

NDRG1过表达对去势抵抗性前列腺癌耐药细胞株C4-2/ENZA耐药性的影响及其机制

张 鹰¹, 万朝辉², 蒋先训¹

(1. 南华大学衡阳医学院附属第二医院重症医学科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学衡阳医学院附属第二医院急诊科, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] **目的:** 探讨N-myc下游调节基因1(NDRG1)对去势抵抗性前列腺癌(CRPC)恩杂鲁胺(ENZA)耐药的影响,并阐明其作用机制。**方法:** 体外培养人CRPC C4-2细胞和ENZA耐药株C4-2/ENZA细胞,采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测C4-2/ENZA细胞及其亲本C4-2细胞中NDRG1 mRNA表达水平,Western blotting法检测C4-2/ENZA细胞及其亲本C4-2细胞中NDRG1、雄激素受体(AR)和前列腺特异性抗原(PSA)蛋白表达水平,以验证细胞转染效率。将C4-2/ENZA细胞分为空白组(正常培养不进行处理)、阴性对照慢病毒(Lv-NC)组(转染Lv-NC)、Lv-NDRG1组(转染Lv-NDRG1)、Lv-NC+ENZA组(转染Lv-NC后加入ENZA处理)、Lv-NDRG1+ENZA组(转染Lv-NDRG1后加入ENZA处理)、Lv-NDRG1+表皮生长因子(EGF)组(转染Lv-NDRG1后加入EGF处理)和Lv-NDRG1+EGF+ENZA组(转染Lv-NDRG1后加入EGF和ENZA处理)。采用噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞半数抑制浓度(IC₅₀)、耐药指数(RI)和细胞增殖活性,流式细胞术检测各组细胞凋亡率,RT-qPCR法检测各组细胞中NDRG1 mRNA表达水平,Western blotting法检测各组细胞中NDRG1、AR、第213位丝氨酸磷酸化雄激素受体(p-ARSer²¹³)、第81位丝氨酸磷酸化雄激素受体(p-ARSer⁸¹)和PSA蛋白表达水平。**结果:** 与C4-2细胞比较,C4-2/ENZA细胞中NDRG1 mRNA和蛋白表达水平均明显降低($P<0.01$),AR和PSA蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),提示ENZA耐药株C4-2/ENZA中NDRG1低表达;与Lv-NC组比较,Lv-NDRG1组细胞中NDRG1 mRNA和蛋白表达水平均明显升高($P<0.01$),提示成功构建NDRG1基因过表达C4-2/ENZA耐药细胞株。MTT法,与C4-2细胞比较,C4-2/ENZA细胞IC₅₀明显升高($P<0.01$),RI为17.78;与Lv-NC组比较,Lv-NDRG1组C4-2/ENZA细胞IC₅₀明显降低($P<0.01$)。EGF处理24 h,与Lv-NC组比较,Lv-NC+EGF组C4-2/ENZA细胞IC₅₀明显升高($P<0.01$);与Lv-NDRG1组比较,Lv-NDRG1+EGF组C4-2/ENZA细胞IC₅₀明显升高($P<0.01$)。与ENZA处理前比较,不同浓度ENZA处理24 h,C4-2和C4-2/ENZA细胞增殖活性均逐渐降低($F=223.80, P<0.01$; $F=81.46, P<0.01$)。ENZA处理24 h,与Lv-NC组比较,Lv-NDRG1组C4-2/ENZA细胞增殖活性明显降低($P<0.01$)。EGF处理24 h,与Lv-NC组比较,Lv-NC+EGF组C4-2/ENZA细胞增殖活性明显升高($P<0.01$),Lv-NDRG1+EGF组C4-2/ENZA细胞增殖活性明显降低($P<0.01$)。选择10.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ENZA和干预24 h作为后续检测浓度及时间点。流式细胞术,ENZA处理24 h,与Lv-NC组比较,Lv-NDRG1组细胞凋亡率明显升高($P<0.01$);与Lv-NC+ENZA组比较,Lv-NDRG1+ENZA组细胞凋亡率明显升高($P<0.01$)。EGF处理24 h,与Lv-NDRG1组比较,Lv-NDRG1+EGF组细胞凋亡率明显降低($P<0.01$),Lv-NDRG1+ENZA组细胞凋亡率明显升高($P<0.01$);与Lv-NDRG1+ENZA组比较,Lv-NDRG1+EGF+ENZA组细胞凋亡率明显降低($P<0.01$)。Western blotting法,ENZA处理24 h,与Lv-NC组比较,Lv-NDRG1组细胞中AR和PSA蛋白表达水平及p-ARSer²¹³/AR和p-ARSer⁸¹/AR比值均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。EGF处理

[收稿日期] 2023-05-25

[基金项目] 湖南省卫健委卫生科研项目(D202304058812, D202213014836)

[作者简介] 张 鹰(1987-),男,湖南省衡阳市人,主治医师,医学硕士,主要从事重症医学基础和临床方面的研究。

[通信作者] 万朝辉,主治医师(E-mail:hygtc7985@163.com)

24 h, 与 Lv-NC 组比较, Lv-NC+EGF 组细胞中 AR 和 PSA 蛋白表达水平及 p-ARSer²¹³/AR 和 p-ARSer⁸¹/AR 比值均明显升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与 Lv-NDRG1 组比较, Lv-NDRG1+EGF 组细胞中 AR 和 PSA 蛋白表达水平及 p-ARSer²¹³/AR 和 p-ARSer⁸¹/AR 比值均明显升高 ($P<0.01$)。

结论: NDRG1 过表达可降低 CRPC 对 ENZA 的耐药性, 其作用机制可能与抑制 AR 信号转导有关。

[关键词] 去势抵抗性前列腺癌; N-myc 下游调节基因 1; 恩杂鲁胺; 耐药性; 雄激素受体

[中图分类号] R737.25 **[文献标志码]** A

Effect of over-expression of NDRG1 on resistance of castration-resistant prostate cancer resistant cell line C4-2/ENZA and its mechanism

