

[文章编号] 1007-385X(2002)02-0094-04

重组分泌型人 PSP94 对前列腺癌细胞株 PC-3 抑制作用的研究

郭丛慧¹, 田长生¹, 赵丹¹, 高瑞娟¹, 谭岩², 姜艳芳², 狄茜¹, 赵雪俭¹(1. 吉林大学基础医学院病理生理教研室, 长春 130021; 2. 吉林大学第一医院中心研究室)

[摘要] 目的: 探讨重组分泌型人 PSP94(rsHPSP94)对雄激素非依赖性前列腺癌细胞株 PC-3 生长的作用和作用机制。方法: 采用噻唑蓝(MTT)法检测 rsHPSP94 对 PC-3 的抑制率。流式细胞仪检测细胞周期分布的变化。结果: rsHPSP94 以剂量和时间依赖性抑制 PC-3 的增殖, 流式细胞仪分析表明细胞增殖阻滞在 G₁ 期, 并出现凋亡。结论: 本实验结果表明 rsHPSP94 通过使细胞阻滞在 G₁ 期抑制 PC-3 细胞的增殖。

[关键词] 前列腺癌; 重组分泌型人 PSP94; 抗肿瘤

[中图分类号] R979.1; R737.5 [文献标识码] A

Suppression of Recombinant Secreted Human Prostate Secretory Protein of 94 Amino Acids(rsHPSP94) on Prostate Cancer Cell PC-3

GUO Cong-hui¹, TIAN Chang-sheng¹, ZHAO Dan¹, GAO Rui-juan¹, TAN Yan², JIANG Yan-fang², DI Qian¹, ZHAO Xue-jian¹(1. Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun, 130021, China; 2. Department of the Center Laboratory, First Clinical College, Jilin University)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of purified recombinant secreted human prostate secretory protein of 94 amino acids (rsHPSP94) on the growth of androgen-independent human prostate cancer cells (PC-3) and its potential mechanism of action. Methods: Cell growth inhibition rate was determined by MTT and cell cycle distribution was analysed by Flow cytometry(FCM). Results: rsHPSP94, in a dose- and time-dependent manner, inhibited the growth of PC-3. Flow cytometric analysis showed that rsHPSP94 arrested the cell cycle in the G₁-phase and induced the cell apoptosis after treatment for 48 h. Conclusion: These results suggest that rsHPSP94 can inhibit the growth of PC-3 by arresting the cell cycle in the G₁-phase.

[Key words] prostatic neoplasm; rsHPSP94; antitumor

* 随着科学技术的发展,人类已进入老龄化社会,前列腺癌的发病率逐年上升,对人民健康构成严重威胁。目前的治疗手段只能维持或延缓生命,不能真正地解除病人的痛苦和提高患者的生活质量。而且,前列腺癌经去势治疗后大部分复发并演变成激素非依赖性肿瘤。这就迫切需要一种新的方法来早期发现前列腺癌,同时对其进行有效的治疗。前列腺分泌蛋白(prostate secretory protein of 94 amino acids, PSP94)是前列腺腺泡上皮细胞合成分泌的含有 94 个氨基酸的蛋白质。其可能通过诱导前列腺细胞凋亡抑制前列腺组织的生长,抑制体内外肿瘤细胞株的生长和 DNA 的合成^[1-3],特别是对于雄激素非依赖性前列腺癌的抑制作用深受人们的关注。而且,研究发现 PSP94 表达阳

性的前列腺癌患者比表达阴性的患者预后要好的多($P=0.01$)^[4]。在当今前列腺癌的各种治疗方案均不能令人十分满意的情况下, PSP94 对前列腺癌的治疗作用就成为人们研究的热点,它的抑瘤性将给前列腺肿瘤治疗领域注入新的生机,临床应用前景广阔。目前我们实验室已从大肠杆菌中表达出重组分泌型人前列腺分泌蛋白(recombinant secreted human prostate secretory protein of 94 amino acids, rsHPSP94)。为此我们

* [基金项目] 本课题受吉林省科技发展计划项目(NO. 20001110)、JICA(日本国际协力事业团)资助。

[作者简介] 郭丛慧(1969-), 女, 吉林省东丰县人, 讲师, 硕士, 主要从事前列腺癌分子生物学研究。

采用噻唑蓝(MTT)等方法检测 rsHPSP94 对体外培养的人雄激素非依赖性前列腺癌细胞株 PC-3 的抑制率,初步探讨其生物学活性及作用机制,为重组 PSP94 应用于临床奠定基础。

