

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.08.001

• 基础研究 •

长链非编码 RNA LINC01006 对前列腺癌细胞增殖和侵袭的影响 *

王钺洋¹ 王世远¹ 李健瑛¹ 王 成² 姜辰一¹ 赵福军^{1Δ}

(1 上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科 上海交通大学医学院 上海 200080;

2 江阴市人民医院泌尿外科 江苏 无锡 214400)

摘要 目的:探究长链非编码 RNA LINC01006 对前列腺癌(prostate cancer, PCa)细胞增殖和侵袭能力的影响。**方法:**体外培养人前列腺正常上皮细胞系 RWPE-1, 人 PCa 细胞系 LNCaP、22Rv1、PC3、C4-2b, 应用实时定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测上述细胞 LINC01006 的表达; 分别通过转染小干扰 RNA (siRNA) 或过表达 LINC01006 的慢病毒载体, 在 LNCaP 和 PC3 细胞中敲减 LINC01006 或稳定过表达 LINC01006; 应用 CCK8、克隆形成实验检测 LINC01006 对 PCa 细胞增殖能力的影响; 应用 Transwell 侵袭实验检测 LINC01006 对 PCa 细胞侵袭能力的影响; 通过网站预测 LINC01006 的转录调控因子及其结合位点。**结果:**相较于正常前列腺上皮细胞系 RWPE-1, PCa 细胞系 LNCaP、22Rv1、C4-2b 和 PC3 中 LINC01006 表达明显升高 ($P<0.05$)。敲减 LINC01006 后的 PCa 细胞系 LNCaP 和 PC3 的增殖和侵袭能力被显著抑制 ($P<0.05$), 过表达 LINC01006 则明显促进 PCa 细胞系 LNCaP 和 PC3 的增殖、侵袭能力 ($P<0.05$)。通过 PROMO 网站预测可见 AR 是 LINC01006 的潜在转录调控因子, 通过 Cistrome DB 数据库发现 LINC01006 上游启动子区域存在 AR 富集; 敲减、抑制 AR 后 LNCaP 细胞中 LINC01006 表达明显升高 ($P<0.05$)。**结论:**LINC01006 在 PCa 细胞系中呈高表达, 促进 PCa 细胞的增殖和侵袭, 其受到 AR 负向调控, 可能在 PCa 发生发展和去势抵抗形成过程中发挥作用。

关键词:前列腺癌; lncRNA; 细胞增殖; 细胞侵袭; 转录因子**中图分类号:**R33;R737.25 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)08-1401-07

Influence of Long Non-coding RNA LINC01006 on the Proliferation and Invasion of Prostate Cancer Cell*

WANG Yue-yang¹, WANG Shi-yuan¹, LI Jian-ying¹, WANG Cheng², JIANG Chen-yi¹, ZHAO Fu-jun^{1Δ}

(1 Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China;

2 Department of Urology, Jiangyin People's Hospital, Wuxi, Jiangsu, 214400, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effects of long non-coding RNA LINC01006 on the proliferation and invasion of prostate cancer (PCa) cells. **Methods:** Human prostate normal epithelial cell line RWPE-1 and human PCa cell lines LNCaP, 22Rv1, PC3 and C4-2b were cultured in vitro, and the expression of LINC01006 was detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR). The effect of LINC01006 on the proliferation of PCa cells was detected by CCK8 and colony formation assays. Transwell chamber was used to evaluate the effect of LINC01006 on the invasion ability of PCa cells. Transcriptional regulatory factors and their binding sites of LINC01006 were predicted through the website. **Results:** Compared with normal prostate epithelial cell line RWPE-1, the expression of LINC01006 in PCa cell lines LNCaP, 22Rv1, C4-2b and PC3 was significantly increased ($P<0.05$). Knockdown of LINC01006 significantly inhibited the proliferation and invasion of LNCaP and PC3 ($P<0.05$), and overexpressing LINC01006 significantly promoted the proliferation and invasion of PCa cell lines LNCaP and PC3 ($P<0.05$). AR was predicted to be a potential transcriptional regulator of LINC01006 using the PROMO website, and was significantly recruited to the upstream promoter region of LINC01006 according to the Cistrome DB database. The expression of LINC01006 in LNCaP cell line increased significantly after silencing or inhibiting AR ($P<0.05$). **Conclusions:** LINC01006 is highly expressed in PCa cell lines, which promotes the proliferation and invasion of PCa cells. It is negatively regulated by AR and may play a role in the occurrence and development of PCa and the formation of castration resistance.

Key words: Prostate cancer; LncRNA; Cell proliferation; Cell invasion; Transcription factor**Chinese Library Classification (CLC):** R33; R737.25 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2021)08-1401-07

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81772746)

作者简介: 王钺洋(1995-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 前列腺恶性肿瘤, 电话: 18008238675, E-mail: Urowangyy@163.com

Δ 通讯作者: 赵福军, 男, 博士, 主任医师, 主要研究方向: 前列腺疾病发病机制研究和微创治疗的并发症机制研究,

E-mail: drzhaofujun@yahoo.com

(收稿日期: 2020-10-07 接受日期: 2020-10-30)

