

前列腺癌细胞激素非依赖性转化过程中 microRNA 的差异化表达

纪家涛,许传亮,叶华茂,周 铁,汤元杰,孙颖浩*

第二军医大学长海医院泌尿外科,上海 200433

[摘要] **目的** 对比观察雄激素依赖前列腺癌细胞(LNCaP)与雄激素非依赖前列腺癌细胞(LNCaP-AI)中 microRNA 的表达差异,探讨前列腺癌激素依赖向非依赖转化的转录后调控机制。**方法** 利用 Agilent 基因芯片检测 LNCaP 及 LNCaP-AI 细胞 microRNA 的表达,用 RT-PCR 方法对其中 6 个 microRNA 进行验证,并对差异表达的 microRNA 所调控靶基因功能进行生物信息学分析。**结果** 基因芯片检测发现:与 LNCaP 相比,LNCaP-AI 细胞有 27 个 microRNA 表达降低,11 个 microRNA 表达升高。对其中 6 个 microRNA 进行 RT-PCR 验证,结果与基因芯片结果一致。通过检索 <http://www.mirbase.org/> 针对 microRNA 调控的靶基因,并参考已知的与雄激素非依赖相关基因的功能,发现 LNCaP 细胞转化为激素非依赖的 LNCaP-AI 细胞过程中,差异表达的 microRNA 主要调控表皮生长因子受体(EGFR)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、Bcl-2 及雄激素相关代谢酶。**结论** 前列腺癌激素非依赖转化过程中存在 microRNA 的差异表达,可能涉及雄激素受体(AR)旁路信号通路、金属酶、抗凋亡基因及雄激素相关代谢酶基因等。

[关键词] 前列腺肿瘤;雄激素非依赖;LNCaP 细胞;微 RNAs

[中图分类号] R 737.25

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2013)01-0024-05

MicroRNA alteration associated with prostate cancer LNCaP cell progression to androgen-independence

Ji Jia-tao, XU Chuang-liang, YE Hua-mao, ZHOU Tie, TANG Yuan-jie, SUN Ying-hao*

Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To compare profiles of microRNA between the LNCaP and LNCaP-AI cell lines, so as to further elucidate the post-transcriptional mechanism regulating the progression to androgen-independence. **Methods** The microRNA profiles of LNCaP and LNCaP-AI cell lines were examined by Agilent's microarray. The expression of six microRNAs was verified by RT-PCR. The functions of differentially expressed microRNAs were elucidated by a search with miRBase software (<http://www.mirbase.org/>). **Results** The Agilent's microRNA microarray showed that 11 microRNAs were up-regulated and 27 were down-regulated during the LNCaP progression to androgen-independence. RT-PCR results were consistent with those of the Agilent's microarray chips. By searching the targets of microRNAs in the miRBase software, we found that the differentially expressed microRNAs were mainly involved in regulation of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), Bcl-2, and epithelial growth factor receptor (EGFR) and genes mediating androgen metabolism. **Conclusion** There is alteration of microRNA during the progression of LNCaP to androgen-independence, which may involve androgen receptor related pathway, metalloenzyme, anti-apoptotic gene and genes related to androgen metabolism.

[Key words] prostatic neoplasms; androgen-independent; LNCaP cells; microRNAs

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(1): 24-28]

前列腺癌是常见的男性恶性肿瘤之一,其死亡率位居欧美国家男性肿瘤患者第 2 位^[1]。近年来,我国前列腺癌的发病率及死亡率均呈逐渐升高趋势。目前,对于晚期前列腺癌患者,标准的治疗方法是全雄阻断治疗,但大部分患者均在 2~3 年左右复

发。去雄治疗失败的原因是前列腺癌细胞的激素非依赖性生长^[2]。因此,激素非依赖性前列腺癌的发生机制、治疗方案等一直是近年来该领域的研究热点,虽已取得初步成效^[3-5],但确切机制仍不明确。

微小 RNA 是细胞内天然存在的一种长度约为

[收稿日期] 2012-07-25

[接受日期] 2012-09-31

[作者简介] 纪家涛,博士生,主治医师。E-mail: jiatao22@sohu.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31161718, E-mail: sunyh@medmail.com

