

雄激素受体在前列腺癌干/祖细胞和非干/祖细胞的不同作用

马志方 许召良 王东文 岳亮 土锐 郝斌

【摘要】 目的 探讨雄激素受体(AR)在前列腺癌细胞系LNCaP中分选出的干/祖(S/P)细胞和非干/祖(non S/P)细胞的不同作用。方法 采用流式细胞术从LNCaP中分选出S/P细胞和Non S/P细胞,使用慢病毒载体携带AR转入两种细胞,在不同的雄激素浓度(1 nmol/L和10 nmol/L)培养条件下,应用四甲基偶氮唑盐(MTT)实验,前列腺细胞球体形成实验,琼脂糖凝胶克隆形成实验,细胞迁移实验来比较AR在两种细胞中的不同作用。结果 AR转入S/P细胞,细胞生长受到抑制($P < 0.05$),形成前列腺球的能力下降($P < 0.05$),成瘤能力减弱($P < 0.05$),细胞迁移能力下降($P < 0.05$);反之,AR转入non S/P细胞,细胞生长能力增强($P < 0.05$),成瘤能力加强($P < 0.05$),细胞迁移能力增强($P < 0.05$)。结论 AR在前列腺癌细胞系LNCaP中分选出的S/P和non S/P细胞表达不同,发挥相反作用,这可能是现有前列腺癌内分泌治疗失败的原因之一。

【关键词】 前列腺肿瘤; 干细胞; 祖细胞; 受体, 雄激素

The different role of androgen receptor in the stem/progenitor cells and none stem/progenitor cells isolated from human prostate cancer cell line MA Zhi-fang, XU Zhao-liang, WANG Dong-wen, YUE Liang, TU Rui, HAO Bin. Department of Urology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: MA Zhi-fang, Email: zhifangma@163.com

【Abstract】 Objective Imploring the different role of androgen receptor(AR)in the stem/progenitor(S/P) cells and none stem/progenitor(non S/P) cells isolated from human prostate cancer cell line LNCaP. **Methods** The S/P and non S/P cells could be obtained through florescence-activated cell sorting (FACS). AR was transferred in S/P and non S/P cells with lentivirus vector. The role of AR in the two kinds of cells were compared in different experiments, such as MTT assay, prostate sphere formation assay, soft agar assay, cell immigration assay. **Results** After AR transfected in S/P cells, the cell growth was inhibited ($P < 0.05$), the ability to form prostate sphere, the tumorigenesis ability, the capability of cell immigration all decreased ($P < 0.05$), but in non S/P cells AR played a contrary role. AR promoted the cell growth ($P < 0.05$). The tumorigenesis ability and the capability of cell immigration all increased($P < 0.05$). **Conclusions** AR play a contrary role in S/P and non S/P cells isolated from human prostate cancer cell line LNCaP. This may be one of the reasons for the failure of prostate cancer endocrine therapy.

【Key words】 Prostatic neoplasms; Stem cells; Progenitor cells; Receptors, androgen

正常前列腺组织由上皮和基质两大类细胞组成,上皮包括基层上皮(CK5⁺CK8⁻),中间上皮(CK5⁺CK8⁺),腺腔上皮(CK5⁻CK8⁺)和少量神经内分泌上皮,基质细胞含有内皮细胞,成纤维细胞和平滑肌细胞等。目前认为前列腺癌的细胞组成也是多样

的,主要是腺腔上皮,但也有部分细胞具有基层上皮和中间上皮的特点,并且具有部分基层上皮标志的干细胞可能是肿瘤的起源^[1-3]。最近有研究表明雄激素受体(androgen receptors, AR)在前列腺癌不同细胞的表达不同,发挥不同作用。Niu等^[4-5]初步研究发现,AR在前列腺癌的腺腔上皮高表达,维持细胞生长;在中间上皮或者基层样上皮低表达或不表达,抑制细胞生长;在基质细胞AR高表达,促进肿瘤细胞生长。多数研究提示在前列腺癌分选出的干/祖细胞(stem cells/progenitor cells, S/P)有基层细胞的标志(CK5⁺),AR不表达或低表达^[6-7],课题组前期采用荧光激活流

