

靶向 AKT 的 RNA 干扰调控人乳腺癌细胞生长的体外研究

梅 玫¹ 任 玉¹ 周 旋² 祁艳斌¹ 赵 川¹ 申潇咏¹ 姚 智^{3,4*}

(天津医科大学,¹天津市基础医学研究中心,²附属肿瘤医院头颈一科,³免疫教研室,

⁴教育部免疫微环境与疾病重点实验室,天津 300070)

摘要 采用 Oligofectamine 转染靶向 AKT 的 siRNA 至人乳腺癌细胞系 MCF-7, 利用 real-time PCR 检测 AKT 的表达水平; MTT 及流式细胞术分析转染后细胞的生物学特征变化; 免疫荧光染色及 Western 印迹方法观察 IA 型 PI3K/ AKT 通路主要成员的表达变化。Real-time PCR 结果表明转染靶向 AKT 的 siRNA 组可以有效敲低 AKT 的表达水平; MTT 结果显示 AKT siRNA 治疗组细胞增殖率显著降低; 流式细胞术结果显示 AKT siRNA 转染组细胞在 G₀/G₁ 期阻滞, 凋亡比例明显高于空白对照组与空载体治疗组; 免疫荧光和 Western 印迹结果均表明转染 AKT siRNA 组细胞 AKT、pAKT、Ki67、Bcl-2 几个重要癌蛋白的表达水平均有明显的下调。以上结果表明运用 AKT siRNA 转染人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞后, 可抑制其肿瘤细胞的增殖并诱导凋亡, 因此 AKT 可以作为人乳腺癌基因治疗的候选靶点。

关键词 AKT; RNA 干扰; 乳腺癌; 基因治疗

近年来的研究发现, 与乳腺癌相关的许多癌基因和抑癌基因编码调控细胞生长、增殖和分化过程的信号转导途径中的一些成员。细胞癌变是由于信号转导途径异常, 细胞接受了异常生长、增殖、分化的信号所致^[1]。PI3K/AKT 通路是很重要的调节细胞增殖的信号通路, 而 AKT 是 PI3K/AKT 通路中的关键分子。活化的 AKT (pAKT) 通过磷酸化 mTOR、caspase 家族、Forkhead 家族等多种作用底物, 在促进肿瘤细胞的生长、增殖, 抑制细胞凋亡, 促使细胞侵袭和转移, 促进血管生成, 抵抗化疗和放疗中细胞的凋亡等方面起重要作用^[2-4]。为了进一步探讨 AKT 在人乳腺癌发生过程中的作用及其可能的机制, 本文基于 RNA 干扰(RNAi)技术, 以 AKT 为靶点进行了基因治疗的体外研究。

1 材料与方法

1.1 材料

RNAi 购自上海吉玛技术公司。具体序列如下: Nonsense siRNA: 5'-GCG AUG CUG CAU GAU CUC C-3'; AKT-siRNA: 5'-GGA GAU CAU GCA GCA UCG C-3'。

DMEM 购自美国生命技术公司(GIBCO/BRL), AKT、pAKT、Ki67、Bcl-2 抗体购自 Santa Cruz 公

司。Western 印迹实验所用试剂购自 Sigma 公司, PVDF 膜购自 Millipore 公司, RIPA 裂解液购自北京百泰克生物技术有限公司, 化学发光检测试剂盒购自美国 Pierce 公司。逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司。Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。二甲基四氮唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和基因转染 人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞系在 DMEM 完全培养液中常规培养。实验分组: 空白对照组, 不给予任何干预措施; 空载体转染组, 将 6 μ g Nonsense siRNA 与 10 μ l oligofectamine (Invitrogen 公司, 美国)混和均匀, 转染 MCF-7 细胞; AKT siRNA 转染组, 方法同空载体转染组, 用 AKT siRNA 替代 Nonsense siRNA。转染 48 h 后收获细胞。

1.2.2 Real-time PCR 法检测转染后 AKT 表达情况 按照 Promega 公司反转录试剂盒说明书抽提总 RNA, Nanodrop 紫外分光光度计(Gene 公司, 美国)测定总 RNA 浓度和纯度。Real-time PCR 按照

