

# EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路 促进SGC-7901细胞的增殖

李国栋, 王洋洋, 刘玉河, 李湘奇

泰山医学院附属医院普外科, 山东 泰安 271000

**[摘要]** **背景与目的:** EPHA2能够促进胃癌细胞中Cyclin D1的表达及胃癌细胞的细胞周期进程, 从而增强胃癌细胞的增殖能力, 但EPHA2调控胃癌细胞中Cyclin D1的表达及胃癌细胞的细胞周期进程的分子机制依然不明确。Akt/mTOR信号通路能够通过促进胃癌细胞中Cyclin D1的表达及胃癌细胞的细胞周期进程增强胃癌细胞的增殖能力, 且有研究表明EPHA2能够激活Akt/mTOR信号通路。基于此, 该研究探讨了Akt/mTOR信号通路在EPHA2促胃癌细胞增殖中的作用。**方法:** 采用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测过表达EPHA2和敲低EPHA2表达对SGC-7901细胞中Akt、mTOR和4EBP1磷酸化的影响。使用Akt抑制剂MK2206和mTOR抑制剂RAD001分别处理转染空载体病毒的SGC-7901-NC细胞和过表达EPHA2的SGC-7901-EPHA2细胞, 分别通过CCK8、流式细胞术和Western blot检测细胞增殖、细胞周期及周期相关蛋白Cyclin D1的表达。**结果:** 过表达EPHA2增强SGC-7901细胞中Akt、mTOR和4EBP1的磷酸化, 敲低EPHA2的表达抑制SGC-7901细胞中Akt、mTOR和4EBP1的磷酸化。MK2206和RAD001处理细胞时, EPHA2过表达对SGC-7901细胞增殖、细胞S期和Cyclin D1表达的促进作用被显著抑制。**结论:** EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路促进胃癌细胞SGC-7901的增殖能力, 提示我们将来针对EPHA2高表达的胃癌患者或许可以采用Akt抑制剂和mTOR抑制剂予以个体化治疗。

**[关键词]** EPHA2; Akt/mTOR信号通路; 胃癌; SGC-7901细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2016.02.002

中图分类号: R735.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)02-0128-06

## EPHA2 promotes SGC-7901 cell proliferation through enhancing Akt/mTOR signaling pathway

LI Guodong, WANG Yangyang, LIU Yuhe, LI Xiangqi (Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Taishan Medical University, Taian 271000, Shandong Province, China)

Correspondence to: LI Xiangqi E-mail: lxqaaa@aliyun.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** EPHA2 has been reported to enhance the proliferation of gastric cancer cells through promoting CyclinD1 expression and cell cycle progression. However, the underlying mechanism that EPHA2 promotes CyclinD1 expression and cell cycle progression is still poorly understood. Akt/mTOR signaling pathway has been reported to enhance the proliferation of gastric cancer cells by promoting CyclinD1 expression and cell cycle progression, and some studies have shown that EPHA2 can activate Akt/mTOR signaling pathway. Based on this, this study investigated whether EPHA2 promoted gastric cancer SGC-7901 cell proliferation through enhancing Akt/mTOR signaling pathway. **Methods:** Western blot was used to determine the effect of EPHA2 overexpression or knockdown on the phosphorylation of Akt and mTOR in SGC-7901 cells. SGC-7901-NC infected with control lentivirus and SGC-7901-EPHA2 cells with EPHA2 overexpression were treated with DMSO, MK2206 (an Akt inhibitor) and RAD001 (a mTOR inhibitor) for different time periods, respectively. Cell proliferation was detected using the CCK8 assay. Cell cycle was detected using flow cytometry, and the expression of CyclinD1 was determined by Western blot. **Results:** Overexpression of EPHA2 enhanced Akt/mTOR signaling pathway in SGC-7901 cells, and silencing EPHA2 in SGC-7901 cells inhibited Akt/mTOR signaling pathway. MK2206 and RAD001 antagonized the promoting effect of EPHA2 on the proliferation, S-phase and CyclinD1 expression of SGC-7901 cells, respectively. **Conclusion:** EPHA2 promotes SGC-7901 cell proliferation through enhancing Akt/mTOR signaling pathway. Akt inhibitor or mTOR inhibi-

tor could be an effective treatment strategy for gastric cancer patients overexpressing EPHA2.

