

# 过表达 Akt1 细胞株的构建及鉴定

潘姝花, 郑婷婷, 郑旭升, 吴登伟, 陈培远, 许传莲

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

**摘要:** Akt1 是细胞信号传导通路中的关键信号分子, 具有促进细胞增殖、生长、迁移、侵袭, 以及抑制细胞凋亡, 抵抗化疗和放疗等作用。文章通过构建 pLJM1-Akt1 重组质粒, 利用慢病毒侵染的方法将重组质粒转染至 K562、Bel-7404 细胞, 用嘌呤霉素筛选得到 Akt1 稳定过表达的 Bel-7404/Akt1、K562/Akt1 细胞株, 通过 Western blotting 分析细胞株中 Akt1 的表达情况。结果显示: Bel-7404/Akt1 与 K562/Akt1 细胞中 Akt1 表达量明显高于野生型 Bel-7404 细胞与 K562 细胞, 成功构建过表达 Akt1 的 K562/Akt1、Bel-7404/Akt1 稳转细胞株。Akt1 过表达细胞株的成功构建为寻找和筛选高效、低毒、强特异性的 Akt1 抑制剂以及逆转细胞多药耐药 (multidrug resistance, MDR) 的研究提供了实验模型。

**关键词:** Akt1; 重组质粒; 病毒侵染

**中图分类号:** Q786

**文献标志码:** A

## 0 引言

Akt 是一种处于 PI3K/Akt 信号转导通路 (又称 Akt 或 PKB 通路) 核心部位的丝氨酸/苏氨酸激酶, 存在由不同的基因编码的 Akt1/PKB $\alpha$ 、Akt2/PKB $\beta$ 、Akt3/PKB $\gamma$  3 种亚型, 具有促进细胞增殖、生长、抑制细胞凋亡等作用。另外, Akt 在促进细胞迁移、侵袭, 以及促进血管生成, 抵抗化疗和放疗等方面也起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。Akt 是存在于人类染色体中的鼠类胸腺瘤病毒 (t-8 strain from AKR/J mouse, Akt8) 致癌基因的同源物, 已被定义为癌基因<sup>[3-4]</sup>, 在多种肿瘤中均存在异常表达和活化现象, 如卵巢癌、胃癌、乳腺癌等<sup>[5-7]</sup>。目前, 国内外关于 PI3K/Akt 信号通路与药物耐药性关系的研究越来越多, 并且该通路被认为是化疗耐药治疗的新靶点<sup>[2]</sup>。许多研究表明化疗药物可增加 Akt 活化水平, 使肿瘤细胞产生药物化疗耐受, 深入研究 Akt 作用机制, 可为肿瘤基因治疗、抗肿瘤药物开发提供新靶点<sup>[8-9]</sup>。

本研究选用 pLJM1 慢病毒载体, 构建重组质粒 pLJM1-Akt1, 并运用病毒侵染的方法筛选得到

Akt1 稳定高表达 K562 与 Bel-7404 细胞株。本研究旨在运用慢病毒载体的优势构建 Akt1 高表达细胞株, 为寻找和筛选高效、低毒、强特异性的 Akt1 抑制剂以及 MDR 的研究提供实验模型, 并为后续深入研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

DNA 限制性内切酶 Age I 和 EcoR I 购自 Takara 公司; 反转录试剂盒购自 TOYOBO 公司; Akt1 抗体购自 Cell Signaling 公司; Akt1 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。慢病毒载体 pLJM1、包装载体 (psPAX2、pMD2. G) 和大肠杆菌菌株 Stbl 3 由浙江理工大学新元医学与生物技术研究所有保存。

### 1.2 细胞株

人肾上皮细胞 293T、人肝癌细胞 Bel-7404、人慢性髓性白血病细胞 K562 均为浙江理工大学新元医学生物技术研究所有保存。

### 1.3 重组载体构建

提取 Bel-7404 细胞的总 RNA, 逆转录得到 cD-

收稿日期: 2013-12-04

作者简介: 潘姝花 (1988-), 女, 浙江富阳人, 硕士研究生, 主要从事天然产物方面的研究。

通信作者: 许传莲, E-mail: chuanlianxu@163.com

NA 模板,以 *Akt1* 上游引物(Former primer, FP): 5'-CGCACCGGTATGAGCGACGTGGCTATT-GTGAA-3';下游引物(Reverse primer, RP): 5'-CCGGAATTCTCAGGCCGTGCCGCTGG-3' 扩增 *Akt1* 片段。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min; 98℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 1 min, 反应为 30 个循环;继续 68℃ 延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收。*Akt1* 目的片段和 pLJM1 载体均用限制性内切酶 *Age* I 和 *Eco*R I 在 37℃ 同时酶切 2.5 h。将酶切回收的 *Akt1* 基因产物与载体 pLJM1 片段用 *T*<sub>4</sub> 连接酶进行连接,置于 16℃ 水浴中连接过夜,得到重组质粒 pLJM1-*Akt1*,并经质粒 PCR、双酶切及测序鉴定。

