

## 肿瘤基础专题

## KHSRP 通过 ANK3 调节前列腺癌细胞对雄激素的反应性

蔡人杰, 徐 明

上海交通大学医学院附属第九人民医院肿瘤科, 上海 201999

**[摘要]** **目的**·研究KH型剪接调节蛋白 (KH-type splicing regulatory protein, KHSRP) 对前列腺癌细胞增殖能力的影响及其下游基因的表达调控, 考察KHSRP在前列腺癌由雄激素依赖型向非依赖型转变过程中的潜在作用及机制。**方法**·通过重组慢病毒感染雄激素依赖型前列腺癌 LNCaP 细胞和雄激素非依赖型前列腺癌 DU145 细胞, 分别构建 *KHSRP* 功能性缺失/获得的稳定细胞株, 并比较 KHSRP 在 2 种细胞之间的功能差异。采用蛋白质印迹法 (Western blotting) 检测稳定细胞株中 KHSRP、雄激素受体 (androgen receptor, AR) 及锚定蛋白 3 (ankyrin 3, ANK3) 的表达量。通过细胞增殖实验、平板克隆实验、小鼠成瘤实验等检测 KHSRP 对 LNCaP 细胞增殖能力的影响。通过转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 检测 *KHSRP* 影响的下游基因, 并通过实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 检测 *KHSRP* 下游基因的 mRNA 表达量。结合癌细胞系百科全书 (Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE)、癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA)、基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数据库, 分析研究 *ANK3* 和 *KHSRP* 在前列腺组织样本中的表达情况以及 *ANK3* 在不同前列腺癌细胞株中的表达差异。**结果**·GEO 数据分析结果显示 *KHSRP* 在前列腺癌组织中的表达高于良性前列腺组织, 提示其与前列腺癌的发生相关。细胞增殖实验、平板克隆实验、小鼠成瘤实验结果显示 KHSRP 的表达与 LNCaP 细胞增殖能力呈负相关, 提示 KHSRP 可以抑制前列腺癌细胞的增殖, 且 KHSRP 对 LNCaP 细胞增殖能力的影响强于对 DU145 细胞的影响。对 LNCaP 稳定细胞株的 Western blotting 和 RT-qPCR 检测显示 *KHSRP* 过表达后 LNCaP 细胞中 AR 蛋白质水平下降, 但 mRNA 水平未产生变化, 提示 KHSRP 可以间接调节 AR 的蛋白质水平。RNA-seq 和 RT-qPCR 结果显示 *KHSRP* 与影响 AR 蛋白稳定性的调节因子 *ANK3* 的表达呈正相关, 随后的 Western blotting 证明 *KHSRP* 过表达后 ANK3 蛋白质的表达量明显升高, TCGA 数据分析结果进一步说明 *KHSRP* 与 *ANK3* 的 mRNA 表达的相关性。根据 CCLE 和 GEO 数据, *ANK3* 的表达与前列腺癌的恶性程度也密切相关。**结论**·KHSRP 可能通过 ANK3 间接调控 AR 的蛋白稳定性, 影响雄激素依赖型前列腺癌细胞的增殖能力, 并介导前列腺癌细胞对雄激素反应性的改变。

**[关键词]** KH 型剪接调节蛋白 (KHSRP); 雄激素受体 (AR); 锚定蛋白 3 (ANK3); 前列腺癌; 细胞增殖**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2024.04.001 **[中图分类号]** R737.25 **[文献标志码]** A

## KHSRP regulates the responsiveness of prostate cancer cells to androgens through ANK3

CAI Renjie, XU Ming

Department of Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 201999, China

**[Abstract]** **Objective**·To investigate the impact of KH-type splicing regulatory protein (KHSRP) on the proliferation of prostate cancer cells and the regulation of downstream gene expression, and explore the potential role and mechanism of KHSRP in the transition of prostate cancer from androgen-dependent to androgen-independent. **Methods**·Recombinant lentivirus was used to infect androgen-dependent prostate cancer LNCaP cells and androgen-independent prostate cancer DU145 cells to establish stable cell lines with functional deficiency/acquisition of *KHSRP*, and the functional differences of KHSRP between the two cell types were compared. Western blotting was used to detect the expression levels of KHSRP, androgen receptor (AR), and ankyrin 3 (ANK3) in the stable cell lines. Cell proliferation assay, colony formation assay, and mouse xenograft assay were performed to assess the impact of KHSRP on the proliferation ability of LNCaP cells. RNA sequencing (RNA-seq) was performed to identify downstream genes affected by *KHSRP*, and the mRNA expression levels of these genes were measured by quantitative real-time PCR (RT-qPCR). The expression of *ANK3* and *KHSRP* in prostate tissue samples and the difference of *ANK3* expression in different prostate cancer cell lines were analyzed by combining Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), The Cancer Genome Atlas (TCGA)

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81302236)。**[作者简介]** 蔡人杰 (1994—), 男, 硕士生; 电子信箱: renjiecaichn@126.com。**[通信作者]** 徐 明, 电子信箱: mingxu@shsmu.edu.cn。**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (81302236)。**[Corresponding Author]** XU Ming, E-mail: mingxu@shsmu.edu.cn。

and Gene Expression Omnibus (GEO) databases. **Results**•GEO data analysis showed that *KHSRP* was upregulated in prostate cancer tissues compared to benign prostate tissues, suggesting its association with prostate tumorigenesis. Cell proliferation assay, colony formation assay, and mouse xenograft assay demonstrated a negative correlation between *KHSRP* expression and the proliferation ability of LNCaP cells, indicating that *KHSRP* can inhibit the proliferation of prostate cancer cells, with a stronger effect on LNCaP cells than on DU145 cells. Western blotting and RT-qPCR analysis of the stable LNCaP cell lines showed that *KHSRP* overexpression led to a decrease in AR protein level without affecting its mRNA level, suggesting that *KHSRP* can indirectly regulate AR protein level. RNA-seq and RT-qPCR results showed *KHSRP* was positively correlated with the expression of *ANK3*, a regulatory factor affecting AR protein stability, and subsequent Western blotting confirmed an increase in *ANK3* protein expression after *KHSRP* overexpression. TCGA data analysis further supported the correlation between *KHSRP* and *ANK3* mRNA expression. Interestingly, according to CCLE and GEO data, the expression of *ANK3* was closely related to prostate cancer malignancy. **Conclusion**•*KHSRP* may indirectly regulate AR protein stability through *ANK3*, thereby influencing the proliferation of androgen-dependent prostate cancer cells and mediating the altered responsiveness to androgen in prostate cancer cells.

