

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0173-06

腺病毒介导的 *PTEN* 对 A549 肺癌细胞体内外生长的影响

张海峰^{1,2}, 章春花¹, 盛伟华¹, 王金志¹, 谢宇锋¹, 缪竞诚¹, 杨吉成¹(1. 苏州大学细胞与分子生物学教研室, 江苏苏州 215007; 2. 蚌埠医学院附属医院, 安徽蚌埠 233003)

[摘要] 目的: 研究携带第 10 号染色体缺失的磷酸脂酶和张力蛋白同源基因(phosphatase and tensin homologue-deleted chromosome ten gene, *PTEN*)的腺病毒表达载体对 A549 肺癌细胞体内外生长的抑制作用。**方法:** 从人外周血淋巴细胞中通过 RT-PCR 扩增出 *PTEN* 基因片段, 将其克隆到 pAdTrack-CMV 转移载体上, 构建了 *PTEN* 重组腺病毒载体。体外用 MTT 法检测 Ad-*PTEN* 对 A549 肺癌细胞生长的抑制作用, 以流式细胞术检测肿瘤细胞的周期和凋亡率。建立荷瘤裸鼠模型, 体内检测 Ad-*PTEN* 对 A549 肺癌细胞移植瘤生长的影响, 以免疫组化法检测移植瘤中微血管密度。**结果:** 克隆的 *PTEN* 基因测序结果与基因 Bank 数据库完全相符。Ad-*PTEN* 体外感染 A549 肺癌细胞 48 h 后其凋亡率为 10.5%, 明显高于对照细胞; 4 d 后细胞生长与对照细胞相比抑制了 57%。肺癌细胞移植瘤治疗结束时, Ad-*PTEN* 组瘤重为(0.58 ± 0.29)g, 对照组瘤重为(1.42 ± 0.24)g, 其生长抑制达 59% ($P < 0.05$); 同时移植瘤中微血管密度降低约 49% ($P < 0.05$)。**结论:** 成功构建的 Ad-*PTEN* 腺病毒载体能在体内外抑制 A549 肺癌细胞及其移植瘤的生长。

[关键词] 第 10 号染色体缺失的磷酸脂酶和张力蛋白同源基因; 腺病毒载体; 肺癌细胞; 细胞凋亡; 抗肿瘤

[中图分类号] R730.59

[文献标志码] A

Influence of adenovirus mediated *PTEN* gene on growth of A549 cells *in vitro* and *in vivo*

ZHANG Hai-feng, ZHANG Chun-hua, SHENG Wei-hua, WANG Jin-zhi, XIE Yu-feng, MIAO Jing-cheng, YANG Ji-cheng (1. Department of Cellular and Molecular Biology, Medical College, Suzhou University, Jiangsu Suzhou 215007, China; 2. First Hospital, Bengbu Medical College, Anhui Bengbu, 233003, China)

[Abstract] Objective: To study the inhibitory effect of adenovirus mediated (phosphatase and tensin homologue-deleted chromosome ten gene) *PTEN* gene on the growth of A549 cells *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** The *PTEN* gene was amplified by RT-PCR from human peripheral blood and was inserted into pAdTrack-CMV to construct pAdTrack-CMV-*PTEN*. The growth inhibition effect of pAdTrack-CMV-*PTEN* on A549 cells was detected by MTT; flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis of the tumor cells. The tumor inhibitory effect of pAdTrack-CMV-*PTEN* on A549 cells was studied with tumor-bearing mice model. The microvessel density (MVD) of the implanted tumor tissue was determined immunohistochemically. **Results:** The sequencing result of cloned *PTEN* accorded well to that in GeneBank. The apoptosis rate of A549 cells was 10.5% 48 h after infection with pAdTrack-CMV-*PTEN*, significantly higher than that in the control group (0). Four days after infection, the growth of the A549 was inhibited by 57%. At the end of tumor inhibition experiment, the average tumor weight was (0.58 ± 0.29) g in pAdTrack-CMV-*PTEN* treated group and (1.42 ± 0.24) g in the control group, with a inhibitory rate of 59% ($P < 0.05$); pAdTrack-CMV-*PTEN* also decreased MVD by 49% ($P < 0.05$). **Conclusion:** We have successfully constructed pAdTrack-CMV-*PTEN*, which can inhibit the growth of A549 cells *in vitro* and *in vivo*.

