

过表达 calbindin-d28k 在卡铂诱导子宫内膜癌细胞凋亡中的作用及机制

武静¹, 池淑琦², 吴婷婷², 肖诚瑀², 廉然芳², 刘艳², 王国珍², 汪宏波²

(1. 孝昌县第一人民医院, 湖北 孝昌 432000; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院, 湖北 武汉 430022)

摘要: [目的] 研究过表达钙结合蛋白 calbindin-d28k 对卡铂诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡的影响及其可能的作用机制。[方法] 构建 calbindin-d28k 基因真核过表达 calbindin-d28k 质粒, 稳定转染子宫内膜癌 Ishikawa 细胞; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及免疫印迹方法检测细胞中靶基因 mRNA 及蛋白的表达; MTT 法检测不同浓度卡铂作用下子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的存活率 Hoechst 33258 染色法观察卡铂诱导的子宫内膜癌 Ishikawa 细胞核变化。[结果] 卡铂对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的最佳作用浓度为 100 μg/ml, 可显著性上调细胞活性 Caspase-3 蛋白的表达 ($P < 0.05$); 稳定转染组 Ishikawa 细胞 calbindin-d28k mRNA 水平上调约 10 倍, 蛋白水平升高约 1.6 倍 ($P < 0.05$); 过表达 calbindin-d28k 后, 卡铂诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的凋亡作用减弱, 活性 Caspase-3 蛋白的表达水平下调约 7 倍 ($P < 0.05$)。[结论] 过表达 calbindin-d28k 蛋白可抑制卡铂诱导的子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的凋亡作用, 并与通过下调 Caspase-3 有关。

关键词: 子宫内膜癌; 卡铂; 凋亡; calbindin-d28k

中图分类号: R711.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)09-0878-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.09.B007

Effects of Calbindin-d28k Over-expression on Carboplatin-induced Apoptosis in Human Endometrial Cancer Cells and Its Mechanism

WU Jing¹, CHI Shu-qi², WU Ting-ting², XIAO Cheng-yu², LIAN Ran-fang², LIU Yan², Wang Guo-zhen², WANG Hong-bo²

(1. The First People's Hospital of Xiaochang, Xiaochang 432000, China; 2. Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of calbindin-d28k over-expression on carboplatin-induced apoptosis in endometrial cancer cells and the related mechanism. [Methods] A eukaryotic expression vector of human calbindin-d28k gene was constructed and transfected into human endometrial cancer Ishikawa cells. RT-PCR and western blotting were used to analyze the mRNA and protein expression of calbindin-d28k genes in Ishikawa cells, respectively. The Ishikawa cells were treated with different concentrations of carboplatin and the cell survival rate in were observed by MTT assay. Hoechst 33258 assay was used to detect the nuclear variation of Ishikawa cells induced by carboplatin. [Results] The levels of mRNA and protein expression of calbindin-d28k gene in the stable transfected Ishikawa cells were 10 and 1.6 times higher than those in vector group, respectively. The optimal concentration of carboplatin was 100 μg/ml in Ishikawa cells, at which the expression of cleaved Caspase-3 was significantly increased. The cell apoptosis and Caspase-3 expression level were reduced by 7 times in Ishikawa cells with over-expression of calbindin-d28k. [Conclusion] The over-expression of calbindin-d28k inhibits carboplatin-induced apoptosis in endometrial cancer, which is related to the decreased expression of Caspase-3.

