DOI:10.16016/j.1000-5404.201906119

交感神经 β2 肾上腺素受体促进前列腺癌转移并抵抗肿瘤细胞的凋亡

张 咪,王千慧,陈津滢,尹青青,徐 晨 400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院

[**摘要**] **目的** 探讨交感神经 β2 肾上腺素受体(β2 adrenergic receptor,β2AR)对前列腺癌细胞迁移、侵袭以及凋亡的影响。**方法** 通过 UALCAN 数据库检索分析 β2AR 在人前列腺癌组织及癌旁组织中的基因表达水平及与患者年龄的相关性;通过免疫组织化学染色分析 β2AR 在 29 例前列腺癌组织中的蛋白表达水平。体外培养人前列腺癌细胞系 PC-3、LNCaP,β2AR 激动剂异丙肾上腺素(ISO,2 μmol/L,24 h 或 1、12、24 h),β2AR 抑制剂普萘洛尔(PRO,1 μmol/L,24 h)处理细胞;β2AR RNAi 慢病毒转染 PC-3、LNCaP 细胞,Western blot 及 RT-PCR 分别检测 β2AR 的蛋白及 mRNA 水平。Transwell 实验检测细胞迁移及侵袭。Western blot 检测上皮间充质转化(epithelial mesenchymal transformation,EMT)相关标记物 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)和凋亡相关蛋白 Caspase3、cleaved-Caspase3 及 PARP 的表达;流式细胞仪检测凋亡率;透射电镜观测细胞凋亡情况。**结果** UALCAN 数据库检索结果显示 β2AR 在前列腺癌患者组织中的基因表达高于正常前列腺组织($P<0.05$);β2AR 在 41~60 岁与 61~80 岁患者组间的表达差异不显著。29 例前列腺癌患者组织的免疫组化结果显示,高风险患者(Gleason 评分≥7)组织中 β2AR 蛋白水平高于低风险患者(Gleason 评分<7)($P<0.001$);细胞迁移及侵袭实验中,ISO 处理组细胞迁移和侵袭增加($P<0.01$),E-cadherin 表达下调,N-cadherin 和 Vimentin 表达上调($P<0.05$);而 PRO 处理组及下调 β2AR 的表达后,细胞迁移和侵袭减少($P<0.01$),E-cadherin 表达上调,N-cadherin 和 Vimentin 表达下调($P<0.05$)。细胞凋亡实验中,ISO 处理组细胞凋亡率降低,Caspase3、cleaved-Caspase3、PARP 的表达明显降低($P<0.05$),而 PRO 处理组及下调 β2AR 的表达细胞凋亡率明显增高,且 Caspase3、cleaved-Caspase3、PARP 的表达增高($P<0.05$)。**结论** β2AR 能够促进细胞 EMT 的形成,增加前列腺癌细胞的迁移、侵袭能力,并且通过下调凋亡相关蛋白的表达,对细胞凋亡产生抵抗作用,从而促进肿瘤转移。

[**关键词**] 前列腺癌;β2 肾上腺素受体;转移;凋亡
[**中图法分类号**] R73-37; R730.23; R737.25 [**文献标志码**] A

Sympathetic β2 adrenergic receptor promotes prostate cancer metastasis and resists tumor cell apoptosis

ZHANG Mi, WANG Qianhui, CHEN Jinying, YIN Qingqing, XU Chen Institution of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of sympathetic β2 adrenergic receptor (β2AR) on the migration, invasion and apoptosis of prostate cancer cells. **Methods** The gene expression levels of β2AR in human prostate cancer tissues and adjacent tissues were analyzed by UALCAN database retrieval. Then, the protein level of β2AR in human prostate cancer tissues from 29 cases was analyzed by immunohistochemical assay. β2AR agonist isoproterenol (ISO, 2 μmol/L, 24 h, or 1, 12 and 24 h) and β2AR inhibitor propranolol (PRO, 1 μmol/L, 24 h) were used to treat human prostate cancer cell lines PC-3 and LNCaP, respectively, and lentiviral vectors containing β2AR RNAi were transfected to the cell lines. The protein and mRNA levels of β2AR were detected by Western blotting and RT-PCR, respectively. Cell migration and invasion were detected by Transwell assay. Western blot assay was performed to detect the expression of epithelial mesenchymal transformation (EMT)-related markers, E-cadherin, N-cadherin and vimentin, and

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金(CSTC2009BA5081)
[**通信作者**] 徐 晨,E-mail:xuchen@cqmu.edu.cn

apoptosis-related proteins, Caspase3, cleaved-Caspase3 and PARP. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. Transmission electron microscopy was used to observe the apoptotic cells. **Results** The results of UALCAN database retrieval showed that the expression level of β2AR were significantly higher in prostate cancer tissues than normal prostate tissues ($P<0.05$), and the expression showed no significant difference between the patients of 41~60 and 61~80 years old. Among the 29 patients, those with high risk (Gleason score ≥7) showed higher expression of β2AR than low risk (Gleason score <7) patients ($P<0.001$). In cells migration and invasion assays, ISO treatment promoted the migration and invasion of cells ($P<0.01$), down-regulated the expression of E-cadherin, and up-regulated N-cadherin and vimentin levels ($P<0.05$), while PRO treatment and β2AR knockdown reduced the expression of β2AR, inhibited the migration and invasion ($P<0.01$), enhanced the expression of E-cadherin, and decreased the expression of N-cadherin and vimentin ($P<0.05$). ISO treatment also resulted in suppressed cell apoptosis and inhibited expression of Caspase3, cleaved-Caspase3 and PARP ($P<0.05$), while PRO treatment and β2AR knockdown showed opposite trends ($P<0.05$). **Conclusion** β2AR promotes EMT, enhances the migration and invasion ability, exerts resistance to apoptosis by down-regulating apoptosis-related proteins, and thus, promotes tumor metastasis of prostate cancer cells.

[**Key words**] prostate cancer; β2 adrenergic receptor; metastasis; apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5081). Corresponding author: XU Chen, E-mail: xuchen@cqmu.edu.cn

前列腺癌是老年男性中常见的恶性肿瘤之一。2012 年,全球前列腺癌新发病例已达 110 万例,因病死亡人数达到 30.7 万[1]。我国前列腺癌的发病率和病死率虽低于发达国家[2-3],然而近年来随着人口不断老龄化及生活方式日益西方化等诸多因素的影响,我国前列腺癌的发病率和病死率呈现不断增高的趋势[4]。前列腺癌前期病程较为隐匿,晚期患者多发生转移,一旦发生转移,患者预后较差,生存期明显缩短[5]。研究表明,自主神经系统参与了前列腺癌细胞的生长及转移的调控[6]。我们前期的研究发现,副交感神经 M1 受体参与前列腺癌的迁移、侵袭。此外,有研究报道交感神经在肿瘤的早期生长中发挥重要作用[7],然而具体的分子机制目前仍不清楚。交感神经释放神经递质作用于细胞表面的肾上腺素受体通过信号传导发挥作用[8]。肾上腺素受体分为 α 受体和 β 受体。在前列腺癌细胞系 PC-3 和 LNCaP 中,β2AR 是主要的表达亚型[6,9]。报道显示 β2AR 及其传导的信号通路可能与前列腺癌的增殖、神经内分泌分化、血管形成等有关[8,10-11]。在临床研究中发现 β2AR 抑制剂可能降低前列腺癌的因病死亡率,改善患者预后[12]。然而关于 β2AR 对前列腺癌发展及具体机制目前仍不清楚。

