

PI3K/Akt 抑制剂对鸡胚蛋白过表达 DF-1 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

万学瑞, 朱曼玲, 杨润霞, 刘桂林, 刘磊, 吴润*

(甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070)

摘要: 为探讨 PI3K/Akt 信号通路在鸡细胞型胚蛋白(ChPrP^C)过表达的 DF-1 细胞(DF-1-PrP)增殖、黏附、侵袭和凋亡过程中的作用及其与 ChPrP^C 表达量的关系, 以 DF-1-PrP 细胞为模型, 空载体转染的 DF-1-NC 细胞和 DF-1 细胞为对照, 分别用 0、10、20、50、100、200 nmol · L⁻¹ 渥曼青霉素处理以抑制 PI3K/Akt 信号通路, 检测细胞对鼠尾胶原的黏附能力, Transwell 小室法检测细胞侵袭力, MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, RT-PCR 法检测 *PRNP* 基因转录量。结果显示, 随着渥曼青霉素浓度的增加, DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞的 *PRNP* 基因转录量均减少, 其增殖、黏附、侵袭能力相应下降, 而总凋亡率均升高; 但在低于 100 nmol · L⁻¹ 的同一渥曼青霉素浓度下, DF-1-PrP 细胞增殖、黏附、侵袭能力始终高于对照组, 而总凋亡率均低于对照组。本研究表明 ChPrP^C 的过量表达可促进 DF-1 细胞增殖、黏附和侵袭, 抑制其凋亡, 在以上过程中, PI3K/Akt 信号通路可能具有重要的作用, 渥曼青霉素能有效阻断这一通路, 但 PI3K/Akt 信号通路并不是 ChPrP^C 调节细胞凋亡的唯一途径。

关键词: PI3K/Akt; 鸡胚蛋白; DF-1 细胞系; 渥曼青霉素; 凋亡

中图分类号: S831.1; S852.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)10-1844-07

Effects of PI3K/Akt Inhibitor on Proliferation, Invasion and Apoptosis of DF-1 Cells with Over-expression of Chicken PrP^C

WAN Xue-rui, ZHU Man-ling, YANG Run-xia, LIU Gui-lin, LIU Lei, WU Run*

(College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: DF-1 cells with over-expression of chicken PrP^C (DF-1-PrP), DF-1 cells with pcDNA3.1 (DF-1-NC) and DF-1 cells were used as cell models in order to study the effect of PI3K/Akt pathway on DF-1-PrP cells proliferation, adhesion, invasion and apoptosis and its relationship with ChPrP^C expression. After cells were treated with 0, 10, 20, 50, 100 and 200 nmol · L⁻¹ Wortmannin, adhesion assay, transwell assay, MTT assay, flow cytometric assay and RT-PCR analyses were used to detect cell adhesion, invasion, proliferation, apoptosis and expression of *PRNP* mRNA, respectively. The data showed that the expression of *PRNP* mRNA of DF-1-PrP, DF-1-NC and DF-1 cells were all decreased with the increasing of wortmannin concentration, and adhesion, invasion and proliferation ability were reduced, but apoptosis rate were increased. Furthermore, under the same concentration of less than 100 nmol · L⁻¹, adhesion, invasion and proliferation ability of DF-1-PrP cells was higher than DF-1-NC and DF-1 cells, apoptosis rate was lower. All these results indicated that over-expression of ChPrP^C promoted DF-1-PrP cells adhesion, invasion and proliferation and inhibited apoptosis, in which processes PI3K/Akt pathway may play an im-

收稿日期: 2015-02-05

基金项目: 国家自然科学基金(31160510); 甘肃省自然科学基金计划项目(1107RJZA198); 甘肃农业大学动物医学院教研产支持计划(JYCX-KX009)

作者简介: 万学瑞(1979-), 女, 甘肃白银人, 讲师, 博士, 主要从事预防兽医学研究工作, E-mail: 383921499@qq.com

* 通信作者: 吴润, 男, 教授, 博士生导师, E-mail: wurun@gsau.edu.cn

portant role. PI3K/Akt pathway can be effectively blocked by wortmannin, but it may not be the only pathway that ChPrP^C regulated cell apoptosis.

