

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01161

前列腺癌相关长链非编码 RNA 在前列腺癌中的表达及生物学功能

胡晶晶^{1△}, 王富博^{2△}, 卢蕾¹, 王录美¹, 刘淑鹏¹, 汪佳祺¹, 任善成², 徐贵霞¹, 刘善荣¹, 孙颖浩^{2*}

1. 第二军医大学长海医院临床实验中心, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨前列腺癌相关长链非编码 RNA (prostate cancer related long non-coding RNA, PCRL) 在前列腺癌中的表达情况及其潜在的生物学功能。 **方法** 采用 qRT-PCR 检测 PCRL 在前列腺癌组织、癌旁组织及其他组织中的表达, 同法检测并比较 PCRL 在雄激素依赖 (LNCaP-AD) 与雄激素非依赖 (LNCaP-AI) 前列腺癌细胞和正常前列腺上皮细胞 (RWPE-1) 中的表达差异。以 siRNA 干扰 PCRL 后, 采用 qRT-PCR 方法检测 LNCaP-AI 细胞和 LNCaP-AD 细胞中雄激素受体的表达变化。 **结果** PCRL 在前列腺及前列腺癌组织中特异高表达, LNCaP-AI 细胞中 PCRL 水平高于 LNCaP-AD 细胞和 RWPE-1 细胞。干扰 PCRL 后 LNCaP-AI 细胞和 LNCaP-AD 细胞中雄激素受体的表达量上升 (前者 $P < 0.0001$)。 **结论** 在前列腺癌中特异高表达的 PCRL 与前列腺癌的进展有关, PCRL 和雄激素受体之间可能存在一定的调控关系。

[关键词] 前列腺肿瘤; 长链非编码 RNA; 雄激素受体**[中图分类号]** R 737.25**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2013)11-1161-05

Expression of prostate cancer related long non-coding RNAs in prostate cancer and its biological function

HU Jing-jing^{1△}, WANG Fu-bo^{2△}, LU Lei¹, WANG Lu-mei¹, LIU Shu-peng¹, WANG Jia-qi¹, REN Shan-cheng², XU Gui-xia¹, LIU Shan-rong¹, SUN Ying-hao^{2*}

1. Clinical Experiment Center, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

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

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of prostate cancer related long non-coding RNAs (PCRL) in prostate cancer and its biological function. **Methods** The expression levels of PCRL in prostatic cancer tissues, adjacent tissues and tissues of other organs were examined by qRT-PCR. The expression levels of PCRL in androgen-dependent (LNCaP-AD), androgen-independent (LNCaP-AI) prostatic cancer cell lines and normal prostate epithelial cells (RWPE-1) were also compared by using qRT-PCR. Finally, the expression levels of androgen receptor were compared between LNCaP-AD and LNCaP-AI prostatic cancer cells by qRT-PCR after siRNA interference of PCRL expression. **Results** PCRL were highly expressed in the prostate and prostatic cancer tissues. Expression of PCRL was notably higher in LNCaP-AI cells than in LNCaP-AD and RWPE-1 cells. Interference of PCRL expression in LNCaP-AI and LNCaP-AD cells significantly increased androgen receptor level ($P < 0.0001$ for LNCaP-AI cells). **Conclusion** Overexpression of PCRL in prostatic cancer is related to the progression of prostatic cancer; and regulatory relation may exist between PCRL and androgen receptor.

[Key words] prostatic neoplasms; long non-coding RNA; androgen receptors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(11):1161-1165]

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是全球发病率第 2、死亡率第 6 的男性恶性肿瘤^[1]。近年来, 我国前列腺癌的发病率显著上升。流行病学数据显示,

我国前列腺癌发病率已从 1993 年的 1.71/10 万男性人口增加到 2005 年的 7.9/10 万男性人口, 年增幅 13%^[2]。与西方国家不同的是, 我国前列腺癌发

