

# 细胞穿透肽 VP22 对抑癌蛋白 PTEN 体外抗肿瘤作用影响的研究\*

李婷婷<sup>1</sup>, 杨勤<sup>2</sup>, 余娴<sup>3</sup>, 何冠军<sup>4</sup>, 雷军<sup>4△</sup>

(1. 川北医学院麻醉学系, 四川南充 637000; 2. 川北医学院附属医院感染科, 四川南充 637000; 3. 重庆医科大学附属第二医院药学部, 重庆 400010; 4. 川北医学院药学院, 四川南充 637000)

**[摘要]** **目的** 构建表达细胞穿透肽融合蛋白第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(PTEN)-VP22 的真核表达质粒, 在食管癌细胞 Eca109 细胞中验证细胞穿透肽 VP22 能否增强抑癌蛋白 PTEN 体外抗肿瘤作用。**方法** 通过本实验室前期构建成功的重组真核表达质粒 pcDNA3-PTEN、pcDNA3-PTEN-VP22 和 pcDNA3-VP22, 转染至 Eca109 细胞, 以 pcDNA3 空质粒转染作为阴性对照, 细胞免疫荧光法检测各组 PTEN 蛋白表达情况, Western blot 法检测各组 PTEN 蛋白和免抗磷酸化-Akt(p-Akt)蛋白的表达水平, CCK-8 法检测细胞增殖活性, 流式细胞术测细胞凋亡率。**结果** 与 pcDNA3 相比, pcDNA3-PTEN、pcDNA3-PTEN-VP22 都能抑制 Eca109 细胞增殖( $P < 0.05$ ), 促进 Eca109 细胞凋亡( $P < 0.05$ ); pcDNA3-PTEN-VP22 抗肿瘤活性显著高于 pcDNA3-PTEN( $P < 0.05$ ), pcDNA3-PTEN-VP22 的 p-Akt 表达显著低于 pcDNA3-PTEN( $P < 0.05$ )。**结论** 细胞穿透肽 VP22 能增强抑癌蛋白 PTEN 对 Eca109 细胞体外抗肿瘤活性, 其机制可能与其下调 p-Akt 表达水平有关。

**[关键词]** 食管肿瘤; 肿瘤蛋白质类; 重组融合蛋白质类; 转染; 肽类; PTEN; VP22; 基因治疗

**[中图分类号]** R966

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2017)03-0308-04

## Research on influence of cell penetrating peptides VP22 on in vitro anti-tumor effect of tumor suppressor protein PTEN\*

Li Tingting<sup>1</sup>, Yang Qin<sup>2</sup>, Yu Xian<sup>3</sup>, He Guanjun<sup>4</sup>, Lei Jun<sup>4△</sup>

(1. Department of Anesthesiology, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China;

2. Department of Infectious Disease, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong,

Sichuan 637000, China; 3. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University,

Chongqing 400010, China; 4. College of Pharmacy, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**[Abstract]** **Objective** To construct the eukaryotic expression plasmid of cell penetrating peptides fusion protein PTEN-VP22 and to verify whether cell penetrating peptides VP22 could enhance the in vitro anti-tumor effect of tumor suppressor protein PTEN in esophageal cancer Eca109 cells. **Methods** The recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3-PTEN, pcDNA3-PTEN-VP22 and pcDNA3-VP22 constructed by our laboratory at earlier stage were transfected into Eca109 cells respectively, and the cells transfected with empty plasmid pcDNA3 were used as negative control group. Immunofluorescence was used to detect the expression of PTEN protein in each group and PTEN-VP22 fusion protein, Western blot were used to determine the expression levels of PTEN and p-Akt protein, the cell proliferation activities were measured by CCK-8 method and the cell apoptosis rate was analyzed by flow cytometry. **Results** Compared with the pcDNA3 control group, the pcDNA3-PTEN group and pcDNA3-PTEN-VP22 group both inhibited the proliferation of Eca109 cells( $P < 0.05$ ) and promoted the apoptosis of Eca109 cells( $P < 0.05$ ) and the anti-tumor activities in pcDNA3-PTEN-VP22 group was significantly higher than that in the pcDNA3-PTEN group( $P < 0.05$ ). The expression level of p-Akt in the pcDNA3-PTEN-VP22 group was significantly lower than that in the pcDNA3-PTEN group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The cell penetrating peptides VP22 can enhance the anti-tumor activity in vitro of PTEN protein to Eca109 cells, its mechanism may be associated with the down-regulation of p-Akt expression level.

