

### 【基础研究】

通信作者:赵艳秋(1965-),女,河南郑州人,硕士,主任医师,主要从事肺癌的基础与临床研究;E-mail:zhaoyq657@163.com。

## Effect of PTEN on the sensitivity of non-small cell lung cancer to cisplatin through the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B signaling pathway

CHEN Lijuan<sup>1</sup>, MU Xiaoqian<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, ZHANG Tipeng<sup>2</sup>, ZHAO Yanqiu<sup>1</sup>

(1. Department of Oncology, Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, Henan Province, China; 2. Department of Cardiology, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of PTEN on the sensitivity of non-small cell lung cancer (NSCLC) to cisplatin through the phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway. **Methods** The cancer tissue and paracancerous tissue specimens (more than 5 cm from tumor margin) of 60 patients with NSCLC who underwent surgical resection from January 2016 to January 2018 in the Cancer Hospital Affiliated to Zhengzhou University were selected, and the expression of PTEN protein in NSCLC and paracancerous tissues was detected by immunohistochemistry. The NSCLC cells A549 were cultured, and the cells in logarithmic growth phase were obtained and they were randomly divided into blank group (without any treatment), pcDNA-PTEN group (transfected with PTEN overexpression plasmid), pcDNA-PTEN control group (transfected with PTEN overexpression control plasmid), siRNA-PTEN group (transfected with siRNA-PTEN plasmid), siRNA-PTEN control group (transfected with siRNA-PTEN control plasmid), wortmannin group (transfected with PI3K/Akt signal pathway inhibitor), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) group (transfected with PI3K/Akt signal pathway activator), pcDNA-PTEN + IGF-1 group (co transfected with pcDNA-PTEN overexpression plasmid and PI3K/Akt signal pathway activator). The cells were transfected by Lipofectamine 2000. After 6 hours of transfection, the cells were cultured in complete medium at 37 °C for 48 hours. The expression of PTEN, PI3K and AKT mRNA in A549 cells was detected by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The expression of PTEN, PI3K and AKT protein in A549 cells was detected by Western blot method. The invasion ability of A549 cells was detected by Transwell test, and the migration ability of A549 cells was detected by scratch test. The cells in each group were cultured for 48 hours after transfection, 0.00, 0.75, 1.50, 3.00, 6.00, 12.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  cisplatin for 48 hours respectively, then the sensitivity of A549 cells to cisplatin was detected by cell count kit-8. **Results** Compared with the paracancerous tissues, the positive expression rate of PTEN protein was lower, and that of PI3K and AKT protein was higher in NSCLC tissues ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of PTEN, PI3K, AKT protein and mRNA among the blank group, pcDNA-PTEN control group and siRNA-PTEN control group ( $P > 0.05$ ). Compared with the pcDNA-PTEN control group, the expression of PTEN protein and mRNA in A549 cells was higher, while the expression of PI3K, AKT protein and mRNA in A549 cells was lower in the pcDNA-PTEN group ( $P < 0.05$ ). Compared with the siRNA-PTEN control group, the expression of PTEN protein and mRNA in A549 cells was lower, while the expression of PI3K, AKT protein and mRNA in A549 cells was higher in the siRNA-PTEN group ( $P < 0.05$ ). Compared with the pcDNA-PTEN group, the expression of PTEN protein and mRNA in A549 cells was lower, and the expression of PI3K, AKT protein and mRNA in A549 cells was higher in the pcDNA-PTEN + IGF-1 group ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank group, the expression of PTEN protein and mRNA in A549 cells was higher, and the expression of PI3K, AKT protein and mRNA in A549 cells was lower in the wortmannin group ( $P < 0.05$ ). Compared with the blank group and wortmannin group, the expression of PTEN protein and mRNA in A549 cells was lower, while the expression of PI3K, AKT protein and mRNA was higher in the IGF-1 group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the invasion and migration of A549 cells among the blank group, pcDNA-PTEN control group and siRNA-PTEN control group ( $P > 0.05$ ). The invasion and migration ability of A549 cells in the pcDNA-PTEN group was significantly lower than that in the pcDNA-PTEN control group ( $P < 0.05$ ). The invasion and migration ability of A549 cells in the siRNA-PTEN group was significantly higher than that in the siRNA-PTEN control group ( $P < 0.05$ ). The invasion and migration ability of A549 cells in the IGF-1 group was significantly higher than that in the blank group and wortmannin group ( $P < 0.05$ ). The invasion and migration ability of A549 cells in the wortmannin group was significantly lower than that in the blank group ( $P < 0.05$ ). The invasion and migration ability of A549 cells in the pcDNA-PTEN + IGF-1 group was significantly higher than that in the pcDNA-PTEN group ( $P < 0.05$ ). With the increase of concentration of cisplatin, the survival rate of A549 cells in each group decreased gradually ( $P < 0.05$ ). Under the intervention of different concentrations of cisplatin, there was no significant difference in the survival rate of A549 cells between the blank group, and the pcDNA-PTEN control group and the siRNA-PTEN control group ( $P > 0.05$ ), the survival rate of A549 cells in the pcDNA-PTEN group was significantly lower than that in the pcDNA-PTEN control group ( $P < 0.05$ ), the survival rate of A549 cells in the siRNA-PTEN group was significantly higher than that in the siRNA-PTEN control group ( $P < 0.05$ ), the survival rate of A549 cells in the wortmannin group was significantly lower than that in the blank group ( $P < 0.05$ ), the survival rate of A549 cells in the IGF-1 group was significantly higher than that in the wortmannin group and the blank group ( $P < 0.05$ ).

and the survival rate of A549 cells in the pcDNA-PTEN + IGF-1 group was significantly higher than that in the pcDNA-PTEN group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of PTEN protein is decreased in NSCLC tissues. The up-regulation of PTEN gene expression may reduce the cell invasion and migration by inhibiting the activity of PI3K/AKT signaling pathway, and enhance the sensitivity of NSCLC cells to cisplatin.

