

雪胆素乙通过破坏微丝结构和促进 p21^{Cip1} 表达抑制 前列腺癌 PC-3 细胞的增殖

任 帅¹, 徐丽慧^{1,2}, 曾龙辉¹, 欧阳东云¹, 何贤辉¹

(暨南大学生命科学技术学院 1. 免疫生物学系, 2. 细胞生物学系, 广东 广州 510632)

摘要: 目的 分析雪胆素乙 (Cu II b) 对人前列腺癌 PC-3 细胞增殖及细胞周期的影响, 探讨其作用机制。方法 MTS 法检测 Cu II b 0.064 ~ 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 48 h 后 PC-3 细胞增殖; Cu II b 2 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h, 相差显微镜观察细胞形态; Cu II b 2 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 48 h, 流式细胞术分析细胞周期分布; 免疫荧光染色分析 Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别作用 1, 4 和 24 h 后微丝和微管细胞骨架变化; 免疫印迹法测定 Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别作用 1, 4 和 24 h 后 G 肌动蛋白、F 肌动蛋白、p21^{Cip1} 及细胞周期蛋白 A, B1, E 和 D1 的表达。结果 Cu II b 以浓度依赖方式抑制 PC-3 细胞的增殖 ($r = 0.9817, P < 0.05$)。Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 48 h, 使细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 从溶剂对照组的 (27.7 ± 1.5)% 上升为 (45.3 ± 1.8)% ($P < 0.01$), 相差显微镜见细胞发生明显收缩。Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h, 使 G 肌动蛋白水平显著下降, F 肌动蛋白发生严重聚集 ($P < 0.05$), 而对微管只有轻微影响。与溶剂对照组相比, Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 24 h 后, 细胞 p21^{Cip1} 表达明显升高, 细胞周期蛋白 A 表达显著下调, 其他细胞周期蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。结论 Cu II b 能明显抑制人前列腺癌 PC-3 细胞的增殖, 其机制可能是通过诱导肌动蛋白聚集, 破坏微丝骨架, 促进抑癌因子 p21^{Cip1} 表达, 阻滞细胞周期的进程。

关键词: 雪胆素乙; 前列腺癌细胞; 肌动蛋白聚集; 细胞周期阻滞

中图分类号: R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)06-0835-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.06.010

前列腺癌已成为欧美男性的多发疾病。最新数据显示, 美国新增患者 22.3 万例, 约 2.9 万人因之死亡^[1]。在欧美男性癌症死亡率中仅次于肺癌而位居第二^[2]。目前, 化疗是治疗激素非依赖性前列腺癌的主要手段, 但随着临床上一些抗前列腺癌药物的广泛使用, 其毒性作用和机体产生的耐药性日益增强^[3]。此外, 这些药物对前列腺癌并没有足够的特异杀伤作用。因此研发新的药物显得尤为必要。研究发现, 一些天然植物提取的活性成分如葫芦素类化合物葫芦素 E, 具有抗前列腺癌效应^[4]。

雪胆素乙 (cucurbitacin II b, Cu II b) 是从葫芦科雪胆属植物雪胆 (*Hemsleya amabilis* Diels) 提取的一种四环三萜类有效成分, 是葫芦素家族的一个成员, 化学名为 23, 24-双氢葫芦素 F, 临床上常用于

治疗菌痢、肠炎、支气管炎和急性扁桃体炎等^[5]。许多研究表明, 葫芦素类物质具有广泛的抗肿瘤效应, 能够显著抑制肿瘤的发生发展, 其作用机制包括扰乱正常肌动蛋白细胞骨架, 引起肌动蛋白异常聚集, 抑制 Jak/STAT3 信号通路, 调节 MAPK 信号通路等^[6-10]。然而, Cu II b 抗人前列腺癌的研究尚未见报道, 具体作用机制不清。本研究以雄性激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞为模型, 借助流式细胞仪和荧光显微镜等技术分析不同浓度 Cu II b 对细胞增殖和细胞周期分布的影响, 探讨其抗癌作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物、试剂和仪器

Cu II b, 纯度 98%, 购自上海顺勃生物技术公司; RPMI 1640 培养液、胎牛血清、青霉素/链霉素均购自美国 Invitrogen 公司; 二甲亚砜 (DMSO)、碘化丙啶 (propidium iodide, PI)、十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 购自美国 Sigma 公司; MTS 为 Promega 产品; 兔抗肌动蛋白抗体、鼠抗细胞周期蛋白 A、鼠抗细胞周期蛋白 D1、鼠抗细胞周期

基金项目: 国家自然科学基金 (81173604); 中央高校基本科研业务费专项资金 (21609403)

作者简介: 任 帅 (1987 -), 男, 硕士研究生, 主要从事肿瘤药理学研究, E-mail: renshuai19880511@163.com, Tel: (020)85220732

