基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003595

DLC-1通过Rho通路抑制耐恩杂鲁胺前列腺癌细胞的增殖与侵袭能力

汤洋斌，杨　果，吴小候，全　真
（重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆　421800）

【摘　要】**目的**：探索肝癌缺失因子1（deleted in liver cancer 1，DLC-1）对耐恩杂鲁胺前列腺癌（prostate cancer，PCa）细胞增殖，侵袭和凋亡的影响以及作用机制。**方法**：体外以不同浓度的恩杂鲁胺药物培养人前列腺癌lncap及C4-2细胞株6个月以上，构建恩杂鲁胺耐药细胞系lncap-R，C4-2-R。CCK-8法检测其IC_{50}，验证恩杂鲁胺耐药株是否构建成功。利用慢病毒转染lncap-R，C4-2-R，以敲低和过表达DLC-1，采用克隆实验、Transwell实验和流式细胞术检测DLC-1对耐恩杂鲁胺的前列腺癌细胞的增殖、侵袭和凋亡的影响。**结果**：与对照组相比，过表达组DLC-1显著抑制了2个耐药株的增殖和侵袭进程。机制上，WB实验结果表明DLC-1表达与2个耐药株中Rho蛋白的表达呈负相关。Rho抑制剂rhosin逆转了因敲低DLC-1后lncap-R细胞凋亡减少的情况。**结论**：DLC-1可以下调耐药株中的Rho蛋白的表达，并抑制耐药株的增殖和侵袭。

【关键词】肝癌缺失因子1；前列腺癌；恩杂鲁胺；Rho蛋白；增殖；侵袭
【中图分类号】R737.25　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2024-03-14

Deleted in liver cancer-1 inhibits the proliferation and invasion of enzalutamide-resistant prostate cancer cells via the Rho pathway

Tang Yangbin，Yang Guo，Wu Xiaohou，Quan Zhen
（*Department of Urology，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the effect of deleted in liver cancer-1（DLC-1）on the proliferation，invasion，and apoptosis of enzalutamide-resistant prostate cancer cells and its mechanism of action. ***Methods***：Hμmol/Lan prostate cancer lncap and C4-2 cell lines were cultured *in vitro* with different concentrations of enzalutamide for more than 6 months，and enzalutamide-resistant cell lines were constructed as lncap-R and C4-2-R. IC_{50} was measured by CCK-8 assay to verify the successful construction of enzalutamide-resistant cell lines. lncap-R and C4-2-R were transfected by lentivirus to achieve the knockdown and overexpression of DLC-1，and colony formation assay，Transwell assay，and flow cytometry were used to observe the effect of DLC-1 on the proliferation，invasion，and apoptosis of enzalutamide-resistant prostate cancer cells. ***Results***：Compared with the control group，the overexpression group showed that DLC-1 significantly inhibited the proliferation and invasion of the two enzalutamide-resistant cell lines. As for mechanism of action，Western blot showed that the expression of DLC-1 was negatively correlated with the expression of Rho protein in both enzalutamide-resistant cell lines. The Rho inhibitor rhosin reversed the reduction in the apoptosis of lncap-R cells due to knockdown of DLC-1. ***Conclusion***：DLC-1 can downregulate the expression of Rho protein in drug-resistant cell lines and inhibit their proliferation and invasion.

【**Key words**】deleted in liver cancer-1；prostate cancer；enzalutamide；Rho protein；proliferation；invasion

前列腺癌（prostate cancer，PCa）作为最常见的泌尿系恶性实体肿瘤，其发病率在男性群体中高居第2位，并且死亡率高居第5位[1]。随着我国日渐加剧的人口老龄化程度，以及相关筛查方法的普及，如前列腺特异性抗原（Prostate Specific Antigen，

作者介绍：汤洋斌，Email：3071019337@qq.com，
研究方向：泌尿系统疾病。
通信作者：全　真，Email：tyb15073492311@163.com 。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81802543）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241023.0947.006
（2024-10-23）

