



· 论 著 ·

# 核受体HNF4 $\alpha$ 通过调控雄激素受体表达促进去势抵抗性前列腺癌进展

王 铸, 张 颖, 张建文, 邓 琼, 梁 辉

南方医科大学附属深圳龙华医院泌尿外科, 广东 深圳 518109

**[摘要]** **背景与目的:** 核受体肝细胞核因子4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ ) 作为重要的转录因子, 其在前列腺癌中的作用及调控机制尚不清楚。探讨HNF4 $\alpha$ 在前列腺癌去势抵抗进展中的作用及调控机制。**方法:** 采用Oncomine数据库分析HNF4 $\alpha$ 在前列腺癌临床样本中的表达水平, 并通过cBioPortal数据库分析HNF4 $\alpha$ 在不同类型前列腺癌中的表达特征及其对前列腺癌患者总生存率的影响。构建HNF4 $\alpha$ 慢病毒表达载体并转染到HEK-293细胞中用于慢病毒包装, 上调LNCaP细胞中HNF4 $\alpha$ 表达, 通过实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR) 和蛋白质印迹法 (Western blot) 分析其对雄激素受体 (androgen receptor, AR) 表达水平的影响。通过萤光素酶报告基因实验分析HNF4 $\alpha$ 对AR表达调控的影响。**结果:** HNF4 $\alpha$ 基因在前列腺癌临床样本中表达上调, 而且在去势抵抗性前列腺癌和神经内分泌前列腺癌样本中异常改变比例显著升高, 与患者的总生存率呈负相关。HNF4 $\alpha$ 的外源性表达显著促进AR表达, 并可能通过直接结合AR启动子的方式调控AR的基因转录过程。**结论:** 核受体HNF4 $\alpha$ 在前列腺癌中表达上调并与前列腺癌恶性进展呈正相关, 很可能通过直接靶向AR启动子促进其表达, HNF4 $\alpha$ 有望成为前列腺癌新的治疗靶点。

**[关键词]** 核受体; 肝细胞核因子4 $\alpha$ ; 前列腺癌; 去势抵抗性前列腺癌; 神经内分泌前列腺癌

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2021.03.002

中图分类号: R737.25 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2021)03-0170-06

**Nuclear receptor HNF4 $\alpha$  promotes castration-resistant prostate cancer via its regulation of androgen receptor expression** WANG Zhu, ZHANG Ying, ZHANG Jianwen, DENG Qiong, LIANG Hui (Urology Department, Affiliated Hospital of Longhua Shenzhen, Southern Medical University, Shenzhen 518109, Guangdong Province, China)

Correspondence to: LIANG Hui E-mail: dr.lianghui@aliyun.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) is a critical transcriptional factor, however, the functional and regulatory role of HNF4 $\alpha$  in prostate cancer is not clear. The aim of this study was to investigate the mechanism of HNF4 $\alpha$  involved in the development of castration-resistant prostate cancer. **Methods:** Oncomine analysis was used to characterize the expression level of HNF4 $\alpha$  in clinical samples of prostate cancer. cBioPortal analysis was used to study the alteration of HNF4 $\alpha$  in different subtypes of prostate cancer. The overall survival of prostate cancer patients with altered and unaltered HNF4 $\alpha$  was also compared. The plenti-HNF4 $\alpha$  vector was constructed and transfected into HEK-293 cells for lentivirus package. HNF4 $\alpha$  was ectopically expressed in LNCaP cells, and its effect on androgen receptor (AR) expression level was analyzed by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) and Western blot. Luciferase reporter assay was performed to study the potential binding effect of HNF4 $\alpha$  on AR promoter. **Results:** HNF4 $\alpha$  was upregulated in clinical samples of prostate cancer, and the proportion of abnormal changes in castration-resistant prostate cancer and neuroendocrine prostate cancer samples was significantly increased, which was negatively correlated with the overall survival rate of patients. The exogenous upregulation of HNF4 $\alpha$  significantly promoted the expression of AR, and was positively correlated with the expression of the luciferase reporter gene. **Conclusion:** HNF4 $\alpha$  is upregulated in prostate cancer and likely promotes AR expression by directly targeting the AR promoter. HNF4 $\alpha$  may serve as a new therapeutic target in prostate cancer.

