论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1736-04

降低蛋白激酶D3的表达和活性增强前列腺癌细胞DU-145对依托泊甙的敏感性

邹志鹏[1],曾方银[2],冯 丽[1],柯志勇[1],Wang Q Jane[3],邓 凡[1] (510515 广州,南方医科大学:细胞生物学教研室[1],南方医院检验科[2];15260 USA,Pennsylvania,Pittsburgh,University of Pittsburgh School of Medicine,Department of Pharmacology and Chemical Biology[3])

【摘要】 **目的** 探讨蛋白激酶D3(protein kinase D3,PKD3)是否会影响依托泊甙对激素抵抗性前列腺癌(hormonal refractory prostate cancer,HRPC)的生长抑制。**方法** 在HRPC细胞系DU-145中瞬时转染PKD3的siRNA,Western blot检测细胞中内源性PKD3的表达变化;siRNA转染48 h后,分别以0、30、70、100、300 μmol/L的依托泊甙处理对照siRNA、siRNA-PKD3-1、siRNA-PKD3-2转染的DU-145细胞24 h,并以细胞活力测定观察敲定内源性PKD3的表达有无影响依托泊甙对DU-145的生长抑制;利用PKC单一抑制剂、PKC-PKD双重抑制剂处理DU-145细胞,以观察二者是否增强DU-145对依托泊甙的敏感性。**结果** Western blot证实siRNA-PKD3的转染敲低DU-145细胞内源性PKD3的表达;细胞活力测定表明,在非特异性siRNA(si-CTL)转染的DU-145细胞中,依托泊甙剂量依赖地抑制DU-145细胞的生长,而敲低PKD3的表达不仅可显著抑制DU-145的生长($P<0.01$),还可显著增强依托泊甙对DU-145生长的抑制($P<0.01$);Go6976(PKC-PKD的双重抑制剂)可明显抑制前列腺癌DU-145细胞生长($P<0.01$),而Go6983(单一的PKC抑制剂)则仅对DU-145的生长起微弱抑制作用。**结论** PKD3的表达和活性可增强前列腺癌DU-145细胞对依托泊甙的敏感性,提示可作为抗前列腺癌药物设计的潜在靶点之一。

【关键词】 蛋白激酶D3;前列腺癌;依托泊甙

【中图法分类号】 R394.6;R737.25;R979.1 【文献标志码】 A

Reduced PKD3 expression and activity enhance human prostate cancer DU-145 cells 's sensitivity to Etoposide

Zou Zhipeng[1], Zeng Fangyin[2], Feng Li[1], Ke Zhiyong[1], Wang Q Jane[3], Deng Fan[1] ([1]Department of Cell Biology, [2]Department of Clinical Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510515, China; [3]Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, 15260, USA)

【**Abstract**】 **Objective** To explore whether protein kinase D3 (PKD3) has an effect on Etoposide-induced growth inhibition in hormonal refractory prostate cancer (HPRC) cells. **Methods** The human prostate cancer DU-145 cells were transfected with siRNA of non-specific control (si-CTL), and siRNA of PKD3 (si-PKD3-1, si-PKD3-2) respectively. The expression of PKD3 in the transfected cells was measured by Western blot analysis. The DU-145 cells transfected with siRNA after 48 h were treated with 0, 30, 70, 100, or 300 μmol/L of Etoposide for 24 h. In addition, the DU-145 cells were also treated with PKC inhibitor (Go6983, 5 μmol/L), PKC-PKD inhibitor (Go6976, 5 μmol/L), or the 2 agents combined with Etoposide respectively for 24 h, cell lysates were harvested and measured by CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay kit. **Results** Silence of endogenous PKD3 was confirmed in the DU-145 transfected with si-RNA-PKD3 by Western blot analysis. Cell viability assay showed that cell growth in DU-145 cells transfected with si-CTL was inhibited in a dose-dependent manner after treatment of Etoposide. Furthermore, silence of endogenous PKD3 expression not only significantly inhibited DU-145 cell growth ($P<0.01$), but also dramatically enhanced cell growth inhibition response to Etoposide ($P<0.01$). Moreover, the DU-145 cell growth was also inhibited by PKC-PKD double inhibitor Go6976, whereas slightly inhibited by single PKC inhibitor Go6983. **Conclusion** Reduced

