

# 科研总结报告

张溥 13307110406

**课题名称** 雄激素应答的 lncRNA LINC00304 通过调控 CCNA1 促进前列腺癌的周期与增殖

**摘要** 长链非编码 RNA(lncRNA)在疾病的发展进程中发挥着重要的作用。LncRNA 的异常表达与许多肿瘤的发生发展密切相关。本研究通过表达谱芯片首次鉴定了在雄激素刺激后表达发生显著改变的 LINC00304, 在 LNCaP 细胞系中进一步的验证显示 LINC00304 的表达量在雄激素刺激后显著降低; 通过生物信息学预测与染色质免疫共沉淀实验发现, AR 能够结合在 LINC00304 上游的雄激素应答元件上直接调控其表达; 运用 qRT-PCR 在前列腺癌细胞系和肿瘤样本中检测 LINC00304 的表达量, 发现 LINC00304 在人类前列腺癌细胞系与肿瘤组织样本中高表达。通过在 LNCaP 和 PC3 细胞系中高表达 LINC00304 发现, LINC00304 能够促进前列腺癌细胞由 G1 期向 S 期转化, 进而促进细胞增殖; 进一步的靶基因筛选显示 LINC00304 能够显著促进 CCNA1 在前列腺癌中的表达。上述结果预示 LINC00304 能够为前列腺癌提供新的临床诊断靶标, 并为前列腺癌的治疗提供理论依据。

**关键词** LINC00304, 前列腺癌, 雄激素信号通路, 诊断及治疗靶标, CCNA1

## 1、研究背景

前列腺癌是发生在前列腺上皮的恶性肿瘤。2015 年中国肿瘤年报显示前列腺癌的发病率与死亡率已经中国男性肿瘤第六位。与此同时, 随着人们生活方式的改变, 前列腺癌的发病率呈现出持续上升的趋势, 从 2000 年的 4/10 万提升至 2015 年的 11/10 万, 严重威胁中国男性健康。前列腺癌的早期治疗手段为前列腺切除术或放射治疗, 然而大多数病患的临床确诊较晚, 上述方法往往难以奏效。

自研究发现前列腺癌细胞的雄激素依赖性生长后, 雄激素剥夺治疗成为近 50 年来治疗前列腺癌的主要手段。然而, 大多数前列腺癌细胞在接受雄激素剥夺治疗 18 到 24 个月后对雄激素的依赖性逐渐减弱, 最终发展为雄激素非依赖性的细胞。鉴于前列腺癌细胞的这种转变, 雄激素相关的细胞内信号通路受到广泛关注。

雄激素受体 (Androgen receptor, AR) 是 I 型甾类激素受体家族的成员之一, 在雄激素刺激的条件下 AR 会进入细胞核。在细胞核中, AR 与雄激素应答元件 (androgen response element, ARE) 特异性结合, 并招募更多的辅助因子形成复合物, 调控基因的表达。另外, AR 还可以同其他转录调控因子协同作用, 通过改变靶基因区域的染色质结构和组蛋白修饰来调控下游靶基因的表达。AR 在雄激素信号通路中起着决定作用, 研究 AR 及其下游调控基因在前列腺癌雄激素非依赖转化过程中的作用是前列腺癌研究领域的热点<sup>[1]-[4]</sup>。

长链非编码 RNA (Long noncoding RNA, lncRNA) 是一类长度超过 200nt 的非编码 RNA。近年来, 有越来越多的证据显示 lncRNA 在多个生物过程中起到了非常重要的作用, 如逆境反应、发育、胚胎干细胞多能化、定位等。另外, lncRNA 还影响诸如细胞周期、增殖、迁移和代谢等多种细胞生命过程, 这说明 lncRNA 与癌症的发生有密切关联。

当前研究表明大量的 lncRNA 在前列腺癌细胞或组织中异常表达, 发挥原癌或抑癌作用。例如: PCAT-1 在前列腺癌组织中高表达, 通过干扰 microRNA (如 miR-34a) 对 MYC 3' 非翻译区活性的抑制对 c-Myc 进行转录后调控, 从而上调 c-Myc 蛋白水平并促进前列腺癌细胞的增殖, 发挥原癌作用<sup>[5]</sup>; MEG3 在前列腺癌组织中含量降低, 研究发现它能够通过降低 Bcl-2 蛋白的表达增强 Bax 并激活 caspase3, 抑制细胞周期蛋白 D1 的表达从而使细胞停滞在 G0/G1 期, 发挥抑癌作用<sup>[6]</sup>。

