

shPLC ϵ 通过PPAR β /twist1抑制前列腺癌细胞的迁移和EMT过程

范佳鑫¹ 李 罗¹ 牛凌芳¹ 范砚茹¹ 高英英¹ 吴小侯² 罗春丽^{1*}

¹重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

²重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

摘要 该研究旨在探讨磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C epsilon(phospholipase C epsilon, PLC ϵ)对前列腺癌细胞上皮-间充质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及迁移能力的影响。用LV-shPLC ϵ 感染前列腺癌细胞, q-PCR和Western blot检测PLC ϵ 、过氧化物酶体增殖物激活受体 β (peroxisome proliferator activated receptor β , PPAR β)、twist1和EMT相关分子mRNA和蛋白质水平, 划痕实验和Transwell实验检测细胞迁移能力。结果表明, 感染LV-shPLC ϵ 可显著下调PLC ϵ 、PPAR β 和twist1的mRNA和蛋白质水平, 同时降低前列腺癌细胞株PC3和DU145的迁移能力以及EMT过程。而在shPLC ϵ 组细胞中加入PPAR β 的激动剂能一定程度逆转PPAR β 和twist1的下调, 促进细胞的迁移能力和EMT过程; 而PPAR β 的抑制剂产生相反作用。该研究说明, PLC ϵ 可通过PPAR β /twist1影响前列腺癌细胞的迁移能力和EMT过程。

关键词 前列腺癌; 磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C epsilon; twist1; EMT

shPLC ϵ Can Inhibit Cell Migration and EMT of Prostate Cancer Cell via PPAR β /twist1

Fan Jiaxin¹, Li Luo¹, Niu Lingfang¹, Fan Yanru¹, Gao Yingying¹, Wu Xiaohou², Luo Chunli^{1*}

¹Key Laboratory of Diagnostics Medicine of Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

²Department of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the effects of PLC ϵ (phospholipase C epsilon) on EMT (epithelial-mesenchymal transition) and migration, we first build shPLC ϵ cell lines by transfecting LV-shPLC ϵ into prostate cancer cell PC3 and DU145. q-PCR, Western blot, wound healing assay and Transwell experiment were used to investigate the effect of PLC ϵ activity, EMT and migration induced by PLC ϵ knockdown in PC3 and DU145. The results showed that shPLC ϵ could significantly reduce both mRNA and protein levels of PLC ϵ , PPAR β , and twist1. Wound healing assay and Transwell assay showed that the migration ability was remarkably decreased in the shPLC ϵ group. At the same time, compared with the blank control group and shNC group, EMT was also decreased in shPLC ϵ group ($P < 0.05$). After adding the PPAR β agonist in shPLC ϵ group, the expression of PPAR β and twist1 in both mRNA and protein levels, the migration ability and EMT were increased. The expression of PPAR β and twist1, the migration ability and EMT were lower in shPLC ϵ +GSK (PPAR β antagonists) group than those in shPLC ϵ group.

Keywords prostate cancer; PLC ϵ ; twist1; EMT

收稿日期: 2017-12-01 接受日期: 2018-02-09

国家自然科学基金(批准号: 81072086)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68584890, E-mail: luochunli79@126.com

Received: December 1, 2017 Accepted: February 9, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81072086)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68584890, E-mail: luochunli79@126.com

网络出版时间: 2018-05-21 17:11:28

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180521.1711.018.html>

在西方国家,前列腺癌是最常见的恶性肿瘤之一,居男性癌症患者死亡的第二位^[1]。在我国,随着人口老龄化及生活条件改善,其发病率逐年升高^[2]。前列腺癌的侵袭转移是其导致死亡的重要因素^[3]。研究表明,前列腺癌侵袭转移过程与多种分子机制相关,其中,上皮-间充质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)被认为是肿瘤细胞发生侵袭转移的一个主要驱动力^[4]。

磷脂酰肌醇特异性磷脂酶C epsilon(phospholipase C epsilon, PLC ϵ),是磷脂酶C的一种新型同工酶,能被H-ras癌基因的蛋白质表达产物(小G蛋白)和G蛋白双向调节^[5-6]。研究表明,PLC ϵ 与膀胱癌肿瘤细胞的迁移和EMT密切相关^[7-9],但是PLC ϵ 基因能否影响前列腺癌细胞的迁移和EMT目前尚无报道。本研究在前列腺癌细胞株中感染shPLC ϵ 慢病毒,并以此为切入点,探究PLC ϵ 对前列腺癌迁移和EMT的影响及其分子机制,从而为前列腺癌的临床治疗提供新靶点和新策略。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人前列腺癌细胞系PC3、DU145购于中国科学院上海细胞库,由重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室保存。

1.2 慢病毒

PLC ϵ 干扰慢病毒(LV-shPLC ϵ)及通用阴性对照慢病毒(LV-shNC)由上海吉玛制药技术有限公司构建,序列信息见表1。

1.3 主要试剂

细胞培养基DMEM-F12、RPMI1640和胎牛血清购于Gibco公司;嘌呤霉素购于北京索莱宝公司;Transwell细胞培养小室(3422型,membrane filter孔径8 μ m)购于Costor公司;PCR引物由Invitrogen公司合成;RNA提取试剂盒Trizol、RT-PCR试剂盒和q-PCR试剂

盒购于TaKaRa公司;蛋白质提取试剂购于上海碧云天生物技术有限公司;鼠抗人 β -actin单克隆抗体购于ImmunoWay公司;山羊抗人多克隆抗体PLC ϵ 购于Santa Cruz公司;鼠抗人单克隆抗体PPAR β 购于Santa Cruz公司;鼠抗人单克隆抗体twist1购于Abcam公司;兔抗人多克隆抗体MMP2和MMP9购于Abcam公司;兔抗人多克隆抗体E-钙黏蛋白购于Bioss生物技术有限公司;兔抗人多克隆抗体vimentin购于Cell Signaling Technology公司;兔抗人多克隆抗体N-钙黏蛋白购于Wanleibio公司;PPAR β 特异性激动剂GW501516和抑制剂GSK3787购于MCE公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 DU145细胞常规培养于RPMI1640完全培养基(含10%胎牛血清及1%的青链霉素),置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂及45%~65%湿度的培养箱中培养,待细胞贴壁且生长汇合度达80%~90%,0.25%胰蛋白酶消化传代。前列腺癌细胞株PC3常规培养于DMEM-F12完全培养基(含10%胎牛血清及1%青链霉素),培养方法同DU145。

