

PTEN基因联合多西环素抑制黏液表皮样癌细胞系端粒酶活性的研究

刘斌 吴军正 关素敏 李焰 徐小方

(第四军医大学口腔医学院 口腔生物学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 探讨外源性PTEN抑癌基因联合多西环素对人黏液表皮样癌细胞系端粒酶活性的影响。方法 用脂质体将野生型PTEN基因导入黏液表皮样癌细胞系,再用不同质量浓度的多西环素处理细胞,采用MTT比色法测定细胞存活,用端粒酶重复扩增法-酶联免疫吸附(TRAP-ELISA)测定细胞端粒酶活性。结果 与对照细胞比较,野生型PTEN基因明显增加癌细胞对多西环素的敏感性,增敏比为1.65~4.75倍。PTEN基因转染或多西环素诱导癌细胞端粒酶活性明显下降($P<0.05$),二者联合应用对癌细胞端粒酶活性抑制更为显著($P<0.01$)。结论 PTEN抑癌基因联合多西环素对人黏液表皮样癌细胞系端粒酶活性具有显著的协同抑制效应。

[关键词] 多西环素; 黏液表皮样癌; 端粒酶

[中图分类号] R 782 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.05.020

PTEN tumor suppressor gene combined with doxycycline inhibites telomerase activity in human mucoepidermoid carcinoma cell line LIU Bin, WU Jun-zheng, GUAN Su-min, LI Yan, XU Xiao-fang. (Dept. of Oral Biology, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of PTEN tumor suppressor gene combined with doxycycline on telomerase activity in human mucoepidermoid carcinoma cell line. **Methods** The wild-type PTEN tumor suppressor gene or empty vector was introduced into mucoepidermoid carcinoma cell line *in vitro*, then the cancer cells were treated with doxycycline. Cancer cell survival was determined by MTT assay. Telomerase activity was determined using telomerase repeat amplification protocol-enzyme-linked immunosorbent assay (TRAP-ELISA). **Results** Compared to the control cells, cancer cells transfected with the wild-type PTEN gene showed growth inhibition and increased sensitivity to doxycycline, and the ratio of augment of drug sensitivity was 1.65-4.75. The telomerase activity in cancer cells treated with PTEN gene transfection or doxycycline alone decreased, however, telomerase activity in combined group decreased more remarkably. **Conclusion** PTEN gene in combination with doxycycline has significant inhibitory effect on telomerase activity in cancer cells.

[Key words] doxycycline; mucoepidermoid carcinoma; telomerase

端粒酶是一种维持染色体结构和功能稳定的核糖核蛋白体聚合酶,其激活与肿瘤恶性行为关系密切^[1]。抑制肿瘤端粒酶活性能导致癌细胞增殖和侵袭减弱^[2]。PTEN基因是近年发现的一种具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,参与细胞生长及肿瘤细胞浸润、血管发生及肿瘤转移的调节^[3],并且具有抑制端粒酶活性的作用^[4]。多西环素是一种传统的抗生素,近年发现其新用途,具有抗肿瘤侵袭和转移的作用^[5]。本文报道PTEN基因转染联合多西环素

对人高转移性涎腺黏液表皮样癌细胞系增殖和端粒酶活性的影响,探讨两者是否有协同抑癌效应。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

含野生型PTEN抑癌基因cDNA重组逆转录病毒表达质粒pBp-PTEN及空载体pBabe-puro质粒(pBp)(美国加州大学Ludwig癌症研究所Furnari教授构建并惠赠),多西环素(doxycycline hyclate,简记为Doxy, Sigma公司,美国),RPMI 1640培养基(Gibco公司,美国),胎牛血清(杭州四季青公司),脂质体试剂盒(Gibco公司,美国),端粒酶重复扩增法-酶联免疫吸附(telomerase repeat amplification protocol en-

[收稿日期] 2009-08-18; [修回日期] 2009-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30470471)

[作者简介] 刘斌(1960—),男,湖北人,教授,博士

[通讯作者] 刘斌, Tel: 029-84776175

zyme-linked immunosorbent assay, TRAP-ELISA)检测盒(Boehring Mannheim公司,德国), GenAmp 9600型PCR仪(Bio-Rad公司,美国), EL312型ELISA读数仪(Bio-Tek公司,美国)。

