

# CIP2A 通过 AKT-NF- $\kappa$ B 信号通路促进细胞凋亡

董千泽, 付琳, 刑济麟, 韩勇

(中国医科大学病理科)

**摘要:** 目的: 探讨 CIP2A 如何调控 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达。方法: 选取 HBE 和 A549 细胞系进行实验。采用 western blot 方法检测细胞系中 p-AKT 的表达量。使用 AKT 抑制剂后检测细胞中 p-AKT、p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、Bcl-xL 和 Bcl-2 的表达量, 并通过荧光素酶报告基因检测 NF- $\kappa$ B 转录活性。使用 NF- $\kappa$ B 特异性抑制剂处理后检测 p-I $\kappa$ B $\alpha$ 、Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达量。结果: CIP2A 促进细胞中 Bcl-2 和 Bcl-xL 表达上调而且 AKT 和 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化活性增加。加入 AKT 或 NF- $\kappa$ B 信号通路抑制剂处理后, 细胞中 Bcl-2 以及 Bcl-xL 表达下调。结论: CIP2A 通过 AKT-NF- $\kappa$ B 信号通路上调细胞凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达。

**关键词:** 病理科; CIP2A; AKT; NF- $\kappa$ B; 细胞凋亡

**中图分类号:** R734.2

## CIP2A inhibits cell apoptosis through AKT-NF- $\kappa$ B pathways

dongqianze, fu lin, xing jilin, han yong

(department of pathology ,China medical university)

**Abstract:** Objective The study is to find out how CIP2A regulates the expression of Bcl-2 and Bcl-xL. Method HBE and A549 cell lines were used for research and PDTC and LY294002 were employed in the experiment to detect the expression of Bcl-2, Bcl-xL, p-AKT and p-I $\kappa$ B $\alpha$  by western blot assay. Transcription activity of NF- $\kappa$ B was analyzed through luciferase report essays. Results CIP2A upregulates the expression of p-AKT, Bcl-2, Bcl-xL and p-I $\kappa$ B $\alpha$ , which was reversed by AKT/NF- $\kappa$ B inhibitor. Conclusions CIP2A promotes cell apoptosis through AKT-NF- $\kappa$ B pathways.

**Key words:** pathology; CIP2A; AKT; NF- $\kappa$ B; Cell apoptosis

## 0 前言

CIP2A 是 2007 年新发现的一种癌蛋白。研究表明 CIP2A 能够抑制 PP2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 对 c-Myc 的去磷酸化作用, 稳定 c-Myc 蛋白表达水平, 促进细胞转化和体内肿瘤生长, 抑制放化疗诱导的细胞凋亡<sup>[1-3]</sup>。近来研究发现, CIP2A 在多种人体良性组织中低表达, 在恶性肿瘤组织如结肠癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌、宫颈癌等中过度表达, 并与临床病理参数和预后有一定关系<sup>[4-10]</sup>。

众所周知, 细胞凋亡受到严格而复杂的调控, 其调控手段可通过死亡受体、线粒体、凋亡抑制蛋白和 Caspase 酶等多个水平实现, 也受到相关信号转导通路的调节。Bcl-2 相关蛋白家族, AKT 和 NF- $\kappa$ B 信号通路都对细胞凋亡具有重要调节作用。

由于 CIP2A 是 PP2A 的抑制因子, 而 PP2A 可以拮抗真核细胞中磷酸化酶的活性, 对细胞内的许多通路产生影响, AKT 信号通路就是其中一条重要信号通路<sup>[11]</sup>。AKT 信号通路的

基金项目: 博士点新教师课题基金 (20122104120026)

作者简介: 1984, 男, 副教授, 肺癌发生发展的分子机制. E-mail: dongqianze@mail.cmu.edu.cn

激活可以促进 NF- $\kappa$ B 信号通路的关键因子 I $\kappa$ B 的磷酸化, 释放 NF- $\kappa$ B 进入细胞核从而上调 Bcl-2 和 Bcl-xL 的基因转录<sup>[12, 13]</sup>, 发挥抑制细胞凋亡的功能。这提示我们, CIP2A 对细胞凋亡的抑制作用和对 Bcl-2、Bcl-xL 的调控可能是通过 AKT 信号通路介导的。

