

# *p85a*基因对人神经母细胞瘤SY5Y细胞迁移的影响

陈林华 敬霞 王丽花 王教\*

(温州医科大学附属眼视光医院, 眼视光学和视觉科学国家重点实验室, 温州 325027)

**摘要** 通过干扰*p85a*基因的表达, 探讨其在人神经母细胞瘤SY5Y细胞迁移中的作用及对mRNA和蛋白质水平的影响。首先, 构建*p85a*基因的干扰质粒siRNA质粒(si-p85a)和过表达质粒(OE-p85a), 转染人神经母细胞瘤SY5Y细胞, 48 h后, 用定量PCR方法检测*p85a*基因的mRNA水平变化; Western blot检测其蛋白质水平变化; 用流式细胞术检测细胞周期变化; 随后, 将si-p85a、OE-p85a等质粒转染12孔板中的细胞, 分别在24、48、72 h时做划痕实验, 观察细胞迁移的变化。定量PCR显示, 与MOCK组相比, 不同组*p85a*基因表达有差异。干扰质粒(si-p85a)组表达降低, 约为对照组的0.42倍; 而过表达(OE-p85a)组表达明显升高, 为对照组的22.84倍, 均有显著性统计学差异( $P < 0.05$ )。Western blot结果显示, 转染si-p85a质粒后, *p85a*蛋白质水平下降; 而转染OE-p85a质粒, *p85a*蛋白质水平升高。划痕实验中, 转染OE-p85a可促进SY5Y细胞迁移, 转染si-p85a后抑制细胞迁移, 均有统计学差异( $P < 0.05$ )。实验结果表明, 在SY5Y细胞生长过程中, *p85a*基因起到重要作用, 可以促进SY5Y细胞迁移运动。

**关键词** 人神经母细胞瘤; SY5Y; *p85a*; 迁移

## Research on *p85a* Gene in Migration of Human Neuroblastoma SY5Y Cell

Chen Linhua, Jing Xia, Wang Lihua, Wang Jiao\*

(School of Ophthalmology and Optometry, Eye Hospital, Wenzhou Medical University;  
State Key Laboratory of Ophthalmology, Optometry and Visual Science, Wenzhou 325027, China)

**Abstract** By interfering the expression of *p85a* gene, we investigated the function of *p85a* on migration, and the effect with mRNA and protein expression in human neuroblastoma SY5Y cell. First, the RNAi plasmid (si-p85a) and overexpression plasmid (OE-p85a) were constructed for *p85a* gene. Si-p85a and OE-p85a were transferred separately into cultured human neuroblastoma SY5Y cell. After 48 hours, Real-time PCR and Western blot analysis were carried out to detect the mRNA and protein expression level of *p85a* gene. The cell cycle was evaluated by flow cytometry. SY5Y cell migration was examined by wound-healing assay. The results of Real-time PCR showed that the *p85a* gene expressed differentially compared with the MOCK control. The expression level of si-p85a group was reduced by 58%. Conversely, the expression of OE-p85a group was significantly increased, which was 22.84 times that of the control group ( $P < 0.05$ ). Western blot indicated that *p85a* protein expression was decreased by transfection of si-p85a plasmid. On the other hand, transfection of OE-p85a plasmid increased *p85a* protein expression. Wound-healing assay showed that cell migration was promoted in OE-p85a plasmid transfected SY5Y cell. Consistently, migration was retarded in si-p85a plasmid transfected

收稿日期: 2018-01-16 接受日期: 2018-04-04

温州市科技计划项目(批准号: Y20140356)和温州市科技计划项目(批准号: Y20130254)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0577-88067934, E-mail: wj@mail.eye.ac.cn

Received: January 16, 2018 Accepted: April 4, 2018

This work was supported by the Wenzhou Science and Technology Plans (Grant No.Y20140356) and Wenzhou Science and Technology Plans (Grant No.Y20130254)

\*Corresponding author. Tel: +86-577-88067934, E-mail: wj@mail.eye.ac.cn

网络出版时间: 2018-07-04 15:13:22

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180704.1513.008.html>

SY5Y cell ( $P < 0.05$ ). During SY5Y cell growth process, *p85a* plays an important role in promoting the migration of SY5Y cells.

