

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01311

## 激素递减法成功建立雄激素非依赖性 LNCaP 细胞亚系

纪家涛,许传亮,叶华茂,周 铁,汤元杰,孙颖浩\*

第二军医大学长海医院泌尿外科,上海 200433

**[摘要]** **目的:**利用激素递减法对 LNCaP 细胞进行去雄环境培养,建立雄激素非依赖的 LNCaP 细胞(LNCaP-AI)亚系并予以鉴定。**方法:**利用活性炭处理的血清培养模拟去雄细胞环境,逐步递减培养基中激素 10 d,后完全在非雄培养,共连续培养 3 个月,直到 LNCaP 细胞重新进入快速生长期,利用 CCK-8 法、放免法、RT-PCR 法分别测定细胞生长曲线、PSA 及雄激素(AR)表达情况。**结果:**LNCaP 细胞在激素递减后,生长缓慢,呈神经内分泌样改变和成簇生长,经过共 3 个月的连续非雄培养,细胞重新恢复以前的形态及生长。CCK-8 测定提示 LNCaP-AI 细胞能够在去雄环境中生长,放免法提示 LNCaP-AI 细胞能够在去雄环境中恢复分泌 PSA 功能,RT-PCR 方法提示 LNCaP-AI 细胞显著高表达 AR。**结论:**激素递减方法可以 3 个月左右有效地建立雄激素非依赖的 LNCaP 细胞亚系。

**[关键词]** 前列腺肿瘤;雄激素非依赖;LNCaP 细胞系

**[中图分类号]** R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1311-05

### Establishment of androgen-independent human prostate cancer line LNCaP by gradual deprivation of hormone

Ji Jia-tao, XU Chuan-liang, YE Hua-mao, ZHOU Tie, TANG Yuan-jie, SUN Ying-hao\*

Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To establish and identify androgen-independent human prostate cancer cell line LNCaP by culturing LNCaP cells with gradual deprivation of hormone. **Methods:** LNCaP cells were cultured in the medium with gradual deprivation of hormone (treated by active carbon to simulate androgen deprivation) for 10 days; and then the cells were cultured with complete deprivation of androgen for 3 months till the cell entered the rapid proliferation phase again. The cell growth and expression of PSA and androgen were examined by CCK-8, immunofluorescence and RT-PCR methods. **Results:** LNCaP cells grew slowly after deprivation of hormone and took on a neuroendocrine phenotype and cluster growth pattern. After 3 months' non-androgen culture, the cells regained original morphology and growth, CCK-8 indicated that LNCaP cells could grow in non-androgen condition; immunofluorescence assay indicated that LNCaP-AI cells could regain PSA-secreting activity in non-androgen condition; and RT-PCR suggested that androgen was highly expressed in LNCaP-AI cells. **Conclusion:** Androgen-independent LNCaP cell line can be established by culturing with gradual deprivation of hormone for 3 months.

**[KEY WORDS]** prostatic neoplasms; androgen-independent; LNCaP cell line

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1311-1315]

前列腺癌是常见的男性恶性肿瘤之一。在欧美国家男性肿瘤患者中,死于前列腺癌者已跃居第二位<sup>[1]</sup>。前列腺癌在我国的发病率呈逐年上升的趋势,平均发病年龄也趋向年轻化。目前,对于中晚期的前列腺癌,一般只能采用雄激素剥夺来治疗,但也只能延缓其进程,这类患者最终会演变为雄激素非依赖的前列腺癌。临床上尚无有效的方法来治疗这样的患者,病死率较高。因此,雄激素非依赖性前列腺癌是目前的研究热点。

在已经建立的前列腺癌细胞模型中,有代表不同前列腺癌临床状态的前列腺癌细胞系<sup>[2]</sup>,其中也有激素依赖的和非依赖的前列腺癌细胞系。但是由于它们的来源不同,我们无法从它们的比较中探询前列腺癌进展为激素非依赖状态的机制。

利用激素依赖性的前列腺癌细胞系,经过体外实验手段诱导产生激素非依赖的前列腺癌细胞亚系,是理想的激素非依赖前列腺癌细胞的模型。这种模型可以模拟临床上在内分泌治疗过程中,前列

**[收稿日期]** 2008-04-22 **[接受日期]** 2008-07-15

**[作者简介]** 纪家涛, 博士生, 主治医师. E-mail: jiatiao22@yahoo.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25072077, E-mail: sunyh@medmail.com

