

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00001

## 微管蛋白酪氨酸连接酶类似物 12 和硝基化酪氨酸对前列腺癌细胞生长的影响

李雅冬<sup>1</sup>, 张劲松<sup>1</sup>, 杨 凯<sup>1</sup>, 张福军<sup>1</sup>, 陈 睿<sup>1</sup>, 洪苏玲<sup>2\*</sup>

1. 重庆医科大学附属第一医院颌面外科, 重庆 400016

2. 重庆医科大学附属第一医院耳鼻喉头颈外科, 重庆 400016

**[摘要]** **目的** 研究微管蛋白酪氨酸连接酶类似物 12 (TTLL12) 和硝基化酪氨酸对前列腺癌细胞生长的影响。**方法** 利用正常前列腺上皮细胞株 PWR1E、RWPE1 和前列腺癌细胞株 DU145, 通过蛋白质印迹分析检测 TTLL12 和硝基化酪氨酸微管蛋白的表达量, 用 MTT 实验检测细胞的增殖情况。**结果** 在硝基化酪氨酸的作用下, DU145 细胞的硝基化酪氨酸微管蛋白表达量低于 PWR1E 和 RWPE1 细胞 ( $P < 0.05$ )。和对照组 (以含 800  $\mu\text{mol/L}$  盐酸培养) 相比, 实验组 (以含 800  $\mu\text{mol/L}$  硝基化酪氨酸的培养液培养) PWR1E 和 RWPE1 细胞增殖受到抑制 ( $P < 0.05$ ), 而 DU145 细胞无明显改变 ( $P > 0.05$ )。在有效沉默 TTLL12 后, 实验组 (用 siTTLL-12 转染) 的硝基化酪氨酸微管蛋白表达量高于对照组 (用 siControl 转染,  $P < 0.05$ ); 实验组内, 硝基化酪氨酸使 DU145 细胞增殖受到抑制 ( $P < 0.05$ ), 而对照组内, 硝基化酪氨酸对细胞增殖改变较小 ( $P > 0.05$ )。**结论** TTLL12 可使前列腺癌细胞逃避硝基化酪氨酸的打击, 从而使前列腺癌细胞逃脱机体监控作用, 获得异常增殖机会。

**[关键词]** 微管蛋白酪氨酸连接酶类似物 12; 硝基化酪氨酸; 前列腺肿瘤

**[中图分类号]** R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0001-04

### Effect of tubulin tyrosine ligase like 12 and nitrotyrosine on growth of prostate cancer cells

LI Ya-dong<sup>1</sup>, ZHANG Jin-song<sup>1</sup>, YANG Kai<sup>1</sup>, ZHANG Fu-jun<sup>1</sup>, CHEN Rui<sup>1</sup>, HONG Su-ling<sup>2\*</sup>

1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

**[Abstract]** **Objective** To study the effect of tubulin tyrosine ligase like 12 (TTLL12) and nitrotyrosine on the growth of prostate cancer cells. **Methods** TTLL12 and  $\alpha$ -tubulin nitrotyrosination (N-tubulin) were detected by Western blotting analysis in normal prostate epithelial cell lines PWR1E and RWPE1, and prostate cancer cell line DU145; the proliferation of cells was observed by MTT assay. **Results** The expression of N-tubulin was significantly lower in DU145 cells than those in PWR1E and RWPE1 cells after treatment with nitrotyrosine ( $P < 0.05$ ). The proliferation of PWR1E and RWPE1 cells treated with nitrotyrosine (cultured with 800  $\mu\text{mol/L}$  nitrotyrosine) were significantly inhibited compared with the control (cultured with 800  $\mu\text{mol/L}$  hydrochloric acid,  $P < 0.05$ ), while there was no visible change in the proliferation of DU145 cells. N-tubulin level was significantly higher in the experimental group (transfected with siTTLL-12) than the control group (transfected with siControl) after effective silence of TTLL12 ( $P < 0.05$ ); the proliferation of DU145 cells treated with nitrotyrosine in the experimental group was significantly inhibited ( $P < 0.05$ ), while there was no visible change in cell proliferation in the control group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** TTLL12 allows an escape of prostate cancer cells from the treatment of nitrotyrosine, leading to the escape of prostate cancer cells from the body's surveillance system and acquirement of their abnormal proliferation.