**Key words:** non-small-cell lung carcinoma; PTEN; phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B signaling pathway; cisplatin; chemosensitivity

肺癌是人类常见的恶性肿瘤,其中非小细胞肺癌(non-small-cell lung carcinoma, NSCLC)约占80%<sup>[1]</sup>。多数NSCLC患者确诊时已属晚期,失去了最佳的手术时机,因此,化学治疗在晚期NSCLC治疗中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。然而,由于治疗过程中化学治疗药物敏感性降低,导致患者预后不良<sup>[3]</sup>。在介导肿瘤细胞生长、分化和死亡进程的众多信号转导通路中,磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB 又称 AKT)信号通路的作用尤为突出,该通路是细胞重要的生长调节通路<sup>[4]</sup>。有研究显示,PTEN 是 PI3K/AKT 信号通路的负向调控因子,PTEN 低表达可促进 PI3K/AKT 信号通路的活化,PI3K/AKT 信号通路过度激活可导致骨肉瘤、肺癌、结直肠癌的发展<sup>[5-7]</sup>,并诱导患者化学治疗耐药<sup>[8]</sup>。本研究旨在探讨 PTEN 通过 PI3K/AKT 信号通路对 NSCLC 化学治疗敏感性的影响,为提高 NSCLC 患者的顺铂敏感性提供思路。

# 1 材料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2016 年 1 月至 2018 年 1 月于郑州大学附属肿瘤医院手术切除的 60 例 NSCLC 患者的癌组织标本及对应的癌旁组织(距肿瘤边缘 >5 cm)标本,均经病理学检查证实为 NSCLC,术前未接受放射治疗、化学治疗及免疫治疗。60 例患者中,男 37 例,女 23 例,年龄 38 ~ 69 (53.25 ± 7.00) 岁。本研究通过医院伦理委员会审查,所有患者签署知情同意书。

**1.2 细胞、试剂与仪器** NSCLC 细胞株 A549 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;顺铂购自珠海市丽珠集团利民制药厂(国药准字:Z199990065),免疫组织化学 PTEN 单克隆抗体及 Western blot 兔抗人 PTEN、PI3K 和 AKT 抗体和磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)多克隆抗体、羊抗兔 IgG 抗体均自美国 Abcam 公司,链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物、3, 3'-二氨基联苯胺(3, 3'-diaminobenzidine, DAB)显色剂、苏木精、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)购自武汉博士德生物技术有限

公司, Lipofectamine 2000 转染试剂、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK8)、Matrigel 胶购自上海翊圣生物科技有限公司,定量反转录聚合酶链反应(quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自上海联迈生物工程有限公司,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、电化学发光(electrochemiluminescence, ECL)液、放射免疫沉淀测定(radioimmunoprecipitation, RIPA)裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司, Bio-Rad GelDoc EZ 凝胶成像系统、qRT-PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司, ND-1000 紫外/可见光分光光度计购自美国 Thermo Scientific 公司。

**1.3 实验方法**

**1.3.1 免疫组织化学法检测 NSCLC 组织和癌旁组织中 PTEN、PI3K 和 AKT 蛋白表达** 癌组织和癌旁组织经体积分数 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,制作连续切片(4 μm),常规二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水、抗原修复。山羊血清 37 ℃ 封闭 20 min,弃血清,滴加一抗兔抗人 PTEN 抗体,4 ℃ 过夜, PBS 洗涤 3 次, PBS 作为一抗阴性对照;一抗复温 1 h, PBS 冲洗 15 min;滴加二抗羊抗兔 IgG 抗体,室温下温育 20 min;随后滴加链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物, 37 ℃ 孵育 30 min; PBS 冲洗后 DAB 显色,并置于显微镜下观察并控制显色时间;苏木精复染 1 min,水洗 1 min,乙醇脱色,流水冲洗 1 min,二甲苯透明 15 min,中性树胶封片。PTEN、PI3K 和 AKT 蛋白表达均定位于细胞质,呈棕黄色或棕褐色。免疫组织化学染色结果由 2 位观察者采用盲法判定,随机选择 5 个有代表性的高倍视野,以染色程度和阳性细胞百分比进行评分。染色程度评分:棕褐色为 3 分,棕黄色为 2 分,黄色为 1 分,无着色为 0 分。着色细胞百分比评分:≥ 51% 为 3 分, 21% ~ 50% 为 2 分, 6% ~ 20% 为 1 分, ≤ 5% 为 0 分。将每张切片染色程度得分与着色细胞百分比得分的乘积为其最后得分:6 ~ 9 分为强阳性(+++), 3 ~ 5 分为中度阳性(++), 1 ~ 2 分为弱阳性(+), 0 分为阴性(-);强阳性、中度阳性和弱阳性定义为阳性细胞。

