

[文章编号] 1000-4718(2009)03-0502-03

人质膜型唾液酸酶在前列腺癌细胞凋亡中的作用*

禹彬^{1,2}, 孙连坤¹, 许莉¹, 李晓洁¹, 李扬^{1△}, 赵雪俭¹

(¹ 吉林大学白求恩医学院病理生理学教研室, 吉林 长春 130021; ² 内蒙古民族大学附属医院, 内蒙古 通辽 028000)

[摘要] 目的: 探讨人质膜型唾液酸酶(NEU3)在维生素 K3(VK3)诱导的人雄激素非依赖型前列腺癌 PC3 细胞凋亡中的作用及可能机制。方法: 以稳定转染人质膜型唾液酸酶基因(neu3)的前列腺癌细胞(PC3-neu3 细胞)为靶细胞,通过 MTT、吖啶橙/溴化乙啶(AO/EB)染色观察 VK3 作用下 NEU3 与凋亡的关系;应用细胞内活性氧(ROS)测定,Western blotting 检测 p65、Bcl-XL 蛋白表达,探讨 NEU3 影响细胞凋亡的机制。结果: (1)VK3 浓度相同时,PC3-neu3 细胞的生存率高于 PC3 细胞,凋亡率低于 PC3 细胞;PC3-neu3 细胞内 ROS 产生的荧光强度弱于 PC3 细胞。(2)在 VK3 的作用下,p65 的蛋白表达在两组细胞中具有相同的趋势,均随 VK3 浓度的增加,蛋白表达增强;Bcl-XL 的蛋白表达趋势则相反,PC3 细胞组,Bcl-XL 的表达随 VK3 浓度的增加逐渐减弱,而 PC3-neu3 细胞组则增强,两组比较差异显著($P < 0.01$)。结论: NEU3 对 VK3 诱导的细胞凋亡具有抵抗作用,这一作用是通过降低细胞内活性氧水平,上调 Bcl-XL 和 p65 的蛋白表达实现的。

[关键词] 人质膜型唾液酸酶; 前列腺肿瘤; 维生素 K3; 细胞凋亡

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

Effects of human membrane associated sialidase on apoptosis of PC3 cells

YU Bin^{1,2}, SUN Lian-kun¹, XU Li¹, LI Xiao-jie¹, LI Yang¹, ZHAO Xue-jian¹

(¹ Department of Pathophysiology, Norman Bethune Medical College of Jilin University, Changchun 130021, China; ² The Affiliation Hospital of Innermongolia National University, Tongliao 028000, China. E-mail: lyang@jlu.edu.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To explore the effects and mechanisms of human membrane associated sialidase (NEU3) on apoptosis of PC3 cells induced by vitamin K3 (VK3). **METHODS:** The target cells was PC3 cells stable transfected the gene of NEU3 (neu3). The relation of NEU3 and apoptosis was detected by MTT assay and AO/EB-staining. The mechanisms were investigated by examining intracellular ROS and p65, Bcl-XL protein expression. **RESULTS:** (1) The survival rate of PC3-neu3 cells were higher than that of PC3 cells under the condition of the same VK3 density. The apoptosis rate of PC3-neu3 cells was lower, and the fluorescence intensity of ROS in PC3-neu3 cells was weaker than that in PC3 cells. (2) The expression tendency of p65 was the same in the two groups treated by VK3. The density of VK3 was increased, the protein expression was stronger. With the density of VK3 increased, the Bcl-XL protein expression was weaker in PC3 cells and it was stronger in PC3-neu3 cells ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** The antiapoptotic mechanisms of NEU3 may be related with the suppressed intra-cellular ROS synthesis, upregulation of p65 and Bcl-XL expression.

[KEY WORDS] Human membrane-associated sialidase; Prostatic neoplasms; Vitamin K3; Apoptosis

肿瘤是威胁人类健康的主要疾病之一。许多研究显示,人质膜型唾液酸酶(human membrane associated sialidase, NEU3)与肿瘤的发生密切相关,肿瘤组织中 NEU3 的表达普遍增高^[1-2]。我们的前期工作证明 NEU3 与前列腺特异性抗原(PSA)及前列腺癌恶性程度呈正相关,并初步证实 NEU3 与肿瘤细胞的凋亡抑制有关^[3]。本实验以稳定转染人质膜型唾液酸酶基因(neu3)的前列腺癌 PC3 细胞株(PC3-neu3)为研究对象^[4],以未转染的 PC3 细胞株为对

