干扰PTEN基因表达对人宫颈癌细胞系HeLa细胞周期的影响及相关机制研究

孙　卓,卢今奇,吴牧雨,白　璐,魏璐璐,李明岩,吴永平*

徐州医科大学基础医学院病理学教研室,临床与实验病理学实验室,江苏　徐州　221004

[摘　要]　**目的:**研究干扰PTEN表达对HeLa细胞细胞周期分布的影响并探索其相关机制。**方法:**以人宫颈癌细胞系HeLa为实验对象,利用慢病毒转染技术导入PTEN-特异性短发卡RNA(short hairpin RNA,shRNA)干扰PTEN表达,采用实时荧光定量PCR和Western blot技术检测转染前后PTEN及细胞周期蛋白Cyclin B1 mRNA和蛋白的表达,流式细胞术检测细胞周期分布变化,蛋白酶体抑制剂MG-132处理细胞后利用Western blot检测Cyclin B1蛋白稳定性变化。**结果:**PTEN shRNA作用HeLa细胞后,PTEN mRNA及蛋白表达水平较对照组显著降低;下调PTEN表达后,细胞周期中G2/M期细胞比例与对照组相比明显增加,Cyclin B1蛋白表达水平下降,但Cyclin B1 mRNA水平与对照组相比无明显差异。MG-132处理细胞后,PTEN干扰组中Cyclin B1蛋白表达与未处理组相比明显增加。**结论:**在HeLa细胞中干扰PTEN表达会导致细胞周期阻滞于G2/M期,这可能与细胞周期相关蛋白Cyclin B1表达水平降低有关。

[关键词]　PTEN;HeLa;细胞周期;Cyclin B1;CDK1

[中图分类号]　R737.33　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2018)09-1175-06

doi:10.7655/NYDXBNS20180901

Effects and mechanism of PTEN-specific shRNA on cell cycle in human cervical carcinoma cell line HeLa

Sun Zhuo,Lu Jinqi,Wu Muyu,Bai Lu,Wei Lulu,Li Mingyan,Wu Yongping*

Department of Pathology, Clinical and Experimental Pathology Laboratory, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China

[**Abstract**]　**Objective:** To investigate the effect of down-regulating PTEN on cell cycle in HeLa cells and to explore its underlying mechanism. **Methods:** PTEN-specific short hairpin RNA(shRNA)was synthesized and introduced into HeLa cells via lentivirus. The mRNA and protein expression of PTEN and Cyclin B1 were detected by qPCR and Western blot assay, respectively. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Cyclin B1 protein expression was examined by Western blot after proteasome inhibitor MG-132 treatment to evaluate its protein stability. **Results:** Compared to the control group, both mRNA and protein levels of PTEN were decreased in HeLa cells transfected with PTEN-specific shRNA. PTEN down-regulation in HeLa cells induced cell cycle arrest in G2/M phase, decreased Cyclin B1 protein level, but had no effect on Cyclin B1 mRNA level. After MG-132 treatment, the expression of Cyclin B1 protein in the PTEN interference group was significantly elevated. **Conclusion:** Inhibition of PTEN expression in HeLa cells led to cell cycle arrest in G2/M phase, which could be caused by decreased expression level of cell cycle related proteins(Cyclin B1).

[**Key words**]　PTEN;HeLa;cell cycle;Cyclin B1;CDK1

[Acta Univ Med Nanjing,2018,38(09):1175-1180]

PTEN基因是定位于染色体10q23.3的抑癌基因,于1997年被首次克隆[1]。PTEN是目前为止人类发现的最容易突变的抑癌基因之一,其在肿瘤的发生发展中起着至关重要的作用。PTEN基因突变或缺失可见于人类多种器官肿瘤,包括前列腺、乳腺、甲状腺、子宫内膜、宫颈以及神经系统等[1-2]。

[基金项目]　国家自然科学基金(81372479,81502387);江苏省普通高校研究生科研创新课题(KYLX16_1134);徐州市科技计划项目(KC15SH069)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:wyp@xzhmu.edu.cn

