

〔文章编号〕 1007-0893(2021)05-0014-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.05.005

PI3K/AKT 信号通路抑制剂对食管癌细胞 TE1 的侵袭及迁移影响的机制研究

吴瑞暖 翁欣 张萌 杨雅洁 孙艳花 许美权 刘霞^{*}

(深圳市第二人民医院 深圳大学第一附属医院, 广东 深圳 518035)

〔摘要〕 **目的:** 探讨 PI3K/AKT 信号通路抑制剂对食管癌细胞 TE1 迁移及侵袭能力的影响, 并分析其可能机制。 **方法:** 培养食管癌 TE1 细胞株, 用 30 μmol·L⁻¹ 的 LY294002 处理 TE1 细胞 1 h, 24 h 后采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法测定细胞增殖抑制率, 采用细胞划痕实验、细胞侵袭实验观察细胞迁移及侵袭情况, 采用 Western blot 实验检测 PY14 Cav-1 的表达水平。 **结果:** LY294002 能明显抑制食管癌细胞株 TE1 的增殖, 并抑制其迁移及侵袭能力, 与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。同时 LY294002 能够使 PY14Cav-1 表达水平下调。 **结论:** PI3K/AKT 信号通路正向调节食管癌细胞的增殖, 并参与细胞的侵袭及迁移, LY294002 能够抑制食管癌细胞的生长、迁移及侵袭, 其可能机制与通过下调 PY14 Cav-1 表达水平有关。

〔关键词〕 食管癌; PI3K/AKT 信号通路; PY14 Cav-1; LY294002

〔中图分类号〕 R 735.1 〔文献标识码〕 A

Mechanisms of PI3K/AKT Signaling Pathway Inhibitors on Invasion and Migration of Esophageal Cancer Cell TE1

WU Rui-nuan, WENG Xin, ZHANG Meng, YANG Ya-jie, SUN Yan-hua, XU Mei-quan, LIU Xia^{*}

(The Second People's Hospital of Shenzhen, The First Affiliated Hospital of Shenzhen University, Guangdong Shenzhen 518035)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the effects of PI3K/AKT signaling pathway inhibitor on the invasion and migration of esophageal cancer cell TE1, and to discuss the possible mechanism. **Methods** TE1 cells were cultured and treated with LY294002 (30 μmol/L) for 1 hour. The inhibition rate of cell proliferation was measured by MTT 24 hours later. Cell migration and invasion were observed by cell scratch test and cell invasion test. The expression level of PY14 Cav-1 was detected by Western blot. **Results** LY294002 could significantly inhibit the growth of TE1 cell and inhibit its migration and invasion ability. There was a significant difference between LY294002 group and control group ($P < 0.05$). At the same time, LY294002 could down-regulate the expression of PY14 Cav-1. **Conclusion** PI3K/AKT signaling pathway positively regulates the proliferation of esophageal cancer cells and participates in cells invasion and migration. LY294002 can inhibit the growth, migration and invasion of esophageal cancer cells. Its possible mechanism is related to down-regulation of PY14Cav-1 expression.

〔Key Words〕 Esophageal cancer; PI3K/AKT signaling pathway; PY14 Cav-1; LY294002

食管癌在世界范围内, 不论在恶性肿瘤的发病率还是死亡率方面均位于前列, 严重危及着居民的健康。食管癌进展隐匿, 出现症状时常常已进入中晚期阶段, 这是影响患者预后生存期的关键。目前对于食管癌的治疗手段有限, 随着食管癌相关分子的研究, 对于食管癌的靶向治疗有可能成为今后的有效治疗手段。

相关研究发现, 阻断 PI3K/AKT 信号通路可以明显抑制食管癌细胞增殖^[1]。同时也有研究指出 Cav-1 和 PY14 Cav-1 在食管癌细胞 TE1 中高表达^[2], 采用 Cav-1 RNA 干扰技术处理食管癌细胞后细胞的侵袭及迁移能力明显被抑制^[3], 另外研究^[4]发现 PY14 Cav-1 表达水平与细胞的生

长、侵袭及迁移明显相关。目前尚未见关于 PY14 Cav-1 与 PI3K/AKT 通路在食管癌细胞迁移及侵袭中的相互关系的研究报道, 本研究旨在通过阻断 PI3K/AKT 信号通路后观察食管癌细胞增殖、迁移及侵袭, 并初步探讨 PI3K/AKT 信号通路是否通过调控 PY14 Cav-1 的表达来调节食管癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

