

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.002

过表达PTEN基因对甲状腺髓样癌细胞生长及细胞周期的影响

翟明慧¹, 袁殿宝², 赵峻峰¹, 张敬¹

(河北北方学院附属第一医院 1. 肿瘤内科; 2. 消化内科, 河北 张家口 075000)

[摘要] 目的: 探讨PTEN基因对甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)细胞生长、周期的影响以及作用机制。方法: 使用酶切酶连的方法构建真核表达载体pcDNA3.1-PTEN, 采用脂质体转染法将其转入pA10RP8细胞中。实时荧光定量PCR(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测细胞内PTEN表达水平的变化, Western印迹法检测PTEN, Ki-67, p21, cyclin D1蛋白表达水平的变化; CCK-8法和平板克隆试验检测PTEN对pA10RP8细胞增殖的影响; 细胞流式术检测pA10RP8细胞周期的变化。结果: 成功构建了PTEN真核表达载体。转染pcDNA3.1-PTEN质粒的pA10RP8细胞PTEN和p21表达上调, Ki-67和cyclin D1蛋白表达下调; 转染pcDNA3.1-PTEN质粒的pA10RP8细胞生长增殖受到抑制; 细胞在G₀/G₁期比例增加, 发生周期阻滞。结论: 过表达PTEN能够抑制pA10RP8细胞的增殖, 诱导细胞周期阻滞, 其机制可能与周期蛋白p21上调和cyclin D1下调表达有关。

[关键词] 甲状腺髓样癌; PTEN; 细胞周期; 细胞周期蛋白

Effect of over-expression of PTEN gene on growth and cell cycle of medullary thyroid carcinoma cells

ZHAI Minghui¹, YUAN Dianbao², ZHAO Junfeng¹, ZHANG Jing¹

(1. Department of Medical Oncology; 2. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou Hebei 075000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of over-expression of PTEN gene on the growth and cell cycle of medullary thyroid carcinoma cells and to explore its mechanism. **Methods:** The eukaryotic expression vector pcDNA3.1-PTEN was constructed by restriction enzyme linked method transferred into pA10RP8 cells by liposome transfection. The mRNA expression level of PTEN in the cells were detected by RT-qPCR, the protein expression level of PTEN, Ki-67, p21 and cyclin D1 were detected by Western blot; the effect of PTEN in pA10RP8 cells on the proliferation was detected by CCK-8 and flat clones; and the changes of cell cycle were detected by flow cytometry. **Results:** The PTEN eukaryotic expression vector was successfully constructed; the expression of PTEN and p21 in cells with pcDNA3.1-PTEN was significantly up-regulated; the expression of Ki-67 and cyclin D1 protein in pA10RP8 cells with pcDNA3.1-PTEN was down-regulated; the proliferation of pA10RP8 cells with pcDNA3.1-PTEN was inhibited; the PTEN gene induced cell cycle arrest of pA10RP8 cells with

收稿日期 (Date of reception): 2018-09-04

通信作者 (Corresponding author): 翟明慧, Email: 1685337381@qq.com

a significant increase of the proportion of pA10RP8 cells in G₀/G₁ phase. **Conclusion:** Over-expression of PTEN could inhibit the proliferation and induce cell cycle arrest of pA10RP8 cells, whose mechanism may be related to p21 and cyclin D1 protein.

Keywords medullary thyroid carcinoma; PTEN; cell cycle; cyclin

甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)为中度恶性肿瘤, 发病率低, 占甲状腺癌的1%~2%^[1], 但病死率却占甲状腺癌的13.4%^[2]。PTEN是首先于1997年被克隆出来的抑癌基因, 具有磷酸酶活性, 能够使脂类特异性磷酸化, 是肿瘤细胞中最常突变的抑癌基因之一^[3-4]。近年来, 关于PTEN在肿瘤领域的作用机制成为广泛关注的热点。研究^[5]表明: PTEN基因在能够通过PI3K/Akt通路影响乳腺癌细胞的增殖转移。此外, PTEN基因对卵巢癌、胶质细胞癌、前列腺癌肿瘤的发生均有影响^[6]。然而关于PTEN在MTC中的作用机制相关报道却很少。因此, 本研究将在体外构建PTEN真核表达载体, 并通过脂质体转染法将其导入人甲状腺髓样癌细胞pA10RP8中, 以探讨过表达PTEN基因对pA10RP8细胞的生长增殖和细胞周期的影响以及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所选用细胞: 人MTC细胞pA10RP8购自北京北纳科技有限公司; pcDNA3.1(+)载体购自优宝生物技术有限公司; RPMI 1640培养基(货号11875093)、胎牛血清购自美国Thermo公司; CCK-8试剂盒、BCA试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司; RNA提取试剂盒Transzol Up(货号ET111-01), 逆转录试剂盒(TransScript Reverse Transcriptase, TransStart Top Green qPCR SuperMix)购自美国Trans-tech公司; GAPDH抗体、Ki-67抗体购自美国Abcam公司; PTEN抗体、cyclin D1抗体、p21抗体、羊抗兔二抗购自美国Cell Signaling Technology公司; Lipofectamine[®] 2000 转染试剂购自美国Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

