

· 论著 · 一次研究 ·

PCSK9 调控前列腺癌细胞生物学功能和铁死亡敏感性的作用研究



王诗淳, 史明慧, 王丹琦, 习舒, 崔金龙, 刘姝言, 袁帅, 靳英辉

武汉大学中南医院循证与转化医学中心 (武汉430071)

【摘要】目的 探讨前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (PCSK9) 在前列腺癌 (PCa) 中的生物学功能及其对铁死亡敏感性的影响, 以期为 PCa 的治疗提供新的思路。**方法** 利用生物信息学分析 PCSK9 与 PCa 预后的关系, 并利用 RT-qPCR 检测 PCa 细胞系中 PCSK9 的表达情况。利用 siRNA 构建干扰 PCSK9 的 PCa 细胞, 通过 CCK-8 实验和 Transwell 实验分析 PCSK9 在体外对细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响。利用癌症治疗反应门户 (CTRP) 分析 PCSK9 与铁死亡药物敏感性的相关性, 并通过铁死亡诱导剂 (RSL3) 处理 PCa 细胞, 检测细胞敲低 PCSK9 后对铁死亡诱导剂敏感性的变化。**结果** 生物信息学分析显示, PCSK9 低表达患者具有较长的癌症特异性生存期 ($P < 0.05$)。体外实验结果表明, 敲低 PCSK9 的表达能显著抑制 PCa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力 ($P < 0.001$)。此外, CTRP 分析显示细胞对铁死亡诱导剂的敏感性与 PCSK9 的表达水平相关; PCSK9 敲低细胞对铁死亡诱导剂 RSL3 展现出更高的敏感性。**结论** 敲低 PCSK9 抑制 PCa 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并增加细胞对铁死亡诱导剂的敏感性, 有望为 PCa 的治疗提供新的思路。

【关键词】 前列腺癌; 前蛋白转化酶枯草溶菌素 9; 增殖; 迁移; 侵袭; 铁死亡

【中图分类号】 R 737.25 **【文献标识码】** A

The role of PCSK9 in regulating the biological function and ferroptosis sensitivity of prostate cancer cells

WANG Shichun, SHI Minghui, WANG Danqi, XI Shu, CUI Jinlong, LIU Shuyan, YUAN Shuai, JIN Yinghui

Center for Evidence-Based and Translational Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding authors: JIN Yinghui, Email: jinyinghui0301@163.com; YUAN Shuai, Email: yuanshuai021@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To investigate the biological function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) in prostate cancer (PCa) and its effect on ferroptosis sensitivity. **Methods** Bioinformatics was used to analyze the relationship between the expression of PCSK9 and the prognosis of prostate cancer. The expression of PCSK9 in PCa cell lines were detected using RT-qPCR. PCa cells with PCSK9 knockdown were constructed using siRNA, and the effect of PCSK9 on cell proliferation, migration, and invasion were detected using CCK-8 assays.

DOI: 10.12173/j.issn.1005-0698.202411088

基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目 (2023AFB742)

通信作者: 靳英辉, 博士, 副教授, 博士研究生导师, Email: jinyinghui0301@163.com

袁帅, 博士, 副教授, Email: yuanshuai021@whu.edu.cn

and Transwell assays. The Cancer Therapeutics Response Portal (CTRP) was employed to investigate the correlation between PCSK9 and ferroptosis drug sensitivity, and PCa cells with PCSK9 knockdown were treated with the ferroptosis inducer (RSL3) to detect the sensitivity to ferroptosis. **Results** Bioinformatics showed low expression of PCSK9 had longer disease specific survival ($P<0.05$). The results of the *in vitro* experiments showed that PCSK9 knockdown significantly inhibited the proliferation, migration, and invasion of PCa cells ($P<0.001$). Furthermore, CTRP analysis showed that cellular sensitivity to ferroptosis inducers correlated with the expression level of PCSK9. PCSK9 knockdown cells exhibited higher sensitivity to the ferroptosis inducer RSL3. **Conclusion** Knockdown of PCSK9 inhibits the proliferation, migration, and invasion of PCa cells, and increases the sensitivity of cells to ferroptosis inducers. PCSK9 may provide new insights for the treatment of PCa.

【Keywords】 Prostate cancer; Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; Proliferation; Migration; Invasion; Ferroptosis

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是全球男性中第二常见的癌症类型^[1]。我国 PCa 的发病率逐年升高, 其中超过半数的患者初诊时已经发生转移^[2]。雄激素剥夺疗法 (androgen deprive therapy, ADT) 是主要的治疗方法, 但 ADT 治疗 18~24 个月后, 大部分患者会从激素敏感性 PCa 进展为转移性去势抵抗性 PCa (metastatic castration resistant prostate cancer, mCRPC)^[3]。mCRPC 的恶性程度高, 肿瘤异质性大, 容易产生治疗抵抗导致治疗失败^[4]。因此, 亟需探索新的治疗策略以改善 PCa 患者的预后。

前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 是前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶家族的第 9 个成员, 因其在胆固醇代谢调节中的关键作用及其对心血管疾病的影响而受到广泛关注^[5-6]。PCSK9 不仅调节脂质代谢, 还涉及炎症反应、病毒感染、肿瘤进展及免疫检查点调节等多个生物学过程^[7-8]。在肿瘤进展中, PCSK9 可以促进食管癌、肝癌、结直肠癌等恶性肿瘤细胞的增殖和迁移^[9-11]; 敲低 PCSK9 可以促进肺腺癌和胃癌细胞的凋亡^[12-13]; 下调 PCSK9 表达能抑制头颈部鳞状细胞癌的肿瘤干性^[14]。PCSK9 正逐渐成为多种恶性肿瘤的生物标志物, 并有望成为新的治疗靶点。

铁死亡作为一种新型程序性细胞死亡方式, 其特征为铁依赖性和脂质过氧化积累^[15]。PCSK9 通过降解低密度和极低密度脂蛋白受体, 抑制载脂蛋白 B 降解等方式调节细胞的脂质代谢^[16]。由于铁死亡与脂质过氧化密切相关, PCSK9 对脂质代谢的调控可能对铁死亡的敏感性产生影响。在

