

PAK2 磷酸化激活 TRIM28 在前列腺癌进展中的作用机制研究^{*}

吴培康¹ 王可举¹

[摘要] 目的:研究 P21 蛋白活化酶 2(p21-activated protein kinase 2,PAK2)在前列腺癌(prostate cancer,PCa)中的表达水平,并分析 PAK2 与 PCa 患者临床资料及 PCa 进展的相关性,进一步研究及分析 PAK2 磷酸化激活 KRAB 相关蛋白 1 即三重基序蛋白 28(tripartite motif-containing 28,TRIM28)促进 PCa 进展的相关性,阐明 PAK2 在去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer,CRPC)进展中的作用关系,探讨 PAK2 磷酸化激活 TRIM28 通路在 PCa 进展中扮演的角色,为治疗 CRPC 提供方法和思路。**方法:**使用 ONCOMINE 数据库预测 PAK2 在 PCa 组织和癌旁正常组织中的表达差异。分别采用 Western Blot 和 RT-qPCR 检测 PAK2 在收集的临样本(癌旁正常组织和 PCa 组织)中的表达差异。采用免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)检测 PAK2 在前列腺增生(BPH)组织、激素性前列腺癌(androgen dependent prostate cancer,HNPC)组织和 CRPC 组织中的表达差异,通过癌症基因组图谱(the cancer genome atlas,TCGA)数据库预测 PAK2 的不同表达水平对患者疾病无进展的影响差异。使用医学统计学方法收集、整理、分析统计 140 例 PCa 患者的临床病理特征与 PAK2 的关系。利用 GEPIA 数据库预测 TRIM28 与 PAK2 在 PCa 中的相关性。采用 Western Blot 方法检测 PAK2 表达水平的不同对 TRIM28 的磷酸化水平的影响。**结果:**在数据库 ONCOMINE 中显示,PCa 组织中 PAK2 的表达水平高于其在癌旁正常组织中的表达水平,与我们收集的临床组织中的检测结果一致。PAK2 在 PCa 组织中的 RNA 表达水平高于癌旁正常组织的表达水平。同样 PAK2 在 PCa 组织中的蛋白表达水平高于癌旁组织的表达水平。IHC 结果显示 PAK2 在 BPH 组织、HNPC 组织和 CRPC 组织中的表达水平逐渐升高。TCGA 数据库显示,PCa 患者中 PAK2 低表达水平较高表达水平有一个较长的疾病无进展生存期。患者临床资料统计分析得出 PAK2 的表达水平与患者的 PSA 水平、Gleason 评分、临床分期、病理分级、转移、总生存期及疾病的生化复发情况密切相关,患者的 PSA 水平越高,Gleason 评分越高,临床分期及病理分期越高,PAK2 的表达水平越高,患者越容易发生转移及生化复发,患者的生存期越短,反之亦然。GEPIA 数据库显示,PAK2 与 TRIM28 呈正向相关性。荧光素酶报告基因实验显示,只转染 PAK2 过表达组的 SOX2 启动子区活性最高。而转染 PAK2 过表达及敲低 TRIM28 组的 SOX2 启动子区活性低于只转染 PAK2 过表达组,但是明显高于对照组。**结论:**PAK2 在 PCa 中表达水平显著高于癌旁正常组织,在 CRPC 中表达水平最高,并且 PAK2 的表达水平与患者的 PSA 水平、Gleason 评分、临床分期、病理分级、转移、总生存期及疾病的生化复发情况密切相关,与患者年龄无关。PAK2 表达水平可以影响 SOX2 的表达水平,说明 PAK2 可能调节肿瘤细胞的干性来影响疾病进展,PAK2 可以磷酸化激活 TRIM28,活化的 TRIM28 可以增强 SOX2 启动子区的活性,使肿瘤细胞的细胞学行为更为活跃。

[关键词] 去势抵抗性前列腺癌;磷 21 蛋白活化酶 2;三元基序家族蛋白 28;磷酸化;性别决定基因相关高活性群组蛋白 2

DOI:10.13201/j.issn.1001-1420.2023.10.004

[中图分类号] R737.25 [文献标志码] A

Mechanism research of PAK2 phosphorylating TRIM28 in the progression of prostate cancer

WU Peikang WANG Keju

(Department of Urology, Jining No. 2 People's Hospital, Jining, Shandong, 272000, China)

Corresponding author: WANG Keju, E-mail: wangkeju@126.com

Abstract Objective: In order to study the detailed expression level of PAK2 in prostate cancer, we analyzed the correlation between PAK2 and clinical data of prostate cancer patients and the progression of prostate cancer. To further study and analyze the correlation of PAK2 phosphorylation activating TRIM28 to promote the progression of prostate cancer. To elucidate the role of PAK2 in the progression of castration-resistant prostate cancer (CRPC), and explore that PAK2 phosphorylation activation of TRIM28 pathway plays a very important role in the progression of prostate cancer, providing us with new methods and ideas for the treatment of CRPC. **Methods:** We used the ONCOMINE database to predict the difference in PAK2 expression between prostate cancer and nor-

^{*}基金项目:国家自然科学基金面上项目(No:81872079)

