

文章编号 1006-8147(2017)02-0103-05

论著

CtBP2 异常表达对前列腺癌 PC3 细胞增殖效应影响的研究

薄志强¹, 孙桂江², 王丽³, 张昌文¹, 张志宏¹

(天津医科大学第二医院 1.泌尿外科, 天津市泌尿外科研究所; 2.血液透析中心; 3.产科, 天津 300211)

摘要 目的:探讨 CtBP2 在前列腺癌中的表达情况,并明确其异常表达对前列腺癌 PC3 细胞增殖效应的影响。方法:采用免疫组化、qPCR 及 Western blot 检测 CtBP2 的表达情况,采用细胞计数法、单克隆集落形成实验及 MTT 法检测细胞的增殖能力。结果:在前列腺癌组织中 CtBP2 蛋白高表达率为 97.5%(156/160),表达水平较良性前列腺增生组织显著升高($P<0.05$);细胞计数及 MTT 实验结果表明 CtBP2 Silencer 组较 Vector control 组及 Parent control 组,其增殖能力降低分别为 70%及 75%($P<0.05$);单克隆集落形成实验结果显示 Blank control 组、Vector control 组和 Silencer 组 PC3 细胞培养 12 d 后可见克隆数分别为(136±11)、(128±12)和(56±9)($P<0.05$),克隆面积为(342±22)mm²、(322±23)mm²和(122±16)mm²($P<0.05$)。结论:CtBP2 在前列腺癌中高表达,而减低其表达水平可显著抑制前列腺癌细胞增殖能力。

关键词 前列腺癌;CtBP2;细胞增殖

中图分类号 R737.25

文献标志码 A

Effect of abnormal expression of CtBP2 on the proliferation of prostate cancer cell line PC3

BO Zhi-qiang¹, SUN Gui-jiang², WANG Li³, ZHANG Chang-wen¹, ZHANG Zhi-hong¹

(1.Department of Urology, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Urology Research Institute of Tianjin; 2.Hemodialysis Center, The Second Hospital, Tianjin Medical University; 3.Department of Obstetrics, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To determine the expression of the CtBP2 in prostate cancer, and to explore the effect of the abnormal expressed CtBP2 on the proliferation of PC3 cells. **Methods:** The immunohistochemistry, qPCR and Western blot were used to assess the level of CtBP2. And MTT, cell number counting and cell colony formation assay were used to investigate the proliferation of PC3 cells. **Results:** CtBP2 was expressed in 97.5% prostate cancer tissues, and it was highly expressed compared with the adjacent normal prostate tissues ($P<0.05$). MTT and cell number counting showed that cell proliferation was significantly inhibited by 75% and 70% in CtBP2-silenced cells compared with control, respectively. The colony formation assay showed that the numbers of clone in Blank control group, Vector control group and Silencer group were (136±11), (128±12) and (56±9) ($P<0.05$), and the areas of clone were (342±22)mm², (322±23)mm² and (122±16)mm² ($P<0.05$). **Conclusion:** CtBP2 may be overexpressed in prostate cancers, and decreased expression of CtBP2 could inhibit the proliferation of PC3 cells.

Key words prostate cancer; CtBP2; cell proliferation

前列腺癌是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤^[1]。我国属于传统前列腺癌低发病率区域,但随着生活方式的改变、平均寿命的延长以及医疗保健和诊断水平的提高,前列腺癌的发病率及死亡率近年也呈明显上升的趋势^[2]。羧基末端结合蛋白(C-

terminal-binding proteins, CtBP2)作为一种转录辅助抑制因子,可通过参与调控相关基因的转录,促进上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),抑制多个肿瘤抑制因子发挥其促肿瘤效应;最新研究发现 CtBP1 在转移前列腺癌中高表达,降低 CtBP1 的表达水平可显著抑制前列腺癌体内增殖及转移^[3]。本研究中,我们收集天津医科大学第二医院 2005 年 1 月-2012 年 12 月间前列腺癌组织标本,并检测其中 CtBP2 的表达水平,发现 CtBP2 在前列腺癌中明显高表达,且其高表达与前列腺癌不良分化及患者不良预后密切相关。此外,降低内源性 CtBP2 水平可显著抑制人前列腺癌 PC3 细胞

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81402124, 1472416, 21577097);中国科学院战略性先导科技专项资助项目(XDB14040401, XDB14010300);天津市应用基础与前沿技术研究计划(14JCQNJC10800);天津市高等学校科技发展基金计划专项(20130124)

