

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002276

SerpB3 蛋白表达上调促进前列腺癌进展的研究

何 犇¹, 周 亮¹, 卓 晖¹, 唐 伟²

(1. 重庆医科大学附属成都第二临床学院泌尿外科/成都市第三人民医院泌尿外科, 成都 610031;

2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨丝氨酸蛋白酶抑制剂因子 B3 基因 (serine protease inhibitor, SerpinB3) 与前列腺癌的相关性。**方法:**运用 Western blot 方法检测 SerpinB3 蛋白在 29 例前列腺癌组织和 35 例正常对照前列腺增生组织中的表达差异;免疫组织化学方法检测 SerpinB3 蛋白在 48 例各期前列腺癌组织, 33 例良性对照组织芯片中的表达差异。应用脂质体法将合成的 SerpinB3 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 瞬转前列腺癌 DU145 及 PC3 细胞;分为 SerpinB3-siRNA1、SerpinB3-siRNA2 和 SerpinB3-siRNA3, 随机干扰 SerpinB3-siRNA-NC 为阴性对照, 未转染为空白对照组。选择干扰最佳的实验组行后续细胞迁移实验;判断干扰 SerpinB3 基因表达后对前列腺癌 DU145 及 PC3 细胞侵袭能力的影响。**结果:**Western blot 证实 SerpinB3 蛋白在前列腺癌组织中的表达均高于对应的良性组织 ($P<0.001$);免疫组化检测发现 SerpinB3 蛋白在前列腺癌和良性组织中染色强度差异明显 ($P<0.001$);SerpinB3 蛋白表达情况和患者年龄、肿瘤是否转移间无统计学差异 ($P=0.268$, $P=0.178$);和肿瘤病理及临床分期组间差异明显 ($P=0.031$, $P=0.042$)。SerpinB3-siRNA 能明显抑制肿瘤细胞迁移。**结论:**SerpB3 蛋白的明显上调表达能增强前列腺癌细胞侵袭能力。

【关键词】丝氨酸蛋白酶抑制剂因子 B3;前列腺癌;RNA 干扰;迁移

【中图分类号】R737.25

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-02-23

Overexpression of SerpinB3 in prostate cancer promotes tumor cell progression

He Ben¹, Zhou Liang¹, Zhuo Hui¹, Tang Wei²

(1. Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Chengdu Chongqing Medical University/The Third Peoples Hospital of Chengdu; 2. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the relativity between serine protease inhibitor (SerpB3) and prostate cancer. **Methods:** Western blot was used to determine the SerpinB3 levels in 29 cases of prostate cancer tissues and 35 cases of prostate hyperplasia tissues, and immunohistochemistry was used to detect the expression of SerpinB3 in 48 cases of prostate cancer tissues and 33 cases of prostate hyperplasia tissues. The SerpinB3 small interfering RNA (siRNA) was transiently transfected into DU145 and PC3 cells by liposome method, including SerpinB3-siRNA1, SerpinB3-siRNA2 and SerpinB3-siRNA3. Random disturbance SerpinB3-siRNA-NC was used as negative control, and cells without transfection were blank control. SerpinB3-siRNA with the highest efficiency was chosen for subsequent cell migration assay in order to detect the effects of SerpinB3 on the invasion ability of DU145 and PC3 cells. **Results:** Western blot results showed that the level of SerpinB3 protein in the tissues of prostate cancer was higher than that of the benign group ($P<0.001$). Immunohistochemistry results showed SerpinB3 protein level was significantly higher in tumor tissues than that in benign tissues ($P<0.001$). There was no statistic difference between SerpinB3 expression and the patient's age and tumor metastasis ($P=0.268$, $P=0.178$, respectively), but SerpinB3 expression was significantly correlated with pathological grade and clinical stage of the tumor ($P=0.031$, $P=0.042$, respectively). SerpinB3-siRNA could inhibit the proliferation and invasion of the cancer cells. **Conclusion:** Overexpression of SerpinB3 can increase the invasion ability of prostate cancer cells.

