

· 基础论著 ·

NSBP1 调节非激素依赖性前列腺癌 DU145 细胞的凋亡和增殖

蒋宁 李晓石 陈靖 常文亮 王娟 周利群 牛远杰

【摘要】 目的 探讨重组慢病毒介导的人核小体结合蛋白1(NSBP1)基因沉默对非激素依赖性前列腺癌细胞系 DU145 凋亡和增殖的调控机制。方法 慢病毒 lentivirus-shRNA-NSBP1 转染非激素依赖性前列腺癌细胞系 DU145, MTT 法检测细胞生长活性, 流式细胞技术检测细胞凋亡和细胞周期。Western blot 方法检测敲减 NSBP1 蛋白后细胞中 cyclinB1 与 BCL-2 蛋白的表达。结果 体外实验证实 NSBP1 表达水平的降低, 对肿瘤细胞的生长有明显抑制作用, 96 h 细胞生长抑制率为 22.6%。同时随着 NSBP1 表达水平的降低, cyclinB1 和 BCL-2 的蛋白的表达也降低。结论 NSBP1-RNAi-lentivirus 重组慢病毒能有效抑制 DU145 细胞的生长, NSBP1 可能通过调控 cyclinB1、BCL-2 基因的变化影响肿瘤细胞的生长。

【关键词】 前列腺肿瘤; RNA, 小分子干扰; HMG1 蛋白质; 慢病毒属; 印迹法, 蛋白质

NSBP1 regulate the proliferation and apoptosis of the prostate cancer DU145 cell JIANG Ning, LI Xiao-shi, CHEN Jing, CHANG Wen-liang, WANG Juan, ZHOU Li-qun, NIN Yuan-jie. Department of Urology, The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin Institute of Urology, Tianjin 300211, China
Corresponding author: NIN Yuan-jie, Email: jiangning@bjmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate regulation mechanism on apoptosis and proliferation by recombinant lentivirus-mediated nucleosome-binding protein 1 (NSBP1) gene silencing of the prostate cancer DU145 cell. **Methods** The lentivirus-shRNA-NSBP1 transfect DU145 cell, cell growth activity is assayed by MTT, cell apoptosis detected by Flow Cytometry and cell cycle detected cyclinB1 and BCL-2 protein expression after knockdown NSBP1 protein by Western blot method. **Results** We confirm the proliferation of the tumor cells was significantly inhibited 22.6% in 96 h after NSBP1 protein expression were lower, simultaneously cyclinB1 and BCL-2 protein is also reduced. **Conclusions** NSBP1-RNAi-lentivirus recombinant lentivirus can effectively inhibit the proliferation of DU145 cells, NSBP1 by regulating cyclinB1 and BCL-2 protein affect the growth of tumor cells.

【Key words】 Prostatic neoplasms; RNA, small interfering; HMG1 protein; Lentivirus; Blotting, Western

前列腺癌是老年男性最常见的肿瘤之一, 美国癌症学会(ACS)公布 2009 年美国前列腺癌为新发病例的 28%, 死亡病例约占男性癌症相关死亡病例的 11%, 是美国男性癌症的第二大死因^[1]。我们国家前列腺癌发病率呈逐年增高趋势, 最新发布的《北京市 2011 年健康白皮书》提示, 北京市男性前列腺癌发病率由 2001 年的 5.53/10 万上升至 2010 年的 16.62/10

万, 9 年增长 200.5%, 年均增长 9.2%。所以对前列腺癌发病机制的研究有着重要的意义。NSBP1 是高迁移率族蛋白(high mobility group protein, HMG 蛋白)家族的一员, HMG 蛋白在人类疾病的发生、发展过程中有着重要作用, 参与肿瘤细胞的浸润和转移^[2], 增强染色质转录和复制, 与多种肿瘤有关^[3], 但 NSBP1 的功能尚不明确。本课题组前期已应用分子生物学方法证实人组织前列腺癌、细胞系和膀胱癌组织中 NSBP1 蛋白表达增高^[4-5], 我们也证实 NSBP1 重组慢病毒能抑制裸鼠前列腺癌细胞系移植肿瘤的生长^[6]。本研究中, 我们探讨重组慢病毒介导的人 NSBP1 基因沉默对非激素依赖性前列腺癌细胞系 DU145 细胞凋亡和增殖的调控机制。