[Key words] Phosphatase and tensin homologue-deleted chromosome ten gene; adenovirus vector; lung cancer cell; apoptosis; anti-tumor

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 173-178]

第 10 号染色体缺失的磷酸脂酶和张力蛋白同源基因 (phosphatase and tensin homologue-deleted chromosome ten gene, *PTEN*) 是 1997 年由 Steck 等^[1] 3 个研究小组分别发现并命名的一种新的抑癌基因。现已证实, 该基因的突变、失活与多种肿瘤的

[基金项目] 苏州大学医学发展基金资助项目(No. EE134517)

[作者简介] 张海峰(1974-), 男, 安徽宿州人, 博士, 主要从事肿瘤免疫及自身免疫性疾病的研究

[通讯作者] 杨吉成, E-mail: jcyang@suda.edu.cn

发生、发展密切相关,成为继 p53 后又一有重要意义的抑癌基因^[2-5]。为了探讨 *PTEN* 基因的生物活性及其在肿瘤防治中的作用,本研究从人外周血淋巴细胞中扩增出 *PTEN* 基因片段,将其克隆到 pAdTrack-CMV 转移载体,进而构建 *PTEN* 重组腺病毒载体,并通过体内外实验,观察其对肺癌细胞 A549 增殖的抑制作用,为今后开展肿瘤基因治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli 菌株 DH5 α 、细菌 BJ5183 及 A549 肺癌细胞为本室保存。*Pac* I 和 *Pme* I 购自 New England Biolab 公司。pAdTrack-CMV 转移载体、pAdEasy-1 腺病毒载体和 QBI-293A 细胞为复旦大学钟江教授惠赠。Lipofectamine Reagent 为 Invitrogen 公司产品。CD34 抗体购自晶美公司。S-P 试剂盒购自迈新公司。4~6 周龄雄性裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[实验动物合格证号为 SCXK(沪)2003-0003]。引物由上海生物工程公司合成。

1.2 RT-PCR 从人外周血淋巴细胞中扩增 *PTEN* 基因片段

分离健康人外周血单个核细胞,参照 RNA 抽提试剂盒手册进行总 RNA 的提取。取 3 μ l 总 RNA, 15 mmol/L Oligo-dT₁₈ 加入 2 μ l, 65 $^{\circ}$ C 作用 5 min; 然后加入 5 \times RT 缓冲液 4 μ l, 10 mmol/L dNTPs 2 μ l, 0.5 μ l RNA 酶抑制剂和 1 μ l M-MLV 逆转录酶,最后加双蒸水至总体积 20 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 70 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 反应体系如下: ddH₂O 18.5 μ l, 10 \times Reaction Buffer 2.5 μ l, 10 mmol/L dNTP 0.5 μ l, P₁ 0.5 μ l, P₂ 0.5 μ l, cDNA 模板 2.0 μ l, DNA 聚合酶 0.5 μ l (P₁, 5'-gcg gta cca tga cag cca tca tca aag ag-3'; P₂, 5'-cga agc ttt cag act ttt gta att tgt gt-3')。PCR 反应条件如下: 首先 94 $^{\circ}$ C 4 min 预变性, 然后进行下列循环, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 10 min。

1.3 重组腺病毒质粒的构建

将纯化的 PCR 产物和带有 GFP 标记基因的 pAdTrack-CMV 质粒经 *Kpn* I、*Hind* III 双酶切后, 胶回收试剂盒回收目的片段, 再由 T4 DNA 连接酶连接过夜, 氯化钙法转化 DH5 α 感受态细胞, 筛选 pAdTrack-CMV-*PTEN* 转移质粒的阳性克隆, PCR 和测序鉴定。将测序正确的 pAdTrack-CMV-*PTEN* 质粒和 pAdTrack-CMV 空质粒分别用 *Pme* I 单酶切线性化后, 胶回收, 与 pAdEasy-1 腺病毒载体氯化钙