AR 与 lncRNA 之间存在着复杂的作用机制。例如, lncRNA PCGEM1 是前列腺癌中报道最多的一个 lncRNA, 它可结合在甲基化的 AR 和 PYGO2 上, 促进染色质松散和 2000 个左右的 AR 反应基因的转录<sup>[7]</sup>; PlncRNA-1 在前列腺癌中高表达, 下调表达后细胞增殖受阻、凋亡增加, 并下调 AR 表达, 而 AR 下调后也会导致 PlncRNA-1 表达降低<sup>[8]</sup>; PCAT18 在前列腺癌中高表达, DHT 诱导其上调表达, 并促进肿瘤的浸润和转移<sup>[9]</sup>; PCAT29 在 DHT 诱导时低表达, 而在前列腺癌去势治疗后高表达, 与预后差关联, 并发挥抑癌基因的作用<sup>[10]</sup>。

LINC00304 位于人类 16 号染色体的 89159146-89164245 区段, 具备一个外显子, 编码长 1864bp 的 LINC00304。在实验室前期雄激素应答的 lncRNA 的筛选中, 发现在雄激素刺激条件下, LINC00304 的表达发生显著差异。本课题首次阐明 AR 通过结合到 LINC00304 上游的雄激素应答元件直接调控 LINC00304 的表达, 并发现 LINC00304 通过调控 CCNA1 促进前列腺癌细胞 G1/S 的转化, 进而促进前列腺癌细胞的增殖。进一步研究表明, LINC00304 在人类前列腺癌细胞系与肿瘤组织样本中高表达。上述结果说明 LINC00304 能够为前列腺癌提供潜在的临床诊断靶标, 并为前列腺癌的治疗提供新的理论依据。

## 2、研究方法和材料

### 2.1 细胞株

人前列腺癌细胞株 LNCaP、22Rv1、DU145、PC-3、人前列腺正常细胞 WPMY-1 均由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供。

### 2.2 临床样本收集

本研究中的前列腺癌患者来自 2001 年 1 月到 2013 年 10 月在上海市同济医院接受前列腺癌根治术和淋巴结清扫的患者, 患者在手术前没有接受任何的治疗。收集病例样本数为 13 例, 正常样本数为 9 例。本研究经复旦大学生命科学学院

及同济医院伦理委员会批准，样本采集及信息收集经研究对象知情同意，遵守伦理学的各项规定。

### 2.3 细胞培养

吸去培养皿中培养液，加入 5mLPBS 清洗细胞，弃去 PBS；加入 1mL 胰酶，消化 1min（LNCaP 细胞）或 2min30s（PC-3 细胞）；加入完全培养液 4ml 终止消化，1000 rpm 离心 5min；弃上清，按照 1:2 比例传两皿，摇匀铺平；37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养。

### 2.4 转染

用 HilyMax 将 LINC00304 高表达质粒转入细胞。每孔需要：（1）120μLOpti-Mem+200/400/600ng 质粒+5μLHilyMax，室温孵育 15min；向（1）中加入 1.0mL 不含血清及二抗的 RPMI 1640 细胞培养基得（2）。弃去六孔板中培养液，每孔用 1mL PBS 洗并加入 1mL 不含血清及二抗的 RPMI 1640 细胞培养基，之后加入（2）。4h 后重新换液，48h 后进行 RNA 抽提、蛋白抽提、细胞增殖或周期的实验。

### 2.5 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 200μL 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。

### 2.6 逆转录

在 RNase free 的 200μLEP 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 RNA1.0μL，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，-80℃保存。

### 2.7 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。

### 2.8 染色质免疫共沉淀（ChIP）

首先对将处理的细胞进行计数,控制细胞量。之后使用 1%甲醛交联 10 分钟。弃尽培养基,用含有蛋白酶抑制剂的 PBS 洗细胞两次。收集细胞至洁净离心管中。2000rpm 4℃ 离心 4 分钟,留细胞沉淀。按照每百万细胞加入 200ul 含蛋白酶抑制剂的 SDS 裂解液,冰上孵育 10 分钟。之后进行细胞超声处理,使 DNA 碎片成 200~500 碱基对大小的片段。4℃ 13000rpm 离心 10 分钟,上清转移至一个洁净的 2 ml 新管。取出 3%作为 input。样品中加入对应 AR 抗体 4ug, 4℃ 孵育过夜。之后加入 60 ul 的 Protein A Agarose 4℃ 旋转孵育 1 小时。4℃ 4000rpm 离心 1 分钟,小心移除上清,依次用 1 ml 的 Low Salt, high Salt, LiCl ImmuneComplexWashBuffer 和 TE buffer 洗。向沉淀中加入 ChIP elution buffer,室温旋转 15 分钟后 3000rpm 离心 5 分钟,收集上清。上清液中加入 5 M NaCl 至终浓度 400 mM 65℃ 交联 4 小时。加入 10 ul 的 0.5 M EDTA, 20ul pH 为 6.5 的 1 M Tris-HCl 和 2 ul 10 mg/ml 的蛋白酶 K,混匀后 45℃ 孵育 1 小时。最后酚-氯仿法抽提 DNA,通过 PCR 或者 RT-PCR 检测结果。

