

网络出版时间: 2020 - 5 - 8 15: 44 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200507.0934.017.html

CD147 通过 Wnt/ β -catenin 途径抑制前列腺癌细胞对多西紫杉醇敏感性

方芳¹, 徐海月², 李强¹, 陈爽¹, 王立国³

摘要 目的 探讨 CD147 在多西紫杉醇 (DOC) 对前列腺癌细胞敏感性的作用及机制。方法 实验分为对照组 (PC-3/Scramble) 和 RNAi 干扰 CD147 组 (PC-3/shCD147)。DOC 作用细胞 72 h, MTT 法检测 DOC 对细胞的生长影响; 流式细胞术检测细胞凋亡情况; Western blot 法检测 β -连环蛋白 (β -catenin) 和 P 糖蛋白 (P-gp) 表达。结果 DOC 作用 PC-3/Scramble 细胞的 IC₅₀ 值 (12.47 ± 1.71) μ mol/L 明显高于 PC-3/shCD147 细胞的 IC₅₀ 值 (2.38 ± 0.13) μ mol/L。

5 μ mol/L DOC 诱导 PC-3/Scramble 细胞的凋亡率是 (8.75 ± 0.75) % , 低于 PC-3/shCD147 细胞 (16.1 ± 0.95) % (P < 0.01); 5 μ mol/L DOC 作用细胞后, PC-3/shCD147 细胞中 β -catenin 和 P-gp 表达低于 PC-3/Scramble 细胞 (P < 0.01); 与 PC-3/shCD147 细胞比较, Wnt 途径激活剂 LiCl 作用细胞后细胞存活率升高 (P < 0.01) β -catenin 和 P-gp 表达增加 (P < 0.01)。结论 CD147 通过 Wnt/ β -catenin 信号途径降低前列腺癌 PC-3 细胞对 DOC 的敏感性。

关键词 CD147; 多西紫杉醇; 前列腺癌; 细胞耐药; Wnt/ β -catenin 信号途径

中图分类号 R 737.25

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2020)05 - 0740 - 05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2020.05.017

2020 - 02 - 22 接收

基金项目: 吉林省卫生技术创新项目(编号: 2016J100); 吉林省科技厅重点科技攻关项目(编号: 20160204033YY)

作者单位: ¹ 吉林医药学院检验学院医学免疫学技术教研室, 吉林 132013

² 延边大学医学院免疫教研室, 延边 133002

³ 吉林医药学院附属医院, 吉林 132013

作者简介: 方芳, 女, 博士, 教授;

王立国, 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: urolancet@sina.com

随着生活方式的改变, 我国前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 的发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[1]。雄激素阻断疗法 (androgen deprivation therapy, ADT) 是中晚期 PCa 主要治疗手段。然而, 大多

The study of key factors for in-situ reduction of nano-silver on dopamine-modified surface

Xu Kehui, Wang Shuang, Cui Wendi, et al

(Stomatologic College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Teaching and Research Section of Dental Materials, Anhui Province
Key Laboratory of Oral Diseases Research, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the key regulatory factors for in situ liquid phase reduction of nano-silver on dopamine surface and to evaluate the antimicrobial properties of the prepared surface. **Methods** The dopamine-modified micro-nanoporous titanium discs were immersed in silver nitrate solution with various concentrations and pH values to prepare different nano-silver modified surfaces. The surface properties were evaluated by scanning electron microscopy, atomic emission spectrometry and static water contact angle. Antibacterial activity was evaluated by the turbidity method, coating plate method, inhibition zone and live/dead bacterial staining. **Results** Compared with acidic and neutral environments, alkaline environments significantly promoted the deposition of silver nanoparticles, and the deposited nano-silver were smaller in size and more evenly distributed. The quantity of silver loaded on the surface was positively correlated with the concentration of silver nitrate in the solution. The antibacterial ability of the constructed surface was greatly enhanced with the increase of pH and silver concentration. **Conclusion** The pH value of solution has a stronger effect on in situ reduction of nanosilver compared to the concentration of silver ions, and high pH value is conducive to the preparation of good antibacterial surface for inhibiting infection.