PSA）[2]，泌尿系超声等相关检查，前列腺癌的早期诊断率和发病率逐年上升。对于前列腺癌患者，尽管我国家现在已有外科手术、放疗、雄激素剥夺治疗（androgen deprivation therapy，ADT）等治疗方式[3]，但以上的这些方法更多的是用于患者的局部治疗，而且前列腺癌患者的5年生存率并未达到令人满意的程度。此外，部分前列腺癌患者采用雄激素剥夺治疗方案后，最终还是会无法避免地进展到去势抵抗性阶段，即去势抵抗性前列腺癌[4]（castration-resistant prostate cancer，CRPC）。对于CRPC患者，目前并没有非常有效的治疗方案，这也是导致CRPC患者死亡[5]的重要原因。为此，对于CRPC的研究至今仍然是泌尿系统疾病中难题之一。

恩杂鲁胺（Enzalutamide，ENZ）是作为新一代的雄激素受体（androgen receptor，AR）拮抗剂[6]，可以在更大程度上竞争性地抑制雄激素与AR的结合[7]。除此以外，恩杂鲁胺还可以阻止雄激素受体的在细胞核的转运以及AR与DNA的相互作用[8]。基于以上的机制，恩杂鲁胺药物对CRPC患者的治疗具有良好效果，但是依然会有部分患者在短时间内出现药物抵抗现象[9]，最后导致治疗失败。因此，探寻恩杂鲁胺的耐药机制对于临床治疗前列腺癌具有重大意义。

肝癌缺失因子1（deleted in liver cancer 1，DLC-1），位于染色体8p21-22区域[10]。最早开始于肝癌细胞中研究，在肝癌等多种实体瘤的研究中发现其表达下调或缺失[11]。DLC-1可以激活GPT酶激活蛋白（GPTase-activating protein，GAP），而GAP作为一种小分子开关，在细胞的内部起到负性调节激活型GTP-Rho到非激活型GDP-Rho的重要过程[12]，激活的Rho蛋白可在细胞信号转导[13]和细胞的骨架重塑[14]中起重要作用。然而，lncap-R细胞，C4-2-R细胞中DLC1的潜在分子网络仍需进一步探索。

1 材料与方法

1.1 恩杂鲁胺耐药株的构建

lncap细胞通过在含10%的活性炭剥离血清的培养基中连续培养6个月建立雄激素非依赖性lncap细胞（lncap Androgen Independence，lncap-AI），再通过在不同浓度的恩杂鲁胺（1、2、5、10、20 μmol/L）培养基中连续培养6个月建立lncap-R细胞。C4-2细胞在10、20、40 μmol/L恩杂鲁胺培养基中连续培养6个月以上建立C4-2-R细胞。

1.2 试剂

结晶紫（索莱宝科技公司），PBS（碧云天公司），RPMI1640和胎牛血清（Gibco公司），青霉素-链霉素（碧云天公司），胰蛋白酶（Sigma-Aldrich公司），DMSO（生工生物工程公司），CCK-8试剂盒（碧云天公司），DLC-1抗体及Rho抗体（Abmart公司）。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 lncap细胞，C4-2细胞均为课题组前期保存。lncap细胞和C4-2细胞均在含10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素的1640培养基中进行培养。Lncap-AI细胞在10%木炭剥离胎牛血清及1%青霉素-链霉素的1640培养基中进行培养。而Lncap-R，C4-2-R则在含10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素以及不同浓度的恩杂鲁胺的1640培养基中进行培养。

1.3.2 细胞转染 于擎科公司购买DLC1-1的过表达和敲低质粒，使用293T细胞进行慢病毒包装。取生长状态良好的对数生长期的lncap-R细胞，C4-2-R细胞接种在12孔细胞培养板，待细胞密度至60%，使用碧云天Lipo3000转染试剂按说明书进行转染，24 h后更换为新鲜完全培养基，48 h后观察转染效率，72 h后加入嘌呤霉素进行筛选。

1.3.3 实时荧光定量聚合酶链反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，q-PCR） 采用TRIZOL方法提取lncap-R细胞和C4-2-R细胞中的总RNA，随后利用逆转录技术反转成cDNA，采用q-PCR方法检测lncap-R细胞和C4-2-R细胞中的DLC-1 RNA表达情况，最后使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法分析2株细胞中DLC-1的相对表达情况。在提取细胞中的总蛋白后，需要使用BCA法测量蛋白样本的浓度，并选择合适的蛋白样本进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。接着，使用伯乐湿转装置进行转膜，将凝胶转移到PVDF膜上。随后，使用25%浓度的脱脂奶粉进行2 h的封闭，再加入一抗在4 ℃孵育10 h。之后，用TBST洗涤6次，每次5 min，加入二抗在室温蜡板上孵育2 h，再进行6次洗涤，每次5 min，最后使用bio-rad仪器进行发光显影。