肿瘤转移是癌症进展的重要标志,是包含多因素多步骤的复杂过程。在肿瘤转移过程中,EMT 通过细胞表型的变化使肿瘤的粘附能力下降,迁移扩散能力增强,便于肿瘤浸润和转移[13]。此外肿瘤的转移与细胞的生存状态也密切相关。在肿瘤转移过程中,细胞的凋亡可以使异位的癌细胞死亡从而阻止肿瘤的播散转移,因此细胞凋亡在肿瘤转移中发挥重要的抑制作用[14]。本研究通过观察 β2AR 对前列腺癌细胞迁移侵袭及凋亡的影响,探讨其对前列腺癌转移的作用,以期为神经受体对前列腺癌的发展及分子靶向治疗提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本及细胞 取 2012 年 1 月至 2015 年 1 月重庆医科大学附属第一医院病理科 29 例前列腺癌组织,患者年龄 59~77 岁,平均 67 岁。根据 Gleason 评分系统标准,Gleason 评分<7 分的 9 例,Gleason 评分≥7 分的 20 例。本实验经重庆医科大学伦理委员会批准(2019 年 5 月)。人前列腺癌细胞系 PC-3 和 LNCaP 细胞于本课题组传代冻存。

1.1.2 数据下载 通过 UALCAN 数据库(http://ualcan.path.uab.edu/index.html)下载前列腺癌患者分析基因的表达量及相关的临床信息,经整理后用于进一步分析。在不同 Gleason 评分癌组织与癌旁组织表达分析中,共获取 544 例样本的基因表达量,其中 52 例癌旁组织,492 例癌组织。癌组织按 Gleason 评分,评分为 6 的 45 例,评分为 7 的 247 例,评分为 8 的 64 例,评分为 9 的 136 例。在患者年龄分析中,获取 495 例患者样本的基因表达量,其中 41~60 岁的 222 例,61~80 岁 273 例。

1.1.3 主要试剂 DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 Biological Industries 公司;SP-0023 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自中杉金桥公司;二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司;异丙肾上腺素(isoprenaline hydrochloride,ISO)、普

萘洛尔(propranolol hydrochloride, PRO)购自 MCE 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司;兔抗人 β2AR、E-cadherin(E-cad)、N-cadherin(N-cad)和 Vimentin(Vim)IgG 单克隆抗体购自 Abcam 公司,Caspase3、cleaved-Caspase 3 和 PARP 抗体购自 CST 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自 Invitrogen 公司;PrimeScript™ RT reagent kit 购自 TaKaRa 公司;RT-PCR 引物购自上海生工公司;β2AR RNAi 以及慢病毒包装由上海吉凯基因化学技术公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 人前列腺癌细胞系 PC-3 和 LNCaP 细胞使用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基于 37 ℃,5%CO_2,饱和湿度的细胞孵箱中进行培养。取生长良好的对数期细胞进行后续实验,实验分为对照组(DMSO)、ISO 处理组(2 μmol/L,处理 24 h 或 1、12、24 h)和 PRO 处理组(1 μmol/L,处理 24 h)。

1.2.2 慢病毒稳转株构建 取生长良好的 PC-3 和 LNCaP 细胞(1×10^5/孔)分别接种于 6 孔板中,分为 NC 组(转染阴性对照)和 sh-β2AR 组(转染 β2AR-RNAi),每组设置 3 个复孔。待细胞生长到 40%~50%时,按照慢病毒转染试剂盒说明步骤对各组细胞进行转染,转染 12 h 后更换新鲜的完全培养基继续培养。72 h 后进行传代培养,再用嘌呤霉素(5 μg/mL)进行稳转细胞株的筛选。

1.2.3 免疫组织化学染色 采用 SP 免疫组化试剂盒检测 β2AR 的表达情况。光学显微镜下观察拍照,使用 Image-Pro-Plus 软件进行 IOD 值的分析。使用 GraphPad Prism7 软件进行统计分析。

1.2.4 Western blot 检测 采用 RIPA 裂解法提取各细胞中的总蛋白,并用 BCA 法检测蛋白浓度。配置所需浓度的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳及转膜。于 5%脱脂牛奶中室温封闭 2 h。加入稀释的一抗,1∶1 000 的 E-cad、N-cad、Vim、Caspase3、cleaved-Caspase 3、PARP、β2AR 抗体,4 ℃孵育过夜。次日 1∶2 000 山羊抗兔二抗或 1∶5 000 山羊抗鼠二抗室温孵育 1.5 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加 ECL 发光液在 Chemi-Doc 成像系统中进行显影。Image J 软件进行灰度值分析,以 GAPDH 为内参,目的条带灰度值/内参灰度值表示结果。

1.2.5 实时荧光定量 PCR β2AR 上游引物 5′-GTCTTGAGGGCTTTGTGCTC-3′,下游引物 5′-GGCAGCTCCAGAAGATTGAC-3′,产物长度 139 bp;GAPDH 上游引物 5′-ACGGATTTGGTCGTATTGGG-3′,下游引物 5′-CGCTCCTGGAAGATGGTGAT-3′,产物长度 214 bp。用 RNA 提取试剂盒获取总 RNA,并进行浓度的测定。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。将 SYBR(5 μL)、上下游引物(各 0.3 μL)、DEPC 水(3.4 μL)和 cDNA(1 μL)混匀加样。上机检测:95 ℃ 5 min,39 个循环(95 ℃ 10 s, 58 ℃ 30 s, 72 ℃ 20 s)。结果用 Bio-Rad CFX Manager 软件进行分析,并用 Prism7 GraphPad 软件统计。

1.2.6 Transwell 细胞迁移侵袭实验 迁移实验:将对数生长期的细胞用无血清的培养基重悬后以 100 μL、3×10^4/孔接种在 Transwell 小室的上室中,下室加 600 μL 含 20%胎牛血清的培养基,置于培养箱中培养 24 h,取出小室,PBS 洗涤 2 次,用 10%的多聚甲醛固定细胞 15 min,使用结晶紫染色 15 min。用棉签轻轻擦拭掉上室内残余的细胞,PBS 洗涤 3 次,晾干。显微镜下观察并随机选取 5 个视野采图计数。侵袭实验:将预冷的 matrigel∶DMEM/F12 培养基=1∶3比例稀释后混匀制成 matrigel 稀释液,取 50 μL 稀释液滴于 Transwell 小室的膜上,37 ℃培养箱静置 30 min 待其凝固。接种以无血清培养基重悬的 5×10^4/孔的细胞悬液 100 μL 于上室,下室加入 600 μL 含 20%胎牛血清的培养基,常规培养 24 h,取出小室,PBS 洗涤 2 次,用 10%的多聚甲醛固定细胞 15 min,使用结晶紫染色 15 min。用棉签轻轻擦拭掉上室中的胶质及液体,PBS 洗涤 3 次,晾干。显微镜下观察并随机选取 5 个视野采图计数。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 收集对数生长期的各组细胞,用 PBS 洗涤 2 次重悬后将细胞转移至流式管中,4 ℃、1 000 r/min 离心 5 min,弃上清。每管加入 400 μL Binding buffer 重悬细胞后,加入 5 μL 的 Annexin V-FITC,避光室温孵育 15 min,加入 5 μL 的 DAPI 混匀后避光孵育 5 min。上流式细胞仪检测。

1.2.8 透射电镜凋亡检测 将对数生长期的各组细胞用细胞刮从培养皿中轻轻刮下来,使细胞呈条状悬浮在培养液中,置于离心管中离心,弃上清,用吸管沿管壁缓慢加入 2%的戊二醛,4 ℃固定 1.5 h 后送电镜室检测。

1.3 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 7.0 统计软件。两组间比较采用独立样本 t 检验。多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 β2AR 在前列腺癌组织中的表达增高

