

DOI:10.13350/j.cjpb.240604

• 论著 •

PTEN 慢病毒过表达肝癌稳转株的构建 及对 Huh-7 肿瘤活性的影响^{*}

余惟一¹, 甘露¹, 雷晨霞¹, 吴心怡¹, 胡学涛¹, 林乐颖¹, 付文涛¹, 祝珊珊^{1,2,*}

(1. 厦门医学院药理学系, 福建厦门 361021; 2. 厦门市海洋药用天然产物资源重点实验室)

【摘要】 目的 构建过表达 PTEN 的人肝癌稳转细胞株, 观察 PTEN 对肝癌细胞生物学行为的影响并探讨潜在机制。

方法 将编码 PTEN 的基因编码片段克隆到慢病毒载体 pLV-puro-GFP, 利用 293T 细胞得到慢病毒原液感染肝癌细胞 Huh-7, 嘌呤霉素筛选获得稳定过表达 PTEN 的 Huh-7 细胞。用 RT-PCR、免疫荧光和 Western blot 法检测细胞内基因和蛋白的表达; Transwell 检测细胞迁移活性; 探讨 AKT 抑制剂 MK2206 对稳转株的药理作用。 **结果** 成功构建了 PTEN 过表达的肝癌稳转细胞株(Huh-7/hPTEN)。与对照株 Huh-7/EGFP 相比, Huh-7/hPTEN 细胞 PTEN 的蛋白和 mRNA 表达升高($P < 0.01$), P53 蛋白表达升高, Slug 和 AR 的 mRNA 表达水平下降($P < 0.01$), HNF4 α 的 mRNA 表达升高($P < 0.01$), 耐药蛋白 ABCB1 和 ABCC2 的表达下降, E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达升高($P < 0.01$), Vimentin 的蛋白和 mRNA 表达下降($P < 0.01$), 细胞迁移性能减少; Huh-7/hPTEN 细胞对 AKT 抑制剂 MK2206 的利用率升高, 并影响相关蛋白的表达。 **结论** 成功构建 PTEN 过表达肝癌稳转株, PTEN 过表达可改善肝癌 Huh-7 细胞肿瘤生物学效应, 致癌蛋白表达下降, 迁移减弱。

【关键词】 PTEN; 肝癌稳转株; P53; 细胞迁移; MK2206**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)06-0636-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jun.; 19(6): 636-641.]

Construction of PTEN lentiviral stablization of cell line and its effect on tumor activity of Huh-7

YU Weiyi¹, GAN Lu¹, LEI Chengxia¹, WU Xinyi¹, HU Xuetao¹, LIN Leying¹, FU Wentao¹, ZHU Shanshan^{1,2} (1. Dept of Pharmacy of Xiamen Medical College, Xiamen 361026, Fujian, China; 2. Key Lab of Marine Medicinal Natural Products Resources)

【Abstract】 Objective To establish stable human hepatocellular carcinoma cell lines overexpressing PTEN, investigate the effect of PTEN on the biological behavior of hepatocellular carcinoma cells, and explore probable mechanisms. **Methods** The PTEN gene was cloned into the lentiviral vector pLV-puro-GFP, and the lentiviral stock was obtained from 293T cells to infect liver cancer cells Huh-7. Puromycin was used to determine the stability of Huh-7 cells overexpressing PTEN. RT-PCR, immunofluorescence, and Western blotting were employed to detect gene and protein expression. Transwell was utilized to assess cell migration activity. MK2206 was designed to evaluate pharmacological action. **Results** A stable liver cancer cell (Huh-7/hPTEN) overexpressing PTEN and a control group (Huh-7/EGFP) were successfully generated. Huh-7/hPTEN cells showed higher PTEN protein and mRNA expression ($P < 0.01$), higher P53 protein expression, lower Slug and AR mRNA expression levels ($P < 0.01$), and higher HNF4 α mRNA levels ($P < 0.01$). Drug-resistant proteins ABCB1 and ABCC2 mRNA and protein expression decreased, whereas E-cadherin protein and mRNA expression increased ($P < 0.01$) and Vimentin protein and mRNA expression decreased ($P < 0.01$). Cell migration performance decreased. Huh-7/hPTEN increased the utilization rate of AKT inhibitor MK2206 in cells while weakening the expression of related proteins. **Conclusion** PTEN overexpression can alter the tumor biological effects of Huh-7 liver cancer cells, reduce the expression of oncogenic proteins, and decrease migration.

