雄激素非依赖性前列腺癌细胞雄激素受体 靶基因的筛选与初步鉴定

徐思琪^{1,2} 廖昭平^{1,2} 刘春华^{3,2} 程 玥² 季丽丽^{1,2} 段秀枝² 陈玉华² 陶志华^{1,2*} (¹温州医科大学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;³温州医科大学检验医学院、生命科学学院,温州 325000)

摘要 采用染色质免疫共沉淀技术在全基因组水平筛选雄激素非依赖性前列腺癌细胞LNCaP-AI的雄激素受体结合位点,行高通量测序及生物信息学分析共得到2 876个peak(p-value<1×10⁻⁵),peak平均长度为673 bp;将peak序列定位到Hg19基因组,共有1 865个靶基因,其中fold enrichment≥10的基因有425个。对peak相关基因进行GO分析发现,与细胞、细胞组分、细胞过程、结合、细胞器相关的基因位列前五位;对peak相关基因进行通路分析发现,与黏着斑、代谢通路、癌症中的转录错误调控、嘌呤代谢等信号通路相关的基因占大多数。筛选出7个候选AR靶基因,采用Real-time qPCR技术分析它们在LNCaP-AI细胞和雄激素依赖性前列腺癌细胞LNCaP中对DTH刺激的反应性,发现DHT刺激可改变7个候选AR靶基因在LNCaP-AI细胞中的表达,为进一步研究雄激素依赖性前列腺癌向非依赖性前列腺癌发展的过程中雄激素受体及其调控的下游靶基因功能起着至关重要的作用。

关键词 前列腺癌; 雄激素非依赖; 染色质免疫共沉淀; 雄激素受体; 靶基因

The Screening and Identification of Androgen Receptor Target Genes in Androgen-independent Prostate Cancer Cell

 Xu Siqi^{1,2}, Liao Zhaoping^{1,2}, Liu Chunhua^{3,2}, Cheng Yue², Ji Lili^{1,2}, Duan Xiuzhi², Chen Yuhua², Tao Zhihua^{1,2*}
(¹Department of Clinical Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;
²Department of Laboratory Medicine, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; ³School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract Chromatin immunoprecipitation assay was performed to screen the androgen receptor binding sites in androgen-independent prostate cancer cell LNCaP-AI in the whole genomic. Using high-throughput sequencing and bioinformatic analysis, there were 2 876 peaks (p-value $<1\times10^{-5}$), and the average length of peaks was 673 bp; locating each peak in the *Hg19* genome, 1 865 genes were founded. There were 425 genes which the fold enrichment was more than 10. It could be founded that the top five genes were associated with cell, cell part, cellular process, binding and organelle by GO analysis of peak related genes. Genes associated with focal adhesion, metabolic pathways, transcriptional misregulation in cancer and purine metabolism were the majority by pathway analysis of peak related genes. Seven candidated AR target genes were selected to analyze the reactivity to DHT stimulation in LNCaP-AI cell and LNCaP cell by Real-time qPCR. The result showed that DHT stimulation could change the expression of seven candidated target genes in LNCaP-AI cell. Our data play a vital role in the further study on

收稿日期: 2014-02-20 接受日期: 2014-03-27

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

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81271917)

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

网络出版时间: 2014-07-02 12:12 URL: http://www.enki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.07.0048.html

国家自然科学基金(批准号: 81271917)资助的课题

Received: February 20, 2014 Accepted: March 27, 2014

androgen receptor and it's regulated target genes in the process of androgen-dependent prostate cancer progress to androgen-independent prostate cancer.

