

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00142

## PTEN 基因逆转白血病多因素多药耐药机制探讨

成志勇<sup>1\*</sup>, 李琳<sup>1</sup>, 王亚丽<sup>1</sup>, 李华<sup>1</sup>, 颜晓燕<sup>1</sup>, 蒋丽媛<sup>1</sup>, 田赫<sup>1</sup>, 贾志强<sup>1</sup>, 潘峻<sup>2</sup>

1. 保定市第一医院血液内科, 保定 071000

2. 四川大学华西医院血液内科, 成都 610041

**[摘要]** **目的** 研究分析野生型 *PTEN* 基因对多柔比星(阿霉素, ADM)耐药人红白血病细胞系 K562/ADM 多药耐药 (MDR) 逆转的作用机制。**方法** 将携带野生型 *PTEN* 基因的腺病毒载体(Ad-*PTEN*-GFP)或空载体(Ad-GFP)感染 ADM 耐药的 K562/ADM 细胞, 流式细胞术检测感染效率, 在感染 3 d 内联合应用不同浓度的 ADM、阿糖胞苷(Ara-C)或三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 通过 MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 根据 IC<sub>50</sub> 计算药物逆转倍数, 观察 *PTEN* 基因对上述化疗药物 MDR 逆转作用。同时采用荧光定量 PCR 检测 *PTEN*、*NF-κB*、*MDR1*、MDR 相关蛋白(MRP)及凋亡相关基因 *Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* 及 *Bax* 水平变化, 蛋白质印迹检测 *PTEN*、Akt、p-Akt、P65 水平变化。**结果** 以感染复数为 200 感染第 3 天后, Ad-*PTEN*-GFP 感染与化疗药物联合作用组 K562/ADM 细胞增殖抑制率、凋亡率均高于 Ad-GFP 与化疗药物联合作用组 ( $P < 0.05$ ), *PTEN* 感染能增加 K562/ADM 对 ADM、Ara-C、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的敏感性, 逆转倍数分别为 3.80、2.65、2.64。与 Ad-GFP 组相比, Ad-*PTEN*-GFP 感染 K562/ADM 细胞 3 d 后 p-Akt 与 P65 蛋白表达下调, *NF-κB*、*MDR1*、*Bcl-2*、*Bcl-x<sub>L</sub>* mRNA 表达下调, *Bax* mRNA 表达上调。**结论** 野生型 *PTEN* 基因可能通过抑制 Akt 信号转导通路进一步调控下游信号分子, 通过下调 *NF-κB*、*MDR1*、*Bcl-2* 及上调 *Bax* 等多种信号分子逆转 K562/ADM 细胞的多药耐药。

**[关键词]** 白血病; 肿瘤抗药性; 多药耐药; *PTEN* 磷酸水解酶; Akt**[中图分类号]** R 733.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0142-06

### Role of *PTEN* gene in multidrug resistance reversal in leukemia cells

CHENG Zhi-yong<sup>1\*</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, WANG Ya-li<sup>1</sup>, LI Hua<sup>1</sup>, YAN Xiao-yan<sup>1</sup>, JIANG Li-yuan<sup>1</sup>, TIAN He<sup>1</sup>, JIA Zhi-qiang<sup>1</sup>, PAN Ling<sup>2</sup>

