DOI:10.16016/j.2097-0927.202208013

# ATF6 通过 Hippo-YAP 信号通路促进前列腺癌 PC3 细胞的增殖、迁移和侵袭

刘恒川[1],杨宗珂[2],刘清源[1],张金栋[1],朱辉轩[1],王德林[1] 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科[1];408399 重庆,重庆市垫江县人民医院泌尿外科[2]

[摘要] **目的** 探讨转录活化因子 6(activating transcription factor 6,ATF6)对前列腺癌 PC3 细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 收集前列腺癌组织标本和前列腺增生组织标本,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 分别检测 ATF6 的 mRNA 和蛋白质水平。通过 shRNA 慢病毒干扰载体感染 PC3 细胞,敲降 ATF6 表达水平。CCK8 和 EdU 实验检测 PC3 细胞增殖能力,划痕实验和 Transwell 侵袭实验检测 PC3 细胞迁移和侵袭能力。采用裸鼠异种移植模型评估 ATF6 在体内对肿瘤增殖的影响。使用 JASPAR 数据库预测和荧光素酶报告基因评估 Yes 相关蛋白(YAP)和 ATF6 之间的关联。qRT-PCR、免疫荧光检测 YAP 的 mRNA 和蛋白质水平。qRT-PCR 检测 YAP 的两个下游因子结缔组织生长因子(CTGF)和富含半胱氨酸的 61(Cyr61)的 mRNA 表达水平。**结果** 在前列腺癌组织中,ATF6 的 mRNA 和蛋白质水平均显著升高($P<0.05$)。敲降 ATF6 后,PC3 细胞的增殖能力、侵袭能力和迁移能力均受到抑制($P<0.05$)。动物实验证实敲降 ATF6 能明显抑制肿瘤生长($P<0.05$)。JASPAR 数据库预测发现 ATF6 与 YAP 之前存在启动结合位点,荧光素酶报告基因证实 ATF6 与 YAP 存在相互作用。敲降 ATF6 后显著下调 YAP 的 mRNA 及蛋白质表达水平($P<0.05$),且 YAP 下游基因 CTGF 和 Cyr61 的 mRNA 表达水平也随之下调($P<0.05$)。**结论** ATF6 能通过 Hippo-YAP 信号通路促进前列腺癌 PC3 细胞的增殖、迁移和侵袭。

[关键词] 前列腺癌;转录活化因子 6;Hippo;YAP;增殖
[中图法分类号] R394.3;R73-37;R737.25 [文献标志码] A

# Activating transcription factor 6 promotes proliferation, migration and invasion of PC3 human prostate cancer cells through Hippo-YAP signaling pathway

LIU Hengchuan[1], YANG Zongke[2], LIU Qingyuan[1], ZHANG Jindong[1], ZHU Huixuan[1], WANG Delin[1] [1]Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Urology, Dianjiang People's Hospital of Chongqing, Chongqing, 408399, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of activating transcription factor 6 (ATF6) on the proliferation, migration and invasion of prostate cancer PC3 cells. **Methods** Prostate cancer tissue samples and benign prostatic hyperplasia tissue samples were collected, then the mRNA and protein levels of ATF6 were detected by qRT-PCR and Western blotting, respectively. Lentivirus with ATF6 shRNA was transfected into PC3 cells to downregulate ATF6 expression, then CCK8 and EdU assays were adopted to determine the proliferation of PC3 cells, and wound-healing and Transwell invasion tests were performed to evaluate the migration and invasion abilities of PC3 cells. Nude mouse xenograft models were used to assess the influence of ATF6 on tumorigenesis *in vivo*. Moreover, the association between Yes-associated protein (YAP) and ATF6 was analyzed using online JASPAR database prediction and luciferase reporter. The mRNA and protein levels of YAP were detected with qRT-PCR and immunofluorescence assay, and the mRNA levels of 2 downstream

[基金项目] 重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0732);重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2017shms-zdyf0319)
[通信作者] 王德林,E-mail:wangdlws@sina.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

factors of YAP, connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (Cyr61), were also measured by qRT-PCR. **Results** The mRNA and protein levels of ATF6 in prostate cancer tissues were significantly increased ($P<0.05$). Knockdown of ATF6 decreased the proliferation, invasion, and migration abilities of PC3 cells ($P<0.05$), and the *in vivo* study showed that ATF6-knockdown attenuated tumor growth as well ($P<0.05$). JASPAR database predicted that there was an initiation binding site between ATF6 and YAP, and the luciferase reporter assay also confirmed the interaction between them. In addition, YAP expression was remarkably downregulated after knockdown of ATF6 ($P<0.05$), and the mRNA level of YAP downstream genes CTGF and Cyr61 were also decreased accordingly ($P<0.05$). **Conclusion** ATF6 promotes the proliferation, migration, and invasion of prostate cancer PC3 cells through Hippo-YAP signaling pathway.

[**Key words**] prostate cancer; Hippo; YAP; proliferation

Supported by the Program of Natual Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0732), the Special Project of Science and Technology Innovation of Social Undertakings and People's Livelihood Security of Chongqing (cstc2017shms-zdyf0319). Corresponding author: WANG Delin, E-mail: dlwangws@sina.com

据 2022 年 *CA Cancer J Clin* 报道,前列腺癌(prostate cancer, PCa)为男性最常见的恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的第二大原因[1]。在我国,前列腺癌发病率近年来逐渐升高,从 2008 年开始,前列腺癌已经上升为泌尿系统肿瘤第一位[2]。我国的多中心研究资料显示,68%的前列腺癌患者已处于晚期,导致我国前列腺癌患者的总体预后远远差于西方发达国家,而远处转移患者的 5 年总生存率仅为 30%[3]。研究发现前列腺癌的发生发展与多种癌基因过度表达以及抑癌基因的失活密切相关,但是目前对这个过程的具体分子机制尚不完全清楚。因此,进一步探索新的基因功能改变和前列腺癌的发生发展及其恶性特征的关系,对揭示前列腺癌发生发展的分子机制、设计合理的治疗药物及判断预后有重要意义。

