

PI3K 信号通路通过 Skp2、p27 调节 肝癌细胞的增殖 *

傅 奕^{1, 2)} 方征宇¹⁾ 王丽影¹⁾ 李增霞¹⁾ 杨 勇¹⁾ 查锡良^{1)**}

(¹⁾复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032; ²⁾扬州大学医学院生化教研室, 扬州 225001)

摘要 探讨磷脂酰肌醇 3- 激酶(PI3K)信号通路调节肝癌细胞增殖的机制。用 LY294002 特异性阻断 PI3K 信号通路后, 人肝癌细胞(SMMC-7721)的增殖明显被抑制。RT-PCR 及蛋白质印迹结果显示, LY294002 增加了 p27 蛋白的表达, 但不影响 p27 的 mRNA 表达。在 LY294002 处理的细胞中转入 p27 的 RNAi 质粒以干扰 p27 蛋白的表达后, 肝癌细胞的增殖能力可部分恢复。放线菌酮(Chx)处理实验表明, 阻断 PI3K 信号通路使 p27 蛋白的半衰期延长, 稳定性增加。进一步研究发现, LY294002 可抑制介导 p27 蛋白降解的关键分子 Skp2 的 mRNA 表达, 还可缩短 Skp2 蛋白的半衰期, 降低 Skp2 蛋白的稳定性。但在 SMMC-7721 中分别转染 PI3K 下游重要靶分子 Akt 的持续激活和失活突变体, 却并不影响 p27 蛋白的表达。这些结果表明, PI3K 信号通路在转录及翻译后水平调节 Skp2 的表达而影响 p27 蛋白的降解, 从而调节肝癌细胞的增殖, 但 Akt 并没有参与这种调节。

关键词 PI3K, 信号通路, p27, Skp2, Akt, 蛋白质降解

学科分类号 R735.7, Q78

磷脂酰肌醇 3- 激酶(PI3K)家族可参与多种信号通路, 调节细胞的各种功能。PI3K 已发现 3 种同工酶, 其中研究最广泛的是能被细胞表面受体所激活的 I 型 PI3K。PI3K 被激活时, 可催化磷脂酰肌醇的 D3 羟基磷酸化, 生成 3, 4, 5- 三磷酸磷脂酰肌醇[PI(3, 4, 5)P₃], 然后作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白, 组成一个信号级联系统。其中, PI3K 和其下游分子丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶 Akt(或 PKB)所组成的信号通路因其与肿瘤发生发展的相关性, 近年来备受瞩目。PI3K 可使 Akt 的 Thr308 和 Ser473 磷酸化, 进而激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、Caspase9、NF- κ B、p21^{Cip1} 和 p27^{Kip1} 等, 从而调节肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移等^[1]。

p27^{Kip1}(p27)是一种重要的细胞周期负调控因子, 其蛋白质表达量的变化与肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[2]。有文献报道 PI3K 信号通路可调节 p27 蛋白的表达, 但具体机制尚未十分明确^[3]。本文观察了 PI3K 信号通路对肝癌细胞 SMMC-7721 增殖的影响, 并探讨了 PI3K 调节 p27 的具体

机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株与质粒

人肝癌细胞株 SMMC-7721 由上海第二军医大学建株。大肠杆菌(*E. coli*)菌株 DH5 α 及 pcDNA3 质粒由复旦大学上海医学院分子遗传研究室提供, 本室保存。pcDNA3-HA-Akt/PKB^{DD}(Akt^{DD})由 Dr. Jim Woodgett (University of Toronto, Canada)惠赠。在此突变质粒中, 其 Thr308 和 Ser473 被突变为 Asp, 导致 Akt 激酶活性持续激活。Akt dominant negative(dn-Akt)质粒 pcDNA3-DN-Akt/PKB 由复旦大学上海医学院基因中心惠赠。在此突变质粒中, Akt 的激酶活性丧失。RNA 干扰质粒 pSilencer2.0-U6 以及对照质粒 pSilencer 2.0-U6-Nonsense

* 国家自然科学基金资助项目(30570963)和上海市重点学科建设资助项目(B110)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54237696, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

收稿日期: 2008-02-18, 接受日期: 2008-04-08

(pNonsense)购自 Ambion 公司.

