

DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20170810.017

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1049.R.20170810.1039.034.html> .

前列腺癌病灶内 GPRC6A、PKCzeta 表达与细胞增殖、EMT 的关系研究

曾繁飞, 田生平, 杨伟忠, 张小悦

(广东省惠州市第三人民医院泌尿外科, 广东 惠州 516000)

[摘要] **目的:** 研究前列腺癌病灶内 G 蛋白偶联受体 C6A(G protein-coupled receptor class C group 6 member A,GPRC6A)和蛋白激酶 C ζ (Protein Kinase Czeta,PKCzeta)表达水平与细胞增殖、上皮间质转化(EMT)的关系。**方法:** 选择 2014 年 6 月~2017 年 3 月期间在我院接受手术切除治疗的前列腺癌患者以及良性前列腺增生患者, 留取前列腺癌患者的前列腺癌病灶、癌旁病灶适量, 检测病灶中 GPRC6A、PKCzeta、细胞增殖基因、EMT 基因的表达量。**结果:** 前列腺癌病灶、癌旁病灶中 GPRC6A、Survivin、SRSF1、Bcl-xl、N-cadherin、Vimentin 的表达量显著高于良性前列腺增生病灶, PKCzeta、Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1、E-cadherin、CK5/6 的表达量显著低于良性前列腺增生病灶; PKCzeta 低表达的前列腺癌病灶中 Survivin、SRSF1、Bcl-xl 的表达量显著高于 PKCzeta 高表达的前列腺癌病灶, Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1 的表达量显著低于 PKCzeta 高表达的前列腺癌病灶; GPRC6A 低表达的前列腺癌病灶中 E-cadherin、CK5/6 的表达量显著高于 GPRC6A 高表达的前列腺癌病灶, N-cadherin、Vimentin 的表达量显著低于 GPRC6A 高表达的前列腺癌病灶。**结论:** 前列腺癌病灶内高表达的 GPRC6A 和低表达的 PKCzeta 分别能够促进细胞 EMT 和增殖。

[关键词] 前列腺癌; G 蛋白偶联受体 C6A; 蛋白激酶 C ζ ; 增殖; 上皮间质转化

[中图分类号] R737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-1237(2017)15-2153-04

Relations of GPRC6A and PKCzeta expression levels in prostate cancer lesions with cell proliferation and EMT

ZENG Fan-fei, TIAN Sheng-ping, YANG Wei-zhong, ZHANG Xiao-yue

(Department of Urinary Surgery, the Third People's Hospital of Huizhou City, Huizhou 516000, China)

[Foundation Project]: This study was supported by Huizhou Municipal Science and Technology Project (Grant No. 2016Y154)

[Author]: ZENG Fan-fei (1983-), Male, Heyuan Guangdong, Attending Physician, M.B., Tel: 15816312211, E-mail: zff6912@126.com.

Received: 2017-07-20 Revised: 2017-07-28

JHMC, 2017; 23(15): 2153-2156

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective:** To study the relations of GPRC6A and PKCzeta expression levels in prostate cancer lesions with cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition (EMT). **Methods:** Patients with prostate cancer and patients with benign prostatic hyperplasia who received surgical resection in the Third People's Hospital of Huizhou City between June 2014 and March 2017 were selected as the research subjects. Prostate cancer lesion and the lesion adjacent to carcinoma were properly collected from patients with prostate cancer, and then the expression of GPRC6A, PKCzeta, cell proliferation genes and EMT genes in these lesions were detected. **Results:** GPRC6A, Survivin, SRSF1, Bcl-xl, N-cadherin and Vimentin expression in prostate cancer lesions and adjacent lesions were significantly higher than those in benign prostatic hyperplasia lesions ($P <$

[基金项目] 惠州市科技计划项目 (2016Y154)

[作者简介] 曾繁飞(1983-),男,广东河源人,主治医师,本科,电话:15816312211,Email: zff6912@126.com.

[收稿日期] 2017-07-20 **[修回日期]** 2017-07-28 网络出版时间:2017-08-10 10:39:27

0.05) while PKCzeta, Caspase-3, Caspase-9, Apaf-1, E-cadherin and CK5/6 expression were significantly lower than those in benign prostatic hyperplasia lesions ($P < 0.05$); Survivin, SRSF1 and Bcl-xl expression in prostate cancer lesions with lower PKCzeta expression were significantly higher than those in prostate cancer lesions with higher PKCzeta expression ($P < 0.05$) while Caspase-3, Caspase-9 and Apaf-1 expression were significantly lower than those in prostate cancer lesions with higher PKCzeta expression ($P < 0.05$); E-cadherin and CK5/6 expression in prostate cancer lesions with lower GPRC6A expression were significantly higher than those in prostate cancer lesions with higher GPRC6A expression ($P < 0.05$) while N-cadherin and Vimentin expression were significantly lower than those in prostate cancer lesions with higher GPRC6A expression ($P < 0.05$).
 Conclusions: Highly expressed GPRC6A and lowly expressed PKCzeta in prostate cancer lesions can promote cell EMT and proliferation respectively.

