

抑癌基因 PTEN 在线粒体上的定位促进 A431 细胞的凋亡

岳晓婧^{1,2} 宋卫东³ 姜学军^{1*}

(¹中国科学院微生物研究所 北京 100101)(²中国科学院研究生院 北京 100049)

(³北京大学第一医院男科中心 北京 100009)

摘要:为研究抑癌基因 PTEN 在线粒体上的定位对细胞凋亡的影响,构建 N 端融合有细胞色素 C 氧化酶亚基七(Cox VII)的 PTEN 腺病毒重组体(Mito-PTEN)。将 Cox VII-PTEN 片段克隆至腺病毒穿梭载体 pAdTrack-CMV 中,经 Pme I 线性化穿梭质粒,并与腺病毒基因组载体 pAdeasy-1 共转化大肠杆菌菌株 BJ5183,鉴定重组体,并将阳性重组体转化至大肠杆菌菌株 DH5 α 中进行扩增,经 Pac I 酶切后的重组体通过脂质体方法转染用于腺病毒包装的细胞 HEK-293A,包装重组腺病毒,收集病毒液,反复扩增,进行病毒滴度的测定,通过绿色荧光蛋白(GFP)标签检测转染及感染效率,用 Mito-PTEN 腺病毒感染人表皮鳞状癌细胞 A431,以流式细胞分析仪检测细胞凋亡情况。成功构建了 Mito-PTEN 的腺病毒重组体,并进行了该重组体的病毒包装,滴度为 10^7 pfu/mL,通过免疫印迹检测目的蛋白,并发现 Mito-PTEN 可以促进 A431 细胞的凋亡。Mito-PTEN 的成功构建以及它对 A431 细胞凋亡的促进作用为研究 PTEN 在线粒体上的功能以及可能的在肿瘤治疗方面的应用提供了理论依据。

关键词: Mito-PTEN; Cox VII; 腺病毒; 线粒体; 细胞凋亡

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2007)06-0968-05

PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) 是 1997 年首次发现的肿瘤抑制蛋白,PTEN 基因的突变与多种肿瘤的发生有着直接的关系,并且在某些肿瘤细胞中突变频率高达 50%^[1]。PTEN 具有蛋白磷酸酶和脂磷酸酶活性,在细胞信号转导中起着重要的作用^[2,3]。长期以来,人们认为 PTEN 主要存在于细胞的胞浆中;近来的研究发现,PTEN 既可以转入细胞核,也可以定位于线粒体。Zhu 等^[4]报道,在凋亡诱导剂星形孢菌素的刺激下,PTEN 可以与促凋亡蛋白 Bax 一起转移至线粒体上。

线粒体是细胞非常重要的细胞器之一,不仅参与能量代谢及细胞凋亡,而且在细胞信号转导等其他细胞的生理活动中也起着重要的作用^[5]。一些过去认为非线粒体定位的蛋白如蛋白激酶、磷酸酶、肿瘤抑制基因、生长因子受体等均发现可以定位于线粒体^[5,6]。为了进一步研究 PTEN 线粒体定位与细胞凋亡的关系,我们将细胞色素 C 氧化酶亚基七构建于 PTEN 基因的 N 端,借助于细胞色素 C 氧化酶亚基的线粒体定位序列,使 PTEN 定位于线粒体上,

构建了 Mito-PTEN 的腺病毒重组体,并且通过流式分析发现,Mito-PTEN 可以引起人表皮鳞状癌细胞 A431 的凋亡。该腺病毒重组体的成功构建为深入研究 Mito-PTEN 功能以及探讨其在肿瘤治疗的潜力等方面提供了理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞株:质粒 Cox VII-PTEN-YFPN1 由北京大学第一医院辛钟成教授惠赠;pAdTrack-CMV, pAdeasy-1 载体由中国科学院微生物研究所田波教授惠赠;大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 BJ5183 和 DH5 α 为本实验室所有。腺病毒包装细胞 293A,人表皮鳞状癌细胞 A431 及人胚胎肾细胞 293T 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器:限制性内切酶及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自北京天为时代公司;脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司;硝酸纤维素膜购自美国 Amersham 公司(RPN303D);X 光片为 Kodak 公司

基金项目 国家自然科学基金(90408024,30470855)

* 通讯作者。Tel 86-10-64807598 Fax 86-10-64807569 E-mail jiangxj@im.ac.cn

作者简介 岳晓婧(1982-),女,山西人,硕士研究生,研究方向为细胞与分子生物学。Tel 86-10-64807589 E-mail yuexiaojing_mic@yahoo.com.cn