通讯作者: 何贤辉, E-mail: thexh@jnu.edu.cn, Tel: (020)85220679

蛋白 E、兔抗细胞周期蛋白 B1(一抗)购自美国 CST 公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠 IgG 抗体为 Jackson ImmuneResearch 产品;BCA 试剂盒为美国 Pierce 公司产品;BeyoECL Plus 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术研究;FACSCalibur 型流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品;DMIRB 荧光显微镜为德国 Leica 产品,FluorChem 8000 为美国 AlaphaInnotech 公司产品。Cu II b 溶于 DMSO,配成 20 mmol·L⁻¹的储存液,存于 -20℃ 备用。

1.2 细胞培养

人前列腺癌细胞株 PC-3 购自中国科学院上海细胞库,置于含 10% 胎牛血清、青霉素 100 kU·L⁻¹ 和链霉素 100 mg·L⁻¹ 的 RPMI 1640 培养液中,并在 37℃ 及 5% CO₂ 的湿化培养箱中培养,每 3 d 传代 1 次,实验时采用对数生长期细胞。细胞分成溶剂对照组,只加含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 培养液;Cu II b 组加入不同浓度的 Cu II b 作用一定的时间。实验均重复 3 次。

1.3 MTS 方法测定细胞存活

取对数生长期的 PC-3 细胞接种于 96 孔培养板,每孔 5000 个细胞,24 h 后将培养液换成溶剂对照组(含 0.1% DMSO)和 Cu II b 0.064, 0.32, 1.6, 8.0, 40.0 和 200.0 μmol·L⁻¹,培养 48 h,加入 20 μl MTS,37℃ 培养箱中培养 4 h 后,全自动酶标仪测定 490 nm 波长处吸光度($A_{490\text{nm}}$)值,并计算药物对细胞抑制率的影响。为消除培养基对结果的影响,实验同时设空白对照组(没有细胞,含 RPMI 1640 培养液和 0.1% DMSO)。细胞抑制率(%) = $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。从 MTS 曲线中有浓度依赖性的浓度区,选取高低两个抑制率分别为约 25% 和 65% 的浓度(即 2 和 20 μmol·L⁻¹)作为下一步实验的测试浓度。

1.4 倒置相差显微镜观察形态学改变

细胞以每孔 2×10^4 种于 6 孔板中,分别以 Cu II b 2 和 20 μmol·L⁻¹ 处理细胞,24 h 后显微镜下观察细胞的形态变化,拍照记录细胞图像。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期^[11]

细胞接种于 75 cm² 培养瓶,分别以 Cu II b 2 和 20 μmol·L⁻¹ 处理 48 h 后,用 0.25% 的胰酶消化收集细胞,400 × g 离心 10 min,冷 PBS 洗 2 次,加 70% 的预冷乙醇于 -20℃ 固定 1.5 h 以上,离心去除乙醇,细胞中加入 0.4 ml 含 PI 20 mg·L⁻¹ 和 RNase A 30 mg·L⁻¹ 的染色液,37℃ 避光染色 1 h,用流式细胞仪检测细胞周期分布,每个样本收集 2.0×10^4 细胞参数,数据用 CELLQuest 进行分析。

1.6 荧光染色观察肌动蛋白表达

取对数生长期 PC-3 细胞,调整到 1.5×10^4 L⁻¹,接种于玻璃底培养皿中(每个培养皿 2 ml),24 h 后将培养液换成溶剂对照组(含 0.1% DMSO)或 Cu II b 20 μmol·L⁻¹,分别培养 1, 4 和 24 h,4% 多聚甲醛处理 15 min,PBS 洗 3 次,冰冷的甲醇于 -20℃ 通透 10 min,PBS 洗涤,封闭液(含 5% 的山羊血清、0.1% 的吐温-20,10% 的 10 × PBS)封闭 1 h 后加入抗 β 肌动蛋白一抗,4℃ 反应过夜,洗涤后加入 CF-488A 标记的二抗,避光反应 1 h,以 Leica DMIRB 荧光显微镜观察和记录荧光图像。