【Keywords】 PTEN; stable liver cancer cell; P53; cell migration; MK2206^{***}

* **【基金项目】** 福建省中青年科技项目 (No. JAT220401), 厦门医学院大学生创新创业项目 (No. 202212631003, 202312631015, S202112631011)。

** **【通讯作者】** 祝珊珊, E-mail: yeshan2005xy@163.com

【作者简介】 余惟一 (2002-), 男, 福建漳州人, 大学本科, 主要研究方向: 肿瘤药理学。E-mail: 971202513@qq.com
余惟一和甘露为共同第一作者

肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是世界上最常见的实体肿瘤之一。根据2020年全球癌症统计数据,肝癌排在肺癌和结直肠癌后,2020年有90万肝癌新病例报告,每年有83万人死于肝癌,这些数字还在上升,从1990年到2016年,肝癌的发病率增加了114.0%,是全球癌症死亡的最主要原因之一^[1-2]。尽管手术和抗癌药的兴起为治疗肝癌提供了有效的手段和方式,但是不能降低肝癌的发生和死亡率,HCC的预后高度依赖于诊断时的疾病分期。如果肿瘤发现得早,体积小,可以进行根治性治疗。如果在晚期才确诊,治愈性治疗就不再可能,患者也无法治愈。因此,早期诊断HCC至关重要^[3]。

10号染色体上缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物(gene of phosphate and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN),也称为MMAC1/TEP1,是1997年由三个实验室独立发现的肿瘤抑制因子,具有脂质和蛋白磷酸酶活性^[4-6]。PTEN是一个经典的肿瘤抑制因子,主要参与AKT级联的稳态维持。在细胞内多条信号传导途径调控中起着重要作用。其在肿瘤中经常表达缺失。通过对人类蛋白质图谱(HPA)分析显示,PTEN在正常肝组织中过表达,而在肝癌组织中表达下调,而这种表达下调、缺失可能是肝癌患者肿瘤细胞内PTEN表达下调的主要机制之一,提示PTEN在肝癌细胞中过表达后具有显著的抑癌作用及预后价值^[7]。PTEN在GEMM(基因工程小鼠模型)肿瘤发生中研究提示PTEN可能是药物开发利用的新靶点,为癌症预防和治疗提供潜在的治疗策略,可为患者应付由PTEN功能异常驱动的肿瘤以及种系PTEN突变引起的疾病提供希望。

本研究采用慢病毒感染法构建PTEN过表达的肝癌稳转株,通过细胞外基因编辑技术使肝癌细胞稳定表达PTEN,研究PTEN表达对肝癌细胞肿瘤生物学活性的影响,为探讨PTEN在肝癌抗癌靶点提供研究数据。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞 293T细胞购自武汉普诺赛生物科技有限公司,人肝癌细胞Huh-7购自上海富衡生物科技有限公司。

1.2 主要试剂 慢病毒载体pLVX-puro-EGFP以及包装质粒pH1和pVSVG均购自厦门生命互联科技有限公司;PCR引物由江苏金唯智生物有限公司合成;Xho I和Sma I限制性内切酶、T₄DNA连接酶等购自Fermentas公司。DMEM培养基和磷酸盐缓冲液(PBS)由美国Hyclone公司生产;胎牛血清(FBS)

和胰蛋白酶由美国Gibco公司生产;4%多聚甲醛、RI-PA和含DAPI抗淬灭封片剂由北京索莱宝科技有限公司生产;CCK-8试剂购买于上海东仁化学科技有限公司;Trizol由美国赛默飞公司生产;cDNA反转录试剂盒、SYBR Green Mix、ECL Plus购买于北京兰博利德商贸有限公司;Alexa Fluor 594标记的山羊抗兔IgG、Alexa Fluor 647标记的山羊抗小鼠IgG、PTEN抗体、GAPDH抗体、 β -actin抗体等均购买于英国Abcam公司;E-cadherin、Vimentin抗体和Sulg抗体购买于美国CST公司;HRP标记的山羊抗兔IgG和HRP标记的山羊抗小鼠IgG由武汉联科生物技术有限公司生产。AKT抑制剂MK-2206购自上海MCE公司。

