论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201501011

# 过表达精子相关抗原9对前列腺癌细胞PC3生物学行为的影响

龙 洲,刘 骞,朱景振,赵 江,董兴有,冯观贵,丁国林,李龙坤 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 研究精子相关抗原9(sperm-associated antigen 9, SPAG9)对前列腺癌细胞增殖、细胞周期、侵袭转移等生物学行为的影响,探讨可能的分子机制。**方法** 前列腺细胞PC3中转染SPAG9后,qRT-PCR和Western blot检测转染后细胞SPAG9的表达变化;CCK-8检测SPAG9对PC3细胞增殖的影响;流式细胞术检测SPAG9对PC3细胞周期的作用;Transwell实验检测转染SPAG9对PC3细胞体外迁移能力的影响。**结果** qRT-PCR检测结果表明SPAG9组的SPAG9的相对表达量(20.776 3±3.080 9)明显高于对照组(1.010 2±0.178 4)($P<0.01$)。Western blot结果显示在前列腺癌细胞PC3中过表达SPAG9后成功。CCK-8实验表明SPAG9促进细胞增殖;流式细胞术检测结果表明过表达SPAG9使PC3细胞周期加快;在Transwell迁移实验中,SPAG9转染细胞后,SPAG9组穿膜细胞数为(88.078±4.509)/视野,对照组穿膜细胞数为(54.333±4.582)/视野,SPAG9组细胞迁移能力明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** SPAG9促进前列腺癌细胞PC3的增殖、细胞周期及侵袭转移等生物学行为,并可能通过ERK和JNK信号通路发挥这些作用。

[关键词] SPAG9;前列腺癌;增殖;细胞周期

[中图法分类号] R341;R730.23;R737.25 [文献标志码] A

# Effect of over-expression of SPAG9 on proliferation, cell cycle and migration in human prostate cancer cell line PC3

Long Zhou, Liu Qian, Zhu Jingzhen, Zhao Jiang, Dong Xingyou, Feng Guangui, Ding Guolin, Li Longkun (Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of sperm-associated antigen 9 (SPAG9) over-expression on the proliferation, cell cycle and migration in human prostate cancer cell line PC3 and the relevant molecular mechanism. **Methods** PC3 prostate cancer cells were transformed with plasmid M29-SPAG9 and plasmid M29, and qRT-PCR and Western blotting were used to detect the SPAG9 expression levels. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Transwell migration assay was used to analyze cell migration ability. **Results** The results of qRT-PCR and Western blot analysis indicated that the SPAG9 expression in the M29-SPAG9 over-expression group was higher than that of the M29 control group (20.776 3±3.080 9 *vs* 1.010 2±0.178 4, $P<0.01$). Compared with the M29 control group, the cell proliferation activity was significantly higher in the SPAG9 over-expression group ($P<0.05$), and the $G_2$/S phase proportion was increased ($P<0.05$). Transwell migration assay indicated that the cell migration ability of the M29-SPAG9 over-expression group was significantly higher than that of the M29 control group (88.078±4.509 *vs* 54.333±4.582, $P<0.05$). **Conclusion** Over-expression of SPAG9 promotes the proliferation, cell cycle and migration in human

[通信作者] 李龙坤, E-mail:lilongk@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150327.1422.023.html(2015-03-27)

prostate cancer cell line PC3 through ERK and JNK signaling pathway.

[**Key words**] sperm-associated antigen 9; prostate cancer; proliferation; cell cycle; migration