1 材料与方法

1.1 材料

人食管癌细胞株 TE1 (来自于汕头大学医学院第一附属医院分子心脏病学实验室), LY294002 溶液 (碧云天生物

〔收稿日期〕 2020 - 11 - 15

〔作者简介〕 吴瑞暖, 女, 主治医师, 主要从事病理科工作。

〔* 通信作者〕 刘霞 (E-mail: mdcg2014bl@163.com)

技术公司, 中国), PY14Cav-1 抗体 (San Diego, 美国), DMEM 培养基 (Sigma, 德国), 胎牛血清 (Sigma, 德国), 平衡盐溶液 (碧云天生物技术公司, 中国), 培养皿 (上海艾研科技有限公司, 中国), 烧杯 (上海艾研科技有限公司, 中国), 显微镜 (Olympus, 日本), 离心机 (湘仪离心机仪器有限公司, 中国), EP 管 (上海艾研科技有限公司, 中国), 移液枪 (Eppendorf, 德国), 冻存管 (上海艾研科技有限公司, 中国), 发光仪 (上海金鹏分析仪器有限公司, 中国) 等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 复苏食管癌 TE1 细胞, 采用 DMEM 高糖培养基进行培养, 培养基中含有 10% 胎牛血清。将培养皿置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中进行培养, 细胞呈贴壁生长状态, 根据细胞生长情况更换培养基或传代。

1.2.2 四甲基偶氮唑蓝法 将 TE1 细胞接种于 96 孔培养板中, 密度要求 $6 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔加入 100 μL , 按照观察时间分组, 每组设 5 个复孔, 分为药物组及对照组; 将加好细胞的培养板置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养过夜, 第 2 天观察细胞贴壁情况并加入 LY294002 溶液 ($30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 继续置入培养箱培养, 分别于 12 h、24 h 及 48 h 测量细胞增值抑制情况, 对照组加入等量的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)。具体操作如下: 每孔加入四甲基偶氮唑蓝 (methyl thiazolyl tetrazolium, MTT) 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 10 μL , 继续置入培养箱培养 4 h 后取出培养板并弃去上清, 每个孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO), 震荡 20 ~ 30 min, 用酶标仪检测各孔吸光度, 采用公式计算细胞生长的抑制率^[7]。

1.2.3 划痕实验 选择对数期生长的食管癌细胞 TE1 接种于 6 孔板中, 细胞数量掌握为过夜后细胞融合度约为 80%。PI3K/AKT 抑制剂 LY294002 以 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度加入培养皿中继续培养 1 h。对照组加入等量的 PBS。1 h 后取出培养皿, 用 200 μL 的枪头垂直划痕, PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养基, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h。按 0 h, 24 h 拍照, 拍照前如漂浮细胞多可先更换无血清培养基。

1.2.4 Transwell 实验 选择对数期生长的食管癌细胞 TE1, 培养其贴壁生长, 待贴壁超过 80% 后将 LY294002 以 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度加入培养皿中继续培养 1 h, 对照组加入等量的 PBS。1 h 后将药物组与对照组的细胞转移至小室中进行侵袭试验。具体步骤如下: 加 300 μL 预温不含血清的培养基到 Transwell 上室中, 放置 15 ~ 30 min 后吸去培养基。取 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞 100 μL 接种于 Transwell 小室上层, 注意枪头高于 Matrigel 层, 在 Transwell 小室的下层加入含 10% 胎牛血清的培养基 600 μL , 将 Transwell 小室置于培养箱 24 h 后取出小室, 用冰 PBS 轻柔清洗 1 遍, 加入冰甲醇后放置 10 min 进行固定, 后再次用冰 PBS 轻柔清

洗 1 遍, 进行 HE 染色后用棉签刮掉小室上层细胞, 将小室膜用刀片小心切下, 切下的膜置于载玻片上用中性树胶固定封片。显微镜下取膜上全部细胞总数进行细胞计数。

