DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.014
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
1434 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)16-1434-04

雄激素受体反义RNA对前列腺癌细胞LNCaP生长特性的影响

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生长特性的影响。方法 用含不同浓度雄激素培养基培养前列腺癌细胞LNCaP、$LNCaP^{as\text{-}AR}$(基因组DNA中整合了AR反义RNA逆转录病毒载体的LNCaP细胞)和$LNCaP^{Neo}$(基因组DNA中整合了空逆转录病毒载体的LNCaP细胞),用台盘蓝染色细胞计数法及^{3}H-胸腺嘧啶核苷掺入试验观察体外细胞增殖状况。结果 在1 nmol/L合成雄激素R1881、10 nmol/L 17β-雌二醇和1 nmol/L孕酮浓度下,与$LNCaP^{Neo}$和LNCaP相比,$LNCaP^{as\text{-}AR}$生长显著受抑制($P<0.05$),$LNCaP^{Neo}$与LNCaP细胞增殖无显著性差异($P>0.05$)。^{3}H-胸腺嘧啶核苷掺入试验表明$LNCaP^{as\text{-}AR}$的DNA合成明显抑制率非常显著地高于对照组$LNCaP^{Neo}$ DNA合成抑制率($P<0.01$),显微镜下观察见LNCaP和$LNCaP^{Neo}$生长状态良好,而$LNCaP^{as\text{-}AR}$细胞稀疏且有较多细胞死亡。结论 雄激素受体反义RNA可以改变LNCaP细胞的雄激素非依赖性特征,抑制前列腺癌细胞LNCaP对激素的增殖反应。

关键词:雄激素受体;反义RNA;前列腺癌
中图法分类号:R394.2;R737.25;R977.1$^+$2 文献标识码:A

Effects of androgen receptor antisense RNA on the growth characteristics of human prostatic cancer cell LNCaP

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

Abstract: Objective To investigate the effects of androgen receptor (AR) antisense RNA on the growth characteristics of LNCaP. Methods LNCaP cells transfected with AR antisense RNA retroviral vector pL-AR-SN were designed as LNCaPas-AR. LNCaP cells containing empty vector pLXSN were designed as $LNCaP^{Neo}$. LNCaP and $LNCaP^{Neo}$ served as the controls. After LNCaP and transfected LNCaP cells were cultured in media with synthetic androgen R1881, 17β-estradiol and progesterone, respectively, their growth was determined by trypan blue staining and ^{3}H-thymidine incorporation. Results Compared with that of LNCaP and LNCaPNeo at 1 nmol/L R1881, growth of $LNCaP^{as\text{-}AR}$ was inhibited significantly ($P<0.05$). There was no difference in cell proliferation between LNCaP and LNCaPNeo ($P>0.05$). ^{3}H-thymidine incorporation test showed that the DNA synthetic rate of $LNCaP^{as\text{-}AR}$ was significantly higher than that of $LNCaP^{Neo}$ ($P<0.01$). Microscopic obse
well, but living $LNCaP^{as\text{-}AR}$ cells were rare and dead in large amount. Conclusion AR antisense RNA can change the androgen-dependent characteristics of LNCaP cells and can also inhibit the proliferative responses of human prostatic cancer cell LNCaP to androgen.

Key words: androgen receptor; antisense RNA; prostate carcinoma

前列腺癌具有雄激素依赖性,雄激素去势或/和抗雄激素治疗可导致前列腺癌细胞死亡,这是前列腺癌内分泌治疗的基础,雄激素去势或/和抗雄激素已经成为治疗晚期前列腺癌的金标准[1]。然而绝大多数前列腺癌最终转变为雄激素非依赖性,对内分泌治疗失去反应。研究显示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[2~8]。基于此,采用AR反义RNA抑制前列腺癌细胞AR表达,可能会使前列腺癌细胞的生长特性及对激素反应性发生改变,达到抑制前列腺癌细胞生长的目的。本实验在这方面进行了初步研究。

