

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.10.014

基因沉默孤儿核受体 ERR α 抑制前列腺癌细胞的体内转移 *肖利佳¹ 郝建华¹ 李江¹ 李钢¹ 王娟¹ 邹畅^{2△}

(1 广东医学院附属南山医院检验科 广东 深圳 518052;

2 暨南大学第二临床医学院, 深圳市人民医院临床研究中心 广东 深圳 518000)

摘要 目的: 研究孤儿核受体 ERR α 对前列腺癌细胞 E-cadherin(上皮细胞钙粘蛋白)的表达水平和体内转移能力的影响。**方法:** 利用慢病毒介导的 shRNA 构建稳定下调 ERR α 表达的 DU145-shERR α 和 PC-3M-shERR α 前列腺癌细胞模型, 同时用 ERR α 特异性抑制剂 XCT790 抑制其活性, 并利用 Western Blotting (免疫印迹) 检测上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达水平。将 PC-3M-shERR α 细胞和 PC-3M-scramble 对照细胞用荧光素酶标记后原位注射小鼠前列腺, 8 周以后通过体内成像系统检测原位瘤的形成及其体内转移情况。**结果:** 基因沉默 ERR α 表达水平和用其特异性抑制剂 XCT790 处理 DU145 后, E-cadherin 的表达水平明显降低。在 PC-3M-shERR α 细胞中, E-cadherin 的表达水平明显低于对照组, 同时由其构建的 6 只原位前列腺癌小鼠模型中没有发生转移, 而对对照组细胞构建的 7 只原位前列腺癌小鼠模型中有 4 只发生了转移。**结论:** 在前列腺癌细胞中下调 ERR α 的表达水平抑制其 E-cadherin 的表达和体内转移能力。

关键词: ERR α ; E-cadherin; 前列腺癌; 体内转移

中图分类号: Q75; R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)10-1855-03

Knockdown ERR α Inhibits in Vivo Metastasis in Prostate Cancer Cells*XIAO Li-jia¹, HAO Jian-hua¹, LI Jiang¹, LI Gang¹, WANG Juan¹, ZOU Chang^{2△}

(1 Department of Clinical Laboratory, Nanshan Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong, 518052, China; 2 The Second clinical collage of Ji Nan University, The People's Hospital of Shenzhen, Clinical research Centre, Shenzhen, Guangdong, 518000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the roles of orphan nuclear receptor ERR α in E-cadherin expression regulation and in vivo metastasis in prostate cancer cells. **Methods:** DU145-shERR α and PC-3M-shERR α cell models were established by gene knockdown mediated by lentivirus. ERR α specific antagonist XCT790 was used to inhibit its activity, the expression level of E-cadherin was identified by Western Blotting. PC-3M-shERR α and PC-3M-scramble cells were labeled by luciferase and injected in situ in mice prostate, metastases were measured through in vivo image system and indicated by the fluorescence intensity 8 weeks after injection. **Results:** The expression level of E-cadherin was significantly decreased in DU145 after knockdown ERR α or treatment with XCT790. The expression level of E-cadherin in PC-3M-shERR α was significantly suppressed as compared to that in control cells. Moreover, 4 of 7 in situ prostate cancer mice models derived from PC-3M-scramble cells, while 0 of 6 from PC-3M-shERR α cells, develop metastases. **Conclusions:** Knockdown ERR α in prostate cancer cells attenuate E-cadherin expression and their in vivo metastasis.

Key words: ERR α ; E-cadherin; Prostate cancer; In vivo metastasis

Chinese Library Classification (CLC): Q75; R737.25 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)10-1855-03

前言

前列腺癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一,近年来由于我国居民饮食方式的西方化和人口老龄化的加剧,其发病率呈现快速的上升趋势,高居我国男性恶性肿瘤发病率的第5位^[1]。目前对于前列腺癌的治疗方法主要有传统的手术治疗、放疗、化疗和内分泌治疗(抗雄激素治疗)等,但是这些传统方法的治疗结果均难以令人满意。近年来,随着医学分子生物学的发展以及人们对前列腺癌的病理机制的深入探索,越来越多的新的治

