

副交感神经M1受体促进前列腺癌转移并抵抗肿瘤细胞凋亡的研究

王千慧 张咪 王红 陈津滢 黄燕萍 徐晨*

(重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016)

摘要 该文旨在探讨副交感神经M1受体(muscarinic acetylcholine M1 receptor, CHRM1)通过调节PI3K/AKT信号通路对前列腺癌增殖、转移以及肿瘤细胞凋亡影响的研究。选用Western blot、免疫荧光等方法检测CHRM1在前列腺癌细胞中表达情况。体外培养人前列腺癌细胞系PC-3、LNCaP、DU145, 然后用CHRM1激动剂卡巴胆碱(CAR)及特异性抑制剂哌仑西平(PIN)处理细胞。用CHRM1 RNAi慢病毒感染细胞, 构建前列腺癌CHRM1敲低的稳转株。选用CCK8细胞增殖实验、平板克隆实验、细胞迁移侵袭实验、流式细胞术检测及透射电镜观察等方法探究CHRM1在前列腺癌中增殖、转移和凋亡水平。最后, 用Western blot方法检测敲低的CHRM1前列腺癌细胞中上皮间质标志物及PI3K/AKT信号表达水平。结果显示, CHRM1大量表达在前列腺癌各细胞系细胞中。CAR处理后细胞增殖能力、克隆形成水平、转移能力及抗凋亡能力提高, 而PIN处理后其增殖能力、克隆形成能力、转移能力及抗凋亡能力降低。敲低CHRM1后, 细胞的转移能力及抗凋亡能力降低, 且电镜下出现凋亡小体。在细胞迁移与侵袭实验中发现其转移能力与肿瘤的上皮-间充质转化(EMT)有关。同时, CHRM1通过PI3K/AKT信号通路调控肿瘤细胞进程。该研究结果提示, CHRM1在前列腺癌细胞中调节PI3K/AKT信号通路促进, 前列腺癌增殖、转移并抵抗肿瘤细胞凋亡。

关键词 CHRM1; 前列腺癌; 转移; 凋亡; 信号通路; EMT

Muscarinic Acetylcholine Receptor M1 Promotes Cell Metastasis and Resists Cell Apoptosis in Prostate Cancer

WANG Qianhui, ZHANG Mi, WANG Hong, CHEN Jinying, HUANG Yanping, XU Chen*

(College of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effects of CHRM1 (muscarinic acetylcholine receptor M1) on the proliferation, metastasis and anti-apoptosis of prostate cancer cells by regulating PI3K/AKT signaling pathway. Western blot, immunofluorescence and the other methods were used to detect the expression of CHRM1 in prostate cancer cells. Human prostate cancer cells PC-3, LNCaP, DU145 were cultured *in vitro*, and the cells were treated by CHRM1 agonist CAR (carbachol) and CHRM1 specific inhibitor PIN (pirenzepine). PC-3 cells were infected with CHRM1 RNAi lentivirus and a stably transfected strain of CHRM1 knockdown was constructed. CCK8 cell proliferation assay, plate cloning assay, cell migration and invasion experiments, flow cytometry detection and observation under transmission electron microscope were used to explore the proliferation, metastasis and apopto-

收稿日期: 2020-01-01 接受日期: 2020-03-19

*通讯作者。Tel: 023-68485046, E-mail: xuchen@cqmu.edu.cn

Received: January 1, 2020 Accepted: March 19, 2020

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485046, E-mail: xuchen@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5238>

sis levels of CHRM1 in prostate cancer. Western blot was used to detect the expression of epithelial-mesenchymal markers and PI3K/AKT signals in prostate cancer cells knocking down *CHRM1*. The results showed that CHRM1 expressed abundantly in prostate cancer cells. In our assays, the group treated with CAR promoted the proliferation, colony formation, migration, invasion and anti-apoptosis abilities of prostate cancer, while the group PIN inhibited the proliferation, colony formation, migration, invasion and anti-apoptosis abilities. What's more, *CHRM1* knockdown also inhibited the migration, invasion and anti-apoptosis abilities, and apoptotic bodies appeared under electron microscope. The ability of metastasis was related to EMT (epithelial mesenchymal transformation) in the experiment of cell migration and invasion. Moreover, CHRM1 regulates tumor cell progression through PI3K/AKT signaling pathway. The results of this study suggested that CHRM1 could regulate PI3K/AKT signaling pathway to promote proliferation, metastasis and resist apoptosis in prostate cancer cells.

Keywords CHRM1; prostate cancer; metastasis; apoptosis; signaling pathway; EMT

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是常见的男性恶性肿瘤,在西方国家的男性肿瘤死亡因素中居于第二位^[1],且其发病率在我国男性人群中呈逐年攀高趋势。去雄激素治疗成为晚期前列腺癌的一线疗法。然而,在经历过10~24个月的治疗后,绝大多数患者均会由雄激素依赖型向非雄激素依赖型转变^[2],即雄激素抵抗型前列腺癌(androgen-resistant prostate cancer, CRPC),导致对传统的去势治疗反应效果不佳。因此寻求新的晚期前列腺癌治疗的方法变得迫在眉睫。

副交感神经M受体是G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)定位在副交感神经突触后膜,由七个跨膜结构域组成^[3]。目前发现其有M1~M5五种亚型^[4]。五种亚型在正常前列腺以及前列腺肿瘤组织中均有表达,但副交感神经M1受体(muscarinic acetylcholine receptor M1, CHRM1)是主要的受体类型。主要表达在腺上皮细胞中^[5-6]。M受体调节许多基本生理功能,如心率减慢、血管扩张和腺体分泌。近些年来,越来越多人关注到神经调节在肿瘤微环境的参与和调节肿瘤进程中的重要作用。有大量文献报道支持神经内分泌系统与肿瘤微环境存在大量的联系^[7-9]。副交感神经M受体也参与多种肿瘤如前列腺癌、肺癌、乳腺癌的发生与演进。在大量人前列腺增生及前列腺癌病例中发现,CHRM1表达增加^[10]。有研究发现,副交感神经通过M受体能够促进前列腺癌的增殖、侵袭和转移^[11-13],但具体机制不明确。其相应受体的去神经支配、药物抑制或遗传突变能显著阻断肿瘤的扩散,使动物体的存活率提高。然而,在前列腺癌发展进程中,CHRM1的功能及潜在调控机制尚未具

体探讨,特别是在晚期前列腺癌的转移与抗凋亡中的作用仍有待阐明。

本文主要探究在晚期前列腺癌中,CHRM1参与调控PI3K/AKT信号通路影响肿瘤发展进程,从而为临床治疗CRPC提供新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM/F12培养基购于美国Gibco公司;胎牛血清购于Biological Industries公司;青霉素/链霉素、RIPA裂解液购于Beyotime公司;卡巴胆碱(carbachol, CAR)、哌仑西平(pirenzepine, PIN)购于MCE公司;CCK8购于APEBIO公司;Transwell小室、基质胶购自美国Corning公司;PMSF购于Solarbio公司;CHRM1、PI3K、AKT及相应磷酸化抗体购于CST公司;GAPDH抗体及二抗购于Bioss公司;RNA提取试剂盒购于杭州博日生物科技有限公司;qRT-PCR引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成;敲低CHRM1病毒液及相应对照由上海吉凯基因化学技术公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用DMEM/F12培养基、10%胎牛血清、1%抗生素混合物配制的培养基,细胞培养条件为37 °C、5% CO₂、100%湿度。

