

RNA 结合蛋白 ELAVL1 依赖 m6A 调控 SOX4 稳定性 促进激素敏感型前列腺癌增殖

闵莎莎^{1,2}, 蔡忠林^{1,2}, 沈彦婷^{1,2}, 王 忠^{1,2}

(1. 上海理工大学公利医院医疗技术学院, 上海 200093;

2. 上海市浦东新区公利医院泌尿外科男科学部, 上海 200135)

【摘要】 目的: 探讨 RNA 结合蛋白 ELAVL1 在前列腺癌 (PCa) 组织, 特别是激素敏感型前列腺癌 (HSPC) 组织中的表达及其与肿瘤增殖的关系, 揭示 ELAVL1 通过 m6A 修饰介导 SOX4 mRNA 稳定性, 促进 HSPC 增殖的分子机制。方法: 在癌症基因组图谱 (TCGA) 数据库分析 ELAVL1 在 PCa 组织中的表达及其与预后的关系, 并比较其在 HSPC 和激素抵抗型前列腺癌 (HRPC) 组织中的差异。通过 Western 印迹检测 ELAVL1 在 PCa 细胞系中的蛋白表达, siRNA 敲低 ELAVL1 后通过 CCK-8 评估其对细胞增殖的影响, 并用 RT-qPCR 检测下游靶基因的变化。裸鼠成瘤实验进一步验证 ELAVL1 对肿瘤生长的影响。接着通过 RIP-seq 鉴定 ELAVL1 与 SOX4 mRNA 的互作关系, RT-qPCR 和 Western 印迹分别检测 siRNA 敲低 ELAVL1 后 SOX4 mRNA 和蛋白水平。CCK-8 用于评估敲低 SOX4 对细胞增殖的影响。MeRIP-qPCR 用于检测 SOX4 的 m6A 修饰水平及敲低 METTL3 的影响, RNA pull-down 实验验证 SOX4 RNA 片段与 ELAVL1 蛋白的互作, RNA 稳定性实验评估 ELAVL1 敲低对 SOX4 mRNA 稳定性的影响。结果: ELAVL1 在 PCa 细胞中的表达高于前列腺正常上皮细胞。ELAVL1 高表达的患者预后明显差于低表达的患者, GSE32269 数据库中 HSPC 组织中的 ELAVL1 表达水平显著高于 HRPC。在人 PCa 细胞 LNCaP 和 VCaP 中敲低 ELAVL1 后, 细胞增殖能力受到影响, 而过表达 ELAVL1 会促进 HSPC 细胞的增殖。体内研究显示敲低 ELAVL1 后, LNCaP 移植瘤的生长受到明显抑制, 移植瘤的质量明显降低。在 LNCaP 和 VCaP 细胞中 SOX4 mRNA 和蛋白水平均显著高于前列腺正常上皮细胞 RWPE-1。RIP-qPCR 证实 ELAVL1 蛋白与 SOX4 mRNA 存在互作关系。在敲低 ELAVL1 后, SOX4 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降; 敲低 SOX4 后, LNCaP 和 VCaP 细胞的增殖能力受到显著抑制。HSPC 细胞中 ELAVL1 依赖 m6A 调控了 SOX4 的 RNA 稳定性。结论: ELAVL1 高表达于 HSPC 组织中。高表达的 ELAVL1 与 HSPC 细胞的增殖有关。SOX4 是 ELAVL1 的下游分子, 促进 HSPC 细胞的增殖; ELAVL1 依赖 m6A 促进 SOX4 mRNA 促进 SOX4 mRNA 的稳定性。

【关键词】 激素敏感型前列腺癌; ELAVL1; SOX4; 前列腺癌; 增殖; m6A

中图分类号: R737.25 文献标志码: A doi: 10.13263/j.cnki.nja.2025.09.003 ①

RNA-binding protein ELAVL1 regulates SOX4 stability and promotes hormone-sensitive prostate cancer proliferation through m6A-dependent regulation

MIN Sha-sha^{1,2}, CAI Zhong-lin^{1,2}, SHEN Yan-ting^{1,2}, WANG Zhong^{1,2}

1. School of Gongli Hospital Medical Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China; 2. Department of Urology, Shanghai Pudong New Area Gongli Hospital, Shanghai 200135, China

① 基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82170788, 62101319); 上海理工大学医工交叉项目 (2023JK-GL30Z)

作者简介: 闵莎莎 (1998-), 女, 四川成都市人, 硕士研究生, 从事泌尿男科专业。

通信作者: 王 忠, Email: zhongwang2010@sina.com

[Abstract] Objective: To investigate the expression of RNA binding protein ELAVL1 in prostate cancer (PCa), especially hormone-sensitive prostate cancer (HSPC), and its relationship with tumor proliferation. This study further aims to reveal the molecular mechanism by which ELAVL1 promotes HSPC proliferation by stabilizing *SOX4* mRNA in an m6A-dependent manner. **Methods:** The expression of ELAVL1 in PCa tissues and its relationship with prognosis were analyzed in the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and the differences in HSPC and hormone-resistant prostate cancer (HRPC) were compared. And its relationship with prognosis were analyzed in the Cancer Genome Atlas (TCGA) database, and the differences in HSPC and hormone-resistant prostate cancer (HRPC) were compared. Western blot was used to detect ELAVL1 protein expression in PCa cell lines. After ELAVL1 knockdown by siRNA, cell proliferation was evaluated using CCK-8 assays, and changes in downstream target genes were detected by RT-qPCR. Tumor xenograft experiments in nude mice were performed to further assess the impact of ELAVL1 on tumor growth. The interaction between ELAVL1 and *SOX4* mRNA was verified by RIP-seq. And the mRNA and protein levels of *SOX4* after knockdown of *ELAVL1* were detected by RT-qPCR and Western blot, respectively. CCK-8 was used to evaluate the effect of *SOX4* knockdown on cell proliferation. MeRIP-qPCR was used to detect the m6A modification level of *SOX4* and the effect of knocking down METTL3. RNA pull-down experiments verified the interaction between *SOX4* RNA fragments and ELAVL1 protein. RNA stability experiments evaluated the effect of *ELAVL1* knockdown on *SOX4* mRNA stability. **Results:** The expression of ELAVL1 in PCa cells was higher than that in normal prostate epithelial cells. The prognosis of patients with high expression of ELAVL1 was significantly worse than that of patients with low expression. In the GSE32269 dataset, the expression level of ELAVL1 in HSPC was significantly higher than that in HRPC. After knocking down of *ELAVL1* in LNCaP and VCaP cells, CCK-8 experiments showed that the cell proliferation ability was significantly affected after knocking down *ELAVL1*, and overexpressed ELAVL1 promoted the proliferation of HSPC cells. The results of *in vivo* studies showed that knockdown of ELAVL1 significantly inhibited the tumorigenic capacity of LNCaP cells and resulted in a marked reduction in xenograft tumor mass. The levels of *SOX4* mRNA and protein in LNCaP and VCaP cells were significantly higher than those in normal prostate epithelial cells RWPE-1. RIP-qPCR confirmed the interaction between ELAVL1 protein and *SOX4* mRNA. After knocking down of *ELAVL1*, the expression levels of *SOX4* mRNA and protein were significantly decreased. After knocking down of *SOX4*, the proliferation ability of LNCaP and VCaP cells was significantly inhibited. **Conclusion:** ELAVL1 is highly expressed in HSPC. High expression of ELAVL1 is associated with the proliferation of HSPC. *SOX4* is a downstream molecule of ELAVL1 which promotes the proliferation of HSPC. ELAVL1 enhances the stability of *SOX4* mRNA through an m6A-dependent mechanism.