1. Department of Hematology, the First Hospital of Baoding, Baoding 071000, Hebei, China

2. Department of Hematology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the mechanism by which wild-type *PTEN* gene reversing multi-drug resistance (MDR) in human leukemia K562/ADM cells resistant to adriamycin (ADM). **Methods** The recombinant adenovirus containing green fluorescent protein and *PTEN* (Ad-*PTEN*-GFP) or empty vector (Ad-GFP) was transduced into K562/ADM cells resistant to ADM. The transduction efficiency was assessed by flow cytometry (FCM). Then the cells were treated with different concentrations of ADM, cytarabine (Ara-C) or arsenic trioxide(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 3 days after transduction. The proliferation of K562/ADM cells was examined by MTT assay, the apoptosis rate was assessed by FCM, and the IC<sub>50</sub> of different drugs was used to calculate the drug resistance reversal fold (RF), so as to observe the effect of *PTEN* on reversing MDR of the 3 drugs. *PTEN*, *NF-κB*, *MDR1*, MDR-associated protein (*MRP*) and apoptosis related genes (*Bcl-2*, *Bcl-x<sub>L</sub>*, *Bax*) were detected by fluorescence quantitative PCR. *PTEN*, Akt, p-Akt and *NF-κB* protein levels were detected by Western blotting analysis. **Results** The proliferation inhibition rate and apoptosis rate of cells in Ad-*PTEN*-GFP plus chemotherapeutic groups were significantly higher than those Ad-GFP plus chemotherapeutic groups at 3 days after infection (MOI=200) ( $P < 0.05$ ). *PTEN* transduction promoted the sensitivity of K562/ADM cells to ADM, Ara-C and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, with the RF being 3.80, 2.65 and 2.64 folds, respectively. K562/ADM cells in Ad-*PTEN*-GFP group had lower p-Akt and *NF-κB* (P65) protein levels and lower *NF-κB*, *MDR1*, *Bcl-2* and *Bcl-x<sub>L</sub>* mRNA levels, and up-regulated *Bax* mRNA level compared with those in Ad-GFP group. **Conclusion** Wild-type *PTEN* gene may reverse drug resistance via inhibiting Akt pathway and regulating its downstream

**[收稿日期]** 2012-10-18**[接受日期]** 2012-12-27**[基金项目]** 保定市科技攻关计划(10ZF015). Supported by Science and Technology Program of Baoding City, Hebei Province (10ZF015).**[作者简介]** 成志勇, 博士, 副主任医师.

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0312-2096685, E-mail: dzczy@sohu.com

signaling molecules, such as NF- $\kappa$ B, MDR1, Bcl-2 and Bax.

[Key words] leukemia; neoplasm drug resistance; multidrug resistance; *PTEN* phosphohydrolase; Akt

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2):142-147]

肿瘤细胞的多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 是导致化疗失败的主要原因, 其耐药机制包括: 细胞内药物转运蛋白如 P 糖蛋白 (P-gp) 等表达增加而导致细胞内有效药物浓度的降低, 抑癌基因的失活及癌基因的激活, 信号转导通路的异常激活等。研究表明, 肿瘤细胞的 MDR 是多因素综合作用的结果<sup>[1-3]</sup>。与张力蛋白同源的 10 号染色体缺失的磷酸酶 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, *PTEN*) 基因是一种具有蛋白磷酸酶及脂质磷酸酶双特异性活性的抑癌基因, 研究显示 *PTEN* 在包括造血系统肿瘤在内的多种肿瘤 (如肺癌、乳腺癌、白血病) 中存在突变失活、表达降低等, 与肿瘤的不良预后密切相关<sup>[4-6]</sup>。它可能通过调控多种信号通路、信号分子发挥肿瘤抑制功能<sup>[4-5]</sup>。近来研究发现, *PTEN* 基因在实体肿瘤耐药中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>, 而对白血病等恶性血液病是否能够逆转 MDR, 其机制尚不清楚。

多柔比星 (阿霉素, ADM) 耐药人红白血病细胞系 K562/ADM 高表达包括 *MDR* 基因 (*MDR1*) 在内的多种耐药基因及蛋白, 由于其细胞内存在磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3-K/Akt) 信号的活化, 从而导致该细胞系对多种化疗药物交叉耐药<sup>[2]</sup>。本研究将野生型 *PTEN* 基因感染 K562/ADM 细胞系, 研究高表达 *PTEN* 基因对多种化疗药物的敏感性, 探讨 *PTEN* 逆转 MDR 可能的分子作用机制, 为研究白血病 MDR 逆转的新途径提供理论依据。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及药物 反转录反应体系及引物 (北京赛百盛生物工程公司)、SYBR Green Real Master Mix (北京天根生化科技有限公司); *PTEN*、Akt、Ser473 p-Akt、P65 鼠抗人单克隆抗体 (Santa Cruz), 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠二抗 (北京鼎国生物公司); ADM (浙江海正药业股份有限公司, 批号 070301)、阿糖胞苷 (Ara-C, 比利时普强药业, 批号 75G010)、三氧化二砷 ( $As_2O_3$ , 哈尔滨伊达药业有限公司, 批号 20060603)。

