

网络出版时间: 2018-6-22 17:51 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180621.1453.007.html>

地塞米松对前列腺癌 PC3 细胞自噬的影响

王培宇¹ 梁前俊¹ 张 力^{1,2} 樊 松^{1,2} 梁朝朝^{1,2}

摘要 目的 探究地塞米松(Dex)对前列腺癌 PC3 细胞自噬的影响。方法 通过不同浓度的 Dex(0、500、750、1 000 $\mu\text{mol/L}$)处理前列腺癌 PC3 细胞 24 h,MTT 法检测其对细胞存活率的影响,Western blot 法检测自噬蛋白 LC3 的表达情况,LC3 质粒标记绿色荧光蛋白(GFP-LC3)转染 PC3 细胞后,荧光显微镜下观察 GFP-LC3 的表达情况,并通过自噬抑制剂 50 $\mu\text{mol/L}$ 氯喹(CQ)来探究自噬对 Dex 作用下前列腺癌 PC3 细胞的作用。结果 Dex 抑制 PC3 细胞的存活,随浓度增加,抑制作用更为明显;诱导 LC3 II 及 GFP-LC3 蛋白表达增加。CQ 抑制自噬后,细胞存活率进一步下降。结论 Dex 激活了前列腺癌 PC3 细胞的自噬,在此过程中自噬可能起保护作用。

关键词 前列腺癌;地塞米松;自噬

中图分类号 R 737.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)08-1190-04

2018-03-12 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81370856、81400757);国家临床重点专科建设项目(卫办医政函[2012]649号)

作者单位:¹ 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科,合肥 230022

² 安徽医科大学泌尿外科研究所,合肥 230022

作者简介:王培宇,男,硕士研究生;

梁朝朝,男,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:Liang_chaozhao@163.com

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.007

前列腺癌是老年男性常见的恶性肿瘤,随着前列腺特异性抗原(prostate specific antigen,PSA)筛查的普及,更多的患者被早期检出。然而一部分患者就诊时已经为临床晚期,治疗方法上常采用内分泌联合放疗或根治性手术^[1]。自噬是细胞内溶酶体降解过程,在细胞生长、分化和内环境稳态中起着重要作用,参与细胞器的更新和细胞正常代谢。糖皮质激素可以诱导骨细胞的自噬^[2],也可以降低去势抵抗型前列腺癌患者的 PSA 水平,其中地塞米松(dexamethasone,Dex)可能是单一疗法中效果最好的糖皮质激素^[3]。目前糖皮质激素对前列腺癌自噬的影响尚不十分清楚,该研究使用不同浓度的糖皮质激素 Dex 处理激素非依赖性前列腺癌 PC3 细胞,观察自噬过程的变化,并通过自噬抑制剂氯喹(chloroquine,CQ)来探讨自噬对 Dex 作用下前列腺癌 PC3 细胞的影响,为晚期激素非依赖性前列腺癌患者的治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料和仪器 前列腺癌 PC3 细胞来

adipogenic differentiation assay. The 5% concentration of PRP and ADSCs were co-cultured, and their effects on cell proliferation were observed by CCK-8 method; Alizarin red staining, alkaline phosphatase staining and RT-PCR methods were used to observe the effect of osteogenic differentiation. **Results** The results of platelet count showed that platelet recovery of PRP prepared by Tubex modified method was significantly higher than that of the other two groups. The expression of specific antigens on the cell surface obtained in the experiment had osteogenic differentiation and adipogenic differentiation ability. After ADSCs cultured for 21 days, ADSCs in all PRP treatment groups had the formation of mineralized nodules, and alkaline phosphatase activity was also significantly higher than that of mineralization inducer treatment group ($P < 0.05$). RT-PCR results showed that the expression of osteogenic differentiation marker genes in PRP-treated cells was also significantly higher than that in the mineralization-induced group ($P < 0.05$). The PRP prepared by Tubex method had a significantly stronger effect on osteogenic differentiation of ADSCs than the other two methods ($P < 0.05$). **Conclusion** The platelet recovery rate of platelets prepared from PRP is higher than that of secondary centrifugation and three centrifugation methods, and it is superior to the other two methods in promoting proliferation and osteogenic differentiation of rabbit ADSCs. The preparation of PRP by Tubex sealed device not only has simple operation, but also can increase the collection rate of platelets. The abundant cytokines in PRP facilitate the proliferation and differentiation of ADSCs.

