

前列腺癌细胞表达的 LRG1 对血管形成的影响

龙金, 任鹏, 戚正君, 刘风炼
(贵州医科大学第二附属医院, 贵州 凯里 556000)

【摘要】目的: 研究前列腺癌细胞表达的富含亮氨酸 α -2 糖蛋白 1 (Leucine-rich α -2-glycoprotein1, LRG1) 对血管形成的影响。**方法:** 通过 Western blot 和 Real time-PCR 检测前列腺癌组织、癌旁组织、前列腺细胞 (PC-3 和 LNCaP) 和前列腺细胞系 (RWPE-1) LRG1 的表达, 以判断 LRG1 在前列腺癌形成中的表达变化; 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 经 LRG1 刺激 24 h, CCK8 检测细胞活性; HUVECs 接种至预先包被基质胶的 96 孔板中, 经 LRG1 刺激 12 h, 用 LIVE/DEAD Cell Imaging Kit 染色后, 荧光显微镜观察血管形成状态; 前列腺癌细胞转染 Lv-GFP 或者 Lv-shLRG1-GFP72 h 后, Western blot 检测 LRG1 的表达; 前列腺癌细胞经正常培养、转染 Lv-GFP 或者 Lv-shLRG1-GFP72 h 后, 收集培养上清, 用其制备 HUVECs 单细胞悬液, 接种于预先包被基质胶的 96 孔板, 培养 12 h 后, 用 LIVE/DEAD Cell Imaging Kit 染色, 荧光显微镜观察血管形成状态。**结果:** LRG1 在前列腺癌组织及前列腺癌细胞中明显高表达; LRG1 刺激导致 HUVECs 生长活性增强和血管形成能力的增加; 前列腺癌细胞 LRG1 表达的抑制导致其促血管形成能力减弱。**结论:** 前列腺癌细胞高表达的 LRG1 具有明显的促血管形成作用。

【关键词】 前列腺癌; 富含亮氨酸 α -2 糖蛋白 1; 血管形成

【中图分类号】 R737.25 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-4983 (2025) 02-0127-05

The Effect of LRG1 Derived from Prostate Cancer Cells on Angiogenesis

LONG Jin, REN Peng, QI Zheng-jun, LIU Feng-lian

(Second Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Kaili, Guizhou 556000, China)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of LRG1 derived from prostate cancer cells on angiogenesis. **Methods:** The expression of LRG1 in prostate cancer tissues, para-cancer tissues, prostate cells (PC-3 and LNCaP) and prostate cell line (RWPE-1) were detected by Western blot and real-time PCR to determine the expression characteristic of LRG1 in the development of prostate cancer. After stimulation with LRG1 for 24 h, HUVECs viability was detected by CCK8. HUVECs was inoculated into a 96-well plate precoated with Matrigel, and then stimulated by LRG1 for 12 hours, following by staining with LIVE/DEAD Cell Imaging Kit, the degree of angiogenesis was observed under a fluorescence microscope. After transfection with LV-GFP or LV-shLRG1-GFP for 72 hours, the expression of LRG1 was detected by Western blot. After 72 hours of normal culture and transfection with LV-GFP or LV-shLRG1-GFP, the supernatant of prostate cancer cells was collected and used to prepare HUVECs single-cell suspension. These cells were inoculated in 96-well plates pre-coated with Matrigel. After 12 hours of culture, these cells were stained with LIVE/DEAD Cell Imaging Kit and the degree of angiogenesis was observed under fluorescence microscope. **Results:** LRG1 was highly expressed in prostate cancer tissues and prostate cancer cells. LRG1 stimulation resulted in increased growth activity and angiogenesis of HUVECs. The ability of angiogenesis in prostate cancer cells was decreased due to the inhibition of LRG1 expression. **Conclusion:** The highly expressed LRG1 in prostate cancer cells play an obvious role in angiogenesis.