Key words prostate cancer; androgen-independent; chromatin immunoprecipitation; androgen receptor; target gene

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是西方男性发 病率最高的肿瘤^[1]。近年来,随着生活方式的改变, 我国PCa的发病率呈逐年上升的趋势^[2-3]。去势治 疗是PCa的主要治疗手段,早期PCa呈雄激素依赖 性(androgen-dependent prostate cancer, ADPC), 其治 疗主要依赖手术去势;晚期PCa的治疗手段为手术 去势联合雄激素去势。在2~3年缓解期后,大部分 患者发展为极度恶性的雄激素非依赖性前列腺癌 (androgen-independent prostate cancer, AIPC), 预后 极差^[4]。雄激素受体(androgen receptor, AR)为核受 体超家族的成员之一, 它对前列腺正常功能的发挥、 PCa的发生发展以及ADPC向AIPC转化的过程都起 着非常关键的作用^[4-5]。AR及其调控的靶基因的改 变将导致AR信号通路的改变,寻找AIPC细胞中的 关键AR靶基因对了解AIPC的发生有着重要意义。 本研究使用染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation assay, ChIP)联合高通量测序技术(ChIPseq)在全基因组水平对AIPC细胞LNCaP-AI¹⁰的AR 靶基因进行筛选与初步鉴定,初步探索在AIPC发生 中可能起着关键作用的AR靶基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 常规培养细胞 ADPC细胞LNCaP购自中国 科学院上海细胞库,培养于含10%胎牛血清(FBS)的 F12培养液中。AIPC细胞LNCaP-AI为本实验室前 期已诱导成功的雄激素非依赖性前列腺癌细胞株^[6], 培养于含10%碳吸附处理FBS(CCS)的DMEM/F12无 酚红培养液中。在5% CO₂、37°C培养箱中培养,细 胞传代后第3~4 d换液一次,7 d左右传代一次。

1.1.2 饥饿培养细胞 处于对数生长期的常规培养LNCaP-AI细胞用胰酶消化后传代于15 cm培养 皿,待细胞生长至60%左右时换液一次,72 h后加入 10 nmol/L DHT, 24 h后收集细胞进行ChIP实验。处于对数生长期的常规培养LNCaP细胞和LNCaP-AI 细胞用胰酶消化后传代于六孔板培养皿,待细胞生长至60%左右时用含10% CCS的DMEM/F12无酚红

培养液换液一次,72 h后加入10 nmol/L DHT,分别于 0,3,6,9,24,48 h后收集细胞进行实验。

1.1.3 主要试剂和仪器 EZ-ZymeTM Chromatin Prep Kit(Millipore公司); F12培养基、DMEM/F12无酚红 培养基(Gibco公司); FCS、CCS(Biowest公司); anti-AR(Abcam公司); Protein G Magnetic Beads(Millipore 公司); NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents(Thermo公司); DHT(Sigma公司); 总 RNA提 取试剂Trizol(Invitrogen公司); Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche公司); PCR Purification Kit(QIAGEN公司); SYBR Green Master(Roche公司); CO₂培养箱(Thermo公司); 倒置显微镜(尼康公司); Stepone plus实时荧光定量PCR仪(ABI公司); 凝胶成 像仪(BIO-RAD公司); 电泳仪(BIO-RAD公司); Nano drop紫外分光光度计(Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 LNCaP-AI细胞胞质和胞核AR含量的检测 收集经10 nmol/L DHT刺激24 h前后的LNCaP-AI细 胞,按说明书进行操作,分别提取胞质和胞核蛋白, 以BSA为标准品进行定量,100 °C 5 min将蛋白变性 后以适量蛋白进行电泳、转膜、孵育一抗(anti-AR)、 孵育二抗,最后进行显色、曝光,以GAPDH为内参 比较AR蛋白含量。

1.2.2 LNCaP-AI细胞染色质免疫共沉淀 (1)ChIP 方法富集LNCaP-AI细胞AR结合位点:LNCaP-AI 细胞在饥饿培养+10 nmol/L DHT 24 h后收集细胞 并按照Chromatin Prep Kit所述以80 U微球菌核酸 酶对4×10⁷个细胞进行染色质片段化,上清(含染色 质片段)按约4×10⁶细胞/tube进行分装并验证酶切 效果。若染色质主片段集中在500 bp以下,即在 每个Ep管中加入Dilution Buffer,混匀后取1%作为 input储存于4°C冰箱备用,在不同的Ep管中分别加 入5 μg anti-AR和20 μL Protein G(ChIP实验组)、1 μg anti-RNA pol-II和20 μL Protein G(ChIP阴性对照组), 1 μg normal IgG和20 μL Protein G(ChIP阴性对照组), 并置于旋转混匀器于4°C层流柜过夜。按Massie 等^[7]的操作进行免疫复合物洗涤,随后取出input管, 对input管和IP管同时进行洗涤及洗脱后,按照PCR Purification Kit说明进行纯化并用30 μL DEPC水洗 脱,所得离心液即含ChIP富集所得AR结合位点。