1.2.5 Western blot 实验 培养 TE1 细胞, 待细胞生长至培养皿基 80% ~ 90% 时加入 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 LY294002 培养 1 h, 对照组加入等量 PBS。1 h 后弃去含有药物及 PBS 的培养基, 加入 DMEM 培养基继续培养 24 h, 24 h 后取出培养皿, 弃去培养基, 用冰 PBS 冲洗细胞 1 次, 刮取细胞, 提取蛋白。然后进行制胶、上样 (上样量分别为 30 μg)、转膜、封闭、孵抗体、发光、曝光、显影、定影、灰度分析。

1.3 实验数据处理及统计分析

采用 SPSS 18.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 计数资料用百分比表示, 采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法实验结果

用不同时间下 LY294002 处理 TE1 后检测细胞生长抑制率, 随着药物作用时间的延长, 药物组与对照组增殖抑制率均逐渐增强, 药物组增殖抑制率明显高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示, LY294002 对食管癌 TE1 细胞有明显的抑制作用, 而对对照组细胞无明显生长抑制, 见图 1。

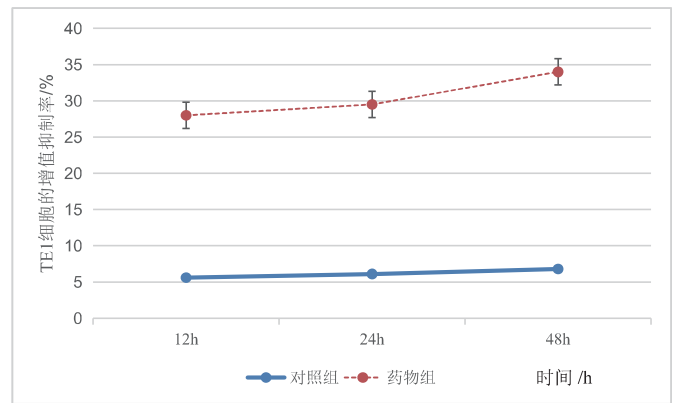


图 1 MTT 法检测 LY294002 在不同时间对 TE1 细胞增殖抑制的作用

2.2 划痕实验结果

药物组与对照组在 0 h 时划痕距离基本相同 (39 mm VS 40.5 mm), 24 h 后对照组划痕距离为 10.4 mm, 且划痕内可见大量细胞生长, 而药物组划痕距离为 29.85 mm, 见图 2。

2.3 Transwell 实验结果

LY294002 处理 24 h 后的细胞中, 对照组细胞迁移数为 (66 ± 7) 个, LY294002 组细胞迁移数为 (38 ± 5) 个, 两组的侵袭细胞数目比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

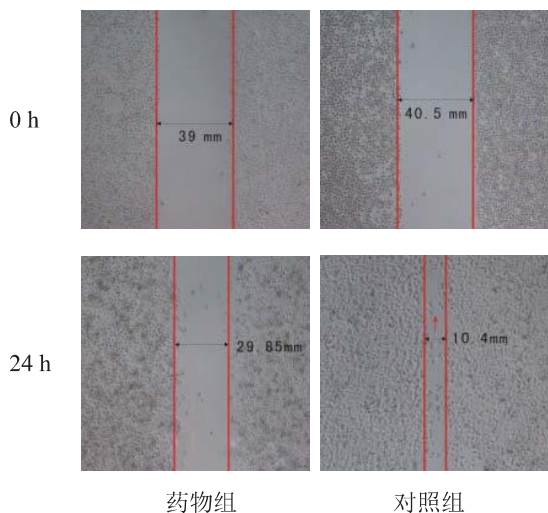


图2 细胞划痕实验结果

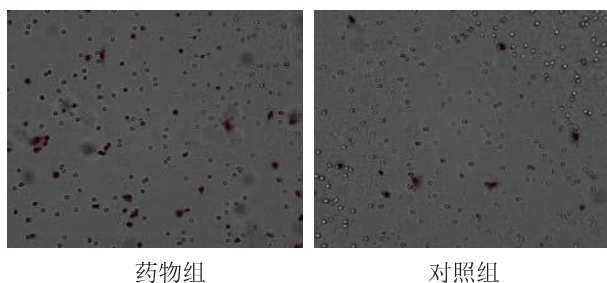


图3 Transwell 实验观察 LY294002 对细胞侵袭的影响

2.4 Western blot 结果结果

用 LY294002 处理食管癌 TE1 细胞，浓度为 30 μmol · L⁻¹，检测 Cav-1 蛋白及 PY14Cav-1 蛋白表达，结果显示 Cav-1 和 PY14Cav-1 表达水平均下降，而对照组 Cav-1 蛋白及 PY14Cav-1 的表达水平未见明显改变，组间比较，差异具有统计学意义 (P < 0.05)，见图 4。