UALCAN 数据库检索结果显示,与癌旁组织相比,

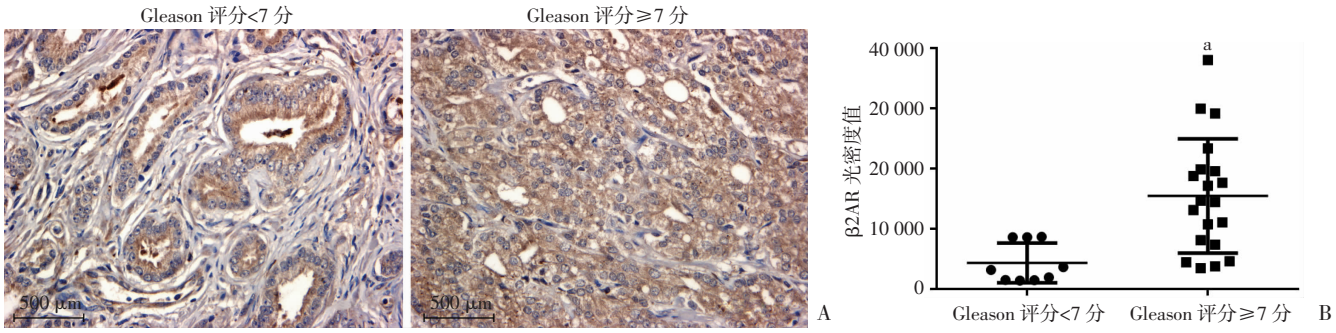
不同阶段(Gleason 评分为 6~9 分)的前列腺癌患者组织中 β2AR 的基因表达水平均显著增高($P<0.05$)。与 41~60 岁患者相比,61~80 岁患者癌组织中 β2AR 基因表达水平差异无统计学意义($P=0.401$)。

2.2　β2AR 在高风险的前列腺癌组织中表达增高

对 29 例前列腺癌患者组织标本进行免疫组化染色实验,结果显示,与 Gleason 评分<7 的低风险患者前列腺癌组织相比,Gleason 评分≥7 的高风险患者癌组织中 β2AR 表达更高($P<0.01$,图 1)。

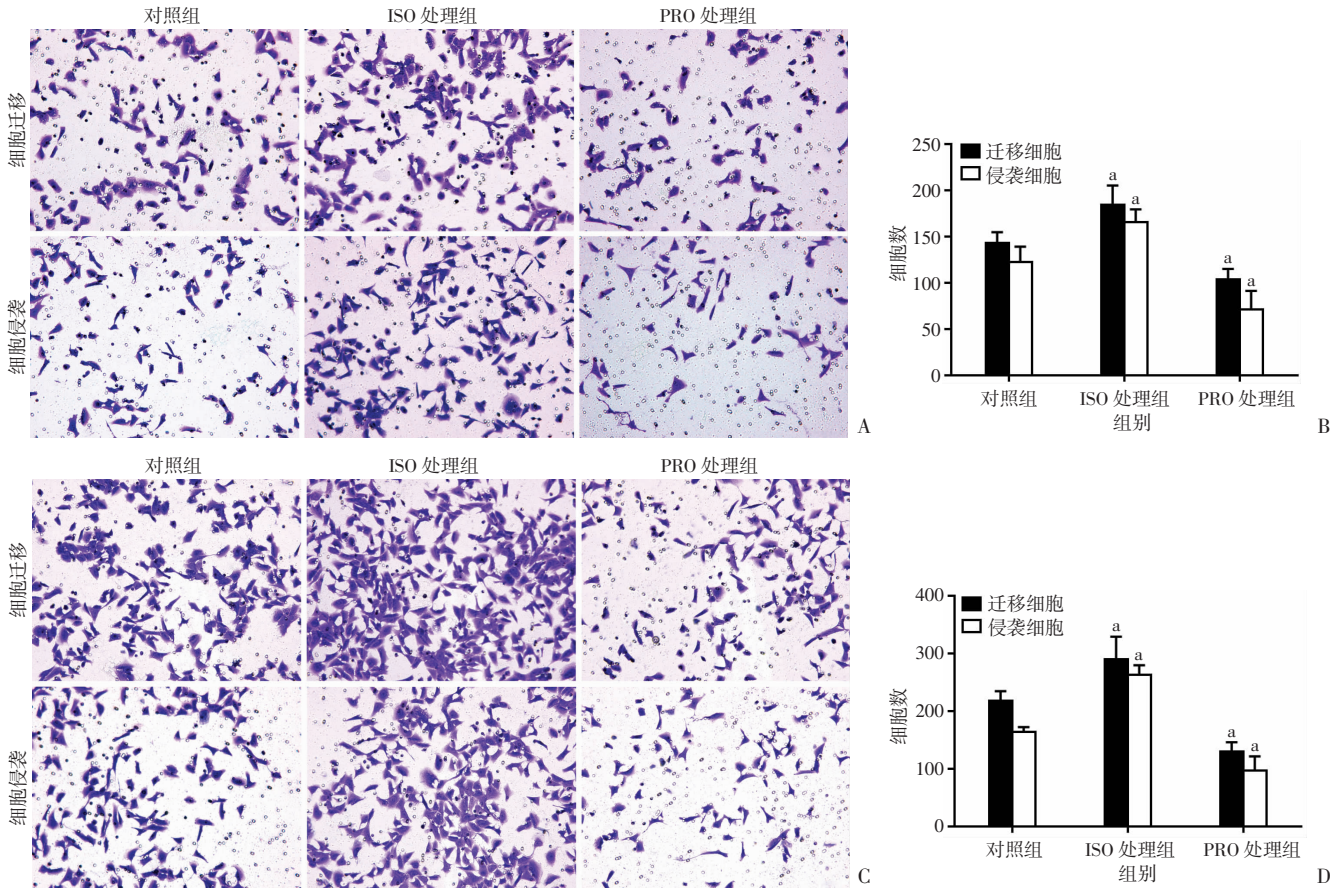
2.3　β2AR 激动剂促进前列腺癌细胞的迁移和侵袭,抑制剂则减弱细胞迁移和侵袭

Transwell 实验检测前列腺癌细胞 PC-3 和 LNCaP 在各处理组作用下的迁移和侵袭能力(图 2),结果显示,与对照组比较,β2AR 激动剂 ISO 处理组迁移和侵袭细胞数明显增加($P<0.01$),而 β2AR 抑制剂 PRO 处理组迁移和侵袭细胞数显著下降($P<0.01$)。



A:前列腺癌组织中 β2AR 的表达;B:免疫组化结果的定量分析　a:$P<0.01$,与 Gleason 评分<7 分比较

图 1　免疫组化染色检测 29 例前列腺癌组织中 β2AR 的表达　(S-P)



