

血清饥饿诱发的前列腺癌 DU145 细胞反应^{*}

李璐^{1,2} 张国安³ 侯森⁴ 崔文^{4△}

(¹ 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院, 济南 250062; ² 山东省医学科学院, 济南 250022;

³ 济宁医学院司法鉴定中心; ⁴ 济宁医学院法医学与医学检验学院, 济宁 272067)

摘要 目的 探讨血清饥饿诱发的前列腺癌 DU145 细胞适应性反应。方法 血清培养 DU145 细胞 24h 后更换为无血清培养基。24、48、72h 后收集细胞, 分别应用 MTT 实验、细胞计数实验研究血清饥饿对细胞活力、增殖能力的影响; Real-time PCR 和 Western blot 实验分别在 mRNA 水平和蛋白水平检测干预前后细胞上皮间质转化(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)相关基因表达的变化。结果 随着血清饥饿时间的延长, DU145 细胞拉长呈细叶状, 多中心聚合性生长; 细胞活力、增殖能力受到明显抑制。Real-time PCR、Western blot 结果均显示血清饥饿后 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达升高, SNAIL、SLUG 表达降低。结论 为应对血清饥饿, DU145 细胞发生了 EMT 的逆转, 这可能是其适应性反应的一部分。

关键词 血清饥饿; DU145; EMT; 细胞反应

中图分类号: R73-3 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2016)10-309-05

The cellular response of prostate cancer DU145 cells induced by serum starvation

LI Lu^{1,2}, ZHANG Guoan³, HOU Sen⁴, CUI Wen^{4△}

(¹ School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan - Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062;

² Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250022; ³ Center of Forensic Science Jining Medical University;

⁴ Institute of Forensic Medicine and Laboratory Medicine of Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: To explore the cellular adaptive response of human prostate cancer DU145 cells induced by serum starvation. Methods Prostate cancer DU145 cells were cultured in DMEM supplemented in 10% FBS and then replaced with serum free medium. Cells were collected from serum and serum-free medium after 24, 48 and 72 hours. The cell viability and multiplication capacity were detected using MTT and Cell Counting, respectively. RT-PCR and Western Blotting are used to examine EMT related gene expression. Results With serum starvation morphological changes of DU145 cells were observed. MTT and Cell counting results indicated that serum starvation inhibited cell proliferation significantly. Real-time PCR and Western Blotting results showed that the expression of E-cadherin gene increased, while SNAIL, SLUG decreased. Conclusion In response to serum starvation, EMT reversion occurred in DU145 cells and this performance may be a part of the adaptive response.

Keywords: Serum starvation; DU145; EMT; Cell reflection

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是欧美男性最常见的恶性肿瘤之一^[1], 在美国 PCa 发病率占第 1 位, 死亡率仅次于肺癌。我国 PCa 发病率虽远低于欧美, 但有逐年上升趋势^[2]。由于 PCa 早期症

状轻, 确诊时年龄较大, 故晚期多已发生转移, 失去了手术根治时机, 只能采用完全雄激素阻断治疗, 国内则多采用双侧睾丸切除加抗雄激素制剂治疗^[3]。但因为内分泌治疗仅仅是肿瘤的姑息性治疗, 大部分病人在经历 18~24 个月的中位期后, 原来激素依赖性的 PCa 最终成为非激素依赖性 PCa^[4-5]。一般情况下, 一旦肿瘤呈现出激素非依赖特性, 对其目前尚无有效方法加以控制, 患者的

* [基金项目] 山东省高等学校科技计划项目(J13LK14);
山东省研究生教育创新计划项目(SDYY14014)