**[Key words]** esophageal neoplasms; neoplasm proteins; recombinant fusion proteins; transfection; peptides; PTEN; VP22; gene therapy

食管癌是全球常见的十大恶性肿瘤之一, 我国食管癌发病率、病死率高居榜首<sup>[1-2]</sup>。研究发现第 10 号染色体同源缺失性磷酸酶-张力蛋白基因(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN)表达下调与食管癌细胞分化程度、浸润深度及淋巴结转移密切相关<sup>[3-5]</sup>, 但基因转导效率低阻碍了肿瘤基因治疗的应用。1 型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus type 1, HSV-1)间层蛋白 VP22 是一种高效的细胞穿透肽, 研究已经报道了 VP22 能介导抑癌蛋白 P27、P53 在细胞间转运, 并显示出对多种肿瘤细胞显著的抗肿瘤活性<sup>[6-7]</sup>。本研究通过构建 PTEN/VP22 融合蛋白真核表达质粒, 验证 VP22

能否增强 PTEN 的转运和表达, 为研究体内治疗奠定基础。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 真核表达质粒 pcDNA3 由本实验室保存, 购自美国 Invitrogen 公司; pcDNA3-PTEN、pcDNA3-PTEN-VP22、pcDNA3-VP22 由本实验室构建并保存<sup>[8]</sup>; 人食管癌细胞 Eca109 由川北医学院分子生物学研究所惠赠; Lipofectamine 2000 脂质体购自美国 invitrogen 公司; 免抗 PTEN 单克隆抗体购自美国 abcam 公司; 免抗磷酸化-Akt((p-Akt)单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG、HRP 标记羊抗小鼠 IgG、鼠抗  $\beta$ -actin 购自 Beyotime 公

\* 基金项目: 四川省科技厅资助项目(2009JY0122)。 作者简介: 李婷婷(1990-), 助教, 硕士, 主要从事生物技术药物药理学方面研究。

△ 通信作者, E-mail: sencljun@126.com。

司;异硫氰酸荧光素(FITC)-羊抗兔 IgG 购自武汉博士德公司;二氨基联苯胺(DAB)辣根过氧化物酶显示试剂盒、CCK-8 试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)凝胶配置试剂盒购自 Beyotime 公司;细胞凋亡 Annexin V/碘化丙啶(PD)试剂盒购自联科生物。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 Eca109 细胞培养在含 10% 热灭活的胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中,在 37 °C、含 5%CO<sub>2</sub> 的孵箱中孵育。

1.2.2 试验分组和细胞转染 (1)试验分为 4 组,PTEN 组、PTEN-VP22 组、试验组(VP22 组)、对照组(pcDNA3 组)。(2)细胞转染:取对数生长期的 Eca109 细胞接种于相应的培养板中,待细胞长至 50%~70% 融合时更换无血清培养基,按 lipofectamine2000 说明书步骤进行转染,同时用荧光标记的质粒 pEGFP-N1 转染目的细胞,在荧光显微镜下观察转染效率。

