

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.06.004

· 基础研究 ·

环磷腺苷效应元件结合蛋白对前列腺癌 PC3 细胞迁移、侵袭和细胞周期的影响

李蕊, 杨柳, 刘家云(空军军医大学附属西京医院 全军临床医学检验研究所, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的:** 探讨环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)对前列腺癌细胞恶性生物学行为的影响。**方法:** 常规培养前列腺癌细胞 PC3, 用转染试剂将过表达对照质粒, CREB 过表达质粒(CREB-oe)、敲减对照序列(si-NC)和 si-CREB 序列转染至 PC3 细胞, 分为 vector, CREB-oe、si-NC 和 si-CREB 组。用划痕愈合实验、Transwell 小室实验和流式细胞术分别检测各组细胞的迁移、侵袭能力和细胞周期情况。用 CRISPR/cas9 技术构建 CREB 敲除的 PC3 细胞, 用 PC3 细胞移植瘤实验检测 CREB 敲除对移植瘤生长的影响。**结果:** 在 PC3 细胞中成功地敲减或过表达了 CREB(均 $P < 0.01$), 过表达或敲减 CREB 均可明显促进或抑制 PC3 细胞的迁移、侵袭能力(均 $P < 0.01$), 过表达 CREB 可促使 PC3 细胞进入 S 期, 而敲减 CREB 表达则使 PC3 细胞阻滞于 G1 期(均 $P < 0.01$)。成功地构建了 CREB 敲除 PC3 细胞, 敲除 CREB 可明显抑制 PC3 细胞移植瘤的生长($P < 0.01$)。**结论:** 敲减或敲除 CREB 能够抑制 PC3 细胞的迁移和侵袭, 并使其阻滞于 G1 期, 进而抑制移植瘤的生长。

[关键词] 前列腺癌; CRISPR/Cas9; CREB 基因; 细胞周期; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.25; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 06-0587-07

Effects of CREB on migration, invasion, and cell cycle of prostate cancer PC3 cells

LI Rui, YANG Liu, LIU Jiayun (Institute for Clinical Laboratory Medicine of PLA, Xijing Hospital Affiliated to the Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB) on the malignant biological behaviors of prostate cancer PC3 cells. **Methods:** Prostate cancer PC3 cells were routinely cultured. The overexpression control plasmid (vector), CREB overexpression plasmid (CREB-oe), knockdown control sequence (si-NC), and si-CREB sequence were transfected into PC3 cells using transfection reagents, namely vector, CREB-oe, si-NC, and si-CREB groups. Scratch wound healing assay, Transwell chamber assay, and flow cytometry were performed to evaluate cell migration, invasion, and cell cycle distribution, respectively. PC3 cells with CREB knockout were constructed using CRISPR/Cas9 technology, and a xenograft tumor model was employed to evaluate the impact of CREB knockout on tumor growth *in vivo*. **Results:** CREB was successfully knocked down or overexpressed in PC3 cells (all $P < 0.01$). CREB overexpression significantly promoted, while its knockdown significantly inhibited the migration and invasion of PC3 cells (all $P < 0.01$). Overexpression of CREB promoted the transition of PC3 cells into the S phase, whereas knockdown of CREB induced G1 phase arrest (all $P < 0.01$). PC3 cells with CREB knockout were successfully constructed, and CREB knockout significantly inhibited the growth of PC3 cell-transplanted tumors ($P < 0.01$). **Conclusion:** Knockdown or knockout of CREB inhibits migration and invasion of PC3 cells and induces G1 phase arrest, thereby suppressing tumor growth.

[Key words] prostate cancer; CRISPR/Cas9; cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein (CREB) gene; cell cycle; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(6): 587-593. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.06.004]

前列腺癌(prostate cancer, PC)是全球男性癌症相关死亡的主要原因之一^[1], 寻找其有效的治疗靶点和诊断标志物具有重要的临床意义。尽管当前治疗方法已取得一定成效, 但晚期前列腺癌患者的预后依然不佳, 主要归咎于肿瘤细胞的高度转移和侵袭能力。环磷腺苷效应元件结合蛋白(cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein,

CREB)是有核细胞中广泛存在的转录因子, 属于 DNA 结合蛋白碱性亮氨酸拉链(basic-region leucine zipper, bZIP)超家族成员, 通过与基因启动子的环磷

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81372747)

[作者简介] 李蕊(1988—), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事肿瘤分子机制及靶向治疗的研究

[通信作者] 刘家云(扫码获取作者联系方式)



