

## • 论著-实验研究 •

氯喹抑制高糖环境下前列腺癌 PC3 细胞  
增殖机制研究\*江绍钦<sup>1</sup> 李梦强<sup>1</sup> 陈珍霖<sup>1</sup> 许恩赐<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究氯喹是否能通过自噬和活性氧(ROS)通路抑制高糖诱导的前列腺癌 PC3 细胞的增殖。方法:PC3 细胞培养后分为 4 组(正常糖组、高糖组、正常糖+氯喹组、高糖+氯喹组)予相应干预。运用 CCK-8 实验检测细胞的增殖能力;Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 的表达;DCFH-DA 活性氧荧光探针检测细胞中 ROS 水平;JC-1 法检测细胞线粒体膜电位的去极化。结果:CCK-8 实验结果表明氯喹能够显著抑制高糖环境下 PC3 细胞的增殖。Western blot 实验结果显示氯喹会使 PC3 细胞 LC3-II/I 比值升高,说明细胞自噬显著被抑制。DCFH-DA 探针检测结果表明,氯喹能够显著上调高糖环境下 PC3 细胞中 ROS 水平。JC-1 检测结果表明,氯喹能够诱导高糖环境下 PC3 细胞中线粒体膜电位去极化。结论:氯喹通过自噬和 ROS 通路抑制高糖环境下前列腺癌细胞的增殖。

**[关键词]** 前列腺癌;氯喹;自噬;ROS;高糖

**DOI:**10.13201/j.issn.1001-1420.2021.01.010

**[中图分类号]** R737.25 **[文献标志码]** A

**Inhibition of chloroquine on the proliferation of prostate cancer cell line  
PC3 in high glucose condition**

JIANG Shaoqin LI Mengqiang CHEN Zhenlin XU Enci

(Department of Urology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, 350001, China)

Corresponding author: XU Enci, E-mail: xuenci0531@163.com

**Abstract Objective:** To investigate whether chloroquine can inhibit the proliferation of prostate cancer cell line PC3 in high glucose condition via autophagy and reactive oxygen species (ROS) pathways. **Methods:** PC3 cells were divided into four groups: normal glucose group, high glucose group, normal glucose+chloroquine group and high glucose+chloroquine group. CCK-8 assay was applied to assess the effect of proliferation. The protein expression of LC3 related to autophagy was detected with Western blot. ROS levels were detected using DCFH-DA staining in PC3 cells. JC-1 staining was performed to investigate the depolarization of mitochondrial membrane in PC3 cells. **Results:** CCK-8 assay showed that the proliferation of PC3 cells were significantly inhibited by chloroquine in high glucose condition. Western blot assay indicated that the LC3-II/I expression of PC3 cells were elevated by chloroquine in high glucose condition, which illustrated that chloroquine inhibited the autophagy of PC3 cells. DCFH-DA staining assay showed that the ROS levels in PC3 cells were up-regulated by chloroquine in high glucose condition. Furthermore, results of JC-1 assay demonstrated that chloroquine induced the depolarization of mitochondrial membrane of PC3 cells in high glucose condition. **Conclusion:** Chloroquine can inhibit the proliferation of prostate cancer cell line PC3 in high glucose condition via autophagy and ROS pathways.

**Key words** prostate carcinoma; chloroquine; autophagy; reactive oxygen species; hyperglycemia

前列腺癌是西方国家男性比较常见的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。在中国随着经济水平改善,生活方式改变、人口老龄化不仅导致前列腺癌的发生率升高,而且合并糖尿病的患癌人群也是逐年上升<sup>[2]</sup>。有研究报道,高血糖可促进前列腺癌进展,但目前针

对合并糖尿病的前列腺癌患者的治疗指导仍较少<sup>[3]</sup>。有研究表明高血糖会导致细胞内有毒害作用的 ROS 升高,而自噬可能通过清除细胞内 ROS 增强肿瘤细胞耐受性<sup>[4]</sup>。氯喹作为传统抗疟疾药物,目前研究发现其具有抗肿瘤活性,作用机制可能通过影响溶酶体功能,抑制细胞自噬影响肿瘤细胞增殖<sup>[5]</sup>。上述研究结果表明氯喹可能作为合并糖尿病的前列腺癌患者的理论治疗药物,但相关研究尚无报道。本文旨在探究氯喹是否通过自噬和 ROS 通路,抑制高糖环境下前列腺癌细胞的增殖,以期为