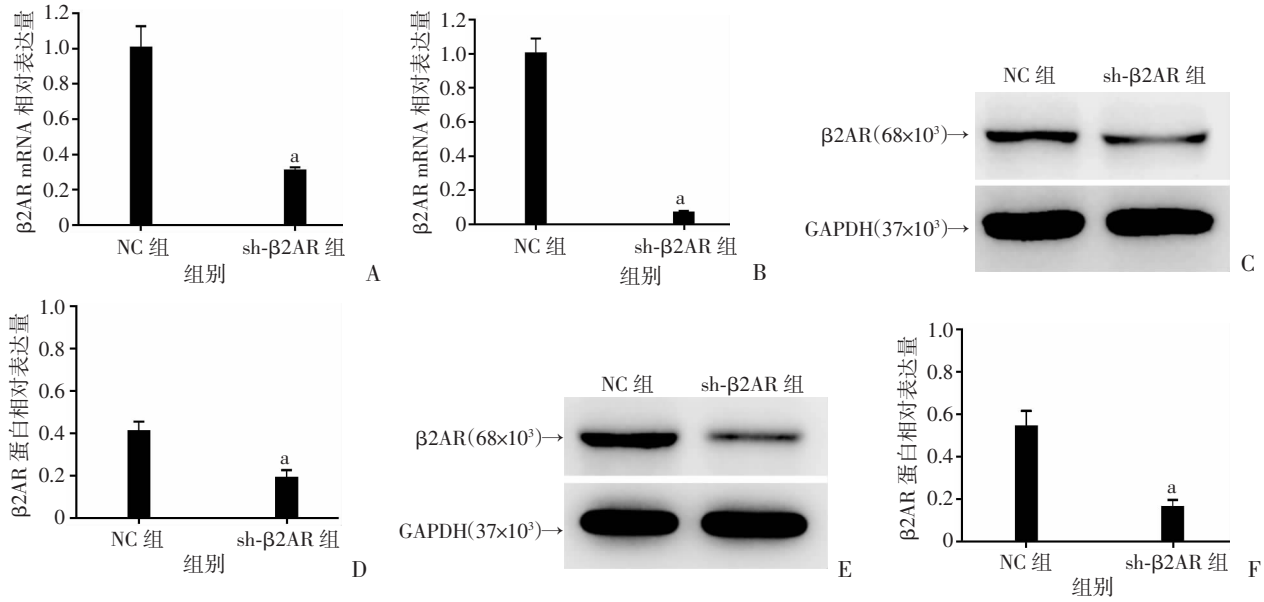
A、B:PC-3 细胞各组迁移和侵袭能力(×400)及定量分析;C、D:LNCaP 细胞各组迁移和侵袭能力(×400)及定量分析;a:$P<0.01$,与对照组比较

图 2　β2AR 激动剂和抑制剂对 PC-3 和 LNCaP 细胞迁移和侵袭的影响

2.4　下调 β2AR 表达减弱前列腺癌细胞的迁移和侵袭

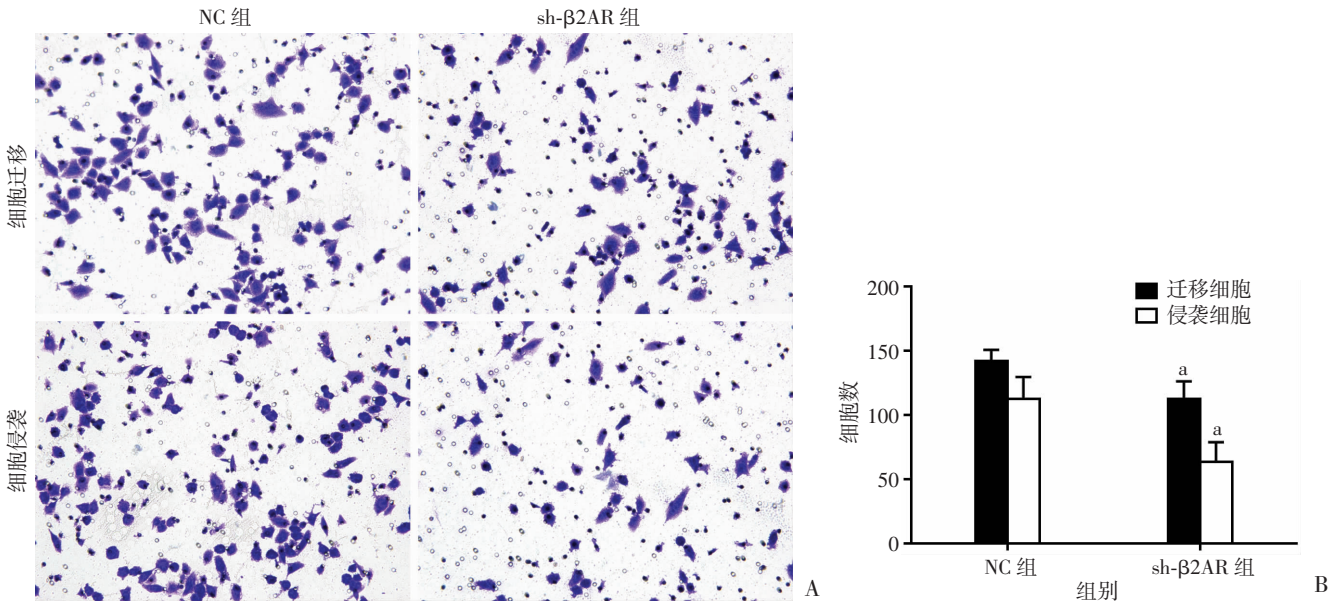
用 β2AR RNAi 慢病毒感染 PC-3 和 LNCaP 细胞,构建了 β2AR 敲低的稳转株。RT-PCR 检测结果显示,与 NC 组比较,sh-β2AR 组的 β2AR mRNA 水平显著下降($P<0.01$,图 3A、B),Western blot 检测发现其蛋白水平较 NC 组也明显下调($P<0.01$,图 3C～F)。说明癌细胞 β2AR 基因已被成功敲低。

采用 Transwell 迁移和侵袭实验检测下调 β2AR 表达对 PC-3 和 LNCaP 细胞迁移和侵袭能力的影响(图 4、5),结果显示 sh-β2AR 组细胞迁移及侵袭数明显低于 NC 组($P<0.01$),提示下调 β2AR 的表达细胞的迁移和侵袭能力明显降低。



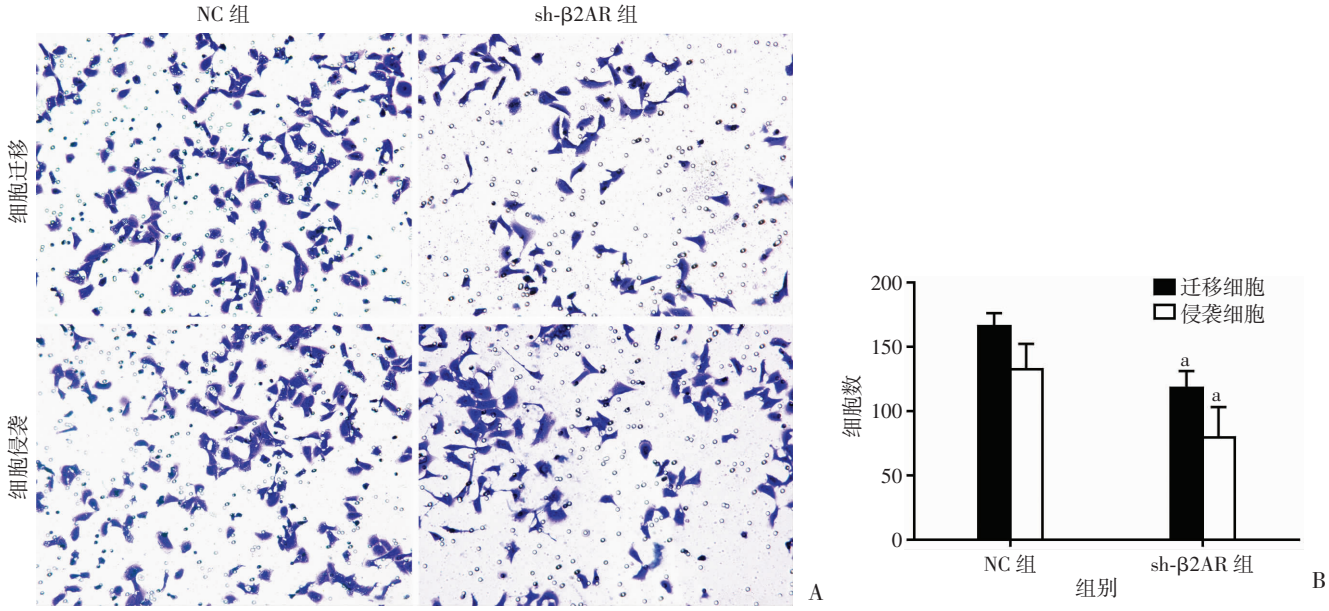
A:PC-3 稳转株细胞 RT-PCR 检测结果;B:LNCaP 稳转株细胞 RT-PCR 检测结果;C、D:PC-3 稳转株细胞 Western blot 检测结果及蛋白半定量分析;E、F:LNCaP 稳转株细胞 Western blot 检测结果及蛋白半定量分析;a:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 3　NC 组与 sh-β2AR 组细胞中 β2AR mRNA 及蛋白表达



