

泌尿生殖器肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002519

PARP-1 抑制剂 PJ34 对前列腺癌细胞生物学行为的影响

高清河, 李金雨, 赵 力, 于忠英, 杨镇有, 庄园丽

(中国解放军联勤保障部队第九〇九医院泌尿外科, 漳州 363000)

【摘要】目的:观察聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1[poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1] 抑制剂 PJ34 对前列腺癌 PC-3 细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭等生物学行为的影响。**方法:**使用不同浓度 PJ34 处理 PC-3 细胞后, CCK-8 法检测细胞增殖, Western blot 检测 PARP-1 蛋白表达, annexin V-FITC/IP 双染法检测细胞凋亡, Transwell 法检测细胞迁移、侵袭等相关生物学行为的变化。**结果:**PJ34 组分别作用 72 h、48 h、24 h 后, PARP-1 蛋白水平明显低于 control 组 ($t=4.647, P=0.0097$; $t=4.816, P=0.0085$; $t=17.28, P<0.0001$)。PJ34 组凋亡率为 $(17.64 \pm 4.49)\%$, 与 control 组凋亡率的 $(3.83 \pm 0.74)\%$ 相比, 差异有统计学意义 ($t=5.261, P=0.006$)。Control 组和 PJ34 组细胞迁移差异有统计学意义 ($t=23.67, P<0.0001$), 细胞侵袭差异有统计学意义 ($t=29.31, P<0.0001$)。**结论:**PJ34 通过抑制 PARP-1 的表达抑制前列腺癌细胞 PC-3 的增殖、迁移和侵袭能力。

【关键词】前列腺癌; 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1; 生物学行为; 迁移; 侵袭

【中图分类号】R737.25

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-11-25

Effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor PJ34 on biological behaviors of prostate cancer cell

Gao Qinghe, Li Jinyu, Zhao Li, Yu Zhongying, Yang Zhenyou, Zhuang Yuanli

(Department of Urinary Surgery, The No. 909 Hospital, Joint Logistic Support Force of PLA)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of PJ34, poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor, on the biological behavior of human prostate cancer cell line PC-3, including cells proliferation, apoptosis, migration and invasion. **Methods:** PJ34 with different concentration was used to treat PC-3 cells, CCK-8 assay was used to detect cell proliferation, Western blot was used to detect the expression of PARP-1, annexin V-FITC/IP double-staining method was used to detect cell apoptosis, Transwell method was used to detect changes of cell biological behavior including migration and invasion. **Results:** After treatment for 72 h, 48 h and 24 h, PARP-1 levels in the PJ34 group were lower than those in the control group ($t=4.647, P=0.0097$; $t=4.816, P=0.0085$; $t=17.28, P<0.0001$). Apoptosis rate in the PJ34 group was $(17.64 \pm 4.49)\%$, while in the control group was $(3.83 \pm 0.74)\%$, with statistically significant differences ($t=5.261, P=0.006$). Differences in migration had statistical significance in two groups ($t=23.67, P<0.0001$). In addition, cell invasion had statistically significant differences ($t=29.31, P<0.0001$). **Conclusion:** PJ34 can inhibit PC-3 cells' proliferation, apoptosis and invasion by inhibiting expression of PARP-1.

【Key words】prostate cancer; poly(ADP-ribose) polymerase-1; biological behavior; migration; invasion

前列腺癌是男性最为常见的恶性肿瘤之一, 2018年其发病率在全球范围内仅次于肺癌, 死亡率在男性癌症中位列第七位^[1]。随着生活、饮食结构的

改变, 以及人口老龄化, 我国前列腺癌的发生率呈逐年升高趋势^[2]。由于前列腺癌发病隐匿、早期容易转移, 患者就诊时多处于癌症晚期, 体内出现局部浸润及远处转移, 已失去手术根治的机会。有研究显示新诊断的前列腺癌患者中, 54%已经发生远处转移, 一旦发生骨转移将无法治愈并伴有严重并发症^[3]。转移是恶性肿瘤临床治疗失败的主要原因, 发生转移的患者往往比未发生转移者更难取得疗效, 前者 5 年相对生存率低至 30%, 后者 5 年相对生存