pA10RP8细胞选用RPMI 1640培养基, 含有10%的胎牛血清和100 U/mL的青链霉素。培养条件为温度37 ℃、相对湿度95%, CO₂含量5%的恒温培养箱, 每隔2~3 d及时更换新鲜的培养基, 待细

胞贴壁生长至80%~90%的覆盖率后使用0.3%的胰蛋白酶消化传代培养。

1.2.2 重组质粒的构建

根据NCBI公布的人PTEN序列, 使用Primer Premier 5.0软件设计扩增CDS区的引物, 正向引物为5'-AGAAAGCTTATGACAGCCATCATCAAAGA-3', 反向引物为5'-AGAGGATCCGGAATAAAACGGGAAAGT-3', 引物由北京华大基因研究中心有限公司合成。使用TransZol Up提取细胞总RNA, TransScript Reverse Transcriptase进行反转录, 具体操作参考说明书。PCR反应体系为: 模板0.25 μL, 正向引物0.25 μL (10 μmol/L), 反向引物0.25 μL (10 μmol/L), 高保真酶0.25 μL, dNTPs 2 μL, 5×buffer 5 μL, ddH₂O补足25 μL。反应程序为: 98 ℃ 3 min; 98 ℃ 10 s, 58 ℃ 15 s, 72 ℃ 1 min 30 s, 32个循环, 72 ℃ 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测条带大小的正确性, 割胶回收后, 使用酶切酶连的方法与pcDNA3.1进行连接。重组质粒使用Hind III和Bam H I进行鉴定, 阳性质粒由北京华大基因研究中心有限公司进行测序。

1.2.3 细胞的转染

设置空载质粒组pcDNA3.1(+)和不进行转染的pA10RP8细胞组, 操作参考Lipofectamine[™] 2000说明书。

1.2.4 CCK-8 法检测细胞的增殖

选择生长状态良好并稳定转染pcDNA3.1-PTEN, pcDNA3.1(+)以及未转染的pA10RP8细胞, 以每孔1×10⁵个细胞接种于96孔板中, 在37 ℃培养箱中培养48 h, 避光加入10 μL的CCK-8试剂, 轻晃混匀后, 培养箱中培养适宜时间, 于450 nm处测定吸光度(OD)值。

1.2.5 克隆形成试验

取对数生长期并转染pcDNA3.1-PTEN, pcDNA3.1(+)以及未转染的pA10RP8细胞, 使用0.25%胰蛋白酶消化处理得到细胞单选液, 梯度稀释后接种于细胞培养板, 静置培养, 每组设置3个重复。终止培养后, 使用PBS清洗, 加入2 mL甲醇固定10 min, 使用吉姆萨液进行染色后进行计数。

1.2.6 RT-qPCR 选择稳定转染

pcDNA3.1-PTEN, pcDNA3.1(+)以及未转染的pA10RP8细胞, 提取细胞内的总RNA, 检测质量后

反转录为cDNA, 做实时荧光定量检测。PTEN正向引物为5'-ATACCAGGACCAGAGGAAACC-3', 反向引物为5'-TTGTCATTATCCGCACGCTC-3'; β -actin正向引物为5'-CTGGCACCACACCTTCTACAAT-3', 反向引物为5'-AATGTCACGCACGATTTCCCGC-3'。反应体系为: TransStart Top Green qPCR SuperMix 10 μ L, 模板5 ng, 正向引物0.2 μ mol/L, 反向引物0.2 μ mol/L, Passive Reference 0.4 μ L, ddH₂O补足至20 μ L。反应程序采用两步法, 具体为: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40个循环。以GAPDH为内参, 根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各检测组PTEN的mRNA相对表达水平, 每组3个重复。