收稿日期 2007-04-12 接受日期 2007-05-16 修回日期 2007-06-14

Kodak X-Omat BT Film(XBT-1);兔抗 PTEN 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗 β -actin 多克隆抗体,辣根过氧化物酶偶联羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司。PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国)激光共聚焦显微镜(莱卡公司,德国)荧光显微镜 ZEISS 公司(德国);生物安全柜(BHC-1360 II,北京东哈联);电转仪(Bio-Rad 公司,美国);流式细胞分析仪(BD 公司,美国)。

1.2 穿梭质粒 CoxV II-PTEN-pAdTrack 的构建

选择合适的酶切位点,设计引物,对目的基因进行扩增。引物序列如下:上游引物 5'-CCCTCGAGACCATGCTGTGGAATCTGC-3'(Xho I);下游引物 5'-GCTCTAGAGCTCAGA CTTTGTAAATTTGTGTATGC-3'(Xba I)。以 Xho I 和 Xba I 对目的片段及载体进行双酶切,连接转化,挑取克隆,PCR 及双酶切鉴定,并设计测序引物,对所得到的阳性质粒进行测序验证。

1.3 腺病毒重组体的构建与筛选

用 Pme I 对穿梭质粒 Cox VII-PTEN-pAdTrack 进行单酶切,37℃酶切 4~6h,将单酶切产物与腺病毒基因组质粒 pAdeasy-1 按照 5:1 的比例电转入大肠杆菌菌株 BJ5183 中,在该菌株中发生同源重组,电转参数如下:2mm 电转杯,2.5KV,25 μ Fd,200 Ohms。倒置培养 18~20h 后,选取小的单菌落,挑菌,提取质粒,电泳检验,与 pAdeasy-1 大小相仿的为候选阳性克隆。用 Pac I 对这些质粒进行单酶切,阳性质粒可以切出一条 30kb 左右的大片段以及一条 3.0kb 或 4.5kb 的小片段。

1.4 腺病毒的包装与扩增

将 HEK-293A 细胞接种于直径 60mm 盘子中,待细胞密度达到 90%~95% 时,将 Pac I 线性化的重组质粒转染入该细胞中。转染后,在倒置荧光显微镜下检测绿色荧光蛋白的表达,以确定转染效率及病毒包装的情况。一般在 9~10d 后,细胞出现较为明显的细胞病变效应,在荧光显微镜下观察,绿色荧光呈簇状分布。收集细胞,1000r/min,离心 3min。以 PBS 重悬,反复冻融 4~5 次以裂解细胞,12000r/min,离心 15min,去除细胞碎片。取三分之一的上清液感染 293A 细胞以扩增病毒,其余的 -70℃ 冻存。

1.5 腺病毒的鉴定及效价测定

将收集的腺病毒感染 293T 细胞,离心分离线粒体组分^[12],进行 western blot 检测,在 96 孔板上接种

293A 细胞,24h 后进行病毒滴度的测定,将病毒液按 $10^{-1} \sim 10^{-9}$ 进行倍比稀释,24h 后在倒置荧光显微镜下观察荧光表达情况,根据以下公式来计算病毒的 TCID₅₀。(TCID₅₀ = $10^{1+(d-s-0.5)}$,d 为每 lg 稀释度的间距,s 为被感染细胞比例之和)。

1.6 Mito-PTEN 对 A431 细胞凋亡的影响

将 A431 细胞种于 6 孔板中,分别以空腺病毒(control-Ad)和 Mito-PTEN-Ad 感染细胞,24h 后用不含 EDTA 的胰酶消化,收集细胞,Annexin V-Cy5 Apoptosis Detection Kit(BioVision)标记细胞,流式细胞仪分析凋亡情况。

2 结果

2.1 质粒 Cox VII-PTEN-pAdTrack 的 PCR 及酶切鉴定

用 Cox VII-PTEN 的引物进行菌液 PCR 扩增出目的条带(1.46kb)的菌液为候选的阳性克隆,再用 Xho I 和 Xba I 进行双酶切,阳性克隆中可以切出一条 1.46kb 的目的条带和 9kb 左右的 pAdTrack-CMV 的空载体条带(图 1)。