(2)染色质酶切效果验证:取适量染色质片段溶 液,按照Chromatin Prep Kit所述进行过夜解交联后, 将100 bp DNA ladding marker和待测样品同时上样 进行2%琼脂糖凝胶电泳,85 V 30 min后将凝胶置于 凝胶成像仪,判断DNA片段长度。

(3)富集物含量测定:使用Nano drop 2000进行 DNA浓度、D₂₆₀/D₂₈₀测定。打开软件,初始化后用 2 μL DEPC水进行blank,在检测基座上加2 μL待测 定样品,检测结果显示于电脑界面。

(4)ChIP富集效果及富集效率判断:以ChIP阴性 对照和阳性对照组DNA片段作为PCR模板, *GAPDH* 基因片段作为引物(表1),通过Real-time PCR结果来判 断ChIP实验本身是否成功。用ChIP实验组DNA片段 作为PCR模板,含ARE的*PSA Promotor*基因片段(表1) 作为引物,通过Real-time PCR结果来初步判断anti-AR 对靶基因的富集效率。PCR反应体系为: 2.0 μL DNA, 12.5 μL SYBR Green mix, 1 μL primer,加DEPC水补 足至25 μL。PCR反应程序为: 94 °C 10 min; 94 °C 20 s, 60 °C 1 min, 50个循环。PCR结束后调节基线至适 宜处,基线与扩增曲线的交点即为Ct值。以input为 基准,计算基因的相对富集效率(% of input)。第一 步,将Ct(1% input)调整到Ct(100% input), Ct(100% input)=Ct Input(1% input)-6.644; 第二步, Percentage of input=2^[Ct(100% input)-Ct IP]×100%。

1.2.3 高通量测序及生物信息分析 使用Illumina

HiSeq2000测序技术完成测序后,对原始数据进行 去污染、去接头及去除低质量数据处理,即为clean data。使用SOAP软件将clean data与*Hg19*基因组序 列进行比对,允许不超过2个碱基的错配,其中比对 到基因组上唯一位置的reads(唯一比对reads)将用于 后续的信息分析。将唯一比对reads与基因组参考数 据库做比对,统计reads在基因间区、基因内含子区、 基因外显子区、基因上游20 Kb和基因下游20 Kb的 分布情况。使用MACS软件,基于Poisson分布模型 在全基因组水平进行peak扫描(p-value<1×10⁻⁵),可 得到peak在基因组上的位置信息、peak区域序列信 息等。最后进行peak相关基因筛选,并对相关基因 进行GO功能聚类分析和pathway分析。

1.2.4 DHT刺激影响候选AR靶基因表达水平的检测 (1)细胞总RNA提取:LNCaP细胞和LNCaP-AI 细胞经饥饿培养+10 nmol/L DHT, 0, 3, 6, 9, 24, 48 h 后分别收集细胞,加入Trizol,经异丙醇沉淀和75% 乙醇洗涤风干后,加入55°C预热的DEPC水50 μL 溶解即可。(2)RNA浓度检测:使用Nano drop 2000 按上述操作进行检测。(3)RNA逆转录:使用1 μg RNA按Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作,总反应体系为20 μL。反应结束后将 产物保存备用。(4)Real-time qPCR: 2.0 μL cDNA, 12.5 μL SYBR Green mix, 1.0 μL primer, 加DEPC 水补足至25 μL。94°C 10 min; 94°C 20 s, 60°C 30 s, 50个循环。以*GAPDH*为内参,计算LNCaP细 胞和LNCaP-AI细胞中各靶基因的相对表达量以及 LNCaP-AI细胞相对于LNCaP细胞中各靶基因的相