**[Key words]** Nuclear receptor; Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ ; Prostate cancer; Castration-resistant prostate cancer; Neuroendocrine prostate cancer

基金项目: 国家自然科学基金 (81802566); 深圳市科技计划项目 (JCYJ20180228163919346)。

通信作者: 梁 辉 E-mail: dr.lianghui@aliyun.com

目前,前列腺癌仍是威胁男性健康的重要因素,尤其是去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC),患者预后极差,临床尚无有效的治疗手段<sup>[1]</sup>。随着CRPC进展机制研究的不断深入,包括雄激素受体(androgen receptor, AR)在内的核受体这一类重要的转录因子的作用受到越来越多的关注<sup>[2]</sup>。

肝细胞核因子4 $\alpha$ (hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ )属于没有配体或目前尚未发现配体的孤儿核受体亚家族成员,蛋白结构含有DNA结合结构域(DNA binding domain, DBD)和配体结构域(ligand binding domain, LBD),能够直接进入细胞核调控靶基因转录表达,从而调控机体的各项生理活动。HNF4 $\alpha$ 通常以二聚体形式与其顺式作用元件相结合,处于转录因子“调控网络”上游,广泛参与人体代谢过程的调节、细胞分化相关基因的表达调控等过程<sup>[3]</sup>,与肿瘤的发生、发展密切相关。

有研究<sup>[4-5]</sup>发现,HNF4 $\alpha$ 在肝癌、胃癌、结肠直肠癌、胰腺癌和鼻咽癌等肿瘤组织中表达上调,表现为癌基因特征。但是HNF4 $\alpha$ 在前列腺癌中的作用及调控机制尚不清楚,本研究通过基于高通量测序的生物信息学分析HNF4 $\alpha$ 在不同类型前列腺癌组织中的表达水平,并且阐明这种表达水平的改变与前列腺癌患者总生存率的相关性,初步探讨其通过上调AR表达介导CRPC进展的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

前列腺癌细胞系LNCaP购自美国模式培养物保藏所(American Type Culture Collection, ATCC),用含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的RPMI-1640培养基(美国Gibco公司)在37℃条件下培养。鼠抗人HNF4 $\alpha$ 单抗购自英国Abcam公司(货号:ab41898),兔抗人AR单抗购自英国Abcam公司(货号:

ab108341),鼠抗人 $\beta$ -actin单抗购自英国Santa Cruz公司(货号:sc-47778),HNF4 $\alpha$ 基因(序列号:BC137539.1)的表达克隆购自美国亚利桑那州立大学。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 OncoPrint数据分析

通过OncoPrint(<http://www.oncoPrint.org>)分析基于癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中前列腺癌临床样本和正常前列腺组织中HNF4 $\alpha$ 基因的mRNA表达水平<sup>[6]</sup>。分析参数包括:以HNF4 $\alpha$ (NR2A1)为基因名称,以前列腺癌为分析对象,以癌症与正常组织中的表达水平作为分析类型。用于查询微阵列数据阈值:包括癌组织和正常组织之间的表达差异倍数>2,  $P<0.05$ 。

#### 1.2.2 cBioPortal分析

通过cBioPortal(<https://www.cbioportal.org/>)综合15个独立的前列腺癌研究的基因组数据、临床资料和患者数据等<sup>[6]</sup>。分析HNF4 $\alpha$ 在不同类型前列腺癌样本中的表达变异情况,以及HNF4 $\alpha$ 表达变异的肿瘤样本和无变异的肿瘤样本的总生存率。