[ Key words ] EPHA2; Akt/mTOR signaling pathway; Gastric cancer; SGC-7901 cell

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一。在世界范围内,胃癌的发病率在所有恶性肿瘤中位于第四位,致死率位于第三位<sup>[1]</sup>。我国胃癌发病率远高于欧、美国家,占到全球新增病例的40%以上<sup>[2]</sup>。EPHA2是受体酪氨酸激酶EPH家族成员,其在胶质母细胞瘤、卵巢癌和胆管癌等多种肿瘤中高表达,且与肿瘤的恶性进展密切相关<sup>[3]</sup>。有研究发现,EPHA2在77.3%胃癌患者的胃癌组织中高表达<sup>[4]</sup>,进一步的研究发现,敲低EPHA2的表达能够抑制胃癌细胞的增殖和迁移<sup>[5]</sup>。最近的研究表明,EPHA2是通过增强Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),进而促进胃癌细胞迁移<sup>[6]</sup>,且发现EPHA2能够促进胃癌细胞中Cyclin D1的表达及胃癌细胞的细胞周期进程,从而增强胃癌细胞的增殖能力,但EPHA2调控胃癌细胞中Cyclin D1的表达及胃癌细胞的细胞周期进程的分子机制依然不明确。有研究发现,Akt/mTOR信号通路能够通过促进胃癌细胞中Cyclin D1的表达及胃癌细胞的细胞周期增强胃癌细胞的增殖能力<sup>[7]</sup>,且有研究表明EPHA2能够激活Akt/mTOR信号通路<sup>[8]</sup>。基于此,本研究探讨了Akt/mTOR信号通路在EPHA2促胃癌细胞增殖中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株及主要试剂

胃癌细胞株SGC-7901由本研究室保存。过表达EPHA2的慢病毒和携带EPHA2 shRNA的慢病毒为上海吉凯基因化学技术有限公司产品。Akt抑制剂MK2206和mTOR抑制剂RAD001为美国Selleck公司产品。EPAH2、Akt、pAkt-473、pAkt-308、mTOR、p-mTOR-2448、4EBP1、p4EBP1-65和Cyclin D1抗体均为美国Cell Signaling Technology公司产品。Tubulin抗体为美国Santa Cruz公司产品。

### 1.2 SGC-7901-EPHA2和SGC-7901-shE-EPHA2稳定细胞株的建立

SGC-7901细胞以 $5 \times 10^5$ 个/孔的密度接种到60 mm细胞培养皿中,24 h后,分别使用携带EPHA2基因的重组慢病毒颗粒(LV-EPHA2)和携带EPHA2 shRNA的重组慢病毒颗粒(LV-shEPHA2)及相应的空载体对照病毒(SGC-7901-NC、SGC-7901-shNC)感染SGC-7901细胞,48 h后加嘌呤霉素筛选,持续筛选至不再有细胞死亡为止。

### 1.3 蛋白[质]印迹法(Western blot)检测

蛋白质提取后使用BSA法进行定量,取等量的蛋白质加入5×SDS后进行沸水浴5~10 min,上样进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后进行半干转膜,转完后将膜用5%的脱脂奶粉室温封闭2 h,随后加入相应的一抗4 ℃温育过夜,1×TBST洗膜3次后加入偶联辣根过氧化物酶的二抗室温温育1 h,1×TBST洗膜3次后化学发光法显色。采用Image J软件对条带进行灰度分析,对蛋白质表达水平进行相对定量分析。

### 1.4 CCK8 实验

在96孔板中分别接种SGC-7901-NC和SGC-7901-EPHA2细胞,每孔2 000个细胞,24 h后分别用DMSO、MK2206(0.1  $\mu$ mol/L)和RAD001(20 nmol/L)处理48 h。每孔加入15  $\mu$ L CCK8溶液,37 ℃温育1 h后,使用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度(D)值。每个时间点平行做3个孔,实验重复3次。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