ZHANG Ying¹, WAN Zhaohui², JIANG Xianxun¹

(1. Department of Critical Medicine, Affiliated Second Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Department of Emergency, Affiliated Second Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) on the enzalutamide (ENZA) resistance in the castration-resistant prostate cancer (CRPC), and to clarify its mechanism. **Methods:** The human CRPC C4-2 cells and ENZA-resistant strain C4-2/ENZA cells were cultured *in vitro*. The expression levels of NDRG1 mRNA in the C4-2/ENZA cells and their parental C4-2 cells were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method. The expression levels of NDRG1, androgen receptor (AR), and prostate-specific antigen (PSA) proteins in the cells were detected by Western blotting method to verify the transfection efficiency of the cells. The C4-2/ENZA cells were divided into blank group (normally cultured without treatment), negative control lentivirus (Lv-NC) group (transfected with Lv-NC), Lv-NDRG1 group (transfected with Lv-NDRG1), Lv-NC+ENZA group (transfected with Lv-NC followed by ENZA treatment), Lv-NDRG1+ENZA group (transfected with Lv-NDRG1 followed by ENZA treatment), Lv-NDRG1+epidermal growth factor (EGF) group (transfected with Lv-NDRG1 followed by EGF treatment), and Lv-NDRG1+EGF+ENZA group (transfected with Lv-NDRG1 followed by EGF and ENZA treatment). The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀), resistance index (RI), and proliferation activity of the cells were detected by MTT assay; the apoptotic rates of the cells in various groups were detected by flow cytometry; RT-qPCR method was used to detect the expression levels of NDRG1 mRNA in the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of NDRG1, AR, phosphorylated AR at serine²¹³ (p-ARSer²¹³), phosphorylated AR at serine⁸¹ (p-ARSer⁸¹), and PSA proteins in the cells in various groups. **Results:** Compared with C4-2 cells, the expression levels of NDRG1 mRNA and protein in the C4-2/ENZA cells were significantly decreased ($P<0.01$) and the expression levels of AR and PSA proteins were increased ($P<0.01$), indicating low expression of NDRG1 in the ENZA-resistant C4-2/ENZA strain. Compared with Lv-NC group, the expression levels of NDRG1 mRNA and protein in the cells in Lv-NDRG1 group were significantly increased ($P<0.01$), indicating the successful construction of an NDRG1 gene over-expression strain of C4-2/ENZA resistant cells. The MTT assay results showed that compared with the C4-2 cells, the IC₅₀ of the C4-2/ENZA cells was increased ($P<0.01$) and the RI was 17.78; compared with Lv-NC group, the IC₅₀ of the C4-2/ENZA cells in Lv-NDRG1 group was decreased ($P<0.01$). After 24 h of EGF treatment, compared with Lv-NC group, the IC₅₀ of the C4-2/ENZA cells in Lv-NC+EGF group was significantly increased ($P<0.01$); compared with Lv-NDRG1

group, the IC_{50} of the C4-2/ENZA cells in Lv-NDRG1+EGF group was increased ($P<0.01$). Compared with before ENZA treatment, after 24 h of ENZA treatment, the proliferation activities of C4-2 and C4-2/ENZA cells were gradually decreased ($F=223.80$, $P<0.01$; $F=81.46$, $P<0.01$). Compared with Lv-NC group, the proliferation activity in the C4-2/ENZA cells in Lv-NDRG1 group after 24 h of ENZA treatment was significantly decreased ($P<0.01$). After 24 h of EGF treatment, compared with Lv-NC group, the proliferation activity of the C4-2/ENZA cells in Lv-NC+EGF group was significantly increased ($P<0.01$), while the proliferation activity of the C4-2/ENZA cells in Lv-NDRG1+EGF group was significantly decreased ($P<0.01$). The chosen concentration and treatment duration for further testing were $10\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ENZA and the intervention time was 24 h. The flow cytometry results showed that after 24 h of ENZA treatment, compared with Lv-NC group, the apoptotic rate of the cells in Lv-NDRG1 group was significantly increased ($P<0.01$); compared with Lv-NC+ENZA group, the apoptotic rate of the cells in Lv-NDRG1+ENZA group was significantly increased ($P<0.01$). After 24 h of EGF treatment, compared with Lv-NDRG1 group, the apoptotic rate of the cells in Lv-NDRG1+EGF group was significantly decreased ($P<0.01$), while the apoptotic rate of the cells in Lv-NDRG1+ENZA group was significantly increased ($P<0.01$); compared with Lv-NDRG1+ENZA group, the apoptotic rate of the cells in Lv-NDRG1+EGF+ENZA group was significantly decreased ($P<0.01$). The Western blotting results showed that after 24 h of ENZA treatment, compared with Lv-NC group, the expression levels of AR and PSA proteins and the ratio of p-ARSer²¹³/AR and p-ARSer⁸¹/AR in the cells in Lv-NDRG1 group were significantly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). After 24 h of EGF treatment, compared with Lv-NC group, the expression levels of AR and PSA proteins and the ratio of p-ARSer²¹³/AR and p-ARSer⁸¹/AR in the cells in Lv-NC+EGF group were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with Lv-NDRG1 group, the expression levels of AR and PSA proteins and the ratio of p-ARSer²¹³/AR and p-ARSer⁸¹/AR in the cells in Lv-NDRG1+EGF group were significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** Over-expression of NDRG1 can reduce the resistance of CRPC to ENZA, and its mechanism may be related to the inhibition of AR signaling.

