

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.28.003  
文章编号: 1005-8982 (2017) 28-0012-04

## 野生型 PTEN 过表达对体外活化肝星状细胞内钙离子浓度的影响 \*

郝礼森, 宋小杰, 王玉兰, 刘玉龄, 宋洁, 张明婷, 靳丽敏, 张朋垒

(华北理工大学附属医院 消化内科, 河北 唐山 063000)

**摘要: 目的** 探讨野生型第 10 号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源物基因 (PTEN) 过表达对体外活化肝星状细胞 (HSC) 内钙离子浓度的影响。**方法** 体外培养活化大鼠肝星状细胞系 (HSC-T6), 利用腺病毒载体, 将野生型 PTEN 基因转染活化 HSC; Western blot 及实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 HSC 的 PTEN 蛋白及 mRNA 表达; 采用钙离子荧光探针 Rhod-2/AM, 于激光扫描共聚焦显微镜下检测 HSC 内钙离子浓度变化。实验分组: ① Control 组: 腺病毒转染时以 DMEM 代替病毒液; ② Ad-GFP 组: 转染表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的对照空病毒 Ad-GFP; ③ Ad-PTEN 组: 转染携带野生型 PTEN 基因并表达 GFP 的重组腺病毒 Ad-PTEN。**结果** 野生型 PTEN 在活化大鼠 HSC 大量表达, 3 组 HSC 内钙离子浓度比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Ad-PTEN 组 HSC 内钙离子浓度 ( $251.60 \pm 90.88$ ) 低于 Control 组 ( $1\ 953.95 \pm 132.99$ ) 及 Ad-GFP 组 ( $1\ 937.57 \pm 115.17$ ), 而 Control 组与 Ad-GFP 组之间 HSC 内钙离子浓度比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** 野生型 PTEN 过表达可降低体外活化大鼠 HSC 内钙离子浓度。

**关键词:** 肝星状细胞; 第 10 号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源物基因; 细胞内钙离子浓度

**中图分类号:** R575

**文献标识码:** A

## Effect of wild-type *PTEN* over-expression on intracellular calcium ion concentration in activated hepatic stellate cells *in vitro* \*

Li-sen Hao, Xiao-jie Song, Yu-lan Wang, Yu-ling Liu, Jie Song, Ming-ting Zhang,  
Li-min Jin, Peng-lei Zhang

(Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of over-expression of wild-type phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten (*PTEN*) on the intracellular calcium ion concentration in activated hepatic stellate cells (HSCs) *in vitro*. **Methods** Using adenoviral vector, wild-type *PTEN* gene was transduced into activated rat HSC (HSC-T6) *in vitro*, and the expressions of *PTEN* mRNA and protein were detected by qRT-PCR and Western blot. Then with the help of laser scanning confocal microscope (LSCM), the changes of intracellular calcium ion concentration in HSCs were detected using calcium ion fluorescence probe Rhod-2/AM. The cells were grouped as follows: control group, in which the viral medium was replaced by DMEM when HSCs were transfected with adenovirus; Ad-GFP group, in which HSCs were transfected with adenovirus expressing green fluorescent protein (GFP) alone; and Ad-PTEN group, in which HSCs were transfected with adenovirus harboring both wild-type *PTEN* and *GFP* genes. **Results** The wild-type *PTEN* was successfully transduced into activated HSCs by adenoviral vector. The intracellular calcium ion concentration of the HSCs in the Ad-PTEN group significantly decreased compared with the control group and the Ad-GFP group ( $P < 0.05$ ). However, no significant difference was

收稿日期: 2016-11-26

\* 基金项目: 河北省自然科学基金 (No: H2013209327); 中国肝炎防治基金会天晴肝病研究基金资助项目 (No: CFHPC20132078)

observed in the intracellular calcium ion concentration of HSCs between the control group and the Ad-GFP group ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** The over-expression of wild-type *PTEN* can significantly reduce the intracellular calcium ion concentration in activated hepatic stellate cells *in vitro*.

