

## 胰高血糖素样肽类似物对人前列腺癌细胞的生长抑制作用

焦雪花<sup>1,2</sup>, 马向华<sup>1\*</sup>, 李晓娜<sup>1</sup>, 范苇苇<sup>1</sup>, 赵莎<sup>1</sup>, 俞岭<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>吴江市第一医院内分泌科, 江苏 吴江 215200)

**[摘要]** 目的:探讨胰高血糖素样肽(GLP-1)类似物对前列腺癌细胞(LNcap)的生长抑制作用。方法:不同浓度的艾塞那肽(GLP-1类似物)(0~100 nmol/L)处理LNcap 24 h后,采用CCK-8法检测LNcap细胞的增殖率;Western blot法检测Bcl-2和Bax蛋白的表达,计算Bcl-2/Bax的比值。结果:艾塞那肽作用LNcap细胞24 h后,LNcap细胞的增殖率随艾塞那肽浓度的升高而降低( $P < 0.05$ )。Bcl-2/Bax的比率随艾塞那肽浓度的增高而降低( $P < 0.05$ )。结论:在浓度为1~100 nmol/L,作用时间为24 h的情况下,艾塞那肽能呈剂量依赖性地诱导LNcap细胞的凋亡。

**[关键词]** GLP-1类似物;LNcap;Bcl-2;Bax

**[中图分类号]** R737.25

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)12-1674-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20131206

### Inhibition of GLP-1 analogues on prostate cancer cells(LNcap)

Jiao Xuehua<sup>1,2</sup>, Ma Xianghua<sup>1\*</sup>, Li Xiaona<sup>1</sup>, Fan Weiwei<sup>1</sup>, Zhao Sha<sup>1</sup>, Yu Ling<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Department of Endocrinology, the First Hospital of Wujiang City, Wujiang 215200, China)

**[Abstract]** **Objective:**To explore inhibition of GLP-1 analogues on prostate cancer cells (LNcap). **Methods:**LNcap cells were treated with different concentrations(0~100 nmol/L)of exenatide for 24 hours. The Optical Density was measured by CCK-8 analysis. The expression of Bcl-2 and Bax protein were measured by Western blot analysis. **Results:**The viability of LNcap cells was decreased in a dose-dependent manner after the cells treated with exenatide for 24 hours, as well as the rate of Bcl-2/Bax, and the difference between groups was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:**Exenatide can induce apoptotic cell death in LNcap cells in a dose-dependent manner.

**[Key words]** GLP-1 analogues;LNcap;Bcl-2;Bax

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(12): 1674-1677]

前列腺癌是目前欧美国家男性发病率最高,病死率第2位的恶性肿瘤,仅次于肺癌<sup>[1]</sup>。近年来在我国的发病率也有所上升<sup>[2]</sup>。有研究表明,2型糖尿病患者的胰腺癌、肝癌、子宫内膜癌、结直肠癌及乳腺癌、膀胱癌的发病率较正常人高<sup>[3]</sup>。而2型糖尿病患者雄性激素分泌减少<sup>[4-5]</sup>,前列腺癌的发病率较正常人低<sup>[6]</sup>。

研究表明,长期服用艾塞那肽可增加胰腺癌、甲状腺癌的风险,却可以减少乳腺癌及结肠癌的发生

率<sup>[7-9]</sup>。那么艾塞那肽对雄激素依赖性前列腺癌是否有影响呢?目前国内外关于这方面的研究极少。本研究通过检测艾塞那肽干预LNcap细胞24 h后细胞增殖率的变化及凋亡蛋白Bax和Bcl-2的表达情况研究胰高血糖素样肽(GLP-1)类似物艾塞那肽对LNcap细胞的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

前列腺癌细胞(LNcap)由南京医科大学第一附属医院提供,艾塞那肽(礼来公司,美国),胎牛血清(澳洲血清,加拿大)、DMEM/F12 1:1(Hyclone公司,美国)、PBS(Hyclone公司,美国)、青链霉素(Hyclone

**[基金项目]** 江苏省自然科学基金资助(BK20131441)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xianghuama@sina.com

公司,美国)、胰蛋白酶(Gibco 公司,美国),CCK-8 试剂盒(碧云天生物技术有限公司,中国),Western blot 试剂盒(TaKaRa 公司,中国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

LNcap 细胞用含有 10%胎牛血清、 $1 \times 10^5$  U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM/F12(1:1)的培养液,在 37°C,5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,用 0.25%的胰蛋白酶消化传代。

