

以pAAV为载体的RNAi沉默E2F3对前列腺癌LNCAP细胞系的影响*

陈涛 胡海龙 孙岩 吴长利

摘要 目的:探讨以pAAV为载体的RNAi沉默E2F3对前列腺癌LNCAP细胞系的影响及其作用机制。方法:用pAAV-siE2F3穿梭质粒转染LNCAP细胞,流式细胞计数检测转染后细胞凋亡,细胞周期变化;Western blot检测转染后E2F3蛋白与Bcl-2蛋白表达的变化,分析E2F3蛋白与Bcl-2蛋白变化相关性。结果:与对照组相比,pAAV-siE2F3穿梭质粒有效的沉默了E2F3蛋白表达($P < 0.01$),pAAV-siE2F3穿梭质粒组细胞凋亡明显增加($P < 0.01$),G₁期细胞明显增加($P < 0.01$),S期明显减少($P < 0.01$),pAAV-siE2F3穿梭质粒组与对照组相比,Bcl-2蛋白表达明显减少($P < 0.01$)。结论:本实验初步明确了E2F3在前列腺癌细胞周期调控细胞凋亡方面起的作用,E2F3可能通过影响Bcl-2表达调控细胞凋亡;为进一步阐明E2F3基因与前列腺癌的关系,以及E2F3为靶点的前列腺癌基因治疗提供理论基础。

关键词 E2F3 Bcl-2 pAAV RNAi 前列腺癌

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.02.003

Effects of Silencing E2F3 Expression Using RNAi with pAAV Virus Expressing Vector in Prostate Cancer Cell Line LNCAP

Tao CHEN, Hailong HU, Yan SUN, Changli WU

Correspondence to: Changli WU, E-mail: Wucl2003@163.com

Department of Urology, Second Affiliated Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China

Abstract Objective: To observe the effects of pAAV-siE2F3 mediated E2F3 gene on silencing prostate cancer cell line LNCAP. **Methods:** pAAV-siE2F3 plasmids were transfected into prostate cancer cells LNCAP. After LNCAP cells were transfected, the interference effects were detected by Western blot. The apoptosis index and cell cycle of LNCAP cells were detected by flow cytometry. **Results:** The results of Western blot indicated that pAAV-siE2F3 plasmid could knock down the expression of E2F3 gene. After LNCAP cells were transfected with pAAV-siE2F3 plasmid, the apoptosis index of LNCAP cells increased obviously ($P < 0.01$), the number of cells during G₁ phase increased ($P < 0.01$), and the number of cells during S phase decreased evidently ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 gene decreased apparently ($P < 0.01$). **Conclusions:** E2F3 plays an important role in the progress of prostate cancer cell cycle. E2F3 regulates cell apoptosis index through affecting the expression of Bcl-2 genes, indicating that E2F3 maybe a new target of gene therapy for prostate cancer.

Keywords E2F3; Bcl-2; pAAV; RNAi; Prostate cancer

前列腺癌是欧美最常见的男性恶性肿瘤之一,目前在美国前列腺癌的发病率已经超过肺癌,成为第1位危害男性健康的肿瘤^[1]。在我国,随着生活方式的改变、人口的老齡化及诊断技术的提高,前列腺癌的发病率也呈持续增长趋势。多数前列腺癌患者在一定时期内对雄激素剥夺治疗有效,然而最终几乎所有患者都将发展为“雄激素抵抗型前列腺癌”,对于这些病例,当前的治疗手段有限,即便姑息治疗也非常困难。伴随着前列腺癌发生的分子机制研究深入,多种机制单独或相互作用影响着前列腺癌的

恶性进展。肿瘤的发生、发展与细胞周期调节失控,细胞凋亡抑制密切相关。E2F3是E2F转录因子家族成员之一,也是细胞周期调控过程中起重要作用的调控蛋白之一,其为细胞由G₁期进入S期最重要的细胞因子,调控着细胞增殖,大量实验研究证明E2F3蛋白的异常表达与肿瘤的形成恶性进展密切相关^[2]。Bcl-2蛋白属于凋亡抑制蛋白,能够阻止细胞色素c从线粒体释放到细胞质,从而抑制了细胞凋亡。本研究通过pAAV-siE2F3穿梭质粒沉默前列腺癌细胞LNCAP系中E2F3蛋白的表达,观察其对LNCAP细胞

作者单位:天津医科大学第二附属医院泌尿外科,天津市泌尿外科研究所(天津市300211)

