

组织蛋白酶 D 增强胃癌细胞对顺铂敏感性的研究

黄声凯¹, 王佳², 李燕¹, 赵玫¹, 黄常志¹

(1. 国家癌症中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院, 北京 100021; 2. 煤炭总医院, 北京 100028)

摘要: [目的] 探讨组织蛋白酶 D(CTSD) 能否增强胃癌细胞对顺铂的敏感性及其机理, 从而为临床胃癌的化疗开辟一条新路径。[方法] 通过慢病毒将 CTSD 及其酶活性失活突变体 231N 稳定整合到胃癌细胞株 MKN45 中, 运用 MTT 法、流式细胞术、Western blot 等技术, 观察转染前后各组肿瘤细胞的存活率、凋亡、凋亡蛋白表达的改变。[结果] 与相同浓度作用下的对照组相比, CTSD、231N 联合顺铂对细胞存活率的抑制更明显; 与对照组相比, CTSD、231N 联合顺铂诱导细胞凋亡能力明显增加; Western blot 结果显示, CTSD、231N 联合顺铂组 cleaved caspase 3, cleaved caspase 9 表达增加, 而代表死亡受体途径的 procaspase 8 无变化。[结论] 与单一顺铂作用相比, CTSD、231N 联合顺铂抑制 MKN45 细胞存活率、诱导细胞凋亡能力更强, 这一作用是通过线粒体途径发挥作用的。

关键词: 组织蛋白酶 D; 顺铂; 胃癌

中图分类号: R73-3; R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2018)03-0218-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2018.03.A011

Cathepsin D Enhancing Sensitivity of Gastric Cancer Cells to Cisplatin

HUANG Sheng-kai¹, WANG jia², LI yan¹, et al.

(1. National Cancer Center/Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China; 2. China Meitan General Hospital, Beijing 100028, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of cathepsin D(CTSD) on the chemosensitivity of gastric cancer cells to cisplatin. [Methods] CTSD and its mutation 231N were transfected into gastric cancer MKN45 cells by lentivirus. The cell proliferation was determined by MTT and the expression of apoptosis related proteins was tested by Western blot. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. [Results] Compared to cisplatin alone, CTSD or 231N combined with cisplatin inhibited cell proliferation and enhanced cell apoptosis more markedly. Western blotting results indicated that the expression levels of cleaved caspase 3, cleaved caspase 9 in CTSD or 231N combined with cisplatin were increased, however, there were no significant changes in expression of procaspase 8. [Conclusion] CTSD and 231N can increase the inhibition effect of cisplatin on gastric cancer MKN45 cells and enhance cell apoptosis, which may be associated with mitochondrial pathway.

Key words: cathepsin D(CTSD); cisplatin; gastric cancer

胃癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 在全球范围内, 胃癌的死亡率位居恶性肿瘤死因第 3 位, 在男性中位于肺癌、肝癌之后, 女性中位于乳腺癌和肺癌之后^[1]。2012 年中国胃癌新发病例约 42.4 万

例, 死亡病例约 29.8 万例^[2]。胃癌是我国恶性肿瘤发病率和死亡率最高的肿瘤之一, 为继肺癌之后的第二大恶性肿瘤^[3,4]。

顺铂是金属铂类络合物, 属周期非特异性抗肿瘤药, 是最常用于胃肠道肿瘤的化疗药物之一^[5,6]。但是长期应用顺铂后化疗疗效降低, 而提高使用剂量患者常不能耐受其副作用^[7-11]。组织蛋白酶 D

收稿日期: 2017-11-13; 修回日期: 2018-01-01

基金资助: 国家自然科学基金(81472208); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2016-I2M-1-001)