#### 1.4 慢病毒包装

取  $7.5 \times 10^5$ /dish 293T 细胞接种至直径 10 cm 的培养皿中培养,待细胞汇合度达 50% 左右,换成 6 mL 无血清 MEM 培养基培养 3 h;取 10  $\mu$ g pLJM1-*Akt1*(或 pLJM1), 3.5  $\mu$ g pMD2. G, 5.5  $\mu$ g psPAX2 至 400  $\mu$ L 无血清 MEM 培养基中;取另一 EP 管中加入 20  $\mu$ L Transfers 至 400  $\mu$ L 无血清 MEM 培养基中,室温孵育 5 min。混合两 EP 管培养基轻轻吹打混合均匀,室温孵育 20 min,逐滴加入细胞培养皿中。细胞于 37℃ 培养箱中培养 6 h 后换成 10% 血清的 DMEM 培养基培养;培养 24 h 后,观察 293T 细胞,约有 30% 左右的细胞死亡,此时收集培养基(已经有慢病毒产生)。继续加入 6 mL 10% 血清的 DMEM 培养基培养,48 h 后再收获一次病毒。将两次收获的病毒液合并,可用孔径为 0.45  $\mu$ m 的针头滤器过滤去除 293T 细胞,取滤液感染 K562、Bel-7404 细胞。

#### 1.5 病毒包装成功与否鉴定

收集转染 48 h 后的 293T 细胞,加入细胞裂解液收集蛋白,通过 Western blot 检测是否成功包装 pLJM1-*Akt1* 慢病毒。

#### 1.6 慢病毒感染及稳定株的筛选

K562 细胞、Bel-7404 细胞在感染前 2 h 分别换新鲜的含 10% FBS 的 RPMI-1640、DMEM 培养基 6 mL,滴加 4 mL 病毒液感染细胞;并于 12 h 后第二次感染细胞。24 h 后换含 5% FBS 的 RPMI-1640 和 DMEM 培养,感染两天后用 0.6  $\mu$ g/mL 的嘌呤霉素(puromycin)进行筛选。以未感染的 K562 细胞、Bel-7404 细胞作为对照,每隔两天换一次选择性培养基,最优浓度为在 3~5 d 内杀死所有对照组细胞的浓度。细胞传代后继续用 0.6  $\mu$ g/mL 的 puromycin 进行筛选。

mycin 进行筛选。

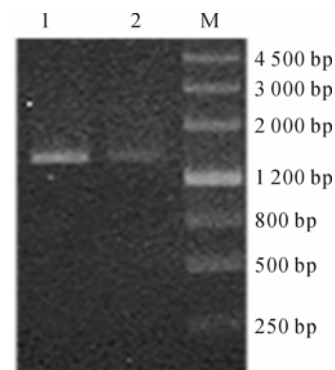
#### 1.7 稳转细胞株验证

细胞筛选 5~6 次后,收集 K562 细胞、Bel-7404 细胞及其未感染对照 K562 细胞、Bel-7404 细胞,进行 Western blot 检测目的蛋白 *Akt1* 的表达情况。

## 2 结果与分析

#### 2.1 目的产物扩增

提取的 RNA 进行逆转录成 cDNA,以逆转录产物 cDNA 为模板进行 PCR 反应。*Akt1* PCR 扩增产物如图 1,片段大小在 1 400 bp 左右,与目的片段 *Akt1* 相符。