Key words platelet-rich plasma; Tubex modified technique; adipose-derived stem cells; osteogenic differentiation

自安徽医科大学第一附属医院泌尿外科研究所; Dex 购自山东辰欣药业股份有限公司; CQ 购自美国 Selleck 公司; LC3 质粒标记绿色荧光蛋白转染质粒 (greenfluorescent-LC3, GFP-LC3) 和 Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; MTT 购自美国 Solarbio 公司; 兔抗 LC-3 抗体、鼠抗 GAPDH 抗体、兔抗二抗购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; 细胞培养试剂购自美国 Gibco 公司; 超净工作台购自苏州净化设备公司; 高速冷冻离心机购自美国 Thermo 公司; Chemscope 5600 化学发光成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司; ELx800 酶标仪购自美国伯腾仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 实验 PC3 细胞培养在 1640 培养基, 含 10% 胎牛血清和 0.1% 青霉素、链霉素。在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中生长。细胞接种于 96 孔板, 细胞贴壁 24 h 后分别以 Dex (0、500、750、1 000 μmol/L) 以及 50 μmol/L CQ 处理 24 h, 然后每孔加入 10 μl MTT 溶液 (5 mg/ml), 作用 4 h 后吸去培养液, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砜, 溶解后 490 nm 下测定吸光度值。

1.2.2 Western blot 法检测 不同浓度 Dex (0、500、750、1 000 μmol/L) 和 50 μmol/L CQ 处理前列腺癌 PC3 细胞 24 h 后, 冰上裂解 20 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。取上清液加上样缓冲液煮沸 10 min, 以 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 将 LC3 蛋白转移到 0.45 μm 的 PVDF 膜上。5% 的脱脂奶粉缓慢摇晃封闭 2 h。1:1 000 稀释 LC3 一抗后 4 °C 孵育过夜。然后用 TBST 洗膜 40 min, 室温下孵育二抗 1 h, 加 ECL 试剂后显影。

1.2.3 免疫荧光法 取对数生长期的 PC3 传代至细胞培养皿, 待细胞贴壁后按说明书将 Lipofectamine 2000 转染试剂转染 GFP-LC3 到 PC3 细胞后, 以不同浓度 Dex 和 CQ 处理 24 h, 然后在荧光显微镜下观察细胞内点状聚集情况。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 16.0 软件进行分析, 所有统计描述指标采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用独立样本 *t* 检验 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 Dex 对前列腺癌 PC3 细胞的增殖的影响 与对照组比较, 浓度为 500、750、1 000 μmol/L 的 Dex 处理前列腺癌 PC3 细胞 24 h 后, MTT 法测得细胞存活率相对百分比分别为 (81.66% ± 3.47%)、

(77.78% ± 1.15%)、(72.44% ± 3.42%), 差异有统计学意义 ($t = 9.16, 33.36, 13.97, P < 0.01$)。与对照组比较, 浓度为 50 μmol/L CQ 处理前列腺癌 PC3 细胞 24 h 后, 细胞存活率相对百分比为 (98.81% ± 0.82%), 差异无统计学意义 ($t = 2.52, P > 0.05$)。与不加 CQ 的 Dex 组比较, 浓度为 500、750、1 000 μmol/L Dex 和 50 μmol/L CQ 共同处理细胞 24 h 后, 细胞存活率相对百分比分别为 (71.19% ± 2.10%)、(68.84% ± 3.08%)、(63.56% ± 3.41%), 差异有统计学意义 ($t = 4.47, 4.71, 3.19, P < 0.05$)。见图 1。

