

内皮素-1 对紫杉醇诱导激素非依赖性前列腺癌 细胞 PC3 凋亡的影响

武睿毅 王国民^Δ 王杭 张立

(复旦大学附属中山医院泌尿外科 上海 200032)

【摘要】 目的 观察内皮素-1(endothelin-1, ET-1)对紫杉醇诱导激素非依赖性前列腺癌细胞 PC3 凋亡的影响,并研究其机制。方法 采用人激素非依赖性前列腺癌细胞株 PC3,设对照组、紫杉醇组、紫杉醇+ET-1组。流式细胞仪测定 PC3 细胞周期分布和凋亡细胞百分比。免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)及 Western blot 检测 PC3 细胞 Bcl-2、Bax 和 Bax/Bcl-2 异二聚体的表达。结果 紫杉醇+ET-1组 PC3 细胞的 G0-G1(%)高于紫杉醇组,G2-M(%)低于紫杉醇组,凋亡细胞百分比低于紫杉醇组,差异有统计学意义($P<0.05$)。紫杉醇+ET-1组 PC3 细胞的 Bcl-2 磷酸化水平显著低于紫杉醇组,Bax/Bcl-2 异二聚体水平显著高于紫杉醇组,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 ET-1 能逆转紫杉醇对 PC3 细胞的 G2/M 期阻滞,并能通过影响 Bcl-2 磷酸化作用于细胞凋亡通路,减少细胞凋亡,从而降低激素非依赖性前列腺癌 PC3 细胞对紫杉醇的敏感性。

【关键词】 内皮素-1; 激素非依赖性前列腺癌; 紫杉醇; 凋亡

【中图分类号】 R 730.59 **【文献标识码】** A

Influence of endothelin-1 on apoptosis induced by paclitaxel in hormone refractory prostate cancer cell line PC3

WU Rui-yi, WANG Guo-min^Δ, WANG Hang, Zhang Li

(Department of Urology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 Objective To investigate influence of endothelin-1 (ET-1) on apoptosis induced by paclitaxel in hormone refractory prostate cancer line PC3, and further investigate its mechanism.

Methods Hormone refractory prostate cancer cell PC3 was cultured *in vitro* and divided into control group, Paclitaxel group and Paclitaxel + ET-1 group. Distribution of cell cycles and percentage of apoptotic cells was detected by flow cytometry, and the level of Bcl-2, Bax and Bax/Bcl-2 heterodimer was determined by immunoprecipitation and Western blot. **Results** Compared with paclitaxel group, PC3 cells in paclitaxel + ET-1 group showed a increased G0-G1 percentage and decreased G2-M percentage in cell cycle and a decreased percentage of apoptotic cells, and showed a decreased phosphorylation level of Bcl-2 and increased Bax/Bcl-2 heterodimer level. All results had significant difference($P<0.05$). **Conclusions** ET-1 could reverse paclitaxel-induced G2/M phase blockade and protect PC3 cells from paclitaxel-induced apoptosis by decreasing Bcl-2 phosphorylation to influence apoptotic pathways, thereby reduced hormone refractory prostate cancer cell PC3's sensibility to paclitaxel.

【Key words】 endothelin-1; hormone refractory prostate cancer; paclitaxel; apoptosis

前列腺癌在我国泌尿生殖系恶性肿瘤中已占第3位。由于发病隐匿,大多数病人就诊时肿瘤已进入局部进展期,或已发生转移,丧失了根治性手术的机会。一般认为前列腺癌细胞具有雄激素依赖性生

长的特性,因此目前临床上对中晚期肿瘤主要采用抗雄激素内分泌治疗,但治疗过程中肿瘤易发展为激素非依赖性前列腺癌(hormone refractory prostate cancer, HRPC),不仅对抗雄激素药物失

^ΔCorresponding author E-mail: wang.guomin@zs-hospital.sh.cn

去反应,而且对各种化疗药物均不敏感,目前临床上尚无满意的治疗药物,病人生存期大多不超过2年,预后很差^[1]。

Nelson等^[2]发现,HRPC细胞的内皮素-1(endothelin-1, ET-1)高表达。现已证实ET-1能促进肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移,并能抑制其凋亡等,是调控HRPC细胞生物学行为的一个关键因子^[3,4]。但是,HRPC对细胞毒性药物不敏感是否与ET-1的高表达有关,目前尚不明确。本实验以治疗HRPC的常用药物紫杉醇作为载体,观察ET-1对其诱导激素非依赖性前列腺癌细胞PC3凋亡的影响,并研究其机制。