## 2.9 细胞增殖

细胞增殖实验使用 CCK-8 试剂盒。按 1.4 进行细胞转染,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、48h、72h 及 96h 的细胞增殖情况。每个时间点时,在每孔中加入 10 $\mu$ L CCK-8,37℃、5%CO<sub>2</sub> 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。

## 2.10 细胞周期

按 1.4 进行细胞转染(分别转染 pcDNA3.1+空载、200ng, 400ng, 600ng LINC00304 高表达质粒),4h 后换液;48h 后,弃培养液,1mL PBS 洗细胞;加入 200 $\mu$ L 胰酶消化;加入 1mL 含血清培养基终止消化,吹下细胞,1000rpm 离心 5min;用 PBS 洗细胞三次,每次 1000rpm 离心 3min;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。

## 2.11 蛋白印迹检测 (Western blot)

### 2.11.1 细胞总蛋白质提取

处理好的细胞弃去培养液,用预冷 PBS 清洗 2 遍,然后用细胞刮将细胞刮下,转移入离心管内。于 4℃,5000 rpm/10 min 离心,去上清。加入 1 mL RIPA 裂解液,放置冰上裂解 15 min,期间可颠倒混匀数次。于 4℃,13000 rpm/15 min 离心,将上清收集入离心管(细胞总蛋白),可于-80℃ 长期保存。每次制备 SDS-PAGE 样品之前用 Bradford 法将总蛋白质定量。

### 2.11.2 蛋白电泳上样液的制备

取 30-60  $\mu$ g 总蛋白质样品,按比例加入 SDS-PAGE 上样缓冲液和 RIPA

裂解液稀释至 30  $\mu$ L (小孔胶) 或 50  $\mu$ L (大孔胶), 混匀后 100 $^{\circ}$ C 加热 5-10 min, 置冰上 1min, 短暂离心。

### 2.11.3 蛋白电泳及免疫检测

将制备好的蛋白质样品依次加入制好的 SDS-PAGE 胶泳道中, 恒压 80 V 电泳至浓缩胶结束, 切换电压 100 V 电泳至溴酚蓝染料条带至铂丝位置。将 SDS-PAGE 分离胶剥离后用于蛋白质电转。电转用恒流 200 mA/120 min, 将胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上, 将膜按需切好在 1 $\times$ TBST 奶粉封闭液中室温摇动 1 hr (80-90 rpm)。用相应的一抗稀释液于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 (12-16 小时)。回收一抗稀释液冻存于 -20 $^{\circ}$ C, 用 TBST 缓冲液简短漂洗 PVDF 膜 3 次, 然后室温洗涤四次, 每次摇动 5 min。加入对应一抗的辣根过氧化物酶交联的二抗稀释液室温孵育 1 hr, 按上述步骤洗涤。去除洗涤液后, 加入 ECL 化学发光反应液。置于 ChemiScopeSeries 荧光及化学发光成像系统中采集图像, 图像文件选择背景较低, 条带亮度合适的文件作为结果。

## 2.11 统计分析

实验每组重复至少 3 次, 每次实验为独立实验检测。实验结果表示为平均值  $\pm$  标准差。每两组实验组之间的差异用双尾的 T-test 检验统计, 认为  $p < 0.05$  的结果为有显著统计学差异。所用实验数据的统计用 SPSS 软件完成。连续时间点的变化通过 One way ANOVA 统计, 认为  $p < 0.05$  的结果为有显著统计学差异。

