

FKBP5 对前列腺癌 C4-2 细胞生长的影响及机制的初步研究

胡斌¹ 尚芝群² 牛远杰²

[摘要] 目的:观察抑制 FK506 结合蛋白 5(FKBP5)基因表达和应用 FKBP5 的抑制剂 FK506 对前列腺癌细胞生长的影响,并初步探究其作用机制。方法:利用 shRNA 和 FK506 处理前列腺癌 C4-2 细胞,然后用 MTT 法检测细胞生长变化情况;通过 Western blot 检测处理过的 C4-2 细胞中 NF- κ B 信号通路中相关蛋白的变化。结果:利用 shRNA 和 FK506 抑制 C4-2 细胞中的 FKBP5 的表达后,MTT 法显示实验组细胞的增殖活性明显低于对照组($P<0.05$),FK506 对细胞生长有明显的抑制作用,并且这种作用具有浓度依赖性。在 C4-2 细胞系中,降表达 FKBP5 后发现 I κ B α 表达量增高,磷酸化的 NF- κ B 表达升高,并且胞浆的 NF- κ B 含量增多而细胞核中的 NF- κ B 明显减少。结论:抑制 FKBP5 的表达可以抑制前列腺癌 C4-2 细胞系的生长,FKBP5 的抑制剂 FK506 同样可以抑制细胞生长,FKBP5 对细胞生长的影响可能是通过调节 NF- κ B 信号通路来实现的,而 FKBP5 可能是去势抵抗性前列腺癌的一个新的治疗靶点。

[关键词] 前列腺癌;FKBP5;FK506;NF- κ B

doi:10.13201/j.issn.1001-1420.2018.08.011

[中图分类号] R737.25 **[文献标识码]** A

Preliminary study on the effect and mechanism of FKBP5 on prostate cancer C4-2 cells

HU Bin¹ SHANG Zhiquan² NIU Yuanjie²

(¹Department of Comprehensive Surgery, Tianjin Medical University General Hospital Airport Hospital, Tianjin, 300308, China; ²Tianjin Institute of Urology)

Corresponding author: HU Bin, E-mail: hubin0216@sohu.com

Abstract Objective: To observe the effect of inhibiting the FKBP5 gene on the growth of prostate cancer cells and explore the mechanism. **Method:** The growth activity of these cells were detected by MTT assay, after the C4-2 cells were treated by shRNA and FK506. We detected the proteins content change involved in the NF- κ B signaling pathway by Western blot. **Result:** After the expression of FKBP5 was decreased by shRNA or the FKBP5 was inhibited by FK506, the growth of the prostate cancer C4-2 cell decreased significantly compared with the control group by MTT assay ($P<0.05$). The inhibition of FK506 for the cell growth had the concentration dependence. In C4-2 cells, we found that the expression of I κ B α and the phosphorylated NF- κ B increased, after knockout of the FKBP5. Moreover the content of NF- κ B in the cytoplasm increased and the NF- κ B in the cell nucleus decreased. **Conclusion:** The growth of C4-2 cell can be inhibited by knockout of FKBP5 and FK506. The effect of FKBP5 on cell growth may involve the NF- κ B pathway. FKBP5 may be a new therapeutic target for prostate cancer.

Key words prostate cancer;FKBP5;FK506;NF- κ B

前列腺癌是西方国家男性最常见的恶性肿瘤之一,占男性癌症死因的第 2 位,全世界每年约有 100 万人确诊此病,占男性新发肿瘤病例的 10%^[1]。我国前列腺癌发病率及死亡率虽然较低,但近年其发病率呈快速增长趋势^[2]。因此,对前列腺癌发病机制的研究具有十分重要的意义。FK506 结合蛋白 5(FKBP5)与人类多种肿瘤的发生密切相关,并涉及到许多信号通路,这些信号通路可能在肿瘤的发生发展及抗肿瘤治疗中起着重要作用。本研究通过观察抑制 FKBP5 基因表达和

应用 FKBP5 的特异性抑制剂 FK506 对前列腺癌 C4-2 细胞生长的影响,初步探究 FKBP5 基因在去势抵抗前列腺癌中的作用及其机制,并讨论其潜在应用价值。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 一般材料

前列腺癌 C4-2 细胞:C4-2 前列腺癌细胞系由美国罗切斯特大学张传祥教授惠赠。

1.2 主要试剂和仪器

RPMI 1640 培养液,进口胎牛血清,0.05%胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司;二甲基亚砜(DMSO)购自上海华舜生物工程有限公司;转染试剂盒购自 Roche 公司;噻唑蓝(MTT),FK-506 mono-