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)、雌二醇β-Estradiol(美国Sigma)和孕酮Progesterone(美国Sigma),用0.1%

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。电话:(023)68757364
收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-07-04

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

的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, 所含激素浓度分别为 0、10 pmol/L、100 pmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 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 细胞[9,10]。细胞培养: RPMI1640 培养基含 10% 活性炭/葡聚糖处理的 FBS, 37 ℃, 5% CO_2 培养箱内培养。

1.3　细胞增殖检测

1.3.1　不同浓度激素对细胞生长的刺激作用　　接种 LNCaP、$LNCaP^{Neo}$、$LNCaP^{as\text{-}AR}$于 24 孔板, 每孔接种 3×10^4 个细胞(1×10^5/ml), 培养基中不加激素培养 2 d, 更换培养基, 加入含不同浓度激素的培养基, 每种激素浓度每种细胞各 6 孔。培养基内激素终浓度分别为 0、10、100 pmol/L, 1.0、10、100 nmol/L, 每 3 天换液, 第 6 天计数。计数方法: 弃培养基, 每孔加 50 μl 消化液, 37 ℃ 10 min, 加入 250 μl 培养基终止消化, 吹打分散细胞, 用台盼蓝染色计数板计数活细胞, 结果以每 ml 含细胞数表示。显微镜下观察细胞形态变化。用相同方法检测人工合成雄激素 R1881, 雌激素 17β-estradiol 以及黄体酮对细胞增殖的影响, 每一实验至少重复 3 次。

1.3.2　^{3}H-胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)掺入试验　　为了检测 AR 反义 RNA 对 LNCaP 细胞的生长抑制作用, 取对数生长期 LNCaP、$LNCaP^{Neo}$、$LNCaP^{as\text{-}AR}$细胞, 制成 1×10^5/ml 细胞悬液, 接种于 24 孔板, 每孔 0.5 ml。置 37 ℃、5% CO_2 培养箱内培养 48 h。每孔加入 0.5 μl ^{3}H-TdR, 使之终浓度为 3.7 Bq。继续培养 18 h 后终止培养, 小心吸弃培养上清液。用 PBS 漂洗单层细胞 2 次, 用纯甲醇固定 10 min。然后加 2 ml 预冷的 10% 三氯醋酸, 放置 10 min。再用 10% 三氯醋酸重复洗两次, 每次 5 min, 洗去未掺入的^{3}H-TdR。每孔加 0.5 ml 0.3 mol/L NaOH, 在 60 ℃处理 30 min, 然后使之冷至室温。收集上述裂解液, 移入闪烁瓶中, 加 5 ml 闪烁液, 用液体闪烁计数仪测定每分脉冲数(cpm)。计算 DNA 合成抑制率, 计算公式如下[11]。

$$\text{DNA 合成抑制率} = C1 - \frac{\text{对照组(实验组)cpm}}{\text{空白组 cpm}} \times 100\%$$

其中空白组为 LNCaP 细胞, 对照组为 $LNCaP^{Neo}$, 实验组为 $LNCaP^{as\text{-}AR}$。

1.4　统计学分析

采用 t 检验进行显著性检验。

2　结果

2.1　不同浓度激素对细胞生长的刺激作用

LNCaP、$LNCaP^{Neo}$和 $LNCaP^{as\text{-}AR}$在不同浓度 R1881 下的细胞计数见图 1, 可以看出, R1881 浓度不同, 对 LNCaP 细胞的生长刺激作用不同, LNCaP 细胞的最适浓度为 1 nmol/L, 浓度过高或过低均不利于 LNCaP 细胞生长, LNCaP 在无激素状态下生长状态不良, 细胞形态欠佳, 且有细胞脱壁。在 1 nmol/L R1881 浓度下, $LNCaP^{Neo}$与 LNCaP 细胞生长无显著性差异($P>0.05$), $LNCaP^{as\text{-}AR}$细胞计数显著低于前两者($P<0.05$), 镜下见 $LNCaP^{Neo}$生长状态良好, 而 $LNCaP^{as\text{-}AR}$细胞稀疏且有细胞死亡, 见图 2, 表明其对激素的反应性发生改变, 对 R1881 的敏感性降低。