【基金项目】 国家自然科学基金(30973014);教育部留学回国人员科研启动基金(K1010353)

【通信作者】 邓 凡,电话:(020)61647073,E-mail:fandeng@smu.edu.cn

PKD3 expression and activity can enhance cell growth inhibitory and sensitivity to Etoposide in HPRC cells, suggesting that PKD3 may be as a potential therapeutic target in human prostate cancer therapy.

[Key words] protein kinase D3; prostate cancer; Etoposide

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973014) and the Starting Funds for Personnel Returning from Overseas of Ministry of Education (K1010353). Corresponding author: Deng Fan, Tel: 86-20-61647073, E-mail: fandeng@smu.edu.cn

前列腺癌是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤，早期局限性前列腺癌一般采用手术或局部放疗，而对于晚期前列腺癌，内分泌治疗（包括手术或药物去势、雄激素受体拮抗剂以及其他抗雄激素药物）仍然是首选治疗方案。然而，几乎所有初始对内分泌治疗敏感的前列腺癌患者最终都将产生激素抵抗，成为激素抵抗性前列腺癌（hormonal refractory prostate cancer，HRPC）[1,2]。

依托泊甙（Etoposide）在 HRPC 联合化疗中的作用越来越受到重视，作为一种拓扑异构酶Ⅱ抑制剂，依托泊甙不仅可增加 HRPC 细胞内的神经酰胺水平[3]、诱导凋亡[4-7]，也可降低雄激素受体（AR）的活性进而抑制雄激素依赖型前列腺癌细胞系 LNCaP 的增殖[8]。然而 HRPC 细胞系对依托泊甙的敏感性相对较低，往往需要比 LNCaP 更高的剂量，提示 HRPC 细胞系内可能存在抗凋亡及促增殖信号通路拮抗依托泊甙的作用。

蛋白激酶 D3（protein kinase D3，PKD）属于一类新的结合二酰基甘油（DAG）和佛波酯的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族，目前已鉴定出 3 种 PKD 亚型（PKD1，2，3），分别参与细胞高尔基体反面膜转运、细胞存活、迁移、分化、增殖和凋亡等多种细胞功能的调节[9,10]。我们的前期研究显示：PKD3 通过激活下游 AKT 和 ERK1/2 信号通路而促进前列腺癌细胞的存活和生长[11]，且 PKD3 促进非小细胞肺癌 A549 细胞的迁移[12]。本研究以 HRPC 细胞系 DU-145 为研究模型，观察敲低或抑制 PKD3 对依托泊甙抑制 DU-145 生长的影响，为探讨联用 PKD3 抑制剂及依托泊甙治疗 HRPC 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 液体培养基和胎牛血清购自 HyClone，Etoposide、PKC 和 PKD 抑制剂 Go6976、PKC 抑制剂 Go6983 均购自 Sigma，Rabbit Anti-PKD3 Polyclonal Antibody（A300-319A）购自 Bethyl Laboratories，Beta-Actin 抗体（C4）：sc-47778 购自 Santa Cruz，Lipofectamine2000 购自 Invitrogen，聚丙烯酰胺凝胶电泳所需之丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、SDS、Tris 及甘氨酸等超纯生化试剂均购自美国 Promega 公司。

siRNA-PKD3-1 和 siRNA-PKD3-2 由 Invitrogen 公司设计并证实具有抑制作用的 PKD3 Validated Stealth™ RNAi（Part No./Catalog No. 45-1814），其序列为：siRNA-PKD3-1 5′-GCUGCUUCUCCGUGUUCAAGUCCUA-3′，siRNA-PKD3-2：5′-GCAGAGUGAAAGUUCCACACACAUU-3′。

