

# 甲胎蛋白抑制 PTEN 活性导致肝癌细胞 耐受 ATRA 诱导的凋亡 \*

朱明月<sup>1)</sup> 符史干<sup>3)</sup> 李孟森<sup>1, 2)\*\*</sup> 谢协驹<sup>4)</sup> 李 刚<sup>5)</sup>

(<sup>1)</sup>海南医学院分子生物学重点实验室, 海口 571159; (<sup>2)</sup>海南医学院肿瘤研究所, 海口 570102; (<sup>3)</sup>海南医学院生理学教研室, 海口 571159;

(<sup>4)</sup>海南医学院病理生理学教研室, 海口 571159; (<sup>5)</sup>北京大学医学部生物化学与分子生物学系, 北京 100191)

**摘要** 研究甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein, AFP)对肝癌细胞内 PTEN/AKT 信息通路信号传递的影响. 用 Western blotting 法分析全反式维甲酸(all *trans* retinoic acid, ATRA)处理人肝癌 Bel 7402 和 HepG2 细胞 24 h 后 PTEN 表达的变化. 免疫共沉淀(Co-IP)技术研究 AFP 与 PTEN 相互作用. 激光共聚焦显微镜观察 AFP 与 PTEN 在细胞共定位. RNA 干扰(RNAi)技术抑制 AFP 表达, 再用 ATRA 处理 24 h 后检测细胞内 PTEN 表达的变化, 并分析蛋白激酶 B(AKT)的磷酸化. 用 pcDNA3.1 质粒和人 *afp* 基因连接构建表达 AFP 的载体(称为 pcDNA3.1-*afp*), 然后转染到不表达 AFP 的人肝癌 HLE 细胞. 结果显示, 人肝癌 Bel 7402 和 HepG2 细胞均有 PTEN 的表达, ATRA(160  $\mu$ mol/L)处理 24 h 后能促进这些细胞的 PTEN 表达. Co-IP 技术研究发现 AFP 能与 PTEN 结合. 共聚焦显微镜观察显示 AFP 与 PTEN 共定位于细胞浆. 干扰 AFP 表达后, PTEN 表达明显提高. 抑制 AFP 表达后, ATRA 能显著促进 Bel 7402 细胞内 PTEN 的表达, 并能抑制 AKT 的磷酸化. 转染 pcDNA3.1-*afp* 载体后, HLE 细胞内有 AFP 表达, 并与 PTEN 结合, 且发现 pcDNA3.1-*afp* 载体能增加 AKT 的磷酸化[p-AKT(Ser473)], 对抗 ATRA 抑制 HLE 细胞增殖. 研究的结论是: 肝癌细胞内表达的 AFP 能与 PTEN 结合并抑制 PTEN 对 AKT 的去磷酸化作用, 肝癌细胞内高表达的 AFP 能激活 AKT 信息通路. 胞浆内的 AFP 是肝癌细胞耐受 ATRA 的重要因子.

**关键词** 甲胎蛋白, PTEN, 肝癌细胞, PI3K/AKT 信号通路

**学科分类号** R735.7

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2010.00546

肝细胞癌是严重危害人类健康的重大疾病. 由于病毒性肝炎和环境等因素的影响, 肝癌有逐年上升趋势, 尽管临床上常规采用手术和药物(化疗)治疗肝细胞癌, 但是由于癌细胞的再生和转移, 以及癌细胞对药物的耐受, 造成了治疗肝癌前景的暗淡, 所以揭示肝癌耐药的分子机制, 将给肝癌治疗带来新的希望. 甲胎蛋白( $\alpha$ -fetoprotein, AFP)是肝癌细胞合成的特异性很高的蛋白质, 很多肝癌病人(70%~80%)在发病期间都有 AFP 基因高表达的特征. AFP 是一种胚原蛋白, 其基因在胎儿发育过程开放表达, 而在人出生两年后基本处于关闭状态, 但是成人发生肝癌或肝脏良性再生时, AFP 的基因重新被激活而大量表达, 因而 AFP 被用作诊断肝癌的金标准. AFP 在临床上被认为是肝癌的经典肿瘤标记物. 已经有大量研究证明, 肝癌细胞分泌的 AFP 具有促进肿瘤细胞增殖<sup>[1-5]</sup>和诱导肿瘤细胞凋

亡<sup>[6-9]</sup>的双重作用. 研究发现 AFP 与肿瘤细胞的恶性生长、转移和侵袭密切相关<sup>[10-12]</sup>, AFP 高表达的肝癌病人预后效果让人沮丧<sup>[13]</sup>, 并且认为 AFP 是肝癌耐药的关键性细胞因子<sup>[14]</sup>. 这些研究结果提示, AFP 具有潜在的抗凋亡诱导作用的生物学性质, 然而肝癌细胞分泌的 AFP 在肝癌细胞耐受凋亡诱导过程中发挥怎样的作用, 知之甚少. 在体内高浓度的 AFP 能促进肝癌细胞生长, 肝癌细胞也由于分泌 AFP 而能抑制淋巴细胞的攻击和诱导淋

\* 国家自然科学基金资助项目(31060164, 30660071, 30760090, 30960153), 海南省自然科学基金资助项目(309034, 310044)和海南省教育厅高等学校科研项目(Hjkj2010-32).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0898-66895322, E-mail: mengsenli@163.com

收稿日期: 2010-10-26, 接受日期: 2010-12-21

巴细胞凋亡,从而逃避免疫监视<sup>[15-17]</sup>,而且肝癌细胞对化学药物例如全反式维甲酸(all *trans* retinoic acid, ATRA)也失去敏感性<sup>[18-20]</sup>,因而认识肝癌细胞耐药的分子机制是寻找靶向治疗肝癌的有效途径.

PTEN (phosphatase and tension homolog deleted on chromosome ten)是水解 3-磷酸肌醇( $\text{PIP}_3$ )为 2-磷酸肌醇( $\text{PIP}_2$ )的磷酸酶,其能阻止 3-磷酸肌醇激酶( $\text{PI3K}$ )磷酸化蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB/AKT),阻断  $\text{PI3K/AKT}$  的信号传递,因而被认为是一个重要的抑癌基因<sup>[21-22]</sup>,其表达下降或功能的丧失是引起生长信号错误传递的分子基础,后果是导致肿瘤细胞过度分裂.在对肝癌病人的细胞分析中发现,约有 12.5%的病人 PTEN 基因关闭,而 70%的病人 PTEN 基因开放并高表达,PTEN 蛋白合成量与正常组织没有显著性差别<sup>[23]</sup>,因而 PTEN 在肝癌内丧失发挥抑癌作用可能是由于其功能失活导致的.免疫组织化学分析发现,PTEN 表达缺失或下降与 AFP 高表达呈正相关,并且与肝癌病人预后差有高度相关性<sup>[24]</sup>.AFP 是肝癌细胞高表达的蛋白质,AFP 对 PTEN 的功能有没有影响及其在对抗诱导凋亡中有何作用?AFP 是不是激活肝癌细胞生长信号通路的重要物质?这些问题是认识肝癌细胞发生过程中高表达 AFP 所产生作用的核心环节.本研究分析 AFP 在肝癌细胞内对 PTEN 活性的影响,探索 AFP 激活  $\text{PI3K/AKT}$  信号传递的一些分子机制.

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞系和蛋白质材料

人肝癌 Bel 7402、HepG2 和 HLE 细胞由北京大学医学部细胞生物学系提供;小鼠抗人 AFP 单克隆抗体(code: T-2)、兔抗人 AKT/PKB 多克隆抗体(code: 18)、Phosph-AKT/PKB  $\alpha$ (ser473)多克隆抗体 (code: 232) 购买于 Perfe Scientific 公司 (USA);  $\beta$ -Actin(code: sc-1616, 8432)单克隆抗体、Western blotting luminol reagent (code: sc-2048) 从 Santa Cruz 公司 (California, USA) 购买;兔抗人 PTEN 多克隆抗体为 Lab Vision corporation (California, USA) 产品;二抗为辣根过氧化物酶连接的羊抗鼠、羊抗兔多克隆抗体;FITC-conjugated (code: 66288) 羊抗兔和 TRITC-conjugated (code: 61551) 羊抗小鼠二抗为 Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc (Baltimore, PA, USA) 产品;RNA 干扰试剂盒 pGPU6/GFP/Neo siRNA Expression

Vector Kit (code: E-07/F-07) 从上海吉玛制药技术有限公司 (Shanghai GenePharma Co, Ltd, 中国上海) 购买, Ly294002(2-(4morpholinyl)-8-phenyl-benzopyran-4-one hydrochloride) (code: L9908-1MG), ATRA (code: 98F-0178) 为 Sigma 公司产品; pcDNA3.1 载体由广州泰盛生物技术有限公司 (中国广州) 提供.