1.3.4 CCK-8实验 将每组细胞分别接种于96孔板，并在0、24、48、72 h后进行处理。随后吸除培养基，添加CCK-8试剂，放回细胞培养箱中避光孵育1.5 h。最后使用酶标仪检测每组在450 nm处的吸光度来计算细胞存活率。细胞存活率的计算公式为：细胞存活率=[（实验组吸光度-空白孔吸光度）/（对照组吸光度-空白孔吸光度）]×100%。

1.3.5 流式细胞术 以5×10^5个/L的密度将细胞传代于6孔板中，培养48 h，按需求将细胞分组，每组设3个复孔，吸弃

培养液，PBS 清洗 2 次，加入不含 EDTA 的胰酶 1 mL/孔，消化 2 min，离心收集沉淀细胞。用 1 mL PBS 将细胞重悬，吹打均匀，继续离心，转速 1 000 r/min，3 min，收集细胞。最后将样本送到流式仪室进行后续实验，数据由软件 CytExpert 进行分析。

1.3.6 细胞克隆实验 经过对数生长期细胞的消化和计数后，将细胞悬液重悬于完全培养基中，并在 6 孔板培养板中接种 1 000 个/孔作为实验组。随后持续培养至第 14 天，直到大多数单个克隆中的细胞数超过 50。完成克隆后，进行 PBS 洗涤并固定，然后进行结晶紫染色。6 孔板流水冲洗干净，风干后进行拍照。

1.3.7 Transwell 实验 取生长状态良好，处于对数期并且无污染的细胞，胰酶消化 2 min，吹打制成单细胞悬液。transwell 下室中加入含有 20% 胎牛血清的完全培养基 600 μL，将单细胞悬液加入铺有基质胶的小室内。二氧化碳细胞培养箱中孵培育 48 h。取出小室，PBS 洗涤 2 遍，使用甲醇固定 15 min。随后每个小室加入结晶紫染色 20 min，PBS 洗涤 2 遍，风干后，正置荧光显微镜下使用白光模式进行拍照和计数。

1.4 统计学方法

用 GraphPad Prism9.5 进行相关数据统计学处理。多组间比较采用单因素方差分析，两样本比较采用 t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 成功构建耐恩杂鲁胺 lncap-R 和 C4-2-R 细胞

对 lncap 和 C4-2 细胞分别在 20 μmol/L 和 40 μmol/L 的恩杂鲁胺培养基中持续培养 6 个月，直至 2 株细胞可以在恩杂鲁胺培养基中可以稳定传代培养，命名为 lncap-R 和 C4-2-R。CCK8 对亲本细胞和耐药细胞测定 IC_{50}，结果显示 lncap 和 lncap-R 的 IC_{50} 分别为 11.78 μmol/L、51.33 μmol/L，lncap-R 的耐药指数（resistance index，RI）为 4.35（图 1A）。C4-2、C4-2-R 细胞的 IC_{50} 分别为 28.90 μmol/L、74.18 μmol/L，C4-2-R 的 RI 为 2.56（图 1B）。

2.2 过表达 DLC-1，可以抑制耐药株的增殖

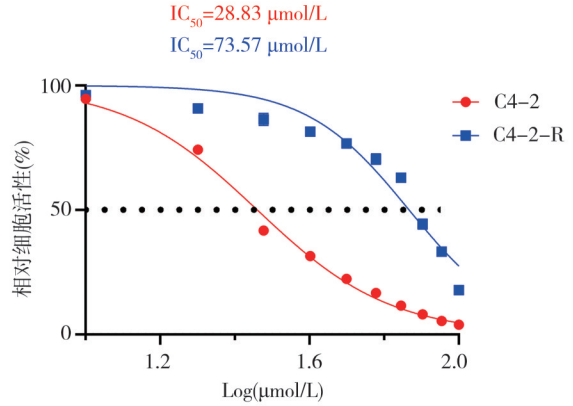
为了研究 DLC-1 在耐恩杂鲁胺 lncap-R 和 C4-2-R 细胞的作用功能，本课题组在 2 株耐药株中对 DLC-1 进行了过表达，进行克隆实验以检测耐药株的增殖能力。q-PCR 和 WB 实验证明，在 2 株耐药株中成功过表达 DLC-1（图 2A、B）。对比 NC 组，oe-DLC-1 组中的细胞克隆团数明显减少（图 2C），并且具有统计学意义（P<0.05）（图 2D）。