Subject words: endometriosis; carboplatin; apoptosis; calbindin-d28k

子宫内膜癌约占女性生殖系统恶性肿瘤的 20%~30%, 近些年来发病年龄有年轻化趋势, 严重

影响妇女的生活质量和生命健康。目前子宫内膜癌的治疗手段包括手术、放疗、化疗及联合治疗。早期子宫内膜癌患者的手术治疗后一般预后良好, 但晚期及复发子宫内膜癌患者手术切除率低或对放化疗不敏感, 复发率高、预后差^[1]。卡铂是近年来备受重

通讯作者: 汪宏波, 主任医师, 博士; 华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科, 湖北省武汉市江汉区解放大道 1277 号 (430022); E-mail: whbdf@yahoo.com

收稿日期: 2017-11-09; **修回日期:** 2018-05-18

视的第二代铂类化合物,在子宫内膜癌化疗中显示出良好的应用前景。钙离子结合蛋白 calbindin-d28k 是钙结合蛋白家族中的一员,在人体多种组织器官中广泛表达,包括小肠、肾脏、胰腺、脑组织、骨组织和子宫等。研究表明,calbindin-d28k 阳性表达与多种肿瘤预后相关,但其作用机制仍不清楚。细胞凋亡是一种程序性死亡行为,可清除受损细胞维持体内平衡,其中 Caspase 蛋白家族是参与凋亡过程的关键酶;已有研究显示神经元中 calbindin-d28k 蛋白与神经细胞突触的生长和神经退行性变均密切相关,可通过抑制氧化应激作用、Caspase-3 活化、 α -synuclein 聚合、Bax 裂解和稳定胞内钙离子浓度等机制保护神经元细胞免受各种刺激因素诱导的细胞死亡作用^[2-4];此外,calbindin-d28k 可通过调节促凋亡基因表达(包括 Bax, p53 和 Caspase-3),抑制过氧化氢(钙离子依赖型刺激因子)诱导的子宫内膜细胞凋亡^[5]。但 calbindin-d28k 在子宫内膜癌细胞暴露于非钙离子刺激因子条件下所起作用及具体机制尚不明确。本研究主要探讨 calbindin-d28k 蛋白表达对卡铂诱导的子宫内膜癌细胞凋亡的影响,为提高子宫内膜癌临床化疗敏感性的提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养

子宫内膜癌细胞系 Ishikawa 购于美国典型培养物保藏中心(ATCC),培养于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基。细胞放置于 37℃、含 5%CO₂ 及饱和湿度的细胞培养箱中培养。

1.2 药品和试剂

高糖 RPMI-1640 培养基购自美国 HyClone 公司;胎牛血清(FBS)购自美国 Gibico 公司,无血清 Opti-MEM 培养基、脂质体 lipofectamine 2000、RT 试剂盒及实时荧光定量 PCR 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;Trizol 试剂购自日本 TaKaRa 公司;兔抗人 calbindin-d28k、Cleaved caspase-3 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司,山羊抗兔辣根过氧化物酶标二抗购自美国 Santa Cruz 公司;荧光染料 Hoechst33258 购自碧云天公司;新霉素 G418 购自 Sigma 公司;噻唑兰(MTT)购自美国 Amresco 公司。Calbindin-d28k 过表达(cDNA)质粒 GV230-CB、空载体质粒 GV230-

Vec 及含该质粒的菌种均由上海吉凯基因化学技术有限公司合成及鉴定。

1.3 实验方法

1.3.1 MTT 法确定卡铂作用浓度

取稳筛后处于对数生长期的空载转染(GV230-Vec)组 Ishikawa 细胞以 10 000 个细胞/孔接种到 96 孔板中,贴壁后加入含不同浓度卡铂的培养液 200 μ l (0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 μ g/ml),每浓度组设置 5 个复孔并另设空白对照,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 40h。每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml,避光),培养箱中继续孵育 4h 后弃上清,勿触及孔底结晶,每孔再加 150 μ l DMSO 孵育 7min 使紫色结晶全部溶解。酶标仪在 570nm 波长下测定 96 孔板各孔的光吸收值(OD 值)。结果分析:某一浓度卡铂对细胞抑制率=(对照组 OD 值-该浓度组 OD 值)/对照组 OD 值 \times 100%。以浓度为横坐标,抑制率为纵坐标绘制细胞抑制率曲线,计算得出卡铂作用于 Ishikawa 细胞的半数抑制浓度 IC₅₀。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 技术检测细胞 calbindin-d28k mRNA 的表达

