文章编号:1000-5404(2014)14-1477-04

论著

Puma抑制卵巢癌细胞生长及其机制研究

邹冬玲[1],王 冬[1],刘海霞[2] (400030 重庆,重庆市肿瘤研究所:妇瘤科[1],医务部[2])

[摘要] **目的** 探讨Puma对于卵巢癌细胞生长及体内成瘤的影响,了解其行使功能的分子机制。**方法** 采用腺病毒载体实现Puma在卵巢癌细胞中的过表达,并通过CCK-8检测细胞增殖情况,通过Annexin-V染色测定细胞凋亡情况,通过小鼠荷瘤实验确定卵巢癌细胞体内成瘤能力。并进一步通过Western blot的方法检测了细胞凋亡相关基因Caspase-9和Bax蛋白的表达及定位情况。**结果** 成功构建hTERT基因启动子介导的Puma基因腺病毒表达载体,并实现Puma基因在卵巢癌细胞中的过表达,过表达Puma后,卵巢癌细胞增殖被明显抑制($P<0.05$),细胞凋亡增加,从对照组细胞的7.2%增加为过表达组的29%($P<0.05$),且在小鼠体内的成瘤能力下降,所产生肿瘤组织的平均质量由0.53 g降至0.22 g($P<0.05$)。**结论** Puma通过激活细胞内Caspase-9的活性、促使Bax从胞质转移至线粒体、促进细胞凋亡信号传导诱导细胞凋亡,从而抑制卵巢癌细胞增殖及体内成瘤能力。

[关键词] Puma;卵巢癌;细胞凋亡
[中图法分类号] R394-33;R73-362;R737.32 [文献标志码] A

Function and significance of Puma inhibiting ovarian carcinoma growth through inducing cell apoptosis

Zou Dongling[1], Wang Dong[1], Liu Haixia[2] ([1]Department of Gynecological Oncology, [2]Department of Medical Chongqing Institute of Oncology, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the function and mechanism of p53 up-regulated modulator of apoptosis (Puma) in inhibiting ovarian carcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Overexpression of Puma in ovarian carcinoma cell line COC1 was achieved by adenovirus vectors. Cell proliferation was detected using CCK-8 kit, meanwhile the percentage of apoptotic cells was identified by Annexin V staining. The mouse xenograft model was established to detect the inhibition on ovarian carcinoma cell growth *in vivo*. The expression of caspase 9 and Bax was detected by Western blotting. **Results** Puma was successfully over-expressed in COC1 cells using the established adenovirus expression vector. Over-expression of Puma inhibited the cell proliferation of COC1 cells evidently ($P<0.05$) and increased the percentage of apoptotic cells to 29% as compared to 7.2% in the control ($P<0.05$). Meanwhile, Puma inhibited the tumorigenicity of ovarian carcinoma cells *in vivo*. The average weight of xenografts was 0.22 g in the Puma overexpression group, significantly lower than 0.53 g in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Puma plays a tumor-suppressor role in ovarian carcinoma. Puma inhibits cell proliferation, induces cell apoptosis partially through activating caspase 9 and inducing Bax translocation to mitochondria and also inhibits the tumorigenicity *in vivo*.

[**Key words**] Puma; ovarian carcinoma; cell apoptosis

Supported by the General Prograin of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-2-366). Corresponding author: Liu Haixia, E-mail:haixial222@163.com

卵巢癌是女性生殖系统最常见恶性肿瘤之一,病死率高居妇科恶性肿瘤之首,且近年发病率呈逐年上升趋势[1]。据统计,世界范围内每年约204 000例新发病例,125 000例死于该疾病[2]。卵巢癌临床表现隐蔽,病理类型复杂,发现时70%~80%已属晚期。传统的手术、化学治疗可使大部分患者达到临床缓解,但即便获得完全缓解,70%~80%仍将复发,而一旦复发,其中位生存时间为12~24个月[3]。因此,探索一种新的有效杀灭肿瘤细胞的方法迫在眉睫。近年来,有关细胞凋亡的基因治疗已成为研究热点。

[基金项目] 重庆市卫生局医学科面上项目(2011-2-366)
[通信作者] 刘海霞, E-mail:haixial222@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140618.1743.005.html(2014-06-18)

Puma(p53 up-regulated modulator of apoptosis,p53正向凋亡调控因子)基因为Bcl-2家族成员,因其可被p53快速诱导并具有强大促凋亡作用而在生命科学的研究领域受到广泛关注[4-5]。Puma不仅能够诱导多种肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖,还能增加肿瘤细胞对放化疗的敏感性[6-8],是非常有前景的肿瘤基因治疗靶点。但其在肿瘤治疗中的研究才刚刚起步,在卵巢癌靶向基因治疗方面尚属空白。

