

[文章编号] 1000- 4718(2005)04- 0748- 04

前列腺癌 PC- 3M 细胞 hmSD 活性与细胞凋亡相关性的实验研究*

李 扬¹, 狄 茜¹, 许 莉¹, 刘喜春¹, 赵 丹¹, 赵雪俭^{1, Δ}, 宫城妙子²

(¹吉林大学基础医学院病理生理教研室, 吉林 长春 130021; ²日本宫城县癌中心)

[摘 要] 目的: 研究前列腺癌 PC- 3M 细胞株 hmSD 的活性与细胞凋亡的相关性。方法: 应用丁酸钠诱导前列腺癌 PC- 3M 细胞发生凋亡, 吖啶橙/ 溴化乙锭染色检测细胞凋亡率; 收集丁酸钠作用后的 PC- 3M 细胞, 匀浆后离心取上清, 与底物共同孵育, 以硫代巴比妥酸(TBA) 显色反应检测所生成的唾液酸, 计算唾液酸酶活性; 将细胞凋亡率与 hmSD 活性进行相关性分析。结果: 丁酸钠诱导 PC- 3M 细胞凋亡的同时显著下调 hmSD 的活性, 凋亡率与 hmSD 活性呈负相关。结论: hmSD 活性变化与前列腺癌细胞凋亡呈相关性。

[关键词] 神经氨酸酶; 前列腺肿瘤; PC- 3M 细胞; 细胞凋亡; 丁酸盐类

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Relation between hmSD activity and apoptosis rate in a PC- 3M cell line

LI Yang¹, DI Qian¹, XU Li¹, LIU Xi- chun¹, ZHAO Dan¹, ZHAO Xue- jian¹, Miyagi Taeko²

(¹Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China; ²Miyagi Prefectural Cancer Center 981- 1293, Japan)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the correlation between human membrane- associated sialidase (hmSD) activity and apoptosis rate in a PC- 3M cell line. METHODS: Sodium butyrate was added to the culture media of PC- 3M cells for 48 h to induce apoptosis and then the cells were collected, homogenated and centrifuged. The supernatant was incubated with the substrate. TBA reaction was then used to detect the sialic acid and the activity of the sialidase was calculated. Meanwhile, the apoptosis rate was detected by AO/EB assay, and the correlation between hmSD activity and apoptosis rate was calculated. RESULTS: HmSD activity of PC- 3M cells was significantly down- regulated when cell apoptosis was induced by sodium butyrate and high correlation between hmSD activity and apoptosis rate was observed. CONCLUSION: There is a significant correlation between apoptosis rate and hmSD activity in prostate cancer.

[KEY WORDS] Neuraminidase; Prostatic neoplasms; PC- 3M cells; Apoptosis; Butyrates

唾液酸酶(sialidase, SD) 是一种糖苷酶, 其功能是从糖蛋白和糖脂的非还原末端水解唾液酸。HmSD (human membrane- associated sialidase) 即人类质膜型唾液酸酶, 主要位于细胞膜、神经突触体膜表面, 具有严格的底物特异性, 优先水解神经节苷脂, 由于神经节苷脂在细胞表面反应、细胞分化和跨膜信号转导中起重要作用, 因此, hmSD 在细胞的表面行使重要功能^[1]。Kakugawa 等^[2]报道, 肿瘤组织中 hmSD 的表达普遍上调, 高表达的 hmSD 抑制结肠癌细胞凋亡, 提示 hmSD 可以成为诊断与治疗癌症的新靶点。

HmSD 与前列腺癌相关性的研究尚未见文献报道。丁酸钠(sodium butyrate, NaBT) 是膳食纤维在肠道中酵解后产生的主要短链脂肪酸^[1], 丁酸钠及其稳定的衍生物能够影响多种生理过程。本研究以高转移性激素非依赖性的前列腺癌细胞株 PC- 3M 为研究对象, 以丁酸钠诱导 PC- 3M 细胞凋亡, 观察 hmSD 在细胞凋亡前后的变化, 从而揭示前列腺癌 hmSD 与细胞凋亡的相关性, 为 hmSD 应用于前列腺癌的诊断与治疗提供理论依据。