腺苷反应元件(cyclic adenosine monophosphate response element, CRE)结合,启动具有CRE序列的靶基因转录,调控细胞分化,增殖和代谢等多个生理过程^[2]。对CREB结合位点的全基因组筛查提示超过4 000个基因受CREB调控^[3]。近年来,越来越多的研究^[4-6]指出,CREB在恶性肿瘤的发生发展中发挥非常重要的作用,且在多种肿瘤组织中CREB表达水平显著升高。在中国,CREB在前列腺癌中的作用鲜有报道。本研究通过CRISPR/Cas9技术构建了CREB基因敲除的前列腺癌PC3细胞,并且探讨了CREB对前列腺癌细胞周期、侵袭和转移能力的影响,以其作为治疗靶点和标志物应用于临床提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞及主要试剂

SPF级BALB/C裸鼠(实验动物合格证号:SCXK(湘)2024-0009)购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司。人胚肾细胞293T和人前列腺癌细胞PC3购自中国科学院,质粒LentiCRISPRv2GFP、辅助载体pSPAX2和pMD2G、萤光素酶SSA均购自武汉擎科生物公司,载体感受态细菌DH5 α 、T4多聚磷酸酶、内切酶BsmBI、T4连接酶均购自TaKaRa公司,DMEM培养基、胎牛血清和胰酶均购自GIBCO公司、质粒提取试剂盒购自QIAGEN公司,兔抗人CREB抗体购自ABclonal公司,转染试剂Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司,细胞周期检测试剂盒购自KeyGEN BioTECH公司,侵袭试剂盒购自Corning公司,Giemsa染色液购自上海鼎国生物技术有限公司,CREB表达质粒由本实验前期构建及保存^[7],siRNA-CREB由西安擎科生物公司合成(正义链:5'-GCC AACUCCAAUUUACCAATT-3',反义链5'-UUGGUA AAUUGGAGUUGGCTT-3'),引物合成和测序服务由西安擎科生物公司提供。

1.2 细胞培养及转染

将PC3细胞用含有10%胎牛血清、1%青-链霉素的DMEM培养基重悬,并置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。将PC3细胞分为空白质粒对照组(vector)、CREB过表达组(CREB-oe)、siRNA阴性对照组(si-NC)和CREB敲减组(si-CREB)。按Lipofectamine 2000转染试剂说明书操作,将相应核酸和质粒转染至相应组别细胞中。

1.3 划痕愈合实验检测CREB对前列腺PC3细胞迁移能力的影响

用记号笔在6孔板背面等距离画2条间隔5 mm的横线,取对数生长期的各组PC3细胞将其接种于

6孔板中(6×10^5 个/孔)。转染24 h后用1 mL移液器吸头沿横线中点垂直划痕,弃去旧培养基,PBS清洗2次后继续培养。在显微镜下拍照,记录0、24和48 h时划痕宽度,使用Image J软件测量其面积,用“(0 h划痕宽度 - 24/48 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 $\times$ 100%”公式计算细胞迁移率。

1.4 Transwell小室实验检测CREB对前列腺PC3细胞侵袭能力的影响

从-20℃冰箱中取出侵袭试剂盒,将小室置于24孔板中,使其恢复至室温。上、下小室各加500 μ L无血清培养基,37℃培养箱中放置2 h使基质胶层水化。制备无血清细胞悬液,并计数,将细胞密度调整为 10^5 个/mL。Matrigel基质胶层再水化完成后,将小室全部转移至新的孔板中,小心除去上室中培养基并加入500 μ L细胞悬液,下室内加入750 μ L含30% FBS培养基,37℃培养箱培养24 h。倒扣小室于吸水纸上以去除培养基,用棉拭子轻轻移去小室内非侵袭细胞,滴2~3滴Giemsa染色液到膜的下表面染色转移细胞3~5 min后,将小室浸泡冲洗、空气晾干后,显微镜下观察拍照。

1.5 流式细胞术检测各组PC3细胞的细胞周期

在各组细胞生长至汇合度约80%时,用胰酶消化细胞并用基础培养基重悬细胞。150 $\times$ g离心10 min,弃上清液,PBS洗涤细胞1次,收集并调整细胞密度为 10^6 个/mL,取1 mL细胞悬液,将其离心收集后加入70%冷乙醇在4℃下固定过夜。150 $\times$ g离心5 min去除乙醇后,用PBS洗涤细胞2次,并将细胞悬液用200目筛网过滤一次,加入提前配制好的500 μ L PI/Rnase A染色工作液,室温下避光处理30~60 min,最后用流式细胞仪检测细胞周期。

1.6 利用CRISPR/cas9技术构建CREB敲除的PC3细胞

1.6.1 向导RNA(guide RNA, gRNA)序列设计

利用CRISPR在线设计工具网站(<http://crispr.mit.edu/>),根据系统评分,各自选取评分比较高的gRNA(gRNA1、gRNA2、gRNA3)序列。以gRNA序列为模板,设计其互补链,分别在编码链模板5'端添加CACC,非编码链模板5'端添加AAAC。设计的gRNA序列见表1。

