肿瘤精准医学与转化研究

DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003890

LSD1通过MMP13/IL-17途径调控前列腺癌去势抵抗性

李海英，范秀杰，方秀秀，汪运山
（山东第一医科大学附属中心医院，济南　250013）

【摘　要】**目的**：本研究旨在阐明赖氨酸特异性脱甲基酶 1（lysine specific demethylase 1，LSD1）在去势抵抗性前列腺癌（prostate cancer，PCa）中的作用及分子机制。**方法**：通过利用癌症基因组图谱（The Cancer Genome Atlas，TCGA）数据库进行生物信息学分析，探索LSD1在PCa中的差异表达和预后情况；为了构建雄激素非依赖性（androgen-independent，AI）细胞系，对PCa雄激素依赖细胞系前列腺癌淋巴结转移细胞系（lymph node carcinoma of the prostate cells，LNCap）进行雄激素剥夺处理，敲低LSD1观察细胞变化，并用LSD1抑制剂处理雄激素非依赖前列腺癌PC-3细胞系（Prostate Cancer-3 cell line，PC-3）；构建PCa原位瘤模型探究LSD1抑制对去势治疗敏感性的影响；最后通过转录组测序、实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time fluorescence quantitative PCR，qPCR）和蛋白质印迹技术（Western blot，WB）和染色质免疫沉淀（chromatin immunoprecipitation，ChIP）实验探索机制。**结果**：LSD1在TCGA-PCa及去势抵抗性PCa中明显上调，高表达患者生存期短，且在LNCap-AI细胞中表达高于LNCap细胞，敲低LSD1可抑制细胞恶性行为、提高凋亡水平，LSD1抑制剂能抑制PC-3细胞恶性行为，抑制LSD1可提高PCa对去势治疗的敏感性，LSD1敲低降低基质金属蛋白酶13（Matrix Metalloproteinase 13，MMP13）的表达、抑制白细胞介素-17（interleukin-17，IL-17）信号通路，并通过调节MMP13基因启动子区域组蛋白H3第9位赖氨酸（histone H3 lysine 9，H3K9）的甲基化水平调控其表达。**结论**：LSD1通过调节MMP13基因启动子区域H3K9的甲基化水平控制MMP13表达，进而影响IL-17信号通路，在前列腺癌去势抵抗性进程中发挥重要作用。

【关键词】赖氨酸特异性去甲基化酶1；前列腺癌；白细胞介素17通路；基质金属蛋白酶13
【中图分类号】R737.25　　【文献标志码】A

Mechanism of lysine-specific demethylase 1 regulating castration resistance in prostate cancer via the matrix metalloproteinase-13/interleukin-17 signaling pathway

Li Haiying，Fan Xiujie，Fang Xiuxiu，Wang Yunshan
（*Central Hospital Affiliated to Shandong First Medical University*）

【**Abstract**】***Objective***：This study aimed to elucidate the role and molecular mechanism of lysine specific demethylase 1（LSD1）in castration-resistant prostate cancer（PCa）. ***Methods***：Bioinformatics analysis was conducted using The Cancer Genome Atlas（TCGA）database to explore the differential expression and prognostic significance of LSD1 in PCa. An androgen-independent（AI）cell line was established by subjecting the androgen-dependent LNCap cell line of PCa to androgen deprivation. The effects of LSD1 knockdown on cell characteristics were observed，and the androgen-independent PC-3 cells were treated with the LSD1 inhibitor. A PCa orthotopic tumor model was constructed to investigate the impact of LSD1 inhibition on the sensitivity of PCa to castration therapy. Finally，transcriptome sequencing，real-time fluorescence quantitative PCR（qPCR），Western blot，and chromatin immunoprecipitation（ChIP）assays were performed to explore the underlying mechanisms. ***Results***：LSD1 was significantly upregulated in TCGA-PCa and castration-resistant PCa. Patients with high LSD1 expression had shorter survival times. The expression of LSD1 was higher in LNCap-AI cells compared to LNCap cells. LSD1 knockdown inhibited the malignant behavior of cells and increased apoptosis. The LSD1 inhibitor suppressed the malignant behavior of PC-3 cells. Inhibition of LSD1 enhanced the sensitivity of PCa to castration therapy. Mechanistically，LSD1 knockdown decreased the expression of Matrix Metalloproteinase 13（MMP13）and inhibited the interleukin-17（IL-17）signaling pathway. LSD1 regulated the expression of MMP13 by modulating the methylation level of the H3K9 region in the MMP13 gene promoter. ***Conclusion***：LSD1 controls the expres-

作者介绍：李海英，Email：haiyingli26@126.com，研究方向：前列腺癌耐药复发。
通信作者：汪运山，Email：yunshanwang26@126.com。
基金项目：山东省自然科学基金资助项目（ZR20220H311）；济南市临床医学科技创新计划（202134056）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250618.1647.007
2025-06-19

sion of MMP13 by regulating the methylation level of the H3K9 region in the MMP13 gene promoter, thereby influencing the IL17 signaling pathway and playing a crucial role in the progression of castration resistance in prostate cancer.

【Key words】lysine-specific demethylase 1; prostate cancer; interleukin-17 pathway; matrix metalloproteinase 13

前列腺癌（prostate adenocarcinoma，PCa）作为男性恶性肿瘤中发病率较高的疾病之一，对全球男性健康构成了严重威胁[1-2]。雄激素受体（androgen receptor，AR）信号的异常激活在PCa进展中起着至关重要的作用，雄激素剥夺疗法（androgen deprivation therapy，ADT）是局部晚期或转移性PCa的主要治疗方法，但大多数患者会逐渐从雄激素依赖性前列腺癌（androgen-dependent prostate cancer，ADPC）发展为去势抵抗性前列腺癌（castration-resistant prostate cancer，CRPC）[3-4]。尽管前列腺癌的早期诊断和治疗手段不断进步，但CRPC患者的预后仍然不容乐观[5]。因此，深入研究CRPC的分子机制，探索新的治疗靶点，对于改善患者生存质量和延长生存期具有重要意义[6]。CRPC的发生和发展是一个复杂的多阶段过程，涉及遗传因素、环境因素和生活方式等多种因素的相互作用[7-8]。在分子层面，基因突变、表观遗传修饰、蛋白质异常表达等均在CRPC的进展中扮演着重要角色[9-11]。特别是表观遗传学的改变，如DNA甲基化、组蛋白修饰以及非编码RNA的表达失调，已被证实与CRPC的发病机制密切相关[12-14]。赖氨酸特异性脱甲基酶1（lysine-specific demethylase 1，LSD1）是一种关键的表观遗传调控酶，其功能在于通过去除组蛋白和其他蛋白质上的甲基化修饰来调节基因表达[15]。LSD1的这种活性对于维持正常的细胞功能至关重要，但其异常表达或功能失调也与多种疾病的发生发展密切相关，尤其是在肿瘤生物学中[16]。近年来的研究发现，LSD1不仅是一个单独作用的酶，而且是一个多功能的转录调控协调分子[15]。例如，LSD1能够与核受体、雌激素受体等转录因子相互作用，通过去除抑制性的组蛋白标记组蛋白H3第9位赖氨酸二甲基化（histone H3 lysine 9 dimethylation，H3K9me2）来促进转录活性[17-18]。此外，LSD1还参与调控与肿瘤相关的转录因子，如肿瘤蛋白53，影响其转录抑制功能[19]。在神经系统中，LSD1与抑制元件1沉默转录因子（rE1-silencing transcription factor，REST）/神经元限制性沉默因子（neuron-restrictive silencer factor，NRSF）转录抑制复合体相互作用，调控特定神经基因的表达，进一步凸显了其在细胞命运决定中的作用[20]。在肿瘤发展过程中，E2启动子结合转录因子（E2F transcription Factor Family，E2F）和髓细胞增生症病毒癌基因同源物（myelocytomatosis viral oncogene homolog，MYC）信号通路作为细胞周期和增殖的关键调控因子，其异常激活与肿瘤细胞的快速增殖、逃避免疫监视以及促进血管生成、侵袭和转移等恶性生物学行为密切相关[21-23]。LSD1通过其去甲基化活性可能直接影响E2F和MYC通路中关键蛋白的表达或活性，或者通过与其他转录因子的相互作用间接调控这些通路，从而在肿瘤细胞的增殖和存活中发挥着重要作用。因此，LSD1的作用机制可能为CRPC的治疗提供新的靶点。