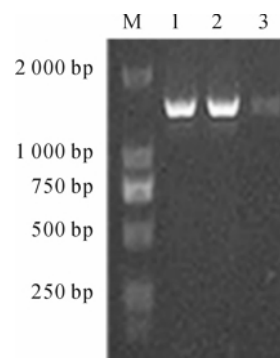


M: Marker III;泳道 1 和 2: *Akt1* PCR 扩增产物

图 1 目的片段 *Akt1* PCR 扩增产物

#### 2.2 重组质粒 pLJM1-*Akt1* 的 PCR 鉴定

目的片段 *Akt1* 和载体 pLJM1 双酶切后,经 *T*<sub>4</sub> 连接酶连接后,在无抗性的 LB 液体培养基中活化后,涂布至含有 Amp 抗性的 LB 固体培养基平板上,经 12 h 左右挑取单克隆扩大培养,并提取质粒做质粒 PCR 鉴定,图 2 的鉴定结果显示,存在阳性克隆且片段大小在 1 400 bp 左右,与预期目的片段 *Akt1* 相符。



M: DL2 000 Marker;泳道 1-2:阳性克隆 PCR 产物;

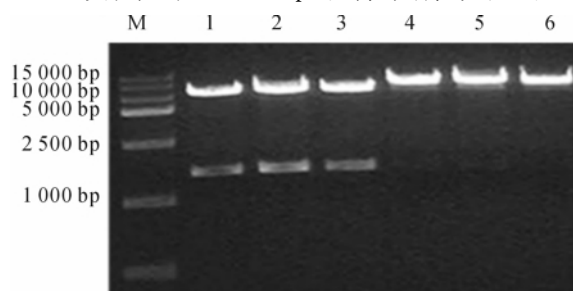
泳道 3:阴性克隆 PCR 产物

图 2 重组质粒 pLJM1-*Akt1* 的 PCR 鉴定

#### 2.3 重组质粒 pLJM1-*Akt1* 的酶切鉴定结果

重组 pLJM1-*Akt1* 质粒提取后,进行单/双酶切

鉴定,结果显示重组质粒经 *EcoR* I 酶切后得到单一条带,经 *Age* I 和 *EcoR* I 双酶切后得到两条条带,且与目的片段 *Akt1* 大小(1 443 bp 左右)以及 pLJM1 质粒大小(8 083 bp)相符,具体结果见图 3。



M:DL15 000 Marker;泳道 1—3:*Age* I 和 *EcoR* I 双酶切产物;泳道 4—6:*EcoR* I 单酶切产物

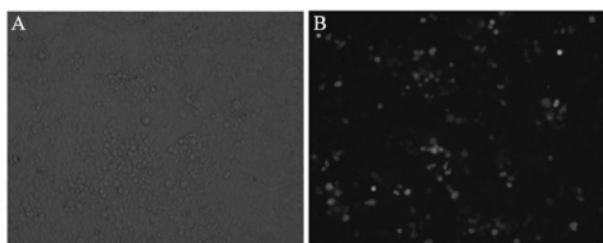
图 3 重组质粒 pLJM1-Akt1 的单双酶切鉴定图

## 2.4 测序鉴定结果

测序结果显示,构建的重组质粒目的片段 *Akt1* 的碱基序列正确。

## 2.5 pLJM1-Akt1 与包装质粒共转染 293T 细胞

载体 pLJM1 带有 EGFP 荧光蛋白的标签,能产生绿色荧光蛋白,在荧光显微镜下能看到大量绿色荧光,转染效率达 50% 以上,结果见图 4 所示。



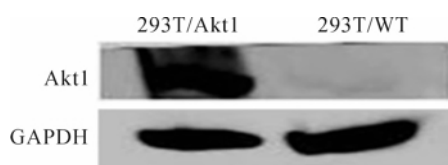
A:pLJM1 质粒转染 293T 后明场观察,

B:pLJM1 质粒转染 293T 后荧光场观察

图 4 pLJM1 质粒转染 293T 的荧光显微镜观察(100×)

## 2.6 包装的慢病毒 Western blot 检测

收集转染 48 h 后的 293T 细胞,加入细胞裂解液收集蛋白,通过 Western blot 检测是否包装成功 pLJM1-Akt1 慢病毒。结果如图 5 所示,293T/*Akt1* 细胞株中 *Akt1* 表达量明显高于野生型 293T/WT 细胞,说明 pLJM1-Akt1 慢病毒包装成功。



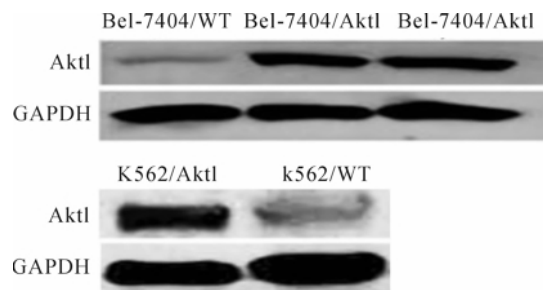
293T/*Akt1*:转染 pLJM1-Akt1 的 293T 细胞;

