

## GSTP1 表达下调促进膀胱癌细胞 T24 凋亡

唐荣金<sup>1</sup>, 何小龙<sup>2</sup>, 朱海琴<sup>2</sup>, 徐方明<sup>1</sup>, 尉毅<sup>1</sup>, 梁健鹏<sup>1</sup>, 高漓<sup>1</sup>, 张天禹<sup>1</sup>

**摘要** 目的 通过慢病毒表达系统,使用 shRNA 下调人膀胱癌 T24 细胞 GSTP1 基因的表达,研究其对 T24 细胞增殖的影响,并探讨其可能的作用机制。方法 通过慢病毒表达系统,建立稳定低表达 GSTP1 基因的 T24 细胞株;进行 CCK-8 实验以及克隆形成实验,检测 GSTP1 表达下调对 T24 细胞增殖的影响;对细胞进行 Annexin V-FITC/PI 染色,使用流式细胞仪,检测 GSTP1 表达下调对 T24 细胞凋亡的影响。结果 与未处理组、对照组相比,GSTP1 干扰组的 T24 细胞增殖受到明显抑制,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );细胞凋亡检测结果显示,GSTP1 表达下调后明显促进 T24 细胞凋亡,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 GSTP1 表达下调抑制膀胱癌细胞 T24 增殖,并其机制可能与促进 T24 细胞凋亡相关。

**关键词** 膀胱癌; GSTP1; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号** R 737.14

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)10-1463-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.010

膀胱癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,在发达国家,膀胱癌在常见肿瘤中排列第五,并在泌尿生殖系肿瘤死亡原因中排列第二<sup>[1-2]</sup>。手术是膀胱癌患者的主要治疗手段,术后常规进行膀胱灌注辅助治疗。目前以肿瘤特异性通路为靶点的治疗,已经在多种癌症(如乳腺癌、卵巢癌及肾癌)中被证明是有效的,但对膀胱癌而言,这样的治疗靶点仍未被发现。这提示着,新的治疗策略和治疗靶点的显示是改善膀胱癌疗效的关键。

谷胱甘肽 S-转移酶 P1(GSTP1)是一种具有催化作用的二聚体同工酶,可催化还原型谷胱甘肽与亲电子物质的轭合,参与激素、药物、致癌物以及具

有基因毒性的外来复合物等代谢和解毒,起到保护细胞防止 DNA 损伤和癌细胞形成的作用,是体内生物转化最重要的 II 相代谢酶之一。GSTP1 基因的超甲基化和恶性肿瘤的关系密切,为探讨 GSTP1 基因在膀胱癌发生及发展中的作用,该研究将通过慢病毒表达系统,在人膀胱癌 T24 细胞中通过 shRNA 下调 GSTP1 基因的表达,以观察膀胱癌细胞增殖的改变情况,从而进一步了解 GSTP1 在膀胱癌演变中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 人 T-24 膀胱癌细胞株购自中国科学院上海生科院细胞资源中心;慢病毒包装质粒 pA2-pMDG2 由瑞士日内瓦大学 T. Didier 博士馈赠;GSTP1 shRNA 慢病毒质粒(干扰序列:5'-GCATTA-AAGCAGCGTATC-3',货号:V3LHS\_406905)、shRNA 干扰对照慢病毒质粒为购 GSTP1 shRNA 慢病毒质粒时附送,购自美国 GE 公司;高纯度质粒小提试剂盒购自中国 TIANGEN 公司(货号:C1015-05);DMEM 高糖培养基购自美国 GIBCO 公司(货号:C11995500BT);胎牛血清 FBS 购自中国 Corille 公司(货号:C1015-05);CCK-8 试剂(货号:CK04)与细胞凋亡检测试剂盒(货号:AD10)购自上海同仁化学研究所;Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂盒(货号:11668-019)购自美国 Invitrogen 公司;GSTP1 单克隆抗体(鼠源性)(货号:sc-66000)以及  $\beta$ -actin(鼠源性)(货号:sc-47778)购自美国 Santa Cruz 公司;羊抗鼠二抗(货号:31431)购自美国 Pierce 公司;ECL 发光底物试剂盒(货号:34075)购自美国 Pierce 公司。