\*基金项目:福建省科技创新联合基金项目(No:2017Y9023);福建省自然科学基金项目(No:2017J01203);福建医科大学启航基金(No:2016QH032, No:2018QH1044)

<sup>1</sup>福建医科大学附属协和医院泌尿外科(福州,350001)

通信作者:许恩赐, E-mail: xuenci0531@163.com

合并糖尿病前列腺癌的治疗提供新思路、新方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

人前列腺癌细胞系 PC3 细胞、鼠抗人 Tubulin 抗体、辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔二抗、兔抗鼠二抗购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;氯喹、二甲基亚砜、D-(+)-葡萄糖、兔抗人 LC3 抗体购自美国 Sigma 公司;RPMI-1640 培养基、无糖型 RPMI-1640 培养基购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;10%胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素双抗购自美国 Hyclone 公司。CCK-8 细胞增殖试剂盒购自美国 Genview 公司;DCFH-DA 荧光探针试剂盒、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 细胞培养

前列腺癌 PC3 细胞培养于含 10%胎牛血清和双抗的 RPMI-1640 培养基中,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱静置培养。根据细胞生长状况,每 2 d 更换培养液,待细胞汇合度达 80%时进行胰蛋白酶消化传代。利用无糖型 RPMI-1640 培养基和 D-(+)-葡萄糖配制 5 mmol/L 正常浓度葡萄糖培养基和 30 mmol/L 高浓度葡萄糖培养基。氯喹药物浓度配制为 40 μmol/L。研究共分为 4 组:正常糖组、高糖组、正常糖+氯喹组、高糖+氯喹组。

### 1.3 CCK-8 法检测细胞增殖

收集对数生长期、状态良好的 PC3 细胞,接种于 96 孔板,每孔 5000 个细胞,置于培养箱培养。培养 24 h 后弃去原培养液,实验分别加入正常糖组、高糖组、正常糖+氯喹组、高糖+氯喹组培养基,100 μL/孔,以上每组各设 3 个复孔。分别培养 72 h,每日更新培养基。按照试剂盒说明书要求每孔加 CCK-8 试剂 10 μL,于培养箱中继续孵育 1 h 后终止培养,在酶联免疫检测仪上用 450 nm 波长检测各孔的光密度 OD 值。

### 1.4 Western blot

将 PC3 细胞种植到 6 孔板中,待过夜培养贴壁后,分别用正常糖组、高糖组、正常糖+氯喹组、高糖+氯喹组培养基处理 72 h 后,冰上裂解细胞提取细胞蛋白,BCA 蛋白测定,变性后蛋白经 SDS-PAGE 电泳、免疫印迹转膜后用含 5%脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h,LC3 一抗(1:1000 稀释)4℃孵育过夜,二抗(1:5000 稀释)室温孵育 2 h,TBST 漂洗 3 次后,化学发光法显影,Image J 软件分析条带灰度值。

### 1.5 DCFH-DA 活性氧荧光探针检测细胞内 ROS 水平

将 PC3 细胞种植在 24 孔板中,待过夜培养贴壁后,分别用正常糖组、高糖组、正常糖+氯喹组、高糖+氯喹组培养基处理 72 h。使用 DCFH-DA

探针用培养基液稀释至 10 μmol/L,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱静置 20 min,随后用 RPMI-1640 培养基洗涤细胞 3 次,在荧光显微镜下拍照,Image J 软件测算平均荧光密度,实验重复 3 次。

### 1.6 JC-1 法检测细胞线粒体膜电位

将 PC3 细胞种植到 6 孔板中,待过夜培养贴壁后,分别用正常糖组、高糖组、正常糖+氯喹组、高糖+氯喹组培养基处理 72 h。后按照 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒要求,6 孔板吸除培养液用 PBS 洗涤细胞 1 次,加入 1 mL 细胞培养液和 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀。细胞培养箱中 37℃孵育 20 min。在孵育期间,配制适量的 JC-1 染色缓冲液,并放置于冰浴。孵育结束后,吸除上清,用染色缓冲液洗涤 2 次。加入 2 mL RPMI-1640 培养液,在荧光显微镜下观察拍照,实验重复 3 次。

