

波形蛋白对前列腺癌细胞侵袭与转移的影响

魏军成, 吴明富, 张永涛, 赵良平, 卢运萍, 马 丁

Effects of Vimentin on Invasion and Metastasis of Prostate Cancer Cell Lines PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4

WEI Jun-Cheng, WU Ming-Fu, ZHANG Yong-Tao, ZHAO Liang-Ping, LU Yun-Ping, MA Ding

华中科技大学同济医学院
附属同济医院
妇产科,
湖北 武汉 430030

Department of Obstetrics and
Gynecology,
Tongji Hospital,
Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and
Technology,
Wuhan, Hubei, 430030,
P. R. China

通讯作者: 马 丁

Correspondence to: MA Ding

Tel: 86-27-83662681

Fax: 86-27-83662661

E-mail: dma@tjh.tjmu.edu.cn

基金项目: 国家重点基础研究发
展规划资助项目
(No. 2002CB513107)

Grant: National Key Basic
Research Foundation of China
(No. 2002CB513107)

收稿日期: 2007-07-09

修回日期: 2007-08-10

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Vimentin, a cytoskeleton protein, is involved in regulating the migration and proliferation of cells. This study was to detect the expression of vimentin in prostate cancer cell lines PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4, and evaluate the effects of vimentin on invasion and metastasis of prostate cancer cells. METHODS: Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) followed by matrix-assisted laser desorption/time of flight mass spectrometry (MALDI TOF-MS) were used to detect the expression of vimentin in prostate cancer cell lines PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4. Genetic intervention of vimentin gene and *in vitro* invasion assay were used to investigate the effects of vimentin on the invasion and metastasis of prostate cancer cells. RESULTS: The protein level of vimentin was higher in PC-3M-1E8 cells with high metastatic potential than in PC-3M-2B4 cells with low metastatic potential. Eukaryotic vectors expressing antisense- and sense-vimentin were constructed successfully and transfected into PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4 cells separately. The number of invasive cells was significantly lower in PC-3M-1E8/vas cells with antisense-vimentin than in control PC-3M-1E8/3.1(-) cells (99.3 ± 4.8 vs. 319.4 ± 6.5 , $P < 0.01$), and significantly higher in PC-3M-2B4/vs cells with sense-vimentin than in control PC-3M-2B4/3.1(+) cells (330.5 ± 5.8 vs. 98.6 ± 7.5 , $P < 0.01$). CONCLUSION: Vimentin is a promising marker for predicting the invasion and metastasis of prostate cancer cells.

KEYWORDS: Prostate neoplasm; Invasion; Metastasis; Vimentin

【摘 要】 背景与目的: 波形蛋白(vimentin)是一种细胞骨架蛋白, 参与调节细胞的运动和增殖。本研究通过检测波形蛋白在前列腺癌细胞系中的表达, 探讨其对前列腺癌细胞侵袭与转移的影响。方法: 应用二维电泳-质谱分析(two-dimensional gel electrophoresis matrix-assisted laser desorption/time of flight mass spectrometry, 2-DE MALDI TOF-MS)检测波形蛋白在前列腺癌配对细胞系中的差异表达, 用基因干预技术结合体外侵袭实验探讨波形蛋白对细胞侵袭能力的影响。结果: 波形蛋白在前列腺癌高转移细胞系 PC-3M-1E8 中的表达高于低转移细胞系 PC-3M-2B4 中的表达。成功构建波形蛋白反义真核表达载体和正义真核表达载体, 分别转染 PC-3M-1E8 和 PC-3M-2B4 细胞, 转染波形蛋白反义真核表达载体的细胞(PC-3M-1E8/vas)的穿膜细胞数为 99.3 ± 4.8 , 明显低于空质粒对照组细胞[PC-3M-1E8/3.1(-)]的 319.4 ± 6.5 ($P < 0.01$); 转染波形蛋白正义真核表达载体的细胞(PC-3M-2B4/vs)的穿膜细胞数为 330.5 ± 5.8 , 明显高于空质粒对照组细胞[PC-3M-2B4/3.1(+)]的 98.6 ± 7.5 ($P < 0.01$)。结论: 波形蛋白高表达可促进前列腺癌细胞的侵袭与转移。

