

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)23-2119-03

## 雄激素受体在不同激素依赖特性的前列腺癌细胞株中的表达及活性

韩毅力<sup>1</sup>, 罗勇<sup>2</sup>, 贺大林<sup>1</sup>, 祝广峰<sup>1</sup>, 程鹤鹏<sup>1</sup>

(1 西安交通大学医学院第一附属医院泌尿外科, 陕西 西安 710061; 2 首都医科大学附属北京安贞医院泌尿外科, 北京 100029)

**Expression and transcription of androgen receptor in prostate cancer cell lines with different characteristics of androgen independence**HAN Yi-Li<sup>1</sup>, LUO Yong<sup>2</sup>, HE Da-Lin<sup>1</sup>, ZHU Guang-Feng<sup>1</sup>, CHENG He-Peng<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Urology, First Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, <sup>2</sup>Department of Urology, Affiliated Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China

**【Abstract】** AIM: To investigate the transcription and protein expression of androgen receptor (AR) in four prostate cancer cell lines with different characteristics of androgen dependence. **METHODS:** The transcription and protein expression of AR were detected by Western Blot and RT-PCR in four different prostate cancer cell lines. **RESULTS:** AR was detected with lower transcription and protein expression levels in LNCaP cells, which had lower metastatic potential. On the other hand, the higher transcription and protein expression of AR were observed in C4, C4-2, C4-2B cells, which was associated with higher metastatic potential. The remarkable differences in the expression of AR between the androgen-dependent cell line (LNCaP) and the androgen-independent cell lines (C4, C4-2, C4-2B) were observed. **CONCLUSION:** The actual variation of AR in the expression and transcription activity happens during the pathological process from androgen-dependent to androgen-independent in prostate cancer cell lines. Expression of AR protein may play important roles in the development of prostate cancer.

**【Keywords】** receptor, androgen; prostate neoplasms; hormone independent

**【摘要】**目的 探讨雄激素受体(AR)在前列腺癌激素依赖性转变过程中的可能作用。方法 分别应用 Western Blot 和 RT-PCR 法检测四种前列腺癌细胞株(LNCaP, C4, C4-2 及 C4-2B)的 AR 蛋白表达差异和转录活性差异状况, 并初步分析

收稿日期 2007-06-20; 接受日期 2007-09-07

通讯作者 贺大林. Tel (029) 85323661 Email hadalinxjtu@sohu.com  
作者简介 韩毅力. 博士 主治医师. Tel (029) 85323661 Email hanyili2000@163.com

其在前列腺癌雄激素依赖性转化过程中所发挥的作用。结果 AR 在雄激素依赖的低转移性细胞株 LNCaP 中的蛋白表达量和转录活性最低, 同时 AR 在雄激素非依赖的高转移性细胞株 C4, C4-2 及 C4-2B 细胞株中的蛋白表达、转录活性却逐渐增高。结论 AR 在雄激素依赖特性和转移潜能不同的前列腺癌细胞株之间确实存在着有意义的差异表达, 而这种表达差异可能在影响前列腺癌激素依赖性转变过程中发挥重要作用。