1.7 Western 印迹法检测细胞骨架及细胞周期相关蛋白表达

细胞接种于 75 cm² 培养瓶,分别以 Cu II b 20 μmol·L⁻¹ 处理 1, 4 和 24 h 后,用预冷的 PBS 洗细胞 2 次,参考文献[10],制备 G 肌动蛋白和 F 肌动蛋白样品,先加入 200 μl 预冷的肌动蛋白抽提液(含 0.2% Triton X-100)抽提 G 肌动蛋白,残余部分以 2 × SDS-PAGE 上样液裂解获得含 F 肌动蛋白的样品。制备总蛋白样品时,直接加入 160 μl 全细胞裂解液,抽提总蛋白,以 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度,取适量蛋白样品,以 12% 或 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质,电泳后将蛋白电转移至 PVDF 膜上,加入一抗于 4℃ 摇床孵育过夜,洗涤后,加入相应的 HRP 标记二抗孵育 1 h,最后用 BeyoECL Plus 化学发光试剂盒显色,X 线片显影,FluorChem 8000 成像仪记录结果,并以 β 微管蛋白作为内参,以 AlphaEaseFC 软件分析求半定量数据,作为 G 肌动蛋白、F 肌动蛋白、细胞周期蛋白 A, B1, D1, E, p21^{Cip1} 蛋白相对表达量。

1.8 实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 GraphPad Prism 4.0 软件进行单因素方差分析,组间比较采用 Newman-Student-Keuls 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cu II b 对 PC-3 细胞形态的影响

在 MTS 结果基础上,选择对细胞增殖有明显抑制效应两个浓度 Cu II b 2 和 20 μmol·L⁻¹,观察其对细胞形态和周期的影响。如图 1 所示,PC-3 细胞经 Cu II b 作用 24 h,相差显微镜下观察,溶剂对照组细胞生长良好(图 1A),Cu II b 2 μmol·L⁻¹ 组细胞生长缓慢,细胞间隙变宽,但大部分细胞保持伸展状态(图 1B);Cu II b 20 μmol·L⁻¹ 组细胞数量明显减少,大部分细胞收缩变圆,且可发现明显的细胞收缩后留下的丝状痕迹(图 1C)。

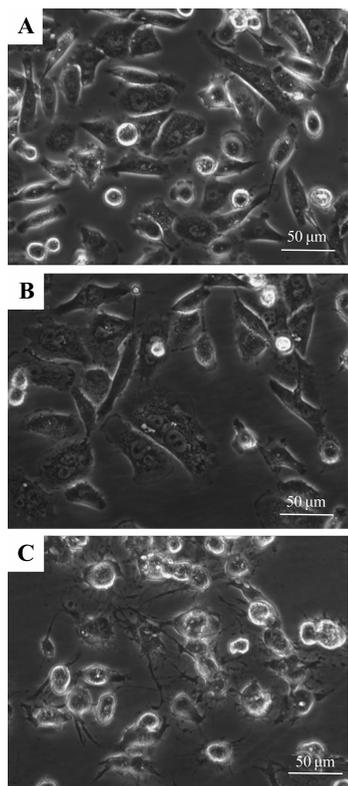


Fig. 1 Effect of cucurbitacin II b (Cu II b) on cell morphology after culturing for 24 h. A: normal control; B - C: Cu II b 2 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.2 Cu II b 对 PC-3 细胞增殖的影响

如图 2 所示, Cu II b 0.064, 0.32, 1.6, 8, 40 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 PC-3 细胞 48 h 后, 随着药物浓度的升高, 抑制率明显增强, 并呈现一定的浓度依

赖性。Cu II b 1.6, 8 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞抑制率分别为 $(15.8 \pm 7.9)\%$, $(51.9 \pm 3.2\%)$ 和 $(69.7 \pm 1.4)\%$ ($r=0.9817, P < 0.05$)。

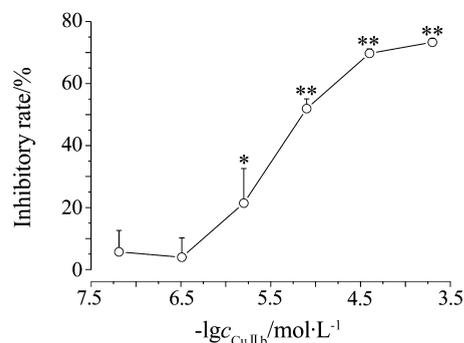


Fig. 2 Effect of Cu II b on PC-3 cells survival by MTS assay. The PC-3 cells were seeded in 96-well plates and incubated with Cu II b for 48 h at the concentrations of 0.064, 0.32, 1.6, 8, 40 and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, and then measured by MTS assay. Inhibitory rate (%) = $[1 - (A_{\text{CuIIb}} - A_{\text{Blank}}) / (A_{\text{Normal control}} - A_{\text{Blank}})] \times 100\%$. $\bar{x} \pm s, n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group (containing 0.1% DMSO).