本研究旨在深入探讨LSD1在去势抵抗性前列腺癌中的分子机制和治疗潜力，通过生物信息学分析、细胞实验和分子生物学技术，评估LSD1在前列腺癌发展中的作用，并探索其作为治疗靶点的可能性，为前列腺癌的诊断、治疗和预后评估提供新的视角和策略。

1 材料与方法

1.1 材料

前列腺癌淋巴结转移细胞系（lymph node carcinoma of the prostate cells，LNCap）购自武汉普诺赛生命科技有限公司（产品编号：CL-0143，中国武汉）。LSD1抗体（货号：A1156）购自ABclonal公司（美国）；GAPDH抗体（货号60004-1-Ig）购自Proteintech公司（中国武汉）；Annexin V-PE/7-AAD凋亡检测试剂盒（货号：MA0429）购自大连美仑生物技术有限公司（中国大连）；Transwell侵袭实验试剂盒（货号：3422）购自美国康宁公司（马萨诸塞州）；结晶紫染色试剂（货号：CB0331）购自上海生工生物工程股份有限公司（中国上海）。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 将LNCap细胞在孵育有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基中培养。细胞培养环境设定为37 ℃和5%CO_2。将LNCap细胞在含有10%活性炭处理去除了雄激素的胎牛血清中培养构建LN-

Cap雄激素非依赖细胞系。

小干扰载体的构建：LSD1基因的siRNA以及shRNA序列购自上海吉玛制药技术有限公司。根据制造商的说明，用siRNA、shRNA或阴性对照转染LNCap细胞24 h，并进一步使用实时荧光定量聚合酶链式反应（real-time fluorescence quantitative PCR，qPCR）检测基因敲低效率。同时，用蛋白质印迹技术（Western blot，WB）检测LSD1蛋白表达水平。

1.2.2 采用四甲基偶氮唑盐（3-4，5-dimethylthiazol-2-yl-2，5-diphenyltetrazolium bromide，MTT）实验 根据标准试剂盒操作手册进行MTT测定。首先，将细胞用胰蛋白酶消化并计数，然后调节至均匀浓度（约10^5个/孔），然后进行孵育。实验时，向每个孔中加入10 μL MTT溶液，以获得每个孔中MTT的最终浓度为0.5 mg/mL。随后在培养箱中孵育4 h后，除去上清液并加入甲酰胺溶液。最后，使用酶免疫测定检测器在570 nm处测量不同时间点的吸光度。

1.2.3 qPCR检测基因表达水平 使用TRIzon试剂进行RNA提取细胞。然后，使用Evo M-MLV RT Master Mix进行逆转录，使用CFX Connect实时荧光定量PCR系统（Bio-Rad Laboratories，Inc.，美国）进行实时荧光定量PCR分析。最后，使用ΔΔCT方法计算基因的相对表达值。GAPDH作为内参。所有引物序列如下：LSD1：F：CAGGCATTGGAAGTTGTCATTCA，R：ATCTCTGGGTGGCTTTACTTCAG；GAPDH：F：AGAAGGCTGGGGCTCATTTG，R：AGGGGCCATCCACAGTCTTC。

1.2.4 Western blot检测蛋白质表达水平 在实验中，LNCap细胞培养后去上清并用磷酸盐缓冲盐水（phosphate-buffered saline，PBS）清洗，随后加入放射免疫沉淀分析缓冲液（radioimmunoprecipitation assay buffer，RIPA）裂解细胞，冰上裂解30 min，4 ℃以12 000 r/min离心15 min，上清转移至新EP管。使用BCA法测定蛋白浓度，加入buffer使蛋白变性5 min，并于-80 ℃保存。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）电泳15 μL蛋白样品，转至PDVF膜后室温封闭2 h。使用一抗（LSD1和GAPDH）4 ℃孵育过夜，二抗孵育后，用Image J软件进行蛋白定量分析，评估组间差异。

1.2.5 细胞流式细胞术检测细胞凋亡水平 用胰蛋白酶消化LNCap细胞并离心收集后，采用AnnexinV-FITC/PI双染法进行细胞凋亡检测。用不含乙二胺四乙酸（ethylenediaminetetraacetic acid，EDTA）的胰蛋白酶对贴壁细胞进行消化；取5×10^4细胞，加入Binding Buffer让细胞重新悬浮并将其转移到流式管中；将5 μL的AnnexinV-FITC加入到流式管中，混匀后于室温和避光的条件下进行孵化15 min，上机前的5 min加入5μL PI进行染色。最后，使用流式细胞术（Agilent，中国，杭州）检测细胞凋亡水平。

1.2.6 Transwell侵袭试验 将配置好的Matrigel胶加入Transwell小室的上室底部，待基质胶凝固后将重悬好的细胞消化接种到上室，并添加无血清的达尔伯克改良伊格尔培养基（dulbecco's modified eagle medium，DMEM）培养液，下室加入含有10%胎牛血清的培养液。将小室放置于恒温培养箱中培养14~16 h。将下室侵入的细胞用甲醛进行固定，0.1%结晶紫染色20 min。使用显微镜下取3个视野拍照，观察计数，取平均值，每组实验重复3次。

1.2.7 RNA测序（RNA sequencing，RNA-seq）测序 提取LSD1敲低组和对照组前列腺癌PC-3细胞系（Prostate Cancer-3 cell line，PC-3）的RNA后，使用纳米光度计检查RNA纯度，并使用安捷伦2100检查样品完整性。通过检查后，生成标准RNA文库，并通过Illumina高通量测序平台进行测序。

采用FastQC软件（版本0.11.8）检查下载的原始数据，使用Fastp工具（版本0.19.5）完成数据处理，通过去除低质量序列和适配器污染等获得高质量序列。然后使用STAR比对软件（版本2.7.0b）工具将高质量序列与参考基因组进行比对，然后使用HTseq-count（版本0.13.5）对基因进行计数。

1.2.8 差异基因分析 基于每千碱基转录本每百万映射片段数（fragments per kilobase million，FPKM）值对mRNA表达水平进行定量分析。差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs）的筛选通过DESeq2软件包（version 1.42.1）完成，以原始基因计数矩阵作为输入数据。DEGs的判定标准为校正后P值（padj）<0.05且绝对log2变化倍数（|log2FoldChange|）>1。通过ggplot2软件包（version 3.4.4）可视化分析结果，包括火山图（展示差异表达基因整体分布）和热图（呈现基因表达模式聚类）。

1.2.9 基因功能分析 为评估LSD1敲低对细胞功能的影响，本研究采用ClusterProfiler软件包（v4.10.1）及Metascape在线分析平台（https://metascape.org）对差异表达基因进行基因本体论（gene ontology，GO），进行GO功能注释与京都基因与基因组百科全书（kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析，显著性阈值设定为错误发现率（false discovery rate，FDR）校正后P值<0.05。

1.2.10 基因集富集分析 前列腺癌转录组数据（the cancer genome atlas-Prostate cancer，TCGA-PCa）从Xena基因组学分析平台（https://xena.ucsc.edu）获取。基于基因集富集分析（gene set enrichment analysis，GSEA）方法，本研究将LSD1基因表达量作为连续型变量，计算各基因与LSD1表达的皮尔逊相关系数（pearson correlation coefficient）并依此排序。通过ClusterProfiler软件包调用分子特征数据库（Molecular Signatures Database，MSigDB）的标志性基因集（Hallmark：h.all.v7.1.symbols.gmt）及KEGG通路基因集（c2.cp.kegg.v7.1.symbols.gmt）进行富集分析，显著性阈值设定为标准化富集得分（normalized enrichment Score，NES）>1且经错误发现率（false discovery rate，FDR）校正后P值<0.05。

使用GSEA软件对测序数据进行了GSEA富集分析。GSEA软件下载（https://software.broadinstitute.org）。分析过程中，样本分为sh-NC组以及sh-LSD1组。在经过差异分析

后，软件自动根据2组间差异基因的列表及log2倍数变化（log2 fold change，log2FC）值的大小基于log2FC排序的基因列表，参照分子特征数据库（molecular signatures database，MSigDB）的标志性基因集（Hallmark：h.all.v7.1.symbols.gmt）进行富集分析。通路气泡图由ggplot2包（v3.4.2）完成。

