

RFX1 在前列腺癌细胞中的作用及机制的研究

姓名
杜文婷

指导小组成员

李瑶 教授

目 录

摘要	1
Abstract	2
前言	3
材料与方法	8
结果	14
讨论	24
参考文献	28
致谢	30

摘要

前列腺癌是常见的男性恶性肿瘤之一，对于前列腺癌由依赖型向非依赖型转化的研究一直是寻找前列腺癌有效治疗方法的关键所在。雄激素相关的细胞内信号通路对前列腺癌的发生发展及依赖型向非依赖型转化有重要作用。本文通过 mRNA 表达谱芯片数据分析及验证，发现在雄激素刺激后表达发生明显变化的转录因子 Regulatory factor X 1 (RFX1)；运用 RNA 干扰技术和 RT-PCR，验证了雄激素受体能调控 RFX1 的表达；运用 RNA 干扰技术和 CCK-8 检测试剂盒，发现 RFX1 在 LNCaP 及 PC-3 细胞中能促进细胞增殖；运用 RNA 干扰技术和流式细胞仪检测，发现 RFX1 在 LNCaP 及 PC-3 细胞中能抑制细胞凋亡、促进细胞 G1/S 期转化；运用 RNA 干扰技术和 RT-PCR、Western Blot，在 mRNA 和蛋白水平证实 RFX1 能促进 HK2、PFKFB2 和 PFKFB3 等糖酵解酶的表达，并通过 genomatix 数据库找到 PFKFB3 上下游的 RFX1 结合位点。以上实验结果说明 RFX1 能通过促进 HK2、PFKFB2 和 PFKFB3 等糖酵解酶的表达，促进糖酵解，进而促进细胞增殖；RFX1 在雄激素依赖及非依赖的细胞系中都能通过抑制细胞凋亡、促进 G1/S 期转化来促进细胞增殖，提示 RFX1 对前列腺癌细胞的生长及前列腺癌非依赖型的转化有重要作用。

关键词：

前列腺癌，RFX1，雄激素受体，雄激素非依赖型前列腺癌，糖酵解

Abstract

Prostate cancer is one of the common male malignancies. The key of finding effective therapeutic methods for prostate cancer always lies in the study of transformation from androgen dependent prostate cancer to androgen independent prostate cancer. Androgen-related intracellular signaling pathways are of great importance in the development of prostate cancer and the transformation from androgen dependent prostate cancer to androgen independent prostate cancer. This paper finds that the expression of transcription factor Regulatory factor X 1 (RFX1) is significantly changed after androgen stimulation by mRNA expression chip, verifies that androgen receptor can regulate the expression of RFX1 by RNA interference and RT-PCR, shows that RFX1 can promote proliferation in LNCaP and PC-3 cells by RNA interference and CCK-8, shows that RFX1 can suppress apoptosis and promote the transformation from G1 phase to S phase in LNCaP and PC-3 cells by RNA interference and flow cytometry, shows that RFX1 can enhance the expression of several crucial enzymes of glycolysis, such as HK2, PFKFB2 and PFKFB3, in both mRNA and protein level by RNA interference, RT-PCR and Western Blotting and finds the binding sites of RFX1 in the upstream and downstream of gene PFKFB3 by genomatrix database. All the results above prove that RFX1 can enhance the expression of HK2, PFKFB2 and PFKFB3, strengthen glycolysis and promote proliferation, prove that RFX1 can promote cell proliferation through the promotion of G1/S transformation and the depression of apoptosis in both androgen-dependent prostate cancer cells and androgen-independent prostate cancer cells, and indicate that RFX1 plays an important part in the growth of prostate cancer cells and the transformation from androgen-dependent prostate cancer to androgen-independent prostate cancer.

Keywords,

Prostate cancer, RFX1, Androgen receptor, Androgen independent prostate cancer, Glycolysis

前言

1 前列腺癌的研究进展

前列腺癌是常见的男性恶性肿瘤之一。在中国，前列腺癌的发病率呈现快速增长的趋势，在男性十大恶性肿瘤中的排名由原来的第九位迅速上升至第五位。在欧美等国家，前列腺癌的死亡率在各种癌症中排名第二。当前列腺癌局限于前列腺内时，早期治疗通常采用前列腺切除术或放射治疗等手段，但大多数前列腺癌患者的临床确诊较晚，以上方法效果欠佳。自从前列腺癌细胞的生长对雄激素存在依赖性的观点被证实后，雄激素饥饿治疗成为近年来的一种主要治疗手段。但是大多数前列腺癌细胞在接受雄激素饥饿治疗后对雄激素的依赖性会逐渐减弱，最终由雄激素依赖性的前列腺癌发展为雄激素非依赖性的前列腺癌（Androgen independent prostate cancer, AIPC）。无论是早期的前列腺癌还是晚期的前列腺癌，它们的发生和演化都与雄激素信号通路密切相关。雄激素结合细胞内的雄激素受体（Androgen receptor, AR）后会激活其活性。雄激素受体受到配体雄激素的激活后，可介导下游一系列基因的表达。这种基因表达谱的特异性，造成了前列腺细胞的癌变以及前列腺癌细胞的转化。所以，雄激素受体调控的基因表达一直是前列腺癌生物学研究中的热点^{[1][2][3][4]}。

2 AR 信号通路

睾酮是人体产生的主要雄激素，主要由睾丸间质细胞释放，少量由肾上腺产生。游离的睾酮不会和类固醇激素结合蛋白结合，可以进入前列腺细胞，在前列腺细胞中转化成更有效的代谢物二氢睾酮（DHT）。DHT 和睾酮都能和 AR 结合，但是 DHT 与 AR 的亲合性比睾酮高得多。AR 是 I 型甾体激素受体家族的成员之一，是一种核转录因子，能激活和调控很多与生长和增殖有关基因的表达。AR 基因位于 X 染色体上，全长 90kb，编码一个大小约为 99kd 的蛋白。AR 蛋白包含三个区域：DNA 结合域、配体结合域和 N 端结构域。抑制 N 端结构域可以降低 AR 的转录活性，说明这个区域对 AR 的转录激活作用意义重大。配体结合域是与雄激素结合的区域，与雄激素结合后会发生构象的变化，并从细胞质中的热休克蛋白中分离，转移到核中定位。在细胞核中，AR 通过 DNA 结合域与 AR 反应元件（androgen response element, ARE）结合，招

募更多的辅助因子形成复合物，调控基因的表达^[5]。AR 还可以同其他转录调控因子协同作用，通过改变靶基因的染色质结构和组蛋白修饰来调控下游靶基因的表达。

受 AR 调控的下游靶基因在雄激素激活的 AR 信号通路中参与了细胞的很多生理过程，因此，寻找受 AR 调控的靶基因对于研究雄激素介导的信号通路非常重要。近年来，已鉴定出一批受 AR 调控的基因，如：前列腺特异性抗原（Prostate specific antigen, PSA）^[6]、miR-125B2^[7]、II 型跨膜丝氨酸蛋白酶 2（TTSP2）^{[8][9]}等，这些基因在一定程度上促进了前列腺癌的发生和发展。

3 RFX1

RFX1 是调节因子 X 基因家族的成员之一。RFX1 编码的转录因子含有一个高度保守的翼状螺旋 DNA 结合域，其结构和调节因子 X2、X3、X4 及 X5 等相关。RFX1 是一种转录激活因子，可以作为单体与 DNA 结合，或者与 RFX 家族的其他成员形成复合物再与 DNA 结合。RFX1 可以结合在 MHC II 基因的 X 盒上，是 MHC II 的表达所必需的^[10]。

RFX1 可以与 TGFβ2 的启动子结合，抑制其表达，从而通过抑制 TGFβ2-ERK 信号通路来抑制神经母细胞瘤细胞的增殖，这种功能也存在于人脑瘤组织中。在乳腺癌中，RFX1 可以与 JNK 及 AP4 形成复合物，结合到 SHP1 的启动子上，激发 SHP1 的表达，从而抑制乳腺癌细胞的增殖^[11]。以上研究说明 RFX1 对肿瘤的发生发展有重要的作用。

4 雄激素非依赖型前列腺癌的转化

对于前列腺癌依赖型向非依赖型转化的研究一直是寻找前列腺癌有效治疗方法的关键所在，目前对于转化机制的主要观点如下：大多数雄激素非依赖的前列腺细胞中 AR 信号通路仍在发挥作用，在雄激素欠缺的条件下增强 AR 信号通路的机制有：AR 基因的扩增；AR 基因的突变；AR 辅助因子浓度平衡的改变；类固醇激素合成前体的增加以及“非法”途径对 AR 的激活。除了 AR 信号通路外，其他不依赖 AR 的旁路途径在雄激素非依赖型前列腺癌中也会发挥异常的作用。表观遗传的改变和 miRNA 在转录后水平上的调控在激素非依赖型前列腺癌的演化过程中也发挥了作用^[5]。

大约 25%-30%的前列腺癌中都存在 AR 基因扩增的现象，对临床样本的研究发现这种扩增现象是雄激素饥饿治疗的副产物。基因的扩增可以导致 AR 蛋白的过量表达，从而增强 AR 信号通路，使 AR 通路的信号传导在雄激素水平低于正常的情况下也能发挥正常强度的作用。AR 基因表观遗传水平的变化和 miRNA 的转录后调控也能导致 AR 蛋白的过量表达^[12]。

AR 的突变是前列腺癌细胞向雄激素非依赖性转化的另一种途径。AR 位点的突变水平在早期前列腺癌中很低（0%-4%），但是在晚期和复发性前列腺癌中很高。特殊的 AR 位点的突变（如 N 端突变、DBD 区域的突变、剪接体的改变、点突变或缺失导致形成 AR 融合蛋白等）可以改变 AR 的作用^[13]。

AR 对靶基因的转录调控作用需要辅助因子的参与，在雄激素缺乏的情况下，这些辅助因子浓度的变化也可以促进雄激素相关基因的表达，并增强 AR 的活性，维持 AR 信号通路对细胞增殖等的调控，促进前列腺癌细胞在雄激素短缺的条件下生存^[5]。