20~23 nt 的非编码 RNA, 主要以 microRNA (miRNA) 的形式在哺乳动物细胞内存在, 能够调控包括早期胚胎发育、细胞增殖和细胞死亡、细胞凋亡与脂肪代谢、细胞分化等多种生理和病理过程^[6-8], 调控部分编码蛋白基因的表达, 参与细胞活动的调节^[8-9]。某些特异性 miRNA 还参与肿瘤的触发和进展, 可作为组织或肿瘤特异性标志^[7,10-11], 有利于肿瘤的临床分析、诊断、治疗及预后分析^[10-12]。MiRNA 对靶基因的调控并非一对一的关系^[13], 单个 miRNA 可以调控多个靶基因, 且在不同的细胞条件下功能可能发生变化, 这导致一些研究结果的不一致^[14-15]。目前关于前列腺癌 miRNA 差异表达的相关研究结果仍存在争议^[7,16-17], 且机制也不明确。因此, 对前列腺癌激素非依赖转化相关的 miRNA 进行系统、全面的研究具有重要意义。

本研究利用雄激素依赖性前列腺癌 LNCaP 细胞, 在逐步递减激素培养基中长时间连续培养, 诱导产生雄激素非依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞亚系 (LNCaP-AI)^[18], 对比观察两个细胞系间 miRNA 的差异表达, 初步探讨前列腺癌激素非依赖的可能机制。

1 材料和方法

1.1 前列腺癌细胞株的培养 LNCaP 由德国洪堡大学 Charite 医学院泌尿外科 Jung 教授惠赠。LNCaP-AI 由第二军医大学长海医院泌尿外科保存。细胞培养参见文献^[18]。

1.2 主要试剂及仪器 Agilent miRNA 芯片扫描使用 Agilent Technologies miRNA Microarray System。miRNeasy Mini Kit、miScript Reverse Transcription Kit、miScript SYBR[®] Green PCR Kit 均为 Qiagen 公司产品; 引物由 Qiagen 公司提供。实验仪器: ABI 9700 型 PCR 扩增仪, ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪。

1.3 MiRNA 基因芯片检测 抽提总 RNA, 用琼脂糖凝胶电泳或 LAB-ON-A-CHIP 系统对样品总 RNA 进行质量检测 and 定量。用 miRNeasy Mini Kit 分离 miRNA, 将 miRNA 标记后进行杂交、洗脱; 用激光共聚焦扫描仪对杂交结束后的芯片进行扫描。对杂交信号值进行扣本底、标准化等处理, 筛选出表达差异 1.5 倍以上的 miRNA。以同一样品的 2 张芯片上 2 个重复点相关系数高于 80% 作为质控标准, Spike-in 阳性质控点有荧光信号。

1.4 实时定量 RT-PCR 方法验证 miRNA 的表达 抽提 RNA 并反转录合成 cDNA^[13-14]。以 cDNA (1 μ L) 为模板, 加入上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, RNase-free H₂O 8 μ L, 2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master mix 10 μ L, 总反应体系为 20 μ L。在 PCR 反应体系中加入荧光染料 (普通 Syb-Green), 把加好样品的 96 孔板放在 ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪中进行反应, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 min; 94 $^{\circ}$ C 15 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后对未知模板进行定量分析。管家基因为 5S RNA。每一个 miRNA 重复测定 3 次, 取平均值标准化后进行对比。

1.5 生物信息学分析 通过检索 <http://www.mirbase.org/> 比对 miRNA 调控的靶基因, 结合已发现与非雄依赖相关的基因, 对差异表达的 miRNA 所调控的靶基因功能进行生物信息学分析。

2 结果

2.1 Agilent miRNA 芯片扫描结果 通过 Agilent 芯片检测 (图 1), 发现在 LNCaP-AI 细胞中表达下调 2 倍以上的 miRNA 有 17 个, 表达上调 2 倍的仅有 2 个。如果将选择范围扩大至 1.5 倍, 发现有 27 个 miRNA 在 LNCaP-AI 细胞中表达下调 1.5 倍以上, 11 个 miRNA 在 LNCaP-AI 细胞中表达上调 1.5 倍以上。表达下调的 miRNA 明显比上调的多。

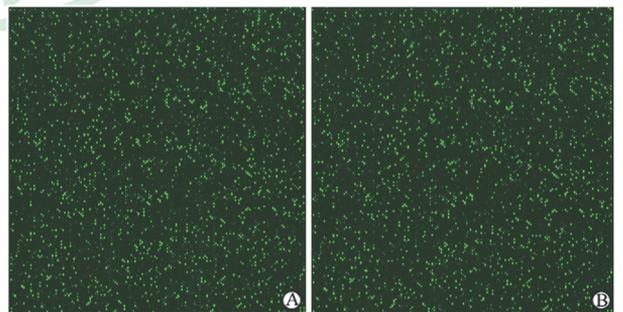


图 1 LNCaP 细胞 (A) 及 LNCaP-AI 细胞 (B) miRNA 原始芯片扫描图

Fig 1 miRNA scanogram of LNCaP cells (A) and LNCaP-AI cells (B)

