

论 著

(基础研究)

西格列汀调节 CCL2-CCR2 信号轴对前列腺癌细胞迁移、侵袭和免疫逃逸的影响

陈莉洁, 陈 晨

[摘要] **目的** 探讨西格列汀(Sit)调节 CC 趋化因子配体 2 (CCL2)-CC 趋化因子受体 2 (CCR2) 信号轴对前列腺癌细胞迁移、侵袭和免疫逃逸的影响。**方法** 将前列腺癌 PC3 细胞分为 CK 组、西格列汀低剂量(Sit-L)组、西格列汀高剂量(Sit-H)组、Sit-H+pcDNA-NC 组、Sit-H+pcDNA-CCL2 组。克隆形成实验检测细胞增殖; Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭; 流式细胞术检测细胞凋亡率; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞上清中趋化因子配体(CXCL-2、CXCL-8)水平; 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测细胞中 CCL2 mRNA、CCR2 mRNA 表达水平; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞增殖细胞核抗原(PCNA)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved caspase-3)、CCL2、CCR2 蛋白表达; 将上述各组细胞与 NK-92MI 细胞共培养, 细胞计数(CCK-8)法检测 NK-92MI 细胞免疫杀伤率; ELISA 检测共培养细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ -干扰素(IFN- γ)水平。**结果** 与 CK 组相比, Sit-L 组、Sit-H 组和 Sit-H+pcDNA-NC 组 PC3 细胞克隆形成率、细胞迁移和侵袭个数、CXCL-2、CXCL-8 水平、CCR2 mRNA 和 CCL2 mRNA 的表达水平、PCNA、MMP-9、CCL2、CCR2 蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率、cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$); 过表达 CCL2 可减弱 Sit 对 PC3 细胞的抑制作用($P < 0.05$); 与 CK-NK 组共培养组比较, Sit-L-NK 组、Sit-H-NK 组和 Sit-H+pcDNA-NC-NK 组共培养组 NK-92MI 细胞免疫杀伤率、细胞上清中 TNF- α 、IFN- γ 水平显著升高($P < 0.05$); 与 Sit-H+pcDNA-NC-NK 共培养组比较, Sit-H+pcDNA-CCL2-NK 共培养组 NK-92MI 细胞免疫杀伤率, 细胞上清中 TNF- α 、IFN- γ 水平显著降低($P < 0.05$)。**结论** Sit 通过抑制 CCL2-CCR2 信号轴可抑制前列腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和免疫逃逸, 并促进其凋亡。

[关键词] 西格列汀; CCL2-CCR2 信号轴; 前列腺癌; 迁移、侵袭; 免疫逃逸**[中图分类号]** R737.25**[文献标志码]** A**[文章编号]** 2097-2768(2025)01-0022-06**[DOI]** 10.16571/j.cnki.2097-2768.2025.01.004

Effects of sitagliptin on the migration, invasion, and immune escape of prostate cancer cells by regulating the CCL2-CCR2 signaling axis

CHEN Lijie, CHEN Chen

(The First Outpatient Department of the 960th Hospital of the Joint Logistics Support Force, PLA, Jinan 250000, Shandong, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of sitagliptin (Sit) on the migration, invasion and immune escape of prostate cancer cells by regulating the CC chemokine ligand 2 (CCL2) -CC chemokine receptor 2 (CCR2) signaling axis. **Methods** PC3 cells were divided into CK group, sitagliptin low dose (Sit-L) group, Sitagliptin high dose (Sit-H) group, Sit-H+pcDNA-NC group and Sit-H+pcDNA-CCL2 group. Cell proliferation was detected by clonal formation assay. Cell migration and invasion were detected by Transwell assay. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The chemokine ligands (CXCL-2, CXCL-8) in the supernatant

were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of CCL2 mRNA and CCR2 mRNA in cells. Western blot was used to detect the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), cysteine protease 3 (cleaved caspase-3), CCL2, and CCR2. The above groups of cells were co-cultured with NK-92MI

作者单位: 250000 济南, 解放军联勤保障部队第九六〇医院

第一派驻门诊部(陈莉洁, 陈 晨)