通讯作者: 黄常志, E-mail: huangpumc@163.com

(cathepsin D, CTSD) 是一个凋亡的功能性调控因子, 是 Moallem 等人最先报道的(1995)^[12]。许多研究指出, 化疗很大程度上是通过药物诱导细胞凋亡来实现的, 肿瘤细胞中促凋亡基因的表达下调或缺失, 导致了化疗药物诱导细胞凋亡的抑制, 产生化疗药物耐药^[13,14]。因此, 如何诱导肿瘤细胞凋亡、重建和增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性成为肿瘤化疗研究的重点^[15]。本文将探讨 CTSD 能否增强胃癌细胞对顺铂的敏感性及其机理, 从而为临床胃癌的化疗开辟一条新路径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人胃癌细胞株 MKN-45、慢病毒包装体系 PLVX-IRES-Neo、PLP2、VSVG、 Δ 8.9 均为本实验室保存。内切酶购自 Thermo 公司, PCR 反应所需酶购自 TaKaRa 公司, 抗体购自 Cell Signaling Technology, 凋亡试剂盒购自 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 突变质粒的构建

合成 231N 突变引物, 上游引物为 CCTGT-GTTCACAATGGCCTC, 下游引物为 GAGGC-CATTGTGAACACAGG。分别合成两段含有突变位点的片段, 反应条件为 95℃ 5min, 95℃ 5s, 60℃ 30s, 72℃ 40s, 共 25 个循环。分别胶回收上述两段 PCR 产物。将回收的 CTSD 突变片段进行重叠延伸反应, 循环设置同上, 共 10 个循环。暂停反应后, 加入 CTSD 上下游引物, F CGGAATTCATGCAGCC-CTCCAGCC, R: GCTCTAGACTAGAGCGGGCAGC, 继续 PCR 反应。

1.2.2 稳定克隆的筛选

于 6 孔培养板中接种 1×10^6 细胞/孔, 加不同浓度的 G-418(200~1000g/ml), 第 14d 细胞全部死亡的浓度为最佳 G-418 筛选浓度。将 7.5 μ g 空载体及 PLVX-IRES-CTSD/231N-Neo, 2.5 μ g PLP2, VSVG 3.5 μ g, Δ 8.9 6.5 μ g, 共转染 293T 细胞中, 培养 48h 后收集上清。将收集的慢病毒加入 MKN45 细胞, 48h 后将细胞按照 1:10 传代于 10cm 培养皿中, 以含 G-418 筛选浓度的完全培养基培养, 以后每 3~5d 换液 1 次, 大约 14d 后获得 G418 抗性克隆, 当细胞形成 2~

3mm 大小的克隆时, 以胰酶浸湿的相应大小滤纸片将各个细胞克隆分别转移至 12 孔细胞培养板, 待细胞增长至一定数量后消化收集细胞进行 Western blot 鉴定。

1.2.3 Western blot

收集细胞, 向沉淀加入适量蛋白裂解液(50mmol/L Tris-Cl, pH=7.4, 150mmol/L NaCl, 1mol/L EDTA, 0.5% Triton X-100), 在漩涡振荡器上震荡混匀, 冰浴 30min, 13 000r/min 离心 15min, 保留上清。蛋白质定量测定后, 取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后, 将胶转移至 PVDF 膜。将膜放入 5% BSA-TBST (20mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, 0.05% Tween-20, pH=7.4), 室温孵育约 1h。加入一抗孵育。室温孵育 2h。TBST 洗膜, 10min $\times$ 3 次。加入二抗室温孵育 1h。TBST 漂洗膜 10min $\times$ 3 次。再使用 ECL 法显色。

1.2.4 细胞活力分析

胃癌细胞株以 1×10^5 /孔的浓度种 96 孔板, 24 小时后弃细胞板中原有的培养基, 加入药物设计好的含药培养基处理细胞。将上述细胞板置于 5% CO₂, 37℃ 培养箱内, 继续培养。弃去细胞板中原来培养基, 加入用培养基现配的 MTT 溶液, 置于培养箱中 4h。弃上清, 加入 DMSO 150 μ l, 振荡混匀, 于酶标仪中测定吸光度值(OD₄₉₂)。

1.2.5 流式细胞仪检测凋亡细胞比例

收集细胞培养液, 培养液中有凋亡的死细胞。消化细胞, 用收集的培养液终止胰酶, 轻轻将细胞吹成单细胞悬液, 1000g 离心 5min 后, PBS 洗细胞两次。加入 1 $\times$ Binding Buffer 重悬细胞, 使浓度为 1×10^6 个/ml。取 100 μ l 细胞悬液, 加入 5 μ l PE Annexin V, 避光放置 10min。加入 5 μ l 7-ADD, 避光放置 10min。加入 400 μ l Binding Buffer, 上机检测。

