

靶向调控 PTEN 和 PI3K 对肾母细胞瘤细胞增殖和凋亡的影响

耿耿¹ 鹿洪亭² 李庆浩¹ 明明¹

(1 青岛大学附属泰安市中心医院儿童外科,山东 泰安 271000; 2 青岛大学附属妇女儿童医院)

[摘要] 目的 探讨靶向调控张力蛋白同源物 (PTEN) 和磷脂酰肌醇激酶 (PI3K) 对肾母细胞瘤细胞增殖和凋亡的影响及其机制。方法 选取 15 例肾母细胞瘤患儿的术后肿瘤组织及癌旁正常组织,采用免疫印迹实验及实时荧光定量 PCR 方法检测组织中 PTEN 和 PI3K 蛋白及 mRNA 的表达水平;将肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞分为对照组 (A 组,转染 NC siRNA 及 Flag 空载体)、PTEN 过表达组 (B 组,转染 NC siRNA 及 Flag-PTEN 表达载体)、PI3K 敲低组 (C 组,转染 siPI3K 及 Flag 空载体)、联合靶向组 (D 组,转染 siPI3K 及 Flag-PTEN)。采用免疫印迹实验检测各组转染 24 h 后 SK-NEP-1 细胞中 PI3K、蛋白激酶 A (AKT) 及磷酸化蛋白激酶 A (p-AKT) 的表达水平;采用 CCK-8 实验检测干预第 24、48、72 小时时 SK-NEP-1 细胞增殖情况;采用流式细胞术分析各组 SK-NEP-1 细胞转染 24 h 后细胞凋亡率及细胞周期。结果 与癌旁正常组织相比,肾母细胞瘤肿瘤组织中 PI3K 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高 ($t=22.862, 7.098, P<0.05$), PTEN 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低 ($t=25.634, 8.379, P<0.05$);体外细胞实验结果显示,B、C、D 组 SK-NEP-1 细胞中 p-AKT 蛋白水平明显低于 A 组 ($t=8.386\sim 11.900, P<0.05$);CCK-8 实验显示,干预第 48、72 小时时,B、C、D 组 SK-NEP-1 细胞吸光度值明显低于 A 组 ($t=5.163\sim 8.647, P<0.05$),干预第 72 小时时,D 组 SK-NEP-1 细胞吸光度值明显低于 B、C 组 ($t=3.982, 4.021, P<0.05$);B、C、D 组 SK-NEP-1 细胞早期凋亡率和晚期凋亡率均明显高于 A 组 ($t=4.673\sim 9.563, P<0.05$),D 组 SK-NEP-1 细胞早期凋亡率和晚期凋亡率明显高于 B、C 组 ($t=5.829\sim 8.075, P<0.05$);B、C、D 组 SK-NEP-1 细胞 G₁ 期细胞比例明显高于 A 组 ($t=7.518\sim 14.747, P<0.05$),S 期细胞比例明显低于 A 组 ($t=8.029\sim 13.451, P<0.05$),D 组 SK-NEP-1 细胞 G₁ 期细胞比例明显高于 B、C 组 ($t=9.930, 9.732, P<0.05$),S 期细胞比例明显低于 B、C 组 ($t=10.281, 9.927, P<0.05$)。结论 相比于单一靶向 PTEN 或 PI3K,联合靶向调控 PTEN 和 PI3K 可更显著抑制肾母细胞瘤细胞生长,促进肾母细胞瘤细胞凋亡,其作用机制可能与其抑制 PI3K/AKT 信号通路、阻断细胞周期有关。

[关键词] Wilms 瘤;细胞增殖;细胞凋亡;细胞周期;PTEN 磷酸水解酶;磷酸肌醇 3-激酶类

[中图分类号] R737.11 **[文献标志码]** A

Effect of targeted regulation of phosphatase and tensin homolog and phosphatidylinositol 3-kinase on the proliferation and apoptosis of nephroblastoma cells