**Keywords** human neuroblastoma; SY5Y; *p85a*; cell migration

神经母细胞瘤是儿童时期较为常见的颅外神经内分泌性实体肿瘤<sup>[1]</sup>。神经母细胞瘤确诊时几乎70%已经出现转移且多数为多部位转移,最常见的转移部位为骨髓、骨、淋巴结、肝脏和皮肤等,其中,70.5%的患者出现骨髓转移、55.7%骨骼转移、30.9%淋巴结转移、30.9%肝脏转移,少数转移至肺和脑<sup>[2]</sup>。肿瘤的侵袭和转移包括细胞外基质的降解、细胞穿破血管基膜、穿出血管壁进入宿主微环境等一系列复杂的过程<sup>[3]</sup>。

PI3K/AKT通路作为细胞内重要信号转导通路之一,通过影响下游多种效应分子的活化状态,在细胞内发挥着抑制凋亡、促进增殖的关键作用,与人类诸多肿瘤的发生、发展密切相关。磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)是细胞内重要的信号转导分子,是膜受体信号向细胞内转导的重要途径,由调节亚基*p85a*和催化亚基*p110*构成<sup>[4]</sup>。PI3K/AKT转导通路广泛存在于多种细胞中,除具有调节细胞迁移、增殖、分化、抗细胞凋亡等细胞生物学作用外,还参与了神经系统的发育、保护、学习和记忆等多种生理功能<sup>[5]</sup>。

本研究利用*p85a*基因构建的质粒作用于人神经母细胞瘤SY5Y细胞,观察其对细胞增殖、迁移及对mRNA、蛋白质水平改变的影响,探讨PI3K/AKT信号通路在脑部肿瘤发生、发展中的作用,为探索神经系统发病机制、研发治疗药物等提供重要依据<sup>[6]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验对象

SY5Y细胞来源于温州医科大学眼视光重点实验室,并培养于温州医科大学眼视光实验室。

### 1.2 实验材料

DMEM、F12、Superscript III Firststrand Kit、Real-time PCR试剂均购自美国Life Technologies公司; Lipo2000购自Invitrogen公司; RNeasy Mini Kit、PCR Purification Kit、Plasmid Mini Kit、GEL Purification Kit均购自德国Qiagen公司; T4 DNA连接酶、*Hind* III、*Bgl* II、*Eco*R I、*Not* I均购自NEB公司; Cycle-TEST PLUS Kit购自BD公司; TE、RIPA购自上海碧

云天生物技术有限公司; 单克隆一抗*p85a*、PAKT、MTOR、PTEN等购自Cell Signaling Technology公司。实验所需主要仪器为Imager A2荧光显微镜(德国Carl Zeiss公司)、FACS Calibur流式细胞仪(BD公司)、M5检测仪(MD公司)和Vii7型荧光实时定量PCR仪(美国Life Technologies公司)。

### 1.3 *p85a*质粒的构建

1.3.1 NC对照构建 阴性对照(negative control, NC)是序列打乱后重新随机组合的RNA Oligo,用于对比目的基因组的实验效果,实验所需的NC购买于美国ABI公司,稀释后的使用浓度为20  $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3.2 siRNA质粒(si-*p85a*)寡核苷酸引物设计 构建si质粒,设计质粒的靶序列(表1)。引物序列由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,加入30  $\mu\text{L}$  TE溶解引物; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 每3 min降5  $^{\circ}\text{C}$ , 缓慢降温至20  $^{\circ}\text{C}$ , 再稀释引物浓度为25 ng/ $\mu\text{L}$ 。

1.3.3 siRNA质粒(si-*p85a*)的构建 用*Hind* III、*Bgl* II将pBUH质粒, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 双酶切过夜后电泳检测酶切产物大小,并用GEL Purification Kit割胶纯化回收质粒,然后再用T4 DNA连接酶, 16  $^{\circ}\text{C}$ 、16 h,将质粒与合成引物连接,将连接产物电转至大肠杆菌中,加1 mL SOC液体,再取20  $\mu\text{L}$ 电转产物加入至LB培养板上,均匀涂板, 37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜后用无菌的牙签挑菌,置于10 mL含有Amp的LB培养液中,再300 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜,最后用Plasmid Mini Kit提取质粒。

1.3.4 过表达(OE-*p85a*)质粒的构建 设计过表达引物序列(表1),PCR反应扩增目的片段,再用GEL Purification Kit割胶回收目的片段并测序鉴定,然后用*Eco*R I酶、*Not* I酶将目的片段pCAGEN质粒于37  $^{\circ}\text{C}$ 双酶切过夜;再电泳检测酶切产物大小,并用GEL Purification Kit割胶纯化回收载体后,用T4 DNA连接酶, 16  $^{\circ}\text{C}$ 、16 h,将质粒和目的片段连接。连接产物电转至大肠杆菌中,加1 mL SOC液体,再取20  $\mu\text{L}$ 电转产物加入至LB培养板上,均匀涂板, 37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用无菌的牙签挑菌,置于10 mL含有Amp的LB培养液中, 300 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜,最后用Plasmid Mini Kit提取质粒。

1.3.5 挽救实验中si-*p85a*+OE-*p85a*质粒的制备 各

取10  $\mu\text{L}$  si-p85a质粒和10  $\mu\text{L}$  OE-p85a质粒, 配成混合液, 用于后续的挽救实验。

#### 1.4 SY5Y细胞培养实验

10%培养基用DMEM/F12+FBS配置, 加入细胞培养皿中, 置37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱内培养; 24 h后, 吸弃旧培养基, 用Hanks清洗后, 加入2 mL胰蛋白酶, 37  $^{\circ}\text{C}$ 消化3 min, 再加入血清中止。离心后计数细胞, 分别铺6、12、24、96孔板, 用于后续实验。将si-p85a、OE-p85a、si-p85a+OE-p85a质粒转染至培养的SY5Y细胞上, 作为3组实验组; MOCK作为对照组, NC作为阴性组。

