

抑癌基因 PTEN 对人原代子宫内膜细胞凋亡及细胞周期的影响

朱巧英¹, 贾雪梅¹, 陈玲², 余宁珠^{1*}, 吕娟^{1*}

(¹南京医科大学附属南京妇幼保健院妇科,²儿童保健科,江苏 南京 210004)

[摘要] **目的:** 通过人原代子宫内膜细胞实验研究第 10 号染色体缺失的磷酸酶 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 对子宫内膜异位症发生、发展的作用和意义。**方法:** 利用慢病毒载体分别在人原代子宫内膜细胞中过表达和静默 PTEN 基因的表达; 流式细胞仪检测慢病毒感染之后不同 PTEN 表达组的细胞周期及凋亡变化情况。**结果:** PTEN 过表达组人原代子宫内膜细胞 G0/G1 期比例增加, 与对照组比较差异具有统计学意义, G2/M 期比例逐渐减少, 细胞周期阻滞在 G0/G1 期; 空白对照组、PTEN 过表达组、PTEN 静默组的细胞凋亡率分别是 (11.70 ± 0.03)%、(15.80 ± 0.14)%、(5.33 ± 0.08)%。**结论:** PTEN 可显著增加人原代子宫内膜细胞凋亡, 抑制细胞周期, 对子宫内膜异位症的发生发展有一定抑制作用。

[关键词] 子宫内膜异位症; PTEN; 凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R714.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)11-1533-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20151107

Effect of tumor suppressor gene PTEN on human primary endometrial cell apoptosis and its cell cycle

Zhu Qiaoying¹, Jia Xuemei¹, Chen Ling², Yu Ningzhu^{1*}, Lü Juan^{1*}

(¹Department of Gynecology, ²Department of Child Health Care, Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To study the role and significance of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) protein for the occurrence and development of endometriosis (EMs) *in vitro* experiments. **Methods:** Lentiviral vector was used to overexpress PTEN and silence PTEN expression in human primary endometrial cells; flow cytometry was used to detect the changes in cell cycle and apoptosis in the different PTEN expression groups after lentivirus infection. **Results:** Cell cycle analysis showed that after transfection of overexpressed lentivirus of PTEN gene, the proportion of G0/G1 phase in human primary endometrial cells was increased, compared with the control group ($P < 0.05$). The proportion of G2/M phase was gradually decreased, and cell cycle was arrested in G0/G1 phase; In the blank group, the overexpressed PTEN group, and the siPTEN group, cell apoptosis rates were (11.70 ± 0.03)%, (15.80 ± 0.14)%, and (5.33 ± 0.08)%, respectively. **Conclusion:** Overexpression of PTEN could significantly increase apoptosis rate and inhibit cell cycle of human primary endometrial cells. PTEN has a certain inhibiting effect on the occurrence and development of endometriosis.

[Key words] endometriosis; PTEN; apoptosis; cell cycle

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(11): 1533-1537]

子宫内膜异位症 (endometriosis, EMs) 是医学中亟待解决的一个顽疾, 其发病机制至今尚未阐明, 因此其治疗面临巨大困难和挑战。药物治疗及常规

手术后 5 年复发率较高, 极大影响患者的生活质量及生殖健康。近年, EMs 的发病率呈现显著上升趋势, 在基因水平上研究 EMs 的发病机制、生物学特性, 寻求一般药物治疗及手术治疗外的其他治疗方法已经成为妇科基础研究的热点之一。

第 10 号染色体缺失的磷酸酶 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 基因是定位于染色体 10q23.3 的一种抑癌基因, 由 9 个

[基金项目] 南京市医学科技发展基金 (YKK12104); 南京医科大学科技发展基金 (2011NJMU213)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zqy2101@sohu.com; lj8508@126.com

外显子组成,包括 1 209 个核苷酸,编码 403 个氨基酸组成约 55 kDa 的蛋白质^[1]。许多学者对子宫内膜癌、乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌中 PTEN 基因的表达进行了研究^[2-6],现已证实,在多种肿瘤中,PTEN 存在较高频率的缺失或突变,PTEN 的失活导致其抑癌功能丧失,与肿瘤的发生及进展相关。