1.2 试剂

RPMI 1640 购自 GIBCO BRL 公司. 转染试剂 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司. 小鼠抗人 p27(F-8)、p-p27(Thr187) 多克隆抗体、p-GSK-3 β (Ser9)单克隆抗体、Skp2 p45(H-435) 多克隆抗体和 β -actin(C-2)单克隆抗体均购自 Santa Cruz 公司. 小鼠抗人 p-PKB(Ser473)抗体及放线菌酮(cycloheximide, Chx)购自 Sigma 公司. 二抗为 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体或山羊抗兔 IgG 抗体, 为上海康成生物技术公司产品. PI3K 抑制剂 LY294002 购自 Calbiochem 公司.

1.3 MTT 比色法测定细胞生长曲线

0.25%胰酶消化单层培养细胞, 用含 10%血清的 RPMI 1640 培养液配成单个细胞悬液, 以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于 96 孔培养板中, 每孔体积 200 μ l. 分别于 0、12、24、36 h, 每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μ l, 37°C 继续孵育 4 h, 终止培养. 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μ l DMSO, 37°C 振荡 10 min, 选择 490 nm 波长, 用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度(A), 以时间为横轴, 吸光度(A)为纵轴绘制细胞生长曲线.

1.4 免疫印迹(Western blot)

细胞培养一定时间后, 弃去培养液, 以预冷的 PBS 洗涤 2 次, 吸尽液体. 向培养瓶中加入相应体积的 1 $\times$ SDS 蛋白裂解液, 冰上放置 30 min. 然后以刮棒刮下细胞, 收集到 1.5 ml 离心管中. 沸水浴 10 min, 然后 4°C, 12 000 r/min 离心 10 min. 吸出上清, 用改良 Lowry 法进行蛋白质定量. 调整样品蛋白质浓度使其接近, 保证每个样品孔蛋白质上样量一致. 蛋白质经 SDS-PAGE 后, 转移至 PVDF 膜上. PVDF 膜以 5%脱脂奶粉封闭 4 h 后, 加入一抗过夜. 经洗涤后, 再加入 HRP 标记的二抗, 室温下反应 3~4 h. 每步反应结束均用 PBST 洗涤 3 次, 每次 10 min. 最后用 ECL 化学发光, 经曝光、显影、定影后, 胶片晾干保存.

1.5 RNA 抽提及 RT-PCR

单层贴壁细胞培养预定时间后, 弃掉培养液, 将 TRIzol 试剂直接加在培养细胞上, 反复吹打使细胞裂解, 将裂解液移入 1.5 ml 离心管中. 室温静置 5 min, 4°C, 12 000 g 离心 10 min, 将上清转移入另一个离心管中. 然后按照 TRIzol: 氯仿为 5:1 的比例加入氯仿, 用力颠倒离心管以充分混匀, 静置 10 min 使其分层后, 4°C, 12 000 g 离心 15 min.

转移水相至 1.5 ml 离心管中, 加入等体积异丙醇, 振荡混匀, 室温放置 10 min. 4°C, 12 000 g 离心 10 min, 弃上清. 在离心管中加入 75%乙醇, 振荡片刻, 以 4°C, 7 500 g 离心 5 min, 弃上清. 室温静置 5~15 min 使 RNA 沉淀干燥, 以无菌水溶解, 保存于 -70°C 冰箱中. 用紫外分光光度计进行定量, 测定样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光度, 确定 RNA 质量.

将 2 μ g 模板 RNA, 0.5 μ g Olig(dT)及 10 mmol/L dNTP 与 DEPC 水混合(总体积至 12 μ l), 置于 65°C 水浴 5 min, 立即放到冰上. 然后依次加入 RNase 抑制剂、DTT 及逆转录酶, 37°C 孵育 50 min. 最后 70°C, 15 min, 终止反应, 得到反转录产物 cDNA. 建立最适的 PCR 反应体系, 扩增相应的产物. 引物如下(由上海生工生物公司合成): p27(F), 5' AAG TGG CAT GTT TTG TGC ATT T 3', p27 (R), 5' GCT CAG TAT GCA ACC TTT TAA GCA 3', Skp2(F), 5' TCA ACT ACC TCC AAC ACC TAT CAC 3', Skp2(R), 5' GAC AAC TGG GCT TTT GCA GT 3', β -actin (F), 5' TGG GCA TGG GTC AGA AGG AT 3', β -actin (R), 5' AAG CAT TTG CGG TGG ACG AT 3'.