**[Key words]** KH-type splicing regulatory protein (*KHSRP*); androgen receptor (AR); ankyrin 3 (*ANK3*); prostate cancer; cell proliferation

前列腺癌目前已经成为威胁男性健康的第二大恶性肿瘤<sup>[1]</sup>。该疾病的进展高度依赖于雄激素受体 (androgen receptor, AR) 对转录的调节作用, 因而去雄激素治疗是前列腺癌的一线治疗方案之一。根据去雄激素治疗的有效性, 临床上也将前列腺癌分为雄激素依赖型和雄激素非依赖型<sup>[2]</sup>。大部分早期前列腺癌都属于雄激素依赖型, 对去势治疗敏感, 有更好的治疗预期。然而, 在前列腺癌的进展过程中, 由于AR过表达或异常激活等机制的影响, 雄激素依赖型前列腺癌最终可能转变为雄激素非依赖型前列腺癌, 导致原本有效的治疗手段失效, 肿瘤恶性程度升高, 患者预后变差。因此, 迫切需要一种新的治疗方法以应对去势抵抗型前列腺癌的威胁。

KH型剪接调节蛋白 (KH-type splicing regulatory protein, *KHSRP*) 是一种能够在转录层面通过多种途径影响基因表达的蛋白质。例如, 它可以通过与mRNA的3'非翻译区 (untranslated region, UTR) 结合, 促进mRNA降解, 从而调节下游基因的表达<sup>[3]</sup>。此外, *KHSRP*还可以通过调控miRNA成熟的过程来影响雄激素非依赖型前列腺癌的进展<sup>[4]</sup>。不过, 目前尚未研究*KHSRP*在雄激素依赖型前列腺癌中的功能。为进一步了解*KHSRP*对mRNA的调控是否影响雄激素依赖型前列腺癌细胞的增殖能力, 并探究其调控作用与AR通路的关联, 本研究重点关注*KHSRP*在前列腺癌由雄激素依赖型转变为非依赖型的过程中发挥的潜在作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

LNCaP 和 DU145 前列腺癌细胞株购自中国科学

院细胞库。HEK293T 细胞为本实验室保存。使用含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养 LNCaP 细胞, 使用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 DU145 细胞。所有细胞均常规培养在 37 °C、含 5% 二氧化碳的加湿培养箱中。

### 1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清、DMEM 高糖培养基和 RPMI-1640 培养基购自美国 Hyclone。抗 *KHSRP* 抗体 (ab150393) 购自英国 Abcam, 抗锚定蛋白 3 (ankyrin 3, *ANK3*) 抗体 (sc-12719)、抗 AR 抗体 (sc-7305)、抗  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (sc-47778) 购自美国 Santa Cruz, 蛋白酶抑制剂 (#5872)、抗血凝素 (hemagglutinin, HA) 抗体 (C29F4, #3724)、抗兔 IgG 二抗 (#7074)、抗小鼠 IgG 二抗 (#7076) 购自美国 Cell Signaling Technology, 抗  $\alpha$  微管蛋白 ( $\alpha$ -tubulin) 抗体 (Cat66031-1-Ig) 购自美国 Proteintech, TRIzol 购自美国 Invitrogen, 脂质体转染试剂购自上海翌圣生物科技股份有限公司, 反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, RT-qPCR) 试剂购自日本 Takara。所有设备和仪器由上海精准医学研究院提供。实时荧光定量 PCR 仪购自瑞士 Roche。酶标仪购自美国 PerkinElmer。超灵敏多功能成像仪购自美国 General Electric。

### 1.3 慢病毒质粒的构建

pGreenPuro-Dual 质粒和辅助包装质粒均为本实验室保存。在 pGreenPuro-Dual 基础上自制慢病毒载体, 在 1 次感染中同时敲低内源蛋白并表达外源蛋白, 相关描述已在此前发表的文章中提及<sup>[5]</sup>。将基

于pGreenPuro-Dual自制的慢病毒载体作为空载对照质粒,分别针对*KHSRP*的3' UTR和编码序列(coding sequence, CDS)设计并合成*KHSRP*的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA);将shRNA通过T4 DNA连接酶连接至*Bam*H I和*Eco*R I-HF双酶切后的空载对照质粒上;将连接后的载体转化至trans5 $\alpha$ 感受态细胞,使用氨苄抗生素筛选并送测序

鉴定,鉴定成功后抽提sh-*KHSRP*质粒。设计携带HA标签的*KHSRP*的PCR引物,PCR扩增目的片段,进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的基因;将PCR产物通过DNA重组酶连接到*Nhe*I和*Xba*I-HF双酶切后的sh-*KHSRP*质粒上,通过氨苄抗生素筛选后送测序鉴定,鉴定成功后抽提sh-*KHSRP*-HA-*KHSRP*质粒。慢病毒质粒构建所用引物序列见表1。

表1 慢病毒质粒构建所用引物序列

Tab 1 Primer sequences used for lentiviral vector plasmid construction

Primer	Sequence (5'→3')
sh- <i>KHSRP</i> -UTR-F	GATCCGCTGAGGATAAAGCAATTCATTCTCGAGAATGAATTGCTTTATCCTCAGCTTTTTG
sh- <i>KHSRP</i> -UTR-R	AATTCAAAAAGCTGAGGATAAAGCAATTCATTCTCGAGAATGAATTGCTTTATCCTCAGCG
sh- <i>KHSRP</i> -CDS-F	GATCCGCCCCGAGAAGATTGCTCATATACTCGAGTATATGAGCAATCTTCTCGGGCTTTTTG
sh- <i>KHSRP</i> -CDS-R	AATTCAAAAAGCCCGAGAAGATTGCTCATATACTCGAGTATATGAGCAATCTTCTCGGGCG
HA- <i>KHSRP</i> -F	TTTTGACCTCCATAGAAGATTATGGGTACCTATCCTACGA
HA- <i>KHSRP</i> -R	GCGTCTAGGAAGAGCTCGATCAGTTAGAGGAGAACTTGTCT

**Note:** F—forward; R—reverse; sh-*KHSRP*-UTR—shRNA targeting the 3' UTR region of *KHSRP*; sh-*KHSRP*-CDS—shRNA designed for silencing the CDS region of *KHSRP*; HA-*KHSRP*—the HA-tagged *KHSRP* fragment which is utilized to restore the expression of exogenous *KHSRP* on the background of *KHSRP* knockdown.