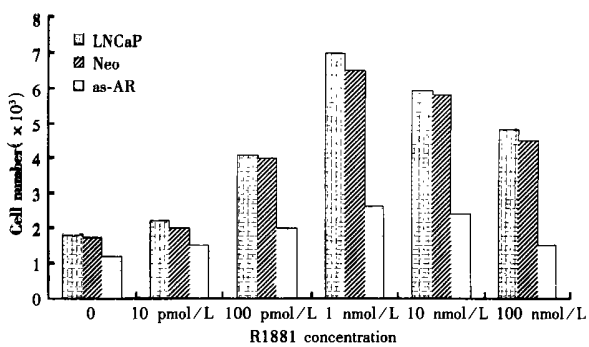
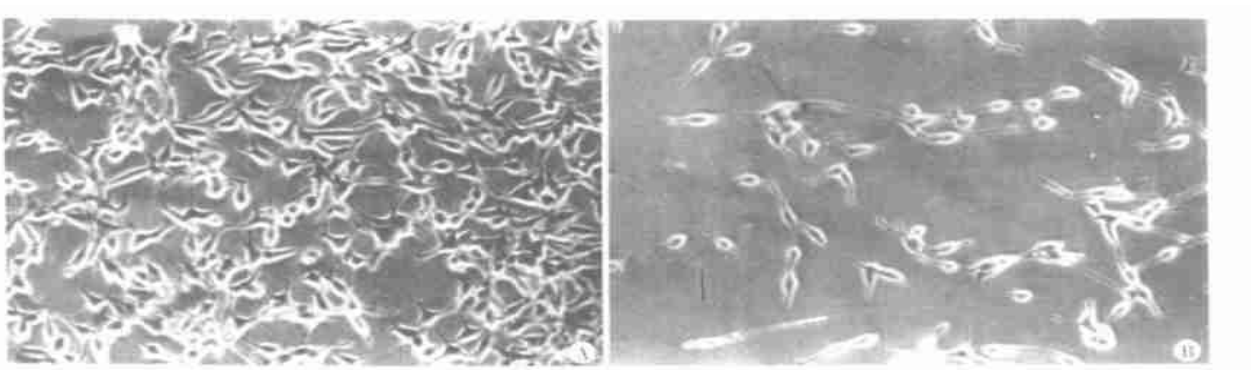


图 1　LNCaP、$LNCaP^{Neo}$和 $LNCaP^{as\text{-}AR}$细胞对 R1881 的生长反应

Fig 1　Proliferative responses of LNCaP, $LNCaP^{neo}$ and $LNCaP^{as\text{-}AR}$ to R1881



A: $LNCaP^{Neo}$ cells grow well; B: Growth of $LNCaP^{as\text{-}AR}$ is inhibited

图 2　$LNCaP^{Neo}$及 $LNCaP^{as\text{-}AR}$在 1 nmol/L 合成雄激素 R1881 培养条件下生长情况

Fig 2　Growth of $LNCaP^{Neo}$ and $LNCaP^{as\text{-}AR}$ in culture medium containing 1 nmol/L synthetic androgen R1881

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

不同浓度的β-Estradiol 对 LNCaP、LNCaP^{Neo}和 LNCaP^{as-AR}的生长刺激作用亦不相同，见图 3，在 100 pM-100 nmol/L 范围可显著刺激 LNCaP 细胞生长，最适浓度为 10 nmol/L；其对 LNCaP^{Neo}的刺激作用与 LNCaP 细胞相似，但 LNCaP^{as-AR}生长明显抑制，表明 LNCaP^{as-AR}对β-Estradiol 的敏感性较 LNCaP 降低。