1.2.3 细胞免疫荧光检测 PTEN 蛋白的表达 待 24 孔板中细胞长至 50%~70% 融合时按每孔转染 0.5 μg DNA,48 h 后用含多聚甲醛免疫染色固定液固定 10 min,含 Triton X-100 免疫染色洗涤液透化 5 min,共两次,rabbit anti-PTEN(1:100)一抗 4 °C 过夜封闭,次日加入 FITC 标记的羊抗兔 IgG(1:50 稀释),37 °C 孵育 1 h,荧光显微镜下观察 PTEN 蛋白的表达,并用荧光酶标仪检查荧光光密度(OD)值。

1.2.4 Western blot 检测 PTEN 蛋白和 p-Akt 蛋白的表达 待 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中细胞生长至 50%~70% 融合时按上述方法每瓶转染 10 μg DNA,48 h 后用预冷刮刀刮取细胞至 EP 管中离心,加入 50 μL 裂解液(1 mmol/L PMSF)4 °C 持续振荡裂解 30 min 后离心,上清液即为所提蛋白。按照碧云天二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒步骤测定蛋白浓度,与 5×蛋白上样缓冲液按照 5:1 的比例混匀,沸水中加热 5 min 充分变性,进行 10% SDS-PAGE 分离后转移至聚偏二氟乙烯

(PVDF)膜上,Western 封闭液 1 h,一抗 4 °C 摇床过夜孵育,二抗室温孵育 1 h,DAB 显色,用 Image-labe 软件读取各组条带灰度值。

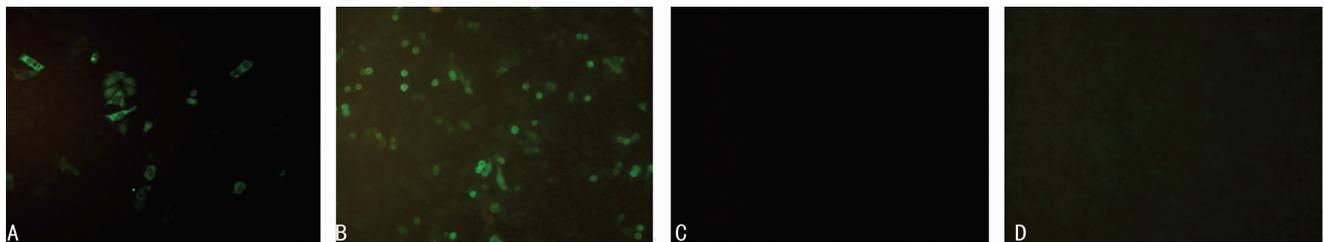
1.2.5 CCK-8 法细胞增殖活性检测 取对数生长期细胞,以每孔 1×10<sup>4</sup>/100 μL 接种到 96 孔板,当细胞生长至 50% 融合时,分别用 4 组质粒转染,设置 5 个浓度梯度,即 1、2、3、4、5 μg/mL,每组每个浓度设置 3 个复孔,分别培养 24、48、72 h 后按 CCK-8 试剂说明书进行 OD 值的检测。

1.2.6 流式细胞术测细胞凋亡率 待 6 孔板中的细胞长至 50%~70% 融合时每孔转染 2.5 μg DNA,48 h 后加入不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶(0.25%)消化,1 200 r/min 离心 5 min 收集 1×10<sup>5</sup>/管细胞沉淀,500 μL 1×binding buffer 重悬细胞,加 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,室温暗室孵育 5 min,400 目筛网过滤后,用流式细胞仪进行检测,Winmdi 软件分析细胞凋亡率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行试验数据的统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验;多个样本均数的多重比较采用单因素 one-way-ANOVA 检验分析,首先进行方差齐性检验,若方差齐,两两比较则用最小差异法(LSD),检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