雄激素及其前体的产生过程发生变化也可能导致雄激素非依赖型的转化。在雄激素非依赖的前列腺癌细胞中，类固醇生物合成途径中的关键酶过量表达，使得在前体浓度很低的情况下也能合成出能够激活 AR 的 DHT，保证 AR 信号通路的作用^[14]。

以上途径都是雄激素配体存在但浓度很低时增强 AR 信号通路的方法。AR 也可以在配体不存在的情况下被激活，这些途径被称为“非法”途径。AR 可以和很多其他的信号通路相互作用，相互调节。很多生长因子（如胰岛素样生长因子 1 和表皮生长因子等）、细胞因子、激酶和其他蛋白都能在雄激素水平很低甚至没有雄激素的情况下激活 AR，其具体机制可能是通过对 AR 进行化学修饰来完成 AR 的非配体激活^[5]。

除了 AR 信号通路，其他替代信号通路也会在雄激素非依赖的前列腺癌的发展过程中发挥作用。这些旁路途径可以完全脱离 AR 信号通路。而且很多上文提到过的“非法”途径也可以作为旁路途径发挥作用。胰岛素样生长因子 1 和它们的酪氨酸激酶受体可以激活一个级联信号转导通路，促进有关细胞生长、DNA 损伤修复等的基因的表达。Akt 级联信号通路在调控细胞凋亡和增殖中也发挥了重要作用。“非法”途径和旁路途径有着密切的相互作用，它们可以

激活 AR 信号通路也可以促进其他信号通路，在雄激素缺乏和 AR 表达缺失的情况下对前列腺癌细胞的生存和生长意义重大^[5]。

表观遗传的改变（如甲基化和组蛋白修饰）也可以使前列腺癌细胞的基因组的表达谱发生变化，进而导致了癌细胞的转化。在 DU145 和 PC3 细胞中，启动子的甲基化导致了 AR 的表达缺失，而与细胞周期、DNA 损伤修复等相关的基因的表现观遗传修饰的改变，也会使它们的表达发生异常，从而维系前列腺癌细胞的生长。MicroRNA 也可以在转录后水平对基因组的表达进行调控，进而影响前列腺癌细胞的生长^[15]。

5 糖酵解及其在癌细胞中的作用

瓦伯格效应告诉我们：肿瘤细胞比正常细胞需要和利用更多的葡萄糖，已产生更多的能量和核酸等小分子，维持其生长和增殖的需要。能量代谢不仅能为肿瘤细胞的生长提供能量，而且还为肿瘤细胞增殖所需化合物的合成提供原材料。例如：为满足肿瘤细胞快速的 DNA 复制，6-磷酸葡萄糖会通过磷酸戊糖途径合成核酸，并产生大量的丙酮酸，促进合成更多的脂类，用于合成快速分裂的肿瘤细胞的细胞膜。因此即使在有氧情况下，肿瘤细胞仍偏好于糖酵解的方式进行葡萄糖代谢^[16]。大量的能量代谢和癌细胞在三维空间上的积累使细胞周围的氧气和营养物质维持在较低水平，从而激发血管的生成。因此，癌细胞对低氧的适应是肿瘤生存和发展所必须的^[17]。

正常细胞向癌细胞的转变是一个长期的不可逆的过程，其中代谢方式也发生改变，从原来的有氧呼吸逐步转变成及时在有氧的条件下也运用糖酵解的方式利用葡萄糖，在这个过程中，葡萄糖的摄入量和糖酵解活动显著增加，而线粒体的活动则受到强烈的级联信号通路的抑制。原癌基因和抑癌基因的突变导致细胞内信号通路的异常，而细胞内信号通路的改变则会影响代谢酶等的表达和活性，导致癌细胞的代谢方式发生变化。同样，代谢酶的突变也能使癌症继续恶化^[16]。

葡萄糖进入细胞需要葡萄糖转运子（GLUT），GLUT 在癌细胞中广泛的高表达，特别是在高增殖性和恶化的癌细胞中，以维持高强度的能量代谢。除了表达量的提高，GLUT 在癌细胞中的活性也比在正常细胞中高了 10-12 倍。糖酵解过程中的酶，如己糖激酶、磷酸果糖激酶等，在癌细胞中也不同程度的

高表达，这些代谢酶的高表达是突变的原癌基因或抑癌基因调控的结果^[18]。

本文研究在雄激素刺激后表达发生明显变化的转录因子 **RFX1** 对前列腺癌细胞的作用，预期验证 **RFX1** 的表达受雄激素受体的调控，确认 **RFX1** 对前列腺癌细胞增殖、周期、凋亡等生理活动的影响；并寻找表达受 **RFX1** 调控的糖酵解酶，研究 **RFX1** 对其的调控作用，进而确定 **RFX1** 对前列腺癌细胞影响的作用途径，希望能够进一步了解前列腺癌的发生发展过程，为前列腺癌提供新的临床观测指标，为前列腺癌的预防、诊断和治疗提供理论依据。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞

LNCaP 和 PC-3 细胞系，购自中国科学院细胞库。

2 试剂

人工合成双链 RNA(AR、RFX1)，Ambion 公司；

RNA 抽取试剂 TRIZOL，Life Technologies 公司；

反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit，大连宝生物公司；

RT-PCR 反应液 HotSybr PCR Reaction Mix，上海晶檀生物有限公司；

MicroAmp 384 孔光学反应板、板盖，Life Technologies 公司；

RPMI 1640 细胞培养基，Life Technologies 公司；

胎牛血清 FBS，Hyclone 公司；

丙酮酸钠，Life Technologies 公司；

非必需氨基酸 NEAA，Life Technologies 公司；

氨苄青霉素硫酸链霉素双抗，Life Technologies 公司；

胰酶，Life Technologies 公司；

Opti-Mem 无血清培养基，Life Technologies 公司；

Lipofectamine 2000 真核转染试剂盒，Life Technologies 公司；

Cell Counting Kit-8 细胞增殖检测试剂盒，日本同仁化学研究所；

FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒，BD Biosciences 公司；

碘化丙啶 PI，Sigma 公司；

Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒，上海生工生物工程公司；

PVDF 膜，默克密理博公司；

PageRuler Prestained Protein Ladder 蛋白分子量标准，Thermo 公司；

小鼠抗 β -actin 单克隆抗体，Sigma 公司；

兔抗 PFKFB3 多克隆抗体，PTG 公司；

辣根过氧化物酶联羊抗小鼠二抗，ICL 公司；

辣根过氧化物酶联羊抗兔二抗，ICL 公司；

ECL+Plus Western blotting detection Kit，GE Healthcare 公司；

3 引物

引物来自 Universal ProbeLibrary Assay 数据库，由上海赛百盛生物公司合成，通过 PAGE 纯化。

RT-PCR 引物（方向 5'-3'）：

引物名称	引物序列
AR	F: GCCTTGCTCTAGCCTCAA
AR	R: GGTCGTCCACGTGTAAGTTG
RFX1	F: GAGATGCTGCGGGTGAAG
RFX1	R: GGTGGTTGAGCGACGTGTA
HK2	F:TCCCCTGCCACCAGACTA
HK2	R:TGGACTTGAATCCCTTGGTC
PFKFB2	F: CACCGTGACAAGCCAACTAA
PFKFB2	R: GCGTAAAGCTGTTCCTTCTCA
PFKFB3	F: CAACAGCTTTGAGGAGCATGT
PFKFB3	R: GGGAGCCTTTCATGTTTTGT

4 仪器

T100 Thermal Cycler PCR 仪，Bio-rad 公司；

Heraeus Fresco 17 台式高速冷冻离心机，Thermo 公司；

DNP-9052 型恒温培养箱，上海精宏实验设备有限公司；

SDJ 超净工作台，上海淀山湖净化设备厂；

HWS26 型恒温水浴锅，上海恒科技有限公司；

流式细胞仪 FACSCalibur Flow Cytometer，BD 公司；

实时荧光定量 PCR 仪 Light Cycler 480 II，Roche 公司；

酶标仪 Biotek Elx808，Biotek 公司；

PowerPac Basic 型电泳仪，Bio-rad 公司；

FR-180B 型电泳槽，上海复日生物实验技术研究所；

Mini-PROTEAN 2 Cell 蛋白电泳及电转移装置，Bio-rad 公司；

TS-100 型水平摇床，海门市其林贝尔仪器制造有限公司；

荧光及化学发光成像系统，上海勤翔科学仪器有限公司；

微量进样器, Eppendof 公司;

Pipet Boy acu 型电动移液器, Intergra Biosciences 公司;

Vortex-5 型振荡器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

5 软件及数据库

NCBI 数据库: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>;

Universal Probe Library Assay 数据库: <https://www.roche-applied-science.com>;

Genomatix 数据库: <https://www.genomatix.de>;

ModFit LT 软件, Verity Software House 公司;

Quantity One 软件, Bio-rad 公司;

6 实验方法

6.1 细胞培养

6.1.1 细胞复苏: 取出在液氮中储存的细胞, 放入 37℃ 恒温水浴锅中迅速融化, 弹化混匀, 1000 rpm 离心 5min, 去掉冻存液, 加入 2.5mL 完全培养液, 混匀后转入含有 7.5mL 完全培养液的中型培养皿 (直径 10cm) 中, 37℃、5%CO₂ 培养。待细胞贴壁后, 更换培养液 10mL, 之后可进行细胞传代等实验。

6.1.2 细胞传代: 当细胞生长达到全皿 80%后即可进行细胞传代。吸去培养液, 加入 5mLPBS 清洗细胞, 弃去 PBS; 加入 1mL 胰酶, 消化 1min (LNCaP 细胞) 或 3min (PC-3 细胞), 显微镜下观察细胞变圆, 间隙变大即消化完全; 加入完全培养液 4ml, 旋转培养皿吹打九次, 将所有细胞全部吹下, 1000 rpm 离心 5min; 弃上清, 先加入 1mL 完全培养液重悬细胞, 后加入 4mL 完全培养液混匀细胞。取 2.5mL 细胞液加入已含有 7.5mL 完全培养液的中型培养皿中 (1:2 比例传代), 摇匀铺平; 37℃、5%CO₂ 培养。