2.3 敲低 DLC-1，可以增加耐药株的侵袭能力

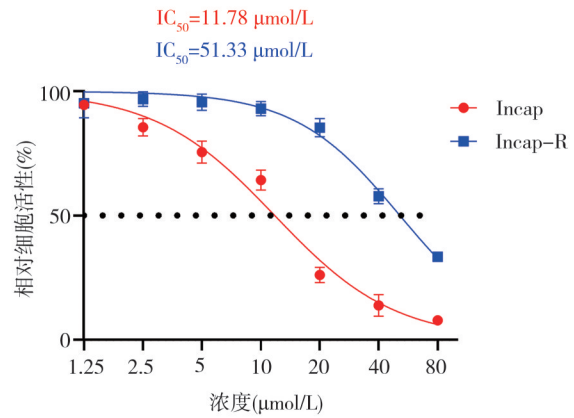
为了进一步研究 DCL-1 的作用，在 2 株耐药株中对 DLC-1 进行了敲低。Q-PCR 和 WB 实验证明，本课题组在 2 株耐药株中成功敲低 DLC-1（图 3A、B）。进行 Transwell 实验以检测耐药株的侵袭能力，对比 NC 组，sh-DLC-1 组中的细胞侵袭能力明显增加，并且差异有统计学意义（P<0.05）（图 3C、D）。

2.4 DLC-1 通过 Rho 通路调节耐恩杂鲁胺 lncap-R 细胞的凋亡

最后，为了探究 DLC-1 的作用机制，本课题组使用 String 数据库对 DLC-1 进行 PPI 蛋白质网络互作图，发现其下游分子包括 Rho 通路（图 4A）。为了进一步分析 DLC-1 和 Rho 通路之间的联系，特异性 Rho 抑制剂 rhosin 用于处理 lncap-R 细胞的 NC 组和 sh-DLC1 组细胞。如图 4B 所示，对比 NC 组和 sh-DLC-1 组，NC+rhoisn 组和 sh-DLC-1+rhosin 组中的 Rho 表达量进一步下降。rhosin 显著增加了 NC 组和 sh-DLC-1 组细胞的凋亡率（图 4C）。综上所述，这些结果表明，Rho 抑制剂 rhosin 在挽救 lncap-R 细胞中 DLC1 的功能中发挥了重要作用。