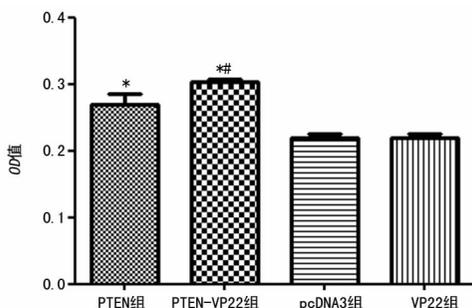
2 结果

2.1 细胞免疫荧光检测 PTEN 蛋白和 PTEN-VP22 融合蛋白的表达情况 分别用 4 组质粒转染 Eca109 细胞 48 h 后,细胞免疫荧光检测发现 PTEN 组和 PTEN-VP22 组可见发绿色荧光细胞,PTEN-VP22 组绿色荧光蛋白的量明显多于 PTEN 组,pcDNA3 组和 VP22 组未见发绿色荧光的细胞(图 1)。通过荧光定量酶标仪对各组绿色荧光蛋白的 OD 值进行测量,发现 PTEN 组和 PTEN-VP22 组 OD 值明显高于 pcDNA3 组( $P<0.05$ ),PTEN-VP22 组 OD 值明显高于 PTEN 组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。



A:PTEN 组;B:PTEN-VP22 组;C:pcDNA3 组;D:VP22 组。

图 1 细胞免疫荧光检测 PTEN 蛋白在不同质粒转染组的表达情况(×20)

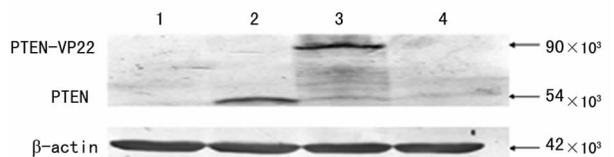


\*:  $P<0.05$ ,与 pcDNA3 组比较;#:  $P<0.05$ ,与 PTEN 组比较。

图 2 各转染组 PTEN 荧光蛋白定量 OD 值

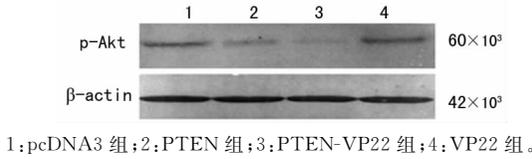
2.2 Western blot 检测目的蛋白的表达情况 Western blot 结果显示 PTEN 和 PTEN-VP22 组分别检测到相对分子质量

为  $54 \times 10^3$  的 PTEN 蛋白和相对分子质量为  $90 \times 10^3$  的 PTEN-VP22 融合蛋白的特异性条带(图 3)。和 pcDNA3 组相比,PTEN 组和 PTEN-VP22 组 p-Akt 蛋白的表达减少( $P<0.05$ ),PTEN-VP22 组 p-Akt 蛋白灰度值低于 PTEN 组( $P<0.05$ ),差异具有统计学意义,见图 4、5。



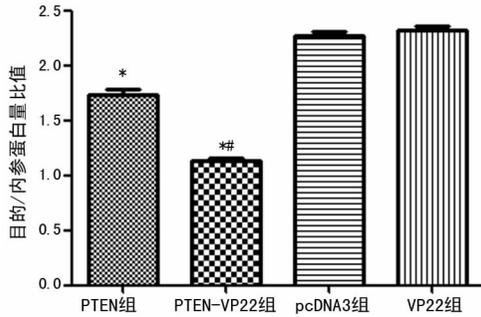
1:PTEN 组;2:PTEN-VP22 组;3:pcDNA3 组;4:VP22 组。