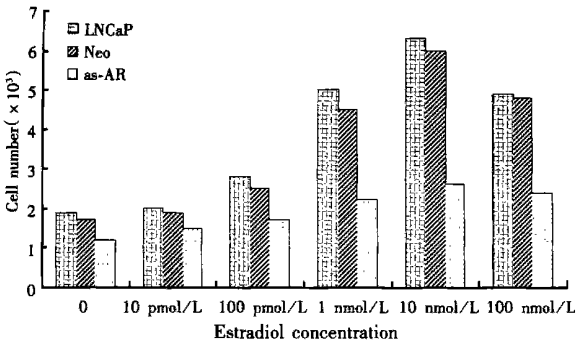


图 3 LNCaP、LNCaP^{Neo}和 LNCaP^{as-AR}细胞对β-Estradiol 的生长反应

Fig 3 Proliferative responses of LNCaP, LNCaP^{neo} and LNCaP^{as-AR} to β-Estradiol

孕酮对 LNCaP、LNCaP^{Neo}和 LNCaP^{as-AR}亦有生长刺激作用，对 LNCaP 细胞的最适浓度为 1 nmol/L，见图 4。

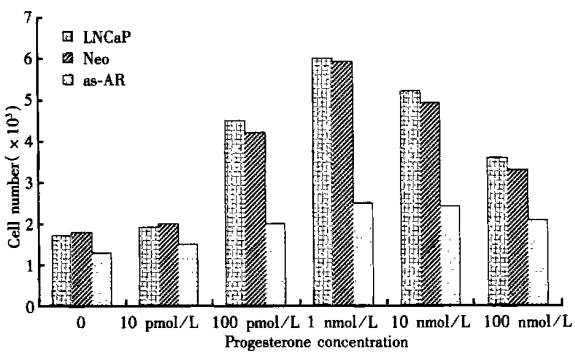


图 4 LNCaP、LNCaP^{Neo}和 LNCaP^{as-AR}细胞对 Progesterone 的生长反应

Fig 4 Proliferative responses of LNCaP, LNCaP^{neo} and LNCaP^{as-AR} to progesterone

2.2 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)掺入试验

根据 DNA 合成抑制率公式计算各细胞的 DNA 合成抑制率，实验组细胞(LNCaP^{as-AR})的 DNA 合成抑制率为(45.67±2.33)%非常显著地高于对照组 LNCaP^{Neo}(2.78±0.72)%($P<0.01$)，表明 LNCaP^{as-AR}的 DNA 代谢减慢，说明 AR 反义 RNA 逆转录病毒表达载体转染 LNCaP 细胞后细胞增殖受到明显抑制。

3 讨论

雄激素及雄激素受体是前列腺发育、生长的基本前提条件。雄激素受体是细胞核配体依赖性转录激活因子，雄激素通过与雄激素受体相结合而发挥作用[1]。在正常前列腺细胞内，去除雄激素，雄激素受体不被激活。前列腺癌细胞在初期也表现为雄激素依赖性，所以，临床晚期前列腺癌病人采用雄激素去势或抗雄激素治疗，这种治疗在初期对病人有效，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，且无有效的替代疗法[2]。迄今为止，前列腺癌发生雄激素非依赖性改变的机制尚不完全清楚，目前研究认为，AR 在内分泌治疗失败的前列腺癌中仍起着重要作用，许多细胞通过敏化(Sensitization)AR 而获得雄激素非依赖性生长[2]。归纳起来主要原因为：①AR 突变：突变 AR 可被雄激素以外的甾体激素如雌激素、孕激素及某些抗雄激素药物激活[3]；②AR 扩增，AR 表达增加，低浓度雄激素环境仍可激活雄激素-AR 通路[4]；③生长因子或细胞因子以配体非依赖的方式直接激活 AR[5,6]；④过量表达 AR 协同激活子(Cofactors)，如类固醇受体辅助激活因子蛋白质(SRAP)及雄激素受体相关蛋白 70(ARA-70)，使 AR 的活性大幅度提高[7,8]。说明前列腺癌 AR 不仅对雄激素调节反应存在多种复杂的“适应”及“逃逸”机制，导致 AR 反常激活，而且可被其它激素反常激活，导致前列腺癌细胞明显增殖反应，表现出对其它性激素生长依赖性。这样，在早期对前列腺癌具有治疗作用的抗雄激素药物(如目前常用的雌激素、雄激素拮抗剂、孕激素)在后期反过来促进前列腺癌细胞增殖。目前，临床上尚难以对这种变化进行预测而采取针对性治疗措施。如能设计一种治疗方法能直接阻断雄激素受体表达及功能激活，避开雄激素受体调节的“适应”及“逃逸”机制，就有可能阻止 AR 的敏化从而达到治疗雄激素非依赖性前列腺癌的目的。