材料和方法

1. 材料: 前列腺癌细胞系 DU145 由北京大学泌尿

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.07.104

基金项目: 天津市卫生局科技基金(2010KZ95); 天津市科技计划项目(11JCZDJC19700); 国家重点基础研究发展计划(2012CB518304); 国家国际科技合作专项(2012DFG32220)

作者单位: 300211 天津医科大学第二医院泌尿外科 天津市泌尿外科研究所(蒋宁、陈靖、常文亮、王娟、牛远杰); 北京大学第一医院泌尿外科(周利群)

通讯作者: 牛远杰, Email: jiangning@bjmu.edu.cn

外科研究所提供(购自美国 ATCC 公司)。细胞系从液氮中取出复苏后,置于 5% CO₂ 37 °C 环境下在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中培养。NSBP1 的 siRNA 重组慢病毒(NSBP1-RNAi-lentivirus)和阴性对照慢病毒由上海吉凯基因公司提供,上海博雅生物技术有限公司测序。病毒滴度为 2×10^8 TU/ml, NSBP1 的 shRNA 靶序列:5'-CACAGCCTTTCTTTAGCAT-3'(NSBP1 mRNA 第 1008 位, Genbank gi: NM_030763)。兔抗人 NSBP1 多克隆抗体由北京博奥森生物公司制备, cyclinB1、BCL-2 兔抗人多克隆抗体及山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2. MTT 法检测慢病毒转染细胞的活性:96 孔板的每一孔种植约 3000 个细胞,培养过夜,每孔加入 100 μ l 放大的病毒液(MOI 10:1),37 °C 孵育 8 h 后换含 10% 胎牛血清的 1640 培养液。分别于 0、24、48、72 和 96 h 检测。每孔先加入 50 μ l MTT,37 °C 孵育 4 h,每孔再加 200 μ l DMSO 使沉淀溶解,转入 96 孔酶标板,570 nm 测 Absorbance 值(设 CK 组),计算生长率。公式:(CK 组 A570 - 实验组 A570)/CK 组 A570 \times 100%。

3. 流式细胞光度术检测细胞凋亡:将 1×10^5 个细胞接种于 100 ml 培养瓶中,常规培养至 70% 满,将慢病毒(MOI 1:10)与无血清、双抗的培养液 6 ml 混匀。分别于 0、24、48、72 和 96 h 胰酶消化收集细胞,4 °C, 1000 r/min,离心 10 min,弃上清。加入预冷的 PBS,清洗沉淀,离心,弃上清。加入 1 ml PBS,轻轻震荡使细胞悬浮,300 目尼龙网过滤细胞。离心,弃上清。凋亡细胞的标记按 Annexin-V 检测试剂盒说明书操作。将细胞沉淀重悬于 200 μ l 结合缓冲液,加入 10 μ l Annexin-V-FITC 和 5 μ l PI,轻轻混匀,4 °C 避光,30 min。加入 300 μ l 结合缓冲液,立即上机检测。