作者介绍: 高清河, Email: 475561786@qq.com,

研究方向: 泌尿系统肿瘤基础与临床。

通信作者: 庄园丽, Email: 420913556@qq.com。

基金项目: 中国解放军联勤保障部队第九〇九医院青年苗圃基金资助项目(编号: 20YQ003)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200610.1652.006.html>

(2020-06-11)

率尚有 80%^[4]。有研究提示聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1[poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1]不仅能够识别 DNA 损伤并参与 DNA 修复,还可调节多种转录因子并影响其功能发挥,可能与肿瘤细胞的迁移、侵袭有关^[5]。本研究通过 PARP-1 抑制剂 PJ34 调控前列腺癌细胞 PC-3 中 PARP-1 的表达,观察其对 PC-3 细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响,旨在探讨 PARP-1 在前列腺癌侵袭转移过程中的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人前列腺癌细胞株 PC-3 购自上海中科院细胞库; PARP-1 抑制剂 PJ34 购自美国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司;抗 PARP-1、 β -actin 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; CCK-8 分析试剂盒、Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒、全蛋白提取试剂盒、ECL 化学发光检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 常规复苏前列腺癌 PC-3 细胞,使用含 10% FBS 的 1640 培养基,置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,连续传代培养,选择对数生长期细胞用于后续实验。本研究将细胞分为空白对照组(control 组,行常规培养)和实验组(PJ34 组,行 PARP-1 抑制剂 PJ34 培养)。

1.2.2 CCK-8 实验 收集对数生长期细胞, PBS 洗涤后使用完全培养基重悬,浓度调至 4×10^4 个细胞/mL,以 100 μ L/孔接种于 96 孔板。培养箱孵育过夜后,分别加入不同浓度的 PJ34 (0.00、1.25、2.5、5、10、20 μ g/mL) 处理细胞,每组均有 6 个平行孔,药物作用时间分为 24 h、48 h、72 h。在各组实验终止前 4 h,加入现配的 CCK-8 溶液 (10 μ L/孔),孵育培养 4 h 后,酶标仪测定 450 nm 处的光密度 (optical density, OD) 值,绘制曲线,计算药物 IC₅₀。

1.2.3 Western blot 实验 收集对数生长期细胞,裂解细胞提取总蛋白,BCA 法对蛋白进行定量,100 °C 下变性 5 min。将样本等量上样至 12% 的 SDS-PAGE 凝胶,电泳分离蛋白后恒流转至 PVDF 膜,5% 脱脂乳粉封闭 2 h,分别加入稀释的一抗 4 °C 震荡孵育过夜, TBST 漂洗后室温震荡孵育二抗 60 min, ECL 试剂盒显色,凝胶成像分析仪扫描,计算灰度值,比对各孵育时间在相应 IC₅₀ 浓度下的 PARP-1 表达情况。

1.2.4 细胞凋亡实验 收集对数生长期细胞,按 4×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔培养板中,正常培养 24 h 后,将培养细胞分为 2 组, PJ34 组加入 IC₅₀ 浓度的 PJ34, control 组加入等体积的培养基,继续培养适宜时间。使用不含 EDTA 胰

酶消化并收集细胞,用细胞筛过滤,血细胞计数板计数后,每组收集 2×10^5 个细胞,用 0.3 mL Buffer 缓冲液重悬细胞于流式管内加 Annexin V-FITC,室温避光染色 30 min 再加 PI 染液,室温避光染色 10 min,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 Transwell 检测细胞迁移和侵袭能力 ①细胞迁移能力:收集 PJ34 处理 48 h 后的细胞,使用无血清培养基重悬,以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种于 Transwell 小室的上室,下室则加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的完全培养基,于细胞培养箱孵育 24 h。4% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色,拍照。②细胞侵袭能力:按照使用说明书,将 Matrigel 基质胶包被于 Transwell 小室,4 °C 条件下风干,37 °C 温育 60 min 使其凝固。收集细胞接种于小室的上室,下室则加入 500 μ L 含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。培养 24 h 后, PBS 温柔清洗小室膜的上层以去除未穿膜的细胞,用 4% 多聚甲醛固定及 0.1% 结晶紫染色,于显微镜下随机选取数个视野拍照,计数统计。