2.3 Cu II b 对 PC-3 细胞周期分布的影响

如图 3 和表 1 所示, 流式细胞仪分析显示, Cu II b 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的 PC-3 细胞周期分布 (图 3B) 与溶剂对照组 (图 3A) 相似, 而 Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的 PC-3 细胞周期发生明显变化 (图 3C), 使 G_2/M 期 (四倍体峰) 明显增多, G_0/G_1 期细胞减少, 亚二倍体峰 (凋亡峰) 细胞有微小的升高趋势 ($P < 0.05$)。

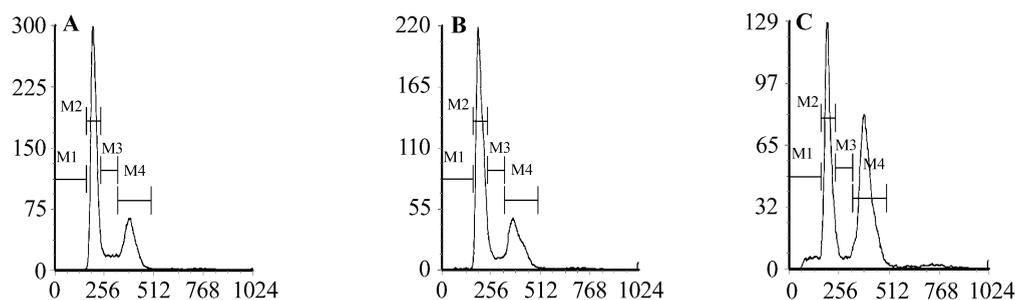


Fig. 3 Cell cycle analysis of PC-3 cells treated with Cu II b for 48 h by flow cytometry. A: normal control (containing 0.1% DMSO); B - C: Cu II b 2 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. M1: sub- G_0/G_1 , M2: G_0/G_1 , M3: S, M4: G_2/M .

Tab. 1 Effect of Cu II b on cell cycle of PC-3 cells

Cu II b/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Cell cycle/%			
	Sub- G_0/G_1	G_0/G_1	S	G_2/M
0	0.5 ± 0.1	57.4 ± 0.8	11.3 ± 0.9	27.7 ± 1.5
2	1.0 ± 0.6	$63.6 \pm 2.2^*$	$7.7 \pm 0.4^*$	24.9 ± 1.8
20	$5.1 \pm 0.9^*$	$36.6 \pm 0.1^{**}$	$7.9 \pm 0.6^*$	$45.3 \pm 1.8^{**}$

PC-3 cells were treated with Cu II b for 48 h and measured by flow cytometry. $\bar{x} \pm s, n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group.

2.4 Cu II b 对 PC-3 细胞肌动蛋白聚集的影响

免疫印迹法分析 G 肌动蛋白和 F 肌动蛋白的含量结果显示,与溶剂对照组相比,随着作用时间的延长,Cu II b $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的 PC-3 细胞,G 肌动蛋白含量明显降低 ($P < 0.05$) (图 4A, B),其中 Cu II b 作用 1 h 后,G 肌动蛋白含量约减少三分之一,作用 4 h 和 24 h 后 G 肌动蛋白含量低于检测下限,没有显示明显的条带,而相应的 F 肌动蛋白水平随着作用时间的延长呈升高趋势,其中在 4 h 和 24 h 后 F 肌动蛋白水平明显升高 ($P < 0.05$) (图 4C, D)。