**[Key words]** tubulin tyrosine ligase like 12; nitrotyrosine; prostatic neoplasms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1):1-4]

**[收稿日期]** 2011-10-23 **[接受日期]** 2011-11-25

**[基金项目]** 重庆市卫生局医学科科研项目(2011-2-013). Supported by Medical Research Program of Chongqing Municipal Health Bureau (2011-2-013).

**[作者简介]** 李雅冬, 博士生, 主治医师. E-mail: llxyydd@yahoo.com.cn

\* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-89012907, E-mail: pro\_hsl@163.com

微管存在于所有真核细胞中,并发挥多种重要功能,它是由微管蛋白聚合而成,并需进行由微管蛋白酪氨酸连接酶(tubulin tyrosine ligase, TTL)主导的翻译后修饰<sup>[1]</sup>,而 TTL 可将硝基化酪氨酸(nitrotyrosine)与微管蛋白连接起来,形成硝基化酪氨酸微管蛋白( $\alpha$ -tubulin nitrotyrosination, N-tubulin),最终导致细胞死亡<sup>[2]</sup>。本课题组发现,在前列腺癌细胞中,微管蛋白酪氨酸连接酶类似物 12(tubulin tyrosine ligase like 12, TTLL12)通过干扰微管的翻译后修饰,可减少 N-tubulin 的形成,从而使前列腺癌细胞逃脱死亡打击,现将研究结果报告如下。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物和细胞 健康雄性新西兰大白兔,体质量 2.3 kg,4 月龄,购自重庆医科大学动物中心[实验动物资格证书编号:0131110760073,许可证号:SCXK(渝)2007-0001]。前列腺上皮细胞株 PWR1E、RWPE1 和前列腺癌细胞株 DU145 由重庆医科大学中心实验室提供。

1.2 主要试剂和仪器 硝基化酪氨酸(Sigma 公司); siTTLL12-2: 5'-GGA ACG AGC UGU GCU ACA A-3', siControl(Dharmacon 公司); 硝基酪氨酸抗体(anti-nitrotyrosine)、磷酸三丁酯抗体(anti-TBP)、 $\alpha$  微管蛋白抗体(anti- $\alpha$ -tubulin)均为 Sigma 公司产品。MTT 检测试剂盒(Sigma 公司)。培养液成分:伊格尔培养基(Sigma 公司),10%小牛血清(Sigma 公司),1 mmol/L 丙酮酸钠,40  $\mu$ g/ml 庆大霉素。Lipofectamine 转染试剂(Invitrogen 公司)。YG-875 型超净工作台、CO<sub>2</sub> 孵箱(Bio-Rad 公司),倒置光学显微镜(Olympus 公司),酶联免疫检测仪(Eppendorf 公司)。

1.3 抗体制备 将雄性兔麻醉,自耳部血管抽取免疫前血液作为阴性对照,然后在兔背部的某一区域刮毛,将含 200  $\mu$ g 的人 TTL 多肽 358-VFPPPD-VEQPQTQPAAFIKL-377(Sigma 公司)的 1 ml 抗原溶液与 1 ml 完全弗氏佐剂混合,混合溶液分 40 至 60 个不同的人针点注射于兔背,1 个月后收集 30 ml 兔血,302 $\times$ g 离心 20 min,可获得约 10 ml 抗体血清。若效价较低,可将 1 ml 含 200  $\mu$ g TTL 多肽的抗原溶液和 1 ml 不完全弗氏佐剂混合,将混合液注射于兔子皮下,以加强免疫反应,12 d 后处死兔子,可收获约 130~150 ml 血液,离心可得约 70 ml 抗体血清,从而获得多克隆抗体,提纯备用,命名为 anti-TTL。anti-TTLL12 制备方法相同,由人 TTLL12 多肽 78-EDEAAREVRKQQPNPGNEL-96(Sigma 公司)所得。