Key words dopamine; silvernanoparticles; pH value; silver concentration

数患者在接受 ADT 治疗 2~3 年内由雄激素依赖性前列腺癌 (androgen-dependent prostate cancer, AD-PC) 转化为生存期短、易转移和侵袭的去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC), 中位生存期只有 1~2 年。多西紫杉醇 (docetaxel, DOC) 是治疗 CRPC 的一线化疗药物, 能有效提高患者生存率, 但效果较短暂, 极易产生耐药, 从而影响临床治疗的效果。因此, 克服 DOC 的耐药问题有望改善 CRPC 难治的现状。

细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 (extracellular metalloproteinase inducer, EMMPRIN), 又称 CD147。CD147 属于跨膜免疫球蛋白超家族成员, 过表达在多种肿瘤细胞表面。CD147 参与肿瘤细胞增殖、转移和侵袭等作用^[2-3]。研究^[4]表明, 在化疗药物抵抗的肿瘤细胞中 CD147 表达增高。CD147 表达阳性的肿瘤患者接受铂类化合物治疗后生存期短、预后差^[5]。该研究旨在探讨 CD147 在前列腺癌细胞 DOC 耐药中的作用, 并对其可能机制进行初步研究, 从而为逆转 PCa 对 DOC 化疗耐药提供新的研究靶点。

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂 人前列腺癌 PC-3 细胞购自上海中科院细胞库; DOC 和溴化四氮唑蓝购自美国 Sigma 公司; 细胞核蛋白提取试剂盒和 Annexin V/碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 凋亡检测试剂盒购自南京碧云天生物有限公司; DMEM-F12 培养基及胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 购自美国 Gibco 公司; β -连环蛋白 (β -catenin)、P 糖蛋白 (P-glycolprotein, P-gp) 和 β -actin 抗体、Wnt 通路激活剂 LiCl 购自美国 Cell Signaling Technology 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 低表达 CD147 的实验组 PC-3 细胞 (PC-3/shCD147) 和阴性对照组细胞 PC-3 细胞 (PC-3/Scramble) 由吉林医药学院抗体工程实验室保存^[6]。细胞用 DMEM-F12 完全培养基 (含 10% 胎牛血清) 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 隔日换液。

1.2.2 MTT 法检测细胞 IC₅₀ 取对数生长期 PC-3/Scramble 细胞和 PC-3/shCD147 细胞, 调整细胞浓度为 1 × 10¹⁰/L, 体积为 200 μ l, 分别接种于 96 孔板内, 于 37 °C、5% CO₂ 条件培养 24 h。分别加入不

同浓度 (0、1.5 和 10 μ mol/L) DOC 培养液, 每组设 3 个复孔, 体外继续培养 72 h。MTT 法测定吸光度 (A) 值, 实验重复 3 次, 计算细胞抑制率: 抑制率 (%) = (1 - 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值) × 100%, 计算各组细胞 IC₅₀ 值。

