

· 论著 ·

核小体结合蛋白调控 CXCR4 抑制前列腺癌 PC-3 细胞的侵袭作用

纪世琪 周利群 李学松 瓦斯里江·瓦哈甫 张晓宇 张崔健 郝翰 姚林

【摘要】 目的 探讨抑制人核小体结合蛋白1(NSBP1)基因后抑制非激素依赖性前列腺癌细胞系PC-3侵袭能力的作用机制。方法 通过慢病毒 lentivirus-NSBP1 转染非激素依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 后,MTT 法观察细胞活性变化,Transwell 实验观察细胞侵袭能力的变化,应用 Western-blot 技术检测 NSBP1、CXCR4 蛋白的变化情况。结果 抑制 NSBP1 表达水平后非激素依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 细胞活性降低,侵袭能力降低,同时伴有 CXCR4 蛋白的表达降低。结论 通过慢病毒转染抑制 NSBP1 的表达可以抑制非激素依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 的侵袭能力,NSBP1 可能是通过调控 CXCR4 蛋白的变化影响细胞侵袭能力的。

【关键词】 前列腺肿瘤; HMGNI 蛋白质; 受体,CXCR4; 肿瘤浸润

Effect of nucleosome-binding protein 1 on prostate cancer cell of PC-3 in invasion by modulating CXCR4

Ji Shi-qi, ZHOU Li-qun, Li Xue-song, WASILJIANG Wahafu, ZHANG Xiao-yu, ZHANG Cui-jian, HAO Han, YAO Lin. Department of Urology, Peking University First Hospital, Institute of Urology, Peking University, National Urological Cancer Center, Beijing 100034, China

Corresponding author: ZHOU Li-qun, Email: zhoulq@mail@china.com

【Abstract】 Objective To study the effect and mechanism of nucleosome-binding protein 1 (NSBP1) modulating invasion on human androgen-independent prostate cancer cell PC-3. **Methods** This study employed lentivirus mediated knockdown of NSBP1 to elucidate the oncogenic role of NSBP1 in prostate cancer PC-3 cell, MTT assay and transwell assay were used to observed cell proliferation and invasion, Western-blot was used to test the expression of NSBP1 and CXCR4. **Results** The transfected lentivirus-NSBP1 PC-3 cells induced decrease of cell proliferation and invasion, and at the same time the expression of CXCR4 protein also decreased. **Conclusions** Knocking down of NSBP1 induce decrease of cell proliferation and invasion, which may have role in SDF-1/CXCR4 ways.

【Key words】 Prostatic neoplasms; HMGNI protein; Receptors, CXCR4; Neoplasm invasiveness

前列腺癌是老年男性最常见的肿瘤之一,在美国其发病率居男性肿瘤首位^[1],近几年我国及其他亚洲国家前列腺癌的发病率也有增高趋势。前列腺癌发生的确切病因与发病机制仍不清楚,目前国外有关前列腺癌分子病因学方面的研究已成为泌尿外科基础研究的一个热点,前列腺癌转移更成为治疗上的难题。本课题组前期应用改进的 mRNA 差异显示技术,从前列腺癌组织和正常前列腺组织中获得两者的差异片段,通过网上核苷酸比对发现其中一个片段与已知核小体结合蛋白1(NSBP1)基因高度同源(97%)^[2-3]。本研

究通过慢病毒转染抑制 NSBP1 在非激素依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 的表达情况,采用四甲基偶氮唑盐 MTT 法观察细胞活性变化,Transwell 实验观察细胞侵袭能力的变化,同时应用 Western-blot 技术检测 NSBP1、CXCR4 蛋白的变化情况,寻找 NSBP1 影响前列腺癌侵袭转移能力的可能途径。

材料与方法

1. 材料:前列腺癌细胞系 PC-3 由北京大学泌尿外科研究所提供。细胞系从液氮中取出复苏后,置于 5% CO₂ 37 °C 环境下在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养。将细胞分为 PC-3 组、PC-3 对照组和 PC-3 转染组进行实验。

2. 主要试剂:兔抗人 NSBP1 多克隆抗体由北京大学泌尿外科研究所提供,兔抗人 CXCR4 单克隆抗体购自 Abcam 公司,兔抗人 GAPDH 抗体购自北京中杉金桥

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.04.006

基金项目:国家自然科学基金(30271295,30672099);北京市自然科学基金(7092101)

作者单位:100034 北京大学第一医院泌尿外科 北京大学泌尿外科研究所 中国泌尿男科生殖系肿瘤研究中心

通讯作者:周利群,Email:zhoulq@mail@china.com

生物技术有限公司,碱性磷酸酶(AP)标记的山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司。NSBP1的siRNA重组慢病毒(NSBP1-RNAi-lentivirus)和阴性对照慢病毒由上海吉凯基因公司提供,NSBP1的shRNA靶序列:5'-CACAGCCTTTCTTTAGCAT-3'。