¹济宁市第二人民医院泌尿外科(山东济宁,272000)

通信作者:王可举,E-mail:wangkeju@126.com

mal prostate tissue. Western Blot and RT-qPCR were used to detect the difference of PAK2 expression in the collected clinical samples (paracancer tissue and prostate cancer tissue). The expression difference of PAK2 in benign prostatic hyperplasia (BPH) tissues, androgen dependent prostate cancer (HNPC) tissues and CRPC tissues was detected by IHC, and the influence of different expression levels of PAK2 on disease progression was predicted by TCGA database. The relationship between the clinicopathological features and PAK2 in 140 patients with prostate cancer was collected and analyzed by medical statistics. GEPIA database was used to predict the correlation between TRIM28 and PAK2 in prostate cancer. The effects of PAK2 expression levels on TRIM28 phosphorylation were detected by Western Blot. **Results:** In the database ONCOMINE, PAK2 expression levels were shown to be higher in prostate cancer tissues than in paracancer prostate tissues, consistent with the detection results in clinical tissues collected by us. The expression level of PAK2 RNA in prostate cancer tissues was higher than that in paracancer tissues. Similarly, PAK2 protein expression level in prostate cancer tissues was higher than that in paracancer tissues. IHC results showed that PAK2 expression level increased gradually in BPH, HNPC and CRPC tissues. The TCGA database showed that patients with prostate cancer with low PAK2 expression level had a longer progression-free survival than those with high PAK2 expression level. Statistical analysis of clinical data of patients showed that the expression level of PAK2 was closely related to the PSA level, Gleason score, clinical stage, pathological grade, metastasis, overall survival and biochemical recurrence of the disease. The higher the PSA level of patients, the higher the Gleason score, and the higher the clinical stage and pathological stage, the higher the PAK2 expression level. The more likely a patient is to develop metastasis and biochemical recurrence, the shorter the patient's survival, and vice versa. GEPIA database showed that PAK2 was positively correlated with TRIM28. Luciferase reporter gene experiment showed that the activity of SOX2 promoter region was the highest in PAK2 overexpression group. The activity of SOX2 promoter in PAK2 overexpression and TRIM28 knockdown groups was lower than that in PAK2 overexpression group, but significantly higher than that in control group. **Conclusion:** The expression level of PAK2 in prostate cancer was significantly higher than that in paracancer normal tissues, and the expression level of PAK2 was the highest in CRPC. The expression level of PAK2 was closely related to the PSA level, Gleason score, clinical stage, pathological grade, metastasis, overall survival and biochemical recurrence of the disease, but not related to the age of the patient. The expression level of PAK2 can affect the expression level of SOX2, indicating that PAK2 may regulate the dryness of tumor cells, so as to affect the progression of disease. PAK2 can phosphorylate and activate TRIM28, and activated TRIM28 can enhance the activity of SOX2 promoter region, making the cytological behavior of tumor cells more active.

Key words castration-resistant prostate cancer; p21-activated protein kinase 2; tripartite motif-containing 28; phosphorylation; sex determining region Y-box 2

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 上升为世界范围内男性的第二大导致死亡的恶性肿瘤, PCa 是发达国家中最常见的恶性肿瘤之一, 近年来 PCa 在中国的发病率呈急剧上升趋势^[1]。PCa 具有很高的死亡率和发病率。PCa 一旦发生淋巴结和 (或) 其他组织器官转移, 患者的病情提示预后不良, 患者的总生存期极短。截至目前已有许多成熟的治疗 PCa 的手段、方法, 如等待观察治疗和主动监测治疗、外科手术切除治疗、放射放疗、内分泌治疗、化学治疗等。其中雄激素剥夺治疗 (androgen deprivation therapy, ADT) 方法是治疗 PCa 最有效的方法之一, 但是许多患者在治疗过程中常常产生耐药性, 最后导致生化复发发生疾病进展, 发生去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC), 治疗极为困难, 众多患者都在发生转移性 CRPC 阶段死亡^[2]。阐明 CRPC 进展过程的信号通路作用机制及耐药作用机制可为新的治疗方法提供可靠的科学依据。本研究提到的磷 21 蛋白活化激酶 2 (p21-activated protein kinase 2, PAK2) 为 Rho 家族里 GTP 酶的下游效应器, PAK2 可以调控细胞的增殖细胞学行为, 在细胞的运动及细胞的凋亡等许多过程中起到了非常重要

的作用^[3]。PAK2 的功能出现异常时, 会导致多种疾病 (包括肿瘤) 的发生和进展可能。目前已有相关实验研究表明 PAK2 可以参与 PCa 疾病的进展过程, 但机制尚不是特别清楚, 有待进一步深入研究, 这为本研究的开展提供了理论支撑及帮助。