1.2.3 Annexin V/PI 法检测细胞凋亡率 5 μ mol/L DOC 处理 PC-3/Scramble 和 PC-3/shCD147 细胞 24 h 后, 胰酶消化收集细胞。用预冷无菌的 PBS 充分洗涤细胞 2 次, 收集细胞调整细胞数为 5 × 10⁵ 个, 加 195 μ l Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞; 加入 5 μ l Annexin V-FITC 轻轻混匀。室温、避光孵育 10 min; 加入 10 μ l 碘化丙啶染色液, 轻轻混匀, 冰浴避光放置, 流式细胞仪进行分析。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达 取对数生长期的细胞, 5 μ mol/L DOC 处理细胞 72 h 后。加入细胞裂解液, 用细胞刮器刮取细胞, 4 °C 超声裂解细胞, 分别提取细胞总蛋白和细胞核蛋白, 收集上清液测蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 分离并转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。室温下 PVDF 膜在封闭缓冲液中 2 h, 加兔抗 β -catenin (1:1 000)、P-gp (1:1 000) 和 β -actin 抗体 (1:4 000) 4 °C 过夜。次日, TBST 洗膜, 分别加 HRP 标记的山羊抗兔抗体 (1:5 000) 室温避光孵育 2 h。TBST 洗膜, 加底物发光显影。使用 Quantity One 软件扫描并做灰度分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沉默 CD147 表达增强 PC-3 细胞对 DOC 的敏感性 分别用 1.5 和 10 μ mol/L DOC 作用细胞 72 h 后, MTT 结果表明, 与 PC-3/Scramble 细胞比较, DOC 对 PC-3/shCD147 细胞的抑制率升高, 并随 DOC 浓度的增加而增高 ($F = 11.28, P < 0.05$; $F = 397.15, P < 0.01$; $F = 60.69, P < 0.01$) (图 1)。计算 DOC 对 PC-3/Scramble 和 PC-3/shCD147 细胞 IC₅₀ 值。结果显示, PC-3/Scramble 细胞的 IC₅₀ 值为 (12.47 ± 1.71) μ mol/L, PC-3/shCD147 细胞的 IC₅₀ 值为 (2.38 ± 0.13) μ mol/L。提示 CD147 具有抑制 PC-3 细胞对 DOC 的敏感性作用。

2.2 沉默 CD147 表达促进 DOC 干预的 PC-3 细胞凋亡 通过上述实验结果, 采用 0 或 5 μ mol/L

DOC 作用细胞 24 h ,流式细胞仪对 PC-3/Scramble 和 PC-3/shCD147 细胞进行凋亡检测。结果显示 ,与 PC-3/Scramble 组细胞比较 ,5 μmol/L DOC 作用后 CD147 干扰组细胞凋亡率增高($F = 111.26, P < 0.01$) (图 2)。提示 CD147 能够抑制 PC-3 细胞在 DOC 作用下的细胞凋亡。

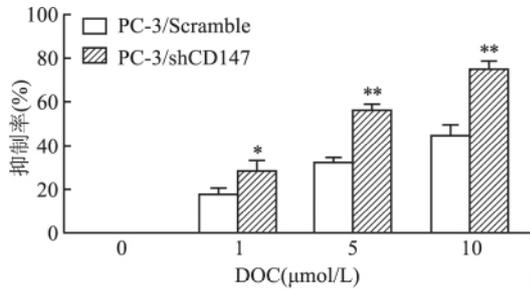


图 1 沉默 CD147 增强 DOC 抑制的 PC-3 细胞生长作用与 PC-3/Scramble 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

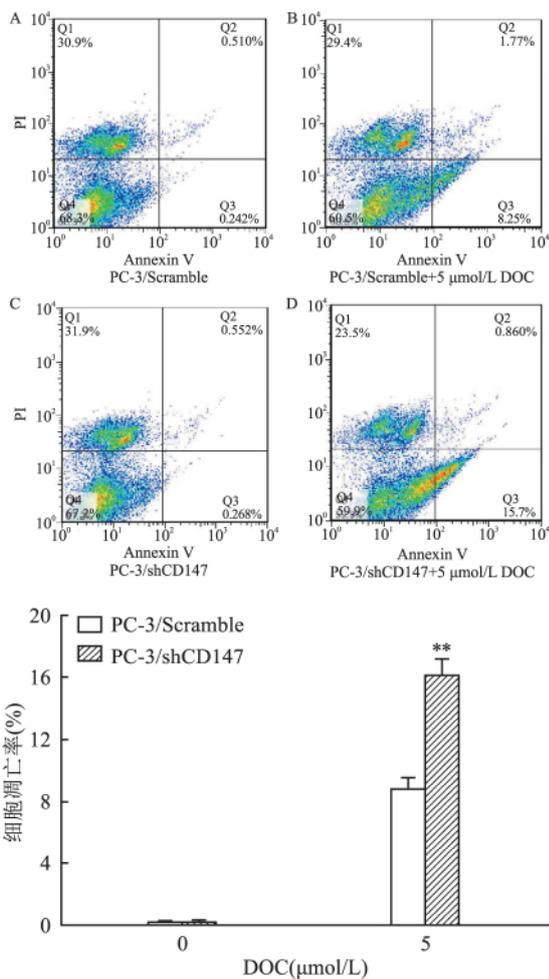


图 2 沉默 CD147 促进 DOC 作用 PC-3 细胞凋亡与 5 μmol/L DOC 作用 PC-3/Scramble 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 CD147 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路抑制

