

[文章编号] 1007-385X(2006)03-0205-04

抗前列腺癌多肽 APP216 的体外活性

李 斌^{1,2}, 郝晓柯¹, 李立文³, 苏明权¹(第四军医大学 1. 西京医院检验科; 2. 唐都医院检验科; 3. 西京医院全军骨科研究所, 西安 710038)

[摘要] **目的:** 探讨抗前列腺癌多肽 APP216 对体外培养的前列腺癌细胞的杀伤作用, 为抗前列腺癌新药的研究奠定基础。**方法:** 利用 MTT 实验、细胞凋亡染色及流式细胞仪, 检测含有 BH3、K237、DG2 结构域和能被 PSA 特异性水解的短肽序列的多肽药物 APP216 对分泌 PSA 的前列腺癌细胞系 LNCaP、22RV1 及不分泌 PSA 的前列腺癌细胞系 PC3m、DU145 的杀伤作用。**结果:** APP216(270 μg/ml)处理 48 h 后, 前列腺癌细胞系 LNCaP、22RV1 的细胞生存率分别为 22% 和 34%, 72 h 后为 10% 和 8%; 前列腺癌细胞系 PC3m、DU145 的细胞生存率分别为 90% 和 95%, 72 h 后为 87% 和 92%。APP216 作用后, 分泌 PSA 的前列腺癌细胞胞核呈致密浓染, 或呈碎块状, 有凋亡小体出现; 不分泌 PSA 的 PC3m 细胞则未发现改变。APP216(270 μg/ml)处理 48 h 后, 分泌 PSA 的 LNCaP 细胞凋亡率为 36.26%, 不分泌 PSA 的 PC3m 细胞凋亡率仅为 1.63%。**结论:** APP216 多肽对分泌 PSA 的前列腺癌细胞有杀伤作用, 可诱导肿瘤细胞发生凋亡; 而对于不分泌 PSA 的前列腺癌细胞则效果不佳。证实了该多肽可被 PSA 特异性酶切; 同时, BH3 结构域可通过 HIV-TAT 的转导作用转入细胞内诱导凋亡。

[关键词] 多肽; 前列腺癌; 活性; 凋亡

[中图分类号] R737.25 [文献标识码] A

In vitro activity of an anti-prostate cancer polypeptide APP216

LI Bin^{1,2}, HAO Xiao-ke¹, LI Li-wen³, SU Ming-quan¹(1. Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital; 2. Department of Clinical Laboratory, Tangdu Hospital; 3. Institute of Orthopaedics of PLA, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the *in vitro* the anti-prostate cancer effect of a novel polypeptide, APP216, so as to provide a basis for development of new drug for treatment of prostate cancer. **Methods:** The polypeptide drug included the amino sequences of BH3, K237 and DG2 domain and the peptide that could be digested by PSA. The anti-prostate cancer effects of the polypeptide prodrug on prostate cancer cell line LNCaP, 22RV1 (secreting PSA) and PC3, DU145 (secreting no PSA) were determined by MTT test and Hoechst 33258 staining. **Results:** MTT test revealed that the surviving rates of LNCaP and 22PV1 cells were respectively 22% and 34% 48 h after APP216 (270 μg/ml) treatment, and 9.8% and 8.2% 72 h after APP216 (270 μg/ml) treatment. The surviving rates of PC3 and DU145 cells were respectively 90% and 95% 48 h after APP216 (270 μg/ml) treatment, and 87% and 92% 72 h after APP216 (270 μg/ml) treatment. Hoechst 33258 staining showed the typical features of cell apoptosis: cell shrinkage, chromatin condensation and hypodiploid genomic DNA content in LNCaP and PC3m cells. Flow cytometry showed an apoptosis rate of 36.26% 48 h after APP216 (270 μg/ml) treatment in LNCaP cells, and of 1.63% after 48 h APP216 (270 μg/ml) treatment in PC3m cells. **Conclusion:** APP216 has a satisfactory *in vitro* cytotoxicity on human PSA-secreting prostate cancer cells and can induce tumor cell apoptosis, but not on non-PSA secreting prostate cancer cells, indicating APP216 polypeptide can be specifically digested by endonuclease enzyme. Meanwhile, BH3 domain can be transferred into cells and induce apoptosis through HIV-TAT.

