研究报告

干扰 E2F3 基因对前列腺癌细胞侵袭、迁移的影响

蒋昱枫,张　炜*,李　航,张　璐

(苏州大学附属第一医院泌尿外科,江苏 苏州　215006)

【摘要】 **目的**　探究干扰转录因子 E2F3 基因表达对前列腺癌细胞侵袭、迁移的影响及可能的作用机制。**方法**　转染 siRNA 干扰前列腺癌 Du145 细胞中 E2F3 基因表达,实验分为对照组、Du145 NC 组(转染 siRNA-NC)、Du145-siRNA 组(转染 siRNA-E2F3)。Transwell 侵袭实验和划痕实验检测细胞迁移、侵袭能力,蛋白质印迹法(western blot)检测细胞中 E2F3、钙黏蛋白 E(E-cadherin)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白的表达量。**结果**　转染 siRNA-E2F3 后,Du145 细胞中 E2F3 蛋白的表达量显著低于对照组($P < 0.01$);Du145-siRNA 组细胞的侵袭数目、划痕愈合率显著低于对照组($P < 0.01$);Du145-siRNA 组细胞中 E-cadherin 蛋白表达上调($P < 0.01$),MMP-9 蛋白表达下调($P < 0.01$)。**结论**　干扰 E2F3 可降低前列腺癌 Du145 细胞的迁移和侵袭能力,该作用可能通过调控 E-cadherin 和 MMP-9 蛋白表达实现的。

【关键词】 E2F3;前列腺癌;侵袭;迁移;E-cadherin

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 04-0088-05

doi: 10.3969/j.issn.1671 – 7856. 2018.04.015

Effect of E2F3 gene interfering on the invasion and migration of prostate cancer cells

JIANG Yufeng, ZHANG Wei*, LI Hang, ZHANG Lu

(Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effect of interfering with E2F3 gene expression on the invasion and migration of prostate cancer cells and its mechanism. **Methods**　The expression of E2F3 gene in human prostate cancer Du145 cells was knocked down by siRNA. The cells were divided into three groups: control group, Du145 NC group (siRNA-NC) and Du145-siRNA group (siRNA-E2F3). Cell migration and invasion were detected by Transwell invasion and wound healing assay. The expressions of E2F3, E-cadherin and MMP-9 proteins were detected by western blotting. **Results**　After transfection, the expression of E2F3 protein in the Du145-siRNA group was significantly lower than the control group ($P < 0.01$). The number of invasive cells and wound healing rate of Du145 cells in the Du145-siRNA group were significantly lower than the control group ($P < 0.01$). Furthermore, the protein expression of E-cadherin was significantly increased ($P < 0.01$) while MMP-9 decreased ($P < 0.01$) in the Du145-siRNA group. **Conclusions**　E2F3 silencing can inhibit the invasion and migration ability of prostate cancer Du145 cells, and this might be accomplished by regulating E-cadherin and MMP-9 protein.

【**Key words**】 E2F3; prostate cancer cells; invasion; migration; E-cadherin

[作者简介]蒋昱枫(1979—),男,本科,主管检验师,研究方向:前列腺癌的临床治疗研究。E-mail: jsjyf79@163.com

[通信作者]张炜(1971—),女,硕士,副主任检验师,研究方向:前列腺男科,男性不育。E-mail: zebra990@163.com

前列腺癌是一种发生于男性泌尿系统的恶性肿瘤,在欧美国家男性的发病率和死亡率较高。据统计,前列腺癌的发病率和死亡率居欧美国家男性患者的第 1 位和第 2 位[1]。近年来,随着老龄化问题的出现和人们生活方式的改变,我国前列腺癌的发病率逐渐上升[2-3],严重威胁着男性的生命健康。研究表明,未发生转移的前列腺癌患者的 5 年生存率可达到 100% 左右,但已发生远处转移的患者 5 年生存率仅为 28%[4]。研究表明前列腺癌侵袭、迁移的过程受到多种癌基因的调控,但其具体的作用机制还不完全清楚。E2F 转录因子家族包括 8 个成员(E2F1-8),可活化早期区域 2(E2)启动子,通过调控细胞周期参与细胞的生长、分化过程。核转录因子 E2F3 是 E2F 家族的成员之一,参与细胞生长、分化等过程,从而调控肿瘤的发生、发展[5]。但在前列腺癌中关于 E2F3 的研究较少,因此本实验通过研究干扰 E2F3 基因表达对前列腺癌 Du145 细胞侵袭、迁移的影响及其可能的作用机制,以期为前列腺癌的治疗提供理论基础。