本课题通过探究 CIP2A 抑制细胞凋亡依赖的信号通路, 为防治肺癌开辟新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养与转染

选择 HBE 细胞系和 A549 细胞系, 均购于美国模式菌株保藏中心(Manassas, VA, USA)。细胞生长繁殖所用培养基为 DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 其中包括 10%热灭活新鲜胎牛血清 (Invitrogen), 100 IU/ml 青霉素(Sigma, St. Louis, MO, USA), 以及 100  $\mu$ g/ml 链霉素(Sigma)。细胞培养每隔两天用 0.25%的胰蛋白酶进行处理。使用脂质体 LTX 试剂 (Invitrogen, USA)将质粒转染进入细胞。转染前 24 小时将细胞按 50%密度接种于 24 孔板, 转染后 48 小时使用 Western blot 检测转染效率。

### 1.2 实时定量 PCR(SYBR Green 方法)

实时定量 PCR 反应采用 SYBR Green PCR master mix(TAKARA)20 $\mu$ l 体系, 反应采用 7300 实时定量 PCR 仪 (Applied Biosystems), 绘制溶解曲线以确保 PCR 扩增的特异性。内参基因使用  $\beta$ -激动蛋白。基因表达的相对量通过 the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法来测定。

### 1.3 Western Blot

收集培养细胞, 加入裂解液充分裂解, 低温高速离心 (4 $^{\circ}$ C, 12000 转/min, 30min), 提取上清为总蛋白。上样蛋白量为 20 $\mu$ g。电泳 (12%SDS-PAGE 凝胶)、转印 (50V, 120min)、5%正常小牛血清封闭, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 对应二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, ECL 显色, 结果经自动电泳凝胶成像分析仪 (Chemi Imager 5500, Alpha Innotech, USA) 采集, 进行灰度值测定。

### 1.4 荧光素酶报告实验

吸尽细胞培养液后可以直接加入报告基因细胞裂解液, 充分裂解后, 10,000-15,000g 离心 3-5 分钟, 取上清用于测定。融解荧光素酶检测试剂, 并达到室温。开启荧光测定仪, 将测定间隔设为 2 秒, 测定时间设为 10 秒。每个样品测定时, 取样品 20-100 微升, 加入 100 微升荧光素酶检测试剂, 用枪打匀或用其它适当方式混匀后测定 RLU(relative light unit)。以报告基因细胞裂解液为空白对照。

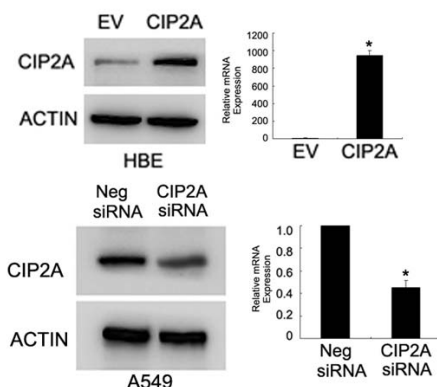
### 1.5 统计分析

所有的统计分析均使用 SPSS version 12 软件。采用 t 检验的方法比较对照组与处理组细胞的荧光素强度。p 值小于 0.05 为有显著差异。

## 2 结果

### 2.1 CIP2A 激活 NF-KB 信号通路

为了探究 CIP2A 抑制细胞凋亡的分子信号通道, 如前文所示: 我们在 HBE 细胞中转染 CIP2A, 在 A549 细胞中干扰 CIP2A 表达, 48 小时后检测转染效率 (图 1)。检测凋亡相关信号通路发现: 过表达 CIP2A 促进 p-I $\kappa$ B $\alpha$  的表达而敲除 CIP2A 则抑制 p-I $\kappa$ B $\alpha$  的表达 (图 2)。同时采用荧光素酶报告基因检测 NF- $\kappa$ B 转录活性。实验结果表明: CIP2A 促进 NF-KB 信号通路的活性 (图 3)。



