

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2008)03-0231-04

pten 基因重组腺病毒对卵巢癌细胞生长的抑制作用

林观平¹ 熊亮² 李树梅³ 黄秀兰¹ 周克元¹ (¹ 广东医学院生物化学与分子生物学教研室 广东 湛江 524023, ² 赣南医学院预防医学教研室 江西 赣州 341000, ³ 攀枝花钢铁(集团)公司第十九冶职工医院妇产科 四川 攀枝花 617023)

Inhibition on growth of ovarian carcinoma cells by recombinant adenovirus carrying *pten* gene

LIN Guan-Ping¹, XIONG Liang², LI Shu-Mei³, HUANG Xiu-Lan¹, ZHOU Ke-Yuan¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China, ²Department of Phylaxiology, Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China, ³Department of Obstetrics and Gynaecology, 19th Metallurgy Staff-worker Hospital of PanZhihua Iron & Steel(group) Corporation, Panzhihua 617023, China

【Abstract】 AIM: To observe the expression of *pten* in human highly metastatic ovarian carcinoma cell line HO-8910PM after *in vitro* infection and investigate the effects of *pten* gene on the proliferation and metastatic ability of human ovarian carcinoma HO-8910PM cells. **METHODS:** Ad-*pten* was constructed through Ad-Easy adenovirus vector system and the expression of *pten* gene in HO-8910PM cells was determined by Western Blot. The transfection efficiency of Ad-*pten* was determined by fluorescence microscope. The inhibitive effect of Ad-*pten* on proliferation of HO-8910PM cells was determined by MTT assay. The morphologic changes of HO-8910PM cells transfected with Ad-*pten* were observed by light microscopy(HE staining). The metastatic ability was analyzed by cell scratching model *in vitro*. Hoechst33258 staining was used to study the cell apoptosis. **RESULTS:** The expression of PTEN protein in HO-8910PM cells was confirmed by Western Blot. The efficiency of adenovirus mediated Ad-*pten* gene transfer was above 90% when the multiplicities of infection (MOI) was 100. Exogenous *pten* gene significantly suppressed the growth and metastatic ability of HO-8910PM cells and induced the apoptosis of the cells. **CONCLUSION:** The constructed Ad-*pten* transfection system is highly efficient in transferring wild-type *pten* gene into human endometrial carcinoma cells. Ad-*pten* can strongly inhibit the proliferation and metastasis of the cells, and

also induce the apoptosis of the cells.

【Keywords】 ovarian neoplasms ;gene therapy ;*pten* gene ;adenovirus ;apoptosis ;inhibition of metastasis

【摘要】目的:观察携带野生型 *pten* 基因的重组腺病毒(Ad-*pten*)体外转染高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞后的表达,并研究其对卵巢癌细胞抑制增殖、诱导凋亡和抑制迁移的作用。方法:利用 Ad-Easy 腺病毒载体系统构建 Ad-*pten* 体外转染高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞,荧光显微镜检测 Ad-*pten* 的转染效率。Western 印迹检测 *pten* 在 HO-8910PM 细胞中的表达,MTT 实验观察 *pten* 对细胞生长的影响,HE 染色法观察外源性 *pten* 基因表达对细胞形态学的影响,细胞划痕实验观察 *pten* 对细胞迁移的抑制作用,Hoechst33258 凋亡染色检测 *pten* 基因对 HO-8910PM 细胞凋亡的诱导作用。结果:外源性野生型 *pten* 基因经腺病毒介导成功转入 HO-8910PM 细胞,Western 印迹检测出有 PTEN 蛋白的表达,当感染复数 MOI 为 100 时,体外转染效率高达 90% 以上。*pten* 显著抑制 HO-8910PM 细胞增殖、诱导其凋亡并能抑制其迁移。结论:重组腺病毒是高效的基因转移系统,能将 *pten* 目的基因高效地转移到高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞中,对细胞产生强有力的生长抑制及凋亡诱导作用,并能抑制其迁移。