[收稿日期] 2013-06-15 **[接受日期]** 2013-10-03**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划, 2012CB518300, 2012CB518306); 国家自然科学基金 (81372763). Supported by National Key Basic Research Program of China (“973” Program, 2012CB518300, 2012CB518306) and National Natural Science Foundation of China (81372763).**[作者简介]** 胡晶晶, 实习研究员. E-mail: luckyjingjing2000@163.com; 王富博, 博士生. E-mail: wangbofengye@163.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

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

现时多为晚期,肿瘤已经局部或远处转移^[3]。肿瘤进入晚期后,抗雄激素治疗(去除雄激素或者使用雄激素受体拮抗剂)是主要治疗方法之一,经抗雄治疗后大部分患者可获得病情好转,然而,在经过中位时间为18~24个月后,几乎所有患者都会转变为去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)^[4]。这一临床难题已困扰了泌尿外科医师多年,至今尚无法有效解决,这也是前列腺癌死亡率居高不下的主要原因。

我们的前期研究利用芯片筛选发现了406个与前列腺癌有关的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)^[5]。此后,我们用14对RNA-seq数据建立了中国人前列腺癌及癌旁正常组织数据库,将此数据库与中国科学院其他组织(包括肝脏、肺、胰腺、乳腺、结直肠、胃、膀胱、肾、输尿管等)数据库进行比对后,发现编号为22476的lncRNA在前列腺组织中的表达远高于在其他组织中的表达。在前列腺癌组织中,22476的表达量也远远高于在正常前列腺组织中的表达量。我们测序的结果和NCBI数据库登录序列(ref/NW004929393.1/)一致。该序列位于14号染色体着丝粒附近的短臂上。进一步分析发现,转录本序列5'端无启动子序列,3'端不存在poly(A),从分析上看,属于lncRNA类型的序列。我们将22476命名为前列腺癌相关lncRNA(prostate cancer related long non-coding RNA, PCRL)。本研究以PCRL为切入点来研究其在前列腺组织中的表达差异及在前列腺癌发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 RPMI 1640培养液、无酚红RPMI 1640培养液、活性炭和葡聚糖处理的胎牛血清为Gibco公司产品,0.05%含EDTA的胰蛋白酶购自Biological Industry公司,进口胎牛血清购于PAA公司,脂质体Lipofectamine2000、RNA抽提试剂TRIzol为Invitrogen公司产品,反转录试剂盒(货号:DRR037A)和实时荧光定量试剂盒(货号:DRR041A)购于宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 细胞来源及培养 本研究中所有细胞系(包括前列腺癌细胞系C4-2、PC-3、DU145、22RV1、LNCaP-AD、LNCaP-AI,正常前列腺细胞系RWPE-1)

均来源于第二军医大学长海医院泌尿外科实验室。C4-2、PC-3、DU145、LNCaP-AD、22RV1用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液培养,LNCaP-AI用含10%活性炭和葡聚糖处理的胎牛血清的无酚红RPMI 1640培养液培养,RWPE-1用K-SFM(Gibco 17005-042)培养液培养。所有细胞均在37℃、5%CO₂条件下培养。

1.3 组织标本来源 本实验所有临床组织标本均来自于第二军医大学长海医院。所有标本的使用均由患者或其委托人签署知情同意书。所有涉及人体标本的研究均事先获得长海医院医学伦理委员会的批准。所有前列腺癌组织和癌旁正常组织均经病理确认。所有癌组织均至少含前列腺癌70%,所有正常癌旁组织含癌量为0。

1.4 qRT-PCR检测PCRL在细胞系和组织中的表达 用TRIzol(Invitrogen, United States of America, USA)法提取细胞系和组织中的总RNA,将1 μg总RNA按PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa;RR037A)反转录试剂盒步骤反转录成cDNA,根据实时荧光定量试剂盒[SYBR (Premix Ex Taq[™] (Perfect RealTime) (2 ×) (TaKaRa; DRR081A)]的步骤,使用Applied Biosystems Step One Plus实时荧光定量系统,检测组织和细胞系中PCRL的表达。PCRL定量正义引物为5'-TCC ATG TCC TTA AGG TGA CAA A-3',反义引物为5'-TCT CCC TTT CTC CCC AGT CT-3'; βactin定量正义引物为5'-CGC GAG AAG ATG CCC AGA TC-3',反义引物为5'-TCA CCG GAG TCC ATC ACG A-3'。以βactin为内参基因,应用StepOne Software version v2.1 (Applied Biosystems, USA)处理qRT-PCR数据,各组重复3次取平均值。