本研究选用的 LNCaP 是雄激素依赖性前列腺癌细胞株，雄激素可刺激其生长，但它同时具有雄激素非依赖性的特征。由于 LNCaP 细胞的 AR 基因第 8 外显子点突变(ACT→GCT)，导致 LNCaP 细胞 AR 基因配体结合位点对雄激素亲和力的特异性发生改变，某些雌激素、孕激素或雄激素拮抗剂可与之结合发挥雄激素的激动剂作用，导致前列腺癌细胞增殖[3,5]，这可能是临床上前列腺癌内分泌治疗抗雄激素撤除综合征发生的重要机制[12]。

在既往的研究中，我们成功构建了 AR 反义 RNA 逆转录病毒载体并导入前列腺癌细胞株 LNCaP，获得了能表达 AR 反义 RNA 的 LNCaP^{as-AR}，并证实 LNCaP^{as-AR}细胞 AR 表达下降[3,4]。本研究显示，LNCaP 细胞在无雄激素存在的环境中，β-雌二醇、孕酮均可刺激其增殖，但采用反义核酸抑制 AR 表达后，此二者的作用减弱，证实β-雌二醇、孕酮可能是通过激活 AR 而刺激 LNCaP 细胞增殖的。这更进一步支持了 Grigorgv 的研

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

究结果[5]。

本研究证实, 对于 LNCaP 细胞, 合成雄激素 R1881 的最适浓度为 1 nmol/L, β-雌二醇的最适浓度为 10 nmol/L, 孕酮的最适浓度为 1 nmol/L。以 3 种激素的 LNCaP 最适浓度培养 $LNCaP^{as-AR}$、$LNCaP^{Neo}$, 发现 $LNCaP^{Neo}$对激素增殖反应性与 LNCaP 相似, 二者无明显差别, 而 $LNCaP^{as-AR}$则与前两者有明显差别, 3 种激素对 $LNCaP^{as-AR}$的生长刺激作用均明显减弱。换言之, $LNCaP^{as-AR}$细胞对这些激素的增殖反应变得迟钝。对这一现象的可能解释是 $LNCaP^{as-AR}$细胞表达 AR 反义 RNA, 导致其细胞内 AR 表达下降。β-雌二醇、孕酮对 LNCaP 的促生长作用均需要 AR 介导。抑制 LNCaP AR 的表达同时抑制 LNCaP 对雄激素、雌激素及孕激素生长刺激作用。另外我们还分别应用 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷掺入试验证实 AR 受体反义 RNA 逆转录病毒表达载体转染 LNCaP 后, DNA 合成率下降 45%左右。

我们的研究结果表明, 应用 AR 受体反义 RNA 逆转录病毒表达载体转染前列腺癌细胞 LNCaP 可改变 LNCaP 对雄激素 R1881、β-雌二醇、孕酮的生长刺激反应, 抑制 LNCaP 细胞的 DNA 合成, 说明应用 AR 受体反义 RNA 抑制 LNCaP 细胞 AR 表达, 改变了 LNCaP 的某些雄激素非依赖性特征, 抑制了 LNCaP 细胞的增殖, 这一研究结果也证实了我们的推论, 应用 AR 反义 RNA 抑制 AR 表达可同时抑制 LNCaP 对多种激素生长刺激作用, 避开前列腺癌 AR 调节的"适应"及"逃逸"机制, 阻止 AR 敏化, 达到治疗雄激素非依赖性晚期前列腺癌的目的。

参考文献:

[1] Jenster G. The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer[J]. Semin Oncol, 1999, 26(4): 407—421.