1.6.2 cas9/gRNA表达载体构建

根据选择的gRNA分别合成寡聚核苷酸片段,采用T4多聚磷酸酶对寡聚核苷酸片段进行磷酸化后退火形成双链。退火体系:正、反义链各取10 μ L(10 μ mol/L)(加水至50 μ L),混匀后放入500 mL沸水浴中,自然冷却至室温。寡聚核苷酸二聚体插入载体反应体系:LentiCRISPRv2回收产物1 μ L,退火

产物 4 μL, T4 连接酶 5 μL 在室温下处理 10 min。取上述连接产物 10 μL, 加入 100 μL DH5α 感受态细胞中吹匀, 冰浴静置 30 min, 再放入 42 °C 水浴中 90 s, 迅速置于冰浴中 3 min, 加入 500 μL LB 液体培养基,

放置摇床(180 rpm)37 °C, 1 h, 取菌液 100 μL 均匀涂布于 LB 固体培养基上(含 50 ng/μL 氨苄青霉素), 37 °C 培养过夜。挑取菌落, 摇菌测序验证。

表1 CREB1 基因向导 RNA 靶点位点的核苷酸序列(5'→3')

靶点	gRNA 序列	5'向导序列	寡聚核苷酸序列
gRNA1	GGGCAGACAGTTCAAGTCCA	编码链 CACC	GGGCAGACAGTTCAAGTCCA
		非编码链 AAAC	TGGACTTGAAGTGTCTGCCC
gRNA2	GGGCTTGAAGTGTCAATTTGT	编码链 CACC	GGGCTTGAAGTGTCAATTTGT
		非编码链 AAAC	ACAAATGACAGTTCAAGCCC
gRNA3	GGAGCCGAGAACCAGCAGAG	编码链 CACC	GGAGCCGAGAACCAGCAGAG
		非编码链 AAAC	CTCTGCTGGTTCTCGGCTCC

1.6.3 萤光素酶-SSA 报告载体活性检测

将终止子和靶点插入萤光素酶载体中, 靶点位于终止子前, 以转染试剂共转染 CRISPR/gRNA 载体, 以及新构建的萤光素酶报告基因和内参供体质粒, 对照组转染空载体, 检测萤光素酶信号(图 1)。在 CRISPR/Cas9 作用下, 靶点位置产生 DNA 双链断裂(double-stranded break, DSB), 细胞通过同源重组方式修复 DNA, 形成有活性的萤光素酶。通过与参照的比值变化反映 CRISPR/Cas9 剪切的活性水平。

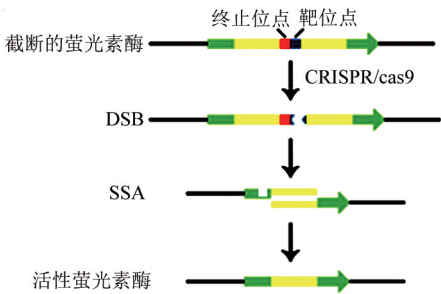


图1 萤光素酶-SSA 报告载体活性检测结构示意图

1.6.4 lenti CRISPR-CREB-T1 过表达慢病毒包装

在 293T 细胞内先转染慢病毒包装质粒混合物(包含包装质粒 psPAX2 和 pMD2.G)和重组质粒。24 h 后更换新鲜慢病毒生产培养基继续培养 48 h 后收集细胞培养液, 离心去除杂质后即得慢病毒原液。利用浓缩柱超滤法进行病毒浓缩, 并用稀释计数法进行病毒滴度测定。

1.6.5 构建 CREB 基因敲除 PC3 细胞

慢病毒 lenti CRISPR-CREB-T1 感染 PC3 细胞, 以 MOI = 20 进行感染, 感染 48 h 后, 将细胞极度稀释, 进行筛选。将感染并筛选后的细胞挑选至少 5 个克隆进行细胞扩增。提取其蛋白, 用 WB 法验证蛋白

的表达, 并送测序进一步验证。

1.7 裸鼠 PC3 细胞移植瘤模型的建立与观察

BALB/c 雄性裸鼠, 共 12 只适应性喂养 1 周。实验共分为正常 PC3 细胞对照组、CREB 基因敲除组, 每组 6 只。调节各组细胞密度为 1×10^7 个/mL, 于裸鼠右侧腋下部位皮下接种 150 μL。接种后继续饲养, 每隔 1 d 观察并记录瘤体大小(瘤体长、短径)、称量裸鼠体重, 建立生长曲线。饲养 4 周后, 用安乐死方式处死各组裸鼠, 完整剥离肿瘤组织, 称其质量后用于后续检测。

