

文章编号:1005-6947(2008)04-0346-04

· 基础研究 ·

# 蛋白激酶 B siRNA 转染对胃癌 SGC-7901 细胞生长增殖的影响

杨策尧<sup>1</sup>, 郑斌<sup>3</sup>, 段文晶<sup>2</sup>, 段体德<sup>2</sup>, 贾伟<sup>1</sup>

(昆明医学院第一临床学院 1. 医学研究中心 2. 外科, 云南 昆明 650032; 3. 云南省昆明市延安医院 外科, 云南 昆明 650051)

**摘要:**目的 探讨蛋白激酶 B (PKB) 基因沉默对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的作用。方法 应用基因转染技术将蛋白激酶 B 家族的 Akt2 siRNA 转染至胃癌细胞中, 采用 Western blot、琼脂糖凝胶电泳、流式细胞术 MTT 等方法观察和检测 Akt2 siRNA 转染后对转染组细胞生长和增殖的影响。结果 与对照组比较, 转染 Akt2 siRNA 组的胃癌 SGC-7901 细胞生长、增殖速度明显减缓 ( $P < 0.01$ ), Akt2 siRNA 组较对照组细胞的 Akt2 蛋白表达水平显著下调 ( $P < 0.01$ ); 转染组出现梯状凋亡条带; 细胞周期显示转染组细胞聚集在 G<sub>2</sub>/M 期。结论 应用 RNAi 使蛋白激酶 B 基因沉默能使人胃癌 SGC-7901 细胞的生长受到抑制, 胃癌细胞增殖速度减缓, 其作用机理可能通过诱导细胞凋亡和抑制 PI3/K 信号传导通路而实现。Akt2 有望成为胃癌基因治疗的新靶点。

[ 中国普通外科杂志, 2008, 17(4): 346-349 ]

**关键词:** 胃肿瘤; RNA 干扰; 蛋白激酶 B; 细胞周期; 细胞增殖

中图分类号: R 735.2

文献标识码: A

## In vitro growth inhibition of gastric cancer cells (MFC) by siRNA targeting PKB

YANG Ceyao<sup>1</sup>, ZHENG Bin<sup>3</sup>, DUAN Wenjing<sup>2</sup>, DUAN Tide<sup>2</sup>, JIA Wei<sup>1</sup>

(1. Medical Research Centre 2. Department of Surgery, the First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 3. Department of Surgery, Yanan Hospital of Kunming City, Kunming 650051, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of PKB gene silencing on the growth of gastric cancer cell line SGC-7901 in vitro. **Methods** Gene transfection technique was used to transfect Akt2 siRNA into gastric cancer cells. Akt2 expression was detected by RNAi technique, Akt2 protein level was detected by Western blot, and the change of cell cycle distribution and apoptosis of SGC-7901 cells were detected by flow-cytometry, SGC-7901 proliferation was measured by MTT method. **Results** After SGC-7901 cells transfected with Akt2 siRNA, the expression of protein level decreased obviously ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the transfected group had more SGC-7901 cells accumulated at G<sub>2</sub>/M phase, and proliferation rate was reduced ( $P < 0.01$ ). It also showed that the transfected group had apoptosis ladder, and the cell growth concentrated at G<sub>2</sub>/M phase. **Conclusions** siRNA targeting Akt2 could inhibit the proliferation of SGC-7901 cells in vitro. Induction of apoptosis and inhibition of PI3/K signaling pathway may be involved in its mechanism. Akt2 could be a novel target for gene therapy of gastric cancer.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(4): 346-349 ]

