

CD147 抑制前列腺癌细胞氧化应激作用

徐海月¹, 李泽颢¹, 韩永琪¹, 王立国², 方芳¹

摘要 目的 探讨 CD147 减轻过氧化氢诱导的细胞氧化应激对前列腺癌细胞(LNCaP)损伤的作用。方法 利用慢病毒系统建立沉默 CD147 的前列腺癌细胞模型(LNCaP/shCD147 细胞),同时设立阴性对照细胞(LNCaP/Scramble 细胞),并进行 RT-qPCR 验证。通过检测 LNCaP/shCD147 和 LNCaP/Scramble 两种细胞中活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性及丙二醛(MDA)的含量以验证沉默 CD147 后前列腺癌细胞氧化应激和抗氧化酶的变化;而后向细胞内加入过氧化氢(H_2O_2),CCK-8 法检测细胞生长;Western blot 检测核因子 E2 相关因子(Nrf2)和血红素加氧酶-1(HO-1)的表达变化,验证沉默 CD147 后前列腺癌细胞发生的氧化应激与 PI3K/AKT 信号通路之间的关系。结果 成功构建沉默 CD147 的前列腺癌细胞模型,与 LNCaP/Scramble 细胞相比,mRNA 中 CD147 表达量降低($P < 0.01$)。氧化应激结果显示沉默 CD147 后细胞内 ROS 和 MDA 含量增高($P < 0.01$, $P < 0.05$),而 SOD 和 GSH-PX 的活性下降($P < 0.01$),表明沉默 CD147 后,LNCaP/shCD147 细胞发生氧化应激作用。此外,随着 H_2O_2 浓度的升高 LNCaP/shCD147 组细胞的存活率下降($P < 0.01$)。当抑制 PI3K/AKT 信号通路后,LNCaP/shCD147 组 Nrf2 和 HO-1 表达量均降低($P < 0.01$),表明 CD147 通过 PI3K/AKT 通路抑制前列腺癌细胞的氧化应激损伤。结论 CD147 可减轻前列腺癌细胞的氧化应激损伤,其抑制机制可能与 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词 CD147;氧化应激;前列腺癌;PI3K/AKT

中图分类号 R 737.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0144-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.027

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是一种恶性肿瘤,是全世界男性癌症死亡的主要原因之一^[1]。

2021-09-21 接收

基金项目:吉林省卫生与健康技术创新项目(编号:20207076);吉林省教育厅科学技术研究项目(编号:JKH20210491KJ);吉林医药学院大学生创新创业项目(编号:201913706006)

作者单位:¹ 吉林医药学院检验学院医学免疫学教研室,吉林 132013

² 吉林医药学院附属医院,吉林 132013

作者简介:徐海月,女,硕士;

方芳,女,博士,硕士生导师,责任作者,E-mail: jlmme-fang@163.com

PCa 多发生于 55 岁以上男性患者,高脂饮食、炎症、性激素失衡等是导致其发生的危险因素,这些因素与氧化应激密切相关。活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)是氧化应激反应中产生的一种最为重要的氧化性介质。一定水平的 ROS 有助于机体抵御感染等引起的炎症反应、促进细胞增殖等作用;而过量的 ROS 可能对细胞造成不同程度的氧化性损伤^[2]。因此,调节肿瘤氧化应激的分子对肿瘤的治疗至关重要。

分化簇(CD)147(CD147),是一种属于免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白,在 PCa 等恶性肿瘤中表达增高^[3-5]。研究^[6]表明,在黑色素瘤细胞中删除 CD147 的表达使细胞对过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)诱导的氧化应激更为敏感。然而 CD147 对调节 PCa 细胞氧化应激作用尚不清楚。该研究旨在探讨 CD147 对 PCa 细胞氧化应激的调节作用,为 PCa 的临床治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 胰酶、胎牛血和 RPMI-1640 购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒购自北京博奥森公司;活性氧(ROS)检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;RNA 提取试剂盒购自北京索莱宝公司;反转录试剂盒及实时定量 PCR 试剂盒购自美国 GeneCopoeia 公司;PCR 引物由库美公司合成;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒购自南京建成生物科技有限公司;Nrf2 和 HO-1 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;内参抗体 β -actin 抗体购自美国 Gene Tex 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 低表达 CD147 的实验组 LNCaP 细胞(LNCaP/shCD147)和阴性对照组 LNCaP 细胞(LNCaP/Scramble)由本实验室保存^[7]。细胞用含 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养,隔日换液。