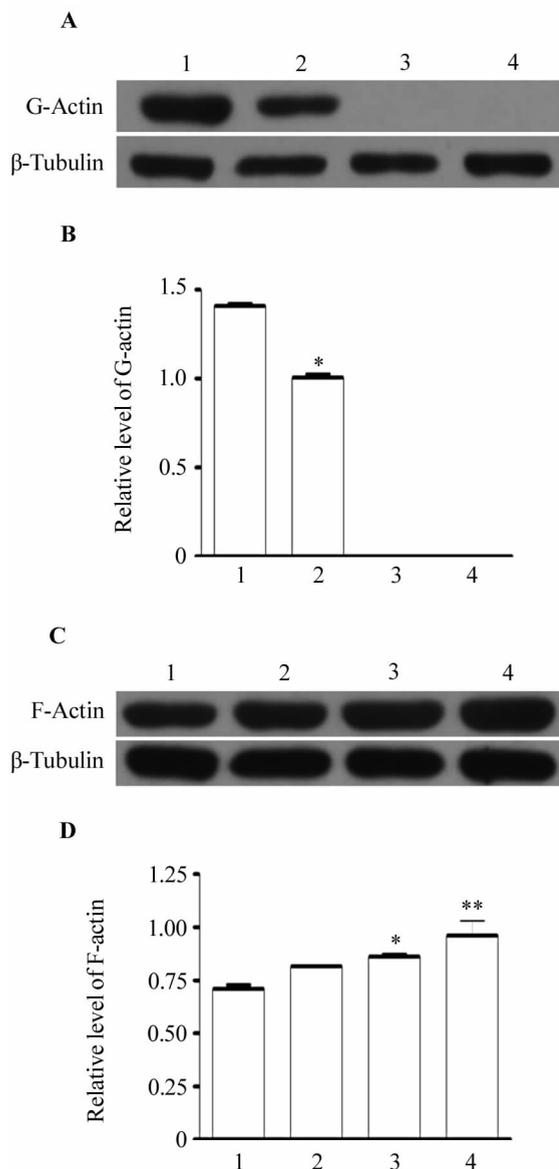


Fig. 4 Effect of Cu II b $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ on levels of G-actin (A, B) and F-actin (C, D) analyzed by Western blotting. 1: normal control group; 2: 1 h group; 3: 4 h group; 4: 24 h group. The relative levels of G-actin and F-actin were normalized to β -tubulin. B was the semiquantitative result of A. D was the semiquantitative result of C. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group.

免疫荧光显微分析表明(图 5),溶剂对照细胞肌动蛋白在细胞皮质区成细丝状分布(图 5A1 和 B1);Cu II b $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 4 h 肌动蛋白开始聚集(图 5A2 和 B2),Cu II b $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理 24 h 组细胞肌动蛋白发生明显聚集,成亮点状区域性分布(图 5A3 和 B3)。与肌动蛋白相比,微管结构的变化较小且滞后于肌动蛋白的聚集。

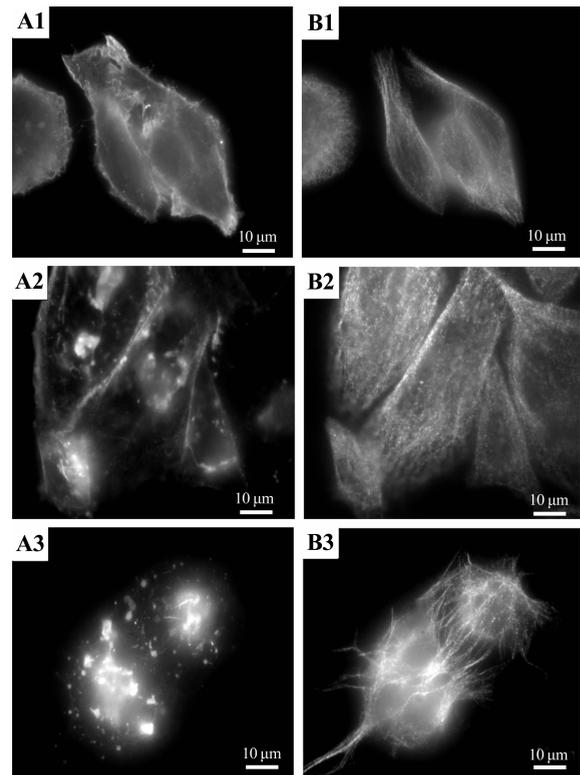


Fig. 5 Effect of Cu II b $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ on actin (A) and β -tubulin (B) in PC-3 cells (Immunofluorescence). 1: normal control group; 2: 4 h group; 3: 24 h group.

2.5 Cu II b 对 PC-3 细胞周期蛋白及 p21^{Cip1} 表达的影响

免疫印迹分析显示,与溶剂对照组相比,Cu II b $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 1 h 后,没有检测到 p21^{Cip1} 表达,但 Cu II b $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 4 和 24 h 后,p21^{Cip1} 表达明显升高 ($P < 0.05$) (图 6A, 图 6B1)。与溶剂对照组相比,Cu II b $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 4 和 24 h 后,周期蛋白 B1 (图 6A, 图 B2) 和周期蛋白 E (图 6A, 图 B3) 表达均明显上调 ($P < 0.01$),作用 1 h 时蛋白表达无显著差异。与此相反,周期蛋白 A 在 1 和 4 h 时明显增加 ($P < 0.01$),24 h 后几乎检测不到(图 6A, 图 B4);与对照组相比,周期蛋白 D1 在 1 和 4 h 时表达水平明显升高 ($P < 0.01$),24 h 后下调到溶剂对照组水平(图 6A, 图 B5)。

