

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00888

PTEN 基因表达对辐射诱发小鼠胸腺瘤细胞生物学行为的影响

李百龙, 崔建国*, 黄越承, 蔡建明, 高 福, 赵 芳, 孙 顶, 孙 权

第二军医大学海军医学系放射医学教研室, 上海 200433

[摘要] 目的:检测辐射诱发的胸腺瘤组织中第10染色体PTEN的表达,观察外源PTEN基因导入辐射诱发小鼠胸腺瘤细胞体外增殖能力及体内成瘤作用的影响,探讨PTEN与辐射诱发肿瘤的可能作用机制。方法:采用SP免疫组织化学法和Western印迹比较辐射诱发的小鼠胸腺瘤组织和正常小鼠胸腺组织中PTEN、 γ -H2AX和Rad51蛋白的表达。RT-PCR技术检测胸腺瘤组织和正常胸腺组织中PTEN基因的缺失情况。利用基因转染技术将外源性PTEN转入小鼠胸腺瘤细胞中,观察其对小鼠胸腺瘤组织细胞体外增殖能力和体内成瘤作用的影响。结果:辐射诱发的小鼠胸腺瘤组织中PTEN蛋白表达阳性率为22.73%(5/22),显著低于正常胸腺瘤组织的阳性率($P<0.01$);Western印迹结果显示胸腺瘤组织中PTEN表达水平明显低于正常组织($P<0.01$);RT-PCR检测发现在肿瘤组织中存在高频率PTEN缺失。外源性PTEN表达后胸腺瘤细胞生长速度显著降低,而且细胞致瘤能力明显下降($P<0.01$)。辐射诱发的胸腺瘤细胞 γ -H2AX水平明显高于正常组织,而Rad51蛋白水平明显低于正常组织($P<0.01$)。结论:PTEN表达缺失可能通过影响Rad51途径的DNA断裂修复通路,导致辐射诱发胸腺瘤的发生;外源PTEN的导入可以抑制胸腺瘤细胞的体外增殖能力及体内成瘤作用,有望成为辐射诱发肿瘤防治的新靶点。

[关键词] 辐射;PTEN;胸腺瘤;Rad51

[中图分类号] R 736.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0888-04

Influence of tumor suppressor gene *PTEN* expression on biological behaviors of radiation-induced mouse thymoma cells

LI Bai-long, CUI Jian-guo*, HUANG Yue-cheng, CAI Jian-ming, GAO Fu, ZHAO Fang, SUN Ding, SUN Quan

Department of Radiation Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of tumor suppressor gene *PTEN* in the radiation-induced mouse thymoma cells, and to observe the inhibitory effect of exogenous *PTEN* transfection on the *in vitro* proliferation and *in vivo* tumor forming ability of radiation-induced thymoma. **Methods:** Immunohistochemistry SP and Western blotting assay were used to examine the expression of *PTEN*, γ -H2AX, and Rad51 protein in radiation-induced mice thymoma and normal thymus tissues. RT-PCR assay was conducted to examine the *PTEN* gene loss. Exogenous *PTEN* gene was transferred into mouse thymoma cells and its inhibitory effects on cell proliferation and tumor-forming ability were observed. **Results:** The positive rate of *PTEN* protein expression was 22.73% (5/22) in radiation-induced thymoma tissue, significantly lower than that in the normal thymus tissue ($P<0.01$). Western blotting assay showed that the expression of *PTEN* protein in thymoma was markedly lower than that in the normal thymus tissue ($P<0.01$). RT-PCR found that in tumor tissue there was high-frequency of *PTEN* gene loss. Exogenous *PTEN* expression in thymoma significantly inhibited the cell proliferation and the tumor-forming ability ($P<0.01$). The expression of γ -H2AX protein in the thymoma tissue was significantly higher than that in the normal thymus tissue; the expression of Rad51 protein was significantly lower than that in the normal tissue. **Conclusion:** Loss of *PTEN* gene may contribute to radiation-induced thymoma *via* influencing the Rad51-mediated DNA repair pathway. Exogenous *PTEN* gene transfer can inhibit the *in vitro* proliferation of thymoma cells, which may contribute to the treatment and prevention of radiation-induced tumor.

