

PEMT2 过表达抑制大鼠肝癌细胞 PI3K, Akt 的表达*

李亚丽¹⁾ 邹伟²⁾ 马克里¹⁾** 夏泉¹⁾ 崔肇春¹⁾

(¹⁾大连医科大学生物化学与分子生物学教研室, 大连 116027; ²⁾辽宁师范大学生命科学院, 大连 116029)

摘要 为探讨磷脂酰乙醇胺-N-甲基转移酶 2 (PEMT2) 过表达抑制大鼠肝癌细胞增殖的机制, 构建了 PEMT2 高表达细胞克隆, 并采用半定量 RT-PCR、免疫细胞化学及流式细胞仪技术, 研究了 PEMT2 过表达对 PI3K/Akt 信号转导途径的影响. 实验结果显示, PEMT2 过表达可抑制细胞 PI3K 和 Akt 的表达, 并诱导细胞凋亡. 这一结果提示, PI3K/Akt 信号转导途径下调可能是 PEMT2 抑制肝癌细胞增殖的部分机制.

关键词 磷脂酰乙醇胺-N-甲基转移酶 2 (PEMT2), 磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K), 蛋白激酶 B (Akt), 肝癌, 凋亡
学科分类号 Q593, Q545

磷脂酰乙醇胺-N-甲基转移酶 2 (PEMT2) 是存在于哺乳动物肝细胞中的一种甲基转移酶, 其作用是催化磷脂酰乙醇胺 (PE) 甲基化生成磷脂酰胆碱 (PC)^[1], 该途径是细胞内 CDP-胆碱通路合成 PC 的重要补充. 近年来的研究表明, PEMT2 的活性与肝细胞的增殖程度呈负相关性^[2]. 增殖慢的正常肝细胞中, PEMT2 的活性较高, 而增殖快的胚胎肝细胞、再生肝细胞和肝癌等, PEMT2 的活性很低^[3]. 另外, 转染 *pemt2* 基因使 PEMT2 过表达可抑制细胞的增殖^[4]. 目前, 有关 PEMT2 抑制细胞增殖的分子机制尚不清楚. 为研究 PEMT2 抑制细胞增殖的机制, 我们用 *pemt2*-cDNA 转染大鼠肝癌 (CBRH-7919) 细胞, 发现转染 *pemt2* 可抑制细胞 c-Met 和 Bcl-2 的表达. 已知这些蛋白质表达受细胞内 PI3K/Akt 信号转导途径的调节, 我们在本文中进一步观察了转染 *pemt2* 对细胞 PI3K/Akt 通路的影响, 结果表明, PEMT2 过表达可抑制磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 和蛋白激酶 B (Akt) 的表达, 并诱导细胞凋亡.

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肝癌细胞 CBRH-7919 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所; RPMI-1640 购自美国 Gibco 公司; RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司; 抗 PI3K 抗体、抗 Akt 抗体购自美国 Sigma 公司; 抗 PEMT2 抗体由加拿大 Alberta 大学 Vance 教授惠赠; 生物素标记的羊抗兔 IgG、碱性磷酸酶

标记的亲合素购自北京中山生物公司.

1.2 方法

1.2.1 *pLNCX-pemt2* 重组载体的转染、筛选与鉴定: *pemt2*-cDNA 的转染、筛选及鉴定方法详见文献 [5]. 将细胞分为 *pLNCX-pemt2* 转染组和 *pLNCX* 空质粒对照组, 采用磷酸钙沉淀法, 转染 48 h 后, 用 G418 筛选转染阳性克隆细胞并扩增. 采用 PCR 方法鉴定 *pemt2* 转染阳性细胞.

1.2.2 PEMT2、PI3K 和 Akt 的表达: 按常规方法固定封闭细胞, 依次加入一抗 (抗 PEMT2, 或 PI3K 或 Akt 抗体)、生物素标记的二抗, 37℃ 温育 30 min, 然后加入碱性磷酸酶标记的链亲和素, 37℃ 温育 30 min, 用 NBT/BCIP 显色. 结果采用计算机灰度扫描系统进行定量分析.