2.2 RT-PCR 验证芯片检测的结果 图 2 是采用 RT-PCR 测定 6 个差异 miRNA 标准化后相对表达量比较图, 其中 miR-565 表达上调, miR-125b、miR-222、miR-221、miR-149、miR-96 表达均下调, 与芯片扫描结果相符。

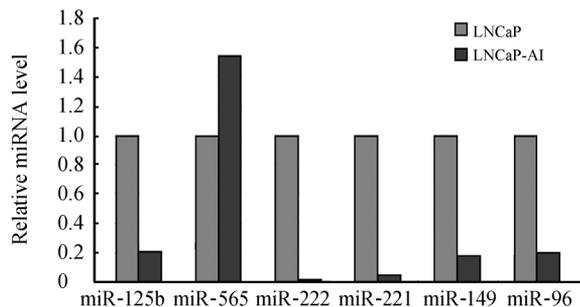


图2 LNCaP-AI细胞和LNCaP细胞中 miRNA 标准化后相对表达量比较图

Fig 2 Expression of miRNA after normalization in LNCaP-AI cells and LNCaP cells

2.3 LNCaP-AI 细胞 miRNA 变化调控非雄依赖转化中已知有关的基因 通过检索 <http://www.mirbase.org/> 比对 miRNA 调控的靶基因, 结合已发现与非雄依赖相关的基因, 我们认为 LNCaP 转化为激素非依赖的 LNCaP-AI 细胞中, 明显变化的 miRNA 主要调控表皮生长因子受体(EGFR)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)、Bcl-2 和雄激素相关代谢酶。表 1 和表 2 显示 LNCaP-AI 细胞中与 ErbB1 和 MMP-9 调控相关的 miRNA 都是降低的。

表 1 LNCaP-AI 细胞中与 ErbB1 调控相关的 miRNA(与 LNCaP 细胞比较)

Tab 1 MiRNAs associated with ErbB1 regulation in LNCaP-AI cells (compared with LNCaP cell)

Differential miRNA	Relative level
miR-146b	0.66(Down-regulated)
miR-196b	0.29(Down-regulated)
miR-330-3p	0.59(Down-regulated)
miR-let-7c	0.65(Down-regulated)

表 2 LNCaP-AI 细胞中与 MMP-9 调控相关的 miRNA(与 LNCaP 细胞比较)

Tab 2 MiRNAs associated with MMP-9 regulation in LNCaP-AI cells (compared with LNCaP cell)

Differential miRNA	Relative level
miR-149	0.49(Down-regulated)
miR-330	0.59(Down-regulated)
miR-24	0.63(Down-regulated)
miR-30e-3p	0.57(Down-regulated)
miR-345	0.65(Down-regulated)
miR-615	0.25(Down-regulated)

3 讨论

研究表明, 前列腺癌细胞获得雄激素非依赖性

的生长特性是一个复杂的过程, 涉及到多因素的综合作用。MiRNA 是细胞内天然生成的一种长度约为 20~23 nt 的非编码 RNA, 它们通过 3' 端非翻译区碱基配对介导的特异性的基因沉默导致靶 mRNA 降解或抑制蛋白质的合成调控转录后基因表达水平, miRNA 的变化参与了许多细胞功能, 包括肿瘤的发生、发展^[6-8]。研究前列腺癌细胞 LNCaP 转化为 LNCaP-AI 雄激素非依赖的 miRNA 的变化, 有助于了解哪些 miRNA 参与非雄依赖转化, 从而进一步阐明非雄依赖转化的机制。

通过 Agilent 芯片检测, 我们发现 27 个 miRNA 在 LNCaP-AI 表达下调 1.5 倍以上, 11 个 miRNA 在 LNCaP-AI 中表达上调 1.5 倍以上, 下降的明显比升高的多。我们选择其中 6 个 miRNA 进行 RT-PCR 验证, 结果与 Agilent 的 miRNA 芯片检测的结果是一致的。其中 miRNA-125b 在前列腺癌非雄依赖转化中的作用已被研究证实^[19], 雄激素可以明显调高其表达, 去雄处理可以使其表达降低, 我们的验证结果也提示这种改变。说明 Agilent 的 miRNA 芯片检测结果是可信的。

尽管已有学者对前列腺癌中的 miRNA 做了研究, 但结果不完全一致^[13-14, 20-21]。分析这些结果的差异, 推测原因认为是不同细胞系之间差异造成的^[22]。LNCaP-AI 是我们经过 LNCaP 非雄培养获得的, 与 LNCaP 相比较, 这些 miRNA 的变化更能说明与非雄依赖的相关性。我们通过对 LNCaP-AI 与 LNCaP 细胞, 发现 miR-149、miR-196b、miR-221、miR-222、miR-563、miR-615、miR-146b、miR-125b、miR-15a、miR-16 等表达是降低的, 基本上与文献^[13, 20]报道相一致。