### 1.2 细胞培养

用含有 10% 胎牛血清 (GIBCOBRL 公司产品) 的 RPMI-1640 培养基 (GIBCOBRL 公司产品) 培养人肝癌 Bel 7402 和 HepG2 细胞, 用 DMEM 培养液培养 HLE 细胞, 待细胞长到 90% 融合时, 用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞, 再用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 或 DMEM 培养基吹散细胞, 把细胞调整到一定的数目, 做相关的实验研究.

### 1.3 Western blotting 分析相关基因的表达

Bel 7402 细胞按  $1.0 \times 10^5$  个 /ml, 培养于  $33 \text{ cm}^2$  培养瓶中, 每组设 3 个平行瓶, 每瓶 6ml, 细胞被饥饿培养 (用不含血清的培养液) 24 h 后, 换成含 10% 胎牛血清的培养液培养 12 h, 加入 ATRA ( $160 \mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h, 收集并裂解细胞, 提取细胞蛋白质, 行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转膜, 加入一抗在  $4^\circ\text{C}$  轻轻混合 12 h, 用辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠和羊抗兔二抗在室温轻摇 2 h 后, 用发光显影法 (Western blotting Luminol Reagent, code: sc-2048) 检测细胞 AFP、PTEN、AKT 和  $\beta$ -Actin 蛋白的表达, 并用 FUJI 公司 (Japan) LAS3000 型化学发光 / 荧光 (Chemiluminescence/fluorescence) 仪拍摄杂交蛋白质条带. 详细的方法按文献[25]进行.

### 1.4 激光共聚焦显微镜技术研究蛋白质的细胞内定位

$20 \text{ mm} \times 20 \text{ mm}$  的盖玻片经过洁净处理, 高温、高压消毒后放置于 6 孔细胞培养板中, 然后加入用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 把细胞调整到  $2 \times 10^4$  个 /ml 的细胞悬液 2 ml, 待细胞长到 70% 融合, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 再用 0.3% 的 Triton X-100 浸泡细胞 30 min, 去掉全部液体, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 去掉全部液体, 用 5% 胎牛血清 (PBS 配制) 封闭细胞 1 h, 去掉封闭液, 加入小鼠抗人 AFP 的单克隆抗体 (抗体浓度为 1:100) 和兔抗人 PTEN 的多克隆抗体 (抗体浓度为 1:50),  $4^\circ\text{C}$  轻摇 12 h, 去掉一抗液体, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 加入 FITC 标记的羊抗兔二抗和 TRITC 标记的羊抗小鼠二抗, 室温轻摇 2 h (避光), 再加入

10  $\mu$ l 浓度为 100 mg/L 的 DAPI, 室温轻摇 30 min (避光), 去掉全部液体, 用 1 ml PBS 清洗细胞 3 次, 用 Olympus Fluoview FV1000(Japan)型激光共聚焦显微镜观察标记结果并拍摄图像, 选择荧光分子可能的重叠区域, 分析荧光分子的共定位情况。

### 1.5 免疫共沉淀技术分析蛋白质相互作用

Bel 7402 和 HepG2 细胞均用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 调整到  $2.0 \times 10^4$  个 /ml, 5 ml 细胞悬液培养于 33 cm<sup>2</sup> 的培养瓶, 每组设 3 个平行瓶, 细胞培养 48 h 后, 去掉培养液, 换成含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 再培养 24 h, 提取细胞蛋白质, 蛋白质分 4 份, 其中一份做 Input, 剩下的 3 份分别用抗 AFP 单克隆抗体、抗 PTEN 多克隆抗体和兔免疫血清(IgG)沉淀相应的抗原, 然后用 protein A-agarose 把抗原抗体复合物吸附于 agarose 珠子上, 离心清洗其他蛋白质, 再用上样缓冲液和高温变性方法使 agarose 珠子与蛋白质复合物分离, 经 SDS-PAGE 把抗原和抗体分离, Western blotting 分析相关抗原, 用 FUJI 公司(Japan)LAS3000 型化学发光 / 荧光(Chemiluminescence/fluorescence)仪拍摄杂交蛋白质条带。

### 1.6 RNA 干扰技术抑制 AFP 表达

20 mm $\times$ 20 mm 的盖玻片经过洁净处理, 高温、高压消毒后放到 6 孔培养板中, 然后加入含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 把 Bel 7402 细胞调整到  $2 \times 10^4$  个 /ml 的细胞悬液 2 ml, 待细胞长到 80% 融合, 转染已经构建有 siRNA-AFP 序列的 pGPU6/GFP/Neo 质粒, 干扰 AFP 表达的序列[正义: GAAC GTGG TCAA TGTA TAA, 反义: TTAT ACAT TGAC CACG TTC]称为 siRNA-AFP 923, 阴性对照序列[正义: GTTC TCCG AACG TGTC ACG, 反义: ACGT GACA CGTT CGGA GAA]称为 siRNA-control. 用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen 公司产品)促进转染, 待转染 12 h 后, 去掉全部液体, 用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养细胞 18 h 后, 取出盖玻片, 置于载玻片上, 荧光显微镜观察转染效率。

Bel 7402 细胞均用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 调整到  $2.0 \times 10^4$  个 /ml, 5 ml 细胞液培养于 33 cm<sup>2</sup> 的培养瓶, 每组设 3 个平行瓶, 待细胞培养 80% 融合后, 转染已经构建有 siRNA-AFP 序列的 pGPU6/GFP/Neo 质粒, 用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 促进干扰载体转染细胞, 待转染 12 h 后更换新的培养液, 再培养细胞 18 h, 按 Western blotting 方法

提取细胞蛋白质并分析 AFP 表达, 确定干扰效果。

### 1.7 RNAi 抑制 AFP 表达后对 AKT 磷酸化的影响

Bel 7402 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 调整到  $2.0 \times 10^5$  个 /ml, 2 ml 细胞液培养于 6 孔细胞培养板, 每组设 3 个平行孔, 待细胞培养 70% 融合后, 转染已经构建有 siRNA-AFP923 序列的 pGPU6/GFP/Neo 质粒, 用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 促进干扰载体转染细胞, 待转染 12 h 后, 更换新的培养液再培养细胞 12 h, 再用 ATRA(160  $\mu$ mol/L)处理细胞 12 h, 按 Western blotting 方法提取细胞蛋白质并分析 AKT 和磷酸化 AKT[p-AKT(Ser473)]的表达。

### 1.8 AFP 表达载体的构建及其对肝癌细胞 AKT 磷酸化的影响

根据 AFP 的基因序列(GenBank 登陆号: NM\_001134)从人肝母细胞瘤 HepG2 细胞中扩增 AFP 基因的全长 cDNA(引物为: 正向 5' TAG GAATTC TAGCAA CCATG AATGT GGTGG 3', 反向 5' AGC TCTAG A TTAA ACTCC CAAAG CAGCA CG 3'), PCR 扩增条件是, 95 $^{\circ}$ C 3 min, 98 $^{\circ}$ C 10 s $\rightarrow$ 53 $^{\circ}$ C 10 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min. *afp* 基因用 *EcoR* I 和 *Xba* I 进行酶切, 置于 pcDNA3.1 质粒的 CMV 启动子之后, *afp* 基因和载体 pcDNA3.1 连接后, 命名为 pcDNA3.1-*afp* 载体, 经酶切电泳和测序证明连接正确. 用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 促进 pcDNA3.1-*afp* 载体转染 HLE 细胞 36 h 后, Western blotting 分析 HLE 细胞的 AFP 表达情况, 并分析转染 pcDNA3.1-*afp* 载体后用 ATRA(160  $\mu$ mol/L)处理 12 h, 观察 pcDNA3.1-*afp* 对 HLE 细胞 p-AKT(Ser473)表达的影响. 转染 pcDNA3.1-*afp* 载体 34 h, 再用 Ly294002 (终浓度为 50  $\mu$ mol/L)处理细胞 62 h, 分析 p-AKT(Ser473)的表达情况。

### 1.9 MTT 分析 ATRA 对肝癌细胞生长的影响以及 AFP 对肝癌细胞耐受 ATRA 的作用

**1.9.1 MTT 分析 ATRA 对肝癌细胞生长的影响.** Bel 7402 细胞和 HLE 细胞按  $2.5 \times 10^4$  个 /ml 分别培养于 96 孔培养板, 待细胞培养到 60%融合后, 用不同浓度的 ATRA(DMSO 溶解, 浓度分别为 0、10、20、40、80 和 160  $\mu$ mol/L)处理细胞, 溶质对照组为相应百分比的 DMSO, 处理细胞 24 h 后, 加入终浓度为 10 mg/L 的 MTT, 继续培养 4 h, 去掉全部液体, 用 PBS 洗细胞 3 次, 加入 120 ml/孔的 DMSO, 微震荡仪震荡 30 min, 用 ELX-800UV

Universal Microplate Reader (Bio-TEK Instrument Co) 酶标仪测 570 nm 波长的吸光度值( $A_{570}$ ), 代表细胞的生长状况.

