

• 论 著 •

FTO 在前列腺癌中的表达及其临床意义^{*}

胡 萍, 李 会, 杨溪霖, 张海宁, 卿克勤

四川省成都市第一人民医院检验科, 四川成都 610041

摘 要:**目的** 探讨肥胖相关蛋白(FTO)在前列腺癌组织和细胞中的表达及对前列腺癌细胞侵袭功能的影响。**方法** 采用免疫组织化学染色方法检测前列腺癌组织中 FTO 的表达;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量 PCR(qPCR)检测 FTO 在前列腺正常细胞和癌细胞中的表达;分析 FTO 的表达与前列腺癌组织的临床病理特征的关系;采用 FTO 慢病毒干扰载体(pLVX-shRNA-FTO)感染前列腺癌细胞 22RV1 后,Western blot 检测实验组、对照组和空白组的 FTO 蛋白表达水平,Transwell 实验检测细胞的侵袭能力。**结果** 前列腺癌组织中 FTO 蛋白表达水平明显高于癌旁组织($P<0.05$);前列腺癌细胞中 FTO 的蛋白和 mRNA 表达水平高于前列腺正常细胞($P<0.05$);FTO 的表达与前列腺癌组织的 Grade 分级有关($P<0.05$);实验组 FTO 蛋白表达水平低于对照组和空白组($P<0.05$);下调 FTO 的表达能够抑制前列腺癌细胞 22RV1 的侵袭能力。**结论** FTO 在前列腺癌组织和细胞中高表达,其能促进前列腺癌细胞的侵袭能力,FTO 可能是前列腺癌发生发展的关键分子。

关键词: 前列腺癌; 肥胖相关蛋白; 侵袭

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.10.011

中图法分类号:R737.25

文章编号:1673-4130(2022)10-1202-05

文献标志码:A

Expression of FTO in prostate cancer and its clinical significance^{*}

HU Ping, LI Hui, YANG Xilin, ZHANG Haining, QING Keqin

Department of Clinical Laboratory, Chengdu First People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract:**Objective** To investigate the expression of obesity-related protein (FTO) in prostate cancer tissues and cells and its effect on the invasion function of prostate cancer cells. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of FTO in prostate cancer tissue. Western blot and real-time PCR (qPCR) were used to detect the expression of FTO in prostate normal cells and cancer cells. The relationship between the expression of FTO and the clinicopathological characteristics of prostate cancer tissue was analyzed. After the prostate cancer cell 22RV1 was infected with FTO lentiviral vector (pLVX-shRNA-FTO), the expression levels of FTO protein in the experimental group, the control group and the blank group were detected by Western blot, and the invasive ability of the cells was detected by Transwell assay. **Results** The protein expression level of FTO in prostate cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues ($P<0.05$); the protein and mRNA expression levels of FTO in prostate cancer cells were higher than those in normal prostate cells ($P<0.05$); the expression of FTO was related to the grade of prostate cancer tissue ($P<0.05$); the expression level of FTO protein in the experimental group was lower than that in the control group and blank group ($P<0.05$); down-regulation of FTO expression significantly inhibited the invasive ability of prostate cancer cells 22RV1. **Conclusion** FTO is highly expressed in prostate cancer tissues and cells, and it can promote the invasion ability of prostate cancer cells. FTO may be a key molecule in the occurrence and development of prostate cancer.

Key words: prostate cancer; obesity-related proteins; invasion

前列腺癌在西方发达国家是最常见的男性肿瘤, 约占男性肿瘤的 1/3, 病死率位于男性肿瘤的第 3 位^[1-2]。随着我国经济的快速发展、人口老龄化的加剧, 前列腺癌的发病率逐年上升, 成为老年男性健康

^{*} 基金项目: 四川省成都市医学科研课题(2018062)。

作者简介: 胡萍, 女, 主管技师, 主要从事前列腺癌转移机制的相关研究。

的重要威胁。由于前列腺癌早期症状隐匿,且不同地区前列腺特异抗原筛查存在差异,在我国前列腺癌初诊患者人群中,高危患者占比较多^[3-4]。目前,前列腺癌发生发展的分子机制仍然不是十分明确。因此,寻找前列腺癌发生发展过程中的关键因子,将为前列腺癌早期诊断、治疗及预后等提供理论基础和分子靶标。

