

## Par-4 基因增敏顺铂对肾母细胞瘤荷瘤裸鼠生长的抑制作用

李贇,殷丽萍,陆超\*

(南京医科大学第一附属医院儿科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨腺病毒介导的前列腺凋亡反应因子-4(prostate apoptosis response-4,Par-4)协同顺铂(CDDP)对人肾母细胞瘤细胞 SK-NEP-1 裸鼠皮下移植瘤的影响。方法:采用人肾母细胞瘤细胞株 SK-NEP-1 建立 BALB/c 裸鼠皮下移植瘤模型,分别用表达 Par-4 的腺病毒、CDDP 及两者联合治疗,随机分成 5 组:Par-4+CDDP 组、Par-4 组、CDDP 组、空 Par-4(不表达 Par-4 的对照腺病毒)组、空白对照组。测定移植瘤的体积及瘤重,通过 HE 染色及免疫组化分析,检测移植瘤组织中 Par-4、GRP78 及 BAX 蛋白的表达水平。结果:Par-4+CDDP 组、Par-4 组及 CDDP 组均有抑制裸鼠移植瘤生长的作用,瘤重差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中,Par-4+CDDP 组优于 Par-4 组与 CDDP 组。而空 Par-4 组与空白对照组相比,差异无统计学意义。Par-4+CDDP 组能明显上调 Par-4、GRP78 及 BAX 蛋白表达( $P < 0.05$ )。结论:外源性 Par-4 协同 CDDP 抑制裸鼠移植瘤的生长可能是外源性 Par-4 通过结合 GRP78 后上调 BAX 蛋白所致。

**[关键词]** 肾母细胞瘤;Par-4 基因;GRP78 蛋白

**[中图分类号]** R737.11

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)09-1195-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150902

## Inhibitory effect on growth of xenograft with Wilms' tumor by Par-4 gene sensitizing cisplatin

Li Yunjie, Yin Liping, Lu Chao\*

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effects of adenovirus mediated prostate apoptosis response-4 (Par-4) combined with cisplatin (CDDP) on subcutaneous xenografts of human Wilms' tumor cells SK-NEP-1 in nude mouse. **Methods:** Inhibition effect of subcutaneous transplanted Wilms' tumor model were established in BALB/c nude mice, and then the nude mice were randomly divided into five groups, namely Par-4+CDDP group, Par-4 group, CDDP group, negative control Par-4 group and blank control group. The volumes and weights of the transplanted tumors were measured. Transplanted tumor tissues were used to detect the expression levels of Par-4, GRP78 and BAX protein by HE staining and immunohistochemical analysis. **Results:** The tumor growth was inhibited in Par-4+CDDP group, Par-4 group and CDDP group, and there were differences in the tumor weight among 3 groups ( $P < 0.05$ ). The inhibition effect of Par-4+CDDP group was superior to the Par-4 group and CDDP group. There was no statistically significance in tumor inhibition between blank control group and negative control Par-4 group. Par-4+CDDP can significantly increased Par-4, GRP78 and BAX protein ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Ectopic Par-4 in combination with CDDP suppressed the cancer-xenografted growth in nude mice, which might up-regulate BAX protein, the result of the interaction of extracellular Par-4 and GRP78.

**[Key words]** nephroblastoma; Par-4 gene; GRP78 protein

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(09): 1195-1199]

肾母细胞瘤(Wilm's tumor, WT)是一种胚胎性的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,其与多基因突变的参与有关,被认为是婴幼儿期间最常见的泌尿系统癌症,列儿童腹部肿瘤第 2 位。该病好发于 1~5 岁<sup>[2]</sup>,尽管现阶段手术

与放、化疗综合技术的推进,患儿生存率有明显提高,但仍有少数患儿面临疾病恶化、转移或复发最终导致死亡的严峻问题。因此,研究者开始寻找全新及更有效的治疗方案。本研究探讨外源性前列腺凋亡反应因子-4(prostate apoptosis response-4, Par-4)联合顺铂对肾母细胞瘤是否有抑制作用。

Par-4 是从非依赖 AT-3 大鼠的前列腺癌细胞中

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170487)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: chaodoctor@163.com

