

PTEN 基因诱导人胚肾 293 细胞 凋亡和细胞周期停滞*

张利能^{1,2)} 俞强³⁾ 查锡良^{1)**}

¹⁾卫生部糖复合物重点实验室, 复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032;

²⁾同济大学医学院生物化学教研室, 上海 200422;

³⁾The Pulmonary Center and Department of Biochemistry, Boston University Medical Center, Boston MA 02118, USA)

摘要 为了研究抑癌基因 *PTEN* 过表达对人胚肾 293 细胞凋亡和细胞周期停滞的作用, 以野生型 *PTEN* 和 *PTEN* 突变子 (T910G) 表达质粒分别转染无 *PTEN* 表达的人胚肾 293 细胞, 采用细胞质梯度 DNA 方法检测细胞凋亡, 以流式细胞仪分析细胞周期。发现 *PTEN* 过表达能够诱导人胚肾 293 细胞质中出现梯度 DNA, 293 细胞发生凋亡, *PTEN* 过表达改变细胞周期分布, G0/G1 期细胞增加 13%, S 期细胞下降 15%。*PTEN* 突变子对细胞凋亡和 G1 细胞停滞的影响略弱于野生型 *PTEN*。*PTEN* 基因过表达明显下调血小板衍生生长因子 (PDGF) 诱导的蛋白激酶 B (PKB) 和 p42, p44 促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 磷酸化水平, *PTEN* 突变子对 p42, p44-MAPK 磷酸化水平的调节作用略弱于野生型 *PTEN*。*PTEN* 通过抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡而影响细胞生长。

关键词 抑癌基因, *PTEN*, 细胞凋亡, G1 停滞, 蛋白激酶 B, 促分裂原活化蛋白激酶

学科分类号 Q78, Q28

PTEN 基因在胶质瘤, 前列腺癌, 子宫内膜癌中因缺失、突变或伴转录水平降低而失活。在两种常染色体显性遗传疾病 Cowden 综合症、Bannayan-Zonana 综合症 (具有乳腺、甲状腺癌高发倾向) 病人细胞发生显性负突变。可见, 抑癌基因 *PTEN* 的活性与肿瘤的形成发展关系密切^[1-4]。*PTEN* 基因表达产物结构预测表明, *PTEN* 蛋白 N 端与张力蛋白高度同源, 而张力蛋白与肌动蛋白 (actin) 纤维结合参与聚焦粘附^[1]。对 *PTEN* 基因结构和功能的研究显示, *PTEN* 蛋白 N 端含有一个双专一性磷酸酶结构域, 体外实验证明其对短肽中磷酸化丝/苏氨酸、酪氨酸残基具有去磷酸作用, 而且偏爱酸性多肽底物^[5]。另一酸性底物磷脂酰肌醇三磷酸 (PIP₃) 受 *PTEN* 蛋白催化而在 D3 位脱磷酸^[6]。*PTEN* 通过调节 PIP₃ 水平, 影响 PIP₃-AKT/PKB-凋亡信号途径。肿瘤细胞中 *PTEN* 基因突变引起 *PTEN* 蛋白的磷酸酶活性降低, 使细胞活动失去控制^[7]。晶体结构研究显示, *PTEN* 蛋白其他功能结构域与信号分子结合并影响更多的信号途径^[8]。我们以前的工作发现^[9], 肝细胞癌中 *PTEN* 基因开放阅读框 910 位碱基 T/G 突变, 引起编码产物 304 位氨基酸 Cys/Gly 改变。部分肝癌组织中 *PTEN* 基因表达水平降低。我们构建野生型和突变型 (nt910 T/G) *PTEN* 表达载体, 转染无 *PTEN* 表达的人胚肾 293