1.2.7 Western 印迹法

收集稳定转染pcDNA3.1-PTEN, pcDNA3.1(+)以及未转染的pA10RP8细胞, 加入预冷后的RIPA裂解液裂解1 h, 4 $^{\circ}$ C条件下12 000 r/min离心10 min后, 弃沉淀收集上清。使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 并调整细胞浓度保持一致。取50 μ g蛋白样品加入上样缓冲液, 于沸水中处理5 min, 12.5%的SDS-PAGE过后, 200 mA条件下转膜30 min, 最终将蛋白完全转移至PVDF膜。5%的脱脂奶粉4 $^{\circ}$ C封闭过夜, 加入PTEN抗体、Ki-67抗体、cyclin D1抗和p21抗体, 室温孵育2 h, TBS洗膜5次, 加入二抗孵育2 h, 以TBS洗膜5次, 用化学发光法显色反应。

1.3 统计学处理

本研究所得数据使用GraphPad Prism 5软件处理, 结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间数据比较采用t检验, 多组间数据比较采用单因素方差

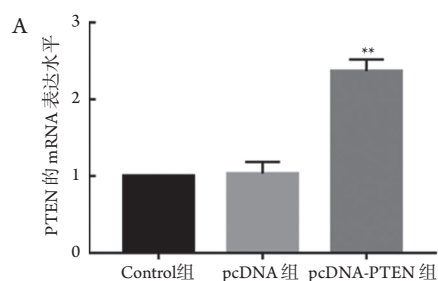


图2 pA10RP8细胞转染效果的鉴定

Figure 2 Identification of transfection efficiency of pA10RP8 cells

(A)为RT-qPCR检测PTEN的mRNA表达水平; (B)Western印迹法检测PTEN的蛋白表达水平。与Control组相比, ** $P < 0.001$ 。

(A) RT-qPCR for detecting the PTEN mRNA expression level; (B) Western blot for detecting the PTEN protein expression level. Compared with Control group, ** $P < 0.001$.

分析, 组间多重比较使用SNK-q检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PTEN在MTC中表达下调

Western印迹显示: 与正常组织相比, PTEN在MTC中显著下调表达(图1)。

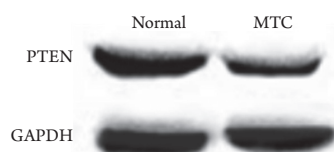
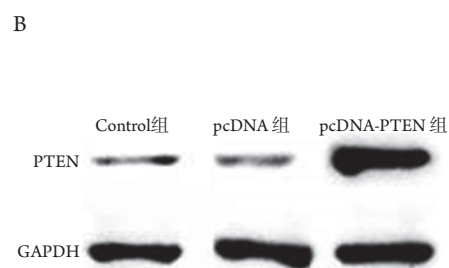


图1 PTEN在MTC中表达水平检测

Figure 1 Detection of PTEN expression level in MTC

2.2 细胞转染效果的鉴定

为确定细胞转染效果, 收集转染pcDNA3.1-PTEN和pcDNA3.1(+)真核表达质粒后的pA10RP8细胞, 提取细胞总RNA以及总蛋白, 检测转染效果。结果如图2所示, 转染pcDNA3.1-PTEN的细胞内PTEN的mRNA大约上调表达2.5倍, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.001$); 与对照组和pcDNA3.1(+)空载组相比, 蛋白表达量大量提升。提示pcDNA3.1-PTEN真核表达重组质粒构建成功, 并且在pA10RP8细胞内成功表达。



2.3 过表达 PTEN 抑制 pA10RP8 细胞的增殖

CCK-8法检测过表达PTEN对pA10RP8细胞增殖情况的影响,结果显示:PTEN基因过表达对pA10RP8细胞细胞的增殖具有抑制作用。PTEN过表达组的细胞增长速度明显低于对照组和pcDNA3.1(+)空载组,差异有统计学意义($P < 0.05$);Western印迹法检测增殖相关蛋白Ki-67的表达水平发现,pcDNA3.1-PTEN组内的Ki-67蛋白表达量低于对照组pcDNA3.1(+)组,即Ki-67的蛋白表达水平与PTEN的表达量呈负相关(图3)。