1.2.2 慢病毒构建稳转株 取生长良好的细胞接种于24孔板,待其贴壁密度达40%~50%,加入DMEM/F12培养液,后缓缓滴加用培养液稀释好的慢病毒(MOI=100),同时加入感染增强液。12 h后,更换新鲜完全培养基并继续培养72 h,在此期间镜下观察细胞生长及荧光转染情况。然后用嘌呤霉素

定时进行筛选。靶基因干扰序列(5'→3')sh-NC: TTC TCC GAA CGT GTC ACG T; sh-CHRM1: GCA CTC TGC AAC AAA GCC TTC。

1.2.3 CCK8细胞增殖实验 将处于对数生长期的细胞均匀接种于96孔板, 待其贴壁后进行不同处理, 一定时间培养后, 去除培养基, 加入100 μ L DMEM/F12培养液, 加入10 μ L CCK8, 避免气泡产生。放入培养箱培养1.5 h, 然后用酶标仪检测各孔吸光度(D)值, 再进行统计分析。

1.2.4 平板克隆形成实验 将对数生长期细胞消化后制成单细胞悬液并计数, 将其接种于6孔板(500个/孔), 待其贴壁后进行不同处理, 培养10天后用PBS轻轻清洗, 加入4%多聚甲醛固定15 min, 后用结晶紫染液染色15 min。去除染液后经PBS清洗, 室温干燥, 光学显微镜下拍照计数并统计。

1.2.5 细胞迁移和侵袭实验 迁移实验将细胞制成悬液计数, 5万个细胞(100 μ L体系, DMEM/F12培养基重悬)均匀加入到Transwell上室中, 下室加入含20%浓度血清的培养基, 避免产生气泡。在上室加入处理条件, 培养一段时间后, 先用4%多聚甲醛固定20 min, 再用结晶紫染液染20 min。PBS中清洗后, 用棉签轻轻擦去上室里的细胞, 翻扣小室, 室温静置待干, 后在显微镜下拍照, 计数并分析。侵袭实验须先在小室铺一层1:5稀释好的基质胶放培养箱中2 h后待其凝固再进行操作, 上室接种10万个细胞(100 μ L体系、5%浓度血清), 下室加入含20%浓度血清的培养基, 其他步骤同迁移实验。

1.2.6 RNA提取、逆转录、qRT-PCR 将处理过的细胞按照RNA提取试剂盒说明进行, 依次加入裂解液R1、裂解液R2, 静置后上清中加入纯化柱, 12 000 r/min

离心30 s, 加洗涤液, 12 000 r/min离心30 s, 加入洗脱液, 将柱子套在无酶EP管上, 12 000 r/min离心30 s, 得到所需的RNA, 进行RNA测定。按照1 μ g总RNA质量及20 μ L体系进行逆转录。得到的cDNA先用DEPC水稀释到一定浓度再进行接下来的荧光定量PCR。结果用Bio-Rad CFX Manager软件进行分析, 引物序列见表1。

1.2.7 蛋白提取及Western blot 细胞接种于培养皿, 待细胞贴壁加入各种处理条件后培养数小时, 用RIPA裂解液+1% PMSF混合均匀后加入用PBS洗好的细胞中, 充分裂解离心取上清后加入5 \times 上样缓冲液100 $^{\circ}$ C加热10 min后制成蛋白样本。加入配好的Western blot胶孔, 经过电泳、转膜、封闭(5%脱脂牛奶)后敷于各抗体中, 4 $^{\circ}$ C过夜, 再经过洗膜(TBST)、敷二抗1.5 h、洗膜、曝光等步骤最后得到显影条带并作分析。

1.2.8 免疫荧光实验 将细胞均匀接种于铺有爬片的24孔板中, 待其贴壁后进行不同处理后培养一定时间, PBS轻缓清洗, 用4%多聚甲醛固定20 min, PBS清洗, 置于摇床慢摇。若为核抗原, 加用0.5% Triton X-100室温通透15 min, PBS清洗。5% BSA室温封闭1 h, 加入一抗4 $^{\circ}$ C过夜, 第2天PBS清洗后加入荧光二抗, 避光轻摇1 h, 再用PBS避光清洗, 若需染核, 可加入DAPI染液3 min, PBS清洗后, 捞片封片。最后在荧光显微镜下避光观察。

1.2.9 流式细胞术检测细胞凋亡 收集处理好的细胞培养基离心(1 000 r/min 3 min), 去除上清, 并向培养皿及沉淀中加胰酶消化, 一起收集在离心管中离心(1 000 r/min 3 min)。PBS洗涤2次后收集在流式管中, 每管加入400 μ L结合缓冲液(binding buffer)重悬细胞。

表1 qRT-PCR基因引物序列

Table 1 Primer sequences used for qRT-PCR

基因名称 Genes	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	退火温度/ $^{\circ}$ C $T_m / ^{\circ}$ C
CHRM1	Forward: CCG CTA CTT CTC CGT GAC TC	59.0
	Reverse: AAC TGG ATG TAG CAC TGC CC	
GAPDH	Forward: GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT	59.0
	Reverse: GCC TTC TCC ATG GTG GTG AA	
E-cadherd	Forward: GAA CAC ATT TGC CCA ATT CCA	57.3
	Reverse: CCT ACC CCT CAA CTA ACC C	
N-cadherd	Forward: GAG TTT ACT GCC ATG ACG TT	55.6
	Reverse: GGT TGA TCC TTA TCG GTC ACA	
Vimentin	Forward: ATT GAG ATT GCC ACC TAC AGG A	57.4
	Reverse: CCA TCT CTA GTT TCA ACC GTC T	

加入5 μ L Annexin V-FITC混匀, 避光室温孵育15 min, 加入5 μ L PI混匀, 避光室温孵育5 min。最后上机检测。

1.2.10 电镜样本处理 待细胞贴壁后用0.1%胰酶消化转入离心管中, 800 r/min离心5 min, 弃上清, 保留1.5 mL液体吹散后装入EP管中, 1 200 r/min离心10 min。吸净上清液后, 延管壁缓缓加入电镜专用固定液, 切勿破坏细胞团块。4 $^{\circ}$ C保存, 尽快送到重庆医科大学电镜室制片, 并在镜下观察。