△ [通信作者] 崔文, E-mail: cuiwenmd@163.com

生存期很少超过 12 个月。这些研究表明,迫切需要对 PCa 的发生、发展机理进行深入研究,以便为临床提供新的治疗方法^[6]。

血清因其富含多种营养物质,如激素、生长因子等,可以为体外培养的细胞提供充足的养分。癌症晚期阶段,肿瘤体积增大,大量肿瘤内部的细胞会面临恶劣的生存环境如低氧和营养物质不足^[7]。本文采用血清饥饿的方法,在体外模拟 PCa 晚期 DU145 细胞营养缺乏的生存环境^[7-8],分析上皮间质转化(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)相关基因的表达变化,研究晚期癌细胞增殖、转移机制,为 PCa 的研究、治疗提供新的方法及思路。

1 材料与方法

1.1 材料

DU145 细胞系购置于欧洲细胞库;DMEM 培养基购自 Fisher 公司;胎牛血清(FBS)购自杭州四季青公司;双抗购自美国 HyClone 公司;RNeasy mini kit 购自 qiagen;FastQuant RT Kit(with gD-Nase)购自北京天根生化科技有限公司;SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;鼠抗人 β -Actin 单克隆抗体购于碧云天生物技术有限公司;E-cadherin、Vimentin、羊抗兔-IgG(H+L)/HRP、羊抗鼠-IgG(H+L)/HRP 抗体均购自 CST 公司;Chemi DocMP 成像分析仪购自上海菲特科学器材有限公司;引物由上海生工设计,见表 1。

表 1 基因上游、下游引物序列

基因	上游引物	下游引物
E-cadherin	GCCCTGCCAATCCCGATGAAA	GGGGTCAGTATCAGCCGCT
SNAIL	CCAGA CCCACTCAGATGCAAGAA	GGCAGAGGACACAGAACCAGAAAA
SLUG	CCCA ATGGCCTCTCTCTCTTT	CATCGCAGTGCAGCTGCTTATGT TT
β -Actin	AAGGAGCCCCACG AGAAAAAT	ACCGAACTTGCATTGATTCAG

1.2 方法

1.2.1 DU145 细胞培养 在 37℃、5% CO₂ 培养箱内,将 DU145 细胞置于含 10% 的胎牛血清、1% 双抗(青霉素、链霉素)的 DMEM 的培养液中培养,每日显微镜下观察细胞生长状况,隔日更换培养液,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 MTT 取对数生长期的 DU145 细胞,常

规消化,制成细胞悬液;细胞计数,调整细胞密度至 3×10^4 /ml,以每孔 3000 个(100 μ l)接种于 96 孔板,每组做 3 个平行复孔;24h 后除正常对照组外其余各组均换为无血清培养基;分别在 24、48、72h 后观察细胞生长情况,每孔垂直加入 25 μ l MTT 溶液,培养箱内孵育 2h 后加入 100 μ l Lysis Buffer;培养箱内孵育 24h 后置于酶标仪上,分别检测 570nm、630nm 波长处的 OD 值,以 OD₅₇₀₋₆₃₀ 的值作为增殖的指标。

1.2.3 细胞计数 实验前一天将 DU145 细胞接种于 24 孔板上,每孔 5×10^4 个(100 μ l),再加入完全培养基 400 μ l/孔,每组做 3 个平行复孔,十字摇匀后置于培养箱中孵育;24h 后除正常对照组外其余各组均换为无血清培养基;分别于 24、48、72h 后观察细胞状态,以胰酶 200 μ l/孔消化细胞。使用 TC20 细胞计数仪计数细胞。

1.2.4 Real-time PCR 1)RNA 提取 分别于 24、48h 后,提取各组 RNA。弃去培养液,加入 4ml 预冷的 PBS 并倒掉。根据试剂盒说明书提取 RNA。nano-drop 测量模板 RNA 的浓度和纯度;2)逆转录 冰上解冻,每种溶液漩涡震荡混匀,简短离心收集。建立 gDNA 去除反应体系,置于 42℃ 孵育 3min,建立反转录反应体系,置于 42℃ 孵育 15min,95℃ 孵育 3min 后置于冰上,得到 cDNA。3)根据试剂盒说明书建立并进行 Real-time PCR。

