

文章编号:1005-6947(2006)03-0181-04

· 实验研究 ·

# 体外转染 PTEN 抑制胆管癌 QBC939 细胞生长及下调 mTOR 表达的研究

刘民锋, 徐立宁, 左石, 罗剑, 郭伟, 董泾青, 邹声泉

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 普通外科, 湖北 武汉 430030)

**摘要:**目的 研究信号转导通路 PI3K/AKT/PTEN/mTOR 中抑癌基因 PTEN 在体外对胆管癌 QBC939 细胞生长的抑制作用, 及对下游 mTOR 表达的影响。方法 用携带有野生型 PTEN 和突变型 PTEN 的真核表达载体及空载质粒转染 QBC939; 用 Western blot 检测转染后 PTEN 蛋白的表达及蛋白激酶 B 磷酸化的变化; 流式细胞技术检测细胞周期和细胞凋亡情况, 及对下游 mTOR 表达的影响。结果 野生型 PTEN 转染成功后的 QBC939 细胞中 PTEN 明显上升, 磷酸化 AKT 明显下降, mTOR 表达也明显下调; 而突变型 PTEN 转染后的细胞中 PTEN 上升, 但磷酸化 AKT 的变化不明显, mTOR 的表达亦无明显变化。结论 PTEN 通过磷酸化 AKT 使之活化, 进一步使下游的 mTOR 同步下调, 继而调节肿瘤细胞周期和细胞凋亡。在 PI3K/AKT/PTEN/mTOR 信号转导途径中, PTEN 与 mTOR 通过 AKT 的磷酸化有密切关系。

**关键词:**胆管癌细胞; 抑癌基因; 转染

**中图分类号:**R735.8; R730.23.13

**文献标识码:**A

## Investigation of the inhibition of the cell growth and down-regulation of mTOR in the cholangiocarcinoma QBC939 cells transfected with plasmid PTEN in vitro

LIU Min-feng, XU Li-ning, ZUO Shi, LUO Jian, GUO wei, DONG Jing-qing, ZOU Shen-quan

(Department of General Surgery, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of the tumor suppressor gene PTEN in growing inhibition and down-regulating mTOR in cholangiocarcinoma QBC939 cells in vitro. **Methods** QBC939 cells were transfected with plasmids wild-type PTEN and C124S-PTEN in vitro. After transfection, the expression of the PTEN and phosphorylation of AKT and mTOR was detected by Western blot. Flow cytometry was used to analyze apoptosis and cell cycle of the transfected cells. **Results** Compared with the control, the expression of phosphorylation AKT was decreased and mTOR were down-regulated respectively when transfected with the wild-type PTEN. However, after transfection with mutation-type PTEN, the level of PTEN in the cells by increased, but phosphorylation AKT level and mTOR expression had no significant change. **Conclusions** PTEN can be activated by phosphorylated AKT. Activated AKT decreased the mTOR which led to tumor cells apoptosis and regulation of the tumor cell cycle. In the pathway of signal transmission of PI3K/AKT/PTEN/mTOR, PTEN and mTOR are closely related through phosphorylation of AKT.