1.2 细胞株和细胞培养

人前列腺癌 DU-145 细胞引自美国 ATCC 并培养于 DMEM 完全培养基（10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 ng/ml 链霉素）中，培养条件为 37 ℃，5% CO_2。

1.3 siRNA 转染

按 Lipofectamine 2000 的说明书进行。对照 siRNA 和 siRNA PKD3 转染组细胞分别命名为 si-CTL、si-PKD3-1、si-PKD3-2。

1.4 Western blot

收集细胞，加入细胞裂解液于冰上裂解 30 min，于 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min，取上清 Bradford 法测定蛋白浓度。取等量的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳并转位到 PVDF 膜上，最后采用化学发光法检测。具体步骤及试剂配方参见文献[7]。

1.5 细胞活力测定

siRNA 转染的细胞 48 h 后，Etoposide 分别以 0、30、70、100、300 μmol/L 处理各组细胞 24 h，收集细胞裂解液进行细胞活力测定；PKC-PKD 的双重抑制剂 Go6976 和单一的 PKC 抑制剂 Go6983 均按 5 μmol/L 处理细胞 24 h，收集细胞裂解液进行细胞活力测定。细胞活力测定按 Promega 公司的 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 试剂盒进行。

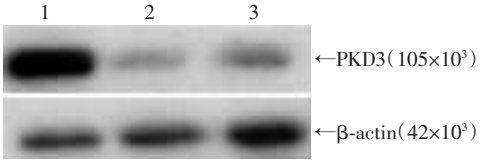
1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 Graphpad Prism 5.0 软件进行统计，分析敲低 PKD3 对 Etoposide 抑制 DU-145 生长的影响进行双因素方差分析，多重比较行 Bonferroni 检验。而分析 PKD 抑制剂对 DU-145 生长的影响进行单因素方差分析，多重比较行 Turkey 检验。

2 结果

2.1 siRNA-PKD3 敲低 DU-145 细胞内源性 PKD3 的表达

转染 48 h 后，Western blot 结果表明：与对照 siRNA（si-CTL）相比，siPKD3-1 和 siPKD3-2 均可有效敲低 PKD3 的表达（图 1）。

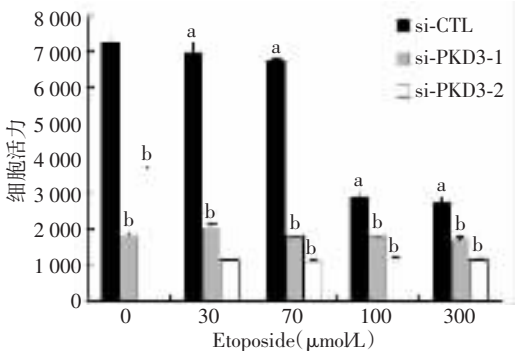


1：si-CTL；2：si-PKD3-1；3：si-PKD3-2

图 1 免疫印迹法检测转染 DU-145 细胞后 48 h PKD3 的表达

2.2 siRNA-PKD3 促进 Etoposide 对前列腺癌 DU-145 细胞生长的抑制

无 siRNA-PKD3 作用时，Etoposide 剂量依赖地抑制前列腺癌 DU1-45 的生长（$P<0.01$）。si-PKD3-1 或 si-PKD3-2 的转染均明显增强 Etoposide 对 DU-145 细胞生长的抑制（$P<0.01$），相对于 si-PKD3-1，si-PKD3-2 的抑制作用更强。无论转染 si-PKD3-1 还是 si-PKD3-2，30 μmol/L Etoposide 即可接近抑制作用的最高峰，继续增加其剂量对此作用并无明显增强（图 2）。