4. 流式细胞光度术检测细胞周期:取对数生长期 DU145 细胞,用消化液消化成单细胞悬液,传代后于 25 cm² 培养瓶中培养。待细胞长至 90% ~ 95%。用血清饥饿法同步化 24 h。将慢病毒(MOI 1:10)与无血清、双抗的培养液 3 ml 混匀,室温孵育 5 min。加入 25 cm² 培养瓶,置于 37 °C,5% CO₂ 温箱孵育(不用换液,但 6 ~ 8 h 后可换液)。每种设 3 个平行组,于 0、24、48、72、96 h 后应用流式细胞光度术检测细胞周期分布。弃培养液,用消化液 1 ml 消化细胞,1 ml 培养液终止反应,吹打成单细胞悬液(显微镜下观察)。收集细胞,移至 15 ml 离心管,1 000 \times g 离心 5 min,吸去上清(注意吸液面),用 2 ml 冷 PBS 洗,吹打均匀,1 000 \times g 离心 5 min,重复 1 次。弃 1 ml PBS,将离心管中细胞吹打均匀。在细胞悬液中缓慢加入 95% 冷乙醇(-20 °C)2.5 ml(注意置振荡器上,旋转搅拌,防止结

团)。4 °C 固定 24 h 以上。吹打均匀,移入塑料管,加入 PBS,300 g 离心 5 min 去除乙醇,PBS 洗 3 次。重悬后加入 100 μ l RNase(1 000 U/ml),37 °C 消化 30 min。加入 PBS 2 ml,振荡,300 g 离心 5 min。弃上清,加入 800 μ l PBS,混匀。加入 PI 50 μ l,混匀。避光 4 °C 染色 30 min 以上,经 400 目尼龙网过滤后,流式细胞仪测定,PI 激发波长为 488 nm。

5. TUNEL 染色检测细胞凋亡:洁净盖玻片置入 6 孔板,接种 DU145 细胞 12 h 贴壁后,转染对照慢病毒和 PscSI616 孵育 48 h 后,按试剂盒(Roche)操作应用 TUNEL 染色,Olympus 显微镜观察,凋亡细胞核呈棕黄色,每张切片随机选取 20 个高倍视野,计数 300 个细胞,以其中凋亡细胞占的百分比作为细胞凋亡率。

6. Western blot 检测 NSBP1、cyclinB1、BCL-2 蛋白表达:转染细胞加入 RIPA 组织裂解液,冰浴 30 min,4 °C 10 000 r/min 离心 10 min,收集上清,考马斯亮蓝定量。取 50 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后,5% 脱脂奶粉封闭,1:500 稀释的一抗 4 °C 孵育过夜,TTBS 洗膜后加二抗辣根过氧化物酶标记的 IgG,37 °C 温育 2 h,洗膜后加入 ECL 试剂,在 X 线胶片上曝光,显影,定影。用 Labwork 4.5 分析软件测定 Western blot 条带的吸光度值,与 β -actin 吸光度值的比值表示蛋白的相对含量。

7. 统计学处理:应用 SPSS 13.0 统计学软件,采用方差分析对 NSBP1、cyclinB1、Bcl2 基因在 DU145 细胞表达差异进行比较分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. MTT 法检测慢病毒转染后细胞活性(图 1):慢病毒转染相同数量的 DU145 细胞后,72 h 细胞的生长受到抑制,96 h 细胞生长抑制率为 22.6% ($P < 0.01$)。

2. 流式细胞光度术分析细胞周期(图 2):结果表明转染 24、48 h 后抑制组与对照组的 G2M + S 期细胞比例无统计学差异($P > 0.05$);从转染后 72 h 起,到 96 h,两者有统计学差异(P 均 < 0.05),72 h 抑制组 G2 期细胞增加了 5.94% ($P < 0.01$),S 期细胞增加了 0.3% ($P > 0.05$);96 h 抑制组 G2 期细胞增加了 8.78% ($P < 0.01$),S 期细胞增加了 15.26% ($P < 0.01$);提示抑制 NSBP1 的表达使 DU145 细胞在 G2 期略有阻滞。

3. NSBP1 基因转染对前列腺癌细胞系 DU145 细胞凋亡的影响(图 3):DU145 细胞经转染 PscSINC 慢病毒和 PscSI616 慢病毒后,分别于 24、48、72 和 96 h 用流式细胞仪测定细胞凋亡的比例。结果表明 24 和 48 h,

