

E-cadherin 表达下调致 GSK-3β 磷酸化失活的分子机制研究

马修平,张 海,汪亦品,张 丽,马 娟,彭 韬,冷 静*

(南京医科大学肿瘤中心,病理学系,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 E-cadherin 表达下调在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)中诱导 GSK-3β 磷酸化失活信号通路的调控机制。方法:运用 RNA 干扰技术建立 E-cadherin 表达缺失的稳定细胞株。Western blot 实验检测稳定株细胞(HepG2-E-cadherin-shRNA)E-cadherin 的表达水平以及 GSK-3β 与 Akt 的磷酸化水平;用 10 μmol/L PI3K 抑制剂(LY294002)处理 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞,Western blot 检测细胞 GSK-3β 磷酸化水平,RT-PCR 检测 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞 PTEN 和 Egr-1 的 mRNA 水平,Western blot 检测细胞 PTEN 的蛋白表达水平。结果:Western blot 实验结果表明,HepG2-E-cadherin-shRNA 稳定株细胞 E-cadherin 表达水平较空白对照组下调约 82.54%,GSK-3β 磷酸化水平较空白对照组上升约 298.93%,Akt 磷酸化水平较空白对照组上升约 218.98%;LY294002 作用 4 h 后,GSK-3β 磷酸化水平与空白对照组相比下降至 48.13%;RT-PCR 结果显示,下调 HepG2 细胞 E-cadherin 表达水平后,细胞 PTEN 的 mRNA 水平下降至 76.14%,Egr-1 的 mRNA 水平下降至 66.89%,PTEN 的蛋白表达水平下降至 53.77%。结论:人 HCC 细胞中 E-cadherin 抑制性表达导致细胞内 GSK-3β 磷酸化失活很可能是通过 PI3K/Akt 的信号通路实现的。

[关键词] E-钙黏蛋白;肝细胞肝癌;Akt 信号转导通路;糖原合酶激酶 3β;PTEN

[中图分类号] R730.231

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)07-896-07

Down-regulation of E-cadherin upregulates the phosphorylation level of GSK-3β in human hepatoma cells

MA Xiu-ping,ZHANG Hai,WANG Yi-pin,ZHANG Li,MA Juan,PENG Tao,LENG Jing*

(Cancer center,Department of Pathology,NJMU,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:**To explore the molecular regulatory mechanism of down-regulation of E-cadherin inducing GSK-3β phosphorylation deactivation in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:**The stable cell line without E-cadherin expression was constructed by RNA interference method. The expression levels of E-cadherin,Akt,p-Akt,GSK-3β and p-GSK-3β were examined by Western blot analysis;The expression levels of p-GSK-3β in HepG2-E-cadherin-shRNA stable cell line were examined by Western blot analysis after 10 μmol/L LY294002 (PI3K inhibitors) treatment;The mRNA level of Egr-1 and PTEN in HepG2-E-cadherin-shRNA cells were tested by RT-PCR;The expression of PTEN was also examined by Western blot analysis. **Results:** Compared with the blank,E-cadherin expression level down-regulated 82.54%,and the phosphorylation level of GSK-3β and Akt upregulated 298.93% and 218.98%,respectively. With the stimulation of PI3K inhibitor (LY294002),the phosphorylation level of GSK-3β down-regulated to 48.13% when compared with the blank. The mRNA level of PTEN dropped to 76.14%,and Egr-1 to 66.89% when compared with the blank. The expression of PTEN protein also down-regulated to 53.77% when compared with the blank. **Conclusion:**Down-regulation of E-cadherin deactivated GSK-3β via PI3K/Akt signaling in HCC cells.

[Key words] E-cadherin;hepatocellular carcinoma;Akt signaling pathway;GSK-3β;PTEN

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(7): 896-902]

E-钙黏蛋白(E-cadherin)是 Cadherin 家族的组
员之一,其主要功能为参与细胞间黏附,调节细胞

外增殖相关信号,与细胞侵袭和转移相关^[1]。目前研
究表明,肿瘤边缘的单个侵袭性细胞中 E-cadherin
表达水平明显降低^[2],在乳腺癌细胞中,抑制 E-cad-
herin 的表达,可以使肿瘤细胞的侵袭迁移能力得到
增强^[3]。

[基金项目] 国家自然科学基金(30871015,81172003)

*通讯作者,E-mail:lengjing@njmu.edu.cn

糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK-3 β)是一种可磷酸化抑制糖原合成的蛋白激酶,是糖原合成的关键调控酶。GSK-3 β 是 PI3K/Akt^[4]和 Wnt/ β -catenin^[5]细胞信号通路的关键组成部分,参与细胞黏附功能调节、细胞分化与增殖、细胞凋亡等^[6-7]。GSK-3 β 参与了多种肿瘤的进程,在肿瘤细胞的信号转导通路中发挥了重要作用。