发现的,它是一种促凋亡基因。众多研究发现,大多数肿瘤细胞中该基因的表达量较低,因此 Par-4 基因的下调可能参与肿瘤发生<sup>[3]</sup>。然而 Par-4 基因的上调可以促进肿瘤细胞凋亡,却对正常细胞无影响。现阶段,对于 Par-4 的研究停留在细胞水平。本课题组前期已证实在 T 淋巴细胞白血病中,Par-4 联合核凋亡因子 THAP1 可诱导 CCAR1 基因表达且引起细胞凋亡。Par-4 在很多肿瘤细胞中起到促凋亡作用,如肾癌、肠癌、肺癌及胰腺癌等。

最新研究发现 Par-4 蛋白可通过与癌细胞表面的葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulated protein 78, GRP78)结合后诱导细胞凋亡。GRP78 是位于内质网上的分子伴侣<sup>[4]</sup>。当内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)增强时,内源性 Par-4 与 GRP78 在内质网结合后运送至细胞膜。有研究证实外源性 Par-4 可与 GRP78 联合增敏三苯氧胺致 HNCG 细胞凋亡。到目前为止,尚未有研究探讨 Par-4 与 GRP78 共定位于内质网是否也引起肾母细胞瘤细胞的凋亡。

肾母细胞瘤患儿可在手术前后使用放线菌素 D 及长春新碱,它们是该病最经典有效的化疗药物。当标准化疗药无效时,顺铂也可替代放线菌素 D 进行化疗。但药物耐药可能成为治疗肾母细胞瘤的关键问题。有研究表明在肠癌中 Par-4 可增敏氟尿嘧啶。因此,试想在肾母细胞瘤中,Par-4 可否增敏顺铂提高抑瘤率。

本实验通过外源性 Par-4 联合顺铂抑制裸鼠移植瘤的生长可能是通过内质网凋亡途径引起相关凋亡蛋白的改变所致。因此,Par-4 可能将成为肿瘤研究的新靶点。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人 SK-NEP-1 细胞株(中国科学院上海生命科学院细胞资源中心),McCoy's 5A 培养基(Gibco 公司,美国);胎牛血清、青霉素-链霉素双抗(Hyclone 公司,美国);4~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠,体重 17~20 g[上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SCXK(沪)2012-0002],饲养于南京医科大学实验动物中心清洁级(SPF)动物实验室,高压灭菌的水及标准饲料供动物食用;基质胶 Matrigel(BD 公司,美国);表达 Par-4 腺病毒及不表达 Par-4 的对照腺病毒空 Par-4(上海生博生物医药科技有限公司);顺铂(CDDP,南京制药厂有限公司);Par-4 一抗、GRP78 一

抗、Bax 一抗(Cell Signaling Technology 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 SK-NEP-1 细胞培养及 WT 裸鼠移植瘤模型建立

用含 15%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 McCoy's 5A 培养基 5% CO<sub>2</sub> 37℃培养 SK-NEP-1 细胞。细胞呈半贴壁生长,取对数生长期的细胞直接轻微吹打脱落,离心后用含 McCoy's 5A 培养基与基质胶 Matrigel 混合液重悬,将细胞密度调整至 1.5×10<sup>7</sup> 个/mL。用 1 mL 无菌注射器接种 SK-NEP-1 细胞在裸鼠右前腋下,每只裸鼠接种 0.2 mL,注射完成后需用酒精棉球轻微按压接种处以防细胞液渗出。

#### 1.2.2 动物分组及处理

24 d 后裸鼠移植瘤的直径可达 8~10 mm,随机分为 5 组:空白对照组、空 Par-4 对照组、CDDP 组、Par-4 组、Par-4+CDDP 组。分别向瘤体内少量多点注射 0.1 mL PBS 或 0.1 mL 腺病毒(1.0×10<sup>10</sup> pfu)或腹腔注射 CDDP 1.5 g/L,隔 2 d 注射 1 次,共 6 次。每隔 3 d 用游标卡尺测量移植瘤体积,肿瘤体积=ab<sup>2</sup>×0.5(a 为肿瘤最大直径,b 为肿瘤最短直径),绘制肿瘤生长曲线,第 22 天脱颈处死裸鼠,用无菌眼科剪、镊剥离瘤块,后逐一称重。

#### 1.2.3 移植瘤组织的 HE 病理及免疫组织化学检测

肿瘤块用 4%多聚甲醛固定 24 h,梯度酒精脱水(70%酒精浸泡 2 h、80%酒精浸泡 3 h、95%酒精浸泡 40 min、无水乙醇浸泡 30 min),透明(二甲苯浸泡 30 min),石蜡包埋切片(厚度 4.5 μm),苏木精-伊红染色后镜下观察肿瘤组织的病理变化。通过运用免疫组织化学染色 SP 法检测 Par-4、GRP78 及 BAX 在各组荷瘤鼠中的表达,通过 ImagePro Plus 6.0 软件定量分析免疫组化染色的平均光密度(单位体积内目的蛋白的密度值),然后计算平均值。