1.2.3 RNA 的提取与 RT-PCR: 用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, DNase 消化处理, 酚: 氯仿 (24:1) 抽提纯化, 乙醇沉淀后, 溶于 20 μl DEPC 水中, 测定吸光值 (A). 根据总 RNA 的浓度, 分别取 1 μg 总 RNA 为模板, GAPDH 为内参, 进行半定量 RT-PCR. 以 oligo-dT 为反转录引物合成 cDNA 作为模板, PCR 的引物由大连宝生物公司合成. GAPDH-F: 5' CCATCACCATCTT-CCAGGAG 3', GAPDH-R: 5' CCTGCTTACCACC-TTCTTG 3'; Akt-F: 5' ACAGACGGCTCATTCATAGG 3', Akt-R: 5' CTCGGTACACAATCTTTCCAG 3'. 扩增片段长度分别为 550 bp 和 720 bp. 取 5 μl PCR 产物进行

* 国家自然科学基金资助项目 (39670809).

** 通讯联系人.

Tel: 0411-4720650, E-mail: Makeli666@yahoo.com.cn

收稿日期: 2003-09-17, 接受日期: 2003-11-10

3% 琼脂糖凝胶电泳, 利用 Image Master ED 软件扫描分析电泳结果, 对 akt 与相应的 GAPDH 电泳条带进行灰度扫描, 以二者比值作为 akt 基因表达的相对量.

1.2.4 细胞周期分析: 收集细胞, 用 70% 乙醇固定, 加入 RNase 和 Triton X-100, 以碘化丙啶 (PI) 标记细胞的 DNA, 用流式细胞仪于 630 nm 波长进行细胞周期及凋亡分析.

2 结 果

2.1 PEMT2、PI3K 和 Akt 的表达

用 pemt2-cDNA 转染大鼠肝癌细胞 (CBRH-7919) 使 PEMT2 高表达, 然后用免疫组化方法分别检测对照细胞和 pemt2 转染细胞 PI3K 和 Akt (PKB) 的表达情况. 结果提示, 转染 pemt2 抑制肝癌细胞 PI3K 和 Akt (PKB) 的表达.

图 1a 为 pemt2-cDNA 转染阳性克隆细胞抗 PEMT2 抗体免疫组化染色结果. 由图 1 可见, 对照组细胞 (C) PEMT2 表达较弱, 而 pemt2 转染阳性细胞 (H) PEMT2 表达显著增强. 图 1b 是图 1a 的计算机灰度扫描分析结果, 二者结果一致.

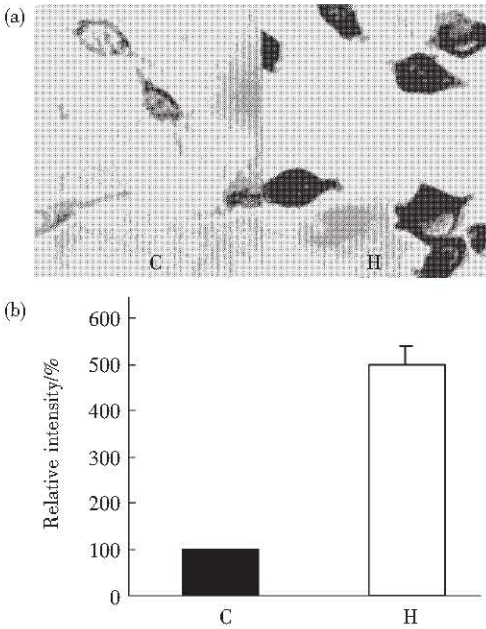


Fig.1 Expression of PEMT2 in pemt2-cDNA transfected hepatoma cells (H) and pLNCX transfected hepatoma cells (C)
(a) Immunocytochemical micrographs showing the expression of PEMT2 ($\times 250$). The cells were fixed onto a slide, then first and second antibodies were applied sequentially, then avidin linked with alkaline phosphatase was added, and the bands were visualized by NBT/BCIP treatment. (b) Morphometric scanning results of Figure 1a. The control arbitrarily was set as 100. C vs H, $P < 0.01$ ($n = 3$).