1.6 p27 RNAi 干扰质粒的构建

根据 siRNA Target Finder、Dharmacon siDESIGN Center 及 Qiagen DesignTool 等网上设计工具确定一靶序列位于 p27 mRNA (Pubmed/Nucleotide No.NM-004064)序列中的 469~488 之间. 针对该序列设计寡核苷酸片段如下: 正义链, 5' gatccg CCGACGATTCTTCTACTCA ttcaagaga TGAGTA-AAGAATCGTCGG ttttggaag 3', 反义链, 5' agctttt-ccaaaa ACCGACGATTCTTCTACTCA tctcttgaa TG-AGTAGAAGAAT CGTCGG cg 3'. 每条链中包括与目的片段对应的一段回文序列, 转录后其 RNA 能形成发夹结构. 序列的上下游存在 BamH I 和 Hind III 位点以利于连接. 序列合成后将两段对应序列等量混合置于 90°C 水浴中缓慢降温, 使其逐步退火形成双链结构备用(其中下划线标记者为酶切位点序列).

1.7 蛋白质稳定性测定(Chx 处理实验)

用 0.25%胰酶消化培养细胞, 用含 10%血清的 RPMI 1640 培养液配成单个细胞悬液, 以同等细胞量接种于 6 孔培养板中. 细胞培养 14 h 后, 加入 50 mg/L 放线菌酮, 分别作用 2、4、6 h. 对照孔($t = 0$ h)加入 DMSO. 用 1 $\times$ SDS 蛋白质裂解液收集

细胞蛋白, 定量后, Western blot 检测。

1.8 质粒转染

按 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2000 转染操作说明书进行, 具体如下: 将 5×10^5 个 SMMC-7721 细胞加入无菌 6 孔培养板中, 培养 24 h 至细胞融合率 90% 以上时进行转染。取 2 个无菌 EP 管, 分别平行配制转染试剂 Lipofectamine 的无血清 DMEM 稀释液 (250 μ l 无血清 DMEM 和 10 μ l Lipofectamine) 和重组质粒的无血清稀释液 (4 μ g 重组质粒溶于 250 μ l 无血清 DMEM), 轻轻混匀, 室温静置 5 min 内混合上述 2 管液体, 轻轻混匀, 室温静置 20 min, 形成 DNA-Lipofectamine 复合物。孵育 DNA-Lipofectamine 复合物时, 弃去细胞培养旧液, 换以新鲜的含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 1.5 ml。孵育结束后将上述配置的 500 μ l DNA-Lipofectamine 复合物加入孔中, 混合均匀。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 细胞孵箱中孵育 8 h 后, 更换新鲜培养液, 继续培养。转染 48 h 后, 收集细胞进行检测。

2 结 果

2.1 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制 SMMC-7721 细胞的生长

将 SMMC-7721 分为 2 组, 一组加入 25 μ mol/L 的 PI3K 抑制剂 LY294002 (7721-LY), 一组加入 DMSO 作为对照 (7721)。将 2 组细胞接种于 96 孔板中, 分别于 0、12、24、36 h 时收集细胞, 以 MTT 法测定相对细胞数量, 并以此绘制生长曲线。如图 1 所示, 加入 LY294002 后, 肝癌细胞的

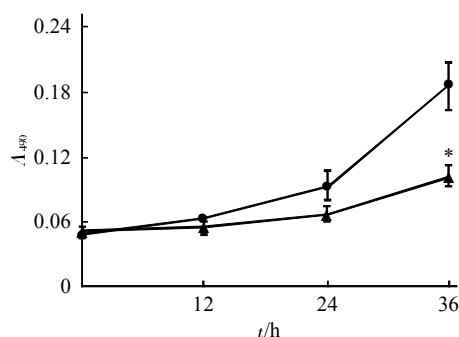


Fig. 1 PI3K inhibitor LY294002 inhibited SMMC-7721 cell proliferation

Cell suspensions of SMMC-7721 and LY294002-treated SMMC-7721 cells were seeded onto normal 96-well culture plates, and survive for 0, 12, 24 and 36 h, respectively. After growth for the indicated times, cells were quantified with MTT assay. The results represent means of triplicates. *Statistically different from 7721 at $P < 0.05$. ●—●: 7721; ▲—▲: 7721-LY.