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.23.090

基金项目:山西省留学回国人员科技活动择优资助项目(晋财社[2011]172号),山西省高等学校留学回国人员科研资助项目(晋教外[2011]63),山西省回国留学人员科研资助项目(2012-085)

作者单位:030001 太原,山西医科大学第一医院泌尿外科

通讯作者:马志方, Email: zhifangma@163.com

式细胞分选前列腺癌细胞系 LNCaP, 得到前列腺癌 S/P 细胞, 利用其表面标志物进行鉴定, 明确了 AR 在前列腺癌 S/P 细胞中低表达, 并研究了 S/P 细胞的生长和侵袭特性^[8]。本研究将进一步比较 AR 在 S/P 细胞和非干/祖细胞 (non S/P) 中的不同作用。

材料和方法

1. 主要材料: 流式细胞分选仪为美国 BD 公司产品。荧光显微镜及数字图像采编系统为日本 Olympus 公司产品。RPMI1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司, 10% 胎牛血清购自英国 Gibco 公司。LNCaP 细胞株和 293T 细胞均购自中国典型培养物保藏中心。携带 AR 或 vector 的慢病毒载体由美国罗彻斯特大学医学中心乔治韦伯肿瘤实验室惠赠。四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 购自宝泰克公司, 碘硝基四唑紫 (INT) 和琼脂糖购自美国 Invitrogen 公司, 实验用多孔细胞培养板和 Transwell 系统均购自美国 Corning 公司。

2. 细胞培养、荧光激活细胞分选 (FACS) 和细胞转染: 将细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的恒温培养箱内培养, 每天更换 1 次培养液; 待细胞培养至约 85% 贴壁时, 更换培养液, 继续在相同条件下培养 24 h; 选择状态良好、95% 融合且位于指数生长期的细胞备用。细胞分选过程参见前期发表文献描述^[8]。分选后的 S/P 细胞培养于无血清, 加有数种生长因子的 RPMI1640 条件培养液, non S/P 细胞应用普通培养液培养。使用慢病毒载体携带 AR 或者 vector 转入两种细胞, 转染过程参见说明书。以下实验除特殊说明外均在不同的雄激素浓度 (1 nmol/L 和 10 nmol/L) 培养条件下进行。

3. MTT 实验比较 AR 对两种细胞生长情况的影响: 使用携带 AR 或者 vector 的慢病毒分别转入两种细胞, 获得 AR S/P、V S/P、AR non S/P 和 V S/P 4 种细胞, 每种细胞 3 孔重复。常规培养, 12 孔板每孔以 1×10^5 个细胞/1000 μ l 接种, 继续培养 0~6 d, 分别在 0、2、4、6 d 在每孔中加入新配制的 5 mg/L MTT 100 μ l, 培养箱内继续作用 4 h, 加入 DMSO 400 μ l 终止反应。用酶标仪于 570 nm 处测吸光度值 (A 值)。取 3 孔平均值, 记录结果。以时间为横轴, 光吸收值为纵轴绘制细胞生长曲线。

4. 前列腺细胞球体形成实验检测 AR 对 S/P 细胞自我更新能力的影响: 使用携带 AR 或者 vector 的慢病毒分别转入 S/P 细胞, 获得 AR S/P、V S/P 两种细胞, 每种细胞 3 孔重复。单个细胞悬液 (1×10^3 , 悬于 50 μ l 培养液) 与 Matrigel 50 μ l 混匀 (用前置于冰上), 100 μ l

混合液沿着 24 孔低黏附培养板 (美国 BD 公司) 边沿缓缓加入。培养板置于 37 °C 培养箱中 10 min, 然后加入 500 μ l 特殊培养液。特殊培养液为无血清的上皮基础培养液, 另加有 ProstaLife LifeFactors (德国 Lifeline cell technology)。每 3 d 换液 1 次, 培养 14 d 后在 Olympus 光学显微镜下计数形成前列腺细胞球的数量。

