

· 基础研究 ·

AKT 途径在雌激素调控子宫内膜癌 KLE 细胞中乙二醛酶表达的作用 *

祝颖 冯怡雯 周冬梅 魏桢楠 吴凌 扬婷 席晓薇[△] 张箴波[△] 丰有吉

(上海交通大学附属上海第一人民医院妇产科 上海 200080)

摘要 目的 探讨雌激素是否通过 AKT 途径调控子宫内膜癌 KLE 细胞中乙二醛酶 (Glyoxalase, Glo) 的表达。方法 采用 RT-PCR 和 Western blotting 检测雌激素(17-β 雌二醇)处理或 AKT 途径抑制剂(LY294002)处理子宫内膜癌 KLE 细胞后 Glo 的 mRNA 或蛋白的表达情况。实验分 4 组: Con 组(对照组)、LY294002 组(LY294002 处理组)、E2 组(17-β 雌二醇处理组); E2+LY294002 组(LY294002 预处理 1 小时后再 17-β 雌二醇处理组)。结果: 1. 经不同浓度的 17-β 雌二醇(Con、10⁻¹¹、10⁻¹⁰、10⁻⁹ M)作用于 KLE 细胞 24 小时后, Glo mRNA 的相对表达量分别为 1.158±0.04、1.82±0.03、1.81±0.04, 以 10⁻¹⁰ M 的浓度时最为显著(P<0.05)。以 10⁻¹⁰ M 的 17-β 雌二醇作用于 KLE 细胞 48 小时后, Glo 蛋白的相对表达量为 1.79±0.02, 高于 Con 组。2. 以 LY294002 抑制 AKT 途径后, KLE 细胞中 Glo mRNA 的相对表达量为 0.69±0.03, 蛋白的相对表达量为 0.16±0.02, 均低于 Con 组。3. E2+LY294002 组 Glo mRNA 和蛋白的相对表达量分别为 1.02±0.04、1.01±0.03, 均低于 E2 组中 Glo mRNA 和蛋白的相对表达量, E2 组分别为 1.34±0.03、1.79±0.02。LY294002 组 Glo mRNA 和蛋白的相对表达量分别为 0.69±0.03、0.16±0.02, 均低于 Con 组 Glo mRNA 和蛋白的相对表达量。结论 雌激素可上调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo mRNA 和蛋白的表达。抑制 AKT 途径可下调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo mRNA 和蛋白的表达。AKT 途径在雌激素调控子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 的表达无明显作用。

关键词: 子宫内膜癌; 雌激素; 乙二醛酶; AKT 途径

中图分类号: R737.33 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2011)17-3201-03

A Possible Role of AKT Signal Pathway for Estrogen Regulates Glyoxalase Gene Expression in KLE Endometrial Cancer Cells*

ZHU Ying, FENG Yi-wen, ZHOU Dong-mei, WEI Ya-nan, WU Ling, YANG Ting, XI Xiao-wei[△], ZHANG Zhen-bo[△], FENG You-ji
(Shanghai Jiao Tong University Affiliated First People's Hospital, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To study the possible role of AKT signal pathway for estrogen regulates Glyoxalase Gene expression in KLE endometrial cancer cells. **Methods:** RT-PCR and western blot were used to determine the effect of estrogen or ly294002 on Glo expression in mRNA and protein levels respectively. KLE cells were divided into 4 groups: Con group (the control group); LY294002 group(which were treated by LY294002);E2 group(which were treated by E2);E2 +LY294002 group(which were treated by LY294002 for 1h,then with E2). **Results:** 1.The expression of Glo mRNA levels in KLE cells, which were treated by E2 (Con、10⁻¹¹、10⁻¹⁰、10⁻⁹ M) for 24h, were increased. The results were:1.158±0.04, 1.82±0.03, 1.81±0.04(P<0.05). The protein levels were also increased, the results were 1.79±0.02 (P<0.05). 2 After treated by LY294002, the expression of Glo mRNA and protein levels were decreased. The results were 0.69±0.03 and 0.16±0.02 (P<0.05).3.The expression of Glo mRNA and protein levels of E2 +LY294002 group were lower than E2 group. The difference between the group: LY294002 and Con were the same. **Conclusions:** E2 up-regulated the expression of Glo. Inhibition of AKT signal pathway by LY294002 reduced the expression of Glo. AKT signal pathway is not the main step for estrogen regulates Glyoxalase Gene expression in KLE endometrial cancer cells.