通信作者: 陈 晨, E-mail: 15253125599@139.com

cells, and CCK-8 method was used to detect the immune killing rate of NK-92MI cells. ELISA was applied to detect the levels of tumor bad factor- α (TNF- α) and γ -interferon (IFN- γ) in the supernatant of co-cultured cells. **Results** Compared with CK group, PC3 cell clonal formation rate, number of cell migration and invasion, CXCL-2, CXCL-8 levels, CCR2 mRNA and CCL2 in Sit-L, Sit-H and Sit-H+pcDNA-NC groups mRNA expression levels, protein expression levels of PCNA, MMP-9, CCL2, and CCR2 were significantly decreased ($P<0.05$), and apoptosis rate and cleaved caspase-3 protein expression levels were significantly increased ($P<0.05$). Overexpression of CCL2 could weaken the inhibitory effect of Sit on PC3 cells ($P<0.05$). Compared with the CK-NK group, the immune killing rate of NK-92MI cells and the levels of TNF- α and IFN- γ in the cell supernatant of the Sit-L-NK group, SIT-H-NK group and Sit-H+pcDNA-NC-NK group were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the Sit-H+pcDNA-NC-NK co-culture group, the immune killing rate of NK-92MI cells and the levels of TNF- α and IFN- γ in the cell supernatant of the Sit-H+pcDNA-CCL2-NK co-culture group were significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Sit can inhibit the proliferation, migration, invasion and immune escape of prostate cancer cells and promote their apoptosis by inhibiting the CCL2-CCR2 signal axis.

[Key words] sitagliptin; CCL2-CCR2 signal axis; prostate cancer; migration and invasion; immune escape

0 引言

前列腺癌是一种男性常见的泌尿系统恶性肿瘤^[1]。据统计,全世界每年新增前列腺癌患者达到160万人,而死亡人数约36万人,严重威胁男性患者生命健康^[2]。目前,增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)为增殖促进蛋白,基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)为迁移促进蛋白,在前列腺癌细胞中高表达,可促进癌细胞增殖、转移和侵袭,导致治疗困难,死亡率较高^[3]。因此,阻断前列腺癌细胞迁移和侵袭是治疗前列腺癌的关键。西格列汀(Sitagliptin, Sit)是一种治疗糖尿病的药物,有研究表明其具有抑制癌细胞迁移和侵袭的作用^[4]。有研究表明 Sit 可抑制结直肠癌细胞迁移和侵袭^[5]。Shah 等^[6]研究表明 Sit 可提高伴有糖尿病的前列腺癌患者的生存率。Sit 可抑制癌症的发展,但其具体作用机制尚不明确。研究显示, CCL2-CCR2 轴参与肿瘤细胞的转移和侵袭过程。Chen 等^[7]研究过表达 CCL2 可促进鼻咽癌 TWO1 和 TEO4 细胞增殖、迁移侵袭,抑制 CCL2 的表达可降低鼻咽癌 TWO1 和 TEO4 细胞的恶性生物学行为。Natsagdorj 等^[8]研究表明抑制 CCL2-CCR2 轴可降低前列腺癌细胞迁移并降低其化疗耐药性。推测 CCL2-CCR2 轴参与癌细胞的恶性生物学过程。因此本研究探讨 Sit 是否可通过调节 CCL2-CCR2 轴来影响前列腺癌细胞迁移、侵袭和免疫逃逸。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 前列腺癌 PC3 细胞和 NK-92MI 细胞购自于上海博尔森生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂 Sit 购自美国 TSZ CHEM 公司; DMEM 培养基和 α -MEM 培养基、Transwell 小室、

凋亡检测试剂盒购自南京世洲生物科技有限公司; 趋化因子配体(chemokine ligand 2, CXCL-2)、趋化因子配体(chemokine ligand 8, CXCL-8)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)酶联免疫吸附法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自北京博雷德生物科技有限公司; 细胞计数(cell counting Kit-8, CCK-8)试剂盒、胰蛋白酶购自上海冠导生物工程有限公司; 增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、MMP-9、半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved caspase-3)、CC 趋化因子配体 2 (CC chemokine ligand 2, CCL2)、趋化因子受体 2 (CC chemokine receptor 2, CCR2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗及二抗均购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 培养条件: PC3 细胞用 DMEM 培养基培养, NK-92MI 细胞用 α -MEM 培养基培养。将对数期前列腺癌 PC3 细胞分为 CK 组、西格列汀低剂量(Sit-L)组、西格列汀高剂量(Sit-H)组、Sit-H+pcDNA-NC 组、Sit-H+pcDNA-CCL2 组。Sit-L 组和 Sit-H 组 PC3 细胞分别用 0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 的 Sit 干预^[4], Sit-H+pcDNA-NC 组转染 pcDNA-NC, Sit-H+pcDNA-CCL2 组转染 pcDNA-CCL2, 之后后用 1 mmol/L 的 Sit 干预, 培养 24 h。