GENG Geng, LU Hongting, LI Qinghao, MING Ming
(Department of Pediatric Surgery, The Affiliated Taian City Central Hospital of Qingdao University, Taian 271000, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect and mechanism of targeted regulation of phosphatase and tensin homolog (PTEN) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) on the proliferation and apoptosis of nephroblastoma cells. **Methods** Postoperative tumor tissue and normal paracancerous tissue were collected from 15 children with nephroblastoma, and Western blotting and quantitative real-time PCR were used to measure the protein and mRNA expression levels of PTEN and PI3K in tissue. Nephroblastoma SK-NEP-1 cells were divided into control group (group A, transfected with NC siRNA and Flag empty vector), PTEN overexpression group (group B, transfected with NC siRNA and Flag-PTEN expression vector), PI3K knockdown group (group C, transfected siPI3K and Flag empty vector), and combined targeting group (group D, transfected siPI3K and FLAG-PTEN). Western blotting was used to measure the expression levels of PI3K, protein kinase A (AKT), and phosphorylated AKT (p-AKT) in SK-NEP-1 cells at 24 h after transfection; CCK-8 assay was used to observe the proliferation of SK-NEP-1 cells at 24, 48, and 72 h of intervention; flow cytometry was used to observe apoptosis rate and cell cycle at 24 h after transfection. **Results** Compared with normal paracancerous tissue, nephroblastoma tumor tissue showed significant increases in the protein and mRNA expression levels of PI3K ($t=22.862, 7.098, P<0.05$) and significant reductions in the protein and mRNA expression levels of PTEN ($t=25.634, 8.379, P<0.05$). The results of *in vitro* cell experiments showed that compared with group A, groups B, C, and D had a significantly lower protein expression level of p-AKT ($t=8.386\sim 11.900, P<0.05$). CCK-8 assay showed that groups

B, C, and D had a significantly lower absorbance value of SK-NEP-1 cells than group A at 48 and 72 h of intervention ($t=5.163\sim 8.647, P<0.05$), and at 72 h of intervention, group D had a significantly lower absorbance value of SK-NEP-1 cells than groups B and C ($t=$

[收稿日期] 2023-12-17; **[修订日期]** 2024-03-18

[基金项目] 中国高校产学研创新基金-北创助教项目

(2021BCF01003)

[通讯作者] 明明, Email: mingming1023@163.com

3.982, 4.021, $P < 0.05$). Groups B, C, and D had significantly higher early and late apoptosis rates of SK-NEP-1 cells than group A ($t = 4.673 - 9.563, P < 0.05$), and group D had significantly higher early and late apoptosis rates of SK-NEP-1 cells than groups B and C ($t = 5.829 - 8.075, P < 0.05$). Compared with group A, groups B, C, and D had a significantly higher proportion of SK-NEP-1 cells in G₁ phase ($t = 7.518 - 14.747, P < 0.05$) and a significantly lower proportion of cells in S phase ($t = 8.029 - 13.451, P < 0.05$), and compared with groups B and C, group D had a significantly higher proportion of SK-NEP-1 cells in G₁ phase ($t = 9.930, 9.732, P < 0.05$) and a significantly lower proportion of cells in S phase ($t = 10.281, 9.927, P < 0.05$). **Conclusion** Compared with the targeted regulation of PTEN or PI3K alone, the targeted regulation of PTEN and PI3K can significantly inhibit the growth of nephroblastoma cells and promote cell apoptosis, possibly by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway and blocking cell cycle.

[KEY WORDS] Wilms tumor; Cell proliferation; Apoptosis; Cell cycle; PTEN phosphohydrolase; Phosphatidylinositol 3-kinases

肾母细胞瘤又称维尔姆斯瘤,是临床常见的儿童肾脏恶性肿瘤,主要采用手术、放化疗等综合方案进行治疗,但是少数患儿因对化疗药物不敏感,导致预后效果欠佳^[1-3]。靶向基因治疗的副作用相对较少,已有靶向治疗肾母细胞瘤患儿的成功案例^[4],有望成为肾母细胞瘤一线治疗方式。张力蛋白同源物(*PTEN*)基因是细胞内重要的抑癌基因,可以通过抑制磷脂酰肌醇激酶(PI3K)/蛋白激酶 A(AKT)信号通路,影响细胞迁移、增殖以及分化等重要生理过程^[5-11],是当前肿瘤治疗的热门靶点。此前有研究发现,PTEN 在肾母细胞瘤组织中表达水平显著下调^[12-13],并且一些非编码 RNA 可以通过对 PI3K/AKT 信号通路的调控而影响肾母细胞瘤的疾病进展^[14]。但目前通过联合靶向 PTEN 和 PI3K 是否能有效抑制肾母细胞瘤的生长仍缺乏直接的研究证据。鉴于此,本研究通过在肾母细胞瘤细胞中过表达 PTEN 同时敲低 PI3K,探讨联合靶向调控肾母细胞瘤细胞中的 PTEN 及 PI3K 对肾母细胞瘤细胞增殖和凋亡的影响,以期为该肿瘤靶向药物的研发提供新方向。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Lipofectamine 2000(美国赛默飞世尔科技公司);组织总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒以及 SYBR green qPCR 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司);鼠源抗 Flag 抗体、PI3K 抗体、AKT 抗体、p-AKT(S308)抗体和 GAPDH 抗体(美国 CST 公司),兔源抗 PTEN 抗体(武汉艾美捷科技有限公司);HRP 偶联抗小鼠 IgG 抗体、HRP 偶联抗兔 IgG 抗体[生工生物工程(上海)股份有限公司];CCK-8 细胞增殖试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 细胞培养及分组