#### 1.5 Real-time PCR方法检测SY5Y细胞p85a基因的表达情况

6孔板中的SY5Y细胞, 转染质粒后继续培养48 h, 收集细胞, 用RLT试剂裂解细胞, RNeasy Mini Kit提取细胞RNA, 用Superscript III Firststrand Kit合成cDNA后, 用SYBR Green荧光标记方法做Real-time PCR, 检测5组p85a基因的表达(引物序列见表2), 以GAPDH为内参基因。Real-time PCR反应体系为25  $\mu\text{L}$ , 包括12.5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SYBR Green mix、1.25  $\mu\text{L}$  20 $\times$ Primer、1.5  $\mu\text{L}$  cDNA和9.75  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。反应程序为: 50  $^{\circ}\text{C}$ 预热2 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸60 s, Real-time PCR反应体系均反应40个循环。

#### 1.6 Western blot检测p85a蛋白表达水平

6孔板中的SY5Y细胞, 转染后继续培养48 h, 加入蛋白裂解液RIPA, 提取蛋白后, BCA法测蛋白浓度。每孔上样40  $\mu\text{g}$ 蛋白, 做SDS-PAGE胶(10%)电泳, 电转至0.45  $\mu\text{m}$  PVDF膜上, 封闭2 h后, 加一抗

(GAPDH、p85a、PAKT、MTOR、PTEN), 室温孵育过夜; 用PBST洗涤3次后, 再加入二抗, 室温孵育2 h, 再用PBST洗涤3次后, 用红外激光仪检测。

#### 1.7 细胞增殖试验

96孔板中的SY5Y细胞, 转染后继续培养, 分别于24、48、72 h时, 加入100  $\mu\text{L}$  MTS溶液, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、3 h, 用酶标仪在490 nm波长下检测D值。

#### 1.8 细胞周期实验

6孔板中的SY5Y细胞, 转染后继续培养48 h, 用胰蛋白酶消化, 离心弃上清, 加入预冷的70%乙醇固定细胞, -20  $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 加入CycleTEST PLUS Kit中的A/B/C液, 400目过滤后, 用流式细胞仪检测。

#### 1.9 细胞划痕试验

12孔板中的SY5Y细胞, 转染后继续培养48 h, 吸走旧培养基, 加Hanks液清洗1次, 再加500  $\mu\text{L}$  Hanks液, 用黄枪头沿着孔中线划线; 吸走Hanks液, 加入5%培养基, 分别于0、24、48 h时拍照。

#### 1.10 统计学方法

统计学分析采用SPSS 16.0软件包, Real-time PCR数据结果中: 基因D-Ct值=目标基因( $\text{Ct}_{\text{test}}$ )-内参基因( $\text{Ct}_{\text{control}}$ ), 实验数据用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示相对倍数关系, 结果用mean $\pm$ S.D.表示; 组间比较采用独立样本t检验;  $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 si-p85a、OE-p85a质粒的构建及鉴定

取10  $\mu\text{L}$ 经Hind III、Bgl II双酶切的pBUH质粒和10  $\mu\text{L}$ 经EcoR I、Not I双酶切的pCAGEN质粒, 经140 V、0.8%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图1所示。

表1 si-p85a及OE-p85a质粒引物序列

Table 1 The primer sequences of plasmids with si-p85a and OE-p85a

样品	序列(5'→3')
Sample	Sequence (5'→3')
si-p85a	GCA CAA TGA CTC CCT CAA TGT
OE-p85aL	ATG CAT GCA CGA ATT CGT GCG GGC CGT ATA G
OE-p85aR	ATG CAT GCA TGC GGC CGC TCC GAG GCT GCG TGT C

表2 Real-time PCR中p85a基因引物序列

Table 2 The Real-time PCR primer sequences of p85a gene

样品	序列(5'→3')
Sample	Sequence (5'→3')
p85aL	CAT GTA CAC CAC GGT TTG GA
p85aR	TGC CAC AGT TTA TAT CTG TCT TGG