KEYWORDS Castration-resistant prostate cancer; N-myc downstream regulatory gene 1; Enzalumide; Drug resistance; Androgen receptor

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是全球范围内最常见的男性恶性肿瘤之一, 也是导致男性癌症死亡的主要因素^[1]。研究^[2]显示: 2020年PCa在男性癌症中发病率位居第2位, 占新发癌症的14.1%。雄激素剥夺疗法是目前临床治疗PCa的常规方法, 通过药物或手术去势, 并结合雄激素受体拮抗剂恩杂鲁胺 (enzalumide, ENZA) 降低体内雄激素水平, 从而抑制癌症发展^[3-4]。然而, 大部分患者均会出现耐药性, 雄激素受体 (androgen receptor, AR) 转录活性恢复甚至增强, 导致PCa发展为去势抵抗性PCa (castration-resistant prostate cancer, CRPC), 从而对化疗药物ENZA不敏感, 对患者的治疗效果较差。因此, 探讨CRPC耐药发生的分子机制并寻找逆转耐药的靶点具有重要的意义, 有助于开发新的治疗方法延长患者生存期。N-myc下游调节基因1 (N-myc downstream regulatory gene 1, NDRG1) 是NDRG

家族成员之一, 在大部分肿瘤中发挥抑癌基因的作用, 调控肿瘤细胞增殖、凋亡及侵袭等进程^[5-7]。LIM等^[8]发现: NDRG1能够抑制PCa细胞中AR信号通路激活从而抑制癌症发展。郭晓波等^[9]研究发现: NDRG1在PCa细胞PC-3中低表达, NDRG1表达上调可逆转PCa细胞多西他赛耐药。但NDRG1是否可调控AR信号通路参与CRPC耐药目前尚未见报道。因此, 本研究探讨NDRG1对CRPC耐药的影响, 并阐明其作用机制, 为寻找CRPC新的治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、主要试剂和仪器 人CRPC C4-2细胞 (雄激素非依赖性PCa细胞系) 购自美国ATCC公司。NDRG1过表达慢病毒 (Lv-NDRG1) 及其阴性对照慢病毒 (Lv-NC) 购自上海汉恒生物科技有限公司。ENZA购自美国Selleck公司,

RPMI-1640 培养基和胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 噻唑蓝 [3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT] 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司, 兔抗人 NDRG1 抗体、AR 抗体、第 213 位丝氨酸磷酸化雄激素受体 (phosphorylated AR at serine 213, p-ARSer²¹³) 抗体、第 81 位丝氨酸磷酸化雄激素受体 (phosphorylated AR at serine 81, p-ARSer⁸¹) 抗体、前列腺特异性抗原 (prostate specific antigen, PSA) 抗体和 GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶 (horse radish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔抗体购自美国 Affinity 公司。二氧化碳培养箱 (型号: MCO-18AC) 购自日本松下公司, 流式细胞仪 (型号: Accuri C6) 购自美国 BD 公司, 酶标分析仪 (型号: AMR-100) 购自杭州奥盛仪器有限公司, 化学发光成像系统 (型号: Tanon-5200) 购自上海天能科技有限公司。

1.2 细胞培养及耐药细胞株构建 采用 ENZA 梯度递增法逐步诱导获得耐药株 C4-2/ENZA 细胞。将亲本 C4-2 细胞置于 0、0.500、1.000、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 和 100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ENZA 的完全培养液中逐步诱导筛选, 整个过程持续时间约 7 个月。C4-2 细胞及耐药株 C4-2/ENZA 细胞使用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。取对数生长期 C4-2 和 C4-2/ENZA 细胞, 以每孔 2 500 个细胞的密度接种至 96 孔细胞培养板中, 过夜。分别加入 0、0.500、1.000、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 和 100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ENZA 继续培养 24 h。

1.3 细胞转染和实验分组 取对数生长期 C4-2/ENZA 细胞, 按每孔 5×10^6 个细胞的密度接种至 6 孔细胞培养板中培养过夜。次日, 按病毒感染复数 (multiplicity of infection, MOI) = 100 加入 Lv-NDRG1 (慢病毒滴度为 5.21×10^8 $\text{TU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 Lv-NC (慢病毒滴度为 3.15×10^8 $\text{TU}\cdot\text{mL}^{-1}$), 24 h 后更换新配制的 RPMI-1640 完全培养基继续培养, 感染 72 h 后采用 RT-qPCR 法和 Western blotting 法检测细胞转染效率, 收集细胞进行后续实验。

根据实验处理方式不同, 将 C4-2/ENZA 细胞分为空白组 (正常培养不进行处理)、Lv-NC 组 (转染 Lv-NC)、Lv-NDRG1 组 (转染 Lv-NDRG1)、Lv-NC+ENZA 组 (转染 Lv-NC 后加入 ENZA 处理)、Lv-NDRG1+ENZA 组 (转染 Lv-NDRG1 后加入 ENZA 处理)、Lv-NDRG1+表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 组 (转染 Lv-NDRG1 后加入 EGF 处理) 和 Lv-NDRG1+EGF+ENZA 组 (转染 Lv-NDRG1 后加入 EGF 和 ENZA 处理)。Lv-NC+ENZA 组和 Lv-NDRG1+ENZA 组细胞 NDRG1 基因过表达后联合 ENZA 处理, ENZA 干预浓度为 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 干预时间为 24 h。Lv-NDRG1+EGF 组和 Lv-NDRG1+EGF+ENZA 组细胞 NDRG1 基因过表达后联合 ENZA 及 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 雄激素非依赖性受体激动剂 EGF 处理^[10]。

1.4 MTT 法检测各组细胞半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50})、耐药指数 (resistance index, RI) 和细胞增殖活性 取对数生长期 C4-2/ENZA 细胞, 以每孔 2 500 个细胞的密度接种至 96 孔细胞培养板中培养过夜, 慢病毒感染后分别加入不同浓度 (0、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 和 100.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ENZA 或联合加入 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ENZA 或 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ EGF, 另设调零孔 (培养基对照)。培养 24 h 后提前 4 h 取出培养板, 每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ 0.5% MTT 溶液, 置于培养箱中继续培养 4 h, 弃培养液, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 二甲基亚砷, 置于摇床上避光震荡 15 min, 采用酶标分析仪检测波长 490 nm 处吸光度 (A) 值, 计算 ENZA 对 C4-2 和 C4-2/ENZA 细胞的 IC_{50} 、RI 和 各组细胞增殖活性。RI = C4-2/ENZA 细胞 IC_{50} / C4-2 细胞 IC_{50} ; 细胞增殖活性 = [(实验孔 A 值 - 空白孔 A 值) / (对照孔 A 值 - 空白孔 A 值)]。