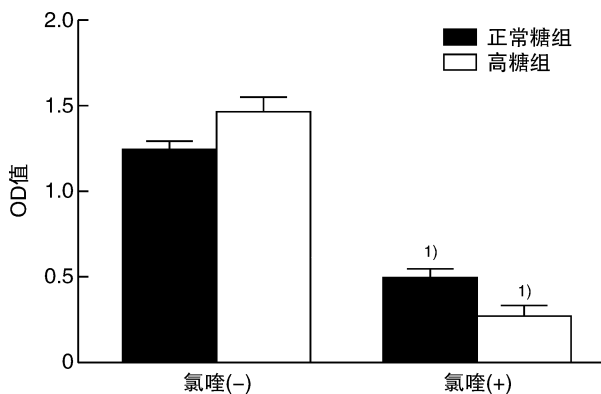
### 1.7 统计学方法

应用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 氯喹抑制高糖环境下前列腺癌细胞增殖

CCK-8 细胞增殖实验结果表明氯喹处理细胞后,PC3 细胞的增殖被明显抑制。而与正常糖组相比,高糖组的 PC3 细胞的增殖受氯喹的抑制更加明显,见图 1。高糖组的 PC3 细胞比正常糖组增殖能力更强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



氯喹用药组与非用药组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

图 1 CCK-8 实验检测 PC3 细胞增殖柱状图

### 2.2 氯喹抑制前列腺癌细胞自噬

Western blot 结果表明:高糖组的 PC3 细胞的自噬水平较正常糖组的高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与非氯喹处理组相比,氯喹处理组的 PC3 细胞的自噬相关蛋白 LC3-II / I 比值升高,提示氯喹能够抑制前列腺癌细胞自噬,见图 2。

### 2.3 氯喹上调高糖环境下前列腺癌细胞 ROS 水平

ROS 的检测结果表明:氯喹上调 PC3 细胞的

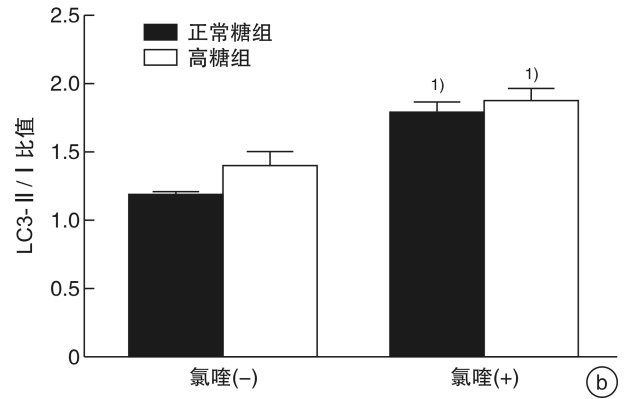
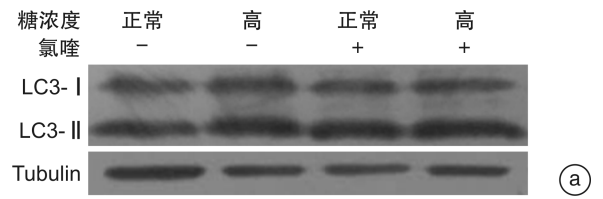
ROS 的水平。与正常糖组比较,氯喹使得高糖组 PC3 细胞的 ROS 水平上调得更加显著,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 3。

### 2.4 氯喹诱导高糖环境下前列腺癌细胞线粒体膜电位去极化

JC-1 的实验结果显示:氯喹可诱导前列腺癌 PC3 细胞线粒体膜电位的去极化。其中,高糖+氯喹组 PC3 细胞的绿与红荧光比值较正常糖+氯喹组 PC3 细胞显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明氯喹诱导高糖组 PC3 细胞线粒体膜电位的去极化作用更加显著。见图 4。

