

过表达HepaCAM联合谷氨酰胺剥夺抑制 前列腺癌细胞的增殖

何镇廷¹ 李婷¹ 范佳鑫¹ 袁鸿玲¹ 郑永波² 吴小侯² 罗春丽*

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 该研究旨在探讨过表达肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, HepaCAM)联合谷氨酰胺(glutamine, Gln)剥夺对前列腺癌(prostate cancer, PCa)细胞谷氨酰胺代谢及增殖的影响。采用Ad-HepaCAM腺病毒感染前列腺癌细胞株PC3、LNCaP。克隆形成实验及MTT实验检测细胞的克隆形成率及增殖活性。qRT-PCR、Western blot分别检测PC3、LNCaP细胞中谷氨酰胺酶(glutaminase, GLS)、溶质载体家族I成员V(solute carrier family 1 member 5, SLC1A5)、MYC癌基因家族(可编码c-MYC蛋白分子)以及细胞周期蛋白D1(cyclin D1)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达情况。结果显示,单独过表达HepaCAM与剥夺Gln均可抑制PC3、LNCaP细胞的增殖能力,两者联用效果更佳。qRT-PCR和Western blot显示,与对照组(+Gln组)相比,剥夺谷氨酰胺组(-Gln组)细胞中的GLS、SLC1A5、MYC表达呈应激抵抗式上调,过表达HepaCAM后上述基因表达重新受到抑制。该实验证明,过表达HepaCAM与Gln剥夺联用可更显著地抑制前列腺癌的增殖能力,同时,过表达HepaCAM可在一定程度上抑制前列腺癌细胞的谷氨酰胺代谢重编程。

关键词 前列腺癌; Gln剥夺; 谷氨酰胺代谢; 增殖; HepaCAM

Overexpression of HepaCAM Combined with Glutamine Deprivation Inhibits the Proliferation of Prostate Cancer Cells

HE Zhenting¹, LI Ting¹, FAN Jiixin¹, YUAN Hongling¹, ZHENG Yongbo², WU Xiaohou², LUO Chunli*

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

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

Abstract The purpose of this study was to investigate the effect of HepaCAM (hepatocyte cell adhesion molecule) combined with Gln (glutamine) deprivation on glutamine metabolism and proliferation of PCa (prostate cancer) cells. Prostate cancer cell lines PC3 and LNCaP were infected with Ad-HepaCAM adenovirus. Clone formation experiment and MTT assay were used to detect the clonogenesis rate and proliferation activity. The expression of GLS (glutaminase), SLC1A5 (solute carrier family I member V), MYC oncogene family, cyclin D1 and PCNA (proliferating cell nuclear antigen) were detected by qRT-PCR and Western blot. The results showed that overexpression of HepaCAM and deprivation of Gln could inhibit the proliferation of PC3 and LNCaP cells, and the combination of them worked better. qRT-PCR and Western blot showed that compared with the +Gln group

收稿日期: 2020-06-23

接受日期: 2020-09-22

国家自然科学基金青年科学基金(批准号: 81802543)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13101381623, E-mail: 100960@cqmu.edu.cn

Received: June 23, 2020 Accepted: September 22, 2020

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81802543)

*Corresponding author. Tel: +86-13101381623, E-mail: 100960@cqmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5377>

(control group), the expression of GLS, SLC1A5 and MYC in the -Gln group (glutamine deprivation group) was up-regulated in a stress-resistant manner, and above the genes were inhibited again after overexpression of HepaCAM. This experiment proves that the combination of overexpression of HepaCAM and Gln deprivation can significantly inhibit the proliferation of prostate cancer, and overexpression of HepaCAM can inhibit the reprogramming of glutamine metabolism in prostate cancer cells to some extent.

Keywords prostate cancer; Gln deprivation; glutamine metabolism; proliferation; HepaCAM

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是西方男性最常见的泌尿系肿瘤, 死亡率高, 2016年全球前列腺癌患者病死率达7.1%, 居所有癌症病死率第二位^[1-2]。近年来, 随着我国人口老龄化的加速, 中国男性前列腺癌发病率和发病趋势、死亡率逐年上升, 由于发病隐匿、确诊时多已发生远处转移等原因, 导致治疗效果欠佳^[3]。因此, 探索细胞、组织的异常代谢改变, 对诊断和治疗PCa显得尤为重要。

谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 是人体内含量最丰富的氨基酸之一, 在血液中占游离氨基酸总量的20%以上, 在肌肉中占40%, 可被大量消耗为快速分裂细胞提供能量, 亦可作为蛋白质、核酸等合成所需的前体物质^[4-5]。细胞中谷氨酰胺的主要代谢途径是通过特异性转运体溶质载体家族I成员V(SLC1A5)将其转运至细胞内后, 再由定位于线粒体的谷氨酰胺酶 (GLS1/2) 催化脱氨, 随后在线粒体中产生谷氨酸和氨, 谷氨酸在谷氨酸脱氢酶或转氨酶作用下生成 α -酮戊二酸, α -酮戊二酸可以进入三羧酸循环产生ATP^[6-7]。大量研究发现, 肿瘤组织内的谷氨酰胺代谢异常^[8-10], 本课题组前期研究发现, 前列腺癌患者较正常人血液中的谷氨酰胺浓度水平显著下降, 且谷氨酸与谷氨酰胺的比值显著升高^[11], 提示谷氨酰胺可能作为潜在的肿瘤早期筛查标志物。大量研究也证实, 谷氨酰胺剥夺可导致肿瘤细胞增殖能力下降^[12-14]。但是也有研究团队^[15]发现, 在剥夺肿瘤生长微环境中的Gln后, 尽管有限的谷氨酰胺水平会造成代谢压力, 但癌细胞仍有能力适应生存和生长的条件, 这已经成为谷氨酰胺剥夺治疗被应用于临床的难点。剥夺Gln对前列腺癌细胞的增殖影响机制尚未被揭示。

肝细胞黏附分子 (hepatocyte cell adhesion molecule, HepaCAM) 是在人类肝脏中分离出来的具有抑癌基因特性的新型免疫球蛋白 (immuno globulin, Ig) 类细胞黏附分子, 在包括PCa在内的多种肿瘤组织和细胞中表达降低甚至缺失, 而在正常组织和细胞中通常高表达^[16-18]。前期研究发现, HepaCAM与泌尿

系统肿瘤包括膀胱癌和肾癌的增殖、侵袭及瓦伯格效应有关^[19-22], 同时过表达HepaCAM可以抑制前列腺癌细胞的增殖与凋亡^[23], 但能否通过联用谷氨酰胺剥夺进一步抑制前列腺癌细胞代谢与增殖尚无研究。本研究拟将过表达HepaCAM腺病毒与谷氨酰胺剥夺实验分别及联合作用于人前列腺癌细胞PC3与LNCaP, 研究其对细胞代谢与增殖的影响及其分子机制, 为基因靶向与谷氨酰胺代谢诊断和治疗前列腺癌提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株

正常前列腺上皮细胞株RWPE-1和前列腺细胞癌株PC3、LNCaP来自上海中桥新洲生物技术公司。

1.2 腺病毒

编码HepaCAM基因的腺病毒载体 (adenovirus vector of HepaCAM protein, Ad-HepaCAM) 及编码绿色荧光蛋白基因的腺病毒载体 (adenovirus vector of green fluorescent protein, Ad-GFP) 均为本课题组前期构建保存。

1.3 主要试剂

培养基K-SFM、RPMI-1640(含有L-谷氨酰胺)、RPMI-1640(不含L-谷氨酰胺)以及胎牛血清购于Gibco公司; 实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 引物由Invitrogen公司合成, 引物信息见表1; RNA提取试剂盒、Trizol、反转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒和qRT-PCR试剂盒购于TaKaRa公司; 蛋白质提取试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; HepaCAM、GLS1兔抗人多克隆抗体购于Protein Tech公司; SLC1A5、c-MYC、PCNA、Cyclin D1兔抗人多克隆抗体购于北京博奥森生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔Ig G购于北京中杉金桥生物技术有限公司; MTT试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 cBioPortal分析基因表达及生存差异 综合性数据库 cBioPortal的数据来源于TCGA、ICGC、GEO等数据库,本研究摘取数据库中22个前列腺数据集共7 161例样本(其中前列腺癌患者样本6 875例),利用Logrank检验对其进行HepaCAM、GLS、SLC1A5、MYC等基因的表达差异分析及对应基因变化时样本个体的生存差异分析。

1.4.2 细胞培养 前列腺癌细胞PC3、LNCaP用RPMI-1640完全培养基(含10%胎牛血清)培养,前列腺正常上皮细胞RWPE-1用K-SFM培养基培养,加入10%胎牛血清,置于含5% CO₂、1% O₂和45%~65%湿度的37 °C培养箱中,待细胞贴壁生长至融合度为80%~90%时,用0.25%胰酶进行消化传代。

