

丁酸钠对前列腺癌 LNCaP 细胞 HER-2 信号通路的影响

郝通利,肖序仁,郭刚,朱捷

Targeting HER2 Signal Pathway in LNCaP Prostate Cancer Cells by Sodium Butyrate

HAO Tong-li, XIAO Xu-ren, GUO Gang, ZHU Jie

Department of Urology, PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Abstract :Objective To investigate the mechanisms underlying the antitumor effect of histone deacetylase inhibitor sodium butyrate on LNCaP prostate cancer cells. **Methods** Proliferation of LNCaP cells exposed to sodium butyrate was detected by MTT assay. Cell apoptosis was assayed by hoechst 33342 nuclei staining as well as apoptosis marker protein leaved PARP expression. The expression of HER-2 as well as downstream key signaling molecules was assayed by western blotting after sodium butyrate exposure. **Results** Sodium butyrate killed LNCaP cells with an EC_{50} value of 5.6mmol/L within 48 hours as well as inducing cell apoptosis. Sodium butyrate could downregulate HER-2 expression through suppression of HER-2 gene transcription. Activation of downstream signaling molecules such as Akt and Erk were also suppressed. **Conclusion** Sodium butyrate exhibits significant antitumor effect against LNCaP cells through suppression of HER-2 signaling pathway.

Key words :Sodium butyrate ; Histone deacetylase inhibitor ; Prostate cancer ; HER-2 ; Cell signaling pathway ; Apoptosis

摘要:目的 研究组蛋白去乙酰化酶抑制剂丁酸钠对前列腺癌 LNCaP 细胞 HER-2 信号通路的影响,探讨其抗肿瘤作用的分子机制。方法 四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测药物对肿瘤细胞增殖的影响;hoechst 33342 染色观察细胞凋亡的形态学变化,Western blot 检测凋亡标志蛋白、HER2/ neu、Phos-Akt、Phos-Erk 等信号蛋白的表达。结果 丁酸钠能够有效抑制 LNCaP 细胞的增殖并诱导细胞凋亡,半效杀伤剂量(EC_{50})为 5.6mmol/L;药物能够抑制 HER-2 基因的转录和蛋白的表达,并抑制下游信号通路中 MAPK 和 AKT 的活化。结论 丁酸钠能够阻断对前列腺癌细胞生长具有重要作用的 HER-2 信号通路,从而对肿瘤细胞发挥抑制作用。

关键词:丁酸钠;组蛋白去乙酰化酶抑制剂;前列腺癌;HER-2;细胞信号通路;凋亡
中图分类号:R737.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8578(2008)07-0476-03

0 引言

丁酸钠是膳食纤维在肠道中酵解后产生的主要短链脂肪酸,具有组蛋白去乙酰化酶抑制剂活性,主要通过改变组蛋白的乙酰化程度来改变染色质结构,参与多种基因的表达。动物实验及临床实验显示,丁酸钠可以抑制多种肿瘤细胞生长,诱导细胞成熟分化,诱导癌细胞发生凋亡,达到治疗肿瘤的目的^[1]。

新近研究观察到丁酸钠对前列腺癌细胞系具有抑制效应,但是其作用机制尚不明确,这种抑制作用并非是因为对雄激素受体的清除^[2],本实验研究丁

酸钠对 HER-2 信号通路的影响,探讨其对前列腺癌 LNCaP 细胞的抑制作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

RPMI1640、胎牛血清购于 Invitrogen 公司;胰蛋白酶、青链霉素、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠购于 Hyclone 公司;丁酸钠购于 Sigma 公司,溶于 PBS, -20 保存;MTT(四甲基偶氮唑蓝)、hoechst 33342 购于 Sigma 公司;小鼠抗 β -actin、抗多聚(ADP-核糖)聚合酶降解产物(cleaved PARP)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG 均为 Cell Signaling 公司产品;BCA 蛋白定量试剂盒、化学发光底物购于 PIERCE 公司。RT-PCR 试剂盒购于 Takara 公司。引物序列如下:HER-2: 5'-AGC CGC GAG CAC CCA AGT-3', 5'-TTG GTG GGC AGG TAG GTG AGT T-3'^[3];Oligo 6.0 软件设

收稿日期:2007-07-30;修回日期:2008-03-31

作者单位:100853 北京,解放军总医院泌尿外科

作者简介:郝通利(1957-),男,本科,副主任医师,主要从事老年前列腺癌的诊断治疗工作

计 2 微球蛋白 (2-mG) 引物序列:5-CTC GCG CTA CTC TCT CTC TTT CTG G3 ,5-GCT TAC ATG TCT CGA TCC CAC TTA A-3。引物由上海博亚生物技术公司合成。DL600 为大连宝生物公司产品。

1.2 细胞系及细胞培养

LNCaP 细胞为本实验室保存,培养基为含 10% 胎牛血清、2 mM L-谷氨酰胺、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、1.0 mM 丙酮酸钠的 RPMI-1640,在 37 饱和湿度,5% CO₂ 条件下培养。

