

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01166

## 5 $\alpha$ -双氢睾酮对前列腺癌 LNCaP 细胞钙离子移动和细胞生长的影响

汤元杰<sup>1,2</sup>, 孙颖浩<sup>1\*</sup>, 高旭<sup>1</sup>, 许传亮<sup>1</sup>, 王林辉<sup>1</sup>

1. 第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433  
2. 武警江苏省总队医院泌尿外科, 扬州 225003

**[摘要]** 目的:探讨 5 $\alpha$ -双氢睾酮(DHT)对前列腺癌 LNCaP 细胞钙离子移动的影响及其机制。方法:应用 Fura-2/AM Ca<sup>2+</sup> 荧光探针法结合 MiraCal 荧光成像系统动态检测 DHT 刺激以及 Ca<sup>2+</sup> 通道阻滞剂干预后 LNCaP 细胞内钙离子浓度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)的变化。应用 MTT 法观察细胞活力,流式细胞仪观察早期细胞凋亡率。结果:DHT 浓度为 1、10、100 和 1 000 nmol/L 时,能快速诱导[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高,在 20 s~3 min 升至峰值。细胞外液无 Ca<sup>2+</sup>时,1 000 nmol/L DHT 未能诱导[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高。细胞膜 L-型电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道阻滞剂维拉帕米(50  $\mu$ mol/L)、地尔硫(100  $\mu$ mol/L)或硝苯地平(5 mmol/L)37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 5 min 后,能完全抑制 1 000 nmol/L DHT 诱导的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高。磷脂酶 C 抑制剂新霉素(1 mmol/L)37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 5 min 或兰尼定受体阻滞剂普鲁卡因(50 mmol/L)37 $^{\circ}$ C 孵育细胞 3 min 后,对 1 000 nmol/L DHT 诱导的[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高没有影响。1 000 nmol/L DHT 作用细胞 48 h 后,与 1 000 nmol/L DHT 作用前用维拉帕米预孵细胞相比,细胞光密度(D)值[(0.67 $\pm$ 0.10) vs (2.13 $\pm$ 0.16)]和早期细胞凋亡率[(14.31 $\pm$ 2.29)% vs (1.07 $\pm$ 0.19)%]差异有统计学意义(P<0.01)。结论:DHT 可快速地、剂量依赖性地诱导 LNCaP 细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高;DHT 诱导的 LNCaP 细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>的升高是通过细胞外 Ca<sup>2+</sup> 经细胞膜 L-型电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道流入细胞内实现的,细胞内贮钙库未释放 Ca<sup>2+</sup>。DHT 诱导的 LNCaP 细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高促进细胞凋亡、抑制细胞生长。

**[关键词]** 前列腺肿瘤;5 $\alpha$ -双氢睾酮;钙;钙通道

**[中图分类号]** R 737.25

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2008)10-1166-05

### Effects of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone on calcium mobilization and growth of prostate cancer cell line LNCaP

TANG Yuan-jie<sup>1,2</sup>, SUN Ying-hao<sup>1\*</sup>, GAO Xu<sup>1</sup>, XU Chuan-liang<sup>1</sup>, WANG Lin-hui<sup>1</sup>

1. Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China  
2. Department of Urology, Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Jiangsu Regional Headquarters, Yangzhou 225003