本课题前期实验证实,在人肝癌细胞 HepG2 中下调 E-cadherin 的表达水平,细胞浆内磷酸化失活的 GSK-3 β 水平会显著上升。但肝癌细胞中 E-cadherin 表达下调致 GSK-3 β 活性降低的相互调控关系目前尚不明确。

本研究拟运用 RNA 干扰技术建立 E-cadherin 表达缺失的稳定细胞株,检测其 E-cadherin 表达水平以及细胞的 Akt 与 GSK-3 β 磷酸化水平;并运用 PI3K 抑制剂处理稳定细胞株,检测 GSK-3 β 磷酸化水平;以证实在 HepG2 细胞中 E-cadherin 表达下调可能通过激活 PI3K/Akt 信号转导通路使得 GSK-3 β 失活,并初步探讨其分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞株 HepG2 细胞(美国 American Type Culture Collection 公司),DMEM 高糖培养基(美国 Invitrogen 公司),无支原体胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司),PI3K 拮抗剂 LY294002^[8]、PKA 抑制剂 H89、Erk 抑制剂 PD98059(美国 Cayman Chemical 公司),兔抗人 E-cadherin、兔抗人磷酸化 GSK-3 β (Ser9)、兔抗人磷酸化 Akt (Thr308)、鼠抗人磷酸肌醇磷酸酶(PTEN)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),鼠抗人 GSK-3 β 抗体(美国 BD Biosciences 公司),鼠抗人 AKT1 抗体(美国 SAB 公司),鼠抗人磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogease, GAPDH)(上海康成生物工程公司),抗 β -actin 的多抗及二抗(美国 Santa Cruz 公司),TRITC-羊抗兔、TRITC-羊抗鼠抗体(杭州联科生物),嘌呤霉素(美国 Sigma-Aldrich 公司)。RNA 提取试剂盒 Rneasy mini kit(美国 Qiagen 公司),RT 试剂盒、DNA 质粒抽提试剂盒(日本 Takara 公司),重组质粒 pLKO.1 empty 和 pLKO.1 shRNA E-cadherin plasmid^[9-10](美国 Whitehead 研究所 Robert A. Weinberg 博士馈赠),pCMV-delta8.91 packaging plasmid 和 pCMV-VSVG envelope plasmid(南京医科大学李建民博士馈赠)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人肝癌细胞 HepG2 于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中常规培养,取生长良好、对数生长期的细胞用于实验。HepG2-empty 细胞和 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞,均用含有 2 μ g/ml 嘌呤霉素和 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基维持培养。

1.2.2 慢病毒感染及药物处理实验

取对数生长期的 HepG2 细胞 2×10^5 个,接种于 100 mm \times 20 mm 细胞培养皿中,待细胞贴壁生长至密度约为 30%时,取病毒滴度 1×10^8 UT/ml 以上的 pLKO.1 E-cadherin shRNA 慢病毒载体和 Polybrene 8 μ g/ml 进行细胞感染,以 pLKO.1 empty 空白慢病毒载体作为内参,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养 72 h,2.0 μ g/ml 嘌呤霉素筛选出稳定细胞株。以 pLKO.1 empty 空白慢病毒载体感染 HepG2 获得的稳定细胞称为 HepG2-empty 细胞株;以 pLKO.1 E-cadherin shRNA 慢病毒载体感染 HepG2 获得的稳定细胞称为 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞株;筛选成功后,提取细胞总蛋白,同时取 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞接种 6 孔板,每孔接种 2×10^5 个细胞,分别给予 10 μ mol/L LY294002、10 μ mol/L H89、5 μ mol/L PD98059 处理,分别处理后 4、8、12、16 和 24 h,提取细胞总蛋白,以上实验均重复 3 次以上。

1.2.3 Western blot 检测实验

收集常规培养细胞、慢病毒感染稳定株细胞和不同药物处理后的细胞,加适量细胞裂解液,高速离心分离细胞上清液并测定蛋白浓度,以 DMSO 组为对照,进行 E-cadherin、GSK-3 β 、Akt 和 PTEN 等免疫印迹实验分析。定量蛋白上样后行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜封闭后加一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBST 洗涤后,加二抗孵育 2 h,洗涤后 ECL 显色,暗室 X 线胶片曝光,调整曝光时间直至最佳条带。对各组条带进行计值及统计分析。以上实验均重复 3 次以上。

1.2.4 RT-PCR

以 HepG2-empty 细胞为对照, HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞为实验组,每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁生长至密度约为 70%时,按 RNA 提取试剂盒 Rneasy mini kit 说明书进行操作。取少量 RNA 进行琼脂糖电泳分析,同时用 Gene Quant 测定 RNA 的浓度和纯度。取 0.5 μ g 总 RNA 进行反转录(反应体系为 10 μ l)。引物序列如