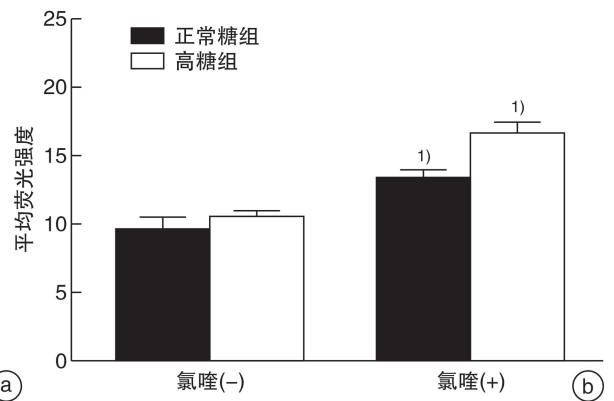
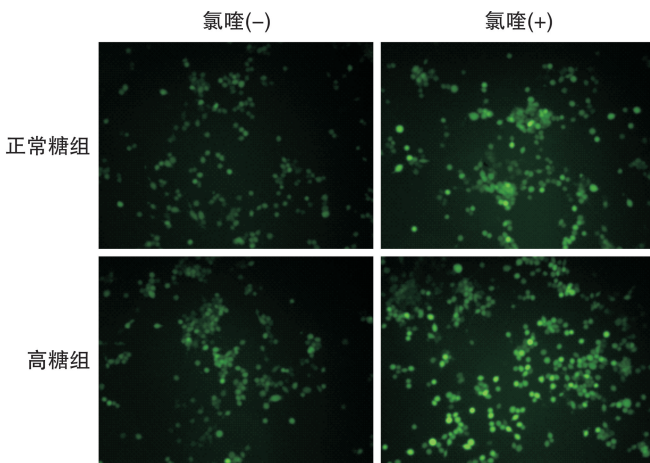
### 3 讨论

药物诱导癌细胞内源性 ROS 增加可能是抑制癌细胞增殖的有效策略<sup>[6]</sup>。本课题研究发现氯喹能够通过抑制高糖环境下前列腺癌细胞的自噬,诱导癌细胞内源性 ROS 激增,同时线粒体膜电位去极化,继而抑制癌细胞的增殖。本课题尝试探究氯喹作为治疗合并糖尿病的前列腺癌患者的可能理论机制。



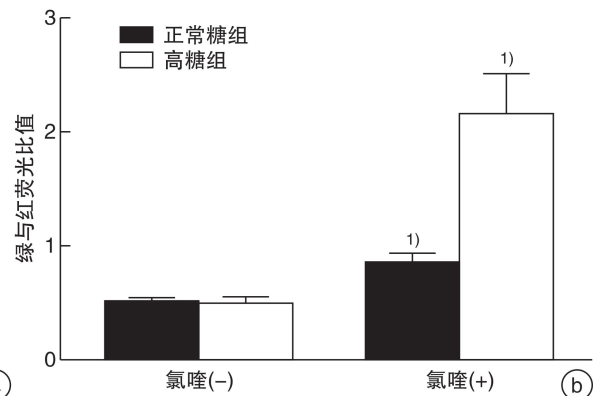
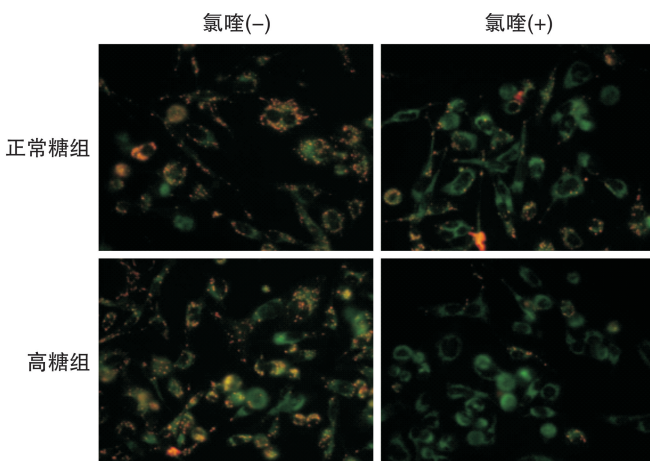
a:LC3 蛋白的表达条带图;b:LC3 蛋白表达水平柱状图。氯喹用药组与非用药组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 Western blot 检测自噬相关蛋白 LC3 的表达



a:ROS 表达的荧光图;b:ROS 平均荧光强度柱状图。氯喹用药组与非用药组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 DCFH-DA 活性氧荧光探针检测 PC3 细胞中 ROS 水平



a:细胞线粒体膜电位变化荧光图;b:绿与红荧光比值柱状图。氯喹用药组与非用药组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ 。

