

DAB2IP 基因沉默引起的前列腺癌细胞辐射耐受 与 ATM 的相关性研究

杨晨¹ 章婷婷¹ 陈莹² 孔肇路¹

¹ (复旦大学放射医学研究所 上海 200032)

² (淮安市妇幼保健院儿童保健科 淮安 223002)

摘要 实验以具有不同卵巢癌差异表达基因 2 相互作用蛋白(Disabled homolog 2 interaction protein, DAB2IP)表达的前列腺癌细胞为研究对象, 讨论 DNA 损伤修复关键蛋白-共济失调毛细血管扩张症基因突变(Ataxia-telangiectasia mutated, ATM)在 DAB2IP 影响肿瘤细胞放射敏感性中的作用。研究比较了单纯 γ -射线(0、2、4、6、8 Gy)和 ATM 特异性抑制剂-KU55933(10 μ mol/L)联合射线作用后, 不同 DAB2IP 表达的前列腺癌细胞集落形成率的差异; 采用 qRT-PCR 及 Western blot 方法分别检测了 2 Gy 和 KU55933+2 Gy 照射后, 细胞内 ATM 在翻译转录、蛋白表达和磷酸化水平的变化。结果显示, 同一吸收剂量下, DAB2IP 基因沉默的前列腺癌细胞, 集落形成能力明显高于 DAB2IP 阳性表达的对照组细胞, 并伴随着 ATM 合成与磷酸化水平的提高。KU55933 通过抑制 ATM 的翻译转录与蛋白磷酸化, 可显著增强射线对低表达 DAB2IP 的辐射耐受细胞的损伤作用。提示 ATM 是 DAB2IP 基因沉默引起肿瘤细胞辐射耐受的关键分子, 可以 ATM 为靶点筛选药物, 提高 DAB2IP 基因缺陷的肿瘤患者对放射治疗的敏感性。

关键词 前列腺癌, 辐射敏感性, 卵巢癌差异表达基因 2 相互作用蛋白, 共济失调毛细血管扩张症基因突变
中图分类号 R811.5, TL72 **DOI:** 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.020203

卵巢癌差异表达基因 2 相互作用蛋白(Disabled homolog 2 interaction protein, DAB2IP)是 Ras-GTP 酶激活蛋白家族的新成员^[1], 通过介导多种肿瘤相关信号通路, 如 MAPK-ERK^[2], PI3K-Akt^[3], ASK1-JNK^[4]和 GSK-3 β -catenin^[5-7]等, 影响细胞的增殖、存活和凋亡。临床研究发现, 在多种肿瘤组织(如前列腺癌、肺癌、乳腺癌、胃肠道肿瘤、肝癌等)中, DAB2IP 启动子 5'区域的异常甲基化引起 DAB2IP 基因下调和转录失活, 促进肿瘤细胞的增生和侵袭, 从而导致肿瘤的恶性进展与治疗预后不佳^[8]。细胞水平研究证实 DAB2IP 缺失可以引起肿瘤细胞对电离辐射的耐受^[9]。前期研究发现, 抑制 DAB2IP 表达可以上调共济失调毛细血管扩张症基因突变(Ataxia-telangiectasia mutated, ATM)蛋白磷酸化, 提示 DAB2IP 对肿瘤细胞辐射敏感性的影响可能是通过 ATM 介导, 但具体效应分子及作

用机制尚不明确。

本研究通过 KU55933 抑制 ATM 的活化, 讨论 ATM 在 DAB2IP 基因沉默引起前列腺癌细胞辐射耐受中的作用, 为提高恶性前列腺癌的放射治疗疗效提供新的靶点与理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

具有不同 DAB2IP 表达的人前列腺癌细胞 PC3 shVector, PC3 shDAB2IP 以及 Anti-DAB2IP 抗体由美国德州大学 JT Hsieh 教授馈赠^[3]。一抗: ATM, phospho-ATM (pS1981) 源自 Abcam 公司。 β -actin、辣根过氧化物酶标记的二抗购于碧云天生物技术研究, KU55933 购于 TOCRIS 公司, 溶于 DMSO 配成 10 mmol/L 的储存液。

基金资助: 国家自然科学基金项目(31270896)、上海市自然科学基金项目(11ZR1402100)、留学回国人员科研启动基金 44-8 和复旦大学卓学计划资助