肝癌中, 抑制 PCSK9 可以促进肿瘤细胞发生铁死亡^[17]。然而, 目前尚不清楚 PCSK9 是否与 PCa 细胞铁死亡相关。

诱导细胞发生铁死亡被认为是应对肿瘤治疗抵抗的新策略^[18]。诱导铁死亡不仅能直接抑制肿瘤细胞的生长, 还能增强免疫治疗效果^[19]。许多恶性肿瘤如多发性骨髓瘤、乳腺癌、卵巢癌、及胆管癌等均被认为是铁死亡敏感的肿瘤类型^[20-21]。肿瘤中多种基因和信号通路在调控细胞生物学功能的同时, 对细胞铁死亡也具有重要的调控作用。如 Yes 相关蛋白 /PDZ 结合基序转录共激活因子信号通路不仅调控肿瘤细胞增殖和分化, 还可通过细胞密度改变肿瘤细胞对铁死亡的敏感性^[22]。Kruppel 样因子 2 通过上调谷胱甘肽过氧化物酶 4 增强细胞的抗氧化能力, 抑制肿瘤细胞迁移和侵袭的同时, 降低细胞对铁死亡的敏感性^[23]。基于此, 本研究探讨 PCSK9 对 PCa 细胞功能的影响及其与铁死亡药物敏感性之间的关联性, 以期 PCa 的临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Sorvall Micro 17/17R 微量离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific)、NanoDrop One 超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific)、1300 生物安全柜 (美国 Thermo Fisher Scientific)、细胞培养孵箱 (美国 Thermo Fisher Scientific)、L2-6K 台式低速离心机 (中国湖南可成仪器设备有限公司)、IC1000 细胞计数仪 (中国 Countstar)、S1000 Thermal Cycler PCR 仪 (美国 Bio-Rad)、

CFX Connect PCR 仪(美国 Bio-Rad)、倒置荧光显微镜(日本 Olympus)、Alliance Q9 化学发光凝胶成像仪(英国 Uvitec)。

RPMI 1640 细胞培养液(批号: 61240203)、F-12K Nutrient Mixture (1X) 培养基(批号: 2956325)、DMEM 高糖培养基(批号: 6124110)均购自美国 Gibco; 0.25% 胰酶(批号: 2995340)购自美国 Gibco; 胎牛血清(批号: 2428321)购自中国达特希尔生物科技; 青霉素-链霉素-两性霉素 B 溶液(批号: A069241015)购自中国碧云天。Eastep 总 RNA 提取试剂盒(批号: 0000604674)购自上海 Promega; 逆转录试剂盒(批号: AN70490A)购自日本 TaKaRa; PCR 引物序列由上海生工合成; (1S, 3R)-RSL3(批号: HY-100218A)购自美国 MCE; CCK8 试剂盒(批号: PH600)购自日本 Dojindo; Transwell 小室(批号: 1322010)购自美国 Corning; 结晶紫染色液(批号: 111621220401)购自中国碧云天; siRNA 购自苏州吉玛基因; Lipofectamine 2000(批号: 2856134)购自美国 Thermo Fisher Scientific; Opti-MEM(批号: 2962140)购自美国 Gibco; PCSK9 抗体(批号: ab181142)购自英国 Abcam; RIPA 裂解液(批号: A034240830)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(批号: 123022230511)购自中国碧云天; 5×SDS 上样缓冲液(批号: 21050195)购自中国 Biosharp; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(批号: CR2212109)购自武汉塞维尔; 10×TBST 缓冲液(批号: 241705001)购自中国 Solarbio; PAGE 凝胶快速制备试剂盒(10%, 批号: 038C11500)购自中国雅酶; PVDF 膜(批号: 0000342136)购自美国 Bio-Rad; 特超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号: 103122230516)购自中国碧云天。

1.2 细胞

前列腺癌细胞系(22RV1、C4-2、PC3、DU145)来源于中国科学院细胞库或武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养与转染

22RV1、C4-2 细胞在含有 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 1640 培养液中培养, PC3 细胞在含有 10% FBS 的 F-12K 培养液中培养, DU145 细胞在含有 10% FBS 的 DMEM 培养

液中培养。所有细胞在 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 2~3 代, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

设置阴性对照组(si-NC)及实验组 siRNA-PCSK9(siRNA-605、948、1536 及 2239), 6 孔板中每孔接种 2×10^5 个细胞。铺板 24 h 后, 在无血清的培养基中使用 Lipofectamine 2000 进行转染, 转染 48 h 后采用 RT-qPCR 法检测 mRNA 表达, 并在转染 72 h 后进行 Western Blot 检测干扰效率。siRNA-605: GCGAUACCUCACCAAGAUCTT; siRNA-948: CAGCAAGUGUGACAGUCAUTT; siRNA-1536: CCACUUCUCUGCCAAAGAUCTT; siRNA-2239: GACAACACGUGUGUAGUCATT; NC: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT。

1.3.2 细胞总 RNA 提取及实时荧光定量 PCR

根据 Eastep 总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 采用分光光度仪对获得的 RNA 进行定量及纯度鉴定。参照 PrimeScript RT 试剂盒的说明书, 取 1 μg RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 qPCR 扩增。PCR 反应液包括 12.5 μL 的 Genious 2X SYBR Green Fast qPCR、1 μL 的 PCR 上游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、1 μL 的 PCR 下游引物($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、1 μL 的 cDNA 溶液和 9.5 μL 的去离子水, 总体积为 25 μL。将上述反应液置于 PCR 仪中进行反应, 反应条件如下: ① 95 ℃ 预变性 30 s; ② PCR 反应(循环 40 次): 95 ℃ 反应 5 s、60 ℃ 反应 30 s。PCSK9 上游引物序列为 5'-GACACCAGCATACAGAGTGACC-3', 下游引物序列为 5'-GTGCCATGACTGTCACACTTGC-3'; 内参基因 GAPDH 上游引物序列为 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3', 下游引物序列为 5'-CAAA GTTGTCATGGATGACC-3'。采用 $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 法计算各目的基因 mRNA 相对表达量。

1.3.3 蛋白免疫印迹

将 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂按照 50 : 1 : 1 的比例制备蛋白裂解液, 混匀后冰上裂解细胞 30 min, 4 ℃ 条件下 $13\,000 \times g$ 离心 30 min 后取上清, 并与适量 5×SDS 上样缓冲液混匀, 100 ℃ 煮沸 10 min; 配置 10% SDS-PAGE 分离胶, 泳道中加入蛋白样, 80 V 电泳 30 min, 150 V 电泳 60 min; 235 mA 转膜 100 min 将蛋白转至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。

一抗 (GAPDH 抗体 1:1 000 稀释、PCSK9 抗体 1:5 000 稀释) 4 ℃ 过夜孵育; 次日用三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (tris-borate-sodium tween-20, TBST) 室温洗膜 3 次, 每次 10 min; 室温孵育二抗 (1:10 000 稀释) 1 h; TBST 室温洗膜 3 次, 每次 10 min; 借助 ECL 发光液使蛋白条带在化学发光凝胶成像仪中显影; Image J 软件对所得图片进行灰度分析。

1.3.4 细胞增殖实验

实验分为 si-NC、si-948 及 si-1536 组。细胞转染 24 h 后种于 96 孔板中, 按照 CCK-8 试剂说明书进行浓度配比 (配比 1:10), 避光加入后反应 2 h, 并每间隔 24 h 加入配比试剂, 测定各时间点 450 nm 处的吸光度 (absorbance, *A*) 值, 并记录数据。每组设立 3 个复孔。