1.3 细胞增殖检测

采用 MTT 测定法。10⁴ 个细胞接种于 96 孔板,每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl,继续孵育 5 h 后加裂解液,37 过夜,震荡后以 Immunoskan340 酶联仪 540 nm 波长检测吸光度。每组设 3 个复孔。细胞存活率 (%) = 实验组的吸光度/对照组吸光度 ×100%。

1.4 凋亡的检测

细胞涂片以甲醇固定,PBS 洗涤后,以 hoechst 33342 染色,荧光显微镜(Nikon ECLIPSE TE2000-U)紫外激发光下观察细胞核形态。

1.5 Western blot 检测

对数生长期的细胞以药物处理 48 h(对照组加入 PBS),收集细胞后以 Laemmli 裂解液冰浴条件下裂解细胞,获取全细胞裂解液,热变性后以 BCA 试剂盒进行蛋白定量,取 60 μg 蛋白上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,然后电转至 PVDF 膜上,以 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加一抗过夜,漂洗后加脱脂牛奶稀释的辣根过氧化物酶标记二抗,室温反应 1 h,化学发光底物显色,胶片曝光。

1.6 RT-PCR

按 Trizol 试剂盒操作说明进行,提取细胞总 RNA 进行逆转录反应,随后对 Her-2/neu 进行 35 个循环的 PCR 扩增,反应产物以含 0.1 μg/μl 溴化乙啶的 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,JS-380 自动凝胶图像分析仪扫描。

1.7 统计学方法

概率单位法计算半效杀伤剂量 (EC₅₀)。

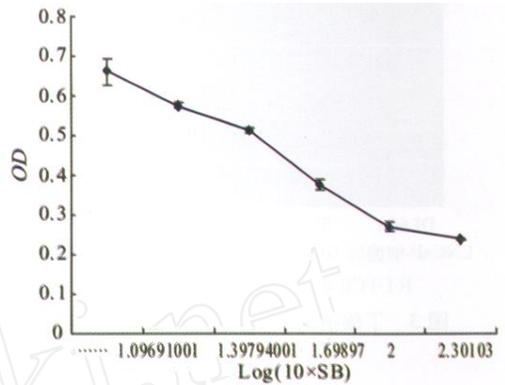
2 结果

2.1 丁酸钠对细胞的杀伤效应

96 孔板中 LNCaP 细胞生长至对数生长期,加入按倍比浓度稀释的丁酸钠,48 h 后 MTT 检测细胞存活情况,概率单位法计算 EC₅₀ 为 5.6 mmol/L,见图 1。

2.2 丁酸钠诱导 LNCaP 细胞凋亡

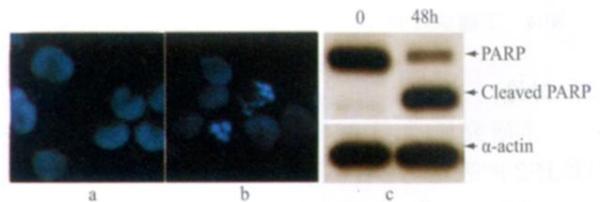
药物作用 48 h 后收集细胞,hoechst 33342 染色,如图 2 所示,丁酸钠处理组发现部分细胞胞核碎裂、染色质浓集,符合凋亡的细胞形态学改变。



LNCaP 细胞以按倍比浓度稀释的丁酸钠 (0、1.25、2.5、5、10、20 mmol/L) 处理 48 h,MTT 法检测细胞存活情况

图 1 丁酸钠对前列腺癌 LNCaP 细胞的杀伤效应

LNCaP 细胞暴露于丁酸钠 48 h 后检测细胞凋亡的标志蛋白——PARP 降解产物 (Cleaved PARP),如图 2c 所示,对照组 PARP 为 116 kd,而药物处理 48 h 后出现了 89 kd 的降解产物,因此符合凋亡的生化改变。



a:对照;b:丁酸钠(10 mmol/L)处理 48 h 后 (hoechst 33342 染色 ×40);c:Western blot 检测 cleaved PARP

图 2 丁酸钠诱导 LNCaP 细胞凋亡

2.3 丁酸钠对 HER-2 的影响

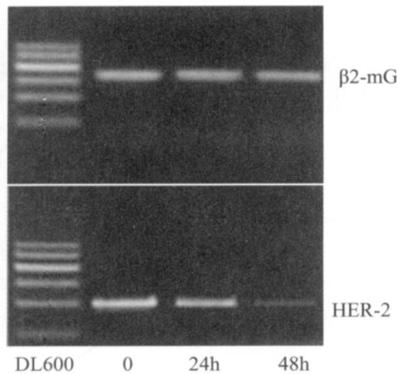
Western blot 分析显示,药物处理后 HER-2 的蛋白表达呈剂量依赖性下降,20 mmol/L 丁酸钠作用 48 h 能够完全抑制 HER-2 的表达。