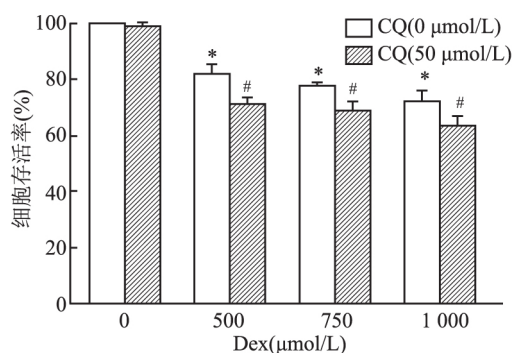


图1 前列腺癌 PC3 细胞经 Dex 处理后细胞存活率
与对照组比较: * $P < 0.01$; 与同浓度 Dex 比较: # $P < 0.05$

2.2 Dex 对前列腺癌 PC3 细胞自噬蛋白表达的影响 CQ 是一种自噬抑制剂, 可以升高溶酶体 pH, 抑制溶酶体自噬体的融合和溶酶体蛋白降解, 提高 LC3 II 型蛋白的积累。Western blot 结果显示, 在 Dex 作用于 PC3 细胞 24 h 后, 可以观察到 LC3 II 型蛋白表达增加, 说明 Dex 诱导了前列腺癌 PC3 细胞的自噬效应。随着浓度的增加, 这种自噬效应更加明显。CQ 抑制了 PC3 细胞的自噬效应, 也抑制了 Dex 诱导的自噬, 见图 2。

2.3 Dex 对前列腺癌 PC3 细胞自噬的影响 当自噬形成时, GFP-LC3 融合蛋白会转位到自噬体膜上, 在荧光显微镜下可以观察到多个明亮的绿色荧光斑点。本实验通过观察前列腺癌 PC3 细胞中自噬小体 GFP-LC3 点状聚集的程度来评估细胞自噬水平。Dex 处理 24 h 后, 荧光显微镜下观察到 Dex 作用后的前列腺癌细胞内 GFP-LC3 点状聚集程度较对照组增加。随着 Dex 的浓度增加, GFP-LC3 点状聚集程度增加, 说明 Dex 浓度越高, 诱导自噬效应越强。CQ 可以抑制前列腺癌 PC3 细胞的自噬, 并且可以抑制 Dex 诱导的自噬, 见图 3。

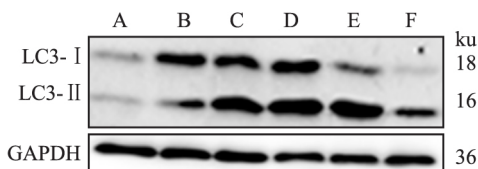


图2 Western blot 法检测前列腺癌 PC3 细胞自噬蛋白 LC3 的表达
A: 对照组; B: Dex 500 $\mu\text{mol/L}$; C: Dex 750 $\mu\text{mol/L}$; D: Dex 1 000 $\mu\text{mol/L}$; E: Dex 1 000 $\mu\text{mol/L}$ + CQ 50 $\mu\text{mol/L}$; F: CQ 50 $\mu\text{mol/L}$

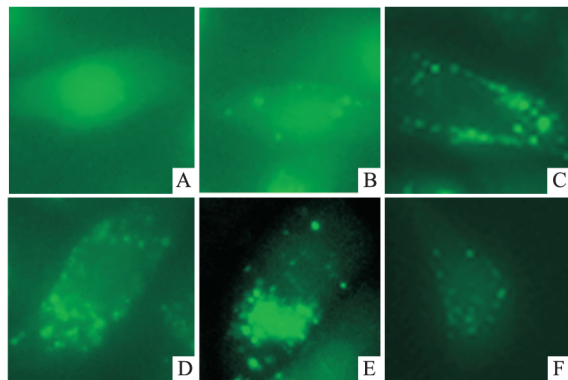


图3 荧光显微镜下观察前列腺癌 PC3 细胞中点状 GFP-LC3 $\times 400$
A: 对照组; B: Dex 500 $\mu\text{mol/L}$; C: Dex 750 $\mu\text{mol/L}$; D: Dex 1 000 $\mu\text{mol/L}$; E: Dex 1 000 $\mu\text{mol/L}$ + CQ 50 $\mu\text{mol/L}$; F: CQ 50 $\mu\text{mol/L}$

