DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.017
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)06-0501-04

论著

雄激素受体反义RNA对前列腺癌细胞雄激素受体表达的抑制作用研究

江 军,王洛夫,方玉华,靳风烁,靳文生,李彦锋 (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 观测雄激素受体(AR)反义RNA逆转录病毒表达载体在前列腺癌细胞中的表达及其对AR表达的影响。方法 将AR反义RNA逆转录病毒表达载体导入前列腺癌细胞株LNCaP,PCR检测AR目的片段在重组LNCaP细胞基因组中的存在,RT-PCR检测AR反义RNA表达和AR mRNA水平,Western blot检测AR蛋白表达水平。结果 PCR在$LNCaP^{as\text{-}AR}$基因组DNA中扩增出了AR目的片段,表明AR目的片段整合到了细胞基因组。RT-PCR证实$LNCaP^{as\text{-}AR}$有AR反义RNA表达,且其AR mRNA水平较LNCaP和空载体转染的$LNCaP^{Neo}$显著下调($P<0.05$),Western blot证实$LNCaP^{as\text{-}AR}$细胞AR蛋白含量显著下降($P<0.05$)。结论 AR反义RNA可抑制前列腺癌细胞AR表达。

关键词:反义核苷酸;雄激素受体;前列腺癌
中图法分类号:R347.911;R392.13;R737.25 文献标识码:A

A study of the inhibitive effect of androgen receptor antisense RNA on androgen receptor in prostate cancer cells

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

Abstract: Objective To detect the expression of androgen receptor (AR) antisense RNA retroviral vector in prostate cancer cell LNCaP and the effect of AR antisense RNA on the expression of ARmRNA and its protein. Methods The AR antisense RNA retroviral vector was transfected into the prostate cancer cell LNCaP. The presence of the AR inserted fragment was examined by PCR in the genomic DNA of recombinant LNCaPas-AR. The expression of AR antisense RNA and the level of AR mRNA were detected by RT-PCR. The level of AR protein was detected by Western blot. Results A fragment containing the AR inserted fragment was amplified by PCR in the genomic DNA of LNCaPas—AR cells, demonstrating that the AR cDNA fragment was integrated into the genomic DNA of the cells. AR antisense RNA was detected in LNCaPas-AR cells by RT-PCR and the level of AR mRNA was significantly down-regulated in LNCaPas-AR as compared with LNCaP and LNCaPNeo ($P<0.05$). Western blot analysis showed a significant reduction of AR protein in LNCaPas-AR as compared with those of LNCaP and LNCaPNeo ($P<0.05$). Conclusion AR antisense RNA can inhibit the AR expression in prostate cancer cell LNCaP.

Key words: antisense ribonucleic acid; androgen receptor; prostate cancer

前列腺癌(Prostate cancer, PC)是西方工业国家老年男性最常见的恶性肿瘤之一,我国前列腺癌的发病率也呈上升趋势[1,2]。前列腺癌具有雄激素依赖性,雄激素的作用通过雄激素受体(Androgen receptor, AR)介导,在雄激素信号传导途径中,AR起着关键作用[3]。AR不仅在原发性前列腺癌中有表达,而且在复发性前列腺癌、前列腺癌转移灶和内分泌治疗失败的前列腺癌中均有表达[3~6]。现有研究表明,AR可能与前列腺癌的发生有关,而且AR可能与前列腺癌内分泌治疗失败有关[3]。鉴于AR在前列腺癌进展、复发及治疗中的作用,我们通过将AR反义RNA逆转录病毒表达载体导入前列腺癌细胞株LNCaP,观测其在前列腺癌细胞中的表达及其对AR表达的影响。

1 材料和方法

1.1 雄激素受体反义RNA逆转录病毒载体的构建、包装

我们已成功构建了雄激素受体反义RNA逆转录病毒载体pL-AR-SN,并包装出重组逆转录病毒。重组的逆转录病毒载体含有反向插入的AR cDNA片段,该片段长237 bp,含AR基因外显子B、C的绝大部分,参阅文献[7]。