收稿日期: 2009-08-19 接受日期: 2009-11-11

国家自然科学基金(No.30670802)和天津市应用基础与前沿计划重点项目(No.09JCZDJC19700)资助

* 通讯作者。Tel: 022-23542817, Fax: 022-23542866, E-mail: yaozhi@tmu.cn

TaKaRa real-time PCR 检测试剂盒说明书进行。Opticon 2 软件计算 ΔC_t 值。

1.2.3 Western 印迹检测转染 AKT 和 pAKT 表达

将 5×10^7 个待检验细胞培养过夜后,十二烷基肌酸钠上样缓冲液裂解法收获蛋白质, $20 \mu\text{l}$ 上样量(约 1×10^7 个细胞 / 上样孔)进行电泳。转膜,免疫抗体结合,再加 HRP 偶合的二抗反应(1 : 1 000), Supersignal Protein Detection Kit 增强化学发光(ECL)显色,凝胶图像分析系统进行灰度分析。

1.2.4 MTT 法检测转染后 MCF-7 细胞增殖率 随机挑选对数生长期转染 AKT siRNA 和 Nonsense siRNA 的细胞常规消化,接种于 96 孔板,4 000 个($200 \mu\text{l}$ / 孔),以未转染的细胞作为对照组。分别于转染前,转后 24、48、72、96、120 h 行 MTT 检测,用紫外分光光度计 570 nm 波长测定各孔的吸光度(A 值),取每组 8 孔的均值。

1.2.5 流式细胞术检测转染后细胞周期分布与凋亡 收集细胞,消化成单细胞悬液,离心,弃上清液,按照 GENMED 细胞周期流式细胞分析试剂盒产品说明书(杰美公司,上海)标记细胞;膜联蛋白(annexin) V/碘化丙啶(PI)(晶美公司,上海)染色后使用 FACSCalibar (BD 公司,美国)流式细胞仪分别检测细胞周期分布和细胞凋亡。

1.2.6 免疫荧光法检测转染后相关蛋白表达 免疫组织化学染色方法详见参考文献^[5]。使用 FV-1000 激光共聚焦扫描显微镜(Olympus 公司,日本)观察。

1.2.7 统计学方法 所用实验数据使用 SPSS11.5 统计软件包,采用单因素方差分析进行统计学分析,按照 $P < 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 AKT siRNA 转染组 MCF-7 细胞 AKT 表达水平下调

通过 real-time PCR 检测发现,AKT siRNA 转染组达到规定荧光强度所需的循环数明显增多,表明目的基因的拷贝数明显增多,可见转染 AKT1 siRNA 可明显敲低 MCF-7 细胞 AKT mRNA 的表达,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$) (表 1, 图 1)。

2.2 siRNA 干扰 AKT 后相关蛋白变化

经 Western 印迹检测发现, MCF-7 乳腺癌细胞转染 AKT siRNA 后, AKT、pAKT、Ki67、Bcl-2 几个重要癌蛋白的表达水平均有明显的下调,空白对照组、无义序列组没有显著变化(图 2)。经统计软件分析, AKT siRNA 治疗组与对照组、无义治疗组之

间存在显著差异 ($P < 0.01$)。

激光共聚焦显微镜观察发现, AKT、pAKT、Bcl-2 均存在于细胞质中,而 Ki67 则存在于细胞核中。和空白对照组相比, nonsense siRNA 转染细胞中 AKT、pAKT、Ki67、Bcl-2 表达的强度和部位均无明显变化,而 AKT 转染细胞中 AKT、pAKT、Ki67、Bcl-2 表达的强度均减弱(图 3)。

2.3 MTT 法检测转染后 MCF-7 细胞增殖率

观察期内 AKT siRNA 转染组 MCF-7 细胞生长速度较空白对照组和 Nonsense siRNA 转染组缓慢。转染后 24、48、72 h, Nonsense siRNA 转染组细胞的生长未受到明显抑制,而 AKT siRNA 转染组细胞的生长在转染后 24 h 出现明显受到抑制,且随时间的推移,被抑制程度越明显(表 2、图 4)。