#### 1.2.3 HNF4 $\alpha$ 过表达载体构建

HNF4 $\alpha$ 基因通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增获得全长cDNA,并将其克隆到慢病毒质粒pLenti-puro载体上进行过表达研究。将构建的pLenti-HNF4 $\alpha$ 质粒转染到HEK-293细胞中进行慢病毒包装制备(实验组),空的pLenti-puro载体包装作为阴性对照(对照组)。包装好的慢病毒经过分离纯化后用来感染LNCaP细胞。分别通过实时荧光定量PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测HNF4 $\alpha$ 的表达。

#### 1.2.4 RTFQ-PCR实验

采用TRIzol法提取细胞样品总RNA,脱氧核糖核酸酶I(deoxyribonuclease I, DNase I)处理后,用PrimeScript RTase和Oligo(dT)

[ PrimeScript RT Master Mix, 宝生物工程 (大连) 有限公司 ] 的混合物在 37 °C 下温育 15 min 完成反转录cDNA合成, 然后在 85 °C 下 5 s 热灭活反转录酶 (reverse transcriptase, RTase)。混合 25 ng cDNA, 100 nmol/L 引物对和 RTFQ-PCR 试剂混合物 [ ( SYBR Premix Ex Taq, ROX Plus, 宝生物工程 (大连) 有限公司 ) ] 在实时 PCR 系统 ( StepOne, Applied Biosystems, US ) 中以 95 °C 20 s 进行 PCR, 随后再以 95 °C 15 s、60 °C 20 s、72 °C 30 s 为 1 个周期进行 40 次循环。

### 1.2.5 Western blot检测

采用 RAPI 冷裂解缓冲液 ( 含终浓度为 1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟 ) 提取全细胞蛋白。采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 ( sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE ) 分离和转印到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭后进行一级和二级抗体温育, 随后用 Western blot 检测系统 ( 美国

Amersham 公司 ) 检测蛋白表达水平。

### 1.2.6 萤光素酶报告基因实验

构建包含 HNF4 $\alpha$  蛋白潜在结合位点的 AR 启动子区域 PGL-4-AR 载体, 通过萤光素酶报告基因试剂盒 [ Renilla ( 货号: ab228546, 英国 Abcam 公司 ) ] 测定萤光素酶活性<sup>[7]</sup>。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。定量资料进行单因素方差分析 ( One-way ANOVA ), 两组间差异采用 *t* 检验法分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 HNF4 $\alpha$ 在前列腺癌组织中表达显著升高

Oncomine 数据分析 4 个独立的基于高通量的测序研究<sup>[8-11]</sup>, 提取 HNF4 $\alpha$  基因 mRNA 表达的数据, 分析发现相较于正常前列腺组织, HNF4 $\alpha$  在前列腺癌临床样本中表达显著升高 (  $P < 0.05$ , 图 1 )。

