

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.11.004

野生型 PTEN 基因在乳腺癌细胞中对表阿霉素的增敏作用

李祥勇, 曾今诚, 林观平, 周克元

PTEN Induces Chemosensitivity to Epirubicin in Breast Cancer Cells

LI Xiang-yong, ZENG Jin-cheng, LIN Guan-ping, ZHOU Ke-yuan

*Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China**Corresponding Author: LIN Guan-ping, E-mail: gplin2008@126.com; ZHOU Ke-yuan, E-mail: kyz@gdmc.edu.cn*

Abstract: Objective To investigate the influence of wild-type PTEN gene on chemo-sensitivity of Epirubicin in breast cancer cell lines MCF-7 and ZR-75-1. **Methods** The wild-type PTEN gene was transfected into human breast cancer cell line MCF-7 and ZR-75-1 by recombinant adenoviruses (Ad-PTEN). The expression of PTEN gene mRNA was analyzed by RT-PCR and the PTEN protein was identified by Western blot. The effect of Epirubicin alone or combined with Ad-PTEN on cell survival rate was measured by CCK-8 test. **Results** Adenovirus-mediated PTEN gene transfer system obviously increased the expression of PTEN mRNA and protein in cells. After treatment with Ad-PTEN, the chemosensitivity of breast cancer cells to Epirubicin increased about two folds in MCF-7 cells and ten folds in ZR-75-1 cells. **Conclusion** The synergism of Ad-PTEN to epirubicin obviously increased the cytotoxicity on breast cancer cell lines.

Key words: PTEN; Epirubicin; Synergism; Breast cancer

摘要:目的 探讨野生型 PTEN 基因在人乳腺癌细胞系 MCF-7 和 ZR-75-1 中对表阿霉素的增敏作用。**方法** 腺病毒介导野生型 PTEN 基因导入人乳腺癌细胞系 MCF-7 和 ZR-75-1, RT-PCR 检测 PTEN mRNA 的表达, Western blot 检测转染后 PTEN 蛋白的表达; Ad-PTEN 感染联合不同浓度的表阿霉素处理细胞, 采用 CCK-8 法测定细胞增殖抑制率和联合效应。**结果** 腺病毒介导的 PTEN 基因导入法可明显地增加细胞中 PTEN 基因的表达, 野生型 PTEN 基因转染联合表阿霉素使乳腺癌细胞 MCF-7 对表阿霉素的敏感度增加了两倍, 而使乳腺癌细胞 ZR-75-1 对表阿霉素的敏感度增加了十倍。**结论** 腺病毒重组的野生型 PTEN 基因联合表阿霉素对人乳腺癌细胞增殖具有显著的协同抑制效应。

关键词: PTEN 基因; 表阿霉素; 联合治疗; 乳腺癌

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)11-1232-04

0 引言

PTEN 基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten gene) 是迄今为止发现的第一个具有双特异磷酸酶活性的抑癌基因^[1]。主要通过抑制 PIK/Akt 信号途径调节下游

多种细胞增殖和凋亡相关蛋白的表达, 参与调节细胞的生长与凋亡及细胞的迁移和黏附等^[2]。研究表明 PTEN 基因在多种肿瘤中发生杂合性丢失和突变, 而且其蛋白表达的降低与缺失, 可直接影响肿瘤细胞的生长^[3-4]。

表阿霉素 (Epirubicin, EPI) 是一种新的蒽环类抗生素, 目前作为化疗药物应用于包括乳腺癌在内的多种肿瘤的临床治疗, 其抗肿瘤活性与 DNA 的结合有关。虽然化疗药物在肿瘤的治疗中发挥着重要的作用, 一直以来化疗药物敏感度不高已成为化疗药物广泛应用于临床的瓶颈问题。本研究旨在探讨重组野生型 PTEN 腺病毒表达载体在增加表阿霉素的化疗敏感度的作用及其临床意义。

收稿日期: 2010-12-08; 修回日期: 2011-06-14

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (83039); 湛江市科技计划资助项目 (2009C3101012)

作者单位: 524023 广东湛江, 广东医学院生物化学与分子生物学研究所

通信作者: 林观平, E-mail: gplin2008@126.com; 周克元, E-mail: kyz@gdmc.edu.cn

作者简介: 李祥勇 (1975-), 男, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤基因治疗的研究