人肾母细胞瘤 SK-NEP-1 细胞购买于美国典型

菌种保存中心,接种于 6 孔板中,加入完全培养基(DMEM 高糖培养基中加入 10%胎牛血清及 1%青链霉素),置于 37 °C 含体积分数 0.05 CO₂的培养箱中传代培养。待培养至第 2 代时分为 4 组,对照组(A 组)细胞转染 NC siRNA 及 Flag 空载体,PTEN 过表达组(B 组)细胞转染 NC siRNA 以及 Flag-PTEN 表达载体,PI3K 敲低组(C 组)细胞转染 si-PI3K 及 Flag 空载体,联合靶向组(D 组)细胞转染 siPI3K 及 Flag-PTEN。使用 Lipofectamine 2000[®]转染试剂转染表达载体及 siRNAs,转染操作依照产品说明书进行。

1.3 免疫印迹实验检测组织和细胞当中的 PI3K、PTEN、Flag、AKT、p-AKT 蛋白

收集 2019 年 11 月—2022 年 10 月青岛大学附属泰安市中心医院儿童外科收治的 15 例肾母细胞瘤患儿手术切除的肿瘤组织及癌旁正常组织,剪碎后加入 PBS 研磨,离心以后弃上清液,加入 1~2 mL 组织裂解液以后继续研磨,待充分裂解后于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,获得组织总蛋白。取转染 24 h 后的 A~D 组 SK-NEP-1 细胞置于 1 mL Ep 管中,加入 PBS 500 μ L 重悬,以 2 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,然后向其中加入 500 μ L RIPA 细胞裂解液,置于冰上裂解 30 min 后,4 °C 下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,得到细胞总蛋白。采用 BCA 法检测组织和细胞中的总蛋白浓度。从各组组织及细胞中选取 30 μ g 的蛋白样品进行加热变性,SDS-PAGE 电泳、转膜并封闭。在装有 PVDF 膜的容器中加入一抗及 GAPDH 抗体,4 °C 下孵育过夜,洗膜后加入对应的二抗,室温孵育 1 h,最后加入化学发光底物,进行蛋白条带成像。采用 Image J 软件对图像进行分析,以 GAPDH 作为内参,蛋白相对表达水平以目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值表示。实验重复 3 次,结果取均值。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测组织当中

PI3K、PTEN mRNA 的表达

取 15 例肾母细胞瘤患儿术后肿瘤组织及癌旁正常组织,采用 Trizol 法提取组织中总 RNA,检测 RNA 浓度与纯度,引物名称及其序列见表 1。取 0.5 μg 总 RNA,采用逆转录试剂盒获得 cDNA,并以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR,每个样品设置 3 个复孔,实验重复 3 次,以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量。

表 1 引物名称及其序列

名称	序列	长度(bp)
PI3K	F:5'-CGCCTCTTCTTATCAAGCTCGTG-3'	23
	R:5'-GAAGCTGTCGTAATTCTGCCAGG-3'	23
PTEN	F:5'-TGAGTTCCTCAGCCATTGCCT-3'	22
	R:5'-GAGGTTTCTCTGGTCTGGTA-3'	22
GAPDH	F:5'-AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG-3'	22
	R:5'-GGCAGAGATGATGACCCTTTTA-3'	22

1.5 细胞增殖实验

取转染 24 h 后的 A~D 组 SK-NEP-1 细胞,待细胞处于对数生长期且生长状态良好时,加入胰酶消化细胞,然后将消化好的细胞加入 1 mL Ep 管中,2 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,以 DMEM 培养基重悬细胞后,接种于 96 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞,置于 37 °C 培养箱中培养。分别于接种后第 24、48 和 72 小时取出培养板,加入 10 μL CCK-8 反应液,于 37 °C 下孵育 4 h,采用酶标仪检测波长 450 nm 处的吸光度值。实验设置 3 个复孔,结果取均值。

