

肿瘤错配修复基因 PMS2 及活化 Akt1 在不同卵巢癌细胞株中的表达及相关性

贾静辉,李春东,陈冰,李景轩,童英[△]

(中国人民解放军空军总医院妇产科,北京 100142)

[摘要] 目的 检测 Akt1、P-Akt S473 和 PMS2 蛋白在人类不同卵巢癌细胞株(A2780、Caov3、C13* 和 ES2)中的表达水平及相关性。方法 应用 Western blot 检测 Akt1、P-Akt S473 和 PMS2 蛋白分别于 A2780、Caov3、C13* 和 ES2 细胞中表达水平;应用 Akt1 激动剂胰岛素样生长因子-1(IGF-1)及 Akt1 特异性抑制剂 API-2 调节 Akt1 活化水平,观察 PMS2 蛋白表达水平变化。结果 Akt1、P-Akt S473 及 PMS2 3 种蛋白在 A2780、Caov3、C13* 和 ES2 卵巢癌细胞内均表达,但表达水平高低不一,即 Akt1 的活化形式 P-Akt S473 与 PMS2 蛋白表达呈负相关;应用 IGF-1 上调 Akt1 的活性后,ES2 和 Caov3 中 PMS2 表达水平明显下降,且与 IGF-1 的作用存在时间依赖性;应用特异性抑制剂 API-2 抑制 Akt1 的活性后,A2780 中 PMS2 表达水平明显升高,且与 API-2 的作用存在时间依赖性。结论 人类卵巢癌细胞中 PMS2 蛋白的表达水平可能受活化 Akt1 的直接调控。

[关键词] 卵巢肿瘤;蛋白激酶类;胰岛素样生长因子 1

[中图分类号] R737.31

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)09-1183-03

The expression and the relativity of PMS2 and P-Akt S473 in different human ovarian cancer cell lines

Jia Jinghui, Li Chundong, Chen Bing, Li Jingxuan, Tong Ying[△]

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the expression and the relativity of PMS2, Akt1 and P-Akt S473 protein in A2780, Caov3, C13* and ES2 ovarian cancer cell lines. **Methods** The expression of PMS2, Akt1 and P-Akt S473 protein in A2780, Caov3, C13* and ES2 ovarian cancer cells was detected by Western Blot. After treated with IGF-1 (Akt1 activator) and API-2 (specific Akt1 inhibitor), Caov3, ES2 and A2780 cells were collected and the level of PMS2 was detected by Western Blot. **Results** PMS2, Akt1 and P-Akt S473 proteins were detected in all of the four ovarian cancer cell lines with varied expression levels, and the activity of Akt1 was inversely related to PMS2 expression in ovarian cancer cells. Exposed to Akt kinase stimulator IGF-1, ES2 and Caov3 cells were detected with a dramatically PMS2 decreasing. Meanwhile, the decreasing of PMS2 protein was time-dependent on IGF-1. Treated with API-2, Akt kinase specific inhibitor, A2780 was detected with PMS2 dramatically increasing, and the increasing of PMS2 protein was time-dependent on API-2. **Conclusion** In ovarian cancer cells, PMS2 expression could be directly regulated by activated Akt1.

[Key words] ovarian neoplasms; protein kinases; insulin-like growth factor 1

Akt1 又称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 是一种丝/苏氨酸蛋白激酶, 它是细胞生存信号通路 PI3K/Akt 的枢纽分子, Akt1 活化后可通过磷酸化作用, 活化其下游生长因子及其旁路分子, 从而抑制细胞凋亡、促进细胞周期、促使细胞侵袭和转移, 促进血管生成等生物学效应。Akt1 存在两个磷酸化位点 Thr308 和 Ser473, 只有当 Ser473 活化后 Akt1 才能完全活化, Akt1 通过磷酸化下游靶分子中保守序列 RXXRXXS/TB (X: 任意氨基酸; R: 精氨酸; B: 疏水氨基酸) 发挥其生物学效应^[1]。

PMS2 是 MMRs 蛋白家族中的重要一员, 它在保持基因组稳定性中起至关重要的作用。PMS2 基因突变或表达缺失与 HNPCC 及 15% 的实体肿瘤发生、发展密切相关^[2]。然而有关 PMS2 与肿瘤相关性报道不尽相同, 有研究证实: 前列腺癌中 PMS2 表达异常增高^[3]。因此, 研究 PMS2 蛋白的表达调控及稳定性, 可能成为新的肿瘤防治靶点。应用 DNAmanta 软件分析发现: PMS2 蛋白中存在 Akt1 识别及磷酸化的共有

