

p53 基因与 PTEN 基因共转染对膀胱癌 T24 细胞凋亡的影响

于立春, 盛玉文, 曲更庆, 王庆军, 孙世宝

辽宁医学院附属第一医院 泌尿外科, 辽宁锦州 121001

摘要: **目的** 探讨抑癌基因 p53 和 PTEN 基因共转染膀胱肿瘤 T24 细胞后对其凋亡的影响。**方法** 将 p53、PTEN 基因以及 p53 联合 PTEN 基因分别转染到 T24 细胞; 目的基因的表达采用 RT-PCR 法检测; 细胞的生长抑制作用通过细胞集落形成实验进行测定; Western blotting 法检测蛋白表达; AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术检测 p53 基因和 PTEN 基因对 T24 凋亡的影响。**结果** 荧光显微镜下观察到 p53、PTEN 及两个基因同时在 T24 细胞系中成功表达; T24 细胞的集落数量及大小均有不同程度的降低, 以共转染组降低最为明显 ($P < 0.05$), Western blotting 法检测共转染组蛋白表达水平明显高于 PTEN 组或 p53 组 ($P < 0.05$); 共转染组凋亡率明显高于 p53 基因单转染组、PTEN 基因单转染组以及空载体转染组 ($P < 0.05$)。**结论** p53 和 PTEN 基因均能诱导膀胱癌 T24 细胞的凋亡, 且这两个基因具有协同作用。

关键词: 膀胱肿瘤; 基因, p53; PTEN; 转染; 细胞凋亡

中图分类号: R 737.14 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2013)08-0886-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2013.08.031

近年研究发现, 在多形性神经胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、原发性前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌等人类肿瘤中, 张力蛋白同源物 (phosphatase and tension homologue deleted on chromosome 10, PTEN) 发生了不同程度的缺失和突变^[1]。在各型白血病细胞中也发现 PTEN 有不同程度的突变和缺失^[2]。目前人类最重要的抑癌基因是 p53, 在人类一半以上的肿瘤组织中发现了 p53 基因的突变^[3]。p53 介导的细胞信号转导途径与细胞内其他信号转导通路间的联系十分复杂, 近年研究发现, p53 和 PTEN 在前列腺癌、子宫内膜癌存在相互关联的作用^[4]。本研究旨在探讨共转染野生型 p53 基因和 PTEN 基因对膀胱癌 T24 细胞凋亡的影响。

材料和方法

1 细胞和试剂 人膀胱肿瘤 T24 细胞株 (中国科学院上海分院); 小牛血清 (Hyclone 公司); 抗生素潮霉素 B (hygro-mycin B)、LipofectAMINETM2000、携带野生型 p53 基因、PTEN 基因、重组质粒 pVITR02-hp53、pVITR02-hPTEN 和 pVITR02-hp53-hPTEN 的大肠埃希菌 (Takara 公司); RNA 提取试剂盒、TRIzol 溶液以及 RPMI 1640 培养液 (美国 Gibco 公司); 质粒抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司); 反转录试剂盒 (美国 Promega 公司); 鼠抗人

PTEN、鼠抗人 p53 单克隆抗体 (SANTA CRUZ 公司)。引物合成和 DNA 测序由武汉英骐生物技术有限公司完成。

2 细胞培养和基因转染 T24 细胞用含 10% 胎牛血清、RPMI 1640 培养液 (加双抗), 置于培养箱中培养 (37 °C、CO₂ 体积分数为 5%), 每 2~3 d 换液 1 次, 待细胞长满培养瓶底部 80% 左右时进行传代, 待传至 5~6 代, 取对数生长期细胞进行实验。按产品说明书操作方法进行细胞转染: 将携带有重组质粒的大肠埃希菌进行扩增和培养, 并提取质粒; 实验分空白质粒 (pVITR02) 转染组 (A 组)、携带 p53 基因质粒 (pVITR02-hp53) 转染组 (B 组)、携带 PTEN 基因质粒 (pVITR02-hPTEN) 转染组 (C 组)、联合携带 p53-PTEN 基因质粒 (pVITR02-hp53-hPTEN) 转染组 (D 组), 每实验组各取 4 μg 质粒, 分别放入 10 μl 的 LipofectAMINETM 2000 中充分混匀, 待静置 20 min 分别加入 1 × 10⁶ 个 T24 细胞中, 于 6 孔板中培养, 待 24 h 后可按 1 : 10 进行传代, 待 36 h 后加入浓度为 200 μg/ml 潮霉素 B 进行筛选, 筛选后继续培养扩增^[5]。