1.4.2 不同组慢病毒感染和稳定细胞株的筛选 按照吉玛公司指导说明,将细胞消化后,接种于6孔板中(每孔 5×10^4 个),待细胞生长汇合度达60%~70%时,更换为无血清培养基,同时在2个孔中各加入2 μ L聚凝胺(polybrene),然后再分别加入10 μ L LV-shNC、LV-shPLC ϵ 病毒原液,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂孵箱中培养48 h后观察细胞状态和感染效率。细胞株感染病毒后连续传代3~4次,每次加1 μ g/mL嘌呤霉素筛选,获得DU145-shPLC ϵ 、DU145-shNC和PC3-shPLC ϵ 、PC3-shNC稳定细胞株。

1.4.3 细胞抑制剂和激动剂处理 依照MCE公司说明书推荐,PPAR β 特异性激动剂GW501516和抑制剂GSK3787的使用浓度为1 μ mol/L,将粉末用DMSO溶解成浓度为1 mmol/L的母液,再用无菌超纯水将母液稀释为浓度为100 μ mol/L的使用液。培养细胞

表1 慢病毒信息

Table 1 lentivirus sequence

病毒名称	病毒序列(5'→3')
Lentivirus name	Lentivirus sequence (5'→3')
LV-shPLC ϵ	Sense: GGT TCT CTC CTA GAA GCA ACC Anti-sense: CCA AGA GAG GAT CTT CGT TGG
LV-shNC	Sense: TTC TCC GAA CGT GTC ACG T Anti-sense: AAG AGG CTT GCA CAG TGC A

表2 PCR引物信息
Table 2 The sequence of primer for PCR

基因 Gene	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>PLCϵ</i>	GGA GAA TCC TCG GTA G	GGT TGT CAG CGT ATG TCC
<i>twist1</i>	TCC GCG TCC CAC TAG CA	AGT TAT CCA GCT CCA GAG TCT CTA GAC
<i>PPARβ</i>	GCC GCC CTA CAA CGA GAT CA	CCA CCA GCA GTC CGT CTT TGT
<i>E-cadherin</i>	CAC CCT GGC TTT GAC GCC GA	AAA ATT CAC TCT GCC CAG GAC GCG
<i>N-cadherin</i>	CGC CAT CCA GAC CGA CCC AA	GTC GAT TGG TTT GAC CAC GGT GAC
<i>vimentin</i>	ATG GCT CGT CAC CTT CG	AGT TTC GTT GAT AAC CTG TCC
<i>β-actin</i>	GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC	ACG AGA CCA CCT TCA ACT CCA C

时,每1 mL培养基加入 20 μ L的药物使用液。

1.4.4 实时定量PCR(q-PCR) 常规处理细胞48 h后且汇合度达到90%后,用Trizol法提取细胞的总RNA,逆转录为cDNA后用SYBGreen法进行q-PCR(以 β -actin为内参)。反应条件如下:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性10 s;退火(温度因基因不同而不同)30 s;72 $^{\circ}$ C延伸20 s;共40个循环(RT-PCR为30个循环)。所用引物序列见表2。

1.4.5 Western blot检测细胞中相关蛋白质水平 常规处理细胞48 h后且汇合度达到90%后,常规方法提取总蛋白质,BCA法测定蛋白质浓度。用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis, SDS-PAGE)分离样品;湿转法转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜;室温5%脱脂奶粉封闭2 h,4 $^{\circ}$ C一抗孵育过夜;辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的二抗室温孵育2 h;ECL化学发光,显影分析。

1.4.6 划痕实验 细胞传代至6孔板,汇合度达到50%时,加药处理48 h后消化、细胞计数,接种于6孔板中,使各组细胞数目大致相同。待细胞达到90%汇合度时更换为无血清培养基,划痕,于固定位置拍照。分别在划痕24 h及48 h后,再次在固定位置拍照,计算相对迁移距离,重复3次实验后取平均值。

1.4.7 Transwell实验 用500 μ L无血清DMEM预处理小室1 h,紫外照射2 h后置于12孔板中,小室下加入有血清培养基700 μ L。细胞传代,用无血清培养基稀释并计数,接种于12孔板中的小室内,使各个小室内细胞浓度为 1×10^5 个/mL。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱内常规培养12 h后,取出上室,在12孔板中加入700 μ L 4%多聚甲醛固定20 min。然后,0.1%的结晶

紫染色5 min,流水冲洗5 min,用棉签擦去上室内细胞,干燥后显微镜下拍照并计数。

1.4.8 统计学分析 实验结果采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 感染shPLC ϵ 慢病毒下调前列腺癌细胞株PC3和DU145的PLC ϵ 的表达

q-PCR和Western blot结果发现,无论是mRNA还是蛋白质水平,感染shPLC ϵ 慢病毒组的PLC ϵ 表达均低于shNC组($P < 0.05$,图1);而空白对照组和shNC组的PLC ϵ 表达差异无统计学意义($P > 0.05$,图1)。结果表明,感染shPLC ϵ 慢病毒能有效抑制前列腺癌细胞株中PLC ϵ 的表达,并为后续实验奠定基础。