2.4 丁酸钠对 HER-2 基因转录的影响

RT-PCR 显示,10 mmol/L 丁酸钠作用 24 h 始 HER-2 mRNA 水平即明显下降,说明药物能够抑制 HER-2 基因的转录,见图 3。

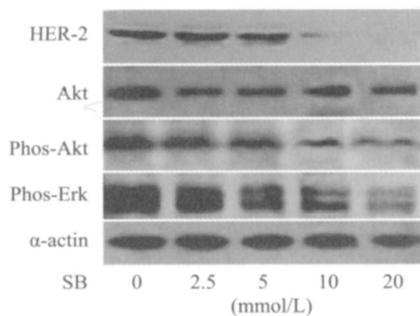
2.5 丁酸钠抑制 MAPK 和 AKT 活化

丁酸钠处理后,Phos-Erk、Phos-Akt 的表达呈剂量依赖性下降,总 Akt 无明显改变,说明药物抑制 HER-2 的表达后,其下游 MAPK 和 PI3K 信号通路的关键蛋白活化 (Phos-Erk、Phos-Akt) 也受到相应抑制,见图 4。



LNCaP 细胞以 10 mmol/L 丁酸钠处理 0~48 h 后,
RT-PCR 检测 HER-2 mRNA 的表达

图 3 丁酸钠对 HER-2 基因转录的影响



LNCaP 细胞以不同浓度丁酸钠处理 48 h 后,
Western blot 检测 HER-2 等信号蛋白的表达

图 4 丁酸钠对 HER-2 信号通路关键蛋白表达的影响

3 讨论

本研究显示,丁酸钠能够抑制 LNCaP 细胞中 HER-2 的表达,并阻断其下游的 MAPK 和 PI3K/Akt 通路的活化,从而对细胞产生杀伤效应。

her-2/neu 基因(又名 c-erbB2)编码的跨膜受体酪氨酸蛋白激酶,是表皮生长因子受体家族的成员,在多种肿瘤中均有高表达。正常前列腺上皮细胞低表达 HER-2,但在前列腺癌,尤其是在雄激素非依赖性前列腺癌中表达增高^[4]。HER-2/neu 作为受体型蛋白酪氨酸激酶,能够在没有细胞外配体的情况下发生自身激活,通过 MAPK、PI3K/Akt 通路,促进细胞增殖,获得对凋亡的抵抗能力^[5,6]。此外,HER-2 激酶信号级联的活化尚能激活雄激素受体,使前列腺癌细胞对雄激素受体的抑制具有抵抗性,在前列腺癌的雄激素非依赖性进展中发挥着重要作用^[7]。

既往研究观察到丁酸钠对前列腺癌细胞具有抑制效应,但药物作用后雄激素受体的表达并无改变,说明该效应并非通过雄激素受体信号通路介导

的^[2]。但对于 HER-2 信号通路在其中的作用尚无研究报道。本研究首次发现,丁酸钠可有效抑制细胞内 HER-2 的表达,进而抑制其下游信号通路关键蛋白的活化,阻断 MAPK 及 PI3K/Akt 信号通路,从而诱导前列腺癌细胞凋亡。丁酸钠抑制 HER-2 表达的机制之一在于对 HER-2 基因转录的抑制,是否能够促进 HER-2 蛋白的降解尚不明确。由于 HER-2 在前列腺癌的雄激素非依赖性进展中发挥的重要作用,因此丁酸钠在基因转录和蛋白表达水平上对这一关键性信号蛋白表达的抑制,理论上能够为治疗雄激素非依赖性前列腺癌提供新的思路。

丁酸钠的不足之处是相对低效能(作用浓度为 mmol)、血浆清除过快等,使得丁酸钠的临床应用受到一定限制。人们开发了低毒性及更具特异性的衍生物,其中 AN-9 在期临床实验中已显示了明确的抗肿瘤作用前景^[8]。可以预见到,单独使用丁酸钠及其衍生物,或者配合去势治疗,在治疗晚期前列腺癌方面将会有更广泛的研究和应用价值。

参考文献:

- [1] Chen JS, Faller DV, Spanjaard RA. Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003, 3 (3): 219-236.
- [2] Chen L, Meng S, Wang H, et al. Chemical ablation of androgen receptor in prostate cancer cells by the histone deacetylase inhibitor LAQ824 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4 (9): 1311-1319.
- [3] Bièche I, Onody P, Laurendeau I, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications [J]. *Clinical Chemistry*, 1999, 45 (8 Pt 1): 1148-1156.
- [4] Signoretti S, Montironi R, Manola J, et al. Her-2-neu expression and progression toward androgen independence in human prostate cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92 (23): 1918-1925.
- [5] Ellis M. Overcoming endocrine therapy resistance by signal transduction inhibition [J]. *Oncologist*, 2004, 9 (Suppl 3): 20-26.
- [6] Solit DB, Rosen N. Targeting HER-2 in prostate cancer: where to next? [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25 (3): 241-243.
- [7] Mellinghoff IK, Vivanco I, Kwon A, et al. HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6 (5): 517-527.
- [8] Reid T, Valone F, Lipera W, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pivaloyloxymethyl butyrate (Pivanex, AN-9) in advanced non-small cell lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2004, 45 (3): 381-386.

[编辑:周永红;校对:马福元]