【关键词】 卵巢肿瘤 ;基因治疗 ;*pten* 基因 ;腺病毒 ;细胞凋亡 ;迁移抑制

【中图分类号】 R73.37

【文献标识码】 A

0 引言

抑癌基因 *pten*, 即第 10 号染色体缺失的与张力蛋白同源的基因,是继 p53 后又一个与多种肿瘤发生发展密切相关的抑癌基因,其编码具有双重特异磷酸酶活性的蛋白,可以反向调控磷脂酰肌醇(-3)激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt 信号传导途径,从而抑制细胞生长增殖。其突变和缺失多发于乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌等^[1-3]。在某些 *pten* 基因突变或缺失的癌细胞中过表达 PTEN 蛋白能抑制细胞增殖和肿瘤的形成,使其细胞周期停滞在 G1 期并发生细胞凋亡^[4-5],而且在某些没有 *pten* 基因突变的癌细胞中,使 *pten* 基因过表达也能抑制这些癌细胞生长,诱导其发生凋亡^[6];另外 *pten* 基因还能抑制癌细胞的浸润转移,降低其迁移能力。这就提示 *pten* 基因用于癌症基因治疗有着重要意义。而基因治疗载

收稿日期 2007-07-13; 接受日期 2007-09-10

基金项目 广东省自然科学基金(031962)

通讯作者 周克元。Tel (0759) 2388301 Email kyzhou@gdmc.edu.cn

作者简介 林观平, 学士, 副教授。Tel (0759) 2388581 Email :gplin2008@126.com

体的选择最为重要,当今运用最多最广泛的就是腺病毒(adenovirus, Ad)载体,其具有在哺乳动物及其他多种生物细胞上进行基因转移和蛋白表达的高效性和不整合宿主细胞的性质,是一种比较安全、转染效率又高的载体^[7]。本研究采用携带野生型 *pten* 基因的重组腺病毒(Ad-*pten*),将 *pten* 基因导入人高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞,观察其在卵巢癌细胞中的表达,研究其对卵巢癌细胞生长抑制、迁移抑制、诱导凋亡的作用,对卵巢癌基因治疗进行初步的探索并提供有意义的参考数据。

1 材料和方法

1.1 材料

人高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞和人胚肾细胞 293T 购自中国科学院上海细胞生物学研究所;野生型 *pten* 表达质粒(*wt-pten*)为美国加州大学 Frank Furnari 教授惠赠;Ad-Easy 腺病毒表达载体系统由美国休斯霍华德医学院及 John Hopkins 肿瘤中心 Bert Vogelstein 教授惠赠,其中穿梭载体 pAdTrack-CMV 带有绿色荧光蛋白报告基因(*gfp*)。在表达外源基因时也能单独表达 *gfp*,用于重组腺病毒的快速筛选以及转染率的测定;抗 PTEN 抗体为美国 Santa Cruz 公司产品;HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体和马抗山羊 IgG 均购自北京生物技术有限公司;MTT 为美国 Amerson 公司产品。Hoechst33258 细胞凋亡染色试剂盒购于武汉碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒载体的构建及细胞培养

应用细菌内同源重组的方法,构建携带野生型 *pten* 基因的重组腺病毒 Ad-*pten* 及阴性对照 Ad-*gfp*^[8]。HO-8910PM 细胞培养于含 100 mL/L 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,置 50 mL/L CO₂, 37℃ 孵箱培养。

1.2.2 Ad-*pten* 转染效率的测定

取指数生长期的 高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞,以 5×10^4 /孔接种于 6 孔培养板中,24 h 后吸弃培养基,换无血清 RPMI-1640 培养基,用 25, 50, 100 感染复数(multiplicity of infection, MOI = 病毒颗粒数/转染的细胞数)的腺病毒感染,培养 6 h 后,换完全培养液继续培养。24 h 后在荧光显微镜下计数 *gfp* 阳性细胞百分率。确定 HO-8910PM 细胞转染所需的 MOI 值,使得转染效率 >90%。