腺癌由激素依赖发展为激素非依赖的过程。同时因为是从同一个细胞系诱导所形成的细胞亚系,两者有可比性,可以用来观察前列腺癌由激素依赖向非依赖转变过程的分子生物学变化。

LNCaP 前列腺癌细胞系是目前为止仅有的保留了人前列腺癌激素依赖特征细胞系<sup>[3]</sup>。其生长有很强的雄激素依赖性,因此,LNCaP 前列腺癌细胞系在前列腺癌细胞生长的激素依赖性的研究方面具有独特的优势。

国外目前报道采用去激素培养基,对雄激素依赖性前列腺癌 LNCaP 细胞进行长达 6 个月时间连续去雄下培养<sup>[2,4-5]</sup>,诱导产生雄激素非依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞亚系,我们借此方法,先采用逐步减低培养基中激素,3 个月成功建立雄激素非依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞模型,为进一步对激素非依赖前列腺癌的机制研究打下基础。

## 1 材料和方法

1.1 细胞株及试剂 雄激素依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞株由德国洪堡大学 Charite 医学院泌尿外科 Jung 教授惠赠。RPMI 1640 培养液、去酚红 RPMI 1640 培养液、D-Hank's 液、0.05%胰蛋白酶、进口胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司。活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清(dextran-charcoal stripped FBS, DCC-FBS)购自 Biological Industry, Israel 公司。CCK-8 比色试验用试剂(日本同仁实业有限公司进口分装)。PSA 检测用主要试剂 Roche 公司的 Elecsys total PSA reagent Kit, Cat. No. 11731262。

1.2 雄激素非依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞模型的建立 雄激素依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞复苏,用常规 RPMI 1640 培养液配制的 10% FBS 进行连续传代培养。传 2 代后,10 d 内用激素递减方法逐步减低培养液中雄激素(表 1),每 2 d 换液 1 次,每次细胞换液并调整含雄与去雄培养基的比例,其中第 6 日予以传代,将 25 cm<sup>2</sup>培养瓶更换为 75 cm<sup>2</sup>的培养瓶。后换用含有 10% DCC-FBS 的去酚红 RPMI 1640 培养液,进行长期传代培养,共 3 个月。体外培养的培养基中,主要的激素成分来自于血清和 RPMI 1640 培养液的酚红。而经过活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清及去酚红 RPMI 1640 培养液,其中各种激素含量被大大降低。培养过程中,每周更换新鲜细胞培养液 2 次。培养环境为 37℃、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 的潮湿培养箱,培养成功的细胞命名为 LNCaP-AI。

1.3 细胞生长曲线(CCK-8)比色试验 将 LNCaP 细胞及 LNCaP-AI 消化收集,吹打制成单细胞悬液,采用血细胞计数法计数细胞,按 2×10<sup>3</sup>个细胞/孔接种于 96 孔培养板,在含 10%的 FBS 培养液及 10% DCC-FBS 的去酚红 RPMI 1640 培养液中培养,分 4 个时段,每个时段 3 个复孔,加 100 μl 培养液后,移入 CO<sub>2</sub> 孵箱,在 37℃、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度环境下静置培养。分别在培养 2、4、6、8 d 呈色。每孔加 CCK-8 溶液(5 mg/ml)10 μl,移入 37℃孵箱中继续孵育 4 h。用全自动酶标仪测定每孔的光密度(D)值,测定波长为 450 nm。以时间为横轴,D 值为纵轴描绘细胞生长曲线。

采用血细胞计数法计数细胞,按 2×10<sup>3</sup>个细胞/孔接种于 96 孔培养板,在含 10%的 FBS 培养液及 10% DCC-FBS 的去酚红 RPMI 1640 培养液中培养,分 4 个时段,每个时段 3 个复孔,加 100 μl 培养液后,移入 CO<sub>2</sub> 孵箱,在 37℃、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 及饱和湿度环境下静置培养。分别在培养 2、4、6、8 d 呈色。每孔加 CCK-8 溶液(5 mg/ml)10 μl,移入 37℃孵箱中继续孵育 4 h。用全自动酶标仪测定每孔的光密度(D)值,测定波长为 450 nm。以时间为横轴,D 值为纵轴描绘细胞生长曲线。

