

泌尿系统疾病诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000164

多西紫杉醇诱导前列腺癌 PC-3 细胞自噬的研究

黄 彭, 苟 欣, 何卫阳, 罗 勇

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察多西紫杉醇是否诱导前列腺癌 PC-3 细胞产生自噬,并初步探讨其可能机制。**方法:**实验应用 MTT 法测定细胞的增殖率;透射电镜观察细胞超微结构的变化;免疫荧光和 Western blot 分别定性和定量检测自噬相关蛋白 II 型微管相关蛋白轻链 3 蛋白(microtubule-associated protein 1 light chain 3 type II, LC3-II)、底物蛋白(sequestosome 1/SQSTM1, P62)表达水平,RT-PCR 检测自噬相关基因 Beclin-1 mRNA。**结果:**MTT 结果显示多西紫杉醇能有效抑制 PC-3 细胞增殖($F=58.684, P=0.000$); 10^{-6} mol/L 多西紫杉醇处理 PC-3 细胞 24 h,即可发生明显的自噬,透射电镜观察到自噬体双层膜结构的形成。免疫荧光和 Western blot 结果显示多西紫杉醇处理 PC-3 细胞后 P62 表达降低($P=0.003, P=0.000, P=0.000$),LC3-II 表达增强($P=0.002, P=0.000, P=0.000$),RT-PCR 结果显示多西紫杉醇处理 PC-3 细胞后可引起细胞 Beclin-1 mRNA 水平的上调($P=0.000, P=0.000, P=0.000$)。**结论:**多西紫杉醇可以有效抑制前列腺癌 PC-3 细胞的增殖并诱导自噬,其发生可能与通过上调 Beclin-1 的 mRNA 水平有关。

【关键词】前列腺癌;多西紫杉醇;自噬;PC-3**【中图分类号】**R697.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-10-09

Research of autophagy induced by docetaxel in prostate cancer cell line PC-3

Huang Peng, Gou Xin, He Weiyang, Luo Yong

(Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the autophagy induced by docetaxel in prostate cancer cell line PC-3 and to explore its possible mechanism. **Methods:** PC-3 cells cultured in vitro were treated with docetaxel. Proliferation inhibition rate of PC-3 cells was assayed by MTT; ultra-structural cellular changes were observed by transmission electron microscope(TEM); levels of sequestosome 1/SQSTM1 (P62) and microtubule-associated protein 1 light chain 3 type II (LC-3 II) protein were detected by Immunofluorescence and Western blot, qualitatively and quantitatively; level of mRNA of autophagy gene Beclin-1 was detected by RT-PCR. **Results:** After docetaxel treatment, proliferation of PC-3 cells was inhibited effectively($F=58.684, P=0.000$). Autophagy could be observed in prostate cancer PC-3 cells treated with 10^{-6} mol/L docetaxel after 24 h. TEM examination revealed the appearance of autophagosome with double-membrane structure. Immunofluorescence and Western blot showed that expression of LC-3 II was increased($P=0.002, P=0.000, P=0.000$) in PC-3 cells after being treated with docetaxel and expression of P62 was decreased($P=0.003, P=0.000, P=0.000$). RT-PCR showed that levels of mRNA of Beclin-1 were increased by docetaxel($P=0.000, P=0.000, P=0.000$). **Conclusion:** Docetaxel could inhibit the growth of PC-3 cells and induce the appearance of autophagy in PC-3 cells, and the possible mechanism of autophagy induced by docetaxel is related to the increase of Beclin-1 mRNA.

【Key words】prostate cancer; docetaxel; autophagy; PC-3

前列腺癌是发生于男性前列腺的恶性肿瘤,在欧美等发达国家和地区居于男性恶性肿瘤发病率首位,其死亡率居各种癌症的第 2 位;在我国,其发病率低于西方国家,但近年来呈迅速上升趋势。现代治疗观点为多模式治疗,包括放疗、手术切除,但

这 2 种疗法对于晚期前列腺癌病人疗效不佳。晚期病人主要用内分泌疗法以及化疗^[1]。近年来,化疗药物紫杉类已应用于临床,可以抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡。自噬又名 II 型细胞程序性死亡,广泛存在于真核细胞中,参与调控细胞的生长,并调节维持细胞内环境稳定^[2-3]。研究表明,自噬与肿瘤的发生发展有着密切的关系。多西紫杉醇作为紫杉类药物,是前列腺癌的主要化疗药物,但关于多西紫杉醇是否诱导前列腺癌细胞发生自噬,目前尚未