我们的前期研究建立了hTERT基因启动子介导的Puma基因腺病毒表达载体,实现了Puma基因在卵巢癌细胞中的定向表达[9],在进一步的研究中我们利用该表达载体在卵巢癌细胞中表达Puma基因,探寻Puma在卵巢癌细胞中的治疗效果及其具体机制,为建立新的卵巢癌基因治疗方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

人卵巢癌细胞株COC1购自广西医科大学细胞中心。提取RNA所用TRIzol及反转录试剂盒为Invitrogen公司产品。实时定量PCR所用试剂为TaKaRa公司产品。提取线粒体蛋白试剂盒为Thermofisher公司产品。用于检测细胞增殖的试剂盒CCK-8 kit为日本株式社同仁化学研究所产品。实验中所用的表达Puma的重组腺病毒为本实验室构建并包装。实验中所用抗体分别为:Puma抗体(ab9643, Abcam);GAPDH抗体(10494-1-AP,Proteintech);Annexin V-FITC(556419, BD); Bax(2772, Cell signaling); Cox VI(4844, Cell signaling); Caspase-9(9502, Cell signaling)。

1.2 细胞培养及病毒感染

人卵巢癌细胞COC1培养于RPMI1640培养基中,血清浓度为10%。培养条件为37 ℃,5% CO_2及饱和湿度。细胞于感染前1 d进行传代,使其在感染当天处于对数生长期,以1∶100及1∶50的比例加入病毒上清液,感染8~12 h后换液,病毒感染48~72 h,收集细胞,进行检测。

1.3 实时定量PCR检测Puma表达

在病毒感染后3 d收集细胞,分为1×(感染浓度2 μg/mL),2×(感染浓度4 μg/mL),根据TRIzol操作说明,提取细胞总RNA。对总RNA进行定量后,使用oligodT作为反转录引物,按照反转录试剂盒操作说明合成cDNA第1链。SYBR染料标记实时定量PCR检测基因表达情况,以GAPDH为内参分析目的基因的相对表达情况。所使用仪器为Bio-Rad CFX-96,所使用引物序列为:Puma正向:5′-CGACCTCAACGCACAGTACG-3′;Puma反向:5′-GGCAGGAGTCCCATGATGA-3′。GAPDH正向:5′-TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCA-3′; GAPDH反向:5′-GCTGGTGGTCCAGGGGTCTTACT-3′。

1.4 Western blot检测凋亡相关基因Caspase-9和Bax蛋白的表达及定位情况

收集处理后的COC1及过表达Puma的COC1细胞,提取总蛋白质或根据试剂盒操作说明分别提取胞质蛋白和线粒体蛋白,BCA法测定蛋白浓度。SDS-PAGE电泳分离蛋白样品,并将PAGE胶上的蛋白样品转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭2 h后与一定比例稀释的一抗(Puma稀释比例为1∶1 000,GAPDH及Cox Ⅳ稀释比例为1∶10 000)4 ℃孵育过夜,TBST洗膜3次后与1∶10 000稀释的二抗室温孵育2 h,TBST洗膜后经ECL显色,显影。

1.5 CCK-8法检测细胞的增殖情况

在病毒感染后2 d将卵巢癌细胞COC1以2×10^3个/孔的细胞密度接种于96孔培养板中,置于37 ℃、5 % CO_2培养箱中,分别与接种后的第0、1、2、3、4 d采用CCK-8法检测细胞的增殖情况,确定Puma过表达对于COC1细胞增殖的影响。使用BioTek Synergy2多功能酶标仪进行检测。

1.6 流式细胞仪检测COC1细胞凋亡

在病毒感染后3 d收集COC1细胞,预冷的PBS洗2次,重悬于100 μL PBS中,加入5 μL Annexin-V抗体, 4 ℃孵育30 min,期间混匀数次。PBS洗细胞2次后,细胞重悬于500 μL PBS或4%的多聚甲醛,于BD公司的C6 Flow Cytometer® 流式细胞仪检测即可。

1.7 小鼠体内成瘤实验

选择10只6~8周龄的雌性裸鼠(体质量18~22 g,购于重庆国家生物产业基地实验动物中心),随机分为2组,每组5只,分别接种表达Puma的腺病毒感染的卵巢癌细胞COC1及感染对照病毒的COC1细胞,均为皮下注射,注射细胞数量为2×10^6。在接种后动态观察两组肿瘤生长情况,记录肿瘤体积,并于接种后28 d处死裸鼠,剥离肿瘤组织,比较两组肿瘤组织的大小及质量。