表 1 激素递减方法逐步减低培养液中雄激素  
Tab 1 Gradual steroid deprivation in culturing medium for LNCaP cells

Time t/d	10% FBS V/ml	10% DCC-FBS (Androgen deprivation) V/ml	Steroid-depletion ratio/%
2	2.4	0.6	20
4	1.8	1.2	40
6	1.2	1.8	60
8	2	8	80
10	0	10	100

1.4 细胞分泌前列腺癌特异抗原(PSA)能力检测 将LNCaP 细胞及 LNCaP-AI 消化收集,吹打制成单细胞悬液,采用血细胞计数法计数细胞,按 1×10<sup>5</sup>个细胞/孔接种于 12 孔培养板,在含 10%Gibco 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 1 ml 及 10%DCC-FBS 的去酚红 RPMI 1640 培养液 1 ml 中培养,培养环境同上。在 2、4、6 d 3 个时间点收集各时间点培养基,移入 Eppendorf 管中,放置于 -20℃低温保存。应用 Roche 公司的 Elecsys total PSA reagent Kit 检测 PSA 浓度。以时间为横轴,PSA 值为纵轴描绘 LNCaP 及 LNCaP-AI 的 PSA 分泌曲线。

1.5 雄激素受体(AR)变化的测定 TRIzol 一步法提取 RNA<sup>[4]</sup>。使用 TaKaRa 逆转录试剂盒进行逆转录,具体步骤按说明书。使用罗氏 LightCycler 进行 RT-PCR 的方法(SYBR 染料法,具体见罗氏公司产品简介)。PCR 反应条件:95℃ 5 min,94℃ 10 s,60℃ 30 s,72℃ 10 s,共 40 个循环。AR1(雄激素受体亚型 a)引物(5'→3'):上游 TCA TCT GTT CCA TCT TCT TGC CTA T,下游 CAG GAG CAC TCT GCA TTC GTT T,目标片段长度 110 bp。AR2(通常所说的雄激素受体,雄激素受体亚型 b)引物(5'→3'):上游 AGC CAG CTT GCT GGG AGA,下游 CAA GAG GCG TTG GCT GTC,目标片段长度 162 bp。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 软件包处理实验数

据, ANOVA 方法进行统计学分析。

## 2 结果

**2.1 雄激素非依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞模型的建立** LNCaP 前列腺癌细胞在 10% DCC-FBS 的 RPMI 1640 培养液中开始经过很短暂的增殖后, 其生长迅速受到抑制, 1 周后开始处于自分泌状态, 主要表现为 LNCaP 细胞向外伸出许多过长的突触, 细胞伪足变细长, 彼此之间通过突触相互联系成网状(图 1A)。随后细胞始终保持这种状态。到 1 个半月后 LNCaP

细胞开始摆脱自分泌状态, 突触逐渐减少, 并开始出现细胞形态相同的细胞集落, 考虑为少数细胞适应了无激素的环境, 迅速增殖造成的(图 1B)。随后的培养中细胞, 随着细胞传代, 约到 9 代, 细胞从集落样生长转变为铺开样生长(图 1C、图 1D), 并且细胞凋亡进一步减少, 在培养瓶内能够进行连续传代培养, 传代时间约 6~7 d, 从而形成不依赖于激素生长的 LNCaP 细胞系, 命名为 LNCaP-AI 细胞, 将该 LNCaP-AI 细胞冻存并再次复苏后, 细胞依然保持很好的活性, LNCaP 细胞的传代时间为 5~6 d。