激活转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)是一种定位于内质网 的蛋白质,是亮氨酸拉链转录因子家族的成员[4]。作为内质网应激信号因子,ATF6 通过将信号转导至顺式受体来发挥核转录因子的作用[5]。ATF6 在各种生理过程中发挥着至关重要的作用,包括细胞分化、促存活、细胞凋亡和炎症,而 ATF6 的这些功能使其自身与肿瘤发生有关[6]。研究表明,ATF6 的表达水平在结肠癌中显著增加[7],且高表达的 ATF6 与癌症转移和复发之间也存在相关性[8]。在前列腺癌中,ATF6 的表达水平明显上调,与前列腺癌的恶性程度、预后不良有关[9]。然而,ATF6 促进前列腺癌的恶性进展的分子机制尚未得到充分研究。YAP 是 Hippo 信号通路中的关键因子,可以通过影响癌细胞增殖、迁移和侵袭促进肿瘤形成[10-11]。我们前期研究表明,在前列腺癌组织及 PC3 细胞中 YAP 呈高表达,且与细胞的增殖和凋亡明显相关[12]。在肝癌细胞中,内质网应激和 Hippo-YAP 通路之间存在双重调节作用[13]。ATF6 作为内质网应激重要因子之一,推测 ATF6 也能通过激活 YAP 从而影响前列腺癌细胞的生物学功能。本研究通过生物信息学、荧光素酶报告基因、免疫荧光、细胞实验、动物实验等方法,探讨 ATF6 在前列腺癌细胞中的作用以及潜在的分子机制,为前列腺癌的诊疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 病例与组织标本

收集 2020 年 3 月至 2021 年 12 月在重庆医科大学附属第一医院泌尿外科接受手术的前列腺癌组织标本 16 例,所有患者未接受化疗、放疗和雄激素剥脱治疗。另收集良性前列腺增生组织标本 16 例作为对照组。本研究经重庆医科大学附属第一医院伦理委员会审查批准实施(批号 2022-051)。

### 1.2 细胞培养和感染

RWPE-1、PC3 和 DU145 细胞系购买自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)。RWPE-1 细胞在前列腺上皮细胞培养基 PEpiCM-b(Sciencell,美国)中培养,DU145 细胞在含有 10%胎牛血清(Gibco, 美国)的 MEM 培养基(Gibco, 美国)中培养,PC3 细胞在含有 10%胎牛血清(Gibco, USA)的 F12K 培养基(Gibco, 美国)中培养,所有细胞置于 37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱内培养。通过慢病毒感染技术,采用含有 ATF6 shRNA 的 pLVX-ShRNA2-puro 载体(英杰生命技术有限公司,美国)感染 PC3 细胞敲降 ATF6,对照组采用 Scramble shRNA 慢病毒载体进行感染,感染后的 PC3 细胞分别标注为 shATF6 和 shScr 细胞。使用含有 5 mg/mL 嘌呤霉素的培养基进行筛选。通过 Western blot 和 qRT-PCR 检测感染效率。见表 1。

**表 1 慢病毒序列信息**

| 慢病毒名称 | 慢病毒序列(5′→3′) |
|---|---|
| shATF6-1 | 正义链: GATCCGCAATTGGAAGCAGCAAATGATTCAAGAGATCATTTGCTGCTTCCAATTGCTTTTTTCTCGAGG<br>反义链: AATTCCTCGAGAAAAAAGCAATTGGAAGCAGCAAATGATCTCTTGAATCATTTGCTGCTTCCAATTGCG |
| shATF6-2 | 正义链: GATCCGCAAAGCAGCAACCAATTATCTTCAAGAGAGATAATTGGTTGCTGCTTTGCTTTTTTCTCGAGG<br>反义链: AATTCCTCGAGAAAAAAGCAAAGCAGCAACCAATTATCTCTCTTGAAGATAATTGGTTGCTGCTTTGCG |
| shATF6-3 | 正义链: GATCCGCTGTTCAATACACAGAAACCTTCAAGAGAGGTTTCTGTGTATTGAACAGCTTTTTTCTCGAGG<br>反义链:AATTCCTCGAGAAAAAAGCTGTTCAATACACAGAAACCTCTCTTGAAGGTTTCTGTGTATTGAACAGCG |
| shScramble | 正义链: GATCCGCTCGCCTGTCTACTAACTAATTCAAGAGATTAGTTAGTAGACAGGCGAGCTTTTTTCTCGAGG<br>反义链: AATTCCTCGAGAAAAAAGCTCGCCTGTCTACTAACTAATCTCTTGAATTAGTTAGTAGACAGGCGAGCG |

### 1.3 CCK-8 实验检测细胞活力

通过 CCK-8 检测 PC3 细胞活力的影响。将感染后的 PC3 细胞接种在 96 孔板中,每组 3 个复孔,每孔接种 2 000 个细胞,分别于 24、48、72 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂(七海生物,中国),在 37 ℃细胞培养箱中培养 2 h 后,使用酶标仪检测各组细胞在 450 nm 处的光密度值。

### 1.4 EdU 实验检测细胞增殖能力

通过 5-ethynyl-20-deoxyuridine (EdU) 检测试剂盒(锐博生物,中国)检测细胞增殖能力。将感染后的 PC3 细胞以 $1\times10^4$/孔的密度接种在 96 孔板中,每组 3 个复孔,每孔加入 300 μL 含 EdU 培养基孵育细胞 2 h,其中 EdU 的终浓度为 10 μmol/L。根据试剂盒说明书进行 EdU 染色。通过荧光显微镜(Olympus,日本)拍照观察并用 ImageJ 软件(National Institutes of Health,美国)计数。通过计算 EdU 染色阳性细胞占总细胞的比率来测定细胞增殖能力。

### 1.5 划痕实验检测细胞迁移能力

将感染后的 PC3 细胞接种于 6 孔板中,每组 3 个复孔,当细胞生长到 90% 汇合时,使用 200 μL 枪头均匀划一条直线。0 h 和 24 h 在显微镜(Olympus)下对划痕区域拍照,通过 ImageJ 软件测量划痕面积。迁移面积计算如下:(0 h 时的划痕面积-24 h 时的划痕面积)/ 0 h 时的划痕面积×100%。