[KEY WORDS] Prostate cancer; G-protein-coupled receptor C6A; Protein kinase C ζ ; Proliferation; Epithelial-mesenchymal transition

前列腺癌是我国老年男性常见的泌尿系恶性肿瘤,发病率呈逐年升高趋势且肿瘤容易早期发生转移^[1,2]。癌细胞增殖及上皮间质转化(EMT)是造成前列腺癌病灶浸润性生长及远处转移的重要生物学行为^[3,4],但调节前列腺癌增殖及EMT的具体机制尚未阐明。G蛋白偶联受体C6A(G protein-coupled receptor class C group 6 member A, GPRC6A)和蛋白激酶C ζ (protein kinase czeta, PKCzeta)是近年来发现的肿瘤调控分子,前者的活化能够促进EMT过程,后者的活化则能抑制细胞的增殖过程^[5,6]。目前,关于GPRC6A、PKCzeta在前列腺癌组织中的表达及其对细胞增殖、EMT的影响尚未明确。本研究分析了前列腺癌病灶内GPRC6A、PKCzeta表达水平与细胞增殖、EMT的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2014年6月~2017年3月期间在我院接受手术切除治疗的前列腺癌患者78例以及良性前列腺增生患者54例作为研究对象,前列腺癌患者和良性前列腺增生患者均经术后病理学检查确认组织性质。前列腺癌患者年龄45~68岁,体重指数(BMI)(23.1 ± 3.3) kg/m^2 ;良性前列腺增生患者年龄49~64岁,BMI(22.8 ± 3.5) kg/m^2 。前列腺癌患者和良性前列腺增生患者一般资料的比较无显著性差异($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 实验方法

1.2.1 临床标本的采集方法 手术切除后,留取前列腺癌患者的前列腺癌病灶、癌旁病灶适量,留取良性前列腺增生患者的良性前列腺增生病灶适量。适量盐水洗净病灶组织上残留的血迹后,用液氮快速冷冻病灶组织20~30 min,而后将病灶组织放置在一70℃的超低温冰箱保存。

1.2.2 基因表达的检测方法 取前列腺癌病灶、癌旁病灶、良性前列腺增生病灶,采用RNA抽提试剂盒分离提取组织中的RNA,反转录合成为cDNA后进行荧光定量PCR扩

增,扩增的目的基因为GPRC6A、PKCzeta,内参基因为GAPDH,根据扩增曲线计算mRNA表达量。

1.3 统计学处理

采用SPSS20.0软件录入数据,计算前列腺癌病灶中GPRC6A、PKCzeta表达量的中位数并依据中位数分为GPRC6A、PKCzeta低表达和GPRC6A、PKCzeta高表达。对两组间数据的差异进行 t 检验,对3组间数据的差异进行方差分析,按照 $P < 0.05$ 判断差异有统计学意义。

2 结果

2.1 前列腺癌病灶组织中GPRC6A、PKCzeta的表达量

前列腺癌病灶、癌旁病灶、良性前列腺增生病灶中GPRC6A的表达量分别为(3.47 ± 0.52)、(1.87 ± 0.24)、(1.04 ± 0.17),PKCzeta的表达量分别为(0.33 ± 0.06)、(0.78 ± 0.09)、(1.02 ± 0.14)。经方差分析发现:前列腺癌病灶、癌旁病灶中GPRC6A的表达量显著高于良性前列腺增生病灶,PKCzeta的表达量显著低于良性前列腺增生病灶;前列腺癌病灶中GPRC6A的表达量显著高于癌旁病灶,PKCzeta的表达量显著低于癌旁病灶,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 前列腺癌病灶组织中细胞增殖基因的表达量及其与PKCzeta的相关性

前列腺癌病灶、癌旁病灶、良性前列腺增生病灶中细胞增殖基因Survivin、SRSF1、Bcl-xl、Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1表达量的分析如下:前列腺癌病灶、癌旁病灶中Survivin、SRSF1、Bcl-xl的表达量显著高于良性前列腺增生病灶,Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1的表达量显著低于良性前列腺增生病灶;前列腺癌病灶中Survivin、SRSF1、Bcl-xl的表达量显著高于癌旁病灶,Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1的表达量显著低于癌旁病灶,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

