

超表达蛋白激酶 B 对 SMMC 7721 肝癌细胞增殖和凋亡的影响*

陈 舌 黄传新 殷祥雷 顾建新 申宗侯**

(复旦大学上海医学院生物化学系, 上海 200032)

摘要 采用脂质体转染的方法, 将含持续激活蛋白激酶 B 的真核表达质粒转染到 SMMC 7721 肝癌细胞中, 研究蛋白激酶 B 对人肝癌细胞增殖和凋亡的影响. 用 RNA 印迹及蛋白激酶 B 测活鉴定, 并获得稳定表达持续激活蛋白激酶 B 的细胞株, 用 MTT 法、软琼脂克隆形成率及细胞周期测定等方法检测超表达蛋白激酶 B 的 7721 细胞增殖情况, 结果显示超表达蛋白激酶 B 的 7721 细胞生长能力增强, 软琼脂克隆形成率增高, S 期细胞增多, p27^{Kip1} 表达下降. 用流式细胞术检测悬浮培养诱导的细胞失巢凋亡, 发现超表达蛋白激酶 B 能抑制细胞失巢凋亡. 上述结果提示蛋白激酶 B 能促进肝癌细胞增殖, 抑制细胞凋亡.

关键词 蛋白激酶 B, 不依赖锚定生长, 细胞周期, 失巢凋亡

学科分类号 Q5

蛋白激酶 B (PKB/Akt) 于 1991 年被克隆, 是一个近 60 ku 的丝/苏氨酸蛋白激酶, 包括一个位于 N 端的 PH 结构域以及位于 C 端的催化结构域. 因其催化结构域与 PKA 及 PKC 均有很高的同源性, 故被命名为 PKB (protein kinase B)^[1] 或 RAC-PK (related to the A and C kinase)^[2], 此外, 该激酶被证明为逆转录病毒 Akt-8 的癌基因 v-akt 编码的蛋白质产物^[3], 故又称 Akt. 有研究表明超表达 PKB/Akt 可以使细胞发生转化^[4], 在不同的肿瘤如胃癌、卵巢癌、胰腺癌和乳房癌等均发现 PKB/Akt 的过度表达^[5], 提示 PKB/Akt 在肿瘤细胞异常行为中起重要的作用. 为此, 本研究观察在 SMMC 7721 肝癌细胞中超表达持续激活的蛋白激酶 B (gagPKB) 对细胞增殖和凋亡的影响.

1 材料与方法

1.1 材料

含持续激活蛋白激酶 B 的质粒 pSG5-gagPKB 及质粒 pSG5-gag 由荷兰 Coffey 教授惠赠. PKB 测活试剂盒购自 NEB 公司. 兔抗人 p27^{Kip1} 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的二抗购自 Santa Cruz 公司. RPMI1640 及 Trizol、DNA 限制性内切酶购自 Gibco 公司. 随机引物标记试剂盒购自 Promega 公司. 尼龙膜、PVDF 膜、增强化学发光 (ECL) 试剂及 ³²P-dATP 购自 Amersham 公司. 胶回收试剂盒购自华美公司, 其他试剂为国产市售分析纯.

1.2 细胞培养和基因转染

细胞生长于含 10% 已灭活小牛血清 RPMI-1640 培养基中 (含 100 mg/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素), 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的温箱中培养, 每两天换液一次. 脂质体转染方法参照说明书. 转染 48 h 后, 用终浓度 400 mg/L G418 筛选阳性克隆.

1.3 gag 探针制备和 RNA 印迹

用 EcoRI 和 Bgl II 双酶切 pSG5-gagPKB 后电泳回收 gag 片段作为探针. 用 Trizol 试剂 (按说明书操作) 抽提细胞总 RNA, 紫外分光光度计定量. 20 μg 总 RNA 经 1.0% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离后, 常规方法转印至 Hybond-N⁺ 膜上, 此膜经紫外光交联固定 RNA 后, 用 ³²P-α-dATP 标记的 gag cDNA 为探针杂交过夜, 洗膜后进行放射自显影. GAPDH 作为内标.

1.4 蛋白质印迹

收集细胞, PBS 漂洗 2 次, 加细胞裂解液 (50 mmol/L Tris·HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 0.02% 叠氮钠, 0.1% SDS, 100 mg/L PMSF, 1% NP-40, 0.5% 无氧胆酸钠), 4℃冰浴 30 min 后刮下细胞. 4℃ 10 000 r/min 离心收集细

* 国家自然科学基金 (39630080, 39870619, 39970338) 和上海市教委重点基金资助项目 (B990806).

