D1+LY294002组。四甲基偶氮盐微量酶反应比色法(MTT)检测细胞增殖;Transwell检测细胞迁移和侵袭;蛋白质印迹法(Western blotting)检测增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、FOX D1和PI3K/AKT相关蛋白的表达;实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测FOX D1 mRNA的表达。**结果** 与Control组相比,SST组可以抑制FOX D1 mRNA(0.47±0.03)及蛋白表达(0.42±0.04)、增殖(0.52±0.05)、迁移(66.8±7.2)和侵袭(63.7±6.5)能力,下调p-PI3K(0.43±0.04)、p-AKT(0.39±0.03)蛋白表达;与SST+pcDNA组相比,SST+FOX D1组可以促进以抑制FOX D1 mRNA(0.67±0.05)及蛋白表达(0.64±0.06)、增殖(0.71±0.07)、迁移(86.9±8.5)和侵袭(81.5±7.3)能力,上调p-PI3K(0.62±0.05)、p-AKT(0.65±0.06)蛋白表达。与SST+FOX D1组相比,SST+FOX D1+LY294002组可以抑制FOX D1 mRNA(0.37±0.04)及蛋白表达(0.35±0.03)、增殖(0.53±0.05)、迁移(67.2±6.5)和侵袭(62.5±5.2)。**结论** 生长抑素通过调控FOX D1的表达抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,其作用机制可能与抑制PI3K/AKT通路有关。

关键词: 生长抑素; 胰腺肿瘤; 人转录因子叉头框蛋白D1(FOX D1); 磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B通路(PI3K/AKT通路)

Study on the mechanism of somatostatin combined with human transcription factor forkhead box protein D1 in regulating the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway

WANG Shufen^a, NI Meng^b, XUE Meng^b

Author Affiliation:^aDepartment of Western Medicine, ^bDepartment of Gastroenterology, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of somatostatin combined with human transcription factor forkhead box protein

D1 (FOXD1) regulating the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) pathway. **Methods** The experiment was conducted from December 2018 to December 2019, PANC-1 cells were cultured *in vitro*, and treated with somatostatin (SST) at different concentrations (0 mg/L, 100 mg/L, 200 mg/L, 400 mg/L), and the cells were recorded as somatostatin dose groups, among them, 0 mg/L and 400 mg/L somatostatin were used as the control group (Control) and somatostatin group (SST); the transfection of overexpression vector (pcDNA) and overexpression FOXD1 (FOXD1) into PANC-1 cells, and the cells were treated with 400 mg/L somatostatin and 20 mol/L PI3K inhibitor LY294002, denoted as SST+pcDNA group, SST+FOXD1 group, and SST+FOXD1+LY294002 group. Colorimetric method of microenzyme reaction of tetramethylazazole salt (MTT) detected cell proliferation; Transwell detected cell migration and invasion; Western blot detected the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase (MMP-9), FOXD1 and PI3K/AKT related protein; real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) detected the expression of FOXD1 mRNA. **Results** Compared with the Control group, the SST group could inhibit FOXD1 mRNA (0.47 ± 0.03) and protein (0.42 ± 0.04) expression, proliferation (0.52 ± 0.05), migration (66.8 ± 7.2) and invasion (63.7 ± 6.5), and down-regulate the expression of p-PI3K (0.43 ± 0.04) and p-AKT (0.39 ± 0.03) protein; compared with the SST+pcDNA group, the SST+FOXD1 group could promote and suppress FOXD1 mRNA (0.67 ± 0.05) and protein (0.64 ± 0.06) expression, proliferation (0.71 ± 0.07), migration (86.9 ± 8.5) and invasion (81.5 ± 7.3), up-regulation of p-PI3K (0.62 ± 0.05), p-AKT (0.65 ± 0.06) protein expression. Compared with the SST+FOXD1 group, the SST+FOXD1+LY294002 group could inhibit FOXD1 mRNA (0.37 ± 0.04) and protein (0.35 ± 0.03) expression, proliferation (0.53 ± 0.05), migration (67.2 ± 6.5) and invasion (62.5 ± 5.2). **Conclusion** Somatostatin inhibits the proliferation, migration and invasion of pancreatic cancer cells by regulating the expression of FOXD1, and its mechanism may be related to the inhibition of the PI3K/AKT pathway.

