论著

文章编号:1000-5404(2011)14-1484-04

PTEN基因调控口腔鳞癌细胞TCA-8113增殖及凋亡

杨雨晗[1],邓 缅[2] (610083 成都,成都医学院生物医学系:细胞生物学和遗传学教研室[1],生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 评估PTEN基因在人口腔鳞癌细胞系TCA-8113中的增殖抑制和促凋亡功能。**方法** 利用PTEN真核表达质粒转染TCA-8113细胞,另设PBS处理作为空白组,转染pcDNA3.1质粒和Lipofectamine处理作为对照组。采用MTT和克隆形成实验检测细胞增殖情况,采用流式细胞术、TUNEL和Western blot法检测细胞凋亡。**结果** pcDNA3.1-PTEN转染TCA-8113细胞得到高效的外源性表达。克隆形成实验结果表明,空白组、Lipofectamine处理组、空载体质粒组和PTEN转染组的克隆数分别为(107.34±4.62)、(79.27±3.71)、(72.03±2.38)和(19.73±1.02),PTEN转染组抑制率为72.60%,与空载体质粒组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);MTT实验结果显示PTEN基因的表达对TCA-8113细胞的抑制率在48 h和72 h分别为18.16%和42.74%,PTEN转染组与空载体质粒组比较有统计学差异($P<0.05$);流式细胞术检测结果显示,PTEN基因能引起62.12%的细胞死亡;TUNEL检测PTEN基因高表达能引起(45.67±2.31)%的细胞凋亡;Western blot检测结果表明,PTEN能抑制Bcl-2的表达并激活Bax的表达。**结论** PTEN在TCA-8113细胞中的表达能显著抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。

[关键词] 口腔鳞癌;PTEN;增殖;凋亡
[中图法分类号] R739.85;R394.2;R730.23 [文献标志码] A

PTEN gene expression inhibits proliferation and promotes apoptosis in human oral squamous carcinoma cell line TCA-8113

Yang Yuhan[1], Deng Mian[2] ([1]Department of Cell Biology and Genetics, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Biomedical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effects of PTEN gene expression on inhibiting the proliferation and promoting the apoptosis of human oral squamous carcinoma cell line TCA-8113. **Methods** TCA-8113 cells were transfected with eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-PTEN to obtain an experimental group. Besides, TCA-8113 cells were also treated with PBS, plasmid pcDNA3.1 and Lipofectamine to obtain a blank group and two control groups (a pcDNA3.1-transfected group and a Lipofectamine-treated group). The proliferation of TCA-8113 cells was detected by MTT assay and colony-forming assay. The apoptosis of TCA-8113 cells was evaluated by flow cytometry, TUNEL assay and Western blotting. **Results** TCA-8113 cells transfected with plasmid pcDNA3.1-PTEN had high intracellular expression of PTEN. Colony-forming assay showed that the clone numbers of the blank group, Lipofectamine-treated group, pcDNA3.1-transfected group and pcDNA3.1-PTEN-transfected group were 107.34±4.62, 79.27±3.71, 72.03±2.38 and 19.73±1.02, respectively. The inhibitive rate of TCA-8113 cells in the pcDNA3.1-PTEN-transfected group was 72.60%, significantly higher than that in the pcDNA3.1-transfected group ($P<0.05$). MTT assay showed that the inhibitive rates of TCA-8113 cells in the pcDNA3.1-PTEN-transfected group were 18.16% and 42.74% at 48 h and 72 h after transfection, significantly higher than those in the pcDNA3.1-transfected group ($P<0.05$). Flow cytometry showed that the death rate of TCA-8113 cells in the pcDNA3.1-PTEN-transfected group was 62.12%, significantly higher than that in the pcDNA3.1-transfected group ($P<0.05$). TUNEL assay showed that the apoptosis of TCA-8113 cells in the pcDNA3.1-PTEN-transfected group was (45.67±2.31)%, significantly higher than that in the pcDNA3.1-transfected group ($P<0.05$). Furthermore, PTEN inhibited Bcl-2 expression and activated Bax expression, as proven by Western blotting. **Conclusion** The expression of PTEN gene can remarkably inhibit the proliferation and promote the apoptosis of TCA-8113 cells.