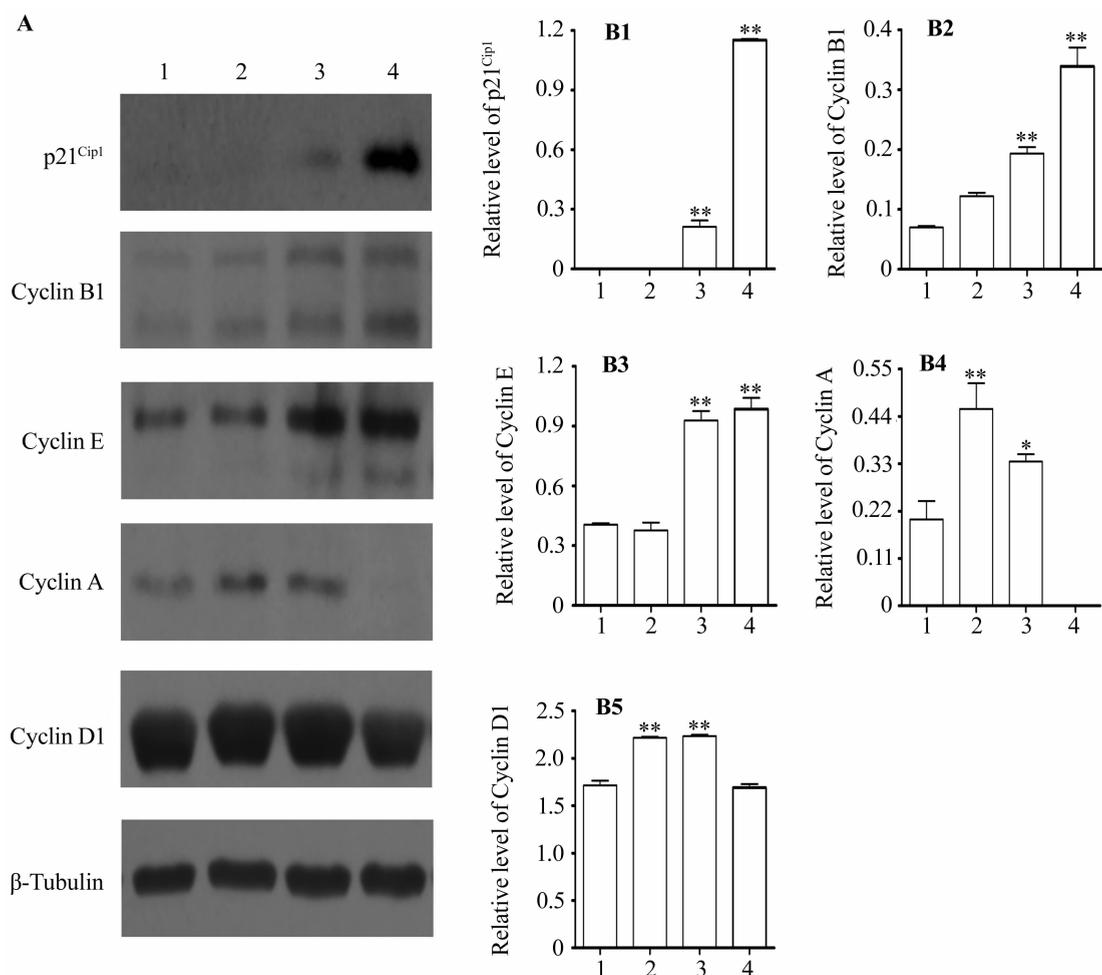


Fig. 6 Effect of Cu II b on expression of cell cycle related proteins in PC-3 cells analyzed by Western blotting. B1 – B5 were the semiquantitative results of A. 1: normal control group; 2: 1 h group; 3: 4 h group; 4: 24 h group. The relative levels were normalized to β -tubulin. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with normal control group.

3 讨论

本研究显示, Cu II b 能快速引起人前列腺癌 PC-3 细胞中 G 肌动蛋白的清除和 F 肌动蛋白聚集, 严重破坏微丝细胞骨架的结构, 同时上调细胞周期抑制因子 p21^{Cip1} 的水平, 降低细胞周期蛋白 A 的表达, 从而导致细胞周期阻滞, 抑制细胞增殖。这些结果表明, Cu II b 可能通过破坏肌动蛋白细胞骨架而发挥其抗前列腺癌的效应。

在 MTS 结果基础上, 本研究选择对细胞增殖有明显抑制效应的 Cu II b 浓度 2 和 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 观察其对细胞形态和周期的影响。实验进程中发现, 与溶剂对照组相比, Cu II b 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 24 h 后细胞形态已发生明显变化, 作用 48 h 细胞周期出现明显阻滞, 而在 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 细胞形态和周期阻滞并不明显。基于这些细胞水平的药理作用, 本研究在机制研究时选择有明显药效的 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 研究作

用 1, 4 和 24 h 对细胞骨架和细胞周期相关蛋白表达的影响。

葫芦素类物质影响肌动蛋白细胞骨架的现象已有报道, 如葫芦素 B 能够诱使肌动蛋白聚集, 引起 G₂/M 期阻滞, 抑制细胞增殖^[12]。我们也曾发现葫芦素 B 能引起小鼠 B16F10 细胞 G 肌动蛋白的快速清除^[13]。在细胞有丝分裂胞质分离期, 肌动蛋白与肌球蛋白结合形成收缩环, 收缩环收缩, 使两个子细胞最终分离; 肌动蛋白的聚集往往引起胞质分裂的失败, 导致多核细胞的形成。Cu II b 促使肌动蛋白聚集, 但对微管的结构影响较小, 这与以往报道相符^[12, 14]。因此, 可以推测, Cu II b 通过破坏微丝细胞骨架, 影响收缩环的形成, 使细胞核不能分离, 从而将细胞周期阻滞在四倍体峰 G₂/M 期。

