

槐耳清膏抑制人前列腺癌 PC3 细胞增殖和侵袭作用及其机制研究

杨爱琳^{1,2}, 胡仲冬^{1*}, 屠鹏飞^{1*}

(1. 北京中医药大学 中药现代研究中心, 北京 100029;

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 该研究探讨槐耳清膏对人前列腺癌 PC3 细胞增殖和侵袭的抑制作用及其相关分子机制。采用 CCK-8 法检测槐耳清膏对 PC3 细胞的增殖抑制作用。采用流式细胞术分析槐耳清膏给药后 PC3 细胞凋亡及细胞周期的变化。采用细胞划痕实验及 Transwell 侵袭实验分析给药后 PC3 细胞侵袭与迁移能力的变化。通过 Western blot 法, 检测槐耳清膏给药后与侵袭迁移相关的 EMT 蛋白标志物表达水平的变化及 MAPK 信号通路中关键蛋白磷酸化水平的变化。结果显示, 槐耳清膏可以明显抑制人前列腺癌 PC3 细胞的增殖。槐耳清膏 $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用于 PC3 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率较对照组明显升高, 且细胞发生明显的 S 期阻滞。槐耳清膏给药后可以明显降低 PC3 细胞的侵袭与迁移能力, 并且能够下调 N-cadherin 和 TCF8/ZEB1 的表达水平和上调 E-cadherin 的蛋白表达水平, 表明槐耳清膏能够促进 PC3 细胞 MET 的发生, 同时还发现 MAPK 信号通路中的关键蛋白 JNK 和 ERK 的磷酸化水平明显下降。因此, 槐耳清膏能够抑制人前列腺癌 PC3 细胞增殖和迁移侵袭能力, 这可能与调控 EMT 及抑制 MAPK 信号通路有关。

[关键词] 槐耳清膏; 前列腺癌; 增殖; 侵袭; MAPK 信号通路

Study on effect and mechanism of Huaier aqueous extract on growth and invasion of human prostate cancer PC3 cells

YANG Ai-lin^{1,2}, HU Zhong-dong^{1*}, TU Peng-fei^{1*}

(1. *Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;*

2. *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China*)

[Abstract] The purpose of this study was to investigate the effect and mechanism of Huaier aqueous extract on growth and invasion of human prostate cancer PC3 cells. CCK-8 assay was used to evaluate the inhibitory effect of Huaier aqueous extract on proliferation of PC3 cells. The effects of Huaier aqueous extract on cell cycle and apoptosis of PC3 cells were analyzed by flow cytometry. Moreover, wound healing assay and Transwell assay were performed to determine the effect of Huaier aqueous extract on invasion and migration abilities of PC3 cells. PC3 cells treated with Huaier aqueous extract were subjected to western blotting for protein levels of EMT markers and phosphorylation levels of key proteins in MAPK pathway. Results revealed that Huaier aqueous extract significantly inhibited the proliferation of PC3 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. Huaier aqueous extract dramatically increased the apoptosis rate and induced S-phase arrest in PC3 cells. Furthermore, Huaier suppressed invasion and migration abilities of PC3 cells, and facilitated MET process of PC3 cells via down-regulation of N-cadherin and TCF8/ZEB1 and up-regulation of E-cadherin. In addition, Huaier reduced the phosphorylation of JNK and ERK. Therefore, the regulatory effects of Huaier on EMT and MAPK pathway may be responsible for the suppressive effect of Huaier on growth and invasion of PC3 cells.

[收稿日期] 2016-04-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81403147);北京中医药大学基本科研业务费项目(2015-JYB-XYQ-004)

[通信作者] * 胡仲冬, 助理研究员, 主要从事中药活性成分抗肿瘤作用研究, Tel/Fax: (010) 64286180, E-mail: huzhongdong@126.com; * 屠鹏飞, 教授, 主要从事中药活性成分与新药开发研究, Tel: (010)82802750, E-mail: pengfeitu@163.com

[Key words] Huaier aqueous extract; prostate cancer; proliferation; invasion; MAPK signaling pathway

doi:10.4268/cjmm20161422

前列腺癌是全球范围内男性第二位最常见的癌症,其发病率已占我国男性泌尿系统肿瘤之首^[1]。化疗药物治疗、激素治疗等成为主要的治疗手段,然而较大的细胞毒性、抗药性及高成本等缺点紧随其来,越来越多的目光转向了低毒性、多靶点、疗效良好的天然药物上来。