**1.3.2 细胞培养及筛选** 取冷存的 NSCLC 细胞株 A549,将细胞连同冷存管立即置于 37 ℃ 恒温水浴中,摇动冷存管,使细胞尽快复苏,在超净工作台上使用吸管吸取融化后的细胞加入到离心管中,向离心管中加入 RPMI 1640 培养液(含体积分数 10% 胎牛血清)悬浮细胞,接种于 24 孔板(每孔 1 mL),置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub>、100%湿度的培养箱中温育,当细胞密度达到 90%时,使用 2.5 g · L<sup>-1</sup>胰蛋白酶消化后按 1 : 3 比例进行传代培养,每隔 2~3 d 传代 1 次。取对数生长期细胞用于后续实验。

**1.3.3 细胞分组及转染** 取对数生长期细胞,随机分为 blank 组(不作任何处理)、pcDNA-PTEN 组(转染 PTEN 过表达质粒)、pcDNA-PTEN 对照组(转染 PTEN 过表达对照质粒)、siRNA-PTEN 组(转染 siRNA-PTEN 质粒)、siRNA-PTEN 对照组(转染 siRNA-PTEN 对照质粒)、wortmannin 组(转染 PI3K/AKT 信号通路抑制剂)、胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)组(转染 PI3K/AKT 信号通路激动剂)、pcDNA-PTEN + IGF-1 组(共转染 pcDNA-PTEN 过表达质粒和 PI3K/AKT 信号通路激动剂),采用 Lipofectamine 2000 介导细胞转染,转染 6 h 后更换成完全培养基,37 ℃ 培养 48 h 后收集细胞。

**1.3.4 qRT-PCR 检测 A549 细胞中 PTEN、PI3K 及 AKT mRNA 表达** 收集各组转染后培养 48 h 细胞,培养于 RPMI 完全培养基中,待细胞生长至约 80% 融合度时,采用 TRIzol 一步法提取细胞总 RNA,使用紫外/可见分光光度计测量 260、280 nm 波长处吸光度,对总 RNA 的质量进行鉴定,并调整 RNA 浓度。提取的 RNA 采用两步法进行反转录,反转录所得 cDNA 暂置于 -80 ℃ 冰箱保存。按照 qRT-PCR 试剂盒说明书操作,将样品 RNA 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板扩增目的基因。PCR 反应条件:95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 变性 10 s;60 ℃ 退火 20 s,70 ℃ 延伸 10 s,共 40 个循环。以 GAPDH 为内参。采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算其目的基因的相对表达量。实验重复 3 次,取均值。

**1.3.5 Western blot 法检测 A549 细胞中 PTEN、PI3K 及 AKT 蛋白表达** 收集转染后培养 48 h 细胞,PBS 洗涤并重悬后离心取上清液,加入 RIPA 裂解液轻摇重悬后冰上孵育 30 min,4 ℃ 下 12 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液,即为细胞总蛋白,应用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。将提取的蛋白加入上样缓冲液后煮沸 10 min,每孔上样 30 μg,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶

电泳分离蛋白质,以恒压 100 V 进行湿转,将蛋白转至聚偏氟乙烯膜,转膜时间为 60~70 min,随后使用 50 g · L<sup>-1</sup> 脱脂奶粉封闭 1.5 h。以 GAPDH 多克隆抗体(1 : 10 000)为内参,按照抗体说明书加入一抗 PTEN(1 : 50)、PI3K(1 : 100)及 AKT(1 : 300),4 ℃ 过夜;TBST 漂洗 3 次,每次 5 min,再加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗兔 IgG 抗体(1 : 2 000),室温反应 1~2 h 后采用 ECL 发光液显色。应用 Bio-Rad GelDoc EZ 凝胶成像系统采集图像,Image J 软件进行条带灰度值分析,以目标条带与内参条带的灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

**1.3.6 Transwell 实验检测 A549 细胞侵袭能力** 收集转染后培养 48 h 细胞,4 ℃ 下于无血清培养基中加入 200 μL Matrigel 基质胶,充分混匀以稀释基质胶,并加入 Transwell 上室,使 Matrigel 基质胶均匀铺于上室底面,放入培养箱中孵育 2~3 h。采用无血清培养基制备 1 × 10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 细胞悬液,在上室加入 200 μL 细胞悬液,下室加入 800 μL 含体积分数 20% FBS 的条件培养基,37 ℃ 培养箱孵育 24 h;使用棉签轻轻擦去上室内未穿透的细胞,取出 Transwell 板,置于体积分数 95% 乙醇固定 15~20 min,PBS 漂洗 3 遍;1 g · L<sup>-1</sup> 结晶紫染色,室温下静置 30 min,高倍倒置显微镜下观察,随机选取 5 个视野,计数侵袭细胞数,取均值。