前言

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是当今男性最常见的肿瘤,也是男性癌症死亡的主要原因之一,严重危害着中老年男性的健康^[1]。局部早期 PCa 的首选治疗是根治性手术,对于局部晚期、生化复发或转移性 PCa,雄激素剥夺治疗(androgen deprivation therapy, ADT)是目前最有效的治疗方案^[2],但逐步进展的去势抵抗性前列腺癌(castration resistance prostate cancer, CRPC)仍对患者的生命健康造成极大威胁^[3]。因此,研究 PCa 的发生发展以及向去势抵抗转化的机制,并探索新的治疗方法及靶点有着非常重要的意义。长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)在恶性肿瘤发生发展过程中发挥的重要作用近年来被逐渐发现,lncRNA 是一种长度大于 200 个碱基的不具备蛋白质编码功能的 RNA,其能够参与调控肿瘤细胞的增殖、分化及凋亡等过程,并与 CRPC 的形成与发展密切相关^[4,5]。例如恩杂鲁胺诱导 lncRNA-p21 在 PCa 中表达上调,通过调节 EZH2 / STAT3 信号通路介导 PCa 的神经内分泌分化^[6];lncRNA PCAT1 通过干扰 PHLPP / FKBP51 / IKK α 复合物,激活了 CRPC 中 AKT 和 NF- κ B 的信号转导途径,促进了 CRPC 细胞的生长^[7]。研究发现一种新的 lncRNA LINC01006,位于 7 号染色体,可作为胃癌的诊断预测指标^[8],能促进胰腺癌细胞的增殖和侵袭^[9],但尚无研究探讨其在 PCa 中的作用。本研究通过检测正常前列腺细胞系和 PCa 细胞系中 LINC01006 的表达,研究其对 PCa 增殖、侵袭能力的影响,利用数据库预测寻找 LINC01006 的转录调控因子,并研究其对 LINC01006 表达的影响,以期揭示 LINC01006 在 PCa 发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

PCa 细胞系 LNCaP、22Rv1、PC3、C4-2b,正常前列腺细胞系 RWPE-1 以及慢病毒包被所使用的 293T 细胞均购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;细胞培养所使用的 RPMI 1640、K-SFM、F12K 培养基,胎牛血清(FBS)等均购自美国 Gibco 公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;逆转录及实时定量 PCR 试剂购自日本 TAKARA 公司;恩杂鲁胺购自 MedChemExpress 公司,CCK8 试剂盒购自日本 DOJINDO 公司;转染试剂 Lipofectamine3000 购自美国 ThermoFisher 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;siRNA 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 正常前列腺上皮细胞系及 PCa 细胞系培养 PCa 细胞系 LNCaP、22Rv1 培养所用培养基为含有 10%FBS、1%青霉素 / 链霉素的 RPMI 1640 培养基,PC3 所用培养基为含有 10% FBS、1%青霉素 / 链霉素的 F12K 培养基,前列腺正常上皮细胞系 RWPE-1 培养于 K-SFM 培养基。上述细胞均培养在含有 5% CO₂ 的 37℃ 恒温培养箱,平均 2 天更换一次新鲜培养基,观察细胞融合度达到 80 %~90 %时按照 1:3~1:5 比例进行传代。**1.2.2 qRT-PCR** 使用 TRIzol 试剂提取正常前列腺上皮细胞系和各 PCa 细胞系的总 RNA,并按照 TAKARA 公司逆转录试剂盒说明书将 RNA 逆转录为 cDNA,根据 NCBI-Gene 提供

的基因序列设计合成 LINC01006 及内参 GAPDH 的引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。LINC01006 上游引物:5'-TTGTGTTTCCTGCTTCGTGG-3',下游引物:5'-GGAACGCGTTGCCTCAATTC-3';内参 GAPDH 上游引物:5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGGAAGG-3';下游引物:5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。qRT-PCR 按照 TAKARA 公司 TB Green 试剂盒说明书配置反应体系,所有样本均设置 3 个复孔。反应条件:阶段一:预变性 95℃ 30s;阶段二:PCR 反应(40 个循环):95℃ 5s,60℃ 34s。采用 2^{- Δ CT} 法计算目的 RNA 的相对表达量。

1.2.3 质粒构建及 siRNA 转染 根据 NCBI-Gene 和 Ensembl 提供的 LINC01006 基因全长转录本序列,插入到 pLenti-EF1a 质粒中,构建成功后转化至大肠杆菌 DH5 α ,加入含适当比例对应抗性抗生素的 LB 液体培养基中,37℃ 250 rpm 匀速培养 12-16 h,菌液浑浊后使用 TIANGEN 无内毒素质粒小提中量试剂盒(货号:DP118)抽提质粒。分别使用了两种包装质粒 psPAX2 及 pMD2.G 与过表达 LINC01006 的质粒共转染了 293T 细胞系,从而产生具有合适滴度的慢病毒,并用于感染 LNCaP 和 PC3 细胞系;使用合适浓度的嘌呤霉素(Invitrogen)筛选细胞系一周,以构建稳定的 LINC01006 过表达细胞系。将细胞分为实验组(标记为 LINC01006),阴性对照组(空载体慢病毒转染细胞,标记为 Vec),通过 qRT-PCR 检测过表达 LINC01006 的效率(方法同 1.2.2)。为了沉默 LINC01006 或 AR 在 PCa 细胞系中的表达,转染 siRNA 以干扰 LINC01006 或 AR 的表达:将培养至对数生长期的 LNCaP 和 PC3 细胞接种至 6 孔培养板,待细胞融合度达 70-80 %时,使用 Lipofectamine3000(Invitrogen)试剂转染 siRNA,方法按照说明书,分组:LINC01006 沉默阴性对照组(标记为 siCtrl),LINC01006 沉默组(标记为 si1006);AR 沉默阴性对照组(siCtrl),AR 干扰组(siAR)。37℃ 恒温培养 48-72 h 后检测 LINC01006 或 AR 的表达水平。