1.5 流式细胞术检测各组细胞凋亡率 取病毒感染后的 C4-2/ENZA 细胞, 以每孔 5×10^6 个细胞的密度接种至 6 孔细胞培养板中培养过夜, 分组处理 24 h, 收集各组细胞, 加入 $500\ \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 重悬, 调整细胞密度至 $1\times 10^6\ \text{mL}^{-1}$, 加入 $5\ \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 轻轻混匀, 后加入 $10\ \mu\text{L}$ 碘化丙啶染液轻轻混匀, 室温避光 20 min 后, 采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.6 RT-qPCR法检测各组细胞中NDRG1 mRNA表达水平 分组干预后收集各组细胞,加入预冷PBS缓冲液清洗2次,加入TRIzol溶液于冰上提取总RNA,采用逆转录试剂盒将总RNA逆转录为cDNA,使用RT-qPCR试剂盒检测细胞中NDRG1 mRNA表达水平。引物序列: GAPDH上游引物, 5'-AATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3',下游引物, 5'-GCCCAATACGACCAAATCAGAG-3'; NDRG1上游引物, 5'-AGGGTCCCATTCATCTCCCC-3',下游引物, 5'-GCTGTCACCTGCCTAGTCC-3'。反应条件: 95℃预变性5 min, 95℃、10 s, 60℃、25 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算NDRG1 mRNA表达水平。

1.7 Western blotting法检测各组细胞中NDRG1、AR、PSA、p-ARSer²¹³和p-ARSer⁸¹蛋白表达水平

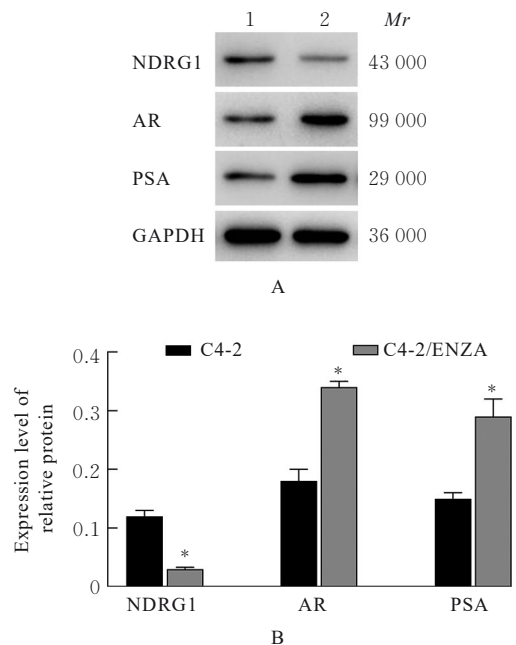
分组处理后收集各组细胞,加入预冷PBS缓冲液清洗2次,加入裂解液于冰上裂解提取总蛋白,采用BCA蛋白试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白样品置于金属浴上煮沸10 min,每孔取40 μg蛋白上样,电泳分离蛋白,采用湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,室温封闭1 h,加入一抗NDRG1抗体(1:1 000)、AR抗体(1:1 000)、p-ARSer²¹³抗体(1:1 000)、p-ARSer⁸¹抗体(1:1 000)、PSA抗体(1:1 000)和GAPDH抗体(1:5 000),4℃孵育过夜,TBST溶液清洗3次,加入HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育1 h,TBST溶液清洗3次,滴加显影液,曝光,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH或AR为内参,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/GAPDH或AR蛋白条带灰度值。

1.8 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件进行统计学分析。各组细胞增殖活性和细胞凋亡率,各组细胞中NDRG1 mRNA表达水平及各组细胞中NDRG1、PSA和AR蛋白表达水平以及p-ARSer²¹³/AR和p-ARSer⁸¹/AR比值均符合正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞转染效率 RT-qPCR法检测结果显示:与C4-2细胞(1.00±0.03)比较,C4-2/ENZA细胞中NDRG1 mRNA表达水平(0.11±0.03)明显降低($P<0.01$)。Western blotting法检测结果

显示:与C4-2细胞比较,C4-2/ENZA细胞中NDRG1蛋白表达水平明显降低($P<0.01$),AR和PSA蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)。提示ENZA耐药株C4-2/ENZA中NDRG1低表达。见图1。



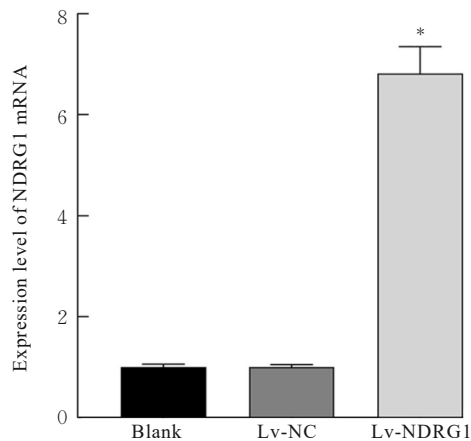
Lane 1: C4-2 cells; Lane 2: C4-2/ENZA cells. * $P<0.01$ compared with C4-2 cells.

图1 2种细胞中NDRG1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 1 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expression of NDRG1 protein in two type of cells

与空白组比较,Lv-NC组C4-2/ENZA细胞中NDRG1 mRNA和蛋白表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。与Lv-NC组比较,Lv-NDRG1组细胞中NDRG1 mRNA和蛋白表达水平均明显升高($P<0.01$)。提示成功构建NDRG1基因过表达C4-2/ENZA耐药细胞株。见图2和3。

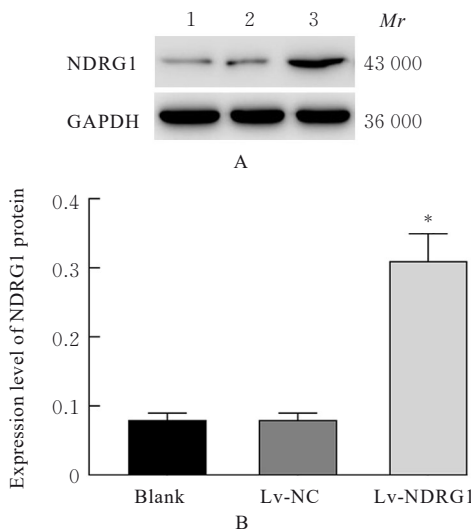
2.2 各组细胞IC₅₀、RI和细胞增殖活性 与C4-2细胞(2.16 μmol·L⁻¹±0.37 μmol·L⁻¹)比较,C4-2/ENZA细胞IC₅₀(38.40 μmol·L⁻¹±6.31 μmol·L⁻¹)明显升高($P<0.01$),RI=17.78。与空白组(39.73 μmol·L⁻¹±5.70 μmol·L⁻¹)比较,Lv-NC组C4-2/ENZA细胞IC₅₀(36.14 μmol·L⁻¹±6.04 μmol·L⁻¹)差异无统计学意义($P>0.05$);与Lv-NC组比较,Lv-NDRG1组C4-2/ENZA细胞IC₅₀(11.13 μmol·L⁻¹±0.42 μmol·L⁻¹)明显降低($P<0.01$)。EGF处理24 h,与Lv-NC组