1.3 主要仪器 细胞CO₂培养箱(新加坡ESCO公司);荧光显微镜系统DMI8和扫描激光共聚焦显微镜系统SP8(德国Leica公司);荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司);多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);电泳及化学发光凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 质粒构建及鉴定 选择人PTEN(Genebank: NM_000314.8)基因序列设计引物,两端为限制性内切酶位点XhoI和SmaI,用于构建PTEN的过表达病毒载体。引物序列:PTEN-F:5'-CCCTCGAGATGACAGCCATCATCAA-3';PTEN-R:5'-CCCCCGGGC-CCGGGTCAGACTTTTGTAAG-3'。

PCR聚合酶链式反应得到的PTEN片段经限制性内切酶酶切后与慢病毒空载Plvx-puro-GFP在T₄DNA连接酶的作用下4℃连接过夜,转化到大肠埃希菌DH5a内,经过摇菌扩增和质粒提取,DNA电泳及酶切鉴定和测序,最终得到PTEN过表达慢病毒质粒(Plvx-puro-GFP-PTEN)。

2.2 慢病毒包装与鉴定 利用人胚肾细胞293T进行慢病毒包装,细胞经传代后用转染试剂Lipo8000将Plvx-puro-GFP-PTEN和pVSVG、pHR加入细胞,转染24h后更换新鲜培养基。48h后收集293T细胞上清液分装于1.5 mL管并在液氮罐内急速冷冻后,存放-80℃冰箱待用。

2.3 病毒感染 培养人肝癌细胞Huh-7胰酶消化后传于10 cm细胞培养皿,待细胞贴壁后加入慢病毒上清液感染细胞。24 h更换培养基并观察荧光表达情况。利用2 μ g/mL嘌呤霉素进行阳性细胞筛选,最终得到PTEN过表达Huh-7/hPTEN稳转株和对照稳转株Huh-7/EGFP。

2.4 qRT-PCR法检测基因表达水平 分别将对数期的肝癌细胞Huh-7/EGFP和Huh-7/hPTEN传代至6 cm盘,摇匀培养。待细胞密度达80%~90%后,弃

去细胞培养液, Trizol 法提取细胞 RNA。将细胞中总 RNA 逆转录为 cDNA, 进行扩增。引物序列见表 1。按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算 mRNA 的倍数变化。实验重复 3 次。

表 1 RT-PCR 基因引物序列
Table 1 Primer sequence of RT-PCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
ABCB1 F	CGTAGGAGTGTCCGTGGATCA
ABCB1 R	GCGAGCCTGGTAGTCAATGC
ABCC2 F	ACAGGATGGCTGAAGGTGACA
ABCC2 R	ATGGCGGCATTGTAGGTGTTT
PTEN F	GCTGGAAGGACGAACCTGGTG
PTEN R	ACAGGTAACGGCTGAGGGAAC
Vimentin F	CGACGCCATCAACACCGAGTT
Vimentin R	TGCCAGAGACGCATTGTCAACA
E-cadherin F	CGAGTGCCAACTGGACATTCA
E-cadherin R	TCCTCTTCTCCGCTCCTTCTT
HNF4a F	AAGATCAAGCGGCTGCGTTCC
HNF4a R	TCTGTCCGTTGCTGAGGTGAGT
AR F	CTCTCACATGTGGGAAGCTGC
AR R	AGCCTCTCCTTCCTCTGTA

2.5 Western blot 法检测蛋白表达 收集肝癌 Huh-7/EGFP 和 Huh-7/hPTEN 细胞, 加入 RIPA 溶液裂解提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后每组加入 30 μ L 进行 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜, 用无蛋白快速封闭缓冲液封闭 5 min, 分别加入 PTEN(1 : 5000)、P53(1 : 5000)、E-cadherin(1 : 4000)、Vimentin(1 : 3000)、Slug(1 : 3000)、ABCB1(1 : 3000 和 ABCC2(1 : 4000), 以及 β -actin(1 : 10000)一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜后二抗(1 : 6000)室温孵育 1 h, 用 ECL 进行显影, 以 β -actin(1 : 10000)为内参, 分析印迹条带灰度值, 并作差异分析。

