

· 论 著 ·

前列腺素 E₂ 对结肠癌细胞 CacyBP/SIP 核转位的影响*谢福利¹, 翟惠虹^{2△}

(1. 宁夏师范学院医学院, 银川 756000; 2. 宁夏医科大学总医院消化内科, 银川 750004)

摘要:目的 用前列腺素 E₂ 刺激结肠癌细胞, 观察和探讨可否引起 CacyBP/SIP 核转位。方法 根据 hCacyBP/SIP 序列设计引物, PCR 扩增、酶切、连接、转化等分子克隆法构建含有钙周期素结合蛋白(CacyBP/SIP)的慢病毒重组质粒, PCR 鉴定、测序; 将构建好的带有绿荧光蛋白的 CacyBP-Lentivirus 载体转染至结肠癌 SW480 细胞, 用激光共聚焦显微镜检测 CacyBP/SIP 表达定位; 前列腺素 E₂ 刺激后激光共聚焦显微镜、Western blot 观察 CacyBP/SIP 在细胞中的定位。结果 激光共聚焦和 Western blot 发现: 前列腺素 E₂ 刺激前 CacyBP/SIP 定位和表达主要在细胞胞质, 用 100 μmol/L 前列腺素 E₂ 刺激 1 h, CacyBP/SIP 定位和表达在细胞胞质和胞核。结论 前列腺素 E₂ 刺激可以引起 CacyBP/SIP 由胞质转位至细胞核。

关键词: CacyBP/SIP; 前列腺素 E 类; 核转位; 结肠肿瘤

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2012. 29. 002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)29-3020-03

Study on the effect of Prostaglandin E₂ on nuclear translocation of CacyBP/SIP*Xie Fuli¹, Zhai Huihong^{2△}

(1. Medical College of Ningxia Teachers University, Yinchuan, Ningxia 756000, China; 2. Ningxia Medical University Hospital, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: Objective To observe and evaluate effect of Prostaglandin E₂ on nuclear translocation of CacyBP/SIP by stimulating colorectal cancer with Prostaglandin E₂. Methods To design the primer according to the sequence of CacyBP/SIP, and to build lentivirus recombinant plasmid contains CacyBP/SIP by cloning. To transfect the over expressed lentiviral vector with Green fluorescent protein CacyBP/SIP into SW480 colon cancer cells, and to test the location and expression of the CacyBP/SIP with Laser Scanning Confocal Microscope and the Western blot. To test the location of the CacyBP/SIP after the stimulation of Prostaglandin E₂ with Laser Scanning Confocal Microscope and the Western blot. Results CacyBP/SIP were located and expressed in the periplasm, and both in periplasm and nuclear after 1 hour stimulation of 100 μmol/L Prostaglandin E₂ with Laser Scanning Confocal Microscope and Western blot. Conclusion The Prostaglandin E₂ can transfer CacyBP/SIP to the nucleus.

Key words: CacyBP/SIP; prostaglandins E; nuclear translocation; colonic neoplasms

20 世纪 70 年代研究发现大肠癌患者体内前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 含量是其它肿瘤的 1.7~5.0 倍^[1]。80 年代应用非甾体消炎药可降低结肠癌 40%~50% 发病率^[2]。PGE₂ 异常升高与肿瘤的关系密切, 促进结肠癌的发展^[3]。钙周期素结合蛋白(calicyclin-binding-protein, or siah-1 interacting protein, CacyBP/SIP) 自 1996 年发现以来, 越来越多的证据显示^[4-5]: CacyBP/SIP 在肿瘤发生、发展、侵袭、转移等方面都有重要的作用; 同时, CacyBP/SIP 具有依赖 Ca²⁺ 浓度的核转位现象^[6]。PGE₂ 是否可诱导 CacyBP/SIP 核转位, 由此促进结肠癌细胞增殖? 本研究拟通过构建 CacyBP/SIP 过表达慢病毒颗粒, 转染至结肠癌细胞, 给予 PGE₂ 刺激, 观察 CacyBP/SIP 在结肠癌细胞中的定位, 明确 PGE₂ 是否诱导 CacyBP/SIP 核转位。