1.3 统计学处理

应用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 采用 *t* 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为显著性检验水准。

2 结 果

2.1 构建稳定表达野生型 CTSD 和酶活性失活突变体 231N 的 MKN45 细胞株

由于 CTSD 是一种天门冬氨酸肽链内切酶, 为

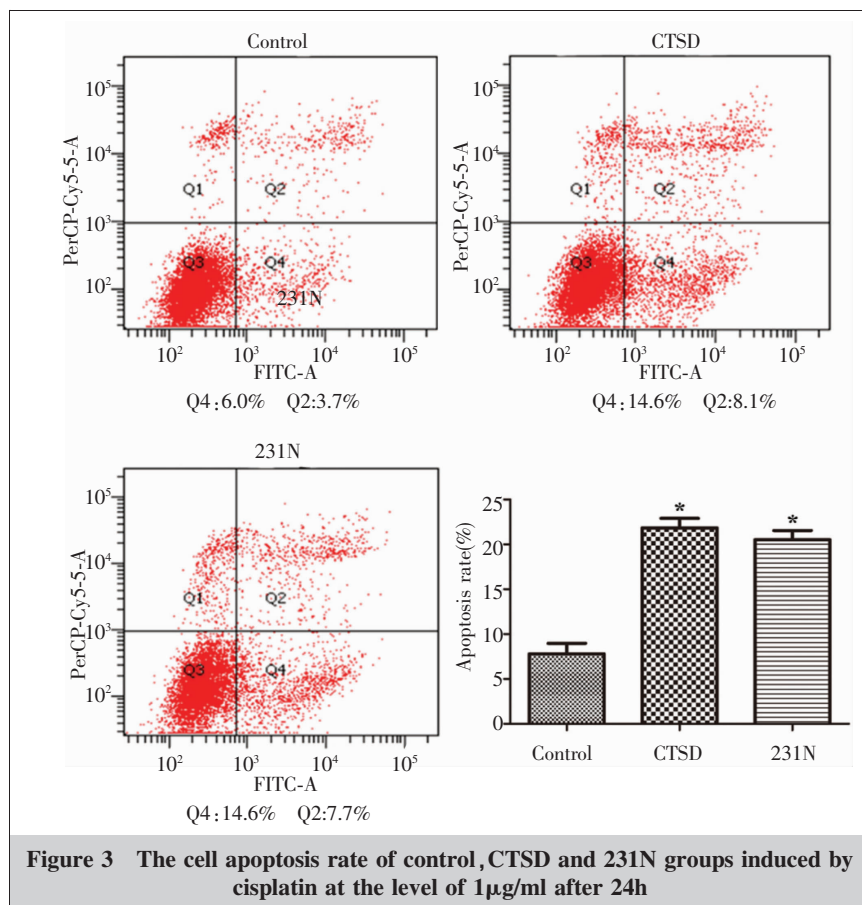


Figure 3 The cell apoptosis rate of control, CTSD and 231N groups induced by cisplatin at the level of 1 μg/ml after 24h

