

基础研究

多西他赛对雄激素依赖型及非依赖亚型前列腺癌细胞中C-jun与雄激素受体相互作用的影响

陈玢岫, 徐亚文, 徐啊白, 刘春晓, 郑少波, 李虎林, 许凯
南方医科大学珠江医院泌尿外科, 广东 广州 510282

摘要:目的 研究C-jun和雄激素受体(AR)在多西他赛处理的前列腺癌LNCaP细胞及其非雄激素依赖亚型LNCaP-bic细胞中的相互作用。方法 采用多西紫杉醇处理雄激素依赖型LNCaP前列腺癌细胞及其亚型雄激素非依赖型LNCaP-bic细胞,采用荧光素酶分析检测AR及AP-1基因的表达,利用Western blotting,免疫沉淀方法分析C-jun以及AR的蛋白表达和相互作用。结果 经多西他赛处理后,LNCaP-bic以及其父代LNCaP细胞AR和C-jun在基因表达水平均得到增强。Western blotting提示LNCaP-bic细胞中C-jun的磷酸化水平高于LNCaP细胞,同时其PSA蛋白表达也更强。免疫沉淀结果提示多西他赛使LNCaP-bic细胞株中的AR和C-jun有更高的相关作用。结论 多西他赛可以激活AR非配体依赖的转录功能,AR和C-jun之间的相互作用可能影响多西他赛对前列腺癌的化疗结果。

关键词:多西他赛;前列腺癌细胞;雄激素受体;C-jun

中图分类号:R737.25

文献标志码:A

文章编号:1673-4254(2012)10-1461-04

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.10.017

http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20121012.2015.004.html

Effect of docetaxel on C-jun and androgen receptor interaction in prostate cancer LNCaP cells and its androgen-independence subtype LNCaP-bic cells

CHEN Binshen, XU Yawen, XU Abai, LIU Chunxiao, ZHENG Shaobo, LI Hulin, XU Kai

Department of Urology, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To investigate the effect of docetaxel on the interaction between C-jun and androgen receptor (AR) in prostate cancer LNCaP cells and its androgen-independence subtype LNCaP-bic cells. **Methods** LNCaP and LNCaP-bic cells were treated with docetaxel and the changes in AR and AP-1 expression were evaluated using luciferase assay. Western blotting and immunoprecipitation assay were employed to analyze the effects of docetaxel on the expressions of C-jun and AR and their interaction. **Results** Luciferase assay showed that LNCaP and LNCaP-bic cells expressed higher levels of AR and C-jun after docetaxel treatment. Docetaxel induced a higher level of p-c-jun expression in LNCaP-bic cells than in the parental LNCaP cells. Western blotting showed a strong PSA protein expression in LNCaP-bic cell after docetaxel treatment. Docetaxel caused a stronger interaction between AR and C-jun in LNCaP-bic cells. **Conclusion** Docetaxel activates ligand-independent AR transcription, and the interaction between AR and C-jun may affect the outcome of docetaxel chemotherapy.

Key words: docetaxel; prostate cancer cell; androgen receptor; C-jun

前列腺癌(PCa)是西方国家男性最常见的恶性肿瘤,美国男性因肿瘤导致的死亡率中,前列腺癌排第2位。据美国肿瘤学会统计,2011年美国共有240 890例患者确诊为前列腺癌,其中因前列腺癌导致死亡的病例为33 720例^[1]。流行病学统计,我国前列腺癌发病率也在逐年上升,以统计资料最齐全的海上为例,1998~2002年上海市民的前列腺癌发病率增长为上世纪70年代的8倍^[2]。对于雄激素抵抗型前列腺癌,紫杉醇化疗

可以提高患者的生存率^[3]。C-jun是一种原癌蛋白,它可以与C-fos聚合为雄激素受体(AR)的转录因子AP-1,通过反式激活作用来调控基因表达,对细胞分化起重要作用。

在本实验中,我们采用多西他赛对雄激素依赖型前列腺癌LNCaP细胞株及其非雄激素依赖亚型LNCaP-bic细胞株进行处理,对C-jun与AR之间的相互作用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

雄激素依赖型前列腺癌LNCaP细胞株和非雄激素依赖型前列腺癌LNCaP-bic细胞由瑞典隆德大学临床研究中心Nishtman Dizeyi教授惠赠。

收稿日期:2012-04-07

基金项目:国家自然科学基金(81101559);广东省自然科学基金(10151051501000114)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81101559).

