

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.04.006

环磷酰胺及其代谢产物作用于卵巢癌细胞 SKOV3 后对 PTEN 基因的影响

熊正方,李冰,曾湘晖,王莉云
(青海省人民医院生殖中心,西宁 810007)

[摘要] **目的** 探讨环磷酰胺(CP)及其代谢产物丙烯醛(ACR)作用卵巢癌细胞 SKOV3 后对人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)的影响。**方法** 选择不同浓度 CP 及其代谢产物 ACR 作用重组 PTEN 蛋白,采用硝基苯磷酸二钠(PNPP)检测 PTEN 的磷酸化活性,Western blot 技术检测蛋白表达,通过生物素与蛋白结合检测药物与蛋白的结合方式;同时分析 PTEN 基因通路 P53/TP53 的表达改变;不同药物浓度作用细胞后通过免疫沉淀(IP)方法得到目的蛋白,通过高效液相色谱(HPLC)检测其蛋白磷酸化活性。**结果** 药物代谢产物作用重组 PTEN 蛋白后其磷酸化活性随着药物浓度的增高而降低,ACR 抗体作用表达随着药物浓度增高表达增多,不同实验组蛋白与生物素表达随药物浓度增高而增多,在细胞中随着药物浓度增高 PTEN 磷酸化活性降低,TP53 蛋白表达随着药物浓度增加而减少。**结论** CP 代谢产物 ACR 可通过抑制 PTEN 蛋白磷酸化活性引起细胞毒性。

[关键词] 第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因;环磷酰胺;丙烯醛;磷酸化;活性

[中图分类号] R711.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)04-0453-03

Influence of cyclophosphamide and its metabolites on PTEN gene after acting on ovarian cancer cell line SKOV3

XIONG Zhengfang, LI Bing, ZENG Xianghui, WANG Liyun

(Reproduction Center, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining, Qinghai 810007, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of cyclophosphamide(CP) and its metabolites acrolein(ACR) on PTEN gene deleted on chromosome 10 after acting on ovarian cancer cells SKOV3. **Methods** Different concentrations of CP and ACR were selected to act on recombinant PTEN protein. The phosphorylation activity of PTEN was detected by PNPP. The expression of PTEN protein was detected by Western blot. The binding mode of drug with protein was detected by the biotin combined with protein; meanwhile the expression change of P53/TP53 in PTEN gene pathway was analyzed. The target protein was obtained by immunoprecipitation(IP) after different drug concentrations acting on the cells. The phosphorylation activity of the target protein was detected by high performance liquid chromatography(HPLC). **Results** After the drug metabolites acting on recombinant PTEN protein, the phosphorylation activity was decreased with the increase of drug concentration, while the expression of ACR antibody action was increased with the drug concentration elevation. The expression of protein and biotin in different experimental groups was increased with the increase of drug concentration. The PTEN phosphorylation activity was decreased with the drug concentration increased in cells, and so did the expression of TP53 protein. **Conclusion** CP metabolite ACR induces the cytotoxicity by inhibiting PTEN protein phosphorylation activity.

[Key words] chromosome 10 loss of phosphatase and tension protein homologous genes; cyclophosphamide; acrolein; phosphorylation; activity

卵巢癌是女性生殖器恶性肿瘤之一,具有高度致死性。目前抗卵巢癌的主要方法包括改进治疗和早期诊断。虽然已知早期疾病的检测可以延长存活率,甚至治愈,但是目前卵巢癌都是在晚期被发现,手术和化疗的治愈率有限^[1-2]。因此,对治疗方案的选择及化疗存在的毒性进行深入研究显得极为重要。环磷酰胺(CP)是一种烷化剂,可导致皮质纤维化,血管损伤和原始卵泡严重减少,同时也可以阻止细胞增殖和凋亡^[3]。尽管 CP 有很多益处,但 CP 也可引起诸多不良反应。CP 可能导致正常组织损伤,如肾脏过氧化损伤,急性心脏毒性作用和骨髓抑制^[4]。CP 可通过产生 DNA 交联和促进 DNA 断裂来诱导细胞毒性,故大多数卵巢癌幸存者有卵巢毒性和不育^[5-6]。人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(PTEN)位于 10 号染色体,是具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶双特异性活性的一种抑癌基因,其主要通过抑制磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸激酶(PI3K/Akt)信号通路去磷酸化来抑制肿瘤生长。

