

# PTEN 基因对 MKN45 胃癌细胞系 p-AKT 和 p-ERK 表达的影响

陈 渊 郝 鑫 郭 剑 李 杰 张 刚 张爱民 张卓奇

**【摘要】** 目的 探讨 PTEN 基因对 MKN45 胃癌细胞增殖及磷酸化的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)和磷酸化的细胞外信号调节激酶(p-ERK)表达的影响,分析可能的作用机制。方法 体外培养胃癌细胞株 MKN45,通过质粒转染技术建立过表达 PTEN 的稳定细胞株 MKN45/PTEN,空载体细胞株作为阴性对照组,未转染细胞为正常对照组。应用逆转录-聚合酶链反应法(RT-PCR)检测 PTEN 的转染效果,MTT 法检测细胞的增殖率,蛋白质印迹法(Western blot)检测 p-AKT 和 p-ERK 蛋白水平的表达变化。结果 PTEN 在 MKN45/PTEN 细胞中表达量明显高于阴性对照组和正常对照组( $P < 0.05$ )。PTEN 在 72 h 和 96 h 明显抑制 MKN45 细胞的增殖,细胞增长缓慢,与阴性对照组和正常对照组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。MKN45/PTEN 组 p-AKT 和 p-ERK 的相对表达量显著低于阴性对照组及正常对照组( $P < 0.05$ )。结论 PTEN 对胃癌细胞的体外增殖有抑制作用,可能通过 p-AKT 和 p-ERK 发挥作用。

**【关键词】** 胃癌;RT-PCR;Western blot;p-AKT;p-ERK;PTEN

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2017.06.017

胃癌是常见的消化道肿瘤,近年来其发病率呈上升趋势,目前胃癌发病机制尚不清楚,普遍认为与遗传缺陷和环境因素相关,其中原癌基因激活和抑癌基因失活是胃癌发生发展的分子基础。PTEN 是一种近年发现的抑癌基因,与多种肿瘤的预后密切相关。磷脂酰肌醇-3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)信号通路和丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)级联通路是研究较广泛的两条信号通路,磷酸化的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)及磷酸化的细胞外信号调节激酶(p-ERK)是两条信号通路中的关键蛋白分子,控制着信号通路活化的关键步骤。本研究通过质粒转染技术建立稳定过表达 PTEN 的细胞株,探讨 PTEN 基因对 MKN45 胃癌细胞增殖及 p-AKT 和 p-ERK 蛋白表达的影响,为其在胃癌治疗中的应用提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与仪器

MKN45 细胞(白求恩医科大学提供),RPMI1640 干粉培养基(美国 GIBCO 公司),胎牛血清(FBS)(美国 Hyclone 公司),兔抗 p-ERK、p-AKT 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司),QIAGEN Plasmid Midi kit(上海众华生物科技有限公司),逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)引物(大连 TaKaRa 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞复苏与转染 细胞冻存管快速置于 37℃ 恒温水浴箱中使其融化,将细胞悬液吸至离心管中,加入 3 倍体积的培养基,1 000 rpm 离心 5 min,弃上清,加入适量新培养基,充分吹打混匀,用含有 10% FBS、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 IU/mL 的 1640 培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。用 QIAGEN 质粒提取试剂盒分别提取 PTEN/pcDNA3.1 和阴性对照质粒。取对数生长期细胞进行实验,实验分 3 组:过表达 PTEN 的稳定细胞株 MKN45/PTEN 组,空载体细胞株为阴性对照组,未转染细胞为正常对照组。转染方法

基金项目:河北省政府资助临床医学优秀人才培养和基础课题研究计划项目(361007)

作者单位:071000 河北保定,河北大学附属医院胃肠外科

通信作者:张刚,Email: zhanggang268@sina.com

严格按罗氏转染试剂说明书进行。

1.2.2 RT-PCR 检测 PTEN 在细胞中的表达 取对数生长期的各组 MKN45 胃癌细胞系,按 Trizol 试剂盒说明书操作,用 Trizol、氯仿和异丙醇提取各组细胞总 RNA,紫外分光光度仪检测 RNA 纯度和浓度。按照逆转录试剂盒的说明书操作,逆转录合成 cDNA,以  $\beta$ -actin 作为内参照,进行 RT-PCR 扩增。 $\beta$ -actin 扩增片段大小为 250 bp,引物序列为 F: 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'。PTEN 的扩增片段大小为 600 bp,引物序列为 F: 5'-GGACGAACTGGTGTGAATGAAT-3', R: 5'-TCTACTG TTGTGAAGTACAGG -3'。

