

外源性AKT1增强上皮性卵巢癌细胞侵袭和迁移能力的机制



张海燕, 孙 红

Mechanism of AKT1 Enhancing Migration and Invasion of Epithelial Ovarian Cancer Cells

ZHANG Haiyan, SUN Hong

Department of Gynecology, Hospital of Obstetrics and Gynecology, Affiliated of Fudan University, Shanghai 200011, China

Corresponding Author: SUN Hong, E-mail: hongsun57@hotmail.com

Abstract: Objective To explore the effects of AKT1 gene on the invasion and migration of epithelial ovarian cancer cells SKOV3 and its mechanism. **Methods** Recombinant plasmid carrying the full-length AKT1 cDNA and AKT1 shRNA plasmid were constructed. Plasmids were transfected into SKOV3 cells to dual-directionally regulate AKT1 expression. RT-PCR and western blot were used to detect the transfection efficiency. Wound healing assay was used to analyze cell migration. Transwell-Matrigel assay was used to analyze cell invasion. RT-PCR was used to explore the expression of CXCR4, VEGF, MMP-2, MMP-9 and uPA which were related with cell invasion and migration at mRNA level. **Results** A plasmid (pEF-1 α -AKT1) containing full length of AKT1 cDNA and a specific AKT1-targeted shRNA expression plasmid were constructed successfully, which could effectively regulate the activation of p-AKT after SKOV3 cells transfected. Compared with untransfected cells or non-target shRNA transfected cells, up-regulation AKT1 promoted cell migration and invasion, and increased the expression of CXCR4, VEGF, MMP-2, and uPA at mRNA level($P<0.05$). On the other hand, down-regulation AKT1 inhibited cell migration and invasion, and decreased the expression of CXCR4, VEGF, MMP-2, and uPA at mRNA level($P<0.05$). **Conclusion** AKT1 might impact cell migration and invasion by regulating the expression of CXCR4, VEGF, MMP-2, and uPA at mRNA level.

Key words: Epithelial ovarian cancer; AKT1; Signal pathway

摘 要: 目的 探讨AKT1基因对上皮性卵巢癌SKOV3细胞迁移和侵袭能力的影响及相关分子机制。**方法** 针对AKT1基因, 设计并构建shRNA质粒和真核表达质粒, 双向调节SKOV3细胞中AKT1的表达, 运用RT-PCR和western blot检测转染效率。运用Wound healing和Transwell-Matrigel方法检测转染前后细胞迁移和侵袭能力的变化。RT-PCR法检测与细胞运动侵袭相关分子CXCR4、VEGF、MMP-2、MMP-9和uPA在mRNA水平的表达变化。**结果** 成功构建AKT1基因的真核表达质粒pEF-1 α -AKT1和靶向抑制AKT1基因的shRNA表达质粒pRNAT-AKT1。转染上皮性卵巢癌SKOV3细胞后, 能有效调控p-AKT表达。参照未转染组和空载体转染组, 外源性AKT1促进细胞迁移和侵袭, CXCR4、VEGF、MMP-2和uPA的mRNA表达水平升高。shRNA靶向抑制AKT1基因的表达可抑制细胞迁移和侵袭, CXCR4、VEGF、MMP-2和uPA的mRNA表达水平下降。**结论** AKT1可能通过调控CXCR4、VEGF、MMP-2和uPA的转录水平来影响细胞侵袭和运动能力。

关键词: 上皮性卵巢癌; AKT1; 信号通路

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-07-23; 修回日期: 2013-09-29
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001150); 高等院校教育部博士点基金资助项目(20100071120090); 上海科委医学引导项目资助课题(10411960800)
作者单位: 200011 上海, 复旦大学附属妇产科医院妇科
通信作者: 孙红, E-mail: hongsun57@hotmail.com
作者简介: 张海燕(1981-), 女, 博士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤的研究

0 引言

AKT在正常卵巢组织和癌组织中激活水平的显著差异提示其在肿瘤发生发展中的重要作用。本文前期研究发现, 上皮性卵巢癌中AKT异常激活不仅是上游PI3K分子异常激活的后续效应, 同时与AKT基因自身扩增密切相关。既往研究表明, AKT异常激活可促进卵巢癌细胞增殖, 抑制

