

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.06.001

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200210.1409.016.html\(2020-02-10\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200210.1409.016.html(2020-02-10))

PBF 基因对前列腺癌细胞 PC3 增殖和侵袭的影响*

黄盛权¹,李为兵¹,支 轶¹,廖钱金^{2△}

(1. 重庆医科大学附属第三医院泌尿疾病中心,重庆 401120;2. 重庆市沙坪坝区新桥社区卫生服务中心预防保健科,重庆 400037)

[摘要] **目的** 探讨沉默垂体肿瘤转化基因结合因子(PBF)基因的表达对前列腺癌细胞 PC3 增殖、侵袭及化疗药物耐药的影响。**方法** 利用慢病毒转染法将靶向 PBF 干扰质粒转染前列腺癌细胞 PC3, Western blot 检测质粒的转染效果;噻唑蓝(MTT)和软琼脂克隆形成实验检测各组细胞的增殖及成瘤能力的变化;流式细胞术检测 PBF 沉默前后 PC3 细胞周期的变化;Transwell 实验和划痕实验检测细胞的侵袭和迁移能力;细胞存活率实验检测细胞对化疗药物的耐药性。**结果** PBF 干扰质粒能降低前列腺癌细胞 PC3 中 PBF 的表达;沉默 PC3 细胞中 PBF 表达后,与对照组比较,PC3/shPBF 细胞增殖能力明显降低($P=0.002$)且细胞周期阻滞于 G₁ 期($P=0.046$),PC3/shBPF 细胞成瘤能力明显降低($P=0.000$);PBF 表达被沉默后,PC3 细胞侵袭转移能力下降($P=0.001$);PC3 细胞 PBF 表达降低后,对前列腺癌常用化疗药物紫杉醇的敏感性增加($P=0.013$)。**结论** 沉默 PBF 的表达能降低前列腺癌细胞 PC3 的增殖和侵袭能力并增强其对化疗药物的敏感性,提示 PBF 可能会成为前列腺癌治疗的潜在靶点。

[关键词] 垂体肿瘤转化基因结合因子;前列腺肿瘤;细胞增殖;细胞侵袭**[中图分类号]** R737.25**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)06-0861-05

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of PBF gene on proliferation and invasion of prostate cancer cell line PC3*

HUANG Shengquan¹, LI Weibing¹, ZHI Yi¹, LIAO Qianjin^{2△}

(1. Urological Disease Center, Third Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401120, China; 2. Department of Prevention and Health Care, Xinqiao Community Health Service Center of Shapingba District, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of silencing PTTG binding factor (PBF) gene expression on the proliferation, invasion and chemotherapy resistance of prostate cancer cell line PC3. **Methods** The lentivirus transfection method was used to transfect the interfering plasmid of targeted PBF to prostate cancer cell line PC3. The effect of plasmid was detected by Western blot. MTT and soft agar clone formation experiment were used to detect the cell proliferation and change of tumorigenesis ability. The change of PC cell cycle before and after PBF silence was detected by the fluid cytometry. The ability of cellular invasion and migration was detected by the Transwell experiment and scratch experiment. The cellular viability test was used to detect the resistance of cell to chemotherapeutic drugs. **Results** PBF interfering the plasmid could reduce the PBF expression level in PC3 cells; after silencing PBF expression in P3, MTT experiment and fluid cytometry indicated that compared with the control group, the cell proliferation rate was significantly decreased ($P=0.002$), moreover the cellular cycle was arrested at the G₁ stage ($P=0.046$). In the soft agar clone formation experiment, after silencing PBF expression, the tumorigenesis ability was significantly decreased ($P=0.000$). Transwell experiment and scratch experiment showed that after silencing PBF expression, the invasion and migration ability of PC3 was decreased ($P=0.001$). After PBF expression decrease in P3 cells, its

* 基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(KJQN201800404)。 作者简介:黄盛权(1983-),主治医师,博士,主要从事前列腺癌分子发生机制及治疗的研究。△ 通信作者,E-mail:1871559224@qq.com。

sensitivity to chemotherapeutic drug paclitaxel in prostate cancer was increased ($P=0.013$). **Conclusion** Silencing PBF expression can decrease the proliferation and invasion ability of PC3 cells, enhance its sensitivity to chemotherapeutic drug, indicating that PBF may become the latent target spot of prostate cancer therapy.