### 1.3 统计学方法

应用 SPSS19.0 软件、ImagePro Plus 6.0 软件及 GraphPad Prism 5 软件进行试验数据的统计分析,所有数据都以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验、方差分析及 SNK 法, $P \leq 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 裸鼠成瘤情况

裸鼠接种 SK-NEP-1 细胞当天可见黄豆样大小囊泡,次日消失,于 17 d 左右可触及米粒样大小瘤块,1 周后瘤块生长明显加快,直径可达 8~9 mm,长

出的肿块大致均一,裸鼠皮下移植瘤外形见图 1。



图 1 移植瘤生长情况

Figure 1 The growth of transplanted tumor

### 2.2 各组处理前后移植瘤体积变化情况

观察各组移植瘤接种部位无感染、坏死。Par-4+CDDP 组、Par-4 组、CDDP 组、空 Par-4 组、空白对照组处理前移植瘤体积分别是(252.76±38.76)、(249.64±38.08)、(262.40±37.64)、(246.40±38.85) 及 (256.00±38.01)mm<sup>3</sup>;处理后瘤体体积分别是(400.36±52.47)、(676.51±71.33)、(530.35±62.75)、(1 225.07±301.78) 及 (1 330.43±335.09)mm<sup>3</sup>。空白对照组与空 Par-4 组移植瘤体积显著增大,两者无统计学意义( $P > 0.05$ ); Par-4+CDDP 组、Par-4 组及 CDDP 组瘤体体积无明显增大,其中,Par-4+CDDP 组的移植瘤体积变化最小,与 Par-4 组相比,CDDP 组瘤体体积变化小,3 组与空白对照组相比差异有统计学意义(图 2,  $P < 0.05$ )。

### 2.3 处理后各组移植瘤瘤重及肿瘤抑制率

用无菌眼科剪、镊剥离瘤块后可见多为不规则小圆球形,上面覆一层纤维性假包膜,与周围组织分界清楚,瘤体切面呈鱼肉状,内有血管生成。荷瘤鼠瘤重分别是 Par-4+CDDP 组(0.120±0.019)g、Par-4 组(0.203±0.062)g、CDDP 组(0.159±0.043)g、空 Par-4 组(0.368±0.059)g 及空白对照组(0.399±0.087)g。

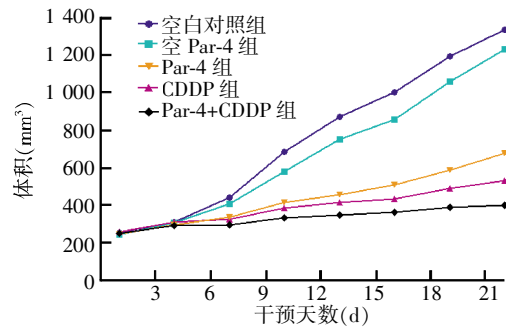


图 2 各处理组不同时间的移植瘤体积

Figure 2 The volumes of the transplanted tumors in each group

计算肿瘤抑制率=(1-治疗组移植瘤平均瘤重/空白对照组平均瘤重)×100%,结果显示:空 Par-4 组与空白对照组的瘤重无明显差异,而 Par-4+CDDP 组、Par-4 组、CDDP 组组间相比,以及与空白对照组和空 Par-4 组的瘤重和抑制率相比,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中,Par-4+CDDP 组的瘤重最低,抑制率最高(表 1)。

表 1 干预第 22 d 荷瘤鼠瘤重及肿瘤抑制率

Table 1 Tumor weight and growth inhibition of xenografts of nude mice on the 22nd day

组别	瘤重(g)	肿瘤抑制率(%)
空白对照组(n=3)	0.399 ± 0.087	-
空 Par-4 组(n=3)	0.368 ± 0.059	7.77
CDDP 组(n=3)	0.159 ± 0.043**	60.15**
Par-4 组(n=3)	0.203 ± 0.062**	49.12**
Par-4+CDDP 组(n=3)	0.120 ± 0.019**#▲	69.92**#▲

与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与空 Par-4 组比较,\*\* $P < 0.05$ ;与 CDDP 组相比,▲ $P < 0.05$ ;与 Par-4 组相比,▲ $P < 0.05$ 。