A:PC-3 稳转株细胞迁移和侵袭能力(×400);B:定量分析　a:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 4　NC 组与 sh-β2AR 组 PC-3 细胞迁移和侵袭能力

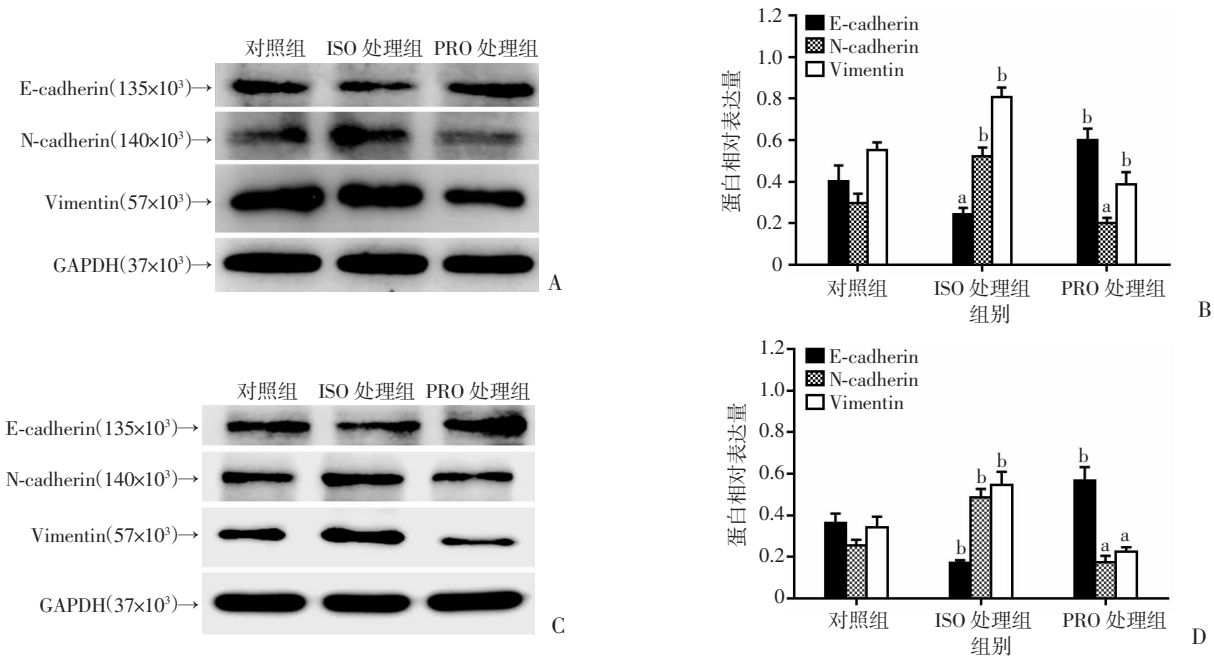


A:LNCaP 稳转株细胞迁移和侵袭能力(×400);B:定量分析;a: $P<0.01$,与 NC 组比较

图 5 NC 组与 sh-β2AR 组 LNCaP 细胞迁移和侵袭能力

2.5 β2AR 激动剂促进细胞 EMT 形成,抑制剂或下调 β2AR 表达则抑制 EMT 的形成

为了深入了解 β2AR 影响细胞迁移和侵袭的机制,采用 Western blot 检测在 β2AR 激动剂 ISO 和抑制剂 PRO 处理后,PC-3 和 LNCaP 细胞中 EMT 相关蛋白 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 的表达情况。结果显示,与对照组比较,ISO 处理组 E-cadherin 表达下调,N-cadherin 和 Vimentin 的表达上调,说明其对 EMT 形成具有促进作用;PRO 处理组 E-cadherin 表达上调,N-cadherin 和 Vimentin 的表达下调,说明其抑制细胞 EMT 的形成($P<0.05$,图 6)。



A、B:PC-3 各组细胞 EMT 相关蛋白的表达及半定量分析;C、D:LNCaP 各组细胞 EMT 相关蛋白的表达及半定量分析;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 6 Western blot 检测 β2AR 激动剂、抑制剂对 EMT 相关蛋白表达的影响

通过 Western blot 对稳转株中 EMT 相关蛋白的检测发现,与 NC 组比较,sh-β2AR 组 E-cadherin 表达上调,N-cadherin 和 Vimentin 的表达下调,说明下调 β2AR 的表达抑制细胞 EMT 的形成($P<0.05$,图 7)。