6.2 转染

6.2.1 种板: 吸去培养液, 加入 5mLPBS 清洗细胞, 弃去 PBS; 加入 1mL 胰酶, 消化 1min (LNCaP 细胞) 或 3min (PC-3 细胞), 显微镜下观察细胞变圆, 间隙变大即消化完全; 加入完全培养液 4mL, 旋转培养皿吹打九次, 将所有细胞全部吹下, 1000 rpm 离心 5min; 弃上清, 先加入 1mL 完全培养液重悬细胞, 后加入 4mL 完全培养液混匀细胞; 取 1mL 细胞液加入含有 5.6mL

培养液的玻璃管中，混匀，向六孔板中每孔加 1mL（每孔先加入 1mL 培养基）；37℃、5%CO₂ 培养。

6.2.2 转染：培养 48h 后，细胞丰度达 70-80%，此时可进行转染。用 Lipofectamine 2000 将 siRNA 转染入细胞。每孔需要：（1）250μL Opti-Mem+5μL Lipofectamine 2000，室温孵育 5min；（2）250μL Opti-Mem+5μL siRNA，室温孵育 5min；将（1）（2）混合得（3），室温孵育 20min；向（3）中加入 1.5mL 新培养液得（4）；弃去六孔板中的培养基，加入（4）。4h 后，重新种板，48h 后进行 RNA 抽提、蛋白抽提、细胞凋亡或增殖的实验。

6.3 RNA 提取

六孔板中的细胞生长到 85%左右时，弃培养液；每孔用 1mL PBS 洗，加入 1mL TRIZOL；刮下所有细胞，转移至 1.5mL EP 管中，室温放置 5min；加 200μL 氯仿，震荡 15s，室温放置 5min；4℃、12000 g 离心 15min，取上层无色液体层到另一 1.5mL 离心管内；加 500μL 异丙醇，颠倒混匀 6 次，室温放置 10min；4℃、12000 g 离心 15min；弃上清，加 1mL 75%乙醇；4℃、7500 g 离心 5min；弃上清，室温干燥至沉淀透明；加 50μL Milli-Q 水溶解沉淀。

6.4 逆转录

在 RNase free 的小 EP 管内依次加入：5×Prime Script Buffer 2μL，Prime Script RT Enzyme Mix I 0.5μL，Oligo dT Primer 0.5μL，Random 6 mers 0.5μL，Total RNA 1.0μL，RNase free 水补足至 10μL，振荡混匀，置 PCR 仪上设置 37℃ 15 min，85℃ 3s，12℃ 保温。测浓度，电泳检测纯度，-80℃ 保存。用于 RT-PCR 前先用 RNase free 水稀释 10 倍。

6.5 RT-PCR

384 孔板中每孔加 2×SYBR mix 5μL，正向引物 1μL，反向引物 1μL，cDNA 模板 1μL，RNase free 水补足至 10μL。用罗氏的 RT-PCR 仪进行实验，在溶解曲线显示无非特异性扩增的情况下，以 β-actin 为内参，用 Ct 值获得相对表达量。

6.6 细胞增殖实验

细胞增殖实验使用 CCK-8 试剂盒。按 6.2 进行细胞转染（分别转染 siRFX1 和 NC），4h 后，在 96 孔板中以 10000 细胞/孔接种细胞（每组至少重复 8

孔)。以种板时为 0h 计算，分别测量 0h、24h 及 48h 的细胞增殖情况。每个时间点时，在每孔中加入 10 μ L CCK-8，37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 放置 2h。用酶标仪测量每孔在 450nm 处的吸光值。615nm 作为参比波长，以除去背景吸光值。

6.7 细胞周期实验

按 6.2 进行细胞转染（分别转染 siRFX1 和 NC），4h 后，将每孔细胞以 1:2 的比例分种在六孔板的两个孔中；48h 后，弃培养液，1mL PBS 洗细胞；加入 200 μ L 胰酶消化细胞；终止消化后两孔合为一孔，1000rpm 离心 5min；用 PBS 洗细胞两次，每次 1000rpm 离心 10min；加入 1mL PI 稀释染液重悬，室温下避光孵育 15min，分三组用流式细胞仪检测。

6.8 细胞凋亡实验（FITC Annexin V Apoptosis 检测）

按 6.2 进行细胞转染（分别转染 siRFX1 和 NC），4h 后，将每孔细胞以 1:2 的比例分种在六孔板的两个孔中；48h 后，弃培养液，1mL PBS 洗细胞；加入 200 μ L 胰酶消化细胞；终止消化后两孔合为一孔，1000rpm 离心 5min；用 PBS 洗细胞两次，每次 1000rpm 离心 10min；加入 1 $\times$ Binding Buffer 重悬；转移 100 μ L 细胞悬液到 1.5mL EP 管中，在每管中加入 5 μ L FITC Annexin V 和 5 μ L PI（设三个对照组，一个不加染液，一个只加 FITC Annexin V，一个只加 PI），混匀，室温下避光孵育 15min；在每管中加入 400 μ L 1 $\times$ Binding Buffer，使用流式细胞仪检测。

6.9 Western Blot

6.9.1 总蛋白的提取：取出需要抽提细胞总蛋白的细胞，弃去培养基，向六孔板中每孔加 1mL PBS 洗细胞，再加入 1mL PBS，刮下所有细胞，转移至 EP 管中，4 $^{\circ}$ C、12000 rpm 离心 10min。弃上清，每个 EP 管中加入 200 μ L 裂解液，放置冰上 15 分钟，每三分钟弹化一次。4 $^{\circ}$ C、12000 rpm 离心 10min，将上清移入新 EP 管中，-80 $^{\circ}$ C 保存。

6.9.2 样品制备：先用 Bradford 法检测样品的蛋白浓度，每个样品测两次取平均值。取 EP 管，空白对照组加 200 μ L Bradford Reagent 和 20 μ L PBS，样品组加 200 μ L Bradford Reagent，1 μ L 样品和 19 μ L PBS。从 EP 管中吸 200 μ L 加入 96 孔板，用酶标仪检测浓度。经定量的蛋白样品曲 40 μ g，按稀释比例加入

SDS-PAGE 上样缓冲液，再加入对应的蛋白抽提缓冲液将体积补齐至 30 μ L，震荡点甩，沸水浴 5min。冰浴 5min，25 $^{\circ}$ C、12000 rpm 离心 1min。

6.9.3 电泳、电转及杂交检测：将制备好的样品依次加入 SDS-PAGE 胶泳道中，其中一泳道加入 5 μ L 蛋白 Marker。恒流 30mA 电泳 100min。电泳结束后将 SDS-PAGE 胶剥离用于电转，电转条件恒压 100V，180min。电转后裁膜，然后将 PVDF 膜在脱脂奶粉封闭液中封闭 1h。1h 后分别加入一抗 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。回收一抗，用 TBST 洗 PVDF 膜三次，然后室温洗涤四次，每次在摇床上摇 5min。分别加入二抗，室温孵育 1h。用 TBST 洗 PVDF 膜三次，然后室温洗涤四次，每次在摇床上摇 5min。加入 ECL 化学发光反应液，至于荧光及化学发光呈像系统中，采集图像，整理结果。

结果

1 RFX1 的表达受 AR 调控

本实验室的前期工作进行了 LNCaP 细胞系中的 mRNA 表达谱芯片的检测及数据的分析，发现其中 543 个基因在雄激素刺激后表达或活性发生改变。在这些基因中，RFX1 在雄激素刺激后表达的改变较明显（图 1）。通过实验验证，发现在 DHT 刺激后，其中 RFX1 的表达量的确发生了明显的变化（图 2），并且变化趋势与芯片数据结果相吻合。这些实验结果可以说明 RFX1 对 AR 敏感，与 AR 信号通路密切相关，因此本文选择 RFX1 作为研究对象。

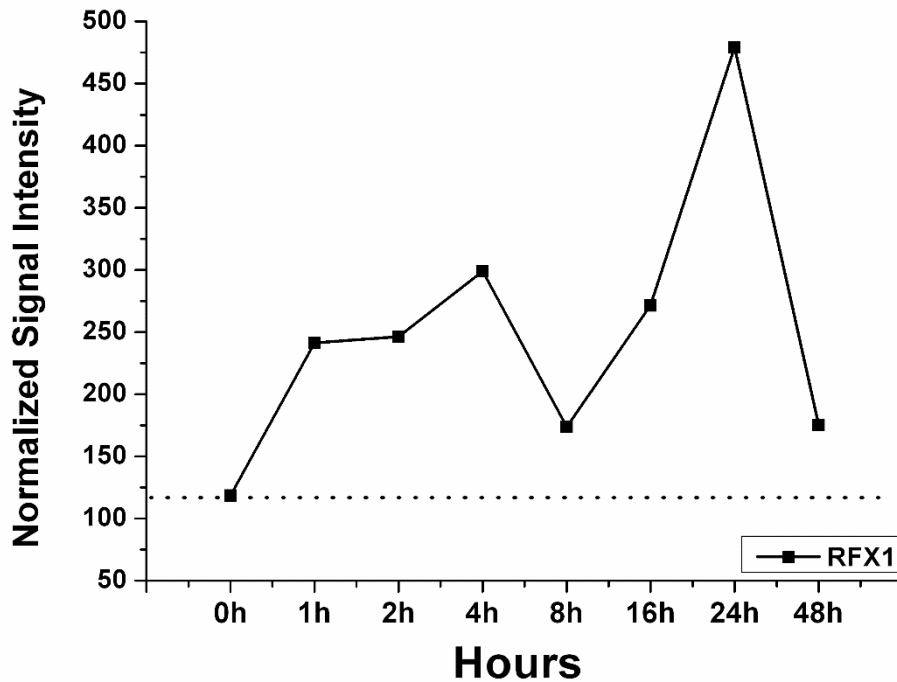


图 1. LNCaP 细胞中 DHT 刺激后 RFX1 表达量的变化（芯片数据结果）。

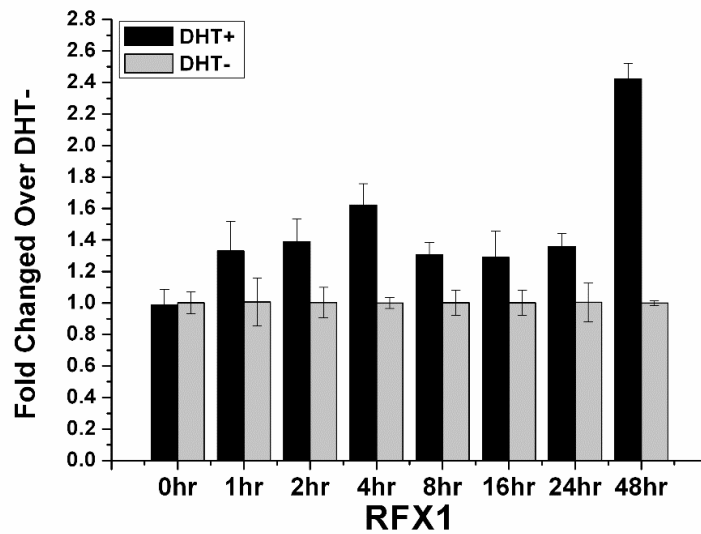


图 2. LNCaP 细胞中 DHT 刺激后 RFX1 表达量的变化（实验验证结果）。

LNCaP 经过去激素饥饿培养 3 天后，使用 DHT 刺激 0h、1h、2h、4h、8h、16h、24h 和 48h，在每个时间点都设置了一个阴性对照，然后抽取总 RNA 进行 RT-PCR。