生长速率减慢, 在 36 h 时为对照细胞的 55%。此结果表明, 阻断 PI3K 信号通路可以抑制肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖。

2.2 PI3K 抑制剂 LY294002 增加 p27 蛋白的表达

由于细胞增殖受细胞周期的调控, 而 p27 是一种重要的细胞周期负调控蛋白。因此, 为解释 LY294002 抑制肝癌细胞生长的机制, 故分析 PI3K 通路 p27 表达的关系。用 25 μ mol/L 的 LY294002 (对照组加 DMSO) 处理细胞 20 h 后, 收集细胞, 分别测定 p27 的 mRNA 及蛋白质表达水平。结果显示, 用 LY294002 阻断 PI3K 通路后, p27 的 mRNA 水平没有明显变化 (图 2a), 但 p27 蛋白的表达量显著增加 (图 2b)。

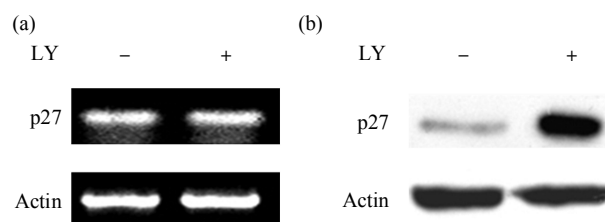


Fig. 2 PI3K inhibitor LY294002 increased p27 protein level

(a) Message RNA levels of p27 were assessed by RT-PCR, and normalized by that of β -actin. There was no significantly different of p27 mRNA levels in the SMMC-7721 cells treated with LY294002 or DMSO. (b) Western blotting showed that p27 protein level was obviously increased in LY294002-treated cells compared to DMSO-treated cells. The protein levels of β -actin were detected to determine the loading amount in each well in the SDS-PAGE gel.

2.3 干扰 p27 蛋白的表达可部分恢复细胞的增殖能力

为证实 p27 蛋白的表达上调确实参与了 LY294002 引起的细胞增殖抑制。我们构建了 p27 的 RNAi 质粒 (Si-p27), 经过酶切鉴定并测序无误后, 我们将该质粒瞬时转染 SMMC-7721 细胞, 并以转染 pSi-nonsense (Si-NS) 作为对照, 同时加入 25 μ mol/L 的 LY294002 处理细胞。转染 36 h 后 (也即 LY294002 处理 36 h 后), 收集一部分细胞, 用 Western blot 检测 p27 蛋白的表达。另一部分细胞用 MTT 方法测定该时间点细胞的生长情况。结果如图 3a 所示, 在 LY294002 处理的细胞中转染 Si-p27 质粒后, p27 蛋白的表达量明显减少。而图 3b 显示, 在 LY294002 处理的细胞中转染 Si-NS (对照质粒) 36 h 后, 细胞的生长速率仅为对照细胞

(SMMC-7721)的50%左右. 但在LY294002处理的细胞中转染 Si-p27 质粒后, 细胞的增殖能力有所恢复, 为对照细胞(SMMC-7721)的75%. 此结果表

明, 抑制 p27 蛋白的表达可部分恢复细胞的增殖能力, 从而证实了 p27 蛋白的表达上调至少部分参与了LY294002引起的细胞增殖抑制.

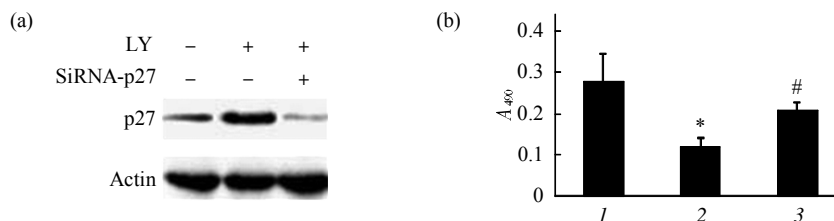


Fig. 3 Knock-down of p27 protein expression partly blocked the cell growth inhibition induced by LY294002

Confluent SMMC-7721 cells were transiently transfected with pSi-p27 and pSi-nonsense(pSi-NS) plasmids respectively. Meanwhile, these cells were treated with 25 μ mol/L LY294002. (a) 36 h after transfection, a part of cells were collected, and p27 protein levels were detected by Western blotting. (b) 36 h after transfection, another part of cells were used for MTT assay. All results shown are representative of at least three independent experiments. The histogram shows the $\bar{x} \pm s$ (* $P < 0.01$, # $P < 0.05$, compared with SMMC-7721 cells). 1: 7721; 2: 7721-LY/Si-NS; 3: 7721-LY/Si-p27.