Key words: Somatostatin; Pancreatic neoplasms; FOXD1; PI3K/AKT pathway

胰腺癌作为消化道常见的恶性肿瘤,在我国,胰腺癌病人的发病率和死亡率在恶性肿瘤中分别排第10位和第6位,而早期胰腺癌病人的确诊率不高,大多数病人在确诊时已经是晚期,已经错过最佳的治疗时期,导致5年的预后生存率仅为2%~9%^[1-2]。生长抑素是一种多肽类激素,在脑、胃肠和胰腺组织含量较高,通过抑制胰酶和胰液的分泌,保护胰腺细胞^[3]。刘力等^[4]研究结果显示,生长抑素通过联合吉西他滨抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和上皮间质转化。人转录因子叉头框蛋白D1(FOXD1)在多种癌症中异常表达,如FOXD1在胰腺癌组织和细胞中表达上调,敲减FOXD1可以明显抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[5]。PI3K/AKT通路在胰腺癌中发挥着重要的作用,在胰腺癌中常常被激活^[6],有研究结果显示,胰腺癌缺失位点4(DPC4)基因通过抑制磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/帕霉素靶蛋白(PI3K/AKT/mTOR)通路抑制胰腺癌细胞的增殖、侵袭和上皮间质转化^[7]。但是关于生长抑素能否通过联合FOXD1调控PI3K/AKT通路是在胰腺癌细胞中的研究尚不明确,因此,本研究于2018年12月至2019年12月通过探讨生长抑素联合FOXD1通过PI3K/AKT通路调控胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,为胰腺癌的研究提供合理的数据支撑。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂 胰腺癌细胞PANC-1购买于美国ATCC研究中心;胎牛血清(10025632C)购买于赛默飞生物、DMEM培养基(PAC0036)购买于武汉博士德生物公司;注射用生长抑素购买于扬子江集

团药业公司,批号H20066708,批次20180530,规格:3 mg; Lipofectamine™2000转染试剂盒(10523005)购买于美国Thermo Fisher公司;pcDNA、FOXD1和引物购买于上海吉玛公司;PI3K抑制剂LY294002(HY-10123)购买于美国Med Chem Express公司;MTT试剂盒(P0102S)购买于碧云天生物公司;Transwell小室(258730236120)、Matrigel基质胶(334002)购买于美国BD公司;增殖细胞核抗原(PCNA)抗体(ab12165)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)抗体(ab204523)、基质金属蛋白酶-2(MMP-9)抗体(ab140352)、FOXD1抗体(ab128311)、磷酸化磷脂肌醇3激酶(p-PI3K)抗体(ab31075)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)抗体(ab8201)、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)抗体(ab120245)、蛋白激酶B(AKT)抗体(ab32451)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(ab7221)购买于购自美国Abcam公司;辣根过氧化物酶标记免疫球蛋白G(IgG)(ym-a0137G-HRP)购买于上海恒斐生物公司;Trizol试剂盒(9078)、逆转录试剂盒(RR024A)、SYBR Green Premix试剂盒(RB732A)购买于大连宝生物工程有限公司。

1.2 细胞培养和分组 胰腺癌细胞PANC-1采用含有10%胎牛血清的DMEM培养基内,置于5%二氧化碳、37℃条件下的恒温培养箱内进行孵育培养,2~3 d后进行传代培养。收集生长状态良好的PANC-1细胞接种24孔细胞板内(5×10^4 个/孔),采用生长抑素浓度为0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L处理细胞,记为各生长抑素各剂量组,其中生长抑素浓度为0 mg/L和400 mg/L,记为Control组和

SST组;参照 Lipofectamine™2000 转染试剂盒说明书将 pcDNA 和 FOXD1 转染至 PANC-1 细胞,经过 400 mg/L 的生长抑素及 20 mol/L 的 PI3K 抑制剂 LY294002 处理细胞,记为 SST+pcDNA 组、SST+FOXD1 组和 SST+FOXD1+LY294002 组。

1.3 MTT 检测细胞增殖 收集生长状态良好的 PANC-1 细胞接种至 96 孔板中(2×10^3 个/孔),在恒温培养箱固定培养 48 h 后,在每孔加入 20 μ L 的 MTT 溶液,继续培养孵育 4 h,出去上清液,继续加入 150 μ L 的二甲基亚砷(DMSO),轻轻震荡混匀,在酶标仪 490 nm 检测细胞的光密度(OD)值,并计算半抑制浓度(IC₅₀)值。