1.3 统计学处理

应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据分析。实验数值均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间均数比较采用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PJ34 抑制 PC-3 细胞的增殖

CCK-8 法检测细胞增殖能力如图 1 所示,随 PJ34 给药浓度不断增加,细胞抑制率也相应提高,在 20 μ g/mL 时已基本没有细胞存活。同时,随 PJ34 给药时间不断延长,细胞抑制率也随之增加,在 72 h 时对细胞的抑制效果最大。经计算,经 24、48、72 h 孵育后 PJ34 的 IC₅₀ 分别为 13.21 μ g/mL、7.39 μ g/mL、5.20 μ g/mL。

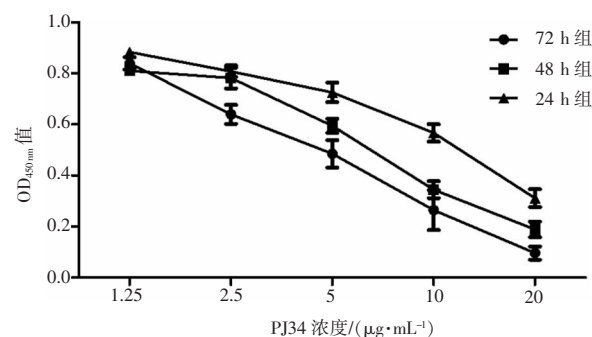


图 1 CCK-8 检测 PJ34 对 PC-3 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.2 PJ34 抑制 PC-3 细胞表达 PARP-1 蛋白

以所测 IC₅₀ 浓度为基础, Western blot 测定各组细胞在相应 PJ34 药物 IC₅₀ 浓度下 PARP-1 蛋白的表达情况。如图 2 所示, PJ34 组在 72 h、48 h、24 h 孵育时间下 PARP-1 蛋白水

平均明显低于未加药的 control 组 ($t=4.647, P=0.0097; t=4.816, P=0.0085; t=17.28, P<0.0001$)。72 h 和 48 h 作用下, PARP-1 蛋白表达无统计学差异 ($t=0.074, P=0.9444$), 提示 PJ34 在 7.39~13.21 $\mu\text{g/mL}$ 可能已达到最高抑制浓度。后续实验将选用 7.39 $\mu\text{g/mL}$ 作用 48 h 为本研究最佳使用条件。

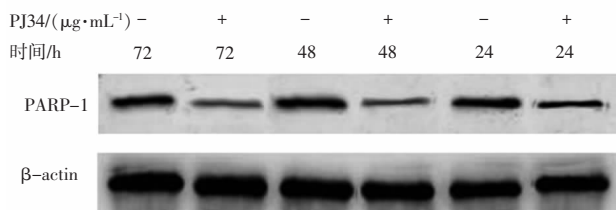


图2 Western blot 检测 PJ34 不同处理后 PC-3 细胞中 PARP-1 蛋白的表达情况

2.3 PJ34 诱导 PC-3 细胞的凋亡

流式细胞仪分析 Annexin V-FITC/PI 双染结果如图 3 所示, control 组发生凋亡的细胞比例很少, 凋亡细胞总数为 $(3.83 \pm 0.74)\%$ 。PJ34 组早期凋亡及晚期凋亡明显增加, 凋亡细胞总数为 $(17.64 \pm 4.49)\%$ 。与 control 组相比, 差异有统计学意义 ($t=5.261, P=0.006$), 说明一定浓度的 PJ34 能够诱导 PC-3 细胞凋亡。

2.4 PJ34 减弱 PC-3 细胞的迁移侵袭能力

常规培养的 control 组和 PJ34 组迁移穿入下室的细胞数分别为 (286.60 ± 32.16) 个和 (89.64 ± 9.23) 个; 侵袭到 Transwell 下室的细胞数分别为 (195.30 ± 23.59) 个和 (46.25 ± 5.77) 个。比对 control 组和 PJ34 组, 细胞迁移差异有统计学意义 ($t=23.67, P<0.0001$)、细胞侵袭差异有统计学意义 ($t=29.31, P<0.0001$) (图 4)。