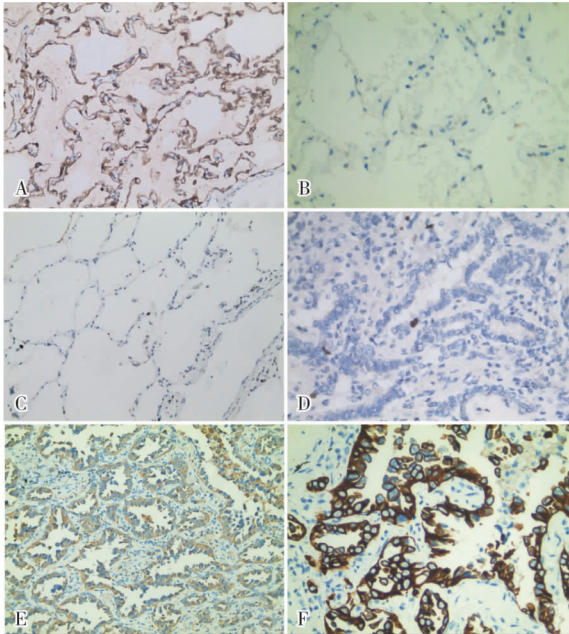
**1.3.7 划痕实验检测 A549 细胞迁移能力** 收集转染后培养 48 h 细胞,使用微量移液器枪头在 6 孔板背后画线,横穿过孔,每孔至少穿过 5 条线,加入约 5 × 10<sup>5</sup> 个细胞,均匀分布于 6 孔板,置于恒温箱中孵育 24 h,次日用枪头比着直尺垂直于 6 孔板背后横线划痕,PBS 洗涤,去除漂浮的细胞,更换新鲜培养基,在显微镜下拍照测量划痕宽度(a),置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 48 h 后,再拍照测量划痕宽度(b),细胞迁移率 = (a - b) / a × 100%。

**1.3.8 CCK8 检测 A549 细胞的顺铂敏感性** 参照 CCK8 试剂盒操作指南,取转染后培养 48 h 细胞,调整细胞密度为 2 × 10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>,接种于 96 孔培养板,置于 37 ℃、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,顺铂浓度设为 0.00、0.75、1.50、3.00、6.00、12.00 μmol · L<sup>-1</sup>,将各浓度梯度顺铂依次加入 96 孔板中,设 3 个复孔;培养 48 h 后将培养液换成 CCK8 试剂,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸去培养液。选择 450 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔吸光度值,以 blank 组顺铂浓度 0.00 μmol · L<sup>-1</sup> 为对照组。细胞存活率 = 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值 × 100%。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 21.0 软件进行数据统计与分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 NSCLC 患者癌组织和癌旁组织中 PTEN、PI3K、AKT 蛋白的表达** 结果见图 1 和表 1。NSCLC 患者癌组织中 PTEN 蛋白阳性表达率显著低于癌旁组织,癌组织中 PI3K、AKT 蛋白阳性表达率显著高于癌旁组织,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A:癌旁组织中 PTEN 蛋白表达;B:癌旁组织中 PI3K 蛋白表达;C:癌旁组织中 AKT 蛋白表达;D:癌组织中 PTEN 蛋白表达;E:癌组织中 PI3K 蛋白表达;F:癌组织中 AKT 蛋白表达。

图1 癌组织和癌旁组织中 PTEN、PI3K、AKT 蛋白的表达 (免疫组织化学,×400)

Fig.1 Expression of PTEN, PI3K and AKT protein in cancer tissues and paracancerous tissues ( immunohistochemistry, ×400)

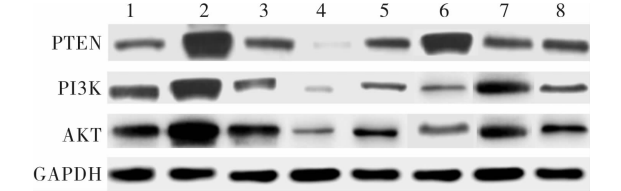
表1 癌组织与癌旁组织中 PTEN、PI3K、AKT 蛋白阳性表达率比较

Tab.1 Comparison of the positive expression rate of PTEN,PI3K and AKT protein in cancer tissues and paracancerous tissues

组织类型	<i>n</i>	PTEN 蛋白阳性 表达/例(%)	PI3K 蛋白阳性 表达/例(%)	AKT 蛋白阳性 表达/例(%)
癌旁组织	60	46(76.67)	11(18.33)	12(20.00)
癌组织	60	15(25.00)	40(66.67)	43(71.67)
$\chi^2$		32.042	28.679	32.257
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

**2.2 8 组 A549 细胞中 PTEN、PI3K 及 AKT 蛋白、mRNA 表达比较** 结果见图 2、表 2 和表 3。blank

组、pcDNA-PTEN 对照组和 siRNA-PTEN 对照组 A549 细胞中 PTEN、PI3K、AKT 蛋白及 mRNA 表达比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与 pcDNA-PTEN 对照组比较,pcDNA-PTEN 组 A549 细胞中 PTEN 蛋白及 mRNA 表达增加,PI3K、AKT 蛋白及 mRNA 表达减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 siRNA-PTEN 对照组比较,siRNA-PTEN 组 A549 细胞中 PTEN 蛋白及 mRNA 表达减少,PI3K、AKT 蛋白及 mRNA 表达增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 pcDNA-PTEN 组比较,pcDNA-PTEN + IGF-1 组 A549 细胞中 PTEN 蛋白及 mRNA 表达减少,PI3K、AKT 蛋白及 mRNA 表达增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 blank 组比较,wortmannin 组 A549 细胞中 PTEN 蛋白和 mRNA 表达增加,PI3K、AKT 蛋白及 mRNA 表达减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 blank 组和 wortmannin 组比较,IGF-1 组 A549 细胞中 PTEN 蛋白和 mRNA 表达减少,PI3K、AKT 蛋白及 mRNA 表达增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