收稿日期: 2007-11-16; 修订日期: 2008-03-04。

作者简介: 杨策尧, 女, 昆明医学院第一临床学院博士研究生, 主要从事乳腺癌及胃肠肿瘤基础方面的研究。

通讯作者: 段体德 E-mail: ceyao@163.com

**Key words:** Stomach Neoplasms; RNA interference; Protein Kinase B; Cell Cycle; Cell Proliferation

**CLC number:** R 735.2

**Document code:** A

胃癌是一种严重危害人类健康的恶性肿瘤,其发病率在我国仍然呈逐年上升趋势。胃癌的临床治疗通常以手术为主辅之以化疗和免疫治疗。然而很多患者治疗后依然发生复发和转移,导致远期疗效不佳。寻找新的治疗方法,降低其复发率,提高胃癌治疗效果是当前急待解决的问题。本实验研究通过小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术,将蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 家族的 Akt2 小片断基因转染给人胃癌细胞,观察其对胃癌细胞的抑制作用,以探讨 siRNA 技术行基因治疗的方法和可行性,以及胃癌治疗的新靶点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 细胞来源及培养条件 胃癌 (SGC-7901) 细胞来源于本院临床医学研究中心细胞室冻存品。胃癌 SGC-7901 细胞在含 10% 胎牛血清 (浙江联科生物公司产品), RPMI1640 (Gibco, USA) 培养液, 5% CO<sub>2</sub> 及 37℃ 条件下孵育培养。

1.1.2 试剂及仪器 实验试剂及 Akt2 siRNA 使用 Cell Signaling Technology 公司的专业软件设计的人 Akt2 siRNA 转染试剂盒。DNA 抽提试剂及聚丙烯酰胺凝胶电泳等的相关试剂由云南大学生命科学院谭德勇教授馈赠; 一抗 (mAb) 及二抗均购自深圳晶美公司; 二苯基四氮 (MTT) 为 Sigma 公司的产品; 其余试剂均为国产分析纯。1 500 型全波长酶标仪为芬兰 Thermo Electron Corporation 产品。流式细胞仪为美国 BD 公司的 FACSCalibur 型的产品。图像采集获取及分子生物学分析软件 1.4 和分析系统、PAC300 电泳仪为 Bio - Rad 公司的产品。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 将胃癌细胞分为 4 组: 不加任何药物组 (空白组) 即对照组; Akt2 siRNA 转染组; 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 组; Akt2 siRNA + 5-FU 组。

1.2.2 Akt2 siRNA 转染人胃癌细胞 按试剂盒标准程序将 Akt2 siRNA 片断转染至人胃癌 (SGC-7901) 中。

1.2.3 MTT 法检测 Akt2 siRNA 转染 SGC-7901 细胞的增殖速度 取对数生长期的细胞配制为

$2 \times 10^5$  / mL 浓度, 接种在 12 孔培养板中, 在含 10% 胎牛血清 RPMI1640 液, 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 环境下, 培养 24 h 后转染 Akt2。转染后 24, 48, 72, 96 h, 加入 MTT 10 μL 培养 4 h, 再加入酸化异丙醇 200 μL 孵育 5 min, 轻轻振摇 10 s, 用全自动酶标仪测波长 570 nm 的吸光度 (OD) 值。

1.2.4 免疫印迹 (Western blot) 法检测蛋白质 收集各组细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次, 离心, 弃上清液, 匀浆器研磨, 超声细胞破碎仪破碎细胞, 裂解液裂解细胞。采用试剂盒标准操作步骤进行蛋白质的抽提, 应用蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度; 取 50 μg 的蛋白浓度行聚丙烯酰胺电泳, 电泳完毕将蛋白转膜; 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 室温阻断 2 h, 1:200 的 Akt2 一抗室温孵育 2 h, 1:1 000 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 1 h, 3, 3' - 二氨基联苯 (DAB) 显色; 采用与对照组的灰度比计算半定量。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳测定胃癌细胞凋亡 取各组细胞 PBS 洗 3 次, 加入含蛋白酶 K 的细胞裂解液裂解, 12 000 r/min, 4℃ 离心 10 min。55 ~ 60℃ 水浴保温过夜。酚/氯仿/异戊醇反复抽提 4 次, 取上清液, 用等体积的冷乙醇悬浮 DNA, -20℃ 沉淀, 沉淀用 75% 乙醇洗盐 2 次, 55℃ 烘箱干燥, 加入 RNA 酶 37℃ 保温, 1% 琼脂糖 120V 电泳 1.5 h。