材料和方法

细胞株和主要试剂 人激素非依赖性前列腺癌细胞株PC3,购自中科院上海细胞所;DMEM细胞培养基购自GibcoBRL公司;人内皮素-1购自Alexis Biochemicals公司(编号155-001-PC01);紫杉醇购自Sigma公司(编号F 4759);小鼠抗人Bcl-2单克隆抗体,小鼠抗人Bax单克隆抗体,兔抗人 β -actin多克隆抗体,Protein G PLUS-Agarose购自Santa Cruz公司;进口试剂分装HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体,HRP标记的山羊抗兔IgG抗体购自北京中杉金桥生物科技有限公司;BCA-100蛋白定量测定试剂盒和ECL试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司;预染的蛋白Marker购自MBI Fermentas公司。

细胞培养及分组 实验分为对照组、紫杉醇组、紫杉醇+ET-1组。每组设3个细胞培养瓶。接种PC3细胞 6×10^5 个于细胞培养瓶中瓶(相当于6孔板2个孔的面积),采用含10%小牛血清的DMEM培养液培养,观察细胞贴壁生长情况。在细胞贴壁生长良好,PC3细胞生长面积达80%后,弃去原细胞培养液,以无血清的DMEM培养液饥饿细胞24h,使其达静止状态。再弃去培养液,各组分别加入含不同药物的无血清的DMEM培养液,继续培养24h。ET-1的浓度为100 nmol/L,紫杉醇浓度为50 nmol/L,ET-1及紫杉醇浓度参照相关文献^[5,6]。实验重复3次。

流式细胞仪检测 测定PC3细胞细胞周期分布和凋亡细胞百分比。每组收集培养瓶中的PC3细胞约 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 个,PBS洗2次,柠檬酸钠缓冲液2 mL 4℃固定20 min。100 μ g/mL RNase 37℃孵育30 min,酶切RNA。50 μ g/mL 碘化丙啶(PI)避光4℃染色30 min,通过流式细胞仪测定细胞周

期分布和凋亡情况。以出现在G0/G1峰前的亚G1峰(亚二倍体峰)细胞作为凋亡细胞,计算凋亡细胞比率Apoptosis(%)。

Western blot 检测 测定PC3细胞Bcl-2、Bax的表达。弃去培养液,PBS洗涤细胞2次,加入4℃预冷RIPA细胞裂解缓冲液提取蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取蛋白质100 μ g行Tris-甘氨酸SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),15%的分离胶和5%的浓缩胶。电泳完成后,电转移法将蛋白质转移到PVDF膜。5%脱脂奶粉的PBST缓冲液封闭PVDF膜。加一抗(抗Bcl-2抗体1:100稀释,抗Bax抗体1:200稀释,抗 β -actin抗体1:200稀释)4℃过夜。加HRP标记的二抗(1:1 000),37℃反应2h。杂交膜用ECL化学发光试剂于暗室中显影并感光胶片。在Western blot检测Bcl-2时,26 \times 10³处条带是未磷酸化的Bcl-2,而移动较慢的条带代表磷酸化的Bcl-2^[8]。

免疫沉淀(Immunoprecipitation, IP) 测定Bax/Bcl-2异二聚体的表达。进行Western blot前,需首先进行IP。蛋白样品先加入Bcl-2抗体和Protein G PLUS-Agarose进行免疫沉淀,4℃摇床孵育过夜,弃上清,裂解缓冲液洗涤3次,将所有的Bcl-2蛋白(包括Bax/Bcl-2异二聚体)先沉淀分离出来。免疫沉淀加入SDS上样缓冲液,沸水浴5 min,然后再以Bax抗体作为一抗进行Western blot分析(方法同前)^[8]。

统计学方法 采用SPSS 11.5软件计算所有实验组各项检测指标的均值,并采用One-way ANOVA方差分析方法对各实验组的均值进行两两比较,检验差异显著性。

结 果

流式细胞仪检测结果 各组的PC3细胞的细胞周期分布和凋亡细胞百分比的均值见表1。各组之间进行均值两两比较和方差分析检验,结果如下:(1)紫杉醇组PC3细胞的G0-G1(%)均低于对照组,G2-M(%)均高于对照组,凋亡细胞百分比均高于对照组,且差异均有显著性, $P < 0.05$ 。提示紫杉醇能抑制PC3细胞增殖,将其阻滞在细胞周期的G2/M期,并能诱导其凋亡。(2)紫杉醇+ET-1组PC3细胞的G0-G1(%)高于紫杉醇组,G2-M(%)低于紫杉醇组,凋亡细胞百分比低于紫杉醇组,且差异均有显著性, $P < 0.05$ 。提示ET-1部分逆转了紫杉醇对PC3细胞的G2/M期阻滞作用,并能保护PC3细胞对抗紫杉醇诱导的细胞凋亡。