1　材料和方法

1.1　材料

人前列腺癌细胞系 Du145 购自美国 ATCC 公司。

1.2　主要试剂

RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清、青霉素、链霉素购自美国 HyClone 公司;胰蛋白酶购自上海谱振生物科技有限公司;Lipofectamine™ 2000 转染试剂、Transwell 小室购自美国 Millipore 公司;siRNA-NC 或 siRNA-E2F3 购自上海吉玛有限公司;E2F3 抗体、钙黏蛋白 E(E-cadherin)抗体、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloprotease-9, MMP-9)抗体购自美国 Epitomics 公司;β 肌动蛋白(β-actin)抗体、HRP 标记羊抗兔二抗购自美国 Abcam 公司。

1.3　实验方法

1.3.1　细胞的培养

前列腺癌细胞 Du145 置于 RPMI-1640 培养基培养,加入 10% 的胎牛血清、青霉素和链霉素,确保细胞培养过程的无菌性,在 5% CO_2、37℃ 培养箱中培养过夜。每天观察细胞的生长状态,取生长状态良好的细胞用于后续实验。

1.3.2　转染细胞

转染前 24 h,取对数期 Du145 细胞接种于 24 孔板上,每孔 1×10^5 个细胞,培养于细胞培养箱中,待细胞密度达到 90%~95% 左右进行转染。弃去完全培养基,加入 400 μL Opti-MEM 培养基。0.8 μg siRNA-NC 或 siRNA-E2F3 与 50 μL Lipofectamine™ 2000 混合均匀,37℃ 结合 20 min,将形成的 siRNA-E2F3-Lipofectamine™ 2000 复合物加入 24 孔板中,培养 6~8 h,将培养基更换为完全培养基,细胞培养箱中培养 48 h 进行其它实验。实验分为对照组,Du145 NC 组,Du145-siRNA 组,蛋白质印迹法(western blot)检测转染效率。

1.3.3　细胞划痕实验检测细胞的迁移能力

取 8×10^5 个生长状态良好的对数期细胞接种到 6 孔板中,37℃ 培养箱中培养至细胞密度达到 90% 左右,200 μL 消毒枪头划线,弃去液体,更换为不含血清的培养基,ImageJ 1.48 软件观察细胞 0、48 h的划痕距离,根据 0、48 h 划痕距离计算细胞的划痕愈合率,实验重复 3 次。

1.3.4　Transwell 侵袭实验检测细胞的侵袭能力

实验前,稀释 Matrigel 胶,每 1 cm^2 Transwell 小室加入 200 μL Matrigel 胶,37℃ 通风 30 min 备用。细胞饥饿处理 24 h,0.25% 胰酶消化,离心,不含血清的培养基重悬细胞,以每孔 5×10^5 个细胞接种到 Transwell 小室上室中,下室中加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的培养基(作为趋化因子),37℃ 培养箱继续孵育 24 h,棉签擦去小室中未穿过滤膜的细胞,1% 甲醇固定,苏木精染色,随机选取 5 个视野计算细胞的数量,每组 5 个复孔,取平均值代表侵袭数目。