[收稿日期] 2003- 08- 26 [修回日期] 2003- 11- 03

* [基金项目] 吉林省科技厅资助项目(No. 20010709)

Δ 通讯作者 Tel: 0431- 5632348; E- mail: pro_ 2@jlu. edu. cn

材 料 和 方 法

1 细胞株及试剂

前列腺癌细胞株 PC-3M 培养于含 10% - 20% 小牛血清的 IMDM 培养基中, 置于 5% CO₂、37 °C 恒温密闭孵箱中, 2-3 d 传代; 丁酸钠(Sigma) 以无菌去离子水配制成 0.2 mol/L 的贮存液, 高压灭菌于 4 °C 保存, 使用时用培养液稀释成所需浓度。

2 相差显微镜观察丁酸钠作用后细胞形态学变化

取对数生长期 PC-3M 细胞, 调细胞浓度为 5×10^7 cells/L, 接种于无菌 96 孔培养板, 24 h 后分组加药。共分 7 组, 分别为对照组、丁酸钠 0.1 mmol/L 组、0.2 mmol/L 组、1 mmol/L 组、2 mmol/L 组、5 mmol/L 组和 10 mmol/L 组, 每组设 5 复孔, 连续培养 6 d, 第 3 d 更换培养液并重新加药。每天用相差显微镜观察细胞并拍照记录。

3 吖啶橙/溴化乙锭(AO/EB)染色检测凋亡细胞

取对数生长期 PC-3M 细胞, 以不同浓度的丁酸钠作用一定时间后收集, 调细胞浓度为 0.5×10^9 cells/L - 2.0×10^9 cells/L, 用 1 μ L 吖啶橙/溴化乙锭(1 份 PBS 中 0.1 g/L 吖啶橙溶液, 1 份 PBS 中 0.1 g/L 溴化乙锭溶液)与 25 μ L 细胞悬液轻微混合, 置 10 μ L 悬浮细胞于载玻片上, 用荧光显微镜检测至少 300 个细胞, 记录其中的凋亡细胞数, 计算凋亡率。凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。样品必须立即测评。

4 HmSD 活性的测定

①给药方法: 取对数生长期 PC-3M 细胞, 调细胞浓度为 5×10^7 cells/L, 100 μ L/孔接种于无菌 96 孔培养板, 24 h 后分组加药, 方法同上。每组设 5 复孔, 培养 48 h 后收集细胞。②细胞悬液经超声匀浆后, 离心 10 min (3 000 r/min), 吸取上清作为样本。③酶与底物反应: 10 g/L 混合神经节苷脂 (10 μ L), 0.5 mmol/L 醋酸钠 pH 4.6 (20 μ L), 2% TritonX-100 (10 μ L), 20 g/L BSA (10 μ L), 样品 (100 μ L), 水 (40 μ L), 37 °C 水浴孵育 1-3 h。④TBA 显色反应, 孵育的样品加高碘酸钠 0.1 mL, 室温 20 min, 加亚砷酸钠 1 mL, 震荡混匀, 加硫代巴比妥酸(TBA)液 3 mL, 混匀, 沸水浴 15 min, 冰水中 5 min, 加环己酮 3 mL, 混匀后, 离心 3 000 r/min, 10 min, 吸取上清检测 A_{595} 与 A_{532} 的值, 根据吸光度值计算 hmSD 的活性。⑤唾液酸酶计算公式: $(0.084 \times A_{595} - 0.031 \times A_{532}) \times 3/4 \times 1/V \times 1/P \times 1/T$ 。V 是样品的体积, 单位是 mL; P 是样本的蛋白浓度, 单位是 g/L; T 是孵育时间, 单位是

h。⑥蛋白定量: 以 BSA 作为标准蛋白, 应用 BIORAD PROTEIN 试剂, 检测 A_{595} 值, 计算出样品的蛋白浓度。

5 统计学处理

统计学处理采用 *t*-test 分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用直线回归法进行两变量间相关检验。

