

雄激素受体抑制剂通过 AR 信号通路对胶质瘤生物学特性的影响

王长林, 牛万祥, 程传东, 鲍得俊, 牛朝诗

1. 安徽医科大学附属省立医院神经外科, 安徽 合肥 230001
2. 脑功能与脑疾病安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230001
3. 安徽省脑立体定向神经外科研究所, 安徽 合肥 230001

摘要:目的 研究雄激素受体 (androgen receptor, AR) 抑制剂 (flutamide) 对人胶质瘤细胞增殖、凋亡、侵袭的影响。方法 采用不同浓度的 flutamide (低浓度 1.0×10^{-8} 、中浓度 1.0×10^{-7} 、高浓度 1.0×10^{-6} mol/L) 作用于胶质瘤细胞系 U251, Real Time-PCR 和 Western Blot 检测 AR mRNA 及 AR 蛋白的表达情况; Cell Counting Kit-8 法测定 flutamide 对胶质瘤细胞增殖的影响; Annexin V-7AAD/PE 双染检测 flutamide 诱导胶质瘤细胞凋亡的作用; Transwell 测定 flutamide 对胶质瘤细胞侵袭能力的改变。结果 在体外胶质瘤细胞的增殖、侵袭能力能被 AR 抑制剂 (flutamide) 显著抑制且凋亡增加, 与药物浓度正相关。结论 AR 抑制剂 (flutamide) 能明显抑制胶质瘤细胞的增殖与侵袭, 并且诱导细胞凋亡, AR 可能是引起胶质瘤发生、发展的危险因素。

关键词: 胶质瘤; 雄激素受体; AR 抑制剂 (flutamide); 增殖; 凋亡

DOI: 10.16636/j.cnki.jinn.2018.01.002

Effects of androgen receptor inhibitor (flutamide) on biological characteristics of glioma via the androgen receptor signaling pathway

WANG Chang-lin, NIU Wan-xiang, CHENG Chuan-dong, BAO De-Jun, NIU Chao-shi. Department of Neurosurgery, the Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Province Key Laboratory of Brain Function and Brain Disease, Hefei 230001, China
Corresponding author: NIU Chao-shi, E-mail: niuchaoshi@126.com

Abstract: Objective To investigate the effects of the androgen receptor (AR) inhibitor flutamide on the proliferation, apoptosis, and invasion of human glioma cells in vitro, since AR is overexpressed in glioma tissues and is a risk factor for the development and progression of gliomas. **Methods** Different concentrations of flutamide (1.0×10^{-8} , 1.0×10^{-7} , and 1.0×10^{-6} mol/L) were added to glioma U251 cells. The mRNA and protein expression of AR was measured by real-time PCR and Western blot, respectively. Cell Counting Kit-8 assay was used to investigate the effect of flutamide on glioma cell proliferation. Flutamide-induced apoptosis of glioma cells was detected by Annexin V-7AAD/PE staining. The change in glioma cell invasion in the presence of flutamide was evaluated by Transwell assay. **Results** Flutamide significantly inhibited the proliferation and invasion and increased the apoptosis of U251 cells in vitro, in a dose-dependent manner. **Conclusions** The AR inhibitor flutamide can significantly inhibit the proliferation and invasion of glioma cells and induce their apoptosis in vitro, and AR may be a risk factor for the development and progression of gliomas.

Key words: Glioma; Androgen receptor; Androgen receptor inhibitor (flutamide); Proliferation; Apoptosis

胶质瘤是最常见的脑肿瘤, 对于高级别胶质瘤来说, 肿瘤增殖侵袭性强, 复发率高, 预后较差。虽然了解胶质瘤的分子机制对于胶质瘤患者的临

床治疗极其重要, 但目前对于胶质瘤发生、发展的认识依然有限。既往有流行病学调查显示, 胶质瘤患者中男性发病率为女性的 1.5 ~ 2 倍^[1,2], 随后的

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 81172407); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1408085MK169); 安徽省科技攻关项目 (编号: 1604a0802069); 脑功能与脑疾病安徽省重点实验室绩效考核补助项目 (1606c08235)