槐耳^[2]为多孔菌科真菌槐栓菌 *Trametes robinio-phila* Murr. 的干燥子实体。槐耳作为一种传统中药,在中国已有 1 600 余年的应用历史,其单味药物、提取物以及用于癌症辅助治疗的槐耳颗粒在近年来都受到学者们的广泛关注,基础研究以及临床应用已经证实了其具有良好的抗癌效果。本研究采用 CCK-8 法,流式细胞术,Western blot 及细胞划痕与 Transwell 侵袭实验,研究槐耳清膏对人前列腺癌 PC3 细胞的作用及相关机制,以期对槐耳抗前列腺癌作用深入研究和临床应用提供参考。

1 材料与方

1.1 药物与试剂 槐耳清膏来自于江苏盖天力药业有限公司,溶于 F-12K 完全培养基中配成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤除菌待用。人前列腺癌细胞系 PC3 细胞购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。F-12K 基础培养基,胎牛血清,青霉素-链霉素混合液, 0.25% 胰蛋白酶-EDTA, Matrigel 胶, Transwell 小室均购于美国 Corning 公司; CCK-8 细胞增殖和毒性检测试剂盒购于日本同仁化学研究所;流式凋亡检测试剂盒购于美国 BD 公司;细胞周期检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; β -actin 购于美国 Abgent 公司; ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, E-cadherin, N-cadherin, TCF8/ZEB1 购于美国 CST 公司; HRP-标记的羊抗鼠/兔购于 Santa Cruz 公司; $4\% \sim 12\%$ Bis-Tris Nu-PAGE 凝胶购于美国 Invitrogen 公司; SuperECL Plus 超敏发光液购自北京普利莱基因技术公司。

1.2 细胞培养 人前列腺癌细胞系 PC3 细胞用 F12K 完全培养基培养(含有 10% 的 FBS, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素)。细胞培养条件为 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$, 饱和湿度培养。

1.3 CCK-8 细胞增殖毒性试验 取对数期生长的细胞制备细胞悬液,调整细胞数量为 3.5×10^4 个/

mL,加入 96 孔板,每孔 $100 \mu\text{L}$ 。细胞培养 24 h 使其完全贴壁,将槐耳清膏用完全培养基稀释成不同浓度的工作液,每个浓度设置 5 个复孔。分别于加药后 24, 48, 72 h 后,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 试剂,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 作用 2 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,计算细胞存活率。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 PC3 细胞以适当浓度接种在 6 孔板中,过夜贴壁后,分别加入终浓度为 $0, 4, 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的槐耳清膏,培养 48 h,按 Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒方法操作进行,运用流式细胞仪分析,计算细胞凋亡率。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期 PC3 细胞以适当浓度接种在 6 孔板中,过夜贴壁后,分别加入终浓度为 $0, 8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的槐耳清膏,培养 48 h,按细胞周期检测试剂盒方法操作进行,运用流式细胞仪分析。

1.6 细胞划痕试验 PC3 细胞接种在 12 孔板中,待细胞处于亚融合状态时,换用无血清的 F-12K 培养基饥饿培养 12 h。用 $10 \mu\text{L}$ 的白色枪头垂直轻柔划痕。 $1 \times \text{PBS}$ 清洗因划痕而飘起的细胞碎片,拍照,作为加药前的空白对照。分别用不含血清的基础培养基将槐耳清膏稀释成 $0, 2, 4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的工作液,给药,划痕后 24, 48 h 于相差显微镜下观察拍照,评价细胞迁移能力的大小。

1.7 细胞侵袭试验 取对数生长期的 PC3 细胞,更换培养液为无血清的培养液饥饿 12 h,以减少血清的干扰。将 Transwell 小室置于 24 孔板中,将 Matrigel 胶与细胞培养基按 $1:12$ 混匀。取 $60 \mu\text{L}$ 均匀铺到 Transwell 小室的上室中,将铺好 Matrigel 胶的小室放在细胞培养箱中 4 h,使胶凝固。将细胞消化,用无血清培养基悬浮,细胞计数板计数,下室加入含 10% FBS 的完全培养基 $750 \mu\text{L}$,上室加入 $200 \mu\text{L}$ 含药无血清培养基混匀的细胞悬液。于细胞培养箱内培养 36 h 后,用棉签擦掉上室细胞,多聚甲醛透化 4 min,甲醇固定 15 min,结晶紫染色 10 min 后用 PBS 冲洗小室,将染料去除,显微镜下取样,拍照。

1.8 Western blot 法 细胞用 $1 \times \text{PBS}$ 洗 2 遍,加入适量裂解液,将细胞和裂解液刮入 1.5 mL EP 管中, $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 煮沸 10 min,稍离心。取 15 孔 $4\% \sim 12\%$ Bis-