作者简介:陈玢岫,博士,主治医师,E-mail: cbshe@126.com

通讯作者:刘春晓,主任医师,教授,博士生导师,E-mail:liuchx888@hotmail.com

LNCaP 细胞培养液为 RPMI 1640 培养液:内含 10% 新生小牛血清(Gibco), 100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素、0.01 U/ml 胰岛素。LNCaP-bic 细胞培养液去酚红 RPMI 1640 培养液, 内含活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清(Biological Industry)。培养条件为均 37 °C, 含 5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱内。每 2~3 d 换液 1 次。

1.2 细胞转染

细胞按上述操作培养于 60 mm 培养皿中, 脂质法转染细胞。用含萤火虫和海肾荧光酶素的 ARE-luc 报告基因质粒、AP-1-luc 报告基因质粒转染细胞(质粒由瑞典斯堪纳省大学医院 Martina Tinzl 医师惠赠)。转染 24 h 后, 细胞培养液换为去酚红的 RPMI 1640 培养液, 内含活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清, 分为(1)对照组; (2)DOC 组, 多西他赛 10 nm 处理 48 h; (3)DHT 组, 双氢睾酮 100 nm 处理 48 h。裂解细胞, 收集细胞提取物用双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测(Promega), 海肾荧光酶素活性作为内对照。每个实验至少重复 3 次。

1.3 细胞总蛋白的提取

取 1.1 步骤中对数生长期的细胞, 0.25% 胰蛋白酶常规消化后以 3×10^4 孔接种于 6 孔培养板。将 LNCaP 细胞和 LNCaP-bic 细胞均分为(1)对照组; (2)DOC 组: 多西他赛 10 nm 刺激 24 h。细胞弃去培养液后用冰磷酸盐缓冲液漂洗 2 次后收集细胞, 在冰上加裂解液裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 经蛋白含量测定后, 分装并在 -80 °C 储存备用。

1.4 Western blotting 分析

SDS-PAGE 电泳分离蛋白组分, 电转移法将蛋白条带转移至硝酸纤维素薄膜。丽春红染色检查上样量均一性及电转移效率。洗去丽春红染色后, TBST 缓冲液

封闭 1 h, 漂洗后, 蛋白条带与特异一抗孵育过夜, 一抗为 AR 抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc.), C-jun 抗体, P-C-jun 抗体(Cell signalling), 洗涤后与辣根过氧化物酶偶联的抗兔或抗鼠的二抗孵育 1 h, 用增强型 ECL 化学发光(ECL, Amersham Corporation)进行的蛋白分析, 扫描拍照。

1.5 免疫沉淀法检测 Cjun 与 AR 的相互作用

将 300 μ g 细胞提取物与多克隆 AR 抗体以及 20 μ l 蛋白 A-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 进行免疫沉淀。将得到的免疫沉淀物用缓冲液洗涤 4 次, 加入样本缓冲液(6% SDS, 0.24 mol/L Tris-HCl 0.5 mol/L pH 6.8, 30% glycerol, 0.3 mg/ml bromophenol blue, 50 mmol/L DTT)中煮沸 5 min 后, 3000 r/min 离心 30 s。收集上清, 按上文所述方法进行 Western blot 分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 数据用均值 \pm 标准差表示, 两组蛋白表达量差异的比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间数据的比较则采用单因素方差分析, 进一步多重比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 采用荧光素酶系统分析多西他赛处理的非雄激素依赖系 LNCaP-bic 细胞中 ARE 和 AP-1 基因的表达活性

AR 在与配体雄激素结合后, 转到细胞核与雄激素元件(ARE)结合, 在转录水平上增强 PSA 的表达。因此我们通过检测 ARE 的活性来检测 AR 的转录激活功能。而检测 AP-1 的活性亦可反映其构成组分 C-jun 的活性。结果如图 1 所示。