PTEN蛋白含有两个主要的功能结构域，氨基端的磷酸酶结构域和羧基端的C2结构域。其氨基端磷酸酶结构域是PTEN的主要功能结构域，具有脂质和蛋白双重磷酸酶活性，可将细胞质中的磷脂酰肌醇3，4，5三磷酸[phosphatidylinositol-(3，4，5)-triphosphate，PIP3]去磷酸化生成磷脂酰肌醇4，5二磷酸[phosphatidylinositol-(4，5)-bisphosphate，PIP2]，从而抑制PI3K-Akt信号通路，抑制细胞增殖、存活，进而抑制肿瘤发生和发展。这也是公认的PTEN抑制肿瘤的经典机制。但是随着人们对PTEN研究的深入，近年来越来越多的PTEN功能被发现，其中PTEN对细胞周期的调控也逐渐引起人们的重视。本研究以人宫颈癌细胞系HeLa为研究对象，通过慢病毒干扰技术抑制HeLa细胞中PTEN的表达，采用流式细胞分析技术检测干扰PTEN表达后细胞周期的变化，并探索其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人宫颈癌细胞系HeLa（中国科学院上海生命科学院细胞资源中心）；PTEN基因干扰shRNA（short hairpin RNA，shRNA）序列5′-GACAAAGCCAACCGATACTTT-3′（上海吉玛制药技术有限公司）；高糖DMEM培养基（Hyclone公司，美国），胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司），青霉素-链霉素双抗、TRIzol Reagent、定量PCR试剂盒（Invitrogen公司，美国），RNA逆转录试剂盒（Promega公司，美国），细胞周期检测试剂盒（南京凯基生物公司），胞浆胞核分离试剂盒（南京凯基生物公司）；蛋白酶体抑制剂MG132（Sigma公司，美国）；抗PTEN抗体（Cell Signaling公司，美国），抗Cyclin B1抗体（Santa Cruz公司，美国），抗CDK1抗体、抗p-CDK1（Y15）抗体（Abcam公司，美国），抗GAPDH抗体（Proteintech公司，美国），抗Lamin B1抗体（南京恩晶生物科技有限公司）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理

细胞生长于含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的高糖DMEM培养基中，置于含5% CO_2的37 ℃培养箱中常规孵育，取对数生长期的细胞进行相关实验。需要蛋白酶体抑制剂MG-132处理的细胞以终浓度10 μmol/L加入培养基，处理4 h后收集细胞进行相关实验。

1.2.2 细胞分组及慢病毒感染

将HeLa细胞制成细胞悬液，接种至24孔板中。实验分为2组：对照组（shControl组，转染Control shRNA）、PTEN干扰组（shPTEN组，转染PTEN-特异性shRNA）。根据慢病毒使用说明，将处于对数生长期的细胞接种于24孔板，至汇合度为40%~60%，移除培养基，加入稀释后的病毒液（培养基400 μL+慢病毒原液30 μL +终浓度5 μg/mL的polybrene），放于37 ℃含5% CO_2的培养箱中继续孵育，24 h后移除病毒液，加入0.5 mL培养基继续培养，48 h后可检测PTEN表达，进行相关实验。

1.2.3 实时荧光定量PCR

根据TRIzol Reagent使用说明书提取HeLa细胞总RNA，测定浓度后根据反转录试剂盒说明反转录为cDNA。根据定量PCR试剂盒说明书配制20 μL反应体系后进行PCR扩增，反应条件采用二步法：第1步95 ℃ 10 min；第2步95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s，40个循环。在分析系统中读取各组Ct值，以$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对结果进行分析。所用引物序列如下：PTEN上游5′-TAGAGGAGCCGTCAAATC-3′，下游5′-ATCAGAGTCAGTGGTGTC-3′；Cyclin B1上游5′-CGGGAAGTCACTGGAAACAT-3′，下游5′-AAACATGGCAGTGACACCAA-3′。

1.2.4 Western blot检测蛋白表达

收集各组细胞提取细胞总蛋白（如需提取胞核蛋白，按照胞浆胞核分离试剂盒说明书的步骤进行操作），Bradford法测定蛋白浓度。10%的SDS-PAGE胶进行蛋白质分离，湿转法将蛋白质转移到PVDF膜上，5%脱脂奶粉溶液室温封闭1 h。分别加入一抗4 ℃孵育过夜，HRP标记二抗室温孵育2 h。洗膜后滴加ECL发光液进行曝光。采用Quantity One软件计算各组灰度值与对照组内参蛋白的比值，定量分析蛋白表达水平。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期分布

