

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2025.04.001

❖ 基础医学研究 ❖

# 肿瘤源性 LINC01006 经外泌体途径促进前列腺癌增殖侵袭

王世远, 姜辰一, 赵福军

(上海交通大学医学院附属第一人民医院泌尿外科, 上海 200080)

**【摘要】目的:** 明确 LINC01006 在去势抵抗性前列腺癌中的差异性表达, 证明 LINC01006 介导前列腺癌细胞增殖侵袭性增强。探讨 LINC01006 包装至外泌体并在细胞间传递, 使 PCa 细胞增殖侵袭性增强。**方法:** 分析正常前列腺组织和前列腺癌组织外泌体差异表达的转录组, 并进行筛选。验证 LINC01006 在正常前列腺组织和癌组织中的表达差异。利用构建 shRNA 表达载体质粒, 并结合慢病毒包被技术, 通过转染 LNCaP 及 22RV1 细胞。验证 LINC01006 被膜结构覆盖。高超速离心法提取 PCa 细胞外泌体并以 Western blot 验证。RT-qPCR 技术验证 LINC01006 在外泌体中的表达差异。CCK-8 增殖活性实验及平板克隆实验来进行验证 LINC01006 敲除的情况下, PCa 细胞增殖、迁移能力的变化情况。CCK-8 增殖活性实验及平板克隆实验同种、异种 PCa 细胞来源的外泌体共培养时, LINC01006 敲除的情况下 PCa 细胞增殖、迁移能力恢复情况。**结果:** 相比较正常前列腺上皮细胞 (RWPE-1), LNCaP 和 22RV1 细胞中的 LINC01006 的表达上调。敲减的 LNCaP 与对照组相比, LINC01006 的表达下调了 84.7% ( $P < 0.01$ ), 敲减的 22RV1 与对照组相比, LINC01006 的表达下调了 80.3% ( $P < 0.01$ )。CM + RNase + T 组相比另外两组, LINC01006 的检测水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。高超速离心法成功提取外泌体, 特异性蛋白 CD63, CD81, HSP70 高表达 ( $P < 0.05$ )。源于 LNCaP 细胞和源于 22RV1 细胞的外泌体 LINC01006 的表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ )。与对照组 (siCtrl) 相比, 敲除组 (si1006) 细胞在第 3、4 天的吸光度显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。与对照组 (siCtrl) 相比, 敲除组的细胞克隆形成数显著减少 ( $P < 0.05$ )。与对照组 (Ctrl) 相比, 外泌体组 (LNCaP exosome) 细胞在第 4 天的吸光度显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。与对照组 (Ctrl) 相比, 外泌体组的细胞克隆形成数显著增多 ( $P < 0.05$ )。与对照组 (Ctrl) 相比, 外泌体组 (22RV1 exosome) 细胞在第 3、4 天的吸光度显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。与对照组 (Ctrl) 相比, 外泌体组的细胞克隆形成数显著增多 ( $P < 0.01$ )。**结论:** LINC01006 在 PCa 细胞系中高表达, 且能够促进肿瘤的增殖迁移。LINC01006 由外泌体包被, 经由 PCa 细胞分泌至胞外发挥相应的生物学活性。PCa 源性的外泌体可以诱导 LINC01006 PCa 细胞恢复增殖能力。

**【关键词】** 前列腺癌; 长链非编码 RNA; 外泌体; 细胞增殖

**【中图分类号】** R737.25 **【文献标志码】** A

## Tumor-derived LINC01006 promotes proliferation and invasion of prostate cancer via exosome-mediated pathway.

WANG Shi-yuan, JIANG Chen-yi, ZHAO Fu-jun

(Department of Urology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200080, China)

**【Abstract】 Objective:** To clarify the differential expression of LINC01006 in Castration-Resistant Prostate Cancer. To prove that LINC01006 mediates the enhanced proliferation and invasiveness of prostate cancer cells. To clarify that LINC01006 is packaged into exosomes and delivered between cells, resulting in enhanced PCa cell proliferation and invasiveness. **Methods:** Screen the differentially expressed transcriptomes of normal prostate tissue and prostate cancer tissue by analyzing the biological information database. The expression difference of LINC01006 in normal prostate tissue and cancer tissue was verified by RT-qPCR technology. Using the construction of shRNA expression vector plasmid, combined with lentivirus coating technology, LNCaP and 22RV1 cells were transfected. Using the technology of extracting extracellular medium, by adding RNase and changing the permeability of the probe, it was verified that LINC01006 was covered by the membrane structure. PCa cell exosomes were extracted by high-speed ultracentrifugation and verified by Western Blot. The expression difference of LINC01006 in exosomes was verified by RT-qPCR technology. CCK-8 assay and colony formation assay were used to verify the changes of PCa cell proliferation and migration ability in the case of LINC01006 knockout. CCK-8