2.6　下调 β2AR 表达的稳转株中凋亡细胞增多

透射电镜检测稳转株细胞的凋亡情况发现,与 NC 组比较,sh-β2AR 组出现较多的凋亡细胞(图 8)。

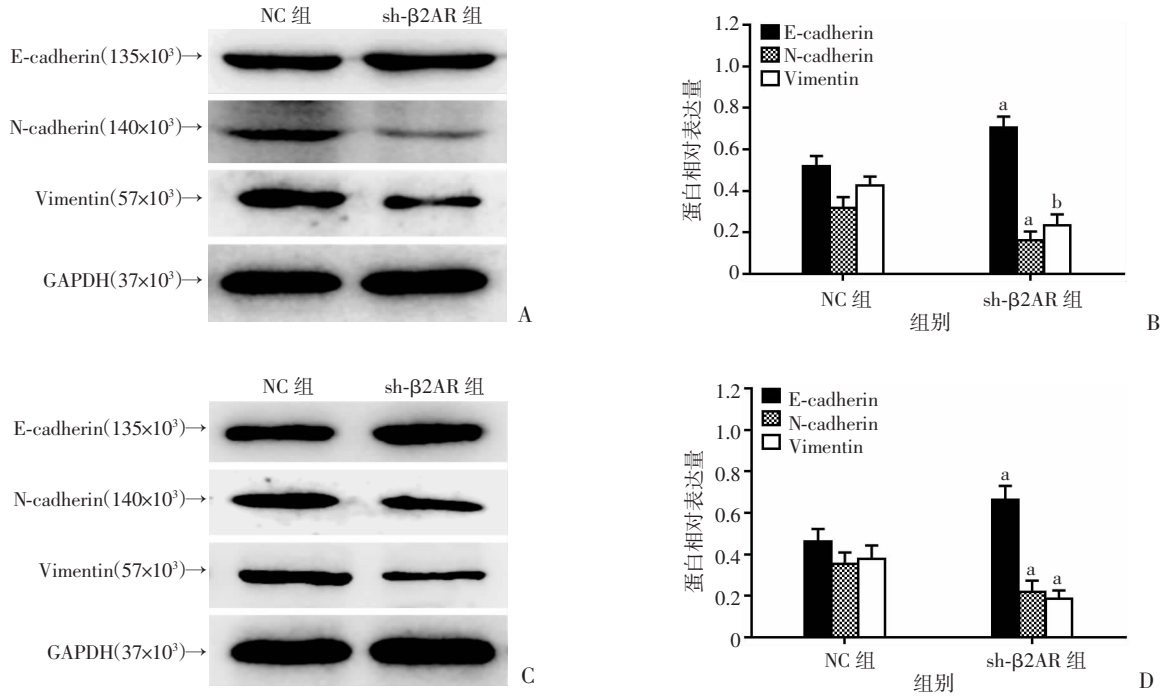
2.7　抑制或下调 β2AR 的表达细胞凋亡率明显增加

通过流式细胞术进一步对 ISO 和 PRO 处理后的细胞进行凋亡检测发现,与对照组比较,ISO 处理组细胞的凋亡率略有降低,而 PRO 处理组细胞凋亡率明显增加(图 9A、B)。在对 β2AR 敲低的稳转株进行凋亡检测时发现,与 NC 组比较,sh-β2AR 组细胞凋亡率也明显增加(图 9C、D)。

2.8　β2AR 激动剂下调凋亡相关蛋白的表达,抑制剂及下调 β2AR 表达则上调凋亡相关蛋白的表达

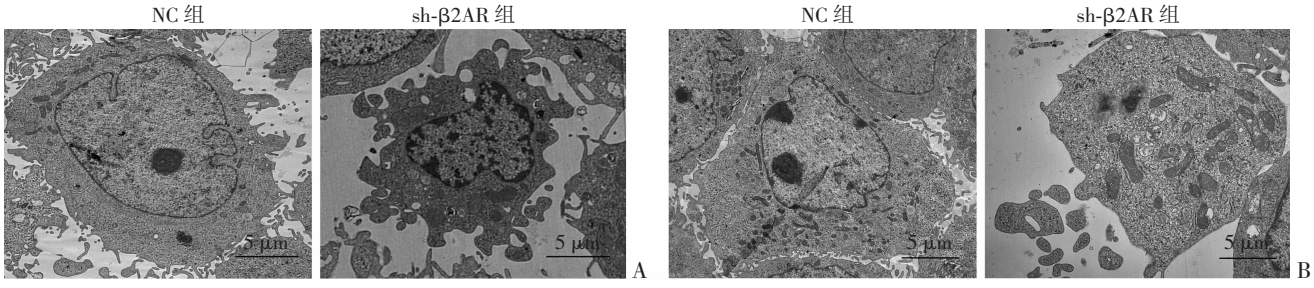
采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达,结果显示,与对照组相比,ISO 处理组在处理 1、12、24 h 后凋亡相关蛋白 Caspase3、cleaved-Caspase3 和 PARP 的表达均明显降低,提示 ISO 对凋亡的抑制作用;而与 ISO 处理 1 h 组相比,ISO 处理 12 h 和 24 h 组的凋亡蛋白变化不明显,说明 ISO 对凋亡相关蛋白表达的影响可能不具有时间依赖性;PRO 处理组凋亡蛋白表达明显增高($P<0.05$,图 10),提示其对细胞凋亡的促进作用。

进一步检测稳转株中凋亡相关蛋白的表达情况,结果显示,与 NC 组相比,sh-β2AR 组凋亡相关蛋白的表达明显增加($P<0.05$,图 11),提示下调 β2AR 的表达细胞的凋亡作用增强。



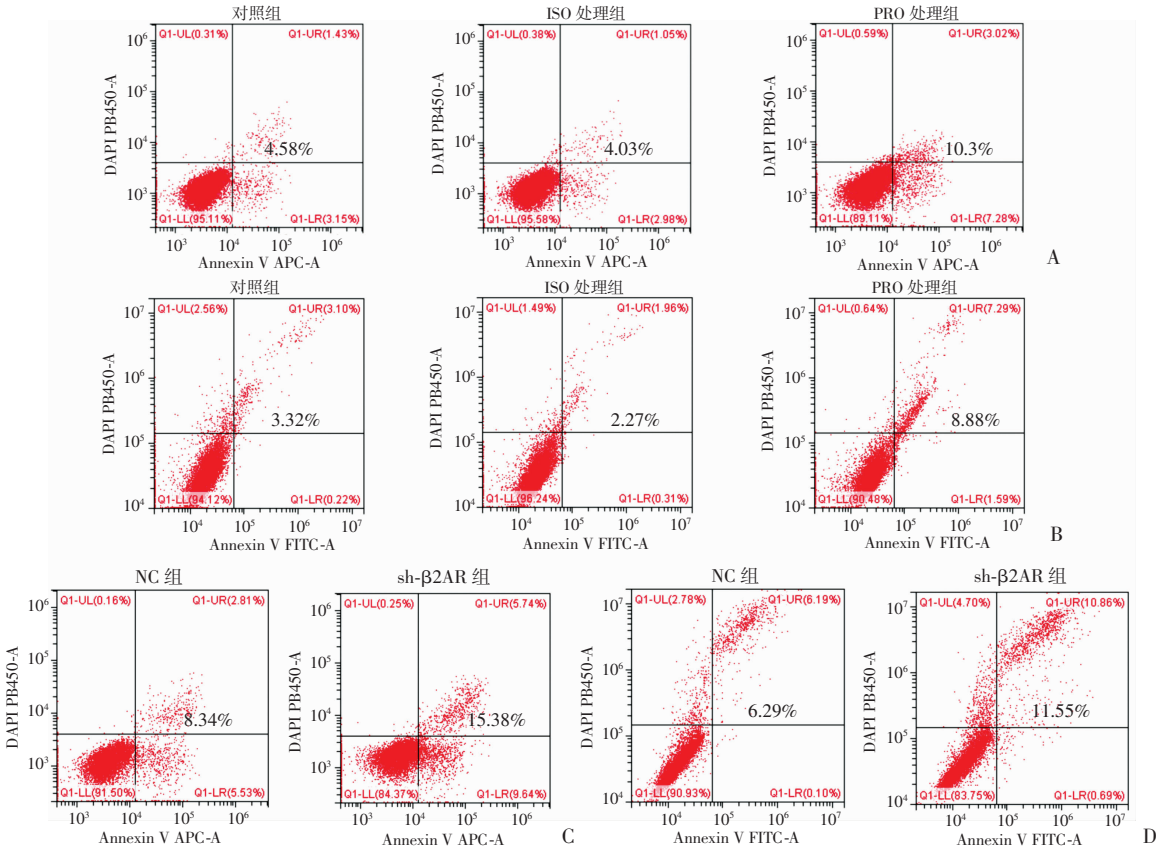
A、B:PC-3 稳转株细胞 EMT 相关蛋白的表达及半定量分析;C、D:LNCaP 稳转株细胞 EMT 相关蛋白的表达及半定量分析;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 7　Western blot 检测下调 β2AR 的表达对 EMT 相关蛋白表达的影响