将各组细胞用适量胰酶消化，离心收集细胞，PBS冲洗制成细胞悬液，调整浓度为1×10^6个/mL。取1 mL细胞悬液，离心去除上清后加入500 μL预冷70%乙醇，4 ℃固定1~4 h，离心除去固定液，加入100 μL RNase A于37 ℃水浴30 min，再加入400 μL PI混匀，避光染色30 min后上流式细胞仪检测，分析细胞周期变化。

1.3 统计学方法

用SPSS16.0进行统计分析，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，计数资料以百分率（%）表示；计量资料两组间比较采用t检验，多组间均数比较采用one-way ANOVA分析，两两比较采用SNK法；计

数资料两组间比较采用卡方检验，$P \leqslant 0.05$为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　HeLa细胞转染PTEN shRNA后PTEN表达水平的变化

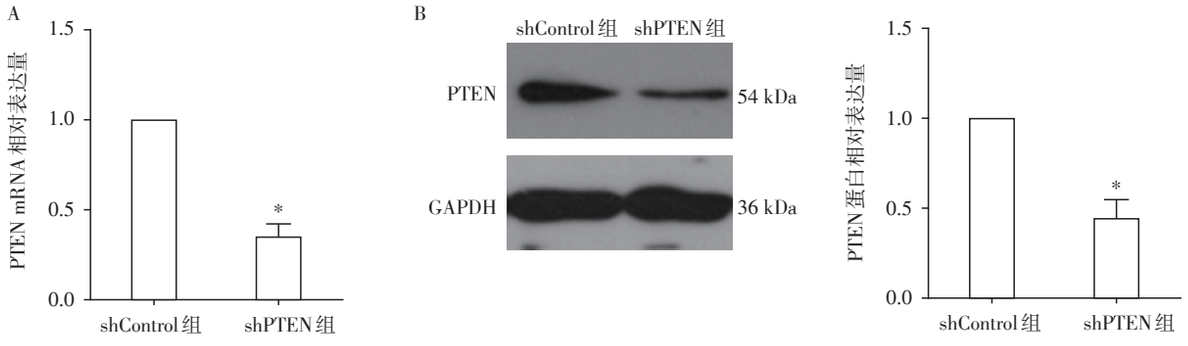
为了研究PTEN低表达对HeLa细胞周期的影响，利用慢病毒干扰技术构建了PTEN低表达HeLa细胞（shPTEN）及其对照组细胞（shControl）。病毒转染48 h后，收集各组细胞，通过荧光实时定量PCR实验检测PTEN mRNA的表达水平。结果显示shPTEN组中PTEN mRNA相对表达量为0.35 ± 0.06，较shControl组显著降低，差异有统计学意义（$P < 0.05$，图1A）。Western blot实验也显示shPTEN组中PTEN蛋白表达水平较shControl组明显减少，差异有统计学意义（$P < 0.05$，图1B）。

2.2　干扰PTEN表达对HeLa细胞周期的影响

为了解PTEN干扰对HeLa细胞周期的影响，通过流式细胞术检测各组细胞的细胞周期分布。结果显示，与对照组相比，转染PTEN shRNA后，HeLa细胞中处于G0/G1期及S期的细胞比例无明显变化，但处于G2/M期细胞的比例由12.24%增加至17.60%，差异有统计学意义（$P < 0.01$，图2），表明PTEN基因表达下调后HeLa细胞被阻滞于G2/M期，提示PTEN参与了HeLa细胞的细胞周期调控。