**【关键词】** 雄激素受体 前列腺肿瘤 激素非依赖性

**【中图分类号】** R737.25 **【文献标识码】** A

## 0 引言

恶性程度低的部分前列腺癌(prostatic carcinoma, PCA)患者可以长期带瘤生存, 部分恶性程度高的 PCA 患者却进展很快、广泛转移, 尤其易对抗雄激素治疗产生耐受特性, 是导致复发和死亡的主要原因。对于雄激素非依赖前列腺癌(androgen independent prostate cancer, AIPC)的发生原因, 尽管已做了大量基础与临床的研究工作, 但是确切分子机制目前仍然不清楚。因此我们采用能模拟 PCA 临床进展过程的细胞模型, 即 LNCaP/C4-2 细胞系列(包括 C4, C4-2, C4-2B 细胞)检测低转移的雄激素依赖型前列腺癌细胞(ADPC)细胞 LNCaP 和高转移的 AIPC C4, C4-2, C4-2B 细胞中雄激素受体(androgen receptor, AR)的蛋白表达和基因转录活性, 旨在探讨 AR 在 PCA 细胞雄激素依赖性转变过程中可能的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人 Pca 细胞株 LNCaP 及其亚细胞系 C4, C4-2 和 C4-2B 细胞均由美国 Emory 大学 Leland WK Chung 教授馈赠。Trizol 购自 Invitrogen 公司。RT 及 PCR 试剂盒均购自 Fermentas 公司。小鼠抗人 AR mAb 购自美国 Santa Cruz 公司, 兔抗人  $\beta$ -actin mAb 及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗均购自武汉博士德公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 用含 100 mL/L 胎牛血清(杭州四季青公司)的 T-medium(美国 Gibco 公司)在 37℃,

50 mL/L CO<sub>2</sub> 的孵箱内培养,以 1.25 g/L 胰酶和 0.2 g/L EDTA 的混合液消化传代。

1.2.2 RT-PCR 提取细胞总 RNA[方法参照分子克隆指南(第 3 版)]. RT-PCR 反应:0.5 mL 离心管中加入 4 μg 总 RNA, Oligo(dT) 18 μL, 加 DEPC 处理水至 12 μL, 70℃ 温浴 5 min 后取出冰浴,依次加入 5× 反应缓冲液 4 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, RNA 酶抑制剂 1 μL (20 U), 37℃ 温浴 5 min 后,加 1 μL (200 U) M-MuLV 逆转录酶,混匀后 42℃ 温浴 1 h, 70℃ 灭活 10 min. PCR 反应体系为 2× 反应缓冲液 12.5 μL, 引物正义链各 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL 以及 DEPC 处理水 9.5 μL 至终体积 25 μL. AR 的反应参数:93℃ 3 min, 进入循环:93℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s, 29 个循环, 72℃ 10 min. β-actin 的反应参数:94℃ 3 min, 进入循环:94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 45 s, 29 个循环后, 72℃ 5 min. AR 引物正义链:5' GCAATCATTTCTGCTGGCGCA 3', 反义链:5' AGC-TACTCCGGACCTTACG 3'. β-actin 正义链:5' GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 3', 反义链:5' CTCCTTA-ATGTCACGCACGATTC 3'. 引物由上海生物工程公司合成。

1.2.3 蛋白提取 将处于对数生长期且状态良好的细胞,用 10 g/L NP-40 细胞裂解液(10 g/L NP-40, pH 7.4 Tris 碱 50 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, 1 g/L SDS, 5 g/L 脱氧胆酸盐, 200 mg/L 苯甲基磺酰氟, 50 mg/L 抑肽酶)裂解细胞,震荡混匀,4℃ 静置 30 min,然后在 4℃ 条件下 2 0627 g 离心 10 min,提取上清总蛋白.用考马斯亮蓝 G-250 定量,最后 100℃ 沸水中变性 10 min.

1.2.4 Western Blot 按每孔 20 μg 上样,SDS-PAGE 90 V 电压下分离,再用 25 V 电压将凝胶上的蛋白半干转至硝酸纤维素膜(NC 膜)上.5 g/L 脱脂奶粉将膜封闭 2 h 后,加入一抗(小鼠抗人 AR, 稀释度为 1:300;兔抗人 β-actin, 稀释度为 1:3000)4℃ 孵育过夜,TBS 充分漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释度为 1:3000)孵育 2 h. 化学发光显色。

## 2 结果

2.1 AR 在不同雄激素依赖特性细胞株中的蛋白差异表达情况 Western Blot 显示 AR 在 LNCaP, C4, C4-2 及 C4-2B 细胞中均有较高等度的表达(图 1),随着肿瘤细胞的恶性程度增强而表达逐渐增强.这表明 AR 在 LNCaP, C4, C4-2 及 C4-2B 细胞中的表达可能与细胞适应低水平雄激素环境的能力有关系。