1.4.3 腺病毒感染前列腺癌细胞 将PC3和LNCaP细胞正常传代至6孔板内,置于37 °C含5% CO₂的恒温培养箱中培养,待细胞贴壁并长至底部的80%时,弃去原培养液,加入1 mL不含血清的培养基,分别用Ad-HepaCAM和Ad-GFP处理细胞(分别为3 μL/孔),并设对照组,4 h后再加入1 mL完全培养基,置于37 °C、5% CO₂的恒温培养箱中继续培养48 h,根据实验所需对细胞进行不同处理。

1.4.4 谷氨酰胺剥夺实验 将RWPE-1和PC3、LNCaP分别稳定接种在K-SFM培养基和RPMI-1640完全培养基(含10%胎牛血清及1%青链霉素)中培养48 h,待细胞稳定生长后,用不含Gln的对应培养基替换,设置为剥夺Gln组(-Gln组),在无Gln的对应培养基中加入2 mmol/L Gln并将其设置为对照组(+Gln组)。

1.4.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR) 常规处理LNCaP、PC3、RWPE-1细胞,待细胞融合度达到90%时,用Trizol法提取细胞总RNA,逆转录试剂盒将RNA逆

转录为cDNA,进行qRT-PCR(以β-actin为内参)。

反应条件:95 °C预变性3 min;95 °C变性10 s,退火(温度因基因不同而不同)30 s,72 °C延伸20 s,共40个循环(RT-PCR为30个循环)。根据Ct值,用2^{-ΔΔCt}法分析。

1.4.6 Western blot 常规处理LNCaP、PC3、RWPE-1细胞,待细胞融合度达到90%时,用常规方法提取细胞总蛋白质,BCA法测定蛋白质浓度。取30 μg/孔的蛋白质进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide electrophoresis, SDS-PAGE),将电泳分离后的蛋白质条带以湿转法转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,5%的脱脂奶粉室温封闭2 h,一抗4 °C孵育过夜, TBST洗涤6次(5 min/次),用辣根过氧化物酶(horse-radish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔或抗鼠IgG抗体室温孵育1 h, TBST洗涤6次(5 min/次),ECL化学发光显影, Image J进行灰度值分析。

1.4.7 克隆形成实验 常规处理LNCaP、PC3、RWPE-1细胞,收集对数生长期细胞胰酶消化后接种于6孔板中(400个/孔),实验分为以下几个组:对照组(+Gln组)、空载组(Ad-GFP组)、剥夺Gln组(-Gln)、过表达组(Ad-HepaCAM组)、联用组(Ad-HepaCAM/-Gln),每组设置3个复孔。置于37 °C、5% CO₂及45%~65%湿度的培养箱中培养1~2周,培养期间每天观察细胞克隆集落的生成情况,待形成肉眼可见且镜下计数单个集落细胞数约为200个克隆时,终止培养;PBS洗2~3次,室温下用甲醇固定细胞5 min,0.1%结晶紫染色5 min,染色后用自来水冲洗1 min,干燥后拍照并计数各组细胞克隆数(1个克隆:含≥100个细胞)。

1.4.8 MTT实验 常规处理LNCaP、PC3、RWPE-1细胞,收集对数生长期细胞,用胰酶消化后

表1 qRT-PCR引物信息

Table 1 The sequences of primers for qRT-PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
HepaCAM	TGT ACA GCT GCA TGG TGG AGA	TCT GGT TTC AGG CGG TCA TCA
GLS	TAC TGA GCC CTG AAG C	TCC AGA GGA GGA GAC C
SLC1A5	GAG CTG CTT ATC CGC TTC TTC	GGG GCG TAC CAC ATG ATC C
MYC	CCT ACC CTC TCA ACG AGA GC	CTC TGA CCT TTT GCA AGG AG
Cyclin D1	TCA AGA AGG TGT TGG AGG CA	CTC CGC CTC TGG CAT TTT G
PCNA	TCA AAG GTG TTG GAG GCA	CAG CGG TAG GTG TCG AAG C

接种于96孔板中(5 000个/孔)。实验分为以下几个组: 对照组(+Gln组)、空载组(Ad-GFP组)、剥夺Gln组(-Gln)、过表达组(Ad-HepaCAM组)、联用组(Ad-HepaCAM/-Gln), 每组设置5个复孔, 置于37 °C、5% CO₂及45%~65%湿度条件下培养箱培养0、24、48、72 h后每孔避光加入20 μL MTT试剂继续培养, 4~6 h后吸弃上清, 每孔避光加入180 μL DMSO, 轻柔振荡混匀10 min, 用酶联免疫检测仪检测490 nm波长处各孔的吸光度(D)值。

1.4.9 统计学分析 本研究各项实验均重复3次以上, 实验结果均采用SPSS.18.0进行统计分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间两两比较采用 t 检验, 多组间均数分析采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 生物数据库对比谷氨酰胺相关基因的表达差异

cBioPortal数据库结果显示, 与正常样本相比, 前列腺癌患者样本中GLS、SLC1A5、MYC的表达均高于正常样本($P<0.01$, 图1A~图1C), 而HepaCAM表达较低甚至缺失($P<0.01$, 图1D), 同时利用Logrank检验分析数据库生存分析。结果显示, 与未发生变异样本相比, 当以上基因出现任意一处变异的样本, 其患者总体死亡率较高, 且除HepaCAM组($P>0.05$, 图1E)外, 预后差异均具有统计学意义($P<0.01$ 、 $P<0.05$ 、 $P<0.01$, 图1F~图1H)。

2.2 前列腺细胞癌中HepaCAM表达降低甚至缺失

qRT-PCR和Western blot结果发现, 与前列腺正常上皮细胞RWPE-1相比, 前列腺癌细胞株PC3和LNCaP中, HepaCAM表达缺失($P<0.001$, 图2A~图2C)。

2.3 感染过表达HepaCAM腺病毒上调PC3、LNCaP细胞中HepaCAM的表达水平

qRT-PCR和Western blot结果显示, 感染过表达HepaCAM腺病毒的PC3、LNCaP细胞, 无论在mRNA还是蛋白质水平, 其HepaCAM表达均高于空载组(Ad-GFP组)($P<0.001$, 图3), 而空白对照组与Ad-GFP组间的表达差异无统计学意义($P>0.05$, 图3)。结果表明, 感染过表达HepaCAM腺病毒成功上调PC3、LNCaP细胞中HepaCAM的表达水平, 为后续实验奠定基础。

2.4 感染过表达HepaCAM腺病毒的前列腺癌细胞的增殖水平下降

MTT实验结果显示, 与Ad-GFP组相比, 过表达

HepaCAM组PC3、LNCaP细胞增殖活性受到明显抑制($P<0.01$, 图4), 而空白对照组与Ad-GFP组相比差异无统计学意义($P>0.05$, 图4)。以上结果表明, 过表达HepaCAM可以抑制前列腺癌细胞的增殖。

2.5 过表达HepaCAM抑制前列腺癌细胞增殖与Gln代谢基因的表达

qRT-PCR和Western blot分别检测LNCaP和PC3细胞中GLS、SLC1A5、MYC、Cyclin D1、PCNA的mRNA和蛋白水平。结果显示, 无论是mRNA水平还是蛋白质水平, 过表达HepaCAM后, LNCaP和PC3细胞中的GLS、SLC1A5、MYC、Cyclin D1、PCNA表达均明显低于Ad-GFP组和空白对照组($P<0.01$, 图5A~图5C)。以上结果表明, 过表达HepaCAM可抑制细胞增殖并下调谷氨酰胺代谢相关分子的表达。