1 材料与方 法

1.1 材料 结肠癌细胞 SW480 购于上海中科院。小牛血清、L15 培养基、胰酶购自 Gibco 公司; CacyBP/SIP mAb 购于 Cell signaling; PGE₂ 购于 Cayman 公司; 胞浆核蛋白抽提试剂盒购于 pierce 公司; DAPI 染色剂购于 Sigma 公司; FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为中山公司产品; Triton x-100 裂解液试剂盒为北京鼎国公司; 293T 细胞、pGC-LV 重组载体、pHelper 1.0、

pHelper 2.0 来源于吉凯基因公司; PVDF 膜购自 Merck 公司; 其他相关试剂购自 Takara、Fermentas、SinoBio、NEB、捷瑞公司。

1.2 方法

1.2.1 过表达慢病毒载体构建 应用人结肠癌细胞株 HCT-116 的 cDNA 序列, 采用 Primer Premier v5.0 软件设计上游和下游引物, PCR 法扩增, 分别用 Nhe I 和 EcoR I 进行双酶切, T4 连接酶将酶切后的产物相连, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, PCR 法筛选阳性克隆, 接种阳性转化子, 送测序。慢病毒包装、采用逐孔稀释法测定并标定病毒滴度。

1.2.2 转染人结肠癌细胞 SW480 细胞 用含 10% 的 56 ℃、30 min 热灭活小牛血清的 L15 培养基, 在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养, 隔天换液, 待细胞长至 80%~90% 传代。至细胞在 T50 瓶长至 30%~50% 时, 每瓶加入 500 μL (5 μg/mL) Polybrene, 4 400 μL 完全培养基和 100 μL (1×10⁸) 过表达 CacyBP/SIP 的慢病毒颗粒, 在水平方向轻轻摇动培养瓶, 使其充分混匀, 放入培养箱培养 8~12 h 以后观察细胞状态, 更换为新鲜培养基继续培养。

1.2.3 激光共聚焦和 Western blot 检测 正常消化传代并行激光共聚焦检测。再取 3 个 12 孔培养板, 每孔放置一个细胞

爬片,每孔接种(3~4)×10⁴ 细胞于 12 孔板。至细胞长至最佳状态时,吸干培养基,用 PBS 冲洗 2 次,每个培养板加入 2 mL 含 100 μmol/L PGE₂ 培养基,对照组每孔分别加入完全培养基作为对照。放入培养箱培养 1 h。固定、打孔、用含 DAPI 封片剂染色封片。激光共聚焦检测 CacyBP/SIP 在细胞中的定位。Western blot 法检测:分别取转染后的 SW480 细胞,在给予 100 μmol/L PGE₂ 刺激前、后 1 h,分别抽提胞浆、胞核蛋白,用 BCA 定量;上样缓冲液稀释至 5 μg/uL,煮沸后-80 °C 冻存;把 20 μL 蛋白样品上样到 12%SDS-PAGE 胶加样孔内,电泳电压 80 V,时间 20 min;湿式转膜,电流 200 mA,60 min;加入 5%脱脂牛奶封闭 60 min 后,加入 CacyBP/SIP 单抗(1:200)4 °C 孵育过夜,常规洗膜后加入羊抗鼠 IgG(1:2 000)的二抗,室温孵育 1 h,洗涤。曝光、显影。

2 结 果

2.1 激光共聚焦检测 PGE₂ 刺激前、后 CacyBP/SIP 在细胞内定位和表达 无 PGE₂ 刺激条件下,CacyBP/SIP 主要位于细胞胞质内,给予 100 μmol/L PGE₂ 刺激 1 h 条件下 CacyBP/SIP 可转位至细胞核内(图 1);100 μmol/L PGE₂ 刺激 0.5 h 条件下 CacyBP/SIP 无明显核转位(图 2)。

