

· 综述 ·

三种常见的前列腺癌细胞系 LNCap、PC3 和 DU145 的生物学特性

林艳端 申铎 胡兵

前列腺癌在西方国家男性高发的恶性肿瘤中,其死亡率居癌症死亡率的第二位,仅次于肺癌^[1],近年来,随着人们生活方式的改变、人口的老龄化以及诊断水平的不断提升,我国前列腺癌的发病率呈明显上升趋势,上海市统计数据示,前列腺癌的发病率已经从 1991 年的 2.9/10 万男性上升至目前的 12.6/10 万男性,将成为严重危害我国男性身体健康的重要疾病之一^[2-3]。

自 20 世纪 90 年代起,前列腺癌的实验研究在我国受到了重视并迅速开展,然而晚期前列腺癌和雄激素非依赖阶段的前列腺癌,对其相关的发病机制知之甚少,尚无有效的治疗方法^[3],当前的研究仍然处于摸索阶段,还需要通过大量的体内外实验进一步深入的探索,因此,掌握常见的前列腺癌细胞的生物学特性就变得至关重要,目前常用的前列腺癌细胞有 LNCap、PC3 以及 DU145 细胞系等,在此对这三种常见的前列腺癌细胞的生物学特性作一综述。

一、LNCap、PC3 和 DU145 细胞系的一般生物学特性

1. LNCap 细胞系:是由 Horoszewicz 等^[4]在 1980 年从前列腺癌患者的淋巴结转移灶标本中建立起来的,保留了前列腺癌肿瘤细胞学及其早期分化功能的特征,代表着早期雄激素依赖性的前列腺癌的显著特征。LNCap 细胞在体外培养易脱壁,其完全贴壁的时间在 48 h 左右^[5],可在半固体培养基中形成集落。接种 LNCap 细胞于裸鼠皮下可以形成肿瘤,其成瘤率与接种方式密切相关,单独裸鼠皮下接种的成瘤率很低,而与某些基质混合或原位接种裸鼠成瘤率可达 45% 或更高,且有淋巴转移的现象^[3,6]。LNCap 细胞倾向分泌总前列腺特异性抗原(tPSA),而升高的 tPSA 提示为雄激素依赖性和早期肿瘤^[5]。LNCap 细胞有很强的促血管新生能力,血管内皮生长因子(VEGF)作为一种促血管新生因子,在 LNCap 细胞呈高表达。E-cadherin 和 Vimentin 分别与肿瘤转移及细胞的生长分化状态、细胞迁移密切相关,LNCap 细胞高表达 E-cadherin,不表达 Vimentin。对 LNCap 细胞进行上皮细胞间质转化(EMT)特性鉴定发现 LNCap 具有显著的上皮细胞特性,其表达细胞生长因子 CK8/18 阳性,CK5 阴性,其中 CK8/18 是分化成熟的前列腺上皮细胞的标志物,CK5 是分化成熟的基底细胞的标志物^[7]。

2. PC3 细胞系:是从人前列腺癌骨转移肿瘤中分离出来的,分化程度低,为雄激素非依赖性前列腺癌细胞,不含有内源性的雄激素受体,具有中等强度的转移潜能,被广泛用于雄激素抵抗型的前列腺癌的研究^[7-8],PC3 细胞高表达表皮生长因子受体(EGFR),EGFR 是一种穿膜糖蛋白,在前列腺癌细胞中广泛存在,与表皮生长因子(EGF)结合发生磷酸化,一方面激活一系列

的信号传导系统促使肿瘤细胞增生,另一方面参与了雄激素的增生刺激作用,EGFR 在雄激素非依赖性前列腺癌细胞中的含量高于在雄激素依赖性前列腺癌细胞中的含量,同时在雄激素非依赖性前列腺癌细胞中 EGFR 表现出更强的促肿瘤细胞增生作用。此外 PC3 细胞高表达 E-cadherin,不表达 Vimentin,EMT 特性鉴定发现 PC3 细胞尽管同时表达细胞因子 CK5 和 CK8/18 但以显著的上皮细胞特性为主^[7]。