Key words: PI3K/Akt; chicken PrP^C; DF-1 cells; wortmannin; apoptosis

PI3K/Akt 信号转导通路广泛存在于细胞中, Akt 是此通路中的一个关键分子, 活性主要由 PI3K 的产物调控。胞外信号可以通过激活受体酪氨酸激酶(RTK)或 G 蛋白偶联受体而激活 PI3K, 其产物使 Akt 磷酸化, p-Akt 可在细胞质或细胞核内磷酸化多种蛋白质分子, 通过改变下游分子的磷酸化状态参与细胞的生长、增殖和存活。PI3K/Akt 信号转导通路是抑制细胞凋亡, 促进细胞生长增殖的重要因素, 使细胞维持周期运行^[1]。渥曼青霉素(wortmannin, WM)是丝状真菌绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)的代谢产物, 可特异性、不可逆的抑制 PI3K 活性, 阻断 PI3K/Akt 信号通路。

细胞型朊蛋白(cellular prion protein, PrP^C)是由细胞自身基因编码, 普遍表达在真核细胞膜上的 GPI 锚定蛋白^[2]。哺乳动物细胞型朊蛋白错误折叠形成异常痒病型朊蛋白(scrapie prion protein, PrP^{Sc})可致传染性海绵状脑病, 但在非哺乳动物体内却未见发病^[3]。多项研究已证明哺乳动物细胞型朊蛋白具有多种生理功能, 参与调节细胞增殖、分化、凋亡、侵袭、黏附、信号转导、铜离子代谢和氧化应激等过程^[4-10], 但具体机制还不清楚。本课题组前期的研究发现鸡细胞型朊蛋白(ChPrP^C)表达及分布规律同哺乳动物 PrP^C 相似^[11], 通过构建鸡细胞型朊蛋白过表达的鸡成纤维(DF-1)稳定细胞系(DF-1-PrP)证实其可促进 DF-1 细胞黏附、增殖和侵袭, 抑制其凋亡^[12], 进一步应用实时荧光定量 PCR 检测发现鸡细胞型朊蛋白过表达 DF-1 细胞的 Akt 基因表达量明显高于 DF-1 细胞, 推测鸡细胞型朊蛋白可能参与 Akt 的激活, 进而促进细胞生长与抑制细胞凋亡^[13]。为了证实这一推测, 本研究拟利用渥曼青霉素阻断 PI3K/Akt 信号通路, 探讨其对鸡细胞型朊蛋白过表达 DF-1 细胞黏附、增殖、侵袭和凋亡的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 DF-1 细胞、DF-1-PrP 细胞(ChPrP^C 过表达 DF-1 细胞)和 DF-1-NC 细胞(导入空表达载体 pCDNA3.1 的 DF-1 细胞), 均由本实验

室保存或构建。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(FBS, HyClone 公司), 鼠尾胶原(杭州生友生物技术有限公司); G418、DMEM、无血清培养基(GIBCO 公司), 渥曼青霉素(Alexis 公司), 噻唑蓝(MTT)、台盼蓝(上海酶联生化试剂有限公司), Annexin V-FICT/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物公司), Transwell 小室(Costar 公司), 牛血清白蛋白(BSA, 西安依科生物技术有限公司), 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 MyCycler™ Thermal Cycler EN-61010 PCR 仪(美国 BIO-RDA 公司), Light Cycler 480 II 荧光定量 PCR 仪(美国 Roche 公司); 酶标仪 680(美国 BIO-RAD 公司), FACSCalibur flow cytometer(美国 BD 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞用含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U · mL⁻¹)和链霉素(100 U · mL⁻¹)的 DMEM 培养基置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养, 当培养瓶中的细胞覆盖率达到 80% 以上时, 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 传 3 代稳定后进行后续试验。