[Key words] hormone-sensitive prostate cancer; *ELAVL1*; *SOX4*; prostate cancer; proliferation; m6A

Funding information: National Natural Science Foundation of China (82170788, 62101319) and University of Shanghai for Science and Technology Medical Engineering Cross-disciplinary Project (2023JK-GL30Z).

Corresponding to: WANG Zhong, email: zhongwang2010@sina.com

Received: October 15, 2024; accepted: March 14, 2025

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是老年男性常见的恶性肿瘤,同时也是男性癌症相关死亡的第二大原因^[1]。近年来,我国的发病率也逐年上升^[2]。目前,全世界约有1 000万男性患有该病,在男性人群中发病率仅次于肺癌^[3-4]。PCa 筛查与早期诊断的开展显著提高了其早期诊治率,但是仍然有相当多的PCa患者由于未及时就诊而延误治疗^[5-6]。临床上针对PCa的治疗手段较多,包括手术、放疗、化疗、免疫治疗、内分泌治疗等,但是肿瘤进展仍然避免不了,死亡率仍然居高不下^[7]。了解PCa发生发展的分子机制并发展新的治疗研究是一个重要策略,但相关分子机制仍不清楚^[8]。

ELAVL1 是一个重要的 RNA 结合蛋白,既往的研究已经发现其在多种肿瘤包括肺癌、肝癌、胰腺癌等组织中高表达并促进肿瘤的发生发展^[9-11];同时还与化疗耐药^[12-13]、放疗抵抗^[14-15]等治疗反应有

关。另外,在肿瘤研究中 ELAVL1 也被报道与 YTH-DC1、IGF2BP1 等分子结合协同促进 RNA 的稳定^[16-17]。在 PCa 组织中,既往研究已经报道了 ELAVL1 在 PCa 组织中高表达,并且促进 PCa 的发生发展^[18-19]。既往研究发现 ELAVL1 与多个 m6A 结合蛋白的 RNA 和蛋白有互作的关系,提示 ELAVL1 可能是 RNA m6A 修饰的上游分子,能够调控下游多个 m6A 调控因子的表达进而影响 m6A 修饰^[20]。因此,ELAVL1 被认为是一个重要 PCa 治疗靶分子。本文通过探讨 RNA 结合蛋白 ELAVL1 在 PCa 组织中的表达及其与肿瘤增殖的关系,揭示 ELAVL1 促进 HSPC 增殖的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与实验动物 激素敏感型前列腺癌细

胞系 LNCaP、VCaP 和前列腺正常上皮细胞 RWPE-1 购自中国医学科学院细胞中心, LNCaP、DU145、22RV1、PC-3 细胞系采用 RPMI-1640 培养基(含 10% 胎牛血清)培养, VCaP 细胞系采用 DMEM(含 10% 胎牛血清)培养, RWPE-1 细胞系采用 RWPE-1 专用培养基即 Prostate Epithelial Cell Medium; 4 ~ 5

周龄雄性 BALB/c-nu 裸鼠购自武汉斯莱克景达实验动物有限公司。所有动物实验获得上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物使用与管理委员会批准(批号: SH9H-2022-A013-SB)。

1.1.2 试剂与耗材 实验主要试剂与耗材见表 1、2。

表 1 实验主要试剂

Table 1. Main reagents of the experiment

序号	试剂名称	公司	货号
1	预染蛋白质分子量标准 marker	Thermo Fisher	26616
2	5 × SDS 上样缓冲液	GenStar	E153-10
3	BCA 蛋白浓度测定试剂盒	GenStar	E162-05
4	多聚甲醛	Sigma	P6148
5	苏木素染色液	中杉金桥	ZLI-9610
6	中性树胶	西雅金桥	FZ-5202
7	BSA	经科宏达	2180543991
8	封闭用羊血清(原液)	中杉金桥	ZLI-9021
9	DAB 试剂盒	Vector	SK-4100
10	免疫组化笔	中杉金桥	ZLI-9305
11	100% Triton X-100	Amresco	0694
12	DAPI	Sigma	F6057
13	TRIzol	Invitrogen	T9424
14	ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒	TOYOBO	FSQ-301
15	SYBR Green Realtime PCR Master Mix	TOYOBO	QPS-201
16	siRNA 转染试剂	百代生物	11012
17	Dynabeads Protein A	Invitrogen	10002D
18	Anti-m6A	Synaptic Systems	202003
19	N6-Methyladenosine, 5'-monophosphate sodium salt	Sigma	M2780
20	RNeasy MinElute Cleanup 试剂盒	Qiagen	74204
21	Qubit dsDNA HS 缓冲液	Life Technologies Corporation	Q32851
22	Protease inhibitor cocktail tablets	Roche	04693159001
23	Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega	N2515
24	高效 RIPA 裂解液	索莱宝	R0010
25	胎牛血清	四季青	11011-8611
26	Prostate Epithelial Cell Medium	Sciencell	4411
27	RPMI 1640	Gibco	C11875500BT
28	胰酶含 EDTA	索莱宝	T1320
29	双氢睾酮溶液	Sigma	D-073
30	嘌呤霉素	索莱宝	P8230
31	Lipofectamine™ 3000 转染试剂	Invitrogen	L3000008
32	放线菌素 D	sigma	A9415
33	3-deazaadenosine hydrochloride	Medchemexpress	HY-WD13332A
34	HuR fusion protein	Proteintech	Ag2249