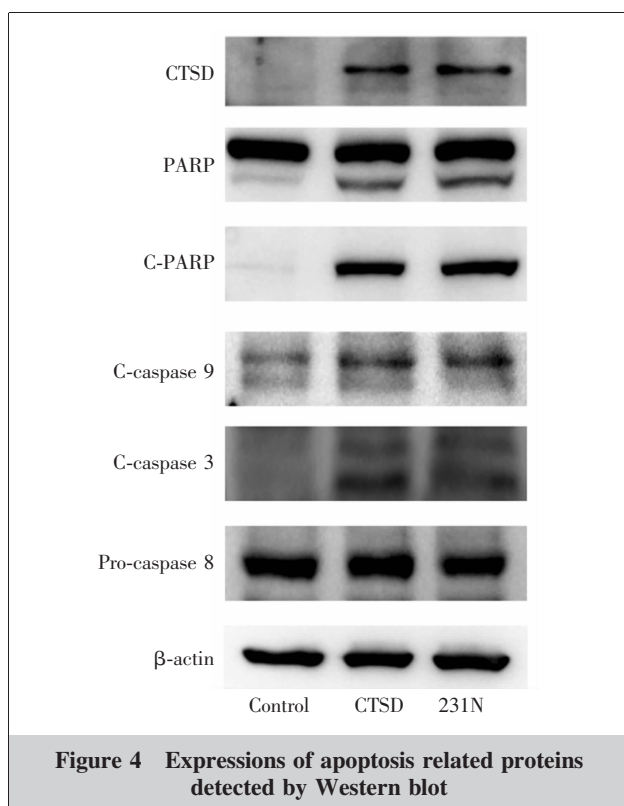


Figure 4 Expressions of apoptosis related proteins detected by Western blot

不是死亡受体途径。

3 讨论

CTSD 在所有细胞中都可以低浓度存在,主要分布于细胞浆的溶酶体中,亦可分泌到细胞间质、血液、体液中^[16]。CTSD 最初在粗面内质网中合成,经过信号肽切除,以及 N 端糖基化,形成酶前体被转运至高尔基体,这个 52kD 的前体通过 M6P 受体结合进入溶酶体形成 48kD 的中间分子,中间体进一步加工修饰为 34kD 及 14kD 的肽链片段,为其成熟形式。CTSD 是一种诱导凋亡的重要介质。在存在凋亡信号时,如 TNF-α^[17,18]、IFN-γ、Fas/APO 或其他凋亡信号^[12],酸性鞘磷脂酶被激活,释放神经酰胺作为二级信号诱导 CTSD 从溶酶体到细胞质的易位^[19]。CTSD 在细胞溶质中激活 Bax,导致凋亡诱导因子(AIF)选择性激活^[20]。激活的 Bax 导致线粒体细胞色素 C 的释放,进一步激活 caspase 9,从而导致细胞凋亡^[21]。将分离的线粒体与 CTSD 一起孵化,观察到了细胞色素 C 的释放^[22]。我们的结果显示:CTSD 能够增强顺铂的细胞毒作用,增强其对细胞存活率的抑制和诱导细胞凋亡的能力。因此,联合 CTSD 可以增强顺铂对胃癌细胞的杀伤力。

CTSD 是一种天门冬氨酸肽链内切酶,其活性位点位于 34kD 和 14kD 的天冬氨酸残基 (33 位点和 231 位点),激活主要通过半胱氨酸溶酶体途径或天冬氨酸酶切途径^[23]。CTSD 作为一种溶酶体酶,pH 值约 4 时可以激活其催化活性,而其发挥诱导凋亡作用是 34kD 的成熟片段通过溶酶体到细胞质的转位实现的^[24],而在几乎中性 pH 的细胞液中,其酶活性几乎完全丢失。我们的实验结果显示,34kD 片段的酶活性突变体——231N,也可以发挥诱导凋亡的功能。因此,CTSD 诱导细胞凋亡并不依赖其天冬氨酸酶活性,其诱导凋亡的机制还不是很清楚。有可能,

CTSD 是一种天门冬氨酸肽链内切酶,其活性位点位于 34kD 和 14kD 的天冬氨酸残基 (33 位点和 231 位点),激活主要通过半胱氨酸溶酶体途径或天冬氨酸酶切途径^[23]。CTSD 作为一种溶酶体酶,pH 值约 4 时可以激活其催化活性,而其发挥诱导凋亡作用是 34kD 的成熟片段通过溶酶体到细胞质的转位实现的^[24],而在几乎中性 pH 的细胞液中,其酶活性几乎完全丢失。我们的实验结果显示,34kD 片段的酶活性突变体——231N,也可以发挥诱导凋亡的功能。因此,CTSD 诱导细胞凋亡并不依赖其天冬氨酸酶活性,其诱导凋亡的机制还不是很清楚。有可能,

CTSD 为级联反应切割半胱天冬酶,或是作为caspase 激活的正向调控因子,或是与其它蛋白结合来稳定具有催化活性的复合物。完整的理解 CTSD 介导的凋亡途径仍然需要进一步的研究。