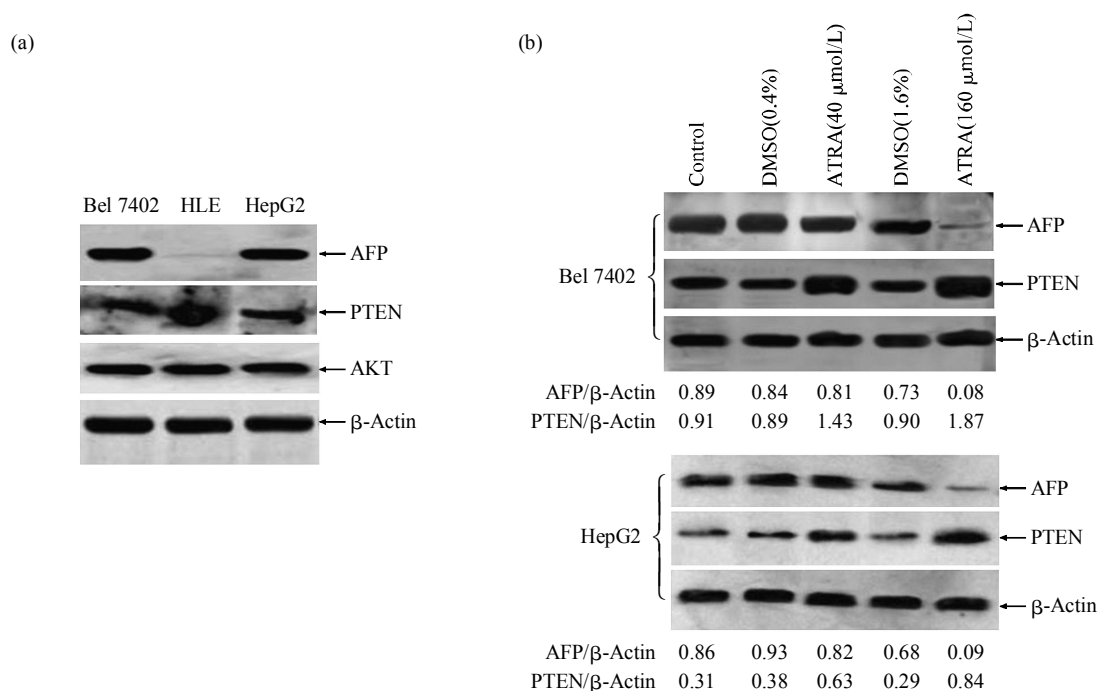
**1.9.2 AFP 对肝癌细胞耐受 ATRA 的作用.** 取 RNA 干扰的 Bel 7402 细胞和转染 pcDNA3.1-*afp* 的 HLE (HLE 细胞按  $3 \times 10^4$ /ml 培养于 6 孔板, 每孔 3 ml, 待细胞长到 70% 融合, 用 Lipofectamine™ 2000 促进 pcDNA3.1-*afp* 载体转染 HLE 细胞 36 h 后, 用 0.25% 胰酶消化, 即为转染 pcDNA3.1-*afp* 的 HLE), Bel 7402 和 HLE 细胞均按  $2.5 \times 10^4$  个/ml 培养于 96 孔培养板( $0.33 \text{ cm}^2$ ), 对照组为自然培养的 Bel 7402 和 HLE 细胞. 待细胞长到 60% 融合后, 用终浓度为  $40 \mu\text{mol/L}$  的 ATRA 处理 Bel 7402 细胞, 而 HLE 细胞则用终浓度为  $160 \mu\text{mol/L}$  的 ATRA 处理, 溶剂组分别为 0.4% 和 1.6% 的 DMSO, 处理 24 h 后, 按上面的 MTT 方法处理细胞, 再用

ELX-800UV Universal Microplate Reader (Bio-TEK Instrument Co.) 酶标仪测  $A_{570}$  值, 代表细胞的生长状况.

## 2 结 果

### 2.1 人肝癌 Bel 7402 细胞表达 PTEN 的情况及 ATRA 对 PTEN 表达的影响

Western blotting 分析发现, 人肝癌 Bel 7402 和 HepG2 细胞高表达 AFP 和 AKT, 而低表达 PTEN (图 1a). 低剂量的 ATRA( $40 \mu\text{mol/L}$ )对 Bel 7402 和 HepG2 细胞的 AFP 表达没有显著性影响, 但是能促进 PTEN 的表达, 而高剂量的 ATRA( $160 \mu\text{mol/L}$ )处理后, 不仅能抑制 AFP 表达, 而且能明显地促进这两种肝癌细胞表达 PTEN, 作为溶质的 DMSO 对 Bel 7402 和 HepG2 细胞的 AFP 和 PTEN 表达则没有明显的影响(图 1b).



**Fig. 1 Influence of ATRA on the expression of AFP and PTEN in hepatoma cells**

(a) The expression of AFP, PTEN and AKT in hepatoma cells. Human hepatoma cells line, Bel 7402, HepG2 and HLE were cultured in 5%  $\text{CO}_2$  and 95% air in humid atmosphere environment, and the cells were lyzed, loading protein was  $60 \mu\text{g}/\text{lane}$ , Western blotting was applied to determined the expression of the objective protein, detected the expression of  $\beta$ -actin as an internal control. (b) The effects of ATRA on the expression of AFP and PTEN in hepatoma cells line. Bel 7402 and HepG2 cells were treated with ATRA ( $40 \mu\text{mol/L}$ ) and ( $160 \mu\text{mol/L}$ ) for 48 h, and the expression of AFP and PTEN were detected by Western blotting. The result was representation of at least three replicated experiments.

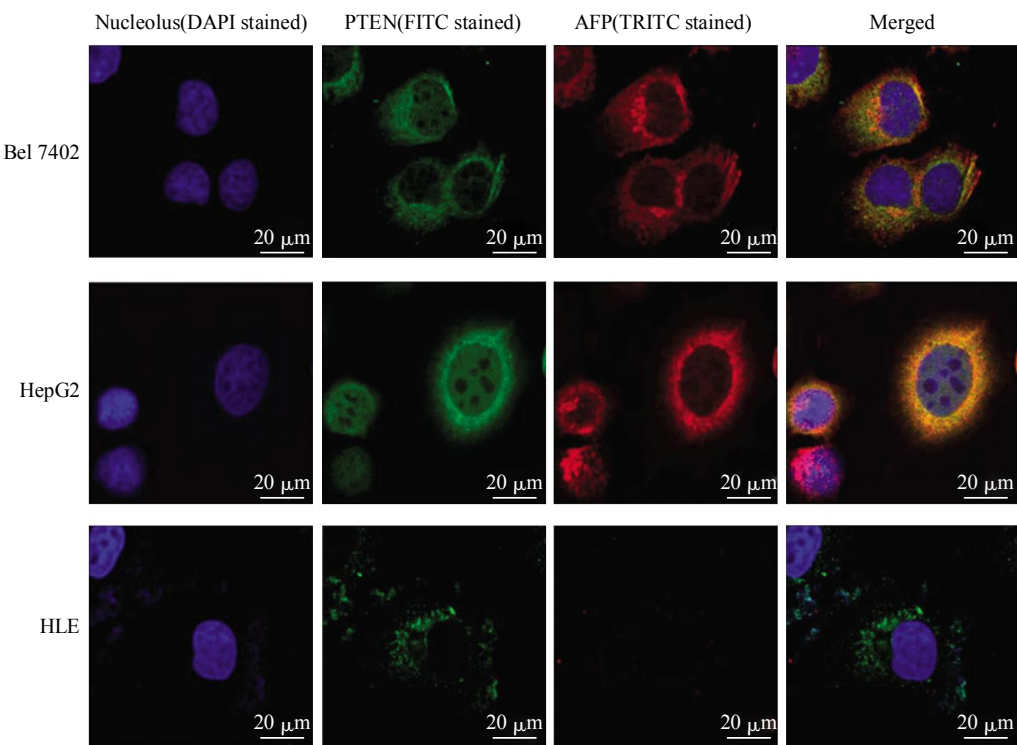
### 2.2 激光共聚焦显微镜观察 AFP 与 PTEN 在 Bel 7402、HepG2 和 HLE 细胞内共定位情况

激光共聚焦显微镜研究发现, 人肝癌 Bel 7402、

HepG2 细胞内合成的 AFP 主要分布于细胞浆, 特别是在核周围有明显的聚集(用 TRITC 标记的二抗与抗 AFP 的一抗结合, 红色标记显示的是 AFP 分

布). 而 Bel 7402、HepG2 和 HLE 细胞内的 PTEN 也主要集中在胞浆, 并有少量的 PTEN 在细胞核内, 在胞浆的 PTEN 也主要聚集在细胞核周围(用 FITC 标记的二抗能与抗 PTEN 的一抗结合, 绿色标记显示的是 PTEN 分布). 从图 2 观察发现, 在局部区域, 自然培养条件下, Bel 7402 和 HepG2 细胞内 AFP 和 PTEN 有共定位现象. 共定位分析

证明, 绿色荧光分子和红色荧光分子有共定位特性(图 2). 由于 HLE 细胞不表达 AFP, 所以用 TRITC 标记的 AFP 并没有出现, 但是可以看到用 FITC 标记的 PTEN 主要分布于 HLE 细胞的胞浆里, 但无法观察到 HLE 细胞内有 AFP 和 PTEN 共定位现象(图 2).