[2] Koivisto P, Kolmer M, Visakorpi T, *et al*. Androgen receptor gene and hormonal therapy failure of prostate cancer[J]. Am J Pathol, 1998, 152(1): 1—9.

[3] Veldscholte J, Ris-Stalpers C, Kuiper G G, *et al*. A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 173(2): 534—540.

[4] Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, *et al*. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer[J]. Cancer Res, 1997, 57(2): 314—319.

[5] Grigoryev D N, Long B J, Njar V C, *et al*. Pregnenolone stimulates LNCaP prostate cancer cell growth *via* mutated androgen receptor[J]. J Steroid Biochem Biol, 2000, 75(1): 1—10.

[6] Jenster G. Ligand-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer by growth factors and cytokines[J]. J Pathol, 2000, 191(3): 227—228.

[7] Miyamoto H, Yeh S, Wilding G, *et al*. Promotion of agonist activity of antiandrogens by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(13): 7379—7384.

[8] Kawashima H, Takano H, Sugita S, *et al*. A novel steroid receptor co-activator protein (SRAP) as an alternative form of steroid receptor RNA-activator gene: expression in prostate cancer cells and enhancement of androgen receptor activity[J]. Biochem J, 2003, 369(Pt 1): 163—171.

[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.

[10] 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): 511—514.

[11] 惠宏襄, 王成济, 金　明, 等. 逆转录病毒载体表达的 TGFα 反义 RNA 对人脑胶质瘤细胞 BT325 的生长抑制作用[J]. 肿瘤, 1996, 16(1): 31—32.

[12] Paul R, Breul J. Antiandrogen withdrawal syndrome associated with prostate cancer therapies: incidence and clinical significance[J]. Drug Saf, 2000, 23(5): 381—390.

(编辑　张大春)

(上接 1433 页)

附。绿脓杆菌的菌落分为两种, 即粘液型和粗糙型(非粘液型)菌落。研究显示菌体粘附与粘膜上皮, 在粘液型菌株是有细胞外粘多糖(MEP)介导, 而粗糙型菌株则由菌毛(Pili)介导[1]。目前认为粘附过程包括非特异结合和细菌表面粘附素与细胞表面的受体之间特异性结合两个方面。细菌表面疏水性(CSH)在微生物与宿主细胞之间早期非特异性结合过程中, 通过疏水键的作用, 介导粘附过程。本研究结果提示粘液型的菌株在粘附早期粘附宿主细胞的能力要好于粗糙型, 而其疏水性要高于粗糙型, 说明 CSH 在绿脓杆菌初始粘附过程中起一定的作用, 在粘附的初期疏水力作用参与了微生物与宿主表面的非特异粘附和相互作用; 我们的研究也发现在粘附作用一段时间后(30 min), 两种类型的绿脓杆菌的粘附数逐渐趋于一致。有研究表明绿脓杆菌菌体表面的岩藻糖、表面蛋白等成分可能是决定表面疏水的分子, 但具体的作用机制尚待阐明[2]。

综上我们认为高 CSH 可增加绿脓杆菌非特异性粘附, 间接促进绿脓杆菌粘附早期的局部定植能力, 而粘附性代表着绿脓杆菌对宿主细胞的直接侵袭力, 二者的致病性关系, 仍值得进一步探讨。

关键词: 烧伤; 疏水性; 菌株
中图法分类号: R378.99$^+$1　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Boyd A, Chakrabarty A M. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(7): 2355—2359.

[2] Lillehoj E P, Hyun S W, Kim B T, *et al*. Muc1 mucins on the cell surface are adhesion sites for *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 280(1): L181—187.

(编辑　张　宁)

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