Corresponding author: Li Longkun, E-mail: lilongk@hotmail.com

前列腺癌是泌尿系常见的恶性肿瘤之一,在欧美国家和地区发病率居首位,死亡率居第2位[1];在我国,虽发病率低于西方等国家,但近年来逐渐升高。前列腺癌目前的治疗多为多模式综合治疗,包括手术切除、放疗、内分泌治疗等,由于雄激素抵抗,手术及放疗对于晚期前列腺癌患者疗效不显著。前列腺癌易复发、侵袭和转移,因此积极寻求前列腺癌相关肿瘤标志物成为前列腺癌早期检测、靶向治疗和预防复发的关键[2]。精子相关抗原9(SPAG9),是癌睾丸抗原(CTA)家族成员之一,在睾丸组织中特异性表达[3]。目前主要观点认为,SPAG9主要是作为支架蛋白,辅助活化JNK信号通路,从而促进肿瘤的增殖、侵袭及转移,抑制肿瘤凋亡等。JNK信号通路的活化对于肿瘤的促进均有报道[4]。由此推测,在肿瘤中,SPAG9表达上调,可改变原有的基因调节模式,促进肿瘤的增殖、侵袭及转移等。本研究主要探讨SPAG9对前列腺癌细胞PC3侵袭、增殖及生长等生物学行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及主要试剂

人前列腺癌细胞PC3为本实验室保存,血清(Gibco,美国),DMEM培养基(Sigma,美国),兔抗人单克隆SPAG9抗体、兔抗人多克隆磷酸化ERK抗体、兔抗人多克隆ERK抗体、兔抗人多克隆磷酸化JNK抗体、兔抗人多克隆JNK抗体(CST,美国),鼠抗人单克隆GAPDH抗体、总蛋白提取试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。TRIzol、逆转录试剂盒、RT-PCR试剂盒(TaKaRa,中国大连),SDS PAGE胶试剂盒(碧云天,中国上海)。转染试剂X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent(Roche,美国),M29真核表达载体及M29-SPAG9真核质粒由广州复能基因有限公司提供,SPAG9序列来源于NCBI网站(ID:9043)。

### 1.2 细胞培养及病毒转染

人前列腺癌细胞PC3培养于10%的完全培养基,放在5% $CO_2$、37 ℃孵箱培养,每3天更换培养基,当细胞长至90%融合时进行传代培养。按照$5\times10^5$接种于6孔培养板,生长至90%融合时,分别以M29-SPAG9与M29转染PC3细胞(质粒均带有绿色荧光及抗性)。转染48 h后,加入G418(300 mg/mL)筛选并建立稳定转染细胞系,荧光显微镜下观察转染效果,PCR及Western blot检测转染效果。

### 1.3 qRT-PCR检测

用TRIzol提取细胞总RNA,以其为模板,逆转录cDNA,条件是42 ℃,2 min,37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,按照qRT-PCR试剂盒(DRR037A)SYBR Green法步骤进行PCR扩增,qRT-PCR扩增程序:95 ℃预变性3 min,95 ℃变性10 s,60 ℃退火45 s,以GAPDH作为内参,扩增40个循环周期,每个标本3个复孔。人SPAG9引物序列为5′-AGTCATCAGCCCACAAAGTAGCAG-3′,5′-GATTCTCCACCTTCATCACCCATT-3′,扩增目的片段大小为173 bp。

### 1.4 Western blot检测

用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,RCDC法检测蛋白浓度,经5%的浓缩胶和6%的分离胶SDS-PAGE电泳,每孔上样量为80 μg总蛋白。浓缩胶60 V电泳1 h,分离胶100 V电泳1 h,常规湿法转膜120 min,5%的BSA封闭1 h,免疫抗体反应(稀释比例,一抗SPAG9 1∶1 000,GAPDH 1∶500;二抗:山羊抗鼠1∶5 000,山羊抗兔1∶5 000)。ECL化学发光,凝胶成像系统显影。

### 1.5 CCK-8法检测细胞增殖

取处于对数生长期的转染M29-SPAG9和对照组M29细胞消化成单细胞悬液,分别按照4 000个/孔接种于96孔板,每孔加入100 μL完全培养基,设置6个复孔。分别于0、24、48 h加入CCK-8检测试剂,每孔加入10 μL,再次置于孵箱培养2 h检测,于酶标仪上检测450 nm处各孔光密度值[$D(450)$]。

