

胡桃醌对人前列腺癌 PC-3 细胞抑制作用*

方芳, 王立国, 张巍, 陈艳媛, 杨冬梅, 王宇

摘要:目的 探讨胡桃醌对前列腺癌 PC-3 细胞的抑制作用。方法 溴化四氮唑蓝 (MTT) 法检测不同剂量胡桃醌对 PC-3 细胞生长抑制影响; 采用 Annexin V-FITC/PI 染色实验, 流式细胞仪检测 PC-3 细胞凋亡情况; 蛋白印迹法检测 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 蛋白和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的表达量。结果 与对照组比较, 12.5、25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 胡桃醌对前列腺癌 PC-3 细胞具有抑制作用且呈剂量依赖性, 抑制率分别为 20.6%、39.7%、57.3% 和 66.2%; 流式细胞仪检测胡桃醌 ($\geq 25 \mu\text{mol/L}$) 作用细胞后诱导 PC-3 细胞发生早期和晚期凋亡, 当胡桃醌浓度为 25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时其早、晚期凋亡率分别是 7.37% 和 2.07%、11.03% 和 5.8% 及 18.62% 和 8.54%, 均高于对照组诱导的细胞凋亡率 ($P < 0.05$); 随着胡桃醌浓度 ($\geq 50 \mu\text{mol/L}$) 不断增加, 可上调 Bax 并下调 Bcl-2 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。结论 胡桃醌对前列腺癌 PC-3 细胞具有细胞毒作用, 抑制细胞生长。

关键词: 胡桃醌; PC-3 细胞; 凋亡

中图分类号: R 73.0; R 737.25 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)10-1458-03 DOI: 10.11847/zgggws2013-29-10-17

Inhibitive effect of juglone on prostate cancer PC-3 cells

FANG Fang*, WANG Li-guo, ZHANG Wei, et al (* Department of Pathogenicity, Jilin Medical College, Jilin, Jilin Province 132013, China)

Abstract: Objective To explore inhibitive effect of juglone on prostate cancer PC-3 cells. **Methods** The 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to determine the growth of PC-3 cells treated with different concentrations of juglone. The induction of apoptosis was detected by flow cytometry with annexin V-FITC/PI staining. Western blot was used to detect the expression of apoptosis-associated protein of B-cell lymphoma (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax). **Results** Juglone could significantly inhibit the growth of PC-3 cells in dose-dependent manner with the inhibition ratios of 20.6%, 39.7%, 57.3%, and 66.2%, respectively. Flow cytometry detection showed that the early and late apoptosis rates of PC-3 cells treated with juglone of 25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$ were 7.37% and 2.07%, 11.03% and 5.8%, and 18.62% and 8.54%, respectively, and higher than those of the control group ($P < 0.05$). High dose of juglone ($\geq 50 \mu\text{mol/L}$) could reduce the expression of apoptosis-regulated protein Bcl-2 and increase the expression of apoptosis-regulated protein Bax ($P < 0.05$). **Conclusion** Juglone can suppress the growth of PC-3 prostate cancer cells.

Key words: juglone; PC-3 cell; apoptosis

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是男性最常见的恶性肿瘤。随着生活方式的改变和社会老龄化, 中国 PCa 发病率呈逐年增高趋势。雄激素阻断疗法 (androgen deprivation therapy, ADT) 仍然是 PCa 的主要治疗手段。然而, 绝大多数患者在接受 ADT 治疗的 2~3 年内由雄激素依赖性前列腺癌 (androgen-dependent prostate cancer, ADPC) 转化为雄激素非依赖性前列腺癌 (androgen-independent prostate cancer, AIPC), 继而引起肿瘤复发和转移, 导致患者死亡^[1]。探寻治疗 AIPC 的有效药物及治疗手段已迫在眉睫。胡桃醌 (juglone) 又名 5-羟基-1,4-萘醌, 是从胡桃属植物中的新鲜根皮、枝皮、青果皮中提取分离的羟基萘醌类化合物。到目前为止, 胡桃醌是唯一的 Pin1 抑制剂。作为 Pin1 的抑制剂, 研究表明