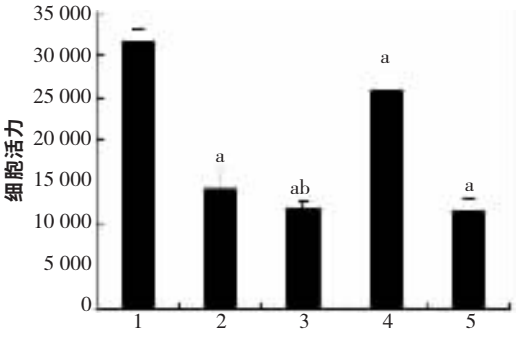


a：$P<0.01$，与 0 μmol/L Etoposide 比较；b：$P<0.01$，与 si-CTL 比较

图 2 敲低 PKD3 的表达对 Etoposide 诱导的 DU-145 生长抑制的影响

2.3 PKC-PKD 的双重抑制剂可明显增强 Etoposide 对前列腺癌 DU-145 细胞生长的抑制

单独的 Go6976（PKC-PKD 的双重抑制剂）可明显抑制前列腺癌 DU-145 细胞生长（$P<0.01$），而 Go6983（单一的 PKC 抑制剂）则仅对 DU-145 的生长起微弱抑制作用（$P<0.01$），提示 PKD3 在前列腺癌细胞生长中起着重要作用。同时，100 μmol/L Etoposide 与 Go6976 或 Go6983 联合作用也可增强 Go6976 或 Go6983 对 DU-145 细胞生长的抑制（$P<0.05$，图 3）。



1：CTL；2：Go6976；3：Go6976 + Etoposide；4：Go6983；5：Go6983 + Etoposide；a：$P<0.01$，与 CTL 比较；b：$P<0.05$，与 Go6976 比较

图 3 PKC 和（或）PKD 抑制对 100 μmol/L Etoposide 诱导的 DU-145 生长抑制的影响

3 讨论

无 Etoposide 刺激时，在 DU-145 中瞬时转染 si-PKD3-1 与 si-PKD3-2 均可明显抑制 DU-145 的生长，提示 PKD3 很可能促进 DU-145 的增殖。这与我们的前期研究结果即 PKD3 可诱导 HRPC 细胞系 PC-3 从 G_0 期向 G_1 期转换从而促进其增殖相一致[11]，同时也验证了 PKD3 在不同 HRPC 细胞系中促增殖作用的普遍性。

当 Etoposide 剂量高于 100 μmol/L 时对 DU-145 的生长有明显抑制作用。最新研究显示，40 μmol/L Etoposide 可明显下调 LNCaP 中雄激素受体（AR）的表达，阻止合成雄激素与 AR 结合并阻止 AR 向核内转位，从而降低了 AR 的转录活性，最终抑制 LNCaP 的生长[8]。此研究中，40 μmol/L Etoposide 并不能明显抑制 HRPC 细胞系 PC-3 的生长，与我们的结果相符合，也表明 HRPC 细胞对于 Etoposide 的敏感性要低于雄激素依赖型前列腺癌细胞系。本研究中，从 30 μmol/L 至 300 μmol/L Etoposide，si-PKD3-1 或 si-PKD3-2 与 Etoposide 的协同作用均优于各自的单独作用，提示很可能 PKD3 信号通路和 Etoposide 所抑制的信号通路（很可能包括 AR 转录激活通路[8] 和 ERK 信号通路[13]）共同调控 DU-145 的生长；然而，两者的协同作用仍不能完全阻断其生长，提示仍有其他信号通路参与 HRPC 的生长调控。更进一步，当使用 si-PKD3-2 敲低 PKD3 时，仅 30 μmol/L Etoposide 即达到了对 DU-145 生长的最大抑制，为临床上降低 Etoposide 并减少副作用提供了理论依据。

