

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.01.010

· 基础研究 ·

## RNAi 下调 AKT1、PI3K P85 表达抑制乳腺癌 MCF-7 细胞的增殖

梅 玫<sup>1,2</sup>, 任 玉<sup>2</sup>, 周 旋<sup>3</sup>, 赵津辉<sup>4</sup>, 王 凡<sup>4</sup>, 高 伟<sup>5</sup>, 祁艳斌<sup>2</sup>, 姚 智<sup>5</sup>, 蒋伶活<sup>1,2</sup> (1. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072; 2. 天津医科大学 天津市基础医学研究中心, 天津 300070; 3. 天津医科大学 附属肿瘤医院, 头颈一科, 天津 300060; 4. 天津医科大学 第二附属医院 泌尿研究所, 天津 300211; 5. 天津医科大学 基础医学院 免疫教研室, 教育部免疫微环境与疾病重点实验室, 天津 300070)

**[摘要]** 目的: 探讨 RNAi (RNA interference) 技术抑制乳腺癌 MCF-7 细胞中 AKT1 和 PI3K P85 亚基的表达对 MCF-7 细胞增殖和侵袭等的影响。方法: 将包含 AKT1、PI3K P85 两种 siRNA 开放阅读框的短发夹 RNA (shRNA) 重组腺病毒质粒表达载体 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染至乳腺癌 MCF-7 细胞。应用 real-time PCR 和 Western blotting 检测转染后目的基因 mRNA 和蛋白的表达水平, 并用 Western blotting 检测目的基因被沉默后 PCNA、cyclin D1 和 P53 的表达情况。应用 MTT 法、流式细胞术、2-D 和 3-D Matrigel 实验检测 MCF-7 细胞转染前后的细胞增殖周期和侵袭能力。结果: 重组腺病毒质粒表达载体 rAd5-siAKT1-siPI3K 介导的靶向 AKT1、PI3K P85 shRNA 可以有效抑制目的基因 AKT1 和 PI3K P85 的 mRNA 和蛋白表达; 下游相关因子 PCNA、cyclin D1 的表达亦下调, P53 表达则上调。MTT 法结果显示 rAd5-siAKT1-siPI3K 组细胞生长抑制率 > 50%, 与未转染组和 rAd5-siCtrl 转染组比较, 出现明显的 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> 细胞周期阻滞; 2-D 和 3-D Matrigel 实验显示, 未转染组和 rAd5-siCtrl 转染组细胞呈正常形态, 而 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染组细胞贴壁生长能力明显减低, 细胞团块明显缩小。结论: 靶向 AKT1、PI3K P85 亚基的 shRNA 技术可以抑制 MCF-7 细胞中 AKT1、PI3K P85 亚基的表达, 抑制 MCF-7 细胞的体外增殖。

**[关键词]** RNA 干扰; 乳腺肿瘤; AKT1; PI3K P85; 增殖

**[中图分类号]** R737.9; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2010)01-0051-06

## RNAi targeting AKT1 and PI3K P85 suppresses proliferation of breast carcinoma MCF-7 cells

MEI Mei<sup>1,2</sup>, REN Yu<sup>2</sup>, ZHOU Xuan<sup>3</sup>, ZHAO Jin-hui<sup>4</sup>, WANG Fan<sup>4</sup>, GAO Wei<sup>5</sup>, QI Yan-bin<sup>2</sup>, YAO Zhi<sup>5</sup>, JIANG Ling-huo<sup>1,2</sup> (1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Tianjin Research Center of Basic Medical Science, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 3. Department of Head & Neck Surgery I, Affiliated Tumor Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China; 4. Urology Research Institute, Second Affiliated Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 5. Key Laboratory of Immunomicroenvironment and Disease of Education Ministry, Department of Immunology, Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of RNA interference (RNAi) targeting AKT1 and PI3K P85 on the proliferation and invasion of breast carcinoma MCF-7 cells. **Methods:** The recombinant adenovirus expression vector, which contained short hairpin RNA (shRNA) targeting open reading frames of AKT1 and PI3K P85 (rAd5-siAKT1-siPI3K), was transfected into human breast carcinoma MCF-7 cells. AKT1 and PI3K P85 mRNA and protein expressions were detected by real-time PCR and Western blotting analysis. The expressions of PCNA, cyclinD1, and P53 were also detected by Western blotting analysis. The proliferation and apoptosis of MCF-7 cells were measured by MTT, flow cytometry and 2-dimensional and 3-dimensional matrigel assay. **Results:** Recombinant adenovirus vector rAd5-siAKT1-siPI3K dra-

