

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.01.008

转染 PDCD5 基因促进顺铂诱导前列腺癌细胞的凋亡作用

刘磊玉, 赵彬佳惠, 秦 玮, 陈媛媛, 林 锋, 邹海峰, 于晓光

Transfection of PDCD5 Promotes Effects of Cisplatin on Apoptosis-inducing of Prostate Cancer Cells

Liu Leiyu, Zao Binjiahui, Qin Wei, Chen Yuanyuan, Lin Feng, Zou Haifeng, Yu Xiaoguang

Department of Biochemistry and Molecular, College of Basic Medical Science, Harbin Medical University, Harbin 150081, China

Corresponding Author: Yu Xiaoguang, E-mail: yxg301@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the effects of PDCD5 overexpression on apoptosis of human prostate cancer DU145 cells induced by cisplatin. **Methods** First, the proliferation of the DU145 cells treated with cisplatin was assayed by CCK-8. Secondly, we established stably transfected DU145 cells overexpressing PDCD5. Then, apoptosis was determined by Annexin V-FITC & PI double staining and electron microscopy, and the expression of apoptosis-related proteins was detected by western blot. **Results** Cisplatin inhibited cell proliferation of prostate cancer DU145 cells on a dose- and time-dependent manner. Stably transfected DU145 cells with PDCD5 overexpression were successfully established. As shown in flow cytometric analysis and electron microscopy images the apoptosis of DU145 cells treated with PDCD5 and cisplatin (25 $\mu\text{mol/L}$) was increased markedly compared with the cells treated with PDCD5 and cisplatin (10 $\mu\text{mol/L}$) or the cells treated with cisplatin alone. Western blot analysis suggested that the level of Bcl-2 expressed in the DU145 cells treated with PDCD5 and cisplatin was decreased obviously, while Bax protein level showed no significant difference. **Conclusion** Although PDCD5 overexpression alone does not cause apoptosis in DU145 cells, it can largely enhance the apoptosis-promoting effect of cisplatin on DU145 cells. The mechanism is involved in reducing the expression ratio of Bcl-2/Bax.

Key words: Cisplatin; PDCD5; Prostate cancer; Cell apoptosis

摘 要: 目的 探讨过表达细胞程序性死亡基因 5(PDCD5)对顺铂诱导人前列腺癌 DU145 细胞凋亡以及细胞凋亡相关蛋白表达的影响。**方法** CCK-8 法检测顺铂处理 DU145 细胞后对细胞生长增殖的影响;构建稳定过表达 PDCD5 的 DU145 细胞系;Annexin V-FITC & PI 双染法检测细胞的凋亡率、电子显微镜观察细胞凋亡的形态学变化;Western blot 法检测细胞凋亡相关蛋白的表达。**结果** 顺铂对 DU145 细胞的生长有抑制作用,且呈时间-剂量依赖性;成功构建稳定过表达 PDCD5 的 DU145 细胞;流式细胞术和电子显微镜都显示 PDCD5 联合顺铂 (25 $\mu\text{mol/L}$) 促进细胞的凋亡作用比联合顺铂 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和单独使用顺铂明显,Western blot 结果显示,顺铂联合 PDCD5 能明显降低 Bcl-2 的表达,而 Bax 的表达变化不明显。**结论** 单独 PDCD5 过表达不引起 DU145 细胞的凋亡,但 PDCD5 能显著增强顺铂诱导 DU145 细胞凋亡的作用,其机制之一是通过降低 Bcl-2/Bax 的表达比率实现的。