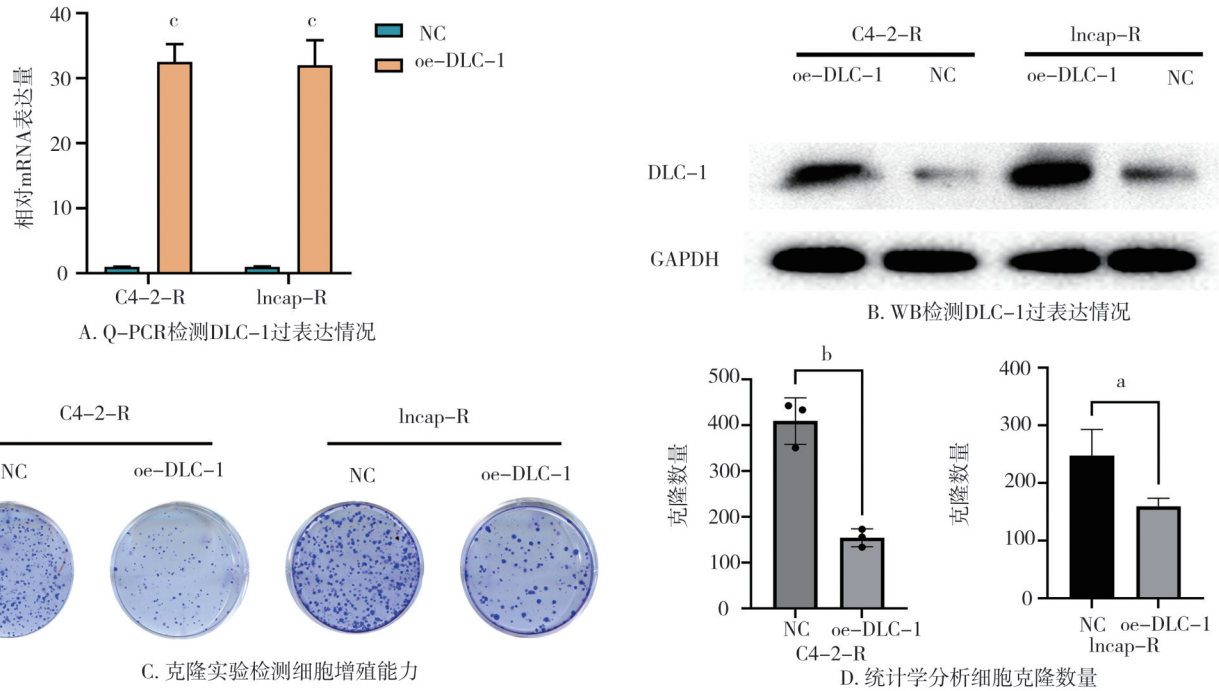


A. CCK8检测C4-2和C4-2-R细胞的细胞活性



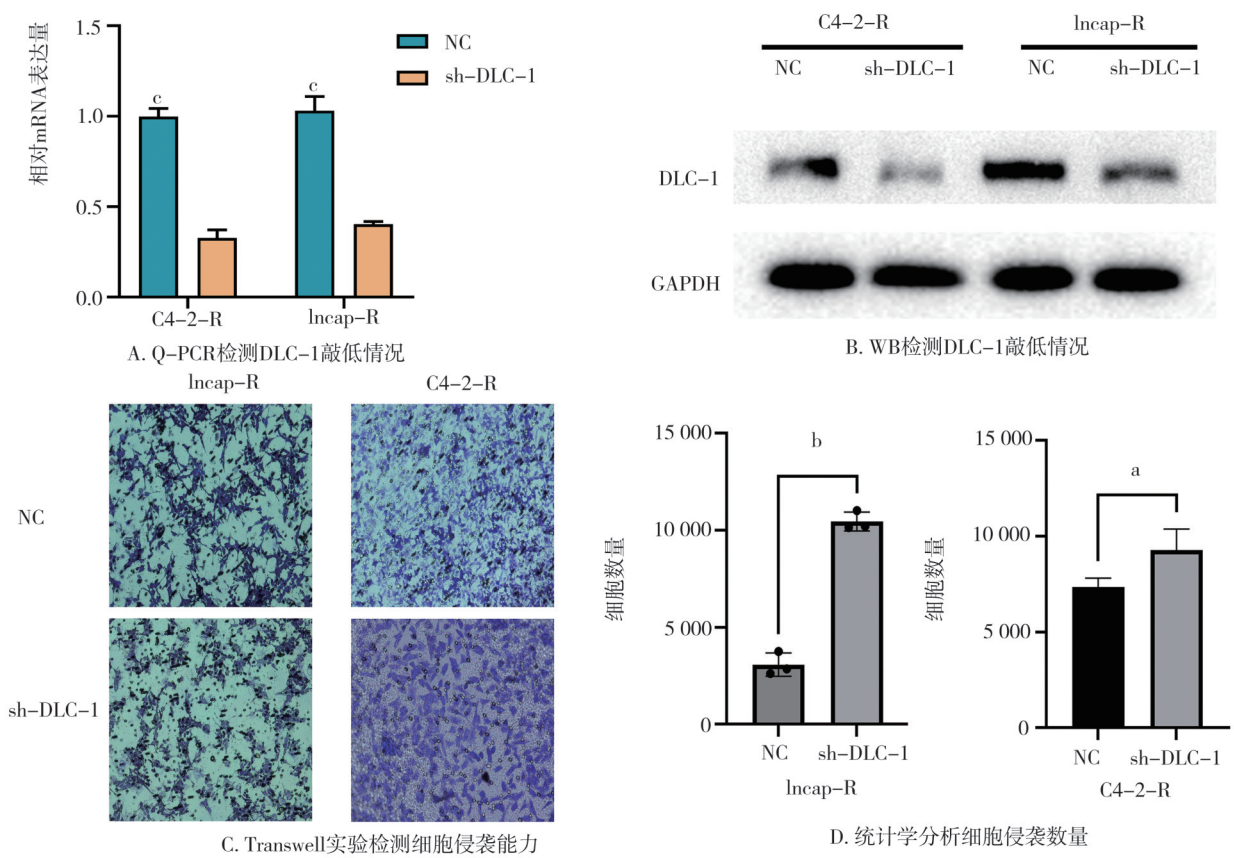
B. CCK8检测lncap和lncap-R细胞的细胞活性

图 1 构建耐恩杂鲁胺 lncap-R 和 C4-2-R 细胞