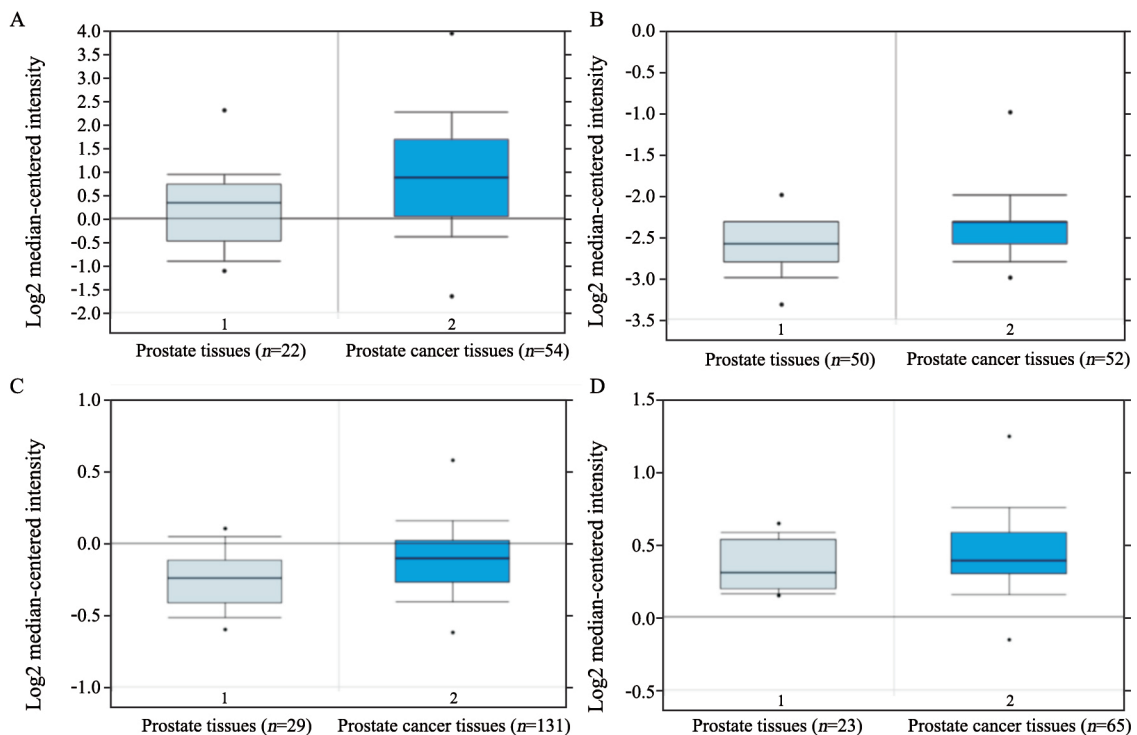


图 1 HNF4 $\alpha$ 在前列腺癌组织中的表达水平分析

Fig. 1 The expression of HNF4 $\alpha$  in prostate cancer tissues

A: Grasso study; B: Singh study; C: Taylor study; D: Yu study.  $P < 0.05$ , compared with prostate tissues

## 2.2 HNF4α在不同前列腺癌类型中的表达及其对总生存率的影响

通过cBioPortal分析了15个独立研究中的4 153份样本,结果显示,在恶性程度更高的CRPC和神经内分泌前列腺癌(neuroendocrine prostate cancer, NEPC)中,HNF4α表达改变比例显著升高(图2A)。另外,HNF4α表达改变组的患者总生存率显著低于未改变组(图2B,  $P=0.0006$ )。

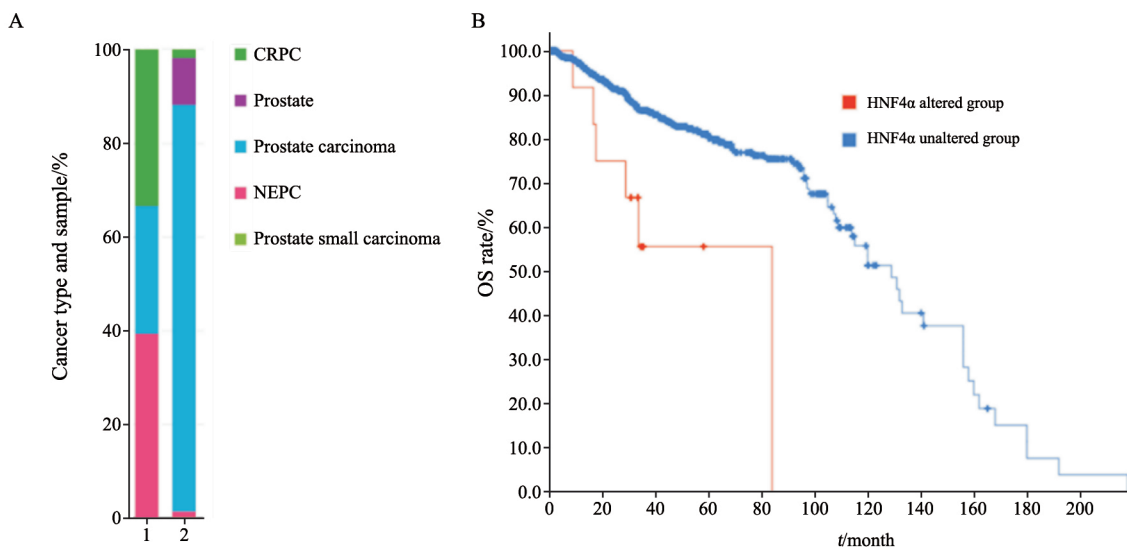


图2 HNF4α在不同前列腺癌类型中的表达及其对总生存率的影响

Fig. 2 The alteration of HNF4α in subtypes of prostate cancer and its effect on OS