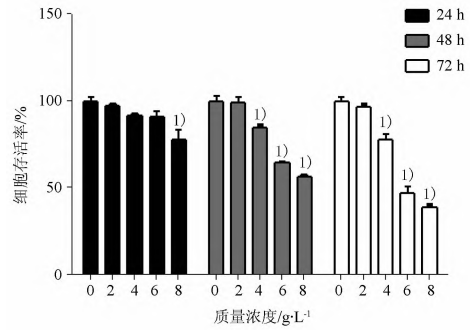
Tris Nu-PAGE 凝胶,蛋白样品上样量为 15 $\mu\text{L}/\text{孔}$,电泳,转膜,5%脱脂奶粉(TBST 稀释)室温轻摇封闭 1 h,用相应一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,1 \times TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,HRP 标记二抗室温孵育 2 h,1 \times TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,曝光、显影。

1.9 统计学分析 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,各组之间的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槐耳清膏能够抑制人前列腺癌 PC3 细胞的增殖 采用 CCK-8 法分别测定了 0 ~ 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度下的槐耳清膏对人前列腺癌细胞系 PC3 的增殖活性的影响,结果见图 1,随着槐耳清膏浓度的增加以及时间的延长,增殖抑制率越来越大。槐耳清膏作用 PC3 细胞 72 h,其 IC_{50} 为 6.6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 槐耳清膏能够促进人前列腺癌 PC3 细胞的凋亡 PC3 细胞经 0,4,8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的槐耳清膏处理 48 h



与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ (图 2 ~ 4 同)。

图 1 槐耳清膏对 PC3 细胞增殖的影响

Fig. 1 The effects of Huaier on proliferation of PC3 cells

后,经 Annexin V-FITC/PI 染色,利用流式细胞仪可分析细胞凋亡率。左下象限为活细胞,右下象限为早期凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡细胞,左上象限为坏死细胞。结果见图 2,8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 槐耳清膏作用 48 h 后,PC3 细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$),细胞凋亡率与剂量成正相关。

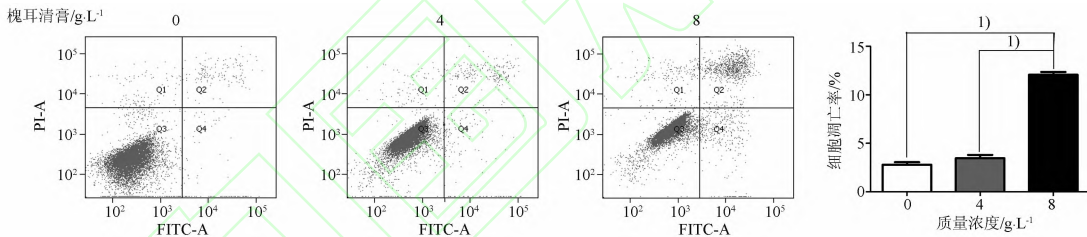


图 2 槐耳清膏对 PC3 细胞凋亡的影响

Fig. 2 The effects of Huaier on apoptosis of PC3 cells

2.3 槐耳清膏能够诱导人前列腺癌 PC3 细胞发生 S 期阻滞 结果见图 3,槐耳清膏 8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用于 PC3 细胞 48 h 后,S 期细胞比例从 (16.92 \pm 1.47)%

上升到 (28.11 \pm 1.79)%, G_1 期细胞比例从 (54.67 \pm 2.42)% 下降到 (41.25 \pm 0.71)%,细胞发生明显的 S 期阻滞。

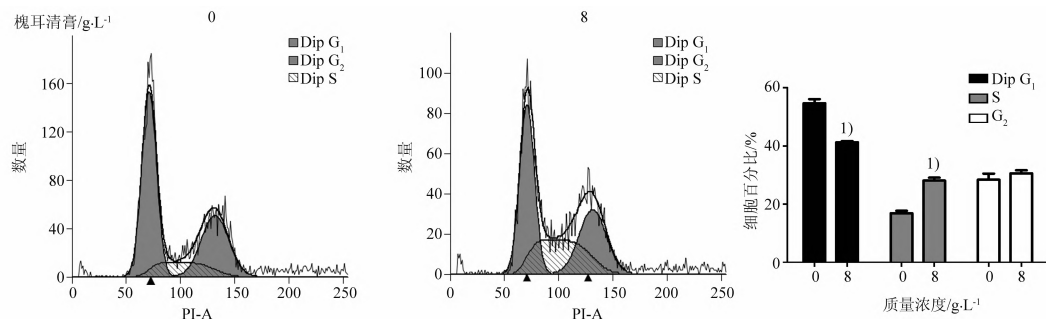


图 3 槐耳清膏对 PC3 细胞周期的影响

Fig. 3 The effects of Huaier on cell-cycle distribution of PC3 cells

2.4 槐耳清膏能够抑制人前列腺癌 PC3 细胞的迁移 细胞划痕实验被用来评价细胞体外的迁移能力。0,2,4 g · L⁻¹的槐耳清膏作用 PC3 细胞并在 24,48 h 分别观察其对 PC3 细胞体外迁移能力的影

