

·基础研究·

PTEN 基因对子宫内膜癌细胞 PI3K/AKT 通路的影响

许成芳, 李小毛*, 李 田, 王小韵
(中山大学附属第三医院妇产科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨 *PTEN* 基因在子宫内膜癌 PI3K/AKT 通路中的作用, 评估 *PTEN* 基因在抗肿瘤治疗中的意义。【方法】利用慢病毒载体系统, 构建人 *PTEN* 基因 RNA 干扰慢病毒载体和 *PTEN* 基因过表达慢病毒载体, 分别转染 *PTEN* 野生型的 HEC-1A 细胞和 *PTEN* 突变型的 Ishikawa 细胞, 建立 *PTEN* 基因敲减及过表达的细胞模型, Western blot 方法检测 *PTEN* 基因敲减或过表达前后 *PTEN* 蛋白的表达和 AKT 通路的活化情况, MTT 法检测慢病毒转染前后细胞增殖的变化, 流式细胞术检测慢病毒转染前后细胞周期及细胞凋亡率的变化。【结果】①HEC-1A 细胞转染 *PTEN* 基因干扰慢病毒载体后, 细胞的增殖曲线和细胞凋亡率与对照组比较无明显变化。但 Ishikawa 细胞转染 *PTEN* 基因过表达慢病毒载体后, 增殖曲线和细胞凋亡率显示其生长呈明显抑制状态。②当 HEC-1A 细胞转染了 RNA 干扰病毒后(HEC-1A-RNAi), Western blot 结果显示 *PTEN* 蛋白表达下调, 其 EGFR, p-EGFR, mTOR, p-mTOR, AKT, p-AKT 蛋白表达增强, 当 Ishikawa 细胞转染了过表达载体病毒后(Ishikawa-PTEN), Western blot 结果显示其 *PTEN* 蛋白表达上调, p-EGFR, p-mTOR, AKT, p-AKT 蛋白表达减弱。③HEC-1A-RNAi 细胞周期中 G1 期细胞比例减少, S 期细胞比例增加, Ishikawa-PTEN 细胞周期中 G1 期细胞比例增加, S 期细胞比例减少。【结论】*PTEN* 基因可以抑制细胞增殖过程, 有可能成为子宫内膜癌患者基因治疗的选择之一。

关键词: 慢病毒载体; *PTEN* 基因; 子宫内膜癌; AKT; PI3K

中图分类号: R711.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2011)06-0701-07

Effect of Different *PTEN* Status on PI3K/AKT Pathway of Endometrial Cancer Cell Lines

XU Cheng-fang, LI Xiao-mao*, LI Tian, WANG Xiao-yun

(Department of Obstetrics and Gynecology, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objectives】To explore the function of *PTEN* gene in the PI3K/AKT pathway, to evaluate the function of *PTEN* gene in antitumor therapy. 【Methods】Two lentiviral vectors were constructed; one was used to conduct the RNA interference against *PTEN* gene, another was used to over-express the wild type *PTEN* gene. These two vectors were transduced into the two endometrial cancer cell lines with different *PTEN* status. Cell viability was evaluated by MTT assay. Cell apoptosis and cell cycle were evaluated by flow cytometry. Western blotting was performed to evaluate the related protein alteration in PI3K/AKT signaling pathway after the cell transfection. 【Results】①When *PTEN* was knocked down with siRNA on HEC-1A cells (*PTEN* wild type), there was no significant change in both cell viability and cell apoptosis rate compared with HEC-1A cells. On Ishikawa cells (*PTEN* mutated), when *PTEN* gene was over-expressed, the results of cell viability and cell apoptosis rate showed cell proliferation was inhibited obviously; ②Western blot results demonstrated that *PTEN* expression in HEC-1A-RNAi cells was abated, expression of EGFR, p-EGFR, mTOR, p-mTOR, AKT, and p-AKT were up-regulated, PI3K/AKT pathway was activated. In Ishikawa-*PTEN* cells with *PTEN* over-expressed, the results manifested that expression of EGFR, p-EGFR, mTOR, and p-mTOR, AKT, and p-AKT were down-regulated, PI3K/AKT pathway was inhibited. ③When *PTEN* was knocked down, the proportion of cells in G1 phase decreased and the proportion of cells in S phase increased. By contrast, when *PTEN* over-expressed, the proportion of cells in G1 phase increased and the proportion of cells in S phase decreased. 【Conclusions】*PTEN* genes can restrain cell proliferation process, might become one of the choices in endometrial carcinoma gene therapy.

