

# PTEN-Long 通过 PI3K-AKT 途径对 HepG2 肝癌细胞的影响

张 谢<sup>1</sup>, 谭 麟<sup>2</sup>, 毛琦淇<sup>1</sup>, 李 宏<sup>1</sup>

(1. 宁波市医疗中心李惠利医院, 浙江 宁波 315040;

2. 宁波大学医学院, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** [目的] 探讨 PTEN-Long 对肝细胞癌 HepG2 细胞的影响及其脂质磷酸酶活性与 PI3K-AKT 信号通路之间的关系。[方法] 细胞转染法转染 PTEN-Long、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 和 Vector 于 HepG2 细胞。转染 48h 后, 检测各组细胞增殖数, Western blot 法检测各组细胞 PTEN-Long、pAkt、pS6K 表达变化, 流式细胞法检测各组细胞细胞凋亡水平变化, 细胞划痕法检测各组细胞迁移情况。[结果] 细胞转染后, PTEN-Long 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组表达 PTEN-Long 蛋白量无显著性差异; 与 Vector、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组相比, PTEN-Long 组 pAkt (Ser473)、pS6K (Thr389) 表达量明显下降。从转染后 48h 开始, PTEN-Long 组细胞增殖数较 Vector 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组明显减少, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); PTEN-Long 组较 Vector 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组凋亡明显增强 ( $P < 0.05$ ); 划痕 14h 后, PTEN-Long 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组较 Vector 组的迁移细胞数明显减少 ( $P < 0.05$ )。[结论] PTEN-long 依赖于其脂质磷酸酶活性, 通过 PI3K-AKT 通路调控肝癌 HepG2 细胞的增殖与凋亡。

**关键词:** 磷酸酶及张力蛋白同源基因剪接体; HepG2 细胞系; 细胞凋亡; 磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B

**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)08-0764-05

**doi:** 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.08.B002

## Effects of PTEN-Long on PI3K-AKT Pathway in HepG2 Cells

ZHANG Xie<sup>1</sup>, TAN Lin<sup>2</sup>, MAO Qi-qi<sup>1</sup>, LI Hong<sup>1</sup>

(1. Ningbo Medical Treatment Center Li Huili Hospital, Ningbo 315040, China;

2. School of Medicine, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the effect of PTEN-Long on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and the relationship between lipid phosphatase activity and PI3K-AKT signaling pathway. [Methods] PTEN-Long, PTEN-Long<sup>G320R</sup> and Vector were transfected to HepG2 cells, respectively. After transfection for 48h, cell proliferation was detected in three groups, the expression of PTEN-Long, pAkt and pS6K was detected by Western blot, cell apoptosis was detected by flow cytometry, cell migration was detected by cell scratch assay. [Results] After transfection for 48 h, there was no significant difference in expression of PTEN-Long protein between PTEN-Long group and PTEN-Long<sup>G320R</sup> group. Compared with Vector and PTEN-Long<sup>G320R</sup> group, the expression of pAkt (Ser473) and pS6K (Thr389) in PTEN-Long group decreased significantly. From 48h after transfection, the cell proliferation in PTEN-Long group was significantly lower than that of PTEN-Long<sup>G320R</sup> group and Vector group ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate in PTEN-Long group was significantly higher than that in vector group and PTEN-Long<sup>G320R</sup> group ( $P < 0.05$ ). The scratch assay showed that the number of migrating cells in PTEN-Long group and PTEN-Long<sup>G320R</sup> group was significantly lower than that in Vector group ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] PTEN-long regulates the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells through PI3K-AKT pathway, which is lipid phosphatase activity-dependent.

