

LRPPRC 对前列腺癌细胞凋亡的影响

张鸿毅^{1,2},高继学²,汪峰²,李义²,贺晓龙²,张培波²,崔洁^{3*}

(¹西安医学院第一附属医院泌尿外科,陕西 西安 710077;²延安大学附属医院泌尿外科,陕西 延安 716000;³西安医学院第一附属医院肿瘤科,陕西 西安 710077)

[摘要] 目的:分析富含亮氨酸的三角状五肽重复结构蛋白(LRPPRC)和抗凋亡蛋白 Bcl-2 在前列腺癌组织的表达及 LRPPRC 对前列腺癌细胞凋亡的影响。方法:应用免疫组化法检测 198 例前列腺癌组织中 LRPPRC 和 Bcl-2 的表达;分析 LRPPRC 和 Bcl-2 表达的相关性;分析 LRPPRC 和 Bcl-2 表达与预后的关系;应用 siRNA LRPPRC 转染前列腺癌细胞下调 LRPPRC 水平,观察对细胞增殖、凋亡和 Bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达的影响。结果:前列腺癌和前列腺增生组织 LRPPRC 的表达率分别为 61.6%(122/198)和 18.0%(18/100)($P<0.001$);Bcl-2 的表达率分别为 49.5%(98/198)和 45.0%(45/100)($P=0.539$)。LRPPRC 和 Bcl-2 的表达有显著正相关性 ($r=0.179$, $P=0.012$)。LRPPRC 和 Bcl-2 同时高表达的患者无疾病进展生存和总生存期均显著降低 ($P<0.001$)。下调 LRPPRC 表达可抑制前列腺癌细胞增殖,促进前列腺癌细胞凋亡,降低 Bcl-2 蛋白的表达,使 caspase-3 活化增多,对 Bax 表达无显著影响。结论:前列腺癌组织 LRPPRC 表达显著增高;LRPPRC 与抑制凋亡有关;LRPPRC 在前列腺癌中的作用机制与抗凋亡蛋白 Bcl-2 有关。

[关键词] 前列腺癌;LRPPRC;Bcl-2;凋亡

[中图分类号] R737.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-847-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170712

Effects of LRPPRC on apoptosis in prostate cancer cells

Zhang Hongyi^{1,2}, Gao Jixue², Wang Feng², Li Yi², He Xiaolong², Zhang Peibo², Cui Jie^{3*}

(¹Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077; ²Department of Urology, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000; ³Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710077, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expressions of LRPPRC and Bcl-2 in prostate cancer, and the effects of LRPPRC on apoptosis. **Methods:** Immunohistochemistry was performed to analyze the expressions of LRPPRC and Bcl-2 on 198 prostate cancer tissues. The correlation between LRPPRC and Bcl-2 expressions was analyzed. The relationship between LRPPRC and Bcl-2 expressions and prognosis was analyzed. siRNA LRPPRC was used to transfect prostate cancer cells to decrease the level of LRPPRC, and the effects on proliferation, apoptosis, the expressions of Bcl-2, Bax and caspase-3 protein were observed. **Results:** Prostate cancer and prostate hyperplasia tissues highly expressed LRPPRC in 61.6%(122/198) and 18.0%(18/100) of patients, respectively ($P<0.001$). Prostate cancer and prostate hyperplasia tissues highly expressed Bcl-2 in 49.5%(98/198) and 45.0%(45/100) of patients, respectively ($P=0.539$). A significant association between the expressions of LRPPRC and Bcl-2 was observed ($r=0.179$; $P=0.012$). High expression of LRPPRC combined with Bcl-2 was related with shorter biochemical progress (BCP)-free survival and overall survival ($P<0.001$). When LRPPRC level being down-regulated by siRNA, the survival rate of prostate cancer cells was decreased, the apoptosis rate was increased, Bcl-2 protein level was decreased, and cleaved caspase-3 protein level was increased. There were no significant effects on Bax expression. **Conclusion:** LRPPRC expression was increased in prostate cancer tissues. LRPPRC may inhibit endogenous apoptosis of prostate cancer cells. The effect may be related with regulating Bcl-2 expression.