#### 1.4 慢病毒的包装和稳转细胞株的构建

将慢病毒的辅助包装质粒(pCMV-dR8.2、pMD2.G)与目的质粒(空载对照、sh-*KHSRP*、sh-*KHSRP*-HA-*KHSRP*)用脂质体转染试剂转染至HEK293T细胞。培养48 h后,收集病毒上清液,用0.22  $\mu$ m的滤器过滤。将病毒液感染合适密度的LNCaP细胞或DU145细胞48 h后,使用嘌呤霉素(puromycin)筛选,获得稳定细胞株。在LNCaP细胞中,感染空载对照质粒包装的慢病毒以构建LNCaP<sup>NC</sup>稳定细胞株,感染sh-*KHSRP*-CDS质粒包装的慢病毒以构建LNCaP<sup>sh-KHSRP-CDS</sup>稳定细胞株,作为阳性对照确保*KHSRP*的有效沉默。在LNCaP和DU145细胞中,感染sh-*KHSRP*-UTR质粒包装的慢病毒,以构建沉默*KHSRP*的LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup>和DU145<sup>sh-KHSRP</sup>稳定细胞株;并在sh-*KHSRP*-UTR的基础上回复过表达外源*KHSRP*构建LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup>和DU145<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup>稳定细胞株。

#### 1.5 细胞增殖实验

LNCaP细胞中,以LNCaP<sup>NC</sup>细胞为空白对照组,LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup>细胞为敲低内源*KHSRP*的对照组,LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup>细胞为敲低内源*KHSRP*后回复表达外源*KHSRP*的实验组。DU145细胞中,以DU145<sup>sh-KHSRP</sup>细胞为对照组,DU145<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup>细胞

为实验组。将LNCaP和DU145稳定细胞株计数后以每孔 $3 \times 10^3$ 个细胞的密度接种至96孔板中,每种细胞设置5个复孔,以同样方式共接种4块96孔板;待细胞完全贴壁后,将第一块96孔板用25%三氯乙酸在4  $^{\circ}$ C反应1 h进行固定,用清水洗净,之后每隔24 h固定1块96孔板;待细胞全部固定完成后,加入用1%冰乙酸溶解的磺胺霍丹明B(sulforhodamine B, SRB)染料,在避光条件下反应30 min,用1%冰乙酸洗净未结合的SRB染料,使用10 mmol/L Tris溶液(pH 10.5)溶解SRB染料;最后使用酶标仪在510 nm波长测量吸光度,根据吸光度数值绘制每日生长曲线以比较细胞的增殖能力。

#### 1.6 平板克隆实验

以LNCaP<sup>NC</sup>细胞为空白对照组,LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup>细胞为敲低内源*KHSRP*的对照组,LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup>细胞为敲低内源*KHSRP*后回复表达外源*KHSRP*的实验组进行LNCaP细胞的平板克隆实验。将LNCaP稳定细胞株计数后以每孔 $1 \times 10^3$ 个细胞的密度接种至6孔板中,培养2周,观察克隆长至肉眼可见程度后,将上层培养基吸除,加入无水甲醇固定15 min;弃去无水醇,加入2 mL 0.001%的结晶紫,于室温染色2~3 h;将结晶紫吸除,清水洗净后使用相机拍照并使用ImageJ软件对各孔全视野(直径35 mm)内的克隆进行计数。

### 1.7 小鼠成瘤实验

非肥胖糖尿病/重度联合免疫缺陷 (non-obese diabetic/severe combined immunodeficient, NOD/SCID) 小鼠和 BALB/c 裸鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物生产许可证: SCXK (浙) 2019-0001。将小鼠饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院浦东分院的无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物实验室; 动物使用许可证: SYXK (沪) 2020-0025。将 6 只体质量 20~24 g 的 NOD/SCID 小鼠随机分为 2 组, 每组 3 只; 在每只 NOD/SCID 小鼠背部注射悬浮于 100  $\mu$ L PBS 的  $1 \times 10^6$  个 LNCaP 稳定细胞株。同样将 6 只体质量 19~22 g 的 BALB/c 裸鼠随机分为 2 组, 每组 3 只; 以相同方式注射  $1 \times 10^5$  个 DU145 稳定细胞株。在第 35 日使所有小鼠颈椎脱臼以确保安乐死, 解剖出所形成的瘤体, 吸干表面液体后称重, 并使用相机拍照记录瘤体大小。

### 1.8 转录组测序

使用 TRIzol 处理 LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> 稳定细胞株和 LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 稳定细胞株, 各重复 3 份。将 LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> 细胞作为对照组, LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 细胞作为实验组, 将样品送至上海旭燃生物科技有限公司进行转录组测序 (RNA sequencing, RNA-seq)。使用 VAHTS Universal V6 RNA seq Library Prep Kit (NR604-02, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 构建 cDNA 库, 使用 Illumina Nova seq6000 平台进行

RNA-seq。使用 STAR 程序, 将 RNA-seq 结果与从 Ensemble (版本 98) 检索并下载的人类转录组注释文件和从 UCSC (University of California Santa Cruz) 基因组浏览器检索并下载的人类基因组 (版本 hg38) 进行比对。使用 DESeq2 程序进行差异基因分析, 并根据满足对照组 LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> 细胞和实验组 LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 细胞之间  $|\log_2$  倍数差异 (fold change, FC)  $\geq 0.2$  和  $P < 0.05$  的差异表达范围, 筛选 2 组之间的差异转录物。使用 R 软件包 ClusterProfiler 进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 富集分析。将 RNA 原始数据存入 NCBI 数据库 (GEO 编号: GSE206486) 以供访问。

### 1.9 RT-qPCR

使用 TRIzol 从 LNCaP 稳定细胞株中提取总 RNA。按照说明书使用反转录试剂盒对 1  $\mu$ g 总 RNA 进行反转录, 获得 10  $\mu$ L cDNA。将 cDNA 稀释 5 倍后, 配置包含 10  $\mu$ L SYBR Green, 2  $\mu$ L 稀释后的 cDNA, 0.4  $\mu$ L 上、下游引物, 7.6  $\mu$ L 无菌水的体系; 充分混合后加至 96 孔板中, 每孔 20  $\mu$ L, 每组设置 3 个复孔。使用实时荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR, PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}$ C, 30 s, 共 1 个循环; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。使用 GAPDH 作为内参标定目的基因的表达量, 采用公式  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算基因的相对表达水平。RT-qPCR 所用引物序列见表 2。

表 2 RT-qPCR 所用引物序列

Tab 2 Primer sequences used for RT-qPCR

Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
GAPDH	ATGAGGTCCACCACCCTGTT	CTCAAGGGCATCCTGGGCTA
ANK3	GAAGATGCAATGACCGGGGA	AAAGCCCATGTAACCCCTCTG
AR	GACGACCAGATGGCTGTCAAT	GGGCGAAGTAGAGCATCCT

### 1.10 蛋白质印迹法

使用 SDS 裂解液裂解 DU145 和 LNCaP 稳定细胞株, 收集蛋白裂解液, 使用 SDS-PAGE 电泳分离, 转至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 按 1:1 000 配置 ANK3、KHSRP 和 AR 的一抗, 1:5 000 配置  $\alpha$ -tubulin 的一抗, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜, 按 1:5 000 配置对应的二抗 (KHSRP 使用抗兔 IgG 二抗;  $\alpha$ -tubulin、ANK3、AR 使用抗小鼠 IgG 二抗) 并室温孵育 1 h, 再次 TBST 洗膜后使用 ECL 发光液和超灵敏多功能成像仪显影。