胡桃醌可直接抑制体外培养肿瘤细胞的增殖^[2-4], 但是能否抑制 AIPC 细胞的增殖及凋亡相关报道较少。本研究旨在细胞实验的基础上研究胡桃醌对 AIPC 细胞的体外抑制及细胞凋亡作用, 结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 胡桃醌和溴化四氮唑蓝 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT] (美国 Sigma 公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒及碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (碧云天生物有限公司); DMEM/F12 培养基及胰酶 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (Fetal calf serum, FCS) (杭州四季青公司); B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体 (美国 EPITOMICS 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人激素非依赖性前列腺癌 PC-3

* 基金项目: 吉林省教育厅“十二五”教育技术研究项目 (吉教科合字 2011 第 286 号); 吉林省教育厅“十二五”教育技术研究项目 (吉教科合字 2012 第 333 号)

作者单位: 吉林医药学院病原学教研室, 吉林 吉林 132013

作者简介: 方芳 (1973-), 女, 吉林长春人, 副教授, 博士, 主要从事肿瘤治疗研究工作。

细胞株为本实验室保存株,将细胞于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中,用 DMEM/F12 + 10% FCS 培养,隔日换液,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 比色法检测 PC-3 细胞增殖 取对数生长期细胞,制备成 PC-3 单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^5 /mL 细胞,体积为 200 μ L,接种于 96 孔板内,于 37 ℃,5% CO₂ 条件下培养。加入胡桃醌培养液,每组设 3 复孔(终浓度分别为 100、50、25 及 12.5 μ mol/L),同时设立正常对照组。体外培养 24 h 后以 MTT 法测定吸光度(A)值,实验重复 3 次,依下列公式计算胡桃醌对 PC-3 细胞株的抑制率:抑制率(%) = (对照组平均 A 值 - 试验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值) \times 100%。独立实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡变化 按上述浓度刺激细胞 12 h 后,收集细胞调整 PC-3 细胞数为 5×10^5 ,加 195 μ L Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞;加入 5 μ L Annexin V-FITC,轻轻混匀。室温、避光孵育 10 min;加入 10 μ L 碘化丙啶染色液,轻轻混匀,冰浴避光放置,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.4 蛋白免疫印迹法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 按上述浓度刺激细胞 24 h 后,磷酸盐缓冲液洗 1 次,加入细胞裂解液 100 μ L,加入蛋白酶抑制剂,冰上裂解 1 h,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,蛋白定量后,加入上样缓冲液,煮沸 5 min,12% 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印到硝酸纤维素膜上,利用 Bcl-2 和 Bax 特异性抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗检测,加到显色液中孵育,用计算机生物图像分析系统对干燥后的 PVDF 膜进行扫描,并用 Quality One 软件进行灰度值分析。

1.3 统计分析 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,组间差异比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对细胞形态的影响 倒置显微镜下观察细胞形态,正常对照组 PC-3 细胞多呈梭形,在经胡桃醌处理 24 h 后,12.5 μ mol/L 组表现出细胞生长缓慢较为稀疏,而 25、50 和 100 μ mol/L 组细胞边缘毛糙变圆,贴壁能力下降,随浓度的增加而变化明显。

2.2 胡桃醌对 PC-3 细胞生长抑制 不同浓度胡桃醌处理 PC-3 细胞 24 h 后采用 MTT 法检测各组吸光度,计数胡桃醌对 PC-3 细胞的生长抑制率。与对照组比较,12.5、25、50 和 100 μ mol/L 对 PC-3 细胞的增殖具有明显的抑制作用,其抑制率分别 20.6%、39.7%、57.3% 和 66.2%。

2.3 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测凋亡率(表 1) 不同浓度胡桃醌处理 PC-3 细胞 12 h 后通过 Annexin V/PI 双染细胞,经流式细胞仪检测细胞凋亡。结果显示,胡桃醌具有诱导 PC-3 细胞凋亡作用。

表 1 胡桃醌对 PC-3 细胞凋亡率的影响($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

组别(μ mol/L)	早期凋亡率	晚期凋亡率
对照组	2.80 \pm 0.26	0.80 \pm 0.12
胡桃醌		
12.5	3.97 \pm 0.50 ^a	1.03 \pm 0.35
25	7.37 \pm 2.80 ^b	2.07 \pm 0.60 ^b
50	11.03 \pm 2.04 ^b	5.80 \pm 1.96 ^b
100	18.62 \pm 5.70 ^b	8.54 \pm 2.10 ^b