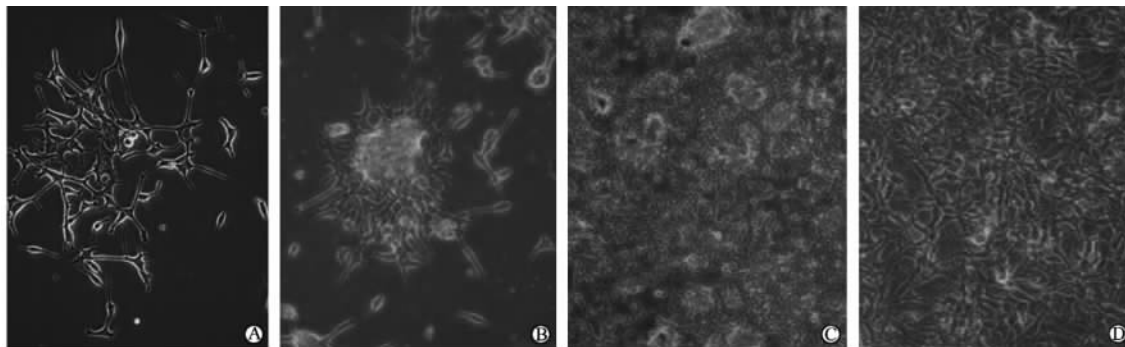


图 1 LNCaP 细胞转变为非雄激素依赖的细胞时相

Fig 1 Phases of cell morphology during transition of LNCaP into LNCaP-AI cells

A; The LNCaP cells grow in presence of 10% DCC-FBS; B; LNCaP-AI cells have cluster growth pattern in steroid-depleted medium; C; LNCaP-AI cells have sprawling growth pattern in steroid-depleted medium; D; LNCaP-AI cells have normal growth pattern in steroid-depleted medium with 10% DCC-FBS

**2.2 LNCaP-AI 细胞亚系在激素剥夺环境下的生长情况** 见图 2, 在 DCC-FBS 培养液下的增殖情况发现 LNCaP-AI 细胞的生长趋势明显, 随着时间的增加, 细胞明显增殖; 相比之下, LNCaP 细胞在这种环境下生长曲线低平, 细胞增殖明显受到抑制(两组  $D_{450}$  在 4、6、8 d 时差异显著,  $P < 0.05$ ), 说明 LNCaP-AI 细胞相对于 LNCaP 细胞, 明显能适应无激素的环境。LNCaP-AI 细胞和 LNCaP 细胞在正常 Gibco 血清环境下生长速度明显高于在含活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清的无酚红 RPMI 1640 培养液下的生长速度。

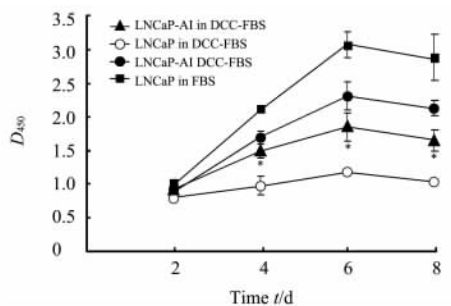


图 2 LNCaP 组与 LNCaP-AI 组在正常 Gibco 血清及激素剥夺环境下的生长曲线

Fig 2 Growth curves of LNCaP and LNCaP-AI in DCC-FBS and FBS

$n=3, \bar{x} \pm s; * P < 0.05$  vs LNCaP in DCC-FBS group

**2.3 LNCaP-AI 细胞在含雄及去雄培养环境下的 PSA 的分泌情况** 在正常含雄培养下, LNCaP-AI 和 LNCaP 细胞都分泌 PSA, 并且随着时间延长而增加, 2 d 时分别为  $(6.18 \pm 0.246)$ 、 $(21.66 \pm 1.36)$  ng/ml, 4 d 时分别为  $(51.94 \pm 2.01)$ 、 $(99.45 \pm 0.85)$  ng/ml, 均有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 但 LNCaP-AI 分泌的 PSA 低于 LNCaP, 由于 PSA 数值大于 100, 超出机器检测的范围, 所以第 6 日的这 2 种细胞的 PSA 结果没有标出来。LNCaP-AI 细胞在无激素环境下仍能保持 PSA 的分泌, 随着时间的推移, 培养液中的 PSA 水平逐渐增加; 相比之下, LNCaP 细胞在这种环境下 PSA 的分泌明显受到抑制, 始终处于极低的水平(6 d 时两组比较有统计学差异,  $P < 0.05$ )。说明 LNCaP-AI 细胞已经适应无激素的环境, 恢复了 PSA 的分泌能力(图 3)。