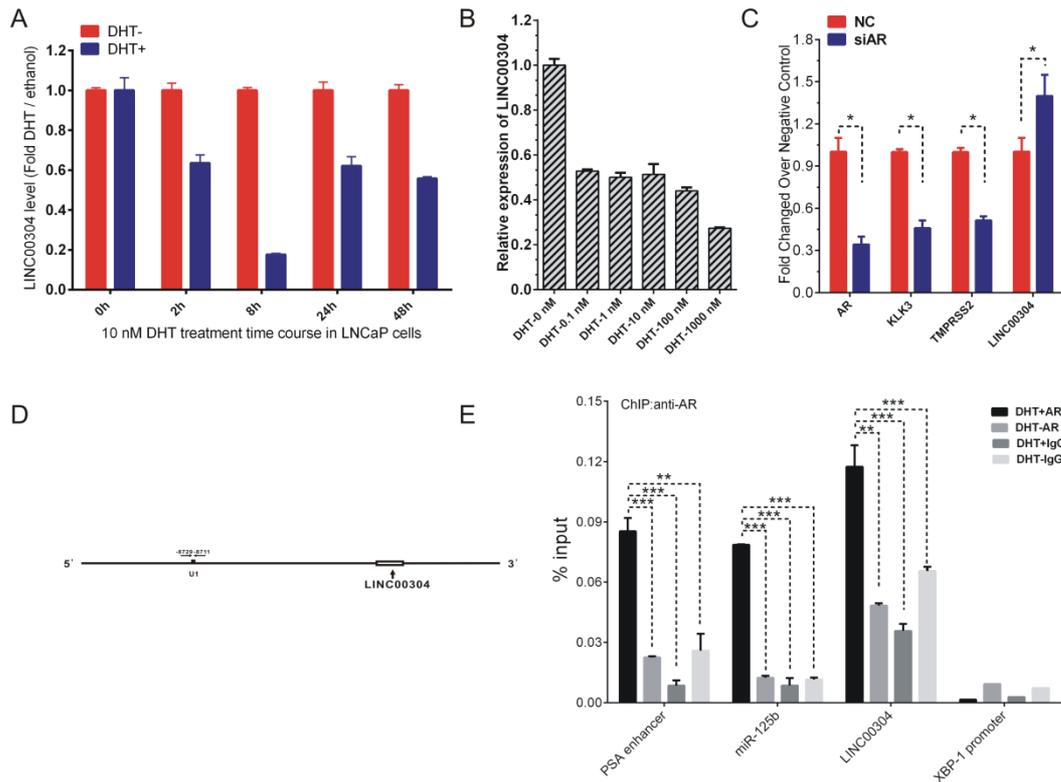
## 3、主要研究结果

### 3.1 LINC00304 的表达受 AR 调控

前期表达谱芯片数据显示 LINC00304 在雄激素刺激后表达量的降低较明显。通过实验验证, 发现在 DHT 刺激后 LINC00304 的表达量的确发生了显著的降低 (图 1A-B)。这些实验结果可以说明 LINC00304 对 AR 敏感, 与 AR 信号通路密切相关, 因此本文选择 LINC00304 作为研究对象。

本课题为了进一步探究 AR 对 LINC00304 的直接调控。运用 RNA 干扰技术降低 AR 在 LNCaP 细胞中的表达, 然后观察 LINC00304 表达量的变化 (图 1C)。由图可知, 转染 siAR 后, LNCaP 细胞中 LINC00304 的表达量明显上升。

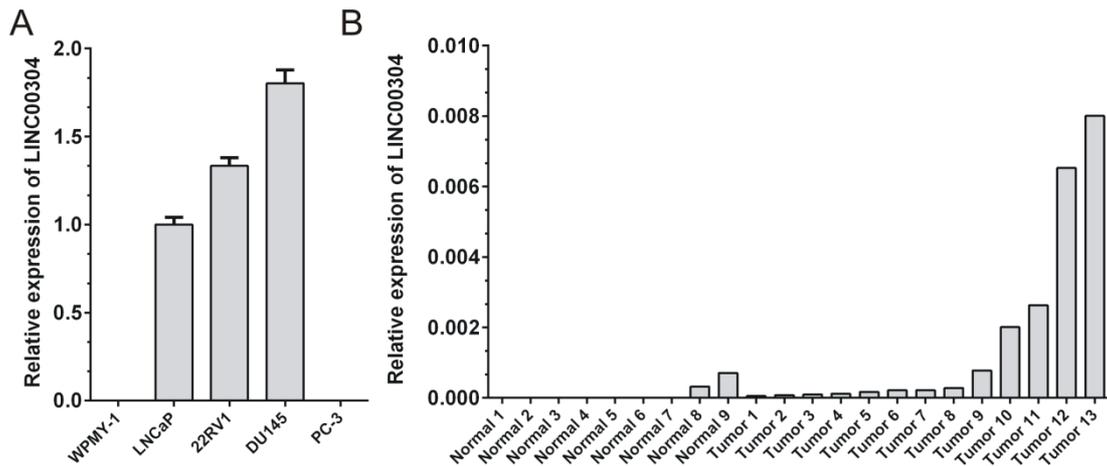
为了直接验证 LINC00304 作为 AR 的直接靶基因。利用生物信息学方法预测了 LINC00304 上游 10kb 以内存在雄激素应答元件 (图 1D), 之后通过染色质免疫共沉淀实验验证了雄激素应答元件的存在 (图 1E), 这说明 AR 通过结合在雄激素应答元件上对下游 LINC00304 的表达进行直接调控。



**图一: AR 通过结合到 LINC00304 上游的雄激素应答元件直接调控 LINC00304 的表达(A)** LNCaP 经过去激素饥饿培养 3 天后, 使用 DHT 刺激 0h、1h、2h、8h、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。(B) LNCaP 经过去激素饥饿培养 3 天后, 使用浓度为 0、0.1、1、10、100、1000nM 的 DHT 进行刺激, 然后抽取总 RNA 进行 RT-PCR。(C) 转染 siAR 入 LNCaP 细胞, 48h 后抽 RNA, RT-PCR 检测 AR 和 LINC00304 的表达量。(D) 使用 Genomatix 数据库预测 LINC00304 上游 10kb 以内的雄激素应答元件。(E) ChIP 结果显示雄激素刺激可以显著增加 LINC00304 上游 ARE 的 AR 结合。

