

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.26.016

hTERT 启动子调控的 PUMA 腺病毒转染卵巢癌 COC1 细胞的研究*

李雨聪,王 冬[△]

(重庆市肿瘤研究所妇瘤科 400030)

摘要:目的 探讨卵巢癌 COC1 细胞中大量表达 p53 正向凋亡调控因子(PUMA)在抑制 COC1 细胞中的作用。方法 采用人端粒酶逆转录酶(hTERT)启动子调控的 PUMA 基因腺病毒载体(Ad-hTERT-PUMA)转染卵巢癌 COC1 细胞,通过细胞活性检测试剂盒和凋亡试剂盒研究 COC1 细胞的生长情况,同时分析表达 PUMA 的水平。结果 转染 Ad-hTERT-PUMA 后,PUMA 大量表达,抑制 COC1 细胞生长,促进细胞凋亡。结论 Ad-hTERT-PUMA 成功转染卵巢癌 COC1 细胞并大量表达,起到了抑制卵巢癌细胞增长的作用。

关键词:端粒,末端转移酶;p53 正向凋亡调控因子;卵巢肿瘤;腺病毒科

中图分类号:R737.31 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)26-3452-03

Recombinant adenovirus containing PUMA gene regulated by human telomerase reverse transcriptase promoter transfected into ovarian cancer COC1 cells*

Li Yucong,Wang Dong[△]

(Department of Gynecological Oncology,Chongqing Tumor Research Institute,Chongqing 400030,China)

Abstract: Objective To over-express the P53 upregulated modulator of apoptosis(PUMA) in ovarian cancer COC1 cells for playing the role to restrain the cell growth. **Methods** Adenovirus vector(Ad)-human telomerase reverse transcriptase promoter (hTERT)-PUMA was transfected into ovarian cancer COC1 cells. Then the growth of COC1 cells was studied by CCK-8 and the apoptosis kit and the level of PUMA was analyzed. **Results** After transfection of Ad-hTERT-PUMA,PUMA was over-expressed in COC1 cells,which restrained the cells growth and promoted the cell apoptosis. **Conclusion** Ad-hTERT-PUMA is successfully transfected into ovarian cancer COC1 cells and PUMA is over-expressed to play the role for restraining the cells growth.

Key words: telomerase;P53 up-regulate modulator of apoptosis;ovarian neoplasms;adenoviridae

据统计,全世界每年约 125 000 人死于卵巢癌^[1]。卵巢癌临床表现隐蔽,传统的治疗虽然可达到临床缓解,但 70%~80% 仍将复发^[2]。约一半的人类肿瘤发生与抑癌基因失活有关,而 p53 依赖的凋亡途径是很多肿瘤都存在的共同发病机制^[3]。虽然该机制未完全阐明,但大量数据证实通过转录激活不同的靶促凋亡基因也可以实现,这其中大部分与 p53 正向凋亡调控因子(PUMA)基因有着重要关系^[4]。虽然 PUMA 基因细胞凋亡的能力较早发现,但由于 PUMA 缺乏靶向性,在杀灭肿瘤细胞的同时连带正常组织细胞一并杀死,限制了其应用^[5]。目前,越来越多的基因治疗利用人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase,hTERT)启动子控制下游目的基因的表达,其有望成为比 p53 更好的基因治疗工具^[6-8]。本研究拟利用先前设计并构建好的 hTERT 启动子控制的 PUMA 腺病毒载体(Ad-hTERT-PUMA),转染卵巢癌细胞系 COC1,让 PUMA 在卵巢癌细胞中大量表达,观察其对 COC1 细胞的生长抑制作用和凋亡的影响,为实现卵巢癌的特异性基因靶向治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 卵巢癌 COC1 细胞购买于上海通派生物科技有限公司,细胞培养相关试剂均购自 Gibco 公司。PUMA 的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒、AnnexinV/FITC、PI 染色试剂

盒和细胞活性检测(CCK-8)试剂盒均购自上海生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Ad-hTERT-PUMA 转染 COC1 细胞 取对数生长的 COC1 细胞,消化计数,并以 1×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,37℃,5% CO₂,细胞培养箱过夜培养。取不同感染强度的 Ad-hTERT-PUMA 感染上述细胞继续培养,感染 90 min 后,弃去病毒液,再添加完全培养基继续培养。