作者简介 薄志强(1990-),男,硕士在读,研究方向:泌尿外科;通信作者:张志宏, E-mail: zhihongzhang19667@163.com。

体外增殖。因此,CtBP2 是评价前列腺癌发病及疾病进展的可能的分子标志物,其可能是未来前列腺癌分子治疗的有效靶点之一。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及组织 人前列腺癌 PC3 细胞购自北京协和基础医学中心,于含 10 %血清的 RPMI 1640 培养液中 37 ℃ 5%CO₂ 培养。160 例前列腺癌组织标本及 60 例癌旁对照标本取自前列腺癌患者前列腺根治性切除术后的标本(天津医科大学第二医院),所有标本均通过病理诊断。该研究已经获得天津医科大学伦理委员会的批准。

1.2 总 RNA 提取与反转录及 qPCR 标本总 RNA 采用 PureLink™RNA Mini Kit 试剂盒 (Invitrogen) 提取,所提取的 RNA 采用紫外分光光度法测定 RNA 在 260 nm 和 280 nm 的吸光度,获取 RNA 浓度,并运用 RNA 凝胶电泳进行质量检测。取所提样本总 RNA 各 2 μg,行反转录,反转录调节如下:65 ℃/5 min,42 ℃/60 min,72 ℃/5 min。qPCR 检测采用 Go Taq® qPCR Master Mix (Promega) 试剂,于 Eco™ Real-Time PCR System (illumina) 仪器上进行检测,为确保引物的特异性扩增,每个 PCR 反应设置一个阴性对照,qPCR 反应 CtBP2 上游引物为:5'-ATCCACGAGAAGGTTCTAAACGA-3',下游引物为:5'-CCGCACGATCACTCTCAGG-3';GAPDH 作为内参,上游引物为:5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGT-3',下游引物为:5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'。反应条件:预变性 95 ℃ 5 min(95 ℃变性 20 s,60 ℃退火 20 s,72 ℃延伸 20 s)/30 个循环,72 ℃延伸 5 min。

1.3 免疫细胞化学法检测 免疫组化采用 SP 方法。取组织病理切片,3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶活性,正常兔血清封闭非特异性结合位点后,滴加浓度为 10 μg/mL 的羊抗人 CtBP2 抗体,4 ℃过夜。滴加生物素标记的兔抗羊二抗(1:100 稀释),室温孵育 20 min,用 pH 7.2 的浓度 0.01 mol/L PBS 洗后,滴加辣根过氧化物酶标记的链卵白素,室温孵育 20 min,最后 DAB 显色。所有切片均由两位病理科医师采用双盲法独立检测,取平均值。高倍镜下随机观察至少 4 个视野,细胞核染色出现淡黄色至黄棕色为阳性细胞标志,计算阳性细胞占细胞总数的百分率。染色结果分为阴性(-):细胞无染色或很弱,阳性细胞率<5%;阳性结果分为 4 个等级:“+”阳性细胞率 5%~25%;“++”阳性细胞率 25%~50%;“+++”阳性细胞率 50%~75%;“++++”阳性细胞率 75%~100%。

1.4 细胞转染及单克隆细胞的筛选和鉴定 CtBP2-shRNA 质粒及对照空质粒(GeneCopoeia 公司)购自广州复能基因有限公司,携带增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP) 报告基因,将质粒采用 Lipofectamine 2000 介导转染入 PC3 细胞,转染 6 h 后换液,24 h 后用终浓度 400 μg/mL 的嘌呤霉素筛选阳性克隆,扩大培养。筛选出的 CtBP2-shRNA 质粒整合的细胞克隆为 Silencer 组,对照空质粒整合的克隆为 Vector control 组。

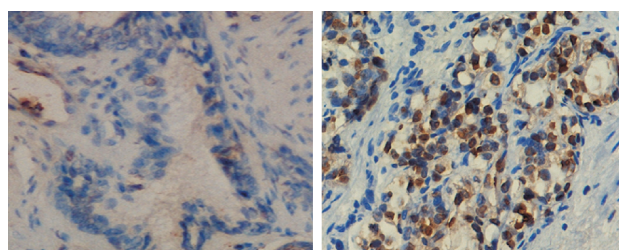
1.5 Western blot 检测 将细胞收集到蛋白裂解液(Solarbio, China) 中,蛋白浓度测定使用 Lowry protein assay 试剂盒(Solarbio, China)检测。每孔上 30~50 μg 蛋白行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,Western blot 检测参照有关文献方法进行^[12]。抗体浓度 anti-GAPDH (1:1 000),anti-CtBP2 (1:100) (Santa Cruz Biotechnology, CA)。