法分别共转化 BJ5183 感受态, 涂布卡那平板, 挑选克隆扩增并抽提质粒, 进行 PCR 及酶切鉴定, 然后大量扩增转化子。

1.4 重组病毒子 Ad-*PTEN* 的获得及效价检测

碱裂解法抽提 *PTEN* 基因重组腺病毒质粒和空载体腺病毒质粒, 经 *Pac* I 线性化后, 按 Lipofectamine Reagent 操作说明转染 70% 贴壁的 QBI-293A 细胞。在荧光显微镜下 3~5 d 观察荧光, 7~10 d 收集细胞悬液, 2 000 r/min 离心 5 min, 细胞沉淀用无菌 PBS 洗涤 2~3 次后, 将细胞悬液反复冻融 3 次。2 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 经多轮感染后, 将培养生长状况良好的 QBI-293A 细胞以胰酶消化后, 细胞计数器计数。稀释细胞密度为 1 \times 10⁵/ml, 在 96 孔板上按每孔 100 μ l 接种细胞, 培养 24 h 后, 将收获的 Ad-*PTEN* 重组病毒子和空载体 Adv 腺病毒子按 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 做稀释后, 每个稀释度按每孔 100 μ l 接种 3 孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 细胞培养箱里培养 18 h 后, 荧光显微镜下, 进行荧光计数。病毒效价 (PFU/ml) = (每孔荧光平均数 \times 10) / 稀释度。获得高滴度 Ad-*PTEN* 重组病毒子和空载体 Adv 腺病毒子于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 重组病毒子感染 QBI293 细胞后的 Western blotting 鉴定

用 100 MOI 的 Ad-*PTEN* 重组病毒子和空载体 Adv 腺病毒子分别感染 QBI293 细胞 48 h 后, 1 500 r/min 离心收集细胞, PBS 洗涤 2~3 次, 加 SDS-PAGE 上样缓冲液混匀 (1 \times 10⁷/ml), 煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE。再将凝胶蛋白转印到 NC 膜(硝酸纤维膜)上, 经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 分别加入兔抗 *PTEN* 抗体 (1:1 000), 37 $^{\circ}$ C 1 h, 然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗, 最后用特异性的底物联苯二胺显色, 每步反应结束均用 TBST (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 100 mmol/L NaCl, 1 g/L Tween 20) 洗涤 4 次, 每次 5 min。

1.6 MTT 法检测 Ad-*PTEN* 重组腺病毒对 A549 肺癌细胞生长的影响

收取 A549 肺癌细胞作为靶细胞, 用 RPMI 1640 配成密度为 1 \times 10⁵ 的细胞悬液, 于 96 孔培养板每孔加 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育过夜。弃上清, 于 96 孔培养板中分别加无血清 RPMI 1640 培养液 10 μ l 为空白细胞对照; 加 10 μ l (1 \times 10⁸ PFU/ml) 空载体 Adv 腺病毒为空白病毒对照; 加 10 μ l (1 \times 10⁸ PFU/ml) Ad-*PTEN* 重组病毒子为实验组。每组设 3 个复孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵育 2 h 后, 每孔补加 90 μ l 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液。随后分别于 0、24、

48、72、96 h 每孔加 MTT(5 mg/ml)10 μ l, 继续孵育 4 h 后加入溶解剂[10% SDS + 1% HCl(1 mol/L)]100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C。次日待甲臜结晶完全溶解后, 在酶联免疫检测仪上测 D_{570} 值。抑制率(%)=(对照组 D 值 - 实验组 D 值)/对照组 D 值。