1.8 统计学处理

上述流式细胞术检测、WB 法检测、细胞侵袭和划痕等实验至少重复 3 次。采用 SPSS 19.0 统计学软件对实验数据进行统计分析。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 在 PC3 细胞中成功地敲减或过表达了 CREB

WB 法检测结果(图 2)表明, 相较于 vector 组, CREB-oe 组 PC3 细胞中 CREB 蛋白的表达明显升高($P < 0.01$); 与 si-NC 组比较, si-CREB 组 PC3 细胞中 CREB 蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$)。实验结果表明, 本研究成功地在 PC3 细胞中敲减或过表达了 CREB。

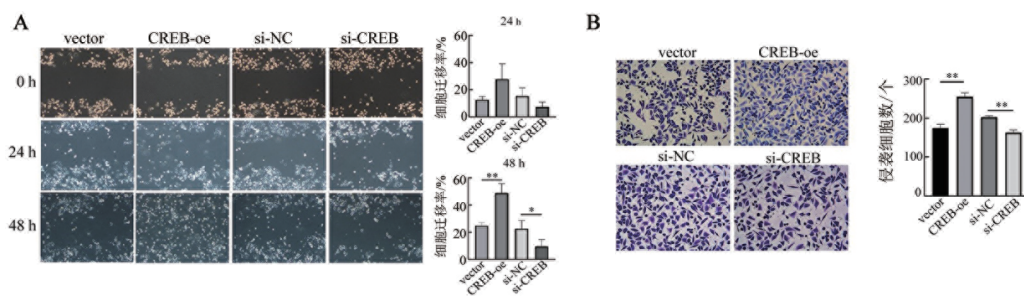
2.2 过表达或敲减 CREB 可明显促进或抑制 PC3 细胞的迁移和侵袭能力

划痕愈合实验检测结果(图 3A)显示, 与 vector 组比较, CREB-oe 组细胞划痕愈合率明显升高($P < 0.01$); 与 siNC 组比较, si-CREB 组细胞划痕愈合率明显降低($P < 0.05$)。Transwell 小室实验检测结果(图 3B)显示, 与 vector 组比较, CREB-oe 组 PC3 细胞

的侵袭数目显著增多 ($P < 0.01$); 与 si-NC 组比较, si-CREB 组 PC3 细胞侵袭数目显著减少 ($P < 0.01$)。实验结果表明, 过表达 CREB 可增强 PC3 细胞的迁移和侵袭能力, 而敲减 CREB 表达则可抑制 PC3 细胞的迁移和侵袭能力。

2.3 过表达或敲减 CREB 对 PC3 细胞周期的影响

流式细胞术检测结果 (图4) 显示, 与 vector 组比较, CREB-oe 组 PC3 细胞中 G1 期的细胞数量明显减少, S + G2 期细胞明显增多 (均 $P < 0.01$); 与 si-NC 组比较, si-CREB 组 PC3 细胞中 G1 期的细胞数量明显增多, S + G2 期细胞明显减少 ($P < 0.05$)。实验结果表明, 过表达 CREB 可促使 PC3 细胞进入 S 期, 而敲减 CREB 表达则使 PC3 细胞周期阻滞于 G1 期。



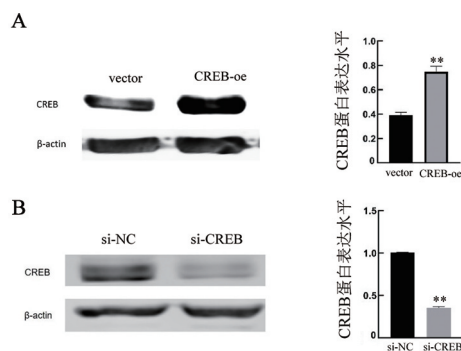
A: 划痕愈合实验检测各组 PC3 细胞的迁移能力 ($\times 40$); B: Transwell 小室实验检测各组 PC3 细胞的侵袭能力 ($\times 200$)。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 CREB 对 PC3 细胞迁移和侵袭能力的影响