[Key words] prostate cancer; LRPPRC; Bcl-2; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07):847-851]

[基金项目] 延安市科学技术研究发展计划项目(2015KW-06)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: cuicui780204@163.com

前列腺癌是西方国家男性中最常见的恶性肿瘤,发病率和死亡率均较高,虽然亚洲地区前列腺癌

发病率较低,但近年也呈逐年上升的趋势^[1]。前列腺癌进展为去势抵抗型是治疗失败的主要原因^[2]。目前前列腺癌尚缺乏早期预测的标志物和有效的分子靶向药物,因此研究前列腺癌发生的分子机制,为前列腺癌提供新的分子靶标,是当今前列腺癌研究亟待解决的问题。

线粒体在维持细胞存活中发挥重要作用。目前研究发现,致癌因素或细胞自身代谢过程中产生的活性氧会影响线粒体基因组的稳定性,线粒体凋亡途径的异常使机体无法清除恶性转化的细胞,促进肿瘤的发生发展^[3]。Bcl-2 蛋白是调节线粒体凋亡的重要因子。富含亮氨酸的三角状五肽重复结构蛋白(LRPPRC)主要定位于线粒体内膜,在转录和翻译水平调节线粒体蛋白的表达,在调控线粒体功能中发挥重要作用^[4]。LRPPRC 可以使细胞内的 Bcl-2 维持在一个较高的水平^[5]。近期研究发现,在多种类型的肿瘤组织中 LRPPRC 呈现高表达^[6]。

本研究通过检测前列腺癌组织 LRPPRC 和 Bcl-2 蛋白的表达,分析两者的相关性及与预后的关系,并在体外观察下调 LRPPRC 对前列腺癌细胞凋亡的影响,探讨 LRPPRC 是否通过调节线粒体凋亡促进前列腺癌的发生发展。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

选择 2005 年 1 月—2011 年 8 月延安大学附属医院和西安交通大学第二附属医院前列腺癌标本 198 例和前列腺增生标本 100 例。此研究获得医院伦理委员会同意,病理标本的收集获得了患者本人或家属知情同意。所有病例均经组织病理学确诊。所有前列腺癌患者均接受戈舍瑞林联合比卡鲁胺治疗。排除标准:①首诊时前列腺癌未发生转移;②接受戈舍瑞林联合比卡鲁胺治疗时间少于 6 个月;③曾接受睾丸切除术、前列腺癌根治术或放疗。

1.1.2 细胞株

人前列腺癌细胞株 LNCaP 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,培养在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,于 37 °C 5%CO₂ 条件下培养。

1.1.3 主要试剂

RPMI1640 培养基(赛默飞世尔生物化学制品有限公司,美国);胎牛血清(浙江天杭生物科技有限公司);小鼠抗人 LRPPRC 单克隆抗体、小鼠抗人

Bcl-2 单克隆抗体、兔抗人 Bax 单克隆抗体、小鼠抗人 caspase-3 单克隆抗体(Abcam 公司,英国);二抗生物素化山羊抗小鼠 IgG/抗兔 IgG、链霉亲和素-生物素复合物(SABC)试剂盒和 DAB 显色液(武汉博士德生物工程有限公司);Lipofectamin 2000(Invitrogen 公司,美国);细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);蛋白提取试剂盒和超敏 ECL 化学发光试剂盒(西安沃尔森生物技术有限公司);SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(北京华肽先锋生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法

石蜡切片烤片、脱蜡、脱水;3%过氧化氢去离子水封闭;高压热修复;血清封闭;一抗孵育过夜;二抗孵育滴加 SABC,DAB 显色,苏木素复染。随机在 200 倍镜下选取 5 个视野进行阳性细胞百分数评分(0:0%;1:1%~25%;2:26%~50%;3:51%~75%;4:>75%)。染色强度评分:0 分,阴性;1 分,淡黄色;2 分,黄色;3 分,棕黄色。以阳性细胞百分数评分与染色强度评分的和来对蛋白表达进行分级。低表达:0~3 分;高表达:≥4 分^[7]。