**基金项目:** 国家自然科学基金 (82371634)

**作者简介:** 王世远 (1996 -), 男, 硕士, 住院医师。E-mail: wshyhtangjiuxiang@163.com

**通讯作者:** 赵福军, 博士。E-mail: zhaofujun72@163.com

proliferation activity experiment and plate cloning experiment When exosomes derived from homologous and xenogeneic PCa cells were co-cultured, the recovery of PCa cell proliferation and migration ability in the case of LINC01006 knockout. **Results:** Compared with normal prostate epithelial cells (RWPE-1), the expression of LINC01006 in LNCaP and 22RV1 cells was up-regulated ( $P < 0.01$ ). The expression of LINC01006 in knockdown LNCaP was down-regulated by 84.7% compared with the control group ( $P < 0.01$ ), and the expression of LINC01006 in knock-down 22RV1 was down-regated by 80.3% compared with the control group ( $P < 0.01$ ). There was no significant difference between CM group and CM + RNase group ( $P > 0.05$ ). Compared with the other two groups, the detection of LINC01006 in the CM + RNase + T group was significantly lower ( $P < 0.01$ ). The exosomes were successfully extracted by high-speed ultracentrifugation, and the specific proteins CD63, CD81 and HSP70 were highly expressed ( $P < 0.05$ ). Exosomal LINC01006 expression derived from LNCaP cells was significantly increased ( $P < 0.01$ ). The expression of exosome LINC01006 derived from 22RV1 cells was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared to the control group (siCtrl), the absorbance of the knockout group (si1006) cells on the 3rd and 4th day was obviously lower than that of the control group ( $P < 0.01$ ). Compared to the control group (siCtrl), the cells of the knockout group (siCtrl), the number of clones were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). As opposed to the control group (Ctrl), the absorbance of cells in the exosome group (LNCaP exosome) on the 4th day was obviously higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). As opposed to the control group (Ctrl), the number of cell clones in the exosome group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group (Ctrl), the absorbance of cells in the exosome group (22RV1 exosome) on the 3rd and 4th day was significantly bigger than which in the control group ( $P < 0.05$ ). As opposed to the control group (Ctrl), the number of cell clones in the exosome group was significantly increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** LINC01006 is highly expressed in PCa cell lines and can promote tumor proliferation and migration. LINC01006 is coated with exosomes and secreted into the extracellular space through PCa cells to exert corresponding biological activities. PCa-derived exosomes can induce LINC01006 PCa cells to restore their proliferative capacity.

**[Key words]** Prostate cancer; Long non-coding RNA; Exosomes; Cell proliferation

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 在全球范围内已成为男性最常见的恶性肿瘤之一, 在中国, 其发病率呈显著上升趋势, 且发现时多为晚期, 严重威胁中老年男性健康<sup>[1-2]</sup>。lncRNAs 在实体肿瘤上皮-基质间相互作用的过程中起到重要作用, 但在去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate, CRPC) 中的研究还在起步阶段, 基质细胞是实体肿瘤组织中的重要组成成分, 去势相关的 LINC01006 是否参与上皮-基质间的相互作用仍未可知。

外泌体是一类可由各种细胞所分泌的具有膜结构的, 呈囊性的、泡状的小体形的结构, 其中可包含核酸、蛋白质、脂质等多种生命物质, 来源细胞广泛, 并且可以在人体的各种例如血、尿、精液等当中存在<sup>[3]</sup>。外泌体在诊断人体各大系统 (消化、神经、泌尿生殖) 的恶性肿瘤中存在的生物学作用得到了非常广泛重视<sup>[4]</sup>。此外, 外泌体具有一些特定的生物学特性, 诸如比较稳定不易降解、能够通透一定物质、无毒或低毒性、不同细胞组织之间具有一定的相容性, 免疫原性较低的特点<sup>[5]</sup>。其参与调控肿瘤组织及其微环境中各种各样的一些细胞的生物功能, 调节肿瘤细胞的转移、生长或者侵袭, 在恶性肿瘤发生、发展的过程中起到十分重要作用<sup>[6]</sup>。外泌体能够携带细胞特异性活性物质, 如 lncRNA, 作为信号分子在细胞间传递<sup>[7]</sup>。由耐舒尼替尼的肾癌细胞释放的外泌体 lncARSR, 作用于邻旁非耐药细胞, 能够促进非耐药细胞的治疗抵抗<sup>[8]</sup>。

基于此, 本研究拟采用分子生物学技术、细胞培养术等方法, 探讨 LINC01006 在去势抵抗性前列腺癌中的差异性表达, 观察 LINC01006 是否介导前列腺癌细胞增殖侵袭性增强, 且包装至外泌体并在细胞间传递, 使 PCa 细胞增殖侵袭性增强。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

PCa 细胞系 LNCaP、VCaP、22Rv1、C4-2、PC3 及 DU145 均购自美国式培养收集库 (American type culture collection, ATCC), 本实验室长期保存, 慢病毒包被所使用的 293T 细胞系来源于本课题组实验室保存。PCa 细胞系 LNCaP、C4-2、22Rv1 所用的培养基为 RPMI-1640 培养基, 含有 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、1% 青霉素/链霉素。细胞全部在 37 °C, 含 5% CO<sub>2</sub>, 湿度饱和的细胞恒温培养箱内进行培养。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 PCa 细胞系采用含有 10% FBS、1% 青霉素/链霉素的 RPMI1640 培养基。上述细胞均培养在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 恒温培养箱, 每 2 d 更换 1 次新鲜培养基。根据需求传代。