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展规划(973计划)资助项目(No.2009CB918903);国家自然科学基金资助项目(No.30670802);天津市应用基础与前沿计划重点项目(No.09JCZDJC19700, No.10JCYBJC12500)。Project supported by Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No.2009CB918903), and the National Natural Science Foundation of China (No.30670802), and the Applied Basic and Advanced Research Program of Tianjin (No.09JCZDJC19700, No.10JCYBJC12500)

**[作者简介]** 梅玫(1968-),女,天津市人,博士研究生,主要从事肿瘤分子生物学研究。E-mail:meim11@yahoo.com.cn

**[通信作者]** 蒋伶活(JIANG Ling-huo, corresponding author), E-mail:linghuojiang@yahoo.com.cn

matically down-regulated AKT1 and PI3K P85 mRNA and protein expressions in MCF-7 cells; the downstream factors PCNA and cyclin D1 were also down-regulated, while P53 was up-regulated. Growth of MCF-7 cells was inhibited by over 50% in rAd5-siAKT1-siPI3K group as measured by MTT assay, and cell cycle was arrested in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase compared with untransfected and rAd5-siCtrl transfected groups. Cell growth on matrigel matrix showed normal cell shapes, while the cells in rAd5-siAKT1-siPI3K transfected group were detached from the matrix or grew in scattered clustering patterns, forming only small aggregates. **Conclusion:** shRNA targeting *AKT1* and *PI3K P85* can significantly down-regulate the expression of AKT1 and PI3K P85 in breast carcinoma MCF-7 cells, and inhibit the growth of MCF-7 cells *in vitro*.

[ **Key words** ] RNA interference; breast neoplasms; AKT1; PI3K P85; proliferation

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(1): 51-56 ]

以表皮生长因子受体( epidermal growth factor receptor, EGFR )突变、扩增或过表达为代表的分子生物学变化是许多肿瘤发生的早期和主要的分子事件<sup>[1-2]</sup>。生长因子信号转导通路通过激活下游磷酸肌醇酯-3-激酶( phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K )活性,将生长因子受体酪氨酸激酶信号由细胞膜转导至胞质,PI3K/AKT1 是 EGFR 信号通路中的关键因子,在 EGFR 信号通路异常激活的致癌作用中发挥着重要的作用<sup>[3-5]</sup>。近年发现的 RNA 干扰技术( RNA interference, RNAi )与常规的反义 RNA 技术比较而言,具有明显的优势<sup>[6-7]</sup>。腺病毒载体具有宿主细胞范围广、转染效率高等优点,是目前基因治疗研究中应用最为广泛的载体<sup>[8]</sup>。鉴于 RNA 干扰技术在多种肿瘤细胞株中均得到应用,且腺病毒载体介导的 RNAi 可以有效地抑制靶 RNA 的表达,同时 PI3K/AKT1 在 EGFR 信号通路中的重要作用,本研究选择 *AKT1*、*PI3K P85* 为靶点进行了 RNAi,观察其对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的抑制作用,探索肿瘤基因治疗的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

含荧光蛋白真核表达框的重组腺病毒载体 rAd5-siAKT1-siPI3K 委托武汉晶赛生物工程技术公司构建( 干扰序列: AKT1: 5'-GGAGAUCAUGCAGCAUCGCTT-3', 干预位点: 1 540-1 558; PI3K P85: 5'-GAAAGGAGGAAUAACAAATT-3', 干预位点: 371-389)。DMEM 购自 Gibco 公司, AKT1、PI3K P85、PCNA、cyclin D1、P53 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。Western blotting 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 Pierce 公司。逆转录试剂盒和 Real-time PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。AKT1 引物序列: F: 5'-GGCCAGATGATCACCATCAC-3', R: 5'-CTATCGTC

CAGCGCAGTCCA-3'; PI3K P85 引物序列, F: 5'-AGCATTGGGACCTCACATTACACA-3', R: 5'-ACTG-GAAACACAGTCCATGCACATA-3'。MTT 和 DMSO 为 Sigma 公司产品。Matrigel 购自 BD 公司, Transwell 购自 Costar 公司, 其余试剂为天津产分析纯试剂。