在多种子宫内膜相关性疾病中,PTEN 的表达改变都具有特殊意义,PTEN 已被提高到子宫内膜“看家基因”的高度^[7]。本研究以原代培养的人子宫内膜细胞为研究对象,通过检测 PTEN 转染后人原代子宫内膜细胞的细胞周期变化、凋亡情况了解 PTEN 对人子宫内膜细胞的作用,进而研究该基因对 EMs 发生和发展的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

鼠抗人细胞角蛋白抗体和鼠抗人波形蛋白抗体(Major BioTech 公司,美国);丙烯酰胺、亚甲丙烯酰胺、Tris-base、过硫酸铵、TEMED、甘氨酸、SDS(Biosharp 公司,美国);I 型胶原酶(Sigma-Aldrich 公司,美国);EndoFree plasmid ezFlow midi kit(Biomiga 公司,美国)。

子宫内膜标本来源于 2013 年 8 月因子宫肌瘤于南京医科大学附属南京妇幼保健院住院行子宫切除的患者。术中无菌操作,收集子宫内膜组织,冷 PBS 反复漂洗,保存于无菌 DMEM 培养基中,取材后 1 h 内处理。

1.2 方法

1.2.1 人原代子宫内膜细胞的培养与鉴定

新鲜的子宫内膜标本在无菌培养皿中用 PBS 冲洗 3 次,去除表面杂质及血液,剪成 1 mm³ 左右的小组织块,加入 0.1% 的 I 型胶原酶 2~3 mL,37℃ 恒温水浴振荡消化组织 60~100 min,显微镜下观察,组织块消失,成单个细胞后终止消化,经 300 目细胞筛过滤,滤液 800 r/min 离心 5 min,待间质细胞基本贴壁后将上皮细胞的培养液移至培养瓶继续培养。两种细胞均放入 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养,24 h 后换液除去未贴壁的死细胞和血细胞。分别选择鼠抗人细胞角蛋白抗体和鼠抗人波形蛋白抗体作为特异性标记,用含有 FITC 荧光标记的二抗进行免疫荧光染色,对分离获得的子宫内膜细胞进行鉴定。

1.2.2 PTEN 过表达及静默慢病毒载体构建

合成 PTEN 基因,亚克隆至 pLV-IRES-PURO 质

粒中;合成 3 个 PTEN 的 siRNA 和 siNC,从 3 个序列中确定 5'-AAGTAAGGACCAGAGACAA-3' 序列为有效序列,设计 shRNA 并构建入载体 pLV2-shPTEN 及 pLV2-shNC,经质粒大提,转染进 293T 细胞包装慢病毒,感染原代子宫内膜细胞,Western blot 法检测 PTEN 的表达。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期

根据对人子宫内膜细胞处理方式的不同,将其分为 5 组:空白对照组(Blank 组)、空载体组(Vector 组)、PTEN 过表达组(Over-PTEN 组)、无义序列组(siNC 组)及 PTEN 静默组(si-PTEN 组)。空白对照组不经特殊处理,空载体组及 PTEN 过表达组分别转染携带 pLV-NC 和 pLV-PTEN 的慢病毒,空载体组作为阴性对照组,无义序列组及 PTEN 静默组子宫内膜细胞分别转染携带无义序列和静默 PTEN 序列的慢病毒。

离心收集不同 PTEN 表达状态的各组细胞,每组 3 管,弃上清,用预冷 PBS 洗 2 遍,弃上清后缓慢加入 1 mL 预冷 70%乙醇,混合均匀,4℃ 固定 30 min。再次离心收集细胞,预冷 PBS 洗涤去除乙醇,离心沉淀,弃上清后以 0.2 mL PI 染液重悬细胞,加入 RNaseA 至终浓度 50 μg/mL,4℃ 静置 30 min。之后离心沉淀,弃上清,0.2 mL PBS 重悬细胞后上流式细胞仪检测。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡

离心收集 Blank 组、Vector 组、siNC 组、si-PTEN 组及 Over-PTEN 组的各组细胞,弃上清,用预冷 PBS 洗 2 遍,弃上清。用 200 μL 1×buffer 悬浮细胞,加入 5 μL Annexin V,避光静置 15 min 后离心收集细胞,用 1×buffer 洗涤后用 200 μL 1×buffer 悬浮细胞,加入 5 μL PI 后上机检测。

1.3 统计学方法

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS12.0 统计软件,单因子变异数分析(One Way ANOVA), $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子宫内膜原代细胞培养与鉴定结果