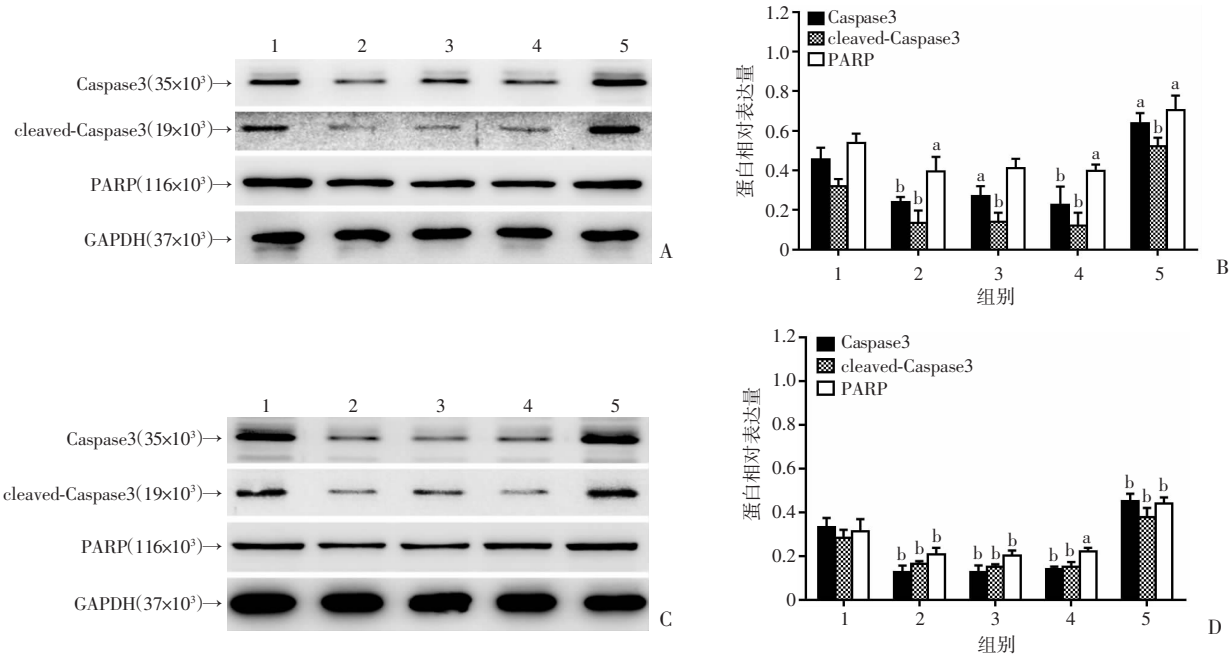
A:PC-3 稳转株;B:LNCaP 稳转株

图 8　透射电镜检测下调 β2AR 表达细胞的凋亡情况



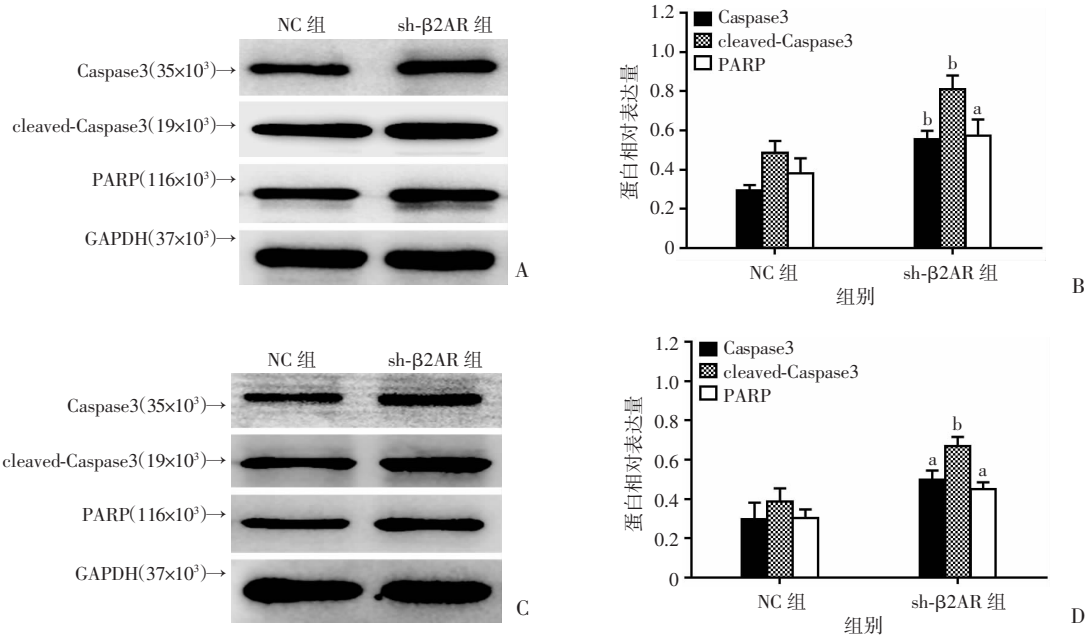
A:流式细胞术检测 PC-3 各组中细胞的凋亡率;B:LNCaP 各组细胞凋亡率;C:PC-3 稳转株细胞凋亡率;D:LNCaP 稳转株细胞凋亡率

图 9 流式细胞术检测 β2AR 激动剂、抑制剂及下调 β2AR 的表达对细胞凋亡的影响



A、B:PC-3 各组细胞凋亡相关蛋白的表达及半定量分析;C、D:LNCaP 各组细胞凋亡相关蛋白的表达及半定量分析;1:对照组;2:ISO 处理 1 h 组;3:ISO 处理 12 h 组;4:ISO 处理 24 h 组;5:PRO 处理 24 h 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 10 Western blot 检测 β2AR 激动剂、抑制剂对凋亡相关蛋白表达的影响



A、B:PC-3 稳转株细胞凋亡相关蛋白的表达及半定量分析;C、D:LNCaP 稳转株细胞凋亡相关蛋白的表达及半定量分析;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 NC 组比较

图 11 Western blot 检测下调 β2AR 的表达对凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨论

交感神经作为自主神经系统的重要组成部分,在前列腺癌的形成和发展过程中发挥了重要作用。研究显示,交感神经纤维在前列腺癌及其周围的正常组织中密集分布,而且与低风险患者相比,高风险前列腺癌患者的交感神经密度更高且肿瘤增殖指数也更高[7]。

β2AR 作为交感神经信号传导过程的重要环节,在前列腺癌进展过程中的表达目前仍存在争议[15-17]。本研究回顾分析了 UALCAN 数据库发现,与癌旁组织相比,β2AR 在前列腺癌组织中的基因表达更高;且不同年龄患者间 β2AR 的表达差异不显著。以上结果提示,β2AR 对前列腺癌的发生可能具有重要的影响,而年龄虽然是目前公认的前列腺癌的危险因素之一[18],但对 β2AR 在前列腺癌中的表达影响不显著,说明年龄可能不是影响 β2AR 在癌组织中表达的因素。通过对 29 例患者组织的免疫组化染色观察发现,高风险的前列腺癌组织中 β2AR 的蛋白表达水平明显高于低风险癌组织,提示在前列腺癌进展中 β2AR 可能发挥重要的作用。

本研究通过 Transwell 实验发现 β2AR 激动剂能显著促进前列腺癌细胞 PC-3 和 LNCaP 的迁移以及侵袭,而 β2AR 抑制剂或下调 β2AR 的表达则明显抑制癌细胞的迁移及侵袭能力,提示 β2AR 能够促进前列腺癌细胞迁移及侵袭。

EMT 是肿瘤细胞获得形变能力而转化为有运动能力的细胞表型,从而促使癌细胞发生转移的过程[19]。EMT 发生时常有上皮表型 E-cadherin 表达下调、间质表型 N-cadherin 以及 Vimentin 上调等特征。在肿瘤细胞的 EMT 形成过程中,细胞失去胞间连接及细胞极性,出现上皮标记物如 E-caderin 减少,而 N-caderin 和 Vimentin 等间充质标记物逐渐增多,从而使细胞获得高迁移、侵袭的能力[20]。在本研究中,采用 Western blot 检测 E-caderin、N-caderin 和 Vimentin 在 β2AR 激动剂、抑制剂处理以及下调 β2AR 表达后的蛋白表达,结果显示,β2AR 激动剂下调 E-caderin 的表达,上调 N-caderin 和 Vimentin 的表达,说明 β2AR 激动剂促进 EMT 的形成,而 β2AR 抑制剂或下调 β2AR 的表达则抑制 EMT 的形成。提示 β2AR 能够诱导前列腺癌细胞 EMT 的形成,增强肿瘤迁移以及侵袭能力。