关键词: 顺铂;细胞程序性死亡基因 5;前列腺癌;细胞凋亡

中图分类号: R737.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)01-0032-04

0 引言

顺铂(cisplatin)是一种治疗前列腺癌等癌症的常规化疗药物,但是由于它的不良反应较多,如肾毒性等^[1],以及癌细胞对顺铂可很快产生耐药性^[2],故

在临床上的应用有局限性。因此,寻找有效的治疗药物和方法具有非常重要的临床意义。细胞程序性死亡基因 5(programmed cell death 5, PDCD5),是从诱导凋亡的 TF-1 细胞中克隆的上调表达的人类基因^[3],其表达广泛,在人类的多数组织中均有发现,进化保守,有促进凋亡和促进 paraptosis 的效应^[3-4]。本研究以前列腺癌 DU145 细胞为研究对象,构建稳定转染 PDCD5 重组质粒的 DU145 细胞系,在体外将顺铂和 PDCD5 联合起来,观察两者联

收稿日期:2011-08-08;修回日期:2011-10-08

作者单位:150081 哈尔滨,哈尔滨医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室

通信作者:于晓光, E-mail: yxg301@yahoo.com.cn

作者简介:刘磊玉(1968-),男,硕士在读,讲师,主要从事肿瘤分子生物学的研究

合作用对前列腺癌 DU145 细胞凋亡的影响,为提高顺铂抗肿瘤效果、减弱其不良反应提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人前列腺癌细胞株 DU145 来源于 ATCC。本课题组构建的 PDCD5 重组质粒经 PCR 和双酶切鉴定并送上海生工生物技术有限公司测序。FBS、RPMI 1640 培养液、胰酶、G418 为 Gibco 公司产品。Cell Counting Kit-8(CCK-8)为日本株式会社同仁化学研究所产品。脂质体 2000 购自 Invitrogen 公司。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。所用抗体都购自美国 Santa Cruz 公司。顺铂购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测顺铂对 DU145 细胞生长的影响 胰蛋白酶消化对数生长期的 DU145 细胞,用 RPMI1640 培养液制备每毫升含 1×10^4 个细胞悬液,接种三块 96 孔板,每孔 100 μ l,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中过夜使细胞贴壁。再向各孔中加入含浓度为 0(对照组)、1、5、10、25、50 μ mol/L 顺铂的 RPMI 1640 培养液,在 37℃ 培养箱中分别孵育 24、48、72 h。最后向各孔中加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液,37℃ 下继续孵育 2 h,酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(OD)值,求出各剂量组的平均 OD 值,并计算细胞存活率 = 实验组 OD 值/对照组 OD 值 $\times$ 100%。

1.2.2 稳转细胞系的构建和有关生物学行为的检测 经浓度梯度试验,选择出筛选所用最佳 G418 浓度为 500 μ g/ml,维持培养时使用筛选浓度的一半。利用基因转染技术将空载体和 PDCD5 重组表达载体瞬时转染 DU145 细胞,用含 G418 的 10% 血清培养液筛选出稳定转染细胞,分别称为 DU/MOCK 细胞和 DU/PDCD5 细胞。用 Western blot 法检测细胞内 PDCD5 蛋白的表达以确定稳定转染是否成功,细胞计数绘制生长曲线。

1.2.3 流式细胞术(FCM)检测顺铂处理后该稳转细胞的凋亡 DU/MOCK 和 DU/PDCD5 细胞分别接种在 60 mm² 的培养皿中(每皿 5.0×10^5 个细胞),过夜使之贴壁,用 10、25 μ mol/L 的顺铂处理细胞 48 h 后,收集细胞(漂浮起来的细胞也要收),1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 195 μ l AnnexinV-FITC 结合液重悬细胞,再加入 5 μ l AnnexinV-FITC 混匀,室温避光孵育 10 min,离心去上清液加入 190 μ l AnnexinV-FITC 结合液重悬细胞,加入 10 μ l 碘化丙啶(PI)染色液,冰浴避光放置,进行流式细胞仪检测。