分离得到的细胞 24 h 后基本贴壁完成,3 d 后接种的上皮细胞形成漩涡状排列的致密单层细胞集落,细胞呈多角形或蝌蚪形,边界清楚。间质细胞呈具有成纤维细胞形态的梭形(图 1)。分离得到的细胞 5~7 d 长满 25 cm² 的细胞培养瓶,采用胰酶消化传代。子宫内膜上皮细胞表达角蛋白,间质细胞

表达波形蛋白。分别用鼠抗人细胞角蛋白抗体和鼠抗人波形蛋白抗体对细胞进行免疫荧光染色,均可见胞浆的绿色荧光(图 2)。

2.2 Western blot 鉴定 PTEN 过表达和干扰的沉默效率

导入 PTEN 过表达慢病毒后,其表达上调了 2 倍;导入 PTEN 慢病毒干扰载体后,其沉默效率达到 70%左右(图 3)。

2.3 各组细胞凋亡情况及周期变化

流式细胞仪检测到 Blank 组的细胞凋亡率是

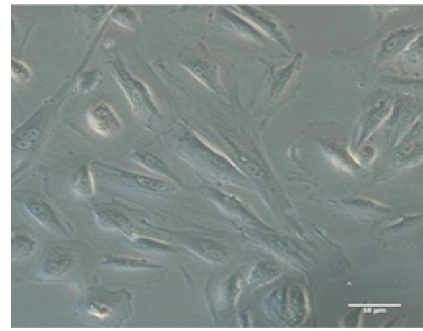


图 1 人原代子宫内膜细胞形态 (×200)

Figure 1 The morphology of human endometrial cells (×200)

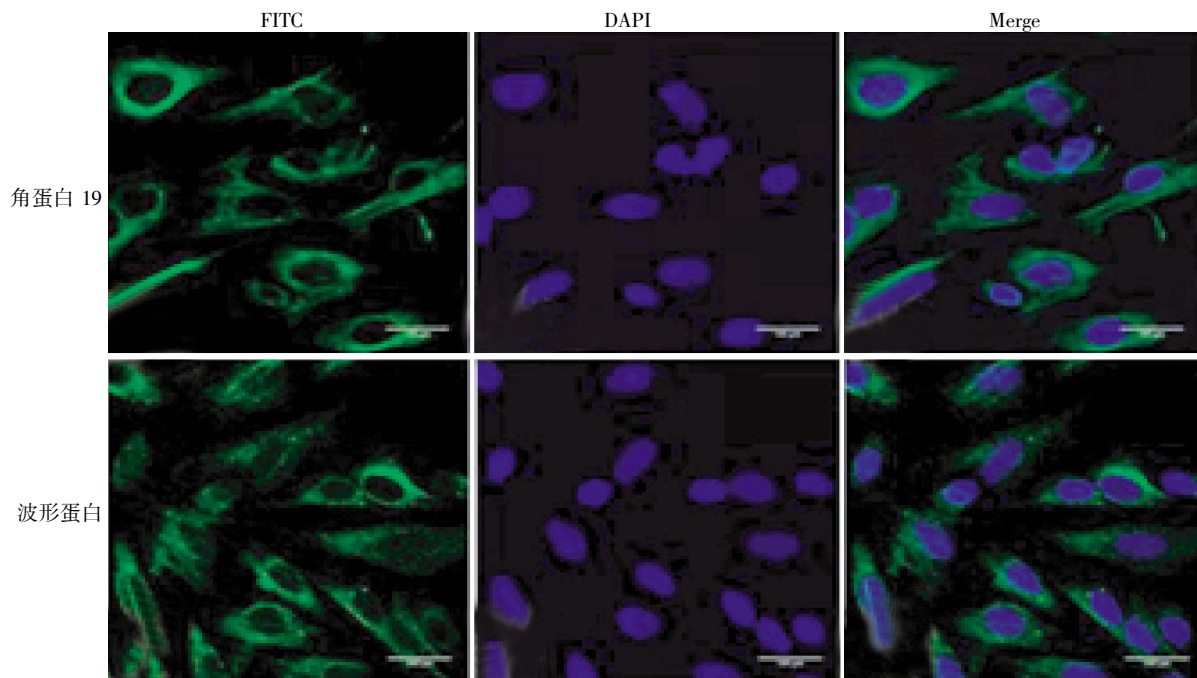


图 2 鼠抗人细胞角蛋白抗体和鼠抗人波形蛋白抗体对人原代子宫内膜细胞进行免疫荧光染色结果 (×200)