**1.2 细胞培养及实验分组** T24 细胞接种于含 10% FBS 的 DMEM 培养液中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内进行培养,选用对数生长期的细胞进行实验。按照随机化原则将细胞分组:① 未处理组(正常膀胱癌 T24 细胞);② 对照组(载有慢病毒质粒未下调 GSTP1 的 T24 细胞);③ GSTP1 干扰组(载有慢病毒质粒且下调 GSTP1 的 T24 细胞)。

**1.3 GSTP1 shRNA 慢病毒包装** 取对数生长期的 293T 细胞接种于 60 mm 细胞培养皿,培养 24 h

2017-05-31 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81360377、81660425);广西自然科学基金(编号:2015jjDA40034、2010GXNSFA183013)

作者单位:<sup>1</sup> 桂林医学院附属医院泌尿外科 桂林 541004

<sup>2</sup> 赣州市人民医院泌尿外科 赣州 341000

作者简介:唐荣金,男,副主任医师,硕士;

高漓,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: 40407864@qq.com

后使其细胞密度达到 70% ~ 80%。次日,取 1 个离心管向其中加入所制备的各种 DNA 溶液 [GSTP1 shRNA 慢病毒质粒 6  $\mu\text{g}$ , 包装质粒 (pA2) 3  $\mu\text{g}$  包膜质粒 (pMDG2) 1.2  $\mu\text{g}$ ], 加 DMEM 2.5 ml 混匀; 将 20  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000 加入另一个离心管中, 加 DMEM 2.5 ml 混匀; 静置 5 min 后将两者混匀, 室温放置 20 ~ 25 min。将质粒及 Lipofectamine 2000 混合液滴入培养 293T 细胞的培养基中。48 h 后收集转染后的培养基, 室温下 3 000 r/min 离心 5 min, 用 0.22  $\mu\text{m}$  孔径过滤器过滤收获病毒液。

**1.4 GSTP1 稳定下调 T24 细胞株的建立** 将 T24 细胞于转染前 1 天接种于 35 mm 细胞培养皿, 培养 24 h 后使其细胞密度达到 70% ~ 80%。病毒感染前进行换液, 加入完全培养基 1 ml, 加入聚凝胺使终浓度为 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。30 min 后, 加入包装好的慢病毒液 200  $\mu\text{l}$ 。慢病毒感染 24 h 后用完全培养液换液, 并继续在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 14 d, 之后提取细胞总蛋白使用 Western blot 法进行鉴定。

**1.5 Western blot 实验** 将未处理组、对照组与 GSTP1 干扰组 T24 细胞提取细胞总蛋白后, 用蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。按 20  $\mu\text{g}/\text{泳道}$  进行蛋白电泳, 经丙烯酰胺凝胶 (12% 分离胶 + 5% 浓缩胶) 电泳后转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉在室温下封闭 1 h 后, GSTP1 一抗 (1 : 500 稀释, 鼠源性)、 $\beta$ -actin 一抗 (1 : 1 000 稀释, 鼠源性) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。之后采用 TBST 洗涤 3 次, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗 (1 : 1 000 稀释) 在室温下封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次, 与 ECL 反应, X 线片曝光、显影、定影。胶片扫描后进行光密度分析。

**1.6 细胞增殖实验** 将未处理组、对照组与 GSTP1 干扰组 T24 细胞以 0.25% 胰蛋白酶室温消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液配成单细胞悬液, 按每孔 1 000 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中, 继续培养于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱。分别在第 1、3、5、7 天检测时, 弃去细胞培养基后, 在每孔加入 100  $\mu\text{l}$  CCK-8 检测试剂, 继续培养 2 h 后, 置光栅型连续波长酶标仪 (infinite M200 PRO 仪器), 读取各孔在 450 nm 波长处吸光值。