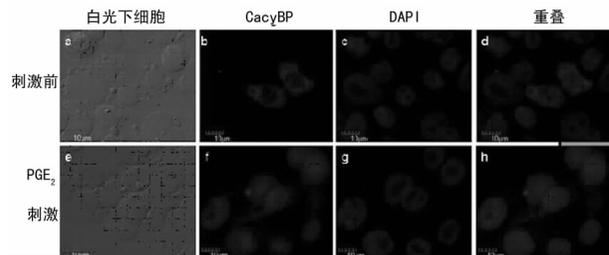


图 1 PGE₂ 刺激前、后 CacyBP/SIP 在细胞内定位
a:白光下细胞;b:未给予 PGE₂ 刺激 CacyBP/SIP 位于胞浆;c:DAPI 染色;d:重叠图像显示 CacyBP/SIP 位于胞浆;e:白光下细胞;f:给予 PGE₂ 刺激 CacyBP/SIP 进入胞核;g:DAPI 染色;h:重叠显示 CacyBP/SIP 位于胞核。

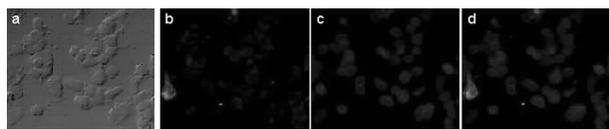


图 2 100 μmol/L PGE₂ 刺激 0.5 h Cacy BP/SIP 在细胞内定位

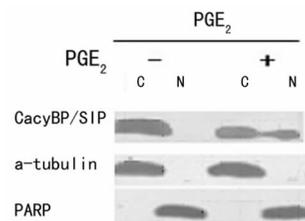


图 3 PGE₂ 刺激前、后 Western blot 检测 CacyBP/SIP 在细胞浆及细胞核中的表达

2.2 Western blot 检测 PGE₂ 刺激前、后 CacyBP/SIP 在细胞内定位和表达 无刺激条件下,CacyBP/SIP 主要在胞质内表达,给予 100 μmol/L PGE₂ 刺激 1 h,可在细胞核内表达

(图 3)。

3 讨 论

1996 年 Filipek 从小鼠腹水瘤细胞和鼠脑组织中首次发现一个以依赖 Ca²⁺ 浓度,可与 S100 A6 结合,命名为 Calcyclin (S100A6)-binding-protein(钙周期素结合蛋白),既 CacyBP。2001 年在研究 p53 刺激下 β-catenin 泛素化降解新通路时,从 cDNA 文库中调到一个可以与 Siah-1 相互作用的蛋白,命名为 Siah-1-interacting-protein,即 SIP。进一步研究发现,SIP 即 CacyBP,因此,目前命名为 CacyBP/SIP。其相对分子质量约 26×10³,含一个 687 bp 的开放阅读框,编码 228 个氨基酸,存在 7 个磷酸化位点和 1 个核定位信号^[7]。

目前,对 CacyBP/SIP 功能研究较少,其功能主要表现在:(1)与 p53 有关:参与了新的泛素-蛋白酶体降解,当 p53 在细胞内表达升高时,可诱导 Siah-1 基因的表达,共同组成泛素连接酶复合体(Siah-1-CacyBP/SIP-SCF),将未被磷酸化的 β-catenin 蛋白酶体降解;(2)与红细胞有关^[8]:有报道促红细胞生成素受体活化可促进 CacyBP/SIP 表达上调。

以往研究发现,CacyBP/SIP 在胃癌阿霉素耐药细胞中高表达^[9]并参与胃癌细胞多重耐药,其下调可以部分逆转耐药性^[10]。在肾细胞癌中发现:CacyBP/SIP 表达上调能抑制肾细胞癌的增殖和肿瘤形成^[11]。近年来又发现 CacyBP/SIP 参与乳腺癌、胰腺癌的发生、发展及复发转移,可能成为预后不良的生物学指标之一^[12-14]。因此,推断 CacyBP/SIP 与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。