1.2.3 Western Blot 检测转染细胞表达的 PTEN 蛋白

取对数生长期细胞,按 2×10^6 接种于 25 cm² 培养瓶中。常规条件培养 24 h 后,按 MOI = 100 加入病毒,设 Ad-*pten* 组和 Ad-*gfp* 组,培养 6 h 后,换完全培

养液继续培养。48 h 后提取细胞总蛋白;以 Bradford 酶标仪蛋白定量法测定蛋白含量,然后作 SDS-PAGE (12 g/L),于 4℃ 冰箱中 90 mA 恒流电转过夜,使目的蛋白转移至硝酸纤维素膜上,封闭液于 4℃ 封闭过夜,将膜转至新的封袋中,按 0.1 mL/cm² 加入适量的一抗稀释液(小鼠抗人 PTEN 单抗按 1:300 封闭液稀释,山羊抗人 Actin 多抗按 1:500 封闭液稀释),封口后,室温下平缓摇动反应 4 h。TBS 洗涤后加入二抗稀释液(PTEN, Actin 的二抗均按 1:2000 封闭液稀释),同条件反应 1 h。大量 TBS 洗涤去除未结合的二抗。ECL(化学发光)处理,暗箱中以 X 光胶片曝光,显影、定影。

1.2.4 MTT 法测定 HO-8910PM 细胞增殖抑制率

取对数生长期细胞,以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板培养,常规条件培养 24 h 后,吸弃培养基,换无血清 RPMI-1640 培养基,按 MOI = 100 加入病毒,设 Ad-*pten* 组, Ad-*gfp* 组, PBS 空白对照组和本底对照组(只加完全培养液,不种细胞),培养 6 h 后,换完全培养液继续培养。每个时间点设 6 个平行孔,在指定时间(24, 48, 72 h)加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL/孔,孵育 4 h 后,小心吸弃孔内上清液,加入 DMSO 150 μL/孔,振荡 10 min,490 nm 作为测定波长,570 nm 作为参比波长,在酶标仪上测定各孔的光吸收值。细胞增殖抑制率 = $[1 - \frac{\text{实验组}(A_{570\text{nm}} - A_{490\text{nm}})}{\text{本底对照组}(A_{570\text{nm}} - A_{490\text{nm}})] \times 100\%$ 。

1.2.5 HE 染色观察细胞形态

取指数生长期高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞,以 5×10^4 接种于 35 mm 培养皿中,24 h 贴壁后,加入 Ad-*pten* 或 Ad-*gfp* 感染,并设加 PBS 为空白对照;病毒感染方法同 1.2.4。24 h 后弃培养基,生理盐水漂洗,950 mL/L 乙醇固定 15 min,苏木素染色 3 ~ 10 min,自来水冲洗 5 ~ 8 min,5 ~ 10 mL/L 盐酸酒精分化数分钟,自来水冲洗 5 ~ 8 min,然后加温热水 5 ~ 10 min 显蓝,自来水充分冲洗,伊红复染 2 min,再次用自来水充分冲洗,普通光学显微镜下观察。

1.2.6 细胞划痕试验

取指数生长期高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞,按 2×10^4 /孔接种于 6 孔培养板,用 RPMI 1640 完全培养基孵育 24 h 后,用移液枪枪尖在细胞培养基表面划一条痕迹(长约 2 cm),用 PBS 洗 3 次后加入无血清 RPMI-1640 培养基,病毒感染方法同 1.2.4,设加 PBS 为空白对照,继续培养 48 h 后镜下观察。

1.2.7 Hoechst33258 凋亡染色

取对数生长期 HO-8910PM 细胞 2×10^4 /孔接种于 6 孔板,病毒感染方法同 1.2.4,设加 PBS 为空白对照,48 h 后用固定液

固定 10 min, PBS 洗 2 次, Hoechst33258 染色 5 min, 荧光显微镜下观察。

统计学处理: 本实验采用 SAS 8.0 统计软件进行统计分析, 用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-*pten* 对 HO-8910PM 细胞体外转染效率的测定 Ad-*pten* 在体外感染人高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞具有较高的转染效率。在 MOI = 100 时可以达到 90% 以上(图 1)。