照,通过 VK3 诱导细胞凋亡,观察 NEU3 在细胞凋亡中的作用,并探讨其可能的机制,为前列腺癌的诊治、治疗提供实验依据。

材 料 和 方 法

1 细胞培养

PC3 和 PC3-neu3 细胞株用含 10% 小牛血清 IMDM 培养液,37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。

2 MTT 法检测 VK3 对细胞增殖的影响

[收稿日期] 2008-03-31 [修回日期] 2008-12-16

* [基金项目] 吉林省科技发展计划资助项目(No. 20070728-1);教育部留学基金资助项目(No. 2003)

△通讯作者 Tel: 0431-85619485; E-mail: lyang@jlu.edu.cn

本实验共分 6 组,PC3 和 PC3 - neu3 细胞各分 3 组:(1) 对照组;(2) VK3 30 μmol/L 组;(3) VK3 60 μmol/L 组。每组设 5 复孔。药物作用结束前 4 h 每孔加 MTT(5 g · L⁻¹)20 μL,然后加 DMSO 100 μL,酶标仪检测各孔的吸光度值(A₅₇₀)。

3 吖啶橙/溴化乙啶(AO/EB)双荧光染色法检测细胞凋亡

分别取 PC3 和 PC3 - neu3 细胞接种于 6 孔培养板,每孔 5 × 10⁵。孵育 24 h 后,同上分组加入 VK3 作用 4 h,加入 AO/EB 30 μL,激光共聚焦显微镜观察、拍照。计算凋亡细胞百分比:每份样品选取 3 个不同视野,每个视野计数 100 个细胞,记录其中的凋亡细胞数。

4 DCFH - DA 激光共聚焦法检测细胞内 ROS

PC3 和 PC3 - neu3 细胞接种于 24 孔板,孵育 24 h,分组同上,VK3 作用 4 h,加 DCFH - DA。激光共聚焦显微镜观察荧光强度,由此判断细胞内 ROS 产生情况。

5 Western blotting 检测 P65、Bcl - XL 蛋白表达

VK3 作用 8h 后,提取每组细胞总蛋白,SDS - PAGE 电泳。转至 PVDF 膜,分别加 I 抗(P65 抗体、Bcl - XL 抗体),第 2 d 早晨加碱性磷酸酶标记的 II 抗,DAB 显色、拍照。

6 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学处理采用 SPSS11.5 软件分析,各组间均值比较采用 ANOVA 检验。

结 果

1 VK3 对细胞生长的影响

MTT 法显示,不同浓度 VK3 分别作用于 PC3 和 PC3 - neu3 细胞 24 h,其生存率均降低,且 VK3 浓度为 60 μmol/L 时,细胞存活率明显降低,与各自对照组比较 $P < 0.01$ 。并且 VK3 浓度相同时,PC3 - neu3 细胞的生存率高于 PC3 细胞($P < 0.05, P < 0.01$),见表 1。

表 1 维生素 K3 作用 24 h 细胞生存率

Tab 1 The survival rate of PC3 and PC3 - neu3 cells treated with VK3 for 24 h(% . $\bar{x} \pm s, n = 5$)

Group	PC3 cells	PC3 - neu3 cells
Control	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.03
VK3(30 μmol/L)	0.92 ± 0.03*	0.96 ± 0.01*
VK3(60 μmol/L)	0.47 ± 0.01**	0.62 ± 0.02***

* $P < 0.05, ** P < 0.01$ vs control; * $P < 0.05, ** P < 0.01$ vs PC3 cells.

2 AO/EB 法检测细胞凋亡

两种细胞对照组均为梭形或多角形,细胞膜光滑,细胞核染色质为均匀绿色;VK3 作用后,细胞核出现典型的凋亡形态改变,可见荧光亢进的固缩状或圆珠状小体,见图 1。计算凋亡细胞百分比,可见 VK3 浓度相同时,PC3 - neu3 细胞组的凋亡百分比低于 PC3 细胞组,见表 2。

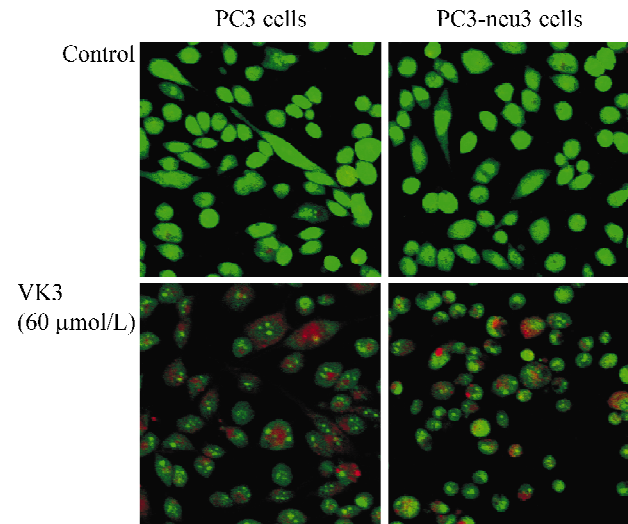


Fig 1 Cells apoptosis detected by AO/EB staining(×200).