### 1.6 流式细胞术检测细胞周期

取处于对数生长期的转染M29-SPAG9和对照组M29细胞消化成单细胞悬液,分别按照$5\times10^5$接种于6孔培养板,生长至90%融合时,消化成单细胞悬液,胰酶消化,收集各组细胞,预冷PBS清洗2~3次,重悬细胞于EP管中,于流式细胞仪上检测细胞周期情况。按细胞周期检测试剂盒说明进行操作,使用碧云天PI染色试剂盒操作说明。

### 1.7 Transwell体外迁移实验

PC3细胞接种至24孔板中并分别转染M29和SPAG9,每组设3个复孔。转染24 h后将细胞温和消

化下来,计数并接种至Transwell小室上室(约细胞$1\times10^5$/孔),上室为无血清培养基,下室为含10%胎牛血清的培养基。培养24 h后弃掉培养基并用PBS清洗,4%多聚甲醛固定20 min,再用PBS清洗3遍,0.1%结晶紫染色15 min,棉签轻轻刮掉小室上室内的细胞,显微镜下随机选取10个视野倒置显微镜下观察并计数。

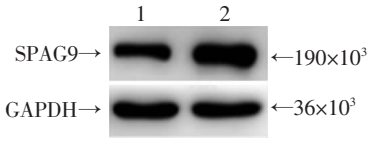
1.8 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件,计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,两组间比较采用$t$检验或非参数秩和检验,两配对样本之间采用配对$t$检验。

## 2 结果

2.1 过表达SPAG9人PC3前列腺癌细胞的建立和鉴定

用M29-SPAG9(实验组)及空质粒M29(对照组)转染前列腺癌PC3细胞,48h后分别通过qRT-PCR和Western blot来检测细胞中SPAG9的mRNA及蛋白水平的变化,结果显示,转染M29-SPAG9组与转染M29组比较,SPAG9表达量显著增高,mRNA表达量实验组(20.776 3±3.080 9),对照组(1.010 2±0.178 4),蛋白水平见图1。证实SPAG9转染前列腺癌细胞PC3构建成功。

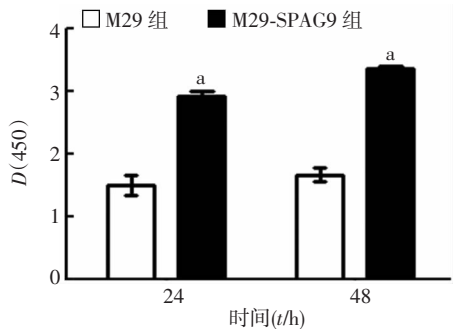



1:M29组;2:M29-SPAG9组

**图1 转染SPAG9对前列腺癌PC3细胞株中SPAG9蛋白水平的影响**

2.2 过表达SPAG9促进前列腺癌细胞PC3细胞的生长

采用CCK-8法测定稳定转染前列腺癌细胞PC3的$D(450)$,M29-SPAG9组CCK-8光密度值明显高于M29组($P<0.05$,图2),说明过表达SPAG9后促进前列腺癌细胞PC3的增殖。