基因序列 YPRPRGT₁56TVSV。因此推测 Akt1 可能通过活化共有序列中 T₁56 位点调控 PMS2 蛋白的表达及其稳定性。

本研究通过 Western blot 技术检测不同人类卵巢癌细胞株中 Akt1、P-Akt S473 和 PMS2 蛋白的表达水平; 应用 Akt1 激动剂和 Akt1 特异的抑制剂调节其活化水平, 检测 PMS2 的蛋白表达变化情况。初步探讨 PMS2 蛋白与活化 Akt1 的关系, 为进一步研究活化的 Akt1 与 PMS2 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 将 A2780、Caov3、C13* 和 ES2 卵巢癌细胞株于 10% 胎牛血清 RPMI-1640 中培养, 每 2 天传代 1 次, 选择生长状态好的细胞进行试验。

1.2 Western blot 检测 PMS2、Akt1 和 P-Akt S473 的表达 各组细胞中加 RIPA, 超声裂解, BCA 法检测蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转膜于 PVDF 膜, 室温封闭 1 h, 加入 Akt1 抗体 (CST)、P-Akt S473 抗体 (CST)、PMS2 抗体 (Epito-

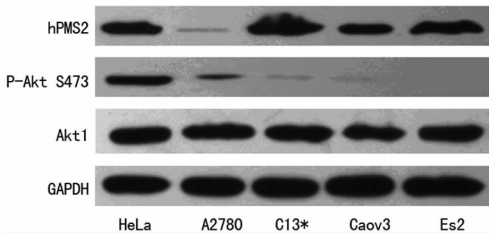
mics)、GAPDH 抗体(CST),稀释度均为 1 : 1 000,4 °C 过夜,加二抗(稀释度 1 : 5 000)室温孵育 1 h,曝光,利用 Quantity-one 软件进行分析,本试验重复 3 次。

1.3 Akt1 活性上调 选取已验证低 Akt1 活化状态的 ES2 及 Caov3 卵巢癌细胞,于无血清培养基中饥饿过夜;应用 Akt1 活化剂胰岛素样生长因子-1(IGF-1,100 ng/mL)刺激细胞^[4-6],观察 Akt1 的活化是否与 IGF-1 作用存在时间依赖性。

1.4 Akt1 活性下调 选取已验证高 Akt1 活化的 A2780 卵巢癌细胞,于无血清培养基中饥饿过夜;应用 Akt1 特异抑制剂 API-2 4 μM 抑制其活性,观察 Akt1 活性抑制是否与 API-2 存在时间依赖性。

2 结 果

2.1 Western blot 检测不同卵巢癌细胞株中 Akt1、P-Akt S473 和 PMS2 的表达情况 P-Akt S473 在卵巢癌细胞株 ES2 中表达缺失(图 1)。PMS2、Akt1 和 P-Akt S473 蛋白在 A2780、Caov3 及 C13* 细胞株中均表达,且表达水平不一。如图 1 示,C13*、Caov3、ES2 细胞株中 P-Akt S473 表达处于低水平,与此同时 PMS2 蛋白高水平表达;A2780 细胞株中,P-Akt S473 蛋白表达明显增高,但伴随 PMS2 蛋白的低表达。因相关报道证实,HeLa 宫颈癌细胞株中既无 MMR 蛋白表达缺失^[7],又无 Akt1 蛋白异常活化^[8],故本试验中将其作为阳性对照。综上所述,在不同的卵巢癌细胞株中,P-Akt S473 蛋白高表达对应 PMS2 蛋白低表达,Akt1 低活化水平对应 PMS2 蛋白高表达。卵巢癌细胞株中 Akt1 的活化形式 P-Akt S473 蛋白与 PMS2 蛋白表达水平呈负相关。



GAPDH:内参照,HeLa:阳性对照。

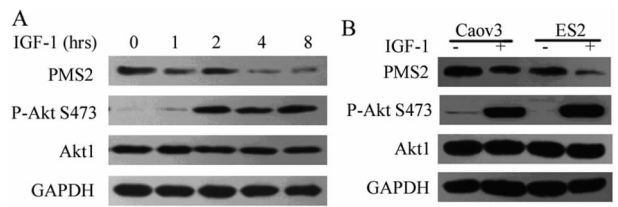
图 1 Western Blot 检测卵巢癌细胞中 PMS2、Akt1 和 P-Akt S473 蛋白的表达水平