### 3.2 LINC00304 在人类前列腺癌细胞系与肿瘤组织样本中高表达

为了探究 LINC00304 在人类前列腺癌细胞系中的表达情况, 用 qRT-PCR 在正常前列腺细胞系 WPMY-1 和前列腺癌细胞系 LNCaP、22RV1、DU145 和 PC3 细胞系中检测 LINC00304 的表达量。如图 2 所示, LINC00304 在 LNCaP, 22RV1, DU145 细胞系中的表达量高于前列腺正常细胞系 WPMY-1 中的表达量(图 2A)。为了验证上述细胞系中的结果, 在 13 个肿瘤样本及 9 个前列腺正常组织样本中检测 LINC00304 的表达量(图 2B)。检测结果显示, LINC00304 在前列腺癌中的平均表达量显著高于正常的前列腺组织中的表达量( $P < 0.001$ )。



**图二：LINC00304 在前列腺细胞系及组织中的表达量** (A) LINC00304 在前列腺正常细胞系 WPMY-1 和前列腺癌细胞系 LNCaP、22RV1、DU145、PC3 中相对于 LNCaP 的含量。(B) LINC00304 在前列腺癌及正常组织中的相对于  $\beta$ -actin 的含量。

### 3.3 LINC00304 对前列腺癌细胞表型的影响

#### 3.3.1 LINC00304 能促进前列腺癌细胞的增殖

为了研究 LINC00304 对于前列腺癌细胞增殖的影响，首先在 LNCaP 细胞中转染 LINC00304 高表达质粒。实验方法为：转染 LINC00304 高表达质粒至 LNCaP 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、2 天、3 天和 4 天加入 CCK-8，2h 后用酶标仪检测。由图 3E 可见，转染高表达质粒后，LNCaP 细胞的增殖受到了明显的促进。这些结果说明 LINC00304 能促进前列腺癌细胞的增殖。