2.2 不同雄激素依赖特性细胞株中的 AR 基因转录

活性分析 AR mRNA 在激素依赖特性及转移特性不同的 LNCaP, C4, C4-2 及 C4-2B 细胞中均可被扩增出来,尤其在雄激素非依赖的高转移特性的细胞系 C4, C4-2, C4-2B 中,转录活性更高(图 2). 这表明,AR 转录活性增强可能与细胞的雄激素非依赖特性机制有关。

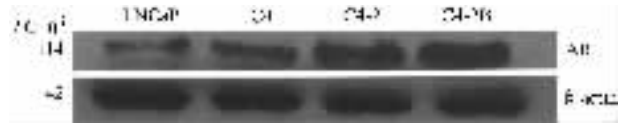


图 1 AR 在不同雄激素依赖特性细胞株中的蛋白差异表达

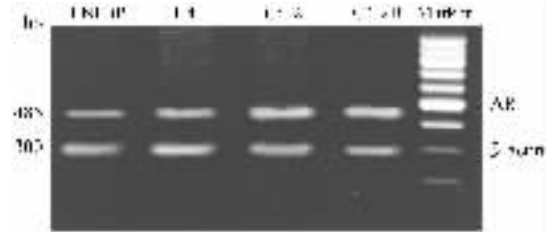


图 2 不同雄激素依赖特性细胞株中的 AR 基因转录活性分析

## 3 讨论

雄激素非依赖性 PCA 的确切发生机制尚未完全明了,关于 PCA 雄激素敏感性改变的原因,主要有几个假说<sup>[1-2]</sup>. 这些研究说明了 PCA 激素依赖特性转变机制的复杂性,此外,组织学标本的体内生物学差异,或非亲本细胞株之间的基因差异等因素也存在影响.因此,对于 PCA 生物学特性转变机制的研究,由于缺乏准确模拟其临床进展特点的细胞和动物模型,从而限制了相关研究的进展。

LNCaP 细胞是 ADPC 细胞,几乎无侵袭及转移能力,而且在裸鼠体内成瘤率低.而 LNCaP 细胞亚系 C4, C4-2, C4-2B 为 AIPC 细胞,不但可以在去势裸鼠体内生长成瘤,而且局部侵袭及远处转移能力逐渐增强,尤其是特异性骨转移倾向逐渐明显,为研究 PCA 的进展机制建立了很好的研究平台<sup>[3]</sup>.

我们应用同一亲本起源的 LNCaP/C4-2 细胞模型,观察 AR 在其中的蛋白表达和基因转录活性,发现二者均随着细胞激素依赖特性改变和转移能力增强而增强.我们认为,这与 PCA 细胞适应低水平雄激素环境密切相关,AR 表达及转录水平的升高,使 AR 对低浓度雄激素的敏感性增强,PCA 细胞失去对正常生长的调控,在极低浓度雄激素环境下仍能无限增殖,这可能是 AIPC 产生的重要机制之一。

过去认为 AIPC 是由于 AR 表达蛋白下调或缺乏引起,但是, Brown 等<sup>[4]</sup>检查 18 例 AIPC 的 AR 和 9 例原发肿瘤相比较,应用 FISH 分析发现 9/18 的 HR-

PC 有 AR 基因扩增,而未治疗的原发前列腺癌中无 AR 基因扩增,提示 AIPC 有 AR 基因的扩增。国内张勇等<sup>[5]</sup>采用 RBA 法研究证实,AIPC 的 AR 表达量高于 ADPC 的 AR 表达量。甘道举等<sup>[6]</sup>用免疫组化两步法检测 15 例国人 AIPC 发现,1 例(1/15) AIPC 无 AR 表达,其余 14 例(14/15) AR 表达均为强阳性,AIPC 的 AR 染色的平均光密度值较 ADPC 升高,表明 AIPC 有更高的 AR 基因扩增率。Chen 等<sup>[7]</sup>还证实,30% 的 AIPC 存在 AR 基因扩增及 AR 转录水平升高。这与我们的研究结果类似。