疗靶点和治疗方案被提出并进行临床试验,取得了可喜的成果^[2-4]。核受体是一类转录因子超家族,其通过受体依赖性或者非受体依耐性的方式调控下游基因表达,在新陈代谢、生殖、发育等生理过程中起着重要的作用^[5]。雌激素受体相关受体 α (Estrogen-related receptors α , ERR α) 是最早发现的孤儿核受体之一,其与雌激素受体 α 在氨基酸序列上具有高度的同源性^[6]。以往报道证明 ERR α 参与机体细胞的能量代谢过程,其调控的下游靶基因在细胞线粒体发生,氧化磷酸化和脂肪氧化等生理过程中发挥重要作用^[7]。另外,研究证实 ERR α 的表达水平在多

* 基金项目:广东省深圳市南山科技局项目(2012005)

作者简介:肖利佳(1986-),男,博士,助理研究员,主要研究方向:肿瘤发病机理及分子诊断, E-mail: x190791844@126.com

△ 通讯作者:邹畅, E-mail: zouchang.cuhk@gmail.com

(收稿日期:2014-10-21 接受日期:2014-11-15)

种肿瘤组织中明显升高, 并与其恶性进展和不良预后正相关^[8]。本研究利用慢病毒介导的基因沉默 ERR α 的方法, 初步探索 ERR α 在前列腺癌细胞体内转移过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

前列腺癌细胞株 DU145 和 PC-3M 为本实验室保存, 培养于含有 10%FBS 的培养基中。兔抗人 ERR α 单克隆抗体购自 Epitomics 公司(货号: 2131-1), 兔抗人 E-cadherin 多克隆抗体购自 abcam 公司(货号: ab15148), 鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 生物科技公司(货号: sc-47778), pLKO.1-shERR α 病毒质粒购自 Open Biosystems 公司(货号: RHS4533), ERR α 特异性抑制剂 XCT790 购自 Sigma Aldrich 公司, 按浓度 5 mM 溶于 DMSO 中。体内成像系统 FMT 1000 Fluorescence Tomography System 购自美国 PerkinElmer 公司。

1.2 方法

1.2.1 DU145-shERR α 和 PC-3M-shERR α 细胞的建立 转染前一天, 将 293FT 细胞按 1×10^6 接种于 100 mm 培养皿, 待细胞生长处于对数生长期时, 用 FuGENE 6 将 pLKO.1-shERR α 和慢病毒包装质粒共转染 293FT 细胞, 第二天换成新鲜培养液继续培养 48 h。将含有慢病毒的培养液收集并过滤后, 按 1:1 比例加入处于对数生长期的 DU145 和 PC-3M 培养基中感染细胞 48 h, 然后用含 0.8 μ g/mL 嘌呤霉素(puromycin)的培养液继续培养, 同时在未经病毒感染的 DU145 和 PC-3M 细胞培养液中加入同样浓度的嘌呤霉素作为对照, 待对照细胞全部被杀死后, 收集被病毒成功感染的 DU145 和 PC-3M 细胞并用 96 孔板稀释法筛选单克隆, 经 Western Blotting 鉴定成功的细胞克隆用于后续实验。

1.2.2 PC-3M-shERR α 细胞的前列腺原位成瘤和转移实验 将构建好的三个 PC-3M-shERR α 细胞克隆混合成混合株并与对照细胞经慢病毒介导的荧光素酶标记, 然后原位注射 SCID 免疫缺陷小鼠前列腺建立原位瘤模型, 其中实验组 8 只小鼠, 对照组 6 只小鼠。8 周以后通过体内成像系统检测荧光强度以评价细胞的原位成瘤和转移能力。

1.2.3 Western Blotting 实验 待细胞长至对数生长期时提取细胞总蛋白, 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液后于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 然后于 4 $^{\circ}$ C 转速 $11625 \times g$ 离心收集上清, 用已知浓度的小牛血清白蛋白作为标准品通过 Lowry 法测定蛋白浓度。随后按每孔 40-80 μ g 蛋白上样于 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 于 30 v, 4 $^{\circ}$ C 过夜将分离的蛋白转移至 PVDF 膜后, 加入按一定比例稀释一抗, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗去一抗并加入碱性磷酸酶标记的二抗室温孵育 1 h, 洗去未结合的二抗后加入底物 NBT/BCIP 显色, 以目的条带与内参 β -actin 的比值作为半定量依据。XCT790 处理 DU145 的试验中, XCT790 按浓度 4、8、12、15 μ M 处理 DU145 细胞后, 提取总蛋白进行上述 Western Blotting 实验。