1.2.2 RT-qPCR 将细胞培养液 Trizol 处理, 室温裂解 0.5 ~ 2 min。用紫外分光光度计进行定量。读取 OD 260 值及 OD20/OD280 比值。RNA 溶液和 5 × PrimeScript RT Master Mix 进行逆转录。按照如下

组分配制定量:TB Green PrimixExTaqII(2 ×)10 μL + PCR Forward Primer(10 μmol/L) + PCR Reverse Primer(10 μmol/L)共 1 μL + ROX Dye II(50 ×)0.4 μL + cDNA 溶液及 DEPC 水补充至 20 μL。以 GAPDH 为内参。采用两步法 PCR 扩增程序。观察溶解曲线是否平滑,是否出现双峰(双峰意味着可能存在二聚体的干扰),确认数据准确可靠可用后,对数据进行处理分析( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法)进行分析处理。

1.2.3 制备慢病毒,建立稳转株 培养 293T 细胞,直至融合度为 70% 左右。按如下体系进行慢病毒包装 psPAX2 质粒(1.5 μg)pMD2. G 质粒(0.6 μg)shRNA/过表达质粒(2 μg)DMEM 无血清培养基(至 250 μL)Lipofectamine 3000(10 μL)P3000(10 μL)DMEM 无血清培养基(至 250 μL)。根据有荧光的细胞数量和稀释梯度计算出病毒的滴度。

1.2.4 超速离心法提取外泌体 1640 完全培养基正常培养 LNCaP 细胞、22RV1 细胞,将所得细胞培养上清 400 × g 离心 10 min,除去残余细胞,所有离心在 4 °C 下进行。经彻底离心去除细胞及碎片后,将细胞所得上清转入 38.5 mL 超速离心管,电子天平进行两侧配平,Beckman 离心机 100 000 × g 离心 60 min。将离心后的超速离心管小心平稳得取出并轻轻打开,吸去顶层液体,每管用 500 μL PBS 进行沉淀的重悬,重新汇合至 13.2 mL 超速离心管中并用 PBS 配平;将上述所得的溶液以 100 000 × g 离心 70 min,相同方法弃上清,并用针筒吸干残留的液体,300 μL PBS 重悬所得沉淀。进行相应的分装,做好标记,外泌体暂时冻存于 -80 °C 冰箱待用。

1.2.5 Western blot 取适当体积样本混合 6 × Loading buffer,100 °C 加热 5 min。缓慢用移液器吸 8 ~ 10 μL 样品,将枪头缓慢得插进去加样孔中,慢慢得像孔中加入样品,在外侧的上样孔加入蛋白预染 Marker,中央加入样品。采用 80 V 恒压 30 min,130 V 恒压 60 min。当溴酚蓝的前缘刚刚跑出时,可结束电泳。电泳结束后立即转膜。转膜需要准备干净的滤纸,PVDF 膜,尺寸为 6 cm × 4 cm 左右。孵育一抗,用抗体稀释液将一抗用封闭液稀释至适当浓度,将一抗与膜共同放入小盒或试管中,使一抗刚好没过膜的表面,摇床 25 ~ 35 次/min,4 °C 过夜。用抗体稀释液稀释与一抗相对应的二抗,显影后使用凝胶图像处理系统 bio-rad 的 Quantity One 对所得的图像进行分析和处理。

1.2.6 CCK-8 法测定细胞增殖 以 10 cm 培养皿细胞为例,当细胞融合度达到 80% ~ 90% 时提取细胞。按照一定的细胞倍数进行稀释,调整浓度使得

细胞处于  $5 \times 10^3$ /mL ~  $5 \times 10^4$ /mL。接种到 96 孔板中:根据合适的铺板细胞数(约  $1 \sim 2 \times 10^4$ ),每孔约 100 μL 细胞悬液,同样的样本可做 4 ~ 6 个重复。37 °C 培养箱中培养:细胞接种后贴壁大约需要培养 4 h。加入 10 μL CCK-8 工作液:由于每孔加入 CCK-8 量比较少,如果试剂沾在孔壁上会带来误差,在加完试剂后轻轻敲击培养板混匀,把枪头浸没在其中帮助其充分溶解。37 °C 孵育 1 ~ 4 h 后,酶联免疫仪器上选择 450 nm 的波长,用其测量吸光度,分别记录每个孔的吸光度数值。将数据用 Excel 拷贝下来,进行相应的处理分析,再利用作图软件 Graph-Pad,以时间为横轴、吸光度值为纵轴绘制生长曲线。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PCa 组织与正常前列腺组织之间转录组差异筛选

为筛选异常表达的基因,本课题组提取了 PCa 细胞外泌体,利用转录组测序,分析了 PCa 组织和正常前列腺组织来源的外泌体的表达谱差异。将所有差异表达的基因进行热图聚类分析,其中有 250 个基因上调,和 139 个基因下调。从中组挑选 LINC01006 进行后续研究。见图 1。