**Subject words:** PTEN-Long; HepG2 lines; apoptosis; PI3K-AKT

原发性肝癌发病率居全球第 6 位, 死亡率居全

球第 2 位, 而肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 占原发性细胞癌 80%<sup>[1]</sup>。在浙江省, 肝癌和胃癌、肺癌列恶性肿瘤病因前 3 位, 造成了巨大的疾病负担和经济损失。

人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homologue deleted

**基金项目:** 浙江省公益技术应用研究计划项目 (2017C35002); 宁波市重大民生项目 (2013C51009); 浙江省医药卫生平台计划项目 (2016DTA009)

**通讯作者:** 李宏, 副院长, 主任医师, 学士; 宁波市医疗中心李惠利医院普外科, 浙江省宁波市鄞州区兴宁路 57 号 (315040); E-mail: lancet2017@163.com

**收稿日期:** 2017-10-27; **修回日期:** 2018-01-22

on chromoon chromosome 10, PTEN), 又称多种晚期癌突变基因, 在人类多种肿瘤中存在突变或缺失, 是一个重要的肿瘤抑制因子<sup>[2,3]</sup>。PTEN-Long 是 PTEN 蛋白选择性剪接体, 在 N-末端比 PTEN 多了一个 173 氨基酸序列。前期研究发现 PTEN-Long 在肿瘤组织中的表达显著降低, 被认为是一个新的肿瘤抑制因子<sup>[4,5]</sup>。然而, PTEN-Long 在 HCC 中分子机制尚未明确。本文选取 HCC 细胞株系列的 HepG2 肝癌细胞, 旨在研究 PTEN-Long 是否依赖于其脂质磷酸酶活性通过磷酸肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-AKT) 通路调控 HepG2 肝癌细胞凋亡。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

DMEM 高糖细胞培养液、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.25% 胰蛋白酶、双抗 (100U/ml 青霉素, 100U/ml 链霉素) 均购自美国 Gibco 公司; anti-PTEN、 $\alpha$ -Tubulin、anti-pAKT、anti-pS6k 抗体及羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; 流式细胞凋亡试剂盒购自美国 BD 公司。人肝癌细胞株 HepG2 细胞株购自上海中科院细胞库。pcDNA3.1 (Vector)、pcDNA3.1-PTEN-Long、pcDNA3.1-PTEN-Long<sup>G302R</sup> (此突变体丧失脂质磷酸酶活性) 由美国纽约斯隆癌症中心赠送。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞株 HepG2 用含 10% FBS, 双抗 (100U/ml 青霉素, 100U/ml 链霉素) 的高糖 DMEM 培养基, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养, 取对数生长期细胞进行实验。2×10<sup>5</sup> 细胞/3ml 接种于 100mm 培养皿中, 等其贴壁长到全皿的 80%~90% 时收蛋白。

#### 1.2.2 细胞转染

按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书将 PTEN-Long、PTEN-Long<sup>G302R</sup> 和 Vector 分别转染进入 HepG2 细胞。转染前 1d, 细胞铺板于 100mm 培养皿中, 使其转染日密度为 80%~90%。转染试剂用 Opti-MEM 无血清培养基稀释, 细胞也用 Opti-MEM 无血清培养基孵育。转染 6h 后, 转染培养基换成完全培养基包含 10% FBS 和抗生素。细胞转染 48h 后, 提

取蛋白。

#### 1.2.3 蛋白印迹法 (Western blot) 检测

收集对数生长期的各组细胞株, 分别用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液裂解, 提取蛋白并定量。取 50  $\mu$ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 其后转移至 PVDF 膜上, 再用含 5% 脱脂牛奶封闭 30min, 在 1:1000 浓度的一抗中室温孵育 2h, TBST 洗涤 3 次以后, 1:2000 浓度的二抗室温孵育 1.5h, TBST 洗涤 3 次, 通过加入 BeyoECL Plus 显色液于凝胶成像仪器曝光。

#### 1.2.4 细胞增殖检测

pcDNA3.1、pcDNA3.1-PTEN-Long、pcDNA3.1-PTEN-Long<sup>G302R</sup> 转染 HepG2 细胞, G418 筛选数周后获得稳定表达细胞。将 2×10<sup>5</sup> 个稳定表达细胞种在细胞培养皿中, 每种表达细胞各种 15 个培养皿。从第 2d 开始每天取 3 个培养皿用胰蛋白酶消化收集细胞、计数取平均值, 连续 5d。所得平均值以天为横坐标制作生长曲线, 通过比较各种相应质粒转染的细胞生长曲线判断 PTEN-Long、PTEN-Long<sup>G302R</sup> 对细胞生长的影响。

