

PTEN 基因影响 K562 细胞周期的分子机制探讨

成志勇^{1,2}, 潘 峻^{1*}, 梁文同², 焦 婷¹, 温省初², 姚 丽¹, 魏晓璇¹, 王素云¹

(1. 河北医科大学第二医院血液内科//河北省血液病重点实验室, 河北 石家庄 050000;

2. 保定市第一医院血液肿瘤科, 河北 保定 071000)

摘要:【目的】探讨抑癌基因 PTEN 对人慢性粒细胞白血病细胞系 K562 细胞周期的影响。【方法】将携带有野生型 PTEN 和绿色荧光蛋白的腺病毒(Ad-PTEN-GFP)及对照载体腺病毒(Ad-GFP)转染人慢性粒细胞白血病细胞系 K562。MTT 检测细胞增殖抑制率;流式细胞仪检测转染效率、细胞凋亡率和细胞周期的变化;荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 PTEN、Cyclin D1、Cyclin D2、CDK4、P27^{Kip1} mRNA 水平变化,Western blot 检测上述蛋白表达水平的变化。【结果】与 Ad-GFP 组比较,Ad-PTEN-GFP 转染 K562 细胞后,细胞凋亡率最高为 30%,细胞周期显示:G₀/G₁ 期细胞比例由 54.9%增加至 78.5%,G₂/M 期比例由 30.2%降至 13.6%,Cyclin D1、Cyclin D2、CDK4 mRNA 及 Cyclin D1 蛋白表达降低,P27^{Kip1} mRNA 及蛋白表达增加。【结论】PTEN 基因高表达可以促进 K562 细胞凋亡,并通过抑制 Cyclin D1、Cyclin D2、CDK4 及增加 P27^{Kip1} 表达使细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期。

关键词: PTEN 基因; 细胞周期; Cyclins; P27^{Kip1}

中图分类号: R733 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)02-0183-04

Molecular Mechanism of PTEN Gene Influencing K562 Cell Cycle

CHENG Zhi-yong^{1,2}, PAN Ling^{1*}, LIANG Wen-tong², JIAO Ting¹, WEN Xing-chu²,

YAO Li¹, WEI Xiao-xuan¹, WANG Su-yun¹

(1. The Key Laboratory of Hematologic Diseases, Department of Hematology, The Second Hospital Affiliated to

Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2. Department of Hematology-Oncology,

The First Hospital of Baoding, Baoding 071000, China)

Abstract:【Objective】To investigate the effect of tumor suppressor wild type PTEN gene (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten gene) on the cell apoptosis and cell cycle of human chronic myeloid leukemia (CML) cell line K562 in vitro.【Methods】The recombination of wild type PTEN gene and adenovirus with green fluorescent protein (GFP) (Ad-PTEN-GFP) and control vector adenovirus (Ad-GFP) were transfected into K562 cell lines. The inhibitory rate of cell proliferation was detected by MTT assay and the transfection efficiency of Ad-PTEN-GFP, apoptosis rate and cell cycle were assessed by flow cytometry (FCM). The transcription changes of PTEN, Cyclin D1, Cyclin D2, CDK4, and P27^{Kip1} mRNA were measured by fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR), and their protein levels were measured by Western blotting.【Results】Compared with transfected Ad-GFP, the highest apoptosis rate was 30% after transfected with Ad-PTEN-GFP in K562 cell lines. The ratio of G₀/G₁ phase cells increased from 54.9% to 78.5% and reduced from 30.2% to 13.6% in G₂/M phase cells. Protein expression levels of Cyclin D1, Cyclin D2, CDK4 Mrna, and Cyclin D1 down-regulated and P27^{Kip1} mRNA and protein expression up-regulated after the cells transfected with PTEN gene.【Conclusion】Over expression of PTEN gene can promote the apoptosis of K562 cells in vitro and block cell cycle progression at G₀/G₁ phase by down-regulating Cyclin D1, Cyclin D2, CDK4 expression and up-regulating P27^{Kip1} expression.