3 讨论

非激素依赖性前列腺癌对于常规细胞毒性药物敏感性差,如何延长患者的生存期,提高患者的生活质量,是研究热点之一。糖皮质激素可以减缓疾病进展,改善疼痛,降低化疗的副作用,已经用于前列腺癌的药物化疗^[4]。近些年,节拍化疗在缓解和维持治疗转移性非激素依赖性前列腺癌展现出非常有潜力的治疗价值。节拍化疗具有安全、低毒性的优点,尤其适用于老年、体弱的非激素依赖性前列腺癌患者。其治疗方法多样,包括单一应用化疗药物,化疗药物联合皮质醇类药物以及多种化疗药物联合应用。糖皮质激素联合化疗药物的节拍化疗方案多为Ⅱ期临床研究,Nelius et al^[5]研究了17例多西他赛耐药的激素依赖性前列腺癌患者,每日口服 Dex 1 mg 和环磷酰胺 50 mg,直到疾病进展或不能耐受的副作用。9例患者治疗后 PSA 下降,总生存期为24个月。Fontana et al^[6]研究了28例激素非依赖性前列腺癌患者,其中68%为多西他赛耐药患者。第1天,患者接受500 mg/m² 环磷酰胺静滴治疗,从第2天开始,每天口服50 mg 环磷酰胺联合400 mg 塞来昔布和1 mg Dex 直到疾病进展。结果9例

(32%) 治疗后 PSA 下降超过50%。中位无进展生存期和总生存期分别为3个月和21个月。

糖皮质激素对前列腺癌的具体作用机制目前尚不十分清楚。糖皮质激素通过负反馈抑制下丘脑、垂体轴,抑制睾丸和肾上腺雄激素的合成,延缓前列腺癌进展^[7]。糖皮质激素也可以通过糖皮质激素受体依赖的方式调节细胞因子,进而抑制前列腺癌细胞的生长。通过上调转化生长因子- β 及其受体,抑制核因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 信号的传导,抑制前列腺癌细胞增殖^[8]。糖皮质激素可以抑制单核细胞白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 的表达和分泌,而 IL-6 参与前列腺癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭^[9]。通过结合其亚基 gp130 激活 mTOR 信号通路,阻止 ULK 1 的活化,抑制自噬小体形成, mTOR 抑制剂可以减少肿瘤的血管生成和细胞增殖,因此,糖皮质激素可能通过抑制 IL-6 的分泌来达到抑制肿瘤的作用。国内有学者认为 Dex 阻滞前列腺癌 DU145 细胞周期于 G0 / G1 期,可能与其抑制了 ERK1 / 2 信号通路活性以及 cyclin D1 蛋白表达有关^[10]。Dex 抑制前列腺癌 PC3 细胞的机制,可能是其抑制了转录因子 NF- κB 的转录活性,并且抑制其下游的靶基因 cyclinD1 蛋白的表达^[11]。

自噬是真核生物两种主要的降解途径之一,参与细胞的生长、增殖、分化和凋亡。在自噬过程中,一些细胞质和细胞器被自噬囊泡包裹,然后递送至溶酶体进行降解。自噬是把双刃剑,可以去除氧化损伤的细胞器来保护细胞免受凋亡,但过度自噬也会损害细胞器。因此,自噬既可以保护细胞器和细胞成分免受氧化损伤,也可以是一个自毁的过程,导致细胞死亡^[12]。自噬水平关系着细胞器的合成、降解、以及再循环利用之间的平衡^[13]。Tan et al^[14]评估了3种人类肿瘤细胞系 (MCF7、PC3 和 LNCaP) 对低氧的敏感性,发现自噬有助于肿瘤对抗低氧环境,因为低氧和抗癌治疗的抗性有关,抑制自噬可能有助于提高肿瘤的治疗效果。Kim et al^[15]发现聚乙二醇化精氨酸脱亚胺酶可以诱导前列腺癌 CWR22Rv1 自噬和死亡,在抑制自噬后,细胞死亡增多。PC3 细胞是雄激素非依赖性前列腺癌细胞,本实验通过检测自噬荧光蛋白 GFP-LC3 和自噬相关蛋白 LC3 的表达水平来观察自噬,结果显示 Dex 作用后自噬荧光蛋白 GFP-LC3 点状聚集增多,LC3-II 型蛋白表达增加,综合以上结果, Dex 诱导了前列腺癌 PC3 自噬。同时,本实验显示 Dex 具有抑制前列腺癌 PC3 细胞存活作用,在抑制了自噬效应