### 2.4 瘤块的病理变化

HE 染色镜下观察空白对照组及空 Par-4 组瘤块坏死区域较少见,原始胚基组织区中可见大量密集小圆形成片状弥漫性分布的细胞,核大深染,核浆比例增大;而经过 Par-4 与 CDDP 处理后,Par-4 组、CDDP 组及 Par-4+CDDP 组细胞排列紊乱,呈高度特异性,染色质浓集,核分裂像及凋亡小体多见(图 3)。

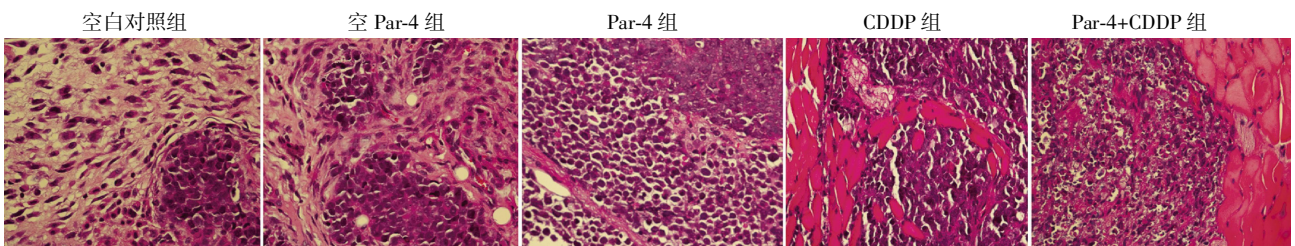


图 3 各组裸鼠移植瘤 HE 染色(×400)

Figure 3 HE staining of xenografts of nude mice in each group(×400)



2.5 免疫组化检测相关蛋白的表达

5 组移植瘤组织进行石蜡包埋切片,苏木精-伊红染色后观察 Par-4、GRP78 及 BAX 的蛋白表达水平,在镜下观察阳性细胞:在胞膜或胞质处可见棕黄色颗粒(图 4)。得出以下结论:在 Par-4+CDDP 组中,Par-4、GRP78 及 BAX 蛋白的平均光密度值分别

是  $0.256 \pm 0.051$ 、 $0.222 \pm 0.017$ 、 $0.219 \pm 0.009$ ,明显高于其他各组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );CDDP 组中 GRP78 蛋白的平均光密度值( $0.120 \pm 0.017$ )与空白对照组( $0.108 \pm 0.004$ )间差异无统计学意义( $P > 0.05$ );空白对照组与空 Par-4 组比较,两者各蛋白表达量无明显差异(表 2)。