1.2 腺病毒及细胞系 重组腺病毒 Ad-*PTEN*-绿色荧光蛋白 (GFP) 和 Ad-GFP 由上海吉凯生物公司合成并鉴定, 在人胚肾细胞系 293A 细胞 (河北医科

大学) 中进行扩增及滴度测定。293A 细胞在含 10% 胎牛血清 (FBS) 的高糖 DMEM 中培养, ADM 耐药的 K562/ADM 细胞系 (河北医科大学) 用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养。K562/ADM 细胞在含 ADM 1.7  $\mu$ mol/L 培养液中稳定生长, 实验前 2 周换用无 ADM 的 RPMI 1640 培养; 所有细胞均在 37 $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$  饱和湿度环境培养。

1.3 腺病毒感染和感染效率的测定 按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 200, 在 100  $\mu$ L 无血清培养液中加入含有 *PTEN* 基因 (Ad-*PTEN*-GFP 组) 或空载体 (Ad-GFP 组) 的病毒液感染 K562/ADM 细胞, 在 37 $^{\circ}$ C、含 5%  $CO_2$ 、无血清、无抗生素的 RPMI 1640 培养基中孵育 2 h 后, 加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 继续培养, 48 h 后用流式细胞仪检测表达 GFP 的细胞比例, 计算感染效率。

1.4 实验分组 分为以下几组: (1) 对照组, 未用药物干预及未感染腺病毒; (2) Ad-GFP 组, 细胞感染空载体腺病毒; (3) Ad-*PTEN*-GFP 组, 细胞感染携带 *PTEN* 基因的腺病毒; (4) 未感染 + 化疗药物组, 未感染细胞用相应化疗药物处理; (5) Ad-GFP + 化疗药物组, 细胞在感染空载体腺病毒同时加相应化疗药物处理; (6) Ad-*PTEN*-GFP + 化疗药物组, 细胞在感染 *PTEN* 基因同时加相应化疗药物干预。

所选用的化疗药物及终末浓度分别为 ADM 1.7、8.5、17、85  $\mu$ mol/L, Ara-C 1、2、5、10  $\mu$ mol/L,  $As_2O_3$  1、2、5、10  $\mu$ mol/L。

1.5 MTT 法检测药物对肿瘤细胞的抑制作用 取对数生长期 K562/ADM 细胞, 在 96 孔板中, 每孔接种 5 000 个细胞, 每组设 3 个复孔, 同时设立无细胞的空白对照, 在干预后 0、1、2、3、4、5 d, 每孔加入 5  $\mu$ g/mL MTT 溶液 20  $\mu$ L, 培育 4 h 后离心弃上清, 加入二甲基亚砷 (DMSO) 200  $\mu$ L/孔, 振荡数分钟, 酶标仪读取光密度 ( $D_{490}$ ) 值, 计算细胞生长抑制率, 绘制生长曲线。细胞生长抑制率 = [对照组  $D$  值 - 实验组  $D$  值] / 对照组  $D$  值  $\times$  100%。并计算药物的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ )。以上实验重复 3 次。逆转倍数 (RF) = [药物与 Ad-GFP 联合作用  $IC_{50}$ ] / [药物与 Ad-*PTEN*-GFP 联合作用  $IC_{50}$ ]。

1.6 细胞凋亡率的检测 收集感染腺病毒后第 1、2、3 天的细胞, 每组收集  $1 \times 10^6$  个, 70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固