1 材料与方法

1.1 研究对象

本研究中涉及到的 PCa 组织及癌旁、前列腺增生 (benign prostatic hyperplasia, BPH) 组织均来源于天津医科大学第二医院泌尿外科经过手术治疗的患者。有关收集患者手术组织临床标本统一经过天津医科大学第二医院伦理委员会批准并且备案保存患者信息, 所涉及的患者均知情同意。所收集的全部组织样本均经该院 3 名专业病理学医师诊断。本课题研究纳入 140 例患者, 基于该研究所涉及患者的临床相关信息均由医院临床病历系统采集, 包括患者的一般信息 (姓名、年龄、职业、家庭地址、联系电话、主治医师、手术方式等) 和患者病理类型信息 (PSA 水平、Gleason 评分、临床分期、病理分级、相关医学影像、手术记录等), 并且手术 14 d 后, 每 2 周进行随访, 密切跟踪患者治疗情况。随机抽取其中 20 例患者的标本用于基础实验

研究,另收集患者 PCa、癌旁及 BPH 组织标本制作组织蜡块,其中包含 15 例 BPH 组织、25 例激素性前列腺癌 (androgen dependent prostate cancer, HNPC) 组织、25 例 CRPC 组织。

1.2 主要试剂

浓缩性 DAB 显色的试剂盒 (ZLI-9018, 优宁维科技股份有限公司, 中国), 通用性 (小鼠/兔聚合物法检测系统) PV-6000 二步法检测试剂盒 (PV-6000, 中杉金桥生物有限公司, 中国), 苏木素 (G1080, 百泰克生物科技有限责任公司, 中国), PAK2 兔抗人的单克隆抗体 (Cell Signal Technology, 美国), PBS 粉 (P80316, 百泰克生物科技有限责任公司, 中国), 中性树胶 (天津市百倍生物有限公司, 中国), PAK2、TRIM28 相关质粒 (生工生物工程上海有限公司, 中国) 等。

1.3 主要实验方法及步骤

1.3.1 数据库 ONCOMINE 数据库、癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据库、GEPIA 数据库。

1.3.2 免疫组织化学 (immunohistochemistry, IHC) 首先将实验组织放置于 10% 的甲醛溶液中固定 4 h, 然后包埋制作实验组织蜡块, 组织蜡块制作完成放置 -20℃ 冰箱 1 h 左右, 应用石蜡切片工具 (LEIZI/515, 德国) 切片 5 μm 厚度。切片制作完成放置 70℃ 烤箱加热约 50 min, 实验组织脱蜡二甲苯静置 20 min, 无水乙醇静置 10 min, 95% 乙醇静置 5 min, 85% 乙醇静置 5 min, 75% 乙醇静置 5 min, 最后切片放置在流水下洗去残留乙醇。应用 PBS 洗 3 遍每次 3 min, 应用枸橼酸钠溶液抗原修复切片高火 5 min, 中低火 8~10 min, 室温放凉约 1 h。PBS 再洗 3 遍每次 3 min, 3% 的内源性过氧化物酶阻断剂每片约 40 μL 静置 20 min, PBS 再洗 3 遍每次 3 min, 在湿盒孵育一抗 (1:100), 4℃, 静置过夜。第 2 天切片恢复室温约 30 min, PBS 洗 3 遍每次 3 min, 在室温条件下湿盒内孵育二抗约 1 h, PBS 洗 3 遍每次 3 min, 应用 DAB 染色 1 min, 用自来水终止染色。苏木素染色约 15 s。自来水洗终止染色, 脱水、透明: 75% 乙醇浸泡 1 min, 85% 乙醇 1 min, 95% 乙醇 1 min, 无水乙醇 3 min, 二甲苯 10 min, 最后应用中性树胶封片, 封片后置于通风安全台晾干约 1 h, 遂显微镜下观察并采集图片。

1.3.3 蛋白免疫印迹 (Western Blot) 具体步骤如下: ①制凝胶、配置蛋白 marker 及检测样品蛋白, 由左向右依次加入蛋白 marker 5 mL 及计量的对应量蛋白样品, 然后电泳; ②裁剪好的 PVDF 膜放入甲醇溶液中静置激活, 活化 PVDF 膜上的正电基团和带负电的蛋白更容易结合在一起, 活化后放入电转溶液中备用; ③电转; ④洗膜; ⑤封闭膜; ⑥一抗孵育; ⑦二抗孵育; ⑧进行设置曝光时间和张数进行曝光工作, 曝光过程完成及时保存图片及相关数据。拷贝数据进行分析实验结果。

1.3.4 荧光素酶报告实验方法 ①接种细胞于 96 孔板内进行转染报告质粒终体积 100 μL, 待细胞培养达到实验要求; ②每个孔内加入 100 μL 的双荧光素酶试剂, 轻轻地混匀, 静置 10 min; ③细胞裂解充分, 把 96 孔板放入分光计之内进行检测其萤火虫荧光; ④每个孔内加入 100 μL DUAL-GLO STOP GLO REAGENT, 然后缓和摇匀, 静置 10 min; ⑤反应充分后, 把 96 孔板放入分光计之内进行检测与萤火虫荧光对应的海肾荧光; ⑥记录数值, 参考对照组进行计算比值及分析实验结果; ⑦应用 GraphPad 软件绘制图表。