表2 实验主要耗材

Table 2. Main consumables of the experiment

序号	耗材名称	公司
1	PVDF膜	Millipore 公司
2	96孔酶标板	Corning 公司
3	阳离子防脱片	北京中杉金桥公司
4	96孔PCR板及封口膜	美国ABI公司
5	各型号离心管	Axygen 公司
6	Eppendorf管	Axygen 公司
7	各型号枪头	Axygen 公司
8	各型号孔板	Corning 公司
9	各型号移液管	Labselect 公司
10	各型号培养皿	Labselect 公司

1.2 方法

1.2.1 Western 印迹实验 依据所需检测蛋白的分子量配置浓度 8% ~ 12% 的分离胶及相应浓缩胶,每孔加入 30 ~ 50 μg 待检测蛋白样品,80 V 跑浓缩胶,80 ~ 100 V 跑分离胶。采用 0.2 μm PVDF 膜进行湿转法转膜(300 mA, 2 ~ 4 h),5% 牛奶封闭液室温封闭 1 h,一抗根据抗体种类进行相应稀释(1:1 000)后室温孵育 2 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,含吐温的 Tris 缓冲液(TBST)清洗 8 min \times 3 次,一抗种属对应二抗以一定比例稀释(1:10 000)后室温孵育 1 h TBST,清洗后加入适量超敏显影液于曝光机中显影。

1.2.2 RNA 提取、cDNA 合成及实时荧光 PCR 取

适量 PCa 细胞加入 1 mL TRIzol 充分裂解,随后加入 200 μL 氯仿混匀后静置 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 13 000 r/min 离心 20 min,取上清后加入等体积异丙醇混匀后于液氮中沉淀,并在 4 $^{\circ}\text{C}$,13 000 r/min 离心 40 min 后去除上清,加入 1 mL 75% 乙醇于 4 $^{\circ}\text{C}$,13 000 r/min 离心 5 min 清洗重复 2 次,去除上清后于干燥盒中干燥数分钟,加入适量 DEPC 水溶解 RNA 沉淀块并测浓度。取适量 RNA 加入 RNAase-free 水后于 65 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min 变性,加入适量 4 \times DNA Master Mix 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 5 min 去除 DNA,再次加入适量 5 \times RT Master Mix 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 15 min 进行逆转录反应,98 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 使酶失活获得 cDNA。取适量 cDNA 模板加入 SYBR Green Realtime PCR Master Mix、上下引物、ROX 及蒸馏水,上样后于 ABI StepOne Real-Time PCR Detection System 进行反应。反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环(95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s/60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s/95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s),60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。引物序列见表 3。

1.2.3 siRNA 及质粒转染 种植适量细胞至第 2 天细胞融合度为 30% ~ 50%,接着按照终浓度 20 nmol/L 分别转染两条不同的 siRNA 进细胞(序列见表 4),转染方案参考 Rfect 转染试剂(公司:百代生物;货号:11012)。转染后 24 h 后提取 RNA,48 h 后提取蛋白进行后续实验。种植细胞至第 2 天细胞融合度 80% 以上,接着按照 Lipo3000 试剂盒说明书转染质粒,转染方案参考转染试剂盒。转染后 24 h 以上进行后续实验。

表3 引物序列

Table 3. Primer sequences

基因	正向引物	反向引物
<i>ELAVL1</i>	5'-AGAGAGCGATCAACACGCTG-3'	5'-GGAGCCCGCTGATGTACAAG-3'
<i>SOX4</i>	5'-GCAAAACCAACAATGCCGAGAA-3'	5'-GCTTGATGTGCCCACTCGG-3'
<i>SOX4-m6A-peak1</i>	5'-CGCTAGGAAATGACCCGAGA-3'	5'-GTTTGACCGTGAACCCCTT-3'
<i>ACTB</i>	5'-GTACGCCAACACAGTGCTG-3'	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTG-3'

表4 siRNA 引物序列

Table 4. Primer sequences of siRNA

名称	序列	
	正义链	反义链
si-h-METTL3-1	5'-CGUCAGUAUCUUGGGCAAGUU-3'	5'-AACUUGCCCAAGAUACUGACG-3'
si-h-METTL3-2	5'-CUGCAAGUAUGUUCACUAUGA-3'	5'-UCAUAGUGAACAUACUUGCAG-3'
si-h-ELAVL1-1	5'-GACCCAGGAUGAGUUACGA-3'	5'-UCGUAAACUCAUCCUGGGUC-3'
si-h-ELAVL1-2	5'-GGUUGCGUUUAUCCGGUUU-3'	5'-AAACCGGAUAAACGGCAACC-3'
si-h-SOX4-1	5'-UGAAGCGCGUCUACCUUU-3'	5'-AACAGGUAGACGCGCUUCA-3'
si-h-SOX4-2	5'-AAGAAGGUGAAGCGGUCUA-3'	5'-UAGACGCGCUACCUUU-3'

1.2.4 MeRIP-qPCR 通过 TRIzol 法提取总 RNA, 使用 10 × Fragmentation 缓冲液在一定反应条件 (MeRIP-seq 70 °C 10 min, MeRIP-qPCR 70 °C 5 min) 下进行片段化, 加入 Anti-m6A 4 °C 下孵育 2 ~ 3 h, 之后加入 BSA 封闭的 beads 4 °C 下孵育 2 ~ 3 h, 利用 m6A 核苷洗脱总 RNA 两次, 经 RNeasy MinElute Spin Column 纯化回收并反转录为 cDNA 后进行 qPCR 检测。

1.2.5 RNA 免疫共沉淀实验 每个 IP 反应所需细胞 2×10^7 个, 经过 non-denaturing 裂解缓冲液裂解, 用 Protein G Agarose beads 对蛋白裂解液进行预清理, 并加入正常兔 IgG 和 anti-ALKBH5 抗体进行蛋白-抗体结合 6 h, 将已封闭的 beads 加入蛋白-抗体结合物 4 °C 下过夜孵育, 接着收集 beads 进行 RNA 提取, 经反转录后进行 RT-qPCR, β -actin 作阴性对照。