第一作者: 杨晨, 女, 1991 年 3 月出生, 2012 年毕业于吉林医药学院管理专业, 现为复旦大学放射医学研究所放射生物学方向在读硕士研究生

通讯作者: 孔肇路, 博士, 副研究员, E-mail: kongzhaolu@fudan.edu.cn

收稿日期: 初稿 2014-12-15; 修回 2015-01-05

1.2 辐照条件与给药方式

照射用 ^{137}Cs γ -射线装置 (Gammacell-40, 加拿大 MDS Nordion 公司), 辐照腔容积 7.5 L, 中心剂量率为 0.77 Gy/min。KU55933 在照射前 1 h 加入细胞培养液中, 作用浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 集落法检测细胞放射敏感性

取对数生长期的细胞悬液, 计数后接种于 60 mm 培养皿, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱内培养 2 h, 待细胞贴壁后给予不同剂量(0、2、4、6、8 Gy)照射或 KU55933 联合照射。分别继续培养 1 周(PC3 shDAB2IP)和 2 周(PC3 shVector)后, 用结晶紫染色计克隆数(>50 细胞为 1 克隆)。细胞存活率可用下列公式进行计算:

接种效率(PE)=(对照组克隆数/细胞接种数) $\times 100\%$;

细胞存活率=(实验组克隆数/细胞接种数 $\times$ PE) $\times 100\%$ 。

以 SigmaPlot 11.0 软件按照下列公式拟合细胞存活曲线, 并计算 2 Gy 剂量照射下细胞存活分数(Survival fraction at 2 Gy, SF₂)。

$$\text{SF}=\exp(-ax-bx^2)$$

1.4 实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)检测细胞中 ATM mRNA 水平

对对数生长期的细胞进行分组: ①未处理的对照组(NC), ②单纯 2 Gy 照射组, ③单纯给予 10 $\mu\text{mol/L}$ KU55933 的用药组, ④射线联合药物组。作用 24 h 后弃培养液, 加入 TRIZOL, 氯仿异丙醇法提取 RNA, 按试剂盒方法(北京 Tiangen 公司)进行逆转录和实时定量聚合酶链反应。95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 然后进行以下循环: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 共进行 40 个循环。产物经溶解曲线单峰验证, 于 T 阶段采集信号获得 Ct 值, 以 GAPDH 为内参基因, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法对样本基因进行表达差异相对定量分析。

采用公式: $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{CT}_{\text{ATM}}-\text{CT}_{\text{GAPDH}})_{\text{实验组}}-(\text{CT}_{\text{ATM}}-\text{CT}_{\text{GAPDH}})_{\text{对照组}}$, 比较不同实验条件下细胞内 ATM mRNA 含量的差异。

引物由南京金斯瑞设计合成 ATM: forward: 5'-TTAAGGTGGACCACACAGGA-3', reverse: 5'-GGCCCTTAACAAGCTGTCTC-3', GAPDH forward:

5'-CACCAACTGGGACGACAT-3', reverse: 5'-ACAGCCTGGATAGCAACG-3'。

1.5 目标蛋白检测

对数生长期的细胞分组同 1.4 节。作用后 2 h 内收集细胞, 加入适量的细胞裂解液吹打混匀, 冰浴裂解、离心、收集上清、蛋白定量、变性后 20 μg 蛋白/孔上样电泳、转膜, 免疫化学检测蛋白表达, β -actin 为内参, 化学发光仪采集图像。

1.6 数据处理与统计分析

实验重复 3 次, 数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 经 SPSS 10.0 统计软件分析, 组间比较采用两独立样本 t -检验, $p<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KU55933 对 DAB2IP 基因沉默的前列腺癌细胞克隆形成能力的影响

集落形成实验显示: γ -射线作用后, DAB2IP 表达抑制的 PC3 shDAB2IP (图 1, 内嵌小图) 细胞克隆形成能力明显高于对照组 PC3 shVector。KU55933 显著降低 PC3 shDAB2IP 照射后的克隆形成数, 而对 PC3 shVector 细胞作用不明显 (图 1)。PC3 shVector 和 PC3 shDAB2IP 细胞单纯照射时 SF₂ 分别为 0.35 ± 0.02 和 0.73 ± 0.08 , 照射前予以 KU55933 处理, 两种细胞 SF₂ 分别下降至 0.27 ± 0.03 和 0.41 ± 0.02 (图 2), 提示 KU55933 可以显著提高射线对 PC3 shDAB2IP 的损伤作用, 而对 PC3 shVector 细胞无明显影响。