3. 细胞转染:将培养的非激素依赖性前列腺癌PC-3细胞5~8万个细胞去血清培养6h使其同步化,将慢病毒液体以1 μ l:10 000细胞数的比例加入培养皿中8h,更换含血清培养基培养72h,荧光显微镜下观察转染效率。

4. MTT及流式细胞学:72h转染成功的PC-3进行细胞活力和凋亡检测,MTT检测按照MTT细胞活力检测试剂盒(南京凯基公司)中说明进行操作。

5. Transwell实验:用50 mg/L Matrigel 1:5稀释液包被Transwell小室底部膜的上室面,室温风干。每孔加入100 μ l无血清DMEM培养液,37 $^{\circ}$ C,30 min。在上室的聚碳酸酯膜上加入稀释后的Matrigel(3.9 μ g/ μ l)30~40 μ l置37 $^{\circ}$ C 30 min使Matrigel聚合成凝胶。制备细胞悬液前可先让细胞撤血清饥饿12~24h,消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,用PBS洗1~2遍,用无血清培养基重悬,调整细胞密度至5 \times 10⁵/ml,取细胞悬液100 μ l加入Transwell小室,24孔板下室加入500 μ l含10%FBS的培养基,常规培养48h,用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,4%多聚甲醛固定30 min,0.1%结晶紫染色。使用Leica DC 300F正置显微镜进行观察、计数和拍照。

6. Western-blot方法检测蛋白变化:提取PC-3细胞、对照组细胞和转染细胞40 mg蛋白加含 β -巯基乙醇的上样缓冲液,并于沸水中煮5 min,用10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离。电泳后电转至硝酸纤维素膜,用5%脱脂奶粉封闭,加兔抗人NSBP1多克隆抗体、兔抗人CXCR4单克隆抗体(1:1000),4 $^{\circ}$ C摇床过夜,1 \times PBS洗膜3次,加二抗AP标记的山羊抗兔IgG孵育杂交,室温30 min,加显色液显色发光,扫描并分析条带的吸光度值,结果以GAPDH的光密度值作为参照。

7. 统计学分析:应用SPSS 11.0统计学软件,采用*t*检验对实验组和对照组的结果进行统计分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 慢病毒转染PC-3细胞:慢病毒lentivirus-NSBP1成功转染非激素依赖性前列腺癌细胞系PC-3,荧光显微镜下观察可见转染细胞发出绿色荧光(图1,2)。

2. 细胞活性:转染抑制NSBP1基因后细胞的生长

增殖活性受到抑制,细胞凋亡有所增加。转染细胞72h抑制效率[(69 \pm 4)%]最大,比PC-3组(100%)和对照组细胞(100%)增殖活力降低30%($P < 0.05$)。

3. Transwell侵袭实验:实验结果显示,慢病毒转染抑制NSBP1的细胞侵袭能力下降,如图3所示,常规培养48h后穿过基质胶的细胞数分别为正常组110.4 \pm 3.2,对照组106.7 \pm 2.4,转染组50.9 \pm 2.1,NSBP1沉默后前列腺癌PC-3细胞侵袭能力显著低于对照组(图4)($P < 0.01$)。

4. Western-blot检测:慢病毒转染细胞抑制了NSBP1蛋白的表达,抑制效率为87.4%($P < 0.05$)。在NSBP1蛋白被抑制后CXCR4蛋白也出现下降,蛋白水平下降了68.6%($P < 0.05$)(图5)。

讨 论

前列腺癌是西方国家男性中常见恶性肿瘤,在美国其发病率居男性肿瘤首位,死亡率仅次于肺癌列第二位。近年来,随着人们寿命的延长、生活水平的提高、饮食结构的改变,以及环境污染的加重,前列腺癌在我国的发病率也有逐年增高的趋势。因此目前关于前列腺癌的发病原因、生物学特性、临床诊治策略的研究正受到广泛关注^[1]。前列腺癌晚期发生转移,特别是骨转移,影响临床的治疗和预后,但具体原因不详,正在科研探索中。

本课题组以改进mRNA差异显示技术,从前列腺癌患者和正常成人前列腺组织获得两者的差异片段中发现NSBP1/HMG5表达差异,在前列腺癌组织中表达高于正常组织。NSBP1/HMG5是高速泳动蛋白家族的新成员之一^[4-7]。经典的HMG蛋白在真核生物中广泛存在,其分子量较小,含量相对丰富,结构简单,通常只由数个HMG蛋白特有的结构域构成,它们广泛存在于真核细胞核中,行使与DNA相关的一系列生物学功能^[8]。HMG蛋白家族广泛参与多种重要的核内生物学功能的完成,包括调节DNA复制、转录、重组和修复等,其中最为重要的是对基因表达转录的调控。HMG在核内快速、跳跃式的运动,不断穿梭于染色质和各种蛋白质因子之间,寻找合适的结合位点,一旦达到特异性的位点,就发生结合,从而进一步对染色质结构进行修饰,并使调节蛋白(激活或抑制)发生聚集^[9]。NSBP1/HMG5在前列腺癌组织中高表达^[10-12],其在前列腺癌的发生、发展过程的作用机制还未明了。