1.2.6 CCK8 细胞增殖实验 采用碧云天 CCK8 试剂盒参照试剂盒说明书检测细胞增殖情况, 简述如下: 将细胞进行 siRNA 转染后, 以约 5×10^3 个细胞/孔种植 96 孔板继续孵育 24 h, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 450 nm 波长下测吸光度值并进行记录。

1.2.7 RNA pull down 实验 使用赛默飞的 RNA pull down 试剂盒按照试剂盒说明书进行 RNA-蛋白互作实验, 简述如下: 将合成的生物素标记的探针与链霉亲和素包被的磁珠室温孵育 1 h, 之后加入蛋白裂解液室温孵育 30 min, 后收集磁珠并清洗后洗脱蛋白。

1.2.8 RNA 稳定性实验 细胞进行转染 siRNA, 24 h 后种植于 6 孔板中继续培养 24 h, 之后加入放线菌酮 D 至终浓度 5 mg/mL, 于 0、0.5、1、1.5 h 分别收集细胞后提取 RNA 进行 qPCR 检测。

1.2.9 敲低 ELAVL1 的 LNCaP 细胞稳转株建立及裸鼠皮下成瘤 将 shELAVL1 慢病毒以 MOI 10 感染 LNCaP 细胞, 48 h 后 2.5 μ g/mL 嘌呤霉素筛选稳转株, 此后 1.25 μ g/mL 嘌呤霉素的完全培养基继续培养获得 LNCaP 的 shELAVL1 稳转株。制备 1×10^7 cells/100 μ L 的 LNCaP-shELAVL1 稳转株细胞悬液含 50 μ L 高浓度无酚红的基质胶 (碧云天, 货号: C0383)。每只裸鼠侧腹部注射 100 μ L 细胞悬液进行成瘤。

1.2.10 免疫组织化学实验 将 PCa 组织芯片 (上海芯超, 货号: HProA150PG02) 和裸鼠移植瘤石蜡块切片后 60 °C 烘片 2 ~ 3 h, 依次采用二甲苯 2 次各

10 min、100% 乙醇 2 次各 10 min、95% 乙醇各 10 min、90% 乙醇 10 min、80% 乙醇 5 min 及 70% 乙醇 5 min 脱蜡, 1 × PBS 清洗后 3% 双氧水室温避光孵育 10 min, 1 × PBS 清洗后, 采用枸橼酸微波修复 (中高火, 15 min), 1 × PBS 清洗后 2.5% BSA 封闭液封闭 1 h, 一抗 ALKBH5 抗体 1:500 稀释比例 4 °C 过夜孵育, PBS 清洗后对应二抗 (见 2.1.6 抗体) 37 °C 孵育 60 min, DAB 显色后进行苏木素染色、氨水返蓝, 依次 70%、80%、90%、95%、100% 及 100% 乙醇各 1 min 脱水, 二甲苯 2 次各 5 min 透明, 并树脂封片。

1.3 统计学分析 采用 GraphPad Prism 6.0 软件及 ImageJ 进行作图和统计学处理。计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用独立样本 *t* 检验进行组间或组内的比较, 统计检验采用双尾检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELAVL1 高表达于 HSPC 在 TCGA 前列腺癌数据集中, 高表达 ELAVL1 的患者预后显著差于低表达的患者 (图 1A), 这提示高表达的 ELAVL1 与 PCa 进展有关, 并且其预后更差。随后, 在 PCa 组织芯片中 ELAVL1 表达水平被验证, 结果证实 PCa 组织中 ELAVL1 表达显著高于癌旁组织 (图 1B)。通过细胞系模型和公开数据集 (如 GSE32269) 的多角度验证, 进一步支持了 ELAVL1 在 HSPC 组织中的高表达及其与肿瘤增殖的相关性。

与癌旁组织相比, 雄激素受体 (AR) 阳性 PCa 组织中 ELAVL1 水平显著升高, 而 AR 阴性 PCa 组织中 ELAVL1 未明显升高 (图 1C)。同时也证实了 HSPC 组织中的 ELAVL1 表达水平显著高于激素抵抗型前列腺癌 (图 1D)。以上研究表明高表达的 ELAVL1 与 HSPC 发展有着密切的关系。

检测 5 株 PCa 细胞系中 ELAVL1 表达情况, 结果发现与前列腺正常上皮细胞 RWPE-1 相比, PCa 细胞系 LNCaP 中 ELAVL1 mRNA 显著高表达, 而其他 PCa 细胞系包括 22RV1、DU145 中 ELAVL1 无显著变化, PC-3 中轻度升高 (图 1E)。此外, 这 5 株细胞系中 ELAVL1 蛋白表达水平情况也呈现上述一致的趋势 (图 1F), 上述结果提示, ELAVL1 的高表达可能与 HSPC 的发生发展密切相关。VCaP 作为另一株 HSPC 细胞系, 也显示出 ELAVL1 的高表达水平, 包括 mRNA 和蛋白 (图 1G、H)。