基金项目: 贵州省卫健委科技基金项目 (gzwkj2023-116)。

作者简介: 龙金 (1982-), 男, 主治医师, 主要从事泌尿外科临床工作。

通信作者: 刘风炼 (1988-), 女, 主治医师, 主要从事肿瘤基础与临床工作。

戚正君 (1983-), 男, 主治医师, 主要从事头颈肿瘤临床工作。

【Key words】 Prostate cancer; LRG1; Angiogenesis

前列腺癌 (PCa) 是西方国家最常见的诊断癌症,也是男性癌症死亡的第二大原因^[1-2]。在中国,前列腺癌的发病率和死亡率在过去十年中也呈上升趋势^[3]。大约有60~70%的前列腺癌患者发生了肿瘤转移^[4],而癌细胞从原发部位扩散到身体其他部位的转移过程,意味着前列腺癌已经发展到晚期阶段^[5]。肿瘤组织中血管生成是影响癌细胞转移的重要因素^[6],且已有研究证实,前列腺癌组织中的血管密度越高,肿瘤分级就越高,预后也会越差^[7-8]。因此,了解肿瘤血管生成的调控机制对寻求治疗复发性和转移性癌症的新策略至关重要。作为一个高度保守的富亮氨酸重复序列蛋白家族成员之一,LRG1具有调节多种细胞的生物学功能,包括上皮向间质转化、肿瘤细胞的增殖、和皮肤损伤的修复反应^[9-11]。另外,还有研究表明,LRG1也能调控结肠癌、角膜损伤和关节炎等病变中所伴随的血管生成^[12-14]。在本研究中,课题组在发现前列腺癌组织和前列腺癌细胞中明显高表达LRG1的基础上,进一步明确LRG1具有促进前列腺癌血管形成的潜力。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 实验组织标本、细胞与试剂 前列腺癌手术切除标本及其邻近正常组织采集自2017年9月至2022年12月贵州医科大学第二附属医院,共23例,所有标本均经病理科医师进行组织学确认,所开展的实验研究获得贵州医科大学第二附属医院伦理委员会的伦理许可,并获得了所有组织捐赠者对组织标本进行科研使用的知情同意。人前列腺癌细胞(PC-3和LNCaP)、前列腺细胞RWPE-1和HUVECs均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。其它主要试剂如下:兔抗LRG1抗体(英国Abcam公司);兔抗 β -actin抗体(英国Abcam公司);PVDF膜(美国Millipore公司);ECL(美国Millipore公司);HRP标记的羊抗兔二抗(美国Earthox公司);LIVE/DEAD Cell Imaging Kit(Thermo Fisher);Matrigel(BD公司)。

1.1.2 主要实验仪器 倒置荧光显微镜(OLYMPUS公司);-80℃低温冰箱(青岛海尔);低温离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RWPE-1细胞用RWPE-1细胞专用培养基(武汉Procell)进行培养;前列腺癌细胞系用含10%胎牛血清(Gibco)的1640培养基(Invitrogen, USA)进行培养;HUVECs在含有10%胎牛血清(Gibco)的ECM培养基(sciencell)培养。所有细胞培养基中均加入1%青霉素/链霉素和1%谷氨酰胺,所有细胞均在37℃、5%CO₂的湿化培养箱中培养。

1.2.2 Western blot 前列腺癌组织、癌旁组织、前列腺癌细胞以及前列腺细胞用含蛋白酶抑制剂的RIPA强细胞

裂解液裂解、离心和变性,经SDS-PAGE胶电泳后,转至PVDF膜,用含5%脱脂奶粉的TBS封闭后孵育兔抗LRG1抗体(1:1500)或者兔抗 β -actin抗体(1:2000),TBST洗涤后用HRP标记的羊抗兔二抗(1:3500),PVDF膜经ECL激发曝光。