1.2.11 差异、预后及其他分析 基因表达谱交互分析平台（gene expression profiling Interactive analysis，GEPIA；http://gepia2.cancer-pku.cn）用于检测LSD1在癌与正常组织中的表达差异及预后价值，其中正常组织样本整合自TCGA-PCa（the cancer genome atlas-prostate cancer）和GTEx（genotype-tissue expression project）数据库共152例，癌症样本取自TCGA-PCa数据库492例，差异表达阈值设定为|log2 fold change（log2FC）|>1且P<0.05，生存分析采用log-rank检验并通过Kaplan-Meier曲线展示总生存期（overall survival，OS）；阿拉巴马大学癌症数据分析平台（Ualcan；http://ualcan.path.uab.edu）用于分析LSD1表达与肿瘤蛋白53（tumor protein 53，TP53）突变状态的关联（Student's t 检验，P<0.01）及TCGA泛癌数据集（pan-cancer Atlas）中LSD1的跨癌种表达模式，泛癌数据来源于Ualcan默认集成的TCGA标准化转录组数据。

1.2.12 PCa原位瘤构建 本研究的动物实验已获得山东第一医科大学附属中心医院实验动物福利伦理审查委员会的批准（批准号：JNCH2021-120），实验过程中严格遵守了“3R”原则，尽量减少动物的使用数量，并采取了必要的措施以减轻动物的痛苦。所有手术操作均在麻醉状态下进行，实验过程中的动物福利和伦理标准得到了伦理委员会的监督和检查。4~6周龄的雄性裸鼠通过腹腔注射10%氯醛水合物进行麻醉。在Leica M651体视显微镜（Leica Microsystems GmbH，Germany）下进行前列腺内PC-3细胞的注射。具体为，将20 μL PC-3细胞悬液（2×10^7个/mL，PBS基质）注射到小鼠的前列腺叶中。将小鼠模型分为5组：对照组、去势治疗组、LSD1敲低组、GSK2879552治疗组和GSK2879552治疗联合去势治疗组。GSK2879552处理是指对小鼠进行腹腔注射给药。

1.2.13 染色质免疫沉淀（chromatin immunoprecipitation，ChIP） ChIP实验使用Magna ChIP™ A/G试剂盒（货号：17-10085，Sigma-Aldrich）并严格遵循说明书流程：细胞经1%甲醛（37 ℃）交联10 min后，加入甘氨酸缓冲液（终浓度0.125 mol/L）室温终止反应5 min，PBS洗涤3次后重悬于含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液；染色质通过超声破碎仪（750 W，25%功率，10 s超声/10 s间歇，冰上孵育2 min，共7次循环）剪切至200~500 bp片段，取上清加入H3K9me1特异性抗体进行免疫沉淀，最终通过qPCR定量靶向DNA片段。

1.3 统计学方法

本研究采用GraphPad Prism 9.0（GraphPad Software，San Diego，CA，USA）进行统计学分析。所有实验均独立重复3次，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。通过Shapiro-Wilk检验验证数据正态性后，采用独立样本t检验比较LSD1在癌组织与癌旁组织中的表达差异（方差齐性经Levene检验确认）。所有统计检验均为双侧检验，检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 LSD1的表达与PCa预后的关系

为了探究LSD1和PCa进展的关系，首先在公共数据库中分析了前列腺癌中LSD1的表达。如图1A所示，与正常组织相比LSD1在大多数癌症里上调表达。图1B和1C显示了LSD1在TCGA-PCa里明显上调。同时，TP53突变组的LSD1表达明显高于非突变组（图1D）。此外，无病生存期（disease-free survival，DFS）结果显示高表达的LSD1患者的生存期短于低表达患者（图1E）。且LSD1在CRPCa中明显上调（图1F）。这些结果提示LSD1可能参与了前列腺癌的去势抵抗性进展。

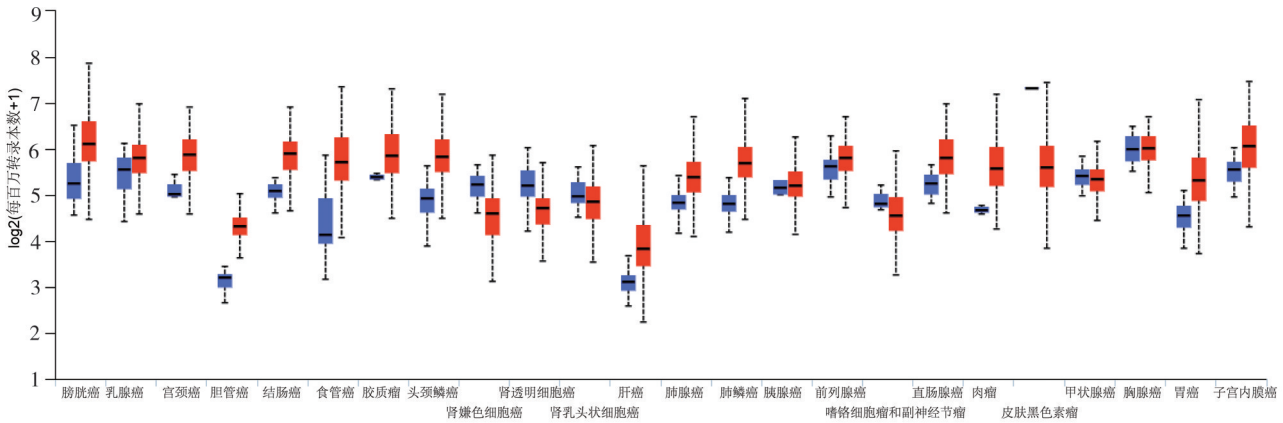
2.2 LSD1的敲低对LNCap-AI细胞去势抵抗性的影响

为了探究LSD1是否参与了PCa的去势抵抗性进展，首先通过对PCa雄激素依赖细胞系LNCap进行雄激素剥夺处理构建雄激素非依赖性（androgen-independent，AI）细胞系。为了评估LNCap-AI细胞系是否成功构建，检测了PSA的表达。结果显示LNCap-AI细胞前列腺特异性抗原（prostate-specific antigen，PSA）的表达明显高于LNCap-AD组（t=4.785，P=0.008），提示LNCap-AI细胞系成功构建。之后检测了LSD1在这2组细胞系中的表达。如图2B所示，LSD1在LNCap-AI细胞系中mRNA和蛋白的表达均明显升高（t=-11.505，P<0.001；t=-25.873，P<0.001）。

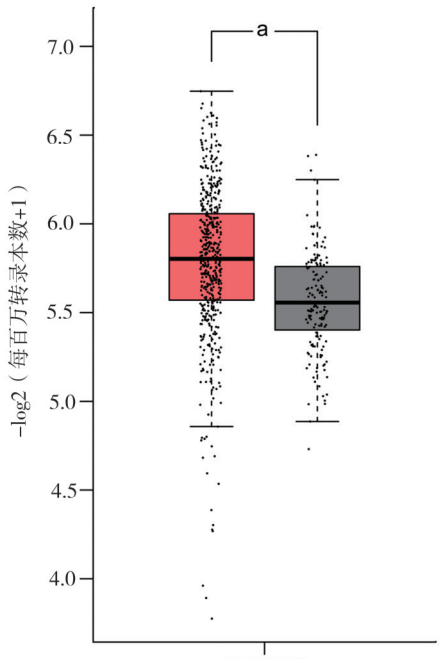
接下来，利用RNA干扰技术针对去势抵抗性细胞系LNCap-AI中的LSD1进行了基因敲低。通过qPCR技术检测LSD1的mRNA水平，结果显示siRNA1和siRNA2均能明显降低LSD1的表达，尤其是siRNA2，其敲除效率超过50%（图3A）。基于此结果，利用Western blot实验验证了LSD1敲低组LSD1的表达，发现相对于NC组，LSD1敲低组中LSD1的表达明显降低（t=8.392，P<0.001），见图3B。接下来本课题组考察了LSD1敲低对LNCap-AI细胞系恶性生物学行为的影响。MTT和Transwell侵袭实验结果表明，LSD1敲低后，LNCap-AI细胞的增殖活性和侵袭能力均明显降低（图3C和E）。流式细胞术结果表明，与对照siNC相比，LSD1敲低组细胞凋亡率明显增加（t=32.533，P<0.001，图3D）。上述结果提示，LSD1的敲低能够明显逆转LNCap-AI细胞的去势抵抗性。

2.3 LSD1抑制剂GSK2879552对PC-3细胞系恶性生物学行为的影响

LSD1抑制剂GSK2879552对PC-3恶性生物学行为的影响。首先在PC-3细胞系中过表达LSD1，qPCR和WB证明了LSD1的成功过表达（图4A）。MTT和Transwell侵袭实验考察了GSK2879552对PC-3细胞系增殖和侵袭能力的影响。结果表明，PC-3细胞用GSK2879552处理后，增殖活性