**1.7 克隆形成实验** 将未处理组、对照组与 GSTP1 干扰组 T24 细胞以 0.25% 胰蛋白酶室温消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液配成单细胞悬液, 按每孔 1 000 个细胞/孔接种于 96 孔培养板中, 继续培养于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱。培养 10 d 后终止实验后弃去上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次, 加 4% 多

聚甲醛固定 15 min, 弃去固定液, 加入结晶紫染色液染色 15 min, 洗去染色液, 空气干燥, 拍摄图像。然后加入 10% 的冰醋酸 2 ml, 静置 30 min, 待结晶紫溶解后, 取 100  $\mu\text{l}$  于 96 孔板中, 使用光栅型连续波长酶标仪 (infinite M200 PRO 仪器), 记录各孔在 560 nm 波长处吸光值。

**1.8 细胞凋亡检测** 将处于对数生长期的未处理组、对照组与 GSTP1 干扰组 T24 细胞以 0.25% 胰蛋白酶室温消化后, 以 D-PBS 将细胞调整至  $1 \times 10^6$  个细胞/ml 浓度, 按试剂盒操作说明书进行 Annexin V-FITC/PI 染色。染色后以 300 目筛网过滤, 用流式细胞仪 (BD FACS Aria III) 检测, 数据采用 Multi-cycle DNA 软件进行测定与分析。

**1.9 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 稳定下调 GSTP1 基因表达的 T24 细胞株的建立** 通过慢病毒表达系统, 建立稳定低表达 GSTP1 基因的 T24 细胞株, 提取 T24 细胞蛋白进行 Western blot 法检测。结果显示, 未处理组、对照组、GSTP1 干扰组 GSTP1 蛋白光密度值分别为: ( $3.564 \pm 0.133$ )、( $3.498 \pm 0.302$ )、( $0.440 \pm 0.045$ ) (经  $\beta$ -actin 校正  $n = 3$ )。对照组的 GSTP1 蛋白表达水平与未处理组相比, 差异无统计学意义; GSTP1 shRNA 慢病毒显著下调 GSTP1 蛋白的表达, GSTP1 干扰组和对照组与未处理组比较, 差异有统计学意义 ( $P = 0.0031$ 、 $0.0009$ )。见图 1。

### 2.2 GSTP1 基因表达下调对 T24 细胞增殖的影响

在细胞增殖试验中, 未处理组、对照组与 GSTP1 干扰组均设 3 个平行样本, 实验重复 3 次。结果显示未处理组、对照组和 GSTP1 干扰组的吸光值分别为: ( $1.899 \pm 0.063$ )、( $1.902 \pm 0.051$ )、( $1.259 \pm 0.045$ )。将实验数值进行统计分析, 对照组与未处理组相比, 吸光值差异无统计学意义; 而 GSTP1 干扰组吸光值明显低于对照组与未处理组, 差异有统计学意义 ( $P = 0.0070$ 、 $0.0018$ )。实验结果提示, 当 GSTP1 基因表达下调后, 对 T24 细胞的增殖具有抑制作用。见图 2。