[Key words] PTTG binding factor; prostate neoplasms; cell proliferation; cell invasion

前列腺癌是男性常见的恶性肿瘤之一,在西方国家中,前列腺癌在恶性肿瘤中的发病率位居第一,病死率位居第二^[1-4]。随着我国人口老龄化的到来,前列腺癌已成为泌尿系统发病率较高的肿瘤,发病率及病死率随年龄呈指数增长。前列腺癌的发生和发展都离不开癌基因的参与;垂体肿瘤转化基因结合因子(PTTG binding factor, PBF)是近年来发现的一个新的癌基因,它在甲状腺癌、乳腺癌、大肠癌等肿瘤中均高表达,并且对肿瘤的生长和侵袭转移均有促进作用^[5-7]。而 PBF 对前列腺癌生物学特性的影响并没有文献报道,本研究利用慢病毒转染技术、成瘤实验、Transwell 实验等观察 PBF 对前列腺癌细胞增殖和侵袭能力及化疗耐药的影响,探讨前列腺癌发生发展的机制及新的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料

人前列腺癌细胞株 PC3 和 LNCaP 均购自美国 ATCC 细胞库, PBF RNAi 慢病毒和空载体购自上海吉玛公司, 抗体均购自美国 Santa 公司, RPMI 1640 和胎牛血清购自美国 Promega 公司, Transwell 小室购自美国 Coning 公司, Matrigel 基质胶购自美国 BD 公司, 紫杉醇购自美国百时美施贵宝公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和慢病毒转染

人前列腺癌细胞株 PC3 和 LNCaP, 在 37 °C 及 5% CO₂ 条件下以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基常规培养。每 2~3 天给细胞更换 1 次新鲜培养基。取对数生长期 PC3 细胞, 调整细胞密度为 2.5 × 10⁴ 个/mL, 取 2 mL 分别接种在 6 孔板培养, 24 h 后细胞密度达 30%~40%, 分别加入 1.0 × 10⁸ TU/mL 病毒液 200 μL [感染复数 (MOI) = 100, 感染率 90%] 进行转染, 转染 PBF RNAi 慢病毒和空载体的 PC3 细胞通过 Blasticidin 筛选 1 周得到稳定沉默 PBF 表达的 PC3 细胞和空载体 PC3 细胞, 分别命名为 PC3/shPBF 和 PC3/control, 扩大培养后用于后续实验。

1.2.2 Western blot 检测前列腺癌细胞中 PBF 的表达及 PBF RNAi 慢病毒效果

提取蛋白后, 用 Bradford 法测定蛋白浓度, 取 30 μg 蛋白上样检测 PBF 的表达, 利用肌动蛋白 (β-actin) 作为内参照, 将蛋白经过 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE) 电泳后转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h, 加入

一抗 (兔抗人, 1 : 500) 4 °C 温育过夜, 加入相应二抗 (羊抗兔, 1 : 5 000) 常温孵育 2 h, 用 BioRad 显像和图像采集系统对 Western blot 的实验结果进行采集显影, 实验重复 3 次。

1.2.3 噻唑蓝 (MTT) 实验检测 PC3 细胞的增殖活性

将 PC3/shPBF 和 PC3/control 细胞按每孔 2 × 10³ 的密度铺入 96 孔板培养。在第 1、2、3、4、5、6 天和第 7 天时进行 MTT 检测。使用 MTT 试剂盒: 每孔加入 50 μL MTT (5 mg/mL) 试剂; 37 °C 孵育 2 h, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞 2 次, 加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO) 37 °C 孵育 30 min 裂解细胞; 将裂解液吸入 96 孔板。用自动酶标仪 (BioRad) 分析结果, 实验结果重复 3 次, 计算标准差, 绘制生长曲线。

1.2.4 软琼脂克隆形成实验检测 PC3 体外成瘤能力

分别取对数生长期的 PC3/control 和 PC3/shPBF 细胞, 用含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基调整细胞密度至 1 × 10⁶ 个/L。用蒸馏水分别制备出 1.2% 和 0.7% 的低熔点琼脂糖液, 高压灭菌后, 维持 40 °C 使之不凝固。按 1 : 1 的比例将 1.2% 的琼脂糖和 2 × RPMI 1640 培养基 (含有 2 × 抗生素和 20% 的胎牛血清) 混合后, 取 2 mL 混合液均匀注入 6 孔板中, 冷却凝固, 可作底层琼脂置于 CO₂ 温箱中备用。按 1 : 1 的比例将 0.7% 的琼脂糖和 2 × RPMI 1640 培养基 (含有 2 × 抗生素和 20% 的胎牛血清) 在无菌试管中混匀以后, 再向管中加入 0.2 mL 的细胞悬液充分混匀, 注入铺有 1.2% 琼脂糖底层平皿中, 遂形成双琼脂层。待上层琼脂凝固后, 置入 37 °C 5% CO₂ 温箱中培养 14 d。把平皿放置在倒置显微镜 40 倍视野下, 观察细胞克隆数。随机选取 10 个视野, 取平均值。每个实验重复 3 次, 计算标准差。