定过夜;PBS洗涤3次后加入RNA酶,37℃水浴消化15~30 min后加入碘化丙啶(PI),4℃存放15 min以上,流式细胞仪检测凋亡率。

1.7 靶基因的实时荧光定量PCR检测 收集不同处理组细胞,TRIzol提取总RNA,电泳鉴定RNA并定量,反转录合成cDNA。SYBR反应体系共25 μL,反应条件为94℃ 5 min,94℃ 45 s,60℃ 1 min,

30个循环,设空白对照。PCR反应前3~15个循环的荧光信号作为荧光本底信号,调节基线至适当处,各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为Ct值。根据 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\beta\text{-actin})$ , $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$ 计算检测基因mRNA相对表达量,每组重复3次取平均值。PCR引物序列见表1。

表1 荧光定量PCR扩增引物序列

Tab 1 Primer sequence of fluorescence quantitative PCR

Gene	Primer sequence	Product size (bp)	Accession number
<i>PTEN</i>	F:5'-ATA CCA GGA CCA GAG GAA ACC-3' R:5'-TTG TCA TTA TCC GCA CGC TC-3'	101	000314
<i>NF-κB</i>	F:5'-GTT CAC AGA CCT GGC ATC CGT-3' R:5'-GAG AAG TCC ATG TCC GCA ATG-3'	240	NM_003998
<i>MDR1</i>	F:5'-CAG CAA AGG AGG CCA ACA TAC-3' R:5'-TGA GGC TGT CTA ACA AGG GCA-3'	142	NM-000927
<i>MRP</i>	F:5'-ATA TTC CTG GCC CCA GTG TT-3' R:5'-GAA CTC CCT TCC TCC TCT CC-3'	101	L05628
<i>Bcl-2</i>	F:5'-CAT GTG TGT GGA GAG CGT CAA-3' R:5'-GCC GGT TCA GGT ACT CAG TCA-3'	83	NM_000657
<i>Bcl-xL</i>	F:5'-GTA AAC TGG GGT CGC ATT GT-3' R:5'-TGC TGC ATT GTT CCC ATA GA-3'	83	Z23115
<i>Bax</i>	F:5'-ACC AAG AAG CTG AGC GAG TGT C-3' R:5'-TGT CCA GCC CAT GAT GGT TC-3'	185	NM_138761
<i>βactin</i>	F:5'-CTG GCA CCA CAC CTT CTA CAA T-3' R:5'-AAT GTC ACG CAC GAT TTC CCG C-3'	382	NM_001101

1.8 靶蛋白的蛋白质印迹检测 收集不同组K562/ADM细胞,每组取 $1 \times 10^7$ 个细胞,分别按照核蛋白提取试剂盒(北京鼎国生物公司)和浆蛋白提取试剂盒(北京鼎国生物公司)说明提取蛋白。取上清,用考马斯亮蓝试剂盒(北京鼎国生物公司)测定蛋白浓度,分装后置-20℃保存。取80 μg样品蛋白质,加入等体积上样缓冲液,经5%浓缩胶和10% SDS-PAGE后,用水浴式电转仪转至硝酸纤维素膜上。经5%BSA 37℃封闭1 h,分别加入1:500稀释的小鼠抗人PTEN、Akt和p-Akt、P65单克隆抗体,4℃培育过夜。Tris缓冲液(TBS)漂洗5 min×3次,加入山羊抗小鼠HRP标记二抗,37℃孵育1 h, TBS漂洗5 min×3次。化学发光法检测后分析结果。

1.9 统计学处理 采用SAS 8.0统计软件进行分析处理,多组间计量资料进行方差分析,两组间进一步比较采用q检验,计数资料采用 $\chi^2$ 检验。检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 过表达PTEN基因对K562/ADM细胞的增殖抑制作用 当MOI为200时,腺病毒感染K562/ADM细胞的效率为(82.2±5.8)%,符合基因治疗对载体的要求。MTT法检测结果显示:在MOI=200感染K562/ADM细胞后第1~3天,未感染组、Ad-GFP感染组和Ad-PTEN-GFP感染组细胞的增殖抑制率差异无统计学意义( $P > 0.05$ );但第4~5天,各组细胞的增殖抑制率出现差别,与Ad-GFP组相比,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图1),Ad-PTEN-GFP组细胞的最大生长抑制率出现在第5天(32.3%)。

