

雄激素非依赖性前列腺癌细胞中差异 甲基化基因的初步筛选

秦婷婷¹ 许刚¹ 季丽丽¹ 陶志华^{1,2*}

(¹温州医学院温州附属第一医院实验诊断中心, 温州 325000;

²浙江大学医学院附属第二医院临床检验中心, 杭州 310009)

摘要 应用全基因组DNA甲基化芯片(Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip)杂交技术以及转录组RNA测序技术, 检测了雄激素依赖性前列腺癌(androgen-dependent prostate cancer, ADPC)细胞株LNCaP和雄激素非依赖性前列腺癌(androgen-independent prostate cancer, AIPC)细胞株LNCaP-AI(androgen independent)中的差异甲基化基因。发现与LNCaP细胞株相比, LNCaP-AI细胞株有990个CpG位点表现为高甲基化, 涉及855个基因; 2 305个CpG位点表现为低甲基化, 涉及1 970个基因。结合转录组mRNA表达结果, 筛选出6个超甲基化基因: *FAM111B*、*RAB36*、*PCDH7*、*COL6A2*、*IGF1R*、*GULP1*; 8个低甲基化基因: *EPHA3*、*TM4SF1*、*IGFBP5*、*FAM105A*、*RASD1*、*ITPR2*、*CYP27B1*、*UBE2E3*。这些差异甲基化基因涉及钙离子信号通路、Wnt信号通路等多个信号通路, 参与了细胞的基因表达、信号传导、细胞通讯、细胞运动、细胞黏附以及血管生成等功能, 为探讨这些差异甲基化基因在前列腺癌雄激素非依赖性转化过程中发挥的作用奠定了基础。

关键词 雄激素非依赖性前列腺癌; DNA甲基化; DNA甲基化芯片; 转录组测序

Preliminary Screening of Differentially Methylated Genes in Androgen-independent Prostate Cancer Cell Line

Qin Tingting¹, Xu Gang¹, Ji Lili¹, Tao Zhihua^{1,2*}

(¹Department of Clinical Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China;

²Department of Laboratory Medicine Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China)

Abstract An integrated analysis of Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip platform and transcriptome RNA sequencing technology was performed to screen out the differential methylated genes between androgen-dependent prostate cancer cell lines and androgen-independent prostate cancer cell lines. Compared with LNCaP, 990 hypermethylated CpG sites (involved 855 genes) and 2 305 hypomethylated CpG sites (involved 1 970 genes) were identified in LNCaP-AI. Combined with transcriptome sequencing data, some hypermethylated genes (including *FAM111B*, *RAB36*, *PCDH7*, *COL6A2*, *IGF1R* and *GULP1*) and hypomethylated genes (including *EPHA3*, *TM4SF1*, *IGFBP5*, *FAM105A*, *RASD1*, *ITPR2*, *CYP27B1* and *UBE2E3*) were screened out. These differential methylated genes were thought to be involved in some signaling pathways, such as the calcium signaling pathway and the Wnt signaling pathway, participating in cell biological process and its regulation, gene expression,

收稿日期: 2012-08-05 接受日期: 2012-10-24

浙江省自然科学基金(批准号: Y2100902)和温州市科技计划项目(批准号: Y20100011)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-87783752, E-mail: zrtzh@zju.edu.cn

Received: August 5, 2012 Accepted: October 24, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. Y2100902) and Wenzhou City Science and Technology Project (Grant No. Y20100011)

*Corresponding author. Tel: +86-571-87783752, E-mail: zrtzh@zju.edu.cn

signal transduction, cell communication, cell movement, cell adhesion, angiogenesis and so on. Our data provide a foundation for future study on the differential methylated genes in prostate cancer androgen-independent conversion process.