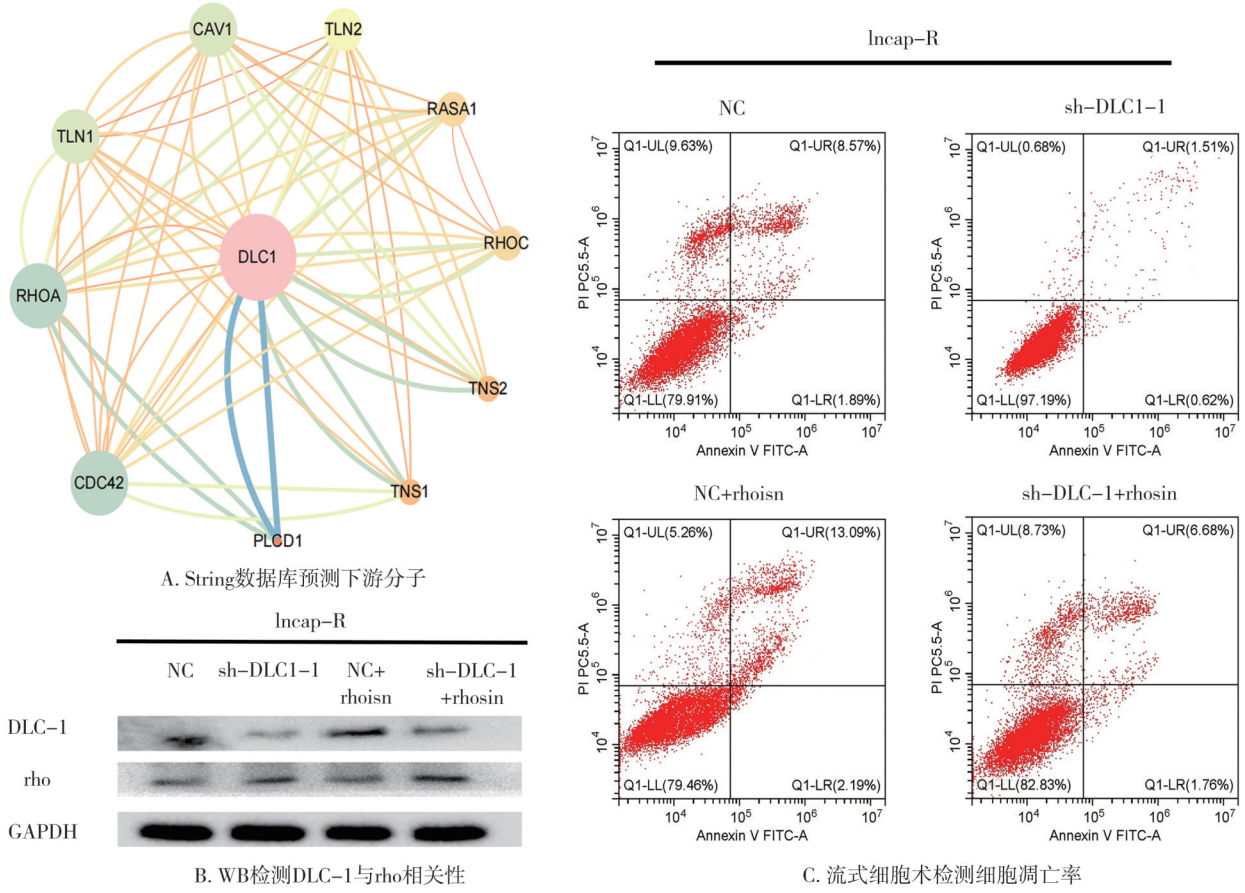
注：a，与NC组对比，oe-DLC-1组细胞克隆数量减少，且2组间的差异具有统计学意义，$P<0.05$；b，与NC组对比，oe-DLC-1组细胞克隆数量减少，且2组间的差异具有统计学意义，$P<0.01$；c，与NC组对比，oe-DLC-1表达量增加，且2组间的差异具有统计学意义，$P<0.001$