注:与对照组比较,a $P < 0.05$,b $P < 0.01$ 。

2.4 Bcl-2 和 Bax 表达水平变化 不同浓度胡桃醌处理 PC-3 细胞 24 h 后,蛋白免疫印迹法检测 Bcl-2 和 Bax 表达水平。结果显示,与对照组比较,胡桃醌剂量 $< 50 \mu$ mol/L 时仅 Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.05$),而胡桃醌剂量 $\geq 50 \mu$ mol/L, Bcl-2 蛋白水平表达下降并且 Bax 蛋白水平表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

Pin1 是癌细胞中普遍存在的高表达的基因之一,如 PCa、宫颈癌、肺癌等,其与癌细胞的分化和增殖密切相关。去除它则肿瘤细胞增殖减低,凋亡增加。胡桃醌是从胡桃属植物中的新鲜根皮、枝皮、青果皮中分离出来的羟基萜醌类化合物,可以抑制 Pin1 的转录和活性,能够抑制细胞生长,具有抗肿瘤作用。细胞凋亡是指为维持内环境稳定,由基因控制的细胞自主的有序的死亡。细胞凋亡与细胞坏死不同,细胞凋亡不是一件被动的过程,而是主动过程,它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用,它并不是病理条件下自体损伤的一种现象,而是为更好地适应生存环境而主动争取的一种死亡过程。在细胞凋亡因子中,Bcl-2 是重要的凋亡抑制因子,而 Bax 则是促细胞凋亡基因,能阻遏 Bcl-2 的抑制细胞凋亡作用^[4]。胡桃醌的促进癌细胞凋亡作用可能通过抑制 Pin1 促使 Bcl-2 基因表达下调,Bax 基因表达上调有关^[5]。

本研究通过不同浓度的胡桃醌作用于 PC-3 细胞,采用 MTT 法测定细胞存活率,实验证明胡桃醌对 PC-3 细胞具有明显的抑制作用。本研究采用流式细胞仪检测细胞凋亡显示,细胞凋亡率与胡桃醌剂量呈一定的量效关系。Bcl-2 是一个公认的前列腺癌不良预后指标^[6],并且表达的高水平与 PCa 患者的化疗抵抗有关^[7]。本研究表明,随着胡桃醌剂量的增加,Bcl-2 蛋白表达下降及 Bax 蛋白表达升

高。提示胡桃醌能够促进 PC-3 细胞凋亡是通过上调 Bax 表达和下调 Bcl-2 表达来实现的。综上所述,胡桃醌对 AIPC 中 PC-3 细胞的生长具有抑制作用,为 AIPC 的临床治疗提供重要的理论指导和实验依据。

参考文献

[1] Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges[J]. *Genes Dev*, 2010, 24(18): 1967-2000.

[2] Ryo A, Liou YC, Lu KP, et al. Prolyl isomerase Pin1: a catalyst for oncogenesis and a potential therapeutic target in cancer [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(5): 773-783.

[3] 曹军, 刘建生. 胡桃醌体外抗胰腺癌细胞机制的初步研究

[J]. *中国当代医药*, 2011, 18(10): 22-23.

[4] 党瑜慧, 李芝兰, 杜蔚云, 等. 芹菜对小鼠生精细胞中 Bcl-2、Bax 蛋白表达影响[J]. *中国公共卫生*, 2011, 27(9): 1151-1152.

[5] Xu HL, Yu XF, Qu SC, et al. Anti-proliferative effect of juglone from *Juglans mandshurica Maxim* on human leukemia cell HL-60 by inducing apoptosis through the mitochondria-dependent pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 645(1-3): 14-22.

[6] Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL. Molecular marker of prostate cancer outcome[J]. *Cancer*, 2005, 41(6): 858-887.