1.2.4 CCK8 法和克隆形成实验检测 LINC01006 对 PCa 细胞系增殖能力的影响 为了评估 PCa 细胞的增殖能力,行 CCK-8 和克隆形成实验。将经 "1.2.3" 验证过的 LNCaP 和 PC3 细胞用于此步实验,分组:siCtrl 组、si1006 组、Vec 组、LINC01006 组。CCK-8 实验:将 3000-5000 个细胞接种到 96 孔板的每个孔中,设置培养 0、1、2、3 天四个时间点,更换新鲜培养液,每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂,在 37℃ 恒温培养箱中孵育 2 h 后使用酶标仪在 450 nm(OD450)处测量吸光度。克隆形成实验:分别将 500-2000 个细胞接种到六孔板的每个孔中,吹打成单细胞悬液,使细胞均匀分散,并在标准条件下培养 10-14 天,待六孔板中出现肉眼可见的细胞集落后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞,4 %多聚甲醛中固定细胞,1.0 %结晶紫染色,清水洗涤后在空气中晾干,拍摄平板并计数细胞集落数。

1.2.5 Transwell 检测 LINC01006 对 PCa 细胞系侵袭能力的影响 通过 Transwell 侵袭试验评估 PCa 细胞的侵袭性。用无血清培养基将经过 "1.2.3" 验证的 LNCaP 和 PC3 细胞稀释成合适浓度的单细胞悬液(分组同 "1.2.4"),分别接种至包被基质胶(Corning)的 Transwell 小室的上室中,并放入 24 孔板培养,每孔加入 600 μ L 含有 10 % FBS 的细胞培养液,每组设置 3 个复

孔, 培养 48 h 后 4 %多聚甲醛固定 30 min, 0.1 %结晶紫染色 10 min, 用洁净的棉签除去上室中的细胞, 在显微镜下取 5 个视野拍摄穿过小孔的细胞数量。

1.2.6 数据库预测 LINC01006 转录因子 通过使用 ALGGEN - PROMO 数据库在线预测 LINC01006 的转录因子, 并与 Cistrome Data Browser 数据库进行比对。首先在 Ensembl 数据库 (<http://asia.ensembl.org/index.html>) 检索得到 LINC01006 的上游 3kb 启动子序列, 进入 PROMO 数据库 (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3/), 选择种属为人, 将在 Ensembl 数据库中得到的 LINC01006 启动子序列输入, 选择合适的容错率后提交预测, 得到预测的转录因子。进入 Cistrome Data Browser 数据库 (<http://cistrome.org/db/#/>), 以人为目标种属, AR 为所分析的转录因子, LNCaP 和 VCaP 细胞系为生物来源, 选择符合要求的数据集, 进入加利福尼亚大学圣克鲁斯分校 (University of California, Santa Cruz, UCSC) 基因组浏览器, 在 LINC01006 的基因序列区域查看在启动子区域是否有 AR 富集。

1.2.7 雄激素敏感 PCa 细胞的 AR 激活或抑制 使用 AR 激动剂双氢睾酮(DHT)或 AR 抑制剂恩杂鲁胺(enzalutamide)处理雄激素敏感的 PCa 细胞系 LNCaP, 处理之前将 LNCaP 细胞在含有 10 %活性炭处理的 FBS(CS-FBS)的 RPMI 1640 培养基中培养 3 天, 然后用不同浓度(1 nM 或 10 nM)的 DHT 或不同浓度(1 μ M 或 10 μ M)的恩杂鲁胺诱导细胞, 培养 48 h 后提取细胞总 RNA, 应用 qPCR 检测 LINC01006 的表达。

1.2.8 统计学分析 统计分析采用 SPSS 软件 22.0 版本进行, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差(SD)表示, 采用 t 检验或 ANOVA 检验来确定各组数据之间的统计学差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 LINC01006 在正常前列腺上皮细胞和 PCa 细胞系中的表达

通过检测正常前列腺上皮细胞系 RWPE-1 以及 PCa 细胞系 LNCaP、C4-2b、22Rv1、PC3 中的 LINC01006 的表达, 结果显示与正常前列腺上皮细胞系 RWPE-1 相比, LINC01006 在 PCa 细胞系中表达显著升高($P < 0.05$, 图 1)。

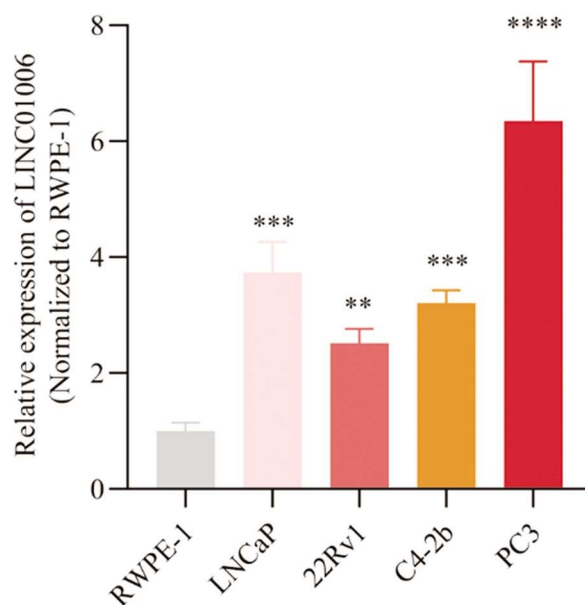


图 1 LINC01006 在正常前列腺上皮细胞系和 PCa 细胞系中的表达
(注: 与 RWPE-1 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)。

Fig.1 Expression of LINC01006 in normal prostate epithelial cell line and PCa cell lines

(Note: Compared with RWPE-1 group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

2.2 在 PCa 细胞中上调及敲减 LINC01006 的水平

为了研究 LINC01006 在 PCa 细胞中发挥的作用, 我们利用特异性 siRNA 和慢病毒包装的过表达质粒在 LNCaP 和 PC3 细胞中敲减或过表达了 LINC01006。qRT-PCR 结果显示, 和对照组(Vec)相比, 过表达组(LINC01006 组)LINC01006 表达量明显升高(P 均 < 0.05 , 图 2A 和 2B); 转染 siRNA 48 h 后提取总 RNA 进行逆转录及 qRT-PCR 检测, 结果显示 si1006 组的 LINC01006 表达量显著下调(P 均 < 0.05 , 图 2C 和 2D)。说明特异性 siRNA 可显著降低 LINC01006 在 LNCaP 和 PC3 细胞中的表达水平, 而慢病毒包装的过表达质粒能够显著上调 LINC01006 在 LNCaP 和 PC3 细胞中的表达水平, 可进行后续实验。