本文首先探究 AR 对 RFX1 是否有调控作用，以进一步验证 RFX1 与 AR 信号通路的相关性。实验方法为：运用 RNA 干扰技术下调 AR 在 LNCaP 细胞中的表达，然后观察 RFX1 表达量的变化（图 3）。用 Lipofectamine 2000 转染 siAR 入 LNCaP 细胞，4h 后重新种板，48h 后抽 RNA，RT-PCR 检测 AR 和 RFX1 的表达量。由图可知，转染 siAR 后，LNCaP 细胞中 RFX1 的表达量明显上升，说明 RFX1 的表达受 AR 调控。

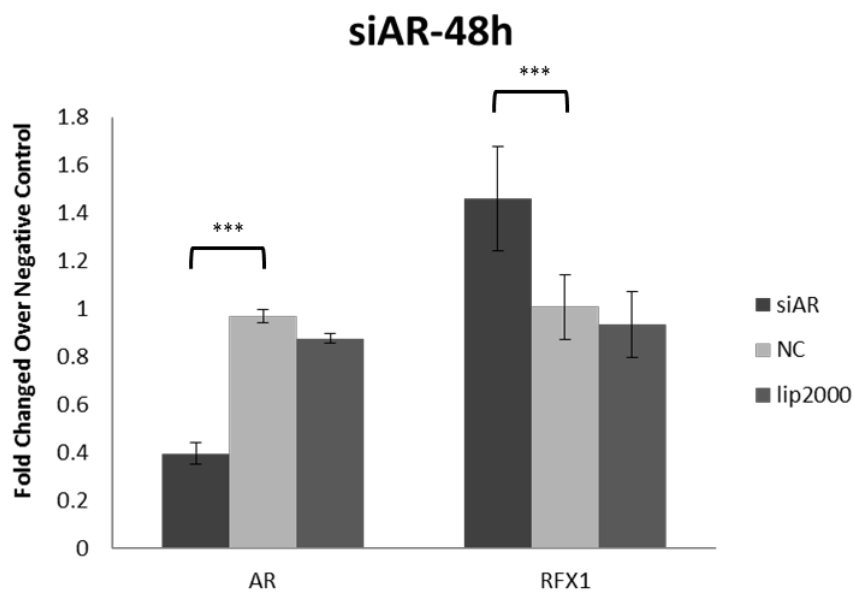


图 3. LNCaP 细胞中下调 AR 表达后 RFX1 表达量的变化。 各组从左至右分别为转染 siAR 后、转染 NC 后及只转染 Lipofectamine 2000 后 AR 及 RFX1 的表达量。数据来自三组重复实验。

2 RFX1 对前列腺癌细胞的作用

2.1 RFX1 能促进前列腺癌细胞的增殖

本文进一步展示 RFX1 对前列腺癌细胞的作用，首先是 RFX1 被抑制后 LNCaP 及 PC-3 细胞的增殖情况（图 4）。实验方法如下：用 Lipofectamine 2000 转染 siRFX1 至 LNCaP 或 PC-3 细胞中，4h 后将转染过的细胞种于 96 孔板中，分别在 0 天、1 天和 2 天加入 CCK-8，2h 后用酶标仪检测，每个实验至少重复 3 次。由图可见，转染 siRFX1 后，LNCaP 细胞与 PC-3 细胞的增殖都受到了明显的抑制，其中 LNCaP 细胞的增殖从第二天即表现出抑制，PC-3 细胞在第三天表现出抑制，受抑制程度比 LNCaP 细胞更显著。这些结果说明 RFX1 能促进前列腺癌细胞的增殖。

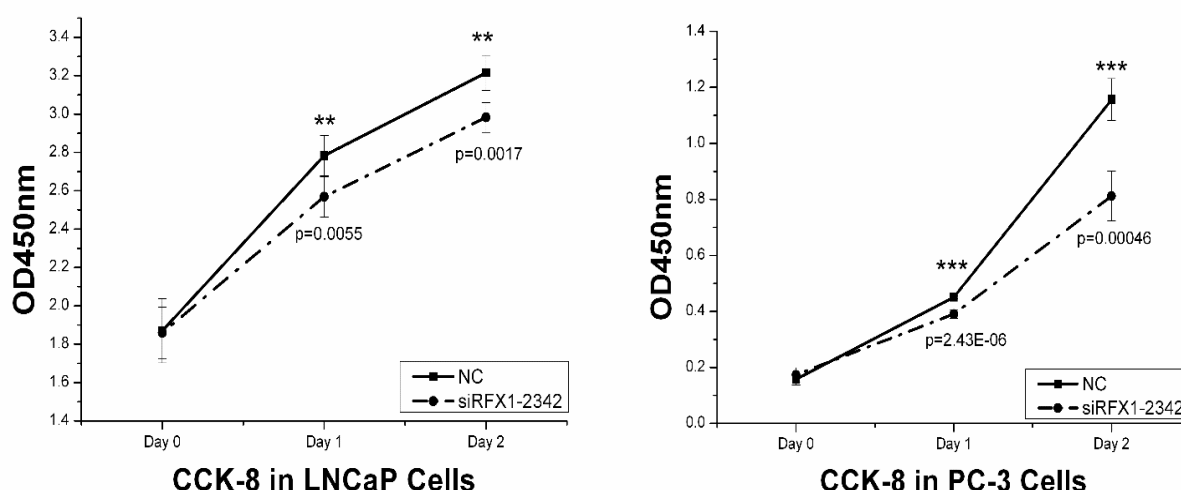


图 4. LNCaP 和 PC-3 细胞中下调 RFX1 表达后细胞增殖的变化。 左图为 LNCaP 细胞中的实验结果，右图为 PC-3 细胞中的实验结果。虚线为转染 siRFX1 后的结果，实线为转染 NC 后的对照。数据来自三组重复实验。

2.2 RFX1 能促进前列腺癌细胞 G1/S 的转化

前面的实验验证了 RFX1 对前列腺癌细胞增殖和凋亡的影响，接下来本文又探究 RFX1 对细胞周期的作用。实验方法：用 Lipofectamine 2000 转染 siRFX1 至 LNCaP 或 PC-3 细胞中，4h 后重新种板，48h 后收集细胞，加入 PI 染液后使用流式细胞仪进行检测，每个实验至少重复 3 次。

LNCaP 细胞中流式细胞仪结果如图 5 上所示。在 LNCaP 细胞中转染 siRFX1 后，G1 期细胞比例上升了 13%（第一个峰），S 期细胞比例下降了 40.4%（第一第二个峰之间）。图 5 下为三组重复实验结果所做对比柱状图，可以看出在 LNCaP 细胞中下调 RFX1 表达后，G1 期细胞数量增加，S 期细胞数量减少。可见 RFX1 能促进 LNCaP 细胞从 G1 期向 S 期转化。