A: The alteration of HNF4α in subtypes of prostate cancer; 1: HNF4α altered group; 2: HNF4α unaltered group. B: The OS analysis

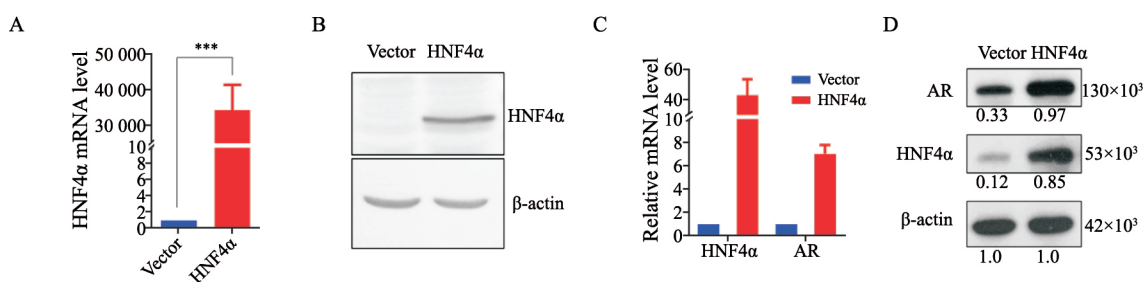


图3 HNF4α的外源表达促进了AR的表达水平

Fig. 3 Ectopic expression of HNF4α promoted the AR expression in LNCaP cells

A, B: Validation of pLenti-HNF4α expression by RTFQ-PCR and Western blot; C, D: AR determination in HNF4α overexpressed LNCaP cells by RTFQ-PCR and Western blot; \*\*\*:  $P<0.001$ , compared with vector