**Key words:** Biliary Tract Carcinoma Cell Line; Tumor Suppressor Gene; Transfect

**CLC number:** R735.8; R730.23.13

**Document code:** A

**基金项目:**国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2002AA214061)。

**收稿日期:**2005-11-07; **修订日期:**2006-01-21。

**作者简介:**刘民锋,男,安徽合肥人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生,主要从事胆胰外科方面的研究。

**通讯作者:**刘民锋 E-mail:matthewliu007@yahoo.com.cn。

在恶性肿瘤细胞的增殖、分化过程中,PI3K/AKT/PTEN/mTOR 信号转导通路起着重要的作用。而在这条信号转导通路中,PTEN 作为一种具有磷酸酶活性的肿瘤抑制基因,在人类许多肿瘤和遗传性肿瘤易感综合征中均存在突变或缺失<sup>[1]</sup>。mTOR 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,与蛋白的转录与翻译关系密切<sup>[2]</sup>。它们在该信号转导通路中起重要调节作用,最终调控细胞周期和细胞凋亡。本研究通过脂质体介导转染野生型 PTEN 和突变型 PTEN 导入人胆管癌 QBC939 细胞中,观察转染后 PTEN 蛋白,磷酸化 AKT 和 mTOR 蛋白表达的变化;以及它们对 QBC939 细胞生长作用的影响,从而探讨 PI3K/AKT/PTEN/mTOR 信号转导通路对胆管癌细胞体外的抑制作用。

## 1 资料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人胆管癌细胞株 QBC939 由第三军医大学西南医院王曙光博士惠赠。

1.1.2 质粒与菌株 PGZ21- $\sigma$ XZ-PTENwt 携带的野生型 PTEN 质粒,PGZ21- $\sigma$ XZ-PTEN-C124S 携带无磷酸酶活性的 PTEN 和空载质粒均由美国国立健康卫生研究所 Kenneth 教授提供。3 种质粒中均含有绿色荧光蛋白 GFP<sup>[3]</sup>,DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

1.1.3 试剂 兔抗磷酸化 AKT (p-FAK, Ser-473) 单克隆抗体、兔抗 PTEN 多克隆抗体及兔抗 mTOR 多克隆抗体均为 Abcam 公司产品,深圳晶美公司代理。Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,质粒大提试剂盒为 Qiagen 公司产品。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 胆管癌细胞在 10% FBS (胎牛血清) 的培养基中种植,37℃,5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 质粒的鉴定和扩增 质粒 PGZ21- $\sigma$ XZ-PTENwt, PGZ21- $\sigma$ XZ-PTEN-C124S 及空载质粒转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,37℃ 培养 24h;挑选阳性克隆,培养 90min 提取质粒;限制性内切酶 Hind III 和 XbaI,酶切后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定;扩增质粒并提取纯化。

1.2.3 质粒转染 介导 PGZ21- $\sigma$ XZ-HA-PTENwt, PGZ21- $\sigma$ XZ-HA-PTEN-C124S 及空载质粒转染,37℃,5% CO<sub>2</sub> 下培养 4~6h,再用 10% 小牛血清培养基继续培养 48h。细胞传代,继续孵育。当细胞融合达 70%~80% 时,按照 1  $\mu$ g/mL 加入嘌呤霉素以筛选阳性克隆。

1.2.4 PTEN 基因过表达的检测 倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,判断转染效率。

1.2.5 Western blot (免疫印迹) 转染 48h 后,收集细胞,提取总蛋白进行电泳,转膜,一抗 4℃ 过夜,二抗室温 2h,增强化学发光法 (ECL) 显影。

1.2.6 细胞生长 细胞转染后接种于 6 孔板培养,隔日换培养基。每种细胞 7 个孔。每日取 1 种细胞 1 孔进行计数,连续观察 7d。绘制细胞生长曲线。

1.2.7 细胞凋亡分析 收集转染后 48h 的各实验组及对照组细胞,冷磷酸缓冲液洗涤 2 遍,1mL 70% 冷乙醇固定过夜处理,碘化丙啶 (PI) 染色,流式细胞仪检测凋亡率和细胞周期。ModFit 软件分析。

### 1.3 统计学分析处理

SPSS 13.0 进行 *t* 检验和相关性分析。

## 2 结果

### 2.1 质粒转染后表达质粒的鉴定

PGZ21- $\sigma$ XZ-PTENwt, PGZ21- $\sigma$ XZ-PTEN-C124S 及空载质粒转染细胞后,于荧光显微镜下观察,可见转染成功的细胞呈明显的绿色。脂质体转染的转染率达 70%~80% (图 1)。