图 4 JC-1 法检测 PC3 细胞线粒体膜电位的去极化水平

高血糖是糖尿病患者的一个重要临床表现。大多数糖尿病患者由于疾病发现不及时或降糖药物使用不够合理规范,继而血糖未能控制理想水平,导致机体长期处于高血糖状态。有研究表明高血糖会促进恶性肿瘤细胞的发生发展,例如肝癌、胰腺癌、乳腺癌、直肠癌和膀胱癌等<sup>[7]</sup>。由于癌细胞无限的分裂增殖需要大量的能量代谢,因而机体高血糖的能量供应正好能满足癌细胞的能量需求。本研究也发现高糖促进前列腺癌 PC3 细胞增殖。这一发现也与前列腺癌流行病学数据相一致。后者发现合并糖尿病的前列腺癌患者比非糖尿病的前列腺癌患者预后更差<sup>[3]</sup>。因而探究合并糖尿病的前列腺癌患者的治疗药物具有迫切的临床需求。

氯喹作为一种传统临床抗炎药,广泛应用于疟疾、风湿性关节炎、病毒感染等疾病。氯喹是一种碱性药物,具有趋细胞溶酶体效应,因而使用药物后可在细胞的溶酶体内蓄积,继而中和溶酶体的酸性物质,升高 pH 值,抑制单酰基甘油脂肪酶等溶解酶的活性,使得自噬体包裹的长寿蛋白质、受损的细胞器等未能被溶酶体降解,导致自噬性囊泡在细胞内堆积,即表现为自噬标记微管相关蛋白轻链 3(LC3)-I 向 LC3-II 的转化增加,继而抑制了自噬过程<sup>[8]</sup>。本研究结果表明,氯喹处理前列腺癌 PC3 细胞后会使得自噬相关蛋白 LC3-II / I 的比值升高,印证了氯喹能够抑制前列腺癌自噬的发生。同时我们发现氯喹对高糖环境下前列腺癌细胞增殖的抑制作用更加明显,说明氯喹的自噬抑制作用可能与高糖环境下的前列腺癌细胞增殖存在某种联系。

自噬通常被认为是对外部环境变化的重要防御机制,具体来说细胞自噬的功能是对外源性干扰包括营养缺乏、感染、应激刺激等的保护性反应。自噬的作用底物是细胞内的蜕变、破损的某些细胞器或局部细胞质的核苷酸、氨基酸、脂肪酸等。自噬在细胞内起“清道夫”作用,可通过降解细胞内自噬作用底物来供应细胞生存所需,从而应对外界营养缺乏,内部毒害物质损伤,继而避免细胞凋亡<sup>[9]</sup>。有研究表明,自噬可以清除受损的细胞线粒体,减少细胞内氧化应激水平,避免细胞遭受 ROS 的损害<sup>[10]</sup>。ROS 是氧的衍生物,是细胞代谢过程中酶促反应的过量产物或副产物。细胞内 ROS 的过量产生具有毒副作用,可导致蛋白肽链断裂,氧化损伤 DNA 碱基,进而诱导细胞凋亡<sup>[4]</sup>。越来越多的证据表明,高糖会诱导哺乳动物细胞内线粒体中 ROS 增加。葡萄糖摄入细胞内进入线粒体三羧酸循环代谢,其产生 ATP 的过程需要借助线粒体内膜的电化学梯度推动电子传递链及质子泵的运转。在电子传递链中的异常传导过程会发生电子的流失导致具有毒害作用的 ROS 产生过多<sup>[11]</sup>。Park 等<sup>[12]</sup>发现高糖培养的鼠脊髓细胞可诱发细胞线粒

体损伤产生大量 ROS,继而促进细胞自噬的发生。Ma 等<sup>[13]</sup>也在肾脏足细胞中发现高糖诱导细胞内的自噬能够调节代谢紊乱的 ROS。本研究发现,高糖组的 PC3 细胞的增殖能力未受到 ROS 影响,可能与高糖组 PC3 细胞的自噬水平较正常糖组的升高,进而平衡 ROS 损伤作用有关。