### 1.6 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力

将 8 μm 孔径的 Transwell 小室(康宁,美国)底部均匀涂上 80 μL 基质胶,并在 37 ℃条件下孵育 30 min。将 $1\times10^5$ 个感染后的 PC3 细胞悬浮在 200 μL 无血清 F12K 培养基中并加入 Transwell 小室,同时将 600 μL 含 10%胎牛血清的 F12K 培养基加入下室。孵育 24 h 后除去上表面的非侵袭细胞,用 4%多聚甲醛固定下表面上的侵袭细胞,并用 0.5%的结晶紫染色。光学显微镜下随机选择 3 个视野拍照并通过 Image J 软件进行细胞计数。

### 1.7 RNA 提取和 qRT-PCR 检测 mRNA 的表达水平

使用 TRIzol 试剂盒(TaKaRa,日本)按照说明书要求从组织标本和细胞中提取总 RNA,然后使用 PrimescriptTMR 试剂盒(TaKaRa,日本)按照说明书要求将 2 μg RNA 逆转录为 cDNA,利用 TB Green Premix *Ex Taq* Ⅱ (TaKaRa,日本)进行实时荧光定量 PCR,每组设 3 个复孔。ATF6、YAP、CTGF、Cyr61 和 GAPDH 引物购自美国英杰生命技术有限公司(表 2)。mRNA 相对表达量使用 $2^{-\triangle Cq\triangle Cq}$ 方法计算。

**表 2 引物序列信息**

| 基因名称 | 引物序列(5′→3′) |
|---|---|
| ATF6 | 正义链: GCCTTTATTGCTTCCAGCAG<br>反义链: TGAGACAGCAAAACCGTCTG |
| YAP | 正义链: CAGTGGACTAAGCATGAGCA<br>反义链: TCAAGGTAGTCTGGGAAACG |
| CTGF | 正义链: CCAATGACAACGCCTCCTG<br>反义链: TGGTGCAGCCAGAAAGCTC |
| CYR61 | 正义链: AGCCTCGCATCCTATACAACC<br>反义链: TTCTTTCACAAGGCGGCACTC |
| GAPDH | 正义链: TGGAAGGACTCATGACCACA<br>反义链: TTCAGCTCAGGGATGACCTT |

### 1.8 蛋白质提取和 Western blot 检测蛋白质的表达水平

使用 RIPA 裂解液(碧云天生物技术,中国)从组织标本和细胞中提取总蛋白。使用 BCA 蛋白质测定试剂盒(碧云天生物技术,中国)测量蛋白质浓度。将 40 μg 的蛋白质加到凝胶上进行电泳分离,然后转移到 PVDF 膜(通用电气,美国)上,含有 5%脱脂牛奶的 TBST 封闭 2 h。一抗(ATF6, 1∶1 000, Abcam, ab37149; β-actin, 1∶1 000, Cell Signaling Technology, No. 58169; YAP, 1∶1 000, Cell Signaling Technology, No. 12395)4 ℃孵育过夜,然后与辣根过氧化物酶偶联

的二抗(碧云天生物技术,中国)在室温下孵育 2 h。使用 ECL 试剂盒(Advansta,美国)通过 GelDoc XR+成像仪(BioRad,美国)对条带进行化学发光检测。使用 Image J 软件定量各目的条带的灰度值,用目的蛋白/β-actin 来表示目的蛋白的相对表达量。

1.9 转录因子结合位点预测

使用转录因子预测数据库 JASPAR(http://jaspar.genereg.net)预测 ATF6 和 YAP 之间的相互作用。操作流程步骤参考 Castro-Mondragon 组报道[14],使用 JASPAR 数据库分析 ATF6 的结合序列,选择 YAP 的上游 2 000 bp 序列来预测相互作用。选择负链上的预测位点用于荧光素酶报告基因检测。

1.10 荧光素酶报告基因检测转录调控

通过 PCR 扩增含有预测的 YAP 结合序列的启动子区域,并插入荧光素酶载体(吉玛基因,中国),海肾荧光素酶作为内部对照。然后使用 Lipofectamine 3000 试剂(英杰生命技术有限公司,美国)用荧光素酶构建体和内部对照荧光素酶载体转染 shScr 和 shATF6 细胞。根据荧光素酶双重测定试剂盒(Omega,美国)说明书操作流程,使用荧光酶标仪(Tecan Spark,中国)检测荧光素酶活性。

1.11 免疫荧光检测 YAP 蛋白质表达水平及亚细胞分布

将细胞接种于盖玻片上生长,待细胞融合率为 70%左右时取出盖玻片,用预冷的 4%多聚甲醛固定 20 min,用 0.2%的 Triton X-100(Biosharp,中国)通透 5 min,然后用含有 5%牛血清白蛋白(赛维尔生物科技有限公司,中国)的 PBS 封闭 2 h。一抗在 4 ℃孵育过夜,Cy3 标记的二抗(英杰生命技术有限公司,美国)室温孵育 2 h,滴加 DAPI,室温放置 3 min,然后使用荧光显微镜拍照观察。

1.12 动物实验评估 ATF6 在体内对肿瘤生长的影响

5 只 4 周龄雄性 BALB/c-nu 裸鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司,体质量(247±16) g。将感染 shATF6 的 PC3 细胞($5\times10^6$ 个细胞)接种于裸鼠右侧背部,并将相同数量的 shScramble(shScr)的 PC3 细胞接种于左侧背部。每周使用游标卡尺沿 2 个垂直轴测量肿瘤直径。使用以下公式计算肿瘤体积:体积=1/2(长度×宽度×宽度)。接种 7 周后处死小鼠,取出肿瘤称重。动物实验经重庆医科大学动物伦理委员会审查批准实施(批号 2020-020)。

1.13 统计学分析

使用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,GraphPad Prism 8.0 软件进行统计及绘图。3 次重复进行的实验数据表示为 $\bar{x}\pm s$。两组之间比较采用 $t$ 检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