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与细胞培养 人乳腺癌细胞株 ZR-75-1 购自中国医学科学院基础医学研究所、人乳腺癌细胞株 MCF-7 和腺病毒包装细胞 293A 为本研究所保存。293A 细胞用含 10% 胎牛血清、DMEM (高糖) 培养液培养, 人乳腺癌细胞系 MCF-7 和 ZR-75-1 用含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液培养, 所有细胞均在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱培养, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.1.2 药品与试剂 盐酸表阿霉素 (Epirubicin, Epi) 购于辉瑞制药 (无锡) 有限公司。DMEM (高糖) 培养液、胰蛋白酶为 Hyclone 产品。胎牛血清为杭州四季青生物公司产品。普通型 RT-PCR 试剂盒为大连宝生物工程有限公司产品, CCK-8 试剂盒为碧云天生物技术有限公司产品。重组腺病毒 Ad-PTEN 和 Ad-GFP 由本实验室合成^[5] 保存。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒的扩增、纯化、及滴度测定 取少量 Ad-PTEN、Ad-GFP 腺病毒, 分别感染融合率为 80%~90% 的 293A 细胞, 大量扩增腺病毒, 待细胞发生完全病变时收集细胞及上清液, GENMED 少量腺病毒沉淀法纯化试剂盒进行纯化与浓缩。微量全细胞病变法检测病毒滴度^[6]。

1.2.2 重组腺病毒在乳腺癌细胞中最佳感染复数测定 分别以每孔 1×10^5 个细胞接种 MCF-7 和 ZR-75-1 细胞于 6 孔板; 待细胞完全贴壁后, 弃去 DMEM 10% 培养液, 以感染复数 MOI 分别为 0、25、50、100、150、200 进行感染, 十字形慢慢晃动混匀 3 次, 然后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱继续培养 3 min; 其间每 10~15 min 摇动培养板一次, 使细胞均匀受染 (病毒上清液吸取所用枪头均为带滤芯的枪头)。每孔添加 1.5 ml 新鲜 DMEM 10% 培养液, 继续培养 48 h; 倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况, 判定感染率; 以 90%~95% 细胞表达 GFP 的最低感染复数值为最佳感染复数。

1.2.3 RT-PCR 检测乳腺癌细胞 PTEN 基因的表达 分别以每孔 1×10^5 个细胞接种 MCF-7 和 ZR-75-1 细胞于 6 孔板; 细胞完全贴壁后, 以 Ad-PTEN 腺病毒 MOI = 100 进行感染, 48 h 后, Trizol 法提取细胞总 RNA, 以通用 RT-PCR 试剂盒说明书步骤进行 RT-PCR。PTEN 的上游引物为 5'-TTT-GTGGTCTGCCAGCTA-3', 下游引物为 5'-GGT-TCATTCTCTGGATCAGA-3', 其扩增片段长度为 510 bp。同时以 β -actin 作为内参, 其上游引物为

5'-ATGGATGATGATGATATCGCC-3', 下游引物为 5'-GTGATGACCTGGCCGTCAGG-3', 其扩增片段长度为 685 bp。反应条件均为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 50 s; 58℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1 min; 循环 32 圈; 72℃ 再延伸 7 min。取 RT-PCR 产物 10 μ l, 加 6 $\times$ Loading Buffer (含 1/1 000 浓度的 SYBR Green I 荧光染料) 2 μ l, 充分混匀后于 1% 琼脂糖凝胶上样。80 V 恒压电泳, 当二甲苯菁 F 达凝胶底部时, 停止电泳。紫外灯观察结果并拍照。

1.2.4 Western blot 检测 Ad-PTEN 转染人乳腺癌细胞 PTEN 蛋白的表达 分别以每孔 1×10^5 个细胞接种 MCF-7 和 ZR-75-1 细胞于 6 孔板; 细胞完全贴壁后, 以 Ad-PTEN 腺病毒 MOI = 100 进行感染, 培养 48 h 后收集细胞, 细胞裂解液裂解细胞, 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液 BCA 法测定蛋白质含量, 12% SDS-PAGE 将蛋白电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶常温封闭 2 h, 加入 PTEN 单克隆抗体结合或 β -actin 单克隆抗体之后用辣根过氧化物酶结合的二抗结合 ECL 法显色, 曝光显影。