【Key words】SerpB3; prostate cancer; RNA interference; tumor migration

作者介绍: 何 犇, Email: outlookhb@126.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤。

通信作者: 唐 伟, Email: tangwei2060@163.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1045.016.html>

(2019-09-18)

丝氨酸蛋白酶抑制剂因子 (serine protease inhibitor, Serpin) 是迄今为止发现的最大蛋白酶抑制剂家族^[1]。其中 Serpin B 亚族成员是人类 Serpin 家族中最多的一类,与肿瘤的发生发展密切相关。人类 Serpin B3 基因定位于 18q21.33,其编码 Serpin B3 蛋白分子量 44.6 kD,主要定位于细胞质。研究发现其与肿瘤的早期复发具有密切关系^[2]。关于 Serpin B3 在前列腺癌中的研究尚鲜见报道,本实验主要探讨 Serpin B3 对前列腺癌的影响,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

收集近一年来成都市第三人民医院就诊的 29 例各期前列腺癌患者手术或者穿刺组织标本以及 35 例前列腺增生组织标本(对照组)用于 Western blot 实验。所有标本收集的患者均为未接受化疗或者放疗,肿瘤标本均经过最后的病理确认,所有组织来源均向患者说明,并签署知情同意书。用于免疫组化实验的组织病理切片标本购买于西安艾丽娜公司(产品货号:PR483),共 48 例。我院病理科保存的 33 例良性前列腺增生组织切片标本作为对照。人前列腺癌 DU145、PC3 细胞系由广州莱德生物技术有限公司提供。

1.2 主要试剂

RPMI1640 培养基、胎牛血清等细胞培养相关试剂(Gibco 公司,美国)。Serpin B3、GAPDH 抗体(Abcam 公司,英国),10×PCRBuffer 购自 Takara 公司;siRNA-mate 转染试剂(上海吉凯基因公司),Trizol(Invitrogen 公司,美国),Marker、上样缓冲液(上海碧云天公司,中国),聚偏二氟乙烯膜(PVDF)、ECL 化学发光试剂(上海生工公司,中国)

1.3 Serpin B3 蛋白表达定量检测

提取 29 例各期前列腺癌组织以及 35 例前列腺增生组织总蛋白,组织样本加 3 倍体积预冷的 PBS,0℃研磨,加入 5×STOP Buffer,180 W 6 min,0℃超声波破碎,5 min 离心。组织样品上样量 35 μg,15%SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜转,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,Serpin B3 及 GAPDH 抗体浓度均为 1:200,HRP 标记的抗 IgG 抗体(1:30 000)为二抗,一抗 4℃过夜,二抗 37℃孵育 50 min,PBST 漂洗后显影,BandScan 分析胶片灰度值。

1.4 临床组织芯片免疫组化

EnVision 二步法进行免疫组化实验。组织芯片脱蜡至水。蒸馏水洗、0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)冲洗;抗原修复;(3% H_2O_2)孵育。滴加 Serpin B3 抗体(1:200 稀释)、37℃

孵育 60 min。PBS 冲洗 3 min×3 次。滴加 HRP 标记 En-Vision™ 二抗;孵育冲洗后 DAB 显色,苏木素复染。结果判断:观察 10 个具有代表性的显微镜视野并确定阳性染色部位,阳性染色细胞的数量。阳性染色细胞百分比得分为:0 分(小于 5%)、1 分(5%~15%)、2 分(15%~50%)、3 分(>50%)。染色强度评分:0 分(不着色 0)、1 分(淡黄色+)、2 分(深黄色++)、3 分(棕褐色染色+++)。总的免疫组化得分为阳性染色细胞百分比得分+染色强度得分,其中≤4 分为阴性表达,≥5 分为阳性表达。

1.5 siRNA 合成及转染

实验分组 PC3、DU145 细胞加入含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 或 1640 培养基,置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每 3~4 d 换液及传代。实验选用生长良好的对数生长期细胞。根据 Genbank, Serpin B3 基因序列,由上海吉凯公司设计 Serpin B3-siRNA 序列,一共设计 3 对干扰序列:SerpinB3-siRNA1:5'-ATG-GACAAGTTTGCAGAATAT-3'; SerpinB3-siRNA2:5'-TTG-GCCAAACAAGAATACATA-3', SerpinB3-siRNA3:5'-TGGG-TGGAAAGTCAAACGAAT-3',随机干扰序列作为阴性对照: Serpin B3-siRNA-NC:5'-TGCCTGGAAATACCATACAAA-3'、未干扰作为空白对照。细胞复苏后,将 DU145 细胞系接种于含 10%FBS 的 1640 培养基,将 PC3 细胞系接种于含 10%FBS 的 DMEM 培养基。细胞汇合度为 92%以上时,按照 siRNA-mate 转染试剂严格按步骤进行转染。实验组设 3 组(Serpin B3-siRNA1、Serpin B3-siRNA2 和 Serpin B3-siRNA3),随机干扰 Serpin B3-siRNA-NC 为阴性对照,未转染的 DU145 细胞及未转染的 PC-3 细胞为空白对照组。转染后 48 h 进行 Western blot 检测判断 RNA 干扰效率,选取最佳干扰效率组用于后续细胞实验。