Key words: Endometrial cancer; Estrogen; Glyoxalase I(GloI); AKT signal pathway

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)17-3201-03

乙二醛酶 (glyoxalase, Glo) 是调节细胞糖代谢的关键酶, 主要在降解乙二醛与甲基乙二醛的毒性中发挥作用^[1]。目前各项研究证实 Glo 在多种人类肿瘤细胞中, 如乳腺癌, 膀胱癌, 肺癌, 子宫内膜癌和卵巢癌等, 表达均较正常组织增

* 基金项目 国家自然科学基金(81001155 和 81020108027)、上海市卫生局面上项目(2009028)

作者简介 祝颖(1986-) 女, 硕士研究生, 研究方向: 妇科肿瘤, 妇科腔镜

Tel: 13681648635 E-mail: yxzcl02a@163.com

△通讯作者: 席晓薇, 主任医师 E-mail: xixiaowei66@yahoo.com.cn 张箴波, Email: zhangzhenbozzb@yahoo.com.cn

(收稿日期: 2011-03-08 接受日期: 2011-03-31)

高^[2-5]。研究结果提示 Glo 的高表达与肿瘤细胞的增殖,侵袭及耐药性有相关性^[6-7]。子宫内膜癌是妇科常见的三大生殖道恶性肿瘤之一。其中,长期的雌激素刺激是子宫内膜癌发生的高危因素。因此,本研究旨在探讨雌激素对子宫内膜癌中 Glo 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人子宫内膜癌细胞系 KLE(ER-)由上海市第一人民医院妇产科实验室保存并提供。

1.2 主要试剂及材料

DMEM-F12 培养基、胎牛血清均购自 HYCLONE 公司; 17-β 雌二醇、GloI、AKT、P-AKT、GAPDH 抗体均购自 sigma 公司,LY294002 购自默克公司,ECL 购自 PerkinElmer 公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 Takara 公司,Glo、GAPDH 引物序列由上海生物工程有限公司合成。

1.3 细胞培养及处理

在 37℃,5% CO₂ 条件下,用含 10%胎牛血清、100 U/L 青霉素和 100 U/L 链霉素双抗的 DMEM-F12 培养液培养 KLE 细胞。当细胞处于对数生长期时,用无血清培养基饥饿处理 24 小时后,经不同浓度(con、10⁻¹¹、10⁻¹⁰、10⁻⁹M)的雌激素刺激 24 小时,收集细胞提取 RNA,用于 PCR 鉴定 Glo mRNA 的表达情况。应用 AKT 途径的特异性抑制剂 LY294002 预处理细胞一小时,加入 10⁻¹⁰ M 的雌激素处理细胞 24 小时后,收集细胞提取 RNA 用于 PCR,同样处理细胞 48 小时后,收集细胞提取蛋白用于 Western-blot,鉴定雌激素是否通过介导 AKT 途径调控 Glo 的表达。实验分 4 组:Con 组(对照组),LY294002 组(LY294002 处理组),E2 组(雌激素处理组),E2+LY294002 组(LY294002 预处理 1 小时后雌激素处理组)。

1.4 RT-PCR 反应

按 Trizol 说明书提取细胞总 RNA,按 TAKARA 试剂盒说明将其逆转录为 cDNA,然后进行 PCR 反应,体系为 20 ul。反

应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,共 35 个循环,最后 72℃去杂 5 min。Glo 引物:上游 5'-CGA GGA TTC GGT CAT ATT GG-3',下游 5'-CCA GGC CTT TCA TTT TAC CA-3',扩增片段为 151 bp;GAPDH 作为内参,引物:上游 5'-AAC GGA TTT GGT CGT ATT G-3',下游 5'-GGA AGA TGG TGA TGG GAT T-3'。反应结束后,行琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色,用凝胶成像系统观察扩增片段的表达情况。