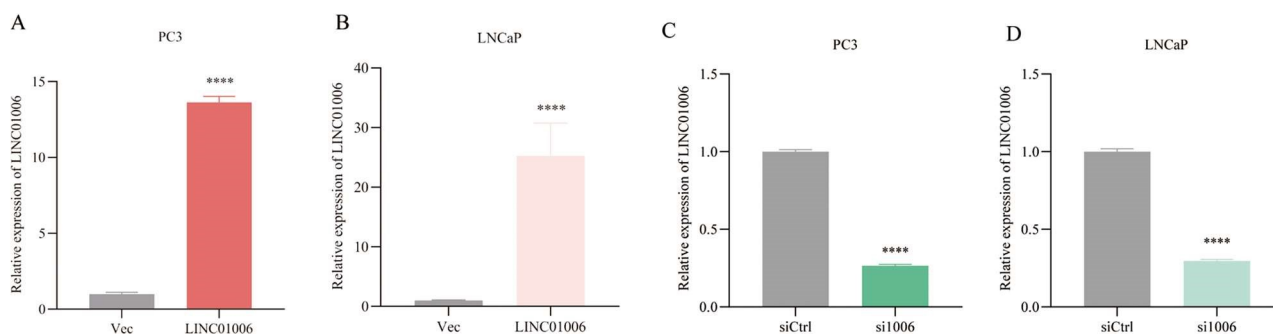


图 2 qRT-PCR 验证 LINC01006 在 PCa 细胞系 LNCaP 和 PC3 中的过表达和敲减效率

(A 和 B. LINC01006 在 PC3 和 LNCaP 细胞中的过表达效率; C 和 D. LINC01006 在 PC3 和 LNCaP 中的敲减效率)

(注: 与 Vec/ siCtrl 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)。

Fig.2 Overexpression and knockdown efficiencies of LINC01006 in PCa cell lines LNCaP and PC3 were determined by qRT-PCR

(A and B. Overexpression efficiency of LINC01006 in PC3 and LNCaP cells; C and D. Knockdown efficiency of LINC01006 in PC3 and LNCaP cells)

(Note: Compared with Vec/ siCtrl group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

2.3 LINC01006 对 PCa 细胞增殖能力的影响

为了研究 LINC01006 对 PCa 细胞增殖能力的影响, 我们进行了 CCK8 和克隆形成实验, 我们发现, 在过表达 LINC01006 后, LNCaP 和 PC3 的增殖明显增强 ($P < 0.05$, 图 3A

和 3B), 克隆形成能力也明显增强 (P 均 < 0.05 , 图 3E 和 3F), 相反, 在敲减 LINC01006 的表达后, LNCaP、PC3 细胞系的增殖能力明显受到抑制 (P 均 < 0.05 , 图 3C 和 3D)。