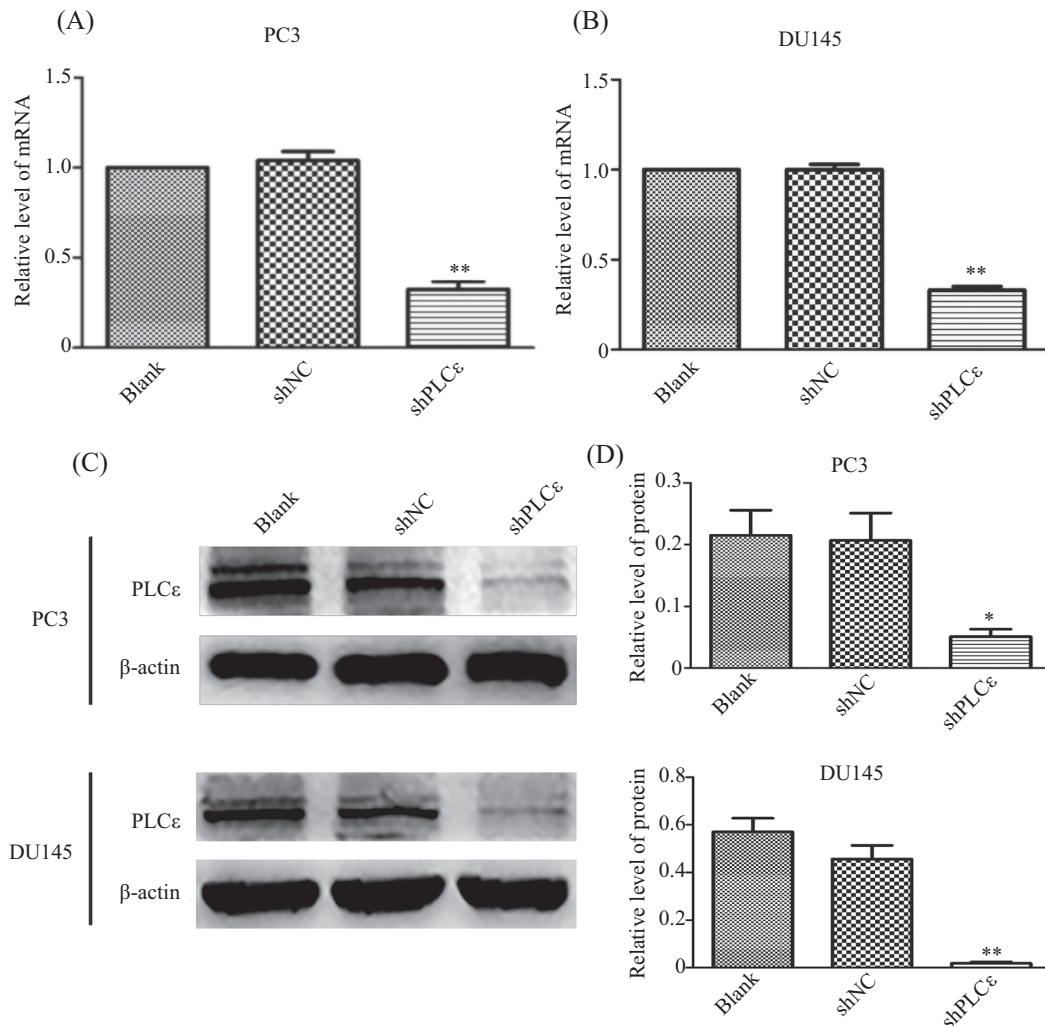
2.2 感染shPLC ϵ 慢病毒抑制前列腺癌细胞株的迁移能力

划痕实验结果表明,感染shPLC ϵ 慢病毒后,PC3和DU145细胞株的shPLC ϵ 组48 h的相对迁移距离分别为39.95%、13.58%,而对照组的相对迁移距离分别为76.45%、92.24%。干扰组的细胞的迁移能力显著低于对照组($P < 0.01$ 和 $P < 0.001$,图2)。

Transwell实验结果表明,PC3-shPLC ϵ 组细胞的相对迁移数为 300 ± 39 ,而对照组PC3-shNC组细胞的相对迁移数为 860 ± 118 ,二者差异有统计学意义($P < 0.01$,图3A和图3C);DU145-shPLC ϵ 组细胞相对迁移数 60 ± 20 ,明显低于DU145-shNC组细胞相对迁移数 230 ± 50 ($P < 0.01$,图3B和图3D)。

2.3 下调PLC ϵ 对EMT相关分子表达的影响

q-PCR检测PC3和DU145细胞中E-钙黏蛋白



A: shPLCε感染PC3细胞后PLCε mRNA水平; B: DU145细胞PLCε mRNA水平; C: PC3和DU145细胞中PLCε蛋白质水平; D: PLCε蛋白质灰度值相关水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与shNC组比较。

A: determination of PLCε mRNA level by q-PCR in PC3 cells infected by LV-shPLCε; B: determination of PLCε mRNA level by q-PCR in DU145 cells; C: determination of PLCε protein level by Western blot in PC3 and DU145 cells; D: relative protein level of PLCε in PC3 and DU145 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs shNC group.

图1 感染shPLCε慢病毒后PC3和DU145细胞中PLCε的mRNA和蛋白质水平

Fig.1 PLCε mRNA and protein levels in PC3 and DU145 cells infected by LV-shPLCε

(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)的mRNA水平。结果显示, PC3细胞中shPLCε组E-钙黏蛋白明显高于对照组shNC($P < 0.01$, 图4A), 而N-钙黏蛋白和波形蛋白明显低于对照组($P < 0.001$, 图4A); DU145细胞shPLCε组E-钙黏蛋白明显高于对照组shNC($P < 0.01$, 图4B), 而N-钙黏蛋白和波形蛋白明显低于对照组($P < 0.01$, 图4B)。

Western blot检测twist1、E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白的蛋白表达量。结果显示, 在PC3和DU145细胞中干扰PLCε, 上皮细胞标志物E-钙黏蛋白表达升高; 间质细胞标志物N-钙黏蛋白和波形蛋白水平下调($P < 0.05$, 图5)。结果表明, 下调PLCε