[KEY WORDS] radiation; *PTEN*; thymoma; Rad51

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8): 888-891]

[收稿日期] 2008-06-24 **[接受日期]** 2008-07-15

[作者简介] 李百龙, 硕士, 讲师. E-mail: libailong@hotmail.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070357, E-mail: mustardcc@yahoo.com.cn

辐射的致癌效应和其他肿瘤的发生类似,是多因素、多阶段引起的极其复杂的过程,涉及多种相关基因的改变和功能的异常,其中抑癌基因的突变是主要原因之一^[1]。目前,关于辐射致癌的机制尚未完全阐明,研究特定抑癌基因在辐射诱发肿瘤发生和发展中的作用,具有重要的理论意义和应用价值。第10染色体 *PTEN* 编码由403个氨基酸组成的肿瘤抑制蛋白,该基因对 PI3K-Akt(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-Akt) 凋亡抑制通路具有负调控作用,其蛋白产物通过下调 Akt/PKB 通路负性调节细胞迁徙和生存,诱导细胞周期阻滞于 G₁ 期^[2]。很多肿瘤均存在 *PTEN* 基因突变、等位基因杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH) 或表达异常,其表达异常与肿瘤发生发展的生物学行为密切相关^[3-6]。本研究首先利用已经建立的辐射致癌模型^[7],检测 *PTEN* 在辐射诱发胸腺瘤组织中的表达变化,并且通过基因转染技术调控 *PTEN* 基因表达变化观察其对肿瘤细胞表型的影响,以确定 *PTEN* 在肿瘤发生和发展中的作用。进一步,本研究分析了 *PTEN* 基因缺失对细胞 DNA 断裂修复能力的影响,并且检测了 DNA 修复相关蛋白 Rad51 的表达变化,旨在探讨 *PTEN* 在 DNA 双链断裂修复和维持染色体稳定性中的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 辐射诱发的小鼠胸腺瘤和胸腺组织通过组织块培养法,收集胸腺瘤和胸腺细胞,在含10%胎牛血清的 DMEM 培养液(Gibco 公司),5% CO₂ 孵箱 37℃ 恒温培养。

1.2 主要材料及试剂 细胞总蛋白裂解液购自 PIECE 公司,0.45 μm NC 膜购自 Pharmacia 公司;*PTEN* 抗体购自北京联合博伟生物公司, γ -H2AX 抗体、Rad51 抗体、Actin 抗体和 ECL 显色检测试剂盒购自 Santa Cruz 公司,相应的辣根过氧化物酶标记的二抗购自上海生工公司。*PTEN* 鼠源性 SABC 免疫组化试剂盒购于博士德生物技术公司。真核表达载体 pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司,细胞总 RNA 抽提试剂 TRIzol、Lipofectamine 2000 均购自美国 Gibco 公司。AMV 逆转录酶、RNasin、Oligo(dT)₁₈ 及 *Taq* DNA 聚合酶均为 Promega 公司产品。

1.3 免疫组化 石蜡组织切片常规脱蜡至水,室温孵育,消除内源性过氧化物酶活性,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡。石蜡切片经抗原修复后,滴加 1:100 抗 *PTEN* 抗体,4℃ 过夜,次日滴加 1:100 生物素标记的山羊抗小鼠 IgG 及 1:100 HIGH2 SABC,

DAB 显色,苏木精复染。以不加一抗的组织切片作阴性对照,以已知阳性反应片作阳性对照。胞质中出现明显棕黄色颗粒为 *PTEN* 蛋白阳性,无阳性或阳性细胞 <10% 为 (-),阳性细胞 10%~50% 为 (+),>50% 为 (++)。

1.4 Western 印迹 分别抽提胸腺瘤及对对照组胸腺(各 20 例)总蛋白以及培养细胞总蛋白,以 β -actin 为内参,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western 印迹分析 *PTEN*、 γ -H2AX 和 Rad51 蛋白的表达水平。

