

文章编号:10056947(2007)01-0061-04

· 基础研究 ·

# 腺病毒介导野生型 PTEN 基因对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞周期的影响

陈庆永<sup>1</sup>, 陈道达<sup>2</sup>, 蒋春舫<sup>2</sup>, 陈剑英<sup>2</sup>

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 1. 急诊外科 2. 普通外科, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 探讨腺病毒介导野生型 PTEN 基因对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞周期时相的影响。方法 构建含 PTEN 目的基因的腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV-PTEN 与骨架质粒 pAdEasy-1, 将重组腺病毒 pAd-PTEN 制备成纯化高效的含绿色荧光蛋白(GFP)的 PTEN 腺病毒, 体外转染人乳腺癌 MDA-MB-468 后, 检测 PTEN 表达后对乳腺癌 MDA-MB-468 细胞周期的影响。结果 携带 PTEN 基因重组腺病毒载体成功构建, 检测病毒滴度为  $2.5 \times 10^{10}$  pfu/mL。表明重组腺病毒已含有 PTEN 蛋白。流式细胞术显示对照组处于 G<sub>1</sub> 期的细胞占 41.18%, PTEN 蛋白表达后处于 G<sub>1</sub> 期的细胞占 56.47%。结论 利用腺病毒载体系统 AdEasy-1 可快速构建表达 PTEN 基因的腺病毒载体, 可高效制备均一的高滴度重组病毒; 野生型 PTEN 基因转染使乳腺癌细胞周期停滞于 G<sub>1</sub> 期。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(1): 61-64]

**关键词:** 乳腺肿瘤/病理学; 腺病毒科; 基因, PTEN; 细胞周期; 转染

中图分类号: R737.9; R73-3

文献标识码: A

## The effect of adenovirus-mediated wild-type PTEN gene expression on the cell cycle of human breast carcinoma cell line MDA-MB-468

CHEN Qing-yong<sup>1</sup>, CHEN Dao-da<sup>2</sup>, JIANG Chun-fang<sup>2</sup>, CHEN Jian-ying<sup>2</sup>

(1. Department of Emergency Surgery; 2. Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of wild-type PTEN gene mediated by adenovirus vector on the cell cycle of human breast cancer cell line MDA-MB-468 in vitro. **Methods** PTEN gene was cloned into pAdTrack-CMV-PTEN. The newly recombinated pAd-PTEN containing green fluorescent protein (GFP) was infected into human breast cancer cell line MDA-MB-468 in vitro, and the cell cycle was detected by flow cytometric analysis. **Results** The recombinant adenovirus vector carrying PTEN was constructed successfully, and the titre of purified adenovirus was  $2.5 \times 10^{10}$  pfu/mL. Cell number of control group in G<sub>1</sub> phase accounted for 41.18%, while the transfected PTEN gene group was 56.47% of G<sub>1</sub> cell number as measured by flow cytometry. **Conclusions** The recombinant adenovirus vector of PTEN was rapidly constructed successfully using AdEasy-1 system. Target genes were successfully transfected and expressed stably. PTEN may cause cell cycle arrest at the G<sub>1</sub> phase.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(1): 61-64]

**Key words:** Breast Neoplasmas/Pathol; Adenoviridae; Genes, PTEN; Cell Cycle; Transfection

**CLC number:** R735.9; R73-3

**Document code:** A

PTEN 基因定位于染色体 10q, 在多种进展期肿瘤均有突变<sup>[1]</sup>。肿瘤中 PTEN 基因突变导致其

磷酸酶活性剧降, 肿瘤细胞恶性增殖能力增强, PTEN 特异性使磷酸酰肌醇 3, 4, 5 三磷酸去磷酸化, 拮抗 PI3K/AKT 信号通路, 具有调节细胞生长、增殖、迁移等多种功能。本研究构建了携带人抑癌基因 PTEN 的重组腺病毒载体, 将含有人 PTEN cDNA 转染人乳腺癌细胞系 MDA-MB-468, 观察野生型 PTEN 基因的表达对人乳腺癌细胞周期时相的影响, 报告如下。