Key words: lentiviral vectors; *PTEN* gene; endometrial cancer; PI3K; AKT

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2011, 32(6): 701-707]

收稿日期: 2011-06-09

基金项目: 国家自然科学基金(30772332); 澳门科学技术发展基金(002/2009/A); 广东省妇幼安康工程子宫内膜癌防治项目(2010)

作者简介: 许成芳, 主治医师, 在读博士生, E-mail: lindaxu@21cn.com; * 通信作者: 李小毛, 教授, 博士生导师, E-mail: tigerlee777@163.com

近年来,磷酸肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号转导通路成为子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)发生发展分子水平研究上的热点。研究发现,该信号通路与肿瘤的发生发展、转移、治疗耐药性密切相关,选择性抑制 PI3K 或 AKT 活性,降低 AKT 磷酸化水平,将会使细胞对化疗、放疗所致凋亡的敏感性增加。抑癌基因 PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome Ten)为 PI3K/AKT 通路的上游信号分子,其在肿瘤的发生和发展过程中起重要作用^[1-4]。由于 PTEN 基因可作用于 PI3K/AKT 信号传导通路,调节细胞的生长同时还可以拮抗 PI3K/AKT 通路发挥肿瘤抑制作用,因此 PTEN 基因可作为一种新型的抑癌基因,其作用机制独特,为肿瘤的基因治疗和开发新的抗肿瘤药物,提供了新的靶点。为了探讨 PTEN 基因在子宫内膜癌 PI3K/AKT 通路中的作用,评估 PTEN 基因在抗肿瘤治疗中的意义,本研究利用慢病毒载体系统,构建人 PTEN 基因 RNA 干扰慢病毒载体和 PTEN 基因过表达慢病毒载体,分别转染 PTEN 野生型的 HEC-1A 细胞和 PTEN 突变型的 Ishikawa 细胞,建立 PTEN 基因敲减及过表达的细胞模型,并对其生物特性进行检测。

1 材料与方 法

1.1 材 料

①人 PTEN 基因 RNAi 慢病毒载体和 PTEN 基因过表达慢病毒载体由上海吉凯基因化学有限公司协助包装及提供。吉凯基因慢病毒载体系统由 pGC-LV 载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体三质粒组成。pGC-LV 载体中携带用于研究的 PTEN 基因及 RNAi 基因,并带有 GFP 标记。②细胞株:人子宫内膜癌细胞株 Ishikawa(PTEN 阴性)细胞及 HEC-1A 细胞(PTEN 阳性)由本室保存。③主要试剂:胎牛血清购自美国 GIBCO 公司;DMEM 购自美国 Hyclone 公司;兔抗人 pEGFR 单抗,EGFR 单抗,p-mTOR 单抗,mTOR 单抗,p-AKT 单抗,AKT 单抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司;鼠抗人 PTEN 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;鼠抗 β -actin 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司;细胞总蛋白提取试剂盒购自美国 Pierce 公司;蛋白分子质量 Marker 购自

本 Fermentas 公司;Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司;ANNEXIN V-PE APOPTOSIS DETECTION KIT/Cycle TEST PLUS DNA Reagent KIT 购自 BD Biosciences 公司。

1.2 细胞培养及转染实验

1.2.1 培养条件 Ishikawa 及 HEC-1A 于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养。在体积分数 5% CO₂、饱和湿度及 37 °C 下进行。两种细胞生长接近 90% 融合时,用质量浓度 0.25% 胰酶消化细胞,以 1:2 或 1:3 比例传代。

1.2.2 病毒载体稳定转染 ①转染前 1 d,将细胞用胰酶消化、计数按 Ishikawa 细胞 2.5×10^5 /孔,HEC-1A 细胞 5×10^4 /孔铺于 6 孔板中,使转染日细胞融合度为 80% ~ 90%。在铺板和转染期间避免使用抗生素;②将每个 6 孔板中的旧培养基吸尽,用不含血清的培养基洗涤 1 ~ 2 次;③然后每个六孔板中加入 1.5 mL 的无血清培养基;Ishikawa 细胞按 MOI 为 10 进行慢病毒转染,HEC-1A 细胞按 MOI 为 50 进行转染,分别设对照组,目的基因病毒转染组及阴性病毒转染对照组。④转染 4 h 后将无血清培养基换为含 100 mL/L 胎牛血清的培养基继续培养。

1.3 细胞转染荧光检测及转染后两株细胞形态学特点

分别转染后 48 h,吸尽六孔培养板中的培养液,并以无血清培养液洗涤 1 次,PBS 洗 2 次,倒置相差荧光显微镜下观察并拍照。

1.4 流式细胞仪检测细胞转染效率

成功转染 24 h 后的两株细胞,胰酶消化,1 000 r/min($r = 12$ cm)离心 5 min,PBS 洗涤细胞 2 次,PBS 重悬细胞,每组均取 3 孔平均值。流式细胞仪 FACSCan 检测,Cell Quest 软件分析。