收稿日期: 2017-10-20; **修回日期:** 2018-01-04

作者简介: 王长林 (1990-), 男, 在读硕士, 主要研究方向: 脑胶质瘤基础与临床。

通信作者: 牛朝诗, 男, 博士, 主任医师, 教授, 博士生导师, 科主任, 主要从事脑肿瘤和功能神经外科基础与临床; E-mail: niuchaoshi@163.com

研究发现 AR 在胶质瘤组织中存在高表达,但确切的机制还不清楚。AR 抑制剂 (flutamide) 为非甾体类抗雄激素药物,主要应用于临床上前列腺癌的治疗。本研究采用 AR 抑制剂 (flutamide) 作用于人胶质瘤细胞,观察其对细胞增值、凋亡、侵袭的影响,初步探讨 AR 在胶质瘤发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胶质瘤细胞 U251 (上海中科院细胞库); AR 抑制剂 (flutamide) (Sigma 公司); RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit (德国 QIAGEN 公司); 反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (美国赛默飞公司); Real Time-PCR 试剂盒 Premix Ex Taq™ II (Takara 公司); 小鼠抗人 AR 单克隆抗体 (Santa Cruz); Cell Counting Kit-8 (日本同仁公司); Transwell chamber、Matrigel 胶 (美国 Corning 公司); Annexin V-7AAD/PE 凋亡试剂盒 (BD); AR 和 GAPDH 引物 (Invitrogen)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胶质瘤细胞 U251 在含有 10% 的胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基中,置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养。

1.2.2 Flutamide 处理细胞 精确称量 0.25 g flutamide,加入 9 ml 无水乙醇充分溶解,使其浓度为 0.1 mol/L 母液,4℃ 存放使用。使用前先用培养基稀释 100 倍,然后逐步稀释到实验浓度 (乙醇终浓度 < 0.01% 对细胞生长无影响)。取对数生长期的 U251 细胞,分别加入终浓度为 1.0×10^{-6} mol/L、 1.0×10^{-7} mol/L、 1.0×10^{-8} mol/L flutamide 在培养箱中培养,根据不同实验要求进行细胞处理。

1.2.3 Real Time-PCR 检测 AR 的 mRNA 表达 取 flutamide 分别处理过的细胞,按照 RNeasy Mini Kit 方法提取 RNA,之后使用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。进行 Real Time-PCR 反应,反应条件:预变性 (95℃, 30s)、变性 (95℃, 5s)、退火延伸 (60℃, 34s), 40 个循环。所有样本设置 3 个复孔。记录下其 Ct 值,AR 上游引物: 5'-CTCTCACATGTGGAAGCTG-CAAG-3', 下游引物: 5'-TTTCCGAAGACGACAAGAT-GGAC-3'; 内参 GAPDH 上游引物: 5'-GCACCGT-CAAGGCTGAGAAC-3', 下游引物 5'-TGCTGAAGACGC-CAGTGA-3'。

1.2.4 Western Blot 检测 AR 的蛋白表达 将 flu-

tamide 处理过的细胞加入细胞裂解液进行裂解,提取各组蛋白质,然后 SDS-PAGE 电泳、转膜,5% 脱脂牛奶封闭,加入 AR-抗孵育,ECL 法曝光显影。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 将对数生长期的 U251 细胞进行消化离心,取 3000 个/100μl 的细胞分别加入 96 孔板中,细胞贴壁后依次加入低浓度 (1.0×10^{-8} mol/L)、中浓度 (1.0×10^{-7} mol/L)、高浓度 (1.0×10^{-6} mol/L) 的 flutamide 溶液,每组设置 3 个复孔。24h、48h、72h 后分别加入 CCK8 溶液 10μl,置于培养箱中孵育 2h,用酶标仪测得 450nm 的 OD 值。