Key words: PTEN gene; Cell cycle; Cyclins; P27^{Kip1}

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(2):183-186, 190]

收稿日期: 2008-11-21

基金项目: 河北省科技攻关计划项目(072761130)

作者简介: 成志勇, 博士研究生, 主治医师, 血液肿瘤专业, 现工作单位: 保定市第一医院血液肿瘤内科; * 通讯作者: 潘峻, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: lingpan20002000@yahoo.com.cn

与张力蛋白同源的 10 号染色体缺失的磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten gene, PTEN) 编码的蛋白具有脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶活性, 发挥双重肿瘤抑制功能^[1,2]。研究表明, PTEN 基因在白血病中突变罕见, 但存在不同程度的缺失和低表达, 其通过抑制 PI3K/Akt 通路抑制白血病的进展^[3-5]。细胞周期素 Cyclin D1 是 PTEN 信号传导通路的靶蛋白, PTEN 其主要通过脂质磷酸酶活性负调控 PI3K/Akt 通路, 进而降解 Cyclin D1, 导致细胞周期阻滞于 G₁ 期, 其蛋白磷酸酶活性亦有降低 Cyclin D1 表达的作用^[6]。P27^{Kip1} 属周期素依赖性激酶抑制剂 (cyclin-dependent kinases inhibitors, CDKIs) 家族成员之一, 负调控细胞从 G₁ 期到 S 期的转化^[7-10]。在人慢性粒细胞白血病急变细胞系 K562 细胞中, PTEN、Cyclins、CDKs 和 P27^{Kip1} 都有不同水平的表达^[3]。我们以重组腺病毒介导的野生型 PTEN 基因体外转染 K562 细胞系, 使其高表达后, 观察其对细胞周期表达的调控及诱导凋亡作用, 为基因治疗白血病提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 逆转录反应体系、SYBR Green Real Master Mix(北京天根); PTEN、Cyclin D1、D2、P27^{Kip1} 鼠抗人单克隆抗体 (Santa Cruz)、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(北京鼎国生物)。

1.1.2 重组腺病毒 Ad-PTEN-GFP 和 Ad-GFP 由上海吉凯生物公司合成并鉴定。在人胚肾细胞系 293A 细胞中进行扩增及滴度测定。

1.1.3 细胞系 人胚肾细胞系 293A 细胞用于腺病毒扩增, 用含 100 mL/L 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养, 人慢性粒细胞白血病急变细胞系 K562 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清 RPMI 1640 培养基培养; 均在 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 饱和湿度环境孵育。两种细胞均为本实验室长期保存细胞系。

1.2 方 法

1.2.1 病毒转染及效率的测定 按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 200, 在 100 μL 无血清培养液中加入病毒液后加入 K562 细胞中, 37 °C 体积分数 5% CO₂ 条件下培养 2 h 后加入含 100 mL/L 胎牛血清 RPMI 1640 培养液继续培养。

直接用流式细胞仪检测表达绿色荧光蛋白的细胞比例, 计算转染效率。

1.2.2 细胞生长抑制曲线 (MTT 法) 采用 96 孔板, 取对数生长期细胞每孔接种 5000 个, 分为对照组, 转染 Ad-GFP 组, 转染 Ad-PTEN-GFP 组, 按 MOI 200 转染细胞。于不同时间点每孔加入噻唑兰 (MTT) 溶液, 孵育 4 h 后离心弃之, 另加入二甲基亚砷 (DMSO) 振荡数分钟, 酶标仪检测每孔 A 540 值, 计算不同转染组对 K562 细胞生长抑制率, 绘制生长抑制曲线。

1.2.3 细胞周期检测 收集转染不同时间的细胞, 每组收集 1 × 10⁶ 个, 700 mL/L 乙醇 4 °C 固定过夜; 加入 RNA 酶, 37 °C 水浴消化 15 ~ 30 min 后加入碘化丙啶 (PI), 4 °C 存放 15 min 以上, 流式细胞仪检测, 分析凋亡率及计算不同细胞周期中 (G₀/G₁ 期, S 期, G₂/M 期) 细胞比例。