1.6 细胞增殖检测 细胞增殖采用 MTT 及细胞计数进行检测,将细胞铺板每组 6 孔,饥饿过夜,然后采用 1%血清培养基在 37 ℃、5%CO₂ 条件下培养,分别于接种 24、48、72 h 后进行活细胞计数及 MTT,绘制细胞生长曲线。

1.7 统计学分析 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS11.5 统计软件对实验数据进行统计处理,多组样本均数的比较采用 One-way ANOVA (单因素方差分析),应用 levene 检验行方差一致性检验,若方差齐时采用 LSD(最小显著差法)检验,方差不齐采用 Dunnett'T3 检验完成组间两两比较。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色检测 CtBP2 蛋白在前列腺癌中高表达 CtBP2 蛋白在良性前列腺增生组织中未见明显表达,而在前列腺癌组织中 97.5%(156/160)出现阳性表达(图 1),在低分化前列腺癌组织中 CtBP2 高表达更为明显($P < 0.01$),各组织的具体阳性率比较见表 1。



前列腺增生组织

前列腺癌组织

图 1 CtBP2 在前列腺癌组织中表达(×200)

Fig 1 Expression of CtBP2 in prostate cancer(×200)

表 1 CtBP2 在前列腺癌及正常前列腺组织中的表达
Tab 1 Expression of CtBP2 in prostate cancer and normal prostate tissues

组织	例数	免疫反应/n(%)					P
		-	+	++	+++	++++	
正常前列腺组织	60	46(76.7)	9(15.0)	5(8.3)	0(0.0)	0(0.0)	0.00
高分化前列腺癌	48	4(8.3)	8(16.7)	15(31.0)	21(44.0)	0(0.0)	
中分化前列腺癌	52	0(0.0)	7(13.5)	10(19.0)	16(31.0)	19(36.5)	
低分化前列腺癌	60	0(0.0)	5(8.3)	7(11.7)	18(30.0)	30(50.0)	

2.2 Silencer 组 CtBP2 水平检测 为了评价 CtBP2 的肿瘤生物学功能,首先将 3 个克隆 CtBP2-shRNA 重组质粒利用 Lipofectamine 2000 分别转染入前列腺癌细胞 PC3,并通过嘌呤霉素筛选获得稳定转染细胞后,设置对照,然后检测细胞中 CtBP2 的表达情况,如图 2A、2B 显示,克隆 CtBP2-shRNA#1 的干

扰效果最佳,CtBP2 的表达水平明显降低,约 87%,qPCR 显示,与 Vector control 组及Parent control 组相比较,克隆组(Silencer 组)细胞中 CtBP2 的水平明显减低至 70%($P=0.023$)(图 2C),Western blot 亦获得相似的结果(图 2D)。所以,我们以 Silencer 组继续进行下面的实验研究。