1.4 结果评定

染色评分及表达级别划分: 采用 IRS 评分系统进行计算, 由 3 位病理科主治医师在统计学双盲的条件下进行评判全部免疫组化染色结果, 进行图像的采集; PAK2 的阳性表达定位在细胞核和细胞质, 呈黄色、浅黄色或棕黄色。根据阳性细胞占观察细胞的百分比和着色效果强弱对实验结果进行评定: 实验依照统计学随机原则, 以 200×放大率捕获 10 个随机或者 3 个代表性区域, 分别统计每一个视野中阳性细胞所占百分比, 每个结果取其平均值。按照阳性细胞数量所占的百分比大小换算为 0~3 分, ≥75% 定义为 3 分, 50%~<75% 定义为 2 分, 10%~<50% 定义为 1 分, <10% 定义为 0 分。按照同样的方法, 着色强弱也换算为 0~3 分, 棕黄色定义为 3 分, 金黄色定义为 2 分, 灰黄色定义为 1 分, 无色定义为 0 分。通过将强度评分和染色评分的程度相加来计算 PAK2 的 ICH 评分。通过评分作为评价观察指标在该切片上的 PAK2 表达水平, 我们定义计分 <3 分为低表达水平, ≥3 分为高表达水平。

1.5 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计学处理分析数据资料, 采用 *t* 检验分析目的 PAK2 基因的表达水平差异情况, 采用 Kaplan-Meier 处理 PAK2 的表达水平与前列腺癌疾病无进展生存期 (DFS) 的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, 实验获得的数据采用 Graphpad 7.0 分析处理制作, Western Bolt 条带灰度值通过软件 Image-J 分析处理量化并且与相对应的 Gapdh 进行标准化比较。所有实验均重复 ≥3 次并记录取有效值。

2 结果

2.1 PAK2 在 PCa 组织样本的表达情况

为了预测 PAK2 在 PCa 的发生发展过程中是否有重要意义, 首先采用数据库 ONCOMINE 对 PAK2 在 PCa 及癌旁正常组织的表达进行预测及分析, 结果示 PAK2 在 PCa 组织中的表达水平远高于癌旁正常组织, 差异有统计学意义 ($P<0.001$)。见图 1。

临床收集 20 对 PCa 患者的手术组织标本, 随机选取 12 例患者的组织进行 RT-qPCR 实验检测 PAK2 在 PCa 组织与癌旁正常组织中的实际表达情况, 结果示 PAK2 在 PCa 组织中的表达水平远高于

癌旁正常组织,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见图 2。

同时,随机从上述 12 例患者中抽取 6 例,通过 Western Bolt 实验检测 PCa 组织及癌旁组织中的 PAK2 蛋白水平的表达情况,结果示在 PCa 组织中 PAK2 的蛋白表达水平明显高于对应的癌旁正常组织($P < 0.001$)。见图 3。

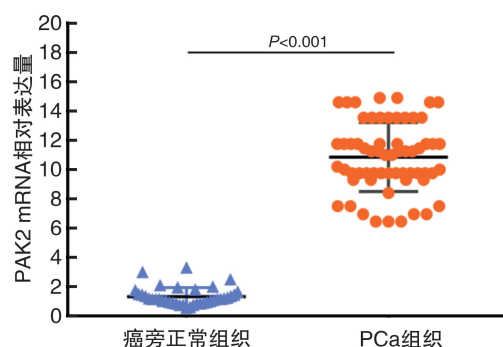
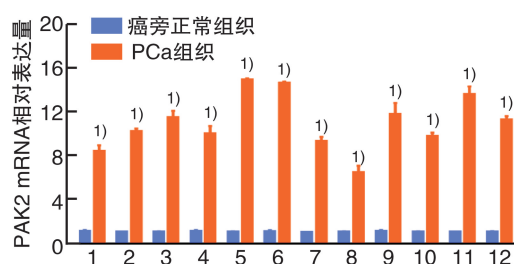
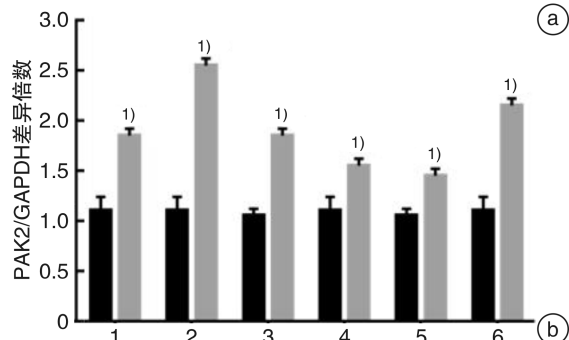
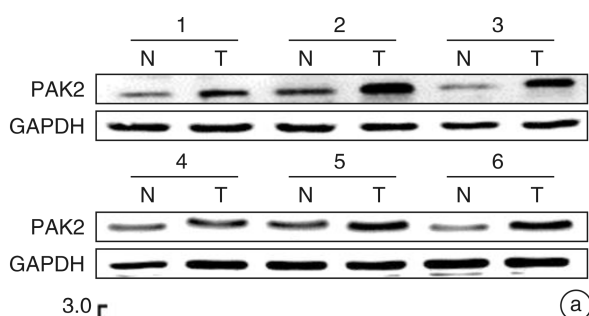