前列腺癌病灶中PKCzeta表达量与细胞增殖基因Survivin、SRSF1、Bcl-xl、Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1表达量的相关性分析如下:PKCzeta低表达的前列腺癌病灶中Survivin、SRSF1、Bcl-xl的表达量显著高于PKCzeta高表达的前列腺癌病灶,Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1的表达量显著低于PKCzeta高表达的前列腺癌病灶,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、2。

表 1 不同来源前列腺癌病灶中细胞增殖基因的表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组织来源 | n | Survivin | SRSF1 | Bcl-xl | Caspase-3 | Caspase-9 | Apaf-1 |
|---------|----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 前列腺癌 | 78 | 2.93±0.41* # | 3.26±0.46* # | 2.74±0.35* # | 0.32±0.05* # | 0.27±0.05* # | 0.39±0.06* # |
| 癌旁 | 78 | 1.66±0.22* | 1.74±0.21* | 1.48±0.18* | 0.68±0.09* | 0.55±0.07* | 0.73±0.09* |
| 良性前列腺增生 | 54 | 1.02±0.12 | 1.04±0.15 | 0.98±0.11 | 1.01±0.14 | 0.96±0.09 | 1.03±0.13 |

注:与良性前列腺增生病灶比较,* $P<0.05$;与前列腺癌旁病灶比较,# $P<0.05$ 。

表 2 不同 PKCzeta 表达量前列腺癌病灶中细胞增殖基因的表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| PKCzeta | n | Survivin | SRSF1 | Bcl-xl | Caspase-3 | Caspase-9 | Apaf-1 |
|---------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 低表达 | 39 | 4.13±0.58 | 4.42±0.61 | 3.69±0.47 | 0.23±0.04 | 0.19±0.03 | 0.22±0.04 |
| 高表达 | 39 | 1.87±0.23 | 2.13±0.35 | 1.85±0.22 | 0.42±0.07 | 0.38±0.07 | 0.57±0.08 |
| t | | 13.485 | 11.039 | 9.938 | 9.174 | 10.326 | 14.218 |
| P | | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

2.3 前列腺癌病灶组织中 EMT 基因的表达量及其与 GPRC6A 的相关性

前列腺癌病灶、癌旁病灶、良性前列腺增生病灶中 EMT 基因 E-cadherin、CK5/6、N-cadherin、Vimentin 表达量的分析如下:前列腺癌病灶、癌旁病灶中 E-cadherin、CK5/6 的表达量显著低于良性前列腺增生病灶,N-cadherin、Vimentin 的表达量显著高于良性前列腺增生病灶;前列腺癌病灶中 E-cadherin、CK5/6 的表达量显著低于癌旁病灶,N-cadherin、Vimentin 的表达量显著高于癌旁病灶。前列腺癌病灶中 GPRC6A 表达量与 EMT 基因 E-cadherin、CK5/6、N-cadherin、Vimentin 表达量的相关性分析如下:GPRC6A 低表达的前列腺癌病灶中 E-cadherin、CK5/6 的表达量显著高于 GPRC6A 高表达的前列腺癌病灶,N-cadherin、Vimentin 的表达量显著低于 GPRC6A 高表达的前列腺癌病灶。差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 3、4。

表 3 不同来源前列腺癌病灶中 EMT 基因的表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组织来源 | n | E-cadherin | CK5/6 | N-cadherin | Vimentin |
|---------|----|--------------|--------------|------------|--------------|
| 前列腺癌 | 78 | 0.31±0.05* # | 0.38±0.05* # | 3.41±0.45 | 3.08±0.47* # |
| 癌旁 | 78 | 0.67±0.08* | 0.72±0.09* | 1.87±0.24* | 1.57±0.20* |
| 良性前列腺增生 | 54 | 1.05±0.12 | 0.99±0.14 | 1.02±0.15 | 0.96±0.13 |

注:与良性前列腺增生病灶比较,* $P<0.05$;与前列腺癌旁病灶比较,# $P<0.05$ 。

表 4 不同 GPRC6A 表达量前列腺癌病灶中 EMT 基因的表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

| GPRC6A | n | E-cadherin | CK5/6 | N-cadherin | Vimentin |
|--------|----|------------|-----------|------------|-----------|
| 低表达 | 39 | 0.45±0.07 | 0.54±0.07 | 4.58±0.61 | 4.19±0.58 |
| 高表达 | 39 | 0.20±0.03 | 0.18±0.02 | 2.27±0.33 | 2.03±0.34 |
| t | | 11.394 | 20.512 | 10.492 | 10.226 |
| P | | <0.05 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