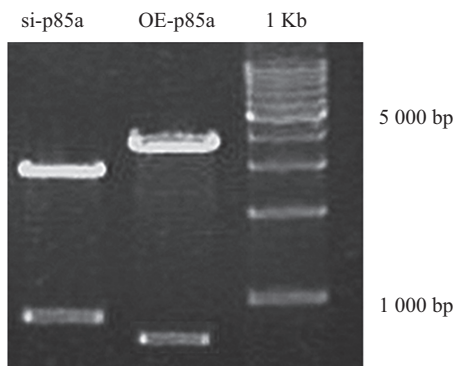


图1 质粒酶切电泳图

Fig.1 Electropherogram of enzyme digestion for plasmid

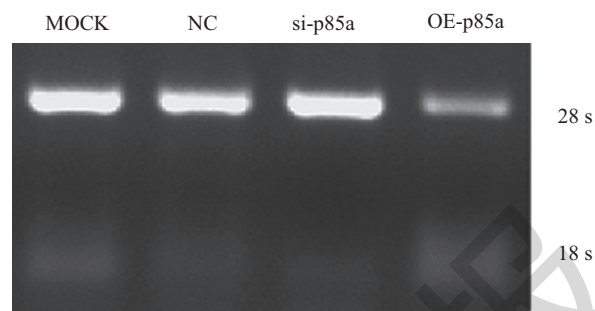
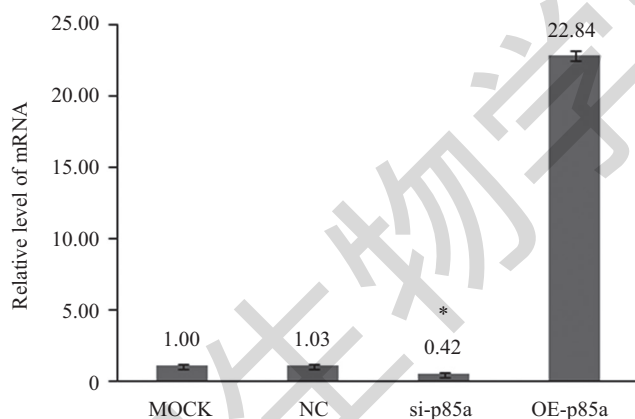


图2 SY5Y细胞RNA电泳图

Fig.2 RNA electropherogram of SY5Y cell



与MOCK组相比较, \* $P < 0.05$  (采用  $t$  检验,  $n = 6$ )。

\* $P < 0.05$  compared with sample of MOCK alone (Student's  $t$  test,  $n = 6$ ).

图3 定量PCR测定*p85a*基因的mRNA水平Fig.3 The mRNA level of *p85a* gene detected by Real-time PCR

si-p85a样品产生约2 900 bp的大片段和800 bp的小片段, 割胶回收2 900 bp大片段, 作为后续实验pBUH质粒的载体; OE-p85a样品产生约3 900 bp的大片段和约600 bp的小片段, 割胶回收3 900 bp大片段, 作为pCAGEN质粒的载体。

## 2.2 SY5Y细胞转染质粒后的mRNA电泳检测

在6孔板中培养SY5Y细胞, 经MOCK、NC、si-p85a、OE-p85a转染48 h后, 用RNeasy Mini Kit提取细胞mRNA后, 取5  $\mu$ L mRNA样品, 进行mRNA电泳检测。结果显示, 4个样品的原始mRNA条带完整, 未降解, 均有28 s和18 s条带(图2), 可用于后续实验。

## 2.3 检测SY5Y细胞转染后*p85a*基因的表达水平

将不同质粒转染SY5Y细胞转染后再培养48 h, 收集细胞mRNA, 用*GAPDH*作为内参, 检测*p85a*基因mRNA水平, 结果如图3所示。与MOCK相比, RNA干扰质粒si-p85a样品*p85a*基因表达降低, 约为

MOCK组的0.42倍( $0.42 \pm 0.13$ ), 且有显著性统计学差异( $P < 0.05$ ); 而过表达(OE-p85a)样品*p85a*基因表达明显升高, 为MOCK组的22.84倍( $22.84 \pm 0.35$ ), 且有显著性统计学差异( $P < 0.05$ )。综上, 我们认为, 构建的4个样品为所需质粒, 可用于后续实验。

## 2.4 Western blot检测SY5Y细胞*p85a*及相关蛋白的表达

在6孔板中培养SY5Y细胞, 经转染后继续培养48 h, 提取蛋白进行Western blot实验, 检测*p85a*、PI3K/AKT信号通路的上游调控因子PTEN、MTOR及下游调控因子PAKT的蛋白质水平情况。实验重复3次, 结果如图4所示。与MOCK组相比, 干扰si-p85a后, *p85a*、PAKT蛋白质水平下降; 转染OE-p85a后, *p85a*、PAKT蛋白质水平升高; 与MOCK组相比, 上游调控因子PTEN、MTOR蛋白质水平无差异; 由此可见, *p85a*蛋白质水平受RNA干扰影响, 干