1.2.2 siRNA 转染前列腺癌细胞

设计并合成 LRPPRC siRNA 序列(上海吉玛制药技术有限公司,表 1)。取对数生长期细胞,转染前 1 d 将细胞传代至 6 孔板中,待细胞贴壁生长至孔板面积的 30%~50%,应用 Lipofectamin 2000 按说明书操作步骤进行转染,同时转染对照 siRNA。

表 1 LRPPRC siRNA 序列
Table 1 Sequences of LRPPRC siRNA

siRNA	序列(5'→3')
LRPPRC siRNA-1	F:GGAGGAGCATTGAGACAATATTTCAA R:GAGATATTGTCTCAAATGCTCCTCC
LRPPRC siRNA-2	F:GGAGGAAGCAAACATTTCAACCTTCAA R:GAGAGGTTGAATGTTTGCTTCCTCC
LRPPRC siRNA-3	F:CACCCGAGGAGCATTGAGACAATAT R:GATCCAAAAAAGGAGGAGCATTGA

1.2.3 MTT 法检测细胞存活率

消化收集转染细胞和对照细胞,调整细胞密度,96 孔板每孔加入 200 μL 使细胞密度为 5 000 个/孔。将 96 孔板置于 5%CO₂、37 °C 培养箱孵育 24 h,待细胞贴壁后进行检测,分为两组:siRNA 组、Control 组,同时设不加细胞的调零孔(空白组)和加入未转染细胞的对照孔(对照组),弃去旧培养液,每孔分别加入培养液 180 μL 和 MTT 20 μL,继续放置于培养箱培养 4 h。弃上清,每孔分别加入 150 μL DMSO,

避光震荡 10 min 使甲瓚颗粒完全溶解。在酶联免疫检测仪波长 490 nm 处检测吸光度值。细胞存活率=(实验组吸光度-空白组吸光度)/(对照组吸光度-空白组吸光度)×100%。实验重复 3 次。

1.2.4 凋亡检测

胰蛋白酶消化后收集细胞,调整细胞密度为(0.5~1.0)×10⁶个/mL;离心 5 min,弃上清;应用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次;加入 Binding Buffer、Annexin-V-FITC 和 PI,避光反应 15 min;1 h 内以流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复 3 次。

1.2.5 蛋白免疫印迹法

按蛋白提取试剂盒说明提取细胞总蛋白;BCA 法测定蛋白浓度;蛋白变性;制备 SDS-PAGE 凝胶,电泳、转膜、一抗 4 ℃孵育过夜、二抗孵育,然后按照超敏 ECL 化学发光试剂盒说明书进行化学发光反应,显影、定影;应用 Quantity One 4.62 凝胶图像进行扫描。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

统计分析应用 SPSS19.0 统计软件进行。采用 *t* 检验进行两组间均数的比较,采用单因素方差分析进行多组间均数比较。分类变量应用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法进行分析。相关性应用 Spearman 相关性检验。无疾病进展时间定义为雄激素阻断治疗(ADT)开始的时间至生化复发和末次随访时间;总生存时间定义为 ADT 开始的时间至死亡时间或末次随访时间。中位无疾病进展生存和总生存的差异应用 Kaplan-Meier 法和 log-rank 检验进行分析,双侧检验 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