1.2.2 RT-qPCR 鉴定 CD147 mRNA 表达 采用有机溶剂抽提法 TRIzol 法提取细胞总 RNA,定量后逆转录为 cDNA,以 β -actin 为内参照,RT-qPCR 检测

CD147 mRNA 表达量,用基因相对定量法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算结果。 β -actin 的上游引物序列为 5'-CACTGTGCCCATCTACGAGG-3',下游引物序列为 5'-TAATGTCACGCACGATTTCC-3';CD147 的上游引物序列为 5'-CAGAGTGAAGGCTGTGAAGTCG-3',下游引物序列为 5'-TGCGAGGAAGTCAAGAA-3'。

1.2.3 流式细胞仪检测 ROS 收集两组细胞,1 000 r/min 离心 5 min 后吸除上清液,用无菌 PBS 溶液洗涤 2 次。细胞内 ROS 水平检测按照 ROS 检测试剂盒说明书进行。即每份样本细胞中加入 1 ml 的 DCFH-DA 稀释液(无血清 DMEM 培养液按照 1:1 000 比例稀释),混匀后置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱内避光孵育 30 min,用 PBS 洗涤细胞并重复 3 次,重悬细胞于 0.5 ml PBS 中,用流式细胞仪进行检测和分析。

1.2.4 SOD、GSH-PX 和 MDA 水平的检测 收集细胞离心,将各组细胞沉淀用 PBS 重悬后超声裂解,离心后取上清进行蛋白含量测定,抗氧化酶(SOD, GSH-PX)活性及 MDA 含量的检测严格按照试剂盒说明书进行操作,分光光度计测吸光度。

1.2.5 CCK-8 实验观察细胞活力 取对数期细胞配制成浓度为 4×10^5 个/L 的单细胞悬液,体积为每孔 100 μ l,接种于 96 孔板内,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。待细胞贴壁后将培养基吸掉,分别加入终浓度为 100、200、400、800 μ mol/L 的 H₂O₂ 稀释液,同时设立阴性对照组,每组设 4 个复孔,分别作用 2、4 h 后,每孔避光加入 10 μ l CCK-8 溶液,待培养液显色后用酶标仪检测 450 nm 吸光度值,以细胞的存活率表示细胞的活力。

1.2.6 Western blot 检测细胞中 p-AKT、AKT、Nrf2 和 HO-1 蛋白表达 将两组细胞用无菌 PBS 缓冲液清洗 3 次,再用 RIPA 细胞裂解液冰上静置 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液蛋白定量后加入上样缓冲液,煮沸 5 min,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中每个泳道加入 20 μ l(含 40 μ g)的总蛋白电泳分离,转印至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h,加入兔抗 p-AKT、AKT、Nrf2 和 HO-1 抗体(1:500)、 β -actin 和 Histone H3 抗体(1:1 000)4 °C 过夜。次日 TBST 洗膜,分别加入 HRP 标记的羊抗兔抗体(1:5 000),室温避光孵育 45 min,TBST 洗膜后 ECL 化学发光显影,Image J 软件分析目的蛋白相对表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差

分析,两两比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR 鉴定 H₂O₂ 刺激下细胞内 CD147 的表达 采用不同浓度的 H₂O₂ 刺激 LNCaP 细胞后,CD147 的表达逐渐增加($P < 0.001$)。见图 1。

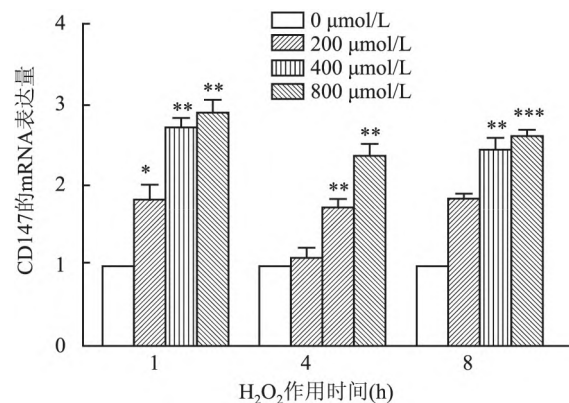


图1 H₂O₂ 刺激下 CD147 的表达情况

与 0 μ mol/L 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 RT-qPCR 鉴定细胞 CD147 的表达 结果显示,与 LNCaP/Scramble 组细胞 CD147 表达水平比较,LNCaP/shCD147 组 CD147 的表达下降,差异有统计学意义($F = 64.408, P < 0.01$)。