1.2.2 转染后细胞生长情况 采用 CCK-8 法研究感染强度分别为 0、100、200、300 MOI(感染复数:感染时病毒与细胞数量的比值)的 Ad-hTERT-PUMA,用于感染 COC1 细胞 5 d 内细胞的生长情况。每一处理组至少设 6 个平行孔,实验重复 2 次。计算平均值及标准差,绘制剂量效应曲线。待培养一定时间后,以 CCK-8 法检测其光密度(OD)值。检测前弃去上清液,用培养液洗 3 次。每孔加入适量的 CCK-8 试剂。加入 CCK-8 试剂 2 h 后酶标仪测定,450 nm 波长的吸收值。最终以培养时间为横坐标,OD 值代表细胞相对数为纵坐标绘制生长曲线。

1.2.3 转染后细胞凋亡测定 取对数生长的 COC1 细胞,消化计数,并以 5×10^5 细胞接种于 6 孔板中培养。加入 Ad-hTERT-PUMA 感染 90 min 后,弃去病毒液,再添加完全培养

* 基金项目:重庆市卫生局课题(2011-2-366)。 作者简介:李雨聪(1981—),本科,主治医师,主要从事妇科肿瘤的研究。 [△] 通讯作者, Tel:13708301293;Email:cqwindow120@163.com。

基继续培养 48 h。用 PBS 重悬细胞,加入,混匀置于室温避光孵育 15 min,置于流式细胞仪检测,并计算凋亡率(%)=凋亡细胞数量/总细胞数量×100。

1.2.4 Western blot 检测 Ad-hTERT-PUMA 转染 COC1 细胞 0~48 h,提取 6 孔板中细胞的总蛋白。通过 SDS-PAGE 将 COC1 细胞提取液中的各种蛋白按照相对分子质量大小分离。采用湿式转膜将蛋白转印至硝酸纤维素膜上。将膜分别移入含一抗(hTERT 一抗稀释度 1:2 000,PUMA 一抗稀释浓度为 1:1 000)的 10 mL 溶液平皿中,4 ℃孵育过夜,1×TBST 漂洗膜 5 min 3 次。最后将膜在 37 ℃下染二抗(辣根过氧化物酶标记,稀释浓度为 1:1 000),再一次进行曝光,显影和定影。

1.2.5 ELISA 检测 将转染 0~48 h 后的 COC1 细胞提取总蛋白按照 PUMA 的 ELISA 试剂盒操作。

2 结 果

2.1 PUMA 抑制 COC1 细胞生长 腺病毒感染强度越高,COC1 细胞活性越低,生长越受到抑制。当感染强度为 300 MOI 时,细胞在 5 d 内,生长几乎停滞不前,450 nm 的 OD 值为未作转染处理(0 MOI)的细胞 OD 值的 4.3 倍,见图 1。

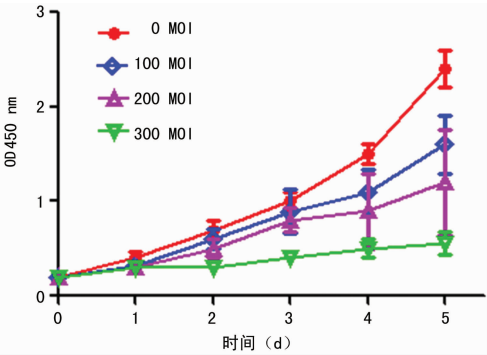


图 1 重组腺病毒质粒酶切鉴定

2.2 转染后细胞凋亡测定 采用经典的 AnnexinV/FITC 和 PI 染色法检测 PUMA 对 COC1 细胞凋亡的影响。染色后,经流式细胞仪检测并统计凋亡的细胞数量,分别计算出 0、100、200、300 MOI 的 Ad-hTERT-PUMA 转染 COC1 细胞 0、6、12、24 和 48 h 的凋亡率,见图 2。随着时间的增长,Ad-hTERT-PUMA 转染的细胞均出现凋亡率增长的趋势,同样,感染强度增加,凋亡率增大。

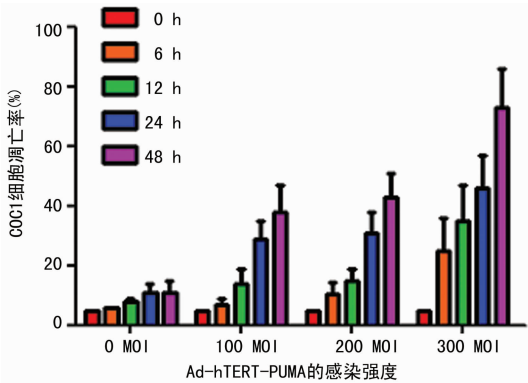
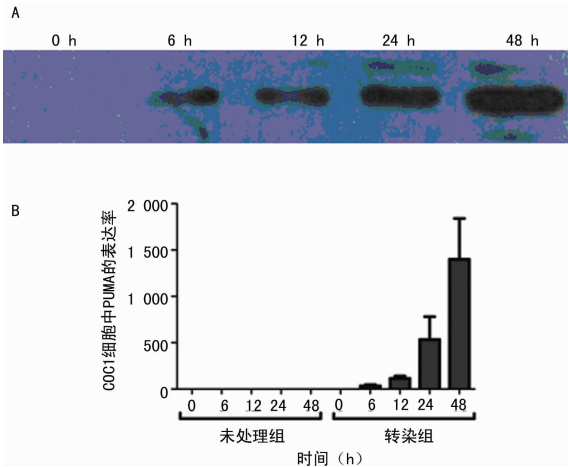