2.2 PTEN基因过表达对ADM、Ara-C、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>敏感性的影响 以MOI=200感染K562/ADM细胞,并以不同化疗药物干预3 d后,MTT检测结果显示PTEN基因能够增加K562/ADM细胞对ADM、Ara-C、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的敏感性,RF分别为3.80、2.65和2.64(表2)。



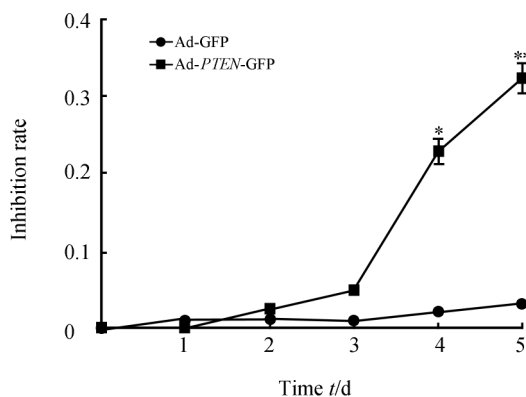


图 1 *PTEN* 对 K562/ADM 细胞的增殖抑制曲线

Fig 1 Anti-proliferation effect of *PTEN* against K562/ADM cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Ad-GFP group.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

表 2 *PTEN* 基因感染 K562/ADM 细胞后对不同化疗药物逆转倍数

Tab 2 Drug resistance reversal folds (RF) of different chemotherapeutic drugs after K562/ADM cells

Drug	IC <sub>50</sub> c <sub>B</sub> / (μmol · L <sup>-1</sup> )		RF
	Ad-GFP	Ad- <i>PTEN</i> -GFP	
ADM	1 379	363	3.80
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.75	0.66	2.65
Ara-C	17.73	6.71	2.64

2.3 *PTEN* 基因过表达对不同处理组凋亡率的影响 Ad-*PTEN*-GFP 感染联合 17 μmol/L ADM、5 μmol/L Ara-C、1 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 干预后 3 d 出现典型的亚二倍体凋亡峰, 细胞凋亡率高于 Ad-GFP 联合同种化疗药物干预组 ( $P < 0.05$ ), 结果见表 3。

表 3 不同处理组干预 K562/ADM 细胞后 3 d 细胞凋亡率  
Tab 3 Apoptosis rates of K562/ADM cells in different groups 3 days after infection

Group	Apoptosis rate
Ad-GFP	1.8 ± 0.5
Ad-GFP + ADM 17 μmol/L	3.7 ± 1.2
Ad-GFP + Ara-C 5 μmol/L	15.2 ± 1.8
Ad-GFP + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 1 μmol/L	20.4 ± 2.1
Ad- <i>PTEN</i> -GFP	3.7 ± 1.2
Ad- <i>PTEN</i> -GFP + ADM 17 μmol/L	17.8 ± 2.3*
Ad- <i>PTEN</i> -GFP + Ara-C 5 μmol/L	28.6 ± 2.9*
Ad- <i>PTEN</i> -GFP + As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 1 μmol/L	61.7 ± 3.2*

\*  $P < 0.05$  vs Ad-GFP group with the same chemotherapeutics

2.4 腺病毒感染后 K562/ADM 细胞 *PTEN*、Akt、p-Akt 表达结果 腺病毒感染 K562/ADM 细胞 3 d 后 Ad-*PTEN*-GFP 感染组 *PTEN* mRNA (25.43 ± 6.77) 和蛋白 (1.24 ± 0.22) 表达水平均高于 Ad-GFP 感染组的 *PTEN* mRNA (0.47 ± 0.32) 和蛋白 (0.11 ± 0.01) 表达水平, 也高于未感染对照组 *PTEN* mRNA (0.48 ± 0.21) 和蛋白 (0.07 ± 0.01) 表达水平 ( $P < 0.05$ )。感染野生型 *PTEN* 基因后, 总 Akt 无明显改变, 而 p-Akt 表达降低 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