作者介绍:黄 彭, Email: 709139159@qq.com,

研究方向:泌尿系肿瘤。

通信作者:苟 欣, Email: gouxinq@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000164.html>

见文献报道^[4]。本课题组研究多西紫杉醇能否诱导前列腺癌 PC-3 细胞发生自噬,并初步探讨其作用机制,为临床更加合理应用化疗方案提供参考及理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

前列腺癌细胞株 PC-3 细胞由重庆医科大学生命科学院赠予;多西紫杉醇购自浙江万马制药公司,用 PBS 溶解,配制存储液存储于 -20 ℃,胎牛血清购自 Hyclone 公司,DMEM-F12 培养液购自 Gibco 公司。MTT 购自华美生物有限公司, PBS、胰酶粉剂购自武汉博士德公司,鼠抗人 P62 抗体购自 BD 生物,兔抗人 LC-3 II 抗体购自 Sigma-Aldrich 公司,抗人 FITC 荧光二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司,RT-PCR 试剂盒购自 TAKARA。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 前列腺癌 PC-3 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基中,在 37 ℃,5% CO₂ 饱和湿度培养箱中常规传代培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测多西紫杉醇对 PC-3 细胞增殖的影响 取对数生长期的前列腺癌 PC-3 细胞,待细胞生长 80% 时,用 2.5% 胰酶消化细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液配制成 2×10^4 个/ml 细胞浓度的单细胞悬液,接种在 96 孔培养板中,每孔 200 μ l,待细胞贴壁后,分别加入 20 μ l 已配成不同浓度的多西紫杉醇工作液,使其在各个孔中的终浓度分别为 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L,另设对照组不加多西紫杉醇,加入 20 μ l PBS,每个浓度组及对照组均设 5 个复孔,放入孵箱培养。于 24 h 后取出,加入 20 μ l 5 mg/ml 的 MTT 溶液,37 ℃ 继续孵育 4 h 后终止培养,吸去上清加入 150 μ l DMSO,震荡 10 min,以充分溶解结晶,混匀后用酶标仪在 570 nm 波长下测定各孔吸光度(absorbance, A)值,实验重复 3 次,取均值。计算各组细胞生长抑制率,增值抑制率 = $(1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{细胞对照组}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 透射电镜扫描 取对数生长期 PC-3 细胞,调整好细胞密度后接种于培养瓶中,每瓶 4 ml 细胞悬液,细胞贴壁后加入多西紫杉醇,使多西紫杉醇终浓度为 10^{-6} mol/L,另设一空白对照组,处理 24 h 后收集细胞。PBS 离心洗涤 2 次,1 000 r/min,5 min,然后将细胞收集于离心管中,加入 2.5% 戊二醛固定 2 h, PBS 洗 3 遍,再用 4 ℃ 预冷的 1% 锇酸固定 1 h,丙酮脱水,树脂包埋,超薄切片(50 nm),醋酸铀和枸橼酸铅双染色后,投射电镜观察细胞超微结构并摄像。

1.2.4 免疫荧光 取对数生长期前列腺癌 PC-3 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液配制成 2×10^4 个/ml 的细胞悬浮液,加入提前放入已消毒的玻片的 24 孔板中,做细胞爬片。每孔 500 μ l,分为对照组和 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 药物组。培养 24 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞。按照免疫荧光步

骤染色,50% 甘油封片,用激光共聚焦显微镜观察荧光表达强弱。

1.2.5 Western blot 分组同上,分别收集各组细胞, PBS 洗涤,离心,加裂解液提取蛋白。检测蛋白浓度,变性后每组取等量蛋白(20 μ g)进行 SDS-PAGE 电泳分离,将蛋白转移至 PDVF 膜上,脱脂奶粉封闭 4 h 后,加入适当稀释浓度的一抗,过夜,复温 1 h, TBS-T 洗涤 3 次,每次 15 min,再滴加适当稀释的二抗,结合 2 h, TBS-T 洗涤后显色、曝光。

1.2.6 RT-PCR 取对数生长期 PC-3 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液配制成 2×10^4 个/ml 的细胞悬浮液,加入 6 孔板中,每孔 1 000 ml,分组同 1.2.4。药物处理 24 h 后提取 RNA,逆转录成 cDNA 后进行 PCR 扩增,扩增条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。反应结束后,取反应液进行琼脂糖凝胶电泳,以确认反应产物。引物序列:Beclin-1(159 bp)F:5'-CTGAGGGATGGAAGGGTC-3', R:5'-AAAGGGTGTAAACCG-AACTAA-3'; GAPDH, F:5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3', R:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'。

