

TCP1- β 在雄激素非依赖性前列腺癌细胞增殖中的作用

刘亚伟¹, 赵明², 刘刚², 邓新军², 何敏毅^{2*}

(¹南方医科大学南方医院神经外科, 广东 广州 510515; ²南方医科大学珠江医院器官移植科, 广东 广州 510282)

[摘要] 目的: 探讨 TCP1- β 在雄激素非依赖性前列腺癌细胞(AIPC)增殖中的作用。方法: 选择雄激素依赖性的前列腺癌细胞系 LnCap 和雄激素非依赖性的前列腺癌细胞系 PC3 作为模型, 用不含酚红的培养基和活性炭吸附过的血清培养 LnCap 和 PC3 细胞, 检测其对雄激素的依赖性; 采用 RNA 干扰(RNAi)技术抑制 PC3-Ad 和 LnCap 细胞的 TCP1- β 表达, Q-PCR、Western blot 方法检测 TCP1- β 的表达变化; MTT 方法检测细胞存活率; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; 并用生物信息学方法探讨可能参与 TCP1- β 调控 AIPC 增殖的信号通路。结果: ① 撤除雄激素后, LnCap 细胞增殖受到显著抑制, 而 PC3 细胞增殖未受明显影响; ② 转染 TCP1- β 的 siRNA 后, PC3-Ad 和 LnCap 细胞的 TCP1- β 表达受到显著抑制 ($P = 0.002, P = 0.006$); ③ PC3-Ad 的 TCP1- β 表达受到显著抑制后, 细胞的增殖受到抑制 ($P = 0.015$), 但是细胞没有出现明显凋亡; TCP1- β 表达抑制对 LnCap 细胞的增殖和凋亡都没有产生显著影响; ④ TCP1- β 可能参与了 PI3K/Akt 信号通路对 AIPC 增殖的调控作用。结论: TCP1- β 过表达可能参与了 AIPC 细胞的增殖调控。

[关键词] TCP1- β ; 前列腺癌; 雄激素

[中图分类号] R737.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1333-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20131001

The role of TCP1- β in the proliferation of androgen-independent prostate cancer

Liu Yawei¹, Zhao Ming², Liu Gang², Deng Xinjun², He Minyi^{2*}

(¹Department of Neurosurgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515; ²Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of TCP1- β in the proliferation of androgen-independent prostate cancer (AIPC). **Methods:** Androgen-dependent prostate cancer (ADPC) cell line LnCap and AIPC cell line PC3 were chosen as a model. Phenol-red free medium and FBS that was depleted of steroids by charcoal/dextran-treatment were used for the cell culture, to detect the androgen dependence of the cells. RNAi was used to inhibit the TCP1- β expression of PC3-Ad and LnCap cells. Q-PCR and Western blot were used to detect the expression of TCP1- β . The viability or apoptosis of PC3-Ad and LnCap cells was determined by MTT or flow cytometry (FCM) method. STRING was used to analyze the interaction between TCP1- β and AR. **Results:** The proliferation of LnCap but not PC3 cells was inhibited by androgen deletion. The expression of TCP1- β was significantly decreased when PC3-Ad and LnCap cells were transfected with siRNA of TCP1- β ($P < 0.05$). The proliferation of PC3-Ad but not LnCap cells was significantly inhibited when TCP1- β expression was inhibited ($P = 0.002, P = 0.006$). No significant apoptosis was detected in both PC3-Ad and LnCap cells when TCP1- β expression was inhibited ($P = 0.015$). **Conclusion:** Over-expression of TCP1- β may involved into the regulation of AIPC proliferation.