细胞, 探讨 *PTEN* 活性对细胞凋亡和增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

RPMI1640 液体培养基为 GIBCO 公司产品。*E. coli* XL1-Blue 感受态细菌购自 Stratagene 公司。HEK293 细胞购自美国模式培养物保藏所。pBSK-*PTEN* cDNA 质粒由俞强博士提供, pEGFP C2 质粒为 Clontech 公司产品。限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶购自 New England BioLabs 公司。PCR 试剂盒、T 载体为 Promega 公司产品, PCR 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。抗 *PTEN*、抗 GFP 抗体为 Santa Cruz 公司产品, 抗 AKT/PKB, 抗 phospho-AKT 抗体购自 New England BioLabs 公司, 抗 MAPK、phospho-MAPK 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗购自 Upstate 公司, 增强化学发光 (ECL) 试剂盒为 Bio-Rad 公司产品。硝酸纤维素膜为 Schleicher Schuell 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 pEGFP-*PTEN* 表达质粒的构建: 引物 1 为 5' CG GAA TTC ATG ACA GCC ATC ATC AAA G

* 国家自然科学基金资助项目 (39970338)。

** 通讯联系人。

Tel: 021-54237696, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

收稿日期: 2002-09-03, 接受日期: 2002-11-01

3', 引物 2 为 5' CG GGA TCC TCA GAC TTT TGT AAT TTG TGT 3', 引物 3 为 5' CTC TAT ACT GCC AAT GCT ATC GA 3', 引物 4 为 5' TCG ATA GCA TTG GCA GTA TAG AG 3'. 野生型 *PTEN* cDNA (wt*PTEN*) 的 PCR 条件: 200 μ l 反应体系含适量 pBSK-*PTEN* cDNA 质粒, 引物 1 和引物 2 各 20 pmol, MgCl₂ 1.5 mmol/L. 95 $^{\circ}$ C 3 min 热启动, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 63 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 扩增 30 循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. *PTEN* 突变子 (nt910 T/G, mu*PTEN*) 的 PCR 定位突变: PCR 反应体系同上. *PTEN* cDNA1 (nt 1~ 921), *PTEN* cDNA2 (nt 898~ 1 212) 的 PCR 扩增分别采用引物 1、引物 3 和引物 2、引物 4. PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳, 切取 1.2 kb 产物片段, 以胶回收试剂盒纯化. 等量 *PTEN* cDNA1 和 *PTEN* cDNA2 作为模板, 以引物 1、引物 2 进行 PCR. PCR 产物的限制性核酸内切酶切: wt*PTEN*, mu*PTEN* PCR 产物分别以 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 切取 1.2 kb 片段, 分别回收 wt*PTEN* cDNA 和 mu*PTEN* cDNA. wt*PTEN* cDNA, mu*PTEN* cDNA 分别与 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切线性化的 pEGFP 质粒连接, 转化感受态细菌. 如上述步骤, 质粒扩增、小抽, 重组质粒经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 酶切鉴定. 对插入 pEGFP 质粒的 wt*PTEN* 和 mu*PTEN* 进行测序分析证实后, pEGFP-wt*PTEN*, pEGFP-mu*PTEN* 质粒经大量扩增、纯化, 以备细胞转染.

1.2.2 转染: 用胰蛋白酶消化 HEK293 细胞, 转至 60 mm 直径的细胞培养皿, 培养 14~ 18 h 后, 细胞培养至 50%~ 60% 汇合, 进行磷酸钙转染. 10 μ g 质粒与磷酸钙转染试剂混合, 转移至细胞单层上的培养液中, 轻轻晃动培养皿, 使培养液得以混匀, 此时培养液呈橙色微浊状. 6 h 后, 更换培养液. 24 h 后换成选择性培养基 (含 G418 600 mg/L), 选择培养 1 周.

1.2.3 蛋白质印迹: 收集细胞, 用放射性免疫沉淀裂解缓冲液 (RIPA) 裂解细胞. 样品上样进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE). 电泳结束, 用电转移的方法将蛋白质转移至硝酸纤维素膜, 5% 牛奶封闭 2 h, 加 anti-*PTEN*, anti-GFP, anti-PKB, anti-phosphoPKB, anti-MAPK, 或 anti-phosphoMAPK 抗体孵育过夜, 洗涤, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗孵育 2 h, 加增强化学发光试剂于暗室自显影.