肿瘤的复发和转移一直是决定患者手术和预后的两个难题。前列腺癌细胞侵袭和转移由趋化因子及其受体严密调控,而在这个过程中CXC趋化因子(SDF-1)及其受体CXCR4可能起着决定性的作用。近年来,

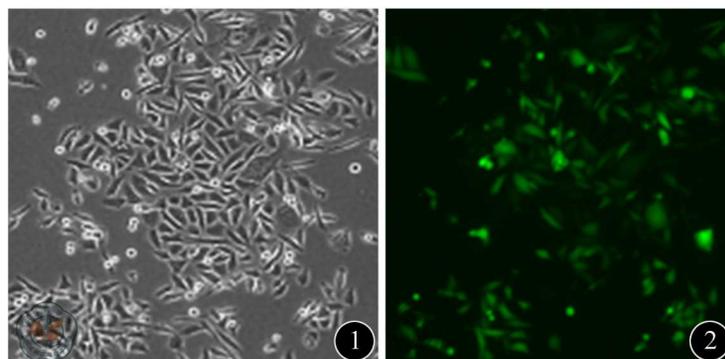


图1 光镜下PC-3细胞(×200) 图2 荧光显微镜下转染PC-3细胞(×200)

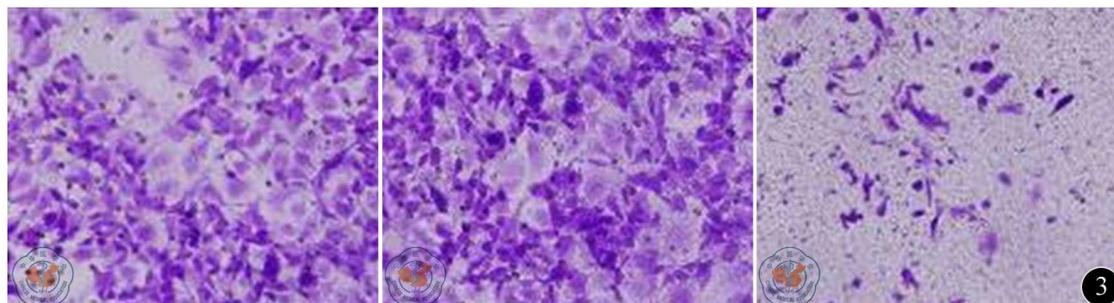


图3 Transwell: 结晶紫染色后光镜下PC-3组、对照组、转染组PC-3细胞比较, 转染组抑制NSBP1表达后细胞侵袭能力降低, 细胞数明显减少(×200)

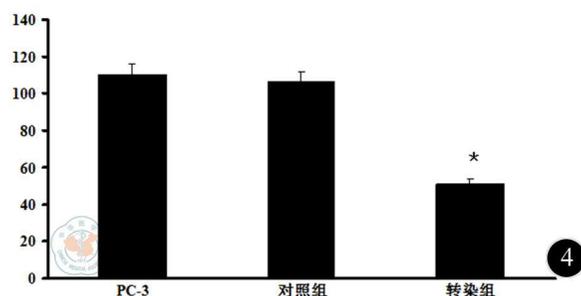


图4 Transwell实验PC-3组、对照组、转染组PC-3细胞数比较, 转染组抑制NSBP1表达后细胞数明显减少, 侵袭能力降低

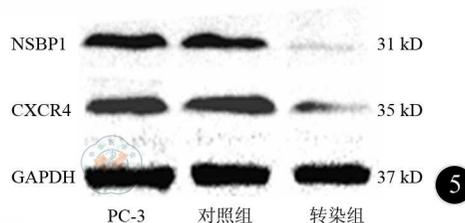


图5 Western-blot显示NSBP1、CXCR4、GAPDH蛋白表达情况, 转染组抑制NSBP1表达后, CXCR4也随之减少

SDF-1/CXCR4 反应轴在泌尿系肿瘤细胞生长和转移中的作用越来越受到人们的关注, 并认为其可能成为肿瘤治疗的一个新靶点^[13-14]。Ponomaryov 等^[15]研究发现 SDF-1 由骨髓成骨细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞分泌, 而且仅在骨髓分泌具有活性的 SDF-1。研究表明, CXCR4 的配体 SDF-1 在某器官的高浓度表达代表癌细胞首先转移的目的地。CXC 趋化因子受体(CXCR4)是一类表达于不同细胞上含有 7 个跨膜区的 G 蛋白偶联受体, CXCR4 是目前已知 SDF-1 唯一的受体。Taichman 等^[16]报道人类前列腺癌细胞有大量 CXCR4 表达, 并证明 CXCR4 与其配体 SDF-1 共同作用导致晚期前列腺癌的特异性器官转移, 为归巢学说的化学诱导理论提供了依据^[17]。