1 材料和方法

1.1 药物和试剂

重组分泌型人 PSP94 由本室构建的大肠杆菌分泌表达; PSP94 多克隆抗体由加拿大 West Ontario 大学 Xuan 博士惠赠。其它试剂为国内外分析纯。

1.2 细胞株

PC-3 自美国引进,北京医科大学泌尿外科研究所提供。细胞在二氧化碳恒温培养箱(37℃,5% CO₂)用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基培养,每 3 天换液 1 次,0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验前 1 天取外观良好、贴壁生长、接近汇合的细胞更换培养液。

1.3 重组克隆的诱导表达与纯化

将构建的分泌型表达质粒 pBV220-PSP94 转染大肠杆菌 JM109。取重组质粒接种于 LB 培养基中 31℃,130 r/min 过夜,次日以 1:100 稀释继续培养至 A₆₀₀ 为 0.4~0.6,升高温度至 38℃ 诱导表达 4.5 h。诱导的菌液上清和经溶菌酶处理得到的周质空间产物经透析(pH7.2 PBS)和半透膜(截留分子量为 30 000)离心。

1.4 重组蛋白的鉴定

离心产物经 16% 的 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色和 Western blot 证实为一条带。

1.5 PSP94 浓度调制

蛋白含量测定采用 Bio-Rad Protein Assay,用 RPMI-1640 将 PSP94 调成浓度为(1 000,500,100,50,10,5,0) × 10⁻⁷ mol/L,过滤除菌,置于 4℃ 冰箱备用。

1.6 细胞生长抑制实验(MTT 法)

调细胞浓度为 2 × 10⁸ L⁻¹ 接种于 96 孔平底培养板,每孔 100 μl(2 × 10⁴/孔)。培养 24 h 弃上清,各孔依次加入不同浓度的 rsHPSP94 200 μl,每组设 3 复孔,阴性对照为培养液和同期培养的含质粒 pBV220 的周质空间上清。细胞培养 44 h,显微镜下观察拍照后,各孔加入浓度为 5 g/L MTT(用 PBS 新鲜配制)20 μl,温箱孵育 4 h,轻轻吸去上清,再加入 100 μl 的 DMSO,微振荡上振荡 10 min,在酶联检测仪上测波长 570 nm 光的吸光度(A)值。按公式抑制率(%)=(对照组 A 均值-实验组 A 均值)/对照组 A 均值 × 100% 计算各组抑制率。

1.7 流式细胞仪检测细胞周期

将生长状态良好的 PC-3 细胞分为 2 组,实验组培养液中含 rsHPSP94(1 × 10⁻⁴ mol/L),对照组加培养

液,培养 24 h 和 48 h 后,分别制成单细胞悬液。70% 乙醇固定 12 h 以上,PBS 洗 2 次,调细胞浓度为 1 × 10⁹ L⁻¹。RNAase 消化后,加入 1.5 ml PI(碘化丙啶 5 mg/100 ml)染色 1 h,经细胞过滤混匀后上流式细胞仪做单参数分析,每份样品检测 1 × 10⁴ 个细胞。实验数据用累积曲线分割法计算各期细胞所占比例。

1.8 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据采用 *t* 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 分泌型 PSP94 的 SDS-PAGE 和 Western blot 的结果

如(图 1)所示,转染重组质粒 pBV220-PSP94 的大肠杆菌 JM109 周质空间和上清中均有蛋白带,分子量约为 11 kD,Western blotting 证实为 PSP94,说明信号肽可使表达的 PSP94 分泌至细胞外。

图 1 分泌型 PSP94 蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western blot 分析

Fig.1 The SDS-PAGE and Western blot analysis of secreted PSP94 protein

Lane M: Protein marker; 1,6: Supernatant fluid of bacteria JM109 with rsHPSP94; 2,7: Periplasm of bacteria JM109 with rsHPSP94; 3,8: Periplasm of bacteria with pBV220; 4: Bacteria HB101 with rsHPSP94; 5: Bacteria JM109 with rsHPSP94

