

LncRNA PCGEM1和雄激素受体 在前列腺癌中的共定位表达及临床意义

朱竹先¹, 余晨¹, 邱忠民², 吕寒静², 关广聚³, 张子强²

1. 同济大学附属同济医院肾内科, 上海 200065;
2. 同济大学附属同济医院呼吸内科, 上海 200065;
3. 山东大学第二附属医院肾内科, 山东 济南 250014

[摘要] 背景与目的: 长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)可参与肿瘤调控, 有研究提示lncRNA PCGEM1可能影响雄激素受体(androgen receptor, AR)通路。本研究拟检测前列腺癌lncRNA PCGEM1和AR的表达情况, 探讨其在前列腺癌中的表达及意义。方法: 构建RNA核酸探针, 应用荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)技术检测前列腺癌lncRNA PCGEM1的表达情况, 并使用荧光免疫组织化学技术检测前列腺癌AR的表达; 采用RNA-pull down技术检测PCGEM1和AR的共同作用。结果: 依赖AR的LNCaP细胞的PCGEM1表达水平显著高于非AR依赖性的PC3和DU145细胞, 差异有统计学意义($P<0.01$)。前列腺癌组织中PCGEM1的表达与AR表达程度显著相关。与良性前列腺肿瘤相比, 转移性肿瘤中的PCGEM1细胞核内定位显著不同, 雄激素去势显著影响PCGEM1的表达及细胞内定位。而共定位检测发现, PCGEM1与AR之间存在一定程度的共定位现象。结论: 本研究通过FISH研究发现, PCGEM1表达在雄激素去势条件下显著上调, 而在转移性前列腺癌中, PCGEM1和AR的共定位表达表明, lncRNA PCGEM1和AR相互作用可能共同参与调控前列腺癌的恶性进展及转移。

[关键词] 长链非编码RNA; 雄激素受体; 前列腺癌

DOI: 10.3969/j.issn.1007-3969.2016.04.006

中图分类号: R737.25 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2016)04-0320-06

Expression of lncRNA PCGEM1 and AR co-localization in prostate cancer and tis significance ZHU Zhuxian¹, YU Chen¹, QIU Zhongmin², LV Hanjing², GUAN Guangjiv³, ZHANG Ziqiang² (1.Department of Nephrology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China; 2.Department of Respiratory Medicine, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China; 3. Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Shandong University, Jinan 250014, Shandong Province, China)

Correspondence to: ZHANG Ziqiang E-mail: zzq1419@126.com

[Abstract] **Background and purpose:** Long non-coding RNA (lncRNA) could be an important player in cancer biology. Recent studies showed that lncRNA PCGEM1 might be important in the regulation of androgen receptor (AR) signaling pathway. We tried to observe the expressions of lncRNA PCGEM1 and AR in prostate cancer, and investigate their role and significance in prostate cancer genesis and progress. **Methods:** The expression of lncRNA PCGEM1 was observed in prostate cancer by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique. Then detection of AR was performed by immunofluorescence histochemistry methods. Their co-effective role was checked by RNA pull-down technique. **Results:** Compared with the AR-independent cell line such as PC3 or DU145, AR-dependent cell line such as LNCaP showed much higher expression of lncRNA PCGEM1 ($P<0.01$). PCGEM1 and AR could be co-localized in most of these prostate cancer samples, especially in the metastasis samples. Moreover, androgen deprivation promoted the translocation of PCGEM1 into nucleus. RNA pull-down results also proved the co-effective role of PCGEM1 and AR. **Conclusion:** This study showed that lncRNA PCGEM1 was highly expressed in metastatic prostate cancer. It was related to the progress and malignant behavior of the prostate cancer. Its co-localization with AR may play an important

role in prostate cancer genesis and progress.