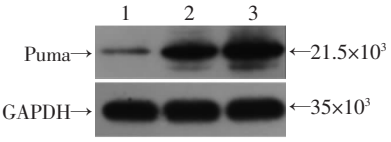
1.8 统计学分析

Real-time PCR检测Puma的相对表达值,3次实验结果取均值,并采用双总体t检验进行统计分析。测量不同时间点的光吸收值,以检测细胞增殖情况,3次实验结果取均值,并采用双总体t检验进行统计分析。流式细胞术检测Annexin-V阳性细胞比例,3次实验结果取均值,并采用双总体t检验进行统计分析。测量不同接种天数的肿瘤体积,每组5只小鼠的结果取平均值,并采用双总体t检验进行统计分析。所有统计学分析均在SPSS 15.0统计软件中进行。

2 结果

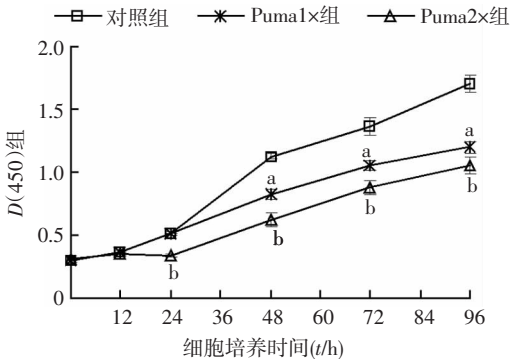
2.1 Puma能够抑制卵巢癌细胞的增殖

为检测Puma在卵巢癌中的治疗效果,使用已构建好的Puma腺病毒表达载体包装病毒颗粒,感染卵巢癌细胞COC1。感染后3 d检测Puma过表达情况,Western blot检测结果均证明Puma过表达成功(图1),且Puma的表达量随着感染病毒浓度的增加而增加($P<0.05$)。同时检测Puma过表达后对COC1细胞增殖的影响(图2),Puma过表达的细胞呈现出明显的增殖被抑制,在每个时间点细胞数量均少于对照组细胞,且Puma过表达越强,表现出的抑制细胞增殖越明显,多个时间点差异显著($P<0.05$)。表明Puma能够明显抑制卵巢癌细胞COC1的增殖,可用于卵巢癌治疗。



1:对照组; 2:Puma 1×组; 3: Puma 2×组

图 1 Western blot 检测 Puma 在 COC1 细胞中的表达



a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 Puma 1×组比较

图 2 CCK-8 法检测 Puma 对 COC1 细胞增殖的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.2 Puma 能够诱导 COC1 细胞凋亡

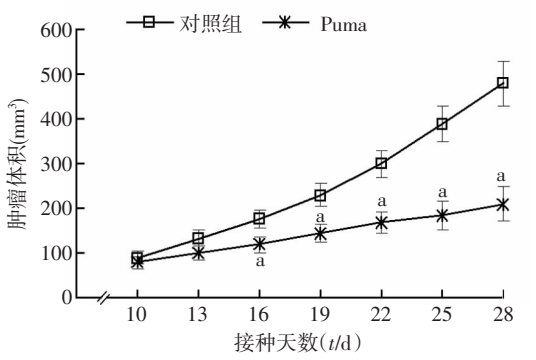
对照组细胞凋亡比例仅为 7.2%, 而 Puma 过表达后细胞凋亡比例增加至 29%,差异具有统计学意义($P<0.05$)。且随着 Puma 表达量的增加,凋亡细胞比例也略有增加(图 3)。对多次细胞流式结果进行统计学分析,差异显著($P<0.05$)。

2.3 Puma 能够抑制 COC1 细胞体内成瘤能力

卵巢癌细胞 COC1 的小鼠体内成瘤实验结果显示过表达 Puma 的卵巢癌细胞在小鼠皮下所形成的肿瘤体积明显低于对照组(图 4),肿瘤平均质量由 0.53 g 降至 0.22 g,具有统计学意义($P<0.05$)。