2.6 免疫荧光法检测蛋白荧光表达 分别将肝癌细胞 Huh-7/EGFP 和 Huh-7/hPTEN 传代于 3.5 cm 玻璃细胞培养皿上, 培养 24 h; 用 PBS 细胞后 4% 的多聚甲醛固定, 0.1% Triton X-100 透化细胞, 2% BSA 封闭 1 h。一抗 PTEN(1 : 400), P53(1 : 400), E-cadherin(1 : 300), Vimentin(1 : 800) 和 ABCB1(1 : 500) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 用 PBS 清洗细胞后, 荧光二抗室温孵育 1 h。用含 DAPI 的封片剂室温淬灭 20 min, 激光共聚焦显微镜下扫描拍照。

2.7 Transwell 法检测细胞迁移 Huh-7 EGFP 和 Huh-7 hPTEN 细胞用无血清 DMEM 培养基重悬。调整细胞密度至 5×10^5 /mL。取细胞悬液 20 μ L 加入 Transwell 小室中, 24 孔板下室加入 500 μ L 含 20% FBS 的 DMEM 培养基, 培养 24 h 后, 取出 Transwell 小室, 弃去孔中培养液, PBS 清洗细胞, 甲醇固定后, 0.1% 结晶紫染色 20 min, 用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, PBS 洗 3 遍后, 显微镜观察细胞, 计数。

2.9 统计学分析 本实验采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析。采用 t 检验法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验独立重复 3 次及以上。

结 果

1 PTEN 慢病毒过表达质粒的构建及测序鉴定

慢病毒载体构建完成后, 使用限制性内切酶 Xho I 和 Sam I 对连接载体进行双酶切, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 经过酶切的片段在 DNA 电泳结果显示, PTEN 片段的 DNA 条带大小约为 1 224 bp(图 1A)。送样测序结果显示碱基正确, PTEN 慢病毒过表达质粒 Plvx-puro-GFP-PTEN 构建成功(图 1B)。

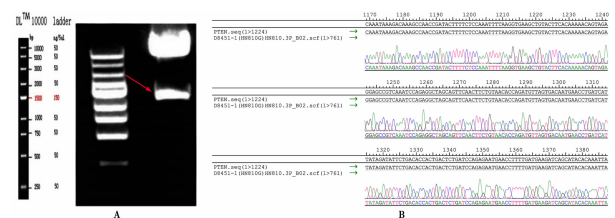


图 1 PTEN 慢病毒质粒电泳与测序结果

Fig. 1 PTEN lentivirus plasmid construction and sequencing results

2 包装病毒上清和感染肝癌细胞

慢病毒质粒转染 293T 细胞, 结果显示, GFP 荧光表达显著(图 2A)。病毒颗粒感染肝癌细胞 Huh-7 后, 经过嘌呤霉素筛选后, 结果显示, Huh-7/EGFP 和 Huh-7/hPTEN 细胞能正常存活在含 2 μ g/mL 嘌呤霉素的培养环境中(图 2B)。

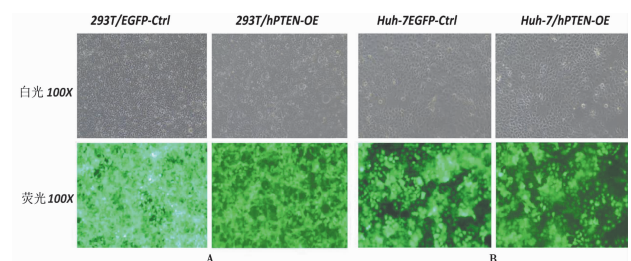


图 2 293T 和 Huh-7 细胞明场和荧光图(100 $\times$)

Fig. 2 Bright field and fluorescence images of 293T and Huh-7 cells

3 Huh-7/hPTEN 稳转株内基因和蛋白的表达

RT-PCR 和 Western blot 结果显示, 与对照组 Huh-7/EGFP 相比, Huh-7/hPTEN 组细胞 PTEN 和 P53 的 mRNA 和蛋白表达显著升高($P < 0.01$), Slug 的 mRNA 和蛋白表达显著降低($P < 0.01$)(图 3A 和 3B); 免疫荧光结果如图 3C 所示, P53 和 PTEN 蛋白表达显著增强。