### 1.2 实验分组与转染

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国科学院上海细胞生物学研究所中国科学院细胞库, 用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养液, 置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中常规培养。实验分 3 组: 空白对照组( Ctrl)、重组腺病毒无义序列组( rAd5-siCtrl)、重组腺病毒组( rAd5-siAKT1-siPI3K)。转染时用无血清培养液按 MOI 为 100; 转染后 4 h, 弃培养液, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养 48 ~ 72 h。荧光显微镜下检测细胞转染效率, 转染率( % ) = ( 荧光阳性细胞数 / 总细胞数 ) × 100%

### 1.3 Real-time PCR 检测 AKT1 和 PI3K P85 mRNA 的表达

转染后 48 h, 提取细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA。进行 real-time PCR, 以 GAPDH 作参照。扩增体系 25 μl: SYBR Green 12.5 μl, ROX 0.5 μl, dd H<sub>2</sub>O 10 μl, cDNA 1 μl, 上游引物 0.5 μl, 下游引物 0.5 μl。反应条件: 95 °C、10 min, 95 °C、5 min, 60 °C、34 min( 循环数 40 ), 95 °C、15 min, 60 °C、1 min, 95 °C、15 min。结果判定: ΔCt = Ct 目的基因 - CtGAPDH, ΔΔCt = ΔCt 治疗组 - ΔCt 对照组; RQ ( relative quantization ) 治疗组 = 2<sup>-ΔΔCt</sup>, RQ 对照组 = 1。

### 1.4 Western blotting 检测 AKT1 和 PI3K P85 蛋白的表达

转染 48 ~ 72 h 后提取 MCF-7 细胞总蛋白, 检测蛋白浓度, 每孔加入等量待测蛋白, 行 10% SDS-PAGE。电泳后冰浴下 80 V 转膜 60 min。PVDF 膜室温封闭 2 h, 加入一抗( 抗-AKT1, 抗-PI3K P85, 1:1 000 ) 轻摇, 孵育过夜, 洗涤后加入二抗

(1:1 000)室温轻摇孵育 1~2 h。PVDF 膜正面向上,将化学发光底物(按 1:1 混匀)加于 PVDF 膜上,SYNGENE Chem Genius 成像系统成像,用 Quanti Scan3.0 软件对目的条带进行分析。

### 1.5 MTT 法检测 MCF-7 细胞增殖

取对数生长期 MCF-7 细胞,常规消化,接种于 96 孔板,接种量 2 000 个/孔(200  $\mu$ l),每组 5 复孔,并设未加细胞的对照孔,96 孔板边缘孔用无菌 PBS 填充,置 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。接种 12 h 后,常规转染。转染后 24、72、120、168 h 行 MTT 检测;每孔加入 5 mg/ml MTT 20  $\mu$ l,继续培养 4 h,小心吸去上清液,每孔加 DMSO 200  $\mu$ l,置于微量振荡器上振荡 10 min。酶标仪测各孔光密度值( $D$ ),计算每组 5 孔的均值。肿瘤细胞存活率(%) =  $(D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

### 1.6 流式细胞仪分析 MCF-7 细胞周期

将上述转染后并处于对数生长期的 MCF-7 细胞消化成单细胞悬液,滤网过滤后 75% 乙醇 4  $^{\circ}$ C 固定细胞过夜。加入 RNase A(1 mg/ml)200  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,与 PI 染色液 800  $\mu$ l 混匀后,4  $^{\circ}$ C 避光染色 30 min。Calibur 流式细胞仪检测,然后用 Cell Quest 软件分析各组细胞的周期时相分布。

### 1.7 Matrigel 基质法检测 MCF-7 细胞的生长和侵袭

2-D Matrigel 实验:Matrigel 和 DMEM 按 1:2 比例稀释后取 200  $\mu$ l 预先铺置于 24 孔板,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min 使 Matrigel 完全凝固。将转染后并处于对数期生长的 MCF-7 细胞消化成单细胞悬液,将细胞 10 000 个/孔接种在凝固的 Matrigel 胶上,加入含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基 200  $\mu$ l,每组 3 复孔。