1.6 Western blot 检测 SerpinB3 蛋白水平

细胞转染 48 h 后分别提取各组细胞的总蛋白,加入上样缓冲液,100℃加热处理 10 min;每孔上样量 12 μL,15% SDS-PAGE 电泳;SDS-PAGE 分离。PVDF 转膜,转膜完毕后封膜 2 h。加入 Serpin B3 一抗工作液(1:200),4℃过夜。ECL 底物发光;显影定影处理后胶片用扫描仪扫描,BandScan 分析胶片灰度值。

1.7 细胞迁移实验

取对数生长期的细胞,置于 24 孔板,细胞密度 8×10^4 个/孔,设 3 个复孔,当细胞呈现单层贴壁生长时,用 10 μL 的消毒枪头在 24 孔板垂直划痕,并划好标记,然后用无血清培养基洗 2、3 次,尽量将划掉的细胞清洗掉,换无血清培养基,37℃、5%CO₂ 培养箱继续培养,于 0、24、48 h 在相差显微镜下随机选择 5 个 40 倍视野内测量划痕面细胞愈合比例。PC3、DU145 细胞各实验重复 3 次,随机干扰的 DU145 细胞(NC)作为阴性对照。

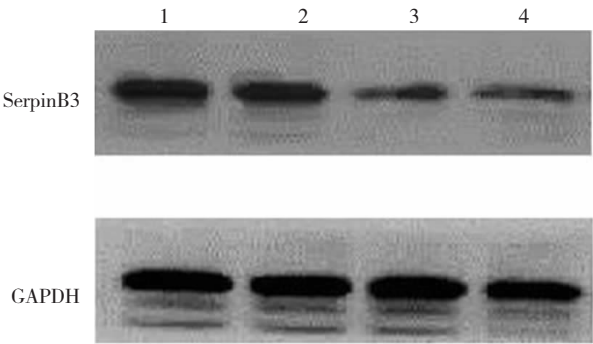
1.8 统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件进行数据统计。正态分布的定量资料以均数 $\pm$ 标准差表示;采用两独立样本 t 检验分析 SerpinB3 蛋白在前列腺癌组织和良性对照组织中的表达差异和细胞迁移实验结果;计数资料采用构成比表示,采用卡方检验分析 SerpinB3 蛋白在前列腺癌组织和良性组织中免疫组化染色表达强度差异及 SerpinB3 蛋白在癌组织中的免疫组化评分与患者临床病理参数之间的关系。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