图2　DLC-1调节lncap-R和C4-2-R细胞的增殖能力



注：a，与NC组对比，sh-DLC-1组细胞侵袭数量增加，且2组间的差异具有统计学意义，$P<0.05$；b，与NC组对比，sh-DLC-1组细胞侵袭数量增加，且2组间的差异具有统计学意义，$P<0.0001$；c，与NC组对比，sh-DLC-1表达量降低，且2组间的差异具有统计学意义，$P<0.001$

图3　DLC-1调节lncap-R和C4-2-R细胞的侵袭能力



A. String数据库预测下游分子

B. WB检测DLC-1与rho相关性

C. 流式细胞术检测细胞凋亡率

图4　DLC-1通过rho通路调节耐恩杂鲁胺lncap-R细胞的凋亡

3　讨　论

前列腺癌是老年男性最常见恶性肿瘤疾病之一[15]，因环境、人种和地区等因素的不同，所以各个地方前列腺癌患病率也具有较大的差异，其中欧美等发达地区的发病率最高[16]。但是在近些年，我国前列腺癌发病率呈现升高的趋势，主要原因是我国人口结构呈现老龄化趋势、筛查方法如PSA检测法的普及，男性平均寿命的延长等各种原因。

雄激素是前列腺癌维持生长和进展所必需的物质。据统计，我国近半成的患者首次发现前列腺癌即为晚期[17]。晚期前列腺癌的主要治疗手段为新内分泌治疗，通过雄激素剥夺治疗有一定的治疗效果。然而ADT治疗后，部分患者最终会进展为CRPC，并且预后较差。然而目前，针对CRPC的研究较少，且发生机制并不明确。目前其发病机制主要为以下几个方面：AR扩增和突变[18]、AR的异常活化或修饰[19]、AR剪接变异体[20]。但确定的是，一旦进展到该阶段，患者的生存时间将大大减少。所以，如何提高CRPC患者的生活质量和生存时间，是泌尿医生急需探索解决的一个重大难题。通过临床辅助检查证据表明，CRPC的发生与雄激素受体具有很强的相关性[21]。

作为第2代的靶向雄激素受体拮抗剂，恩杂鲁胺不仅可以抑制雄激素与AR的结合，还可以阻止AR在核内的转运。因此CRPC患者服用恩杂鲁胺后，能有效延长CRPC患者的生存时间[22]，治疗效果表现良好。但依然有部分患者对其产生耐药性，最终会出现都对恩杂鲁胺的耐药情况[23]。

本研究结果表明在2株耐药株中，过表达DLC-1明显抑制了耐药株的侵袭能力。此外，本研究结果阐明了DLC-1是恩杂鲁胺耐药细胞中的肿瘤抑制因子。此外，本研究分析表明DLC1和Rho蛋白在恩杂鲁胺耐药细胞中呈负相关。DLC1可能通过抑制Rho通路来抑制恩杂鲁胺耐药细胞的增殖和侵袭。

在本次研究中，本研究在2株恩杂鲁胺耐药细胞中验证了DLC-1的生物学功能，使用慢病毒载体对DLC1进行敲低和过表达。且2个实验部分获得的结果是一致的，这使得本研究的结果更加可靠。更重要的是，本研究发现Rho抑制剂可以挽救敲低DLC-1在耐药株中的增殖能力。因此，rhosin是治疗恩杂鲁胺耐药患者的潜在药物，靶向Rho信号通路，可能为恩杂鲁胺耐药患者的治疗提供新的思路。

参 考 文 献

[1] Siegel DA, O'Neil ME, Richards TB, et al. Prostate cancer incidence and survival, by stage and race/ethnicity - United States, 2001-2017[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2020, 69(41): 1473-1480.

[2] Zhou ZE, Xu YY, Li QY, et al. Prognostic significance of a novel indicator (PSA_{postd3}/PSA_{pre}) for PSA recurrence in patients after radical prostatectomy[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 5777-5783.

[3] Schmidt-Hegemann NS, Zamboglou C, Mason M, et al. ESTRO-ACROP recommendations for evidence-based use of androgen deprivation therapy in combination with external-beam radiotherapy in prostate cancer[J]. Radiother Oncol, 2023, 183: 109544.