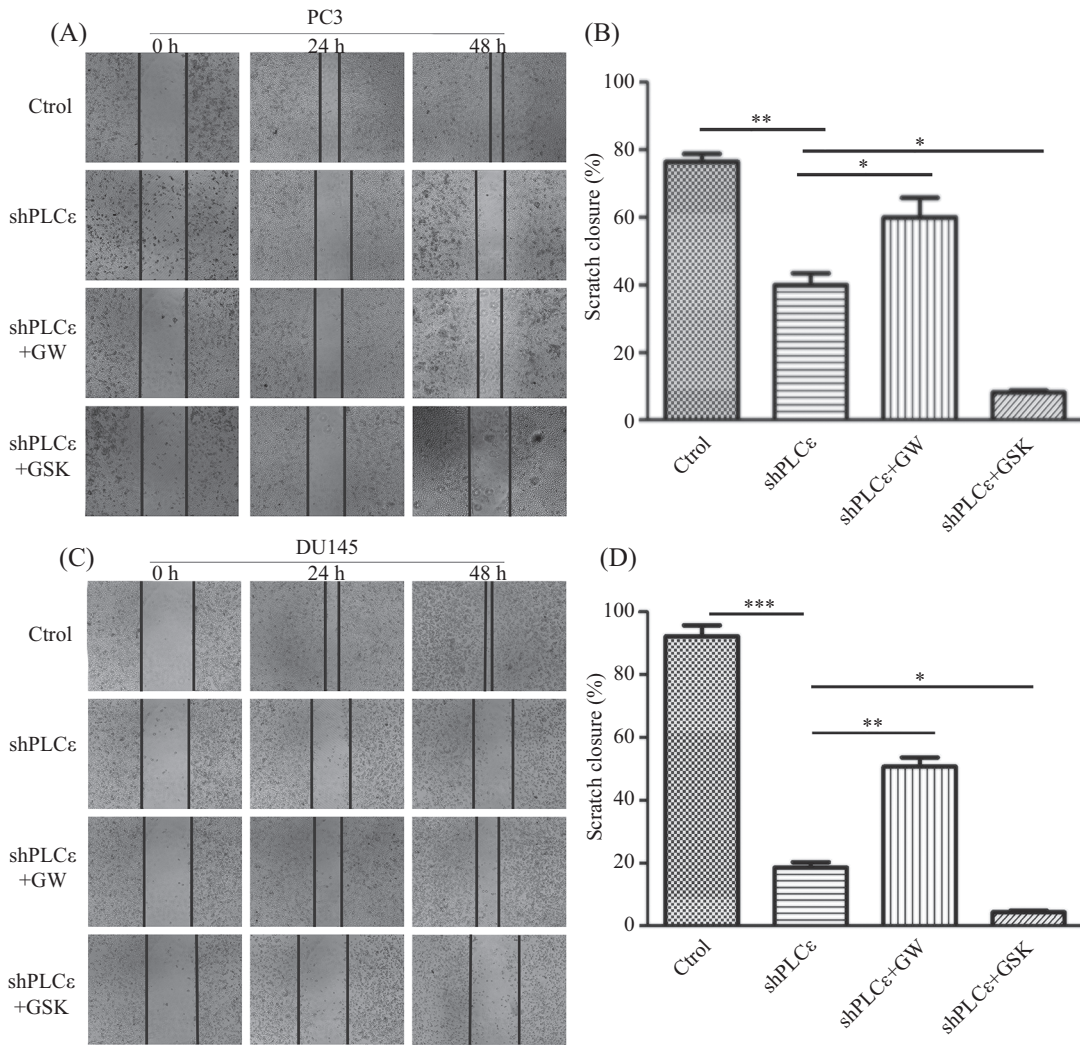
可显著抑制前列腺癌细胞的EMT。

2.4 下调PLCε抑制PPARβ和twist1的表达

q-PCR和Western blot实验结果显示, 在PC3和DU145细胞中, shPLCε组的过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARβ)和诱导EMT的转录因子twist1表达量均低于对照组shNC($P < 0.05$, 图4和图5)。结果表明, shPLCε抑制PPARβ和twist1的表达。

2.5 PPARβ的特异性激动剂和抑制剂可调节twist1表达, 进而影响EMT相关分子

在PC3-shPLCε和DU145-shPLCε稳定细胞株中加入PPARβ特异性激动剂GW501516或抑制剂GSK3787, 培养24 h。q-PCR和Western blot实验结



A: PC3细胞的划痕实验; B: PC3细胞相对迁移距离; C: DU145细胞划痕实验; D: DU145细胞相对迁移距离。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。
A: wound healing assay of PC3 cells; B: relative migration distance of PC3 cells; C: wound healing assay of DU145 cells; D: relative migration distance of DU145 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图2 PC3和DU145的划痕实验及相关迁移距离
Fig.2 Wound healing assay of PC3 and DU145 cells

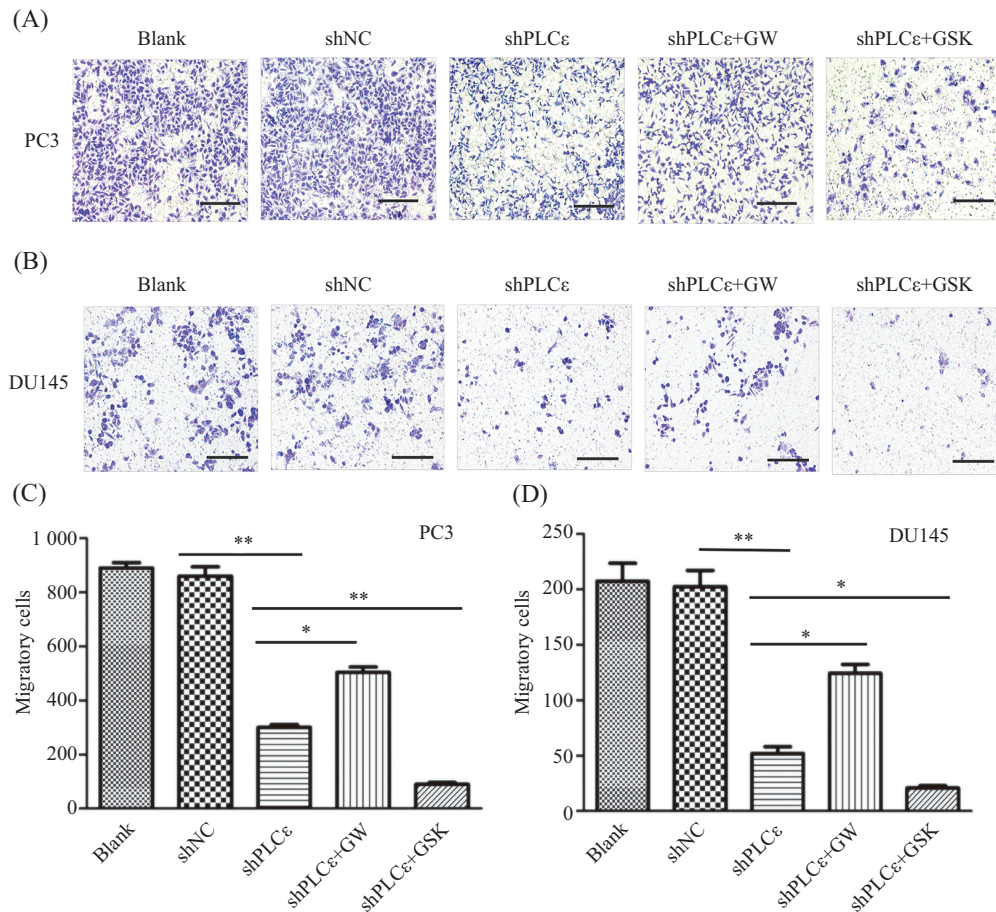
果显示, 在PC3和DU145细胞中, shPLCε+GW组的PPARβ和twist1在mRNA和蛋白质水平均明显高于shPLCε组($P < 0.05$, 图6和图7); shPLCε+GSK组则明显低于shPLCε组($P < 0.05$, 图6和图7)。同时, EMT相关分子的变化也具有统计学意义($P < 0.05$, 图6和图7)。结果表明, 加入PPARβ的激动剂能一定程度逆转PPARβ和twist1的下调, 同时促进细胞的EMT过程; 而PPARβ的抑制剂产生相反作用, 提示PLCε可通过PPARβ和twist1的表达调节前列腺癌的EMT过程。