[Key words] TCP1- β ; prostate cancer; androgen

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10): 1333-1338]

[基金项目] 国家自然科学基金(81302229); 广东省医学科研基金 (B2013247); 广东省自然科学基金博士启动基金 (S2012040007081); 南方医科大学“科研启动计划”

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: hmy705@fimmu.com

前列腺癌是男性泌尿生殖系常见恶性肿瘤之一, 在美国位居男性恶性肿瘤之首, 是男性死亡原因的第 2 位。随着我国人民的饮食结构和生活习惯与西方差别的逐渐缩小, 前列腺癌在我国的发病率也

逐年增加^[1]。

前列腺癌细胞的生长依赖于雄激素的存在。雄激素阻断疗法(去势疗法)治疗可以抑制肿瘤生长,且绝大多数患者可无病生存1.5~3.0年,但此后肿瘤往往复发,获得雄激素非依赖性增殖的能力^[2]。通常,临床上将雄激素完全阻断后仍有进展的前列腺癌称为雄激素非依赖性前列腺癌(androgen-independent prostate cancer, AIPC)^[3]。对AIPC当前的治疗手段有限,预后很差。深入揭示AIPC的发生机制,是预防和治疗AIPC的关键^[4]。

本课题组用蛋白质组学方法比较了雄激素依赖性前列腺癌(androgen-dependent prostate cancer, ADPC) LnCap细胞系在雄激素撤除前后蛋白质谱的差异,发现当撤除雄激素后, LnCap细胞的T-complex protein 1 subunit beta (TCP1- β)蛋白表达下调。TCP1- β 作为一种分子伴侣是TCP-1分子伴侣复合体(chaperonin containing TCP1 complex, CCT)的一个成员, CCT也称为TCP1环复合体(TCP1 ring complex, TRiC)。CCT与Bardet-Biedl综合征(Bardet-Biedl syndrome, BBS)复合体形成BBS/CCT复合体,参与actin和tubulin的折叠,在BBSome的组装中发挥重要作用。BBSome是参与纤毛发生的一种复合体,由7种BBS蛋白组成:BBS1、BBS2、BBS4、BBS5、BBS7、BBS8和BBS9^[5-6]。已有报道表明TCP1参与肿瘤耐药性产生等机制^[7-8],而是否参与AIPC细胞的发生发展机制并不清楚。本文拟对TCP1- β 是否影响AIPC细胞的增殖能力进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

ADPC细胞系LnCap、AIPC细胞系PC3由本实验室保存。胎牛血清、含酚红RPMI1640培养液、无酚红RPMI1640培养液购自美国Gibco公司;磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国Hyclone公司;活性炭/右旋糖酐吸附的无激素胎牛血清(depleted of steroids by charcoal/dextran-treatment, CDS FBS)购自以色列Biological Industry公司;甲基偶氮唑蓝[3-(4,5)-dimethylthiazolyl-3,5-di-phenyltetrazoliumromide, MTT]、胰蛋白酶均为美国Sigma公司产品;TRIzol、转染试剂Lipofectamine 2000购自美国Invitrogen公司;兔抗TCP1- β 单克隆抗体(ab92746)购自美国Abcam公司;内参照 β -actin一抗、羊抗兔二抗均购自上海碧云天公司;SYBR PrimeScript Real Time RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

LnCap、PC3细胞系常规用含10%胎牛血清的RPMI1640培养基,于37℃ 5% CO₂饱和湿度条件下培养,0.25%胰蛋白酶消化传代。撤除雄激素的LnCap、PC3细胞用含10% CDS FBS的无酚红RPMI1640培养基,于37℃ 5% CO₂饱和湿度条件下培养,用无酚红的0.25%胰蛋白酶消化传代。撤除雄激素培养的LnCap、PC3分别称为LnCap-Ad、PC3-Ad。

1.2.2 TCP1- β siRNA 转染

按照Lipofectamine 2000的操作手册将TCP1- β 的siRNA片段转染至LnCap细胞和PC3-Ad细胞,分别进行Q-PCR、Western blot和MTT检测。