细胞凋亡。但AKT异常激活对卵巢癌细胞的运动和侵袭的影响及相关机制，仍有待深入探讨。本研究中，构建了外源性AKT1基因真核表达质粒和靶向AKT1基因的shRNA质粒，采用脂质体介导的方法，分别转染SKOV3细胞，观察细胞转染前后p-AKT表达水平的变化，检测其对细胞侵袭和迁移等生物学行为的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

上皮性卵巢癌细胞株SKOV3购自ATCC。鼠抗人磷酸化AKT（Ser473）单克隆抗体、兔抗人AKT多克隆抗体、兔、鼠抗人GAPDH单克隆抗体均购自美国Cell Signal公司。TRIZOL、RT-PCR试剂盒购自美国Invitrogen公司。培养液及胎牛血清购自美国GIBICO公司。RT-PCR试剂及限制性内切酶盒购自Fermentas公司。质粒抽提试剂盒购自美国QIAGEN公司。Lipofectamine™2000购自美国Invitrogene公司。

1.2 构建pEF6/Myc-AKT1质粒

根据GeneBank中AKT1基因序列（收录号：NM0332300），应用Primer5.0软件设计引物，在5'端和3'端引物加上BamH I、Xba I酶切位点。扩增AKT1反义核酸引物序列为：上游引物：5'-GGA TCC ATG AAG ACG GAG CGG CCC CG-3'，下游引物：5'-TCT AGA TCA GGC CGT CGC GCT GGG CG-3。以SKOV3 cDNA模板进行高保真PCR扩增，扩增片段1 443 bp。产物经酶切、回收、纯化后与载体片段 pEF6/Myc-His A酶切片段相连，再次经酶切、回收、纯化后转化感受态菌DH5α。摇菌后进行质粒抽提、鉴定，获得导入AKT1基因全长cDNA的质粒。

1.3 构建短发卡式RNA-AKT1质粒（shRNA-AKT1）

参照siRNA的设计原则，在 AKT1(序列号：NM033230)的编码序列中，设计19~21 nt的DNA片段，并利用BLAST进行查询，确定其为特异性序列。阴性对照选取国际通用的non-target siRNA。根据选定的siRNA序列合成两条模板单链，每条单链均包括该基因的正义链和反义链，中间以9个脱氧核苷酸的Loop结构相连，后面续接RNA PollyⅢ聚合酶转录终止位点，同时模板链两端分别设计BamH I和Hind Ⅲ的内切酶位点。产物经酶切、回收、纯化后与双酶切的线化pRNA质粒载体相连，再次经酶切、回收、纯化后转化感受态体菌DH5α。摇菌后进行质粒抽提、鉴定，-20℃保存待用。

1.4 重组质粒转染SKOV3细胞

SKOV3细胞以 2.5×10^6 /孔的密度接种至6孔板，待细胞汇聚率达到90%左右，按照推荐剂量准备质粒-Lipofectamine™2000复合物，加入到培养孔中，分为实验组(含目的基因质粒转染组)、阴性对照组(空质粒转染组或含non-target shRNA转染组)、空白对照组(未转染组)。在转染后6 h改换含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液。

1.5 Transwell小室检测细胞的侵袭能力

Matrigel(50 mg/L)按1:8稀释，包被Transwell小室底部，4℃过夜；上室加入200 μl含0.5%BSA的DMEM培养液，水化基底膜，37℃ 30 min，加入含 5×10^3 个细胞悬液200 μl；下室加入800 μl 5% FBS培养液；在37℃、5%CO₂培养箱培养24 h；PBS淋洗，并用棉签擦去微孔膜上层的细胞，95%乙醇室温固定20 min后，苏木精染色10 min，1%盐酸酒精分化，自来水淋洗；电子显微镜观察、拍照、计数5个高倍视野（×200）下穿过滤膜的细胞数，取其平均值。各组细胞穿过Transwell的数量作为比较细胞侵袭能力的指标。实验重复3次。

