DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.011
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
1336 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)15-1336-03

雄激素受体反义RNA抑制前列腺癌细胞LNCaP致瘤性的研究

江 军,王洛夫,方玉华,靳风烁,靳文生 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 观察雄激素受体(Androgen receptor, AR)反义RNA对前列腺癌细胞LNCaP致瘤性的影响。方法 分别用细胞平板克隆形成试验及裸鼠接种实验观察前列腺癌细胞LNCaP、LNCaP^{Neo}和LNCaP$^{as\text{-}AR}$细胞致瘤性的变化。结果 LNCaP$^{as\text{-}AR}$细胞的克隆形成效率显著低于LNCaP^{Neo}细胞($P<0.01$)。LNCaP$^{as\text{-}AR}$细胞在雄性裸鼠体内形成的瘤体体积明显小于LNCaP^{Neo}细胞并且形成瘤体的时间延长。结论 雄激素受体反义RNA可抑制前列腺癌细胞LNCaP成瘤能力。

关键词:雄激素受体;反义RNA;前列腺癌
中图法分类号:R392.2;R737.25;R977.1^{+}2 文献标识码:A

Inhibitive effect of androgen receptor antisense RNA on tumorigenesis of human prostate cancer cell LNCaP

JIANG Jun, WANG Luo-fu, FANG Yu-hua, JIN Feng-shuo, JIN Wen-sheng (Department of Urology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of AR antisense RNA on tumorigenesis of LNCaP cells. **Methods** Tumor formation abilities of LNCaP, LNCaP^{Neo} and LNCaP$^{as\text{-}AR}$ cells were determined by plate cloning formation efficiency *in vitro* and by injection of the cells into intact male nude mice. **Results** Cloning formation efficiency of LNCaP$^{as\text{-}AR}$ cells *in vitro* was significantly lower ($P<0.05$) than that of LNCaP and LNCaP^{Neo}. LNCaP$^{as\text{-}AR}$ tumor formation in the nude mice *in vivo* was inhibited and time for tumor formation was prolonged as compared with that of LNCaP and/or LNCaP^{Neo}. There was no difference between LNCaP and LNCaP^{Neo} ($P>0.05$). **Conclusion** Antisense AR RNA can inhibit tumor formation of prostate carcinoma cell LNCaP.

Key words: androgen receptor; antisense RNA; prostate carcinoma cell

前列腺癌是老年男性最常见的肿瘤,是美国以及多数西方国家老年男性第二大死亡原因。前列腺是雄激素依赖性器官,雄激素去势或/和抗雄激素治疗可导致前列腺癌细胞凋亡,肿瘤萎缩,这是前列腺癌内分泌治疗的基础,已经成为治疗晚期前列腺癌的金标准[1],但在病情缓解几个月到几年后,绝大多数病人会发展为雄激素非依赖性前列腺癌,抗雄激素治疗不再有效,导致病人死亡[2,3]。晚期雄激素非依赖前列腺癌是前列腺癌治疗的难点。研究表明前列腺癌内分泌治疗失败可能与雄激素受体(Androgen receptor, AR)反常激活有关[2~4]。应用AR反义RNA可通过抑制前列腺癌细胞LNCaP AR表达,改变体外培养条件下前列腺癌细胞LNCaP的生长特性,抑制前列腺癌细胞生长的目的[5,6]。在本研究中我们进一步观察了AR反义RNA对LNCaP细胞致瘤性的影响,探讨AR反义RNA对前列腺癌的治疗作用。

1 材料和方法

1.1 试剂和培养基

所用激素为合成雄激素R1881(美国DuPont),用0.1%乙醇配制成所需浓度。RPMI1640培养基含10%活性炭/葡聚糖处理的FBS,所含R1881激素浓度分别为1 nmol/L。

1.2 LNCaP细胞株

前列腺癌细胞株LNCaP购自美国ATCC。LNCaP$^{as\text{-}AR}$为基因组DNA中整合了AR反义RNA逆转录病毒载体pL-AR-SN的LNCaP细胞,LNCaP^{Neo}为基因组DNA中整合了空逆转录病毒载体pLXSN的LNCaP[5,6]。细胞培养:RPMI1640培养基含10%活性炭/葡聚糖FBS,37 ℃ 5% CO_2 培养箱内培养。