### 2.2 转染后对 QBC939 细胞生长的影响

转染野生型 PTEN,突变型 PTEN,空载质粒及未转染组细胞生长曲线见图 2,从图 2 明显可见转染野生型 PTEN 组细胞的生长速度明显减慢,而未转染组和转染空载体质粒组无明显变化。

### 2.3 转染后 PTEN 蛋白的表达

转染野生型 PTEN 基因后,其表达明显升高,与转染突变型 PTEN 基因后有明显差异;转染野生型 PTEN 基因后,AKT 和 mTOR 的表达也明显下降,与其他 3 组有明显差异 (图 3)。

a: PGZ21- $\sigma$ XZ 转染组b: PGZ21- $\sigma$ XZ-PTEN-C124S 转染组c: PGZ21- $\sigma$ XZ-PTENwt 转染组

图1 转染后绿色荧光图

图2 转染后细胞生长曲线图

图3 转染后蛋白表达 western bolt

## 2.4 细胞周期和细胞凋亡情况

流式细胞术检测可见,野生型 PTEN 转染组的细胞凋亡率达(21.3 ± 2.3)%,转染突变型 PTEN

组的细胞凋亡率达(10.3 ± 1.9)%,与对照组相比明显升高( $P < 0.01$ )。而转染空质粒组的凋亡率无明显变化(附表)。

附表 转染前后流式细胞检测比较

分组	细胞周期(%)			细胞凋亡率(%)
	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>	
PGZ21- $\sigma$ XZ-HA-PTENwt	50.2 ± 6.6	30.3 ± 2.4	15.5 ± 3.7	21.3 ± 2.3
PGZ21- $\sigma$ XZ-HA-PTEN-C124S	54.3 ± 5.8	26.4 ± 4.7	19.8 ± 4.5	10.3 ± 1.9
PGZ21- $\sigma$ XZ-HA	52.7 ± 2.8	29.8 ± 6.4	16.7 ± 3.2	3.8 ± 1.3
QBC939	66.4 ± 7.5	20.4 ± 4.8	15.8 ± 2.4	2.2 ± 0.7

## 3 讨论

PI3K/AKT/PTEN 信号转导通路在调节细胞的凋亡、增生、分化等活动中起着重要作用,与恶性肿瘤的发生、发展关系密切。PI3K/AKT/PTEN 依赖磷脂酰肌醇激酶的激活而活化。磷酸化磷脂酰肌醇二磷酸的 3 位羟基的磷酸化,产生磷酸化磷脂酰肌醇 3 磷酸(PIP3)。PIP3 的激活使 AKT 连接到质膜发生构象改变,激活许多下游途径。PTEN 作为一种具有双重磷酸酶活性的蛋白,可依赖其

蛋白磷酸酶活性去磷酸化,也可依赖其脂质磷酸酶活性使磷酸肌醇三磷酸的 D3 位脱磷酸,从而阻断 AKT 的作用,阻止细胞进行分裂,并导致细胞凋亡。PTEN 的突变将使 PI3K 增加,AKT 活性增强。在胶质瘤,前列腺癌,AKT 激活调节其下游底物参与肿瘤细胞凋亡及细胞周期等作用<sup>[1]</sup>。mTOR 信号转导途径的被调节将调控蛋白质的翻译而控制细胞周期,也能直接磷酸化 STAT3 参与转录的调控<sup>[2,4]</sup>。

