

磷酸酶基因 PTEN 对骨肉瘤细胞凋亡机制研究

张 昊 王 勇 成志勇 张金金 鲁会亮 张 楠

摘 要 **目的** 探讨肿瘤抑制基因 PTEN 对人骨肉瘤细胞系 MG-63 细胞凋亡的影响及其分子作用机制。**方法** 将携带有野生型 PTEN 及绿色荧光蛋白的腺病毒(Ad-PTEN-GFP)及空载体腺病毒(Ad-GFP),转染 MG-63 细胞系,流式细胞仪分析转染效率及细胞凋亡率,半定量 RT-PCR 检测 PTEN mRNA 水平变化,Western blot 法检测 PTEN 蛋白表达,试剂盒检测 caspase-3、caspase-7、caspase-9 蛋白活性。**结果** 以感染复数为 100,转染 MG-63 细胞 2 天后腺病毒感染效率即达 $93.2\% \pm 4.7\%$ 。转染 PTEN 基因 5 天后,细胞凋亡率为 29.8%,细胞形态出现明显凋亡改变。分子学检测结果显示转染 PTEN 基因后,PTEN mRNA 及蛋白表达明显升高;caspase-3、caspase-7、caspase-9 蛋白活性明显增加。**结论** PTEN 基因可能通过提高 caspase-3、caspase-7、caspase-9 活性,诱导人骨肉瘤 MG-63 细胞凋亡。

关键词 PTEN 基因 MG-63 细胞系 caspase 家族 骨肉瘤

中图分类号 R738 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.016

Research of PTEN Gene on Apoptosis in Osteosarcoma Cells. Zhang Hao, Wang Yong, Cheng Zhiyong, et al. Department of Orthopedics, Baoding Orthopaedic Hospital, Hebei 071000, China

Abstract **Objective** To investigate the mechanism of tumor-suppressing gene PTEN on the cell apoptosis and the influence of Caspase family on human osteosarcoma cell line MG-63 cells in vitro. **Methods** The Recombinated adenovirus which contained PTEN gene(Ad-PTEN-GFP) and the empty vector (Ad-GFP) were transfected into MG-63 cells respectively. The transfection efficiency of Ad-PTEN-GFP and apoptosis rate were assessed by flow cytometry (FCM). The apoptosis was detected by morphological characteristics of light microscope. The PTEN mRNA levels were detected by reverse transcriptional PCR. Western blot was used to detected PTEN protein. Caspase-3, caspase-7 and caspase-9 protein activities were tested by kits. **Results** When multiplicity of infection (MOI) was 100, the efficiency of denovirus transfection MG-63 cell was $93.2\% \pm 4.7\%$ after transfection 48h. The apoptosis ratio was 29.8% after MG-63 cells transfected with Ad-PTEN-GFP 5 days. The apoptosis appearance with morphological characteristics appeared, PTEN mRNA and protein increased, the caspase-3, caspase-7, caspase-9 protein activity was up-regulated respectively compared with Ad-GFP group after transfection of PTEN gene. **Conclusion** PTEN gene can induce MG-63 cells apoptosis probability via up-regulating the caspase-3, caspase-7, caspase-9 ability.

Key words PTEN gene; MG-63 cell line; Caspase family; Osteosarcoma

骨肉瘤(osteosarcoma, OS)是起源于间叶组织的恶性肿瘤,好发于青少年,瘤细胞增殖迅速,浸润性生长,破坏周围正常组织,是对青少年危害最为严重的恶性骨肿瘤。研究表明癌基因的激活和抑癌基因的失活参与了骨肉瘤的发生、发展。

第 10 号染色体缺失的张力蛋白同源的磷酸酶基因(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, PTEN),为抑癌基因,编码的蛋白具有脂质及蛋白磷酸酶双重活性^[1]。PTEN 通过多种信号转

导通路,调控肿瘤细胞增殖、凋亡。PTEN 表达水平减低或表达缺失及突变等,均可影响该基因对肿瘤生长、侵袭及耐药的功能。与包括骨肉瘤在内的多种肿瘤的发生、发展及预后等密切相关^[2-4]。研究表面,在人骨肉瘤细胞系及原代细胞中均未检测到 PTEN 基因及蛋白的突变,但存在不同程度的低表达或缺失^[4,5]。

本研究将外源性野生型 PTEN 基因体外转染人骨肉瘤 MG-63 细胞,观察 PTEN 对骨肉瘤细胞增殖、凋亡的影响,并探讨其分子作用机制,为基因治疗骨肉瘤提供理论依据。

材料与方法

1. 细胞培养:人骨肉瘤细胞 MG-63,用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液在 37℃ 5% CO₂ 条件下培养。人胚肾