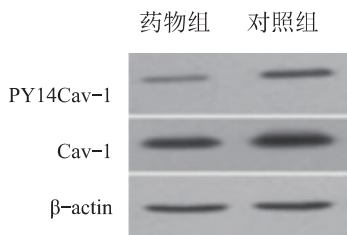


图4 Western blot 检测 LY294002 药物组与对照组中 Cav-1 与 PY14Cav-1 的表达

3 讨论

Cav-1 是位于细胞膜上小窝内的膜蛋白，为发卡样结构，镶嵌在细胞膜上，有着传导和运输的作用^[5]。目前研究发现 Cav-1 在肿瘤的发生发展过程中扮演促癌或抑癌作用。关于 Cav-1 在食管癌方面的研究发现，Cav-1 扮演着促癌角色。课题组前期研究发现，在食管癌患者组织中，Cav-1 表达明显高于癌旁组织及正常组织^[6]。通过体外培养食管癌细胞，

采用 Cav-1 RNA 干扰技术处理细胞后细胞的迁移及侵袭能力明显减弱^[3]。这些研究结果说明 Cav-1 在食管癌中是一种促癌蛋白。同时笔者发现，磷酸化 Cav-1，即 PY14Cav-1 的表达下调与食管癌细胞的侵袭及迁移呈负相关，这说明 Cav-1 可能通过调节 PY14Cav-1 的表达行使着促癌作用^[4]。

PI3K/AKT 信号通路是细胞内发挥重要作用的细胞通路，在细胞的生长、发育、转换、畸变等过程中扮演着重要角色。研究发现，PI3K 基因表达上调与多肿瘤组织的生长、增殖密切相关，比如食管癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌、甲状腺癌、膀胱癌等^[7-9]，此外，PI3K/AKT 信号转导通路的激活与肿瘤的血管形成和侵袭转移也密切相关，并由此影响患者的预后^[10-12]。课题组前期通过 PI3K/AKT 信号转导通路抑制剂 LY294002 处理人食管癌细胞株 EC109 后细胞增殖能力明显下降，考虑其机制可能与其抑制 AKT 磷酸化有关^[1]，但是具体机制仍不明确。并且这一结论已得到广泛的认可。

为了进一步揭示 PI3K/AKT 信号通路在食管癌发生发展过程中的具体作用机制，本研究试图通过体外培养人食管癌细胞株 TE1，采用 PI3K/AKT 信号转导通路抑制剂 LY294002 处理细胞后观察细胞的增殖、迁移及侵袭，结果发现，LY294002 能够明显提高 TE1 细胞的增殖抑制率，并且可以明显抑制 TE1 的迁移及侵袭能力，证明 PI3K/AKT 信号转导通路在食管癌中扮演着促癌作用。同时笔者通过检测 Cav-1 与 PY14Cav-1 蛋白表达发现，用 LY294002 处理过的细胞，Cav-1 与 PY14Cav-1 蛋白表达水平明显降低，这意味着 LY294002 可能通过调控 PY14Cav-1 蛋白的表达调控着食管癌细胞的增殖、侵袭及迁移。

综上所述，PI3K/AKT 信号通路正向调节食管癌细胞的增殖，并参与细胞的侵袭及迁移，LY294002 能够抑制食管癌细胞的生长、迁移及侵袭，其可能机制与通过下调 PY14 Cav-1 表达水平有关。

[参考文献]

- (1) 左丽萍, 陈素钻, 俞晶, 等. PI3K/Akt 信号通路抑制剂对食管癌细胞 EC109 中 FR 和 hnRNP-E1 表达的影响 (J). 广东医学, 2012, 33(19): 2871-2873.
- (2) 黄潮添, 刘朝晖, 吴瑞暖, 等. 磷酸化 Cav-1 在食管癌细胞中的表达及意义 (J). 中国临床研究, 2015, 28(10): 1363-1364.
- (3) 蔡晓曼, 陈素钻, 俞晶, 等. Cav-1 和 E-钙黏蛋白在食管癌 TE1 细胞系中的表达及其意义 (J). 癌变·畸变·突变, 2016, 28(3): 227-230.
- (4) Liu Z, Yu J, Wu R, et al. Rho/ROCK Pathway Regulates Migration and Invasion of Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Regulating Caveolin-1 (J). Med Sci Monit, 2017, 23(12): 6174-6185.
- (5) Liu W, Yin NC, Liu H, et al. Cav-1 promote lung cancer cell proliferation and invasion through lncRNA HOTAIR (J). Gene, 2018, 641(1): 335-340.