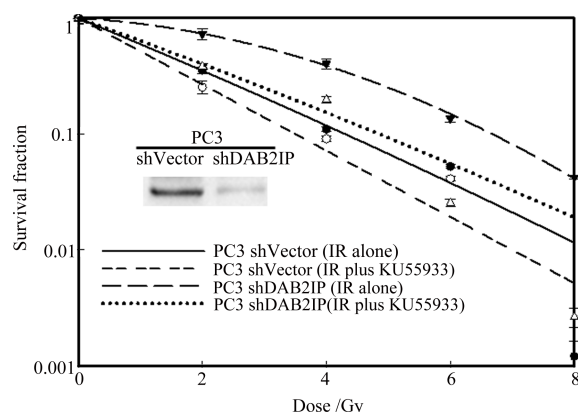


图 1 KU55933 对前列腺癌细胞辐射敏感性的影响

Fig.1 Effects of KU55933 on prostate cancer cells sensitivity to ionizing radiation

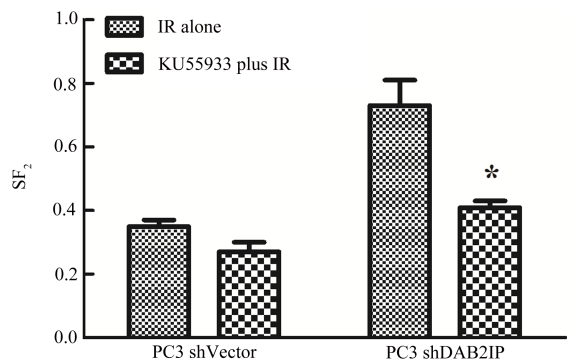


图 2 不同处理条件下的 SF₂ 值变化(*与左侧单纯照射组相比, $p<0.05$, $n=3$)

Fig.2 SF₂ of cells treated with IR or IR plus KU55933(*compared with left column, $p<0.05$, $n=3$)

2.2 KU55933 对 PC3 shDAB2IP 细胞内 ATM 的合成与磷酸化的影响

为了明确 KU55933 增强射线对 PC3 shDAB2IP 细胞损伤的作用机制, 实验从 mRNA、总蛋白表达、蛋白磷酸化三个层面对细胞中 ATM 的含量变化进行了观察。图 3 显示, 在无任何处理的条件下(NC), PC3 shDAB2IP 细胞内 ATM mRNA 的含量显著高于 PC3 shVector($p<0.0001$)。单纯 KU55933 作用, 可以一定程度上抑制 PC3 shDAB2IP 细胞内 ATM mRNA 的合成(下降 $27.24\pm1.01\%$), 而对 PC3 shVector 无明显影响。单纯射线作用, PC3 shVector 和 PC3 shDAB2IP 细胞内 ATM mRNA 含量均呈现出迅速的升高。而在 KU55933 联合射线组, 可以观察到射线引起的 ATM mRNA 含量升高被 KU55933 显著抑制, 尤其是在 PC3 shDAB2IP 细胞, 同单纯照射组相比, 联合作用后, ATM mRNA 合成下降了 $(49.41\pm0.01)\%$, 而在 PC3 shVector 细胞中的 ATM

mRNA 合成仅下降 $(20.00\pm0.28)\%$ 。

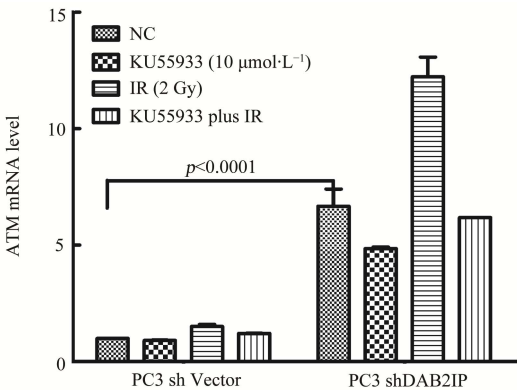


图 3 qRT-PCR 检测不同处理条件下的细胞内 ATM mRNA 含量
Fig.3 Relative levels of mRNA expression of ATM in cells under different treatment were detected by qRT-PCR

进一步用蛋白免疫印迹杂交方法对 KU55933 影响细胞中 ATM 总蛋白和磷酸化 ATM 的表达进行了检测。如图 4 所示, 无论在高表达 DAB2IP 的 PC3 shVector 细胞还是在低表达 DAB2IP 的 PC3 shDAB2IP 中, 都可以观察到射线诱导 ATM 总蛋白和磷酸化 ATM 含量增加, 而 KU55933 可以显著的抑制射线引起的 ATM 磷酸化并一定程度上减少总蛋白的合成。值得注意的是, 在未经任何处理的细胞中, PC3 shDAB2IP 中磷酸化 ATM 的含量远高于 PC3 shVector, 结合图 3 中所观察到 PC3 shDAB2IP 细胞中高水平的 ATM mRNA, 提示 ATM 合成与磷酸化的升高可能是 DAB2IP 基因沉默细胞对射线耐受的重要原因, 而 KU55933 对 PC3 shDAB2IP 细胞内 ATM 蛋白在转录和磷酸化水平合成的有效抑制决定了其可以显著增强细胞对射线的敏感性。