1.2.2 黏附试验 将鼠尾胶原用 6 mmol · L⁻¹ 无菌乙酸配制成 6.25 mg · L⁻¹ 的溶液, 50 μL · 孔⁻¹ 加入 96 孔培养板, 4 °C 过夜制备基底膜, 吸出孔中残余液体, 加入 50 μL 无血清培养基 37 °C 孵育 30 min 水化基底膜。将对数生长期的 DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞, 胰蛋白酶消化后, 用培养液重悬细胞, 调整细胞数为 1 × 10⁵ · mL⁻¹, 100 μL · 孔⁻¹ 分别接种于包被鼠尾胶原的孔中, 再加入渥曼青霉素使其终浓度分别为 0、10、20、50、100、200 nmol · L⁻¹, 每组 4 个重复, 37 °C 5% CO₂ 环境下培养细胞, 以包被牛血清白蛋白(BSA)为对照。细胞培养 1 h 后, 用 PBS 溶液小心的洗细胞 3 次, 按照 MTT 比色法测定培养板各孔的光吸收值(A 值), 试验重复 3 次。应用如下公式分别计算各组细胞的黏附率: 黏附率(%) = [(处理组 A 值/BSA 对照组 A 值) - 1] × 100%。

1.2.3 侵袭试验 用 6.25 mg · L⁻¹ 鼠尾胶原溶液包被 Transwell 小室, 4 °C 过夜风干, 吸出残余液

体,加入 50 μL 无血清培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。用 0.25% 的胰蛋白酶消化处于对数生长期的 DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞,无血清培养液重悬细胞($1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)。在下室中加入 400 μL 按 1:1 混合的完全培养液和条件培养液(DF-1 细胞生长至 80% 以上融合,换无血清培养液培养 24 h 后收集培养上清液,过滤除菌),上室中加入 100 μL 细胞悬液,再加入渥曼青霉素使其终浓度分别为 0、10、20、50、100、200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,每组 4 个重复,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% 的 CO_2 环境中培养 24 h 后,弃培养基,擦净上室细胞,取出 Transwell 用 PBS 洗 2 次,95% 的乙醇溶液固定细胞 15 min,风干;加 4 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的台盼蓝溶液染色 20 min,PBS 洗 3 次,倒置显微镜下随机计数 10 个视野的细胞,取平均数,试验重复 3 次。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的 DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞 ($1 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$),100 $\mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 接种 96 孔培养板中,加入渥曼青霉素使其终浓度分别为 0、10、20、50、100、200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,以 DMEM 培养液为空白对照,每组 3 个重复。细胞培养 12、24、36、48、60 h 后,每孔加入 20 μL MTT(5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)溶液,置于 CO_2 培养箱中孵育 4 h 后吸出孔内液体,再加入 150 μL DMSO 振荡 10 min。用酶标仪检测,读取 $\text{OD}_{490 \text{ nm}}$ 处的吸光值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 在对数生长期的 DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞中加入渥曼青霉素使其终浓度分别为 0、10、20、50、100、200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,作用 24 h 后,消化收集细胞($1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$),按 Annexin V-FICT/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作,冷 PBS 洗细胞 2 次,加入 200 μL 结合缓冲液重悬细胞,再加入 10 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI,轻摇混匀,孵育 15 min;上述溶液中加入 300 μL 结合缓冲液充分混

匀,立即进行流式细胞仪检测。

1.2.6 不同渥曼青霉素浓度下 PRNP 基因的转录量检测 在对数生长期的 DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞中加入渥曼青霉素使其终浓度分别为 0、10、20、50、100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,作用 24 h 后,收集细胞提取总 RNA。利用本实验室建立的鸡 PrP^C 基因 mRNA 定量 RT-PCR 检测方法,检测 PRNP 基因 mRNA 表达量^[13]。

1.2.7 统计学分析 采用 SPSS17.0 软件 One-Way 分析(Anova)或 t 检验进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 渥曼青霉素以剂量依赖方式抑制 DF-1-PrP 细胞黏附

细胞黏附试验结果如表 1 所示,渥曼青霉素浓度为 0 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,各细胞黏附率均最高,且 DF-1-PrP 细胞黏附率比 DF-1-NC 细胞和 DF-1 细胞分别高 26.04% 和 26.18%,差异极显著($P < 0.01$),随着渥曼青霉素浓度的升高,各细胞的黏附率均显著下降。渥曼青霉素浓度 10~50 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DF-1-PrP 细胞黏附率极显著($P < 0.01$)高于 DF-1 和 DF-1-NC 细胞;100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DF-1-PrP 细胞黏附率显著($P < 0.05$)高于 DF-1 和 DF-1-NC 细胞;渥曼青霉素浓度达到 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞的黏附率无显著差异;当渥曼青霉素浓度 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,3 种细胞的黏附率分别被抑制了 87.46%、72.65% 和 84.32%。