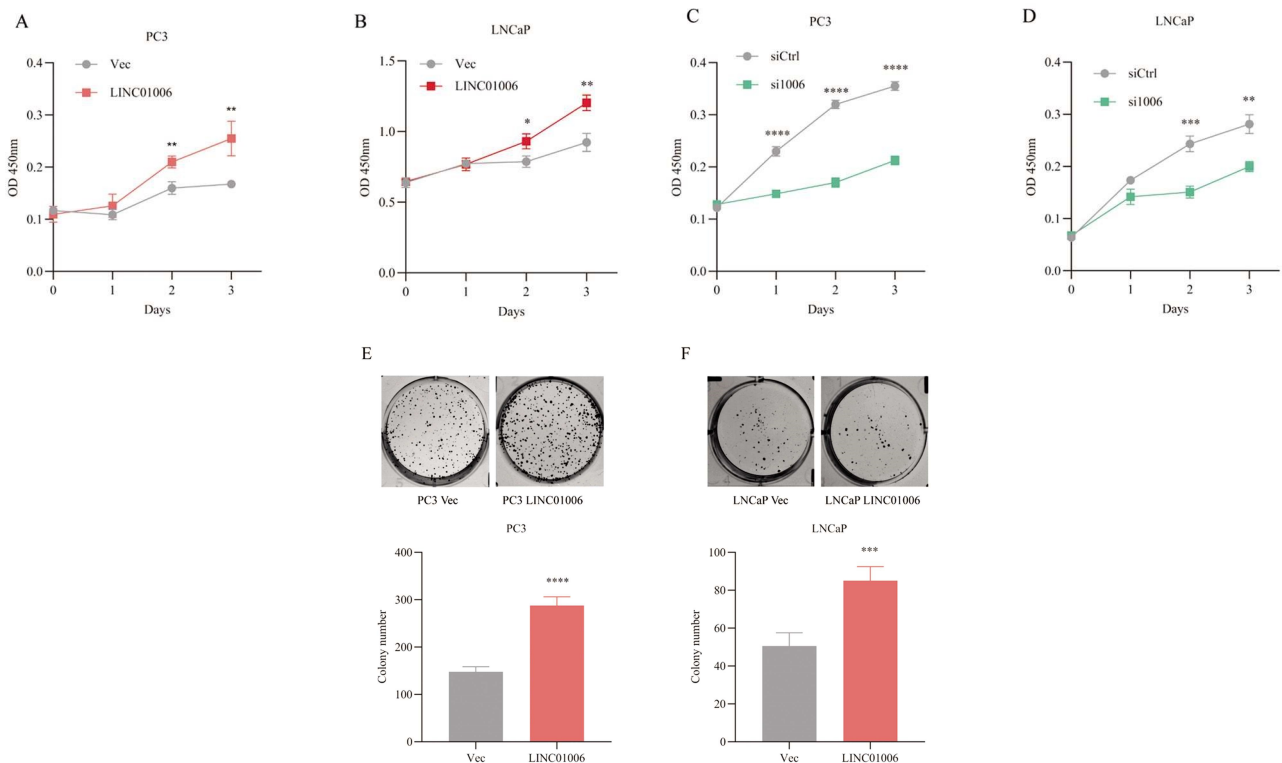


图 3 LINC01006 对 PCa 细胞 PC3、LNCaP 增殖能力的影响

(A 和 B. CCK8 实验表明过表达 LINC01006 促进 PC3 和 LNCaP 细胞的增殖能力; C 和 D. CCK8 实验表明敲减 LINC01006 抑制 PC3 和 LNCaP 细胞的增殖能力; E 和 F. 平板克隆形成实验表明过表达 LINC01006 促进 PC3 和 LNCaP 细胞的克隆形成能力)

(注: 与 Vec/ siCtrl 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$)。

Fig.3 The effect of LINC01006 on proliferation of PCa cells PC3 and LNCaP

(A and B. CCK8 experiments showed that overexpression of LINC01006 promoted the proliferation of PC3 and LNCaP cells. C and D. CCK8 experiments showed that knockdown of LINC01006 inhibited the proliferation of PC3 and LNCaP cells. E and F. Colony formation experiments showed that overexpression of LINC01006 promoted the proliferation of PC3 and LNCaP cells.)

(Note: Compared with Vec/ siCtrl group, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

2.4 LINC01006 对细胞侵袭能力的影响

为了探究 LINC01006 对 PCa 细胞侵袭能力的影响, 我们进行了 Transwell 侵袭实验, 结果表明, 与对照组 (Vec) 相比, 过表达 LINC01006 后明显增强了 LNCaP、PC3 的侵袭能力 (P 均 < 0.05 , 图 4A 和 4B); 反之, 与 siCtrl 组相比, 敲减 LINC01006 后明显抑制了 LNCaP、PC3 细胞的侵袭能力 (P 均 < 0.05 , 图 4C 和 4D)。

2.5 LINC01006 的表达受到 AR 调控

为了探究 LINC01006 在 PCa 细胞中表达升高的机制, 我们通过网站预测了 LINC01006 的潜在转录因子 (<http://algggen.lsi.upc.es/recerca/frame-recerca.html>) (图 5A), 并分析了公共 ChIP-seq 数据库 (<http://cistrome.org/db/#/>), 与预测结果进行对比, 结果发现用雄激素处理 VCaP、LNCaP 细胞后, AR 被显著募集到 LINC01006 的预测雄激素反应元件 (androgen response element, ARE) 区域 (图 5B)。我们进一步通过转染 siRNA 干扰 AR 在雄激素敏感细胞系 LNCaP 中的表达, 并通过 qRT-PCR

检测 LINC01006 的表达, 结果显示敲减 AR 后 LINC01006 的水平升高 ($P < 0.05$, 图 5C); 我们进一步使用不同浓度 AR 激动剂双氢睾酮 (DHT) 或 AR 抑制剂恩杂鲁胺 (enzalutamide) 处理 LNCaP 细胞, qRT-PCR 检测结果显示使用恩杂鲁胺后 LINC01006 的表达水平升高 ($P < 0.05$, 图 5D 和 5E), 结果提示 AR 可能作为 LINC01006 的转录因子负向调控 LINC01006 的表达。

3 讨论

近年来 PCa 在美国已成为男性发病率最高的癌症, 成为男性癌症死亡的第二大原因, 在中国的发病率也在逐年上升, 严重危害中老年男性的健康^[10]。对于局部早期 PCa, 前列腺根治性手术是治疗的首选, 但由于在我国多数患者初诊时已处于局部中晚期或已出现转移, 部分已失去手术机会, 预后较差^[11]。前列腺是雄激素反应性器官, 雄激素 / 雄激素受体 (androgen receptor, AR) 轴及其相关信号通路与 PCa 的发生发展有着密切

关系^[12,13],因此对于局部晚期或转移性 PCa,雄激素剥夺治疗 (androgen deprivation therapy, ADT) 是目前的一线治疗手段^[3], 尽管初期控制疾病进展效果较好,但几乎所有肿瘤都会在 2-3 年内进展为对 ADT 不敏感的去势抵抗性前列腺癌 (castration resistance prostate cancer, CRPC)^[14],其中的机制非常复杂,涉及旁分泌及自分泌雄激素合成、AR 突变和对雄激素消融及抑制

的抵抗、AR 剪接变异体等多种途径^[15-18],且现有的医学手段并不能有效控制和治愈 CRPC,随着疾病进展,患者会出现尿频、尿急、尿流中断等下尿路症状,甚至出现尿潴留、尿失禁等,转移性病灶还可出现骨痛和病理性骨折,患者生活质量极差,最终将导致患者死亡^[19]。因此研究 PCa 发生发展和 CRPC 形成的机制和寻找新的治疗方法迫在眉睫。