结 果

1 不同剂量丁酸钠对 PC-3M 细胞的促凋亡作用

不同剂量丁酸钠作用于 PC-3M 细胞 48 h 后, 相差显微镜下可观察到典型的细胞凋亡现象, 细胞贴壁不佳, 部分细胞漂浮于培养液中, 细胞固缩, 失去原有的形态, 细胞膜表面不光滑, 出现发泡现象, 形成凋亡小体。细胞形态学变化呈时间剂量依赖性。收集细胞, 经吖啶橙/溴化乙锭染色后荧光显微镜下观察, 对照组细胞形态为规则的圆形, 细胞膜光滑, 呈均匀的绿色。丁酸钠作用 48 h 后, 镜下可观察到较多早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞, 早期凋亡细胞多为圆形, 细胞膜较粗糙, 呈绿色, 细胞核中有鲜绿色的斑点; 晚期凋亡细胞形状不规则, 细胞膜粗糙, 有较多突起, 被吖啶橙染成橙色, 细胞中有鲜亮的橙色斑点。细胞凋亡率呈剂量依赖性。

每份样品镜下计数 300 个细胞, 记录其中的凋亡细胞数, 计算凋亡率。凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ (图 1、图 2)。

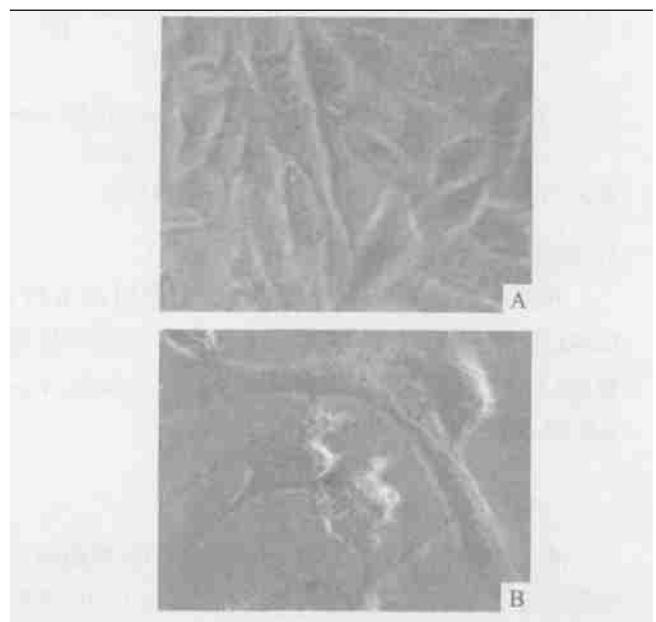


Fig 1 Apoptosis cells induced by NaBT for 48 h. A: control (phase - contrast microscope, $\times 100$); B: apoptosis cells (phase - contrast microscope, $\times 100$).

图 1 丁酸钠作用 48 h 诱导的细胞凋亡

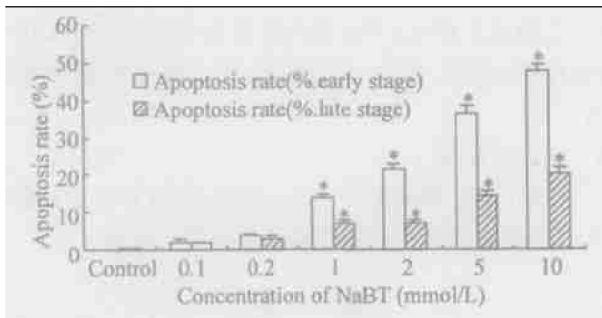


Fig 2 Apoptosis rate of PC-3M cells induced by NaBT for 48 h (detected by AO/EB assay, $\times 100$). $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control.