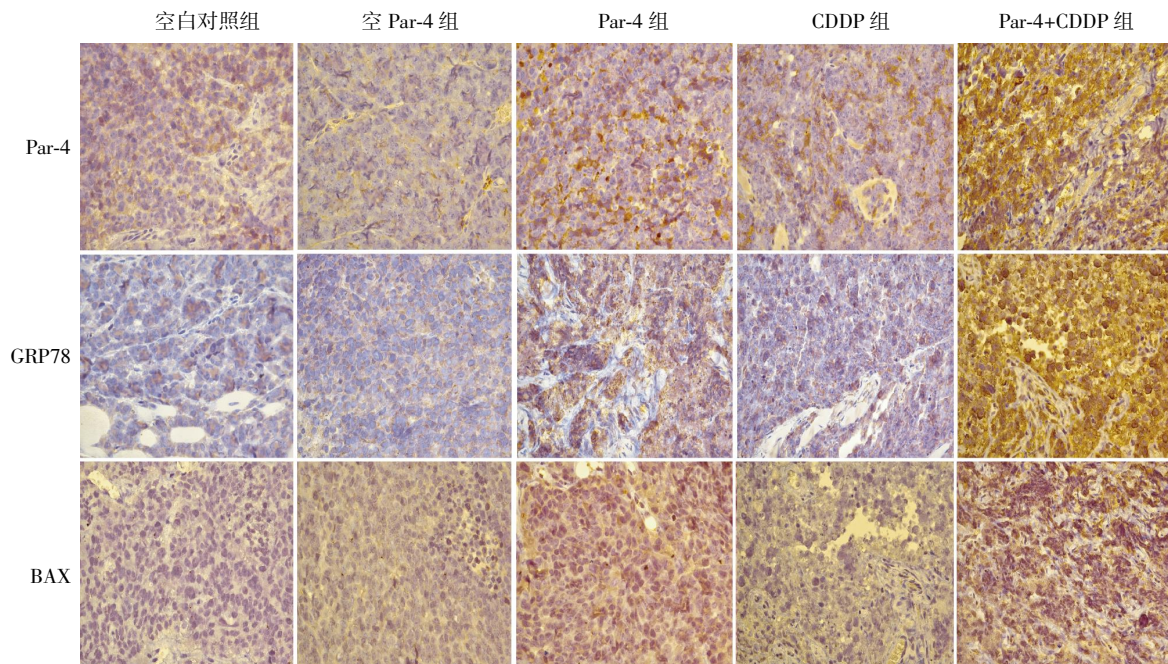


图 4 裸鼠移植瘤组织中 Par-4、GRP78 和 BAX 表达的免疫组织化学染色结果( $\times 400$ )

Figure 4 Immunochemical detection the infiltration of Par-4, GRP78 and BAX in transplanted tumor( $\times 400$ )

表 2 裸鼠移植瘤组织中 Par-4、GRP78 和 BAX 阳性表达的半定量统计分析结果

Table 2 Positive area percentage of Par-4, GRP78 and BAX in transplanted tumor

组别	空白对照组	空 Par-4 组	CDDP 组	Par-4 组	Par-4+CDDP 组
Par-4	$0.131 \pm 0.005$	$0.140 \pm 0.006$	$0.163 \pm 0.004$	$0.173 \pm 0.011$	$0.256 \pm 0.051^{* \# \Delta \blacktriangle}$
GRP78	$0.108 \pm 0.004$	$0.123 \pm 0.005$	$0.120 \pm 0.017$	$0.137 \pm 0.006$	$0.222 \pm 0.017^{* \# \Delta \blacktriangle}$
BAX	$0.142 \pm 0.028$	$0.145 \pm 0.031$	$0.177 \pm 0.017$	$0.201 \pm 0.033$	$0.219 \pm 0.009^{* \# \Delta \blacktriangle}$

与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与空 Par-4 组相比, # $P < 0.05$ ; 与 CDDP 组相比,  $\Delta P < 0.05$ ; 与 Par-4 组相比,  $\blacktriangle P < 0.05$ 。

3 讨论

虽然肾母细胞瘤 5 年生存率已提高至 90% 以上,但是预后不良型或肿瘤复发人群的生存率还有待提高。动物体内成瘤实验为深入了解发病机制、诊断及治疗提供了良好的平台,裸鼠皮下成瘤是最直观、最简便的动物模型<sup>[3]</sup>。而基因治疗从 90 年代以来一直是研究热点,显示了作为新型治疗手段的良好前景<sup>[6]</sup>。基因治疗有针对性地杀死肿瘤细胞,对正常细胞无影响,而本研究的 Par-4 就是选择性抑制肿瘤生长的基因<sup>[7]</sup>,具有重要的临床应用价值,可为基因治疗提供新靶点。

在实体瘤中,顺铂是使用较为普遍的化疗药,但其缺点是存在耐药性,因此为寻找增加顺铂敏感性的基因尤为重要。本课题组前期已证实 Par-4 可促进急性 T 淋巴细胞白血病细胞凋亡<sup>[8]</sup>,猜想 Par-4 能增敏顺铂有效促进细胞凋亡,而本研究通过体内试验证实这一点:腹腔注射顺铂能有效抑制荷瘤鼠瘤块的生长,用腺病毒 Par-4 单因素处理瘤块也可抑制肿瘤其生长,两者联合处理后抑瘤效应更明显。又有相关文献表明在 PC-3 细胞中,过表达的 Par-4 可与分子伴侣 GRP78 的 N 端结构域结合可致细胞凋亡。GRP78 是属于热休克蛋白 70(HSP70)家族<sup>[9]</sup>,又称之免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP),主要