Trizol 试剂裂解各处理组细胞,提取各组细胞总 RNA,分光光度计测定各组 RNA 浓度,RT 合成 cDNA。按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书配制荧光定量 PCR 反应体系,每组体系 20 μ l;calbindin-d28k 基因引物序列,上游:5'-TCATCCTCATCACAGCCTCA-3',下游:5'-TGATAACTCCAATCCAGCCTTCT-3';内参照磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因的引物序列:上游:5'-ACTCCACTCACGGCAAATTC-3',下游:5'-TCTCCATGGTGGTGAAGACA-3';采用 StepOne 软件检测并保存实验结果,设定循环阈值(Ct 值),以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因 calbindin-d28k mRNA 的表达水平,实验重复 3 次。

1.3.3 蛋白印迹法检测细胞 calbindin-d28k 蛋白的表达

各处理组细胞取出置于冰上,预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 遍,每孔加入适量细胞裂解液及蛋白酶抑制剂冰上裂解 30min,12 000r/min 4℃离心 15min,取上清液,二辛可宁酸(BCA)法测定蛋白样品浓度,计算所需蛋白上样缓冲液及细胞裂解液量,将各组蛋白调整至同一终浓度,于沸水中加热 10 min 后置-20℃保存。每孔加入 20 μ g 蛋白进行 15%

十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳, 280mA 恒流 45min, 电转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜), 含 5%脱脂奶粉、0.05%吐温 20 的枸橼酸盐缓冲液(TBST)室温封闭 2 h, 据蛋白相对分子质量切取所需条带, 加入一抗(1:800 稀释), 4℃孵育过夜, TBST 冲洗, 加入二抗(1:5000 稀释), 室温孵育 1h, TBST 冲洗, 增强化学发光法(ECL)显影, Image Lab 软件分析各蛋白条带灰度值, 以 β 肌动蛋白(β-actin)为内参, 计算 calbindin-d28k 蛋白的相对表达水平, 实验重复 3 次。

1.3.4 Hoechst33258 染色法观察不同处理组中的细胞核形态学改变

取对数生长期的稳转细胞以合适密度均匀接种在玻片中, 贴壁后加入 100μg/ml 卡铂作用 40h, 分组分别为①GV230-CB+PBS 组; ②GV230-Vec+PBS 组; ③GV230-CB+100ug/ml 卡铂; ④GV230-Vec+100ug/ml 卡铂组; 取出细胞, 4%多聚甲醛 4℃固定 15min, PBS 洗 2 次, 加入 5μg/ml 的 Hoechst33258 溶液浸泡, 避光作用 15min, 弃核染色液, PBS 洗 2 次, 避光风干。荧光显微镜下观察随机选取 5 个视野并计数核发生浓缩, 碎裂改变的细胞及总细胞数。结果分析: 凋亡率=5 个视野核发生浓缩, 碎裂改变的细胞总数/5 个视野细胞总数×10。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间均数的差异性检验采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卡铂对 Ishikawa 细胞的抑制情况

用 MTT 方法检测不同浓度的卡铂(0, 4, 16, 32, 64, 128, 256, 512 μg/ml)作用 40h 后, 子宫内膜癌细胞 Ishikawa 的抑制率情况见 Figure 1。卡铂作用 Ishikawa 细胞 40h 的 IC₅₀ 为 99.58μg/ml, 故选取卡铂浓度 100μg/ml 用于后续实验。

2.2 过表达及卡铂作用下 Ishikawa 细胞中 calbindin-d28k 的表达水平

稳转 GV230-CB 质粒的 Ishikawa 细胞较稳转空载质粒 GV230-Vec 组细胞在卡铂和 PBS 作用下其

Carboplation(μg/ml)	QD	Inhibition rate(%)
0	0.614±0.015	0
4	0.538±0.052	12.2
16	0.465±0.045	24.3
32	0.436±0.020	28.9
64	0.338±0.007	44.9
128	0.332±0.016	45.9
256	0.214±0.008	65.1
512	0.103±0.018	83.3