¹天津医科大学总医院空港医院综合外科(天津,300308)

²天津市泌尿外科研究所

通信作者:胡斌,E-mail:hubin0216@sohu.com

hydrate(F4679)购自美国 Sigma 公司, shRNA-FKBP5/shRNA-CONTROL 购自美国 GeneCopoeia [CSHCTR001-mH1, HSH005563-1-mH1 (agacacagacattccaatt)];ECL 显色试剂盒购自英国 Amersham 公司;硝酸纤维素膜(PVDF 膜)购自美国 AMRESCO 公司;兔抗人 FKBP5(ab46002)多克隆抗体、鼠抗人 GAPDH(ab181603)单克隆抗体购自 Abcom 公司,二抗(驴抗兔、羊抗鼠 IgG HRP)购自 Abcom 公司;Forma CO₂ 孵箱 HW0301T-VBA 型,半干转膜仪和电泳仪(美国 BD 公司),全自动数码凝胶成像系统 Tanon-4500。

1.3 MTT 方法

取对数生长的 C4-2 细胞,在 96 孔板加入细胞 100 μ l/孔(约 2×10^3 个),置 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱培养 24 h,细胞换液后继续培养。待细胞生长到所要求时,向每孔加 50 μ l 5 mg/ml MTT 溶液,在 37℃孵育 4 h,使 MTT 还原为甲月赞。吸出上清液,每孔加 150 μ l DMSO 使甲月赞溶解,用平板摇床摇匀。酶标仪在 570 nm 波长处检测每孔的光密度值。

1.4 细胞转染方法

转染前 1 d, 5×10^4 细胞接种在 6 孔板上,2 ml 含 FBS 的基础培养基。按照试剂盒说明书配比转染试剂复合物,将 shRNA-Transfection Reagent 复合物加入到每一个包含细胞和培养基的孔中。轻柔摇动培养板充分混合。分别转染 shRNA-FKBP5(实验组)与 shRNA-control(对照组),24 h 后接种到 96 孔板。

1.5 Western blot 方法

终止细胞培养,PBS 漂洗 2 次,加入 RIPA 裂解液,充分吹打混匀,然后冰上放置 10~20 min,将匀浆液吸出放到 1.5 ml 离心管中。14 000 r/min 4℃离心 15 min,取上清液备用,BCA 比色法定量。将待测样品加热变性后按序加入到电泳槽中,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,250 mA 4℃转膜 3 h,5%脱脂牛奶室温下封闭 1 h,滴加一抗(1:1 000)4℃孵育过夜,滴加二抗(1:5 000)室温孵育 1 h。ECL 化学发光曝光,使用凝胶成像系统采集图像并分析结果。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,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 FKBP5 敲除后对 C4-2 细胞系生长的影响

前列腺癌细胞分别转染进 shRNA-FKBP5 质粒和空白质粒,并通过 Western blot 验证敲除效果(图 1)。两组细胞转染后同时培养,并统计不同时间两组细胞的生长情况,转染 4 d 后,实验组和对照组的细胞数目分别为 $(2.240 \pm 0.103) \times 10^4$ 个、 $(1.378 \pm 0.061) \times 10^4$ 个,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。这表明转染 shRNA-FKBP5 之后,C4-2 细胞增殖活性明显被抑制。

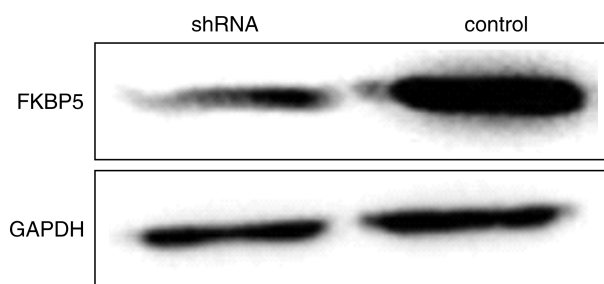


图 1 Western blot 检测 FKBP5 敲除效果

2.2 不同浓度 FK506 对 C4-2 细胞生长的影响

将细胞铺于 96 孔板,每孔约 1 000 个细胞,24 h 后,培养基中分别加入 FK506(用 DMSO 溶解),浓度分别为 0.1、1、10 μ mol/L,以 0.1% DMSO 为对照组(每组 5 个复孔)。分别培养 0、2、4、6 d 后 MTT 法测得 570 nm 处的 OD 值,显示随着 FK506 浓度的增加,C4-2 细胞的增殖活性明显受到抑制,并且这种抑制作用具有浓度依赖性,见表 2、图 2。