1.5 PCRL的生物学功能研究 将LNCaP-AD和LNCaP-AI细胞以3×10⁵个/孔的密度接种在6孔板,24 h后将两种细胞同时按Lipofectamine2000说明书转染PCRL的干扰RNA(购于上海拓然生物科技有限公司)。siRNA序列如下:PCRL-siRNA-1-sense为5'-GCC UGG AGA AAG UUU AAC UdTdT-3',PCRL-siRNA-1-antisense为5'-AGU UAA ACU UUC UCC AGG CdTdT-3'; PCRL-

siRNA-2-sense 为 5'-GAG GCU GUU AAG UGA AUC AdTdT-3', PCRL-siRNA-2-antisense 为 5'-UGA UUC ACU UAA CAG CCU CdTdT-3'; PCRL-siRNA-3-sense 为 5'-CAC CAA UGG ACU GCA ACA UdTdT-3', PCRL-siRNA-3-antisense 为 5'-AUG UUG CAG UCC AUU GGU GdTdT-3'。以 Mock(在培养液中加 Lipofectamine2000)和 Control(在培养液中加 Negative siRNA 和 Lipofectamine2000)作为对照。转染 12 h 后采用 qRT-PCR 法检测细胞中雄激素受体(androren receptor, AR)的表达, AR 定量正义引物为 5'-GAC GCT TCT ACC AGC TCA CC-3', 反义引物为 5'-GAA AGG ATC TTG GGC ACT TG-3', 方法同前。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件包对数据进行统计学分析, 使用 Wilcoxon 符号秩检验比较前列腺癌与癌旁组织中 PCRL 表达差异, 使用 Mann-Whitney U 检验比较西方人群细胞系和中国人前列腺癌组织中的 PCRL 表达差异。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 PCRL 是前列腺和前列腺癌相关性 lncRNA 我们检测了不同组织中 PCRL 的表达。结果发现, 与肝、胰腺、乳腺、肠、胃、膀胱、肾、食管等组织相比, PCRL 在前列腺和前列腺癌组织中高表达(图 1A)。此后, 我们用 15 对前列腺癌和癌旁正常组织做了进一步检测。使用 Wilcoxon 符号秩检验比较前列腺癌与癌旁组织的 PCRL 表达差异, 结果发现, 前列腺癌组织中 PCRL 的表达高于癌旁组织($P=0.027$, 图 1B)。

2.2 PCRL 在西方人群细胞系和中国人前列腺癌组织中的表达差异 我们利用 qRT-PCR 在来源于西方人群前列腺癌组织的细胞系和中国人前列腺癌组织中检测了 PCRL 的表达。使用 Mann-Whitney U 检验比较西方人群细胞系和中国人前列腺癌组织中的 PCRL 表达差异, 结果表明, PCRL 在中国人前列腺癌组织中的表达量远高于西方人群前列腺癌细胞系($P<0.0001$, 图 2), 这提示 PCRL 可能具有中国人种族特异性。