1.4 Transwell 检测细胞迁移和侵袭 细胞迁移实验:收集生长状态良好的 PANC-1 细胞在不含胎牛血清培养基内培养 24 h,消化培养后调整密度至 10^5 个/毫升。在 Transwell 上室加入 200 μ L 细胞悬液,下室内加入 500 μ L 含胎牛血清培养基继续培养 24 h。用棉签擦去未成功迁移的细胞,采用 4% 甲醛固定 15 min 后,结晶紫染色,30 min 倒置在显微镜下观察迁移细胞数目。

细胞侵袭实验:将 Matrigel 基质胶在不含血清培养基稀释,稀释比例为 1:3,取 200 μ L 稀释的 Matrigel 基质胶铺板于 Transwell 上室内,风干 5 h,后续实验同上述迁移实验。

1.5 蛋白质印迹法检测 PCNA、MMP-2、MMP-9、FOXD1 和 PI3K/AKT 蛋白的表达 收集生长状态良好的 PANC-1 细胞,按照 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。加入 45 μ g 上样蛋白经过 12% SDS-PAGE 处理转移至 PVDF 膜上,然后在 5% 脱脂牛奶封闭培养 2 h,加入 PCNA(1:500)、MMP-2(1:500)、MMP-9(1:500)、FOXD1(1:500)、p-PI3K(1:500)、p-AKT(1:500)、PI3K(1:800)、AKT(1:800)和 GAPDH(1:1000)抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜培养,次日加入辣根过氧化物酶标记二抗,室温下培养 2 h,加入 ECL 试剂显影,曝光。采用 Quantity One 软件扫描各组蛋白条带的灰度值,然后以 GAPDH 为内参计算蛋白的表达。

1.6 qRT-PCR 检测 FOXD1 mRNA 的表达 收集各组 PANC-1 细胞采用 Trizol 试剂提取细胞的总 RNA,紫外分光光度计检测浓度和纯度。按照逆转录试剂盒说明书将总 RNA 逆转录合成 cDNA,然后采用 SYBR Green Premix 试剂盒说明书进行 PCR 扩增。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 FOXD1 mRNA 的表达。FOXD1 正向引物 5'-AAGAACCCGCTGGTGAAG-3',反向引物 5'-GTCCAGTAGTTGCCCTTGC-3';GAPDH 正向引物 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3',反向引物 5'-GCC ATCACGCCACAGTTTC-3'。

1.7 统计学方法 通过采用 SPSS 20.0 分析处理实验数据,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 方法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的生长抑素对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 随着不同浓度(0 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L)的生长抑素处理胰腺癌细胞后,结果显示,随着不同浓度生长抑素的增加,细胞的 OD 值、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达逐渐降低($P < 0.05$)。其中生长抑素为 400 mg/L 达到半数抑制(IC₅₀),因此选择 400 mg/L 的生长抑素进行后续实验。见图 1,表 1。

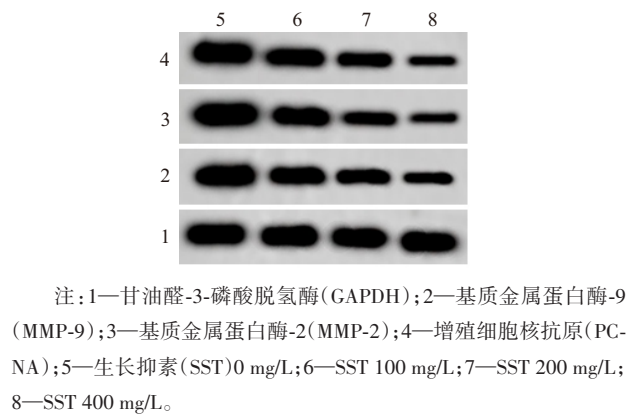


图1 各组胰腺癌细胞增殖和迁移、侵袭蛋白表达

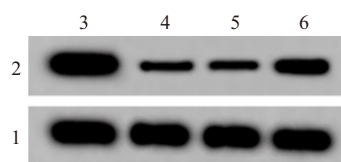
表1 不同浓度生长抑素对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