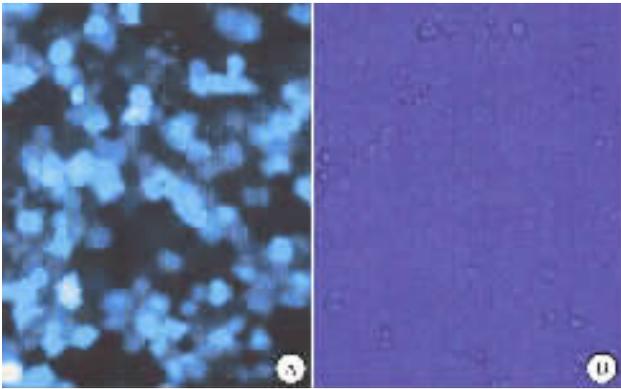


图 1 Ad-*pten*(MOI = 100)感染 HO-8910PM 细胞的效果 × 200

2.2 Western 检测转染后 PTEN 蛋白的表达

Western 印迹分析结果表明, Ad-gfp 感染后的 HO-8910PM 细胞未见特异性条带, 而 Ad-*pten* 感染后的 HO-8910PM 细胞则见到特异性条带, 而且 Pten 蛋白表达量也较高(图 2)。

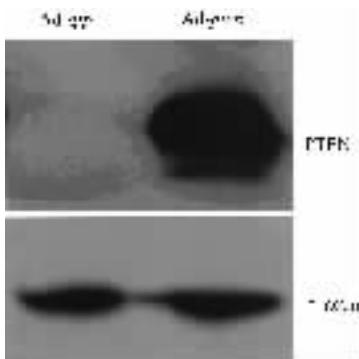


图 2 Western Blot 检测 PTEN 蛋白的表达

2.3 Ad-*pten* 对 HO-8910PM 细胞增殖的影响 以 MOI = 100 病毒感染后 24, 48, 72 h, 通过吸光度值计

算, Ad-*pten* 的抑制率分别为(89.76 ± 1.49)%, (91.11 ± 1.38)%, (92.38 ± 1.78)%, 而 Ad-gfp 感染组分别为(8.14 ± 2.16)%, (7.82 ± 2.32)%, (6.16 ± 2.86)%, 二者比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 Ad-*pten* 对 HO-8910PM 细胞形态的影响 重组腺病毒 Ad-*pten* 感染及非病毒感染(对照)的 3 组 HO-8910PM 细胞, 经 HE 染色光镜下观察可见, 正常对照及 Ad-gfp 处理组细胞成片生长, 细胞间隙紧密, 胞质舒展, 核分裂现象明显。Ad-*pten* 处理组细胞则细胞间隙变大, 胞质红, 核固缩, 易见凋亡小体(图 3)。