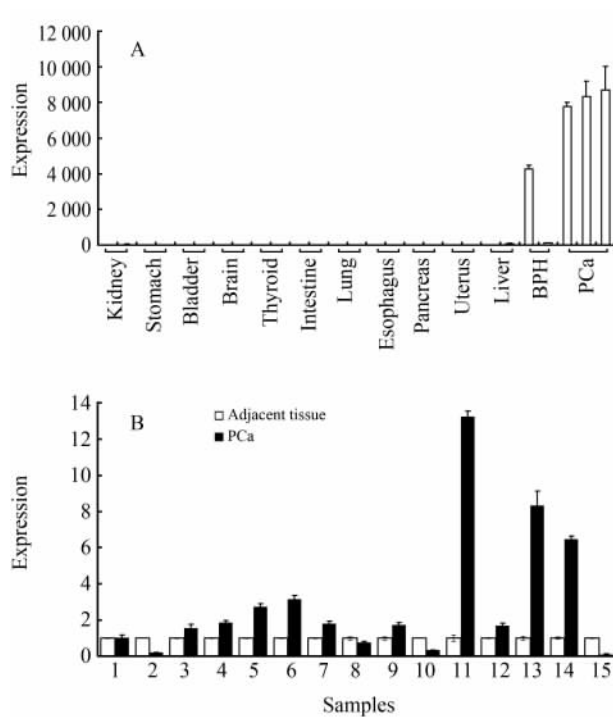


图 1 PCRL 在前列腺癌和其他组织中的表达

Fig 1 The expression of PCRL in PCa and other tissues

A: Expression of PCRL in prostate was higher than other tissues; B: Expression of PCRL in PCa was notably higher than in adjacent tissues ($P=0.027$). PCRL: Prostate cancer related long non-coding RNA; BPH: Benign prostatic hyperplasia; PCa: Prostatic cancer. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

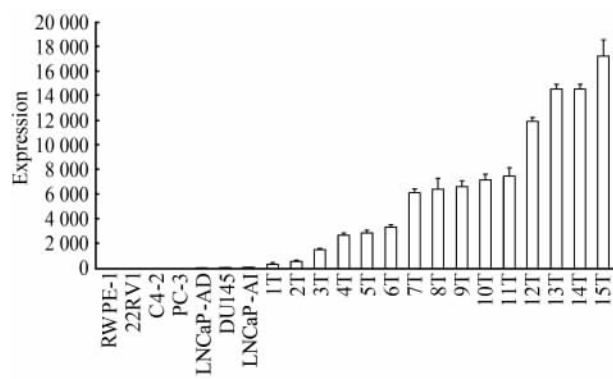


图 2 PCRL 在西方人群细胞系和中国人前列腺癌组织中的表达

Fig 2 Expression of PCRL in cell lines derived from Western population and prostate cancer tissues of Chinese patients

1T-15T: Prostate cancer tissues of Chinese patients. Expression of PCRL in 1T-15T was notably higher than the cell lines ($P<0.0001$). PCRL: Prostate cancer related long non-coding RNA; $n=3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 PCRL 在前列腺癌进展过程中的初步生物学功能研究 首先, 我们通过 real-time PCR 技术检测

了 PCRL 和 AR 在雄激素依赖性前列腺癌细胞 LNCaP-AD、雄激素非依赖性前列腺癌细胞 LNCaP-AI 和人正常前列腺上皮细胞 RWPE-1 中的表达情况。结果(图 3A、3B)发现, LNCaP-AD 和 LNCaP-AI 中 PCRL 表达量明显高于 RWPE-1, 而且, LNCaP-AI 中 PCRL 表达量明显高于 LNCaP-AD 中的表达; 更为有意义的是, AR 在这 3 种细胞系中的表达情况与 PCRL 相同。此后, 我们研究了 siRNA 干扰 PCRL 后 AR 的表达。由于干扰效率图

(图 3C)可知, siRNA-1 的干扰效率明显高于 siRNA-2 和 siRNA-3, 由此, 我们选择 siRNA-1 用于后续实验。通过 qRT-PCR 技术检测 PCRL 干扰后 LNCaP-AD 和 LNCaP-AI 中的 AR 的表达量, 结果表明, 无论是在 LNCaP-AI 细胞中还是 LNCaP-AD 细胞中, 干扰 PCRL 后 AR 的表达量都有不同程度升高; 在 LNCaP-AI 细胞中, AR 的表达量增加更明显($P < 0.0001$, 图 3D、3E)。