1.2.5 Western blot 1)总蛋白提取,分别于 24、48h 后提取各组蛋白,弃去细胞培养皿中的培养液,分两次加入 3ml PBS 冲洗。每 10cm 培养皿加 400 μ l RIPA 混合液(裂解液:磷酸酶抑制剂 = 10:1,裂解液:蛋白酶抑制剂 = 100:1)。用细胞刮子将细胞刮下,吸出液体至 EP 管中进行蛋白超声。冰上孵育 30min 后 4℃ 14000g 离心 30min。吸出上清,测定蛋白浓度,计算出上样体积。2)SDS-PAGE 电泳,配制 10% 分离胶、5% 浓缩胶,各孔按设计加入 marker 和已变性好的蛋白样品;以最大电流,恒定电压,电泳 4h。按照 marker 对应的蛋白分子量切取目的条带,以电压 100V 转膜 2h。5% 的脱脂奶粉室温封闭 1h,一抗 4℃ 孵育过夜,室温下用 TBST 在摇床上洗 3 次,每次 5min。二抗孵育 1h,同样用 TBST 洗 3 次。滴加等体积混合的 ECL 发光液,使用 ChemiDocMP 成像分析仪进行曝光。运用 ImageJ 软件进行条带灰度值分析,以目的基因条带的灰度值与 β -Actin 灰度值的比值作为该基因的相

对表达量。

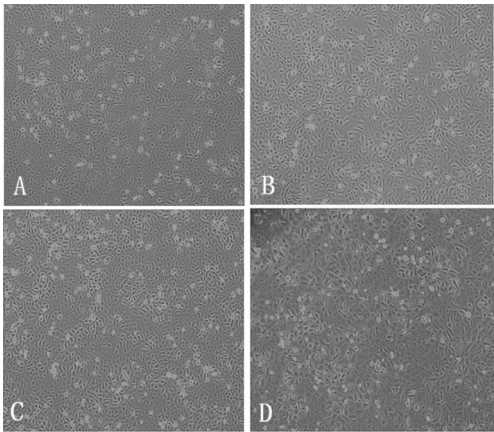
1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 血清饥饿对细胞形态的影响

无血清干预 6cm 培养皿中的 DU145 细胞 24、48、72h (B、C、D 组) 后于倒置显微镜下观察。结果显示,正常培养(A 组)的 DU145 细胞生长状态良好,呈贴壁生长,多数呈菱形、类圆形。血清饥饿 DU145 细胞后观察,发现随血清饥饿时间延长,细胞密度逐渐降低。部分细胞形态也发生变化,尤以无血清 72h (D 组) 明显,细胞逐渐拉长呈梭形、细叶状,放射样多中心性聚合生长。见图 1。



注:A. 正常培养;B. 无血清 24h;C. 无血清 48h;D. 无血清 72h

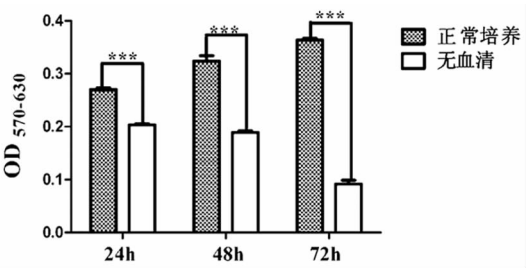
图 1 血清饥饿对 DU145 细胞形态的影响 (×100)

2.2 血清饥饿对 DU145 细胞活力的影响

DU145 细胞在血清饥饿 24、48、72h 后,在酶标仪上检测正常培养组与无血清组吸光值,发现在相同干预时间下,无血清组 DU145 细胞活力较正常组降低($P<0.0001$)。见表 2、图 2。

表 2 血清饥饿对 DU145 细胞活力的影响

分组	OD ₅₇₀₋₆₃₀		
	24h	48h	72h
正常培养	0.270 ± 0.006	0.324 ± 0.017	0.364 ± 0.006
无血清组	0.203 ± 0.003	0.189 ± 0.005	0.092 ± 0.013
<i>t</i>	16.12	12.91	34.12
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001