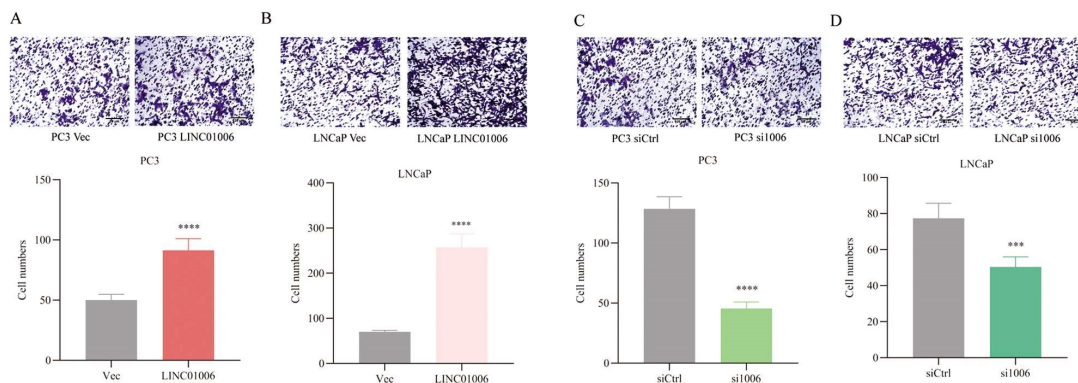


图 4 Transwell 侵袭实验验证 LINC01006 对 PCa 细胞 PC3 和 LNCaP 侵袭能力的影响

(A 和 B. 过表达 LINC01006 促进 PC3 和 LNCaP 细胞侵袭能力; C 和 D. 敲减 LINC01006 抑制 PC3 和 LNCaP 细胞的侵袭能力)

(注:与 Vec/ siCtrl 组相比, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$)。

Fig.4 Transwell invasion test verified the effect of LINC01006 on invasion ability of PCa cells PC3 and LNCaP

(A and B. Overexpression of LINC01006 promotes invasion ability of PC3 and LNCaP cells; C and D. Knockdown of LINC01006 inhibited invasion ability of PC3 and LNCaP cells.)

(Note: Compared with Vec/ siCtrl group, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$).

癌症是一种复杂的疾病,与多种遗传突变、表观遗传学改变、染色体易位、缺失和扩增有关。由于转录组测序技术的不断发展,学界发现了大量 lncRNAs 在多种肿瘤的发生发展中起到重要作用,这些 lncRNAs 能够通过与 DNA、RNA 以及蛋白相互结合,进而在转录水平、转录后水平,甚至表观遗传学等水平影响多种生物学进程,对细胞的增殖、侵袭、凋亡过程及基因组稳定性进行调控^[20-22]。例如 LINC942 通过稳定 METTL14 的 mRNA 并与 METTL14 蛋白结合,通过转录后的 m6A 甲基化修饰稳定了下游靶标 CXCR4 和 CYP11B1 的表达,促进了乳腺癌的进展^[23];lncRNA HOTAIR 在 PCa 细胞中表达上调,能够与 AR 蛋白结合,阻止 AR 泛素化降解,诱导雄激素非依赖性 AR 活化从而促进 CRPC 进展^[24];lncRNA NORAD 能够和 PUMILIO 蛋白结合,抑制了其靶向结合 mRNA 并促进染色体不稳定性^[25];STAT3 介导 lncRNA HOXD-AS1 表达上调,通过 ceRNA 机制调节 SOX4 的表达进而促进肝癌的转移^[26]。LINC01006 已被报道可能作为胃癌的新型生物标志物^[8];而在胰腺癌中,LINC01006 在胰腺癌组织中的表达较癌旁组织明显升高,并可通过 miR-2682-5p/HOXB8 信号轴促进胰腺癌细胞的增殖和转移^[9];但 LINC01006 在 PCa 中发挥的作用尚未见报道。

在本项研究中,通过比对正常前列腺上皮细胞系和 PCa 细胞系中 LINC01006 的表达,我们发现 LINC01006 在 PCa 细胞系中高表达。LNCaP 细胞是雄激素敏感型 PCa 细胞,具有雄激素依赖的生长特征,常被用于雄激素信号通路与 PCa 关系的研究;而 PC3 细胞是雄激素非依赖型 PCa 细胞,不含内源性的 AR,我们发现 LINC01006 在 PC3 细胞中的表达较其他几种 PCa 细胞更高,因此将其用于研究 LINC01006 对 PCa 发生发

展影响的后续实验。我们进而利用 siRNA 沉默 LINC01006 在 PCa 细胞系 LNCaP 和 PC3 中的表达,通过慢病毒过表达质粒构建稳定过表达 LINC01006 的 PCa 细胞系 LNCaP 和 PC3,通过 qRT-PCR 验证 LINC01006 的水平证实敲减和过表达有效,可进行后续实验。随后在 LNCaP 和 PC3 细胞中,我们发现与对照组相比,敲减 LINC01006 能够显著抑制 LNCaP、PC3 细胞的增殖和侵袭,反之,过表达 LINC01006 则促进了 LNCaP、PC3 细胞的增殖和侵袭能力,结果提示 LINC01006 在 PCa 当中起到促进作用。

有研究表明 lncRNA 的表达受到严格的调控,lncRNA 的基因启动子区域能够富集活性组蛋白、转录因子和一些染色质重塑酶,从而调节 lncRNA 的转录过程^[27,28]。例如 AR 诱导 LINC01503 表达上调,进而通过 SFPQ-FOSL1 轴促进鼻咽癌的增殖和侵袭^[29];AR 和 ERG 能够驱动多种 PCa 特异的 lncRNA 表达^[30]。因此,为了进一步探索 LINC01006 在 PCa 细胞中转录的调控因素,我们首先利用 ALGGEN-PROMO 网站 (http://alggen.lsi.upc.es/cgibin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) 预测了 LINC01006 的潜在转录因子,并与 ChIP-seq 公共数据库 (<http://cistrome.org/db/#/>) 进行比对,结果发现 AR 在 LINC01006 的预测 ARE 处大量富集。我们进一步干扰了 AR 在雄激素敏感性 PCa 细胞系 LNCaP 中的表达后发现 LINC01006 表达升高;在利用双氢睾酮处理 LNCaP 细胞系后, LINC01006 表达下调,利用恩杂鲁胺抑制 AR 后 LINC01006 表达上升,提示雄激素 /AR 通路的抑制可能成为 LINC01006 升高的原因,结合上述发现我们推测,LINC01006 在 PCa 细胞的增殖、侵袭及去势抵抗形成过程中可能发挥一定作用。但本研