1.2.4 透射电子显微镜观察细胞的凋亡 DU/PDCD5 细胞接种在 60 mm² 的培养皿中(每皿 5.0×10^4

$\sim 5.0 \times 10^5$ 个细胞),过夜使之贴壁,25 μ mol/L 的顺铂处理细胞 48h 后,收集细胞(漂浮起来的细胞也要收集),1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 重悬细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 1 ml 的 PBS 重悬细胞,转入 EP 管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,缓慢加入 1 ml 戊二醛,4℃ 保存或送检。

1.2.5 蛋白印迹法检测细胞中凋亡蛋白的表达

10、25 μ mol/L 顺铂分别处理 48 h 后,收集细胞,PBS 洗涤,加入变性细胞裂解液,煮沸 10 min,12 000 r/min 低温离心 15 min,吸取上清液,-20℃ 保存备用。蛋白定量试剂盒测总蛋白浓度。用 4 $\times$ buffer 按 1:3 比例与样品蛋白混匀,取 20~60 μ g 样品蛋白上样,进行 SDS-PAGE 电泳和转膜,5% 脱脂奶粉液中室温封闭 2 h,一抗中 4℃ 过夜,二抗中室温孵育 2 h,ECL 处理膜,X 胶片曝光。凝胶成像系统在白光上对 X 光胶片扫描后,进行吸光度分析,从而判断比较不同实验组相关凋亡蛋白表达水平。

1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据比较采用单因素方差分析,应用 SPSS 13.0 统计分析软件处理实验数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂对 DU145 细胞增殖的影响

实验结果显示,顺铂对 DU145 细胞生长增殖具有抑制作用,在 5~50 μ mol/L 内,随着时间的延长和浓度的增大,抑制作用也增强,呈时间-剂量依赖性。在 48 h 实验组,随着顺铂浓度的增大,细胞存活率降低,当顺铂浓度达到 10 μ mol/L 或以上时,细胞存活率明显降低,见图 1。

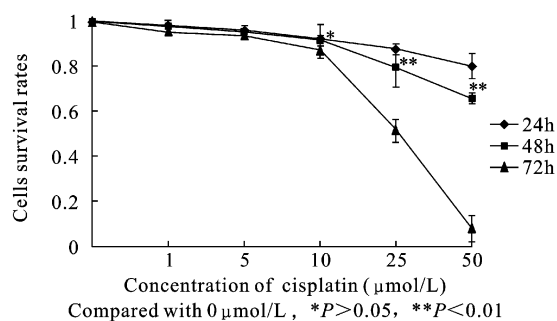
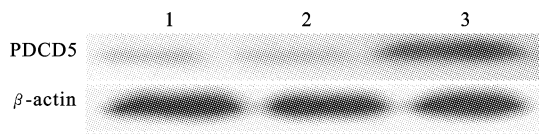


图 1 顺铂对 DU145 细胞生长增殖的影响
Figure 1 Effects of cisplatin on cell growth and proliferation in DU145 cell

2.2 稳定转染 PDCD5 质粒的 DU145 细胞的鉴定

收集 DU145、DU/MOCK 和 DU/PDCD5 细胞,通过 Western blot 检测 PDCD5 的表达,DU/PDCD5 细胞中 PDCD5 表达明显高于其他二者,见

图 2。细胞计数,绘制生长曲线,结果显示稳定转染 PDCD5 后,细胞的生长增殖未受到明显影响,三者之间差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。



1: DU 145 cell; 2: DU/MOCK cell; 3: DU/PDCD5 cell

图 2 稳定转染空载体或 PDCD5 后 DU145 细胞中 PDCD5 蛋白的表达

Figure 2 Identification of stable transfection of PDCD5 in prostate cancer DU145 cell