图 2a 和图 3a 分别为抗 PI3K 和抗 Akt 抗体免疫组化染色图谱. 由图 2 和图 3 可见, pemt2 转染阳性克隆细胞的 PI3K 和 Akt 表达均比对照组减弱, 说明 PEMT2 过表达可以抑制 PI3K 和 Akt 的表达. 图 2b 和图 3b 分别为图 2a 和图 3a 的计算机灰度扫描分析图谱.

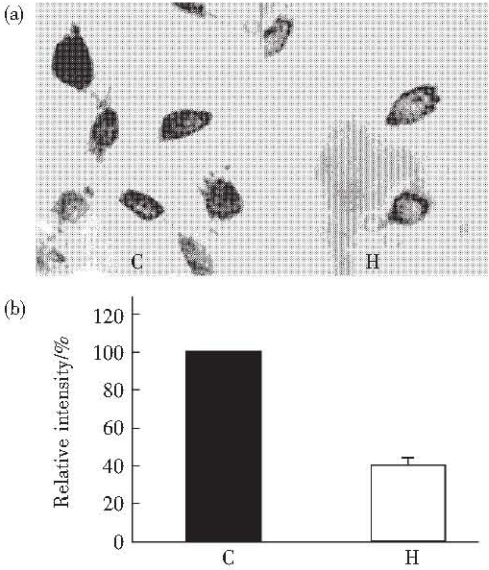


Fig. 2 Expression of PI3K in pemt2-cDNA transfected hepatoma cells (H) and pLNCX transfected cells (C)
(a) Immunocytochemical micrographs ($\times 250$). (b) Morphometric scanning results of Figure 2 a. The control arbitrarily was set as 100. C vs H, $P < 0.01$ ($n = 3$).

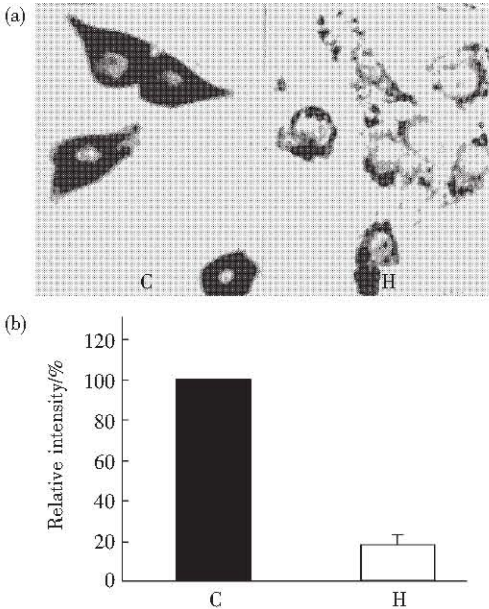


Fig.3 Expression of Akt in pemt2-cDNA transfected hepatoma cells (H) and pLNCX transfected hepatoma cells (C)
(a) Immunocytochemical micrographs ($\times 250$). (b) Morphometric scanning results of Figure 3a. C vs H, $P < 0.01$ ($n = 3$).

2.2 RT-PCR 结果

为进一步证明上述结果，我们利用 RT-PCR 分别观察对照细胞和 *pemt2* 转染细胞 *akt* 基因表达情况.

图 4a 为对照组 (C) 与转染组 (H) 细胞中

akt 基因半定量 RT-PCR 产物的电泳结果. 由图 4 可见, *pemt2* 转染阳性克隆细胞 *akt* 基因的表达比对照组明显减弱, 这进一步证实了免疫组化结果的可靠性, 说明 *PEMT2* 过表达抑制了 *akt* 基因在转录水平的表达. 图 4b 是图 4a 的计算机灰度扫描分析结果.