1.5 MTT 检测子宫内膜癌细胞的增殖情况

Ishikawa 细胞和 HEC-1A 细胞分别以 7.5×10^3 /孔和 5×10^3 /孔接种于 96 孔板中,常规培养 24 h,待细胞贴壁后,按上述步骤转染细胞。并分别于转染后 24、48、72 h 倾去培养液,每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μ L 继续孵育 4 h,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min,用酶联免疫检测仪读取每孔的吸光度(A)值(λ 实验 = 492 nm, λ 参考 = 630 nm)。细胞存活率 = $A_{\text{试验组}}/A_{\text{对照组}} \times 100\%$;绘制细胞增殖曲线。实验重复 3 次,每次、每时段均设 3 复孔。

1.6 各组子宫内膜癌细胞凋亡及细胞周期分布

1.6.1 细胞凋亡 各组细胞转染后 72 h, 胰酶消化, 1 000 r/min ($r = 12$ cm) 离心 5 min 去除培养基, PBS 洗涤 1 次, 弃上清, 收集细胞。100 μ L PBS 重悬细胞, 分别加入 Annexin V-PE 和 7-AAD 试剂各 2.5 μ L, 室温中避光孵育 30 min, 1 h 内流式细胞仪 (FACS Calibur, Becton-Dickinson 公司) 检测, Cell Quest 软件分析。实验重复 3 次。

1.6.2 细胞周期分布 各组细胞转染后 72 h, 胰酶消化, 0.01 mol/L PBS 1.0 mL 洗涤细胞, 离心 5 min 去除 PBS, PBS 再洗涤 1 次, 弃上清, 收集细胞。加入溶液 A (胰酶缓冲液) 125 μ L, 反应 10 min, 加入溶液 B (胰酶抑制剂和 RNA 酶) 100 μ L, 反应 10 min, 最后加入溶液 C (碘化丙啶染液, PI) 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 避光染色 10 ~ 15 min, 1 h 内流式细胞仪 (FACS Calibur, Becton-Dickinson 公司) 检测细胞周期, CellQuest 软件分析细胞周期各时相的特点。每组实验重复 3 次。

1.7 Western blot 检测

提取细胞蛋白, 浓度检测, 取等量样本 50 μ g 上样于质量浓度 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 100 V, 电泳至溴酚蓝达分离胶, 加大电压至 200 V, 直至溴酚蓝达凝胶的底部, 半干电转移至硝酸纤维素膜上, 再转移至硝酸纤维素膜上, 膜用 TBST (50 mmol/L Tris.Cl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) 洗 3 \times 5 min, 加入 50 g/L 牛奶 (TBST 配制) 封闭抗体, 室温下摇床上摇 1 h。TBST 洗 3 \times 5 min, 加入各工作浓度抗体。4 $^{\circ}$ C 冰箱摇床过夜。TBST 缓冲液漂洗硝酸纤维素膜 3 次, 每次 15 min, 室温摇动; 质量浓度 5% 脱脂牛奶稀释二抗中 37 $^{\circ}$ C 摇床温育 1 h; TBST 缓冲液漂洗硝酸纤维素膜 3 次, 每次 15 min, 室温摇动; ECL 化学发光法检测结果; 结果处理: 扫描 X 线片, 输入计算机; 采用 BioRad 公司的图形分析软件 Quantity One 对 Western blot 的特异性条带进行灰度扫描, 分析电泳条带。

1.8 统计学分析

实验数据采用 SPSS 11.5 软件进行 t 检验和方差分析。各指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞转染荧光检测

两株细胞转染后 24 h 均可见较多特异性 GFP 绿色荧光的表达, 表明我们的转染相对成功。(图 1)。

2.2 细胞转染效率检测

流式细胞仪检测 HEC-1A 和 Ishikawa 细胞转染 24 h 效率分别为 $(56.83 \pm 8.85)\%$ 、 $(40.90 \pm 8.43)\%$ 。

2.3 慢病毒载体稳定转染后的子宫内膜癌细胞形态学观察

未转染 HEC-1A 和 Ishikawa 细胞分布呈现出四边型及多型, Ishikawa 细胞外形较 HEC-1A 为大, 更加表现为融合生长。稳定转染后, HEC-1A 细胞外观形态无显著改变; Ishikawa 细胞收缩明显, 体积缩小, 细胞边角变得锐利 (图 2)。

2.4 慢病毒载体稳定转染后细胞增殖情况的变化

两株子宫内膜癌细胞分别转染 *PTEN* 基因干扰慢病毒载体及 *PTEN* 基因过表达慢病毒载体, 并将 shRNA-NC-LV 和 GFP-LV 作为感染阴性病毒对照组, 另再设空白对照组。6 组细胞分别于转染后 24、48、72 h 采用 MTT 法检测其细胞存活率, 并绘制细胞增殖曲线 (图 3)。如图所示, HEC-1A 细胞转染 *PTEN* 基因干扰慢病毒载体及 shRNA-NC-LV 载体后, 细胞的增殖曲线与对照组比较无明显变化, 均与时间呈正相关。但 Ishikawa 细胞转染 *PTEN*-GFP-LV 载体后细胞增殖与空白对照组基本一致, 说明慢病毒载体本身对细胞增殖无影响。而转染 *PTEN* 基因过表达慢病毒载体后, 增殖曲线显示其生长呈明显抑制状态, 与时间成负相关, 提示 *PTEN* 基因对细胞的增殖有抑制作用。