DOC 对 PC-3 细胞的敏感性 采用 0 或 5 μmol/L DOC 作用细胞 72 h ,Western blot 检测 PC-3/Scramble 和 PC-3/shCD147 细胞 β -catenin 和 P-gp 的表达。结果表明 ,与对照组 PC-3/Scramble 的 β -catenin 和 P-gp 的表达比较 ,PC-3/shCD147 细胞中 β -catenin 和 P-gp 表达下降($F = 73.83, P < 0.01$; $F = 10.97, P < 0.05$); 与 5 μmol/L DOC 作用 PC-3/Scramble 细胞比较 ,5 μmol/L DOC 作用 PC-3/shCD147 细胞导致 β -catenin 和 P-gp 的表达显著降低($F = 159.05, P < 0.01$; $F = 110.47, P < 0.01$); 与 PC-3/shCD147 细胞比较 ,5 μmol/L DOC 作用 PC-3/shCD147 细胞导致 β -catenin 和 P-gp 的表达降低($F = 160.27, P < 0.01$; $F = 8.63, P < 0.05$) (图 3)。结果提示 ,CD147 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号途径抑制 PC-3 细胞对 DOC 的敏感性作用。

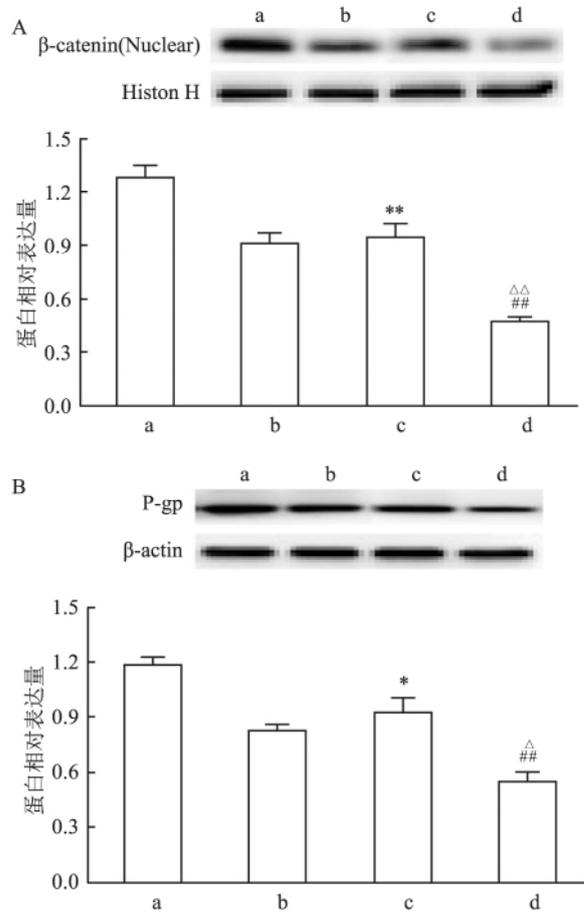


图 3 沉默 CD147 抑制 DOC 作用 PC-3 细胞 β -catenin 和 P-gp 的表达

a: PC-3/Scramble 组; b: PC-3/Scramble + DOC 组; c: PC-3/shCD147 组; d: PC-3/shCD147 + DOC 组; 与 PC-3/Scramble 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 5 μmol/L DOC 作用 PC-3/Scramble 细胞比较: ## $P < 0.01$; 与 PC-3/shCD147 细胞比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