1.6 划痕试验检测细胞的迁移能力

在12孔板接种细胞 5×10^5 /孔，设置3复孔；待细胞密度达到90%时，用10 μl的枪头做垂直划痕；PBS洗涤3次以去除细胞碎片；加入含5% FBS的培养基，在37℃、5%CO₂培养箱培养，不同时间点（0，24，48h）显微镜下观察细胞向划痕区的生长情况并拍照，测量各组细胞任意三个部位的不同伤口的宽度，相对运动率=[W(t=0 h) - W(t=24 h, 48 h)]/W(t=0 h)，计数三次实验的平均值，作为评价细胞迁移能力的指标。

1.7 Western blot分析总AKT和磷酸化AKT的蛋白表达水平

细胞经无血清培养24 h同步化后，加入含10%血清的培养液刺激2 h后，弃去上清液，PBS淋洗，甩干，RIPA提取总蛋白并BCA法测定蛋白水平。SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后，稳定电流270 mA在4℃90 min转移到硝酸纤维素膜上，放入5%封闭液中，室温摇床振荡2 h，单克隆鼠抗人磷酸化AKT (Ser473)(1:500)，或单克隆兔抗人AKT (1:1 000)以及内参GAPDH (1:5 000)的封闭液，赶尽气泡，用封口机封口，4℃过夜。PBST轻轻漂洗15 min×3次；将膜转入另一杂交袋中，加入荧光二抗，室温避光孵育1 h (1:3 000)，应用LI-COR Odyssey Infrared Imaging System扫描检测。得出的IOD值经内参GAPDH校正后进行统计学分析。

1.8 RT-PCR分析AKT激活对MMP-2、MMP-9、uPA、CXCR4和VEGF mRNA表达水平的影响

依据试剂盒步骤进行提取总RNA。引物由上海生工合成。AKT1上游引物为5'-TCT ATG GCG

CTG AGA TTG TG-3', 下游引物为5'- CTT AAT GTG CCC GTC CTT GT-3'(合成片段 112bp, 退火温度59℃); VEGF上游引物为5'-GC TCT ACC TCC ACC ATG CCA-3', 下游引物为5'-AGC TCA TCT CTC CTA TGT GC-3'(合成片段 320bp, 退火温度51.5℃); CXCR4上游引物为5'-TCT CGG TCC ACT CTT GTT-3', 下游引物为5'-GCC ACT CAG GAG GAT TAC-3'(合成片段362bp, 退火温度60℃); MMP-2上游引物为5'-CAT AGG ATG TGC CCT GGA AG-3', 下游引物为5'-TGG TCC TGG TTG TAG AAG GG-3'(合成片段 427bp, 退火温度58.5℃)。MMP-9上游引物为5'- GGA TGG GAA GTA CTG GCG ATT-3', 下游引物为5'-CAC TTG GTC CAC CTG GTT CAA-3'(合成片段543bp, 退火温度59℃)。uPA上游引物为5'-CGG AAT TCC AGC AAC GAA CTT-3', 下游引物为5'-GAT CCG CTA GCT TTC AGT CTG-3'(合成片段376bp, 退火温度55℃)。GAPDH上游引物为5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3', 下游引物为5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3' (合成片段 220bp, 退火温度50~60℃)。各样本PCR产物通过1.2%琼脂糖凝胶电泳后, 应用凝胶成像扫描及分析系统, 用各样本的目的基因条带灰度值与相应GAPDH条带灰度值相比, 求其比值。

1.9 统计学方法

应用SPSS11.5软件进行统计分析, 实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用Excel软件作图, 采用单因素方差分析及 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为有差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒对上皮性卵巢癌SKOV3细胞中AKT1 mRNA表达和蛋白激活水平的调节