1.2.3 蛋白质印迹法检测 p-AKT 和 p-ERK 蛋白的表达 收集对数生长期各组胃癌细胞,提取总蛋白,聚丙烯酰胺凝胶电泳,低温转膜,洗膜,封闭,一抗过夜,洗膜,滴加二抗,室温孵育 2 h 后曝光,观察结果。以  $\beta$ -actin 作为上样内参照,用相对吸光度(OD)值(目的蛋白条带吸光度值/ $\beta$ -actin 条带吸光度值)表示目的蛋白的相对表达强度。

1.3 统计学分析

应用 SPSS18.0 软件进行统计学分析,各组样本均数的比较采用单因素方差分析,两组间数据的比较采用两个独立样本 *t* 检验,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒转染对 MKN45 细胞 PTEN 表达的影响 RT-PCR 结果显示,稳定转染 PTEN 的 MKN45/PTEN 组,PTEN mRNA 的相对定量值( $5.26 \pm 0.12$ )明显高于阴性对照组细胞( $0.15 \pm 0.01$ )和正常对照组细胞( $0.15 \pm 0.01$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1。

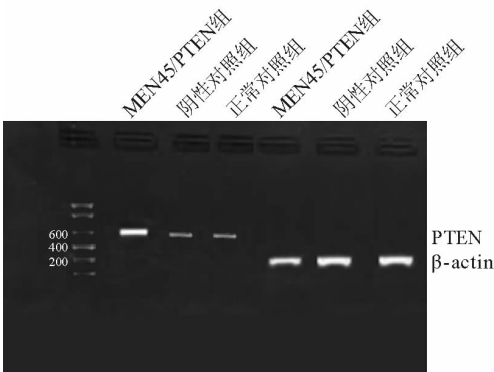


图 1 RT-PCR 检测各组细胞株中 PTEN mRNA 的表达量

2.2 PTEN 对胃癌细胞增殖的抑制作用

将各组细胞接种于 96 孔板,每组 8 个复孔,MTT 法检测各孔的 OD 值,测定细胞生长曲线,进行统计学分析。结果显示,与空白对照组及阴性对照组相比,PTEN 在 72 h 和 96 h 明显抑制 MKN45 细胞的增殖,细胞增长缓慢,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。

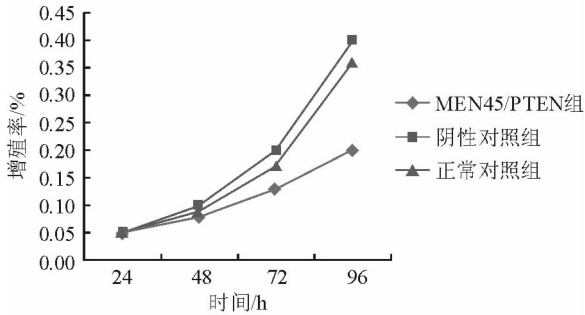


图 2 PTEN 对胃癌细胞增殖的抑制作用

2.3 PTEN 对 p-AKT 和 p-ERK 蛋白表达的影响

蛋白质印迹法(Western blot)检测 MKN45/PTEN 组、阴性对照组及正常对照组中 p-AKT 和 p-ERK 蛋白表达,结果显示 MKN45/PTEN 组细胞中 p-AKT 和 p-ERK 的相对表达量分别为( $0.313 \pm 0.053$ )、( $0.460 \pm 0.041$ ),显著低于阴性对照组 [ $(1.239 \pm 0.121)$ 、( $1.328 \pm 0.097$ )]和空白对照组 [ $(1.537 \pm 0.152)$ 、( $1.629 \pm 0.155$ )],与后两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。

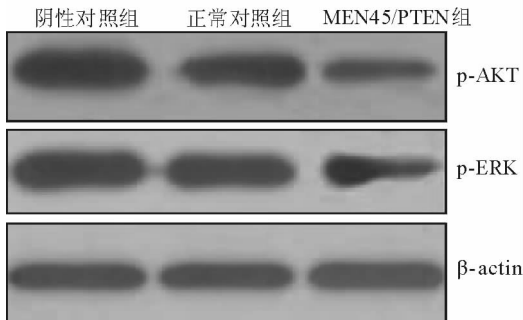


图 3 PTEN 对 p-AKT 和 ERK 蛋白表达的影响

3 讨论

胃癌发生是一个涉及多种因素的复杂过程,研究发现在此过程中有些基因和蛋白高表达或低表达,通过一系列级联反应参与胃癌的发生发展。本研究结果显示,PTEN 基因及蛋白在胃癌组织中表达降低,与其在多种其他癌组织中表达一致<sup>[1-2]</sup>。本研究通过质粒转染技术建立过表达 PTEN 的胃癌细胞株,检测 PTEN 对胃癌细胞增殖的影响。黄丽