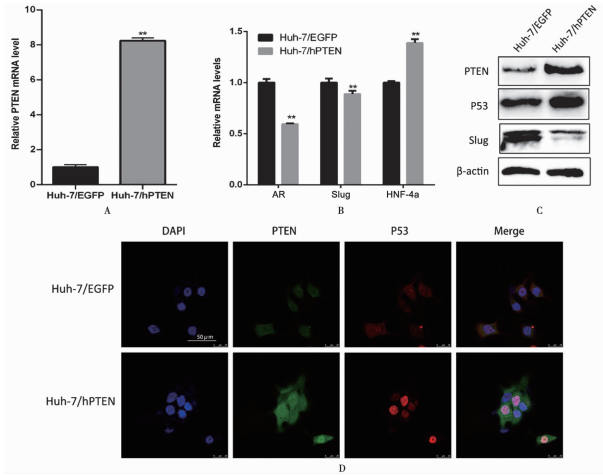


图 3 Huh-7/hPTEN 稳转株内基因和蛋白情况
Fig. 3 Gene and protein expression in Huh-7/hPTEN stable cells

4 Huh-7/hPTEN 稳转株耐药相关蛋白表达

RT-PCR 和 Western blot 结果显示,与对照组 Huh-7/EGFP 细胞相比,Huh-7/hPTEN 组细胞耐药蛋白 ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 和蛋白表达显著降低($P<0.01$)(图 4)。

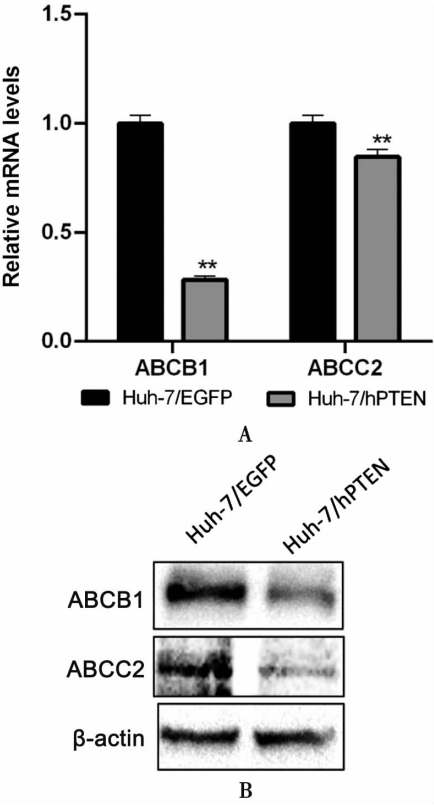


图 4 ABCB1 和 ABCC2 的 mRNA 和蛋白表达
Fig. 4 The mRNA and protein expression of ABCB1 and ABCC2

5 Huh-7/hPTEN 稳转株对 EMT 相关蛋白表达影响

RT-PCR 和 Western blot 结果显示,与对照组 Huh-7/EGFP 细胞相比,Huh-7/hPTEN 组 EMT 相关蛋白 E-cadherin 和 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表

达显著降低($P<0.01$)。免疫荧光实验结果与 Western blot 结果一致(图 5A 和 5B)。

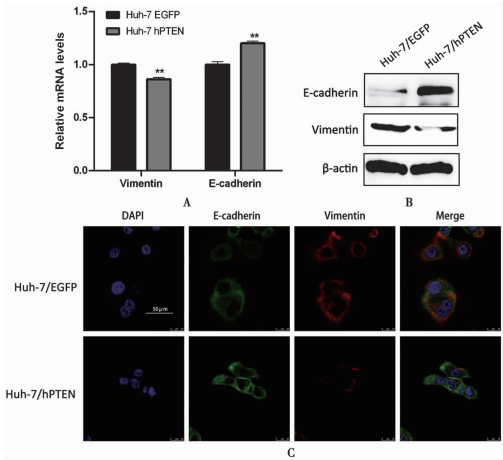


图 5 E-cadherin 和 Vimentin 的基因和蛋白表达
Fig. 5 The gene and protein expression of E-cadherin and Vimentin