[基金项目] 四川省教育厅科研基金(10ZC090)
[通信作者] 邓 缅,电话:(028)68289239,E-mail:5996965@qq.com

[**Key words**] oral squamous carcinoma; PTEN; proliferation; apoptosis

Supported by the Science Research Foundation of Sichuan Department of Education (10ZC090). Corresponding author: Deng Mian, Tel: 86-28-68289239, E-mail: 5996965@qq.com

口腔鳞癌(oral squamous carcinoma, OSCC)是常见的恶性肿瘤,占全身肿瘤的3%。每年全球有50万新发病例,患者的5年生存率仅50%[1]。第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(phosphatase and tension homolog deleted on chromosome ten, PTEN)是迄今发现的第1种具有双特异性磷酸酶活性的肿瘤抑制基因。它参与调控细胞内诸多重要的信号通路,例如PI3K/AKT、FAK/p130Cas、ERK、p53/MDM2和FRAP/mTOR[2-4]。通过发挥磷酸酶作用,PTEN降低多种信号转导途径的关键酶磷酸化水平,阻断信号转导通路,以抑制细胞的生长、黏附、铺展和迁移,诱导细胞凋亡,从而对肿瘤的生长、侵袭和转移产生负性调节作用[4-5]。临床样本显示[6-7],PTEN基因在口腔鳞癌中呈低表达状态,且表达水平与口腔鳞癌的组织学分化程度呈正相关,不表达或表达弱者多见于组织分化程度低,恶性程度高的口腔鳞癌。提示PTEN基因在口腔鳞癌的发生过程中起到重要作用。本研究以口腔鳞癌细胞系TCA-8113为模型,探讨增加口腔鳞癌细胞TCA-8113中PTEN基因的表达对细胞增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人口腔鳞癌细胞系TCA-8113由成都医学院生物医学系生物技术实验室-80 ℃冻存,pcDNA3.1-PTEN质粒及pcDNA3.1空载体购自上海艾博思生物科技有限公司,DH5α大肠杆菌菌株购自天根生化科技有限公司,小量质粒抽提纯化试剂盒购自OMEGA公司,DMEM培养基购自Gibco公司,超级新生牛血清购于杭州四季青生物公司,转染试剂Lipofectamin 2000购自Invitrogen公司,MTT购自Sigma公司,TUNEL凋亡检测试剂盒(DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System)购自Promega公司,蛋白质预染Marker购自MBI公司,聚偏氟乙烯(PVDF)膜购自Millipore公司,Tween-20购自北京中杉金桥生物技术有限公司,ECL显色试剂盒购自Pierce Biotechnology公司,Bcl-2、Bax、β-actin单克隆抗体均购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 TCA-8113细胞在含有10%胎牛血清的DMEM培养基(含10^5 U/L青霉素,100 mg/L链霉素)中于37 ℃,5% CO_2培养箱中培养。

1.2.2 TCA-8113细胞转染 将TCA-8113细胞以10^5/孔(6孔板)或者5 000/孔(96孔板)的浓度接种,每孔加入2 ml(6孔板)或者200 μl(96孔板)完全培养基,置CO_2孵箱中37 ℃培养过夜。待细胞长到50%~80%单层时,在无菌离心管中配制如下溶液:溶液A,将4 μg(6孔板)或0.2 μg(96孔板)质粒分别稀释到250 μl(6孔板)或25 μl(96孔板)无血清培养基中;溶液B,将10 μl(6孔板)或0.5 μl(96孔板)Lipofectamine稀释到250 μl(6孔板)或25 μl(96孔板)无血清培养基中;混合溶液A和B,轻轻混匀,室温放置30 min。用1 ml(6孔板)或者100 μl(96孔板)无血清培养基轻轻洗涤细胞,每孔加入0.5 ml(6孔板)或者0.05 ml(96孔板)无血清培养基,将脂质体复合物滴加到孔中,轻轻摇晃混匀,置于CO_2孵箱中37 ℃孵育4 h。用完全培养基替换转染液,继续培养。