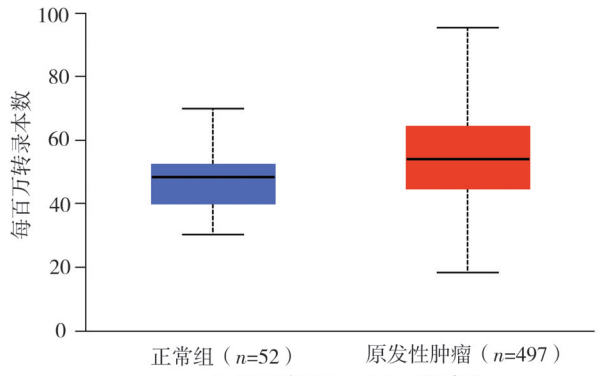


A. LSD1泛癌的表达

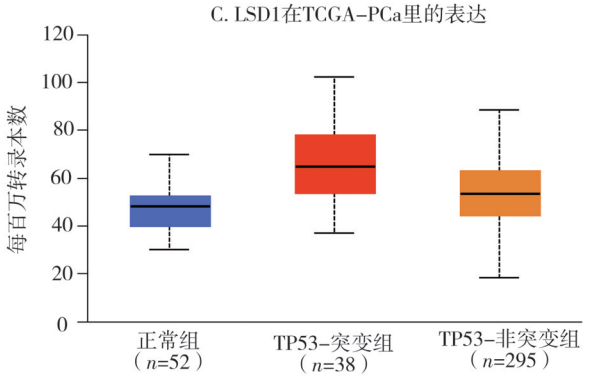


（肿瘤样本n=492; 正常样本n=152）

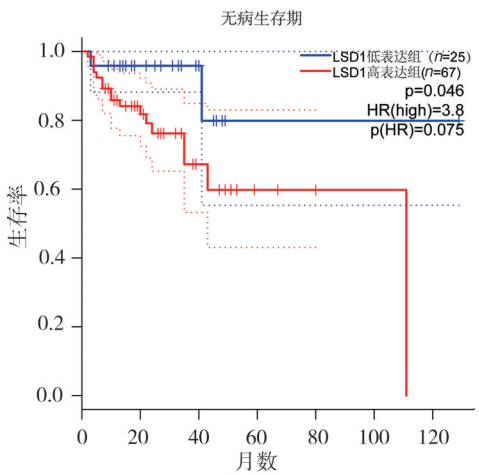
B .LSD1在TCGA-PCa里的表达



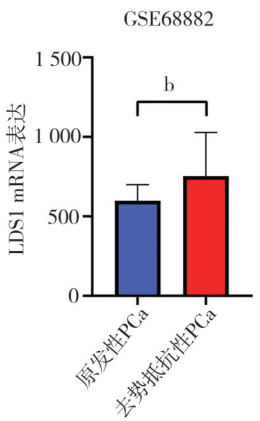
C. LSD1在TCGA-PCa里的表达



D. LSD1在不同TP53突变组里的差异表达



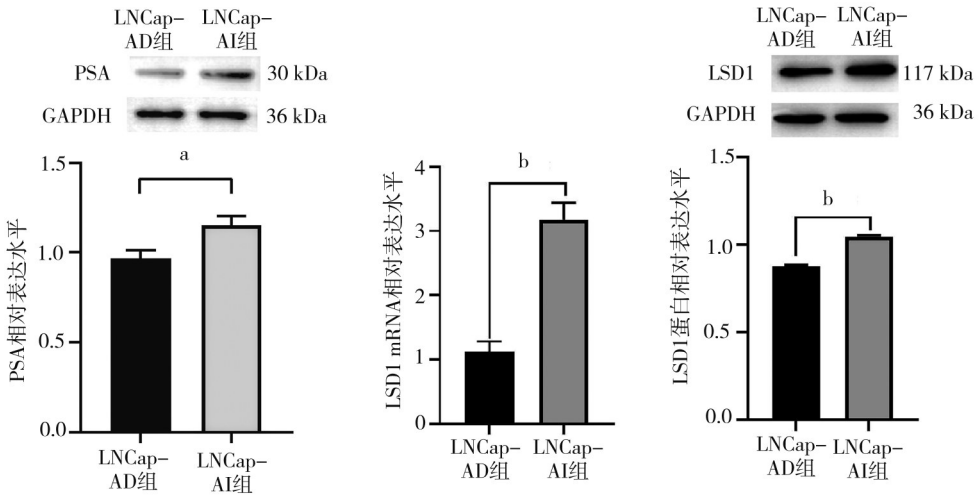
E. LSD1的预后结果



F. GSE68882数据集中LSD1在原发性PCa和去势抵抗性PCa中的表达

注：a，与正常组相比，P<0.05；b，与原发性PCa组相比，P<0.05

图1　LSD1的表达与PCa预后的关系

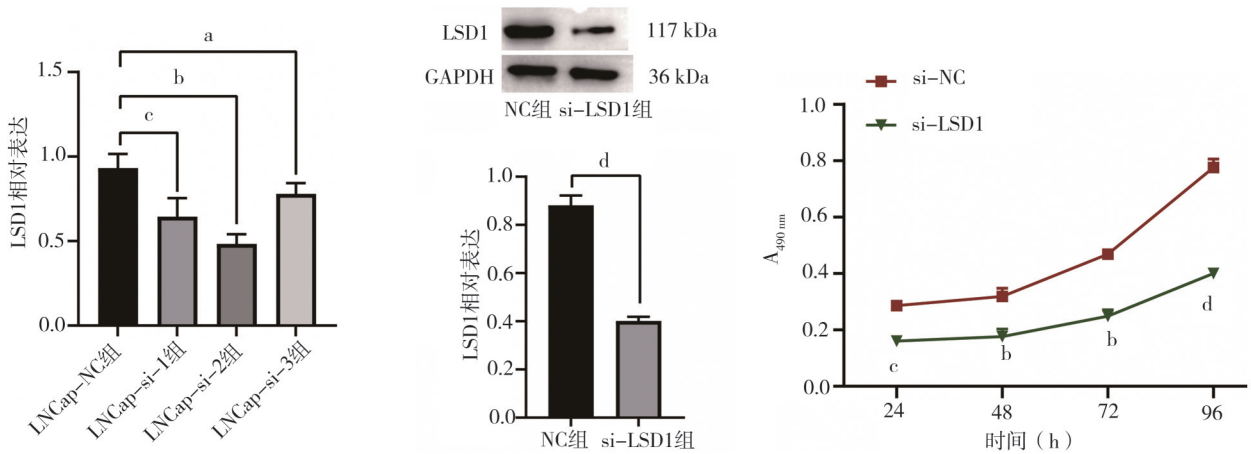


A. LNCap-AD和LNCap-AI 2组细胞系中PSA的表达

B. LNCap-AD和LNCap-AI 2组细胞系中LSD1的表达

注：a，与LNCap-AD组比较，$P<0.01$；b，与LNCap-AD组比较，$P<0.001$

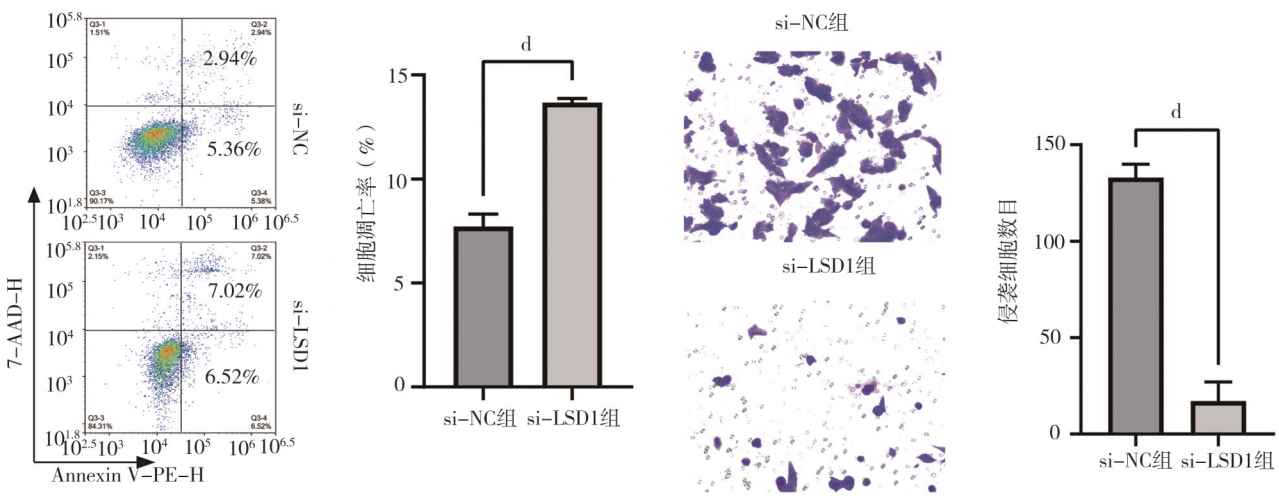
图2 LSD1在去势抵抗性细胞系LNCap-AI中的表达



A. 通过qPCR实验检测LNCap-AI细胞中LSD1的敲低效率

B. 通过WB实验检测LNCap-AI细胞中LSD1的敲低效率

C. MTT测定法检测NC和si-LSD1两组LNCap-AI的细胞活力水平



D. 流式细胞术检测NC和si-LSD1 2组LNCap-AI细胞凋亡水平

E. Transwell侵袭实验检测NC和si-LSD1 2组LNCap-AI细胞的侵袭能力

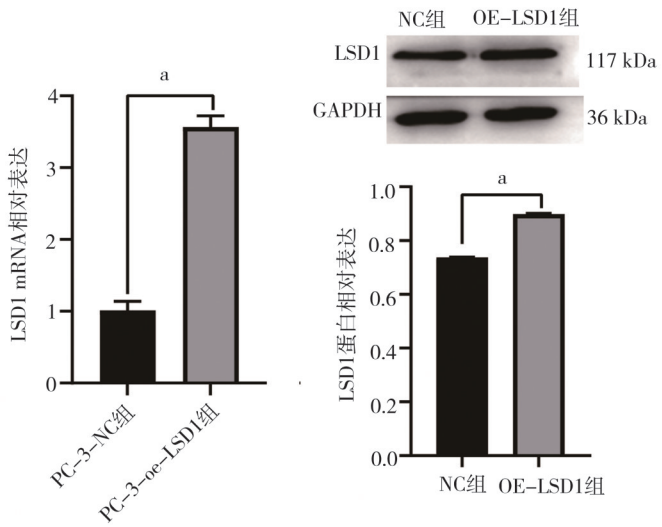