1.2.3 MTT检测细胞增殖情况

LnCap、LnCap-Ad、PC3-Ad细胞铺至96孔板,分别培养24、48、72、96 h,每个时间梯度9个复孔。每孔加入20 μ l MTT(5 mg/ml)溶液,避光孵育4 h。终止孵育,吸去孔内培养液。每孔加入150 μ l 二甲基亚砷,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。以酶联免疫检测仪于490 nm(570 nm)处测量各孔的吸光度值。本实验重复3次。

LnCap、PC3-Ad细胞培养至对数生长期后铺96孔板,分别分为3个组,每组9个孔:①空白组:不转染;②阴性对照组:转染阴性对照RNA片段(NC);③siRNA转染组:转染TCP1- β 的siRNA片段。培养24 h后,按照转染试剂说明书转染相应RNA片段,继续培养72 h后进行MTT检测。

1.2.4 实时荧光定量聚合酶链式反应(Q-PCR)

比较LnCap、LnCap-Ad、PC3-Ad细胞以及转染siRNA后的LnCap、PC3-Ad细胞TCP1- β 表达情况。提取各组细胞总RNA,逆转录得到cDNA,以cDNA为模板应用TCP1- β 的引物和GAPDH的引物进行Q-PCR扩增。Q-PCR参照SYBR PrimeScript Real Time RT-PCR试剂盒说明书操作,确定反应条件后,30 s开始循环,共40循环,每个循环第2步结束后进行荧光的检测。按上述反应体系加样,每个样品做3个复孔,然后将样品置于荧光定量仪上,根据设定好的程序进行反应,运用Stratagene Mx3005p软件进行实时数据收集和定量分析。

1.2.5 Western blot 检测

比较LnCap、LnCap-Ad、PC3-Ad细胞相应培养条件下,以及转染siRNA后LnCap、PC3-Ad细胞TCP1- β 表达情况。将待测细胞等量蛋白加入5 μ l 4 \times 上样缓冲液95℃煮5 min变性后,行12% SDS-

PAGE 电泳,然后电转移至 PVDF 膜上,再用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液 4℃孵育进行封闭过夜, TBST 缓冲液漂洗后,PVDF 膜在室温下用兔源 TCP1-β 单克隆抗体(1:1 000 稀释)孵育 1 h,经 TBST 缓冲液漂洗 3 次,再与 HRP 偶联的羊抗兔 IgG 二抗(1:2 000)室温下孵育 1 h,TBST 缓冲液漂洗 3 次,然后再与化学发光剂反应 1 min,在 Kodak IS2000R 多功能图像工作站采集结果。实验以 β-actin 作为内参照。实验结果采用仪器附带的软件分析系统进行分析,条带的灰度值用面积×密度代表,设置对照组为 100%,其他各组与其相比得出相对光密度值。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡

LnCap、PC3-Ad 细胞铺 6 孔板 5×10^4 个/孔,培养 24 h 后各分为 2 组:转染 NC(阴性对照组)和转染 TCP1-β 的 siRNA(TCP1-β 表达抑制组)。细胞转染完成 48 h 后,消化细胞,每样本细胞数调整为 5×10^6 个/ml,3 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液。用 PBS 洗涤 1 次,3 000 r/min 离心 5 min。加入 400 μl 的结合缓冲液悬浮细胞,加入 5 μl Annexin V-FITC,混匀后再加入 5 μl 碘化丙啶(propidium iodide,PI),混匀,室温避光反应 5~15 min。流式细胞仪检测激发光波长用 488 nm,用波长为 515 nm 的通带滤器检测 FITC 荧光,另一波长 > 560 nm 的滤器检测 PI。

1.2.7 TCP1-β 信号通路分析

采用网络资源 STRING (<http://string-db.org/>) 分析 TCP1-β 调控 AIPC 增殖可能参与的细胞信号转导通路。输入检索词雄激素受体 (androgen receptor, AR)和 TCP1,种属为人。

1.3 统计学方法

统计分析采用 SPSS19.0 统计软件包完成。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,当方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析和析因分析,两两比较用 LSD 方法;方差不齐时,多组间比较用 Welch 方法,两两比较用 Dunnett's T3 方法;以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 撤除雄激素对 LnCap、PC3 细胞增殖的影响