- (6) 汤盛新, 陈素钻, 俞晶, 等. 磷酸化小窝蛋白-1 在食管鳞癌中的表达及意义 (J). 现代肿瘤医学, 2015, 23(9): 1227-1230.
- (7) Fresno Vara JA, Casado E, De CJ, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer (J). Cancer Treatment Reviews, 2004, 30(2): 193-204.
- (8) Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer (J). Apoptosis, 2004, 9(6): 667-676.
- (9) Nandini D, Pradip D, Brian LJ. PI3K-AKT-mTOR Inhibitors in Breast Cancers: From Tumor cell signaling to Clinical Trials (J). Pharmacology & Therapeutics, 2017, 175(7): 91.
- (10) Butler DE, Marlein C, Walker HF, et al. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer (J). Oncotarget, 2017, 8(34): 56698-56713.
- (11) Lien EC, Dibble CC, Toker A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT (J). Current Opinion in Cell Biology, 2017, 45(1): 62.
- (12) Pons-Tostivint E, Thibault B, Guillermet-Guibert J. Targeting PI3K Signaling in Combination Cancer Therapy (J). Trends in Cancer, 2017, 3(6): 454.

〔文章编号〕 1007-0893(2021)05-0017-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.05.006

骨科护理结构化电子病历的建立和应用

孙其凤 韦隆莉 袁春艳

(香港大学深圳医院, 广东 深圳 518028)

〔摘要〕 **目的:** 探讨骨科护理结构化电子病历的建立方法和应用效果。**方法:** 选择香港大学深圳医院 40 名骨科临床一线护理人员作为研究对象, 以骨科结构化电子病历建立前(2019 年 7 月至 12 月)的护理人员记录耗时和文书质量作为对照组, 系统应用后(2020 年 1 月至 6 月)的记录耗时和文书质量作为观察组; 比较系统使用前后的护理人员记录耗时、满意度和护理文书质量。**结果:** 观察组护理记录耗时 (5.82 ± 0.55) min 低于对照组 (10.82 ± 3.81) min, 满意度 (94.85 ± 1.33) 分高于对照组 (84.44 ± 3.81) 分, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。观察组的连续性、客观性、专业性、依从率均高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 两组的书写及时性和完整性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** 骨科护理结构化电子病历的建立, 能够缩短护士的记录时间, 提高工作效率和病历质量。

〔关键词〕 骨科护理; 护理电子病历; 结构化书写模式

〔中图分类号〕 R 473.6; R 319 〔文献标识码〕 B

The Establishment and Application of Structured Electronic Documents System for Orthopedic Nursing

SUN Qi-feng, WEI Long-li, YUAN Chun-yan

(The University of Hong Kong-Shenzhen Hospital, Guangdong Shenzhen 518028)

〔Abstract〕 **Objective** To explore the establishment and application of structured electronic medical record of orthopedic nursing. **Methods** 40 orthopedic nurses in the University of Hong Kong-Shenzhen hospital were selected as the research objects, while the time-consuming and documents quality before the establishment of orthopedic structured electronic documents system (July to December 2019) were taken as the control group, and the time-consuming and document quality after the application of the system (January to June 2020) were taken as the observation group. The time consumption, satisfaction and quality of nursing documents before and after using the system were compared. **Results** The time consumption of the observation group was (5.82 ± 0.55) min lower than that of the control group (10.82 ± 3.81) min, and the satisfaction degree was (94.85 ± 1.33) higher than that of the control group (84.44 ± 3.81), the difference were statistically significant ($P < 0.05$). The continuity, objectivity, professionalism, and

〔收稿日期〕 2020 - 12 - 02

〔基金项目〕 深圳市科技创新委员会科技计划项目资助课题 (JCYJ20150331142757388)

〔作者简介〕 孙其凤, 女, 副主任护师, 主要研究方向是骨科护理、护理管理。