下,PTEN引物上游:5'-CCGTTACCTGTGTGTGGT-GATATC-3',下游:5'-GAATGTATTTACCCAAAAGT-GAAACATT-3',目的片段长183 bp;早期生长响应因子1(Egr-1)引物上游:5'-AGCAGCACCTTCAAC-CCTCA-3',下游:5'-CAGC-ACCTTCTCGTTGTTCA-GA-3',目的片段长140 bp;GAPDH引物上游:5'-TTCCAGGAGCGAGATCCCT-3',下游5'-CACCCAT-GACGAACATGGG-3',目的片段长175 bp。取4 μ l cDNA,上、下游引物各1 μ l,dNTP 2 μ l,rTaq酶1 μ l等进行PCR(20 μ l反应体系)。以上实验均重复3次以上。

1.3 统计学方法

采用SPSS10.0统计软件进行数据分析,所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验数据分析采用成组 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

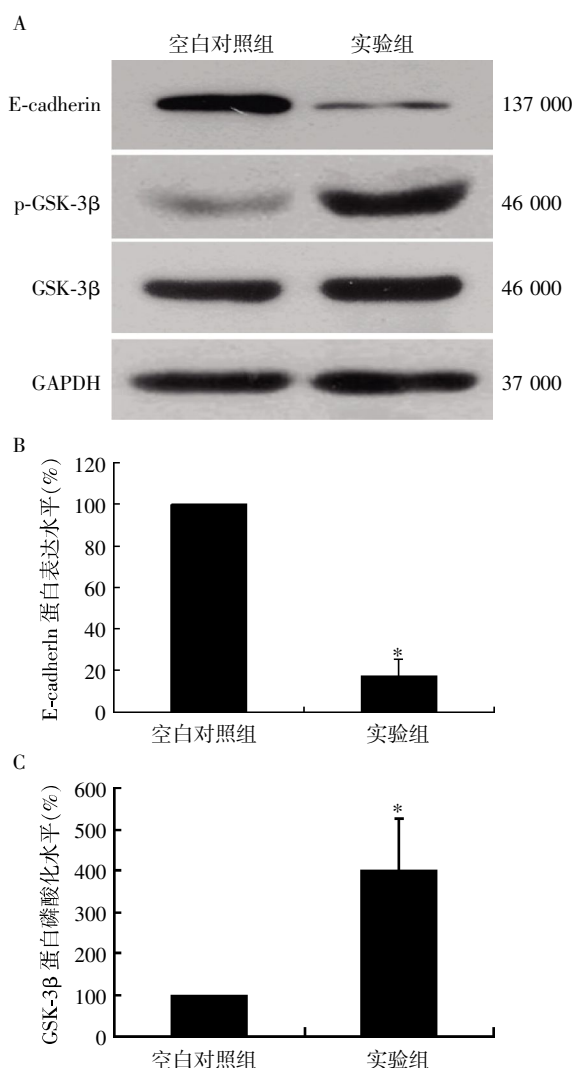
2 结果

2.1 下调 HepG2 细胞 E-cadherin 表达水平,导致细胞内 GSK-3 β 磷酸化水平显著增高

以 HepG2-empty 细胞为空白对照组,HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞为实验组,常规培养细胞后提取细胞总蛋白,Western blot 实验分别检测细胞 E-cadherin、GSK-3 β 和 GAPDH 的表达水平以及 GSK-3 β 磷酸化(p-GSK-3 β ^{Ser9})水平,结果分析为 HepG2-E-cadherin-shRNA 稳定株细胞 E-cadherin 表达水平较 HepG2-empty 空白对照组下调约 82.54% ($P < 0.01$),且 GSK-3 β 磷酸化水平(p-GSK-3 β ^{Ser9})较空白对照组上升约 298.93% ($P < 0.01$,图1)。结果显示:pLKO.1 shRNA E-cadherin 载体具有高效的 RNA 干扰作用,且在 HepG2 细胞 E-cadherin 表达抑制时,细胞内 GSK-3 β 被高效磷酸化而失活。

2.2 HepG2 细胞 E-cadherin 表达下调可能通过 PI3K/Akt 信号转导通路致细胞内 GSK-3 β 功能失活

为了进一步分析 E-cadherin 表达下调导致 GSK-3 β 失活的机制,采用 10 μ mol/L 外源性 PI3K 抑制剂 LY294002 处理 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞,检测时间为处理后 4、8、12、16、24 h;以 DMSO 作为空白对照。Western blot 结果显示 LY294002 作用后,GSK-3 β 磷酸化(p-GSK-3 β ^{Ser9})水平较空白对照组分别下降至 48.13%、55.56%、57.92%、55.17% 和 56.77% (P 均 < 0.01 ,图2)。同时采用 10 μ mol/L PKA 抑制剂 H89 与 5 μ mol/L Erk 抑制剂 PD98059 分别以相同方法处理细胞,Western blot 结果显示 H89 与 PD98059 分别作用后,与空白对照组相比处