收稿日期: 2006-05-31; 修订日期: 2006-10-20。

作者简介: 陈庆永, 男, 湖北广水市人, 华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师, 主要从事乳腺癌基础方面的研究。

通讯作者: 蒋春舫 E-mail: jiangcfun@126.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

腺病毒载体 AdEasy 系统由 Johns Hopkins 肿瘤中心的 Tong-chuan He 博士惠赠;其中骨架质粒 pAdEasy-1(氨苄青霉素抗性)为缺失 E1 区和 E3 区的 5 型野生型腺病毒基因组质粒,穿梭质粒 pAdTrack-CMV(卡那霉素抗性)带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因。质粒 pcDNA3-PTEN 由德国 Kaz 博士惠赠;它含有约 1.2kb 的抑癌基因 PTEN cDNA 开放阅读框,其酶切位点在限制性内切酶 HindIII 和 XbaI 之间。DH5 $\alpha$  和 JM109 菌株由同济医学院分子生物学实验室赠送。293 细胞株购于中科院上海细胞所。MDA-MB-468 乳腺癌细胞系由上海肿瘤医院邵志敏教授惠赠。限制性内切酶 HindIII 和 XbaI 及 T4 连接酶购于 TaKaRa 公司。稀有的限制性内切酶 PmeI 和 PacI 购于 New England Biolabs 公司。脂质体 lipofectamine 2000、胎牛血清为 Gibco 公司产品。电转仪为 Eppendorf 公司 Electroporator 2510 型。

### 1.2 重组腺病毒载体的构建

用 Hind III + XbaI 分别双酶切 pAdTrack-CMV 和 pcDNA3-PTEN;电泳后用 Glassmilk 法分别回收 PTEN cDNA 片断(约 1.2kb)及 pAdTrack-CMV 载体片断;用 T4DNA 连接酶将两者连接,然后转化大肠杆菌 JM109;挑选转化菌落;小量快速提取质粒,双酶切鉴定穿梭质粒 pAdTrack-CMV-PTEN。

pAdTrack-CMV-PTEN 经 PmeI 酶切线性化后,与 pAdEasy-1 混合,转化电穿孔制备的感受态细菌 BJ5183(25  $\mu$ F, 200 欧, 1.5kV)。挑选阳性克隆,酶切鉴定,获重组腺病毒载体,命名为 pAd-PTEN。

### 1.3 转染 293 细胞和重组腺病毒液(Ad-PTEN)的制备

293 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养。于转染前将 pAd-PTEN 经 PacI 酶切线性化后,按脂质体 lipofectamine 2000 转染试剂说明书转染。通过荧光显微镜直接观察转基因细胞 GFP 表达;待贴壁细胞变圆、脱落后,收集培养上清及细胞,于 37 $^{\circ}$ C / -70 $^{\circ}$ C 条件下反复冻融 4 次,离心取含病毒的上清液,倍比稀释病毒上清。

以感染细胞 GFP 阳性数目计算病毒滴度,重新感染 293 细胞进行病毒的大量扩增。重组腺病毒大量繁殖后用氯化铯(CsCl)密度梯度超离心法制备纯化的重组腺病毒。

### 1.4 病毒感染效率的测定

按  $2 \times 10^6$  细胞/孔的量将体外培养扩增的 MDA-MB-468 乳腺癌细胞接种于 6 孔板。待细胞约 80% ~ 90% 汇合时,用 pAd-PTEN 的病毒上清感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10, 50, 80, 100 感染 MDA-MB-468 乳腺癌细胞系, 24h 在荧光显微镜下计数 GFP 阳性率。

### 1.5 基因转染

MDA-MB-468 乳腺癌细胞以  $1 \times 10^3$  接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24h;用 MOI 为 100 的感染强度分别加入重组腺病毒 pAd-PTEN。24h 后在荧光显微镜下可见转染 PTEN 基因的乳腺癌细胞出现绿色荧光,而未转染 PTEN 基因的乳腺癌细胞则未见荧光。