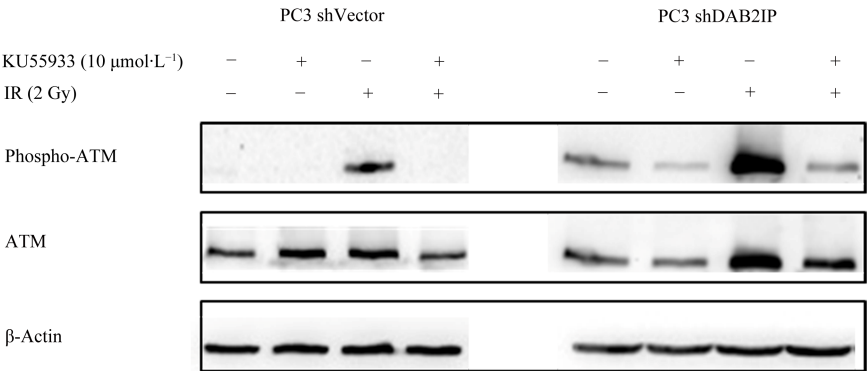


图 4 KU55933 对前列腺癌细胞中 ATM 蛋白表达与活化的影响
Fig.4 The effect of KU55933 on ATM expression and activation in prostate cancer cells

3 讨论

放射治疗作为局限性前列腺癌的可治愈手段,具有疗效确切、并发症少的优点,广泛的用于各期前列腺癌的治疗^[10]。2014年,Saha等^[11]报道了肿瘤组织中DAB2IP蛋白低表达的前列腺癌患者放射治疗的预后明显差于正常表达DAB2IP的患者,之前的离体研究^[9]也证实了DAB2IP缺失可以引起前列腺癌细胞对电离辐射的耐受,其作用机制可能涉及DNA双链断裂损伤修复能力增强,G₂/M检查点功能活跃和抗凋亡作用等。ATM是细胞DNA损伤修复的关键蛋白,参与细胞周期的调控,同时负责维持细胞增殖凋亡的动态平衡^[12]。这些资料提示,ATM可能在DAB2IP表达抑制的肿瘤细胞辐射耐受中起着重要作用。因此,本文对DAB2IP基因沉默引起的前列腺癌细胞辐射耐受与ATM的相关性开展了实验研究,希望可以进一步深入明确DAB2IP基因沉默引起前列腺癌细胞辐射耐受的作用机制,并为提高这部分细胞的辐射敏感性提供思路与手段,为临床肿瘤治疗制定个性化方案提供理论依据。

实验首先验证了DAB2IP基因沉默会造成前列腺癌细胞的辐射耐受(图1),PC3 shVector和PC3 shDAB2IP的SF₂分别为0.35±0.02和0.73±0.08,即:两者接受2 Gy照射时,对γ射线的敏感性相差一倍。通过对比PC3 shVector和PC3 shDAB2IP细胞中ATM mRNA、总蛋白和磷酸化蛋白含量的差异,发现较正常表达DAB2IP的PC3 shVector,DAB2IP基因沉默伴随着细胞中ATM mRNA水平的升高(图3)与磷酸化ATM含量的增加(图4)。射线作用可以引起PC3 shDAB2IP细胞中ATM mRNA,总ATM和磷酸化ATM含量的迅速增加,而在PC3 shVector细胞中,射线的这一作用较弱。实验中所观察到的这一系列现象均为前期设想ATM可能是DAB2IP表达抑制引起肿瘤细胞辐射耐受的关键分子提供了依据,提示以ATM为靶点设计药物可以选择性的提高射线对DAB2IP基因沉默的肿瘤细胞的损伤作用,提高放射治疗的疗效。

KU55933是特异性的ATM抑制剂^[13],集落实验证实照射前予以10 μmol/L KU55933处理,可以强烈抑制PC3 shDAB2IP细胞内ATM的合成与磷酸化(图3和图4),显著提高细胞对射线的敏感性(图1)。同单纯照射组相比,KU55933联合射线作用的细胞存活曲线的肩区消失,提示KU55933通过抑制