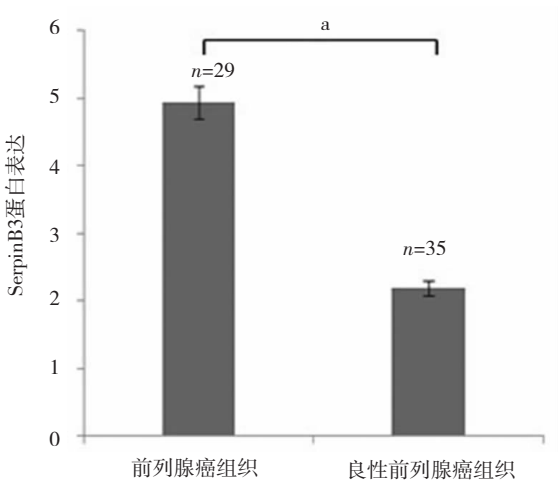
2 结果

2.1 SerpinB3 蛋白在前列腺癌组织和良性组织中的表达差异

Western blot 实验显示 SerpinB3 蛋白在 29 例前列腺癌组织中的表达高于对应的 35 例良性组织, $P<0.001$ (图 1)。



A. SerpinB3 蛋白印迹扫描图,1 和 2 为前列腺癌组织;3 和 4 为良性组织



注:a 表示 $P<0.001$

B. SerpinB3 蛋白在前列腺癌和良性前列腺增生组织中的表达差异

图 1 SerpinB3 蛋白印迹扫描图及 SerpinB3 蛋白在前列腺癌和良性前列腺增生组织中的表达差异

2.2 SerpinB3 蛋白在前列腺癌组织芯片中免疫组化的表达情况

免疫组化染色发现 SerpinB3 蛋白主要定位在细胞质,少量定位在细胞核,阳性信号为棕黄色。癌组织中均有表达,少量良性组织中有表达(图 2A~C)。其中免疫组化染色评分为 0~4 分的癌组织只有 12 例(25.0%),5~6 分癌组织有 36 例(75.0%)。卡方检验比较 SerpinB3 蛋白在前列腺癌和良性组织中染色强度变化之间差异明显($\chi^2=81.000, P=0.000$);把 48 例癌组织标本根据免疫组化染色评分分为 ≤ 4 分组(低中度表达)和 ≥ 5 分组(高表达)2 组。本研究发现:SerpinB3 蛋白表达情况与患者年龄、是否转移无关($\chi^2=1.458, P=0.268$; $\chi^2=1.958, P=0.178$),但是与肿瘤临床分期($\chi^2=5.368, P=0.042$)、病理评分($\chi^2=5.349, P=0.031$)相关(表 1)。

表 1 SerpinB3 蛋白免疫组化评分与前列腺癌临床病理参数的相关性

因素	数量	SerpinB3(<i>n</i> = 48)		χ^2 值	<i>P</i> 值
		阴性表达	阳性表达		
年龄(岁)					
<65	12	2	10	1.458	0.268
≥65	36	10	26		
病理分期					
GS =6	15	7	8	5.349	0.031
GS >6	33	5	28		
临床分期					
<T2	22	9	13	5.368	0.042
≥T2	26	3	23		
转移					
是	16	6	10	1.958	0.178
否	32	6	26		

2.3 SerpinB3-siRNA 干扰效率

SerpinB3 siRNA 分别转染前列腺癌 DU145 及 PC3 细胞 48 h 后提取细胞总的蛋白,按照试剂盒说明书进行 Western blot 实验判断干扰效率。结果发现:SerpinB3-siRNA1 序列在 DU145 及 PC3 细胞系中均有较高的干扰效率(图 3);选择 SerpinB3-siRNA1 干扰组进行后续细胞功能实验。

2.4 SerpinB3- siRNA1 抑制前列腺癌肿瘤细胞迁移

划痕实验显示:与对照组相比,SerpinB3- siRNA1 干扰的前列腺癌 DU145 及 PC-3 细胞迁移效率明显减低(图 4)。肿瘤细胞干扰组在 24 h 和 48 h 的细胞迁移效率均明显降低(图 5)。