1.2.4 实时荧光定量 PCR ① 收集不同组 K562 细胞, TRIzol 提取细胞总 RNA, 电泳鉴定 RNA 并定量, 逆转录合成 cDNA。② 实时荧光定量 PCR 反应: SYBR 反应体系共 25 μL。反应条件为 94 °C 5 min, 94 °C 45 s, 60 °C 1 min, 30 个循环, 设空白对照。PCR 反应前 3 ~ 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号, 调节基线至适宜处, 各荧光曲线与基线交叉点的循环数即为 Ct 值。根据 $DC(t) = C(t) - C(\beta\text{-actin})$ 计算检测基因与 $\beta\text{-actin}$ 相对表达量 (数值越大表明所检测基因 mRNA 表达越高), 每组重复 3 次取平均值, PCR 引物序列见表 1。

1.2.5 Western blot 收集不同组细胞, 每组 10⁷ 细胞, 加入 200 μL 预冷的蛋白裂解液, 4 °C 裂解 1 h, 冰浴下超声裂解 15 min。12 000 r/min ($r = 10$ cm) 4 °C 离心 20 min, 取上清用考马斯亮蓝试剂盒测定蛋白浓度, 分装后置 -20 °C 保存。取 80 μg 样品蛋白质加入等体积上样缓冲液, 经 5% 浓缩胶和 100 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳后, 用水浴式电转仪转至硝酸纤维素膜上。经 5 g/L BSA 37 °C 封闭 1 h, 分别加入小鼠抗人单克隆抗体 (Santa Cruz, USA), 4 °C 孵育过夜。TBS 漂洗 5 min × 3 次, 加入山羊抗小鼠 HRP 标记二抗, 37 °C 孵育 1 h, TBS 漂洗 5 min × 3 次。化学发光法检测后分析结果。

1.2.6 统计分析 两样本均数比较采用 *t* 检验。所有数据用 SAS 8.0 统计软件分析处理。检验水准定为 $P < 0.05$ 有统计学意义。

表1 FQPCR 扩增引物序列
Table 1 Primer sequence of FQPCR

Primer	Sequence	Product size(bp)	Accession number
PTEN	F: 5'-ATACCAGGACCAGAGGAAACC-3'	101	000314
	R: 5'-TTGTCAATTATCCGCACGCTC-3'		
CDK4	F: 5'-CGTGCGAGTGTCTAACGG-3'	356	NM_000075
	R: 5'-CGGATCAGTCTTTGGGTC-3'		
CyclinD1	F: 5'-CGATGCCAACCTCCTCAACGAC-3'	143	nm_053056
	R: 5'-CCAGCATCCAGGTGGCGACG-3'		
CyclinD2	F: 5'-GCGGTGCTCCTCAATAG-3'	125	nm_001759
	R: 5'-TGGCATCCTCACAGGTC-3'		
P27 ^{kip1}	F: 5'-ACGTGAGAGTGTCTAACGG-3'	138	nm_004064
	R: 5'-AGTGCTTCTCCAAGTCCC-3'		
β -actin	F: 5'-CTGGCACCACACCTTCTACAAT-3'	382	nm_001101
	R: 5'-AATGTCACGCACGATTTCCCGC-3'		

2 结果

2.1 重组腺病毒的转染效率

当 MOI 为 200 时, 流式细胞仪检测腺病毒感染 K562 细胞效率为 $(81.2 \pm 5.4)\%$, 符合基因治疗对载体的要求。

2.2 细胞生长抑制曲线

MTT 法对未转染组, Ad-GFP 组, Ad-PTEN-GFP 组转染 K562 细胞生长情况进行检测, 在 MOI = 200 转染 K562 细胞后第 4 ~ 7 d 出现区别, 7 d 以后细胞荧光逐渐衰减, 细胞生长抑制逐渐减弱, 在第 5 天细胞生长抑制率最大, 为 35.2%, Ad-GFP 与 Ad-PTEN-GFP 组 A470 值比较有统计学意义 ($t = 19.12, P < 0.001$, 图 1)。

