

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00059

雄激素非依赖性前列腺癌细胞亚系模型 LNCaP-AI 的建立

叶华茂, 孙颖浩*, 许传亮, 王林辉, 侯建国, 高旭, 杨庆, 刘智勇
第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的:**建立雄激素非依赖性前列腺癌细胞亚系模型 LNCaP-AI。**方法:**长期在去雄激素的血清环境下培养雄激素依赖性 LNCaP 细胞, 培养出能够适应无雄激素环境的 LNCaP-AI 细胞亚系。MTT、RT-PCR、免疫荧光方法观察 LNCaP-AI 细胞在无雄激素环境下的增殖能力和表达及分泌前列腺特异性抗原(PSA)的水平。**结果:**LNCaP 前列腺癌细胞在无雄激素中培养 3 个月后逐渐适应了无雄激素的环境, 成为雄激素非依赖的 LNCaP-AI 细胞亚系。LNCaP-AI 细胞在无雄激素的环境下迅速增殖, 能够分泌 PSA, 但其 PSA mRNA 的表达水平是正常生长 LNCaP 细胞的 44%。**结论:**成功构建雄激素非依赖性前列腺癌细胞亚系模型 LNCaP-AI, 可以模拟前列腺癌由雄激素依赖发展为雄激素非依赖的过程。

[关键词] 前列腺癌; 雄激素非依赖; LNCaP

[中图分类号] R 737.25 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0059-04

Establishment of androgen-independent human prostate cancer cell line model LNCaP-AI

YE Hua-mao, SUN Ying-hao*, XU Chuan-liang, WANG Lin-hui, HOU Jian-guo, GAO Xu, YANG Qing, LIU Zhi-yong
Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an androgen-independent human prostate cancer cell line model LNCaP-AI. **Methods:** LNCaP cells were cultured in absence of hormone for a long-term to establish LNCaP cell line LNCaP-AI, which can live without hormone. MTT, immunofluorescence and RT-PCR techniques were used to study the proliferation activity of LNCaP-AI cells and expression and secretion level of PSA by LNCaP-AI cells in absence of hormone. **Results:** After cultured for 3 months, LNCaP cells gradually became accustomed to the non-hormone condition, showing the characteristics of androgen-independent LNCaP-AI cell line. LNCaP-AI cells rapidly proliferated under the non-hormone condition and secreted PSA. However, PSA mRNA expression level in LNCaP-AI cells was 44% that of the LNCaP cells under hormone condition. **Conclusion:** Androgen-independent LNCaP-AI cell line may simulate the development of androgen-independence in prostate cancer cells and is an ideal model of androgen-independent prostate cancer cell line.

[KEY WORDS] prostate carcinoma; androgen-independent; LNCaP

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1):59-62]

雄激素非依赖前列腺癌发生机制目前尚不清楚, 主要障碍是缺乏理想的细胞模型来模拟前列腺癌由雄激素依赖向雄激素非依赖生长的整个过程。目前仅有 LNCaP 细胞系保留了人前列腺癌的雄激素依赖性的特征, 能够分泌前列腺特异性抗原(PSA)、前列腺特异性膜抗原(PSMA)及表达雄激素受体, 能够在具有雄激素样活性的甾体激素的刺激下生长。研究^[1]表明 LNCaP 细胞系能够在雄激素剥夺的环境下逐渐转变为雄激素非依赖的 LNCaP 前列腺癌细胞亚系。本研究通过慢性雄激素剥夺建立了 LNCaP 由雄激素依赖性进展为雄激素非依赖性生长的细胞模型, 这种模型能够模拟临床内

分泌治疗过程中前列腺癌由雄激素依赖发展为雄激素非依赖的过程, 是理想的研究雄激素非依赖性前列腺癌机制的模型。

1 材料和方法

1.1 材料 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。雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞株由第二军医大学长海医院泌尿外科保存。活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清(Charcoal Dextran Treated FBS)购自 Hylone 公司。