** 通讯联系人.

Tel: 021-64041900-2299, E-mail: zhshen@shmu.edu.cn

收稿日期: 2002-08-16, 接受日期: 2002-10-16

胞上清, 用 Lowry 法进行蛋白质定量. 剩下的细胞裂解物加 $2 \times$ SDS 上样缓冲液 (100 mmol/L Tris·HCl (pH 6.8), 200 mmol/L DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油), 煮沸 10 min, 即可上样. 按抗体说明书操作, 50 μ g 总蛋白经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 电转移到 PVDF 膜, PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭过夜, 漂洗后, 依次与一抗、辣根过氧化酶 (HRP) 偶联的二抗室温作用 2 h, 再与增强化学发光 (ECL) 试剂作用 2 min, 于暗室中, X 光片压片后显影定影.

1.5 蛋白激酶 B 活性测定

按照 PKB 活性测定试剂盒说明书操作. 用冰预冷 PBS 洗细胞 2 次后加细胞裂解液 (lysis buffer), 4℃ 冰浴 10 min 后刮下细胞. 4℃ 10 000 r/min 离心收集细胞上清, 用 Lowry 法进行蛋白质定量. 取同等蛋白质量用细胞裂解液稀释到 200 μ l, 加 20 μ l 细胞裂解液预洗过的 IgG 偶联的 Akt 抗体, 4℃ 反应 3 h 后, 用细胞裂解液洗 2 次, 再用激酶缓冲液 (kinase buffer) 洗 1 次, 加 200 μ mol/L ATP, 1 μ g GSK-3 融合蛋白, 并用激酶缓冲液稀释至 40 μ l, 30℃ 反应 30 min 后加 $2 \times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 即可上样. 经 12% SDS-PAGE 分离后, 电转移到 PVDF 膜, PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭过夜, 漂洗后, 依次与磷酸化的 GSK-3 α/β 抗体、HRP 偶联的二抗室温作用 2 h, 再与增强化学发光 (ECL) 试剂作用 2 min, 于暗室中, X 光片压片后显影定影.

1.6 MTT 法测定生长曲线

按参考文献 [6] 进行. 将待测细胞计数, 按 2 000 个/孔接种于 96 孔细胞培养板中培养. 测定时吸弃每孔培养液, 将 MTT 母液用无血清的 RPMI-1640 培养液按 1:5 稀释后, 每孔 100 μ l 加入 96 孔板中, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的温箱中培养 4 h. 弃去上述培养液, 加入 0.04 mol/L 盐酸异丙醇于 570 nm 波长测吸光度 (A_{570}), 每点做 3 个数据取平均值.

1.7 软琼脂克隆形成率

按参考文献 [6] 进行. 待 SMMC7721 细胞生长至 80%~90% 汇合, 用 0.1% 胰酶消化后进行细胞计数, 将 5×10^3 个细胞悬浮在含 0.3% 琼脂及 10% 血清的 RPMI-1640 中, 然后铺在底层是 0.8% 琼脂的 24 孔板上, 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的温箱中培养两周后, 普通光镜下计数克隆直径大

于 75 μ m 的集落数.

1.8 流式细胞术

按我室已发表方法进行^[7]. 细胞用 0.1% 胰酶消化后离心收集细胞, 70% 酒精固定过夜. 碘化丙啶染色后上机测定.

1.9 失巢凋亡 (anoikis) 检测

参考文献 [8] 加以改进. 细胞培养瓶先用 poly-HEMA (Sigma 公司) 铺底, 然后每瓶接种 10^6 个细胞悬浮培养在无血清的 RPMI-1640 培养液中, 于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的温箱中培养 24 h, 每隔 12 h 收集悬浮细胞, 70% 酒精固定过夜. 碘化丙啶染色后上机测定凋亡细胞百分比.

1.10 统计学处理

采用 t 检验和 q 检验法, 以 $P < 0.05$ 为有统计意义.

2 结 果

2.1 gagPKB/7721 及 gag/7721 稳定细胞株的建立

用 pSG5-gag 和含持续激活 PKB 的质粒 pSG5-gagPKB 分别转染 SMMC 7721 细胞, 经 G418 筛选后, 以 gag 片段为探针, 用 RNA 印迹法检测稳定转染的细胞株. 以 GSK-3 为底物的 PKB 测活结果也显示 gagPKB/7721 细胞 PKB 活性比 7721 及 gag/7721 细胞高约 2 倍 (图 1). 以上结果表明持续激活蛋白激酶 B 在 7721 细胞中表达, 并使细胞 PKB 活性升高.