2.4 过表达 PTEN 抑制 pA10RP8 细胞的克隆形成

细胞克隆形成试验结果显示:上调pA10RP8细胞内PTEN基因的表达水平,能够明显抑制细胞的

克隆形成,与空白对照组和pcDNA3.1(+)空载组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。

2.5 过表达 PTEN 诱导 pA10RP8 细胞周期阻滞

使用流式细胞术检测pcDNA3.1-PTEN,pcDNA3.1(+)以及未转染的pA10RP8细胞的细胞周期的变化。结果如图5所示,转染pcDNA3.1-PTEN的细胞由(49.87 ± 1.64)%上升至(73.65 ± 2.19)%,细胞数量明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 过表达 PTEN 对细胞周期蛋白的影响

使用Western印迹法检测了p21和cyclin D1蛋白的表达水平,结果显示:pcDNA3.1-PTEN组的p21表达水平出现了上调变化,cyclin D1的蛋白表达出现了下调(图6)。

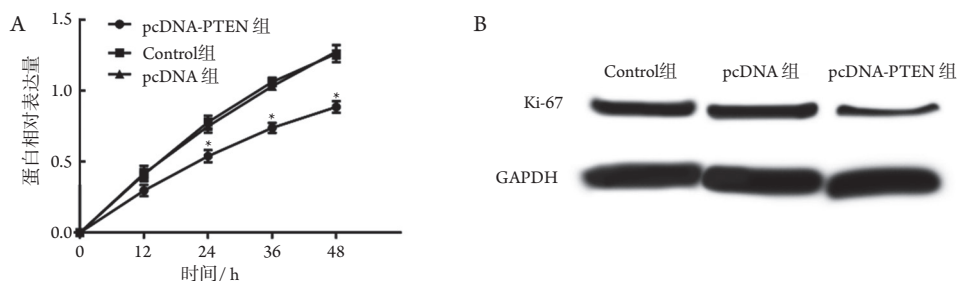


图3 过表达PTEN对pA10RP8细胞增殖的影响

Figure 3 Effect of over-expression of PTEN on proliferation of pA10RP8 cells

(A)CCK-8法检测过表达PTEN对pA10RP8细胞增殖的影响;(B)Western印迹法检测PTEN对Ki-67表达水平的影响。与Control组相比, $*P < 0.05$ 。

(A) Effect of overexpression of PTEN on proliferation of pA10RP8 cells by CCK-8 assay; (B) Effect of PTEN on Ki-67 expression level detected by Western blot. Compared with Control group, $*P < 0.05$.

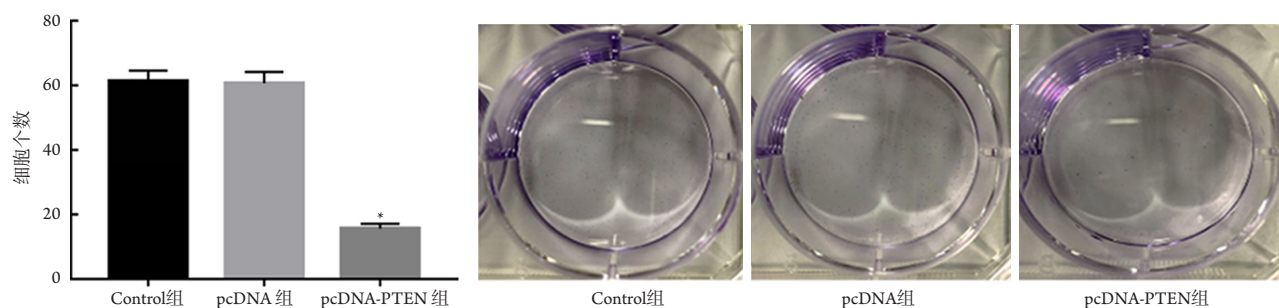


图4 过表达PTEN对pA10RP8细胞克隆形成的影响

Figure 1 Effect of over-expression of PTEN on pA10RP8 cell clone formation

与Control组相比, $*P < 0.05$ 。

Compared with Control group, $*P < 0.05$.

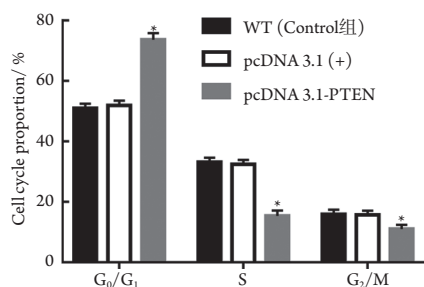


图5 过表达PTEN对pA10RP8细胞周期的影响

Figure 5 Effect of over-expression of PTEN on pA10RP8 cell cycle

与Control组相比, * $P < 0.05$ 。

Compared with Control group, * $P < 0.05$.