PscSI616 组细胞与对照组无区别,但是在 72 h,凋亡的细胞数是对照组的 1.45 倍,抑制组和对对照组凋亡细胞比例分别为 13.38 ± 1.71 和 9.19 ± 1.02 ($P < 0.05$); 96 h 抑制组凋亡的细胞数是对照组的 2.19 倍,有统计学意义 ($P < 0.01$) (抑制组 17.75 ± 0.81 , 阴性对照组 8.12 ± 0.46)。

4. TUNNEL 法检测敲减 NSBP1 蛋白后对 DU145 细胞凋亡的影响(图 4): 阴性对照病毒和 PscSI616 转染细胞后, TUNNEL 法染色检测凋亡, 凋亡细胞核呈棕

黄色。阴性对照组凋亡率 (12.3 ± 3.05)%, PscSI616 组凋亡率为 (54.3 ± 7.76)%, 有统计学意义 ($P < 0.01$)。

5. Western blot 分析 NSBP1 表达(图 5): 空白对照组、阴性对照组、PscSI616 转染组的 NSBP1 蛋白表达强度分别为 0.91 ± 0.08 、 0.85 ± 0.05 、 0.22 ± 0.07 。慢病毒 PscSI616 转染 DU145 细胞后, cyclinB1 和 bcl2 蛋白表达水平明显下调, 其抑制率分别为 20% 和 46.8% ($P < 0.01$)。