Lane 1: Blank group; Lane 2: Lv-NC group; Lane 3: Lv-NDRG1 group. * $P < 0.01$ compared with Lv-NC group.

图2 各组细胞中NDRG1 mRNA表达水平

Fig. 2 Expression levels of NDRG1 mRNA of cells in various groups



Lane 1: Blank group; Lane 2: Lv-NC group; Lane 3: Lv-NDRG1 group. * $P < 0.01$ compared with Lv-NC group.

图3 各组细胞中NDRG1蛋白表达电泳图(A)和直条图(B)

Fig. 3 Electrophoretogram (A) and histogram (B) of expressions of NDRG1 protein in cells in various groups

($37.76 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 3.66 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 比较, Lv-NC+EGF 组 C4-2/ENZA 细胞 IC_{50} ($49.81 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 4.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 明显升高 ($P < 0.01$); 与 Lv-NDRG1 组 ($10.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 比较, Lv-NDRG1+EGF 组 C4-2/ENZA 细胞 IC_{50} ($20.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 3.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 明显升高 ($P < 0.01$)。

与 ENZA 处理前比较, 不同浓度 ENZA 处理 24 h, C4-2 和 C4-2/ENZA 细胞增殖活性均逐渐降低 ($F = 223.80$, $P < 0.01$; $F = 81.46$, $P < 0.01$)。ENZA 处理 24 h, 与空白组比较, Lv-NC 组 C4-2/ENZA 细胞增殖活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Lv-NC 组比较, Lv-NDRG1 组 C4-2/ENZA 细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.01$)。EGF 处理 24 h, 与 Lv-NC 组比较, Lv-NC+EGF 组 C4-2/ENZA 细胞增殖活性明显升高 ($P < 0.01$), Lv-NDRG1+EGF 组 C4-2/ENZA 细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.01$)。根据 Lv-NDRG1 组 C4-2/ENZA 细胞的 IC_{50} , 选择 $10.000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ENZA 和干预 24 h 作为后续检测浓度及时间点。见图 4。

2.3 各组细胞凋亡率 ENZA 处理 24 h, 与 Lv-NC 组比较, Lv-NDRG1 组和 Lv-NC+ENZA 组细胞凋亡率均明显升高 ($P < 0.01$); 与 Lv-NC+ENZA 组比较, Lv-NDRG1+ENZA 组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$)。见图 5 和 6。EGF 处理 24 h, 与 Lv-NDRG1 组比较, Lv-NDRG1+EGF 组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.01$), Lv-NDRG1+ENZA 组细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.01$); 与 Lv-NDRG1+ENZA 组比较, Lv-NDRG1+EGF+ENZA 组细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.01$)。见图 7 和 8。

2.4 各组细胞中 AR、PSA、p-ARSer²¹³ 和 p-ARSer⁸¹ 蛋白表达水平 ENZA 处理 24 h, 与空白组比较, Lv-NC 组细胞中 AR 和 PSA 蛋白表达水平及 p-ARSer²¹³/AR 和 p-ARSer⁸¹/AR 比值差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 Lv-NC 组比较, Lv-NDRG1 组细胞中 AR 和 PSA 蛋白表达水平及 p-ARSer²¹³/AR 和 p-ARSer⁸¹/AR 比值均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。提示 NDRG1 过表达可抑制 C4-2/ENZA 细胞中 AR 通路的活化。见图 9。EGF 处理 24 h, 与 Lv-NC 组比较, Lv-NC+EGF 组细胞中 AR 和 PSA 蛋白表达水平及 p-ARSer²¹³/AR 和 p-ARSer⁸¹/AR 比值均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 Lv-NDRG1 组比较, Lv-NDRG1+EGF 组细胞中 AR 和 PSA 蛋白表达水平及 p-ARSer²¹³/AR 和 p-ARSer⁸¹/AR 比值均明显升高 ($P < 0.01$)。见图 10。