艳等<sup>[3]</sup>构建 2 个靶向 PTEN 的 siRNA 载体及 1 个 PTEN 表达载体,分别转染食管癌 EC9706 细胞,结果显示上调 PTEN 的表达水平可有效抑制 EC9706 细胞的增殖、克隆形成和侵袭转移能力,还可促进细胞凋亡。本研究测定细胞生长曲线,进行统计学分析,结果显示与空白对照组及阴性对照组相比,PTEN 在 72 h 和 96 h 明显抑制 MKN45 细胞的增殖,细胞增长缓慢,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

PTEN 对肿瘤组织的抑制作用的机制包括以下几个方面:(1)调节脂质磷酸化酶的活性,使三磷酸磷脂酰肌醇(PIP3)去磷酸化,PIP3 是 PTEN 的一种重要的生理性底物,也是某些生长因子的第二信使,PIP3 通过结构改变成为二磷酸磷脂酰肌醇(PIP2),PIP2 具有阻断 PI3K/AKT 通路的作用<sup>[4-5]</sup>。(2)抑制 MAPK/ERK 级联通路,抑制肿瘤细胞的生长分化。基于以上理论,本研究检测 MKN45/PTEN 组、阴性对照组和空白对照组中 p-AKT 和 p-ERK 蛋白表达变化,分析 PTEN 对两种蛋白表达的影响,探讨可能的作用机制。Western blot 方法检测 MKN45/PTEN 组、阴性对照组及空白对照组中 p-AKT 和 p-ERK 蛋白的表达,结果显示 MKN45/PTEN 组细胞中 p-AKT 和 p-ERK 的相对表达量分别为( $0.313 \pm 0.053$ )、( $0.460 \pm 0.041$ ),显著低于阴性对照组[( $1.239 \pm 0.121$ )、( $1.328 \pm 0.097$ )]和空白对照组[( $1.537 \pm 0.152$ )、( $1.629 \pm 0.155$ )],与后两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

国内外关于 PTEN 与 p-AKT、p-ERK 关系的研究较少,并且结论不一。Terakawa 等<sup>[6]</sup>和 Kanamori 等<sup>[7]</sup>认为 PTEN 与 p-AKT、p-ERK 之间有一定关系,PTEN 低表达可促进 p-AKT、p-ERK 的活化,PTEN 可能通过两者发挥作用。Mori 等<sup>[8]</sup>则认为 PTEN 与 p-AKT、p-ERK 无明显相关性。因此,它们之间的关系有待于进一步研究探索和

验证。

综上所述,PTEN 对胃癌细胞的体外增殖有抑制作用,可能通过 p-AKT、p-ERK 发挥作用,可能为胃癌临床治疗的新策略提供新思路。

## 参 考 文 献

- 1 da Costa AA, D'Almeida Costa F, Ribeiro AR, et al. Low PTEN expression is associated with worse overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients treated with chemotherapy and cetuximab[J]. Int J Clin Oncol, 2015, 20: 282-289.
- 2 Leslie NR, den Hertog J. Mutant PTEN in cancer: Worse than nothing[J]. Cell, 2014, 157: 527-529.
- 3 黄丽艳,王娜,汤黎明,等. PTEN 基因表达对 EC9706 细胞增殖侵袭凋亡能力的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2013, 48: 16-20.
- 4 Bronisz A, Godlewski J, Wallace JA, et al. Reprogramming of the tumour microenvironment by stromal PTEN-regulated miR-320[J]. Nat Cell Biol, 2011, 14: 159-167.
- 5 Maslah-Planchon J, Pasmant E, Luscan A, et al. MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 473.
- 6 Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S. Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2003, 10: 203-208.
- 7 Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7: 892-895.
- 8 Mori N, Kyo S, Sakaguchi J, et al. Concomitant activation of AKT with extracellular-regulated kinase 1/2 occurs independently of PTEN or PIK3CA mutations in endometrial cancer and may be associated with favorable prognosis[J]. Cancer Sci, 2007, 98: 1881-1888.

收稿日期:2017-04-14)

(本文编辑:林磊)