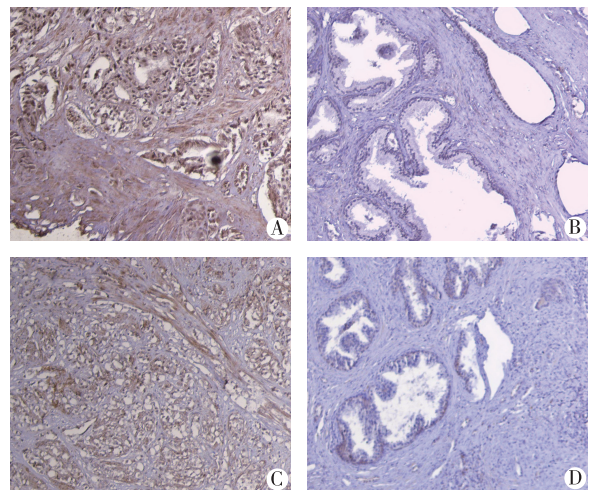
2 结果

2.1 LRPPRC 和 Bcl-2 在前列腺癌组织的表达

LRPPRC 在细胞浆表达,阳性染色为棕黄色均匀染色;Bcl-2 在细胞浆表达,阳性染色为弥漫性棕黄色颗粒(图 1)。前列腺癌和前列腺增生组织 LRPPRC 的表达率分别为 61.6%(122/198)和 18.0%(18/100)($P < 0.001$)。前列腺癌和前列腺增生组织 Bcl-2 的表达率分别为 49.5%(98/198)和 45.0%(45/100)($P = 0.539$)。35.4%(70/198)的前列腺癌组织标本 LRPPRC 和 Bcl-2 同时高表达。LRPPRC 和 Bcl-2 的表达有显著正相关性($r = 0.179, P = 0.012$)。

2.2 LRPPRC 和 Bcl-2 的表达与前列腺癌预后的关系

LRPPRC 高表达和低表达的患者中位无疾病进展生存期分别为 22 和 25 个月($P < 0.001$),中位生存期分别为 40 和 45 个月($P < 0.001$);Bcl-2 高表达和低

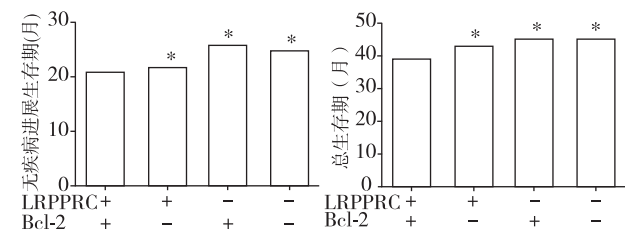


A:前列腺癌组织 LRPPRC 高表达;B:前列腺增生组织 LRPPRC 低表达;C:前列腺癌组织 Bcl-2 高表达;D:前列腺增生组织 Bcl-2 低表达。

图 1 LRPPRC 和 Bcl-2 的表达(免疫组化,×100)

Figure 1 Representative light microscopic images of LRPPRC and Bcl-2 expressions with immunohistochemical examination(IHC, ×100)

表达的患者中位无疾病进展生存期分别为 22 和 23 个月($P = 0.064$),中位生存期分别为 42 和 43 个月($P = 0.094$)。同时 LRPPRC 和 Bcl-2 高表达的患者中位无疾病进展生存期和总生存期均显著低于单独 LRPPRC 或 Bcl-2 高表达或两者均低表达的患者($P < 0.001$,图 2)。



+:高表达;-:低表达。与 LRPPRC 和 Bcl-2 高表达比较,* $P < 0.001$ 。

图 2 前列腺癌患者中位无疾病进展生存期和总生存期
Figure 2 Kaplan-Meier survival analyses for BCP-free survival and overall survival in prostate cancer patients

2.3 siRNA LRPPRC 下调前列腺癌细胞 LRPPRC 的表达

应用 Western blot 法检测 siRNA LRPPRC 对 LNCaP 细胞中内源性 LRPPRC 表达水平的抑制效果,结果显示相比阴性对照,LRPPRC 的 3 个 siRNA 均可抑制 LNCaP 细胞中内源性 LRPPRC 的表达,其中以 LRPPRC siRNA-3 的干扰效果最显著。因此,选择 LRPPRC siRNA-3 用于后续实验。