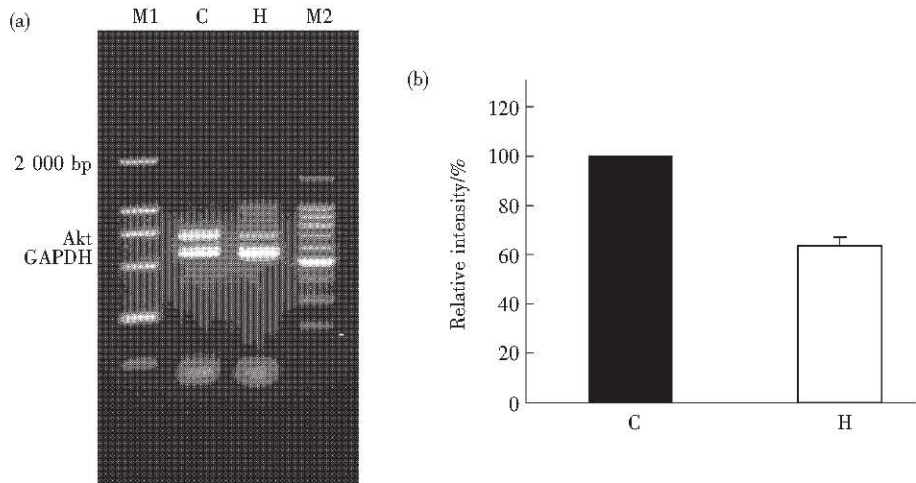


Fig. 4 RT-PCR results showed the expression of Akt in *pemt2*-cDNA transfected hepatoma cells (H) and pLNCX transfected hepatoma cells (C)

M1: DNA maker DL 2000; M2: 100bp DNA ladder marker; (a) Electrophoretic graph of RT-PCR products. (b) Densitometric scanning results of Figure 4a. C vs H, $P < 0.01$ ($n = 3$).

2.3 细胞周期和凋亡分析结果

用流式细胞仪对 *PEMT2* 过表达细胞的细胞周期进行分析. 与对照组相比, *PEMT2* 过表达细胞 G1 期细胞明显增加, S 期细胞比例显著下降

(表 1). 图 5 为 *PEMT2* 高表达细胞 (H) 和对照组细胞 (C) DNA 含量的分布图. 图 5 中 (H) 出现一个亚二倍体凋亡峰 “a”, 说明 *PEMT2* 过表达的细胞出现部分细胞凋亡.

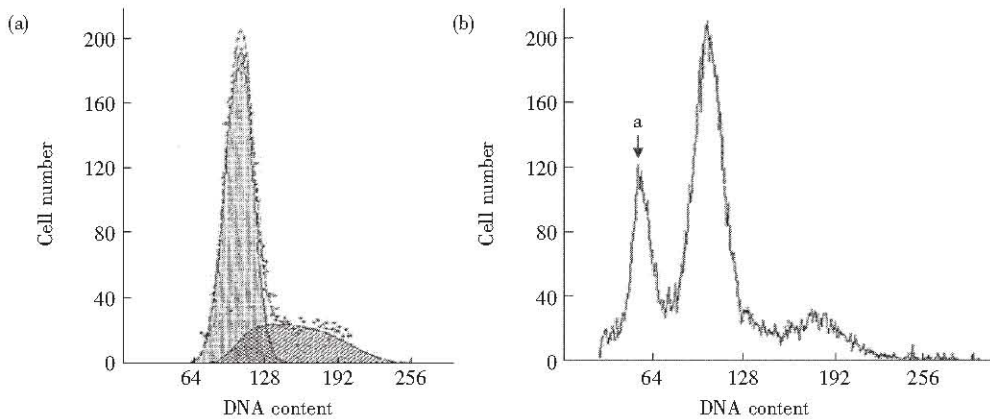


Fig. 5 Apoptosis evidence provided by flow cytometric analysis

Cells were trypsinized and treated with propidium iodide to label the nuclear DNA and analyzed by flow cytometer. (a) Control, rat hepatoma cells transfected with blank plasmid pLNCX; (b) High expression clone of rat hepatoma cells transfected with *pemt2*-cDNA. The appearance of apoptotic peak marked by “a”.

Table 1 FCM assay of cell distribution in cell cycle

Phase of cell cycle	Control/%	High expression clone/%
Phase G1	53.1 ± 8.2	66.3 ± 21.6
Phase S	34.7 ± 9.7	14.3 ± 4.4 ¹⁾
Phase G2	9.9 ± 6.0	14.2 ± 8.8

¹⁾ $P < 0.01$ ($n = 8$). The cells were treated with propidium iodide to label nuclear DNA and cell cycle parameters were determined with a flow cytometer (Coulter) at 630nm. Data shown are the percentage distribution of cells in cell cycle ($\bar{x} \pm s$). Control group was rat hepatoma cells transfected with blank plasmid pLNCX.