1.5 Western blot 分析

收集药物处理的细胞,冰上裂解细胞 30 min,离心收集上清,BCA 蛋白定量法检测蛋白浓度,然后加入上清液体积 1/4 的 1× loading buffer 混匀,煮沸 5 min,保存于 -80℃中。以 60 ug 蛋白每孔上样于 10%的 SDS-PAGE,电泳结束后,将蛋白用 300 mA,90 min 转印置 PVDF 膜上,应用均按 1:1000 稀释好的 Glo、AKT、P-AKT 和 GAPDH 抗体置冰上孵育 12 小时,用 1× TBST 洗涤 4 次,每次 10 min 后,选择对应的按 1:5000 稀释的二抗摇床孵育 1 小时,再次 TBST 洗涤 4 次,每次 10 min,应用 ECL 化学发光法检测目的蛋白表达情况。

1.6 统计学处理

所有实验均重复 3 次,采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析,P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌激素上调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 的表达

不同浓度雌激素作用于 KLE 细胞 24 小时后,经 PCR 反应检测发现随着雌激素浓度的增高,Glo mRNA 的相对表达量逐渐增加,以 Con 组所得数值为标准值 1,mRNA 的相对表达量分别为 1,1.58± 0.04,1.82± 0.03,1.81± 0.04,其中以雌激素浓度为 10⁻¹⁰ M 时最显著(P 均 <0.05),结果见图 1。以 10⁻¹⁰ M 浓度的雌激素作用于 KLE 细胞 48 小时后,GloI 蛋白的相对表达量为 1.79± 0.02(P<0.05) 较 Con 组升高,结果见图 3。提示雌激素具有上调子宫内膜癌 KLE 细胞中 GloI 表达的作用。

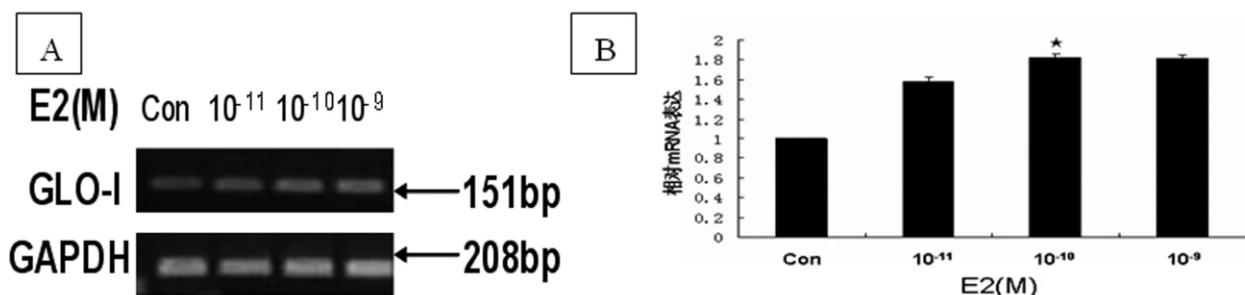


图 1 雌激素上调 KLE 细胞 Glo mRNA 的表达
Fig.1 E2 enhances Glo mRNA expression of KLE cells

2.2 抑制 AKT 途径在雌激素调控子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 表达的作用

经 PCR 反应检测,以 Con 组所得数值为标准值 1,发现 Glo mRNA 的相对表达量分别为 1 (Con 组),0.69± 0.03 (LY294002 组),1.34± 0.03 (E2 组),1.02± 0.04 (E2+LY294002 组)(P 均 <0.05),结果见图 2。用 Western blotting 方法检测,发

现 Glo 蛋白的相对表达量分别为 1 (Con 组),0.16± 0.02 (LY294002 组),1.79± 0.02 (E2 组),1.01± 0.03 (E2+LY294002 组)(P 均 <0.05),结果见图 3。由上可发现,LY294002 组低于 Con 组,表明抑制 AKT 途径可下调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 表达。而 E2+LY294002 组同样低于 E2 组,但数值下降同 LY294002 组相比于 Con 组的数值下降,比值为 1。因此,