### 2.2 PCR 验证前列腺癌与正常前列腺组织 LINC01006 表达差异

在此基础上,本课题组分别在相同的培养条件下,探究了其对雄激素敏感性 PCa 细胞系 LNCaP,及雄激素非敏感性细胞 22RV1 中的 LINC01006 的表达。结果显示,在两种细胞中,相较于正常前列腺上皮细胞(RWPE-1),LNCaP 和 22RV1 细胞中的 LINC01006 的表达明显上调(*P* < 0.01)。见图 2。

### 2.3 LINC01006 敲减稳转株的构建

为了探究 LINC01006 与 PCa 细胞增殖间的关系,本课题组培养了慢病毒包装的 shRNA 质粒,并用其转染 LNCaP 和 22RV1 细胞,用嘌呤霉素筛选后得到相应的稳转株。敲减的 LNCaP 与对照组(shCtrl)相比,LINC01006 的表达下调了 84.7% (*P* < 0.01),敲减的 22RV1 与对照组(shCtrl)相比,LINC01006 的表达下调了 80.3% (*P* < 0.01)。说明成功利用了 shRNA 对两种 PCa 细胞进行了敲减,构建了沉默 LINC01006 的 PCa 稳转株。见图 3。

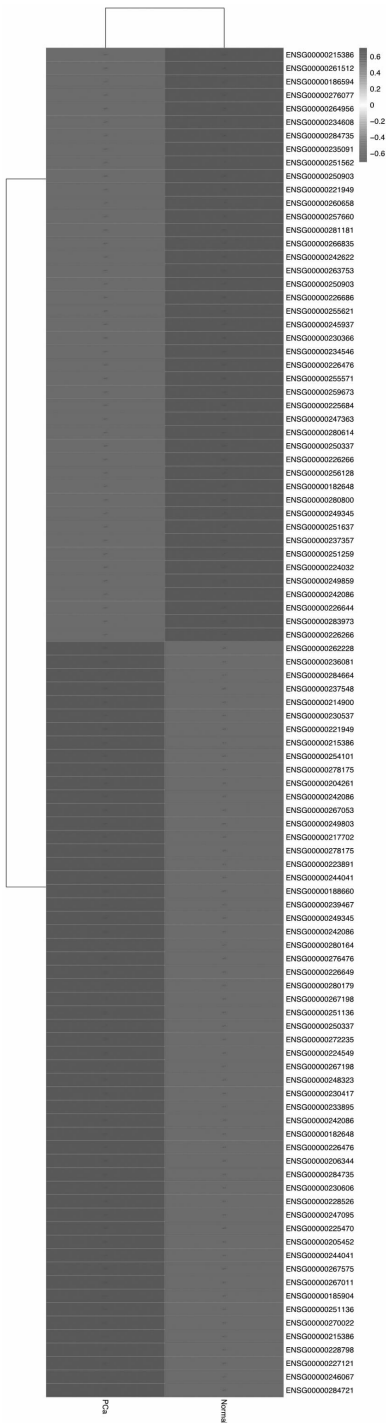


图 1 LINC01006 在前列腺癌组织外泌体中高表达

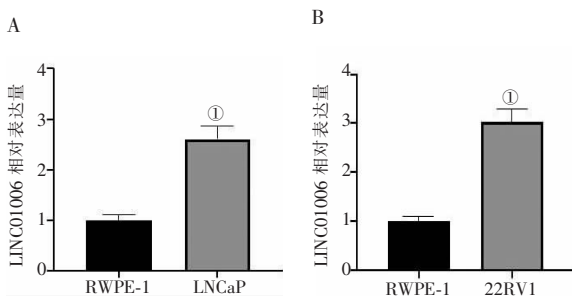


图 2 LINC01006 在 PCa 细胞中呈现高表达

A. LNCaP 细胞中的 LINC01006 高表达; B. 22RV1 细胞中的 LINC01006 高表达。① $P < 0.01$ 。

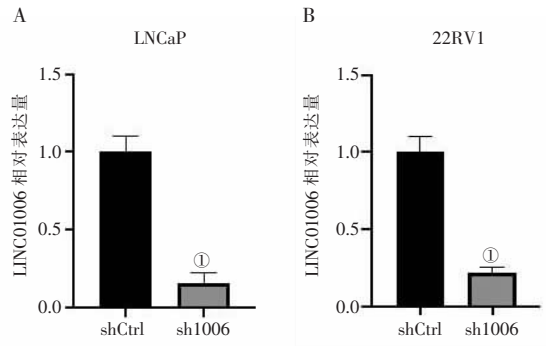


图 3 RT-qPCR 验证 PCa 细胞中慢病毒转染的 LNCaP 和 22RV1 中敲减情况

A. LINC01006 在 LNCaP 的敲减效率; B. LINC01006 在 22RV1 的敲减效率。① $P < 0.01$ 。

### 2.4 验证 LINC01006 的分泌方式

为了探究细胞外 LINC01006 的存在形式,本课题组首先提取了培养 4 d 后的 LNCaP 细胞的培养基,分为对照组 (CM),加 RNA 酶组 (CM + RNase),加 RNA 酶并加 Triton X-100 组 (CM + RNase + T),并进行 LINC01006 的 RT-qPCR 检测,发现 CM 组与 CM + RNase 组间未见差异 ( $P > 0.05$ )。CM + RNase + T 组相比另外两组, LINC01006 的检测则降低 ( $P < 0.01$ )。证明了分泌至细胞外的 LINC01006 成分具有被膜结构包被。见图 4。