3 讨 论

PI3K/Akt 信号转导通路是近年来发现的一条参与细胞增殖调控的重要信号通路, PI3K 和 Akt (又称 PKB) 是该通路中的中心环节. PI3K 的作用是催化肌醇磷脂肌醇环上 3 位羟基磷酸化, 生成各种 3-磷酸肌醇磷脂, 包括 PI-3-P、PI-3,4-P2 和 PI-3,4,5-P3. 生长因子受体活化后可激活 PI3K, 使细胞质膜 3-磷酸肌醇磷脂含量增高. Akt 可与质膜上的 3-磷酸肌醇磷脂 (主要是 PI-3,4,5-P3) 结合并被部分活化. 3-磷酸肌醇磷脂还可激活 PDK (PKB 激酶), 后者使 Akt 磷酸化全部激活. Akt 激活后可激活核糖体 S6 激酶 (ribosomal protein S6 kinase, p^{70S6K}), 促进蛋白质合成及细胞增殖, Akt 也可促进 Bcl-2 表达, 阻止细胞凋亡. 本文实验结果表明, PEMT2 过表达后可通过抑制 PI3K 和 Akt 的表达, 下调 PI3K/Akt 信号转导通路. 我们前期的工作曾发现, 转染 pemt2 抑制大鼠 CBRH-7919 肝癌细胞 Bcl-2 的表达^[6]. 已知 PI3K/Akt 信号通路的作用是促进 Bcl-2 的表达, 推测 Bcl-2 表达受抑制可能是 PI3K/Akt 转导通路下调所致. 已知 Bcl-2 的作用是阻止细胞凋亡, 其作用机制之一是阻止线粒体释放细胞色素 c, 后者进入胞浆激活胱天肽酶导致细胞凋亡. 曾有文献报道, 转染 pemt2

可使肝癌细胞凋亡^[7]. 本实验也发现, CBRH-7919 肝癌细胞过表达 PEMT2 在抑制细胞增殖的同时部分细胞发生凋亡. 其凋亡机制尚不清楚, 推测可能与以下机制有关, 一是 PEMT2 过表达使线粒体外膜脂质组分及结构改变 (PE 甲基化途径生成的 PC 主要分布于线粒体), 导致线粒体外膜通透性变化, 细胞色素 c 释放入胞浆. 再就是 PEMT2 过表达下调 PI3K/Akt 信号转导通路, 抑制 Bcl-2 表达, 使 Bcl-2 抑制线粒体内细胞色素 c 释放的作用减弱, 使细胞色素 c 进入胞浆, 诱导细胞凋亡. PEMT2 过表达是否通过上述机制诱导细胞凋亡, 有待进一步的探讨.

参 考 文 献

1 Vance D E, Vance J E. New Comprehensive Biochemistry. New York: Academic Press, 1996. 153 ~ 181

2 Cui Z, Shen Y J, Vance D E. Inverse correlation between expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 and growth rate of perinatal rat livers. Biochim Biophys Acta, 1997, 1346 (1): 10 ~ 16

3 Vance D E. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase: unexpected findings from curiosity-driven research. Eur J Med Res, 1996, 1 (4): 182 ~ 188

4 邹伟, 李兆育, 李亚丽, 等. 磷脂酰乙醇胺 N-甲基转移酶 2 的表达抑制大鼠 CBRH-7919 肝癌细胞的增殖. 辽宁师范大学学报, 2000, 23 (2): 158 ~ 161

Zou W, Li Z Y, Li Y L, et al. J Liaoning Normal University: Natural Science, 2000, 23 (2): 158 ~ 161

5 邹伟, 李春蕾, 李兆育, 等. pLNCX-pemt2 重组载体的构建及 pemt2 基因在大鼠肝癌 CBRH-7919 细胞中的表达. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16 (5): 597 ~ 601