2.4 流式细胞术检测转染后细胞周期分布

流式细胞术检测细胞周期时相分布,发现对照组细胞 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期所占比例分别是 54.1%、28.1% 和 17.8%, Nonsense siRNA 转染组分别为 54.3%、28.2% 和 17.4%, AKT siRNA 转染组分别为 70.8%、28.1% 和 1.8%。这些结果表明, AKT siRNA 转染 MCF-7 细胞后,细胞出现明显的 G_0/G_1 期阻滞($\chi^2 =$

Table1 AKT mRNA expression in MCF-7 cells transfected with AKT siRNA

Group	n	ΔC_t value	F value	P value
Control	3	5.56 ± 1.42	15.452	0.003
Nonsense siRNA	3	7.64 ± 1.24		
AKT siRNA	3	$15.84 \pm 3.24^*$		

Significant differences from the control value are indicated by * $P < 0.01$.

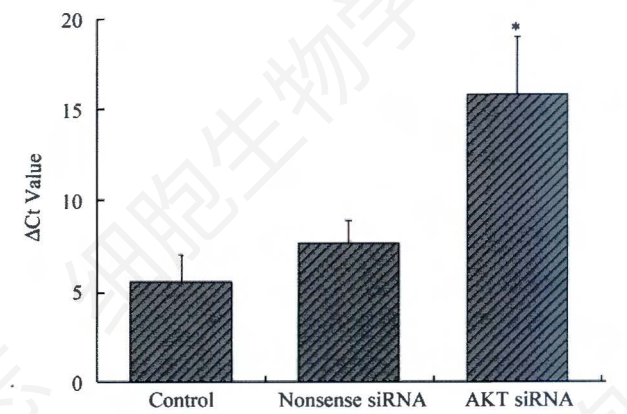


Fig.1 AKT mRNA expression of MCF-7 cells transfected with AKT siRNA

Significant differences from the control value are indicated by * $P < 0.01$.

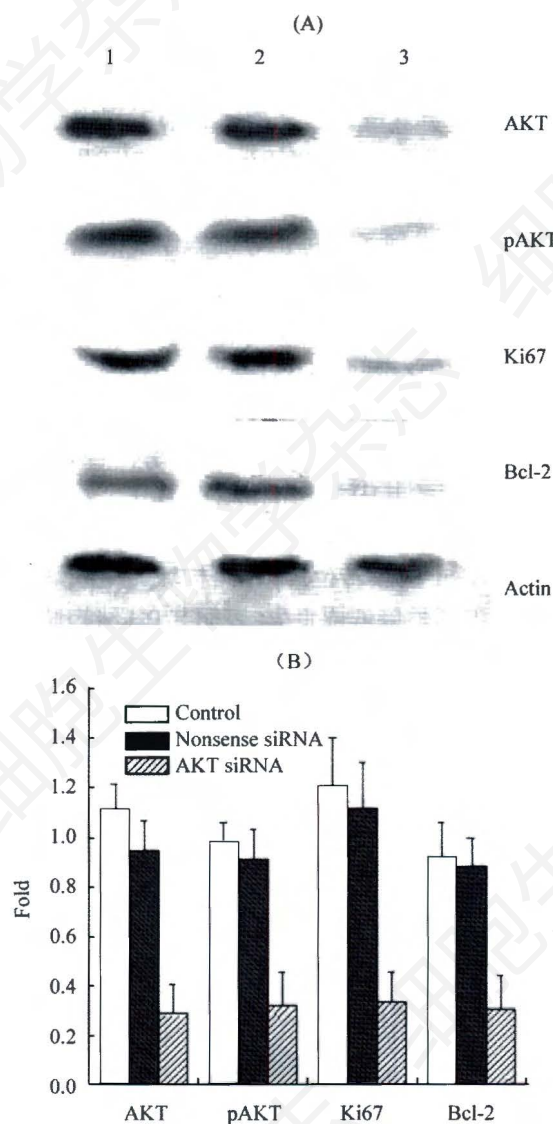


Fig.2 Western blot analysis to detect the protein expression alternations after MCF-7 cells treated with AKT siRNA

A: Western blot analysis of protein expression were performed in triplicate. 1: control group; 2: nonsense siRNA group; 3: AKT siRNA group. B: protein expression is shown in the histogram.