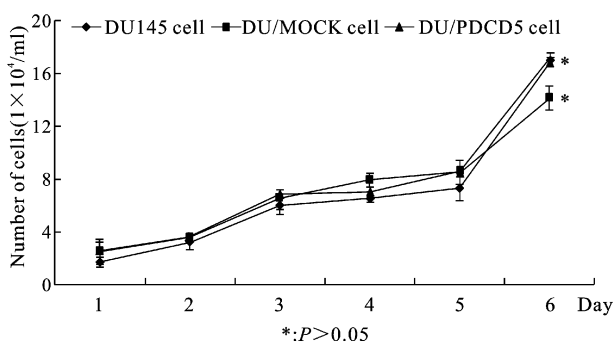


图 3 稳定转染空载体或 PDCD5 质粒对 DU145 细胞生长的影响

Figure 3 Effects of transfection of MOCK and PDCD5 on cell growth in DU145 cell

2.3 FCM 检测细胞凋亡

不同浓度顺铂(10、25 $\mu\text{mol/L}$)作用 48h 后,对照组细胞早期凋亡率为 1.46%,药物组 DU/MOCK 细胞早期凋亡率分别为 2.41%、2.78%,DU/PDCD5 细胞早期凋亡率分别为 3.84%、6.57%,结合细胞晚期凋亡率的比较,提示顺铂浓度较低(10 $\mu\text{mol/L}$),作用较弱时(对 DU145 细胞的抑制率为 9%),PDCD5 过表达促进细胞的凋亡作用也较弱;而顺铂浓度较高(25 $\mu\text{mol/L}$),作用较强时(抑制率为 20.5%),PDCD5 过表达促进细胞的凋亡作用明显增强,见图 4。图中左上象限为 $\text{P I}^- \text{AV}^-$,右上象限是 $\text{P I}^+ \text{AV}^+$,代表晚期凋亡细胞和坏死细胞;左下象限是 $\text{P I}^- \text{AV}^-$,

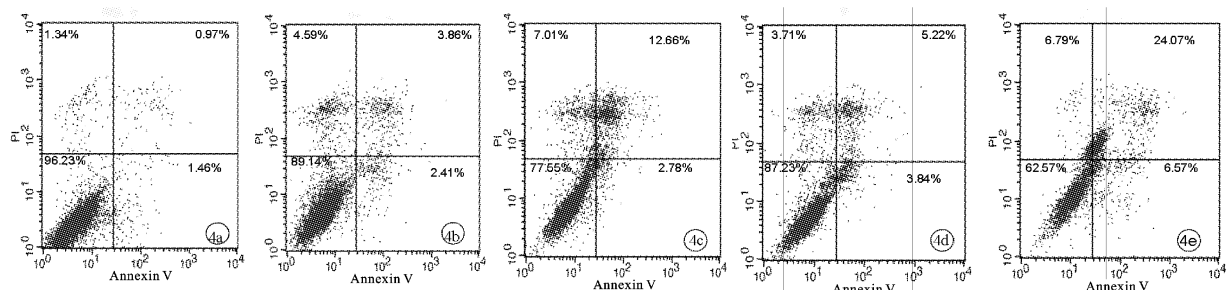


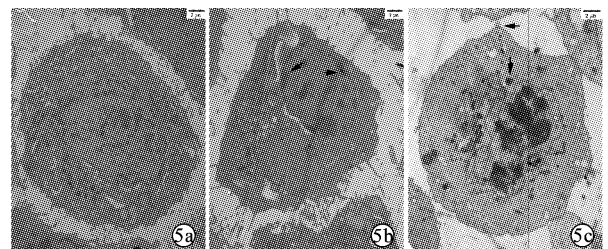
图 4 顺铂对 DU/MOCK 和 DU/PDCD5 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effects of cisplatin on cell apoptosis in DU/MOCK and DU/PDCD5 cells

代表正常细胞;右下象限是 $\text{P I}^- \text{AV}^+$,即早期凋亡细胞。

2.4 透射电子显微镜观察 DU/PDCD5 细胞凋亡的作用

图 5a 对照组细胞形态不规则,细胞表面有较多微绒毛,核浆比高,染色质分布均匀;图 5b 和图 5c 均为实验组,图 5b 细胞缩小,细胞核固缩,核膜完整,核中染色质凝集,箭头所指为核中染色质凝集、边集;图 5c 细胞表面光滑,细胞连接消失,核中染色质凝集,核固缩明显,部分核膜破裂,有染色质释放到细胞质中,部分染色质连同固缩的胞质等突出细胞表面并最终脱离细胞,形成凋亡小体,横箭头所指为凋亡小体,竖箭头所指为由细胞核中逸出的凝聚染色质。