Key words androgen-independent prostate cancer; DNA methylation; DNA methylation chip; transcriptome sequencing

前列腺癌是老年男性最常见的恶性肿瘤之一, 全球范围内, 其发病率在男性所有恶性肿瘤中位居第二^[1]。在美国, 前列腺癌的发病率已经超过肺癌, 成为危害男性健康的第一位肿瘤。据美国癌症协会估计, 2012年美国大约有241 740例新发前列腺癌病例^[2]。随着生活方式的改变、平均寿命的延长、医疗保健和诊断水平的提高, 我国前列腺癌总体发病率呈现显著增长的趋势^[3]。雄激素去势治疗是除手术之外的治疗前列腺癌的有效方法之一, 但是经过18~24个月的缓解期以后, 雄激素依赖性前列腺癌极易转变为雄激素非依赖性前列腺癌, 转变以后的治疗更加棘手, 预后极差, 病人生活质量低下。DNA甲基化是最常见的一种表观遗传学修饰方式, 与肿瘤的发生发展密切相关。抑癌基因的异常甲基化引起的表达抑制, 可导致肿瘤细胞的增殖失控和侵袭转移, 并参与肿瘤组织的血管生成过程^[4]。在许多肿瘤的研究中都发现了基因组整体DNA低甲基化所导致的染色体不稳定^[5]。越来越多的研究表明, 无论是异常的DNA高甲基化还是低甲基化都会导致基因的表达异常, 从而促进癌症的发生。国外研究发现, 前列腺癌的恶化程度与DNA甲基化密切相关^[6]。本文中雄激素非依赖性的前列腺癌细胞株LNCaP-AI是经长期雄激素剥夺培养从雄激素依赖性前列腺癌细胞株LNCaP诱导分化而来的^[7]。本研究采用Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip芯片和转录组RNA高通量测序技术检测LNCaP细胞和LNCaP-AI细胞的差异甲基化基因, 探讨雄激素非依赖性前列腺癌的可能发病机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

透析处理的胎牛血清、普通胎牛血清(SAFC公司); F12培养基、总RNA提取试剂Trizol Reagent、DMEM/F12培养基(Invitrogen公司); DNA提取试剂盒(QIAGEN公司); RevertAidTMCdNA第一链合成试剂盒(MBI Fermentas公司); CO₂培养箱(Forma公

司); 倒置显微镜[尼康映像仪器销售(中国)有限公司]。

1.2 细胞培养

雄激素依赖性前列腺癌LNCaP细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院细胞库。雄激素非依赖前列腺癌LNCaP-AI细胞来自本实验室前期已建立的细胞株^[7]。将雄激素非依赖的LNCaP-AI细胞株设为实验组, 雄激素敏感的LNCaP细胞株设为对照组。处于对数生长期的两组细胞, 经0.05%胰酶消化后, 吹打成单个细胞悬液, 将单细胞悬液以1:2或1:3的比例分至新的培养瓶中, 并添加含10%(体积分数)胎牛血清的培养液至5 mL左右, 在5% CO₂、37 °C培养箱中培养, 细胞传代后第3天换液, 第6天传代。

1.3 基因组DNA和RNA提取

分别收集两组对数期的细胞, 约(1~2)×10⁶/mL, 使用QIAamp DNA Mini Kit DNA提取试剂盒(QIAGEN公司)提取两组细胞的全基因组DNA, 严格按照试剂盒说明书操作。紫外分光光度计检测两组细胞DNA质量, *D*值在1.8~1.9之间为合格, -20 °C保存备用。Trizol法分别提取两组细胞的总RNA, 逆转录成cDNA后-20 °C保存备用。

1.4 DNA甲基化芯片检测

使用Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip芯片进行全基因组DNA杂交实验, 可检测到>27 578个CpG位点, CpG信息涵盖14 475个RefSeq基因, 144个已经确认的癌症基因的甲基化位点。分别提取两个细胞株的基因组DNA, 经亚硫酸盐修饰后进行DNA杂交, 用芯片中121个探针做质控, 包含不依赖于样品的染色(staining)、延伸(extension)、靶点移除(target removal)和杂交(hybridization)控制, 以及依赖样品质量的严格质控、非特异性结合、阴性对照和非多态性对照。通过芯片扫描软件BeadArray Reader(Illumina)对芯片灰度进行扫描, 对扫描结果使用GenomestudioV2011(Illumina)分析, 可以得到芯片上每个甲基化位点Signal A和Signal B的原始