2.2 Western Blot 检测不同卵巢癌细胞中 Akt1 活化与 PMS2 蛋白表达的关系

2.2.1 激活 Akt1 后卵巢癌细胞中 PMS2 蛋白表达水平 为进一步检验 Akt1 的活性是否与其下游 PMS2 蛋白表达相关,应用 Akt1 激动剂 IGF-1 上调 Akt1 蛋白激酶活性,检测卵巢癌细胞株中 PMS2 蛋白表达情况。试验结果表明:应用 100 ng/mL IGF-1 作用于卵巢癌细胞 ES2 和 Caov3 后活化 Akt1 蛋白的表达水平明显增高,且与 IGF-1 作用呈时间依赖性;活化的 Akt1 表达上调卵巢癌细胞株中 PMS2 的蛋白表达水平明显下降,且亦存在时间依赖性,结果见图 2。

2.2.2 抑制 Akt1 活性后卵巢癌细胞中 PMS2 蛋白表达水平 为进一步检测抑制卵巢癌细胞中 Akt1 活性后 PMS2 蛋白表达变化情况,应用 Akt1 特异抑制剂 API-2 作用于卵巢癌细胞 A2780 不同时间,如图 3 示:API-2 可使卵巢癌细胞 A2780 中 P-Akt S473 的表达明显下调,且存在时间依赖性;在卵巢癌细胞 A2780 中 API-2 作用 48 h 对 Akt1 活性抑制最明显,

PMS2 蛋白表达达峰值。



A:在 PMS2 高表达的 ES2 细胞株中,IGF-1 上调 P-AktS473 表达水平,且呈时间依赖性;Akt1 活化后 PMS2 蛋白的表达明显下降,亦存在时间依赖性。B:Caov3 与 ES2 细胞中 IGF-1 上调 Akt1 活性后 PMS2 蛋白表达水平明显下调。

图 2 不同卵巢癌细胞株中活化 Akt1 后 PMS2 的蛋白表达水平

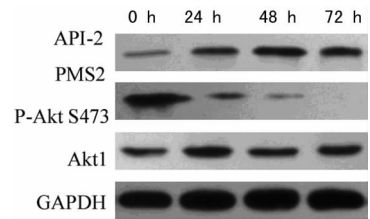


图 3 Western Blot 检测卵巢癌细胞中 PMS2 的表达

3 讨 论

肿瘤的发生、发展有明显的遗传倾向及相关性。DNA 错配修复即 MMR 系统,它是生物进化过程中演化出一种高度保守的错配修复系统。MMR 不仅能够识别和修复 DNA 重组和复制过程中的单个碱基错配,还可矫正小片段 DNA 聚合酶链的插入和缺失(IDLs),以保持整个基因组的稳定性及高度保真性;MMR 亦可通过诱导细胞凋亡抑制细胞癌变^[9]。人类对 MMR 的认识源于对 Ecoli 的研究^[10],且 MMR 的缺失与人类多种肿瘤的发生密切相关,如:宫颈癌、乳腺癌、儿童肿瘤综合征、Turcot 综合征^[11-14]等。

在对散发性结直肠癌的研究中首次发现人类肿瘤错配修复基因,目前 MMR 家族公认有 MutS 同源物 hMSH2~hMSH6 及 MutL 的同源物 hMLH1、hMLH3、hPMS1 和 hPMS2。只有当错配识别复合物 MutSα(hMSH2-hMSH6)和(或)MutSβ(hMSH2-hMSH3)与 DNA 序列上错配位点结合后,使得 ATP 依赖水解酶构象发生改变,复合物 MutLα(MLH1-PMS2)与 MutSα 或 MutSβ 结合,才能激活 MMR 系统,从而发挥其基因错配修复功能^[15-16]。以往经典研究发现,MMRs 绝大部分突变发生在 MLH1、MSH2 和 MSH6,发生于 PMS1 和 PMS2 少见。随着研究深入,PMS2 在人类肿瘤中的作用日益受关注,与其他错配修复蛋白不同,PMS2 具有高度不稳定性,在人类多种肿瘤中表达缺失或功能缺失^[17]。本试验发现,在卵巢癌细胞株 A2780、Caov3、ES2 和 C13* 中 PMS2 均有表达,但在 A2780 中 PMS2 表达水平极低,伴随高活化水平的 Akt1,即 PMS2 的表达水平与活化的 Akt1 呈负相关。

Akt1 是细胞生存通路 PI3K/Akt 的枢纽分子,广泛存在于哺乳动物各组织中,参与细胞的生长、增殖及凋亡^[18-19]。通常情况下,Akt1 处于非激活状态,只有它被上游激酶磷酸化完全活化后,磷酸化下游靶分子中保守序列,从而发挥其生物学效应。Akt1 异常活化与多种恶性肿瘤的发生、发展和转归关