5a: negative control; 5b and 5c: DU/PDCD5 cell treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin

图 5 电子显微镜下观察顺铂处理 DU/PDCD5 细胞的形态学变化($\times 7000$)

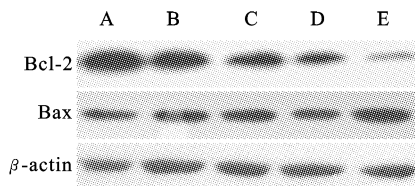
Figure 5 The morphologic change of apoptotic cells treated cisplatin under electron microscope($\times 7000$)

2.5 Western blot 检测顺铂对细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 表达的影响

结果显示 25 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂 DU/PDCD5 细胞组, Bcl-2 表达明显下降, Bax 表达升高不明显,见图 6。

3 讨论

化疗是治疗前列腺癌的重要措施,顺铂作为一线化疗药物,其作用机制主要是攻击 DNA 碱基的氮原子,与 DNA 形成交叉连结,使 DNA 模板作用失活,抑制 DNA 合成,诱导细胞的凋亡^[5]。但是由



A: control; B: DU/MOCK cell treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Cisplatin; C: DU/PDCD5 cell treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Cisplatin; D: DU/MOCK cell treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ Cisplatin; E: DU/PDCD5 cell treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ cisplatin

图 6 不同浓度顺铂处理细胞 48h 后 Bcl-2、Bax 蛋白表达

Figure 6 The protein expression level of Bcl-2 and Bax was detected by Western blot

于顺铂在前列腺癌临床治疗上的局限性,目前的研究集中在如何降低顺铂的不良反应、提高肿瘤细胞对它的敏感性方面^[6-8]。资料表明,PDCD5 蛋白的表达在凋亡细胞中要比在正常细胞中明显升高,而在很多癌组织中下调,如前列腺癌^[8],而且还与一些癌症的发病有密切关系^[9],在 PDCD5 经过真核表达载体或大肠杆菌表达重组蛋白导入多种细胞后,单独增加 PDCD5 的量不能对细胞产生明显的影响,但加入诱导凋亡的因素,则可明显促进细胞凋亡^[10-11]。本研究将 PDCD5 重组质粒转染前列腺癌 DU145 细胞,使 PDCD5 蛋白在细胞内过表达,再和顺铂联合作用前列腺癌细胞。

本研究显示,顺铂抑制 DU145 细胞的生长增殖,且其作用呈时间-剂量依赖性,据此选择 48 h, 10、25 $\mu\text{mol/L}$ 的顺铂做后续实验。PDCD5 基因稳定转染进入前列腺癌 DU145 细胞并进行过表达,通过流式细胞仪的检测和电子显微镜的观察,PDCD5 的过表达能增强顺铂对该细胞的诱导凋亡作用,且 PDCD5 在顺铂诱导细胞凋亡达到一定程度(抑制率为 20.5%)才明显起到促进凋亡作用,这也说明 PDCD5 是凋亡促进剂,而不是诱导剂,和文献^[12-13]报道相符。

细胞凋亡是细胞内连续的信号转导途径,涉及到两类蛋白的参与,即抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白(凋亡前体蛋白)^[14],其中 Bcl-2 家族在细胞凋亡中扮演着重要角色,Bcl-2/Bax 的比值是诱导凋亡的关键^[15],Western blot 可以检测分析这些蛋白在细胞中的表达。本研究中,在 PDCD5 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂的联合作用下,Bcl-2 蛋白的表达明显降低,而 Bax 蛋白的表达升高不明显,提示两者联合作用促进前列腺癌细胞发生凋亡的机制之一是通过降低 Bcl-2/Bax 表达的比值实现的。以上研究仅进行了体外实验,今后仍需进行体内研究加以验证。