基金项目:云南省科技计划项目(12031586)

作者单位:671000 大理学院基础医学院人体解剖学教研室(张昊、王勇);071000 保定市骨科医院骨科(张昊、鲁会亮);071000 保定市第一医院血液内科(成志勇、张金金、张楠)

通讯作者:王勇,电子信箱:347754029@qq.com

母细胞 293A, 用含有 10% 新生牛血清 DMEM 培养液, 在 37℃ 5% CO₂ 条件下培养。

2. 腺病毒转染及转染效率测定: 含野生型 PTEN 细胞毒 (Ad-PTEN-GFP) 及对照细胞毒 (Ad-GFP) 由上海吉凯生物合成。腺病毒于人胚肾母细胞系 293A 细胞中进行扩增及效价测定。

以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 100, 将 100 μl 腺病毒转染 MG-63 细胞, 37℃、5% CO₂ 培养 2h, 然后加入含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液。流式细胞仪直接检测腺病毒转染效率。

3. 细胞形态学检测: 以 MOI 为 100, 将 Ad-PTEN 或对照转染 MG-63 细胞。培养 5 天后, Wright 染色, 光镜下观察细胞形态。

4. 细胞凋亡检测: 收集处理不同时间细胞, 每组 1 × 10⁶ 个, 70% 乙醇处理后, 4℃ 过夜; 加入 RNA 酶, 37℃ 水浴 15 ~ 30min, 加入碘化丙啶 (PI), 流式细胞仪检测, 分析凋亡率。

5. 半定量 RT-PCR: 收集不同转染组或未转染组 MG-63 细胞, 1 × PBS 清洗 3 次, 离心后提取总 RNA。电泳鉴定 RNA 并定量, 反转录合成 cDNA。PCR 扩增条件: 94℃ 5min 预变性, 72℃ 5min 加 TaqDNA 聚合酶, 开始扩增, 94℃ 2min, 60℃ 2min, 72℃ 2min, 30 个循环, 最后给予 72℃ 延伸 10min。以 β-actin 为内对照, PTEN 及 β-actin 引物如下。以与 β-actin 的比值计算基因相对表达水平。引物序列: PTEN 上游引物: 5'-ATACCAGGACCAGAGGAAACC-3', 下游引物: 5'-TTGTCATTATCCGCACGCTC-3', 产物大小 101bp; β-actin 上游引物: 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3', 下游引物: 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3', 产物大小 155bp。

6. Western blot 法: 收集每组 10⁷ 细胞, 1 × PBS 洗涤 2 次。将沉淀溶于 200 μl 细胞裂解液中 4℃ 裂解 1h。4℃, 12000r/min 离心 20min。取上清溶解蛋白质, 并测定蛋白含量。配制 8% 的分离胶和 5% 的浓缩胶取蛋白样品, 加入上样缓冲液混匀, 充分变性蛋白。120V 恒压电泳。将凝胶、PVDF 膜和滤纸浸入转膜缓冲液中。4℃, 100V 恒压, 转膜约 2h。转膜完毕, 取出 PVDF 膜浸入封闭液, 37℃, 封闭 1h。取出封闭好的膜, 加入适量用 1 × TBS 稀释好的一抗, 4℃, 过夜。用 1 × TBS 漂洗膜 5min × 3 次, 加入适量用 1 × TBS 稀释好的二抗 (辣根酶标抗鼠 IgG), 37℃, 1h。TBS 漂洗膜 5min × 3 次。将膜置于培养皿中, 加入发光剂, 显色。后进行显影、定影及灰度扫描分析。

7. caspase-3/7、caspase-9 活性检测: 以 MOI = 100 转染第 1 ~ 3 天后, 选取 96 孔板, 每组设置 3 个复孔, 取不同转染组的 MG-63 细胞 (5000) /100 μl, 同时将 caspase-Glo 3/7 或 9 底物与缓冲液相混合, 取 100 μl 加入孔板, 混合孵育 4h, 选取波长 405nm 处的吸光度, 计算处理组吸光度与对照组吸光度的比值, 计算细胞活化程度。

8. 统计学方法: 统计学通过 SPSS 11.0 软件处理, 符合正态分布计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞转染效率: 感染复数 MOI 为 100 时, 转染 48h 后, 流式细胞检测腺病毒感染骨肉瘤 MG-63 细胞效率为 93.2% ± 4.7%。

2. 细胞形态学改变: 以 MOI = 100, MG-63 细胞转染 Ad-GFP 与 Ad-PTEN-GFP 5 天后, 结果显示在未转染组及转染空载体腺病毒后, 细胞呈多角形或者梭形, 并贴壁生长, 细胞胞质饱满, 胞核呈椭圆形或圆形, 细胞染色质疏松; 而转染野生型 PTEN 基因后, 肿瘤细胞体积缩小, 并脱落, 细胞胞质空泡样变, 染色质高度浓缩边集, 部分出现核破碎 (图 1)。