2.6 Gln缺乏抑制前列腺癌细胞的增殖

克隆形成实验结果显示, 在剥夺前列腺癌细胞PC3、LNCaP细胞培养基中的Gln后, 细胞的生长受到明显抑制($P<0.01$, 图6A和图6B)。

MTT实验结果显示, 在剥夺前列腺癌细胞PC3、LNCaP细胞培养基中的Gln后, 细胞的活性明显受到抑制($P<0.05$, 图6C和图6D)。

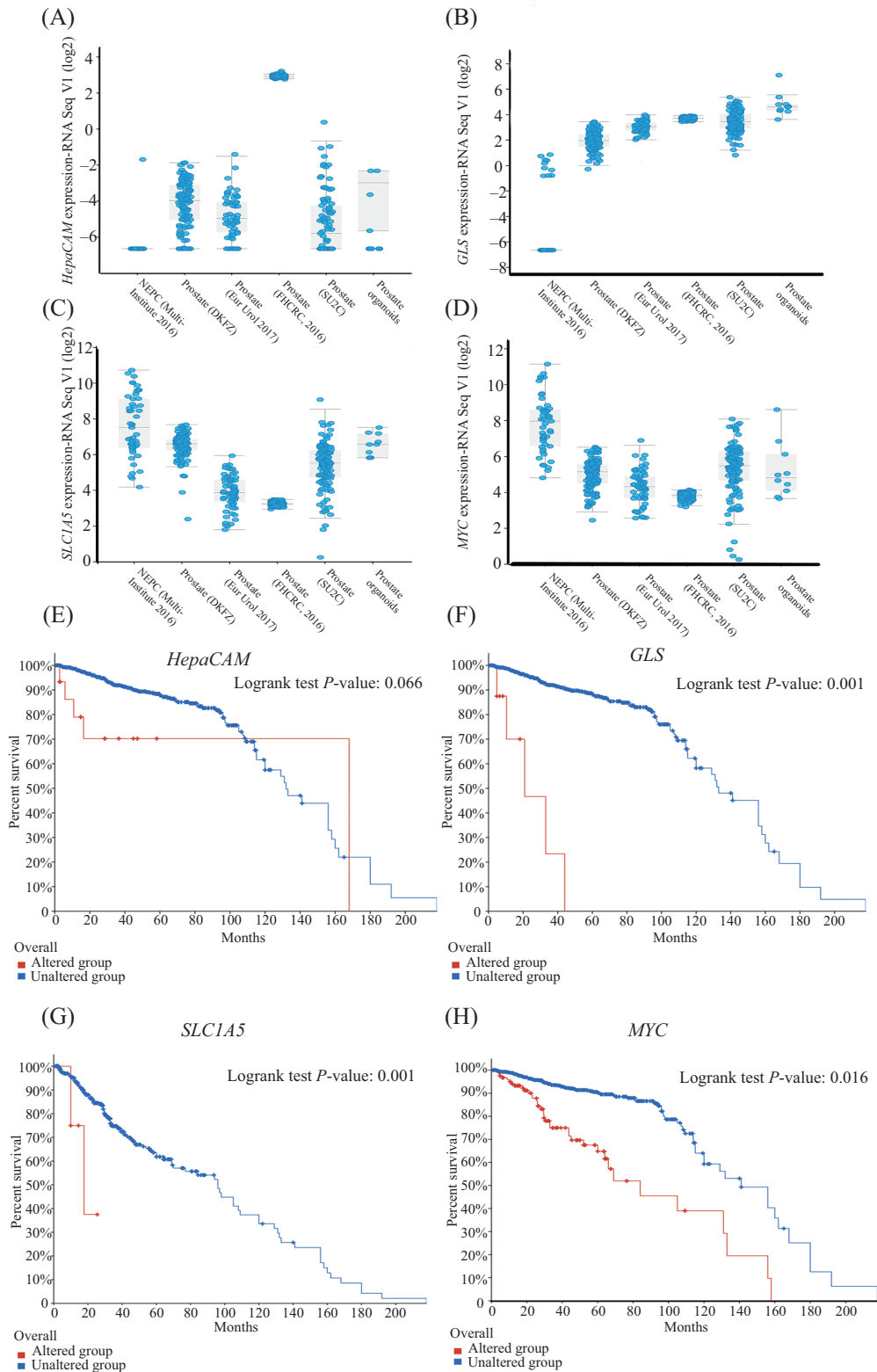
2.7 Gln剥夺影响前列腺癌细胞增殖代谢相关基因的表达

qRT-PCR和Western blot显示, 与正常上皮细胞RWPE-1相比, 前列腺癌细胞PC3、LNCaP细胞中谷氨酰胺代谢基因GLS、SLC1A5、MYC的mRNA及蛋白水平呈高表达($P<0.01$, 图7A~图7C), 此结果与生物信息数据库分析结果(图1)相符。

qRT-PCR和Western blot检测PC3、LNCaP细胞谷氨酰胺代谢相关分子GLS、MYC、SLC1A5及增殖相关分子Cyclin D1、PCNA在剥夺Gln后mRNA和蛋白水平的变化。结果发现剥夺Gln后, 两种细胞的GLS、SLC1A5、MYC均上调, 增殖相关分子Cyclin D1、PCNA表达均下调, 差异具有统计学意义($P<0.01$, 图7D~图7H)。以上结果显示, Gln剥夺可以抑制前列腺癌细胞增殖基因的表达, 同时肿瘤细胞的谷氨酰胺异常代谢也为其发生发展提供了一种应激性抵抗机制即谷氨酰胺的代谢重编程现象。

2.8 过表达HepaCAM联合Gln剥夺抑制前列腺癌细胞的增殖

为了检验过表达HepaCAM能否通过抑制剥夺

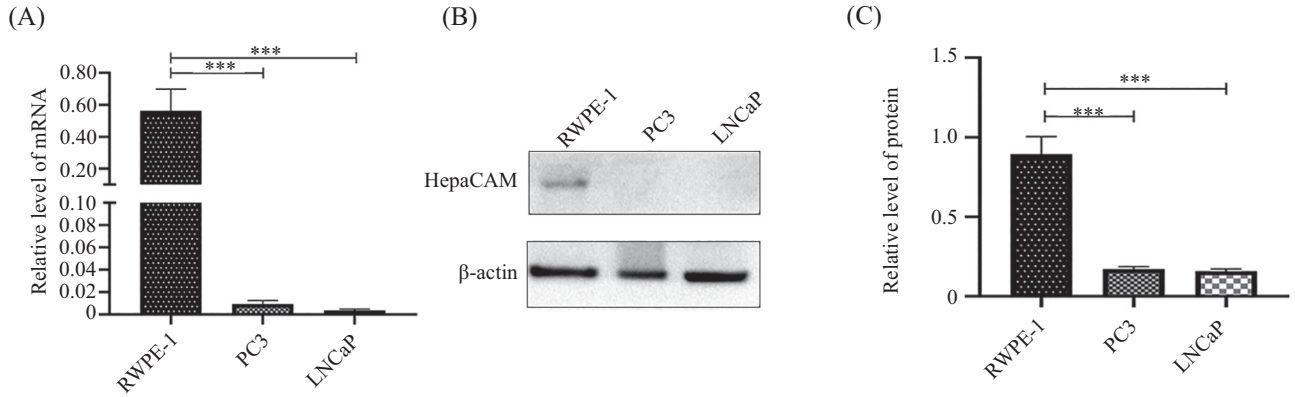


A~D: *HepaCAM*与*GLS*、*SLC1A5*、*MYC*在不同数据集中癌症样本与正常样本的表达对比, $P < 0.05$, 与正常样本比较; E~H: *HepaCAM*与*GLS*、*SLC1A5*、*MYC*变异与非变异样本生存分析, 分别为 $P > 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, 与未变异样本比较。

A~D: the expression of *HepaCAM*, *GLS*, *SLC1A5* and *MYC* in cancer and normal samples in different data sets, $P < 0.05$ compared with normal samples; E~H: survival analysis of *HepaCAM* and *GLS*, *SLC1A5*, *MYC* variant and non variant samples, $P > 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$ compared with non-variant samples.

图1 cBioPortal数据库对比*HepaCAM*与*GLS*、*SLC1A5*、*MYC*的表达差异及对应生存分析

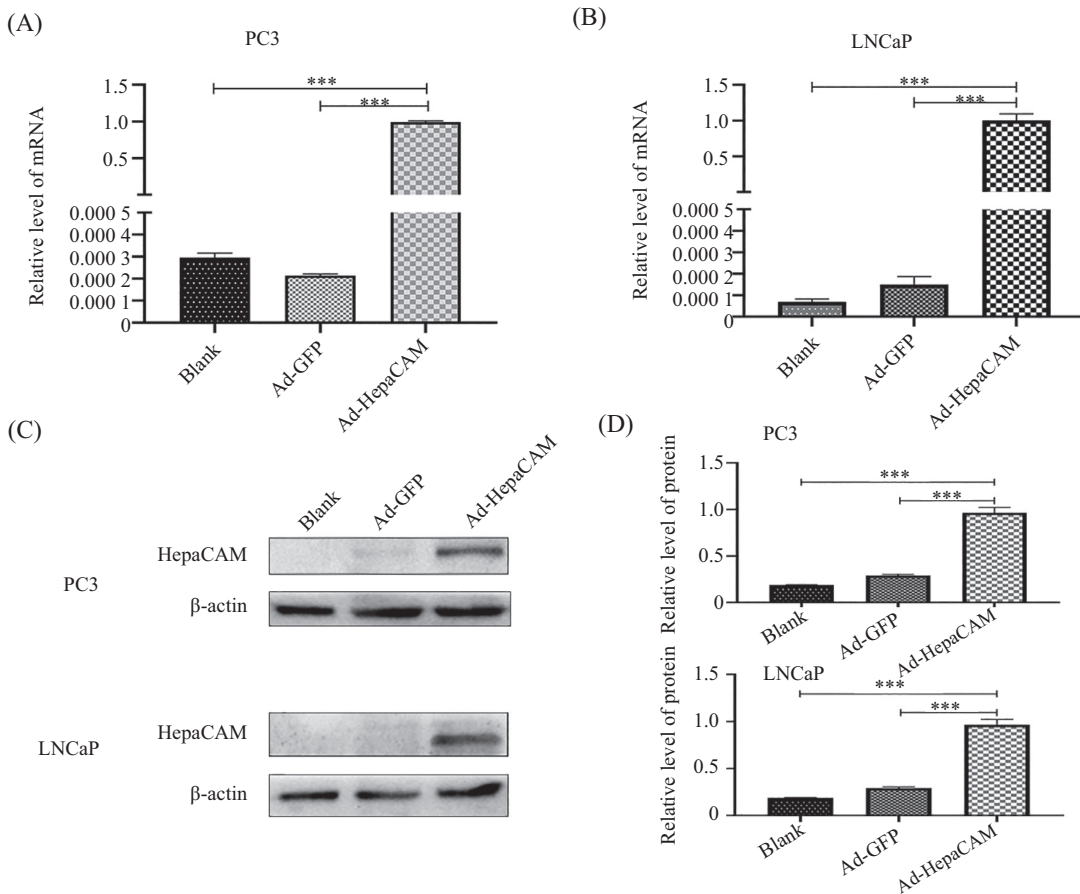
Fig.1 Comparison of expression differences and corresponding survival analysis between *HepaCAM* and *GLS*, *SLC1A5*, *MYC* by cBioPortal database