表1 各组 PC3 细胞的细胞周期分布和凋亡情况

Tab 1 Distribution of cell cycles and percentage of apoptotic cells

(% , $x \pm s$)

Group	G0-G1	S	G2-M	Apoptosis
Control	74.14 ± 3.63	12.81 ± 2.73	13.03 ± 1.35	10.21 ± 0.89
Paclitaxel	18.50 ± 0.79	33.85 ± 1.78	47.64 ± 2.48	40.16 ± 2.11
Paclitaxel + ET-1	42.75 ± 1.87	24.93 ± 4.01	32.31 ± 5.63	21.01 ± 2.20

Western blot 检测 Bcl-2、Bax 表达的结果 图 1 显示: ① 对照组未出现 Bcl-2 磷酸化条带, 两个紫杉醇用药组均在 Bcl-2 条带后出现了移动较慢的 Bcl-2 磷酸化条带(标有箭头的较浅条带), 紫杉醇组 Bcl-2 磷酸化的比例明显高于紫杉醇 + ET-1 组。② 实验各组的 Bax 表达无明显差异, 但是 Bax/Bcl-2 异二聚体, 对照组最高, 紫杉醇组最低, 紫杉醇 + ET-1 组高于紫杉醇组。Tanon-GIS2010 图像分析系统测定 Bcl-2 及 Bax 的相对表达量(灰度值与 β -actin 灰度值的比值)见图 1, 表 2。对各组的 Bcl-2 和 Bax 相对灰度值进行均值两两比较和方差分析检验, 结果显示: ① 虽然各组之间的 Bcl-2 表达水平无显著性差异, $P > 0.05$ 。但是, 两个紫杉醇用药组的 Bcl-2 磷酸化水平均显著高于对照组, 而紫杉醇 + ET-1 组的 Bcl-2 磷酸化水平紫杉醇组较紫杉醇组显著降低, 差异均有显著性, $P < 0.05$ 。② 虽然各组之间的 Bax 表达水平无显著性差异, $P > 0.05$ 。

但是, 两个紫杉醇用药组的 Bax/Bcl-2 异二聚体水平均显著低于对照组, 而紫杉醇 + ET-1 组的 Bax/Bcl-2 异二聚体水平又显著高于紫杉醇组, 且差异均有显著性, $P < 0.05$ 。以上提示 ET-1 不是直接调控 Bcl-2 或 Bax 的表达, 而是通过减少 Bcl-2 磷酸化, 促进 Bax/Bcl-2 异二聚体合成。

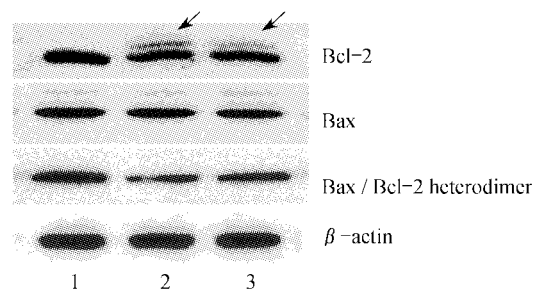


图 1 各组的 Bcl-2 和 Bax 的 Western blot 结果

Fig 1 Western blot of Bcl-2 and Bax

1: Control group; 2: Paclitaxel group; 3: Paclitaxel + ET-1 group;
 ✓: Phosphorylation of Bcl-2

表 2 各组的 Bcl-2 和 Bax 的相对蛋白表达量

Tab 2 Protein expression of Bcl-2 and Bax

($x \pm s$)

Group	phosphorylated Bcl-2	Bcl-2	Bax/Bcl-2 heterodimer	Bax
Control	0	0.946 ± 0.046	0.684 ± 0.057	0.974 ± 0.025
Paclitaxel	0.319 ± 0.061	1.019 ± 0.096	0.377 ± 0.036	0.937 ± 0.039
Paclitaxel + ET-1	0.151 ± 0.035	0.939 ± 0.042	0.487 ± 0.015	0.929 ± 0.041

讨 论

日前, 临床上激素非依赖性前列腺癌(HRPC)对于抗雄激素药物和各种化疗药物均不敏感的原因尚不明确。研究发现, 虽然许多细胞毒性药物在体外实验中能抑制肿瘤细胞生长, 诱导其凋亡, 但临床应用却效果欠佳。肿瘤微环境理论认为, 肿瘤细胞对化疗药物敏感性的体内外差异与体内肿瘤局部环境中一些高表达的细胞因子密切相关。Nelson等^[2]发现, 前列腺癌细胞的 ET-1 和 ET_A 受体表达水平高于正常前列腺上皮细胞, 有转移的激素非依赖性前列腺癌的 ET-1 表达水平显著高于局限性的激素依赖性的前列腺癌。日前认为, 内皮素、内皮素受体及其有关信号通路构成的内皮素轴在多种肿瘤的生长、进展过程中发挥了重要作用^[7]。ET-1 不但自身是一种有丝分裂原, 而且能作为有丝分裂原辅