### 1.11 公共数据来源及分析

从癌细胞系百科全书 (Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE) 数据库 (<https://portals.broadinstitute.org/ccle/about>) 获得前列腺癌的细胞系基因表达矩阵。通过 R v4.0.3 软件包 ggplot2 绘制 ANK3 和 AR 的基因表达图谱。从癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 数据库 (<https://portal.gdc.com>) 获得 498 例前列腺癌的 RNA-seq 数据, 通过 R 软件包 ggstatsplot 制作 KHSRP 和 ANK3 的基因表达量相关性图。从基因表达综合 (Gene Expression Omnibus, GEO) 数

数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中获得包含 59 例前列腺癌和 39 例良性组织样本信息的数据集 (GSE32571), 通过 R 软件包 boxplot 绘制 *KHSRP* 表达量的箱线图。从 GEO 数据库下载含有 Gleason 评分的 52 例前列腺癌患者的数据集 (GSE15484) 并通过 R 软件包 boxplot 绘制 *ANK3* 表达量的箱线图。

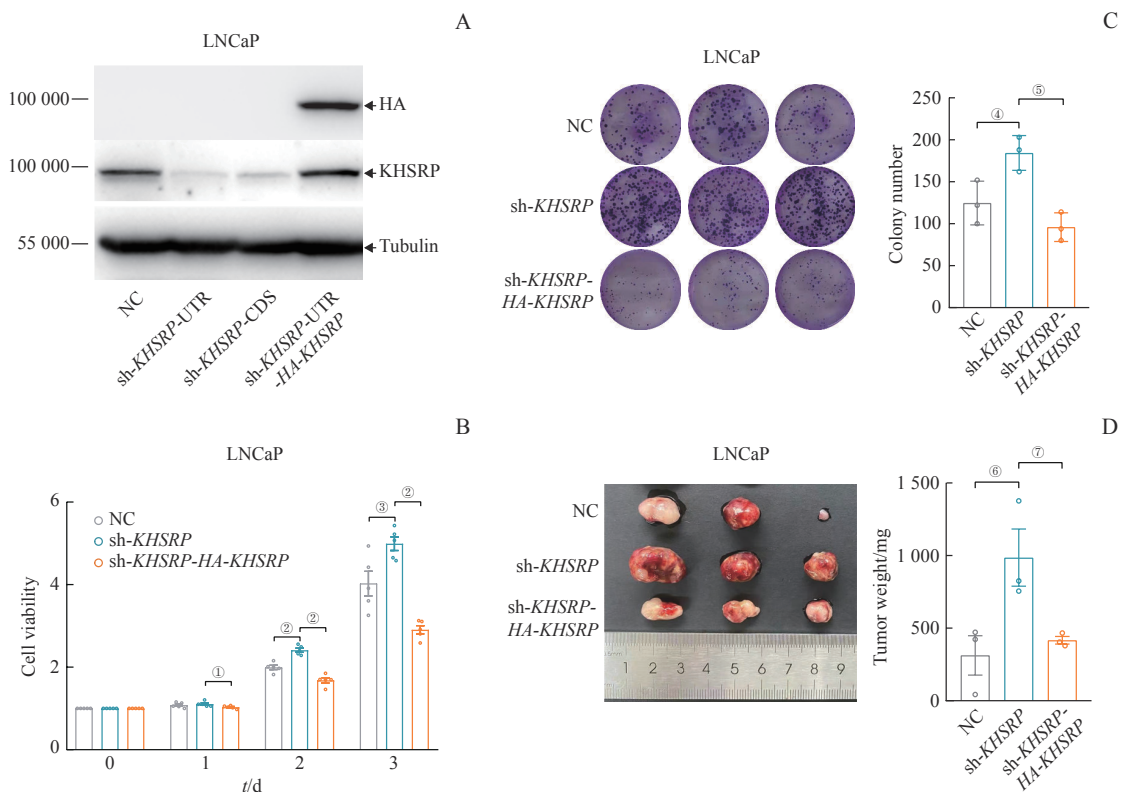
### 1.12 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *KHSRP* 对前列腺癌细胞增殖的体内外抑制

蛋白质印迹法 (Western blotting) 结果显示:



**Note:** A. Verification of *KHSRP* expression in stable LNCaP cell lines through Western blotting. B. Results of the cell proliferation assay in stable LNCaP cell lines. C. Results of the colony formation assay in stable LNCaP cell lines. D. Results of the mouse xenograft assay in stable LNCaP cell lines. ① $P=0.044$ , ② $P=0.000$ , ③ $P=0.022$ , ④ $P=0.036$ , ⑤ $P=0.004$ , ⑥ $P=0.047$ , ⑦ $P=0.045$ .

图1 *KHSRP*对LNCaP细胞增殖能力的影响

Fig 1 Impact of *KHSRP* on the proliferation of LNCaP cells

### 2.2 *KHSRP*对前列腺癌对雄激素反应性的潜在影响

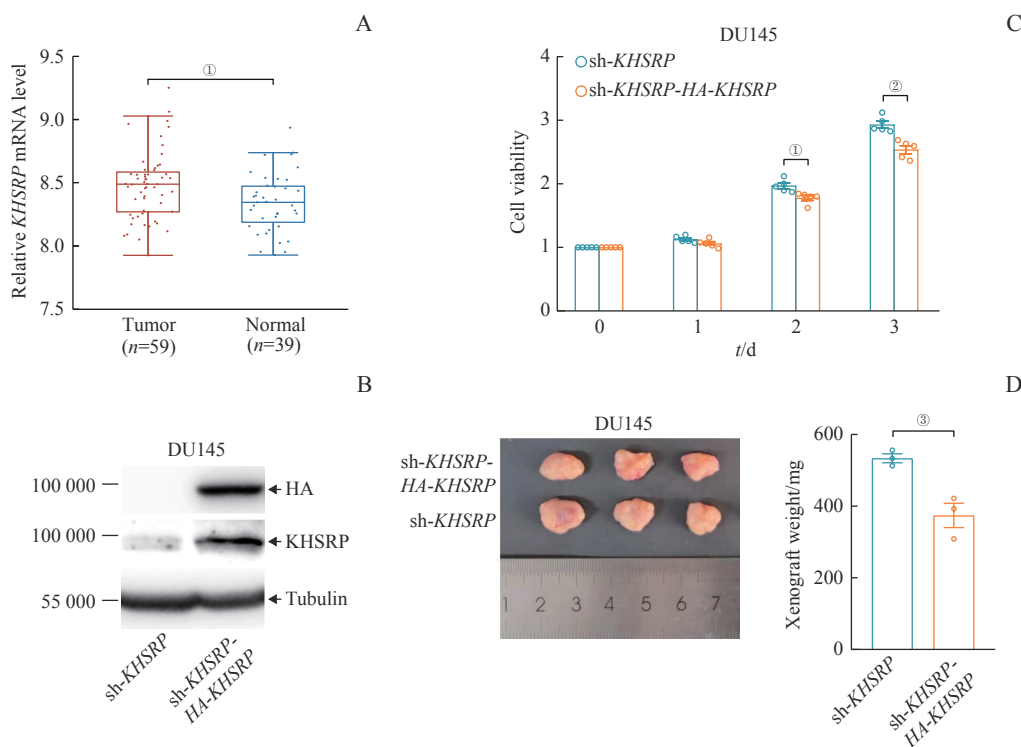
为了研究 *KHSRP* 在前列腺癌癌灶和癌旁组织中的表达情况, 本研究通过 GEO 数据库 (GSE32571) 分析了 59 例前列腺癌和 39 例良性组织样本中 *KHSRP* 的