A: qRT-PCR检测RWPE-1、PC3、LNCaP细胞中HepaCAM mRNA的表达水平。B: Western blot检测RWPE-1、PC3、LNCaP细胞中HepaCAM的蛋白表达水平。C: 三种细胞蛋白表达灰度值相关水平。*** $P < 0.001$, 与RWPE-1组比较。

A: the mRNA expression of *HepaCAM* in RWPE-1, PC3 and LNCaP cells was detected by qRT-PCR. B: Western blot was used to detect the protein expression of HepaCAM in RWPE-1, PC3 and LNCaP cells. C: the gray level of three kinds of cell protein expression. *** $P < 0.001$ compared with RWPE-1 group.

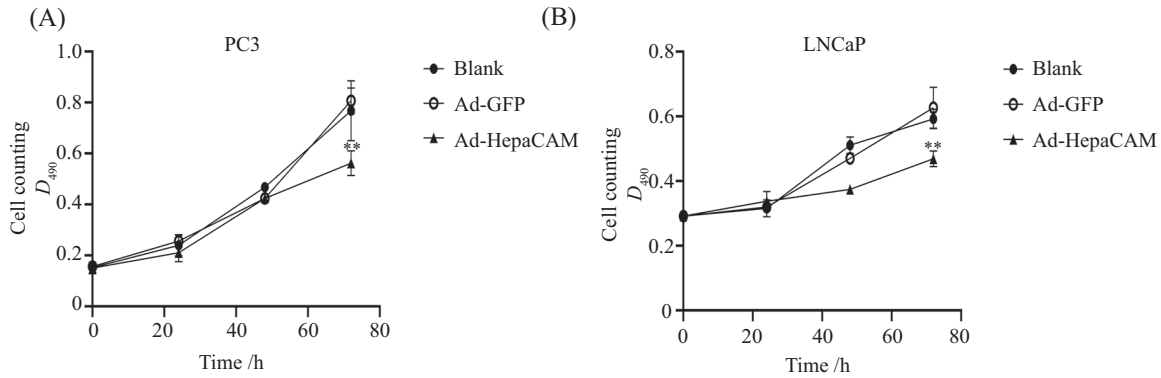
图2 RWPE-1细胞与PC3、LNCaP细胞中HepaCAM的表达
Fig.2 Expression of HepaCAM in RWPE-1 cells, PC3 and LNCaP cells



A、B: qRT-PCR分别检测感染过表达HepaCAM腺病毒后PC3、LNCaP细胞中HepaCAM mRNA的表达水平。C: Western blot分别检测感染过表达HepaCAM腺病毒后PC3、LNCaP细胞中HepaCAM的蛋白表达水平。D: PC3、LNCaP细胞蛋白表达灰度值相关水平。*** $P < 0.001$, 与Ad-GFP组比较。

A,B: qRT-PCR was used to detect the mRNA expression level of *HepaCAM* in PC3 and LNCaP cells after transfection of HepaCAM adenovirus. C: Western blot was used to detect the protein expression level of HepaCAM in PC3 and LNCaP cells after transfection of HepaCAM adenovirus. D: Gray level correlation of PC3, LNCaP cell protein expression. *** $P < 0.001$ compared with Ad-GFP group.

图3 腺病毒过表达HepaCAM的验证
Fig.3 Verification of adenovirus overexpression of HepaCAM



A, B: MTT法分别检测过表达HepaCAM后PC3、LNCaP细胞的增殖活性。 ** $P < 0.01$, 与空白组比较

A, B: MTT method was used to detect the proliferation activity of PC3 and LNCaP cells after HepaCAM overexpression. ** $P < 0.01$ compared with blank group.

图4 MTT法分别检测过表达HepaCAM后PC3、LNCaP细胞的增殖活性

Fig.4 MTT method was used to detect the proliferation activity of PC3 and LNCaP cells after the overexpression of HepaCAM

Gln后前列腺癌细胞产生的代谢重编程现象, 进而更显著地抑制其增殖, 过表达HepaCAM和剥夺Gln分别及联合作用于PC3、LNCaP细胞后, 克隆形成及MTT实验检测细胞的克隆形成率及增殖活性。结果显示, 过表达HepaCAM与Gln剥夺均可抑制细胞增殖, 两者联合作用效果更加明显(图8A), 差异具有统计学意义($P < 0.05$, 图8B~图8E)。

2.9 过表达HepaCAM联合Gln剥夺抑制前列腺癌细胞增殖代谢相关基因的表达

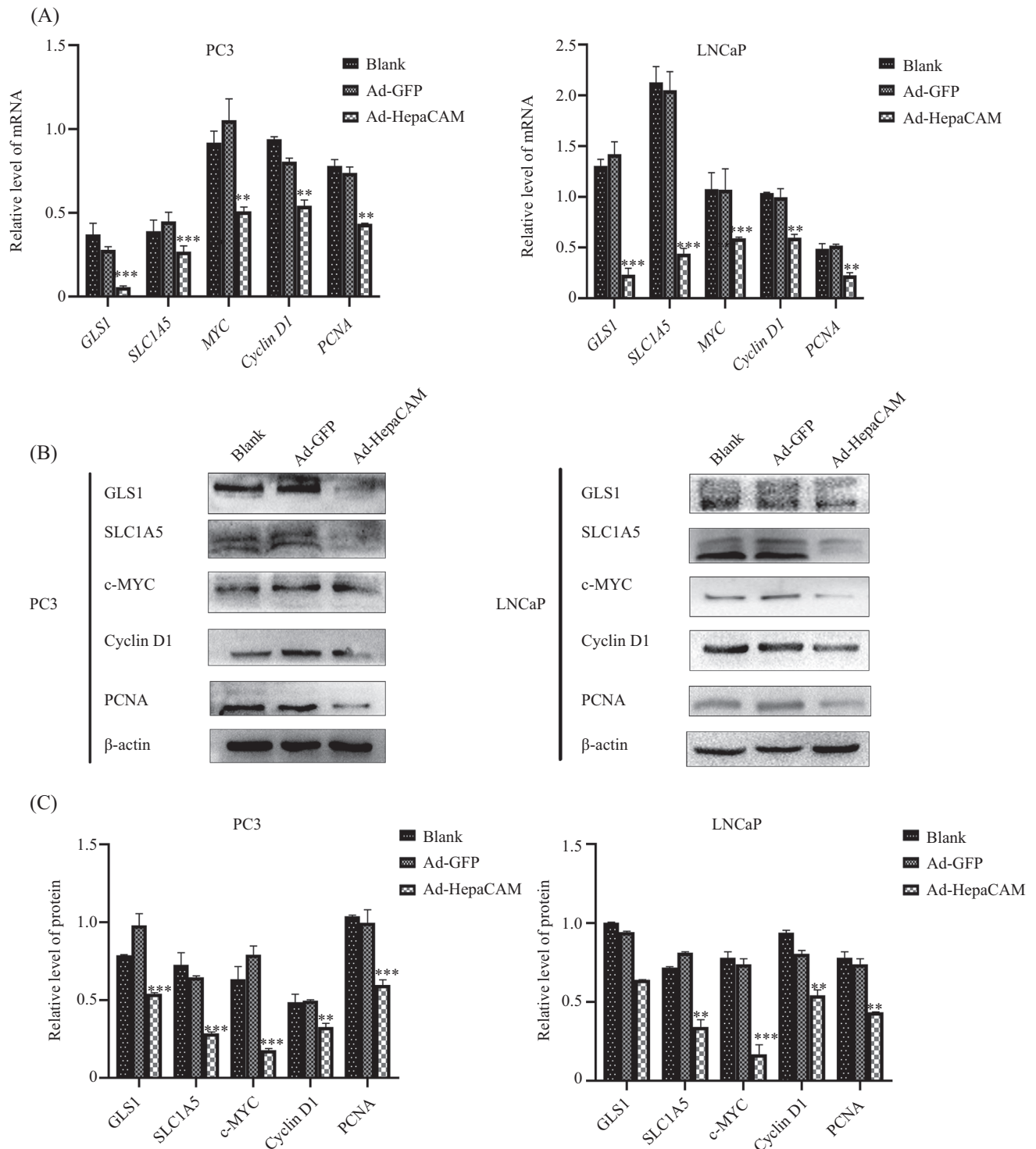
qRT-PCR及Western blot检测结果发现, 在PC3和LNCaP细胞中, 与单独剥夺Gln或过表达HepaCAM组相比, 联用组的增殖相关分子Cyclin D1、PCNA在mRNA和蛋白水平下调变化更为显著($P < 0.01$, 图9A~图9D)。同时, 剥夺Gln后再过表达HepaCAM可逆转谷氨酰胺代谢相关分子GLS、SLC1A5、MYC在mRNA和蛋白水平的应激抵抗式上调($P < 0.01$, 图9A~图9D)。以上结果显示, 过表达HepaCAM可以更显著地抑制谷氨酰胺剥夺后前列腺癌细胞的增殖, 并能抑制细胞的谷氨酰胺异常代谢(代谢重编程)现象。