	-	•
基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
Genes	Forward primers $(5' \rightarrow 3')$	Reverse primers $(5' \rightarrow 3')$
GAPDH	TAC TAG CGG TTT TAC GGG CG	TCG AAC AGG AGG AGC AGA GAG CGA
AR	GCC ACT CAG ACC CAC TTA GC	CCT CAC TCT TCG TCC ACA TCG
PSA	CCT AGA TGA AGT CTC CAT GAG CTA C	GGG AGG GAG AGC TAG CAC TTG
PTGER3	ACG GAG AAG CAG AAA GAA TG	GCA GGG TAA GGA GGT GGA
FOXP2	ACA CGC ATT GGA TGA CCG A	GTC TGA ATG TCG CCT TCG TAT G
FN1	ACA CGC ATT GGA TGA CCG A	ACA CGC ATT GGA TGA CCG A
ZNF438	AGT TGT CGG ATT TGT CGC	TTC GTC TGC CTG GTT TAG
PDE9A	CTA ACG AGG TCC GTC CAA	GGC GTC ATC TAT CCG CTT CA
BDNF	TTC TGC CCA TCC TGT CT	GCT TAT CCC TCA CCC TAC T
PCDH15	CCC AAA CCA ACA GAG CCA TCG	TCC TCC TTC CCC ATA ATA CGG
GAPDH-ChIP	TAC TAG CGG TTT TAC GGG CG	TCG AAC AGG AGG AGC AGA GAG CGA
PSA-ChIP ^[8]	CCT AGA TGA AGT CTC CAT GAG CTA C	GGG AGG GAG AGC TAG CAC TTG

表1 本实验所用引物序列列表 Table 1 List of primers used in the experiment

対含量(2^{-ΔΔCt}), 其中ΔCt=Ct(target gene)--Ct(*GAPDH*), ΔΔCt=ΔCt(LNCaP-AI)--ΔCt(LNCaP)。

2 结果

2.1 DHT刺激对LNCaP-AI细胞胞质和胞核中 AR蛋白表达的影响

提取10 nmol/L DHT刺激前后LNCaP-AI细胞的 胞浆和胞核蛋白,利用anti-AR进行蛋白免疫印迹实 验,以GAPDH为内参判断AR蛋白的表达情况。由 图1可以看出,LNCaP-AI细胞在DHT刺激后胞质AR 减少,胞核AR增多,提示AR信号通路的经典途径在 LNCaP-AI细胞中依然发挥着重要作用。

2.2 LNCaP-AI细胞染色质免疫共沉淀结果

2.2.1 LNCaP-AI细胞染色质片段合格性检测 (1) 染色质片段长度: ChIP-seq要求待检DNA片段应小于1000 bp,尽量控制在500 bp范围内。本实验采用 微球菌核酸酶消化染色质使其片段化,对交联的染



DHT

图1 DHT刺激对LNCaP-AI细胞AR蛋白核转移的影响 Fig.1 The effect of DHT stimulation on nuclear transfer of AR protein in LNCaP-AI cell



2、3泳道均为LNCaP-AI细胞染色质片段化后的结果。
Lane 1,2,3 were all the chromatin fragments of LNCaP-AI cells.
图2 LNCaP-AI细胞染色质片段长度
Fig.2 The length of chromatin fragments of LNCaP-AI cells

色质进行过夜解交联处理后,用2%琼脂糖凝胶电泳 判断片段长度,结果如图2所示。

(2) ChIP富集物含量:使用Qubit Fluorometer对 LNCaP-AI细胞AR-ChIP后富集所得DNA样品的浓 度及体积进行检测,结果为:3.46 ng/μL,135 μL,总 量为0.467 1 μg。ChIP-seq要求待测样品总量不低于 5 ng,结合DNA片段长度,本次ChIP-ed DNA符合测 序建库要求。