关键词: 前列腺肿瘤; 侵袭; 转移; 波形蛋白

中图分类号: R737.31 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2008)01-0030-05

前列腺癌是欧美国家男性发病率最高、死亡率位居第二的肿瘤^[1]。我国前列腺癌的发病率也在不断增加。临床上中晚期或复发后的前列腺癌大都获得了激素非依赖性生长和多药耐药的特性,且多数发生了远隔器官的转移,导致常规治疗的失败,患者死亡率高^[2]。目前认为前列腺癌转移是一个多步骤、多基因参与调控的复杂过程,其机制尚不完全清楚。为了探究前列腺癌转移的机制并筛选与前列腺癌转移相关的基因,本研究以雄激素非依赖性前列腺癌配对细胞系为模型,应用二维电泳-质谱分析(two-dimensional gel electrophoresis matrix-assisted desorption/time of flight mass spectrometry, 2-DE MALDI TOF-MS)结合基因干预技术,以证实波形蛋白可以促进前列腺癌细胞侵袭转移,为临床治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系和主要试剂

人配对前列腺癌细胞系 PC-3M-1E8、PC-3M-2B4 (北京大学生命科学中心)由本室引进并保存。*Taq* DNA 聚合酶及限制性内切酶 *Eco*R I、*Bam*H I 购自 TaKaRa 公司, T4 DNA 连接酶、Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司, MLV 逆转录酶购自 Promega 公司, 鼠抗人波形蛋白单抗、兔抗人 c-src 多抗、兔抗人 c-src 磷酸化多抗、羊抗鼠 β -actin、羊抗兔 β -actin 购自 Santa Cruz 公司。Tramswell 购自美国 Corning Costar 公司, IPG 等电聚焦仪、SE600 电泳仪、GS710 双向凝胶扫描仪和 PDQuest 分析软件、PCR 仪和蛋白垂直电泳系统 Mini protein III 均由 Bio-Rad 公司提供, Re-flex III MALDI-TOF-MS 质谱仪为德国 Bruker 公司产品, PeptIdent 软件由国家生物医学中心提供(<http://www.proteomics.com.cn>)。

1.2 细胞培养和重组质粒的构建

PC-3M-1E8 和 PC-3M-2B4 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养基在 37℃、5% CO₂、相对湿度为 90% 的培养箱中培养, 细胞呈贴壁生长。克隆波形蛋白正义全长基因的引物, P1 序列为 5'-CGGGATCCCCGCCCTCGTTCGCCTCTTCTC-3', 划线处为 *Bam*H I 酶切位点; P2 序列为 5'-CGGAATTC CGATATCGCCTGCCACTGAGTG-3', 划线处为 *Eco*R I 酶切位点。克隆波形蛋白反义全长基因的引物, P1 序列为 5'-CTGCTCGAGCGCCCTCGTTCGCCTCTTCTC-3', 划线处为 *Xho* I 酶切位点; P2 序列为

5'-CGGAATTC CGATATCGCCTGCCACTGAGTG-3', 划线处为 *Eco*R I 酶切位点。检测 neo 基因表达的引物, P1 序列为 5'-AGAGGCTATTCTGCTATGAC-3', P2 序列为 5'-GCTTCAGTGACAACGTCGAG-3'。上述引物均由上海 BioAsia 公司合成。运用 Trizol 提取 PC-3M-1E8 细胞株总 RNA, 逆转录为 cDNA, 借助正义克隆引物按照下述条件进行 PCR 扩增: 95℃ 1 min, 94℃ 30 s, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经纯化后与 pGEM-T 连接, 再转化、筛选、测序获得波形蛋白基因全长。基因全长用 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切后克隆到同样经双酶切后的 pcDNA3.1(+) 载体中, 进一步作酶切、测序鉴定。将波形蛋白正义全长真核表达载体命名为 pcDNA3.1-vs。PC-3M-1E8 细胞 cDNA 借助反义克隆引物按照下述条件进行 PCR 扩增: 95℃ 1 min, 94℃ 30 s, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经纯化后与 pGEM-T 连接, 再转化、筛选、测序获得波形蛋白基因全长。基因全长用 *Xho* I、*Eco*R I 双酶切后克隆到同样经双酶切后 pcDNA3.1(-) 载体中, 进一步作酶切、测序鉴定。将波形蛋白反义全长真核表达载体命名为 pcDNA3.1-vas。