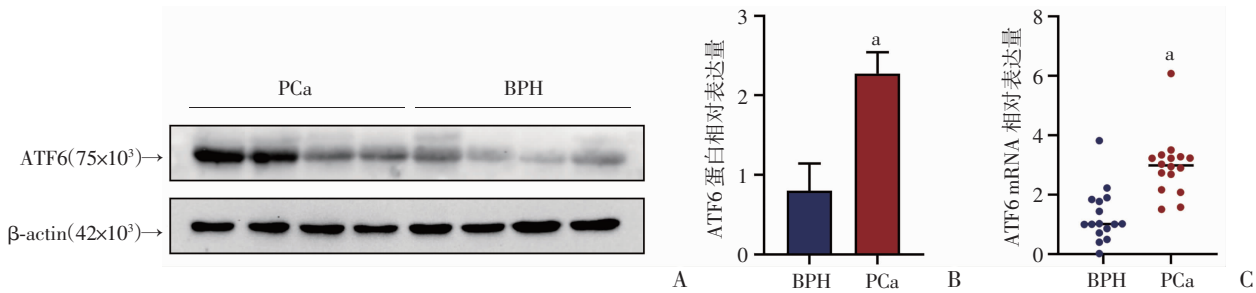
## 2 结果

2.1 ATF6 在前列腺癌组织高表达

Western blot 和 qRT-PCR 分析显示,在前列腺癌组织中,ATF6 的蛋白质和 mRNA 水平均高于前列腺增生组织,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

2.2 慢病毒 ATF6-shRNA 感染 PC3 细胞后敲降 ATF6 的表达

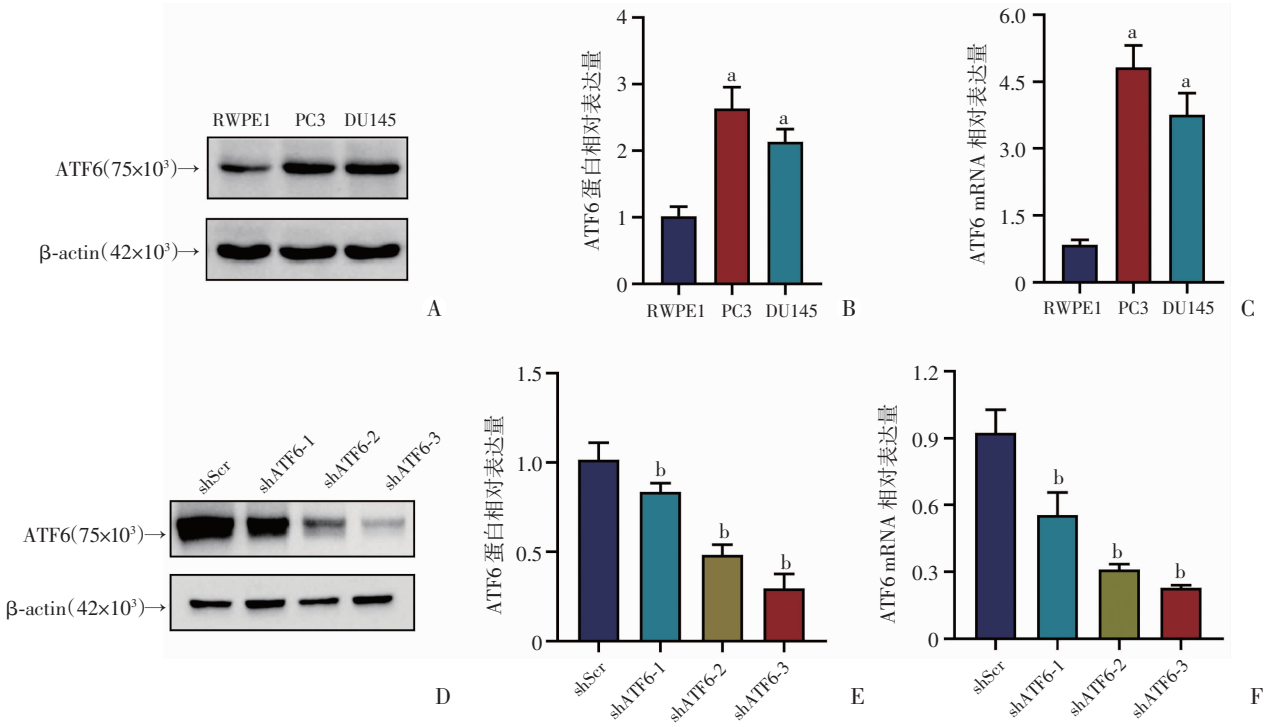
Western blot 和 qRT-PCR 分析显示,在前列腺癌 PC3 和 DU145 细胞中,ATF6 的蛋白和 mRNA 表达水平明显高于正常前列腺上皮细胞 RWPE1 细胞(图 2A~C)。通过慢病毒感染技术,用 3 种包含不同 ATF6 特异性 shRNA 序列的慢病毒分别感染 PC3 细胞敲降 ATF6 的表达。采用 Western blot 和 qRT-PCR 分析感染效率,结果显示,3 条不同序列均能下调 ATF6 的表达,其中 shATF6-3 下调最明显($P<0.05$,图 2D~F)。结果表明,shATF6 慢病毒成功敲降 PC3 细胞 ATF6 的表达。选择感染 shATF6-3 序列的 PC3 细胞(shATF6)作进一步研究,感染 shScramble 序列的 PC3 细胞(shScr)作为对照组。




a:$P<0.05$,与 BPH 比较

A:ATF6 在前列腺癌组织和前列腺增生组织中的蛋白表达;B:ATF6 在前列腺癌组织和前列腺增生组织中的蛋白表达;C:ATF6 在前列腺癌组织和前列腺增生组织中的 mRNA 表达

**图 1 ATF6 在前列腺癌组织和细胞中的表达水平**




a: $P<0.05$, 与 RWPE1 比较;b: $P<0.05$, 与 shScr 比较

A:Western blot 检测 ATF6 在不同前列腺癌细胞系中的蛋白质表达;B:ATF6 在不同前列腺癌细胞系中的蛋白质相对表达量;C:ATF6 在不同前列腺癌细胞系中的 mRNA 表达;D:Western blot 检测 ATF6 在感染慢病毒的 PC3 细胞中的蛋白质表达;E:ATF6 在感染慢病毒的 PC3 细胞中的蛋白质相对表达量;F:ATF6 在感染慢病毒的 PC3 细胞中的 mRNA 表达