LNCaP<sup>sh-KHSRP-UTR</sup> 和 LNCaP<sup>sh-KHSRP-CDS</sup> 细胞中 *KHSRP* 蛋白表达量均降低; LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 细胞中 *KHSRP* 的表达有效回复 (图 1A)。选用 LNCaP<sup>sh-KHSRP-UTR</sup> 细胞作为敲低内源 *KHSRP* 表达的 LNCaP 细胞 (LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup>) 进行后续实验。细胞增殖实验结果显示: *KHSRP* 沉默后 LNCaP 细胞的相对细胞活力较 LNCaP<sup>NC</sup> 细胞升高; 在 LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> 基础上回复表达 *KHSRP* 后, 细胞的相对活力降低 (图 1B)。平板克隆实验结果显示: 与 LNCaP<sup>NC</sup> 细胞的克隆形成数相比, *KHSRP* 功能缺失的 LNCaP 细胞的克隆形成数升高; 重新获得 *KHSRP* 功能后, LNCaP 细胞的克隆形成数相应减少 (图 1C)。小鼠成瘤实验结果显示, 在 NOD/SCD 小鼠皮下注射 LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> 细胞后成瘤质量高于 LNCaP<sup>NC</sup> 细胞和 LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 细胞 (图 1D)。这些结果表明 *KHSRP* 可以在体内和体外抑制前列腺癌 LNCaP 细胞的增殖能力。

表达水平。结果显示, *KHSRP* 在前列腺癌组织中表达量高于正常组织 (图 2A), 这提示 *KHSRP* 可能与前列腺癌的发生过程相关。为了排除内源性 *KHSRP* 的影响, 后续研究选择 LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> 细胞作为对照组, 选

择 LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 细胞作为实验组, 探索 KHSRP 过表达对前列腺癌增殖的调控作用。为了比较 KHSRP 对雄激素依赖型和非依赖型前列腺癌的影响是否存在差异, 在 DU145 细胞中构建了 DU145<sup>sh-KHSRP</sup> 和 DU145<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 稳定细胞株, Western blotting 结果显示 DU145<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 细胞在 DU145<sup>sh-KHSRP</sup> 细胞的基础上成功回复表达了 KHSRP (图 2B)。随后, 通过对 LNCaP 及 DU145 稳定细胞株的细胞增殖实验的结果绘制柱状图比较分析, 发现在 DU145 细胞中, 过表达 KHSRP 同样可以抑制细胞的增殖能力 (图 2C); 但相

较于 LNCaP 细胞, 这种抑制作用较弱 (图 1B)。小鼠成瘤实验结果也显示, 过表达 KHSRP 使 DU145 细胞所形成的瘤体质量减轻 (图 2D), 其减轻程度同样小于 LNCaP 细胞 (图 1D)。这些结果提示 KHSRP 可以抑制雄激素依赖型和非依赖型前列腺癌细胞的增殖能力。值得注意的是, KHSRP 对 LNCaP 细胞的抑制作用强于 DU145 细胞, 这种差异性可能与细胞系的特性有关。鉴于 LNCaP 细胞表达 AR, 而 DU145 细胞则缺少 AR 的表达, KHSRP 对 LNCaP 细胞的调控作用可能与 AR 的参与相关。



**Note:** A. Detection of KHSRP expression in 59 prostate cancers and 39 benign tissue samples. B. Verification of KHSRP expression in DU145 stable cell lines through Western blotting. C. Bar chart showing the results of the cell viability experiment in stable DU145 cell lines. D. Bar chart showing the tumor weight results of the mouse xenograft experiment in stable DU145 cell lines. ① $P=0.012$ , ② $P=0.001$ , ③ $P=0.011$ .

**图2 KHSRP对DU145细胞增殖能力的影响**

**Fig 2** Effects of KHSRP on the proliferation of DU145 cells

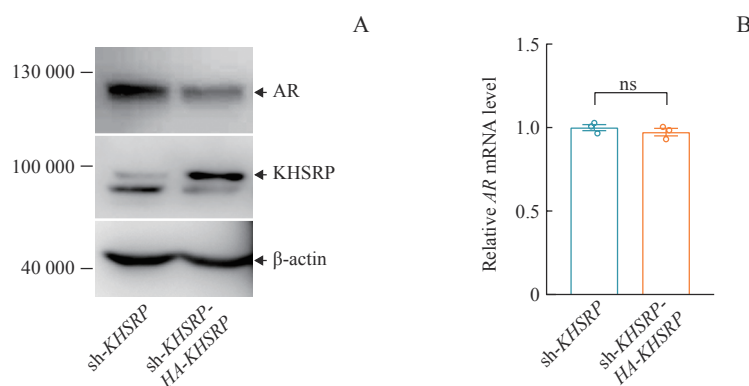
### 2.3 KHSRP对前列腺癌细胞中AR表达量的影响

通过对 LNCaP 稳定细胞株的 Western blotting 检测发现, LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 细胞的 AR 表达量相对 LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> 细胞减少 (图 3A), 提示 KHSRP 可能对 AR 的蛋白质水平产生调控作用。随后的 RT-qPCR 结果显示, 在 LNCaP 细胞中过表达 KHSRP 后 AR 的 mRNA 表达量无显著变化 (图 3B), 提示 KHSRP 在 mRNA 层面不直接调节 AR 的表达。