2.2 PSP94 对 PC-3 的抑制率

从(图 2)可以看出,重组的人 PSP94 对前列腺癌细胞株 PC-3 增殖有抑制作用,且呈剂量和时间依赖性。

2.3 流式细胞仪检测 rsHPSP94 对 PC-3 细胞周期的影响(见表 1)。

由表 1 可见 PSP94 处理细胞后,S,G₂+M 期细胞数减少,G₁ 期细胞数明显增多,作用 48 h 后,出现凋亡。DNA 含量分布如(图 3)所示。

2.4 细胞形态学变化

分别取不同浓度 rsHPSP94 作用 48 h 后的细胞置光学显微镜下观察,对照组细胞贴壁生长,状况良好,

多为梭形,大小适中,核仁清晰,可见核分裂相;而小剂量 PSP94(1×10^{-6} mol/L)作用组细胞数目较对照组少,细胞体积减小,胞浆无明显变化;大剂量 PSP94(1×10^{-4} mol/L)作用组表现为细胞数目明显减少,形态不规则,细胞变圆较多,胞浆内颗粒增多。

3 讨论

前列腺分泌蛋白(PSP94)是前列腺腺泡上皮细胞合成分泌的具有抑制其增殖活性的蛋白质,特别是对于雄激素非依赖性前列腺癌的抑制作用深受人们的关注^[1-2]。国内外关于 PSP94 的研究较多,1988 年 Linard 将 PSP94 基因重组到 Bluescribe 质粒中利用大肠杆菌进行表达,但产量极低,仅仅为放免水平^[5];1996

年 Xuan 将 PSP94 基因整合到大肠杆菌 GST 融合蛋白基因下游进行表达^[6],但融合蛋白中 PSP94 的纯化需

图 2 rsHPSP94 作用 48h 对 PC-3 细胞的抑制率(%)

Fig. 2 The inhibitory rate of PC-3 cell after treatment with PSP94 for 48 h

表 1 PSP94(1 000 μg/ml)对 PC-3 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The cell cycle change of PC-3 cells after treatment with rsHPSP94($\bar{x} \pm s$)

Groups	G ₀ /G ₁ (%)	G ₂ /M(%)	S(%)	Apoptosis(%)
Control	47.99 ± 2.3	5.35 ± 0.9	46.65 ± 3.8	0.64 ± 0.2
PSP94(24 h)	78.52 ± 3.4 ^Δ	12.1 ± 0.8 ^Δ	9.70 ± 0.6 ^Δ	0.95 ± 0.1 ^Δ
PSP94(48 h)	85.0 ± 2.9 ^Δ	5.67 ± 0.6 ^Δ	9.33 ± 0.7 ^Δ	5.12 ± 0.3 ^Δ

ΔP < 0.05 vs control

图 3 PC-3 细胞 DNA 含量分布

Fig. 3 DNA contents frequency hisograms of PC-3 cells

A: Control; B: The cells were exposed to rsHPSP94(1×10^{-4} mol/L)for 24 h;

C: The cells were exposed to rsHPSP94(1×10^{-4} mol/L)for 48 h; ⇨: Apoptosis peak

用凝血酶切割,成本很高,且分离繁琐,只能用于实验室基础研究,不适用于药物开发。国内也有 PSP94 与 TNF 融合表达的报道^[7]。PSP94 蛋白富含半胱氨酸,易形成二硫键,在大肠杆菌内部表达难以形成正确的构象。为克服上述不足,我室构建了 PSP94 分泌型表达载体,并在载体中引入了分泌蛋白所必需的信号肽

序列。当信号肽与 PSP94 蛋白前体跨越细胞膜时,信号肽被膜上的信号肽酶切去,由于在设计信号肽时巧妙删去酶切位点的接头,所以可直接得到分泌的成熟天然结构的 PSP94 蛋白,产量高,分离纯化容易,成本低,并采用透析和半透膜离心的方法分离到了电泳纯的 rsHPSP94。本文用体外培养的人雄激素非依赖性前

列腺癌细胞株(PC-3)检测其生物活性。

本实验发现 rsHPSP94 对 PC-3 呈剂量和时间依赖性抑制作用,更让我们兴奋的是,其抑制率为 50% 时 rsHPSP94 的浓度为 1×10^{-4} mol/L,低于正常男性精浆中的 PSP94 的含量[平均为 $(1320 \pm 183) \mu\text{g/ml}$]^[8]。这表明 PSP94 在生理浓度即能发挥明显的抑制肿瘤细胞生长的作用,也就是说如果重组 PSP94 能应用于临床,其副作用可能是最小的。我们在实验中采用培养液和周质空间的产物作为阴性对照,从而排除了可能由于污染细菌内毒素和其它杂质所引起的实验误差。镜下发现细胞数明显变少,细胞形态不规则,大小不一,细胞变圆,胞浆颗粒增多。细胞 DNA 周期表明细胞增殖阻滞在 G₁ 期。G₁ 期调控是细胞周期调控中最重要的部分^[9]。肿瘤细胞往往表现为增殖、分化和凋亡的失控,其主要原因就是细胞周期 G₁ 期重要调控因子的异常,有人甚至认为癌变过程主要就是正常的细胞周期调控被改变的过程^[10],细胞凋亡往往发生于 G₁ 期阻滞的细胞。Garde 等人^[3]发现 PSP94 通过促进凋亡蛋白 Bax 的表达而诱导前列腺癌细胞 PC-3 的凋亡,本实验也发现重组的人 PSP94 在作用 48 h 后,能诱导 PC-3 细胞凋亡,但凋亡率较小(48 h 为 5.12%)。