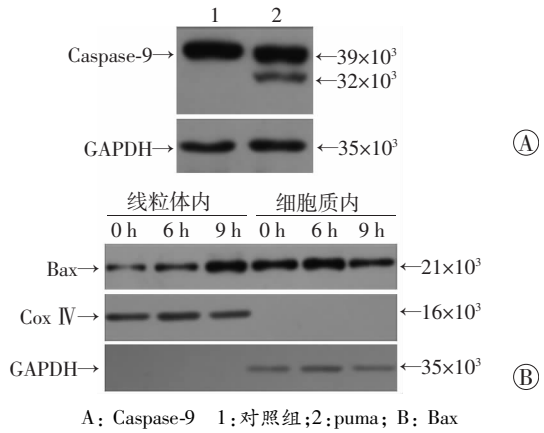
2.4 Puma 通过活化 Caspase-9 及 Bax 移位诱导细胞凋亡

图 5A 所示 Puma 过表达组 Caspase-9 被激活,激活的 Caspase-9 可以激活细胞凋亡的最关键酶 Caspase-3,从而促进后续的细胞凋亡信号。在细胞感染早期的不同时间点收集细胞分别提取线粒体和胞质蛋白,结果显示随着 Puma 表达时间的延长,Bax 从胞质逐渐转移至线粒体(图 5B),Bax 进而在线粒体表面发生多聚化,从而形成一个特异的物质通道,介导细胞色素 c 等凋亡物质的释放。



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4 小鼠体内成瘤实验检测 Puma 对 COC1 细胞体内成瘤的影响 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

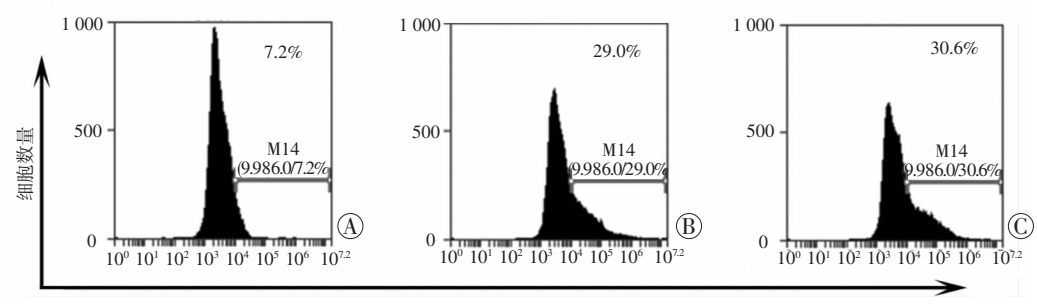


A: Caspase-9 1:对照组;2:puma; B: Bax

图 5 Western blot 检测 Puma 过表达前后 Caspase-9 及 Bax 的变化

3 讨论

近年研究表明,Puma 作为 Bcl-2 家族中 BH3-only 亚家族的成员,在 p53 介导的细胞凋亡中起关键作用,可被依赖 p53 途径及非依赖 p53 途径快速诱导,具有较大的促凋亡作用,并且其凋亡作用不受细胞 p53 基因突变的影响[10]。Puma 与恶性肿瘤的发生乃至预后相关,以 Puma 为基础的基因治疗比 p53 更为有效[11]。本研究表明 Puma 在卵巢癌中确实发挥着重要的抑癌基因功能,其在卵巢癌细胞中的过表达能够明显



A:对照组;B:Puma 1×组; C: Puma 2×组

图 3 流式细胞仪检测 Puma 对细胞凋亡的影响

抑制细胞增殖,且这种抑制作用具有明显的剂量依赖效应。Michalak 等[12]分别构建 Puma 基因和 Noxa 基因敲除小鼠模型,对比 γ 射线作用下细胞死亡,发现在成纤维细胞和胸腺细胞(T 细胞及 B 细胞)中,几乎所有 p53 引起的凋亡都需要 Puma 和 Noxa,其中 Puma 作用尤为重要。由此可见 Puma 在 p53 介导的细胞凋亡中起关键作用。文献[7,13-14]报道了 Puma 蛋白在 P53 介导凋亡途径中的作用机制,发现 Puma 蛋白的 C 端并非凋亡机制所必需,Puma 通过与 Bid 或 Bim 相互作用,或者直接激活 Bax, Bad,导致线粒体外膜结构破坏,从而启动程序性细胞死亡。不仅如此,Puma 在非依赖 p53 的凋亡途径中亦有重要作用[6,15],大量研究表明,除 p53 以外,p73,FoxO3a,CHOP,E2F-1 等也能在转录水平激活 Puma,诱导凋亡途径[16]。同时,已有学者证实,Puma 即便在突变型 p53 神经细胞中也能成功诱导凋亡,并且其凋亡效应显著强于野生型 p53[17]。这些研究都说明了 Puma 在诱导凋亡方面的重要作用,我们的研究也发现 Puma 的过表达确实能够活化 Caspase-9, 而激活的 Caspase-9 可以激活细胞凋亡的最关键酶 Caspase-3[18],从而促进后续的细胞凋亡信号。同时伴随着 Bax 移位至线粒体,而 Bax 则可以在线粒体表面发生多聚化,介导细胞色素 c 等凋亡物质的释放[19]。这些都充分说明了Puma在诱导细胞凋亡方面的重要作用,但 Puma 激活 Caspase-9 的具体机制以及其与 Bax 的相互作用等都需要进一步研究。