### 2.4 KHSRP对前列腺癌细胞中ANK3表达量的影响

为深入了解 KHSRP 对 AR 的调控机制, 通过 RNA-

seq 检测 LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> 细胞和 LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> 细胞间的差异基因, 并进行 KEGG 富集分析。结果显示, LNCaP 细胞中 KHSRP 功能重新获得后, 存在 20 条富集差异基因的 KEGG 通路 (图 4A、B)。其中富集因子最高的 2 条通路为 DNA 复制和碱基切除修复 (base excision repair, BER) 通路。值得注意的是, RNA-seq 结果中 ANK3 的 mRNA 表达量相应增加 (图 4C)。此前的研究已经指出在前列腺癌中 ANK3 可以影响 AR 的稳定性<sup>[6]</sup>。此外, AR 可以通过调节转录影响 DNA 修复<sup>[7]</sup>。RT-qPCR 检测结果同样显示 KHSRP 的回复表达提升了 ANK3 的



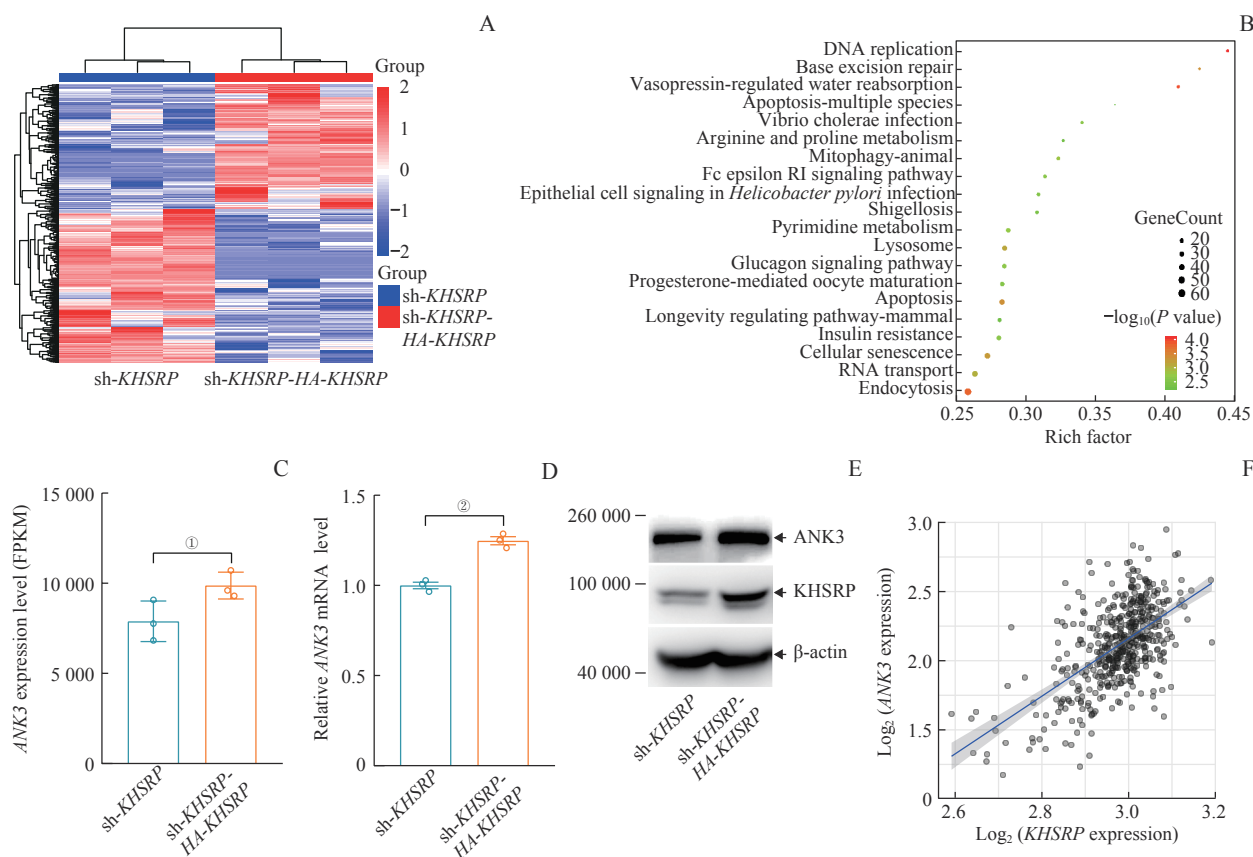
**Note:** A. Detection of AR protein expression in stable LNCaP cell lines through Western blotting. B. Detection of AR mRNA expression in stable LNCaP cell lines through RT-qPCR. ns—not significant.

**图3** 过表达KHSRP后LNCaP细胞中AR表达情况的检测

**Fig 3** Detection of AR expression in LNCaP cells with KHSRP overexpression

mRNA水平(图4D)。Western blotting结果显示, LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup>细胞中ANK3的表达量相较于LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup>细胞明显增加(图4E)。对TCGA数据库中498例前列腺癌患者的RNA-seq数据分析结果

显示, KHSRP与ANK3的mRNA表达量呈正相关( $r=0.54$ ,  $P=0.000$ ;图4F)。这些结果提示KHSRP可能通过调节ANK3的表达量, 间接调节AR的功能。



**Note:** A. Heatmap of differentially expressed genes between LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> and LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> stable cell lines based on RNA-seq. B. Bubble plot of KEGG enrichment analysis of differential genes between LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> and LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> stable cell lines from RNA-seq. C. Bar chart showing the expression level of ANK3 in LNCaP<sup>sh-KHSRP</sup> and LNCaP<sup>sh-KHSRP-HA-KHSRP</sup> stable cell lines based on RNA-seq. FPKM—fragments per kilobase of transcript per million mapped reads. D. Detection of ANK3 mRNA expression in stable LNCaP cell lines through RT-qPCR. E. Detection of ANK3 protein expression in stable LNCaP cell lines through Western blotting. F. Analysis of the correlation between ANK3 and KHSRP expression levels in prostate cancer using the TCGA database. ① $P=0.010$ , ② $P=0.001$ .

