论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0542-04

PTEN基因对胶质瘤细胞增殖及侵袭性影响的体外研究

赵 军[1,2],王宏伟[1],宋继伟[2],肖建奇[2],曲 艺[3],张 军[2],欧阳海峰[2],盛学东[2],谷树清[2],于 雷[2],于广久[2]
(150001 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第四医院微创神经外科[1];161005 黑龙江 齐齐哈尔,齐齐哈尔市第一医院脑外医院神经外科[2];150086 哈尔滨,哈尔滨医科大学第二临床医院神经外科[3])

[摘要] **目的** 探讨PTEN基因转染人胶质瘤U251细胞后对其增殖及侵袭性的影响。**方法** 应用脂质体转染技术,将含PTEN基因重组表达质粒转染U251细胞系,Western blot鉴定其蛋白表达;应用四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)法观察对细胞株生长的影响;流式细胞仪检测细胞周期及凋亡;应用免疫组化检测转染PTEN的U251细胞基质金属蛋白酶(MMP-2、MMP-9)和金属蛋白酶抑制剂(TIMP-1、TIMP-2)的表达变化。**结果** PTEN质粒成功转染U251细胞并有PTEN蛋白的表达。与对照组、空载体组相比,转染组细胞生长抑制率下降达52.46%;细胞周期改变,细胞从G_1期到S期发生阻滞;转染组MMP-2、MMP-9表达显著下降,而TIMP-1、TIMP-2表达显著上升,两者呈负相关($r=-0.506$,$P<0.05$)。**结论** PTEN转染人胶质瘤细胞系U251后,可抑制其增殖、促进凋亡;并可能通过抑制MMPs和促进TIMPs来抑制细胞侵袭性。

[关键词] PTEN基因;胶质瘤;凋亡;基质金属蛋白酶;金属蛋白酶抑制剂
[中图法分类号] R730.264;R394.2;R730.23 [文献标志码] A

Effect of PTEN gene transfection on growth and invasion in human glioblastoma cell line U251

Zhao Jun[1,2], Wang Hongwei[1], Song Jiwei[2], Xiao Jianqi[2], Qu Yi[3], Zhang Jun[2], Ouyang Haifeng[2], Sheng Xuedong[2], Gu Shuqing[2], Yu Lei[2], Yu Guangjiu[2]([1]Department of Minimally Invasive Neurosurgery, Forth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province, 150001; [2]Department of Neurosurgery, First Hospital of Qiqihar, Qiqihar, Heilongjiang Province, 161005; [3]Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang Province, 150086, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the inhibitory effect of wild-type phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) gene on the growth and invasion of human glioblastoma cell line U251. **Methods** Recombinant plasmid pEGFP-PTEN containing wild-type PTEN gene segment was transferred into U251 cells by liposome transfection technique, and the transfection was identified by Western blotting. Cell growth was analyzed by MTT assay, and cell cycle and apoptosis were examined by flow cytometry. The protein levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) were detected by immunohistochemical method. **Results** The recombinant plasmid pEGFP-PTEN was successfully transferred into U251 cells, and PTEN protein expression was detected. Compared with those of the control group and empty vector group, the rate of cell growth inhibition decreased to 52.46%. The cell cycle was arrested at G_1/S phase. The expression levels of MMP-2 and MMP-9 decreased significantly in the transfection group, while those of TIMP-1 and TIMP-2 significantly increased and were negatively correlated with the expression levels of MMP-2 and MMP-9 ($r=-0.506$, $P<0.05$). **Conclusion** PTEN gene transfection can inhibit the growth of human glioblastoma U251 cell line, induce cell apoptosis, and inhibit cell invasion by downregulating MMPs and upregulating TIMPs.