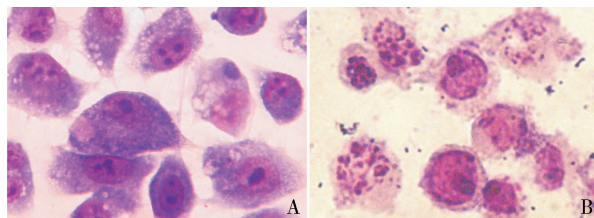


图 1 MG-63 细胞转染后形态学变化 (瑞氏染色, ×400)

A. 转染 Ad-GFP 组; B. 转染 Ad-PTEN-GFP 组

3. 流式细胞检测凋亡率变化: MOI = 100, 转染 Ad-PTEN-GFP 组与转染 Ad-GFP 组和对照组相比, 细胞转染 Ad-PTEN-GFP 后出现亚二倍体凋亡峰, 凋亡细胞比例呈时间依赖性增加。转染 PTEN 基因 3 天、5 天后细胞凋亡率分别达 16.39% ± 3.07%、29.80% ± 4.12% 明显高于转染 Ad-GFP 组 3 天及 5 天后的 4.22% ± 0.42%、6.98% ± 1.12% (*P* < 0.05)。

4. PTEN mRNA 和蛋白的检测: MG-63 细胞转染 Ad-GFP-PTEN 48h 后, PTEN 基因扩增产物在 101bp 处出现单一扩增条带, 相对表达水平为 0.869 ± 0.101。而未转染组及 Ad-GFP 组未表达 PTEN 基因 (图 2)。蛋白印迹结果显示, 对照组及 Ad-GFP 组 PTEN 蛋白阴性, 而转染 PTEN 后可细胞内 PTEN 蛋白表达水平明显增高 (图 3)。

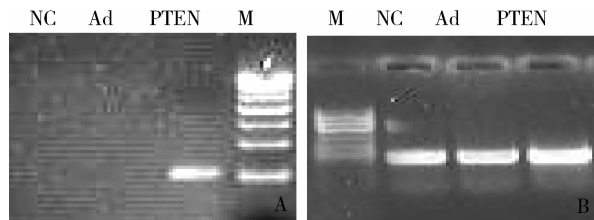


图 2 MG-63 细胞不同转染组凝胶电泳图

A. PTEN mRNA 凝胶电泳图; B. β-actin mRNA 凝胶电泳图; M. 标记; NC. 未转染组; Ad. Ad-GFP 组; PTEN. Ad-PTEN-GFP 组

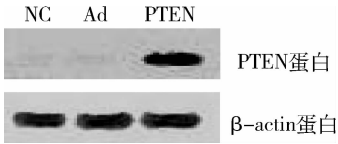


图 3 不同干预组 PTEN 及 β-actin 蛋白印迹图
NC. 未转染组; Ad. Ad - GFP 组; PTEN. Ad - PTEN - GFP 组

表 2 PTEN 转染 MG - 63 细胞后 caspase3/7 及 caspase - 9 活性变化

时间	未转染组		Ad - GFP 组		Ad - PTEN - GFP 组	
	caspase - 3/7	caspase - 9	caspase - 3/7	caspase - 9	caspase - 3/7	caspase - 9
第 0 天	0.401 ± 0.071	0.822 ± 0.178	0.429 ± 0.086	0.839 ± 0.165	0.438 ± 0.088	0.858 ± 0.178
第 1 天	0.427 ± 0.085	0.891 ± 0.167	0.437 ± 0.091	0.851 ± 0.156	0.548 ± 0.119	0.936 ± 0.193
第 2 天	0.441 ± 0.093	0.918 ± 0.179	0.441 ± 0.101	0.871 ± 0.173	0.653 ± 0.153 **	1.206 ± 0.221 **
第 3 天	0.438 ± 0.102	0.911 ± 0.187	0.442 ± 0.103	0.868 ± 0.179	0.709 ± 0.149 **	1.519 ± 0.367 **