2.3 沉默 CD147 对细胞 ROS 含量影响 流式细胞仪检测两组细胞内 ROS 含量,结果显示阴性对照组 LNCaP/Scramble 细胞 ROS 含量为 (3.60 ± 0.84),细胞模型组 LNCaP/shCD147 细胞内 ROS 水平为 (13.23 ± 0.76),与阴性对照组比较,细胞模型组 ROS 增高($F = 33.825, P < 0.01$)。见图 2。

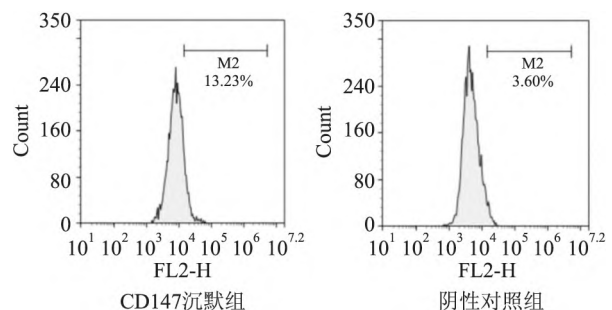


图2 沉默 CD147 表达对 ROS 的生成影响

2.4 沉默 CD147 对 SOD、GSH-PX 活性和 MDA 含量影响 LNCaP/Scramble 组细胞抗氧化酶 SOD、GSH-PX 的活性值和 MDA 的含量分别是 ($41.563 \pm$

1.873)、 (30.341 ± 1.261) 和 (2.562 ± 0.264) ; LNCaP/shCD147 细胞组细胞抗氧化酶 SOD、GSH-PX 的活性值和 MDA 的含量分别是 (250.755 ± 12.502) 、 (173.112 ± 14.591) 和 (3.678 ± 0.398) 。与 LNCaP/Scramble 组相比较, LNCaP/shCD147 细胞 SOD、GSH-PX 的活性降低 ($F = 74.376, 48.999, P < 0.01$), 而细胞上清中 MDA 的含量升高 ($F = 16.568, P < 0.05$)。

2.5 沉默 CD147 对 H_2O_2 诱导的细胞损伤的影响

CCK-8 方法检测细胞存活率, 结果显示: 与 LNCaP/Scramble 组比较, 当 $400 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用细胞 2 h 时, LNCaP/shCD147 细胞存活率下降 ($F = 8.328, P < 0.05$), 并且随着 H_2O_2 浓度的升高细胞存活比率越低 ($F = 26.172, P < 0.01$)。当 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 LNCaP/shCD147 细胞 4 h 后, 细胞存活率下降 ($F = 14.763, P < 0.05$), 随着 H_2O_2 浓度的升高 LNCaP/shCD147 组细胞存活率逐渐下降 ($F = 78.790, 151.603, P < 0.01$)。见图 3。

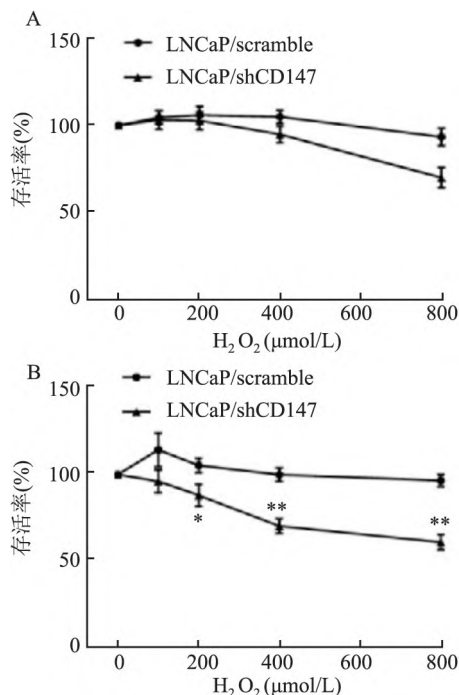


图3 沉默 CD147 对过氧化氢诱导的细胞存活影响

A: 不同浓度 H_2O_2 作用 2 h 后细胞存活率变化; B: 不同浓度 H_2O_2 作用 4 h 后细胞存活率变化; 与 LNCaP/scramble 组比较: ** $P < 0.01$