1.2 细胞系及培养

人高转移性涎腺黏液表皮样癌细胞系M3SP2由第四军医大学口腔医学院生物学教研室建立。细胞用体积分数为10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,在37℃、体积分数为5%CO₂及饱和湿度条件下培养。

1.3 基因转染

按照本课题组以前的实验方法进行^[6]。简言之,按柱离心式质粒抽提纯化试剂盒的方法,提取和纯化质粒pBp-PTEN及空载体pBp。按Lipofectamine脂质体试剂盒的方法,将pBp-PTEN或pBp质粒导入M3SP2细胞,0.5 μg·mL⁻¹嘌呤霉素筛选阳性克隆并扩大培养、鉴定。实验细胞命名为M3SP2-PTEN,对照细胞命名为M3SP2-pBp。

1.4 药物敏感性试验

将每毫升1×10⁴个的M3SP2-pBp和M3SP2-PTEN细胞悬液,分别以每孔100 μL接种于96孔培养板中,培养24 h后,加入100 μL含梯度质量浓度(0、10、50 mg·L⁻¹)Doxy的培养液,每组平行4个样本,继续培养至第1、3、5天时,终止培养,按常规MTT比色法^[3]测定各孔细胞吸光度值A,绘制Doxy剂量效应曲线和时间效应曲线,计算半数抑制浓度(the half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)和增敏倍数。

1.5 端粒酶活性检测

实验分4组,第1组为M3SP2-pBp细胞;第2组为M3SP2-PTEN细胞;第3组为M3SP2-pBp细胞加10 mg·L⁻¹Doxy(简记为M3SP2-pBp/Doxy),第4组为M3SP2-PTEN细胞加10 mg·L⁻¹Doxy(简记为M3SP2-PTEN/Doxy)。分别制备细胞悬液,接种于100 mL培养瓶培养,培养24 h后,1、2组更换新鲜培养液,3、4组更换含10 mg·L⁻¹ Doxy的培养液,培养至第4天时,收获1×10⁶个细胞,参照文献应用TRAP-ELISA方法检测细胞端粒酶活性^[7]。在ELISA读数仪上测定在450 nm/630 nm的吸光度值A,以A值作比较,判定相对端粒酶活性。

1.6 统计学处理

实验数据应用SPSS 11.0软件进行t检验。

2 结果

2.1 PTEN基因联合Doxy对黏液表皮样癌细胞体外生长的影响

Doxy对M3SP2-pBp和M3SP2-PTEN细胞体外生长的抑制效应呈现剂量依赖性和时间依赖性的特点

(图1)。Doxy作用于M3SP2-pBp细胞第1、3、5天时半数抑制剂量(IC₅₀)分别为41.8、24.1、8.6 mg·L⁻¹; Doxy作用于M3SP2-PTEN细胞第1、3、5天时IC₅₀分别为8.8、6.6、5.2 mg·L⁻¹, M3SP2-PTEN细胞对Doxy的敏感性分别增加了4.75、3.65和1.65倍,结果表明转染外源性PTEN抑癌基因的M3SP2-PTEN细胞对Doxy的敏感性明显增加。10 mg·L⁻¹ Doxy作用癌细胞5 d时,单用Doxy组和Doxy联合PTEN转染组的细胞生长抑制率分别为57.6%和83.3%。