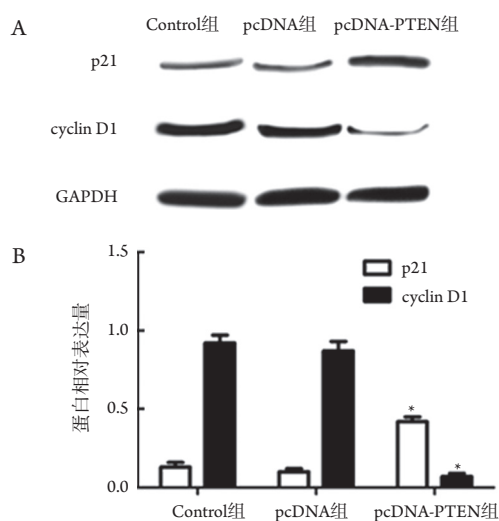


图6 过表达PTEN对细胞周期蛋白表达的影响

Figure 6 Effect of over-expression of PTEN on cyclin expression

(A) Western印迹法检测p21和cyclin D1蛋白表达的结果;

(B) p21和cyclin D1蛋白的相对表达量。与Control组相比, * $P < 0.05$ 。

(A) Result of Western blot to detect the expression of p21 and cyclin D1 protein; (B) Relative expression of p21 and cyclin D1 protein. Compared with Control group, * $P < 0.05$.

3 讨论

肿瘤细胞的典型特征是异常增殖, 在恶性致癌环境下, 细胞的正常生长状态受到刺激脱离原本的代谢调控机制, 发生恶性转化, 表现出持续自主生长的特性^[7]。PTEN为最常突变的抑癌基因之一, 对PI3K/AKT通路具有负调控作用, 在

多种肿瘤的发展进程中起重要作用^[6,8-9]。PTEN的磷脂酶活性功能可使三磷酸磷脂酰肌醇PIP3去磷酸化, 使PIP3丧失信使的功能无法激活蛋白激酶PKB, 进而导致PKB的失活, 使细胞发生周期阻滞, 无法增殖^[10-11]。大量研究结果^[9,12-13]表明: PTEN基因的表达量与癌细胞的增殖能力均呈负相关。

细胞周期的各阶段进程由一系列的细胞因子紧密调控, 周期的紊乱失调代表着细胞代谢机制发生严重失控, 往往预示着肿瘤的发生。在正常细胞中, 激酶抑制因子p21和细胞周期素cyclin等周期调控因子以CDK激酶为核心组成调控网络, cyclin D1可与CDK结合促进细胞增殖, p21则是CDK的一种抑制因子, 可通过与cyclin-CDK复合物结合使细胞在G₁期发生周期阻滞起到负调控作用^[14-15]。在细胞周期进程中, G₁期为周期时间长短的限速点, 主要通过cyclin D1与CDK结合, 使Rb发生磷酸化反应后改变分子构象, 从而与转化活化因子E2F发生解离, 之后被释放激活的E2F发挥作用, 使细胞越过G₁限制点进入到S期, 完成细胞增殖反应^[16-17]。p21表达量的减少与肿瘤的发生有着密切关系, 当细胞内p21的表达量下调时, cyclin-CDK的抑制性被解除, 细胞内的调控机制被打乱, 失去对周期的控制, 开始出现大量增殖的现象, 发生肿瘤。研究^[18-20]表明: p21在胰腺癌、卵巢癌和食管癌等中的表达量均显著低于正常组织, 且对癌细胞的转移能力和癌症的预后有重要影响。

为探究PTEN基因对MTC细胞的作用效果以及机制, 本研究选择pA10RP8细胞作为研究对象, 成功构建了pcDNA3.1-PTEN真核表达质粒, 并通过脂质体介导的方法将其转入pA10RP8细胞中, 发现PTEN在细胞内被成功大量表达; PTEN的过表达能够下调分裂相关蛋白Ki-67的表达水平, 对细胞的增殖以及克隆形成具有抑制作用。细胞周期结果显示: 过表达PTEN能够使细胞停留在G₀/G₁期, 发生周期阻滞; 上调表达PTEN能使p21的表达出现上调现象, 使cyclin D1的表达下调。以上结果均说明过表达PTEN基因能够抑制pA10RP8细胞的增殖, 促进其发生周期阻滞, 具体机制可能为通过上调p21调节因子的表达水平, 降低cyclin D1的表达水平, 抑制cyclin-CDK的活性, 使细胞在G₁期发生停滞无法进入S期。然而关于细胞对内PTEN与cyclin D1和p21之间的具体调控分子机制以及与其他细胞调节因子之间的作用仍不明确, 仍