1.2.6 流式检测细胞凋亡 分别将不同浓度 flutamide 处理的胶质瘤细胞消化离心,收集 1×10^6 个细胞,用 1 ml $1 \times$ Binding Buffer 缓冲液重悬细胞,从中取 100μl,分别加入 5μl Annexin V-7AAD 和 5μl PE 溶液,混匀后室温避光孵育 15min 后加入 400μl $1 \times$ Binding Buffer,用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.7 Transwell 侵袭实验 将 flutamide 处理过的细胞换成无血清培养基饥饿 24h 后,进行消化离心,取 3×10^5 个/ml 的细胞液 200μl 加入小室内,下室加入 700μl 的有血清培养基,置于培养箱中培养 24h 后,依次进行 4% 多聚甲醛固定、甲醇通透、结晶紫染色,然后显微镜下进行观察。

1.3 统计学分析

所有数据使用“ $(\bar{x} \pm s)$ ”表示,根据 SPSS 17.0 统计软件分析数据,计量资料采取单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Flutamide 在 U251 细胞中对 AR 表达的影响

RT-qPCR 结果显示 (图 1),对照组 U251 细胞中 AR 的 mRNA 相对表达量为 1.061 ± 0.053 ,与对照组相比较,加入低浓度 flutamide 组为 0.929 ± 0.043 ,中浓度组为 0.813 ± 0.031 ,高浓度组为 0.711 ± 0.054 ,可见随着 flutamide 药物浓度的增高 AR 的 mRNA 表达逐渐降低,差异有统计学意义 ($F = 32.426, P < 0.05$)。

Western Blot 结果显示 (图 2),AR 蛋白表达的特异性条带出现在 120KDa 的位置上,对照组 U251 细胞中 AR 蛋白的相对表达量为 1.000 ± 0.062 ,与对照组相比较,加入低浓度 flutamide 组为 0.903 ± 0.041 ,中浓度组为 0.449 ± 0.511 ,高浓度组为 0.338 ± 0.040 ,可见随着 flutamide 药物浓

度的增高 AR 的蛋白表达逐渐减少,差异有统计学意义 ($F = 138.007, P < 0.05$)。

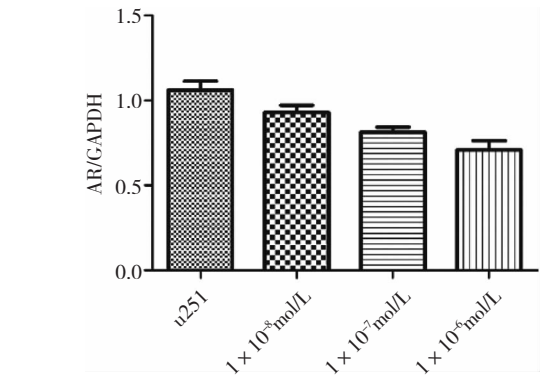


图 1 flutamide 抑制 U251 细胞中 AR mRNA 的表达水平

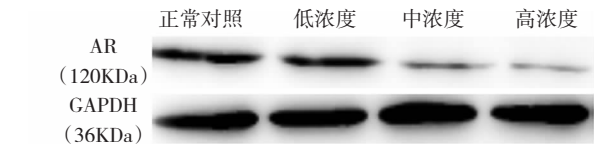


图 2 flutamide 抑制 U251 细胞中 AR 蛋白的表达水平

2.2 Flutamide 对 U251 细胞增殖的影响

如图 3,随着 flutamide 药物浓度的增加,细胞在 48h、72h 时的增殖逐渐被抑制,低浓度 flutamide 组差异无统计学意义 ($F = 0.573, P = 0.592 > 0.05$),中浓度组差异有统计学意义 ($F = 15.359, P < 0.05$),高浓度组差异有统计学意义 ($F = 24.667, P < 0.05$)。