6 Huh-7/hPTEN 稳转株对细胞迁移的影响

利用 Transwell 小室法检测 Huh-7/hPTEN 稳转株的迁移,结果显示,与对照组 Huh-7/EGFP 相比,Huh-7/hPTEN 细胞迁移减弱,数量减少($P<0.01$)(图 6)。

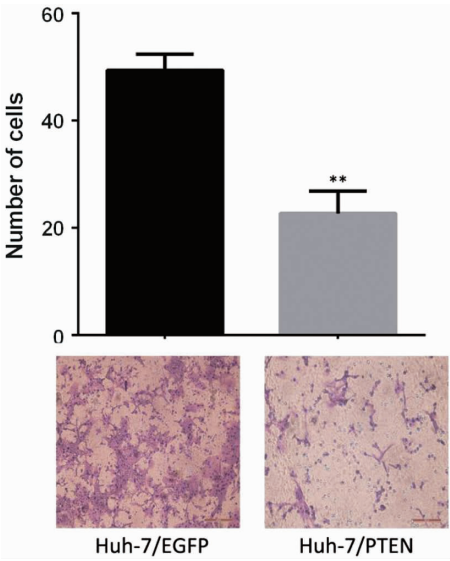


图 6 Huh-7/hPTEN 稳转株细胞迁移
Fig. 6 Cell migration of Huh-7/hPTEN cells

7 Huh-7/hPTEN 稳转株增强抑制剂 MK2206 的抗癌作用

Western blot 法检测 AKT 信号通路抑制剂 MK2206 对 Huh-7/hPTEN 稳转株抗癌效果的影响,结果显示,与对照组 Huh-7/EGFP 相比,MK2206 能增强稳转株 Huh-7/hPTEN 细胞 P53 和 E-cadherin 的表达,降低 Vimentin、ABCB1、ABCC2 和 Slug 的表达(图 7)。

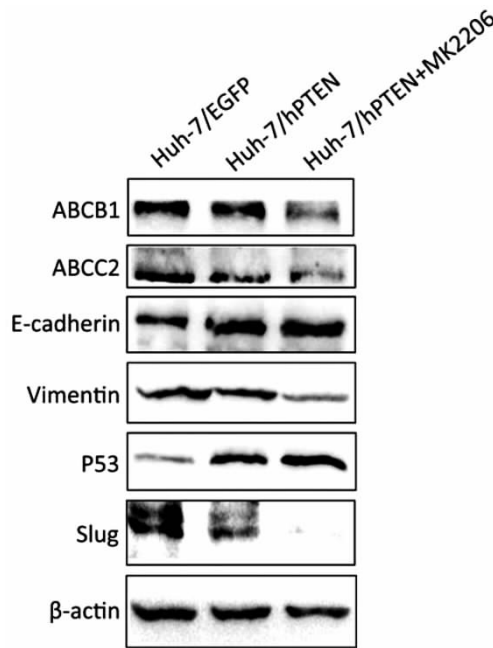


图7 MK2206对Huh-7/hPTEN细胞株蛋白表达的影响
Fig. 7 Effect of MK2206 on protein expression in Huh-7/hPTEN cell line

讨论

自发现PTEN以来的二十多年里,已有近18 000篇文章试图阐明其在正常生理和疾病中的功能和作用^[8]。癌细胞中PTEN的频繁变异或缺失暗示它在肿瘤抑制中具有关键作用,在对746个人类癌症基因组的分析中,它被确定为具有最大选择压力的缺失位点^[9]。PTEN通过磷酸肌苷3-激酶(PI3K)途径限制致癌信号传导,控制了包括细胞存活、增殖、能量代谢和细胞结构在内的许多过程。在对PTEN生物学和信号传导的研究方面,最新研究显示它作为一种未被认识的蛋白磷酸酶作用,确定了非酶支架功能,并阐明了它的核功能^[10-11]。这些发现将会为其全部肿瘤抑制潜力提供新的视角。本研究通过在肝癌细胞内构建PTEN过表达稳转株,以这株细胞中获得的结果为探索PTEN生物学的新的抗癌基因靶点策略提供依据。