[**Key words**] Long non-coding RNA; Androgen receptor; Prostate cancer

在近几十年里, 肿瘤复发和转移仍是改善整体存活率的主要障碍, 这可能主要因为人们对于癌症生物学仍缺乏全面的了解。功能基因组学研究的最新进展表明, 参与人类基因转录的绝大多数是非编码RNA^[1]。最近, 更新的非编码基因数据库列出了超过56 000个人类长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)^[2], 然而, 这些lncRNA的功能仍有待确定。更多的证据表明, lncRNA可以在包括细胞生长、凋亡和肿瘤调控等方面发挥关键性作用, 提示lncRNA在肿瘤生物学中潜在的重要作用如存在lncRNA Loc285194与mir-211之间, 以及lncRNA GAS5和miR-21之间的“竞争性内源RNA”的调节机制^[3-4]。然而, 对于lncRNA在调控癌症基因表达及机制等方面仍所知甚少。

雄激素受体(androgen receptor, AR)是前列腺癌等肿瘤的关键调节因子, 也是这类肿瘤主要的治疗靶点。然而, 对于lncRNA是否及如何在这类肿瘤尤其是前列腺癌的侵袭及去势抵抗中发挥作用, 目前还了解甚少。最近, 有研究表明, PCGEM1可能通过AR发挥作用^[5], 但具体机制仍存在争议。对此, 本研究通过临床标本研究, 希望进一步明确PCGEM1的基因表达与前列腺癌恶性程度及转移程度, 通过荧光染色共定位的检测, 观察PCGEM1可能通过与AR直接作用参与前列腺癌的进展及转移。

1 材料和方法

1.1 细胞及标本来源

前列腺癌LNCaP细胞株, 采用含有5%小牛血清的RPMI1640培养基培养。选择前列腺癌LNCaP细胞进行细胞侵袭实验研究。实验细胞分为对照组及shRNA-PCGEM1组, 具体操作方法参照参考文献[4]。临床男性患者前列腺肿瘤组织标本, 包含前列腺良性肿瘤16例, 平均年龄61.2岁, 转移性前列腺癌组织样本14例,

GS评分均值7.2分(6~10分), 平均年龄58.6岁。两组之间患者年龄等一般特征差异无统计学意义($P>0.05$)。所有的病理学指标均由病理科资深医师来确定。

1.2 实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测

所采用PCGEM1的RTFQ-PCR引物序列为: TTTTGGCCCTATGCCGTAAC, GGAGACTCCCAACCTGATGA。内参照 β -actin引物序列为: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'。

RTFQ-PCR检测用Trozol(Gibco/BRL)一步法提取冰冻组织的总RNA, 紫外分光光度计测定RNA纯度, 取0.5 μ g总RNA用于反转录。反转录体系10 μ L, 包含1 μ L MuLV反转录酶和相应的缓冲液。1 μ L cDNA用于PCR扩增, 总体积25 μ L, 包含1 μ L上下游引物、0.25 μ L DNA聚合酶和相应的缓冲液, PCR循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, β -actin的PCR循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 共30个循环。

1.3 荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)及荧光免疫组织化学检测

通过LNCaP细胞进行FISH来确定PCGEM1的亚细胞定位。采用生物素标记的LNA反义PCGEM1探针(序列: T+T+T+TCCAAAGGG+T+CCGCTGTCCCTG+G+A+G), 信号显示采用TSATM试剂盒(#24)及Alexa Fluor 568(Life Technologies), 石蜡切片厚度4 μ m, 常规脱蜡至水, 采用高压煮沸法行抗原修复后, 操作参照试剂说明书, 具体步骤参照参考文献[5]进行。完成FISH显色后, 进一步应用AR抗体进行免疫荧光染色。免疫组织化学染色兔抗AR多克隆抗体。工作浓度1:300, DAB显色, 苏木精对比染色, 采用山羊抗兔荧光二抗。每批切片免疫组化染色分析均以已知阳性组织切片做阳

性对照, 以PBS代替一抗做阴性对照。

1.4 RNA pull-down检测

为确定PCGEM1与AR之间可能存在的相互作用, 构建T7-PCGEM1核酸探针序列: TAATACGACTCACTATAGGGAGGCACTCTGGCACCCAGTT; GCGGCCGCGAAATCTTTAATATTTGTTA。通过上述T7-PCGEM1核酸探针进行RNA pull-down试验, 所得pull-down产物进行蛋白[质]印迹法(Western blot)及相应特异性抗体检测。具体步骤参照参考文献[4-5]进行。

1.5 统计学处理

采用SPSS 17.0软件包处理数据, 不同组间表达的结果处理用 t 检验或 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCGEM1在不同前列腺癌细胞株及前列腺组织中的表达

研究选择不同类型的前列腺癌细胞株, 包括LNCaP(AR依赖性)、PC3及DU145(非AR依赖性), 通过RTFQ-PCR检测PCGEM1在上述不同细胞株中的表达水平, 结果发现, 与非AR依赖性细胞株PC3或DU145相比, LNCaP的PCGEM1表达水平显著提高, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图1A)。与良性前列腺癌比较, 转移性前列腺癌组织中的PCGEM1表达水平显著提高, 差异有统计学意义($P < 0.01$, 图1B)。

