基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.004

CXCR1/CXCR2 受体拮抗剂（G31P）对人前列腺癌增殖的体内外实验研究

刘 欣[1]，邓国英[1]，杨淑凤[1]，李 芳[2]

（大连医科大学基础医学院 1. 微生物学教研室；2. 免疫学教研室，大连 116044）

【摘 要】目的：探讨 CXCR1/CXCR2 受体拮抗剂-G31P 对人前列腺癌细胞 PC-3 增殖的体内外抑制作用。方法：采用 CCK-8 法研究不同浓度 G31P 对 PC-3 细胞体外增殖的抑制作用。建立体内绿色荧光蛋白（Green fluorescent protein，GFP）标记人雄激素非依赖性前列腺癌细胞 PC-3 裸鼠原位移植瘤模型，观察 G31P 对裸鼠前列腺癌原位移植瘤的体积、重量的影响。结果：CCK-8 结果显示 100 ng/ml G31P 与对照组相比分别作用 1、3 d 和 5 d 差异具有统计学意义（1 d P=0.007、3 d P=0.001、5 d P=0.028，均为 P<0.05）。前列腺癌 PC-3 细胞裸鼠模型体内实验显示，与对照组（100 μl N.S）相比，G31P 处理组（0.5 mg/kg）从给药第 18 天起能显著抑制前列腺肿瘤的体积（P=0.026，P<0.05）；与对照组相比 G31P 处理组在抑制前列腺肿瘤重量方面有明显作用（P=0.027，P<0.05）。结论：G31P 体内外实验均能抑制人雄激素非依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 的增殖。

【关键词】G31P；前列腺癌；CXCR1；CXCR2

【中国图书分类法分类号】R737.25 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-09-28

Inhibition study of G31P, a chemokine receptor CXCR1/2 antagonist, in proliferation of human prostate cancer cells in vivo and in vitro

LIU Xin[1], *DENG Guo-ying*[1], *YANG Shu-feng*[1], *LI Fang*[2]

(*1. Department of Microbiology; 2. Department of Immunology, College of Basic Medicine, Dalian Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of G31P on the proliferation of the prostate cancer in vivo and in vitro. *Methods*: The inhibition effect of G31P on the proliferation of PC-3 cell was investigated by CCK-8 assay in vitro. The effect of G31P on the volume and weight of human prostate tumor of nude mice was observed by building orthotopic transplantation tumor model of human androgen-independent prostate cancer PC-3 (GFP-labeled) in nude mice. *Results*: CCK-8 assay found statistically significant difference in inhibiting the proliferation of PC-3 cells between the 100 ng/ml G31P and control group for 1 day (P<0.01), 3 days (P≤0.01) and 5 days (P<0.05). G31P treatment after the 18th day of administration inhibited significantly the prostate tumor volume compared with control group (P<0.05), and this inhibition was more obvious (P<0.01) after the 24th day of administration in nude mice in vivo. A significant difference was observed between G31P treatment group (P<0.05) and the control group in prostate tumor weight. *Conclusion*: G31P can inhibit the proliferation of the prostate cancer in vivo and in vitro.

【Key words】G31P; prostate cancer; CXCR1; CXCR2

前列腺癌是我国男性常见的恶性肿瘤，在男性泌尿、生殖系统恶性肿瘤中发病率仅次于膀胱癌及肾癌[1]。在临床上，前列腺癌的治疗方法主要有手术治疗、放射治疗、化疗、内分泌治疗和免疫治疗方法，但采取前列腺根治性切除或放射治疗局限性病灶的前列腺癌患者有 30%会出现局部或远处复发[2]。一旦前列腺癌初次治疗后复发，化疗对前列腺癌治疗就会无效，最常用的方法是通过手术或药物雄激素撤除疗法。除了复发患者外，雄激素撤除疗法也用于治疗广泛原位或肿瘤远处侵袭的前列腺癌患者。然而在采用这种治疗 18~24 个月后，前列腺癌细胞则不可避免的转化成雄激素非依赖性，即前列腺癌细胞在雄激素撤除后仍不断增殖，病情进展恶化，并不再对激素敏感，患者的预期生存时间仅仅约为 9~12 个月。目前，任何对于雄激素非依赖性前列腺癌的治疗，疗效均有限，这种雄激素非依赖性前列腺癌往往成为最后病人死亡的原因[3,4]。