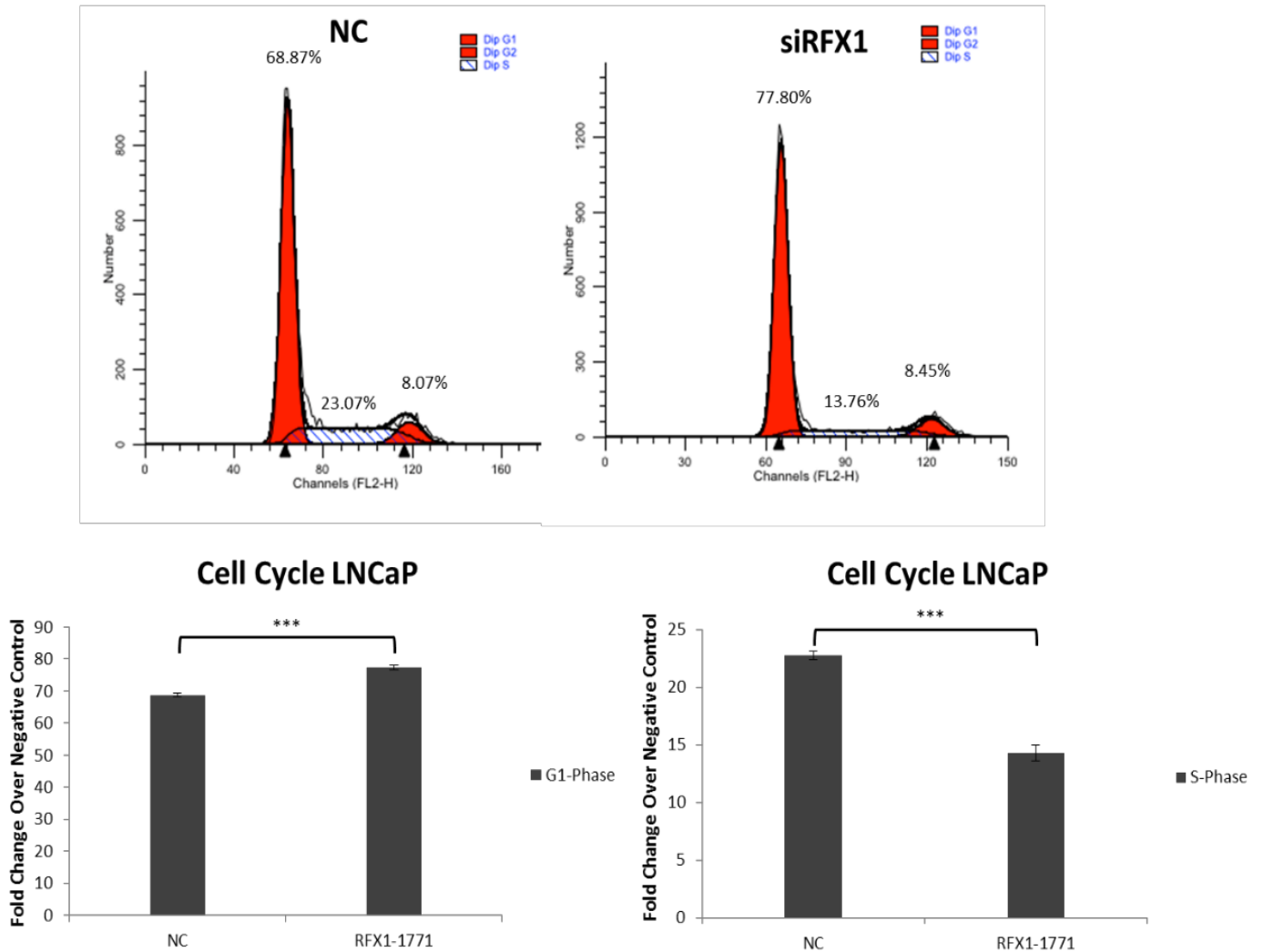


图 5. LNCaP 细胞中下调 RFX1 表达后细胞周期的变化。上图为流式细胞仪实验结果，其中上左图为转染 NC 后的对照组结果，上右图为转染 siRFX1 后的实验组结果。第一个峰为 G1 期细胞，第二个峰为 G2 期细胞，第一第二峰之间为 S 期细胞。下图为 G1 和 S 期细胞数量的对比柱状图。数据来自三组重复实验。

PC-3 细胞中流式细胞仪结果如图 6 上所示。在 PC-3 细胞中转染 siRFX1 后，G1 期细胞比例上升了 7.8%（第一个峰），S 期细胞比例下降了 18.3%（第一第二个峰之间）。图 6 下为三组重复实验结果所做对比柱状图，可以看出在 PC-3 细胞中下调 RFX1 表达后，G1 期细胞数量增加，S 期细胞数量减少。可见 RFX1 能促进 PC-3 细胞从 G1 期向 S 期转化。LNCaP 和 PC-3 细胞中的结果说明 RFX1 能促进前列腺癌细胞由 G1 期向 S 期转化，进而促进细胞增殖。

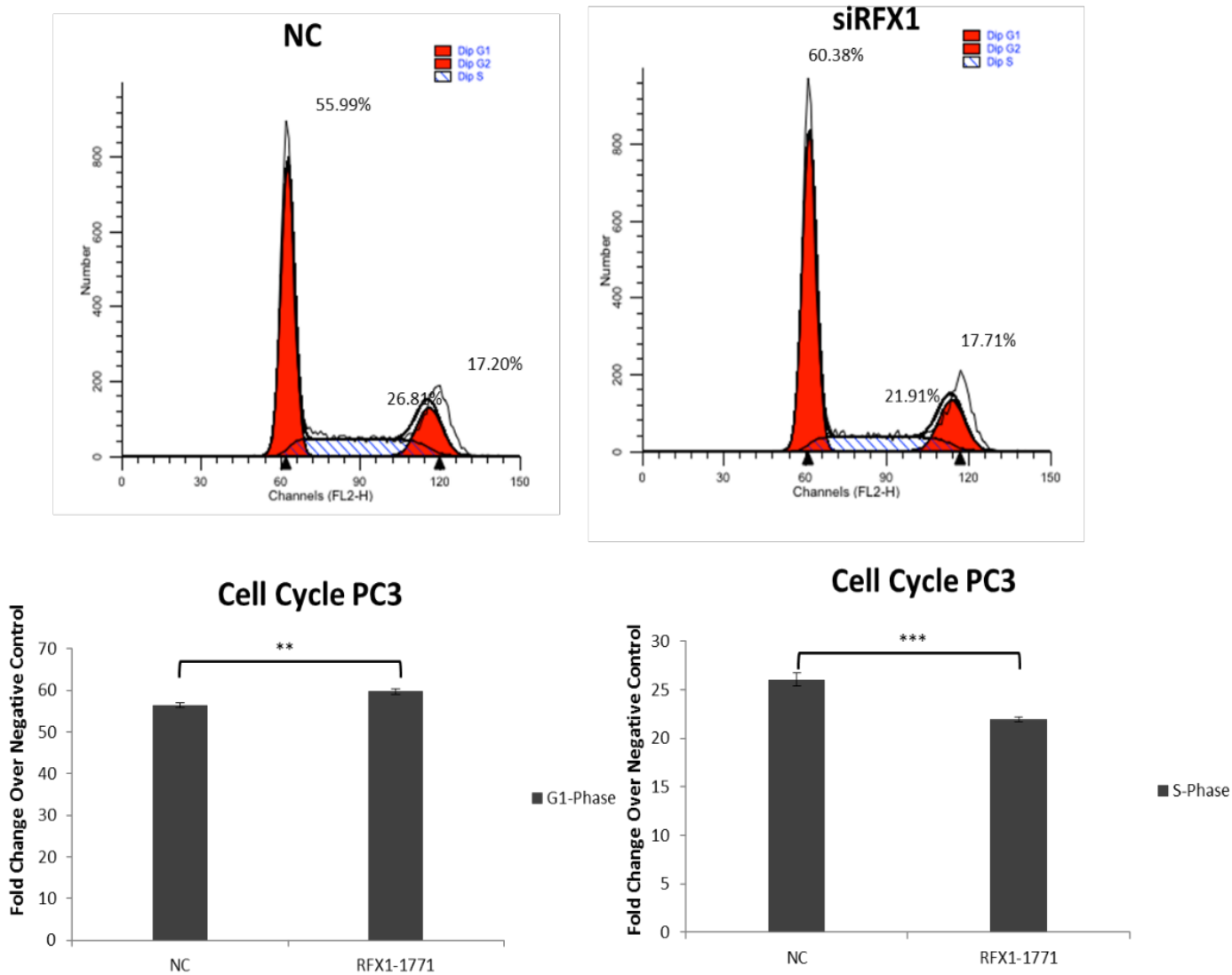


图 6. PC-3 细胞中下调 RFX1 表达后细胞周期的变化。上图为流式细胞仪实验结果，其中上左图为转染 NC 后的对照组结果，上右图为转染 siRFX1 后的实验组结果。第一个峰为 G1 期细胞，第二个峰为 G2 期细胞，第一第二峰之间为 S 期细胞。下图为 G1 和 S 期细胞数量的对比柱状图。数据来自三组重复实验。

2.3 RFX1 能抑制前列腺癌细胞的凋亡

前面的实验验证了 RFX1 对前列腺癌细胞增殖的影响，接下来本文又研究了 RFX1 对细胞凋亡的作用。实验方法：用 Lipofectamine 2000 转染 siRFX1 至

LNCaP 或 PC-3 细胞中，4h 后重新种板，48h 后收集细胞，加入 FITC-Annexin V 和碘化丙啶（PI）染液在室温下避光孵育 15min，之后使用流式细胞仪进行检测，每个实验至少重复 3 次。

图 7 为使用流式细胞仪检测 LNCaP 细胞凋亡的结果图。如图 7 上所示，在 LNCaP 细胞中转染 siRFX1 后，细胞早期凋亡增加了 47%，细胞晚期凋亡增加了 41.3%，死亡细胞数增加了 72.1%。将总凋亡细胞数汇总得图 7 下，可看出抑制 RFX1 后，细胞凋亡水平显著增加。这些结果说明 RFX1 能抑制 LNCaP 细胞的凋亡。