透射电镜观测细胞凋亡发现下调 β2AR 的表达后稳转株中出现了较多的凋亡细胞。流式细胞术检测发现,β2AR 激动剂具有一定的抑制凋亡的作用,此作用较不明显,原因可能由于细胞本底凋亡率较低所致,但在凋亡相关蛋白的检测中发现,β2AR 激动剂使凋亡过程的关键执行者 Caspase3,其剪切形式 cleaved-Caspase3 以及其主要剪切底物 PARP 的表达明显降低,提示 β2AR 激动剂能抵抗细胞的凋亡作用。而 β2AR 抑制剂及下调 β2AR 的表达明显增加细胞的凋亡率,此外,Caspase3、cleaved-Caspase3 以及 PARP 的蛋白表达明显增加,提示抑制或敲低 β2AR 的表达促进细胞的凋亡。由此可以说明 β2AR 能够调节凋亡相关蛋白的表达从而抵抗前列腺癌细胞的凋亡作用。

肿瘤转移是一个复杂且包含多个步骤的过程。肿瘤细胞的成功转移不仅依赖于细胞的迁移、侵袭能力,

而且依赖于其逃避凋亡的能力。因此,在肿瘤转移过程中,凋亡抵抗是必不可少的重要环节,而细胞凋亡则能够抑制肿瘤转移[14]。本研究显示,β2AR 激动剂能够使癌细胞具有凋亡抗性,从而促进肿瘤的转移播散,β2AR 抑制剂或下调 β2AR 的表达具有明显的促凋亡作用,从而能够抑制肿瘤的转移。

综上所述,β2AR 可从两个方面影响肿瘤转移:①β2AR 能够促进前列腺癌细胞 EMT,增强细胞的迁移及侵袭能力;②β2AR 还可以使细胞产生凋亡抵抗,从而能够促进肿瘤的转移播散。而 β2AR 对前列腺癌转移影响的具体机制还需进一步研究探索。

目前关于 β 肾上腺素受体抑制剂对乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌和结肠癌作用的临床Ⅱ期评估工作已经展开[6,21],而 β 肾上腺素受体抑制剂对前列腺癌作用的研究仍需要进一步的临床流行病学以及基础研究的支持[6]。本研究发现 β2AR 能够通过促进前列腺癌细胞的迁移、侵袭及抑制细胞凋亡,从而可能对肿瘤转移具有促进作用,以期能够为前列腺癌可能的分子靶向药物的寻找提供新的线索。

参考文献:

[1] ZHOU C K, CHECK D P, LORTET-TIEULENT J, *et al*. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group[J]. Int J Cancer, 2016, 138(6): 1388-1400. DOI: 10.1002/ijc.29894.

[2] PANG C, GUAN Y Y, LI H B, *et al*. Urologic cancer in China[J]. Jpn J Clin Oncol, 2016, 46(6): 497-501. DOI:10.1093/jjco/hyw034.

[3] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI:10.3322/caac.21338.

[4] REN S C, CHEN R, SUN Y H. Prostate cancer research in China[J]. Asian J Androl, 2013, 15(3): 350-353. DOI: 10.1038/aja.2013.37.

[5] TSUZUKI S, PARK S H, EBER M R, *et al*. Skeletal complications in cancer patients with bone metastases[J]. Int J Urol, 2016, 23(10): 825-832. DOI:10.1111/iju.13170.

[6] BRAADLAND P R, RAMBERG H, GRYTLI H H, *et al*. B-adrenergic receptor signaling in prostate cancer[J]. Front Oncol, 2014, 4: 375. DOI:10.3389/fonc.2014.00375.

[7] MAGNON C, HALL S J, LIN J, *et al*. Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression[J]. Science,2013, 341(6142):1236361. DOI: 10.1126/science.1236361.

[8] TILAN J, KITLINSKA J. Sympathetic neurotransmitters and tumor angiogenesis-link between stress and cancer progression[J]. J Oncol,2010, 2010:539706. DOI: 10.1155/2010/539706.

[9] NAGMANI R, PASCO D S, SALAS R D, *et al*. Evaluation of β-adrenergic receptor subtypes in the human prostate cancer cell line-LNCaP[J]. Biochem Pharmacol,2003, 65(9): 1489-1494. DOI: 10.1016/s0006-2952(03)00105-9.

[10] FARINI D, PUGLIANIELLO A, MAMMI C, *et al*. Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation[J]. Endocrinology, 2003, 144(4): 1631-1643. DOI: 10.1210/en.2002-221009.

[11] CHEN H, LIU D, YANG Z, *et al*. Adrenergic signaling promotes angiogenesis through endothelial cell-tumor cell crosstalk[J]. Endocr Relat Cancer, 2014, 21(5): 783-795. DOI:10.1530/ERC-14-0236.

[12] GRYTLI H H, FAGERLAND M W, FOSSÅ S D, *et al*. Association between use of β-blockers and prostate cancer-specific survival: A cohort study of 3561 prostate cancer patients with high-risk or metastatic disease[J]. Eur Urol, 2014, 65(3): 635-641. DOI: 10.1016/j.eururo.2013.01.007.

[13] MICALIZZI D S, FARABAUGH S M, FORD H L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression[J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 117-134. DOI:10.1007/s10911-010-9178-9.

[14] SU Z, YANG Z, XU Y, *et al*. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis[J]. Mol Cancer, 2015,14: 48. DOI: 10.1186/s12943-015-0321-5.

[15] RAMBERG H, EIDE T, KROBERT K A, *et al*. Hormonal regulation of beta2-adrenergic receptor level in prostate cancer[J]. Prostate, 2008,68(10):1133-1142. DOI:10.1002/pros.20778.

[16] YU J, CAO Q, MEHRA R, *et al*. Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer[J]. Cancer Cell,2007,12(5): 419-431. DOI:10.1016/j.ccr.2007.10.016.

[17] CERAMI E, GAO J, DOGRUSOZ U, *et al*. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data[J]. Cancer Discov, 2012, 2(5): 401-404. DOI:10.1158/2159-8290.CD-12-0095.

[18] SALINAS C A, TSODIKOV A, ISHAK-HOWARD M, *et al*. Prostate cancer in young men: an important clinical entity[J]. Nat Rev Urol, 2014, 11(6): 317-323. DOI:10.1038/nrurol.2014.91.

[19] FIGIEL S, VASSEUR C, BRUYERE F, *et al*. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer[J]. Hum Pathol, 2017,61:26-32. DOI: 10.1016/j.humpath.2016.10.013.

[20] HARNER-FOREMAN N, VADAKEKOLATHU J, LAVERSIN S A, *et al*. A novel spontaneous model of epithelial-mesenchymal transition (EMT) using a primary prostate cancer derived cell line demonstrating distinct stem-like characteristics[J]. Sci Rep, 2017, 7: 40633. DOI: 10.1038/srep40633.

[21] CHOI C H, SONG T, KIM T H, *et al*. Meta-analysis of the effects of beta blocker on survival time in cancer patients[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(7): 1179-1188. DOI:10.1007/s00432-014-1658-7.

(收稿:2019-06-19;修回:2019-08-20)

(编辑 汪勤俭)