作者介绍：刘 欣（1976-），女，讲师，硕士，
研究方向：趋化因子研究。

通信作者：李 芳，女，教授，Email：lifang16@hotmail.com。

趋化因子是许多肿瘤细胞自主分泌并表达其受体影响，肿瘤生物学行为已经成为近年来研究的热点。CXCR1 和 CXCR2 是研究较多的趋化因子受体，文献报道它们在膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、子宫内膜癌、黑色素瘤等肿瘤细胞中过表达[5]。采用抗体封闭则可以抑制肿瘤细胞生长和转移。应用基因工程的方法，对人的CXCL8cDNA 进行改造，设计将人 IL-8 第 11 位赖氨酸突变成精氨酸、第 31 位甘氨酸突变成脯氨酸以改变受体的亲和力和信号转导，得到高亲和力的、无趋化活性的 CXCL8 衍生物，命名为 CXCL8(3-73)-K11R/G31P，简称 G31P。G31P 能够同CXCL8 受体 CXCR1 和 CXCR2 高亲和性结合，但并无生物学活性，同时阻断与 CXCR1 和 CXCR2 受体结合的所有趋化因子[6]。为了探讨 G31P 对人前列腺癌细胞 PC-3 增殖的体内外抑制作用，本实验以人雄激素非依赖性前列腺癌细胞系PC-3 作为研究对象，在体外采用 CCK-8 法研究不同浓度G31P 对 PC-3 细胞增殖的抑制作用，体内建立绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein，GFP)标记的人雄激素非依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 裸鼠原位移植瘤模型，观察 G31P 对裸鼠前列腺癌原位移植瘤的体积、重量的抑制作用，为前列腺癌等肿瘤的治疗开拓新的前景。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验试剂和仪器 1640 细胞培养液(Hyclone 公司，美国)；胰酶(Hyclone 公司，美国)；胎牛血清(Hyclone 公司，美国)；青、链霉素(Hyclone 公司，美国)；CCK-8 试剂盒(Sigma 公司，美国)；二氧化碳细胞培养箱(Thermo，德国)；酶标仪(BIORAD，美国)；倒置相差光学显微镜(Olympus，日本)；荧光体视显微镜(ZOOM645S，江南禹成光学仪器有限公司)；CDC(Retiga Exi cooled Digital Color 型，美国 QIMAGING 公司)；荧光激发仪(LG-150-A 型，南京超腾科技发展有限公司)。

1.1.2 细胞株和实验动物 人前列腺癌 GFP 阳性 PC-3 细胞株、裸鼠人前列腺癌 PC-3 细胞均由南京源端生物科技公司提供。

1.2 试验方法

1.2.1 CCK-8 法检测 G31P 对人前列腺癌 PC-3 细胞的细胞毒作用 生长状态好的对数生长期 PC-3 细胞，常规胰酶消化成为单细胞悬液，于 96 孔板[5×10^3 个/(0.1 ml·孔)]培养。每孔加入不同浓度 G31P，终浓度为：0、0.1、1、10 和 100 ng/ml。5%CO_2、37℃培养箱中培养 1、3 d 或 5 d。试验结束后每孔加 CCK-8 10 μl，37℃ CO_2 孵育箱中继续培养 4 h 后酶标仪检测吸光度(Optical density，OD)值，实验测定波长为 450 nm，参考波长为 600 nm。按下式计算细胞抑瘤率：抑瘤率(%)=(1-药物组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

1.2.2 裸鼠人前列腺癌模型的建立和实验分组 实验动物 BALB/c 雄性裸鼠(4~6 周)在 SPF 级屏障系统中饲养和实验。荧光蛋白标记人前列腺癌细胞株(PC-3-GFP)在含 10%胎牛血清的 1640 培养液中 37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下培养。取 5×10^6 个细胞接种于 3 只裸鼠皮下，2 周后，取皮下种植生长的前列腺癌肿瘤于培养液中分割成 1 mm×1 mm×1 mm 的组织碎块。每只试验裸鼠采用显微外科手术的方法将 1 块 PC-3-GFP 组织碎块植入裸鼠前列腺上，之后关闭腹腔。整个操作过程在超净工作台中完成。完成原位移植后对小鼠的健康状况和肿瘤的生长情况进行监测。手术后第 5 天时根据动物的体重将其随机分成 2 组并开始给药。每组 10 只裸鼠分别每 2 d 皮下注射 100 μl 生理盐水或 G31P(0.5 mg/kg)。分别于给药后 0、12、18 d 和 24 d 在荧光影像系统下测量小鼠的原位肿瘤大小，测量长径(L)、短径(S)。用 Image-Pro 计算出肿瘤的体积。肿瘤体积测定：(V)=肿瘤长径(L)×肿瘤短径$(S)^2$/2。给药后第 24 天，遵照动物福利原则操作，麻醉动物后，切取原发肿瘤。用电子天平称量原发肿瘤的重量。