**Fig. 2 The expression and co-localization of AFP with PTEN in cytoplasm of hepatoma cells**  
Laser confocal microscopy was applied to observe the expression and co-localization of AFP with PTEN in cytoplasm of human hepatoma Bel 7402 (AFP-producing), HepG2 (AFP-producing) and HLE (non-AFP-producing) cells. Nucleolus: Blue(DAPI labeled), PTEN: Green(FITC labeled), AFP: Red (FRITC labeled). The images were the representation of three independent experiments.

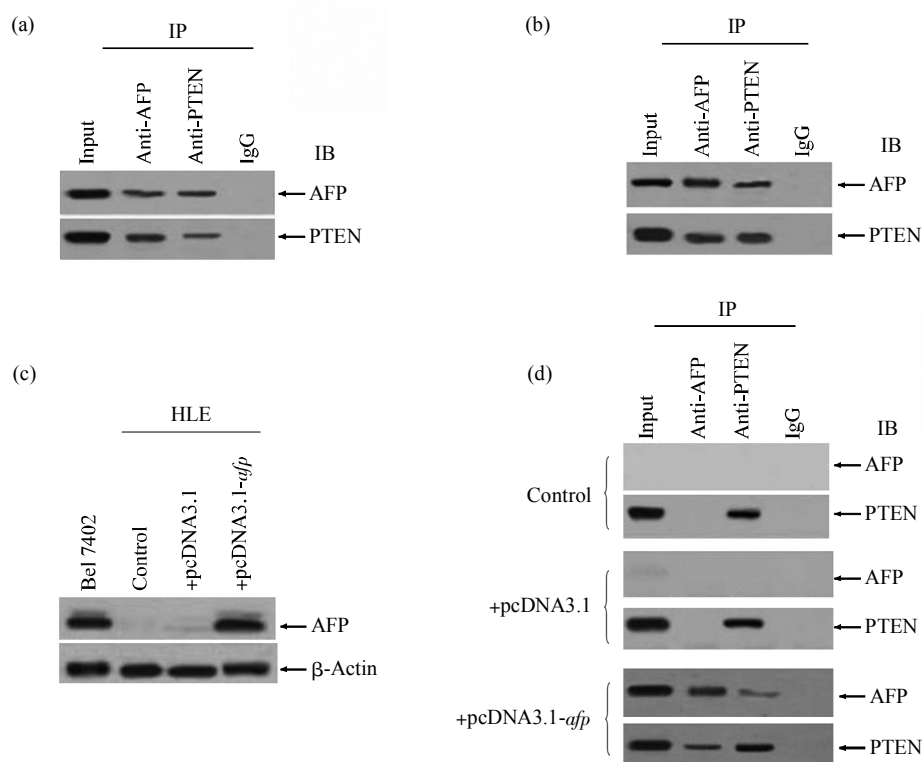
2.3 免疫共沉淀方法证明在 Bel 7402、HepG2 细胞内 AFP 与 PTEN 的相互作用

免疫共沉淀(Co-IP)方法研究证明, 肝癌细胞内的 AFP 能与 PTEN 结合, 同时使用两种抗体沉淀抗原, 均能检测到 PTEN-AFP 复合体的存在, 上述结果提示, 在自然培养的情况下, 肝癌细胞内 AFP 与 PTEN 能以复合体的形式存在于 Bel 7402 细胞(图 3a)和 HepG2 细胞中(图 3b). 由于 HLE 细胞不表达 AFP, 所以在 HLE 细胞转染 pcDNA3.1-*afp* 后 30 h, 检测 HLE 细胞内 AFP 的表达, 发现 HLE 细胞内有 AFP 的高表达(图 3c), 用 Co-IP 技术分析结果显示, 在转染 pcDNA3.1-*afp* 的 HLE 细胞中,

AFP 能与 PTEN 相互结合, 而转染空载体的 HLE 细胞并未显示有 AFP 的存在及 AFP 与 PTEN 结合的迹象(图 3d).

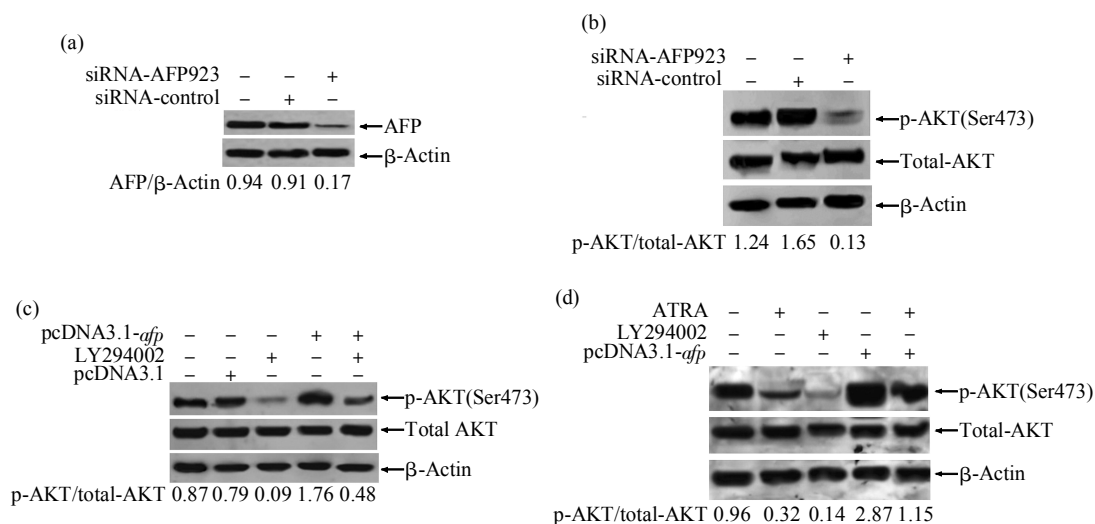
2.4 AFP 对 Bel 7402 和 HLE 细胞 AKT 磷酸化的影响

人肝癌 Bel 7402 细胞具有高表达 AFP 的特性, 本研究采用干扰 AFP 基因 mRNA 合成的片段和 pGPU6/GFP/Neo 质粒连接(简称 siRNA-AFP923)后转染 Bel 7402 细胞, 通过 pGPU6/GFP/Neo 质粒携带干扰序列抑制人肝癌 Bel 7402 细胞的 AFP 表达. 结果表明, siRNA-AFP923 能有效干扰 AFP 的表达(图 4a). 所以实验采用 siRNA- AFP923 干扰 AFP



**Fig. 3 Interaction of AFP with PTEN in human hepatoma cells**

(a) AFP interaction with PTEN was detected by Co-IP in Bel 7402 cells. (b) AFP interaction with PTEN was detected by Co-IP in HepG2 cells. (c) cDNA of AFP gene was inserted to the vector pcDNA3.1 for constructing the expression vector of AFP (named pcDNA3.1-*afp*), and transfected into HLE cells for 30 h, then the expression of AFP was detected by Western blotting, Bel 7402 cells as a positive control. (d) HLE cells were transfected with pcDNA3.1-*afp* for 30 h, and the interaction of AFP with PTEN was detected by Co-IP. The result was representation of at least three replicated experiments. IP: Immuno-precipitation; IB: Immuno-blotting.