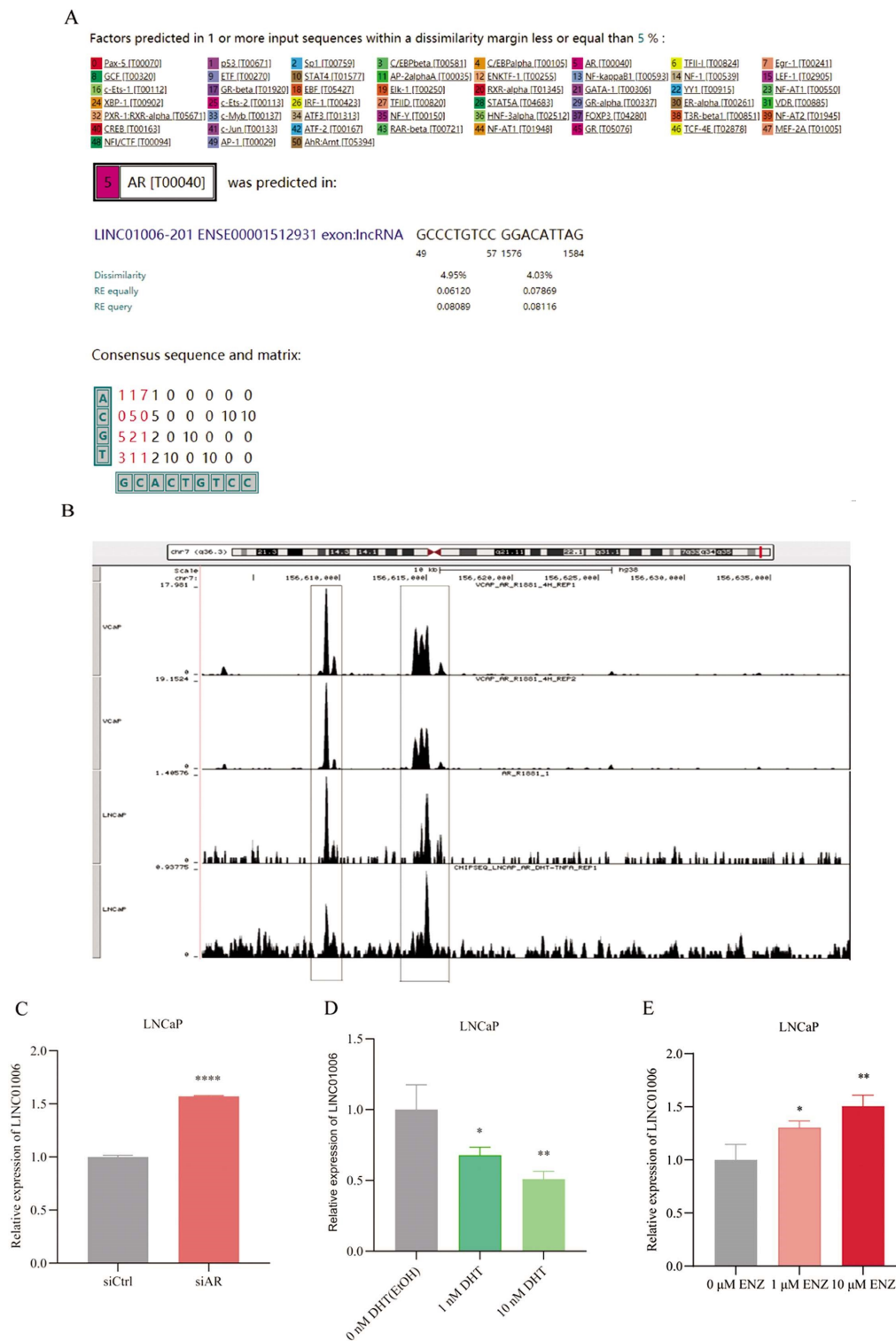


图 5 AR 负向调控 LINC01006 的表达

(A. 通过 ALGGEN-PROMO 预测 LINC01006 上游启动子区域潜在的转录因子及其结合位点; B. 加利福尼亚大学圣克鲁斯分校(UCSC)基因组浏览器将 AR 富集靶基因的 ChIP-seq 结果可视化, 显示在 VCaP 细胞及 LNCaP 细胞中 LINC01006 的启动子区域有显著富集; C. qRT-PCR 检测 siRNA 敲减 LNCaP 中 AR 后 LINC01006 的表达水平; D 和 E. qRT-PCR 检测在用不同浓度(0, 1 nM, 10 nM)DHT 或恩杂鲁胺(Enz) (0, 1 μM, 10 μM)处理 LNCaP 细胞后 LINC01006 的表达水平) (注: 与 siCtrl/ 0 nM DHT/ 0 μM ENZ 组相比, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$)。

Fig.5 AR negatively regulates the expression of LINC01006

(A. Predicting the potential transcription factors and their binding sites in the upstream promoter region of LINC01006 by ALGGEN-PROMO; B. University of California, Santa Cruz (UCSC) genome browser visualized the ChIP-seq results of AR enrichment target gene in VCaP and LNCaP cells, which showed that the promoter region of LINC01006 was significantly enriched; C. qRT-PCR was used to detect the expression level of LINC01006 after AR knockdown in LNCaP; D and E. qRT-PCR was used to detect the expression level of LINC01006 in LNCaP cells which were treated with different concentrations of DHT (0, 1 nM, 10 nm) or enzalutamide (0, 1 μM, 10 μM).) (Note: Compared with siCtrl/ 0 nM DHT/ 0 μM ENZ, * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$).