2.4 利用 CRISPR/cas9 技术成功地构建 CREB 基因敲除 PC3 细胞

为检测构建的 cas9/gRNA 基因敲除载体是否具有敲除活性, 将敲除载体与萤光素酶-SSA 报告载体及供体载体共转染 293T 细胞, 48 h 后收集细胞检测萤光素酶活性。实验结果 (图5) 显示, 3 组载体 (lenti CRISPR-CREB-T1、lenti CRISPR-CREB-T2 和 lenti CRISPR-CREB-T3) 转染后的荧光活性值与对照组相比均明显增加 (均 $P < 0.01$), 其中 lenti CRISPR-CREB-T1 低表达慢病毒包装组增加 7 倍左右, 这说明载体能够有效地敲除萤光素酶-SSA 报告载体中对应的靶位点, 萤光素酶-SSA 报告载体通过同源末端重组形成完整的萤光素酶, 后续实验选用此载体作为工具载体。lenti CRISPR-CREB-T1 慢病毒感染前列腺癌 PC3 细胞后, 继续培养细胞 48 h, 将细胞 96 孔板梯度稀释法选取单细胞克隆进行培养 (图5B)。挑取 8 个细胞克隆, 编号为 1~8, 进行蛋白表达水平鉴定, 筛选得到编号为 5 的 CREB 蛋白敲除的细胞 (图5C)。并对上述蛋白表达阴性的 5 号细胞与野生型基因序列进行测序比对, 比对结果见图5D。实验结果说明, 本研究成功地构建了 CREB 基因敲除 PC3 细胞。



A: WB 法检测 PC3 细胞中转染 CREB 质粒后 CREB 的表达情况; B: WB 法检测 PC3 细胞中敲减 CREB 后 CREB 的表达情况。与 vector 组或 si-NC 组比较, ** $P < 0.01$ 。

图2 WB 法检测各组 PC3 细胞中 CREB 蛋白表达

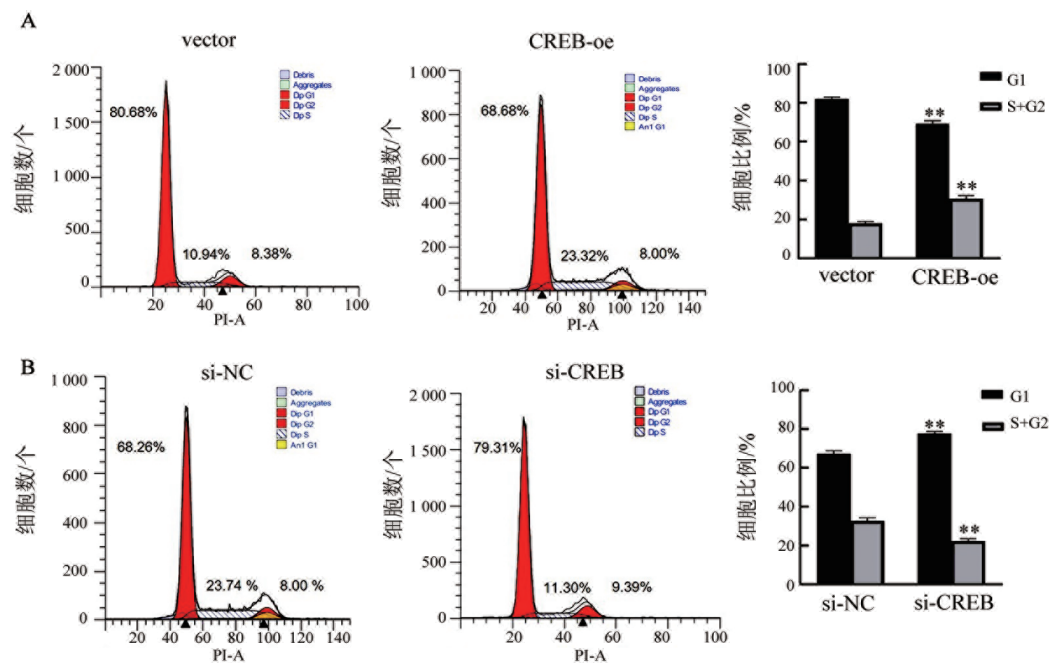
2.5 敲除 CREB 能明显抑制 PC3 细胞移植瘤的生长

利用上述 CRISPR/Cas9 构建的 5 号 CREB 敲除 PC3 细胞, 成功建立裸鼠皮下荷瘤模型。裸鼠移植瘤实验检测结果 (图6) 显示, 与对照组比较, CREB 敲除组 PC3 细胞移植瘤的体积和质量均明显降低 (均 $P < 0.01$)。