**Fig. 4 Effect of AFP on the expression of phosphorylated AKT(Ser473) in Bel 7402 and HLE cells**

(a) siRNA knockdown the expression of AFP in Bel 7402 cells, Western blot was used to analysis expression of AFP. (b) The expression of AKT and p-AKT(ser473) in Bel 7402 cells after transfection with AFP-siRNA923 for 30 h. (c) HLE cells were transfected with pcDNA-*afp* for 36 h followed treated with LY294002 (1.5  $\mu$ mol/L) and the expression of AKT and p-AKT(ser473) were evidenced by Western blotting. (d) HLE cells were transfected with pcDNA-*afp* for 36 h followed treated with ATRA (160  $\mu$ mol/L) for 12 h and the expression of AKT and p-AKT(ser473) were detected by Western blotting. The quantitative data represented the densitometry ratio of the protein. Control-siRNA represented a scrambled siRNA control. The result was representation of at least three replicated experiments.



表达. 干扰人肝癌 Bel 7402 细胞 AFP 表达后, 在自然培养的条件下能抑制 Bel 7402 细胞的 AKT (Ser473)磷酸化. 而在不表达 AFP 的 HLE 细胞里转染 pcDNA3.1-*afp* 则能显著性促进 AKT(Ser473)磷酸化. 用 PI3K 特异性抑制物 Ly294002 与 pcDNA3.1-*afp* 共同处理 HLE 细胞, 则 AKT(Ser473)磷酸化明显减少(图 4b); 用 ATRA(160  $\mu\text{mol/L}$ )处理 HLE 细胞后, AKT(Ser473)磷酸化明显减少(图 4c), 而转染 pcDNA3.1-*afp*, 能明显对抗 ATRA 对 AKT(Ser473)磷酸化的抑制作用(图 4d).

2.5 AFP 对 ATRA 诱导的 Bel 7402 细胞凋亡的抵抗作用和对 caspase-3 活性的影响

形态学观察发现, 用小剂量的 ATRA(40  $\mu\text{mol/L}$ )处理人肝癌 Bel 7402 细胞 48 h 后, 对细胞凋亡

没有显著性影响, 但是在 Bel 7402 细胞转染 siRNA-AFP923 后, 再用 ATRA(40  $\mu\text{mol/L}$ )处理, 结果显示细胞的形态向凋亡转化. 共聚焦显微镜观察细胞核的形态改变, 也发现, 干扰 AFP 表达后 Bel 7402 细胞的细胞核萎缩, 有凋亡核小体形成, 对照的 siRNA 载体和单独用 ATRA 处理组没有明显改变(图 5a). 用 Western blotting 分析这些细胞的 caspase-3 表达和活性改变, 结果显示, 干扰 AFP 表达后再用 ATRA 处理, Bel 7402 细胞内的 caspase-3 由没有活性转变为有活性形式的表达明显增加, 其相应的作用底物 PARP-1 的活性也增强, 而单独用 ATRA 处理, RNA 干扰对照组和干扰 AFP 组则没有明显改变(图 5b).

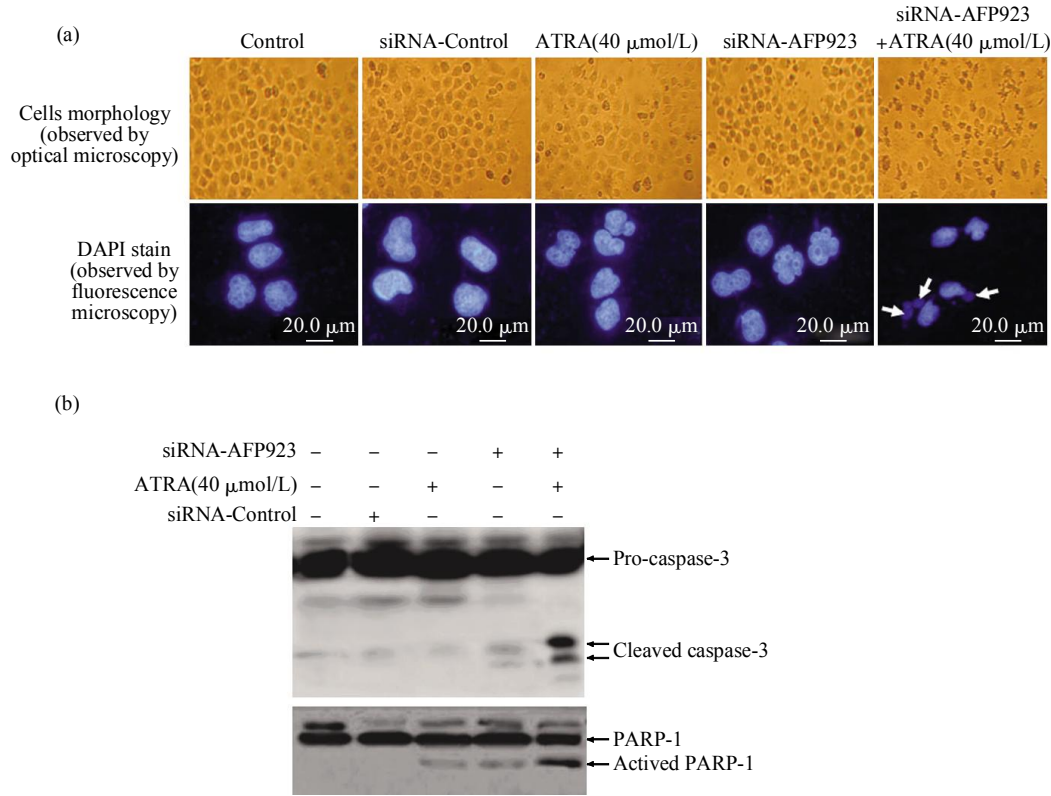


Fig. 5 The resistant effect of AFP on the apoptosis induced by ATRA in Bel 7402 cells

(a) Bel 7402 cells were cultured in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air in humid atmosphere environment, and the cells were transfected with siRNA-AFP923 for 30 h followed by being treated with ATRA(40  $\mu\text{mol/L}$ ), the morphology of cells were observed and images were acquired by optical microscopy ( $\times 400$ ). The cellular caryon was stained by DAPI and the alteration of karyoplast was observed by fluorescence microscopy. The white arrow indicated the apoptosome of the caryoplast. The images were representation of at least three replicated experimentation. (b) Influence of AFP on ATRA regulated the expression and activity of caspase-3 in Bel 7402 cells. Bel 7402 cells were transfected with siRNA-AFP923 vector for 30 h followed by treatment with ATRA (40  $\mu\text{mol/L}$ ) for another 24 h, the protein expression was measured by Western blot. These images were the representation of at least three repeated experiments.

2.6 AFP 对 ATRA 抑制 Bel 7402 和 HLE 细胞生长的影响

MTT 分析发现, 小剂量的 ATRA(小于 40  $\mu\text{mol/L}$ )

不能抑制 Bel 7402 细胞的生长, 而当 ATRA 的剂量大于 80  $\mu\text{mol/L}$  时能显著性抑制 Bel 7402 细胞的增殖(图 6a). MTT 分析也发现, HLE 细胞对

ATRA 的敏感性和 Bel 7402 细胞有相似性(图 6b). 进一步观察发现, 在 Bel 7402 细胞里转染 siRNA-AFP923 后, 再用 ATRA(40  $\mu\text{mol/L}$ )处理则能显著抑制癌细胞生长, 单独用 siRNA-AFP 923 处理 Bel 7402 细胞也能抑制细胞生长(图 6c). 观察也发现, ATRA(160  $\mu\text{mol/L}$ )能显著抑制 HLE 细

胞生长. HLE 细胞导入 pcDN A3.1-*afp* 后, 再用 ATRA(160  $\mu\text{mol/L}$ )处理, ATRA 抑制 HLE 细胞生长的作用明显消失, 而导入空载体 pcDNA3.1 则没有 AFP 表达载体的对抗效果, 提示 pcDNA3.1-*afp* 在 HLE 细胞内表达的 AFP 具有对抗 ATRA 的作用.