1.2.3 Real time-PCR 前列腺癌组织、癌旁组织、前列腺癌细胞以及前列腺细胞用Trizol(Invitrogen)提取总RNA,运用FastQuant RT Super Mix(KR108)合成cDNA,并按照FastFire qPCR PreMix(SYBR Green)(FP207)实验步骤进行PCR反应,所有目的基因表达量以 β -actin的表达量作为内参。引物序列如下:LRG1(human):5'-CCTCTTGGAGCAGACAGCG-3'和5'-CAGGTGTTGACAGGAGATGGA-3'; β -actin(human):5'-GT-CACCAACTGGGACGACA-3'和5'-CACAGCCTG-GATAGCAACG-3'。

1.2.4 细胞生长活性分析 将HUVECs接种于爬片上(5×10⁴个细胞/孔),贴壁4h后,分为两组,一组正常培养,另外一组加入含rhLRG1(500 ng/ml)的培养基,24h后,每孔加入10 μ l kit-8(CCK-8)溶液,孵育2h,然后用酶标仪(Bio-Rad)在460 nm处测定每孔的吸光度。

1.2.5 慢病毒感染 Lv-shLRG1-GFP与Lv-GFP购自OriGene Technologies, Inc。将前列腺癌细胞接种于6孔板,使用Lipofectamine 2000(Invitrogen, CA, USA)转染72h后,Western blot检测LRG1的表达。

1.2.6 肿瘤细胞条件培养基(CM)的制备 慢病毒转染前列腺癌细胞72h后,收集前列腺癌细胞上清培养基上清,即CM,将其在4℃离心机以10000 g转速离心10 min,去除细胞碎片,并在-80℃保存,供后续实验使用。

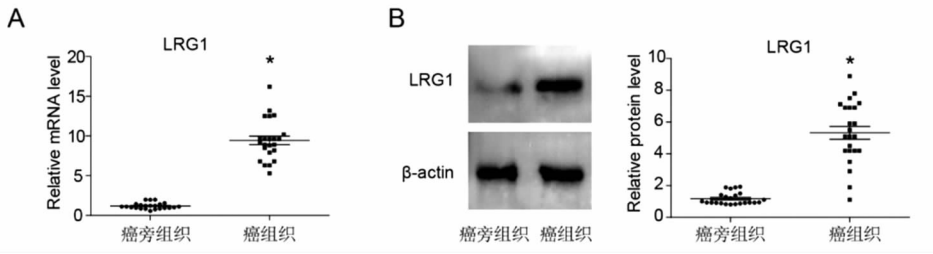
1.2.7 内皮细胞体外血管形成试验 取50 μ l基质胶滴加在96孔板内,放置在37℃培养箱中30 min。将培养的HUVECs制备成单细胞悬液,取3×10⁴ HUVECs滴加入预包被好基质胶的96孔中,根据实验设计,分为以下几组:正常培养组、rhLRG1(2 μ g/ml)刺激组、前列腺癌细胞经正常培养上清刺激组、转染Lv-GFP的前列腺癌细胞培养上清刺激组以及转染Lv-shLRG1-GFP的前列腺癌细胞培养上清刺激组,培养箱孵育8h后弃上清,用LIVE/DEAD Cell Imaging Kit染色,荧光显微镜放大100倍捕捉图像,并随机获取3个视野进行人工计数定量。

1.3 统计分析 两组实验数据之间的对比使用 t 检验,所有数据选用统计分析软件GraphPad Prism 5分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LRG1在前列腺癌组织表达增高 在之前的研究中,已经明确了LRG1在其他肿瘤中的重要作用。为了研究LRG1是否参与前列腺癌的发生发展,课题组首先收集前列腺癌组织及癌旁前列腺组织,采用Real time-PCR和

