

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.07.006

# CXCR1/CXCR2 受体拮抗剂—G31P 抑制前列腺癌血管新生的体内实验

刘欣<sup>1</sup>, 戴晓冬<sup>2</sup>, 李星云<sup>1</sup>, 王晓丽<sup>1</sup>, 李芳<sup>3</sup>

**Inhibition of G31P: Chemokine Receptor CXCR1/CXCR2 Antagonist, in Angiogenesis of Human Prostate Cancer Cells *in vivo***

Liu Xin<sup>1</sup>, Dai Xiaodong<sup>2</sup>, Li Xingyun<sup>1</sup>, Wang Xiaoli<sup>1</sup>, Li Fang<sup>3</sup>

1. Department of Microbiology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China, 2. Department of Parasitology, 3. Department of Immunology

Corresponding Author: Li Fang, E-mail: lifang16@hotmail.com

**Abstract: Objective** To investigate the inhibition of G31P on the angiogenesis of the prostate cancer PC-3 cell *in vivo*. **Methods** The effect of G31P on angiogenesis of human prostate tumor of nude mice were observed in nude mice by building a human androgen-independent prostate cancer PC-3 (GFP-labeled) orthotopic transplantation tumor cells model. **Results** The tumor angiogenesis of G31P treated group ( $1.26 \pm 0.46$ ) was significantly reduced ( $0.49 \pm 0.12, P < 0.05$ ) compared with the control group. VEGF ( $P < 0.01$ ) and NF- $\kappa$ B ( $P < 0.01$ ) expression of G31P treated group was significantly reduced (immunohistochemistry) compared with the control group. **Conclusion** G31P could inhibit the angiogenesis of the prostate cancer PC-3 cell *in vivo*.

**Key words:** G31P; Prostate cancer; Angiogenesis; CXCR1; CXCR2

**摘要:目的** 探讨 G31P(CXCR1/CXCR2 受体拮抗剂)对人前列腺癌 PC-3 细胞的体内血管新生的抑制作用。**方法** 建立体内绿色荧光蛋白(GFP)标记的人雄激素非依赖性前列腺癌细胞 PC-3 的裸鼠原位移植瘤模型,观察 G31P 对裸鼠前列腺原位移植瘤血管新生的影响。**结果** 与对照组( $1.26 \pm 0.46$ )相比,G31P 处理组明显抑制前列腺肿瘤的血管新生( $0.49 \pm 0.12, P < 0.05$ ),与对照组相比,G31P 处理组 VEGF ( $P < 0.01$ )和 NF- $\kappa$ B ( $P < 0.01$ )的表达具有统计学意义(免疫组织化学法)。**结论** 在裸鼠原位移植瘤模型中 G31P 对人雄激素非依赖性前列腺癌的血管新生有明显抑制作用。

**关键词:** G31P; 前列腺癌; 血管新生; CXCR1; CXCR2

中图分类号:R737.25 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)07-0784-03

## 0 引言

血管新生是已存在的血管和循环前体的内皮细胞生成新的毛细血管的过程,是生理和病理条件下的关键性生物学过程,血管的新生失控是肿瘤的重要特征之一<sup>[1]</sup>。CXC 趋化因子(CXC chemokine)超家族是一组和血管新生密切相关的细胞因子。CXC 趋化因子(如 CXCL8 等)与其受体结合后可促进多种肿瘤的血管新生。CXCR2 是目前研究较多的趋化因子受体。研究表明,在癌组织中 CXCR2 及 CXCL8 明显高表达,且阻断 CXCR2 可引起多种肿瘤组织的坏死,如肺癌、胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌<sup>[2]</sup>。

肿瘤的血管生成受多种因子的调节,而在所有的调节因子中,VEGF 是其中作用最强、最具特异

性的生长因子<sup>[3]</sup>。近年来的一些研究表明,核转录因子 NF- $\kappa$ B 在肿瘤的血管生成机制中也起着关键性的作用<sup>[4]</sup>。

我们采用基因定点突变法研制出一种人 CXCL8 的类似物—CXCL8(3-72)K11R/G31P(G31P)对 CXCR2 受体进行竞争性阻断,为了探讨 G31P 对雄激素非依赖性前列腺癌的血管生成的影响,本实验选取了雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞系为研究对象,在体内通过建立人雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞裸鼠原位移植瘤的模型,观察 G31P 对裸鼠肿瘤微血管密度的影响,应用免疫组织化学方法检测前列腺癌组织中 VEGF 和 NF- $\kappa$ B 的表达水平,以探讨 G31P 在前列腺癌血管生成中的有效机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂和仪器