### 1.6 转 PTEN 基因 MDA-MB-468 乳腺癌细胞基因组免疫印迹分析

MDA-MB-468 乳腺癌细胞经 Ad-PTEN 载体感染 24h 后(MOI = 100pfu),细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗两遍后,收集细胞于溶解缓冲液中。在细胞破裂匀浆化,用 10 000r/min 离心 30 min,病毒上清用 8% SDS-PAGE 分离蛋白质,行免疫印迹分析。PAGE 电泳和转膜后,5% 脱脂奶粉封闭蛋白印迹膜 2 h,加 PTEN 羊抗人多克隆抗体(1: 1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜,二抗用猴抗羊辣根过氧化物酶抗体 IgG。

### 1.7 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期

用 0.25% 的胰酶消化收获培养的未转染组 MDA-MB-468 细胞(未转染对照组, A 组)和 Ad-GFP 转染(空载体转染对照组, B 组)及 Ad-PTEN 载体感染 24h 后的 MDA-MB-468 细胞(实验组, C 组), 800r/min 离心 5 ~ 8 min 使细胞沉淀;再用冷的 PBS 500  $\mu$ L 洗涤细胞 2 次, 800 r/min 离心 5 min;然后用 70% 冷乙醇/PBS 溶液重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。再加入 500  $\mu$ L 含 1mg/mL RNA 酶的 PBS 溶液, 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 加入 1mL 碘化丙啶(PI)(PI 的终浓度为 50  $\mu$ g/mL)染色 30 min, 用 FCM 方法检测转染前后细胞周期的变化。

## 2 结果

### 2.1 含 PTEN 腺病毒载体的构建

目的基因首先亚克隆至穿梭质粒中,构建成穿梭质粒 pAdTrack-CMV-PTEN, pAdTrack-CMV-PTEN 经酶切线性化后与骨架载体 pAdEasy-1 在细菌内重组为 pAd-PTEN;经 293 细胞包装为增殖缺陷性腺病毒 Ad-PTEN。pAdTrack-CMV-PTEN 及 pAd-PTEN 的酶切鉴定均与预期结果相符(图 1)。

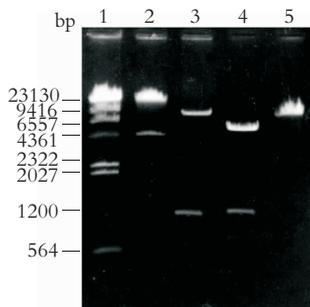


图 1 重组腺病毒载体 pAd-PTEN 的限制性内切酶图谱 1: DNA marker  $\lambda$ -DNA/HindIII; 2: pAd-PTEN (PacI); 3: pAdTrack-CMV-PTEN (HindIII + Xba I); 4: pcDNA3-PTEN (HindIII + Xba I); 5: pAdTrack-CMV (HindIII + Xba I)

### 2.2 重组腺病毒的包装

pAd-PTEN 以 PacI 酶切后,经 lipofectamine 脂质体转染 293 细胞,24h 出现绿色荧光,逐渐增强,呈集落状。待细胞膜收缩、变圆,最后细胞脱落、漂浮时,收集 293 细胞。反复冻融 4 次收集病毒,在 293 细胞内扩增。根据 GFP 计数法测得的腺病毒滴度为  $2.5 \times 10^{10}$  pfu/mL。

### 2.3 重组腺病毒感染效率

用该重组腺病毒通过不同 MOI 感染乳腺癌细胞,当 MOI = 50,结果约 70% 的乳腺癌细胞出现荧光,示有病毒感染。表明该重组腺病毒的生物活性高,适用于基因转运载体。

### 2.4 转染 PTEN 基因细胞的荧光显微镜表现

结果显示,转染 PTEN 腺病毒的 MDA-MB-468 细胞(C 组)在荧光显微镜下可见明显绿色荧光,而亲本细胞(A 组)中及空载体转染 PTEN 基因(B 组)的乳腺癌细胞则未见明显绿色荧光(图 2)。