2.4 下调 LRPPRC 的表达抑制前列腺癌细胞的增殖

应用 MTT 法检测转染 siRNA LRPPRC 24、48、72 h LNCaP 细胞的存活率,结果显示,转染 24 h 就能观察到存活率的降低,转染 48、72 h 存活率降低显著($P<0.05$,图 3)。

2.5 下调 LRPPRC 的表达促进前列腺癌细胞凋亡

应用流式细胞术检测转染 siRNA LRPPRC 48 h LNCaP 细胞的凋亡率,结果显示,与对照细胞比较,转染 siRNA LRPPRC 48 h 使 LNCaP 细胞凋亡率显

著增高 $[(1.8\pm 0.3)\% \text{ vs. } (8.8\pm 1.1)\%, P<0.01$,图 4]。

2.6 下调 LRPPRC 调节凋亡相关蛋白的表达

应用 Western blot 法检测抑制 LRPPRC 48 h 对 LNCaP 细胞 caspase-3、抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 表达的影响。结果显示:LRPPRC 表达水平的降低显著增强 LNCaP 细胞中 caspase-3 活化水平($P<0.05$);抑制 Bcl-2 蛋白表达($P<0.05$),而对 Bax 蛋白表达无显著影响($P>0.05$,图 5),从而使 Bcl-2/Bax 比率降低。

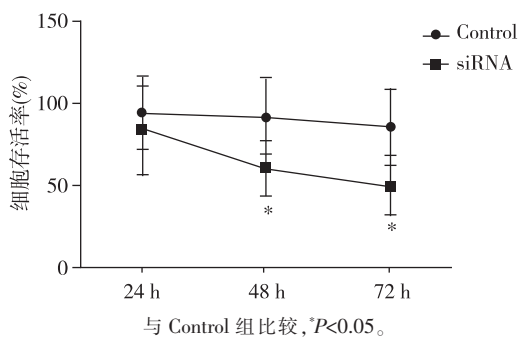


图 3 转染 siRNA LRPPRC 对 LNCaP 细胞存活率的影响
Figure 3 LNCaP cell survival rate of LRPPRC down-regulation with siRNA

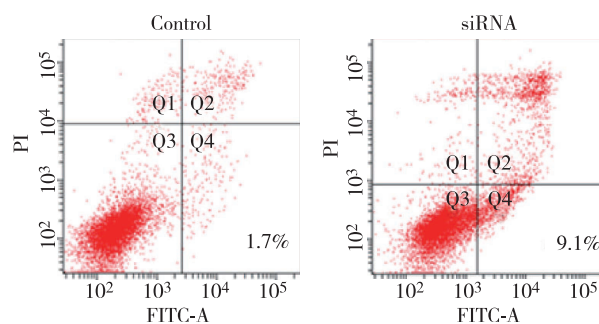


图 4 流式细胞术检测前列腺癌细胞凋亡图
Figure 4 LNCaP cell apoptosis rates of LRPPRC down-regulation with siRNA