响。结果见图 4,随着药物浓度的升高,PC3 细胞划痕愈合减弱,2,4 g · L⁻¹槐耳清膏作用 48 h 后,迁移抑制率分别为 (63.93 ± 2.83)%, (87.94 ± 2.27)%。

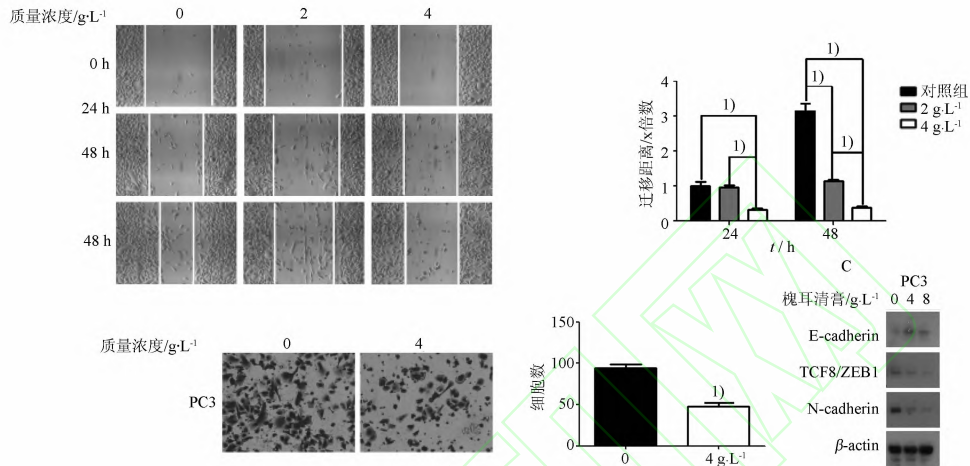


图 4 槐耳清膏对 PC3 细胞迁移侵袭能力的影响

Fig. 4 The effects of Huaier on migration and invasion capability of PC3 cells

2.5 槐耳清膏能够抑制人前列腺癌 PC3 细胞的侵袭 Transwell 细胞侵袭实验被用来评价细胞体外的侵袭能力。0,4 g · L⁻¹槐耳清膏体外作用 36 h 观察其对 PC3 细胞体外侵袭能力的影响。结果见图 4,4 g · L⁻¹槐耳清膏作用 36 h 之后染色拍照,与对照组相比,槐耳清膏作用后穿越过小室的细胞数目下降,显示槐耳清膏对 PC3 细胞的侵袭具有较好的抑制作用。

生物学过程中扮演着重要的角色,例如细胞生长及转移等。本研究对 MAPK 信号通路中的几个关键蛋白的表达进行了检测。结果见图 5,在 PC3 细胞中 ERK 和 JNK 的磷酸化水平随着槐耳清膏给药浓度的上升而下调,显示在人前列腺癌 PC3 细胞中槐耳清膏能够抑制 MAPK 信号通路。

2.6 槐耳清膏能够抑制人前列腺癌 PC3 细胞的 EMT 进程 上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在肿瘤的发展中起到关键作用,提高了肿瘤细胞的转移能力^[3]。0,4,8 g · L⁻¹槐耳清膏作用于 PC3 细胞 48 h 后,对 EMT 的蛋白标志物进行了检测。结果见图 4,在 PC3 细胞中,随着给药浓度的升高,上皮标志物 E-cadherin^[4] 的表达水平显著上调,间质标志物 TCF8/ZEB1 和 N-cadherin^[5-6] 的蛋白表达水平显著下调。

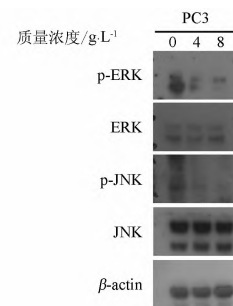


图 5 槐耳清膏对 PC3 细胞中 MAPK 信号通路的影响

Fig. 5 The effects of Huaier on MAPK pathway in PC3 cells

2.7 槐耳清膏能够抑制人前列腺癌 PC3 细胞中 MAPK 信号通路 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 包括 c-Jun N-末端激酶 (JNK)、丝裂原激活蛋白激酶 p38 以及细胞外调节激酶 (ERK)^[7]。MAPK 信号通路在多种细胞