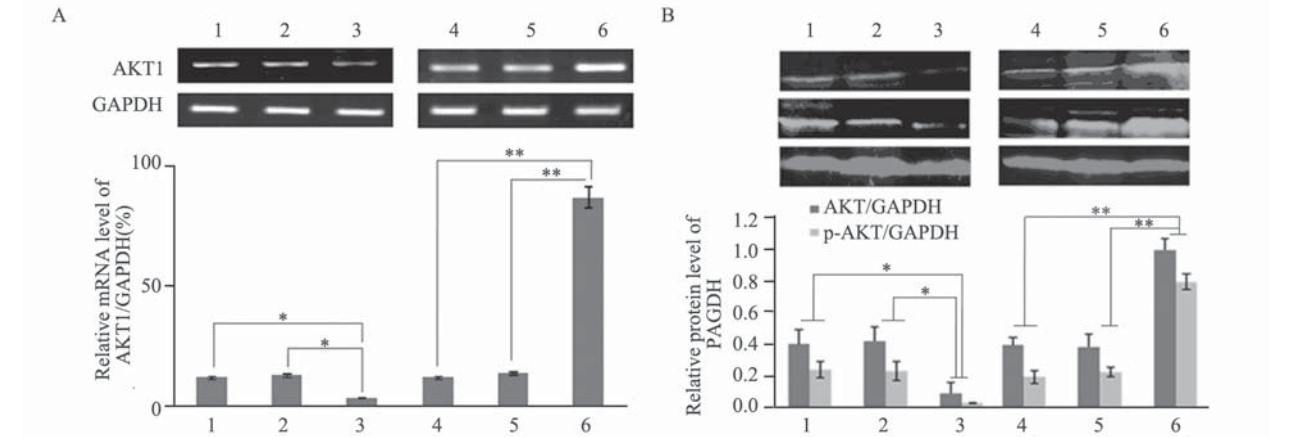
RT-PCR法检测转染前后AKT1 mRNA表达水平的变化, 分别以未转染组细胞和阴性对照组细胞为对照。外源性pEF-1 α -AKT可明显上调AKT1 mRNA转录水平; 而shRNA表达质粒可显著抑制AKT1mRNA表达, 差异有统计学意义($P=0.029$; $P=0.032$), 见图1A。Western blot检测转染前后AKT总蛋白和磷酸化AKT表达水平的变化与mRNA变化水平是一致的, 见图1B。

2.2 AKT基因对SKOV3细胞侵袭能力的影响

Transwell小室培养24 h, 上调AKT基因后SKOV3/pEF1- α -AKT细胞穿透Matrigel包被膜的细胞数(132.92 ± 7.32)显著多于SKOV3/pEF1- α 细胞(60.34 ± 5.23)和未转染SKOV3细胞(57.97 ± 6.73)的穿透数, 差异均有统计学意义($P=0.037$, $P=0.034$), 见图2A。相反, 下调AKT1基因Transwell小室培养24h, SKOV3/pRNAT-AKT1细胞穿透Matrigel包被膜的细胞数(20.21 ± 3.89)显著少于阴性对照SKOV3/Negative细胞(62.34 ± 4.23)和未转染SKOV3细胞(57.97 ± 6.73)的穿透数, 均有统计学意义($P=0.018$; $P=0.025$), 见图2B。

2.3 AKT基因对SKOV3细胞迁移能力的影响

划痕后培养24 h, 相对于未转染质的空白细胞组和和阴性对照细胞组, SKOV3/pEF1- α -AKT细胞明显向划痕处迁移; 划痕48 h, SKOV3/pEF1- α -AKT细胞的划痕基本修复, 见图3A。外源性AKT可促进SKOV3细胞的迁移。反之, 在划痕培养48



A:RT-PCR determined the transfective efficiency in SKOV3 cells on AKT1 mRNA level;B:Western blot determined the transfective efficiency in SKOV3 cells by detecting the activity of AKT;1: SKOV3 cells;2:SKOV3/Negative cells;3:SKOV3/pRNAT-AKT cells;4:SKOV3 cells;5:SKOV3/pEF-1 α cells;6:SKOV3/pEF-1 α -AKT cells;*: $P=0.029$, $P=0.032$,compared with control group and the negative control group, respectively, $n=3$ in each group;**: $P=0.0065$, $P=0.0049$ compared with control group and negative control group, respectively, $n=3$ in each group; take GAPDH as control

图1 RT-PCR、Western blot检测质粒转染前后SKOV3细胞中AKT1 mRNA、AKT总蛋白和磷酸化AKT表达水平
Figure1 RT-PCR and Western blot were used to determine transfective efficiency in SKOV3 cells by detecting the expression of AKT mRNA level and activity of AKT respectively

h时，SKOV3/pRNAT-AKT细胞的划痕明显宽于未转染SKOV3细胞和SKOV3/Negative细胞的划痕，从而提示AKT1基因干扰抑制SKOV3细胞迁移，见图3。