1.2.2 克隆形成实验检测细胞增殖 将各组 PC3 细胞以 5×10^2 个/孔接种于 6 孔板培养 14 d, 固定后用结晶紫染色, 拍照。克隆形成率公式如下:

$$\text{克隆形成率}(\%) = (\text{克隆数} / \text{接种细胞数}) \times 100\%$$

1.2.3 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭 将 200 μ L PC3 细胞悬液(5×10^5 个/mL)加入 Transwell 上室,

下室加入 600 μ L 含血清的 RPMI 1640 培养基, 48 h 后, 多聚甲醛固定, 染色, 显微镜观察迁移细胞。细胞侵袭: 用 Matrigel 胶包被 Transwell 上室, 其余步骤同上。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 离心收集各组 PC3 细胞并重悬, 加入 Annexin V-FITC 溶液与 PI 试剂染色, 黑暗孵育 15 min, 上机检测细胞凋亡。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清中 CXCL-2、CXCL-8 水平 离心各组 PC3 细胞并收集上清液, 根据 ELISA 说明书依次加入反应试剂和显色试剂, 测定吸光值, 根据标线计算相应指标。

1.2.6 qRT-PCR 检测 CCL2 mRNA、CCR2 mRNA 水平 提取细胞总 RNA 并进行逆转录, 对 cDNA 进行荧光定量 PCR 扩增。引物: CCL2 mRNA: 正向 5'-GTCTGTGCTGACCCCAAGAA-3'; 反向: 5'-AAGGCA TCACAGTCCGAGTC-3'; CCR2 mRNA: 正向: 5'-GCT GTGTTTGCCTCTCTACCAG-3'; 反向: 5'-CAAGTAG AGGCAGGATCAGGCT-3'; GAPDH: 正向: 5'-CT-GGGCTACACTGAGCACC-3'; 反向: 5'-AATGGTC-GTTGAGGGCAATG-3'。以 GAPDH 为内参, 计算 CCR2 mRNA 和 CCL2 mRNA 的表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法)。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达 提取各组 PC3 细胞总蛋白并定量, 蛋白热变性后电泳, 转至 PVDF 膜上, 封闭 2 h, 加入 PCNA、MMP-9、cleaved caspase-3、CCL2、CCR2、GAPDH 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 洗膜, 二抗孵育 2 h, ECL 显色, Image-Pro Plus 软件分析蛋白灰度值。

1.2.8 CCK-8 法检测 NK-92MI 细胞免疫杀伤率 以 NK-92MI 细胞为效应细胞, PC3 细胞为靶细胞进行免疫杀伤率检测, 将 NK 细胞与将上述各组已调整细胞浓度 (1×10^4 个/mL) PC3 细胞以 1:5 比例加入 96 孔板共培养, 共培养细胞分为 CK-NK 组、Sit-L-NK 组、Sit-H-NK 组、Sit-H+pcDNA-NC-NK 组、Sit-H+pcDNA-CCL2-NK 组, 培养 3 d 后于各孔加入 CCK-8

试剂, 孵育 2 h, 酶标仪检测 450 nm 处光密度值, 免疫杀伤率公式如下:

$$\text{免疫杀伤率}(\%) = (\text{效应细胞 } A \text{ 值} + \text{PC3 细胞时 } A \text{ 值} - \text{共培养 } A \text{ 值}) / (\text{效应细胞 } A \text{ 值}) \times 100\%$$

1.2.9 ELISA 检测细胞上清中 TNF- α 、IFN- γ 水平 如 1.2.8 中所述共培养 NK-92MI 细胞和 PC3 细胞, 3 d 后收集上清液, 根据 ELISA 说明书检测 TNF- α 、IFN- γ 水平。

1.3 统计学分析 采用 Graphpad Prism 8.0.1 分析数据, 定量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 组内两两比较用 SNK- q 检验; 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Sit 对各组 PC3 细胞克隆形成能力的影响 Sit-L 组、Sit-H 组和 Sit-H+pcDNA-NC 组 PC3 细胞克隆形成率 [(65.82 \pm 6.93)%、(41.37 \pm 4.26)%、(43.58 \pm 5.72)%] 比 CK 组 [(78.43 \pm 8.64)%] 低 ($P=0.000$); Sit-H+pcDNA-CCL2 组 PC3 细胞克隆形成率 [(68.76 \pm 8.47)%] 比 Sit-H+pcDNA-NC 组 [(43.58 \pm 5.72)%] 高 ($P=0.000$), 提示 Sit 可抑制 PC3 细胞克隆。