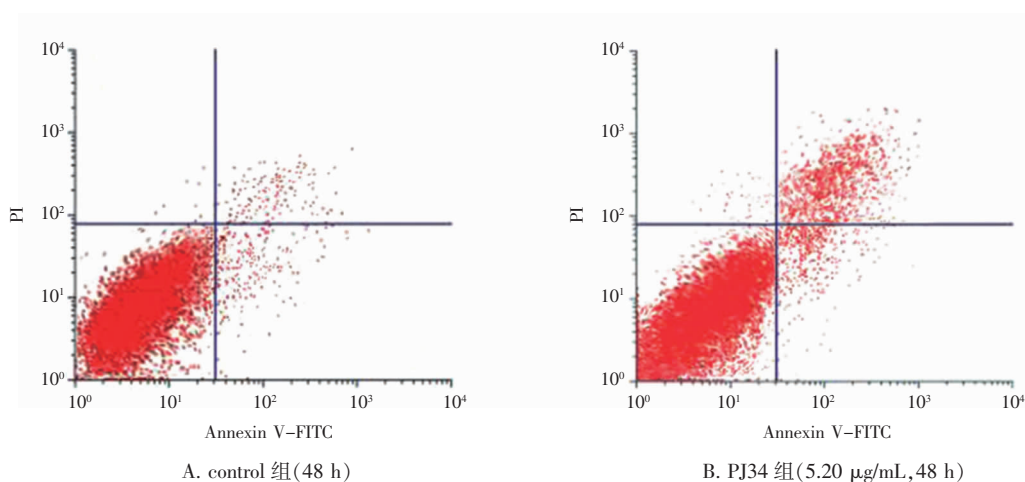


图3 流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 PJ34 对 PC-3 细胞凋亡的影响

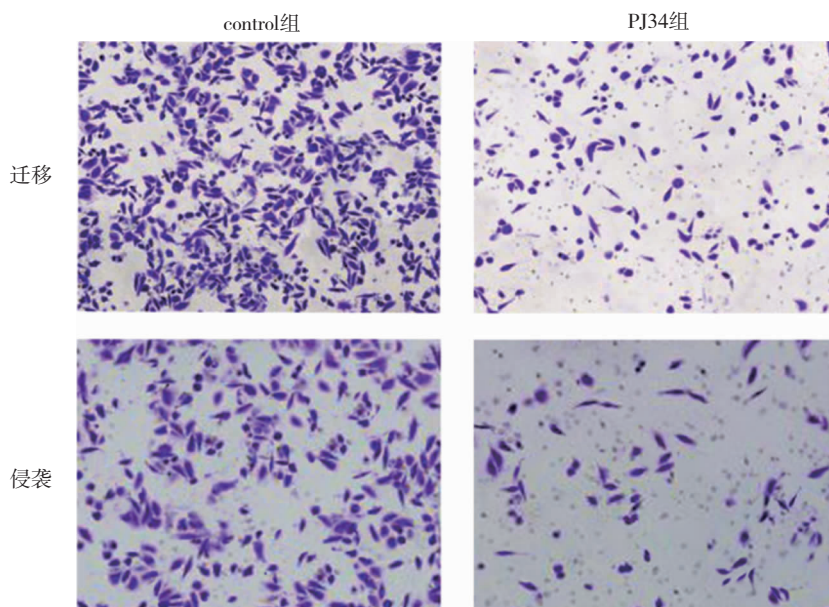


图4 Transwell 检测 PJ34 对 PC-3 细胞迁移与侵袭的影响 (400 $\times$)

3 讨论

PARP 是一种聚合酶, 包含 PARP-1、PARP-2、PARP-3 等亚型, 其中 PARP-1 由 3 部分组成: N 端 DNA 结合区域、C 端催化区域和中间段自我修饰区域, 主要生理功能是催化合成细胞内的蛋白酶活化受体, 可影响目标蛋白的功能、细胞效应等。如 DNA 发生异常损伤, PARP-1 可通过识别和结合受损点形成复合物, 诱导 DNA 修复酶到受损部位修复 DNA。PARP-1 对基因表达及信号传导也有影响, 如调节 DNA 甲基化、引起染色体结构改变等; 对细胞存亡也有调节作用, 在细胞损害严重时如抑制 PARP-1 可为凋亡细胞储存能量, 阻止细胞坏死, 让其转为凋亡而不是修复^[6]。