肥胖相关蛋白(FTO)是一种位于染色体 16q12.2 上的 N6-甲基腺苷去甲基酶^[5],除了与肥胖症的发病相关,越来越多的研究证实,FTO 基因在乳腺癌、胃癌、急性髓细胞性白血病(AML)等多种肿瘤中均过表达,并且参与了多种肿瘤的发生、发展、侵袭和转移,是未来靶向治疗研究的重要热点^[6-7]。

为了探索 FTO 基因与前列腺癌的关系,本研究首先采用免疫组织化学染色法检测前列腺癌癌组织和癌旁组织中 FTO 的表达;采用实时荧光定量 PCR (qPCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 FTO 在前列腺正常细胞和癌细胞中的表达;采用统计学方法分析 FTO 的表达与前列腺癌组织临床病理特征的关系;采用 Transwell 实验检测 FTO 慢病毒干扰质粒感染前列腺癌细胞 22RV1 后的侵袭能力变化情况。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 前列腺癌癌细胞 PC3、22RV1、Du145 和 Lncap,前列腺正常细胞 RWPE 均购自中国科学院细胞库;组织芯片购自上海芯超生物公司,包括 3 例前列腺正常组织,52 例前列腺癌癌旁组织,55 例前列腺癌组织,前列腺癌组织相关病理参数见表 1;脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司;FTO 慢病毒干扰载体 shRNA 购自赛业生物公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 采用免疫组织化学染色检测组织芯片中 FTO 蛋白水平的表达。组织芯片经脱蜡、水化后,采用枸橼酸缓冲液高压修复抗原,冷却至常温。再用 3% H₂O₂ 处理,避光封闭 15 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加山羊血清,37 ℃ 封闭 30 min 后;4 ℃ 过夜孵育兔抗人 FTO 单克隆抗体(编号 27226-1-AP,稀释浓度为 1:100,武汉三鹰生物技术有限公司);PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加兔通用 IgG 二抗(上海长岛生物科技有限公司),37 ℃ 孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的三抗,37 ℃ 孵育 30 min;PBS 洗涤 3 次,每次 5 min 后用 DAB 显色;流水冲洗 15 min,苏木精复染 1 min 后,流水冲洗 30 min,脱水封片,在光学显微镜下观察并采集图像。最后采用半定量方法评价 FTO 的表达情况,得分评价如下,FTO 的染色强度评估:阴性(0 分)、弱阳性(1 分)、中阳性(2 分)、强阳性

(3 分);FTO 的阳性染色的百分比:<5%(0 分)、5%~<26%(1 分)、26%~<51%(2 分)、51%~75%(3 分)、>75%(4 分)。每个组织标本的 FTO 表达最终得分等于强度得分×百分比得分,总得分为 0~12 分,其中<9 分为 FTO 低表达,≥9 分为 FTO 高表达。

1.2.2 qPCR 检测 采用 Triol 法提取细胞总 RNA,按照引物反转录试剂盒说明书进行操作,取 200 ng 总 RNA 经 Bio-Rad 反转录试剂反转录产生 cDNA,产物在 ABI 7500 检测系统进行 PCR 反应,每个标本以 GAPDH 为内参。FTO 基因引物序列如下,上游:5'-CCCTGTGAGCAGCAACATAAG-3',下游:5'-CAACCCGACCCAGTCTAAATC-3';GAPDH 基因引物序列如下,上游:5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGT-3',下游:5'-GGGAAGGATCTGTCTCTGACC-3';引物由上海英骏生物技术有限公司合成。利用相应标本中 GAPDH mRNA 的比例计算组织中 mRNA 的表达水平,并将对照组中靶基因的表达水平设为 1,对其他组中的靶基因的表达水平进行标准化计算。

表 1 前列腺癌患者临床病理特征和前列腺癌 FTO 的表达情况(n=55)