1.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析，样本均数间比较采用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

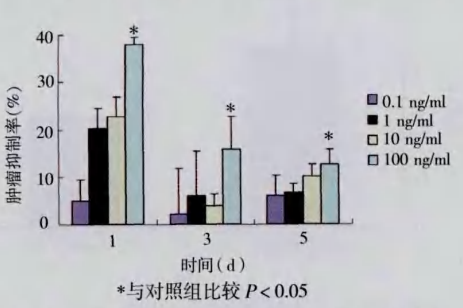
2.1 G31P 对人前列腺癌 PC-3 细胞生长的抑制作用

CCK-8 试验结果见表 1 及图 1，G31P 对 PC-3 细胞的抑瘤率随浓度的增加而增大，这说明 G31P 对 PC-3 细胞的抑制作用存在一定的剂量依赖关系。G31P 100 ng/ml 分别作用 1、3 d 和 5 d 与对照组相比较差异具有统计学意义(1 d P=0.007、3 d P=0.001、5 d P=0.028，均为 $P<0.05$)，故 G31P 浓度在 100 ng/ml 以上时可于体外明显抑制人前列腺癌 PC-3 细胞的增殖。

表 1 G31P 对人前列腺癌 PC-3 细胞生长的抑制作用(OD 值)

分组	1 d	3 d	5 d
对照组	-	-	-
G31P 组	0.276±0.048	0.748±0.021	1.057±0.031
0.1 ng/ml	0.262±0.045	0.730±0.045	0.964±0.095
1 ng/ml	0.220±0.044	0.702±0.020	0.970±0.092
10 ng/ml	0.213±0.041	0.719±0.028	0.929±0.028
100 ng/ml	0.171±0.035*	0.625±0.031*	0.904±0.069*

注：*，与对照组比较 $P<0.05$；-，没有数据



*与对照组比较 $P<0.05$

图 1 G31P 对人前列腺癌 PC-3 细胞生长的抑制作用

2.2　G31P 对裸鼠人前列腺癌模型的抑瘤作用

G31P 对裸鼠人前列腺癌模型的抑瘤作用结果见图 2。G31P 处理组给药第 24 天与对照组相比显著抑制前列腺肿瘤的体积(P=0.01,P<0.05)(表 2 及图 3)。给药后第 24 天,处死动物切取原发肿瘤后用电子天平称量原发肿瘤的重量,结果如图 4,G31P 处理组与对照组相比前列腺肿瘤重量明显减少,并且这种抑制作用具有统计学意义(P=0.027,P<0.05)。

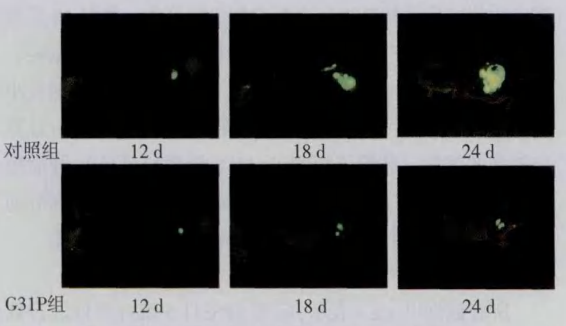
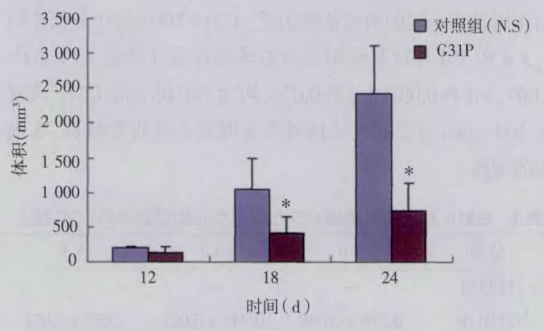