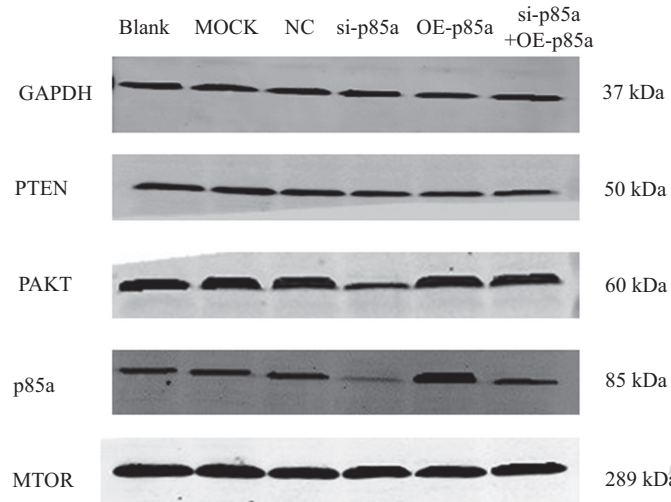


图4 p85a相关蛋白的Western blot结果

Fig.4 The results of p85a related protein by Western blot

表3 不同时间点的D值

Table 3 The result of *D* value on different time

时间 Time	Blank	MOCK	NC	si-p85a	OE-p85a	si-p85a+OE-p85a
24 h	0.76	0.78	0.73	0.77	0.73	0.77
	0.74	0.74	0.88	0.79	0.78	0.73
	0.75	0.74	0.89	0.76	0.90	0.81
	0.77	0.75	0.93	0.80	0.86	0.81
	0.73	0.71	0.82	0.71	0.75	0.77
	0.72	0.67	0.68	0.74	0.72	0.68
48 h	1.44	1.46	1.37	1.33	1.27	1.34
	1.46	1.35	1.49	1.55	1.50	1.50
	1.44	1.45	1.62	1.58	1.64	1.30
	1.43	1.45	1.50	1.52	1.67	1.31
	1.42	1.42	1.47	1.45	1.50	1.36
	1.43	1.41	1.24	1.37	1.40	1.44
72 h	1.96	1.93	2.15	1.96	1.89	1.97
	1.97	2.09	2.02	1.98	1.95	2.01
	1.93	1.70	1.75	1.88	2.02	1.93
	1.93	1.86	1.94	1.62	2.01	1.92
	1.91	1.81	1.93	1.75	1.66	1.91
	1.97	2.02	1.73	1.82	1.69	1.77

扰基因表达, p85a蛋白质表达也随之变化; 而PAKT是PI3K/AKT通路的下游关键分子, 随着p85a蛋白的变化而变化。

## 2.5 MTS试验检测转染后的细胞增值情况

在96孔板中培养SY5Y细胞, 转染后继续培养, 分别于24、48、72 h时, 加入100  $\mu$ L MTS混合溶液, 37  $^{\circ}$ C, 3 h后, 用酶标仪在490 nm波长下检测*D*值, 结果如表3所示。与MOCK组相比, 不同时间点, 样品进行组间*t*检验, 均无统计学差异( $P>0.05$ )。由此可

见, p85a基因对SY5Y细胞的增殖影响不大。

## 2.6 细胞周期实验检测SY5Y转染后G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub>/S期的变化

在6孔板中培养SY5Y, 经CycleTEST PLUS Kit处理后, 每个样本获取30 000个细胞, 挽救实验组收集20 000个细胞, 检测细胞周期G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub>/S期的变化。结果如图5所示, 与MOCK组相比, si-p85a、OE-p85a、si-p85a+OE-p85a这三组细胞的G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>期细胞比例下降趋势, S期细胞比例增多趋势; 干扰质粒组si-