2.2 渥曼青霉素以剂量依赖方式抑制 DF-1-PrP 细胞侵袭

细胞侵袭试验结果如表 2 所示,渥曼青霉素浓度为 0 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,各细胞的侵袭穿膜细胞数最多,其侵袭力最强,随着渥曼青霉素浓度的升高,细

表 1 不同浓度渥曼青霉素对细胞黏附率的影响

Table 1 Effects of different concentration wortmannin(WM) on cell adhesion rates

细胞 Cell	渥曼青霉素浓度/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) Wortmannin concentration						%
	0	10	20	50	100	200	
DF-1-PrP	45.93 \pm 1.04**	37.23 \pm 0.83**	35.11 \pm 1.13**	24.04 \pm 0.89**	13.92 \pm 0.66*	5.76 \pm 0.73	
DF-1	19.77 \pm 0.19	15.94 \pm 0.59	13.99 \pm 1.22	10.11 \pm 1.02	9.35 \pm 0.38	3.10 \pm 0.38	
DF-1-NC	19.89 \pm 0.82	14.81 \pm 0.41	12.11 \pm 0.32	10.38 \pm 0.74	9.82 \pm 1.01	5.44 \pm 0.41	

在同一列中与 DF-1 和 DF-1-NC 相比,** $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。下表同

In the same column,** $P < 0.05$,** $P < 0.01$ compared with DF-1 and DF-1-NC cells. The same as below

表 2 不同浓度渥曼青霉素对细胞侵袭(侵袭细胞数)的影响

Table 2 Effects of different concentration wortmannin on cell invasion(Cell numbers of invasion)

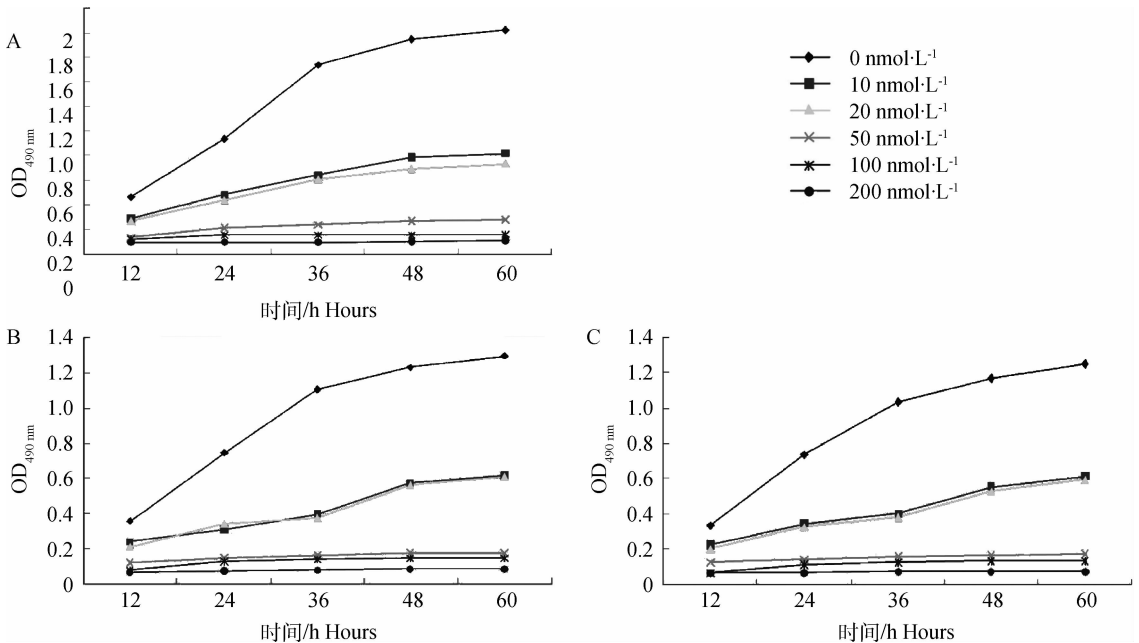
细胞 Cell	渥曼青霉素浓度/(nmol · L ⁻¹) Wortmannin concentration					
	0	10	20	50	100	200
DF-1-PrP	212 ± 14**	181 ± 7**	163 ± 11**	56 ± 10*	—	—
DF-1-NC	121 ± 13	92 ± 19	86 ± 7	32 ± 13	—	—
DF-1	123 ± 9	97 ± 14	83 ± 6	27 ± 16	—	—