2.2 Sit 对各组 PC3 细胞迁移和侵袭能力的影响 Sit-L 组、Sit-H 组和 Sit-H+pcDNA-NC 组 PC3 细胞迁移和侵袭个数比 CK 组低 ($P=0.000$); Sit-H+pcDNA-CCL2 组 PC3 细胞迁移和侵袭个数比 Sit-H+pcDNA-NC 组高 ($P=0.000$), 提示 Sit 可抑制 PC3 细胞迁移和侵袭。见图 1, 表 1。

2.3 Sit 对各组 PC3 细胞凋亡的影响 Sit-L 组、Sit-H 组和 Sit-H+pcDNA-NC 组 PC3 细胞凋亡率比 CK 组高 ($P=0.000$); Sit-H+pcDNA-CCL2 组 PC3 细胞凋亡率比 Sit-H+pcDNA-NC 组低 ($P=0.000$), 提示 Sit 可促进 PC3 细胞凋亡。见图 2。

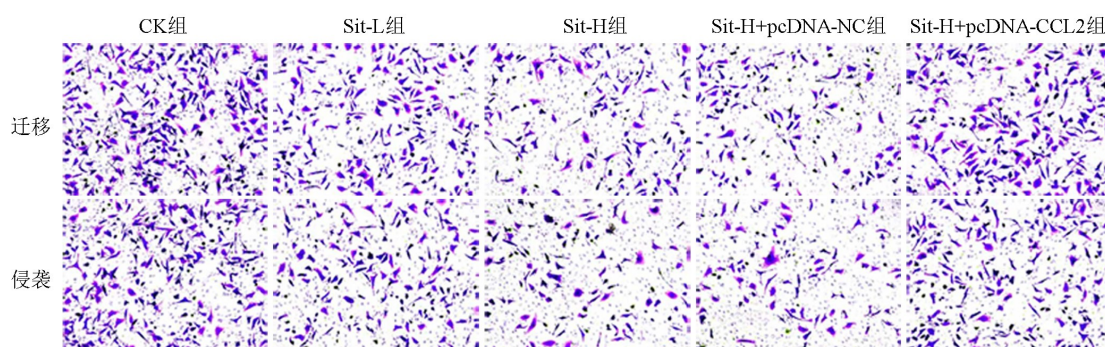


图 1 细胞迁移和侵袭结果图 ($\times 100$)

Figure 1 Cell migration and invasion results ($\times 100$)

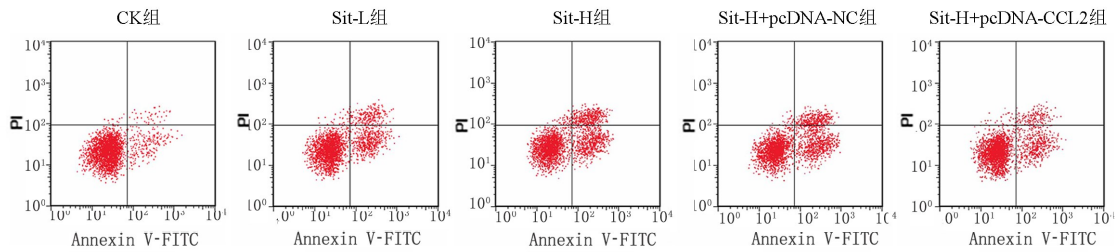


图 2 各组 PC3 细胞细胞凋亡图
Figure 2 Apoptosis of PC3 cells in each group

表 1 Sit 对 各 组 PC3 细 胞 迁 移 和 侵 袭 能 力 的 影 响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 1 Effects of Sit on migration and invasion ability of PC3 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	迁移个数(个)	侵袭个数(个)	凋亡率(%)
CK 组	183.58±19.47	153.24±16.83	4.71±0.68
Sit-L 组	137.42±15.28*	114.68±13.54*	21.36±2.76*
Sit-H 组	76.31±7.84**	63.52±7.43**	37.42±4.25**
Sit-H+pcDNA-NC 组	74.65±6.92**	61.75±7.26**	35.84±3.97**
Sit-H+pcDNA-CCL2 组	146.26±12.67 ^Δ	127.26±11.38 ^Δ	19.58±2.43 ^Δ
F 值	75.936	69.283	112.740
P 值	0.000	0.000	0.000

与 CK 组比较, * $P<0.05$; 与 Sit-L 组比较, # $P<0.05$; 与 Sit-H+pcDNA-NC 组比较, $\Delta P<0.05$