1.3 统计方法

应用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析检验,两两比较用 LSD-*t* 检验,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 多西紫杉醇抑制 PC-3 细胞增殖

用不同浓度多西紫杉醇处理 PC-3 细胞 24 h,细胞增殖受到不同程度的抑制:(1)随着剂量增加,细胞生长抑制率升高,呈剂量依赖性,组间有统计学差异。(2) 10^{-7} mol/L 以上浓度的多西紫杉醇对前列腺癌 PC-3 细胞有明显的生长抑制作用,抑制率 > 35.35%,故选取 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L 多西紫杉醇处理细胞 24 h 后检测各项自噬相关指标(表 1)。

表 1 不同浓度多西紫杉醇体外作用 24 h 对前列腺癌 PC-3 细胞增殖的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of different concentrations of docetaxel on cell proliferation of PC-3 cells after 24 h ($n=5, \bar{x} \pm s$)

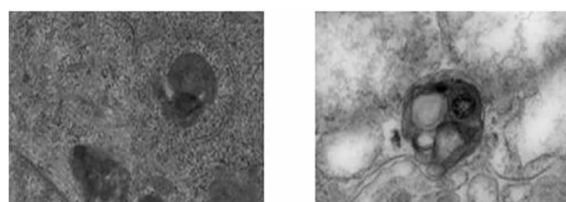
组别	药物浓度(mol/L)	抑制率(%)	F 值和 P 值
多西紫杉醇 1 组	10^{-9}	18.01 ± 0.47^a	
多西紫杉醇 2 组	10^{-8}	21.13 ± 0.09	
多西紫杉醇 3 组	10^{-7}	35.35 ± 0.70^a	$F=58.684$
多西紫杉醇 4 组	10^{-6}	46.51 ± 0.43^a	$P=0.000$
多西紫杉醇 5 组	10^{-5}	56.84 ± 0.51^a	

注:a,组间差异 $P < 0.05$ ($P_{1,2}=0.032$; $P_{1,3}=0.000$; $P_{1,4}=0.000$; $P_{1,5}=0.000$; $P_{2,3}=0.000$; $P_{2,4}=0.000$; $P_{2,5}=0.000$; $P_{3,4}=0.002$; $P_{3,5}=0.000$; $P_{4,5}=0.003$)

2.2 多西紫杉醇诱导 PC-3 细胞发生自噬

在透射电镜下观察,对照组细胞内细胞膜,细胞器,细胞核等结构均正常,未发现自噬体结构;而实验组多西紫杉醇

给药 24 h 后,观察到胞质中出现大的膜状空泡,其典型结构为双层膜结构,并弯曲延展,包裹部分胞质成分和细胞器(图1)。



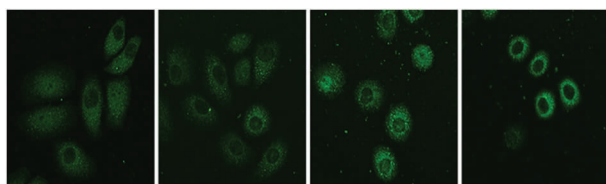
A. 对照组 B. 多西紫杉醇 4 组

图 1 PC-3 细胞的超微结构 (Bar=200 nm)

Fig.1 Ultra-structure of PC-3 cells (Bar=200 nm)

2.3 免疫荧光

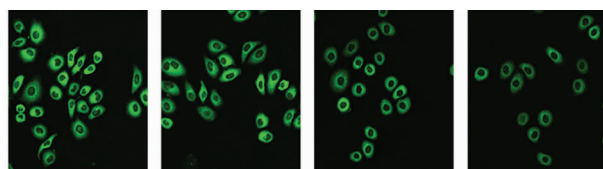
如图 2 所示,与对照组相比,随着浓度增加,绿色荧光标记的自噬标志蛋白 LC-3 II 荧光强度逐渐增强(图 2),P62 蛋白荧光强度逐渐较弱(图 3), 10^{-6} mol/L 多西紫杉醇处理 24 h 后诱导 PC-3 细胞自噬率约为 33%,与对照组相比有统计学差异($P=0.000$)(图 4)。