2.5 慢病毒载体稳定转染后细胞凋亡情况的变化

流式细胞仪检测两株子宫内膜癌细胞转染慢病毒载体 72 h 后的细胞凋亡情况。如图 4 所示, 对照组正常 HEC-1A 细胞的凋亡率为: $(5.02 \pm 1.22)\%$, 转染 shRNA-LV 后细胞凋亡率为: $(3.73 \pm 1.19)\%$, 两组比较无显著性差异 ($t = 0.349, P > 0.05$)。对照组正常 Ishikawa 细胞的凋亡率为 $(4.17 \pm 1.09)\%$, 转染 *PTEN*-LV 后的凋亡率为 $(14.28 \pm 3.78)\%$, 两组间比较差异显著 ($t = -6.565, P < 0.05$)。

2.6 慢病毒载体稳定转染后细胞周期的变化

流式细胞仪检测两株子宫内膜癌细胞转染慢病毒载体 72 h 后细胞周期情况。如图 5 所示, 实验结果显示 HEC-1A 细胞转染 RNAi 慢病毒载体后, 与对照组比较, G1 期细胞明显减少 [对照组 vs

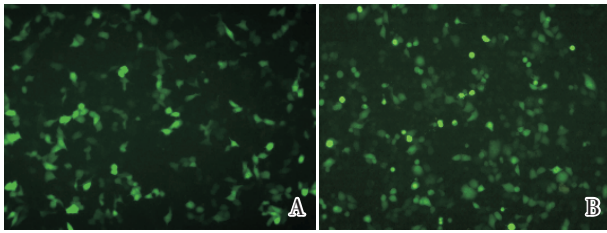


图 1 转染后 24 h HEC-1A 及 Ishikawa 细胞荧光表达
Fig.1 Fluorescence expression of HEC-1A and Ishikawa cells after 24-hour transfection

A: HEC-1A; B: Ishikawa. Fluorescence microscope $\times 100$

RNAi组: $(78.75 \pm 3.98)\%$ vs $(64.38 \pm 4.78)\%$, $P < 0.05$] S 期细胞明显增多[对照组 vs RNAi 组: $(11.73 \pm 2.18)\%$ vs $(24.48 \pm 3.73)\%$, $P < 0.05$]。与 HEC-1A 细胞相反, Ishikawa 细胞转染 PTEN 过表达慢病毒载体后, 其 G1 期细胞明显增多 [对照组 vs PTEN 组: $(38.62 \pm 3.56)\%$ vs $(52.95 \pm 4.78)\%$, $P < 0.05$], S 期细胞明显减少 [对照组 vs PTEN 组: $(48.03 \pm 3.89)\%$ vs $(37.40 \pm 4.35)\%$, $P < 0.05$]。提示 PTEN 基因成功将细胞阻滞在 G1 期, 引起细胞增殖抑制。

2.7 慢病毒载体稳定转染后 PI3K/AKT 通路的蛋白表达变化

2.7.1 慢病毒载体稳定转染后 PTEN 基因表达及干扰情况 慢病毒载体转染细胞 72 h 后, 细胞蛋白的 western blot 结果显示转染 PTEN 基因 RNA 干扰病毒的 HEC-1A 细胞 (PTEN 野生型) 中的 PTEN 基因表达明显减弱, 而感染阴性对照病毒后, PTEN 基因的表达没有明显变化; 而转染 PTEN

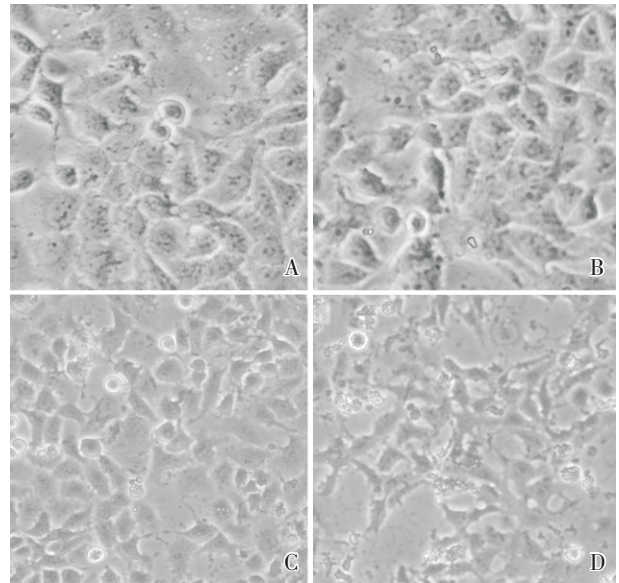


图 2 转染前后的 HEC-1A 和 Ishikawa 细胞形态比较
Fig.2 Morphological change of HEC-1A and Ishikawa cells before and after transfection

A: Log phase HEC-1A Cells; B: HEC-1A cells transfected with PTEN-RNAi-Lentivirus; C: Log phase Ishikawa Cells; D: Ishikawa cells transfected with PTEN-OV-Lentivirus; $\times 200$. There was no obvious morphological change in HEC-1A cells before and after transfection, however, after transfection, Ishikawa-PTEN cells seemed to be shranked, edge horn of cells became sharper.