5. 软琼脂糖凝胶肿瘤克隆形成实验比较 AR 对两种细胞成瘤性的影响: 配制 0.8% 的琼脂糖凝胶 (溶解于 RPMI-1640 培养液), 微波炉加热, 至充分溶解, 将凝胶铺于 6 孔板, 每孔 2 ml。将对数生长期的 AR S/P、V S/P、AR non S/P 和 V non S/P 4 种细胞消化, 重悬。适当温度 (37 °C 左右) 的 0.8% 的琼脂糖凝胶与预置的细胞悬液 (3000 个/3 ml) 1:1 体积混合成 0.4% 含细胞的琼脂糖凝胶 (6 ml, 每种细胞每孔加 2 ml, 重复 3 孔), 待下层凝胶冷却凝固后, 铺于 6 孔板上层。待上层胶凝固后每孔再加入 2 ml 的含血清的 RPMI1640 培养液提供营养支持。每 3 d 换培养液。3 周后用 1 mg/ml INT 对细胞克隆进行染色, 37 °C 培养过夜, 计数 > 2 mm 的克隆。

6. 细胞迁移实验比较 AR 对两种细胞迁移能力的影响: 将对数生长期的各组细胞消化、计数, 培养液洗涤细胞 3 次。以 1×10^6 /ml 的密度重悬细胞, 取 100 μ l 细胞悬液加到 Transwell 上室。在 Transwell 下室中加入 500 μ l 含 5 μ g/ml 的纤维连接蛋白的 RPMI1640 培养液。37 °C, 5% CO₂ 培养 48 h。取出上室, 用棉签擦掉未穿过膜光滑面的细胞, 滤膜用甲醇固定 3 min, 苏木精染色 3 min, 水洗, 200 \times 显微镜下计数迁移的细胞。

7. 统计学处理: 采用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。

结 果

1. MTT 实验比较 AR 对两种细胞生长情况的影响: 将 AR 转入两种细胞, 在不同雄激素浓度培养条件下 (1 nmol/L 和 10 nmol/L), 从图 1 可以得出结论, AR 在 S/P 和 non S/P 中的作用相反, 即在 S/P 中 AR 抑制细胞的增殖, 在 non S/P 中 AR 促进细胞的增殖。类似的结果在 C4-2 和 LAPC-4 等前列腺癌细胞株中也可以得到 (数据没有列出)。

2. 前列腺细胞球体形成实验检测 AR 对 S/P 细胞自我更新能力的影响: 将 AR 转入 S/P 细胞, 在不同雄激素浓度培养条件下 (1 nmol/L 和 10 nmol/L), 14 d 后发现 AR 对 S/P 细胞前列腺球的形成有抑制作用, 即转入 AR 使前列腺球的形成体积较小, 数量较少 ($P < 0.05$) (图 2, 表 1)。

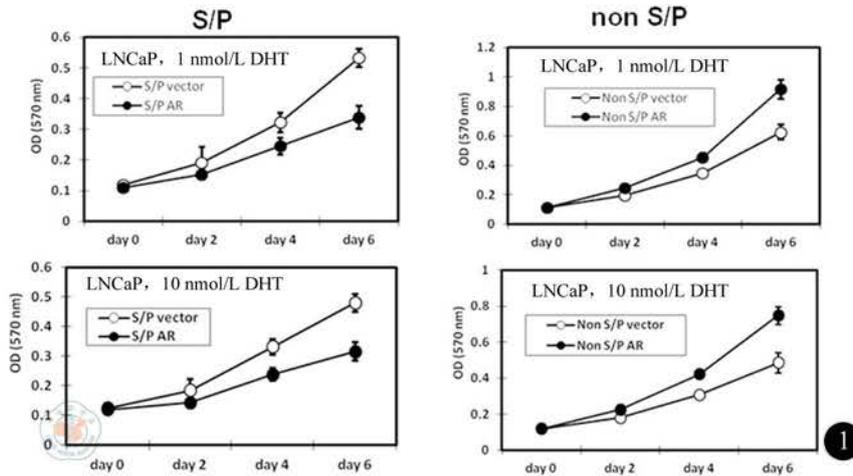


图1 MTT实验。在不同雄激素浓度培养条件下(1 nmol/L, 10 nmol/L), AR在S/P和non S/P中的作用相反,即在S/P中AR抑制细胞的增殖,在non S/P中AR促进细胞的增殖