A. 对照组 B. 多西紫杉醇 3 组 C. 多西紫杉醇 4 组 D. 多西紫杉醇 5 组

图 2 多西紫杉醇对前列腺癌 PC-3 细胞 LC3-II 表达的影响 (400 ×)

Fig.2 Effects of docetaxel on expression of LC3-II in PC-3 cells (400 ×)



A. 对照组 B. 多西紫杉醇 3 组 C. 多西紫杉醇 4 组 D. 多西紫杉醇 5 组

图 3 多西紫杉醇对前列腺癌 PC-3 细胞 P-62 表达的影响 (200 ×)

Fig.3 Effects of docetaxel on expression of P62 in PC-3 cells (200 ×)

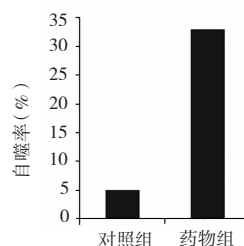
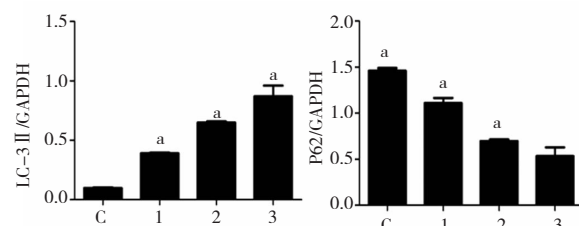
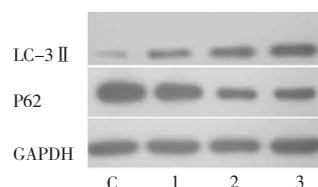


图 4 多西紫杉醇诱导自噬率

Fig.4 Rate of autophagy induced by docetaxel

2.4 Western blot

如图 5 显示,与对照组相比,多西紫杉醇处理细胞后引起自噬标志蛋白 LC-3 II 表达明显增强,P62 蛋白表达减弱,与对照组比较有统计学差异($F=52.799$, $P=0.002$),各处理组间比较差异具有统计学意义($P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.004$)。



C. 对照组;1. 多西紫杉醇 3 组;2. 多西紫杉醇 4 组;3. 多西紫杉醇 5 组

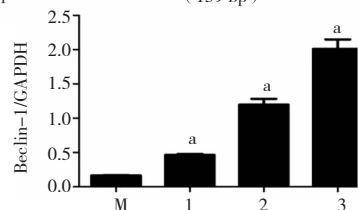
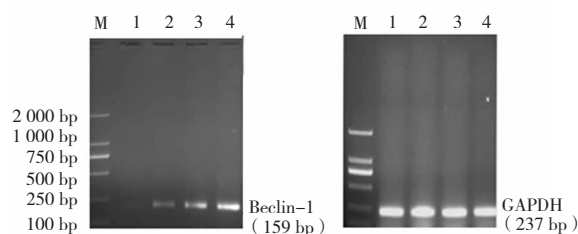
a: 处理组与对照组相比, $P<0.05$,各组间比较均 $P<0.05$

图 5 多西紫杉醇对前列腺癌 PC-3 细胞 LC-3 II, P-62 蛋白表达的 Western blot

Fig.5 Effects of docetaxel on expression of autophagy-related proteins: LC3-II and P62 in PC-3 cells detected by Western blot

2.5 RT-PCR

如图 6 所示,对照组 Beclin-1 表达较弱,多西紫杉醇处理细胞后能导致 Beclin-1 基因 mRNA 水平提高,且随着浓度的增加,表达增强($F=99.988$, $P=0.000$,各组间比较差异 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$)。