基因过表达病毒的 Ishikawa 细胞 (PTEN 突变型) 中的 PTEN 基因呈阳性表达, 而感染阴性对照病毒后的细胞无 PTEN 基因的表达, 证明 PTEN 基因敲减及过表达模型构建成功, 而阴性对照病毒载体对实验结果无干扰 (图 6)。

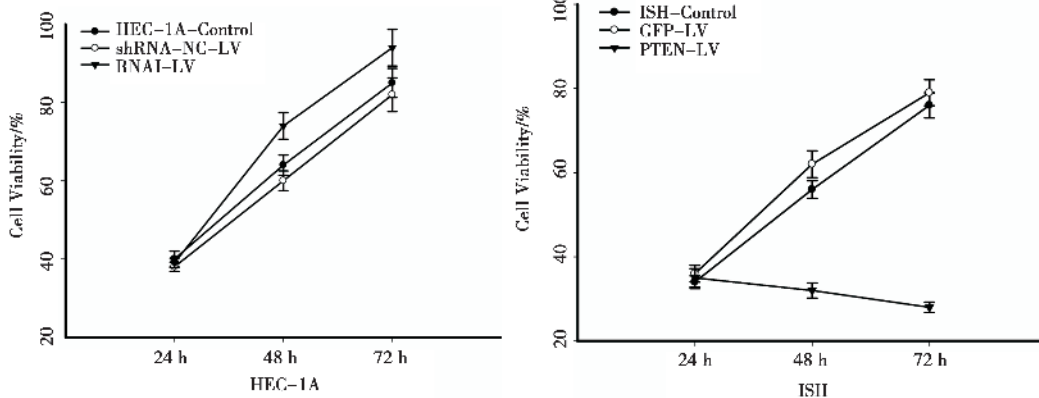


图 3 细胞转染前后增殖率的变化

Fig.3 Cell viability assessed by MTT assay before and after transfection

After PTEN-RNAi-Lentivirus transfected, the viability of HEC-1A cells did not show any alteration compared with untreated and control group during the time course. After PTEN-Lentivirus transfected, the viability of Ishikawa cells evidently decreased according to 48, 72 h time point respectively, but not 24 h time point.

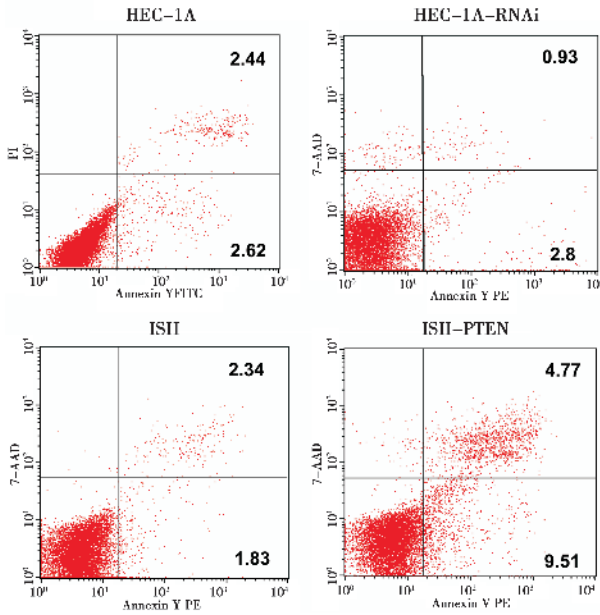


图 4 慢病毒载体稳定转染前后细胞凋亡情况的变化
Fig.4 Cell apoptosis assessed by FACS before and after transfection

There was no significant difference in cell apoptosis between two groups of cells before and after transfection ($P>0.05$). However, cell apoptosis increased sharply in transfected group of Ishikawa cells compared with untreated group ($P<0.05$), indicating *PTEN* over-expression enhance apoptosis in *PTEN*-deficient Ishikawa cells.