1.2.3 MTT检测细胞增殖情况 按1.2.2的方法,转染pcDNA3.1-PTEN质粒作为PTEN转染组,另设PBS处理作为空白组,转染pcDNA3.1质粒(空载体质粒组)和Lipofectamine处理作为对照,共4组,每组设3个复孔。转染结束后48 h和72 h,每孔加入MTT(5 mg/ml)试剂20 μl,37 ℃ 5% CO_2孵育4 h,以不含细胞仅有培养基的孔调零,酶标仪测定仪检测590 nm波长下的光密度值[$D(590)$]。

抑制率=[空载体质粒组$D(590)$-PTEN转染组$D(590)$]/空载体质粒组$D(590)$×100%

1.2.4 克隆形成实验 将转染后24 h的TCA-8113细胞以300/孔的量接种至另1个6孔板中。采用1.2.3中的分组,37 ℃ 5% CO_2下培养细胞2周。弃培养基,甲醇固定5 min,结晶紫染色15 min,以流水缓慢冲洗,洗去染液后观察并计数克隆数(细胞团的细胞数多于50算1个克隆)。

抑制率=(空载体质粒组克隆数-PTEN转染组克隆数)/空载体质粒组克隆数×100%

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 采用1.2.3中的分组,收集处理后的TCA-8113细胞,PBS缓冲液洗涤2次,1 000 r/min离心3 min后弃上清,缓慢加入1 ml 70%冰乙醇,轻柔混匀,制成细胞悬液,-20 ℃固定过夜。流式检测前取出细胞,1 000 r/min离心3 min后弃上清,加入PI染色液1 ml,室温孵育30 min。上流式细胞仪检测DNA-PI荧光强度。流式细胞仪激发光与发射光波长分别为488 nm与530 nm,每个样本1×10^4个细胞。使用Coulter Elite 4.5 Multicycle软件进行参数获取和结果分析,计算凋亡细胞比例与细胞周期分布。实验重复3次。

1.2.6 Western blot 收集细胞,按1×10^7细胞浓度加入300 μl细胞裂解液,冰上放置30 min,4 ℃ 12 000 r/min离心15 min,取上清液加上样缓冲液,100 ℃煮沸变性10 min,为确保蛋白上样量一致,样品中蛋白经Bradford定量,通过12% SDS-PAGE分离后转至PVDF膜上。加入一抗(β-actin, 1∶1 000; Bcl-2, 1∶100; Bax, 1∶500; PTEN, 1∶500)4 ℃过夜,用TBST洗膜3次;辣根过氧化物酶标记二抗(1∶5 000)37 ℃温育2 h,TBST洗涤PVDF膜3次后进行化学发光反应。将ECL试剂盒中的A液与B液以1∶1混匀(总体积为3 ml),加入杂交袋,室温避光孵育5 min,吸干显色液。在暗室中,将已显色的PVDF膜曝光在X胶片上,冲洗胶片,放置在凝胶成像仪上记录并分析结果。

1.2.7 TUNEL检测 细胞爬片培养过夜,按照1.2.3中的

分组,转染后培养48 h,PBS清洗细胞后,用含4%甲醛的PBS于4 ℃固定细胞25 min,然后使用含0.2% Triton X-100的PBS溶液室温处理5 min以增加膜通透性。染色按照说明书进行。荧光观察检测使用Olympus BX60显微镜。

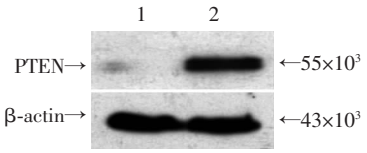
1.3 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组计量数据的比较行 t 检验。