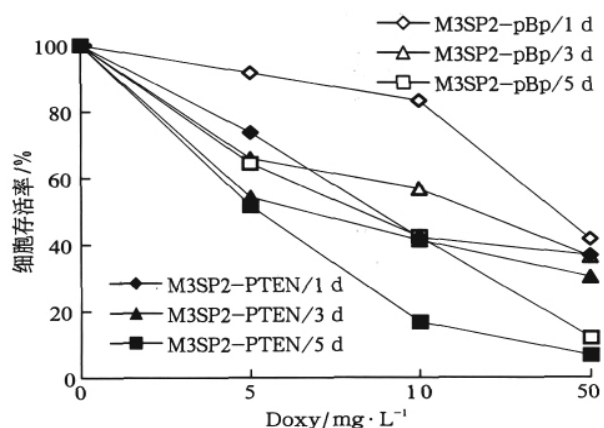


图1 Doxy对M3SP2-pBp和M3SP2-PTEN细胞的剂量效应曲线

Fig 1 Dose-effect curve of M3SP2-pBp and M3SP2-PTEN cells exposed to Doxy

2.2 PTEN基因联合Doxy对黏液表皮样癌细胞端粒酶活性的影响

M3SP2-pBp、M3SP2-PTEN、M3SP2-pBp/Doxy和M3SP2-PTEN/Doxy组细胞相对端粒酶活性检测结果分别为0.175、0.139、0.131和0.084(图2)。黏液表皮样癌细胞与阳性对照(K562细胞)比较,保持较高的端粒酶活性,但是当转染外源性野生型PTEN抑癌基因导致癌细胞端粒酶活性明显下降($P<0.05$)。单用Doxy处理也同样诱导癌细胞端粒酶活性明显下降($P<0.05$)。然而,PTEN抑癌基因联合Doxy对黏液表皮样癌细胞端粒酶活性抑制更为显著,差别有统计学意义($P<0.01$)。

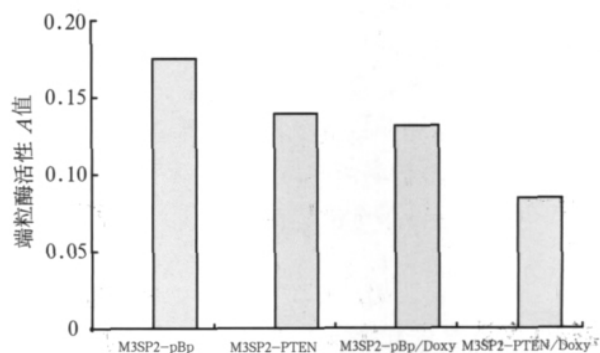


图2 PTEN基因和Doxy对癌细胞端粒酶活性的影响

Fig 2 Effect of PTEN gene and Doxy on telomerase activity in cancer cells

3 讨论

人端粒酶是一种核蛋白复合体,它主要是由端粒酶催化亚基(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、端粒酶RNA模板和端粒酶相关蛋白-1三部分组成,其主要功能在于合成端粒序列以维持其长度的稳定性,它能够以自身的RNA为模板,合成TTAGGG重复序列,补偿端粒的丢失和阻止端粒的缩短,使细胞逃脱程序性死亡或者无限增殖^[1]。端粒酶的激活能使肿瘤细胞获得无限增殖的能力,可能与肿瘤的分化、复发、侵袭和转移有关^[8-9]。大多数肿瘤组织中端粒酶具有很高的活性。在涎腺恶性肿瘤中(包括黏液表皮样癌)均有hTERT mRNA阳性表达,其活性与涎腺癌的病理分级有关,其恶性程度越高,hTERT mRNA表达越强^[5]。研究^[2]表明,抑制肿瘤端粒酶活性能导致癌细胞增殖抑制、凋亡增加和侵袭减弱。因此,端粒酶成为近年来恶性肿瘤治疗研究的重要靶标。

PTEN基因是迄今唯一发现的具有双特异性磷酸酶的抑癌基因,它具有脂质磷酸酶活性和蛋白磷酸酶活性,能使某些磷脂或蛋白激酶去磷酸化,在多种细胞活动过程中发挥重要作用^[3]。近年来,研究^[4]表明,转染野生型PTEN基因也能够抑制肿瘤细胞端粒酶活性。

多西环素是一种常用的四环素类半合成抗生素,临床用于呼吸道感染、泌尿道感染、胆道感染及牙周病等。近年来,为传统抗感染老药多西环素开发出新的用途,研究表明它对高侵袭性的胰腺癌具有明确的增殖抑制作用^[5,10],与传统化疗药顺铂联合应用具有协同抑制乳腺癌转移的作用^[11]。

人涎腺高度恶性黏液表皮样癌具有侵袭性强、转移率高和预后差的临床特点。该肿瘤临床治疗失败的最主要原因就在于很难控制肿瘤细胞的侵袭和转移。本课题组以前的研究^[12]表明,转染野生型PTEN抑癌基因对高转移性涎腺黏液表皮样癌细胞系生长、黏附、运动和侵袭等生物学行为具有抑制作用。考虑到肿瘤侵袭特性与端粒酶活性有密切关系,而PTEN抑癌基因和多西环素都具有抗侵袭作用,将廉价多西环素与独特基因疗法联合应用能否增强PTEN基因的抑制肿瘤增殖和端粒酶活性作用呢?