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) on calcium mobilization and growth of prostate cancer cell line LNCaP. **Methods:** Intracellular calcium concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) was assayed by MiraCal Image System using Fura-2/AM as Ca<sup>2+</sup> fluorescence probe. Cell viability was observed by MTT assay and apoptosis by flow cytometry. **Results:** The calcium levels rapidly increased following addition of DHT, with the latency of response only in seconds. DHT at the concentrations of 1, 10, 100 and 1 000 nmol/L increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> from (28 $\pm$ 5), (29 $\pm$ 5), (28 $\pm$ 4) and (28 $\pm$ 9) nmol/L to (31 $\pm$ 3) (P>0.05, 65 $\pm$ 9) (P<0.01), (193 $\pm$ 33) (P<0.001) and (208 $\pm$ 42) nmol/L (P<0.001), respectively. The response induced by 1 000 nmol/L DHT was similar to that induced by 100 nmol/L DHT. DHT 1 000 nmol/L did not increase [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> under extracellular Ca<sup>2+</sup>-free condition. Blockers of L-type voltage-gated calcium channels, including verapamil (50  $\mu$ mol/L), diltiazem (100  $\mu$ mol/L) or nifedipine (5 mmol/L) at 37 $^{\circ}$ C for 5 min prior to stimulation with 1 000 nmol/L DHT, completely inhibited DHT-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise. Pre-treatment with inhibitor of phospholipase C such as neomycin sulfate (1 mmol/L) at 37 $^{\circ}$ C for 3 min or inhibitor of ryanodine receptor such as procaine (50 mmol/L) at 37 $^{\circ}$ C for 3 min had no influence on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise induced by 1 000 nmol/L DHT. The optical density (D) values and early apoptosis rates of the cells stimulated with 1 000 nmol/L DHT for 48 h were significantly different from those of cells pre-treated with verapamil prior to stimulation with 1 000 nmol/L DHT [(0.67 $\pm$ 0.10) % vs [2.13 $\pm$ 0.16] % and [14.31 $\pm$ 2.29] % vs [1.07 $\pm$ 0.19] %, P<0.01).

**[收稿日期]** 2008-01-25 **[接受日期]** 2008-03-19

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30225046). Supported by National Natural Science Foundation of China (30225046).

**[作者简介]** 汤元杰,博士,主治医师. E-mail: tjy0701@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070584, E-mail:sunyh@medmail.com.cn

**Conclusion:** DHT can induce rapid  $[Ca^{2+}]_i$  rise in LNCaP cells in a concentration-dependent manner. The increase of  $[Ca^{2+}]_i$  induced by DHT involves L-type voltage-gated calcium channels, but does not involve release of intracellular  $Ca^{2+}$  stores. The increase of  $[Ca^{2+}]_i$  induced by DHT increases apoptosis and inhibits growth of LNCaP cells.

**[KEY WORDS]** prostatic neoplasms; 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone; calcium; calcium channels

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1166-1170]

雄激素在前列腺癌的生长、转移和分化中起着决定性的作用<sup>[1]</sup>,但其机制尚不清楚。有研究发现雄激素可诱导前列腺癌 LNCaP 细胞内钙离子浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 升高<sup>[2-4]</sup>,而  $Ca^{2+}$  是普遍存在的细胞内的第二信使,  $[Ca^{2+}]_i$  的变化影响细胞的增生、凋亡、细胞活力和基因表达<sup>[5]</sup>。因此研究雄激素诱导的前列腺癌  $[Ca^{2+}]_i$  变化机制对于阐明雄激素对前列腺癌的作用机制和寻求新的治疗方法具有重要意义。本研究应用 Fura-2/AM 钙离子荧光探针法结合 MiraCal 荧光成像系统实时检测了前列腺内雄激素的主要形式 5 $\alpha$ -双氢睾酮 (5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, DHT) 对雄激素依赖的人前列腺癌 LNCaP 细胞株  $[Ca^{2+}]_i$  的影响,初步探讨了  $[Ca^{2+}]_i$  变化的机制以及  $[Ca^{2+}]_i$  升高对 LNCaP 细胞生长的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 细胞、药品和仪器** 雄激素依赖性前列腺癌 LNCaP 细胞株和 DHT 由德国洪堡大学 Chcerite 医学院 Jung 教授惠赠。维拉帕米 (verapamil)、硝苯地平 (nifedipine)、地尔硫 (diltiazem)、新霉素 (neomycin sulfate)、乙二醇双 ( $\alpha$ -氨基乙基醚) 四乙酸 (EGTA) 和 Pluronic F-127 皆为美国 Sigma 公司产品。Fluo-2/AM 为美国 Calbiochem 公司产品。HEPES 为美国 Serve 公司产品。普鲁卡因 (Procaine) 为上海第一生化药业公司产品。配制 Krebs-HEPES 缓冲液的无机盐类均为国产分析纯级,用三蒸水溶解至所需浓度 (含有 125 mmol/L NaCl, 5.6 mmol/L KCl, 2.2 mmol/L  $CaCl_2$ , 1.2 mmol/L  $MgSO_4$ , 1.2 mmol/L  $NaH_2PO_4$ , 10 mmol/L HEPES 和 10 mmol/L Glucose)。MTT 溶液为上海杰美基因公司产品。Annexin V-PE 凋亡检测盒为美国 BD 公司产品。全自动酶标仪 (DG3022A) 为芬兰 LABSYSTEMS 公司产品。流式细胞仪 (EP-ICS-XL) 及数据分析软件 System II 为美国 Beckman Coulter 公司产品。MiraCal 荧光成像系统 (Cambridge CB25EL) 为英国 Life Science Resource 公司产品,由倒置荧光显微镜 (Nikon Diaphot 200)、低光度 CCD 相机 (MiraCal 10000TE) 和计算机 (Dell Dimension 4700C) 组成。激发波长分别为 340 nm 和 380 nm,发射波长为 510 nm。DHT、Neomycin sul-