本课题组前期利用淋巴细胞杂交瘤技术制备了 3 株 CacyBP/SIP 单克隆抗体,对正常及肿瘤组织中 CacyBP/SIP 表达分布状况做了较系统的研究,研究发现^[15-16]:CacyBP/SIP 在结肠癌组织中的表达明显高于癌旁组织,在正常结肠组织不表达,且主要定位于胞浆及胞核;给予给 KCl 刺激后,通过升高胞浆内 Ca²⁺ 浓度,可诱导 CacyBP/SIP 核转位。

2002 年 Filipek 等^[6]首次发现 CacyBP/SIP 具有依赖 Ca²⁺ 浓度的核转位现象,那么,究竟哪些因素可以引起 CacyBP/SIP 核转位?

PGE₂ 在生理状态下含量很低,却又具有很强的生理活性。环氧酶-2(COX-2)是 PGE₂ 合成的限速酶,应用非甾体消炎药降低结肠癌发病率主要是通过抑制 COX-2 活性达到治疗作用,选择性 COX-2 抑制剂成为结肠癌防治的一条新途径。PGE₂ 异常升高与肿瘤的关系密切:直肠癌 PGE₂ 含量与肝肺转移呈正相关;大肠癌 PGE₂ 含量和肿瘤大小呈正相关,并且 Dukes'D 期明显高于 B、C 期;PGE₂ 能显著促进结肠癌细胞的生长;PGE₂ 含量与肿瘤分化程度呈正相关;结肠癌化疗中用其抑制剂提高了患者生存率^[18]。

本研究通过 CacyBP/SIP 过表达慢病毒颗粒转染至结肠癌 SW480 细胞,激光共聚焦显微镜发现 CacyBP/SIP 主要位于细胞胞浆,Western blot 亦证实其位于胞浆。给予 PGE₂ 刺激发现 CacyBP/SIP 可发生核转位现象,Western blot 亦证实 CacyBP/SIP 在刺激前位于胞浆,刺激后位于胞核。蛋白在细胞中的定位常常与其功能密切相关,CacyBP/SIP 在给予刺激后发生核转位及磷酸化,提示其可能做为信号分子传递信息,从而参与细胞功能的调节。作者前期已发现 CacyBP/SIP 在结肠癌中高表达,免疫组化结果提示 CacyBP/SIP 位于胞浆及胞核,PGE₂ 可诱导 CacyBP/SIP 核转位,CacyBP/SIP 是否作为

信使,传递上游促进恶性肿瘤增殖的信号,需进一步研究。

参考文献:

- [1] Jaffe BM, Parker CW, Philpott GW. Immunochemical measurement of prostaglandin or prostaglandin-like activity from normal and neoplastic cultured tissue J[J]. Surg Forum, 1971,22:90-92.
- [2] Jacoby RF, Seibert K, Cole CE, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib is a potent preventive and therapeutic agent in the min mouse model of adenomatous polyposis [J]. Cancer Res, 2000,60(18):5040-5044.
- [3] 杨鹏远. 前列腺素 E₂ 通过 Gs_Axin_Catenin 信号途径促进结肠癌细胞生长[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007,14(1):25-27.
- [4] Wu J, Tan X, Peng X, et al. Translocation and phosphorylation of calcyclin binding protein during retinoic acid-induced neuronal differentiation of neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. J Biochem Mol Biol, 2003, 36(4):354-358.
- [5] 胡文华,尹芳,金晓航,等. CacyBP 编码基因对胃癌细胞多药耐药性形成的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2002,24(5):426-429.
- [6] Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, et al. Ca²⁺-dependent translocation of the calcyclinbinding protein in neurons and neuroblastoma NB-2a cells [J]. J Biol Chem, 2002,277(23):21103-21109.
- [7] Filipek A, Kuznicki J. Molecular cloning and expression of a mouse brain cDNA encoding a novel protein target of calcyclin[J]. J Neurochem, 1998,70(5):1793-1798.
- [8] Pircher TJ, Geiger JN, Zhang D, et al. Integrative signaling by minimal erythropoietin receptor forms and c-Kit [J]. J Biol Chem, 2001,276(12):8995-9002.
- [9] Hu W, Yin F, Jin X, et al. Effect of human calcyclin binding protein encoding gene on development of multiple drug resistance in gastric cancer[J]. Zhonghua Zhongliu Zazhi, 2002,24(5):426-429.
- [10] Yongquan Shi, Wenhua Hu, Fang Yin, et al. Regulation of drug sensitivity of gastric cancer cells by human calcyclin-binding-protein(CacyBP)[J]. Gastric Cancer, 2004,7(3):160-166.
- [11] Sun S, Ning X, Liu J, et al. Over expressed CacyBP/SIP leads to the suppression of growth in renal cell carcinoma [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007,356(4):864-871.
- [12] 宁晓暄,孙世仁,张坤,等. S100 分子结合域缺失对钙周期素结合蛋白生物学功能影响的研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008,15(13):968-971.
- [13] 王宁菊,马刚,翟惠虹. 钙周期素结合蛋白与乳腺癌临床的相关性研究[J]. 第四军医大学学报, 2009,30(21):2403-2407.
- [14] Chen X, Han G, Zhai H, et al. Expression and clinical significance of CacyBP/SIP in pancreatic cancer[J]. Pancreatology, 2008,8(4):470-477.
- [15] Chen X, Mo P, Li X, et al. CacyBP/SIP protein promotes proliferation and G₁/S transition of human pancreatic cancer cells[J]. Mol Carcinog, 2011,46(10):1002-1004.
- [16] Zhai H, Shi Y, Yu J, et al. Establishment and characterization of calcyclin-binding-p rotein(CacyBP) monoclonal antibody[J]. Hybri doma(Larchm), 2006,25(2):91-94.
- [17] Zhai HH, Shi YQ. Expression of calcyclin-binding-protein/ Siah-1-interacting-protein in normal and malignant human tissues; an immunohisto- chemical survey [J]. J Histochem Cytochem, 2008,56(8):765-772.
- [18] 俞慧宏,吴小翎,张苜,等. 测定胃癌患者肿瘤组织与外周血中前列腺素 E₂ 的临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2008,30(5):444-446.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-28)

(上接第 3019 页)

- [6] Horsley A. Lung clearance index in the assessment of airways disease[J]. Respir Med, 2009,103(6):793-799.
- [7] Hjalmarson O, Sandberg KL. Lung function at term reflects severity of bronchopulmonary dysplasia[J]. J Pediatr, 2005,146(1):86-90.
- [8] Latzin P. Lung volume breathing pattern and ventilation inhomogeneity in preterm and term infants [J]. PLoS One, 2009,4(2):235-237.
- [9] Herting E. Bronchopulmonary dysplasia: pathogenesis, risk factors and early prevention strategies[J]. Chin Med J (Engl), 2010,123(20):2955-2957.
- [10] Baraldi E, Filippone M. Chronic lung disease after premature birth[J]. N Engl J Med, 2007,357(19):1946-1955.
- [11] Hjalmarson O, Sandberg K. Abnormal lung function in healthy preterm infants[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002,165(1):83-87.
- [12] Davis SD. Neonatal and pediatric respiratory diagnostics [J]. Respir Care, 2003,48(4):367-369.
- [13] 张亚平,张皓,邵肖梅. 机械通气新生儿肺功能的随访研究[J]. 临床儿科杂志, 2004,22(4):238-241.
- [14] Friedrich L. Reduced lung function in healthy preterm infants in the first months of life[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006,173(4):442-447.
- [15] Haland G, Fau-Carlson KCL. Reduced lung function at birth and the risk of asthma at 10 years of age[J]. N Engl J Med, 2006,355(16):1682-1689.
- [16] 刘晨,丁晓春. 支气管肺发育不良肺功能变化的初步观察 [J]. 中国新生儿科杂志, 2010,25(4):212-215.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-23)