**2.4 LNCaP 细胞与 LNCaP-AI 细胞 AR 的变化** 结果提示 LNCaP-AI 细胞有很高的 AR2 表达(图 4)。

## 3 讨论

目前, 仅有 LNCaP 细胞系保留了人前列腺癌功能分化的特征, 其生长有很强的雄激素依赖性, 体外需要在具有雄激素样活性的甾体激素的刺激下生

长<sup>[6]</sup>。另外, LNCaP 前列腺癌细胞系表达 PSA<sup>[7]</sup>、前列腺酸性磷酸酶<sup>[8]</sup>、雄激素受体<sup>[9]</sup>和前列腺膜抗原(PSMA)<sup>[10]</sup>。在体内该细胞系也具有激素依赖性的特征,可在雄性裸鼠上成瘤,而不能在去势鼠上成瘤<sup>[11]</sup>。LNCaP 前列腺癌细胞系有一个雄激素受体结合区域的突变。因此,其不仅对雄激素有反应,而且对雌激素、抗雄激素和黄体酮均有反应<sup>[2]</sup>。急性的雄激素剥夺会导致 LNCaP 细胞生长受到抑制<sup>[2,12]</sup>,慢性激素剥夺可以建立激素非依赖的亚细胞克隆<sup>[2]</sup>。虽然 LNCaP 细胞系的雄激素受体为非野生型受体,但是由于缺乏更为理想的细胞系,而且在进展性前列腺癌中雄激素受体的突变也较为常见,这些突变导致了前列腺癌细胞对激素的敏感性,也包括雄激素。因此, LNCaP 前列腺癌细胞系是目前应用最为广泛的前列腺癌细胞系<sup>[13]</sup>。

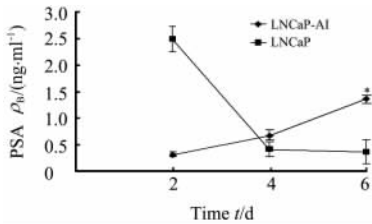


图3 LNCaP组与LNCaP-AI组在激素剥夺环境下PSA的分泌曲线

Fig 3 PSA secretion curves of LNCaP and LNCaP-AI cells in DCC-FBS  
n=3,  $\bar{x} \pm s$ ; \* P<0.05 vs LNCaP group

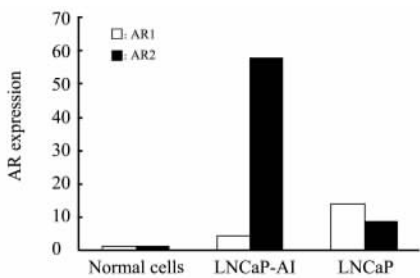


图4 LNCaP-AI及LNCaP细胞雄激素受体表达

Fig 4 AR expression in LNCaP-AI and LNCaP cells

LNCaP 细胞培养所用的常规培养液为 RPMI 1640 培养液,加 10% 的胎牛血清。整个培养基中所含有的总雄激素活性大约相当于 10<sup>-8</sup> nmol 生理浓度的双氢睾酮(DHT)生物活性。其中主要激素活性来源是胎牛血清中所含有的各种类固醇类激素成分。研究表明活性炭/葡聚糖可以去除胎牛血清的绝大部分激素成分。用去酚红 RPMI 1640 培养液加活性

炭/葡聚糖处理的胎牛血清,可以模拟最为接近生理条件下激素剥夺的状况<sup>[14-15]</sup>。前列腺癌细胞形成激素非依赖的定义是前列腺癌细胞能够在去势的宿主或活性炭处理的血清环境中生长<sup>[5,16]</sup>,活性炭处理的胎牛血清及去酚红的培养基 RPMI 1640 能够模拟这种去势的条件,肿瘤细胞能够在这种环境下生长说明这种细胞具有激素非依赖的生物特性。

本实验建立的前列腺癌细胞模型可以模拟临床上在内分泌治疗过程中前列腺癌激素依赖发展为雄激素非依赖的过程。由于是从 LNCaP 前列腺癌细胞系经过干预建立的细胞亚系,两者有可比性,是一个理想的激素非依赖前列腺癌细胞的模型。

血清 PSA 是临床上最常用的前列腺癌生物学指标,它可用来诊断前列腺癌,监控前列腺癌的复发和进展,用以检验各种前列腺癌治疗方法的疗效<sup>[17]</sup>。正常情况下,PSA 基因为雄激素反应性基因,即 PSA 基因受雄激素受体信号途径调控。而在前列腺癌抗雄治疗后,又表现为血清 PSA 水平持续升高,往往提示肿瘤进入激素非依赖状态<sup>[5,17]</sup>。