小鼠单克隆抗 VEGF 抗体、兔多克隆抗 NF- $\kappa$ B p65 抗体(Santa Cruz Biotechnology Inc USA)。RP-MI1640 细胞培养液、胰酶、青、链霉素、胎牛血清(美

收稿日期:2011-09-01;修回日期:2011-12-28

作者单位:1. 116044 辽宁大连,大连医科大学微生物学教研室,2. 寄生虫学教研室,3. 免疫学教研室

通信作者:李芳, E-mail: lifang16@hotmail.com

作者简介:刘欣(1976-),女,硕士,讲师,主要从事趋化因子的研究

国 Hyclone 公司);倒置相差光学显微镜(Olympus, 日本);二氧化碳细胞培养箱(Thermo, 德国);酶标仪(BIORAD, 美国);荧光激发仪(LG-150-A 型, 南京超腾科技发展有限公司)。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)。

### 1.2 细胞株和实验动物

裸鼠和人前列腺癌绿色荧光蛋白阳性 PC-3 细胞株均由南京源端生物科技公司提供。

### 1.3 裸鼠人前列腺癌模型的建立和实验分组

实验动物为 4~6 周的 BALB/c 雄性裸鼠, PC-3-GFP(荧光蛋白标记人前列腺癌细胞株)在 RPMI1640(10%FBS)37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养, 分别取 5×10<sup>6</sup> 细胞接种于 3 只裸鼠皮下。两周后将皮下种植生长的前列腺癌在培养液中分割成 1 mm<sup>3</sup> 组织碎块。用显微外科手术方法将 1 块 PC-3-GFP 组织碎块植入实验裸鼠前列腺上后关闭腹腔。术后第 5 天时根据动物的体重随机分成 2 组并开始给药。每组 10 只裸鼠每两天皮下注射 100 μl 0.9%氯化钠溶液(N. S control 组)或 G31P(0.5 mg/kg)G31P 组。按照动物福利原则, 麻醉动物后打开腹腔在荧光影像系统下观察肿瘤血管密度情况。在荧光影像系统下拍摄照片。使用 Image-Pro 6.0 软件计算肿瘤血管密度, 反映肿瘤血管新生情况。

### 1.4 免疫组织化学方法检测肿瘤标本石蜡切片 VEGF 和 NF-κB 的表达

肿瘤组织常规石蜡包埋切片(厚度 4 μm), 脱蜡、水化和热修复抗原后加 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80% 甲醇)室温静置 10 min; PBS 冲洗三次后加入正常山羊血清封闭液 50 μl, 放置室温 15 min; 1:50 抗 VEGF 或 NF-κB 抗体 50 μl, 4℃ 过夜; 37℃ 复温 30 min 后, PBS 冲洗三次, 加 50 μl(山羊抗鼠或山羊抗兔)生物素标记的第二抗体, 37℃ 孵育 40 min; PBS 冲洗三次, 滴加 50 μl 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 37℃ 孵育 30 min; PBS 冲洗三次, DAB 显色 5 min, 显微镜下掌握染色程度; 水洗 10 min 后, 苏木精对比染色 2 min; 盐酸酒精分化 1 s, 淡氨水返蓝 10 s, 依次置 75%、85%、95%、100% I、100% II 酒精中, 各 5 min; 置入二甲苯 I 和二甲苯 II 中各 10 min, 中性树胶封片。每张切片随机检测 5 个视野(×400), Image-Pro 6.0 软件计算每张照片的累积吸光度值(IOD), 用来反映染色强度。