2.2 PCGEM1在LNCaP细胞中的表达定位及雄激素去势的影响

通过前列腺癌细胞株LNCaP细胞, 应用FISH技术检测发现, PCGEM1主要分布在细胞质中, 少量分布在核仁中。通过雄激素去势处理后, 发现细胞中PCGEM1表达水平显著提高, 并且可以发现显著的PCGEM1异位, FISH检测显示, 细胞PCGEM1明显的分布于细胞核, 尤其是核小体中。而与AR的双重染色共定位检测发现, 通过雄激素去势处理后表现出显著的PCGEM1和AR共定位现象(图2), 提示PCGEM1和AR共定位可能存在二者的共同作用而参与前列腺癌进展。

2.3 PCGEM1在前列腺癌组织中的表达及与临床特性的关系

应用FISH技术检测发现, 前列腺癌组织中PCGEM1的表达与肿瘤恶性程度显著相关。与良性前列腺癌组织比较, 转移性肿瘤中的PCGEM1表达水平显著提高, PCGEM1的表达与前列腺癌的分化程度、转移显著相关。同样与细胞水平的研究相比发现, 在转移性前列腺癌细胞除了PCGEM1表达水平提高, 还发现显著的PCGEM1异位, FISH检测显示, 细胞中PCGEM1明显的分布于细胞核。而与AR的双重染色共定位检测可以发现转移性前列腺癌表现出显著的PCGEM1和AR共定位现象(图3), 进一步提示PCGEM1和AR可能存在二者的共同作用而参与前列腺癌进展。