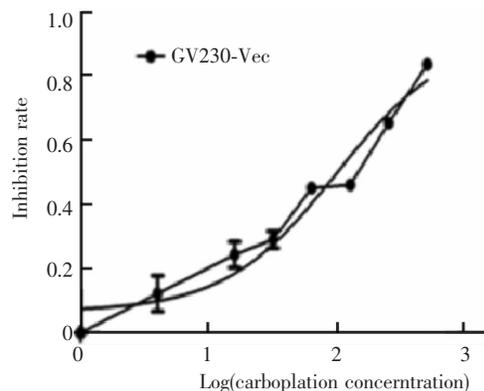


Figure 1 The relationship of carboplatin concentration-inhibition rate in Ishikawa cell after treated for 40h

calbindin-d28k mRNA 表达均显著性上调, 上调幅度约为 10 倍(Figure 2, P<0.01), 蛋白水平表达亦明显增加, 增加约 1.6 倍(Figure 3, P<0.05)。将此过表达 CaBP 细胞株用于后续实验。

2.3 卡铂对过表达 calbindin-d28k 蛋白的 Ishikawa 细胞的抑制情况

稳转 GV230-CB 质粒的 Ishikawa 细胞株过表达 calbindin-d28k 蛋白, 卡铂作用 40h 后细胞株表达 Cleaved caspase-3 含量增加, 而在表达 calbindin-

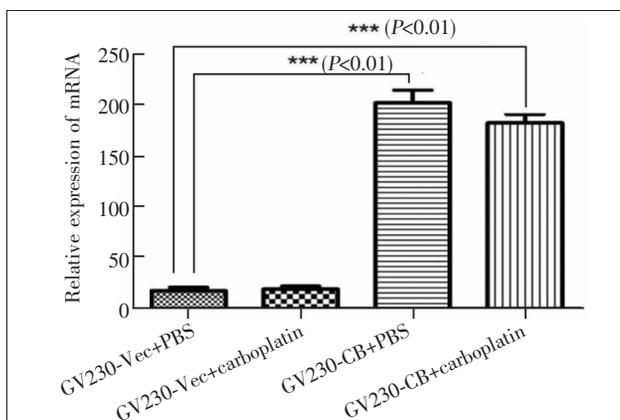


Figure 2 The expression of calbindin-d28k mRNA in different treatment groups

d28k 蛋白的细胞株可抑制 Cleaved caspas-3 蛋白表达, 表达量仅约为 GV230-Vec+卡铂组的 1/7 (Figure 4, $P < 0.05$)。

2.4 Hoechst33258 检测不同处理组 Ishikawa 细胞的凋亡

四组细胞 (①GV230-CB+PBS 组; ②GV230-Vec+PBS 组; ③GV230-CB+100 μ g/ml 卡铂; ④GV230-Vec+100 μ g/ml) 凋亡率分别为 5.1%、4.4%、19.1% 和 14.3%。即 100 μ g/ml 卡铂作用 40h 后可诱导 Ishikawa 细胞核发生浓缩、碎裂等改变(认为凋亡) ($P < 0.01$)。仅转染质粒的两组细胞 (GV230-CB+PBS 组和 GV230-Vec+PBS 组) 凋亡率无明显改变 ($P < 0.30$), 但 GV230-CB+卡铂组细胞凋亡率则明显低于 GV230-Vec+卡铂组 ($P < 0.05$) (Figure 5)。