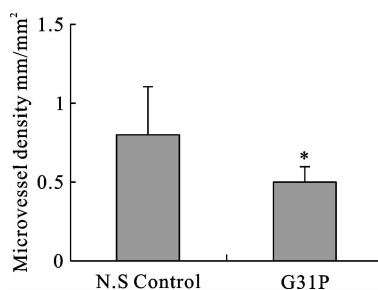
### 1.5 统计学方法

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

## 2 结果

### 2.1 G31P 对裸鼠人前列腺癌血管新生的抑制作用

给药后第 24 天, 处死动物后, 打开腹腔在荧光影像系统下观察肿瘤血管密度情况, 并拍摄照片(图略)。使用 Image-Pro 6.0 软件计算肿瘤血管密度, 反映肿瘤血管新生情况, 结果见图 1。G31P 处理组与对照组相比能明显抑制前列腺肿瘤的血管新生( $0.49 \pm 0.12, P < 0.05$ )。这一结果说明 G31P 对前列腺肿瘤的新生血管具有显著的抑制作用。



\*:  $P < 0.05$  vs. N. S control group

图 1 G31P 对前列腺癌血管新生的抑制作用

Figure 1 G31P inhibits prostate tumor angiogenesis in nude mice

### 2.2 G31P 对裸鼠人前列腺癌 VEGF 及 NF-κB 的影响

VEGF 表达主要位于细胞质中, 每组取三个裸鼠的前列腺癌组织, 每个组织在三个不同位置进行拍照(×400)。对照组和 G31P 处理组裸鼠人前列腺癌 VEGF 免疫组织化学结果见图 2, 对照组细胞质着色较深, 而 G31P 处理组细胞质着色较浅。对照组和 G31P 处理组裸鼠人前列腺癌 IOD 值结果显示, G31P 处理组 VEGF 表达较对照组减少, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 见表 1。对照组和 G31P 处理组裸鼠人前列腺癌 NF-κB 免疫组织化学结果见图 3, 对照组细胞质着色较深, 而 G31P 处理组细胞质着色较浅。对照组和 G31P 处理组裸鼠人前列腺癌 IOD 值结果显示, G31P 处理组 VEGF 表达较对照组减少, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 见表 2。

表 1 G31P 对前列腺癌 VEGF 表达的影响

Table 1 Effect of G31P on the expression of VEGF in prostate cancer

Groups	IOD
N. S Control	56 969 ± 8 463
G31P	16 871 ± 6 250**

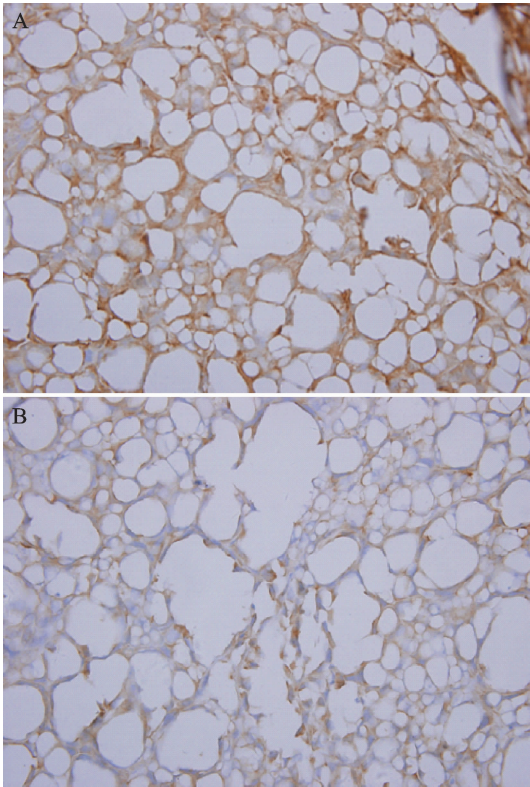
Note: \*\*:  $P < 0.01$  vs. N. S control group