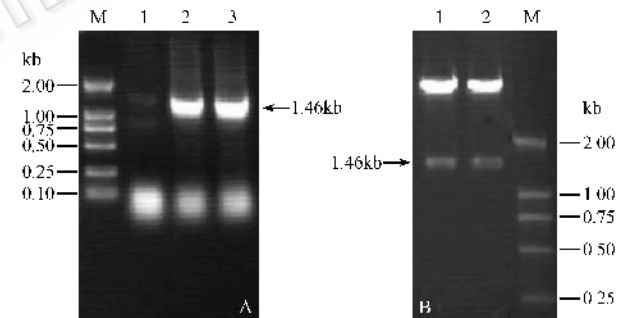


图 1 Cox VII-PTEN-pAdTrack 的 PCR 及酶切鉴定

Fig. 1 Detection of Cox VII-PTEN-pAdTrack by PCR and double digestion. A: PCR confirmation of Cox VII-PTEN-pAdTrack. M. Marker DL2000; 1-3. PCR results. B: Double digestion of Cox VII-PTEN-pAdTrack. M. Marker DL2000; 1-2. Results of double digestion with Xho I and Xba I.

2.2 重组质粒的大小及 Pac I 酶切鉴定

将提取得到的重组质粒,以 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检验,将 pAdeasy-1 作为对照,大小与其相仿的为候选阳性克隆,再用 Pac I 酶切,阳性克隆得到一条 30kb 左右的大片段以及一条 4.5kb 的小片段(图 2)。

2.3 腺病毒的包装与扩增

转染后在倒置荧光显微镜下观察 293A 细胞中绿色荧光蛋白的表达情况,从而确定转染及病毒包装的效率。9d 后细胞出现明显的细胞病变效应,在

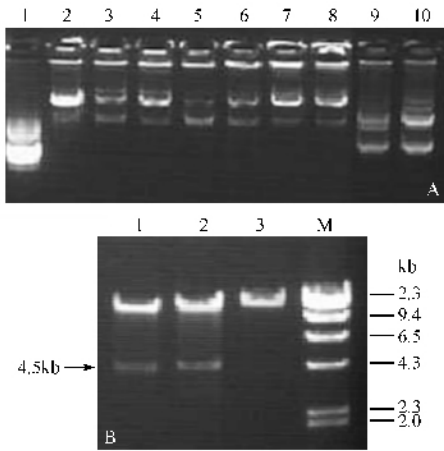


图2 重组体 Cox VII-PTEN-pAdeasy 的质粒大小及 Pac I 酶切鉴定

Fig. 2 Confirmation of recombinant Cox VII-PTEN-pAdeasy by plasmids size and Pac I digestion. A : Confirmation of recombinant plasmids. 1. pAdTrack-CMV vector ; 2. pAdeasy-1 vector ; 3-8. positive recombinant plasmids ; 9-10. negative recombinant plasmids. B : Digestion of positive recombinant plasmids with Pac I . M. Marker λ -Hind III ; 1-2. positive recombinant plasmids ; 3. pAdeasy digestion with Pac I .

倒置荧光显微镜下,绿色荧光呈彗星状簇状分布。收集病毒液,扩增2次,细胞感染后24h内即可出现80%以上的细胞均可表达绿色荧光蛋白(图3)。

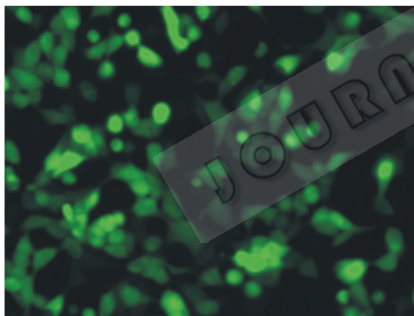


图3 腺病毒感染效率的检测(200×)

Fig. 3 Detection of recombinant adenoviral infection efficiency. 24 h after infection, 293A cells were observed by fluorescent microscope and 80% 293A cells were infected successfully (original magnification : 200 ×).

2.4 腺病毒的鉴定及效价测定

收集该病毒液感染的293T细胞,提取线粒体,Western blot检测全细胞裂解液及线粒体部分PTEN的表达情况,在70kDa处出现目的条带,在54kDa处

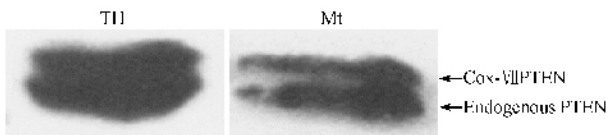


图4 Western blot检测 Mito-PTEN 感染后的293T细胞
Fig. 4 Western blot detection of 293T cells infected by Mito-PTEN adenoviruses. TH : total homogenate ; Mt : mitochondrial fraction

出现内源性 PTEN 的条带(图4)对该病毒液进行效价测定,计算病毒效价为 107pfu/ml(表1)。

表1 Cox VII-PTEN 腺病毒的效价测定

Table 1 The titer detection of Cox VII-PTEN adenoviruses

Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Cox VII-PTEN adenovirus	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	+	+	+	-	-