注：a，与NC组相比，$P>0.05$；b，与NC组相比，$P<0.05$；c，与NC组相比，$P<0.01$；d，与NC组相比，$P<0.001$

图3 LSD1的敲低对LNCap-AI细胞恶性行为的影响

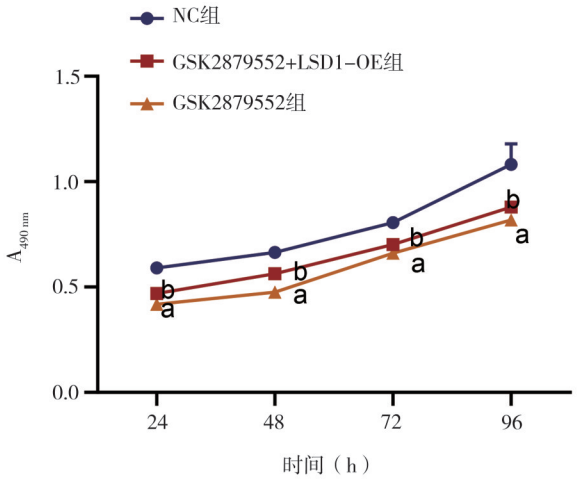
和侵袭能力均明显下降，而继续过表达LSD1后，其增殖活性和侵袭能力部分恢复（图4B~D）。流式细胞术结果表明，PC-3细胞用GSK2879552处理后，凋亡明显提升，而继续过表达LSD1后，凋亡部分恢复（图4E、F）。因此，GSK2879552通过LSD1从而抑制去势抵抗细胞系PC-3的恶性行为。

2.4　体内实验验证LSD1敲低对PCa去势抵抗性的影响

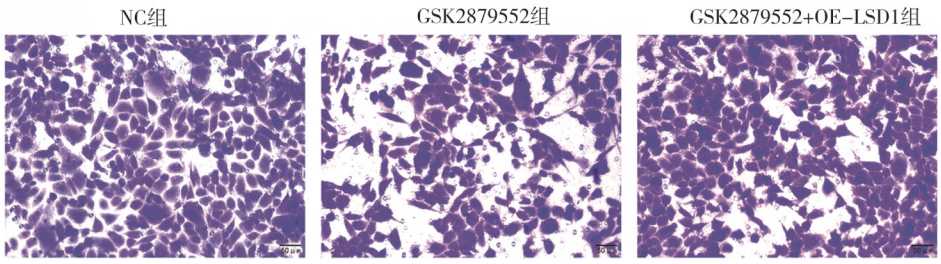
为了体内验证LSD1对PCa去势抵抗性的影响，利用PC-3构建了PCa原位瘤模型。如图5A所示，和NC组对比，去势治疗对肿瘤大小没有明显影响。而尾静脉注射腺病毒敲低小鼠体内LSD1或者腹腔注射LSD1抑制剂GSK2879552后肿瘤体积均明显变小，此外，GSK2879552注射同时去势处理，肿瘤体积进一步减小（图5A）。免疫组化结果显示，LSD1敲低之后，AR和PSA的表达均降低（图5B）。另外HE结果显示（图5C），和NC组对比，去势治疗对肿瘤大小没有明显影响，而GSK2879552治疗明显改善了肿瘤细胞的浸润。GSK2879552联合去势治疗后，肿瘤细胞浸润进一步减少（图5C）。结果提示LSD1敲低能够使PCa的去势抵抗性向敏感性转变。



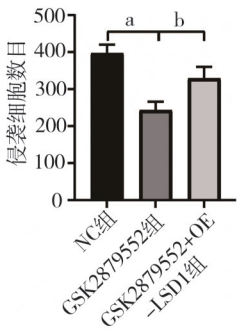
A. qPCR和WB实验验证PC-3细胞中LSD1的敲低效率



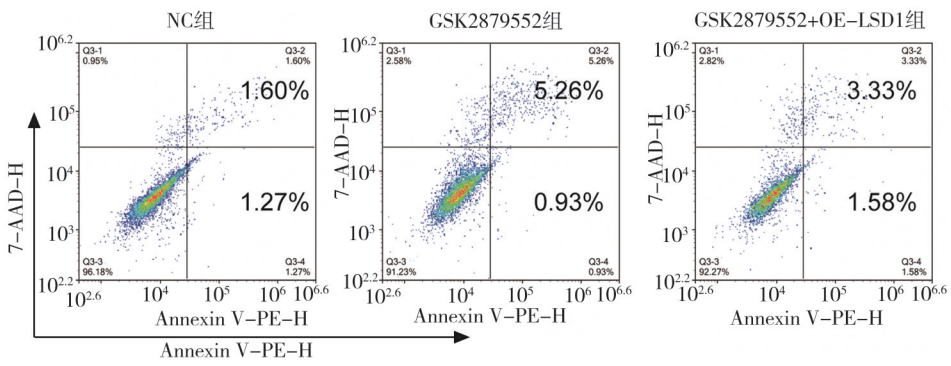
B. MTT实验考察GSK2879552对PC-3细胞增殖活性的影响



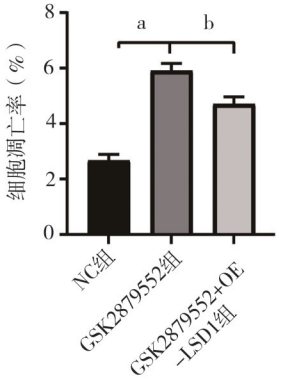
C. Transwell侵袭实验考察GSK2879552对PC-3细胞侵袭能力的影响