2.3 在 C4-2 细胞中敲除 FKBP5 的表达可引起 NF- κ B 信号通路中相关蛋白的改变

在 C4-2 细胞中,通过细胞转染及 RNA 干扰技术,明显降低细胞中 FKBP5 的表达,当 FKBP5 表达降低时,I κ B α 表达升高,Ser536 位点磷酸化的 NF- κ B 也升高,总的 NF- κ B 未见明显变化,Akt 信号通路中的 2 个不同磷酸化位点的蛋白表达量均下降(图 3)。用不同浓度 FK506 处理 C4-2 细胞 96 h 后提取蛋白。结果显示,FK506 作用于 C4-2 细胞后,FKBP5 的表达量并未明显改变,但 I κ B α 的表达量随着 FK506 作用浓度的增加而升高,Caspase-3 的表达量也随着升高(图 4)。

表 1 转染 shRNA 后 C4-2 细胞不同时间细胞计数结果

$\times 10^4$ 个, $\bar{x} \pm s$

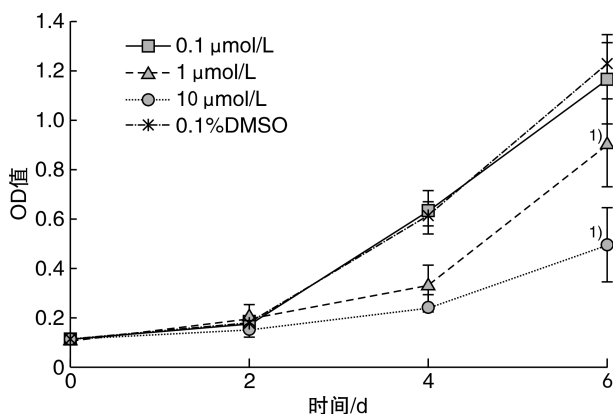
组别	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d
对照组	0.25	0.535 ± 0.048	1.413 ± 0.059	1.745 ± 0.077	$2.240 \pm 0.103^{1)}$
实验组	0.25	0.405 ± 0.047	0.932 ± 0.095	1.103 ± 0.058	1.378 ± 0.061

与实验组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度 FK506 处理 C4-2 细胞的 MTT 检测结果

$\bar{x} \pm s$

时间	FK506 处理			0.1%DMSO
	0.1 $\mu\text{mol/L}$	1 $\mu\text{mol/L}$	10 $\mu\text{mol/L}$	
0 d	0.119 $\pm$ 0.011	0.1245 $\pm$ 0.003	0.114 $\pm$ 0.012	0.115 $\pm$ 0.018
2 d	0.181 $\pm$ 0.016	0.207 $\pm$ 0.037	0.146 $\pm$ 0.022	0.166 $\pm$ 0.035
4 d	0.630 $\pm$ 0.082	0.341 $\pm$ 0.07	0.258 $\pm$ 0.030	0.622 $\pm$ 0.054
6 d	1.160 $\pm$ 0.182	0.911 $\pm$ 0.179	0.499 $\pm$ 0.148	1.226 $\pm$ 0.083



与 0.1%DMSO 组比较, $^{1)} P < 0.05$ 。

图 2 不同浓度 FK506 处理的 C4-2 生长曲线

提取对照组和实验组 C4-2 细胞的胞浆蛋白和胞核蛋白。在敲除 FKBP5 的 C4-2 细胞中,胞浆的 NF- κ B 含量增多而细胞核中的 NF- κ B 明显减少,在对照组的 C4-2 细胞中,NF- κ B 的胞浆胞核分布则相反(图 5)。