1.2.4 细胞质梯度 DNA 测定: 收集 60 mm 直径

培养皿中的贴壁细胞及悬浮细胞, 胰酶-EDTA 消化后计数细胞, 各取 10⁶ 个细胞, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上清. 细胞沉淀加入 0.6 ml 裂解缓冲液, 吹打混匀, 冰浴 1 h. 14 000 r/min 离心 5 min, 上清以等体积 Tris-HCl (pH 8.0) 饱和的酚、酚: 氯仿 (1: 1)、氯仿去除蛋白质, 上清加 3 mol/L 醋酸钠至 0.3 mol/L, 加两倍体积无水乙醇, 混匀, -20 $^{\circ}$ C 放置过夜. 14 000 r/min 离心 10 min, DNA 溶于 30 μ l TE 溶液 (Tris·HCl, EDTA 缓冲液), 1.5% 琼脂糖凝胶电泳. 紫外灯下观察梯度 DNA^[10].

1.2.5 流式细胞仪测定细胞周期: 胰酶消化细胞, 制成单细胞悬液, 调节细胞浓度为 1 \times 10⁶/ml. 加入乙醇至 75% 浓度, 室温固定 10 min. 加入 1% 体积的碘化丙啶溶液 (69 μ mol/L 磷酯酰肌醇 (PI) -38 mmol/L 柠檬酸钠, pH 7.3), 室温避光放置 10 min. 以 Becton Dickinson 流式细胞仪测定细胞周期.

2 结 果

2.1 pEGFP-*PTEN* 表达质粒的鉴定

因为 *PTEN* cDNA 片段定向插入质粒, 我们仍用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 限制性核酸内切酶切重组质粒. 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳, 可见 1.2 kb 和 5.0 kb 2 条条带 (图 1), 表明 *PTEN* cDNA 片段已被定向插入 pEGFP 质粒. 我们对 pEGFP-wt*PTEN*、pEGFP-mu*PTEN* 质粒中的插入序列进行测序分析, wt*PTEN* 未见突变, mu*PTEN* 正如

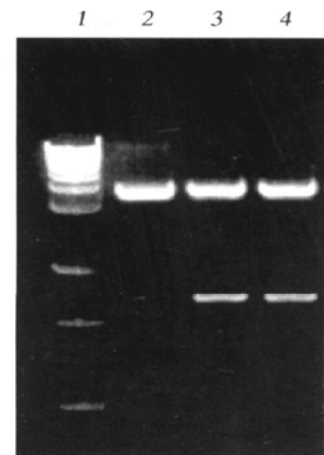


Fig. 1 Electrophoresis analysis of *PTEN* expression plasmids

1: DNA marker; 2: pEGFP; 3: pEGFP-wt*PTEN* digested by *Eco*R I and *Bam*H I; 4: EGFP-mu*PTEN* digested by *Eco*R I and *Bam*H I.

预期在 nt910 发生 T/G 突变.

2.2 pEGFP-PTEN 转染细胞后 PTEN 表达增加

模型细胞中内源性 *PTEN* 表达可干扰外源性 *PTEN* 功能分析. HEK293 细胞无 *PTEN* 蛋白质表达, 比较适合分析 nt910 T/G 突变子的作用. 用磷酸钙沉淀方法将 pEGFP-wt*PTEN*、pEGFP-mu*PTEN* 质粒分别转染 HEK293 细胞, 以空载体 pEGFP 转染 HEK293 细胞作为对照. 在荧光显微镜下, 表达绿色荧光蛋白的细胞较多, HEK293 细胞内荧光强度高, 说明转染效率较高. 细胞以 RIPA 裂解缓冲液裂解. 用蛋白质印迹方法鉴定细胞中 *PTEN* 蛋白质表达水平. 如图 2 所示, HEK293 细胞受 pEGFP-wt*PTEN* 或 pEGFP-mu*PTEN* 质粒转染后 *PTEN* 蛋白水平显著增加, pEGFP 空质粒转染的 HEK293 细胞检测不到 *PTEN* 蛋白.