2.3　干扰PTEN会抑制细胞周期蛋白Cyclin B1的表达

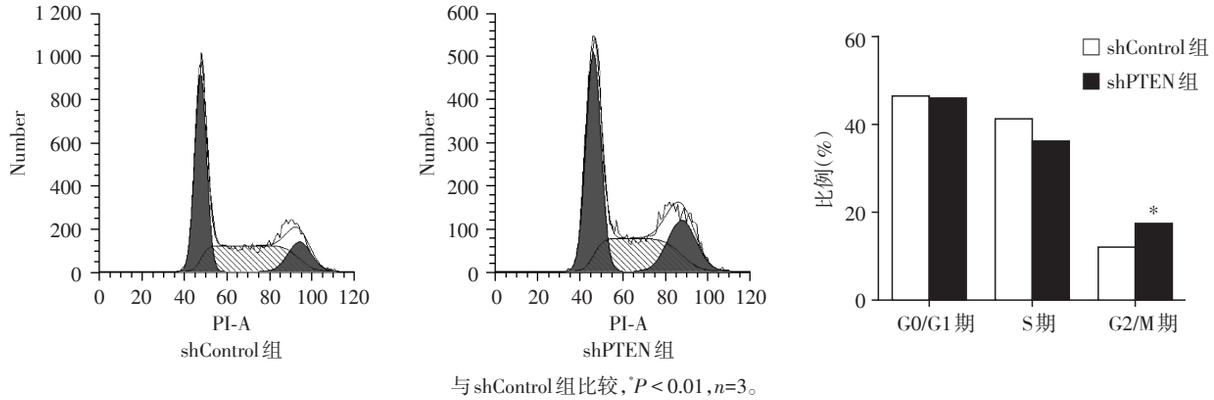
为了探索PTEN参与细胞周期调控的可能分子机制，通过Western blot实验检测了shControl组及shPTEN组中细胞周期相关蛋白Cyclin B1及CDK1、pCDK1的表达情况。实验结果显示与shControl组相比，shPTEN组中Cyclin B1、CDK1及p-CDK1的蛋白水平均显著降低，差异有统计学意义（$P < 0.05$，图3A、B）。Cyclin B1/CDK1复合体只有进入细胞核内才能发挥功能，因此还检测了细胞核内Cyclin B1和CDK1蛋白的表达。Western blot结果显示与shCon-



A：HeLa细胞转染PTEN shRNA后显著抑制PTEN mRNA表达；B：HeLa细胞转染PTEN shRNA后显著抑制PTEN蛋白表达。与shControl组比较，*$P < 0.05$，n=3。

图1　转染PTEN shRNA后HeLa细胞中PTEN的表达

Figure 1　PTEN expression after transfected with PTEN shRNA in HeLa cells



与shControl组比较，*$P < 0.01$，n=3。

图2　转染PTEN shRNA后HeLa细胞被阻滞于G2/M期

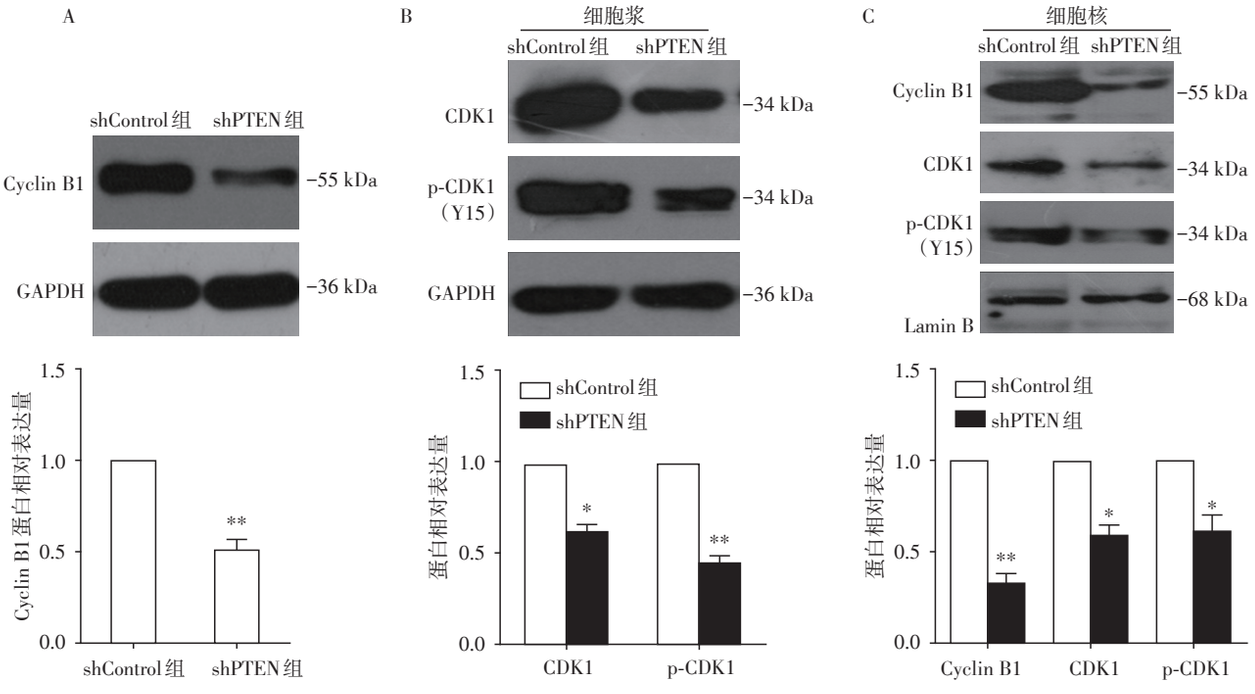
Figure 2　PTEN shRNA induced cell cycle arrest in G2/M phase in HeLa cells