MTT 实验检测了撤除雄激素对 LnCap、PC3 细胞增殖的影响(表 1)。经析因分析发现,LnCap-Ad、LnCap 与 PC3-Ad3 组间细胞增殖率的差异有统计学意义($F = 48.178, P < 0.001$),各组的 4 个处理时间点间增殖率的差异有统计学意义 ($F = 56.225, P < 0.001$),且两个因素存在交互效应 ($F = 3.230, P = 0.006$)。进一步进行多重比较单独效应时,LnCap-Ad 组与 LnCap 组、PC3-Ad 组差异均有统计学意义($P < 0.05$),LnCap-Ad 细胞几乎不增殖,其 24、48、72、96 h 增殖率显著低于常规培养基培养的 LnCap 细胞和撤除雄激素培养的 PC3 细胞(PC3-Ad)。

2.2 撤除雄激素对 LnCap 和 PC 细胞 TCP1-β 表达水平的影响

Q-PCR 实验表明:TCP1-β 在 LnCap 组、LnCap-Ad 组和 PC3-Ad 组中的表达差异有显著统计学意义($F = 11.839, P = 0.008$)。多重比较显示,相对于 LnCap 和 PC3-Ad 细胞,LnCap-Ad 细胞的 TCP1-β 表达水平显著下调($P < 0.05$,图 1A)。Western blot 检测结果与 Q-PCR 检测结果一致(图 1B)。这些结果表明撤除雄激素后,ADPC 细胞LnCap 的 TCP1-β 表达水平显著下调。

2.3 抑制 TCP1-β 表达对 LnCap 细胞和 PC3-Ad 细胞增殖的影响

以 LnCap 细胞和 PC3-Ad 细胞为研究对象,转染 TCP1-β 的特异性 siRNA 片段,24 h 后用 Q-PCR 和 Western blot 检测 TCP1-β 表达情况。以 Blank 组和 NC 组为空白对照组,分别与 PC3-Ad 细胞和 LnCap 细胞中的 siRNA 组比较,显示差异有统计学意义 ($t = -20.785, P = 0.002, t = -13.299, P = 0.006$),siRNA 组的 TCP1-β 显著低于 Blank 组和 NC 组。表明 TCP1-β 表达水平在两种细胞中均显著降低(图 2)。

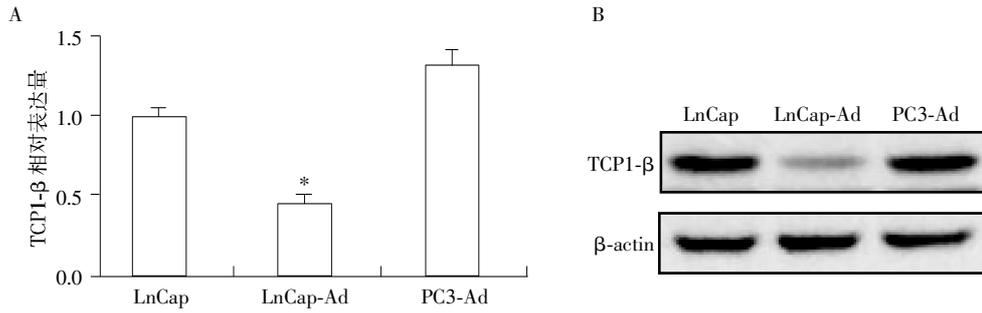
用 MTT 法检测 TCP1-β 表达抑制后,LnCap 细

表 1 3 组细胞不同时间点吸光度值变化

Table 1 The absorbance values of the three groups of cells at different time points ($\bar{x} \pm s, n=8$)