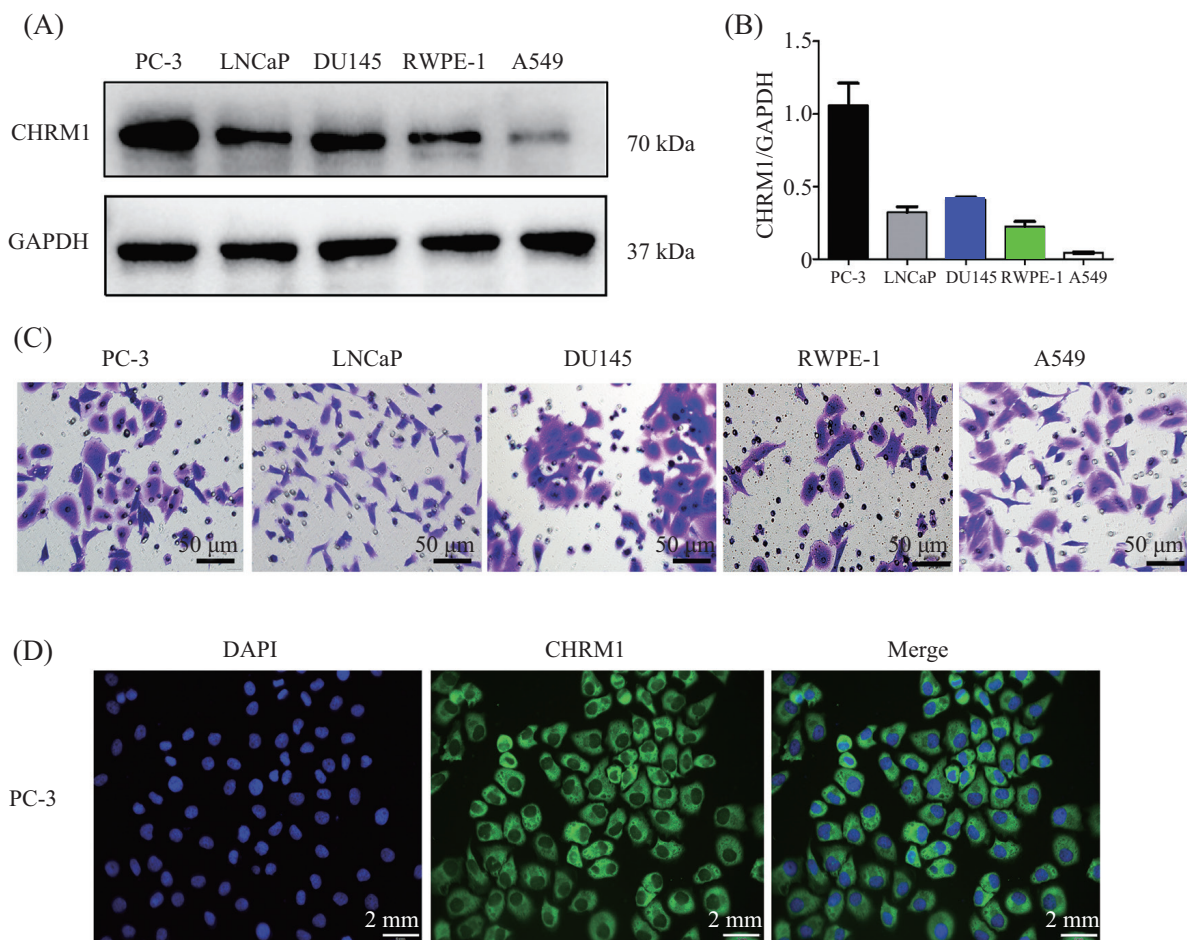
1.2.11 数据统计 实验结果表示为均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)。实验数据使用GraphPad Prism 6.01软件进行统计学分析。采用非配对*t*检验分析两组数据间差

异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CHRM1在前列腺癌各细胞系中的表达情况

为了探究CHRM1是否在人前列腺癌中促进增殖和肿瘤形成, 我们首先比较了CHRM1在人前列腺癌细胞系细胞PC-3、LNCaP、DU145、正常的前列腺上皮细胞RWPE-1、非小细胞肺癌细胞系A549中蛋白表达情况, 发现CHRM1在前列腺癌细胞中表达高于正常前列腺上皮细胞, 而在PC-3中表达最高(图1A和图1B)。用结晶紫染色可清楚观察各种细

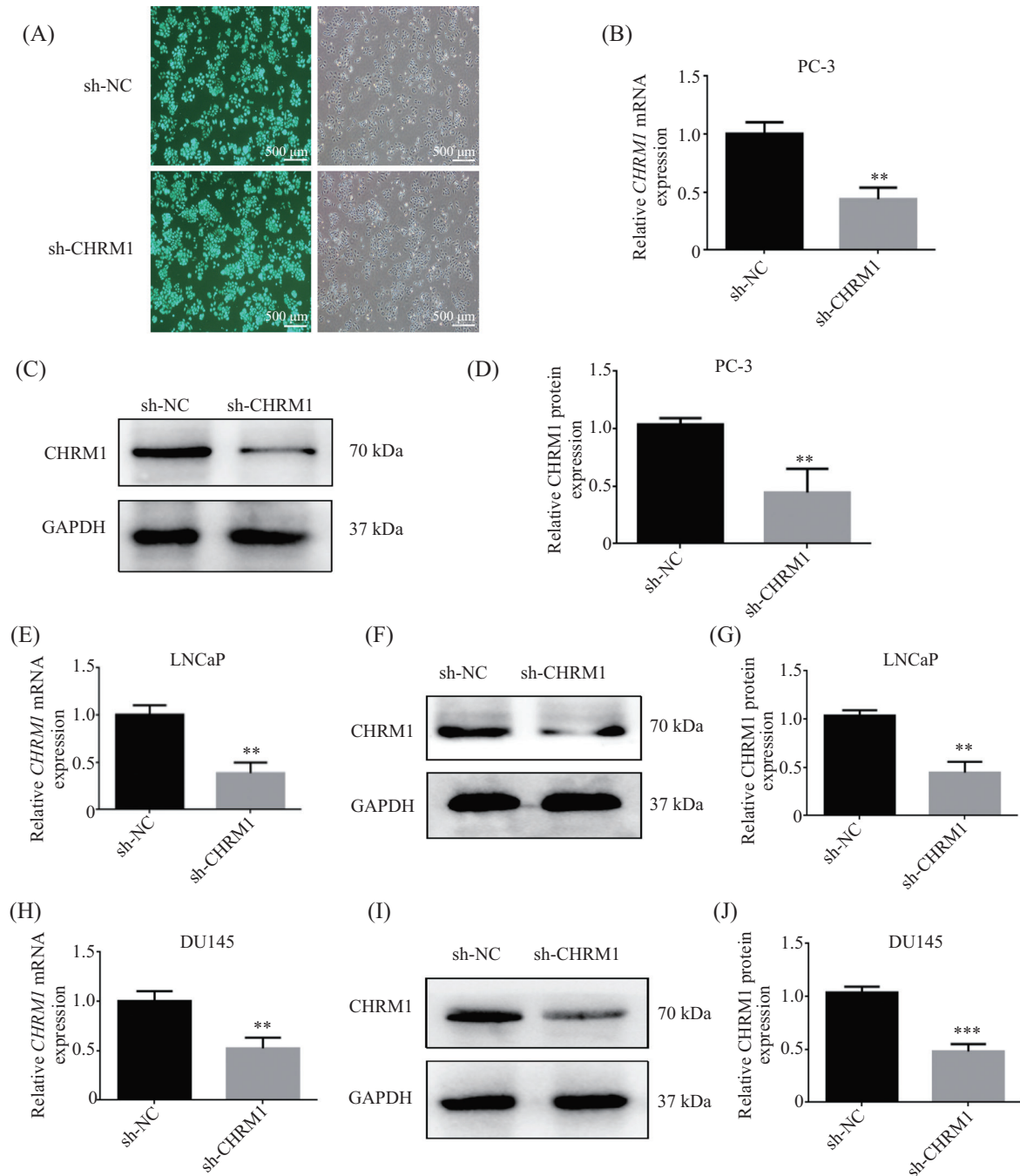


A: Western blot检测前列腺癌各细胞系PC-3、LNCaP和DU145, 正常人前列腺上皮细胞系RWPE-1以及非小细胞肺癌细胞系A549中CHRM1表达情况; B: 数据统计来源于图1A中Western blot结果; C: 用结晶紫染液染前列腺癌各细胞系PC-3、LNCaP和DU145, 正常人前列腺上皮细胞系RWPE-1以及非小细胞肺癌细胞系A549中细胞形态图; D: 免疫荧光法检测前列腺癌细胞PC-3中CHRM1及核表达情况; 蓝色荧光: DAPI; 绿色荧光: CHRM1。

A: Western blot was performed to determine CHRM1 expression in the human PCa cell lines PC-3, LNCaP, and DU145, the normal human prostate epithelial cell line RWPE-1 and the non-small-cell lung cancer cell line A549; B: statistical analysis derived from Fig.1A; C: cell crystal violet staining of the human PCa cell lines PC-3, LNCaP, and DU145 and the non-small-cell lung cancer cell line A549; D: immunofluorescence detection of CHRM1 in PC-3 cells, in which blue fluorescence is DAPI and green fluorescence is CHRM1.