2.2.2 ChIP富集效果和富集效率 以ChIP阴性 对照组和阳性对照组富集物及相应的input对照组 DNA作为PCR模板, GAPDH基因片段作为引物进 行Real-time qPCR;以ChIP实验组富集物及相应的 input对照组DNA作为PCR模板, PSA基因片段作为 引物进行Real-time qPCR。PCR结束后计算GAPDH 和PSA的相对富集度(% of input)。ChIP阴性对照组 的GAPDH基因相对富集度为0.64%, ChIP阳性对照 组的GAPDH基因相对富集度为21.23%, ChIP实验组 的PSA基因相对富集度为4.71%(图3)。

2.3 高通量测序和生物信息学分析结果

本次测序结果中reads长度为49 bp, 共得到 11 416 877条reads, 总产量为559 426 973 bp。将其 与*Hg19*基因组序列进行比对, 比对reads数为10 854 724 条, 比对率95.08%, 唯一比对reads共10 056 037条, 唯一比对率为88.08%。唯一比对reads在各基因功 能元件上的分布为: 基因间区58.26%, 基因内含子 区38.96%, 基因上游20 Kb 11.98%, 基因下游20 Kb 11.66%, 基因外显子区2.11%(图4A)。使用MACS 软件进行peak区扫描, Poisson分布模型进行检验, 共 得 到2 876个peak(p-value<1×10⁻⁵), peak平均长



图3 染色质免疫共沉淀实验及PSA基因的富集效率 Fig.3 The efficiency of chromatin immunoprecipitation experiment and PSA gene enrichment

	Table 2 Some of anuro	gen receptor target ge	nes analysed by the Chil	r-seq
基因	Peak在基因上的位置	Peak数	P值	相对富集度
Genes	Peak position in the gene	Number of peak	P value	Fold enrichment
COL1A1	Up20k, exon, intron	3	2.54×10 ⁻²¹	16.54
TP53BP2	Up20k	2	1.16×10 ⁻¹¹	16.35
PTPRH	Up20k	2	1.48×10 ⁻⁶	13.48
ETV7	Up20k	1	4.55×10 ⁻⁶	13.24
MDM2	Up20k	1	3.48×10 ⁻⁶	10.29
BDNF	Down20k	17	3.43×10 ⁻⁵	7.29
FOXP2	Intron	9	2.88×10 ⁻⁵	10
PCDH15	Intron	24	3.94×10 ⁻⁵ , 4.09×10 ⁻⁵	8.75, 8.33
PDE9A	Up20k	20	1.09×10 ⁻⁶	8.99
ZNF438	Intron	16	9.31×10 ⁻⁶ , 8.83×10 ⁻⁵	7.5, 7.5

122	LNCar-AI细胞Cill - Scu特到的的力雄激素文件轮ᆇ固律例
Table 2	Some of androgen recentor target genes analysed by the ChIP-seq

Up20k、Down20k、exon、intron分别表示peak位于基因上游20 Kb、下游20 Kb、外显子、内含子区域内。

Up20k, Down20k, exon, intron indicated that the peak was located in the region of upstream 20 Kb of gene, downstream 20 Kb of gene, exon of gene and intron of gene.



A: 唯一比对reads在基因组各功能元件上的分布; B: peaks在基因组各功能元件上的分布。

A: the distribution of unique mapped reads in the functional elements of the genome; B: the distribution of peaks in the functional elements of the genome. 图4 唯一比对reads和peaks在基因组各功能元件上的分布情况





度为673 bp, peak在各基因功能元件上的分布特征 与唯一比对reads的分布类似(图4B)。将peak序列 定位到基因组, 共得到1 865个peak相关基因, 其中 fold enrichment≥10的基因有425个, 大部分基因fold enrichment集中于5~10。对数据进行分析, 我们发现 一个peak可以匹配到至少一个基因, 同时一个基因 至少有一个peak的富集, 平均每一个基因可有1.54个 peak。表2列举了部分fold enrichment较高的基因以 及peak较多的基因。对peak相关基因进行GO分析 发现, 与细胞、细胞组分、细胞过程、结合及细胞 器相关的基因量位列前五(图5)。对1 495个peak相 关基因进行信号通路的注释后, 我们发现与黏着斑、 代谢通路、癌症中的转录错误调控及嘌呤代谢等信 号通路相关的靶基因占大多数(表3)。