3 RT-PCR 法检测目的基因的表达 抽提总的 RNA: 经过筛选获得的转染细胞用 0.25% 胰酶消化后, 收集细胞, 洗涤细胞 (用 PBS 液) 2 次, 加入 TRIzol 溶液 1 ml, 吹打、振荡 10 min, 最后加入氯仿 0.2 ml, 在 2~8 °C 条件下离心 5 min (12 000 × g), 收集上清, 加入异丙醇沉淀 RNA 0.5 ml, 最后溶于双蒸水中 (用焦碳酸二乙酯处理后)。取总 RNA 1 μg, 溶于 20 μl 反应体系中, 加入随机引物 500 ng, RNAsin 20 U 和 Mo-MLV 反转录酶 200 U, 70 °C 条件

收稿日期: 2012-12-10

作者简介: 于立春, 男, 在读硕士。研究方向: 膀胱肿瘤。Email: yzsl13@163.com

通信作者: 盛玉文, 男, 教授, 硕士生导师, 副主任。Email: Syw9818@163.com

下反应 10 min, 40 °C 条件下静置 2 h, 在 -20 °C 保存 cDNA 产物以备用。用参考文献 [6] 提供的方法进行 p53 基因引物设计, 5'-CAGCCAAGTCTGTGACTTCCG-TAC-3' 为上游引物, 5'-CTATGTCGAAAAGTGTITCTGTCATC-3' 为下游引物。扩增条件: 94 °C (预变性) 3 min, 94 °C (变性) 30 s, 56 °C (退火) 30 s, 72 °C (延伸) 30 s, 共 30 个循环。参照 GenBank 提供的 PTEN 基因序列, 5'-CAGCCAAGTCTGTGACTTCCG-TAC-3' 为上游引物, 5'-CCGCTCGAGCAGTCGCTGCAACCATCCA-3' 为下游引物, 扩增条件: 94 °C (预变性) 5 min, 94 °C (变性) 30 s, 60 °C (退火) 30 s, 72 °C (延伸) 1 min, 循环 30 次。待目的片段的扩增体系达到总体积为 25 μ l 时, 加入 Taq 酶 1.0 U、引物 82.5 ng 和 cDNA 2 μ l。取 10 μ l 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色后, 观察电泳结果 (在紫外灯下), 摄片记录。在荧光显微镜下观察各组 (空载体组、p53 基因转染组、PTEN 基因转染组和 p53 基因联合 PTEN 基因共转染组) 绿色荧光蛋白在细胞内的表达情况。

4 细胞集落形成实验 将处于对数生长期的 4 组 T24 细胞 (转染后) 即 A 组、B 组、C 组和 D 组, 接种于 24 孔板中 (按照每孔 300 个/ml 的细胞密度), 每组设 5 个平行孔。培养 7 d (在 37 °C、CO₂ 体积分数为 5% 的饱和湿度环境), 弃去上清液, 洗涤细胞 2 次 (用 PBS), 加入甲醇溶液 5 ml 固定 15 min 后, 再加入吉姆萨染色液 200 μ l 染色细胞 20 min, 用流水冲洗去除染色液, 待干燥后, 计数 > 1 mm 视野的集落数目 (在光学显微镜下进行)。

5 Western blotting 检测 p53、PTEN 蛋白表达 分别收集 4 组细胞, 提取每组细胞的蛋白, 以牛血清蛋白为标准品, 测定四组及标准品的蛋白含量。用质量分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离, 然后转至硝酸纤维膜 (或 PVDF 膜) 上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 并洗膜, 加入按 1 : 500 倍稀释的鼠抗人 PTEN 单克隆抗体, 在 4 °C 条件下过夜。洗膜后加入二抗 (用辣根过氧化物酶标记), 作用 1 h (室温), 洗膜后用 ECL 显色, 并在暗室曝光, 用显影定影后扫描分析, 用蛋白表达强度表示其结果。