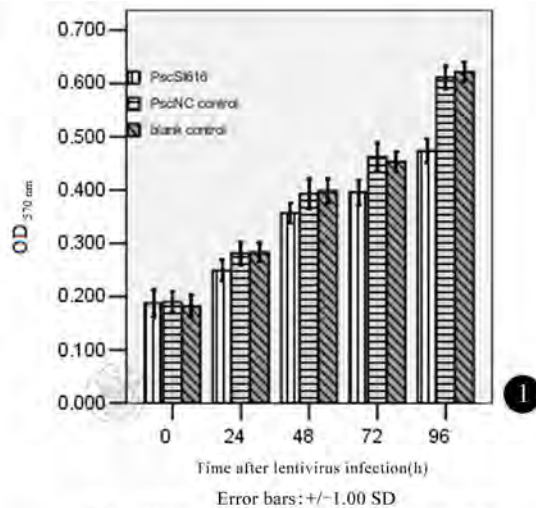


图1 MTT检测慢病毒转染后DU145活性

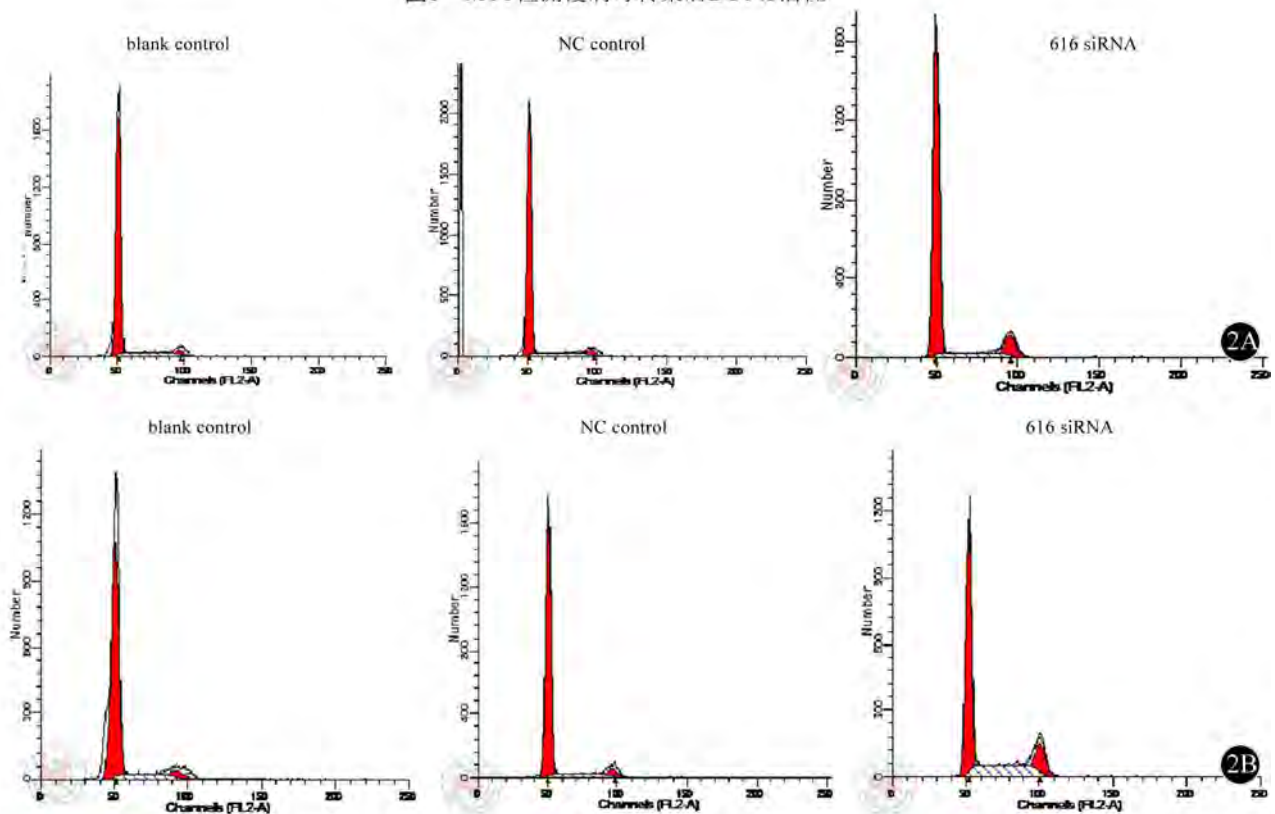


图2 流式细胞仪检测细胞周期的变化。2A: 转染慢病毒72 h后,抑制组G2期细胞数增加了5.94%; 2B: 转染慢病毒96 h后,抑制组G2期细胞数增加了8.78%