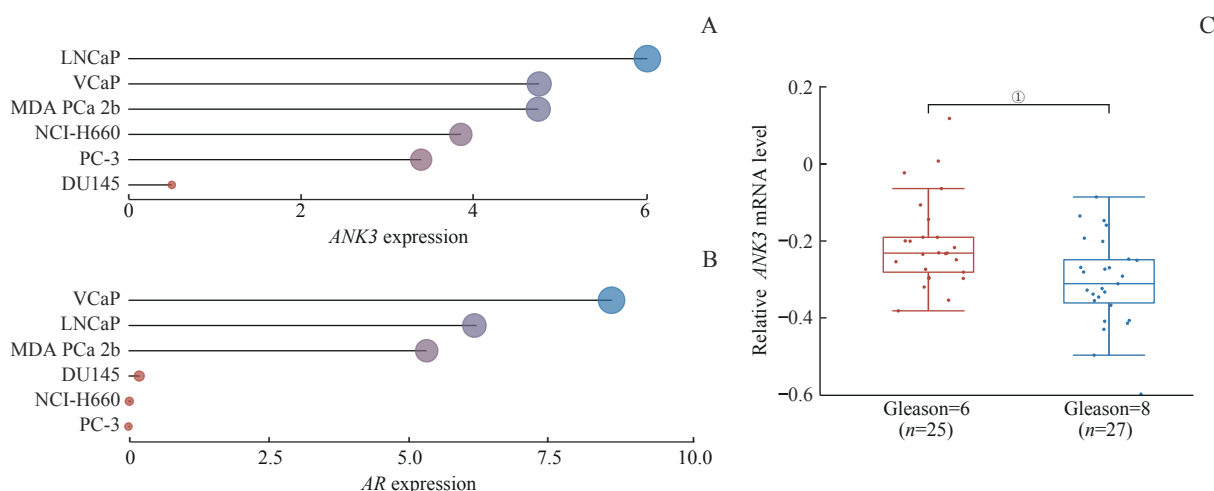
**图4** LNCaP细胞中KHSRP所调控基因的检测

**Fig 4** Detection of genes regulated by KHSRP in LNCaP cells

## 2.5 ANK3与前列腺癌对雄激素的反应性及恶性程度的相关性

为了进一步验证ANK3与前列腺癌对雄激素反应性的关联,对CCLE数据库中6种前列腺癌细胞的基因表达数据进行分析。结果显示:在恶性程度较低且AR的mRNA水平较高的前列腺癌细胞株(如LNCaP、VCaP、MDA PCa 2b)中,ANK3的表达量相对较高;相反,在恶性程度较高且AR的mRNA水平较低的前列腺癌细胞株(如DU145、PC-3、NCI-H660)中,ANK3的表达量相对较低

(图5A、B),进一步支持了ANK3可能通过对AR的调节影响前列腺癌的恶性程度。此外,使用GEO数据库(GSE15484)分析含有Gleason评分的52例前列腺癌患者的ANK3表达量,结果显示在恶性程度较高的前列腺癌(Gleason评分=8)组织样本中,ANK3的表达量低于恶性程度较低(Gleason评分=6)的前列腺癌组织样本(图5C)。这些结果提示ANK3可能与前列腺癌的恶性程度和对雄激素的反应性存在一定的内在关联。



**Note:** A. Relative expression levels of ANK3 mRNA in different prostate cancer cell lines. B. Relative expression levels of AR mRNA in different prostate cancer cell lines. C. Comparison of ANK3 mRNA levels in 25 low-grade (Gleason score=6) and 27 high-grade (Gleason score=8) prostate cancer tissues from the GEO database. ①  $P=0.004$ .

图5 ANK3与前列腺癌组织和细胞的恶性程度的关联

Fig 5 Correlation of ANK3 expression and malignancy of prostate cancer tissues and cells

## 3 讨论

KHSRP在转录后水平对基因的调节作用已被广泛报道。此前的研究<sup>[4]</sup>发现KHSRP可以通过调节miRNA成熟参与调控雄激素非依赖型前列腺癌的进展。同时,KHSRP还可以发挥调节mRNA降解的功能,如KHSRP可以通过与蛋白磷酸酶2催化亚基 $\alpha$ (protein phosphatase 2 catalytic subunit  $\alpha$ , PPP2CA)的mRNA的3' UTR结合促进其降解,从而改变肾母细胞瘤的增殖能力<sup>[8]</sup>。此外,KHSRP也可以通过调节可变剪切参与基因表达的调控,影响单核细胞分化<sup>[9]</sup>。因此,在对恶性肿瘤的调控过程中,KHSRP可能通过不同的机制参与雄激素依赖型和非依赖型前列腺癌进展的调节。

本研究发现KHSRP可以抑制雄激素依赖型前列腺癌LNCaP细胞的增殖;TCGA数据库的分析结果

显示KHSRP基因在前列腺癌组织中高表达。此前相关报道也指出抑癌基因可以在肿瘤组织中高表达,如抑癌基因同源框CUT样蛋白1(CUT-like homeobox 1, CUX1)在进展期癌症中表达升高<sup>[10]</sup>。在肿瘤发生过程中,癌基因和抑癌基因处在复杂的动态调控网络中。抑癌基因在癌灶中表达上调可能是细胞为了对抗癌变过程中的异常情况而采取的一种反应。在前列腺癌的发生过程中。累积的损伤因素可能导致了KHSRP的mRNA表达上调。此外,我们发现相较雄激素非依赖型前列腺癌DU145细胞,KHSRP对雄激素依赖型前列腺癌LNCaP细胞增殖的抑制作用更强。考虑到LNCaP细胞和DU145细胞间的主要差异是LNCaP细胞存在AR表达,而DU145细胞缺少AR的表达,我们推测KHSRP在前列腺癌中的功能可能与AR通路相关。

通过LNCaP稳定细胞株的RNA-seq结果我们发

现KHSRP可以调控ANK3的表达。且KHSRP回复表达后,KEGG分析结果中富集因子最高的2条通路为DNA复制通路和BER通路(图4B)。鉴于此前的研究发现ANK3可以调控AR的表达<sup>[6]</sup>,且前列腺癌中AR可以通过促进转录调节DNA损伤修复的相关通路<sup>[7]</sup>,我们推测KHSRP可能通过ANK3间接调节AR的表达。

AR是前列腺癌发生发展过程中的关键调节因子;在疾病状态下,AR的表达升高,使得前列腺组织对雄激素刺激更为敏感,促进增殖相关的转录活动,从而驱动肿瘤进展<sup>[11]</sup>。多数前列腺癌患者在首次诊断时都可以采用雄激素剥夺治疗作为主要治疗手段<sup>[12]</sup>。然而,尽管大部分前列腺癌在治疗初期对去雄激素治疗有效,随着治疗时间的延长,前列腺癌最终仍难免发展为去势抵抗型。其机制复杂多样,其中最重要的机制之一为雄激素耗竭状态下AR的再激活;其可能原因包括去势抵抗型前列腺癌中AR的过表达,进而诱导低雄激素环境下AR信号通路的重新激活<sup>[13]</sup>。本研究发现KHSRP可以调控AR蛋白的表达量,这提示KHSRP可能在雄激素依赖型前列腺癌向非依赖型前列腺癌的转化过程中发挥重要作用。