#### 1.2.5 流式细胞仪检测

转染后 48h, 离心收集各组细胞, 用预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次, 重悬后调整细胞密度为 1×10<sup>6</sup>, 按 annexin V FITC 凋亡试剂盒说明书操作, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

#### 1.2.6 细胞划痕实验

将生长状态良好的各组细胞以 2×10<sup>5</sup> 个/ml 接种于 6 孔板内, 每孔 2 ml。待细胞长至约 80% 汇合时, 用 200  $\mu$ l 枪头垂直划细痕, 分别观察 0、14h 细胞划痕处细胞运动变化, 随机选取 3 个视野并计算划痕区域的细胞数。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用 *t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 Western blot 检测各组肝癌细胞 PTEN-Long、pAkt、pS6K 表达变化

转染 Vector、PTEN-Long、PTEN-Long<sup>G302R</sup> 质粒到 HepG2 细胞, Western blot 法检测各组细胞 PTEN-

Long 表达, 结果显示 Vector 组 PTEN-Long 不表达, PTEN-Long 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组均表达 PTEN-Long 蛋白, 且二者表达量基本相同 (Figure 1)。与 Vector 组相比, PTEN-Long 组 pAkt (Ser473)、pS6K (Thr389) 表达量明显下降, 而 PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组与 Vector 组相比, pAkt (Ser473)、pS6K (Thr389) 表达量变化不明显 (Figure 1)。

## 2.2 各组肝癌细胞增殖水平比较

MTT 结果显示, 从转染后第 2d 开始, PTEN-Long 组细胞增殖数比 Vector 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组明显减少, 差异有统计学意义 ( $t=3.53, P=0.02$ ;  $t=3.07, P=0.04$ ); 而转染后 Vector 组与 PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组细胞增殖数差异无统计学意义 ( $t=1.19, P=0.30$ )。见 Figure 2。

## 2.3 各组细胞凋亡水平

流式细胞仪检测转染 48h 后细胞凋亡情况, 结果显示 Vector 组、PTEN-Long 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组细胞早期细胞凋亡率分别为  $4.00\% \pm 2.73\%$ ,  $11.83\% \pm 1.75\%$  和  $5.06\% \pm 2.32\%$ 。PTEN-Long 组较 Vector 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组凋亡明显增强 ( $t=4.19, P=0.01$ ;  $t=4.04, P=0.02$ ); 而 Vector 组与 PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组相比差异无统计学意义 ( $t=0.52, P=0.63$ )。见 Figure 3。

## 2.4 各组细胞迁移情况

划痕 0h 时各组细胞贴壁良好, 划痕完全, 划痕处无细胞贴壁或悬浮; 划痕 14h 后, PTEN-Long 组、PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组较 Vector 组的迁移细胞数明显减少 ( $t=5.50, P=0.01$ ;  $t=3.49, P=0.03$ ), PTEN-Long 组与 PTEN-Long<sup>G320R</sup> 组差异无统计学意义 ( $t=0.77, P=0.48$ )。Figure 4。