在无激素的环境下,我们的 LNCaP-AI 前列腺癌细胞亚系 PSA 分泌随着时间明显增加,而 LNCaP 前列腺癌细胞系 PSA 分泌始终处于很低的水平,说明 LNCaP-AI 恢复了分泌 PSA 的能力。这和晚期或进展期前列腺癌经过内分泌治疗后血清 PSA 迅速下降,当发展为激素非依赖前列腺癌时血清 PSA 水平重新升高相一致。通过 RT-PCR 测定 LNCaP-AI 细胞 AR 的表达,发现 AR 在 LNCaP-AI 细胞表达明显高于 LNCaP 细胞,这与 Shi 等<sup>[4]</sup>获得雄激素非依赖的 LNCaP 细胞的结果一致。CCK-8 检测实验发现 LNCaP-AI 细胞在正常 10% 的胎牛血清中生长比在活性炭处理的血清生长要快,这与报道的 LNCaP-AI 细胞的结果一致<sup>[4-5,18]</sup>。Gustavsson 等<sup>[18]</sup>报道 LNCaP 在正常含雄的培养基中倍增时间是 43 h, LNCaP-AI 正常含雄培养下的倍增时间是 46 h,而在活性炭处理的血清中为 58 h,也有人认为 LNCaP-AI 细胞的倍增时间为 80~120 h 之间<sup>[2]</sup>,我们 CCK-8 的实验曲线也提示这种趋势,即 LNCaP-AI 细胞在含雄培养下,生长慢于 LNCaP 细胞,而在去雄培养下,其生长快于 LNCaP 细胞。尽管 LNCaP-AI 细胞的 AR 表达高于 LNCaP 细胞,在含雄激素的培养下,10% 的 FBS 已被证实与 0.05 nmol/L R1881 的雄激素活性相等<sup>[19]</sup>, LNCaP-AI 细胞的生长却慢于 LNCaP 细胞,说明 LNCaP-AI 细胞对雄激素的刺激相对来说已变得不敏感。同样表现在 PSA 的分泌上,对 LNCaP-AI 及 LNCaP 细胞在正常

含雄培养基下培养测定 PSA, 发现 LNCaP 细胞明显高于 AI 细胞, 也说明 LNCaP-AI 对雄激素敏感程度低于 LNCaP 细胞。

文献<sup>[2]</sup>报道通过把 LNCaP 细胞在去雄培养约 6 个月, 99% 的雄激素敏感细胞凋亡, 剩余的细胞能够在非雄条件下继续生长, 这些细胞被命名为 LNCaP-AI 细胞, 我们通过逐步递减培养基中激素, 然后予以非雄条件下培养共 3 个月, 能够成功的建立 LNCaP-AI 细胞系。这其中的机制目前难以解释, 虽然目前解释雄激素非依赖前列腺癌发生机制主要的两个学说, 即克隆选择学说和适应学说<sup>[20-21]</sup>, 但它们都不能满意解释非雄依赖转化的机制。Gustavsson 等<sup>[18]</sup>通过 LNCaP-19 能够成功培育出 LNCaP-AI 细胞系, 而 LNCaP-12 却不成功, 提示 LNCaP 细胞只有经过一定代数的培养后才能有转化为非雄依赖的潜能, 认为前列腺癌非雄转化是本身内在的逐步转化的过程, 而不取决于激素是否存在。我们通过激素逐步递减, 使 LNCaP 细胞能够较快适应非雄培养环境, 3 个月就成功建立 LNCaP-AI 细胞系。

总之, 我们通过 LNCaP 细胞在活性炭处理的血清培养 3 个月, 成功地建立了雄激素非依赖的前列腺癌细胞 LNCaP-AI, 又对 LNCaP 和 LNCaP-AI 前列腺癌细胞系通过 CCK-8 生长曲线测定、RT-PCR 方法及放免测定进行了检测, 发现 LNCaP-AI 前列腺癌细胞能够在非雄培养基中很好地生长, 并且表达显著高的 AR, 恢复了表达 PSA 的能力, 充分说明该细胞对雄激素已不敏感, 为进一步研究前列腺癌非雄依赖的机制奠定了模型基础。

## [参考文献]

[1] Parker S L, Tong T, Bolden S, Wingo P A. Cancer statistics, 1996[J]. CA Cancer J Clin, 1996, 65: 5-27.

[2] Sobel R E, Sadar M D. Cell lines used in prostate cancer research: a compendium of old and new lines-part I [J]. J Urol, 2005, 173: 342-359.