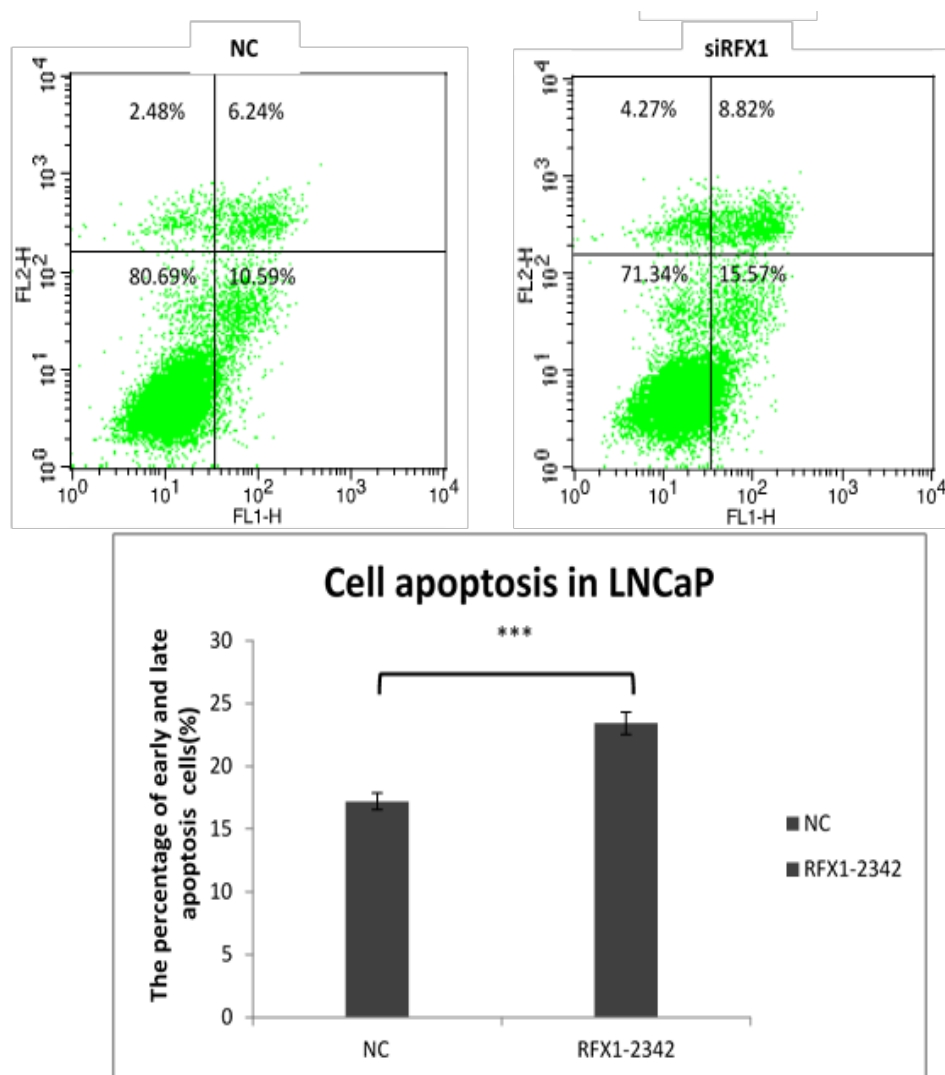


图 7. LNCaP 细胞中下调 RFX1 后细胞凋亡的变化。上图为流式细胞仪实验结果，其中上左图为转染 NC 后的对照组结果，上右图为转染 siRFX1 后的实验组结果。各图左下象限代表正常细胞，右下象限代表早期凋亡细胞，右上象限代表晚期凋亡细胞，左上象限代表死亡细胞。下图为凋亡细胞总和的对比柱状图。数据来自三组重复实验。

PC-3 细胞中的实验结果如图 8 所示。在 PC-3 细胞中转染 siRFX1 后，细胞早期凋亡增加了 58.3%，细胞晚期凋亡增加了 16.8%，死亡细胞数增加了 68.8%。将总凋亡细胞数汇总可看出，抑制 RFX1 后，PC-3 细胞的凋亡水平也显著增加。这些结果说明 RFX1 能抑制 PC-3 细胞的凋亡。

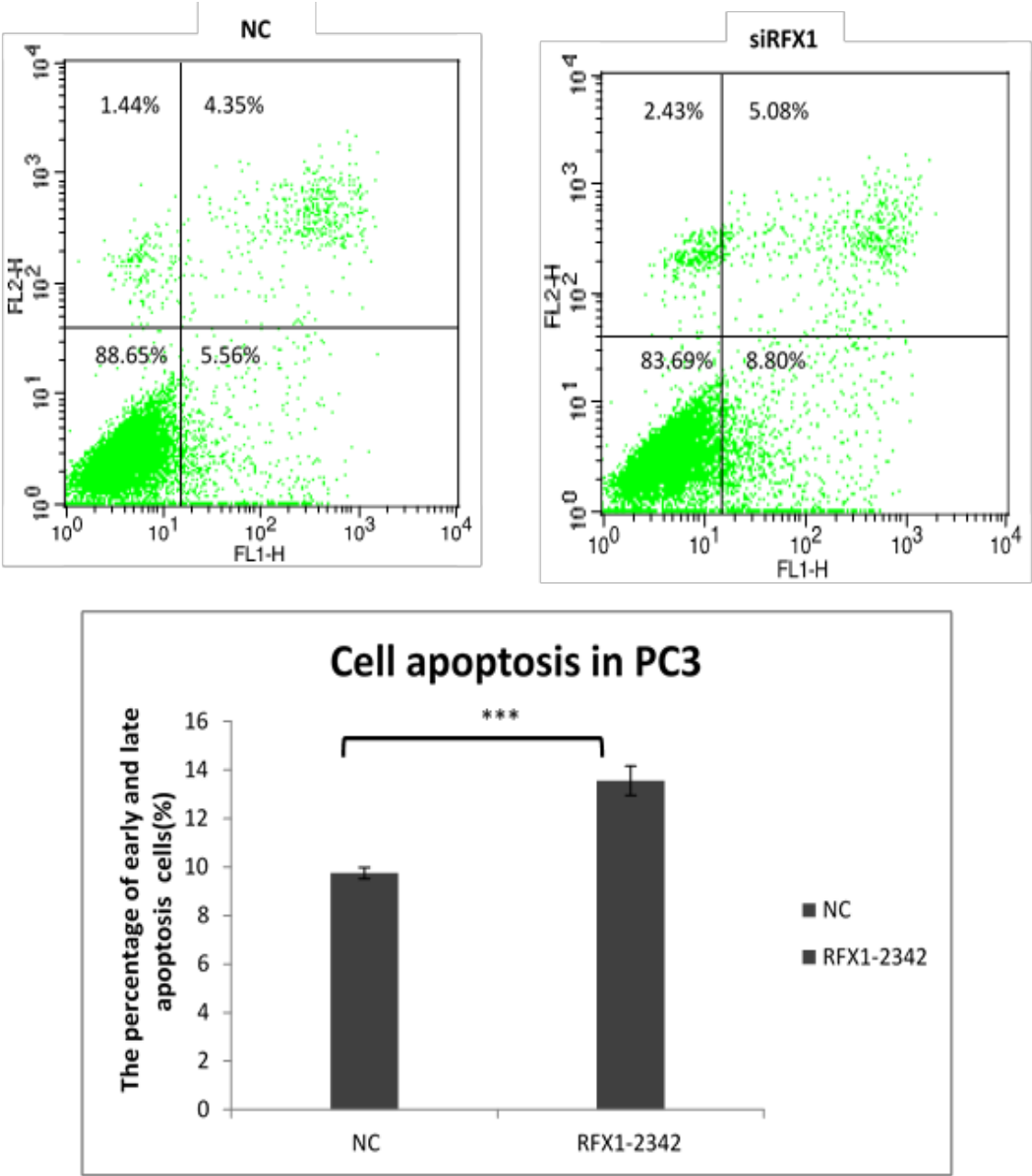


图 8. PC-3 细胞中下调 RFX1 表达后细胞凋亡的变化。上图为流式细胞仪实验结果，其中上左图为转染 NC 后的对照组结果，上右图为转染 siRFX1 后的实验组结果。其中各图左下象限代表正常细胞，右下象限代表早期凋亡细胞，右上象限代表晚期凋亡细胞，左上象限代表死亡细胞。下图为凋亡细胞总和的对比柱状图。数据来自三组重复实验。

3 RFX1 靶基因的预测

由于糖酵解对癌细胞能量代谢的重要性，在预测 RFX1 靶基因时，本文把关注的焦点放在了糖酵解过程中的关键酶上。实验方法如下：运用 RNA 干扰技术，在 LNCaP 细胞中转染 siRFX1 下调 RFX1 的表达，48h 后抽提 RNA，RT-PCR 检测 RFX1 与各酶的表达量，发现 HK2、PFKFB2 和 PFKFB3 的表达在 mRNA 水平被显著抑制（图 9），说明 RFX1 能促进这些酶的表达。

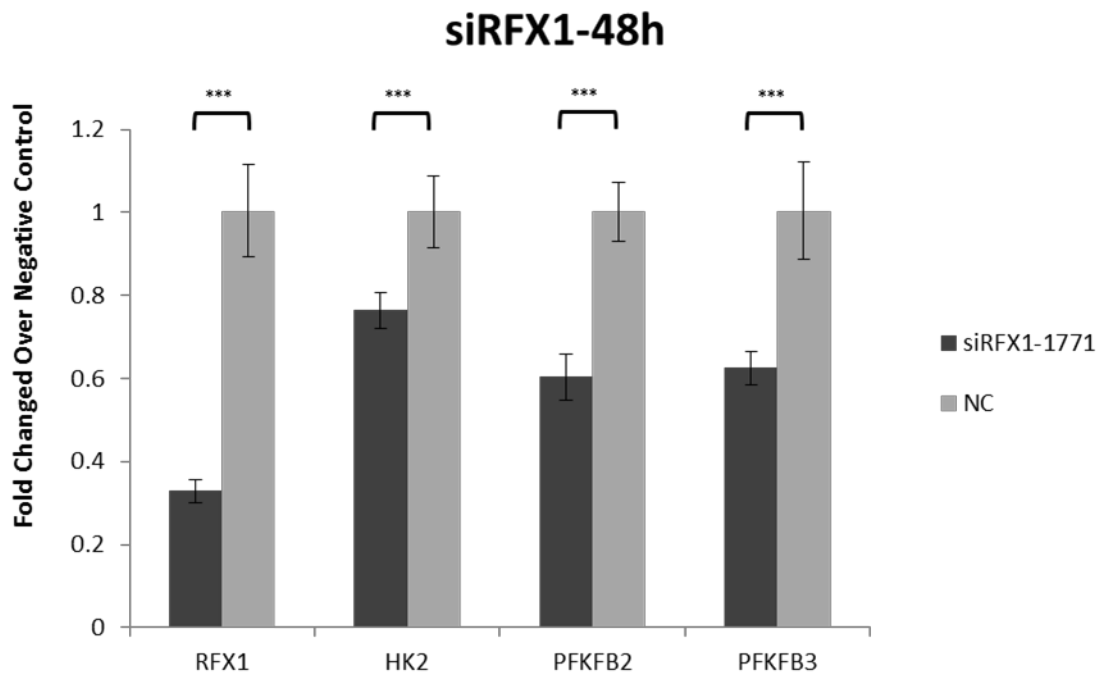


图 9. LNCaP 细胞中下调 RFX1 表达后糖酵解酶表达的变化（mRNA 水平）。各组从左至右分别为转染 siRFX1 后及转染 NC 后 RFX1、HK2、PFKFB2 及 PFKFB3 的 mRNA 含量。数据来自三组重复实验。

在 genomatix 数据库中，PFKFB3 基因的上下游存在 RFX1 的结合位点（图 10），说明 RFX1 可能可以结合在这些位点上，以直接调控 PFKFB3 的表达。