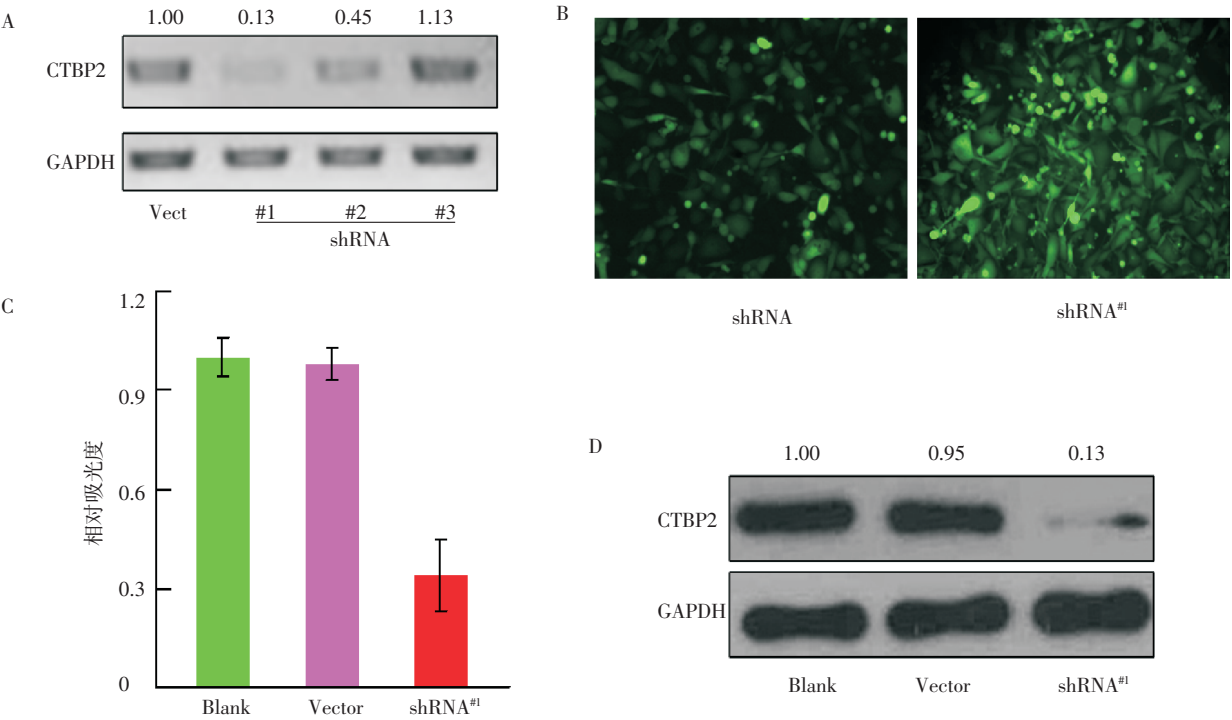


图 2 CtBP2 低表达细胞的筛选
Fig 2 Screening of CtBP2 low expression cells

2.3 CtBP2 低表达可显著抑制细胞增殖及克隆形成 取已验证的 CtBP2 低表达的 PC3 细胞通过细胞计数及 MTT 进行细胞增殖研究,细胞增殖曲线显示,随着时间的推移,Silencer 组 PC3 细胞增殖速率较对照组明显降低,分别降低 70%及 75%($P<0.05$)(图 3)。单克隆形成实验发现 Vector control 组、Parent control 组和 Silencer 组 PC3 细胞的可见克隆数分别为 136 ± 11 、 128 ± 12 和 56 ± 9 ,Silencer 组 PC3 细胞的克隆形成数明显减少 ($P<0.05$)(图 4A、4B),而Silencer 组克隆面积较对照组也明显缩小 ($P=0.02$)(图 4C)。

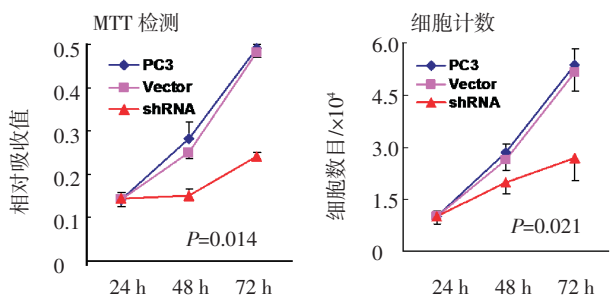


图 3 MTT 及细胞计数检测 CtBP2 低表达细胞增殖效应的影响
Fig 3 Effect of MTT and cell count on the proliferation of CtBP2 cells with low expression

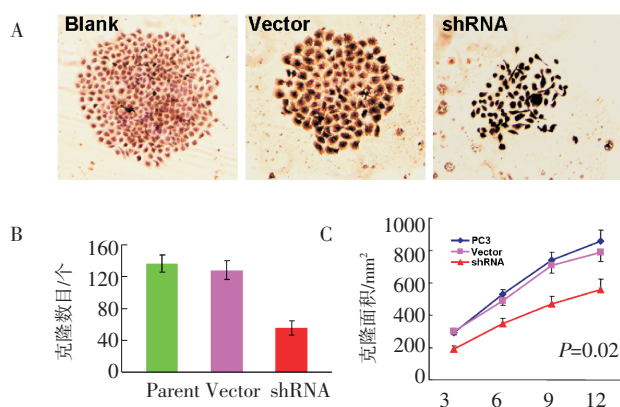


图 4 CtBP2 低表达抑制细胞克隆形成分析

Fig 4 Analysis of CtBP2 low expression inhibiting cell clone formation

2.4 CtBP2 高表达与前列腺癌不良预后密切相关 初步研究发现 CtBP2 在前列腺癌中高表达,且与不良分化的前列腺癌关系密切,为了进一步明确 CtBP2 的表达水平对前列腺癌患者预后的影响,我们采用 Kaplan-Meier 分析和 log-rank 检验方法分析了 CtBP2 对患者总体生存时间的影响。Log-rank 检验显示 CtBP2 表达水平与前列腺癌患者生存时间显著相关($P=0.027$)(图 5)。CtBP2 高表达与前列腺癌的不良预后密切相关。