1.3.5　Western Blot 检测 E-cadherin、MMP-9 蛋白的表达

离心,收集细胞,PBS 缓冲液清洗 2 次,加入 200 μL RIPA 细胞裂解液,在冰上冷却 30 min,12 000 r/min离心 20 min,取上清至一无菌的 Ep 管中,按 BAC 试剂说明书进行蛋白质定量。取 100 μL 蛋白提取液加入 5 μL 溴酚蓝混合均匀,置于沸水中煮沸 10 min。配置 10% 的分离胶和 5% 的积层胶,加入 20 μg 样品蛋白,70 V 电泳直至蛋白质进入积层胶,将电压调整至 100 V,电泳至溴酚蓝到分离胶底部。切除多余凝胶,在转移盒中将蛋白质转移至甲醇浸泡的 PVDF 膜上。将带有目的条带的 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶封闭 1~

1.5 h,弃去封闭液。加入一抗,4℃孵育过夜,加入 25 mL TBST 清洗 3 次,每次 10 min,加入二抗,室温下结合 45 min,加入 25 mL TBST 清洗 3 次,每次 15 min。加入化学发光剂,反应 1 min,暗室中曝光 1 min,以 β-actin 为内参,凝胶成像仪扫描蛋白质的灰度值。

1.4 统计学方法

SPSS 22.0 软件进行统计学分析,结果以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组比较用 LSD-T 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 转染后细胞中 E2F3 蛋白的表达量

结果如图 1、表 1 所示,转染 siRNA-E2F3 后,前列腺癌 Du145 细胞中 E2F3 蛋白的表达水平较对照组明显下降($t = 7.526$, $P < 0.01$),Du145 NC 组细胞中 E2F3 蛋白的表达量差异无显著性($P > 0.05$)。

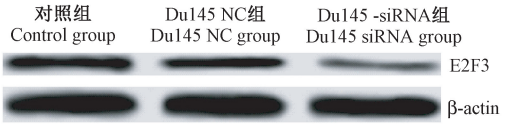

图 1 转染后细胞中 E2F3 蛋白的表达量

Fig. 1 Expression of E2F3 protein in the transfected cells

表 1 转染后细胞中 E2F3 蛋白的表达量

Tab. 1 Expression of E2F3 protein in the transfected cells

组别 Groups	E2F3 蛋白相对表达量 Relative expression of E2F3 protein
对照组 Control group	0.652 ± 0.083
Du145 NC 组 Du145 NC group	0.587 ± 0.064
Du145-siRNA 组 Du145-siRNA group	0.243 ± 0.048 *
F	32.716
P	0.001

注:与对照组相比,*$P < 0.01$。

Note. Compared with the control group, *$P < 0.01$.

2.2 干扰 E2F3 基因表达对细胞迁移能力的影响

结果如表 2 所示,Du145-siRNA 组细胞划痕愈合率较对照组明显下降($t = 5.335$, $P < 0.01$);与对照组相比,Du145 NC 组细胞划痕愈合率差异无显著性($P > 0.05$)。说明沉默 E2F3 表达后降低了前列腺癌细胞的迁移能力。

2.3 干扰 E2F3 基因表达对细胞侵袭能力的影响

结果如表 3 所示,Du145-siRNA 组细胞侵袭数目显著低于对照组($t = 4.133$, $P < 0.01$);Du145 NC 组细胞侵袭数目较对照组差异无显著性($P > 0.05$)。说明沉默 E2F3 表达后降低了前列腺癌细胞的侵袭能力。

表 2 干扰 E2F3 基因表达对细胞迁移能力的影响

Tab. 2 Effect of interference of E2F3 gene expression on the cell migration ability

组别 Groups	划痕愈合率(%) Scratch healing rate
对照组 Control group	42.768 ± 6.775
Du145 NC 组 Du145 NC group	45.369 ± 5.851
Du145-siRNA 组 Du145-siRNA group	18.269 ± 3.840 *
F	21.206
P	0.002

注:与对照组相比,*$P < 0.01$。

Note. Compared with the control group, *$P < 0.01$.