助因子增强多种生长因子(如 IGF-1、IGF-2、EGF、bFGF)的促有丝分裂作用, 同时还能抑制 HRPC 细胞凋亡, 提高其侵袭、迁移能力^[3-5]。临床上大多数化疗药物是通过影响肿瘤细胞的增殖、凋亡发挥作用的, 而紫杉醇是日前治疗 HRPC 的常用药物。Del Bufalo D 等^[6]报道, ET-1 能通过 ET_A 受体抑制 Paclitaxel 诱导卵巢癌细胞凋亡, 而 ET_A 受体拮抗剂 BQ123 能增强 Paclitaxel 的疗效。HRPC 对细胞毒性药物不敏感是否也与 ET-1 的高表达有关, 目前尚不明确。

Haldar 报道紫杉醇在体外能显著抑制 HRPC 细胞生长并诱导其凋亡, 其机制是: ① 在细胞周期的 G2/M 期抑制微管的正常解聚, 阻断肿瘤细胞的有丝分裂, 抑制其增殖; ② 通过引起 Bcl-2 蛋白的丝氨酸残基磷酸化导致其失活, 失去与 Bax 的结合能力, 导致 Bax/Bcl-2 异二聚体减少, Bax/Bax 同二聚体增加, 后者激活凋亡通路, 促使肿瘤细胞凋

亡^[8],本实验的结果与其一致。临床上紫杉醇对 HRPC 有一定的疗效,但仅能在一段时间内缓解患者的临床症状,使血清 PSA 值下降,不久会失去敏感性,患者生存期无明显提高^[9]。因此,有必要探究 ET-1 对紫杉醇诱导激素非依赖性前列腺癌细胞 PC3 凋亡的作用及其机制。本实验流式细胞仪检测结果提示 ET-1 部分逆转了紫杉醇对 PC3 细胞的 G2/M 期阻滞作用,并能保护 PC3 细胞对抗紫杉醇诱导的细胞凋亡。Western blot 检测结果提示 ET-1 没有引起 PC3 细胞 Bax 和 Bcl-2 总蛋白水平的变化,但 Bcl-2 磷酸化减少,Bax/Bcl-2 异二聚体增加,这说明 ET-1 不是直接调控 Bcl-2 或 Bax 的表达,而是通过减少 Bcl-2 磷酸化,促进 Bax/Bcl-2 异二聚体合成,减少了 Bax/Bax 同二聚体,从而影响肿瘤细胞的凋亡通路。

综上所述,本实验证实 ET-1 能逆转紫杉醇对 PC3 细胞的 G2/M 期阻滞,并能通过影响 Bcl-2 磷酸化作用于细胞凋亡通路,减少细胞凋亡,从而降低激素非依赖性前列腺癌 PC3 细胞对紫杉醇的敏感性。因此,ET-1 不仅是调控 HRPC 细胞生物学行为的一个关键因子,而且是临床上 HRPC 对紫杉醇不敏感的重要影响因子。

参 考 文 献

[1] Prapotnich D, Fizazi K, Escudier B, *et al.* A 10-year clinical

experience with intermittent hormonal therapy for prostate cancer[J]. *Eur Urol*, 2003, 43(3): 233 - 240.

- [2] Nelson JB, Hedican SP, George DJ, *et al.* Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate[J]. *Nat Med*, 1995, 1(9): 944 - 949.
- [3] Zonnenberg BA, Voest EE. The role of endothelin in hormone-refractory prostate cancer[J]. *Eur Urol*, 2003, 2(3): 9 - 14.
- [4] 武睿毅,王杭,王国民. 内皮素-1对前列腺癌 PC3 细胞系的侵袭、迁移能力影响[J]. *复旦学报:医学版*, 2005, 32(5): 590 - 593.
- [5] Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, *et al.* Endothelin-1 production and decreased endothelin-B receptor expression in advanced prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(4): 663 - 668.
- [6] Del Bufalo D, Di Castro V, Biroccio A, *et al.* Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis; requirement for akt activation[J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 61(3): 524 - 532.
- [7] Nelson J, Bagnato A, Battistini B, *et al.* The endothelin axis: emerging role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(2): 110 - 116.
- [8] Haldar S, Chintapalli J, Croce CM. Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(6): 1 253 - 1 255.
- [9] Pienta KJ, Smith DC. Advances in prostate cancer chemotherapy: a new era begins[J]. *CA Cancer J Clin*, 2005, 55(5): 300 - 318.

(收稿日期:2007-08-15;编辑:王蔚)