ATM表达与活化下调了PC3 shDAB2IP细胞对射线损伤的修复能力,是提高这些细胞对射线敏感性的有效手段。鉴于ATM是具有广泛生物学作用的蛋白分子,抑制其表达活化在整体条件下可能引起机体某些不可预见的变化,体内环境下,ATM抑制剂能否具有良好的选择性增强DAB2IP基因沉默的肿瘤细胞辐射敏感性还有待进一步实验证实。

参考文献

- 1 Chen H, Pong R, Wang Z, *et al.* Differential regulation of the human gene DAB2IP in normal and malignant prostatic epithelia: Cloning and characterization [J]. *Genomics*, 2002, **79**(4): 573-581.
- 2 Min J, Zaslavsky A, Fedele G, *et al.* An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappa B [J]. *Nature Medicine*, 2010, **16**(3): 286-294.
- 3 Xie D, Gore C, Zhou J, *et al.* DAB2IP coordinates both PI3K-Akt and ASK1 pathways for cell survival and apoptosis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, **106**(47): 19878-19883.
- 4 Zhang H, Zhang R, Luo Y, *et al.* AIP1/DAB2IP, a novel member of the Ras-GAP family, transduces TRAF2-induced ASK1-JNK activation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(43): 44955-11965.
- 5 Zhang R, He X, Liu W, *et al.* AIP1 mediates TNF-alpha-induced ASK1 activation by facilitating dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3 [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, **111**(12): 1933-1943.
- 6 Liu Y, Yin G, Surapichat J, *et al.* Laminar flow inhibits TNF-induced ASK1 activation by preventing dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3 [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2001, **107**(7): 917-923.
- 7 Zhang L, Chen J, Fu H. Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, **96**(15): 8511-8515.
- 8 章婷婷, 孔肇路. DAB2IP基因与肿瘤 [J]. 免疫标记分析与临床, 2013, **20**(4): 277-280.
ZHANG Tingting, KONG Zhaolu. DAB2IP gene and Tumour [J]. *Labeled Immunoassays & Clinical Medicine*, 2013, **20**(4): 277-280.
- 9 Kong Z, Xie D, Boike T, *et al.* Downregulation of Human

- DAB2IP Gene Expression in Prostate Cancer Cells Results in Resistance to Ionizing Radiation [J]. Cancer Research, 2010, **70**(7): 2829-2839.
- 10 王雅棣, 李奕彤. 前列腺癌的放射治疗 [J]. 癌症进展, 2014, **12**(1): 16-21.
- WANG Yali, LI Yitong. Radiation therapy for prostate cancer [J]. Oncology Progress, 2014, **12**(1): 16-21
- 11 Jacobs C, Tumati V, Kapur P, *et al.* DOC-2/DAB2 interacting protein status in high-risk prostate cancer correlates with outcome for patients treated with radiation therapy [J]. International Journal of Radiation Oncology·Biology·Physics, 2014, **89**(4): 729-735.
- 12 Chaudhary M W, Al-Baradie R S. Ataxia-telangiectasia: future prospects [J]. The Application of Clinical Genetics, 2014, **7**: 159-167.
- 13 Hickson I, Zhao Y, Richardson C J, *et al.* Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM [J]. Cancer Research, 2004, **64**: 9152-9159.

Relationship between expression level of ATM and DAB2IP-knockdown induced radio-resistance in prostate cancer cells

YANG Chen¹ ZHANG Tingting¹ CHEN Ying² KONG Zhaolu¹

¹(The Institute of Radiation Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China)

²(Huai'an Women and Children Hospital, Huai'an 223002, China)

ABSTRACT The role of ATM in radio-resistant PCa cells caused by DAB2IP knockdown was investigated in this study. The response of two PCa cell lines, PC3 shVector and PC3 shDAB2IP to γ -rays (0, 2, 4, 6, 8 Gy) alone or combined with 10 μ mol/L KU55933, an ATM inhibitor, were measured by a colony formation assay. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and western blot were used to determine the amount of ATM mRNA and ATM phosphorylation, respectively. The results showed that DAB2IP-knockdown cells (PC3 shDAB2IP) exhibited increased clonogenic survival in response to IR compared with control cells (PC3 shVector) expressing an endogenous level of DAB2IP. KU55933 significantly sensitized PC3 shDAB2IP cells to IR due to inhibition the ATM mRNA synthesis and ATM phosphorylation. It suggests that elevated ATM expression and activation observed in DAB2IP deficient cells could be a key event in resulting in resistance to IR, and ATM inhibitor could be applied to improve the radio-sensitivity of PCa patients with DAB2IP genetic defects.

KEYWORDS Prostate cancer, Radio-sensitivity, Disabled homolog 2 interaction protein, Ataxia-telangiectasia mutated

CLC R811.5, TL72