[**Key words**] PTEN; glioma; apoptosis; metalloproteinase; tissue inhibitor of metalloproteinase

Corresponding author: Wang Hongwei, E-mail: hong. w. w@ live. cn

恶性胶质瘤预后差,增殖与侵袭性生长是胶质瘤的特征性表型,也是胶质瘤综合治疗失败的根本原因。研究表明,恶性胶质瘤进展中抑癌基因PTEN的缺失突变是重要的分子事件之一[1-2]。肿瘤细胞通过其表面受体与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分黏附后而活化肿瘤细胞,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是其ECM降解过程中最重要的

[通信作者] 王宏伟,E-mail:hong. w. w@ live. cn

一类酶,其中 MMP-2 和 MMP-9 与胶质瘤的侵袭性生长关系最密切,其表达水平可以在一定程度上反映胶质瘤的体内侵袭性生长的程度[3-4]。金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases,TIMPs)是基质金属蛋白酶的特异性抑制剂。本研究通过体外对 U251 细胞系转染抑癌基因 PTEN,探讨 PTEN 对胶质瘤细胞生长和侵袭性的影响,为脑胶质瘤的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

胶质瘤细胞系 U251 由哈尔滨医科大学第一临床医院神经外科研究所提供,pEGFP. puro 质粒和 pEGFP. PTEN 质粒由美国伯明翰大学癌症研究中心王慧博博士赠予,嘌呤霉素和四甲基偶氮唑蓝均购自武汉凌飞科技有限公司,质粒纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司,DMEM 培养基购自 Amresco 公司,四甲基偶氮唑蓝、鼠抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,北京中山生物试剂公司的 S-P 试剂盒、DAB 显色试剂盒和 POLY-A 防脱片剂。超净台(Heraeus,Hfsafe 1200)、CO_2 卵育箱(Heraeus),酶标仪(Bio-Rad 550),高速离心机(Biofuge Heraeus),流式细胞仪(Bio-Rad)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及分组 U251 细胞以含 10% 小牛血清,100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基,在 37 ℃,5% CO_2 卵孵箱培养,研究对象取对数生长期细胞。实验分 3 组:未转染质粒的细胞为对照组(U251. ori)、转染不含目的基因的细胞为空载体组(U251. pEGFP. puro)、转染含目的基因 PTEN 的细胞为转染组(U251. pEGFP. PTEN)。

1.2.2 质粒纯化、转染及克隆筛选 含高复制质粒的细菌 130 ml,根据抽提纯化试剂盒提取并纯化 pEGFP. puro 和 pEGFP. PTEN 质粒。取指数期生长的 U251 细胞,按 2.5×10^5/孔接种于 24 孔板中并定容至 2 ml,37 ℃、5% CO_2 培养至密度为 70% ~90%,用 DMEM 液漂洗,再加入含 DNA/质体复合物的无血清 DMEM 并定容至 2 ml,孵育 8 h 后,改用 DMEM 培养 1 d,再加 4 μg/ml 的嘌呤霉素筛选,维持 3 周至对照组及空载体组细胞全部死亡,转染组出现明显的细胞克隆。

1.2.3 Western blot 检测 PTEN 的表达 提取好的细胞总蛋白经 SDS-PAGE 后,4 ℃、80 V 转移至硝酸纤维素膜,37 ℃ 封闭 3 h,按照 1∶500 的浓度加入 PTEN 一抗 10 μl,在摇床上 4 ℃ 轻轻摇动孵育过夜,然后按照 1∶1 000 的浓度加入辣根酶标记的二抗 1 010 μl,在室温下轻轻摇动孵育 1 h,化学发光法显影。

1.2.4 甲基噻唑基四唑(MTT)比色法 取各组生长良好的细胞接种于 96 孔板,各组分别于继续培养后的 24、48、72、96、120 h 加 5 mg/L 浓度的 MTF 共孵育,4 h 后每孔 150 μl 加二甲基甲砜,镜下观察结晶完全溶解后,以空白孔调零,酶标仪上检测 490 nm 的光密度值[D(490)]。细胞生长率 = 实验组 D(490)/对照组 D(490) ×100%。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 各组细胞分别传代接种 24 h 后,PBS 洗 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,70% 乙醇固定;PBS 洗涤后弃上清,加入 1% Triton X-100,静置 10 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清后加入 0.01% RNase 消化 10 min,1 500 r/min 离心 5 min,再弃上清;加入 0.005% 的碘化丙锭染色 15 min,用 300 目丝网过滤后上机分析。用 Cell 软件采集样本,细胞周期采用 Fit 软件分析。按照凋亡试剂盒说明书操作,流式细胞仪检测凋亡率。