### 2.3 GSTP1 基因表达下调显著抑制 T24 细胞的克隆形成

在克隆形成实验中, 未处理组、对照组与 GSTP1 干扰组均设 3 个平行样本, 实验重复 3 次。

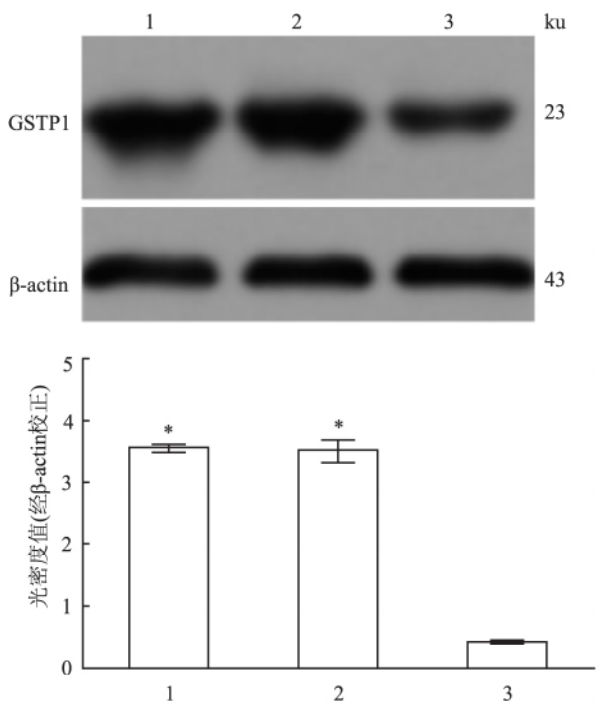


图1 GSTP1 shRNA 慢病毒下调 T24 细胞 GSTP1 基因的表达  
1: 未处理组; 2: 对照组; 3: GSTP1 干扰组; 与 GSTP1 干扰组比较: \*  $P < 0.05$

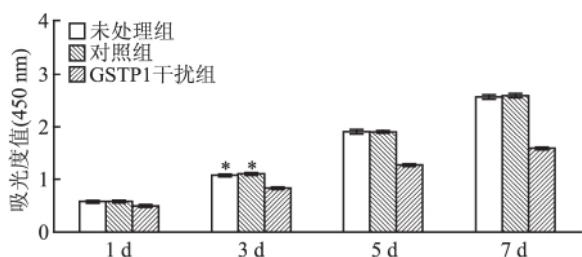


图2 GSTP1 基因表达下调对 T24 细胞的增殖的影响  
与 GSTP1 干扰组比较: \*  $P < 0.05$

未处理组、对照组和 GSTP1 干扰组的吸光值分别为 (1.643 ± 0.096)、(1.554 ± 0.157)、(0.692 ± 0.045)。将实验数值进行统计分析,对照组与未处理组相比,吸光值差异无统计学意义;而 GSTP1 干扰组吸光值明显低于对照组与未处理组,差异有统计学意义 ( $P = 0.0177, 0.0055$ )。实验结果提示,当 GSTP1 基因表达下调后,明显抑制 T24 细胞克隆的形成。见图 3。

**2.4 GSTP1 基因表达下调促进 T24 细胞凋亡** 将未处理组、对照组与 GSTP1 干扰组的 T24 细胞进行 Annexin V-FITC/PI 染色,使用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。结果显示,未处理组、对照组、GSTP1 干扰组细胞存活率 (Q3) 分别为 (90.170 ± 0.252)、(89.630 ± 0.289)、(77.100 ± 0.500)。将实验数值

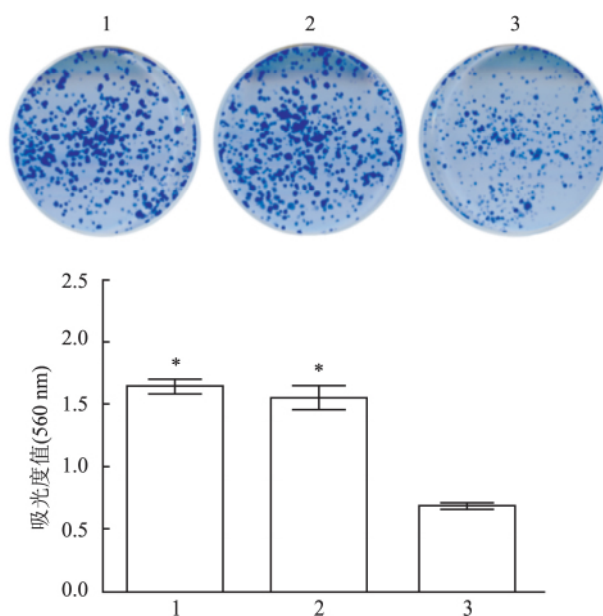


图3 GSTP1 基因表达下调对 T24 细胞克隆的影响  
1: 未处理组; 2: 对照组; 3: GSTP1 干扰组; 与 GSTP1 干扰组比较: \*  $P < 0.05$