图 1 AO/EB 染色检测细胞凋亡

表 2 VK3 作用下 PC3 细胞和 PC3 - neu3 细胞的凋亡百分比

Tab 2 The apoptotic rate of PC3 and PC3 - neu3 cells treated with VK3(% . $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	PC3 cells	PC3 - neu3 cells
Control	3.30 ± 1.52	4.30 ± 0.58
VK3(30 μmol/L)	39.70 ± 9.07	24.30 ± 4.04#
VK3(60 μmol/L)	63.00 ± 7.54	49.70 ± 8.96#

$P < 0.05$ vs PC3 cells.

3 细胞内 ROS 水平检测

图 2 为激光共聚焦显微镜观察结果。两种细胞的对照组都只能见到极微弱的荧光;加入 VK3 荧光强度增强,且随 VK3 浓度的增加而增强。利用 IPP5 软件分析荧光强度,VK3 浓度相同时,PC3 - neu3 细胞的荧光强度弱于 PC3 细胞(数据未显示)。提示 NEU3 具有抵抗 VK3 诱导活性氧产生的作用。

4 p65、Bcl - XL 蛋白的表达

在 VK3 作用下,PC3 和 PC3 - neu3 两组细胞中,p65 的蛋白表达具有相同的趋势,均随 VK3 浓度的增加,蛋白表达增强;当 VK3 浓度相同时,PC3 - neu3 细胞的 p65 蛋白表达强于 PC3 细胞($P < 0.01$)。Bcl - XL 的蛋白表达在两组细胞中趋势相反,在 PC3 细胞组,Bcl - XL 的表达随 VK3 浓度的增加逐渐减弱,而在 PC3 - neu3 细胞组则增强,两组比较差异显著($P < 0.01$),见图 3、表 3。

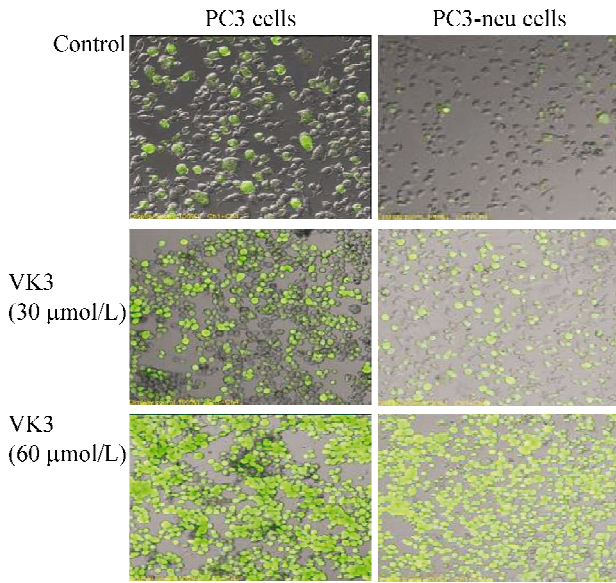


Fig 2 ROS detection in two kinds of cells under laser cofocal microscope.

图2 激光共聚焦显微镜检测细胞内活性氧水平

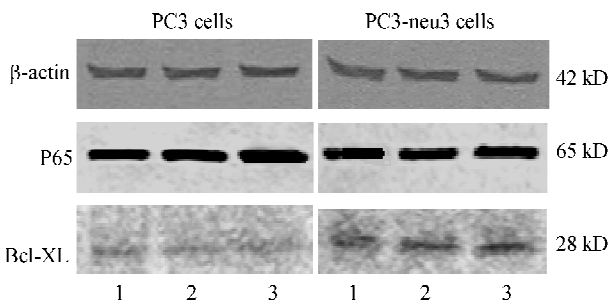


Fig 3 The content changing of p65 and Bcl - XL in PC3 cells and PC3 - neu3 cells treated with VK3. 1: control; 2: VK3 (30 μmol/L); 3:VK3 (60 μmol/L).