1.3.5 细胞迁移实验

实验分为 si-NC、si-948 及 si-1536 组。提前在 24 孔板下层加入 500 μL 含有血清的培养基。细胞消化离心后使用无血清培养基重悬, 以每 100 μL 3 万个的细胞密度加入 Transwell 小室上层, 孵育 18 h。取出 Transwell 小室, 棉签擦净小室上层细胞, 甲醇固定 15 min 后风干, 结晶紫染色 15 min。用显微镜观察, 每个小室取 5 个视野进行拍照分析。每组设立 3 个复孔。

1.3.6 细胞侵袭实验

实验分组同上, 基质胶铺在 Transwell 小室上层, 小室下层加入 500 μL 含有血清的培养基。细胞消化离心后使用无血清培养基重悬, 以每 100 μL 4 万个的细胞密度加入 Transwell 小室上层, 孵育 24 h。后续步骤同迁移实验。每组设立 3 个复孔。

1.3.7 生物信息学分析

在仙桃学术平台 (<https://www.xiantaozi.com/products/apply>) 上获取 498 例 TCGA 数据库中 PCa 患者的 mRNA 表达水平及临床信息, 并利用仙桃学术平台进行 PCSK9 与 PCa 患者预后的生存曲线分析。

根据基因集癌症分析平台 (GSCA, <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/GSCA/#/>) 综合分析 PCSK9 与多种药物耐药性之间的关系; 根据癌症治疗反应门户 (CTRP, <https://portals.broadinstitute.org/ctrp/>) 分析 PCSK9 对铁死亡诱导剂 (ML162、ML210 和 RSL3) 的耐药性的相关性。

1.3.8 耐药实验

将转染后的细胞铺至 96 孔板, 每孔 3×10^3 个细胞; 24 h 后用铁死亡诱导剂 RSL3 (0、0.25、0.5、1、2、4 μmol · L⁻¹) 处理细胞。72 h 后, 加入 CCK-8 试剂 37 ℃ 孵育 120 min 检测光密度 (optical density, OD) 值, 并计算细胞相对存活率 (%)。每组设立 3 个复孔。

1.4 统计学分析

采用 GraphPad prism 8.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间比较采用两独立样本配对 *t* 检验, 多组比较采用单因素方差分析。基因表达与铁死亡药物抵抗性之间的相关性采用 Pearson 相关分析。检验水准为 $\alpha=0.05$, 所有检验均采用双侧检验。

2 结果

2.1 PCSK9 高表达患者比低表达患者具有更差的预后

在仙桃学术平台中, 根据 PCSK9 mRNA 表达水平的中位数, 将 PCa 患者分为高表达组和低表达组。结果显示, 低表达组患者的总生存期优于高表达组患者, 但差异没有统计学意义 ($P=0.100$, 图 1-A)。由于 PCa 进展缓慢, 患者可能死于其他原因而非 PCa 本身, 同时后续治疗效果也可能影响总生存期, 因此进一步分析疾病特异生存期这一结局指标。低表达组患者的疾病特异生存期显著优于高表达组患者 ($P<0.05$) (图 1-B)。提示 PCSK9 可作为 PCa 预后的生物标志物。

2.2 PCSK9 在 PCa 细胞中的表达及敲低细胞株的构建

为探究 PCSK9 的体外生物学功能, 首先使用 RT-qPCR 在 4 个 PCa 细胞系中测量其表达水平。在 22RV1、C4-2、PC3、DU145 四种细胞系中, PC3 和 DU145 细胞的 PCSK9 mRNA 表达量较高, 故选择这两种细胞进行敲低 PCSK9 的细胞功能实验 (图 2-A)。

与对照组相比, 转染的 4 个 siRNA 在 PC3 和 DU145 细胞中表达量均降低, 差异有统计学意义 ($P<0.0001$), 见图 2-B、图 2-C 和表 1, 表明敲低成功。此外, 进行 Western Blot 分析 PCSK9 敲低后蛋白水平的变化, 结果发现两种细胞转染 si-948 和 si-1536 后 PCSK9 蛋白水平均降

低较多（图 2-D）。基于上述结果，选择 4 组中 PCSK9 mRNA 表达量和蛋白水平敲低效果较明显的 si-948 和 si-1536 组进行后续生物学功能实验。

2.3 敲低PCSK9后抑制PCa细胞增殖

在转染 siRNA 后进行 CCK-8 实验，检测 PCa 细胞增殖情况。CCK-8 结果显示，在 5 d 时间

内，si-948和si-1536 组的 A_{450} 显著低于si-NC 组（ $P < 0.001$ ），表明敲低 PCSK9 抑制 DU145 和 PC3 细胞的增殖活性（图 3、表 2）。

2.4 敲低PCSK9后抑制PCa细胞迁移和侵袭

进一步探索敲低 PCSK9 对 PCa 细胞迁移和侵

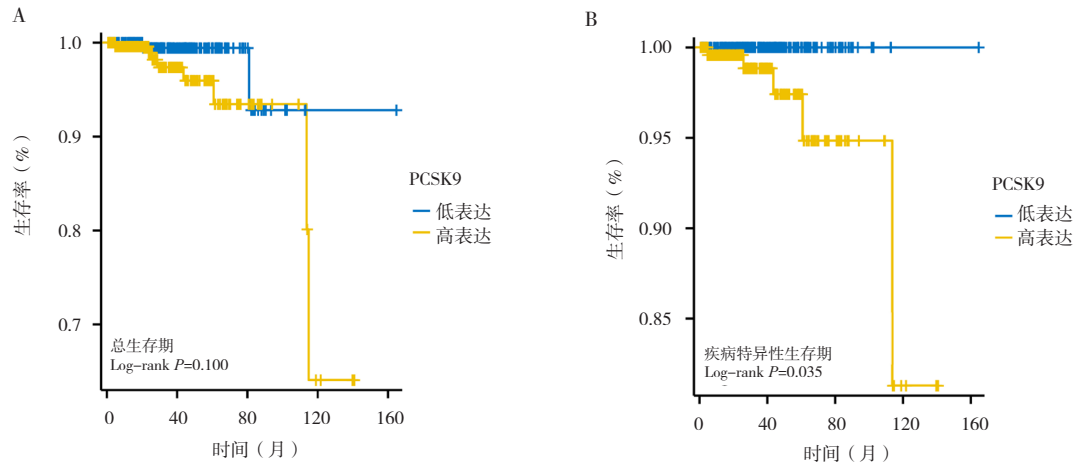


图1 PCSK9 mRNA的表达量与PCa总生存期和疾病特异生存期的关系

Figure 1. The relationship between PCSK9 mRNA expression and overall survival and disease specific survival in prostate cancer patients