图 3 Western blot 检测各转染组 PTEN、PTEN-VP22 蛋白表达情况



1:pcDNA3 组;2:PTEN 组;3:PTEN-VP22 组;4:VP22 组。

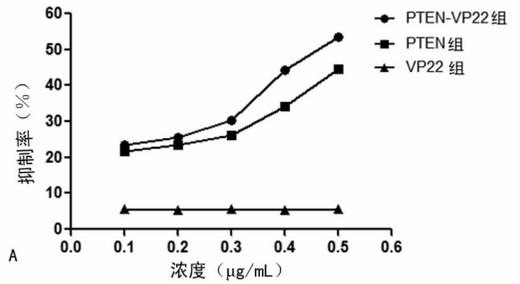
图 4 Western blot 检测 p-Akt 蛋白在各转染组中的表达水平



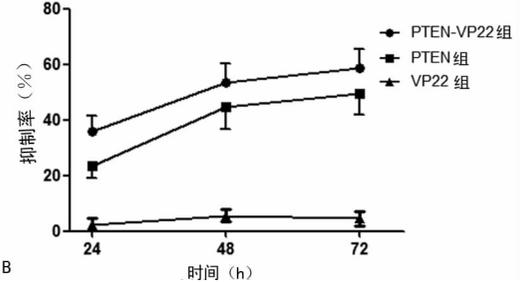
\*:  $P < 0.05$ , 与 pcDNA3 组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 PTEN 组比较。

图 5 Western blot 分析 p-Akt 蛋白在不同质粒转染组中表达水平

**2.3 CCK-8 检测 4 组质粒对 Eca109 细胞增殖活性的影响**  
与 pcDNA3 组相比,PTEN-VP22 组和 PTEN 组 Eca109 生长呈现抑制作用( $P < 0.05$ ),其抑制作用具有时间、浓度依赖性,PTEN-VP22 组在 0.5  $\mu\text{g/mL}$  处开始,较 PTEN 组出现显著地抑制细胞增殖的活性( $P < 0.05$ ),作用 48 h 后在 0.5  $\mu\text{g/mL}$  浓度处其抑制率接近 50%,而 VP22 对 Eca109 的生长未表现出抑制作用( $P > 0.05$ ),见图 6。



A

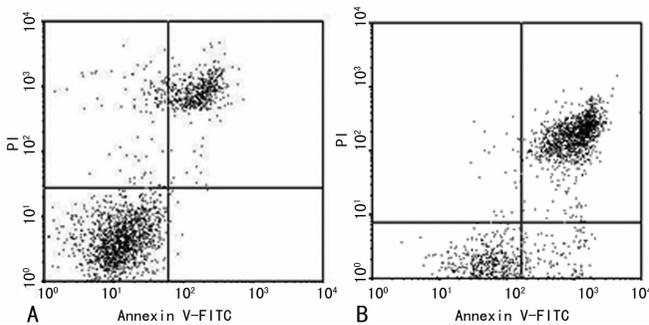


B

A: 作用 48 h 时不同浓度药物对细胞的生长抑制曲线; B: 0.5  $\mu\text{g/mL}$  药物作用不同时间对细胞的生长抑制曲线。

图 6 CCK-8 检测各组细胞增殖活性

**2.4 Annexin V/PI 双染法检测 4 组质粒对 Eca109 细胞凋亡的影响**  
PTEN 组、PTEN-VP22 组、VP22 组细胞凋亡率分别为(30.66 $\pm$ 0.99)、(69.55 $\pm$ 0.38)%和(7.86 $\pm$ 0.13)%,pcDNA3 组凋亡率为(7.65 $\pm$ 0.28)%。和 pcDNA3 组相比,PTEN 组、PTEN-VP22 组凋亡率明显升高( $P < 0.05$ ),并且 PTEN-VP22 组凋亡率也明显高于 PTEN 组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 7、8。