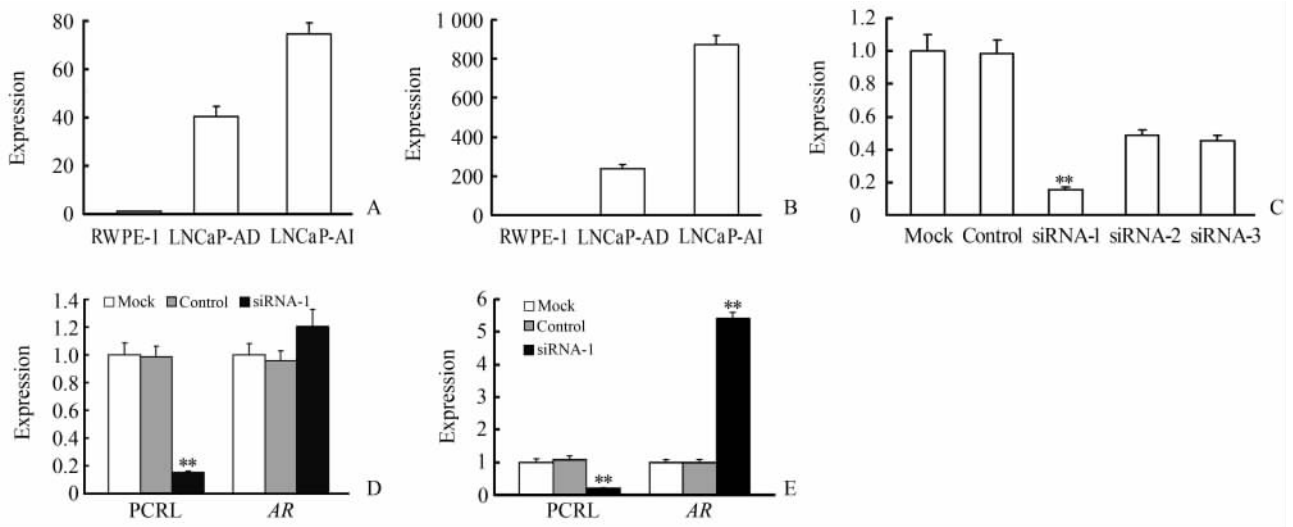


图 3 PCRL 在前列腺癌进展过程中的初步生物学功能研究

Fig 3 Study on biological function of PCRL in prostate cancer progression

A: Expression of PCRL in LNCaP-AI, LNCaP-AD and RWPE-1 cells; B: Expression of androgen receptor (AR) in LNCaP-AI, LNCaP-AD and RWPE-1 cells; C: Efficiency of PCRL interference by siRNA; D: Expression of AR in LNCaP-AD cells after PCRL interference; E: Expression of AR in LNCaP-AI cells after PCRL interference. PCRL: Prostate cancer related long non-coding RNA; * * $P < 0.0001$ vs control. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

去势抵抗性前列腺癌是引起前列腺癌患者死亡的主要原因, 虽然目前雄激素依赖性转变的机制尚不完全清楚, 但其转变机制正在不断被研究并且更新中^[6]。归纳起来去势抵抗性前列腺癌的形成主要通过两种途径实现: (1) AR 途径, 包括 AR 配体结合区突变或 AR 基因扩增, 增加肿瘤对肾上腺源性的低水平雄激素的敏感性^[7-9]; 突变的 AR 能对其他类固醇, 甚至抗雄药物产生应答; 通过改变 AR 与共激活分子之间的相互作用, 使突变或非突变的 AR 被肾上腺雄激素活化^[10], 或通过改变某些肽类生长因子或细胞因子的基因表达与功能, 使 AR 非正常活化; 或通过失活的雄激素代谢产物肿瘤内合

成二氢睾酮^[11]。(2) 非 AR 途径, 包括肿瘤细胞神经内分泌化、凋亡基因异常等^[12-15]。以上这些途径并非相互排斥, 任何单一途径均不能完全解释去势抵抗性前列腺癌的发生机制。

我们利用 qRT-PCR 检测发现, PCRL 在前列腺组织(包含正常的前列腺组织和前列腺癌组织)中的表达高于其他器官如肾脏、胰腺、乳腺和胃。前列腺癌组织中 PCRL 表达比癌旁正常的前列腺组织高得多, 这表明, 尽管我们现在还不清楚其特异性表达的机制, 但 PCRL 与前列腺的生理病理功能调控相关。利用前列腺癌细胞系进一步研究发现, PCRL 在雄激素非依赖性前列腺癌细胞中的表达高于雄激素依赖前列腺癌细胞, 下调 PCRL 后, 雄激素非依赖性前列腺癌细胞中 AR 的表达进一步升高。这提示,