图 2 不同剂量丁酸钠作用 48 h 后 PC-3M 细胞的凋亡率

2 丁酸钠对 PC-3M 细胞 hmSD 活性的影响

不同剂量的丁酸钠作用 PC-3M 细胞 48 h 后对 hmSD 的活性均有明显下调作用, 并且随着剂量的加大对 hmSD 活性的下调作用也越明显。丁酸钠 2 mmol/L 组 hmSD 活性较对照组下调了将近一个数量级, 5 mmol/L 组和 10 mmol/L 组的 hmSD 活性几乎很难测定(图 3)。

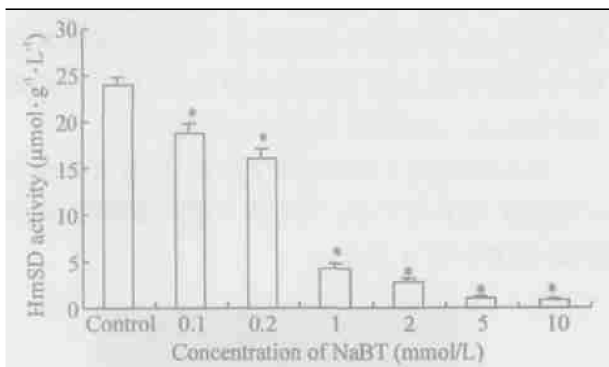


Fig 3 Effect of down-regulate of hmSD activity after NaBT treatment for 48 h. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs control.

图 3 丁酸钠作用 48 h 后对 hmSD 活性的下调作用

3 细胞凋亡率与 hmSD 活性的相关性

相关分析显示, 不同浓度的丁酸钠作用 48 h 后, hmSD 活性与早期和晚期的细胞凋亡率均呈明显负相关($P < 0.05$), 相关系数分别为 $r = -0.86$, $r = -0.83$ 。

讨 论

本实验结果证实, 丁酸钠诱导 PC-3M 细胞凋亡的同时显著下调 hmSD 的活性, 凋亡率与 hmSD 活性呈负相关, 提示在 PC-3M 细胞中 hmSD 与细胞凋亡可能存在某种密切的关系。

HmSD 是一种位于质膜上的特殊糖苷酶, 具有严格的底物特异性, 专一水解神经节苷脂, 在细胞膜表

面行使重要功能。很多研究已经显示, hmSD 在细胞分化^[3,4]、凋亡^[5]和细胞恶性转化中^[6-8]发挥重要的作用。近期研究显示, 在人类的恶性肿瘤中, hmSD 的表达普遍上调。Kakugawa 等^[2]证实, hmSD 的 mRNA 水平和酶活性在结肠癌组织中比正常组织上调 3 - 100 倍。本研究的前期工作初步证实, 前列腺癌组织 hmSD 的表达明显高于非癌组织, 在同一病例中, 癌组织比非癌组织高 4.5 - 6 倍; hmSD 的表达与肿瘤细胞的分化程度呈正相关, 提示 hmSD 可能在前列腺癌的发生中扮演重要角色。Kakugawa 等^[2]的研究还指出, 高表达的 hmSD 抑制细胞凋亡可能是肿瘤发生的环节之一。在本研究中, 丁酸钠诱导 PC-3M 细胞凋亡的同时, 下调 hmSD 的活性, 凋亡率与 hmSD 活性呈明显的负相关, 说明 hmSD 在前列腺癌的发生中可能与细胞凋亡有关, 这与 Kakugawa 等在结肠癌的研究中所得结论一致。

丁酸钠对肿瘤细胞的作用机制是多方面的, 其中, 通过对 Bcl-2 的调节引起线粒体膜电位改变从而引起 caspases 级联活化可能是其诱导肿瘤细胞凋亡的重要环节^[9]。Kakugawa 等^[2]报道, 将 hmSD 的基因转入结肠癌细胞后, Bcl-2 的蛋白水平明显上调, 同时伴随 caspase3 和 caspase9 的下调。转染 hmSD 的细胞与对照组比较, 在丁酸钠的作用下表现出明显的凋亡抑制。说明在肿瘤细胞中, 高表达的 hmSD 通过上调 Bcl-2 的途径抑制肿瘤细胞凋亡, 可能是细胞癌变的重要途径之一。