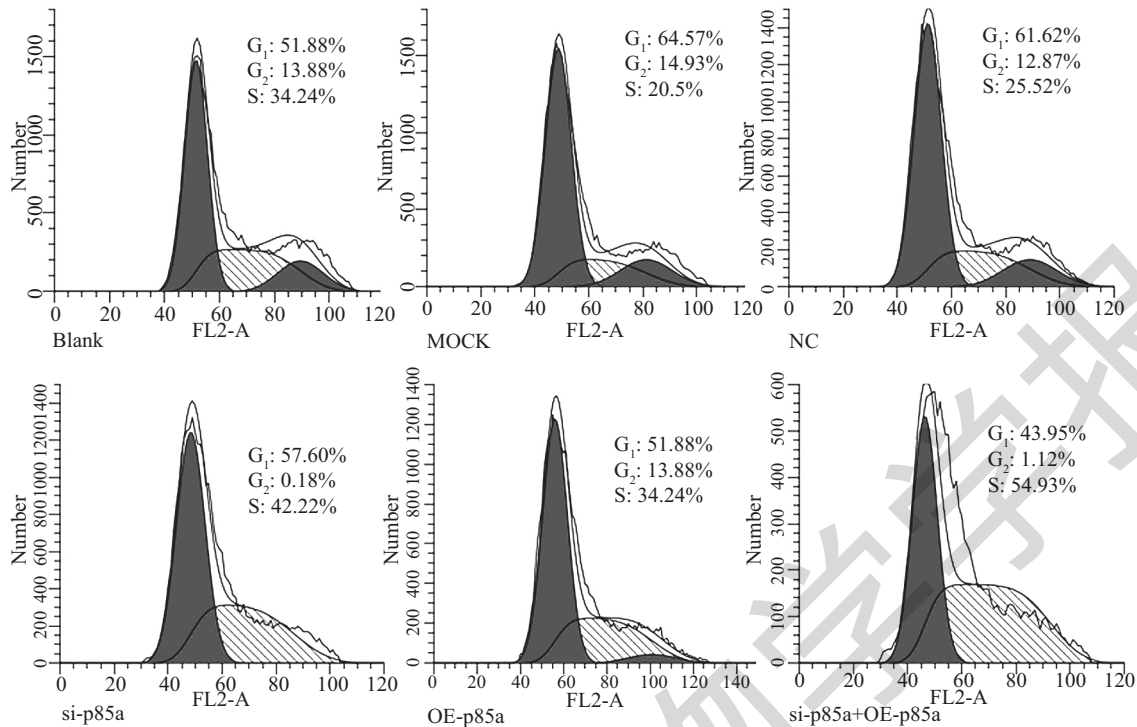


图5 流式细胞实验结果图

Fig.5 The results of FACS for SY5Y cell

表4 不同时间点划痕间距( $\mu\text{m}$ )Table 4 The distance of scratches test on different time ( $\mu\text{m}$ )

时间 Time	Blank	MOCK	NC	si-p85a	OE-p85a	si-p85a+OE-p85a
0 h	175.6 $\pm$ 2.5	172.2 $\pm$ 2.8	175.3 $\pm$ 3.5	172.8 $\pm$ 3.1	172.4 $\pm$ 1.8	168.8 $\pm$ 3.3
24 h	110.9 $\pm$ 2.7	123.3 $\pm$ 3.7	124.1 $\pm$ 3.3	122.7 $\pm$ 3.5	73.8 $\pm$ 3.1	126.7 $\pm$ 4.5
48 h	0 $\pm$ 0.1	0 $\pm$ 0.1	0 $\pm$ 0.3	102.3 $\pm$ 2.6	0 $\pm$ 0.2	75.6 $\pm$ 2.8

*p85a*的G<sub>2</sub>期只有少许细胞(0.18%)。但通过组间*t*检验统计学比较,并不存在统计学差异( $P>0.05$ );可见,转染si-p85a、OE-p85a等对细胞生长周期影响不大。

## 2.7 划痕试验检测SY5Y转染后细胞迁移的速度变化

在12孔板中培养SY5Y细胞,转染48 h后,用200  $\mu\text{L}$ 黄枪头沿皿中线划痕,并分别于0、24、48 h时用显微镜拍照,如表4和图6所示。重复6次实验后,统计采用*t*检验,划痕间的距离用(mean $\pm$ S.D.)  $\mu\text{m}$ 表示;间距为0时,表示已经闭合。与MOCK组相比,在24 h时,转染OE-p85a的细胞迁移速度明显加快,划痕间距为(73.8 $\pm$ 3.1)  $\mu\text{m}$ ,而si-p85a和si-p85a+OE-p85a两组细胞无差异;在48 h时,MOCK、NC等对照组及OE-p85a实验组细胞均已闭合,而si-p85a和si-p85a+OE-p85a组细胞尚未闭合(间距见表4)。细胞划痕的修复

闭合受增殖和迁移双重影响,由于在上述细胞增殖实验中*p85a*基因对SY5Y细胞的增殖影响不大,故排除了增殖对闭合的影响。我们发现,转染OE-p85a可促进SY5Y细胞迁移,转染si-p85a后抑制细胞迁移,均有统计学差异( $P<0.05$ )。由此可见,*p85a*基因在SY5Y细胞迁移过程中起到重要作用。

## 2.8 挽救实验检测SY5Y细胞迁移的变化情况

将质粒转染SY5Y细胞,与MOCK组比较,载入si-p85a+OE-p85a混合质粒的细胞,显示正常迁移,这是因为si-p85a质粒抑制*p85a*表达,而OE-p85a可以过表达*p85a*基因,两种质粒混合后*p85a*表达恢复至正常水平,故SY5Y细胞迁移恢复正常,未造成影响。