注:无血清组与正常培养组相比,*** $P<0.0001$

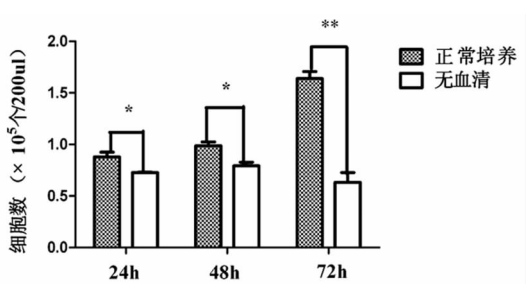
图 2 血清饥饿对 DU145 细胞活力的影响

2.3 血清饥饿对 DU145 细胞增殖的影响

血清饥饿 24、48、72h 后两组 DU145 细胞增殖数。见表 3、图 3。

表 3 血清饥饿对 DU145 细胞增殖的影响

分组	细胞数 (×10 ⁵ 个/200μl)		
	24h	48h	72h
正常培养	0.879 ± 0.080	0.987 ± 0.064	1.640 ± 0.117
无血清组	0.727 ± 0.008	0.792 ± 0.063	0.633 ± 0.162
<i>t</i>	3.278	3.767	8.695
<i>P</i>	0.0306	0.0197	0.001



注:无血清组与正常培养组相比,* $P<0.05$,** $P<0.001$

图 3 血清饥饿对 DU145 细胞增殖的影响

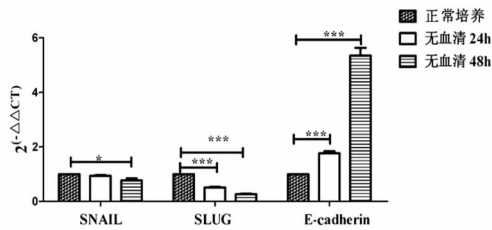
2.4 血清饥饿对 DU145 细胞 mRNA 表达的影响

血清饥饿 24、48h 后 DU145 细胞 E-cadherin、SNAIL、SLUG mRNA 的表达。见表 4、图 4。

表 4 血清饥饿对 DU145 细胞 mRNA 表达的影响

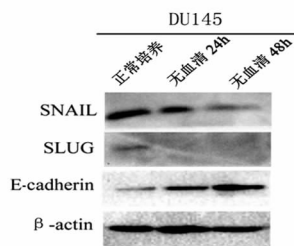
	mRNA 相对表达量			<i>F</i> 值	<i>P</i>
	正常培养	无血清 24h	无血清 48h		
SNAIL	1.000 ± 0.000	0.942 ± 0.040	0.767 ± 0.139 *	6.565	<0.05
SLUG	1.000 ± 0.000	0.512 ± 0.044 ***	0.266 ± 0.035 ***	394.400	<0.0001
E-cadherin	1.000 ± 0.000	1.765 ± 0.139 ***	5.352 ± 0.494 ***	184.200	<0.0001

注:无血清组与正常培养组相比,* $P<0.05$,*** $P<0.0001$



注:无血清组与正常培养组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.0001$

图4 血清饥饿对 DU145 细胞 SNAIL、SLUG、E-cadherin mRNA 表达的影响

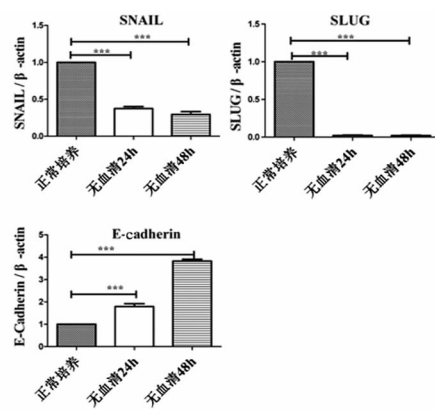


注:无血清组与正常培养组相比,*** $P < 0.0001$

图5 血清饥饿对 DU145 细胞 SNAIL、SLUG、E-cadherin 蛋白表达的影响

2.5 血清饥饿对 DU145 细胞蛋白表达的影响

我们进一步的用 Western blot 确认 mRNA 的检测结果,血清饥饿 DU145 细胞 24、48h 后提取蛋白,以 β -actin 为内参做 Western blotting,检测基因在蛋白水平相对表达量。见图 5。