注 T = 10^{1+(s-0.5)} = 10^{1+(1+1+1+1+1+0.5-0.5)} = 10⁷ pfu/mL
+ 出现细胞病变效应 ; - 未出现细胞病变效应

2.5 Mito-PTEN 在 A431 细胞凋亡中的作用

分别以 Control-Ad 和 Mito-PTEN-Ad 感染 A431 细胞,感染24h后,收集细胞。从流式分析结果可以看出,Mito-PTEN-Ad 的感染引起76.6%的A431细胞发生凋亡,显著高于 Control 及 Control-Ad 组凋亡细胞比值。由此说明 PTEN 在线粒体上的定位能够引起 A431 细胞的凋亡(图5)。

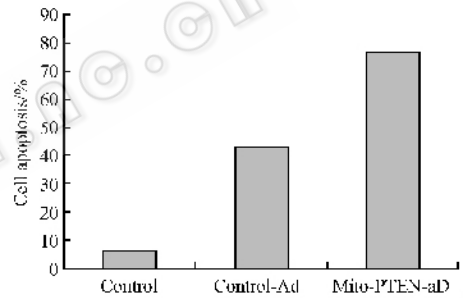


图5 Mito-PTEN 在 A431 细胞凋亡中的作用

Fig. 5 The function of Mito-PTEN in A431 cell apoptosis. Control : A431 cells without treatment ; Control-Ad : A431 cells infected by control adenoviruses ; Mito-PTEN-Ad : A431 cells infected by Mito-PTEN-Ad

3 讨论

PTEN 作为一个重要的肿瘤抑制因子,自1997年首次发现以来,一直是人们关注的热点。最早对于 PTEN 的研究,着手于其蛋白磷酸酶/脂磷酸酶活性以及它在 PI3K/PKB 信号通路中的作用^[2,3]。PTEN 不仅仅在肿瘤抑制中发挥着重要的作用,它还参与了细胞中许多正常的生命活动过程,如细胞的生长发育、细胞周期调控以及细胞自噬等^[1]。

腺病毒表达系统具有多种优点,它具有广泛的宿主范围,可以获得高滴度的病毒用于蛋白的大量表达。目前重组的腺病毒已经被成功的用于基因转移、基因治疗以及疫苗研制等领域。传统的包装腺病毒重组体的方法有两种,一种是将 DNA 片段直接连接到腺病毒的基因组中,但是大片段连接的低效

率以及可用于连接的限制性酶切位点的稀有性使得这种方法在技术上受到了很大的限制。第二种方法是利用真核细胞中的同源重组并通过噬斑进行筛选,这种方法已被广泛使用,但是由于真核细胞中同源重组的低效性以及噬斑纯化的长期性使得这种方法也具有一定的局限性。1998年 He 等^[1]提出了一种更为简便、高效的腺病毒重组体的构建方法。首先同源重组是在大肠杆菌中进行的,大大提高了同源重组的效率;第二,包含有大部分腺病毒基因组的骨架载体是以超螺旋的形式使用的,避免了酶切连接等步骤的复杂性;第三,该系统可以容纳长达 10kb 的目的基因;第四,穿梭载体中的含有 GFP 标签,可以通过荧光显微镜直接观察转染及感染情况。

蛋白在细胞中的定位与其功能有着密切的联系,因此研究蛋白定位也是研究其功能的一种重要手段。以往认为 PTEN 主要存在于细胞的胞浆中,近年来的研究表明,PTEN 在细胞核和线粒体中也有分布。PTEN 具有非典型的核定位信号序列^[7],泛素化作用也调节着 PTEN 在细胞核中的定位^[8,9],而且这种定位对于维持染色体的完整性发挥着重要的作用^[10]。2006年 Zhu 等^[4]报道在星型孢菌素 STS 的刺激下,PTEN 可以与促凋亡蛋白 Bax 一起转运至线粒体上。由此可见,PTEN 在线粒体上的定位与细胞凋亡有着密切的关系。然而,迄今为止对于 PTEN 在线粒体上定位的报道仍然较少,无论其功能方面还是影响其线粒体定位因素均有待于进一步深入研究。我们通过基因融合,将具有线粒体定位序列的细胞色素氧化酶亚基七与该基因融合表达,使其能直接定位于线粒体,并观察到 PTEN 的线粒体定位可以引起细胞凋亡。Mito-PTEN 腺病毒的构建,极大的提高了细胞的转染效率。这不仅克服了瞬时转染条件下无法获得高表达 PTEN 的困难,也为进一步研究线粒体 PTEN 的功能如在细胞自噬方面的作用打下了基础,同时也为利用线粒体功能来治疗肿瘤提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci*, 2001, **114**

(pt 13): 2375 - 2382.