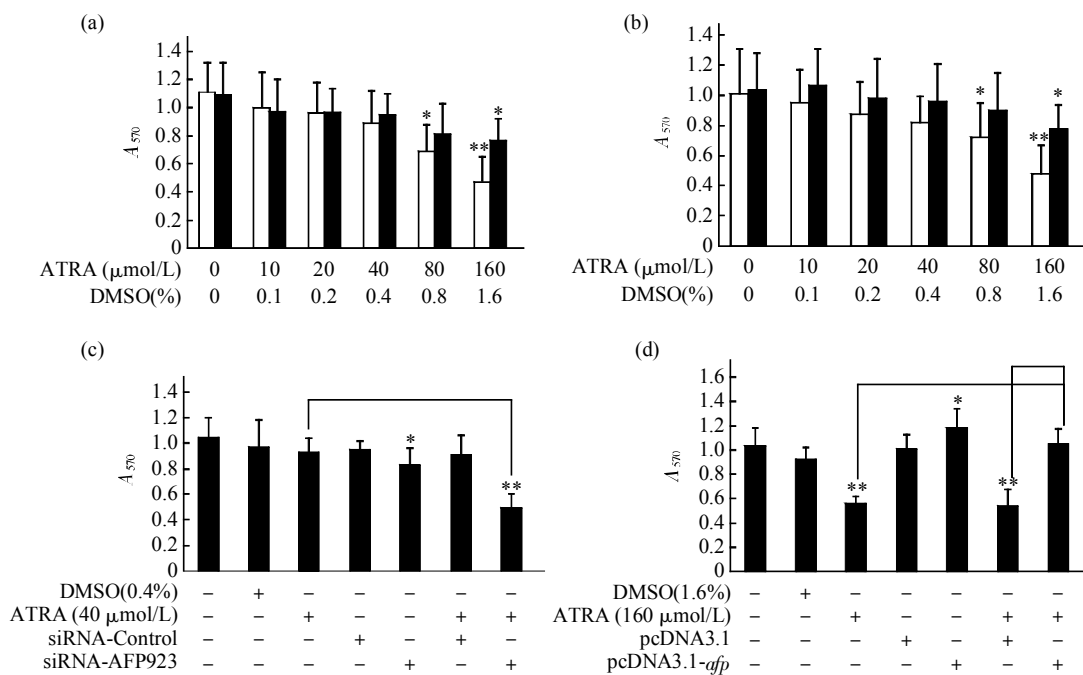


Fig. 6 The effects of AFP on growth of Bel 7402 and HLE cells

(a) Influence of ATRA on growth of Bel 7402 cells. (b) Influence of ATRA on growth of HLE cells. MTT assay was used to evaluate the growth of hepatoma cells, DMSO was the vehicle for ATRA and was used as a vehicle control.  $*P < 0.05$ , and  $**P < 0.01$  compared with untreated group,  $n=8$ . (c) Effects of siRNA-AFP923 on the growth of Bel 7402 cells, siRNA-AFP923 was transfected into Bel 7402 cells for 30 h followed by being treated with ATRA (40  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h. (d) Effect of pcDNA3.1-*afp* on the growth of HLE cells. HLE cells were transfected with pcDNA3.1-*afp* for 36 h followed treated with ATRA (160  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h. MTT assay was used to evaluate the growth of hepatoma cells, DMSO was the vehicle for ATRA and was used as a vehicle control.  $*P < 0.05$ , and  $**P < 0.01$  compared with untreated group,  $n=8$ . siRNA-control represented a scrambled siRNA control. These experiments were repeated at least three times. □: ATRA; ■: DMSO.

### 3 讨 论

肝癌细胞高表达 AFP 被认为与癌细胞过度生长、转移和侵袭密切相关. 有研究发现, 抑制 AFP 的表达能诱导肝癌细胞凋亡<sup>[26]</sup>, AFP 也能与细胞内的信息物质结合而影响凋亡信号的传递<sup>[27-28]</sup>, 这些研究结果提示, AFP 的生物学功能具有多样性, 我们近期的研究也发现, AFP 能与 caspase-3、RAR- $\beta$  结合而抑制 caspase 的级联反应<sup>[29]</sup>, 显示 AFP 调节肝癌细胞信息传递具有中心轴的作用.

首先用 3 种细胞株检测 AFP、PTEN 和 AKT

的表达, 可以研究细胞内 AFP 与 PTEN 的功能以及 AKT 磷酸化的相互关系. 本研究发现人肝癌 Bel 7402 细胞、HepG2 细胞和 HLE 均有 PTEN 的表达. Bel 7402 细胞和 HepG2 细胞高表达 AFP, 而 HLE 细胞不表达 AFP. 这些现象使研究人肝癌 Bel 7402 细胞和 HepG2 细胞内 PTEN 和 AFP 在细胞内相互作用成为可能. PTEN 在肝癌细胞中有 50% 发生突变或者表达程度很低, 所以我们首先检测 Bel 7402 细胞和 HepG2 细胞是否表达 PTEN, 而 PTEN 是调控 3- 磷酸肌醇(PIP<sub>3</sub>)含量的重要水解酶, 与磷脂酰-3- 磷酸激酶(PI3K)的作用相反, 其



能水解 PIP<sub>3</sub> 为 2- 磷酸肌醇(PIP<sub>2</sub>), 从而抑制 PI3K 激活下游的蛋白激酶 B(PKB/AKT). AKT 是传递生长信号的重要物质, 在肿瘤细胞的生长过程发挥中心信息物质的作用<sup>[30-31]</sup>, 因而 AKT 的活化预示肿瘤细胞生长旺盛. PTEN 被认为是一个非常重要的抑癌基因, 其 C2 结构域在抑制肿瘤生长和转移的过程中起重要作用<sup>[32-33]</sup>. 许多研究发现, 肿瘤细胞的 PTEN 基因表达严重下降或者功能丧失<sup>[23-24]</sup>, 也发现肝癌细胞 PTEN 基因表达有下降现象<sup>[34-35]</sup>, 但是肝癌细胞 PTEN 功能丧失并不是由于 PTEN 基因表达减少或基因启动子表观遗传改变引起, 可能还有未知的其他机制存在<sup>[34]</sup>. 本研究证明, 人肝癌 Bel 7402 细胞在 ATRA 的作用下, PTEN 表达明显升高, 表明 PTEN 基因在肝癌细胞可以被激活. 用免疫共沉淀技术研究发现肝癌细胞内的 AFP 能与 PTEN 形成复合体, 提示 AFP 和 PTEN 有相互作用的可能. 共聚焦显微镜观察到, Bel 7402 细胞内 PTEN 和 AFP 主要分布于细胞浆, 有少部分的 PTEN 蛋白也分布于细胞核, 观察显示 PTEN 蛋白和 AFP 在胞浆有共定位现象.

研究 AFP 对 PTEN 的功能影响, 能探索表达 AFP 的肝癌细胞耐受凋亡诱导的关键机制, 也是认识 AFP 新功能的有力证据. PTEN 的活化能减少 PI3K/AKT 信号途径下游的 AKT 磷酸化, 特别是 AKT 分子上 ser473 位点的磷酸化是 AKT 被激活的重要标记, 而去磷酸化的 AKT 则失去其激活下游信息分子的功能, 所以 PTEN 在 PI3K/AKT 信号传递中扮演重要角色. 本研究用 RNA 干扰技术抑制 AFP 表达, 结果显示, 设计干扰 AFP 基因的靶序列能抑制 80% 以上的 AFP 表达(与对照组比较), 因而该干扰序列可用于抑制 AFP 表达的研究. 本研究还发现, 正常培养的人肝癌细胞, PTEN 低水平表达, AKT 分子的 Ser473 位点高磷酸化. 然而干扰 AFP 表达后, Bel 7402 细胞 PTEN 的表达明显升高. ATRA 处理也能明显地促进 PTEN 表达, 干扰 AFP 表达后能直接抑制 AKT 分子的 Ser473 位点磷酸化, 与用 ATRA 处理的效果相一致. 我们前期研究发现, 大剂量的 ATRA 能显著抑制 AFP 表达, 并发现 AFP 能与 ATRA 的  $\beta$  受体结合并阻止  $\beta$  受体进入细胞核, 削弱其对 survivin 表达的抑制作用<sup>[36]</sup>. 本研究结果提示, 用药物 ATRA 抑制 AFP 表达和用 RNA 干扰技术抑制 AFP 的表达, 对 PTEN 调控 AKT 分子 Ser473 位点磷酸化的效果是一致的, 也就是 AFP 能直接抑制 PTEN 活性, 从

而促进 AKT 分子的 Ser473 位点磷酸化.