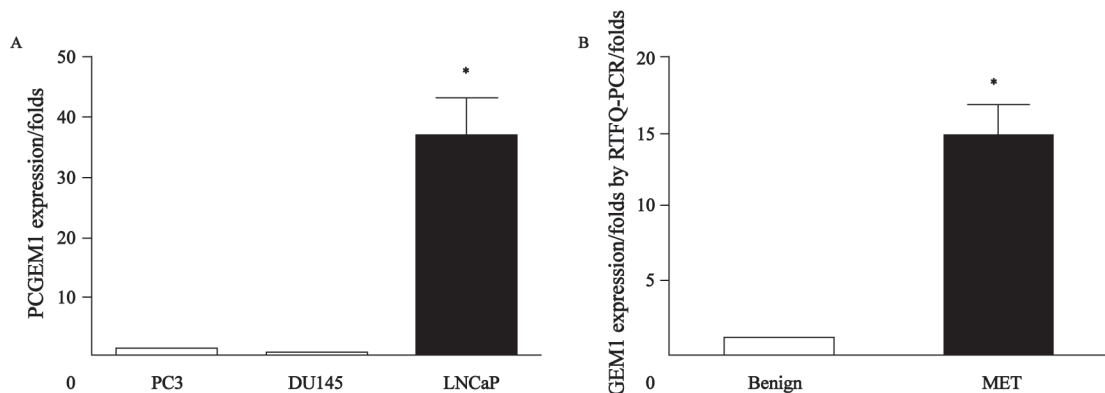


图1 LncRNA PCGEM1在不同类型前列腺癌细胞株中的表达

Fig. 1 Expression of lncRNA PCGEM1 in different prostate cell lines

*: $P < 0.01$

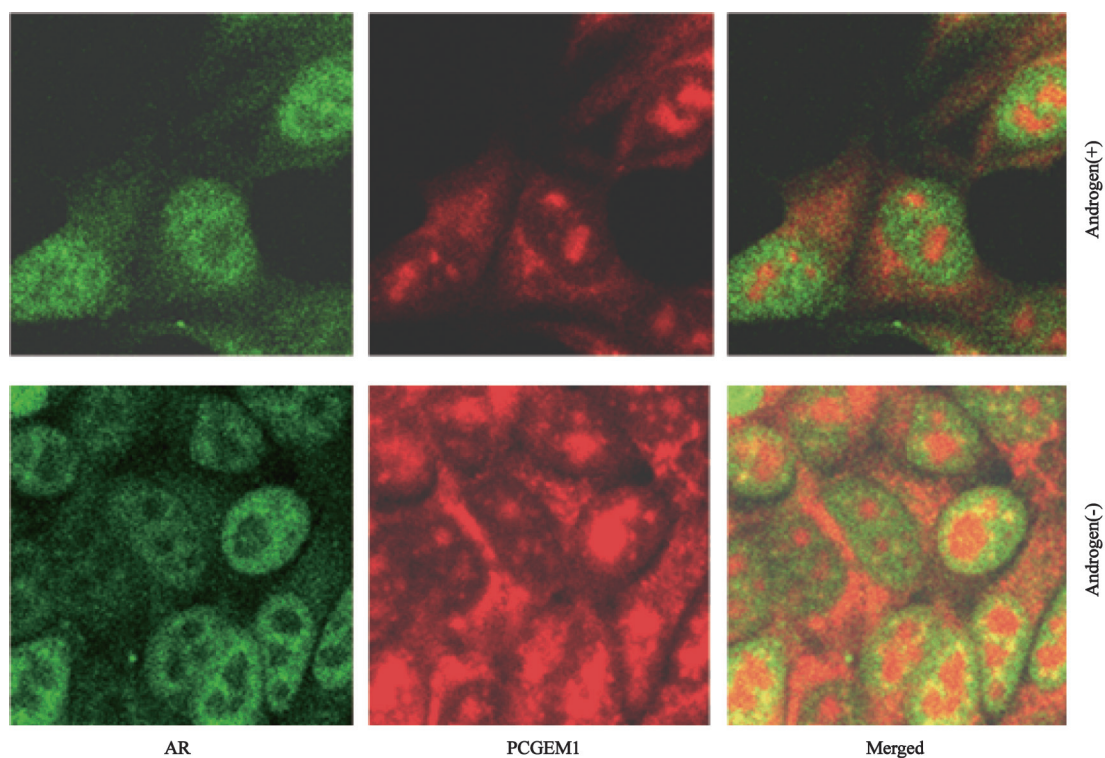


图2 FISH检测PCGEM1和AR在前列腺癌LNCaP细胞中的表达及雄激素去势干预后对其影响

Fig. 2 The expression of PCGEM1 and AR in LNCaP cell line, and the effect of androgen deprivation detected by FISH

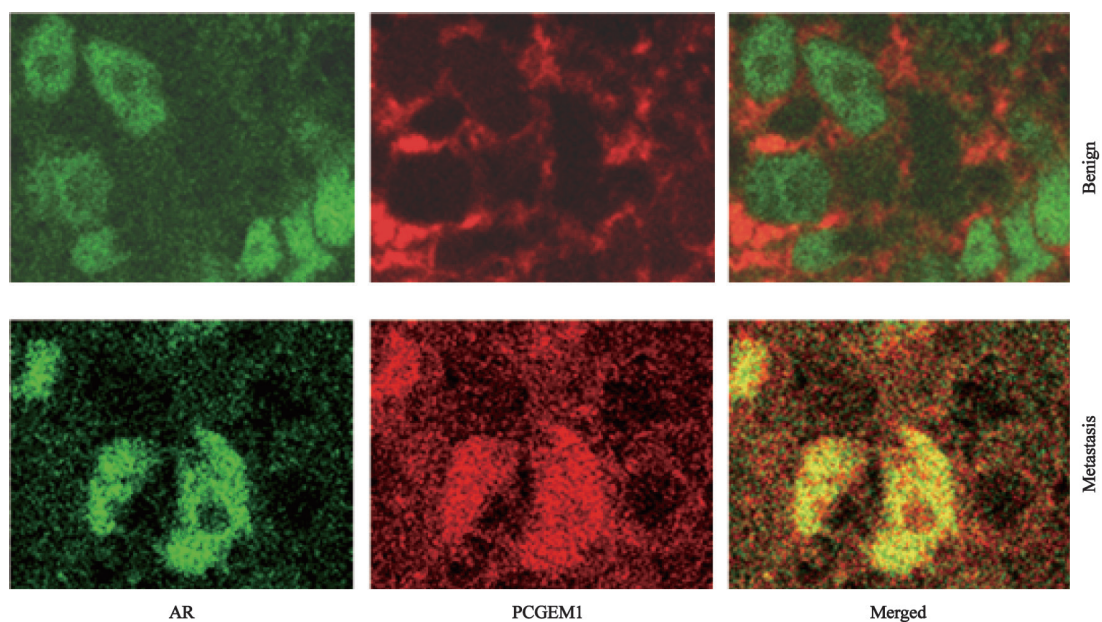


图3 FISH检测PCGEM1和AR在前列腺癌组织中的表达及共定位检测

Fig. 3 The expression and co-localization of PCGEM1 and AR in prostate cancer tissues detected by FISH