3 讨论

晚期和复发的子宫内膜癌常需应用化疗^[6], 标准方案为铂类联合多柔比星、紫杉醇等。卡铂是临床常用化疗药物, 与顺铂而相比, 其具有相似的抗癌谱和抗癌效果, 但毒性作用更小, 常用于不能耐受顺铂毒性但对铂类仍敏感的肿瘤患者。其作用机制主要是与胞核内 DNA 共价结合形成 DNA-铂加合物从而抑制 DNA 复制, 转录, 干扰细胞生长, 通过错配修复, 激活相关蛋白酶和信

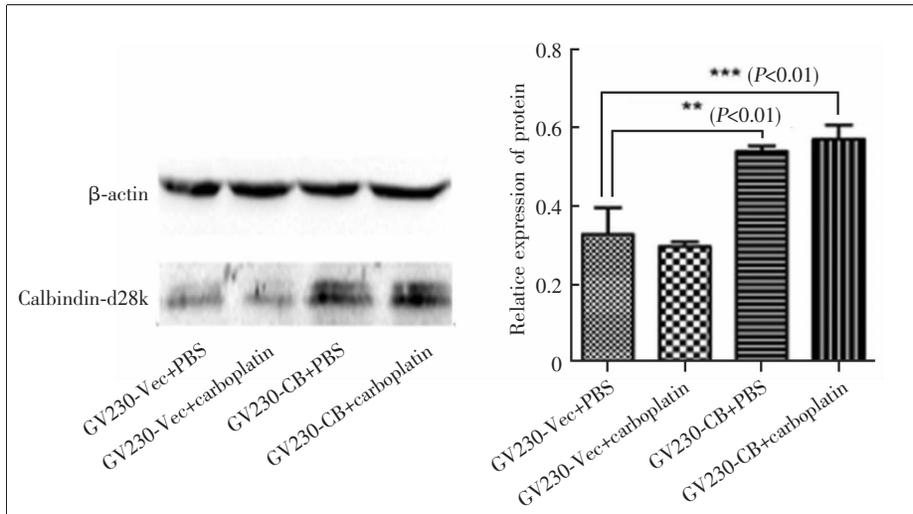


Figure 3 The expression of calbindin-d28k protein in different treatment groups

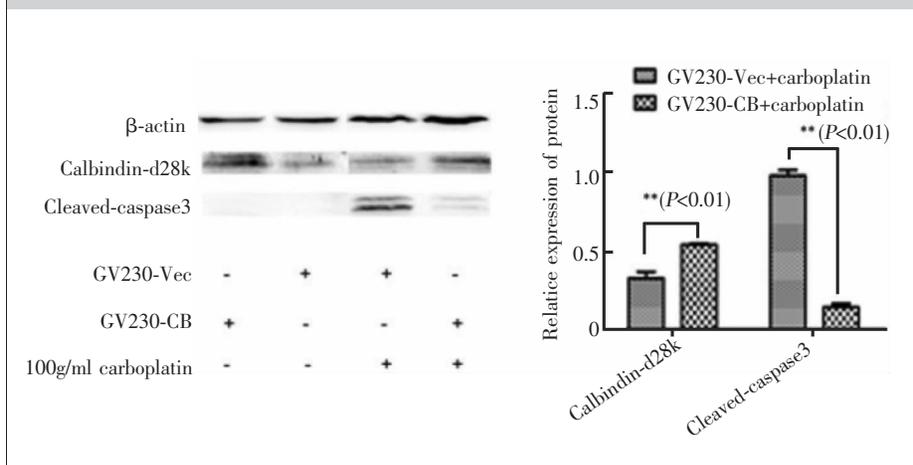
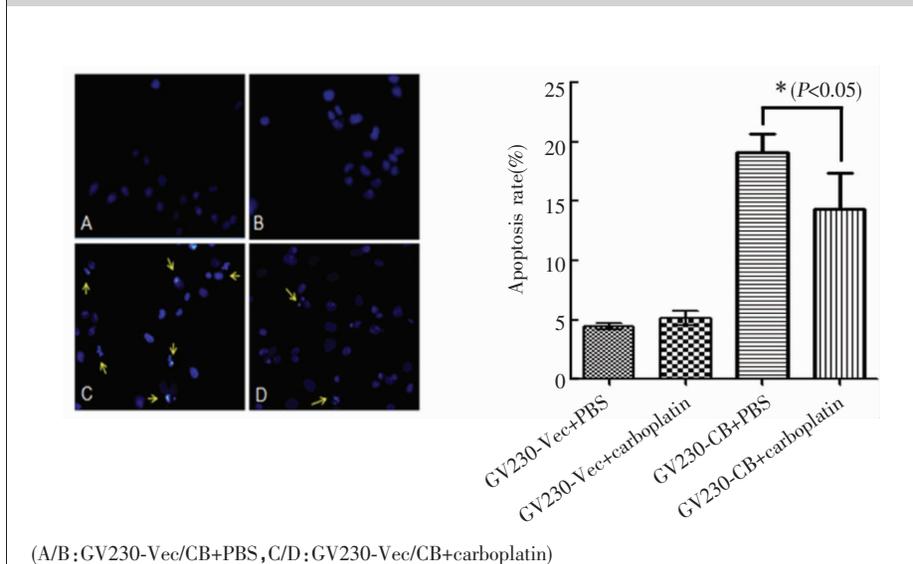