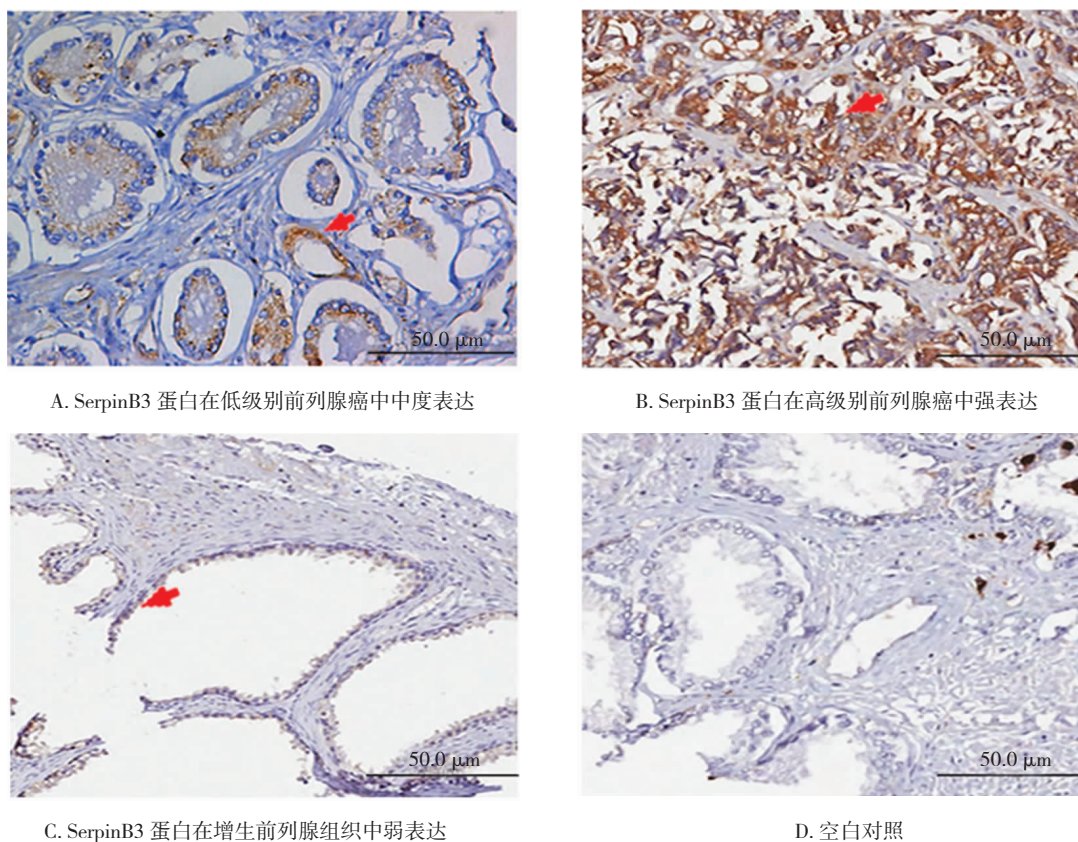


图 2 免疫组化检测 SerpinB3 蛋白在前列腺癌及良性组织中的表达情况(200×)