80

图 1: 如前文图所示 HBE 和 A549 的转染和干扰效率。

Fig1: transfection and interference efficiency

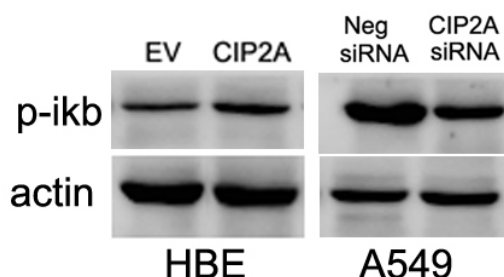
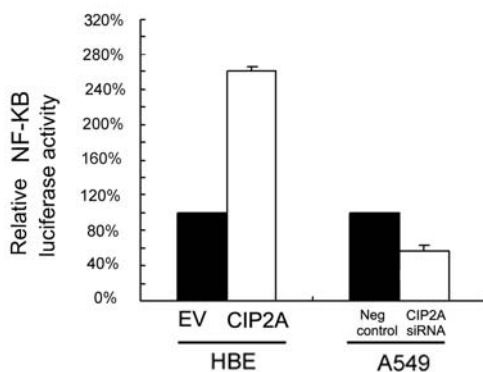


图 2: 在 HBE 中过表达 CIP2A 促进 p-IKB 的蛋白表达而在 A549 中抑制 CIP2A 则下调 CIP2A 的表达。

Fig2: CIP2A promotes p-IKB expression.



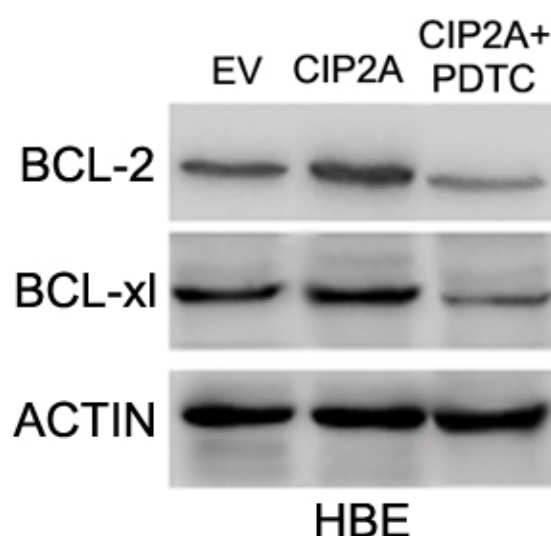
85

图 3: CIP2A 促进 NF-KB 信号的激活。

Fig3: CIP2A activates NF-KB signal pathway.

## 2.2 CIP2A 通过 NF-κB 信号通路调控 Bcl-2、Bcl-xL 的表达

90 为了验证 CIP2A 是否通过 NF-κB 信号通路调节凋亡。我们在转染 CIP2A 的 HBE 细胞（转染 60 小时后）中加入 NF-κB 特异性抑制剂 PDTC (1μM) 处理 2 小时，并通过 western blot 检测磷酸化 IκB 的抑制程度。在收取转染空载体的 HBE、转染 CIP2A 的 HBE、转染 CIP2A 并采用抑制剂处理的 HBE 细胞中检测 Bcl-2、Bcl-xL 的蛋白水平。结果发现 CIP2A 上调 Bcl-2、Bcl-xL 的作用被 PDTC 所逆转(图 4)。



95

图 4: HBE 细胞中, PDTC 逆转 CIP2A 上调 Bcl-2、Bcl-xL 的作用。

Fig4: PDTC reverses the upregulation of Bcl-2、Bcl-xL mediated by CIP2A

### 2.3 CIP2A 促进 p-AKT 的表达

在研究信号通路关键蛋白中, 我们通过 western blot 实验技术发现在转染 CIP2A 的 HBE  
100 细胞中其 AKT 的磷酸化上升而在干扰 CIP2A 的 A549 细胞中 AKT 的磷酸化水平受到抑制  
(图 5)。

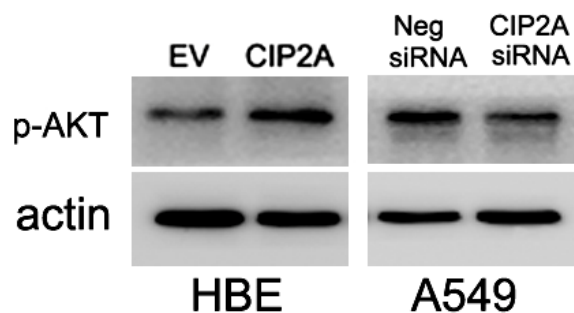


图 5: CIP2A 促进 p-AKT 的表达。

Fig5: CIP2A promotes p-AKT activity.