有研究发现, 雄激素非依赖的前列腺癌细胞系中 miR-146a 显著降低, miR-146a 能够沉默 ROCK1 致癌基因, 并能够抑制 HA/ROCK1(透明质烷激活 ROCK1)诱导的细胞增殖、浸润及与骨髓转移反应, 认为 miR-146a 是肿瘤抑制基因, miR-146b 也有相同的功能, 因为它们碱基序列多数相同^[20]。本研究也发现在 LNCaP-AI 中 miR-146b 降低, 而 miR-146a 降低到几乎测不出。Brookman-Amisshah 等^[23]对临床前列腺癌患者的染色体作了研究, 发现 13q14.2~q14.3 等位基因不平衡(缺失)与术后患者早期生化复发有关, miR-15a 和 miR-16 恰好位于此区域, 它们能够通过转录后抑制 Bcl-2 诱导细胞凋亡^[24], 增加的 Bcl-2 已被证明与前列腺癌非雄转化

和肿瘤进展有关^[25]。本研究的结果也提示在 LNCaP-AI 中 miR-15a 和 miR-16 的表达是降低的。说明非雄依赖转化过程中, miR-15a 和 miR-16 的降低参与了前列腺癌非雄依赖转化。

另外, 我们通过检索 <http://www.mirbase.org/> 比对靶基因寻找 miRNA 调控的相关基因, 发现有些降低的 miRNA 针对调控雄激素相关代谢酶^[26], 如 HSD3B2 (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, 3 β -羟基类固醇脱氢酶 2), 该酶主要在肾上腺表达, 它的增加能够促进雄烯二酮的提高, 从而提高细胞内睾酮的水平; SRD5A1 (type 1 5 α -reductase, 1 型 5 α -还原酶) 能够将睾酮转化为双氢睾酮, 该酶的增加无疑会增加细胞内的双氢睾酮浓度。研究证明进展期前列腺癌并不是完全不依赖雄激素, 而是对低水平的雄激素变得敏感, 因为去势治疗并不能消除全部的雄激素, 仍有雄激素残留^[27]。在分子水平上, 肿瘤细胞仍依赖雄激素和雄激素受体 (AR)^[27]。是否与雄激素代谢酶调控相关的 miRNA 在 LNCaP-AI 细胞中发生改变, 促进雄激素合成及代谢的升高, 加强了细胞利用低水平的激素, 从而促进前列腺癌非雄依赖转化, 有待进一步研究。

表皮生长因子 (EGF) 能够在缺少雄激素的情况下刺激雄激素调节的基因转录^[28-29], 说明雄激素信号通路能够通过非雄依赖的机制被激活, 提示高表达 EGF 及 EGFR 参与前列腺癌非雄依赖转化。本研究结果发现相关调控 EGFR 的 miRNA 在非雄依赖转化过程中表达降低, 推测降低相关 miRNA, 会进一步促进 EGFR 的表达, 加强前列腺癌细胞雄激素非依赖的生长, 参与前列腺癌激素非依赖的转化。临床研究提示高表达 MMP-9 与前列腺癌进展预后有关^[30]。在激素非依赖的前列腺癌中发现高表达 MMP-9^[26]。本研究发现在激素非依赖转化中, 调控 MMP-9 蛋白的相关 miRNA 都是降低的, 并且相关调控 MMP-9 的 miRNA 数量最多。推测这些 miRNA 的降低, 会促进 MMP-9 的高表达, 从而加强 LNCaP-AI 细胞非雄依赖转化及浸润转移能力。

总之, 通过 Agilent miRNA 基因芯片对 LNCaP 及 LNCaP-AI 细胞检测 miRNA 的变化, 联系 <http://www.mirbase.org/> 针对靶基因寻找相关调控的 miRNA, 发现众多的 AR 旁路信号通路、金属酶、抗凋亡基因及雄激素相关代谢酶基因的 miRNA 表达都发生了改变, 提示 miRNA 的变化可能通过调高 AR 旁路信号通路、金属酶、抗凋亡基因及雄激素相