3 讨论

肿瘤耐药机制是肿瘤细胞通过调控基因表达或改变药物在肿瘤细胞中的分布和利用度而发生的一

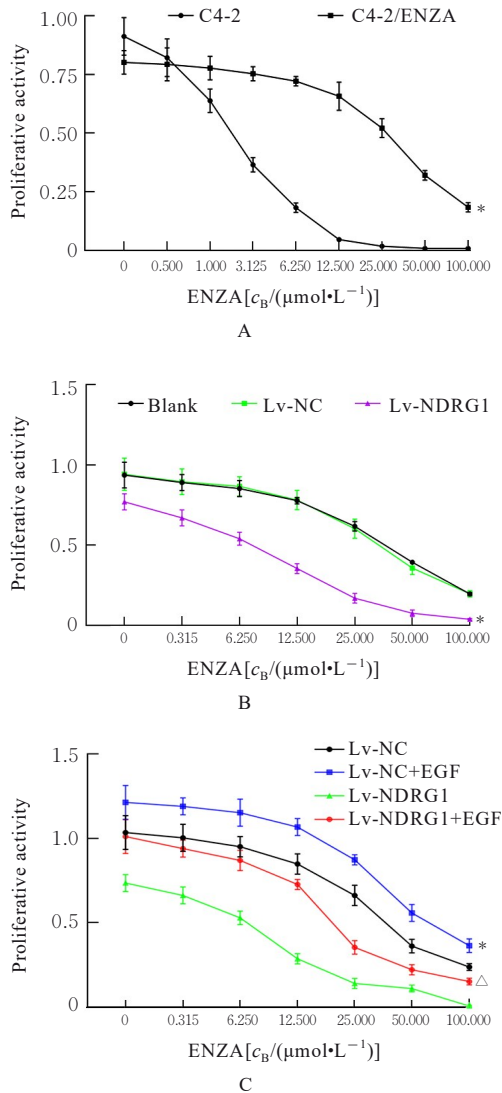


Fig. 4 Proliferation activities of cells in various groups
A: Proliferation activities of C4-2 cells and C4-2/ENZA cells ($P < 0.01$ compared with C4-2 cells); B: Proliferation activities of C4-2/ENZA cells in various groups with over-expression of NDRG1 ($P < 0.01$ compared with Lv-NC group); C: Proliferation activities of cells in various groups after EGF treatment ($P < 0.01$ compared with Lv-NC group; $\Delta P < 0.01$ compared with Lv-NDRG1 group).

图4 各组细胞增殖活性

Fig. 4 Proliferation activities of cells in various groups

系列病理变化^[11]。识别 ENZA 影响的基因并评价其作为治疗 CRPC 靶点的作用具有重要的临床意义。研究^[12-13]报道：基因的异常表达与 CRPC 的发展及 ENZA 耐药有密切关联。番茄红素通过蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) /Zeste 增强子同源物 2 (enhancer of Zeste homolog 2, EZH2) /AR 信号通路增强 CRPC 细胞对 ENZA 的敏感性^[14]。研究^[15]发现：敲低 SOX8 通过靶向抑制 Notch 信号通路逆转 CRPC 细胞的 ENZA 耐药。但目前关于

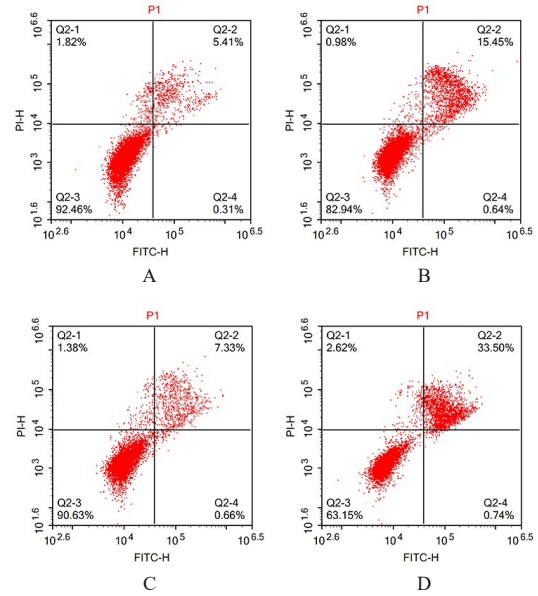


Fig. 5 Apoptotic rates of cells in various groups after treated with ENZA detected by flow cytometry
A: Lv-NC group; B: Lv-NDRG1 group; C: Lv-NC+ENZA group; D: Lv-NDRG1+ENZA group.

图5 流式细胞术检测 ENZA 处理后各组细胞凋亡率

Fig. 5 Apoptotic rates of cells in various groups after treated with ENZA detected by flow cytometry

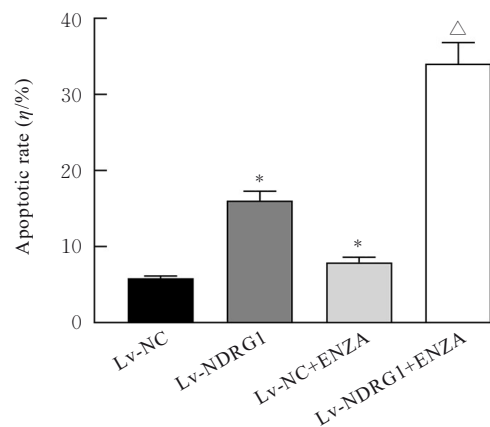


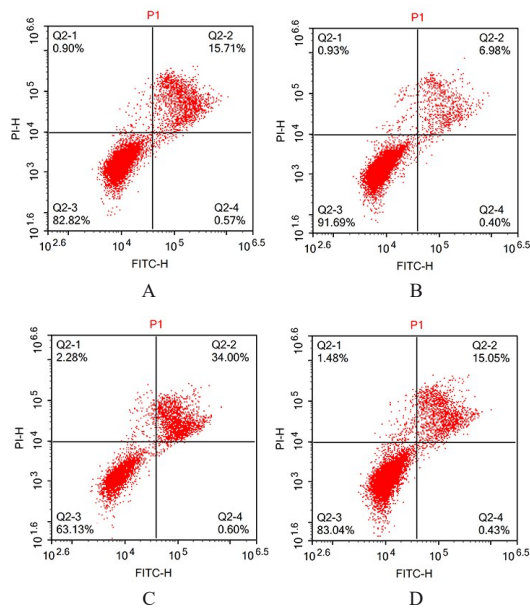
Fig. 6 Apoptotic rates of cells in various groups after treated with ENZA
* $P < 0.01$ compared with Lv-NC group; $\Delta P < 0.01$ compared with Lv-NC+ENZA group.

图6 ENZA 处理后各组细胞凋亡率

Fig. 6 Apoptotic rates of cells in various groups after treated with ENZA

NDRG1 是否参与了 CRPC ENZA 耐药机制的研究尚未见报道。

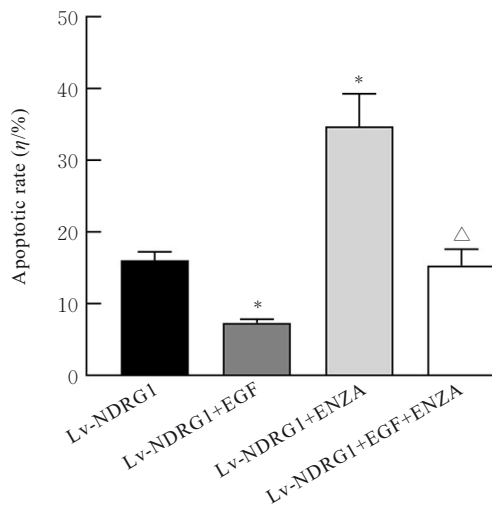
NDRG1 是 NDRG 家族成员之一，参与调控肿瘤细胞增殖、凋亡和耐药等进程，并在多种肿瘤中发挥抗癌作用。王蓓等^[16]发现：NDRG1 在人卵巢癌细胞中表达下调，上调 NDRG1 可抑制细胞增殖并促进细胞凋亡，抑制肿瘤发展。崔喆等^[17]研究发现：在结肠癌细胞中，NDRG1 通过上调抑癌



A: Lv-NDRG1 group; B: Lv-NDRG1+EGF group; C: Lv-NDRG1+ENZA group; D: Lv-NDRG1+EGF+ENZA group.