1.2.5 流式细胞术检测细胞周期

分别取 PC3/control 和 PC3/shPBF 细胞制备单细胞悬液, 调整细胞数量为 1 × 10⁶ 个, 按照检测试剂盒说明进行操作: 预冷 PBS 洗涤 2 遍后, 用 70% 乙醇固定, 4 °C 过夜, 弃去固定液, PBS 洗涤后加入 100 μL RNA 酶, 37 °C 孵育 30 min, 400 μL PI 染色液 4 °C 避光孵育 30 min, 300 目尼龙网过滤后上机检测。

1.2.6 Transwell 实验和划痕实验检测 PC3 细胞的侵袭、迁移能力

用 50 mg/L Matrigel 1 : 4 稀释液覆盖 Transwell 小室底部膜的上室面, 4 °C 风干; 制备细胞悬液

前可先让细胞去血清培养 12~24 h,进一步去除血清的影响。消化细胞,终止消化后离心弃去培养液,用 PBS 洗 2 遍,用含 BSA 的无血清 RPMI 1640 培养基重悬。调整细胞密度至 1×10^5 /mL;取细胞悬液 200 μ L 加入 Transwell 小室上室。24 孔板下室加入含 500 μ L 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基,去除气泡,再将上室放进培养板;37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,用棉拭子擦去基质胶和上室内的细胞,用 0.1% 结晶紫染色 20 min 后,用 33% 醋酸脱色,将结晶紫完全洗脱下来后用手术刀将膜切下贴在玻片上,滴二甲苯后盖上盖玻片,在倒置显微镜下(100 倍)计数拍照,随机选取 10 个视野计数,取平均值。24 孔细胞培养板用于划痕实验,每孔加入等量的 PC3/shPBF 或 PC3/control 细胞,待细胞融合度达 70%,用移液器枪头划过单细胞层,每孔制造出约 500 μ m 宽的划痕,分别于 0、12、24 h 在倒置显微镜下对细胞进行拍照,观察划痕的宽度变化。每个实验重复 3 次,计算标准差。

1.2.7 MTT 实验检测 PC3 对化疗药物紫杉醇的敏感性

将对数生长期的 PC3/shPBF 或 PC3/control 细胞消化计数,分别以 3 000 个/孔的细胞数接种于 96 孔板中。培养 24 h 后,每孔加入梯度稀释的化疗药物紫杉醇,孵育 48 h。每孔中加入 50 μ L MTT(2 mg/mL)溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,吸出上清液,加入 100 mL DMSO。用酶标仪在 490 nm 处测定每个孔的光密度(OD)值。细胞存活率(%)=(加药细胞/未加药细胞) \times 100%。每个实验重复 3 次,计算标准差。

1.3 统计学处理

运用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

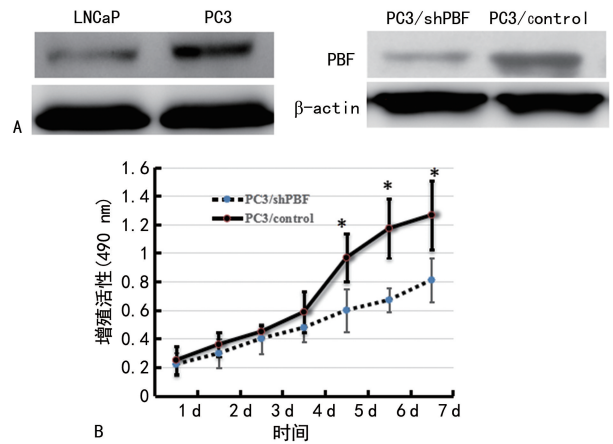
2 结 果

2.1 沉默 PBF 的表达能降低 PC3 细胞的增殖活性

Western blot 实验结果显示 PBF 在去势抵抗前列腺癌细胞 PC3 中的表达明显高于雄激素依赖的前列腺癌细胞 LNCaP,PBF RNAi 慢病毒质粒能明显降低 PC3 中 PBF 的表达;MTT 实验结果显示,PC3/control 和 PC3/shPBF 细胞前 3 d 增殖活性差别不大,但从第 5 天开始,PC3/shPBF 细胞的增殖活性明显低于 PC3/control(下降 38%, $P=0.002$),见图 1。