Table 2 Cell proliferation rate of MCF-7 cells transfected with AKT siRNA determined by MTT assay

Time	Survival rate ($\bar{x} \pm s$) (%)			F value	P value
	Control	Nonsense siRNA	AKT siRNA		
Day 1	100	99.86 $\pm$ 1.21	97.41 $\pm$ 1.05	5.147	0.093
Day 2	100	89.43 $\pm$ 2.04	84.56 $\pm$ 3.01	82.387	0.000
Day 3	100	92.44 $\pm$ 1.08	66.20 $\pm$ 4.54	47.093	0.000
Day 4	100	93.72 $\pm$ 3.11	55.76 $\pm$ 3.48	102.019	0.000
Day 5	100	98.01 $\pm$ 1.67	49.80 $\pm$ 5.09	143.992	0.000
Day 6	100	96.21 $\pm$ 2.03	40.74 $\pm$ 4.11	205.122	0.000

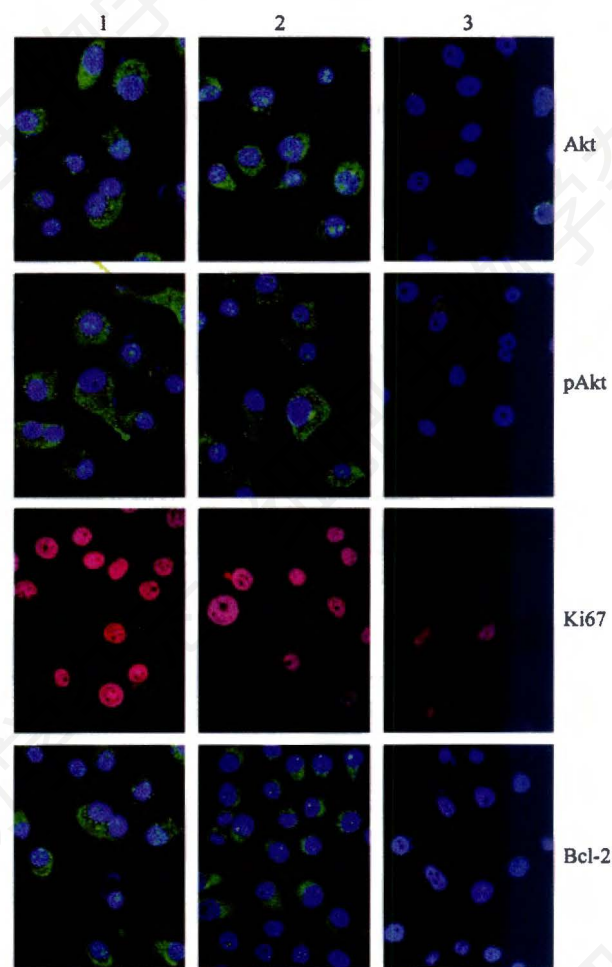


Fig.3 Immunofluorescence stain to detect the protein expression alternations after treated MCF-7 cells with AKT siRNA (40 $\times$)

1: control group; 2: nonsense siRNA group; 3: AKT siRNA group.

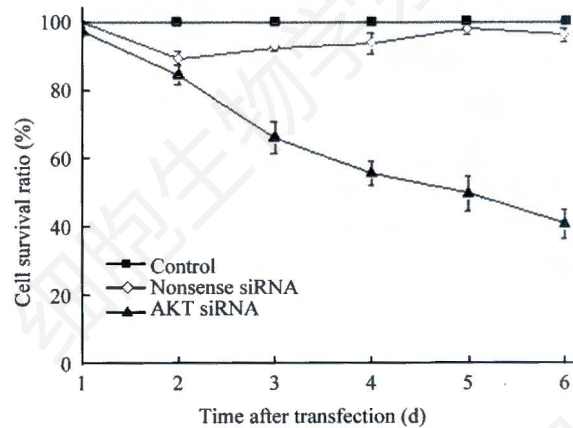


Fig.4 Cell proliferation rate of MCF-7 cells transfected with AKT siRNA determined by MTT assay