1.2.6 流式细胞术测定 SGC-7901 细胞周期的变化 收集各组  $3 \times 10^5$  细胞至测定管, 加入消化液消化, 再加入抑制剂、RNA 酶等缓冲液消化 RNA, 最后加入碘化丙啶 (PI) 染液染色, 300 目铜网过滤后即可上机检测。以鸡血作为细胞周期内对照, 上机测定。CellQuest 软件获取分析。

## 2 结 果

### 2.1 人胃癌 SGC - 7901 细胞的增殖速度

Akt2 基因的 siRNA 转染 SGC-7901 细胞后, 细胞的增殖速度明显降低, 与对照组比较差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), Akt2 siRNA 组和 Akt2 siRNA + 5-FU 组细胞增殖速度明显减慢 ( $P < 0.01$ ), 组间差异有统计学意义。5-FU 组与 Akt2 siRNA 转染组增殖速度组间差异无统计学意义 (图 1)。

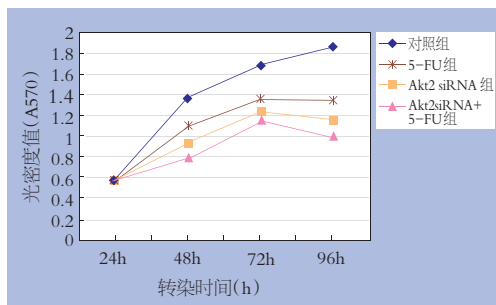


图 1 人胃癌 SGC-7901 细胞生长曲线

## 2.2 各组人胃癌细胞 SGC-7901 蛋白表达的变化

转染后 Akt2 siRNA 组和 Akt2 siRNA + 5-FU 组的蛋白表达量分别为  $(0.73 \pm 0.03)\%$  和  $(0.95 \pm 0.06)\%$ ，两转染组与对照组比较蛋白表达量下调 57.87% 和 69.53% ( $P < 0.01$ )。表明两转染组细胞 Akt2 蛋白表达均明显下调。

## 2.3 各组细胞琼脂糖凝胶电泳的结果

转染 Akt2 siRNA 和转染 Akt2 siRNA + 5-FU 组的细胞以大量凋亡为特征；电泳出现明显的特异性的 DNA 凋亡条带，DNA 断裂为大片断 (1 000 ~ 500 bp) 和小片断 (250 ~ 100 bp) 的 DNA，呈特异的梯状凋亡条带，而对照组未见条带出现。5-FU 组出现少量条带，不明显 (图 2)。

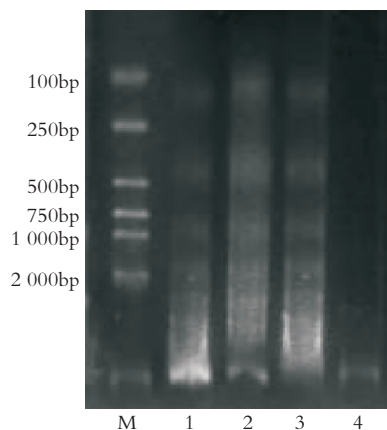


图 2 DNA 梯形条带 Ladder (即特异性的 DNA 凋亡条带) M: Marker; 1: 5-FU 组; 2: Akt2 siRNA 组; 3: Akt2 siRNA 联合 5-FU 组; 4: 对照组

## 2.4 各组 SGC-7901 细胞周期各时相变化

对照组的细胞凋亡率为 0，Akt2 转染组和 Akt2 转染 + 5-FU 组的凋亡率为 51.60% 和 61.00%，5-FU 组为 28.36%。两转染组与对照组比较差异极显著 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。

表 1 各组 SGC-7901 细胞周期各时相变化

组别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期(%)	S期(%)	G <sub>2</sub> /M期(%)	凋亡率(%)
对照组	66.36	24.45	9.19	0
Akt2 siRNA 组	40.81	22.63	37.66	51.60 <sup>1),2)</sup>
Akt2 + 5-FU 组	41.57	41.24	17.20	61.00 <sup>1),2)</sup>
5-FU 组	86.08	13.77	0.15	28.36 <sup>1)</sup>

