

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2010.00348

PC-1 在前列腺癌细胞中促进 *c-myc* 基因的表达

俞岚, 施庆国, 钱晓龙, 李山虎, 王洪涛, 王乐乐, 周建光

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850

摘要: 前列腺癌相关基因 *PC-1* (Prostate and colon gene 1) 是属于癌基因 D52 家族成员, 具有促进前列腺癌细胞雄激素非依赖性生长的功能。为了研究 *PC-1* 发挥这种生物功能的分子机制, 文章在 *PC-1* 高表达的 LNCaP-pc-1 及对照 LNCaP-zero 细胞中, 利用 RT-PCR 和 Western blotting 等方法检测 *c-myc* 基因表达; 提取两细胞胞质和胞核蛋白, 利用 Western blotting 分析 *c-myc* 上游调节蛋白 β -catenin 变化; 利用 c-Myc 蛋白抑制剂 10058-F4 作用前列腺癌细胞 C4-2, Western blotting 检测 *PC-1* 蛋白表达变化。发现 *PC-1* 促进 *c-myc* 基因表达, 并促进 β -catenin 入核; c-Myc 蛋白抑制剂 10058-F4 可抑制 *PC-1* 的表达。结果表明: *PC-1* 在前列腺癌中促进 *c-myc* 基因的表达, 并且这种促进作用可能是通过 Wnt/ β -catenin 信号通路实现的。同时, *PC-1* 与 c-Myc 蛋白间可相互促进, 进一步促进前列腺癌细胞雄激素非依赖性生长。

关键词: 前列腺癌; 前列腺癌相关基因(*PC-1*); *c-myc* 基因; β -catenin 蛋白

PC-1 enhances *c-myc* gene expression in prostate cancer cells

YU Lan, SHI Qing-Guo, QIAN Xiao-Long, LI Shan-Hu, WANG Hong-Tao,
WANG Le-Le, ZHOU Jian-Guang

Laboratory of Molecular Biology, Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China

Abstract: *PC-1* (Prostate and colon gene 1) gene belongs to TPD52 (Tumor Protein D52) gene family. The expression of *PC-1* is found to promote androgen-independent progression. This study was conducted to assess the mechanism of promotion of androgen-independent progression in *PC-1* gene. The *c-myc* gene expression was tested by RT-PCR and Western blotting analyses in the LNCaP-pc-1 and LNCaP-zero cell line. After separation of cytoplasm and nuclear proteins of the LNCaP-pc-1 and LNCaP-zero cell line, the β -catenin protein was detected by Western blotting. C4-2 cell line was used to examine the effects of 10058-F4 on the *PC-1* gene expression. The results of RT-PCR and Western blotting indicated that *PC-1* enhanced *c-myc* gene expression in prostate cancer cells, *PC-1* was also found to enhance β -catenin expression in nuclear. Furthermore, a small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4 represses *PC-1* gene expression in C4-2 cell line. Our findings suggest that *PC-1* enhances *c-myc* gene expression in prostate cancer cells through the Wnt/ β -catenin pathway. Meanwhile, *c-myc* plays a feed-forward role in enhancing *PC-1* driven *c-myc* gene expression, and promotes prostate androgen-independent progression.

Keywords: prostate cancer; prostate and colon gene 1(*PC-1*); *c-myc* gene; β -catenin protein

收稿日期: 2009-11-20; 修回日期: 2010-01-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30770834, 30870961)和国家高技术研究发展计划项目(编号: 2008AA02Z123)资助

作者简介: 俞岚(1981-), 女, 博士研究生, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 010-66931807; E-mail: yulan_229@163.com

通讯作者: 周建光(1956-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子遗传学。Tel: 010-66931807; E-mail: zhou.jianguang@yahoo.com.cn