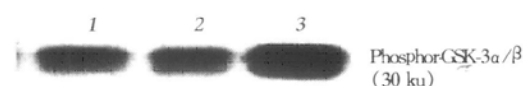


Fig 1 Determination of PKB/Akt activity in 7721, gag transfectant and the gagPKB transfectant

Equal lysate derived from 7721, gag/7721, gagPKB/7721 were precipitated with IgG-conjugated PKB, followed by PKB kinase assay, electrophoresed on 12% SDS-PAGE gel, transferred electrophoretically onto a PVDF membrane and blotted with phospho-GSK-3 α/β antibody. Similar results were obtained in three independent experiments. 1: 7721; 2: gag/7721; 3: gagPKB/7721.

2.2 超表达蛋白激酶 B 对细胞增殖的影响

2.2.1 超表达蛋白激酶 B 对细胞生长曲线的影响: 本实验用噻唑蓝 (MTT) 法检测了转染细胞的生长能力. 将细胞接种至 96 孔细胞培养板, 待细胞贴壁起计为 0 时刻, 从 0 时刻检测第 1 组数据, 其后每隔 1 天检测一次. 检测数据表明在贴壁后 2 天内, 超表达 PKB 的细胞, 其增殖与 7721 及

转染 gag 的对照细胞比较,基本上没有区别.而从第3天开始,转染 gagPKB 的细胞增殖明显较对照组细胞快,表明蛋白激酶 B 能促进 SMMC 7721 细胞生长 (图 2).

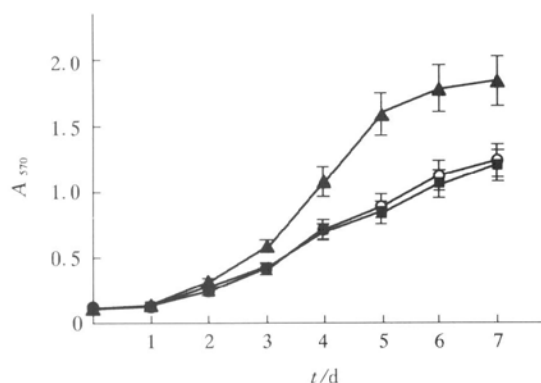


Fig.2 Influence of gagPKB over expression on SMMC 7721 cells growth

The values were the means of triplicate well for each time point. In RPMI-1640 culture with serum, gagPKB/7721 proliferated more rapidly than 7721 cells or control cells (gag/7721). ○—○: 7721;

■—■: gag/7721; ▲—▲: gagPKB/7721.

2.2.2 超表达蛋白激酶 B 对细胞软琼脂克隆形成率的影响: 软琼脂克隆形成率是研究细胞不依赖锚定生长能力的一种方法,反映细胞的恶性程度,用此方法检测发现,超表达持续激活蛋白激酶 B 的细胞克隆形成数明显大于 7721 及对照细胞,约为 2 倍,亦即超表达蛋白激酶 B 能增加细胞恶性程度 (图 3).

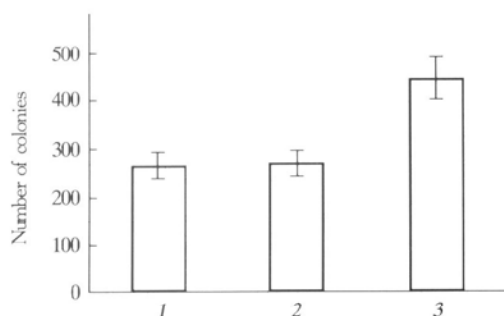


Fig.3 Influence of gagPKB over expression on SMMC 7721 cells anchorage-independent growth in agarose

1: 7721; 2: gag/7721; 3: gagPKB/7721. The values were the means of triplicate well for each time point. The ability of gagPKB/7721 to induce colony formation was about 2 times higher than 7721 cells or control cells (gag/7721). $P < 0.05$ compared to 7721 cells or gag/7721 cells.

2.2.3 超表达蛋白激酶 B 对细胞周期的影响: 检

测细胞周期发现,增加 PKB 活性能够增加 S 期细胞百分数. 7721 及 gag/7721 对照细胞 G0~G1 期细胞分别为 75% 和 73%,而 gagPKB/7721 细胞 G0~G1 期细胞为 55%; 7721 及 gag/7721 对照细胞 S 期细胞为 13% 和 11%,而 gagPKB/7721 细胞 S 期细胞为 31% (图 4). 表明 PKB 可以加速细胞进入 S 期,从而促进细胞生长. 检测细胞 p27^{Kip1} 的表达,发现超表达 PKB 可以抑制 p27^{Kip1} 的表达 (图 5).