3 讨论

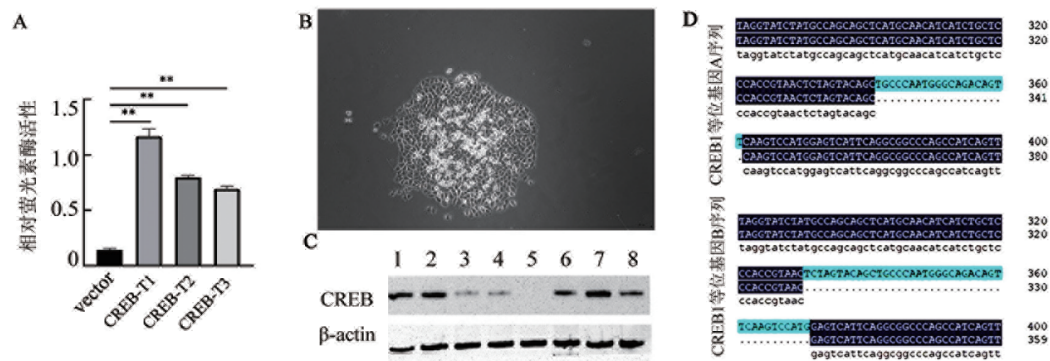
前列腺癌是全球范围内男性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和病死率在全球范围内呈现上升趋势^[8]。尽管当前治疗方法已取得一定成效, 但晚期前列腺癌患者的预后依然不佳, 主要归咎于肿瘤细胞的高度转移和侵袭能力^[9]。因此, 深入解析前列腺癌细胞恶性生物学行为背后的分子机制对于寻找新的治疗靶点具有重要意义。

研究^[10]表明, 肿瘤转移与多种基因的异常表达和信号通路的改变密切相关, 然而肿瘤转移的分子机制尚不明确。CREB 作为一种多功能转录因子, 在细胞分化、凋亡、增殖等方面扮演着关键角色, 其在多种类型癌症的发生发展中起着不可忽视的作用。有研究显示高水平的 CREB 与肿瘤复发和转移有关, 例



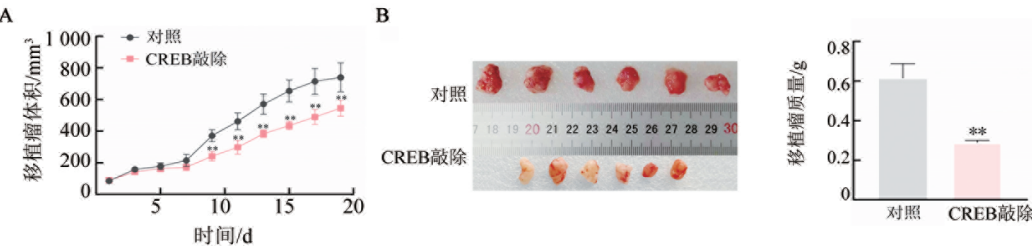
A:过表达 CREB 对 PC3 细胞周期的影响。B:敲减 CREB 对 PC3 细胞周期的影响。与 vector 或 si-NC 组比较,** $P < 0.01$ 。

图4 CREB 对 PC3 细胞周期的影响



A:萤光素酶 SSA 报告载体萤光素酶活性的检测结果;B:lenti CRISPR-CREB-T1 感染的细胞克隆($\times 40$);C:WB 法检测 1~8 号阳性克隆细胞中 CREB 的表达情况;D:CREB 基因敲除细胞中等位基因 A/B 缺失突变。与 vector 组比较,** $P < 0.01$ 。

图5 细胞单克隆基因型鉴定



A:敲除 CREB 对 PC3 细胞移植瘤生长的影响;B:敲除 CREB 对 PC3 细胞移植瘤质量的影响。与对照组比较,** $P < 0.01$ 。

图6 CREB 敲除对 PC3 细胞裸鼠移植瘤生长的影响

如,CHEN 等^[11]报道,CREB 参与调控膀胱癌的迁移和侵袭,与膀胱癌的转移密切相关;WANG 等^[12]发现,CREB 在结直肠癌细胞迁移和侵袭过程中扮演着至关重要的角色。CREB 基因在多种恶性肿瘤中高表达,比如胃癌^[13],肺癌^[14]和乳腺癌^[15]等,但国内有关

CREB 在前列腺癌中的作用却鲜有报道。本研究团队^[7]前期发现,CREB 在前列腺癌组织中高表达,并与前列腺癌分期呈正相关。有研究^[16]发现,前列腺癌患者肿瘤组织中表达高水平的 CREB 倾向于在较短时间内复发;且有研究^[17]发现,STAT3 通过 LKB1/

pAMPK/mTORC1/CREB 信号转导调控前列腺癌细胞的转移, PNN 通过 PI3K/AKT 和 ERK/MAPK 信号通路激活 CREB, 进而上调 Cyclin D1、CDK2 和 CDK6 的表达, 促进细胞周期的 G1/S 转换, 从而加速前列腺癌细胞的增殖, CREB 还可以通过参与 USP1-ATF2 通路, 在前列腺癌中发挥重要作用^[18]。这些研究发现表明, 以 CREB 为靶标可能是一种很有前途的治疗前列腺癌的方法。