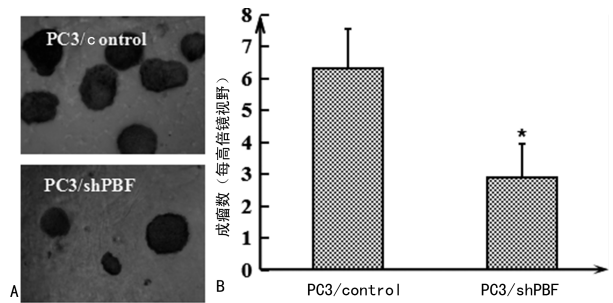
2.2 沉默 PBF 的表达能降低 PC3 细胞的体外成瘤能力

与 PC3/control 细胞比较,PC3/shPBF 细胞体外成瘤能力降低 55%,PC3/control 细胞成瘤数为平均每个视野(6.44 \pm 1.45)个,而沉默 PBF 后,PC3/shPBF 细胞的成瘤数降至平均每个视野(2.78 \pm 1.15)个,二者比较差异有统计学意义($P=0.000$),见图 2。



A: Western blot 检测 LNCaP 和 PC3 细胞中 PBF 的蛋白表达差异和 PBF RNAi 慢病毒质粒效果;B: MTT 检测 PC3 细胞增殖活性,*: $P < 0.05$ 。

图 1 PC3 细胞的 PBF 蛋白表达及增殖活性

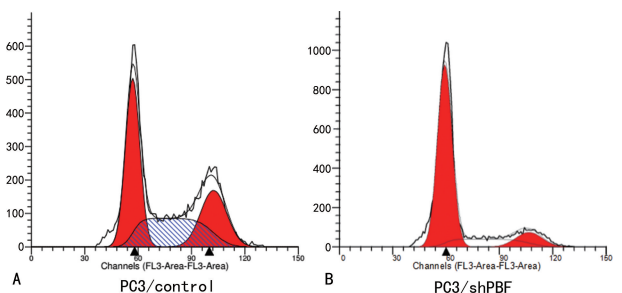


A: PC3 成瘤后显微镜(4 \times)下视野图;B: 成瘤数的计数,*: $P < 0.05$,与 PC3/control 比较。

图 2 软琼脂克隆形成实验检测 PC3 体外成瘤能力

2.3 沉默 PBF 的表达能导致 PC3 细胞周期阻滞于 G₁ 期

流式细胞仪检测 PC3 细胞周期发现,PBF 表达沉默后,PC3 细胞 G₁ 期比例升高(64.99% \pm 8.34% vs. 48.52% \pm 5.43%, $P=0.046$),而 S 期和 G₂ 期细胞比例降低(S 期:25.71% \pm 10.54% vs. 33.81% \pm 7.53%, $P=0.034$; G₂ 期:9.30% \pm 3.81% vs. 17.67% \pm 9.06%, $P=0.021$),差异均有统计学意义,见图 3。

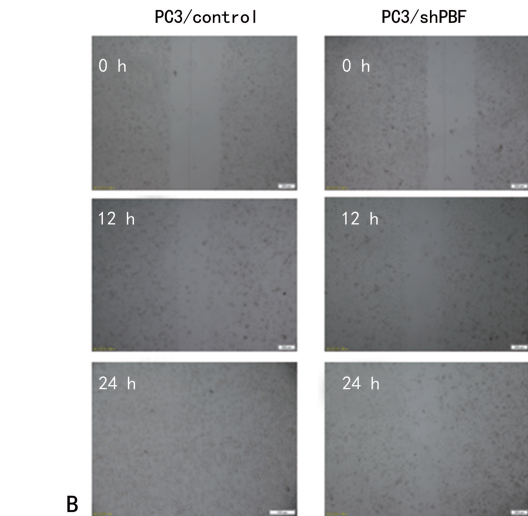
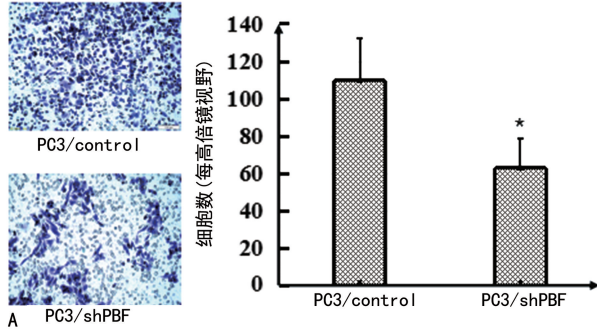


