

恩杂鲁胺对前列腺癌LNCaP细胞衰老的影响及其机制研究

冯诗尧, 李 良, 姚 锴, 闫海新, 张志辉, 谢栋栋*

安徽医科大学第二附属医院泌尿外科, 安徽 合肥

收稿日期: 2023年4月16日; 录用日期: 2023年5月9日; 发布日期: 2023年5月16日

摘 要

探讨雄激素受体抑制剂恩杂鲁胺对人前列腺癌LNCaP细胞衰老的影响。使用CCK8实验检测LNCaP细胞对恩杂鲁胺的IC50, 将加入等体积DMSO的LNCaP细胞定义为对照组, LNCaP细胞以IC50浓度的恩杂鲁胺慢性处理1个月设为实验组。 β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测细胞衰老; 克隆形成实验检测细胞增殖; 蛋白免疫印记实验检测雄激素受体, 衰老标志蛋白的表达情况和信号转导机制。结果显示LNCaP细胞在1 μ M (IC50)剂量恩杂鲁胺慢性暴露后, 雄激素受体被抑制, 细胞发生衰老, 表现为 β -半乳糖苷酶染色增多, 衰老标记蛋白p16, p21表达上调。通过对信号转导研究发现, 实验组中YAP1磷酸化水平降低, 入核增多, YAP1可能是恩杂鲁胺致LNCaP细胞衰老的关键信号。

关键词

恩杂鲁胺, 前列腺癌, LNCaP, 细胞衰老, YAP1

The Molecular Mechanisms of Cellular Senescence Induced by Enzalutamide in LNCaP Cells

Shiyao Feng, Liang Li, Kai Yao, Haixin Yan, Zhihui Zhang, Dongdong Xie*

Department of Urology, Second Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: Apr. 16th, 2023; accepted: May 9th, 2023; published: May 16th, 2023

Abstract

To investigate the effect of enzalutamide, an androgen receptor inhibitor, on the senescence of human prostate cancer LNCaP cells. CCK8 assay was used to detect the IC50 of LNCaP cells to en-

*通讯作者。

文章引用: 冯诗尧, 李良, 姚锴, 闫海新, 张志辉, 谢栋栋. 恩杂鲁胺对前列腺癌 LNCaP 细胞衰老的影响及其机制研究[J]. 临床医学进展, 2023, 13(5): 7783-7789. DOI: 10.12677/acm.2023.1351088

zalutamide. LNCaP cells supplemented with DMSO were defined as the control group, and LNCaP cells were treated with enzalutamide at IC50 concentration for one month as the experimental group. The SA- β -gal staining kit detected cell senescence. Cell proliferation was detected by colony formation assay. Western blot was used to detect the expression of androgen receptor and aging marker proteins and the signal transduction mechanism. The results showed that after chronic exposure to enzalutamide at the dose of 1 μ M (IC50), the androgen receptor was inhibited. Cell senescence occurred in LNCaP cells, as shown by increased SA- β -gal staining and up-regulation of senescence marker proteins p16 and p21. Through the study of signal transduction, it was found that the phosphorylation level of YAP1 was decreased and its nuclear translocation was increased in the experimental group. YAP1 may be the key signal of enzalutamide-induced senescence in LNCaP cells.

Keywords

Enzalutamide, Prostate Cancer, LNCaP, Cell Senescence, YAP1

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

前列腺癌在老年男性中高发,在近2年的美国癌症学会统计中高居男性新发癌症榜首,在我国2020年的数据统计中,居男性新发第6位[1][2][3]。随着我国老龄化的加重,城市迁移人口的增多,前列腺癌的发病率逐年上涨。前列腺癌作为一种腺癌,高度依赖雄激素受体,因此雄激素阻断治疗得以成为前列腺癌治疗的一线方法[4][5]。在转移性前列腺癌中,雄激素靶向药物的应用非常广泛。是细胞在接受外界应激刺激下产生的细胞状态改变,以增殖减慢为特征,药物刺激产生的细胞衰老与耐药性高度相关[6]。恩杂鲁胺是二代雄激素受体拮抗剂,治疗窗口短且最终导致耐药,其耐药机制尚不明确。本研究旨在细胞水平模拟恩杂鲁胺治疗早期前列腺癌,探究恩杂鲁胺慢性暴露对早期前列腺癌 LNCaP 细胞衰老的影响。