Go6976（PKC-PKD 的双重抑制剂）可明显抑制前列腺癌 DU-145 细胞生长，而 Go6983（仅能抑制 PKC 而不能抑制 PKD）则仅对 DU-145 的生长起微弱抑制作用，提示 PKD3 而非 PKC 的活性在 DU-145 的生长调控中起主要作用。而 Go6976 也可增强 Etoposide 对 DU-145 细胞生长的抑制，同样提示 PKD3 信号通路和 Etoposide 所抑制的信号通路共同调控 DU-145 的生长。

综上所述，本研究以 HRPC 细胞系 DU-145 为模型，观察了敲低或抑制 PKD3 对 DU-145 生长的抑制作用以及不同剂量 Etoposide 对 DU-145 的生长抑制，并进一步证实了抑制 PKD3 的表达和活性可明显增加 DU-145 对 Etoposide 化疗的敏感性。PKD3 通过何种机制促进 Etoposide 对 HRPC 的生长抑制将是我们下一步研究的方向。

参考文献：

[1] Pienta K J, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(6): 1665 - 1671.

[2] 王洛夫，靳风烁，江军，等. 前列腺特异启动子驱动的自杀基因对雄激素非依赖前列腺癌的杀伤作用[J]. 第三军医大学学报，2009，31(6)：515 - 517.

[3] Sumitomo M, Ohba M, Asakuma J, *et al*. Protein kinase Cdelta amplifies ceramide formation *via* mitochondrial signaling in prostate cancer cells[J]. J Clin Invest, 2002, 109(6): 827 - 836.
[4] Salido M, Gonzalez J L, Vilches J. Loss of mitochondrial membrane potential is inhibited by bombesin in etoposide-induced apoptosis in PC-3 prostate carcinoma cells[J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(4): 1292 - 1299.
[5] Uzzo R G, Haas N B, Crispen P L, *et al*. Mechanisms of apoptosis resistance and treatment strategies to overcome them in hormone-refractory prostate cancer[J]. Cancer, 2008, 112(8): 1660 - 1671.
[6] Albihn A, Lovén J, Ohlsson J, *et al*. c-Myc-dependent etoposide-induced apoptosis involves activation of Bax and caspases, and PKCdelta signaling[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(6): 1597 - 1614.
[7] Salido M, Larran J, Lopez A, *et al*. Etoposide sensitivity of human prostatic cancer cell lines PC-3, DU-145 and LNCaP[J]. Histol Histopathol, 1999, 14(1): 125 - 134.
[8] Liu S, Yamauchi H. Etoposide induces growth arrest and disrupts androgen receptor signaling in prostate cancer cells[J]. Oncol Rep, 2010, 23(1): 165 - 170.
[9] Wang Q J. PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling[J]. Trends Pharmacol Sci, 2006, 27(6): 317 - 323.
[10] Rozengurt E, Rey O, Waldron R T. Protein kinase D signaling[J]. J Biol Chem, 2005, 280(14): 13205 - 13208.
[11] Chen J, Deng F, Singh S V, *et al*. Protein kinase D3 (PKD3) contributes to prostate cancer cell growth and survival through a PKCepsilon/PKD3 pathway downstream of Akt and ERK 1/2[J]. Cancer Res, 2008, 68(10): 3844 - 3853.
[12] 邹志鹏, 曾方银, 冯丽, 等. PKD3 促进非小细胞肝癌 A549 细胞迁移的作用和机制[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(15): 1609 - 1612.
[13] Woodcock J. Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis[J]. IUBMB Life, 2006, 58(8): 462 - 466.