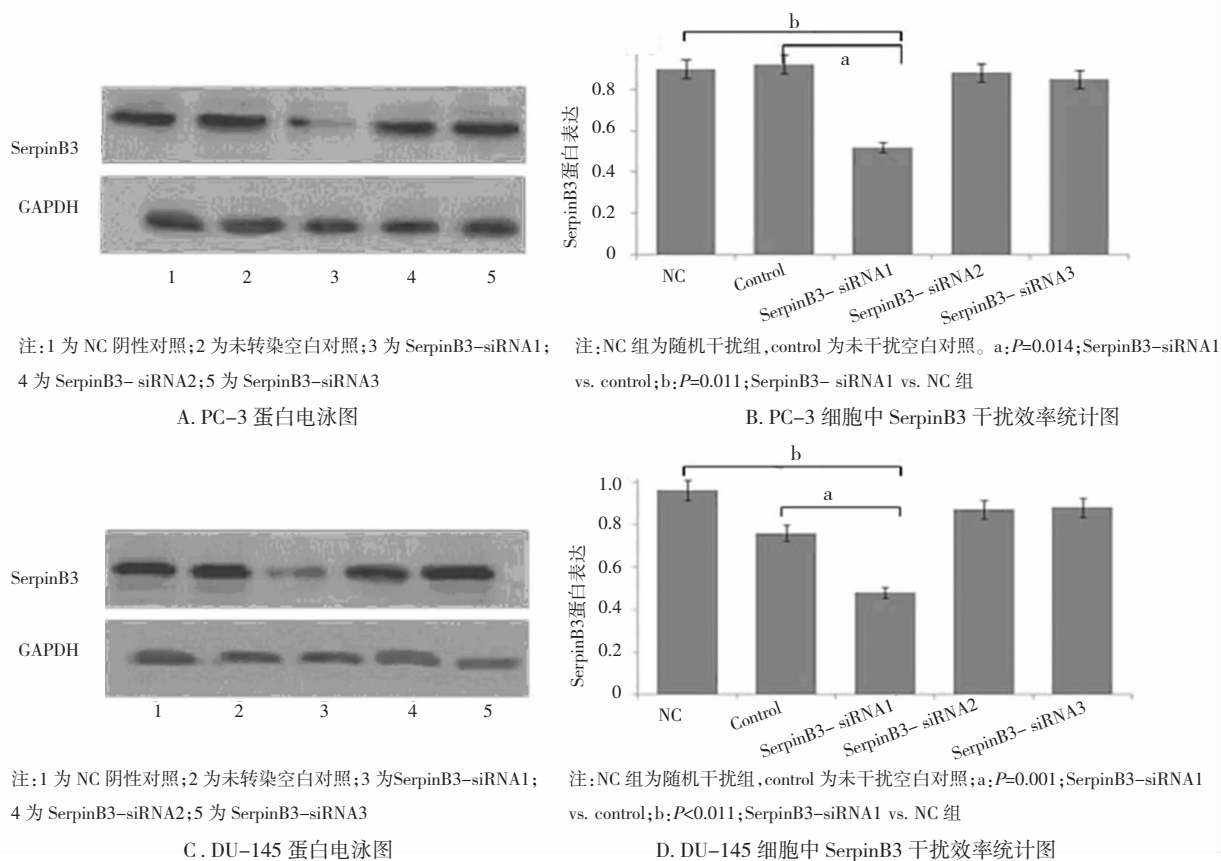
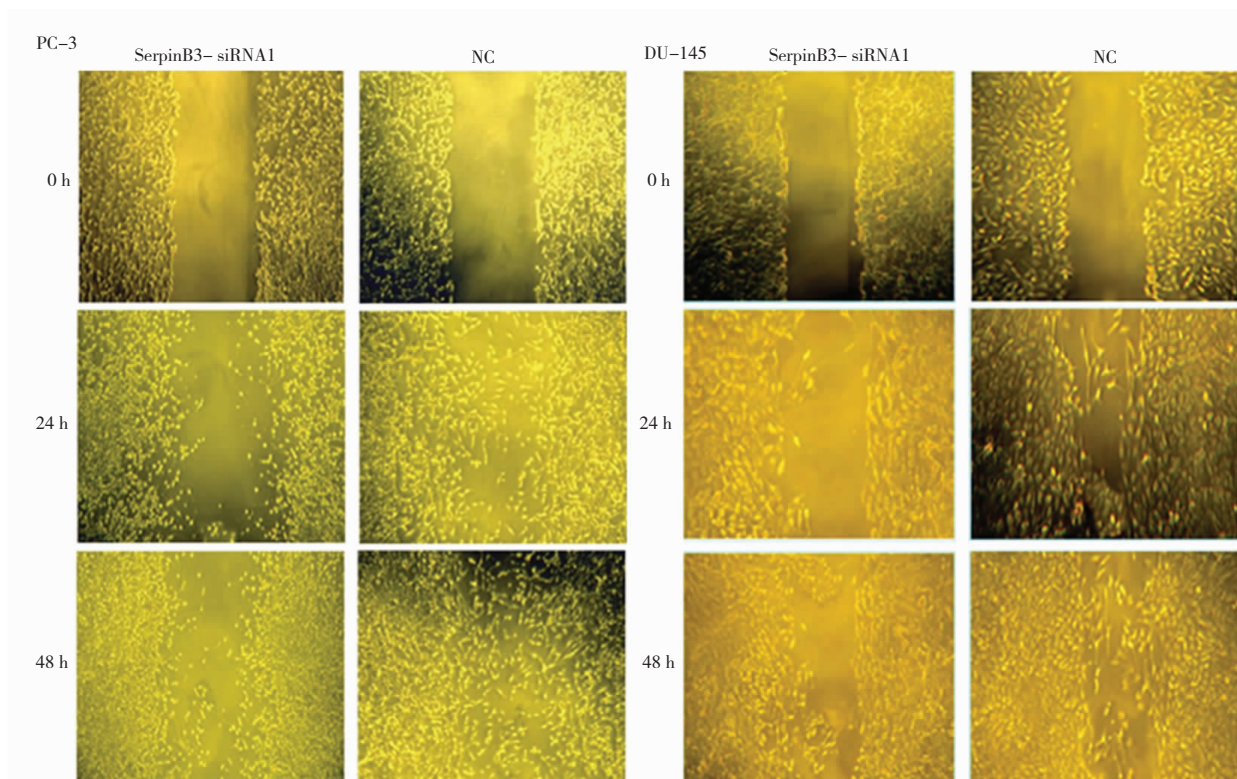
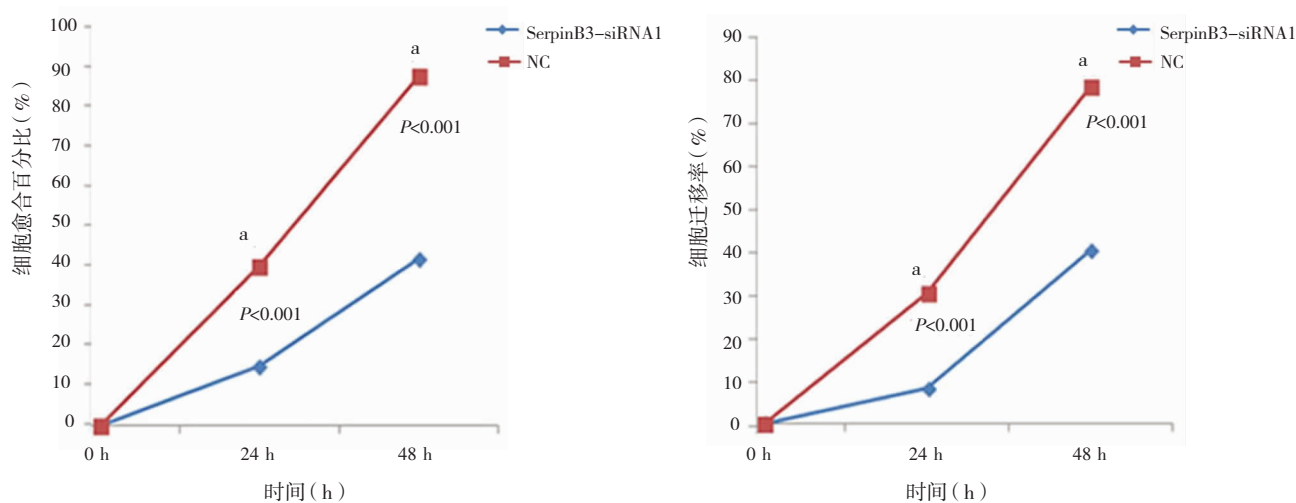