本研究将携带有绿色荧光蛋白 GFP 的野生型

PTEN 导入 QBC939 细胞中,发现细胞的 PTEN 蛋白的表达增强,磷酸化 AKT 的表达明显降低;而转染不具有磷酸酶活性的突变型 PTEN 的 QBC939 细胞虽然 PTEN 的表达也增强,但 AKT 的表达无明显改变。说明 PTEN 对肿瘤细胞的调控与脂质酶的磷酸化有密切关系。转染前后肿瘤细胞的凋亡率有显著意义的改变也提示 PTEN 可使细胞停滞于 G<sub>1</sub> 期。此结果与国内外的报道一致<sup>[5-6]</sup>。而转染前后 mTOR 相应的改变说明,PI3K/AKT/PTEN 与 mTOR 信号转导通路的关系密切。有文献说明,AKT 的活化直接磷酸化 mTOR,使之活化后作用于下游与翻译有关的 P70S6K, EIF4E 及翻译抑制蛋白 4E-BPs,并能直接磷酸化 STAT3,激活蛋白的转录,从而在转录水平和翻译水平上对肿瘤细胞的蛋白进行调节<sup>[2]</sup>。甚而有研究发现,mTOR 的特异性抑制剂可以抑制肿瘤的血管生成<sup>[7]</sup>。

本试验对研究抑癌基因 PTEN 和基因 mTOR 表达的研究,进一步证明 PTEN 作为一种重要的抑癌基因对胆管癌细胞体外作用的重要影响。其主要的机制可能是 PI3K/AKT/PTEN 信号转导通路对蛋白转录和翻译有重要调控作用的关键产物

mTOR 的直接影响。提高对呈网络状的信号转导通路的相互作用的认识,将为寻找肿瘤细胞药物治疗的靶点提供理论基础;同时,也对使用药物之间的协同性和相互作用提供一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] Downes CP, Bennett D, McConnachie G, *et al.* Antagonism of PI3-kinase-dependent signaling pathways by the tumour suppressor protein, PTEN [J]. *Biochem Soc Transactions*, 2001, 29(6): 846-890.
- [2] Huang S, Houghton PJ. Targeting mTOR signaling for cancer therapy [J]. *Cancer*, 2003, 3(3): 371-377.
- [3] Jianguo GU, Massahito TA, Kenneth MY *et al.* Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN [J]. *Cell Biol*, 1999, 146(3): 390-405.
- [4] Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function [J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70(4): 829-844.
- [5] Shivapriya R, Noriaki N, William RS, *et al.* Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *Cell Biol*, 1999, 96(3): 2110-2115.
- [6] 汤聪,孙华文,邹声泉,等. 导入 PTEN 基因抑制胰腺癌细胞体外生长的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(7): 242-243.
- [7] Guba M, Breitenbuch PV, Steinbauer M, *et al.* Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis involvement of vascular endothelial growth factor [J]. *Nature Med*, 2002, (6): 128-135.

## “2006 中国国际肝胆外科论坛——肝移植时代东西方肝胆疾病治疗策略演变”征文通知

由第三军医大学、解放军总医院主办,解放军西南肝胆外科医院和《消化外科》编辑部承办的“2006 中国国际肝胆外科论坛——肝移植时代东西方肝胆疾病治疗策略的演变”学术会议将于 2006 年 8 月 12~13 日在北京市(或重庆市)召开。届时将邀请欧美、日本等国家及港台地区和中国大陆的知名肝脏移植及肝胆外科专家 30 余名作专题演讲,并以肝移植时代的肝胆外科为主题展开广泛深入的学术交流研讨,这将是我国外科学界的又一次盛会,对促进我国肝脏移植和肝胆外科的技术创新和可持续发展具有重要意义。欢迎全国外科同仁踊跃投稿参会。优秀论文将在《消化外科》优先发表。参会者可获得国家级继续教育 I 类学分 8 分。

征文内容:有关肝细胞癌、肝硬化门静脉高压症、肝移植胆道并发症、活体肝移植、劈离式肝移植、儿童肝移植及多脏器移植等领域的临床及基础研究。

征文要求:(1)请寄论文全文及 800 字左右的摘要,注明会议征文,同时附稿件电子版一份(E-mail 或软盘);(2)截稿日期 2006 年 7 月 15 日。

投稿地址:重庆市第三军医大学西南医院《消化外科》编辑部收

邮政编码:400038 E-mail: digisurg@263.net

电话:023-68754655,传真:023-6531763,联系人:郑树国 陈敏