细胞周期受一系列分子的调控, 如 CDK、细胞周期蛋白、抑癌基因及其产物。其中 CDK 的活性受到细胞周期蛋白及抑癌基因产物的双向调节。

p21^{Cip1} 是细胞周期的负调因子,通过结合细胞周期蛋白-CDK 复合物,抑制后者的活性,使细胞周期阻滞于 G₁ 和 G₂/M 期^[15-16]。通过细胞周期标志物(如细胞周期蛋白 A、细胞周期蛋白 D 等),可推测细胞周期阻滞的阶段。细胞周期蛋白 A 是 S 期进程的关键因素。本研究显示,Cu II b 不但上调 p21^{Cip1} 的表达水平,而且使细胞周期蛋白 A 水平下降,推测在 p21^{Cip1} 的调控下,由于细胞周期蛋白 A 的低表达,细胞未能进入并通过 S 期,细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期或 G₂/M 期。需要指出的是,流式细胞仪分析不能区分 G₂/M 期和处于 G₀/G₁ 期的四倍体细胞,可见流式数据显示的 G₂/M 期细胞中可能包含处于 G₀/G₁ 期的四倍体细胞。

微丝主要以球状肌动蛋白和纤维状肌动蛋白动态平衡形式存在。肌动蛋白聚合/去聚合状态的改变与诸多细胞生理过程如胞质分裂、凋亡、运动和分泌等有关,一旦药物打破这种平衡,对细胞产生的影响可想而知^[6]。据报道,葫芦素作用后,细胞的运动能力几乎完全丧失^[17],这在一定程度上限制了肿瘤细胞的扩散。综合本研究结果得知,Cu II b 是一类作用于微丝结构的药物。Lee 等^[18]指出,细胞松弛素 B 及其他抗肌动蛋白药物可不依赖于 p53 介导,通过破坏细胞骨架中肌动蛋白的平衡,直接引起 p21^{Cip1} 表达上调。值得一提的是,PC-3 是 p53 缺陷型细胞。本研究也发现,p21^{Cip1} 表达明显上调。故推测,Cu II b 作用下,PC-3 细胞中 p21^{Cip1} 表达上调可能与微丝骨架的改变有关,其具体机制有待进一步研究。

总之,本研究表明 Cu II b 能抑制前列腺癌 PC-3 细胞的增殖,诱导细胞周期阻滞,表现出明显的抗前列腺癌效应,这种效应可能与其破坏肌动蛋白细胞骨架有关。然而,Cu II b 是否在体内模型中也通过同样的机制发挥抗肿瘤效应,需要进一步研究阐明。

参考文献:

- Centers for Disease Control and Prevention. Prostate cancer[EB/OL][2012-03-20]. http://www.cdc.gov/features/prostate_cancer
- Koeneman KS, Yeung F, Chung LW. Osteomimetic properties of prostate cancer cells: a hypothesis supporting the predilection of prostate cancer metastasis and growth in the bone environment[J]. *Prostate*, 1999, **39**(4):246-261.
- Efferth T, Kahl S, Paulus K, Adams M, Rauh R, Boechzelt H, et al. Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from traditional Chinese medicine and Chinese materia medica with activity against tumor cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, **7**(1):152-161.
- Duncan KL, Duncan MD, Alley MC, Sausville EA. Cucurbitacin E-induced disruption of the actin and vimentin cytoskeleton in prostate carcinoma cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 1996, **52**(10):1553-1560.
- Chen WH, Nie SL, Chen YC, Xia KM. The structures of cucurbitacin IIa and IIb from *Hemsleya amabilis*[J]. *Acta Chim Sin*(化学学报), 1975, **33**(1):49-56.
- Zhang YT, Ouyang DY, He XH. Progress in antitumor effect of cucurbitacin B and its mechanism[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*(中国药理学与毒理学杂志), 2012, **26**(1):112-115.
- Dong Y, Lu B, Zhang X, Zhang J, Lai L, Li D, et al. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2010, **31**(12):2097-2104.
- Huang WW, Yang JS, Lin MW, Chen PY, Chiou SM, Chueh FS, et al. Cucurbitacin E induces G₂/M phase arrest through STAT3/p53/p21 signaling and provokes apoptosis via Fas/CD95 and mitochondria-dependent pathways in human bladder cancer T24 cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, **2012**:952762.
- Yin D, Wakimoto N, Xing H, Lu D, Huynh T, Wang X, et al. Cucurbitacin B markedly inhibits growth and rapidly affects the cytoskeleton in glioblastoma multiforme[J]. *Int J Cancer*, 2008, **123**(6):1364-1375.
- Lee DH, Iwanski GB, Thoennissen NH. Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment[J]. *Sci World J*, 2010, **10**:413-418.
- Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry[J]. *Nat Protoc*, 2006, **1**(3):1458-1461.
- Chen W, Leiter A, Yin D, Meiring M, Louw VJ, Koefler HP. Cucurbitacin B inhibits growth, arrests the cell cycle, and potentiates antiproliferative efficacy of cisplatin in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2010, **37**(3):737-743.
- Zhang Y, Ouyang D, Xu L, Ji Y, Zha Q, Cai J, et al. Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*(Shanghai), 2011, **43**(7):556-567.
- Haritunians T, Gueller S, Zhang L, Badr R, Yin D, Xing H, et al. Cucurbitacin B induces differentiation, cell cycle arrest, and actin cytoskeletal alterations in myeloid leukemia cells[J]. *Leuk Res*, 2008, **32**(9):1366-1373.
- Sitko JC, Yeh B, Kim M, Zhou H, Takaesu G, Yoshimura A, et al. SOCS3 regulates p21 expression and