本研究继续以 CREB 为研究对象, 探讨其对 PC3 细胞迁移, 侵袭和周期的影响。细胞划痕愈合和 Transwell 小室等实验检测结果发现, CREB 过表达显著增强了 PC3 细胞的迁移和侵袭能力, 而敲减 CREB 表达则能有效抑制其迁移和侵袭的能力, 与 MENG 等^[17]的研究结果一致, 提示 CREB 可能通过调节迁移和侵袭的相关基因表达, 促进肿瘤微环境中细胞外基质的降解和重塑, 进而加速癌细胞的移动与穿透能力, 这些发现进一步巩固了 CREB 作为肿瘤转移关键驱动因子的地位。细胞周期调控异常是恶性肿瘤的重要特征之一, 通常伴随着 DNA 复制失控和细胞无限增殖。阻断细胞增殖周期进程可引起凋亡, 而凋亡也常伴随有细胞生长阻滞。有报道^[19-20]发现, 在没有受到任何外源性刺激时, CREB 磷酸化与细胞周期调控密切相关, CREB 可能通过直接或间接调控多个细胞周期检查点蛋白, 如 cyclin D1、p27kip1 等, 影响细胞周期。辛肇晨等^[21]的研究显示, 敲除 CREB 使乳腺癌细胞发生 G1 期阻滞, 周期蛋白 CDK2、CDK4、CDK6、CyclinD1 的表达下降。本研究的功能实验检测结果显示, CREB 过表达加速了 PC3 细胞由 G1 期进入 S 期的进程, 而 CREB 基因的敲除可使 G1 细胞增加, S 期细胞减少, 说明 CREB 基因敲除能阻滞细胞于 G1 期, 从而阻止细胞 DNA 的合成, 进而可能干扰肿瘤细胞蛋白生成, 抑制肿瘤生长。此结果提示, CREB 不仅在前列腺癌细胞迁移和侵袭过程中发挥作用, 而且也是维持肿瘤增殖不可或缺的重要因素。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术成功地获得了 CREB 基因敲除的 PC3 细胞, 为后续的机制研究提供有效的工具。CRISPR/Cas 9 是一种细菌和古生菌中抵御外源性病毒或质粒入侵的获得性免疫系统, 来源于外源性病毒或质粒序列片段的 gRNA 可介导 cas9 特异性识别相应病原的 DNA 分子并进行双链切割, 具有制备简单、特异性高等优点, 使得它在基因编辑过程中存在极大的发挥空间^[22]。最后, 本研究在裸鼠移植瘤实验检测结果发现, CREB 的敲除显著抑制了肿瘤的生长, 进一步强调了 CREB 作为潜在治疗靶点的重要性。

本研究的局限性主要体现在几个方面。首先, 尽管本研究通过细胞模型和小鼠实验探讨了 CREB 在前列腺癌中的作用, 但尚未结合临床样本进行验证, 这限制了结果的临床相关性。此外, 本研究主要集中在 PC3 细胞这一特定细胞上, 是否能在其他前列腺癌细胞, 乃至患者来源的组织样本中重现相同的现象值得后续深入研究。

综上所述, 本研究揭示了 CREB 在前列腺癌 PC3 细胞中的重要作用, 特别是在细胞迁移、侵袭及细胞周期调控方面。通过 CRISPR/Cas9 技术构建 CREB 敲除细胞及进行体内实验, 进一步确认了 CREB 对肿瘤生长的促进作用。这些发现为理解前列腺癌的发生发展分子机制提供了新的视角, 并为未来开发针对 CREB 的治疗策略奠定基础。

【参 考 文 献】

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.
- [2] CHOWDHURY M A R, HAQ M M, LEE J H, *et al.* Multi-faceted regulation of CREB family transcription factors[J/OL]. Front Mol Neurosci, 2024, 17: 1408949[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39165717/>. DOI: 10.3389/fnmol.2024.1408949.
- [3] 石明连, 朱政全, 刘永明, 等. 环磷酸腺苷反应元件结合蛋白在消化系统肿瘤中的作用[J]. 癌症进展, 2023, 21(6): 584-588. DOI: 10.11877/j.issn.1672-1535.2023.21.06.02.
- [4] 郭秀娟, 杜彦艳, 颜晰, 等. CREB 在食管鳞癌组织中的表达及其临床意义[J]. 癌变·畸变·突变, 2020, 32(5): 387-390, 394. DOI: 10.3969/j.issn.1004-616x.2020.05.010.
- [5] 叶丽平, 马静方, 杨春雨, 等. 碱性成纤维细胞生长因子、cAMP 反应元件结合蛋白和 Bcl-2 在卵巢上皮性恶性肿瘤中的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(23): 6712-6714. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2014.23.081.
- [6] 刘中华, 任丽梅, 孟宪梅, 等. CREB1 和 CREB3 在胃癌及癌前病变组织中的表达及其临床意义[J]. 实用癌症杂志, 2024, 39(4): 534-539. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5930.2024.04.003.
- [7] 唐海斌, 马越云, 苏明权, 等. CREB 及 p-CREB 在前列腺癌细胞增殖中的作用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2016, 23(2): 223-229. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2016.02.012.
- [8] [8]SCHAFER E J, LAVERSANNE M, SUNG H, *et al.* Recent patterns and trends in global prostate cancer incidence and mortality: an update[J]. Eur Urol, 2025, 87(3): 302-313. DOI: 10.1016/j.eururo.2024.11.013.
- [9] LI Z, TAO Y, GAO Z, *et al.* SYTL2 promotes metastasis of prostate cancer cells by enhancing FSCN1-mediated pseudopodia formation and invasion[J/OL]. J Transl Med, 2023, 21(1): 303[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37147713/>. DOI: 10.1186/s12967-023-04146-y.
- [10] ZHANG Z X, ZHANG W N, SUN Y Y, *et al.* CREB promotes laryngeal cancer cell migration via MYCT1/NAT10 axis[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 1323-1331. DOI: 10.2147/OTT.S156582.