**图 2 慢病毒 ATF6-shRNA 感染 PC3 细胞后敲降 ATF6 的表达**

### 2.3 敲降 ATF6 后抑制 PC3 细胞增殖、迁移和侵袭能力

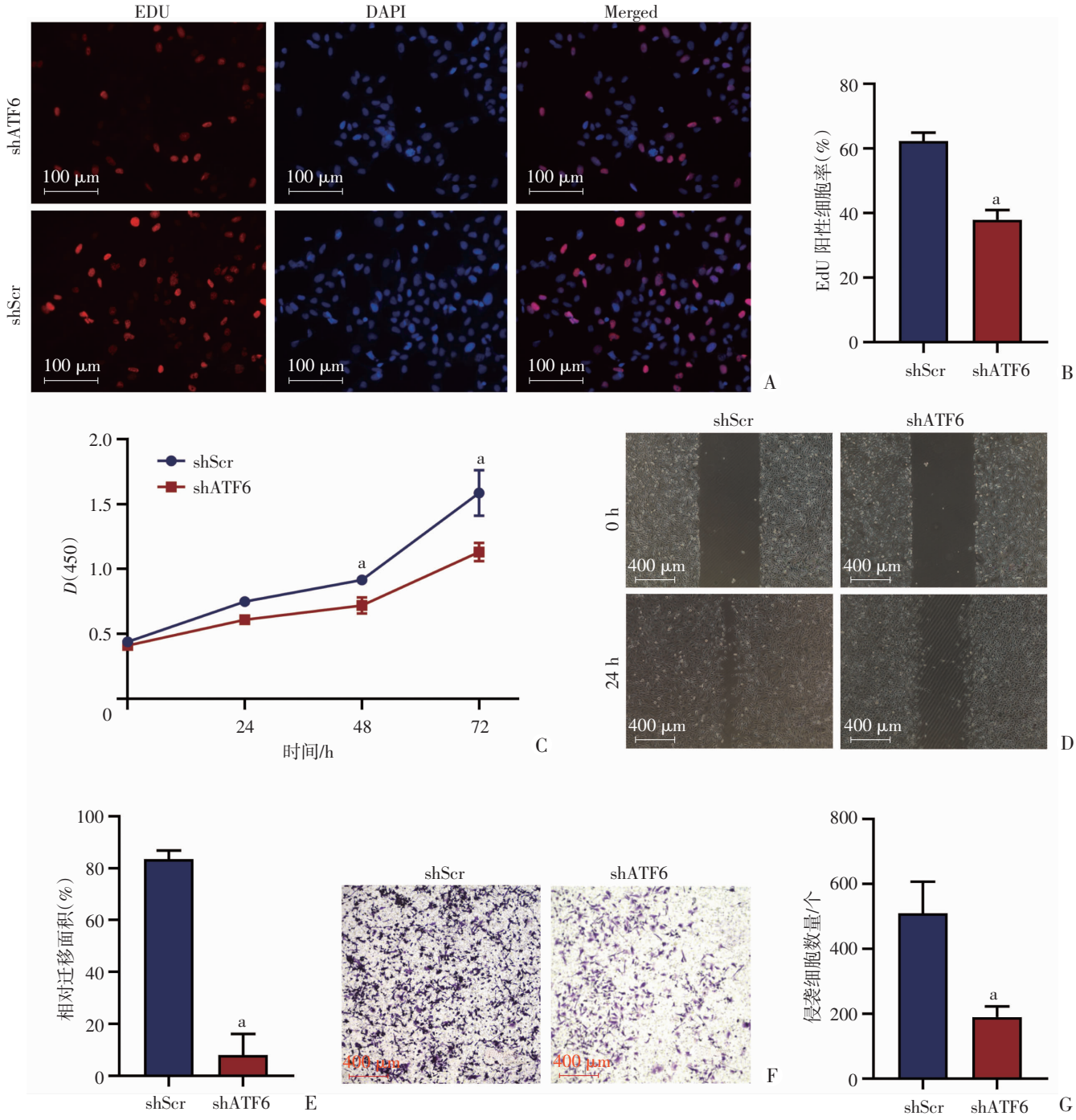
EdU 染色实验结果显示(图 3A、B),敲降 ATF6 后 PC3 细胞的增殖活性明显低于对照组($P<0.05$)。CCK-8 实验结果显示(图 3C),敲降 ATF6 后 PC3 细胞的增殖活性明显低于对照组($P<0.05$)。划痕实验结果显示(图 3D、E),敲降 ATF6 后 PC3 细胞的 24 h 迁移面积率明显低于对照组($P<0.05$),表明敲降 ATF6 能抑制 PC3 细胞的迁移能力。Transwell 侵袭实验结果显示(图 3F、G),与对照组相比,敲降 ATF6 后 PC3 细胞的侵袭能力明显受到抑制($P<0.05$)。以上结果表明,敲降 ATF6 后能够抑制前列腺癌 PC3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

### 2.4 敲降 ATF6 抑制体内肿瘤生长

与对照组相比,ATF6 敲降组肿瘤大小在第 5、6 周和第 7 周均较低($P<0.05$)。第 7 周时,处死小鼠取出肿瘤后拍照,并对肿瘤进行称重,结果发现敲降组的质量明显低于对照组($P<0.05$,图 4)。结果表明,敲降 ATF6 能在体内抑制前列腺癌的生长。