6 Annexin V-FITC V/PI 双染法检测细胞凋亡率 分别取 4 组处于对数生长期的 T24 细胞, 分别进行消化、离心, 并收集制成细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^6 /ml, 取细胞悬液 100 μ l, 分别加入用 FITC 标记的 Annexin V 5 ml 和碘化丙啉

(propidium iodide, PI) 5 ml, 及时用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

7 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析法, 两两比较用 *q* 检验, 方差不齐用 Dunnett-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 基因转染后 p53 和 PTEN mRNA 的表达 RT-PCR 检测结果显示, B 组和 C 组中分别有 p53 和 PTEN mRNA 的表达, D 组中 p53 和 PTEN mRNA 同时存在。见图 1。

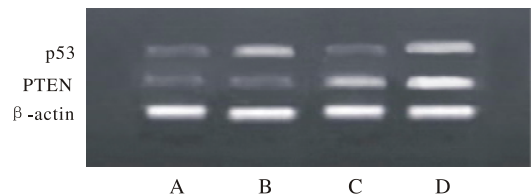


图 1 RT-PCR 检测 p53 和 PTEN mRNA 在 T24 细胞中的表达

A: 实验空白质粒 (pVITR02) 转染组; B: 携带 p53 基因质粒 (pVITR02-hp53) 转染组; C: 携带 PTEN 基因质粒 (pVITR02-hPTEN) 转染组; D: 联合携带 p53-PTEN 基因质粒 (pVITR02-hp53-hPTEN) 转染组

2 荧光显微镜下重组质粒的表达 在荧光显微镜下观察转染后的 B、C、D 组细胞 (在转染后 48 h 效果最好), 可见绿色荧光主要集中在细胞质中, 即绿色荧光蛋白表达成功 (图 2)。A 组未见荧光蛋白表达, B、C、D 组细胞的荧光蛋白表达无明显差别。见图 2。

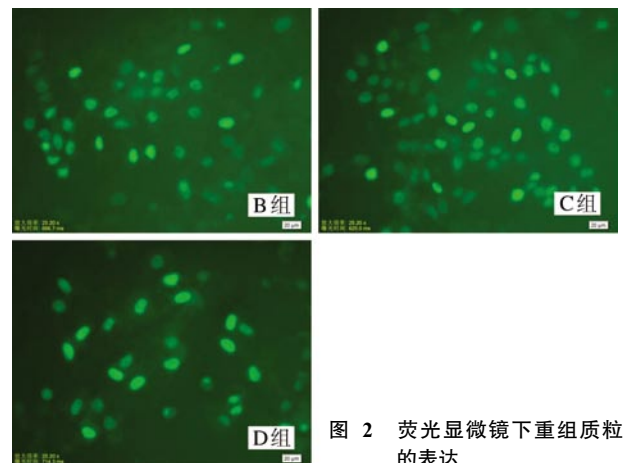


图 2 荧光显微镜下重组质粒的表达

3 细胞集落形成实验 p53 和 (或) PTEN 经过 B 组、C 组以及 D 组共转染后, 集落数在各组 T24 细胞中均有减少, B 组、C 组和 D 组与 A 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

4 T24 细胞中 p53、PTEN 蛋白的表达 Western blotting 检测发现图 3 中 p53 蛋白表达提示 B、D

组与 C、A 组相比明显增加 (图 3)($P < 0.05$), 且 D 组高于 B 组 ($P < 0.05$)。PTEN 蛋白的表达, C、D 组与 B、A 组相比明显增加 (图 4)($P < 0.05$), 且 D 组高于 C 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

5 Annexin V-FITC V/PI 双染法检测细胞凋亡率
Annexin V-FITC V/PI 双染法检测结果显示: B 组、C 组和 D 组明显高于 A 组 ($P < 0.05$), 且 D 组明显高于 B 组和 C 组 ($P < 0.05$) 见图 5、表 3。