信号值、甲基化位点的水平值(Avg_Beta)、检测 P 值等。最后根据这些参数值进行后续的数值分析,筛选出差异甲基化基因。

1.5 转录组RNA测序检测

分别提取实验组和对照组细胞总RNA,使用Illumina/Solexa基因组测序平台,在单核苷酸水平对两组细胞的整体转录活动进行精确检测。对两个细胞系各进行一次mRNA样本测序,采用随机采样模型通过假设检验来分析差异表达。如果一个读段来自于某个基因,称事件A发生。对于一次RNA-seq实验,事件A发生的概率可以用这个基因上的读段数 n 除以所有基因上的读段总数 N 来估计,即RPM(reads per million reads)。事件A发生的概率反应了基因的表达水平。判断某个基因在两个样本中的表达水平是否一致,就可以通过检验事件A在两种条件下发生的概率是否一致来实现^[8-9]。本实验用RPKM(reads per kilo bases per million reads)作为统计量来进行假设检验分析,由于是比较同一个基因在两个样本间的差异,基因长度的影响被抵消,用RPKM和用RPM得到的结果相似^[10]。

1.6 生物信息学分析

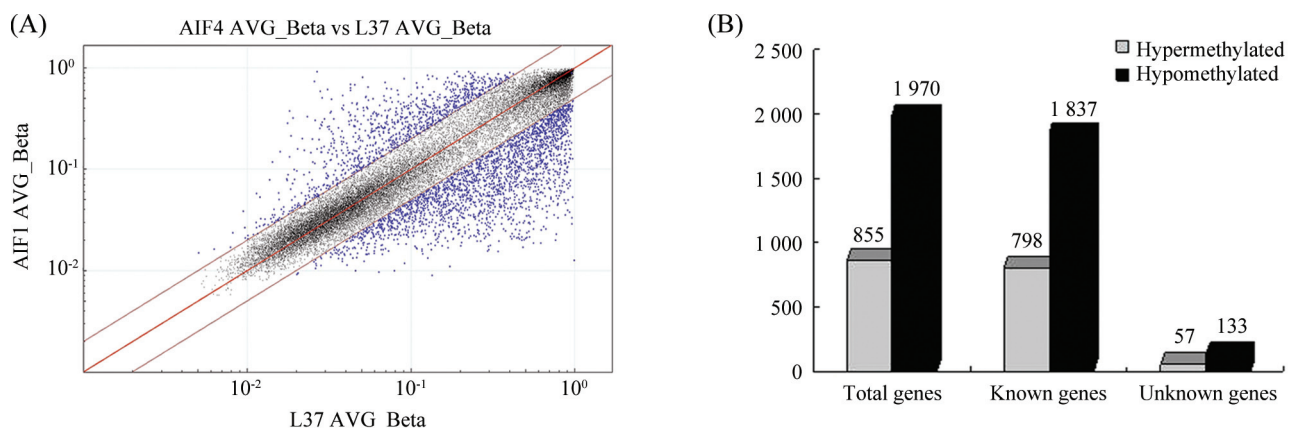
用GenBank注释基因,并将筛选出的差异甲基化基因分别上传至DAVID数据库(<http://david.abcc.ncbicrf.gov/home.jsp>)作基因类型(Gene ontology, GO)分类,KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Geno-