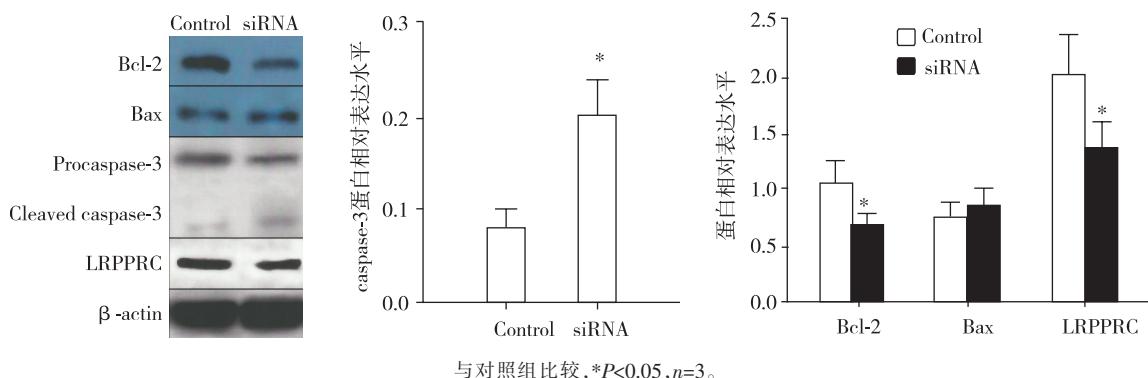


图 5 Western blot 法检测 siRNA LRPPRC 对 LNCaP 细胞 caspase-3、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响
Figure 5 Effects of siRNA LRPPRC on caspase-3, Bcl-2 and Bax expressions

3 讨论

LRPPRC-RNA 蛋白复合物对保持哺乳动物的线粒体基因转录十分必要。LRPPRC 编码的蛋白在转录后调控编码复合物 IV 的组分细胞色素氧化酶亚基 (cytochrome C oxidase subunit, COX)mRNA 的表达, COX IV 复合物是细胞内呼吸链的重要组成部分, LRPPRC 的基因突变会使细胞色素氧化酶缺陷^[8-10]。肿瘤细胞由于其生长代谢更加旺盛,对能量有着更高的需求,因此,LRPPRC 可能在维持肿瘤细胞的存活和凋亡抵抗中发挥重要作用。

本研究发现前列腺癌组织 LRPPRC 表达明显

增高,LRPPRC 高表达的患者预后差。目前有研究也证明了 LRPPRC 在前列腺癌组织的表达水平显著高于前列腺增生组织^[11]。除此之外,我们还发现 LRPPRC 和 Bcl-2 的表达有显著正相关性。LRPPRC 和 Bcl-2 同时高表达的患者在短期内就出现生化复发,总生存期显著缩短。Bcl-2 是一种重要的抗凋亡蛋白,对线粒体凋亡具有重要的调节作用。这些研究结果提示 LRPPRC 可能通过影响线粒体凋亡在前列腺癌的发生发展中发挥重要作用。因此,我们进行了体外研究,在前列腺癌细胞中下调内源性 LRPPRC 的表达水平,发现前列腺癌细胞的存活率显著下降,凋亡率显著增加,Bcl-2 的表达水平显著

降低,caspase-3 活化水平增高,对 Bax 表达水平无显著影响,提示 LRPPRC 可能通过影响抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制线粒体凋亡,维持前列腺癌细胞的存活。

目前有几项研究也证实了 LRPPRC 在其他类型的癌组织中表达增高,包括肺癌、食管癌、胃癌、大肠癌、子宫内膜癌、淋巴瘤组织,而在正常组织中表达很低^[6,12]。Tian 等^[6]在肺腺癌细胞和霍奇金淋巴瘤细胞中敲除 LRPPRC,观察到细胞的抗凋亡能力、侵袭和体外克隆形成能力下降;在 LRPPRC 和活化 caspase-3 双染色的肺腺组织标本中几乎观察不到凋亡细胞。Michaud 等^[13]在肝癌 HepG2 细胞中下调 LRPPRC 水平,发现促进外源性凋亡途径中促凋亡相关基因和蛋白的表达。而本研究发现 LRPPRC 可能通过影响 Bcl-2 影响线粒体凋亡。考虑研究结果的差异是由于不同类型的肿瘤细胞凋亡水平和途径存在较大差异。综上所述,这些研究提示 LRPPRC 可能通过抑制凋亡在肿瘤发生中起重要作用。线粒体基因表达调控是维持细胞能量平衡的关键,LRPPRC 蛋白通过调节线粒体 mRNA 的稳定性,在不同阶段调节线粒体基因的表达,维持正常的氧化磷酸化系统^[14-15]。癌细胞的生长更加活跃,对能量有着更高的需求,癌细胞可能通过上调 LRPPRC 的表达增强线粒体的功能,使癌细胞获得更多的能量供应,这种异常功能的线粒体也使癌细胞获得了较强的抗凋亡能力。当 LRPPRC 表达被抑制时,线粒体基因表达出现异常,损伤线粒体功能,这时线粒体释放出凋亡信号,使抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低,Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 结合减少,使线粒体外膜通透性增加,线粒体中的凋亡因子细胞色素 C 释放到胞浆中,活化 caspase-3,促进细胞凋亡。因此,LRPPRC 通过抑制线粒体凋亡,维持细胞存活,在前列腺癌的发生发展中起重要作用,这种作用与 Bcl-2 蛋白有关。LRPPRC 可能成为一种新型的分子靶标,应用于前列腺癌的治疗。