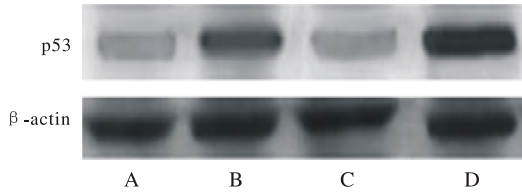


图 3 Western blotting 检测 p53 基因蛋白表达情况

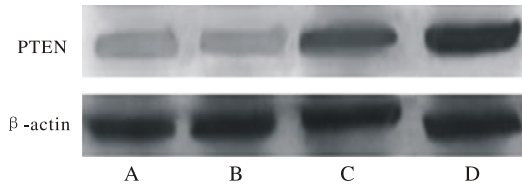


图 4 Western blotting 检测 PTEN 基因蛋白表达情况

表 1 p53 和 PTEN 基因转染对 T24 细胞集落形成数的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	集落数
A	70.6 ± 3.2
B	32.3 ± 4.1 ^a
C	24.7 ± 4.2 ^a
D	18.8 ± 1.9 ^{ab}

^a $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^b $P < 0.05$, 与 B 组或 C 组比较

表 2 不同组别中 p53、PTEN 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	p53	PTEN
A	0.62 ± 0.08	0.62 ± 0.11
B	0.98 ± 0.05 ^a	0.60 ± 0.09 ^c
C	0.63 ± 0.09	1.07 ± 0.02
D	1.37 ± 0.04 ^{ab}	1.38 ± 0.04 ^{cd}

^a $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^b $P < 0.05$, 与 C 组比较; ^c $P < 0.05$, 与 B 组比较; ^d $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^e $P < 0.05$, 与 B 组比较; ^f $P < 0.05$, 与 C 组比较

表 3 p53 和 PTEN 基因转染对 T24 细胞凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	凋亡率
A	0.751 ± 0.039
B	20.137 ± 0.263 ^a
C	25.261 ± 0.286 ^a
D	35.222 ± 0.328 ^{ab}

^a $P < 0.05$, 与 A 组比较; ^b $P < 0.05$, 与 C 组和 D 组比较

讨论

基因治疗已经成为肿瘤治疗的新探索。其中抑癌基因治疗是肿瘤基因治疗的方法之一, 在正常细胞中抑癌基因失活、突变和 (或) 癌基因的过度激活等都有可能引起肿瘤的发生, 基于这一点将正常功能的野生型抑癌基因转染到肿瘤细胞中, 并在肿瘤细胞表达, 恢复细胞正常的生长表型, 从而达到抑制肿瘤的作用。人类 p53 基因是由 11 个外显子和 10 个内含子组成, 位于 17p13.1, 长度约 20 kb, 是目前研究最广泛和最深入的一种抑癌基因, 具有多种生物学功能: 能够阻滞细胞有丝分裂的周期; 其蛋白的表达能够抑制肿瘤血管的形成; 能够促进细胞的凋亡^[7-9]。PTEN 基因有 9 个外显子和 8 个内含子, 位于 10q23.3, 由 200 kb 组成, 是到目前为止发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因^[10]。PTEN 编码的是一种多功能蛋白质, 同时具有蛋白磷酸酶活性和脂质磷酸酶活性, 通过干扰 PI3K/AKT 的信号传导, 使细胞在细胞周期 G 期受到阻滞^[11]。其生物学功能主要是: 使细胞迁移、铺展、局部黏附和增殖受到抑制; 当其等位基因丢失时会引起皮肤、胃肠道、前列腺的肿瘤, 这与 PTEN 基因参与胚胎的正常发育有关, 最近研究发现 PTEN 基因的异常表达可能会导致白血病的发生; PTEN 蛋白表达能抑制肿瘤血管形成^[12]。在人类自发肿瘤和遗传病中, p53 与 PTEN 有较高的突变率, 但两种基因同时发生突变的发生率较小^[13-15]。在制作鼠的前列腺癌实验中得出这样的结论: p53 与 PTEN 在抑制肿瘤发生发展方面存在