前列腺癌(Prostate carcinoma, PCa)是男性常发恶性肿瘤。在西方国家中,前列腺癌死亡率居男性恶性肿瘤的第二位,近年来,我国男性前列腺癌发病率呈明显上升趋势^[1,2]。前列腺癌的发展经历了雄激素依赖且受雄激素刺激阶段,雄激素非依赖但受雄激素刺激阶段,雄激素非依赖且雄激素不敏感阶段及雄激素非依赖且受雄激素抑制阶段等复杂的过程。调控在前列腺癌发生发展过程中,多条信号通路调控异常的,其中*c-myc*基因被广泛关注,其过表达促进肿瘤细胞恶性增殖、侵袭能力增强,有报道超过 1/3 的肿瘤中*c-myc*基因表达失调^[3]。

前列腺癌相关基因*PC-1* (Prostate and colon gene 1)是Zhou等^[4]通过微阵列技术和LNCaP前列腺癌进展细胞模型从前列腺文库中筛选并克隆到的新基因,*PC-1* 编码一个 224 个氨基酸的蛋白分子,属于癌基因D52 家族成员,其N端 46 个氨基酸代表了该蛋白的特异性区域。本实验室前期工作发现*PC-1* 可促进前列腺癌细胞增殖,促进前列腺癌细胞雄激素非依赖性生长^[5],但其具体分子机制尚不十分清楚^[6]。本研究利用PC-1 高表达的LNCaP-pc-1 细胞为模型,发现*PC-1* 可以诱导*c-myc*基因高表达,促进 β -catenin蛋白入核。同时,我们发现在雄激素非依赖和恶性程度更高的C4-2 细胞中抑制c-Myc蛋白活性导致PC-1 蛋白表达水平明显下降,表明PC-1 与c-Myc蛋白间存在相互促进的关系,进而在前列腺癌发生、发展中发挥关键作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

PC-1 高表达 LNCaP-pc-1 细胞、对照细胞 LNCaP-zero 及 C4-2 细胞为本实验室保存。

1.1.2 试剂

RPMI1640 培养基购自 Invitrogen 公司; 优等胎牛血清为 Hyclone 公司产品; c-Myc 抗体为 Santacruz 公司产品(N262); β -actin 抗体为 Santacruz 公司产品(I-19-R); β -catenin 抗体为曹诚教授馈赠; PC-1 抗体为实验室自制; 二抗为 Santacruz 公司产品; ECL 发光液购自 Tiangen 公司。c-Myc 抑制剂 10058-F4 购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人前列腺癌细胞 LNCaP-pc-1/zero 及 C4-2 细胞用含 10%胎牛血清、10 mmol/L HEPES、0.2%碳酸氢钠的 RPMI1640 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 RT-PCR

TRIZOL 法提取细胞总 RNA; 采用 Promega 公司的逆转录试剂盒合成 cDNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 反应体系为 20 μ L: 10 \times 反应缓冲液 2 μ L, cDNA 1 μ L, 上下游引物各 1 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L, 其余用 ddH₂O 补齐 20 μ L。本文所用的引物应用 Primer Premier 5.0 软件综合引物复性温度、错配等因素, 选择扩增长度在 80~300 bp 之间的上下游引物(表 1)。

表 1 本文中所用的引物

名称	序列(5' 3')
c-myc-forward	CGACGCGGGGAGGCTATTCTGC
c-myc-reverse	CCCGCCACCGCCGTCGTTGTCT
PC-1-forward	CGGGATCCCCATGGATTGTAGAGAGAGGAC
PC-1-reverse	CCGCTCGAGTTACAGGCTCTCCTGTGTCTT
GAPDH-forward	CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT
GAPDH-reverse	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

1.2.3 MTT 实验

利用 MTT 法检测细胞生长速率。接种 2 000~3 000 个细胞至 96 孔板中, 每天检测一次细胞生长情况。在检测之前, 在每个待检测孔中加入 20 μ L MTT 溶液(2.5 mg/mL MTT 溶解于 PBS 中), 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 吸弃培养液, 加入 150 μ L DMSO 溶解紫色结晶。在酶联仪中读取 490 nm 波长下的光吸收值 OD₄₉₀。细胞接种的密度由预实验来决定。接种 12 h 后贴壁时检测所得值即为第 0 d 值, 以后第 N d 所测值和第 0 d 相比即为第 N d 值。每个时间点平行做 3 个孔, 每个实验重复 3 次。每个数据用平均数和标准差来表示。