图 2 不同转染强度的 Ad-hTERT-PUMA 腺病毒在 0~48 h 内的凋亡率

2.3 细胞中 PUMA 的表达 为探讨 PUMA 诱导凋亡的机

制,本研究进一步从分子水平观察 PUMA 高表达对 COC1 细胞凋亡的影响。选取 300 MOI 的 Ad-hTERT-PUMA 转染 COC1 细胞,依次按 0、6、12、24 h 和 48 h 的时间点收取细胞并提取总蛋白。通过 Western blot 和 ELISA 检测 PUMA 的变化。结果表明,感染时间的延长,PUMA 表达量逐渐增加(图 3),而未转染 Ad-hTERT-PUMA 腺病毒的 COC1 细胞,未能检测到 PUMA 信号。



A:聚丙烯酰胺凝胶电泳;B:ELISA。

图 3 Ad-hTERT-PUMA 腺病毒感染和处理的 COC1 细胞在 0~48 h 内表达 PUMA 的水平

3 讨 论

卵巢癌是女性生殖系统最常见恶性肿瘤之一,病死率高居妇科恶性肿瘤之首,且近年发病率呈逐年上升趋势。由于卵巢癌具有发现晚,传统的手术不能根治,远期复发等特点,急需要探索一种新的有效杀灭肿瘤细胞的方法出现。因此,靶向、基因疗法等新兴治疗手段逐渐得到尝试,但结果不理想。

PUMA 为 Bcl-2 家族成员,p53 在转录水平上对其进行调控^[9]。大量研究表明,PUMA 能在依赖 p53 和非依赖 p53 途径中均发挥强大的促凋亡作用,并且其凋亡作用不受 p53 基因突变影响^[10-12],因此,PUMA 基因在恶性肿瘤凋亡中的研究已成为重要的基础和临床课题,其有望成为比 p53 更好的基因治疗工具。但是,PUMA 用于治疗恶性肿瘤也存在一个致命的缺点:PUMA 缺乏靶向性,在杀灭肿瘤细胞的同时,正常组织细胞也会凋亡^[8]。

另一方面,hTERT 为含有 1 132 个氨基酸残基的大分子蛋白,是人端粒酶的重要组成部分,它和其他 RNA 结构一起保证持续分化细胞中端粒的完整性。hTERT 启动子在端粒酶阳性的肿瘤细胞中被激活,而在端粒酶阴性的正常细胞中受抑制^[9]。hTERT 被降解后的蛋白或者多肽片段通过 MHC-I 复合体呈递于肿瘤细胞表面^[10],故具有高度特异性,被广泛用于各种恶性肿瘤的靶向治疗研究中。

基于以上两个方面,本研究设计了一种 Ad-hTERT-PUMA,利用 hTERT 的肿瘤特异性,让 PUMA 在卵巢癌细胞中大量表达,从而实现卵巢癌的特异性靶向治疗。可以看到,装载 Ad-hTERT-PUMA 的腺病毒感染的 COC1 细胞的生长受到明显的抑制,5 d 内,通过 CCK-8 的检测,细胞活性停滞不前。同时发现,随着时间的增长及感染强度的增加,Ad-hTERT-PUMA 转染的细胞均出现凋亡率增长的趋势,这也充

分说明了 PUMA 的表达可以有效地抑制细胞生长,促进细胞凋亡,从而实现卵巢癌基因治疗的目的。为了更直接的判定 PUMA 的过量表达,本研究分别通过 Western blott 和 ELISA 技术对转染 48 h 内的 PUMA 进行检测。结果证实了 PUMA 的特异性过量表达,且远远高于未作任何处理的 COC1 细胞。

综上所述,首次尝试并实现了 Ad-hTERT-PUMA 在卵巢癌细胞中大量表达,从而达到抑制细胞生长,促进细胞凋亡的目的。为 PUMA 基因应用于卵巢癌的基因治疗创造可能。

参考文献:

[1] Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological Cancer; The size of the problem[J]. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2006, 20(2): 207-225.