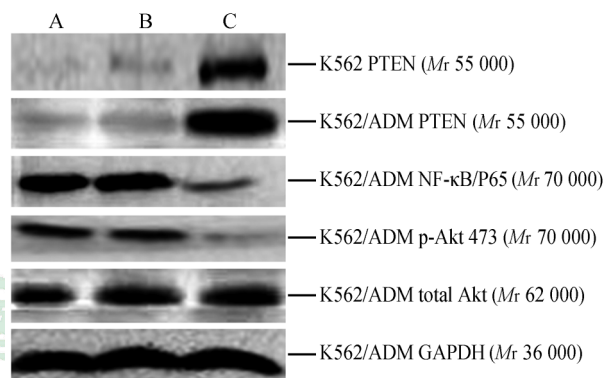


图 2 腺病毒感染 K562 或 K562/ADM 细胞后 *PTEN*、Akt、p-Akt 及 NF-κB/p65 表达

Fig 2 *PTEN*, Akt, p-Akt and NF-κB/p65 protein levels in K562/ADM cells after infection

A: Uninfected group; B: Ad-GFP group; C: Ad-*PTEN*-GFP group

2.5 *PTEN* 基因对白血病细胞 *NF-κB* mRNA 及 P65 蛋白表达的影响 腺病毒感染 K562/ADM 细胞 3 d 后, 在未感染组、Ad-GFP 组和 Ad-*PTEN*-GFP 组, *NF-κB* mRNA 表达水平分别为 16.08 ± 2.85、15.20 ± 2.08 和 1.17 ± 0.06, Ad-*PTEN*-GFP 组较其他组低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Ad-*PTEN*-GFP 组 *NF-κB*/P65 蛋白表达水平亦降低 (图 2)。表明 *PTEN* 基因可降低 *NF-κB* 基因及蛋白表达水平。

2.6 *PTEN* 基因对 *MDR1* 和 *MDR* 相关蛋白 (*MRP*) mRNA 表达的影响 腺病毒感染 K562/ADM 细胞 3 d 后, 未感染组、Ad-GFP 组、Ad-*PTEN*-GFP 组中 *MDR1* mRNA 表达水平分别为 0.25 ± 0.02、0.24 ± 0.03 和 0.13 ± 0.01, Ad-*PTEN*-GFP 组较其他组表达水平降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); *MRP* mRNA 表达水平分别为 0.44 ± 0.07、0.42 ± 0.07 和 0.47 ± 0.09, 3 组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结果见图 3。

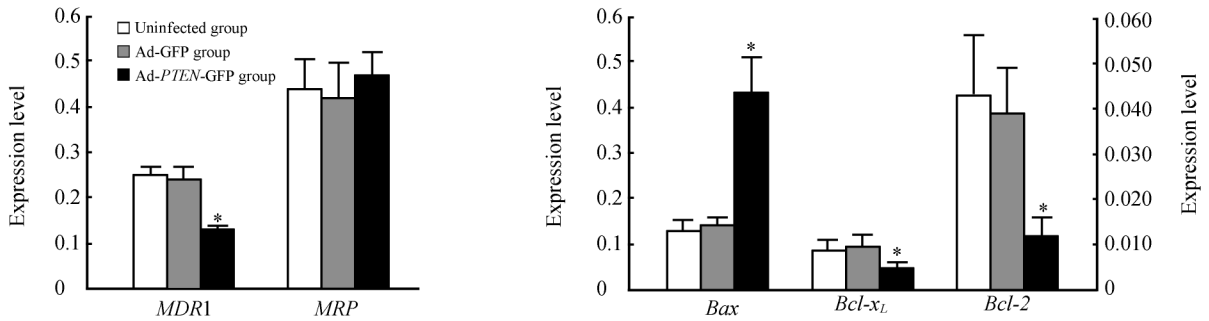


图 3 感染或未感染野生型 PTEN 基因后不同信号分子基因表达水平差异

Fig 3 Expression of different signaling molecules after infection with or without wild-type PTEN gene