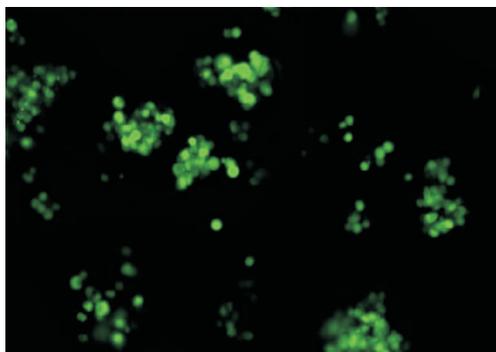


图 2 Ad-PTEN 感染 MDA-MB-468 细胞(C 组)24h 后出现的绿色荧光( $\times 100$ )

### 2.5 Western blot 检测的条带

Ad-PTEN 腺病毒感染的乳腺癌细胞(C 组)总蛋白中,出现一条分子质量约为 55kDa 的条带。证明 C 组有 PTEN 蛋白表达,而 A 组和 B 组均无表达(图 3)。

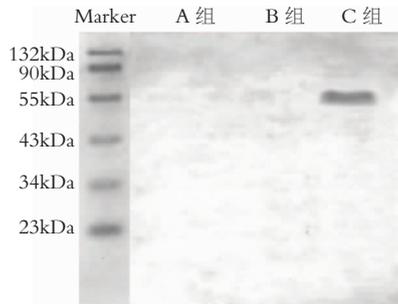


图 3 Western blot 检测 PTEN 蛋白的表达

### 2.6 流式细胞仪所示细胞周期的变化

A 组处于  $G_1$  期的细胞占 41.18%,C 组感染 24h 后的 MDA-MB-468 细胞处于  $G_1$  期的细胞占 56.47%,S 期细胞减少 9.85%。流式细胞仪检测表明,C 组感染 24h 后的乳腺癌  $G_1$  期细胞数量增加,S 期细胞减少;细胞周期从  $G_1$  期至 S 期发生抑制。统计学数据表明,C 组感染 24h 后的乳腺癌  $G_1$  期的细胞百分数与 A 组有显著性差异( $\chi^2 = 4.68, P < 0.05$ )。表明恢复野生型 PTEN 基因的表达可使 MDA-MB-468 细胞周期停滞于  $G_1$  期(图 4)(附表)。

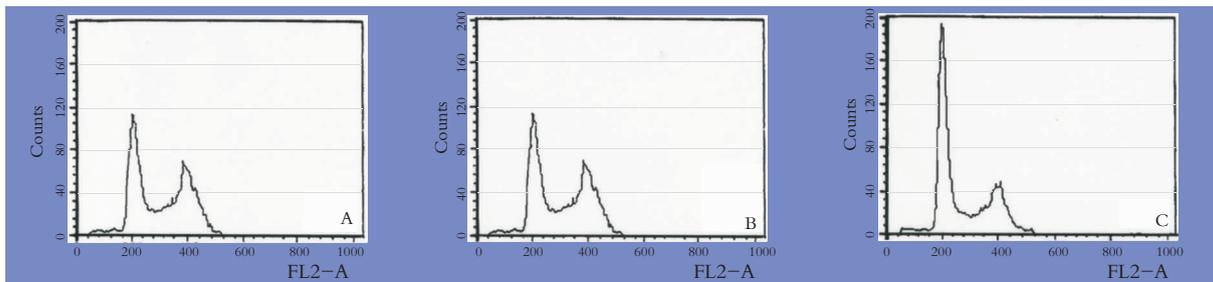


图 4 流式细胞仪检测重组腺病毒感染乳腺癌 MDA-MB-468 细胞 24h 后的细胞周期变化

附表 恢复野生型 PTEN 基因表达对乳腺癌 MDA-MD-468 细胞周期的影响

按细胞株分组	G0/G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G2/M (%)
未转染(A组)	41.18	34.56	24.67
Ad-GFP 转染(B组)	43.82	31.43	25.16
Ad-PTEN 转染(C组)	56.47	24.71	19.25