临床病例参数	n	占比(%)
年龄(岁)		
≥70	15	27.3
<70	40	72.7
Gleason 分级		
6 级	7	12.7
7 级	39	70.9
8 级	5	9.1
9 级	4	7.3
Grade 分级		
1 级	7	12.7
2 级	27	49.1
3 级	12	21.8
4 级	5	9.1
5 级	4	7.3
淋巴结个数(个)		
≥6	28	50.9
<6	27	49.1
FTO 表达		
低表达	25	45.5
高表达	30	54.5

1.2.3 Western blot 采用细胞裂解法提取细胞总蛋白,即加入细胞 RIPA 裂解液,经匀浆、裂解、离心后,获得总蛋白,后通过 Bradford 方法检测总蛋白浓

度,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,经恒流电转将蛋白转印至聚偏二氟乙烯膜上,后将聚偏二氟乙烯膜放入含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭液中封闭,加入一抗加兔抗人 FTO 单克隆抗体(编号 27226-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司,稀释浓度为 1 : 1 000),4 ℃ 孵育过夜,洗膜,加入兔通用二抗(上海长岛生物科技有限公司),37 ℃ 孵育 1 h,洗膜后加入发光液显影。最后,采用分析系统软件测定蛋白条带的积分光密度值,以 GAPDH 蛋白条带作为内参对照。

1.2.4 FTO 干扰慢病毒载体感染 常规培养 22RV1 细胞,待细胞融合度达 60%~80%。将其分为实验组、对照组和空白组 3 组,利用 Lipofectamine™2000 脂质体介导质粒转染 FTO 慢病毒干扰载体(pLVX-shRNA-FTO)至实验组细胞中,转染 48 h 后,使用 2 μg 嘌呤霉素稳定筛选 FTO 沉默细胞,提取细胞总蛋白,在蛋白水平上验证 FTO 干扰效果。

1.2.5 侵袭实验 采用 Transwell 实验,按照细胞外基质胶:无血清培养基为 1 : 7.5 的配比在冰上稀释成使用液。把枪头剪去一小段(约 3 μm)后在冰上吸取每孔 40 μL 细胞外基质胶使用液轻轻加入 24 孔板的 8.0 μm 的 Transwell 上室中,取实验组、对照组、空白组的细胞,分别接种 8 000 个细胞和 200 μL DMEM 培养基到 Transwell 上室中,并将 500 μL

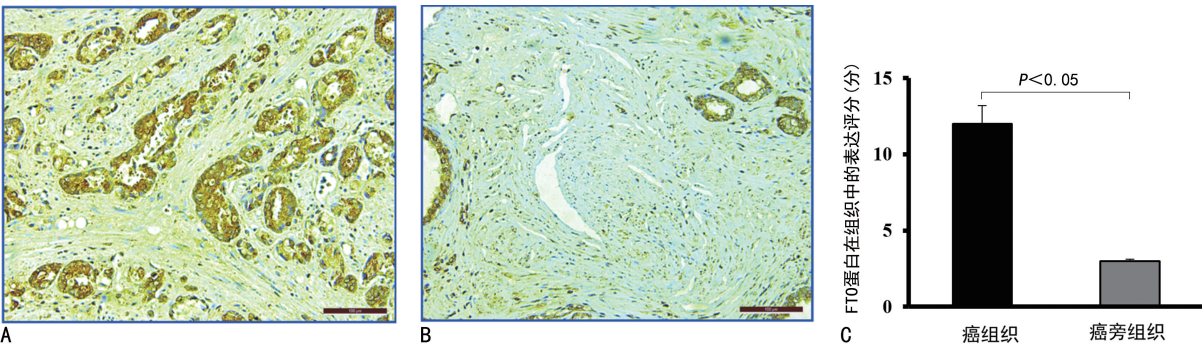
DMEM 培养基(含 10%胎牛血清)置于下室中,每组设置 3 个复孔。在 37 ℃和 5% CO₂ 条件下培养 24 h,然后取出培养室,用 PBS 洗涤两次,用多聚甲醛固定 10 min。将小室内未发生侵袭的细胞用棉签移除,将小室背面的细胞用 0.1%的结晶紫染色并在显微镜下观察结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件对数据进行处理和分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。计量资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。双变量之间的相关性采用 Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