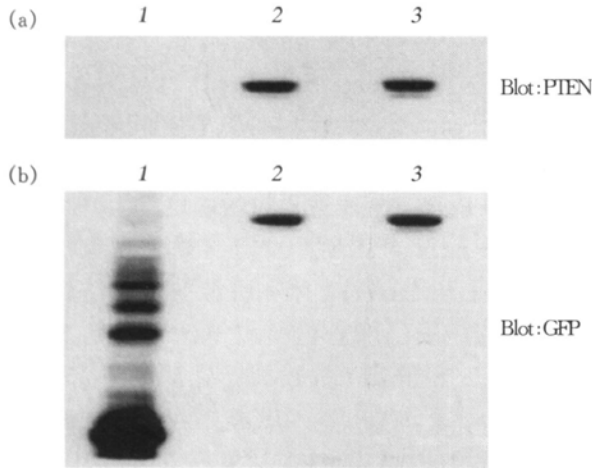


Fig. 2 Western blot analysis of PTEN expression in HEK293 cells transfected with wtPTEN or muPTEN

The filter was detected with anti-PTEN (a) and anti-GFP (b) antibodies sequentially. 1: pEGFP-HEK293; 2: wtPTEN-HEK293; 3: muPTEN-HEK293.

2.3 PTEN 过表达诱导 HEK293 细胞凋亡

常规梯度 DNA 分析因为核内高分子质量 DNA 的掩盖作用, 往往不能观察到实际存在的梯度 DNA. 细胞质梯度 DNA 分析方法排除了核内 DNA 的干扰, 是检测细胞凋亡的一个早期而敏感的方法. HEK293 细胞转染 *PTEN* 后, 应用细胞质 DNA 抽提方法, 可以观察到 HEK293 细胞凋亡发生时 DNA 降解片段 (梯度 DNA). pEGFP 空质粒转染 HEK 细胞仅引起非常微弱的梯度 DNA, pEGFP-wt*PTEN* 转染可见明显的梯度 DNA, pEGFP-mu*PTEN* 转染引起的梯度 DNA 强度稍弱 (图 3).

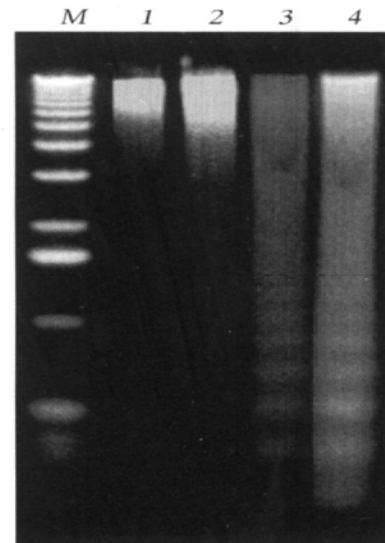


Fig. 3 PTEN induced HEK293 apoptosis

HEK293 cells were transfected with pEGFP, pEGFP-wt*PTEN* and pEGFP-mu*PTEN*, respectively. Cytoplasmic DNAs were isolated from these cells and analyzed by agarose gel electrophoresis. DNA from equal amount of cells was loaded in each lane. M: 1 kb DNA marker from Life Technologies, Inc. 1: HEK293; 2: pEGFP-HEK293; 3: muPTEN-HEK293; 4: wtPTEN-HEK293.

2.4 PTEN 过表达降低 PDGF 诱导的 PKB/Akt, MAPK 磷酸化水平

HEK293 细胞转染 wt*PTEN*, mu*PTEN* 或空质粒后, 0.2% FBS 培养液培养过夜, 以 10 μ g/L 浓度的 PDGF 刺激 10 min. wt*PTEN* 和 mu*PTEN* 的过表达均能使 PDGF 诱导的 Akt 丝氨酸磷酸化水平降低, 但两者之间无明显差异 (图 4). 同样培养条件下, 10 μ g/L 浓度的 PDGF 作用 10 min, *PTEN* 基因过表达显著降低 p42, p44-MAPK 磷酸化水平. wt*PTEN* 转染的 HEK293 细胞中 MAPK 磷酸化水平较 mu*PTEN* 转染的细胞低 (图 5).