2.6 CD147 通过 PI3K/AKT 途径抑制氧化应激

实验结果表明, 与对照组 LNCaP/Scramble 比较, LNCaP/shCD147 细胞中 Nrf2 和 HO-1 表达降低 ($F = 38.495, 73.597, P < 0.01$)。与 LNCaP/shCD147 细

胞组比较, 采用 $20 \mu\text{mol/L}$ PI3K/AKT 途径抑制剂 LY294002 作用细胞 24 h 后, LNCaP/shCD147 细胞中 Nrf2 和 HO-1 表达进一步降低 ($F = 50.342, 47.756, P < 0.01$)。见图 4。

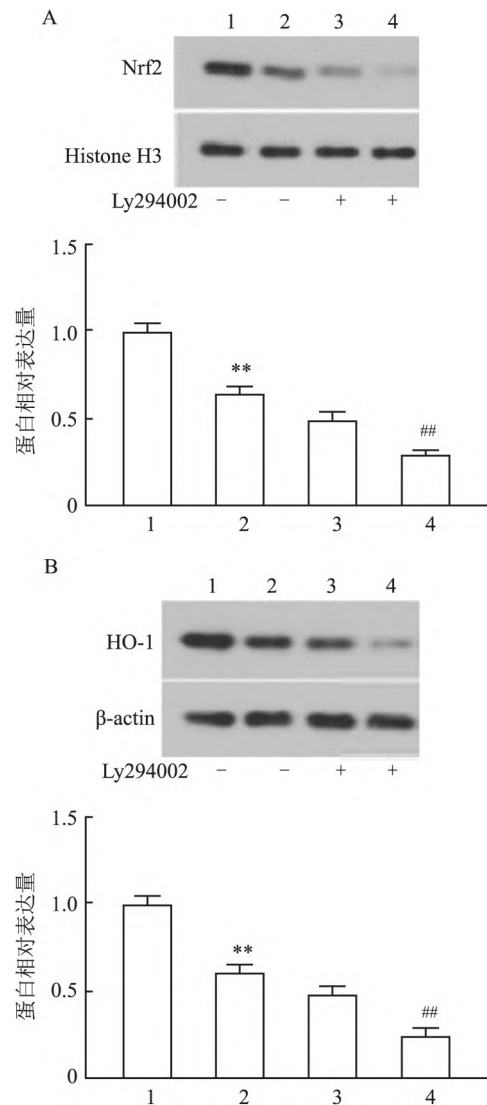


图4 沉默 CD147 促进 H_2O_2 作用 LNCaP 细胞 Nrf2 和 HO-1 的表达

A: 各组 Nrf2 蛋白表达; B: 各组 HO-1 蛋白表达; 1: LNCaP/scramble 组; 2: LNCaP/shCD147 组; 3: LNCaP/scramble + LY294002 组; 4: LNCaP/shCD147 + LY294002 组; 与 LNCaP/scramble 组比较: ** $P < 0.01$; 与 LNCaP/shCD147 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

氧化应激在 PCa 发生发展中起重要作用。与 PCa 旁的正常前列腺组织相比, PCa 组织中产生更高水平的内源性 ROS, 促进肿瘤细胞的增殖和新血管形成等^[8]。然而, 过量的 ROS 可引起氧化应激, 破坏、氧化脂质和蛋白质等导致细胞凋亡和坏死。