2. 材料与方法

2.1. 材料

人前列腺癌 LNCaP 细胞系来自东方肝胆外科医院卫立辛主任赠予;二甲基亚砜,恩杂鲁胺,二氢睾酮购买自美国赛莱克生物公司;青链双抗,CCK8 试剂购买自武汉赛维尔生物公司; β -半乳糖苷酶染色试剂盒购买自上海碧云天生物公司;RPMI 1640 培养基和胎牛血清购买自上海翌圣生物公司;p-YAP, YAP1 购买自蛋白科技;p16, p21 购买自埃博抗生物公司;BCA 试剂盒,核质分离蛋白提取试剂盒(#78833)来自赛默飞生物公司。

2.2. 方法

2.2.1. 细胞培养

人前列腺癌 LNCaP 细胞使用 RPMI 1640 培养基 + 10%胎牛血清 + 1%青链双抗在 37°C, 5%二氧化碳及饱和湿度的培养箱中培养,使用超净台进行无菌操作。

2.2.2. CCK8 检测药物毒性

细胞计数后,使用 96 孔板,以每孔 5000 个细胞使用排枪进行铺板,在 12 小时后更换含不同浓度恩杂

鲁胺的培养基，孵育 24 小时。以无血清 1640 培养基比 CCK8 原液 9 比 1 的比例配置混合液，每孔加入 100 微升，在 37℃，5% 二氧化碳及饱和湿度的培养箱中孵育 1 小时。在 450 nm 波长下检测 OD 值，数据分析。

2.2.3. β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测细胞衰老

6 孔板中培养的细胞，吸去培养液，PBS 洗一次加入 1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液，室温固定 15 分钟。PBS 洗 3 遍。吸去 PBS，每孔加入 1 mL 配置好的混合液(A 液 10 μ L + B 液 10 μ L + C 液 930 μ L + X-cal 液 50 μ L)，37℃ 过夜。显微镜下观察，拍照。

2.2.4. 克隆形成实验

6 孔板，计数后 500 个细胞每孔铺板，2 星期后收样(4% 多聚甲醛固定 15 分钟，PBS 洗 3 遍，结晶紫染色半小时，PBS 洗 3 遍，晾干拍照)。

2.2.5. 蛋白免疫印记实验

提取总蛋白/核质分离蛋白，BCA 测定蛋白浓度后定容至标准。洗干净预制胶，拔出胶板，上样后电泳条件 170 V，恒压 45 分钟。PVDF 膜依次浸入甲醇、1x 膜平衡液各 3 分钟进行活化后转膜。膜浸入快速封闭液摇床上封闭 10 分钟，浸泡在一抗中 4℃ 过夜。条带室温复温 1 小时后 TBST 在摇床上以 60 转的速度清洗 3 次，每次 5 分钟。浸入二抗，室温孵育 1 小时，同样条件 TBST 清洗后显影。

2.2.6. 数据分析

实验组与对照组间各独立样本的统计学意义采用非配对双侧 t 检验。使用 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA) 进行数据分析，定量数据以均数 \pm 标准差表示。

3. 结果

3.1. CCK8 实验检测恩杂鲁胺对 LNCaP 细胞的 IC₅₀

见图 1，使用 CCK8，LNCaP 每组设置 3 个副孔，将恩杂鲁胺按照 100 nM，250 nM，500 nM，1 μ M，1.5 μ M，2 μ M 的梯度给药，处理 24 小时，根据测得 OD 值计算存活率，恩杂鲁胺对 LNCaP 细胞的 IC₅₀ 约为 1 μ M。

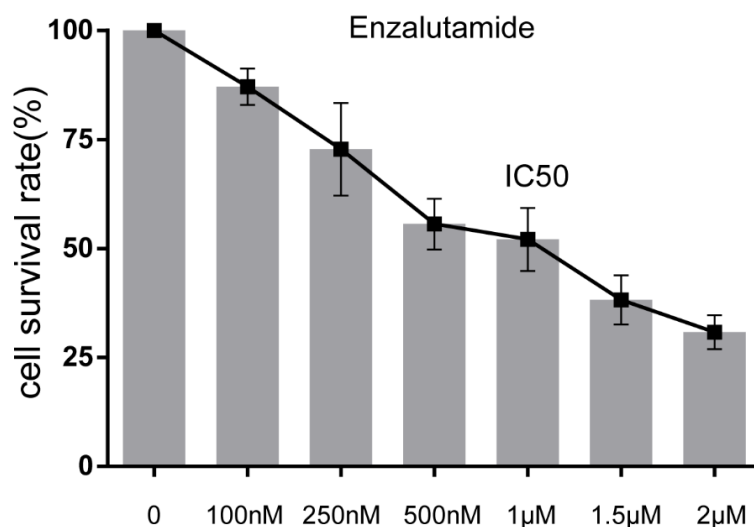


Figure 1. CCK8 assay was used to detect the drug toxicity of enzalutamide on LNCaP cells