Figure 2 Immunofluorescence staining for cytokeratin 19 and vimentin on endometrial cells (×200)

(11.70 ± 0.03)%, Vector 组和 Over-PTEN 组的细胞凋亡率分别是 (7.90 ± 0.07)% 和 (15.80 ± 0.14)%, siNC 组和 si-PTEN 组的细胞凋亡率分别是 (9.47 ± 0.11)% 和 (5.33 ± 0.08)%(图 4)。从中可以看出,PTEN 过表达可显著升高原代子宫内膜细胞的凋亡率,反之,PTEN 静默可显著降低原代子宫内膜细胞的凋亡率,且与 siNC 组和 Blank 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

细胞周期分析显示,转染 PTEN 基因过表达慢病毒后,人原代子宫内膜细胞 G0/G1 期比例增加,且与对照组比较差异有统计学意义,G2/M 期比例逐渐减少,细胞周期阻滞在 G0/G1 期;反之,PTEN 静默以后,人原代子宫内膜细胞 G0/G1 期比例降低,且与各对照组比较差异具有统计学意义(图 5,表 1)。

3 讨论

Govatati 等^[8]对异位子宫内膜进行 PCR 基因扫描分析显示 10q23.3 有高频杂合性丢失(84.4%),该位置在结构上是 PTEN 所在位点。结构移码插入发生于 10:89692992~89692993 位置(即 PTEN 重要的 N 末端磷酸酶区),认为 PTEN-PI3K/Akt-Bad 轴可能参与了 EMs 的发病机制。

一些学者研究表明,子宫内膜细胞自发性凋亡是内膜组织保持正常结构和功能的关键因素,而凋亡异常可导致异位内膜细胞在宫腔外种植并继续存活,与其细胞凋亡及增殖特性改变有关。EMs 中异位子宫内膜细胞的抗细胞凋亡能力增强,使子宫内膜细胞增生和死亡之间的平衡被破坏,细胞死亡少于增殖,生存时间延长,易导致这些细胞的种植、