1.4 蛋白质印迹分析 将细胞 PWR1E、RWPE1 和 DU145 分别种入 6 孔板,每孔  $2 \times 10^5$  个细胞,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。待细胞贴壁生长 12 h 后,更换培养液,加入含 50  $\mu$ mol/L 硝基化酪氨酸的培养液培养,每 48 h 更换一次相应培养液,96 h 后提取细胞进行蛋白质印迹检测。用细胞裂解液收取全细胞蛋白,煮沸变性后,以牛血清白蛋白(BSA)配制标准蛋白溶液,测定总蛋白浓度,12% SDS-PAGE 分离胶行蛋白电泳,电泳后转到硝酸纤维素膜上,用 5% 的牛奶封闭 1 h,然后加入一抗及二抗(辣根过氧化物酶标记鼠抗兔 IgG 抗体),之后利用 DAB 显色试剂盒进行化学发光反应并拍照。用美国 Bio-Rad 公司的 Quantity One 系统进行灰度分析,以目的蛋白条带与内参蛋白条带的比值作为蛋白相对表达水平。

1.5 硝基化酪氨酸对 N-tubulin 表达量的影响 按每孔  $2 \times 10^5$  个细胞,将 PWR1E、RWPE1 和 DU145 细胞种入 6 孔板,分为实验组(以含 800  $\mu$ mol/L 硝基化酪氨酸的培养液培养)和对照组[以含 800  $\mu$ mol/L 盐酸(硝基化酪氨酸的溶剂)的培养液培养]。每 48 h 更换一次相应培养液,120 h 后提取细胞进行蛋白质印迹分析。

1.6 硝基化酪氨酸对细胞增殖的影响 将 PWR1E、RWPE1 和 DU145 细胞以每孔 2 000 个接种到 96 孔板内,分为实验组和对照组,实验组和对照组所含培养液同上。每 48 h 更换一次相应培养液,120 h 后进行 MTT 检测,检测前于每孔内加入 10  $\mu$ l MTT(5 mg/ml),放入 CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 4 h,去上清,每孔加入 150  $\mu$ l 异丙醇与 0.04 mol/L 盐酸的混合物,震荡 1 h 后,再利用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处比色读取光密度(D)值,每次至少检测 6 孔,最后取其平均值。

1.7 siRNA 沉默实验 将 DU145 细胞以每孔  $2 \times 10^5$  个种入 6 孔板,分为实验组和对照组。实验组首先利用 10 nmol/L siTTLL12-2 转染 6 h 后,再分别与 800  $\mu$ mol/L 硝基化酪氨酸和 800  $\mu$ mol/L 盐酸培养,96 h 后进行细胞计数,并提取细胞进行蛋白质印迹检测。对照组首先利用 10 nmol/L siControl 转染 6 h 后,再分别与 800  $\mu$ mol/L 硝基化酪氨酸和 800  $\mu$ mol/L 盐酸培养,96 h 后提取细胞进行蛋白质印迹检测。同时利用 MTT 法测定细胞的增殖(方法同前)。

1.8 统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据分析采用 SPSS 10.0 软件,组间比较采用 *t* 检验,检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 蛋白质印迹分析结果 蛋白质印迹分析结果

(图 1)显示,以 TBP 为内参蛋白, $\alpha$ -tubulin 与 TTL 在 PWR1E、RWPE1 和 DU145 这 3 种细胞株内的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),DU145 细胞的 TTLL12 和 N-tubulin 表达量均低于 PWR1E 和 RWPE1 细胞,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