本研究通过慢病毒 lentivirus-NSBP1 转染非激素依赖性前列腺癌细胞系 PC-3, 抑制了 NSBP1 的表达发现

细胞的生长增殖受到了抑制, Transwell 实验发现细胞的侵袭能力降低。结合 Western-blot 结果发现在 NSBP1 蛋白表达降低后 CXCR4 蛋白水平也有降低, 提示我们 NSBP1 可能是通过调控 CXCR4 进而影响了前列腺癌 PC-3 细胞的侵袭能力。

前列腺癌发生的确切病因与发病机制仍不清楚, 且其生物学行为极其复杂, 故推断其病因可能是在遗传背景易感性的内在基础上, 生物、化学和物理等外在环境因素的持续影响, 促进了前列腺癌的发生和发展, 前列腺癌晚期发生骨转移的器官特异性的机制也成为研究的热点。通过本研究我们希望探讨 NSBP1/HMG5 影响前列腺癌细胞侵袭能力的作用机制, 研究 NSBP1/HMG5 在前列腺癌发生发展中的作用, 为前列腺癌的诊断和治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59: 225-249.
- [2] 周利群, 杨学贞, 黄啸, 等. 应用基因微矩阵芯片筛选前列腺癌的相关基因. *中华泌尿外科杂志*, 2002, 23: 72-75.
- [3] 杨学贞, 周利群, 周键, 等. mRNA 差异显示法克隆前列腺癌相关基因. *中华泌尿外科杂志*, 2003, 24: 545-547.
- [4] King LM, Francomano CA. Characterization of a human gene encoding nucleosomal binding protein NSBP1. *Genomics*, 2001, 71: 163-173.
- [5] Rochman M, Postnikov Y, Correll S, et al. The interaction of NSBP1/HMG5 with nucleosomes in euchromatin counteracts linker histone-mediated chromatin compaction and modulates transcription. *Mol Cell*, 2009, 35: 642-656.
- [6] Tang WY, Newbold R, Mardilovich K, et al. Persistent hypomethylation in the promoter of nucleosomal binding protein1 (Nsbp1) correlates with overexpression of Nsbp1 in mouse uterine neonatally exposed to diethylstilbestrol or genistein. *Endocrinology*, 2008, 149: 5922-5931.
- [7] Shirakawa H, Rochman M, Furusawa T, et al. The nucleosomal binding protein NSBP1 is highly expressed in the placenta and modulates the expression of differentiation markers in placental Rcho-1 cells. *J Cell Biochem*, 2009, 106: 651-658.
- [8] Fusco A, Fedele M. Roles of HMG proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 899-910.
- [9] Hock R, Furusawa T, Ueda T, et al. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol*, 2007, 17: 72-79.
- [10] Jiang N, Zhou LQ, Zhang XY. Downregulation of the nucleosome-binding protein 1 (NSBP1) gene can inhibit the in vitro and in vivo proliferation of prostate cancer cells. *Asian J Androl*, 2010, 12: 709-717.
- [11] 蒋宁, 周利群, 姚鲲, 等. 人核小体结合蛋白 1 小分子干扰 RNA 重组慢病毒抑制非激素依赖性前列腺癌体内生长的实验研究 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010, 4: 154-157.
- [12] 黄晨, 周利群, 宋刚. 核小体结合蛋白 1 在雄激素非依赖性前列腺癌中的作用. *中华医学杂志*, 2008, 88: 657-660.
- [13] Wang JM, Deng X, Gong W, et al. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods*, 1998, 220: 1-17.
- [14] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000, 12: 121-127.
- [15] Ponomaryov T, Peled A, Petit I, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest*, 2000, 106: 1331-1339.
- [16] Taichman RS, Cooper C, Keller ET, et al. Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Research*, 2002, 62: 1832-1837.
- [17] Sun YX, Wang J, Shelburne CE, et al. Expression of CXCR4 and CXCL12 (SDF-1) in human prostate cancers (PCa) in vivo. *J Cell Biochem*, 2003, 89: 462-473.

(收稿日期: 2011-10-17)

(本文编辑: 郝锐)

纪世琪, 周利群, 李学松, 等. 核小体结合蛋白调控 CXCR4 抑制前列腺癌 PC-3 细胞的侵袭作用 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(4): 829-832.

中 华 临 床 医 生 协 会