[Key words] polypeptide; prostate cancer; activation; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2006, 13(3): 205-208]

[基金项目] 国家高新技术研究发展规划(863)资助项目(NO.2001AA215321)

[作者简介] 李 斌(1972-), 男, 河北省秦皇岛市人, 硕士生, 主要从事肿瘤治疗方面的研究, E-mail: libinyx@sohu.com

[通讯作者] 郝晓柯, E-mail: haoxkg@fmmu.edu.cn

前列腺癌是老年男性生殖系统常见的恶性肿瘤^[1]。传统的化疗、激素治疗等方法疗效均不佳,目前临床最常用的去势手术治疗只能针对早期发现的患者,且复发率很高,寻找抗前列腺癌药物的新靶点和合成新型抗前列腺癌药物已成为研究热点。本实验室根据 PSA 具有的肿瘤定位及丝氨酸蛋白酶活性,设计并获得了包含促细胞凋亡的 BH3 结构域^[2-5]、抗肿瘤血管形成的 VEGF 拮抗肽 K237^[6]和 bFGF 拮抗肽 DG2^[7]结构域以及可被 PSA 特异性水解的多肽 APP216 的纯化蛋白^[8]。本研究利用 MTT 实验、Hoechst 细胞凋亡染色及流式细胞仪检测细胞凋亡来观察 APP216 在体外对前列腺癌细胞的杀伤作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞株与试剂

人前列腺癌细胞株 PC3m、DU145(不分泌 PSA), LNCaP、22RV₁(分泌 PSA)购自中科院上海细胞所; MTT 购自鼎国公司;细胞凋亡 Hoechst 染色试剂盒购自碧云天公司; Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒为美国 BD 公司产品;小牛血清购自杭州四季青研究所;胰酶, RPMI 1640 购自 Gibco 公司。

1.2 PSA 的测定

以化学发光法(美国罗氏全自动免疫分析仪)测定人前列腺癌细胞 PC3m、DU145、LNCaP、22RV₁第 3~4 代培养上清液的 PSA 浓度。

1.3 MTT 法检测细胞生长状况

称取 62.5 mg MTT,加 12.5 ml PBS(0.01 mol/L, pH 7.4),充分搅拌溶解,用 0.22 μm 滤器滤过除菌,分装,4℃保存备用。用 0.25 g/L 胰蛋白酶消化第 3~4 代人前列腺癌细胞 PC3m、DU145、LNCaP 和 22RV₁,将单细胞悬液以 1×10^5 /ml 密度接种于 96 孔培养板,每孔 200 μl。于 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养,细胞贴壁约 70% 后,更换无血清的 RPMI 1640 培养液培养 24 h,使细胞同步于 G₀ 期。更换含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,加入 APP216,终浓度分别为 0、45、90、180、270 mg/L;每个浓度设 5 个复孔,分别培养 12、24、48、72 h。每个实验结束前 4 h,每孔加入 MTT 溶液 20 μl,继续培养 4 h 后,吸弃上清,每孔加入 150 μl DM-SO,振荡 15 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上,以波长 490 nm 测定各孔光密度(D)值。计算细胞存活率[细胞存活率(%) = 试验组光密度值/对照组光密度值 × 100%]。

1.4 Hoechst 染色检测细胞凋亡

盖玻片于 70% 乙醇中浸泡 5 min, PBS 溶液洗涤 3 遍,细胞培养液洗涤 1 遍。将盖玻片置于 6 孔板内,分

别种入人前列腺癌细胞 LNCaP、PC3m 培养过夜,使细胞贴壁 50%~80%。加入 APP216,终浓度分别为 0、180 mg/L,各设 2 孔,培养 72 h。按试剂盒操作说明书进行操作,荧光显微镜检测呈蓝色的细胞核。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