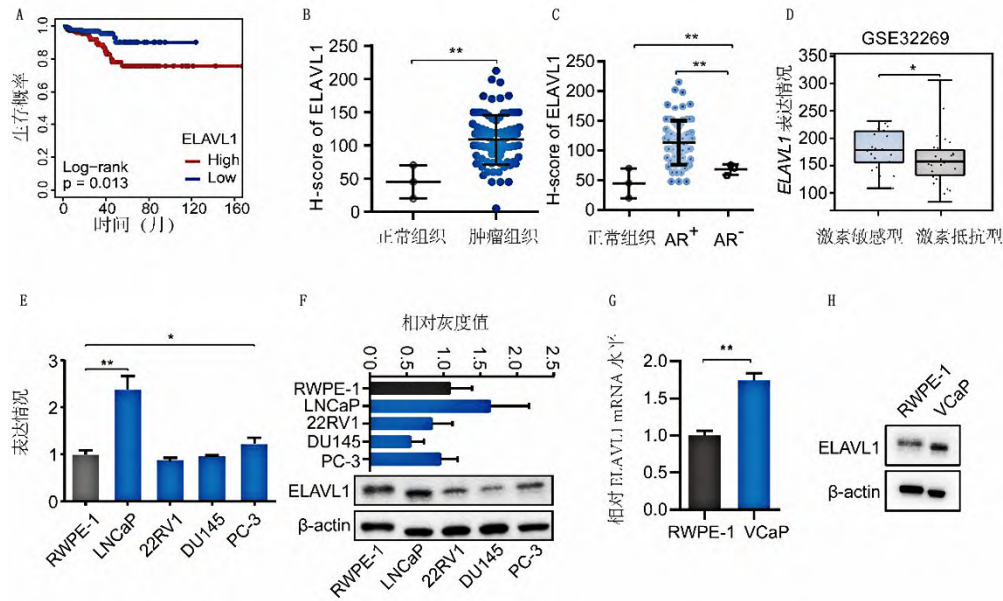


图 1 ELAVL1 在 HSPC 中高表达

A: TCGA 数据集中高低 ELAVL1 水平的病例之间预后的比较; B: 免疫组化检测 PCa 样本中癌和癌旁之间的 ELAVL1 的表达水平; C: 免疫组化检测 PCa 样本中癌旁、AR 阳性及 AR 阴性样本之间 ELAVL1 的表达水平; D: GSE32269 数据集中激素敏感和激素抵抗型前列腺癌样本之间 ELAVL1 的表达水平比较; E: RT-qPCR 检测 ELAVL1 mRNA 在各细胞系中的表达水平; F: Western 印迹检测 ELAVL1 蛋白在各细胞系中的表达水平; G: RT-qPCR 检测 ELAVL1 mRNA 在 VCaP 细胞系中的表达水平; H: Western 印迹检测 ELAVL1 蛋白在 VCaP 细胞系中的表达水平; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

Figure 1 ELAVL1 is highly expressed in hormone-sensitive prostate cancer

A: Comparison of prognosis between cases with high and low ELAVL1 levels in the TCGA dataset; B: Immunohistochemical detection of ELAVL1 expression levels between cancer and adjacent non-cancer tissues in PCa samples; C: Immunohistochemical detection of ELAVL1 expression levels in cancer adjacent, AR-positive, and AR-negative PCa samples; D: Comparison of ELAVL1 expression levels between hormone-sensitive and hormone-resistant PCa samples in the GSE32269 dataset; E: RT-qPCR analysis of ELAVL1 mRNA expression levels in various cell lines; F: Western blot analysis of ELAVL1 protein expression levels in various cell lines; G: RT-qPCR analysis of ELAVL1 mRNA expression levels in the VCaP cell line; H: Western blot analysis of ELAVL1 protein expression levels in the VCaP cell line; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

2.2 低表达的 ELAVL1 抑制 HSPC 的增殖 为了明确低表达 ELAVL1 与 HSPC 生物学作用的关系, 在 LNCaP 和 VCaP 中敲低 ELAVL1 后通过 CCK-8 检测细胞增殖能力, 发现敲低 ELAVL1 后细胞增殖能力受到显著的影响(图 2A); 而过表达的 ELAVL1 会促进 HSPC 细胞的增殖(图 2B)。体内研究显示敲低 ELAVL1 后, LNCaP 移植瘤的生长受到明显抑制(图 2C), 移植瘤的质量明显降低(图 2D)。免疫组化结果显示敲低 ELAVL1 的移植瘤中 Ki67 阳性细胞数量显著少于对照组(图 2E、F)。

2.3 SOX4 是 ELAVL1 的下游分子, 促进 HSPC 的增殖和周期 SOX4 作为转录因子参与调控肿瘤的进展^[21]。TCGA 数据库中, ELAVL1 与 SOX4 mRNA 表达有明显的正相关关系(图 3A)。PCa 细胞系 LNCaP 和 VCaP 中 SOX4 mRNA 和蛋白水平均显著高于前列腺正常上皮细胞 RWPE-1(图 3B、C)。敲低 ELAVL1 后, SOX4 mRNA 和蛋白表达水平均显著

下降(图 3D、E)。RIP-qPCR 证实了 ELAVL1 蛋白与 SOX4 mRNA 的互作关系(图 3F)。以上结果提示 SOX4 受 ELAVL1 的调控, 是其下游靶分子。进一步研究显示敲低 SOX4 后, LNCaP 和 VCaP 细胞的增殖能力受到显著抑制(图 3G)。以上结果表明在 HSPC 中 SOX4 促进肿瘤的增殖。

2.4 ELAVL1 依赖 m6A 促进 SOX4 mRNA 稳定性 推测 ELAVL1 调控 SOX4 是依赖 m6A, 因此分析了 PCa 组织中 SOX4 RNA 上 m6A 水平。MeRIP-qPCR 证实 LNCaP 和 VCaP 中 SOX4 的 peak1 上 m6A 呈现高水平(图 4A)。在敲低甲基转移酶 METTL3 后 m6A 水平显著降低(图 4B)。随后合成了包含上述 m6A 位点 peak1 的一小段 SOX4 RNA(图 4C), RNA pull down 显示带有 m6A 位点的 SOX4 RNA 片段所结合的 ELAVL1 显著多于没有 m6A 位点(图 4D)。以上结果表明 HSPC 细胞中 ELAVL1 依赖 m6A 调控了 SOX4 的 RNA 稳定性(图 4E)。