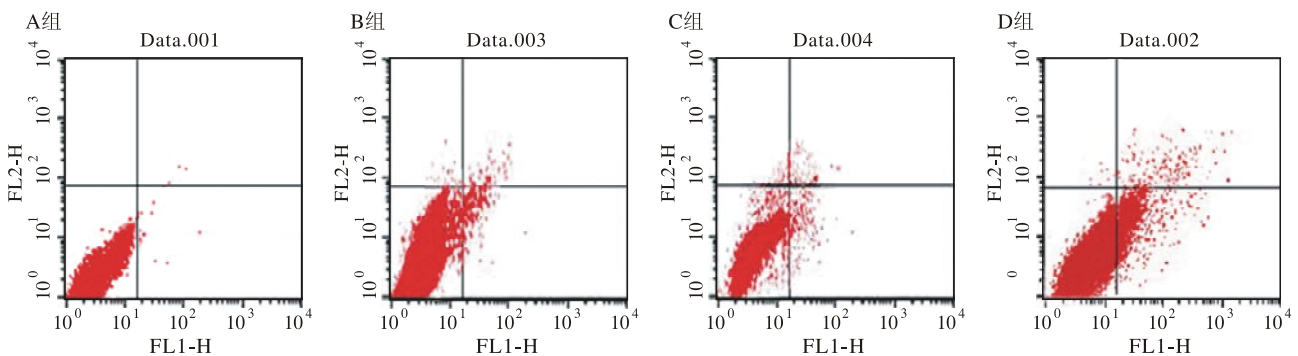


图 5 p53 和 PTEN 基因转染对 T24 细胞凋亡率的影响

互补作用,这种相互作用具有深刻的分子机制^[16]。

Ogawara 等^[17]研究发现,PTEN 使 AKT 的活化受到抑制,从而 MDM2 蛋白 Ser166 不能被磷酸化活化,随后在细胞质中被降解,抑制肿瘤的发生。Chang 等^[18]研究发现,PTEN 通过作用于启动子 MDM2 从而导致 MDM2 基因转录被抑制,MDM2 活性受到抑制,增强了抑瘤功能。在我们检测细胞凋亡率时也发现:p53 基因联合 PTEN 基因共转染组细胞的凋亡率明显高于空载体组和两个单染组。

Tang 和 Eng^[19]研究发现,PTEN 和 p53 形成的复合物可以增强 p53 转录及其蛋白的稳定性^[19-22]。这和 Freeman 等^[20]研究发现类似,当 PTEN 和 p53 结合后,从而稳定了 P53 蛋白;也使 p53 的 DNA 结合能力增强,相应的 p53 的转录活性也增强。本实验的 Western blotting 检测发现共转染组(pVITR02-hp53-hPTEN 转染组)蛋白表达强度明显增强于单转组(pVITR02-hp53、pVITR02-hPTEN)和空转染组,这与两者的相互作用和维持正常细胞基因组的稳定性、凋亡功能和正常细胞周期有关。Wang 等^[23]研究发现,当敲除 p53 基因时,磷酸化 PTEN 蛋白表达水平明显降低,p53 可以激活 PTEN 转录,通过直接结合 PTEN 上游序列,抑制了细胞 PI3K-Akt 信号传导。这点我们用 Western blotting 检测可以得到证实,即共转染组蛋白表达显著高于单用 PTEN 组。

本研究结果显示,p53 和 PTEN 基因均可诱导膀胱癌细胞 T24 的凋亡,共转染组较单基因转染组可更显著地诱导细胞凋亡。说明这 2 种基因在膀胱癌细胞 T24 细胞凋亡方面具有协同增强作用,其作用机制可能与 2 种基因在细胞周期监控和细胞凋亡上相互调节相互协同等方面有着重要作用。这种相互作用对细胞周期和凋亡产生较大影响。