mes)数据库进行信号转导通路的分类,以及MILANO网站(<http://milano.md.huji.ac.il>)完成文献检索。

2 结果

2.1 雄激素非依赖性前列腺癌细胞LNCaP-AI特异性基因组DNA的甲基化DNA芯片筛查结果

本研究采用Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip平台技术,以LNCaP细胞株为实验对照组,LNCaP-AI细胞株为实验组,提取细胞全基因组DNA进行甲基化基因芯片检测,实验组与对照组比较使用ratio方法;实验组与对照组中任何一组中Detection P value <0.05 为有效甲基化点,且ratio值符合一定范围即为差异甲基化点[ratio(实验组/对照组)=实验组的均值/对照组的均值]。在各组对比中选择值ratio为2/0.5(图1A)。结果发现:(1)基因组DNA非甲基化的CpG位点数量远多于发生甲基化的CpG位点,全基因组广泛低甲基化和启动子区高甲基化是甲基化修饰的基本表现;(2)将DNA甲基化芯片结果中差异表达的基因挑选出来,以GO和KEGG数据库进行分析。与对照组LNCaP细胞株相比,实验组LNCaP-AI细胞株有990个CpG位点表现为高甲基化,涉及855个基因,其中57个为功能未知基因,有498个CpG位点位于CpG岛;2 305个CpG位点表现为低甲基化,涉及1 970个基因,其中133个为功能未知基因,有1 857个CpG位点位于CpG岛(图1B)。



A: 筛选出的差异甲基化点,对数化的散点图中的点不包含表达为负值的点,红色斜线分割,上面为fold >2 的点,下面为fold <0.5 的点,图中蓝色表示按照上述ratio标准选出的点; B: 筛选出的差异甲基化基因数目。

A: methylated genes screened by methylation microarray on the logarithmic scatterplot do not contain negative point, with the fold >2 points above the red slash and the fold <0.5 points below, blue points selected in accordance with the above ratio standards; B: the number of methylated genes screened by methylation microarray.

图1 DNA甲基化芯片筛选出的差异甲基化位点和基因

Fig.1 Different methylated sites and genes screened by DNA methylation microarray

2.2 结合转录组数据筛选雄激素非依赖性前列腺癌细胞LNCaP-AI细胞株差异甲基化基因结果

根据甲基化芯片结果中实验组与对照组的ratio值以及转录组RNA测序结果中二者的RPKM值, 筛选出超甲基化的基因(表1)。从表1可知, 发生超甲基化的基因中包括功能未知的基因*FAM111B*(family with sequence similarity 111, member B)、原癌基因*RAS*家

族成员基因*RAB36*、胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)基因等, 这些基因发生超甲基化后可能通过多种途径影响AIPC的形成。同时筛选出发生低甲基化的基因(表2), 包括一系列已经报道的在多种肿瘤中表达异常升高的基因, 如*TM4SF1*(transmembrane 4 L six family member 1)、*EPHA3*(epoxide hydrolase receptor A3)等^[11-12]。

表1 雄激素非依赖性前列腺癌细胞株超甲基化基因

Table 1 The hypermethylated genes of androgen-independent prostate cancer cell lines

基因 Genes	芯片结果比率 Ratio(LNCaP-AI/LNCaP)	转录组结果比率 RPKM ratio(LNCaP-AI/LNCaP)	基因全称 Gene name	基因定位 Gene mapping
<i>FAM111B</i>	34.809 980	8.123 387	Family with sequence similarity 111, member B	11q12.1
<i>RAB36</i>	16.365 870	8.686 876	Member of RAS oncogene family	22q11.22
<i>PCDH7</i>	20.064 560	61.969 260	Protocadherin 7	4p15
<i>COL6A2</i>	9.844 864	2.635 505	Collagen, type VI alpha 2	21q22.3
<i>IGF1R</i>	8.442 970	16.960 830	Insulin-like growth factor 1 receptor	15q26.3
<i>GULP1</i>	2.006 895	642.994 100	Engulfment adaptor PTB domain containing 1	2q32.3-q33

表2 雄激素非依赖性前列腺癌细胞株低甲基化基因

Table 2 The hypomethylated genes of androgen-independent prostate cancer cell lines

基因 Genes	芯片结果比率 Ratio(LNCaP-AI/LNCaP)	转录组结果比率 RPKM ratio(LNCaP-AI/LNCaP)	基因全称 Gene name	基因定位 Gene mapping
<i>EPHA3</i>	0.490 381	192.462 986	Erythropoietin-producing hepatocellular receptor receptor A3	3p11.2
<i>TM4SF1</i>	0.074 772	8.521 232	Transmembrane 4 L six family member 1	3q21-q25
<i>IGFBP5</i>	0.441 695	31.363 888	Insulin-like growth factor binding protein 5	2q33-q36
<i>FAM105A</i>	0.372 051	20.699 672	Family with sequence similarity 105, member A	5p15.2
<i>RASD1</i>	0.048 240	3.552 536	RAS dexamethasone-induced 1	17p11.2
<i>ITPR2</i>	0.074 977	3.463 344	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	12p11
<i>CYP27B1</i>	0.232 702	17.223 293	Cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1	12q13.1-q13.3
<i>UBE2E3</i>	0.287 659	6.007 056	Ubiquitin-conjugating enzyme E2E3	2q32.1