1.3 重组体转染和鉴定

用 pcDNA3.1-vs 和 pcDNA3.1(+) 分别转染 PC-3M-2B4 细胞, 用 pcDNA3.1-vas 和 pcDNA3.1(-) 分别转染 PC-3M-1E8 细胞, 均按照 Lipofectamine 2000 说明书进行。用 G418 筛选转染细胞, 以未转染细胞作对照, 选取阳性细胞克隆扩大培养, 借助 RT-PCR 方法检测阳性细胞株中 neo 基因的表达以鉴定阳性细胞。将转染 pcDNA3.1-vs 和 pcDNA3.1(+) 的 PC-3M-2B4 细胞分别命名为 PC-3M-2B4/vs 和 PC-3M-2B4/3.1(+), 转染 pcDNA3.1-vas 和 pcDNA3.1(-) 的 PC-3M-1E8 细胞分别命名为 PC-3M-1E8/vas 和 PC-3M-1E8/3.1(-)。

1.4 二维电泳实验

参照 Gorg 等^[3]的报道及等电聚焦仪操作指南对样品进行处理。具体为: 将 185 μ L 共 260 μ g 样品吸入 IPG 胶槽, IPG 干胶条 (pH4~7, 11 cm) 胶面朝下放入胶槽, 排除气泡, 加约 1 000 μ L 覆盖液。置于等电聚焦仪电极板上, 水化和等电聚焦在 20℃ 自动进行, 总电压时间积为 52 000~69 000。等电聚焦后于平衡液 I [10 mg/mL DTT、1.5 mmol/L pH8.8 三羟基氨基甲烷 (Tris-base)、6.0 mmol/L 尿素、30% 甘油、2% SDS 和痕量溴酚蓝] 平衡 15

min,再于平衡液Ⅱ(25 mg/mL 碘乙酰胺代替平衡液Ⅰ中的DTT)中平衡15 min。将平衡好的胶条放于12.5%均匀SDS-PAG上,同时在SDS-PAG的一个末端放浸有20 μL标准低分子量蛋白的加样纸片,用约800 μL 0.5%琼脂糖封胶。SDS-PAGE在电泳仪中进行10 mA/gel电泳30 min,然后改为25 mA/gel,直到溴酚蓝指示剂达到胶底线。考马斯亮蓝染色(甲醇:水:冰乙酸= 45:45:10, 0.25%考马斯亮蓝R250)。GS710双向凝胶扫描仪对凝胶扫描,数字化图像文件采用PDQuest软件分析。

1.5 肽质指纹图谱分析

将凝胶脱色后随机选取的差异点送 pro-FlexTM-MALDI-TOF-MS 仪分析,数据通过中国国家生物医学中心蛋白质组学网站(<http://www.proteomics.com.cn>),利用PeptIdent软件进行查询。

1.6 体外侵袭实验

人工基底膜胶用无血清DMEM按1:4稀释后,铺在Transwell上室内,下室加NIH3T3细胞培养上清作为趋化因子,上室加入细胞悬液,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h,取下膜拭去上表面未迁移细胞,下表面按照Transwell说明书固定、染色、高倍镜下计数穿膜细胞数。

1.7 Western blot 检测波形蛋白、C-src

以三去污细胞裂解液将细胞裂解,参照文献[4]方法分别提取转染阳性质粒、空白质粒和未转染质粒的细胞总蛋白,测浓度后,各取80 μg蛋白经SDS-PAGE电泳,转移至硝酸纤维素滤膜,5%脱脂奶常温封闭1 h,加入相应一抗,于4℃孵育过夜,对应二抗常温孵育1 h,按照ECL试剂盒说明书在暗室中曝光,显影。其中磷酸化蛋白的提取方法参见Biswas等^[5]的研究。各组实验重复3次,照片扫描,结果进行吸光度(A)值分析,β-actin作为内参对照,进行半定量检测。