2 结果

2.1 DU145-shERR α 和 PC-3M-shERR α 细胞的构建

DU145 和 PC-3M 细胞经编码 shERR α 的病毒感染后筛选

单克隆, 通过 Western Blotting 实验分别鉴定成功 3 个 DU145-shERR α 和 3 个 PC-3M-shERR α 细胞克隆, 经内参 β -actin 表达水平的校准后, 其 ERR α 的表达水平明显低于对照细胞(见图 1)。

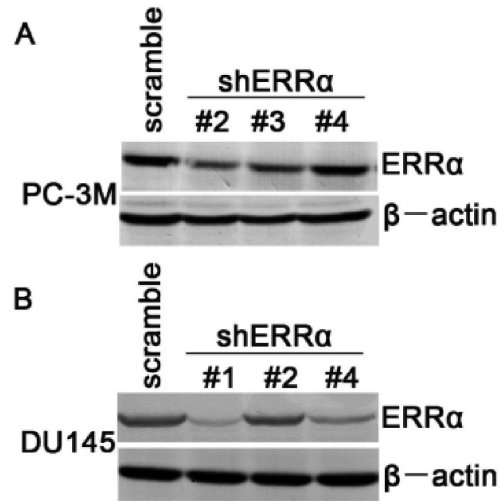


图 1 DU145-shERR α 和 PC-3M-shERR α 的 Western Blotting 鉴定结果

Fig. 1 Identification of DU145-shERR α and PC-3M-shERR α

注: A: PC-3M-shERR α 细胞克隆; B: DU145-shERR α 细胞克隆

Note: A: PC-3M-shERR α cell clones; B: DU145-shERR α cell clones

2.2 PC-3M-shERR α 细胞的前列腺原位成瘤和转移实验

为了评价基因沉默 ERR α 后对前列腺癌细胞体内转移能力的影响, 因此我们选择了具有强迁移能力的 PC-3M 细胞系作为研究对象。将经荧光素酶标记的对照细胞原位注射 8 只小鼠前列腺 8 周以后, 体内成像系统检测荧光强度显示有 7 只小鼠形成了原位瘤, 并有 4 只小鼠发生了癌细胞转移。同时将 PC-3M-shERR α 细胞原位注射 6 只小鼠前列腺后, 有 4 只小鼠形成了原位瘤, 但是没有在小鼠体内检测到转移(见图 2)。没

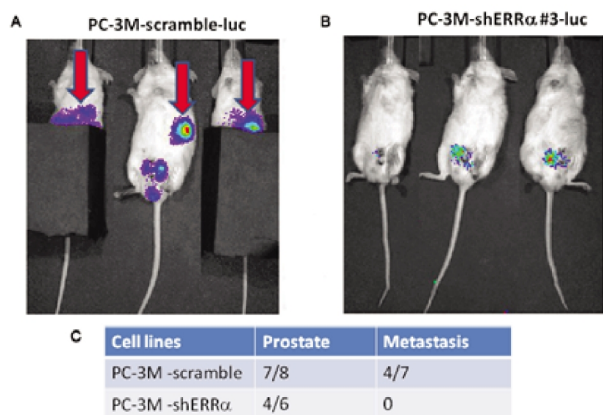


图 2 基因沉默 ERR α 抑制 PC-3M 细胞体内转移

Fig. 2 Knockdown ERR α inhibit in vivo metastasis of PC-3M

注: A: PC-3M-scramble 细胞; B: PC-3M-shERR α 细胞;

C: 原位瘤形成率及迁移瘤的统计结果。

Note: A: PC-3M-scramble cells; B: PC-3M-shERR α cells;

C: Statistics of in situ tumor formation rate and metastasis.