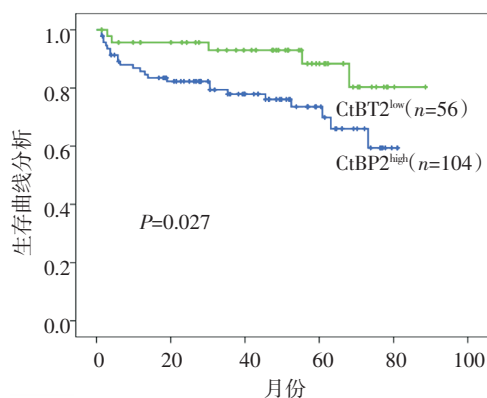


图 5 CtBP2 高表达在前列腺癌中生存曲线分析

Fig 5 Survival curve of CtBP2 high expression in prostate cancer

3 讨论

CtBP 蛋白家族高度保守,研究表明其作为转录辅助因子,参与一系列细胞进程,其在上皮细胞肿瘤的发生,增殖进展等过程中发挥重要作用。有学者指出 CtBP 可作为恶性肿瘤潜在的治疗靶点用于肿瘤治疗^[4]。尽管有研究指出,CtBP2 高表达可作为前列腺癌发病的高风险因素,但是其具体生物学效应目前尚不清楚。本研究通过分子生物学技术研究发现,CtBP2 在前列腺癌中高表达,且降低细胞

CtBP2 内源性表达,可显著抑制细胞体外增殖及致瘤能力,这些发现给予前人报道的 CtBP2 是有效的前列腺恶性肿瘤预测因子有力的证据支持^[5],提示 CtBP2 的异常表达参与了前列腺癌的发生发展,但是其具体作用机制目前尚不明确。

在脊椎动物中,CtBPs 主要包括 CtBP1 和 CtBP2 两个家族成员。然而,由于差异性 RNA 剪接差异,CtBP1 可编码 CtBP1-L 与 CtBP1-S 两种亚型蛋白,而 CtBP2 基因编码 3 种亚型蛋白,即 CtBP2-L、CtBP2-S 和 RIBEYE,其是由 CtBP2 基因通过选择不同的启动子而产生,就其蛋白结构分析发现亚型 CtBP2-L 和 CtBP2-S 与 CtBP1 具有高度同源性,对其功能研究发现 CtBP1-L 和 CtBP2-L、CtBP2-S 均具有辅助抑制因子活性,CtBP1-S 可能参与高尔基体膜分裂,而 RIBEYE 可能具有在中枢神经系统中形成突触的功能^[6-8]。

尽管 CtBPs 蛋白具有多个蛋白亚型,但是其都具有一个高度保守的功能结构域,作为腺病毒 E1A 的绑定配体,一系列转录抑制因子可与其经典的 E1A 绑定结构域相结合,通过与 CtBPs 相互作用形成均聚物或者异源多聚物^[8-9],影响一系列恶性肿瘤如大肠癌、肝细胞癌及黑色素瘤等的增殖与侵袭^[10-11]。另有研究报道,CtBP1 作为 CtBP2 的同家族蛋白成员,其在前列腺癌中高表达,且在细胞中核质异位与前列腺癌发病进展密切相关^[3]。本研究发现,CtBP2 在前列腺癌中也明显高表达,其高表达与前列腺癌不良分化及患者不良预后关系密切,但是其主要位于细胞核内,未发现明显核质异位,这说明尽管作为同家族蛋白成员,但是 CtBP2 与 CtBP1 在前列腺癌发病进展中可能存在不同的作用机制。

目前关于 CtBPs 调节肿瘤进程的机制研究已有部分报道,首先,CtBPs 可激活一系列癌基因,例如 Evi^[12]和 Hdm2^[13]促进肿瘤的发生发展。再者,CtBPs 可作为重要的肿瘤抑制基因的负调节因子,例如 E-cadherin^[14]和 PTEN^[10,15]影响肿瘤进程。此外,像 HIPK2^[16]和 Ink4a/Arf^[10-12]等肿瘤抑制因子均可下调 CtBPs 的表达水平,进而促进细胞凋亡。尽管就 CtBPs 影响肿瘤进展的机制已有一系列研究,但是尚有很多不明确的地方,仍需要我们进一步研究探讨。