PTEN 基因的抑癌作用依赖于其磷酸酶活性并且磷酸酶催化结构域的功能丧失通常与致癌性 PTEN 突变有关^[7]。本文将应用蛋白质研究的相关技术从新的角度研究 CP 作用蛋白后对 PTEN 磷酸化活性及其通路蛋白磷酸化活性的影响,从而探讨 PTEN 基因与药物代谢作用产生细胞毒性的机制。

1 材料与方法

1.1 材料 主要材料:PTEN 蛋白购自上海吉凯公司;SKOV3 细胞株由美国 ATCC 公司提供;CP(相对分子质量为 279.01)和丙烯醛(acrolein, ACR)购自美国 Sigma 公司。主要试剂:PTEN 抗体、P53 抗体、TP53 抗体购自美国 Abcom 公司;二抗山羊抗鼠、二抗山羊抗兔购自北京碧云天生物公司;硝基苯磷酸二钠(PNPP)、生物素试剂购自美国 Sigma 公司;生物素特异抗体购自 Santa Cruz 公司;ACR 抗体购自 Cell Signaling 公司。

1.2 方法

1.2.1 PNPP 法检测磷酸酶活性 反应液组成:50 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,pH 8,不同浓度 ACR(40、20、10、5 $\mu\text{mol/L}$),CP 100 $\mu\text{mol/L}$,室温作用 30 min,加入 0.1 mg/mL PNPP 试剂,酶标仪 450 nm 下读取光密度(OD)值。96 孔板总体积 100 μL 。

1.2.2 Western blot 检测 重组 PTEN(rPTEN)蛋白中加入不同浓度药物作用,蛋白浓度 1 mg,药物浓度为 10、50 $\mu\text{mmol/L}$ ACR,室温作用 30 min,加入蛋白缓冲上样液进行凝胶电泳,尼龙膜转膜 1 h,ACR 抗体 1:1 000 比例稀释,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 洗涤膜,二抗稀释比例 1:10 000,室温孵育 1 h,洗干净膜,增强化学发光剂电化学发光法(ECL)显影。

1.2.3 生物素酰肼 1(biotin-hydrazide,BH2)与蛋白作用 实验分组:(1)牛血清清蛋白(BSA)0.50 mg/mL 组(A组);(2)BSA 0.50 mg/mL+ACR 50 $\mu\text{mmol/L}$ 组(B组);(3)BSA+BH 组(C组);(4)BSA+ACR 50 $\mu\text{mmol/L}$ +BH 组(D组);(5)rPTEN 0.50 mg/mL 组(E组);(6)rPTEN 0.50 mg/mL+ACR 50 $\mu\text{mmol/L}$ 组(F组);(7)rPTEN 0.50 ng/mL+BH 组(G组);(8)rPTEN 0.50 mg/mL+ACR 50 $\mu\text{mmol/L}$ +BH 组(H组);(9)rPTEN 0.50 mg/mL+ACR 10 $\mu\text{mmol/L}$ +BH 组(I组)。药物室温作用 30 min 后,加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 生物素,电泳转膜,蛋白封闭,加入生物素抗体稀释比例 1:1 000,PBS 洗膜 15 min,ECL 直接显影。

1.2.4 细胞培养 90%DMEM 高糖培养基,10%胎牛血清,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养 2 d,1 mL 胰酶(0.25%Trypsin-0.53 mmol/L EDTA)消化传代。取对数成长期细胞,进行实验。