因此,探讨肿瘤细胞在 ROS 作用下的分子机制,有望为治疗肿瘤提供新的线索。

首先通过 RT-qPCR 的实验检测到,选用不同浓度及不同时间点的 H_2O_2 作用 LNCaP 细胞后,CD147 表达逐渐升高,这表明 CD147 可能参与了细胞内的氧化应激。接下来利用特异性 siRNA 干扰技术成功降低了 CD147 在 PCa 中的表达,发现 PCa 细胞氧化应激水平增高,导致细胞中过多的 ROS 积累,说明 CD147 可能具有抑制氧化应激的作用。ROS 包括超氧化物阴离子、 H_2O_2 、羟基自由基,可刺激细胞引起结构破坏,包括脂质过氧化以及 DNA 和蛋白质氧化,破坏人体的氧化还原平衡并改变细胞的正常功能和形态^[9]。在进化过程中,哺乳细胞中产生强大的抗氧化系统,例如 SOD、GSH-PX 和 MDA 等。SOD 是体内重要的抗氧化酶,通过将超氧化物歧化为普通分子氧来维持机体代谢平衡。GSH-PX 是体内重要的自由基捕获酶之一,能减少脂质过氧化物的形成,增强机体抗氧化损伤的能力。MDA 在受到氧化刺激时会显著增加,能影响线粒体呼吸链复合物及关键酶活性并加剧膜的损伤,通过链式反应放大活性氧的作用,可反映机体脂质过氧化的程度。CD147 干扰之后,细胞上清液中 MDA 含量升高,SOD 和 GSH-PX 的活性降低,说明 CD147 可能通过调节抗氧化酶的作用使肿瘤细胞处于平衡状态。此外,利用 H_2O_2 作用细胞建立氧化应激模型表明 CD147 表达降低后细胞存活下降。实验结果进一步说明 CD147 具有对氧化应激的保护作用。

核转录因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 具有重要的抗氧化作用,通过作用抗氧化反应序列元件 (ARE) 并调控下游 II 相代谢酶和抗氧化蛋白/酶的信号通路在细胞防御保护中发挥重要作用。II 相代谢酶血红素加氧酶-1 (HO-1) 是血红素分解代谢过程中的限速酶,是一种参与抗氧化、抗凋亡和抗炎反应的应激蛋白^[10]。实验结果表明,CD147 表达下降后 Nrf2 和 HO-1 的水平减少。目前研究^[11-12]表明,蛋白激酶 C (PKC)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)、核因子 κ B (NF- κ B) 和腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) 途径等均参与了 Nrf2/ARE 信号通路的激活及其依赖的基因表达调控过程。课题组前期研究表明,CD147 能够通过 PI3K/AKT 途径抑制 PCa 细胞自噬,减少自噬性细胞死亡及促进 PCa 细胞雄激素受体活性的作用^[13],因此推测 CD147 是否可以通过 PI3K/AKT 途径参与调节 PCa 细胞的氧化应激。使用 PI3K/AKT 途径抑制剂

LY294002 作用细胞,结果显示 LY294002 能够使 LNCaP/shCD147 细胞中 Nrf2 和 HO-1 表达进一步降低。

参考文献

- [1] Culp M B, Soerjomataram I, Efstathiou J A, et al. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates[J]. Eur Urol, 2020,77(1):38-52.
- [2] Radomska-Lesniewska D M, Hevelke A, Skopiński P, et al. Reactive oxygen species and synthetic antioxidants as angiogenesis modulators: clinical implications[J]. Pharmacol Rep, 2016,68(2):462-71.
- [3] Zhu S, Li Y, Zhang Y, et al. Expression and clinical implications of HAb18G/CD147 in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Res, 2015, 45(1):97-106.
- [4] Kaira K, Arakawa K, Shimizu K, et al. Relationship between CD147 and expression of amino acid transporters (LAT1 and ASCT2) in patients with pancreatic cancer[J]. Am J Transl Res, 2015,7(2):356-63.
- [5] Liang Y X, Lu J M, Mo R J, et al. E2F1 promotes tumor cell invasion and migration through regulating CD147 in prostate cancer[J]. Int J Oncol, 2016,48(4):1650-8.
- [6] Li J, Peng L, Wu L, et al. Depletion of CD147 sensitizes human malignant melanoma cells to hydrogen peroxide-induced oxidative stress[J]. J Dermatol Sci, 2010, 58(3):204-10.
- [7] Fang F, Qin 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.
- [8] Kim J, Kim J, Bae J S. ROS homeostasis and metabolism: a critical liaison for cancer therapy[J]. Exp Mol Med, 2016,48(11):e269.
- [9] Radermacher K A, Wingler K, Langhauser F, et al. Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2013,18(12):1418-27.
- [10] Ji Q, Gao J, Zheng Y, et al. Inhibition of microRNA-153 protects neurons against ischemia/reperfusion injury in an oxygen-glucose deprivation and reoxygenation cellular model by regulating Nrf2/HO-1 signaling[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2017,31(7):10-7.
- [11] Lin M, Zhai X, Wang G, et al. Salvianolic acid B protects against acetaminophen hepatotoxicity by inducing Nrf2 and phase II detoxification gene expression via activation of the PI3K and PKC signaling pathways[J]. J Pharmacol Sci, 2015, 127(2):203-10.
- [12] Li Z, Chen C, Zhu X, et al. Glycyrrhizin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and oxidative stress through inhibiting NF- κ B and MAPK and activating AMPK/Nrf2[J]. Calcif Tissue Int, 2018, 103(3):324-37.
- [13] Fang F, Wang L, Zhang S, et al. CD147 modulates autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway in human prostate cancer PC-3 cells[J]. Oncol Lett, 2015, 9(3):1439-43.