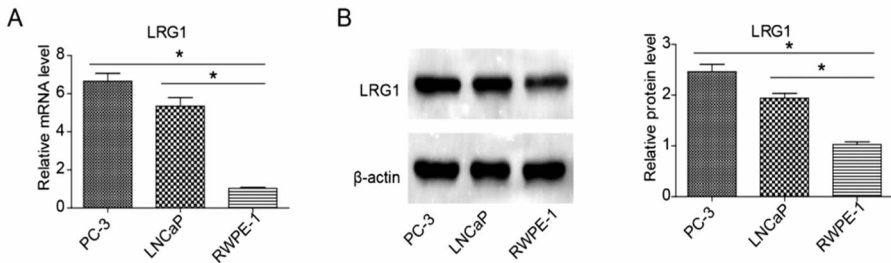
Western blot 法检测 LRG1 的表达。图 1 显示，前列腺癌组织中明显高表达 LRG1，提示 LRG1 可能与前列腺的形成有密切关系。



A. Real time - PCR 检测前列腺癌组织与癌旁组织中 LRG1 的表达; B. Western blot 检测前列腺癌组织与癌旁组织中 LRG1 的表达。所有数据以均数 ± 标准差表示, $n = 23, * P < 0.05$ 。

图 1 LRG1 在前列腺癌组织和癌旁组织的表达

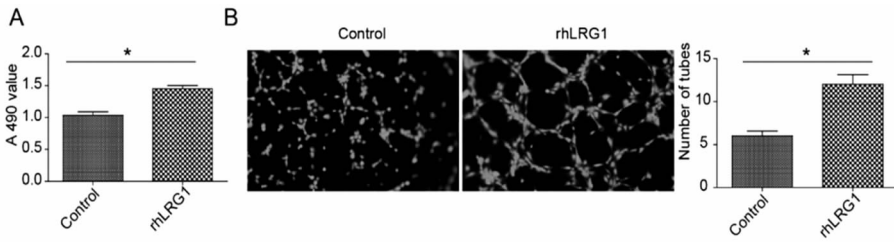
2.2 LRG1 在前列腺癌细胞系中明显高表达 除此之外，课题组还检测了前列腺癌细胞 (PC-3 和 LNCaP) 和前列腺细胞 (RWPE-1) 中 LRG1 的表达。图 2 显示，相对于前列腺细胞来说，前列腺癌细胞具有高表达 LRG1 的特征。



A. Real time - PCR 检测前列腺癌细胞 (PC-3 和 LNCaP) 和前列腺细胞 (RWPE-1) 中 LRG1 的表达; B. Western blot 检测前列腺癌细胞 (PC-3 和 LNCaP) 和前列腺细胞 (RWPE-1) 中 LRG1 的表达。所有数据以均数 ± 标准差表示, $n = 3, * P < 0.05$ 。

图 2 LRG1 在前列腺癌细胞系和前列腺细胞系的表达

2.3 LRG1 能促进 HUVECs 的生长活性和血管形成 基于前列腺癌的发生发展与肿瘤内血管形成的密切相关，以及在发现前列腺癌细胞与前列腺癌组织均高表达 LRG1 的基础上，课题组进一步提出假设，即 LRG1 可能是促进前列腺癌血管形成的重要因素之一，为了验证这个假设，采用 LRG1 刺激 HUVECs，结果 (图 3) 发现其生长活性明显增强，而且，由于受到 LRG1 的刺激，导致 HUVECs 在体外血管形成能力增强。