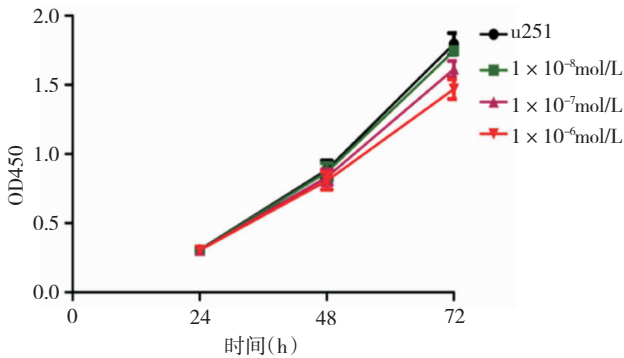


图 3 flutamide 抑制 U251 细胞增殖

表 1 不同浓度 flutamide 在不同时间对 U251 细胞的生长抑制率 ($\bar{x} \pm s$) (%)

浓度/时间	24H	48H	72H		
低浓度组 (1×10^{-8} mol/L)	1.17 ± 1.04	1.74 ± 0.44	2.70 ± 2.85	$F = 0.573$	$P > 0.05$
中浓度组 (1×10^{-7} mol/L)	1.52 ± 1.05	5.91 ± 2.0	10.12 ± 2.40	$F = 15.359$	$P < 0.05$
高浓度组 (1×10^{-6} mol/L)	1.12 ± 0.80	9.10 ± 0.17	18.09 ± 5.06	$F = 24.667$	$P < 0.05$
	$F = 0.148$	$F = 29.080$	$F = 13.500$		
	$P > 0.05$	$P < 0.05$	$P < 0.05$		

2.3 Flutamide 对 U251 细胞凋亡的影响

如图 4,正常对照组的细胞凋亡率为 $4.07\% \pm 0.57\%$,低浓度 flutamide 组为 $11.66\% \pm 1.65\%$,中浓度组为 $16.99\% \pm 1.01\%$,高浓度组为

$23.31\% \pm 0.65\%$,可见随着 flutamide 药物浓度的增高细胞凋亡率显著提高,差异有统计学意义 ($F = 178.662, P < 0.05$)。

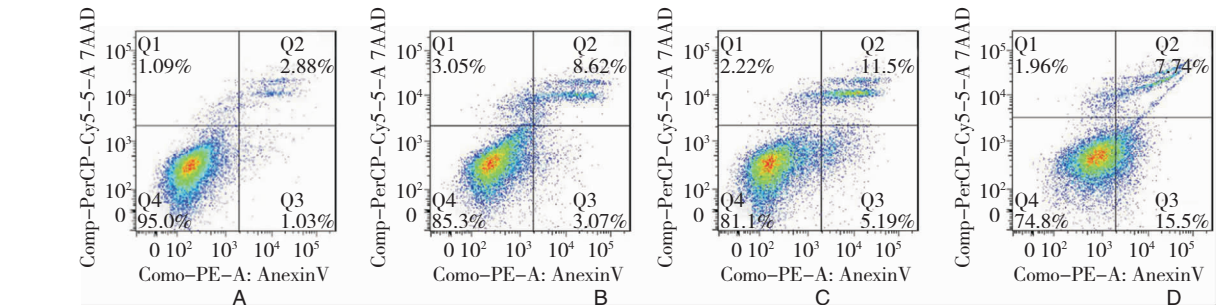


图 4 流式细胞仪检测 flutamide 诱导 U251 细胞凋亡

A: 正常 U251 细胞凋亡率; B: 低浓度 flutamide 组 (1.0×10^{-8} mol/L) 作用下细胞凋亡率; C: 中浓度 flutamide 组 (1.0×10^{-7} mol/L) 作用下细胞凋亡率; D: 高浓度 flutamide 组 (1.0×10^{-6} mol/L) 作用下细胞凋亡率

2.4 Flutamide 对 U251 细胞侵袭能力的影响

如图 5, 正常对照组的侵袭细胞数为 138.04 ± 8.12 个/视野, 低浓度 flutamide 组为 105.33 ± 3.51 个/视野, 中浓度组为 85.67 ± 6.03 个/视野,

高浓度组为 63.66 ± 3.42 个/视野, 结果显示随着 flutamide 药物浓度的增高细胞侵袭能力下降, 差异有统计学意义 ($F = 95.506, P < 0.05$)。