图1 CHRM1在前列腺癌各细胞系中的表达情况

Fig.1 CHRM1 expression in PCa cells



A: *CHRM1* RNAi及空载慢病毒感染细胞72 h筛选后感染效率荧光图及光镜图; B、E、H: qRT-PCR检测*CHRM1*敲低效率; C、F、I: Western blot检测*CHRM1*蛋白; D、G、J: Western blot检测*CHRM1*蛋白半定量分析结果。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与sh-NC比较。

A: images of the transfection efficiency infected with *CHRM1* knockdown lentivirus after 72 h; B,E,H: qRT-PCR was performed to detect the efficiency of *CHRM1* knockout; C,F,I: *CHRM1* protein detected by Western blot; D,G,J: semi-quantitative analysis of *CHRM1* protein. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sh-NC.

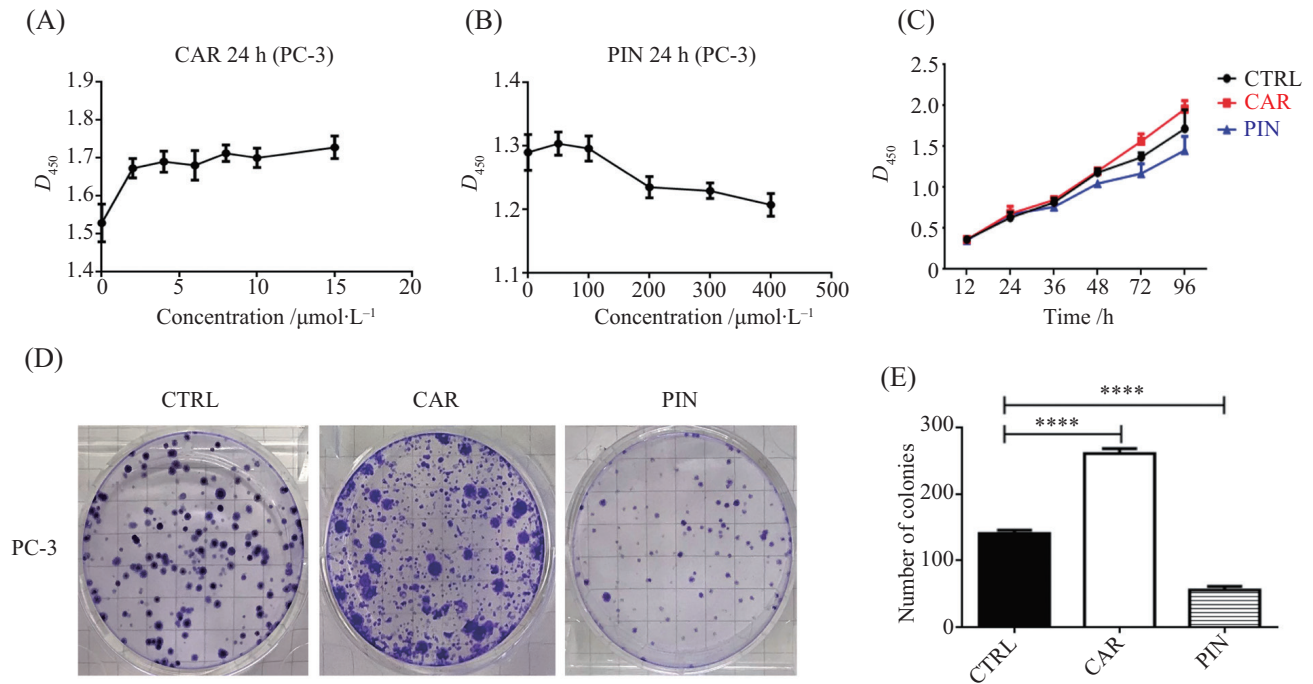
图2 构建*CHRM1*稳定敲低的细胞系模型

Fig.2 Construction of a cell line model for stable knockdown of *CHRM1*

胞的形态(图1C)。用免疫荧光的方法检测细胞核及*CHRM1*表达及定位情况,*CHRM1*大量表达在胞膜及胞质中(图1D)。以上结果提示,*CHRM1*在前列腺癌各细胞系中大量表达。

2.2 构建*CHRM1*稳定敲低的细胞系模型

我们通过用*CHRM1* RNAi慢病毒感染前列腺癌PC-3、LNCaP、DU145细胞,构建了*CHRM1*敲低的稳转株。转染情况如图2A分别是在荧光显微镜及



A: CCK8细胞增殖实验检测在0~15 $\mu\text{mol/L}$ CAR作用下PC-3细胞增殖能力; B: CCK8细胞增殖实验检测在0~400 $\mu\text{mol/L}$ PIN作用下PC-3细胞增殖能力; C: CCK8细胞增殖实验检测在对照组(CTRL, DMSO)、激动剂组(CAR, 2 $\mu\text{mol/L}$)、抑制剂组(PIN, 200 $\mu\text{mol/L}$)作用下PC-3细胞随时间变化增殖能力变化情况, 每组5个独立样本; D: 细胞克隆形成实验图; E: 图3D的统计图。**** $P<0.0001$ 。

A: CCK8 cell proliferation test to detect PC-3 cell proliferation ability under 0-15 $\mu\text{mol/L}$ CAR; B: CCK8 cell proliferation test to detect PC-3 cell proliferation ability under 0-400 $\mu\text{mol/L}$ PIN; C: proliferation treated by DMSO (CTRL), CAR (2 $\mu\text{mol/L}$), PIN (200 $\mu\text{mol/L}$) for various durations was evaluated with CCK8 cell proliferation test; five independent biological samples for each condition were analysed; D: experimental chart of cell colony formation; E: statistical analysis derived from Fig.3D. **** $P<0.0001$.