3 讨论

根据近期研究, 前列腺癌是在世界上超过一半国家(185个国家中的105个)男性中最常被诊断出的癌症, 在中国也是继肺癌之后的第二普遍存在的癌症^[3]。据估计, 2018年全球有近130万前列腺癌新病例, 35.9万人相关死亡, 成为男性第二常见癌症和第五癌症死亡原因^[24]。

HepaCAM作为免疫蛋白超家族的成员之一, 不仅具有该家族经典的胞外、跨膜和胞质三个结构域, 而且其胞浆结构域因具有特殊糖基化结构和磷酸化位点^[25], 使HepaCAM可参与癌细胞的增殖、迁移、凋亡等过程^[26-27]。研究报道, HepaCAM与多种肿瘤包括乳腺癌、结直肠癌的发生发展有关^[17,28]。本课题组前期研究发现, 过表达HepaCAM基因可通过多种信号途径在肾癌、膀胱癌、前列腺癌等肿瘤发生发展过程中发挥重要抑制作用^[29-30]。

谷氨酰胺代谢是细胞三大代谢之一, 可以驱动TCA循环和ATP的产生, 主要途径是依靠膜上的特异性转运体SLC1A5(ASCT2)将其转运至细胞内后再由线粒体GLS转化为谷氨酸, 经过一系列转化成为作为TCA循环的中间产物 α -酮戊二酸, 间接为细胞糖酵解过程提供能量及还原性氢^[31]; 同时还可以为如核酸、谷胱甘肽等生命活动必需的物质提供氮碳源^[32]。研究发现, 肿瘤细胞中的谷氨酰胺不仅具有以上作用, 还具有非生物合成功能。据报道, 低浓度谷氨酰胺诱导的组蛋白高甲基化可导致黑色素瘤细胞产生去分化效应以及对RAF激酶蛋白抑制剂治疗的抵抗^[33]。肿瘤细胞谷氨酰胺代谢的一个重要特征即“谷氨酰胺代谢重编程”^[4,32], 大量研究显示, 谷氨酰胺在多种肿瘤中代谢异常^[8-10,34-35]。例如有研究发现, 在胰腺导管癌中谷氨酰胺代谢重编程是通过激活K-ras, 而上调或阻遏关键代谢酶的转录来实现的^[31]。而GLS1、SLC1A5也属于关键代谢酶或特异性转运体, 有研究报道, 代谢的主要转录调节子c-MYC(由MYC编码)可直接与ASCT2的上游启

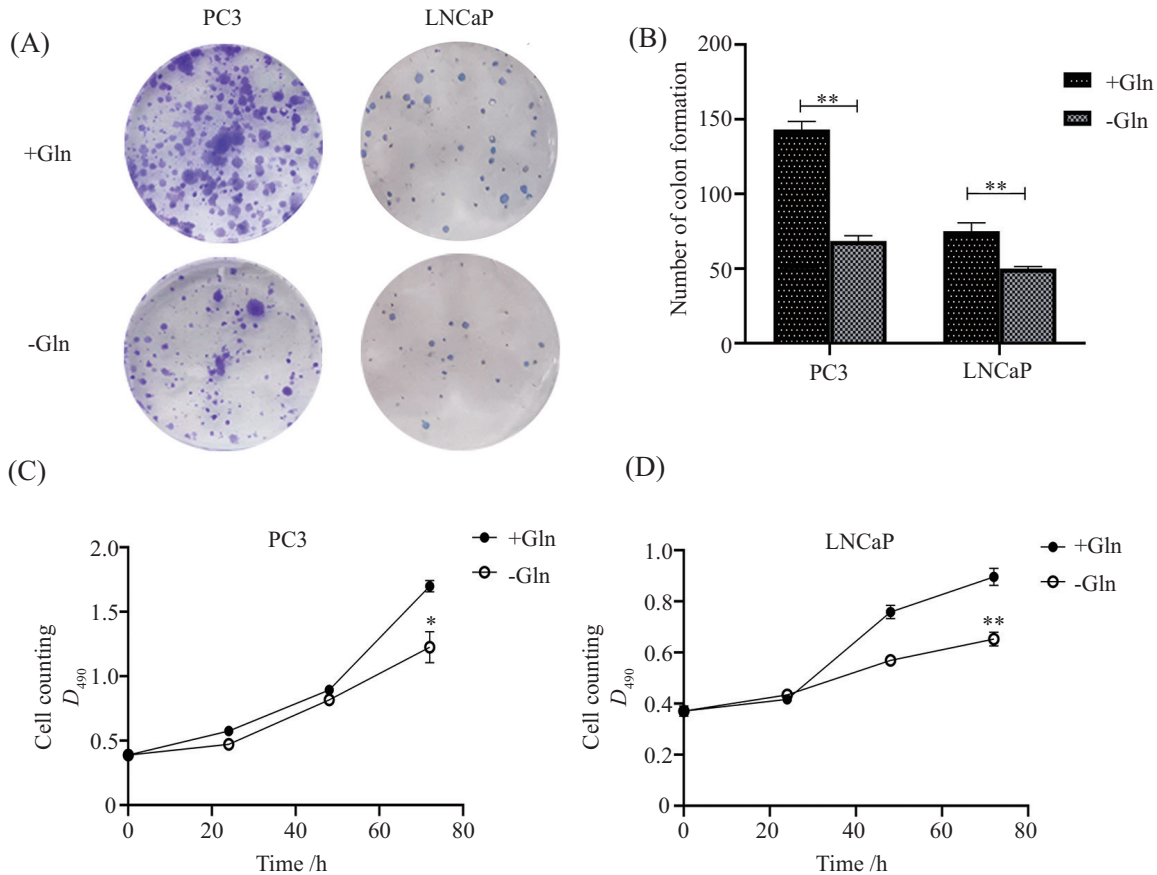


A: qRT-PCR分别检测PC3、LNCaP细胞中GLS、SLC1A5、MYC、Cyclin D1、PCNA mRNA的表达水平。B: Western blot检测PC3、LNCaP细胞中GLS1、SLC1A5、c-MYC、Cyclin D1、PCNA的蛋白表达水平。C: PC3、LNCaP细胞蛋白表达灰度值相关水平。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与Ad-GFP组比较。

A: the mRNA expression levels of GLS, SLC1A5, MYC, Cyclin D1, PCNA in the PC3, LNCaP cells were detected by qRT-PCR. B: the expression of GLS1, SLC1A5, c-MYC, Cyclin D1 and PCNA in the PC3, LNCaP cells was detected by Western blot. C: the gray level of two kinds of cell protein expression. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with Ad-GFP group.

图5 细胞中GLS、SLC1A5、MYC、Cyclin D1、PCNA mRNA与蛋白表达水平

Fig.5 The expression levels of GLS, SLC1A5, MYC, Cyclin D1, PCNA mRNAs and proteins in the cells



A、B: 克隆形成检测RWPE-1、PC3、LNCaP细胞剥夺Gln后的克隆集落数。C、D: MTT法检测剥夺Gln后PC3、LNCaP细胞的增殖活性。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, 与对照组(+Gln组)比较。

A,B: clone formation was used to detect the number of clone colonies of PC3 and LNCaP cells after Gln deprivation. C,D: MTT method was used to detect proliferation activity in PC3 and LNCaP cells after Gln peeling. $*P<0.05$, $**P<0.01$ compared with control group (+Gln group).