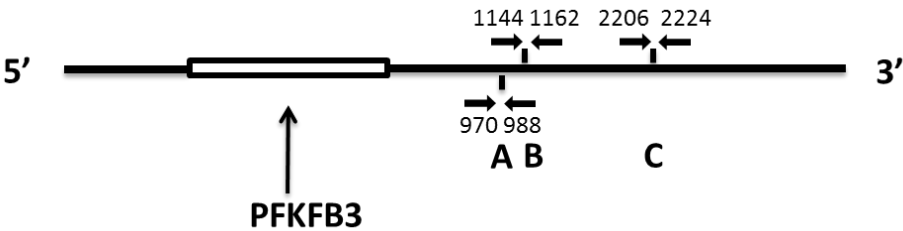


图 10. PFKFB3 上下游的 RFX1 结合位点。数据来自 genomatix 数据库。

除了 mRNA 水平的变化，本文还展示了 PFKFB3 在蛋白水平的表达量变化。实验方法：运用 RNA 干扰技术，在 LNCaP 细胞中转染 siRFX1 下调 RFX1 的表达，48h 后抽提细胞总蛋白，运用 Western Blot 方法检测 PFKFB3 的浓度，

以 actin 作为内参，结果如图 11 所示。左图为 Western Blot 结果图，RFX1 下调后，PFKFB3 蛋白的浓度显著降低；右图是量化后的对比柱状图，可以很直观的看出 PFKFB3 在蛋白水平确实被显著抑制，说明 RFX1 能促进 PFKFB3 的表达。

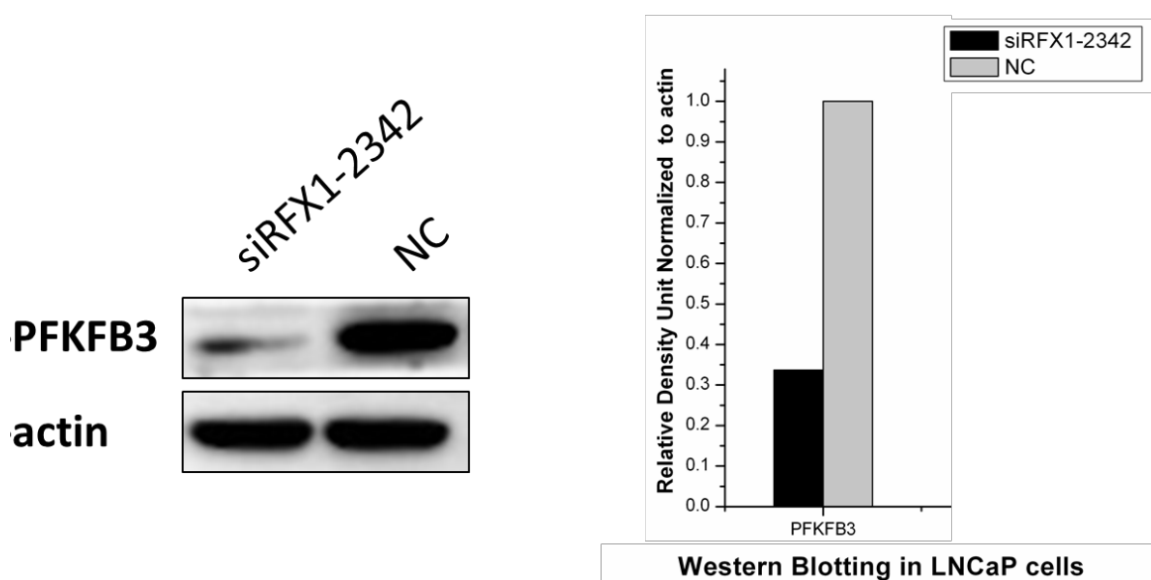


图 11. LNCaP 细胞中下调 RFX1 表达后 PFKFB3 表达量的变化（蛋白质水平）。左图为 Western Blot 结果图。第一行蛋白为 PFKFB3，第二行为 actin；第一列为 siRFX1 结果，第二列为 NC 结果。右图为 Western Blot 浓度量化后的结果，左边为 siRFX1 结果，右边为 NC 结果。

以上这些结果说明 RFX1 能够调控 HK2、PFKFB2 和 PFKFB3 的表达，其中 PFKFB3 有可能是 RFX1 的直接靶基因，同时也可说明 RFX1 可以通过促进 HK2、PFKFB2 和 PFKFB3 的表达，促进前列腺癌细胞的糖酵解过程，进而促进细胞增殖。

综上所述，RFX1 对雄激素敏感，与雄激素相关的细胞内信号通路关系密切，其表达受 AR 的调控；RFX1 能通过抑制细胞凋亡、促进细胞从 G1 期向 S 期转化等来促进前列腺癌细胞的增殖；RFX1 能促进糖酵解酶 HK2、PFKFB2 和 PFKFB3 的表达（mRNA 和蛋白质水平），能通过促进糖酵解促进细胞增殖，对前列腺癌细胞的生长增殖有重要的作用。（图 12）

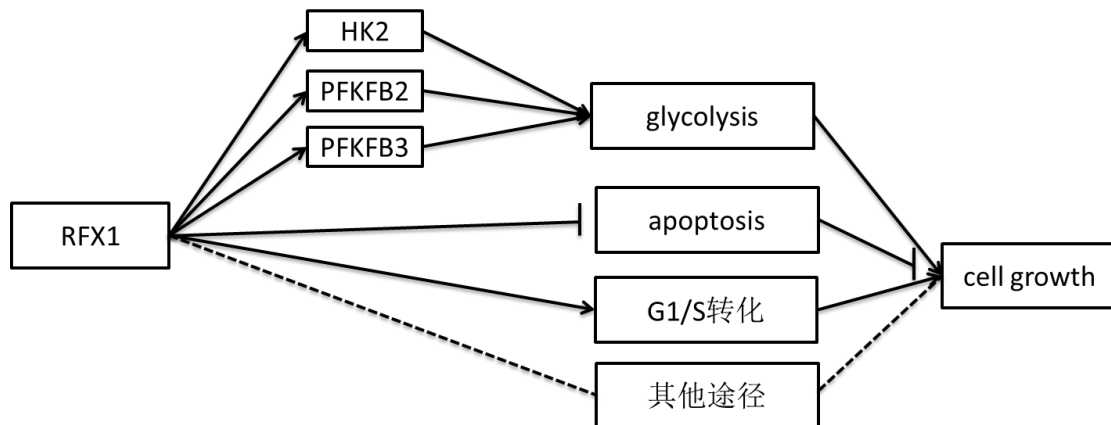


图 12. RFX1 对前列腺癌细胞的作用及作用途径。箭头为促进，竖线为抑制；实线表示已证实，虚线表示尚待研究和发现。

讨论

1 RFX1 在激素依赖型前列腺癌向非依赖型转化过程中的作用

对于前列腺癌依赖型向非依赖型转化的研究一直是寻找前列腺癌有效治疗方法的关键所在。AR 扩增、AR 突变、AR 的可变剪接体、AR 的翻译后修饰、AR 的共调控因子和共作用因子等均可影响 AR 的表达和转录活性，影响 AR 信号通路中信息的传递。除了 AR 信号通路外，其他不依赖 AR 的旁路替代途径也会发挥作用，促使前列腺癌由依赖型向非依赖型转化^[19]。

在 LNCaP 细胞中抑制 AR 的表达时，发现 RFX1 的表达也发生了相应的变化，说明在雄激素依赖的前列腺癌细胞中 RFX1 的表达会受到 AR 的调控，RFX1 与雄激素介导的 AR 信号通路有相关性。在进行 RFX1 对细胞表型影响的实验时，发现在雄激素依赖的前列腺癌细胞 LNCaP 及雄激素非依赖的前列腺癌细胞 PC-3 中，RFX1 对前列腺癌细胞增殖、周期和凋亡等细胞活动的影响均相同。RFX1 在雄激素依赖与非依赖的前列腺癌细胞系中功能的一致性及其与 AR 信号通路的相关性，说明 RFX1 很有可能在前列腺癌由依赖向非依赖转化的过程中发挥了作用。RFX1 很可能与激活 AR 的“非法”途径或不依赖 AR 的旁路途径相关，或者 RFX1 的表观遗传修饰使得它在雄激素非依赖的细胞系中不依赖 AR 也可以继续维持其正常的表达水平，从而继续发挥其对细胞的代谢活动、细胞周期、凋亡和增殖的调控作用。RFX1 在雄激素非依赖的前列腺癌细胞中怎样被激活尚不清楚，但 RFX1 在雄激素依赖与非依赖的前列腺癌细胞系中功能的一致性对维系雄激素非依赖的前列腺癌细胞的生存和生长有重要的意义。

2 RFX1 下游靶基因的生物学意义

在前列腺癌细胞中下调 RFX1 后，发现己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2) 和果糖-2,6-二磷酸酶 2,3 (fructose-2,6-biphosphatase, PFKFB2, PFKFB3) 的表达均明显下降，表明 RFX1 对这些糖酵解过程中的关键酶的表达有促进作用。而这些糖酵解过程中的关键酶，在癌细胞的生存生长增殖过程中，有非常重要的生物学意义。

HK2 是己糖激酶家族的成员之一，调控糖酵解的第一步限速反应，即将磷酸从 ATP 中转移到葡萄糖上，催化葡萄糖磷酸化成 6-磷酸-葡萄糖（Glucose-6-phosphate, G6P），该过程是不可逆转的。此时，带负电的 6-磷酸-葡萄糖被捕获入细胞。之后，6-磷酸-葡萄糖或通过糖酵解过程产生 ATP，或通过磷酸戊糖途径参与生物合成反应。己糖激酶家族有四个亚型，与其他亚型只有 C 端有催化能力不同，HK2 的 C 端和 N 端均有催化能力，这意味着它可以使葡萄糖磷酸化的速率加倍，因而加快整个糖酵解过程。HK2 是缺氧诱导因子 1（Hypoxia-inducible-factor 1, HIF-1）的靶基因。组织缺氧使 HIF-1 激活，HIF-1 和异常表达的致癌转录因子 c-Myc 合作来激活 HK2^[20]。HK2 以磷酸化形式存在于线粒体外膜上，可以和电压依赖性阴离子通道（Voltage dependent anion channel, VDAC）相互作用。这种定位使得 HK2 更倾向于与 ATP 结合，使线粒体产生的 ATP 马上被用于葡萄糖磷酸化；同时，这种定位使 HK2 对其抑制剂 6-磷酸-葡萄糖的反馈抑制敏感性低，也可保护 6-磷酸-葡萄糖被水解，以保证癌细胞的能量代谢需要。HK2 和 VDAC 的相互作用可以干扰促凋亡蛋白 Bax 与 VDAC 的结合，抑制两者结合后通道的形成，阻止细胞色素 c 通过该通道逃离线粒体，从而抑制癌细胞发生细胞凋亡^[21]。由于 HK2 在代谢过程中的优势及 HK2 可以保护癌细胞免于线粒体介导的细胞凋亡，HK2 在肺癌、胃肠癌及乳腺恶性肿瘤组织等很多肿瘤组织中高表达^[22]，也与成髓细胞瘤^[23]、多形性成胶质细胞瘤^[24]的发病机制密切相关。