1.2.5 细胞提取蛋白 应用免疫沉淀(immunoprecipitation,IP)技术提取 PTEN 蛋白。细胞裂解液[含 PBS、1% Triton、苯甲基磺酰氟(PMSF)]加入细胞,冰上裂解 20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 g 离心 20 min,吸取上清液。蛋白浓度 500 μg ,在总体积 1 000 μL 下加入等量 PTEN 及 NAT-1 抗体及细胞裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,次日加入 Protein agrose 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h,细胞裂解液洗涤 3 次,PBS 洗涤 1 次,弃上清液,得到目的蛋白。

1.2.6 细胞内蛋白酶活性检测 将 0.5 mmol/L EE5、1 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)、TrisbufferPH8(30 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl,pH 8)加入 IP 技术提取的蛋白沉淀中,室温孵育 30 min,加入 0.5% HClO_4 1:1 比例,HPLC 仪器检测。

1.2.7 高校液相色谱(HPLC)技术 反应液 buffer 配制:100 mmol/L sodium acetate pH 7,1 mmol/L DTT,50 $\mu\text{mol/L}$ EE5 反应液加入 IP 所得蛋白中,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min,96 孔板中每孔终体积 100 μL ,加入 100 μL 15% HClO_4 终止反应,上机检测。

1.3 统计学处理 数据经过 GraphPad Prism5 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

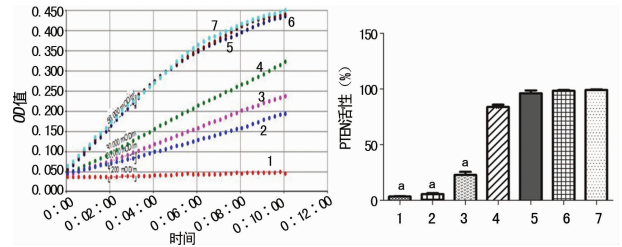
2.1 rPTEN 蛋白磷酸酶活性检测 CP 作用于蛋白后不影响活性改变;40、20、10、5 $\mu\text{mol/L}$ 的 ACR 作用 PTEN 蛋白后,rPTEN 蛋白随着药物浓度增加磷酸酶活性降低,见图 1。

2.2 ACR 特异抗体与蛋白结合 ACR 抗体与蛋白结合,随药物浓度增加表达越明显,不加药物的蛋白与抗体不结合,见图 2。

2.3 BH 作用蛋白表达 高浓度药物组与生物素的结合表达更加明显,不加药物组则无表达,见图 3。

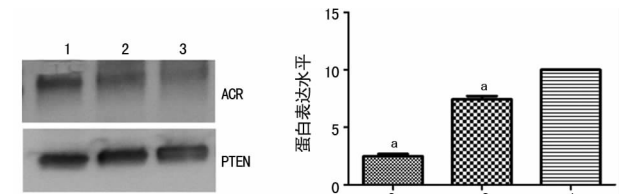
2.4 HPLC 对细胞内药物作用的结果 随着不同的药物浓度

作用细胞蛋白后,蛋白酶活性降低,此结果与 rPTEN 蛋白的活性结果一致,见图 4。



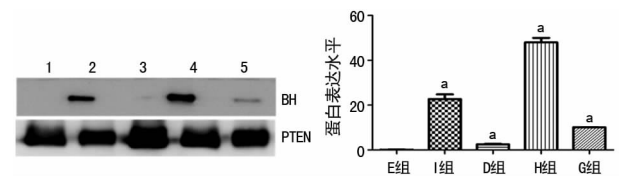
1:ACR 40 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;2:ACR 20 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;3:ACR 10 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;4:ACR 5 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;5:CP 100 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;6:1% DMSO+PTEN;7:rPTEN;^a: $P < 0.05$,与 rPTEN 比较

图 1 PNPP 检测 rPTEN 蛋白活性



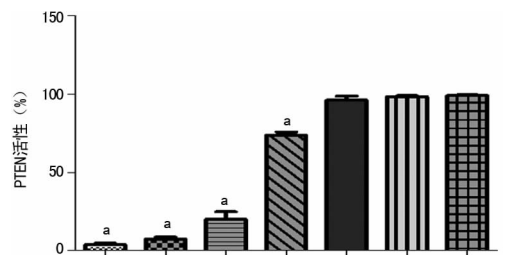
1:rPTEN;2:10 $\mu\text{mol/L}$ ACR + PTEN;3:50 $\mu\text{mol/L}$ ACR + PTEN;^a: $P < 0.05$,与 rPTEN 比较