fate、Fura-2/AM、Verapamil、Diltiazem 和 Nifedipine 使用前先用二甲基亚砷 (DMSO) 溶解成高浓度的储存液,使用时再配制成所需浓度,DMSO 的最终体积分数须低于 0.1%。

**1.2 LNCaP 细胞培养** LNCaP 细胞用含 10% 热灭活胎牛血清的无酚红 RPMI 1640 培养基传代培养 (每周 1 次),培养条件为 37 $^{\circ}C$ , 5%  $CO_2$ 。实验前,细胞在无血清的培养基中培养 24 h。

**1.3 Fura-2/AM 负载步骤** 细胞传代后,将细胞悬液 ( $10^6$ /ml) 接种于改装的 35 mm Petri 细胞培养皿 (美国 Meridian 产品) 中,置于 37 $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  细胞培养箱孵育 48~72 h,待细胞充分黏附于中央玻璃皿底后用于实验。首先将细胞培养皿内的培养基弃去,用 Krebs-HEPES 溶液清洗 3 次后,加入 pluronic F-127 和 Fura-2/AM,用 Krebs-HEPES 溶液稀释至浓度分别为 0.04% 和 5~10  $\mu$ mol/L,在 37 $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  条件下孵育 30 min,其间晃动几次。取出后,再用 Krebs-HEPES 溶液清洗 3 次,以清除细胞表面和细胞外液中的 Fura-2/AM。加入 Krebs-HEPES 溶液,室温放置备用。

**1.4 单细胞内游离  $Ca^{2+}$  浓度的测定与分析** 将细胞培养皿置于荧光倒置相差显微镜载物台上,找到一个细胞分散较均匀视野,根据实验要求加入不同的试剂进行单细胞内  $[Ca^{2+}]_i$  水平的监测。图像获取及定量分析由软件 Miracal Version 2.3 完成。每次实验结束后,得到每个被监测细胞的  $[Ca^{2+}]_i$  变化的动态反应曲线及每个细胞在某一时刻的  $[Ca^{2+}]_i$  数值。每组实验用同一批次的不同培养皿进行 6 次,细胞数用  $n$  表示。

**1.5 细胞增殖活性检测** 按  $1 \times 10^4$  个细胞/孔接种于 96 孔培养板,37 $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  孵育 24 h,吸弃旧培养液。分成如下 4 组:对照组加入不含 DHT 的培养液;verapamil 组加入含 50  $\mu$ mol/L verapamil 的培养液;verapamil + DHT 组加入含 50  $\mu$ mol/L verapamil 的培养液预孵 5 min 后再加入 DHT (终浓度 1 000 nmol/L);DHT 组加入含 1 000 nmol/L DHT 的培养液。每组设 6 个复孔和 1 个调零孔 (只加培养液不加细胞),每孔液体量 200  $\mu$ l。37 $^{\circ}C$ 、5%  $CO_2$  培养 48 h,采用 MTT 比色分析法检测:每孔加 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20  $\mu$ l,37 $^{\circ}C$  孵育 4 h,弃上清