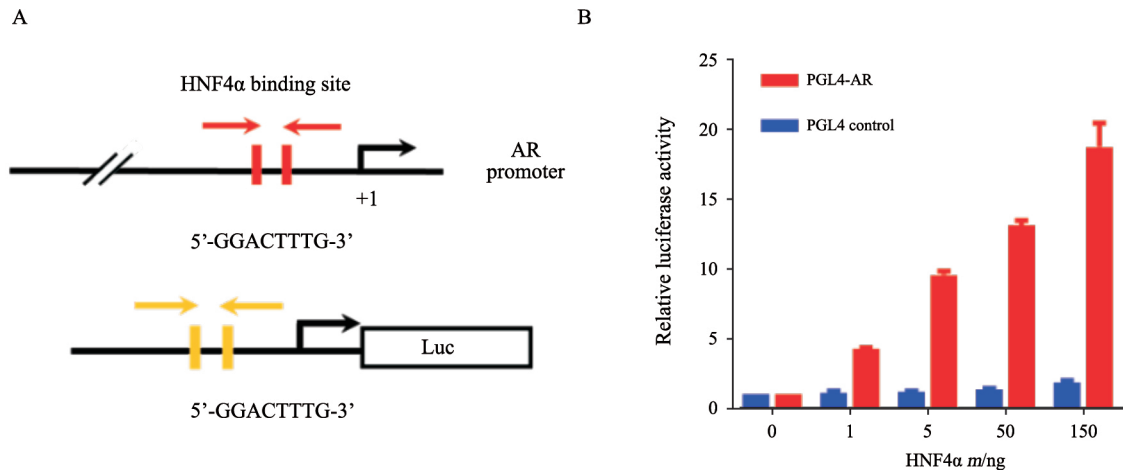
## 2.4 HNF4α可能通过直接靶向AR启动子区域从而介导AR表达上调

通过基因序列分析发现,在AR基因的启动子区域存在潜在的HNF4α蛋白结合位点(5'-GGACTTTG-3',图4A)。通过构建

## 2.3 HNF4α的外源表达促进了前列腺癌LNCaP细胞中AR的表达

通过构建HNF4α外源表达载体,特异性地上调前列腺癌LNCaP细胞中HNF4α的表达水平(图3A、B),分别通过RTFQ-PCR和Western blot检测AR mRNA表达和蛋白水平,结果显示,AR mRNA和蛋白的表达呈显著上调趋势(图3C、D)。

PGL-4萤光素酶报告载体进行分析,发现随着转染HNF4α表达质粒的增加,萤光素酶活性显著升高(图4B),表明HNF4α很可能通过直接靶向AR启动子区域从而介导AR基因表达上调。

图4 HNF4 $\alpha$ 启动子区域的荧光素酶报告基因分析Fig. 4 Luciferase reporter assay of HNF4 $\alpha$  promoter

A: The potential binding site analysis of HNF4 $\alpha$  in AR promoter; B: Luciferase reporter assay

### 3 讨 论

目前研究认为CRPC进展机制可概括为AR依赖型和AR非依赖型两种<sup>[12-13]</sup>。在所有的CRPC进展机制中AR信号通路的异常活化仍然在前列腺癌进展中起主导作用, 阻断雄激素信号转导通路仍是一个重要的治疗手段<sup>[14]</sup>, 但是AR的异常活化机制尚未完全清楚。

本研究结合生物信息学分析阐明了HNF4 $\alpha$ 在前列腺癌临床样本中呈上调表达的特征, 并且在恶性程度更高的CRPC及NEPC样本中, HNF4 $\alpha$ 表达上调的比例显著升高。因此, HNF4 $\alpha$ 可能在前列腺癌细胞中发挥着癌基因的功能, 并与前列腺癌的恶性进展密切相关, 与在肝癌、胃癌及结肠直肠癌中的发现相似。有研究<sup>[15]</sup>表明, HNF4 $\alpha$ 通过直接靶向CYP2B6和GSTK1基因的启动子, 调控活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成相关基因的表达, 从而防止或减少结肠直肠癌细胞中自发性和5-FU化疗诱导的ROS生成。在鼻咽癌中HNF4 $\alpha$ 表达显著上调, 通过靶向基质金属蛋白酶-14(matrix metalloproteinase-14, MMP-14)基因调控从而可以在体内外促进NB细胞的侵袭、转移和血管生成<sup>[16]</sup>。本研究在前列腺癌这一激素依赖型肿瘤LNCaP细胞中, 发现HNF4 $\alpha$ 表达上调可促进AR基因的表达, 并且很可能是通过直接靶向AR基因启动子区中的HNF4 $\alpha$ 结

合位点(5'-GGACTTTG-3')而发挥作用。

鉴于AR及AR信号转导通路在前列腺癌发生、发展及临床治疗过程中的重要作用, 核受体HNF4 $\alpha$ 在AR异常表达及其信号激活过程中的作用机制值得深入研究, HNF4 $\alpha$ 有望成为前列腺癌新的治疗靶点。

### [参 考 文 献]

- [1] WANG G C, ZHAO D, SPRING D J, et al. Genetics and biology of prostate cancer [J]. *Genes Dev*, 2018, 32(17-18): 1105-1140.
- [2] WANG Z, WU D L, NG C F, et al. Nuclear receptor profiling in prostatespheroids and castration-resistant prostate cancer [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25(1): 35-50.
- [3] WALESKY C, APTE U. Role of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) in cell proliferation and cancer [J]. *Gene Expr*, 2015, 16(3): 101-108.
- [4] XU C, OOI W F, QAMRA A, et al. HNF4 $\alpha$  pathway mapping identifies wild-type IDH1 as a targetable metabolic node in gastric cancer [J]. *Gut*, 2020, 69(2): 231-242.
- [5] SUN Q Q, XU W Y, JI S R, et al. Role of hepatocyte nuclear factor 4 alpha in cell proliferation and gemcitabine resistance in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 49.
- [6] WANG Z, ZHANG J W, ZHANG Y, et al. Expression and mutations of BRCA in breast cancer and ovarian cancer: evidence from bioinformatics analyses [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(6): 3542-3550.
- [7] JIA L, WU D L, WANG Y L, et al. Orphan nuclear receptor TLX contributes to androgen insensitivity in castration-resistant prostate cancer via its repression of androgen receptor transcription [J]. *Oncogene*, 2018, 37(25): 3340-3355.
- [8] GRASSO C S, WU Y M, ROBINSON D R, et al. The mutational