2.6 PPARβ的特异性激动剂或抑制剂对影响前列腺癌细胞株迁移能力的影响

如图2所示, 划痕实验结果表明, PC3-shPLCε

和DU145-shPLCε组细胞中加入GW后, 其相对迁移距离分别是59.99%、50.70%, 明显高于shPLCε组的39.95%、13.58%; PC3-shPLCε+GSK和DU145-shPLCε+GSK组的相对迁移距离分别是8.09%、4.29%, 明显低于shPLCε组($P < 0.05$)。

Transwell实验结果表明, PC3-shPLCε组细胞的相对迁移数为 300 ± 39 , 而加药组PC3-shNC+GW和PC3-shNC+GSK组细胞的相对迁移数为 503 ± 70 和 91 ± 20 , 加药组分别与shPLCε组的差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3A和图3C); DU145-shPLCε、DU145-shNC+GW和DU145-shNC+GSK组细胞相对迁移数分别是 60 ± 20 、 124 ± 27 和 21 ± 6 , 加药组分别与shPLCε组的差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3B和图3D)。

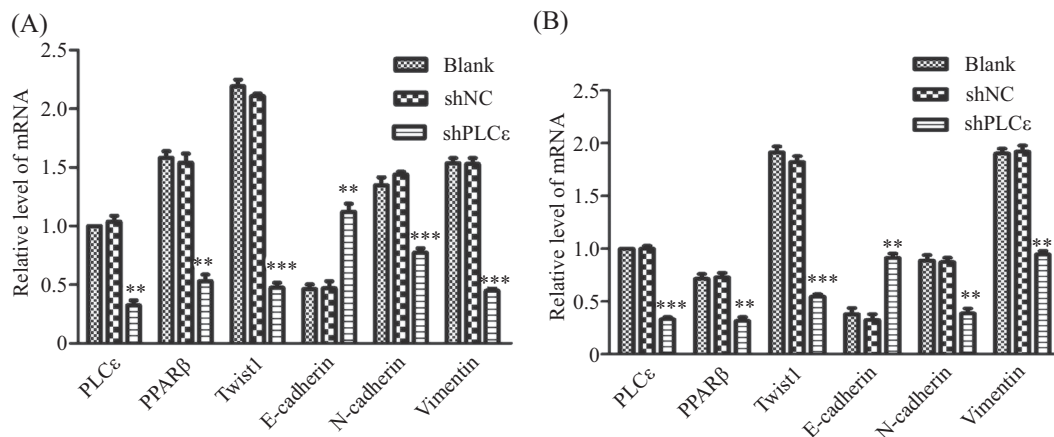


A: PC3细胞中blank、shNC、shPLCε、shPLCε+GW和shPLCε+GSK五组细胞Transwell实验; B: DU145细胞的Transwell实验; C: PC3细胞的相对迁移率; D: DU145细胞的相对迁移率。标尺=500 μm。* P <0.05, ** P <0.01。

A: Transwell assay of blank group, shNC group, shPLCε group, shPLCε+GW group and shPLCε+GSK of PC3 cells; B: Transwell assay of DU145 cells; C: relative migration rate of PC3 cells; D: relative migration rate of DU145 cells. Bars=500 μm. * P <0.05, ** P <0.01.

图3 PC3和DU145的Transwell实验及相关迁移率

Fig.3 Transwell assay of PC3 and DU145 cells

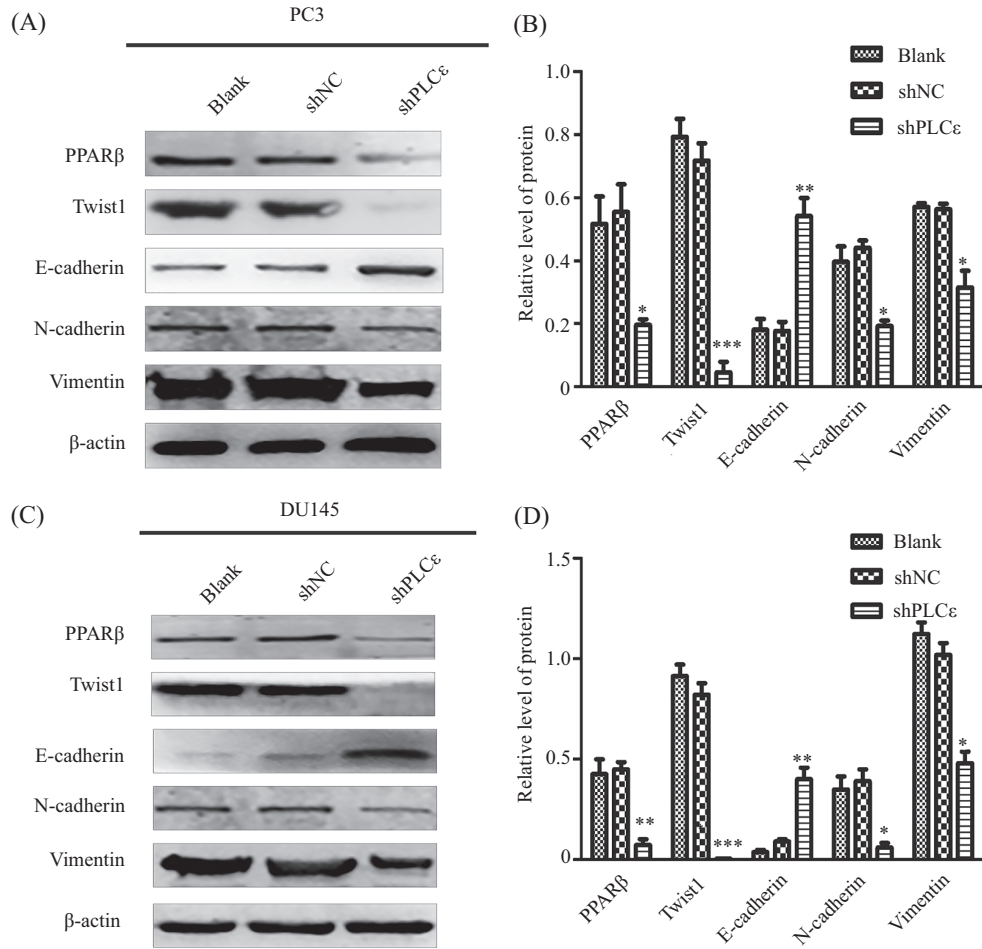


A: PC3细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子mRNA水平; B: DU145细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子mRNA水平。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, 与shNC组比较。

A: determination of PLCε, PPARβ, twist1 and EMT related mRNA level by q-PCR in PC3 cells; B: determination of PLCε, PPARβ, twist1 and EMT related mRNA level by q-PCR in DU145 cells. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs shNC group.