[7] Rosser CJ, Reyes AO, Vakar-Lopez F, et al. Bcl-2 is significantly overexpressed in localized radio-recurrent prostate carcinoma, compared with localized radio-naïve prostate carcinoma [J]. *Inte J Radiat Oncol, Biol, Phys*, 2003, 56(1): 1-6.

收稿日期: 2012-06-26 (郑新编辑 周欣琳校对)

· 实验研究 ·

腺苷对脂多糖致大鼠心肌细胞肥大影响*

杨丽儒^{1,2}, 杨育红¹, 梁灵君¹, 孙雪芳¹, 李洪秀², 王洪新¹

摘要:目的 探讨腺苷对脂多糖诱导乳鼠心肌细胞肥大的影响及作用机制。方法 原代培养新生大鼠心肌细胞,以脂多糖 1 mg/L 诱导心肌细胞肥大,观察不同浓度腺苷对肥大心肌细胞影响,以计算机图像分析系统检测细胞体积,逆转录聚合酶链式反应法检测心房钠尿肽(ANP)mRNA,western blot 法检测心肌细胞 Toll 样受体 4(TLR4)的蛋白量,酶联免疫吸附试验检测肿瘤坏死因子(TNF-α)的含量。结果 腺苷能有效抑制脂多糖诱导的心肌肥大,与模型组比较,低、中、高剂量腺苷组细胞体积分别减小 15.6%、27.1% 和 32.8% (P<0.05),心肌细胞的 ANP mRNA 表达均较模型组降低 (P<0.01);与脂多糖组比较,0.25、1、4 mg/L 腺苷组 TLR4 蛋白表达 [(0.56±0.04)、(0.47±0.02)]均降低 (P<0.05),细胞外液 TNF-α 含量 [(30.8±4.1)、(22.7±2.9)、(19.1±3.7) pg/mL]均减少 (P<0.01)。结论 腺苷对脂多糖诱导的乳鼠心肌细胞有保护作用,其机制可能与抑制 TLR4 表达有关。

关键词:腺苷;脂多糖;炎症因子;肿瘤坏死因子(TNF-α);Toll 样受体 4(TLR4)

中图分类号:R 972 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2013)10-1460-03 DOI:10.11847/zgggws2013-29-10-18

Effects of adenosine on lipopolysaccharide induced myocardial cell hypertrophy in neonatal rats

YANG Li-ru*, YANG Yu-hong, LIANG Ling-jun, et al (* Department of Pharmacology, Liaoning Medical College, Jinzhou, Liaoning Province 121000, China)

Abstract; Objective To investigate the effects and mechanism of adenosine (ADO) on lipopolysaccharide (LPS)-induced neonatal rat cardiomyocyte hypertrophy. **Methods** The hypertrophy of primary cardiac cells of neonatal rat was induced by 1 mg/L LPS and the effect of different concentrations of adenosine on cardiac hypertrophy was observed. The size of cardiomyocytes was measured with a computer photograph analysis system and the expression of atrial natriuretic peptide mRNA was determined by reverse transcription PCR. Toll like receptor 4 (TLR4) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were determined with western blot and enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Adenosine inhibited lipopolysaccharide-induced cardiac hypertrophy, with the decreased volume of 15.6%, 27.1%, and 32.8% for low, moderate, and high ADO treatment compared with that of model group (P<0.05 for all). The expression of atrial natriuretic peptide mRNA also decreased (P<0.01). ADO treatment abolished the inflammatory response induced by LPS, which was partially via attenuating TLR 4 signal pathway (P<0.05). The TNF-α decreased obviously by 56.3%, 67.8%, and 72.9% at ADO doses of 0.25, 1.00, and 4.00 mg/L (P<0.01 for all). **Conclusion** Adenosine has a protective effect on LPS-induced cardiac hypertrophy. The mechanism may be related to the inhibition of TLR 4.

* 基金项目:辽宁省科技计划项目(2009225010-40);辽宁省教育厅创新团队项目(2009T064)

作者单位:1. 辽宁医学院药理学教研室,辽宁 锦州 121001; 2. 盘锦市中心医院

作者简介:杨丽儒(1968-),女,辽宁营口人,主任医师,硕士,研究方向:心血管药理学。

通讯作者:杨育红, E-mail: jzwangpeixun@163.com