### 2.5 ATF6 调节 YAP 和下游基因的转录

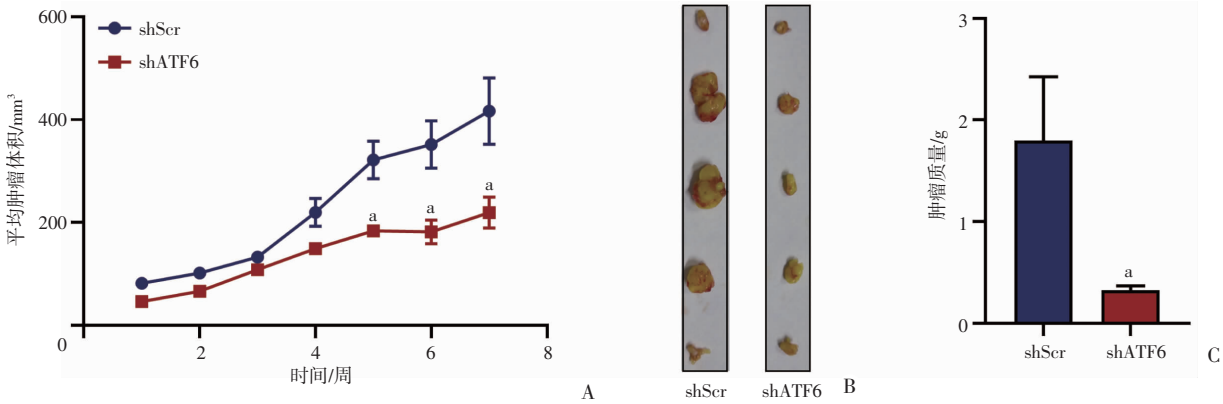
通过 JASPAR 数据库(www.jaspar.genereg.net)预测 ATF6 和 YAP 之间是否存在相互作用,结果表明,YAP 启动区域包含一个与 ATF6 结合的序列(图 5A)。荧光素酶报告基因结果显示,敲降 ATF6 后 YAP 启动子驱动的荧光素酶活性明显下调($P<0.05$),进一步证实 ATF6 与 YAP 之间存在直接相互作用(图 5B)。qRT-PCR 分析显示(图 5C),敲降 ATF6 后 PC3 细胞中 YAP 的 mRNA 水平下调。免疫荧光分析显示,敲降 ATF6 后细胞中总 YAP 和核内 YAP 表达均降低($P<0.05$),但 YAP 的亚细胞分布保持不变(图 5D~G)。qRT-PCR 分析显示,敲降 ATF6 后 CTGF 和 Cyr61 的 mRNA 表达均下调($P<0.05$,图 5H、I)。以上结果表明 ATF6 能调控 YAP 下游基因的转录。




a: $P<0.05$, 与 shScr 比较

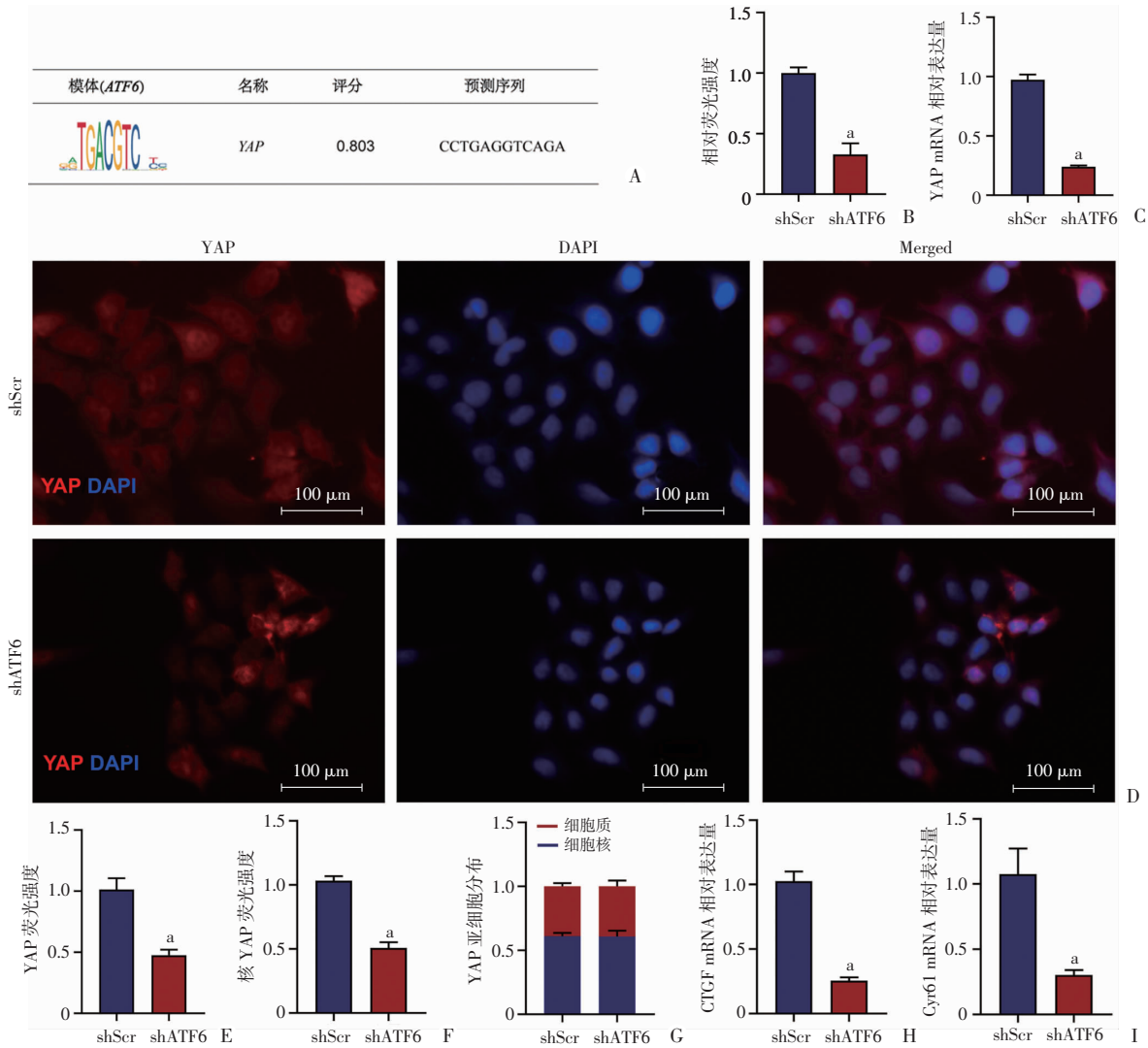
A:EdU 实验检测细胞增殖能力;B:EdU 阳性细胞率统计;C:CCK8 实验检测细胞活力;D:划痕实验检测细胞迁移能力;E:划痕实验细胞相对迁移面积统计;F:Transwell 实验检测细胞侵袭能力;G:侵袭细胞数量统计