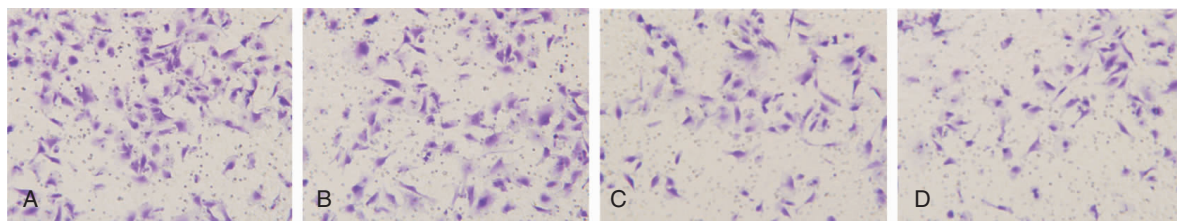


图 5 flutamide 抑制 U251 细胞侵袭 (200 ×)

A: 正常组 U251 细胞侵袭细胞数; B: 低浓度 flutamide 组 (1.0×10^{-8} mol/L) 侵袭细胞数; C: 中浓度 flutamide 组 (1.0×10^{-7} mol/L) 侵袭细胞数; D: 高浓度 flutamide 组 (1.0×10^{-6} mol/L) 侵袭细胞数

3 讨论

AR 属于核受体 (NR) 基因超家族中的成员之一, 是激素诱导型 DNA 结合转录因子^[3]。与其他核受体一样, AR 激活广泛的编码蛋白和非编码 RNAs 的靶基因^[4]。AR 在许多细胞类型中表达, 有研究发现 AR 信号在调节多种肿瘤增殖和凋亡方面有重要作用, 包括前列腺癌、膀胱癌、肾癌、肺癌、乳腺癌和肝癌^[5]。近几年研究发现, AR 在胶质瘤组织中高表达, 是引起胶质瘤发生、发展的一个危险因素^[6-9]。因此, 本实验选择 AR 抑制剂 (flutamide) 作用于人胶质瘤细胞系 U251, 观察其对胶质瘤细胞增殖凋亡的影响, 探讨 AR 在胶质瘤发病机制中的作用。

Flutamide 为非甾体类抗雄激素药物, 其主要的活性形式为小羟基 flutamide, 可以和 AR 结合, 阻断双氢睾酮与 AR 的结合, 导致靶组织对双氢睾酮的摄取阻断, 从而起到抗雄激素的作用。在我国, flutamide 作为 AR 的阻断药被广泛应用于临床上前列腺癌的治疗^[10]。本实验将不同浓度的 flutamide (低浓度 1.0×10^{-8} mol/L, 中浓度 1.0×10^{-7} mol/L, 高浓度 1.0×10^{-6} mol/L) 分别作用于胶质瘤细胞 U251, 研究发现随着 flutamide 浓度的提高, 胶质瘤细胞 U251 中 AR 表达减少, 其肿瘤增殖、侵袭能力下降和凋亡增加。

既往研究发现, AR 参与了多种信号通路影响肿瘤的进展: ①通过基因和非基因转录激活 PI3-K/AKT 信号通路参与细胞增殖; ②与 EGF 相互关联促进细胞的生长; ③与 FOXA1/2 相互结合调控

细胞的增殖与周期; ④促进端粒酶活性的表达进而抑制凋亡; ⑤AR 在 IGF、FGF、VEGF、TGF- β 和 β -actenin 等信号通路的调控中也占有重要作用^[11-13]。此外, AR 也参与到了原癌基因和抑癌基因的调节, 激活或抑制下游靶基因的调控进而影响细胞的增殖与凋亡^[14]。