液;每孔再加 150  $\mu\text{l}$  DMSO,振荡 10 min,用全自动酶标仪测定每孔的  $D$  值,测定波长 570 nm,参考波长为 630 nm。

1.6 细胞早期凋亡率检测 按  $1 \times 10^6$  个细胞/孔接种于 6 孔培养板,分组方法同上。按 Annexin V-PE 凋亡检测盒说明书采用流式细胞仪及其数据分析软件检测细胞早期凋亡率。

1.7 统计学处理 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。多样本比较采用单因素方差分析,组间比较采用成组  $t$  检验。采用统计软件 SPSS 11.5 进行统计分析。

## 2 结果

2.1 不同浓度 DHT 对 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响 向细胞培养皿(已有 Krebs-HEPES 液)中加入高浓度的 DHT 储存液,使其稀释 1 000 倍至 DHT 的终浓度分别为 1、10、100 和 1 000 nmol/L。并设

空白对照组和加 0.1% DMSO 组( $n=40$ )。观察 3 min,空白对照组  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  无明显变化,保持稳定。0.1% DMSO 对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  无影响。图 1A 显示,各组  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  基础值 28~30 nmol/L,差异无统计学意义。1 nmol/L DHT 加入后对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  没有影响。10 nmol/L DHT 加入后约 25 s  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上升至峰值 ( $65 \pm 9$ ) nmol/L(同基础值相比,  $P < 0.05$ )。100 nmol/L DHT 加入后约 3 min  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上升至峰值 ( $193 \pm 33$ ) nmol/L(同基础值相比,  $P < 0.001$ ;同 10 nmol/L DHT 组相比,  $P < 0.01$ )。1 000 nmol/L DHT 加入后约 3 min  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上升至峰值 ( $208 \pm 42$ ) nmol/L(同基础值相比,  $P < 0.001$ ;同 100 nmol/L DHT 组相比,  $P > 0.05$ )。图 1B 显示 DHT 浓度在 1~100 nmol/L 之间可剂量依赖性地诱导 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高。

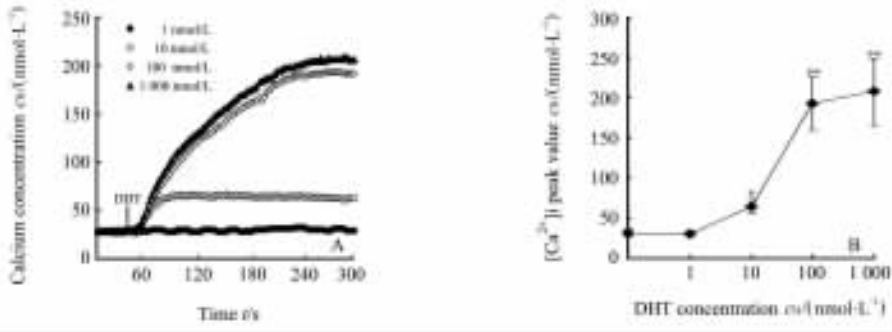


图 1 DHT 对 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响

Fig 1 Effects of 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone (DHT) on intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in LNCaP cells

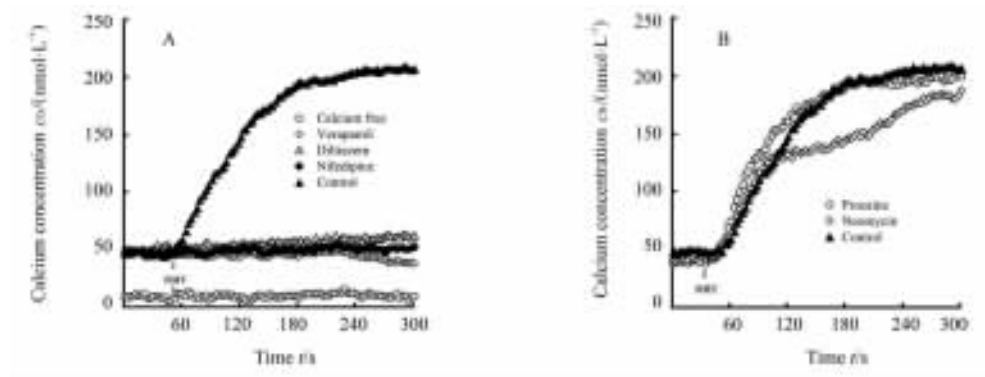
A:  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes induced by DHT at different concentrations. The black bar indicates the time of addition of DHT. B: Concentration - response plots of DHT-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  changes. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ;  $n=6, \bar{x} \pm s$