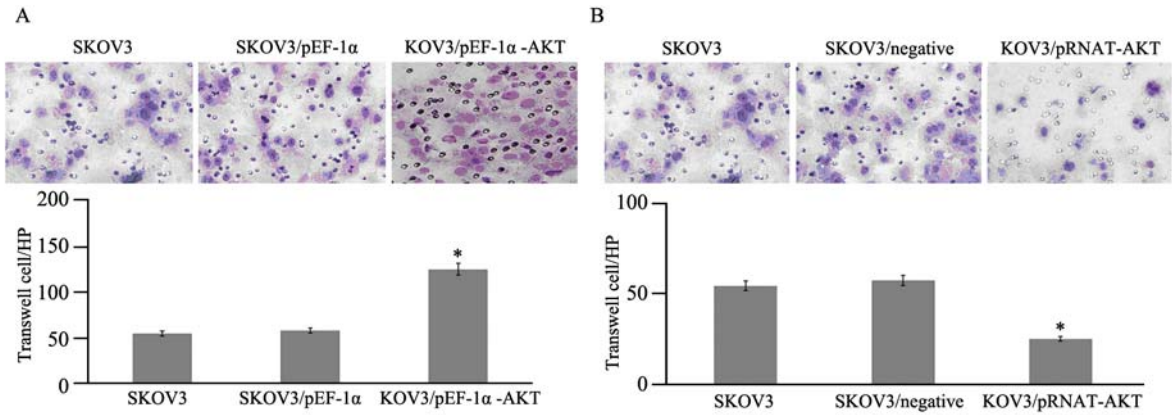
2.4 RT-PCR检测MMP-2、MMP-9、uPA、VEGF和CXCR4 mRNA的表达水平

为探讨可能的调控机制，RT-PCR分析侵袭及迁移相关分子变化。上调AKT可促进MMP-2、uPA、VEGF和CXCR4 mRNA表达，反之下调AKT则抑制MMP-2、uPA、VEGF和CXCR4 mRNA表达水平。但对MMP-9 mRNA表达水平的影响不明显，见图4。

3 讨论

本文通过构建AKT1表达质粒和AKT shRNA调控AKT的mRNA水平，发现相同培养条件下，相对于空白细胞组和阴性对照组，转染细胞组的AKT磷酸化水平发生了相应的调节。

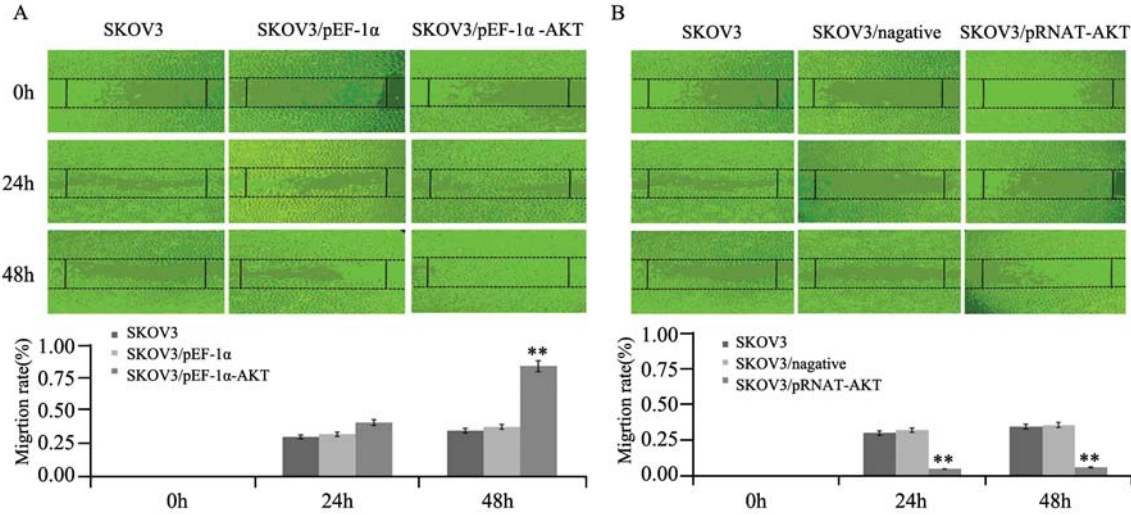
肿瘤细胞的侵袭和迁移能力是肿瘤细胞转移潜能的体现。Transwell-Matrigel法是用来检测细胞侵袭的量化分析模型。划痕实验粗略反映了细胞的迁移能力。本研究显示，shRNA干扰细胞后，细胞侵袭和迁移能力下降超过50%；反之，外源性AKT1转染SKOV3细胞后，细胞侵袭和迁移能力增强，从而说明AKT基因在卵巢癌中可调控细胞的侵袭和迁移能力，AKT基因磷酸化水平越高，则