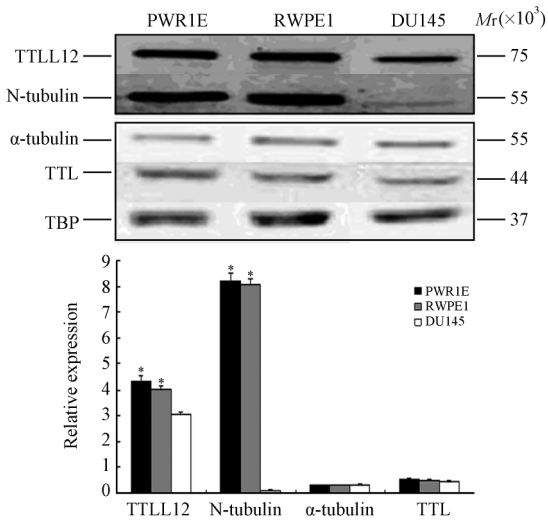


图 1 N-tubulin、 $\alpha$ -tubulin、TTL 和 TTLL12 在 PWR1E、RWPE1 和 DU145 细胞中的表达

Fig 1 Expression of N-tubulin,  $\alpha$ -tubulin,

TTL, and TTLL12 in PWR1E, RWPE1, and DU145 cells

N-tubulin:  $\alpha$ -tubulin nitrotyrosination; TTL: Tubulin tyrosine ligase; TTLL12: Tubulin tyrosine ligase like 12. \*  $P < 0.05$  vs DU145 cells;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.2 硝基化酪氨酸对各细胞 N-tubulin 表达量的影响 检测结果(图 2)显示,加入硝基化酪氨酸后,DU145 细胞的 N-tubulin 表达量( $1.237 \pm 0.095$ )低于 PWR1E( $14.512 \pm 0.973$ )和 RWPE1( $14.179 \pm 0.926$ )细胞,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

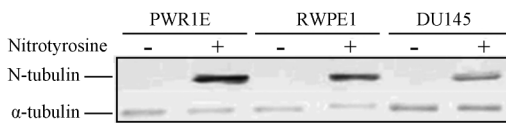


图 2 N-tubulin 在 PWR1E、RWPE1 和 DU145 细胞中的表达

Fig 2 Expression of N-tubulin in PWR1E, RWPE1, and DU145 cells

N-tubulin:  $\alpha$ -tubulin nitrotyrosination

2.3 硝基化酪氨酸对各细胞增殖的影响 结果(图 3)显示,加入硝基化酪氨酸后,PWR1E 和 RWPE1 细胞的增殖明显受到抑制,实验组和对照组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。而加入硝基化酪氨酸后,DU145 细胞的增殖无明显改变,两组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.4 siRNA 沉默实验结果 图 4 显示,siTTLL12-2 转染的实验组 DU145 细胞和 siControl 转染的对照组比较,实验组的 TTLL12 条带消失,实验组中加硝基化酪氨酸的细胞中,以 TBP 为内参蛋白,N-tubulin 表达量( $1.411 \pm 0.130$ )高于相应的对照组( $0.273 \pm 0.012$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。MTT 实验结果(图 5)显示,有效沉默 TTLL12 后,在实验组内,硝基化酪氨酸使 DU145 细胞增殖明显受到抑制( $P < 0.05$ ),而对对照组内,硝基化酪氨酸对细胞增殖改变较小( $P > 0.05$ )。

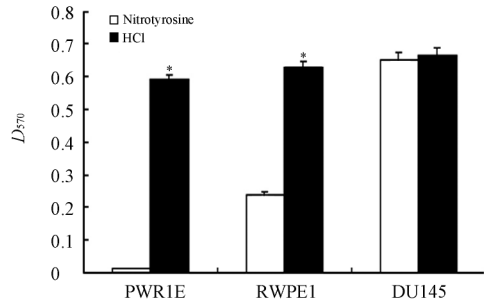


图 3 MTT 法检测硝基化酪氨酸对 PWR1E、RWPE1 和 DU145 细胞增殖的影响

Fig 3 Effect of nitrotyrosine on the proliferation of PWR1E, RWPE1, and DU145 cells by MTT assay