与第 0 天相比, * $P < 0.05$; 与未转染组相比, # $P < 0.05$

讨 论

骨肉瘤是起源于间叶组织的恶性肿瘤,以能够产生骨样组织的梭形基质细胞为特征,具有较强的局部浸润及远处转移能力。肿瘤的基因治疗为骨肉瘤的治疗开辟了新的途径。p53 基因目前已经成功用于临床治疗包括骨肉瘤在内的各种实体肿瘤,并取得了较好效果^[6]。PTEN 基因是磷酸酶家族中的抑癌基因,其表达的蛋白具有脂质及蛋白磷酸酶双活性。其脂质磷酸酶能够抑制 PI₃K/Akt 信号通路,调控细胞的增殖与凋亡^[7]。研究表明人骨肉瘤中 PTEN 基因及蛋白存在不同程度减低或缺失,而在骨肉瘤周围正常组织中 PTEN 表达水平明显高于骨肉瘤组织,PTEN 表达水平高低与骨肉瘤预后密切相关^[8]。

本研究将野生型 PTEN 基因转染人骨肉瘤 MG - 63 细胞,并使其过表达。当以 MOI = 100 时,细胞感染效率在 90% 以上。本研究显示,在骨肉瘤细胞 MG - 63 细胞中存 PTEN 基因表达缺失,将野生型 PTEN 转染人骨肉瘤细胞系 MG - 63 细胞 5 天后,细胞出现凋亡特有典型特征,如胞质空泡,染色质边集,核碎裂及核溶解等,部分细胞可见凋亡小体。流式细胞结果显示,细胞凋亡率达到 29.8% ± 4.12%,明显高于对照组。caspase 家族在正常或肿瘤细胞凋亡过程中发挥着重要的作用。研究表明 caspase - 3 及 caspase - 7 为凋亡执行分子, caspase - 8 及 caspase - 9 为凋亡的效应分子,上述激活后,细胞进入凋亡的最后阶段。caspase - 3 在凋亡的早期阶段被激活,其酶原的形式降解为两个大亚基和两个小亚基,而后裂解相应的胞质、胞核底物,最终导致细胞最终凋亡^[9]。本研究结果显示 PTEN 转染 MG - 63 细胞后

5. caspase - 3/7、caspase - 9 蛋白活性检测:以感染复数 100 转染 MG - 63 肿瘤细胞第 0 ~ 3 天后,转染 PTEN 组细胞 caspase - 3/7 及 caspase - 9 活性逐渐升高,在转染第 3 天后 caspase - 3、caspase - 7、caspase - 9 活性均高于第 0 天及未转染组和 Ad - GFP 组(P 均 < 0.05),详见表 2。

caspase - 3/7 及 caspase - 9 蛋白活性在 24h 后开始增加,并呈现时间剂量依赖性相关。由此推测,PTEN 诱导的骨肉瘤细胞 MG - 63 凋亡可能由 caspase - 3、caspase - 7 及 caspase - 9 介导。

本研究初步探讨了 PTEN 基因在人骨肉瘤中的抑癌作用及其可能的部分分子机制,同时为 PTEN 基因临床生物治疗骨肉瘤提供了理论依据。

参考文献

1 Cheng Z, Yang N, Liang W, *et al.* Effect of phosphatase and tensin homology deleted on chromosome 10 (PTEN) gene transfection on reversal of multidrug resistance in K562/ADM cells[J]. *Leuk Lymphoma*, 2012,53(7):1383 - 1389

2 成志勇,潘峻,牛志云,等. PTEN 基因转染对白血病细胞 VEGF 调控作用的影响[J]. *肿瘤*,2010,30(10):815 - 821

3 成志勇,梁文同,王素云,等. PTEN/NF - κB/Caspase 信号通路对 K562/ADM 细胞阿霉素耐药逆转机制的研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2013,33(3): 54 - 60

4 Freeman SS, Allen SW, Ganti R, *et al.* Copy number gains in EGFR and copy number losses in PTEN are common events in osteosarcoma tumors[J]. *Cancer*, 2008, 113(6): 1453 - 1461

5 Gao Y, Luo LH, Li S, *et al.* miR - 17 inhibitor suppressed osteosarcoma tumor growth and metastasis via increasing PTEN expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444(2): 230 - 234

6 Wang Z, Sun Y. Targeting p53 for novel anticancer therapy[J]. *Transl Oncol*, 2010, 3(1): 1 - 12

7 Wang S, Cheng Z, Deng K, *et al.* Effect of wild type PTEN gene on proliferation and invasion of multiple myeloma[J]. *Int J Hematol*, 2010,92(1):83 - 94

8 黄涛,吕刚,高大新,等. 抑癌基因 PTEN 和 P53 在骨肉瘤组织中的表达及对预后的影响[J]. *中国临床康复*. 2005,9(2):170 - 171

9 Yang SJ, Lee SA, Park MG, *et al.* Induction of apoptosis by diphenylidifluoroketone in osteogenic sarcoma cells is associated with activation of caspases[J]. *Oncol Rep*, 2014,31(5):2286 - 2292

(收稿日期:2014 - 12 - 02)

(修回日期:2015 - 01 - 07)