1:blank 组;2: pcDNA-PTEN 组;3: pcDNA-PTEN 对照组;4: siRNA-PTEN 组;5: siRNA-PTEN 对照组;6: wortmannin 组;7: IGF-1 组;8:pcDNA-PTEN + IGF-1 组。

图2 8 组 A549 细胞中 PTEN、PI3K 和 AKT 蛋白表达 (Western blot)

Fig.2 Expression of PTEN, PI3K and AKT protein in A549 cells of the eight groups( Western blot)

表2 8 组 A549 细胞中 PTEN、PI3K 及 AKT mRNA 相对表达量比较

Tab.2 Comparison of the relative expression of PTEN, PI3K and AKT mRNA in A549 cells among the eight groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	PTEN mRNA	PI3K mRNA	AKT mRNA
blank 组	3	1.01 ± .03	1.02 ± 0.06	0.97 ± 0.05
pcDNA-PTEN 对照组	3	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.04
pcDNA-PTEN 组	3	1.43 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.80 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.05 <sup>a</sup>
siRNA-PTEN 对照组	3	0.98 ± 0.04	1.04 ± 0.04	0.96 ± 0.06
siRNA-PTEN 组	3	0.77 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.57 ± 0.13 <sup>b</sup>
wortmannin 组	3	1.32 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.58 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.57 ± 0.02
IGF-1 组	3	0.72 ± 0.01 <sup>cd</sup>	1.54 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.41 ± 0.08 <sup>cd</sup>
pcDNA-PTEN + IGF-1 组	3	1.20 ± 0.12 <sup>e</sup>	1.14 ± 0.09 <sup>d</sup>	1.09 ± 0.08 <sup>e</sup>
<i>F</i>		37.63	17.75	47.68
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01

注:与 pcDNA-PTEN 对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 siRNA-PTEN 对照组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 blank 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 wortmannin 组<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与 pcDNA-PTEN 组比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ 。



表 3 8 组 A549 细胞中 PTEN、PI3K 和 AKT 蛋白相对表达量比较

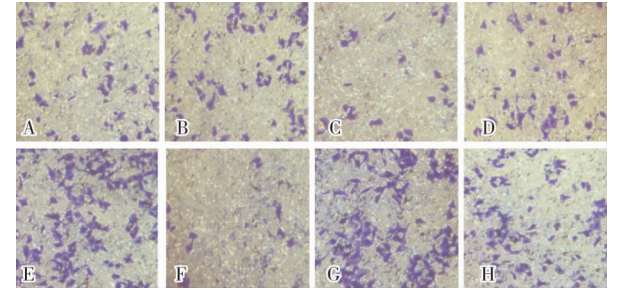
Tab.3 Comparison of the relative expression of PTEN, PI3K and AKT protein in A549 cells among the eight groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PTEN	PI3K	AKT
blank 组	3	0.41 ± 0.03	0.89 ± 0.05	0.92 ± 0.07
pcDNA-PTEN 对照组	3	4.12 ± 0.15	3.74 ± 0.12	3.14 ± 0.13
pcDNA-PTEN 组	3	0.50 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.47 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.08 <sup>a</sup>
siRNA-PTEN 对照组	3	0.07 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.21 ± 0.01
siRNA-PTEN 组	3	0.47 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.02 <sup>b</sup>
wortmannin 组	3	0.74 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.21 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.29 ± 0.02 <sup>c</sup>
IGF-1 组	3	0.36 ± 0.02 <sup>cd</sup>	2.54 ± 0.08 <sup>cd</sup>	3.24 ± 0.08 <sup>cd</sup>
pcDNA-PTEN + IGF-1 组	3	0.51 ± 0.04 <sup>e</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>e</sup>	0.37 ± 0.02 <sup>e</sup>
F		12.475	15.954	9.654
P		<0.01	<0.01	<0.01

注:与 pcDNA-PTEN 对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 siRNA-PTEN 对照组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 blank 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 wortmannin 组比较<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与 pcDNA-PTEN 组比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

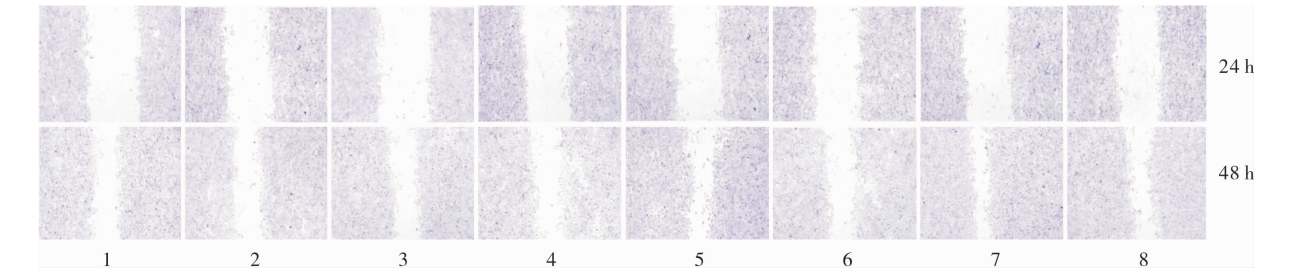
2.3 8 组 A549 细胞侵袭和迁移能力比较 结果见图 3、图 4 和表 4。blank 组、pcDNA-PTEN 对照组和 siRNA-PTEN 对照组 A549 细胞侵袭和迁移能力比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );pcDNA-PTEN 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著低于 pcDNA-PTEN