1.3 细胞致瘤性检测

1.3.1 细胞平板克隆形成试验 制备细胞悬液:取对数生长期的单层培养细胞,用1∶1混合的0.25%胰蛋白酶和0.02%EDTA消化并吹打成单个细胞,把细胞悬浮在含10%FBS的RPMI1640培养液中,计数。接种细胞:按每孔300个细胞接种6孔板,以十字方向轻轻晃动6孔板,使细胞分散均匀。培养:将6孔板移入CO_2培养箱,37 ℃、5% CO_2及饱和湿度环境下,静止培养

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770740)
作者简介:江 军(1964-),男,湖北省随州市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事前列腺癌基因治疗方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)68757364
收稿日期:2003-03-06;修回日期:2003-05-14

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

10～14 d。染色: 当培养至出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。弃去培养液, 用 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)小心浸洗 2 次。加纯甲醇 5 ml 固定 15 min。弃去固定液, 加适量姬姆萨应用液(1 份姬姆萨原液加 9 份 PBS)染色 10～30 min, 然后用水缓慢洗去染色液, 室温干燥。计数: 在 6 孔板下叠加一张带网格的透明胶片, 用肉眼直接计数克隆数, 然后按下式计算克隆形成率[7]。

1.3.2　裸鼠接种致瘤实验细胞准备　　接种细胞为 $LNCaP^{Neo}$、$LNCaP^{as\text{-}AR}$。处于对数生长期的细胞, 消化后吹打使细胞分散, 移入离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入无血清的 RPMI1640, 漂洗 2 次(1 000 r/min 离心 5 min), 重悬细胞于无血清的 RPMI1640, 细胞密度为 2×10^7/ml, 37 ℃保温。BABL/c 裸鼠为雄性 BAB 鼠。接种: 碘酒、乙醇局部消毒, 皮下注射 0.2 ml 细胞悬液于裸鼠背部两侧, 轻微按压后放回鼠笼, 继续饲养, 2 种细胞各接种 3 只裸鼠。结果观察: 接种后, 观察有无肿瘤形成, 记录肿瘤形成时间并用游标卡尺测量肿瘤的两个垂直直径, 计算肿瘤体积, 公式如下: 其中 W 为短径, L 为长径, 单位均为 mm[8]。

$$\text{肿瘤体积}=\frac{W^2\times L}{2}$$

1.4　统计学处理

采用 t 检验。

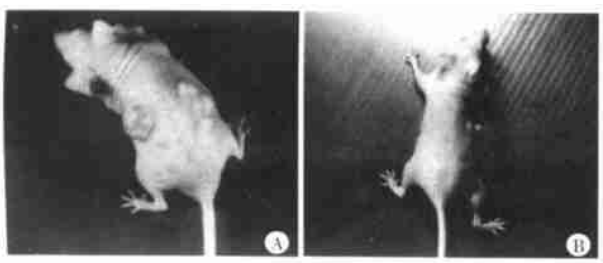
2　结果

2.1　细胞平板克隆形成试验

接种细胞后, 大约 7 d 可见镜下形成的克隆, 14 d 形成肉眼可见克隆, 姬姆萨染液染色, 可见 $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 形成的克隆数明显少于 $LNCaP^{Neo}$, $LNCaP^{Neo}$ 克隆形成效率为(32.0±4.1)%, $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 克隆形成效率为(12.2±2.0)%, $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 的克隆形成效率显著低于 $LNCaP^{Neo}$($P<0.01$)。说明 AR 反义 RNA 逆转录病毒表达载体转染 LNCaP 细胞后细胞在体外的成瘤能力明显减弱。

2.2　裸鼠体内致瘤性

接种 $LNCaP^{Neo}$ 细胞 3 周后, 有 1 只裸鼠长出肿瘤, 而 $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 在 4 周后才有肿瘤形成, 平均成瘤时间 $LNCaP^{Neo}$ 为 25 d, $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 为 32 d; 至第 10 周, $LNCaP^{Neo}$ 共在 4 只裸鼠形成肿瘤 7 个, 平均体积 326 mm^3, $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 共有 2 只裸鼠形成 3 肿瘤, 平均体积 82 mm^3, 图 1 为接种后第 65 天 $LNCaP^{Neo}$ 和 $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 在裸鼠背部形成的移植瘤, $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 形成的移植瘤明显小于 $LNCaP^{Neo}$ 形成的移植瘤, 说明 AR 反义 RNA 逆转录病毒表达载体转染 LNCaP 细胞后细胞在体内的成瘤能力明显减弱。



A: $LNCaP^{Neo}$; B: $LNCaP^{as\text{-}AR}$

图 1　$LNCaP^{Neo}$、$LNCaP^{as\text{-}AR}$ 在裸鼠背部形成的移植瘤　(第 65 天)