1.2 逆转录病毒感染LNCaP细胞及抗性克隆的获得

将5×10^5 LNCaP细胞(前列腺癌细胞株,美国ATCC)接种

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:2002-08-29;修回日期:2003-01-20

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

于6孔培养板，培养基为含10%FBS的RPMI1640，37℃、5% CO_2培养箱内培养2 d，移去培养液，加入1 ml含0.1 ml逆转录病毒上清的上述培养液，再培养2 d，将细胞按1∶3传代，培养液中加入G418(500 μg/ml)，选择培养12～15 d，直至可见抗性克隆。挑选抗性克隆并扩大培养。将重组逆转录病毒感染所得的抗性LNCaP细胞命名为$LNCaP^{as\text{-}AR}$，将空载体病毒感染所得的抗性LNCaP细胞命名为$LNCaP^{Neo}$。

1.3 PCR检测插入片段在基因组DNA中的存在

采用TriPure试剂(瑞士Roche)提取$LNCaP^{as\text{-}AR}$、$LNCaP^{Neo}$、LNCaP细胞基因组DNA，采用引物P1、P2进行扩增。

P1：5′-CCC TTG AAC CTC CTC GTT CGA CC-3′

P2：5′-CTA ACT GAC ACA CAT TCC ACA GCC G-3′

P1、P2引物位于pLXSN多克隆位点的两侧，扩增片段的长度为118 bp，而对pL-AR-SN其扩增片段长度为329 bp。

1.4 RT-PCR检测AR反义RNA的存在

采用高纯度RNA提取试剂盒(瑞士Roche)，提取LNCaP、$LNCaP^{as\text{-}AR}$和$LNCaP^{Neo}$细胞总RNA，分别用AR特异性引物P3和随机六聚体引物反转录为cDNA1和cDNA2，以引物P3、P4扩增cDNA1，采用pLXSN引物P1、P2和β-actin引物P5、P6扩增cDNA2。

P3：5′-CGGGATCCGCCCATTGACTATTACTT-3′

P4：5′-CGGAATTCCATAACATTTCCGAAGAC-3′

P5：5′-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3′

P6：5′-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3′

P3、P4为AR特异性引物，扩增产物长度为237 bp，P5、P6引物扩增片段长度为587bp。

1.5 RT-PCR检测AR mRNA的水平

采用AR特异性下游引物P4进行反转录，采用AR引物P3、P4扩增，以β-actin作外参照，Gel Doc 2000凝胶扫描分析系统(美国Bio-Rad)扫描凝胶，分析结果。

1.6 Western blot定量检测AR蛋白的表达

细胞总蛋白质的提取、定量、电泳、转膜参照文献[8]进行，杂交、显影采用Lumi-LightPLUS Western Blotting Kit进行，AR抗体N-20，为兔抗人多克隆IgG(美国Santa Cruz)，用Bio-Red凝胶扫描分析系统扫描X线片，测定各条带吸光度值，结果以校正吸光度值表示。

1.7 统计学分析

采用t检验。

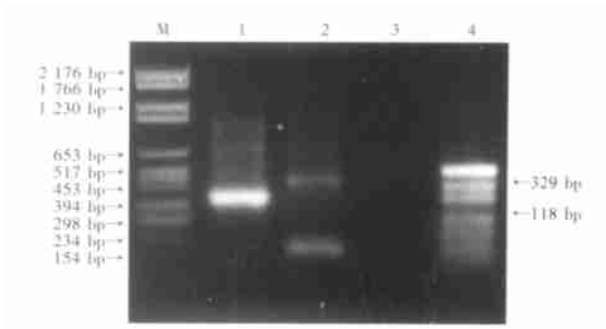
2 结果

2.1 检测AR目的片段在重组细胞基因组DNA中的存在

PCR产物电泳结果见图1，经与DNA分子量标准对照，发现$LNCaP^{Neo}$有大小符合118 bp的带，$LNCaP^{as\text{-}AR}$有329 bp带，而LNCaP未见扩增条带，证明AR目的片段整合到了LNCaP细胞的基因组。