注:1)与对照组比较, $P < 0.01$ ;2)与 5-FU 比较  $P < 0.01$

## 3 讨论

肿瘤是一种细胞凋亡过少而增殖过多的疾病。若能有效地抑制肿瘤的增殖并诱导其凋亡，肿瘤细胞即有可能停止生长。蛋白激酶 B<sup>[1-6]</sup> 作为一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，能够磷酸化多个下游靶点，阻碍凋亡，而其在多种肿瘤中有高表达<sup>[3-7]</sup>。目前已经发现一种比较特异性的小分子抑制剂，它能下调凋亡抑制因子的表达，加强促凋亡因子的敏感性，并已作为多发性骨髓瘤的药物进入临床前研究<sup>[8]</sup>，RNA 干扰 (RNAi) 技术应用病毒载体进行基因导入，已用于导入 shRNA 的病毒载体有逆转录病毒载体 (包括慢病毒载体)、腺病毒载体和 AAV 载体等。用病毒载体携带 shRNA (短发卡 RNA, short hairpin RNA) 转导可以克服人工合成的 siRNA 的转导效率低、持续时间短等缺点，已得到广泛的应用<sup>[9-21]</sup>。RNA 干扰 (RNAi) 技术因其特异、灵敏而持续地使靶基因沉默的特性，正迅速成为基因研究领域中的常规技术。随着 RNAi 技术在理论上和实际应用中的突破和发展，将其有效地导入细胞和在体内应用的需求越来越大。基因导入系统 (gene delivery system) 成为 RNAi 技术应用的关键<sup>[10-20]</sup>。最新研究表明，正是由于蛋白激酶 B 的抗凋亡作用，使得很多肿瘤包括胃癌细胞发展并保留了其恶性的生物学特征，而对于维持体内正常组织细胞增殖与凋亡而言蛋白激酶 B 的活化调控是极其重要和不可或缺的。因此，蛋白激酶 B 的特异性抑制剂针对肿瘤细胞的靶向性更为突出，而对于正常细胞毒副作用较小<sup>[14,17,19]</sup>。此外，将蛋白激酶 B 作为分子靶点筛选药物，可以为评价样品的生物学活性和药理作用提供分子或基因水平的活性结果，能直接揭示化合物与靶点之间的作用机制<sup>[8,14,21]</sup>。本实验将蛋白激酶 B 家族的 Akt2 siRNA 转染胃癌 SGC-7901 细胞，结果显示它能够明显下调蛋白激酶 B

的表达,致使转染组的胃癌细胞大量凋亡,从而抑制胃癌 SGC-7901 细胞的增殖与生长。流式细胞术细胞凋亡分析表明,对照组肿瘤细胞未见细胞凋亡,而 Akt2 转染组和 Akt2 转染 + 5-FU 组肿瘤细胞凋亡率较对照组及 5-FU 组均有显著增高 ( $P < 0.01$ ),提示转染组胃癌细胞均被诱导出大量细胞凋亡。DNA 梯形条带 (Ladder) 结果也证实两转染组细胞均出现凋亡条带,即转染抗凋亡 Akt 小干扰片断后能使胃癌 SGC 细胞大量死亡,而且转染 Akt2 能增强化疗药物的杀伤效率,这可能是 Akt2 siRNA 片断转染胃癌细胞后封闭了 Akt 的抗凋亡作用而产生抗癌作用的结果。

本实验发现联合使用 5-FU 后,可以提高杀伤率。因此,如将 siRNA 转染联合化疗药物,可以最大限度地为杀灭肿瘤细胞提供有效的治疗时机,对于提高化疗的靶向治疗效果,具有重要的实用价值,本研究结果可能为胃癌治疗,建立新的新靶点提供思路。