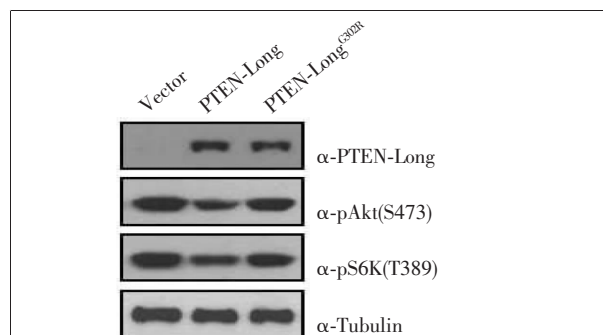


Figure 1 PTEN-Long, pAkt, pS6K expression in each group detected by Western blot

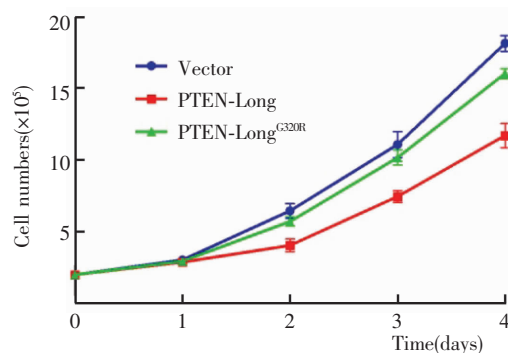


Figure 2 The number of liver cancer cell proliferation in each group

## 3 讨论

肝癌在我国是常见的恶性肿瘤之一, 目前手术治疗是肝癌首选的治疗方法, 通过完整的清除肿瘤组织, 达到治愈的目的。手术后予以一定的化学药物治疗, 以减少术后复发机会。但是手术治疗主要针对早期肝癌患者, 大多数晚期肝癌患者只能进行保守