3-D Matrigel 实验:24 孔板中预铺 100  $\mu$ l Matrigel,37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,使 Matrigel 凝固。将转染后并处于对数期生长的 MCF-7 细胞消化成单细胞悬液,调节细胞浓度至 10 000 个/ml;等体积将 Matrigel 和细胞悬液混合,以每孔 100  $\mu$ l 的量加入 24 孔板中,置 37  $^{\circ}$ C 培养箱中 30 min,使 Matrigel 凝固;加入 200  $\mu$ l 完全培养基,每组 3 复孔。应用 Olympus 相差倒置显微镜观察。

### 1.8 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS11.5 软件处理,采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 腺病毒转染效率测定

按 MOI 为 100 将重组腺病毒载体 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染 MCF-7 细胞,24 h 后在荧光显微镜下观

察荧光蛋白表达情况。结果(图 1)显示,转染率 > 95%,可以进行后续实验。

### 2.2 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染后 MCF-7 细胞中目的基因 mRNA 的表达

Real-time PCR 检测腺病毒载体转染 48 h 后目的基因的  $\Delta$ Ct 值(图 2):AKT1(Ctrl:0.724  $\pm$  0.09, rAd5-siCtrl:0.836  $\pm$  0.09, rAd5-siAKT1-siPI3K:2.151  $\pm$  0.09),PI3K P85(Ctrl:1.279  $\pm$  0.08, rAd5-siCtrl:1.353  $\pm$  0.08, rAd5-siAKT1-siPI3K:1.808  $\pm$  0.15),rAd5-siAKT1-siPI3K 组与 Ctrl 组和 rAd5-siCtrl 组比较均有统计学意义(AKT1: $F = 467.2, P < 0.01$ ;PI3K P85: $F = 68.8, P < 0.01$ )。

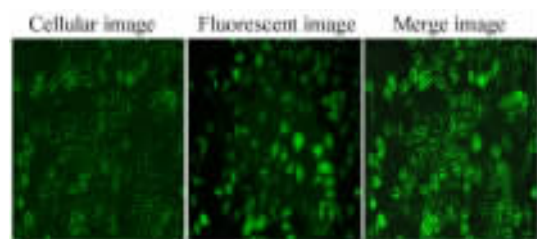


图 1 荧光显微镜下观察 rAd5-siAKT1-siPI3K 腺病毒转染 MCF-7 细胞的转染效率( $\times 200$ )

Fig. 1 Transfection efficiency of rAd5-siAKT1-siPI3K into MCF-7 cells observed under fluorescent microscope( $\times 200$ )

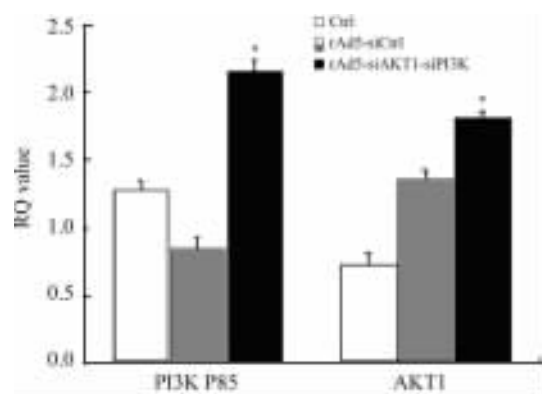


图 2 Real-time PCR 检测转染 rAd5-siAKT1-siPI3K 后 MCF-7 细胞中 PI3K P85 和 AKT1 mRNA 的表达

Fig. 2 PI3K P85 and AKT1 mRNA expressions in MCF-7 cells transfected with rAd5-siAKT1-siPI3K as detected by real-time PCR

\*  $P < 0.01$  vs Ctrl

### 2.3 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染后 MCF-7 细胞中目的蛋白的表达

腺病毒载体转染 48 h 后,rAd5-siCtrl 组目的蛋白条带灰度值分别为 Ctrl 组 AKT1 的(97.62  $\pm$

15.4)%、PI3K P85 的 ( 95.45 ± 9.4 )% ; rAd5-siAKT1-siPI3K 转染组目的蛋白条带灰度值分别为 Ctrl 组 AKT1 的 ( 23.73 ± 6.3 )%、PI3K P85 的 ( 35.38 ± 9.7 )% ,表明 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染后目的蛋白的表达明显减少(图3)。其他相关因子如 PCNA、cyclin D1 和 P53 分别为 Ctrl 组的 ( 33.77 ± 5.03 )%、( 19.45 ± 8.21 )% 和 ( 189.56 ± 19.67 )%。