1.2.4 核蛋白及胞质蛋白提取

待细胞丰度达到 70%~80%时, 用预冷的 PBS 清洗细胞两次后, 用细胞刮子将细胞刮下, 使其悬浮于预冷的 PBS 中, 2 400 r/min, 离心 5 min。去上清, 将沉淀重悬于 1 \times 低渗(hypo-osmotic)的缓冲液 A (10 mmol/L Hepes-KOH pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 蛋白酶抑制剂)

中, 置冰上冰浴 15 min, NP-40 添加至终体积 0.6%(V/V)。4℃, 7 600 r/min 离心 5 min。上清中含有细胞质蛋白。将沉淀的细胞核分散再高盐缓冲液 B(20 mmol/L Hepes-KOH pH7.9, 420 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L EDTA, 25%甘油, 1 mmol/L DTT, 蛋白酶抑制剂)中, 以溶解 DNA 结合蛋白, 悬浮的核于 4℃轻摇 30 min, 11 800 r/min 离心 20 min, 上清包含的则是核蛋白, 于-70℃保存。

1.2.5 Western 印迹分析

将样品进行 SDS-PAGE, 电转移至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶粉 4℃封闭过夜, 弃溶液, 加入 5%脱脂奶粉稀释的一抗, 室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 加入 5%脱脂奶粉稀释的二抗(辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔/鼠 IgG), 室温轻摇 1 h, TBST 洗膜 3 次后, 用化学发光法显色 5 min, 压片显影。

1.2.6 c-Myc 蛋白抑制剂 10058-F4 处理 C4-2 细胞

将 C4-2 细胞传代正常培养 24 h 后, 分别加入终浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 10058-F4(DMSO 配制)处理 24 h, 其中以空白 DMSO 处理的 C4-2 细胞为对照, 最后提取细胞总蛋白进行 Western 印迹分析。

2 结果与分析

2.1 PC-1 表达促进前列腺癌雄激素非依赖性生长

为了阐明 PC-1 在前列腺癌生长中的作用, 文章检测了 PC-1 高表达的 LNCaP-pc-1 细胞和其对照细胞 LNCaP-zero 在药物阻断雄激素条件下的生长能力。在 20 $\mu\text{mol/L}$ 雄激素拮抗剂 bicalutamide(Bic)处理条件下, 利用 MTT 实验分别在 0、2、4、6、8 d 检测细胞生长情况。细胞生长曲线结果表明, PC-1 高表达的 LNCaP-pc-1 细胞株无论在正常还是在在 Bic 药物阻断雄激素的培养条件下, 其生长速度都显著快于对照细胞(图 1)。表明 PC-1 表达具有促进前列腺癌雄激素依赖和非依赖性生长能力。

2.2 PC-1 促进 *c-myc* 基因表达

为了研究 PC-1 促前列腺癌细胞雄激素非依赖生长的分子机理, 用 LNCaP-pc-1 及对照 LNCaP-zero 细胞研究了受 PC-1 表达调控的基因, RT-PCR 检测结果显示 PC-1 可诱导 *c-myc* 基因在转录水平表达上调(图 2A), Western 印迹检测结果同样证明 PC-1 可诱导 c-Myc 蛋白水平升高(图 2B)。表明 PC-1 可促进 *c-myc* 在转录和翻译水平上高表达。