图 3 SerpinB3 siRNA 转染前列腺癌细胞系的干扰效率



NC:随机干扰的阴性对照组

图 4 划痕实验显示 SerpinB3-siRNA1 干扰的前列腺癌 DU145 及 PC-3 细胞系和对照组的细胞迁移效率



A. SerpinB3-siRNA1 干扰后 PC-3 细胞迁移效率

B. SerpinB3-siRNA1 干扰后 DU-145 细胞迁移效率

NC:随机干扰的阴性对照组;a: $P<0.000$

图 5 SerpinB3-siRNA1 干扰后 PC-3 及 DU-145 细胞迁移效率

3 讨论

Serpin基因是一组具有多种生物学功能的内源性蛋白酶抑制因子。在人类基因组中,Serpin 含有

36 个编码蛋白的基因和 8 个假基因^[3]。SerpinB3 蛋白广泛表达于许多细胞类型,包括正常上皮、白细胞、上皮来源的肿瘤。体外及体内的多项实验表明,SerpinB3 在炎症发生、肝病纤维化及肿瘤的细胞程序性死亡的调控中发挥重要作用^[4-5]。

近年来的研究证据发现 SerpinB3 的表达不仅局限在鳞状上皮来源的肿瘤,同时也表达在肺腺癌、乳腺癌、胰腺癌和肝细胞癌中^[6-11]。在大部分肝细胞癌中,SerpinB3 都有表达而且在预后差的肝癌细胞亚群中的表达更高^[2]。这和本研究结果类似。本研究发现 SerpinB3 蛋白不仅在前列腺癌组织中具有较高的表达,且这种高度表达和肿瘤的临床及病理进展相关,说明 SerpinB3 蛋白有促进前列腺肿瘤进展的分子机制。当前 SerpinB3 蛋白与前列腺癌相关性研究很少,其具体参与前列腺癌发生进展或者转移的过程尚不明了。现有研究发现,SerpinB3 体外实验可以保护肿瘤细胞免于遭受凋亡的诱导^[4],促进上皮细胞向间质细胞的转变、减少桥粒连接以及增加肿瘤侵袭性和细胞增殖^[12-13],说明 SerpinB3 有促进肿瘤转移进展的生物学功能。由于前列腺癌大部分也是上皮源性肿瘤,笔者猜测 SerpinB3 异常表达可能通过上皮细胞向间质细胞转化来促进前列腺肿瘤进展,但目前尚未见相关研究。另外,Turato 等^[2]发现在肝细胞癌细胞系中,SerpinB3 可以通过抑制 c-Myc 细胞质形成的增殖和 Yap 通路等直接和间接的机制来增加 c-Myc 的生成,从而促进肿瘤进展。Cannito 等^[14]认为 SerpinB3 是 HIF-2 α 的特异性靶点,在缺氧状态下 HIF-2 α 介导氧化还原机制调控 SerpinB3 的转录、合成和释放,促进肝细胞癌的发生发展。在结直肠癌中,SerpinB3 可上调 COX-2/ β -Catenin positive loop,从而与更具侵袭性的细胞表型相关^[15]。以上这些研究均提示 SerpinB3 蛋白和肿瘤的侵袭甚至转移相关,但是本研究结果并未发现 SerpinB3 蛋白和前列腺癌转移相关,这可能和本研究的病例研究数较少未能统计出明显性差异有关。