*本文课题受天津市科技计划项目(编号:09JCYBJC27800)资助

通信作者:吴长利 Wucl2003@163.com

的影响,进一步明确E2F3基因与前列腺癌的关系,为以E2F3为靶点的前列腺癌基因治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人前列腺癌细胞系LNCAP由天津市泌尿研究所提供。pAAV-siE2F3由本院胡海龙博士合成^[3]。RPMI 1640,胎牛血清,0.25%胰酶,青霉素,链霉素均购自GIBICO公司。Western blot中兔抗人E2F3多抗,兔抗人Bcl-2单抗,GAPDH单抗,碱性磷酸酶标记羊抗兔二抗,蛋白maker,BCA蛋白定量试剂盒,均由武汉博士德公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 选取处于对数生长期的LNCAP细胞,用含有10%胎牛血清、1%青霉素与链霉素的RPMI 1640培养基在5%CO₂、37℃、饱和湿度的孵箱内培养,培养细胞至第6、7代进行后续实验。

1.2.2 pAAV-siE2F3穿梭质粒转染LNCAP细胞 将LNCAP细胞按每组5×10⁴个/mL接种于6孔板,用含有10%胎牛血清的RPMI 1640培养基在5% CO₂、37℃、饱和湿度的卵孚箱内培养,转染细胞融合至70%~80%,再次细胞计数,病毒MOI值(v.g number/cell)分别为1×10⁴、5×10⁴、1×10⁵、5×10⁵行预转染,分别于转染24、48、72 h观察绿色荧光表达。

1.2.3 流式细胞术(FCM)检测细胞周期和凋亡 转染72 h后分别收集细胞,调整细胞浓度为1×10⁶/mL,细胞制备成单细胞悬液后,移入10 mL离心管,同时收集无处理细胞组、AAV转染组细胞作对照。1 000 r/min离心10 min,收集沉淀,PBS洗涤沉淀3次。细胞沉淀中加入4℃预冷的70%乙醇2 mL,-20℃固定过夜。1 000 r/min离心10 min,收集沉淀,加入PI染液1 mL(含33 μg/mL PI,0.13 mg/mL RNAaseA,10 mmol/L EDTA,0.5% Tri

tonX-100)室温孵育30 min。流式细胞仪检测DNA-PI的荧光强度,流式细胞仪的激发光和发射光的波长分别为488、530 nm,每组设4个平行样。

1.2.4 细胞总蛋白的提取及Western blot检测 转染72 h后分别提取无处理组、AAV病毒组、对照组细胞总蛋白并定量至1 μg/μL。分别取30 μL上样量在10%SDS-PAGE进行电泳分离,经电转移转至NC膜上。5%脱脂奶粉室温封闭2 h,按蛋白maker将条带剪开,兔抗人E2F3一抗(1:100),兔抗人Bcl-2(1:100),室温孵育2 h,兔抗人GAPDH一抗(1:200)室温孵育2 h,TBST缓冲液洗涤4次,每次5 min,碱性磷酸酶标记羊抗兔二抗(1:5 000)孵育1h,NBT/BCIP膜显色30 min,每组设4个平行样,结果以Image J软件进行分析。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析,多个样本间两两比较采用LSD-*t*检验,*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率的检测

pAAV-siE2F3穿梭质粒转染LNCAP细胞于6h后开始观察到微量荧光表达,24 h后观察到10%~30% LNCAP细胞有绿色荧光表达,48h约达50%,72 h达60%~80%。经不同MOI的pAAV-siE2F3穿梭质粒转染LNCAP细胞72h后,MOI为1×10⁴、5×10⁴组,荧光表达弱于MOI的1×10⁵组,1×10⁵组与5×10⁵组之间无显著性差异,确定最佳转染MOI为1×10⁵v.g. number/cell。MOI为1×10⁴、5×10⁴、1×10⁵与5×10⁵组转染72 h后的荧光表达(图1~4)。