图 1 数据库 ONCOMINE 中 PAK2 在 PCa 及癌旁正常组织中的表达



与癌旁正常组织比较, ¹⁾ $P < 0.001$ 。

图 2 RT-qPCR 实验结果

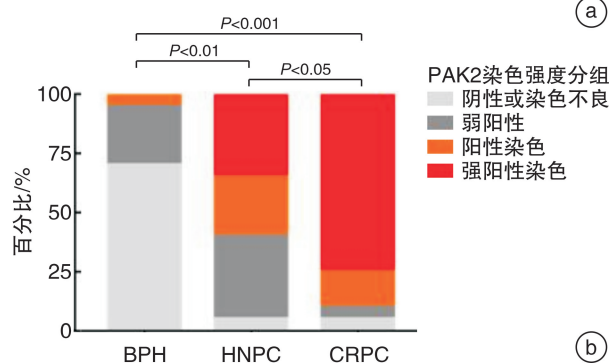
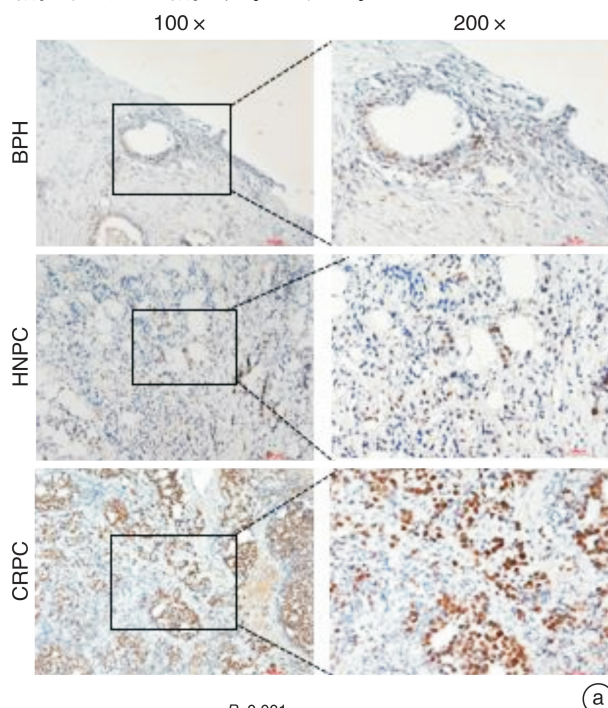


a: 通过 Western Bolt 实验检测 PAK2 分别在临床标本 PCa 及癌旁正常组织中的蛋白表达情况; b: 对实验结果(a)的量化条形统计图。N: 癌旁正常组织; T: PCa 组织; 与癌旁正常组织比较, ¹⁾ $P < 0.001$ 。

图 3 Western Bolt 实验结果

2.2 PAK2 表达情况的临床意义

通过 IHC 染色实验检测 PAK2 在 BPH、HNPC、CRPC 组织中的表达情况,结果示 PAK2 在前列腺组织中表达于细胞核上,且在 BPH、HNPC、CRPC 组织中均有表达,而在 CRPC 组织中表达水平最高,在 BPH 组织中表达水平最低($P < 0.001$),提示 PAK2 的高表达与 PCa 进展密切相关,且呈正相关性。见图 4。



a: PAK2 在临床标本 BPH、HNPC、CRPC 组织中的蛋白表达情况; b: 对 IHC 实验结果(a)的量化条形统计图。

图 4 IHC 实验结果

目前,PCa 发展为 CRPC 往往预后不良,这也导致临床上的治疗困难,也是 PCa 病死率升高的原因之一。有许多指标分析及预测 PCa 治疗的效果,我们通过 TCGA 数据库预测 PAK2 在 PCa 患者中不同表达水平对患者 DFS 的影响差异(PAK2 高低表达各 201 例)。结果示 PCa 患者中高表达 PAK2 较低表达患者的 DFS 短,差异有统计学意义($P = 0.012$)。见图 5。

通过统计分析 140 例 PCa 患者的主要临床病理特征信息(PSA 水平、Gleason 评分、临床分期、病理分级、转移、总生存期)与 PAK2 的关系,发现

患者的 PSA 水平越高,Gleason 评分越高,临床分期及病理分期越高,PAK2 的表达水平越高,患者越容易发生转移及生化复发,患者的生存期越短,反之亦然。但患者年龄差异无统计学意义。见表 1。