A: PBF 表达沉默前;B: PBF 表达沉默后。

图 3 PBF 表达沉默前后 PC3 细胞周期变化

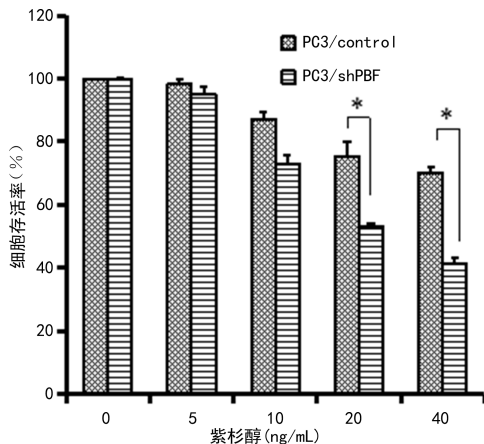
2.4 沉默 PBF 的表达能降低 PC3 细胞的侵袭和迁移能力

细胞处理 24 h 后,PC3/control 穿过基质胶的平均细胞数为(109.78±27.11)个,而 PC3/shPBF 穿过基质胶的平均细胞数则为(63.11±20.18)个,二者比较差异有统计学意义($P=0.001$);PC3/control 细胞通过 24 h 的生长迁移,能让划痕消失,而 PC3/shPBF 细胞在相同的时间内并不能使培养孔中的划痕完全愈合,见图 4。



A: Transwell 实验中穿过基质胶的细胞用结晶紫染色后视野图(左侧),穿过基质胶的细胞计数(右侧),*: $P<0.05$,与 PC3/control 比较;B:分别于 0、12、24 h 在显微镜下观察 PC3 划痕愈合情况。

图 4 Transwell 实验和划痕实验



*: $P<0.05$ 。

图 5 MTT 实验检测 PC3 细胞在不同浓度紫杉醇下的细胞存活率

2.5 抑制 PC3 细胞中 PBF 的表达能增加细胞对紫

杉醇的敏感性

不论是 PC3/control 细胞还是 PC3/shPBF 细胞,较低浓度的紫杉醇对其生长的抑制均较弱,随着紫杉醇的浓度增加,对 PC3 细胞的生长抑制作用也逐渐增强,对 PC3/control 细胞和 PC3/shPBF 细胞的抑制作用也逐渐产生差异,当紫杉醇的浓度达到 20 ng/mL 时,PC3/control 细胞存活率是 75.30%,而 PC3/shPBF 细胞存活率只有 53.14%,差异有统计学意义($P=0.013$),紫杉醇的浓度达到 40 ng/mL 时,这种差异更明显($P=0.000$),见图 5。

3 讨论

PBF 作为垂体肿瘤转化基因的结合因子,在乳腺癌等肿瘤中均有报道^[8],但其在前列腺癌中尚缺乏相关研究。本研究发现 PBF 在前列腺癌细胞 PC3 中高表达,而且沉默其表达对 PC3 细胞的增殖和侵袭均有抑制作用,提示 PBF 对前列腺癌的发生发展有重要的促进作用。

PBF 因能和 PTTG 相互作用而被发现,在染色体上位于 21q22.3,包含 6 个外显子,编码的蛋白包含 180 个氨基酸。它在许多正常组织中均有表达,但在恶性肿瘤中表达更高,而且对肿瘤的增殖和侵袭均有促进作用。在乳腺癌中 PBF 呈高表达,进一步研究提示它是雌激素应答基因,雌激素激活受体后能与 PBF 启动子雌激素受体顺式作用元件(ERE)结合,促进 PBF 转录。同时,PBF 能增强乳腺癌细胞的侵袭能力,而将 PBF 表达沉默后,雌激素对乳腺癌细胞侵袭力的促进作用会被减弱^[6]。在大肠癌中,PBF 能促进癌细胞的增殖和侵袭,并且 PBF 的这种作用和其对 P53 基因的抑制有关^[6]。将 PBF 过表达于正常的甲状腺腺体细胞,可导致正常的甲状腺增生及腺瘤形成^[9]。在甲状腺癌中,PBF 不仅能促进肿瘤细胞的增殖、成瘤及侵袭,而且和肿瘤分期、转移能力呈正相关,和疾病相关存活率呈负相关^[7-10]。本研究发现 PBF 不仅在前列腺癌细胞 PC3 中高表达,而且利用慢病毒技术将 PBF 沉默后,肿瘤细胞的增殖、软琼脂成瘤能力及侵袭能力均有不同程度衰减,这和前面文献研究一致。