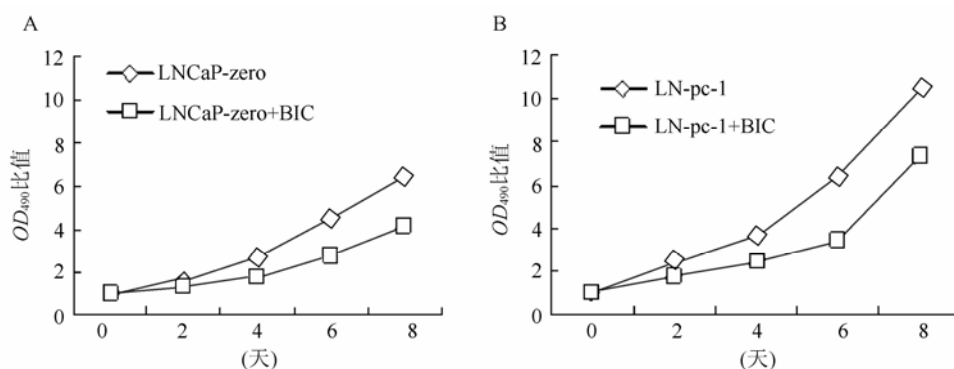


图 1 PC-1 表达变化对前列腺癌细胞雄激素非依赖生长的影响

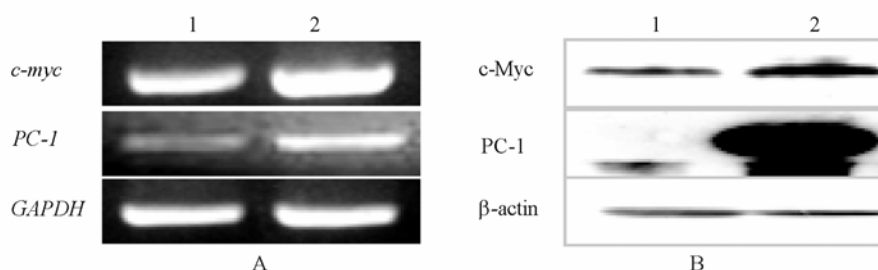


图 2 RT-PCR(A)及 Western 印迹(B)检测 PC-1 高表达 LNCaP-pc-1 及对照 LNCaP-zero *c-myc* 的表达

1: LNCaP-zero; 2: LNCaP-pc-1。GAPDH 为 RNA 水平的内参, β -actin 为蛋白水平的内参, 下图同。

2.3 PC-1 可诱导细胞核内 β -catenin蛋白增加

β -catenin 在核中累积可促进 *c-myc* 基因转录。为了解 PC-1 是否直接诱导了 c-Myc 表达, Western 印迹检测了 *c-myc* 上游分子 β -catenin 在 LNCaP-pc-1 及对照 LNCaP-zero 细胞株中胞浆和胞核中的表达(图 3)。Western 印迹检测结果表明, PC-1 可诱导细胞核内 β -catenin 蛋白水平显著增加, 表明 PC-1 可促进 β -catenin 在核内累积。但同时并未观察到胞质中 β -catenin 蛋白降低, 表明 PC-1 增加了全细胞 β -catenin 蛋白含量。

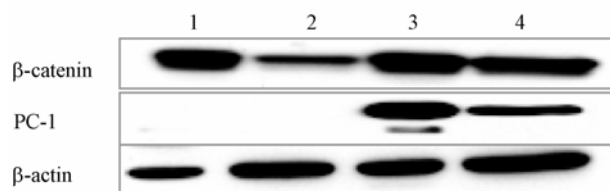


图3 Western 印迹检测 PC-1 高表达 LNCaP-pc-1 及对照 LNCaP-zero 细胞胞核及胞质 β -catenin 蛋白表达

1: LNCaP-zero 胞质蛋白; 2: LNCaP-zero 胞核蛋白; 3: LNCaP-pc-1 胞质蛋白; 4: LNCaP-pc-1 胞核蛋白。

2.4 c-Myc蛋白抑制剂抑制PC-1 蛋白表达

PC-1 和 c-Myc 均为促进前列腺癌生长的分子, 为此分析了这两个分子表达的相互关系。在 PC-1 高表达的 C4-2 细胞中加入 c-Myc 蛋白抑制剂 10058-F4^[7], Western 印迹检测结果表明, 在 c-Myc 蛋白被明显抑制的同时 PC-1 蛋白表达显著下降(图 4)。提示在雄激素非依赖和恶性程度更高前列腺癌 C4-2 细胞中 c-Myc 同样能够促进 PC-1 分子高表达, PC-1 和 c-Myc 表达具有相互促进作用。