1.2 雄激素非依赖性 LNCaP 前列腺细胞模型的建

[收稿日期] 2007-06-12 **[接受日期]** 2007-12-10

[作者简介] 叶华茂, 博士生, 主治医师, E-mail: yehuamao@hotmail.com

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

立 雄激素依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞复苏,用常规 RPMI 1640 培养液(含质量分数为 1% 的谷氨酰胺和 5% 的碳酸氢钠)及 10% 进口胎牛血清进行连续传代培养。传 2 代后,更换无血清 RPMI 1640 培养液培养 2 d,后换用含有经过活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清 RPMI 1640 培养液,进行长期传代培养,筛选培养出不依赖于雄激素生长的 LNCaP 细胞亚系,命名为 LNCaP-AI 细胞亚系。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% 的 CO₂ 的潮湿培养箱内。

1.3 细胞模型的验证

1.3.1 LNCaP-AI 细胞亚系在雄激素剥夺环境下的生长情况 LNCaP 细胞和 LNCaP-AI 细胞在含有经过活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养 1 周,按每孔 5×10^3 细胞接种,细胞贴壁后,加入含有经过活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 100 μ l。孵育 2、4、6、8 d,加入 10 μ l MMT(5 mg/ml),37℃ 孵育 4 h,吸弃上清液,加入 150 μ l DMSO,振荡 10 min,检测光密度 D_{570} 值。以时间为横轴、 D 值为纵轴,描绘细胞生长曲线。

1.3.2 LNCaP-AI 细胞亚系在雄激素剥夺环境下的 PSA 分泌情况 LNCaP 细胞和 LNCaP-AI 细胞在含有经过活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养 1 周,按每孔 5×10^4 细胞接种,细胞贴壁后,加入含有经过活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 1 ml。孵育 1、3、5、7 d,相应收集各时间点培养基,应用 Roche 公司的 Elecsys total PSA reagent Kit 检测 PSA 质量浓度。以时间为横轴、PSA 质量浓度为纵轴描绘 LNCaP 及 LNCaP-AI 的 PSA 分泌曲线。

1.3.3 LNCaP-AI 细胞 PSA mRNA 的表达 抽提 LNCaP-AI 细胞和正常生长的 LNCaP 细胞总 RNA,应用 TaKaRa 公司的 RT-PCR 试剂盒逆转录为 cDNA。PSA(435 bp)上游引物:5'-GAA GAC ACA GGC CAG GTA TTT CAG-3',下游引物:5'-ATG ACG TGA TAC CTT GAA GCA CAC-3'。扩增条件:预变性 95℃ 2 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环;72℃ 10 min。 β -actin(400 bp)上游引物:5'-GCA TCC TCA CCC TGA AG TAC-3',下游引物:5'-TTC TCC TTA ATG TCA CCC AC-3'。扩增条件:95℃ 预变性 2 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,25 个循环;72℃ 10 min。将 PCR 扩增产物上样电泳,采用生物图像分析仪检测,以 β -actin 为内参,求出其相对表达量。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 软件包,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(图 1A)在活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清的 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 周左右开始处于自分泌状态,主要表现为 LNCaP 细胞向外伸出许多突起,彼此之间通过突起相互联系成网状(图 1B)。随后细胞始终保持这种状态,每周换液 2 次。到 3 个月后 LNCaP 细胞开始摆脱自分泌状态,突起逐渐减少,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。本研究在观察中发现了 2 种不同细胞形态(图 1C)。一种细胞体积稍小,外形接近椭圆,突起较少,由这种细胞组成的细胞集落数量较多;另一种,细胞体积相对较大,呈长椭圆形,形态更接近激素依赖的 LNCaP 前列腺癌细胞,但由这种细胞组成的细胞集落数量很少。随后将细胞转移至细胞平皿内培养,当再次出现细胞集落时,挑出体积较小、突起较少的相应集落细胞,转至 24 孔板内生长,当长至 80% 融合时,转至 6 孔板内,逐级倍增。当细胞达到一定数量后,转回培养瓶内进行连续传代培养,从而形成不依赖于雄激素生长的 LNCaP 细胞亚系,将其命名为 LNCaP-AI 细胞亚系(图 1D)。