- [2] Vazquez F, Sellers WR. The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1470**(1): 21 - 35.
- [3] Leslie NR, Gray A, Pass I, et al. Analysis of the cellular functions of PTEN using catalytic domain and C-terminal mutations: differential effects of C-terminal deletion on signalling pathways downstream of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J*, 2000, **346**(Pt 3): 827 - 833.
- [4] Zhu Y, Hoell P, Ahlemeyer B, et al. PTEN: a crucial mediator of mitochondria-dependent apoptosis. *Apoptosis*, 2006, **11**(2): 197 - 207.
- [5] Goldenthal MJ, Marin-Garcia J. Mitochondrial signaling pathways: a receiver/integrator organelle. *Mol Cell Biochem*, 2004, **262**(1-2): 1 - 16.
- [6] Salvi M, Brunati AM, Toninello A. Tyrosine phosphorylation in mitochondria: A new frontier in mitochondrial signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 2005, **38**(10): 1267 - 1277.
- [7] Chung JH, Ginn-Pease ME, Eng C. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res*, 2005, **65**(10): 4108 - 4116.
- [8] Wang X, Trotman LC, Koppie T, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*, 2007, **128**(1): 129 - 139.
- [9] Trotman LC, Wang X, Alimonti A, et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*, 2007, **128**(1): 141 - 156.
- [10] Shen WH, Balajee AS, Wang J, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*, 2007, **128**(1): 157 - 170.
- [11] He TC, Zhou S, da Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(5): 2509 - 2514.
- [12] Bijur GN, Jope R S. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3- kinase activation. *J Neurochem*, 2003, **87**(6): 1427 - 1435.
- [13] 于林君, 祝善俊, 周裔忠, 等. 携带野生型 PTEN 基因的腺病毒载体的构建. 免疫学杂志, 2005, **21**(3): 240 - 243.
- [14] 汪保灿, 李定国, 陈颖伟, 等. smad7 和 uPA 双基因共表达重组腺病毒载体的构建和鉴定. 胃肠病学和肝病学杂志, 2005, **14**(5): 448 - 451.

The mitochondrial localization of tumor suppressor PTEN promotes apoptosis in A431 cells

YUE Xiao-jing^{1,2}, SONG Wei-dong³, JIANG Xue-jun^{1,*}

(¹ Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(² Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(³ Peking University First Hospital Andrology Center, Beijing 100009, China)

Abstract :To study the function of mitochondrial PTEN in mediation of cellular apoptosis, the adenoviral recombinant of Mito-PTEN, which contains Cox VII (subunit VII of Cytochrome C Oxidase) gene in N-terminus, were generated. Using Cox V II -PTEN-EYFPN1 as a template, Cox VII-PTEN was cloned into the shuttle vector pAdTrack-CMV with the restriction endonuclease sites *Xho* I and *Xba* I. The shuttle plasmid was linearize with *Pme* I and co-transformed with adenoviral backbone vector pAdeasy-1 into *E. coli* BJ5183. Following selection and identification, the positive recombinant plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α for propagation. To package the adenoviruses, recombinant plasmid candidate was linearize using *Pac* I and transfected into HEK-293A cells with Lipofectamine 2000. Through freeze-thaw-vortex cycles, recombinant viral particles were collected and harvested, and utilized to infect 293A cells for further amplification. The method of TCID₅₀ was employed to determine virus titers. With green fluorescent protein (GFP) as marker, the efficiency of transfection and infection was monitored by fluorescence microscopy, and the apoptosis of A431 cells after infection of Mito-PTEN-Ad was analyzed by flow cytometry. Adenoviral recombinant of Mito-PTEN was packaged successfully with the TCID₅₀ as 10⁷ pfu/mL and the expressed protein was detected by western blot. In addition, it has been demonstrated that Mito-PTEN promoted apoptosis of A431 cells. Take together, the successful generation of adenoviral recombinant of Mito-PTEN, which could induce apoptosis in A431 cells, sets up a basis for further functional studies of mitochondrial PTEN and provides us a potential tool for cancer treatment in future.

Keywords : Mito-PTEN ; Cox VII ; adenovirus ; mitochondria ; apoptosis

Foundation item :National Natural Science Foundation of China(90408024 ; 30470855)

* Corresponding author. Tel 86-10-64807598 ; Fax 86-10-64807569 ; E-mail :jiangxi@im.ac.cn

Received : 12 April 2007 / Accepted : 16 May 2007 / Revised : 14 June 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>