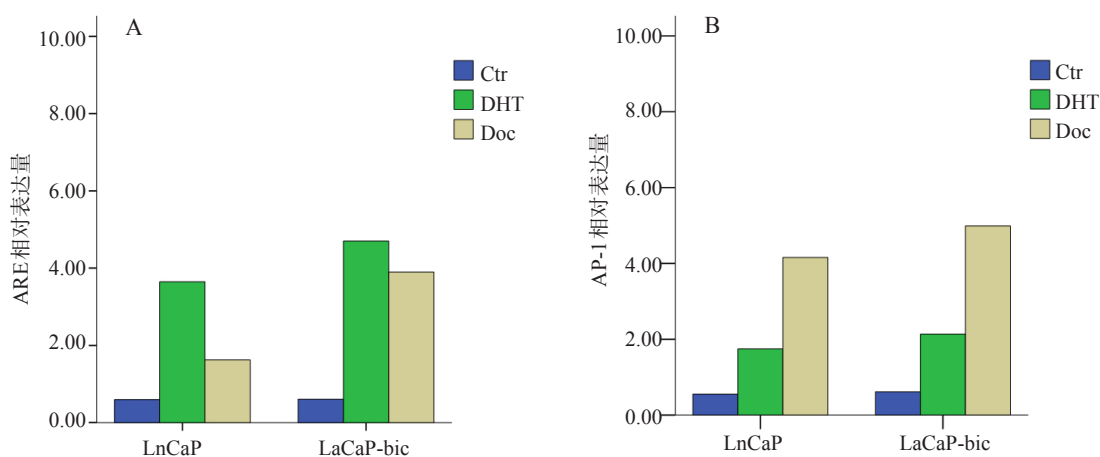


图1 利用 ARE(A)和 AP-1(B)分别作为 AR 和 C-jun 的指标, 荧光酶素分析报告基因活性

Fig.1 Luciferase assay using ARE (A) and AP-1 (B) as the indicator of AR and C-jun activity, respectively.

采用单因素方差分析 LNCaP 细胞和 LNCaP-bic 细胞在对照组、多西他赛处理组和双氢睾酮处理组中

ARE 的相对表达, 各组间提示均有统计学差异 ($F=128.652, P < 0.001$), 且进一步多重比较提示两两之间有

显著差异(P 均小于0.05),对照组表达最低,多西他赛处理组次之,双氢睾酮处理组最高。此结果说明,无论是雄激素依赖的前列腺癌LNCaP细胞,还是雄激素非依赖的LNCaP-bic细胞,在缺乏雄激素配基的情况下,多西他赛均能促进其AR的基因表达水平,但此促进作用相对于雄激素双氢睾酮而言较弱。

单因素方差分析LNCaP细胞和LNCaP-bic细胞在对照组、多西他赛处理组和双氢睾酮处理组中AP-1的相对表达量可发现对照组表达最低,双氢睾酮处理组次之,多西他赛处理组最高。且进一步多重比较提示两两之间有显著差异(P 均 <0.05),说明多西他赛与雄激素双氢睾酮均能促进LNCaP细胞及其子代非雄激素依赖的LNCaP-bic细胞中C-jun的基因表达水平,但多西他赛的促进作用强于双氢睾酮。

2.2 多西他赛促进雄激素非依赖型LNCaP细胞中Cjun的磷酸化及AR的转录活性

我们采用Western blotting方法,分析了LNCaP-bic细胞与其父代LNCaP细胞在多西他赛作用下,细胞核中C-jun磷酸化的情况。通过条带灰度值估算蛋白相对表达量,采用独立样本 t 检验分析提示,经多西他赛处理后,LNCaP和LNCaP-bic细胞中C-jun的磷酸化水平与对照组相比明显升高,两者间有显著性差异($t=6.290, P=0.002$ 和 $t=14.960, P<0.001$)。但LNCaP-bic细胞中多西他赛处理组和对照组p-C-jun相对蛋白量的差值为 1.67 ± 0.15 ,而LNCaP细胞中多西他赛处理组和对照组p-C-jun相对蛋白量的差值为 0.90 ± 0.10 ,两者间存在着显著性差异($t=7.575, P<0.002$),因此在多西他赛的处理下,LNCaP-bic细胞的C-jun蛋白磷酸化水平相对于其父代LNCaP细胞更强(图2)。

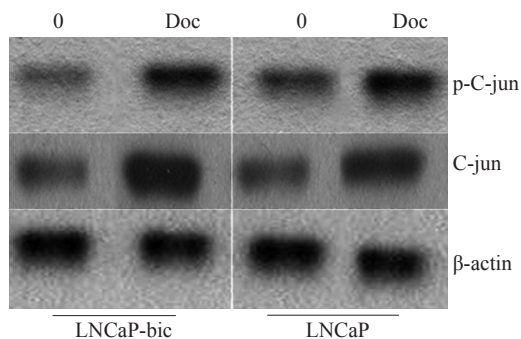


图2 多西他赛处理后,LNCaP-bic细胞C-jun的磷酸化水平明显升高

Fig.2 Docetaxel induces a higher level of p-C-jun expression in LNCaP-bic cells than in the parental LNCaP cells.