(下转第 152 页)

The effect of short sleep deprivation on cognitive performance and sleepiness in adults

Song Yanping¹, Qin Wei¹, Lü Xinrui¹, Wang Ziyao¹, Dang Weimin²,
Chen Zhizhong³, Liu Baohua¹, Dong Wentian²

(Dept of Social Medicine and Health Education, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191)

Abstract Objective To investigate the effects of one night of sleep deprivation on adults' cognitive performance and sleepiness. **Methods** The study employed a repeated-measures design. Participants performed cognitive performance tasks, which included the Continuous Performance Test and Digit Span Test and Karolinska Sleepiness Scale. The data were analyzed using one-way repeated-measures ANOVA. **Results** 48 participants were included in this study. Sleep deprivation during night shift had a adversely affect on sustained attention performance and alertness ($P < 0.05$). Compared with the beginning of night shift work, the correct number decreased, the number of errors, missed number and reaction time increased, and the score of Karolinska sleepiness scale decreased after the night shift work. The sleep deprivation has no significant effect on working memory performance ($P > 0.05$). **Conclusion** One night of sleep deprivation has significant deleterious effects on cognitive performance and subjective sleepiness. However, no effect on the working memory performances has been found.

Key words sleep deprivation; cognition; attention; working memory; sleepiness

(上接第 147 页)

Research on CD147 inhibiting oxidative stress in prostate cancer cells

Xu Haiyue¹, Li Zehao¹, Han Yongqi¹, Wang Liguao², Fang Fang¹

(¹Dept of Immunology, College of Laboratory Medicine, Jilin Medical University, Jilin 132013;

²The Affiliated Hospital of Jilin Medical University, Jilin 132013)

Abstract Objective To investigate the effect of CD147 on reducing hydrogen peroxide – induced oxidative stress injury in prostate cancer LNCaP cells. **Methods** The lentiviral system was used to establish a CD147-silencing prostate cancer cell model (LNCaP/shCD147 cells) and a negative control cell (LNCaP/Scramble cell), and RT-qPCR was performed for verification. By detecting the activity of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) and malondialdehyde (MDA) in LNCaP/shCD147 and LNCaP/Scramble cells to verify the changes of oxidative stress and antioxidant enzymes in prostate cancer cells after silencing CD147; hydrogen peroxide (H_2O_2) was added to the cells and the cell growth was detected by CCK-8; Western blot was used to detect the expression changes of nuclear factor E2 related factors (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) to verify the relationship between the oxidative stress that occurs in prostate cancer cells after silencing CD147 and the PI3K/AKT signaling pathway. **Results** Successfully constructed a CD147-silencing prostate cancer cell model. Compared with LNCaP/Scramble cells, the expression of CD147 in mRNA was reduced ($P < 0.01$). The results of oxidative stress showed that the content of ROS and MDA in cells increased after silencing CD147 (ROS, $P < 0.01$; MDA, $P < 0.05$), while the activities of SOD and GSH-PX decreased ($P < 0.01$), indicating that after silencing CD147, LNCaP/shCD147 cells undergo oxidative stress. In addition, with the increase of H_2O_2 concentration, the survival rate of LNCaP/shCD147 group cells decreased ($P < 0.01$). After inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway, the expressions of Nrf2 and HO-1 in the LNCaP/shCD147 group were reduced ($P < 0.01$), indicating that CD147 inhibits the oxidative stress injury of prostate cancer cells through the PI3K/AKT pathway. **Conclusion** CD147 can reduce the oxidative stress damage of PCa cells, and its inhibitory mechanism may be related to the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words CD147; oxidative stress; prostate cancer; PI3K/AKT