[3] 叶华茂, 孙颖浩, 许传亮, 王林辉, 侯建国, 高旭, 等. 雄激素非依赖性前列腺癌细胞亚系模型 LNCaP-AI 的建立[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 59-62.

[4] Shi X, Ma A, Tepper C G, Xia L, Gregg J P, Gandour-Edwards R, et al. Molecular alterations associated with LNCaP cell progression to androgen independence[J]. The Prostate, 2004, 60: 257-271.

[5] Lu S, Tsai S Y, Tsai M J. Molecular mechanisms of androgen-independent growth of human prostate cancer LNCaP-AI cells [J]. Endocrinology, 1999, 140: 5054-5059.

[6] Sonnenschein C, Olea N, Pasanen M E, Soto A M. Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens[J]. Cancer Res, 1989, 49: 3473-3481.

[7] Yeung F, Li X, Ellett J, Trapman J, Kao C, Chung L W K. Regions of prostate-specific antigen (PSA) promoter confer androgen-independent expression of PSA in prostate cancer cells [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 40846-40855.

[8] Cinar B, Koeneman K S, Edlund M, Prins G S, Zhau H E, Chung L W K. Androgen receptor mediates the reduced tumor growth, enhanced androgen responsiveness, and selected target gene transactivation in a human prostate cancer cell line [J]. Cancer Res, 2001, 61: 7310-7317.

[9] Gleave M, Hsieh J, Gao C, von Eschenbach AC, Chung L W K. Acceleration of human prostate cancer growth *in vivo* by factors produced by prostate and bone fibroblasts [J]. Cancer Res, 1991, 51: 3753-3761.

[10] Israeli R S, Powell C T, Corr J G, Fair W R, Heston W D W. Expression of the prostate-specific membrane antigen [J]. Cancer Res, 1994, 54: 1807-1811.

[11] Horoszewicz J S, Leong S S, Chu T M, Wajsman Z L, Friedman M, Papsidero L, et al. The LNCaP cell line—a new model for studies on human prostatic carcinoma [J]. Prog Clin Biol Res, 1980, 37: 115-132.

[12] Berchem G J, Bosseler M, Sugars L Y, Voeller H J, Zeitlin S, Gelmann E P. Androgens induce resistance to bcl-2-mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 1995, 55: 735-738.

[13] Navone N M, Logothetis C J, von Eschenbach A C, Troncoso P. Model systems of prostate cancer: uses and limitations [J]. Cancer Metastasis Rev, 1998-1999, 17: 361-371.

[14] Huggins C. Effect of orchiectomy and irradiation on cancer of the prostate [J]. Ann Surg, 1942, 115: 1192-1200.

[15] van Steenbrugge G J, van Uffelen C J, Bolt J, Schröder F H. The human prostatic cancer cell line LNCaP and its derived sublines: an *in vitro* model for the study of androgen sensitivity [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 1991, 40(1-3): 207-214.

[16] Thalmann G N, Sikes R A, Wu T T, Degeorges A, Chang S, Ozen M, et al. LNCaP progression model of human prostate cancer: androgen-independence and osseous metastasis [J]. Prostate, 2000, 44: 91-103.

[17] Wu T T, Huang J K. The clinical usefulness of prostate-specific antigen (PSA) level and age-specific PSA reference ranges for detecting prostate cancer in Chinese [J]. Urol Int, 2004, 72: 208-211.

[18] Gustavsson H, Welén K, Damber J. Transition of an androgen-dependent human prostate cancer cell line into an androgen-independent subline is associated with increased angiogenesis [J]. The Prostate, 2005, 62: 364-373.

[19] Kokontis J, Takakura K, Hay N, Liao S. Increased androgen receptor activity and altered c-myc expression in prostate cancer cells after long-term androgen deprivation [J]. Cancer Res, 1994, 54: 1566-1573.

[20] Bruchovsky N, Rennie P S, Coldman A J, Goldenberg S L, To M, Lawson D. Effects of androgen withdrawal on the stem cell composition of the Shionogi carcinoma [J]. Cancer Res, 1990, 50: 2275-2282.

[21] Isaacs J T, Coffey D S. Adaptation *versus* selection as the mechanism responsible for the relapse of prostatic cancer to androgen ablation therapy as studied in the Dunning R-3327-H adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 1981, 41(12 Pt 1): 5070-5075.