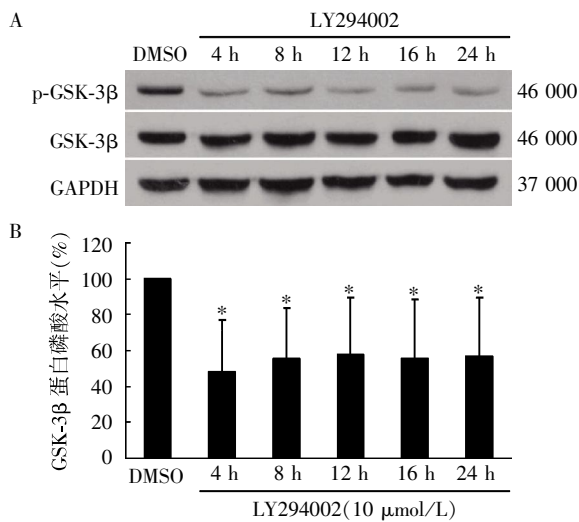


空白对照组为 HepG2-empty 稳定株细胞,实验组为 HepG2-E-cadherin-shRNA 稳定株细胞。A:Western blot 实验结果显示细胞 E-cadherin 表达水平降低,GSK-3 β 磷酸化水平(p-GSK-3 β ^{Ser9})明显升高;B:经 Image J 软件分析,E-cadherin 表达水平较空白对照组下降了 82.54%;C:经 Image J 软件分析,GSK-3 β 磷酸化水平(p-GSK-3 β ^{Ser9})较空白对照组上升了 298.93%。与空白对照组相比,* $P < 0.01$ ($n > 3$)。图1 pLKO.1 载体 HepG2 稳定株细胞的效率检测及细胞内 GSK-3 β 活性检测

Figure 1 Expression of E-cadherin and activity of GSK-3 β in HepG2 cells infected by pLKO.1 shRNA E-cadherin plasmid

理组 GSK-3 β 磷酸化(p-GSK-3 β ^{Ser9})水平的变化差异无统计学意义。

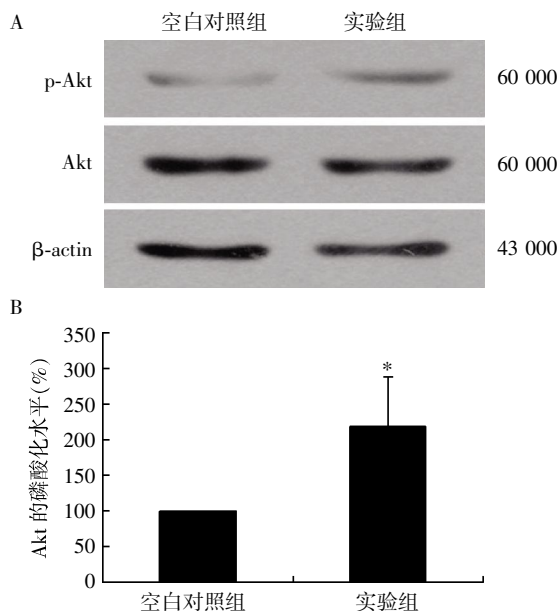
同时以 HepG2-empty 细胞为空白对照组,HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞为实验组,常规培养细胞并提取细胞总蛋白,Western blot 实验分别检测细胞 Akt 的表达水平以及磷酸化(p-Akt^{Thr308})水平,Western blot 结果显示 Akt 磷酸化(p-Akt^{Thr308})水平较空白对照组上升了 218.98% ($P < 0.01$,图3)。



采用 10 μ mol/L 外源性 PI3K 抑制剂 LY294002 处理 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞,处理组 4、8、12、16 和 24 h 检测;以 DMSO 为空白对照。A: Western blot 结果显示,LY294002 作用后,GSK-3 β 磷酸化(p-GSK-3 β ^{Ser})水平较空白对照组降低;B:经 Image J 软件分析,LY294002 处理后 p-GSK-3 β ^{Ser} 表达水平较空白对照组分别下降至 48.13%、55.56%、57.92%、55.17%和 56.77%。与 DMSO 组相比,* $P < 0.01$ ($n > 3$)。

图 2 HepG2 细胞 E-cadherin 抑制性表达通过 PI3K/Akt 信号转导通路致细胞内 GSK-3 β 功能失活

Figure 2 Down-regulation of E-cadherin inhibits the activity of GSK-3 β via PI3K/Akt signaling in HepG2 cells