对照组,siRNA-PTEN 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著高于 siRNA-PTEN 对照组,IGF-1 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著高于 blank 组和 wortmannin 组,wortmannin 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著低于 blank 组,pcDNA-PTEN + IGF-1 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著高于 pcDNA-PTEN 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A:blank 组;B:pcDNA-PTEN 组;C:pcDNA-PTEN 对照组;D:siRNA-PTEN 组;E:siRNA-PTEN 对照组;F:wortmannin 组;G:IGF-1 组;H:pcDNA-PTEN + IGF-1 组。

图 3 8 组 A549 细胞侵袭能力(结晶紫染色,×200)  
Fig.3 Invasion ability of A549 cells in the eight groups (crystal violet staining, ×200)



1:blank 组;2:pcDNA-PTEN 组;3:pcRNA-PTEN 对照组;4:siRNA-PTEN 组;5:siRNA-PTEN 对照组;6:wortmannin 组;7:IGF-1 组;8:pcDNA-PTEN + IGF-1 组。

图 4 8 组 A549 细胞迁移能力(×40)  
Fig.4 Migration ability of A549 cells in the eight groups(×40)

表 4 8 组 A549 细胞侵袭和迁移能力比较

Tab.4 Comparison of the invasion and migration ability of A549 cells among the eight groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	侵袭细胞数	细胞迁移率/%
blank 组	3	30.51 ± 2.54	41.10 ± 1.82
pcDNA-PTEN 对照组	3	32.42 ± 3.85	37.00 ± 1.86
pcDNA-PTEN 组	3	18.97 ± 1.00 <sup>a</sup>	24.52 ± 2.08 <sup>a</sup>
siRNA-PTEN 对照组	3	48.97 ± 2.76	37.12 ± 1.46
siRNA-PTEN 组	3	103.65 ± 6.12 <sup>b</sup>	95.25 ± 2.65 <sup>b</sup>
wortmannin 组	3	12.62 ± 0.78 <sup>c</sup>	24.76 ± 1.73 <sup>c</sup>
IGF-1 组	3	96.24 ± 5.82 <sup>cd</sup>	92.35 ± 3.82 <sup>cd</sup>
pcDNA-PTEN + IGF-1 组	3	65.26 ± 1.87 <sup>e</sup>	48.68 ± 2.32 <sup>e</sup>
F		250.001	391.600
P		<0.001	<0.001

注:与 pcDNA-PTEN 对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 siRNA-PTEN 对照组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 blank 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与 wortmannin 组比较<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与 pcDNA-PTEN 组比较<sup>e</sup> $P < 0.05$ 。

2.4 不同浓度顺铂作用下 8 组 A549 细胞存活率比较 结果见图 5 和表 5。随着顺铂浓度增加,各组 A549 细胞存活率逐渐降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各浓度顺铂干预下,blank 组、pcDNA-PTEN 对照组和 siRNA-PTEN 对照组 A549 细胞存活率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );pcDNA-PTEN 组 A549 细胞存活率显著低于 pcDNA-PTEN 对照组,siRNA-PTEN 组 A549 细胞存活率显著高于 siRNA-PTEN 对照组,wortmannin 组 A549 细胞存活率显著低于 blank 组,IGF-1 组 A549 细胞存活率显著高于 wortmannin 组和 blank 组,pcDNA-PTEN + IGF-1 组 A549 细胞存活率显著高于 pcDNA-PTEN 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 5 不同浓度顺铂作用下 8 组 A549 细胞存活率比较

Tab. 5 Comparison of the survival rate of A549 cells among the eight groups under the intervention with different concentrations of cisplatin