为了进一步证实 Wnt/ β -catenin 信号通路参与

CD147 降低 PC-3 细胞对多西紫杉醇的敏感性。Wnt 信号通路激活剂氯化锂 (LiCl) (10 $\mu\text{mol/L}$) 作用 5 $\mu\text{mol/L}$ DOC 干预的 PC-3/shCD147 细胞 6 h, MTT、Western blot 检测结果显示, PC-3/shCD147 细胞抑制率为 (50.4 \pm 4.16)%, LiCl 干预 PC-3/shCD147 细胞组的抑制率为 (28.7 \pm 3.9)%, 两组比较具有显著差异 ($F = 43.53$, $P < 0.01$)。与 PC-3/shCD147 细胞 β -catenin 和 P-gp 表达比较, LiCl 干预的 PC-3/shCD147 细胞后 β -catenin 和 P-gp 的表达增加 ($F = 43.14$, $P < 0.01$; $F = 95.45$, $P < 0.01$) (图 4)。

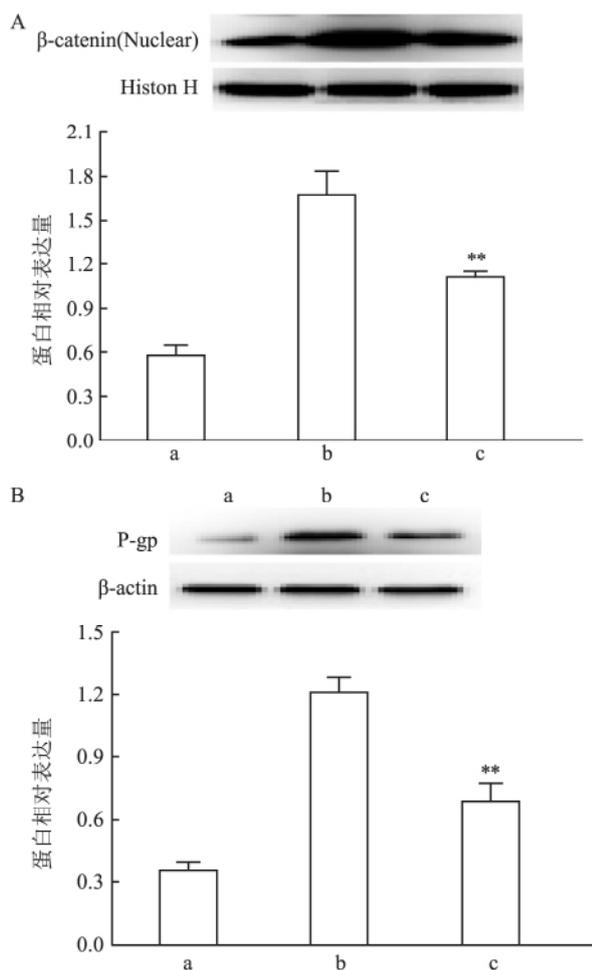


图 4 LiCl 促进沉默 CD147 抑制 DOC 作用的 PC-3 细胞 β -catenin 和 P-gp 的表达

a: PC-3/shCD147 组; b: LiCl 组; c: PC-3/shCD147 + LiCl 组; 与 PC-3/Scramble 细胞比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

化疗是治疗 CRPC 的主要方法。自 2004 年美国食品及药品管理局批准 DOC 用于 CRPC 的治疗,

目前已成为 CRPC 的一线治疗药物,能有效提高患者的生存率。但药物治疗最大障碍之一是多数患者都会对 DOC 产生耐药性,从而影响临床治疗效果。克服 CRPC 的耐药问题,将改善 CRPC 的治疗困境。研究^[7-10]表明,DOC 引起的耐药机制比较复杂,包括凋亡信号通路的改变、微管蛋白的突变、铜转运蛋白的过表达、P-gp 和多药耐药相关蛋白等改变。以及 PI3K/Akt、MAPK 和 Wnt/ β -catenin 多信号通路参与肿瘤的细胞耐药^[10-13]。P-gp 是导致肿瘤细胞耐药的重要分子之一。研究^[14]发现,在 DOC 耐药的 CRPC 细胞 DU-145R 中 P-gp 的表达水平明显高于它们的亲代细胞 DU-145,并且应用 P-gp 抑制剂能够一定程度上逆转 DU-145R 细胞对 DOC 的耐药性。在 CRPC 细胞 PC-3 中沉默 P-gp 的表达,PC-3 细胞对 DOC 的敏感性明显增强^[14]。