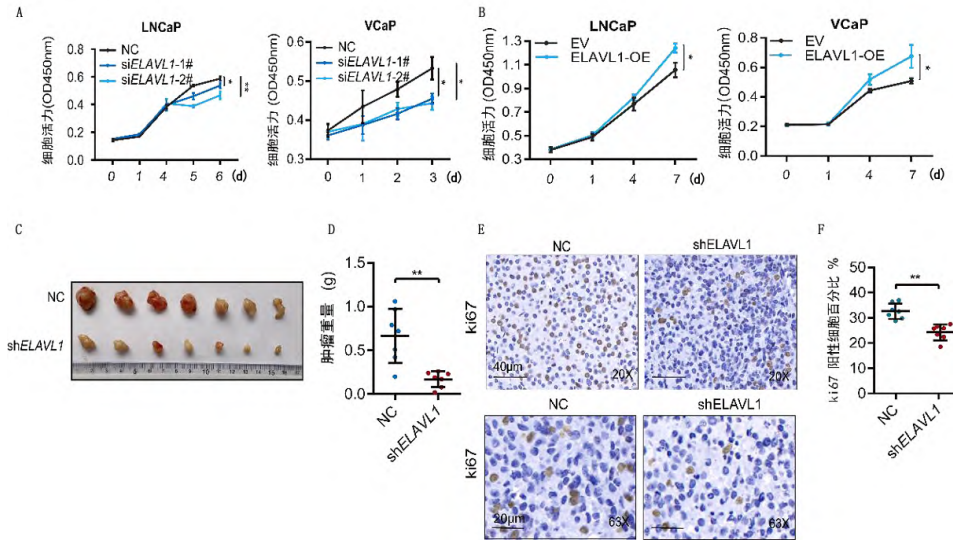


图2 低表达 ELAVL1 抑制 HSPC 细胞的增殖

A; CCK-8 检测敲低 ELAVL1 后 Pca 细胞的增殖能力变化; B; EdU 实验检测敲低 ELAVL1 后 Pca 细胞的增殖能力变化; C, D; 敲低 ELAVL1 后小鼠体内移植瘤大小对比; E, F; 免疫组化检测敲低 ELAVL1 的移植瘤中 Ki67 阳性细胞数量对比; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

Figure 2. ELAVL1 promotes the proliferation of HSPC cells

A; CCK-8 assay to assess changes in Pca cell proliferation after ELAVL1 knockdown; B; EdU assay to evaluate changes in Pca cell proliferation after ELAVL1 knockdown; C, D; Comparison of tumor size in mice after ELAVL1 knockdown and tumor transplantation; E, F; Immunohistochemical detection of Ki67-positive cell count in transplanted tumors following ELAVL1 knockdown; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

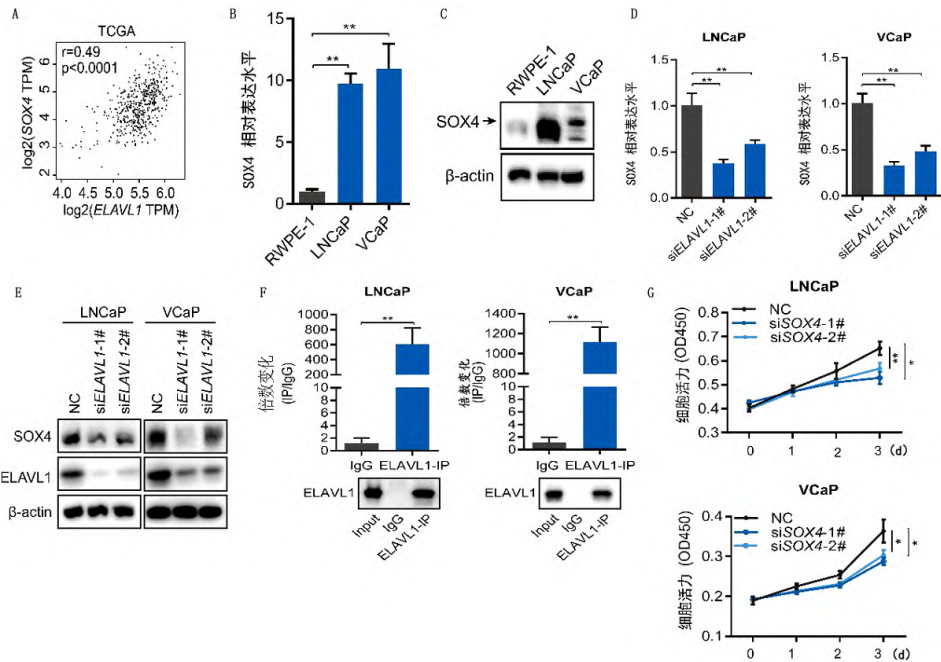


图3 SOX4 是 Pca 的下游靶分子, 调控 Pca 细胞的增殖

A; TCGA 数据集中 ELAVL1 和 SOX4 mRNA 在癌组织之间表达相关性; B; RT-qPCR 检测 SOX4 mRNA 在各 Pca 细胞系中的表达水平; C; Western 印迹检测 SOX4 蛋白在各 Pca 细胞系中的表达水平; D; RT-qPCR 检测 Pca 细胞系中敲低 ELAVL1 后 SOX4 mRNA 的表达水平变化; E; Western 印迹检测 Pca 细胞系中敲低 ELAVL1 后 SOX4 的表达水平变化; F; RIP-qPCR 检测 ELAVL1 与 SOX4 mRNA 的互作关系; G; CCK-8 检测敲低 SOX4 后 Pca 细胞的增殖能力变化; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

Figure 3. SOX4 is a downstream target molecule of Pca and regulates the proliferation of Pca cells

A; Correlation between the expression of ELAVL1 and SOX4 mRNA in cancer tissues from the TCGA dataset; B; RT-qPCR analysis of SOX4 mRNA expression levels in various Pca cell lines; C; Western blot analysis of SOX4 protein expression levels in various Pca cell lines; D; RT-qPCR analysis of changes in SOX4 mRNA expression levels after ELAVL1 knockdown in Pca cell lines; E; Western blot analysis of changes in SOX4 protein expression levels after ELAVL1 knockdown in Pca cell lines; F; RIP-qPCR analysis of the interaction between ELAVL1 and SOX4 mRNA; G; CCK-8 assay to assess changes in Pca cell proliferation after SOX4 knockdown; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