2.4 Sit 对 各 组 PC3 细 胞 上 清 液 中 CXCL-2、CXCL-8 水 平 的 影 响 Sit-L 组、Sit-H 组 和 Sit-H+pcDNA-NC 组 PC3 细 胞 CXCL-2、CXCL-8 水 平 低 于 CK 组 ($P=0.000$) ; Sit-H+pcDNA-CCL2 组 PC3 细 胞 CXCL-2、CXCL-8 水 平 比 Sit-H+pcDNA-NC 组 高 ($P=0.000$) , 提 示 Sit 可 抑 制 CXCL-2、CXCL-8 水 平 。 见 表 2 。

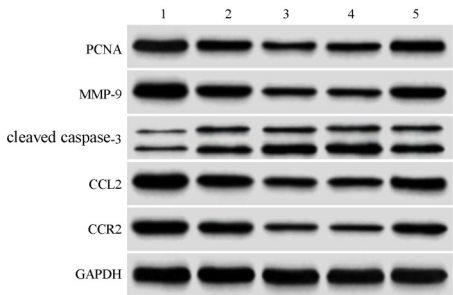
表 2 Sit 对 各 组 PC3 细 胞 上 清 液 中 CXCL-2、CXCL-8 水 平 的 影 响 ($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n=6$)

组别	CXCL-2	CXCL-8	CCL2 mRNA	CCR2 mRNA
CK 组	164.23±9.56	112.64±7.85	1.01±0.03	1.03±0.04
Sit-L 组	122.57±8.38*	87.43±6.63*	0.68±0.05*	0.76±0.06*
Sit-H 组	71.82±5.63**	52.74±4.16**	0.37±0.03**	0.42±0.03**
Sit-H+pcDNA-NC 组	68.65±4.97**	51.36±3.48**	0.39±0.04**	0.43±0.04**
Sit-H+pcDNA-CCL2 组	116.49±7.52 ^Δ	91.82±7.25 ^Δ	0.67±0.05 ^Δ	0.79±0.07 ^Δ
F 值	165.513	112.782	244.214	161.262
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

与 CK 组比较, * $P<0.05$; 与 Sit-L 组比较, # $P<0.05$; 与 Sit-H+pcDNA-NC 组比较, $\Delta P<0.05$

2.5 Sit 对 各 组 PC3 细 胞 CCR2 mRNA 和 CCL2 mRNA 的 表 达 水 平 的 影 响 Sit-L 组、Sit-H 组 和 Sit-H+pcDNA-NC 组 PC3 细 胞 CCR2 mRNA 和 CCL2 mRNA 的 表 达 水 平 比 CK 组 低 ($P=0.000$) ; Sit-H+pcDNA-CCL2 组 PC3 细 胞 CCR2 mRNA 和 CCL2 mRNA 的 表 达 水 平 高 于 Sit-H+pcDNA-NC 组 ($P=0.000$) , 提 示 Sit 可 抑 制 基 因 CCR2 和 CCL2 表 达 。

2.6 Sit 对 各 组 PC3 细 胞 PCNA、MMP-9、cleaved caspase-3、CCL2、CCR2 蛋 白 表 达 的 影 响 Sit-L 组、Sit-H 组 和 Sit-H+pcDNA-NC 组 PC3 细 胞 PCNA、MMP-9、CCL2、CCR2 蛋 白 表 达 水 平 低 于 CK 组 , cleaved caspase-3 蛋 白 表 达 高 于 CK 组 ($P=0.000$) ; Sit-H+pcDNA-CCL2 组 相 较 于 Sit-H+pcDNA-NC 组 PC3 细 胞 PCNA、MMP-9、CCL2、CCR2 蛋 白 表 达 水 平 升 高 , cleaved caspase-3 蛋 白 表 达 降 低 ($P=0.000$) , 提 示 Sit 可 抑 制 PCNA、MMP-9、CCL2、CCR2 蛋 白 表 达 , 促 进 cleaved caspase-3 蛋 白 表 达 。 见 图 3 , 表 3 。



1: CK 组; 2: Sit-L 组; 3: Sit-H 组; 4: Sit-H+pcDNA-NC 组; 5: Sit-H+pcDNA-CCL2 组

图 3 各 组 PC3 细 胞 PCNA、MMP-9、cleaved caspase-3、CCL2、CCR2 蛋 白 表 达

Figure 3 Expression of PCNA, MMP-9, cleaved caspase-3, CCL2, and CCR2 in PC3 cells of each group