## 3 讨论

神经母细胞瘤是婴幼儿最常见的肿瘤之一,属

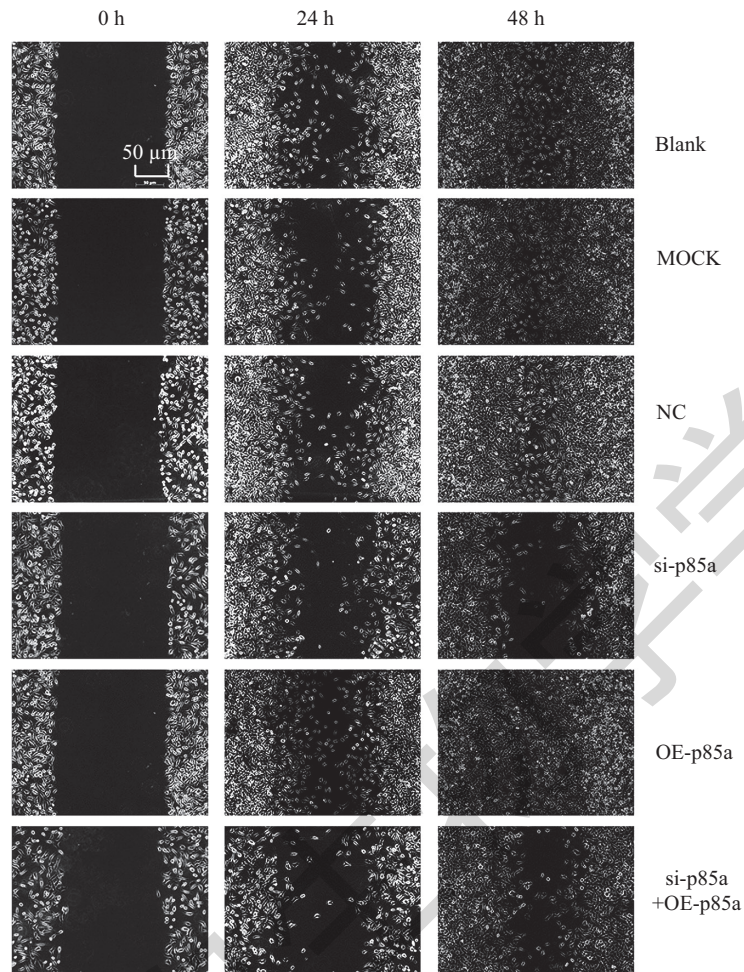


图6 不同时间点的SY5Y细胞迁移图

Fig.6 The result for migration with SY5Y cell on different time

于神经内分泌性肿瘤,可以起源于交感神经系统的任意神经脊部位,其最常见的发生部位是肾上腺,但也可以发生在颈部、胸部、腹部以及盆腔的神经组织,有将近一半的神经母细胞瘤发生在2岁以内的婴幼儿。因化疗、放疗和造血干细胞移植技术在临床中广泛应用,使得低级别神经母细胞瘤治疗取得了长足的发展,但发生早期侵袭、转移的特性,使得高级别或者难治性神经母细胞瘤的预后仍然很差<sup>[7]</sup>。

肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭是个复杂的生物学过程,涉及一系列生化反应。例如,通过细胞内信号调节骨架蛋白重组,在细胞靠近内皮一端形成伪足;细胞通过伪足的延展或缩短与周围组织脱离,而后循着信号分子所指引的靶器官方向移动<sup>[8]</sup>。

*PI3K*家族属于原癌基因,是肌醇与磷酸酰肌醇(*PI*)的重要激酶,*PI*在脑细胞膜中含量较为丰富,达磷脂总量的10%。生长因子、细胞因子、激素、缺氧等细胞外信号刺激可激活*PI3K*。*PI3K*的激活主

要通过两种方式:一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用,引起二聚体构象改变而被激活;另一种是通过*Ras*(大鼠肉瘤)蛋白和*p110*直接结合导致其活化<sup>[9]</sup>。近年来发现的*PI3K/AKT*转导通路在细胞增生、调控、迁移、凋亡等过程中起着重要的作用<sup>[10]</sup>。*PI3K/AKT*通路对于神经细胞的存活有着特殊的重要性。在细胞胞体内,*PI3K/AKT*通路通过营养因子的作用促进神经元存活,还可通过神经细胞轴突远端与另一个神经细胞树突的相互作用,使轴突远端*PI3K/AKT*对另一个细胞的存活产生影响<sup>[11]</sup>。*PI3K/AKT*通路不仅通过转录来调节细胞的生存和死亡,也直接参与调节细胞凋亡。*PI3K/AKT*通路中的*AKT*,亦称为蛋白激酶*B*(protein kinases *B*, *PKB*),是*PI3K*下游主要的效应物,活化的*AKT*(*PAKT*)通过磷酸化多种酶、激酶和转录因子等下游因子,进而调节细胞的功能。*PTEN*是一个*PIP3*-磷酸酶,与*PI3K*的功能相反,它可以通

过去磷酸化将3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇[phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, PIP<sub>3</sub>]转变为PI(4,5)P<sub>2</sub>(PIP<sub>2</sub>)。PTEN可减少AKT的活化而阻止所有由AKT调控的下游信号传导事件。MTOR是PI3K/AKT信号通路一个重要靶蛋白,通过磷酸化其下游靶物控制与细胞生长和增殖密切相关的蛋白质合成,它可以感受生长因子、营养、能量和应激等信息的变化。

PI3K基因是由*p85a*调节亚基和*p110*催化亚基组成的,*p85a*是PI3K家族中表达量最多的调节亚基,*p85a*对*p110*的稳定、聚集以及PI3K的激活是必需的。目前对*p85a*的研究主要集中于肿瘤中*p85a*所发生的突变及突变形式,但对于其在肿瘤中的迁移、侵袭、转移中的作用途径则较少报道<sup>[4]</sup>。