#### 1.2.2 艾塞那肽干预 LNcap 细胞

取对数生长期的 LNcap 细胞悬液分别接种于 96 孔板( $4 \times 10^3$  个/孔)及 6 孔培养板( $3.5 \times 10^5$  个/孔)中,接种 24 h 细胞贴壁后,每孔中加入配置好浓度的艾塞那肽(0、1、10、100 nmol/L)。96 孔板每组设 4 个复孔。两组实验均重复 3 次。

#### 1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖

96 孔板中,艾塞那肽作用细胞 24 h 后将艾塞那肽培养液换 100  $\mu$ l 无血清培养液,每孔中加入 10  $\mu$ l CCK-8,放入 37°C 5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1 h 后置于酶标仪 450 nm 处测各孔吸光度值。细胞增殖率 (viability%)=实验组吸光度平均值/对照组吸光度平均值 $\times$ 100%。

#### 1.2.4 Western blot 检测法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

艾塞那肽作用细胞 24 h 后,按照 Western blot 的操作流程对细胞进行处理,把等量细胞抽提液上样进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移到硝酸纤维素薄膜上与双抗结合(一抗为 Bcl-2、Bax 兔抗人即用型单克隆抗体,二抗为羊抗兔 IgG 及 S-P 试剂盒),最后加入曝光液进行曝光显色。将显色图像输入图像分析系统进行图像处理,检测 Bcl-2 及 Bax 的平均灰度。

### 1.3 统计学方法

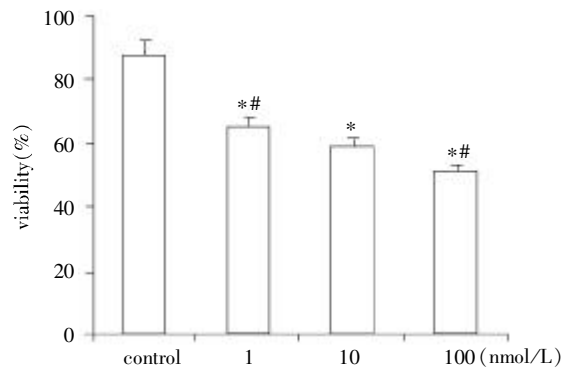
实验结果采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用单因

素方差分析,组间比较采用 SNK-*q* 检验  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCK-8 检测艾塞那肽作用 LNcap 24 h 后细胞增殖率的变化

0~100 nmol/L 艾塞那肽作用 LNcap 细胞 24 h 后 LNcap 细胞增殖率随艾塞那肽浓度的增加而降低,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1)。



与 control 组比较, \* $P < 0.05$ ;与 10 nmol/L 组比较,\*\* $P < 0.05$ 。

图 1 0~100 mmol/L 艾塞那肽作用于 LNcap 细胞 24 h 后细胞增殖率比较

Figure 1 The viability% of LNcap cells being treated with exenatide by a concentration (0~100 mmol/L) for 24 hours

### 2.2 Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

艾塞那肽作用 LNcap 细胞 24 h 后,在 0~100 nmol/L 间 Bcl-2/Bax 的比率随浓度增加而降低,比较组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1,图 2~3)。

## 3 讨论

GLP-1 是肠道 L 细胞受进食营养素刺激而分泌的 30 个氨基酸多肽,研究发现 GLP-1 可以通过提高胰岛  $\beta$  细胞胰十二指肠同源盒-1(PDX-1)蛋白的表达,促进胰岛素基因的表达,诱导  $\beta$  细胞的增殖和分化,抑制  $\beta$  细胞凋亡,增加胰岛素的分泌<sup>[10]</sup>。天

表 1 0~100 mmol/L 艾塞那肽作用 LNcap 24 h 后 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

Table1 The expression of Bcl-2 and Bax of the cells being treated with Exenatide by a concentration(0~100 nmol/L)for 24 hours

| 浓度(nmol/L) | n | Bax                 | Bcl-2               | Bcl-2/Bax           |
|------------|---|---------------------|---------------------|---------------------|
| control    | 3 | 0.253 $\pm$ 0.022   | 0.952 $\pm$ 0.018   | 3.778 $\pm$ 0.338   |
| 1          | 3 | 0.454 $\pm$ 0.074** | 0.853 $\pm$ 0.018   | 1.912 $\pm$ 0.311** |
| 10         | 3 | 0.644 $\pm$ 0.077*  | 0.611 $\pm$ 0.139*  | 0.948 $\pm$ 0.197*  |
| 100        | 3 | 1.207 $\pm$ 0.037** | 0.189 $\pm$ 0.008** | 0.157 $\pm$ 0.005** |