1.7 流式细胞术检测 Ad-PTEN 重组腺病毒对 A549 肺癌细胞凋亡的影响

同上分 3 组处理 A549 肺癌细胞感染病毒 48 h 后, 分别收集 3 组细胞, 所收集细胞用 PBS 1.0 ml 混匀, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复上述步骤 1 次后, 用 70% 的乙醇固定细胞, 最后以流式细胞术检测 3 组细胞的细胞周期和凋亡率。

1.8 Western blotting 检测 Ad-PTEN 感染后 A549 肺癌细胞中 PTEN 表达

方法同 1.5, 检测肺癌细胞感染后 PTEN 表达。

1.9 裸鼠 A549 肺癌细胞皮下移植瘤模型的建立及其治疗

取 0.2 ml 的 2×10^7 /ml A549 肺癌细胞皮下接种于裸鼠右前肢腋下, 建立裸鼠 A549 肺癌细胞皮下移植瘤模型。第 10 天成瘤后, 将 15 只小鼠按肿瘤大小大致相等原则分为 3 组(每组 5 只): PBS 对照组、空病毒对照组、Ad-PTEN 基因治疗组。对照组瘤体内注射 PBS 60 μ l, 空病毒组瘤体内注射空病毒 60 μ l (2×10^9 PFU/ml), Ad-PTEN 治疗组瘤体内注射 60 μ l (2×10^9 PFU/ml) Ad-PTEN, 均隔天 1 次, 共 5 次, 治疗完后第 3 天处死小鼠, 取肿瘤称重。

1.10 免疫组化法检测移植瘤中微血管密度

将裸鼠处死后取出肿瘤组织, 用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m 厚连续切片, 用免疫组化 S-P 法染色, CD34 抗体检测, DAB 显色, 苏木精复染, 肿瘤内微血管内皮细胞在光镜下呈棕褐色反应者为阳性表达。微血管判断按照 Weidne 等^[6]的评判标准: CD34 阳性标记的单个细胞或内皮细胞簇为 1 个单位微血管密度(microvessel density, MVD)。先在低倍镜下全面观察切片, 以确定肿瘤血管密度最明显区域; 然后在高倍镜下选择微血管数量最多的 5 个视野计数 MVD, 求其平均数作为该例的 MVD 值。

1.11 统计学处理

用 SPSS 10 统计软件包行方差分析法进行统计学处理。

2 结果

2.1 人外周血淋巴细胞 PTEN 基因的扩增

由外周血单个核细胞抽提 mRNA, 将 RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 结果发现在 1 200 bp 附

近有一条带, 表明 PTEN 基因已被扩增(图 1)。

2.2 pAdTrack-CMV-PTEN 重组质粒的成功构建

将获得的阳性克隆抽提质粒, 经 PCR 后琼脂糖凝胶电泳鉴定在 1 200 bp 附近有一条带(图 2)。条带测序结果与 GeneBank 报道 PTEN 序列完全一致, 表明 pAdTrack-CMV-PTEN 重组质粒已成功构建。

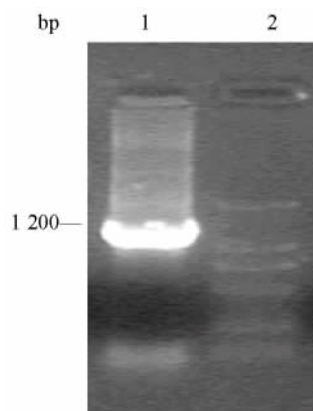


图 1 RT-PCR 扩增 PTEN 基因结果的电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PTEN produced by RT-PCR

1: PCR product; 2: Marker

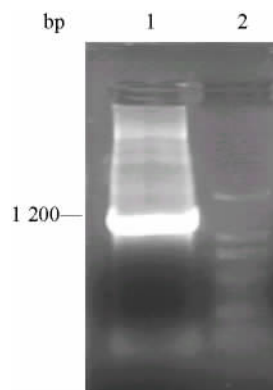


图 2 pAdTrack-CMV-PTEN 重组质粒的 PCR 鉴定
Fig. 2 Identification of pAdTrack-CMV-PTEN by PCR