### 1.5 细胞周期检测

SGC-7901-NC和SGC-7901-EPHA2细胞分别用DMSO、MK2206(0.1  $\mu$ mol/L)和RAD001(20 nmol/L)处理48 h后收集细胞,PBS清洗2次后加入预冷的75%乙醇-20 ℃固定过夜。固定后的细胞用冰冷的PBS洗涤2次,加入100  $\mu$ g/mL的RNA酶于37 ℃温育30 min后加入50  $\mu$ g/mL的PI室温避光反应15 min,用流式细胞仪检测。

## 1.6 统计学处理

利用SAS 9.2软件对数据进行统计分析, 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 $t$ 检验进行组间比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EPHA2基因过表达及沉默表达胃癌细胞株的建立

为了研究EPHA2促进胃癌细胞增殖的机制, 我们首先通过慢病毒感染及嘌呤霉素筛选的方法建立了EPHA2基因持续过表达和沉默表达的胃癌细胞株。我们用携带EPHA2基因的重组慢病毒颗粒(LV-EPHA2)转染SGC-7901细胞建立了过表达EPHA2的胃癌细胞株SGC-7901-EPHA2。Western blot检测结果如图1A。与未转染的SGC-7901细胞相比, 转染空载体病毒的SGC-7901-NC细胞中EPHA2的表达没有显著变化, 而转染LV-EPHA2病毒的SGC-7901-EPHA2细胞中EPHA2的表达显著升高。我们使用携带EPHA2 shRNA的重组慢病毒颗粒(LV-shEPHA2)感染SGC-7901细胞建立了EPHA2基因沉默表达的胃癌细胞株SGC-7901-shEPHA2。Western blot检测结果如图1B。与未转染的SGC-7901细胞相比, 转染空载体病毒的SGC-7901-shNC细胞中EPHA2的表达没有变化, 而转染LV-shEPHA2病毒的SGC-7901-shEPHA2细胞中EPHA2的表达显著降低。

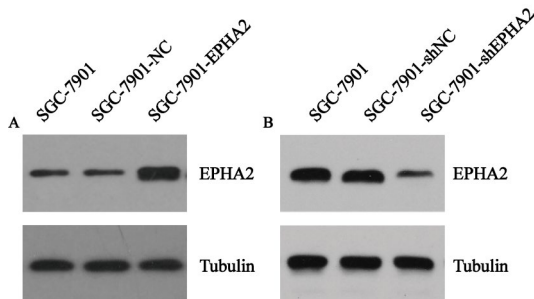


图1 EPHA2过表达及沉默表达胃癌细胞株的建立

Fig.1 Generation of SGC-7901 cell lines stably overexpressing EPHA2 or silencing EPHA2

A: EPHA2 protein expression in SGC-7901, SGC-7901-NC and SGC-7901-EPHA2 cells; B: EPHA2 protein expression in SGC-7901, SGC-7901-shNC and SGC-7901-shEPHA2 cells

### 2.2 EPHA2增强SGC-7901细胞中Akt/mTOR信号通路

Western blot检测结果如图2。EPHA2过表达能够显著促进Akt分子的磷酸化, 同时显著促进了mTOR分子及其下游分子4EBP1的磷酸化, 说明过表达EPHA2能够增强SGC-7901细胞中Akt/mTOR信号通路; 而敲低EPHA2能够显著抑制Akt分子的磷酸化, 同时显著抑制了mTOR分子及其下游分子4EBP1的磷酸化, 说明敲低EPHA2的表达能够抑制SGC-7901细胞中Akt/mTOR信号通路。