2.2 RT-PCR检测AR反义RNA的存在

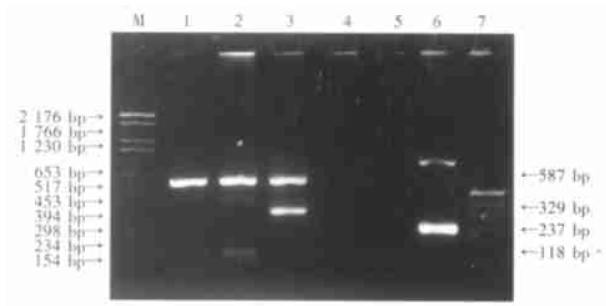
提取LNCaP、$LNCaP^{as\text{-}AR}$和$LNCaP^{Neo}$的细胞总RNA，反转录后，以cDNA1为模板，以引物P1和P2行PCR，在$LNCaP^{as\text{-}AR}$应扩增出237 bp产物，而LNCaP、$LNCaP^{Neo}$无产物；以cDNA2为模板，以引物P3、P4和β-actin引物P5、P6行PCR，在LNCaP应只扩增出587 bp产物，在$LNCaP^{as\text{-}AR}$可扩增出329 bp和587 bp产物，在$LNCaP^{Neo}$可扩增出118 bp和587 bp产物。各取10 μl PCR产物，1.5%琼脂糖凝胶电泳，结果见图2，经与分子量标准比较，各泳道的条带均与预期相同，表明$LNCaP^{as\text{-}AR}$细胞有AR反义RNA产生。



M：pBR328 DNA/*Bgl* Ⅰ+*Hinf* Ⅰ Marker；1：$LNCaP^{as\text{-}AR}$；2：$LNCaP^{Neo}$；3：LNCaP；4：DNA Marker

图1 PCR验证AR目的片段在基因组DNA中的存在(1.5%琼脂糖凝胶)

Fig 1 Detection of inserted AR fragment in genome DNA of $LNCaP^{as\text{-}AR}$ by PCR(1.5% agarose gel)



M：pBR328 DNA/*Bgl* Ⅰ+*Hinf* Ⅰ Marker；1，2，3：amplification of cDNA2 by primer P3，P4 and P5，P6. Lane 1：LNCaP；Lane 2：$LNCaP^{Neo}$；Lane 3：$LNCaP^{as\text{-}AR}$；4，5，6：amplification of cDNA1 by P1 and P2. Lane 4：LNCaP；Lane 5：$LNCaP^{Neo}$；Lane 6：$LNCaP^{as\text{-}AR}$；7：DNA Marker

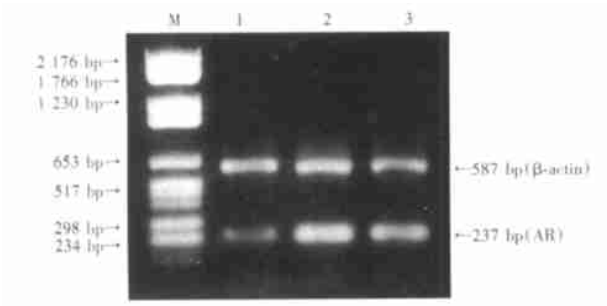
图2 RT-PCR检测AR反义RNA(1.5%琼脂糖凝胶)

Fig 2 Detection of AR antisense RNA by RT-PCR(1.5% agarose gel)

2.3 RT-PCR检测AR mRNA的水平

图3显示不同细胞在相同条件下RT-PCR的结果，采用的是β-actin作为外参照，在总RNA量相同的条件下β-actin的扩增带基本相同(扩增片段长度为587 bp)，引物P1、P2在各细胞均有237 bp带产生，但$LNCaP^{as\text{-}AR}$的条带明显较LNCaP和$LNCaP^{Neo}$减弱，凝胶扫描分析显示，$LNCaP^{as\text{-}AR}$的吸光度比值与后二者有显著差异($P<0.05$)，见表1，而后二者之间无显著差异($P>0.05$)。以上结果说明由于$LNCaP^{as\text{-}AR}$表达AR反义RNA导致该细胞的AR mRNA下调。

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



M: pBR328 DNA/ *Bgl* I + *Hnf* I Marker; 1: LNCaP$^{as\text{-}AR}$; 2: LNCaP^{Neo}; 3: LNCaP

图 3　RT-PCR 检测 AR mRNA 水平(1.5% 琼脂糖凝胶)

Fig 3　AR mRNA levels of the three types of cells detected by RT-PCT(1.5% agarose gel)