表 3 干扰 E2F3 基因表达对细胞侵袭能力的影响

Tab. 3 Effect of interference of E2F3 gene expression on the cell invasiveness

组别 Groups	侵袭细胞数(个) Number of invading cells (unit)
对照组 Control group	135.247 ± 26.789
Du145 NC 组 Du145 NC group	128.598 ± 23.856
Du145-siRNA 组 Du145-siRNA group	62.823 ± 9.752 *
F	10.438
P	0.011

注:与对照组相比,*$P < 0.01$。

Note. Compared with the control group, *$P < 0.01$.

2.4 干扰 E2F3 基因表达对细胞 E-cadherin、MMP-9 蛋白的表达的影响

结果如表 4、图 2 所示,与对照组相比,Du145-siRNA 组细胞中 E-cadherin 蛋白的表达量显著升高($t = 9.887$, $P < 0.01$),MMP-9 蛋白的表达量显著下降($t = 8.362$, $P < 0.01$);对照组和 Du145 NC 组中 E-cadherin、MMP-9 的表达无显著性差异($P > 0.05$)。

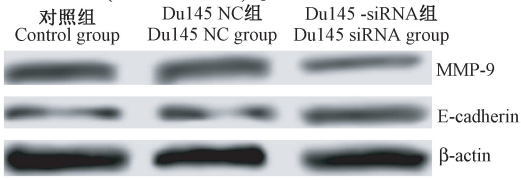

图 2 干扰 E2F3 基因表达对细胞 E-cadherin、MMP-9 蛋白的表达的影响

Fig. 2 Effect of interference of E2F3 gene expression on the expression of E-cadherin and MMP-9 proteins in the cells

表 4　干扰 E2F3 基因表达对细胞 E-cadherin、MMP-9 蛋白的表达的影响

Tab. 4　Effect of interference of E2F3 gene expression on the expression of E-cadherin and MMP-9 proteins in the cells

组别 Groups	E-cadherin 相对表达量 Relative expression of E-cadherin	MMP-9 相对表达量 Relative expression of MMP-9
对照组 Control group	0.236 ± 0.045	0.862 ± 0.092
Du145 NC 组 Du145 NC group	0.258 ± 0.062	0.874 ± 0.076
Du145-siRNA 组 Du145-siRNA group	0.759 ± 0.082 *	0.352 ± 0.050 *
F	62.536	47.736
P	0.000	0.000

注：与对照组相比，$^{*}P < 0.01$。

Note. Compared with the control group, $^{*}P < 0.01$.

3　讨论

前列腺癌是一种男性常见的恶性肿瘤，在美国、欧洲等国家的发病率较高[6]。前列腺癌发生与多种因素相关，比如饮食习惯的改变、年龄的增长均可诱发前列腺癌[7]。目前，前列腺癌常用的治疗方式有内分泌治疗、手术、放化疗等[8]。但大部分前列腺癌发现时已是晚期，发生了远处转移，丧失了内分泌治疗、手术等根治性治疗的机会[9]。化学药物治疗易产生耐药性，放射治疗易产生毒副作用，因此寻找抑制前列腺癌侵袭和转移的治疗靶点具有重要意义。E2F3 在前列腺癌组织中的表达量高于良性前列腺组织，其表达量随着临床分期和病理恶性程度的进展而逐渐升高，提示 E2F3 基因参与前列腺癌的发生、发展，其表达量增加表明肿瘤的恶性程度和侵袭、迁移性较高[10]。本研究通过 siRNA 技术沉默前列腺癌细胞中 E2F3 的表达；细胞划痕和 Transwell 小室侵袭实验表明，干扰 E2F3 基因表达后，Du145 细胞的侵袭、迁移能力显著降低。因此，在前列腺癌的分子靶向治疗中，E2F3 可作为一个重要的基因靶点。