1.8 统计学分析

所有数据以平均数±标准差表示,采用SPSS11.0软件进行Student's *t* 检验统计分析,*P*<0.05表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 二维电泳结果

蛋白凝胶扫描结果采用PDQuest软件分析,发现PC-3M-1E8细胞平均有(873±73)个蛋白质点,PC-3M-2B4细胞平均有(857±67)个蛋白质点,两者比较有少数蛋白存在表达差异。切取有表

达差异的12个蛋白质点送肽质指纹图谱分析,其中2307R蛋白质点利用PeptIdent软件进行查询,PMF数据显示19个肽片段与波形蛋白匹配;再结合该点在2-DE图谱上的表观pI和MW及序列覆盖率,初步认定该蛋白质点为波形蛋白(图1A,B)。进一步采用Western blot显色证实该蛋白质点为波形蛋白(图1C)。吸光度分析波形蛋白在PC-3M-1E8细胞中的相对表达值为0.98±0.09,波形蛋白在PC-3M-2B4细胞中的相对表达值为0.58±0.08。

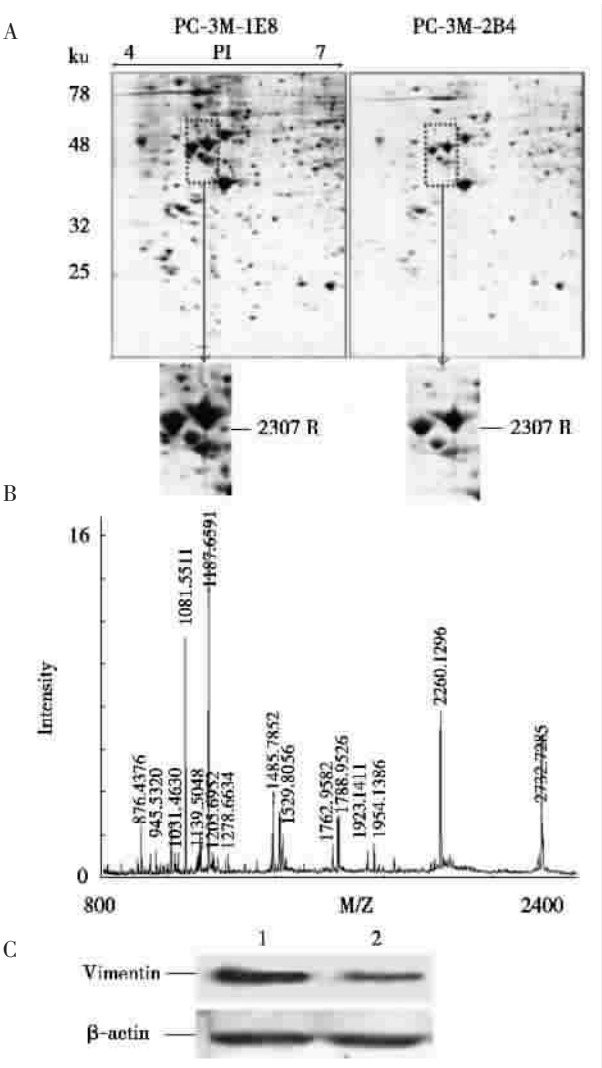


图1 PC-3M-1E8和PC-3M-2B4细胞中蛋白二维电泳结果
Figure 1 Protein expression profiles of PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4 cells detected by 2-DE and Western blot
A: 2-DE images of PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4 cells.
B: The MALDI TOF mass spectrum of peptides derived from 2307R.
C: The expression of vimentin in PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4 cells detected by Western blot. Lane 1: PC-3M-1E8 cells; lane 2: PC-3M-2B4 cells.