表 3 Sit 对 各 组 PC3 细 胞 PCNA、MMP-9、cleaved caspase-3、CCL2、CCR2 蛋 白 表 达 的 影 响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effects of Sit on protein expression of PCNA, MMP-9, cleaved caspase-3, CCL2, and CCR2 in PC3 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	PCNA	MMP-9	cleaved caspase-3	CCL2	CCR2
CK 组	0.86±0.13	1.02±0.13	0.21±0.04	1.08±0.15	0.93±0.14
Sit-L 组	0.59±0.08*	0.71±0.10*	0.45±0.07*	0.74±0.11*	0.65±0.10*
Sit-H 组	0.34±0.05**	0.39±0.06**	0.76±0.11**	0.41±0.06**	0.36±0.05**
Sit-H+pcDNA-NC 组	0.35±0.06**	0.37±0.05**	0.78±0.12*	0.43±0.07**	0.37±0.05**
Sit-H+pcDNA-CCL2 组	0.61±0.09 ^Δ	0.75±0.11 ^Δ	0.47±0.06 ^Δ	0.76±0.12 ^Δ	0.68±0.10 ^Δ
F 值	37.080	49.304	46.664	39.824	38.388
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与 CK 组比较, * $P<0.05$; 与 Sit-L 组比较, # $P<0.05$; 与 Sit-H+pcDNA-NC 组比较, $\Delta P<0.05$

2.7 Sit 对 各 组 NK-92MI 细 胞 免 疫 杀 伤 率 的 影 响 Sit-L-NK 组、Sit-H-NK 组 和 Sit-H+pcDNA-NC-NK 组 NK-92MI 细胞免疫杀伤率 $[(23.42\pm 2.18)\%、(36.57\pm 3.24)\%(34.94\pm 3.46)\%]$ 较 CK-NK 组 $[(11.86\pm 1.39)\%]$ 高($P=0.000$); Sit-H+pcDNA-CCL2-NK 组 NK-92MI 细胞免疫杀伤率 $[(21.63\pm 1.85)\%]$ 较 Sit-H+pcDNA-NC-NK 组 $[(34.94\pm 3.46)\%]$ 低($P=0.000$), 提示 Sit 可增强 NK-92MI 细胞的免疫杀伤率。

2.8 Sit 对 各 组 共 培 养 细 胞 上 清 中 TNF- α 、IFN- γ 水 平 的 影 响 Sit-L-NK 组、Sit-H-NK 组 和 Sit-H+pcDNA-NC-NK 组共培养细胞上清中 TNF- α 、IFN- γ 水平高于 CK-NK 组($P=0.000$); Sit-H+pcDNA-CCL2-NK 组共培养细胞上清中 TNF- α 、IFN- γ 水平比 Sit-H+pcDNA-NC-NK 组低($P=0.000$), 提示 Sit 可促进 TNF- α 、IFN- γ 水平。见表 4。

表 4 Sit 对 各 组 共 培 养 细 胞 上 清 中 TNF- α 、IFN- γ 水 平 的 影 响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effects of Sit on the levels of TNF- α and IFN- γ in the supernatant of co-cultured cells in each group($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IFN- γ (g/mL)
CK-NK 组	56.73 \pm 4.29	1.48 \pm 0.12
Sit-L-NK 组	81.56 \pm 6.87*	2.26 \pm 0.17*
Sit-H-NK 组	108.43 \pm 8.36*#	2.82 \pm 0.24*#
Sit-H+pcDNA-NC-NK 组	105.82 \pm 9.74*#	2.75 \pm 0.21*#
Sit-H+pcDNA-CCL2-NK 组	78.68 \pm 6.53 Δ	2.14 \pm 0.19 Δ
F 值	50.156	48.537
P 值	0.000	0.000

与 CK-NK 组比较, * $P<0.05$; 与 Sit-L-NK 组比较, # $P<0.05$; 与 Sit-H+pcDNA-NC-NK 组比较, $\Delta P<0.05$

3 讨 论

前列腺癌是一种多发于中老年男性的癌症^[9]。前列腺癌早期患者通过手术和抗雄性激素治疗一般都有较好的治疗效果, 大部分还可治愈^[10]。但前列腺癌早期无明显症状, 不易发觉, 发现时已进入中晚期, 肿瘤细胞已发生转移, 抗雄性激素治疗效果不佳, 逐渐发展为去势抵抗性前列腺癌, 难以治愈^[11]。癌细胞迁移是前列腺癌患者死亡的主要因素^[12], 因此寻找新的药物用于阻断癌细胞转移是目前医学工作者的研究方向。Sit 是一种二肽基酶 4 抑制剂, 临床降糖常用药物, 近年研究显示, 其具有抗肿瘤的药效^[13]。Shih 等^[14]研究表明 Sit 可抑制结直肠癌细胞肿瘤生长。Abd 等^[15]研究表明 Sit 可抑制裸鼠肝癌肿瘤细胞增殖、迁移和血管形成, 并促进其凋亡。推测 Sit 可抑制肿瘤细胞生物学活性。