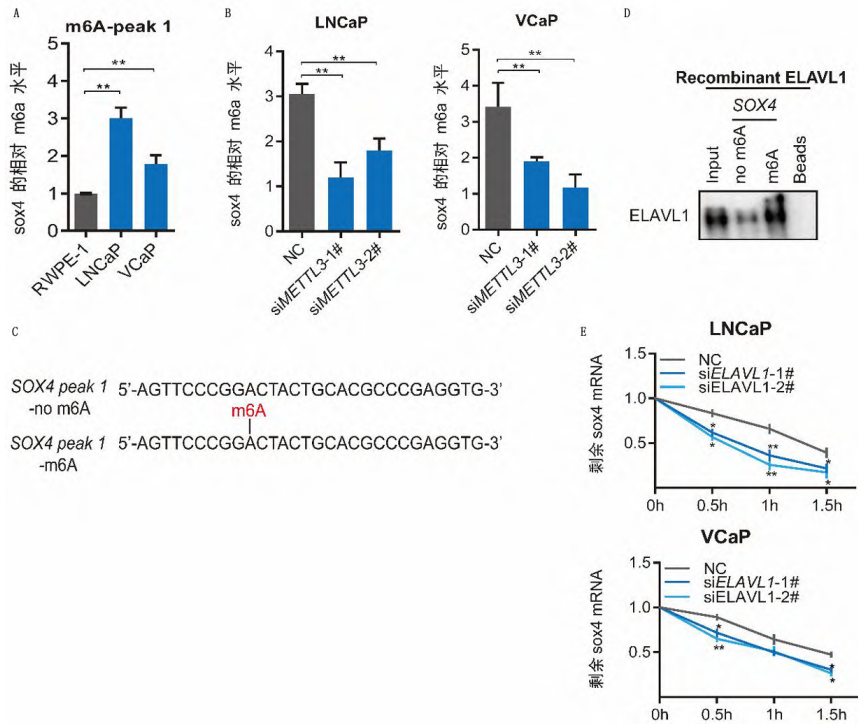


图4 ELAVL1 依赖 m6A 调控 SOX4 mRNA 的稳定性

A: MeRIP-qPCR 检测 SOX4 m6A 水平;B: 敲低 METTL3 后 SOX4 m6A 水平变化;C: 含 m6A 位点的 SOX4 小片段 RNA 示意图;D: RNA pull down 检测 SOX4 小片段 RNA 与重组蛋白 ELAVL1 的互作情况;E: RNA 稳定性实验检测敲低 ELAVL1 后 SOX4 mRNA 的稳定性; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

Figure 4. ELAVL1 regulates SOX4 mRNA stability in an m6A-dependent manner

A: MeRIP-qPCR analysis of SOX4 m6A levels;B: Changes in SOX4 m6A levels after METTL3 knockdown;C: Schematic diagram of the small SOX4 mRNA fragment containing m6A sites;D: RNA pull-down assay to assess the interaction between the small SOX4 mRNA fragment and recombinant ELAVL1 protein;E: RNA stability assay to evaluate SOX4 mRNA stability after ELAVL1 knockdown; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

3 讨论

PCa 是老年男性常见的肿瘤疾病之一,在男性最常见癌症中发病率仅次于肺癌,发病率约为 14.2%^[4]。尽管临床上有多种治疗方式,但是死亡率仍较高。PCa 的发病机制是一个复杂的过程,涉及多种遗传和环境因素^[23],目前具体的发病机制仍不清楚。ELAVL1 与炎症性疾病、代谢相关疾病及癌症的发生发展密切相关^[24]。既往研究已经报道了 ELAVL1 可以促进多种肿瘤的发生发展。高表达的 ELAVL1 会促进肿瘤的增殖、侵袭、迁移周期、放疗抵抗、化疗耐药等^[13]。本研究发现,在 PCa 组织中 ELAVL1 高表达的情况主要存在于 HSPC 组织中。肿瘤的持续生长依赖于细胞的活跃增殖,已有研究表明,ELAVL1 与多种细胞周期调控因子相关,包括 Cyclin D1、Cyclin E1 和 Cyclin A2 等。沉默 ELAVL1 后这些周期相关生物分子的表达均呈下降趋势^[25]。本研究还发现敲低 ELAVL1 后会导致 HSPC 的细胞增殖受到明显的抑制,同时体内研究也进一步证实了敲低 ELAVL1 后会导致裸鼠移植瘤生长受到显著抑制。因此,ELAVL1 被认为对于

HSPC 具有促进肿瘤增殖的作用。

SOX4 是一种重要的发育转录因子,调节干性、分化、祖细胞发育和多种发育途径,其主要在胚胎发育过程中高表达,参与心脏、淋巴、骨等组织的分化^[26]。在 PCa 组织中,SOX4 也被发现通过上皮-间质转化、转移等促进 PCa 的进展^[27-28]。本研究中,也同样发现了 ELAVL1 与下游靶分子 SOX4 mRNA 的稳定性有着密切关系。敲低 ELAVL1 会降低 SOX4 mRNA 的稳定性。m6A 结合蛋白通过 m6A 与目的 RNA 结合后,发挥调控 RNA 代谢的作用,包括出核与入核、可变剪接、RNA 稳定性、降解及翻译等^[29]。ELAVL1 在多项研究中已经显示与 mRNA 的结合具有 m6A 依赖性,缺失 m6A 会导致 ELAVL1 与下游 mRNA 的结合显著减少^[16, 30-32]。在本研究中,进一步通过 RNA pull-down 实验验证了 ELAVL1 与 SOX4 mRNA 的结合具有 m6A 依赖性。

去势治疗 (androgen deprivation therapy, ADT) 是 PCa 的标准治疗方法,通过抑制雄激素作用来阻止肿瘤生长。然而,ADT 的长期疗效受到去势抵抗型前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC) 发展的限制。研究表明,几乎所有接受 ADT 的患者

最终都会出现 CRPC。此外,ADT 通常伴随一系列不良反应,包括骨密度下降、心血管疾病风险增加、代谢综合征和性功能障碍,从而显著降低患者的生活质量。

本研究表明 ELAVL1 在 HSPC 组织中高表达,并通过调控细胞周期相关分子及其下游靶基因 SOX4,促进 PCa 细胞的增殖与进展。敲低 ELAVL1 显著抑制了 PCa 细胞的增殖及移植瘤的生长,提示 ELAVL1 在 PCa 发生发展中起着重要作用。此外,本研究进一步证实了 ELAVL1 与 SOX4 mRNA 的稳定性密切相关,揭示了 ELAVL1 通过调控 SOX4 促进 PCa 进展的潜在机制。相比之下,ELAVL1 作为 RNA 结合蛋白,其作用更具特异性,能够通过 m6A 修饰介导的 SOX4 能够通过 m6A 修饰介导的 SOX4 稳定性调控机制,促进肿瘤细胞的增殖。靶向 ELAVL1 的治疗策略可能实现更精准的干预,减少对正常雄激素相关信号通路的干扰,从而降低系统性不良反应。尤其是在 HSPC 治疗中,抑制 ELAVL1 可能提供一种有效的分子靶向治疗手段,以延缓或防止 CRPC 的进展,提升治疗效果,改善患者预后。