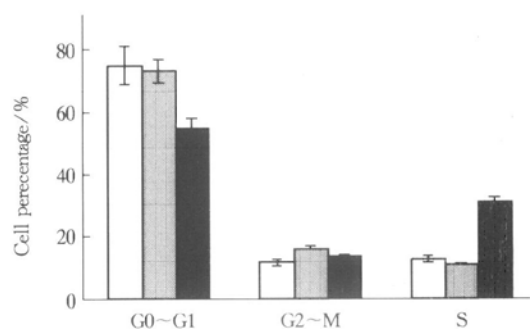


Fig.4 Influence of gagPKB over expression on SMMC 7721 cell cycle

Flow cytometry analysis of gagPKB over expression on SMC 7721 cell cycle. □: 7721; ▒: gag/7721; ■: gagPKB/7721. Data represent ($\bar{x} \pm s$) from three separate experiments. $P < 0.05$ compared to 7721 cells or gag/7721 cells.

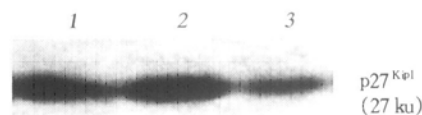


Fig.5 Western blot analysis of p27^{Kip1} expression in gagPKB/7721 and control cells

Equal lysate derived from 7721, gag/7721, gagPKB/7721 were electrophoresed on 12% SDS-PAGE gel, transferred electrophoretically onto a PVDF membrane and immunoblotted with p27^{Kip1} antibody. The "27 ku" on the right indicates the p27^{Kip1}. Similar results were obtained in three independent experiments. 1: 7721; 2: gag/7721; 3: gagPKB/7721.

2.3 超表达蛋白激酶 B 对细胞凋亡的影响

用 poly-HEMA 铺在细胞培养瓶底,再接种细胞,使细胞悬浮培养. 用流式细胞术检测细胞凋亡,发现 7721 及对照细胞悬浮培养 12 h,有约 20% 和 22% 的细胞发生凋亡,而超表达 PKB 的细胞悬浮培养 12 h,仅有 8% 的细胞发生凋亡,悬浮培养 24 h, 7721 及对照细胞约有 35% 和 34% 的细胞发生凋亡,而超表达 PKB 的细胞有 15% 的细胞发生凋亡 (图 6). 表明 PKB 的活化能够抑制 7721

肝癌细胞失巢凋亡。

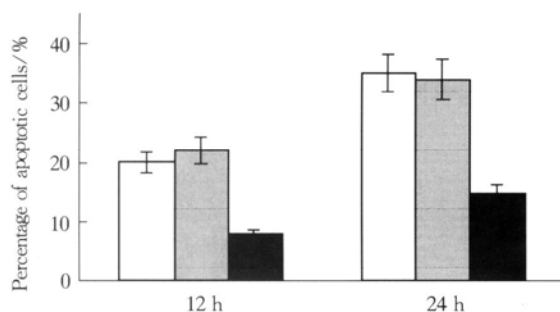


Fig. 6 Influence of gagPKB over expression on SMMC 7721 apoptosis by detachment from matrix

Flow cytometry analysis of subG1 peak of 7721, gag/ 7721, gagPKB/ 7721 induced by detachment from matrix. Data represent ($\bar{x} \pm s$) from three separate experiments. $P < 0.05$ compared to 7721 cells or gag/7721 cells. □: 7721; ■: gag/7721; ■: gagPKB/7721.

3 讨 论

PKB 为癌基因 v-akt 编码的蛋白质产物, 因此又被称为 Akt^[3]. 在许多肿瘤中发现 PKB/Akt 的过表达^[5]. 有研究表明在细胞中过表达活化的 PKB/Akt, 能促进细胞转化^[4], 可能的机制为促进在正常状态生长而阻止细胞的增殖或抑制细胞凋亡. 本研究用脂质体转染的方法在人肝癌细胞株 SMMC7721 细胞中超表达 PKB/Akt, 使其活性增加, 观察它对细胞增殖和凋亡的影响. 结果显示 PKB/Akt 能够促进细胞生长, 使锚定不依赖生长能力增加, S 期细胞增多, 抑制细胞 p27^{kip1} 表达, 抑制细胞失巢凋亡.