1: PCR product; 2: Marker

2.3 重组腺病毒载体 pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-PTEN 构建

测序正确的 pAdTrack-PTEN 质粒和空载体质粒经 *Pme* I 线性化后, 与 pAdeasy-1 质粒共转化 BJ5183 大肠杆菌, 涂卡那霉素平板, 挑选阳性克隆扩增后, 抽提质粒进行 PCR 及酶切鉴定。PCR 产物在 1 200 bp 有一目的条带, 而 *Bam*H I 酶切后有 3 条带(因重组后有 3 个 *Bam*H I 酶切位点, 形成 3 个大小约 5.5、8 与 17 kb 的片段), *Pac* I 酶切后有 2 条带(因重组后有 2 个 *Pac* I 酶切位点, 形成 2 个大

小约为 4.5 与 26 kb 的片段)(图 3,4)。结果表明 pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-PTEN 重组腺病毒载体已成功构建。

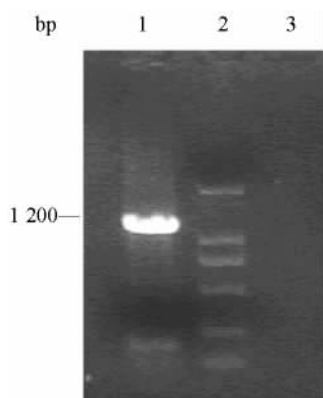


图 3 pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-PTEN 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of pAdeasy-1-pTrack-CMV-PTEN by PCR

1: pAdTrack-CMV-PTEN; 2: Marker; 3: pAdeasy-1-pAdTrack-CMV

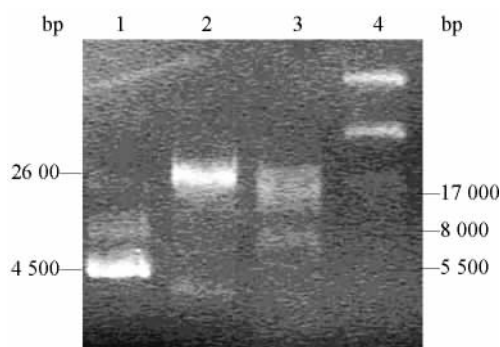


图 4 pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-PTEN 酶切鉴定

Fig. 4 Identification of pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-PTEN by enzyme digestion

1: pAdTrack-CMV-PTEN; 2: pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-PTEN enzyme digest by *Pac* I; 3: pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-PTEN enzyme digest by *Bam*H I; 4: pAdeasy-1-pAdTrack-PTEN

2.4 重组病毒子的获得

鉴定正确的重组 pAdeasy-1-pAdTrack-CMV-PTEN 质粒和空载体腺病毒质粒分别经 *Pac*I 酶切后,用 Lipofectamine 转染 QBI-293A 细胞,5 d 后在显微镜下可观察到荧光,7~10 d 后收集细胞,反复冻融的重组病毒子经多轮感染后,检测效价达到 1×10^9 PFU/ml,重组病毒子于 -80°C 冻存备用(图 5)。

2.5 重组病毒子感染 QBI293 细胞后 PTEN 的表达

用 Ad-PTEN 重组病毒子和空载体 Adv 腺病毒子

分别感染 QBI293 细胞 48 h 后,收集细胞,SDS-PAGE 后进行 Western blotting 分析,结果发现在相对分子质量为 56 000 左右有一特异性条带(图 6)。

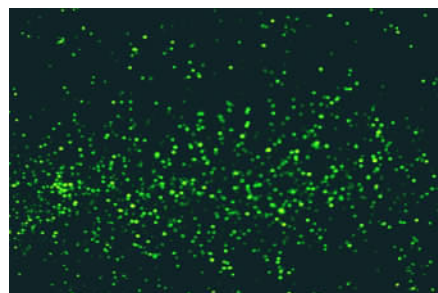


图 5 重组 Ad-PTEN 质粒线性化后转染 QBI 293 细胞的荧光照片

Fig. 5 Ad-PTEN visualized by fluorescence microscopy after transfection of QBI 293 cells