注：A. 为总生存期；B. 为疾病特异生存期。

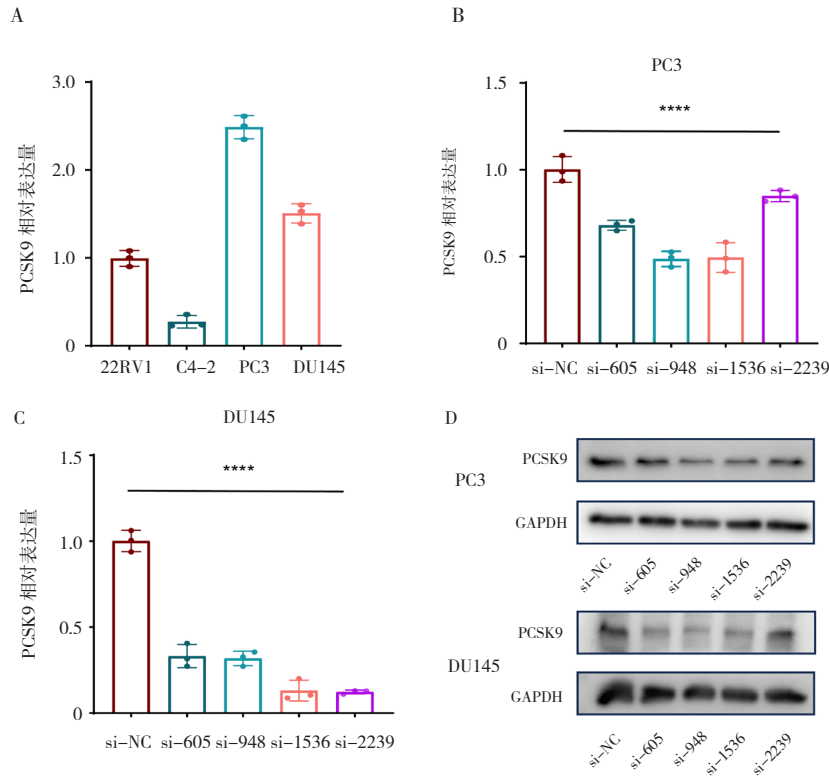


图2 PCSK9在前列腺癌细胞中的表达及其敲低效果验证

Figure 2. PCSK9 expression in prostate cancer cells and the effect of its knockdown

注：A. 为 4 种 PCa 细胞系中 PCSK9 的 mRNA 表达水平；B、C. 为敲除 PCSK9 后 PC3 和 DU145 细胞中 PCSK9 mRNA 表达量；D. 为 Western blot 检测 PC3 和 DU145 细胞中 PCSK9 蛋白水平；与 si-NC 组比较，**** $P < 0.0001$ 。

袭的影响。Transwell 迁移结果显示，与 si-NC 组相比，si-948 和 si-1536 组中 DU145 ($P < 0.001$) 和 PC3 ($P < 0.001$) 细胞迁移水平显著降低 (图4-A、图 4-B、图 4-C 和表 3)。Transwell 侵袭实验显示，与 si-NC 组相比，si-948 和 si-1536 组 DU145 ($P < 0.001$) 和 PC3 ($P < 0.000 1$) 细胞侵袭水平显著降低 (图 4-D、图 4-E、图 4-F 和表 3)。以上结果表明敲低 PCSK9 可以抑制 PCa 细胞迁移和侵袭。

2.5 细胞对铁死亡诱导剂的敏感性与 PCSK9 相关

通过 GSCA 数据库综合分析了 PCSK9 与多种药物抵抗性的相关性。结果发现肿瘤细胞中，PCSK9 与多种铁死亡诱导剂 (RSL3、ML162 和 ML210) 耐药性正相关 (图 5-A)。

进一步通过 CTRP 具体分析 PCSK9 与 3 种铁死亡诱导剂之间的相关性，通过 Pearson 相关系数进一步说明，在多种肿瘤中 PCSK9 的表达与对

表1 PC3和DU145细胞转染siRNA后PCSK9 mRNA相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Figure 1. Relative expression levels of PCSK9 mRNA in PC3 and DU145 transfected with siRNA ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

si-RNA	PC3	P值 (单因素方差分析)	DU145	P值 (单因素方差分析)
si-NC	1.002 ± 0.074		1.001 ± 0.063	
si-605	0.680 ± 0.028		0.331 ± 0.067	
si-948	0.486 ± 0.044	$P < 0.000 1$	0.318 ± 0.042	$P < 0.000 1$
si-1536	0.495 ± 0.085		0.131 ± 0.060	
si-2239	0.849 ± 0.033		0.123 ± 0.011	

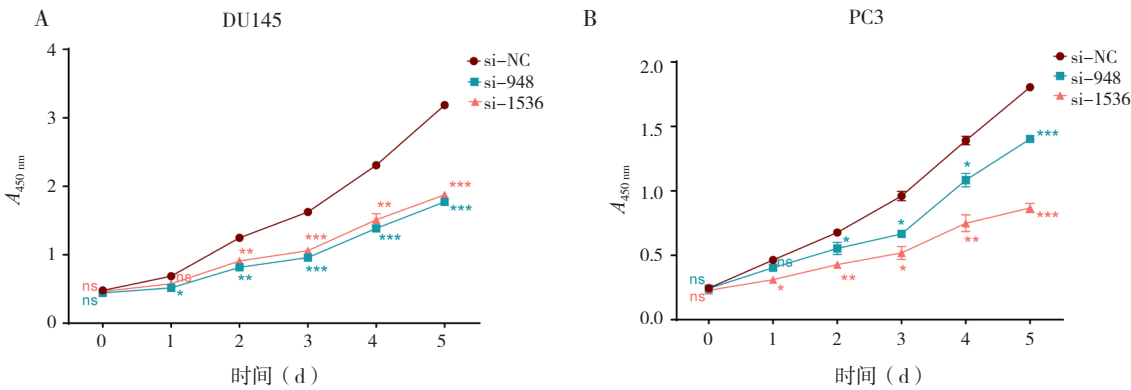


图3 敲低PCSK9对前列腺癌细胞增殖能力的影响

Figure 3. Effect of PCSK9 knockdown on proliferation of prostate cancer cells

注：A. 为CCK-8法检测DU145细胞si-NC组、si-948和si-1536组细胞增殖能力；B. 为CCK-8法检测PC3细胞si-NC组、si-948和si-1536组细胞增殖能力；与si-NC组比较，ns表示 $P > 0.05$ ，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

表2 敲低PCSK9后各组细胞增殖结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 2. Statistics of cell proliferation results in each group after knockdown of PCSK9 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