研究发现,AR 转录除可以被雄激素-受体信号途径激活外,还可以被该路径以外的旁路所激活。生长因子(如 IGF, EGF, TGF $\alpha$ , KGF), LHRH, TH, IL-6 等调控失衡后,均可通过自分泌或旁分泌的方式直接或间接改变 AR 的磷酸化状态,激活 AR 的转录<sup>[8]</sup>。研究表明,多数生长因子信号传导都是经过一系列酪氨酸磷酸化过程实现的,在这个过程中,有丝分裂激活蛋白激酶(MAPK)磷酸化激活显得尤为重要,ADPC 和 AIPC 细胞生长和增生都涉及到 MAPK 的磷酸化激活。IL-6 可通过 MAPK 和 STAT3 激活 AR<sup>[9]</sup>,无需雄激素的参与。这些生长因子通过旁路反常激活 AR 可能为雄激素非依赖细胞提供了逃避正常生长调控的途径,可能是激素治疗失败的又一个原因。从这个角度来看,我们的研究结果可以被理解为:AR 表达及转录水平的升高是细胞为接受雄激素以外的其他细胞因子信号作准备,通过变异的 AR 信号传导途径激活 PCA 细胞的增殖和进展。本研究进一步确认了 AR 转录增强和表达增高与 PCA 的激素依赖特

性转变之间具有密切的联系。

## 【参考文献】

- [1] So A, Gleave M, Hurtado-Col A, et al. Mechanisms of the development of androgen independence in prostate cancer[J]. World J Urol, 2005, 23(1): 1-9.
- [2] De La Taille A, Vacherot F, Salomon L, et al. Hormone-refractory prostate cancer: A multi-step and multi-event process[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2001, 4(4): 204-212.
- [3] Rubin J, Chung LW, Fan X, et al. Prostate carcinoma cells that have resided in bone have an upregulated IGF-I axis[J]. Prostate, 2004, 58(1): 41-49.
- [4] Brown RS, Edwards J, Dogan A, et al. Amplification of the androgen receptor gene in bone metastases from hormone-refractory prostate cancer[J]. J Pathol, 2002, 198(2): 237-244.
- [5] 张勇, 陈炜, 胡笑克, 等. 激素难治性前列腺癌组织中雄激素受体蛋白表达的研究[J]. 癌症, 2003, 22(1): 95-97.
- [6] 甘道举, 江军, 陈善勤, 等. 激素难治性前列腺癌组织中雄激素受体蛋白表达的研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2006, 21(4): 279-281.
- [7] Chen CD, Welsbie DS, Tran C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy[J]. Nat Med, 2004, 10(1): 33-39.
- [8] Richter E, Srivastava S, Dobi A. Androgen receptor and prostate cancer[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2007, 10(2): 114-118.
- [9] Ueda T, Mawji NR, Bruchovsky N, et al. Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells[J]. J Biol Chem, 2002, 277(41): 38087-38094.

编辑 井晓梅

## 欢迎投稿 欢迎订阅

《第四军医大学学报》是国内外公开征稿和发行的高级综合性医学学术期刊,曾荣获首届国家期刊奖,第二届国家期刊奖提名奖,百种中国杰出学术期刊,全国高校优秀期刊和陕西省编辑出版优秀期刊,是中国各大检索系统源期刊,《中文核心期刊要目总览》收入期刊,美国化学文摘(CA),俄罗斯文摘杂志(AJ)和哥白尼索引(IC)源期刊。本刊主要刊载基础医学、临床医学、预防医学、军事医学、口腔医学、航空航天医学、中医中药学、生物医学工程学方面的研究原著、研究快报、经验交流、病例报告、综述和述评等各类学术性中文文稿。

地址(710033)西安市长乐西路169号

电话(029)84774674, 84773456, 84773804, 84773814

传真(029)84774499

http://journal.fmmu.edu.cn

Email: edjfmumu@fmmu.edu.cn