Fig 1　Tumor formation of $LNCaP^{as\text{-}AR}$ and $LNCaP^{Neo}$ in the back of the nude mice　(on day 65)

3　讨论

晚期前列腺癌的标准治疗方法是手术或药物去除睾丸产生的雄激素, 如同时应用雄激素受体拮抗剂去除肾上腺源性雄激素可完全拮抗体内雄激素(Complete androgen blockade), 导致体内前列腺特异性抗原 PSA 快速下降并在一定时间内维持低水平。但绝大多数病人在病情缓解几个月到几年后会由雄激素依赖性前列腺癌发展为雄激素非依赖性前列腺癌, 对抗雄激素治疗不再有效[1,3]。临床上, 研究寻找晚期雄激素非依赖前列腺癌有效治疗方法是目前有关前列腺癌研究的重点任务。

迄今为止, 尽管前列腺癌发生雄激素非依赖性改变的机制尚不完全清楚。目前研究表明, 临床绝大多数雄激素非依赖性前列腺癌细胞仍有转录活性的 AR 表达, 说明 AR 在内分泌治疗失败的前列腺癌中仍起着重要作用[1,2,4]。AR 可通过 AR 突变、扩增, 以配基非依赖的方式生长因子或细胞因子直接激活雄激素受体以及雄激素受体协同激活子等机制大幅度提高 AR 的活性, 导致前列腺癌细胞雄激素非依赖性生长[2,4]。所以, 采用或设计新型 AR 拮抗剂(如 AR 反义核酸、肽或小分子等)阻断 AR 与细胞核 DNA 的结合及蛋白质的相互作用, 从而抑制 AR 的转录活性, 可能成为治疗晚期雄激素非依赖性前列腺癌的有效方法。Eder 等[6]研究发现, 应用雄激素受体反义核酸可显著抑制雄激素非依赖性前列腺癌细胞雄激素受体的表达及细胞增殖。在既往的研究中, 我们应用构建的 AR 反义 RNA 逆转录病毒载体并导入前列腺癌细胞株 LNCaP, 可显著抑制 LNCaP 细胞 AR 表达, 进而抑制雄激素、雌激素及孕激素对 LNCaP 生长刺激作用, 使 LNCaP 细胞 DNA 合成率下降 45%左右[5,9]。本实验显示反义 AR RNA 转染后 $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 细胞体外成瘤能力较对照组 $LNCaP^{neo}$ 及 LNCaP 下降。裸鼠体内成瘤实验也表明, 与对照组 $LNCaP^{neo}$ 及 LNCaP 相比, $LNCaP^{as\text{-}AR}$ 在雄性裸鼠体内不仅平均成瘤时间延长, 成瘤数目少, 而且成瘤体积也明显减小, 即使在没有雄激素去势的条件下 AR 反义 RNA 也可显著降低 LNCaP 细胞的肿瘤生成能力。这一研究结果说明, AR 反义 RNA 将可能成为一种治疗晚期抑制前列腺癌新方法。

参考文献:

[1] Debes J D, Tindall D J. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer[J]. Cancer Lett, 2002, 187(1－2): 1－7.

[2] Navarro D, Luzardo O P, Fernandez L, *et al*. Transition to androgen-independence in prostate cancer[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 81(3): 191－201.

[3] Koivisto P, Kolmer M, Visakorpi T, *et al*. Androgen receptor gene and hor-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

monal therapy failure of prostate cancer[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 1-9.
[4] Balk Steven P. Androgen receptor as a target in androgen-independent prostate cancer[J]. Urology, 2002, 60(3 Suppl 1): 132-139.
[5] 江 军, 王洛夫, 方玉华, 等. 雄激素受体反义 RNA 对雄激素受体表达的抑制作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(6): 501-504.
[6] Eder I E, Hoffmann J, Rogatsch H, *et al*. Inhibition of LNCaP prostate tumor growth *in vivo* by an antisense oligonucleotide directed against the human androgen receptor[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(2): 117-125.
[7] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996. 76-84.
[8] Horoszewicz J S, Loung S S, Kawinski E, *et al*. LNCaP model of human prostatic carcinoma[J]. Cancer Res, 1983, 43(4): 1809-1818.
[9] 王洛夫, 江 军, 方玉华, 等. 雄激素受体反义 RNA 逆转录病毒载体的构建及其鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(6): 641-643.