3 讨论

GPRC6A 是近年来新发现的 G 蛋白偶联受体,在体内多个脏器和组织中均有表达。GPRC6A 具有 G 蛋白偶联受体共有的 7 次跨膜结构域及该受体特有的 VFT 结构,通过 VFT 结构域能够识别 L- α 氨基酸、二价阳离子、骨钙素、鞣酐等配体,进而启动下游信号通路的级联激活并发挥相应的效应^[7]。PKC、SRE、ERK 是 GPRC6A 下游重要的信号分

子,能够介导骨钙素、鞣酐等配体的生物学活性。前列腺癌是一类激素依赖性恶性肿瘤且容易发生骨转移,鞣酐及骨钙素的作用会造成前列腺癌细胞增殖并浸润性生长。已有离体的实验研究证实,过表达 GPRC6A 能够促进前列腺癌细胞的上皮间质转化、增强细胞的侵袭能力^[8]。为了明确 GPRC6A 的前列腺癌发生及发展过程中的作用,本文对前列腺癌病灶内 GPRC6A 的表达量进行了分析,结果显示:前列腺癌病灶中 GPRC6A 的表达量显著高于良性前列腺增生病灶及癌旁病灶。这就说明 GPRC6A 的高表达与前列腺癌的发生有关。

上皮间质转化是恶性肿瘤细胞获得运动能力并表现出浸润性生长特性的重要病理环节,而 GPRC6A 是调控前列腺癌细胞上皮间质转化的重要分子。在上皮间质转化的过程中,上皮细胞表型向间质细胞表型转化,细胞间紧密连接和黏附连接减弱、甚至丧失,转化为间质表型的细胞获得较强的运动、侵袭性能^[9,10]。E-cadherin 和 CK5/6 是上皮表型细胞的标志分子,能够促进细胞间相互黏附并形成紧密连接,维持细胞间的极性并抑制细胞迁移、运动^[11];N-cadherin 和 Vimentin 是间质表型细胞的标志分子,能够促进细胞向临近组织的迁移和运动,有利于细胞的侵袭性生长^[12,13]。本文通过分析前列腺癌病灶中上述上皮间质转化标志基因的表达量可知:前列腺癌病灶中 E-cadherin、CK5/6 的表达量显著低于良性前列腺增生病灶,N-cadherin、Vimentin 的表达量显著高于良性前列腺增生病灶及癌旁病灶。这就说明上皮间质转化过程的激活与前列腺癌的发生有关。进一步分析 GPRC6A 与上皮间质转化的相关性可知:GPRC6A 低表达的前列腺癌病灶中 E-cadherin、CK5/6 的表达量显著高于 GPRC6A 高表达的前列腺癌病灶,N-cadherin、Vimentin 的表达量显著低于 GPRC6A 高表达的前列腺癌病灶。这就说明前列腺癌病灶内高表达的 GPRC6A 能够促进癌细胞的上皮间质转化。

PKCzeta 是具有抑癌基因活性的 PKC 分子,已

有离体细胞实验研究证实:过表达 PKCzeta 能够抑制前列腺癌细胞的增殖^[14]。本文通过分析前列腺癌病灶内 PKCzeta 的表达量可知:前列腺癌病灶中 PKCzeta 的表达量显著低于良性前列腺增生病灶及癌旁病灶。这就说明 PKCzeta 的低表达与前列腺癌的发生有关。细胞内受到 PKCzeta 调控的下游基因包括 Survivin、SRSF1、Bcl-xl、Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1 等多种增殖基因。Survivin 是一类凋亡抑制蛋白,通过与多种 caspase 分子的直接结合作用来抑制细胞凋亡的激活,进而有利于细胞的增殖^[15]; SRSF1 是 SR 蛋白家族的成员之一,有利于细胞周期进程的稳定并促进细胞增殖^[16]; Bcl-xl 是 Bcl-2 家族中的抗凋亡成员,通过阻碍细胞色素 C 在细胞质内的聚集来抑制 Caspase-3、Caspase-9 等促凋亡分子的级联激活,进而抑制细胞凋亡、促进细胞增殖^[17]; Apaf-1 是线粒体凋亡途径中介导细胞色素 C 引起 Caspase-9 活化的重要蛋白,具有显著的促凋亡活性^[18]。本文通过分析前列腺癌病灶内上述增殖基因的表达量可知:前列腺癌病灶、癌旁病灶中 Survivin、SRSF1、Bcl-xl 的表达量显著高于良性前列腺增生病灶,Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1 的表达量显著低于良性前列腺增生病灶。进一步分析前列腺癌病灶内 PKCzeta 表达量与增殖基因的相关性可知:PKCzeta 低表达的前列腺癌病灶中 Survivin、SRSF1、Bcl-xl 的表达量显著高于 PKCzeta 高表达的前列腺癌病灶,Caspase-3、Caspase-9、Apaf-1 的表达量显著低于 PKCzeta 高表达的前列腺癌病灶。这就说明前列腺癌病灶内低表达的 GPRC6A 能够促进癌细胞的增殖、抑制癌细胞的凋亡。