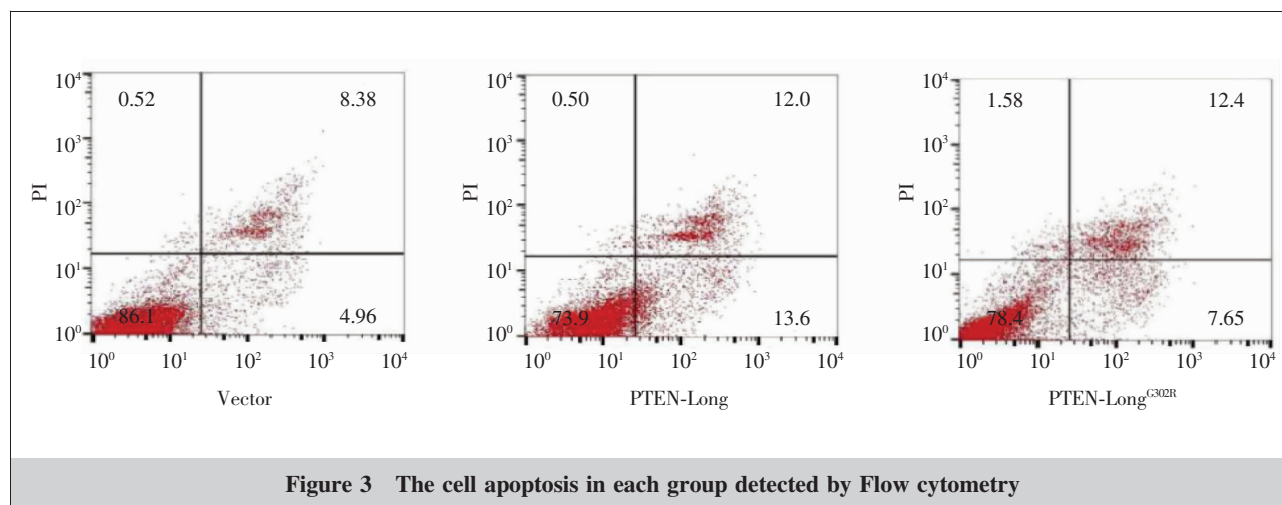


Figure 3 The cell apoptosis in each group detected by Flow cytometry

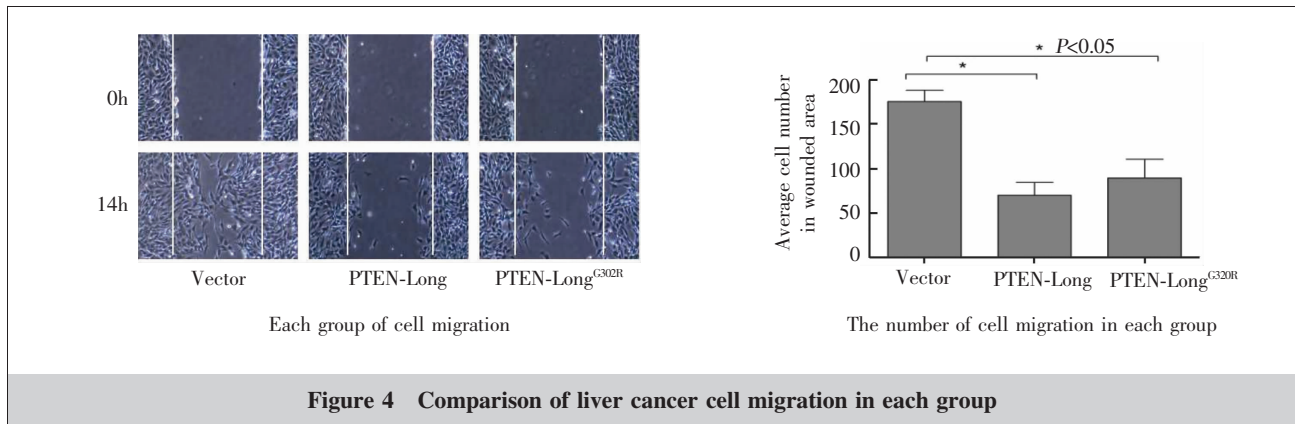


Figure 4 Comparison of liver cancer cell migration in each group

治疗,以达到控制病情,延长患者生存期<sup>[6]</sup>。因此,寻求新的、特别是基于现代分子生物学和肿瘤生物学最新进展而研发的肝癌靶向治疗迫在眉睫。

PTEN 是一个含 403 个氨基酸的蛋白质,具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶活性,双磷酸酶活性使其作为肿瘤抑制因子起作用<sup>[7,8]</sup>。PTEN 在人类多种肿瘤中存在缺失或突变<sup>[9,10]</sup>。研究结果显示 PTEN 诱导细胞凋亡及阻滞细胞分裂,关键在于拮抗了 PI3K-AKT 信号途径<sup>[11,12]</sup>。PTEN 的主要底物是第二信使 PIP3,PIP3 能够引发膜蛋白聚集和 AKT 活化,PTEN 通过阻止依赖 PIP3 的途径抑制 PI3K Class I 信号通路,从而抑制细胞的生存、生长和增殖<sup>[10,13]</sup>。因而,在肿瘤的发展中 PTEN 是一个关键的节点。通常认为通过腺病毒将 PTEN 的 cDNA 重新引入有 PTEN 基因缺陷的动物体内,可以抑制因 PI3K-AKT 通路过于活跃导致的癌症。但是,越来越多的研究显示腺病毒介导的基因治疗存在安全隐患,甚至可能产生新的肿瘤<sup>[14,15]</sup>。

最新研究发现在 PTEN 的上游(5'-UTR)存在一个非常规备用翻译密码(CTG),由此起始密码子翻译的蛋白,在 N 末端比 PTEN 多了 173 个氨基酸,被命名为 PTEN-Long<sup>[16]</sup>。增加的区域使 PTEN-Long 能够输出到细胞外,进入相邻细胞,并在受体细胞中诱导信号传导,不需要再借助新的载体<sup>[11,17,18]</sup>,且 PTEN-Long 具有与 PTEN 相当或甚至更高的脂质磷酸酶活性。我们的研究结果显示 PTEN-Long 与 PTEN 类似,可以抑制 PI3K-AKT 激活,诱导细胞凋亡。而 PTEN-Long<sup>G302R</sup> 中的 G 至 R 点突变,丧失脂质磷酸酶活性后,不再具有调节 Akt 活性,说明 PTEN-Long 依赖于其脂质磷酸酶活性,通过 PI3K-AKT 通

路调控 HepG2 肝癌细胞凋亡。有趣的是,PTEN-Long<sup>G302R</sup> 与 PTEN-Long 一样也可以抑制细胞迁移,这可能是因为 G302 至 R 突变体保留了蛋白磷酸酶活性,说明脂质磷酸酶活性对细胞迁移的影响是非必需的。