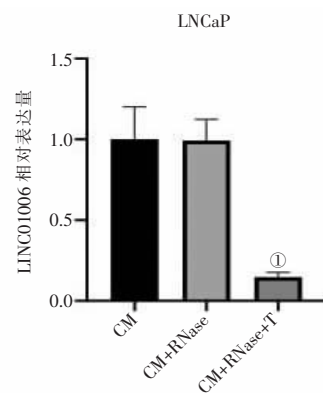


图 4 测定 PCa 细胞培养基中 LINC01006 的表达量

① $P < 0.01$ , 与对照组 CM、CM+RNase 组比较。

### 2.5 利用超高速离心法提取细胞外泌体,应用 Western blot 检测外泌体标志物 CD63、CD81、HSP70

采取超速离心法,对前列腺癌细胞进行了裂解,提取了相应的外泌体,在此基础上,对前列腺癌细胞来源的外泌体进行了蛋白表达的鉴定。结果显示,两种外泌体均高表达外泌体特异性蛋白 CD63、CD81、HSP70 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

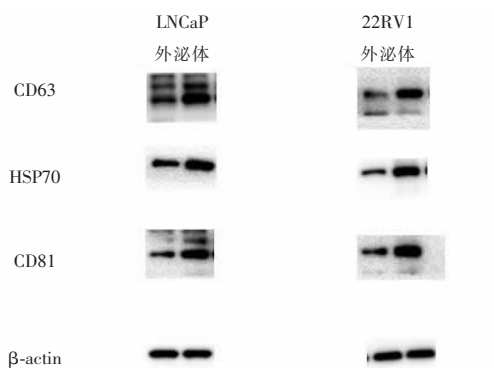


图5 超速离心法提取前列腺癌细胞来源的外泌体蛋白鉴定

## 2.6 抽提所得外泌体总 RNA, RT-qPCR 验证外泌体 LINC01006 的表达情况

为了证明 LINC01006 存在于外泌体中,本课题组首先提取了培养 4 d 后的 LNCaP、22RV1 细胞的培养基,设置为对照组 (CM),将之前所得的外泌体进行使用 Triton X-100 进行通透处理后,并进行 LINC01006 的 RT-qPCR 检测,发现源于 LNCaP 细胞的外泌体 LINC01006 的表达升高 ( $P < 0.01$ )。源于 22RV1 细胞的外泌体 LINC01006 的表达升高 ( $P < 0.01$ )。证明 LINC01006 是通过外泌体结构由 PCa 细胞进行分泌的。见图 6。

2.7 将提取出的外泌体添加入 shLINC01006 LNCaP 细胞培养基中共同培养,qPCR 验证 LINC01006 的表达。

为研究在 LINC01006 敲除的情况下,PCa 细胞增殖、迁移能力的变化情况,本课题组分部应用 CCK-8 增殖活性实验及平板克隆实验来进行验证。结果显示,与对照组 (siCtrl) 相比,敲除组 (si1006) 细胞在第 3、4 天的吸光度低于对照组 ( $P < 0.01$ )。根据平板克隆实验的结果显示,与对照组 (siCtrl) 相比,敲除组的细胞克隆形成数减少 ( $P < 0.01$ )。见图 7。