图4 感染shPLCε慢病毒后PC3和DU145细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子的mRNA水平

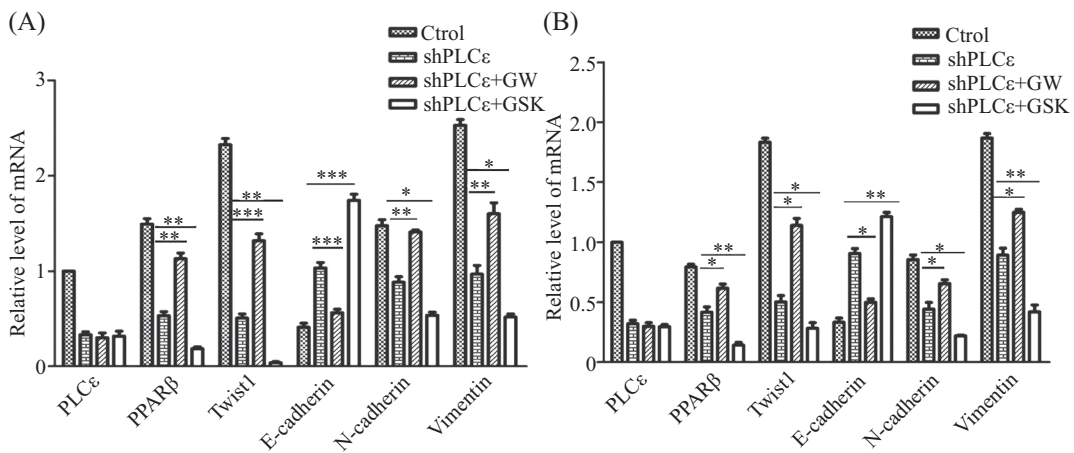
Fig.4 PLCε, PPARβ, twist1 and EMT related mRNA levels in PC3 and DU145 cells infected by LV-shPLCε



A: PC3细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子蛋白质水平; B: PC3细胞的灰度值相关水平; C: DU145细胞的蛋白质水平; D: DU145细胞的灰度值相关水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与shNC组比较。

A: Western blot of PC3 cells infected by LV-shPLCε; B: relative protein level in PC3 cells; C: Western blot of DU145 cells; D: relative protein level in DU145 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs shNC group.

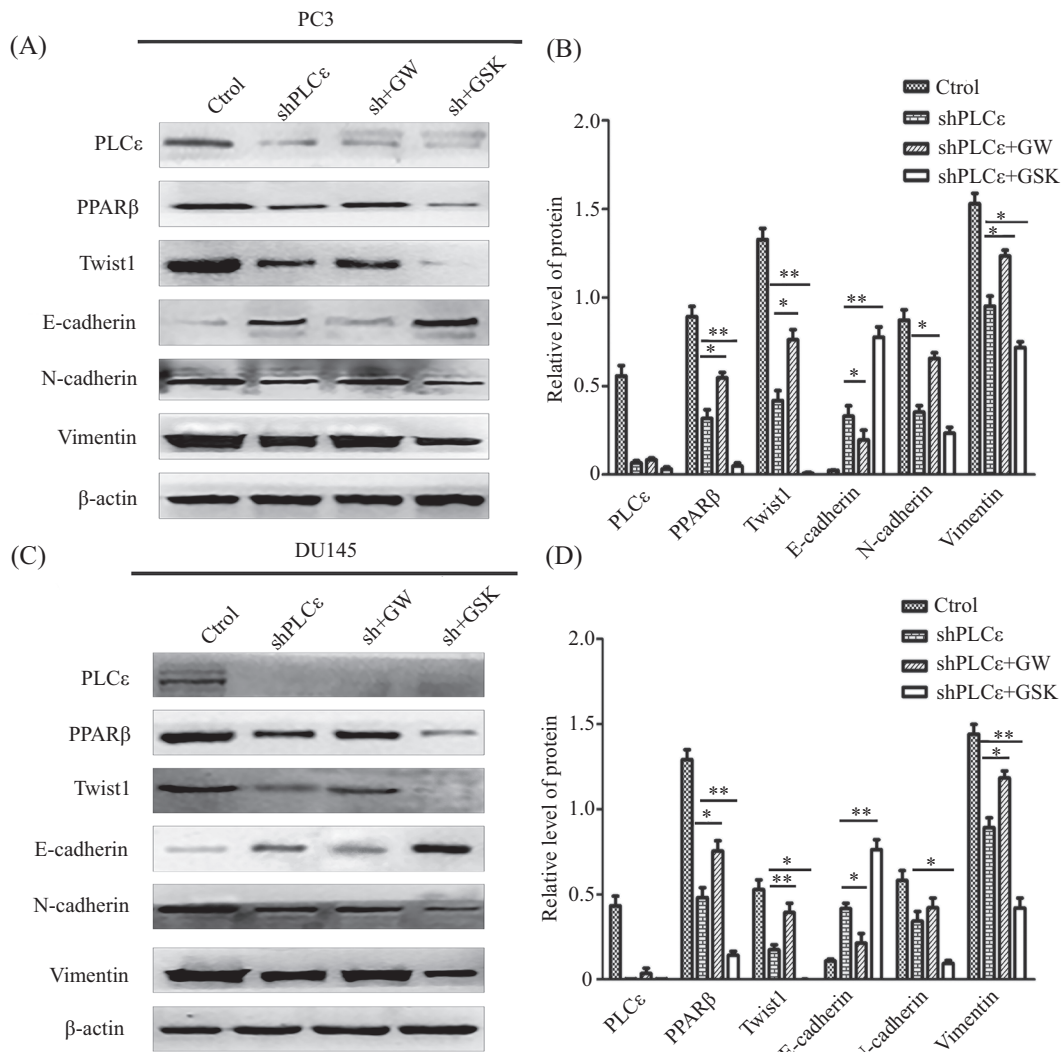
图5 感染shPLCε慢病毒后PC3和DU145细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子的蛋白质水平
Fig.5 PLCε, PPARβ, twist1 and EMT related protein levels in PC3 and DU145 cells infected by LV-shPLCε