综上所述,SerpinB3 蛋白可能涉及多通路、多分子网络参与前列腺癌发生甚至进展过程。下一步本研究小组将进一步设计高通量的实验过程,进一步理清 SerpinB3 蛋白在前列腺癌进展过程中的分子网络结构,希望能初步勾勒出 SerpinB3 蛋白在前列腺癌进展过程中的分子作用,为丰富前列腺癌抗癌治疗提供理论及实验依据。

参 考 文 献

- [1] Gatto M, Iaccarino L, Ghirardello A, et al. Serpins, immunity and autoimmunity: old molecules, new functions[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2013, 45(2): 267-280.
- [2] Turato C, Vitale A, Fasolato S, et al. SERPINB3 is associated with TGF- β 1 and cytoplasmic β -catenin expression in hepatocellular carcinomas with poor prognosis[J]. Br J Cancer, 2014, 110(11): 2708-2715.
- [3] Heit C, Jackson BC, McAndrews M, et al. Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily[J]. Hum Genomics, 2013, 7: 22.
- [4] Vidalino L, Doria A, Quarta S, et al. SERPINB3, apoptosis and autoimmunity[J]. Autoimmun Rev, 2009, 9(2): 108-112.
- [5] Turato C, Calabrese F, Biasiolo A, et al. SERPINB3 modulates TGF- β expression in chronic liver disease[J]. Lab Invest, 2010, 90(7): 1016-1023.
- [6] Petty RD, Kerr KM, Murray GI, et al. Tumor transcriptome reveals the predictive and prognostic impact of lysosomal protease inhibitors in non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2006, 24(11): 1729-1744.
- [7] Catanzaro JM, Guerriero JL, Liu J, et al. Elevated expression of squamous cell carcinoma antigen (SCCA) is associated with human breast carcinoma[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e19096.
- [8] Collie-Duguid ES, Sweeney K, Stewart KN, et al. SerpinB3, a new prognostic tool in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(3): 807-818.
- [9] Pontisso P, Calabrese F, Benvegno L, et al. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen variants in hepatocellular carcinoma[J]. Br J Cancer, 2004, 90(4): 833-837.
- [10] Liu J, Gao Y, Yang B, et al. Overexpression of squamous cell carcinoma antigen 1 is associated with the onset and progression of human hepatocellular carcinoma[J]. Arch Med Res, 2015, 46(2): 133-141.
- [11] 王艳清, 杨 潇, 鲜 舒, 等. SERPINB3、 β -catenin 和 VEGF-C 在宫颈癌中的表达[J]. 医学分子生物学杂志, 2018, 15(2): 82-88.
- [12] Quarta S, Vidalino L, Turato C, et al. SERPINB3 induces epithelial-mesenchymal transition[J]. J Pathol, 2010, 221(3): 343-356.
- [13] Pontisso P. Role of SERPINB3 in hepatocellular carcinoma[J]. Ann Hepatol, 2014, 13(6): 722-727.
- [14] Cannito S, Turato C, Paternostro C, et al. Hypoxia up-regulates SERPINB3 through HIF-2 α in human liver cancer cells[J]. Oncotarget, 2015, 6(4): 2206-2221.
- [15] Terrin L, Agostini M, Ruvoletto M, et al. SerpinB3 upregulates the Cyclooxygenase-2/ β -Catenin positive loop in colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(9): 15732-15743.

(责任编辑:冉明会)