关代谢酶基因的表达, 参与前列腺癌非雄依赖转化。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Parker S L, Tong T, Bolden S, Wingo P A. Cancer statistics, 1996[J]. CA Cancer J Clin, 1996, 46: 5-27.
- [2] Andriole G L, Catalona W J. The urologic clinics of North America[M]. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1991: 15-24.
- [3] Heinlein C A, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer[J]. Endocr Rev, 2004, 25: 276-308.
- [4] Gioeli D. Signal transduction in prostate cancer progression[J]. Clin Sci (Lond), 2005, 108: 293-308.
- [5] Reynolds A R, Kyprianou N. Growth factor signalling in prostatic growth: significance in tumour development and therapeutic targeting[J]. Br J Pharmacol, 2006, 147 (Suppl 2): S144-S152.
- [6] Tsuchiya S, Okuno Y, Tsujimoto G. MicroRNA: biogenetic and functional mechanisms and involvements in cell differentiation and cancer [J]. J Pharmacol Sci, 2006, 101: 267-270.
- [7] Lu J, Getz G, Miska E A, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers[J]. Nature, 2005, 435: 834-838.
- [8] Ouellet D L, Perron M P, Gobeil L A, Plante P, Provost P. MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all [J]. J Biomed Biotechnol, 2006, 2006: 69616.
- [9] Leung A K, Sharp P A. MicroRNAs: a safeguard against turmoil? [J]. Cell, 2007, 130: 581-585.
- [10] Cho W C. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers[J]. Mol Cancer, 2007, 6: 60.
- [11] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 2999-3004.
- [12] Calin G A, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik S E, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 5166-5171.
- [13] Musiyenko A, Bitko V, Barik S. Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates protein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells[J]. J

- Mol Med,2008,86:313-322.
- [14] Tong A W, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16: 206-216.
- [15] Vasudevan S, Tong Y, Steitz J A. Switching from repression to activation; microRNAs can up-regulate translation [J]. *Science*, 2007, 318: 1931-1934.
- [16] Porkka K P, Pfeiffer M J, Waltering K K, Vessella R L, Tammela T L, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2007, 67: 6130-6135.
- [17] Ozen M, Creighton C J, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 1788-1793.
- [18] 纪家涛, 许传亮, 叶华茂, 周 铁, 汤元杰, 孙颖浩. 激素递减法成功建立雄激素非依赖性 LNCaP 细胞亚系 [J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 1311-1315.
Ji J T, Xu C L, Ye H M, Zhou T, Tang Y J, Sun Y H. Establishment of androgen-independent human prostate cancer line LNCaP by gradual deprivation of hormone [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 1311-1315.
- [19] Shi X B, Xue L, Yang J, Ma A H, Zhao J, Xu M. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19983-19988.
- [20] Lin S L, Chiang A, Chang D, Ying S Y. Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer [J]. *RNA*, 2008, 14: 417-424.
- [21] Mattie M D, Benz C C, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott G K, et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies [J]. *Mol Cancer*, 2006, 5: 24.
- [22] Sobel R E, Sadar M D. Cell lines used in prostate cancer research; a compendium of old and new lines; part 1 [J]. *J Urol*, 2005, 173: 342-359.
- [23] Brookman-Amisshah N, Nariculam J, Freeman A, Williamson M, Kirby R S, Masters J R, et al. Allelic imbalance at 13q14. 2 approximately q14. 3 in localized prostate cancer is associated with early biochemical relapse [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 179: 118-126.
- [24] Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, Iorio M V, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 13944-13949.
- [25] Gleave M, Tolcher A, Miyake H, Nelson C, Brown B, Beraldi E, et al. Progression to androgen independence is delayed by adjuvant treatment with antisense Bcl-2 oligodeoxynucleotides after castration in the LNCaP prostate tumor model [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5: 2891-2898.
- [26] Stanbrough M, Bubley G J, Ross K, Golub T R, Rubin M A, Penning T M, et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 2815-2825.
- [27] Cheng H, Snoek R, Ghaidi F, Cox M E, Rennie P S. Short hairpin RNA knockdown of the androgen receptor attenuates ligand-independent activation and delays tumor progression [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 10613-10620.
- [28] Martín-Orozco R M, Almaraz-Pro C, Rodríguez-Ubreva F J, Cortés M A, Roperio S, Colomer R, et al. EGF prevents the neuroendocrine differentiation of LNCaP cells induced by serum deprivation: the modulator role of PI3K/Akt [J]. *Neoplasia*, 2007, 9: 614-624.
- [29] Creighton C J. A gene transcription signature associated with hormone independence in a subset of both breast and prostate cancers [J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 199.
- [30] Sfar S, Saad H, Mosbah F, Gabbouj S, Chouchane L. TSP1 and MMP9 genetic variants in sporadic prostate cancer [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, 172: 38-44.

[本文编辑] 贾泽军