与 control 组比较, \* $P < 0.05$ ;与 10 nmol/L 组比较,\*\* $P < 0.05$ 。

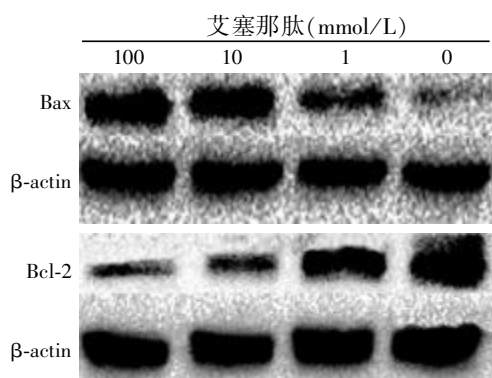
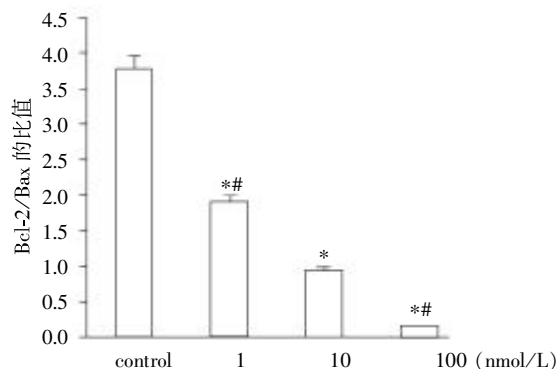


图2 0~100 mmol/L 艾塞那肽作用 LNcap 24 h 后 Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

Figure 2 The expression of Bcl-2 and Bax of the cells being treated with exenatide by a concentration (0~100 nmol/L) for 24 hours



与 control 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 10 nmol/L 组比较, # $P < 0.05$ 。

图3 0~100 mmol/L 艾塞那肽作用于 LNcap 细胞 24 h 后 Bcl-2/Bax 的比率比较

Figure 3 The rate of Bcl-2/Bax of the cells being treated with exenatide by a concentration (0~100 nmol/L) for 24 hours

然的 GLP-1 半衰期很短,只有 1.5~5.0 min<sup>[11]</sup>。艾塞那肽作为 GLP-1 类似物广泛用于临床,艾塞那肽可以增加胰岛素分泌对葡萄糖的敏感性,而其本身对胰岛素分泌只有很少或者没有影响<sup>[12]</sup>。有研究表明, GLP-1 对结肠癌和乳腺癌可能有抑制作用<sup>[13]</sup>,而关于 GLP-1 对雄激素依赖性前列腺癌的作用,国内外文章鲜有报道。

Bcl-2 家族是细胞凋亡发生和调控机制的重要环节, Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族的主要成员,通过调节线粒体的功能来调节凋亡<sup>[14-15]</sup>。研究发现,抑制 Bcl-2,可以增强激素非依赖性以及激素依赖性前列腺癌对化疗药物的影响<sup>[16-17]</sup>。

Bax 可以通过结合 Bcl-2,形成 Bcl-2-Bax 异源二聚体,起到拮抗 Bcl-2 的抑制凋亡功能,从而发挥促凋亡作用<sup>[18]</sup>。研究发现 Bcl-2/Bax 两蛋白之间比

值是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素; Bcl-2/Bax 比值降低可促进细胞凋亡;反之则凋亡被抑制<sup>[19]</sup>。当细胞受到凋亡刺激后是否凋亡取决于 Bcl-2/Bax 的比率<sup>[20]</sup>。

本实验发现, 0~100 nmol/L 艾塞那肽作用 LNcap 细胞 24 h 后,随着艾塞那肽药物浓度的增加, LNcap 细胞增殖率显著降低; Bcl-2/Bax 的比率也随着艾塞那肽浓度的增高而降低。即艾塞那肽可呈剂量依赖性方式诱导 LNcap 细胞的凋亡。GLP-1R 属于 G 蛋白偶联受体 B 家族(分泌素家族)中的胰高血糖素受体亚家族。在人和鼠的肾、脑、肺、胃及心脏等多种脏器细胞中都有广泛的表达。但在骨骼肌、肝脏及脂肪组织中未检测到其表达。研究发现, GLP-1R 激活后可以通过环磷酸腺苷(cAMP)及蛋白激酶 A (PKA) 途径激活 cAMP 反应原件结合蛋白(CREB)的转录因子,上调细胞内 cAMP 的含量<sup>[21]</sup>。Koehler 等<sup>[22]</sup>检测到小鼠结肠癌细胞(CT26)中表达 GLP-1R mRNA,验证了艾塞那肽可以通过作用于 GLP-1R 受体诱导结肠癌细胞的凋亡,并猜想其机制可能是 GLP-1R 激活后通过抑制细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)或者通过上调 cAMP 浓度,抑制糖原合酶 3(GSK3)的合成,诱导结肠癌细胞的凋亡。Ligumsky 等<sup>[10]</sup>研究发现乳腺癌细胞(MCF-7)细胞表达一种非典型的 GLP-1R 受体,艾塞那肽可以通过作用于该受体诱导 MCF-7 细胞的凋亡,并猜想艾塞那肽通过激活该受体上调 cAMP,活化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)而诱导 MCF-7 细胞的凋亡。目前国内外对于艾塞那肽诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究较少,值得进一步探讨。