在此研究中,成功构建了PTEN过表达的慢病毒质粒载体,并通过慢病毒包装感染肝癌Huh-7细胞,嘌呤霉素筛选后得到PTEN过表达的稳转肝癌细胞株Huh-7/hPTEN细胞。在该细胞中,PTEN的蛋白和mRNA表达显著高于对照组Huh-7/EGFP细胞。有研究表明,PTEN在细胞核的转录过程受到Snail和Slug的转录抑制^[12],这两个锌指样转录因子与p53竞争PTEN启动子结合,PTEN通过与p53直接结合促进肿瘤抑制因子p53的稳定性和转录活性^[13-14]。我们的研究显示,Huh-7/hPTEN细胞P53蛋白表达升高,免疫荧光结果显示p53主要定位在细胞核内,这表

明PTEN能募集p53在细胞核内的表达。另外,Huh-7/hPTEN细胞内Slug蛋白表达下降,Slug作为调节EMT进程的重要转录因子之一,也是PTEN的直接转录抑制因子之一^[15]。研究结果显示,PTEN的过表达能反转Slug的表达调控作用,且降低雄激素受体(Androgen receptor;AR)的mRNA表达,提高肝细胞核因子HNF4a的mRNA表达。

肿瘤患者对药物反应的个体差异是一个常见的临床挑战,部分原因是药代动力学的差异。ATP结合盒(ABC)转运体是药物处置的关键决定因素,它们受基因调控和药物相互作用的影响。ABCB1和ABCC2是三磷酸腺苷(ATP)结合盒亚家族成员,是一种ATP依赖性药物转运体,大量的药理学研究显示,ATP结合盒(ABC)转运体在癌症、干细胞和耐药中的作用是将外界药物分子泵出细胞外,清除细胞中的异物,导致药理浓度降低,影响药效发挥^[16-17],即作为首过效应的一部分,ABCB1和ABCC2能消除肠道吸收的药物。在PTEN过表达稳转株Huh-7/hPTEN细胞中,PTEN的稳定表达降低了肝癌细胞内耐药蛋白ABCB1和ABCC2的表达,这个结果表示PTEN的表达复苏能抑制ABCB1和ABCC2的表达,PTEN或可能降低肝癌细胞对外界药物的排异反应。此外,与对照组细胞相比,Huh-7/hPTEN稳转株细胞的上皮标记物E-cadherin表达升高,间质标记物Vimentin表达下降。Transwell小室实验结果显示Huh-7/hPTEN稳转株的迁移能力弱于Huh-7/EGFP株,细胞迁移能力减弱。这个结果说明Huh-7/hPTEN稳转株肿瘤迁移行为降低,细胞间的连接更加紧致。

众所周知,PTEN信号调节的下游效应蛋白是AKT信号,AKT在调控细胞生长、生存、细胞迁移和分化、细胞和器官大小控制、代谢等一系列细胞活动中发挥着重要作用^[18-19]。AKT,也称为蛋白激酶B(PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸激酶。PI3K激活后,PIP3的积累使得AKT通过与其PH结构域的直接相互作用被募集到质膜上^[20]。为了研究抑制AKT活性是否有助于进一步降低Huh-7/hPTEN稳转株的肿瘤生物学活性,我们利用AKT激酶抑制剂MK2206抑制AKT信号后发现Huh-7/hPTEN稳转株在经过MK2206处理后ABCB1、ABCC2、Vimentin和Slug蛋白表达下降更显著,E-cadherin蛋白表达升高也更显著。

在早期的研究中,PTEN被报道是一种仅局限于细胞质的蛋白质。然而,现在已经明确的是不论在分化和休眠的细胞中,PTEN可以同时存在于细胞质和细胞核中^[21]。核PTEN除了具有脂质磷酸酶活性外,还具有其他作用,PTEN的核功能对于PTEN抑制肿