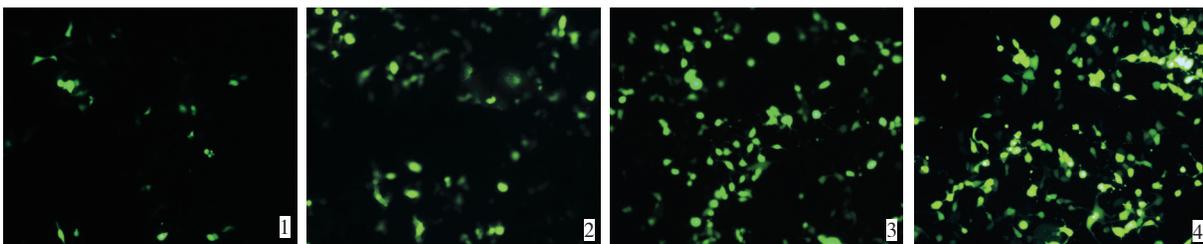


图1 MOI为1×10⁴组转染72h后荧光表达

Figure 1 Fluorescence expression at 72h after transfection with MOI of 1×10⁴ group

图2 MOI为5×10⁴组转染72h后荧光表达

Figure 2 Fluorescence expression at 72h after transfection with MOI of 5×10⁴ group

图3 MOI为1×10⁵组转染72h后荧光表达

Figure 3 Fluorescence expression at 72h after transfection with MOI of 1×10⁵ group

图4 MOI为5×10⁵组转染72h后荧光表达

Figure 4 Fluorescence expression at 72h after transfection with MOI of 5×10⁵ group

2.2 pAAV-siE2F3 穿梭质粒转染 72 h 后三组细胞凋亡和细胞周期变化

各组细胞经 72 h 不同处理后,均出现不同程度的凋亡现象。无处理组凋亡率为(3.5725±0.4480)%, AAV 组凋亡率为(8.6600±0.4715)%, pAAV-siE2F3 穿梭质粒组凋亡率为(26.7800±1.1862)%,无处理组与 AAV 转染组相比 $P<0.001$,无处理组与 pAAV-siE2F3 组相比 $P<0.001$,AAV 转染组与 pAAV-siE2F3 组相比 $P<0.001$,差异均有统计学意义(表 1)。

流式细胞仪检测无处理、AAV、pAAV-E2F3 组细胞周期。各组细胞经 72 h 后不同处理, pAAV-E2F3 处理组与无处理、AAV 处理组相比, G₀/G₁ 期细胞明显增多, S 期细胞明显减少。经方差分析无处理组和 AAV 组相比 $P=0.129$, 差异无统计学意义; 无处理组和 pAAV-siE2F3 穿梭质粒组相比 $P<0.01$, 差异有统计学意义; AAV 转染组和 pAAV-siE2F3 穿梭质粒组相比 $P<0.01$, 差异有统计学意义(表 2)。

2.3 转染前后细胞内 E2F3、Bcl-2 蛋白表达情况

pAAV-siE2F3 转染组 E2F3 蛋白表达明显低于 AAV 转染组及无处理组。无处理组 E2F3 蛋白的表达与 AAV 转染组相比 $P=0.052$, 差异无统计学意义; 无处理组与 pAAV-siE2F3 组相比 $P<0.001$, AAV 转染组与 pAAV-siE2F3 组相比 $P<0.001$, 差异具有统计学意义。Bcl-2 蛋白表达, 无处理组与 AAV 转染组相比 $P=0.159$, 差异无统计学意义; pAAV-siE2F3 转染组 Bcl-2 的表达明显低于 AAV 转染组及无处理组, 差异具有统计学意义($P<0.01$), E2F3 与 Bcl-2 的表达呈正相关, $r=0.924$, $P<0.01$ (表 3, 图 5)

表 1 流式细胞术检测细胞凋亡率 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Apoptosis detected by flow cytometry

项目	无处理组	AAV 转染组	pAAV-siE2F3 组
凋亡率/%	3.5725 ± 0.4480	8.6600 ± 0.4715	26.7800 ± 1.1862

表 2 流式细胞术检测细胞周期 % ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Cell cycle detected by flow cytometry

项目	无处理组	AAV 转染组	pAAV-siE2F3 组
G ₀ /G ₁ 期	27.7350 ± 2.4094	30.9675 ± 3.0203	51.1650 ± 2.7327
S 期	24.6500 ± 2.1798	21.5125 ± 1.7257	16.6075 ± 1.7395

表 3 各组细胞 E2F3、Bcl-2 蛋白的相对灰度值 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 The relative grey scale of E2F3 and Bcl-2 protein

项目	无处理组	AAV 转染组	pAAV-siE2F3 组
E2F3	1.9445 ± 0.04687	1.8668 ± 0.04552	1.1491 ± 0.05422
Bcl-2	2.1446 ± 0.07973	2.0612 ± 0.08133	1.7925 ± 0.06898