2.4 PI3K 抑制剂 LY294002 增加 p27 蛋白的稳定性

分别用 LY294002 和 DMSO 处理 SMMC-7721 细胞 14 h, 然后加入放线菌酮, 分别于 0、2、4、6 h 收集细胞蛋白, 测定 p27 的蛋白质水平. 从图 4 可以看出, 经 LY294002 处理的细胞, p27 蛋白的降解速率减慢, 半衰期大于 6 h, 而对照组细胞中的 p27 蛋白的半衰期约 4 h 左右. 由此可见, 阻断 PI3K 信号通路可以通过抑制 p27 蛋白的降解, 增加 p27 蛋白的稳定性.

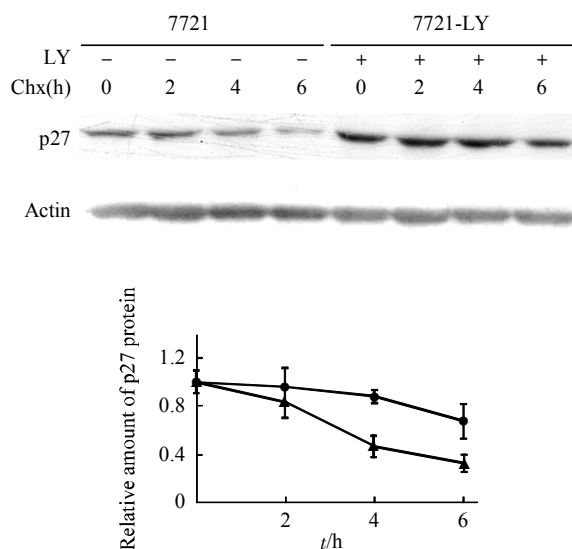


Fig. 4 PI3K inhibitor LY294002 increased the stability of p27 protein

SMMC-7721 cells were treated with 25 μ mol/L LY294002 or DMSO for 20 h. 14 h after treatment with LY294002, Chx (50 mg/L) was added into cells for the indicated time. Then the p27 protein amounts were analyzed with Western blotting. ●—●: 7721-LY; ▲—▲: 7721.

2.5 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制 Skp2 蛋白的表达

泛素-蛋白酶体是介导 p27 蛋白降解的主要机制, Skp2 是该降解系统中 E3 连接酶复合体的重要成分, 能特异识别 Thr187 磷酸化的 p27 蛋白, 介导其泛素化^[4], 促进 p27 蛋白的降解. 免疫印迹结果发现, LY294002 处理的 SMMC-7721 细胞中, Skp2 的蛋白质水平下降, 而 p27 的 Thr187 的磷酸化水平没有变化(图 5). 这些表明, PI3K 信号通路通过调节 Skp2 的表达实现对 p27 降解的调节.

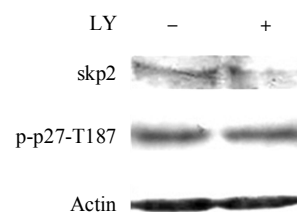


Fig. 5 PI3K inhibitor LY294002 decreased the expression of Skp2

The cell lysates were detected by immunoblotting for p27, p-p27-T187 and Skp2, with β -actin as a control loading.

2.6 LY294002 降低 Skp2 mRNA 表达水平及 Skp2 蛋白稳定性

由图 6a 可见, LY294002 处理细胞后, Skp2 的 mRNA 表达水平明显下降, 与对照细胞相比, mRNA 表达量下降了 30%. 此外, 还发现 LY294002 可使 Skp2 的半衰期由原来的 3 h 缩短至 1.5 h 左右, 降低了 Skp2 蛋白的稳定性(图 6b). 这些结果表明, PI3K 信号通路除了在转录水平, 还可以在翻译后水平调控 Skp2 的表达.