临床应用过程显示, PARP 抑制剂无论是单药还是联合用药, 对多种肿瘤都有良好的抑制作用^[7]。最初, PARP-1 抑制剂作为化疗或放疗增敏剂, 与细胞毒性化疗药物或放疗药物联合应用^[8]。这类抑制药物的主要分子机制是基于上述的 PARP-1 功能, 即抑制 PARP-1 活性后, DNA 单链损伤无法及时修复, 导致单链损伤累积, 进而转化成持续性的双链损伤, 最终致使细胞死亡^[9]。目前处于临床研究阶段的 PARP-1 抑制剂主要有奥拉帕尼 (AZD-2281)、维利帕尼 (ABT-888)、尼拉帕尼 (MK-4827)、他拉唑帕尼 (BMN-673) 和鲁卡帕尼 (AG-014699) 等^[10]。PJ34 是第 3 代选择性 PARP-1 抑制剂, 属于菲啶酮类化合物, 临床数据显示 PJ34 的生物利用度和抑酶活性是传统 PARP 抑制剂 3-AB (第 1 代 PARP-1 抑制剂) 的 10 000 倍。

以往研究表明, PARP-1 在多种肿瘤中的表达和活性均增强, 如前列腺癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、舌癌、胰腺癌等^[6], 并且与疾病病程的发展、侵袭力、血管再生能力等有关, 被认为是引起恶性肿瘤发生侵袭及转移的主要影响因素。有研究发现 PJ34 单药即可抑制 NSCLC 细胞系 Calu-6、A549 及 H460 的增殖与转移, 并能通过激活 Caspase 介导的细胞凋

亡通路促进细胞凋亡^[11]。

本研究利用 PJ34 抑制前列腺癌细胞 PC-3 中 PARP-1 的表达, 研究 PARP-1 与前列腺癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的关系。研究结果证实 PJ34 能有效阻滞 PC-3 细胞分裂、增殖, 诱导细胞发生凋亡, 抑制细胞迁移和侵袭, 推测 PARP-1 抑制剂抑制前列腺癌恶性转移是通过抑制细胞水平的生物学行为实现。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394–424.
- [2] Wei Y, Liu L, Li X, et al. Current treatment for low-risk prostate cancer in China: a national network survey, 2019[J]. J Cancer, 2019, 10(6): 1496–1502.
- [3] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7–30.
- [4] Oswald LB, Kasimer R, Rappazzo K, et al. Patient expectations of benefit from systemic treatments for metastatic prostate cancer[J]. Cancer Med, 2019[Epub ahead of print]. DOI: 10.1002/cam4.2783.
- [5] 卢其腾, 曲 颂, 李 龄, 等. PARP-1 对鼻咽癌 CNE-2 细胞迁移及侵袭能力的影响[J]. 中国癌症防治杂志, 2018, 10(1): 10–14.
- [6] Schiewer MJ, Mandigo AC, Gordon N, et al. PARP-1 regulates DNA repair factor availability[J]. EMBO Mol Med, 2018, 10(12): e8816.
- [7] Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: synthetic lethality in the clinic[J]. Science, 2017, 355(6330): 1152–1158.
- [8] Césaire M, Thariat J, Candéas SM, et al. Combining PARP inhibition, radiation, and immunotherapy: a possible strategy to improve the treatment of cancer? [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): E3793.
- [9] Wang Y, Bernhardt AJ, Nacson J, et al. BRCA1 intronic Alu elements drive gene rearrangements and PARP inhibitor resistance[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5661.
- [10] McCann KE, Hurvitz SA. Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer[J]. Drugs Context, 2018, 7: 212540.
- [11] Gangopadhyay NN, Luketich JD, Opest A, et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) induces apoptosis in lung cancer cell lines[J]. Cancer Invest, 2011, 29(9): 608–616.

(责任编辑: 唐秋姗)