本研究证明 AFP 通过以下两种途径抑制 PTEN 的磷酸酶作用, a. AFP 能抑制 PTEN 表达, 通过这个途径减少 PTEN 水解 PIP<sub>3</sub>; b. AFP 能与 PTEN 结合, 通过两者分子间的相互作用, 抑制 PTEN 的磷酸酶活性, 这个途径可能是 AFP 快速有效地激活 PI3K/AKT 信号的方式. 提示 AFP 能激活 PI3K/AKT 信号途径, 可能是 AFP 促进癌细胞增殖、转移和侵袭的重要机制. 由于 PI3K/AKT 信号通路是肿瘤细胞接受外界生长信号的主要途径, 因而该通路是研究肿瘤靶向药物作用的关键性分子. PTEN 是经典的抑制 PI3K/AKT 信号传递的细胞因子, 正常的细胞通过表达 PTEN 抑制 PI3K/AKT 信号传递, 阻止细胞的过度生长, 显示 PTEN 在肿瘤生长过程所起作用的重要性. 近期研究发现, PTEN 能进入细胞内, 通过调节 Rad5 的作用, 修复细胞核内损伤的 DNA, 所以其被认为是细胞染色体完整性的保护者<sup>[37]</sup>. 有人提出, PTEN 的研究将进入 PTEN 在细胞核发挥功能的时代<sup>[38]</sup>. 由于 PTEN 是阻止肿瘤干细胞形成的关键性物质<sup>[39]</sup>, 而肝癌干细胞高表达 AFP 能促进肿瘤干细胞的不对称分裂<sup>[40]</sup>, 提示 AFP 和 PTEN 的表达及其发挥强势作用决定了肿瘤干细胞的命运, AFP 表达高、发挥作用强, 即抑制 PTEN 活性, 促进肿瘤干细胞不对称分裂, 维持肿瘤干细胞的生存. Khamzina 等<sup>[41]</sup>研究发现, 在克隆的 AFP 阳性或阴性大鼠 McA-RH 7777 肝癌细胞里, PI3K 调节亚基 P85 的酪氨酸磷酸化程度与 AFP 的存在密切相关. 发现在有胰岛素刺激的情况下, 仅在 AFP 阳性的肝癌细胞里有 p85、胰岛素受体  $\beta$  亚基和胰岛素受体底物 -1 的酪氨酸磷酸化, 而且 AFP 阳性细胞比 AFP 阴性细胞的生长速度快得多, 而胰岛素受体信息途径通过 PI3K 使下游的信息分子 AKT 和 MAPK 磷酸化后被激活. 研究还发现, PI3K 特异性抑制物 Ly294002 仅对 AFP 阳性肝癌细胞的生长有抑制作用. Liang 等<sup>[42]</sup>研究发现, AFP 能通过诱导 MAPK 的 p42/p44 亚基磷酸化表达而促进胚胎微血管内皮细胞的增殖, 这些研究表明 AFP 具有促进细胞内生长信号物质磷酸化的生物学活性. 本研究发现, 导入 pcDNA3.1-*afp* 载体后, 能检测到 HLE 细胞表达 AFP, 用 ATRA 处理 HLE 细胞可促进 PTEN 表达, 也可抑制磷酸化的 AKT(Ser473)表达. 研究结果提示, ATRA 具有抑制 PTEN/PI3K/AKT 信号传递的作用. 但是, 在不表达 AFP 的 HLE 细胞内导

入 pcDNA3.1-*afp* 载体后, 能阻止 ATRA 对 AKT 磷酸化的影响, 说明 AFP 具有调节 AKT 磷酸化功能. Ly294002 能抑制 HLE 细胞的 p-AKT(Ser473) 表达, 而导入 pcDNA3.1-*afp* 载体后, 能显著减轻 Ly294002 的作用. 提示, AFP 具有保护 PI3K 活性的功能, AFP 可能通过维持 PI3K 的活性促进肝癌细胞内 AKT(Ser473) 的磷酸化. 本研究用 MTT 分析发现, 两种肝癌细胞对小剂量的 ATRA 耐受, 但是干扰 AFP 表达能增加 Bel 7402 细胞对小剂量 ATRA 的敏感性, 而且在 HLE 细胞(不表达 AFP 细胞系)里导入 pcDNA3.1-*afp* 能明显地对抗大剂量的 ATRA 抑制 HLE 细胞生长, 表明 AFP 是肝癌细胞耐受 ATRA 的一个重要的细胞因子. 研究还发现, 干扰 AFP 表达能增加 caspase-3 的活性, 促进 PARP-1 从没有活性转化成有活性的形式. 我们前期研究证明 AFP 能与 caspase-3 结合, 抑制后者的活性<sup>[43]</sup>. 由于特异性干扰 AFP 表达, 而且 pcDNA3.1-*afp* 转染后在细胞内能特异性表达 AFP. 所以这些结果提示, AFP 通过抑制 caspase-3 的活性对抗 ATRA 诱导凋亡. 近期研究发现, 干扰 AFP 表达能增加人肝癌 Huh-7 细胞凋亡<sup>[44]</sup>. 我们的研究发现, AFP 具有促进 PI3K/AKT 信号传递的生物学功能<sup>[45]</sup>, 高表达 AFP 的肝癌组织血管生成旺盛<sup>[46]</sup>, PI3K/AKT 信号是促进肿瘤细胞生长和血管形成的重要信息通路, 由于人肝癌细胞内高表达的 AFP 能与 PTEN 结合, 提示 AFP 在肝癌细胞的发生、发展过程中不仅仅是通过其受体介导促进癌细胞生长<sup>[16]</sup>, 而且还能抑制 PTEN 的磷酸酶功能, 表明肝癌细胞内高表达的 AFP 能激活生长信号 PI3K/AKT 的传递, 导致高表达 AFP 的肝癌细胞内 PTEN 失去平衡细胞生长的功能, 这可能是本研究新发现的 PTEN 失活的另一种机制. 我们认为 AFP 具有调节信息分子样作用的生物学功能, 由于 PTEN 的正常表达能够增加肿瘤细胞对药物的敏感性, 预示靶向干扰 AFP 表达是有效地诱导肝癌细胞凋亡和抑制 AFP 促进肿瘤细胞生长的新策略.

### 参 考 文 献

- [1] Semenkov L N, Dudich E I, Dudich I V, *et al.* Alpha-fetoprotein as a TNF resistance factor for the human hepatocarcinoma cell line HepG2. *Tumour Biol*, 1997, **18**(1): 30-40
- [2] Li M, Zhou S, Liu X, *et al.* Alpha-Fetoprotein shields hepatocellular carcinoma cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Cancer Lett*, 2007, **249**(2): 227-234
- [3] Muto Y, Moriwaki H, Saito A. Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 1999, **340**(13): 1046-1047
- [4] Kizaki M, Ueno H, Matsushita H, *et al.* Retinoid resistance in leukemic cells. *Leuk Lymphoma*, 1997, **25**(5-6): 427-434
- [5] Sun S Y, Yue P, Chen X, *et al.* The synthetic retinoid CD437 selectively induces apoptosis in human lung cancer cells while sparing normal human lung epithelial cells. *Cancer Res*, 2002, **62**(8): 2430-2436
- [6] Camerini T, Mariani L, Palo G D, *et al.* Safety of the synthetic retinoid fenretinide: Long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer. *J Clin Oncol*, 2001, **19**(6): 1664-1670
- [7] Wang L, Levin M S. Suppression of FGF signaling: a putative mechanism for the chemopreventive effects of acyclic retinoid in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2005, **128**(1): 228-231
- [8] Clerici C, Castellani D, Russo G, *et al.* Treatment with all-trans retinoic acid plus tamoxifen and vitamin E in advanced hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*, 2004, **24**(2C): 1255-1260
- [9] Thomas M B, Abbruzzese J L. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol*, 2005, **23**(31): 8093-8108
- [10] Chang Y C, Nagasue N, Abe S, *et al.* Alpha Fetoprotein producing early gastric cancer with liver metastasis: report of three cases. *Gut*, 1991, **32**(5): 542-545
- [11] Takahashi Y, Inoue T. Des-gamma carboxy prothrombin(PIVKA- II ) and alpha-fetoprotein producing gastric cancer with multiple liver metastases. *Pathol Int*, 2003, **53**(4): 236-240
- [12] Ishigami S, Natsugoe S, Nakashima H, *et al.* Biological aggressiveness of alpha-fetoprotein (AFP)-positive gastric cancer. *Hepatogastroenterology*, 2006, **53**(69): 338-341
- [13] Iida H, Honda M, Kawai H F, *et al.* Ephrin-A1 expression contributes to the malignant characteristics of  $\alpha$ -fetoprotein producing hepatocellular carcinoma. *Gut*, 2005, **54**(6): 843-851
- [14] Kamoshida S, Suzuki M, Sakurai Y, *et al.* Expression of chemoresistance-related proteins in alpha-fetoprotein-producing adenocarcinoma of the digestive organs. *Oncol Rep*, 2006, **16**(4): 721-727
- [15] Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M, *et al.* Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyphenolic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 1996, **334**(24): 1561-1567
- [16] Li M S, Li P F, He S P, *et al.* The promoting molecular mechanism of alpha-fetoprotein on the growth of human hepatoma Bel7402 cell line. *World J Gastroenterol*, 2002, **8**(3): 469-475
- [17] Kim H, Kim E H, Eom Y W, *et al.* Sulforaphane sensitizes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-resistant hepatoma cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of DR5. *Cancer Res*, 2006, **66**(3): 1740-1750
- [18] Wang X, Zhou Y, Ying X, *et al.* Interaction between heat shock