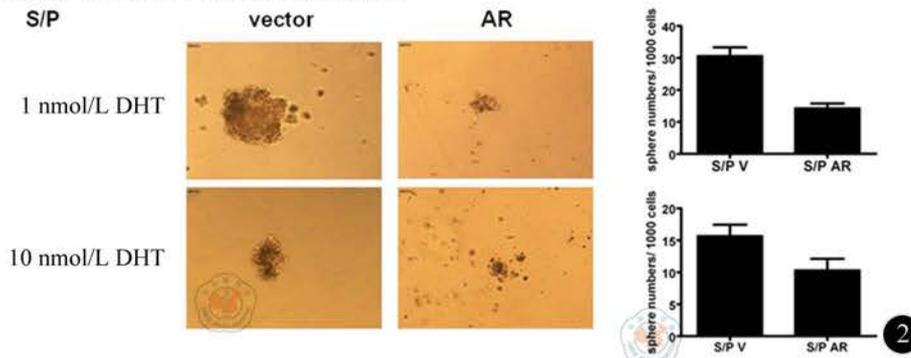


图2 前列腺细胞球体形成实验。AR对S/P细胞前列腺球的形成有抑制作用,转入AR使前列腺球的形成体积较小,数量较少($P < 0.05$)

F Non S/P and S/P cells soft agar assay

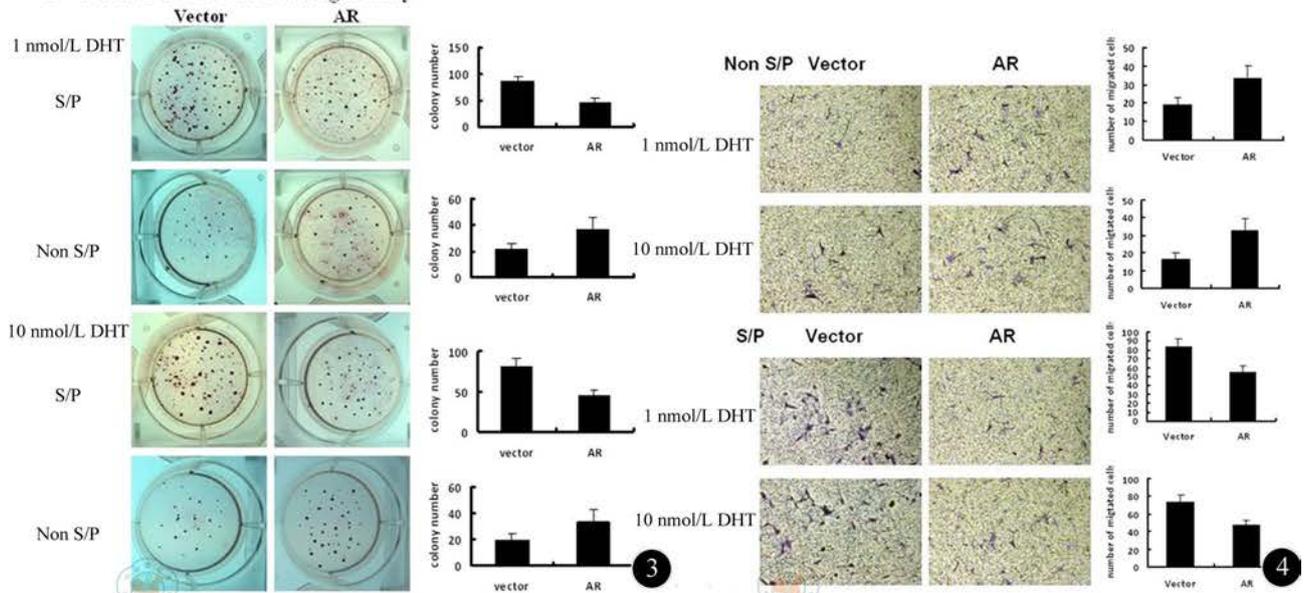


图3 软琼脂糖凝胶实验检测LNCaP分选出的S/P细胞和non S/P细胞分别转染AR后对肿瘤细胞成瘤性的影响。由图中可以看出,在不同雄激素浓度培养下,S/P细胞转入AR后细胞克隆形成减少,成瘤性减弱;non S/P细胞转入AR后细胞克隆形成增加,成瘤性增强,AR在两种细胞的作用相反 图4 细胞迁移实验比较AR对2种细胞迁移能力的影响 由图可以看到,在S/P细胞,转入AR后迁移的细胞数量减少,AR可以抑制细胞的迁移能力;而在non S/P细胞,转入AR后迁移的细胞数量增加,AR可以促进细胞的迁移,AR在2种细胞的作用相反

表1 前列腺细胞球体形成实验比较AR对S/P细胞自我更新能力的影响(球体数, $\bar{x} \pm s$)

项目	雄激素 1 nmol/L	雄激素 10 nmol/L
Vector	29.33 ± 1.53	18.33 ± 2.08
AR	15.67 ± 2.08	11.67 ± 1.53
t 值	9.168	4.472
P 值	0.001	0.011

3. 软琼脂糖凝胶肿瘤克隆形成实验比较AR对两种细胞成瘤性的影响: 在不同浓度雄激素培养条件下, 细胞培养3周后non S/P细胞和S/P细胞均可以在软琼脂凝胶中克隆性生长, AR对两种细胞的成瘤性作用相反, 即在S/P中AR抑制细胞的克隆性生长 ($P < 0.05$), 在non S/P中AR促进细胞的克隆性生长 ($P < 0.05$) (图3, 表2)。

表2 软琼脂糖凝胶肿瘤克隆形成实验比较AR对两种细胞成瘤性的影响(克隆数, $\bar{x} \pm s$)