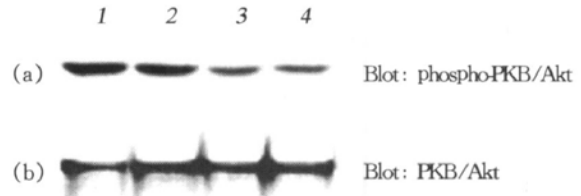


Fig. 4 PTEN reduced PDGF induced PKB/Akt phosphorylation

HEK293 cells were transfected with pEGFP-wt*PTEN* or pEGFP-mu*PTEN*, then were switched to culture in DMEM containing 0.2% FBS overnight. The serum-restricted cells were then incubated in medium in the presence of PDGF for 10 min. Cell lysates were prepared and equal amount of proteins were loaded in each lane and resolved by SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis using anti-phospho-Akt (a) and anti-Akt (b). 1: HEK293; 2: pEGFP-HEK293; 3: wtPTEN-HEK293; 4: muPTEN-HEK293.

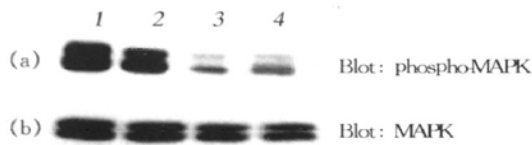


Fig. 5 PTEN reduced PDGF induced MAPK phosphorylation

HEK293 cells were transfected with pEGFP-wtPTEN or muPTEN, then were switched to culture in DMEM containing 0.2% FBS overnight. The serum-restricted cells were then incubated with PDGF for 10 min. Cell lysates were prepared and equal amount of proteins were loaded in each lane and resolved by SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis using anti-phospho-MAPK (a) and anti-MAPK (b). 1: HEK293; 2: pEGFP-HEK293; 3: wtPTEN-HEK293; 4: muPTEN-HEK293.

2.5 wtPTEN 和 muPTEN 过表达对细胞周期的影响

HEK293 细胞受 wtPTEN 或 muPTEN 质粒转染后, S 期细胞减少 15%, 而 G0/G1 期细胞增加 13% (表 1). muPTEN 转染的 HEK293 细胞 G0/G1 期细胞比 wtPTEN 少 3%.

Table 1 The effect of the PTEN gene on cell cycle in HEK293

	G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
pEGFP-HEK293	42.4	31.7	25.9
wtPTEN-HEK293	55.1	15.4	29.5
muPTEN-HEK293	52.2	17.1	30.7

3 讨 论

细胞生长有赖于增殖和生存信号转导途径. 肿瘤细胞恶性生长正是异常增殖和/或细胞死亡调节机制缺陷的结果. 为了研究 PTEN 基因对细胞增殖和凋亡的影响, 我们的实验选择无 PTEN 表达的 HEK293 作为模型细胞, 以避免 PTEN 内源性表达产物对 PTEN 突变子的功能分析. 实验发现, 野生型 PTEN 或突变型 PTEN (nt910 T/G, Cys304Gly) 均引起 HEK293 细胞凋亡, 并影响细胞周期分布, S 期细胞降低 15%, G1 期细胞增加. 突变型 PTEN 对 HEK293 的影响不如野生型 PTEN.

已知 PI3K-PKB/Akt 和 Ras-Raf-MAPK 是细胞膜受体与生长因子或细胞外基质结合后介导细胞生存的两条信号通路. 细胞转染原生激活型 (constitutively active forms) PI3K 或 PKB/Akt 可阻止细胞凋亡, 而抑制 PI3K 则引起凋亡^[11]. 胰岛素样生长因子 (IGF)、表皮生长因子 (EGF)、血小板衍生生长因子 (PDGF) 等生长因子与细胞膜上受体结合后, 通过其中至少一条信号通路触发激活 PI3K,