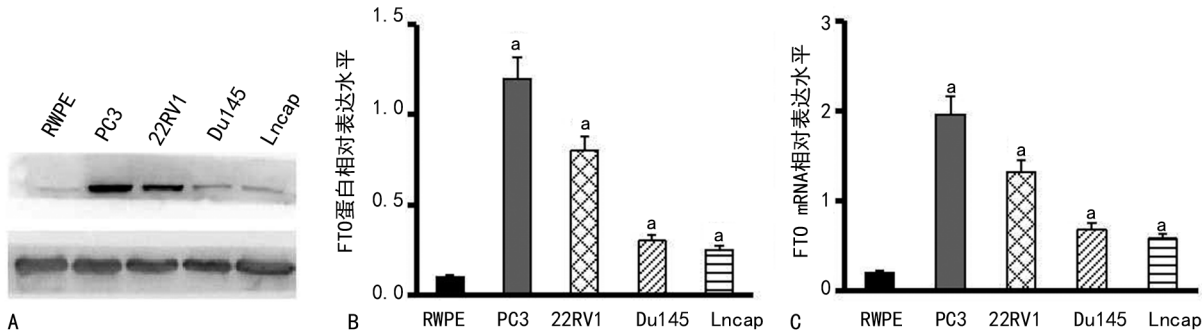
2.1 FTO 在前列腺癌组织中高表达 与癌旁组织比较,FTO 在前列腺癌组织中表达水平更高,差异有统计意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 FTO 在前列腺癌细胞中高表达 Western blot 结果表明,FTO 在前列腺癌细胞 PC3, Du145, 22RV1, Lncap 中的表达水平高于前列腺正常细胞 RWPE,差异有统计学意义($P < 0.05$);qPCR 结果显示,FTO 在前列腺癌细胞 PC3, Du145, 22RV1, Lncap 中的 mRNA 表达水平高于前列腺正常细胞 RWPE,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



注:A为FTO在前列腺癌组织中的表达;B为FTO在前列腺癌旁组织中的表达;C为FTO在前列腺癌和癌旁组织的免疫组化评分图。

图 1 FTO 在前列腺癌组织和癌旁组织中的表达比较



注:A为Western blot分析FTO在前列腺正常细胞和前列腺癌细胞中的蛋白表达图;B为FTO蛋白表达水平的定量柱状图,和RWPE细胞比较,^a $P < 0.05$;C为qPCR分析FTO在前列腺正常细胞和前列腺癌细胞中的mRNA定量表达图,和RWPE细胞比较,^a $P < 0.05$ 。

图 2 FTO 在前列腺正常细胞和前列腺癌细胞中的表达

2.3 高表达的 FTO 与前列腺癌的 Grade 分级的关系 据 FTO 组化评分,将 FTO 的表达分为高表达组 30 例和低表达组 25 例。结果表明,FTO 的表达与前列腺癌的 Grade 分级有关,而与年龄、Gleason 分级、淋巴结个数无关,见表 2、3。

表 2 FTO 的表达与前列腺癌患者临床病理参数的关系			
临床病理参数	FTO 低表达组 (n=25)	FTO 高表达组 (n=30)	P
年龄(岁)			0.912
≥70	7	8	
<70	18	22	
Gleason 分级			0.267
6 级	4	3	
7 级	19	20	
8 级	2	3	
9 级	0	4	
Grade 分级			0.038
1 级	4	3	
2 级	16	11	
3 级	3	9	
4 级	2	3	
5 级	0	4	
淋巴结个数(个)			0.349
≥6	14	13	
<6	11	17	