**Keywords:** hepatic stellate cell; *PTEN*; intracellular calcium ion concentration

钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 作为细胞内第 2 信使, 在细胞兴奋、增殖、收缩等一系列细胞生物学功能中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。第 10 号染色体缺失的磷酸酶张力蛋白同源物基因 (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten, *PTEN*) 是迄今发现的第一个具有磷酸酶活性的肿瘤抑制基因, 它的异常表达与人类多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。近年来对 *PTEN* 的研究已从肿瘤领域逐渐延伸到非肿瘤领域。研究发现<sup>[2]</sup>, *PTEN* 过表达可通过下调大鼠心肌细胞内钙离子浓度阻滞来血管紧张素 II 引起的心肌细胞肥大。而在 *PTEN* 与肝纤维化的相关研究中发现<sup>[3]</sup>, 过表达的野生型 *PTEN* 可抑制体外活化肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSC) 的增殖。但 *PTEN* 过表达对 HSC 内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响仍不清楚。为此, 本研究利用腺病毒载体, 将野生型 *PTEN* 基因转染体外活化 HSC, 构建体外 HSC 的 *PTEN* 过表达模型, 探讨 *PTEN* 过表达对活化 HSC 内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的空病毒 Ad-GFP、携带野生型 *PTEN* 基因并表达 GFP 的腺病毒 Ad-*PTEN* 均由第三军医大学祝善俊教授惠赠, 通过反复感染 293A 细胞的方法扩增腺病毒, 并测定其滴度。胎牛血清购于以色列 BI 公司, DMEM 培养基及 HBSS 购于美国 Gibco 公司, 钙离子荧光探针 Rhod-2/AM 购于美国 Invitrogen 公司, 活化大鼠肝星状细胞系 (HSC-T6) 购自中国医学科学院肿瘤医院, 小鼠抗 *PTEN* 单克隆抗体购于英国 Abcam 公司, 兔抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 单克隆抗体购于美国 Affinity 公司, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔及山羊抗小鼠 IgG 购于美国 KRL 公司。

### 1.2 腺病毒转染活化 HSC

腺病毒转染前细胞培养 24 h, 吸去培养基, 用 DMEM 洗涤 2 次; 按感染倍数 100 确定转染所需病毒量 (病毒量 = 细胞数 × 感染倍数), 用少量 DMEM 稀

释病毒液 (能覆盖细胞表面即可); 轻轻倾斜并晃动培养皿, 以保持病毒液均匀, 于 37℃、5% 二氧化碳培养箱内孵育 2 h, 每隔 15 min 晃动培养皿 1 次, 以促进感染; 补充培养基, 继续培养至所需时间, 倒置荧光显微镜下观察 GFP 表达, 测得表达绿色荧光的细胞数占总细胞数的比例 (转染效率) 在 80% 以上。实验分组: ① Control 组, 腺病毒转染时以 DMEM 代替病毒液; ② Ad-GFP 组, 转染表达 GFP 的对照空病毒 Ad-GFP; ③ Ad-*PTEN* 组, 转染携带野生型 *PTEN* 基因并表达 GFP 的重组腺病毒 Ad-*PTEN*。

### 1.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 HSC 中 *PTEN* mRNA 表达

按上述分组要求处理 HSC 后 48 h, 收集各组 HSC, 按照 Trizol 试剂盒说明书提供的方法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA; 目的基因 *PTEN* 及内参基因 GAPDH 引物由上海英俊生物技术有限公司合成。引物序列: *PTEN* 正向引物 5'-TCCTGCAGA AAGACTTGAAGGT-3', 反向引物 5'-GCTGTGGTGGG TTATGCTCT-3', 扩增产物大小为 182 bp; GAPDH 正向引物 5'-GGCTCATGACCACAGTCCAT-3', 反向引物 5'-ACATTGGGGGTAGGAACACG-3', 扩增产物大小为 202 bp。在 Master cycler ep Real Plex4 qRT-PCR 仪上进行扩增。各反应体系扩增后, PCR 仪显示 S 形扩增曲线平滑完整, 上升迅速陡峭并很快到达平台期, 熔解曲线单峰, 提示扩增产物单一, 无非特异性扩增。采用相对定量  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法比较各组 HSC 的 *PTEN* mRNA 表达<sup>[4]</sup>。

### 1.4 Western blot 检测 HSC 中 *PTEN* 蛋白表达

按上述分组要求处理 HSC 后 48 h, 收集各组细胞并提取蛋白, BCA 法测定蛋白含量。一抗小鼠抗 *PTEN* 多克隆抗体以 1 : 100 稀释、兔抗 GAPDH 单克隆抗体以 1 : 1 000 稀释, 二抗 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 及山羊抗兔 IgG 均以 1 : 5 000 稀释, 采用 Image JV1.47H 软件对图像结果进行定量分析, 图像灰度值以积分光密度 (IOD) 值表示, 结果以目的蛋白与 GAPDH 的 IOD 比值表示。