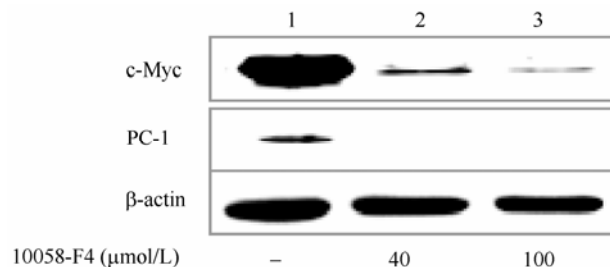


图4 Western 印迹检测 10058-F4 作用后 C4-2 细胞中 PC-1 表达

1: C4-2 对照; 2: 40 μ mol/L 10058-F4 处理; 3: 100 μ mol/L 10058-F4 处理。

3 讨论

前列腺是一种雄激素依赖性器官, 在前列腺癌发展的早期阶段, 其增殖依赖雄激素刺激, 因此, 临床上除了选择手术切除或局部放疗的方法治疗局限于前列腺内的前列腺癌外, 采取雄激素撤除加以辅助治疗可以起到明显作用。但是, 前列腺癌往往会进一步发展为雄激素非依赖型, 撤除雄激素不再有效, 疾病进一步发展, 往往导致治疗失败^[8]。因此对前列腺癌发生、发展分子机制研究对于临床上发展有效的治疗手段具有重要的现实意义。

PC-1 是通过微阵列技术和 LNCaP 前列腺癌进展细胞模型从前列腺文库中筛选并克隆到的新基因, *PC-1* 基因高表达与前列腺癌细胞的高度恶性行为之间存在明显的正相关性, 提示 *PC-1* 基因高表达是促进前列腺癌发展的重要因素之一, 但 PC-1 促进前列腺癌发展的分子机制尚不清楚^[5]。原癌基因 *c-myc* 就是人们熟悉的这类基因之一, 特别是 2004 年 Shachaf 等^[9]发表在 Nature 杂志上的研究论文, 再次引起了人们对 *c-myc* 的关注。Shachaf 等通过在肝细胞中条件表达 *c-myc* 原癌基因的小鼠模型, 表明持续过表达 *c-myc* 基因的小鼠均发生了肝肿瘤, 当停止 *c-myc* 表达后, 肝肿瘤细胞开始分化为正常肝细胞并伴有细胞凋亡, 一旦恢复 *c-myc* 表达, 肿瘤又恢复生长。利用比较基因组杂交手段, 发现在雄激素非依赖型前列腺癌(AIPCs)中 *c-myc* 基因的区域经常发生扩增^[10]。荧光原位杂交验证证实 AIPCs 中 *c-myc* 基因扩增高达 72%^[11]。更有趣的是, 高频率的 *c-myc* 基因的扩增被认为是由抗雄激素治疗诱发的。可见 *c-myc* 在前列腺癌发生、发展中的重要作用。本研究发现 PC-1 与 *c-myc* 基因存在密切联系, 用 RT-PCR 和 Western 印迹杂交技术检测发现 PC-1 可显著诱导 *c-myc* 基因表达, 提示 PC-1 很可能通过激活 *c-myc* 基因, 从而在前列腺癌进展中发挥重要作用。PC-1 对 *c-myc* 基因的调节如何完成呢?

雄激素非依赖型前列腺癌中 *c-myc* 基因的区域经常发生扩增^[10]。*c-myc* 基因可受 β -连环蛋白(β -catenin)调节, β -catenin 是 Wnt 信号通路的重要分子, Wnt 信号通路激活后 β -catenin 蛋白稳定性增加, 大量游离的 β -catenin 在胞浆中聚集并进而进入细胞核内。核内 β -catenin 与 TCF/LCF 结合形成复合体, 特异地激活

*c-myc*等靶基因转录^[12]。Wnt/ β -catenin 信号途径已被公认为肿瘤发生过程中关键的信号通路之一。Wnt/ β -catenin信号通路在前列腺癌中的作用尚不明确,有证据表明 β -catenin能够通过增强雄激素依赖的AR转录活性促进前列腺发展^[13],最新的观点还指出Wnt/ β -catenin信号通路可调节前列腺癌细胞中肿瘤干细胞的自我更新与分化,促进前列腺癌恶性化进程^[14]。本研究检测了核内 β -catenin变化,发现 β -catenin在LNCaP-pc-1 细胞核内累积。对 β -catenin调控过程中,Gsk3 β 发挥重要作用,Gsk3 β 促进 β -catenin降解,相应的降低核内 β -catenin水平。本实验室前期工作发现PC-1 上调AKT磷酸化水平^[5],AKT可磷酸化Gsk3 β 抑制其活性,因此推测PC-1 通过AKT/Gsk3 β 信号通路调节 β -catenin活性,最终促进*c-myc*基因表达。