Zou W, Li C L, Li Z Y, et al. Chin J Biochem Mol Biol, 2000, 16 (5): 597 ~ 601

6 邹伟, 李兆育, 李亚丽, 等. Pemt2-cDNA 的转染抑制大鼠 CBRH-7919 肝癌细胞 c-Met 及 Bel-2 的表达并诱发凋亡. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17 (5): 661 ~ 665

Zou W, Li Z Y, Li Y L, et al. Chin J Biochem Mol Biol, 2001, 17 (5): 661 ~ 665

7 Tessitore L, Sesca E, Bosco M, et al. Expression of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase in Yoshida ascites hepatoma cells and the livers of host rats. Carcinogenesis, 1999, 20 (4): 561 ~ 567

Overexpression of PEMT2 Inhibits PI3K and Akt Expression in Rat CBRH-7919 Hepatoma Cells*

LI Ya-Li¹⁾, ZOU Wei²⁾, MA Ke-Li¹⁾ **, XIA Quan¹⁾, CUI Zhao-Chun¹⁾

¹⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China;

²⁾ Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract In order to unravel the mechanism of inhibition of the cell proliferation induced by overexpression of PEMT2, the cell clone transfected with pemt2-cDNA was constructed and the effect of overexpression of PEMT2 on PI3K/Akt signaling pathway was investigated by the methods of RT-PCR, immunocytochemical and flow cytometry.

The results show that the overexpression of PEMT2 could inhibit the expression of PI3K and Akt, and induce cell apoptosis. The results indicate that the down-regulating of PI3K/Akt signaling pathway could, at least partly, account for the inhibition of hepatoma cell proliferation induced by overexpression of PEMT2.

Key words phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-2 (PEMT2), phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), hepatoma, apoptosis

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39670809).

** Corresponding author. Tel: 86-411-4720650, E-mail: Makeli666@yahoo.com.cn

Received: September 17, 2003 Accepted: November 10, 2003



从基因到基因组——DNA 技术的概念和应用 (影印版)

(From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology)

Jeremy W. Dale, Malcolm Von Schantz 著

2004 年 1 月出版, B5 开, 360 页, 定价: 46.00 元

本书对分子生物学的核心技术的原理及其使用进行了简明而关键的阐释. 本书内容包括分子生物学基础、基因克隆、核酸的纯化与分离、DNA 的剪切与连接、载体、基因组文库和 cDNA 文库、聚合酶链反应、DNA 测序、序列数据分析、基因变异分析、基因表达分析、基因功能分析、医药应用、转基因等等.



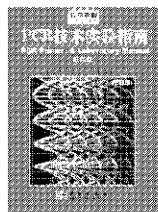
RNAi: 基因沉默指南 (影印版)

RNAi: A Guide to Gene Silencing

Gregory J. Hannon 主编

2004 年 1 月出版, 大 16 开, 442 页, 8 彩插, 定价: 65.00 元

本书由 RNA 组学领域内的著名专家撰写, 内容新颖全面, 系统性强, 具有很高的参考价值. 主要内容包括 RNA 干扰的基本概念、生物化学研究, 双链 RNA 对基因组的调节, 哺乳动物基因表达中的 shRNA 介导沉默, 核酶超家族, 以及 RNA 干扰在多种动物模型中使基因沉默的方案.



PCR 技术实验指南 (第二版) (影印版)

PCR Primer: A Laboratory Manual

Carl W. Dieffenbach, Gabriela S. Dveksle 主编

2004 年 1 月出版, 大 16 开, 528 页, 2 彩插, 定价: 98.00 元

本书是美国冷泉港实验室出版社 PCR Primer: A Laboratory Manual 第二版的影印本, 是第一版的全面更新和升级. 本书由从事 PCR 研究的专家们共同研讨和撰稿, 是一部最新、最权威的 PCR 技术大型实验手册. 其内容从最简单的 PCR 操作到最新的技术进步, 从最基本的 PCR 技术到各种奇思妙想的 PCR 应用技巧无所不包. 具体内容包括 PCR 导论、样品的制备、引物设计、PCR 产物检测 (定量和分析)、RNA 样品的 PCR、PCR 介导的克隆、PCR 法制备突变体、其他扩增技术等. 每个操作都配有疑难解析和完整的参考文献.

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费). 邮购地址: 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目, 010-64012501