2 结果

2.1 Western blot检测PTEN的体外表达

分别取用空载体pcDNA3.1、pcDNA3.1-PTEN转染的TCA-8113全细胞裂解液进行Western blot检测,结果显示,转染pcDNA3.1-PTEN质粒的实验组中PTEN蛋白表达明显上调,而在空载体质粒组中则几乎不表达(图1)。



1:空载体质粒组;2:PTEN转染组

图1 Western blot检测TCA-8113细胞转染后PTEN基因的表达结果

2.2 PTEN高表达对TCA-8113细胞增殖的影响

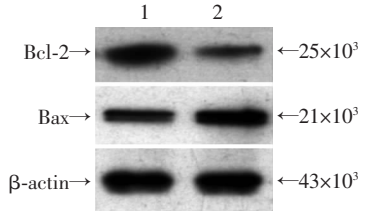
克隆形成实验和MTT均表明,PTEN高表达显著抑制了TCA-8113细胞生长。在克隆形成实验中,经过14 d的培养,空白组、Lipofectamine处理组、空载体质粒组和PTEN转染组的克隆数分别为(107.34±4.62)、(79.27 ±3.71)、(72.03±2.38)和(19.73±1.02),PTEN转染组抑制率为72.60%,与空载体质粒组相比,差异有统计学意义($P<0.05$,图2)。在MTT实验中,TCA-8113细胞的生长抑制呈明显的时间依赖性。pcDNA3.1-PTEN质粒转染后48 h,细胞的增殖抑制率为18.16%,与空载体质粒组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);转染后72 h,细胞的增殖抑制率上升为42.74%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 PTEN高表达对TCA-8113细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,转染后72 h,空白组、Lipofectamine处理组、空质粒载体组和PTEN转染组的细胞凋亡率分别为1.23%、1.62%、6.25%和62.12%,PTEN转染组与空载体质粒组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。为了严格区分PTEN高表达引起的细胞凋亡和死亡,我们通过TUNEL进一步确认。如图3所示,PTEN转染组TUNEL阳性百分比为(45.67±2.31)%,而空白组、Lipofectamine处理组和空载体质粒组的阳性百分比分别为(1.73± 0.38)%、(8.22±1.17)%和(18.27±1.96)%。PTEN转染组与空载体质粒组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果说明PTEN高表达能在TCA-8113显著地诱导凋亡。

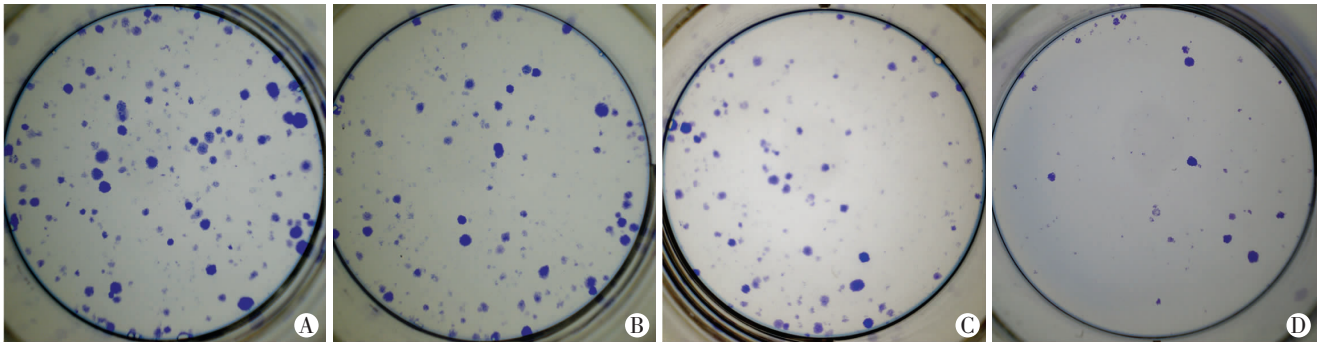
2.4 PTEN高表达对Bcl-2和Bax的影响

Western blot检测结果显示,PTEN高表达的细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2的表达量明显下调;相反,促凋亡蛋白Bax则明显上调(图4)。以上结果说明了PTEN在TCA-8113细胞中可能通过激活线粒体途径触发细胞凋亡。