图3 CHRMI对前列腺癌增殖及克隆形成的影响

Fig. 3 Effects of CHRMI on the proliferation and colony formation of PCa

白光显微镜下的对比图, 得到很高的稳定转染效率。qRT-PCR检测结果显示, 与sh-NC组相比, sh-CHRMI组的 $CHRMI$ mRNA水平显著下降($P<0.01$, 图2B、图2E和图2H)。Western blot检测发现其蛋白水平较sh-NC组也明显下调(图2C和图2D、图2F和图2G以及图2I和图2J)。这说明, 癌细胞 $CHRMI$ 基因已被成功敲低。

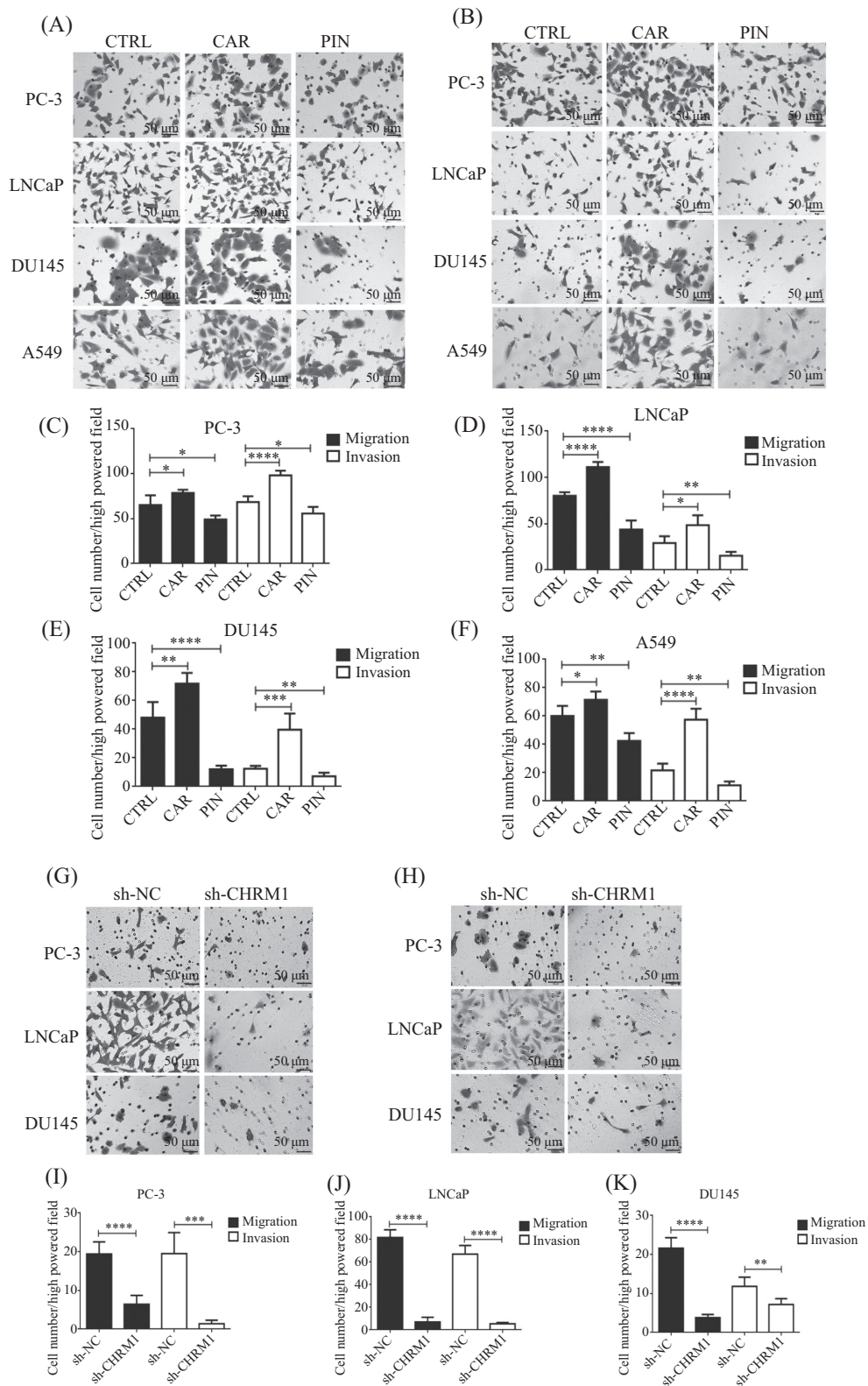
2.3 CHRMI激活促进前列腺癌的增殖及克隆形成能力

为了研究CHRMI在调节肿瘤细胞进展过程中的作用, 我们选取了CHRMI特异性拮抗剂PIN和CHRMI非选择性激动剂CAR进行接下来实验。在PC-3细胞中我们通过CCK8细胞增殖实验发现, 小剂量的CAR可以促进细胞增殖(图3A), 而大剂量的PIN可以抑制细胞增殖(图3B), 且具有剂量依赖性和时间依赖性。最后, 选择2 $\mu\text{mol/L}$ CAR和200 $\mu\text{mol/L}$ PIN作用24 h进行接下来实验(图3C)。同样设置对照组、

激动剂组、抑制剂组进行克隆形成实验, 发现激动剂组PC-3细胞克隆形成能力明显增强, 而抑制剂对其克隆形成能力在很大程度上有抑制作用(图3D和图3E)。以上提示, CHRMI激活促进前列腺癌的增殖及克隆形成能力。

2.4 CHRMI激活促进前列腺癌的迁移和侵袭能力

为了研究CHRMI是否影响前列腺癌细胞的迁移与侵袭能力, 接下来我们进行了Transwell细胞迁移与侵袭实验。实验设置对照组(CTRL)、激动剂组(CAR)、抑制剂组(PIN), 结果发现, 当加入CAR时, 人前列腺癌细胞系PC-3、LNCaP、DU145及非小细胞肺癌细胞A549的迁移与侵袭能力相比对照组有了不同程度的升高, 而PIN的加入却抑制了其迁移侵袭能力(图4A~图4F)。接下来, 用前列腺癌 $CHRMI$ 敲低稳转株进行实验, 结果发现敲低 $CHRMI$ 后, 前列腺癌PC-3、LNCaP、DU145细胞无论迁移能力或