Figure 4 The expression of calbindin-d28k and Cleaved caspase-3 protein in different treatment groups



(A/B: GV230-Vec/CB+PBS, C/D: GV230-Vec/CB+carboplatin)

Figure 5 The apoptosis of Ishikawa cell in different treatment groups was determined through Hoechst 33258

号转导通路,激活细胞死亡受体,干扰正常线粒体代谢和氧化应激作用等途径诱导细胞凋亡和坏死^[7]。研究表明,DNA与铂形成的加合物可通过 Fas/Fas 配体复合物的信号通路激活 Caspase8 及 Caspase3,释放线粒体细胞色素 c 使凋亡蛋白酶激活因子 1 (Apaf-1) 激活 Caspase9 及 Caspase3,最终诱导细胞凋亡^[8],其中 Caspase-3 是卡铂诱导细胞凋亡的关键执行蛋白。Huang 等^[9]研究发现在肺癌铂类耐药细胞株中 Caspase 蛋白和 PARP 显著性下调。在顺铂耐药的前列腺癌细胞株中,将 Ambra1 转染至细胞中可使 Caspase3 失活,抑制凋亡发生并产生顺铂耐药^[10]。因此,多种因素导致的 Caspase 蛋白活性抑制可降低铂类化疗药物的促凋亡作用,进而降低抗肿瘤效果。

Calbindin-d28k 蛋白体内分布广泛,参与维持细胞钙离子稳态并在细胞分化生长、凋亡和侵袭迁移方面具有一定的调节作用。Calbindin-d28k 蛋白含有六个 EF 臂结合域,四个有活性的高亲和力钙离子结合域和两个无钙离子结合能力的调节结构域。Calbindin-d28k 蛋白在组织细胞中有钙离子缓冲作用,同时也是一类钙离子感应蛋白,与钙离子结合后可暴露疏水基团,为酶提供作用位点从而传导钙离子信号。已有多项研究证实 calbindin-d28k 蛋白的表达与神经细胞突触的生长密切相关,可通过抑制氧化应激作用,抑制活化的 Caspase-3、钙蛋白酶活性、Bax 裂解和稳定胞内钙离子浓度等保护神经元细胞免受各种刺激因素诱导的细胞死亡作用。Jung 等^[5]运用过氧化氢处理子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株,使其发生氧化应激作用而诱导凋亡,发现 calbindin-d28k 在宫内膜癌细胞株 Ishikawa 细胞中可通过阻断促凋亡基因 Bax、p53 和 Caspase3 的表达,抑制过氧化氢诱导的凋亡作用。因此,calbindin-d28k 蛋白可能通过多种途径抑制细胞凋亡。