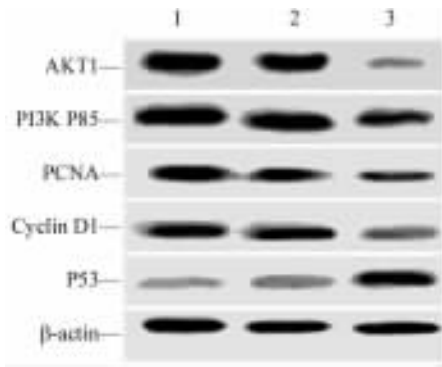


图3 转染 rAd5-siAKT1-siPI3K 后 MCF-7 细胞中相关蛋白的表达

Fig. 3 Protein expressions in MCF-7 cells after transfection with rAd5-siAKT1-siPI3K

1: MCF cell; 2: MCF cell transfected with rAd5-siCtrl; 3: MCF cell transfected with rAd5-siAKT1-siPI3K

2.4 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染抑制 MCF-7 细胞的增殖

rAd5-siAKT1-siPI3K 转染 MCF-7 细胞后 1、3、5、7 d, 检测 rAd5-siCtrl 转染组和 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染组 MCF-7 细胞的存活率(图4), 它们分别为 ( 97.5 ± 4.3 )%、( 96.7 ± 7.8 )%、( 92.3 ± 12.3 )%、( 95.2 ± 14.6 )% 和 ( 96.6 ± 5.2 )%、( 92.3 ± 4.5 )%、( 76.5 ± 5.6 )%、( 47.2 ± 2.1 )% ,结果提示 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染后 MCF-7 细胞增殖受到显著抑制,抑制率超过 50%。

2.5 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染诱导 MCF-7 细胞周期阻滞

流式细胞仪分析细胞周期(图5)发现, Ctrl 组和 rAd5-siCtrl 转染组 MCF-7 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期分别为 61.7% 和 62.1% , S 期分别为 29.4% 和 31.2% , G<sub>2</sub>/M 期分别为 8.9% 和 6.7% ; rAd5-siAKT1-siPI3K 转染组 MCF-7 细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期为 70.8% , S 期为 21.9% , G<sub>2</sub>/M 期为 7.3% ,表明 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染使 MCF-7 细胞周期阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。

2.6 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染抑制 MCF-7 细胞生长和侵袭能力

rAd5-siAKT1-siPI3K 转染 MCF-7 细胞 24 h 后, Ctrl 组和 rAd5-siCtrl 转染组的细胞完全贴壁, 24 ~ 72 h 细胞生长状态良好(图6A), 96 h 后可见细胞大量融汇成片。rAd5-siAKT1-siPI3K 转染组的细胞 24 h 后不能完全贴壁, 48 h 后仅少量贴壁, 观察至 96 h 未见细胞融汇成片, 提示 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染组 MCF-7 细胞生长能力下降。

3-D Matrigel 实验显示, 在 Matrigel 基质夹心中接种 Ctrl 组、rAd5-siCtrl 转染组和 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染组细胞, 培养 10 d 后发现 Ctrl 组、rAd5-siCtrl 转染组细胞可以形成较大的细胞团块, 团块直径分别为 ( 156.45 ± 15.62 ) μm 和 ( 152.01 ± 17.88 ) μm, 而 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染组的细胞团块直径为 ( 76.21 ± 12.32 ) μm, 差别有统计学意义 ( F = 572.12, P < 0.01, 图6B)。结果显示, rAd5-siAKT1-siPI3K 转染抑制 MCF-7 细胞的侵袭能力。

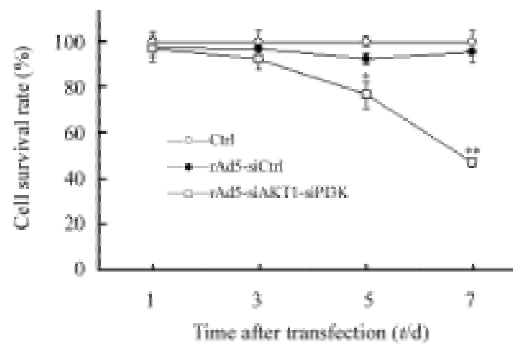


图4 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染抑制 MCF-7 细胞的增殖  
Fig. 4 rAd5-siAKT1-siPI3K transfection inhibited proliferation of MCF-7 cells