[参考文献]

[1] Cookson MS,Lowrance WT,Murad MH,et al. Castration-resistant prostate cancer:AUA guideline amendment[J]. J Urol,2015,193(2):491-499
[2] Chen CH,Hsieh JT,Huang KH,et al. Predictive clinical indicators of biochemical progression in advanced prostate cancer patients receiving leuplin depot as androgen deprivation therapy[J]. PLoS One,2014,9(8):e105091
[3] Vyas S,Zaganjor E,Hagis MC. Mitochondria and can-

cer[J]. Cell,2016,166(3):555-566

- [4] Ruzzenente B,Methodiev MD,Wredenberg AA,et al. LRP-PRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs[J]. EMBO J,2012,31(2):443-456
[5] Zou J,Yue F,Jiang XH,et al.Mitochondrion-associated protein LRPPRC suppresses the initiation of basal levels of autophagy via enhancing Bcl-2 stability[J]. Biochem J,2013,454(3):447-457
[6] Tian T,Ikeda JI,Wang Y,et al. Role of leucine-rich pentatricopeptide repeat motif-containing protein(LRPPRC)for anti-apoptosis and tumorigenesis in cancers[J]. Eur J Cancer,2012,48(15):2462-2473
[7] Jiang XH,Li X,Huang H,et al. Elevated levels of mitochondrion-associated autophagy inhibitor LRPPRC are associated with poor prognosis in patients with prostate cancer[J]. Cancer,2014,120(8):1228-1236
[8] Sterky FH,Ruzzenente B,Gustafsson CM,et al.LRPPRC is a mitochondrial matrix protein that is conserved in metazoans[J]. Biochem Biophys Res Commun,2010,398(4):759-764
[9] Sondheimer N,Fang JK,Polyak E,et al.Leucine-rich Pentatricopeptide-repeat containing protein regulates mitochondrial transcription[J]. Biochemistry,2010,49(35):7467-7473
[10] Xu FH,Addis JB,Cameron JM,et al. LRPPRC mutation suppresses cytochrome oxidase activity by altering mitochondrial RNA transcript stability in a mouse model[J]. Biochem J,2012,441(1):275-283
[11] Jiang XH,Zhong WD,Huang H,et al. Autophagy defects suggested by low levels of autophagy activator MAP1S and high levels of autophagy inhibitor LRPPRC predict poor prognosis of prostate cancer patients[J]. Mol Carcinog,2015,54(10):1194-1204
[12] Li XS,Lv LF,Zheng JY,et al. The significance of LRP-PRC overexpression in gastric cancer[J]. Med Oncol,2014,31(2):1-8
[13] Michaud M,Barakat S,Magnard S,et al. Leucine-rich protein 130 contributes to apoptosis resistance of human hepatocarcinoma cells[J]. Int J Oncol,2011,38(1):169-178
[14] Mourier A,Ruzzenente B,Brandt TA,et al. Loss of LRP-PRC causes ATP synthase deficiency[J]. Hum Mol Genet,2014,23(10):2580-2592
[15] Gohil VM,Nilsson R,Belcher-Timme CA,et al. Mitochondrial and nuclear genomic responses to loss of LRPPRC expression[J]. J Biol Chem,2010,285(18):13742-13747

[收稿日期] 2016-10-25