Lokeshwar 等^[2]发现人精浆 PSP94 能抑制体外肿瘤细胞的 DNA 合成。每日给接种肿瘤的大鼠注射人 PSP94,15 d 后肿瘤重量下降 58%,肿瘤生长速率下降 2 倍,持续注射可显著抑制肿瘤生长速率达 3 倍。最新研究证明,在人前列腺癌细胞株 LNCaP,PC-3 及前列腺组织中有与 PSP94 特异结合的蛋白,这进一步证实了 PSP94 通过自分泌的方式对前列腺组织进行调节,也表明 PSP94 对治疗人前列腺癌的潜在应用价值^[11]。

初步细胞学实验表明重组的 PSP94 具有极强的抑制细胞增殖的活性,并且发现抑制率为 50% 的 PSP94 的浓度低于正常男性精浆中 PSP94 的生理浓度,这为进一步开展 rsHPSP94 蛋白对体内外前列腺癌的作用研究奠定了基础,同时也可能为临床抗肿瘤新药的开发提供一种高效、高选择性、安全的生物制剂。

[参考文献]

- [1] Mundle SD, Sheth N A. Suppression of DNA synthesis and induction of apoptosis in rat prostate by human seminal plasma inhibin (HSPI)[J]. *Cell Biol Int Rep*, 1993, 17(6): 587-593.
- [2] Lokeshwar B, Hurkadli KS, Sheth AR, *et al*. Human prostatic Inhibin suppression tumor growth and inhibits clonogenic cell survival of a model prostatic adenocarcinoma, the dunning R3327G rat tumor[J]. *Cancer Res*, 1993, 53: 4855-4859.
- [3] Garde SV, Basrur VS, Li L, *et al*. Prostate secretory protein (PSP94) suppresses the growth of androgen-independent prostate cancer cell line (PC3) and xenografts by inducing apoptosis[J]. *Prostate*, 1999, 38(2): 118-125.
- [4] Teni TR, ShethAR, KamathMR, *et al*. Serum and urinary prostatic inhibin-like peptide in benign prostatic hyperplasia and carcinoma of prostate[J]. *Cancer Lett*, 1988, 43(1-2): 9-14.
- [5] Linard CG, Mbikay M, Benjannet S, *et al*. Correct processing and secretion of a human prostatic secretory protein (PSP94) in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1988, 73: 479-487.
- [6] Xuan JW, Wu DM, Guo YZ, *et al*. Recombinant PSP94(prostate secretory protein of 94 amino acids) demonstrates similar linear epitope structure as natural PSP94 protein[J]. *J Cell Biol*, 1996, 61: 1-13.
- [7] 刘庆鑫, 刘丽, 刘建香, 等. 人 PSP94 全长 cDNA 的获得及 PSP94-TNF 融合蛋白的构建[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, 15(3): 359-364.
- [8] Dube JY, Frenette G, Paquin R, *et al*. Isolation from human seminal plasma of an abundant 16-kDa protein originating from the prostate, its identification with a 94-residue peptide originally described as beta-inhibin[J]. *J Androl*, 1987, 8(3): 182-189.
- [9] Hyakutake H, Sakai H, Yogi Y, *et al*. Beta-microseminoprotein immunoreactivity as a new prognostic indicator of prostatic carcinoma[J]. *Prostate*, 1993, 22(4): 347-355.
- [10] Herman JG, Merlo A, Mao L, *et al*. Inactivation of the CDKN2/p16/MTSLgene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers[J]. *Cancer Res*, 1995, 55(4): 4525-4530.
- [11] Yang J P, Baijal Gupta M, Garde SV, *et al*. Identification of binding proteins for PSP94 in human prostate adenocarcinoma cell lines LNCaP and PC-3[J]. *Prostate*, 1998, 35(1): 11-17.

[收稿日期] 2001-11-16

[修回日期] 2002-01-20

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》!