细胞的侵袭力显著下降,但同一渥曼青霉素浓度下 DF-1-PrP 细胞侵袭穿膜细胞数显著高于 DF-1-NC 和 DF-1 细胞($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。当渥曼青霉素浓度高于 100 nmol · L⁻¹时,DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞均不见侵袭穿膜细胞。

2.3 渥曼青霉素以剂量和时间依赖方式抑制 DF-1-PrP 细胞增殖

应用 MTT 法检测细胞的增殖,结果显示(图 1),不加渥曼青霉素时,DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1

细胞增殖活性均高于其渥曼青霉素处理的增殖活性;随着渥曼青霉素浓度的增加和作用时间的延长,增殖抑制作用明显增强,呈现明显的时效和量效关系。同时在渥曼青霉素浓度低于 50 nmol · L⁻¹时,DF-1-PrP 细胞具有抗渥曼青霉素的能力,与 DF-1-NC 和 DF-1 细胞相比有统计学差异($P < 0.01$);而当渥曼青霉素浓度大于 50 nmol · L⁻¹时其几乎完全抑制了各细胞的增殖。



A. DF-1-PrP 细胞; B. DF-1-NC 细胞; C. DF-1 细胞
A. DF-1-PrP cells; B. DF-1-NC cells; C. DF-1 cells

图 1 不同渥曼青霉素浓度对细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of different concentration wortmannin on cell proliferation

2.4 渥曼青霉素以剂量依赖方式促进 DF-1-PrP 细胞凋亡

细胞经 Annexin-V-FITC/PI 双染后流式细胞仪检测,结果显示(图 2),在无渥曼青霉素处理时,DF-1-PrP 细胞总凋亡率(5.96%)低于 DF-1-NC 细胞(10.27%)和 DF-1 细胞(13.85%)。随着渥曼青

霉素浓度的增加,各细胞的总凋亡率均升高,而且呈现一定的剂量效应关系;渥曼青霉素浓度低于 20 nmol · L⁻¹以下时,对各细胞的凋亡率影响较小,当渥曼青霉素浓度高于 50 nmol · L⁻¹时,渥曼青霉素浓度对各细胞的凋亡率影响非常大。在同一渥曼青霉素浓度下,DF-1-PrP 细胞的凋亡率低于 DF-1-NC