1.5 RT-PCR 检测 *PTEN* 基因缺失 从 GenBank 上获取小鼠 *PTEN* DNA 序列,采用 Primer Primer 5 软件设计 *PTEN* 引物。上游:5'-GAC TCG ACT GCA GAG TTG CAC AGT-3',下游:5'-CTA AGC TTC ACC TTA AAA TTT GGA-3',扩增片段全长 778 bp,包括外显子 5~8 序列区域。参照试剂盒说明书建立反应体系,PCR 反应条件:94℃ 1 min,50℃ 45 s,72℃ 1 min,共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。取扩增产物 10 μl 在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳,凝胶电泳成像分析系统成像。

1.6 *PTEN* 基因转染 提取胸腺细胞总 RNA,利用上述 *PTEN* 引物,扩增 *PTEN* 相应区域片段 mRNA 序列,通过 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切与 pcDNA3.1 质粒连接,并通过 Lipofectamine 2000 转染胸腺瘤细胞,转染后 24 h 收集细胞,进行细胞增殖能力和致瘤实验。

1.7 细胞生长曲线测定 转染 *PTEN* 和空质粒的胸腺瘤细胞以及胸腺细胞以每孔 5×10^4 接种于 24 孔板中,于 CO₂ 培养箱中常规培养,待细胞贴壁后次日起,每天取 3 个孔,消化后用锥虫蓝染色,细胞计数求均值,连续 6 d,以每孔每剂量活细胞均值绘制生长曲线。

1.8 裸鼠致瘤实验 分别收集 1×10^7 胸腺瘤细胞、转染 *PTEN* 的胸腺瘤细胞,接种到裸鼠颈背部皮下,观察裸鼠肿瘤生长情况。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件。细胞蛋白表达水平数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行统计学分析。率的比较采用 χ^2 和精确概率法进行分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 *PTEN* 蛋白在辐射诱发的小鼠胸腺瘤和胸腺组织中的表达 免疫组化结果表明:*PTEN* 蛋白在小鼠胸腺瘤和胸腺组织中的表达阳性率分别为 22.73%(5/22) 和 95.45%(21/22),差异有统计学

意义($P < 0.01$)。

2.2 PTEN 蛋白表达水平的变化 Western 印迹结果表明:与正常对照组相比,20 例胸腺瘤样本中 PTEN 蛋白含量明显下降或检测不到的为 15 例,即 75% 的胸腺瘤模型中 PTEN 蛋白含量表达下降,差异有统计学意义($P < 0.01$,图 1)。

图 1 辐射诱发的小鼠胸腺瘤和胸腺组织中 PTEN 的表达水平

Fig 1 Expression of PTEN in radiation-induced mice thymoma and normal thymus tissues

T: Radiation-induced thymoma tissue; C: Normal thymus tissues

2.3 辐射诱发小鼠胸腺瘤组织中 PTEN 基因的缺失 RT-PCR 检测结果表明:小鼠正常胸腺组织样本中,均扩增到外显子 5~8 的 778 bp 特异条带,无一例发生缺失;而照射诱发的胸腺瘤组织样本中共有 8/20 例外显子 5~8 发生缺失(图 2)。

图 2 胸腺瘤组织中 PTEN 基因外显子 5~8 的缺失

Fig 2 Extron 5-8 loss of PTEN in mice thymoma tissues

M: 100 bp Marker; C: Control thymus sample; T: Thymoma sample

2.4 PTEN 基因转染后胸腺瘤细胞的增殖活性 细胞生长曲线结果显示,PTEN 基因转染后,胸腺瘤细胞生长速度明显减慢,与对照组胸腺细胞和转染空质粒的胸腺瘤细胞相比其 D 值都显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$,图 3)。说明外源性 PTEN 的表达可以抑制胸腺瘤细胞的增殖。