\*  $P < 0.05$  vs nitrotyrosine group;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

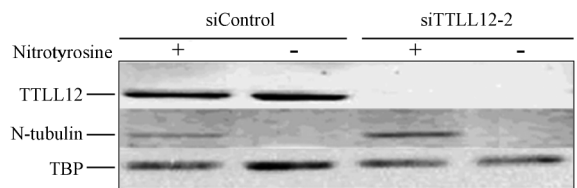


图 4 TTLL12 和硝基化酪氨酸对 N-tubulin 表达的影响

Fig 4 Effect of TTLL12 and nitrotyrosine on the expression of N-tubulin

TTLL12: Tubulin tyrosine ligase like 12; N-tubulin:  $\alpha$ -tubulin nitrotyrosination

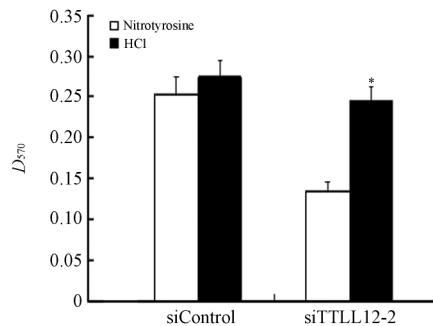


图 5 TTLL12 和硝基化酪氨酸对 DU145 细胞增殖的影响

Fig 5 Effect of TTLL12 and nitrotyrosine on the proliferation of DU145 cells

TTLL12: Tubulin tyrosine ligase like 12; N-tubulin:  $\alpha$ -tubulin nitrotyrosination. \*  $P < 0.05$  vs nitrotyrosine group;  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

微管蛋白可组装成纤毛、鞭毛、轴突、神经管、基粒、中心粒、纺锤体等结构,参与细胞骨架的构成、细胞形态的维持、细胞收缩、伪足运动、细胞内物质运输以及细胞分裂等<sup>[3]</sup>。游离的硝基化酪氨酸可通过 TTL 整合至微管蛋白,这显著地改变了微管的结构,可引起细胞的变形、黏附能力的下降以及胞内运输障碍,最终会导致细胞凋亡和器官功能丧失<sup>[4-5]</sup>。众所周知,在炎症过程中,一氧化氮合成酶会促进硝基化酪氨酸的形成,而 TTL 将硝基化酪氨酸与微管蛋白连接起来,导致细胞死亡,这可作为消除不正常细胞的方法<sup>[6]</sup>。因此硝基化酪氨酸有抑制细胞增殖的功能,而最终行使这一功能的是 N-tubulin,它可以清除非正常细胞,是维持正常细胞种群的重要因素,可以影响 N-tubulin 形成的基因是 TTL,但我们最近又发现了一个影响 N-tubulin 形成的新基因,即 TTLL12。

首先我们利用前列腺上皮细胞株 PWR1E 和 RWPE1 以及前列腺癌细胞株 DU145 与硝基化酪氨酸培养后,发现这 3 株细胞中  $\alpha$ -tubulin、TTL 的表达基本一致,DU145 细胞的 TTLL12 表达量略低于 PWR1E 和 RWPE1 细胞( $P < 0.05$ ),但 DU145 细胞的 N-tubulin 表达量明显低于正常前列腺上皮细胞株 PWR1E 和 RWPE1,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。为明确 N-tubulin 是否能抑制前列腺细胞的增殖,将以上 3 株细胞与硝基化酪氨酸培养后,用蛋白质印迹方法检测 N-tubulin,结果显示 DU145 细胞的 N-tubulin 表达量明显低于正常前列腺上皮细胞株 PWR1E 和 RWPE1( $P < 0.05$ )。MTT 实验结果表明正常前列腺上皮细胞株的增殖受到明显抑制,这说明 N-tubulin 表达量越高,细胞增殖受抑制的程度越大。