图 1. CCK8 实验检测恩杂鲁胺对 LNCaP 细胞的药物毒性

3.2. β -半乳糖苷酶染色试剂盒检测细胞衰老

见图 2, 以 $1\ \mu\text{M}$ 剂量的恩杂鲁胺处理 LNCaP 细胞一个月后, 与 DMSO 对照组仪器进行 β -半乳糖苷酶染色, 恩杂鲁胺处理组的 LNCaP 细胞发生细胞衰老。

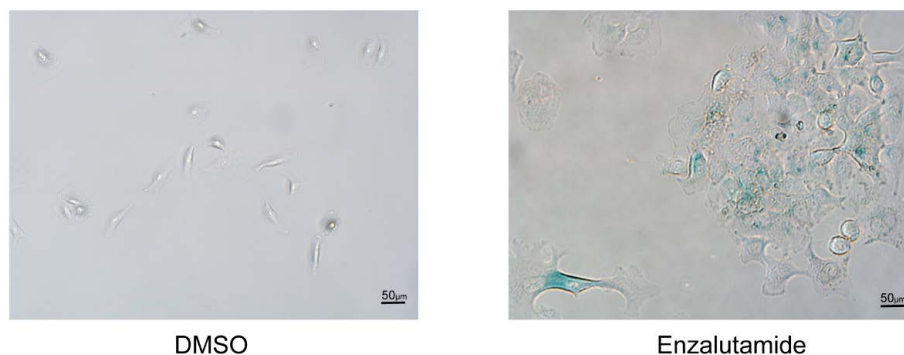


Figure 2. Detection of cell senescence by β -galactosidase staining
图 2. β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老

3.3. 克隆形成实验检测细胞增殖

见图 3, 将恩杂鲁胺处理组与 DMSO 对照组进行克隆形成实验, 在不添加双氢睾酮时, 恩杂鲁胺处理组的增殖明显减少。有意思的是, 在加入双氢睾酮后, 恩杂鲁胺处理组的增殖大大增加。这种现象表明, 恩杂鲁胺慢性暴露导致细胞衰老, 在不适条件下表现为增殖活性降低, 在适宜条件下展现出高增殖活性。

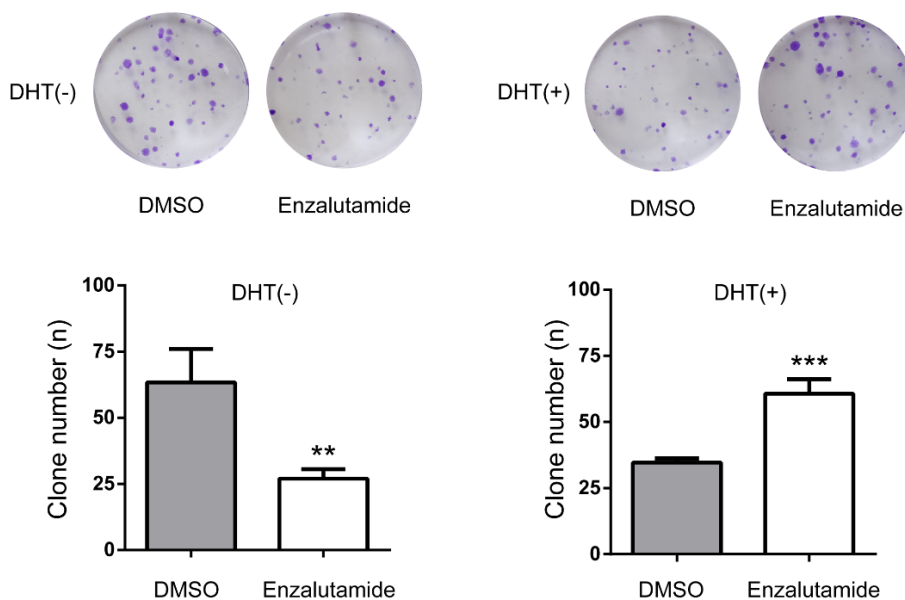


Figure 3. Cell proliferation was detected by clone formation assay
图 3. 克隆形成实验检测细胞增殖