1.2.6 细胞免疫组化 细胞经上述处理后,以细胞密度 3×10^5/ml 种于预置小盖片的 24 孔培养板,培养 8 h 后加 FCS 至 10% 的浓度,24 h 后取出盖片,4% 的多聚甲醛固定 5 min,PBS 洗 3 min 3 次,免疫组化采用 S-P 法,参照说明书进行。以 PBS 代替一抗作阴性对照。DAB 室温显色,苏木精轻度复染。每组随机选择 10 个 400 倍视野,计数 400 ~800 个细胞,算出阳性细胞百分比,阳性细胞标准以中、强性反应的棕黄色和深棕色为准。

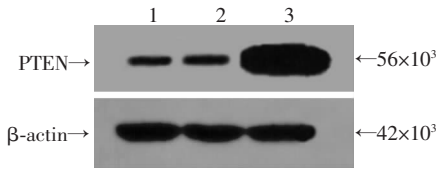
1.3 统计学分析

应用 SAS11.00 统计软件,均数的比较应用方差分析,率的比较应用 χ^2 检验,相关研究应用 Spearman 相关分析。

2 结果

2.1 U251 细胞系转染 PTEN 基因的鉴定

采用 Western blot 鉴定 U251 细胞以及分别转染空载体和 PTEN 基因细胞的 PTEN、β-actin、Western blot 结果见图 1。结果显示,转染 PTEN 构建体后 Western blot 显示 U251 细胞出现 PTEN 的明显表达,表明 PTEN 构建体可以在 U251 细胞内表达 PTEN 蛋白。



1:对照组;2:空载体组;3:转染组

图 1 Western blot 鉴定 PTEN 构建体转染 U251 细胞后 PTEN 的表达

2.2 MTT 法测定转染细胞生长曲线

PTEN 转染组细胞生长曲线平缓,生长速度较对照组和空载体组明显降低,对照组和空载体组细胞抑制率分别为(20.12 ±1.23)%和(22.58 ±1.43)%,转染组细胞生长抑制率为(52.46 ±1.52)%,与空载体组和对照组比较,存在统计学差异(P <0.05)。

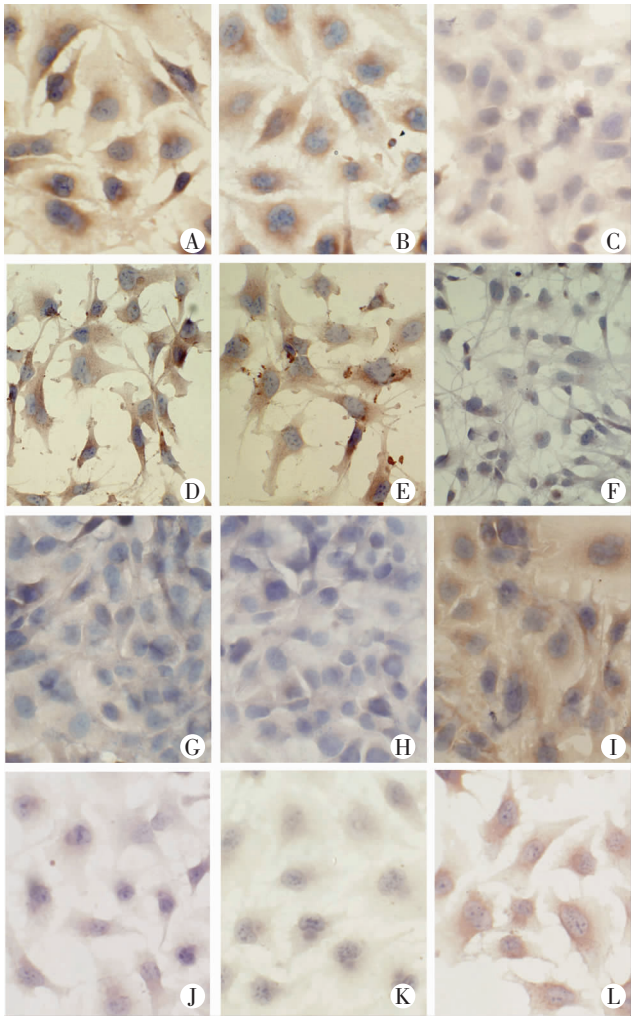
2.3 PTEN 转染 U251 细胞对生长周期及凋亡的影响

PTEN 导入 U251 后,G_0/G_1:58.1%,S:32.3%,G_2/M:9.6%,与未转染组和空载体组相比,细胞处于 G_0/G_1 期比例上升(P <0.05),而 S 期和 G_2 期比例下降(P <0.05),提示 PTEN 可能对 G_1/S 期转换点起阻滞作用。U251 细胞转染 PTEN 后凋亡指数(AI)为 18.26%,较未转染组细胞(5.67%)和空载体组(6.97%)凋亡细胞明显升高(P <0.05)。