2.4 DHT刺激对候选AR靶基因表达情况的影响

我们推测,若某一基因能富集到的peak越多,其 与LNCaP-AI细胞的关联性越大,与AIPC发生的相 关性越高。我们的数据表明,某一基因所能富集到 的peak数最大为24,富集peak数为1的基因有1110 个,富集peak数大于5的基因有99个,其中富集peak 数大于9的基因有20个。我们以富集peak数大于9 的20个基因为初步对象,结合文献报道筛选了其中 的7个候选基因(PTGER3、FNI、PDE9A、BDNF、 PCDH15、FOXP2、ZNF438)作为对象初步判断它 们在LNCaP细胞和LNCaP-AI细胞中的表达情况及 对DHT刺激的反应性。由图6可以看出,DHT刺激可 改变7个候选AR靶基因在LNCaP-AI细胞中的表达,

表3	;与peak相关基因有关的主要信号通路举例
Table 3	Some of the main pathways of peak-related gen

信号通路 Pathway	与通路相关的基 因量(构成比) Constituent ratio of pathway related genes
Regulation of actin cytoskeleton	75 (5.02%)
Focal adhesion	65 (4.35%)
Tight junction	68 (4.55%)
Pathways in cancer	53 (3.55%)
Metabolic pathways	244 (16.32%)
Purine metabolism	113 (7.56%)
Cell cycle	13 (0.87%)
Transcriptional misregulation in cancer	108 (7.22%)
Prostate cancer	11 (0.74%)



A、B分别表示AR靶基因在LNCaP-AI细胞和LNCaP细胞的相对表 达量; C: AR靶基因在LNCaP-AI细胞中相对于LNCaP细胞的表达量。 A,B: the relative expression levels of AR target genes in LNCaP-AI and LNCaP cells; C: the expression levels of AR target genes in LNCaP-AI cells compared to those of LNCaP cells.

图6 不同DHT刺激时间下候选A	AR靶基因的表达情况
------------------	------------

Fig.6 The expression levels of candidated AR target genes after DHT stimulation in indicated times

与DHT刺激0h相比,DHT刺激时间越长候选靶基因 表达差异越明显;其中,FNI和PDE9AmRNA相对表 达量相对较高。各候选靶基因的相对表达量在两株 细胞间均具有差异,其中差异最明显的为PTGER3 和BDNF;与LNCaP细胞相比,表达升高的基因为 PTGER3、FN1、ZNF438、FOXP2和PDE9A,表达 降低的基因为BDNF和PCDH15。

3 讨论

已明确AR作为转录因子在性别分化、前列 腺正常功能的发挥、PCa的发生发展以及ADPC向 AIPC转化的过程都起着非常关键的作用,但机制尚 不明确,目前的研究热点主要包括AR调控基因的异 常、AR过表达、AR突变、非雄激素依赖途径的出 现等^[5]。LNCaP-AI细胞为模拟PCa的雄激素剥夺治 疗诱导而成的细胞株、为AIPC细胞。本课题组前期 研究显示[9-10], AR蛋白和mRNA在LNCaP-AI细胞中 的表达比LNCaP细胞高, DHT可刺激AR表达; 使用 siRNA干扰AR表达后对LNCaP-AI细胞生长的抑制 率大于对LNCaP细胞的抑制率,且无论干扰前还是 干扰后DHT对LNCaP-AI细胞生长的刺激作用都大 于LNCaP细胞; DHT可刺激AR蛋白在胞核中的表 达(图1),因此AR信号途径在LNCaP-AI细胞的发生 中起着关键作用。根据前期研究结果,我们推测由 AR调控的下游靶基因的改变参与了LNCaP细胞向 LNCaP-AI细胞的转化,导致了两个细胞生物学功能 的不同。