需进一步研究; 但本研究为以后基因治疗在癌症中的应用奠定了一定的分子基础。

参考文献

- Pappa T, Alevizaki M. Management of hereditary medullary thyroid carcinoma[J]. *Endocrine*, 2016, 53(1): 7-17.
- Kazaure HS, Roman SA, Sosa JA. Medullary thyroid microcarcinoma: a population-level analysis of 310 patients[J]. *Cancer*, 2012, 118(3): 620-627.
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(4): 356-362.
- Chu EC, Tarnawski AS. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology[J]. *Med Sci Monit*, 2004, 10(10): RA235-RA241.
- López-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM, et al. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality[J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(5): 1121-1131.
- Sansal I, Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(14): 2954-2963.
- 阮丹. 肿瘤代谢研究进展综述[J]. *医学信息旬刊*, 2013, 26(8): 688-689.
RUAN Dan. Advances in tumor metabolism[J]. *Medical Information*, 2013, 26(8): 688-689.
- Lee C, Kim JS, Waldman T. PTEN gene targeting reveals a radiation-induced size checkpoint in human cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 6906-6914.
- Jing X, Cheng W, Wang S, et al. Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 472-478.
- Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(1): 34-44.
- Borkowska A, Sielicka-Dudzin A, Herman-Antosiewicz A, et al. Diallyl trisulfide-induced prostate cancer cell death is associated with Akt/PKB dephosphorylation mediated by P-p66shc[J]. *Eur J Nutr*, 2012, 51(7): 817-825.
- Li Z, Qiu R, Qiu X, et al. EYA2 promotes lung cancer cell proliferation by downregulating the expression of PTEN[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(67): 110837-110848.
- de Araujo WM, Robbs BK, Bastos LG, et al. PTEN overexpression cooperates with lithium to reduce the malignancy and to increase cell death by apoptosis via PI3K/Akt suppression in colorectal cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(2): 458-469.
- Hobeika AC, Etienne W, Torres BA, et al. IFN-gamma induction of p21(WAF1) is required for cell cycle inhibition and suppression of apoptosis[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, 19(12): 1351-1361.
- Gulappa T, Reddy RS, Suman S, et al. Molecular interplay between cdk4 and p21 dictates G0/G1 cell cycle arrest in prostate cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2013, 337(2): 177-183.
- Zhang SY, Liu SC, Johnson DG, et al. E2F-1 gene transfer enhances invasiveness of human head and neck carcinoma cell lines[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21): 5972-5976.
- Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: cyclin D and CDK inhibitors come of age[J]. *Cell*, 1994, 79(4): 573-582.
- 李慧, 耿明. 细胞周期调控因子p21和cyclinD1与胃癌相关性研究的进展[J]. *诊断病理学杂志*, 2008, 15(2): 154-156.
LI Hui, GENG Ming. Research progress on correlation between cell cycle regulators p21 and cyclinD1 and gastric cancer[J]. *Chinese Journal of Diagnostic Pathology*, 2008, 15(2): 154-156.
- Ikeguchi M, Saito H, Katano K, et al. Expression of p53 and p21 are independent prognostic factors in patients with serosal invasion by gastric carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 1998, 43(5): 964-970.
- Kalomenidis I, Orphanidou D, Papamichalis G, et al. Combined expression of p53, Bcl-2, and p21WAF-1 proteins in lung cancer and premalignant lesions: association with clinical characteristics[J]. *Lung*, 2001, 179(5): 265-278.

本文引用: 翟明慧, 袁殿宝, 赵峻峰, 张敬. 过表达PTEN基因对甲状腺髓样癌细胞生长及细胞周期的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(3): 464-469. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.002

Cite this article as: ZHAI Minghui, YUAN Dianbao, ZHAO Junfeng, ZHANG Jing. Effect of over-expression of PTEN gene on growth and cell cycle of medullary thyroid carcinoma cells[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(3): 464-469. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.002