系密切。在人类卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、骨髓瘤、直肠癌及肾细胞癌中 Akt1 异常活化;应用抑制剂抑制 Akt1 磷酸化水平后,明显抑制以上肿瘤的生长^[20-23]。

大量研究证实,已知 Akt1 下游靶分子,如 GSK3、FKHRL1、BAD 及 BRCA1 等,均含有其磷酸化的保守序列 RXXXS/TB^[4,24]。本研究前期实验发现,PMS2 蛋白中存在 YPRPRGT₁56TVSV 共有基序,这一结果提示蛋白 PMS2 可能被活化的 Akt1 磷酸化,影响稳定性,进而影响其生物学功能。本研究发现,不同卵巢癌细胞株中蛋白 PMS2 及活化 Akt1 表达水平呈负相关,提示 PMS2 蛋白的表达水平可能受活化 Akt1 的直接调控,PMS2 可能为 PI3K/Akt 信号通路下游新的靶分子,为人类卵巢癌的治疗寻找新靶点奠定基础。

参考文献

- [1] Alessi DR, Caudwell FB, Andjelkovic M, et al. Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase [J]. *Febs Lett*, 1996, 399(3): 333-338.
- [2] Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance[J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(1): 1-6.
- [3] Norris RD, Woodruff RB, D'Agostino RB, et al. Elevated levels of the mismatch repair protein PMS2 are associated with prostate cancer[J]. *Prostate*, 2007, 67(2): 214-225.
- [4] Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts[J]. *Genes Dev*, 1999, 13(22): 2905-2927.
- [5] Yang L, Dan HC, Sun M, et al. Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells over-expressing Akt[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(13): 4394-4399.
- [6] Hu Y, Qiao L, Wang S, et al. 3-(Hydroxymethyl)-bearing phosphatidylinositol ether lipid analogues and carbonate surrogates block PI3-K, Akt, and cancer cell growth[J]. *J Med Chem*, 2000, 43(16): 3045-3051.
- [7] Boyer JC, Umar A, Risinger JI, et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(24): 6063-6070.
- [8] Su CH, Wang CY, Lan KH, et al. Akt phosphorylation at Thr308 and Ser473 is required for CHIP-mediated ubiquitination of the kinase [J]. *Cell Signal*, 2011, 23(11): 1824-1830.
- [9] Fishel R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer; revising the mutation hypothesis[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(20): 7369-7374.
- [10] Modrich P. Mismatch repair, genetic stability, and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5193): 1959-1960.
- [11] Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients[J]. *Nat Med*, 1996, 2(2): 169-174.
- [12] Tan TY, Orme LM, Lynch E, et al. Biallelic PMS2 mutations and a distinctive childhood cancer syndrome [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2008, 30(3): 254-257.
- [13] Miyaki M, Nishio J, Konishi M, et al. Drastic genetic instability of tumors and normal tissues in Turcot syndrome [J]. *Oncogene*, 1997, 15(23): 2877-2881.
- [14] De Rosa M, Fasano C, Panariello L, et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene [J]. *Oncogene*, 2000, 19(13): 1719-1723.
- [15] Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology [J]. *Annu Rev Biochem*, 1996(65): 101-133.
- [16] Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2004, 3(8/9): 1091-1101.
- [17] Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, et al. Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(24): 18424-18431.
- [18] Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, et al. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(17): 2203-2208.
- [19] Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, et al. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(42): 38349-38352.
- [20] Numahata K, Satoh M, Handa K, et al. Sialosyl-Le(x) expression defines invasive and metastatic properties of bladder carcinoma [J]. *Cancer*, 2002, 94(3): 673-685.
- [21] Marsh Rde W, Rocha Lima CM, Levy DE, et al. A phase II trial of perifosine in locally advanced, unresectable, or metastatic pancreatic adenocarcinoma [J]. *Am J Clin Oncol*, 2007, 30(1): 26-31.
- [22] Cirstea D, Hideshima T, Rodig S, et al. Dual inhibition of akt/mammalian target of rapamycin pathway by nanoparticle albumin-bound-rapamycin and perifosine induces antitumor activity in multiple myeloma [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(4): 963-975.
- [23] Floryk D, Thompson TC. Perifosine induces differentiation and cell death in prostate cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2008, 266(2): 216-226.
- [24] Pearce LR, Komander D, Alessi DR. The nuts and bolts of AGC protein kinases [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(1): 9-22.