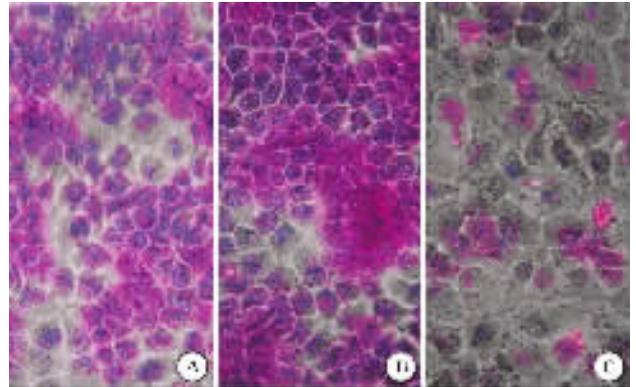


图 3 Ad-*pten* 感染对 HO-8910PM 细胞形态的影响 HE × 400

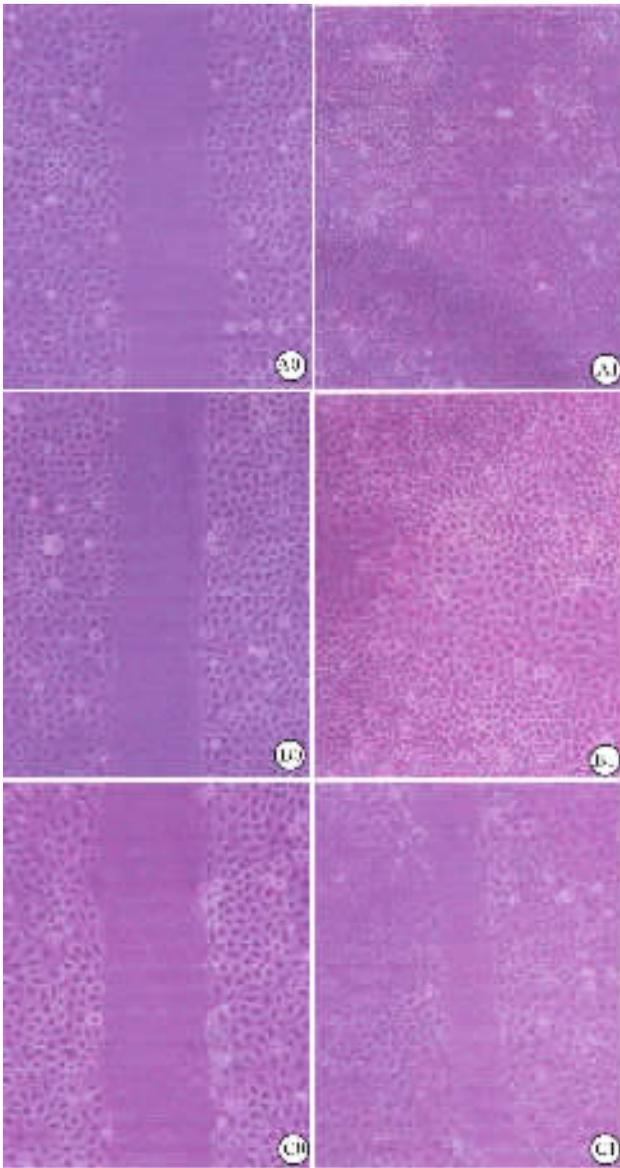
2.5 Ad-*pten* 对 HO-8910PM 细胞迁移能力的影响

重组腺病毒 Ad-*pten* 感染后的指数生长期高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞与对照组(PBS 空白组和 Ad-gfp 组)比较, Ad-*pten* 能有效地抑制 HO-8910PM 细胞的迁移(图 4)。

2.6 Ad-*pten* 诱导 HO-8910PM 细胞凋亡 Hoechst 33258 荧光染色结果显示, 重组腺病毒 Ad-*pten* 感染 HO-8910PM 细胞 48 h 后, Ad-*pten* 感染组出现典型的凋亡形态学改变, 可见胞体缩小、胞浆浓缩、核染色质聚集、核固缩, 还可见膜包裹的凋亡小体。而 PBS 对照组和 Ad-gfp 组的细胞均未发生形态学的改变(图 5)。

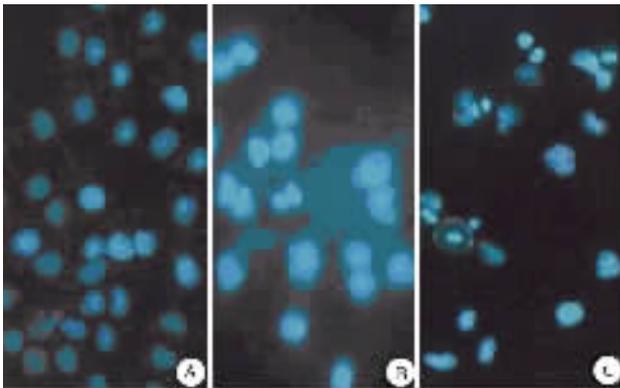
3 讨论

随着分子生物学及分子遗传学的发展, 癌基因的激活和抑癌基因的突变失活, 是目前较为公认的肿瘤发生发展的重要原因之一。本文研究的抑癌基因 *pten*, 其突变和缺失常见于多种恶性肿瘤, 与肿瘤的发生发展有着密切关系。目前普遍使用的肿瘤的基因治疗方法是导入外源性野生型抑癌基因补充或替代突变的抑癌基因。我们选用重组腺病毒载体导入抑



A0, A1: PBS 对照组; B0, B1: Ad-gfp 处理组; C0, C1: Ad-pten 处理组; A0, B0, C0: 0 h; A1, B1, C1: 感染后 48 h.