本实验使用AR-ChIP联合高通量测序技术在 全基因组水平对LNCaP-AI细胞中的AR结合位点进 行富集,并根据结合位点在基因组上的位置定位相 应的基因。由图3我们得知,大部分peak位于功能 尚不能明确的基因间区,其次约40%位于基因内含 子区,AR很可能参与调控了这些基因的表达。本次 AR-ChIP共得到1865个基因,我们初步筛选了7个基 因(FN1、PDE9A、ZNF438、PTGER3、PCDH15、 FOXP2、BDNF)进行相对表达量检测,其中尚未见 FN1、PDE9A、ZNF438与PCa的报道。

DHT刺激可改变AR靶基因在LNCaP-AI细胞 中的相对表达量,且随着DHT刺激时间的延长表达 差异越明显,这说明了它们可能为AR靶基因。前 列腺素E2受体3(PTGER3)基因为前列腺素受体EP3, 该基因广泛分布于多个组织系统,具有多种功能。 在本实验中LNCaP-AI细胞PTGER3 mRNA表达升 高,与Kashiwagi等⁽¹¹⁾的研究结果相反,却与Miyata 等⁽¹²⁾的研究结果有着一致性。我们推测可能是由于 PTGER3亚型不同或PTGER3与不同亲和力的配体 结合产生不同的生物学功能导致的,DHT刺激会降 低PTGER3的表达水平,说明PTGER3在LNCaP-AI细 胞中可能通过非雄激素依赖的AR调控途径影响PCa 的进展。PCDH15为钙黏着蛋白超家族的成员之一,

已有报道显示N-钙黏着蛋白增加和E-钙黏着蛋白减 少(上皮-间质转化, EMT)在肿瘤的转移中起着重要 作用^[13]。LNCaP-AI细胞中PCDH15 mRNA的表达 降低,可能通过编码E-钙黏着蛋白参与EMT对AIPC 的发生起着一定作用。FOXP2在神经细胞的分化中 有着一定的作用, FOX家族参与了多数肿瘤的发生, FOXP2与PCa的发生发展也有着密不可分的关系, 尤其在TMPRSS2-ERG融合阴性的PCa中, FOXP2表 达越高预后越差^[14]。本研究中FOXP2在LNCaP-AI细 胞中表达升高, 证实了其与PCa的发展及AIPC的转 化有着不可分割的关系。BDNF为神经营养因子家 族的成员之一,已明确了神经营养因子在男性生殖 器官发育中的重要作用。Mirabella等^[15]的研究说明, BDNF在去势处理的小鼠中表达比正常小鼠高。本 实验中, LNCaP-AI细胞BDNF mRNA的表达降低, 与 预期不符,还需进一步重复实验进行验证。FNI与 黏着斑和迁移密切相关; PDE9A与细胞转导途径相 关; ZNF438为一锌指蛋白, 与众多基因表达的调控 相关。LNCaP-AI细胞中它们的表达均与LNCaP细 胞中的表达存在差异, 暗示它们可能在PCa的发生 以及AIPC的转化中起着重要作用。但是关于与PCa 之间存在的关系以及它们在PCa的发生发展中所起 的作用还需要更多的实验来说明。

另外, Wang等^[16]发现与细胞周期相关的基因, 尤其是M期基因在AIPC的发展中起着重要作用。M 期直接影响了细胞分裂, M期基因表达升高与肿瘤 细胞的快速生长等特性有着密不可分的关系。由于 G₂到M这个阶段正处在复杂活跃的分子水平变化的 时期, 容易受干扰, 因此我们猜测LNCaP-AI细胞中 也存在着某些调控G₂/M期转位的关键AR靶基因。 AR-ChIP中我们富集了如*Cdc14*等与M期相关的AR 靶基因, 有望在下一步实验中进行深入的研究。另 外, 在与黏着斑、代谢通路、癌症中的转录错误调 控及嘌呤代谢等信号通路明确相关的基因中我们还 富集了较多基因, 这些代谢途径在肿瘤的发生过程 中都或多或少地发生了改变。