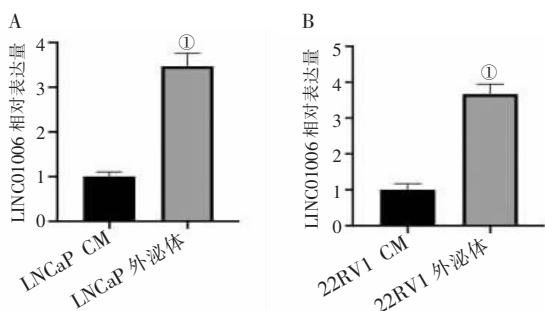


图6 测定 PCa 细胞来源的外泌体中 LINC01006 的表达量

A. LNCaP CM 组与 LNCaP exosome 组的 LINC01006 的表达量;B. 22RV1 CM 组与 22RV1 exosome 组的 LINC01006 的表达量。① $P < 0.01$ 。

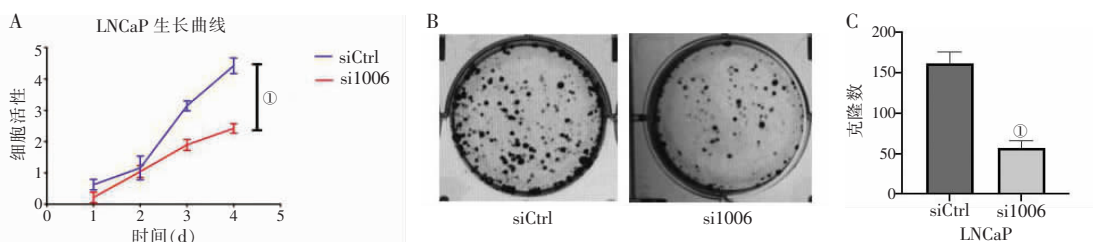


图7 敲减 LINC01006 对 PCa 细胞 LNCaP 增殖能力的影响

A. CCK-8 检测敲减 LINC01006 后 LNCaP 增殖能力;B. 克隆形成实验检测敲减 LINC01006 后 LNCaP 增殖能力;C. 平板克隆形成实验敲减效率量化表达。① $P < 0.01$ 。

## 2.8 同种 PCa 细胞来源的外泌体与 LINC01006 敲除 LNCaP 细胞共培养对增殖的影响

将提取自 LNCaP 细胞的外泌体加入 LNCaP si1006 细胞的培养基进行共培养,应用 CCK-8 增殖活性实验及平板克隆实验来进行验证。结果显示,与对照组 (Ctrl) 相比,外泌体组 (LNCaP exosome) 细

胞在第 4 天的吸光度高于对照组 ( $P < 0.05$ )。根据平板克隆实验的结果显示,与对照组 (Ctrl) 相比,外泌体组的细胞克隆形成数增多 ( $P < 0.05$ )。由此证明来源于同种 PCa 细胞的外泌体能够促进 LINC01006 敲除 LNCaP 细胞的增殖能力。见图 8。

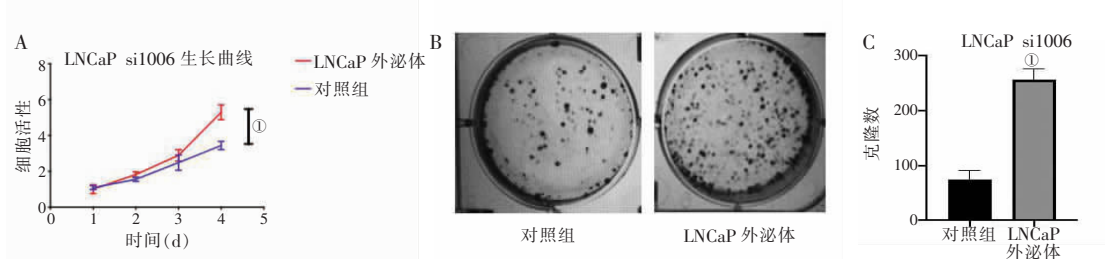


图8 同种 PCa 细胞来源的外泌体对 LNCaP si1006 增殖能力的影响

A. CCK-8 实验检测同种 PCa 细胞来源外泌体共培养后 LNCaP si1006 增殖能力的影响;B. 平板克隆形成实验检测同种 PCa 细胞来源外泌体共培养后 LNCaP si1006 增殖能力的影响;C. 平板克隆形成实验增殖量化表达。① $P < 0.05$ 。

## 2.9 异种 PCa 细胞来源的外泌体与 LINC01006 敲除 LNCaP 细胞共培养对增殖的影响

将提取自 22RV1 细胞的外泌体加入 LNCaP si1006 细胞的培养基进行共培养,应用 CCK-8 增殖活性实验及平板克隆实验来进行验证。结果显示,与对照组 (Ctrl) 相比,外泌体组 (22RV1 exosome) 细

胞在第 3、4 天的吸光度高于对照组 ( $P < 0.05$ )。根据平板克隆实验的结果显示,与对照组 (Ctrl) 相比,外泌体组的细胞克隆形成数增多 ( $P < 0.01$ )。由此证明来源于异种 PCa 细胞的外泌体能够促进 LINC01006 敲除 LNCaP 细胞的增殖能力。见图 9。

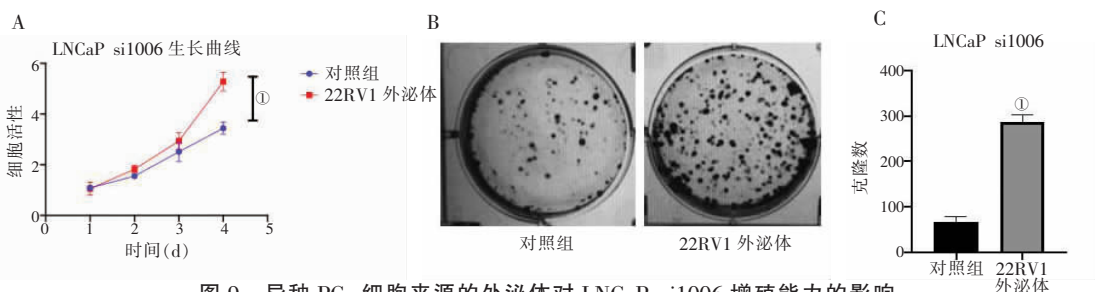


图9 异种 PCa 细胞来源的外泌体对 LNCaP si1006 增殖能力的影响

A. CCK-8 实验检测异种 PCa 细胞来源外泌体共培养后 LNCaP si1006 增殖能力的影响; B. 平板克隆形成实验检测异种 PCa 细胞来源外泌体共培养后 LNCaP si1006 增殖能力的影响; C. 平板克隆形成实验增殖量化表达。① $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