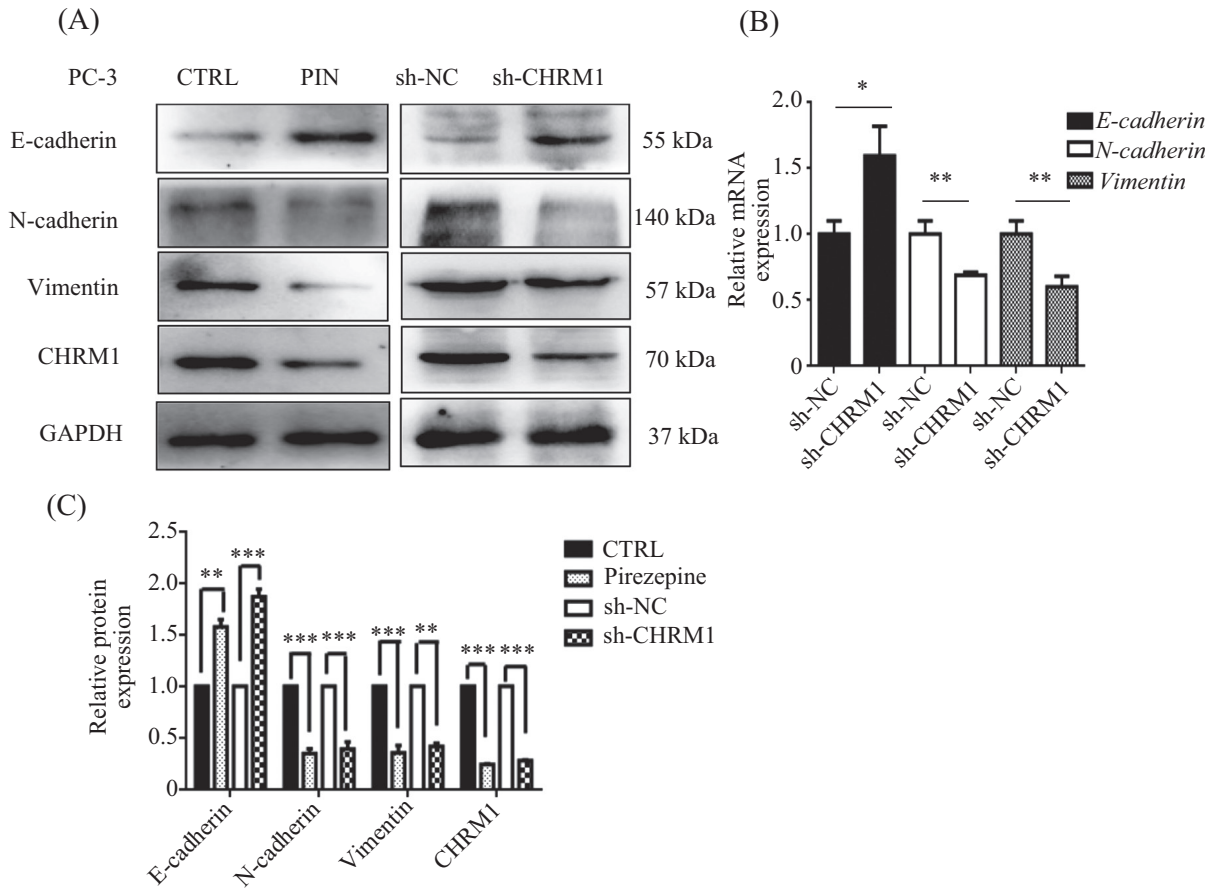


A: 细胞迁移实验; B: 细胞侵袭实验; C-F: 统计数据来源于图4A和图4B; G: 对照组(sh-NC)和敲低组(sh-CHRM1)细胞迁移实验; H: 对照组(sh-NC)和敲低组(sh-CHRM1)细胞侵袭实验; I-K: 统计数据来源于图4G和图4H。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

A: images of cell migration experiment; B: images of cell invasion assay; C-F: the statistical data derived from experiment Fig.4A and Fig.4B; G: images of cell migration experiment in sh-NC and sh-CHRM1; H: images of cell invasion assay in sh-NC and sh-CHRM1; I-K: the statistical data derived from experiment Fig.4G and Fig.4H. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ 。

图4 CHR1对前列腺癌迁移和侵袭的影响

Fig.4 Effects of CHR1 on the migration and invasion of PCa



A、B: Western blot和qRT-PCR检测上皮间质标志物蛋白结果和mRNA水平; C: 蛋白半定量分析统计图, 来源于图5A。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A,B: Western blot and qRT-PCR were performed to detect the protein and mRNA expression of epithelial and interstitial markers; C: semi-quantitative analysis of protein expression obtained from Western blot results in Fig.5A. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图5 CHRMI对前列腺癌细胞上皮-间充质转化的影响

Fig.5 Effects of CHRMI on epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells

侵袭能力都大幅降低(图4G~图4K)。以上结果提示, CHRMI激活可能促进了前列腺癌的迁移与侵袭能力。

2.5 CHRMI促进前列腺癌细胞上皮-间充质转化

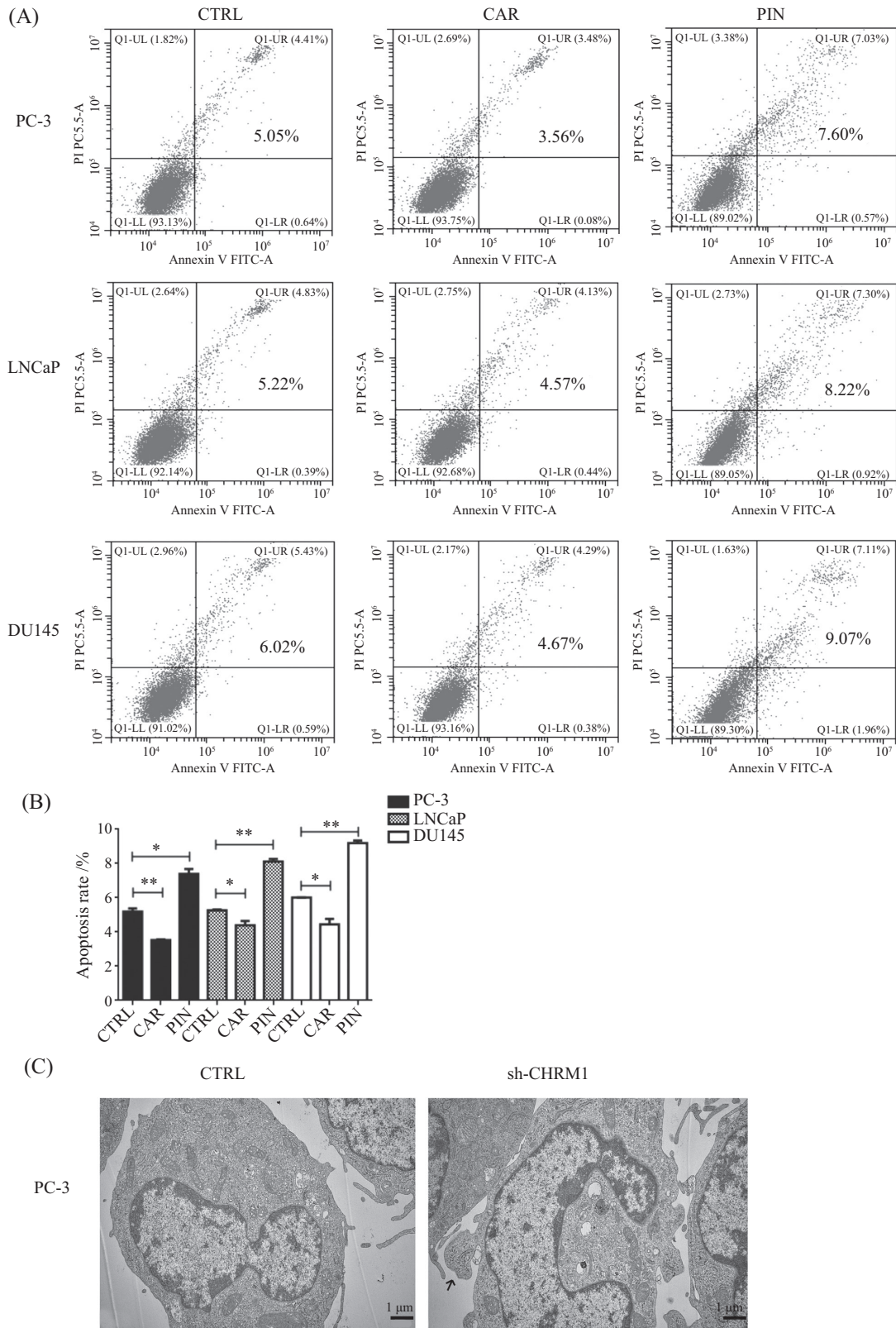
接下来探讨CHRMI引起细胞侵袭和迁移发生变化的机制, 在转录和翻译水平分别检测了CHRMI是否可以引起上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)相关表型转换。利用qRT-PCR及Western blot方法检测了上皮标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)及间质标志物N-cadherin和波形蛋白vimentin的表达情况, 发现加入抑制剂PIN或敲低CHRMI后, E-cadherin增多, 而N-cadherin和波形蛋白减少, 明显抑制上皮间质转换进程(图5)。这说明CHRMI能够促进EMT进程。