### 3 讨论

PTEN 基因是继 p53 基因之后,与各种肿瘤关系密切的抑癌基因之一,PTEN 突变可能是通过 PI3K-AKT-mTOR 信号通路<sup>[2-4]</sup>抑制细胞凋亡。近来有研究<sup>[5-6]</sup>表明,在胆系恶性肿瘤中 p16 和 PTEN 基因均存在缺失,对细胞周期均失去调控,从而促进肿瘤生长。Tsutsui 等<sup>[7]</sup>发现在乳腺浸润性导管癌中约有 29% (65/228) PTEN 蛋白失表达,且其失表达与下游细胞周期抑制剂 p27Kipl (p27) 蛋白失表达密切相关。提示 PTEN 和 p27 蛋白失表达与乳腺癌的恶性表型相关。Chung 等<sup>[8]</sup>发现,胞核/胞浆 PTEN 成分的区别,使其定位不同而起调节细胞周期或细胞凋亡的作用。胞浆 PTEN 下调蛋白激酶 B (Akt) 的磷酸化,上调 p27 (kipl),其对细胞凋亡是必要的。然而胞核 PTEN 可下调细胞周期素 D1 (cyclin D1),防止丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 磷酸化,此系细胞周期所必需。提示 PTEN 基因缺失可能是乳腺癌基因治疗的一个潜在靶点。

本实验选择由 Tong-Chuan He 博士等构建的用来代替传统腺病毒重组系统的一个快捷系统—AdEasyTM 系统来实施外源基因的表达<sup>[9]</sup>。这种方法的基本策略是在大肠杆菌内通过同源重组的方法构建重组腺病毒质粒载体,经酶切线性化后再转染腺病毒包装细胞系,从而获得腺病毒感染颗粒。由于带有 GFP 报告基因,通过荧光显微镜下观察荧光,可以了解制备的 PTEN 腺病毒的纯度及观察基因转导感染效率及测定病毒滴度,笔者应用 Ad-PTEN 转染乳腺癌细胞,有

70% 以上的细胞表达 GFP。

本研究采用携带 PTEN 的重组缺陷性腺病毒 Ad-PTEN 感染人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468,效率达 70%。免疫印迹检测表明重组缺陷性腺病毒已含有 PTEN 蛋白,说明野生型 PTEN 基因可有效表达。且流式细胞仪检测显示,恢复野生型 PTEN 基因表达可使乳腺癌 MDA-MB-468 细胞周期从 G<sub>1</sub> 期到 S 期发生抑制。

#### 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] Panigrahi AR, Pinder SE, Chan SY, *et al.* The role of PTEN and its signaling pathways, including AKT in breast cancer, an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome[J]. *J Pathol*, 2004, 204(1): 93 - 100.
- [3] 刘民锋,徐立宁,左石,等. 体外转染 PTEN 抑制胆管癌 QBC939 细胞生长及下调 mTOR 表达的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(3): 181 - 184.
- [4] 刘民锋,罗剑,余险峰,等. PTEN 和 mTOR 信号转导通路在胆管癌发展中作用的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(4): 274 - 276.
- [5] 谷化平,尚培中,周翠玲. 胆管癌中 PTEN 和 p16 抑癌基因蛋白的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2): 101 - 103.
- [6] 崔平,普苹,赵晓霞,等. 胆系恶性肿瘤 p16, PTEN 和 nm23 基因的表达及其临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(3): 195 - 197.
- [7] Tsutsui S, Inoue H, Yasuda K, *et al.* Inactivation of PTEN is associated with a low p27kipl protein expression in breast carcinoma [J]. *Cancer*, 2005, 104(10): 2048 - 2053.
- [8] Chung JH, Eng L. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) differentially regulates the cell cycle and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(18): 8096 - 8100.
- [9] He TC, Zhou S, Da Costa LT, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenovirus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2509 - 2514.