组别	n	细胞存活率/%					
		0.00 μmol · L <sup>-1</sup>	0.75 μmol · L <sup>-1</sup>	1.50 μmol · L <sup>-1</sup>	3.00 μmol · L <sup>-1</sup>	6.00 μmol · L <sup>-1</sup>	12.00 μmol · L <sup>-1</sup>
		顺铂	顺铂	顺铂	顺铂	顺铂	顺铂
blank 组	3	100.00 ± 0.00	88.63 ± 2.50	72.00 ± 3.60	61.00 ± 1.80	54.00 ± 2.90	53.00 ± 1.10
pcDNA-PTEN 对照组	3	98.45 ± 3.00	89.23 ± 2.54	73.00 ± 2.69	60.00 ± 1.83	51.42 ± 2.76	45.00 ± 1.32
pcDNA-PTEN 组	3	63.25 ± 2.32 <sup>a</sup>	58.52 ± 2.01 <sup>a</sup>	45.45 ± 1.64 <sup>a</sup>	35.83 ± 1.57 <sup>a</sup>	28.32 ± 1.90 <sup>a</sup>	14.58 ± 1.05 <sup>a</sup>
siRNA-PTEN 对照组	3	99.14 ± 3.12	88.64 ± 2.64	72.00 ± 2.78	63.00 ± 1.94	55.00 ± 2.10	42.61 ± 1.32
siRNA-PTEN 组	3	121.41 ± 3.22 <sup>b</sup>	98.23 ± 2.67 <sup>b</sup>	93.19 ± 2.41 <sup>b</sup>	87.42 ± 2.15 <sup>b</sup>	76.76 ± 2.00 <sup>b</sup>	65.24 ± 2.01 <sup>b</sup>
wortmannin 组	3	74.00 ± 2.98 <sup>c</sup>	72.67 ± 2.50 <sup>c</sup>	54.00 ± 2.65 <sup>c</sup>	40.00 ± 1.80 <sup>c</sup>	33.00 ± 1.56 <sup>c</sup>	21.00 ± 1.10 <sup>c</sup>
IGF-1 组	3	116.47 ± 3.00 <sup>cd</sup>	97.00 ± 2.55 <sup>cd</sup>	85.00 ± 2.60 <sup>cd</sup>	74.00 ± 2.12 <sup>cd</sup>	66.00 ± 2.00 <sup>cd</sup>	57.00 ± 1.89 <sup>cd</sup>
pcDNA-PTEN + IGF-1 组	3	84.23 ± 2.88 <sup>e</sup>	82.43 ± 2.41 <sup>e</sup>	67.67 ± 2.52 <sup>e</sup>	58.12 ± 1.89 <sup>e</sup>	52.00 ± 1.90 <sup>e</sup>	37.36 ± 1.13 <sup>e</sup>
F		54.641	42.223	64.690	94.434	48.870	472.906
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 pcDNA-PTEN 对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05;与 siRNA-PTEN 对照组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05;与 blank 组比较<sup>c</sup>*P* < 0.05;与 wortmannin 组比较<sup>d</sup>*P* < 0.05;与 pcDNA-PTEN 组比较<sup>e</sup>*P* < 0.05。

3 讨论

近年来,随着人口老龄化加剧,肺癌发病率呈上升趋势,且病死率高,严重威胁人类健康<sup>[9-10]</sup>。在肿瘤发展过程中,癌基因激活或者抑癌基因失活均发挥重要作用<sup>[11-12]</sup>。PTEN 作为常见抑癌基因,在多种肿瘤中异常表达<sup>[13]</sup>。研究发现,PTEN 功能丧失可诱导 PI3K/AKT 信号通路异常激活,促进肿瘤侵袭和转移。LIU 等<sup>[14]</sup>研究显示,Spalt 样转录因子 4 可以抑制 PTEN 表达,引起 PI3K/AKT 信号通路活化,进而促进胶质瘤细胞增殖,提示抑制 PTEN 表达可以促进肿瘤发生与发展。同时,KE 等<sup>[15]</sup>研究发现,miR-92a 可以通过 PTEN 介导的 PI3K/AKT 信号通路参与结直肠癌的淋巴结转移,提示 PTEN 介导 PI3K/AKT 信号通路在淋巴结转移中发挥一定作用。本研究结果显示,NSCLC 患者癌组织中 PTEN 蛋白阳性表达率显著低于癌旁组织,PI3K 和 AKT 蛋白阳性表达率显著高于癌旁组织;细胞学实验显示,过表达 PTEN 基因可以显著下调 PI3K 和 AKT mRNA 和蛋白表达,而抑制 PTEN 基因表达可显著上调 PI3K 和 AKT mRNA 和蛋白表达;提示 PTEN 可能与 NSCLC 的发生、发展有关,上调 PTEN 表达可抑制 PI3K/AKT 信号通路活性,进而发挥抑癌作用。同时,与单纯过表达 PTEN 基因比较,过表达 PTEN 联合 PI3K/AKT 信号通路激动剂 IGF-1 处理可导致 PI3K 和 AKT 表达升高,提示 PI3K/AKT 信号通路激动剂可逆转上调 PTEN 表达的作用。

本研究结果显示,pcDNA-PTEN 组 A549 细胞侵

袭和迁移能力显著低于 pcDNA-PTEN 对照组,siRNA-PTEN 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著高于 siRNA-PTEN 对照组,说明 PTEN 可抑制 A549 细胞的侵袭和迁移。IGF-1 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著高于 blank 组和 wortmannin 组,wortmannin 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著低于 blank 组,pcDNA-PTEN + IGF-1 组 A549 细胞侵袭和迁移能力显著高于 pcDNA-PTEN 组,说明 PI3K/AKT 信号通路的激活可促进 A549 细胞的侵袭和迁移,PI3K/AKT 信号通路的激活可逆转 PTEN 对 A549 细胞侵袭和迁移的抑制作用。IGF-1 处理细胞后 PI3K/AKT 信号通路被激活,A549 细胞存活率增加,提示 PI3K/AKT 信号通路可提高 A549 细胞对顺铂耐药性;PTEN 过表达后 A549 细胞存活率降低,PTEN 过表达和 PI3K/AKT 信号通路激活组与 PTEN 单独过表达组相比,A549 细胞存活率增加,说明 PI3K/AKT 信号通路激活可逆转 PTEN 引起的 A549 细胞对顺铂的敏感性。

综上所述,NSCLC 患者癌组织中 PTEN 呈低表达,PI3K/AKT 信号通路激活。上调 PTEN 基因表达可通过抑制 PI3K/AKT 信号通路激活而阻止肿瘤细胞侵袭和迁移,提升 NSCLC 细胞对顺铂的敏感性。本研究有助于实现临床个体化治疗,提高药物靶向性并逆转肿瘤细胞的耐药性。

参考文献:

[1] 温源,蔡莉. MMP-12 在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 中国肺癌杂志,2014,17(1):30-33.