105

### 2.4 CIP2A 通过 AKT-NF-KB 途径上调 Bcl-2、Bcl-xL 的表达

为了研究 AKT 通路是否介导 CIP2A 调节 NF-KB 对 Bcl-2、Bcl-xL 的上调作用, 我们加入 AKT 的抑制剂 LY294002 (50 $\mu$ M) 处理 2 小时。分别收取转染空载体的 HBE、转染 CIP2A 的 HBE、转染 CIP2A 并采用抑制剂处理的 HBE 细胞, 采用实时定量 PCR 和 western blot 检测 Bcl-2、Bcl-xL 的 mRNA 和蛋白水平。

110

结果发现: CIP2A 上调 Bcl-2、Bcl-xL 和 p-IkB 的作用被 LY294002 所逆转 (图 6)。

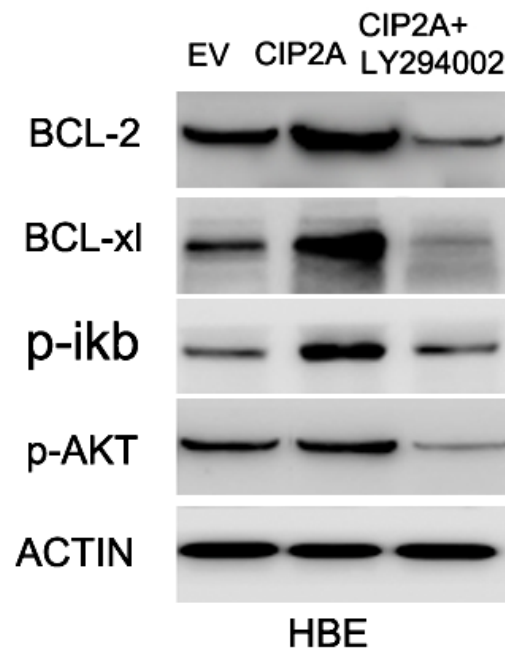


图 6: CIP2A 上调 BCL-2、BCL-xL、p-ikb 受 LY294002 抑制。

Fig6: LY294002 reverses the upregulation of Bcl-2、Bcl-xL and p-ikb mediated by CIP2A

### 3 结论

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, 已经被公认为癌基因; Akt 基因有 Akt1 / PKB $\alpha$ 、Akt2 / PKB $\beta$ 、Akt3 / PKB $\gamma$  种亚型, 分别定位于 14q32. 32, 19q13.1-q13. 2, 1q44。Akt 基因用来编码 56 kD 的丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, 处于 PI3K/Akt 信号转导通路的核心部位。Akt 在 PI3K(phosphatidylinositol-3 kinase), PDK1(3- phosphoinositide-dependent kinase-1), ILK(Integrin-linked kinase)的作用下发生 2 个位点的磷酸化, 只有 2 个位点的磷酸化才能使 Akt 充分活化。活化的 Akt 在介导细胞生长和增殖、细胞运动和侵袭、细胞凋亡和抵抗化疗、放疗方面有重要作用。

NF- $\kappa$ B 家族是真核细胞转录因子 Rel 家族的重要成员, 目前被发现广泛存在于各种哺乳动物中。哺乳动物细胞中已发现的 NF- $\kappa$ B/Rel 家族成员分别为: NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), p65 (Rel A), Rel B, c-Rel (Rel)。NF- $\kappa$ B 的主要生物学功能是调控转录和生长调控因子、免疫调节分子、急性期反应蛋白、病毒癌基因、细胞因子、细胞黏附分子、生长因子等基因编码, 参与炎症反应、免疫反应、细胞凋亡和肿瘤等多种生物进程。