ANK3是膜相关蛋白连结蛋白家族的成员。此前的研究<sup>[6]</sup>发现,在前列腺癌中ANK3表达量降低后,AR的降解速率减慢,表达量增加,进而影响前列腺癌的进展。同时,ANK3也能参与乳腺癌中AR通路的调节,以改善乳腺癌预后<sup>[14]</sup>。本研究发现现在前列腺癌中,当KHSRP升高后ANK3的表达量相应增加。结合这些发现,可以推测KHSRP通过ANK3间接调节AR通路。此外,在恶性程度较高的前列腺癌组织和细胞中ANK3表达升高,提示KHSRP-ANK3-AR的调控轴可以作为衡量前列腺癌恶性程度的指标。

然而,我们尚未发现KHSRP调节ANK3的mRNA表达量的具体机制。ANK3的3' UTR缺少KHSRP介导其mRNA降解调控所需要的富含AU的元件,同时KHSRP也未对ANK3的mRNA降解速率

产生影响,因此KHSRP可能通过影响ANK3的可变剪切等方式调节其表达。我们发现ANK3可以降低AR的稳定性,但在ANK3高表达的前列腺癌细胞中,AR的mRNA表达量升高,这似乎与我们的结论相悖。我们推测AR蛋白质表达量的降低通过负反馈调节减少了mRNA的表达量。这些缺陷和不足有待在后续的实验中进行完善和补充。

综上所述,本研究首次发现KHSRP可以通过ANK3间接调节AR的表达,从而调节前列腺癌对雄激素的反应性。通过深入研究KHSRP-ANK3-AR调控轴,可能为延缓激素敏感型前列腺癌向去势抵抗型前列腺癌的转变提供新的思路。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

两位作者声明不存在利益冲突。

Both authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 伦理批准和动物权利声明/Ethics Approval and Animal Right

所有动物实验均在上海交通大学医学院附属第九人民医院医学伦理委员会批准和指导下进行(审批编号:HKDL-2018-271)。所有动物实验的开展都遵守上海交通大学医学院实验动物伦理委员会相关条例。

All animal studies were carried out with the approval and guidance of the Medical Ethics Committee of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (Approval No. HKDL-2018-271), and all experimental animal protocols were conducted by following the guidelines of Experimental Animal Ethics Committee of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

徐明设计并指导整个课题研究;蔡人杰参与实验设计并完成所有实验;蔡人杰和徐明参与论文的写作与修改。两位作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The study was designed and supervised by XU Ming. CAI Renjie participated in the research design and performed all experiments. The manuscript was drafted and revised by XU Ming and CAI Renjie. Both authors have read the last version of the manuscript and consented to submission.

- Received: 2023-10-30
- Accepted: 2024-02-18
- Published online: 2024-04-28

#### 参·考·文·献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers

in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] DESAI K, MCMANUS J M, SHARIFI N. Hormonal therapy for

- prostate cancer[J]. *Endocr Rev*, 2021, 42(3): 354-373.
- [3] ROSSI M, BUCCI G, RIZZOTTO D, et al. LncRNA EPR controls epithelial proliferation by coordinating Cdkn1a transcription and mRNA decay response to TGF- $\beta$ [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1969.
- [4] YUAN H H, DENG R, ZHAO X, et al. SUMO1 modification of KHSRP regulates tumorigenesis by preventing the TL-G-Rich miRNA biogenesis[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 157.
- [5] LU W M, WANG Q, XU C, et al. SUMOylation is essential for Sirt2 tumor-suppressor function in neuroblastoma[J]. *Neoplasia*, 2021, 23(1): 129-139.
- [6] WANG T T, ABOU-OUF H, HEGAZY S A, et al. Ankyrin G expression is associated with androgen receptor stability, invasiveness, and lethal outcome in prostate cancer patients[J]. *J Mol Med*, 2016, 94(12): 1411-1422.
- [7] POLKINGHORN W R, PARKER J S, LEE M X, et al. Androgen receptor signaling regulates DNA repair in prostate cancers[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(11): 1245-1253.
- [8] CHENG C, CAI Y X, LIU X W, et al. KHSRP modulated cell proliferation and cell cycle *via* regulating PPP2CA and p27 expression in Wilms tumor[J]. *Cell Signal*, 2022, 100: 110447.
- [9] XU J Y, WANG D S, MA H L, et al. KHSRP combines transcriptional and posttranscriptional mechanisms to regulate monocytic differentiation[J]. *Blood Sci*, 2022, 4(3): 103-115.
- [10] RAMDZAN Z M, NEPVEU A. *CUX1*, a haploinsufficient tumour suppressor gene overexpressed in advanced cancers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 673-682.
- [11] REBELLO R J, OING C, KNUDSEN K E, et al. Prostate cancer[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7: 9.
- [12] NARITA S, NOMURA K, HATAKEYAMA S, et al. Prognostic significance of early changes in serum biomarker levels in patients with newly diagnosed metastatic prostate cancer[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12071.
- [13] LABAF M, LI M Q, TING L, et al. Increased *AR* expression in castration-resistant prostate cancer rapidly induces AR signaling reprogramming with the collaboration of EZH2[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1021845.
- [14] KUROSUMI S, JOSEPH C, RAAFAT S, et al. Utility of ankyrin 3 as a prognostic marker in androgen-receptor-positive breast cancer[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2019, 176(1): 63-73.

[本文编辑] 崔黎明

## 学术快讯

## 上海交通大学医学院附属第六人民医院贾伟平院士团队发现食物中的抗性淀粉有望助力减肥

2024年2月26日,上海交通大学医学院附属第六人民医院内分泌代谢科、上海市糖尿病重点实验室贾伟平院士团队在国际代谢领域权威期刊《自然代谢》(*Nature Metabolism*)发表题目为 *Resistant starch intake facilitates weight loss in humans by reshaping the gut microbiota* 的研究成果,发现抗性淀粉配合平衡膳食可以通过调节肠道菌群缓解肥胖,可能成为治疗肥胖的新策略。

研究者针对超重肥胖受试者开展了一项随机双盲、交叉设计干预研究,通过精准的临床指标评估抗性淀粉干预对肥胖的缓解作用,同时进行多组学研究全面分析肠道微生物和代谢物的改变,探索抗性淀粉改善肥胖的机制,并对其中发挥作用的关键菌种进行了因果验证。该研究发现肠道微生物青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)是抗性淀粉改善超重肥胖的关键菌,其在抗性淀粉干预后丰度增加,通过改善肠道屏障作用、降低炎症水平、降低食物中的脂质吸收等机制缓解肥胖。该研究还发现体质量在洗脱期后有所恢复,而体质量反弹是长期体质量管理面临的最主要挑战之一。因此,长期的抗性淀粉摄入并结合平衡膳食的饮食习惯以维持肠道稳态对控制体质量十分关键,将长期可持续的干预融入日常生活是肥胖问题的最优解。该研究为超重肥胖的治疗提供了一种有效、经济、可坚持的生活干预方式,并为开发基于微生物组的减肥干预措施提供了新思路。