2.2 LNCaP 细胞外液中无  $\text{Ca}^{2+}$  时 DHT 对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响 细胞贴壁后,用无  $\text{Ca}^{2+}$  的 Krebs - HEPES (内含 0.1 mmol/L EGTA) 清洗 3 次,复加入无  $\text{Ca}^{2+}$  的 Krebs-HEPES 液,立即用于实验。图 2A 显示细胞外液中无  $\text{Ca}^{2+}$  时  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  基础值为 ( $9 \pm 2$ ) nmol/L,1 000 nmol/L DHT 加入后未能诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高( $n=50$ ;  $P > 0.05$ )。

2.3 细胞膜 L-型电压门控  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻滞剂对 DHT 诱导的 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高的影响 分别用含 50  $\mu\text{mol/L}$  verapamil、100  $\mu\text{mol/L}$  diltiazem 和 5 mmol/L nifedipine 的 Krebs-HEPES 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育细胞 5 min 后加入 DHT,观察其对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响( $n=50$ )。图 2A 示 verapamil、diltiazem 和 nifedipine 本身对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  无影响 ( $P > 0.05$ ),1 000 nmol/L DHT 未能诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高( $P > 0.05$ )。

2.4 细胞内贮钙库  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻滞剂对 DHT 诱导的 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高的影响 用含 1 mmol/L Neomycin sulfate 的 Krebs-HEPES 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育细胞 5 min 后加入 DHT,观察其对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响( $n=55$ )。图 2B 示 Neomycin sulfate 本身对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  无影响( $P > 0.05$ ),1 000 nmol/L DHT 仍能诱导 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  迅速升高到峰值 ( $181 \pm 35$ ) nmol/L(同基础值相比,  $P < 0.001$ ;同对照组相比,  $P > 0.05$ )。

用含 50 mmol/L Procaine 的 Krebs-HEPES 溶液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下孵育细胞 3 min 后加入 DHT,观察其对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的影响( $n=45$ )。图 2B 示 Procaine 本身对  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  无影响( $P > 0.05$ ),1 000 nmol/L DHT 仍能诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  迅速升高到峰值 ( $201 \pm 91$ ) nmol/L(同基础值相比,  $P < 0.001$ ;同对照组相比,  $P > 0.05$ )。

图 2 DHT 诱导下 LNCaP 细胞内增加的 Ca<sup>2+</sup> 的来源Fig 2 Source of DHT-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> increase

A: Effects of extracellular Ca<sup>2+</sup> removal and inhibitors of L-type Ca<sup>2+</sup> channel on 1 000 nmol/L DHT-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes. The black bar indicates the time of DHT addition. B: DHT (1 000 nmol/L)-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> changes when Ca<sup>2+</sup> channels of intracellular Ca<sup>2+</sup> store were blocked. The black bar indicates the time of DHT addition

2.5 DHT 诱导的 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高对细胞增殖和早期凋亡的影响 各组 *D* 值和早期凋亡率见表 1。Verapamil 组、verapamil + DHT 组与对照组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); DHT 组与 Verapamil + DHT 组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

表 1 DHT 对 LNCaP 细胞增殖和凋亡的影响

Tab 1 Influence of DHT on proliferation and apoptosis of LNCaP cells

Group	Proliferation ( <i>D</i> value)	Apoptosis at the early period (%)
Control	2.11 ± 0.13	1.04 ± 0.16
Verapamil	2.09 ± 0.15	1.02 ± 0.14
Verapamil + DHT	2.13 ± 0.16	1.07 ± 0.19
DHT	0.67 ± 0.10** $\Delta\Delta$	14.31 ± 2.29** $\Delta\Delta$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs verapamil + DHT group