图 7 流式细胞术检测 EGF 处理后各组细胞凋亡率

Fig. 7 Apoptotic rates of cells in various groups after treated with EGF detected by flow cytometry

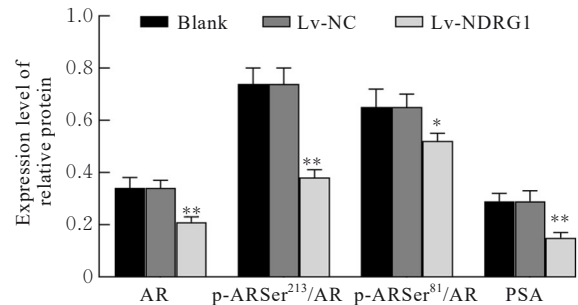
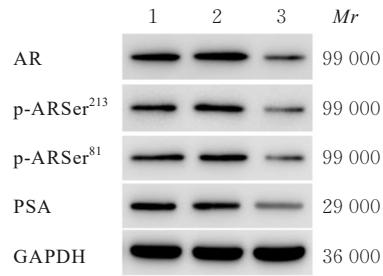


* $P < 0.01$ compared with Lv-NDRG1 group; $\Delta P < 0.01$ compared with Lv-NDRG1+ENZA group.

图 8 EGF 处理后各组细胞凋亡率

Fig. 8 Apoptotic rates of cells in various groups after treated with EGF

基因 p53 表达抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡, 进而提高化疗敏感性并抑制肿瘤进展。YANG 等^[18]发现: NDRG1 可以增强西妥昔单抗在结直肠癌细胞系中的敏感性。本研究结果显示: 与 CRPC 亲本 C4-2 细胞比较, 耐药株 C4-2/ENZA 细胞 IC_{50} 明显升高, 细胞中 NDRG1、AR 和 PSA 蛋白表达水平



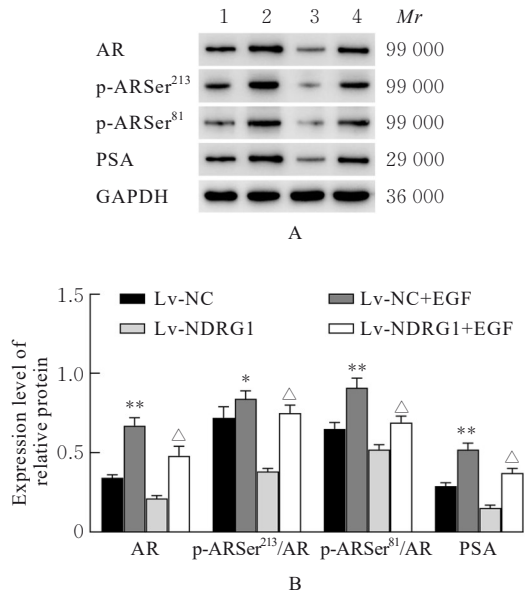
Lane 1: Blank group; Lane 2: Lv-NC group; Lane 3: Lv-NDRG1 group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Lv-NC group.

图 9 ENZA 处理后各组细胞中 AR、PSA、p-ARSer²¹³ 和 p-ARSer⁸¹ 蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 9 Electrophoretogram (A) and histogram (B) of expressions of AR, PSA, p-ARSer²¹³, and p-ARSer⁸¹ proteins in cells in various groups after treated with ENZA

明显降低; 过表达 NDRG1 可抑制 C4-2/ENZA 细胞中 AR 信号通路活化, 降低细胞 IC_{50} , 抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 并提高细胞对 ENZA 的敏感性, 提示 NDRG1 参与了 C4-2/ENZA 细胞耐药过程, 与上述其他肿瘤中有关 NDRG1 的研究结果一致。但 NDRG1 是否通过调控 AR 信号通路影响 C4-2/ENZA 耐药性尚未完全阐明。

AR 是属于核受体超家族中的类固醇受体, 参与调控细胞生长、增殖、死亡和蛋白质合成等进程^[19]。AR 是肿瘤发生、发展的关键因子, 是目前被广泛发现治疗癌症的靶点之一^[20-21]。研究^[22]显示: AR 异常表达被认为是肿瘤耐药的主要因素。AR 在乳腺癌耐药株细胞中表达上调, 而下调其表达可促进细胞凋亡并抑制癌细胞耐药。在 CRPC 中, 长链非编码 RNA (long noncoding RNA, lncRNA) NXTAR 可抑制 AR 表达, 降低癌细胞 ENZA 耐药^[23]。研究^[24-25]显示: EGF 是雄激素非依赖性 AR 激活的关键因子, 可通过激活下



Lane 1: Lv-NC group; Lane 2: Lv-NC+EGF group; Lane 3: Lv-NDRG1 group; Lane 4: Lv-NDRG1+EGF group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Lv-NC group; $\Delta P < 0.01$ compared with Lv-NDRG1 group.