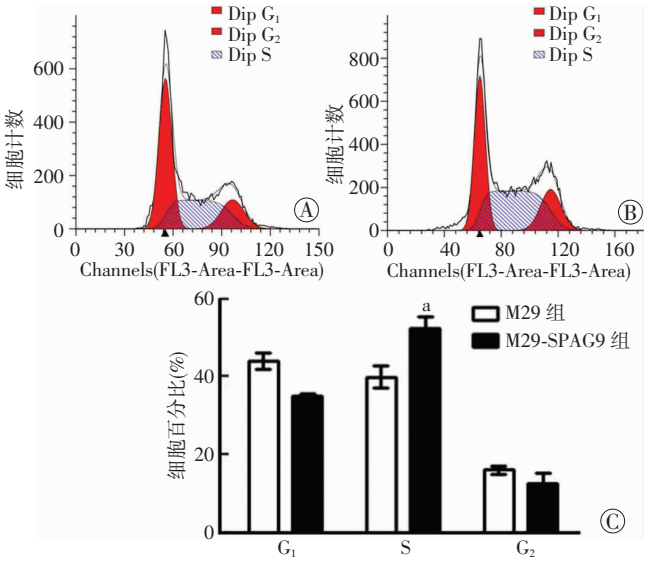



a:$P<0.05$,与M29组比较

**图2 过表达SPAG9对前列腺癌PC3细胞生长的影响**

2.3 过表达SPAG9对前列腺癌细胞PC3细胞周期的影响

采用流式细胞术检测稳定转染后PC3的周期比值,转染M29-SPAG9后,与对照组相比,$G_2$/S期的细胞比例增加,而$G_0/G_1$期的细胞比例减少(图3),差异具有统计学意义($P<0.05$),说明过表达SPAG9后促进前列腺癌细胞PC3的细胞周期。

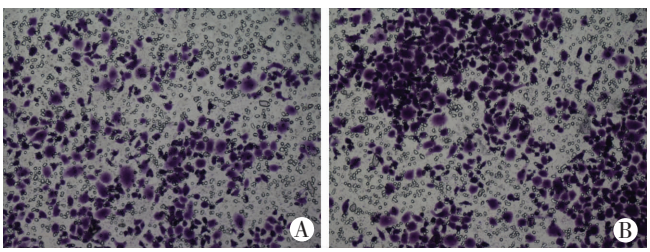



A:M29组流式细胞术检测结果;B:M29-SPAG9组流式细胞术检测结果;C:两组细胞周期分布 a:$P<0.05$,与M29组比较

**图3 过表达SPAG9对PC3细胞周期的影响**

2.4 过表达SPAG9对前列腺癌细胞PC3迁移能力的促进作用

用M29-SPAG9及M29质粒分别转染PC3细胞24 h后,收集细胞采用Transwell检测PC3细胞穿膜能力。SPAG9组穿膜细胞数为(88.078±4.509)/视野,对照组穿膜细胞数为(54.333±4.582)/视野,SPAG9组细胞转移能力明显高于对照组($P<0.05$),说明过表达SPAG9可明显促进前列腺癌细胞PC3的迁移能力(图4)。

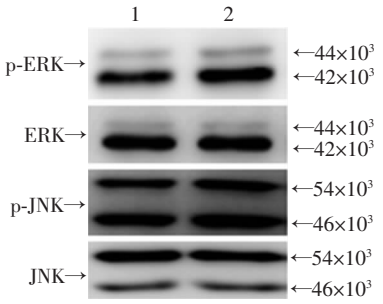



A:M29组;B:M29-SPAG9组

**图4 过表达SPAG9对PC3细胞迁移能力的影响** (结晶紫 ×200)

### 2.5 过表达 SPAG9 对前列腺癌细胞 PC3 信号通路的影响

Western blot 检测结果显示,转染 M29-SPAG9 对磷酸化的 ERK、JNK 都有活化,而总的 ERK 和 JNK 没有变化(图 5),说明转染 SPAG9 活化了 ERK 和 JNK 信号通路,并通过此促进细胞的增殖和细胞周期。




1: M29 组;2: M29-SPAG9 组

**图 5 过表达 SPAG9 活化了 ERK 和 JNK 信号通路**

## 3 讨论

研究证实,SPAG9 在不同的肿瘤中均有增高,且促进肿瘤的侵袭、转移及增殖等生物学行为,如肾癌、肺癌、宫颈癌、乳腺癌、甲状腺癌、直肠癌等[5-10]。近年,国外学者发现 SPAG9 不仅在肿瘤组织表达的阳性率超过 80%(蛋白水平和 RNA 水平),而且该抗原免疫原性强,能引起肿瘤患者较强的体液免疫反应,产生相应抗体[11]。SPAG9 抗体在卵巢上皮癌患者血清中的阳性检出率为 67% ,并在活体内各种组织类型的早期阶段(Ⅰ~Ⅱ期)表现出高的抗 SPAG9 免疫活性,而健康人血清中完全没有。