0.25 g/L 胰蛋白酶消化第 3~4 代人前列腺癌 PC3m、LNCaP,将单细胞悬液以 1×10^5 /ml 密度接种于 6 孔培养板,各 2 孔。于 37℃、5% CO₂ 孵箱内培养,细胞贴壁约 70% 后,更换无血清的 RPMI 1640 培养液培养 24 h,使细胞同步于 G₀ 期。更换含有 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液,加入 APP216,终浓度分别为 0、270 mg/L,培养 48 h。消化 6 孔板中 PC3m、LNCaP 细胞,冷 PBS 洗涤,用结合缓冲液重悬细胞并调整细胞数为 1×10^6 /ml。分别取 100 μl 细胞重悬液各加入 5 μl AnnexinV-FITC 和 5 μl PI,轻轻混匀,25℃,暗处放置 15 min。以不加 APP216 只加 400 μl 结合缓冲液的 PC-3m、LNCaP 细胞为对照。流式细胞仪检测各组细胞的凋亡,计数细胞为 1.5×10^4 /次。

2 结 果

2.1 各前列腺癌细胞株的 PSA 分泌水平

测得各种癌细胞培养上清液中 PSA 浓度分别为: PC-3m: < 0.5 ng/ml; U145: < 0.5 ng/ml; LNCaP: 10 ng/ml, 22RV₁: 4 ng/ml。

2.2 APP216 对前列腺癌细胞增殖的抑制作用

针对分泌 PSA 的前列腺癌细胞系 22RV₁、LNCaP, APP216(270 μg/ml)处理 48 h 后,细胞生存率分别为 22%、34%, 72 h 后分别为 10%、8%。而对于不分泌 PSA 的前列腺癌细胞系 PC3m、DU145, APP216(270 μg/ml)处理 48 h 后,细胞生存率分别为 90%、95%, 72 h 后分别为 87%、92%(图 1)。

2.3 APP216 作用后前列腺癌细胞形态的改变

在 APP216 作用 72 h 后,分泌 PSA 的 LNCaP 细胞核呈致密浓染,或呈碎块状,有凋亡小体出现;而不分泌 PSA 的 PC3m 细胞则未发现改变(图 2)。

2.4 APP216 作用后前列腺癌细胞凋亡改变

加入 APP216(270 μg/ml)培养 48 h 后,分泌 PSA 的 LNCaP 细胞的凋亡率为 36.26%,而不分泌 PSA 的 PC3m 细胞的凋亡率为 1.63%(图 3)。

3 讨 论

化疗药物为传统肿瘤防治的主要手段之一,但大多数化疗药物缺乏对肿瘤组织的高度选择性,寻找抗肿瘤新靶点的全新机制药物成为肿瘤防治的重点,而导向性基因治疗成为研究的热点课题之一^[9]。