D. 侵袭结果的量化柱形图



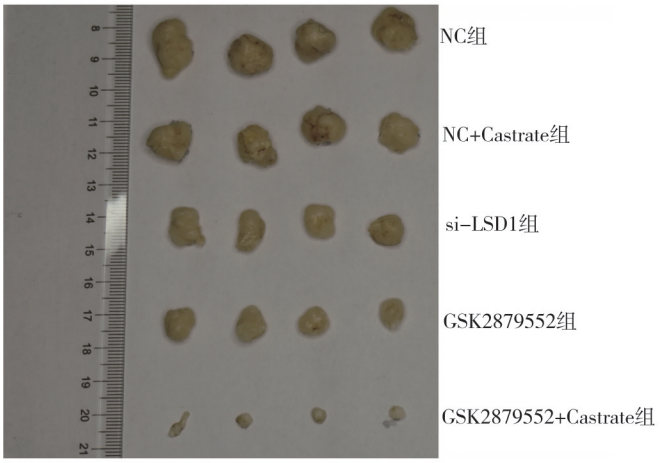
E. 流式细胞术考察GSK2879552对PC-3细胞凋亡的影响



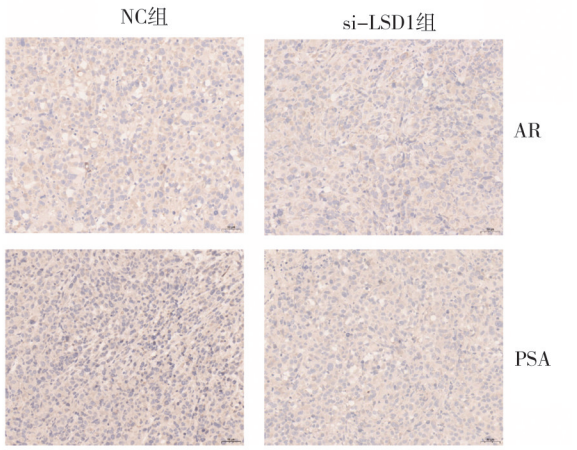
F. 凋亡的量化柱形图

注：a，与NC组相比，$P<0.001$；b，与GSK2879552处理组相比，$P<0.05$

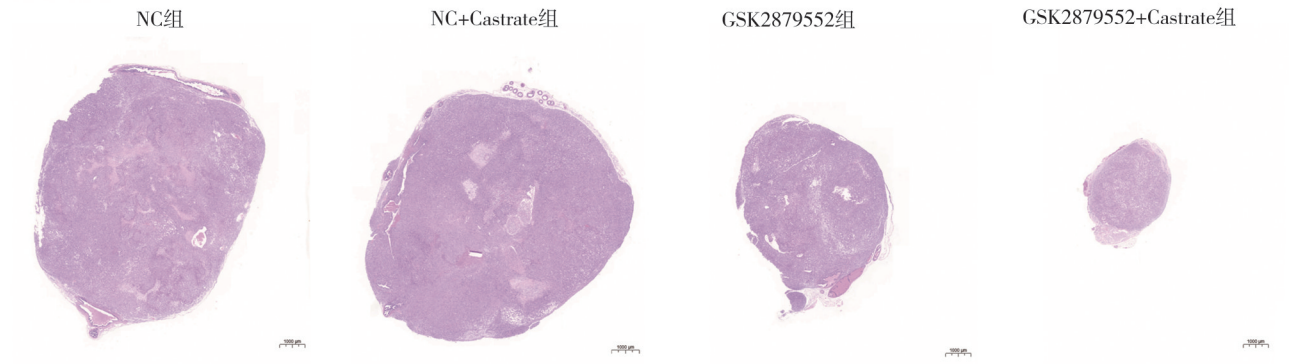
图4　LSD1抑制剂GSK2879552对去势抵抗性PCa细胞PC-3的恶性生物学行为的影响



A. 各组小鼠原位PCa肿瘤大体照



B. IHC检测肿瘤中AR和PSA的表达（标尺=50 μm）



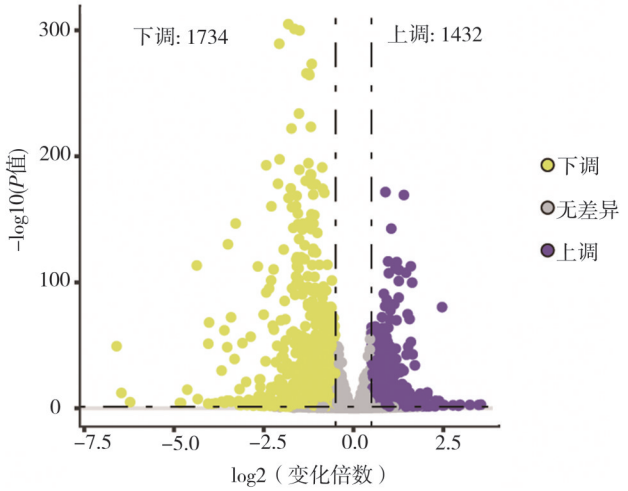
C. 各组小鼠PCa原位瘤的HE染色（标尺=1 000 μm）

图5　体内实验验证LSD1对PCa去势抵抗性进展的影响

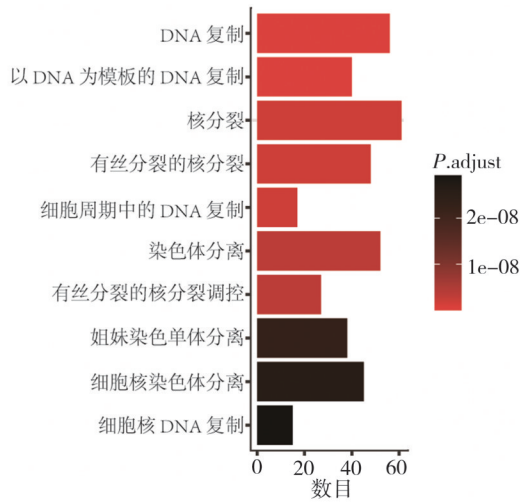
2.5　LSD1影响PCa去势抵抗性机制的探究

接下来为了揭示LSD1影响PCa去势抵抗性的机制，敲低PC-3细胞中LSD1并进行了转录组测序。首先利用火山图对si-NC和si-LSD1 2组的DEGs进行了展示，如图6A所示，转录组测序共鉴定了1 734个下调基因和1 432个上调基因（|Log2foldchange|>0.5，P<0.05）。下面对DEGs进行了GO和KEGG富集分析。如图6B和6C所示，上调基因GO功能主要富集在DNA复制（DNA replication）、核分裂（nuclear division）和染色体分离（chromosome segregation）等功能上，KEGG主要富集在细胞周期（cell cycle）、肌细胞中的细胞骨架（cytoskeleton in muscle cells）和黏着斑（Focal adhesion）等通路。而下调基因的GO功能主要富集在对拓扑结构不正确的蛋白质的反应（response to topologically incorrect protein）、对未折叠蛋白的反应（response to unfolded protein）和内质网应激反应（response to endoplasmic reticulum stress）等（图6D）。KEGG分析发现下调基因主要富集于内质网中的蛋白质加工（protein processing in endoplasmic reticulum）、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染（kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection）、IL-17信号通路和TNF信号通路上（图6E）。研究表明IL-17信号通路与PCa的去势抵抗性发展密切相关。结合转录组测序结果，推测敲低LSD1通过抑制IL-17信号通路调控PCa的去势抵抗性进展。下面利用qPCR对IL-17信号通路中的9个主要基因包括HSP90B1、CXCL8、CEBPB、FOS、FOSB、MMP13、CXCL3、IL6、CXCL2进行了验证。发现这9个基因均在LSD1敲低后明显下调，且MMP13下调倍数最大（图6F）。结果提示LSD1敲低可能通过下调MMP13的表达抑制IL-17信号通路。

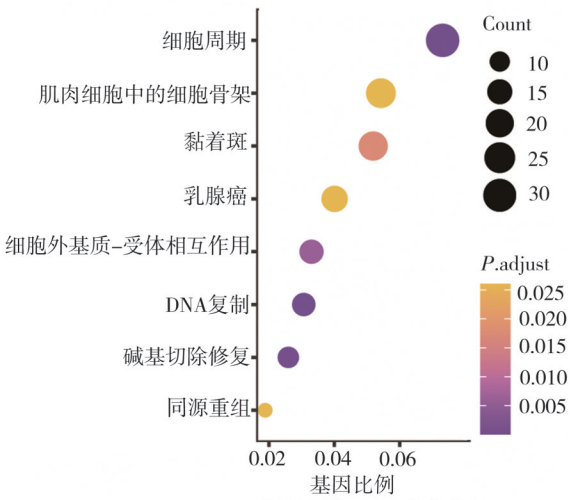
为了验证该假设，利用WB检测了MMP13的表达。图7A显示，LSD1敲低后，MMP13的表达明显降低（t=52.320，P<0.01）。由于LSD1是去甲基化酶，可能通过调控H3K9甲基化调控MMP13的表达，所以检测了H3K9的甲基化水平。图7B显示，LSD1敲低后，H3K9me1和H3K9me2水平均升高（t=-31.692，P<0.001；t=-22.503，P<0.001）。为了验证LSD1的敲低调控了H3K9甲基化与MMP13启动子的结合，利用H3K9me1抗体进行了ChIP实验，之后进行了MMP13的qPCR。结果表明，LSD1敲低后，与H3K9me1抗体结合的MMP13明显增多（图7C，t=5.772，P=0.005）。结果提示LSD1可能通过调控MMP13启动子区域H3K9的甲基化水平调控了MMP13的表达。