2.2 重组质粒的构建、转染及鉴定

应用 RT-PCR 技术,以 PC-3M-1E8 细胞 mRNA 为模板,克隆出带酶切位点的波形蛋白正义全长序列和反义全长序列,经过酶切、测序,表明成功构建波形蛋白正义真核表达载体和反义真核表达载体。转染细胞 neo 基因的 RT-PCR 检测结果显示,PC-3M-2B4/vs、PC-3M-2B4/3.1(+)、PC-3M-1E8/vas 和 PC-3M-1E8/3.1(-) 均有 neo 基因的表达,未转染的对照组细胞中未见 neo 基因表达。Western blot 结果显示,PC-3M-1E8/vas 细胞克隆与 PC-3M-1E8 和 PC-3M-1E8/3.1(-) 细胞比较,波形蛋白表达降低;PC-3M-2B4/vs 细胞克隆与 PC-3M-2B4 和 PC-3M-2B4/3.1(+) 细胞比较,波形蛋白表达增高(图 2)。以上结果提示已成功建立含 pcDNA3.1-vs、pcDNA3.1(+)、pcDNA3.1-vas 和 pcDNA3.1(-) 的细胞株。

2.3 体外侵袭实验结果

PC-3M-1E8/vas 细胞的穿膜细胞数为 $99.3 \pm$

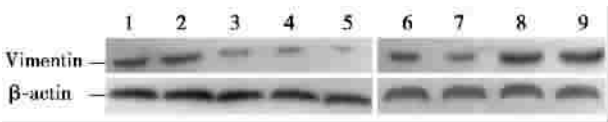


图 2 Western blot 检测 PC-3M-1E8 和 PC-3M-2B4 细胞转染前后波形蛋白的表达

Figure 2 Protein expression of vimentin in PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4 cells detected by Western blot

Lane 1: PC-3M-1E8 cells; lane 2: PC-3M-1E8/3.1(-) cells; lane 3: the first clone of PC-3M-1E8/vas cells; lane 4: the second clone of PC-3M-1E8/vas cells; lane 5: the third clone of PC-3M-1E8/vas cells; lane 6: PC-3M-2B4 cells; lane 7: PC-3M-2B4/3.1(+) cells; lane 8: the first clone of PC-3M-2B4/vs cells; lane 9: the second clone of PC-3M-2B4/vs cells.

4.8, 低于 PC-3M-1E8/3.1(-) 细胞的 319.4 ± 6.5 ($P < 0.01$), 表明转染波形蛋白反义全长后, 肿瘤细胞体外侵袭能力降低。PC-3M-2B4/vs 细胞的穿膜细胞数为 330.5 ± 5.8 , 高于 PC-3M-2B4/3.1(+) 细胞的 98.6 ± 7.5 ($P < 0.01$), 表明转染波形蛋白正义全长后, 肿瘤细胞体外侵袭能力增高(图 3)。