- cell cycle arrest in response to DNA damage[J]. *Cell Signal*, 2008, **20**(12):2221-2230.
- [16] Zhang M, Sun C, Shan X, Yang X, Li-Ling J, Deng Y. Inhibition of pancreatic cancer cell growth by cucurbitacin B through modulation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling[J]. *Pancreas*, 2010, **39**(6):923-929.
- [17] Hayot C, Debeir O, Van Ham P, Van Damme M, Kiss R, Decaestecker C. Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, **211**(1):30-40.
- [18] Lee YJ, Tsai CH, Hwang JJ, Chiu SJ, Sheu TJ, Keng PC. Involvement of a p53-independent and post-transcriptional up-regulation for p21WAF/CIP1 following destabilization of the actin cytoskeleton[J]. *Int J Oncol*, 2009, **34**(2):581-589.

Inhibitory effect of Cucurbitacin II b on proliferation of human prostate cancer PC-3 cells through disruption of microfilaments and upregulation of p21^{Cip1} expression

REN Shuai¹, XU Li-hui^{1,2}, ZENG Long-hui¹, OUYANG Dong-yun¹, HE Xian-hui¹

(1. Department of Immunobiology, 2. Department of Cell Biology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To explore effects of cucurbitacin II b (Cu II b) on human prostate cancer PC-3 cells and its underlying mechanism. **METHODS** The proliferation of cells was detected by MTS assay after PC-3 cells were treated with Cu II b 0.064 – 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h. After treated with Cu II b 2 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h, cell morphologic changes were observed under phase contrast microscopy. After exposed with Cu II b 2 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 h, cell cycle distribution was measured by flow cytometry using propidium iodide (PI) staining. When cultured with Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1, 4 and 24 h dividedly, the changes of microfilament and microtubule structures were assessed by immunofluorescence staining. After separately treated with Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1, 4 and 24 h, the protein expression levels of F-actin, G-actin, p21^{Cip1}, cyclin A, cyclin B1, cyclin D1 and cyclin E were detected by western blotting ($P < 0.05$). **RESULTS** Cu II b inhibited the proliferation of PC-3 cells in a concentration-dependent manner. Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ increased the cell rates of G₂/M phase (tetraploid) to (45.3 ± 1.8)% from (27.7 ± 1.5)% in control group ($P < 0.01$), indicating an arrest of cell cycle progression. The cells became shrunk after Cu II b treatment. Meanwhile, Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ decreased G-actin levels and induced severe F-actin aggregation ($P < 0.05$), but had minimal effect on the microtubules. In addition, Cu II b 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ also elevated p21^{Cip1} expression and downregulated cyclin A level in PC-3 cells, whereas the other cyclins were slightly upregulated ($P < 0.05$). **CONCLUSION** Cu II b can significantly inhibit the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells probably through induction of actin aggregation, disruption of microfilaments, upregulation of tumor suppressor p21^{Cip1} expression and arrest of cell cycle progression.

Key words: cucurbitacin II b; prostate cancer cells; actin aggregation; cell cycle arrest

Foundation item: The project supported by National Natural Science Foundation of China (81173604); and Basic Research Funds for the Central Universities (21609403)

Corresponding author: HE Xian-hui, E-mail: thehx@jnu.edu.cn, Tel: (020)85220679

(收稿日期: 2012-03-28 接受日期: 2012-07-04)

(本文编辑: 乔虹)