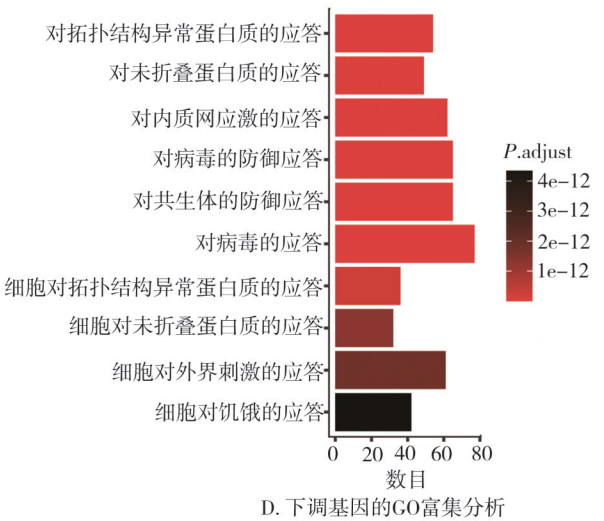
A. 火山图展示NC和si-LSD1 2组PC3细胞的差异表达基因。黄色代表下调基因，紫色代表上调基因，灰色代表没有明显性变化基因，|Log2foldchange|>0.5，且校正后 $P<0.05$



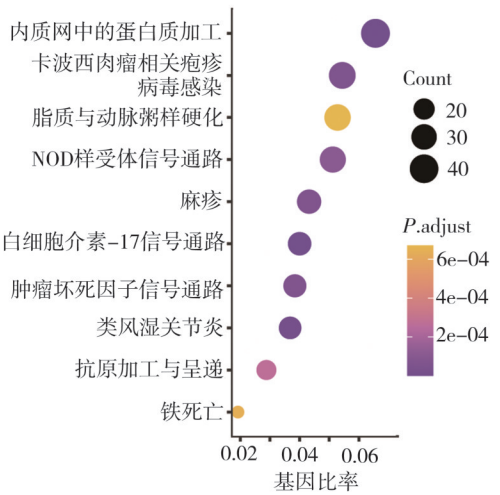
B. 上调基因的GO分析



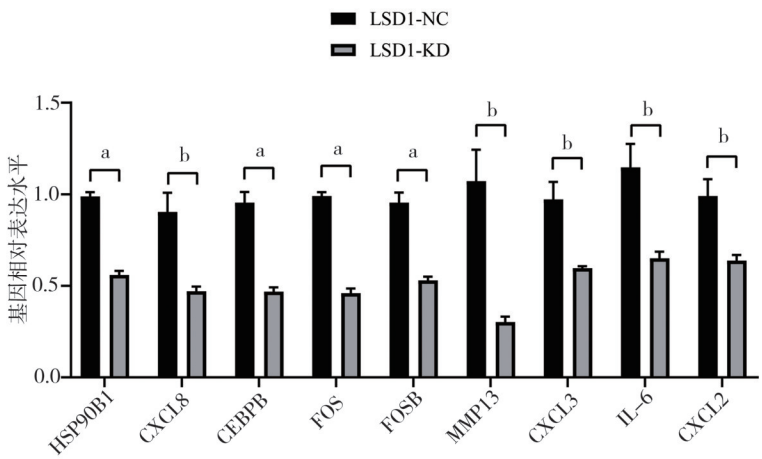
C. 上调基因的KEGG富集分析



D. 下调基因的GO富集分析



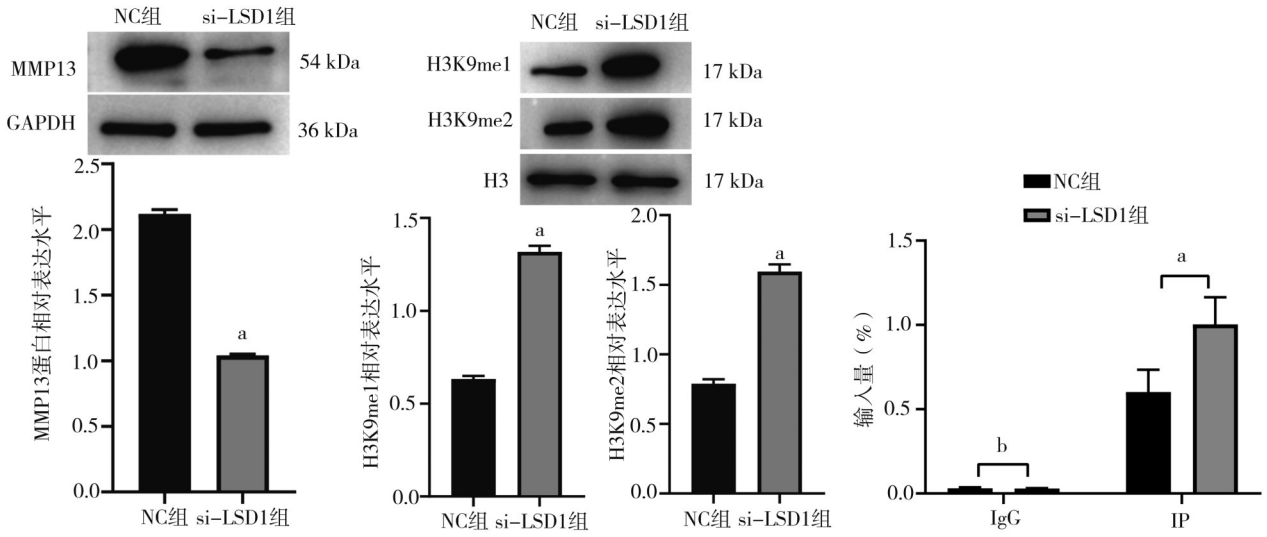
E. 下调基因的KEGG富集分析



F. qPCR分析IL-17信号通路中的9个主要基因的表达水平

注：a，与NC组相比，$P<0.01$；b，与NC组相比，$P<0.001$

图6　对LSD1敲低后的PC-3细胞进行转录组分析



A. PC-3细胞中LSD1的敲低降低了MMP13的表达

B. PC-3细胞中LSD1的敲低提高了H3K9me1和H3K9me2的水平

C. NC和si-LSD1两组PC-3细胞中利用H3K9me1抗体进行ChIP实验，并利用qPCR检测MMP13的水平

注：a，与NC组相比，$P<0.01$；b，与NC组相比，$P<0.05$

图7 LSD1对MMP13的调控

3 讨 论

在本研究中，揭示了LSD1在PCa去势抵抗性进展中的作用：LSD1在去势抵抗性PCa患者中明显升高，且在去势抵抗性PCa细胞系LNCap-AI中明显上调；LSD1的敲低能够改善LNCap-AI细胞系的去势抵抗性表型，体内实验同样证实LSD1的抑制能够逆转PCa去势抵抗性。转录组测序和细胞实验的结果表明，LSD1是通过调节MMP13基因启动子区域H3K9的甲基化水平来控制MMP13的表达。这一调控机制进一步影响了IL-17信号通路，从而在前列腺癌中对去势抵抗性产生重要作用。研究发现LSD1，作为一种依赖黄素腺嘌呤二核苷酸的脱甲基酶，能够去除组蛋白H3K9和H3K4位点的单甲基和双甲基化修饰[24]。这种修饰变化调节了组蛋白与其他蛋白质的相互作用，进而影响基因转录的激活与抑制，对胚胎发育和肿瘤发生具有重要影响[24]。研究结果表明，LSD1的敲低能够抑制去势抵抗性LNCap-AI细胞的增殖、集落形成和侵袭，并促进细胞凋亡。这些发现与近期研究一致，这些研究发现PCa细胞中LSD1的表达被激活，进而影响IL-17信号轴以促进PCa的进展[25-26]。