前列腺癌作为男性常见的恶性肿瘤,不同的 lncRNAs 在肿瘤中发挥的作用不同。ADT 所引起的由雄激素/AR 信号通路调控的基因表达变化在 CRPC 的发生和发展过程中起到非常重要的作用,为了探索其中的分子生物学机制,课题组首先通过分析正常前列腺组织、前列腺癌组织和 CRPC 组织的转录组测序数据,发现在其中有大量差异表达的基因;进一步分析 PCa 细胞系中 AR 调控下游基因的 ChIP-seq 数据,研究去势处理诱导的基因表达谱变化,发现 LINC01006 在 CRPC 组织中表达显著上调,且在 PCa 细胞系中的表达水平受到 AR 的调控。为明确 LINC01006 与 PCa 进展的关系,课题组在组织芯片 (包含 50 例正常前列腺组织、90 例根治性 PCa 组织和 10 例 CRPC 组织) 中对 LINC01006 进行 ISH 染色发现, LINC01006 的表达水平在 CRPC 组织中最高,而在 PCa 组织中次之;且在 Gleason 评分  $> 7$  分的组织中的表达水平较  $< 7$  分的组织中更高。课题组进而在 PCa 细胞系中敲减了 LINC01006 后发现, PCa 在体内外的增殖和侵袭能力均受到明显抑制,提示 LINC01006 起到促癌作用<sup>[9]</sup>。上述结果表明, LINC01006 可能与 ADT 后 PCa 的进展为 CRPC 的过程密切相关,但其中具体的分子机制尚不明确。

尽管多数前列腺恶性肿瘤在病理学上呈现稳定状态,但转移性进展会迅速出现恶化并导致患者死亡<sup>[10]</sup>。越来越多的研究<sup>[11]</sup>发现前列腺癌转移与 miRNA 之间的相关性。此外,外泌体 miRNA 的失调与转移性前列腺癌有关。因此,外泌体中的 miRNA 有望成为治疗前列腺癌的潜在生物标志物<sup>[12]</sup>。此外,外泌体可激活 TGF- $\beta$  受体诱导成纤

维细胞转化为癌相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs), 通过旁分泌反馈调节原肿瘤的增殖与侵袭<sup>[13]</sup>。外泌体还能够促进血管, 如 IGF-1R 等促使肿瘤微环境诱导血管生成<sup>[14]</sup>。外泌体与细胞凋亡相关。外泌体中包含了 PDL-1 能够与各种免疫细胞表明的相应受体结合后使得 T 细胞凋亡<sup>[15]</sup>。上皮间质转化 (EMT) 的发生与外泌体也密切相关。EMT 是指肿瘤细胞失去了特异性, 重新分化后, 迁移和侵袭能力的能力变的更强大, 而转移到特定的部位后, 它们又会转变回原来的上皮类型的细胞, 从而在拥有更强的增殖能力的情况下, 在转移部位形成肿瘤的转移灶<sup>[16]</sup>。可见外泌体在前列腺癌当中扮演了重要的角色, 而外泌体如何提取是研究外泌体的保障, 常用的提取方法包含沉淀法、膜亲和柱法、凝胶法、PS 亲和法、超速离心法<sup>[17]</sup>。其中沉淀法简便快捷, 但杂蛋白多且纯度较低。膜亲和法可以用于提取细胞上清外泌体, 但是纯度低于超速离心法。故本研究采取超速离心法进行, 以确保实验的准确性。

在前列腺研究<sup>[18]</sup>中, 有报导前列腺癌源外泌体表达 PSMA, PTEN 等蛋白。因此, 外泌体在形成的过程中也会包裹一定的蛋白, 这些蛋白在宿主细胞中发挥着重要的功能, 也可成为临床肿瘤标志物的重要潜在目标。在这一部分中, 本课题组成功利用高超速离心法, 提取出 PCa 细胞相应的外泌体, 并加以 Western blot 验证。最后通过 RT-qPCR 验证, 证明 LINC01006 是通过外泌体结构由 PCa 细胞进行分泌的。

LncRNA 功能复杂, 在相同或者不同的肿瘤当中都有可能发挥着不同的生物学功能。LncRNA 的功能往往与 DNA、RNA 或蛋白质之间的相互作用有关<sup>[19]</sup>。LncRNA 主要通过表观遗传调控 (与 DNA、

转录因子等结合),转录调控(与启动子区、RNA 聚合酶、组蛋白结合),转录后调控(对 mRNA 进行处理剪辑运输等),与特定 miRNA 形成竞争性内源 RNA(competing endogenous RNA, ceRNA)。如 DHT 刺激的 LNCaP 和 VCaP, ARLNC1 发生上调。沉默 ARLNC1 的表达导致了 PCa 细胞生长受到抑制<sup>[20]</sup>。LBCS 在 CRPC 细胞中表达下调,当过表达 LBCS 时,发现 LBCS 抑制了 CRPC 细胞的生长,并抑制了 CRPC 细胞在雄激素剥夺条件下的生长,使 CRPC 细胞恢复了去势敏感性<sup>[21]</sup>。