2.4 MMP-2、MMP-9 与 TIMP-1、TIMP-2 的表达及相关性

MMP-2、MMP-9 表达于细胞核及细胞质内,但以细胞质为主,呈黄色或棕黄色,MMP-2、MMP-9 阳性表达率分别为转染组 34.87%、39.45%,空载体组 67.70%、70.34% 和对照组 69.34%、68.98%,各组之间存在统计学差异(P <0.05)。TIMP-1、TIMP-2 在细胞中主要分布于细胞胞质内,呈棕色或棕

黄色颗粒，TIMP-1、TIMP-2 阳性率分别为转染组 73.82%、66.53%，空载体组 39.91%、31.67% 和对照组 40.72%、38.92%，各组阳性率存在统计学差异（$P<0.05$）。转染组 MMP-2、MMP-9 与 TIMP-1、TIMP-2 的表达呈负相关（$r=-0.506$，$P<0.05$）。见图2。



A～C：MMP-2；D～F：MMP-9；G～I：TIMP-1；J～L：TIMP-2；A、D、G、J：对照组；B、E、H、K：空载体组；C、F、I、L：转染组

图2 免疫组化检测各组 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 蛋白的表达（S-P ×400）

3 讨论

PTEN 基因是第1个被发现具有磷酸酶活性的抑癌基因，其所编码的 PTEN 蛋白是一种具有双特异去磷酸化作用的磷酸酶[1]。PTEN 基因与胶质瘤的恶性增殖和转移等生物学特性有关，它的突变、缺失与胶质瘤的发生发展关系密切[2]。Adachi 等[5]利用 PTEN 体外转染 T98G 细胞系，证实外源性 PTEN 能诱发肿瘤细胞分化，其抗肿瘤作用途径包括参与对细胞周期、细胞凋亡、侵袭、血管新生以及端粒酶等多方面的调控。PTEN 蛋白至少控制着两个已知的癌基因 PI3K 和 Akt。活化的 Akt 能拮抗 PTEN 介导的凋亡，但 Akt 的上游分子 PI3K 活化却不能抑制细胞凋亡，表明 PTEN 对凋亡通路影响的作用点在 PI3K 下游和 Akt 上游之间[6-7]。

胶质瘤的发生多伴有基因的缺陷，理想治疗方法是将目的基因高效地转染有此缺陷的肿瘤细胞。目前脂质体介导已被证实是一种有效的基因转运系统，并已经广泛地应用于人类肿瘤的实验研究，取得良好的治疗效果。本研究中 Western blot 显示转染组与对照组及空载体组相比出现特异性条带，提示转染组表达了目的 PTEN 蛋白，说明成功建立了体外实验的模型。同时细胞生长曲线及细胞生长周期的结果亦间接地提示 PTEN 基因的转入成功。本研究显示 PTEN 基因的成功导入可明显改变肿瘤细胞的周期，细胞停滞于 G_0/G_1 期的比例上升，出现了 G_0/G_1 期阻滞现象，说明 PTEN 基因对 U251 细胞生长的抑制作用可能是通过 G_0/G_1 期阻滞作用来完成的。本研究中，PTEN 基因转入 U251 细胞后，细胞生长曲线变得平缓；流式细胞仪检测还发现，PTEN 转染细胞后促进了胶质瘤细胞的凋亡，提示 PTEN 在抑制肿瘤细胞生长和促进凋亡方面可能同时存在。