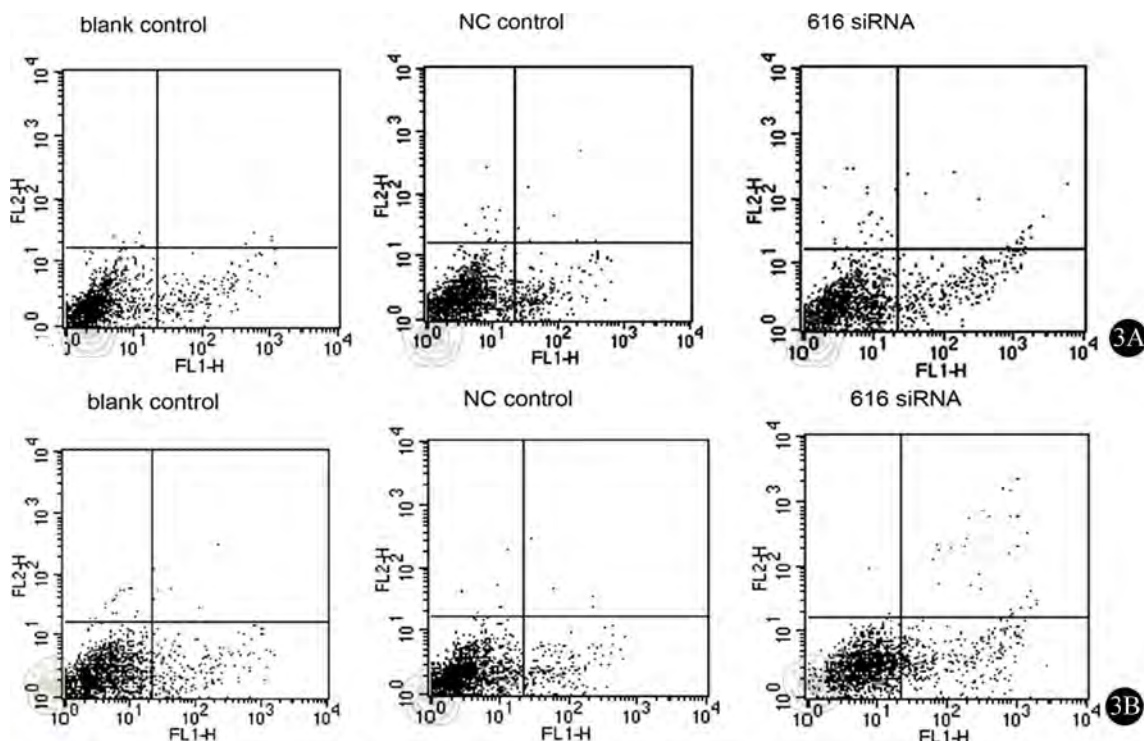


图3 流式细胞仪检测凋亡。3A: 转染慢病毒72 h后, 抑制组凋亡的细胞数是对照组的1.45倍; 3B: 转染慢病毒96 h后, 抑制组凋亡的细胞数是对照组的2.19倍

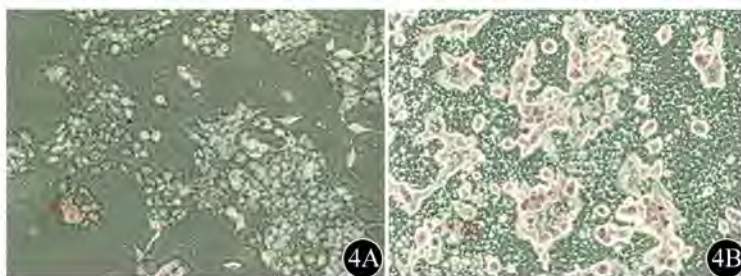


图4 TUNEL法检测PscSI616和control慢病毒转染DU145细胞后细胞凋亡。4A: 阴性对照组; 4B: PscSI616

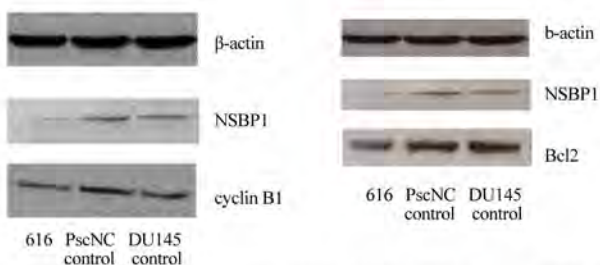


图5 Western-blot检测PscSI616和control慢病毒转染DU145细胞NSBP1, cyclinB1和bcl2的蛋白的表达变化

讨 论

几乎所有前列腺癌患者的死因归根结底都是由于现有的医学手段不能有效控制和治愈非激素依赖性前列腺癌, 肿瘤出现转移性进展而最终导致患者死亡。因此, 研究和开发非激素依赖性前列腺癌的早期诊断、新预防措施和新治疗方法是解决问题的关键。本研究选取非激素依赖性前列腺癌细胞系 DU145 作为研究对象, 探讨 NSBP1 蛋白调节细胞增殖的机制, 从而筛选治