参考文献

- [1] Jochems SHJ, Fritz J, Häggström C, et al. Smoking and risk of prostate cancer and prostate cancer death: A pooled study. *Eur Urol*, 2023, 83(5): 422-431.
- [2] Zhang M, Dai X, Chen G, et al. The Association between spatial-temporal distribution of prostate cancer and environmental factors in mainland China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2023, 32(2): 208-216.
- [3] Sandhu S, Moore CM, Chiong E, et al. Prostate cancer. *Lancet*, 2021, 398(10305): 1075-1090.
- [4] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [5] Jayadevappa R, Guzzo T, Vapiwala N, et al. Continuity of care and advanced prostate cancer. *Cancer Med*, 2023, 12(10): 11795-11805.
- [6] Lowrance W, Dreicer R, Jarrard DF, et al. Updates to advanced prostate cancer: AUA/SUO guideline (2023). *J Urol*, 2023, 209(6): 1082-1090.
- [7] Cai M, Song XL, Li XA, et al. Current therapy and drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Drug Resist Updat*, 2023, 68: 100962.
- [8] Wang G, Zhao D, Spring DJ, et al. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*, 2018, 32(17-18): 1105-1140.
- [9] Dong R, Chen P, Polireddy K, et al. An RNA-binding protein, hu-antigen R, in pancreatic cancer epithelial to mesenchymal transition, metastasis, and cancer stem cells. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19(11): 2267-2277.
- [10] Mao G, Mu Z, Wu DA. Exosomal lncRNA FOXD3-AS1 upregulates ELAVL1 expression and activates PI3K/Akt pathway to enhance lung cancer cell proliferation, invasion, and 5-fluorouracil resistance. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2021, 53(11): 1484-1494.
- [11] Shi J, Guo C, Ma J. CCAT2 enhances autophagy-related invasion and metastasis via regulating miR-4496 and ELAVL1 in hepatocellular carcinoma. *J Cellular Mol Med*, 2021, 25(18): 8985-8996.
- [12] Li Y, Xiong Y, Wang Z, et al. FAM49B promotes breast cancer proliferation, metastasis, and chemoresistance by stabilizing ELAVL1 protein and regulating downstream Rab10/TLR4 pathway. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 534.
- [13] To KKW, Leung WW, Ng SSM. Exploiting a novel miR-519c-HuR-ABCG2 regulatory pathway to overcome chemoresistance in colorectal cancer. *Exp Cell Res*, 2015, 338(2): 222-231.
- [14] Visvanathan A, Patil V, Arora A, et al. Essential role of METTL3-mediated m6A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance. *Oncogene*, 2018, 37(4): 522-533.
- [15] Badawi A, Hehlhans S, Pfeilschifter J, et al. Silencing of the mRNA-binding protein HuR increases the sensitivity of colorectal cancer cells to ionizing radiation through upregulation of caspase-2. *Cancer Lett*, 2017, 393: 103-112.
- [16] Liang D, Lin WJ, Ren M, et al. m6A reader YTHDC1 modulates autophagy by targeting SQSTM1 in diabetic skin. *Autophagy*, 2022, 18(6): 1318-1337.
- [17] Chen F, Chen Z, Guan T, et al. N6-methyladenosine regulates mRNA stability and translation efficiency of KRT17 to promote breast cancer lung metastasis. *Cancer Res*, 2021, 81(11): 2847-2860.
- [18] Melling N, Taskin B, Hube-Magg C, et al. Cytoplasmic accumulation of ELAVL1 is an independent predictor of biochemical recurrence associated with genomic instability in prostate cancer. *Prostate*, 2016, 76(3): 259-272.
- [19] Barbisan F, Mazzucchelli R, Santinelli A, et al. Overexpression of ELAVL1-like protein HuR is associated with increased COX-2 expression in atrophy, high-grade prostatic intraepithelial neoplasia, and incidental prostate cancer in cystoprostatectomies. *Eur Urol*, 2009, 56(1): 105-112.
- [20] Cai Z, Xu H, Bai G, et al. ELAVL1 promotes prostate cancer progression by interacting with other m6A regulators. *Front Oncol*, 2022, 12: 939784.
- [21] Moreno CS. SOX4: The unappreciated oncogene. *Semin Canc Biol*, 2020, 67(Pt 1): 57-64.
- [22] Chang YZ, Chai RC, Pang B, et al. METTL3 enhances the stability of MALAT1 with the assistance of HuR via m6A modification and activates NF- κ B to promote the malignant progression of IDH-wildtype glioma. *Cancer Lett*, 2021, 511: 36-46.
- [23] Haffner MC, Zwart W, Roudier MP, et al. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. *Nat Rev Urol*, 2021, 18(2): 79-92.
- [24] Dolicka D, Sobolewski C, Correia De Sousa M, et al. mRNA post-transcriptional regulation by AU-rich element-binding proteins in liver inflammation and cancer. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6689.
- [25] Kedde M, Agami R. Interplay between microRNAs and RNA-binding proteins determines developmental processes. *Cell Cycle*, 2008, 7(7): 899-903.
- [26] Tsang SM, Oliemuller E, Howard BA. Regulatory roles for SOX11 in development, stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol*, 2020, 67(Pt 1): 3-11.
- [27] Fu W, Tao T, Qi M, et al. MicroRNA-132/212 upregulation inhibits TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition of prostate cancer cells by targeting SOX4. *Prostate*, 2016, 76(16): 1560-1570.
- [28] Feng YG, Zhao JF, Xiao L, et al. MicroRNA-19a-3p suppresses invasion and metastasis of prostate cancer via inhibiting SOX4. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(19): 6245-6251.
- [29] Gu C, Shi X, Dai C, et al. RNA m6A Modification in Cancers: Molecular Mechanisms and Potential Clinical Applications. *Innovation (Camb)*, 2020, 1(3): 100066.
- [30] Panneerdoss S, Eedunuri VK, Yadav P, et al. Cross-talk among writers, readers, and erasers of m6A regulates cancer growth and progression. *Sci Adv*, 2018, 4(10): eaar8263.
- [31] Ji X, Liu Z, Gao J, et al. N6-Methyladenosine-modified lncRNA LINREP promotes Glioblastoma progression by recruiting the PT-BP1/HuR complex. *Cell Death and Differentiation*, 2023, 30(1): 54-68.
- [32] Liu H, Lan T, Li H, et al. Circular RNA circDLC1 inhibits MMP1-mediated liver cancer progression via interaction with HuR. *Theranostics*, 2021, 11(3): 1396-1411.

(收稿日期: 2024-10-15; 接受日期: 2025-03-14)

(本文编辑: 吴秋月)