综上所述,本研究结果表明目前临床上广泛使用的 GLP-1 类似物艾塞那肽能呈剂量依赖性诱导 LNcap 细胞的凋亡,提示有可能用于糖尿病合并前列腺癌患者的治疗。

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277-300

[2] 邢召全. 前列腺癌中 XAF1 表达及生长抑素对其表达调节的研究[D]. 济南:山东大学, 2011

[3] Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, et al. Diabetes and cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2009, 16(4):1103-1123

[4] Chandel A, Dhindsa S, Topiwalas, et al. Testosterone concentration in young patients with diabetes [J]. Diabetes Care, 2008, 31(10):2013-2017

[5] Grossmann M, Panagiotopoulos S, Sharpe K, et al. Low

- testosterone and anaemia in men with type 2 diabetes[J]. *Clin Endocrinol(Oxf)*, 2009, 70:547-553
- [6] Atchison EA, Gridley G, Carreon JD, et al. Risk of cancer in a large cohort of U.S. veterans with diabetes [J]. *Int J Cancer*, 2011, 128(3):635-643
- [7] Ahmad SR, Swann J. Exenatide and rare adverse events [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(18):1970-1972
- [8] Bjerre KL, Madsen LW, Andersen S, et al. Glucagon-like Peptide-1 receptor agonists activate rodent thyroid C-cells causing calcitonin release and C-cell proliferation [J]. *Endocrinology*, 2010, 151(4):1473-1486
- [9] Ligumsky H, Wolf I, Israeli S, et al. The peptide-hormone glucagon-like peptide-1 activates cAMP and inhibits growth of breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 132(2):449-461
- [10] Liu Z, Stanojevic V, Brindamour LJ, et al. GLP1-derived nonapeptide GLP1 (28-36)amide protects pancreatic beta-cells from glucolipototoxicity [J]. *J Endocrinol*, 2012, 213(2):143-154
- [11] Hui H, Farilla L, Merkel P, et al. The short half-life of glucagon-like peptide-1 in plasma does not reflect its long-lasting beneficial effects [J]. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146:863-869
- [12] Meloni AR, Deyoung MB, Lowe C, et al. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic beta-cells: mechanism and glucose dependence [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2013, 15(1):15-27
- [13] Vangoitsenhoven R, Mathieu C, Van der Schueren B. GLP1 and cancer: friend or foe? [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2012, 19(5):77-88
- [14] Reed JC, Haldar S, Croce CM, et al. Complementation by BCL-2 and C-HA-RAS oncogenes in malignant transformation of rat embryo fibroblasts [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(8):4370-4374
- [15] Reed JC. Double indetity for proteins of Bcl-2 family [J]. *Nature*, 1997, 387(6635):773-774
- [16] Jiang H, Xia D. Inhibition of Bcl-2 enhances the efficacy of epirubicin chemotherapy in PC-3 prostate cancer cells [J]. *National Med J of China*, 2011, 124(23):4018-4021
- [17] 李学松, 龚 侃, 孙国锋, 等. Bcl-2 和 Bax 在前列腺癌不同周期时相的表达 [J]. *中华外科杂志*, 2008, 46(10):768-771
- [18] Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death [J]. *Semin Cancer Biol*, 1993, 4(6):327-332
- [19] Barreuzeta LF, Oshima CT, Lima FO. The intrinsic apoptotic signaling pathway in gastric adenocarcinomas of Brazilian patients: immunexpression of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bak, Bax, Bad) determined by tissue microarray analysis [J]. *Mol Med Report*, 2010, 3(2):261-267
- [20] Marzo I, Naval J. Bcl-2 family members as molecular targets in cancer therapy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(8):939-946
- [21] Oeseburg H, de Boer RA, Buikema H, et al. Glucagon-like peptide 1 prevents reactive oxygen species-induced endothelial cell senescence through the activation of protein kinase A [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30:1407-1414
- [22] Koehler JA, Kain T, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor activation inhibits growth and augments apoptosis in murine CT26 colon cancer cells [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(9):3362-3372

[收稿日期] 2013-05-23