时间	DU145					PC3				
	si-NC	si-948	P值 (si-948 vs. si-NC)	si-1536	P值 (si-1536 vs. si-NC)	si-NC	si-948	P值 (si-948 vs. si-NC)	si-1536	P值 (si-1536 vs. si-NC)
0 d	0.478 ± 0.032	0.443 ± 0.037	0.283	0.465 ± 0.019	0.568	0.245 ± 0.008	0.242 ± 0.001	0.509	0.227 ± 0.013	0.058
1 d	0.687 ± 0.033	0.516 ± 0.004	0.015	0.577 ± 0.026	0.077	0.463 ± 0.027	0.403 ± 0.014	0.108	0.311 ± 0.015	0.021
2 d	1.247 ± 0.021	0.816 ± 0.028	0.003	0.909 ± 0.039	0.001	0.677 ± 0.028	0.553 ± 0.047	0.035	0.427 ± 0.015	0.005
3 d	1.623 ± 0.017	0.958 ± 0.005	<0.001	1.060 ± 0.030	<0.001	0.960 ± 0.037	0.665 ± 0.027	0.014	0.518 ± 0.050	0.013
4 d	2.308 ± 0.035	1.385 ± 0.052	<0.001	1.510 ± 0.086	0.007	1.391 ± 0.033	1.083 ± 0.052	0.022	0.748 ± 0.065	0.006
5 d	3.185 ± 0.056	1.772 ± 0.030	<0.001	1.876 ± 0.044	0.004	1.804 ± 0.018	1.402 ± 0.018	<0.001	0.867 ± 0.036	<0.001

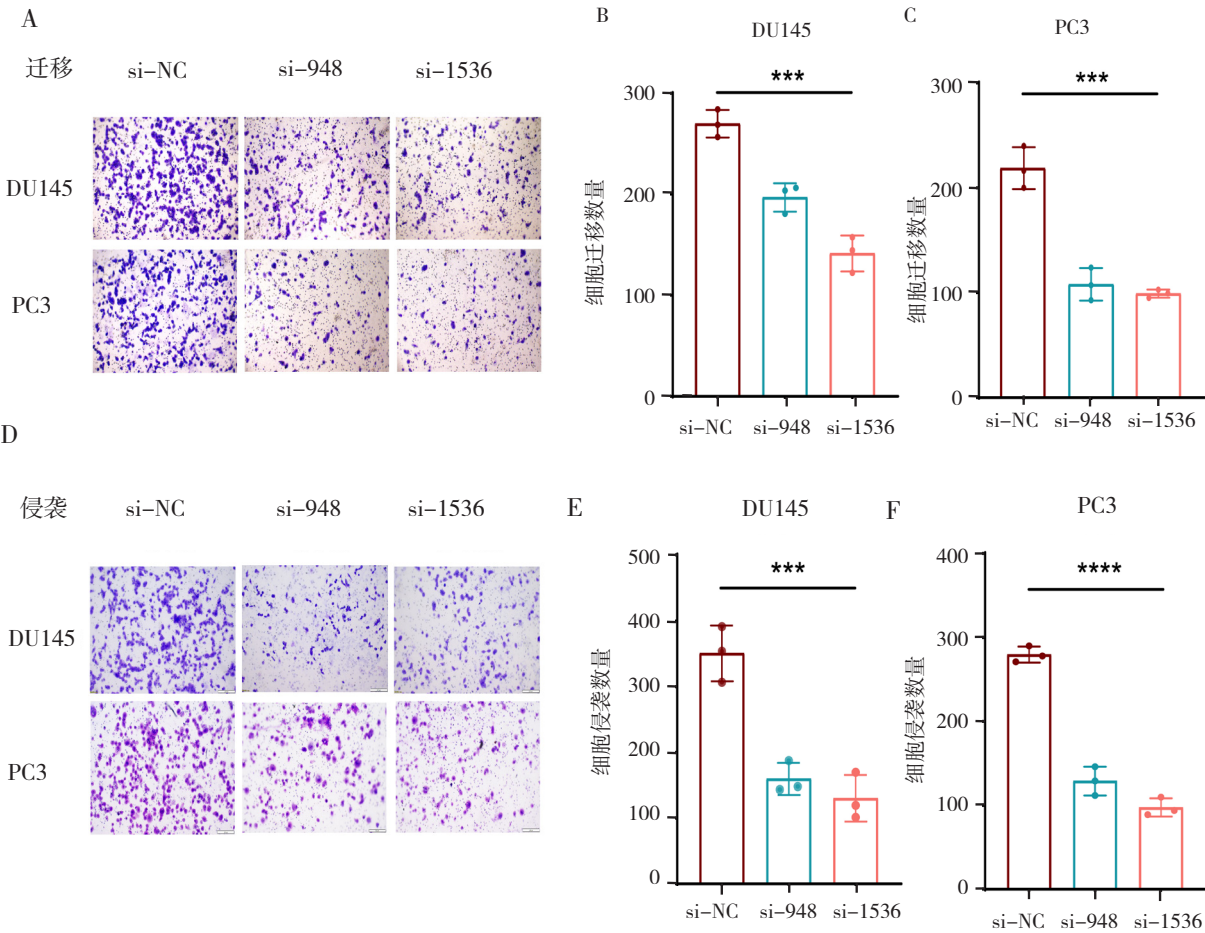


图4 敲低PCSK9对前列腺癌细胞迁移和侵袭的影响

Figure 4. Effect of PCSK9 knockdown on migration and invasion of prostate cancer cells

注：A. 为敲低PCSK9后DU145和PC3细胞迁移能力（20×）；B. 为DU145细胞迁移统计直方图；C. 为PC3细胞迁移统计直方图；D. 为敲低PCSK9后DU145和PC3细胞侵袭能力（20×）；E. 为DU145细胞侵袭统计直方图；F. 为PC3细胞侵袭统计直方图；与si-NC组比较，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ 。

表3 敲低PCSK9前列腺癌细胞迁移和侵袭的结果（ $\bar{x} \pm s, n=3$ ）

Table 3. Statistics of the migration and invasion results of PCSK9 knockdown prostate cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

si-RNA	DU145	P值（单因素方差分析）	PC3	P值（单因素方差分析）
迁移				
si-NC	269.800 ± 13.727	0.000 1	218.767 ± 20.114	0.000 1
si-948	196.867 ± 13.975		108.000 ± 15.615	
si-1536	141.400 ± 17.692		99.100 ± 3.915	
侵袭				
si-NC	350.667 ± 42.387	0.000 5	280.200 ± 9.897	<0.000 1
si-948	159.667 ± 24.300		129.200 ± 16.901	
si-1536	130.133 ± 35.396		98.133 ± 10.986	