3.4. 蛋白免疫印迹实验检测雄激素受体和衰老标记物 p16, p21 的表达情况

见图 4, 蛋白免疫印迹实验的结果显示, 随着恩杂鲁胺处理时间的增加, 雄激素受体被抑制, 而衰老相关蛋白 p21, p16 的表达增加。

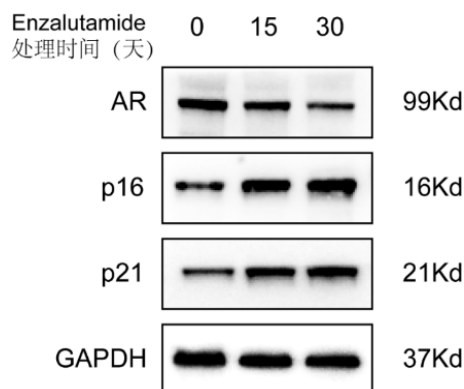


Figure 4. Western Blotting assay to detect the expression of androgen receptors and age-related proteins

图 4. 蛋白免疫印迹实验检测雄激素受体和细胞衰老相关蛋白的表达

3.5. 核质分离检测 YAP1 的表达

见图 5, 蛋白免疫印迹实验的结果显示, 恩杂鲁胺处理组的 YAP1 表达增多, 磷酸化减少, 入核增多。

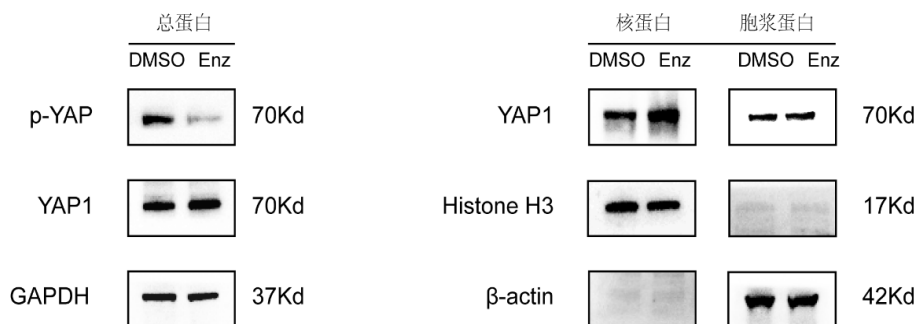


Figure 5. Detection of phosphorylation of YAP1 and its expression in the nucleus by Western blotting

图 5. 蛋白免疫印迹实验检测 YAP1 的磷酸化与在细胞核中的表达

4. 讨论

雄激素受体在前列腺癌中的作用无可替代[7], 雄激素剥夺治疗已经成为在治疗前列腺癌的主要手段[4] [5]。在局限性前列腺癌的治疗中, 根治性手术或放疗往往也会选择性的联用雄激素剥夺[8]。而在转移性前列腺癌中, 促性腺激素释放激素拮抗剂/激动剂已经成为经典雄激素剥夺治疗方案[9]。在疾病发展为去势抵抗性前列腺癌时, 雄激素受体靶向药物被广泛应用, 恩杂鲁胺是二代雄激素受体拮抗剂, 在前列腺癌的治疗当中非常重要[10]。然而, 在短暂的治疗窗口期之后, 往往最终发展为耐药。

细胞衰老本身是内环境维持稳态的一个重要因素, 当细胞受到外源性刺激或者损伤时, 细胞本身的增殖被减缓, 进入一种周期停滞状态, 这种状态也被认为是一种“逃逸状态”, 它组织了含有受损信号的细胞继续增殖, 而在确定环境安全之后, 又可以重启自身, 获得比原本更高的增殖活性[6] [11]。肿瘤细胞的衰老常常与药物杀伤导致, 比较经典的研究是化疗导致的细胞衰老。德国科学家发现从极端化疗环境存活下来的细胞会进入衰老状态, 并且衰老的细胞本身与耐药细胞具备独特的共性, 即干细胞基因

表达增强,这一发现不仅对耐药做出了解释,也说明了肿瘤的治疗后复发可能与细胞的衰老状态相关[6]。

在本研究中,我们使用 IC50 具备中等杀伤剂量的恩杂鲁胺对以内源性表达雄激素受体的前列腺癌 LNCaP 细胞进行慢性暴露 1 个月,来观察该细胞是否发生了衰老,并进行了机制探究。 β -半乳糖苷酶染色结果与衰老蛋白标记物的表达水平显示,恩杂鲁胺的长期使用会导致 LNCaP 细胞向衰老细胞转变,这可能与耐药的进程高度相关。此外,恩杂鲁胺处理后的增殖减弱,而在提供了双氢睾酮对雄激素受体进行激活后,原处于停滞状态的细胞进入了具备高度增殖活性的状态,这进一步验证了衰老状态的特性。