[2] 易晓芳, 丰有吉. 复发性卵巢癌的化疗进展[J]. 肿瘤学杂志, 2006, 12(2): 99-102.

[3] Pastor DM, Irby RB, Poritz LS. Tumor necrosis factor alpha induces p53 up-regulated modulator of apoptosis expression in colorectal cancer cell lines[J]. Dis Colon Rectum, 2010, 53(3): 257-263.

[4] Michalak EM, Villunger A, Adams JM, et al. In several cell types tumour suppressor p53 induces apoptosis largely via Puma but Noxa can contribute[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(6): 1019-1029.

[5] Gurzov EN, Germano CM, Cunha DA, et al. p53 up-regulated modulator of apoptosis(PUMA) activation contributes to pancreatic beta-cell apoptosis induced by proinflammatory cytokines and endoplasmic reticulum stress [J]. J Biol Chem, 2010, 285(26): 19910-19920.

[6] Zhou Z, Sturgis EM, Liu Z, et al. Genetic variants of a BH3-only pro-apoptotic gene, PUMA, and risk of

HPV16-associated squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. Mol Carcinog, 2012, 51 Suppl 1: S54-64.

[7] Spender LC, Carter MJ, O'Brien DI, et al. Transforming growth factor-β directly induces p53-up-regulated modulator of apoptosis(PUMA) during the rapid induction of apoptosis in myc-driven B-cell lymphomas [J]. J Biol Chem, 2013, 288(7): 5198-5209.

[8] Ma B, Shi J, Jia L, et al. Over-expression of PUMA correlates with the apoptosis of spinal cord cells in rat neuropathic intermittent claudication model [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e56580.

[9] Din S, Mason M, Volkers M, et al. Pim-1 preserves mitochondrial morphology by inhibiting dynamin-related protein 1 translocation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(15): 5969-5974.

[10] Majumdar AS, Hughes DE, Lichtsteiner SP, et al. The telomerase reverse transcriptase promoter drives efficacious tumor suicide gene therapy while preventing hepatotoxicity encountered with constitutive promoters [J]. Gene Ther, 2001, 8(7): 568-578.

[11] Jacob D, Bahra M, Schumacher G, et al. Gene therapy in colon cancer cells with a fiber-modified adenovector expressing the TRAIL gene driven by the hTERT promoter [J]. Anticancer Res, 2004, 24(5A): 3075-3079.

[12] Middelburg R, de Haas RR, Dekker H, et al. Induction of p53 up-regulated modulator of apoptosis messenger RNA by chemotherapeutic treatment of locally advanced breast Cancer[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(5): 1863-1869.

(收稿日期: 2014-03-08 修回日期: 2014-06-09)

(上接第 3451 页)

of programmed cell death 5 gene involves in regulation of apoptosis in gastric tumor cells[J]. Apoptosis, 2006, 11(6): 993-1001.

[9] 张雪梅, 滕琳, 刘启明, 等. PDCD5 与 Caspase-3 在人非小细胞肺癌中的表达[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(8): 1533-1536.

[10] Du YJ, Xiong L, Lou Y, et al. Reduced expression of programmed cell death 5 protein in tissue of human prostate Cancer[J]. Chin Med Sci J, 2009, 24(4): 241-245.

[11] Ruan GR, Qin YZ, Chen SS, et al. Abnormal expression of the programmed cell death 5 gene in acute and chronic myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2006, 30(9): 1159-1165.

[12] Wang Y, Li X, Wang L, et al. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/Troy and enhanced by PDCD5 overexpression[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 8): 1525-1532.

[13] Rui M, Chen Y, Zhang Y, et al. Transfer of anti-TFAR19 monoclonal antibody into HeLa cells by in situ electroporation can inhibit the apoptosis [J]. Life Sci, 2002, 71(15): 1771-1778.

[14] 焦建峰, 陈冠英, 黄玫, 等. rhTFAR19 蛋白质对 γ 射线诱导 MCF-7 细胞周期及凋亡影响的初步研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2000, 2(2): 14-16.

[15] 唐春兰, 杨和平, 周向东. DNA 损伤修复与肺癌顺铂耐药机制的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2011, 14(12): 960-964.

[16] Li H, Zhang X, Song X, et al. PDCD5 promotes cisplatin-induced apoptosis of glioma cells via activating mitochondrial apoptotic pathway[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(9): 822-830.

(收稿日期: 2014-03-11 修回日期: 2014-06-20)