AKT 途径在雌激素调控子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 的表达 无明显作用。

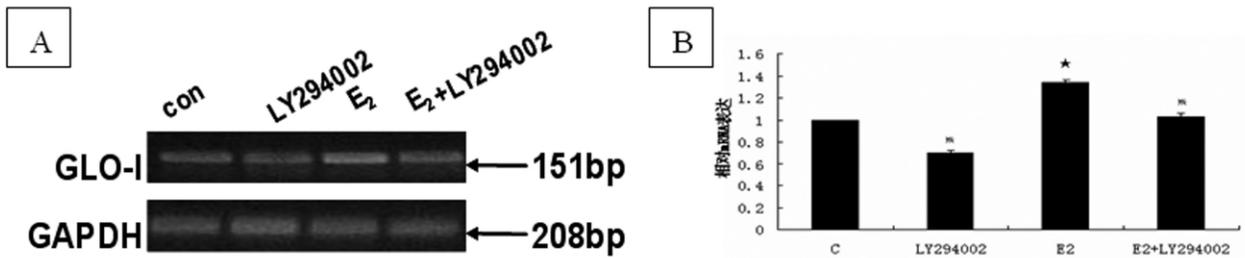


图2 LY294002 抑制子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo mRNA 的表达

Fig.2 LY294002 decrease Glo mRNA expression of KLE cells

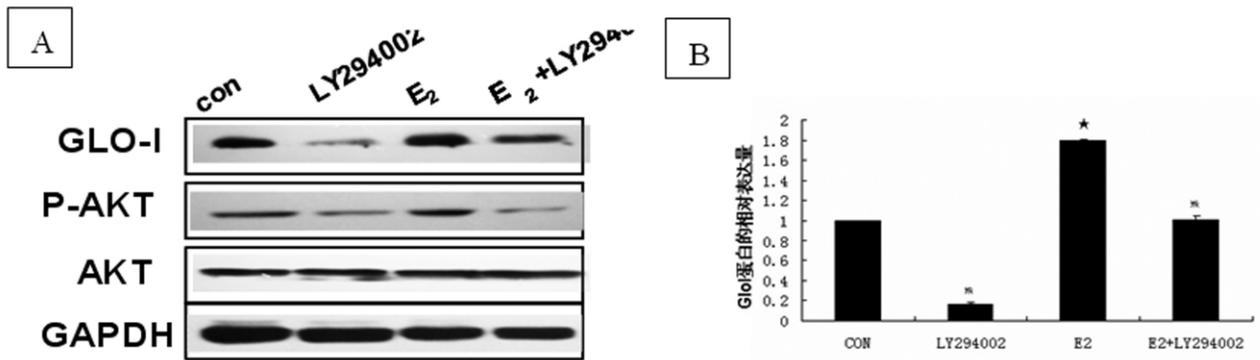


图3 LY294002 抑制子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 蛋白的表达

Fig.3 LY294002 decrease Glo protein expression of KLE cells

3 讨论

子宫内膜癌的流行病学调查显示, 80%~90%的子宫内膜癌为 型, 即雌激素依赖型, 主要与雌激素的过多刺激有关。而型子宫内膜癌与雌激素的关系不大, 因而又称非雌激素依赖型^[8]。长期过度的雌激素刺激是子宫内膜癌发生发展的高危因素目前已基本得到肯定。但其具体的作用机制仍不明确。而子宫内膜癌的发生又是一个多种因素联合作用的复杂过程。肥胖、高血压、糖尿病被称为子宫内膜癌的三联征, 这一系列代谢紊乱性疾病亦是子宫内膜癌的高危因素^[9-12]。因此, 了解雌激素与子宫内膜癌代谢途径中的关键基因之间是否存在联系, 将为研究治疗子宫内膜癌的方法提供新的指导方向。

Glo 是细胞代谢过程中重要的蛋白酶, 包括 Glo 和 Glo , 作为甲基乙二醛的主要代谢酶而引起大家的重视。目前已证实 Glo 在多种肿瘤细胞中均高表达, 提示 Glo 的高表达与肿瘤的发生发展相关^[2-5]。不仅如此, 亦有研究结果提示 Glo 的过度表达还导致肿瘤细胞的高侵袭性和耐药的特性^[6-7]。在同样激素依赖性的乳腺癌中, 有研究指出 17β - 雌二醇可以上调 MCF7 乳腺癌细胞株中 Glo 的表达和酶活性, 同时上调细胞的增殖活性^[13]。但 Glo 在子宫内膜癌中的表达是否同样受到雌激素的调节, 还未见到相关报道。