A:Transwell assay showed upregulation AKT enhanced SKOV3 cells' invasion;B:Transwell assay showed AKT siRNA inhibited SKOV3 cells' invasion (hematoxylin-staining ×200,A *:P=0.037,P=0.034,compared with the control group and the negative control group, respectively,n=3 in each group;B*:P=0.018; P=0.025, compared with the control group and the negative control group, respectively,n=3 in each group

图2 Transwell小室检测质粒转染前后对SKOV3细胞侵袭能力的影响

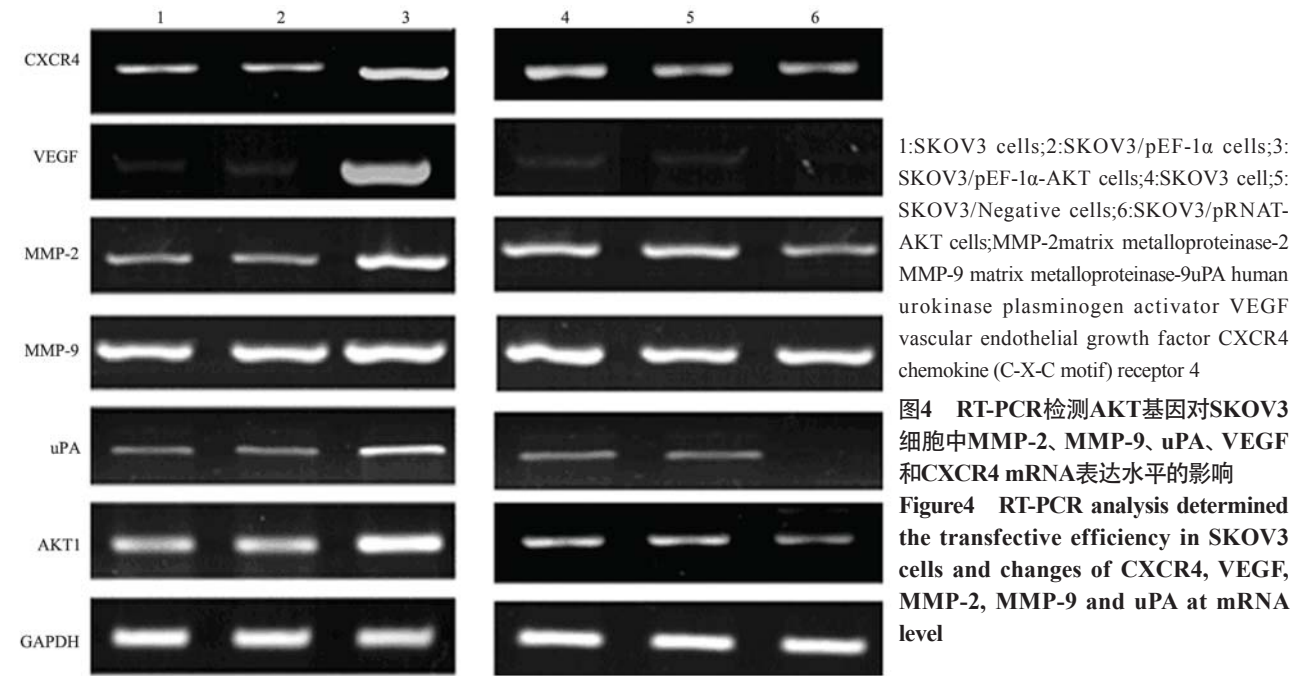
Figure2 Transwell assay detected the effect of AKT regulation on the invasion of SKOV3 cells