CD147 是在 PCa 细胞中高表达,是促进肿瘤细胞转移和侵袭的重要分子。研究^[15-16]表明,在头颈鳞状细胞癌和宫颈癌细胞中抑制 CD147 的表达能够促进对多西紫杉醇的药物敏感性。并且我国学者已经利用 CD147 单克隆抗体干预宫颈癌细胞后能够逆转细胞对紫杉醇的天然耐药^[16]。证实 CD147 可能是一个理想的能够抑制细胞多西紫杉醇耐药的靶点。本研究发现,沉默 CD147 的表达能够提高 CRPC 细胞 PC-3 对 DOC 的敏感性,导致细胞凋亡升高。课题组前期研究^[17]表明,沉默 CD147 能够抑制 LNCaP 细胞 β -catenin 转位到细胞核中。因此,本研究推测本课题组推测 CD147 可能通过 Wnt/ β -catenin 途径抑制 PC-3 细胞对多西紫杉醇的敏感性。本实验结果表明,在 PC-3 细胞中沉默 CD147 导致 β -catenin 在细胞核中的表达同样被降低,并且 β -catenin 的下游基因 P-gp 表达下降;DOC 作用 PC-3/shCD147 细胞,导致 β -catenin 和 P-gp 表达进一步下降。结果提示 CD147 可能通过 Wnt/ β -catenin 途径参与调解 PC-3 细胞对 DOC 的敏感性。为了进一步探讨 CD147 通过 Wnt- β -catenin 途径抑制 PC-3 细胞对 DOC 敏感性,使用 Wnt 信号通路激活剂 LiCl 作用细胞。与 PC-3/shCD147 组比较, LiCl 减弱了沉默 CD147 导致 DOC 作用的 PC-3 细胞存活率下降,促进 β -catenin 和 P-gp 的表达。