项目	S/P		non S/P	
	雄激素 1 nmol/L	雄激素 10 nmol/L	雄激素 1 nmol/L	雄激素 10 nmol/L
Vector	86.33 ± 9.61	80.00 ± 10.54	21.67 ± 4.16	19.67 ± 4.51
AR	47.00 ± 8.19	45.33 ± 7.37	37.00 ± 8.19	34.67 ± 7.02
t 值	5.397	4.671	2.892	3.113
P 值	0.006	0.010	0.044	0.036

4. 细胞迁移实验比较AR对两种细胞迁移能力的影响: 为比较AR对两种细胞体外迁移能力的影响, 我们将转染AR或者Vector的不同细胞分别加入到Transwell上室中, 48 h后观察细胞穿过滤网的数量。实验结果显示, 在S/P细胞, AR可以抑制细胞的迁移能力, 而在non S/P细胞, AR可以促进细胞的迁移, AR在两种细胞的作用相反(图4, 表3)。

表3 细胞迁移实验比较AR对两种细胞迁移能力的影响(细胞数, $\bar{x} \pm s$)

项目	S/P		non S/P	
	雄激素 1 nmol/L	雄激素 10 nmol/L	雄激素 1 nmol/L	雄激素 10 nmol/L
Vector	83.67 ± 8.74	74.00 ± 7.94	19.00 ± 4.00	16.33 ± 3.51
AR	55.33 ± 6.66	47.67 ± 5.86	33.33 ± 7.09	32.67 ± 7.09
t 值	4.468	4.623	3.048	3.574
P 值	0.011	0.010	0.038	0.023

讨 论

课题组前期研究发现, 前列腺癌是由S/P细胞和non S/P细胞组成, 内分泌治疗(去势/抗雄)后S/P细胞数量增加; 这部分细胞对雄激素不敏感, 可能在低雄激素(去势)的条件下更好的生长, 成瘤性和侵袭性更强^[8-9], 导致对雄激素敏感的non S/P细胞数量减