2.4 RNA-pull down检测PCGEM1与AR的相互作用及PCGEM1对LNCaP细胞迁移的影响

为确定PCGEM1与AR之间可能存在的直接相互作用, 本实验设计和构建了T7-PCGEM1核酸探针进行RNA pull-down试验, 对所得到的pull-down产物进行Western blot及相应特异性AR抗体检测。通过检测前列腺癌细胞株LNCaP细

胞发现, PCGEM1可以显著地pull-down AR, 与空白对照组(单纯Beads对照组)比较, 可以发现PCGEM1组能够检测到显著的AR条带(图4A), 进一步提示PCGEM1和AR二者之间的相互作用。与对照组比较, PCGEM1下调(shRNA-PCGEM1)组的细胞侵袭能力显著下降(图4B、C), 差异有统计学意义($P<0.05$)。

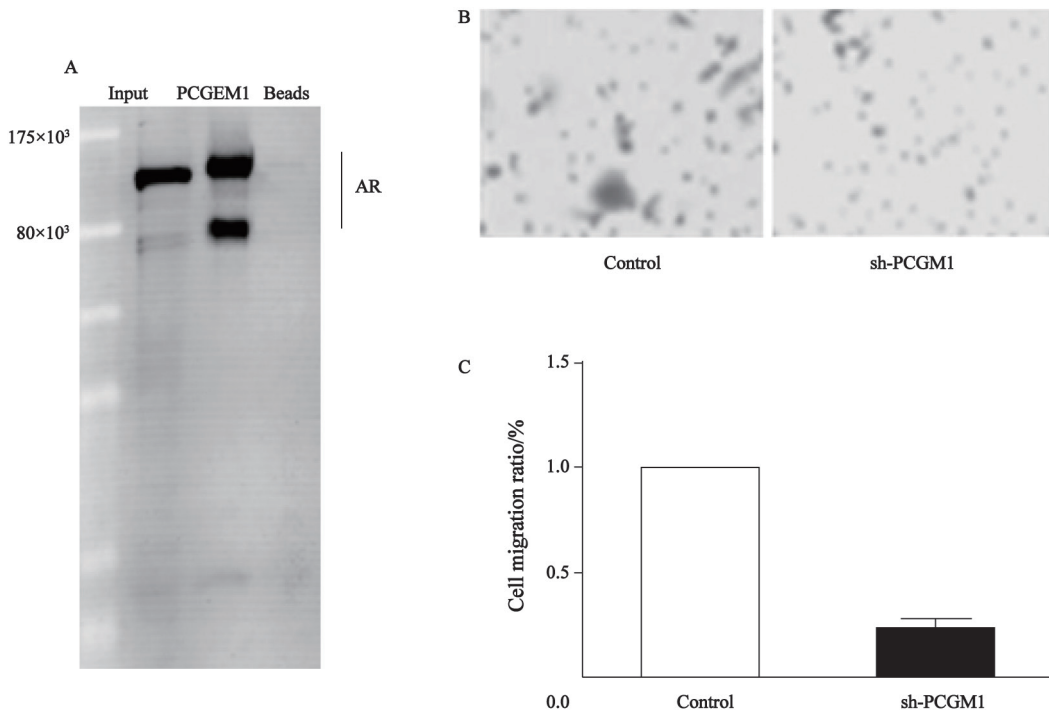


图4 RNA pull-down检测PCGEM1和AR二者的相互作用

Fig. 4 Interaction of PCGEM1 and AR detected by RNA pull-down

3 讨论

LncRNA可作为致癌基因和肿瘤抑制基因影响1个及1个以上的癌症特征^[6]。LncRNA在一级结构、二级结构、表达水平及其同源RNA结合蛋白中的改变导致从神经退行性疾病到癌症等广泛疾病的发生。所以, LncRNA广泛参与人类疾病可能比之前认为的更为普遍^[7]。一方面, 一些LncRNA已被证实可发挥致癌作用, 如PCAT-1作为影响细胞增殖的前列腺特异性调节因子, 已被证实在部分前列腺癌患者群体中具有临床预测价值, PCGEM1在前列腺癌中上调^[8], 可促进细胞增殖^[9], 并