MMPs 是锌离子依赖的内分泌蛋白酶。目前已发现的 MMPs 家族成员已达20多种，在多种恶性肿瘤中均有高表达[4,8]。MMPs 是一种与肿瘤的恶性行为和浸润性生长密切相关的物质，可降解细胞外多种基质成分，在肿瘤浸润、转移过程中发挥极其重要的作用。人脑胶质瘤中存在 MMPs 的过度激活，可能与脑胶质瘤的易复发及浸润性生长有关，与胶质瘤的恶性程度无关[9]。PTEN 的突变或缺失可能为初始因素，激活 Akt，而活化的 Akt 可通过磷酸化降解释放 NF-κB 转位入细胞核在 MMPs 调控区调节 MMPs 的表达[10]。还有研究发现 PTEN 可能增加 MMPs 的抑制物 TIMPs 的分泌证实了 PTEN 从多条途径抑制 MMPs 的表达，抑制肿瘤的侵袭与转移，当 PTEN 表达缺失时，PTEN 对 MMPs 的抑制作用减弱，促进了肿瘤的转移[3,11-12]。本研究中，MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 表达阳性的细胞中并非所有瘤细胞着色，而仅有部分瘤细胞着色，说明四者的蛋白表达存在着不平衡。U251 细胞中随着 PTEN 基因的转染，MMPs 蛋白的表达明显减少，MMPs 与 PTEN 在胶质瘤的发生、发展过程中具有负协同作用，说明 PTEN 基因表达可能会减少或抑制 MMPs 的激活，从而减少脑胶质瘤的复发和转移。可能是由于 PTEN 直接抑制了 MMPs 对细胞外基质的降解从而降低了胶质瘤细胞的侵袭性，也有可能是 PTEN 与 MMPs 的拮抗剂 TIMPs 在相关信号转导通路上相互作用有关，具体的信号机制还有待进一步研究。因此，通过免疫组化方法检测人脑胶质瘤中 MMPs 蛋白的表达情况，可作为判断胶质瘤的恶性程度及是否易复发的

参考指标。

TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制因子,能够抑制 MMPs 的活性和肿瘤细胞侵袭。本研究结果显示,MMPs 和 TIMPs 的阳性表达呈负相关,表明 MMPs 与 TIMPs 比例的失衡可能是导致肿瘤侵袭的另一重要原因,其在胶质瘤的演进过程中具有不可忽视的作用。

参考文献:

[1] Yue Q, Groszer M, Gil J S, *et al*. PTEN deletion in Bergmann glia leads to premature differentiation and affects laminar organization[J]. Development, 2005, 132(14): 3281 - 3291.
[2] 赵军, 刘晓谦, 张军, 等. 脑胶质瘤组织 PTEN 基因异常及其蛋白表达[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(9): 843 - 845.
[3] Guo P, Imanishi Y, Cackowski F C, *et al*. Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 gamma 2 correlates with the invasiveness of human glioma [J]. Am J Pathol, 2005, 166(3): 877 - 890.
[4] Thorns V, Walter G F, Thorns C. Expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-10 and MMP-11 in human astrocytic and oligodendroglial gliomas[J]. Anticaneer Res, 2003, 23(5A): 3937 - 3944.
[5] Adachi J, Ohbayashi K, Suzuki T, *et al*. Cell cycle arrest and astrocytic differentiation resulting from PTEN expression in glioma cells[J]. J Neurosurg, 1999, 91(5): 822 - 830.
[6] Wan X, Li J, Xie X, *et al*. PTEN augments doxorubicin-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells [J]. Int J Gynecol Cancer, 2007, 17(4): 808 - 812.
[7] Hara S, Oya M, Mizuno R, *et al*. Akt activation in renal cell carcinoma: contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor[J]. Ann Oncol, 2005, 16(6): 928 - 933.
[8] 潘虹, 刘 铭, 张晓莉, 等. 非小细胞肺癌组织中 MMP-12 的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 142 - 145.
[9] 王虎, 浦佩玉, 王广秀, 等. 脑胶质瘤中 PTEN、MMP2 与 MMP9 表达的研究[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2005, 31(6): 419 - 421.
[10] Wang M, Wang T, Liu S, *et al*. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades [J]. Brain Tumor Pathol, 2003, 20(2): 65 - 72.
[11] 张军普, 许雯, 刘向辉. PTEN、E-cd 和 MMP-9 在人脑胶质瘤的表达和意义[J]. 山东大学学报: 医学版, 2010, 48(2): 109 - 112.
[12] Tian T, Nan K J, Guo H, *et al*. PTEN inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by coordinately decreasing MMP expression *via* the PI3K/Akt pathway[J]. Oncol Rep, 2010, 23(6): 1593 - 1600.