本实验结果表明,外源性PTEN抑癌基因导入高转移性黏液表皮样癌细胞能够诱导癌细胞增殖抑制,并且增强癌细胞对多西环素的敏感性以及导致端粒酶活性显著下降。文献报道PTEN抑癌基因抑制端粒酶活性的机制可能是通过抑制Akt激酶活化,

下调端粒酶关键组分hTERT mRNA水平,进而导致端粒酶活性降低^[4]。本研究还显示多西环素对黏液表皮样癌细胞体外生长具有显著的抑制效应,并呈现剂量依赖性和时间依赖性的特点。多西环素抑制癌细胞生长的作用机制与PTEN基因抑癌机制有相同之处,对PI3K信号转导通路起负调节作用,抑制癌细胞生长^[13]。与PTEN抑癌基因转染或多西环素单用比较,PTEN抑癌基因联合应用多西环素对高转移性黏液表皮样癌细胞增殖和端粒酶活性的抑制作用更显著。其作用机制可能与PTEN基因抑制端粒酶活性,进而增强癌细胞对多西环素的敏感性有关,有关其精细机制仍需深入研究。最近本课题组的实验证实,PTEN抑癌基因联合应用多西环素对高转移性黏液表皮样癌细胞体外侵袭具有协同抑制效应。总之,该研究尝试用价格低廉、无明显毒副作用的多西环素促进PTEN基因抑制癌细胞增殖和端粒酶活性,可为基因治疗与传统抗感染药物联合用于肿瘤治疗提供新的思路。

【参考文献】

- [1] Folini M, Gandellini P, Zaffaroni N. Targeting the telosome : Therapeutic implications[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1792 (4) 309-316.
- [2] 周雪峰, 王建军, 王家顺, 等. 人端粒酶逆转录酶基因沉默对肺腺癌细胞侵袭、增殖、凋亡的影响[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25 (1) 33-35.
ZHOU Xue-feng, WANG Jian-jun, WANG Jia-shun, et al. RNAi of human telomerase reverse transcriptase gene on invasion, proliferation and apoptosis of human lung adenocarcinoma cell line[J]. *J Pract Med*, 2009, 25(1) 33-35.
- [3] Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy[J]. *Oncogene*, 2008, 27(41) : 5477-5485.
- [4] Zhou C, Bae-Jump VL, Whang YE, et al. The PTEN tumor suppressor inhibits telomerase activity in endometrial cancer cells by decreasing hTERT mRNA levels[J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 101(2) 305-310.
- [5] Fryer RA, Galustian C, Dalglish AG. Recent advances and developments in treatment strategies against pancreatic cancer [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2009, 4(2) :102-112.
- [6] 刘斌, 吴军正, 王廷, 等. PTEN抑癌基因转染黏液表皮样癌细胞系M₃SP₂的建立和鉴定[J]. *实用口腔医学杂志*, 2002, 18(1) : 59-61.
LIU Bin, WU Jun-zheng, WANG Ting, et al. Transfection of mucoepidermoid carcinoma M₃SP₂ cells with tumor suppressor gene PTEN[J]. *J Pract Stomatol*, 2002, 18(1) 59-61.
- [7] Park SE, Yoo HS, Jin CY, et al. Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human lung carcinoma cells by the water extract of *Cordyceps militaris*[J]. *Food Chem Toxicol*,