表 1　RT-PCR 检测 AR mRNA 水平(n=7)

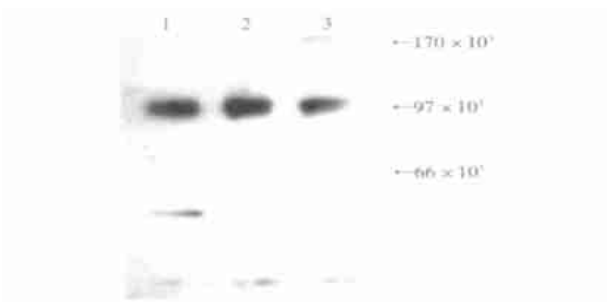
Tab 1　AR mRNA levels detected by RT-PCR(n=7)

Cells	Relative optical density($\bar{x}\pm s$)
LNCaP	1.03±0.23 *
LNCaP^{Neo}	1.10±0.28 *
LNCaP$^{as\text{-}AR}$	0.43±0.11

*: $P<0.05$ *vs* LNCaP$^{as\text{-}AR}$

2.4　雄激素受体蛋白含量的检测

杂交、显影后, 各泳道均见到特异性杂交带, 与蛋白分子量比较, 特异性带的位置符合(110～112)×10^3, 见图 4, 比较各特异带, 显示 LNCaP$^{as\text{-}AR}$的条带明显较 LNCaP 和 LNCaP^{Neo}减弱, 图象分析显示, LNCaP$^{as\text{-}AR}$条带的光密度值与 LNCaP 和 LNCaP^{Neo}之间存在显著差异($P<0.05$), 而后二者无显著差异($P>0.05$), 见表 2, 表明 LNCaP$^{as\text{-}AR}$中 AR 蛋白的含量较 LNCaP 和 LNCaP^{Neo}显著下降。



1: LNCaP; 2: LNCaP^{Neo}; 3: LNCaP$^{as\text{-}AR}$

图 4　Western blot 检测 AR 蛋白含量(8% SDS-PAGE)

Fig 4　Detection of AR protein content in the three types of cells by Western blot(8% SDS-PAGE)

表 2　Western blot 检测 AR 蛋白含量(n=7)

Tab 2　Content of AR protein in the three types of cells detected by Western blot (n=7)

Cells	Revised optical density($\bar{x}\pm s$)
LNCaP	34.69±0.68 *
LNCaP^{Neo}	35.45±1.05 *
LNCaP$^{as\text{-}AR}$	24.77±1.03△

*: $P<0.05$ LNCaP$^{as\text{-}AR}$

3　讨论

尽管前列腺癌的发病机制尚不完全清楚, 但研究表明雄激素受体与前列腺癌的发生、进展与复发有关[3], 因此抑制前列腺癌细胞 AR 表达即可能改变前列腺癌细胞的生物学特性, 从而抑制前列腺癌细胞的生长。本研究即利用重组 AR 反义 RNA 逆转录病毒表达载体转染前列腺癌细胞株 LNCaP, 观察其对 LNCaP 细胞 AR 表达的影响。

雄激素受体是甾体激素受体超家族的一员, 属于核内受体[4-9]。AR 蛋白由 AR 基因的 8 个外显子编码, 可分为三个功能区: ①N-端区: 由外显子 A 编码, 其功能主要是转录激活。②DNA 结合区: 由外显子 B 和 C 编码。③配基结合区: 由外显子 D 到 H 编码, 其功能主要是与激素结合形成激素-受体复合物, 促使受体活化及核内转位并可促进受体二聚化。在 AR 的 8 个外显子中, 外显子 B 和 C 高度保守, 很少发生突变[10], 且其核苷酸序列与其他甾体激素受体的同源性低; 该区完整性的破坏可导致 AR 无法与目的基因结合。因此, 本研究选择此区的 cDNA 序列作为构建 AR 反义 RNA 逆转录病毒载体的插入片段。