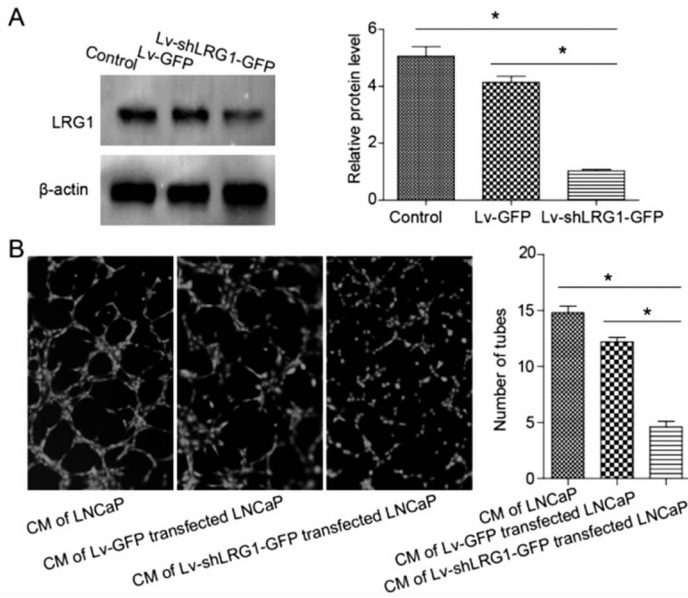
A. HUVECs 经 LRG1 刺激 24 h, CCK8 检测细胞活性; B. HUVEC 接种至预先包被基质胶的 96 孔板中, 经 LRG1 刺激 12 h, 用 LIVE/DEAD Cell Imaging Kit 染色后, 荧光显微镜观察血管形成状态。所有数据以均数 ± 标准差表示, $n = 3, * P < 0.05$ 。

图 3 体外观察 LRG1 对血管形成的影响

2.4 前列腺癌细胞 LRG1 表达的抑制导致其促血管形成能力减弱 为了进一步研究前列腺癌细胞表达的 LRG1 对血管形成作用的影响，课题组将前列腺细胞转染 Lv - shLRG1 - GFP，使其表达 LRG1 的水平降低 (图 4A)，另外，

当前列腺癌细胞经正常培养、转染 Lv - GFP 或者 Lv - shLRG1 - GFP72 h 后, 收集其培养上清, 用其作为 HUVECs 的条件培养基, 观察前列腺癌细胞 LRG1 表达的抑制对 HUVECs 血管形成的影响, 结果 (图 4B) 发现, 随

着前列腺癌细胞 LRG1 表达的抑制, 其促血管形成能力也发生减弱。这些结果表明, LRG1 可能是促进前列腺癌血管形成的重要因子。



A. 前列腺癌细胞转染 Lv - GFP 或者 Lv - shLRG1 - GFP72 h 后, Western blot 观察 LRG1 的表达 ($n=5$); B. 前列腺癌细胞经正常培养、转染 Lv - GFP 或者 Lv - shLRG1 - GFP72 h 后, 收集其培养上清, 用其制作 HUVECs 单细胞悬液, 接种于预先包被基质胶的 96 孔板, 培养 12 h 后, 用 LIVE/DEAD Cell Imaging Kit 染色, 荧光显微镜观察血管形成状态 ($n=3$)。所有数据以均数 \pm 标准差表示, * $P < 0.05$ 。

图 4 体外观察前列腺癌细胞 LRG1 表达的抑制对其促血管形成的影响

3 讨论

前列腺癌是一种典型的高度血管化的肿瘤, 血管生成是影响前列腺癌生长和发展的重要因素^[4,15]。虽然, 目前还没有直接的标志物来评估前列腺癌的血管生成活性, 但普遍观点认为, 血管密度是衡量肿瘤内血管生成活性的一个重要指标。微血管密度是肿瘤血管生成活性的一个标志物, 并已被证明是影响多种肿瘤预后的重要因素, 包括乳腺癌和结肠癌以及恶性黑色素瘤^[16]。在对前列腺癌的血管密度与肿瘤分级和预后的相关性研究发现, 前列腺癌中血管密度越高, 肿瘤分级和分期较高, 预后也较差^[7-8]; 而且, 针对血流动力学指标的超声影像学研究显示, 高恶性肿瘤的峰值强度更高^[17]。评价肿瘤血管生成的另一个重要指标是血管生成调节因子, 其中 VEGF 是这些血管生成调节因子的代表之一^[18], 在 VEGF 亚型中, VEGF - a 已被广泛研究, 并被证实在前列腺癌血管生成中发挥重要作用^[19]。此外, 已发现 VEGF - A 在前列腺癌中过表达, 高水平的 VEGF - A 与远处转移和预后差有关^[20-22]。目前, 虽然已经有研究者使用多种小分子 (如: 抑制蛋白、肿瘤抑素、血管能抑素、内皮抑素和血管稳定因子) 来抑制 VEGF - A、FGF、PDGF 和白介素诱导的内皮细胞增殖和迁移, 起到抑制血管形成的作用^[23], 但在前列腺癌的治疗中还存在很多不确定性, 因此, 寻找新的促进前列腺癌