图6 克隆形成实验及MTT法分别检测PC3、LNCaP细胞剥夺Gln后的克隆集落数和增殖活性

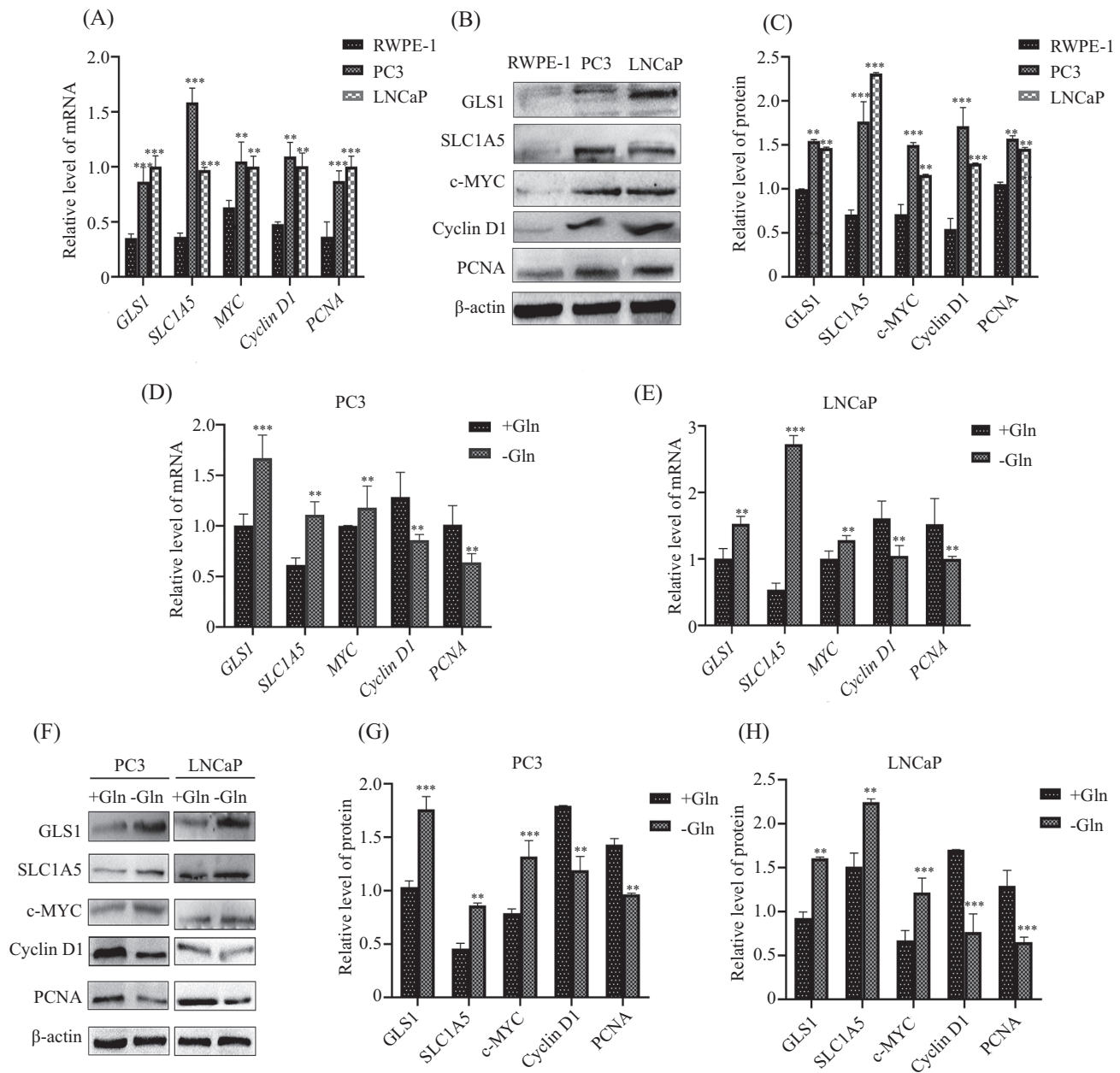
Fig.6 Clone formation and MTT assay separately were used to detect the number of clone colonies and proliferation activity after Gln deprivation for PC3 and LNCaP cells

动子(*SLC1A5*)结合以增加其表达^[36], 另外, c-MYC可以在转录水平上抑制miR-23a和miR-23b, 上调肾型谷氨酰胺酶(GLS1)的表达, 从而导致GLS1蛋白水平增高^[37]。在前列腺癌中, 雄激素受体(androgen receptor, AR)、c-MYC和mTOR共同起到增加谷氨酰胺转运蛋白表达的作用, 从而促进谷氨酰胺摄取和癌细胞生长^[38]。

在我们的研究中发现, 剥夺细胞生长发育所需的Gln后, 前列腺癌细胞生长受到抑制, 但并未完全停止增殖, 说明前列腺癌细胞中也存在谷氨酰胺代谢重编程现象, 并且其相关代谢分子MYC、GLS、SLC1A5的表达出现应激抵抗式增高, 也提示PCa可通过一种非传统的谷氨酰胺合成消耗路径, 来继续支持肿瘤的代谢活动。因而说明, 剥夺外来的Gln虽然能在一定程度上抑制肿瘤的增殖发展, 但无法彻

底阻挡其能量及其他代谢物质的自我合成。

因此, 过表达HepaCAM能否联合Gln剥夺实验抑制其癌细胞的增殖与异常代谢是值得探究的。本研究利用腺病毒感染构建过表达HepaCAM基因的前列腺癌细胞PC3、LNCaP, 进一步探究其影响机制。本研究在基因及蛋白质水平发现, 谷氨酰胺代谢相关基因GLS、SLC1A5、MYC表达均明显下调, 从而抑制肿瘤谷氨酰胺的转运与消耗。同时利用克隆形成实验及MTT实验发现, 前列腺癌细胞的增殖能力受到明显抑制。然后在过表达HepaCAM联用Gln剥夺的情况下发现, 前列腺癌细胞的增殖能力进一步受到抑制, 更重要的是其谷氨酰胺相关代谢基因的表达相较于单独剥夺Gln组出现了明显的下调。这一结论说明, HepaCAM可以一定程度地逆转谷氨酰胺代谢重编程, 使肿瘤细胞在没有摄入外源性谷氨