以 HepG2-empty 细胞为空白对照组,HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞为实验组;A:Western blot 结果;B:经 Image J 软件分析,实验组 Akt 磷酸化(p-Akt^{Thr308})水平较空白对照组上升了 218.98%。与空白对照组相比,* $P < 0.01$ ($n > 3$)。

图 3 HepG2 细胞 E-cadherin 抑制性表达上调了细胞内 Akt 活性

Figure 3 Down-regulation of E-cadherin upregulates the phosphorylation level of Akt in HepG2 cells

2.3 E-cadherin 表达下调可降低 PTEN 的 mRNA 水平和蛋白表达水平

上述实验结果表明 E-cadherin 表达下调可能通过激活 Akt 通路使 GSK-3 β 失活。为了进一步分析 E-cadherin 激活 Akt 的机制,本实验进一步从 Akt 上游入手,研究 PTEN 在蛋白表达水平和 mRNA 水平的表达情况。以 HepG2-empty 细胞为空白对照组,HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞为实验组;常规进行 RT-PCR,琼脂糖凝胶电泳结果显示,下调 HepG2 细胞 E-cadherin 表达水平后,细胞 PTEN 的 mRNA 水平下降至 76.14%($P < 0.01$,图 4A、B)。常规提取细胞总蛋白,Western blot 实验结果显示,下调 HepG2 细胞 E-cadherin 表达水平后,细胞 PTEN 的表达水平下降至 53.77%($P < 0.01$,图 4C、D)。

2.4 E-cadherin 表达抑制可降低 Egr-1 的 mRNA 水平

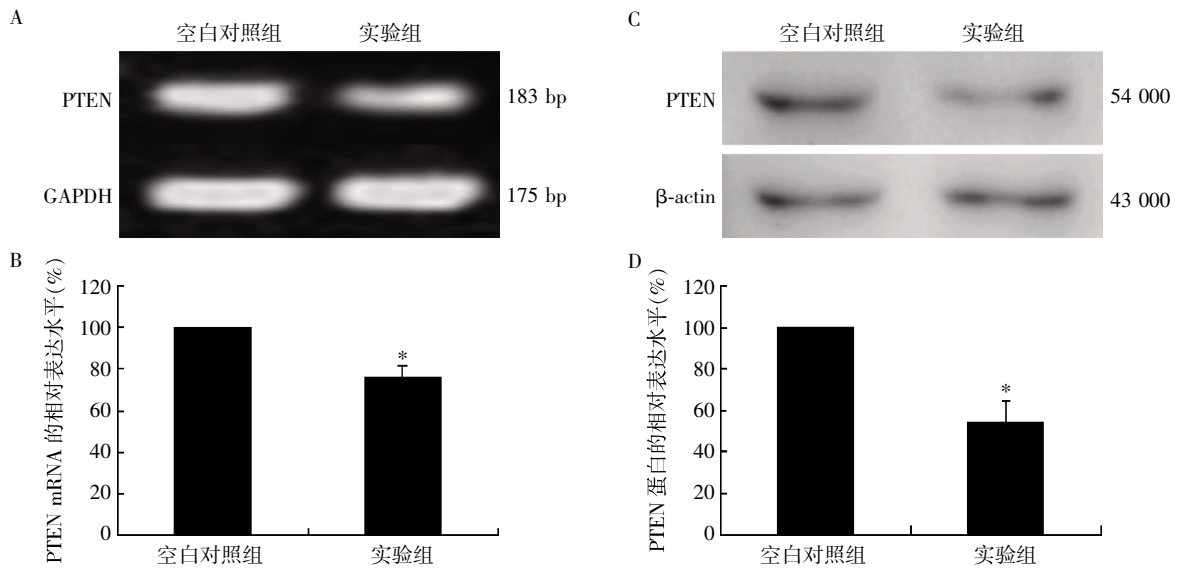
以 HepG2-empty 稳定株细胞为空白对照组,HepG2-E-cadherin-shRNA 稳定株细胞为实验组,常规进行 RT-PCR。琼脂糖凝胶电泳结果显示,下调 HepG2 细胞 E-cadherin 表达水平后,细胞 Egr-1 的 mRNA 水平下降至 66.89%,在转录水平较空白对照组均呈下降趋势($P < 0.01$,图 5)。

3 讨论

肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma,HCC) 是临床常见恶性肿瘤之一,我国已经成为世界上肝癌发病最集中的地区,是病死率居第 2 位的恶性肿瘤^[11]。肿瘤转移是一个多步骤、多环节的过程,肿瘤细胞的黏附、迁移及侵袭能力是恶性肿瘤发生转移的前提^[12],其中细胞黏附参与并起着重要作用^[13-14]。