综上,本研究发现 PTEN-Long 依赖于其脂质磷酸酶活性,通过 PI3K-AKT 通路调控 HepG2 肝癌细胞增殖与凋亡,提示 PTEN-Long 可能作为原发性肝癌的潜在治疗药物,为治疗晚期肝癌病患提供实验依据和理论基础。

## 参考文献:

- [1] McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular carcinoma: an emphasis on demographic and regional variability [J]. Clin Liver Dis, 2015, 19(2): 223-238.
- [2] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947.
- [3] Milella M, Falcone I, Conciatori F, et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors [J]. Front Oncol, 2015, 5: 24.
- [4] Wang H, Zhang P, Lin C, et al. Relevance and therapeutic possibility of PTEN-long in renal cell carcinoma [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e114250.
- [5] Hopkins BD, Fine B, Steinbach N, et al. A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival [J]. Science, 2013, 341(6144): 399-402.
- [6] Abdel-Rahman O. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma (HCC): from bench to bedside [J]. J Egypt Natl Canc Inst, 2013, 5(4): 165-171.

- [7] Maehama T, Dixon JE. The tumor sPTEN-Longressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate [J]. J Biol Chem, 1998, 273(22): 13375–13378.
- [8] Leslie NR, Maccario H, Spinelli L, et al. The significance of PTEN's protein phosphatase activity [J]. Adv Enzyme Regul, 2009, 49 (1): 190–196.
- [9] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. Science, 1997, 275(5308): 1943–1947.
- [10] Song Z, Han X, Shen L, et al. PTEN silencing enhances neuronal proliferation and differentiation by activating PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  pathway in vitro [J]. Exp Cell Res, 2018, pii: S0014–4827(18)30001–6.
- [11] Malaney P, Uversky VN, Davé V. The PTEN Long N-tail is intrinsically disordered; increased viability for PTEN therapy [J]. Mol Bios, 2013, 9(11): 2877–2888.
- [12] Carnero A, Paramio JM. The PTEN/PI3K/AKT pathway in vivo, cancer mouse models [J]. Front Oncol, 2014, 4: 252.
- [13] Zhang Z, Chen Q, Zhang J, et al. Associations of genetic polymorphisms in pTEN/AKT/mTOR signaling pathway genes with cancer risk: A meta-analysis in Asian population. Sci Rep, 2017, 7(1): 17844.
- [14] Mah S, Goh CP, Low LH, et al. PTEN secretion in exosomes [J]. Methods, 2015, 77–78: 157–163.
- [15] Ren Y, Zhou X, Qi Y, et al. PTEN activation sensitizes breast cancer to PI3-kinase inhibitor through the  $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2012, 28 (3): 943–948.
- [16] Fang N, Gu T, Wang Y, et al. Expression of PTEN-long mediated by CRISPR/Cas9 can repress U87 cell proliferation [J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(1): 3337–3346.
- [17] Masson GR, Perisic O, Burke JE, et al. The intrinsically disordered tails of PTEN and PTEN-L have distinct roles in regulating substrate specificity and membrane activity [J]. Biochem J, 2016, 473(2): 135–144.
- [18] Hopkins BD, Fine B, Steinbach N, et al. A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival [J]. Science, 2013, 341(6144): 399–402.

## 坚决贯彻执行《发表学术论文“五不准”》规定

为弘扬科学精神,加强科学道德和学风建设,抵制学术不端行为,端正学风,维护风清气正的良好学术生态环境,重申和明确科技人员在发表学术论文过程中的科学道德行为规范,中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院和自然科学基金委共同研究制定并联合下发了《发表学术论文“五不准”》的通知。

(1)不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。

(2)不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。

(3)不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。

(4)不准提供虚假同行评议人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评议人,应确保所提供的评议人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评议环节的任何弄虚作假行为。

(5)不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。

希望广大科技工作者、读者和作者,以及本刊编委、审稿专家和有关工作人员都应加强学术道德自律,共同努力,捍卫学术尊严,维护良好学风。