率高达77%有一定区别,这可能由于其病例较少有关,仅有22例。

统计学分析结果显示,有临床症状与无临床症状的粪肠球菌检出率无统计学差异($P>0.05$),但在咬合痛与非咬合痛的病例中粪肠球菌的检出率有显著性差异($P>0.05$),提示粪肠球菌可能是导致咬合痛的主要病原菌。有临床症状且有根尖周明显破坏的病例较无临床症状无根尖周破坏的病例粪肠球菌检出率高($P<0.05$),有根尖周破坏的病例与无根尖周破坏的病例中粪肠球菌的检出率存在显著性差异($P<0.05$)。表明再治疗根管内粪肠球菌的检出率与根尖周破坏呈正相关,而在根尖周破坏的情况下,有症状的病例较无症状的病例粪肠球菌检出率高。Kayaoglu等^[7]研究发现,粪肠球菌定植于根管系统,引起牙髓根尖周病的主要毒力因子有聚集物质、肠球菌表面蛋白、肠球菌胶原蛋白黏附素、脂磷壁酸、透明质酸酶及溶细胞素等。透明质酸酶能够降低体内透明质酸的活性,升高组织液的渗透能力,导致细胞肿胀坏死,这可能与粪肠球菌引起的根尖周组织的咬合痛有关。溶细胞素能抑制细胞的自我修复,促使局部恶化,损害细胞膜,这可能导致了根尖周病变不愈合或产生新的根尖周病变。

PCR技术能够应用于细菌检测的关键是核糖体RNA,是所有生物中最保守的大分子物质^[8-9],本实验针对粪肠球菌16S rRNA的保守区域设计特异的寡核苷酸引物,对其进行特异的扩增,进而达到鉴别粪肠球菌的目的。PCR能识别复杂根管环境中死菌或者有活力但是无法用培养法培养出的粪肠球菌所释放的DNA^[10],对粪肠球菌检测的精确度明显大于传统的微生物培养法,确保了实验的准确性。

[参考文献]

- [1] Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004, 97(1) : 85-94.
- [2] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, et al. *Actinomyces species*, *Streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections[J]. J Endod, 2002, 28(3) : 168-172.
- [3] Siqueira JF Jr. Endodontic infections : Concepts, paradigms, and perspectives [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002, 94(3) : 281-293.
- [4] Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus spp* [J]. Oral Microbiol Immunol, 2005, 20(1) : 10-19.
- [5] Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, et al. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation[J]. Int Endod J, 1997, 30(2) : 91-95.
- [6] Gomes BP, Pinheiro ET, Sousa EL, et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006, 102(2) : 247-253.
- [7] Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* : Relationship to endodontic disease[J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2004, 15(5) : 308-320.
- [8] Woese CR. Bacterial evolution[J]. Microbiol Rev, 1987, 51(2) : 221-271.
- [9] Tanner A, Maiden MF, Paster BJ, et al. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria [J]. Periodontol 2000, 1994, 5 : 26-51.
- [10] Signoretto C, Lleò MM, Tafi MC, et al. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(5) : 1953-1959.
- [11] Foroodi F, Duivenvoorden WC, Singh G. Interactions of doxycycline with chemotherapeutic agents in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells [J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(2) : 115-122.
- [12] 刘斌, 吴军正, 孙安, 等. PTEN基因转染对黏液表皮样癌细胞M₃SP₂增殖的抑制作用[J]. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(5) : 361-363.
- [13] LIU Bin, WU Jun-zheng, SUN An, et al. Transfection of the exogenous PTEN inducing growth inhibition of the mucoepidermoid carcinoma cell line M₃SP₂ *in vitro* [J]. West China J Stomatol, 2002, 20(5) : 361-363.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第534页)

2009, 47(7) : 1667-1675.

- [8] Woo HJ, Choi YH. Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity[J]. Int J Oncol, 2005, 26(4) : 1017-1023.
- [9] 郭欣, 陈春悠, 黎洁. 端粒酶逆转录酶在涎腺恶性肿瘤中的表达[J]. 中国综合临床, 2006, 22(11) : 1033-1035.
- GUO Xin, CHEN Chun-you, LI Jie. Expression of human telomerase reverse transcriptase in carcinoma of salivary gland[J]. Clin Med Chin, 2006, 22(11) : 1033-1035.
- [10] Son K, Fujioka S, Iida T, et al. Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells[J]. Anticancer Res, 2009, 29(10) : 3995-4003.
- [11] Foroodi F, Duivenvoorden WC, Singh G. Interactions of doxycycline with chemotherapeutic agents in human breast adenocarcinoma