图 6 重组病毒子感染 QBI293 细胞后 PTEN 蛋白的表达

Fig. 6 PTEN protein expression of QBI293 cells after infected by Ad-PTEN

1: Blank control group; 2: Adv group; 3: Ad-PTEN group

2.6 Ad-PTEN 重组病毒对 A549 肺癌细胞生长的影响

用获得的重组 Ad-PTEN 病毒感染 A549 肺癌细胞,结果表明 A549 肺癌细胞生长受到抑制,感染后第 4 天其抑制率达可到 57%。而空载体 AdV 感染细胞组与空白细胞组无明显差异。

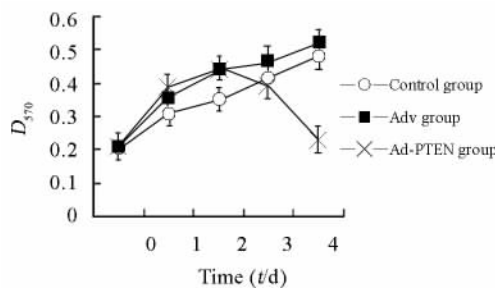


图 7 Ad-PTEN 重组病毒感染对 A549 肺癌细胞生长的影响

Fig. 7 The growth of A549 cells after infected with pAdTrack-CMV-PTEN

2.7 Ad-PTEN 重组病毒感染对 A549 细胞凋亡和细胞周期的影响

经流式细胞仪检测发现,Ad-PTEN 重组病毒感染 A549 肺癌细胞 48 h 后的凋亡率为 10.5%,而空

载体 AdV 感染细胞的凋亡率和空白细胞对照组的凋亡率为 0.6% 和 0。细胞周期检测结果显示, Ad-PTEN 重组病毒感染的细胞在 G_1 期增多(81.3%), 空载体 AdV 感染细胞和空白对照细胞分别为 51.3% 和 61.0%。

2.8 Ad-PTEN 感染 A549 肺癌细胞 PTEN 的表达

A549 肺癌细胞感染病毒 48 h 后, 分别收集 3 组细胞做 Western blotting 分析, 结果显示, Ad-PTEN 病毒感染 A549 细胞后在相对分子质量为 56 000 左右有一特异性条带(图 8)。

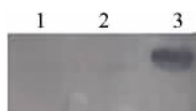


图 8 Ad-PTEN 感染 A549 肺癌细胞 PTEN 的表达

Fig. 8 PTEN expression of A549 cells infected with pAdTrack-CMV-PTEN

1: Blank control group; 2: Adv group; 3: Ad-PTEN group

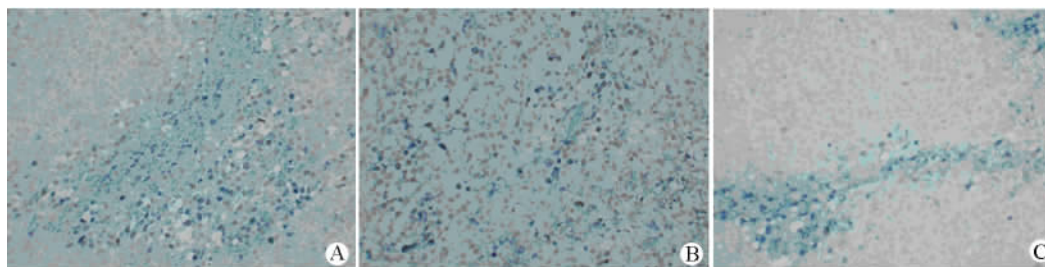


图 9 Ad-PTEN 基因治疗后移植瘤中 MVD 的变化 ($\times 200$)

Fig. 9 Change of MVD in transplantation tumor after treated by pAdTrack-CMV-PTEN ($\times 200$)