[4] Liu PY, Wang WX, Wang F, et al. Alterations of plasma exosomal proteins and motabolies are associated with the progression of castration-resistant prostate cancer[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 40.

[5] Cheng Q, Butler W, Zhou YL, et al. Pre-existing castration-resistant prostate cancer-like cells in primary prostate cancer promote resistance to hormonal therapy[J]. Eur Urol, 2022, 81(5): 446-455.

[6] Agarwal N, Azad AA, Carles J, et al. Talazoparib plus enzalutamide in men with first-line metastatic castration-resistant prostate cancer (TALAPRO-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2023, 402(10398): 291-303.

[7] Armstrong AJ, Iguchi T, Azad AA, et al. The efficacy of enzalutamide plus androgen deprivation therapy in oligometastatic Hormone-sensitive prostate cancer: a post hoc analysis of Arches[J]. Eur Urol, 2023, 84(2): 229-241.

[8] Han H, Wang Y, Curto J, et al. Mesenchymal and stem-like prostate cancer linked to therapy-induced lineage plasticity and metastasis [J]. Cell Rep, 2022, 39(1): 110595.

[9] Wang JX, Zeng LL, Wu NS, et al. Inhibition of phosphoglycerate dehydrogenase induces ferroptosis and overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells[J]. Drug Resist Updat, 2023, 70: 100985.

[10] Basak P, Dillon R, Leslie H, et al. The Deleted in Liver Cancer 1 (Dlc1) tμmol/Lor suppressor is haploinsufficient for mammary gland development and epithelial cell polarity[J]. BMC Cancer, 2015, 15: 630.

[11] Liao YC, Lo SH. Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): a tμmol/Lor suppressor not just for liver[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(5): 843-847.

[12] Ren GH, Li GR. Tμmol/Lor suppressor gene DLC1: its modifications, interactive molecules, and potential prospects for clinical cancer application[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 182: 264-275.

[13] Niu N, Ma XJ, Liu HT, et al. DLC1 inhibits lung adenocarcinoma cell proliferation, migration and invasion via regulating MAPK signaling pathway[J]. Exp Lung Res, 2021, 47(4): 173-182.

[14] Mosaddeghzadeh N, Ahmadian MR. The RHO family GTPases: mechanisms of regulation and signaling[J]. Cells, 2021, 10(7): 1831.

[15] Nguyen-Nielsen M, Borre M. Diagnostic and therapeutic strategies for prostate cancer[J]. Semin Nucl Med, 2016, 46(6): 484-490.

[16] Alajati A, D'Ambrosio M, Troiani M, et al. CDCP1 overexpression drives prostate cancer progression and can be targeted *in vivo*[J]. J Clin Invest, 2020, 130(5): 2435-2450.

[17] Alyamani M, Li J, Patel M, et al. Deep androgen receptor suppression in prostate cancer exploits sexually dimorphic renal expression for systemic glucocorticoid exposure[J]. Ann Oncol, 2020, 31(3): 369-376.

[18] Bultijnck R, Deforche B, Borrey N, et al. Exercise prescription dose for castrate-resistant prostate cancer patients: a phase I prescription dose escalation trial[J]. World J Urol, 2021, 39(2): 357-364.

[19] Cerasuolo M, Maccarinelli F, Coltrini D, et al. Modeling acquired resistance to the second-generation androgen receptor antagonist enzalutamide in the TRAMP model of prostate cancer[J]. Cancer Res, 2020, 80(7): 1564-1577.

[20] Chen XL, Liu JH, Cheng LJ, et al. Inhibition of noncanonical Wnt pathway overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer[J]. Prostate, 2020, 80(3): 256-266.

[21] Dai C, Heemers H, Sharifi N. Androgen signaling in prostate cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017, 7(9): a030452.

[22] Mukherji D, Omlin A, Pezaro C, et al. Metastatic castration-resistant prostate cancer (CRPC): preclinical and clinical evidence for the sequential use of novel therapeutics[J]. Cancer Metastasis Rev, 2014, 33(2/3): 555-566.

[23] Wang YY, Chen JY, Wu ZJ, et al. Mechanisms of enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer and therapeutic strategies to overcome it[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(2): 239-261.

（责任编辑：李青颖）