1.6 细胞凋亡实验

取转染 24 h 后的 A~D 组 SK-NEP-1 细胞,弃去原培养基,用 1 mL 磷酸盐缓冲液漂洗细胞 1 次,于 37 °C 下用胰酶消化 90 s,重悬细胞,收集至 15 mL 离心管中,4 °C 下 1 000 r/min 离心 3 min,弃上清液,用 500 μL 磷酸盐缓冲液重悬细胞,加入 5 μL FITC-Annexin V 溶液及 1 μL PI 溶液,室温避光染色 15 min,使用流式细胞仪分析 FITC 和 PI 标记比例。采用 FCSalyzer 软件分析流式细胞仪的数据,得到 Q1~Q4 四个象限,其中 Q3 象限为早期凋亡率,Q2 象限为晚期凋亡率。实验重复 3 次,结果取均值。

1.7 细胞周期检测

取转染 24 h 后的 A~D 组 SK-NEP-1 细胞,待细胞处于对数生长期且生长状态良好时,加入胰酶消化细胞,然后将消化好的细胞加入 1 mL Ep 管中,2 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,以 500 μL 磷

酸盐缓冲液漂洗细胞 1 次,2 000 r/min 离心 3 min,弃去上清液,以体积分数 0.70 的乙醇(已于 -20 °C 预冷)重悬细胞后,置于 -20 °C 固定 1 h。取出后再以 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,用磷酸盐缓冲液漂洗 2 次后,弃上清液,加入 500 μL 磷酸盐缓冲液重悬,加入 1 μL PI 溶液,避光染色 5 min 以后,使用流式细胞仪分析 PI 通道脉冲积分信号,并用 Flowjo 软件 Dean-Jett-Fox 拟合模型计算 S 期细胞比例、G₂/M 期细胞比例及 G₁ 期细胞比例。实验重复 3 次,结果取均值。

1.8 统计分析

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。多组多时间点比较采用重复测量设计的方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾母细胞瘤患儿肿瘤组织和癌旁正常组织中 PI3K、PTEN 蛋白和 mRNA 表达水平

与癌旁正常组织相比,肾母细胞瘤肿瘤组织中 PI3K 蛋白及 mRNA 表达水平均显著性升高($t = 22.862, 7.098, P < 0.05$),PTEN 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低($t = 25.634, 8.379, P < 0.05$),详见表 2。

表 2 肾母细胞瘤患儿肿瘤组织和癌旁正常组织中 PI3K 和 PTEN 蛋白和 mRNA 表达水平($n = 15, \bar{x} \pm s$)

分组	PI3K 蛋白	PI3K mRNA	PTEN 蛋白	PTEN mRNA
癌旁正常组织	0.46 ± 0.03	1.01 ± 0.01	1.23 ± 0.11	1.01 ± 0.01
肿瘤组织	1.02 ± 0.09	1.78 ± 0.42	0.49 ± 0.02	0.62 ± 0.18

2.2 各组 SK-NEP-1 细胞中 PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达水平

免疫印迹实验结果显示,A~D 组 SK-NEP-1 细胞中 PI3K、p-AKT 蛋白水平比较差异有显著性($F = 6.388, 5.831, P < 0.05$),AKT 蛋白水平比较差异无显著性($P > 0.05$)。与 A 组相比,B、C、D 组中 PI3K 和 p-AKT 蛋白水平均明显降低($t = 5.677 \sim 11.900, P < 0.05$),与 B、C 组相比,D 组 PI3K 和 p-AKT 蛋白水平明显降低($t = 3.786 \sim 4.321, P < 0.05$)。见表 3。

2.3 各组 SK-NEP-1 细胞中细胞增殖情况比较

重复测量设计的方差分析显示,时间、组别及时

间与组别交互作用均对 SK-NEP-1 细胞吸光度值有显著影响 ($F_{\text{时间}} = 464.912, F_{\text{组别}} = 25.201, F_{\text{组别} \times \text{时间}} = 11.570, P < 0.05$)。单独效应分析结果显示,与第 24 小时相比,A~D 组 SK-NEP-1 细胞吸光度值在干预的第 48、72 小时均明显升高 ($F = 83.021 \sim 195.72$);干预第 24 小时时,A~D 组吸光度值差异无显著性 ($P > 0.05$);干预第 48 小时时,与 A 组相比,B、C、D 组吸光度值均显著降低 ($F = 4.067, t = 5.452 \sim 7.821, P < 0.05$);干预第 72 小时时,与 A 组相比,B、C、D 组吸光度值均显著降低 ($F = 29.003, t = 5.163 \sim 8.647, P < 0.05$),与 B、C 组相比,D 组吸光度值均显著降低 ($t = 3.982, 4.021, P < 0.05$)。详见表 4。