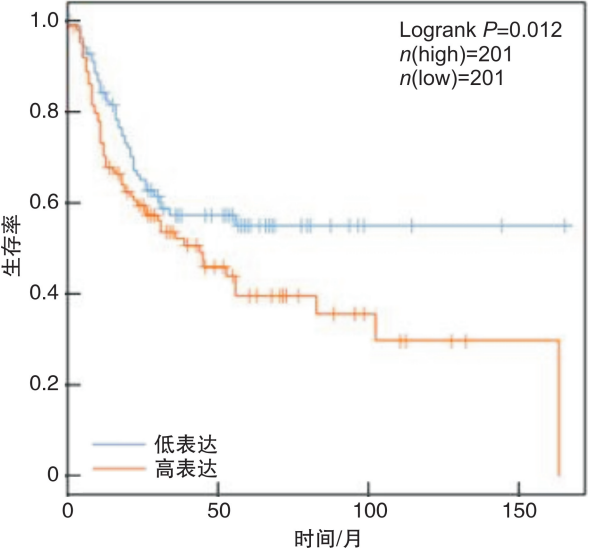


图 5 数据库 TCGA 分析 PAK2 的高低表达与 DFS 的关系

表 1 140 例 PCa 患者的主要临床病理特征信息与 PAK2 的表达水平之间的关系				
临床特征	例数	PAK2 表达		P 值
		低(87 例)	高(53 例)	
年龄/岁				0.637
<65	76	56	20	
≥65	64	31	33	
PSA/(ng/mL)				0.049
<10	87	65	22	
≥10	53	22	31	
Gleason 评分				0.036
≤6	101	78	23	
>6	39	9	30	
临床分期				0.001
≤T _{2a}	105	83	22	
>T _{2a}	35	4	31	
病理分级				0.014
<pT _{3a}	106	80	26	
≥pT _{3a}	34	7	27	
是否转移				0.001
否	122	84	38	
是	18	3	15	
总体生存				0.001
存活	131	86	45	
死亡	9	1	8	
是否生化复发				0.002
否	105	84	21	
是	35	3	32	

2.3 PAK2 磷酸化激活 TRIM28 调节 SOX2 的机制研究

利用 GEPIA 数据库对 TRIM28 与 PAK2 在 PCa 中的相关性进行预测,结果示在 PCa 中 PAK2 与 TRIM28 mRNA 的表达水平呈正相关性,差异有统计学意义($P<0.001$, $R=0.36$)。见图 6。

通过培养稳定敲低和过表达 PAK2 的 C4-2 细胞系,提取细胞蛋白,应用 Western Bolt 实验方法检测不稳定敲低和过表达 PAK2 的 C4-2 细胞系中不同的 PAK2 表达水平对 TRIM28 磷酸化水平的影响情况,结果示 PAK2 的表达水平影响 TRIM28 磷酸化的水平,呈正相关性。差异有统计学意义($P<0.001$)。见图 7。

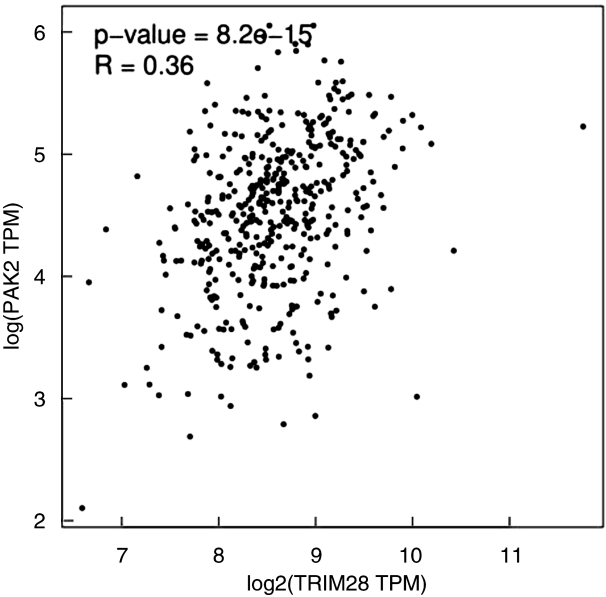
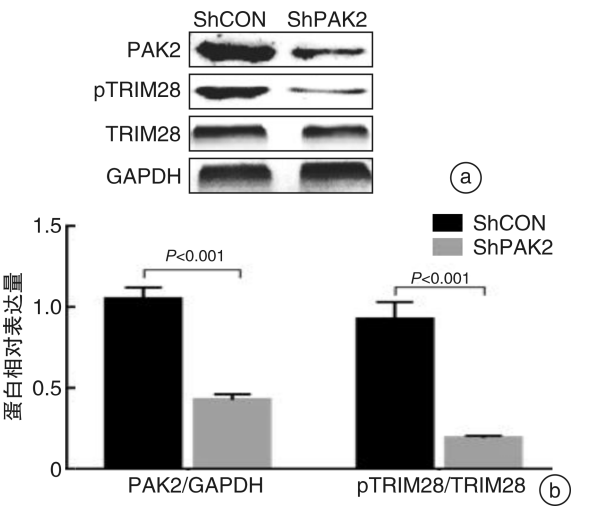


图 6 GEPIA 数据库进行预测 TRIM28 与 PAK2 在 PCa 中的相关性



a: Western Bolt 实验方法检测不稳定敲低 PAK2 的 C4-2 细胞系中 PAK2 表达水平对 TRIM28 磷酸化水平的影响情况;b:对实验结果(a)的量化条形统计图。
图 7 不稳定敲低 PAK2 的 C4-2 细胞系中 PAK2 表达水平对 TRIM28 磷酸化水平的影响

应用荧光素酶报告基因实验检测 PCa 细胞在不同条件处理下的 SOX2 启动子区活性差异情况, 结果示只转染 PAK2 过表达组的 SOX2 启动子区活性最高, 而转染 PAK2 过表达及敲低 TRIM28 组的 SOX2 启动子区活性低于只转染 PAK2 过表达组, 但明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见图 8。