有形成原位瘤的小鼠可能是由于前列腺原位注射细胞过程中的操作差异和小鼠的个体差异引起的。同时,结果显示 PC-3M-shERR α 细胞形成的前列腺原位瘤明显小于对照组(见图 3)。

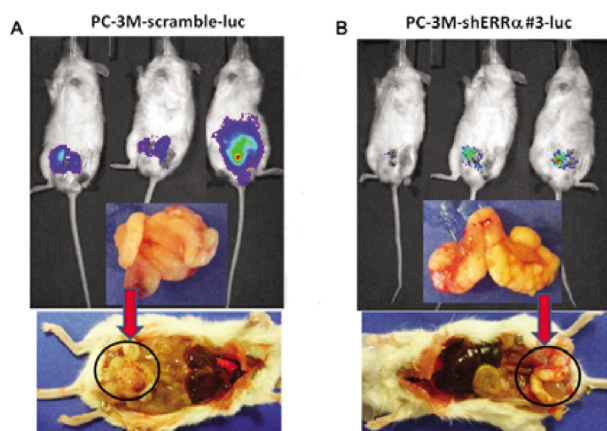


图 3 基因沉默 ERR α 抑制 PC-3M 细胞体内生长

Fig. 3 Knockdown ERR α inhibit in vivo growth of PC-3M

注: A: PC-3M-scramble 细胞; B: PC-3M-shERR α cells 细胞。

Note: A: PC-3M-scramble cells; B: PC-3M-shERR α cells.

2.3 E-cadherin 表达水平的检测

Western Blotting 实验结果显示,在基因沉默 ERR α 的 DU145-shERR α 和 PC-3M-shERR α 细胞克隆中,上皮细胞标志物 E-cadherin 的表达水平显著低于对照细胞。同时,在经 ERR α 特异性抑制剂 XCT790 处理 DU145 后,E-cadherin 的表达水平同样被抑制,抑制程度呈剂量依赖性(见图 4)。

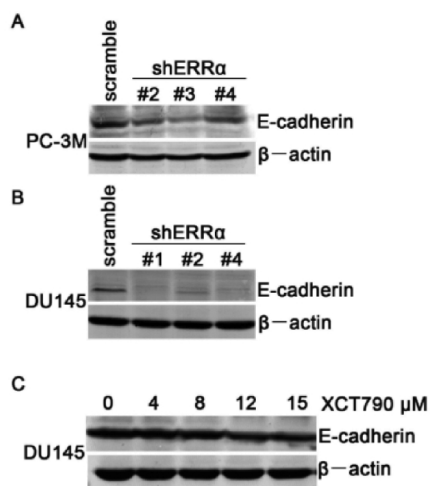


图 4 基因沉默 ERR α 抑制前列腺癌细胞中 E-cadherin 的表达

Fig. 4 Knockdown ERR α suppresses E-cadherin expression in prostate cancer cells

注:A: E-cadherin 在 PC-3M-shERR α 细胞中的表达水平; B: E-cadherin 在 DU145-shERR α 细胞中的表达水平; C: E-cadherin 在经不同浓度 XCT790 处理后的 DU145 细胞中的表达水平。

Note: A: The expression levels of E-cadherin in PC-3M-shERR α ; B: The expression levels of E-cadherin in DU145-shERR α ; C: The expression levels of E-cadherin in DU145 after treatment with XCT790 at different concentrations.

3 讨论

孤儿核受体 ERR α 属于核受体超家族中的第三亚家族成员,主要参与机体细胞的能量代谢过程^[7,8,10]。但是越来越多的证据表明,ERR α 在包括肿瘤在内的疾病进展过程中同样发挥重要作用。近年来,ERR α 在肿瘤发生过程中的功能研究成为热点。