trol组相比，shPTEN组细胞核内的Cyclin B1、CDK1及p-CDK1的表达水平也显著降低，差异有统计学意义（$P<0.05$，图3C）。

这些结果表明PTEN低表达不仅会导致细胞总蛋白中的Cyclin B1、CDK1、p-CDK1表达水平降低，还会减少其在细胞核内的表达，从而影响Cyclin B1/CDK1复合体的功能，提示PTEN可能通过影响细胞周期相关蛋白Cyclin B1、CDK1的表达水平参与对细胞周期的调控。

2.4 干扰PTEN促进Cyclin B1蛋白的降解

为了进一步研究PTEN影响Cyclin B1蛋白水平的分子机制，首先通过实时荧光定量PCR实验检测



A：细胞浆中Cyclin B1蛋白表达水平；B：细胞浆中CDK1、p-CDK1蛋白表达水平；C：细胞核中Cyclin B1、CDK1、p-CDK1蛋白表达水平。与shControl组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$n=3$。

图3 转染PTEN shRNA后HeLa细胞中Cyclin B1、CKD1蛋白表达减少

Figure 3 PTEN shRNA decreased the expression of Cyclin B1 and CDK1 in HeLa cells

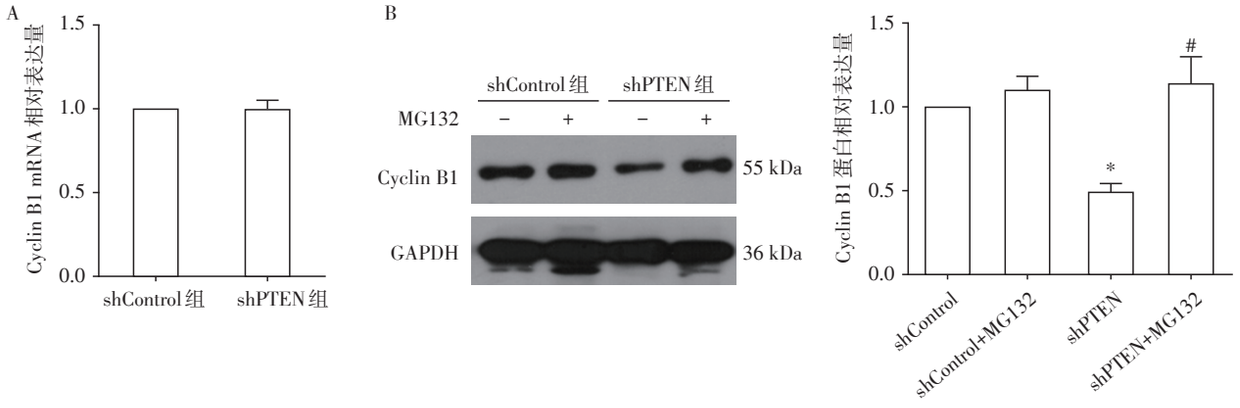
了PTEN干扰对Cyclin B1 mRNA表达水平的影响。结果显示，与shControl组相比，shPTEN组中Cyclin B1 mRNA相对表达量无明显变化，提示PTEN不是在转录水平影响Cyclin B1的表达（图4A）。

进一步猜测PTEN可能通过影响Cyclin B1蛋白稳定性调节其蛋白表达水平，因此使用蛋白酶体抑制剂MG132（终浓度10 μmol/L）分别处理两组细胞，4 h后收集细胞，提取蛋白，检测Cyclin B1蛋白的表达水平。Western blot结果显示，未加MG132处理时，shPTEN组Cyclin B1的蛋白水平比shControl组显著减少（$P<0.05$）；但在MG132处理4 h后，shPTEN组Cyclin B1的蛋白水平较未处理组明显增多（$P<0.05$），而与MG132处理后的shControl组相比无明显差异（$P>0.05$，图4B）。这一结果表明shPTEN组中Cyclin B1蛋白水平减少是由于其降解增多所致，提示PTEN低表达可能会造成Cyclin B1蛋白稳定性降低，继而影响细胞周期分布。