减少抗癌药物如阿霉素和依托泊苷介导的细胞凋亡^[10], 其他与前列腺癌相关的潜在的致癌LncRNA包括ANRIL^[11-12]和CTBP1-AS^[13]; 另一方面, LncRNA也能起到抑制肿瘤的作用, 如LncRNA p21作为p53依赖性的转录反应抑制因子, 通过募集hnRNP-K至其基因组靶目标发挥作用^[14]。

AR是前列腺癌的关键调节因子, 也是其主要的治疗靶点。大量的研究表明, 一些蛋白质可以和AR相互作用, 导致基因的激活和去势抗性^[15]。AR异构体的产生对于前列腺癌侵袭进展及去势抵抗有重要的作用, 而对于LncRNA是否在前列腺癌复发侵袭中发挥作用,

目前还所知甚少。本研究初步发现, LncRNA PCGEM1与AR的表达存在高度的调控关系, 提示PCGEM1可能通过调控AR发挥重要作用。

本研究通过FISH技术检测发现, 前列腺癌组织中PCGEM1的表达与肿瘤恶性程度显著相关。PCGEM1的表达与前列腺癌的分化程度、转移和临床分期显著相关。针对PCGEM1和AR在前列腺癌中的表达的共定位检测发现, PCGEM1与AR之间存在一定程度的共定位现象。所以, PCGEM1表达与前列腺癌的恶性程度及侵袭转移有关, 而PCGEM1和AR在前列腺癌表达中的共定位表明, PCGEM1和AR相互作用共同参与前列腺癌的恶性进展及侵袭转移。因此, FISH技术检测PCGEM1和AR表达及共定位情况可能成为前列腺癌患者预后判断和指导临床治疗的重要指标。

本研究通过对PCGEM1与前列腺癌转移影响等的研究, 明确PCGEM1与AR的相互作用对前列腺癌的临床意义。这为制定新的临床应用策略, 包括发现新型的肿瘤生物标志物及分子治疗靶点提供了理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J] . Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [2] WAPINSKI O, CHANG H Y. Long noncoding RNAs and human disease [J] . Trends Cell Biol, 2011, 21(6): 354-361.
- [3] LIU Q, HUANG J, ZHOU N, et al. LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor [J] . Nucleic Acids Res, 2013, 41(9): 4976-4987.
- [4] ZHANG Z, ZHU Z, WATABE K, et al. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21 [J] . Cell Death Differ, 2013, 20(11): 1558-1568.

- [5] YANG L, LIN C, JIN C, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen-receptor-regulated gene activation programs [J] . Nature, 2013, 29(7464): 598-602.
- [6] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J] . Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [7] WAPINSKI O, CHANG H Y. Long noncoding RNAs and human disease [J] . Trends Cell Biol, 2011, 21(6): 354-361.
- [8] SRIKANTAN V, ZOU Z, PETROVICS G, et al. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(22): 12216-12221.
- [9] PETROVICS G, ZHANG W, MAKAREM M, et al. Elevated expression of PCGEM1, a prostate-specific gene with cell growth-promoting function, is associated with high-risk prostate cancer patients [J] . Oncogene, 2004, 23(2): 605-611.
- [10] FU X, RAVINDRANATH L, TRAN N, et al. Regulation of apoptosis by a prostate-specific and prostate cancer-associated noncoding gene, PCGEM1 [J] . DNA Cell Biol, 2006, 25(3): 135-141.
- [11] KOTAKE Y, NAKAGAWA T, KITAGAWA K, et al. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15 (INK4B) tumor suppressor gene [J] . Oncogene, 2011, 30(16): 1956-1962.
- [12] YAP K L, LI S, MUNOZ-CABELLO A M, et al. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a [J] . Mol Cell, 2010, 38(5): 662-674.
- [13] TAKAYAMA K, HORIE-INOUE K, KATAYAMA S, et al. Androgen-responsive long noncoding RNA CTBP1-AS promotes prostate cancer [J] . EMBO J, 2013, 32(12): 1665-1680.
- [14] HUARTE M, GUTTMAN M, FELDSER D, et al. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response [J] . Cell, 2010, 142(3): 409-419.
- [15] LIU L L, XIE N, SUN S, et al. Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells [J] . Oncogene, 2014, 33(24): 3140-3150.

(收稿日期: 2014-12-15 修回日期: 2015-02-12)