SST 浓度	重复次数	OD 值(490 nm)	迁移细胞数目/个	侵袭细胞数目/个	PCNA	MMP-2	MMP-9
0 mg/L	9	1.19±0.09	132.72±12.28	125.56±10.37	1.03±0.08	1.02±0.08	0.99±0.07
100 mg/L	9	0.93±0.07 ^①	115.78±11.70 ^①	106.11±9.52 ^①	0.84±0.07 ^①	0.81±0.07 ^①	0.79±0.06 ^①
200 mg/L	9	0.71±0.06 ^①	89.32±8.47 ^①	83.51±7.78 ^①	0.70±0.06 ^①	0.68±0.06 ^①	0.64±0.05 ^①
400 mg/L	9	0.48±0.05 ^①	63.42±6.71 ^①	60.23±5.26 ^①	0.49±0.05 ^①	0.45±0.04 ^①	0.42±0.04 ^①
F 值		173.70	82.23	100.28	107.38	124.36	165.52
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:SST 为生长抑素,OD 为光密度,PCNA 为增殖细胞核抗原,MMP 为基质金属蛋白酶。

①与 0 mg/L 组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 生长抑素对胰腺癌细胞 FOXD1 的表达的影响 选择 400 mg/L 的生长抑素处理细胞,通过 qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示,与 Control 组相比, SST 组的 FOXD1 mRNA 和蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$);与 SST+pcDNA 组相比, SST+FOXD1 组的 FOXD1 mRNA 和蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。见图 2,表 2。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—转录因子叉头框蛋白 D1 (FOXD1);3—对照组;4—生长抑素(SST)组;5—pcDNA 转染组(SST+pcDNA);6—FOXD1 转染组(SST+FOXD1)。

图2 各组胰腺癌细胞 FOXD1 蛋白表达

表2 生长抑素对胰腺癌细胞 FOXD1 表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

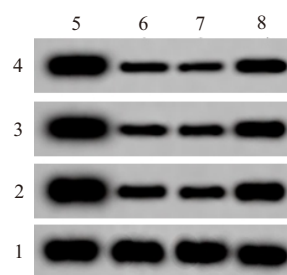
组别	重复次数	FOXD1 mRNA	FOXD1 蛋白
Control	9	1.02±0.06	0.99±0.07
SST	9	0.47±0.03 ^①	0.42±0.04 ^①
SST+pcDNA	9	0.49±0.04	0.39±0.03
SST+FOXD1	9	0.67±0.05 ^②	0.64±0.06 ^②
F 值		271.64	250.69
P 值		<0.001	<0.001

注:Control 为对照组, SST 为生长抑素组, SST+pcDNA 为 pcDNA 转染组, SST+FOXD1 为 FOXD1 转染组, FOXD1 为转录因子叉头框蛋白 D1。

①与 Control 组相比, $P < 0.05$ 。②与 SST+pcDNA 组相比, $P < 0.05$

2.3 生长抑素联合 FOXD1 对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 与 Control 组相比, SST 组的 OD 值、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$);与 SST+pcDNA 组相比, SST+FOXD1 组的 OD 值、迁移细胞数目、侵袭细胞数目、PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3,表 3。

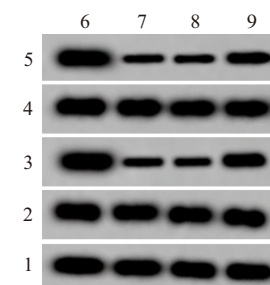
2.4 生长抑素联合 FOXD1 调控 PI3K/AKT 信号通路的表达 与 Control 组相比, SST 组的 p-PI3K、p-



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—基质金属蛋白酶-9 (MMP-9);3—基质金属蛋白酶-2(MMP-2);4—增殖细胞核抗原(PCNA);5—对照组;6—生长抑素(SST)组;7—pcDNA 转染组(SST+pcDNA);8—FOXD1 转染组(SST+FOXD1)。

图3 各组胰腺癌细胞增殖及迁移、侵袭蛋白表达

AKT 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$);与 SST+pcDNA 组相比, SST+FOXD1 组 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)。见图 4,表 4。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—蛋白激酶 B(AKT);3—磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT);4—磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K);5—磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(p-PI3K);6—对照组(Control);7—生长抑素组(SST);8—pcDNA 转染组(SST+pcDNA);9—FOXD1 转染组(SST+FOXD1)。

图4 各组胰腺癌细胞 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达

2.5 加入 LY294002 抑制剂对 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达的影响 与 SST+FOXD1 组相比, SST+FOXD1+LY294002 组的 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。见图 5,表 5。