后,Dex 抑制前列腺癌 PC3 细胞存活作用增强,提示了 Dex 诱导的自噬对前列腺癌 PC3 细胞是保护性的,CQ 作为自噬抑制剂,体现出在增强抗肿瘤药物治疗方面的潜在价值。

参考文献

- [1] 侯瑞鹏,李健,王凤玮,等. 不同时间新辅助内分泌治疗联合调强放疗对局部晚期前列腺癌疗效的影响作用[J]. 中华泌尿外科杂志,2012,33(5):369-72.
- [2] Xia X, Kar R, Gluhak-Heinrich J, et al. Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes [J]. *J Bone Miner Res* 2010, 25(11): 2479-88.
- [3] Holder S L, Drabick J, Zhu J, et al. Dexamethasone may be the most efficacious corticosteroid for use as monotherapy in castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Biol Ther* 2015, 16(2): 207-9.
- [4] Attard G, Reid A H, Auchus R J, et al. Clinical and biochemical consequences of CYP17A1 inhibition with abiraterone given with and without exogenous glucocorticoids in castrate men with advanced prostate cancer. [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 2012, 97(2): 507-16.
- [5] Nelius T, Klatte T, de Riese W, et al. Clinical outcome of patients with docetaxel-resistant hormone-refractory prostate cancer treated with second-line cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy [J]. *Med Oncol* 2010, 27(2): 363-7.
- [6] Fontana A, Galli L, Fioravanti A, et al. Clinical and pharmacodynamic evaluation of metronomic cyclophosphamide, celecoxib, and dexamethasone in advanced hormone-refractory prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res* 2009, 15(15): 4954-62.
- [7] Huggins C, Hodges C V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate [J]. *J Urol*, 2002, 168(1): 9-12.
- [8] Li Z, Chen Y, Cao D, et al. Glucocorticoid up-regulates transforming growth factor-beta (TGF-beta) type II receptor and enhances TGF-beta signaling in human prostate cancer PC-3 cells [J]. *Endocrinology* 2006, 147(11): 5259-67.
- [9] Culig Z, Puhf M. Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer [J]. *Mol Cell Endocrinol* 2012, 360(1-2): 52-8.
- [10] 高庆贞,吕家驹,尉立京,等. 地塞米松对前列腺癌 DU145 细胞 ERK1/2 活性和 cyclin D1 表达的影响 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2006,13(2): 116-9.
- [11] 王燕,陈玉霞,刁飞,等. 糖皮质激素抑制人前列腺癌 PC-3 细胞系增殖的可能机制 [J]. 第二军医大学学报,2006,27(8): 885-7.
- [12] Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death [J]. *Cell Death Differ* 2005, 12(S2): 1528-34.
- [13] Neufeld T P. Autophagy and cell growth - the yin and yang of nutrient responses [J]. *J Cell Sci* 2012, 125(Pt 10): 2359-68.
- [14] Tan Q, Wang M, Yu M, et al. Role of autophagy as a survival mechanism for hypoxic cells in tumors [J]. *Neoplasia* 2016, 18(6): 347-55.
- [15] Kim R H, Coates J M, Bowles T L, et al. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis [J]. *Cancer Res* 2009, 69(2): 700-8.

Effect of dexamethasone on autophagy in prostate cancer PC3 cells

Wang Peiyu¹, Liang Qianjun¹, Zhang Li^{1,2}, et al

(¹Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²The Urological Institute of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of dexamethasone (Dex) on the autophagy in prostate cancer PC3 cells. **Methods** MTT assay was conducted to detect the PC3 cells viability, Western blot analysis was used to detect the autophagy-associated molecules and fluorescence microscope was used to observe GFP-LC3 in the GFP-LC3 transfected PC3 cells post dexamethasone treatment with or without chloroquine. **Results** Dexamethasone inhibited the growth of the PC3 cells, the higher the concentration, the stronger the inhibitory effect. And dexamethasone increased the expression of LC3 II and GFP-LC3 protein. The inhibitory effect caused by dexamethasone was exacerbated by the autophagic inhibitor chloroquine. **Conclusion** Dexamethasone activates the autophagy on prostate cancer PC3 cells, and the autophagy may be protective.

Key words dexamethasone; prostate cancer; autophagy