导致磷酸酰肌醇磷酸 (PIP₃) 生成增加. PIP₃ 与 PKB 结合, 使 PKB/Akt 构象改变, 被部分激活. 同时 PIP₃ 依赖的蛋白激酶 (PDK) 活化, 催化 PKB/Akt 磷酸化而激活^[12]. PTEN 基因表达产物具有肌醇 3-磷酸酶活性, 催化三磷酸脂酰肌醇 (PIP₃) D-3 位脱磷酸^[7], 使 PIP₃ 水平下降. 而 PIP₃ 为磷酸肌醇 D-3 激酶 (PI3K) 的催化产物. 本实验结果显示, HEK293 细胞中 PTEN 表达显著降低 PKB/Akt 磷酸化, 提示 PTEN 通过改变 PKB/Akt 磷酸化水平及下游信号通路而诱发 HEK 细胞凋亡.

本研究发现, PTEN 过表达明显下降 PDGF 诱导的 MAPK 磷酸化水平. 细胞膜受体与 PDGF 结合后, RTK-Ras-Raf-MEK-MAPK 通路激活. 文献报道^[13]: a. 胶质瘤细胞 DTBRG-05MG 受 EGF 刺激, MAPK 激活, 并不受 PI3K 抑制剂 Wortmannin 抑制; b. PTEN 转染显著降低 Ras GTP/GDP 比例, Ras 蛋白活性降低; c. 激活型 H-Ras 和 PTEN 共转染细胞, PTEN 不影响 Ras GTP/GDP 比例. 这些结果提示, MAPK 通路独立于 PI3K 途径, PTEN 表达产物通过影响 Ras 活性而改变 MAPK 磷酸化水平. 我们的实验表明: wtPTEN, muPTEN 均降低 PKB/Akt 磷酸化水平, 两者间无差异; muPTEN 下调 MAPK 磷酸化水平的作用不及 wtPTEN; muPTEN 诱导细胞凋亡的程度低于 wtPTEN. 这说明 wtPTEN 和 muPTEN 均可通过 PI3K-PKB/Akt, Ras-Raf-MAPK 这两条可能独立的信号通路诱导 HEK293 细胞凋亡, muPTEN 对 Ras-Raf-MAPK 的抑制作用低于 wtPTEN, 可能是 muPTEN 诱导细胞凋亡程度较低的原因.

PTEN 基因对细胞的影响呈现组织细胞特异性. 如在胶质瘤细胞株 PTEN 基因过表达, 可以引起 G1 停滞 (G1 arrest)^[7], 在乳腺癌细胞过表达则导致凋亡^[14]. 我们的研究显示, PTEN 基因表达诱导 HEK293 细胞凋亡和 G1 停滞. 研究表明 PTEN 基因过表达使依赖于细胞周期蛋白的激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 抑制蛋白 (CDKI) p^{27kip1} 在细胞周期蛋白 E (cyclin E) 复合物中的水平增加, 从而使 cyclin E 复合体中 cyclin E、CDK2、CDKI 的比例失衡, 引起 CDK2 激酶活性下降, 最终细胞周期停滞于 G1 期^[15].

我们对转染野生型 PTEN 或突变型 PTEN 的 HEK293 细胞的分析表明, PTEN 诱导 HEK293 细胞凋亡, 并使其停滞于 G1 期, 肝癌组织中检测

到的突变型 *PTEN* 作用弱于野生型 *PTEN*，但突变型 *PTEN* 活性下降并不十分明显。我们以前的工作发现，肝癌组织和肝癌细胞株中 *PTEN* 基因表达水平明显降低，说明肝癌细胞中 *PTEN* 基因表达水平降低可能是其失活的主要原因。结合本实验中 *PTEN* 基因过表达抑制细胞增殖，促进细胞凋亡的结果，*PTEN* 基因低表达与肝癌形成发展有密切的关系。