(编辑 张大春)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)15-1338-01

爱迪注射液治疗胃癌术后肝转移疗效观察

Therapeutic efficacy of AiDi injection for the treatment of patients with liver metastasis of postoperative gastric carcinoma

欧武陵 (广州军区武汉总医院肿瘤血液科, 武汉 430070)

胃癌是常见的恶性肿瘤, 常发生肝脏转移。现回顾分析我院 1998 年 1 月至 2001 年 1 月收治 42 例胃癌术后肝转移患者, 观察爱迪注射液疗效。

1 资料与方法

一般资料: 42 例胃癌根治术后患者, 男 31 例, 女 11 例, 经胃镜、B 超、CT 检查, 病理或临床诊断肝内转移, 年龄 36~74 岁, 平均 54 岁。入组前 4 周未行全身化疗, 肝内转移灶均为多发, 大小: 12 mm× 10 mm~57 mm× 63 mm。一般状况按体力活动评分(KPS)评分 50~80 分, 中位 KPS 评分为 70 分, 预计生存期大于 3 个月。分为治疗组、对照组各 21 例。

治疗方法: 治疗组: 爱迪注射液 50 ml 加入 0.9% 氯化钠注射液 500 ml, 静脉点滴, 1 次/d, 连用 4 周, 配合 DFC 方案化疗: 顺铂(DDP)80 mg/m^2, 静脉点滴, 第 1 天; 亚叶酸钙(CF)50 mg, 静脉点滴, 1 次/d, 第 1~5 天; 5-氟尿嘧啶(5-Fu)500 mg/m^2, 静脉点滴, 1 次/d, 第 1~5 天。每 4 周为 1 疗程, 共 2 疗程。对照组不加用爱迪注射液。每疗程前后复查三大常规、肝肾功能、B 超及 CT。

统计学方法: 采用 χ^2 检验

2 结果

一般状况: 治疗组 8 周后 KPS 评分增加 14 例, 稳定 5 例, 下降 1 例, 提高率 66.6%; 对照组 KPS 评分增加 6 例, 稳定 12 例, 下降 2 例, 提高率 28.6%; 治疗组 KPS 提高率明显高于对照组($P<0.05$)。

症状变化: 8 周后治疗组原食欲减退、消瘦 15 例患者中, 11 例食欲改善, 体质量增加; 恶心、呕吐 6 例, 4 例减轻; 腹部胀痛 10 例, 7 例消失; 黄疸 5 例, 3 例减轻; 低热、盗汗 6 例, 4 例恢复正常, 症状改善率 67.7%。对照组原食欲减退、消瘦 13 例患者中, 6 例食欲改善, 体质量增加; 恶心、呕吐 7 例, 2 例减轻; 腹部胀痛 11 例, 3 例消失; 黄疸 6 例, 2 例减轻; 低热、盗汗 5 例, 1 例恢复正常, 症状改善率 42.8%。症状改善治疗组亦高于对照组($P<0.05$)。

血液学毒性: 治疗后治疗组骨髓抑制 2 度以上者 6 例, 占 28.6%; 对照组 11 例, 占 52.4%, 治疗组骨髓抑制 2 度以上发生率低于对照组($P<0.05$)。

肿瘤大小: 治疗组中完全缓解(CR)病例为 0, 部分缓解(PR)8 例, 稳定(NC)12 例, 进展(PD)1 例, 有效率 38.1%。对照组中完全缓解(CR)病例为 0, 部分缓解(PR)7 例, 稳定(NC)10 例, 进展(PD)4 例, 有效率 33.3%。两组有效率比较无明显差异($P>0.05$)。

3 讨论

爱迪注射液的主要成分为人参、黄芪、刺五加、斑蝥等提取液, 具有抗肿瘤及免疫调节的双重作用。配合化疗治疗晚期消化道癌十分有益[1], 通过本组临床观察, 我们认为该药对胃癌肝转移患者提高生存质量、改善症状、减轻化疗药物的毒副作用, 配合化疗有一定的增敏、协同作用, 但对化疗有效率无明显影响。为晚期肿瘤患者提供了一种新的治疗方法, 也为祖国医学如何与现代医学结合提供了一种新的思路。

关键词: 胃癌; 爱迪注射液; 临床观察
中图法分类号: R735.205 文献标识码: B

作者简介: 欧武陵(1974-), 男, 湖北省天门市人, 医师, 主要从事临床肿瘤内科方面的研究。电话: (027)87887455
收稿日期: 2002-11-18; 修回日期: 2003-05-14

参考文献:

[1] 王迪进. 爱迪注射液配合化疗治疗晚期消化系恶性肿瘤的临床观察[J]. 中国肿瘤临床, 1998, 9(10)31.

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net