1.2.5 CCK-8 法测定乳腺癌细胞增殖抑制率及与表阿霉素的联合作用 取对数生长期细胞, 以 2×10^3 个细胞/孔接种于 96 孔板培养, 24 h 后分别用 MOI = 50 和 100 的 Ad-PTEN 和 Ad-GFP 腺病毒转染细胞, PBS 作为对照组。于转染后 0、1、2、3、4、5 天每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液, 37℃ 培养 1.5 h 后, 酶标仪检测每孔 450 nm 和 630 nm 波长下的吸光度 (A) 值。细胞抑制率 = $[1 - \text{实验组}(A_{450} - A_{630}) / \text{对照组}(A_{450} - A_{630})] \times 100\%$ 。分别绘制浓度-抑制率曲线及时间-抑制率曲线。同理, 在以 MOI = 100 的 Ad-PTEN 和 Ad-GFP 腺病毒转染 24 h 后序贯不同浓度 (0.25、0.5、1、2、4 μ g/ml) 的 EPI, PBS 对照, CCK-8 检测 Ad-PTEN 与 EPI 的联合作用。每组设 4 个复孔, 并重复 3 次实验。IC₅₀ 计算器软件计算 50% 细胞生长抑制时的药物浓度。

1.3 统计学方法

实验计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 行单因素方差分析, 两两比较行 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒滴度的测定结果

经反复扩增及纯化后, Ad-PTEN 和 Ad-GFP 的病毒滴度分别为: 1.3×10^8 pfu/ml 和 1.0×10^8 pfu/ml。

2.2 最佳感染 MOI 的确定

Ad-PTEN 分别以 MOI 为 0, 25, 50, 100, 200 感染乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-1, 荧光显微镜下观察 GFP 表达的情况, 发现使 90% 以上细胞出现 GFP 蛋白表达的 MOI 值为 100。即选择 MOI = 100 为最佳感染 MOI 值。

2.3 RT-PCR 检测乳腺癌细胞 PTEN mRNA 表达

Ad-PTEN 转染乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-1 72 h 后, PTEN mRNA 的表达量比对照组 Mock (PBS 对照组) 明显升高, 见图 1。

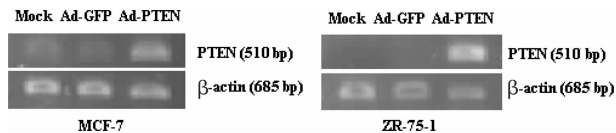


图 1 RT-PCR 检测乳腺癌细胞 PTEN mRNA 的表达

Figure 1 Expressions of PTEN mRNA in breast cancer

cells detected by RT-PCR

2.4 Western blot 检测乳腺癌细胞 PTEN 蛋白的表达

Ad-PTEN 转染乳腺癌细胞 MCF-7 和 ZR-75-1 72 h 后, PTEN 蛋白表达量和对照组相比有明显升高, 见图 2。

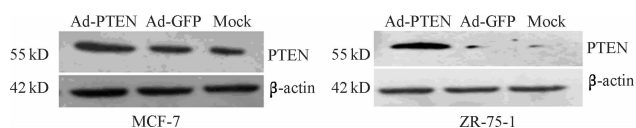


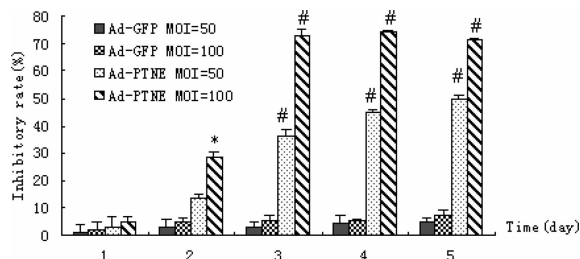
图 2 Western blot 检测乳腺癌细胞 PTEN 蛋白的表达

Figure 2 Expressions of PTEN protein in breast cancer cells

detected by Western blot

2.5 Ad-PTEN 转染对细胞增殖的影响

在乳腺癌细胞 MCF-7 中, 转染后第 3 天 Ad-PTEN 组细胞出现明显增殖抑制, 转染后第 5 天 Ad-PTEN MOI=100 组最大抑制率为 59.7%。在乳腺癌细胞 ZR-75-1 中, 转染后第 3 天 Ad-PTEN 组细胞出现明显增殖抑制, 转染第 4 天 Ad-PTEN MOI=100 组最大抑制率为 70.2%, 见图 3、4。



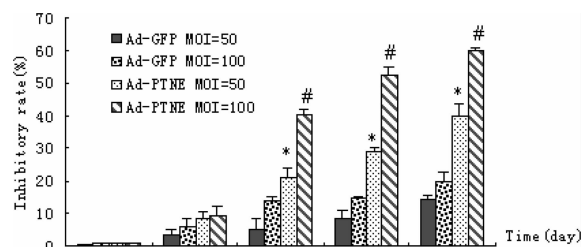
*: $P < 0.05$; #: $P < 0.01$, vs. Ad-GFP MOI=50 and MOI=100