参考文献:

- [1] Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies[J]. *Kidney Int*, 2008, 73(9): 994-1007.
- [2] Lin X, Howell SB. DNA mismatch repair and p53 function are major determinants of the rate of development of cisplatin resistance[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(5): 1239-1247.
- [3] Liu H, Wang Y, Song Q, et al. TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human Leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 254(1): 203-210.
- [4] Liu H, Wang Y, Zhang Y, et al. Study of cDNA cloning, expression and function of a novel apoptosis-related gene TFAR19[J]. *High Tech Lett*, 1998, 8(5): 6-10. [刘红涛, 王玉刚, 张颖妹, 等. 凋亡相关新基因 TFAR19 的 cDNA 克隆、表达和功能研究[J]. 高技术通讯, 1998, 8(5): 6-10.]
- [5] Wang JY, Ma JY, Wu SJ, et al. The effect of trichosanthin, mifepristone, cisplatin on the expression of HLA-G in ovarian cancer cells[J]. *Hebei Med J*, 2011, 33(9): 1285-1287. [王健英, 马俊英, 吴淑娟, 等. 天花粉蛋白、米非司酮和顺铂对卵巢癌细胞 HLA-G 表达的影响[J]. 河北医药, 2011, 33(9): 1285-1287.]
- [6] Li QQ, Wang G, Reed E, et al. Evaluation of Cisplatin in Combination with beta-Elementene as a Regimen for Prostate Cancer Chemotherapy[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2010, 107(5): 868-876.
- [7] Noel EE, Yeste-Velasco M, Mao X, et al. The association of CCND1 overexpression and cisplatin resistance in testicular germ cell tumors and other cancers[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(6): 2607-2615.
- [8] Chen C, Zhou H, Xu L, et al. Recombinant human PDCD5 sensitizes chondrosarcomas to cisplatin chemotherapy in vitro and in vivo[J]. *Apoptosis*, 2010, 15(7): 805-813.
- [9] Zhang X, Wang X, Song X, et al. Clinical and prognostic significance of lost or decreased PDCD5 expression in human epithelial ovarian carcinomas[J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(2): 353-358.
- [10] Zhang YM, Xu XZ, Liu HT, et al. The apoptosis-accelerating effect of human recombinant TFAR19 protein on leukemia HL-60 cells[J]. *Chin J Immunol*, 2000, 16(1): 8-11 [张颖妹, 徐秀珍, 刘红涛, 等. 人重组 TFAR19 蛋白对白血病细胞株 HL260 的促凋亡效应[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(1): 8-11.]
- [11] Li L, Chen YY, Zheng R, et al. Expression of TFAR19 in apoptotic processes of Jurkat cells induced with various methods[J]. *J Exp Hematol*, 2000, 8(2): 81-84. [李莉, 陈英玉, 郑蕊, 等. 几种不同方式诱导 Jurkat 细胞凋亡过程中 TFAR19 的表达[J]. 中国实验血液学杂志, 2000, 8(2): 81-84.]
- [12] Rui M, Chen Y, Zhang Y, et al. Transfer of anti-TFAR19 monoclonal antibody into HeLa cells by in situ electroporation can inhibit the apoptosis[J]. *Life Sci*, 2002, 71(15): 1771-1778.
- [13] Yin A, Jiang Y, Zhang X, et al. Transfection of PDCD5 sensitizes colorectal cancer cells to cisplatin-induced apoptosis in vitro and in vivo[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 649(1-3): 120-126.
- [14] Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(11): 876-885.
- [15] Rossé T, Olivier R, Monney L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c[J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496-499.

[编辑: 黄国玲; 校对: 杨 卉]