A: PC3细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子mRNA水平; B: DU145细胞的mRNA水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: determination of PLCε, PPARβ, twist1 and EMT related mRNA level by q-PCR inPC3 cells; B: q-PCR of DU145 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图6 PPARβ的激动剂或抑制剂处理后PC3和DU145细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子的mRNA水平
Fig.6 PLCε, PPARβ, twist1 and EMT related mRNA levels in PC3 and DU145 cells treated with GW or GSK



A: PC3细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子的蛋白质水平; B: PC3灰度值相关水平; C: DU145细胞相关分子的蛋白质水平; D: DU145细胞灰度值相关水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: Western blot of PC3 cells; B: relative protein level in PC3 cells; C: Western blot of DU145 cells; D: relative protein level in DU145. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图7 加GW和GSK后PC3和DU145细胞中PLCε、PPARβ、twist1和EMT相关分子的蛋白质水平

Fig.7 PLCε, PPARβ, twist1 and EMT related protein levels in PC3 and DU145 cells treated with GW or GSK

结果显示, PPARβ的特异性激动剂GW501516可促进前列腺癌细胞的迁移能力, 而特异性抑制剂GSK3787可抑制其迁移能力, 进一步说明PLCε可通过PPARβ和twist1的表达调节前列腺癌细胞的迁移能力。

3 讨论

PLCε是2001年发现的一种与肿瘤发生密切相关的基因, 位于人类染色体10q23^[5]。被多种信号分子(G蛋白、G蛋白偶联受体、生长因子、Ras家族、Rho家族)激活, 可将位于细胞膜上的磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP2)水解, 产生细胞内重要的第二信

使: 三磷酸肌醇(IP₃)和甘油二酯(DAG), 并激活相关信号通路^[10]。其中, DG/PKC信号通路可引起细胞内一系列靶蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化, 从而促进细胞的增殖和分化^[6]。课题组前期芯片结果证实: 敲低PLCε后, 可影响膀胱癌细胞T24的代谢相关通路以及迁移能力。因此, 本研究在恶性程度较高的具有侵袭性的前列腺癌细胞株PC3和DU145中, 感染shPLCε慢病毒, 筛选低表达PLCε的稳定株, 通过划痕实验和Transwell实验证实, PLCε可以影响PC3和DU145细胞的迁移能力, 而进一步对EMT标志分子的检测, 明确了在前列腺癌细胞发生侵袭转移过程中的PLCε的作用及分子机制。

PPAR β 是PPAR核激素受体超家族成员之一,分布较广,在多种组织和细胞中均有表达,其中以脑、脂肪组织和皮肤表达最多,PPAR β 被配体激活后,参与脑脂新陈代谢、前脂肪细胞增殖以及脂肪形成、胚胎抑制、巨噬细胞胆固醇稳态、肿瘤形成等^[11]。有研究表明,PPAR β 在大肠癌^[12]以及卵巢交接性肿瘤^[13]中高表达;而Jarvis等^[14]进一步研究发现,在前列腺癌细胞中PPAR β 呈高表达,且与细胞周期调控以及肿瘤细胞增殖有关。Lo等^[15]研究发现,dopamine可以通过PLC信号通路影响PPAR β 的表达,而PLC通过Ca²⁺/cPLA₂影响PPAR的表达,从而影响糖代谢^[16]。故推测PLC ϵ 作为PLC家族一员,同样能够影响PPAR β 的表达,从而影响肿瘤细胞的相关生物学行为。为此,本研究敲低PLC ϵ 的表达后,采用q-PCR和Western blot检测到PPAR β 的表达量显著降低,说明PLC ϵ 能调控PPAR β 的表达。

EMT是上皮细胞获得迁移能力的有限方式,也是上皮细胞癌(占恶性肿瘤的90%以上)浸润转移的一个重要途径。发生EMT时,肿瘤细胞E-钙黏蛋白的表达会受到抑制进而失去细胞与细胞之间的连接^[17];而显示出间质细胞的表型,包括上调N-钙黏蛋白和波形蛋白^[18]。同时,一些转录因子(如twist1、Snail和Slug)的表达也会上调^[19]。Twist1作为影响EMT的重要转录因子,可以直接与E-钙黏蛋白和N-钙黏蛋白启动子区域结合,调控它们的转录活性。twist1最初在研究果蝇早期胚胎发育时被发现,作为一种合子基因,对中胚层形成及进一步分化为特定组织起重要作用^[20-21]。大量证据表明, twist1除了在发育过程中发挥重要作用,还参与许多癌症的进程,包括神经胶质瘤、食道癌、支气管癌、胸腺癌、乳腺癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、膀胱癌等几乎所有常见类型的肿瘤^[22],具有影响肿瘤起始、扩展、肿瘤微环境形成^[23]、EMT^[24]、药物抗性等作用^[25-26]。最近的研究还发现, twist1可以受到PPAR β 的转录调控,选择性地在脂肪组织中表达,通过与PGC-1 α 相互作用调控CPT1B、ACADM、ERR α 等一系列基因的表达,实现对线粒体代谢的抑制及脂肪转化的影响^[27]。PPAR β 是否能通过影响twist1,从而抑制EMT,尚无研究。本研究发现,在敲低PLC ϵ 表达后,细胞的PPAR β 与twist1的表达同时下调,而在shPLC ϵ 组细胞中加入PPAR β 的激动剂GW,可逆转twist1的下调,促进EMT和迁移能力;加入PPAR β 的抑制剂GSK后, twist1的

表达进一步降低,EMT和迁移能力的抑制更加显著。这些结果表明,敲低PLC ϵ 能下调PPAR β 的表达水平,从而通过靶向twist1的转录,调控EMT,影响细胞迁移能力。PLC ϵ 通过何种机制实现对PPAR β 及twist1的调控还有待进一步研究。