我们对多西他赛处理的LNCaP-bic细胞PSA蛋白表达也进行了Western blotting分析,结果如图3所示,在多西他赛的处理下,LNCaP-bic细胞对照组和多西他

赛处理组的PSA相对蛋白表达量之间有显著性差异($t=18.570, P<0.001$),前者表达显著低于后者;而LNCaP细胞对照组和多西他赛处理组的PSA相对蛋白量二者间并无统计学差异($t=0.616, P=0.571$)。结果表明,多西他赛可以诱导LNCaP-bic细胞表达更多的PSA蛋白。

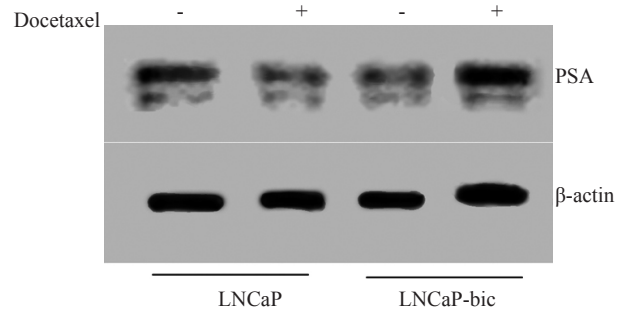


图3 多西他赛的处理后,LNCaP-bic细胞的PSA蛋白表达增强

Fig.3 Docetaxel induces a strong PSA protein expression in LNCaP-bic cells.

2.3 多西他赛诱导性激素非依赖型LNCaP细胞Cjun和AR的相互作用

在之前的许多研究中^[4-5],C-jun与AR之间的相互作用已经得到了确切的证实。为了进一步了解多西他赛作用下LNCaP-bic细胞内C-jun和AR之间的相互作用,我们采用免疫沉淀方法进行了分析。设立LNCaP细胞为对照组,首先经抗AR抗体得到免疫复合物,其次对免疫复合物用Western blotting方法检测C-jun蛋白表达,以未进行免疫沉淀的LNCaP-bic细胞裂解液为Input。结果如图4所示。因为经AR免疫沉淀之后,只有与AR相关性高的C-jun蛋白被保留下来,所以我们虽然在实验结果2.2的电泳结果中发现多西他赛使LNCaP细胞的C-jun表达呈增强趋势,但在本实验步骤中多西他赛处理的LNCaP细胞组中C-jun的相对蛋白表达量经免疫沉淀后却较对照组下降,两者间具有统计学差异($t=9.566, P<0.001$),说明LNCaP细胞中的C-jun和AR在多西他赛处理下未能比对照组表现出更强的相关性。

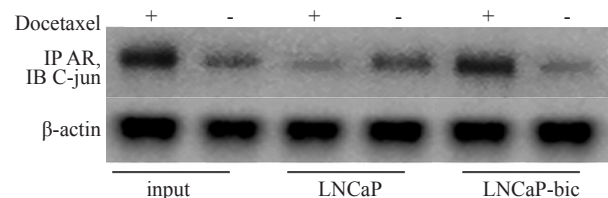


图4 免疫沉淀提示多西他赛处理后的LNCaP-bic细胞比起LNCaP细胞,C-jun与AR有着更强的相关性

Fig.4 Immunoprecipitation assay demonstrating docetaxel-induced strong interactions between AR and C-jun in LNCaP-bic cells.

LNCaP-bic细胞而经AR免疫沉淀后,其多西他赛处理组C-jun的相对蛋白表达量显著高于和对照组($t=18.725, P=0.001$)。条带特点与INPUT组相似,说明在多西他赛处理下,LNCaP-bic细胞中的C-jun和AR具有更高的相关性。

3 讨论

Hara等^[6]将LNCaP的一种非雄激素依赖亚型长期暴露在多西他赛环境中,从而获得可以稳定传代的抵抗多西他赛LNCaPcr亚型细胞。研究发现AR信号机制在LNCaPcr继续发挥作用,而敲除了AR基因的LNCaPcr细胞生长则受到抑制。我们通过荧光素酶分析发现,LNCaP和LNCaP-bic细胞经多西他赛处理后与对照组相比ARE在基因表达水平均有提高。这提示多西他赛可以使LNCaP及其亚型LNCaP-bic细胞中的AR在转录水平上得到了活化。有研究表明,多西他赛可以抑制PTEN基因阳性的前列腺癌细胞株22Rv1中AR的转录活性,但却不能抑制缺乏PTEN基因的LNCaP细胞株中AR的活性。这与我们的实验结果是一致的^[7-9]。