- landscape of lethal castration-resistant prostate cancer [J]. Nature, 2012, 487(7406): 239-243.
- [ 9 ] SINGH D, FEBBO P G, ROSS K, et al. Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior [J]. Cancer Cell, 2002, 1(2): 203-209.
- [ 10 ] TAYLOR B S, SCHULTZ N, HIERONYMUS H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer [J]. Cancer Cell, 2010, 18(1): 11-22.
- [ 11 ] YU Y P, LANDSITTEL D, JING L, et al. Gene expression alterations in prostate cancer predicting tumor aggression and preceding development of malignancy [J]. J Clin Oncol, 2004, 22(14): 2790-2799.
- [ 12 ] ZONG Y, GOLDSTEIN A S. Adaptation or selection-mechanisms of castration-resistant prostate cancer [J]. Nat Rev Urol, 2013, 10(2): 90-98.
- [ 13 ] CRONA D, WHANG Y. Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms involved in prostate cancer therapy resistance [J]. Cancers, 2017, 9(12): 67.
- [ 14 ] CHANDRASEKAR T, YANG J C, GAO A C, et al. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC) [J]. Transl Androl Urol, 2015, 4(3): 365-380.
- [ 15 ] DARSIGNY M, BABEU J P, SEIDMAN E G, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha promotes gut neoplasia in mice and protects against the production of reactive oxygen species [J]. Cancer Res, 2010, 70(22): 9423-9433.
- [ 16 ] XIANG X, ZHAO X, QU H X, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha promotes the invasion, metastasis and angiogenesis of neuroblastoma cells via targeting matrix metalloproteinase 14 [J]. Cancer Lett, 2015, 359(2): 187-197.
- (收稿日期: 2020-08-26 修回日期: 2020-12-22)

## 《中国癌症杂志》2021年征订启事

《中国癌症杂志》1991年创刊,是由中华人民共和国教育部主管、复旦大学附属肿瘤医院主办的全国性肿瘤类学术期刊。名誉主编为汤钊猷、曹世龙教授,主编为沈镇宙教授。其宗旨是“服务读者,成就作者”。

《中国癌症杂志》为中文核心期刊(《中文核心期刊要目总览(2017年版)》收录)、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊、“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊,并被国内多家大型数据库收录。国际上,《中国癌症杂志》目前被荷兰Scopus数据库、美国《化学文摘》(CA)、日本科学技术振兴机构数据库(JST)以及WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录。

《中国癌症杂志》主要报道国内外肿瘤学领域前沿的研究内容,包括肿瘤的临床医学、基础医学、流行病学等。开设栏目包括专家述评与论著、论著、综述、论著选登、个案报道、指南与共识等。

《中国癌症杂志》为月刊,大16开,80页铜版纸(随文彩图),每月30日出版,单价15元,全年180元。国际标准连续出版物号(ISSN)1007-3639,国内统一连续出版物号(CN)31-1727/R,邮发代号4-575,读者可在当地邮局订阅。

联系地址:上海市东安路270号复旦大学附属肿瘤医院10号楼415室

邮 编:200032

电 话:021-64188274; 021-64175590-83574

网 址:www.china-oncology.com

电子邮箱:zgazzz@china-oncology.com

《中国癌症杂志》编辑部