图 2　G31P 对裸鼠人前列腺癌模型的抑瘤作用

表 2　G31P 对裸鼠人前列腺癌肿瘤体积的影响

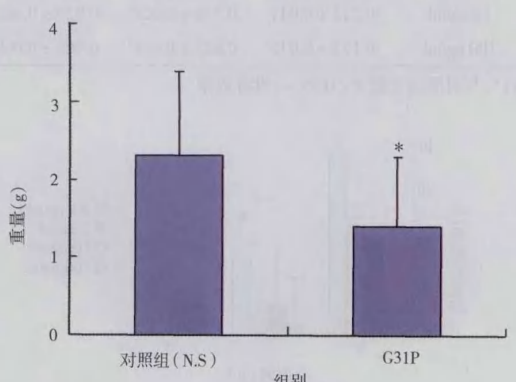
给药时间	对照组肿瘤体积（mm^3）	G31P组肿瘤体积（mm^3）
12 d	202.21 ± 22.87	125.26 ± 95.26
18 d	946.79 ± 478.26	460.66 ± 239.81*
24 d	2425.77 ± 701.94	769.58 ± 517.23*

*，与对照组比较 P < 0.05



*，与对照组比较 P < 0.05

图 3　G31P 对裸鼠人前列腺癌肿瘤体积的抑制作用



*与对照组比较 P < 0.05

图 4　G31P 对裸鼠人前列腺癌肿瘤重量的抑制作用

3　讨　论

人前列腺癌的发生发展是一个复杂的过程,可能与多种癌基因、抑癌基因和转录因子密切相关,具体机制不完全清楚。目前参与恶性肿瘤生长、侵袭和转移过程的各种趋化因子正逐渐引起国内外学者的普遍关注。大量研究证实许多肿瘤可以自分泌 CXC 类趋化因子及受体,通过诱导血管生成间接促进肿瘤的生长,或直接影响肿瘤细胞的生长。CXC 趋化因子(CXCL8 等)能够通过促进肿瘤细胞的增殖和肿瘤组织血管生成促进肿瘤的生长。在体外用 CXCR1 和 CXCR2 特异性抗体可抑制黑色素瘤生长。Li 等发现引入外源性 CXCL1 会增加结肠癌细胞的增殖能力,而 CXCL1、CXCR2 的中和抗体则可以抑制高转移结肠癌细胞株 KM12L4 的增殖。第一个报道的引起黑色素瘤的趋化因子是 CXCL8,通过 RT-PCR检测到 8 种黑色素瘤细胞系中有 6 种分泌 CXCL8,抗 CXCL8 抗体能抑制黑色素瘤在琼脂中的生长。黑色素瘤细胞表面的趋化因子受体为 CXCR1 和 CXCR2,体外特异性抗体可抑制黑色素瘤生长。故以趋化因子及受体为控制靶点,来控制趋化因子系统的功能,可望用于控制和治疗相关疾病。

本实验采用基因定点突变的方法研制出一种人 CXCL8 类似物-CXCL8(3-72)K11R/G31P(G31P),体外用 CCK-8法,体内建立 GFP 标记的人雄激素非依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 裸鼠原位移植瘤模型证实 G31P 体内外实验均能抑制人雄激素非依赖性前列腺癌细胞系 PC-3 的增殖。这一结果将为前列腺癌等肿瘤开拓新的治疗前景。

参　考　文　献

[1] Atmaca A,Maurer A,Heinzel T,et al.A dose-escalating phase Ⅰ study with valproic acid (VPA) in patients (pts) with advanced cancer [J].J Int Oncol,2004,22(14):3169-3178.

[2] Lin H Y,Chen C S,Lin S P,et al.Targeting histone deacetylase in cancer therapy[J].Med Res Rev,2006,26(4):397-413.

[3] Leoni F,Zaliani A,Bertolini G,et al.The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits anti-inflammatory properties via suppression of cytokines[J].Proc Natl Acad Sci USA,2002,99(5):2995-3000.

[4] Catherine W,Timothy W,Patrick G J,et al.Interleukin-8 signaling attenuates TRAIL-and chemotherapyinduced apoptosis through transcriptional regulation of c-FLIP in prostate cancer cells[J].Mol Cancer Ther,2008,7(9):2649-2661.

[5] Sánchez J,Moldobaeva A,McClintock J,et al.The role of CXCR2 in systemic neovascularization of the mouse lung[J].J Appl Physiol,2007,103(2):594-599.

[6] Zhao X,Town J R,Yang A,et al.A novel ELR-CXC chemokine antagonist reduces intestinal ischemia reperfusion-induced mortality,and local and remote organ injury[J].J Surg Res,2010,162(2):264-273.

（责任编辑：冉明会）