**图 3 敲降 ATF6 后抑制 PC3 细胞增殖、迁移和侵袭能力**




A:接种细胞后肿瘤体积的变化;B:接种 7 周后同一时间段取出的对照组和 ATF6 敲降组肿瘤标本($n=5$);C:肿瘤质量统计;a:$P<0.05$,与 shScr 比较

**图 4 敲降 ATF6 抑制体内肿瘤生长**




a:$P<0.05$,与 shScr 比较

A:JASPAR 数据库预测结果;B:荧光素酶报告基因检测荧光强度;C:qRT-PCR 检测 YAP 的 mRNA 表达水平;D:免疫荧光检测 YAP 的蛋白质表达水平和亚细胞分布;E:总 YAP 蛋白质荧光强度;F:核 YAP 蛋白质荧光强度;G:YAP 蛋白质亚细胞分布;H:qRT-PCR 检测 CTGF 的 mRNA 表达水平;I:qRT-PCR 检测 Cyr61 的 mRNA 表达水平

**图 5 ATF6 调节 YAP 和下游基因的转录**

## 3 讨论

前列腺癌为最常见的男性泌尿系肿瘤,在西方国家其发病率仅次于肺癌。随着中国人口老龄化加剧等原因,我国前列腺癌发病率和死亡率近年来呈明显上升趋势,逐步成为影响我国中老年男性健康的首要问题。因此,探究前列腺癌恶性进展机制尤为重要。本课题组前期研究发现[9],ATF6 在前列腺癌组织中高表达,且与前列腺癌的恶性程度呈正相关。然而国际上 ATF6 在前列腺癌中致癌分子机制尚不明确。

ATF6 是定位于内质网上的内质网应激感受因子,通过将信号转导至顺式受体来发挥核转录因子的作用。根据课题组前期研究[9],ATF6 的高表达与前列腺癌患者高 T 分期、高 Gleason 评分以及高血清 PSA 水平明显相关,且 ATF6 高表达患者手术后发生肿瘤特异性死亡时间以及去势治疗后发生生化复发时间明显缩短,这提示 ATF6 在前列腺癌恶性进展过程中具有重要作用,但其具体作用机制尚需要进一步研究。为此本研究重点对 ATF6 在前列腺癌细胞中的作用进行研究,结果发现 ATF6 在前列腺癌细胞表达水平高于正常前列腺上皮细胞,且在 PC3 细胞中表达水平最高,通过慢病毒感染 PC3 细胞敲降 ATF6 后,能明显抑制 PC3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并且动物实验证实,敲降 ATF6 后抑制体内肿瘤生长,表明 ATF6 在前列腺癌发生发展过程中起促进作用。

YAP 是 Hippo 信号通路中的关键因子,主要参与调节细胞增殖、器官发育和肿瘤的发生[15]。YAP 可以通过影响癌细胞增殖、迁移和侵袭促进肿瘤形成[10-11]。研究表明,YAP 蛋白的表达与头颈部鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、肝细胞癌、胃癌、肾透明细胞癌以及前列腺癌的发生发展明显相关[16-22]。在前列腺癌 PC3 及 DU145 细胞中 YAP 呈高表达,且与细胞的增殖和凋亡有关[12,23]。YAP 的活性受到机械力、G 蛋白偶联受体信号传导和内质网应激的影响[24]。有研究表明,软组织肉瘤中 Yap/NF-κB 轴能抑制 ATF6,这与分化过程中的生物钟活动和存活有关[25]。还有研究表明,当用内质网应激抑制剂处理细胞时,能下调 YAP 的蛋白质水平和激活,过表达或下调人肝癌细胞 YAP 时,能促进或抑制细胞内质网应激水平,而这一过程与 ATF6 明显相关,表明内质网应激和 Hippo-YAP 通路之间存在双重调节作用[13]。因此推测 ATF6 作为内质网应激重要因子之一,通过激活 YAP 从而影响前列腺癌细胞的生物学功能。本研究通过 JASPAR 数据库预测发现,ATF6 与 YAP 启动序列之间存在结合位点,因此推测 ATF6 能够直接调控 YAP 的激活,荧光素酶报告基因结果进一步证实 ATF6 与 YAP 的直接联系。在前列腺癌 PC3 细胞中,敲降 ATF6 后明显抑制了 YAP 的转录水平。CTGF 和 Cyr61 是 YAP 的两个下游因子,由 YAP 介导的转录促进并参与许多癌症的肿瘤进展[26-28]。研究表明 YAP 在激活后转移至细胞核并与 TEAD4 结合,促进下游基因 CTGF 和 Cyr61 的转录以促进细胞增殖和迁移[29]。与敲降 ATF6 后 YAP 转录减少一致,CTGF 和 Cyr61 的 mRNA 水平也显著下调。以上结果表明,敲降 ATF6 可以直接抑制 YAP 的转录,从而参与诱导前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭。

综上所述,本研究发现 ATF6 在前列腺癌组织和前列腺癌细胞中表达升高,敲降 ATF6 能够抑制前列腺癌 PC3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,这一过程可能与 ATF6 靶向调节 YAP 转录有关,揭示了 ATF6-YAP 这一新的信号通路,提示靶向 ATF6-YAP 轴的药物可能是前列腺癌的潜在治疗策略,为前列腺癌的精准诊疗提供了新的思路。

**参考文献:**


[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al*. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33. DOI:10.3322/caac.21708.

[2] CHEN W, ZHENG R, 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.

[3] REBELLO R J, OING C, KNUDSEN K E, *et al*. Prostate cancer[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7: 9. DOI: 10.1038/s41572-020-00243-0.

[4] HILLARY R F, FITZGERALD U. A lifetime of stress: $ATF_6$ in development and homeostasis[J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 48. DOI:10.1186/s12929-018-0453-1.