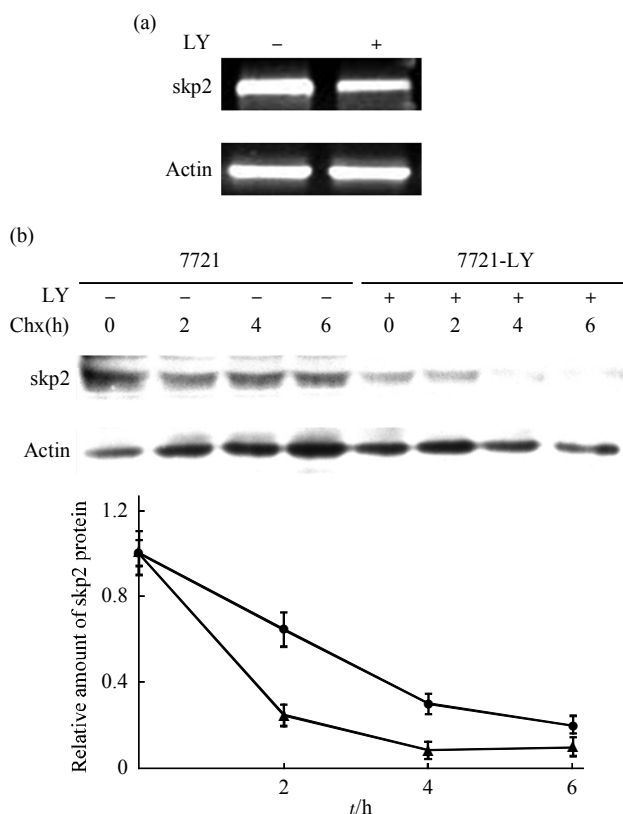


Fig. 6 PI3K inhibitor LY294002 regulated the expression of Skp2 at both transcription and post-translation levels

(a) Message RNA levels of Skp2 were assessed by semi-quantitative RT-PCR, and normalized by that of β -actin. (b) The cells were treated with 25 μ mol/L LY294002 or DMSO for 20 h. 14 h after treatment with LY294002, Chx (50 mg/L) was added into cells for the indicated time. Then the Skp2 protein amounts were analyzed with immunoblotting. ●—●: 7721; ▲—▲: 7721-LY.

2.7 Akt 活性变化不影响 p27 蛋白的表达

Akt 是 PI3K 下游的一个重要效应分子, PI3K 通路的很多功能通过 Akt 的传递而发挥. 为探明 PI3K 信号通路是否通过 Akt 参与对 p27 降解的调节, 在 SMMC-7721 细胞中分别转染 dn-Akt 和 Akt^{DD} 质粒, 然后观察 p27 蛋白表达的变化. 为验证转入质粒的有效性, 我们用 p-PKB-Ser473 和 p-GSK-3 β -Ser9 作为观察指标. GSK-3 β 是 Akt 的下游靶分子, Akt 可以磷酸化 GSK-3 β 的第 9 位丝氨酸而改变其活性, 因此 p-GSK-3 β -Ser9 常用于反映 Akt 的活性. 我们发现, 转染 dn-Akt 质粒后, Akt 的 Ser473 的磷酸化水平下降, 同时也抑制了 GSK-3 β 的磷酸化水平, 但并未影响 p27 蛋白的表达(图 7a). 转染 Akt^{DD} 质粒后, Akt Ser473 和

GSK-3 β Ser9 的磷酸化水平都明显增加, 但 p27 的蛋白质表达却同样没有变化(图 7b).

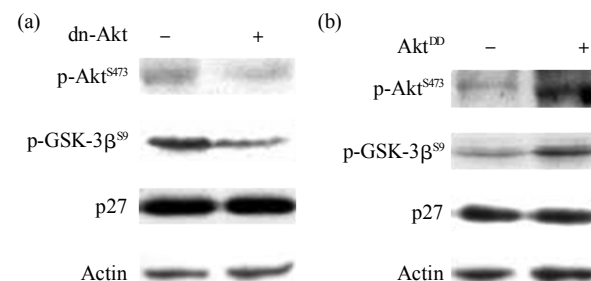


Fig. 7 The activity of Akt did not influence the expression of p27 in SMMC-7721 cells

SMMC-7721 cells were transfected with dominant negative Akt mutant (dn-Akt) (a) or Akt constitutively active mutant (Akt^{DD}) (b). The empty vector pcDNA3.0 as a control. The Akt activities were confirmed by blotting for phosphorylation of p-PKB-Ser473 and p-GSK-3 β -Ser9. The expression of p27 protein were detected by Western blotting.