线粒体的膜电位由线粒体内膜形成,通过控制钙离子平衡及活性氧的生成,起着维持线粒体稳态的作用。线粒体损伤早期最重要的标志是膜电位去极化,一旦线粒体膜电位去极化可诱导细胞发生凋亡<sup>[14]</sup>。线粒体内的氧化呼吸链产生细胞内大部分的活性氧。在正常情况下细胞内的 ROS 维持动态平衡,一旦过量的 ROS 会加重线粒体膜电位去极化<sup>[15]</sup>。本研究发现,氯喹可诱导前列腺癌 PC3 细胞线粒体膜电位的去极化。其中氯喹诱导高糖组 PC3 细胞线粒体膜电位的去极化作用更加显著。氯喹的自噬抑制作用可能打破前列腺癌 PC3 细胞内自噬与 ROS 平衡关系,导致癌细胞线粒体的膜电位去极化,诱导癌细胞凋亡、癌细胞增殖能力受损。

综上所述,氯喹抑制高糖环境下前列腺癌细胞增殖的可能理论机制为氯喹抑制前列腺癌细胞自噬,打破细胞内自噬与高糖诱导的 ROS 生态平衡,导致癌细胞内源性 ROS 激增,作用于线粒体膜电位去极化,继而抑制癌细胞的增殖。由此可见,氯喹为合并糖尿病的前列腺癌的治疗提供新思路、新方法,可能成为今后抗癌治疗研究的一个新突破。

#### 参考文献

- [1] 闫厚煜,邢金春,张开颜,等. 前列腺癌的早期诊断研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志,2020,35(3):242-246.
- [2] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115-132.
- [3] Wu C, Moreira DM, Gerber L, et al. Diabetes and prostate cancer risk in the REDUCE trial[J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2011, 14(4):326-331.
- [4] Victor VM, Rocha M, Herance R, et al. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes[J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(36):3947-3958.
- [5] 韩丽珠,石慧,肖洪涛,等. 羟氯喹在肿瘤治疗中的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志,2018,34(16):2022-2025.
- [6] 郭亚萍,陈璐瑶,吴紫璇,等. 人参皂苷 Rg3 差异调节前列腺癌细胞 PC3 和 DU145 增殖[J]. 天津医药, 2019,47(11):1.
- [7] Zelenko Z, Gallagher EJ. Diabetes and cancer[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2014, 43(1):167-185.
- [8] Al-Bari MA. Chloroquine analogues in drug discovery; new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70 (6):

- 1608-1621.
- [9] Ha J, Guan KL, Kim J. AMPK and autophagy in glucose/glycogen metabolism [J]. Mol Aspects Med, 2015, 46:46-62.
- [10] Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes [J]. Cell Death Differ, 2009, 16(1):87-93.
- [11] Yu T, Jhun BS, Yoon Y. High-glucose stimulation increases reactive oxygen species production through the calcium and mitogen-activated protein kinase-mediated activation of mitochondrial fission[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14(3):425-437.
- [12] Park EY, Park JB. High glucose-induced oxidative stress promotes autophagy through mitochondrial damage in rat notochordal cells[J]. Int Orthop, 2013, 37(12):2507-2514.
- [13] Ma T, Zhu J, Chen X, et al. High glucose induces autophagy in podocytes[J]. Exp Cell Res, 2013, 319(6):779-789.
- [14] Mattson MP, Gleichmann M, Cheng A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders[J]. Neuron, 2008, 60(5):748-766.
- [15] Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species[J]. Biochem J, 2009, 417(1):1-13.

(收稿日期:2020-06-06)

## 严正声明

近期本刊编辑部频繁接到多起举报,有机构和个人冒充《临床泌尿外科杂志》编辑,开展论文快速发表的诈骗业务,影响十分恶劣,严重损害了我刊的权益和声誉。为了避免广大读者、作者上当受骗,特郑重声明如下,本刊从未委托任何机构或中介进行征稿、审稿、编辑等相关事务,敬请广大读者和作者仔细甄别,投稿请认准本刊官方指定网站、地址及电话,谨防上当受骗。对于冒充编辑部从事征稿等行为的网站、机构及个人,本刊将通过法律程序追究其责任。

官方网站:“[www.whuhzs.com](http://www.whuhzs.com)”或通过中国知网搜索“临床泌尿外科杂志”进入投稿界面

联系地址:武汉市解放大道 1277 号协和医院杂志社《临床泌尿外科杂志》编辑部

联系方式:E-mail:[lcmnwkzz\\_whuhzs@163.com](mailto:lcmnwkzz_whuhzs@163.com);Tel:027-85727988 或 85726342-8818

《临床泌尿外科杂志》编辑部