血管形成的调控因子, 以及以此为靶点来抑制前列腺癌血管形成达到治疗前列腺癌的目的显得尤为紧迫。在本研究中, 我们发现前列腺癌组织与前列腺癌细胞中均明显高表达 LRG1, 并通过体外研究, 表明其具有促进血管形成的作用, 也揭示了 LRG1 可能是促进前列腺癌血管形成的重要调控因子。

通过查阅 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles/14263303>), 课题组发现相对于原发性前列腺肿瘤和良性前列腺肿瘤来说, 恶性前列腺癌具有更加明显高表达 LRG1 的特征, 提示 LRG1 可能参与前列腺的发生和发展。本研究检测了前列腺癌与癌旁组织中 LRG1 的表达, 结果发现前列腺癌组织具有比癌旁正常的前列腺组织更高的 LRG1 表达, 同时对比前列腺癌细胞与前列腺上皮细胞中 LRG1 的表达, 也发现前列腺癌细胞具有高表达 LRG1 的特征, 这与 GEO 数据库的结果高度一致。在此基础上, 研究首先通过体外实验确定了 rhLRG1 具有促进内皮细胞血管形成的作用, 随后, 在前列腺癌细胞经正常培养、转染 Lv - GFP 或者 Lv - shLRG1 - GFP 后, 收集其培养上清, 用其制备 HUVECs 单细胞悬液, 并进行体外血管形成实验, 结果发现 LRG1 表达缺失的同时, 前列腺癌细胞的促血管作用明显减弱。这些结果均表明, 前列腺癌表达增多的 LRG1 可能是促进前列腺癌血管形成的

重要因素。

虽然本研究结果阐明了LRG1具有促进前列腺癌血管形成的潜力,但只是从体外血管形成实验中得到了以上结论,在将来的研究中,课题组还将从以下两个方面进一步拓展:(1)需要进一步探索LRG1调控前列腺癌血管形成的信号分子机制;(2)需要通过在前列腺癌细胞系沉默LRG1基因的表达,以此建立前列腺肿瘤异种移植模型,观察肿瘤形成过程中血管密度的变化,通过体内肿瘤模型进一步确定LRG1在前列腺癌血管形成中的作用,其次,对于这方面的研究,课题组也面临着一个挑战,即是否能通过药物等方式抑制LRG1功能来减缓前列腺癌血管形成来达到抑制前列腺癌的目的,这将是下一步探索和深入研究的方向。

参考文献

[1] Attard G, Parker C, Eeles R A, et al. Prostate cancer[J]. *Lancet* (London, England), 2016, 387(10013): 70–82.

[2] Litwin M S, Tan H J. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review[J]. *Jama*, 2017, 317(24): 2532–42.

[3] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: a cancer journal for clinicians* 2016, 66(2): 115–32.

[4] Owens O L, Jackson D D, Thomas T L, et al. Prostate Cancer Knowledge and Decision Making Among African–American Men and Women in the Southeastern United States[J]. *International journal of men's health*, 2015, 14(1): 55–70.

[5] Pellegrini K L, Sanda M G, Patil D, et al. Evaluation of a 24–gene signature for prognosis of metastatic events and prostate cancer–specific mortality[J]. *BJU international*, 2017, 119(6): 961–967.