分组	吸光度值			
	24 h	48 h	72 h	96 h
LnCap	0.47 ± 0.06 [#]	0.77 ± 0.16 [#]	0.97 ± 0.10 [#]	1.03 ± 0.25 [#]
LnCap-Ad	0.39 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.58 ± 0.14	0.63 ± 0.15
PC3-Ad	0.48 ± 0.07 [#]	0.75 ± 0.14 [#]	0.98 ± 0.14 [#]	1.01 ± 0.19 [#]

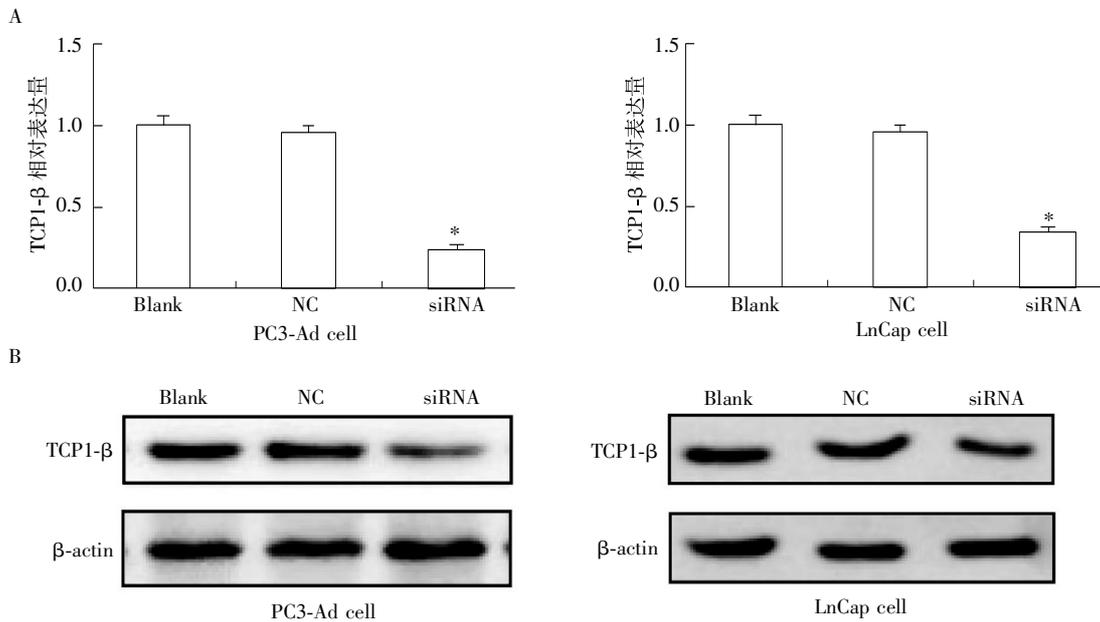
与 LnCap-Ad 组比较, [#] $P < 0.001$ 。



A: Q-PCR; B: Western blot. 与其他两组比较, * $P < 0.05$ 。

图1 LnCap、LnCap-Ad、PC3-Ad 细胞 TCP1-β 表达分析(Q-PCR 和 Western blot)

Figure 1 Expression of TCP1-β in LnCap, LnCap-Ad and PC3-Ad detected by Q-PCR and Western blot



A: Q-PCR 检测 PC3-Ad 和 LnCap 细胞中 TCP1-β 表达; B: Western blot 检测 PC3-Ad 和 LnCap 细胞中 TCP1-β 表达。与空白对照组(Blank 组和 NC 组)比较, * $P < 0.05$ 。

图2 转染 siRNA 对 TCP1-β 表达的影响

Figure 2 The effect of siRNA on the expression of TCP1-β

胞和 PC3-Ad 细胞的增殖水平变化。结果表明:在 TCP1-β siRNA 转染 72 h 后,PC3-Ad 细胞吸光度值显著降低($P < 0.05$),表明该组细胞增殖受到显著抑制;而 LnCap 细胞各组间增殖没有明显改变($F = 0.847, P = 0.441$,表 2)。