Aberg等<sup>[12]</sup>提出,PI3K在发育中的中枢神经系统和成年脑不同区域的表达水平不同。陈林华等<sup>[13]</sup>研究发现,在适当范围内,*p85a*基因对小鼠大脑皮层投射神经元的迁移有影响,对平衡神经元的迁移起重要作用。但是关于*p85a*基因在神经肿瘤类细胞发展过程中起了什么作用,是否和PI3K/AKT通路中相关蛋白有关联作用,至今尚不清楚。

本实验室通过前期的一些研究发现,对PI3K在神经细胞迁移中的作用进行了深入研究。我们主要针对的是PI3K亚型——*p85a*基因,培养人神经母细胞瘤细胞(SY5Y),用构建的干扰siRNA和过表达质粒转染SY5Y细胞,检测其抑制或过表达效率。本研究结果提示,干扰*p85a*基因的表达,将导致细胞迁移减慢;而过表达质粒则促进细胞迁移。综上所述,在SY5Y细胞生长过程,*p85a*基因起到重要作用,可以促进SY5Y细胞迁移运动。

我们对PI3K/AKT信号通路在神经肿瘤细胞迁移中的作用研究,不仅可以深入了解大脑神经发育的相关机制,还有助于阐明脑部肿瘤、神经变性疾病、帕金森病、癫痫等的发病机制,为肿瘤、退行性病变等寻找治疗方法,为探索新的诊断方法(如生物学标记、基因诊断)提供部分理论依据。

## 参考文献 (References)

- 1 王国文, 陈飞, 徐德会, 马飞虎, 赵红宇. 拓扑替康对神经母细胞瘤SH-SY5Y增殖/侵袭和迁移影响的探讨. 现代肿瘤医学 (Wang Guowen, Chen Fei, Xu Dehui, Ma Feihu, Zhao Hongyu. The effects of topotecan on neuroblastoma cell line SH-SY5Y proliferation, invasion and migration. Modern Oncology) 2017; 25(04): 521-4.
- 2 Brodeur GM, Azar C, Brother M, Hiemstra J, Kaufman B, Marshall H, *et al.* Neuroblastoma. Effect of genetic factors on prognosis and treatment. Cancer 1992; 70(6 Suppl): 1685-94.
- 3 Simon T, Längler A, Harnischmacher U, Frühwald MC, Jorch N, Claviez A, *et al.* Topotecan, cyclophosphamide, and etoposide (TCE) in the treatment of high-risk neuroblastoma. Results of a phase-II trial. J Cancer Res Clin Oncol 2007; 133(9): 653-61.
- 4 吴日平, 黄昌明. PI3K/AKT信号通路与肿瘤关系的研究进展. 医学综述 (Wu Riping, Huang Changming. Correlation of PI3K/AKT signaling pathway to tumors. Medical Recapitulate) 2009; 15(10): 1501-4.
- 5 王爽, 谢鹏, 赵裕光, 贾延劫, 牟君, 王运良. PI3K/AKT信号途径在大鼠脑源性神经干细胞中的作用. 江西医学院学报 (Wang Shuang, Xie Peng, Zhao Yuguang, Jia Yanjie, Mu Jun, Wang Yunliang. A role for the phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)/AKT Signaling pathway in rat brain-derived neural stem cells. Acta Academiae Medicinae Jiangxi) 2005; 45(5): 1-4.
- 6 舒怡, 张洪, 章军建. PI3K/AKT信号通路在神经系统疾病中的研究进展. 医学综述 (Shu Yi, Zhong Hong, Zhang Junjian. Research progress of PI3K/AKT signal pathway in neurological diseases. Medical Recapitulate) 2011; 17(18): 2732-6.
- 7 Ara T, DeClerck YA. Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. Cancer Metastasis Rev 2006; 25(4): 645-57.
- 8 Ohta Y, Hartwig JH, Stossel TP. FilGAP, a Rho-and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. Nat Cell Biol 2006; 8(8): 803-14.
- 9 Osaki iM, Oshimu raM, Ito H. PI3K-AKT pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis 2004; 9(6): 667-76.
- 10 Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 2002; 296(5573): 1655-7.
- 11 Downward J. Signal transduction: Regulating S6 kinase. Nature 1994; 371(6496): 378-9.
- 12 Aberg ND, Brywe KG, Isgaard J. Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection regeneration and functional plasticity in the adult brain. Sci World J 2006; 6: 53-80.
- 13 陈林华, 曹华腾, 涂晓萌, 王教, 李雪. *p85a*基因对小鼠大脑皮层投射神经元迁移的影响. 中国细胞生物学学报 (Chen Linhua, Cao Huateng, Tu Xiaomeng, Wang Jiao, Li Xue. Research on *p85a* gene in radial migration of cortical projection neurons of the mouse cortex. Chinese Journal of Cell Biology) 2014; 36(8): 1054-9.