3 讨论

槐耳作为在中国已应用了 1 600 余年的传统中药,因具有较好的疗效、低毒及多靶点等多方面的优点,已经受到了越来越多临床和基础研究的关注。

抑制肿瘤细胞增殖及诱导其凋亡可以达到治疗

肿瘤的目的^[8]。本研究发现槐耳清膏可以呈时间与浓度依赖性的抑制人前列腺癌 PC3 细胞的增殖。通过流式细胞术检测发现其可以显著增加 PC3 细胞中 Annexin V-FITC/PI 双阳性细胞个数,这种 PS 外翻是细胞调亡的经典特征^[9]。另外,经槐耳清膏作用后,S 期的细胞比例明显升高,细胞发生 S 期阻滞。

肿瘤转移是一个多个环节参与的连续复杂的过程,有许多与癌症相关的死亡都与肿瘤转移有着密不可分的关系^[10]。通过划痕实验表明槐耳清膏能够抑制 PC3 细胞的迁移能力。细胞的侵袭能力可以通过一定时间内穿过基底膜基质的细胞数量来评价,实验结果表明槐耳清膏同样可以较为明显的抑制 PC3 细胞的侵袭能力。上皮-间质转化(EMT)是静态上皮细胞丧失细胞间连接,失去极性,逐渐形成可移动性的间质细胞的过程,细胞转移能力因此而增强,此为肿瘤进展中的关键步骤^[3]。本研究发现槐耳清膏能够上调 PC3 细胞中的上皮标志物 E-cadherin 的表达,而且能够下调间质标志物 TCF8/ZEB1 和 N-cadherin 的表达,从而显示槐耳清膏能够减缓 EMT 的进程,在一定程度上解释了槐耳清膏对 PC3 细胞转移能力的抑制作用。

MAPK 信号通路控制着细胞的生长及转移等重要的生物学过程,此通路的异常活化加快了肿瘤的发生发展^[11]。本研究发现随着槐耳清膏给药浓度的上升,JNK 及 ERK 的磷酸化水平在 PC3 细胞中呈浓度依赖性的下调,总蛋白水平基本不变。因此,槐耳清膏可能通过抑制 MAPK 信号通路发挥抗前列腺癌作用。

综上所述,槐耳清膏能够抑制人前列腺癌 PC3

细胞的生长和转移能力,这可能是通过抑制 EMT 进程及 MAPK 信号通路来实现的,本研究为槐耳清膏治疗前列腺癌奠定了一定的理论和实验基础。

[参考文献]

- [1] 韩苏军,张思维,陈万青,等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析[J]. 临床肿瘤学杂志,2013,18(4): 330.
- [2] 杨爱琳,胡仲冬,屠鹏飞. 槐耳抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(24): 4805.
- [3] Alderton G K. Tumour suppression: to EMT or not to EMT? [J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(4): 199.
- [4] 王浩,顾劲扬,丁义涛. 上皮间质转化的分子标志物研究进展[J]. 中华实验外科杂志,2013,30(8):1781.
- [5] 潘漪莲. 上皮细胞间质转化与肿瘤[J]. 国际肿瘤学杂志,2010,37(5):348.
- [6] 张慧君,朱军,刘鸿程,等. 上皮间质转化在肿瘤侵袭转移中的研究进展[J]. 生命科学,2009,21(4):556.
- [7] Gopalakrishnan A, Xu C J, Nair S S, et al. Modulation of activator protein-1 (AP-1) and MAPK pathway by flavonoids in human prostate cancer PC3 cells[J]. Arch Pharm Res, 2006, 29(8):633.
- [8] Kang M, Ho J N, Kook H R, et al. Theracurmin® efficiently inhibits the growth of human prostate and bladder cancer cells via induction of apoptotic cell death and cell cycle arrest[J]. Oncol Rep, 2016, 35(3):1463.
- [9] Van Engeland M, Nieland L J W, Ramaekers F C S, et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure[J]. Cytometry, 1998, 31(1):1.
- [10] Kai F B, Laklai H, Weaver V. Force matters: biomechanical regulation of cell invasion and migration in disease[J]. Trends Cell Biol,2016,7(3):1.
- [11] Corazao-Rozas P, Guerreschi P, André F, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to mapk inhibitors[J]. Oncotarget,2016,5(1): 1.

[责任编辑 马超一]