定位在内质网,在肿瘤组织中高表达,而在正常组织中表达较低,它参与肿瘤细胞的侵袭和迁移。在由腺病毒 Par-4 处理的裸鼠瘤块中,ERS 反应增强<sup>[10]</sup>,定位于内质网的 Par-4 与 GRP78 蛋白相结合,也可引起未折叠蛋白在内质网内积聚,GRP78 是未折叠蛋白反应(URP)途径的调节器,一旦 URP 信号增强,GRP78 蛋白表达也会相应增加,与 Par-4 结合后通过葡萄糖膜自身抗原转运至细胞膜<sup>[11]</sup>,从而有效提高 GRP78 在胞膜表面的表达<sup>[7,12-13]</sup>。GRP78 通过与外源性的 Par-4 结合也可促使 ERS,这一系列应激可使位于内质网膜上的促凋亡 BAX 蛋白表达量增加,BAX 通过构象变化及寡聚化,最终导致内质网整体破坏,钙外流使细胞质内的 Ca<sup>2+</sup>浓度升高<sup>[14]</sup>,最后引发凋亡途径。而本研究通过免疫组化分析裸鼠瘤块也可以得出相应的结论:瘤体内多点注射 Par-4 腺病毒的瘤块组织中,Par-4 蛋白的表达量明显增高,同时也相应增加 GRP78 及 BAX 蛋白的表达;联合顺铂处理的瘤块组织中,Par-4、GRP78 及 BAX 3 种蛋白表达量显著增高,因此,顺铂与 Par-4 两者有协同作用;只经过顺铂处理的瘤块组织中 Par-4 及 BAX 蛋白表达量稍增高,而对 GRP78 蛋白却无影响。

通过免疫组化发现外源性 Par-4 可使 GRP78 蛋白表达量相应增多,而顺铂单独处理组中 GRP78 蛋白量无改变。提示 Par-4 与 GRP78 在功能上存在相关性<sup>[15]</sup>。本实验未对外源性 Par-4 上调 GRP78 蛋白对其他内质网相关蛋白的影响进行深入研究,本课题组后期将围绕这一问题进一步探讨和证实,为肾母细胞瘤的基因治疗提供参考依据。

#### [参考文献]

- [1] 易 斌. 肾母细胞诊疗进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(23): 1784-1787
- [2] Hanks S, Perdeaux ER, Seal S, et al. Germline mutations in the PAF1 complex gene CTR9 predispose to Wilms tumour[J]. Nat Commun, 2014, 5(8): 4398-4405
- [3] Barradas M, Monjas, Diaz-Meco MT, et al. The downregulation of the proapoptotic protein Par-4 is critical for Ras-induced survival and tumor progression[J]. EMBO J, 1999, 18(22): 6362-6369
- [4] Fu R, Yang P, Wu HL, et al. GRP78 secreted by colon cancer cells facilitates cell proliferation via PI3K/Akt signaling[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(17): 7245-7249
- [5] Zanola A, Rossi S, Faggi F, et al. Rhabdomyosarcomas: an overview on the experimental animal models[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(7): 1377-1391
- [6] Ragab SM, Samaka RM, Shams TM. HER2/neu expression: a predictor for differentiation and survival in children with Wilms tumor[J]. Pathol Oncol Res, 2010, 16(1): 61-67
- [7] Jayashree JC, Parveen D, Shah RD, et al. Expression and regulation of prostate apoptosis[J]. PloS One, 2014, 9(2): e88505
- [8] Zhang L, Xu HG, Lu C. A novel long non-coding RNA T-ALL-R-LncR1 knockdown and Par-4 cooperate to induce cellular apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells[J]. Leuk Lymphoma, 2014, 55(6): 1373-1382
- [9] Dudek J, Benedix J, Cappel S, et al. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(9): 1556-1569
- [10] 丁 晶, 曾超美, 杜军保. 内质网应激与动脉粥样硬化[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(13): 1013-1016
- [11] Ravshan B, Shriley Q, Nidhi S, et al. Novel mechanism of apoptosis resistance in cancer mediated by extracellular PAR-4[J]. Cancer Res, 2013, 73(2): 2011-2019
- [12] Sharma AK, Kline CL, Berg A, et al. The Akt inhibitor ISC-4 activates prostate apoptosis response protein-4 and reduces colon tumor growth in a nude mouse model[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(13): 4474-4483
- [13] Qinan W, Ling Z, Bing C, et al. PAR-4: a possible new target for age-related disease[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(8): 917-927
- [14] Lin ML, Chen SS, Huang RY, et al. Suppression of PI3K/Akt signaling by synthetic bichalcone analog TSWU-CD4 induces ER stress and Bax/Bak-mediated apoptosis of cancer cells[J]. Apoptosis, 2014, 19(11): 1637-1653
- [15] Ravshan B, Zhao YM, Anindya G, et al. A novel extrinsic pathway for apoptosis by tumor suppressor Par-4 cell[J]. Cell, 2009, 138(2): 377-388

[收稿日期] 2015-04-07