图 4 Ad-pten 对 HO-8910PM 细胞迁移能力的影响 $\times 100$



A: PBS 对照组; B: Ad-gfp 处理组; C: Ad-pten 处理组.

图 5 Ad-pten 感染 48 h 后对 HO-8910PM 细胞凋亡的影响
Hoechst33258 染色 $\times 200$

癌基因 *pten* 其极少发生插入突变,载体操作方便、宿主广泛、容易繁殖,并具有携带外源基因容量大,可表达接近翻译后成熟水平蛋白质等特点,已广泛用于多种疾病的体内基因治疗。国外报道的 Ad-Easy 系统^[9]除具有腺病毒载体的一般优点外,还具备以下优点 ①在细菌体内完成同源重组,重组效率高,周期短 ②利用含不同抗生素筛选重组子,简化了筛选工作 ③经重组的腺病毒带有 *gfp* 基因,可直接通过荧光显微镜监测病毒的生成,病毒滴度的测定和对宿主细胞的转导效率的检测都较传统方法简便易行。我们利用 Ad-Easy 腺病毒载体系统构建了携带野生型 *pten* 基因的重组腺病毒,导入人高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞,证实 *pten* 基因在 HO-8910PM 细胞中能高效地表达。通过 MTT 比色检测,发现 Ad-*pten* 对 HO-8910PM 细胞具有显著的增殖抑制作用,能有效地抑制该癌细胞生长。细胞划痕实验证明 Ad-*pten* 能有效地抑制该癌细胞的迁移。Hoechst 33258 凋亡染色结果也表明 *pten* 具有诱导该癌细胞凋亡的作用。

本研究结果表明,携带野生型 *pten* 基因的重组腺病毒是一种高效的基因转移系统,能将 *pten* 目的基因转移到受体细胞中,对人高转移卵巢癌 HO-8910PM 细胞产生强有力的生长抑制及凋亡诱导效应,并能抑制该癌细胞迁移,为进一步的基因治疗卵巢癌的研究奠定了基础。

【参考文献】

- [1] 马佳佳,陈必良,马向东,等. 抑癌基因 PTEN 在子宫内膜癌组织中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2004, 11: 1015-1018.
- [2] Haiman CA, Stram DO, Cheng I, et al. Common genetic variation at PTEN and risk of sporadic breast and prostate Cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006, 15: 1021-1025.
- [3] Tsuruta H, Kishimoto H, Sasaki T, et al. Hyperplasia and carcinomas in Pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients[J]. Cancer Res, 2006, 66: 8389-8396.
- [4] Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells[J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5002-5008.
- [5] Zhu XY, Kwon CH, Schlosshauer PW, et al. PTEN Induces G1 cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2001, 61: 4569-4575.
- [6] Saito Y, Swanson X, Mhashilkar AM, et al. Adenovirus-mediated transfer of the PTEN gene inhibits human colorectal cancer growth *in vitro* and *in vivo*[J]. Gene Ther, 2003, 10(23): 1961-1969.
- [7] Majhen D, Ambriovic-Ristov A. Adenoviral vectors - How to use them in cancer gene therapy[J]? Virus Res, 2006, 119(2): 121-133.
- [8] 熊亮,谢富华,赵树勇,等. 以 Ad-Easy 载体系统快速构建 PTEN 重组腺病毒表达载体[J]. 广东医学, 2007, 28(4): 516-518.
- [9] He TC, Zhou S, Costada LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-2514.