表 3 A~D 组 SK-NEP-1 细胞中 PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达水平比较 ($n=3, x \pm s$)

分组	PI3K 蛋白	AKT 蛋白	p-AKT 蛋白
A 组	0.76 ± 0.06	1.03 ± 0.05	0.52 ± 0.05
B 组	0.55 ± 0.08	1.02 ± 0.07	0.23 ± 0.04
C 组	0.47 ± 0.06	1.06 ± 0.05	0.21 ± 0.04
D 组	0.34 ± 0.05	1.07 ± 0.06	0.15 ± 0.02

表 4 A~D 组 SK-NEP-1 细胞干预不同时间吸光度值比较 ($n=3, x \pm s$)

分组	第 24 小时	第 48 小时	第 72 小时
A 组	0.161 ± 0.023	0.272 ± 0.025	0.581 ± 0.032
B 组	0.157 ± 0.021	0.230 ± 0.022	0.425 ± 0.034
C 组	0.158 ± 0.020	0.226 ± 0.019	0.431 ± 0.031
D 组	0.151 ± 0.017	0.218 ± 0.016	0.358 ± 0.023

2.4 各组 SK-NEP-1 细胞凋亡情况比较

A~D 组的 SK-NEP-1 细胞早期凋亡率分别为 (1.76 ± 0.21)%、(3.16 ± 0.44)%、(3.02 ± 0.27)%、(4.60 ± 0.38)%，其晚期凋亡率分别为 (1.38 ± 0.18)%、(2.85 ± 0.23)%、(2.77 ± 0.20)%、(4.42 ± 0.35)%。四组之间细胞早期凋亡率、晚期凋亡率比较差异有显著性 ($F = 11.665, 8.854, P < 0.05$)。与 A 组相比,B、C、D 组细胞早期凋亡率和晚期凋亡率明显升高 ($t = 4.673 \sim 9.563, P < 0.05$);与 B 组、C 组相比,D 组细胞早期凋亡率和晚期凋亡率明显升高 ($t = 5.829 \sim 8.075, P < 0.05$)。

2.5 各组 SK-NEP-1 细胞的细胞周期比较

细胞周期检测结果显示,A~D 组 SK-NEP-1 细胞 G₁ 期细胞比例、S 期细胞比例比较差异有显著性 ($F = 10.921, 12.661, P < 0.05$),G₂/M 期细胞比例比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。与 A 组相比,B、C、D 组 G₁ 期细胞比例明显升高 ($t = 7.518 \sim 14.747,$

$P < 0.05$),S 期细胞比例明显降低 ($t = 8.029 \sim 13.451, P < 0.05$);与 B、C 组相比,D 组 G₁ 期细胞比例明显升高 ($t = 9.930, 9.732, P < 0.05$),S 期细胞比例明显降低 ($t = 10.281, 9.927, P < 0.05$)。见表 5。

表 5 A~D 组 SK-NEP-1 细胞的细胞周期比较 ($x\%, n=3, x \pm s$)

分组	G ₁ 期细胞比例	S 期细胞比例	G ₂ /M 期细胞比例
A 组	63.28 ± 3.61	21.24 ± 1.48	14.27 ± 1.13
B 组	75.91 ± 4.73	16.67 ± 1.27	14.02 ± 1.05
C 组	76.09 ± 4.45	15.93 ± 1.22	13.56 ± 0.93
D 组	86.57 ± 2.63	10.27 ± 0.86	10.19 ± 0.81