E-cadherin 是钙粘素家族的成员之一，不仅维持细胞间的物理性连接，还对上皮细胞特性的保持具有重要作用[11]。E-cadherin 丢失使上皮细胞间的极性和粘附能力丢失，呈现非上皮细胞的特性。E-cadherin 的表达量降低，会使细胞间的粘附能力降低，细胞易发生脱落[12]。研究表明 E-cadherin 的表达量与多种肿瘤的分化程度呈现正相关，参与肿瘤的侵袭、迁移过程[13-15]。基质金属蛋白酶（matrix metalloprotease, MMPs）是一类锌依赖性内切酶，可促进细胞外基质和基底膜的降解，其表达量上调可增强多种癌细胞的侵袭、迁移能力[16]。MMP-9 是 MMPs 家族的重要成员，有研究认为 MMP-9 与肿瘤的侵袭、迁移能力关系最密切和直接[17]。既往研究表明 MMP-9 的表达量与前列腺癌病理学分级和临床分期具有相关性，参与前列腺癌的侵袭和转移过程[18-19]。本研究结果表明，干预 E2F3 表达可下调前列腺癌细胞中 MMP-9 蛋白的表达水平，上调 E-cadherin 蛋白的表达水平。提示干预 E2F3 表达可能通过降低 MMP-9 表达，增加 E-cadherin 表达而降低前列腺癌 Du145 细胞的侵袭、迁移能力。

综上所述，干预 E2F3 表达可能通过调控 MMP-9 蛋白和 E-cadherin 蛋白表达参与前列腺癌细胞的侵袭、迁移过程，提示 E2F3 可作为治疗前列腺癌转移的分子靶点。

参考文献：

[1] Wong MC, Goggins WB, Wang HH, et al. Global incidence and mortality for prostate cancer: Analysis of temporal patterns and trends in 36 countries [J]. Eur Urol, 2016, 70(5): 862-874.

[2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[3] 陈万青，郑荣寿，张思维，等. 2013 年中国老年人群恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中华肿瘤杂志，2017，39(1)：60-66.

[4] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.

[5] 张雅旋，董庆生，张瑞，等. E2F2 基因在胶质瘤中的表达及其对胶质瘤细胞生长与代谢的影响 [J]. 江苏医药，2014，40(16)：1861-1864.

[6] 崔发财，陈瑜，秦望森. 沉默 CHD1L 对前列腺癌 PC3 细胞恶性生物学行为的影响及其可能机制 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2017，24(5)：484-489.

[7] Wang Z, Li Y, Banerjee S, et al. Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-κB signaling pathways [J]. J Cell Biochem, 2016, 117(8): 1960.

[8] Guinney J, Wang T, Laajala TD, et al. Prediction of overall survival for patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: development of a prognostic model through a crowdsourced challenge with open clinical trial data [J]. Lancet Oncol, 2017, 18(1): 132 – 142.

[9] Dart AE, Worth DC, Muir G, et al. The drebrin/EB3 pathway drives invasive activity in prostate cancer [J]. Oncogene, 2017, 36(29): 4111 – 4123.

[10] 梁辰, 王萍, 金由辛, 等. p53/miR – 34a 调控网络在肿瘤中的作用 [J]. 生命科学, 2016, 28(4): 464 – 469.

[11] Labernadie A, Kato T, Brugués A, et al. A mechanically active heterotypic E-cadherin /N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion [J]. Nat Cell Biol, 2017, 19(3): 224 – 237.

[12] Bolós V, Peinado H, Pérez-Moreno MA, et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors [J]. J Cell Sci, 2003, 1116(Pt 3): 499 – 511.

[13] Wang L, Song G, Tan W, et al. miR-573 inhibits prostate cancer metastasis by regulating epithelial-mesenchymal transition [J]. Oncotarget, 2015, 6(34): 35978 – 35990.

[14] Zuo J, Guo Y, Peng X, et al. Inhibitory action of pristimerin on hypoxia-mediated metastasis involves stem cell characteristics and EMT in PC-3 prostate cancer cells [J]. Oncol Rep, 2015, 33(3): 1388 – 1394.

[15] 邹颖, 邝紫桥, 陈欣欣, 等. Sam68 基因过表达可促进乳腺癌 MCF-7 细胞发生上皮-间质转化 [J]. 肿瘤, 2017, 37(1): 12 – 18.