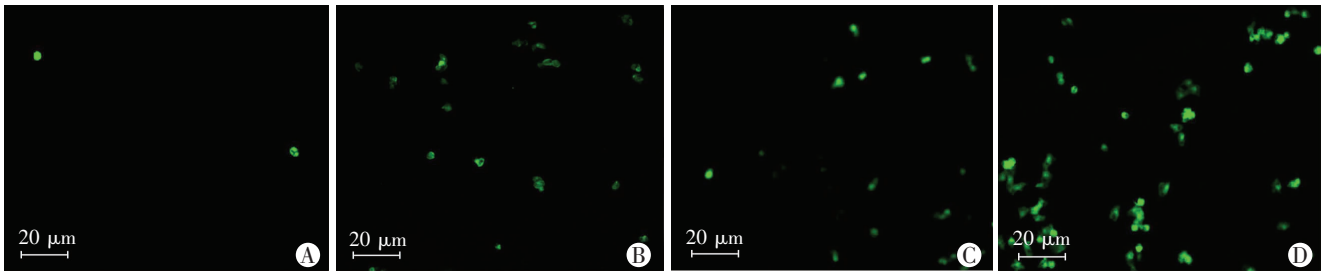
1:空载体质粒组;2:PTEN转染组

图4 Western blot检测PTEN高表达对Bcl-2和Bax表达的影响



A:空白组;B: Lipofectamine处理组;C:空载体质粒组;D:PTEN转染组

图2 克隆形成实验检测TCA-8113细胞转染后的增殖情况



A:空白组;B:Lipofectamine处理组;C:空载体质粒组;D:PTEN转染组

图3 TUNEL检测TCA-8113细胞转染PTEN基因后的凋亡情况(荧光显微镜)

3 讨论

PTEN基因定位染色体10q23.3,含9个外显子,编码1个由403个氨基酸残基组成的蛋白质,在人类多种肿瘤中均发现有PTEN杂合性丢失或突变,其表达与肿瘤的发生、发展及预后有一定的相关性[2,4,8]。多个研究表明[6-7,9],PTEN基因在OSCC组织中的阳性表达率与正常口腔黏膜、口腔上皮单纯增生和口腔黏膜白斑组织中PTEN的表达差异有统计学意义,提示PTEN基因参与维持口腔上皮细胞正常功能,调控正常上皮细胞的物质代谢、细胞增殖和分化,而PTEN基因的突变和PTEN蛋白的失活在OSCC的发生、发展中起着重要作用。

在本研究中,通过转染pcDNA3.1-PTEN质粒,在TCA-8113细胞中高效地表达外源性的PTEN。克隆形成实验和MTT实验表明,外源性PTEN蛋白的表达能强烈的抑制口腔鳞癌TCA-8113细胞的增殖。而且PTEN蛋白对TCA-8113细胞的增殖抑制具有明显的时间依赖性,在转染后48 h,抑制率为18.16%;转染后72 h,抑制率增加为42.74%。这可能与PTEN蛋白随时间推移,表达量提高有关。这提示PTEN基因转染后的作用与基因转染的剂量和时间存在正相关。

有报道证实PTEN在非小细胞肺癌细胞中能够通过PI3K/PKB/p21/CDK1途径调节AKT的活性并诱导表达P21,导致G_2/M期出现过渡阻滞的现象,并最终引起细胞凋亡[10]。在本研究中,通过流式细胞术和TUNEL染色实验表明,相对于对照组,转染后的TCA-8113细胞的死亡率和凋亡率在转染后72 h显著上升。