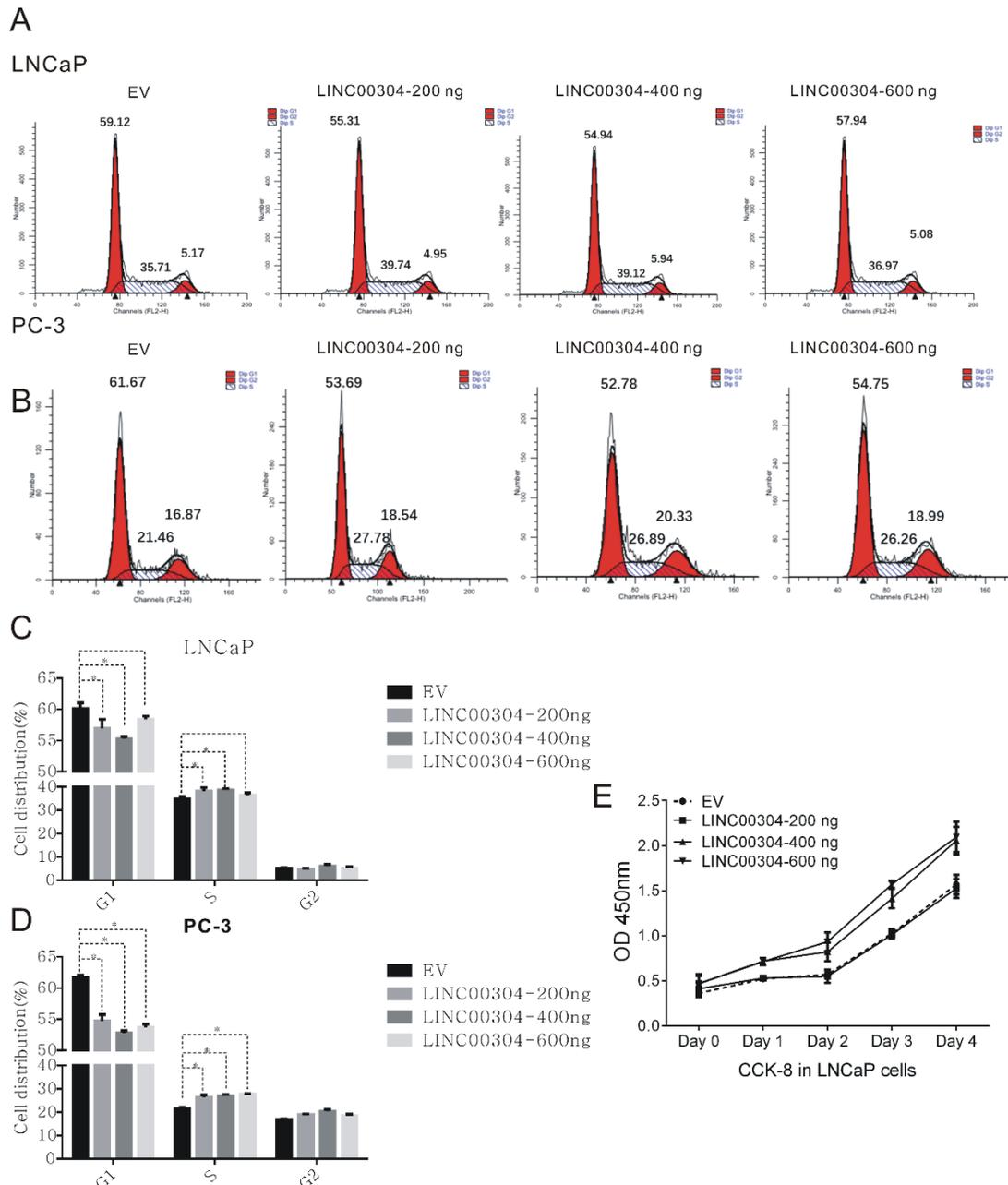
#### 3.3.2 LINC00304 能促进前列腺癌细胞 G1/S 的转化

前文已经验证了 LINC00304 对前列腺癌细胞增殖的影响，接下来本文探究 LINC00304 对细胞周期的作用。实验方法为：转染 LINC00304 高表达质粒至 LNCaP 及 PC3 细胞中，48h 后收集细胞，加入 PI 染液后使用流式细胞仪进行检测。

在 LNCaP 细胞中转染 LINC00304 高表达质粒后，G1 期细胞比例上升，S 期细胞比例下降（图 3A、C）。可以看出在 LNCaP 细胞中上调 LINC00304 后，G1 期细胞数量减少，S 期细胞数量增加，LINC00304 能促进 LNCaP 细胞从 G1 期向 S 期转化。

在 PC3 细胞中转染 LINC00304 高表达质粒后，G1 期细胞比例上升，S 期细胞比例下降（图 3B、D）。可以看出在 PC3 细胞中上调 LINC00304 后，G1 期细胞数量减少，S 期细胞数量增加，LINC00304 能促进 PC3 细胞从 G1 期向 S 期转化。

LNCaP 和 PC-3 细胞中的结果说明 LINC00304 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。



**图三：LINC00304 促进前列腺癌细胞的增殖和周期** (A-D) LNCaP 及 PC3 细胞中转染 LINC00304 高表达质粒后检测细胞周期，由左至右分别是转染 pcDNA3.1+空载、200ng、400ng、600ng LINC00304 高表达质粒之后的实验结果，A,B 图中第一个峰为 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。(E) LNCaP 细胞中转染 LINC00304 高表达质粒后用 CCK-8 分别在 0 天、1 天、2 天、3 天和 4 天检测细胞的增殖情况。

### 3.4 LINC00304 可能通过结合到 eIF4A3 上调控细胞周期

通过细胞增殖与细胞周期实验可以发现，LINC00304 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。为了进一步探究 LINC00304 调控细胞周期的机制，使用 starbase2.0 数据库预测 LINC00304 的相互作用蛋白。预测结果显示 LINC00304 可能与真核翻译延长因子 4A3 (eIF4A3) 相互结合。