2.4 FTO 的下调抑制了 22RV1 细胞的侵袭能力

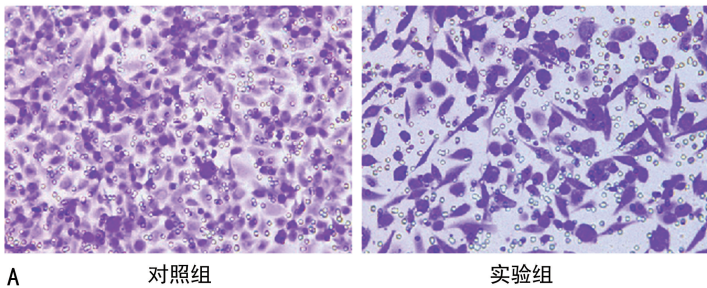


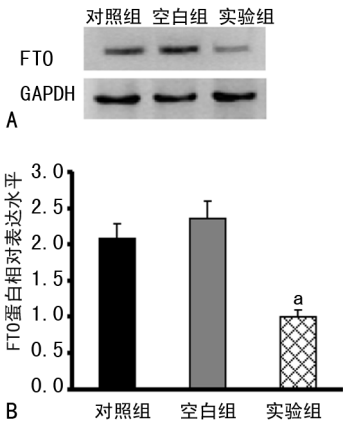
图 4 Transwell 实验分析 pLVX-shRNA-TFO 感染后对 22RV1 细胞侵袭能力的影响(×400)

3 讨 论

前列腺癌是威胁男性健康的常见恶性肿瘤,其全球发病率以每年 5% 的速度迅速增长^[8],据调查显示,我国前列腺癌发病率比 30 年前增加近 3 倍^[9]。FTO 是与肥胖关系密切的易感基因^[10],而肥胖是前列腺癌等癌症的危险因素,这提示 FTO 可能在介导肥胖和肿瘤发生之间发挥作用。现有研究数据表明,FTO 与多种癌症的发生、发展和预后存在关联。例如,

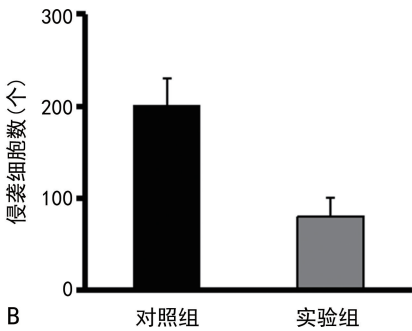
Western blot 检测结果显示,与对照组和空载组比较,实验组细胞中 FTO 的蛋白表达水平降低;通过 Transwell 实验分析结果进一步表明,感染 FTO 慢病毒干扰载体(pLVX-shRNA-TFO)的前列腺癌细胞 22RV1 的侵袭能力降低。见图 3、4。

表 3 Spearman 分析 FTO 的表达与前列腺癌患者临床病理参数的关系		
指标	r	P
年龄	0.015	0.914
Gleason 分级	0.213	0.124
Grade 分级	0.317	0.018
淋巴结个数	0.126	0.359



注:A 为 Western blot 分析 FTO 在对照组、空白组和实验组细胞中的蛋白表达图;B 为 FTO 蛋白表达水平的定量柱状图,^aP<0.05。

图 3 pLVX-shRNA-TFO 感染 22RV1 细胞后的 FTO 蛋白表达图



注:A 为 Transwell 分析对照组和实验组细胞侵袭能力;B 为侵袭细胞数的定量柱状图。

FTO 在 AML 中高表达,促进人 AML 细胞的存活和增殖,并抑制人 AML 细胞的分化和凋亡,从而促进白血病的发生^[11-12]。在雌激素受体表达阳性的子宫内膜癌中,FTO 可以通过 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路诱导肿瘤细胞的生长和侵袭^[13]。FTO 在胃癌组织中高表达的同时能够促进胃癌细胞的增殖和迁移^[14]。此外,在不同癌症中 FTO 表达的增加可能是由肥胖相关的 FTO 单核苷酸多态性引起的,从而促进肿瘤