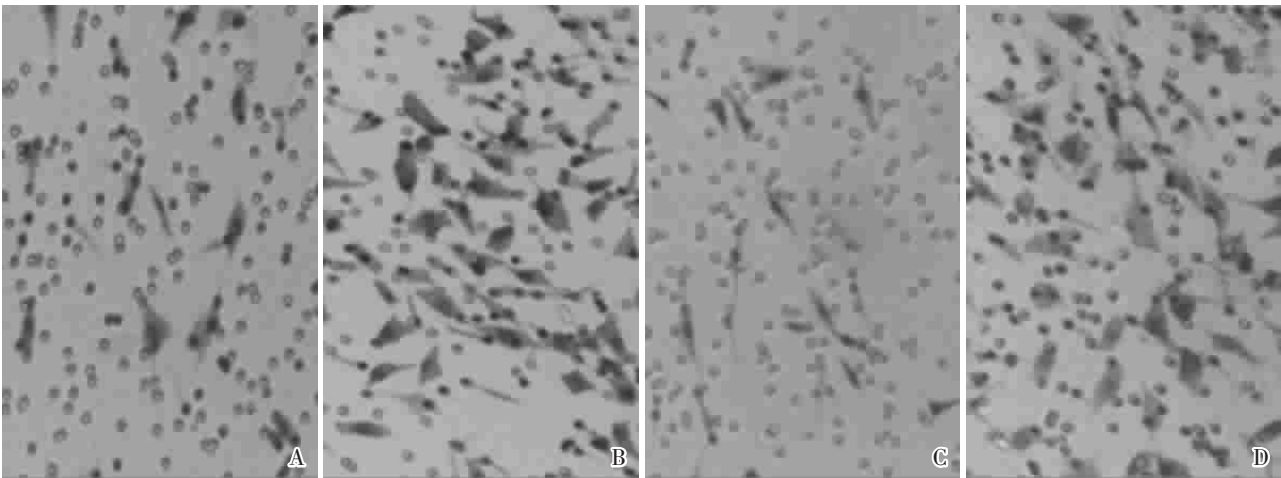


图 3 PC-3M-1E8 和 PC-3M-2B4 细胞转染前后体外侵袭实验结果

Figure 3 The effect of vimentin on invasion of PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4 cells

A: PC-3M-1E8/vas cells; B: PC-3M-1E8/3.1(-) cells; C: PC-3M-2B4/vs cells; D: PC-3M-2B4/3.1(+) cells.

2.4 转染前后细胞 c-src 及 c-src 磷酸化状态的改变

Western blot 结果见图 4。PC-3M-1E8/vas 细胞与 PC-3M-1E8 细胞比较,C-src 蛋白表达降低,其相对积分吸光度值降低 31%;其中 C-src 磷酸化蛋白表达也降低,其相对积分吸光度值降低 51%。PC-3M-2B4/vs 细胞与 PC-3M-2B4 细胞比较,C-src 蛋白表达增高,其相对积分吸光度值增高 85%;其中 C-src 磷酸化蛋白表达也增高,其相对积分吸光度值增高 122%。C-src 和 C-src 磷酸化蛋白在各组

细胞中的相对表达值见表 1。

3 讨论

肿瘤转移取决于肿瘤细胞侵犯局部组织及穿透组织屏障的能力。首先瘤细胞要脱离起源的组织,其次要穿透上皮的基底膜、侵犯间质,然后进一步侵入脉管神经或肌肉,并向局部淋巴结和远处器官转移。临床上中晚期或复发后的前列腺癌大都获得了激素非依赖性生长,且多发生了远隔器官的转移,导致常规治疗的失败,患者死亡率高。本研究以

表 1 PC-3M-1E8 和 PC-3M-2B4 细胞转染前后 C-src 和磷酸化 C-src 的半定量分析

Table 1 Quantitative analysis of C-src and phosphated C-src (p-C-src) proteins in PC-3M-1E8 or PC-3M-2B4 cells before and after transfection with antisense- or sense-vimentin

Group	C-src	p-C-src
PC-3M-1E8	1.52±0.36	0.82±0.08
PC-3M-1E8/vas	1.05±0.25	0.40±0.03
PC-3M-2B4	0.66±0.09	0.36±0.04
PC-3M-2B4/vs	1.22±0.28	0.80±0.07

All values are presented as mean ± SD of relevant cells.

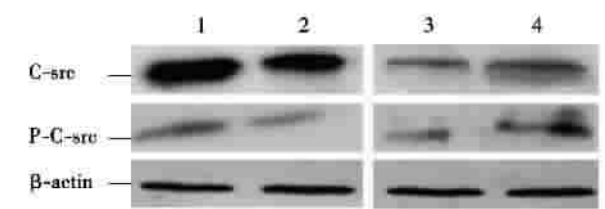


图 4 Western blot 检测PC-3M-1E8 和 PC-3M-2B4 细胞转染前后 C-src 和磷酸化 C-src 的表达
Figure 4 Expression of C-src and phosphated C-src(p-C-src) in PC-3M-1E8 and PC-3M-2B4 cells before and after transfection of antisense- or sense-vimentin detected by Western blot
Lane 1: PC-3M-1E8 cells; lane 2: PC-3M-1E8/vas cells; lane 3: PC-3M-2B4 cells; lane 4: PC-3M-2B4/vs cells.