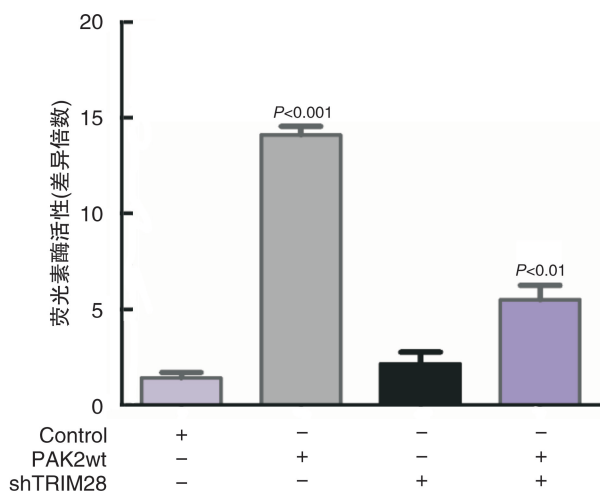


图 8 在荧光素酶报告基因实验检测下 C4-2 PCa 细胞系在不同条件处理下的 SOX2 启动子区活性的差异情况

3 讨论

PCa 是男性最常见的恶性肿瘤之一。虽然组织活检、细胞学检测或根治性前列腺切除术(RP)仍是诊断 PCa 的金标准, 但是多参数磁共振成像对 PCa 的检测和诊断具有了较高的能力。然而, 进一步了解肿瘤的侵袭性、生物学特性和预后情况对优化个体化治疗至关重要。国际泌尿病理学会(ISUP)分级系统为 PCa 患者提供了风险分层和预后评估的标准, 且 Gleason 评分(GS)=7 预后差异较为显著, 进一步细分为 GG2(GS=3+4)和 GG3(GS=4+3)以帮助决定治疗方法。然而, 在临床常规诊断治疗中, GS 的信息通常来源于活检操作, 但活检可能导致出血、疼痛和感染等并发症情况的发生。ADT 是治疗 PCa 最有效的方法之一, 但许多患者在治疗过程中会产生耐药性, 最后导致生化复发, 发生 CRPC, 治疗极为困难。因此, 阐明 CRPC 进展过程的信号通路作用机制及耐药作用机制可为新的治疗方法提供科学依据。

据研究报道, PAK2 在细胞过程中扮演了重要角色^[4], 并参与了人类癌症的进展过程。PAKs 是一个丝氨酸/苏氨酸激酶家族性质, 是 Rho GTPases Cdc42 和 Rac1 的下游中效应因子。于 1994 年, PAK2 首次被鉴定为与 GTP 结合的 RAC 相互作用性的蛋白。迄今为止, 这在哺乳动物中发现了 6 个家族成员, 并将其分为 2 类^[5-6]。所有 PAKs 家族成员都具有共同的特征特点, 如 N 端 GTPase 结

合域(GBD)和 C terminal kinase 结构域^[7], 然而, 在 I 组(PAK1-3)中发现了一个能够识别的自抑制结构域(AID)^[8-9], 而且在 II 组(PAK4-6)中没有发现这一特点。PAK2 可以参与细胞周期、存活、运动、细胞骨架组织和细胞凋亡等多种细胞学行为过程。在之前的研究中表明, PAK2 在多种人类癌症疾病中通常过度表达。例如, 在乳腺癌疾病、结直肠癌和肺癌中等, PAK2 表达水平上调^[8,10-12]。PAK2 也被认为是一个治疗性新靶点, 在结直肠癌、肝癌、胃癌、头颈癌和食管小细胞癌疾病中, 较高的 PAK2 mRNA 表达水平预示着预后不良的后果。研究表明, PAK2-miR-494 可以通过激活 MAPK 信号作用通路, PF-3758309 (PAK2 抑制剂)和吉西他滨药物可抑制胰腺肿瘤的生长作用^[9,13]。然而, PAK2 的表达情况和预后价值性在 PCa 疾病中仍缺乏研究。

本研究对 PAK2 在 PCa 中的转录水平、翻译水平和预后价值进行了全面分析, 结果表明, PAK2 在 PCa 中表达水平显著高于癌旁正常组织, 在 CRPC 中表达水平最高, 并且 PAK2 的表达水平与患者的 PSA 水平、Gleason 评分、临床分期、病理分级、转移、总生存期及疾病的生化复发情况密切相关, 与患者年龄无关。表明 PAK2 可能是潜在的 PCa 生物标志物。研究表明, PAKs 在多种人类癌症中过表达可影响细胞骨架重构、细胞内信号转导, 而 PAKs 在多种细胞功能和多种疾病中扮演重要角色^[13]。然而, 对 PAK2 在 PCa 中的表达、作用和预后的了解甚少。因此, 本研究对评估 PCa 的生化复发进展有重要的意义。