2.3 雄激素非依赖性前列腺癌细胞株LNCaP-AI超甲基化基因功能与信号通路

对DNA甲基化芯片结果采取如下标准进一步分析: (1)CpG岛覆盖启动子区域(-800 bp~+200 bp); (2)CpG岛中至少有一个甲基化峰。实验发现, 722个基因启动子区域内的CpG岛表现为超甲基化, 其中44个为NCBI参考序列上未注释功能的基因, 678个为功能已知基因。根据发生超甲基化改变CpG岛所

处的染色体和基因定位, 作GO和KEGG分析, 研究超甲基化基因的功能分类和所属的信号通路, 发现这些基因所涉及的细胞功能主要为细胞生物进程及其调节、细胞分化、细胞损伤和修复、细胞凋亡、细胞通讯、细胞运动和信号通路以及血管生成等。同时, 这些发生甲基化改变的基因涉及多个信号通路, 主要集中在钙离子信号通路、神经激活配体-受体通路、肿瘤通路、Wnt信号通路、细胞黏附信号

表3 雄激素非依赖性前列腺癌细胞株超甲基化基因所在信号通路

Table 3 The signaling pathway of hypermethylated genes of androgen-independent prostate cancer cell lines

信号通路	超甲基化基因
Signaling pathway	Hypermethylation of genes
Calcium signaling pathway	<i>LHCGR, GRIN2D, PRKACB, HTR4, PRKCB, ADRB2, CYSLTR2, TRHR, PPP3R2, BDKRB1, ADRB3, HRH2, PDE1A, SLC8A1</i>
Neuroactive ligand-receptor interaction	<i>LHCGR, TAAR8, TAAR6, GRIN2D, TAAR2, HTR4, ADRB2, GRM7, CYSLTR2, TRHR, TSHB, BDKRB1, ADRB3, HRH2, PRSS2</i>
Pathways in cancer	<i>WNT1, CASP8, WNT6, FGF4, PRKCB, VEGFC, WNT9B, DCC, IGF1R, PIK3R5, KLK3, VHL, LAMA1, CBLC, WNT7A</i>
Wnt signaling pathway	<i>PPP3R2, WNT1, PPP2CB, PRKACB, WNT6, CSNK1A1L, PRKCB, SFRP1, WNT9B, PPP2R5E, WNT7A</i>
Basal cell carcinoma	<i>WNT1, WNT9B, WNT6, WNT7A</i>

通路等(表3)。

3 讨论

雄激素去势治疗是除外科手术与放射治疗外的标准前列腺癌治疗方法,然而经过中位数为18~24个月的缓解期后,ADPC极易转变为AIPC^[13],表现为前列腺癌细胞在缓解期过后又开始增殖,PSA(puromycin sensitive aminopeptidase)进行性升高,极易发生骨转移,而且转变后的治疗更加棘手,死亡率极高。本研究从表观遗传学的角度出发,采取DNA甲基化芯片杂交技术和转录组RNA测序技术,筛选出大量差异甲基化基因,探讨DNA甲基化在前列腺癌雄激素非依赖性转化过程中可能发挥的作用。