2.7.2 慢病毒载体稳定转染后 PI3K/AKT 通路的蛋白表达变化 慢病毒载体转染细胞 72 h 后,细胞蛋白的 western blot 结果显示干扰 *PTEN* 基因后的 HEC-1A 细胞,其 EGFR,p-EGFR,mTOR, p-mTOR,AKT,p-AKT 蛋白表达增强,而 *PTEN* 基因过表达的 Ishikawa 细胞,其 p-EGFR,p-mTOR, AKT, p-AKT 蛋白表达减弱,EGFR,mTOR 蛋白表达变化不大(图 7)。

3 讨论

PTEN 基因作为继 P53 之后发现的在人类肿瘤中第二个突变率最高的基因,自 1997 年发现起就受到众多研究者的关注。*PTEN* 基因是与细胞生长、凋亡、增殖及黏附等多种细胞生物学相关的抑癌基因,是目前已知的子宫内膜癌中突变率最高的基因,在妇科恶性肿瘤中,*PTEN* 基因与 EC 的关系最密切,*PTEN* 的突变率约为 23.5%~55%,是 EC 中发现的突变率最高的基因,也被称为子宫内膜癌的看法基因^[4-7]。

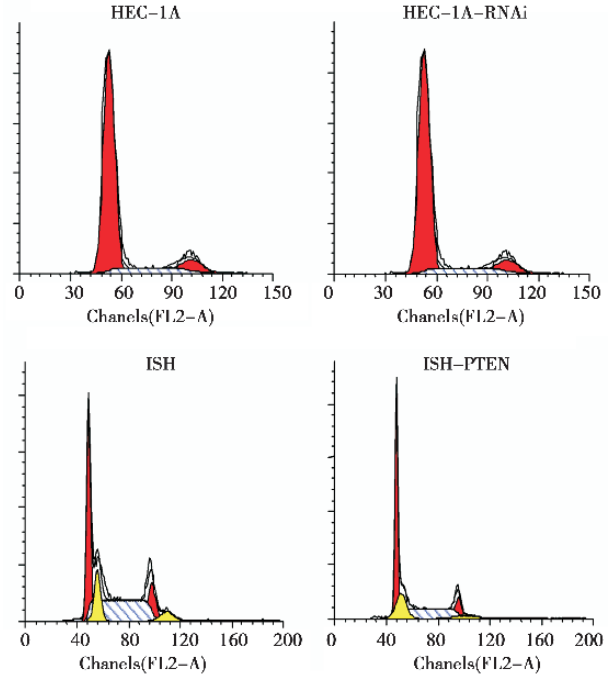


图 5 慢病毒载体稳定转染前后细胞周期的变化
Fig.5 Cell cycle alternation assessed by FACS before and after transfection

When *PTEN* was knocked down in HEC-1A cells, the proportion of cells in G1 phase decreased and the proportion of cells in S phase increased. By contrast, when *PTEN* over-expressed in Ishikawa cells, the proportion of cells in G1 phase increased and the proportion of cells in S phase decreased.

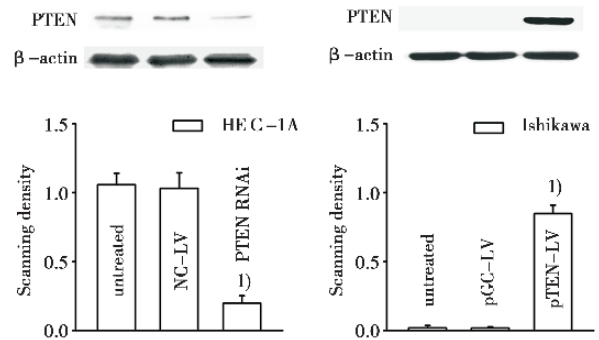


图 6 细胞转染慢病毒载体后 *PTEN* 基因的表达情况
Fig.6 *PTEN* gene expression before and after transfection

Western blot results showed that in endometrial cancer cell lines which transfected with lentiviral vectors, *PTEN* genes were knocked out or over-expressed successfully.

PTEN 的缺失使其对细胞生长的调控及对细胞凋亡、黏附和迁移的控制减弱,有助于癌变的发生和发展^[8]。在细胞黏连依赖信号中,*PTEN* 通过其脂质磷酸酶活性调节 FAK 和 shc 的磷酸化而