用重组逆转录病毒感染 LNCaP 细胞, 获得的 G418 抗性细胞即为重组 LNCaP 细胞。由于逆转录病毒能使所转导基因整合入细胞基因组, 造成长期基因导入和表达, 因此我们先用 PCR 法鉴定其是否整合到了细胞基因组。采用 pLXSN 载体多克隆位点两旁序列作引物, 在 LNCaP$^{as\text{-}AR}$扩增出了 329 bp 产物, 在 LNCaP^{Neo}扩增出了 118 bp 产物, LNCaP 无扩增产物, 与理论片段长度吻合, 说明 LNCaP$^{as\text{-}AR}$基因组整合有转录 AR 反义 RNA 的目的 DNA 片段。

逆转录病毒带有内部启动子, 其中 5′-LTR 启动子和增强子驱动插入 DNA 的转录。为验证 LNCaP$^{as\text{-}AR}$是否表达 AR 反义 RNA, 我们采用 RT-PCR 方法进行鉴定。采用随机六聚体引物能将所有 RNA 反转录成 cDNA, 用 pLXSN 引物(P5、P6)应能扩增出 329 bp 产物; 采用 AR 上游引物 P1 进行反转录只能将 AR 反义 RNA 反转录成 cDNA, 采用引物 P1、P2 进行 PCR 能扩增出 237 bp 产物, 本实验的结果与理论吻合, 表明 LNCaP$^{as\text{-}AR}$能持续表达 AR 反义 RNA。

反义 RNA 能特异地与特定 mRNA 互补结合, 阻断 mRNA 的翻译, 并激活 RNase III 降解 mRNA, 从而使所针对的特定基因表达的蛋白质减少[11]。但并不是所有的反义 RNA 均能达到预期结果, 因为反义 RNA 是否有效取决于一些不确定的因素: ①反义 RNA 能否与 mRNA 结合形成二聚体, 因为不论是 mRNA 还是反义 RNA 均可形成二级结构, 若其结合部位不暴露, 则不能结合。尽管目前有模拟 RNA 二级结构的计算机软

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

件,但其模拟的二级结构只能作为设计反义 RNA 的参考,而并不代表 RNA 在细胞内的真实结构;②形成的二聚体结构能否引发 RNase Ⅲ对靶 mRNA 的降解。RNase Ⅲ是专门针对双链 RNA 的核酸酶,但其激活的机制复杂,并非有双链 RNA 就能使其激活;③反义 RNA 在细胞内表达量的高低:任何基因的表达都受很多因素调控,反义 RNA 的表达也不例外;④反义 RNA 自身的稳定性:稳定的反义 RNA 对靶 mRNA 的作用比不稳定的反义 RNA 要好;⑤mRNA 的寿命:有的靶 mRNA 寿命很短,只有 1~2 min,它们和反义 RNA 结合的机会较少,因而较不敏感,反之,另一些 mRNA 则很稳定,寿命可达 10 多分钟,则其对相应的反义 RNA 的抑制作用就很敏感。本研究在证实重组细胞 LNCaP$^{as\text{-}AR}$有 AR 反义 RNA 表达后,需要进一步证实 AR mRNA 是否下降。采用 AR 下游引物 P2 作反转录,只有 AR mRNA 被反转录成 cDNA,采用引物 P1、P2 行 PCR,证实 LNCaP$^{as\text{-}AR}$的 AR mRNA 量较对照 LNCaP^{Neo}及亲代细胞 LNCaP 显著下降,表明是 AR 反义 RNA 导致了 AR mRNA 的降低,同时也证实我们所设计的反义 RNA 是有效的。

由于靶 mRNA 的减少及与反义 RNA 结合,势必导致蛋白质的合成降低。我们的试验结果显示,LNCaP$^{as\text{-}AR}$的 AR 蛋白质含量显著低于 LNCaP^{Neo}和 LNCaP,这充分说明我们所设计的反义 RNA 能有效抑制 AR 的表达。

本实验的结果表明,应用重组 AR 反义 RNA 逆转录病毒表达载体可显著抑制 LNCaP 细胞 AR mRNA 从而抑制 AR 蛋白表达,这可能导致 LNCaP 细胞的生物学特性变化,抑制细胞的生长增殖。

参考文献:

[1] Landis S, Murray T, Bolden S, *et al*. Cancer statistics 1999[J]. CA Cancer J Clin, 1999, 49(1): 8-31.

[2] 刘耀庭, 李秀霞, 程 伟. 泌尿外科肿瘤发病情况的变化[J]. 临床泌尿外科杂志, 1997; 12(1): 47-48.