293T/WT:野生型 293T 细胞

图 5 293T/*Akt1* 和 293T/WT 细胞中的 *Akt1* 表达量

## 2.7 稳转细胞株的验证

经筛选得到稳定的 Bel-7404/*Akt1*、K562/*Akt1* 细胞株后,收取 Bel-7404/*Akt1*、Bel-7404 细胞、K562/*Akt1* 细胞和 K562 细胞,进行 Western blot 检测目的蛋白 *Akt1* 的表达,结果见图 6。图 6 可见,Bel-7404/*Akt1* 细胞株中 *Akt1* 表达量明显高于野生型 Bel-7404 细胞,K562/*Akt1* 细胞株中 *Akt1* 表达量明显高于野生型 K562 细胞。



Bel-7404/*Akt1* 和 K562/*Akt1*:稳转 *Akt1* 的 Bel-7404 和 K562 细胞;Bel-7404/WT 和 K562/WT:野生型 Bel-7404 和 K562 细胞

图 6 Bel-7404/*Akt1*、Bel-7404/WT 和 K562/*Akt1*、K562/WT 细胞中的 *Akt1* 表达量

## 3 讨论

*Akt* 激酶是 PI3K/*Akt* 通路中关键信号分子,在促进细胞增殖、生长,抑制细胞凋亡,促进细胞迁移、侵袭,促进血管生成,抵抗化疗和放疗等方面具有重要作用,在多种癌细胞中异常表达<sup>[1-2]</sup>。

有研究发现在胃癌 AGS 细胞中上调 PI3K/*Akt* 的表达可导致 P-gp 相关及不相关药物耐药<sup>[10]</sup>。Simon 等<sup>[11]</sup>报道抑制 *Akt* 的活力可以促进多药耐药胃癌细胞凋亡、逆转耐药及增强胰腺癌耐药株对吉西他滨的敏感性。Yuan 等<sup>[12]</sup>发现过度活化的 *Akt* 可以通过抑制凋亡信号激酶(ASK)并且抑制 ASK 下游 JNK 和 P38 的活性,从而产生耐药性。Jin 等<sup>[13]</sup>发现乳腺癌细胞株 MCF 对紫杉醇、5-Fu 以及阿霉素的耐药与 PI3K/*Akt* 的活性升高有关,而抑制 PI3K/*Akt* 可以逆转 MCF7 的耐药性。这些结果均表明,*Akt* 与肿瘤细胞耐药密切相关。

*Akt1* 是 *Akt* 家族成员之一,不但影响肿瘤细胞的增殖、凋亡,而且对许多肿瘤的侵袭和转移也有影响。磷酸化的 *Akt1* 可以促进纤维肉瘤细胞、成纤维细胞、人类胰腺癌细胞等多种癌细胞的侵袭能力<sup>[14-16]</sup>。有研究发现在乳腺癌细胞中发现 *Akt1* 异常表达,并且在癌细胞的迁移和侵袭中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。*Akt1* 在喉癌组织中也异常表达,且与其病理

分化程度和喉癌发生发展密切相关<sup>[18]</sup>。另有研究发现通过 RNA 干扰 Akt1 基因沉默具有抑制喉癌细胞增殖,促进细胞凋亡等作用,因此,Akt1 可作为喉癌基因治疗的候选新靶点<sup>[19]</sup>。这些结果均表明,Akt1 在不同的肿瘤细胞中发挥着重要作用。

深入研究 PI3K/Akt 通路在多药耐药中的具体机制可能为肿瘤治疗提供一个新的靶点。本研究用慢病毒感染的方法,筛选得到 Akt1 高表达细胞株 Bel-7404/Akt1、K562/Akt1 细胞,为寻找和筛选更加高效、低毒、强特异性的 Akt1 抑制剂和逆转多药耐药癌细胞凋亡的后续研究提供研究模型。