(**收稿**:2011-09-20;**修回**:2011-12-20)
(编辑 王小寒)

(上接 541 页)

2 结果

20 次实验(5 只×4 肢)中高压注射器防渗漏智能导流报警系统均能迅速报警并迅即启动导流装置。报警器启动的快慢与注射速度有关,较快的注射速度下报警器启动亦较快,但各种注射速度下报警器均能在皮丘膨胀至直径 2 cm 之前报警。

3 讨论

CT 增强扫描显影剂发生血管外渗时,首先使皮下软组织间隙内液体量增加,如果是高渗剂可使细胞内液流出,致使软组织间隙内液体量进一步增加;若是低渗剂则使细胞外液进入细胞内,导致细胞体积增大。2 种显影剂外渗均可在短时间内导致皮下软组织肿胀。其对表皮增加的压力或形成的皮丘可以压迫安装在该区域的压力检测器,导通报警装置电路,一旦发生血管外渗即自动报警,可及时、准确地检测到对比剂的血管外渗。国内外目前报道的设备亦均采用此基本设想,然而在具体的实现上有较大差异。

国内研究报道通过压力感受器感受造影剂外渗并通过无线传送信号终止高压注射器的一种外渗监测装置[5]。其压力感受器部分检测阈值的设置为手动旋转壳体至阈值,受主观因素影响较大。并且由于是发射信号终止高压注射器,考虑到不同厂家高压注射器内设备、软件均不尽相同,需要根据配套的高压注射器调整软件才能达到无线信号的传递和控制。若有的高压注射器并不具有接受无线信号的性能,则易导致兼容性不好。此外,其设备未设计针头处导流装置,残存在导管里的药液可能会继续进入患者体内,存有继续造成外渗的隐患。

国外有通过人体电阻变化监测压力变化的报道[6],但由于人体的电阻因为年龄、病种、病情的不同,导致体内电解质水平的差异,因此通过对电阻分析而进行监测的临床应用前景有待探讨。由于其机械设计原因而导致寿命较短,同时亦未设计导管内药液导流功能[7]。

本报警设备对皮肤进行直观的监测,把感受压力数值化,因此较易于控制其不同组织下的使用阈值;通过注射针头处导流药液,能够在报警同时瞬间终止注射源头并防止导管内高渗液继续进入患者体内造成外渗;此装置制作简单、价格低廉、使用方便,可以与各类型号的高压注射器连接,而不需要根据不同高压注射器修改内部软件,控制部分兼容性较好,实用性强,有较好的临床推广应用前景。应用此项报警装置避免了 X 线对非必需人员的危害并及时有效的控制了注射液的外渗。

本研究 20 次动物肢体实验无 1 例漏报,达到了预期的设计目标和要求。此结果证实本报警导流系统可以有效实现在发生注射渗漏初期及时对高压注射器进行报警、导流,避免由于造影剂血管外渗给患者造成的痛苦。

参考文献:

[1] 孟海霞. 高压注射器在 CT 增强检查中的应用[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(14): 2197.
[2] 李正东, 陈霖, 鲁军, 等. 高压注射器防渗漏智能导流报警系统设计[J]. 现代电子技术, 2011, 34(16): 164 - 165,168.
[3] Texas Instruments. MSP430Fx44x family user´s guide [EB/OL]. [2009-04-21]. http://www.ti.corn.cn.
[4] 泰龙. MSP430 单片机常用模块与综合系统实例精讲[M]. 北京: 电子工业出版社, 2007.
[5] 李国英, 张殿星, 陈勇华. 高压注射 CT 增强扫描血管外渗监控装置的研制[J]. 医疗卫生装备, 2004(12): 21 - 22.
[6] Powell C C, Li J M, Rodino L, *et al*. A new device to limit extravasation during contrast-enhanced CT[J]. AJR Am J Roentgenol, 2000, 174(2): 315 - 318.
[7] Nelson R C, Anderson F A Jr, Birnbaum B A, *et al*. Contrast media extravasation during dynamic CT: detection with an extravasation detection accessory[J]. Radiology, 1998, 209(3): 837 - 843.

(**收稿**:2012-02-02;**修回**:2012-03-01)
(编辑 栾 嘉)