前列腺癌晚期肿瘤细胞高迁移和侵袭活性是导致患者死亡率较高的主要原因。PCNA 是一种增殖细胞核抗原, 可启动细胞增殖, 促进细胞增殖活性; MMP-9 蛋白是基质金属蛋白酶, 可降解和破坏基底膜促进肿瘤细胞向基底膜位置浸润和侵袭, 可促进肿瘤细胞迁移; cleaved caspase-3 蛋白是一种细胞凋亡蛋白, 被激活后可启动细胞凋亡程序, 促进细胞凋亡蛋白表达, 加速细胞凋亡^[17]。本研究结果显示, CK 组 PC3 细胞 PCNA 和 MMP-9 蛋白高表达, cleaved caspase-3 蛋白低表达, Sit 干预后可显著抑制 PCNA 和 MMP-9 蛋白表达, 提高 cleaved caspase-3 蛋白表达。进一步通过细胞增殖、迁移和侵袭、细胞凋亡实验证实 Sit 可抑制 PC3 细胞增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡, 证实上述结果。CXCL-2 和 CXCL-8 属于趋化因子, 高表达时可促进肿瘤细胞生长发育, 还可导致免疫细胞无法识别肿瘤细胞发挥其抗肿瘤免疫应答^[17]。本研究结果显示, Sit 可降低细胞上清中 CXCL-2 和 CXCL-8 表达, 进而提高免疫细胞对 PC3 细胞的杀伤力。TNF- α 、IFN- γ 是细胞免疫分子, 可衡量细胞免疫逃逸能力, 肿瘤细胞可抑制 T 细胞分泌 TNF- α 、IFN- γ , 进而使肿瘤细胞逃避免疫细胞监察, 促进其转移^[18]。本研究结果显示, CK-NK 组共培养细胞上清中 TNF- α 、IFN- γ 水平较低, Sit-L-NK 和 Sit-H-NK 共培养组细胞上清中 TNF- α 、IFN- γ 水平显著升高, 促进免疫细胞对 PC3 细胞的杀伤能力。进一步将各组细胞与 NK-92MI 细胞共培养发现, Sit-L-NK 组、Sit-H-NK 组 NK-92MI 细胞免疫杀伤率显著升高, 提示 Sit 可抑制 PC3 细胞免疫逃逸。

研究表明, 在免疫系统中 CCL2 是一种重要的调节因子, 与 CCR2 结合后发挥生物学作用, CCL2-CCR2 信号轴被激活后可抑制免疫细胞活性, 促进肿瘤细胞免疫逃逸和肿瘤细胞转移和侵袭, 加快肿瘤的发生发展^[19]。王芳等^[19]研究表明激活 CCL2-CCR2 信号轴可促进胃癌细胞增殖、迁移、侵袭、免疫逃逸和上皮间质转化。Yang 等^[20]研究表明阻断 CCL2-CCR2 信号轴可降低食管癌细胞肿瘤发生率和细胞免疫逃逸, 增强 T 细胞的抗肿瘤作用。本研究结果显示, CK 组 PC3 细胞 CCL2、CCR2 蛋白高表达, CCL2-CCR2 信号轴被抑制, Sit 干预后可显著提高 CCL2、CCR2 蛋白表达, 激活 CCL2-CCR2 信号轴, 前列腺癌 PC3 细胞生物学活性被抑制。为进一步验证 Sit 的作用靶点与 CCL2-CCR2 信号轴的关系, 本研究在 Sit 干预基础上上调 CCL2 表达, 结果显示, 过表达 CCL2 可减弱 Sit 对 PC3 细胞恶性生物学行为的抑制作用。综合以上结果得出结论, Sit 通过可能通过

阻断 CCL2-CCR2 信号轴来抑制前列腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和免疫逃逸,并促进其凋亡。

综上所述,Sit 抑制前列腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和免疫逃逸并促进其凋亡,可能是通过阻断 CCL2-CCR2 信号轴实现的。