本研究发现 CtBP2 在前列腺癌中明显高表达,且其高表达与低分化前列腺癌及患者不良预后密切相关。此外,降低内源性 CtBP2 表达水平可显著抑制细胞体外增殖,因此,我们认为 CtBP2 可作为前列腺癌潜在的肿瘤分子标志物及可能的靶向治疗分子靶点。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA: A Cancer J Clin, 2013,63(1):11
- [2] 叶定伟.前列腺癌的流行病学和中国的发病趋势[J].中华外科杂志,2006,44(6):362
- [3] Wang R, Asangani I A, Chakravarthi B V, et al. Role of transcriptional corepressor CtBP1 in prostate cancer progression[J]. Neoplasia, 2012, 14(10):905
- [4] Bergman L M, Blaydes J P. C-terminal binding proteins: Emerging roles in cell survival and tumorigenesis[J]. Apoptosis,2006,11(6):879
- [5] Thomas G, Jacobs K B, Yeager M, et al. Hutchinson a et al:multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer[J]. Nat Genet, 2008,40(3):310
- [6] Verger A, Quinlan K G, Crofts L A, et al. Mechanisms directing the nuclear localization of the CtBP family proteins[J]. Mol Cell Biol, 2006,26(13):4882
- [7] Schaeper U, Boyd J M, Verma S, et al. Molecular-cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1995,92(23):10467
- [8] Turner J, Crossley M. The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors[J]. Bioessays, 2001,23(8):683
- [9] Chinnadurai G. An unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis[J]. Mol Cell, 2002,9(2):213
- [10] Paliwal S, Kovi R C, Nath B, et al. The alternative reading frame tumor suppressor antagonizes hypoxia-induced cancer cell migration via interaction with the COOH-terminal binding protein corepressor[J]. Cancer Res, 2007,67(19):9322
- [11] Chen Y W, Paliwal S, Draheim K, et al. p19Arf inhibits the invasion of hepatocellular carcinoma cells by binding to c-terminal binding protein[J]. Cancer Res, 2008,68(2):476
- [12] Izutsu K, Kurokawa M, Imai Y, et al. The corepressorCtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor signaling[J]. Blood, 2001,97(9):2815
- [13] Mirnezami A H, Campbell S J, Darley M, et al. Hdm2 recruits a hypoxia-sensitive corepressor to negatively regulate p53-dependent transcription[J]. Current Biol, 2003,13(14):1234
- [14] Grooteclaes M F. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis[J]. Oncogene, 2000,19(33):3823
- [15] Escrivà M, Peiró S, Herranz N, et al. Virtanen I et al:repression of PTEN phosphatase by snail1 transcriptional factor during gamma Radiation-Induced apoptosis[J]. Mol Cell Biol, 2008,28(5):1528
- [16] Di Stefano V, Soddu S, Sacchi A. D'orazi G:HIPK2 contributes to PCAF-mediated p53 acetylation and selective transactivation of p21Waf1 after nonapoptotic DNA damage[J]. Oncogene, 2005,24(35):543

(2016-09-14 收稿)

医学论文中被误用为单位符号的“ppm、ppb、ppt”英文缩写的换算

在医学论文中,“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用,而“ppm、ppb、ppt”不是量纲一的量的单位的专门名称,也不是数学符号,更不是单位符号,只是表示数量份额的英文名词缩写(英文全称分别为 parts per million、parts per billion、parts per trillion)。在实际研究中,仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果,作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言,换算前需了解体积比还是质量比。 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 是质量-体积比,如果溶液的密度是 1 g/mL ,则 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 相当于 1 ppm ;如果溶液密度不是 1 g/mL ,则需要进行换算。

对大气中的污染物而言,常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示(如 cm^3/m^3 、 mL/m^3),换算关系是: $1\text{ ppm}=1\text{ cm}^3/\text{m}^3=10^{-6}$, $1\text{ ppb}=10^{-9}$, $1\text{ ppt}=10^{-12}$;质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示(如 mg/m^3 、 g/m^3),换算关系是: $C=22.4\text{ X}/M$,式中:X为污染物以 mg/m^3 表示的浓度值;C为污染物以ppm表示的浓度值;M为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为: $1\text{ ppm}=1\text{ mg/kg}=1\text{ 000 }\mu\text{g/kg}$; $1\text{ ppb}=1\text{ }\mu\text{g/kg}=10^{-3}\text{ mg/kg}$; $1\text{ ppt}=1\text{ ng/kg}=10^{-6}\text{ mg/kg}$ 。

(编辑部)