A:wound healing assay showed upregulation AKT increased cell migration rate in SKOV3 cells;B:wound healing assay showed downregulation AKT decreased cell migration rate in SKOV3 cells. A**:P=0.0061,P=0.0078, compared with the control group and the negative control group, respectively, n=3 in each group;B**:P=0.0053,P=0.0058,compared with the control group and the negative control group, respectively, n=3 in each group

图3 划痕实验检测AKT基因对SKOV3细胞迁移能力的影响

Figure3 Wound healing assay detected the effect of AKT regulation on the migration rate of SKOV3 cells



细胞越容易浸润周围组织乃至远处转移。

至于AKT基因对癌细胞侵袭和转移的调控机制，以往研究发现，PI3K/AKT信号通路可通过激活mTOR以及其下游核糖体蛋白p70S6K，促进肌动蛋白的细丝重构，促进细胞运动^[1]；AKT可上调NF-κB的转录活性，增加肿瘤细胞的引动功能，有助于癌细胞侵袭^[2]；PI3K/AKT信号通路可上调基质金属蛋白酶-2（MMP-2）^[3]、MMP-9^[4]mRNA和蛋白质表达，降解细胞外基质促进肿瘤细胞的转移。本研究采用RT-PCR法检测了一系列与侵袭或转移相关分子的mRNA水平变化，研究结果与以往的研究结果有不同之处。

MMPs和uPA被认定是对肿瘤细胞本身的增殖和生长所必不可少的，同时也是与肿瘤侵袭转移密切相关的两套系统。本研究显示，转染外源性AKT1的SKOV3细胞比阴性对照组细胞表达MMP-2和uPA的水平明显升高，但MMP-9未见显著增加；反之，shRNA靶向抑制AKT1基因显著下调MMP-2和uPA的表达水平，但MMP-9未见显著改变，提示AKT1基因可能通过调控MMP-2和uPA，影响其对基质的降解，从而调控肿瘤的侵袭和转移。尽管本研究显示，AKT对MMP-9的表达影响不明显，但不排除组织特异性的差异，今后将通过检测多种卵巢癌细胞株来进一步证实。

CXCR4是趋化因子SDF-1α配体^[5]。Hashimoto等^[6]研究认为SDF-1α/CXCR4轴异常是导致胃癌腹腔转移机制之一，阻断CXCR4不仅抑制细胞转移，同时抑制mTOR激活，诱导细胞自噬。本研究发现，AKT1基因亦可能通过调控VEGF、

CXCR4，影响各自信号传递，从而控制卵巢癌细胞的侵袭和转移，但具体的调控网络仍需进一步深入。

综上，AKT信号通路可能通过调控MMP-2、uPA、CXCR4、VEGF转录参与上皮性卵巢癌细胞的侵袭和转移。因此，靶向AKT可深入探讨恶性肿瘤的表型调控机制，为肿瘤治疗筛选有效靶位。

参考文献：

[1] Winbanks CE,Grimwood L,Gasser A, *et al.* Role of the phosphatidylinositol 3-kinase and mTOR pathways in the regulation of renal fibroblast function and differentiation[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2007,39(1):206-19.

[2] Shih YW, Chen PS, Wu CH, *et al.* Alpha-chaconine-reduced metastasis involves a PI3K/Akt signaling pathway with downregulation of NF-kappaB in human lung adenocarcinoma A549 cells[J]. *J Agric Food Chem*,2007,55(26):11035-43.

[3] Lee SJ,Seo KW,Yun MR, *et al.* 4-Hydroxynonenal enhances MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via mitochondrial ROS-mediated activation of the Akt/NF-kappaB signaling pathways[J]. *Free Radic Med*,2008,45(10):1487-92.

[4] Chen JS,Wang Q,Fu XH, *et al.* Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: association with MMP-9[J].*Hepatol Res*,2009,39(2):177-86.

[5] Wong D, Korz W. Translating an antagonist of chemokine receptor CXCR4: from bench to bedside[J]. *Clin Cancer Res*,2008,14(24):7975-80.

[6] Hashimoto I, Koizumi K, Tatematsu M, *et al.* Blocking on the CXCR4/mTOR signalling pathway induces the anti-metastatic properties and autophagic cell death in peritoneal disseminated gastric cancer cells[J]. *Eur J Cancer*,2008,44(7):1022-9.

[编辑：周永红；校对：邱颖慧]