雄激素非依赖性前列腺癌配对细胞系 PC-3M-1E8 (高转移潜能)和 PC-3M-2B4 (低转移潜能)^[6]为模型,应用 2-DE MALDI-TOF-MS 比较二者蛋白质表达的差异,实验证明,波形蛋白在 PC-3M-1E8 细胞的表达远高于在 PC-3M-2B4 细胞的表达。而 Singh 等^[7]运用芯片技术也证实了波形蛋白在雄激素非依赖性前列腺癌细胞中高表达。

波形蛋白属于中间丝蛋白的一种,参与形成细胞骨架,并与胞膜形成广泛联系,主要分布在间叶组织及细胞,曾作为间叶组织起源肿瘤的特异性标记。但近年来大量文献表明,多种上皮性肿瘤细胞表达波形蛋白,且被认为与肿瘤细胞的恶性程度密切相关。本研究运用基因干预技术结合体外侵袭实验,也证实波形蛋白可以促进前列腺癌细胞侵袭转移。

Thompson 等^[8]将波形蛋白在上皮性肿瘤细胞的表达,以及促进肿瘤细胞侵袭转移的现象定义为 EMT(上皮性细胞向间质性细胞转化)。迄今为止,EMT 的具体机制仍不清楚。对于上皮性细胞,需要适量表达钙粘蛋白,从而维持细胞间的粘附。有研

究报道,在 EMT 过程中,存在 E-钙粘蛋白表达下调的现象^[9,10]。Palacios 等^[11]报道 src 激活后,细胞内的 E-钙粘蛋白不是经过通常的途径返回细胞膜循环再利用,而是进入细胞的溶酶体降解。Avizienyte 等^[12]也发现 src 的 SH2/3 区域介导了磷酸化肌球蛋白的外周聚集,而这种聚集抑制了 E-钙粘蛋白的细胞粘附作用。在本研究中,波形蛋白基因干预的细胞株中存在 C-src 和 C-src 磷酸化状态发生相应变化的情况。综上所述,波形蛋白可能通过调节 C-src 激酶,促进前列腺癌细胞侵袭与转移。波形蛋白可能可以作为判断临床前列腺癌细胞侵袭与转移的一个重要参考指标。

[参 考 文 献]

[1] Landis S H, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 1999,49(1):8-31.
[2] Griffiths K, Eaton C L, Harper M E, et al. Hormonal treatment of advanced disease: some newer aspects [J]. Sem Oncol, 1994,21(5):672-687.
[3] Gorg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. Electrophoresis, 2000,21(6):1037-1053.
[4] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京:科学出版社, 2000:20-23.
[5] Biswas P, Canosa S, Schoenfeld D, et al. PECAM-1 affects GSK-3β-mediated beta-catenin phosphorylation and degradation [J]. Am J Pathol, 2006,169(1):314-324.
[6] 刘宇欣, 郑 杰, 方伟岗, 等. 具有不同转移潜能的前列腺癌细胞亚系的分离鉴定 [J]. 中华病理学杂志, 1999,28(5):361-364.
[7] Singh S, Sadacharan S, Su S, et al. Overexpression of vimentin: role in the invasive phenotype in an androgenindependent model of prostate cancer [J]. Cancer Res, 2003,63(9):2306-2311.
[8] Thompson E W, Newgreen D F, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? [J]. Cancer Res, 2005,65(14):5991-5995.
[9] Mareel M, Bracke M, Van Roy F. Invasion promoter versus invasion suppressor molecules: the paradigm of E-cadherin [J]. Mol Biol Rep, 1994,19(1):45-67.
[10] Takeichi M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis [J]. Curr Opin Cell Biol, 1993,5(5):806-811.
[11] Palacios F, Tushir J S, Fujita Y, et al. Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions [J]. Mol Cell Biol, 2005,25(1):389-402.
[12] Avizienyte E, Fincham V J, Brunton V G, et al. Src SH3/2 domain-mediated peripheral accumulation of Src and phosphomyosin is linked to deregulation of E-cadherin and the epithelial-mesenchymal transition [J]. Mol Biol Cell, 2004,15(6):2794-2803.

[编辑及校对:甘可建]