A: Blank control group, B: Adv group; C: Ad-PTEN group

3 讨论

PTEN 是由 Steck 提出来的属于磷酸酶家族的抑癌基因, 其表达产物 PTEN 蛋白具有双特异性磷酸酶活性, 它可以特异地使 PIP3 的 3' 磷酸脱去, 在酪氨酸磷酸酶和丝氨酸/苏氨酸磷酸酶介导的信号传导过程中具有重要的作用。它的主要功能是通过其脂磷酸酶活性, 调节第二信使 PIP3 的水平, 活化 AKT/PKB 和凋亡过程, 进而调控细胞的生长与凋亡, 结果导致细胞信号转导和细胞生长周期的阻滞, 从而诱导细胞凋亡。将野生型的 PTEN 基因转染成神经胶质细胞瘤、黑色素瘤和乳腺癌细胞等, 显示 PTEN 具有抑制细胞生长、促进细胞凋亡的功能^[7-9]。PTEN 通过 PI3K/Akt 依赖性和非依赖性途径调节细胞生长的整个过程^[10-12]。Akt 作为一种原癌基因蛋白能提高细胞的生存和抗凋亡的作用。PTEN 对肿瘤的作用主要有: (1) 抑制细胞增

2.9 Ad-PTEN 的体内抗肿瘤作用

荷 A549 肺癌细胞瘤裸鼠接受 Ad-PTEN 治疗后, 肿瘤生长明显减慢。经连续 5 次治疗, 于最后一次治疗后第 3 天处死小鼠, 取肿瘤称重。结果 PBS 对照组瘤重为 (1.42 ± 0.24) g, 空载体 Adv 对照组瘤重为 (1.12 ± 0.22) g, 而 Ad-PTEN 基因治疗组瘤重为 (0.58 ± 0.29) g; 与 PBS 对照组相比, Ad-PTEN 基因治疗组肿瘤显著减小, 其抑瘤率可达到 59% ($P < 0.05$)。

2.10 免疫组化检测移植瘤组织中的微血管密度

荷瘤裸鼠的移植瘤被取出后, 用 CD34 标记移植瘤中肿瘤血管内皮细胞, 计算其微血管密度 (MVD)。结果发现, 经 Ad-PTEN 基因治疗后, 其 MVD 值为 (45.2 ± 17.2) , 而空载体 Adv 对照组和 PBS 对照组分别为 (81.6 ± 13.6) 和 (89.2 ± 18.3) , 治疗效果明显 ($P < 0.05$, 图 9)。