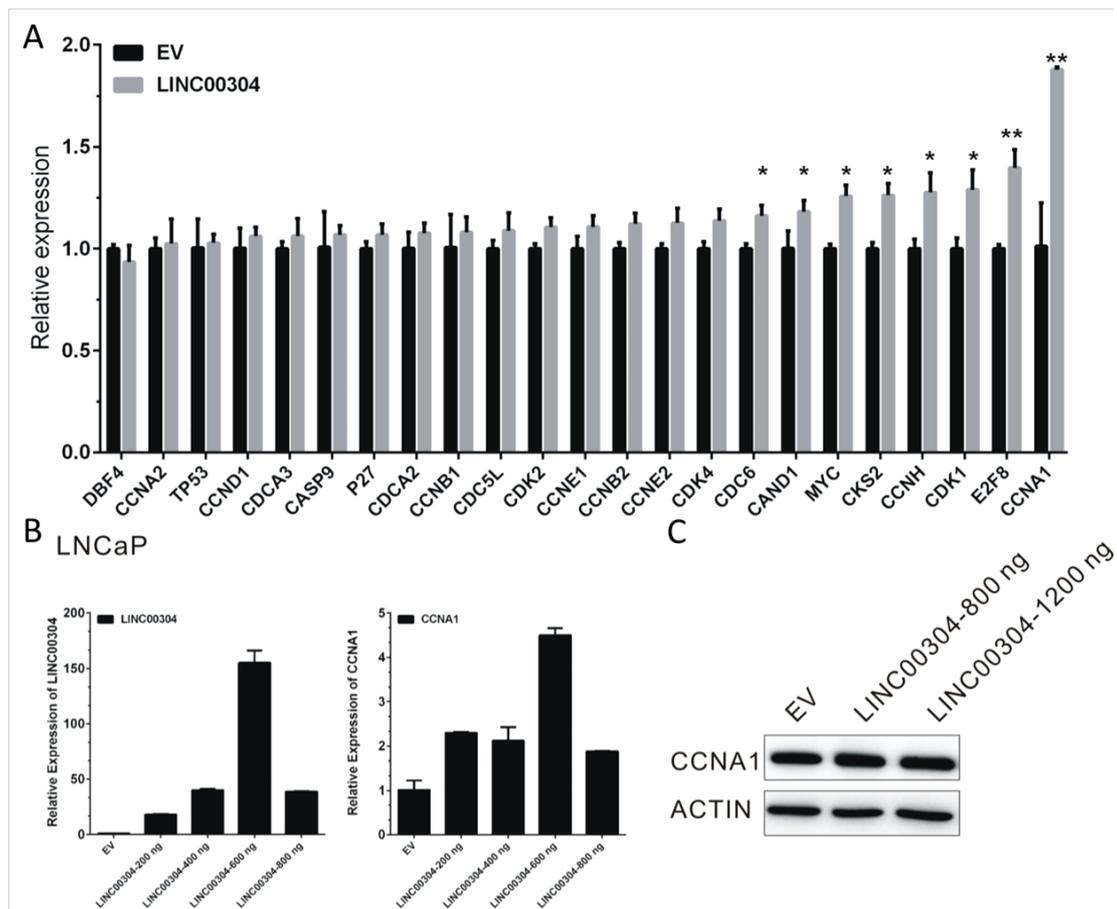
Human RBP-LncRNA interactions: 3 items					
Help	export	Items 1-3 of 3	Shows: 20 items	Page 1 of 1	
previous page		next page			
name	geneName	targetSites	bioComplex	clipReadNum	CancerNum
eIF4AIII	<a href="#">LINC00304</a>	1	1	32	NoData
FUS	<a href="#">LINC00304</a>	2	1	14	NoData
<a href="#">U2AF66</a>	<a href="#">LINC00304</a>	1	1	3	NoData

eIF4A3 是外显子连接复合体（exon junction complex, EJC）的组分，文献报道显示 eIF4A3 能够调控细胞周期蛋白的表达。LINC00304 可能通过结合到 eIF4A3 上调细胞周期相关因子的表达，从而促进细胞增殖。

### 3.5 LINC00304 能够促进 CCNA1 的表达

由 3.3 及 3.4 的实验结果可知，LINC00304 可能通过结合到 eIF4A3 上调细胞周期相关基因。因此，我们检测了高表达 LINC00304 的情况下多个细胞周期调控蛋白的表达水平。转染不同浓度的 LINC00304 高表达质粒之后，我们发现在 CCNA1，E2F8，CDK1 的表达量显著提升，其中 CCNA1 的表达量提升最为明显。

人类 CCNA1 基因位于染色体 13q12.3-13 上，编码细胞周期调控蛋白 A1。CCNA1 在细胞周期调节中起到关键作用，其表达异常与肿瘤的发生、生长、迁移、侵袭有密切关联。因此，LINC00304 可能通过结合到 eIF4A3 上促进 CCNA1 的表达，从而促进前列腺癌细胞周期进程，进而促进细胞增殖。



图三：CCNA1 的表达可能受到 LINC00304 的促进（A-B）通过 RT-PCR 检测转染不同浓度的 LINC00304 高表达质粒之后 CCNA1, E2F8, CDK1, CCNH 等基因的表达情况。（C）通过 Western Bolt 检测转染不同浓度的 LINC00304 高表达质粒之后 CCNA1 蛋白量的变化。

#### 4、讨论

研究 AR 信号通路在前列腺癌雄激素依赖向非依赖转化的作用一直是前列腺癌研究领域的热点。LncRNA 目前广泛报道在疾病的发展进程中发挥着重要的作用。LncRNA 的异常表达与许多肿瘤的发生发展密切相关。近年来，许多报道显示 lncRNA 在前列腺癌中同样起着重要的作用。因此探究雄激素应答 lncRNA 在前列腺癌激素依赖型前列腺癌向非依赖型转化过程中的作用具有着显著的临床意义。

本课题中，通过生物芯片技术，我们鉴定 LINC00304 的表达水平在雄激素刺激之后发生差异变化。进一步的实验验证显示，雄激素刺激的条件下，LINC00304 的表达水平呈现显著下降的趋势。在雄激素依赖的 LNCaP 细胞中抑制 AR 的表达时，发现 LINC00304 的表达发生了升高。这些结果显示 LINC00304 可能作为 AR 的直接靶基因。我们利用生物信息学方法结合染色质免疫共沉淀实验发现 AR 通过结合 LINC00304 的雄激素应答元件上游调控 LINC00304 的表达。上述实验现象表明雄激素应答 LINC00304 作为 AR 的直接靶基因在 AR 信号通路发挥作用。