[6] Rycaj K, Li H, Zhou J, et al. Cellular determinants and microenvironmental regulation of prostate cancer metastasis[J]. *Seminars in cancer biology*, 2017, 44: 83–97.

[7] Bono A V, Celato N, Cova V, et al. Microvessel density in prostate carcinoma[J]. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 2002, 5(2): 123–127.

[8] Borre M, Offersen B V, Nerström B, et al. Microvessel density predicts survival in prostate cancer patients subjected to watchful waiting[J]. *British journal of cancer*, 1998, 78(7): 940–944.

[9] Zhou Y, Zhang X, Zhang J, et al. LRG1 promotes proliferation and inhibits apoptosis in colorectal cancer cells via RUNX1 activation[J]. *PLoS one*, 2017, 12(4): e0175122.

[10] Xie Z B, Zhang Y F, Jin C, et al. LRG-1 promotes pancreatic cancer growth and metastasis via modulation of the EGFR/p38 signaling[J]. *Journal of experimental & clinical cancer Research: CR*, 2019, 38(1): 75.

[11] Gao Y, Zhou J, Xie Z, et al. Mechanical strain promotes skin fibrosis through LRG-1 induction mediated by ELK1 and ERK signalling[J]. *Communications biology*, 2019, 2: 359.

[12] Zhang J, Zhu L, Fang J, et al. LRG1 modulates epithelial–mes-

enchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1 α activation[J]. *Journal of experimental & clinical cancer Research: CR*, 2016, 35: 29.

[13] Song S, Cheng J, Yu B J, et al. LRG1 promotes corneal angiogenesis and lymphangiogenesis in a corneal alkali burn mouse model[J]. *International journal of ophthalmology*, 2020, 13(3): 365–373.

[14] Wang Y, Xu J, Zhang X, et al. TNF- α -induced LRG1 promotes angiogenesis and mesenchymal stem cell migration in the subchondral bone during osteoarthritis[J]. *Cell death & Disease*, 2017, 8(3): e2715.

[15] Scher H I, Solo K, Valant J, et al. Prevalence of Prostate Cancer Clinical States and Mortality in the United States: Estimates Using a Dynamic Progression Model[J]. *PLoS one*, 2015, 10(10): e0139440.

[16] Sharma S, Sharma M C, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprosthetic perspective and significance of neoangiogenesis[J]. *Histopathology*, 2005, 46(5): 481–489.

[17] Jiang J, Chen Y, Zhu Y, et al. Contrast-enhanced ultrasonography for the detection and characterization of prostate cancer: correlation with microvessel density and Gleason score[J]. *Clinical radiology*, 2011, 66(8): 732–737.

[18] Brot S, Ntekim A, Cardenas R, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor in prostate cancer[J]. *Endocrine-related cancer*, 2015, 22(3): R107–123.

[19] Wong S Y, Haack H, Crowley D, et al. Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis[J]. *Cancer research*, 2005, 65(21): 9789–9798.

[20] Wegiel B, Bjartell A, Ekberg J, et al. A role for cyclin A1 in mediating the autocrine expression of vascular endothelial growth factor in prostate cancer[J]. *Oncogene*, 2000, 24(42): 6385–6393.

[21] Green M M, Hiley C T, Shanks J H, et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in locally invasive prostate cancer is prognostic for radiotherapy outcome[J]. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 2007, 67(1): 84–90.

[22] Duque J L, Loughlin K R, Adam R M, et al. Kantoff PW, Zurawski D, Freeman MR. Plasma levels of vascular endothelial growth factor are increased in patients with metastatic prostate cancer[J]. *Urology*, 1999, 54(3): 523–527.

[23] Mundel T M, Kalluri R. Type IV collagen-derived angiogenesis inhibitors[J]. *Microvascular Research*, 2007, 74(2–3): 85–89.

收稿日期: 2024–11–29

责任编辑: 雷长国