E-cadherin 为钙依赖性黏附蛋白超家族成员之一,主要分布于上皮组织。其为单链 I 型膜糖蛋白,可锚定于细胞骨架上,与相邻细胞形成稳定连接^[15-16]。研究发现 E-cadherin 的表达抑制与肿瘤的分化、侵袭和转移有显著的相关性^[17-18]。相关研究表明,E-cadherin 基因在癌细胞中普遍低表达、缺失或突变,与肿瘤细胞丧失接触抑制相关,被认为是抑癌基因^[19]。E-cadherin 表达降低或缺失将有利于肿瘤细胞的侵袭和转移^[20]。

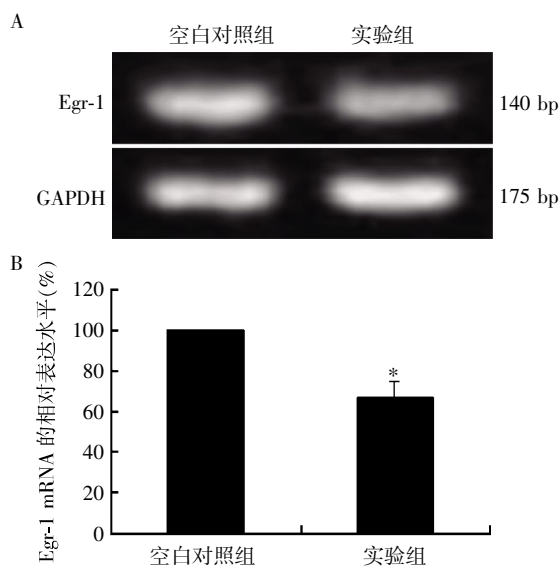
GSK-3 β 是一种通过磷酸化作用而抑制糖原合成酶的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是糖原合成的关键调节酶^[21-22]。GSK-3 β 是为数不多的通过磷酸化而失活的蛋白激酶之一,其磷酸化位点在于 9 位的丝氨酸,磷酸化后使其激酶活性发生显著降低^[21]。在



空白对照组为 HepG2-empty 细胞,实验组为 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞;A:下调 HepG2 细胞 E-cadherin 表达水平,PTEN 在 mRNA 水平较空白对照组呈下降趋势;B:显示经 Image J 软件分析与空白对照组相比,PTEN mRNA 的水平下降至 76.14%;C:下调 HepG2 细胞 E-cadherin 表达水平,PTEN 蛋白表达水平较空白对照组呈下降趋势;D: 经 Image J 软件分析 PTEN 蛋白的表达水平下降至 53.77%。与空白对照组相比, * $P < 0.01 (n > 3)$ 。

图 4 E-cadherin 表达抑制可降低 PTEN 的 mRNA 水平和蛋白表达水平

Figure 4 Down-regulation of E-cadherin inhibits the mRNA and protin expression of PTEN in HepG2-E-cadherin-shRNA cells



空白对照组为 HepG2-empty 细胞,实验组为 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞;A:下调 HepG2 细胞 E-cadherin 表达水平,Egr-1 在 mRNA 水平较空白对照组呈下降趋势;B:经 Image J 软件分析,与空白对照组相比,Egr-1 mRNA 的水平下降至 66.89%。与空白对照组相比, * $P < 0.01 (n > 3)$ 。

图 5 E-cadherin 表达抑制可降低 Egr-1 的 mRNA 水平

Figure 5 Down-regulation of E-cadherin reduces the mRNA expression of Egr-1 in HepG2-E-cadherin-shRNA cells

结/直肠癌组织中 p-GSK-3β^{Ser9} 的磷酸化水平明显低于癌旁组织,癌组织中 GSK-3β 处于高活性状态^[23]。

GSK-3β 是 PI3K/Akt^[4]和 Wnt/β-catenin^[5]细胞信号通路的关键组成部分,其可通过磷酸化 β-catenin 和 cyclin D1 等参与细胞黏附功能调节、细胞分化与增殖、细胞凋亡等^[6-7]。GSK-3β 参与了多种肿瘤的进程,在肿瘤细胞的信号转导通路中发挥了重要作用。肝癌细胞中 E-cadherin 抑制性表达可以导致 GSK-3β 发生磷酸化而活性降低,但其相互之间的调控关系目前尚不明确。

Akt 又称作为蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB),正常情况下以低活性状态存在于细胞浆中。磷酸肌醇-3 激酶(PI3K)被激活后;促进 Akt 从细胞浆转移至细胞膜的内侧面(Akt^{Ser473} 底物结合部位磷酸化位点发生磷酸化),并发生构型变化而激活(Akt^{Thr308} 酶活性中心磷酸化位点发生磷酸化);激活的 Akt 通过磷酸化 GSK-3β 的活性丝氨酸(Ser)9 位的磷酸化位点^[23-24]等,达到促进细胞生存、抑制细胞凋亡、促进肿瘤转移的作用^[25-29]。