本研究发现,在实验组雄激素非依赖性前列腺癌细胞LNCaP-AI中,胰岛素样生长因子1受体(insulin-like growth factor 1 receptor, *IGF1R*)基因启动子区CpG岛发生超甲基化,且转录组结果显示mRNA水平下调。但有文献报道,在雄激素非依赖性前列腺癌中*IGF1R*过表达,并且*IGF1R*基因可作为一个有价值的治疗该病的靶点^[14-17]。*IGF1R*基因是IGF轴的重要成员,IGF轴对前列腺的生理机能起着重要的作用。IGF-1能调节前列腺正常细胞和肿瘤性细胞的生长和分化,还在前列腺癌的骨转移、血管生成和雄激素非依赖性转化过程中起关键作用^[18]。本研究中*IGF1R*基因表达下调的结果与文献^[14-15]不相符,需要进一步的实验验证,同时还发现*IGF1R*基因位于肿瘤信号转导通路中,对该基因进一步研究有助于明确其超甲基化在细胞模型体外转化过程中的作用,进而探究在前列腺癌雄激素非依赖性转化过程中的作用。

Allioli等^[11]研究发现, *TM4SF1*基因在前列腺癌的发生发展中可作为雄激素受体(androgen receptor, AR)的信号靶基因, *TM4SF1*基因编码的蛋白质在前列腺癌细胞转移中发挥作用。本实验中, DNA甲基化芯片结果显示, *TM4SF1*基因启动子区在雄激素非依赖性前列腺癌细胞LNCaP-AI中发生了低甲基化改变,在转录组结果中为mRNA表达上调,二者相符。所以,我们推测是由于*TM4SF1*基因发生低甲基化而导致其编码的蛋白质表达量增加,从而启动了AR信号通路,导致前列腺癌细胞转移。因此,我们后续将对该基因进行深入的研究以进一步明确其在AIPC转化过程中的作用。

芯片结果显示, *EPHA3*基因在实验组中呈低甲基化改变,转录组结果中该基因mRNA水平明显升高,且与对照组差异高达192倍。*EPHA3*基因包括17个外显子、16个内含子,全长375 Kb,是EPH家族中仅次于*EPHA6*的第二大基因,其5'末端包含一个CpG岛。Eph是已知最大的受体酪氨酸激酶家族的一个分支,包括16个成员,它的配体被命名为肝配蛋白(ephin)。Eph和ephin家族成员的表达水平和许多侵袭性肿瘤的侵袭能力增加密切相关,包括乳腺癌、大肠癌、肾肿瘤、恶性黑色素瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌和前列腺癌^[19]。Eph和ephin可以通过调节细胞间的黏附以及细胞与基质的黏附控制肿瘤细胞的运动和转移^[20-21]。因此,我们推测, *EPHA3*基因低甲基化可能导致其编码的蛋白质水平表达上调,影响其在细胞通讯、血管形成等过程中的作用,或者异常激活复杂的信号通路,这些因素共同参与了AIPC的转化过程。

通过表3可以发现,一个基因可以同时存在于不同的信号通路中,形成复杂的信号通路网络共同发

挥作用。如 *WNT1*、*WNT9B*、*WNT6*、*WNT7A* 这四个基因均存在于肿瘤信号通路、Wnt 信号通路和基底细胞肿瘤信号通路中。这些基因的超甲基化可能通过其编码的蛋白异常表达参与了信号通路的异常开放, 进而影响细胞重要的病理生理过程。细胞的恶性转化过程、细胞的增殖与凋亡调控失衡以及细胞基质及黏附分子结构和表达异常等均涉及多条细胞信号传导通路的异常。

综上所述, 本研究在雄激素非依赖性前列腺癌细胞株中筛选出了诸如 *IGF1R*、*EPHA3*、*TM4SF1* 等一系列的差异甲基化基因, 要进一步对所得的差异基因甲基化水平进行精确性定量分析, 应采用其他独立实验加以证明, 如硫酸盐测序分析。所以, 我们将在后续实验中对上述基因进行细胞层面和临床标本的进一步验证, 以明确各基因在前列腺癌雄激素非依赖性转化过程中的作用和机制。

参考文献 (References)