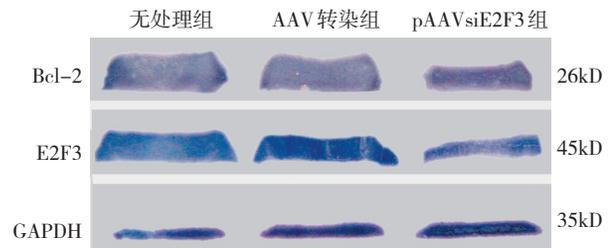


图 5 三组不同处理组中 E2F3、Bcl-2 蛋白的表达

Figure 5 Expression of E2F3 and Bcl-2 protein in the three different treatment groups

3 讨论

E2F3 是 E2F 转录因子家族成员之一, 是细胞周期调控过程中起重要作用的调控蛋白之一, 亦是细胞由 G₁ 期进入 S 期最重要的细胞因子, 调控着细胞增殖^[4]。大量实验研究证明 E2F3 蛋白的异常表达与肿瘤的形成密切相关。E2F3 基因定位于 6p22 染色体, 在视网膜母细胞瘤, 乳腺癌, 膀胱癌都发现了该处基因的异常扩增^[2]。Foster 等^[5]研究预测 E2F3 的过表达能够独立的预测前列腺癌的临床结果, 高表达的 E2F3 水平是前列腺癌预后不良的独立危险因素。Michael 等^[6]比较了 33 例雄激素非依赖型前列腺癌骨转移标本和 22 例原发性前列腺癌患者标本中的基因表达, 雄激素非依赖型前列腺癌标本中 E2F3 的表达明显增高。Olsson 等^[7]在 pRB 下调的情况下 E2F3 的高表达促进前列腺细胞的恶性增殖。本实验以 pAAV-siE2F3 穿梭质粒为载体, 通过沉默前列腺癌 LNCAP 细胞系中 E2F3 的表达, 有效的抑制了前列腺癌 LNCAP 细胞系的增殖速度, 通过流式细胞实验证实这种抑制作用正是由于抑制前列腺癌 LNCAP 细胞系 G₁ 期到 S 期的转变, 抑制细胞增殖。同时观察到伴随着 E2F3 蛋白表达的下调, Bcl-2 蛋白表达明显下调。

Bcl-2 为抗凋亡蛋白, 线粒体膜上的 Bcl-2 通过与凋亡相关因子的协同作用调控线粒体结构与功能的稳定性, 发挥细胞凋亡主开关功效。经常可以在复发的前列腺癌中检测到抗凋亡蛋白 Bcl-2 的过度表达, 在前列腺癌细胞由雄激素依赖型进展至雄激素非依赖型的过程中 Bcl-2 的过表达起到关键作用^[8]。在雄激素非依赖型前列腺癌细胞中, 下调 Bcl-2 的表达细胞凋亡明显增加^[9]。本实验通过沉默 LNCAP 细胞系中 E2F3 表达后, LNCAP 细胞凋亡增加, 且 Bcl-2 的表达下降, 在一定程度上说明了 E2F3 与 Bcl-2 在前列腺癌恶性进展中密切相关, 前列腺癌细胞中高表达的 E2F3 在一定程度上影响 Bcl-2 的表达来达到凋亡抵抗。下调 E2F3 的表达, 直接或间接的导致 Bcl-2 蛋白表达的下调, 为进一步以 E2F3 为靶点的前列腺癌基因治疗提供理论依据。

本实验进一步证明了E2F3在前列腺癌细胞分化增殖,抗凋亡方面所起的重要作用,同时说明了以pAAV-siE2F3穿梭质粒沉默E2F3的有效性,为以pAAV-siE2F3穿梭质粒为载体的基因治疗提供依据,将进一步通过动物实验进行验证其有效性与副作用。