图 2 Western blot 检测蛋白表达



1:E组;2:I组;3:D组;4:H组;5:G组;^a: $P < 0.05$,与 G 组比较

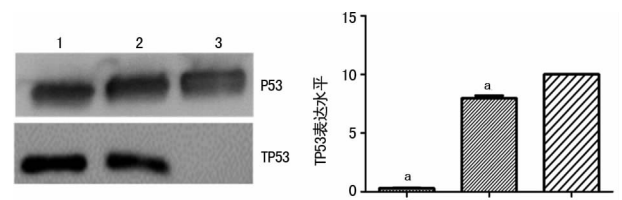
图 3 Western blot 检测 BH 作用蛋白表达



1:ACR 40 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;2:ACR 20 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;3:ACR 10 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;4:ACR 5 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;5:CP 100 $\mu\text{mol/L}$ +PTEN;6:1% DMSO+PTEN;7:rPTEN;^a: $P < 0.05$,与 rPTEN 比较

图 4 HPLC 检测蛋白活性

2.5 TP53 对药物作用的蛋白表达 Western blot 结果显示 TP53 的表达随着药物浓度增高而减少,P53 表达没有变化,见图 5。



1:rPTEN;2:10 $\mu\text{mol/L}$ ACR + rPTEN;3:50 $\mu\text{mol/L}$ ACR + PTEN;^a: $P < 0.05$,与 rPTEN 比较

图 5 Western blot 检测 P53/TP53 蛋白表达

3 讨 论

卵巢癌是女性发病率第二的妇科癌症,仅次于子宫内膜癌的发生。虽然卵巢癌的病因尚未完全了解,但可能与年龄,晚育有关,早期发病在月经初期或晚期绝经,同时乳腺癌突变也涉及卵巢癌的形成和发展^[8-9]。

化疗仍然是当今卵巢癌治疗中常用的方法,化疗方案选择通常有顺铂或卡铂与 CP 组合^[10]。但是化疗药物尤其是 CP 存在细胞毒性,对治疗卵巢癌疗效并不十分明显^[8],组合化疗中的剂量选择未有明确有效的单位,其产生的细胞毒性及对抑癌基因的影响机制是本研究的重点。

本研究通过磷酸酶活性检测得出 ACR 直接抑制抑癌基因 PTEN 的磷酸酶活性,考虑其磷酸化活性的降低可能是导致细胞毒性的主要方式。因此可推测 ACR 使蛋白活性降低,从而抑癌基因作用减弱或发生突变。

CP 的代谢产物 ACR 为不饱和醛类,其含有双键和醛基两种官能团,其共价键在特定催化条件下可发生加成反应^[11]。本研究中 ACR 特异抗体与蛋白结合表达增高,说明 ACR 可通过共价键与蛋白直接作用形成 ACR-PTEN 加合产物,这种加合产物的形成是迈克尔加成作用的结果。本研究可推测出细胞毒性的产生由共价结合导致使其磷酸酶活性降低。

BH 是测定蛋白质羰基化探针性生物素衍生物。在亲和细胞化学中,酰肼功能化基团通过低聚糖部分容许糖脂及糖蛋白的生物素酰化^[12]。本研究结果图 3 显示 BH 检测出 PTEN 蛋白与 ACR 上游游离醛基作用形成共价键,这种共价键加合产物的形成可能与导致细胞磷酸酶活性降低,以及蛋白结构改变有关。

HPLC 结果显示细胞内蛋白活性随着药物浓度增高而降低,这与 ACR 与重组蛋白作用结果表达一致,说明无论在蛋白层面即体外还是细胞内 ACR 对 PTEN 的影响不变,并且此影响较稳定,不会随着内环境改变,这对后续研究提供了有效依据。