3 讨 论

众所周知, 细胞的增殖受到细胞周期的精密控制, 而细胞周期的运转则需要许多蛋白质因子的协调控制, 主要包括正性调节蛋白和抑制性调控因子. 正性调节蛋白主要是由 cyclin D1-CDK4/6 和 cyclin E/A-CDK2 等组成. 而抑制性调控因子主要指细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶抑制剂, 包括两类, INK4(inhibitor of CDK4)蛋白家族和 CIP/KIP 蛋白家族. p27^{Kip1}(p27)属于 Cip/Kip 蛋白家族成员^[9]. 许多胞外的抗增殖信号可诱导 p27 蛋白表达, 阻止细胞由 G1 期进入 S 期, 从而抑制细胞增殖. p27 蛋白的表达量与肿瘤的发生、发展及预后密切相关, 被看作是一种潜在的抑癌蛋白^[2]. 因此在很多肿瘤增殖的相关研究中, p27 的表达调控倍受关注. 但研究发现, 在大多数肿瘤中, p27 很少发生基因缺失或基因突变, 转录水平也很少发生改变^[6]. 对 p27 的调节主要发生在翻译后水平, 尤其是降解的调节. p27 蛋白降解有多种途径^[4, 7~8], 但主要是通过泛素-蛋白酶体途径. CDK2 和其他激酶可使 p27-Thr187 磷酸化, 然后发生泛素化. 介导 p27 泛素化的 E3 连接酶是 SCF 复合体, 由 Skp1、Cullin(Cul1)、F-box proteins(Fbbs)、Roc1 蛋白(Rbx1) 4 个亚基组成. Skp2 (S-phase kinase associated protein2)是 Fbbs 的成员, 能特异识别

Thr187 磷酸化的 p27, 因此 Skp2 是介导 p27 蛋白质泛素化和降解的重要分子^[4].

在多种肿瘤中, PI3K 信号通路活性异常增高. 而阻断 PI3K 通路, 则可以抑制肿瘤的生长. 已有文献报道, 这种由于阻断 PI3K 通路而引起的细胞增殖抑制与 p27 蛋白的表达上调有关, 但对于 PI3K 信号通路究竟如何调节 p27 的表达却不甚明了. 本实验中, 我们也观察到用 LY294002 特异性阻断 PI3K 信号通路后, 肝癌细胞的增殖受到抑制. 我们还发现, LY294002 只是增加了 p27 蛋白的表达, 却并没有影响 p27 mRNA 的水平, 排除了 PI3K 信号通路在转录及转录后水平对 p27 的调节. 为了阐明 p27 蛋白表达的上调与 LY294002 导致的细胞增殖抑制之间的关系, 我们用 RNA 干扰技术抑制 p27 蛋白的表达, 然后观察对细胞增殖的影响. 结果发现, 转染 p27 SiRNA 质粒可显著抑制 p27 的表达, 而 p27 蛋白表达的下调可使细胞的增殖能力部分恢复, 这些结果表明了 p27 蛋白表达的增加至少部分参与了 LY294002 所引起的细胞生长抑制. 当然, 参与细胞增殖抑制的蛋白质还有很多, 如 p21、p57、PTEN 等, 接下来我们还会进一步分析 PI3K 通路与其他负调控细胞增殖的分子之间的关系.

为阐明 PI3K 通路调节 p27 蛋白表达的具体机制, 我们在实验中测定了 LY294002 对 p27 蛋白稳定性的影响, 结果发现, 阻断 PI3K 通路可使 p27 蛋白降解受阻, 稳定性增加. Skp2 是介导 p27 降解的关键蛋白, 磷酸化的 p27 是能被 Skp2 识别的靶分子. 结果发现, PI3K 信号通路的阻断没有影响 p27 Thr187 的磷酸化, 但可抑制 Skp2 蛋白的表达, 提示了 PI3K 信号通路通过调节 Skp2 影响 p27 蛋白的降解. 我们进一步研究发现, PI3K 信号通路可以在 mRNA 水平和翻译后水平同时调节 Skp2 的表达. Pagano 等^[9]曾报道, 细胞外基质(ECM)介导的粘附可调节 Skp2 mRNA 的表达, 而生长因子则在蛋白质水平调节 Skp2 的表达. 由于 PI3K 信号通路可受到多种因素的激活, 因而对 Skp2 的表达调控也呈现出双重作用.

Akt 是 PI3K 下游一个非常重要的效应分子. Akt 可以多种机制调节 p27 的表达. Akt 可使转录因子 AFX 磷酸化, 阻止后者入核, 从而抑制 AFX 介导的 p27 基因表达^[10]. Akt 也可以在蛋白质水平调节 p27. 在前列腺癌细胞中发现, 肿瘤细胞的增殖与 Akt 活性的增强及 p27 的表达下调相关^[11]. 此

外, Akt 也可以调节 p27 在细胞胞浆、胞核的分布^[12~14]. 因此, 为了探讨 PI3K 对 p27 蛋白降解的调节是否通过 Akt, 我们在 SMMC-7721 细胞中分别转染 dn-Akt(Akt 显性失活)质粒和 Akt^{PD}(Akt 持续激活)质粒, 然后观察 p27 蛋白表达的变化, 结果发现 Akt 的活性变化并不影响 p27 蛋白的表达. 因此通过本研究可以表明, 在阻断 PI3K 信号通路而导致的肝癌细胞增殖抑制过程中, Akt 并没有参与 p27 蛋白降解的调节. PI3K 可能通过其他的下游信号分子, 如 PKC、p70S6K、SGK 等调节 Skp2 介导的 p27 降解, 进而调节肝癌细胞的增殖.