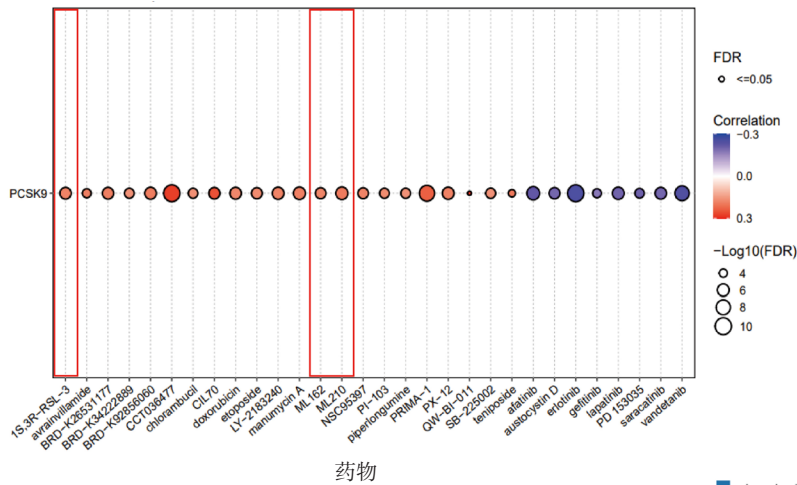
铁死亡药物抵抗性呈正相关（图 5-B）。

2.6 敲低PCSK9后PCa细胞对RSL3敏感性增加

利用不同浓度铁死亡诱导剂 RSL3（0、0.25、

0.5、1、2、4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）处理转染后的 DU145 和 PC3 细胞，结果 PCSK9 敲低细胞表现出对铁死亡诱导剂 RSL3 更高的敏感性（图 6 和表 4），提示敲低 PCSK9 更容易诱发 PCa 细胞发生铁死亡。

A CTRP药物敏感性与mRNA表达的相关性



B Pearson相关系数: 0.218 Pearson相关系数: 0.195 Pearson相关系数: 0.175

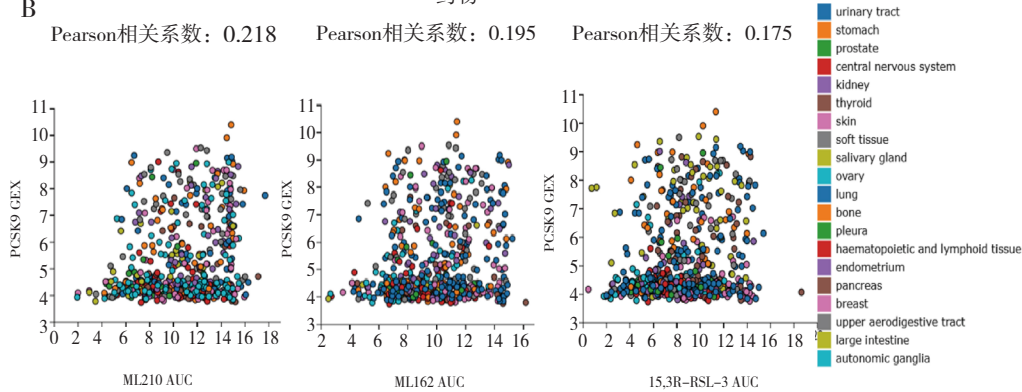


图5 PCSK9与铁死亡的相关性

Figure 5. The relationship between PCSK9 and ferroptosis

注: A. 为在GSCA中, PCSK9与多种药物抵抗性的相关性; B. 为在CTRP中, PCSK9的表达与对铁死亡诱导剂ML210、ML162和RSL3抵抗性的相关性; Pearson相关系数表示两者之间的相关程度, 正相关表明较高的基因表达可能导致耐药, 负相关表明较高的基因表达可能导致药物更敏感; GEX (gene expression) 表示基因表达量; AUC (area under curve) 为每个化合物与肿瘤细胞系间浓度-反应曲线下面积。

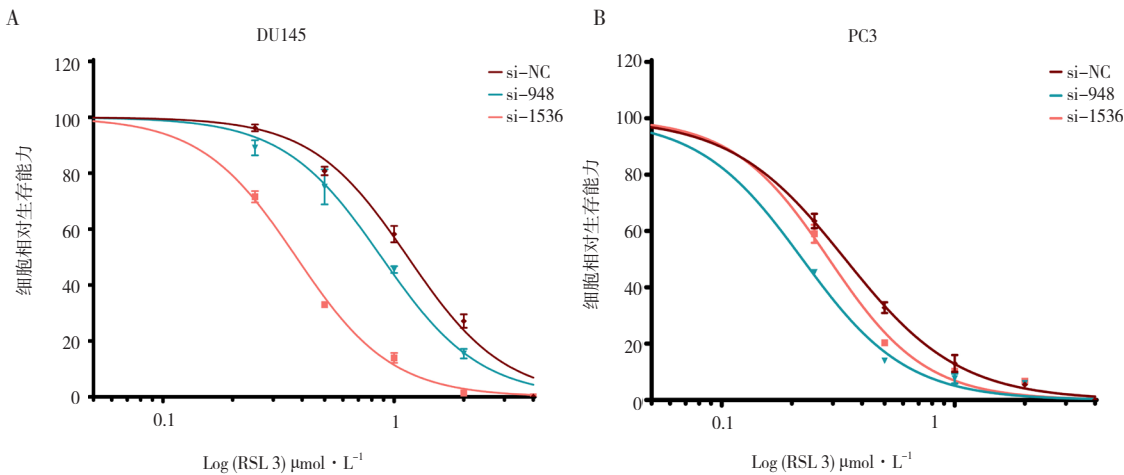


图6 敲低PCSK9后PCa细胞对RSL3的敏感性变化

Figure 6. Changes in sensitivity of prostate cancer cells to RSL3 after knockdown of PCSK9

注: A. 为CCK-8法检测DU145细胞si-NC组、si-948和si-1536组对RSL3的敏感性; B. 为CCK-8法检测PC3细胞si-NC组、si-948和si-1536组对RSL3的敏感性。

表4 敲低PCSK9后DU145和PC3细胞对RSL3的敏感性变化结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Figure 4. Statistical results of changes in sensitivity of DU145 and PC3 to RSL3 after PCSK9 knockdown ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

si-RNA	RSL3 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)					
	0	0.25	0.5	1	2	4
DU145						
si-NC	1.945 $\pm$ 0.028	1.886 $\pm$ 0.019	1.645 $\pm$ 0.024	1.239 $\pm$ 0.046	0.808 $\pm$ 0.037	0.385 $\pm$ 0.017
si-948	1.578 $\pm$ 0.084	1.443 $\pm$ 0.058	1.270 $\pm$ 0.135	0.903 $\pm$ 0.034	0.530 $\pm$ 0.048	0.338 $\pm$ 0.023
si-1536	1.891 $\pm$ 0.070	1.442 $\pm$ 0.056	0.833 $\pm$ 0.020	0.532 $\pm$ 0.063	0.334 $\pm$ 0.018	0.312 $\pm$ 0.039
PC3						
si-NC	1.584 $\pm$ 0.044	1.068 $\pm$ 0.068	0.599 $\pm$ 0.036	0.361 $\pm$ 0.073	0.255 $\pm$ 0.008	0.179 $\pm$ 0.006
si-948	1.595 $\pm$ 0.018	0.864 $\pm$ 0.021	0.450 $\pm$ 0.010	0.367 $\pm$ 0.040	0.344 $\pm$ 0.020	0.266 $\pm$ 0.037
si-1536	1.208 $\pm$ 0.045	0.792 $\pm$ 0.055	0.411 $\pm$ 0.002	0.311 $\pm$ 0.008	0.276 $\pm$ 0.018	0.211 $\pm$ 0.014