A:PTEN 组;B:PTEN-VP22 组;C:pcDNA3 组;D:VP22 组。

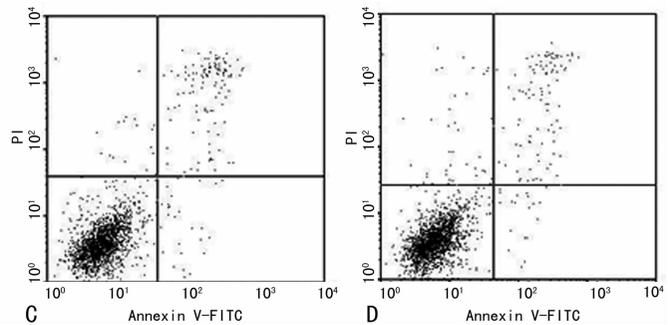
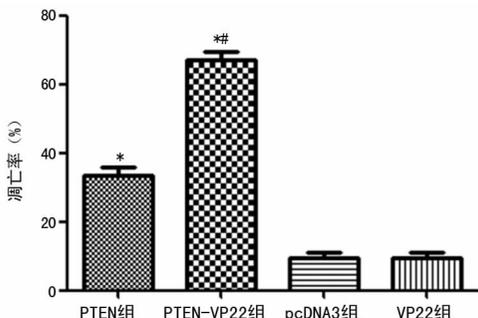


图 7 流式细胞仪检测各组细胞凋亡



\*:  $P < 0.05$ , 与 pcDNA3 组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 PTEN 组比较。

图 8 流式细胞仪检测各组细胞凋亡

**3 讨 论**

PTEN 基因定位于人类染色体 10q23.3,全长 200 kb,有 9

个外显子和 8 个内含子,编码的 PTEN 蛋白含有 403 个氨基酸。PTEN 的基因产物是一种多功能蛋白,具有脂质磷酸酶活性,可对抗磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositide 3-kinase, PI3K)调控的细胞生长因子信号转导通路,降低磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸(Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate, PIP3)水平,抑制肿瘤细胞的增殖、促进凋亡<sup>[8-9]</sup>。根据 PTEN 基因及其表达产物结构和 PTEN 在其他肿瘤表达下调机制的研究,发现 PTEN 基因遗传学及表观遗传学异常导致食管癌中 PTEN 表达减少<sup>[10]</sup>。本研究通过外源性导入表达 PTEN 蛋白的重组质粒,结果发现 PTEN 重组质粒能在 Eca109 细胞中表达 PTEN 蛋白,发挥抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡的作用,这与李菲<sup>[11]</sup>研究的转染 PTEN 质粒对食管癌细胞增殖具有一定的抑制作用的报道一致。

研究已经证实,VP22 融合蛋白能够介导治疗蛋白在相邻

的细胞间进行转运,从而达到治疗性蛋白发挥功效的水平,在整体上发挥生物学效应。本研究将重组质粒 pcDNA3-PTEN、pcDNA3-PTEN-VP22 用脂质体介导的基因转染方法转入细胞后进行免疫荧光实验,结果发现 PTEN-VP22 组 PTEN 绿色荧光蛋白的表达量明显高于 PTEN 组,说明 VP22 确实能够介导 PTEN 蛋白在细胞间转运,增加 PTEN 蛋白的表达和分布,VP22 介导蛋白的转运机制大体是通过高尔基体依赖的途径将其蛋白从最初转染的细胞分泌,并且非常高效地转运至邻近的细胞<sup>[12]</sup>。同时,本研究观察到 PTEN/VP22 蛋白主要在细胞质表达,细胞核也有少量的表达,这和 PTEN 蛋白的表达一致,所以 VP22 并不改变 PTEN 蛋白在细胞中的定位,这就决定了 PTEN 和其他只在细胞核发挥作用的肿瘤抑制基因不一样,PTEN 在调节细胞质和细胞核的功能上都发挥着重要作用<sup>[13]</sup>。