14.264, $P=0.006$), 从而延缓细胞周期进展, 抑制细胞增殖(图 5)。

2.5 流式细胞术检测转染后细胞凋亡

膜联蛋白V/PI染色方法检测转染AKT siRNA后MCF-7 细胞凋亡率, 发现对照组细胞凋亡率仅($2.03\pm 0.04\%$), Nonsense siRNA 转染组细胞凋亡率为($2.43\pm 0.42\%$), 和对照组差别无统计学意义。而转染 AKT siRNA 组细胞凋亡率为($9.67\pm 1.56\%$), 显著高于对照组($F=81.834, P=0.000$), 可见敲低MCF-7细胞的AKT 表达后, 可诱导细胞凋亡(图 6)。

Table 3 Cell cycle distribution of MCF-7 cells transfected with AKT siRNA determined by FCM

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	χ^2 值	P 值
Control	54.1	28.1	17.8	14.264	0.006
Nonsense siRNA	54.3	28.2	17.4		
AKT siRNA	70.8	28.1	1.8		

3 讨论

Akt, 又称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 是一种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶。目前发现至少存在 3 种 Akt 家族成员: Akt1/PKB α 、Akt2/PKB β 、Akt3/PKB γ 。1997 年, Staal 等^[5]在诱发鼠类胸腺瘤的鼠类白血病病毒中发现了一种诱导细胞癌变的癌基因序列 AKT-8。由于它们的催化区与蛋白激酶 A (PKA) 和蛋白激酶 C (PKC) 高度同源, 故又被称为蛋白激酶 B (PKB)。三种亚型的 PKB 在氨基端(N 端)有 80% 的同源序列, 具有类似的一级结构; N 端含有一个 PH 结构域, 中部为一个催化结构域, 羧基端(C 端)含有一个调节结构域。其中 PH 结构域由 100 个氨基酸残基组成, 介导 AKT 与 PIP3 的结合, 在 AKT 的激活过程中介导 AKT 的膜转位。PH 结构域突变或缺失可导致 AKT 的活性降低或丧失, 表明其 PH 结构域具有重要作用。紧邻 PH 区的催化区中 308 位苏氨酸为

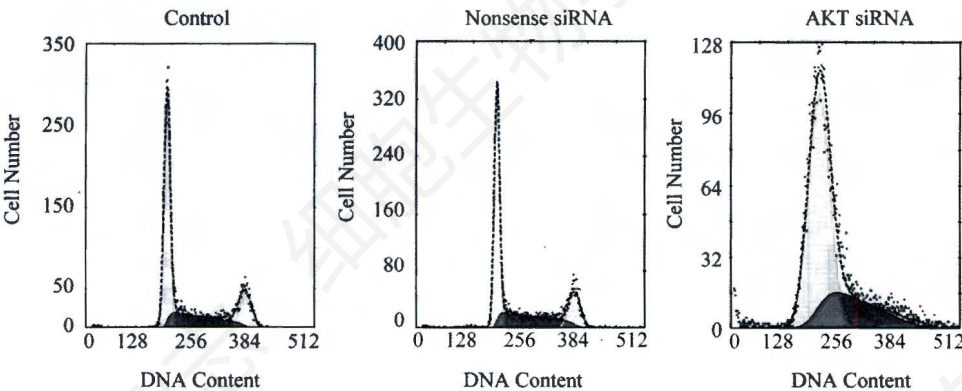


Fig.5 Cell cycle distribution of MCF-7 cells transfected with AKT siRNA examined by FCM