在本研究中, 我们发现不同浓度的雌激素均能上调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo mRNA 的表达水平, 以 10⁻¹⁰ M 时最显著。同浓度的雌激素亦能上调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 蛋白的表达。但雌激素是如何调控 Glo 的表达仍不清楚。PI3K/AKT 信号通路与细胞增殖、凋亡等密切相关, 雌激素能够

活化该信号通路^[14]。因此, 在本研究中, 我们用信号通路抑制剂 LY294004 阻断 AKT 途径后, 发现 Glo mRNA 的表达明显下调。在蛋白水平的改变上, 也出现了类似的结果。说明抑制 AKT 途径可下调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 表达。而抑制 AKT 途径后, 再用雌激素刺激, 相对于单独用雌激素刺激的 KLE 细胞中 Glo 表达的下降幅度同抑制 AKT 途径和未用药物处理的 KLE 细胞中 Glo 表达的下降数值相近, 说明 AKT 途径在雌激素调控子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 的表达无明显作用。

综上所述, 雌激素可上调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 的表达, 抑制 AKT 途径可下调子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 的表达, 但 AKT 途径在雌激素调控子宫内膜癌 KLE 细胞中 Glo 的表达无明显作用。对于 Glo 的研究, 可以为子宫内膜癌的发病机制, 以及相关治疗提供新的思考方向。而雌激素对子宫内膜癌细胞中 Glo 的具体调控机制则需要进一步的研究。

参考文献(References)

- [1] Thornalley PJ. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification: a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy [J]. Gen Pharmacol, 1996, 27(4): 565-573
- [2] Rulli A, Carli L, Romani R, et al. Expression of glyoxalase and in normal and breast cancer tissues [J]. Breast Cancer Res Treat, 2001, 66(1):67-72
- [3] Bhattacharyya N, Pal A, Patra S, et al. Activation of macrophages and lymphocytes by methylglyoxal against tumor cells in the host [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(11):1503-1512 (下转第 3215 页)

可能为第一天 MA 通过氧化应激、化学损伤破坏的 COX-2 的基础水平大于其产生 COX-2, 导致 MA1 天组 COX-2 水平降低; 随着注射 MA 作用时间的延长, 其产生的 COX-2 水平增高, 因此 COX-2 水平也增高。而 COX-2 有两种活性^[9] 过氧化物酶和环氧合酶, 合成 PGE₂ 主要依靠环氧合酶活性, 根据 MA2 天组、MA3 天组 PGE₂、EP₂ 受体表达水平没有随 COX-2 水平增高而增高推测 MA 主要是激活了 COX-2 的过氧化物酶活性而导致上述结果。

在 MPTP 的 PD 模型中, COX-2 水平和小胶质细胞数目呈明显的正相关关系, 和多巴胺能神经元数目呈负相关, 抑制 COX-2 或 COX-2 基因缺陷能明显减少小胶质细胞激活, 保护多巴胺能神经元免受神经毒素的损伤^[8], 且有学者提出 PD 中小胶质细胞活化机制是通过 COX-2 → PGE₂ → EP₂ 受体 → 小胶质细胞激活这个途径进行的^[4]。本研究发现小胶质细胞表达水平三个实验组均高于正常组, 且 3 天组高于 2 天组, 2 天组高于 1 天组, 可以推出 MA 可以引起小胶质细胞活化, 但与上述 PD 的活化途径不同。小胶质细胞可能与 COX-2 的过氧化物酶活性有关, 但肯定还有其他因素参与其中并起主要作用, 有待进一步研究。

基于 COX-2、PGE₂ 和 EP₂ 受体在神经系统中的构成性表达这一前提, 结合 COX-2、PGE₂、EP₂ 受体及小胶质细胞在 MA 中毒大鼠中的表达异常与产生的相应的神经生物学功能的改变, 可以提出 COX-2 与甲基苯丙胺的神经毒性有关, 而 COX-2/PGE₂ 系统与甲基苯丙胺中毒大鼠纹状体内小胶质细胞活化无明显相关性, MA 中毒大鼠导致小胶质细胞活化的机制有待进一步研究。