PTEN 是一种肿瘤抑制基因,可以多途径抑制肿瘤的浸润和转移^[30]。PTEN 可抑制 Akt 与细胞膜内侧的结合后激活,进一步抑制细胞的生长和生存^[30-32]。Egr-1 是一种核内含磷蛋白,属于神经生长因子的一种^[33]。Egr-1 可绑定与 PTEN 的 5'非翻译区,直接上调 PTEN 的转录水平,Egr-1 表达缺失可抑制 PTEN 的基因表达^[34-35]。在人卵巢癌细胞株中

发现 E-cadherin 的表达抑制可通过抑制由 β -catenin-Egr1 介导的 PTEN 表达水平, 从而抑制 PI3K/Akt 信号通路^[36]。

本实验结果显示, 下调人肝癌细胞 HepG2 的 E-cadherin 表达水平, Akt 的磷酸化水平明显升高。因此, 本研究认为在此细胞信号通路中 Akt 极有可能是关键的蛋白激酶。而 p-GSK-3 β 恰是 Akt 经典途径的产物^[23], 故选择使用外源性 PI3K 抑制剂 LY294002 处理 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞, 期望以此证实 PI3K/Akt 信号通路起到主要调控作用。实验结果表明在 LY294002 处理细胞后, 细胞内 GSK-3 β 的磷酸化(p-GSK-3 β ^{Ser9})水平存在一定程度的下调, 说明在 HepG2-E-cadherin-shRNA 细胞中 PI3K 激活 Akt, 促成了 GSK-3 β 磷酸化(p-GSK-3 β ^{Ser9})水平上调。

为进一步验证 PI3K/Akt 信号通路的作用以及 PTEN 在此间是否发挥调节作用, 本研究设计了 RT-PCR 实验和 Western blot 实验来探讨 PTEN 在转录水平和蛋白水平表达的变化情况。RT-PCR 结果表明, 细胞内 E-cadherin 表达水平下调后, 其 PTEN 的 mRNA 水平存在一定程度的下降; Western blot 结果表明, 细胞内 E-cadherin 表达水平下调后, PTEN 蛋白处于低表达水平; 说明 PTEN 转录水平的抑制降低了其本身蛋白水平的表达, 从而降低了其对 PI3K/Akt 的信号通路的抑制作用。

本研究同样设计了 RT-PCR 实验来检测细胞 Egr-1 在转录水平的变化情况, 以进一步间接证实 Egr-1 直接上调 PTEN 的转录水平的作用。RT-PCR 结果表明, 细胞内 E-cadherin 表达水平下调后, 其 Egr-1 的 mRNA 水平同样存在一定程度的下降; 说明 E-cadherin 抑制性表达时, PTEN 和 Egr-1 的转录水平均下降, 故在此本研究提出假设: E-cadherin 的表达下调降低了 Egr-1 的 mRNA 水平, 从而也降低了 PTEN 的 mRNA 水平。

综上所述, 本研究的结论表明人肝癌细胞中 E-cadherin 表达下调导致细胞内 GSK-3 β 活性降低很可能是通过 PI3K/Akt 的信号通路发挥了重要的生物学功能: E-cadherin 表达水平下调很可能抑制了 Egr-1 的转录水平, 进一步抑制了 PTEN 的转录^[31,33-34], 从而使 PI3K/Akt 的信号通路的抑制得以解除, 进入高活性状态^[30], Akt 激活途径促使 GSK-3 β 不断地从其结合蛋白上脱离下来并发生 9 位磷酸化, 上调了胞质中 p-GSK-3 β ^{Ser9} 的水平^[24]。

本研究证实了 E-cadherin 表达水平下调通过抑

制 Egr-1 和 PTEN, 激活 PI3K/Akt 信号转导通路, 上调 HepG2 细胞 GSK-3 β 磷酸化水平的假说, 为阐明人 HCC 的发生发展机制以及探索临床治疗 HCC 的新靶点提供了依据。

[参考文献]

- [1] Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 5(5): 806-811
- [2] Brabletz T, Jung A, Reu S, et al. Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment [J]. *Natl Acad Sci*, 2001, 98(18): 10356-10361
- [3] Prasad CP, Rath G, Mathur S, et al. Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3beta in invasive ductal carcinoma of breast[J]. *BMC Cancer*, 2009, 9: 325
- [4] Hardt SE, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase-3beta: a novel of cardiac hypertrophy and development[J]. *Circ Res*, 2002, 90(10): 1055-1063
- [5] Ding VW, Chen RH, Mc Cormick F. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3beta by insulin and Wnt signaling [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(42): 32475-32481
- [6] Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery[J]. *Biochem J*, 2001, 359(Pt1): 1-16
- [7] Chen G, Jiang Q, You Z, et al. Regulation of GSK-3 beta in the proliferation and apoptosis of human thyrocytes investigated using a GSK-3 beta-targeting RNAi adenovirus expression vector: involvement the Wnt/beta-catenin pathway[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(6): 2773-2779
- [8] Bozzo C, Graziola F, Chicchetti A, et al. Estrogen and beta-amyloid toxicity: role of integrin and PI3-K [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 45(2): 85-91
- [9] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells [J]. *RNA*, 2003, 9(4): 493-501
- [10] Moffat J, Grueneberg DA, Yang XP, et al. A Lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral High-Content screen [J]. *Cell*, 2006, 124(6): 1283-1298
- [11] Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, et al. Hepatocellular carcinoma, epidemiology, risk factors and pathogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(27): 4300-4308
- [12] Liotta LA, Kohn E. Cancer invasion and metastases [J]. *JAMA*, 1990, 263(8): 1123-1126
- [13] Eble JA, Haier J. Integrins in cancer treatment [J]. *Curr Cancer Drug Target*, 2006, 6(2): 89-105