3 讨 论

目前,肾母细胞瘤确诊后的治疗仍以常规外科手术及术后放疗和化疗为主,尽管这些常规治疗方案可以一定程度上提高患者的生存率,但手术创伤及化疗药物的不良反应会给患儿带来极大痛苦^[15]。由于肾母细胞瘤缺乏有效的早期诊断标记物,因此,探究肾母细胞瘤的早期诊断方式,寻找新的靶向干预策略成为当前该疾病研究的热门方向。*PTEN* 是重要的抑癌基因,许多泌尿系统肿瘤如前列腺癌、膀胱癌等的发生都伴随 *PTEN* 基因的缺失或低表达,而 *PTEN* 低表达与肿瘤发生及不良预后均密切相关^[5-10]。GRILL 等^[12] 研究发现,与癌旁正常组织相比,肾母细胞瘤组织中 *PTEN* 表达及活性下降。CUI 等^[13] 研究也发现低表达 *PTEN* 的肾母细胞瘤恶性程度更低,这些结果提示 *PTEN* 在肾母细胞瘤发生中应该发挥着比较重要的作用,因此通过过表达载体靶向上调 *PTEN* 的表达水平,对于 *PTEN* 低表达的肾母细胞瘤患者的治疗可能有益。

PI3K/AKT 信号通路是经典的被 *PTEN* 抑制的下游信号通路,*PTEN* 低表达可能会引起 PI3K、AKT 的活性升高,进而促进细胞增殖、迁移^[16-19]。PI3K 由一个调节亚基 (p85) 以及一个催化亚基 (p110) 构成。胞外信号作用于受体酪氨酸激酶,进一步催化 PI3K 调节亚基磷酸化,激活的 PI3K 将细胞质膜上的 PIP₂ 转变成为 PIP₃,PIP₃ 进一步与 AKT 及磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶 1 (PDK1) 的 PH 结构域结合,促使 PDK 磷酸化 AKT。活化的 AKT 可进一步促进下游诸多信号分子如 mTOR、p27、GSK3 等蛋白的磷酸化,影响下游蛋白的生理活动^[20-22]。*PTEN* 可以将 PIP₂ 转变成为 PIP₃,进而抑制 PDK1 对 AKT 的磷酸化^[23]。因此,在细胞当中过表达 *PTEN* 或敲低 PI3K 都可以实现对

PI3K/AKT 信号通路的抑制作用。PI3K/AKT 信号通路的激活可以使 mTOR 和 GSK-3 β 等关键蛋白磷酸化,磷酸化的 GSK-3 β 激酶活性受到抑制,进而促进 β -catenin 的激活并增强细胞周期关键蛋白如 Cyclin D1 的转录,促进细胞 G₁/S 期转化及细胞增殖,抑制细胞凋亡^[24-25]。然而 PI3K/AKT 信号通路在肾母细胞瘤中的作用仍缺少研究,在过表达 PTEN 的同时抑制 PI3K 是否更能有效抑制肾母细胞瘤的增殖活性,尚待进一步研究。

为了验证 PTEN 及 PI3K 是否在肾母细胞瘤组织中异常表达,本研究使用蛋白质免疫印迹实验及 RT-qPCR 实验对 15 例肾母细胞瘤患儿的肿瘤组织及癌旁正常组织中的 PI3K、PTEN 蛋白及 mRNA 表达水平进行了检测,结果显示,与癌旁正常组织相比,肾母细胞瘤肿瘤组织中 PI3K 蛋白及 mRNA 表达水平均显著升高,PTEN 蛋白及 mRNA 表达水平均显著降低。该结果提示肾母细胞瘤肿瘤的发生可能与 PI3K 和 PTEN 表达异常有关。为了进一步研究 PI3K 和 PTEN 在肾母细胞瘤肿瘤发生发展中的作用,本研究又通过细胞转染技术在肾母细胞瘤细胞中过表达 PTEN 以及敲低 PI3K,观察 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达水平的变化,结果显示肾母细胞瘤细胞中过表达 PTEN 或敲低 PI3K 都抑制了 p-AKT,但并不影响 AKT 蛋白的表达,且过表达 PTEN 并同时敲低 PI3K 的细胞中,p-AKT 表达水平最低,这说明联合靶向调控 PTEN 和 PI3K 能增强 p-AKT 表达下调,抑制 PI3K/AKT 信号通路。