【参考文献】

- [1] 杨 君,江波涛,孔东波,等. circ-MAT2B 调节前列腺癌细胞 DU145 生物学行为的分子机制[J]. 医学研究生学报, 2022, 35(8):833-840.
- [2] Pernigoni N, Guo C, Gallagher L, *et al.* The potential role of the microbiota in prostate cancer pathogenesis and treatment [J]. *Nat Rev Urol*, 2023, 20(12):706-718.
- [3] Pranav, Laskar P, Jaggi M, *et al.* Biomolecule-functionalized nano-formulations for prostate cancer theranostics [J]. *J Adv Res*, 2023, 51(2):197-217.
- [4] 陆 攀,孟 欣,王 彪,等. 西格列汀抑制膀胱癌细胞增殖和诱导细胞凋亡[J]. 解剖科学进展, 2020, 26(1):44-46, 50.
- [5] Varela-Calviño R, Rodríguez-Quiroga M, Dias Carvalho P, *et al.* The mechanism of sitagliptin inhibition of colorectal cancer cell lines' metastatic functionalities [J]. *IUBMB Life*, 2021, 73(5): 761-773.
- [6] Shah C, Hong YR, Bishnoi R, *et al.* Impact of DPP4 Inhibitors in Survival of Patients With Prostate, Pancreas, and Breast Cancer [J]. *Front Oncol*, 2020, 10(3):405-416.
- [7] Chen CH, Su LJ, Tsai HT, *et al.* ELF-1 expression in nasopharyngeal carcinoma facilitates proliferation and metastasis of cancer cells via modulation of CCL2/CCR2 signaling [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11(4):5243-5254.
- [8] Natsagdorj A, Izumi K, Hiratsuka K, *et al.* The CCL2-CCR2 Axis Contributes to Migration of Cabazitaxel-resistant Prostate Cancer Cells [J]. *Anticancer Res*, 2023, 43(6):2561-2569.
- [9] Saeidi H, Ismail P, Samudi Raju C, *et al.* Genetic alterations in prostate cancer as diagnostic and prognostic markers [J]. *Malays J Pathol*, 2023, 45(2):149-155.
- [10] 戚一航,汤井源,陈 爽,等. 前列腺癌根治术后切缘阳性风险因素分析[J]. 医学研究与战创伤救治, 2023, 36(9):949-953.
- [11] Hayden C, Rahman S, Lokeshwar S, *et al.* Management of Pathologic Node-Positive Prostate Cancer following Radical Prostatectomy [J]. *Curr Oncol Rep*, 2023, 25(7):729-734.
- [12] Okubo Y, Sato S, Terao H, *et al.* Review of the Developing Landscape of Prostate Biopsy and Its Roles in Prostate Cancer Diagnosis and Treatment [J]. *Arch Esp Urol*, 2023, 76(9):633-642.
- [13] Li R, Zeng X, Yang M, *et al.* Antidiabetic Agent DPP-4i Facilitates Murine Breast Cancer Metastasis by Oncogenic ROS-NRF2-HO-1 Axis via a Positive NRF2-HO-1 Feedback Loop [J]. *Front Oncol*, 2021, 11(3):679816-679827.
- [14] Shih JW, Wu ATH, Mokgautsi N, *et al.* Preclinical Repurposing of Sitagliptin as a Drug Candidate for Colorectal Cancer by Targeting CD24/CTNNB1/SOX4-Centered Signaling Hub [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(1):609-621.
- [15] Abd El-Fattah EE, Saber S, Youssef ME, *et al.* AKT-AMPK α -mTOR-dependent HIF-1 α Activation is a New Therapeutic Target for Cancer Treatment: A Novel Approach to Repositioning the Antidiabetic Drug Sitagliptin for the Management of Hepatocellular Carcinoma [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12(2):720173-720185.
- [16] Xue W, Sun R, Hao Z, *et al.* Tetrandrine inhibits migration and invasion of BGC-823 and MKN-45 cells by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2023, 101(4):927-936.
- [17] 王 芳,胡洁琼,冯彦虎,等. 次乌头碱通过 cGAS/STING 通路调节胃癌细胞增殖、迁移、侵袭和免疫逃逸 [J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(10):2178-2183.
- [18] Luu M, Riester Z, Baldrich A, *et al.* Microbial short-chain fatty acids modulate CD8⁺ T cell responses and improve adoptive immunotherapy for cancer [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):4077-4089.
- [19] 王 芳,胡洁琼,冯彦虎,等. 乌司他丁调节 CCL2-CCR2 信号轴对胃癌细胞上皮间质转化和免疫逃逸的影响分析 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 17(1):1672-1687.
- [20] Yang H, Zhang Q, Xu M, *et al.* CCL2-CCR2 axis recruits tumor associated macrophages to induce immune evasion through PD-1 signaling in esophageal carcinogenesis [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):41-52.

(收稿日期:2024-04-02; 修回日期:2024-06-18)

(责任编辑:缪 琴; 英文编辑:邵荣青)