### 3 讨论

细胞自由钙离子的分布与转移是形成钙离子信号的基础。细胞受到刺激后 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的升高主要来源于两条途径: 细胞外 Ca<sup>2+</sup> 通过跨膜通道内流和 (或) 细胞内贮钙库 (主要是内质网/肌质网) 释放 Ca<sup>2+</sup>。本实验发现, 1 000 nmol/L DHT 可快速诱导 LNCaP 细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高, 而当细胞外无 Ca<sup>2+</sup> 时, 1 000 nmol/L DHT 却不能诱导 LNCaP 细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高。说明 DHT 诱导的 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高是由于细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流引起的, DHT 本身未能刺激贮钙库释放 Ca<sup>2+</sup>。如果在此过程中贮钙库释放了 Ca<sup>2+</sup>, 也是以细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流为基础。

本实验采用 Fura-2/AM 检测 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>。Fura-2/AM 是一种荧光指示剂, 可选择性地与游离 Ca<sup>2+</sup> 结合, AM 因是脂溶性物质而弥散入细胞, 同时将与之偶联的 Fura-2 带入细胞。Fura-2/AM 进入细胞后, AM 被细胞内的酯酶分解, Fura-2 因是水溶性物质而保留在细胞内。Fura-2 与 Ca<sup>2+</sup> 结合后, 激发波长发生改变, 由未结合 Ca<sup>2+</sup> 时的 380 nm 移至 340 nm。分别测量 340 和 380 nm 波长时 Fura-2-Ca<sup>2+</sup> 和 Fura-2 的荧光强度, 根据以下公式<sup>[6]</sup> 可计算出 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>:  $[Ca^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{min}) / (R_{max} - R) \times Sf_2 / Sb_2$ 。式中  $K_d$ : Fura-2 和 Ca<sup>2+</sup> 结合反应的解离常数, 其值为 224 nmol/L;  $R$ : 不同实验中, 在 340 和 380 nm 处的荧光强度比值 ( $F_{340} / F_{380}$ );  $R_{min}$ : 细胞内极低游离 Ca<sup>2+</sup> 时的荧光强度比值;  $R_{max}$ : 细胞内 Fura-2 被 Ca<sup>2+</sup> 饱和时的荧光强度比值;  $Sf_2$ : 细胞内极低游离 Ca<sup>2+</sup> 时在 380 nm 处的荧光强度;  $Sb_2$ : 细胞内 Fura-2 被 Ca<sup>2+</sup> 饱和时在 380 nm 处的荧光强度。

本实验发现, L-型电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道阻滞剂 verapamil、diltiazem 或 nifedipine 可完全抑制 DHT 诱导的 LNCaP 细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高, 表明细胞膜上的 L-型电压门控 Ca<sup>2+</sup> 通道开放引起细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流是 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高的决定因素。

Steinsapir 等<sup>[7]</sup> 报道 DHT 可诱导 LNCaP 细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的升高, 并可被 verapamil 抑制, 本组结果与其一致, 但其未确定细胞内贮钙库在 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 升高过程中的作用。1,4,5-三磷酸肌醇受体 (IP<sub>3</sub>R) 和兰尼定受体 (RyR) 是细胞内贮钙库的 Ca<sup>2+</sup> 通道, 是调

节细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  释放的两大系统。IP<sub>3</sub>R 受质膜肌醇磷脂分解产物 IP<sub>3</sub> 调节。胞质中  $\text{Ca}^{2+}$  对 IP<sub>3</sub>R 有重要的调节作用。在高浓度的 IP<sub>3</sub> 条件下,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高可刺激 IP<sub>3</sub>R 的开放。  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高也会促进 RyR 开放, 但  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  过高会抑制其开放。本实验发现磷脂酶 C (PLC) 抑制剂 Neomycin sulfate 或 RyR 阻滞剂 Procaine 对 DHT 诱导的 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高没有抑制作用, 证实 DHT 刺激产生的细胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流未引发细胞内贮钙库释放  $\text{Ca}^{2+}$ 。其原因可能是 DHT 刺激后, 尽管  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高, 但 DHT 未激活 G 蛋白-PLC-IP<sub>3</sub> 这条途径, 致使 IP<sub>3</sub> 浓度过低, 而未能促使 IP<sub>3</sub>R 开放。同时由于  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  过高而抑制了 RyR 的开放。