图 3 Ad-PTEN 对乳腺癌细胞 MCF-7 生长的抑制作用

Figure 3 Inhibitory effect of Ad-PTEN on MCF-7 cells growth

2.6 Ad-PTEN 转染联合 EPI 对乳腺癌细胞增殖的影响

细胞生长增殖抑制实验结果显示, 随着 EPI 浓度的增加, Mock 组、Ad-GFP 组和 Ad-PTEN 组



*: $P < 0.05$; #: $P < 0.01$, vs. Ad-GFP MOI=50 and MOI=100

图 4 Ad-PTEN 对乳腺癌细胞 ZR-75-1 生长的抑制作用

Figure 4 Inhibitory effect of Ad-PTEN on ZR-75-1

cells growth

细胞的抑制率明显增大, 而且转染表达 PTEN 基因的细胞抑制率明显高于 Mock 组和 Ad-GFP 组的生长抑制率, 见图 5、6。进一步采用 IC_{50} 计算器软件计算后得到, 在乳腺癌细胞 MCF-7 中, Mock 组 (PBS 对照组) IC_{50} 值为: 3.311 $\mu\text{g/ml}$, Ad-GFP 组 IC_{50} 值为: 4.506 $\mu\text{g/ml}$, Ad-PTEN 组为: 1.577 $\mu\text{g/ml}$ 。结果, 经 Ad-PTEN 转染后, 乳腺癌细胞 MCF-7 对 EPI 的敏感度增加了 2 倍 (3.311/1.577); 而在乳腺癌细胞 ZR-75-1 中, Mock 组 (PBS 对照组) IC_{50} 值为: 11.775 $\mu\text{g/ml}$, Ad-GFP 组 IC_{50} 值为: 7.178 $\mu\text{g/ml}$, Ad-PTEN 组 IC_{50} 值为: 1.127 $\mu\text{g/ml}$ 。结果, 经 Ad-PTEN 转染后, 乳腺癌细胞 ZR-75-1 对 EPI 的敏感度增加了约 10 倍 (11.775/1.127)。

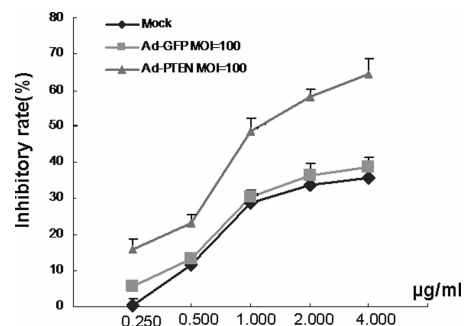


图 5 乳腺癌细胞 MCF-7 在 Ad-PTEN 联合表阿霉素作用下的生长曲线

Figure 5 Curves of MCF-7 cell proliferation treated by epirubicin after transfected with Ad-PTEN

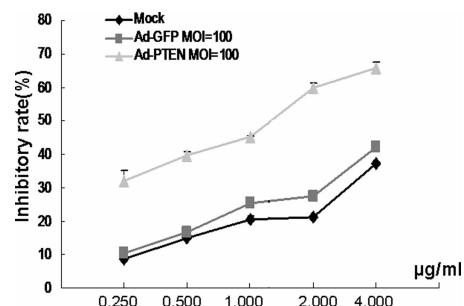


图 6 乳腺癌细胞 ZR-75-1 在 Ad-PTEN 联合表阿霉素作用下的生长曲线

Figure 6 Curves of ZR-75-1 cell proliferation treated by epirubicin after transfected with Ad-PTEN

3 讨论

PTEN 具有抑制肿瘤细胞生长增殖、侵袭转移和促进肿瘤细胞凋亡的作用。我们的前期研究也发现,在 PTEN 缺失表达的乳腺癌 ZR-75-1 细胞中导入野生型的 PTEN 基因,可明显地抑制细胞的生长增殖并诱导凋亡^[7]。表阿霉素是一种蒽环类化合物,是临床上广谱抗肿瘤抗生素,主要作用是直接嵌入 DNA 碱基对之间,干扰转录过程,阻止 mRNA 的形成,从而达到对肿瘤细胞的杀伤作用^[8]。然而,在大多数肿瘤的化学药物治疗中,含蒽环类化疗方案很多已耐药或达到心脏毒性累积剂量。Tian 等^[9]研究发现,PTEN 基因转染后与表皮生长因子抑制剂共同作用于 U87MG 细胞系,可以阻滞 91.7% 的肿瘤细胞生长,明显高于单用表皮生长因子抑制剂(46.8%)。Bianco 等^[10]报道,PTEN 转染联合 0.1 mol/L 和 1.0 mol/L ZD1839,使 MDA-468 细胞的凋亡率比空转染细胞联合 0.1 mol/L 和 1.0 mol/L ZD1839 时的凋亡率增加了 28.43% 和 29.47%。随后在乳腺癌、脑胶质瘤、前列腺癌等多种肿瘤细胞中也证实这种联合增效作用^[11-12]。