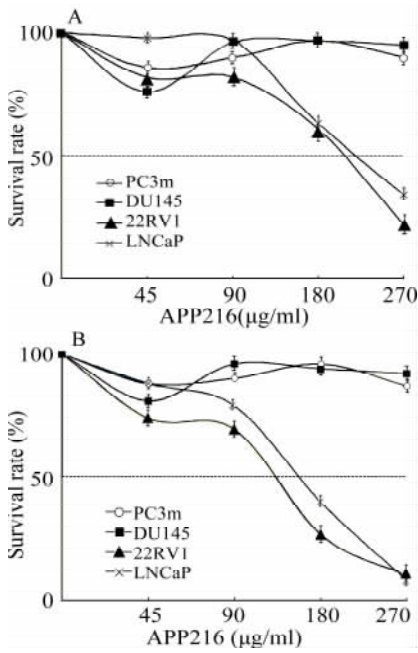


图1 APP216 对前列腺癌细胞增殖的抑制作用

Fig.1 Cytotoxicant curve of prostate cancer cells after APP216 treatment

A: Treated for 48 h; B: Treated for 72 h

难治性前列腺癌的治疗一直是困扰临床医生的重

要难题。本实验室根据 BH3 结构域的促凋亡作用、蛋白转导作用域的跨膜转运及亚细胞定位功能、VEGF 及 bFGF 抑制剂可抑制肿瘤增殖及血管形成等功能特点,设计制备了多肽药物 APP216^[5-7]。同时,APP216 利用 PSA 具有肿瘤定位特异性和丝氨酸蛋白酶水解活性的特点^[24],其分子到达前列腺癌时被 PSA 特异性水解,分子中的 BH3 作用域通过 PTD 的蛋白转导作用进入细胞,定位于线粒体,发挥促凋亡作用;而抗 VEGF/KDR、bFGF/bGFFR 多肽阻断细胞膜上 VEGF/KDR、bFGF/bGFFR 的结合,抑制肿瘤血管的生成^[9]。

本实验设计针对体外培养的人前列腺癌细胞的杀伤试验对其杀伤效果进行验证。由实验结果可见:针对分泌 PSA 的人前列腺癌细胞系 LNCaP、22RV₁,该蛋白显示出了良好的杀伤肿瘤的作用,而针对不分泌 PSA 的人前列腺癌细胞系 PC3m、DU145,均效果不佳,说明该蛋白活性具有对前列腺癌细胞分泌的 PSA 的特异依赖性,同时也证明了本研究设计的多肽 APP216 可以被 PSA 特异性地裂解。Hoechst 细胞凋亡染色显示 APP216 可以诱导细胞的凋亡,证明 HIV-TAT 蛋白转导作用域成功地将 BH3 结构域导入细胞内,使其发挥促凋亡的作用。流式细胞仪检测也证明 APP216 可有效地促进分泌 PSA 的前列腺癌细胞的凋亡。

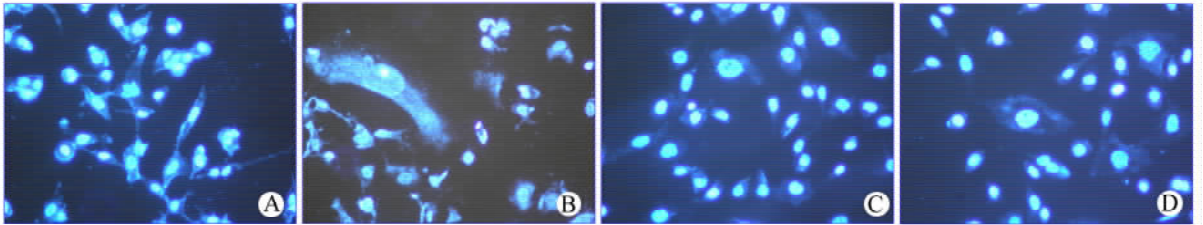


图2 APP216 作用后的前列腺癌细胞凋亡染色(Hoechst 染色, ×200)

Fig.2 Apoptosis of prostate cancer cells by Hoechst staining after APP216 treatment(Hoechs staining, ×200)

A: LNCaP cells; B: LNCaP cells after APP216 treatment 72 h; C: PC3m cells; D: PC3m cells after APP216 treatment 72 h