3. DU145 细胞:是从前列腺癌脑转移肿瘤中分离出来的,分化程度低,为雄激素非依赖的前列腺癌细胞,具有强大的转移潜能,缺乏内源性的雄激素受体的表达^[7]。DU145 细胞完全贴壁的时间通常在 24 h 以内。具有较强的侵袭和促血管新生能力,高表达 VEGF 和 EGFR,EGFR 的表达和激活作用与 PC3 相似。DU145 以分泌游离前列腺特异性抗原(fPSA)为主,而升高的 fPSA 应警惕雄激素非依赖性肿瘤的存在^[5]。值得注意的是与 LNCap 和 PC3 不同,DU145 细胞高表达 Vimentin,不表达 E-cadherin^[9],同时经 EMT 特性鉴定发现 DU145 细胞同时表达细胞生长因子 CK5 和 CK8/18 但以显著的间皮细胞特性为主^[10]。

二、LNCap、PC3 和 DU145 细胞系的雄激素受体表达情况以及对雄激素的反应

前列腺癌的发生发展与雄激素密切相关,大量的临床研究表明很多前列腺癌患者不可避免地经历了从雄激素依赖型到雄激素非依赖型的转变,雄激素是通过与雄激素受体结合,经过雄激素-雄激素受体信号通路,将胞外信号传递至胞内并作用于特定靶基因而发挥作用^[11]。雄激素受体属于核受体超家族的一种,在相应配体的存在下,起转录因子的作用,指导前列腺上皮细胞的正确分布^[12],在正常的前列腺组织发育中,雄激素受体是必不可少的因素,但其过量表达则可以导致组织的增生,且与前列腺癌的分化程度呈负相关^[13-14],不同的前列腺癌细胞具有不同的分化程度及独有的特性,代表着前列腺癌发展的不同阶段,因此在这些不同的癌细胞中雄激素受体也有着不同的表达形式。

1. LNCap 细胞:LNCap 细胞最大的特点在于雄激素依赖的生长特征,体外培养的细胞生长速率、裸鼠体内成瘤率均与雄激素的水平呈正相关,雄激素水平在 10 nmol/L 的浓度时表现出最强的刺激生长的作用,雄性裸鼠比雌性裸鼠以更高的频率和速度成瘤^[3],在 LNCap 细胞的胞质和胞核内皆表达高亲和力的雄激素受体,是典型的雄激素依赖性前列腺癌细胞。此外 LNCap 细胞具有显著的上皮细胞特性,表达突变型雄激素受体(T877A),这种突变型雄激素受体能与其他类固醇物质(孕激素、雌激素及其他抗雄激素类)结合,激活雄激素受体的转录,促进细胞增殖,或改变与共激活子间的相互作用,从而改变雄激素受体的信号通路^[7],Chung 等^[15]通过介导 LNCap 细胞与成骨纤维细胞系 MS 的相互作用得到了恶性程度较高的雄激素非依赖性的 C4 细胞系,包含 C4、C4-2 和 C4-2B 等细胞亚系,完成了从雄激素依赖到雄激素非依赖的转变,且获得了骨转移的能力,其

中 C4 代表着雄激素非依赖但受雄激素刺激的细胞, C4-2 代表雄激素非依赖且对雄激素不敏感细胞, 这种细胞系在半固体琼脂培养基中的集落形成能力较 LNCap 细胞高出 13 ~ 26 倍, C4-2B 代表前列腺骨转移的细胞系, 这些细胞亚型是对 LNCap 细胞系的延伸, 他们共同构成了比较完整的 LNCap 前列腺癌细胞模型, 较全面地阐述了雄激素对 LNCap 细胞系的影响。

2. PC3 细胞: PC3 细胞具有雄激素非依赖性, 不含内源性的雄激素受体, 通过在 PC3 细胞中诱导表达雄激素受体, 观察雄激素对 PC3 细胞的影响, 发现根据介导雄激素受体的启动子(天然启动子和非天然启动子)的不同, 雄激素受体对 PC3 细胞的增殖具有不同的作用, 如在 SV40 和 CMV 等非天然启动子作用下, 雄激素受体抑制 PC3 细胞的增殖^[16], 而在 Atuwaijr 等^[17]建立的基于人天然启动子介导的雄激素受体稳转的细胞系 PC3-AR9, 雄激素受体可以明显增强细胞的增殖能力, 在关于雄激素受体对 PC3-AR 细胞作用的进一步研究中, Niu 等^[8]通过划痕实验发现 PC3-AR 细胞的迁移速率和侵袭能力弱于不表达雄激素受体的 PC3 细胞。