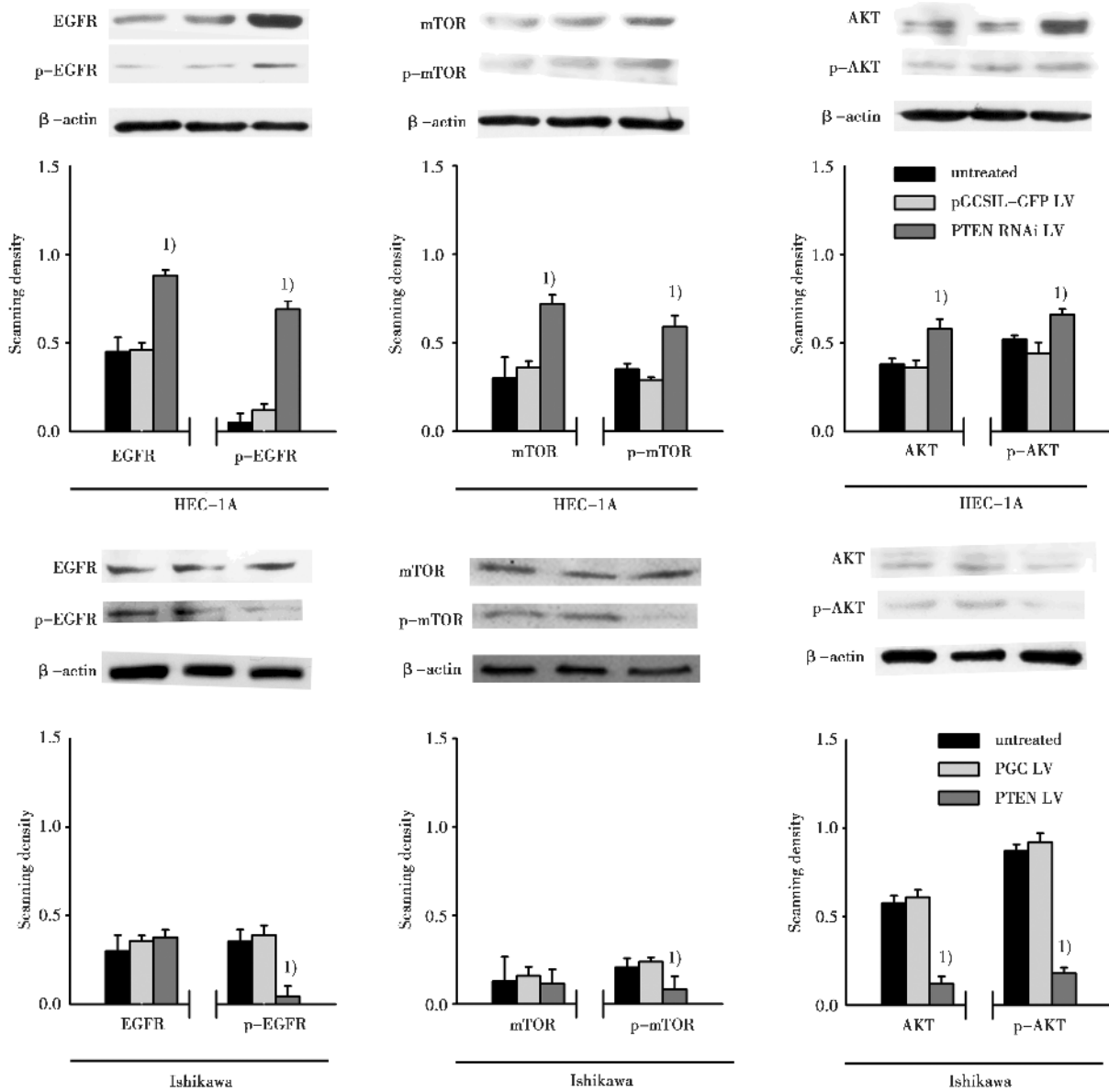


图 7 慢病毒载体稳定转染后细胞的 PI3K/AKT 通路蛋白表达变化

Fig.7 Related protein alteration in PI3K/AKT signaling pathway before and after transfection

Western Blot results demonstrated that in HEC-1A-RNAi cells, expression of EGFR, p-EGFR, mTOR, p-mTOR, AKT, p-AKT all up-regulated, PI3K/AKT pathway was activated. In Ishikawa-PTEN cells, the results manifested that expression of EGFR, p-EGFR, mTOR, p-mTOR, AKT, and p-AKT all down-regulated, PI3K/AKT pathway was inhibited. 1) represents significant difference between treated and untreated cells.

影响细胞的黏连和迁移, 抑制肿瘤细胞的浸润和转移^[9-10]。Matsushima 等^[11]将外源性 *PTEN* 基因导入 14 个均为 *PTEN* 基因突变的子宫内膜癌细胞系中, 经 cDNA 微阵列技术分析他们的基因表达谱, 结果发现, 外源性 *PTEN* 基因可使多种细胞周期阻断因子、细胞信号转导分子、细胞增殖的负性调节因子上调; 同时也可以降调多种与细胞增殖、转录及代谢酶等有关的因子。Sakurada 等^[12]

进行了 *PTEN* 治疗子宫内膜癌的实验研究, 突变型 *PTEN* 和野生型 *PTEN* 子宫内膜癌细胞株各两株, 用 *PTEN* 重组腺病毒载体转染, 体外实验显示细胞生长被抑制、凋亡增强, 在动物体内成瘤性被抑制。Zhu 等^[13]将野生型 *PTEN* 基因转入缺乏内源性 *PTEN* 基因的 AN3CA 和 RL-952 细胞系中, 结果显示, 细胞的生长受到抑制, 提示 *PTEN* 基因可以广泛地抑制细胞增殖过程, 有成为子宫内膜