表 2 G31P 对前列腺癌 NF-κB 表达的影响

Table 2 Effect of G31P on the expression of NF-κB in prostate cancer

Groups	IOD
N. S Control	27 104 ± 5 653
G31P	9 939 ± 5 214**

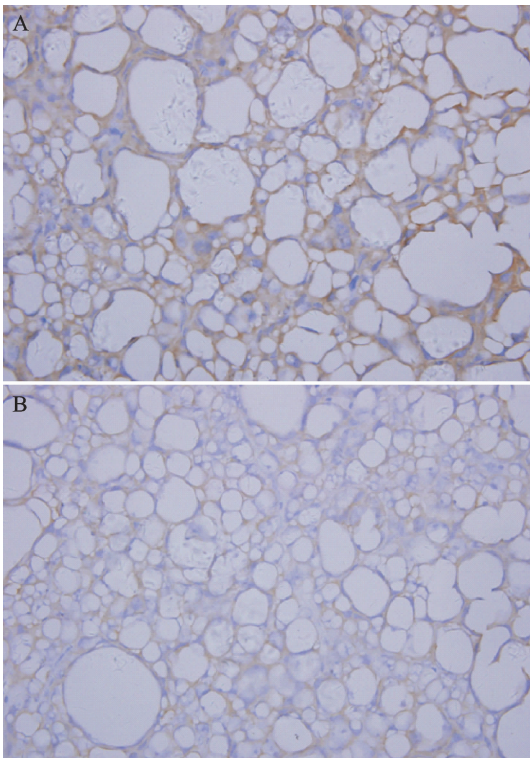
Note: \*\*:  $P < 0.01$  vs. N. S control group



A: N. S control group; B: G31P group

图 2 免疫组织化学染色检测肿瘤切片 VEGF 的表达 (× 400)

Figure 2 Immunohistochemical analysis of VEGF on serial sections (× 400)



A: N. S. control group; B: G31P group

图 3 免疫组织化学染色检测肿瘤切片 NF-κB 的表达 (× 400)

Figure 3 Immunohistochemical analysis of NF-κB on serial sections (× 400)

### 3 讨论

微血管内皮细胞上表达的 CXCR2 是 ELR<sup>+</sup>-CXC 趋化因子促进血管新生的关键性受体,能引起血管内皮细胞增殖、趋化和抑制内皮细胞凋亡等一系列促进血管新生的生物学效应<sup>[5]</sup>。在前期实验中,我们研制出一种能竞争性抑制 CXCR2 受体的人类 CXCL8 的类似物—G31P。本实验通过建立荧光标记人雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞裸鼠原位移植瘤的模型比较了 G31P 处理组和对照组裸鼠前列腺肿瘤的微血管密度。荧光照片比较发现 G31P 处理组的肿瘤血管较对照组明显减少,差异具有统计学意义。这说明 G31P 对人雄激素非依赖性前列腺癌的血管新生具有明显抑制作用。

另外,免疫组织化学分析也发现,G31P 处理组小鼠肿瘤的 VEGF 和 NF-κB 表达较对照组明显降低(P<0.05)。VEGF 和 NF-κB 是肿瘤血管生成机制中的关键性作用因子,CXCR2 经其 ELR<sup>+</sup>-CXC 趋化因子活化后可通过 NF-κB 途径作用于酪氨酸激酶受体(TKRs)实现其促进血管生成的生物学效应<sup>[6]</sup>。由此可见,G31P 对前列腺肿瘤血管新生的抑制作用可能是通过下调 VEGF 和 NF-κB 的表达实现的。

CXCR1 和 CXCR2 是 ELR<sup>+</sup>-CXC 趋化因子的关键性受体,参与体内包括细胞生长、发育、组织损伤等多种生理和病理过程,利用 G31P 拮抗 CXCR1 和 CXCR2 能否引起体内严重的不良反应,还需要更多的实验进行论证。

### 参考文献:

[1] Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(2): 143-54.

[2] O'Hayer KM, Brady DC, Counter CM. ELR<sup>+</sup> CXC chemokines and oncogenic Ras-mediated tumorigenesis[J]. Carcinogenesis, 2009, 30(11): 1841-7.

[3] Wang J. Progress of the application of vascular endothelial growth factor and its receptor in anti-tumor therapy[J]. Zhongguo Yi Yao Gong Ye Za Zhi, 2007, 38(5): 381-6. [王娟. 血管内皮生长因子及其受体在抗肿瘤治疗应用的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38(5): 381-6.]

[4] Gaurnier-Hausser A, Tuszyński GP. The immunomodulatory role of angiocidin, a novel angiogenesis inhibitor [J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(17), 1937-48.

[5] Heidemann J, Ogawa H, Dwinell MB, et al. Angiogenic effects of interleukin 8 (CXCL8) in human intestinal microvascular endothelial cells are mediated by CXCR2 [J]. J Biol Chem, 2003, 278(10): 8508-15.

[6] Addison CL, Daniel TO, Burdick MD, et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR<sup>+</sup> CXC chemokine-induced angiogenic activity [J]. J Immunol, 2000, 165(9): 5269-77.

[编辑: 黄国玲; 校对: 刘红武]