随后本研究对各组肾母细胞瘤细胞增殖、凋亡及细胞周期等情况进行了分析,结果显示,肾母细胞瘤细胞通过表达 PTEN 或敲低 PI3K 都可抑制细胞增殖,提高细胞早期凋亡率、晚期凋亡率,提高细胞周期中 G₁ 期细胞比例,降低细胞周期中 S 期细胞比例;另外本研究又对细胞进行了过表达 PTEN 的同时敲低 PI3K 的处理,发现相比单一靶向 PTEN 或 PI3K,联合靶向的细胞吸光度值、S 期细胞比例显著下降,早期凋亡率、晚期凋亡率、G₁ 期细胞比例显著升高。细胞增殖实验中的吸光度值可反映细胞增殖活性,吸光度值越高代表增殖活性越强,所以该结果提示,联合靶向调控 PTEN 和 PI3K 能增强抑制肾母细胞瘤细胞增殖,促进细胞凋亡,阻断细胞周期。联合靶向调控 PTEN 和 PI3K 的细胞被阻断在有丝分裂 G₁ 期,细胞周期的阻断会减慢细胞的增殖,细胞无法通过细胞周期检验点则会激活细胞凋亡相关信号通路,进而引起细胞凋亡。

综上所述,本研究初步揭示了靶向 PTEN 以及 PI3K 影响肾母细胞瘤细胞增殖、凋亡的作用及其机制。相较于单一靶向 PTEN 或 PI3K,联合靶向调控 PTEN 和 PI3K 可更显著抑制肾母细胞瘤细胞生长,促进肾母细胞瘤细胞凋亡,其作用机制可能与其抑制 PI3K/AKT 信号通路、阻断细胞周期有关。后续的研究可以尝试开发靶向调控 PTEN 和 PI3K 的病毒载体,为 PTEN 低表达的肾母细胞瘤患者的基因治疗提供实验数据参考。

伦理批准和知情同意: 本研究涉及的所有试验均已通过泰安市中心医院医学伦理委员会的审核批准,文件号为(2019)伦审第(18)号。所有试验过程均遵照《赫尔辛基宣言》的条例进行。受试对象或其亲属已经签署知情同意书。

作者声明: 耿耿、李庆浩参与了研究设计;耿耿、鹿洪亭、明明参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] GROENENDIJK A, SPREAFICO F, DE KRIJGER R R, et al. Prognostic factors for wilms tumor recurrence: A review of the literature[J]. *Cancers*, 2021,13(13):3142.
- [2] ZHAO Y X, CHENG H Y, SONG H C, et al. Duplex kidney complicated with preoperative inferior nephroblastoma rupture in children: A case report and literature review[J]. *BMC Pediatr*, 2021,21(1):441.
- [3] NELSON M V, VAN DEN HEUVEL-EIBRINK M M, GRAF N, et al. New approaches to risk stratification for Wilms tumor[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2021,33(1):40-48.
- [4] WANG J J, FAN S Q, FENG Y Q, et al. Antiangiogenic therapy for Wilms tumor in an adult and literature review[J]. *Anticancer Drugs*, 2019,30(6):640-645.
- [5] ZHU J M, LIU B, WANG Z Y, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation [J]. *Theranostics*, 2019,9(23):6901-6919.
- [6] HOPKINS B D, HODAKOSKI C, BARROWS D, et al. PTEN function: The long and the short of it[J]. *Trends Biochem Sci*, 2014,39(4):183-190.
- [7] LEE Y R, CHEN M, PANDOLFI P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: New modes and prospects[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018,19(9):547-562.
- [8] SKELTON P D, STAN R V, LUIKART B W. The role of PTEN in neurodevelopment[J]. *Mol Neuropsychiatry*, 2020,5 (Suppl 1):60-71.
- [9] MANOGARAN P, BEERAKA N M, PAULRAJ R S, et al. Impediment of cancer by dietary plant-derived alkaloids through oxidative stress: Implications of PI3K/AKT pathway in apoptosis, autophagy, and ferroptosis[J]. *Curr Top Med Chem*, 2023,23(10):860-877.