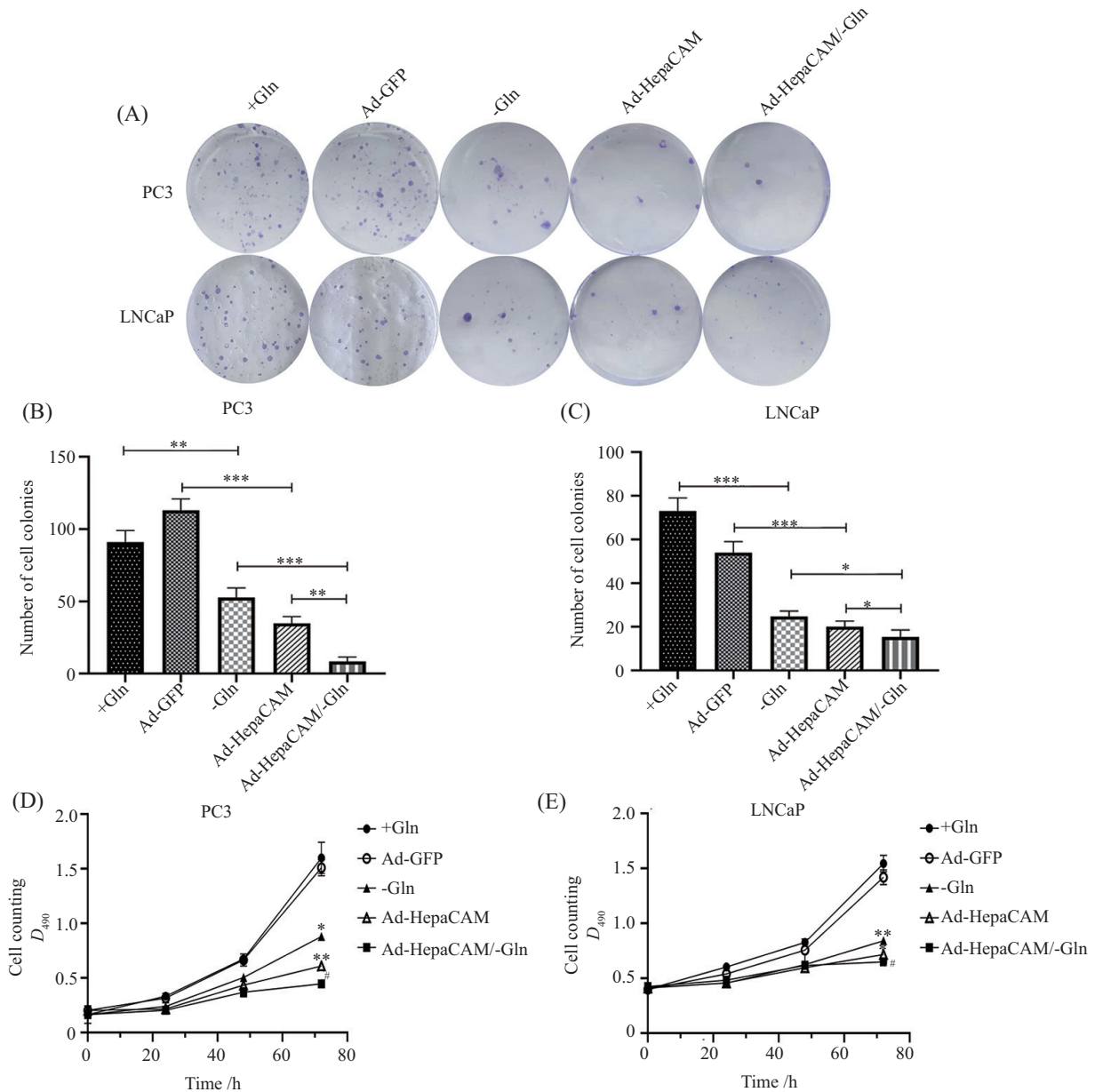


A: qRT-PCR检测 RWPE-1、PC3、LNCaP 细胞 *GLS*、*SLC1A5*、*MYC*、*Cyclin D1*、*PCNA* mRNA 的表达水平。B: Western blot 检测 RWPE-1、PC3、LNCaP 细胞中 *GLS1*、*SLC1A5*、*c-MYC*、*Cyclin D1*、*PCNA* 的蛋白表达水平。C: RWPE-1、PC3、LNCaP 细胞蛋白表达灰度值相关水平。D、E: qRT-PCR 分别检测剥夺 Gln 后 PC3、LNCaP 细胞中 *GLS*、*SLC1A5*、*MYC*、*Cyclin D1*、*PCNA* mRNA 表达水平。F: Western blot 分别检测剥夺 Gln 后 PC3、LNCaP 细胞中 *GLS1*、*SLC1A5*、*c-MYC*、*Cyclin D1*、*PCNA* 蛋白表达水平。G、H: 剥夺 Gln 后 PC3、LNCaP 细胞蛋白表达灰度值相关水平。** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，与 RWPE-1 组或与对照组(+Gln 组)比较。

A: the expression of *GLS*, *SLC1A5*, *MYC*, *Cyclin D1* and *PCNA* mRNA in RWPE-1, PC3 and LNCaP cells was detected by qRT-PCR. B: Western blot was used to detect the expression of *GLS1*, *SLC1A5*, *c-MYC*, *Cyclin D1* and *PCNA* in RWPE-1, PC3 and LNCaP cells. C: the gray level of protein expression in RWPE-1, PC3 and LNCaP cells. D,E: qRT-PCR was used to detect *GLS*, *SLC1A5*, *MYC*, *Cyclin D1* and *PCNA* mRNA levels in PC3 and LNCaP cells after Gln deprivation. F: Western blot was used to detect the expression of *GLS1*, *SLC1A5*, *c-MYC*, *Cyclin D1* and *PCNA* in PC3 and LNCaP cells after Gln deprivation. G,H: gray level of protein expression in PC3 and LNCaP cells after Gln deprivation. ** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ compared with RWPE-1 group or control group (+Gln group).

图7 RWPE-1与PC3、LNCaP细胞剥夺Gln后的GLS、SLC1A5、MYC、Cyclin D1、PCNA mRNA及蛋白表达水平

Fig.7 Expression of *GLS*, *SLC1A5*, *MYC*, *Cyclin D1*, *PCNA* mRNA and protein after Gln deprivation in RWPE-1, PC3 and LNCaP cells



A~C: 克隆形成实验分别检测PC3、LNCaP细胞过表达HepaCAM与剥夺Gln单独及联用后的克隆集落数。D、E: MTT法分别检测PC3、LNCaP细胞过表达HepaCAM与剥夺Gln单独及联用后的克隆集落数和增殖活性。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与+Gln组和Ad-GFP组比较, # $P < 0.05$, 与Ad-HepaCAM/-Gln组比较。

A~C: clone forming assay was used to detect the number of clone colonies of PC3 and LNCaP cells after overexpression of HepaCAM and Gln deprivation alone or in combination. D,E: MTT method was used to detect the number of clone colonies and proliferation activity of PC3 and LNCaP cells after overexpression of HepaCAM and Gln deprivation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with +Gln group or Ad-GFP group; # $P < 0.05$ compared with Ad-HepaCAM/-Gln group.

图8 克隆形成实验及MTT法分别检测PC3、LNCaP细胞过表达HepaCAM与剥夺Gln单独及联用后的克隆集落数和增殖活性

Fig.8 Colony forming assay and MTT assay were used to detect the colony numbers and proliferation activity of PC3 and LNCaP cells after the overexpression of HepaCAM and Gln deprivation alone or in combination

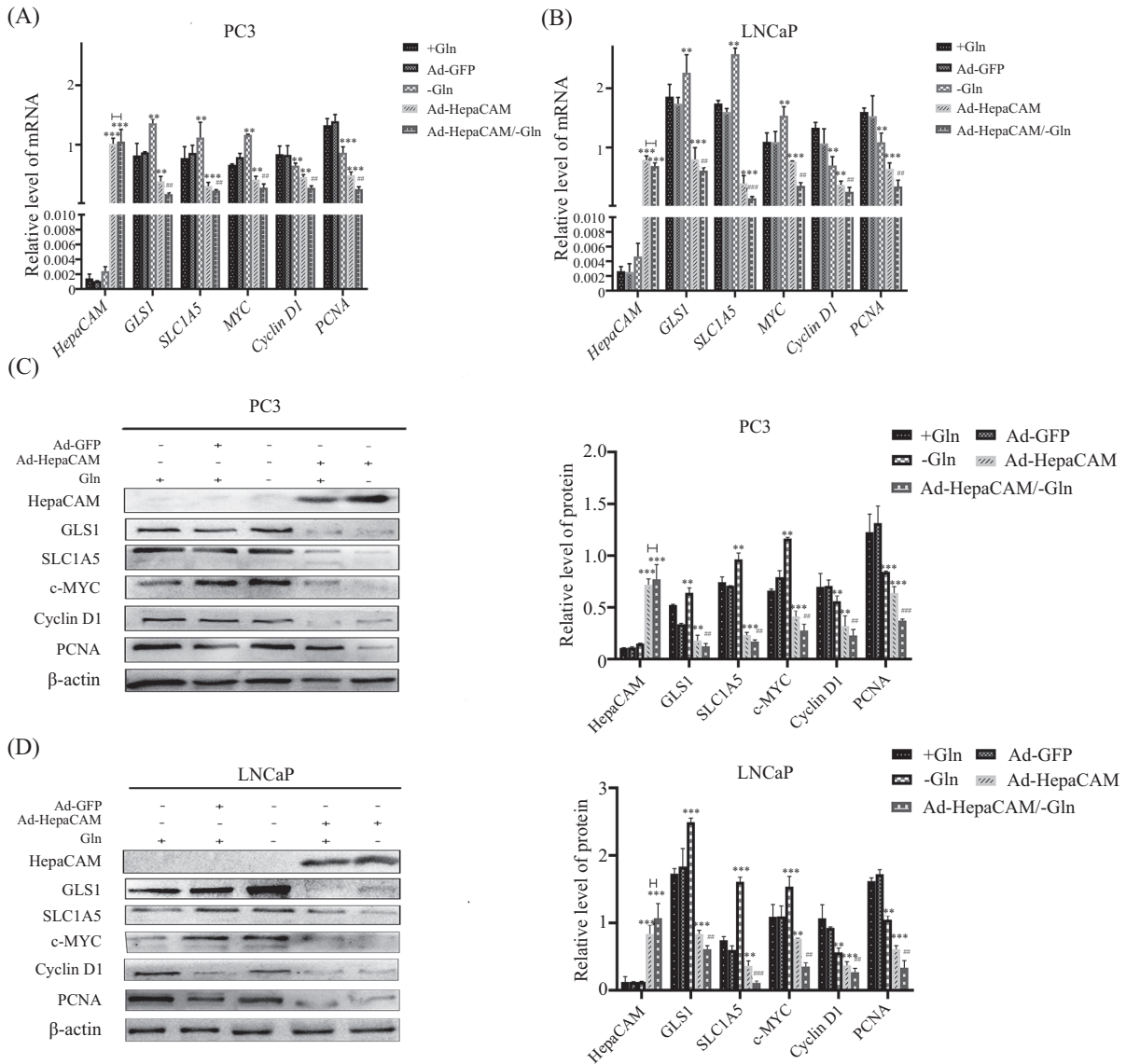
酰胺后其增殖代谢能力显著减弱。

综上所述, 我们的研究发现, 过表达HepaCAM与剥夺Gln均可有效抑制PCa细胞的代谢与增殖, 而且两者联合具有协同作用。HepaCAM可能作为肿瘤代谢治疗的一个新的靶点, 同时, 本研究对Hepa-

CAM影响PCa谷氨酰胺代谢的机制进行了初步的探索, 这为后续研究和临床治疗提供了一个新的思路。

参考文献 (References)

- [1] INAMURA K. Prostatic cancers: understanding their molecular



A, B: qRT-PCR检测PC3、LNCaP细胞过表达HepaCAM与剥夺Gln单独及联用后GLS、SLC1A5、MYC、Cyclin D1、PCNA mRNA的表达水平。C: Western blot检测PC3细胞过表达HepaCAM与剥夺Gln单独及联用后GLS1、SLC1A5、c-MYC、Cyclin D1、PCNA 蛋白表达及蛋白表达灰度值相关水平。D: Western blot检测LNCaP细胞过表达HepaCAM与剥夺Gln单独及联用后GLS1、SLC1A5、c-MYC、Cyclin D1、PCNA 蛋白表达及蛋白表达灰度值相关水平。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与+Gln组或Ad-GFP组比较; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, 与Ad-HepaCAM/-Gln组比较。

A,B: qRT-PCR was used to detect the expression of *GLS*, *SLC1A5*, *MYC*, *Cyclin D1* and *PCNA* mRNA in PC3 and LNCaP cells. C: Western blot was used to detect the levels of GLS1, SLC1A5, c-MYC, Cyclin D1, PCNA and protein expression gray level in PC3 cells. D: Western blot was used to detect the levels of GLS1, SLC1A5, c-MYC, Cyclin D1, PCNA and protein expression gray level in LNCaP cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with +Gln group or Ad-GFP group; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ compared with Ad-HepaCAM/-Gln group.