参考文献(References)

- [1] David M. Thomas and Donald M.Kuhn. Cyclooxygenase-2 is an obligatory factor in methamphetamine-induced neurotoxicity [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 313:870-876
- [2] Hastings TG. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase [J]. *Journal of Neurochemistry*, 1995, 64: 919-924
- [3] Zhang X, Dong F, Mayer GE, et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 exacerbates methamphetamine-induced dopamine depletion in the striatum in rats [J]. *Neuroscience*, 2007, 150:950-958
- [4] 高俊鹏, 孙珊, 李文伟等. 环氧合酶在神经变性疾病神经元进行性损伤中起的作用 [J]. *生理科学进展*, 2008, 39(3):214-220
- [5] 乔东访, 李艳红, 谭晓辉等. 甲基苯丙胺中毒大鼠纹状体小胶质细胞的激活特性 [J]. *法医学杂志*, 2009, 25(5):321-325
- [6] Zeng XF, Lu G, Li Z. Progress in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity [J]. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, 2010, 25(1):33-36
- [7] Blobaum AL, Marnett LJ. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition [J]. *Med Chem*, 2007, 50: 1425-1441
- [8] Vijit ruth R, Liu M, Choi DY, et al. Cyclooxygenase-2 mediates microglial activation and secondary dopaminergic cell death in the mouse MPTP model of Parkinson's disease [J]. *J Neuroinflammation*, 2006, 3 :6-6
- [9] Xie W L, Chipman JG, Robberts on DL. Expression of a outogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing . *Proc Natl Acad Sci USA* [J]. 1991, 88: 2692-2696
- [4] Campbell AK, Naseem R, Holland IB, et al. Methylaloxal and other carbohydrate metabolites induce lanthanum-sensitive Ca²⁺ transients and inhibit growth in *E. coli* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 468(1):107-113
- [5] 隋龙, 郭奇桑, 张箴波, 等. 乙二醛酶在子宫内膜癌组织和细胞中的表达及其对细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中华妇产科杂志*, 2010, 45(6):429-433
Sui Long, Guo Qi-sang, Zhang Zhen-bo, et al. Expression of glyoxalase and its effect on cell proliferation and apoptosis in endometrial carcinoma [J]. *Chin J Obstet Gynecol*, 2010, 45(6):429-433
- [6] Mearini E, Romani R, Mearini L, et al. Differing expression of enzymes of the glyoxalase system in superficial and invasive bladder carcinomas [J]. *Europ J Cancer*, 2002, 38(14):1946-1950
- [7] Thornalley PJ. Protecting the genome: defence against nucleotide glycation and emerging role of glyoxalase I overexpression in multidrug resistance in cancer chemotherapy [J]. *Biochem Soc Trans*, 2003, 31(6): 1372-1377
- [8] 王超, 胡丽娜. 子宫内膜癌发病的相关因素 [J]. *实用妇产科杂志*, 2008, 24(5):257-259
Wang Chao, Hu Li-na. Pathogenic factors in relation to endometrial cancer [J]. *J Practical Obstetrics Gynecol*, 2008, 24(5):257-259
- [9] Renehan AG, Roberts DL, Dive C. Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2008, 114(1): 71-83
- [10] Brennan P, McKay J, Moore L, et al. Obesity and cancer: Mendelian randomization approach utilizing the FTO genotype [J]. *Int J Epidemiol*, 2009, 38(4): 971-975
- [11] Kelsey JL, Livolsi VA, Holford TR, et al. A case-control study of cancer of the endometrium [J]. *Am J Epidemiol*, 1982, 116(2):333-342
- [12] La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, et al. Risk factors for endometrial cancer at different ages [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1984, 73(3): 667-671
- [13] Rulli A, Antognelli C, Prezzi E, et al. A possible regulatory role of 17 beta-estradiol and tamoxifen on glyoxalase and glyoxalase genes expression in MCF7 and BT20 human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2006, 96(2):187-196
- [14] Lawlor MA, Alessi DR. PKB/AKT: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? [J]. *Cell Sci*, 2001, 114(16) 2903-2910

(上接第 3203 页)