此外,在 2022 年一项关于前列腺癌细胞与基因网络的研究发表在 science 上,作者提出了一种新的前列腺癌表型,即 YAP1 主导的干细胞样表型[12]。YAP1 已经被证实在前列腺癌从雄激素受体依赖到去势抵抗性前列腺癌的转变中发挥核心[13]。我们猜想前列腺癌由雄激素主导的雄激素受体依赖向 YAP1 主导的干细胞样表型的一个转变过程,可能与细胞的衰老状态高度相关。而恩杂鲁胺作为二代雄激素拮抗剂,在慢性诱导过程中模拟了这样一种治疗过程,蛋白免疫印迹实验发现,YAP1 的磷酸化减少,入核增加,验证了这一点。我们的研究十分有限,还需要更多更加系统的研究深入地剖析在这样一种动态的治疗与肿瘤进展进程中肿瘤细胞的衰老稳态的变化,为前列腺癌治疗的药物使用与耐药研究提供更多的临床思路。

5. 总结

综上所述,我们的研究证明了 LNCaP 细胞在恩杂鲁胺慢性暴露下转向衰老状态,并初步验证了这种转变与 YAP1 的关联性。前列腺癌细胞衰老状态的研究十分有限,需要更加系统化的研究。

基金项目

安徽省自然科学基金(2108085MH261)的资助。

参考文献

- [1] Qiu, H., Cao, S. and Xu, R. (2021) Cancer Incidence, Mortality, and Burden in China: A Time-Trend Analysis and Comparison with the United States and United Kingdom Based on the Global Epidemiological Data Released in 2020. *Cancer Communications*, **41**, 1037-1048. <https://doi.org/10.1002/cac2.12197>
- [2] Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., et al. (2022) Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **72**, 7-33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- [3] Siegel, R.L., Miller, K.D., Wagle, N.S., et al. (2023) Cancer Statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **73**, 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- [4] Huggins, C. and Hodges, C.V. (1972) Studies on Prostatic Cancer: I. The Effect of Castration, of Estrogen and Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **22**, 232-240. <https://doi.org/10.3322/canjclin.22.4.232>
- [5] Ku, S.Y., Gleave, M.E. and Beltran, H. (2019) Towards Precision Oncology in Advanced Prostate Cancer. *Nature Reviews Urology*, **16**, 645-654. <https://doi.org/10.1038/s41585-019-0237-8>
- [6] Milanovic, M., Fan, D.N.Y., Belenki, D., et al. (2018) Senescence-Associated Reprogramming Promotes Cancer Stemness. *Nature*, **553**, 96-100. <https://doi.org/10.1038/nature25167>
- [7] Shafi, A.A., Yen, A.E. and Weigel, N.L. (2013) Androgen Receptors in Hormone-Dependent and Castration-Resistant Prostate Cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, **140**, 223-238. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003>
- [8] Rebello, R.J., Oing, C., Knudsen, K.E., et al. (2021) Prostate Cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, **7**, Article No. 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- [9] Isbarn, H., Boccon-Gibod, L., Carroll, P.R., et al. (2009) Androgen Deprivation Therapy for the Treatment of Prostate Cancer: Consider Both Benefits and Risks. *European Urology*, **55**, 62-75. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.10.008>
- [10] Desai, K., McManus, J.M. and Sharifi, N. (2021) Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *Endocrine Reviews*, **42**, 354-373. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab002>
- [11] Hernandez-Segura, A., Nehme, J. and Demaria, M. (2018) Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*,

28, 436-453. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001>

- [12] Tang, F., Xu, D., Wang, S., *et al.* (2022) Chromatin Profiles Classify Castration-Resistant Prostate Cancers Suggesting Therapeutic Targets. *Science*, **376**, eabe1505. <https://doi.org/10.1126/science.abe1505>
- [13] Kuser-Abali, G., Alptekin, A., Lewis, M., *et al.* (2015) YAP1 and AR Interactions Contribute to the Switch from Androgen-Dependent to Castration-Resistant Growth in Prostate Cancer. *Nature Communications*, **6**, Article No. 8126. <https://doi.org/10.1038/ncomms9126>