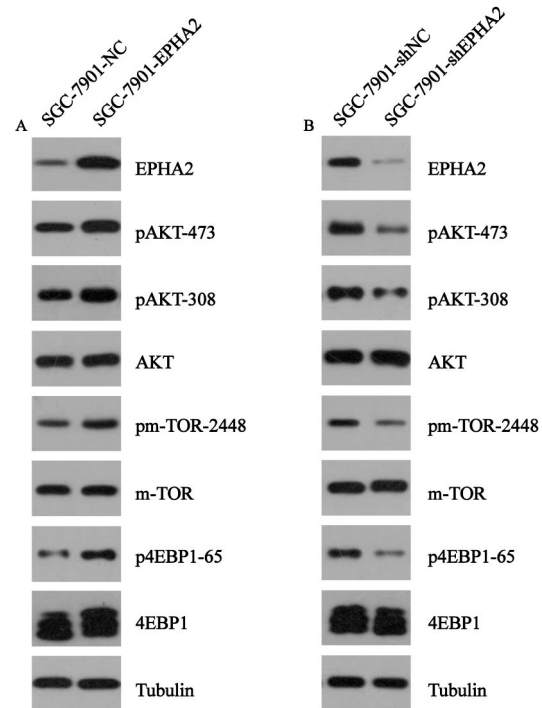


图2 EPHA2增强SGC-7901细胞中Akt和mTOR的磷酸化

Fig.2 EPHA2 promoted the phosphorylation of Akt and mTOR in SGC-7901 cells

A: Effect of EPHA2 overexpression on the phosphorylation of Akt and mTOR; B: Effect of EPHA2 silencing on the phosphorylation of Akt and mTOR

### 2.3 EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路促进SGC-7901细胞的增殖

CCK-8检测结果如图3。在DMSO对照组中, EPHA2过表达显著促进了SGC-7901的增殖( $1.55\pm 0.09$  vs  $1.00\pm 0.04$ ,  $P=0.0016$ ); 当用Akt抑制剂MK2206和mTOR抑制剂RAD001分别处理细胞时, EPHA2对SGC-7901细胞的增

殖促进作用被显著抑制(MK2206:  $0.65 \pm 0.03$  vs  $0.66 \pm 0.03$ ,  $P=0.6384$ ; RAD001:  $0.76 \pm 0.04$  vs  $0.77 \pm 0.05$ ,  $P=0.7828$ )。这说明EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路促进了SGC-7901细胞的增殖。

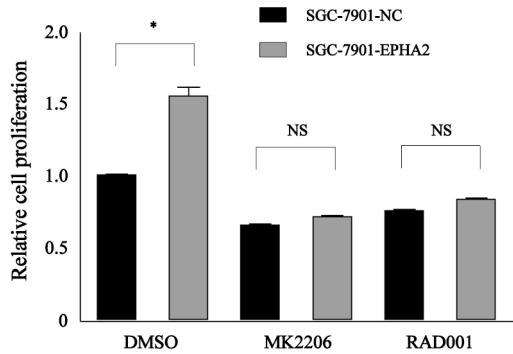


图3 MK2206和RAD001对SGC-7901-NC和SGC-7901-EPHA2细胞增殖的影响

Fig. 3 Effect of MK2206 and RAD001 on the proliferation of SGC-7901-NC and SGC-7901-EPHA2 cells

\*:  $P < 0.05$ ; NS: No significance

#### 2.4 EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路促进SGC-7901细胞周期进程

细胞周期检测结果如图4。在DMSO对照组中，EPHA2过表达显著促进了SGC-7901细胞中S期的比例 [  $(28.51 \pm 1.07)\%$  vs  $(37.41 \pm 1.31)\%$ ,

$P=0.0017$  ] ; 而当用MK2206和RAD001分别处理细胞时，EPHA2对SGC-7901 S期的促进作用却被显著抑制 [ (MK2206:  $(18.64 \pm 1.28)\%$  vs  $(19.53 \pm 1.74)\%$ ,  $P=0.5931$ ; RAD001:  $(22.18 \pm 1.46)\%$  vs  $(23.38 \pm 1.51)\%$ ,  $P=0.4646$  ] 。这说明EPHA2能够通过增强Akt/mTOR信号通路促进SGC-7901细胞周期进程。