我们通过荧光素酶分析发现,多西他赛处理后的LNCaP和LNCaP-bic细胞,其AP-1表达活性与AR一致,呈升高表现。AR的功能和转录因子AP-1紧密关联,AP-1由原癌蛋白C-jun和C-Fos聚合而成。C-jun可以通过与AR发生特异的相互作用,来调节其转录活性,以影响细胞的生长。C-jun第73位丝氨酸经磷酸化后可有效地免受泛素化作用,导致C-jun半衰期延长,活性增加。Chen等^[10]研究发现,C-jun作为辅激活因子可以提高AR对基因的调控作用,诱导雄激素非依赖型前列腺癌细胞的增殖。

通过Western blotting分析我们可以看到,LNCaP-bic细胞的C-jun的磷酸化水平要明显强于其父代LNCaP细胞,与之同时,LNCaP-bic细胞的PSA蛋白表达也增强。由于PSA是AR的下游基因,PSA蛋白表达增加,说明多西他赛提高了非雄激素依赖型LNCaP-bic细胞中AR的转录活性,而这种转录功能是不依赖雄激素配基的。为了验证C-jun在其中的关系,我们利用免疫沉淀技术进行了检测。首先采用AR抗体对细胞总提取物进行沉淀,此时与AR蛋白有直接相关作用的蛋白亦被沉淀。通过对沉淀物进行Western blotting分析,发现LNCaP-bic细胞的C-jun蛋白表达比对照组明显增强,而LNCaP细胞的C-jun表达并未呈现同样特

点。结果表明多西他赛处理后的LNCaP-bic细胞比起LNCaP细胞,C-jun与AR有着更强的相关性。

综上所述,我们的研究初步证明了多西他赛能提高LNCaP细胞及其亚型LNCaP-bic细胞中非配基依赖型AR的转录活性,而在LNCaP-bic细胞中,AR和C-jun之间存在着明显的相关性。虽然不能就此得出C-jun在其中起决定性的重要作用的结论,但C-jun在多西他赛处理的LNCaP-bic细胞中,至少与AR活性相关。在AIPC细胞中,非配基依赖型的AR活性增高后,可以选择性的上调细胞分裂M期的相关基因,使得紫杉醇作用的靶点——M期检查点失活,从而使肿瘤细胞得以分裂增殖^[11]。这也许是AIPC细胞在接受紫杉醇治疗后,逐渐出现紫杉醇抵抗的机制之一。

参考文献:

- [1] Brawley OW. Prostate cancer epidemiology in the United States[J]. World J Urol, 2012, 30(2): 195-200.
- [2] Cullen J, Elsamanoudi S, Brassell SA, et al. The burden of prostate cancer in Asian nations[J]. J Carcinog, 2012: 7.
- [3] Tannock IF, de Wit R, Berry WR, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351: 1502-12.
- [4] Mohler JL, Gregory CW, Ford OI, et al. The androgen axis in recurrent prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10: 440-8.
- [5] Yuan H, Young CY, Tian Y, et al. Suppression of the androgen receptor function by quercetin through protein-protein interactions of Sp1,c-Jun,and the androgen receptor in human prostate cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 339(1-2): 253-62.
- [6] Hara T, Ushio K, Nishiwaki M, et al. A mutation in beta-tubulin and a sustained dependence on androgen receptor signalling in a newly established docetaxel-resistant prostate cancer cell line[J]. Cell Biol Int, 2010, 34(2): 177-84.
- [7] 于洪波,韩小兵,梁宜骞,等. OPN及survivin在前列腺癌组织中的表达及临床意义[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(5): 1141-3.
- [8] Gan L, Chen S, Wang Y, et al. Inhibition of the androgen receptor as a novel mechanism of taxol chemotherapy in prostate cancer [J]. Cancer Res, 2009(69): 8386-94.
- [9] 张哲,孔垂泽. scytonemin对前列腺癌细胞系22RV1的增殖及PLK1活性的影响[J]. 中国医科大学学报, 2011, 40(9): 844-5.
- [10] Chen SY, Cai C, Fisher CJ, et al. c-Jun enhancement of androgen receptor transactivation is associated with prostate cancer cell proliferation[J]. Oncogene, 2006, 25(54): 7212-23.
- [11] Wang QB, Wei L, Yong Z, et al. Androgen receptor regulates a distinct transcription program in Androgen-Independent prostate cancer[J]. Cell, 2009, 138(2): 245-56.

(编辑:陈望忠)