少, 但同时却促进了S/P细胞生长, 疾病从而由激素敏感性进展到激素非依赖性阶段, S/P细胞的存在是现有内分泌治疗最终失败的可能原因之一。

本研究进一步探讨了AR在S/P和non S/P细胞的不同作用。所有的实验均采用了1 nmol/L和10 nmol/L的双氢睾酮浓度, 可以模拟在人体内前列腺组织中去势前后雄激素的浓度, 有利于更好地验证AR的作用。研究采用慢病毒携带AR或者Vector转染两种细胞, 转染的效率是参考病毒载体上携带的绿色荧光蛋白, 可以转染后在荧光显微镜下观察, 绿色荧光细胞大于80%表示转染成功。

MTT实验是反映细胞增殖情况的经典实验, 软琼脂糖凝胶肿瘤克隆形成实验和Transwell细胞迁移实验可以反映肿瘤细胞的成瘤性和迁移侵袭能力。本研究采用上述方法观察AR在两种细胞的不同作用, 结果初步表明, AR在S/P和non S/P的表达不同、作用相反, AR在S/P细胞抑制细胞增殖, 降低成瘤性和迁移能力, 在non S/P细胞作用相反。前列腺球体形成实验可以反映S/P细胞的自我更新能力, 实验发现将AR转入S/P细胞, 细胞自我更新能力受到抑制。上述结果提示, 在现有内分泌治疗后的低雄激素条件下, 肿瘤的两种细胞此消彼长, 依赖于雄激素的AR⁺CK8⁺的non S/P细胞数量减少, 不依赖雄激素的AR⁻CK5⁺CD133⁺CD44⁺的S/P细胞数量增加, 肿瘤的转移和迁移侵袭能力更强, 最终导致现有内分泌治疗失败、肿瘤进展, AR在两种细胞的不同作用可能是现有内分泌治疗失败的机制之一。根据这一结论, 可以进一步研究激素非依赖前列腺癌的干预措施, 可以考虑传统内分泌治疗加上抑制S/P细胞的干预措施联合治疗前列腺癌, 从而更好地杀灭肿瘤, 尤其为晚期前列腺癌患者带来新的治疗思路。

参 考 文 献

- [1] Pfeiffer MJ, Schalken JA. Stem cell characteristics in prostate cancer cell lines. *Eur Urol*, 2010, 57: 246-255.
- [2] Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, et al. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 2610-2615.
- [3] Goldstein AS, Huang J, Guo C, et al. Identification of a cell of origin for human prostate cancer. *Science*, 2010, 329: 568-571.
- [4] Niu Y, Altuwaijri S, Lai KP, et al. Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci*, 2008, 105: 12182-12187.
- [5] Niu Y, Chang TM, Yeh S, et al. Differential androgen receptor signals in different cells explain why androgen-deprivation therapy of prostate cancer fails. *Oncogene*, 2010, 29: 3593-3604.
- [6] Guzmán-Ramírez N, Völler M, Wetterwald A, et al. *In vitro* propagation and characterization of neoplastic stem/progenitor-like cells from human

- prostate cancer tissue. Prostate, 2009, 69: 1683-1693.
- [7] Rajasekhar VK, Studer L, Gerald W, et al. Tumour-initiating stem-like cells in human prostate cancer exhibit increased NF- κ B signalling. Nat Commun, 2011, 2:162-174.
- [8] 马志方, 许召良, 岳亮, 等. 前列腺癌细胞系中干祖细胞的分选和鉴定[J/CD]. 中华细胞与干细胞杂志: 电子版, 2012, 2: 25-29.
- [9] 马志方, 岳亮, 许召良, 等. 内分泌治疗后前列腺癌患者肿瘤组织干/祖细胞数量的变化[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6: 7561-7563.

(收稿日期: 2013-03-21)

(本文编辑: 郝锐)

马志方, 许召良, 王东文, 等. 雄激素受体在前列腺癌干/祖细胞和非干/祖细胞的不同作用[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(23): 10788-10792.



中华医学会