癌基因治疗的可能。

为了探讨 *PTEN* 基因在子宫内膜癌 PI3K/AKT 通路中的作用, 评估 *PTEN* 基因在抗肿瘤治疗中的意义, 本研究利用慢病毒载体系统, 成功构建了人 *PTEN* 基因 RNA 干扰慢病毒载体和 *PTEN* 基因过表达慢病毒载体, 分别转染 *PTEN* 野生型的 HEC-1A 细胞和 *PTEN* 突变型的 Ishikawa 细胞, 建立 *PTEN* 基因敲减及过表达的细胞模型。实验结果显示, 当 *PTEN* 野生型的 HEC-1A 细胞转染了 RNA 干扰病毒后, Western blot 结果显示 *PTEN* 蛋白表达明显减弱甚至无表达, 其 EGFR, p-EGFR, mTOR, p-mTOR, AKT, p-AKT 蛋白表达增强, 细胞周期中 G1 期细胞比例减少, S 期细胞比例增加, 提示 *PTEN* 基因被成功干扰, PI3K/AKT 通路激活, 促进细胞增殖, 与国内外相关报道一致^[14-15]。而 *PTEN* 基因突变型的 Ishikawa 细胞转染了过表达载体病毒后, Western blot 结果显示其 *PTEN* 蛋白明显表达, p-EGFR, p-mTOR, AKT, p-AKT 蛋白表达减弱, 细胞增殖出现明显抑制, 细胞周期中 G1 期细胞比例增加, S 期细胞比例减少, 提示 *PTEN* 基因成功抑制了 PI3K/AKT 通路, 将细胞阻滞在 G1 期, 引起细胞凋亡, *PTEN* 基因可以抑制细胞增殖过程, 有可能成为子宫内膜癌患者基因治疗的选择之一。*PTEN* 基因敲减的 HEC-1A 细胞模型和 *PTEN* 基因过表达的 Ishikawa 细胞模型的成功建立, 可以为体外研究子宫内膜癌的发病机制提供基础, 有助于体外研究其他相关因素与 *PTEN* 的关系及其在子宫内膜癌发病机制中的作用。

参考文献:

- [1] Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of *PTEN* in tumor suppression[J]. *Cell*, 2000, 100(4): 387-390.
- [2] Hopkin K. A surprising function for the *PTEN* tumor suppressor [J]. *Science*, 1998, 282(5391): 1027, 1029-1030.
- [3] Tamura M, Gu J, Matsumoto K, et al. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor *pten*[J]. *Science*, 1998, 280(5369): 1614-1617.
- [4] Ali IU. Gatekeeper for endometrium: The *PTEN* tumor suppressor gene[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92(11): 861-863.
- [5] Salvesen HB, Stefansson I, Kretzschmar EI, et al. Significance of *PTEN* alterations in endometrial carcinoma: a population-based study of mutations, promoter methylation and *pten* protein expression[J]. *Int J Oncol*, 2004, 25(6): 1615-1623.
- [6] Kimura F, Watanabe J, Hata H, et al. *PTEN* immunohistochemical expression is suppressed in g1 endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2004, 130(3): 161-168.
- [7] Salvesen HB, Stefansson I, Kalvenes MB, et al. Loss of *PTEN* expression is associated with metastatic disease in patients with endometrial carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 94(8): 2185-2191.
- [8] Gu J, Tamura M, Yamada KM. Tumor suppressor *PTEN* inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (map) kinase signaling pathways[J]. *J Cell Biol*, 1998, 143(5): 1375-1383.
- [9] Kurose K, Zhou XP, Araki T, et al. Frequent loss of *PTEN* expression is linked to elevated phosphorylated akt levels, but not associated with p27 and cyclin d1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(6): 2097-2106.
- [10] Schwartzbauer G, Robbins J. The tumor suppressor gene *PTEN* can regulate cardiac hypertrophy and survival[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(38): 35786-35793.
- [11] Matsushima-Nishiu M, Unoki M, Ono K, et al. Growth and gene expression profile analyses of endometrial cancer cells expressing exogenous *PTEN* [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(9): 3741-3749.
- [12] Sakurada A, Hamada H, Fukushima S, et al. Adenovirus-mediated delivery of the *PTEN* gene inhibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer[J]. *Int J Oncol*, 1999, 15(6): 1069-1074.
- [13] Zhu X, Kwon CH, Schlosshauer PW, et al. *PTEN* induces G(1) cell cycle arrest and decreases cyclin D3 levels in endometrial carcinoma cells [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(11): 4569-4575.
- [14] 赵丽君, 魏丽惠, 刘宁, 等. *PTEN* 基因敲减后 HEC-1A 细胞生长和信号通路变化的研究[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2008, 9(3): 191-195.
- [15] Chu EC, Tarnawski AS. *PTEN* regulatory functions in tumor suppression and cell biology[J]. *Med Sci Monit*, 2004, 10(10): RA235-241.

(编辑 张恩健)