本研究以慢病毒介导的基因沉默 ERR α 的方法,对 ERR α 在前列腺癌细胞体内转移过程中的作用进行初步探索。PC-3M 细胞有很强的转移能力,因此我们选择在 PC-3M 细胞中基因沉默 ERR α 后进行体内转移实验。通过荧光素酶标记 PC-3M-shERR α 细胞后建立前列腺癌原位模型,并通过体内成像系统监测癌细胞体内转移情况,我们发现在 PC-3M 细胞中下调 ERR α 的表达后,其体内转移能力受到明显抑制。以往研究同样发现在不表达雌激素受体的乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 中,基因沉默 ERR α 显著降低其迁移能力和体内成瘤能力^[11]。2010 年 Dwyer 等也报道 ERR α 能与 β -catenin 相互作用通过调节 Wnt-11 的表达从而促进癌症细胞的迁移能力^[12]。但同时我们也发现,PC-3M-shERR α 细胞形成的前列腺原位瘤明显小于对照组,推测在 PC-3M 细胞中下调 ERR α 的表达同样抑制其体内生长速度。事实上,在多重耐药的肝癌细胞株中,以往研究证实用 XCT790 处理细胞能诱导细胞凋亡,而在肺癌细胞中用 XCT790 处理细胞则抑制其生长^[13,14],另外,2009 年 Bianco 等报道 XCT790 处理细胞能诱导 p53 依赖性的细胞周期抑制因子 p21 的表达,提示抑制 ERR α 活性可以抑制细胞周期^[15]。这些前期报道都与我们的研究结果相符。E-cadherin 是上皮细胞的经典标志物,因此被作为常用的上皮间质转化(EMT)和间质上皮转化(MET)的分子标志物^[16-18]。我们的 Western Blotting 结果显示:DU145-shERR α 和 PC-3M-shERR α 细胞中 E-cadherin 的表达水平显著低于对照组,用 ERR α 特异性抑制剂 XCT790 处理 DU145 后,E-cadherin 的表达水平同样被抑制并呈剂量依赖性。结果提示 ERR α 可能通过调节前列腺癌细胞的间质上皮转化(MET)从而促进其体内转移能力,在 PC-3M-shERR α 细胞脱离前列腺癌原位瘤后并在血管迁移过程中,由于基因沉默 ERR α 后导致其 MET 能力减弱,因此难以在小鼠其它部位形成新的转移瘤。但是我们必须认识到 EMT 跟 MET 是动态复杂的连续过程,其相关分子机制还有待进一步研究^[19,20]。

综上所述,本研究在前列腺癌细胞系 PC-3M 中利用慢病毒介导的基因沉默 ERR α 的方法,初步探索 ERR α 在前列腺癌细胞体内转移过程中的功能和分子机制研究,将给前列腺癌的治疗提供一个新的思路。

参考文献(References)

- [1] Shao Q, Ouyang J, Fan Y, et al. Prostate cancer in the senior men from rural areas in east district of China: contemporary management and 5-year outcomes at multi-institutional collaboration [J]. Cancer Lett, 2012, 315(2): 170-177
- [2] Tanimoto T, Hori A, Kami M. Sipuleucel-T immunotherapy for

- [12] John M. Field, Mary Fran Hazinski, Michael R, et al. 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care[J]. *Circulation*, 2010, 122: 640-656
- [13] 张季元, 何世娟, 詹明萍. 纳洛酮在院前心肺复苏中的应用 [J]. 中国现代医生, 2008, 46(18): 41-42
Zhang Ji-yuan, He Shi-juan, Zhan Ming-ping. The Curative Effect of Naloxone in Ex-hospital Cardiopulmonary Cerebral Resuscitation [J]. *China Modern Doctor*, 2008, 46(18): 41-42
- [14] 刘树元, 陶冶, 林朱森, 等. 山莨菪碱对心脏骤停患者氧化应激及心肺复苏效果的影响[J]. 临床急诊杂志, 2012, 13(5): 319-321
Liu Shu-yuan, Tao Ye, Lin Zhu-sen, et al. Effects of anisodamine on oxidative stress and cardiopulmonary resuscitation in patients with cardiac arrest[J]. *Journal of Clinical Emergency Call*, 2012, 13(5): 319-321
- [15] Hu CL, Wei HY, Liu ZY, et al. Investigation of the relationship between ventricular fibrillation duration and cardiac /neurological damage in a rabbit model of electrically induced arrhythmia [J]. *Trauma*, 2010, 69(6): 1442-1447
- [16] Yu X, Kem DC. Proteasome inhibition during myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(2): 312-320
- [17] Huang S, Patterson E, Yu X, et al. Proteasome inhibition 1 h following ischemia protects GRK₂ and prevents malignant ventricular tachyarrhythmias and SCD in a model of myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(3): H1298 -H1303
- [18] Huet O, Dupic L, Batteux F, et al. Postresuscitation syndrome: potential role of hydroxyl radical-induced endothelial cell damage[J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(7): 1712-1720
- [19] Pilsner JR, Hu H, Wright RO. Maternal MTHFR genotype and haplotype predict deficits in early cognitive development in a lead-exposed birth cohort in Mexico City[J]. *Am J Clin Nutr*, 2010, 92(4): 226-234
- [20] 涂艳阳, 付建芳, 徐如祥. 纳洛酮对颅脑损伤患者脑摄氧率的影响 [J]. 华西医学, 2010, 25(3): 350-452
Tu Yan-yang, Fu Jian-fang, Xu Ru-xiang. Effects of naloxone on cerebral extraction rate of oxygen in heavy craniocerebral injury patients[J]. *West China Medical Journal*, 2010, 25(3): 350-452