- [14] Wu XZ, Chen D, Xie GR. Extracellular matrix remodeling in hepatocellular carcinoma: Effects of soil on seed? [J]. *Med Hypotheses*, 2006, 66(6): 1115-1120
- [15] Georgopoulos NT, Kirkwood LA, Walker DC, et al. Differential regulation of growth-promoting signalling pathways by E-cadherin [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13621
- [16] Horiuchi A, Konishi I. Mechanism of ovarian cancer metastasis changes in E-cadherin expression [J]. *Nippon Rinsho*, 2004, 62(suppl10): 463-466
- [17] Hugh TJ, Dillon SA, Taylor BA, et al. Cadherin-catenin expression in primary colorectal cancer: a survival analysis [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(7): 1046-1051
- [18] Sota F, Shimada Y, Watanabe G, et al. Expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-9 and E-cadherin in the process of lymph node metastasis in oesophageal cancer [J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(7): 1366-1372
- [19] Chothia C, Jones EY. The molecular structure of cell adhesion molecules [J]. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66: 823-862
- [20] Brouxhon S, Kyrkanides S, O'Banion MK, et al. Sequential down-regulation of E-cadherin with squamous cell carcinoma progression: loss of E-cadherin via a prostaglandin E2-EP2 dependent posttranslational mechanism [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(16): 7654-7664
- [21] Jiang H, Guo W, Liang X, et al. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanism: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators [J]. *Cell*, 2005, 120(1): 123-135
- [22] Macanas-Pirard P, Yaacob NS, Lee PC, et al. Glycogen synthase kinase-3 Mediates acetaminophen-induced apoptosis in human hepatoma cells [J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2005, 313(2): 780-789
- [23] Shakoori A. Deregulated GSK-3 β activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation [J]. *Biochem Res*, 2005, 334(4): 1365-1373
- [24] Harney JA, Rodgers RL. Insulin-like stimulation of cardiac fuel metabolism by physiological levers of glucagon: involvement of PI3K but not cAMP [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(1): E155-E161
- [25] Kumar CC, Madison V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors [J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7493-7501
- [26] Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS. Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton [J]. *FEBS Lett*, 2002, 513(1): 71-76
- [27] Tyers M, Rachubinski RA, Stewart MI, et al. Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets [J]. *Nature*, 1988, 333(6172): 470-473
- [28] Hanada M, Feng J, Hemmings BA. Structure, regulation and function of PKB/ AKT- a major therapeutic target [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1697(1-2): 3-16
- [29] Yang J, Cron P, Thopson V, et al. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation [J]. *Molec Cell*, 2002, 9(6): 1227-1240
- [30] Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway [J]. *Clin Oncol*, 2004, 22(14): 2954-2963
- [31] Virolle T, Adamson ED, Baron V, et al. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signaling [J]. *Cell Biol*, 2001, 3(12): 1124-1128
- [32] Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(4): 892-895
- [33] Mitchell A, Dass CR, Sun LQ, et al. Inhibition of human breast carcinoma proliferation, migration, chemoinvasion and solid tumour growth by DNazymes targeting the zinc finger transcription factor EGR-1 [J]. *Nucleic Acid Res*, 2004, 32(10): 3065-3069
- [34] Fantini D, Vascotto C, Deganuto M, et al. APE1/Ref-1 regulates PTEN expression mediated by Egr-1 [J]. *Free Radic Res*, 2008, 42(1): 20-29
- [35] Baron V, Adamson ED, Calogero A, et al. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGF β 1, PTEN, p53, and fibronectin [J]. *Cancer Gene Ther*, 2006, 13(2): 115-124
- [36] M-T Lau, Klausen C, Leung PCK. E-cadherin inhibits tumor cell growth by suppressing PI3K/Akt signaling via β -catenin-Egr1-mediated PTEN expression [J]. *Oncogene*, 2011, 30(24): 2753-2766

[收稿日期] 2012-02-12