[5] YAMAMOTO K, YOSHIDA H, KOKAME K, *et al*. Differential contributions of $ATF_6$ and $XBP_1$ to the activation of endoplasmic Reticulum stress-responsive Cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II[J]. J Biochem, 2004, 136(3): 343-350. DOI:10.1093/jb/mvh122.

[6] WU X P, XIN Z H, ZHANG W, *et al*. A missense polymorphism in $ATF_6$ gene is associated with susceptibility to hepatocellular carcinoma probably by altering $ATF_6$ level[J]. Int J Cancer, 2014, 135(1): 61-68. DOI: 10.1002/ijc.28649.

[7] LIU C Y, HSU C C, HUANG T T, *et al*. ER stress-related $ATF_6$ upregulates CIP2A and contributes to poor prognosis of colon cancer[J]. Mol Oncol, 2018, 12(10): 1706-1717. DOI:10.1002/1878-0261.12365.

[8] SIWECKA N, ROZPEDEK W, PYTEL D, *et al*. Dual role of endoplasmic Reticulum stress-mediated unfolded protein response signaling pathway in carcinogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): E4354. DOI:10.3390/ijms20184354.

[9] LIU J N, XIAO M L, LI J J, *et al*. Activation of UPR signaling pathway is associated with the malignant progression and poor prognosis in prostate cancer[J]. Prostate, 2017, 77(3): 274-281. DOI:10.1002/pros.23264.

[10] ZANCONATO F, CORDENONSI M, PICCOLO S. YAP/TAZ at the roots of cancer[J]. Cancer Cell, 2016, 29(6): 783-803. DOI:10.1016/j.ccell.2016.05.005.

[11] PANCIERA T, AZZOLIN L, CORDENONSI M, *et al*. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(12): 758-770. DOI:10.1038/nrm.2017.87.

[12] SHENG X, LI W B, WANG D L, *et al*. YAP is closely correlated with castration-resistant prostate cancer, and downregulation of YAP reduces proliferation and induces apoptosis of PC-3 cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 4867-4876. DOI:10.3892/mmr.2015.4005.

[13] WU H T, WEI L Y, FAN F Q, *et al*. Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis[J]. Nat Commun, 2015, 6: 6239. DOI:10.1038/ncomms7239.

[14] CASTRO-MONDRAGON J A, RIUDAVETS-PUIG R, RAULUSEVICIUTE I, *et al*. JASPAR 2022: the 9th release of the open-access database of transcription factor binding profiles[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 50(D1): D165-D173. DOI:10.1093/nar/gkab1113.

[15] YU F X, ZHAO B, GUAN K L. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer[J]. Cell, 2015, 163(4): 811-828. DOI:10.1016/j.cell.2015.10.044.

[16] GE L, SMAIL M, MENG W X, *et al*. Yes-associated protein expression in head and neck squamous cell carcinoma nodal metastasis[J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27529. DOI:10.1371/journal.pone.0027529.

[17] WANG Y, DONG Q Z, ZHANG Q F, *et al*. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Sci, 2010, 101(5): 1279-1285. DOI:10.1111/j.1349-7006.2010.01511.x.

[18] XIA Y, CHANG T, WANG Y M, *et al*. YAP promotes ovarian cancer cell tumorigenesis and is indicative of a poor prognosis for ovarian cancer patients[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e91770. DOI:10.1371/journal.pone.0091770.

[19] XU M Z, YAO T J, LEE N P, *et al*. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer, 2009, 115(19): 4576-4585. DOI:10.1002/cncr.24495.

[20] CAO J J, ZHAO X M, WANG D L, *et al*. YAP is overexpressed in clear cell renal cell carcinoma and its knockdown reduces cell proliferation and induces cell cycle arrest and apoptosis[J]. Oncol Rep, 2014, 32(4): 1594-1600. DOI:10.3892/or.2014.3349.

[21] ZHANG L, YANG S P, CHEN X C, *et al*. The hippo pathway effector YAP regulates motility, invasion, and castration-resistant growth of prostate cancer cells[J]. Mol Cell Biol, 2015, 35(8): 1350-1362. DOI:10.1128/MCB.00102-15.

[22] PAN Z J, TIAN Y Q, ZHANG B, *et al*. YAP signaling in gastric cancer-derived mesenchymal stem cells is critical for its promoting role in cancer progression[J]. Int J Oncol, 2017, 51(4): 1055-1066. DOI:10.3892/ijo.2017.4101.

[23] JIN X, ZHAO W C, ZHOU P, *et al*. YAP knockdown inhibits proliferation and induces apoptosis of human prostate cancer DU145 cells[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 3783-3788. DOI:10.3892/mmr.2017.8352.

[24] YU F X, ZHAO B, PANUPINTHU N, *et al*. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling[J]. Cell, 2012, 150(4): 780-791. DOI:10.1016/j.cell.2012.06.037.

[25] RIVERA-REYES A, YE S, E MARINO G, *et al*. YAP1 enhances NF-κB-dependent and independent effects on clock-mediated unfolded protein responses and autophagy in sarcoma[J]. Cell Death Dis, 2018, 9: 1108. DOI:10.1038/s41419-018-1142-4.

[26] CHENG T Y, WU M S, HUA K T, *et al*. Cyr61/CTGF/Nov family proteins in gastric carcinogenesis[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(7): 1694-1700. DOI:10.3748/wjg.v20.i7.1694.

[27] HSU Y L, HUNG J Y, CHOU S H, *et al*. Angiomotin decreases lung cancer progression by sequestering oncogenic YAP/TAZ and decreasing Cyr61 expression[J]. Oncogene, 2015, 34(31): 4056-4068. DOI:10.1038/onc.2014.333.

[28] LAI D, HO K C, HAO Y W, *et al*. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF[J]. Cancer Res, 2011, 71(7): 2728-2738. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-2711.

[29] SHOME D, VON WOEDTKE T, RIEDEL K, *et al*. The HIPPO transducer YAP and its targets CTGF and Cyr61 drive a paracrine signalling in cold atmospheric plasma-mediated wound healing[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 4910280. DOI:10.1155/2020/4910280.

(**收稿**:2022-08-02;**修回**:2022-09-09)

(编辑 刘秋池)