- protein 72 and alpha-fetoprotein in human hepatocellular carcinomas. *Clin Chim Acta*, 2007, **379**(1-2): 158-162
- [19] Mizejewski G J, MacColl R.  $\alpha$ -Fetoprotein growth inhibitory peptides: Potential leads for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther*, 2003, **2**(11): 1243-1255
- [20] Mizejewski G J. Alpha-fetoprotein structure and function: Relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med*, 2001, **226**(5): 377-408
- [21] Li J, Yen C, Liaw D, *et al*. PTEN, a putative tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* (Washington DC), 1997, **275**( 5308 ): 1943-1947
- [22] Stack P A, Pershouse M A, Jasser S A, Y *et al*. Identification of a candidate tumour suppressor gene. MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*, 1997, **15**(4): 356-362
- [23] Lu D D, Zhang X R, Cao X R. Expression and significance of new tumor suppressor gene PTEN in primary liver cancer. *J Cell Mol Med*, 2003, **7**(1): 67-71
- [24] Hu T H, Huang C C, Lin P R, *et al*. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2003, **97**(8): 1929-1940
- [25] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 888-897
- [26] Won Y S, Lee S W. Targeted retardation of hepatocarcinoma cells by specific replacement of alpha-fetoprotein RNA. *J Biotechnol*, 2007, **129**(4): 614-619
- [27] Dudich E, Semenkova L, Dudich I, *et al*. Alpha-fetoprotein causes apoptosis in tumor cells *via* a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases. *Eur J Biochem*, 1999, **266**(3):750-761
- [28] Dudich E, Semenkova L, Dudich I, *et al*. Alpha-fetoprotein antagonizes X-linked inhibitor of apoptosis protein anticaspase activity and disrupts XIAP-caspase interaction. *FEBS J*, 2006, **273**(16): 3837-3849
- [29] Li M S, Liu X H, Zhou S, *et al*. Inhibited the expression of alpha fetoprotein by all trans retinoic acid sensitize hepatoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL) [abstract]. *Gastroenterology*, 2007, **132**(4): A822-A823. suppl 2
- [30] Testa J R, Bellacosa A. AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(20): 10983-10985
- [31] Sodhi A, Montaner S, Patel V, *et al*. Akt plays a central role in sarcomagenesis induced by Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(14): 4821-4826
- [32] Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, *et al*. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science*, 2004, **303**(5661): 1179-1181
- [33] Georgescu M M, Kirsch K H, Kaloudis P, *et al*. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res*, 2000, **60**(24): 7033-7038
- [34] Wang L, Wang W L, Zhang Y, *et al*. Epigenetic and genetic alterations of PTEN in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*, 2007, **37**(5): 389-396
- [35] Zhang L, Yu Q, He J, *et al*. Study of the PTEN gene expression and FAK phosphorylation in human hepatocarcinoma tissues and cell lines. *Mol Cell Biochem*, 2004, **262**(1-2): 25-33
- [36] Li M, Li H, Li C, *et al*. Cytoplasmic alpha-fetoprotein functions as a co-repressor in RA-RAR signaling to promote the growth of human hepatoma Bel7402 cells. *Cancer Lett*, 2009, **285**(2): 190-199
- [37] Shen W H, Balajee A S, Wang J, *et al*. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*, 2007, **128**(1): 157-170
- [38] Baker S J. PTEN enters the nuclear age. *Cell*, 2007, **128**(1): 25-28
- [39] Hede K. PTEN takes center stage in cancer stem cell research, works as tumor suppressor. *J Natl Cancer Inst*, 2006, **98**(12): 808-809
- [40] Ishikawa K, Sasaki A, Haraguchi N, *et al*. A Case of an  $\alpha$ -Fetoprotein-producing intrahepatic cholangiocarcinoma suggests probable cancer stem cell origin. *Oncologist*, 2007, **12**(3): 320-324
- [41] Khamzina L, Borgeat P. Correlation of  $\alpha$ -Fetoprotein expression in normal hepatocytes during development with tyrosine phosphorylation and insulin receptor expression. *Mol Biol Cell*, 1998, **9**(5): 1093-1105
- [42] Liang O D, Korff T, Eckhardt J, *et al*. Oncodevelopmental  $\alpha$ -Fetoprotein acts as a selective proangiogenic factor on endothelial cell from the fetomaternal unit. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, **89**(3): 1415-1422
- [43] Li M, Li H, Li C, *et al*. Alpha fetoprotein is a novel protein-binding partner for caspase-3 and blocks the apoptotic signaling pathway in human hepatoma cells. *Int J Cancer*, 2009, **124**(12): 2845-2854
- [44] Yang X, Zhang Y, Zhang L, *et al*. Silencing alpha-fetoprotein expression induces growth arrest and apoptosis in human hepatocellular cancer cell. *Cancer Lett*, 2008, **271**(7): 281-293
- [45] Li M, Li H, Li C, *et al*. Alpha-fetoprotein, a new member of intracellular signal molecules in regulation of the PI3K/AKT signaling in human hepatoma cells lines. *Int J Cancer*, 2011, **128**(3): 524-532
- [46] Mitsuhashi N, Kobayashi S, Doki T, *et al*. Clinical significance of alpha-fetoprotein: involvement in proliferation, angiogenesis, and apoptosis of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, **23**(7 Pt 2): e189-197

## Inhibited The Activity of PTEN by $\alpha$ -Fetoprotein Caused Resistance to all *trans* Retinoic Acid of Hepatoma Cells\*

ZHU Ming-Yue<sup>1)</sup>, FU Shi-Gan<sup>3)</sup>, LI Meng-Sen<sup>1,2)\*\*</sup>, XIE Xie-Ju<sup>4)</sup>, LI Gang<sup>5)</sup>

<sup>1)</sup> Key Laboratory of Molecular Biology, Hainan Medical College, Haikou 571159, China;

<sup>2)</sup> Institution of Cancer, Hainan Medical College, Haikou 570102, China;

<sup>3)</sup> Department of Physiology, Hainan Medical College, Haikou 571159, China;

<sup>4)</sup> Department of Pathophysiology, Hainan Medical College, Haikou 571159, China;

<sup>5)</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China)

**Abstract**  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) has a property to maintain the growth of hepatocellular carcinoma cells (HCC) *in vivo*, but the critical functional step of AFP is still obscure. In order to explore AFP influences on the transduction of PTEN/AKT signal in HCC, expression of PTEN in human hepatoma cells and the effect of all *trans* retinoic acid (ATRA) on PTEN expression in these cancer cells were detected by Western blotting. AFP interacted with PTEN was analyzed by co-immunoprecipitation (Co-IP). Laser confocal microscopy was used to observe co-localization of AFP and PTEN. Short small RNA interfering (RNAi) was applied to knockdown the expression of AFP in Bel 7402 cells, and the phosphorylation of protein kinase B (AKT) was detected by Western blotting. Growth of Bel 7402 and HLE cells were assayed by MTT. Results showed that Bel 7402 cells expressed PTEN, and the expression of PTEN was induced by ATRA (160  $\mu$ mol/L) mildly. Co-IP indicated that AFP has a property to interact with PTEN. PTEN co-localization with AFP was observed in cytoplasm of Bel 7402 cells. Constructed RNAi vector could knockdown the expression of AFP, expression of PTEN was promoted and phosphorylation of AKT was decreased when the expression of AFP was interfered or the cells were treated with ATRA (160  $\mu$ mol/L). AFP-expressed vector pcDNA3.1-*afp* was transfected into human hepatoma HLE cells (AFP-non production). Co-IP analysis indicated that AFP interacted with PTEN, and expression of p-AKT (Ser473) was promoted in the tumor cells. It was also proved that pcDNA3.1-*afp* was able to reduce the role of LY294002 in inhibiting the activity of AKT in HLE cells. These data provide the first evidence that AFP has a capacity to both interact with and inhibit activity of PTEN, which is also the pivotal events in the process that AFP activated the transduction of PI3K/AKT signal in hepatoma cells. Cytoplasmic AFP plays importance role on the resistance to ATRA induced apoptosis of HCC.

**Key words**  $\alpha$ -fetoprotein, phosphatase and tension homolog deleted on chromosome ten (PTEN), hepatoma cells, PI3K/AKT signal pathway

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2010.00546

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31060164, 30660071, 30760090, 30960153), The National Natural Science Foundation of Hainan Province (309034, 310044) and The Education Department Foundation of Hainan Province (Hjkj2010-32).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-898-66895322, E-mail: mengsenli@163.com

Received: October 26, 2010 Accepted: December 21, 2010