#### 2.5 EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路促进SGC-7901细胞中Cyclin D1的表达

Western blot检测结果如图5A。在DMSO对照组中，EPHA2过表达显著促进了SGC-7901细胞中Cyclin D1的表达 ( $1.00 \pm 0.07$  vs  $1.81 \pm 0.12$ ,  $P=0.0011$ )，而当用MK2206处理细胞时，EPHA2对SGC-7901中Cyclin D1的表达的促进作用被显著抑制 ( $0.51 \pm 0.08$  vs  $0.42 \pm 0.15$ ,  $P=0.4259$ )。在DMSO对照组中，EPHA2过表达显著促进了SGC-7901细胞中Cyclin D1的表达 ( $1.00 \pm 0.08$  vs  $1.73 \pm 0.11$ ,  $P=0.0017$ )；而当用RAD001处理细胞时，EPHA2对SGC-7901中Cyclin D1的表达的促进作用却被显著抑制 ( $0.55 \pm 0.08$  vs  $0.57 \pm 0.10$ ,  $P=0.9398$ , 图5B)。这说明EPHA2能够通过增强Akt/mTOR信号通路促进SGC-7901细胞中Cyclin D1的表达，进而促进SGC-7901的细胞周期进程。

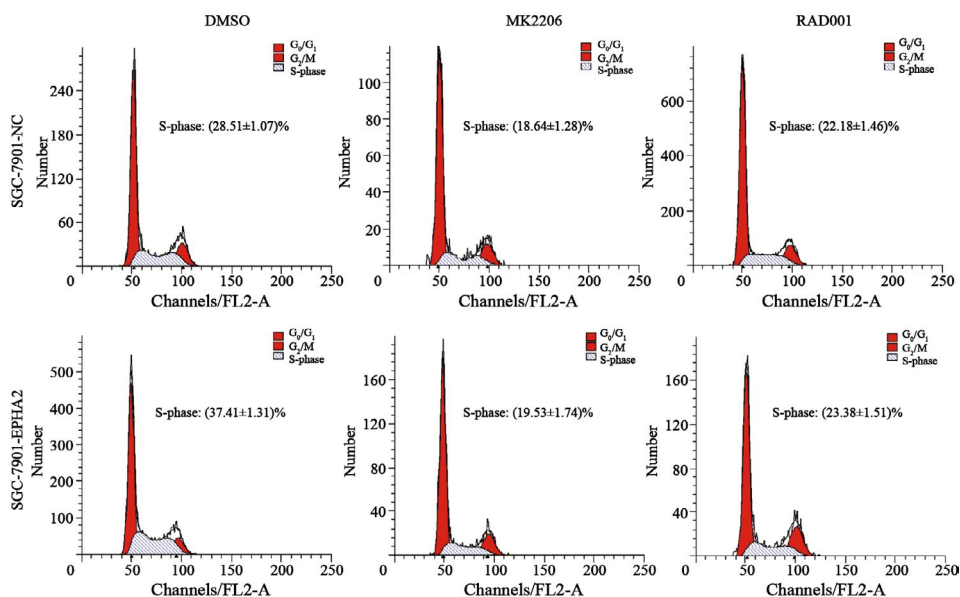


图4 MK2206和RAD001对SGC-7901-NC和SGC-7901-EPHA2细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of MK2206 and RAD001 on the cell cycle of SGC-7901-NC and SGC-7901-EPHA2 cells

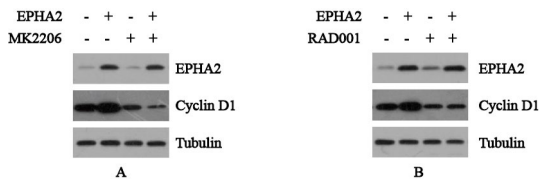


图5 MK2206和RAD001对SGC-7901-NC和SGC-7901-EPHA2细胞中Cyclin D1蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of MK2206 and RAD001 on the expression of Cyclin D1 in SGC-7901-NC and SGC-7901-EPHA2 cells