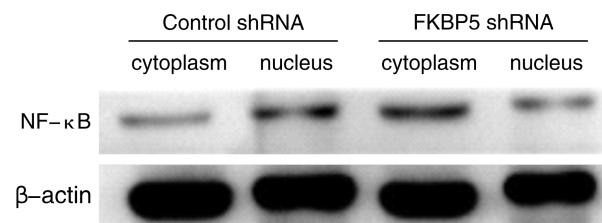


图 5 两组 C4-2 细胞的胞浆胞核中 NF- κ B 含量比较

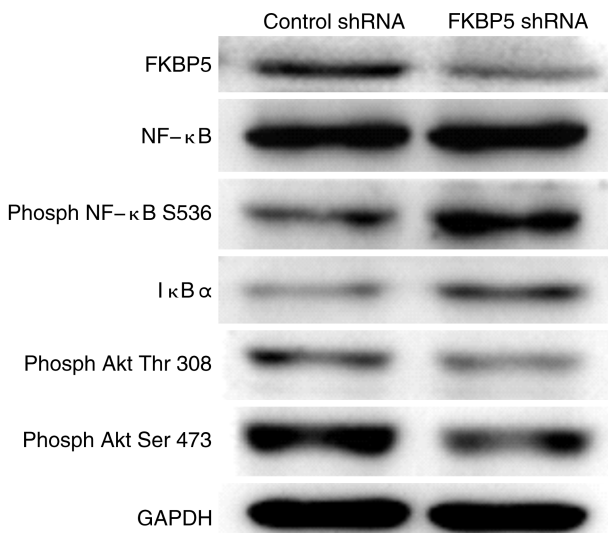


图 3 C4-2 细胞中降表达 FKBP5 的相关蛋白的变化情况

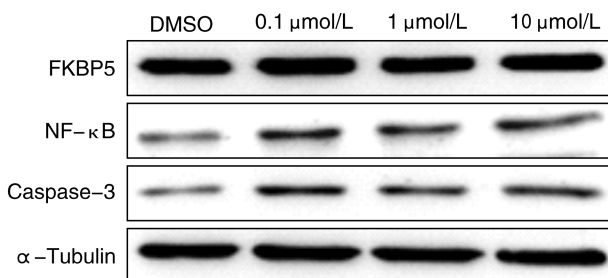


图 4 不同浓度 FK506 处理 C4-2 细胞后相关蛋白的改变

2.4 在 C4-2 细胞中降表达 FKBP5 可抑制 NF- κ B 向细胞核内转移

利用凯基核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒,分别

3 讨论

FKBP5 是一类具有肽酰-脯氨酰-顺反异构酶活性的亲免疫蛋白家族成员之一。研究显示,FKBP5 与人类多种肿瘤相关,在颅脑肿瘤、前列腺癌、淋巴瘤、黑色素瘤中高表达,而在胰腺癌、结肠癌和睾丸癌中表达下调。文献报道 FKBP5 涉及多种信号通路,包括甾体激素受体信号通路、NF- κ B、AKT-PHLPP 信号通路等,这些信号通路可能在肿瘤的发生发展及抗肿瘤治疗中具有重要作用^[3,4]。目前 FKBP5 与 NF- κ B 通路的研究较多,NF- κ B 广泛存在于真核生物中,作为信号传导途径中的枢纽,与肿瘤的发生、发展,细胞凋亡的调节以及胚胎发育等重要环节有着密切联系,参与免疫反应、炎症反应、细胞凋亡、肿瘤发生等多种生物进程,是一种重要的核转录因子。细胞在静息状态下,NF- κ B 以无活性的状态存在于细胞浆中,它与一类抑制因子 I κ B 结合组成一个三聚体。当细胞受到各种外界刺激时,可使 I κ B 磷酸化并从三聚体中解离出来,从而激活 NF- κ B,使其暴露出 DNA 结合位点,并从细胞质中易位到细胞核中,与 κ B 基序相结合,从而发挥转录调控作用。

本实验通过 RNA 干扰技术转染 C4-2 细胞,抑制 FKBP5 的表达量,从而建立 shRNA FKBP5 C4-2 的细胞系,当 FKBP5 表达降低时,I κ B α 表达升高,Ser536 位点磷酸化的 NF- κ B 也升高,总的 NF- κ B 未见明显变化,Akt 信号通路中的 2 个不同磷