3 讨论

PGa 晚期,癌细胞一旦突破包膜发生转移患者预后极差。近年来,研究人员提出了多种假说来解释肿瘤的病理生理过程,尤其是肿瘤的侵袭、转移机制,包括癌细胞脱离原位、进入血液循环、在继发部位形成转移灶等。近年来,研究人员把胚胎发育过程中的 EMT 理论引入肿瘤细胞的转移机制,较好地解释了肿瘤细胞的原位脱离现象,为临床治疗提供了新的思路。

EMT 是指上皮细胞与周围间质相互作用过程中逐渐获得某些间质细胞所特有表型的现象,目前被认为是肿瘤转移的关键启动步骤,参与包括 PGa 在内的多种肿瘤的侵袭、转移过程。其主要特征包括上皮细胞标记物 E-cadherin 表达降低,间质细胞标记物如 N-cadherin、Vimentin 表达升高、细胞侵袭力增强等^[9]。E-cadherin 对于细胞间的粘附连接是不可或缺的,E-cadherin 的缺失可降低细胞间的黏着能力,促进癌细胞的转移。SNAIL 可以与 E-cadherin 启动子元件 E-box 结合,对 E-cadherin 的转录进行直接抑制,下调其表达,从而使上皮细

胞间失去黏附能力,促进 EMT 的发生,参与胚胎发育、肿瘤转移及组织纤维化过程^[10]。

本实验选用人 PGa DU145 细胞株,一种代表了侵袭性和转移性的非雄激素依赖性 PGa 表型^[11-12]。采用血清饥饿的方法在体外模拟大多数实体肿瘤晚期癌细胞所面临的缺血、缺氧、营养物质不足的生存环境。我们发现血清饥饿对 DU145 细胞的生存有一定的冲击力,细胞活力及增殖能力均明显降低。此外我们还观察到与 Kang 等^[13]早期研究相一致的实验结果:E-cadherin 较正常组升高 3 倍。细胞形状由类圆形变成细叶状,反而呈现出了聚合性生长态势。同时我们发现 SNAIL、SLUG 基因表达降低,这与大部分研究发现的 SNAIL、SLUG 基因是调控 E-cadherin 的上游基因,在基因表达上与 E-cadherin 呈显著负相关一致^[14-16]。因此,应对血清饥饿,DU145 癌细胞发生了 EMT 的逆转,这可能是其适应性反应的一部分。

E-cadherin 表达下调的机制是由暴露于 TGF- β 所致。关于 E-cadherin 表达的上调少有研究,了解 E-cadherin 基因可以提高我们对肿瘤发展和转移的认识。我们在体外模拟癌细胞营养缺乏的生

存环境时发现血清饥饿引起了 E-cadherin 表达的上调。这向我们展示了一个全新的分子机制。即：营养物质和生长因子的剥夺可以通过上调 E-cadherin 的表达抑制肿瘤细胞的增殖和转移。该机制在 A549 细胞系中已得以证实^[17]。这也为血管栓塞方法治疗肝癌提供了分子学依据。

另外,基于 SNAIL、SLUG 基因与 E-cadherin 的负相关性^[14-16],我们可以采用 siRNA 技术,制备针对 SNAIL、SLUG 的 siRNA,沉默 SNAIL、SLUG 基因,有效抑制其表达可阻断他们对 E-cadherin 的转录抑制,进而阻断 EMT,抑制肿瘤的侵袭和转移,为治疗晚期雄激素非依赖性 PCa 提供新的靶点。

参考文献:

- [1] Joshi G, Singh P K, Negi A, et al. Growth factors mediated cell signalling in prostate cancer progression; Implications in discovery of anti-prostate cancer agents [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2015, 240: 120-133. DOI:10.1016/j.cbi.2015.08.009.
- [2] Song HZ, Chen LB. Advances in researches on hormonal refractory prostate cancer [J]. *National journal of andrology*, 2007, 13(1): 57-60.
- [3] Kim A, Im M, Ma JY. Ethanol extract of remotiflori radix induces endoplasmic reticulum stress-mediated cell death through AMPK/mTOR signaling in human prostate cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 8394. DOI:10.1038/srep08394.
- [4] Batth IS, Yun H, Kumar AP. Recepteur d'origine nantais (RON), more than a kinase: Role in castrate-resistant prostate cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54(10): 937-946. DOI:10.1002/mc.22354.
- [5] Wu C, Huang W, Guo Y, et al. Oxymatrine inhibits the proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4129-4134. DOI:10.3892/mmr.2015.3338.
- [6] Liu Y, Chen L, Gong Z, et al. Lovastatin enhances adenovirus-mediated TRAIL induced apoptosis by depleting cholesterol of lipid rafts and affecting CAR and death receptor expression of prostate cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 3055-3070. DOI:10.18632/oncotarget.3073.
- [7] Lee SH, Jung YS, Chung JY, et al. Novel tumor suppressive function of Smad4 in serum starvation-induced cell death through PAK1-PUMA pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2011, (2): e235. DOI:10.1038/cddis.2011.116.
- [8] Kubo H, Kitajima Y, Kai K, et al. Regulation and clinical significance of the hypoxia-induced expression of ANGPTL4 in gastric cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(2): 1026-1034. DOI:10.3892/ol.2015.4011.
- [9] Kimura I, Kitahara H, Ooi K, et al. Loss of epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 201-207. DOI:10.3892/ol.2015.3833.
- [10] Villarejo A, Cortés-Cabrera A, Molina-Ortiz P, et al. Differential role of Snail1 and Snail2 zinc fingers in E-cadherin repression and epithelial to mesenchymal transition [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(2): 930-941. DOI:10.1074/jbc.M113.528026.
- [11] Kanaoka R, Kushiyaama A, Seno Y, et al. Pin1 inhibitor juglone exerts anti-oncogenic effects on LNCaP and DU145 cells despite the patterns of gene regulation by pin1 differing between these cell lines [J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(6): e0127467. DOI:10.1371/journal.pone.0127467.
- [12] Liu T, Fang Z, Wang G, et al. Anti-tumor activity of the TRPM8 inhibitor BCTC in prostate cancer DU145 cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(1): 182-188. DOI:10.3892/ol.2015.3854.
- [13] Hazan RB, Kang L, Roe S, et al. Vinculin is associated with the E-cadherin adhesion complex [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(51): 32448-32453. DOI:10.1074/jbc.272.51.32448.
- [14] 张阿丽, 王全胜, 钟亚华, 等. 上皮性肿瘤细胞中 Snail 与 E-cadherin 的表达及其与体外侵袭性的关系 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(1): 17-20. DOI:10.3760/j.issn.0253-3766.2006.01.005.
- [15] Osorio LA, Farfán NM, Castellón EA, et al. SNAIL transcription factor increases the motility and invasive capacity of prostate cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(1): 778-786. DOI:10.3892/mmr.2015.4585.
- [16] Li XN, Fang CQ, Wang YL, et al. Slug regulates E-cadherin expression in metastatic adenocarcinoma cells isolated from pleural fluid [J]. *Diagn Cytopathol*, 2013, 41(1): 9-14. DOI:10.1002/dc.21746.
- [17] Dong S, Khoo A, Wei J, et al. Serum starvation regulates E-cadherin upregulation via activation of c-Src in non-small-cell lung cancer A549 cells [J]. *Am J Physiol, Cell Physiol*, 2014, 307(9): C893-C899. DOI:10.1152/ajpcell.00132.2014.

(收稿日期 2016-05-09)