目前,我们正在着手对LNCaP细胞进行AR-ChIP及sequencing,旨在通过对两个细胞的ChIP-ed DNA进行差异分析后,期望找到不仅与PCa发生相关 同时也与LNCaP-AI细胞转化密切相关的AR靶基因。 另外,对筛选得到的LNCaP-AI细胞AR靶基因,我们 下一步将使用siRNA干扰*AR*基因的表达后检测各靶 基因的表达,以验证其与AR的关联性;用凝胶迁移 试验分析靶基因与AR是否存在直接结合作用。

综上所述, 雄激素受体及其调控的靶基因在雄 激素依赖性前列腺癌向雄激素非依赖性前列腺癌转 化的过程中起着至关重要的作用, 我们期待下一步 的实验能筛选出某些关键的雄激素受体直接作用的 下游靶基因, 为雄激素非依赖性前列腺癌的治疗提 供新靶点。

参考文献 (References)

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin 2013; 63(1):11-30.
- 2 赫 捷,陈万青.中国肿瘤登记年报2012,北京:军事医学科学 出版社,2012,28-60.
- 3 李 铭, 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. A comparative study on incidence trends of prostate cancer in part of cities and counties in China. Chin J Urol) 2009; 30(6): 368-70.
- 4 Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. Clin Cancer Res 2006; 12(6): 1665-71.
- 5 Lonergan PE, Tindall DJ. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. J Carcinog 2011; 10: 20.
- 6 Xu G, Wu J, Zhou L, Chen B, Sun Z, Zhao F, et al. Characterization of the small RNA transcriptomes of androgen dependent and independent prostate cancer cell line by deep sequencing. PLoS One 2010; 5(11): e15519.
- 7 Massie CE, Mills IG. Global identification of androgen response elements. Methods Mol Biol 2011; 776: 255-73.

- 8 Wang Q, Li W, Liu XS, Carroll JS, Janne OA, Keeton EK, et al. A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. Mol Cell 2007; 27(3): 380-92.
- 9 朱小丽. LNCaP细胞株耐药性过程中雄激素受体分子改变研究. 温州医学院 2011.
- 10 韩秀翠. 雄激素非依赖性前列腺癌中雄激素受体的功能研究. 温州医学院 2012.
- 11 Kashiwagi E, Shiota M, Yokomizo A, Itsumi M, Inokuchi J, Uchiumi T, et al. Prostaglandin receptor EP3 mediates growth inhibitory effect of aspirin through androgen receptor and contributes to castration resistance in prostate cancer cells. Endocr Relat Cancer 2013; 20(3): 431-41.
- 12 Miyata Y, Ohba K, Matsuo T, Watanabe S, Hayashi T, Sakai H, et al. Tumor-associated stromal cells expressing E-prostanoid 2 or 3 receptors in prostate cancer: Correlation with tumor aggressiveness and outcome by angiogenesis and lymphangiogenesis. Urology 2013; 81(1): 136-42.
- 13 Jennbacken K, Tesan T, Wang W, Gustavsson H, Damber JE, Welen K. N-cadherin increases after androgen deprivation and is associated with metastasis in prostate cancer. Endocr Relat Cancer 2010; 17(2): 469-79.

14 Stumm L, Burkhardt L, Steurer S, Simon R, Adam M, Becker A, et al. Strong expression of the neuronal transcription factor FOXP2 is linked to an increased risk of early PSA recurrence in ERG fusion-negative cancers. J Clin Pathol 2013; 66(7): 563-8.

15

16

Mirabella N, Squillacioti C, Paone I, Ciarcia R, Russo M, Paino G. Effects of castration on the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the vas deferens and male accessory genital glands of the rat. Cell Tissue Res 2006; 323(3): 513-22.

Wang Q, Li W, Zhang Y, Yuan X, Xu K, Yu J, *et al.* Androgen receptor regulates a distinct transcription program in androgenindependent prostate cancer. Cell 2009; 138(2): 245-56.