前列腺癌细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  持续升高可减少前列腺癌 LNCaP 细胞雄激素受体的表达<sup>[8]</sup> 和促进前列腺癌 LNCaP 细胞凋亡<sup>[9]</sup>, 但雄激素诱导的前列腺癌细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高对前列腺癌细胞功能和生长的影响尚未见报道。文献报道 DHT 的浓度高于 1 nmol/L 时会抑制 LNCaP 细胞的生长<sup>[2-4]</sup>。本实验发现 DHT 浓度低于 1 nmol/L 时对 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  没有影响, 而高于 1 nmol/L 时可明显诱导  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  的升高, 因此细胞内高浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  可能在雄激素对 LNCaP 细胞的生长抑制效应中起了重要作用。本实验显示: 1 000 nmol/L DHT 明显抑制细胞生长、促进细胞凋亡; 使用 verapamil 预先阻断  $\text{Ca}^{2+}$  通道后, 再使用 1 000 nmol/L DHT 刺激细胞, 与对照组相比, 细胞活力和早期凋亡率没有变化。提示雄激素诱导的前列腺癌 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高具有抑制细胞生长和促进细胞凋亡作用。本实验明确雄激素诱导 LNCaP 细胞  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高过程中细胞内增加的  $\text{Ca}^{2+}$  的来源和机制以及雄激素诱导的  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  升高对 LNCaP 细胞生长的影响, 我们将进一步研究在此过程中的信号转导通路并进行体内实验, 为探讨雄激素对前列腺癌的作用机制和研究前列腺癌新的治疗手段提供有效的理论依据。

(志谢 第二军医大学长海医院中心实验室为本研究提供了流式细胞仪; 第二军医大学神经生物教研室为本研究提供了 MiraCal 荧光成像系统, 曹莉老师进行了技术指导, 在此深表谢意!)

## [参考文献]

- [1] Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Mechanisms of endocrine therapy-responsive and unresponsive prostate tumours [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2005, 12: 229-244.
- [2] Olea N, Sakabe K, Soto A M, Sonnenschein C. The proliferative effect of "anti androgens" on the androgen-sensitive human prostate tumour cell line LNCaP [J]. *Endocrinology*, 1990, 126: 1457-1463.
- [3] Veldscholte J, Berrevoets C A, Ris-Stalpers C, Kuiper G G, Jenster G, Trapman J. The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992, 41: 665-669.
- [4] Peng L, Malloy P J, Wang J, Feldman D. Growth inhibitory concentrations of androgens up-regulate insulin-like growth factor binding protein-3 expression via an androgen response element in LNCaP human prostate cancer cells [J]. *Endocrinology*, 2006, 147: 4599-4607.
- [5] Clapham D E. Calcium signaling [J]. *Cell*, 2007, 131: 1047-1058.
- [6] Shimizu S, Ding X, Murray P A. Intravenous anesthetics inhibit capacitative calcium entry in pulmonary venous smooth muscle cells [J]. *Anesthesiology*, 2006, 104: 791-797.
- [7] Steinsapir J, Socci R, Reinach P. Effects of androgen on intercellular calcium of LNCaP cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 179: 90-96.
- [8] Pelley R P, Chinnakannu K, Murthy S, Strickland F M, Menon M, Dou QP, et al. Calmodulin-androgen receptor (AR) interaction: calcium-dependent, calpain-mediated breakdown of AR in LNCaP prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 11754-11762.
- [9] Rekasi Z, Czompoly T, Schally A V, Boldizsar F, Varga J L, Zarándi M, et al. Antagonist of growth hormone-releasing hormone induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells through a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 3435-3440.

[本文编辑] 李丹阳