(上接第 1857 页)

- castration-resistant prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(20): 1966; author reply 1967-1968
- [3] Rehman Y, Rosenberg J E. Abiraterone acetate: oral androgen biosynthesis inhibitor for treatment of castration-resistant prostate cancer[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2012, 6: 13-18
- [4] Crawford E D, Flaig T W. Optimizing outcomes of advanced prostate cancer: drug sequencing and novel therapeutic approaches [J]. *Oncology (Williston Park)*, 2012, 26(1): 70-77
- [5] Francis G A, Fayard E, Picard F, et al. Nuclear receptors and the control of metabolism[J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65: 261-311
- [6] Giguere V, Yang N, Segui P, et al. Identification of a new class of steroid hormone receptors[J]. *Nature*, 1988, 331(6151): 91-94
- [7] Giguere V. Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors[J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(6): 677-696
- [8] Cai Q, Lin T, Kamarajugadda S, et al. Regulation of glycolysis and the Warburg effect by estrogen-related receptors [J]. *Oncogene*, 2013, 32(16): 2079-2086
- [9] Fradet A, Sorel H, Bouazza L, et al. Dual function of ERRalpha in breast cancer and bone metastasis formation: implication of VEGF and osteoprotegerin[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(17): 5728-5738
- [10] Pooya S, Blaise S, Moreno Garcia M, et al. Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1alpha hypomethylation and decreased ER-alpha, ERR-alpha, and HNF-4alpha in the rat liver [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(2): 344-351
- [11] Stein R A, Chang C Y, Kazmin D A, et al. Estrogen-related receptor alpha is critical for the growth of estrogen receptor-negative breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(21): 8805-8812
- [12] Dwyer M A, Joseph J D, Wade H E, et al. WNT11 expression is induced by estrogen-related receptor alpha and beta-catenin and acts in an autocrine manner to increase cancer cell migration [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(22): 9298-9308
- [13] Wu F, Wang J, Wang Y, et al. Estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) inverse agonist XCT-790 induces cell death in chemotherapeutic resistant cancer cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 181(2): 236-242
- [14] Wang J, Wang Y, Wong C. Oestrogen-related receptor alpha inverse agonist XCT-790 arrests A549 lung cancer cell population growth by inducing mitochondrial reactive oxygen species production [J]. *Cell Prolif*, 2010, 43(2): 103-113
- [15] Bianco S, Lanvin O, Tribollet V, et al. Modulating estrogen receptor-related receptor-alpha activity inhibits cell proliferation[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(35): 23286-23292
- [16] Miller P W, Clarke D N, Weis W I, et al. The evolutionary origin of epithelial cell-cell adhesion mechanisms [J]. *Curr Top Membr*, 2013, 72: 267-311
- [17] Wu S K, Yap A S. Patterns in space: coordinating adhesion and actomyosin contractility at E-cadherin junctions [J]. *Cell Commun Adhes*, 2013, 20(6): 201-212
- [18] Gall T M, Frampton A E. Gene of the month: E-cadherin (CDH1)[J]. *J Clin Pathol*, 2013, 66(11): 928-932
- [19] Brabletz T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells?[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(6): 699-701
- [20] Drake L E, Macleod K F. Tumour suppressor gene function in carcinoma-associated fibroblasts: from tumour cells via EMT and back again?[J]. *J Pathol*, 2014, 232(3): 283-288