- [10] HARA S, OYA M, MIZUNO R, et al. Akt activation in renal cell carcinoma; Contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor[J]. *Ann Oncol*, 2005,16(6):928-933.
- [11] ZHANG J H, YANG W M, ZHOU S W. Expression and significance of PTEN in bladder TransitionalCell carcinoma[J]. *Chin Ger J Clin Oncol*, 2005,4(4):218-220.
- [12] GRILL C, GUELLY C, EBNER B, et al. Loss of PTEN/MMAC1 activity is a rare and late event in the pathogenesis of nephroblastomas[J]. *Hum Pathol*, 2010,41(8):1172-1177.
- [13] CUI M Y, LIU W, ZHANG L J, et al. Over-expression of miR-21 and lower PTEN levels in wilms' tumor with aggressive behavior[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017,242(1):43-52.
- [14] DE SÁ PEREIRA B M, MONTALVÃO DE AZEVEDO R, DA SILVA GUERRA J V, et al. Non-coding RNAs in Wilms' tumor; Biological function, mechanism, and clinical implications[J]. *J Mol Med*, 2021,99(8):1043-1055.
- [15] NJUGUNA F, MARTIJN H A, KUREMU R T, et al. Wilms tumor treatment outcomes: Perspectives from a low-income setting[J]. *J Glob Oncol*, 2017,3(5):555-562.
- [16] XU Z R, HAN X, OU D M, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020,104(2):575-587.
- [17] NEPSTAD I, HATFIELD K J, GRØNNINGSÆTER I S, et al. The PI3K-akt-mTOR signaling pathway in human acute myeloid leukemia (AML) cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020,21(8):2907.
- [18] LIU R, CHEN Y W, LIU G Z, et al. PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers[J]. *Cell Death Dis*, 2020,11(9):797.
- [19] DUAN Y, HAYBAECK J, YANG Z H. Therapeutic potential of PI3K/AKT/mTOR pathway in gastrointestinal stromal tumors; Rationale and progress[J]. *Cancers*, 2020,12(10):2972.
- [20] WANG L, WANG J, CHEN L. TIMP1 represses sorafenib-triggered ferroptosis in colorectal cancer cells by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2023,45(4):419-425.
- [21] 熊艳,陈雨柔,王艺,等. PLOD2 通过 PI3K/AKT 通路促进宫颈癌细胞增殖、侵袭和迁移[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2023,9(3):304-309.
- [22] 叶雅丽,阮荣华,蔡莎莎,等. UBE2Q1 靶向 PI3K/AKT 通路对胃癌细胞凋亡、增殖的影响[J]. *中国卫生检验杂志*, 2022,32(9):1080-1083.
- [23] XIANG H G, ZHANG J F, LIN C C, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020,10(4):569-581.
- [24] SATI I S E E, PARHAR I. MicroRNAs regulate cell cycle and cell death pathways in glioblastoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2021,22(24):13550.
- [25] KUMAR N, MANDAL C C. Cholesterol-lowering drugs on Akt signaling for prevention of tumorigenesis[J]. *Front Genet*, 2021,12:724149.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 113 页)

- [8] LE ROY T, LLOPIS M, LEPAGE P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. *Gut*, 2013,62(12):1787-1794.
- [9] VOLTA U, BONAZZI C, BIANCHI F B, et al. IgA antibodies to dietary antigens in liver cirrhosis[J]. *Ric Clin Lab*, 1987,17(3):235-242.
- [10] SHEVELEVA S A. Probiotics, prebiotics and probiotic products. Current status[J]. *Voprosy Pitaniia*, 1999,68(2):32-40.
- [11] AACHARY A, PRAPULLA S. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: Microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications[J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2011,10:2-16.
- [12] MARRA F, SVEGLIATI-BARONI G. Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis[J]. *J Hepatol*, 2018,68(2):280-295.
- [13] 简程芳,张博宇,王存萍,等. 藏族药二十五味松石丸调控肠道菌群改善非酒精性脂肪性肝炎的作用机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2022,47(8):2038-2048.
- [14] YE X L, LIU Y, HU J J, et al. Chlorogenic acid-induced gut microbiota improves metabolic endotoxemia[J]. *Front Endocrinol*, 2021,12:762691.
- [15] HU W B, GAO W Y, LIU Z M, et al. Specific strains of *Faecalibacterium prausnitzii* ameliorate nonalcoholic fatty liver disease in mice in association with gut microbiota regulation [J]. *Nutrients*, 2022,14(14):2945.
- [16] ISLAM M A, KHAIRNAR R, FLEISHMAN J, et al. Lipocalin-type prostaglandin D2 synthase protein—A central player in metabolism[J]. *Pharm Res*, 2022,39(11):2951-2963.
- [17] KUMAR S, SRIVASTAVA A, PALAIA T, et al. Lipocalin-type prostaglandin D₂ synthase deletion induces dyslipidemia and non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2020,149:106429.
- [18] DONG W C, MAO Y L, XIANG Z H, et al. Traditional Chinese medicine formula Jian Pi Tiao Gan Yin reduces obesity in mice by modulating the gut microbiota and fecal metabolism [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022,2022:9727889.

(本文编辑 耿波 厉建强)