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs Ctrl or rAd5-siCtrl

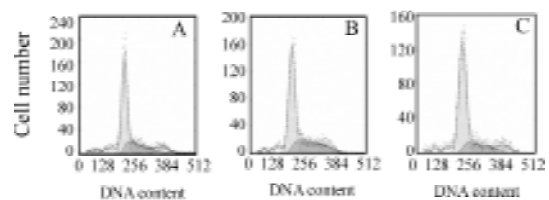


图5 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染后 MCF-7 细胞细胞周期的变化

Fig. 5 Cell cycle changes of MCF-7 cells transfected with rAd5-siAKT1-siPI3K

A: Ctrl; B: rAd5-siCtrl; C: rAd5-siAKT1-siPI3K

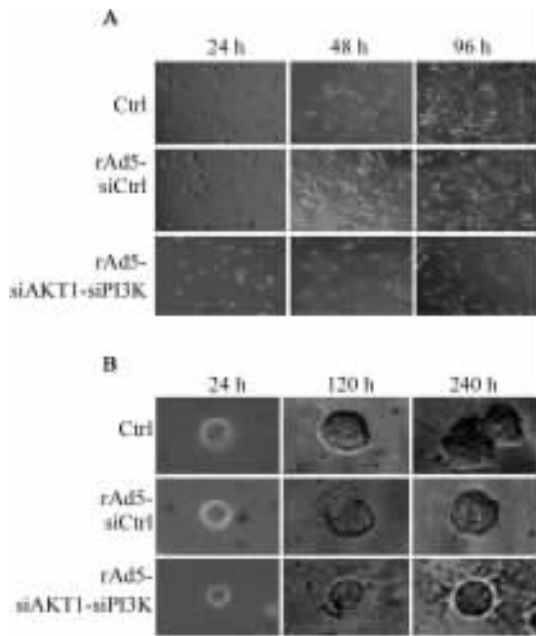


图 6 rAd5-siAKT1-siPI3K 转染抑制 MCF-7 细胞的生长和侵袭(  $\times 100$  )

Fig. 6 rAd5-siAKT1-siPI3K transfection inhibited proliferation and invasion capability of MCF-7 cells as detected by 2-D Matrigel assay ( A ) and 3-D Matrigel assay ( B ) (  $\times 100$  )

### 3 讨论

乳腺癌是一种多基因异常疾病,涉及癌基因的过表达和抑癌基因的突变、缺失等多环节,但相关的分子机制尚不十分明确<sup>[9]</sup>。以 EGFR 为代表的生长因子及其受体信号转导通路在肿瘤恶性进展中的作用已日益受到关注<sup>[10-11]</sup>。多种生长因子信号转导通路通过激活 PI3K 将生长因子信号由细胞膜转导至胞质。PI3K 是由催化亚单位( P110 )和调节亚单位( P85 )组成的异源二聚体,PI3K 磷酸化下游底物磷脂酰肌醇肌醇环上的 3' 羟基,从而使 4,5-2 磷酸磷脂酰肌醇转变为 3,4,5-3 磷酸磷脂酰肌醇,这是胞外生长因子的关键活化步骤<sup>[12]</sup>。PI3K 在 PDK 的辅助作用下诱导 AKT 磷酸化活化;AKT 调控的下游信号蛋白涉及细胞周期<sup>[13]</sup>、凋亡<sup>[14]</sup>、血管生成<sup>[15]</sup>、端粒酶活性<sup>[16]</sup>等,在恶性肿瘤的进展中发挥着重要的作用<sup>[17]</sup>。

近年的研究发现,一些小的双链 RNA( double-stranded RNA, dsRNA )可以高效、特异地诱导体内特定靶基因 mRNA 的降解,使细胞出现特定基因的缺失,这种技术即 RNA 干扰( RNA interference,

RNAi)<sup>[18]</sup>。在 RNAi 作用的起始阶段 dsRNA 被 Dicer 酶切割为 19 ~ 21 bp 的小分子干扰 RNA 片段( small interfering RNA, siRNA );随后 siRNA 与核酶复合物结合后形成 RNA 诱导沉默复合物( RNA induced silencing complex, RISC );RISC 激活后通过碱基配对定位到同源靶 mRNA 转录本上并切割靶 mRNA,从而部分或完全抑制靶标基因的表达<sup>[19]</sup>。