Bcl-2 and Bcl-xL to right coordinate axis. MDR1: Multiple drug resistance gene; MRP: Multidrug resistance-associated protein. \* P<0.05, \*\* P<0.05 vs the uninfected group and Ad-GFP group. n=3, x±s

2.7 PTEN 基因对凋亡相关基因 Bcl-2、Bcl-xL、Bax mRNA 表达的影响 腺病毒感染 3 d 后,在未感染组、Ad-GFP 组、Ad-PTEN-GFP 组中 Bcl-2 mRNA 表达水平分别为 0.040±0.013、0.036±0.010、0.011±0.004, Ad-PTEN-GFP 组 Bcl-2 mRNA 水平低于未感染组和 Ad-GFP 组 (P<0.05);未感染组、Ad-GFP 组、Ad-PTEN-GFP 组中 Bcl-xL mRNA 表达水平分别为 0.007±0.003、0.008±0.003、0.004±0.001, Ad-PTEN-GFP 组 Bcl-xL mRNA 水平低于未感染组和 Ad-GFP 组 (P<0.05);未感染组、Ad-GFP 组、Ad-PTEN-GFP 组中 Bax mRNA 表达水平分别为 0.129±0.028、0.141±0.018、0.432±0.071, Ad-PTEN-GFP 组 Bax mRNA 水平高于未感染组和 Ad-GFP 组 (P<0.05)。见图 3。

3 讨论

PI3-K/Akt 通路是细胞内重要的信号转导通路,在促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、诱导肿瘤细胞 MDR 等方面发挥重要作用,在包括白血病在内的多种肿瘤中存在此信号通路的异常活化[3]。有研究表明 PI3-K 抑制剂 LY294002 和磷脂酰肌醇类似物 (phosphatidylinositol ether lipid analogues, PIAs) 可以增加白血病细胞对依托泊苷 (VP16)、Ara-C 和 As2O3 等传统化疗药物的敏感性[8-9]。PTEN 蛋白通过其磷酸酶活性抑制 PI3-K/Akt 信号转导通路,影响细胞增殖、凋亡、血管新生及 MDR,发挥抑癌作用[1-2,10-11]。研究发现在实体肿瘤中过表达 PTEN

基因可以增加对 ADM、紫杉醇、顺铂等多种化疗药物的敏感性[12-13]。本实验将 PTEN 基因感染与多种化疗药物联合作用 K562/ADM 细胞后显示,PTEN 基因能增加对 ADM、As2O3 及 Ara-C 的敏感性,表明 PTEN 基因能够逆转造血系统肿瘤的 MDR。

核转录因子 NF-κB 为 PI3-K/Akt 下游信号转导分子,可以被 p-Akt 激活,PI3-K/Akt 抑制剂能够降低 NF-κB 转录因子的活性[1]。有研究表明 NF-κB 抑制剂亦可降低白血病 HL60AR 细胞对 As2O3 的耐药,增加对 Ara-C 及 VP16 等化疗药物对白血病细胞的敏感性[14]。本研究发现感染野生型 PTEN 基因后 p-Akt 表达降低,NF-κB mRNA 及蛋白水平亦明显下调,推野生型 PTEN 基因能够抑制 K562/ADM 细胞中 Akt 的磷酸化水平,继而可能进一步调控其下游信号分子 NF-κB 的表达。NF-κB 活化后能够进一步促进凋亡抑制基因 Bcl-2、Bcl-xL 表达,抑制促凋亡基因 Bax、caspase 表达,在促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、诱导肿瘤细胞 MDR 等方面发挥重要作用[1,14]。我们研究发现在 PTEN 抑制 NF-κB 表达后 Bcl-2、Bcl-xL 表达降低,Bax 表达增高,从而支持凋亡相关分子在 PTEN 介导的 MDR 逆转中的作用。