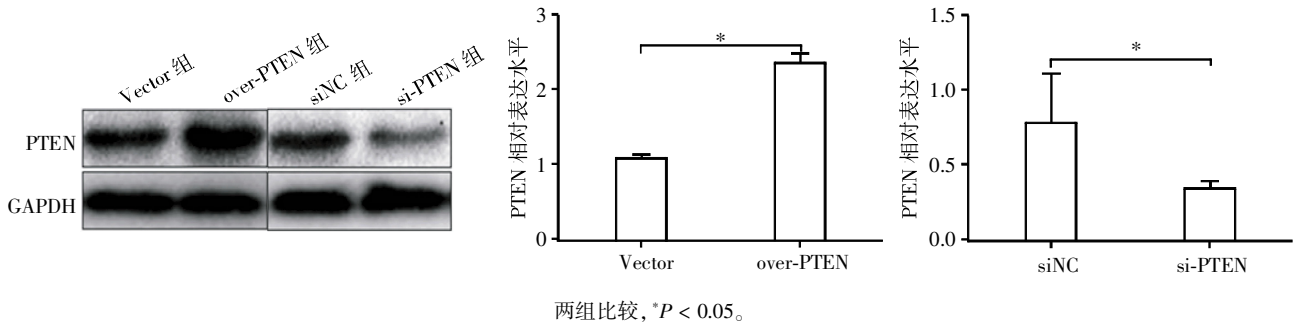


图 3 各组中 PTEN 的表达情况

Figure 3 Expressions of PTEN in different groups

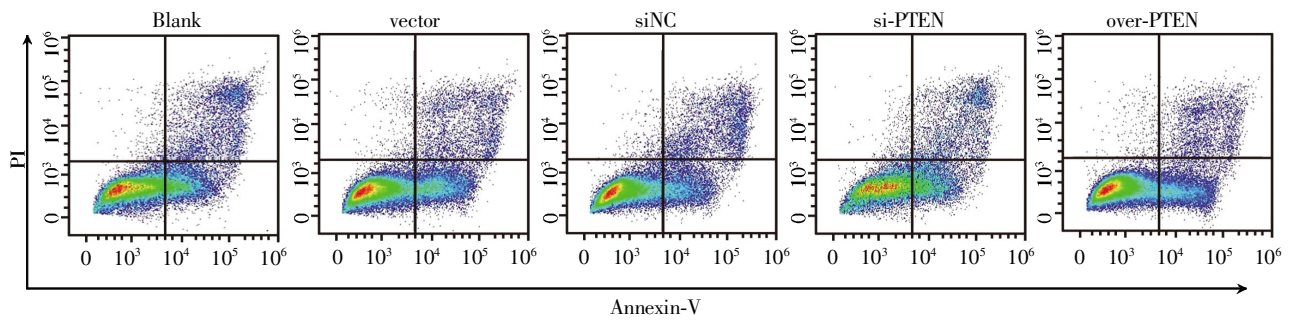


图 4 不同组别细胞的凋亡情况

Figure 4 Cell apoptosis in different groups

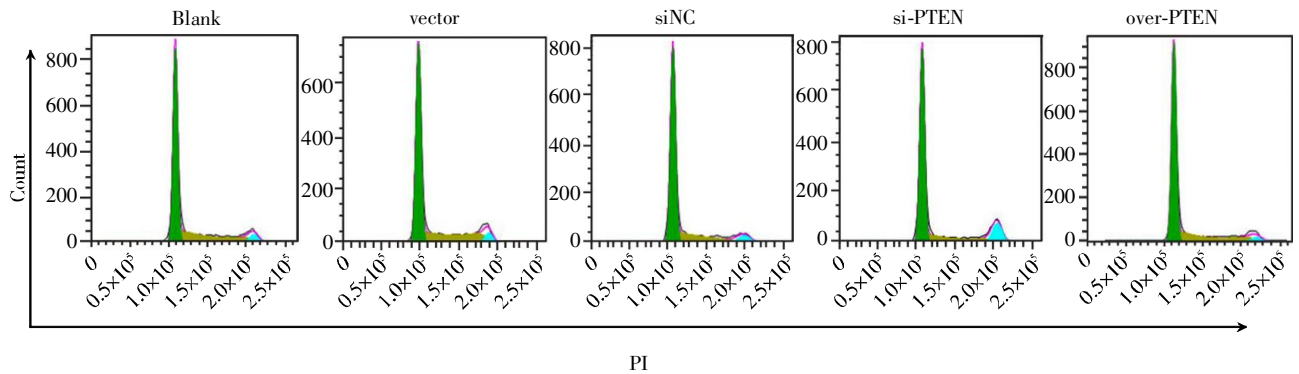


图 5 不同组别细胞的细胞周期情况

Figure 5 Cell cycle in different groups

表 1 5 组细胞的细胞周期检测结果

Table 1 Influence of PTEN on the cell cycle phase distribution in the 5 groups (%)

组别	G0/G1	G2/M
Blank 组	60.46 ± 0.24	5.52
Vector 组	60.08 ± 0.32	5.82
siNC 组	60.88 ± 0.17	13.64
si-PTEN 组	56.64 ± 0.32* [△]	3.73
Over-PTEN 组	66.41 ± 0.19 ^{#△}	3.85

与 siNC 组比较, * $P < 0.05$; 与 Vector 组比较, $P < 0.05$; 与 Blank 组比较, $^{\Delta}P < 0.05(n=3)$ 。

生长, 促发 EMS^[9-10]。PTEN 可通过调节 PI3K 途径, 促进细胞凋亡^[11], PTEN/Akt 信号通路亦可抑制细胞

增殖, 促进细胞凋亡^[12-13]。而 PTEN 表达下降使异位内膜细胞的抗凋亡性增强并引起细胞周期调控机制的改变, 从而导致逆流的子宫内膜细胞得以异位存活和种植。另有研究表明, PTEN 可以抑制整合素介导的细胞铺展过程, 降低细胞黏附能力, 故 PTEN 失表达的内膜细胞侵袭及转移能力增加, 从而有利于内膜细胞异位生长^[14]。

本研究成功地对人子宫内膜细胞进行了原代细胞培养, 鉴定所含细胞有子宫内膜腺上皮细胞及间质细胞, 发现 PTEN 静默可显著降低人原代子宫内膜细胞的凋亡率, 人原代子宫内膜细胞 G0/G1 期比例降低; 反之, PTEN 过表达可显著升高人原代子宫