检测 LINC00304 在前列腺癌样本和正常组织中的差异表达情况发现，在绝大多数正常组织中 LINC00304 没有表达，而在前列腺癌组织中 LINC00304 均有表达且部分表达很高，因此 LINC00304 具备成为临床标志物的可能。

与此同时，为了探究 LINC00304 在前列腺癌中的功能与作用。我们检测了 LINC00304 对细胞表型影响。实验结果显示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，LINC00304 能够显著促进前列腺癌细胞的增殖以及加速细胞周期的进程。为了进一步探究 LINC00304 调控细胞周期的机制，使用 starbase2.0 数据库预测 LINC00304 的相互作用蛋白。预测结果显示 LINC00304 可能通过结合到 eIF4A3 上调细胞周期相关因子的表达，从而促进细胞增殖。为了探究 LINC00304 的下游调控基因，我们检测了高表达 LINC00304 的情况下一系列细胞周期调控蛋白的表达水平，发现 LINC00304 能够显著促进 CCNA1 的表达。

当前研究表明，CCNA1 在前列腺癌中特异性高表达能够显著促进前列腺癌的细胞周期与增殖<sup>[11]</sup>。目前尚未有任何关于非编码 RNA 对于 CCNA1 调控的研究，而我们首次发现 LINC00304 能够促进 CCNA1 的表达。LINC00304 对于 CCNA1 的特异性调控可能是 LINC00304 发挥原癌功能的重要机制。

检测 LINC00304 在人类前列腺癌细胞系中与正常前列腺上皮细胞的表达情况发现，LINC00304 在雄激素依赖的细胞系与雄激素非依赖的细胞系中表达有较大差异；与此同时，观察 LINC00304 受到 DHT 刺激之后表达量的变化及其对细胞表型的影响可以发现，LINC00304 是一个受到 AR 抑制的原癌基因。这些结果表明当前列腺癌由依赖向非依赖转化时，LINC00304 受到 AR 的抑制将会解除，其表达可能会有比较显著的提升，起到更加显著的促癌作用。据此，我们可以合理推测，在进行雄激素剥夺治疗的时候 LINC00304 的表达上调，进而促进雄激素非依赖前列腺癌细胞的生长，我们下一步的工作便是利用 LNCaP-AI 模型来探究 LINC00304 在前列腺癌雄激素非依赖转化过程中的功能与作用，进而为前列腺癌的临床治疗提供新的视野。

结合前文所述，LINC00304 作为受雄激素抑制表达的 AR 直接靶基因，在前列腺癌中起着原癌基因的作用，能够显著促进细胞周期的进程。与此同时我们发现其在部分前列腺癌样本中显著高表达。这些结果显示 LINC00304 雄激素依赖向非依赖转化过程中起着重要作用。因此，探究 LINC00304 在前列腺癌中的功能与表达可能为前列腺癌的临床治疗提供潜在的靶点。

## 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]Prensner J R, Chen W, Han S, et al. The Long Non-Coding RNA PCAT-1 Promotes Prostate Cancer Cell Proliferation through cMyc 1 2[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(11):900-908.
- [6]Luo G, Wang M, Wu X, et al. Long Non-Coding RNA MEG3 Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis in Prostate Cancer[J]. *Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology*, 2015, 37(6):2209-2220.
- [7]Liuqing Y, Chunru L, Chunyu J, et al. lncRNA-dependent mechanisms of androgen- receptor- regulated gene activation programs.[J]. *Nature*, 2013, 500(7464):598-602.
- [8]Cui Z, Ren S, Lu J, et al. The prostate cancer-up-regulated long noncoding RNA PlncRNA-1 modulates apoptosis and proliferation through reciprocal regulation of androgen receptor[J]. *Urologic Oncology Seminars & Original Investigations*, 2013, 31(7):1117–1123.
- [9]Francesco C, Akira W, Luca Q, et al. Identification of a long non-coding RNA as a novel biomarker and potential therapeutic target for metastatic prostate cancer.[J]. *Oncotarget*, 2014, 5(3):764-774.
- [10]Malik R, Patel L, Prensner J R, et al. The lncRNA PCAT29 inhibits oncogenic phenotypes in prostate cancer.[J]. *Molecular Cancer Research*, 2014, 12(8):1081-1087.
- [11] Miftakhova R, Hedblom A, Semenas J, et al. Cyclin A1 and P450 aromatase promote metastatic homing and growth of stem-like prostate cancer cells in the bone marrow.[J]. *Cancer Research*, 2016, 76.