3. DU145 细胞: DU145 细胞同样具有雄激素非依赖性, 不含内源性的雄激素受体, 由 Scaccianoce 等^[18]建立的 DU145-AR 稳转细胞系, 发现雄激素受体的表达抑制了细胞的增殖, 同时 Nagakawa 等^[19]研究发现雄激素受体通过影响整联蛋白亚基, 抑制了 DU145 细胞的迁移和侵袭能力, 但也有研究认为雄激素受体对 DU145 的增殖不存在作用^[7], 可见, 事实上雄激素受体在 DU145 细胞中的作用尚不是很明确, 还需要进一步的研究证实。

三、LNCap、PC3 和 DU145 细胞系的凋亡与增殖

在正常的前列腺细胞中存在着细胞凋亡及增殖的一个平衡点, 当这个平衡点遭到破坏的时候, 容易发生前列腺的增生或者癌变, 而细胞的凋亡和增殖受到不同基因的调控, 常见的参与调控细胞凋亡及增殖的基因有 P53、mdm2-p53 的负反馈调节环、bax 与 bcl-2、caspase 以及 TNF 家族等。

P53 基因是一种抑癌基因, P53 基因有野生型和突变型两种, 大量的研究表明野生型 P53 基因通过诱导肿瘤细胞的凋亡抑制肿瘤细胞的生长, 对致癌性有一定的抑制作用, 突变性 P53 不仅引起 P53 抑癌活性的丧失, 而且可以提高 PCNA(增殖细胞核抗原)的表达, 从而促进细胞的增殖水平, 提高恶性转化的活性^[20-21], P53 基因的表达产物 P53 蛋白是一种细胞周期的相关蛋白, 野生型 P53 蛋白不稳定, 用免疫组织化学的方法不易检测, 因此当免疫组化检测 P53 蛋白阳性时, 说明 P53 基因发生突变^[2]。

61% 的临床局灶性前列腺癌中可见 P53 异常升高。P53 可发生突变, Heidenberg 等^[22]发现在未治疗的前列腺癌中, P53 的突变率为 10% ~ 35%, 在雄激素非依赖性的前列腺癌中 P53 的突变率高达 40% ~ 50%。研究显示某些前列腺癌突变常常是由于 17 号染色体短臂上的等位基因的缺失引起的。与 P53 相关的另一种致癌基因为 mdm2, 位于 12 号染色体长臂上 13 ~ 14 位点, 在 30% ~ 40% 的前列腺癌组织中过度表达, 与 P53 形成负反馈环, 调整 P53 的表达, 同时通过抑制使细胞周期停滞或凋亡的相关基因的转录活性, 实现在细胞凋亡中的调节作用^[23-24]。不同的癌细胞对 P53 基因有不同的表达, 一般认为 PC3 细胞系不表达野生型 P53 蛋白, 而 DU145 和 LNCAP 细胞均可表达野生型 P53 蛋白, 而只有 DU145 细胞可以通过免疫印迹的方法检测到 P53 蛋白的表达, 通过研究发现 PC3 细胞的 17 号染色体短臂上

只有一个 P53 的等位基因, DU145 和 LNCap 细胞 17 号染色体的两条短臂上均有 P53 等位基因的存在, 在 DU145 细胞上检测到了 P53 基因的突变, 存在两种突变型(CCT 突变成 CTT 及 GTT 突变成 TTT), LNCap 细胞则不存在 P53 基因的突变^[20], 可以推想突变型 P53 基因的表达与前列腺癌细胞对雄激素依赖性的相关性, 同时有研究证明表达野生型 P53 基因的肿瘤细胞对放、化疗的敏感性强于不表达野生型 P53 基因或表达突变型 P53 基因的肿瘤细胞^[22]。