在 N-tubulin 的生成过程中,硝基化酪氨酸、 $\alpha$ -tubulin 和 TTL 的多少会影响 N-tubulin 的最终表达量<sup>[7]</sup>,在本实验中,硝基化酪氨酸、 $\alpha$ -tubulin 和 TTL 的表达量一致,但 N-tubulin 的最终表达量却不一致,因此,应该还有其他影响因素,那就是 TTLL12。根据本实验结果,TTLL12 能有效减少 N-tubulin 的产生,在有效沉默 TTLL12 后,将 DU145 细胞与硝基化酪氨酸培养,然后检测 N-tubulin,发现沉默 TTLL12 可以提高 N-tubulin 的表达量。

本实验结果表明 N-tubulin 会抑制前列腺细胞的增殖,其表达量越高,细胞增殖受抑制的程度越大。而 TTLL12 可以抑制 N-tubulin 的生成,从而使前列腺癌细胞避免死亡;阻断 TTLL12 会导致 N-tubulin 增多,从而使细胞死亡,这说明 TTLL12 参

与了 N-tubulin 的形成过程。

我们在实验中发现,前列腺癌细胞中的 TTLL12 含量略低于前列腺正常细胞,但 N-tubulin 表达量却明显降低,推测在前列腺癌细胞中,虽然 TTLL12 的总量稍有下降,但可能由于 TTLL12 的结构发生微小变化,使得 TTLL12 阻止 N-tubulin 生成的功能加强,导致癌细胞逃避了 N-tubulin 对其的打击,从而继续增殖,因此 TTLL12 具有潜在癌基因的功能,在前列腺癌发生和发展中,TTLL12 可能发挥了重要的作用。国内尚未见关于 TTLL12 的报道,国外 Wasylyk 等<sup>[8]</sup>报道 TTLL12 促进了肿瘤的生长和转移,参与微管蛋白的修饰,可作为肿瘤治疗的靶点。而根据本实验的结果可知,TTLL12 通过干扰 TTL 的功能,阻止硝基化酪氨酸与  $\alpha$ -tubulin 的整合,从而减少了 N-tubulin 生成,避免细胞受到死亡打击,而对这一调控机制的进一步研究,将有助于控制肿瘤细胞的生长。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

### [参考文献]

- [1] Sahab Z J, Hall M D, Me Sung Y, Dakshanamurthy S, Ji Y, Kumar D, et al. Tumor suppressor RARRES1 interacts with cytoplasmic carboxypeptidase AGBL2 to regulate the  $\alpha$ -tubulin tyrosination cycle[J]. *Cancer Res*, 2011, 71: 1219-1228.
- [2] Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T. Post-translational modifications of tubulin in the nervous system [J]. *J Neurochem*, 2009, 109: 683-693.
- [3] Pellegrini F, Budman D R. Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development [J]. *Cancer Invest*, 2005, 23: 264-273.
- [4] Hammond J W, Cai D, Verhey K J. Tubulin modifications and their cellular functions[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2008, 20: 71-76.
- [5] Tedeschi G, Cappelletti G, Nonnis S, Taverna F, Negri A, Ronchi C, et al. Tyrosine nitration is a novel post-translational modification occurring on the neural intermediate filament protein peripherin[J]. *Neurochem Res*, 2007, 32: 433-441.
- [6] Gadau S, Lepore G, Zedda M, Manca P, Chisu V, Farina V. D-glucose induces microtubular changes in C1300 neuroblastoma cell line through the incorporation of 3-nitro-L-tyrosine into tubulin[J]. *Arch Ital Biol*, 2008, 146: 107-117.
- [7] Wood S C, Tang X, Tesfamariam B. Paclitaxel potentiates inflammatory cytokine-induced prothrombotic molecules in endothelial cells[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 55: 276-285.
- [8] Wasylyk C, Zambrano A, Zhao C, Brants J, Abecassis J, Schalken J A, et al. Tubulin tyrosine ligase like 12 links to prostate cancer through tubulin posttranslational modification and chromosome ploidy[J]. *Int J Cancer*, 2010, 127: 2542-2553.