内膜细胞的凋亡率,细胞 G0/G1 期比例增加,细胞周期阻滞在 G0/G1 期;从而推测通过 PTEN 的过表达可以使异位子宫内膜细胞凋亡进而防治 EMs。

子宫内膜异位病灶的发生与发展必须有新生血管的建立才能得以维持^[15-16],新生血管的生成是 EMs 发病的中心环节。Ye 等^[17]发现在人肝癌中,PTEN 抑制剂恢复了 VEGF 的表达和肝癌细胞诱导人脐静脉内皮形成毛细血管结构的能力,具有剂量依赖性,说明 PTEN 通过作用于 VEGF 而影响血管生成。另有学者通过研究推测野生型 PTEN 基因可能通过调控 VEGF 及 FLT1 表达,在抑制白血病血管新生及髓外浸润中发挥重要作用^[18]。在后期实验中我们将进一步研究 PTEN 在 EMs 的发生发展中与 VEGF 的相互作用,及其对血管生成的作用。

[参考文献]

- [1] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers[J]. *Nat Genetics*, 1997, 15(4): 356-362
- [2] Garcia-Dios DA, Lambrechts D, Coenegrachts L, et al. High-throughput interrogation of PIK3CA, PTEN, KRAS, FBXW7 and TP53 mutations in primary endometrial carcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 128(2): 327-334
- [3] Zhang HY, Liang F, Jia ZL, et al. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(1): 161-168
- [4] Kinross KM, Montgomery KG, Kleinschmidt M, et al. An activating Pik3ca mutation coupled with Pten loss is sufficient to initiate ovarian tumorigenesis in mice[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(2): 553-557
- [5] Darido C, Georgy SR, Wilanowski T, et al. Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 635-648
- [6] Sun Y, Tian H, Wang L. Effects of PTEN on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells via the phosphoinositol-3-kinase/Akt pathway [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(4): 1828-1836
- [7] Tang JM, He QY, Guo RX, et al. Phosphorylated Akt overexpression and loss of PTEN expression in non-small cell lung cancer confers poor prognosis[J]. *Lung Cancer*, 2006, 51(2): 181-191
- [8] Govatati S, Kodati VL, Deenadayal M, et al. Mutations in the PTEN tumor gene and risk of endometriosis; a case-control study[J]. *Hum Reprod*, 2014, 29(2): 324-336
- [9] Harada T, Kaponis A, Iwabe T, et al. Apoptosis in human endometrium and endometriosis[J]. *Hum Reprod Update*, 2004, 10(1): 29-38
- [10] Nishida M, Nasu K, Ueda T, et al. Endometriotic cells are resistant to interferon-gamma-induced cell growth inhibition and apoptosis; a possible mechanism involved in the pathogenesis of endometriosis[J]. *Mol Hum Reprod*, 2005, 11(1): 29-34
- [11] Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, et al. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in malignant melanoma progression and therapy [J]. *Dermatol Res Pract*, 2012, 2012: 354191
- [12] Li XT, Wang HZ, Wu ZW, et al. miR-494-3p regulates cellular proliferation, invasion, migration, and apoptosis by PTEN/AKT signaling in human glioblastoma cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5): 679-687
- [13] Tan W, Gu Z, Shen B, et al. PTEN/Akt-p27 (kip1) signaling promote the BM-MSCs senescence and apoptosis in SLE patients [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116 (8): 1583-1594
- [14] Zheng W, Baker HE, Mutter GL, et al. Involution of PTEN-null endometrial glands with progestin therapy [J]. *Gynecol Oncol*, 2004, 92(3): 1008-1013
- [15] 郎景和,冷金花,周应芳,等. 子宫内膜异位症 [J]. *现代妇产科进展*, 2006, 15(3): 161-172
- [16] Taylor RN, Yu J, Torres PB, et al. Mechanistic and therapeutic implications of angiogenesis in endometriosis [J]. *Reprod Sci*, 2009, 16(2): 140-146
- [17] Ye ZL, Huang Y, Li LF, et al. Argonaute 2 promotes angiogenesis via the PTEN/VEGF signaling pathway in human hepatocellular carcinoma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(10): 1237-1245
- [18] 成志勇,牛志云,李琳. PTEN、VEGF、FLT1 基因在髓系白血病中的表达及其相关性研究 [J]. *南京医科大学学报:自然科学版*, 2010, 30(2): 234-238

[收稿日期] 2015-08-04