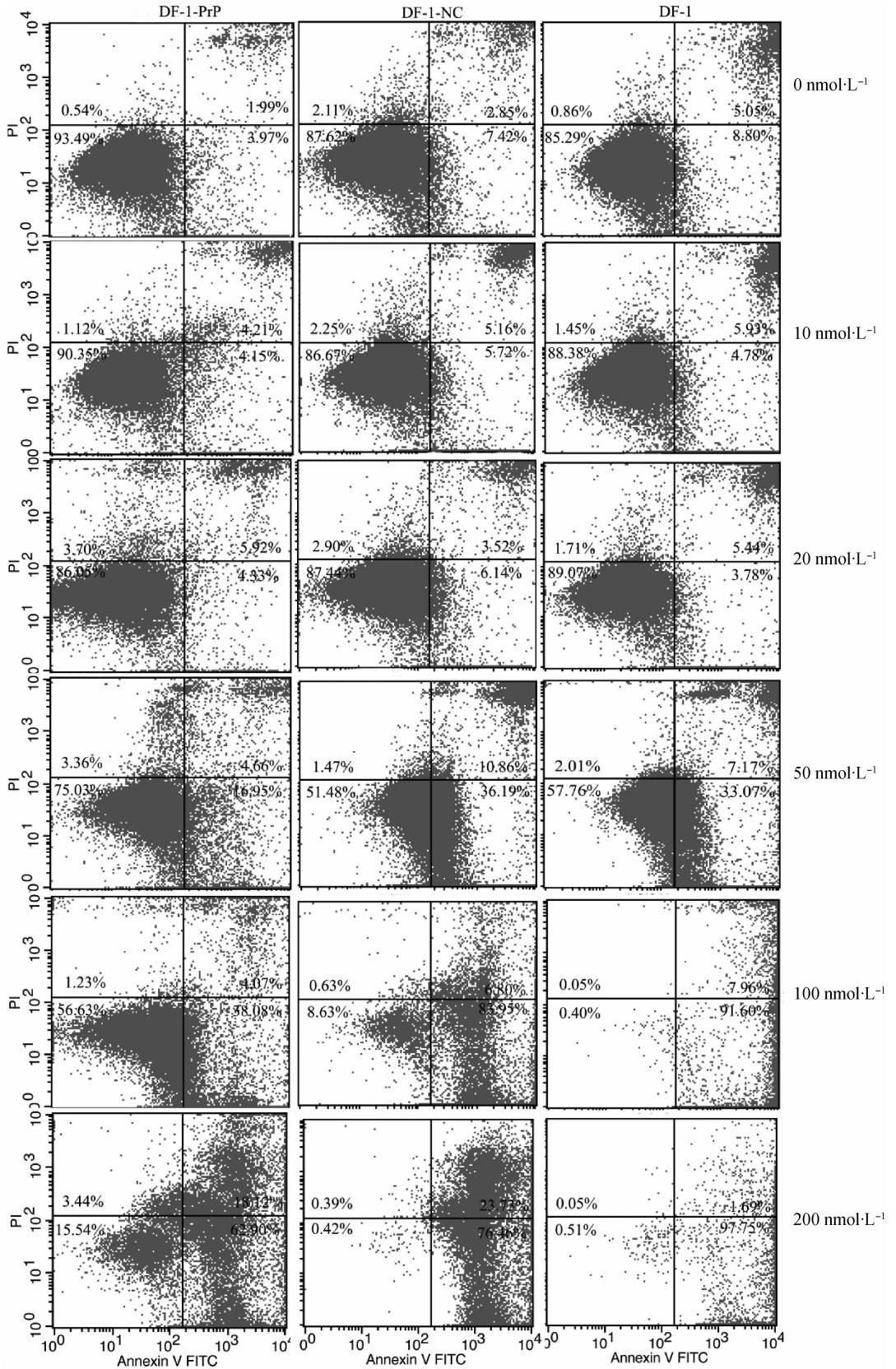


图 2 不同浓度渥曼青霉素对细胞凋亡的影响
 Fig. 2 Effects of different concentration wortmannin on cell apoptosis

和 DF-1 细胞;尤其渥曼青霉素浓度为 100、200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DF-1-NC 和 DF-1 细胞几乎全部凋亡,但 DF-1-PrP 细胞仍有 56.63% 和 15.54% 的细胞存活,具有抗渥曼青霉素的能力。

2.5 不同渥曼青霉素浓度下 PRNP 基因的转录量分析

利用本实验室建立的鸡 PRNP 基因 mRNA 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法,检测 DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞 PRNP 基因转录水平表达量,结果显示(图 3),加入渥曼青霉素时各细胞 PRNP 基因的 mRNA 拷贝数均出现变化;随着渥曼青霉素浓度的增加,PRNP 基因的 mRNA 拷贝数呈现出下降的趋势。在同一渥曼青霉素浓度下,DF-1-PrP 细胞 PRNP 基因的 mRNA 拷贝数均显著高于 DF-1-NC 和 DF-1 细胞。