进行统计分析,对照组与未处理组相比,细胞存活率差异无统计学意义;而 GSTP1 干扰组细胞存活率低于对照组与未处理组,差异有统计学意义 ( $P = 0.0002, 0.0009$ )。细胞凋亡率 (Q4) 未处理组、对照组、GSTP1 干扰组分别为 (6.367 ± 0.153)、(6.900 ± 0.265)、(19.770 ± 0.208)。将实验数值进行统计分析,对照组与未处理组相比,细胞凋亡率差异无统计学意义;而 GSTP1 干扰组细胞凋亡率明显高于对照组与未处理组,差异有统计学意义 ( $P = 0.0004, 0.0002$ )。实验结果提示,当 GSTP1 基因表达下调可明显促进 T24 细胞凋亡。见图 4。

### 3 讨论

谷胱甘肽 S-转移酶 (Glutathione S-transferases, GSTs) 是一组分布广泛的多功能同工酶,根据其主体结构的不同,该家族包括 GSTα (GSTA)、GSTμ (GSTM)、GSTπ (GSTP) 和 GSTθ (GSTT) 4 种类型。GSTP1 作为 GSTs 家族中的一员,其能够催化各种抗癌药物与谷胱甘肽结合,影响抗癌药物的疗效和提高其排泄。因此,目前研究<sup>[3]</sup>显示,肿瘤中 GSTP1 的表达水平与肿瘤耐药和肿瘤恶性程度密切相关, GSTP1 在以下多种恶性肿瘤中表达率较高,如结肠癌、膀胱癌、胃癌、皮肤癌、乳腺癌、前列腺癌及肺癌等<sup>[4-5]</sup>。GSTP1 在乳腺癌中的表达与雌激素受体表

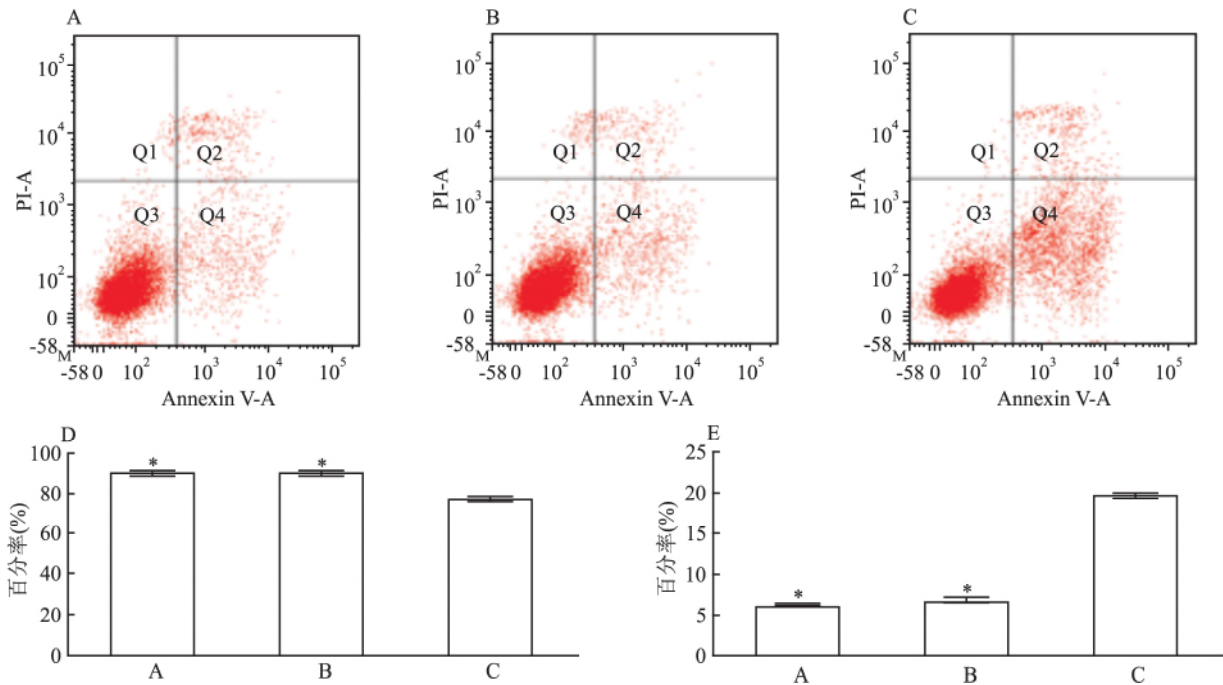


图4 GSTP1 基因表达下调明显促进 T24 细胞的凋亡

A: 未处理组; B: 对照组; C: GSTP1 干扰组; D: 细胞存活率(Q3 区); E: 细胞早期凋亡率(Q4 区); 与 GSTP1 干扰组比较: \* P < 0.05