2.5 PTEN 基因转染后对胸腺瘤细胞致瘤作用的影响 选取 PTEN 蛋白表达阴性的胸腺瘤细胞转染 PTEN 基因 cDNA 后,进行裸鼠致瘤试验,结果显示,未转染的胸腺瘤细胞致瘤率达 100% (8/8),而转染 PTEN 后的胸腺瘤细胞致瘤率仅有 12.5% (1/8),而且在未转染组 40 d 后裸鼠生长的肿瘤明显大于转染 PTEN 基因组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.6 辐射诱发小鼠胸腺瘤组织中 γ -H2AX 和 Rad51 的表达 辐射诱发胸腺瘤组织中可以检测到 γ -H2AX 蛋白水平升高(图 4),而 γ -H2AX 是 DNA

双链断裂的指示剂,说明胸腺瘤细胞会出现自发性 DNA 断裂。同时,胸腺瘤组织中 Rad51 的表达水平明显降低,说明 Rad51 相关的 DNA 损伤修复通路存在缺陷(图 4)。

图 3 PTEN 基因外源性表达对细胞生长速度的影响

Fig 3 Cell growth inhibition induced by exogenous PTEN expression in thymoma

Control: Normal thymus cells; NS+TC: Thymoma cells transfected with blank plasmid; PTEN+TC: Thymoma cells transfected with exogenous PTEN; * * $P < 0.01$ vs control or NS+TC group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

图 4 辐射诱发小鼠胸腺瘤组织中 γ -H2AX 和 Rad51 的表达

Fig 4 Expression of γ -H2AX and Rad51 in radiation-induced mice thymoma and normal thymus tissues

C: Normal thymus tissues; T: Radiation-induced thymoma tissues

3 讨论

PTEN 基因是迄今发现的第一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,定位在染色体 10q23.3 上,全长 21 kb,由 9 个外显子和 8 个内含子组成。PTEN 与肿瘤的恶性增殖、侵袭和转移等生物学特性密切相关,在生物机体内起广泛的作用,包括调控细胞周期、诱导细胞凋亡和调节细胞粘连、迁移和分化等。其在辐射诱发肿瘤发生过程中的作用和作用机制还有待阐明。多种肿瘤如恶性胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌中 PTEN 表达异常或频繁突变^[5,8-9]。肿瘤组织中 PTEN 基因突变可导致其磷酸酶活性剧降,细胞恶性增殖能力增强;也可导致细胞游走性增加并抑制细胞凋亡^[10-11]。

辐射诱发肿瘤的发生过程中涉及多种肿瘤相关基因的改变。本研究室前期研究中发现癌基因

MDM2、抑癌基因 P16、信号转导相关基因 STAT3 等在辐射致癌过程中都有明显的表达异常^[12-15]。利用生物学手段调控相关基因的表达可以有效改变肿瘤的相关生物学行为改变,从而为肿瘤的生物学治疗手段提供分子靶标。本研究结果显示 *PTEN* 蛋白在辐射诱发的小鼠胸腺瘤组织中的表达阳性率和蛋白表达水平与正常胸腺组织相比显著降低。进一步分析还发现,在胸腺瘤组织中 *PTEN* 基因存在高频率的基因缺失。而且在转染 *PTEN* 基因使胸腺瘤细胞中外源性表达 *PTEN* 后,肿瘤细胞生长速度和致瘤活性都受到明显的抑制,说明 *PTEN* 在辐射诱发小鼠胸腺瘤发生过程中起到重要的作用。通过 γ -H2AX 检测发现,辐射诱发胸腺瘤组织中 γ -H2AX 蛋白水平升高,提示 *PTEN* 缺失可以诱发细胞出现自发性 DNA 断裂,如果细胞缺乏相应的有效修复机制将导致细胞无法维持染色体稳定性。