参考文献

- O'Hara AJ, Bell DW. The genomics and genetics of endometrial cancer [J]. *Adv Genomics Genet*, 2012, 2012 (2): 33-47.
- Magee JA, Ikenoue T, Nakada D, et al. Temporal changes in PTEN and mTORC2 regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and leukemia suppression [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11 (3): 415-428.
- Ishikawa T, Shimizu D, Yamada A, et al. Impacts and predictors of cytotoxic anticancer agents in different breast Cancer subtypes [J]. *Oncol Res*, 2012, 20 (2-3): 71-79.
- Ghiță C, Vîlcea ID, Dumitrescu M, et al. The prognostic value of the immunohistochemical aspects of tumor suppressor genes p53, bcl-2, PTEN and nuclear proliferative antigen Ki-67 in resected colorectal carcinoma [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2012, 53 (3): 549-556.
- Yang JY, Li X, Gao L, et al. Co-transfection of dendritic cells with AFP and IL-2 genes enhances the induction of tumor antigen-specific antitumor immunity [J]. *Exp Ther Med*, 2012, 4 (4): 655-660.
- Baronio R, Danziger SA, Hall LV, et al. All-codon scanning identifies p53 Cancer rescue mutations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38 (20): 7079-7088.
- Ogata DC, Marcondes CA, Tuon FF, et al. Superficial papillary urothelial neoplasms of the bladder (PTA E PT1): correlation of expression of P53, Ki-67 and CK20 with histologic grade, recurrence and tumor progression [J]. *Rev Col Bras Cir*, 2012, 39 (5): 394-400.
- Saxena A, Shukla SK, Prasad KN, et al. Analysis of p53, K-ras gene mutation & Helicobacter pylori infection in patients with gastric Cancer & peptic ulcer disease at a tertiary care hospital in North India [J]. *Indian J Med Res*, 2012, 136 (4): 664-670.
- Sosin AM, Burger AM, Siddiqi A, et al. HDM2 antagonist MI-219 (spiro-oxindole), but not Nutlin-3 (cis-imidazole), regulates p53 through enhanced HDM2 autoubiquitination and degradation in human malignant B-cell lymphomas [J]. *J Hematol Oncol*, 2012, 5: 57.
- Yoshimoto M, Ding K, Sweet JM, et al. PTEN losses exhibit heterogeneity in multifocal prostatic adenocarcinoma and are associated with higher Gleason grade [J]. *Mod Pathol*, 2013, 26 (3): 435-447.
- Slomovitz BM, Coleman RL. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial Cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (21): 5856-5864.
- Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, et al. PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis [J]. *Adv Hematol*, 2012: 843085.
- Napoli E, Ross-Inta C, Wong S, et al. Mitochondrial dysfunction in Pten haplo-insufficient mice with social deficits and repetitive behavior: interplay between Pten and p53 [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (8): e42504.
- Habib SL, Yadav A, Mahimainathan L, et al. Regulation of PI 3-K, PTEN, p53, and mTOR in malignant and benign tumors deficient in tuberlin [J]. *Genes Cancer*, 2011, 2 (11): 1051-1060.
- Fornari F, Milazzo M, Chieco P, et al. In hepatocellular carcinoma miR-519d is up-regulated by p53 and DNA hypomethylation and targets CDKN1A/p21, PTEN, AKT3 and TIMP2 [J]. *J Pathol*, 2012, 227 (3): 275-285.
- Antico Arciuch VG, Russo MA, Dima M, et al. Thyrocyte-specific inactivation of p53 and Pten results in anaplastic thyroid carcinomas faithfully recapitulating human tumors [J]. *Oncotarget*, 2011, 2 (12): 1109-1126.
- Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, et al. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (24): 21843-21850.
- Chang CJ, Freeman DJ, Wu H. PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (28): 29841-29848.
- Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner [J]. *Cancer Res*, 2006, 66 (2): 736-742.
- Freeman DJ, Li AG, Wei G, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms [J]. *Cancer Cell*, 2003, 3 (2): 117-130.
- Ming M, He YY. PTEN in DNA damage repair [J]. *Cancer Lett*, 2012, 319 (2): 125-129.
- Wysham WZ, Mhawech-Fauceglia P, Li H, et al. BRCAness profile of sporadic ovarian cancer predicts disease recurrence [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (1): e30042.
- Wang J, Ouyang W, Li J, et al. Loss of tumor suppressor p53 decreases PTEN expression and enhances signaling pathways leading to activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB induced by UV radiation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (15): 6601-6611.