M. Marker (DL2000);1. 多西紫杉醇 3 组;2. 多西紫杉醇 4 组;

3. 多西紫杉醇 5 组

a: 处理组与对照组相比, $P<0.05$,各组间比较均 $P<0.05$

图 6 多西紫杉醇对前列腺癌 PC-3 细胞对 Beclin-1 mRNA 表达的影响

Fig.6 Effects of docetaxel on expression of Beclin-1 mRNA in PC-3 cells

3 讨论

虽然前列腺癌在我国的发病率远低于欧美等发达国家和地区,但是随着生活水平的提高,体检意识的增强,近年来我国前列腺癌发病率显著上升,严重影响我国男性健康水平和生活质量^[5]。由于患者认知和诊疗水平的局限,很多病人在发现时已进入中晚期。内分泌治疗及化疗成为主要治疗手段,然而化疗药物耐药却严重限制了化疗效果;化疗药物耐药的原因很多,自噬是目前发现的导致化疗药物抵抗的重要原因^[6]。自噬广泛存在于真核细胞中,细胞可以通过自噬形成自噬溶酶体,能清除衰老变性的细胞和细胞内过量或受损的细胞器、蛋白质与核酸等生物大分子物质,并予以回收利用,对细胞的生长发育和调节细胞内环境的稳定起着重要作用。研究表明,自噬在肿瘤的发生发展过程中发挥着重要作用。目前普遍认为自噬是一种防御和应激调控机制^[7]。LC-3 是哺乳动物细胞中酵母 Atg8 的同源物,分为 LC-3 I 型和 LC-3 II 型,LC-3 I 型位于胞浆,LC-3 II 型定位于自噬体膜上,是自噬体的标志分子^[8]。P62 蛋白在自噬过程中发挥着重要作用,可以连接 LC-3 蛋白并且泛素化底物,并由自噬溶酶体降解,与自噬水平呈负相关,可用于自噬的检测^[9]。Beclin-1 是酵母自噬相关基因 Atg6 的哺乳动物细胞同源基因,是自噬的关键因子之一,对自噬体的形成至关重要^[10-11]。随着自噬研究的深入,其在肿瘤发生发展过程中的作用也日益引起人们的关注。近年来大量研究表明,化疗药物不仅可以导致肿瘤细胞的凋亡,还可以诱导肿瘤细胞发生自噬。多西紫杉醇是一种紫杉类衍生物,对多种肿瘤细胞具有较强的抑制作用,在临床中也已得到广泛应用,但其是否会诱导前列腺癌细胞发生自噬还未见报道。本实验结果显示:多西紫杉醇能有效抑制前列腺癌 PC-3 细胞的增殖,终浓度在 10^{-7} mol/L 至 10^{-5} mol/L 的多西紫杉醇处理细胞 24 h 后均出现显著的抑制现象,具有明确的剂量依赖性。同时,透射电镜下观察到有自噬体的形成;免疫荧光和 Western blot 结果均显示多西紫杉醇处理细胞后 LC-3 II 表达增强,P62 表

达下降,表明多西紫杉醇能诱导前列腺癌 PC-3 细胞发生自噬。RT-PCR 显示正常对照组细胞 Beclin-1 表达较弱,用多西紫杉醇处理细胞后,与对照组比较,PC-3 细胞 Beclin-1 表达明显增强,与本实验发现的多西紫杉醇诱导的自噬水平成正相关。因此,推测多西紫杉醇抑制 PC-3 细胞增殖,诱导 PC-3 细胞发生自噬,可能与上调自噬基因 Beclin-1 的表达有关,而至于自噬在其中的作用以及作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Chen FZ,Zhao XK.Prostate cancer;current treatment and prevention strategies[J].Iran Red Crescent Med J,2013,15(4):279-284.
- [2] Rabinowitz JD,White E.Autophagy and metabolism[J].Science,2010,330(6009):1344-1348.
- [3] Baehrecke EH.Autophagy;dual roles in life and death[J].Nat Rev Mol Cell Biol,2005,6(6):505-510.
- [4] Jr Lara PN,Evans CP.Dasatinib and docetaxel in advanced prostate cancer[J].Lancet Oncol,2013,14(13):1248-1249.
- [5] Tefekli A,Tunc M,Tugcu V,et al.Prostate cancer;all aspects[J].Scientific World Journal,2013,2013:265234.
- [6] Liu B,Cheng Y,Liu Q,et al.Autophagic pathways as new targets for cancer drug development[J].Acta Pharmacol Sin,2010,31(9):1154-1164.
- [7] Mizushima N,Levine B,Cuervo AM,et al.Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J].Nature,2008,451(7182):1069-1075.
- [8] Holt SV,Wyspianska B,Randall KJ,et al.The development of an immunohistochemical method to detect the autophagy-associated protein LC3-II in human tumor xenografts[J].Toxicol Pathol,2011,39(3):516-523.
- [9] Bjorkoy G,Lamark T,Brech A,et al.p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death[J].J Cell Biol,2005,171(4):603-614.
- [10] Wang RC,Wei Y,An Z,et al.Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation[J].Science,2012,338(6109):956-959.
- [11] He W,Wang Q,Xu J,et al.Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation[J].Autophagy,2012,8(12):1811-1821.

(责任编辑:冉明会)