综上所述,CD147 能够导致前列腺癌细胞对 DOC 的敏感性降低,该作用可能通过 Wnt/ β -catenin 信号转导通路实现。

参考文献

[1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA

- Cancer J Clin ,2014 ,64(1) :9 - 29.
- [2] Obchoei S , Sawanyawisuth K , Wonqkham C , et al. Secreted cyclophilin a mediates G1/S phase transition of cholangiocarcinoma cells *via* CD147/ERK1/2 pathway [J]. *Tumour Biol* , 2015 ,36(2) :849 - 59.
- [3] Kong L M , Liao C G , Zhang Y , et al. A regulatory loop involving miR-22 , Sp1 , and c-Myc modulates CD147 expression in breast cancer invasion and metastasis [J]. *Cancer Res* , 2014 ,74(14) :3764 - 78.
- [4] Yang J M , Xu Z , Wu H , et al. Overexpression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in multidrug resistant cancer cells [J]. *Mol Cancer Res* , 2003 ,1(6) :420 - 7.
- [5] Afonso J , Santos L L , Miranda-Goncalves V , et al. CD147 and MCT1-potential partners in bladder cancer aggressiveness and cisplatin resistance [J]. *Mol Carcinog* , 2015 ,54(11) :1451 - 66.
- [6] Fang F , Wang L , Zhang S , et al. CD147 modulates autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer PC3 cells [J]. *Oncol Lett* 2015 ,9(3) :1439 - 43.
- [7] Yang Y , Li S , Sun Y , et al. Reversing platinum resistance in ovarian cancer multicellular spheroids by targeting Bcl-2 [J]. *Oncotargets Ther* , 2019 ,12: 897 - 906.
- [8] Girolimetti G , Guerra F , Lommarini L , et al. Platinum-induced mitochondrial DNA mutations confer lower sensitivity to paclitaxel by impairing tubulin cytoskeletal organization [J]. *Hum Mol Genet* , 2017 ,26(15) :2961 - 74.
- [9] Mangala L S , Zuzel V , Schmandt R , et al. Therapeutic targeting of ATP7B in ovarian carcinoma [J]. *Clin Cancer Res* , 2009 ,15(11) :3770 - 80.
- [10] Teodori E , Dei S , Bartolucci G , et al. Structure-activity relationship studies on 6,7-dimethoxy-2-phenethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives as multidrug resistance reversers [J]. *Chem Med Chem* , 2017 ,12(16) :1369 - 79.
- [11] Dong J , Zhai B , Sun W , et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/snail signaling pathway contributes to epithelial-mesenchymal transition-induced multi-drug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Plos One* , 2017 ,12(9) :e0185088.
- [12] Riahi-Chebbi I , Souid S , Othman H , et al. The phenolic compound kaempferol overcomes 5-fluorouracil resistance in human resistant LS174 colon cancer cells [J]. *Sci Rep* , 2019 ,9(1) :195.
- [13] 高原, 刘赞, 张秀伟, 等. Wnt/ β -catenin 信号转导通路与肺腺癌顺铂耐药作用机制研究 [J]. *中华肿瘤预防杂志* , 2014 ,21(11) :805 - 10.
- [14] 张赛, 邱明宁, 汤焕城, 等. 去势抵抗性前列腺癌发生多西紫杉醇耐药的相关机制及其治疗进展 [J]. *肿瘤* , 2016 ,36(10) :1165 - 70.
- [15] Ma C , Wang J , Guo Y. Inhibition of CD147 expression promotes chemosensitivity in HNSCC cells by deactivating MAPK/ERK signaling pathway [J]. *Exp Mol Pathol* , 2017 ,102(1) :59 - 64.
- [16] 胡芸, 吴宜林. CD147 单克隆抗体对 HCE1 多细胞球体紫杉醇耐药的影响 [J]. *中南大学学报(医学版)* , 2011 ,36(3) :192 - 202.
- [17] Fang F , Qing Y , Hao F , et al. CD147 modulates androgen receptor activity through the Akt/Gsk-3 β / β -catenin/AR pathway in prostate cancer cells [J]. *Oncol Lett* , 2016 ,12(2) :1124 - 8.

CD147 inhibit sensitivity of prostate cancer cells to docetaxel *via* Wnt/ β -catenin pathway

Fang Fang¹ , Xu Haiyue² , Li Qiang¹ , et al

(¹Dept of Immunology , Jilin Medical University , Jilin 132013;

²Dept of Immunology , Yanbian University , Yanbian 133002)

Abstract Objective To investigate the effect of CD147 on sensitivity of prostate cancer cells to docetaxel (DOC). **Methods** The experiment included negative control group (PC-3/Scramble) and CD147 shRNA group (PC-3/shCD147). PC-3/Scramble and PC-3/shCD147 cells were treated with DOC for 72 h. The cell proliferation was detected by MTT assay. The cell apoptosis was determined by flow cytometry. The protein expressions of β -catenin and P-glycoprotein (P-gp) were detected by Western blot. **Results** IC₅₀ values of DOC treatment in PC-3/Scramble cells (12.47 ± 1.71) μ mol/L were higher than those in PC-3/shCD147 cells (2.38 ± 0.13) μ mol/L. The 5 μ mol/L DOC induced apoptosis in PC-3/Scramble cells (8.75 ± 0.75)% was lower than that in PC-3/shCD147 cells (16.1 ± 0.95)% ($P < 0.01$). The expression of β -catenin and P-gp protein in PC-3/shCD147 cells was significantly lower than that in PC-3/Scramble cell ($P < 0.01$). Wnt pathway agonist LiCl-treated PC-3/shCD147 cells showed the increase in cell survival ($P < 0.01$) and expression levels of β -catenin and P-gp ($P < 0.01$) compared with PC-3/shCD147 cells. **Conclusion** CD147 decreases the sensitivity of prostate cancer cells to DOC *via* Wnt/ β -catenin pathway.

Key words CD147; docetaxel; prostate cancer; drug resistance of cells; Wnt/ β -catenin pathway