究并未进一步证明 AR 和 LINC01006 的结合关系,在后续的实验可通过染色质免疫共沉淀和双荧光素酶报告基因实验进一步验证二者之间的结合和调控关系;另外本研究在研究 AR 对 LINC01006 表达的影响时仅使用了雄激素敏感的 PCa 细胞系,在后续的研究中可进一步探索 AR 在 CRPC 细胞中的调控机制。

总而言之,LINC01006 在 PCa 细胞中表达上调,能够促进 PCa 细胞的增殖和侵袭能力,其表达受到 AR 的负向调控,抑制 AR 后 LINC01006 的表达上升。LINC01006 可能在激素敏感性 PCa 进展至 CRPC 的过程中起到一定作用,有望成为 PCa 和 CRPC 治疗的靶点。但 LINC01006 在 PCa 发生发展过程中起到的具体机制还需要进一步研究,同时还需结合临床样本进一步讨论 LINC01006 和 PCa 预后之间的关系。

参考文献(References)

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics [J]. 2020, CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30
- [2] Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(12): 701-711
- [3] Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review[J]. JAMA, 2017, 317(24): 2532-2542
- [4] Mitobe Y, Takayama KI, Horie-Inoue K, et al. Prostate cancer-associated lncRNAs[J]. Cancer letters, 2018, 418: 159-166
- [5] Ramnarine VR, Kobelev M, Gibb EA, et al. The evolution of long noncoding RNA acceptance in prostate cancer initiation, progression, and its clinical utility in disease management [J]. European urology, 2019, 76(5): 546-559
- [6] Luo J, Wang K, Yeh S, et al. LncRNA-p21 alters the antiandrogen enzalutamide-induced prostate cancer neuroendocrine differentiation via modulating the EZH2/STAT3 signaling [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2571-2587
- [7] Shang Z, Yu J, Sun L, et al. LncRNA PCAT1 activates AKT and NF- κ B signaling in castration-resistant prostate cancer by regulating the PHLPP/FKBP51/IKK α complex [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(8): 4211-4225
- [8] Zhu X, Chen F, Shao Y, et al. Long intergenic non-protein coding RNA 1006 used as a potential novel biomarker of gastric cancer[J]. Cancer Biomark, 2017, 21(1): 73-80
- [9] Zhang L, Wang Y, Zhang L, et al. LINC01006 promotes cell proliferation and metastasis in pancreatic cancer via miR-2682-5p/HOXB8 axis [J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 320-331
- [10] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [11] Zhu Y, Wang HK, Qu YY, et al. Prostate cancer in East Asia: evolving trend over the last decade[J]. Asian journal of andrology, 2015, 17(1): 48-57
- [12] Hu R, Lu C, Mostaghel EA, et al. Distinct transcriptional programs mediated by the ligand-dependent full-length androgen receptor and its splice variants in castration-resistant prostate cancer[J]. Cancer research, 2012, 72(14): 3457-3462
- [13] Dai C, Heemers H, Sharifi N. Androgen Signaling in Prostate Cancer [J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7(9)
- [14] Galletti G, Leach BI, Lam L, et al. Mechanisms of resistance to systemic therapy in metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2017, 57: 16-27
- [15] Karantanos T, Evans CP, Tombal B, et al. Understanding the mechanisms of androgen deprivation resistance in prostate cancer at the molecular level[J]. European urology, 2015, 67(3): 470-479
- [16] Snow O, Lallous N, Singh K, et al. Androgen receptor plasticity and its implications for prostate cancer therapy [J]. Cancer Treat Rev, 2019, 81: 101871-101879
- [17] Labrecque MP, Coleman IM, Brown LG, et al. Molecular profiling stratifies diverse phenotypes of treatment-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. The Journal of clinical investigation, 2019, 129(10): 4492-4505
- [18] Paschalis A, Sharp A, Welti JC, et al. Alternative splicing in prostate cancer[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(11): 663-675
- [19] Attard G, Parker C, Eeles RA, et al. Prostate cancer [J]. Lancet (London, England), 2016, 387(10013): 70-82
- [20] Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm[J]. Cancer research, 2017, 77(15): 3965-3981
- [21] Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways [J]. Cancer cell, 2016, 29(4): 452-463
- [22] Kopp F, Mendell JT. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs[J]. Cell, 2018, 172(3): 393-407
- [23] Sun T, Wu Z, Wang X, et al. LNC942 promoting METTL14-mediated m(6)A methylation in breast cancer cell proliferation and progression [J]. Oncogene, 2020, 39(31): 5358-5372
- [24] Zhang A, Zhao JC, Kim J, et al. LncRNA HOTAIR Enhances the Androgen-Receptor-Mediated Transcriptional Program and Drives Castration-Resistant Prostate Cancer[J]. Cell Rep, 2015, 13(1): 209-221
- [25] Lee S, Kopp F, Chang TC, et al. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins[J]. Cell, 2016, 164(1-2): 69-80
- [26] Wang H, Huo X, Yang XR, et al. STAT3-mediated upregulation of lncRNA HOXD-AS1 as a ceRNA facilitates liver cancer metastasis by regulating SOX4[J]. Molecular cancer, 2017, 16(1): 136-150
- [27] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function[J]. Nat Rev Genet, 2016, 17(1): 47-62
- [28] Ransohoff JD, Wei Y, Khavari PA. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(3): 143-157
- [29] He SW, Xu C, Li YQ, et al. AR-induced long non-coding RNA LINC01503 facilitates proliferation and metastasis via the SF-PQ-FOSL1 axis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncogene, 2020, 39(34): 5616-5632
- [30] Kohvakka A, Sattari M, Shcherban A, et al. AR and ERG drive the expression of prostate cancer specific long noncoding RNAs [J]. Oncogene, 2020, 39(30): 5241-5251