本实验结果表明,在人乳腺癌细胞系 MCF-7 中,转染腺病毒重组的野生型 PTEN 基因后使得表阿霉素对乳腺癌细胞表现出明显的生长抑制作用,其野生型 PTEN 与表阿霉素联合治疗组的抑制率明显高于两者单用的抑制率。联合治疗组表阿霉素的 IC_{50} 值比单用表阿霉素组表阿霉素的 IC_{50} 值降低了约 2 倍(3.311 : 1.577),即腺病毒重组的野生型 PTEN 基因转染乳腺癌 MCF-7 细胞后,使该细胞对表阿霉素的敏感度增加了约 2 倍。而在人乳腺癌细胞系 ZR-75-1 中,联合治疗组表阿霉素的 IC_{50} 值比单用表阿霉素组表阿霉素的 IC_{50} 值降低了约 10 倍(11.775 : 1.127),即腺病毒重组的野生型 PTEN 基因转染乳腺癌 ZR-75-1 细胞后,使该细胞对表阿霉素的敏感度增加了约 10 倍。结果表明:相比单用表阿霉素或单纯的野生型 PTEN 基因的导入,基因治疗与药物的联合应用对人乳腺癌细胞的生长抑制作用更加明显,而且使得表阿霉素对肿瘤细胞的药物敏感度显著提高。这种基因治疗与化疗药物的联合应用在 PTEN 表达差异的两种乳腺癌细胞中的作用也不尽相同,这进一步表明了 PTEN 可显著地提高表阿霉素对肿瘤细胞的药物敏感度进而更好地抑制肿瘤细胞的生长增殖。

本实验结果表明通过基因治疗与化学治疗联用,外源野生型 PTEN 基因表达可明显地增加化学药物表阿霉素对乳腺癌细胞的药物敏感度,对化疗药物多药耐药性机制的研究具有一定的指导作用,也可作为新的临床联合化疗方案提供依据。

参考文献:

- [1] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947.
- [2] Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN[J]. Science, 1998, 280(5369): 1614-1617.
- [3] Nemenoff RA, Simpson PA, Furgeson SB, et al. Targeted deletion of PTEN in smooth muscle cells results in vascular remodeling and recruitment of progenitor cells through induction of stromal cell-derived factor-1alpha[J]. Circ Res, 2008, 102(9): 1036-1045.
- [4] Kanda S, Kanetake H, Miyata Y. Loss of PTEN function may account for reduced proliferation pathway sensitivity to LY294002 in human prostate and bladder cancer cells[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(2): 303-311.
- [5] 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.
- [6] 周文泉, 闵志廉, 李莉, 等. 重组腺病毒 Ad-p16 的扩增及病毒滴度检测[J]. 医学研究生学报, 2001, 14(1): 44-46.
- [7] Li X, Lin G, Wu B, et al. Overexpression of PTEN induces cell growth arrest and apoptosis in human breast cancer ZR-75-1 cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007, 39(10): 745-750.
- [8] 孙燕, 周际昌. 临床肿瘤内科手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 348-353.
- [9] Tian XX, Zhang YG, Du J, et al. Effects of cotransfection of antisense-EGFR and wild-type PTEN cDNA on human glioblastoma cells[J]. Neuropathology, 2006, 26(3): 178-187.
- [10] Bianco R, Shin I, Ritter CA, et al. Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors[J]. Oncogene, 2003, 22(18): 2812-2822.
- [11] Anai S, Goodison S, Shiverick K, et al. Combination of PTEN gene therapy and radiation inhibits the growth of human prostate cancer xenografts[J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(10): 975-984.
- [12] Weng LP, Smith WM, Dahia PL, et al. PTEN suppresses breast cancer cell growth by phosphatase activity-dependent G1 arrest followed by cell death[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5808-5814.

[编辑:周永红;校对:刘红武]