2.3 细胞周期变化

以 MOI = 200 转染 K562 细胞后, 分别于 2、5、7 d 收集各组细胞, 流式细胞仪检测细胞凋亡率

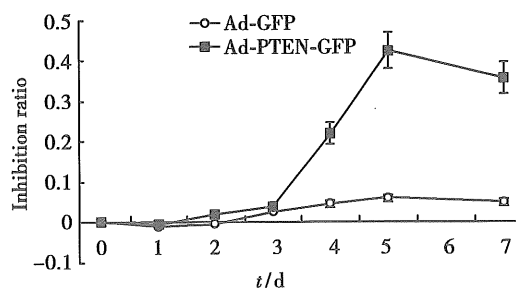


图1 不同转染组 K562 细胞生长抑制曲线图。

Fig.1 Growth inhibiting curve of K562 cells in different transfection groups

及分析处于不同细胞周期的比例。转染 Ad-PTEN-GFP 组与 Ad-GFP 和未转染组相比, 细胞凋亡率最高为 30%, 细胞周期显示 G_0/G_1 期细胞比例由 $(54.9 \pm 2.51)\%$ 增加至 $(78.5 \pm 4.13)\%$ ($t = 6.46, P < 0.01$), G_2/M 期比例由 $(30.2 \pm 1.91)\%$ 降至 $(13.6 \pm 1.02)\%$ ($t = 9.20, P < 0.01$), 处于 G_0/G_1 期细胞比例逐渐增加, 处于 G_2/M 期细胞比例逐渐减少。

2.4 PTEN mRNA 及蛋白和细胞周期相关基因 mRNA 及蛋白检测

应用 FQ-PCR 和 Western blot 分别检测转染后 3d PTEN 基因及蛋白表达水平显示转染 PTEN 后基因及蛋白表达 (与 GAPDH 比值) 水平明显高于 Ad-GFP 组与未转染组。转染后 Ad-PTEN-GFP 组 PTEN mRNA 表达水平 (23.58 ± 4.52) 高于 Ad-GFP 组 $(0.65 \pm 0.32, t = 8.76, P < 0.01)$ 及未转染对照组 $(0.58 \pm 0.23, t = 8.80, P < 0.01)$ 。转染 Ad-PTEN-GFP 组与转染 Ad-GFP 组 PTEN 蛋白水平表达明显增加 ($t = 11.23, P < 0.01$, 图 2)。

转染后 3 d 细胞周期相关基因 mRNA 及蛋白表达水平, 结果显示转染 Ad-PTEN-GFP 组 K562 细胞 Cyclin D1、Cyclin D2、CDK4、P27^{kip1} mRNA 表达水平分别为转染 Ad-GFP 组 K562 细胞表达水平的 0.336 倍 ($t = 6.78, P < 0.01$)、0.415 倍 ($t = 8.510, P < 0.01$)、0.311 倍 ($t = 10.56, P < 0.01$)、6.90 倍 ($t = 13.21, P < 0.01$)。转染 PTEN 基因后 Cyclin D1、Cyclin D2、CDK4 mRNA 表达水平明显降低, 而 P27^{kip1} mRNA 表达升高。转染 Ad-PTEN-GFP 组 K562 细胞 Cyclin D1 与 P27^{kip1} 蛋白表达水平分别为转染 Ad-GFP 组的 0.222 倍 ($t = 12.77, P$

< 0.01)与4.51倍($t = 9.12, P < 0.01$,图2)。由于未转染组与转染 Ad-GFP 组比较,各组均无统计学差异,故数据未列出。

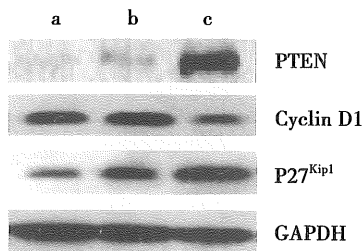


图2 不同组转染组转染 K562 细胞 3d 后 PTEN、Cyclin D1、P27^{Kip1} 蛋白的表达差异

Fig.2 Protein expression levels of PTEN, Cyclin D1, P27^{Kip1} mRNA and in K562 cells in different transfected groups after 3 days