[2] KAEWBUBPA W, AREEPIUM N, SRIURANPONG V. Effect of the ERCC1 (C118T) polymorphism on treatment response in advanced non-small cell lung cancer patients undergoing platinum-based chemotherapy[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*,2016,17(11): 4917-4920.

[3] 张强,翟西菊,魏丽,等. 非小细胞肺癌化疗药物耐药性及其与 ERCC1、RRM1 表达的相关性[J]. *实用医药杂志*,2017,34(1):11-13.

[4] 刘苗,石清照,姜毅,等. 阿伐他汀通过磷脂酰肌醇 3-激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白途径调节 HL-60 白血病细胞凋亡的作用[J]. *中华实用儿科临床杂志*,2015,30(3):198-202.

[5] 王勤志,徐立军,李名武,等. 小分子 RNA 干扰磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基  $\alpha$  基因对人骨肉瘤 Saos-2 细胞增殖和侵袭能力的影响[J]. *新乡医学院学报*,2019,36(1):19-24.

[6] ZHAO R, CHEN M J, JIANG Z Q, *et al.* Platycodein-D induced autophagy in non-small cell lung cancer cells via PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways[J]. *J Cancer*, 2015, 6(7): 623-631.

[7] BAHRAMI A, KHAZAEI M, HASANZADEH M, *et al.* Therapeutic potential of targeting PI3K/AKT pathway in treatment of colorectal cancer; rational and progress[J]. *J Cell Biochem*, 2017, 119(8): 1979-1983.

[8] 侯倩倩,李易明,陈坤,等. 抑制 PI3K/Akt 信号转导通路逆转喉癌耐药的作用及其机制[J]. *现代中西医结合杂志*,2017,26(21):32-35.

[9] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.

[10] 孙可欣,郑荣寿,张思维,等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. *中国肿瘤*,2019,28(1):1-11.

[11] SHI W, XU X, YAN F, *et al.* N-Myc downstream-regulated gene 2 restrains glycolysis and glutaminolysis in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 6881-6887.

[12] EAHGHIFAR N, FARROKHI N, NAJI T, *et al.* Tumor suppressor genes in familial adenomatous polyposis[J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2017, 10(1): 3-13.

[13] YANG Y, GUO J X, SHAO Z Q. miR-21 targets and inhibits tumor suppressor gene PTEN to promote prostate cancer cell proliferation and invasion; an experimental study[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10(1): 87-91.

[14] LIU C, WU H, LI Y, *et al.* SALL4 suppresses PTEN expression to promote glioma cell proliferation via PI3K/AKT signaling pathway[J]. *J Neurooncol*, 2017, 135(2): 263-272.

[15] KE T W, WEI P L, YEH K T, *et al.* MiR-92a promotes cell metastasis of colorectal cancer through pten-mediated PI3K/AKT pathway[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(8): 2649-2655.

( 本文编辑:徐自超)

## 发表学术论文“五不准”

中国科协、教育部、科技部、卫生计生委、中科院、工程院、自然科学基金会联合印发《发表学术论文“五不准”》(科协发组字[2015]98 号,2015 年 11 月 23 日)

1. 不准由“第三方”代写论文。科技工作者应自己完成论文撰写,坚决抵制“第三方”提供论文代写服务。
2. 不准由“第三方”代投论文。科技工作者应学习、掌握学术期刊投稿程序,亲自完成提交论文、回应评审意见的全过程,坚决抵制“第三方”提供论文代投服务。
3. 不准由“第三方”对论文内容进行修改。论文作者委托“第三方”进行论文语言润色,应基于作者完成的论文原稿,且仅限于对语言表达方式的完善,坚决抵制以语言润色的名义修改论文的实质内容。
4. 不准提供虚假同行评审人信息。科技工作者在学术期刊发表论文如需推荐同行评审人,应确保所提供的评审人姓名、联系方式等信息真实可靠,坚决抵制同行评审环节的任何弄虚作假行为。
5. 不准违反论文署名规范。所有论文署名作者应事先审阅并同意署名发表论文,并对论文内容负有知情同意的责任;论文起草人必须事先征求署名作者对论文全文的意见并征得其署名同意。论文署名的每一位作者都必须对论文有实质性学术贡献,坚决抵制无实质性学术贡献者在论文上署名。
- 本“五不准”中所述“第三方”指除作者和期刊以外的任何机构和个人;“论文代写”指论文署名作者未亲自完成论文撰写而由他人代理的行为;“论文代投”指论文署名作者未亲自完成提交论文、回应评审意见等全过程而由他人代理的行为。