酸化位点的蛋白表达量均下降。在敲除 FKBP5 的 C4-2 细胞中,胞浆的 NF- κ B 含量增多而细胞核中的 NF- κ B 明显减少,在对照组的 C4-2 细胞中,NF- κ B 的胞浆胞核分布则相反。本结果证实 FKBP5 可以影响 NF- κ B 信号通路,FKBP5 降表达后,与其结合的 IKK α 减少,使 I κ B α 磷酸化下降,进而影响 NF- κ B 的激活,使其转移到细胞核发挥转录功能受阻,同时磷酸化的 I κ B α 降解减少,导致细胞中 I κ B α 水平升高。与文献中关于 FKBP5 在胶质瘤及黑色素瘤的研究结果^[5,6]类似,而 FKBP5 对于 AKT 信号通路的影响与文献中关于胰腺癌的研究^[7]结果相反,说明在前列腺癌中 FKBP5 的作用机制与其他癌症不一定相同。NF- κ B 下游调控许多细胞生物功能,本实验以凋亡蛋白 Caspase-3 为代表,说明激活 NF- κ B 可减少凋亡和促进抗凋亡功能。不同浓度 FK506 作用于 C4-2 细胞后,FKBP5 的表达量并未明显改变,但 I κ B α 的表达量随着 FK506 作用浓度的增加而增加,Caspase-3 的表达量也随着增加;该实验结果说明 FK506 作为 FKBP5 的特异性抑制剂并不影响 FKBP5 的转录翻译,而是 FK506 与 FKBP5 结合后,影响其顺反异构酶的活性,从而影响 IKK 的功能,导致 I κ B α 磷酸化受阻,使 NF- κ B 激活受到抑制。Jin 等^[8]研究发现激活 NF- κ B 通路可将雄激素敏感的前列腺癌细胞转变成激素不敏感性的细胞,同时下调 NF- κ B 通路来抑制雄激素受体剪接变体的表达并恢复抗雄治疗的敏感性。Nunes 等^[9]在细胞和动物实验中联合青蒿酯和比卡鲁胺可显著抑制前列腺肿瘤的生长和转移,并且使得激素抵抗的前列腺癌细胞恢复对 ADT 治疗的敏感性。我们前期的研究已经证实前列腺癌组织中 FKBP5 是高表达的,且 FKBP5 在前列腺癌由雄激素依赖进展至去势抵抗性的过程中先降低后增高;应用 FKBP5 的抑制剂 FK506 可以抑制前列腺癌小鼠异种移植肿瘤的生长^[10]。

本实验还存在很多不足,虽然能在一定程度上验证文献中的信号通路,但在前列腺癌中,其信号通路有其特殊性并未得到充分阐述,对于 IKK α 的作用本实验并未涉及,磷酸化 NF- κ B 和磷酸化的 I κ B α 的改变并未进行说明,以及实验中出现的磷酸化 AKT 的变化尚无法解释,FKBP5 与 NF- κ B

信号通路中相关蛋白的相互作用也缺乏直接的证据。因此,阐明其在前列腺癌进展中的作用,必将会为治疗前列腺癌,特别是激素抵抗型前列腺癌提供新思路或开辟新的治疗领域。

[参考文献]

- 1 Tao Z Q, Shi A M, Wang K X, et al. Epidemiology of prostate cancer: current status[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(5): 805—812.
- 2 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌死亡现状及流行趋势分析[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2012, 33(11): 836—839.
- 3 Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, et al. A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway[J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(2): 97—105.
- 4 Li L, Lou Z, Wang L. The role of FKBP5 in cancer aetiology and chemoresistance[J]. *British J Cancer*, 2011, 104(1): 19—23.
- 5 Jiang W, Cazacu S, Xiang C, et al. FK506 binding protein mediates glioma cell growth and sensitivity to rapamycin treatment by regulating NF- κ B signaling pathway[J]. *Neoplasia*, 2008, 10(3): 235—243.
- 6 Romano M F, Avellino R, Petrella A, et al. Rapamycin inhibits doxorubicin-induced NF- κ B/Rel nuclear activity and enhances the apoptosis of melanoma cells[J]. *Eur J Cancer*, 2004, 40(18): 2829—2836.
- 7 Pei H, Li L, Fridley B L, et al. FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt[J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(3): 259—266.
- 8 Jin R, Yamashita H, Yu X, et al. Inhibition of NF- κ B signaling restores responsiveness of castrate-resistant prostate cancer cells to anti-androgen treatment by decreasing androgen receptor-variant expression[J]. *Oncogene*, 2015, 34(28): 3700—3710.
- 9 Nunes J J, Pandey S K, Yadav A, et al. Targeting NF- κ B Signaling by Artesunate Restores Sensitivity of Castrate-Resistant Prostate Cancer Cells to Antiandrogens[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(4): 333—345.
- 10 王强, 胡斌, 郝海峰, 等. FK506 结合蛋白 5 对前列腺癌 LNCaP 细胞株及裸鼠移植瘤的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(12): 2932—2935.

(收稿日期: 2017-08-08)