表 2 MTT 检测 PC3-Ad 细胞和 LnCap 细胞的增殖
Table 2 The proliferation of PC3-Ad and LnCap cells
($\bar{x} \pm s, n=9$)

分组	PC3-Ad	LnCap
Blank	0.89 ± 0.11 [▲]	0.93 ± 0.24
NC	0.85 ± 0.16 [▲]	0.86 ± 0.16
siRNA	0.69 ± 0.15	0.98 ± 0.20

与 siRNA 组比较, [▲] $P < 0.05$ 。

2.4 抑制 TCP1-β 表达对 LnCap 细胞和 PC3-Ad 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测 TCP1-β 表达抑制后, LnCap 和 PC3-Ad 细胞的凋亡情况,结果表明:无论 LnCap 细胞还是 PC3-Ad 细胞,在 siRNA 转染 48 h 后,相对于阴性对照组,细胞凋亡没有明显改变(图 3)。

2.5 TCP1-β 调控 AIPC 增殖的细胞信号通路分析

用网络资源 STRING 进行 TCP1 与 AR 相互作用分析,发现二者之间可能存在间接的相互作用。以二者作为检索目标获得的蛋白质相互作用网络中, Akt 和 HSP90α (HSP90AA1) 将二者联系起来(图 4)。

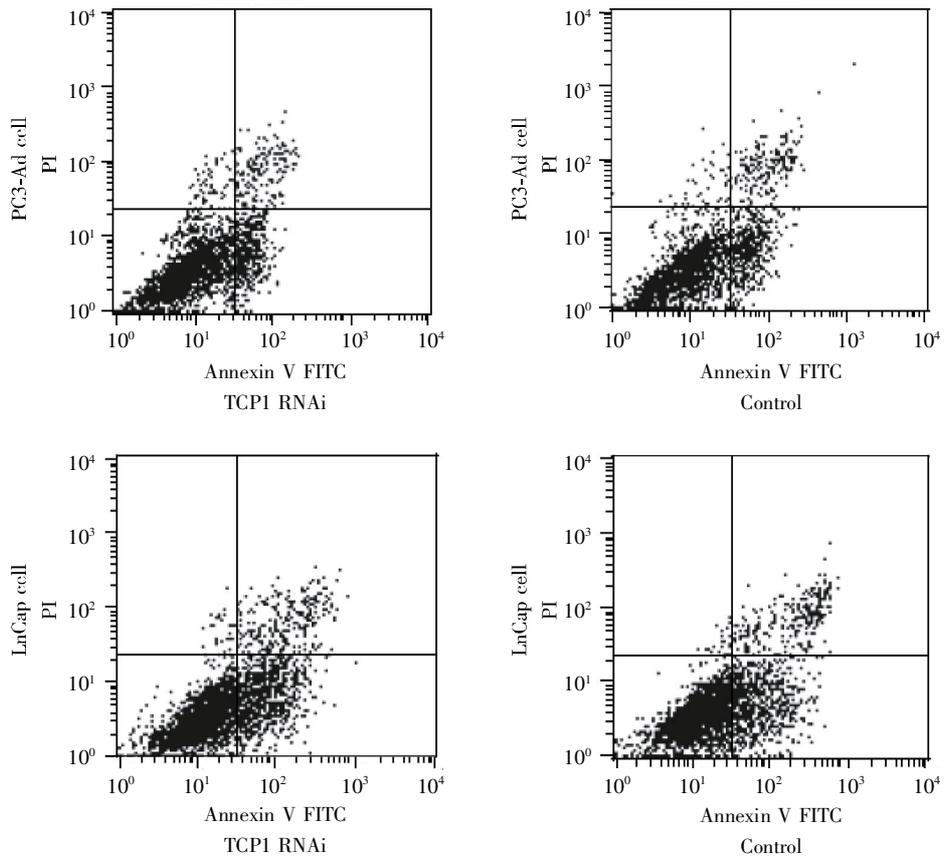


图 3 TCP1- β 表达对 PC3-Ad 和 LnCap 细胞凋亡的影响

Figure 3 The effect of TCP1- β expression on the apoptosis of PC3-Ad and LnCap cells