3 讨 论

PTEN是一个重要的抑癌基因，其突变或缺失可见于包括乳腺癌、甲状腺癌、前列腺癌、宫颈癌在内的多种肿瘤中；PTEN基因的胚系突变还可造成一系列遗传综合征，如Cowden综合征、Lhermitte-Duclos病和Bannayan-Zonana综合征等[3-4]；而在小鼠模型中，PTEN基因杂合缺失或突变则会导致小鼠自发形成包括乳腺癌、甲状腺癌、淋巴瘤在内的多种肿瘤[5]。这些研究结果都表明了PTEN作为抑癌基因的重要性及多功能性。

多年研究发现PTEN可以抑制细胞增殖[6]、促进细胞凋亡[7-8]、影响DNA复制[9-10]、维持基因组稳定[11]、调控细胞迁移等[12]，调控细胞周期也是PTEN的一项重要功能。早年研究已经证实PTEN可以通



A：HeLa细胞转染PTEN shRNA后Cyclin B1 mRNA表达情况；B：MG132处理前后shControl组及shPTEN组中Cyclin B1蛋白表达情况。与shControl组比较，*$P<0.05$；与shPTEN组比较，#$P<0.01$，$n=3$。

图4　转染PTEN shRNA对Cyclin B1 mRNA水平及蛋白稳定性的影响

Figure 4　Effect of PTEN shRNA on the mRNA level and protein stability of Cyclin B1 in HeLa cells

过抑制PI3K/Akt通路使细胞周期阻滞于G1期。近年来也不断有研究发现PTEN调控细胞周期的新机制[13-15]。但目前研究多集中于PTEN高表达所致G1期阻滞，而关于PTEN低表达或缺失对细胞周期的影响研究较少。为了进一步明确PTEN在细胞周期调控中的作用，本研究采用RNA干扰技术抑制HeLa细胞中PTEN的表达，继而通过流式细胞仪检测细胞周期改变，结果显示HeLa细胞中PTEN低表达会使细胞周期阻滞于G2/M期。这一结果也提示PTEN低表达可能通过不同的机制参与细胞周期调控。

细胞周期蛋白是参与细胞周期调控的主要蛋白，其表达水平在细胞周期中呈周期性变化，且与细胞周期进程密切相关。目前已经发现的细胞周期蛋白超过10种，作用于G1期的主要有Cyclin C、D、E，作用于M期的主要有Cyclin A、B[16]。文献报道Cyclin D1在PTEN高表达导致的G1期阻滞中起着重要作用[13]。而本研究发现PTEN低表达会导致HeLa细胞G2/M期阻滞，因此推测作用于M期的Cyclin B1可能在其中扮演重要角色。Cyclin B1主要参与有丝分裂的起始和退出调控，Cyclin B1的蛋白表达水平对于细胞能否顺利进入和退出有丝分裂期至关重要。本研究采用Western blot检测了干扰PTEN后Cyclin B1蛋白的表达，结果发现干扰PTEN表达会造成Cycin B1蛋白水平降低。而Cylin B1低表达则会导致细胞无法正常进入M期，从而被阻滞于G2/M期，这与流式细胞周期结果中G2/M期细胞比例增多相吻合。CDK1是另一个非常重要的细胞周期相关蛋白，Cyclin B1可与其结合形成Cyclin B1/CDK1复合体参与细胞周期调控。CDK1的活性与其磷酸化状态相关，T161位磷酸化会激活CDK1，而T14与Y15位磷酸化则会抑制其活性。本研究发现干扰PTEN会导致p-CDK1（Y15）水平降低，说明PTEN可能并非通过影响Y15位的磷酸化来调节CDK1的功能。