参 考 文 献

- 1 Li J, Yen C, Liaw D, *et al.* *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 1997, **275** (5308): 1943~ 1947
- 2 Risinger J I, Hayes A K, Berchuck A, *et al.* *PTEN/MMAC1* mutations in endometrial cancers. *Cancer Res*, 1997, **57** (21): 4736~ 4738
- 3 Liaw D, Marsh D J, Li J, *et al.* Germline mutations of the *PTEN* gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet*, 1997, **16** (1): 64~ 67
- 4 Marsh D J, Dahia P L, Zheng Z, *et al.* Germline mutations in *PTEN* are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet*, 1997, **16** (4): 333~ 334
- 5 Myers M P, Stolarov J P, Eng C, *et al.* *P-TEN*, the tumor suppressor from human 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (17): 9052~ 9057
- 6 Myers M P, Pass I, Batty I H, *et al.* The lipid phosphatase activity of *PTEN* is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (23): 13513~ 13518
- 7 Li D M, Sun H. *PTEN/MMAC1/TEP1* suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (26): 15406~ 15411
- 8 Lee J O, Yang H, Georgescu M M, *et al.* Crystal structure of the *PTEN* tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*, 1999, **99** (3): 323~ 334
- 9 张利能, 查锡良, 俞 强, 等. 人肝癌细胞中 *PTEN/MMAC1/TEP1* 基因的突变分析. *实验生物学报*, 2000, **33** (3): 223~ 227
- 10 Zhang L N, Zha X L, Yu Q, *et al.* *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, 2000, **33** (3): 223~ 227
- 10 Frisch S M, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*, 1994, **124** (4): 619~ 626
- 11 Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, *et al.* Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J*, 1997, **16** (10): 2783~ 2793
- 12 Shepherd P R, Withers D J, Siddle K. phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*, 1998, **333** (3): 471~ 490
- 13 Gu J, Tamura M, Yamada K M. Tumor suppressor *PTEN* inhibits integrin- and growth factor-mediated mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling pathways. *J Cell Biol*, 1998, **143** (5): 1375~ 1383
- 14 Li J, Simpson L, Takahashi M, *et al.* The *PTEN/MMAC1* tumor suppressor induces cell death that is rescued by the Akt/ protein kinase B oncogene. *Cancer Res*, 1998, **58** (24): 5667~ 5672
- 15 Cheney I W, Neuteboom S T, Vaillancourt M T, *et al.* Adenovirus mediated gene transfer of *MMAC1/PTEN* to glioblastoma cells inhibits S phase entry by the recruitment of p27Kip1 into cyclin E/CDK2 complexes. *Cancer Res*, 1999, **59** (10): 2318~ 2323

The Expression of *PTEN* in HEK293 Cells Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest*

ZHANG Li-Neng^{1,2)}, Yu Qiang³⁾, ZHA Xi-Liang^{1)**}

¹⁾Key Laboratory of Glycoconjugate Research, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fudan University Shanghai Medical School, Shanghai 200032, China;

²⁾Department of Biochemistry, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200422, China;

³⁾The Pulmonary Center and Department of Biochemistry, Boston University Medical Center, Boston MA 02118, USA)

Abstract It was to study whether overexpression of the tumor suppressor *PTEN* in HEK293 cells could lead to apoptosis and cell cycle arrest. The wild-type and mutant T910G of *PTEN* expression plasmids were constructed and transfected into *PTEN*-null HEK293 cells respectively. Apoptosis was evaluated by the appearance of cytosolic low molecular DNA ladder on the gel. Cell cycle was determined by flow-cytometric analysis. The Western blot analysis was performed to determine the phosphorylation levels of PKB/Akt and MAPK. The present data showed that the overexpression of *PTEN* in HEK293 cells could induce apoptosis and resulted in an increase in G1 cell population through inhibiting PKB/Akt and MAPK phosphorylation stimulated by PDGF. Mutant *PTEN* cause less apoptosis and G1 arrest than wild-type *PTEN*. MAPK dephosphorylation caused by mutant *PTEN* was not so significant as by wild-type *PTEN*. These data suggested that *PTEN* may exert its tumor-suppressive effects through both the inhibition of cell cycle progression and the induction of apoptosis.

Key words suppressor gene, *PTEN*, apoptosis, G1 arrest, PKB, MAPK

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39970338).

** Corresponding author. Tel: 86-21-54237696, E-mail: xlzha@shmu.edu.cn

Received: September 3, 2002 Accepted: November 1, 2002