图9 PC3、LNCaP细胞过表达HepaCAM与剥夺Gln单独及联用后GLS、SLC1A5、MYC、Cyclin D1、PCNA mRNA及蛋白表达水平

Fig.9 Expression in mRNA and protein levels of GLS, SLC1A5, MYC, Cyclin D1 and PCNA in PC3 and LNCaP cells after the overexpression of HepaCAM and Gln deprivation alone or in combination

pathology and the 2016 WHO classification [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(18): 14723-37.

[2] FRIEDENREICH C M, WANG Q, NEILSON H, et al. Physical activity and survival after prostate cancer [J]. *Eur Urol*, 2016, 70(4): 576-85.

[3] BANERJEE S, ZARE R N, TIBSHIRANI R J, et al. Diagnosis of prostate cancer by desorption electrospray ionization mass spectrometric imaging of small metabolites and lipids [J]. *PNAS*, 2017, 114(13): 3334-9.

[4] NIKLISON C M V, ERNGREN I, ENGSKOG M, et al. Tap73 is a marker of glutamine addiction in medulloblastoma [J]. *Genes Dev*, 2017, 31(17): 1738-53.

[5] MAYERS J R, VANDER H M G. Famine versus feast: understanding the metabolism of tumors *in vivo* [J]. *Trends Biochem*, 2015, 40(3): 130-40.

- [6] WANG C, WU J, WANG Z, et al. Glutamine addiction activates polyglutamine-based nanocarriers delivering therapeutic siRNAs to orthotopic lung tumor mediated by glutamine transporter SLC1A5 [J]. *Biomaterials*, 2018, 183: 77-92.
- [7] HASSANEIN M, HOEKSEMA M D, SHIOTA M, et al. SLC1A5 mediates glutamine transport required for lung cancer cell growth and survival [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(3): 560-70.
- [8] DAI W, XU L, YU X, et al. OGDHL silencing promotes hepatocellular carcinoma by reprogramming glutamine metabolism [J]. *Hepatology*, 2020, 72(5): 909-23.
- [9] YOO H C, PARK S J, NAM M, et al. A variant of SLC1A5 is a mitochondrial glutamine transporter for metabolic reprogramming in cancer cells [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(2): 267-83.e12.
- [10] LIU M, WANG Y, RUAN Y, et al. PKM2 promotes reductive glutamine metabolism [J]. *Cancer Biol Med*, 2018, 15(4): 389-99.
- [11] 余朝文. 基于质谱技术的临床重要疾病代谢相关标志物的鉴定及应用研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2018.
- [12] RUBIN H. Deprivation of glutamine in cell culture reveals its potential for treating cancer [J]. *PNAS*, 2019, 116(14): 6964-8.
- [13] NISHI K, SUZUKI M, YAMAMOTO N, et al. Glutamine deprivation enhances acetyl-CoA carboxylase inhibitor-induced death of human pancreatic cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(12): 6683-9.
- [14] WANG L, BI R, LI L, et al. Functional characteristics of autophagy in pancreatic cancer induced by glutamate metabolism in pancreatic stellate cells [J]. *Int Med Res*, 2020, doi: 10.1177/0300060519865368.
- [15] LOWMAN X H, HANSE E A, YANG Y, et al. p53 promotes cancer cell adaptation to glutamine deprivation by upregulating SLC7A3 to increase arginine uptake [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(11): 3051-60.e4.
- [16] CHUNG M M, HOON L L, SHEN S. Cloning and characterization of HepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2005, 42(6): 833-41.
- [17] MOH M C, ZHANG C, LUO C, et al. Structural and functional analyses of a novel ig-like cell adhesion molecule, HepaCAM, in the human breast carcinoma MCF7 cells [J]. *Biol Chem*, 2005, 280(29): 27366-74.
- [18] SONG X, WANG Y, DU H, et al. Overexpression of HepaCAM inhibits cell viability and motility through suppressing nucleus translocation of androgen receptor and ERK signaling in prostate cancer [J]. *Prostate*, 2014, 74(10): 1023-33.
- [19] TANG M, ZHAO Y, LIU N, et al. Overexpression of HepaCAM inhibits bladder cancer cell proliferation and viability through the AKT/FoxO pathway [J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(5): 793-805.
- [20] WANG X, CHEN E, YANG X, et al. 5-azacytidine inhibits the proliferation of bladder cancer cells via reversal of the aberrant hypermethylation of the HepaCAM gene [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3): 1375-84.
- [21] FAN Y, OU L, FAN J, et al. HepaCAM regulates Warburg effect of renal cell carcinoma via HIF-1 α /NF- κ B signaling pathway [J]. *Urology*, 2019, 127: 61-7.
- [22] QUAN Z, HE Y, LUO C, et al. Interleukin 6 induces cell proliferation of clear cell renal cell carcinoma by suppressing HepaCAM via the STAT3-dependent up-regulation of DNMT1 or DNMT3b [J]. *Cell Signal*, 2017, 32: 48-58.
- [23] DENG Q, LUO L, QUAN Z, et al. HepaCAM inhibits cell proliferation and invasion in prostate cancer by suppressing nuclear translocation of the androgen receptor via its cytoplasmic domain [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 2115-24.
- [24] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [25] MOH M C, ZHANG T, LEE L H, et al. Expression of HepaCAM is downregulated in cancers and induces senescence-like growth arrest via a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(12): 2298-305.
- [26] XU B, HE Y, WU X, et al. Exploration of the correlations between interferon- γ in patient serum and HepaCAM in bladder transitional cell carcinoma, and the interferon- γ mechanism inhibiting BIU-87 proliferation [J]. *Urology*, 2012, 188(4): 1346-53.
- [27] XUN C, LUO C, WU X, et al. Expression of HepaCAM and its effect on proliferation of tumor cells in renal cell carcinoma [J]. *Urology*, 2010, 75(4): 828-34.
- [28] GENG H T, CAO R J, CHENG L, et al. Overexpression of Hepatocyte cell adhesion molecule (HepaCAM) inhibits the proliferation, migration, and invasion in colorectal cancer cells [J]. *Oncol Res*, 2017, 25(7): 1039-46.
- [29] WANG Q, LUO C, WU X, et al. HepaCAM and p-mTOR closely correlate in bladder transitional cell carcinoma and HepaCAM expression inhibits proliferation via an AMPK/mTOR dependent pathway in human bladder cancer cells [J]. *Urology*, 2013, 190(5): 1912-8.
- [30] WANG X, CHEN E, TANG M, et al. The SMAD2/3 pathway is involved in hepaCAM-induced apoptosis by inhibiting the nuclear translocation of SMAD2/3 in bladder cancer cells [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(8): 10731-43.
- [31] SON J, LYSSIOTIS C A, YING H, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway [J]. *Nature*, 2013, 496(7433): 101-5.
- [32] DEBERARDINIS R J, MANCUSO A, DAIKHIN E, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis [J]. *PNAS*, 2007, 104(49): 19345-50.
- [33] PAN M, REID M A, LOWMAN X H, et al. Regional glutamine deficiency in tumours promotes dedifferentiation through inhibition of histone demethylation [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(10): 1090-101.
- [34] BIANCUR D E, PAULO J A, MAŁACHOWSKA B, et al. Compensatory metabolic networks in pancreatic cancers upon perturbation of glutamine metabolism [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15965.
- [35] VANHOVE K, DERVEAUX E, GRAULUS G, et al. Glutamine addiction and therapeutic strategies in lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, doi: 10.3390/ijms20020252.
- [36] WISE D R, DEBERARDINIS R J, MANCUSO A, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction [J]. *PNAS*, 2008, 105(48): 18782-7.
- [37] GAO P, TCHERNYSHYOV I, CHANG T C, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism [J]. *Nature*, 2009, 458(7239): 762-5.
- [38] WHITE M A, LIN C, RAJAPAKSHE K, et al. Glutamine Transporters are targets of multiple oncogenic signaling pathways in prostate cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2017, 15(8): 1017-28.