Li 等[12]报道,在前列腺癌 148 对标本中,免疫组化证实 SPAG9 阳性表达的占 54 例,阳性率 36.5%,且 SPAG9 的表达与前列腺癌的分期分级密切相关。SPAG9 在前列腺癌中的表达越高,前列腺癌恶性程度高,患者预后越差,这一现象提示我们 SPAG9 的表达与其侵袭、转移密切相关。因此,本研究采用在前列腺癌中相对 SPAG9 表达较低的 PC3 细胞,过表达 SPAG9 后,细胞穿膜数明显增加,其侵袭能力明显增强。这一想象表明,SPAG9 促进前列腺癌的侵袭转移,加快其发生、发展。

既往研究[5-10]表明,在肾癌、结肠癌、宫颈癌及肺癌中,干扰 SPAG9 后,细胞增殖减慢。在本实验中,过表达 SPAG9 后,PC3 细胞增殖加快。此外,膀胱癌相关研究[13]表明,过表达 SPAG9 后,cyclin D1、B 和 E 表达上调,细胞周期加快,提示过表达 SPAG9 可促进恶性肿瘤细胞的生长,且这一过程主要是通过调节周期相关蛋白来实现的。而 cyclin D1 在多种癌中表达上调,其作用主要使细胞从 $G_1$ 期进入 $G_2$/S 期,从而加快细胞周期。本研究中,过表达 SPAG9 后,$G_2$/S 期细胞比例明显增加,说明在前列腺癌中,SPAG9 通过对细胞周期的调控作用,促进其增殖和生长。

但是 SPAG9 如何促进了前列腺癌细胞的侵袭转移,目前仍不清楚。众所周知,MAPK 信号通路与细胞生长的关系最为密切,参与调节细胞的增殖、分化和凋亡等多种进程[14]。文献[15]报道,通过氨基端序列分析发现,SPAG9 与 JNK 相互作用蛋白具有结构同源性,通过 N 端 JNK 结合域与 JNK 结合而在 MAPK 信号通路发挥作用,也就是说,SPAG9 在 MAKP 信号通路中正是作为一种支架蛋白来起作用,参与人体多种生理功能[16]。那么在前列腺癌中,是否也是如此? 本研究证实,PC3 过表达 SPAG9 后,JNK 及 ERK 信号通路明显活化。而这一实验结果说明 SPAG9 是通过 JNK 及 ERK 信号通路发挥促进肿瘤侵袭转移、增殖的作用。

本研究证实 SPAG9 不仅促进了前列腺癌侵袭转移及增殖,加快细胞周期,且发挥这一作用主要是通过 JNK 及 ERK 信号通路来实现的。因此,在前列腺癌中,SPAG9 可能作为一个潜在的肿瘤标志物,有利于肿瘤早期的诊断及治疗,尚需进一步动物实验及临床标本证实 。

**参考文献:**

[1] Shaikhibrahim Z, Lindstrot A, Ochsenfahrt J, *et al*. Epigenetics-related genes in prostate cancer: expression profile in prostate cancer tissues, androgen-sensitive and -insensitive cell lines[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(1): 21-25.

[2] Thompson I M, Ankerst D P, Chi C, *et al*. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial[J]. J Natl Cancer Inst, 2006, 98(8): 529-534.

[3] Shankar S, Mohapatra B, Suri A. Cloning of a novel human testis mRNA specifically expressed in testicular haploid germ cells, having unique palindromic sequences and encoding a leucine zipper dimerization motif[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 243(2): 561-565.

[4] Jagadish N, Rana R, Selvi R, *et al*. Characterization of a novel human sperm-associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting pro-