加速细胞进入 S 期依赖 cyclin E/cdk2 复合物的活性, p27^{kip1} 可抑制 cyclin E/cdk2 复合物形成^[9]. 本实验表明 PKB/Akt 可以抑制 p27^{kip1} 表达, 提示 S 期细胞增多与 p27^{kip1} 表达减少有关.

有研究表明诱导 MDCK 细胞失巢凋亡可导致细胞 PKB/Akt 活性的快速下降^[10], 提示 PKB/Akt 参与调节细胞失巢凋亡. 本研究将 7721 细胞悬浮培养, 使细胞与胞外基质分离, 诱导细胞失巢凋亡, 发现 PKB/Akt 活性升高能抑制 7721 细胞失巢凋亡. 糖原合成酶 3 (GSK-3) 是最早发现的 PKB/Akt 的底物^[11], 近来有研究表明整合素相关激酶 (ILK) 抑制 IEC-18 上皮细胞失巢凋亡是磷酸

化 GSK-3 的结果^[12], 因此推测 GSK-3 可能参与 PKB/Akt 阻止 7721 细胞失巢凋亡.

细胞的增殖和凋亡之间的平衡是维持细胞正常生长所必需的, 增殖和凋亡的失平衡导致肿瘤形成, 而 PKB/Akt 基因在多种肿瘤中活性增高, 超表达 PKB/Akt 可以促进细胞增殖及抑制细胞凋亡, 提示 PKB/Akt 可望成为肿瘤治疗的靶分子.

参 考 文 献

- 1 Coffey P J, Woodgett J R. Molecular cloning and characterization of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*, 1991, **201** (2): 475~ 481
- 2 Jones P F, Jakubowicz T, Pitossi F J, *et al.* Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88** (10): 4171~ 4175
- 3 Bellacosa A, Testa J R, Staal S P, *et al.* A retroviral oncogene, akt, encoding a serine/threonine kinase containing a SH2-like region. *Science*, 1991, **254** (4029): 274~ 277
- 4 Aoki M, Batista O, Bellacosa A, *et al.* The akt kinase: molecular determinants of oncogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (25): 14950~ 14955
- 5 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 phosphatidylinositol 3-kinase in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res*, 1998, **58** (14): 2973~ 2977
- 6 鄂 征. 组织培养技术和分子生物学技术. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 155
E Zh. The Technology of Cell Culture and Molecular Biology. 2nd. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997. 155
- 7 Zhang Z W, Cai M M, Zhang S, *et al.* Interaction of p58^{PITSLRE}, a G2/M-specific protein kinase with cyclin D3. *J Biol Chem*, 2002, **277** (38): 35314~ 35322
- 8 Frisch S M, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 1994, **124** (4): 619~ 626
- 9 Polyak K, Kato J Y, Solomon M J, *et al.* p27^{kip1}, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev*, 1994, **8** (1): 9~ 22
- 10 Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, *et al.* Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J*, 1997, **16** (10): 2783~ 2793
- 11 Cross D A, Alessi D R, Cohen P, *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 1995, **378** (6559): 785~ 789
- 12 Delcommenne M, Tan C, Gray V, *et al.* Phosphoinositide 3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase-3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (19): 11211~ 11216

Influence of Over-expressing Protein Kinase B on Proliferation and Apoptosis of Human Hepatocellular Carcinoma SMMC 7721 Cells*

CHEN She, HUANG Chuan-Xin, YIN Xiang-Lei, GU Jian-Xin, SHEN Zong-Hou**

(Department of Biochemistry, Shanghai Medical Center of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The protein kinase B (PKB/Akt) is found over-expression in many kinds of cancer. Here Lipofectamin was used to transfect a consistent active form of PKB (gagPKB) into SMMC 7721 cells to study the ability of the influence of this protein on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC 7721 cells. The stably over expressing PKB/Akt cell line was identified by Northern blot, Western blot and the assay of PKB activity. Over expressing PKB/Akt promoted cell growth in serum culture and anchorage-independent growth in agarose with high efficiency. Alternatively, over-expressing PKB/Akt was sufficient to promote the cells into the S phase of the cell cycle and decreased the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}. Furthermore, over-expression of PKB/Akt suppressed the apoptosis of cells induced by the detachment of the cells from extracellular matrix. These results suggest the ability of PKB/Akt to promote proliferation and suppress apoptosis in cancer cells.

Key words protein kinase B, anchor-independent growth, cell cycle, anoikis

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39630080, 39870619, 39970338) and The Fund from Key Subject of Shanghai Education Committee (B990806).

** Corresponding author. Tel: 86-21-64041900-2299, E-mail: zhshen@shmu.edu.cn

Received: August 16, 2002 Accepted: October 16, 2002