达水平具有相关性<sup>[6-7]</sup>, GSTP1 能作用于对基因和药物失活的三阴乳腺癌的癌细胞并能损害其细胞的生存和影响肿瘤发生, 其机制主要是通过损害癌细胞的新陈代谢及其信号通路来实现<sup>[8]</sup>, 而下调 T 细胞中 GSTP1 的活性有利于 T 细胞凋亡<sup>[9]</sup>; 当大鼠肝癌细胞 GSTP1 功能受到抑制后, 会诱导大鼠肝癌细胞的凋亡<sup>[10]</sup>。在本研究中, 通过慢病毒表达系统, 使用 shRNA 下调人膀胱癌 T24 细胞 GSTP1 基因的表达后, 显示 T24 细胞的增殖受到明显抑制; 同时, 细胞凋亡检测结果显示, GSTP1 表达下调后明显促进 T24 细胞凋亡。这提示 GSTP1 在调控细胞凋亡中起着重要作用。

近年的研究<sup>[11-12]</sup>显示, GSTP1 对细胞增殖的影响及对细胞凋亡的调控作用, 与 JNK 家族(c-Jun N-terminal kinases) 蛋白密切相关。JNK 家族蛋白是丝裂原活化蛋白激酶家族的一员, 其活性可被紫外线、渗透休克、细胞因子与生长因子调控。JNK 家族蛋白包含 JNK1、JNK2 及 JNK3 等 3 个家族成员, 其中, JNK1 包含 4 个异构体, JNK2 包含 4 个异构体, JNK3 包含 2 个异构体。当 JNK 被磷酸化活化后, 其将继续磷酸化胞质内的下游底物如 Bcl-2, 或进入细胞核, 细胞核内的 JNK 激活 c-Jun、ATF2、ELK1、c-Myc 与 p53 的转录因子<sup>[11-13]</sup>。c-Jun 与 ATF2 作为 AP-1 (activator proteins 1) 家族的成员, 当其被 JNK 磷酸

化后, 其将以同源二聚体和异源二聚体与 TPA 反应元件或 c-AMP 应答元件结合, 诱导基因转录和蛋白质合成, 引发细胞凋亡的过程<sup>[14]</sup>。

体外研究<sup>[15]</sup>结果表明, GSTP1 可以抑制 JNK 的活性; 进一步的研究<sup>[16]</sup>数据显示, JNK 的 C 末端在 GSTP1 与 JNK 相互结合中起着关键作用。在氧化应激条件下, GSTP1 与 JNK 解离, 随后形成非活化的共价二聚体, JNK 的活性恢复, 激活 c-Jun (Ser-63 或 ser-73 残基的磷酸化), 导致细胞凋亡<sup>[17]</sup>。此外, GSTP1 还可以与 JNK 的下游底物 ATF2 直接结合, 抑制 JNK 的活性<sup>[18]</sup>。

在本课题研究中, 细胞凋亡检测以及 Western blot 等实验结果显示, 与空白载体对照组相比, GSTP1 基因在 T24 细胞表达下调后, 促进 T24 细胞凋亡, GSTP1 对 JNK 表达调控的具体实现途径尚需进一步研究以明确。

### 参考文献

- [1] Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012 [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(6): 1374-403.
- [2] Parkin D M. The global burden of urinary bladder cancer [J]. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2008, (218): 12-20.
- [3] Ralat L A, Manevich Y, Fisher A B, et al. Direct evidence for the formation of a complex between l-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes

- [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(2): 360–72.
- [4] Henderson C J, Wolf C R. Disruption of the glutathione transferase pi class genes [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 401: 116–35.
- [5] Watson M A, Stewart R K, Smith G B, et al. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19(2): 275–80.
- [6] Howie A F, Miller W R, Hawkins R A, et al. Expression of glutathione S-transferase B1, B2, Mu and Pi in breast cancers and their relationship to oestrogen receptor status [J]. *Br J Cancer*, 1989, 60(6): 834–7.
- [7] Gilbert L, Elwood L J, Merino M, et al. A pilot study of pi-class glutathione S-transferase expression in breast cancer: correlation with estrogen receptor expression and prognosis in node-negative breast cancer [J]. *J Clin Oncol*, 1993, 11(1): 49–58.
- [8] Louie S M, Grossman E A, Crawford L A, et al. GSTP1 is a driver of triple-negative breast cancer cell metabolism and pathogenicity [J]. *Cell Chem Biol* 2016 23(5): 567–78.
- [9] Bernardini S, Bernassola F, Cortese C, et al. Modulation of GST P1-1 activity by polymerization during apoptosis [J]. *J Cell Biochem*, 2000, 77(4): 645–53.
- [10] Asakura T, Hashizume Y, Tashiro K, et al. Suppression of GST-P by treatment with glutathione-doxorubicin conjugate induces potent apoptosis in rat hepatoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2001, 94(2): 171–7.
- [11] Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239–52.
- [12] Shaw D, Wang S M, Villaseñor A G, et al. The crystal structure of JNK2 reveals conformational flexibility in the MAP kinase insert and indicates its involvement in the regulation of catalytic activity [J]. *J Mol Biol*, 2008, 383(4): 885–93.
- [13] Cui J, Han S Y, Wang C, et al. c-Jun NH(2)-terminal kinase 2alpha2 promotes the tumorigenicity of human glioblastoma cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(20): 10024–31.
- [14] Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival [J]. *Oncogene*, 2001, 20(19): 2390–400.
- [15] Adler V, Yin Z, Fuchs S Y, et al. Regulation of JNK signaling by GSTp [J]. *EMBO J*, 1999, 18(5): 1321–34.
- [16] Wang T, Arifoglu P, Ronai Z, et al. Glutathione S-transferase P1-1 (GST P1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(24): 20999–1003.
- [17] Ruscoe J E, Rosario L A, Wang T, et al. Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GSTpi) influences cell proliferation pathways [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(1): 339–45.
- [18] Thévenin A F, Zony C L, Bahnson B J, et al. GST pi modulates JNK activity through a direct interaction with JNK substrate, ATF2 [J]. *Protein Sci*, 2011, 20(5): 834–48.

## GSTP1 down-expression promotes the apoptosis of bladder cancer T24 cell

Tang Rongjin<sup>1</sup>, He Xiaolong<sup>2</sup>, Zhu Haiqin<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Urology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541004;

<sup>2</sup>Dept of Urology, The People's Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000)

**Abstract Objective** To investigate the effect of GSTP1 down-expression on the proliferation and apoptosis of human bladder cancer cell T24. **Methods** The GSTP1 shRNA lentivirus obtained from 293T cells which were cotransfected with lentiviral vector GSTP1 shRNA, pA2 and pMDG2 by Lipofectamine 2000. The infected T24 was divided into untransfected group, sh-control group and sh-GSTP1 group. Cell proliferation assays (ck-8), clonogenic assays and Annexin V-FITC/PI staining were used to detect the function of GSTP1 down-expression on the proliferation and apoptosis of T24 respectively. The changes of GSTP1 protein level were detected by Western blot. **Results** Cell proliferation was inhibited remarkably ( $P < 0.01$ ) after GSTP1 down-expression in T24 Cells. The rate of cell apoptosis was obvious higher than that in sh-control group and the untransfected group. **Conclusion** GSTP1 down-expression inhibits cell proliferation and promotes the apoptosis of T24 cell.

**Key words** bladder cancer; GSTP1; cell proliferation; apoptosis