在前列腺癌细胞凋亡和增殖中起作用的还有 bax 基因和 bcl-2 基因, bax 基因与 bcl-2 基因是 BCL-2 家族中功能相反的两个重要成员, bax 基因具有促进细胞凋亡的作用, 散布于细胞基质中, 而 bcl-2 基因主要是抑制细胞凋亡, 其表达产物是一种膜结合蛋白, 通过 C 末端疏水性氨基酸锚定于线粒体外膜。在线粒体内外膜之间存在一种巨大渗透性通道, 称为 PT 孔, 位于富含 bax 及 bcl-2 的部位, bax 能促进 PT 孔开发, 释放细胞色素, 激活 caspase 酶联反应, 从而激活钙离子依赖性由 caspase 激活的 DNA 酶, 降解 DNA; bcl-2 通过抑制 PT 孔开放, 阻止细胞凋亡, 此外还可以负调控与细胞色素释放无关的 bax 下游的细胞凋亡信号通路, 调节线粒体内外膜间基质的 PH 值, 保持线粒体膜的完整性, 抑制细胞凋亡^[21]。在 bax 与 bcl-2 间存在着一个平衡点, bcl-2/bax 比例是决定细胞凋亡的关键因素^[12], 有研究发现 bax 的上调及 bcl-2 的下调, 可以诱发 caspase3 的活化, 促进细胞的凋亡。caspase 是含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶, 能特异性的切割靶蛋白天冬氨酸残基上的肽键, 可高度选择性的切割某些蛋白, 从而促进细胞的凋亡, 其中 caspase3 起着执行凋亡的作用; TNF 家族是一种多功能的细胞因子, 具有诱导细胞凋亡、抗病毒、免疫调节等多种活性, 在诱导前列腺癌细胞的凋亡中起着重要作用。然而上述基因在不同的前列腺癌细胞有不同程度的表达, 有研究表明 bcl-2、caspase3 主要表达于 LNCap 细胞, caspase3 以外的 caspase 家族基因则主要存在于 PC3 细胞, 包括 caspase1、4、6 及 14, 在 PC3 细胞中还高度表达 TNF 家族, 有研究证明 TNF 家族基因在 PC3 细胞中的表达量是 LNCap 细胞中表达量的两倍^[1]。

四、LNCap、PC3 和 DU145 细胞系常见的生物学特性小结(表 1)

面对我国前列腺癌发病率逐年升高, 国内研究者在前列腺癌实验研究中已经做了大量工作, 也取得了一些阶段性的成果, LNCap 细胞系由于保留了早期雄激素依赖的分子生物学及肿瘤细胞学的特征, 成为目前最广泛应用于研究前列腺癌的病理、遗传稳定性、激素调节及诊断治疗的细胞系, 同时还建立了雄激素非依赖性的 C4、C4-2 细胞亚系和具有骨转移能力的 C4-2B 细胞亚系, 经历了从雄激素依赖逐渐过渡到雄激素非依赖、受雄激素刺激到对雄激素不敏感的转变, 成功模拟了临床上前列腺癌发展、转移的过程, 因此, LNCap 细胞系及 C4、C4-2 细胞亚系可作为一套完整的发展模型用于前列腺癌发展转移的分子机制、药物筛选、药物评价和基因治疗的研究, 成为研究前列腺癌中最常用的细胞系^[3, 15]。高骨转移倾向是前列腺癌的临床特征及导致患者死亡的主要原因, 廖辉等通过 PC3 细胞反复建立裸鼠骨转移模型, 获得高骨转移潜能的细胞亚型 T3B 和低骨转移潜能的细胞亚型 P24, 通过高骨转移潜能的细胞株将有助于研究前列腺癌骨转移的分子机制以及筛选前列腺癌骨转移基因治疗的靶向位点^[25]等。DU145 细胞系在常见的前列腺癌细胞系中恶性程度

表 1 LNCap、PC3 和 DU145 前列腺癌细胞系生物学特性

细胞系	细胞来源	转移潜能	内源性雄激素受体表达情况	对雄激素的依赖性	P53 基因表达与突变	上皮细胞状态(EMT)	CK5	CK8/18	E-cadherin	Vimentin	PSA
LNCap 细胞	前列腺癌淋巴结转移灶	弱	高表达	雄激素依赖性	表达野生型 P53; 无 P53 突变型	上皮细胞特性	阴性	阳性	高表达	无表达	以分泌 tPSA 为主
PC3 细胞	前列腺癌骨转移肿瘤灶	中	无表达	雄激素非依赖性	不表达野生型 P53	上皮细胞特性为主	阳性	阳性 (主要)	高表达	无表达	不确定
DU145 细胞	前列腺癌脑转移肿瘤灶	强	无表达	雄激素非依赖性	表达野生型 P53; 含两种 P53 突变型	间皮细胞特性为主	阳性 (主要)	阳性	无表达	高表达	以分泌 fPSA 为主

注:细胞因子 CK5:分化成熟的基底细胞的标志物;细胞因子 CK8/18:分化成熟的上皮细胞的标志物;tPSA:总前列腺特异抗原;fPSA:游离前列腺特异抗原

较高,同时具有较强的转移潜能,是一种雄激素非依赖性的前列腺癌细胞,主要用于研究晚期激素非依赖性前列腺癌的进展,由于 DU145 具有显著的间皮细胞特性,因此也是研究 EMT 致肿瘤细胞转移潜能改变的理想的细胞资源^[9]。

参 考 文 献

[1] He Z,Zhang Y,Mehta SK,et al. Expression profile of apoptosis related genes and radio-sensitivity of prostate cancer cells. J Radiat Res, 2011,52:743-751.