Rad51 是真核细胞中重要的同源重组修复蛋白,在体内可以识别损伤的 DNA 位点,并与其他修复蛋白形成复合体,促进同源重组修复的进行。在多种肿瘤组织中都存在 Rad51 的表达异常, Rad51 缺陷可以导致肿瘤的发生率明显升高^[16-17]。本研究中发现的 Rad51 的表达水平明显降低,说明在辐射诱发的小鼠胸腺瘤中存在 Rad51 相关的 DNA 损伤修复通路存在缺陷,这可能是肿瘤的发生和发展的原因之一。本研究结果有助于对辐射诱发的肿瘤发生的理解,对 *PTEN* 和 Rad51 的深入研究将有望为辐射诱发肿瘤的防治提供实验依据和新的治疗策略。

[参考文献]

- [1] Little J B. Radiation carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21:397-404.
- [2] Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal J F. The *PTEN*/*PI3K*/*AKT* signalling pathway in cancer, therapeutic implications[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8:187-198.
- [3] Tate G, Suzuki T, Endo Y, Mitsuya T. A novel mutation of the *PTEN* gene in a Japanese patient with Cowden syndrome and bilateral breast cancer[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008, 184: 67-71.
- [4] Sato N, Tsunoda H, Nishida M, Morishita Y, Takimoto Y, Kubo T, et al. Loss of heterozygosity on 10q23. 3 and mutation of the tumor suppressor gene *PTEN* in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary[J]. *Cancer Res*, 2000, 60:7052-7056.
- [5] Li J, Yen C, Liaw D, Podyspanina K, Bose S, Wang S I, et al.

PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *Science*, 1997, 275:1943-1947.

- [6] Steck P A, Pershouse M A, Jasser S A, Yung W K, Lin H, Li-gon A H, 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, 15:356-362.
- [7] 韩玲, 蔡建明, 李百龙, 黄定德, 黄越承, 赵芳, 等. ⁶⁰Co γ 射线体外诱发小鼠恶性肿瘤[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24: 745-748.
- [8] Bar-Shira A, Matarasso N, Rosner S, Bercovich D, Matzkin H, Orr-Urtreger A. Mutation screening and association study of the candidate prostate cancer susceptibility genes *MSR1*, *PTEN*, and *KLF6*[J]. *Prostate*, 2006, 66:1052-1060.
- [9] Kokubo Y, Gemma A, Noro R, Seike M, Kataoka K, Matsuda K, et al. Reduction of *PTEN* protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (*IRESSA*)[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92: 1711-1719.
- [10] McCubrey J A, Steelman L S, Abrams S L, Lee J T, Chang F, Bertrand F E, et al. Roles of the *RAF*/*MEK*/*ERK* and *PI3K*/*PTEN*/*AKT* pathways in malignant transformation and drug resistance[J]. *Adv Enzyme Regul*, 2006, 46:249-279.
- [11] Hartmann W, Digon-Söntgerath B, Koch A, Waha A, Endl E, Dani I, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase/*AKT* signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of *PTEN*[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12:3019-3027.
- [12] 黄越承, 蔡建明, 韩玲, 高福, 崔建国, 高建国. γ 射线诱发的小鼠淋巴细胞白血病中 *MDM2* 的表达研究[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25:598-602.
- [13] 高福, 杨平, 黄越承, 汤靓, 韩玲, 蔡建明, 等. γ 射线诱发小鼠白血病模型中 p16 基因的改变[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24:724-727.
- [14] 黄越承, 董志涛, 褚万立, 蔡建明, 韩玲, 高福, 等. γ 射线诱发小鼠皮肤汗腺癌中 p53、*MDM2* 基因的表达[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2004, 24:517-519.
- [15] 唐古生, 蔡建明, 倪瑾, 项莺松, 崔建国, 朱丹, 等. 反义 *STAT3* 对肿瘤细胞增殖抑制和诱导凋亡的作用[J]. *癌症*, 2006, 25:269-274.
- [16] Bertrand P, Lambert S, Joubert C, Lopez B S. Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells[J]. *Oncogene*, 2003, 22:7587-7592.
- [17] Sonoda E, Sasaki M S, Buerstedde J M, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, et al. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death[J]. *EMBO J*, 1998, 17: 598-608.

[本文编辑] 贾泽军