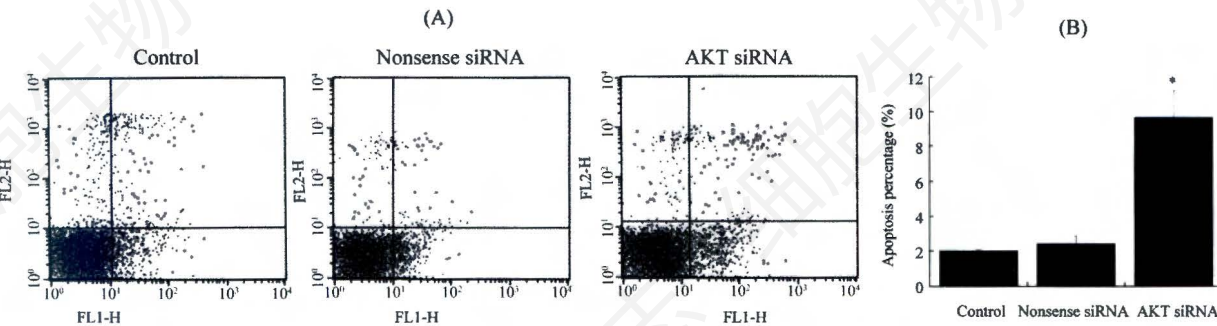


Fig.6 Cell apoptosis percentage alteration after MCF-7 cells transfected with AKT siRNA was detected by annexin V stain assay

A: flow cytometry analyses of propidium iodide-stained cells were performed in triplicate; B: percentages of apoptotic cells are shown in the histogram. Significant differences from the control value are indicated by * $P<0.01$.

活化所必需的第一个磷酸化位点。在催化区后的 C 端为调节区, 调节区富含脯氨酸, 并含有活化所必需的第二个磷酸化位点(Ser473), 该位点的磷酸化使 AKT 活性达到最大。在 AKT 分子中, 还存在着其它氨基酸磷酸化位点如 124 位苏氨酸、450 位丝氨酸等, 但这些位点与 AKT 的活性关系不大^[6]。

pAKT 在介导细胞生长和增殖、运动和侵袭、凋亡和抵抗化疗、放疗等方面有重要作用。AKT 的活化与肿瘤的发生、发展密切相关^[7]。在 PI3K/AKT 信号通路中, pAKT 是一个较好的分子靶点, 它处于此通路的上游, 可以活化下游很多分子, 从而促进乳腺癌的发展, 使传统的治疗产生耐药。有研究发现, pAKT 在大约 58% 的乳腺癌组织中被过度活化, 并且 HER-2 阳性的肿瘤表达高水平的 pAKT^[8]。当前研究发现, Akt 在乳腺癌中检出频率较高, 说明 Akt 的过度表达与肿瘤的形成有关^[9]。此外, Akt 还可诱导细胞周期的发展。总之, 致癌基因可能通过高度激活的 Akt 来阻断生理性的细胞凋亡, 使细胞失去正常增殖与分化的能力从而导致癌变。因此, Akt 作为细胞生存的一个关键性因子, 对于乳腺癌的诊断与治疗可能具有十分重要的意义。近来研究表明, PI3K/AKT 通路在细胞对放疗抵抗中起着重要作用, 主要分子机制是: 在 AKT 的 308 号苏氨酸和 473 号丝氨酸同时被磷酸化, AKT 充分激活其下游基因, 可通过抑制 Chk1 而使细胞丧失 G₂ 期阻滞功能, 使细胞监测系统得以恢复而发挥最大的促进细胞生长、抑制细胞凋亡的生物功能^[10]。

Terakawa^[11]等证明靶向 AKT1 的 siRNA 可以有效降低乳腺癌细胞的侵袭和迁移能力。Wang 等^[12]证明运用 siRNA 敲低 AKT2 的表达后可以显著降低细胞趋化性及细胞远处转移能力。本研究利用 siRNA 敲低 MCF-7 细胞 AKT 的表达后, MTT 实验显示细胞增殖减缓, 流式细胞学实验显示细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期, 膜联蛋白 V 检测到凋亡细胞增多, 表明 siRNA 靶向敲低 AKT 的表达在体外确实能抑制细胞增长、诱导细胞凋亡。其机制可能是 AKT 表达降低后, 减少了细胞浆内 pAKT 的含量, 从而减弱了下游的分子通路。由此可见, 通过 siRNA 技术敲低

AKT 的表达对乳腺癌的治疗是有效的。目前已有相关的研究报道表明, 将靶向 PUMA 的腺病毒联合靶向 AKT 的抑制剂基因治疗可以抑制黑色素瘤细胞的生长, 增加细胞凋亡比例, 并且体内细胞增殖抑制率大于 80%^[13]。鉴于此, 我们相信, 在未来的研究中, AKT 也可能成为乳腺癌治疗的候选基因, 并具有潜在的临床应用前景。