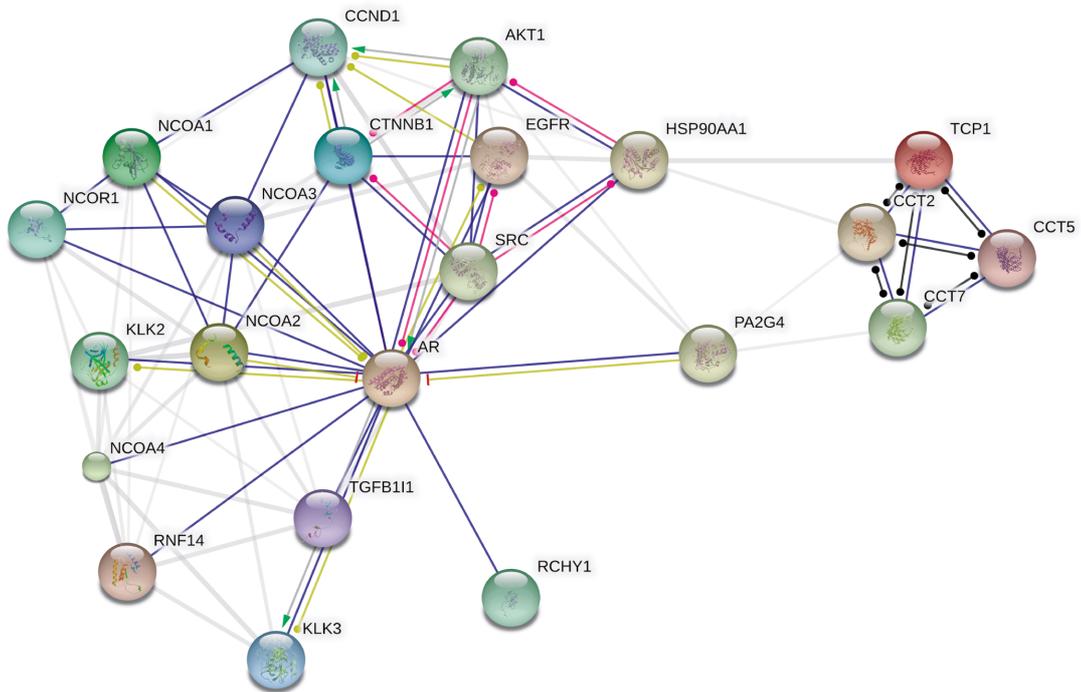


图 4 TCP1- β 和 AR 相互作用分析 (STRING)

Figure 4 The interaction analysis of TCP1- β and AR by STRING

3 讨论

前列腺癌细胞的生长依赖于雄激素的存在,自1941年 Huggins 和 Hodges^[9]提出前列腺癌是一种对雄激素敏感的疾病后,雄激素阻断疗法就已经成为转移性前列腺癌患者的首选治疗方法。最初,雄激素阻断或雄激素对抗疗法几乎对所有晚期前列腺癌患者均有效。但事实上,都会因为雄激素非依赖性或去势抵抗性前列腺癌细胞的生长而复发。

本课题组前期利用功能蛋白质组学策略发现:TCP1- β 蛋白在撤除雄激素的环境中培养的 ADPC 细胞中表达显著下降,提示 TCP1- β 可能在 AIPC 的发生发展中发挥一定作用。为了对该假说进行验证,本研究选择了 ADPC 细胞系 LnCap 细胞和 AIPC 细胞系 PC3 细胞作为研究对象,探讨 TCP1- β 在 AIPC 细胞增殖中的作用。