2.6 生长抑素联合 FOXD1 调控 PI3K/AKT 通路对胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响 与 SST+FOXD1 组相比, SST+FOXD1+LY294002 组的 FOXD1 mRNA 及蛋白表达、OD 值、迁移细胞数目、

表3 FOXD1 过表达对生长抑素处理的胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	OD 值(490 nm)	迁移细胞数目/个	侵袭细胞数目/个	PCNA	MMP-2	MMP-9
Control	9	1.15±0.11	129.32±11.44	123.57±11.63	1.01±0.08	0.99±0.07	0.97±0.07
SST	9	0.52±0.05 ^①	66.79±7.22 ^①	63.72±6.51 ^①	0.47±0.05 ^①	0.43±0.04 ^①	0.44±0.05 ^①
SST+pcDNA	9	0.49±0.04	62.73±6.82	65.78±5.59	0.45±0.04	0.40±0.03	0.43±0.04
SST+FOXD1	9	0.71±0.07 ^②	86.88±8.46 ^②	81.52±7.30 ^②	0.66±0.06 ^②	0.62±0.06 ^②	0.67±0.05 ^②
F 值		158.03	111.09	105.95	171.98	241.09	201.68
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:Control 为对照组, SST 为生长抑素组, SST+pcDNA 为 pcDNA 转染组, SST+FOXD1 为 FOXD1 转染组, OD 为光密度, PCNA 为增殖细胞核抗原, MMP 为基质金属蛋白酶。

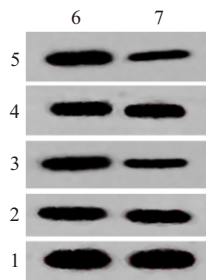
①与 Control 组相比, $P < 0.05$ 。②与 SST+pcDNA 组相比, $P < 0.05$ 。

表4 过表达FOXD1对生长抑素处理的胰腺癌细胞PI3K/AKT通路相关蛋白表达的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
Control	9	1.03±0.08	0.99±0.07
SST	9	0.43±0.04 ^①	0.39±0.03 ^①
SST+pcDNA	9	0.40±0.03	0.42±0.04
SST+FOXD1	9	0.62±0.05 ^②	0.65±0.06 ^②
F值		265.99	251.43
P值		<0.001	<0.001

注:Control为对照组,SST为生长抑素组,SST+pcDNA为pcDNA转染组,SST+FOXD1为FOXD1转染组,PI3K为磷脂酰肌醇3激酶,p-PI3K为磷酸化磷脂酰肌醇3激酶,AKT为蛋白激酶B,p-AKT为磷酸化蛋白激酶B。

①与Control组相比, $P<0.05$ 。②与SST+pcDNA组相比, $P<0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—蛋白激酶B(AKT);3—磷酸化蛋白激酶B(p-AKT);4—磷脂酰肌醇3激酶(PI3K);5—磷酸化磷脂酰肌醇3激酶(p-PI3K);6—FOXD1转染组(SST+FOXD1);7—生长抑素及PI3K抑制剂LY294002处理组(SST+FOXD1+LY294002)。

图5 各组胰腺癌细胞PI3K/AKT通路相关蛋白表达

侵袭细胞数目、PCNA、MMP-2、MMP-9蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见图6,表6。

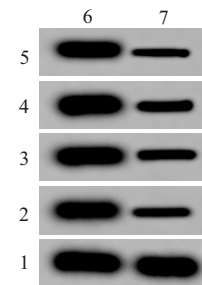
3 讨论

胰腺癌多发于糖尿病病人和慢性胰腺炎病人,临床症状表现为腹痛、腹部饱胀不适和消瘦无力等现象,受吸烟、高脂肪、饮酒、饮用咖啡和环境等因素影响^[8-9]。生长抑素作为临床治疗肿瘤和癌症常见的药物,在抗癌方面具有一定的作用效果,最早是由Krudich于1968年在大鼠下丘脑生长激素释放因子,是一种抑制生长激素的物质,经过Brazeau分离提纯^[10-11]。生长抑素不仅能减少胰腺、胃小肠和

表5 LY294002对生长抑素与FOXD1联合处理的胰腺癌细胞PI3K/AKT通路相关蛋白表达的影响

组别	重复次数	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
SST+FOXD1	9	0.60±0.07	0.63±0.07
SST+FOXD1+LY294002	9	0.43±0.04	0.46±0.05
t值		6.33	5.93
P值		<0.001	<0.001