本研究应用重组腺病毒表达载体 rAd5-siAKT1-siPI3K,转染乳腺癌 MCF-7 细胞,体外研究发现转染 rAd5-siAKT1-siPI3K 后 MCF-7 细胞内 AKT1、PI3K 的表达被明显抑制,且肿瘤细胞的增殖能力显著减低。在 AKT1、PI3K P85 表达下调的同时 PCNA, cyclin D1 表达水平亦下降,而 P53 则表达上调。PCNA 是细胞核内蛋白,与细胞增殖密切相关。P53 是最早发现的抑癌基因,其表达的下调或缺失是肿瘤发生的重要机制。有研究证实 P53 与 PCNA 关系密切,P53 可诱导 P21 蛋白和 GAP45 蛋白的产生,后两者能与 PCNA 结合,从而使 PCNA 失活和降解<sup>[20]</sup>。Cyclin D1 在许多肿瘤中均高表达,其功能是促进 G<sub>1</sub>/S 转变,促进肿瘤增殖。研究证实 P21 可以抑制 cyclin D1 的活化,进而抑制肿瘤增殖<sup>[21-22]</sup>,因此 P53 可能通过 P21 调节 cyclin D1 的表达活性。本研究表明:( 1 )PI3K/AKT1 信号通路异常激活使 P53 表达下调,Cyclin D1、PCNA 失去了 P53 的抑制作用而表达量增加,从而促进肿瘤细胞的增殖。( 2 )阻断乳腺癌中 PI3K/AKT1 信号转导通路的联合基因治疗能显著抑制肿瘤细胞的增殖,是乳腺癌基因治疗的新策略。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Galbaugh T, Cerrito MG, Jose CC, Cutler ML. EGF-induced activation of AKT results mTOR-dependent p70S6 kinase phosphorylation and inhibition of HC11 cell lactogenic differentiation [ J ]. BMC Cell Biol, 2006, 7( 34 ): 1-15.
- [ 2 ] Loew S, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms [ J ]. Anticancer Agents Med Chem, 2009, 9( 6 ): 703-715.
- [ 3 ] Zheng X, Jiang F, Katakowski M, Zhang ZG, Lu QE, Chopp M. ADAM17 promotes breast cancer cell malignant phenotype through EGFR-PI3K-AKT activation [ J ]. Cancer Biol Ther, 2009, 8( 11 ): 1045-1054.
- [ 4 ] Asanuma H, Torigoe T, Kamiguchi K, Hirohashi Y, Ohmura T, Hirata K, et al. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells [ J ]. Cancer Res, 2005, 65( 23 ): 11018-11025.