[16] Grünwald B, Vandooren J, Gerg M, et al. Systemic ablation of MMP-9 triggers invasive growth and metastasis of pancreatic cancer via deregulation of IL6 expression in the bone marrow [J]. Mol Cancer Res, 2016, 14(11): 1147 – 1158.

[17] Aroui S, Najlaoui F, Chtourou Y, et al. Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway [J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 3831 – 3839.

[18] 张延伦, 张刚, 张晏, 等. VIP 与 MMP-9 在前列腺癌组织中的表达及意义 [J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2012, 4(1): 38 – 40.

[19] 刘彼得, 顾晓, 周广臣, 等. TMPRSS2-ERG 及 MMP-9 基因对前列腺癌侵袭性的影响[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(4): 508 – 512.

〔收稿日期〕2017 – 10 – 19

(上接第 80 页)

[12] Yu L, Fan Y, Ye G, et al. Curcumin inhibits apoptosis and brain edema induced by hypoxia-hypercapnia brain damage in rat models [J]. Am J Med Sci, 2015, 349(6): 521 – 525.

[13] 赵荣,刘江伟,许永华, 等. 姜黄素对沙漠干热环境中暑大鼠脑损伤的保护作用研究 [J]. 实验动物科学, 2016, 33(6): 21 – 24.

[14] 龙鸿川, 阚奇伟, 刘泗军, 等. 高压氧治疗脑外伤后综合征 213 例疗效观察 [J]. 海南医学, 2012, 23(8): 49 – 51.

[15] Lvovskaya EI, Derginskyi NV, Sadova VA, et al. Prognostic value of the parameters of free radical oxidation in traumatic brain injury [J]. Biomed Khim, 2016, 62(1): 107 – 111.

[16] Yuan Y, Zhang X, Zheng Y, et al. Regulation of mitophagy in ischemic brain injury [J]. Neurosci Bull, 2015, 31(4): 395 – 406.

[17] Apostolova N, Victor VM. Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: therapeutic implications [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(8): 686 – 729.

[18] Hassan W, Noreen H, Khalil S, et al. Ethanolic extract of Nigella sativa protects Fe(II) induced lipid peroxidation in rat's brain, kidney and liver homogenates [J]. Pak J Pharm Sci, 2016, 29(1): 231 – 237.

[19] Dudek H, Farbiszewski R, Rydzewska M, et al. Evaluation of antioxidant enzymes activity and concentration of non-enzymatic antioxidants in human brain tumours [J]. Wiad Lek, 2004, 57(1 – 2): 16 – 19.

[20] Dudek H, Farbiszewski R, Rydzewska M, et al. Concentration of glutathione (GSH), ascorbic acid (vitamin C) and substances reacting with thiobarbituric acid (TBA-rs) in single human brain metastases [J]. Wiad Lek, 2005, 58(7 – 8): 379 – 381.

[21] McLafferty FS, Barmparas G, Ortega A, et al. Predictors of improved functional outcome following inpatient rehabilitation for patients with traumatic brain injury [J]. Neuro Rehab, 2016, 39(3): 423 – 430.

[22] Wu H, Kong L, Tan Y, et al. C66 ameliorates diabetic nephropathy in mice by both upregulating NRF2 function via increase in miR-200a and inhibiting miR-21 [J]. Diabetologia, 2016, 59(7): 1558 – 1568.

[23] Tapia E, García-Arroyo F, Silverio O, et al. Mycophenolate mofetil and curcumin provide comparable therapeutic benefit in experimental chronic kidney disease: role of Nrf2-Keap1 and renal dopamine pathways [J]. Free Radic Res, 2016, 50(7): 781 – 792.

[24] Lu XY, Wang HD, Xu JG, et al. Deletion of Nrf2 exacerbates oxidative stress after traumatic brain injury in mice [J]. Cell Mol Neurobiol, 2015, 35(5): 713 – 721.

〔收稿日期〕2017 – 04 – 18