图3 p65 和 Bcl - XL 蛋白的表达

表3 p65、Bcl - XL 蛋白的表达

Tab 3 p65 and Bcl - XL protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Group	P65		Bcl - XL	
	PC3	PC3 - neu3	PC3	PC3 - neu3
Control	1.00 ± 0.03	1.21 ± 0.09 [#]	1.00 ± 0.09	1.30 ± 0.16 [#]
VK3 (30 μmol/L)	1.20 ± 0.09 [*]	1.38 ± 0.13 [#]	0.90 ± 0.19	1.56 ± 0.08 ^{***}
VK3 (60 μmol/L)	1.58 ± 0.08 ^{**}	1.79 ± 0.15 ^{***}	0.77 ± 0.04 [*]	1.92 ± 0.13 ^{***#}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs PC3 cells.

讨 论

本课题组前期工作证明, VK3 可以诱导细胞发生凋亡, 这一作用是通过氧化应激来完成的^[5]。本实验中 MTT 与 AO/EB 染色结果显示, NEU3 对 VK3 诱导的细胞凋亡具有抵抗作用。那么这种凋亡抵抗作用是通过何种机制发生的? 为此我们检测了凋亡相关通路(氧化应激、NF - κB、Bcl - XL)的变化。结果显示: 在 VK3 浓度相同的条件下, PC3 - neu3 细胞的荧光强度弱于 PC3 细胞, 表明 NEU3 在抵抗 VK3

诱导的细胞凋亡的过程中减少了细胞内活性氧的产生。这与 Malisan 等^[6]报道相符, 他们研究显示, NEU3 的特异性底物神经节苷脂 GD3 参与活性氧的产生和释放, 当高表达 NEU3 时, 由于底物 GD3 被水解为 GM3, 因此依赖于 GD3 的 ROS 释放减少。

进一步对凋亡相关蛋白的检测发现: 在 VK3 浓度相同的情况下, 抗凋亡蛋白 Bcl - XL 的表达在 PC3 细胞中弱于 PC3 - neu3 细胞的 Bcl - XL 蛋白表达; 表明 NEU3 在抵抗凋亡的过程中, 上调抗凋亡蛋白 Bcl - XL 的表达。Bcl - XL 与 Bcl - 2 同属于 Bcl - 2 家族中的成员, Ozaki 等^[7]将 NEU3 稳定转染结肠癌 HCT - 116 细胞中, 亦发现 Bcl - 2 蛋白含量明显增加。本实验 p65 的 Western blotting 结果显示, 加入 VK3 后两种细胞均出现 p65 蛋白表达升高, PC3 - neu3 细胞的 p65 蛋白表达增高显著, 因此, p65 参与了 NEU3 的抗凋亡过程。p65/p50 异源二聚体是 NF - κB 的典型代表, 几乎存在于所有细胞中, 是对氧化敏感的核转录因子。有研究发现, GD3 可阻止 NF - κB 的核转录诱导肝癌细胞凋亡^[5]。NEU3 与 NF - κB 之间存在着怎样的调节通路, 是否通过 GD3 来完成, 有待进一步研究。

综上所述, 本实验证明 NEU3 对 VK3 诱导的细胞凋亡具有抵抗作用。这一作用是通过降低细胞内活性氧产生, 上调 Bcl - XL 和 p65 的蛋白表达来实现的。此结果为明确 NEU3 的功能及机制奠定了基础, 并为肿瘤的治疗提供了新的思路及实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Ueno S, Saito S, Wada T, et al. Plasmamembrane - associated sialidase up - regulation in renal cell carcinoma and promotes the interleukin - 6 induced apoptosis suppression and cell motility[J]. J Biol Chem, 2006, 281 (12): 7756 - 7764.
- [2] Miyagi T, Wada T, Yamaguchi K, et al. Sialidase and malignancy: a minireview [J]. Glycoconj J, 2004, 20 (3): 189 - 198.
- [3] 李 扬, 狄 茜, 许 莉, 等. 前列腺癌 PC - 3M 细胞 NEU3 活性与细胞凋亡相关性的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (4): 748 - 751.
- [4] 许 莉, 李 扬, 狄 茜, 等. 人质膜型唾液酸酶 (NEU3) 在前列腺癌细胞系 (PC3) 中的表达 [J]. 中国应用生理学杂志, 2005, 21 (3): 299 - 301.
- [5] 周 磊, 李 扬, 苏 静, 等. 维生素 K3 对雄激素非依赖性前列腺癌 PC - 3M 细胞的凋亡诱导作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23 (7): 1339 - 1342.
- [6] Malisan F, Testi R. GD3 ganglioside and apoptosis [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1585 (2 - 3): 179 - 187.
- [7] Ozaki M, Deshpande SS, Angkeow P, et al. Inhibition of the Rac1 GTPase protects against nonlethal ischemia reperfusion induced necrosis and apoptosis *in vivo* [J]. FASEB J, 2000, 14 (2): 418 - 429.