图10 EGF处理后各组细胞中AR、PSA、p-ARSer²¹³和p-ARSer⁸¹蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 10 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of AR, PSA, p-ARSer²¹³ and p-ARSer⁸¹ proteins in cells in various groups after treated with EGF

游磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K)/AKT信号通路促进AR转录活性和CRPC发展。本研究结果显示:联合EGF处理后,细胞中AR和PSA蛋白表达水平及p-ARSer²¹³/AR和p-ARSer⁸¹/AR比值均升高,提示EGF处理可激活AR信号转导,这与HSIEH等^[26]研究结果一致。进一步研究结果显示:EGF处理NDRG1过表达的C4-2/ENZA细胞,可增强细胞增殖活性,升高细胞IC₅₀,降低细胞凋亡率,提示EGF可通过激活AR信号转导逆转NDRG1对C4-2/ENZA细胞增殖抑制和凋亡促进作用,提高细胞耐药性。

综上所述,NDRG1在C4-2细胞ENZA耐药中起着关键作用,能够抑制AR通路逆转CRPC耐药细胞株C4-2/ENZA对ENZA的耐药性。NDRG1可能是CRPC患者有效的治疗靶点和预后监测指标。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

张鹰和万朝辉参与论文设计、撰写及修改,张鹰和蒋先训参与实验设计、实验数据获取及分析。

[参考文献]

- [1] SEKHOACHA M, RIET K, MOTLOUNG P, et al. Prostate cancer review: genetics, diagnosis, treatment options, and alternative approaches [J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5730.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [3] LIU J Z, DONG L, ZHU Y J, et al. Prostate cancer treatment - China's perspective[J]. *Cancer Lett*, 2022, 550: 215927.
- [4] RITCH C, COOKSON M. Recent trends in the management of advanced prostate cancer[J]. *F1000Res*, 2018, 7.DOI:10.12688/f1000vesearch.15382.1.
- [5] HE Y X, SHEN H, JI Y Z, et al. N-myc downstream regulated gene 1 inhibition of tumor progression in Caco2 cells[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2022, 14(12): 2313-2328.
- [6] VILLODRE E S, HU X D, ECKHARDT B L, et al. NDRG1 in aggressive breast cancer progression and brain metastasis[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2022, 114(4): 579-591.
- [7] MAO M S, JIA Y L, CHEN Y X, et al. HJURP regulates cell proliferation and chemo-resistance via YAP1/NDRG1 transcriptional axis in triple-negative breast cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(4): 396.
- [8] LIM S C, GELETA B, MALEKI S, et al. The metastasis suppressor NDRG1 directly regulates androgen receptor signaling in prostate cancer[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(6): 101414.
- [9] 郭晓波,李岗,赵宇峰,等.长非编码RNA linc00641通过调节miR-362-5p/NDRG1逆转前列腺癌细胞多西他赛耐药的研究[J]. *沈阳药科大学学报*, 2022, 39(6): 703-708.
- [10] 杨嘉昕,夏 僮,周骊杰,等.双氢青蒿素对前列腺癌PC-3细胞自噬的诱导作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2023, 48(6): 676-685.
- [11] 李芳,蒋妮谚含,柳文洁,等.肿瘤耐药发生机制的研究进展[J]. *肿瘤药学*, 2018, 8(3): 307-312.
- [12] NGUYEN D T, YANG W, RENGANATHAN A, et al. Acetylated HOXB13 regulated super enhancer genes define therapeutic vulnerabilities of castration-resistant prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2022, 28(18):

- 4131-4145.
- [13] DUTTA S, POLAVARAM N S, ISLAM R, et al. Neuropilin-2 regulates androgen-receptor transcriptional activity in advanced prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2022, 41(30): 3747-3760.
- [14] CHEN X, YANG G, LIU M, et al. Lycopene enhances the sensitivity of castration-resistant prostate cancer to enzalutamide through the AKT/EZH2/androgen receptor signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 613: 53-60.
- [15] DU Z B, CHEN X B, ZHU P Y, et al. SOX8 knockdown overcomes enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer by inhibiting the Notch signaling pathway [J]. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 9235837.
- [16] 王 蓓, 代聪伟, 李 娜, 等. 上调NDRG1基因对人卵巢癌OVCAR3细胞周期和凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(14): 3045-3049.
- [17] 崔 喆, 商 震, 谷 乐, 等. 上调NDRG1表达降低奥沙利铂耐药结肠癌细胞的存活率[J]. *实用药物与临床*, 2020, 23(4): 289-293.
- [18] YANG G, HUANG L, JIA H T, et al. NDRG1 enhances the sensitivity of cetuximab by modulating EGFR trafficking in colorectal cancer [J]. *Oncogene*, 2021, 40(41): 5993-6006.
- [19] ANESTIS A, ZOI I, PAPAVALASSILOU A G, et al. Androgen receptor in breast cancer-clinical and preclinical research insights [J]. *Molecules*, 2020, 25(2): 358.
- [20] PLATA BELLO A, TAMAYO JOVER M A, GUTIERREZ NICOLAS F, et al. Biomarkers for characterization and therapeutic orientation in castration-resistant prostate cancer [J]. *Arch Esp Urol*, 2022, 75(2): 195-202.
- [21] KHAN A, MAO Y S, TAHREEM S, et al. Structural and molecular insights into the mechanism of resistance to enzalutamide by the clinical mutants in androgen receptor (AR) in castration-resistant prostate cancer (CRPC) patients [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 218: 856-865.
- [22] 孙 红, 侯佳林, 蔡加琴, 等. SUMO E3连接酶介导雄激素受体的转录促进乳腺癌他莫昔芬耐药[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(3): 285-291.
- [23] GHILDIYAL R, SAWANT M, RENGANATHAN A, et al. Loss of long noncoding RNA *NXTAR* in prostate cancer augments androgen receptor expression and enzalutamide resistance [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(1): 155-168.
- [24] BONACCORSI L, MURATORI M, CARLONI V, et al. The androgen receptor associates with the epidermal growth factor receptor in androgen-sensitive prostate cancer cells [J]. *Steroids*, 2004, 69(8/9): 549-552.
- [25] SHORNING B Y, DASS M S, SMALLEY M J, et al. The PI3K-AKT-mTOR pathway and prostate cancer: At the crossroads of AR, MAPK, and WNT signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4507.
- [26] HSIEH T F, CHEN C C, MA W L, et al. Epidermal growth factor enhances androgen receptor-mediated bladder cancer progression and invasion via potentiation of AR transactivation [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(6): 2917-2922.