### 1.5 $\text{Ca}^{2+}$ 荧光探针 Rhod-2/AM 检测 HSC 内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度

将 HSC 以  $4 \times 10^4$  个接种于激光扫描共聚焦显微

镜专用皿中, 生长 24 h 后, 按照上述分组处理细胞, 继续培养 48 h, 以 HBSS 溶液冲洗细胞 3 次; 加入配制的浓度为  $5 \mu\text{mol/L}$  的 Rhod-2/AM 工作液, 充分覆盖培养皿中的细胞, 置于  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  细胞培养箱避光孵育 30 min, 除去 Rhod-2/AM 工作液, 置于激光扫描共聚焦显微镜下, 用 557 和 581 nm 波长的激发光激发  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针 Rhod-2/AM 发射荧光, 随机选取 6 个视野进行观察, 利用激光扫描共聚焦显微镜的图像量化分析系统进行图像分析, 得出 HSC 平均  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度。由于细胞的荧光强度与细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度呈正比, 因此本实验中用荧光强度表示细胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  浓度<sup>[5]</sup>。

### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 野生型 PTEN 基因在活化 HSC 大量表达

腺病毒感染 HSC 48 h, qRT-PCR 检测 HSC 的 PTEN mRNA 表达, Ad-GFP 组、Ad-PTEN 组 HSC 的 PTEN mRNA 表达量相对于 Control 组 (Control 组 HSC 的 PTEN mRNA 表达量确定为 1) 分别为 1.03 和 1.90 倍, 3 组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Ad-PTEN 组 HSC 的 PTEN mRNA 表达高于 Control 组及 Ad-GFP 组, 而 Control 组与 Ad-GFP 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见表 1)。进一步用 Western blot 检测显示, 3 组 HSC 的 PTEN 蛋白表达比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Ad-PTEN 组 HSC 的 PTEN 蛋白表达较 Control 组及 Ad-GFP 组升高, Control 组与 Ad-GFP 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1、

图 1。

### 2.2 过表达的野生型 PTEN 降低 HSC 内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度

各组 HSC 内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度检测显示, 3 组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Ad-PTEN 组较 Control 组及 Ad-GFP 组降低, 而 Control 组与 Ad-GFP 组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 2、图 2。

表 1 3 组活化 HSC 的 PTEN mRNA 及蛋白表达水平比较 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	PTEN mRNA			PTEN 蛋白 ( $\bar{x} \pm s$ )
	$\Delta \text{Ct}(\bar{x} \pm s)$	$\Delta \Delta \text{Ct}$	$2^{-\Delta \Delta \text{Ct}}$	
Control 组	$7.04 \pm 0.04$	0.00	1.00	$0.56 \pm 0.05$
Ad-GFP 组	$6.99 \pm 0.04$	-0.05	1.03	$0.69 \pm 0.07$
Ad-PTEN 组	$6.11 \pm 0.07$	-0.93	$1.90^\dagger$	$1.08 \pm 0.07^\dagger$

注:  $\Delta \Delta \text{Ct}$  = 腺病毒转染组  $\Delta \text{Ct} (\text{Ct}_{\text{PTEN}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}}) - \text{Control 组} \Delta \text{Ct} (\text{Ct}_{\text{PTEN}} - \text{Ct}_{\text{GAPDH}})$ ;  $^\dagger$  与 Control 组及 Ad-GFP 组比较,  $P < 0.05$

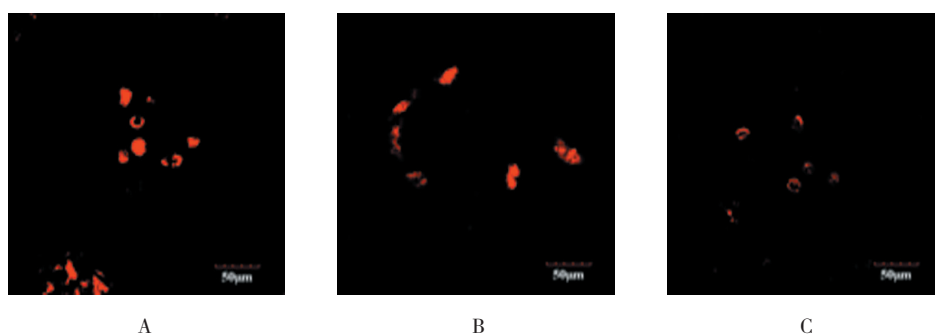


图 1 腺病毒感染 HSC 48 h 各组 HSC 的 PTEN 蛋白表达

表 2 腺病毒感染 HSC 48 h 各组 HSC 内  $\text{Ca}^{2+}$  的平均荧光强度 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	$\text{Ca}^{2+}$ 荧光强度
Control 组	$1953.95 \pm 132.99$
Ad-GFP 组	$1937.57 \pm 115.17$
Ad-PTEN 组	$251.60 \pm 90.88^\dagger$