本研究阐述了 Puma 在抑制卵巢癌细胞生长方面的作用,并对其诱导卵巢癌细胞凋亡的机制进行了初步探讨,发现 Puma 诱导卵巢癌细胞凋亡的通路与在结肠癌中的一致[20-21],均激活了 Caspase-9, 从而促进后续的细胞凋亡信号传导。但本研究对于 Puma 抑制卵巢癌细胞生长的研究仅局限于卵巢癌细胞系中,其在临床病例中是否参与卵巢癌的发生以及其在动物体内对于卵巢癌的抑制都需要进一步研究,因此,我们将进一步在卵巢癌患者中调查 Puma 的表达情况,并在卵巢癌动物模型中实践 Puma 靶向治疗肿瘤的效果,为建立新的卵巢癌治疗方法奠定基础。

参考文献:

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al*. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.

[2] Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2006, 20(2): 207-225.

[3] 易晓芳, 丰有吉. 复发性卵巢癌的化疗进展[J]. 肿瘤学杂志, 2006, 12(2): 99-102.

[4] Zhang L N, Li J Y, Xu W. A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia[J]. Cancer Gene Ther, 2013, 20(1): 1-7.

[5] Hikisz P, Kilianska Z M. PUMA, a critical mediator of cell death--one decade on from its discovery [J]. Cell Mol Biol Lett, 2012, 17(4): 646-649.

[6] Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53[J]. Oncogene, 2008, 27(Suppl 1): S71-S83.

[7] Chipuk J E, Green D R. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis[J]. Cell Cycle, 2009, 8(17): 2692-2696.

[8] Sarkar S, Dubaybo H, Ali S, *et al*. Down-regulation of miR-221 inhibits proliferation of pancreatic cancer cells through up-regulation of PTEN, p27(kip1), p57(kip2), and PUMA[J]. Am J Cancer Res, 2013, 3(5): 465-477.

[9] 王冬, 周琦, 李雨聪. hTERT 启动子调控的 PUMA 重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 重庆医学, 2013, 42(36): 4430-4432.

[10] Day C L, Smits C, Fan F C, *et al*. Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1[J]. J Mol Biol, 2008, 380(5): 958-971.

[11] Hershko T, Ginsberg D. Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis[J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 8627-8634.

[12] Michalak E M, Villunger A, Adams J M, *et al*. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(6): 1019-1029.

[13] Gallenne T, Gautier F, Oliver L, *et al*. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on antiapoptotic Bcl-2 family members[J]. J Cell Biol, 2009, 185(2): 279-290.

[14] Yee K S, Vousden K H. Contribution of membrane localization to the apoptotic activity of PUMA[J]. Apoptosis, 2008, 13(1): 87-95.

[15] Wu B, Qiu W, Wang P, *et al*. p53 independent induction of PUMA mediates intestinal apoptosis in response to ischaemia-reperfusion [J]. Gut, 2007, 56(5): 645-654.

[16] Niizuma K, Endo H, Nito C, *et al*. Potential role of PUMA in delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia[J]. Stroke, 2009, 40(2): 618-625.

[17] Ito H, Kanzawa T, Miyoshi T, *et al*. Therapeutic efficacy of PUMA for malignant glioma cells regardless of p53 status [J]. Hum Gene Ther, 2005, 16(6): 685-698.

[18] 王剑龙,郭刚文,孙剑锋,等. 促凋亡基因 PUMA 的研究进展及其与肿瘤的关系[J]. 中国医药指南, 2013,11(3): 50-52.

[19] 赵宝锋, 刘建香, 苏旭. 细胞凋亡信号通路调控与肿瘤辐射敏感性[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005, 25(4): 401-404.

[20] Zheng X, He K, Zhang L, *et al*. Crizotinib induces PUMA-dependent apoptosis in colon cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(5): 777-786.

[21] Sun J, Sun Q, Brown M F, *et al*. The multi-targeted kinase inhibitor sunitinib induces apoptosis in colon cancer cells *via* PUMA[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43158.

(**收稿**:2014-02-10;**修回**:2014-03-15)

(编辑 吴培红)