MDR 的经典途径是由 MDR1 基因编码的 P-gp 介导的。有研究表明 Akt 磷酸化及 NF-κB 均可以促进 MDR1 基因的转录,增加 P-gp 蛋白表达[1,14]。本研究发现高表达 PTEN 基因的 K562/ADM 细胞 MDR1 亦有不同程度受抑,而 MRP 无明显变化,

*MDR1* 基因受抑制程度与 p-Akt 及 NF- $\kappa$ B 受抑程度不成比例,推测 *MDR1* 基因可能只是部分参与了 *PTEN* 介导的 MDR。

本研究发现 *PTEN* 基因可以增加白血病 K562/ADM 细胞对多种化疗药物的敏感性,*PTEN* 基因抑制 K562/ADM 细胞增殖、逆转其 MDR 的分子生物学机制不仅与多种信号转导通路的激活相关,也与经典的 MDR 途径密切联系,从而形成了复杂的调控网络,这为研究白血病 MDR 逆转的新途径提供了理论依据。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Lin X, Zhang X, Wang Q, Li J, Zhang P, Zhao M, et al. Perifosine downregulates *MDR1* gene expression and reverses multidrug-resistant phenotype by inhibiting PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway in a human breast cancer cell line[J]. *Neoplasma*, 2012, 59: 248-256.
- [2] Yu H G, Ai Y W, Yu L L, Zhou X D, Liu J, Li J H, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death[J]. *Int J Cancer*, 2008, 122: 433-443.
- [3] Martelli A M, Evangelisti C, Chappell W, Abrams S L, Bäsecke J, Stivala F, et al. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway [J]. *Leukemia*, 2011, 25: 1064-1079.
- [4] Song M S, Salmena L, Pandolfi P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 283-296.
- [5] Zuurbier L, Petricoin E F 3rd, Vuerhard M J, Calvert V, Kooi C, Buijs-Gladdines J G, et al. The significance of PTEN and AKT aberrations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia [J]. *Haematologica*, 2012, 97: 1405-1413.
- [6] 成志勇, 万建设, 王亚丽, 梁丽青, 梁文同, 穆敬, 等. *PTEN* 基因对慢性粒细胞白血病 Survivin, Xiap, Smac 调控的研究[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91: 2868-2872.
- [7] Shen S, Gu L J, Liu P Q, Ye X, Chang W S, Li B S. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins between K562 and K562/ADM cells [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2008, 121: 463-468.
- [8] Tabellini G, Cappellini A, Tazzari P L, Falà F, Billi A M, Manzoli L, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells[J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202: 623-634.
- [9] Tabellini G, Tazzari P L, Bortul R, Billi A M, Conte R, Manzoli L, et al. Novel 2'-substituted, 3'-deoxy-phosphatidyl-myo-inositol analogues reduce drug resistance in human leukaemia cell lines with an activated phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway[J]. *Br J Haematol*, 2004, 126: 574-582.
- [10] 成志勇, 潘峻, 牛志云, 梁文同, 贾志强, 颜晓燕, 等. *PTEN* 基因转染对白血病细胞 VEGF 调控作用的影响[J]. *肿瘤*, 2010, 30: 815-821.
- [11] 成志勇, 潘峻, 梁文同, 焦婷, 温省初, 姚丽, 等. *PTEN* 基因影响 K562 细胞周期的分子机制探讨[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30: 183-186, 190.
- [12] Han Z, Hong L, Han Y, Wu K, Han S, Shen H, et al. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2007, 26: 261-268.
- [13] Han Z, Hong L, Han Y, Wu K, Han S, Shen H, et al. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN[J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 425-433.
- [14] Vasudevan K M, Gurumurthy S, Rangnekar V M. Suppression of PTEN expression by NF-kappaB prevents apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 1007-1021.

[本文编辑] 周燕娟, 邓晓群