tein[J]. Biochem J, 2005, 389(Pt 1): 73 – 82.
[5] Garg M, Kanojia D, Khosla A, *et al*. Sperm-associated antigen 9 is associated with tumor growth, migration, and invasion in renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(20): 8240 – 8248.
[6] Wang Y, Dong Q, Miao Y, *et al*. Clinical significance and biological roles of SPAG9 overexpression in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2013, 81(2): 266 – 272.
[7] Garg M, Kanojia D, Suri S, *et al*. Small interfering RNA-mediated down-regulation of SPAG9 inhibits cervical tumor growth[J]. Cancer, 2009, 115(24): 5688 – 5699.
[8] Sinha A, Agarwal S, Parashar D, *et al*. Down regulation of SPAG9 reduces growth and invasive potential of triple-negative breast cancer cells: possible implications in targeted therapy[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2013, 32: 69.
[9] Garg M, Kanojia D, Suri S, *et al*. Sperm-associated antigen 9: a novel diagnostic marker for thyroid cancer[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(11): 4613 – 4618.
[10] Kanojia D, Garg M, Saini S, *et al*. Sperm associated antigen 9 expression and humoral response in chronic myeloid leukemia[J]. Leuk Res, 2010, 34(7): 858 – 863.
[11] Garg M, Chaurasiya D, Rana R, *et al*. Sperm-associated antigen 9, a novel cancer testis antigen, is a potential target for immunotherapy in epithelial ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(5): 1421 – 1428.
[12] Li H, Peng Y, Niu H, *et al*. SPAG9 is overexpressed in human prostate cancer and promotes cancer cell proliferation[J]. Tumour Biol, 2014, 35(7): 6949 – 6954.
[13] Kanojia D, Garg M, Saini S, *et al*. Sperm associated antigen 9 plays an important role in bladder transitional cell carcinoma[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e81348.
[14] Ando K, Uemura K, Kuzuya A, *et al*. N-cadherin regulates p38 MAPK signaling *via* association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease[J]. J Biol Chem, 2011, 286(9): 7619 – 7628.
[15] Chen F, Lu Z, Deng J, *et al*. SPAG9 expression is increased in human prostate cancer and promotes cell motility, invasion and angiogenesis *in vitro*[J]. Oncol Rep, 2014, 32(6): 2533 – 2540.
[16] Andreeva A V, Kutuzov M A, Voyno-Yasenetskaya T A. Scaffolding proteins in G-protein signaling[J]. J Mol Signal, 2007, 2: 13.

(**收稿**:2015-01-03;**修回**:2015-01-30)
(编辑 龙 亮)

(上接1011页)

## 2 讨论

支气管异物是临床常见急症。异物可存留在喉咽腔、喉腔、气管和支气管内,引起声嘶、呼吸困难等,因右支气管较粗、短,故异物易落入右主支气管。支气管异物可引起剧烈呛咳,并有憋气、呼吸不畅等症状,呼吸困难程度与异物部位及阻塞程度有关。常见支气管异物及气管异物多使用直接喉镜及支气管镜取出,个别支气管镜钳取有困难者需开胸取出。该患者吸入异物为塑料容器,牢牢嵌顿于左主支气管,无法以异物钳及冷冻等常规方法取出,因塑料类为绝缘体,使用高频电刀未能形成有效回路,不能达到高温烧穿异物;最终经纤支镜以钬激光对异物盲端打孔,再以活检钳经孔伸入远端,张开活检钳将异物固定于纤支镜远端后成功取出,避免开胸手术。今后类似气道内异物可借鉴此方法。在使用钬激光烧灼时,吸入氧气浓度必须严格控制在40%以下,避免氧气助燃使气道内异物、导管及内镜等发生燃烧,损伤气道壁及内镜。支气管异物取出后,因存在肺部阻塞性炎症,术后使用抗生素等对症治疗。

## 参考文献:

[1] 陈圣光. 纤支镜取支气管异物体会[J]. 临床肺科杂志, 2007, 12(1): 26.
[2] 徐德宏, 穆书惠, 李静. 钬激光治疗大气道内新生物的疗效观察与护理[J]. 华北煤炭医学院学报, 2010, 12(6): 860 – 861.
[3] 谢国水, 杨世忠, 侯晓延. 纤支镜下钬激光击穿主支气管内柱状异物取出1例[J]. 武警医学院学报, 2006, 15(4): 374.

(**收稿**:2015-03-04;**修回**:2015-03-16)
(编辑 邓强庭)