哺乳动物细胞中存在两种磷酸果糖酶（6-phosphofructokinase, PFK）：磷酸果糖酶 1（6-phosphofructo-1-kinase, PFK1），催化 6-磷酸果糖（Fructose-6-phosphate, F6P）不可逆的转变成为果糖-1,6-二磷酸（Fructose-1,6-bisphosphate, F1,6BP）；磷酸果糖酶 2（6-phosphofructo-2-kinase, PFK2），具有激酶和磷酸酶双重作用，可调控果糖-2,6-二磷酸（Fructose-2,6-bisphosphate, F2,6BP）的合成及其向 6-磷酸-果糖的转化，因而也被称作果糖-2,6-二磷酸酶（Fructose-2,6-biphosphatase, FBPase）。果糖-2,6-二磷酸酶（PFKFB）是一类同型二聚体酶家族的成员，具有两种相反的催化功能。果糖-2,6-二磷酸酶既可以催化果糖-2,6-二磷酸的生成，也可以催化果糖-2,6-二磷酸酶去磷酸化生成 6-磷酸-果糖。果糖-2,6-二磷酸是糖酵解活动的关键调控因子，是糖酵解限速酶之一的磷酸果糖激

酶 1 的变构激活体，可以缓解 ATP 对 PFK1 的变构抑制，使 PFK 催化这一步变得更加高效，促进糖酵解的整个过程。PFK2/FBPase 家族有四个成员，其中 PFKFB1、PFKFB2 和 PFKFB4 磷酸化和去磷酸化作用相等，而 PFKFB3 磷酸化作用较高，几乎没有去磷酸化活性。这四种酶均可在缺氧条件下被诱导转录。而作为 HIF-1 的靶基因，PFKFB3 主要在 HIF-1 的诱导下表达。PFKFB3 在 462 位上丝氨酸磷酸化残基的缺失，使得它的磷酸化活性增强，有利于果糖-2,6-二磷酸的生成。PFKFB3 对高效率的糖酵解代谢活动的维持至关重要，在很多种类的肿瘤组织中高表达^[21]。

RFX1 对 HK2、PFKFB2 及 PFKFB3 等糖酵解酶表达的调控，能直观地反映出 RFX1 对前列腺癌细胞生长的作用途径，即通过促进糖酵解关键酶的表达，促进前列腺癌细胞的糖酵解过程，进而促进前列腺癌细胞的增殖。

3 问题与展望

RFX1 作为重要的转录因子，它对癌细胞的作用已在脑瘤与乳腺癌中有所研究，但是在前列腺癌中还没有有关报道。本文证明了 RFX1 与雄激素相关的细胞内信号通路关系密切，在雄激素依赖的前列腺癌细胞系中其表达受 AR 的调控；也展示了 RFX1 能通过抑制细胞凋亡、促进细胞从 G1 期向 S 期转化、促进细胞糖酵解酶的表达等来促进前列腺癌细胞的增殖，对 RFX1 在前列腺癌细胞中的作用及机制进行了一个初步的系统研究；RFX1 在雄激素依赖和非依赖细胞系中作用的一致性也指示其在前列腺癌由依赖型向非依赖型的转化过程中会有重要作用。然而，其中具体的机制仍待进一步研究。

mRNA 表达谱芯片数据显示，DHT 刺激 LNCaP 细胞后，RFX1 的表达量呈上升趋势，RFX1 对前列腺癌细胞增殖的促进作用也与该上升趋势相吻合，而抑制 AR48h 后，RFX1 的表达量也上升了。这虽然可以说明 RFX1 的表达受 AR 的调控，表明 RFX1 与 AR 信号通路存在相关性，但似乎与 DHT 刺激后 RFX1 表达量的变化不相符。AR 信号通路与其他信号通路相互作用形成的转录调控网络错综复杂，AR 对 RFX1 转录调控的作用途径也尚不明确。所以目前有几个问题值得深入研究：RFX1 是否为 AR 的直接靶基因？AR 怎样对 RFX1 进行转录调控？RFX1 在 AR 信号通路中所处的地位如何？或许 RFX1 与 AR 存在相互作用，或许 RFX1 不是 AR 的下游基因反而是 AR 的上游基因，DHT 刺激

后其他基因上调 RFX1 的表达，RFX1 上调 AR 的表达，而 AR 对 RFX1 的转录调控作用是一种反馈现象。也或许 AR 对 RFX1 的转录调控有早期晚期的区别，在开始的几小时内，被 DHT 激活的 AR 的确上调 RFX1 的表达，48 小时后，这种调控作用则变成了下调。这些调控机制均有待研究。

本文展示了 RFX1 对糖酵解过程中关键酶表达的显著调节作用，除了调控糖酵解酶的表达，RFX1 对其他细胞活动中的关键蛋白（如细胞周期蛋白，p53 等）的表达是否有调控作用？RFX1 在前列腺癌中的作用途径还有哪些？深入具体研究 RFX1 的作用途径，可能会发现 AR 信号通路与其他新的信号通路的相互作用。

RFX1 在雄激素依赖型与非依赖型前列腺癌细胞系中作用的一致性对维系雄激素非依赖的前列腺癌细胞的生存和生长有重要的意义。研究 RFX1 在雄激素非依赖型的前列腺癌细胞中的激活方式有可能揭示另一条在雄激素非依赖型前列腺癌细胞中可以替代 AR 信号通路的旁路途径。研究 RFX1 在 AR 信号通路与旁路途径等形成的网络中的地位、研究 RFX1 在雄激素非依赖型前列腺癌细胞中的激活方式有助于我们研究雄激素非依赖型前列腺癌的演化过程，也可以为雄激素非依赖型前列腺癌的治疗提供新的靶标与思路。

参考文献

1. Ahmad N, Kumar R. Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics. *Cancer Letters*. (2011) 1, 1-9.
2. Redig AJ, Munshi HG. Metabolic Syndrome After Hormone-Modifying Therapy: Risks Associated With Antineoplastic Therapy. *Oncology*. (2010) 24, 839-844.
3. Fang LC, Merrick GS, Wallner KE. Androgen Deprivation Therapy: A Survival Benefit or Detriment in Men With High-Risk Prostate Cancer. *Oncology*. (2010) 24,790-796.
4. Sharifi N, Gulley JL, Dahut WL. An update on androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*. (2010)17, 305-315.
5. Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Molecular alterations during progression of prostate cancer to androgen independence. *Clinical chemistry*. (2011)57, 1366-1375.
6. Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol*. (2003)21, 383-391.
7. Shi XB, et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2007)104, 19983-19988.
8. Yu J, et al. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell*. (2010)17, 443-454.
9. Lin C, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell*. (2009)139, 1069-1083.
10. Reith W, et al. RFX1, a transactivator of hepatitis B virus enhancer I, belongs to a novel family of homodimeric and heterodimeric DNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology*. (1994)14, 1230-1244.
11. Amin S, et al. Breast cancer cells proliferation is regulated by tyrosine phosphatase SHP1 through c-jun N-terminal kinase and cooperative induction of RFX-1 and AP-4 transcription factors. *Molecular Cancer Research*. (2011)9, 1112-1125.
12. Waltering KK, et al. Increased expression of androgen receptor sensitizes prostate cancer cells to low levels of androgens. *Cancer Res*. (2009)69, 8141–8149.
13. V Fiandalo M, Wu W, L Mohler J. The Role of Intracrine Androgen Metabolism, Androgen Receptor and Apoptosis in the Survival and Recurrence of Prostate Cancer During Androgen Deprivation Therapy. *Current drug targets*. (2013)14, 420-440.
14. Mellado B, et al. Molecular biology of androgen-independent prostate cancer: the role of the androgen receptor pathway. *Clinical and Translational Oncology*. (2009)11, 5-10.
15. Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* (2010)17, F1–17.

16. Jang M, Kim SS, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Experimental & molecular medicine*. (2013)45, e45.
17. Dang CV. Links between metabolism and cancer. *Genes & development*. (2012)26, 877-890.
18. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene*. (2013)32, 5501-5511.
19. Granchi C, Minutolo F. Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *ChemMedChem*. (2012)7, 1318-1350.
20. Kim J, et al. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Molecular and cellular biology*. (2007)27, 7381-7393.
21. Porporato PE, et al. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in pharmacology*. (2011)2, 1-18.
22. Palsson - McDermott E M, O'Neill L A. The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *BioEssays*. (2013)35, 965-973.
23. Gershon TR, et al. Hexokinase-2-mediated aerobic glycolysis is integral to cerebellar neurogenesis and pathogenesis of medulloblastoma. *Cancer Metab*. (2013)1, 1-17.
24. Wolf A, et al. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *The Journal of experimental medicine*. (2011)208, 313-326.

致谢

首先诚挚的感谢我的导师李瑶老师在我完成毕业论文期间给予我的指导和帮助。老师悉心的教导使我掌握细胞生物学基本知识、领略肿瘤分子遗传学领域的研究思路和前沿进展，不时的讨论与谈话引领我正确的方向，使我的毕业设计顺利完成。

感谢我的师兄万学超耐心细致地教会我实验技术与方法，不厌其烦地指出我实验中的缺失与错误，在我遇到问题时为我解惑。感谢众位的师兄师姐们在我遇到困难时跟我进行讨论，给我提出意见和建议。感谢实验室勤奋团结踏实愉快的科研氛围，提高了我对科研的兴趣。