A: Effect of MK2206 on the expression of Cyclin D1 in SGC-7901-NC and SGC-7901-EPHA2 cells; B: Effect of RAD001 on the expression of Cyclin D1 in SGC-7901-NC and SGC-7901-EPHA2 cells

### 3 讨 论

EPHA2在胃癌细胞的增殖和迁移过程中发挥着重要的作用。有研究发现, EPHA2通过增强wnt/ $\beta$ -catenin信号通路促进EMT进而促进胃癌细胞迁移<sup>[6]</sup>, 但是EPHA2促进胃癌细胞增殖的分子机制尚不明确。有研究发现, 在胃癌组织中EGFR、PI3K和PTEN的突变均能使Akt和mTOR的磷酸化程度增高<sup>[9]</sup>, 且进一步的研究发现Akt和mTOR的磷酸化程度与胃癌的恶性程度呈正相关, 而与患者的生存期呈负相关<sup>[10]</sup>, 表明Akt/mTOR信号通路在胃癌的恶性进展中发挥着重要的作用。有研究发现, Akt/mTOR信号通路能够通过多种机制促进胃癌细胞的增殖: mTOR激酶通过磷酸化4EBP1增强胃癌细胞中的帽依赖性翻译进而促进Cyclin D1蛋白的翻译和细胞周期进程, 从而增强胃癌细胞的增殖能力<sup>[11]</sup>; Akt/mTOR信号通路能够促进HIF-1 $\alpha$ 的表达进而增强胃癌细胞中VEGF信号通路转导从而促进胃癌细胞的增殖<sup>[12-13]</sup>。

为了探索Akt/mTOR信号通路在EPHA2促进胃癌细胞增殖中的作用, 我们建立了稳定过表达EPHA2的胃癌细胞株SGC-7901-EPHA2和稳定敲低EPHA2表达的胃癌细胞株SGC-7901-shEPHA2, 然后进行Western blot检测。结果发现, 过表达EPHA2能够显著促进Akt、mTOR和4EBP1的磷酸化, 敲低EPHA2能够显著抑制Akt、mTOR和4EBP1的磷酸化, 说明EPHA2增强SGC-7901细胞中Akt/mTOR信号通路。随

后, 我们使用MK2206和RAD001处理细胞, 阻断Akt/mTOR信号通路。发现EPHA2对SGC-7901细胞增殖和细胞周期的促进作用被显著抑制, 说明EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路促进SGC-7901细胞的增殖和细胞周期进程。CyclinD1在肿瘤细胞周期调控中发挥着重要的作用<sup>[14]</sup>, 且其表达受Akt/mTOR信号通路调控, 我们发现了抑制Akt/mTOR信号通路能够拮抗EPHA2对SGC-7901中Cyclin D1表达的促进作用, 说明EPHA2能够通过增强Akt/mTOR信号通路促进SGC-7901细胞中Cyclin D1的表达, 进而促进SGC-7901的细胞周期进程。

EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路促进肿瘤恶性进展已经在多种肿瘤中报道。在胆管癌中, 过表达EPHA2增强Akt/mTOR信号通路, 进而促进CHO-CK细胞的体外增殖能力和体内成瘤能力<sup>[15]</sup>; 在乳腺癌中, 磷酸化的EPHA2能够通过PI3K激活Akt参与曲妥珠单抗耐药<sup>[16]</sup>; 在宫颈癌中, EPHA2以RhoG依赖的方式激活Akt促进HeLa细胞的存活<sup>[17]</sup>。此外, Akt也可以反向通过调控EPHA2的磷酸化促进肿瘤细胞的恶性增殖。研究表明, Akt通过增强EPHA2第897位丝氨酸的磷酸化促进胶质瘤细胞和前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力<sup>[18]</sup>。

总之, 本研究结果显示, EPHA2通过增强Akt/mTOR信号通路促进胃癌细胞的增殖, 提示我们将来针对EPHA2高表达的胃癌患者可以采用Akt抑制剂和mTOR抑制剂予以个体化治疗。