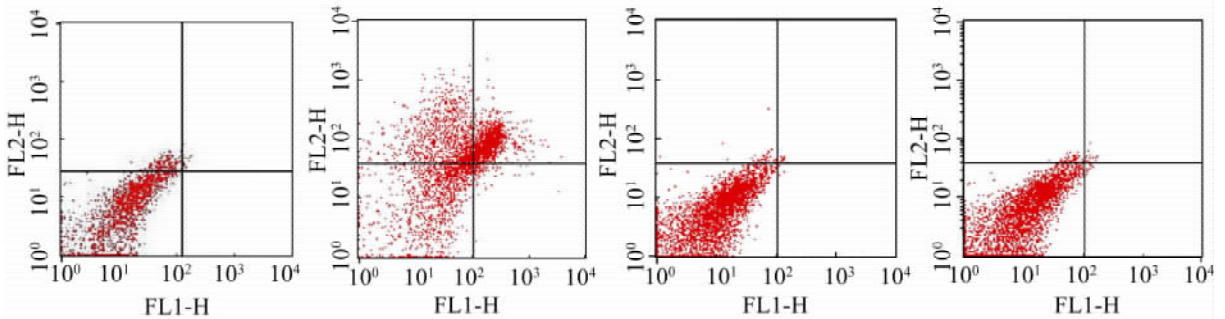


图3 流式细胞仪检测 APP216 作用 48 h 后前列腺癌细胞的凋亡

Fig.3 Apoptosis of prostate cancer cells by flow cytometry 48 h after APP216 treatment

A: LNCaP cell; B: LNCaP cell, APP216 270 μg/ml; C: PC3m cell; D: PC3m cell, APP216 270 μg/ml

体外实验的结果,为 APP216 的体内细胞毒性试验及进一步应用于临床治疗奠定了实验基础,也为前列腺癌的治疗提供了新的思路。

[参 考 文 献]

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics, 2006[J]. CA Cancer J Clin, 2006, 56(2): 106-130.

[2] Balk SP, Ko YJ, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen [J]. J Clin Oncol, 2003, 21(2): 383-391.

[3] Brady SF, Pawluczuk JM, Lumma PK, *et al.* Design and synthesis of a pro-drug of vinblastine targeted at treatment of prostate cancer with enhanced efficacy and reduced systemic toxicity [J]. J Med Chem, 2002, 45(21): 4706-4715.

[4] 李 斌, 郝晓柯, 苏明权. PSA 激活的前体药物疗法治疗前列腺癌研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2004, 11(2): 154-156.

[5] Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating pro-

grammed cell death [J]. J Cell Sci, 2002, 115(8): 1567-1574.

[6] Hetian L, Ping A, Shumei S, *et al.* A Novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to Its kinase domain receptor [J]. J Biol Chem, 2002, 277(45): 43137-43142.

[7] Yayon A, Aviezer D, Safran M, *et al.* Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(22): 10643-10647.

[8] 李 斌, 郝晓柯, 李立文, 等. 抗前列腺癌多肽融合蛋白在大肠杆菌中的原核表达[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(9): 796-798.

[9] Renner M. Inverted chemistry—from drug to prodrug[J]. Trends Mol Med, 2001, 7(3): 100.

[收稿日期] 2006 - 02 - 20 [修回日期] 2006 - 05 - 10
[本文编辑] 韩 丹

· 读 者 · 作 者 · 编 者 ·

参考文献题名后需标注文献类型和文献载体标志代码

本刊参考文献按照国家标准 GB/T 7714-2005《文后参考文献著录规则》的要求进行著录。该国家标准要求,每条文献的题名后都需标上[文献类型标志]或[文献类型标志/文献载体标志]。对纸质文献,如为期刊中析出文献,题名后应标上[J];如为专著中析出文献,题名后应标上[M]。对电子文献,如为网络期刊析出文献,题名后需标上[J/OL];如为网络专著中析出文献,题名后需标上[M/OL]。

现把常用的文献类型标志代码和电子文献载体标志代码介绍如下:

表 1 文献类型和文献载体标志代码

文献类型	标志代码	文献类型	标志代码	载体类型	标志代码
期 刊	J	报 纸	N	磁 带	MT
专 著	M	专 利	P	磁 盘	DK
汇 编	G	标 准	S	光 盘	CD
会 议 录	C	数 据 库	DB	联机网络	OL
学 位 论 文	D	计 算 机 程 序	CP		
报 告	R	电 子 公 告	EB		