参 考 文 献

- 1 Liang J, Slingerland J M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle*, 2003, **2**(4): 339~345
- 2 Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*, 2000, **183**(1): 10~17
- 3 Furuya F, Lu C, Willingham M C, *et al.* Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase delays tumor progression and blocks metastatic spread in a mouse model of thyroid cancer. *Carcinogenesis*, 2007, **28**(12): 2451~2458
- 4 Carrano A C, Eytan E, Hershko A, *et al.* SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, 1999, **1**(4): 193~199
- 5 Sherr C J, Roberts J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 1999, **13** (12): 1501~1512
- 6 Blain S W, Massague J. Breast cancer banishes p27 from nucleus. *Nat Med*, 2002, **8**(10): 1076~1078
- 7 Delmas C, Aragou N, Poussard S, *et al.* MAP kinase-dependent degradation of p27^{Kip1} by calpains in choroidal melanoma cells. Requirement of p27^{Kip1} nuclear export. *J Biol Chem*, 2003, **278**(14): 12443~12451
- 8 Kamura T, Hara T, Matsumoto M, *et al.* Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol*, 2004, **6**(12): 1229~1235
- 9 Carrano A C, Pagano M. Role of the F-box protein Skp2 in adhesion-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol*, 2001, **153** (7): 1381~1390
- 10 Medema R H, Kops G J, Bos J L, *et al.* AFX-like forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27^{Kip1}. *Nature*, 2000, **404**(6779): 782~787
- 11 Graff J R, Konicek B W, McNulty A M, *et al.* Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27^{Kip1} expression. *J Biol Chem*, 2000, **275**(32): 24500~24505
- 12 Liang J, Zubovitz J, Petrucelli T, *et al.* PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med*, 2002, **8**(10): 1153~1160
- 13 Shin I, Yakes F M, Rojo F, *et al.* PKB/Akt mediates cell-cycle

progression by phosphorylation of p27 (Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*, 2002, **8** (10): 1145~1152

14 Min Y H, Cheong J W, Kim J Y, *et al.* Cytoplasmic mislocalization

of p27^{Kip1} protein is associated with constitutive phosphorylation of Akt or protein kinase B and poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*, 2004, **64**(15): 5225~5231

Mechanism of PI3K Signaling-mediated Hepatoma Cell Growth Involves p27 and Skp2, but Akt Independent

FU Yi^{1,2)}, FANG Zheng-Yu¹⁾, WANG Li-Ying¹⁾, LI Zeng-Xia¹⁾, YANG Yong¹⁾, ZHA Xi-Liang^{1)**}

¹⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾Department of Biochemistry, Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract To investigate the mechanism of PI3K signaling-mediated hepatoma cell growth, specific PI3K inhibitor LY294002 were used to treat hepatocellular carcinoma cell line (SMMC-7721). LY294002 could inhibit cell proliferation of SMMC-7721. RT-PCR and Western blotting results showed that inhibition of PI3K signaling increased the protein expression of p27, but not mRNA expression. The protein expression of p27 could be inhibited by transfecting p27 SiRNA plasmid in LY294002-treated cells. And the knock-down of p27 protein expression could partly block the cell growth-inhibition induced by LY294002. Chx treatment experiment revealed that LY294002 prolonged the half-life of p27 protein, which increased its stability. In LY294002-treated cells, not only the mRNA expression of Skp2 (which is a critical molecule mediating the degradation of p27 protein) were reduced, but also the half-life of Skp2 protein were shorten. However, the activity alteration of Akt (an important downstream effector of PI3K signaling) by transfecting Akt constitutively active mutant and Akt dominant negative plasmid, did not influence the expression of p27. Taken together, these findings indicated that PI3K signaling regulated cell growth through modulating the degradation of p27 protein *via* Skp2 in SMMC-7721, however which was Akt independent.

Key words PI3K, signaling, p27, Skp2, Akt, protein degradation

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30570963) and Shanghai Leading Academic Discipline Project (B110).

**Corresponding author. Tel: 86-21-54237696, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

Received: February 18, 2008 Accepted: April 8, 2008