2.6 CHRMI激活促进前列腺癌细胞的抗凋亡能力

流式细胞仪检测分析, 设置对照组(CTRL)、激动剂组(CAR)和抑制剂组(PIN), 发现加入激动剂CAR后凋亡细胞明显减少, 而加入抑制剂PIN后凋亡细胞增多(图6A)。透射电镜凋亡检测结果中发现下调CHRMI后, 视野下出现大量凋亡小体(图6B), 提示CHRMI激活对于PC-3细胞抗凋亡能力有着重要作用。

2.7 CHRMI通过介导PI3K/AKT信号通路调控肿瘤进展

选择CHRMI敲低稳转株及敲低基础上加入激动剂CAR与对照组进行Western blot实验, 发现下调CHRMI后, p-PI3K、p-AKT473蛋白表达降低, 再加入CAR后, 有一定回复, 但总蛋白无明显变化。这提

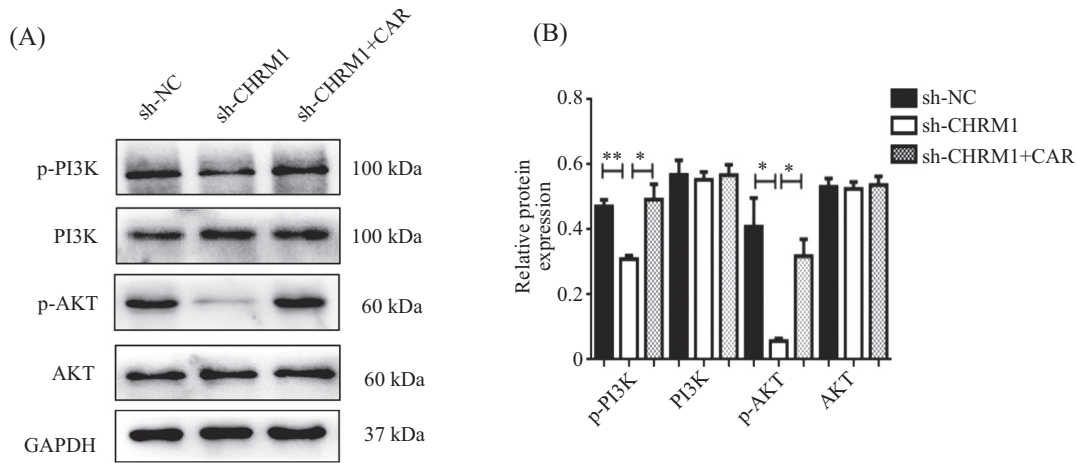


A: 流式细胞术检测PC-3、LNCaP、DU145细胞的凋亡率; B: 流式细胞术检测结果统计; C: 透射电镜凋亡检测; 黑色箭头: 凋亡小体。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: flow cytometry was used to detect the apoptosis rates in PC-3, LNCaP and DU145 cells; B: results of flow cytometry; C: apoptosis was detected by transmission electron microscopy. Black arrows: apoptosis body. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图6 CHRM1对前列腺癌抗凋亡的影响

Fig.6 Effects of CHRM1 on the anti-apoptosis of PCa



A: Western blot检测结果条带图, 分为对照组(sh-NC)、敲低组(sh-CHRM1)、敲低加激动剂组(sh-CHRM1+CAR)组; B: Western blot检测蛋白半定量分析结果。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

A: Western blot results (sh-NC, sh-CHRM1, sh-CHRM1+CAR); B: results of semi-quantitative analysis of proteins detected by Western blot. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

图7 CHRM1对前列腺癌PI3K/AKT信号激活的影响

Fig.7 Effects of CHRM1 on the activation of PI3K/AKT signaling in PCa

示, CHRM1参与并介导了PI3K/AKT信号通路调控肿瘤细胞进程(图7)。

3 讨论

慢性应激在肿瘤的生长和进展中扮演了很重要的角色, 而过度的神经调节可引起应激反应, 在肿瘤微环境中发挥了重要作用, 大量文献报道支持神经内分泌系统与肿瘤微环境存在大量的联系^[7-9]。因此非常有必要在肿瘤进展过程中采取一定措施减少应激对其影响。近来有证据表明, 自主神经系统的分支(交感神经系统和副交感神经系统)在前列腺癌的发生和发展中起互补作用^[11]。而CHRM1作为发挥重要作用的副交感神经受体之一, 是如何在前列腺癌中被激活后调控肿瘤细胞进展的, 其机制还不明确。故在本研究中, 主要将目光聚焦到国内外鲜有人研究的副交感神经M1受体上, 将前列腺癌中CHRM1与其信号激活后调控肿瘤细胞进展联系起来, 揭示了CHRM1对前列腺癌进展的重要作用。

交感神经和副交感神经广泛分布于前列腺间质和上皮中, 共同调节前列腺的生长及功能^[14-15]。然而, 有大约75%的前列腺切除术后病理报告发现, 癌细胞沿神经入侵伴有某些上皮恶性肿瘤的特征^[16-17], 并且有人认为这与预后不良有关^[17-18], 这就表明, 神经系统对于肿瘤进展有着重要作用。早期研究表

明, 副交感神经受体促进癌症的生长, 例如结肠直肠癌和肺癌。在结肠直肠癌中, 副交感神经M3受体(CHRM3)的促增殖作用已被证明依赖于表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)和EGFR后信号转导的反式激活^[19-20]。在PC-3细胞荷瘤小鼠中, CHRM1的激动剂CAT治疗增强了肿瘤细胞侵袭淋巴结, 而其抑制剂PIN抑制淋巴结点入侵^[11]。在本文中, 我们发现在人PC-3、LNCaP和DU145前列腺癌细胞中CHRM1表达显著增加, 其中, 从各细胞系细胞表达发现, PC-3与LNCaP的表达含量与之前报道^[10]有些许差异, 分析可能受到实验条件如实验次数或Western blot过程中各条件设置、灰度值测量、结果统计等因素及两细胞系细胞特征影响。而鉴于PC-3和LNCaP是否对于雄激素依赖的特征, 导致CHRM1在其两个细胞系中表达差异是否与雄激素有关的猜测需要接下来实验的验证。对比正常前列腺上皮细胞及A549细胞, CHRM1在前列腺癌各细胞系中表达丰度均较高, 提示CHRM1或许在前列腺癌进展中有着潜在作用。通过CHRM1敲低的方式, 并与CHRM1激动剂和抑制剂的效果进行比较, 研究证实, CHRM1在前列腺癌细胞系细胞迁移侵袭能力和抗凋亡能力中起正向调控作用。然而, 有报道指出, CHRM1 mRNA表达与前列腺大小有关, 但与年龄、前列腺特异性抗原水平(prostate specific antigen, PSA)和病理

诊断(前列腺增生和前列腺癌)无关^[6], 具体原因有待接下来实验探究。

肿瘤生长、迁移侵袭及凋亡受着多因素的调控, 例如肿瘤细胞增殖与凋亡的平衡、肿瘤血管生成、肿瘤微环境调控、肿瘤细胞异质性、EMT等。其中EMT被认为是存在人类上皮细胞肿瘤转移的重要机制, 主要表现为上皮细胞失去与基底膜的连接, 细胞极性消失, 并获得侵袭性的间质细胞表型, 其重要特征为E-cadherin表达减少, 细胞角蛋白(cytokeratin)为主的细胞骨架转化成vimentin为主的细胞骨架及形态上具有间质细胞的特征等^[21-22]。在本次实验中, 我们通过抑制剂的加入及慢病毒感染敲低方式下调CHRM1表达后, E-cadherin表达增加, 而N-cadherin及波形蛋白表达减少, 代表典型的抑制EMT, 提示CHRM1调控前列腺癌细胞生长增殖及侵袭转移可能与细胞发生EMT有关。