参考文献

- Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- Libertini SJ, Chen H, Al-Bataina B, et al. The interleukin 6 receptor is a direct transcriptional target of E2F3 in prostate tumor derived cells [J]. Prostate, 2011, [Epub ahead of print].
- 胡海龙, 韩瑞发, 孙岩, 等. E2F3基因腺相关病毒干扰载体的构建[J]. 中国肿瘤临床, 2009, 36(19): 1117-1119.
- Oeggerli M, Tomovska S, Schraml P, et al. E2F3 amplification and overexpression is associated with invasive tumor growth and rapid tumor cell proliferation in urinary bladder cancer[J]. Oncogene, 2004, 23(33): 5616-5623.
- Foster CS, Falconer A, Dodson AR, et al. Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome[J]. Oncogene, 2004, 23(35): 5871-5879.
- tanbrough M, Bubley GJ, Ross K, et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer[J]. Cancer Res, 2006, 66(5): 2815-2825.
- Olsson AY, Feber A, Edwards S, et al. Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells[J]. Oncogene, 2007, 26(7): 1028-1037.
- Lin Y, Fukuchi J, Hiipakka RA, et al. Up-regulation of Bcl-2 is required for the progression of prostate cancer cells from an androgen-dependent to an androgen-independent growth stage[J]. Cell Res, 2007, 17(6): 531-536.
- Song R, Harris LD, Pettaway CA. Downmodulation of Bcl-2 Sensitizes metastatic LNCaP-LN3 cells to undergo apoptosis via the intrinsic pathway[J]. Prostate, 2010, 70(6): 571-583.

(2011-10-13收稿)

(2012-01-02修回)

(杨红欣校对)

· 病例报告与分析 ·

颌下腺脊索瘤并多发肺转移1例

赵向飞 聂青

关键词 颌下腺 脊索瘤 肺转移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.02.017

患者女性, 32岁, 2006年初发现右颌下肿块, 未行治疗。自2008年10月病情加重, 出现疼痛, 给予右颌下肿物切除术, 术后病理示: 颌下腺混合瘤, 2010年5月再次发现右颌下肿物, 后肿物逐渐增大, 2010年9月13日行右侧颌下肿物切除术, 术后病理示: 脊索瘤。免疫组化CK(-)、Vimentin(+)、SMA(-)、Calponin(-)、S-100(+). 2010年9月27日开始术后放疗, 共给予放射剂量6MV-Dt5600/28f治疗, 2010年11月5日结束放疗。术后每3个月复查。2011年2月逐渐出现右侧面部麻木不适, 2011年5月复查MRI发现颅底占位, 行PET/CT示: 右颌下腺、腮腺术后未见明显代谢异常, 符合术后改变; 左侧颌下腺结节, 考虑放疗后改变; 右中颅窝区肿块, 葡萄糖代谢异常增高, 考虑转移瘤或脊索瘤, 累计右侧岩骨、蝶骨; 双肺多发病变, 葡萄糖代谢不均匀增高, 考虑转移瘤。无骶尾部疼痛, 2011年7月29日开始给予右中颅窝病变局部扩大野调强放疗, 并同步给予顺铂增敏, 2011年9月2日治疗结束, 共给予放射剂量6MV-Dt5000/28f, 2011年10月给予肺部转移灶伽玛刀治疗, 目前随访中。

小结 脊索瘤是一种低度恶性肿瘤, 起源于胚胎残余脊

索组织, 1894年由Ribbert首先描述并命名。该病发展缓慢, 好发于脊柱中轴的两端颅底斜坡和脊椎骶尾部, 其中骶尾部占40%~50%, 颅底部占35%~40%, 多数在40~70岁之间发病, 偶见于儿童和青年^[1]。脊索瘤发生远处转移较少, 转移常在该病的晚期发生, 往往是在先有局部复发的基础上又发生转移, 5年治愈率为50%左右, 转移率为5%~43%^[2]。目前脊索瘤治疗首选手术。近年来新的放疗技术如: γ -刀、伽马刀及射波刀应用于脊索瘤治疗。本例患者首发部位为颌下腺, 后出现颅底及肺转移病灶, 非常罕见。该患者考虑肺部病灶可能系血源性转移, 应考虑全身化疗。

参考文献

- McMaster ML, Goldstein AM, Bromley CM, et al. Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995[J]. Cancer Causes Control, 2001, 12(1): 1-11.
- Baratti D, Gronchi A, Pennacchioli E, et al. Chordoma: natural history and results in 28 patients treated at a single institution[J]. Ann Surg Oncol, 2003, 10(3): 291-296.
- Samii A, Gerganov VM, Herold C, et al. Chordomas of the skull base: surgical management and outcome[J]. J Neurosurg, 2007, 107(2): 319-324.

(2011-12-12收稿)(2012-01-16修回)

(贾树明校对)

作者单位: 中国人民解放军海军总医院放射肿瘤科(北京市100048)

通信作者: 赵向飞 article1977@163.com