2.2 LNCaP-AI 细胞亚系在雄激素剥夺环境下的生长情况 LNCaP-AI 细胞在含活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清的 RPMI 1640 培养液下的生长趋势明显,随着时间的增加,细胞明显增殖。而 LNCaP 细胞在相同环境下生长曲线低平,细胞增殖明显受到抑制($P < 0.001$)。说明 LNCaP-AI 细胞相对于 LNCaP 细胞,明显能适应无雄激素的环境(图 2)。

2.3 LNCaP-AI 细胞亚系在雄激素剥夺环境下 PSA 的分泌情况 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。而 LNCaP 细胞在相同环境下 PSA 的分泌明显受到抑制,始终处于极低的水平。这说明 LNCaP-AI 细胞已经适应无雄激素的环境,恢复了 PSA 的分泌能力(图 3)。

2.4 LNCaP-AI 细胞亚系 PSA mRNA 的表达情况 RT-PCR 方法检测 LNCaP-AI 细胞系只是部分恢复了表达 PSA mRNA 的能力,其表达水平要低于正常生长 LNCaP 细胞,表达水平是后者的 44%。PC-3 细胞则不表达 PSA mRNA(图 4)。

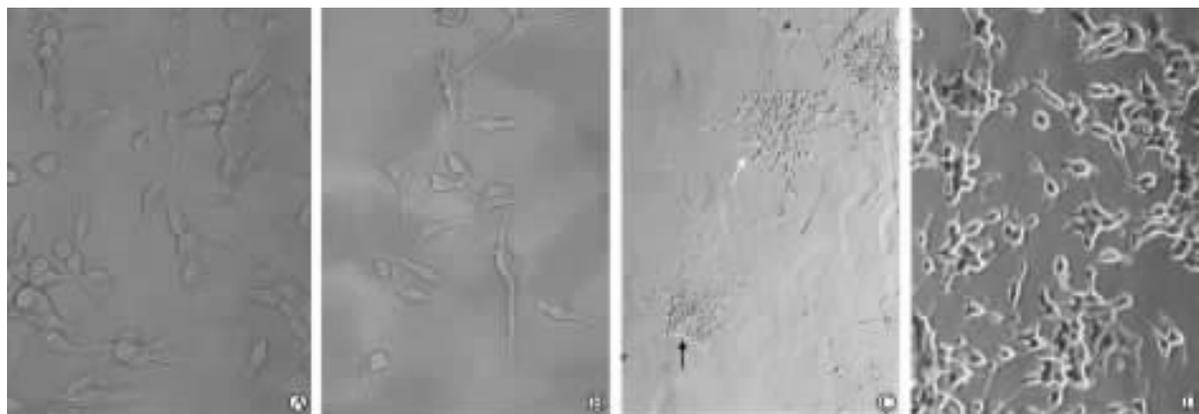


图 1 雄激素非依赖性 LNCaP 前列腺癌细胞模型的建立过程

Fig 1 Establishment of androgen-independent human prostate cancer cell model LNCaP cell line

A: Androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells(Original magnification: $\times 200$); B: Autocrine status of LNCaP cells(Original magnification: $\times 200$); C: Two types of LNCaP cell clone(Original magnification: $\times 100$; black arrow: clones of smaller oval cells with less projections; white arrow: clones of larger elliptic cells similar to androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells); D: Androgen-independent human prostate cancer LNCaP cell (LNCaP-AI subline; Original magnification: $\times 200$)