前列腺癌细胞中存在多条与PCa发展相关的信号转导通路, 如PI3K/AKT信号通路、Hedgehog信号通路、Wnt信号通路、Notch信号通路、MAPK信号通路、AR信号通路等。研究发现, PI3K/AKT信号通路与PCa的发生发展密切相关, 超过42%的原发性PCa和几乎所有的转移性肿瘤均有PI3K/AKT途径的改变^[23]。多项研究中发现, PI3K/AKT通路的过度活化与肿瘤细胞迁移、肿瘤血管形成和细胞外基质降解密切相关^[24-26]。副交感神经受体通过AKT和核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)介导的机制阻断细胞凋亡^[27], 故本实验利用PI3K/AKT通路来探究CHRM1对前列腺癌抗凋亡能力水平影响, 发现CHRM1通过激活PI3K/AKT磷酸化靶点影响肿瘤细胞进程, 但具体机制还需进一步探讨。

目前, 临床上关于晚期前列腺癌的治疗主要集中在放射治疗(radiotherapy, RT)、雄激素去势治疗(androgen deprivation therapy, ADT)、雄激素受体抑制剂治疗、紫杉醇类药物治疗等几个方面。在经历众多治疗后, 前列腺癌仍会发展成为CRPC, 那么治疗将变得非常棘手, 寻求更好的治疗药物及方法变得极其重要。副交感神经受体拮抗剂具有广泛的临床应用空间, 例如用于治疗胃溃疡(gastric ulcer, GU)、慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)和精神分裂症等, 但对于肿瘤的治疗还需要更多的临床试验。CHRM1抑制剂PIN作为临床上相对成熟的老药, 安全性高, 或许可以在治疗晚期前列腺

癌中老药新用, 与放化疗方法联合应用成为潜在的理想治疗选择。

综上, 在前列腺癌的发生发展进程中, CHRM1作为一种潜在的神经调节因素起到重要作用。在临床应用上, 我们期待CHRM1拮抗剂PIN在今后治疗晚期前列腺癌中与其他疗法联合应用发挥其独特的作用。

参考文献 (References)

- [1] ANEJA S, PRATIWADI R R, YU J B. Hypofractionated radiation therapy for prostate cancer: risks and potential benefits in a fiscally conservative health care system [J]. *Oncology (Williston Park, NY)*, 2012, 26(6): 512-8.
- [2] 鲍镇美. 晚期前列腺癌的治疗新动向[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2002, 2: 4-6.
- [3] PERALTA E G, ASHKENAZI A, WINSLOW J W, et al. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors [J]. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3923-9.
- [4] BONNER T, BUCKLEY N, YOUNG A, et al. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes [J]. *Science*, 1987, 237(4814): 527-32.
- [5] RUGGIERI M R, COLTON M D, WANG P, et al. Human prostate muscarinic receptor subtypes [J]. *J Pharmacol Experim Ther*, 1995, 274(2): 976-82.
- [6] WITTE L P, TEITSMA C A, DE LA ROSETTE J J, et al. Muscarinic receptor subtype mRNA expression in the human prostate: association with age, pathological diagnosis, prostate size, or potentially interfering medications [J]? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2014, 387(2): 207-14.
- [7] ANTONI M H, LUTGENDORF S K, COLE S W, et al. The influence of bio-behavioural factors on tumour biology: pathways and mechanisms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(3): 240-8.
- [8] CHANDWANI K D, RYAN J L, PEPPONE L J, et al. Cancer-related stress and complementary and alternative medicine: a review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 979213.
- [9] HERSCHBACH P, KELLER M, KNIGHT L, et al. Psychological problems of cancer patients: a cancer distress screening with a cancer-specific questionnaire [J]. *Br J Cancer*, 2004, 91(3): 504-11.
- [10] YIN Q Q, XU L H, ZHANG M, et al. Muscarinic acetylcholine receptor M1 mediates prostate cancer cell migration and invasion through hedgehog signaling [J]. *Asian J Androl*, 2018, 20(6): 608-14.
- [11] MAGNON C, HALL S J, LIN J, et al. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression [J]. *Science*, 2013, 341(6142): 1236361.
- [12] ZHAO C M, HAYAKAWA Y, KODAMA Y, et al. Denervation suppresses gastric tumorigenesis [J]. *Science Translat Med*, 2014, 6(250): 250ra115.
- [13] SALOMAN J L, ALBERS K M, RHIM A D, et al. Can stopping nerves, stop cancer [J]? *Trends Neurosci*, 2016, 39(12): 880-9.
- [14] LENZ H J, KAHN M. Safely targeting cancer stem cells via selec-

- tive catenin coactivator antagonism [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(9): 1087-92.
- [15] KOPAN R, ILAGAN M X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. *Cell*, 2009, 137(2): 216-33.
- [16] MAGNON C. Role of the autonomic nervous system in tumorigenesis and metastasis [J]. *Mol Cell Oncol*, 2015, 2(2): e975643.
- [17] LIEBIG C, AYALA G, WILKS J A, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature [J]. *Cancer*, 2009, 115(15): 3379-91.
- [18] MARU N, OHORI M, KATTAN M W, et al. Prognostic significance of the diameter of perineural invasion in radical prostatectomy specimens [J]. *Hum Pathol*, 2001, 32(8): 828-33.
- [19] FRUCHT H, JENSEN R T, DEXTER D, et al. Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(9): 2532-9.
- [20] CHENG K, ZIMNIAK P, RAUFMAN J P. Transactivation of the epidermal growth factor receptor mediates cholinergic agonist-induced proliferation of H508 human colon cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(20): 6744-50.
- [21] LE GALLO M, RUDD M L, URICK M E, et al. Somatic mutation profiles of clear cell endometrial tumors revealed by whole exome and targeted gene sequencing [J]. *Cancer*, 2017, 123(17): 3261-8.
- [22] JANOUSKOVA H, EL TEKLE G, BELLINI E, et al. Opposing effects of cancer-type-specific SPOP mutants on BET protein degradation and sensitivity to BET inhibitors [J]. *Nat Med*, 2017, 23(9): 1046-54.
- [23] CHANG L, GRAHAM P H, NI J, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance [J]. *Critical Rev Oncol/hematol*, 2015, 96(3): 507-17.
- [24] LUO Y, WU J Y, LU M H, et al. Carvacrol alleviates prostate cancer cell proliferation, migration, and invasion through regulation of PI3K/Akt and MAPK signaling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 1469693.
- [25] HUANG G X, WANG Y, SU J, et al. Up-regulation of Rho-associated kinase 1/2 by glucocorticoids promotes migration, invasion and metastasis of melanoma [J]. *Cancer Lett*, 2017, 410: 1-11.
- [26] LI X, TENG S, ZHANG Y, et al. TROP2 promotes proliferation, migration and metastasis of gallbladder cancer cells by regulating PI3K/AKT pathway and inducing EMT [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 47052-63.
- [27] SHANT J, CHENG K, MARASA B S, et al. Akt-dependent NF-kappaB activation is required for bile acids to rescue colon cancer cells from stress-induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2009, 315(3): 432-50.