3 讨论

本研究通过生物信息学分析发现 PCSK9 与 PCa 患者预后密切相关，提示 PCSK9 可能参与 PCa 的发生发展。细胞生物学功能研究发现，干扰 PCSK9 表达后，PCa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力均受到显著抑制。同时，干扰 PCSK9 也可增加 PCa 细胞对铁死亡诱导剂 RSL3 的敏感性。本研究结果不仅证实了敲低 PCSK9 对 PCa 细胞恶性生物学行为的抑制作用，而且初步揭示了 PCSK9 在 PCa 中与铁死亡的相关性，为靶向 PCSK9 的临床治疗提供了新的思路。

PCSK9 作为一种关键的胆固醇代谢调节因子，不仅在治疗血脂异常方面作用显著，也是肿瘤治疗的新希望^[24]。多项研究^[25]表明 PCSK9 与肿瘤生物学有关。在肝癌中，PCSK9 通过脂肪酸合酶（fatty acid synthase, FASN）/B 淋巴细胞瘤-2-Associated X 的蛋白质（Bcl2-associated X, Bax）/B 淋巴细胞瘤-2（B-cell lymphoma-2, Bcl-2）/胱天蛋白酶（caspase）9/caspase 3 通路抑制肿瘤细胞凋亡^[26]；在胃癌中，PCSK9 通过上调热休克蛋白 70（heatshockprotein70, HSP70）来促进丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase, MAPK）信号传导通路，促进细胞侵袭^[13]；PCSK9 也可以通过调节上皮间质转化（epithelial-mesenchymal transition, EMT）和磷脂酰肌醇 3 激酶（phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K）/蛋白激酶 B（Akt）信号传导促进结肠癌细胞进展和转移^[27]；PCSK9 还可以通过内质网应激和线粒体信号通路调节肺腺癌 A549 细胞凋亡^[12]。本研究中，PCSK9 表达的降低可明显抑制 PCa 细胞的增殖、迁移和侵袭能力，与其他类

型癌症的研究结果一致。除以上机制外，这也可能与 PCSK9 促进低密度脂蛋白受体降解，调节细胞内胆固醇水平和影响细胞膜流动性中的作用有关^[28]。胆固醇水平的改变可以操纵脂筏并影响肿瘤的发展^[29]。在 PCa 中，胆固醇水平的升高会激活 Hedgehog 通路和白细胞介素 6（interleukin 6, IL6）-信号传导-转录激活蛋白 3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）通路等致癌途径促进 PCa 细胞转移^[30-31]。综上，PCSK9 可能通过脂质代谢和非脂质代谢两种途径促进肿瘤的发生发展。

细胞对铁死亡的敏感性高度依赖于细胞的代谢状态^[32]。抑制 PCSK9 可通过提高脂质的摄取，使细胞膜中对脂质过氧化反应敏感的多不饱和脂肪酸含量增加。游离的多不饱和脂肪酸在被氧化前可酯化成膜磷脂，诱导铁死亡信号的发生^[17]。多不饱和脂肪酸的过氧化也会使细胞容易受到铁死亡的影响^[33]。本研究发现，敲低 PCSK9 的 PCa 细胞对铁死亡诱导剂 RSL3 的敏感性显著增加，说明抑制 PCSK9 可以增加细胞对铁死亡的敏感性。

综上所述，本研究证实了 PCSK9 在 PCa 细胞生物学行为中的作用，并揭示了其在调节细胞铁死亡中的潜在作用。未来的研究需要进一步探索敲低 PCSK9 对 PCa 细胞铁死亡影响的具体调控机制，为 PCa 的靶向治疗提供新的思路。