瘤发展的能力至关重要。本研究中我们构建了 PTEN 过表达的稳转肝癌细胞株,这株细胞的肿瘤生物学行为和蛋白活性相比于对照株 Huh-7/EGFP 明显减弱,细胞内的 ATP-结合盒家族成员 ABCB1 和 ABCG2 表达减少,肿瘤抑制因子 p53 表达上升,与上皮-间质有关的靶分子 E-cadherin 表达升高,Vimentin 表达下降,细胞迁移性能减少。MK2206 的参与表明 Huh-7/hPTEN 能提高细胞对外界药物的利用率,进一步增强对相关蛋白的调控作用。我们的研究结果为 PTEN 作为肝癌治疗的有效分子靶点提供了依据,未来在对肝癌的治疗中,可以针对 PTEN 信号机制研究新的系统性联合治疗,从而降低癌细胞对治疗产生耐药性的可能性。

【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71: 209-249.
- [2] Liu Z, Jiang Y, Yuan H, et al. The trends in incidence of primary liver cancer caused by specific etiologies: results from the Global Burden of Disease study 2016 and implications for liver cancer prevention[J]. J Hepatol, 2019, 70: 674-683.
- [3] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2018, 69: 182-236.
- [4] Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta[J]. Cancer Res, 1997, 57: 2124-2129.
- [5] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275: 1943-1947.
- [6] Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome[J]. Nat Genet, 1997, 16: 64-67.
- [7] Shi Y, Zhang DD, Liu J B, et al. Comprehensive analysis to identify DLEU2L/TAOK1 axis as a prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 1(23): 702-

718.

- [8] Chow ATS, Salmena L. Recent advances in PTEN signalling axes in cancer[J]. Fac Rev, 2020, 9: 31.
- [9] Wang XJ, Trotman LC, Koppie T, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN[J]. Cell, 2007, 128(1): 129-139.
- [10] Tay Y, Kats L, Salmena L, et al. Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs[J]. Cell, 2011, 147(2): 344-357.
- [11] Trotman LC, Wang XJ, Alimonti A, et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression[J]. Cell, 2007, 128(1): 141-156.
- [12] Uygur B, Abramo K, Leikina E, et al. SLUG is a direct transcriptional repressor of PTEN tumor suppressor[J]. Prostate, 2015, 75: 907-916.
- [13] Freeman DJ, Li AG, Wei G, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms[J]. Cancer Cell, 2003, 3: 117-130.
- [14] Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner[J]. Cancer Res, 2006, 66: 736-742.
- [15] Liang XX, Li XP, Wang P, et al. Inhibition of lncRNA RET enhances radio-sensitivity of tumor cells via miR-3179/Slug/PTEN axis[J]. Toxicol Res (Camb), 2022, 11(2): 348-360.
- [16] Bruckmueller H, Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, and ABCC3 drug transporter polymorphisms and their impact on drug bioavailability: what is our current understanding? [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2021, 17(4): 369-396.
- [17] Weng HJ, Tsai TF. ABCB1 in dermatology: roles in skin diseases and their treatment[J]. J Mol Med, 2021, 99: 1527-1538.
- [18] Stiles B, Gilman V, Khanzenon N, et al. Essential role of AKT-1/protein kinase B alpha in PTEN-controlled tumorigenesis[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 3842-3851.
- [19] Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream [J]. Cell, 2007, 129: 1261-1274.
- [20] Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 489-501.
- [21] Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN [J]. J Cell Sci, 2008, 121: 249-253.

【收稿日期】 2023-12-26 【修回日期】 2024-03-17

(上接 635 页)

- [17] Brito F, Cordey S, Delwart E, et al. Metagenomics analysis of the virome of 300 concentrates from a Swiss platelet bank[J]. Vox Sang, 2018: 1111.
- [18] Jacobs MR, Lazarus HM, Maitta RW. The safety of the blood supply-time to raise the bar[J]. N Engl J Med, 2015, 373(9): 882.
- [19] Paise S, Valle C, Servant F, et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing[J]. Transfusion, 2016, 56(5): 1138-1147.

- [20] Goraya MU, Li R, Mannan A, et al. Human circulating bacteria and dysbiosis in non-infectious diseases[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 932702.
- [21] Liu XY, Li J, Zhang Y, et al. Kidney microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension[J]. Gut Microbes, 2022, 14(1): 2143220.
- [22] Borriello L, Coste A, Traub B, et al. Primary tumor associated macrophages activate programs of invasion and dormancy in disseminating tumor cells[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 626.

【收稿日期】 2024-01-27 【修回日期】 2024-04-09