本实验表明卡铂可诱导 Ishikawa 细胞凋亡,并呈剂量依赖型。100 μ l/ml 的卡铂溶液作用于子宫内膜癌 Ishikawa 细胞可上调细胞内活性 Caspase-3 蛋白,细胞核发生浓缩、碎裂等改变,最终诱发凋亡。而过表达 calbindin-d28k 蛋白的子宫内膜癌 Ishikawa 细胞,发生核浓缩、碎裂等形态学改变的细胞数量减少,伴有活性 Caspase-3 蛋白的表达减少,说明 Ishikawa 细胞胞质中过表达的 calbindin-d28k 蛋白

可能通过直接或间接增强钙离子缓冲能力、抑制钙离子超载促发的相关凋亡蛋白酶激活或其他通路降低活性 Caspase-3 蛋白表达等机制保护细胞免受卡铂影响。因此,calbindin-d28k 可能在增加内膜癌铂类化疗耐药中具有重要作用,但仍需进一步探索 calbindin-d28k 蛋白在子宫内膜癌中抑制凋亡的分子机制。

综上,过表达 calbindin-d28k 蛋白可通过减少凋亡执行蛋白 Caspase-3 表达抑制卡铂诱导的子宫内膜癌细胞凋亡作用。本研究为子宫内膜癌化疗耐药的机制提供了新线索,以 calbindin-d28k 蛋白为靶点的治疗有望提高子宫内膜癌化疗效果。Calbindin-d28k 在子宫内膜癌中的具体作用及机制仍有待进一步研究阐明。

参考文献:

- [1] Morice P, Leary A, Creutzberg C, et al. Endometrial cancer [J]. *Lancet*, 2016, 387(10023): 1094-1108.
- [2] Choi WS, Oh YJ. Calbindin-d28K prevents staurosporin-induced bax cleavage and membrane permeabilization [J]. *Exp Neurobiol*, 2014, 23(2): 173-177.
- [3] Rcom-H'cheo-Gauthier AN, Meedeniya AC, Pountney DL. Calcipotriol inhibits α -synuclein aggregation in SH-SY5Y neuroblastoma cells by a Calbindin-D28k-dependent mechanism [J]. *J Neurochem*, 2017, 141(2): 263-274.
- [4] Zetzmann K, Strehl J, Geppert C, et al. Calbindin D28k-immunoreactivity in human enteric neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): pii: E194.
- [5] Jung EM, Choi KC, Jeung EB. Expression of calbindin-D28k is inversely correlated with proapoptotic gene expression in hydrogen peroxide-induced cell death in endometrial cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(4): 1059-1166.
- [6] Bradford LS, Rauh-Hain JA, Schorge J, et al. Advances in the management of recurrent endometrial cancer [J]. *Am J Clin Oncol*, 2015, 38(2): 206-212.
- [7] Castrellon AB, Pidhorecky I, Valero V, et al. The role of carboplatin in the neoadjuvant chemotherapy treatment of triple negative breast cancer [J]. *Oncol Rev*, 2017, 11(1): 324.
- [8] Schaaf GJ, Maas RF, De Groene EM, et al. Management of oxidative stress by heme oxygenase-1 in cisplatin-induced toxicity in renal tubular cells [J]. *Free Radic Res*, 2002, 36(8): 835-843.
- [9] Huang Z, Yang C, Sun S, et al. Heat shock protein 27, a novel regulator of transforming growth factor β induced resistance to cisplatin in A549 cell [J]. *Pharmacology*, 2017, 100(5-6): 283-291.
- [10] Liu J, Chen Z, Guo J, et al. Ambra1 induces autophagy and desensitizes human prostate cancer cells to cisplatin [J]. *Biosci Rep*, 2017, pii: BSR20170770.