综上所述,采用慢病毒感染技术敲低癌基因PLC ϵ 的表达,研究其对前列腺癌迁移和EMT的影响及可能的分子机制,揭示了PLC ϵ /PPAR β /twist1这一新的信号通路,为前列腺癌的防治提供了新靶点和策略。

参考文献 (References)

- 1 鲍镇美. 前列腺癌的治疗. 中华泌尿外科杂志(Bao Zhenmei. Treat of prostate cancer. Chinese Journal of Urology) 1997; 5: 315-20.
- 2 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学. 济南: 山东科学技术出版社(Wu Jieping. Wu Jieping urological surgery. Jinan: Shandong Science and technology press) 1993, 532-7.
- 3 Mettlin C, Jones GW, Murphy GP. Trends in prostate cancer care in the United States, 1974-1990: Observations from the patient care evaluation studies of the American college of surgeons commission on cancer. Ca Cancer J Clin 1993; 43(2): 83.
- 4 Ansieau S, Courtois S, Puisieux A. Failsafe program escape and EMT: A deleterious partnership. Semin Cancer Biol 2011; 21(6): 392-6.
- 5 Song C, Hu CD, Masago M, Kariyai K, Yamawakikataoka Y, Shibatohe M, et al. Regulation of a novel human phospholipase C, PLCepsilon, through membrane targeting by Ras. J Biol Chem 2001; 276(4): 2752.
- 6 Bunney TD, Baxendale RW, Katan M. Regulatory links between PLC enzymes and Ras superfamily GTPases: signalling via PLCepsilon. Adv Enzyme Regul 2009; 49(1): 54.
- 7 欧俐苹, 杜红飞, 杨雪, 唐敏, 蔡晓钟, 罗春丽. PLC ϵ 通过PKC α /TBX3信号通路调控人膀胱癌细胞系T24的迁移和侵袭. 基础医学与临床(Ou Liping, Du Hongfei, Yang Xue, Tang Min, Cai Xiaozhong, Luo Chunli. PLC ϵ regulates migration and invasion of human bladder cancer cell line T24 through PKC α /TBX3 signaling pathway. Basic Medicine and Clinical) 2015; 35(9): 1155-61.
- 8 欧俐苹, 罗春丽, 郭永灿, 赵懿. PLC ϵ siRNA转染对膀胱癌细胞株T24侵袭能力的影响. 重庆医科大学学报(Ou Liping, Luo Chunli, Guo Yongchan, Zhao Yi. Effects of PLC ϵ siRNA transfection on invasion ability of bladder cancer cell line T24. Journal of Chongqing Medical University) 2007; 32(5): 503-5.
- 9 赵燕, 郝燕妮, 刘南京, 李婷, 吴小候, 罗春丽. miR-145通过下调PLC ϵ 抑制膀胱癌EMT和迁移及其机制研究. 中国生物工程杂志(Zhao Yan, Hao Yanni, Liu Nanjing, Li Ting, Wu Xiaohou, Luo Chunli. miR-145 inhibits EMT and migration of bladder cancer by down-regulating PLC ϵ and its mechanism. Chinese Journal of Biological Engineering) 2017; 37(3): 27-36.
- 10 Zhang L, Malik S, Pang J, Wang H, Park KM, Yule DI, et al. Phospholipase cepsilon hydrolyzes perinuclear phosphatidylinositol 4-phosphate to regulate cardiac hypertrophy. Cell 2013;

- 153(1): 216-27.
- 11 Trottein F. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2002; 8(9): 422.
- 12 He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 1999; 99(3): 335-45.
- 13 杨 瑛, 侯建青, 鞠红卫, 于振海, 赵志伟, 杨 书. 过氧化物酶体增殖物激活受体 β 与上皮性卵巢癌的关系. *细胞与分子免疫学杂志* (Yang Ying, Hou Jianqing, Ju Hongwei, Yu Zhenhai, Zhao Zhiwei, Yang Shu. The relationship between peroxisome proliferator-activated receptor β and epithelial ovarian cancer. *Journal of Cellular and Molecular Immunology*) 2007; 23(7): 630-2.
- 14 Jarvis MC, Gray TJ, Palmer CN. Both PPARgamma and PPARdelta influence sulindac sulfide-mediated p21WAF1/CIP1 upregulation in a human prostate epithelial cell line. *Oncogene* 2005; 24(55): 8211.
- 15 Lo SH, Lee KS, Chen LJ, Chen CH. Increase of PPAR δ by dopamine mediated via DA-1 receptor-linked phospholipase C pathway in neonatal rat cardiomyocytes. *Auton Neurosci* 2013; 177(2): 211-6.
- 16 Suh HN, Huong HT, Song CH, Lee JH, Han HJ. Linoleic acid stimulates gluconeogenesis via Ca^{2+} /PLC, cPLA2, and PPAR pathways through GPR40 in primary cultured chicken hepatocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(6): C1518.
- 17 Du B, Shim JS. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer. *Molecules* 2016; 21(7): 965.
- 18 Corlin C. Civilizing the margins: Southeast Asian government policies for the development of minorities by CHRISTOPHER R. DUNCAN. *Am Anthropol* 2013; 331(2): 131.
- 19 Kaufhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res* 2014; 33(1): 62.
- 20 Thisse B, El MM, Perrinshmitt F. The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(8): 3439.
- 21 Simpson P. Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* 1983; 105(3): 615-32.
- 22 蒋红果, 邵 杨, 罗 瑛. Twist1在肿瘤发生中的作用. *中国生物化学与分子生物学报* (Jiang Hongguo, Shao Yang, Luo Ying. The role of Twist1 in tumorigenesis. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*) 2015; 5: 440-7.
- 23 Yang MH, Wu MZ, Chiou SH, Chen PM, Chang SY, Liu CJ, *et al.* Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 2008; 10(3): 295-305.
- 24 Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, *et al.* Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117(7): 927.
- 25 Zhang X, Wang Q, Ling MT, Wong YC, Leung SC, Wang X. Anti-apoptotic role of TWIST and its association with Akt pathway in mediating taxol resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2007; 120(9): 1891-8.
- 26 Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res* 2007; 67(5): 1979.
- 27 Pan D, Fujimoto M, Lopes A, Wang YX. Twist-1 is a PPARdelta-inducible, negative-feedback regulator of PGC-1 α in brown fat metabolism. *Cell* 2009; 137(1): 73-86.