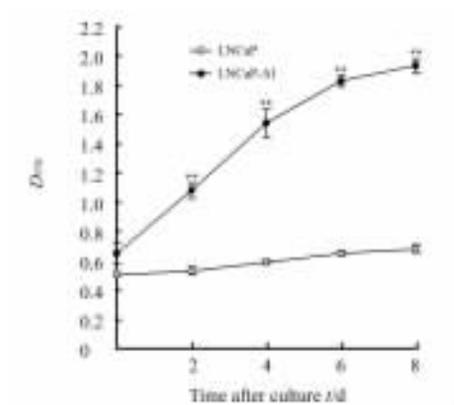


图 2 LNCaP 与 LNCaP-AI 细胞在雄激素剥夺环境下的生长曲线

Fig 2 Growth curves of LNCaP and LNCaP-AI cells in non-hormone circumstance

** $P < 0.001$ vs LNCaP cells; $n = 4, \bar{x} \pm s$

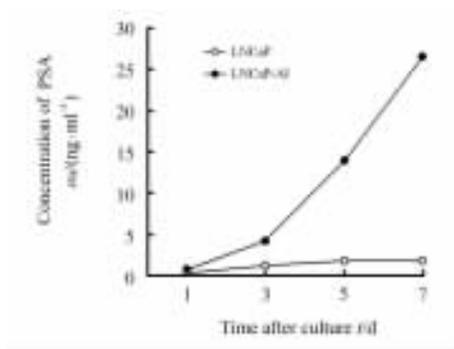


图 3 LNCaP 与 LNCaP-AI 细胞在雄激素剥夺环境下 PSA 的分泌曲线

Fig 3 PSA secretion by LNCaP and LNCaP-AI cells in non-hormone circumstance

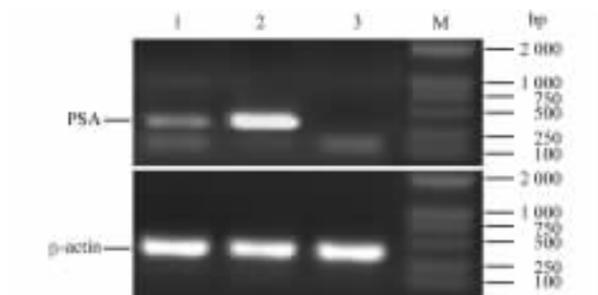


图 4 LNCaP-AI 前列腺癌细胞 PSA mRNA 的表达

Fig 4 PSA mRNA expression in LNCaP-AI cells

1: LNCaP-AI in non-hormone condition; 2: LNCaP in hormone condition; 3: PC-3 in non-hormone condition; M: DL 2 000 marker

3 讨论

在雄激素剥夺的环境下, 正常前列腺上皮细胞失去了再生和增殖的能力^[2-3]。然而前列腺癌细胞能够适应这种环境, 发展为雄激素非依赖状态。目前几种假说试图解释雄激素非依赖前列腺癌发生机制, 其中克隆选择学说和适应学说最为重要。虽然这些假说均有一些实验或临床研究结果支持, 但这些研究结果之间有相互矛盾之处, 因此确切的发病机制仍有待进一步研究。而目前研究的主要障碍是缺乏理想的细胞模型来模拟前列腺癌由雄激素依赖向雄激素非依赖生长的整个过程。已经建立的雄激素非依赖性前列腺癌细胞系有 PC-3、DU-145、TSU-Pr1 细胞系和雄激素依赖性前列腺癌细胞系 LNCaP 细胞系, 但这些细胞系的来源不同, 所表达的前列腺癌的标志物也有所不同, 因而缺乏可比性, 无法从它们之间的对比探询前列腺癌由雄激素依赖