愈非激素依赖性前列腺癌的靶标。NSBP1 是 HMG 家族 HMGN 中的一员^[1]。HMG 蛋白都是分子质量小于 30 kD 的小分子蛋白质, 能在核内快速的、跳跃式的运动, 不断和核小体发生碰撞, 一旦达到特异性的位点, 就发生结合, 从而进一步对染色质的结进行修饰。并使调节蛋白(激活或抑制)发生聚集^[7]。HMGN 或者通过组蛋白的修饰或染色质因子的限制, 或者受相互作用的其他蛋白质的影响结合特异的染色质构型^[7-8]。目前 NSBP1 的功能还不明确, 我们推测 NSBP1 能与染色质结合, 可能起促进染色质高级结构的打开, 增强基

因转录的功能。

本实验用 MTT 和流式细胞技术实验证实抑制细胞内 NSBP1 蛋白表达后,前列腺癌细胞生长减慢,细胞周期在 G2 期略有阻滞,并且肿瘤细胞凋亡细胞数明显增多,说明 NSBP1 蛋白能影响前列腺癌 DU145 细胞的凋亡和增殖。我们通过应用 Western blot 分子生物学方法初步对 NSBP1 调控 DU145 肿瘤细胞生长的机制进行了探讨。cyclinB1 作为 G2M 期的调控因子,在 G2 晚期,cyclinB1 转录的增加是细胞有丝分裂进行的必要条件^[9]。因此,cyclinB1 的蛋白减少或许会减弱 cyclinB1-CDC2 复合体激酶的活性,继而导致 G2M 期的阻止。我们发现随着 NSBP1 的蛋白表达降低,cyclinB1 的蛋白表达减少了 20%。凋亡也是参与细胞生长重要的生理现象,bcl2 是抑制细胞凋亡的原癌基因^[10],我们也发现 bcl2 的蛋白降低了 46.8%。说明 NSBP1 在凋亡的调控过程中或许起了积极的作用。

我们的实验结果提示在前列腺癌 DU145 细胞中 NSBP1 与 cyclinB1、bcl2 之间可能具有相关性,NSBP1 可能通过调控 cyclinB1、bcl2 的变化来调控细胞周期和凋亡的过程,继而影响肿瘤细胞的生长。但是这种相互作用关系是直接还是间接的以及其所涉及的具体功能区域还需进一步实验证实。

蒋宁,李晓石,陈靖,等. NSBP1 调节非激素依赖性前列腺癌 DU145 细胞的凋亡和增殖[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(7):3001-3005.

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60:277-300.
- [2] Qu J, Yan R, Chen J, et al. HMG5: a potential oncogene in gliomas. *J Neurooncol*, 2011, 104:729-736.
- [3] Rochman M, Malicet C, Bustin M. HMG5/NSBP1: a new member of the HMG protein family that affects chromatin structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799:86-92.
- [4] 姚鲲,周利群,李学松,等. 核小体结合蛋白 1 在膀胱癌中的表达和意义[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2010,4:50-54.
- [5] 王建伟,周利群,杨学贞,等. 前列腺癌细胞中 NSBP1 基因表达上调. *基础医学与临床*, 2004, 24:393-397.
- [6] 蒋宁,周利群,姚鲲,等. 人核小体结合蛋白 1 小分子干扰 RNA 重组慢病毒抑制非激素依赖性前列腺癌体内生长的实验研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2010,4:154-157.
- [7] Lim JH, West KL, Rubinstein Y, et al. Chromosomal protein HMG1 enhances the acetylation of lysine 14 in histone H3. *EMBO J*, 2005, 24:3038-3048.
- [8] Adkins NL, Watts M, Georgel PT. To the 30-nm chromatin fiber and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1677:12-23.
- [9] Cherukuri S, Hock R, Ueda T, et al. Cell cycle-dependent binding of HMG proteins to chromatin. *Mol Biol Cell*, 2008, 19:1816-1824.
- [10] Zhao X, Ogunwobi OO, Liu C. Survivin inhibition is critical for Bcl-2 inhibitor-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*, 2011, 6:e21980.

(收稿日期:2012-12-05)

(本文编辑:郝锐)

中 華 醫 學 會