- [ 5 ] 曾慧敏,王丹红,刘文贤. PDK/AKT 通路与肿瘤治疗 [ J ]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2008, 15( 1 ): 82-89.
- [ 6 ] Kang CS, Pu PY, Li YH, Zhang ZY, Qiu MZ, Huang Q, *et al.* An *in vitro* study on the suppressive effect of glioma cell growth induced by plasmid-based small interference RNA ( siRNA ) targeting human epidermal growth factor receptor [ J ]. J Neuro Oncol, 2005, 74 ( 3 ): 267-273.
- [ 7 ] 康 楷,胡丽娜,董晓静,朱元方. CXCR4-siRNA 逆转录病毒载体对宫颈癌 Caski 细胞 CXCR4 基因表达的抑制作用 [ J ]. 中国肿瘤临床, 2008, 35( 21 ): 1244-1248.
- [ 8 ] Bocangel D, Zheng M, Mhashilkar A, Liu Y, Ramesh R, Hunt KK, *et al.* Combinatorial synergy induced by adenoviral-mediated mda-7 and hereceptin in Her-2<sup>+</sup> breast cancer cells [ J ]. Cancer Gene Ther, 2006, 13( 10 ): 958-968.
- [ 9 ] Teschendorff AE, Caldas C. The breast cancer somatic ‘ mutome ’: tackling the complexity [ J ]. Breast Cancer Res, 2009, 11 ( 2 ): 301.
- [ 10 ] Xu K, Shu HK. EGFR activation results in enhanced cyclooxygenase-2 expression through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the Sp1/Sp3 transcription factors in human gliomas [ J ]. Cancer Res, 2007, 67 ( 13 ): 6121-6129.
- [ 11 ] Wu R, Coniglio SJ, Chan A, Symons MH, Steinberg BM. Up-regulation of Rac1 by epidermal growth factor mediates COX-2 expression in recurrent respiratory papillomas [ J ]. Mol Med, 2007, 13 ( 3-4 ): 143-150.
- [ 12 ] Wells V, Mallucci L. Phosphoinositide 3-kinase targeting by the beta galactoside binding protein cytokine negates AKT gene expression and leads aggressive breast cancer cells to apoptotic death [ J ]. Breast Cancer Res, 2009, 11( 1 ): R2.
- [ 13 ] Jin CY, Kim GY, Choi YH. Induction of apoptosis by aqueous extract of Cordyceps militaris through activation of caspases and inactivation of Akt in human breast cancer MDA-MB-231 cells [ J ]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18( 12 ): 1997-2003.
- [ 14 ] She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, *et al.* Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to AKT signaling [ J ]. PLoS One, 2008, 3( 8 ): e3065.
- [ 15 ] Liu W, Bagaitkar J, Watabe K. Roles of AKT signal in breast cancer [ J ]. Front Biosci, 2007, 12: 4011-4019.
- [ 16 ] Kawagoe J, Ohmichi M, Takahashi T, Ohshima C, Mabuchi S, Takahashi K, *et al.* Raloxifene inhibits estrogen-induced up-regulation of telomerase activity in a human breast cancer cell line [ J ]. J Biol Chem, 2003, 278( 44 ): 43363-43372.
- [ 17 ] Pu P, Kang C, Li J, Jiang H, Cheng J. The effects of antisense AKT2 RNA on the inhibition of malignant glioma cell growth *in vitro* and *in vivo* [ J ]. J Neuro Oncol, 2006, 76( 1 ): 1-11.
- [ 18 ] Aharinejad S, Sioud M, Lucas T, Abraham D. Target validation using RNA interference in solid tumors [ J ]. Methods Mol Biol, 2007, 361( 7 ): 227-238.
- [ 19 ] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference [ J ]. Nature, 2001, 409 ( 6818 ): 363-366.
- [ 20 ] Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B. p21 binding to PCNA causes G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> cell cycle arrest in p53-deficient cells [ J ]. Oncogene, 1998, 16( 3 ): 311-320.
- [ 21 ] Lebeau A, Unholzer A, Amann G, Kronawitter M, Bauerfeind I, Sendelhofert A, *et al.* EGFR, HER-2/neu, Cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma *in situ* of the breast [ J ]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 79 ( 2 ): 187-198.
- [ 22 ] Yamamoto H, Ochiya T, Takeshita F, Toriyama-Baba H, Hirai K, Sasaki H, *et al.* Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1-conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation [ J ]. Cancer Res, 2002, 62 ( 6 ): 1641-1647.
- [ 收稿日期 ] 2009 - 11 - 10 [ 修回日期 ] 2009 - 12 - 18  
[ 本文编辑 ] 徐红梅

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 文稿中计量单位使用的要求

本刊严格执行国务院颁发的《中华人民共和国法定计量单位》,全面贯彻国家标准 GB3100-3102-1993《量和单位》的规定,正确使用量和单位的名称和符号。(1)量符号以斜体拉丁和希腊字母表示(pH用正体除外),例如*m*(质量)、*t*(时间)、*c*(浓度)、*V*(体积)、*p*(压力)、*F*(力)等。(2)单位符号一律以正体拉丁或希腊字母表示,例如kg(千克)、m(米)、h(小时)、mol/L(摩尔每升)等。(3)表示人体检验指标的浓度或质量浓度时,一般使用L(升)作为检验组成含量单位的分母。(4)表示用药剂量单位时,不能写成mg/kg/d的形式,应写成mg/(kg·d)或mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的形式。(5)单位符号常见书写错误:长度单位符号A°(埃)已不用,应写作0.1nm;时间单位“小时”符号为h(不是hr)、“秒”符号为s(不是sec);转速单位符号为r/min(不是rpm);量浓度单位符号为mol/L(不是M、N,也不是mol/mm<sup>3</sup>);力的单位“牛顿”符号为N[不是dyn(达因)、kgf(千克力),换算1dyn=10<sup>-5</sup>N];热量单位“焦耳”符号为J[不是cal(卡)、kcal(千卡),换算1cal=4.187J];放射性活度单位符号为Bq[不是Ci(居里),换算1Ci=3.7×10<sup>10</sup>Bq]。

(本刊编辑部)