首先用撤除雄激素的培养条件培养两种细胞(LnCap-Ad、PC3-Ad),增殖实验表明,撤除雄激素后,LnCap 细胞增殖受到显著抑制,而 PC3 细胞增殖不受影响。进而发现相对于 LnCap-Ad、PC3-Ad 细胞中 TCP1- β 蛋白表达增高,这提示该蛋白与 AIPC 细胞的增殖具有相关性。用特异性 siRNA 片段抑制 TCP1- β 蛋白在 PC3-Ad 和 LnCap 细胞中的表达,发现 PC3-Ad 细胞增殖受到明显抑制,而 LnCap 细胞增殖没有受到明显影响。这验证了 TCP1- β 参与 AIPC 细胞增殖的假说。同时检测了 TCP1- β 表达对 PC3-Ad 和 LnCap 细胞凋亡的影响,发现 TCP1- β 表达抑制不会引起这两种细胞的凋亡。

TCP1- β 是近年来新发现的分子伴侣家族,已知它对真核细胞中蛋白质的折叠装配起着重要作用,在肿瘤发生发展中的作用报道较少^[10]。本研究提示 TCP1- β 参与了 AIPC 细胞增殖的调控,进而用生物信息学的方法探讨了可能介导这种调控的信号通路。STRING 软件是综合利用各种相互作用原理来进行预测的,主要原理有检索相互作用组数据(高通量酵母实验和高通量亲和-质谱实验数据库);根据已有的相关实验报道;根据系统进化谱、染色体邻近、基因融合等基因分析计算,然后进行综合评分。由于 AR 在 AIPC 的发生、进展过程中发挥关键作用,因此,本文分析了 TCP1- β 与 AR 之间可能存在的相互作用。经过 STRING 的蛋白质相互作用

预测,发现 TCP1- β 与 AR 之间可能存在间接的相互作用,而 PI3K/Akt 通路可能是介导 TCP1- β 调控 AIPC 增殖的关键通路,但是在这个过程中,TCP1- β 与 PI3K/Akt 的相关性以及其下游通路尚需进一步验证。

[参考文献]

- [1] 窦建国,王德林. 前列腺癌临床各因素与预后的关系分析[J]. 重庆医学,2011,40(3):211-214
- [2] Fioriti D, Mischitelli M, Di Monaco F, et al. Cancer stem cells in prostate adenocarcinoma: a target for new anti-cancer strategies [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 216(3):571-575
- [3] Schnadig ID, Beer TM. Optimal timing of chemotherapy in androgen independent prostate cancer [J]. Urol Oncol, 2009,27(1):97-100
- [4] 黄昆,朱明. 雄激素非依赖性前列腺癌的发生研究进展[J]. 医学综述,2011,17(3):371-373
- [5] Seo S, Baye LM, Schulz NP, et al. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly [J]. Proc Natl Acad Sci, 2010, 107(4):1488-1493
- [6] Satish L, Johnson S, Wang JH, et al. Chaperonin containing T-complex polypeptide subunit eta (CCT-eta) is a specific regulator of fibroblast motility and contractility [J]. PLoS One, 2010, 5(4):e10063
- [7] Yoshida K, Kuramitsu Y, Murakami K, et al. Proteomic differential display analysis for TS-1-resistant and -sensitive pancreatic cancer cells using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. Anticancer Res, 2011, 31(6):2103-2108
- [8] Lin YF, Tsai WP, Liu HG, et al. Intracellular beta-tubulin/chaperonin containing TCP1-beta complex serves as a novel chemotherapeutic target against drug-resistant tumors [J]. Cancer Res, 2009, 69(17):6879-6888
- [9] Huggins C, Hodges CV. Studies on prostatic cancer I: the effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate [J]. CA Cancer J Clin, 1972, 22(4):232-240
- [10] Wang JW, Peng SY, Li JT, et al. Identification of metastasis-associated proteins involved in gallbladder carcinoma metastasis by proteomic analysis and functional exploration of chloride intracellular channel 1 [J]. Cancer Lett, 2009, 281(1):71-81

[收稿日期] 2012-12-29