以多西紫杉醇(多西他赛)为主要药物的化疗是终末期前列腺癌治疗的最终选择^[11-12],但其疗效并不理想,化疗耐药现象普遍,而在前列腺癌化疗耐药过程中,癌基因的激活发挥重要作用^[13-15]。在本研究中,也初步探讨了 PBF 对前列腺癌化疗耐药的影响,实验发现,沉默 PBF 的表达后 PC3 细胞对化疗药物紫杉醇的耐受性明显下降,提示 PBF 参与了前列腺癌的化疗耐药。

虽然本研究发现 PBF 在前列腺癌细胞 PC3 中高表达,且 PBF 对前列腺癌细胞的生长、增殖、侵袭、迁

移有重要促进作用,但是作用机制并不清楚,而且 PBF 表达在雄激素依赖的前列腺癌中和去势抵抗的前列腺癌组织中是否有差异及是否参与前列腺的去势抵抗也不清楚,这将是下一步研究的重点。

综上所述,本研究首先发现 PBF 在前列腺癌细胞 PC3 中高表达,而沉默 PBF 的表达能抑制前列腺癌细胞 PC3 的增殖、成瘤能力及侵袭迁移能力并能增加癌细胞对化疗药物的敏感性,这提示 PBF 在前列腺癌诊断和治疗中有潜在重要意义。

参考文献

- [1] FERLAY J, SOERJOMAMARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5):359-386.
- [2] SCHÜZ J, ESPINA C, WILD C P. Primary prevention: a need for concerted action [J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(3):567-578.
- [3] WILD C P, ESPINA C, BAULD L, et al. Cancer prevention Europe[J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(3):528-534.
- [4] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe; estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018[J]. *Eur J Cancer*, 2018(103):356-387.
- [5] WATKINS R J, READ M L, SMITH V E, et al. Pituitary tumor transforming gene binding factor: a new gene in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9):3739-3749.
- [6] READ M L, SEED R I, MODASIA B, et al. The proto-oncogene PBF binds p53 and is associated with prognostic features in colorectal cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55(1):15-26.
- [7] HSUEH C, LIN J D, CHANG Y S, et al. Prognostic significance of pituitary tumour-transforming gene-binding factor (PBF) expression in papillary thyroid carcinoma[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013, 78(2):303-309.
- [8] SMITH V E, FRANKLYN J A, MCCABE C J. Pituitary tumor-transforming gene and its binding factor in endocrine cancer[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2010(12):e38.
- [9] READ M L, LEWY G D, FONG J C, et al. Proto-oncogene PBF/PTTG1IP regulates thyroid cell growth and represses radioiodide treatment [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(19):6153-6164.
- [10] HSUEH C, LIN J D, CHANG Y S, et al. Prognostic significance of pituitary tumour-transforming gene-binding factor (PBF) expression in papillary thyroid carcinoma[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013, 78(2):303-309.
- [11] RULACH R, MCKAY S, NEILSON S, et al. Real world uptake, safety profile and outcomes of docetaxel in newly diagnosed metastatic prostate cancer[J]. *BJU Int*, 2018, 121(2):268-274.
- [12] LEE S, KIM K, HO J N, et al. Analysis of resistance-associated gene expression in docetaxel-resistant prostate cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(3):3011-3018.
- [13] CÁNOVAS V, PUÑAL Y, MAGGIO V, et al. Prostate tumor overexpressed-1 (PTOV1) promotes docetaxel-resistance and survival of castration resistant prostate cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(35):59165-59180.
- [14] HOUR T C, CHUNG S D, KANG W Y, et al. EGFR mediates docetaxel resistance in human castration-resistant prostate cancer through the Akt-dependent expression of ABCB1 (MDR1) [J]. *Arch Toxicol*, 2015, 89(4):591-605.
- [15] HOLDER S L, ABDULKADIR S A. PIM1 kinase as a target in prostate cancer; roles in tumorigenesis, castration resistance, and docetaxel resistance [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2014, 14(2):105-114.

(收稿日期:2019-06-07 修回日期:2019-11-12)