注:SST+FOXD1为FOXD1转染组,SST+FOXD1+LY294002为生长抑素及PI3K抑制剂LY294002处理组,p-PI3K为磷酸化磷脂酰肌醇3激酶,PI3K为磷脂酰肌醇3激酶,p-AKT为磷酸化蛋白激酶B,AKT为蛋白激酶B。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—基质金属蛋白酶-9(MMP-9);3—基质金属蛋白酶-2(MMP-2);4—增殖细胞核抗原(PCNA);5—转录因子叉头框蛋白D1(FOXD1);6—FOXD1转染组(SST+FOXD1);7—生长抑素及PI3K抑制剂LY294002处理组(SST+FOXD1+LY294002)。

图6 各组胰腺癌细胞FOXD1蛋白及增殖和迁移、侵袭蛋白表达

胆囊等分泌,还能够减少酶活性,对肿瘤细胞具有保护作用,可以作为抗肿瘤的一种药物^[12]。有研究发现,生长抑素联合吉西他滨抑制胰腺癌细胞增殖^[13]。朱威等^[14]研究结果显示,生长抑素药物通过下调环氧合酶2(Cox-2)抑制胃癌细胞增殖和诱导细胞的凋亡。丁瑞贤^[15]研究结果显示,生长抑素通过调控Wnt/ β -连环蛋白通路抑制胃癌细胞增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化。本研究结果显示,结果不同浓度的生长抑素抑制胰腺癌细胞,结果显示,细胞的OD值、迁移细胞数目和侵袭细胞数目明显降低,PCNA、MMP-2、MMP-9蛋白表达下调,说明生长抑素可以明显抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,具有抗肿瘤的作用。

表6 LY294002对生长抑素与FOXD1联合处理的胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	FOXD1 mRNA	FOXD1蛋白	OD值(450 nm)	迁移细胞数目/个	侵袭细胞数目/个	PCNA	MMP-2	MMP-9
SST+FOXD1	9	0.72±0.06	0.93±0.05	0.69±0.06	83.72±7.20	78.57±7.52	1.01±0.07	0.97±0.07	0.99±0.07
SST+FOXD1+LY294002	9	0.37±0.04	0.35±0.03	0.53±0.05	67.19±6.46	62.52±5.16	0.41±0.05	0.39±0.04	0.44±0.04
t值		14.56	29.84	6.15	5.13	5.28	20.93	21.58	20.47
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:SST+FOXD1为FOXD1转染组,SST+FOXD1+LY294002为生长抑素及PI3K抑制剂LY294002处理组,FOXD1为转录因子叉头框蛋白D1,OD为光密度,PCNA为增殖细胞核抗原,MMP为基质金属蛋白酶。

FOXD1 是 FOXD 家族成员之一,位于染色体 5q12 区域,广泛存在于真核组织和细胞中^[16],有研究发现,FOXD1 在结直肠癌组中表达上调,与肿瘤分化程度、分期、淋巴结转移和不良预后显著相关,沉默 FOXD1 可以抑制结直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭,并促进其凋亡^[17]。Pan 等^[18]研究结果显示,FOXD1 在大肠癌组织中表达上调,异常表达与一些临床表现(肿瘤大小、分化、TNM 分期和淋巴结转移等)有关,敲低 FOXD1 减弱了大肠癌细胞增殖、迁移和侵袭。本研究结果显示,生长抑素可以下调 FOXD1 mRNA 和蛋白表达,过表达 FOXD1 可以逆转生长抑素对胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭的作用,说明生长抑素通过上调 FOXD1 发挥在胰腺癌细胞中的作用。PI3K 家族可以参与多种通路(PI3K、PTEN、AKT)调控肿瘤细胞的生长、转移等^[19],Zhang 等^[20]研究结果显示鳶尾素可以通过下调 PI3K/AKT 通路抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡。经过生长抑素处理细胞后,p-PI3K、p-AKT 蛋白表达下调,过表达 FOXD1 则上调 p-PI3K、p-AKT 蛋白表达,说明生长抑素通过联合 FOXD1 调控 PI3K/AKT 通路的表达。加入 PI3K 抑制剂 LY294002 处理后,p-PI3K、p-AKT 蛋白表达下调,细胞的 OD 值、迁移细胞数目和侵袭细胞数目明显降低,FOXD1 mRNA 表达下调,FOXD1、PCNA、MMP-2、MMP-9 蛋白表达下调,这说明生长抑素通过联合 FOXD1 调控 PI3K/AKT 通路影响胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述,生长抑素通过上调 FOXD1 的表达抑制 PI3K/AKT 通路抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