的发生和发展^[15-17],如,FTO rs9939609 与前列腺癌相关。然而,关于 FTO 表达与前列腺癌发生发展的相关性,目前尚缺乏相关研究。

本研究通过免疫组织化学染色在 55 例前列腺癌组织与 52 例癌旁组织中检测了 FTO 的表达;且通过 Western blot 和 qPCR 实验在前列腺癌细胞 PC3、22RV1、Du145、Lncap 和前列腺正常细胞 RWPE 中检测了 FTO 的表达。FTO 在前列腺癌细胞中的 mRNA 和蛋白表达水平均升高,与临床病理组织中表达升高的趋势一致,这些结果共同提示 FTO 的高表达可能与前列腺癌的发生密切相关,FTO 高表达可能有助于前列腺癌的发生。通过结合临床病理资料分析发现 FTO 与前列腺癌的 Grade 分级具有相关性。在细胞水平干扰 FTO 的表达后,发现降低 FTO 的表达可抑制前列腺癌细胞的侵袭能力,提示 FTO 在前列腺癌中可能具有促进肿瘤细胞侵袭和转移的能力,其具体的分子机制还需在后续研究中进一步探索。

因此,本研究可为前列腺癌的治疗寻找合适的靶点提供实验依据,FTO 可能成为前列腺癌的重要分子靶点。

参考文献

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1): 7-30.

[2] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(4): 330-334.

[3] CHEN R, REN S, Chinese Prostate Cancer Consortium, et al. Prostate cancer in Asia: a collaborative report[J]. Asian J Urol, 2014, 1(1): 15-29.

[4] WONG M C, GOGGINS W B, WANG H H, et al. Global incidence and mortality for prostate cancer: analysis of temporal patterns and trends in 36 countries [J]. Eur Urol, 2016, 70(5): 862-874.

[5] DINA C, MEYRE D, GALLINA S, et al. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity[J]. Nat Genet, 2007, 39(6): 724-726.

[6] CHEN J, DU B. Novel positioning from obesity to cancer: FTO, an m6A RNA demethylase, regulates tumour progression[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(1): 19-29.

[7] JAFARI N J, KARGAR S, NEAMATZADEH H, et al.

Lack of association of the fat mass and obesity associated (FTO) gene rs9939609 polymorphism with breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis based on case-control studies[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(4): 1031-1037.

[8] CUZICK J, THORAT M A, ANDRIOLE G, et al. Prevention and early detection of prostate cancer[J]. Lancet Oncol, 15(11): 484-492.

[9] HUDSON S V, O'MALLEY D M, MILLER S M. Achieving optimal delivery of follow-up care for prostate cancer survivors: improving patient outcomes[J]. Patient Relat Outcome Meas, 2015, 6: 75-90.

[10] LOOS R J F, YEO G S H. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene[J]. Nat Rev Endocrinol, 2014, 10(1): 51-61.

[11] HUANG Y, SU R, SHENG Y, et al. Small-molecule targeting of oncogenic FTO demethylase in acute myeloid leukemia[J]. Cancer Cell, 2019, 35(4): 677-691.

[12] LI Z J, WENG H Y, SU R, et al. FTO plays an oncogenic role in acute myeloid leukemia as a N(6)-methyladenosine RNA demethylase[J]. Cancer Cell, 31(1): 127-141.

[13] ZHANG Z, ZHOU D, LAI Y, et al. Estrogen induces endometrial cancer cell proliferation and invasion by regulating the fat mass and obesity-associated gene via PI3K/AKT and MAPK signaling pathways[J]. Cancer Letters, 2012, 319(1): 89-97.

[14] XU D, SHAO W W, JIANG Y S, et al. FTO expression is associated with the occurrence of gastric cancer and prognosis[J]. Oncol Rep, 2017, 38(4): 2285-2292.

[15] LEWIS S J, MURAD A, CHEN L, et al. Associations between an obesity related genetic variant (FTO rs9939609) and prostate cancer risk[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13485.

[16] HUANG X Y, ZHAO J, YANG M Y, et al. Association between FTO gene polymorphism (rs9939609 T/A) and cancer risk: a meta-analysis[J]. Eur J Cancer Care (Engl), 2017, 26(5): 9-11.

[17] NOCK N L, PLUMMER S J, THOMPSON C L, et al. FTO polymorphisms are associated with adult body mass index (BMI) and colorectal adenomas in African-Americans[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(5): 748-56.

(收稿日期: 2021-10-22 修回日期: 2022-02-18)