- [11] CHEN J F, WANG K J, YE S Z, *et al.* Tyrosine kinase receptor RON activates MAPK/RSK/CREB signal pathway to enhance CXCR4 expression and promote cell migration and invasion in bladder cancer[J]. *Aging* (Albany NY), 2022, 14(17): 7093-7108. DOI: 10.18632/aging.204279.
- [12] WANG Y, LIU Q, ZHANG H S. Phosphorylation of CREB-specific coactivator CRTC2 at Ser238 promotes proliferation, migration, and invasion of colorectal cancer cells[J/OL]. *Technol Cancer Res Treat*, 2020, 19: 153303382096211[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33000695/>. DOI: 10.1177/1533033820962111.
- [13] ROMERO-ESTRADA J H, MONTAÑO L F, RENDÓN-HUERTA E P. Binding of YY1/CREB to an enhancer region triggers claudin 6 expression in *H. pylori* LPS-stimulated AGS cells[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(18): 13974[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37762277/>. DOI: 10.3390/ijms241813974.
- [14] YAO G D, YU S, HOU F, *et al.* Rab3B enhances the stabilization of DDX6 to promote lung adenocarcinoma aggressiveness[J/OL]. *Mol Med*, 2024, 30(1): 75[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38834947/>. DOI: 10.1186/s10020-024-00848-1.
- [15] 蒋琦雯, 徐杨, 姚军, 等. 咪达唑仑调节 cAMP/PKA/CREB 通路对乳腺癌细胞的影响[J]. *中国现代医生*, 2023, 61(36): 101-105, 128.
- [16] PENCİK J, PHILIPPE C, SCHLEDERER M, *et al.* STAT3/LKB1 controls metastatic prostate cancer by regulating mTORC1/CREB pathway[J/OL]. *Mol Cancer*, 2023, 22(1): 133[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37573301/>. DOI: 10.1186/s12943-023-01825-8.
- [17] MENG X Y, ZHANG H Z, REN Y Y, *et al.* Pinin promotes tumor progression via activating CREB through PI3K/AKT and ERK/MAPK pathway in prostate cancer[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(4): 1286-1303.
- [18] GENG L, CHEN X, ZHANG M, *et al.* Ubiquitin-specific protease 14 promotes prostate cancer progression through deubiquitinating the transcriptional factor ATF2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 524(1): 16-21. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.12.128.
- [19] PAWLONKA J, RAK B, AMBROZIAK U. The regulation of cyclin D promoters-review[J/OL]. *Cancer Treat Res Commun*, 2021, 27: 100338[2025-02-11]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100338>. DOI: 10.1016/j.ctarc.2021.100338.
- [20] PERRAULT R, MOLNAR P, POOLE J, *et al.* PDGF-BB-mediated activation of CREB in vascular smooth muscle cells alters cell cycling via Rb, FoxO1 and p27^{kip1}[J/OL]. *Exp Cell Res*, 2021, 404(1): 112612[2025-02-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33895117/>. DOI: 10.1016/j.yexcr.2021.112612.
- [21] 辛肇晨, 吴茜, BANG SOYEON, 等. 沉默环磷腺苷效应元件结合蛋白1对乳腺癌细胞生物学行为的影响[J]. *中国临床医学*, 2022, 29(2): 153-160. DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2022.20210844.
- [22] 周建, 任雪梅, 王馨, 等. CRISPR/Cas 核酸检测系统的研究进展和未来挑战[J]. *检验医学*, 2024, 39(6): 608-614. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2024.06.017.

[收稿日期] 2024-09-29

[修回日期] 2025-06-10

[本文编辑] 向正华