(收稿:2010-03-10 修回:2010-05-04)
(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2010)16-1739-01

个案与短篇

慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病合并肺结核 1 例

任俊伟,杨 琴,谢 鹏,秦新月,杨 军 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

【关键词】 慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病;结核;血浆交换;皮质类固醇激素
【中图法分类号】 R744.5 【文献标志码】 B

慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, CIDP)是一种获得性由免疫介导的周围神经系统脱髓鞘性疾病。CIDP 可能与感染和非感染性因素相关。CIDP 合并结核病国内尚少见报道。现就我院 2009 年诊治 1 例 CIDP 合并肺结核报告如下。

1 临床资料

患者,男性,19 岁,因四肢无力、麻木 4^+ 个月,加重 2^+ 个月于 2009 年 6 月 16 日入我院。患者于 4^+ 个月前因"感冒"后出现四肢无力、麻木,伴咳嗽、偶痰中带血丝,未治疗。2 个月前上述症状加重,四肢远端麻木加重,伴咳嗽、咯血。到浙江省某医院就诊,肺 CT 示右肺上叶及下叶背段感染性病变(图 1)。诊断"肺结核"。予以抗结核治疗,症状进行性加重。1 个月前到湖北省某医院就诊,考虑异烟肼不良反应,停用抗结核药 2 d,症状无缓解。腰穿:压力 95 mmH_2O;脑脊液常规:无色透明,有核细胞数 2.5×10^6/L;脑脊液生化:蛋白 1.206 g/L,糖 3.17 mmol/L,氯 103.9 mmol/L;涂片未见抗酸杆菌及新型隐球菌;肌电图示周围神经损害。诊断:"格林-巴利综合征,肺结核"。予以维生素 B_1、甲钴胺肌注,抗结核、保肝治疗,症状无缓解。10 d 前转入重庆市某医院就诊,胸部 CT 见右肺上叶及下叶背段感染性病变,纵隔淋巴结肿大,右侧胸膜增厚;肌电图示周围神经损害;血沉 14 mm/h;超敏 C 反应蛋白 14.1 mg/L;痰涂片未见抗酸杆菌;腰穿:压力不详;脑脊液常规:无色清亮,潘氏实验(+),白细胞计数 2.0×10^6/L;脑脊液生化:蛋白 1.29 g/L,糖 3.0 mmol/L,氯 123.0 mmol/L;涂片未找到抗酸杆菌、新型隐球菌及革兰阴性双球菌。诊断为"格林-巴利综合征,肺结核"。治疗同前,症状仍无缓解,遂转入我院。入院查体:体温 36.3 ℃,脉搏 82/min,呼吸 20/min,血压 116/68 mmHg,消瘦,神志清楚,颅神经征(-);四肢无肌肉萎缩,四肢肌张力低,双上肢近端肌力Ⅲ级,远端肌力Ⅳ级,双下肢近端肌力Ⅱ级,远端肌力Ⅲ级;双前臂下 1/3 以下、双踝关节以下痛觉减退,深感觉正常;四肢腱反射消失,双侧病理征(-)。胸部 X 线片:右肺上叶及下叶背段感染性病变,结核可能性大;腰穿:压力133 mmH_2O;脑脊液常规:无色透明,潘氏实验(+),有核细胞数5×10^6/L;脑脊液生化:蛋白 1.3 g/L,糖 3.8 mmol/L,氯 117.4 mmol/L;血沉 8 mm/h;癌谱(-),HIV、梅毒抗体(-);肌电图示双侧下肢 H 反射、双侧上肢 F 波及左侧胫神经感觉传导速度均不出波;左侧正中神经、尺神经、桡神经、胫神经、腓总神经运动、感觉传导速度明显减慢。腰骶丛神经磁共振成像(magnetic resonance nerve, MRN):腰骶丛神经弥漫性增粗,边缘模糊,信号增强,神经周围见斑片状边缘不清信号(图 2)。诊断:"CIDP,肺结核"。予以异烟肼 300 mg、利福平 450 mg、乙胺丁醇 750 mg、吡嗪酰胺 1 500 mg 1 次/d 口服,泼尼松片 60 mg 1 次/d 口服,小剂量血浆置换 8 次(400 ml/次),甲钴胺 1.5 mg

(下转 1744 页)

【通信作者】 杨 琴,E-mail:xyqh200@126.com