前列腺癌病灶内 GPRC6A 的表达量显著升高、而 PKCzeta 的表达量显著降低;高表达的 GPRC6A 能够促进前列腺癌细胞的上皮间质转化、有利于细胞的侵袭,低表达的 PKCzeta 分别能够促进前列腺癌细胞的增殖。

参考文献

- Pou SA, Tumas N, Coquet JB, et al. Burden of cancer mortality and differences attributable to demographic aging and risk factors in Argentina, 1986-2011[J]. *Cad Saude Publica*, 2017, 33(2):e00016616.
- Gnanapragasam VJ, Thurtle D, Srinivasan A, et al. Evolution and oncological outcomes of a contemporary radical prostatectomy practice in a UK regional tertiary referral centre [J]. *BJU Int*, 2016, 118(5): 779-784.
- Nakazawa M, Kyprianou N. Epithelial-mesenchymal-transition regulators in prostate cancer: Androgens and beyond [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 166:84-90.
- Haider M, Zhang X, Coleman I, et al. Epithelial mesenchymal-like transition occurs in a subset of cells in castration resistant prostate cancer bone metastases [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2016, 33(3):239-248.
- Li XH, Xu Y, Yang K, et al Association of THADA, FOXP4, GPRC6A/RFX6 genes and 8q24 risk alleles with prostate cancer in Northern Chinese men [J]. *J BUON*, 2015, 20(5):1223-1228.
- Fan HH, Li L, Zhang YM, et al. PKC ζ in prostate cancer cells represses the recruitment and M2 polarization of macrophages in the prostate cancer microenvironment [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(6): 1010428317701442.
- Liu M, Zhao YY, Yang F, et al. Evidence for a role of GPRC6A in prostate cancer metastasis based on case-control and in vitro analyses [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(11):2235-2248.
- 盛彬,杨帆,孙心旂,等. GPRC6A 过表达前列腺癌细胞株构建及 EMT 相关研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2017, 37(3):18-26.
- Lindsay CR, Le Moulec S, Billiot F, et al. Vimentin and Ki67 expression in circulating tumour cells derived from castrate-resistant prostate cancer [J]. *BMC Cancer*, 2016, 29(16): 168.
- Dalmau N, Jaumot J, Tauler R, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition involves triacylglycerol accumulation in DU145 prostate cancer cells [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(12): 3397-3406.
- Wang M, Ren D, Guo W, et al. N-cadherin promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like traits via ErbB signaling in prostate cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(2): 595-606.
- Ipekci T, Ozden F, Unal B, et al. Epithelial-mesenchymal transition markers β -catenin, snail, and E-cadherin do not predict disease free survival in prostate adenocarcinoma: a prospective study [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21(4): 1209-1216.
- Fonseca-Alves CE, Kobayashi PE, Rivera-Calderón LG, et al. Evidence of epithelial-mesenchymal transition in canine prostate cancer metastasis [J]. *Res Vet Sci*, 2015, 100:176-181.
- Kim JY, Valencia T, Abu-Baker S, et al. c-Myc phosphorylation by PKC ζ represses prostate tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(16): 6418-6423.
- Eslami M, Khamechian T, Mazoochi T, et al. Evaluation of survivin expression in prostate specimens of patients with prostate adenocarcinoma and benign prostate hyperplasia underwent transurethral resection of the prostate or prostatectomy [J]. *Springerplus*, 2016, 14(5): 621.
- Mavrou A, Brakspear K, Hamdollah-Zadeh M, et al. Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) inhibition as a potential novel targeted therapeutic strategy in prostate cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34(33): 4311-4319.
- Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Monfaredan A, et al. The herbal medicine *Melissa officinalis* extract effects on gene expression of p53, Bcl-2, Her2, VEGF-A and hTERT in human lung, breast and prostate cancer cell lines[J]. *Gene*, 2017, 20(613): 14-19.
- Kim J, Parrish AB, Kurokawa M, et al. Rsk-mediated phosphorylation and 14-3-3 ϵ binding of Apaf-1 suppresses cytochrome c-induced apoptosis [J]. *EMBO J*, 2012, 31(5):1279-1292.