为研究 lncRNA 在 PCa 生长中发挥的作用,本课题组通过生物信息学的技术,筛选出 LINC01006。选取了雄激素敏感性细胞 LNCaP 和雄激素非敏感性细胞 22RV1 作为研究对象,分析两种 PCa 细胞系中的细胞中 LINC01006 的相对表达水平。同时,通过了 RNA 沉默技术,构建了 LINC01006 沉默的细胞系。结果证明了 LINC01006 在 PCa 细胞系中高表达,且能够促进肿瘤的增殖迁移。LINC01006 由外泌体包被,经由 PCa 细胞分泌至胞外发挥相应的生物学活性。PCa 源性的外泌体可以诱导 LINC01006 PCa 细胞恢复增殖能力。

本课题组通过 RNA pull-down 实验研究与 LINC01006 相互结合的蛋白,发现 Smad2 蛋白在基质成纤维细胞中与 LINC01006 具有相互结合关系。

#### 参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020, 70(1): 7-30.

[2] Liu J, Dong L, Zhu Y, et al. Prostate cancer treatment - China's perspective [J]. Cancer Letters, 2022, 550: 215927.

[3] Ubanako P, Mirza S, Ruff P, et al. Exosome-mediated delivery of siRNA molecules in cancer therapy: triumphs and challenges [J]. Frontiers in Molecular Biosciences, 2024, 11: 1447953.

[4] Geng Z, Sun T, Yu J, et al. Cinobufagin suppresses lipid peroxidation and inflammation in osteoporotic mice by promoting the delivery of miR-3102-5p by macrophage-derived exosomes [J]. International Journal of Nanomedicine, 2024, 19: 10497-10512.

[5] Lorenc T, Klimczyk K, Michalczyewska I, et al. Exosomes in prostate cancer diagnosis, prognosis and therapy [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(6): 2118.

[6] Xie Y, Dang W, Zhang S, et al. The role of exosomal noncoding RNAs in cancer [J]. Molecular Cancer, 2019, 18(1): 37.

[7] Lou Y, Yan J, Liu Q, et al. Biological functions and molecular mechanisms of exosome-derived circular RNAs and their clinical implications in digestive malignancies: the vintage in the bottle [J]. Annals of Medicine, 2024, 56(1): 2420861.

[8] Zaccagnino A, Vynnytska-Myronovska B, Stöckle M, et al. Molecu-

lar and functional characterization of reversible-sunitinib-tolerance state in human renal cell carcinoma [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2024, 28(9): e18329.

[9] 王铖洋,王世远,李健瑛,等.长链非编码 RNA LINC01006 对前列腺癌细胞增殖和侵袭的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2021, 21(8): 1401-1407.

[10] Birnbaum MD, Zhao N, Moorthy BT, et al. Reduced Arginyltransferase 1 is a driver and a potential prognostic indicator of prostate cancer metastasis [J]. Oncogene, 2019, 38(6): 838-851.

[11] Papanikolaou S, Vourda A, Syggelos S, et al. Cell plasticity and prostate cancer: the role of epithelial-mesenchymal transition in tumor progression, invasion, metastasis and cancer therapy resistance [J]. Cancers, 2021, 13(11): 2795.

[12] Bhagirath D, Yang TL, Bucay N, et al. microRNA-1246 is an exosomal biomarker for aggressive prostate cancer [J]. Cancer Research, 2018, 78(7): 1833-1844.

[13] Herrera M, Llorens C, Rodríguez M, et al. Differential distribution and enrichment of non-coding RNAs in exosomes from normal and Cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer [J]. Molecular Cancer, 2018, 17(1): 114.

[14] Wu M, Wang G, Hu W, et al. Emerging roles and therapeutic value of exosomes in cancer metastasis [J]. Molecular Cancer, 2019, 18(1): 53.

[15] Zhang J, Wang Q, Guo TH, et al. Computed tomography-based radiomic model for the prediction of neoadjuvant immunochemotherapy response in patients with advanced gastric cancer [J]. World Journal of Gastrointestinal Oncology, 2024, 16(10): 4115-4128.

[16] Qi XK, Han HQ, Zhang HJ, et al. OVOL2 links stemness and metastasis via fine-tuning epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma [J]. Theranostics, 2018, 8(8): 2202-2216.

[17] Xu L, Wu LF, Deng FY. Exosome: an emerging source of biomarkers for human diseases [J]. Current Molecular Medicine, 2019, 19(6): 387-394.

[18] Hu HT, Nishimura T, Kawana H, et al. The cellular protrusions for inter-cellular material transfer: similarities between filopodia, cytonemes, tunneling nanotubes, viruses, and extracellular vesicles [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2024, 12: 1422227.

[19] Zhao Q, Ye Y, Zhang Q, et al. PANoptosis-related long non-coding RNA signature to predict the prognosis and immune landscapes of pancreatic adenocarcinoma [J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2024, 37: 101600.

[20] Zhang Y, Pitchiaya S, Ciešlik M, et al. Analysis of the androgen receptor-regulated lncRNA landscape identifies a role for ARLNC1 in prostate cancer progression [J]. Nature Genetics, 2018, 50(6): 814-824.

[21] Gu P, Chen X, Xie R, et al. A novel AR translational regulator lncRNA LBCS inhibits castration resistance of prostate cancer [J]. Molecular Cancer, 2019, 18(1): 109.

(收稿日期:2024-08-13

修回日期:2024-12-21)