参考文献(References)

- [1] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657
- [2] Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy, *Cell Signal*, 2002, 14(5): 381-395
- [3] 潘 智, 张令强, 蒋继智, 等. mTOR 的研究进展, *细胞生物学杂志*, 2006, 28(3): 395-398
- [4] 席广民, 牛瑞芳. PI3K-Akt 信号通路阻断在乳腺癌治疗中的作用, *中华肿瘤防治杂志*, 2007, 14(3): 230-233
- [5] Staal SP, Hartley JW, Rowe WP. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma, *Proc Natl Aca Sci USA*, 1997, 74(7): 3065-3067
- [6] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway, its functions and alterations in human cancer, *Apoptosis*, 2004, 9(6): 667-676
- [7] Kevin L, Abigail DW. The effect of estradiol on *in vivo* tumorigenesis is modulated by the human epidermal growth factor receptor 2/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt1 pathway, *Endocrinology*, 2007, 148(3): 1171-1180
- [8] Crowder RJ, Ellis MJ. Treating breast cancer through novel inhibitors of the phosphatidylinositol 3'-kinase pathway, *Breast Cancer Res*, 2005, 7(5): 212-214
- [9] Basu A. Molecular targets of breast cancer: AKTing in concert, *Breast Cancer*, 2008, 2: 11-16
- [10] Toker A, Yoeli-Lerner M. Akt signaling and cancer: surviving but not moving on, *Cancer Res*, 2006, 66(8): 3963-3966
- [11] Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S. Loss of PTEN expression followed by AKT phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer, *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10(2): 203-208
- [12] Wang J, Wan W, Sun R, et al. Reduction of Akt2 expression inhibits chemotaxis signal transduction in human breast cancer cells, *Cell Signal*, 2008, 20(6): 1025-1034
- [13] Karst AM, Dai DL, Cheng JQ, et al. Role of p53 up-regulated modulator of apoptosis and phosphorylated Akt in melanoma cell growth, apoptosis, and patient survival, *Cancer Res*, 2006, 66(18): 9221-9226

Knockdown of AKT Expression by RNA Interference Human Breast Cancer Cell Growth *in Vitro*

Mei Mei¹, Yu Ren¹, Xuan Zhou², Yan-Bin Qi¹, Chuan Zhao¹, Xiao-Yong Shen¹, Zhi Yao^{3,4*}

(¹Tianjin Research Center of Basic Medical Science, ²Department of Head and Neck Cancer, Tianjin Cancer Institute & Hospital,

³Department of Immunology, ⁴Laboratory of Immune Micro-environment, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Oligofectamine was used to transfect AKT siRNA to knock down the AKT expression level in MCF-7 human breast cancer cells. Real-time PCR was conducted to detect the expression of AKT mRNA. MTT and flow cytometry analysis were performed to detect the biological activity alternation after cells treated with AKT siRNA. Protein expression was evaluated by immunofluorescence staining and Western blot. The expression of AKT detected by RT-PCR was dramatically regressed in AKT siRNA-treated cells. Data from MTT assay indicated that growth was delayed for MCF-7 cells treated with AKT siRNA. Cell cycle was arrested in G₀/G₁ phase and the percentage of cell apoptosis increased significantly for the treated cells, which were determined by flow cytometry analysis. The result of immunofluorescence shown that the level of AKT, pAKT, Ki67, Bcl-2 were down-regulated which were also proved by Western blotting. Thus, AKT siRNA can effectively suppress the growth of MCF-7 cells and induce cell apoptosis, which suggests that AKT can be a candidate for gene therapy of human breast cancer.

Key words AKT; RNA interference; breast cancer; gene therapy

Received: August 19, 2009

Accepted: November 11, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30670802) and the Applied Basic Research Projects of Tianjin (No.09JCZDJC19700)

*Corresponding author. Tel: 86-22-23542817, Fax: 86-22-23542866, E-mail: yaozhi@tmu.cn