殖, 诱导凋亡; (2) 抑制细胞迁移、铺展和局部黏附; (3) 抑制端粒酶的活性; (4) 参与胚胎的正常发育; (5) 抑制血管的生成^[13-18]。

肺癌是发病率和病死率最高的恶性肿瘤之一, 虽然有多种新的治疗方法问世, 但患者 5 年生存率始终徘徊在 4% ~ 14%。基因治疗作为一种肺癌治疗的新模式, 越来越受到人们的重视。已证实 PTEN 对多种肿瘤细胞有抑制作用, 但对肺癌的研究不多。本实验中, 我们利用已构建好的 Ad-PTEN 重组腺病毒子, 开展了对 A549 肺癌细胞体内外抗肿瘤实验。结果发现, Ad-PTEN 基因在体外能抑制 A549 肺癌细胞生长, 促使细胞凋亡, 并升高细胞 G_1 期; 在体内 Ad-PTEN 也能显著抑制裸鼠 A549 肺癌移植瘤的生长, 并能抑制肿瘤组织血管的生成。实验提示, Ad-PTEN 通过多种方式抑制细胞生长, 具有显著的抗 A549 肺癌细胞生长功能, 研究为肺癌的 PTEN 基因治疗提供了实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, *et al.* Identification of a candidate tumor suppressor gene MMAC, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers[J]. *Nat Genet*, 1997, 15(3): 356-362.
- [2] Tsuruta H, Kishimoto H, Sasaki T, *et al.* Hyperplasia and carcinomas in pten-deficient mice and reduced PTEN protein in human bladder cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 8389-8396.
- [3] Oda K, Stokoe D, Taketani Y, *et al.* High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(12): 10669 - 10673.
- [4] Abdel-Rahman MH, Yang Y, Zhou XP, *et al.* High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(1): 288-295.
- [5] Wei Q, Clarke L, Scheidenhelm DK, *et al.* High-grade glioma formation results from postnatal pten loss or mutant epidermal growth factor receptor expression in a transgenic mouse glioma model [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(15): 7429-7437.
- [6] Weidner N, Semphe JP, Welch WR, *et al.* Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1): 1-8.
- [7] Knobbe CB, Reifenberger G. Genetic alterations and aberrant expression of genes related to the phosphatidylinositol-3'-kinase/protein kinase B(Akt) signal transduction pathway in glioblastomas[J]. *Brain Pathol*, 2003, 13(4): 507-518.
- [8] Mikhail M, Velazquez E, Shapiro R, *et al.* PTEN expression in melanoma: Relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(14): 5153-5157.
- [9] Agrawal S, Eng C. Differential expression of novel naturally occurring splice variants of PTEN and their functional consequences in Cowden syndrome and sporadic breast cancer[J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(5): 777-787.
- [10] Zhong H, Chiles K, Feldser D, *et al.* Modulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol-3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: Implications for tumor angiogenesis and therapeutics[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 1541-1545.
- [11] Hara S, Oya M, Mizuno R, *et al.* Akt activation in renal cell carcinoma: Contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor[J]. *Ann Oncol*, 2005, 16(6): 928 - 933.
- [12] Liu JL, Sheng X, Hortobagyi ZK, *et al.* Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of Akt down-regulation[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(7): 6211-6224.
- [13] Tamura M, Gu J, Matsumoto K, *et al.* Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN[J]. *Science*, 1998, 280(5539): 1614-1617.
- [14] Gu J, Tamura M, Pankov R, *et al.* Src and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN[J]. *Cell Biol*, 1999, 146(2): 389-403.
- [15] Di Costanzo A, Pesce B, Cordon-Cardo C, *et al.* PTEN is essential for embryonic development and tumor suppression[J]. *Nat Genet*, 1998, 19(4): 348-355.
- [16] Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(1): 736 - 742.
- [17] Yao D, Alexander CL, Quinn JA, *et al.* PTEN loss promotes Ras-mediated papillomatogenesis via dual up-regulation of AKT activity and cell cycle deregulation but malignant conversion proceeds via PTEN-associated pathways[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(3): 1302-1312.
- [18] Li G, Hu Y, Huo Y, *et al.* PTEN deletion leads to up-regulation of a secreted growth factor pleiotrophin[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(16): 10663-10668.

[收稿日期] 2006 - 10 - 10

[修回日期] 2007 - 01 - 20

[本文编辑] 王莹

· 简 讯 ·

第一届世界华人免疫学大会征文通知

由中国免疫学会主办、第二军医大学免疫学研究所承办,由第二军医大学曹雪涛、美国约翰霍普金斯大学医学院陈列平、美国 MD 安德森癌症中心刘勇军任共同主席的“第一届世界华人免疫学大会”(The first World Chinese Conference on Immunology)将于 2007 年 7 月 12 日 - 15 日在上海召开,大会将邀请世界著名的免疫学家包括美国科学院院士、世界杰出华人免疫学家、国内著名免疫学学科带头人和免疫学实验室主任作专题报告,报告内容包括基础免疫学、临床免疫学和免疫学技术等领域的研究和应用新进展。大会将为从事免疫学研究的全球华人学者提供一个交流与合作的平台,为国内免疫学学者、学生提供及时了解免疫学国际前沿进展的机会。

征文要求: 凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料均可向会议投稿;本次会议采用网络投稿,请将英文摘要(小 4 字号,1.5 倍行间距,A4 页面 1 页)发送至会务联系人第二军医大学免疫学研究所吴艳峰博士(immunology2007@126.com;联系电话:021-55620605;传真:021-65382502)。来稿经专家评审后选择优秀论文作会议发言,所接受论文摘要将录入会议文集。

中国免疫学会