虽然我们的研究表明 CTSD 是一个有潜在价值的肿瘤治疗靶点,但是目前胃癌是一个世界上都难以攻克的难题,患者的早期转移较多,5 年生存率较低。如果能进一步深入了解 CTSD 基因,并且与基因治疗相结合,用于胃癌的早期诊断与治疗,提高患者的生存率,改善生活质量,将是在胃癌研究中的一项突破。本文仅是从体外细胞实验的角度提供增强胃癌细胞对顺铂敏感性的一种可行方法,距离实际临床应用用于治疗肿瘤患者还有一定的过程,需要更多深入的研究。

参考文献:

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1):5-29.
- [2] Zuo TT, Zheng RS, Zeng HM, et al. Epidemiology of stomach cancer in China [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2017, 44(1):52-58. [左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状 [J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(1):52-58.]
- [3] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in china, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [4] Chen WQ, Zheng RS, Zhang SW, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2012 [J]. China Cancer, 2017, 26(1):1-7. [陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1):1-7.]
- [5] Spiegel D, Palta M, Uronis H. Role of chemotherapy and radiation therapy in the management of gastric adenocarcinoma [J]. Surg Clin North Am, 2017, 97(2):421.
- [6] Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740:364-378.
- [7] Wong DYQ, Lim JH, Ang WH. Induction of targeted necrosis with her2-targeted platinum (iv) anticancer prodrugs [J]. Chem Sci, 2015, 6(5):3051-3056.
- [8] Cetintas VB, Kucukaslan AS, Kosova B, et al. Cisplatin resistance induced by decreased apoptotic activity in non-small-cell lung cancer cell lines [J]. Cell Biol Int, 2012, 36(3):261-265.
- [9] Ren JH, He WS, Nong L, et al. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2010, 25(1):75-80.
- [10] Shen DW, Pouliot LM, Hall MD, et al. Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes [J]. Pharmacol Rev, 2012, 64(3):706.
- [11] Amable L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine [J]. Pharmacol Res, 2016, 106:27-36.
- [12] Deiss LP, Galinka H, Berissi H, et al. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha [J]. EMBO J, 1996, 15(15):3861-3870.
- [13] Circu M, Cardelli J, Barr M, et al. Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells [J]. PLoS One, 2017, 110(9):133-141.
- [14] Ni P, Xu W, Zhang Y, et al. Txn1l induces apoptosis in cisplatin resistant human gastric cancer cell lines [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2015, 14(9):850.
- [15] Grothpedersen L, Jäättelä M. Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes [J]. Cancer Lett, 2013, 332(2):265-274.
- [16] Barrett AJ. Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver [J]. Biochem J, 1970, 117(3):601-607.
- [17] Fritsch J, Stephan M, Tchikov V, et al. Cell fate decisions regulated by K63 ubiquitination of tumor necrosis factor receptor 1 [J]. Mol Cell Biol, 2014, 34(17):3214-3228.
- [18] Fritsch J, Fickers R, Klawitter J, et al. TNF induced cleavage of HSP90 by cathepsin D potentiates apoptotic cell death [J]. Oncotarget, 2016, 7(46):75774-75789.
- [19] Cocchiari P, Fox C, Tregidgo NW, et al. Lysosomal protease cathepsin D; a new driver of apoptosis during acute kidney injury [J]. Sci Rep, 2016, 6:27112.
- [20] Aits S, Jäättelä M. Lysosomal cell death at a glance [J]. J Cell Sci, 2013, 126(9):1905-1912.
- [21] Repnik U, Česen MH, Turk B. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges [J]. Mitochondrion, 2014, 19 Pt A:49-57.
- [22] Emertsedlak L, Shangary S, Rabinovitz A, et al. Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome C release, caspase activation, and cell death [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4(5):733.
- [23] Metcalf P, Fusek M. Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site [J]. EMBO J, 1993, 12(4):1293-1302.
- [24] Liaudetcoopman E, Beaujouin M, Derocq D, et al. Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis [J]. Cancer Lett, 2006, 237(2):167-179.