在本次课题研究中, 我们着重探索 CIP2A 抑制细胞凋亡的分子机制。为了证实 CIP2A 是否通过 AKT 信号通路抑制细胞凋亡。我们分别检测了 HBE 细胞系以及 A549 细胞系中 p-AKT 的表达量, 证实 CIP2A 转染后显著提高 AKT 信号通路的活性, 而 CIP2A 干扰后抑制细胞内 AKT 信号通路的活性。研究表明 CIP2A 是通过上调 Bcl-2、Bcl-xL 的表达进而抑制细胞的凋亡。那么 CIP2A, AKT 信号通路, Bcl-2、Bcl-xL 存在怎样的联系? 我们将经过 CIP2A 转染的 HBE 细胞系用 AKT 信号通路抑制剂进行处理, 结果发现: 在 mRNA 和蛋白质水平上, HBE 细胞系中 Bcl-2、Bcl-xL 的表达均显著下调, 说明 CIP2A 介导 AKT 信号通

路上调 Bcl-2、Bcl-xL 的表达, 进而抑制细胞的凋亡。

NF- $\kappa$ B 是 AKT 的下游信号通路, 我们大胆猜想 NF- $\kappa$ B 也参与到 CIP2A 调控细胞凋亡的过程中。为了进一步证实我们的猜想, 首先我们将 A549 和 HBE 细胞分别用 AKT 的抑制剂和 AKT 通路激活剂处理, 检测细胞磷酸化 I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白水平发现 AKT 通路激活能增强 NF- $\kappa$ B 信号通路活性, AKT 活性抑制能够下调 NF- $\kappa$ B 信号通路活性。为了进一步研究, 我们通过 western blot 技术检测 CIP2A 转染的 HBE 细胞系以及 CIP2A siRNA 干扰的 A549 细胞系中磷酸化 I $\kappa$ B 的表达量, 并通过荧光素酶报告基因检测 NF- $\kappa$ B 转录活性, 结果表明 CIP2A 能够有效提高 NF- $\kappa$ B 信号通路的活性。我们将 CIP2A 转染的 HBE 细胞系用 NF- $\kappa$ B 特异性抑制剂进行处理, 检测磷酸化 I $\kappa$ B 发现, 其表达量显著下调。同时发现 Bcl-2、Bcl-xL 的表达量在 mRNA 和蛋白质水平上均显著下调。

综上所述, CIP2A 通过 AKT 以及其下游的 NF- $\kappa$ B 信号通路上调 Bcl-2、Bcl-xL 的表达, 从而抑制细胞的凋亡。这为非小细胞肺癌的靶向治疗提供了新的思路。

### [参考文献] (References)

- [1] Huang, C.Y., et al., Bortezomib enhances radiation-induced apoptosis in solid tumors by inhibiting CIP2A. *Cancer Lett*, 2012. 317(1): p. 9-15.
- [2] Chen, K.F., et al., CIP2A mediates effects of bortezomib on phospho-Akt and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, 2010. 29(47): p. 6257-66.
- [3] Junttila, M.R., et al., CIP2A inhibits PP2A in human malignancies. *Cell*, 2007. 130(1): p. 51-62.
- [4] Bockelman, C., et al., CIP2A overexpression is associated with c-Myc expression in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*, 2012. 13(5): p. 289-95.
- [5] Teng, H.W., et al., CIP2A is a predictor of poor prognosis in colon cancer. *J Gastrointest Surg*, 2012. 16(5): p. 1037-47.
- [6] Li, W., et al., CIP2A is overexpressed in gastric cancer and its depletion leads to impaired clonogenicity, senescence, or differentiation of tumor cells. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(12): p. 3722-8.
- [7] Niemela, M., et al., CIP2A signature reveals the MYC dependency of CIP2A-regulated phenotypes and its clinical association with breast cancer subtypes. *Oncogene*, 2012. 31(39): p. 4266-78.
- [8] Come, C., et al., CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(16): p. 5092-100.
- [9] Vaarala, M.H., M.R. Vaisanen, and A. Ristimaki, CIP2A expression is increased in prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010. 29: p. 136.
- [10] Huang, L.P., et al., CIP2A expression is elevated in cervical cancer. *Cancer Biomark*, 2010. 8(6): p. 309-17.
- [11] Arroyo, J.D. and W.C. Hahn, Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene*, 2005. 24(52): p. 7746-55.
- [12] Madrid, L.V., et al., Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the I $\kappa$ B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem*, 2001. 276(22): p. 18934-40.
- [13] Hamacher, R., et al., Apoptotic pathways in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer*, 2008. 7: p. 64.