向非依赖转变的机制。

理想的前列腺癌细胞模型应该是表现出雄激素依赖性的特性,表达野生型雄激素受体,并且在体外能够在雄激素剥夺的环境下转变为雄激素非依赖性。目前唯一能够利用的就是 LNCaP 细胞系,因为 LNCaP 细胞系生长具有很强的雄激素依赖性,它分泌 PSA,随着细胞的增殖,PSA 水平会逐渐升高。急性的雄激素剥夺会导致 LNCaP 细胞生长受到抑制^[4],慢性雄激素剥夺可以建立雄激素非依赖的亚细胞克隆^[1,5-6]。

本研究利用活性炭/葡聚糖去除 LNCaP 细胞系培养液中胎牛血清的绝大部分雄激素成分,来模拟最为接近生理条件下雄激素剥夺的状况^[7],在这种去雄激素的环境中长期培养 LNCaP 细胞。经过自分泌状态^[8]、细胞集落状态,最终培养出雄激素非依赖性的 LNCaP-AI 前列腺癌细胞亚系。MTT 实验证实 LNCaP-AI 前列腺癌细胞亚系在去雄激素环境中具有良好的增殖能力。

随后,本研究对雄激素非依赖 LNCaP-AI 细胞亚系 PSA 的分泌情况进行了研究。结果发现在无雄激素的环境下,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,这与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,当发展为雄激素非依赖前列腺癌血清 PSA 水平重新升高的现象相一致。但是,因为是体外实验,培养液中 PSA 的水平取决于两方面的因素:一方面取决于前列腺癌细胞的数量;另一方面取决于细胞本身 PSA 表达能力。本研究中,MTT 检测结果证明 LNCaP-AI 前列腺癌细胞可以在雄激素剥夺的环境下增殖,但并不清楚其本身 PSA 表达能力。我们又通过 RT-PCR 的方法对 LNCaP 和 LNCaP-AI 前列腺癌细胞系的 PSA 表达情况进行了检测,发现 LNCaP-AI 前列腺癌细胞系已部分恢复了表达 PSA 的能力,但其表达水平要低于正常生长的 LNCaP 前列腺癌细胞,是其的 44%。这也说明,临床上晚期或进展期前列腺癌中血清 PSA 水平持续升高,可能主要是前列腺癌细胞适应了内分泌治疗的环境,迅

速增殖的缘故。

综上所述,雄激素非依赖性 LNCaP-AI 细胞亚系模型可以模拟临床上在内分泌治疗过程中,前列腺癌由雄激素依赖发展为雄激素非依赖的过程。由于 LNCaP-AI 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,可以用来观察前列腺癌由雄激素依赖向非依赖转变过程的分子生物学变化,是理想的雄激素非依赖性前列腺癌细胞的模型。

[参考文献]

- [1] Shi X B, Ma A H, Tepper C G, Xia L, Gregg J P, Gandour-Edwards R, et al. Molecular alterations associated with LNCaP cell progression to androgen independence[J]. *Prostate*, 2004, 60:257-271.
- [2] Akakura K, Bruchofsky N, Goldenberg S L, Rennie P S, Buckley A R, Sullivan L D. Effects of intermittent androgen suppression on androgen-dependent tumors: apoptosis and serum prostate-specific antigen[J]. *Cancer*, 1993, 71:2782-2790.
- [3] Wu J P, Gu F L. The prostate 41-65 years post castration: an analysis of 26 eunuchs[J]. *Chin Med J (Engl)*, 1987, 100:271-272.
- [4] 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.
- [5] Culig Z, Hoffmann J, Erdel M, Eder I E, Hobisch A, Hittmair A, et al. Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system[J]. *Br J Cancer*, 1999, 81:242-251.
- [6] Hara T, Miyazaki J, Araki H, Yamaoka M, Kanzaki N, Kusaka M, et al. Novel mutation of androgen receptor: A possible mechanism of bicalutamide withdrawal syndrome[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:149-153.
- [7] 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, 40:207-214.
- [8] Yuan T C, Veeramani S, Lin F F, Kondrikou D, Zelivianski S, Igawa T, et al. Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2006, 13:151-167.

[本文编辑] 孙岩