参考文献

- [1] 杨军,李贺,郑荣寿,等.2014 年中国胰腺癌发病与死亡分析[J].中国肿瘤,2018,27(6):420-425.
- [2] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin. 2020, 70(1):7-30.
- [3] GOMES-PORRAS M, CARDENAS-SALAS J, ÁLVAREZ-ESCO-LA C. Somatostatin analogs in clinical practice: a review[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5):1682.
- [4] 刘力,饶奇硕,王文婷,等.生长抑素联合吉西他滨对人胰腺癌 PANC-1 细胞的影响[J].广东医学,2017,38(19):2925-2930.
- [5] 丁方遯,刘振东.叉头盒蛋白 D1 激活细胞外信号调节酶通路促进胰腺癌侵袭转移[J].外科理论与实践,2020,25(6):486-492.
- [6] EBRAHIMI S, HOSSEINI M, SHAHIDSALES S, et al. Targeting the Akt/PI3K signaling pathway as a potential therapeutic strategy for the treatment of pancreatic cancer[J]. Curr Med Chem, 2017, 24(13):1321-1331.
- [7] 邓国伟,任丽楠,王孟岩,等.DPC4 基因抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路调控胰腺癌细胞增殖、侵袭及上皮间质转化[J].解剖科学进展,2020,26(5):567-569,574.
- [8] 张强,秦爱玉,秦玉刚.吉西他滨与厄洛替尼联合治疗胰腺癌的试验研究[J].安徽医药,2020,24(10):1952-1957.
- [9] 刘梦奇,吉顺荣,徐晓武,等.2019 年胰腺癌研究及诊疗新进展[J].中国癌症杂志,2020,30(1):1-10.
- [10] 邢加彰,程月鹏,白春梅.生长抑素类似物治疗神经内分泌肿瘤进展[J].临床药物治疗杂志,2019,17(8):26-31.
- [11] HARIS B, SARASWATHI S, HUSSAIN K. Somatostatin analogues for the treatment of hyperinsulinaemic hypoglycaemia[J]. Ther Adv Endocrinol Metab, 2020, 11:2042018820965068. DOI: 10.1177/2042018820965068
- [12] CURT AM, POPA ILIE IR, CAINAP C, et al. MicroRNAs and treatment with somatostatin analogs in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine neoplasms: challenges in personalized medicine[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2020, 29(4):647-659.
- [13] 刘力,王文婷.生长抑素联合吉西他滨对人胰腺癌 BxPC-3 细胞增殖抑制作用的研究[J].医学理论与实践,2020,33(24):4053-4055.
- [14] 朱威,饶雷平,赵登秋,等.NS-398 联合奥曲肽对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡的影响及机制[J].山东医药,2016,56(25):41-43.
- [15] 丁瑞贤.生长抑素通过 Wnt/ β -catenin 调控上皮间质转化抑制胃癌细胞迁移侵袭[D].郑州:郑州大学,2020.
- [16] ZENG CW, SHEN JC, TSAI HJ. A new member of the forkhead box protein family in zebrafish: domain composition, phylogenetic implication and embryonic expression pattern[J]. Gene Expr Patterns, 2020, 35:119093. DOI: 10.1016/j.gep.2019.119093.
- [17] 谢力,阮燕.FOXD1 的表达与结肠癌患者临床病理特征及细胞生物学行为的关系研究[J].结直肠肛门外科,2020,26(1):69-74.
- [18] PAN FP, LI MJ, CHEN WB. FOXD1 predicts prognosis of colorectal cancer patients and promotes colorectal cancer progression via the ERK 1/2 pathway[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(5):1522-1530.
- [19] LIU GL, YANG HJ, LIU B, et al. Effects of microRNA-19b on the proliferation, apoptosis, and migration of wilms' tumor cells via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(10):3424-3434.
- [20] ZHANG DG, ZHANG P, LI L, et al. Irisin functions to inhibit malignant growth of human pancreatic cancer cells via downregulation of the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12:7243-7249.

(收稿日期:2021-05-05,修回日期:2021-06-25)