HmSD 抑制凋亡的确切作用机制尚未见报道, 根据 hmSD 在亚细胞结构中的位点和严格的底物特异性, 认为 hmSD 抑制凋亡的机制是通过在细胞表面调节神经节苷脂的糖基化而引发信号转导^[2]。神经节苷脂是 hmSD 的特异性底物, 是一种含唾液酸的糖鞘脂, 位于细胞膜的外表面, 神经节苷脂的变化对调节细胞内外信息传递有重要意义。Hakomori^[10]很早就发现, 所有的肿瘤中细胞表面的糖基化均发生异常改变, 这种改变与肿瘤的侵袭性、转移性等特性密切相关。近年来, 对肿瘤细胞表面异常的糖基化所引发的凋亡信号转导的研究为癌症研究开辟了一条新的路径。HmSD 的作用产物半乳糖酰鞘氨醇很可能是凋亡信号转导的负调控因子^[2]。神经节苷脂 GM3、GD3 可促进细胞凋亡^[11,12], 高表达的 hmSD 对神经节苷脂 GM3、GD3 的抑制可能是肿瘤细胞凋亡抑制的原因之一。总之, 在肿瘤细胞中高表达的 hmSD 可能是通过调节细胞膜表面神经节苷脂的糖基化而干扰凋亡信号转导, 引起凋亡抑制, 促进肿瘤

恶性转化。

本研究证实,丁酸钠诱导高转移性的激素非依赖性前列腺癌细胞株 PC-3M 发生凋亡的同时,下调 hmSD 的活性,凋亡率与 hmSD 活性呈负相关,提示过度表达的 hmSD 影响细胞凋亡可能是前列腺癌的发生机制之一。

[参 考 文 献]

- [1] 宫城 妙子. シアリターゼ研究の新展開[J]. 蛋白質・核酸・酵素, 1998, 43(16): 2358-2365.
- [2] Kakugawa Y, Wada T, Yamaguchi K, et al. Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(16): 10718-10723.
- [3] Kim YJ, Varki A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer[J]. Glycoconj J, 1997, 14(5): 569-576.
- [4] No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(8): 3346-3351.
- [5] Nojiri H, Many H, Isono H, et al. Induction of terminal differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cells by brefeldin A, a drug affecting ganglioside biosynthesis[J]. FEBS Lett, 1999, 453(1-2): 140-144.
- [6] Bartke T, Siegmund D, Peters N, et al. p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF- κ B-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells[J]. Oncogene, 2001, 20(5): 571-580.
- [7] Siddiqui B, Whitehead JS, Kim YS. Glycosphingolipids in human colonic adenocarcinoma[J]. J Biol Chem, 1978, 253(7): 2168-2175.
- [8] Taki T, Takamatsu M, Myoga A, et al. Glycolipids of metastatic tissue in liver from colon cancer: appearance of sialylated Le (x) and Le (x) lipids[J]. J Biochem (Tokyo), 1988, 103(6): 998-1003.
- [9] Thompson MA, Rosenthal MA, Ellis SL, et al. c-Myb down-regulation is associated with human colon cell differentiation, apoptosis, and decreased Bcl-2 expression[J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5168-5175.
- [10] Hakomori S. Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(16): 10231-10233.
- [11] Ono M, Handa K, Withers DA, et al. Motility inhibition and apoptosis are induced by metastasis-suppressing gene product CD82 and its analogue CD9, with concurrent glycosylation[J]. Cancer Res, 1999, 59(10): 2335-2339.
- [12] De Maria R, Lenti L, Malisan F, et al. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis[J]. Science, 1997, 277(5332): 1652-1655.