### [参 考 文 献]

- [1] DE MARTEL C, FERLAY J, FRANCESCHI S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis [J]. Lancet Oncol, 2012, 13(6): 607-615.
- [2] FERLAY J, SHIN H R, BRAY F, et al. Estimates of Worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [3] LI R, YUAN W, MEI W, et al. MicroRNA 520d-3p inhibits gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion by downregulating EphA2 expression [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 396(1-2): 295-305.
- [4] TAPIA O, RIQUELME I, LEAL P, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway is activated in gastric cancer with potential

- prognostic and predictive significance [ J ] . Virchows Archiv, 2014, 465(1): 25–33.
- [ 5 ] YUAN W, CHEN Z, WU S, et al. Silencing of EphA2 inhibits invasion of human gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro* and *in vivo* [ J ] . Neoplasia, 2011, 59(1): 105–113.
- [ 6 ] HUANG J, XIAO D, LI G, et al. EphA2 promotes epithelial-mesenchymal transition through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in gastric cancer cells [ J ] . Oncogene, 2014, 33(21): 2737–2747.
- [ 7 ] AL-BATRAN S E, DUCREUX M, OHTSU A. mTOR as a therapeutic target in patients with gastric cancer [ J ] . Int J Cancer, 2012, 130(3): 491–496.
- [ 8 ] ZHUANG G, BRANTLEY-SIEDERS D M, VAUGHT D, et al. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy [ J ] . Cancer Res, 2010, 70(1): 299–308.
- [ 9 ] WILLEMS L, TAMBURINI J, CHAPUIS N, et al. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: New data on targeted therapies [ J ] . Curr Oncol Rep, 2012, 14(2): 129–138.
- [ 10 ] POLIVKA J, JANKU F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway [ J ] . Pharmacol Therapeut, 2014, 142(2): 164–175.
- [ 11 ] BU Z, JI J. Therapeutic implications of mTOR inhibitors in the treatment of gastric cancer [ J ] . Curr Cancer Drug Targets, 2013, 13(2): 121–125.
- [ 12 ] LANG S A, GAUMANN A, KOEHL G E, et al. Mammalian target of rapamycin is activated in human gastric cancer and serves as a target for therapy in an experimental model [ J ] . Int J Cancer, 2007, 120(8): 1803–1810.
- [ 13 ] CEJKA D, PREUSSER M, FUEREDER T, et al. mTOR inhibition sensitizes gastric cancer to alkylating chemotherapy *in vivo* [ J ] . Anticancer Res, 2008, 28(6A): 3801–3808.
- [ 14 ] SEILER R, THALMANN G N, ROTZER D, et al. CCND1/Cyclin D1 status in metastasizing bladder cancer: a prognosticator and predictor of chemotherapeutic response [ J ] . Mod Pathol, 2014, 27(1): 87–95.
- [ 15 ] CUI X D, LEE M J, KIM J H, et al. Activation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and Raf/Pyk2 by growth factor-mediated Eph receptor 2 (EphA2) is required for cholangiocarcinoma growth and metastasis [ J ] . Hepatology, 2013, 57(6): 2248–2260.
- [ 16 ] ZHUANG G, BRANTLEY-SIEDERS D M, VAUGHT D, et al. Elevation of receptor tyrosine kinase EphA2 mediates resistance to trastuzumab therapy [ J ] . Cancer Res, 2010, 70(1): 299–308.
- [ 17 ] HARADA K, HIRAMOTO-YAMAKI N, NEGISHI M, et al. Ephexin4 and EphA2 mediate resistance to anoikis through RhoG and phosphatidylinositol 3-kinase [ J ] . Exp Cell Res, 2011, 317(12): 1701–1713.
- [ 18 ] MIAO H, LI D Q, MUKHERJEE A, et al. EphA2 mediates ligand-dependent inhibition and ligand-independent promotion of cell migration and invasion via a reciprocal regulatory loop with Akt [ J ] . Cancer cell, 2009, 16(1): 9–20.

(收稿日期: 2015-09-08 修回日期: 2015-12-10)