线粒体依赖的凋亡途径是重要的细胞程序性死亡信号级联[11-12]。凋亡信号通过改变线粒体膜上Bcl-2家族成员的表达量,引起线粒体膜电位改变,从而导致细胞色素C由线粒体中溢出进入细胞质,从而激活一系列caspase酶的表达,最终触发凋亡。在本实验中,我们研究了外源性PTEN蛋白对线粒体依赖的凋亡途径中两个关键蛋白Bcl-2和Bax的表达调控。Western blot检测结果表明,PTEN蛋白在TCA-8113细胞中的高表达能下调抗凋亡蛋白Bcl-2,并促进促凋亡蛋白Bax的表达。这些结果显示,PTEN蛋白能在TCA-8113细胞中激活线粒体依赖的凋亡途径从而导致细胞凋亡。本研究证明,在蛋白水平上PTEN在OSCC的发生、发展中起了重要的作用,癌细胞中外源性PTEN的表达能有效抑制增殖,诱导凋亡。PTEN基因有望成为口腔鳞癌治疗的新靶点。

值得注意的是,PTEN蛋白在OSCC中的表达下降,一些研究认为是其基因的外显子突变造成[13-14],但也有完全相反的研究结果,利用聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP),发现OSCC样本中PTEN基因所有9个外显子都被成功扩增,没有发现有PTEN基因的纯合性缺失[6,15]。部分结果显示PTEN基因的失活可能与DNA的甲基化有关[6],但其具体机制还值得进一步探讨。

参考文献:

[1] Mueller C K, Thorwarth M, Schultze-Mosgau S. Late changes in cutaneous gene expression patterns after adjuvant treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) by radiation therapy[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 109(5): 694-699.

[2] Kanda S, Kanetake H, Miyata Y. Loss of PTEN function may account for reduced proliferation pathway sensitivity to LY294002 in human prostate and bladder cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(2): 303-311.

[3] Chen J S, Wang Q, Fu X H, *et al*. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: association with MMP-9[J]. Hepatol Res, 2009, 39(2): 177-186.

[4] 赵雪峰, 焦志凯, 李勇, 等. 胃癌中PTEN、IGF-1、IGF-1R蛋白表达及其预后意义评价[J]. 第三军医大学学报, 2008,30(12): 1197-1199.

[5] Wee K B, Aguda B D. Akt versus p53 in a network of oncogenes and tumor suppressor genes regulating cell survival and death[J]. Biophys J, 2006, 91(3): 857-865.

[6] Kurasawa Y, Shiiba M, Nakamura M, *et al*. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma[J]. Oncol Rep, 2008,19(6): 1429-1434.

[7] 王颖, 周传香, 高文信. PTEN、p53在口腔黏膜白斑和口腔鳞癌组织中的表达及意义[J]. 口腔医学研究, 2005, 21(2): 169-172.

[8] Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, *et al*. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(35): 5924-5930.

[9] 龚莉, 周铁军, 陈鲜, 等. 应用自制组织芯片研究抑癌基因PTEN在口腔鳞癌中的表达[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(2): 100-102.

[10] Fine B, Hodakoski C, Koujak S, *et al*. Activation of the PI3K pathway in cancer through inhibition of PTEN by exchange factor P-REX2a [J]. Science, 2009, 325(5945): 1261-1265.

[11] Kim H, Tu H C, Ren D, *et al*. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis[J]. Mol Cell, 2009, 36(3): 487-499.

[12] Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF)[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(1): 95-100.

[13] 李倩, 赵继志, 陈永宁, 等. 口腔鳞状细胞癌中蛋白酪氨酸磷酸酶基因的突变与表达[J]. 中华口腔医学杂志, 2009, 44(11): 660-663.

[14] Shin K H, Kim J M, Rho K S, *et al*. Inactivation of the PTEN gene by mutation, exonic deletion, and loss of transcript in human oral squamous cell carcinomas[J]. Int J Oncol, 2002, 21(5): 997-1001.

[15] 孙斌, 蔡立水, 高芸, 等. 抑癌基因PTEN突变在口腔鳞癌中的研究[J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2010, 18(9): 1241-1242.

(**收稿**:2010-12-25;**修回**:2011-04-03)

(编辑 栾 嘉)