大量研究发现 PTEN 的基因产物是一种具有蛋白和脂类双重磷酸酶活性的抑癌蛋白,并且大多数肿瘤相关 PTEN 基因的突变都聚集在磷酸酶结构域,提示 PTEN 磷酸酶活性在控制肿瘤的发生中起着重要的作用。PTEN 蛋白能够使局部黏著斑激酶(FAK)、Shc 信号分子去磷酸化,FAK 是调节细胞与细胞间黏附的关键分子,Shc 与细胞的扩散和迁移调控有关。PTEN 的脂质磷酸酶活性在调控 PI3K 细胞增殖信号通路中发挥着重要作用,同时 PTEN 也能抑制 PI3K 下游目标丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt/PKB)活性,此活性被认为是 PTEN 抗肿瘤作用的关键<sup>[14]</sup>。研究还发现 PTEN 过表达会减少 Akt 信号通路的激活,使其下游作用分子 p-Akt 表达量下降<sup>[15]</sup>。本试验发现 PTEN-VP22 和 PTEN 组中 p-Akt 蛋白的量低于阴性对照组和空白对照组,PTEN-VP22 组蛋白水平又低于 PTEN 组,说明抑癌蛋白 PTEN 确实能减少 p-Akt 蛋白表达水平,同时 VP22 能增强 PTEN-VP22 融合蛋白表达,并且保留 PTEN 蛋白的生物学活性,即负性调控 PI3K/Akt 信号通路,降低 Akt 的磷酸化水平,从而发挥抑癌活性。

#### 参考文献

- [1] Shibata A, Matsuda T, Ajiki W, et al. Trend in incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Japan, 1993-2001 [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2008, 38(7): 464-468.
- [2] 张思维, 张敏, 李光琳, 等. 2003-2007 年中国食管癌发病与死亡分析[J]. *中国肿瘤*, 2012, 27(4): 241-247.
- [3] 刘康, 李杰, 王兰, 等. SATB1 基因在食管癌中的表达及临床意义[J]. *川北医学院学报*, 2015, 30(4): 447-450.
- [4] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [5] 张玉领, 陈培, 傅玉峰, 等. 中国食管癌患者 PTEN 表达与

临床病理因素相关性 Meta 分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2014, 21(19): 1557-1561.

- [6] Zavaglia D, Favrot MC, Eymin B, et al. Intercellular trafficking and enhanced in vivo antitumour activity of a non-virally delivered P27-VP22 fusion protein[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(4): 314-325.
- [7] Zavaglia D, Lin EH, Guidetti M, et al. Poor intercellular transport and absence of enhanced antiproliferative activity after non-viral gene transfer of VP22-P53 or P53-VP22 fusions into p53 null cell lines in vitro or in vivo[J]. *J Gene Med*, 2005, 7(7): 936-44.
- [8] Huang FF, Zhang L, Wu DS, et al. PTEN regulates BCRP/ABCG2 and the side population through the PI3K/Akt pathway in chronic myeloid leukemia[J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e88298.
- [9] De P, Sun Y, Carlson JH, et al. Doubling down on the PI3K-AKT-mTOR pathway enhances the antitumor efficacy of PARP inhibitor in triple negative breast cancer model beyond BRCA-ness[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(1): 43-72.
- [10] 王帅, 王洲. 抑癌基因 PTEN 与食管癌关系的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(8): 627-631.
- [11] 李菲. PTEN 与 AKT/mTOR 通路在食管癌进展中的研究[D]. 河北: 河北医科大学, 2013.
- [12] Zavaglia D, Favrot MC, Eymin B, et al. Intercellular trafficking and enhanced in vivo antitumour activity of a non-virally delivered P27-VP22 fusion protein[J]. *Gene Ther*, 2003, 10(4): 314-325.
- [13] Gil A, Rodriguez-Escudero I, Stumpf M, et al. A functional dissection of PTEN N-terminus: implications in PTEN subcellular targeting and tumor suppressor activity[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0119287.
- [14] Ni J, Cozzi P, Hao J, et al. Epithelial cell adhesion molecule(EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 12(45): 2736-2748.
- [15] Takashima M, Parsons CJ, Ikejima K, et al. The tumor suppressor protein PTEN inhibits rat hepatic stellate cell activation[J]. *Gastroenterol*, 2009, 44(8): 847-855.

(收稿日期: 2016-07-13 修回日期: 2016-10-04)

## 《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号: ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读者免费订阅。读者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。