[3] 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.

[4] Mendelsohn L G. Prostate cancer and the androgen receptor: strategies for the development of novel therapeutics[J]. Prog Drug Res, 2000, 55(2): 213-233.

[5] Hobisch A, Culig Z, Radmayr C, *et al*. Distant metastases from prostatic carcinoma express androgen receptor protein[J]. Cancer Res, 1995, 55(14): 3068-3072.

[6] Ruizeveld de Winter J A, Janssen P J, Sleddens H M, *et al*. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer[J]. Am J Pathol, 1994, 144(4): 735-746.

[7] 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.

[8] 萨姆布鲁克, E F, 费里奇, T, 曼尼阿蒂斯 著. 金冬雁, 黎孟枫 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 北京: 科学技术出版社, 1992. 888-897.

[9] Brinkmann A O, Blok L J, de Ruiter P E, *et al*. Mechanisms of androgen receptor activation and function[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999, 69(1-6): 307-313.

[10] Lubahn D B, Brown T R, Simental J A, *et al*. Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification of a point mutation in a family with complete androgen insensitivity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(23): 9534-9538.

[11] Denhart D T. Mechanism of action of antisense RNA[J]. Ann N Y Acad Sci, 1992, 660(1): 70-76.

(编辑 郭建秀)

(上接 500 页)

喷散石明止血液后退镜。3 d 后复查胃镜,见原先出血部位仍有新鲜出血,周围粘膜未见异常,以钛夹 2 个夹闭出血点,生理盐水冲洗,未见新鲜血液流出后退镜。

病例 3 男,52 岁,因"腹痛、黑便、乏力半年,加重伴反酸、双下肢肿 20 d"入院。20 年前曾因"急性胃穿孔"行胃大部切除术,术前无饮酒及服药史。查体未见异常。胃镜检查见吻合口距门齿 50 cm,胃腔内可见新鲜血液,未见明显出血灶,以石明止血液 20 ml 喷散后退镜。2 h 后复查胃镜,见胃腔内仍有新鲜血液,吻合口粘膜大弯侧靠贲门方可见新鲜渗血,无明显搏动性,周围粘膜无溃疡及糜烂。考虑 Dieulafoy 病,遂以 3 个钛夹夹闭出血灶,以生理盐水冲洗,未见活动性出血后退镜。3 d 后复查胃镜,未见明确活动性出血。

讨论

Dieulafoy 病[1]是由于胃壁血管畸形,胃供血动脉进入胃粘膜下后,不是逐渐变细形成毛细血管,而是一直保持管径不变,凸出于胃腔,在食物和胃液的作用下引起畸形动脉破裂出血。结合本组病例,我们体会:①溃疡合并出血者,如果内镜下溃疡处无活动性出血,而胃腔内仍有新鲜出血的迹象,应仔细检查胃腔的其它部位,以排除 Dieulafoy 病。②Dieulafoy 病多位于距贲门 6 cm 以内的胃壁,因此,对于过去由于溃疡或肿瘤行远端胃大部切除的患者,在发生上消化道出血,内镜下没有发现溃疡或占位的情况下,亦要考虑是否为 Dieulafoy 病。③由于 Dieulafoy 病的出血来自畸形的动脉破裂,出血量较大,内镜下往往由于胃腔内有较多血液,影响观察,这时应该将积血抽尽后再仔细寻找出血部位。④Dieulafoy 病的治疗,主要包括手术切除和内镜下治疗两种。目前内镜下止血治疗 Dieulafoy 病已成为首选。内镜下治疗有多种方式,如喷散止血药、肾上腺素局部注射、硬化剂注射、热凝固(电凝或微波止血)、血管钳夹等。其中内镜直视下出血部位钳夹止血,由于方法简单,病人痛苦小,止血疗效显著,越来越受到内镜医师的欢迎。

关键词:Dieulafoy 病;内镜
中图法分类号:R573.2 文献标识码:B

参考文献:

[1] Kasapidis P, Georgopoulos P, Delis V, *et al*. Endoscopic management and long-term follow-up of Dieulafoy's lesions in the upper GI tract[J]. Gastrointes Endosc, 2002, 55(4): 527-529.

(编辑 刘洪娥)

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