SOX2 基因具有高度保守特征, 它仅有一个外显子属于 SOX 转录因子家族, 在动物当中广泛分布, 涉及多种功能^[14-15]。SOX2 是一种重要的发育性调节剂, 具有性别的决定、垂体下丘脑维持功能, 并参与视觉系统发育和中枢神经系统(CNS)发育^[16-18]。SOX2 是维持自我更新性、体细胞重编程和未分化胚胎干细胞多能性的关键转录因子^[19]。SOX2 蛋白参与多种癌症, 包括黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌疾病, 并在皮肤、膀胱和结直肠癌中维持 CSCs。其他研究结果表明, Hedgehog-Gli 信号作用通路参与了肿瘤的生长、致癌特性和干细胞特性, 通过 Hedgehog-Gli 信号作用通路介导的 SOX2 调控, 可以诱导黑色素瘤和肺 CSCs 的自我更新^[20-21]。

本研究成功在 PCa 细胞系 C4-2 上构建了 PAK2 稳定的敲低表达细胞系。通过 GEPIA 数据库显示, PAK2 与 TRIM28 呈正向相关性。荧光素酶报告基因实验显示, 只转染 PAK2 过表达组的 SOX2 启动子区活性最高。而转染 PAK2 过表达及敲低 TRIM28 组的 SOX2 启动子区活性低于只转染 PAK2 过表达组, 但是明显高于对照组。我们的研究还需要继续进一步在体外及体内实验模型

中探究分子通路间相互影响的机制。

综上所述,我们可以根据 PAK2、磷酸化的 TRIM28 和 SOX2 的密切相关性,推测 PAK2 磷酸化激活 TRIM28 调控 SOX2 的启动区活性途径推动 PCa 进展及生化复发等过程。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gooding AJ, Zhang B, Jahanbani FK, et al. The lncRNA BORG drives breast cancer metastasis and disease recurrence[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:12698.
- [2] Addison JB, Koontz C, Fugett JH, et al. KAP1 promotes proliferation and metastatic progression of breast cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(2):344-355.
- [3] Cheng CT, Kuo CY, Ouyang C, et al. Metabolic Stress-Induced Phosphorylation of KAP1 Ser473 Blocks Mitochondrial Fusion in Breast Cancer Cells[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(17):5006-5018.
- [4] El-Aarag SA, Mahmoud A, Hashem MH, et al. In silico identification of potential key regulatory factors in smoking-induced lung cancer[J]. *BMC Med Genomics*, 2017, 10(1):40.
- [5] Fitzgerald S, Espina V, Liotta L, et al. Stromal TRIM28-associated signaling pathway modulation within the colorectal cancer microenvironment[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1):89.
- [6] Fitzgerald S, Sheehan KM, O'Grady A, et al. Relationship between epithelial and stromal TRIM28 expression predicts survival in colorectal cancer patients[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(6):967-974.
- [7] Wei CL, Cheng JL, Zhou B, et al. Tripartite motif containing 28 (TRIM28) promotes breast cancer metastasis by stabilizing TWIST1 protein[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:29822.
- [8] Grebeňová D, Holoubek A, Röslová P, et al. PAK1, PAK1Δ15, and PAK2: similarities, differences and mutual interactions[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):17171.
- [9] Hao L, Leng J, Xiao RJ, et al. Bioinformatics analysis of the prognostic value of Tripartite Motif 28 in breast cancer[J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(4):2670-2678.
- [10] Herquel B, Ouararhni K, Davidson I. The TIF1α-related TRIM cofactors couple chromatin modifications to transcriptional regulation, signaling and tumor suppression[J]. *Transcription*, 2011, 2(5):231-236.
- [11] Herquel B, Ouararhni K, Khetchoumian K, et al. Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(20):8212-8217.
- [12] Hu G, Kim J, Xu QK, et al. A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(7):837-848.
- [13] Jovčevska I, Zupanec N, Kočevkar N, et al. TRIM28 and β-actin identified via nanobody-based reverse proteomics approach as possible human glioblastoma biomarkers[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e113688.
- [14] Li JS, Lu D, Dou H, et al. Desumoylase SENP6 maintains osteochondroprogenitor homeostasis by suppressing the p53 pathway[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):143.
- [15] Neo SH, Itahana Y, Alagu J, et al. TRIM28 is an E3 ligase for ARF-mediated NPM1/B23 SUMOylation that represses centrosome amplification[J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(16):2851-2863.
- [16] Peng Y, Zhang MM, Jiang ZZ, et al. TRIM28 activates autophagy and promotes cell proliferation in glioblastoma[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12:397-404.
- [17] Qi ZX, Cai JJ, Chen LC, et al. TRIM28 as an independent prognostic marker plays critical roles in glioma progression[J]. *J Neurooncol*, 2016, 126(1):19-26.
- [18] Robbez-Masson L, Tie CHC, Conde L, et al. The HUSH complex cooperates with TRIM28 to repress young retrotransposons and new genes[J]. *Genome Res*, 2018, 28(6):836-845.
- [19] Santos J, Gil J. TRIM28/KAP1 regulates senescence[J]. *Immunol Lett*, 2014, 162(1 Pt B):281-289.
- [20] Satoh M, Chan JYF, Ross SJ, et al. Autoantibodies to transcription intermediary factor TIF1β associated with dermatomyositis[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(2):R79.
- [21] Song X, Guo CL, Zheng YT, et al. Post-transcriptional regulation of cancer/testis antigen MAGEC2 expression by TRIM28 in tumor cells[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1):1-10.

(收稿日期:2023-07-12)