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62(4): 220-41.
- 李 鸣, 张思维, 马建辉, 陈万青, 那彦群. 中国部分市县前列腺癌发病趋势比较研究. *中华泌尿外科杂志*(Li Ming, Zhang Siwei, Ma Jianhui, Chen Wanqing, Na Yanqun. A comparative study on incidence trends of prostate cancer in part of cities and counties in China. *Chin J Urol*) 2009; 30(6): 568-70.
- Chen L, Zhu Z, Sun X, Dong XY, Wei J, Gu F, *et al.* Down-regulation of tumor suppressor gene FEZ1/LZTS1 in breast carcinoma involves promoter methylation and associates with metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 116(3): 471-8.
- Kitamoto S, Yamada N, Yokoyama S, Houjou I, Higashi M, Yonezawa S. Promoter hypomethylation contributes to the expression of MUC3A in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397(2): 333-9.
- Perry AS, Foley R, Woodson K, Lawler M. The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(2): 357-77.
- 许 刚, 毛易捷, 陈兵华, 何晶晶, 陶志华, 林晓梅, 等. 氟他胺联合去雄激素环境诱导的雄激素非依赖性前列腺癌细胞模型的建立. *细胞生物学杂志*(Xu Gang, Mao Yijie, Chen Binghua, He Jingjing, Tao Zhihua, Lin Xiaomei, *et al.* Establishment of an androgen-independent prostate cancer cell line induced by the combined of flutamide and androgen-free environment. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2009; 31(3): 373-8.
- Bloom JS, Khan Z, Kruglyak L, Singh M, Caudy AA. Measuring differential gene expression by short read sequencing: Quantitative comparison to 2-channel gene expression microarrays. *BMC Genomics* 2009; 10: 221.
- Wang L, Feng Z, Wang X, Zhang X. DEGseq: An R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* 2010; 26(1): 136-8.
- 王 羲, 汪小我, 王立坤, 冯智星, 张学工. 新一代高通量RNA测序数据的处理与分析. *生物化学与生物物理进展*(Wang Xi, Wang Xiaowo, Wang Likun, Feng Zhixing, Zhang Xuegong. A review on the processing and analysis of next-generation RNA-seq data. *Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2010; 37(8): 834-46.
- Allioli N, Vincent S, Vlaeminck-Guillem V, Decaussin-Petrucci M, Ragage F, Ruffion A, *et al.* TM4SF1, a novel primary androgen receptor target gene over-expressed in human prostate cancer and involved in cell migration. *Prostate* 2011; 71(11): 1239-50.
- Wimmer-Kleikamp SH, Lackmann M. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* 2005; 57(6): 421-31.
- Schroder FH. Progress in understanding androgen-independent prostate cancer (AIPC): A review of potential endocrine-mediated mechanisms. *Eur Urol* 2008; 53(6): 1129-37.
- Kojima S, Inahara M, Suzuki H, Ichikawa T, Furuya Y. Implications of insulin-like growth factor-I for prostate cancer therapies. *Int J Urol* 2009; 16(2): 161-7.
- Tang Y, Parmakhtiar B, Simoneau AR, Xie J, Fruehauf J, Lilly M, *et al.* Lycopene enhances docetaxel's effect in castration-resistant prostate cancer associated with insulin-like growth factor I receptor levels. *Neoplasia* 2011; 13(2): 108-19.
- Montenegro LR, Leal AC, Coutinho DC, Valassi HP, Nishi MY, Arnhold IJ, *et al.* Post-receptor IGF1 insensitivity restricted to the MAPK pathway in a Silver-Russell syndrome patient with hypomethylation at the imprinting control region on chromosome 11. *Eur J Endocrinol* 2012; 166(3): 543-50.
- Leo S, Accettura C, Lorusso V. Castration-resistant prostate cancer: Targeted therapies. *Chemotherapy* 2011; 57(2): 115-27.
- Li L, Yu H, Schumacher F, Casey G, Witte JS. Relation of serum insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 to risk of prostate cancer (United States). *Cancer Causes Control* 2003; 14(8): 721-6.
- Wimmer-Kleikamp SH, Lackmann M. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life* 2005; 57(6): 421-31.
- Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17(5): 145-51.
- Janes PW, Nievergall E, Lackmann M. Concepts and consequences of Eph receptor clustering. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(1): 43-50.