利益冲突声明：作者声明本研究不存在任何经济或非经济利益冲突。

参考文献

1 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[J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229–263. DOI: [10.3322/caac.21834](https://doi.org/10.3322/caac.21834).
- 2 樊博, 齐盼, 苏建志, 等. 河北医科大学第四医院前列腺癌患者的基线特征与生存分析[J]. *中国癌症杂志*, 2020, 30(8): 620–625. [Fan B, Qi P, Su JZ, et al. Baseline characteristics and survival analysis of patients with prostate cancer in the Fourth Hospital of Hebei Medical University[J]. *China Oncology*, 2020, 30(8): 620–625.] DOI: [10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.08.009](https://doi.org/10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.08.009).
- 3 He Y, Xu W, Xiao YT, et al. Targeting signaling pathways in prostate cancer: mechanisms and clinical trials[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 198. DOI: [10.1038/s41392-022-01042-7](https://doi.org/10.1038/s41392-022-01042-7).
- 4 邱衍怡, 周晓辉. 去势抵抗性前列腺癌 (CRPC) 的形成机制及其免疫治疗研究进展[J]. *药学研究*, 2024, 43(7): 671–676. [Qiu YY, Zhou XH. Formation mechanism and research progress on the immunotherapy of castrate-resistant prostate cancer (CRPC)[J]. *Journal of Pharmaceutical Research*, 2024, 43(7): 671–676.] DOI: [10.13506/j.cnki.jpr.2024.07.009](https://doi.org/10.13506/j.cnki.jpr.2024.07.009).
- 5 Cohen JC, Boerwinkle E, Moalelyth JR, et al. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(12): 1264–1272. DOI: [10.1056/NEJMoa054013](https://doi.org/10.1056/NEJMoa054013).
- 6 Hummelgaard S, Vilstrup JP, Gustafsen C, et al. Targeting PCSK9 to tackle cardiovascular disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 249: 108480. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2023.108480](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108480).
- 7 Seidah NG, Prat A. The Multifaceted biology of PCSK9[J]. *Endocr Rev*, 2022, 43(3): 558–582. DOI: [10.1210/endrev/bnab035](https://doi.org/10.1210/endrev/bnab035).
- 8 Sun H, Meng W, Zhu J, et al. Antitumor activity and molecular mechanism of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) inhibition[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2022, 395(6): 643–658. DOI: [10.1007/s00210-022-02200-y](https://doi.org/10.1007/s00210-022-02200-y).
- 9 Wang H, Guo Q, Wang M, et al. PCSK9 promotes tumor cell proliferation and migration by facilitating CCL25 secretion in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2023, 26(5): 500. DOI: [10.3892/ol.2023.14086](https://doi.org/10.3892/ol.2023.14086).
- 10 Alannan M, Trézéguet V, Amoêdo ND, et al. Rewiring lipid metabolism by targeting PCSK9 and HMGCR to treat liver cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 15(1): 3. DOI: [10.3390/cancers15010003](https://doi.org/10.3390/cancers15010003).
- 11 Wong CC, Wu JL, Ji F, et al. The cholesterol uptake regulator PCSK9 promotes and is a therapeutic target in APC/KRAS-mutant colorectal cancer[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3971. DOI: [10.1038/s41467-022-31663-z](https://doi.org/10.1038/s41467-022-31663-z).
- 12 Xu X, Cui Y, Cao L, et al. PCSK9 regulates apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells via endoplasmic reticulum stress and mitochondrial signaling pathways[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(5): 1993–1999. DOI: [10.3892/etm.2017.4218](https://doi.org/10.3892/etm.2017.4218).
- 13 Xu B, Li S, Fang Y, et al. Proprotein convertase subtilisin/Kexin type 9 promotes gastric cancer metastasis and suppresses apoptosis by facilitating MAPK signaling pathway through HSP70 Up-regulation[J]. *Front Oncol*, 2021, 10: 609663. DOI: [10.3389/fonc.2020.609663](https://doi.org/10.3389/fonc.2020.609663).
- 14 Yang QC, Wang S, Liu YT, et al. Targeting PCSK9 reduces cancer cell stemness and enhances antitumor immunity in head and neck cancer[J]. *iScience*, 2023, 26(6): 106916. DOI: [10.1016/j.isci.2023.106916](https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106916).
- 15 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072. DOI: [10.1016/j.cell.2012.03.042](https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042).
- 16 Tang Y, Li SL, Hu JH, et al. Research progress on alternative non-classical mechanisms of PCSK9 in atherosclerosis in patients with and without diabetes[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2020, 19(1): 33. DOI: [10.1186/s12933-020-01009-4](https://doi.org/10.1186/s12933-020-01009-4).
- 17 Alannan M, Fatrouni H, Trézéguet V, et al. Targeting PCSK9 in liver cancer cells triggers metabolic exhaustion and cell death by ferroptosis[J]. *Cells*, 2022, 12(1): 62. DOI: [10.3390/cells12010062](https://doi.org/10.3390/cells12010062).
- 18 习舒, 刘梦洋, 郭梦梦, 等. 肺癌上皮间质转化对铁死亡药物的敏感性研究[J]. *药物流行病学杂志*, 2023, 32(5): 513–521. [Xi S, Liu MY, Guo MM, et al. The effect of epithelial-mesenchymal transition on the sensitivity of ferroptosis inducers in lung cancer[J]. *Chinese Journal of Pharmacoeconomics*, 2023, 32(5): 513–521.] DOI: [10.19960/j.issn.1005-0698.202305005](https://doi.org/10.19960/j.issn.1005-0698.202305005).
- 19 Lei G, Zhuang L, Gan B. The roles of ferroptosis in cancer: tumor suppression, tumor microenvironment, and therapeutic interventions[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(4): 513–534. DOI: [10.1016/j.ccell.2024.03.011](https://doi.org/10.1016/j.ccell.2024.03.011).
- 20 Hushmandi K, Klionsky DJ, Aref AR, et al. Ferroptosis contributes to the progression of female-specific neoplasms, from breast cancer to gynecological malignancies in a manner regulated by non-coding RNAs: mechanistic implications[J]. *Noncoding RNA Res*, 2024, 9(4): 1159–1177. DOI: [10.1016/j.ncrna.2024.05.008](https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2024.05.008).
- 21 Yang M, Li M, Lyu Z, et al. Implication of ferroptosis in Cholangiocarcinoma: a potential future target?[J]. *Cancer Manag Res*, 15: 335–342. DOI: [10.2147/CMAR.S406150](https://doi.org/10.2147/CMAR.S406150).
- 22 Sun T, Chi JT. Regulation of ferroptosis in cancer cells by YAP/TAZ and Hippo pathways: the therapeutic implications[J]. *Genes Dis*, 2020, 8(3): 241–249. DOI: [10.1016/j.gendis.2020.05.004](https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.05.004).
- 23 Lu Y, Qin H, Jiang B, et al. KLF2 inhibits cancer cell migration and invasion by regulating ferroptosis through GPX4 in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2021, 522: 1–13. DOI: [10.1016/j.canlet.2021.09.014](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.09.014).
- 24 Patrono C, Volpe M. PCSK9 inhibition: not just LDL-Cholesterol knock down: a glimmer for cancer[J]. *Eur Heart J*. 2021, 42(12): 1130–1131. DOI: [10.1093/eurheartj/ehab047](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab047).
- 25 Oza PP, Kashfi K. The evolving landscape of PCSK9 inhibition in cancer[J]. *Eur J Pharmacol*. 2023, 949: 175721. DOI: [10.1016/j.ejphar.2023.175721](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175721).
- 26 Zhang SZ, Zhu XD, Feng LH, et al. PCSK9 promotes tumor growth by inhibiting tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2021, 10: 25. DOI: [10.1186/s40164-021-00218-1](https://doi.org/10.1186/s40164-021-00218-1).
- 27 Wang L, Li S, Luo H, et al. PCSK9 promotes the progression and

- metastasis of colon cancer cells through regulation of EMT and PI3K/AKT signaling in tumor cells and phenotypic polarization of macrophages[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 303. DOI: [10.1186/s13046-022-02477-0](https://doi.org/10.1186/s13046-022-02477-0).
- 28 张欣, 汪越, 魏嘉. PCSK9 在肿瘤发生中的作用及其在免疫治疗中的潜在价值 [J]. *中国肿瘤临床*, 2022, 49(11): 572–576. [Zhang X, Wang Y, Wei J. Role of PCSK9 in tumor development and its potential value in immunotherapy[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2022, 49(11): 572–576.] DOI: [10.12354/j.issn.1000-8179.2022.20211882](https://doi.org/10.12354/j.issn.1000-8179.2022.20211882).
- 29 Hryniewicz-Jankowska A, Augoff K, Sikorski AF. The role of cholesterol and cholesterol-driven membrane raft domains in prostate cancer[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2019, 244(13): 1053–1061. DOI: [10.1177/1535370219870771](https://doi.org/10.1177/1535370219870771).
- 30 Kim J, Adam RM, Solomon KR, et al. Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(2): 613–619. DOI: [10.1210/en.2003-0772](https://doi.org/10.1210/en.2003-0772).
- 31 Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis[J]. *Nature*, 2004, 431(7009): 707–712. DOI: [10.1038/nature02962](https://doi.org/10.1038/nature02962).
- 32 Chen X, Li J, Kang R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054–2081. DOI: [10.1080/15548627.2020.1810918](https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1810918).
- 33 Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, et al. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(34): E4966–4975. DOI: [10.1073/pnas.1603244113](https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113).

收稿日期: 2024 年 11 月 28 日 修回日期: 2025 年 03 月 06 日
本文编辑: 冼静怡 周璐敏