#### 参考文献:

- [1] Liu A X, Testa J R, Hamilton T C, *et al.* AKT2, a member of the protein kinase B family, is activated by growth factors, v - Ha - ras, and v - src through phosphatidy inositol 3 kinase in human ovarian epithelial cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1998, 58 (14):2973 - 2977.
- [2] Jetzt A, Howe JA, Horn MT *et al.* Adenoviral - mediated expression of a kinase - dead mutant of Akt induces apoptosis selectively in tumor cell and suppresses tumor growth in mice [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (19), 6697 - 6706.
- [3] Bell D W, Cheng JQ, de Feo D, *et al.* Molecular alterations of the Akt2 oncogene in ovarian and breast carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 1995, 64 (4):280 - 285.
- [4] Zhang YA, Nemunaitis J, Samuel SK, *et al.* Antitumor activity of an oncolytic adenovirus - delivered oncogene small interfering RNA [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (19):9736 - 9743.
- [5] Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, *et al.* Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt - dependent phosphorylation [J]. *Nature*, 1999, 399 (6736):601 - 605.
- [6] Ogawa E, Okuyama R, Ikawa S, *et al.* P51/p63 inhibits ultraviolet B - induced apoptosis via AKT activation [J]. *Oncogene*, 2008, 27:848 - 856.
- [7] Page C, Lin HJ, Jin Y, *et al.* Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy induced apoptosis1 [J]. *Anticancer Res*, 2000, 20 (1A):407 - 416.
- [8] Frost P, Shi Y, Hoang B, *et al.* Akt activity regulates the ability of mTOR inhibitors to prevent angiogenesis and VEGF expression in multiple myeloma cells [J]. *Oncogene*, 2007, 26 (16):2255 - 2262.
- [9] Ringel MD, Haye N, Saito J, *et al.* Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (16):6105 - 6111.
- [10] Sourbier C, Lindner V, Lang H, *et al.* Akt siRNA, The phosphoinositide 3 - Kinase /Akt pathway: A new target in human renal cell carcinoma therapy [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (10):5130 - 5142.
- [11] Pu P, Kang C, Li J, *et al.* The effect of antisense Akt2 RNA on the inhibition of malignant glioma cell growth in vitro and in vivo [J]. *J Neuro - Oncol.* 2006, 76 (1):1 - 11.
- [12] Chen JQ, Bell D W, de Feo D, *et al.* Amplification of Akt2 in human pancreatic cells and inhibition of Akt2 expression and tumorigenicity by antisense RNA [M]. *Pro Natl Acad Sci USA*, 1996, 93 (8):3636 - 3641.
- [13] Stal O, Perez Tenorio G, Akerberg L, *et al.* Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy [J]. *Breast Cancer Res*, 2003, 5 (1):37 - 44.
- [14] Sithanandam G, L W Fornwald, Junet F, *et al.* Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (11):1847 - 1859.
- [15] DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, *et al.* Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281 (43):32841 - 32851.
- [16] Fazlul H. Sarkar Yiwei Li, Usingchemopreventive agents to enhance the efficacy of cancer therapy [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (7):3347 - 3350.
- [17] Mende I, Malstrom S, Tschlis PN, *et al.* Oncogenic transformation induced by membrane targeted Akt2 and Akt3 [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (32):4419 - 4423.
- [18] Chen JH, F M Ghazawi, W Bakkar, *et al.* Valproic acid and butyrate induce apoptosis in human cancer cells through inhibition of gene expression of Akt/protein kinase B [J]. *Mol Cancer*, 2006 5 (1):71 - 75.
- [19] Sithanandam G, Fornwald LW, Fields J, *et al.* Inactivation of ErbB3 by siRNA promotes apoptosis and attenuates growth and invasiveness of human lung adenocarcinoma cell line A549 [J]. *Oncogene*, 2005, 24 (11):1847 - 1859.
- [20] Radhakrishnan SK, Halasi M, Bhat UG, *et al.* Proapoptotic compound ARC targets Akt and N - myc in neuroblastoma cell [J]. *Oncogene*, 2008, 27 (5):694 - 699.
- [21] Gutierrez A, Look AT. NOTCH and PIC3K - Akt pathways intertwined [J]. *Cancer Cell*, 2007, 12 (5):411 - 413.