注:  $^\dagger$  与 Control 组及 Ad-GFP 组比较,  $P < 0.05$



A: Control 组; B: Ad-GFP 组; C: Ad-PTEN 组

图 2 腺病毒感染 HSC 48 h 各组 HSC 内  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度 (激光扫描共聚焦显微镜  $\times 100$ )

### 3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病演变为肝硬化的病理过程, 而 HSC 则是参与此过程的主要细胞。HSC 的活化、增殖, 以及在肝脏损伤部位黏附、迁移, 并进一步合成大量细胞外间质是肝纤维化形成的中心环节<sup>[6-7]</sup>。Ca<sup>2+</sup> 作为重要的细胞内第 2 信使, 在细胞兴奋、增殖、收缩等一系列细胞生物学功能中发挥重要作用<sup>[1]</sup>, 而细胞收缩又与细胞黏附、迁移相关。并且, 已有研究显示<sup>[8]</sup> 大鼠 HSC 内钙离子增加可引起 HSC 收缩。因此 HSC 内 Ca<sup>2+</sup> 浓度变化与 HSC 黏附迁移等生物学行为有关。

PTEN 蛋白是一个具有脂质磷酸酶活性及蛋白磷酸酶活性的双重特异性磷酸酶。近年来的研究发现, PTEN 不仅与某些肿瘤的发生发展密切相关, 也参与了一些非肿瘤性疾病的病理过程。研究显示<sup>[9]</sup>, 胆总管结扎大鼠纤维化肝组织及在体外 HSC 的 PTEN 表达下降, 但 PTEN 对活化 HSC 内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的影响仍不清楚。为此, 本实验将腺病毒介导的野生型 PTEN 基因转染体外活化 HSC, 在证实野生型 PTEN 基因成功转染 HSC 并上调 PTEN 表达后, 应用 Ca<sup>2+</sup> 荧光探针 Rhod-2/AM 及激光扫描共聚焦显微镜技术, 观察了 HSC 内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的变化。结果表明, 野生型 PTEN 过表达可降低活化 HSC 内 Ca<sup>2+</sup> 浓度。这与上述研究结果相一致, 提示 PTEN 过表达不仅可下调心肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度, 也下调活化 HSC 内 Ca<sup>2+</sup> 浓度, HSC 内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的降低可能参与了 PTEN 过表达对活化 HSC

增殖的抑制。至于 PTEN 过表达是否能通过降低活化 HSC 内 Ca<sup>2+</sup> 浓度, 进而抑制活化 HSC 黏附、迁移, 尚待进一步研究。

#### 参 考 文 献:

- [1] 刘刚, 胡蕴玉, 赵建宁, 等. I 型胶原促进骨髓基质干细胞粘附的细胞机制 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2006, 8(6): 549-552.
- [2] YU L J, ZHU S J, ZHOU Y Z, et al. Angiotensin II induced cardiac hypertrophy is blocked by PTEN via suppressing Ca<sup>2+</sup>/Calcineurin pathway[J]. Chinese Journal of Cardiology, 2006, 34(6): 541-545.
- [3] 郝礼森, 张晓岚, 安君艳, 等. PTEN 过表达及其突变对体外活化肝星状细胞凋亡的影响 [J]. 中华消化杂志, 2009, 29(8): 529-533.
- [4] AROCHO A, CHEN B, LADANYI M, et al. Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts[J]. Diagn Mol Pathol, 2006, 15(1): 56-61.
- [5] 薛秀兰, 林菊生. 靶向瘦素基因小干扰 RNA 抑制肝星状细胞增殖和细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2014, 43(6): 631-635.
- [6] LEE U E, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Best Pract ResClin Gastroenterol, 2011, 25(2): 195-206.
- [7] PUCHE J E, SAIMAN Y, FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1473-1492.
- [8] LALEMAN W, VAN LANDEGHEM L, SEVERI T, et al. Both Ca<sup>2+</sup> -dependent and -independent pathways are involved in rat hepatic stellate cell contraction and intrahepatic hyperresponsiveness to methoxamine[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(2): 556-564.
- [9] HAO L S, ZHANG X L, AN J Y, et al. PTEN expression is down-regulated in liver tissues of rats with hepatic fibrosis induced by biliary stenosis[J]. APMIS, 2009, 117(9): 681-691.

(张蕾 编辑)