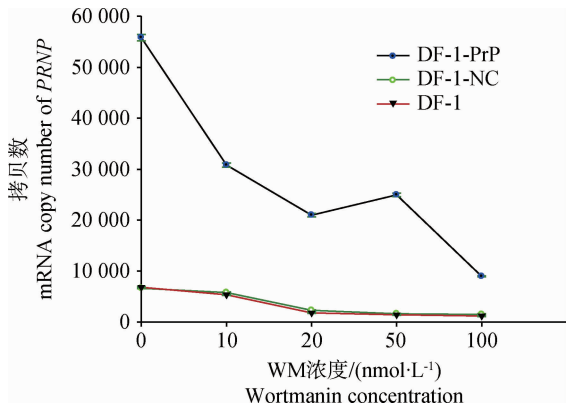


图 3 不同浓度渥曼青霉素对 PRNP 基因 mRNA 拷贝数的影响

Fig. 3 Effects of different wortmannin concentration on mRNA copy number of PRNP

3 讨论

Akt 的活性与抗细胞凋亡以及细胞生长、增殖和能量代谢有关。在肿瘤细胞中 Akt 的表达量较正常细胞高,有加速白血病细胞增殖和抑制细胞程序性死亡的作用^[14],激活 Akt 还可改变细胞迁移和侵袭,提高卵巢肿瘤细胞的侵袭能力^[15]。敲除小鼠的 PrP^C 基因可明显降低 p-Akt 表达量,加剧脑缺血后的神经损伤^[16]。PrP^C 和 p-Akt 在胃癌组织中协同表达,p-Akt 有可能在 PrP^C 介导的胃癌恶性表型中发挥作用^[17]。但鸡细胞型朊蛋白的生理功能及其机制还未见报道,为此作者构建了 ChPrP^C 过表达的鸡成纤维细胞系 DF-1-PrP 及空载体细胞系 DF-1-NC。本试验中,作者应用 PI3K/Akt 抑制剂

渥曼青霉素阻断该信号通路,探讨其对 PrP^C 介导的细胞增殖、黏附、侵袭和凋亡过程的影响。结果显示,渥曼青霉素浓度为 0 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞的增殖、黏附、侵袭能力均最高,总凋亡率均最低;且 DF-1-PrP 细胞增殖、黏附、侵袭能力均高于 DF-1-NC 细胞和 DF-1 细胞,而总凋亡率却低于 DF-1-NC 细胞和 DF-1 细胞,差异显著($P < 0.05$),说明 ChPrP^C 的过量表达可促进 DF-1-PrP 细胞增殖、黏附、侵袭,抑制其凋亡,这和 PrP^C 在哺乳动物中的功能相似^[7]。随着渥曼青霉素浓度的增加,DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞各自的 PRNP 基因 mRNA 表达量均减少,其增殖、黏附、侵袭能力相应下降,而总凋亡率均升高,且呈现一定的剂量效应关系,这证实了文献报道的 PI3K/Akt 信号转导通路是调节细胞存活最重要的途径之一^[18],ChPrP^C 至少部分是通过 PI3K/Akt 信号通路对 DF-1 细胞的增殖、黏附、侵袭和凋亡进行调节的。但在低于 100 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的同一渥曼青霉素浓度下,DF-1-PrP 细胞增殖、黏附、侵袭能力始终高于 DF-1-NC 细胞和 DF-1 细胞,而总凋亡率均低于 DF-1-NC 细胞和 DF-1 细胞,差异显著($P < 0.05$),说明 ChPrP^C 的过量表达具有抗渥曼青霉素的能力。尤其在流式细胞术检测细胞凋亡的试验中,渥曼青霉素浓度为 100 和 200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DF-1-NC 和 DF-1 细胞几乎全部凋亡,但 DF-1-PrP 细胞仍有 56.63% 和 15.54% 的细胞存活,提示 ChPrP^C 还可通过其他途径调节 DF-1 细胞的凋亡。

T. W. Poh 等研究渥曼青霉素对 PI3K/Akt 信号通路的作用,结果表明渥曼青霉素能负调控 PI3K/Akt 信号通路中的多种分子,包括 PI3K 和 mTOR,使 Akt 去磷酸化从而下调 Akt 激酶活性^[18-19]。作者采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测发现,随着渥曼青霉素浓度的增加,DF-1-PrP、DF-1-NC 和 DF-1 细胞中 PRNP 基因 mRNA 表达量均减少,而在同一渥曼青霉素浓度下,DF-1-PrP 细胞中 PRNP 基因 mRNA 表达量均高于 DF-1-NC 细胞和 DF-1 细胞,表明 Akt 基因表达量与 PRNP 基因表达量相关联,Akt 对 PrP^C 可能存在反馈调节,但其机制尚不明确。

总之,ChPrP^C 的过量表达可促进 DF-1 细胞增殖、黏附和侵袭,抑制其凋亡;渥曼青霉素以剂量依赖方式抑制 DF-1 细胞中 PRNP 基因 mRNA 表达及其细胞的增殖、黏附和侵袭,诱导其凋亡,表明