PCRL 和 AR 之间可能存在着一定的调控关系, PCRL 通过影响 AR 表达参与了前列腺癌的发展。尽管信息学分析显示 PCRL 与 AR 在序列上存在一定的互补性, 但二者之间具体的调控机制及 PCRL 在前列腺癌发生发展中的生物学功能需要进一步深入探讨。

我们还发现了一个有意义的现象: PCRL 在中国人前列腺和前列腺癌组织中都特异性高表达且其表达量都远远高于西方人群细胞系。在我们进行的 PCRL 细胞生物学功能研究中, 使用的是西方人群细胞系, 在干扰 PCRL 的表达后, 细胞生物学行为并没有明显改变(结果未显示)。我们设想, 这可能与 PCRL 在西方人群细胞系中的低表达有关。这也提示我们, 利用中国人群细胞系进行生物学功能研究或在西方人群细胞系中进行过表达 PCRL 的研究将是未来研究 PCRL 的重要方向。

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] Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61:69-90.
- [2] 雷涛, 毛伟敏, 杨红健, 陈晓钟, 雷通海, 汪祥辉, 等. 中国城乡 11 市县常见恶性肿瘤发病趋势分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2009, 30:1165-1170.
- [3] Peyromaure M, Debré B, Mao K, Zhang G, Wang Y, Sun Z, et al. Management of prostate cancer in China: a multicenter report of 6 institutions [J]. *J Urol*, 2005, 174:1794-1797.
- [4] Oh W K, Kantoff P W. Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects [J]. *J Urol*, 1998, 160:1220-1229.
- [5] Ren S, Peng Z, Mao J H, Yu Y, Yin C, Gao X, et al. RNA-seq analysis of prostate cancer in the Chinese population identifies recurrent gene fusions, cancer-associated long noncoding RNAs and aberrant alternative splicings [J]. *Cell Res*, 2012, 22:806-821.
- [6] Chi K N, Bjartell A, Dearnaley D, Saad F, Schröder F H, Sternberg C, et al. Castration-resistant prostate cancer: from new pathophysiology to new treatment targets [J]. *Eur Urol*, 2009, 56:594-605.
- [7] Hu R, Dunn T A, Wei S, Isharwal S, Veltri R W, Humphreys E, et al. Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69:16-22.
- [8] Locke J A, Guns E S, Lubik A A, Adomat H H, Hendy S C, Wood C A, et al. Androgen levels increase by intratumoral de novo steroidogenesis during progression of castration-resistant prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68:6407-6415.
- [9] Linja M J, Savinainen K J, Saramäki O R, Tammela T L, Vessella R L, Visakorpi T. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61:3550-3555.
- [10] Taplin M E, Rajeshkumar B, Halabi S, Werner C P, Woda B A, Picus J, et al. Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663 [J]. *J Clin Oncol*, 2003, 21:2673-2678.
- [11] Ishizaki F, Nishiyama T, Kawasaki T, Miyashiro Y, Hara N, Takizawa I, et al. Androgen deprivation promotes intratumoral synthesis of dihydrotestosterone from androgen metabolites in prostate cancer [J]. *Sci Rep*, 2013, 3:1528.
- [12] Debes J D, Tindall D J. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 351:1488-1490.
- [13] Chen C D, Welsbie D S, Tran C, Baek S H, Chen R, Vessella R, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy [J]. *Nat Med*, 2004, 10:33-39.
- [14] Gao L, Schwartzman J, Gibbs A, Lisac R, Kleinschmidt R, Wilmot B, et al. Androgen receptor promotes ligand-independent prostate cancer progression through c-Myc upregulation [J]. *PLoS One*, 2013, 8:e63563.
- [15] Mosquera J M, Beltran H, Park K, MacDonald T Y, Robinson B D, Tagawa S T, et al. Concurrent AURKA and MYCN gene amplifications are harbingers of lethal treatment-related neuroendocrine prostate cancer [J]. *Neoplasia*, 2013, 15:1-10.

[本文编辑] 孙岩