[2] 王国民,武睿毅. 我国前列腺癌实验研究的现状和展望. 中华实验外科杂志,2005,9:1031-1034.

[3] 张惠,周建光,黄翠芬. 前列腺癌转移细胞模型——LNCaP 细胞模型. 军事医学科学院院刊,2005,6:576-579.

[4] Horoszewicz JS,Leong SS,Chu TM,et al. The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. Prog Clin Biol Res, 1980,37:115-132.

[5] 孙伟桂,甘艺平,余强国,等. 人前列腺癌 LNCap 与 DU145 细胞的性激素、VEGF、bFGF 和 PSA 等差异表达及其意义. 中国男科学杂志,2008,11:5-8.

[6] Wang X, An Z, Geller J. High-malignancy orthotopic nude mouse model of human prostate cancer LNCaP. The Prostate,1999,39:182-186.

[7] 王妍青,王伟华,辻一郎,等. 雄激素受体在前列腺癌细胞系中作用的研究进展. 国际泌尿系统杂志,2011,3:361-365.

[8] Niu Y, Altuwajiri S, Lai KP, et al. Androgen receptor is a tumor suppressor and proliferator in prostate cancer. Proc Nati Acad Sci U S A, 2008,105:12182-12187.

[9] 罗勇,贺大林,宁亮. 多种转移潜能不同的人前列腺癌细胞“上皮细胞间质转化态”特性鉴定及其意义. 中华男科学杂志,2006,8:696-700.

[10] van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, et al. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. The Prostate,2003,57:205-225.

[11] Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. Endo Rev,2004,25:276-308.

[12] Zhang ZW, Yang ZM, Zheng YC, et al. Transgelin induces apoptosis of human prostate LNCaP cells through its interaction with p53. Asian J Androl,2010,12:186-195.

[13] Chen CD, Welsbie DS, Tran C, et al. Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. Nature Medicine,2004,10:33-39.

[14] 叶定伟,李慧. 前列腺癌细胞中表皮生长因子受体的表达和激活. 中华泌尿外科杂志,2000,21:32-34.

[15] Chung LW, Zhou HE, Wu TT. Development of human prostate cancer models for chemoprevention and experimental therapeutics studies. J Cell Biochem Suppl,1997,28-29:174-181.

[16] Shen R, Sumitomo M, Dai J, et al. Androgen-induced growth inhibition of androgen receptor expressing androgen-independent prostate cancer cells is mediated by increased levels of neutral endopeptidase. Endocrinology,2000,141:1699-1704.

[17] Altuwajiri S, Wu CC, Niu YJ, et al. Expression of human AR cDNA driven by its own promoter results in mild promotion, but not suppression, of growth in human prostate cancer PC-3 cells. Asian J Androl, 2007,9:181-188.

[18] Scaccianoce E, Festuccia C, Dondi D, et al. Characterization of prostate cancer DU145 cells expressing the recombinant androgen receptor. Oncology Research,2003,14:101-112.

[19] Nagakawa O, Akashi T, Hayakawa Y, et al. Differential expression of integrin subunits in DU-145/AR prostate cancer cells. Oncology Reports,2004,12:837-841.

[20] Isaacs WB, Carter BS, Ewing CM. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. Cancer Research,1991,51:4716-4720.

[21] 王业华,姜英,顾沈阳,等. 前列腺癌 p53、bcl-2、bax 基因表达与凋亡、增殖的关系. 南京医科大学学报:自然科学版,2005,8:564-567.

[22] 姜昊文,张元芳,关明,等. 叶绿素-光动力学诱导 p53 在 PC3 细胞和移植瘤的表达变化. 上海医学,2005,5:412-413.

[23] Leite KR, Franco MF, Srougi M, et al. Abnormal Expression of MDM2 in Prostate Carcinoma. Mod Pathol,2001,14:428-436.

[24] Stoyanova R, Hachem P, Hensley H, et al. Antisense-MDM2 sensitizes LNCaP prostate cancer cells to androgen deprivation, radiation, and the combination in vivo. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007,68:1151-1160.

[25] 廖晖,陈安民,郭风劲,等. 不同骨转移潜能人前列腺癌细胞亚株的筛选. 中国癌症杂志,2007,17:231-235.

(收稿日期:2012-12-14)

(本文编辑:郝锐)