令人意外的发现是利用 c-Myc 蛋白抑制剂 10058-F4 作用细胞,c-Myc 蛋白被显著抑制,同时检测发现 PC-1 蛋白水平也明显下降,表明 PC-1 与 c-Myc 蛋白间可相互促进,进一步加速前列腺癌细胞恶性化进程。

目前对 PC-1 在前列腺癌发生、发展过程中的作用还缺乏更深入的了解,勿容置疑,c-Myc 蛋白在这些过程中起着重要的作用。以 PC-1 调控 *c-myc* 基因表达为切入点,深入研究具体分子调节机制,将为阐述前列腺癌发生、发展机制提供新的理论依据。

参考文献(References):

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2007, 7(57): 43–46.[\[DOI\]](#)
- [2] 叶定伟, 朱耀. 中国前列腺癌的发病趋势. 中国临床肿瘤学教育专辑, 2007, 616–620.
- [3] Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000, 16(1): 653–699.[\[DOI\]](#)
- [4] Zhou JG, Zhau HE, Lin BY, Nelson PS, Visakorpi T, Saramaki O, Chung LWK. DNA microarray identified a novel PC-1 gene differentially expressed by human prostate tissues and tumor cell lines. The Fifth Asian Congress on Urology, Beijing, 2000.
- [5] Wang RX, Xu JC, Saramaki O, Visakorpi T, Sutherland WM, Zhou J, Sen B, Lim SD, Mabjeesh N, Amin M, Dong JT, John P, Nelson PS, Marshall FF, Zhau HE, Chung LWK. *PrLZ*, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1589–1594.[\[DOI\]](#)
- [6] Zhang H, Wang J, Pang B, Liang RX, Li S, Huang P, Wang R, Chung LWK, Zhau HE, Huang C, Zhou JG. PC-1/PrLZ contributes to malignant progression in prostate cancer. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8906–8913. [\[DOI\]](#)
- [7] Huang MJ, Cheng Y, Liu CR, Lin S, Liu HE. A small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, induces cell-cycle arrest, apoptosis, and myeloid differentiation of human acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, 2006, 34(11): 1480–1489.[\[DOI\]](#)
- [8] Isaacs JT. The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol Clin North Am*, 1999, 26(2): 263–273.[\[DOI\]](#)
- [9] Shachaf CM, Kopelman AM, Arvanitis C, Karlsson Å, Beer S, Mandl S, Bachmann MH, Borowsky AD, Ruebner B, Cardiff RD, Yang Q, Bishop M, Contag CH, Felsher DW. MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*, 2004, 431(7012): 1112–1117.[\[DOI\]](#)
- [10] Nupponen NN, Kakkola L, Koivisto P, Visakorpi T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol*, 1998, 153(1): 141–148.
- [11] Bernard D, Pourtier-Manzanedo A, Gil J, Beach DH. Myc confers androgen-independent prostate cancer cell growth. *J Clin Invest*, 2003, 112(11): 1724–1731.
- [12] 杜彦艳, 刘鑫, 单保恩. Wnt/ β -catenin 信号转导通路与肿瘤关系的研究进展. 肿瘤, 2009, 29(8): 803–806.
- [13] Liang S, Rizzol CA, Spires TE, Platero IS, Wu Q, Lin T, Gottardis MM, Attar RM. The androgen receptor can signal through Wnt/ β -catenin in prostate cancer cells as an adaptation mechanism to castration levels of androgens. *BMC Cell Biol*, 2008, 9: 4.[\[DOI\]](#)
- [14] Bisson I, Prowse DM. WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. *Cell Res*, 2009, 19(6): 683–697.[\[DOI\]](#)