### 参考文献:

- [1] Mahajan K, Mahajan N P. PI3K-independent AKT activation in cancers: A treasure trove for novel therapeutics [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2012, 227 (9): 3178-3184.
- [2] 张 晔, 刘云鹏. PI3K/Akt 信号传导通路与肿瘤多药耐药研究进展[J]. *中华临床医师杂志*, 2011, 5(2): 446-449.
- [3] Sarbassov D D, Guertin D A, Ali S M, et al. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex[J]. *Science*, 2005, 307(5712): 1098-1101.
- [4] 苗丽君, 王 静. Akt 与肿瘤的研究进展[J]. *国外医学: 生理病理科学与临床分册*, 2004, 24(5): 406-409.
- [5] Zou J, Wang K, Han L, et al. AKT1 and AKT2 promote malignant transformation in human brain glioma LN229 cells [J]. *Clinical Oncology and Cancer Research*, 2011, 8(3): 144-148.
- [6] Matsuoka T, Yashiro M, Nishioka N, et al. PI3K/Akt signalling is required for the attachment and spreading, and growth in vivo of metastatic scirrhous gastric carcinoma[J]. *British Journal of Cancer*, 2012, 106 (9): 1535-1542.
- [7] Ju X, Katiyar S, Wang C, et al. Akt1 governs breast cancer progression in vivo[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(18): 7438-7443.
- [8] Batchu R B, Gruzdyn O V, Bryant C S, et al. Ritonavir-Mediated induction of apoptosis in pancreatic cancer occurs via the RB/E2F-1 and AKT pathways[J]. *Pharmaceuticals*, 2014, 7(1): 46-57.
- [9] Kumar A, Rajendran V, Sethumadhavan R, et al. AKT kinase pathway: a leading target in cancer research[J]. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 1-6.
- [10] Han Z, Hong L, Wu K, et al. Phospho Akt mediates multidrug resistance of gastric cancer cells through regulation of P-gp, Bcl-2 and Bax[J]. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 2007, 26 (2): 261-268.
- [11] Simon P O, McDunn J E, Kashiwagi H, et al. Targeting AKT with the proapoptotic peptide, TAT-CTMP: a novel strategy for the treatment of human pancreatic adenocarcinoma[J]. *International Journal of Cancer*, 2009, 125(4): 942-951.
- [12] Yuan Z, Feldman R I, Sussman G E, et al. AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1 implication of AKT2 in chemoresistance[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(26): 23432-23440.
- [13] Jin W, Wu L, Liang K, et al. Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells [J]. *British Journal of Cancer*, 2003, 89(1): 185-191.
- [14] Cantley L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [15] Hong S K, Jeong J H, Chan A M, et al. AKT upregulates B-Raf Ser445 phosphorylation and ERK1/2 activation in prostate cancer cells in response to androgen depletion[J]. *Experimental Cell Research*, 2013, 319 (12): 1732-1743.
- [16] Enomoto A, Murakami H, Asai N, et al. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE[J]. *Developmental Cell*, 2005, 9(3): 389-402.
- [17] Liu H, Radisky D C, Nelson C M, et al. Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(11): 4134-4139.
- [18] 陈 静, 韩学尧, 纪立农. 新发现的 MODY 亚型[J]. *中国糖尿病杂志*, 2011, 19(7): 552-554.
- [19] 阎 英, 张海波. 靶向 Akt1 小干扰 RNA 对人喉癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国当代医药*, 2011, 18 (36): 7-9.

## Establishment and Identification of Over Expression of Akt1 Cell Strain

PAN Shu-hua, ZHENG Ting-ting, ZHENG Xu-sheng, WU Deng-wei, CHEN Pei-yuan, XU Chuan-lian

(College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** Akt1 is a key signal molecule in cell signal transduction pathways, which promotes cell growth, proliferation, migration and invasion, inhibits cell apoptosis and resists chemotherapy and radiotherapy. This study establishes the pLJM1-Akt1 recombinant plasmids and transfects the recombinant plasmids into K562 and Bel-7404 cells with the method of virus infection. We obtained stable Bel-7404/Akt1 and K562/Akt1 over expressed by Akt1 through puromycin screening. Akt1 expression in the cell strain was analyzed through Western blotting. The results show that the expression quantity of Akt1 in K562/Akt1 and Bel-7404/Akt1 cells is significantly more than that in wild K562 and Bel-7404 cells; stable and transfected cell strains of K562/Akt1 and Bel-7404/Akt1 of over expressed Akt1 are successfully established. The successful establishment of over expressed Akt1 cell strain provides experimental model for seeking and screening efficient, low-toxicity, strong-specificity Akt1 inhibitors and studying reverse multi-drug resistance (MDR).

**Key words:** Akt1; recombinant plasmid; virus infection

(责任编辑: 许惠儿)