由于LSD1是一种组蛋白去甲基化酶，可以通过表观遗传学调节基因转录和激活，是一种协调因子协助转录因子发挥作用。本课题组推测LSD1在PCa的进展中会影响某些转录因子的活性，从而促进或抑制下游靶蛋白的表达。Li MQ等[27]发现LSD1通过激活超增强子介导的致癌程序来驱动前列腺癌的进展，LSD1和BRD4抑制剂联合使用可以靶向抑制CRPC的生长。本研究发现LSD1的敲低能够抑制IL-17信号通路的活性。IL-17是一种主要由辅助性T淋巴细胞分泌的促炎性细胞因子，其在多种肿瘤中发挥作用。研究发现，IL-17在前列腺癌组织中的表达水平明显高于正常前列腺组织，并且与前列腺癌的恶性度呈正相关，即参与了前列腺癌的发生及恶性进展[21]。IL-17信号通路在去势抵抗性前列腺癌CRPCa中扮演着重要角色。在CRPCa的治疗中，除了传统的雄激素剥夺治疗，针对IL-17信号通路的治疗策略也正在被研究。例如，有研究观察了IL-17A对前列腺癌细胞迁移的促进作用，发现其可能通过激活IL-17A-Stat3-VEGF信号通路来发挥作用[28]。此外，组织蛋白酶K通过IL-17/CTSK/EMT轴调节肿瘤生长和转移，并介导去势抵抗性前列腺癌中的M2型巨噬细胞极化，这表明IL-17信号通路在CRPCa中的重要作用[29]。

综上所述，LSD1在PCa中的多重作用不容忽视。其敲低不仅抑制了LNCap-AI和PC-3细胞的增殖、集落形成和侵袭能力，还促进了细胞凋亡，同时体内实验显示LSD1的敲低重新提高了PCa对去

势治疗的敏感性，从而减缓了CRPCa的进展。LSD1的这种作用可能是通过调节MMP13基因启动子区域H3K9的甲基化水平来控制MMP13的表达。这一调控机制进一步影响了IL-17信号通路，从而在前列腺癌中对去势抵抗性产生重要作用。

参 考 文 献

[1] Ward RD, Purysko AS. Magnetic resonance imaging of prostate adenocarcinoma: detection and staging[J]. Top Magn Reson Imaging, 2020, 29(1): 17-30.

[2] Lee CH, Akin-Olugbade O, Kirschenbaum A. Overview of prostate anatomy, histology, and pathology[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2011, 40(3): 565-575.

[3] Bell PD, Teramoto Y, Gurung PMS, et al. Limited adenocarcinoma of the prostate on needle core biopsy[J]. Arch Pathol Lab Med, 2022, 146(4): 469-477.

[4] 曹 飞，庞 俊. 前列腺癌免疫微环境中免疫抑制性细胞分类及其作用机制[J/OL]. 中华腔镜泌尿外科杂志（电子版），2024，18(2)：121-125.
Cao F, Pang J. Classification and mechanism of immunosuppressed cells in immune microenvironment of prostate cancer[J/OL]. Chin J Endourol Electron Ed, 2024, 18(2): 121-125.

[5] Epstein JI. Is Grade Group 1 (Gleason score 3+3=6) adenocarcinoma of the prostate really cancer?[J]. Curr Opin Urol, 2022, 32(1): 91-95.

[6] Punjabi LS, Ng CK, Cheng L, et al. Ductal adenocarcinoma of the prostate with oncocytic morphology[J]. Pathology, 2024, 56(3): 415-419.

[7] Mannatrizio D, Eusebi L, Yehia M, et al. Granulomatous prostatitis: mimicking locally advanced prostate adenocarcinoma[J]. Acta Biomed, 2023, 94(5): e2023245.

[8] 郑 俊，吴杰英，谭海波，等. EGFR-MEK-TZ三联合分子的构建及其对去势抵抗性前列腺癌细胞增殖与凋亡的影响[J/OL]. 中华腔镜泌尿外科杂志（电子版），2024，18(5)：503-508.
Zheng J, Wu JY, Tan HB, et al. Construction of EGFR-MEK-TZ ternary molecule and its effect on proliferation and apoptosis of ovariectomized resistant prostate cancer cells[J/OL]. Chin J Endourol Electron Ed, 2024, 18(5): 503-508.

[9] Fioriti D, Mischitelli M, Di Monaco F, et al. Cancer stem cells in prostate adenocarcinoma: a target for new anticancer strategies[J]. J Cell Physiol, 2008, 216(3): 571-575.

[10] Alaiya AA, Al-Mohanna M, Aslam M, et al. Proteomics-based signature for human benign prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma[J]. Int J Oncol, 2011, 38(4): 1047-1057.

[11] Sindhwani P, Wilson CM. Prostatitis and serum prostate-specific antigen[J]. Curr Urol Rep, 2005, 6(4): 307-312.

[12] Gao GF, Epstein JI. High-grade desmoplastic foamy gland prostatic adenocarcinoma[J]. Arch Pathol Lab Med, 2023, 147(9): 1039-1049.

[13] Varma M, Delahunt B, Egevad L, et al. Intraductal carcinoma of the prostate: a critical re-appraisal[J]. Virchows Arch, 2019, 474(5): 525-534.

[14] Epstein JI, Eggleston JC. Immunohistochemical localization of prostate-specific acid phosphatase and prostate-specific antigen in stage A2 adenocarcinoma of the prostate: prognostic implications[J]. Hum Pathol, 1984, 15(9): 853-859.

[15] Fu XL, Zhang P, Yu B. Advances toward LSD1 inhibitors for cancer therapy[J]. Future Med Chem, 2017, 9(11): 1227-1242.

[16] Yang GJ, Lei PM, Wong SY, et al. Pharmacological inhibition of LSD1 for cancer treatment[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3194.

[17] Liu ZY, Xin BK, Zhang N, et al. LSD1 modulates the bone metastasis of breast cancer cells through hnRNPA2B1-mediated sorting of exosomal miRNAs[J]. Cell Death Discov, 2024, 10(1): 115.

[18] Du LN, Yang H, Ren YF, et al. Inhibition of LSD1 induces ferroptosis through the $ATF_{4-x}CT$ pathway and shows enhanced anti-tumor effects with ferroptosis inducers in NSCLC[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(11): 716.

[19] Kumaraswamy A, Duan Z, Flores D, et al. LSD1 promotes prostate cancer reprogramming by repressing TP53 signaling independently of its demethylase function[J]. JCI Insight, 2023, 8(15): e167440.

[20] Inui K, Zhao ZP, Yuan J, et al. Stepwise assembly of functional C-terminal REST/NRSF transcriptional repressor complexes as a drug target[J]. Protein Sci, 2017, 26(5): 997-1011.

[21] Oshi M, Takahashi H, Tokumaru Y, et al. The E2F pathway score as a predictive biomarker of response to neoadjuvant therapy in ER+/HER2- breast cancer[J]. Cells, 2020, 9(7): 1643.

[22] Duffy MJ, O'Grady S, Tang MH, et al. MYC as a target for cancer treatment[J]. Cancer Treat Rev, 2021, 94: 102154.

[23] Chen H, Liu HD, Qing GL. Targeting oncogenic Myc as a strategy for cancer treatment[J]. Signal Transduct Target Ther, 2018, 3: 5.

[24] Kim D, Nam HJ, Baek SH. Post-translational modifications of lysine-specific demethylase 1[J]. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2023, 1866(4): 194968.

[25] Wang ZF, Gao S, Han D, et al. LSD1 activates PI3K/AKT signaling through regulating p85 expression in prostate cancer cells[J]. Front Oncol, 2019, 9: 721.

[26] Hou GQ, Zhao Q, Zhang MY, et al. LSD1 regulates Notch and PI3K/Akt/mTOR pathways through binding the promoter regions of Notch target genes in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 5215-5225.

[27] Li MQ, Liu MY, Han WT, et al. LSD1 inhibition disrupts super-enhancer-driven oncogenic transcriptional programs in castration-resistant prostate cancer[J]. Cancer Res, 2023, 83(10): 1684-1698.

[28] Xi Y, Shen YX, Wu DL, et al. CircBCAR3 accelerates esophageal cancer tumorigenesis and metastasis via sponging miR-27a-3p[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 145.

[29] Zhong Y, Yang LT, Xiong F, et al. Long non-coding RNA AFAP1-AS1 accelerates lung cancer cells migration and invasion by interacting with SNIP1 to upregulate c-Myc[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 240.

（收稿：2024-11-24；修回：2024-12-25；录用：2025-02-28）

（责任编辑：周一青）

本文引用格式：
李海英，范秀杰，方秀秀，等. LSD1通过MMP13/IL-17途径调控前列腺癌去势抵抗性[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(12)：1662-1672.