Cyclin B1蛋白的表达受多种因素调控。Krause等[17]就曾报道p53可以抑制Cyclin B1的转录从而导致G2/M阻滞。Chung等[18]研究也表明PTEN可以调节另一个细胞周期蛋白Cyclin D1的转录。因此为了进一步研究PTEN低表达导致Cyclin B1蛋白水平降低的分子机制，本研究首先通过实时荧光定量PCR检测了Cyclin B1 mRNA的表达情况。实验结果显示PTEN低表达对Cyclin B1 mRNA的表达水平无影响，提示PTEN可能是通过其他机制调节Cyclin B1蛋白的表达水平。影响Cyclin B1蛋白水平的另外一个重要因素是蛋白降解。有文献报道Cyclin B1蛋白稳定性降低、降解增加可导致其蛋白水平减少[19]。而Choi等[20]研究则显示PTEN干扰会导致有丝分裂后期Cyclin B1降解速度加快；Song等[21]研究也显示PTEN能够影响APC-CDH1的活性，而APC-CDH1则能使Cyclin B1泛素化促其降解。这些结果都提示PTEN可能会影响Cyclin B1蛋白的降解。因此本研究用蛋白酶体抑制剂MG132处理细胞，抑制蛋白降解，之后再检测Cyclin B1的蛋白水平，发现其在shPTEN组中的水平显著升高，这一结果直接证明了HeLa细胞中PTEN低表达会促进Cyclin B1降解，有力支撑了上述猜测。

综上所述，PTEN作为最著名的抑癌基因之一，在细胞周期调控中的作用非常重要。越来越多的

研究表明PTEN高表达与低表达可以通过不同的机制对细胞周期造成不同影响。本研究在细胞水平上考察了干扰PTEN表达对HeLa细胞周期的影响，提出PTEN低表达可能通过促进Cyclin B1降解造成细胞G2/M期阻滞，为更深入地理解PTEN在细胞周期调控中的作用提供了新的实验依据与研究视点。

[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(538): 1943-1947

[2] 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 Genet, 1997, 15(4): 356-362

[3] Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation[J]. Hum Mol Genet, 1998, 7(3): 507-515

[4] Eng C. PTEN: one gene, many syndromes[J]. Human Mutation, 2003, 22: 183-198

[5] Di Cristofano APB, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression[J]. Nat Genet, 1998, 19: 348-355

[6] 赵向阳，石永强，缪 林，等. 重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽协同5-氟尿嘧啶对小鼠H22肝癌的抑制作用[J]. 南京医科大学学报(自然科学版)，2017，37(1)：44-47

[7] 朱巧英，贾雪梅，陈 玲，等. 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[J]. 南京医科大学学报(自然科学版)，2015，35(11)：1533-1537

[8] 顾 燊，邵欣宇，邹晓平. microRNA-10b与胰腺癌吉西他滨耐药的相关性及机制研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版)，2017，37(7)：830-835

[9] He J, Kang X, Yin Y, et al. PTEN regulates DNA replication progression and stalled fork recovery[J]. Nat Commun, 2015, 6: 7620

[10] Kang X, Song C, Du X, et al. PTEN stabilizes TOP2A and regulates the DNA decatenation[J]. Sci Rep, 2015, 5: 17873

[11] Shen WH, Balajee AS, Wang J, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity[J]. Cell, 2007, 128(1): 157-170

[12] Leslie NR, Yang X, Downes CP, et al. PtdIns(3,4,5)P(3)-dependent and -independent roles for PTEN in the control of cell migration[J]. Curr Biol, 2007, 17(2): 115-125

[13] Radu A, Neubauer V, Akagi T, et al. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23(17): 6139-6149

[14] Wang L, Yang L, Lu Y, et al. Osthole induces cell cycle arrest and inhibits migration and invasion via PTEN/Akt pathways in osteosarcoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(6): 2173-2182

[15] Xiong X, Ren HZ, Li MH, et al. Down-regulated miRNA-214 induces a cell cycle G1 arrest in gastric cancer cells by up-regulating the PTEN protein[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(4): 931-937

[16] Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(1): 21-32

[17] Krause K, Wasner M, Reinhard W, et al. The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(22): 4410-4418

[18] Chung JH, Ostrowski MC, Romigh T, et al. The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation[J]. Hum Mol Genet, 2006, 15(17): 2553-2559

[19] Marangos P, Carroll J. Securin regulates entry into M-phase by modulating the stability of cyclin B[J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(4): 445-451

[20] Choi BH, Pagano M, Wei D. Plk1 phosphorylates PTEN and regulates its mitotic activity during the cell cycle[J]. J Biol Chem, 2014, 289(20): 14066-14074

[21] Song MS, Carracedo A, Salmena L, et al. Nuclear PTEN regulates the APC-CDH1 tumor-suppressive complex in a phosphatase-independent manner[J]. Cell, 2011, 144(2): 187-199

[收稿日期] 2017-06-16