PI3K/Akt 信号通路可能在 ChPrP^C 介导 DF-1 细胞增殖、黏附、侵袭和凋亡过程中具有重要的作用。ChPrP^C 的过量表达可抗渥曼青霉素引起的细胞凋亡,提示 PI3K/Akt 信号通路并不是 ChPrP^C 调节细胞凋亡的唯一途径。本研究结果为进一步阐明 ChPrP^C 生理功能的分子机制奠定基础。

参考文献 (References):

- [1] OSAKI M, OSHIMURA M, ITO H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(6): 667-676.
- [2] PRUSINER S B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie[J]. *Science*, 1982, 216(4542): 136-144.
- [3] JI H F, ZHANG H Y. A comparative molecular dynamics study on thermostability of human and chicken prion proteins[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(3): 790-794.
- [4] BROWN D R, CLIVE C, HASWELL S J. Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein[J]. *J Neurochem*, 2001, 76(1): 69-76.
- [5] RACHIDI W, MANGÉ A, SENATOR A, et al. Prion infection impairs copper binding of cultured cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(17): 14595-14598.
- [6] PAN Y, ZHAO L, LIANG J, et al. Cellular prion protein promotes invasion and metastasis of gastric cancer[J]. *FASEB J*, 2006, 20(11): 1886-1888.
- [7] MEHRPOUR M, CODOGNO P. Prion protein: From physiology to cancer biology[J]. *Cancer Lett*, 2010, 290(1): 1-23.
- [8] DIARRA-MEHRPOUR M, ARRABAL S, JALIL A, et al. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 719-727.
- [9] ROUCOU X, GIANOPOULOS P N, ZHANG Y, et al. Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(7): 783-795.
- [10] KIM B H, LEE H G, CHOI J K, et al. The cellular prion protein(PrP^C) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2004, 124(1): 40-50.
- [11] DIAO X L, WU R, LIU L, et al. Expression patterns of PrP gene during chicken embryo development[J]. *Asian J Anim Vet Adv*, 2011, 7: 199-204.
- [12] 刁小龙. 鸡朊蛋白参与 DF-1 细胞增殖粘附的功能研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012: 60.
- DIAO X L. The function research of ChPrP^C involved in the processes of DF-1 cells proliferation and adhesion[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2012: 60. (in Chinese)
- [13] 朱曼玲, 吴 润, 于宏伟, 等. 鸡 Akt 基因 mRNA SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学, 2014, 44(7): 758-764.
- ZHU M L, WU R, YU H W, et al. Establishment of SYBR Green I real-time RT-PCR for detection of chicken Akt gene mRNA[J]. *Chinese Veterinary Science*. 2014, 44(7): 758-764. (in Chinese)
- [14] 王晓南, 吴 青, 张连生, 等. PI3K/Akt 抑制剂渥曼青霉素对白血病细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(1): 82-87.
- WANG X N, WU Q, ZHANG L S, et al. Effect of PI3K/Akt inhibitor wortmannin on proliferation and apoptosis of leukemia K562 cells[J]. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy*, 2010, 17(1): 82-87. (in Chinese)
- [15] LEE S, CHOI E J, JIN C, et al. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line[J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 97(1): 26-34.
- [16] WEISE J, SANDAU R, SCHWARTING S, et al. Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury[J]. *Stroke*, 2006, 37(5): 1296-1300.
- [17] 葛伏林, 吕 焱, 吴本俨, 等. 朊蛋白 PrP^C 及磷酸化 Akt 在胃癌中共表达及其临床意义[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(9): 962-964.
- GE F L, LV Y, WU B Y, et al. Co-expression of PrP^C and p-Akt in gastric cancer and its clinical significance [J]. *Journal of Chinese PLA Postgraduate Medical School*, 2011, 32(9): 962-964. (in Chinese)
- [18] OHTA T, OHMACHI M, HAYASAKA T, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase increases efficacy of cisplatin in *in vivo* ovarian cancer models[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(4): 1761-1769.
- [19] POH T W, PERVAIZ S. LY294002 and LY303511 sensitize tumor cells to drug-induced apoptosis via intracellular hydrogen peroxide production independent of the phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14): 6264-6274.