目前, 替莫唑胺是临床上胶质瘤患者使用最广泛的化疗药, 然而其并不能达到满意的治疗效果^[15]。所以, 临床医生迫切需要研究出胶质瘤治疗的有效靶点。而目前有研究发现胶质瘤患者血清睾酮水平明显高于正常人, 且术后患者睾酮水平下降明显, 进一步研究发现睾酮合成关键酶 CYP17 和 AR 在胶质瘤组织中高表达, 且和病理级别相关^[6-9, 16]。既往 AR 的作用在前列腺癌中被广泛研究, 因此针对治疗前列腺癌的 AR 抑制剂也不断被开发。而本研究通过 flutamide 作用于胶质瘤细胞抑制 AR 的表达, 从而影响了胶质瘤细胞的增殖和凋亡。这说明 AR 可能是胶质瘤治疗中的一个潜在靶基因。

综上所述, 本实验研究发现 flutamide 在体外可以明显降低胶质瘤细胞的增殖、侵袭能力, 同时细胞凋亡增加, 表明 AR 是胶质瘤发生、发展中的关键因素, 但其作用机制还需要进一步的研究, 为胶质瘤患者的内分泌治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Hess KR, Broglio KR, Bondy ML. Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000. [J]. Cancer, 2004, 101(10): 2293-2299.

- [2] Dubrow R, Darefsky AS. Demographic variation in incidence of adult glioma by subtype, United States, 1992–2007 [J]. BMC cancer, 2011, 11(1):325.
- [3] Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM, et al. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome [J]. Science, 1988, 240(4850):327-330.
- [4] Narayanan R, Jiang J, Gusev Y, et al. MicroRNAs are mediators of androgen action in prostate and muscle [J]. Plos One, 2010, 5(10):e13637.
- [5] Chang C, Lee S O, Yeh S, et al. Androgen receptor (AR) differential roles in hormone-related tumors including prostate, bladder, kidney, lung, breast and liver. [J]. Oncogene, 2014, 33(25):3225-3234.
- [6] 鲍得俊, 王阳, 汪炎, 等. 雄激素受体在脑胶质瘤中的表达及意义[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2014(6):277-279.
- [7] Bao D, Cheng C, Lan X, et al. Regulation of p53 wt glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression. [J]. Oncotarget, 2017, 8(14):23142-23154.
- [8] 牛万祥, 周晨旭, 牛朝诗. CYP17A1 和 AR 在脑胶质瘤中的表达及意义[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2017, 44(1):1-4.
- [9] Yu X, Jiang Y, Wei W, et al. Androgen receptor signaling regulates growth of glioblastoma multiforme in men [J]. Tumour Biol, 2015, 36(2):967-972.
- [10] 邵竹平, 周鹤同. 睾丸实质切除联合缓退瘤治疗前列腺癌[J]. 中华男科学杂志, 2001, 7(6):391-392.
- [11] Gibson DA, Simitsidellis I, Collins F, et al. Evidence of androgen action in endometrial and ovarian cancers [J]. Endocrine-related cancer, 2014, 21(4):T203-218.
- [12] Zazzo ED, Galasso G, Giovannelli P, et al. Prostate cancer stem cells: the role of androgen and estrogen receptors [J]. Oncotarget, 2016, 7(1):193-208.
- [13] Zhu ML, Kyprianou N. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. [J]. Endocrine-related cancer, 2008, 15(4):841.
- [14] Shukla GC, Plaga AR, Shankar E, et al. Androgen receptor-related diseases: what do we know? [J]. Andrology, 2016, 4(3):366-381.
- [15] Cheng Y, Sk UH, Zhang Y, et al. Rational incorporation of selenium into temozolomide elicits superior antitumor activity associated with both apoptotic and autophagic cell death. [J]. Plos One, 2012, 7(4):e35104.
- [16] 周敏, 牛朝诗, 鲍得俊, 等. 脑胶质瘤患者手术前后血清睾酮水平的变化[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(6):1429-1431.

重要启事

本刊于 2017 年第 6 期 660 ~ 664 页上刊登的罗龙, 殷俊综述、杨晓苏审校的《硫化氢与 MAPK/Nrf2 信号通路关系的研究进展》一文受国家自然科学基金青年基金资助(项目编号:81501023), 特此声明。

《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部