PTEN 基因参与 PI3K/Ak 通路,其作用主要调节其下游蛋白的磷酸化,以及调节细胞凋亡增殖等^[13]。本研究主要选择 P53 及 TP53 作为主要研究通路,研究结果显示 P53 蛋白表达在药物作用后不变,TP53 表达随药物浓度改变,表示其突变主要可能发生在 TP53。关于 TP53 是点突变还是失活突变还需要做进一步研究。

本研究结果得出 ACR 直接可以修饰 PTEN 蛋白结构和影响其活性改变,ACR 对蛋白的这种类似反应也发生于 NAT-1 蛋白上^[14],但是与 PTEN 蛋白作用的具体细节及对其他通路磷酸化活性的影响还需做进一步研究。ACR 的这种特征对疾病的病因判断,选择治疗方案和治疗剂量开辟了新的思路及研究方法。

参考文献

[1] KULASINGAM V, DIAMANDIS E P. Genomic profiling for copy number changes in plasma of ovarian cancer patients - a new era for cancer diagnostics? [J]. *BMC Med*, 2016, 14(1):186-190.

[2] VANDERSTICHELE A, BUSSCHAERT P, SMEETS D, et al. Chromosomal instability in cell-free DNA as a highly specific biomarker for detection of ovarian cancer in women with adnexal masses[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9):2223-2231.

[3] SINGH G, MISRA R, AGGARWAL A. Ovarian insufficiency is major short-term toxicity in systemic lupus erythematosus patients treated with cyclophosphamide[J]. *J Assoc Physicians India*, 2016, 64(2):28-31.

[4] GOLDSMITH S R, SLADE M, DIPERSIO J F, et al. Cytomegalovirus viremia, disease, and impact on relapse in T-cell replete peripheral blood haploidentical hematopoietic cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide[J]. *Haematologica*, 2016, 101(11):e465-468.

[5] CHEN X Y, XIA H X, GUAN H Y, et al. Follicle loss and apoptosis in Cyclophosphamide-Treated mice: what's the matter? [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6):29-34.

[6] MARTINS F C, SANTIAGO I D, TRINH A, et al. Combined image and genomic analysis of high-grade serous ovarian cancer reveals PTEN loss as a common driver event and prognostic classifier[J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12):526-532.

[7] SMITH I N, BRIGGS J M. Structural mutation analysis of PTEN and its genotype-phenotype correlations in endometriosis and cancer[J]. *Proteins*, 2016, 84(11):1625-1643.

[8] SALEH D O, MANSOUR D F. Ovario-protective effects of genistein against cyclophosphamide toxicity in rats: Role of anti-mullerian hormone and oestradiol[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 789(15):163-171.

[9] KAVEH F, BAUMBUSCH L O, NEBDAL D, et al. A systematic comparison of copy number alterations in four types of female cancer[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1):913-918.

[10] EL-HUSSEINY K, MOTAWEI H, ALI M S. Continuous Low-Dose oral cyclophosphamide and methotrexate as maintenance therapy in patients with advanced ovarian carcinoma after complete clinical response to Platinum and paclitaxel chemotherapy[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26(3):437-442.

[11] ZHENG Y I, ZONG Z M, CHEN S L, et al. Ameliorative effect of *Trametes orientalis* polysaccharide against immunosuppression and oxidative stress in cyclophosphamide-treated mice[J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 95(2):1216-1222.

[12] WU J Z, LUO X T, JING S Q, et al. Two-dimensional gel electrophoretic detection of protein carbonyls derivatized with biotin-hydrazide[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1019(4):128-131.

[13] DRIESSEN G J, IJSPEERT H, WENTINK M, et al. Increased PI3K/Akt activity and deregulated humoral immune response in human PTEN deficiency[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(6):1744-1747.

[14] BUI L C, MANAA A, XU X, et al. Acrolein, an alpha, beta-unsaturated aldehyde, irreversibly inhibits the acetylation of aromatic amine xenobiotics by human arylamine N-acetyltransferase 1[J]. *Drug Metab Dispos*, 2013, 41(7):1300-1305.