a: untransfected group; b: Ad-GFP group; c: Ad-PTEN-GFP group

3 讨论

PTEN 是磷酸酶家族中发现的首个抑癌基因,具有蛋白磷酸和脂质磷酸酶双重活性,阻断细胞因子介导的信号传导通路,从而抑制肿瘤细胞生长、侵袭、转移,促进肿瘤细胞凋亡^[1,2,11]。在造血系统疾病如白血病、淋巴瘤、骨髓瘤及细胞系中,PTEN 基因及蛋白出现不同程度的低表达或表达缺失,而基因突变、重排少见^[3-5],其低表达与预后不良相关,其表达与否对于区分正常造血干细胞和白血病干细胞具有重要作用^[4]。PTEN 基因的失活主要是间接失活机制如转录沉默、转录后修饰、甲基化等。

K562 细胞系是慢性粒细胞白血病急变细胞系,表达低水平 PTEN mRNA 及蛋白。我们以腺病毒为载体将外源性野生型 PTEN 基因转染 K562 细胞系,当 MOI = 200 时,转染效率在 80% 以上。

通过流式细胞术凋亡检测显示,当 K562 细胞转染 PTEN 后,与对照组比较凋亡率呈时间依赖性增加,转染 5 天后细胞凋亡率可达到 20% 以上,并出现典型的亚二倍体凋亡峰。PTEN 抑制增殖,促进凋亡作用是通过抑制 PI3K/Akt、MAPK 通路,进而抑制 CDK,上调 P27^{Kip1} 和 P53 表达和抑制核转录因子 NF- κ B 从而发挥促凋亡、抑制肿瘤细胞生长增殖的作用^[3,6]。

正常细胞周期的进行依赖于 Cyclins、周期素依赖性激酶、周期素依赖性激酶抑制剂等共同调节。Cyclin D,尤其是 CyclinD1 与细胞增殖周期关

系最为密切。Cyclin D1 蛋白呈周期性改变,通过一系列酶促反应形成 Cyclin D1-CDK4 复合体,使细胞通过 G₁/S 点后进入 S 期。Cyclin D1 高表达,可使 G₁ 期缩短,G/S 调控点失控,细胞异常增殖,导致细胞癌变,发挥癌基因的作用^[12]。抑制其表达,可能有效地抑制恶性肿瘤细胞的生长、增殖,提高肿瘤细胞对放疗、化疗的敏感性。除了在大多实体肿瘤中检测到 Cyclin D1 高表达外,在造血系统肿瘤及细胞系中也存在不同程度的高表达。

P27Kip1 与 Cyclin D1-CDK4 复合体结合,负调控 G1 期到 S 期的转化,从而抑制细胞增殖。在恶性肿瘤中主要表现为 P27 蛋白的减少或缺失,并与肿瘤预后有一定相关性,并且多种化疗药物通过抑制 Cyclin D1,促进 P27^{Kip1} 表达,从而达到有效的化疗效果^[13,14]。

本研究表明 K562 细胞高表达 PTEN 基因后,Cyclin D1、Cyclin D2、CDK4 表达水平不同程度减低,而 P27^{Kip1} 表达水平增高,K562 细胞 S 期及 G₂/M 期细胞比例减少,后者比例由转染前 30.2% 降至转染 7 d 后的 13.6%,G₀/G₁ 期细胞比例由 54.9% 增加至 78.5%,细胞周期重新分布,并且细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。高表达野生型 PTEN 基因后,可能通过下调 K562 细胞系细胞周期蛋白(Cyclin D1 和 Cyclin D2)、CDK4 和上调细胞周期蛋白抑制剂(P27^{Kip1})的表达水平,使细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期,并且抑制了细胞的增殖,促进了细胞凋亡,为进一步研究 PTEN 在白血病中的抑癌作用的分子机制奠定了基础。同时为 PTEN 基因治疗白血病提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Myers MP, Stolarov JP, Eng C, et al. PTEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(17):9052-9057.
- [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] Dahia PL, Aguiar RC, Alberta J, et al. PTEN is inversely correlated with the cell survival factor Akt/PKB and is inactivated via multiple mechanisms in haematological malignancies [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(2):185-193.

(下转第 190 页 to page 190)