

壁虎醇提物体外诱导人前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及机制研究

宋佳玉¹, 游颜杰¹, 王建刚²

(1. 河南漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002;
2. 河南科技大学医学院, 河南 洛阳 471003)

[摘要] **目的:**研究壁虎醇提物(GAE)体外诱导激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞凋亡作用及其可能机制,为激素非依赖性前列腺癌的治疗提供理论依据。**方法:**以前列腺癌 PC-3 细胞为研究对象,MTT 法检测 3.5,4.0,4.5,5.0,5.5 g·L⁻¹ GAE 作用细胞 24,48,72 h 后对激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞增殖抑制作用;3.5,4.0,5.0 g·L⁻¹ 的 GAE 作用 48 h 后,另设空白组,Hoechst33342 荧光染色法,AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡,SP 免疫组化法检测细胞内半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase 3) 和 Fas 的表达情况并做统计学处理。**结果:**3.5,4.0,4.5,5.0,5.5 g·L⁻¹ GAE 作用细胞 24,48,72 h 后能显著抑制 PC-3 细胞的生长且呈剂量和时间依赖性;与空白组比较,3.5,4.0,5.0 g·L⁻¹ 的 GAE 作用 48 h 后 Hoechst33342 荧光染色发现部分 PC-3 细胞发生典型的凋亡形态学改变;Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测显示 3.5,4.0,5.0 g·L⁻¹ 的 GAE 作用 48 h 后,早期凋亡细胞分别占 6.51%,12.48% 和 22.81%,且免疫组化显示细胞内蛋白 Caspase-3 和 Fas 的表达均上调且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。**结论:**GAE 能够诱导激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞凋亡,其作用机制可能与死亡受体介导的信号通路有关。

[关键词] 壁虎醇提物; PC-3 细胞; 凋亡; Fas; 半胱氨酸蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0137-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016040137

Alcohol Extract from Gecko Induces Prostate Cancer Cell Line PC-3 Apoptosis *in Vitro* and Possible Mechanism

SONG Jia-yu¹, YOU Yan-jie¹, WANG Jian-gang²

(1. Henan Luohe Medical College, Luohe 462002, China;

2. Medical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the possible mechanism of the alcohol extract from gecko (GAE) on inducing prostate cancer cell line PC-3 apoptosis and provide theoretical foundation for the therapy of hormone independent prostate cancer. **Method:** The drug was extracted from gecko by alcohol. MTT assay was used to detect the growth inhibition effects of GAE on PC-3 cells of AIPC. With prostate cancer (PC) -3 cells as the research object, MTT method was used to detect the inhibition effect of 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 g·L⁻¹ GAE after 24, 48 and 72 h on hormone dependence after prostate cancer (PC) -3 cell proliferation; after 48h treatment by 3.5, 4.0, 5.0 g·L⁻¹ GAE, a blank group was established. Apoptosis-inducing effect was detected by Hoechst 33342 staining and Annexin V-FITC/PI double stained flow cytometry. The protein expression of Caspase-3 and Fas in PC-3 cells was measured by SP immunohistochemistry assay. **Result:** The proliferation of PC-3 cells treated with GAE (3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 g·L⁻¹) for 24, 48, 72 h, respectively, was significantly inhibited in dose-and time-dependent manner. Compared with the blank group, after 48 h treatment by 3.5, 4.0, 5.0 g·L⁻¹ GAE,

[收稿日期] 20141105(004)

[基金项目] 河南省医学科技攻关计划项目(200903109)

[第一作者] 宋佳玉, 硕士, 讲师, 从事肿瘤药理研究, Tel: 15039597276, E-mail: 2007songjiayu@163.com

typical apoptotic morphological changes were found in part of PC-3 cells by Hoechst 33342 staining. Annexin V-FITC/PI double stained flow cytometry showed that the early apoptotic cells account for 6.51%, 12.48% and 22.81% respectively after 48 h treatment by 3.5, 4.0, 5.0 g·L⁻¹ GAE. Immunohistochemistry assay showed that the protein expression of Caspase-3 and Fas was increased in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$).

Conclusion: GAE can induce prostate cancer cell line PC-3 apoptosis and the mechanism of action may be associated with the signal pathway mediated by death receptor.

[**Key words**] alcohol extract from gecko; PC-3 cells; apoptosis; Fas; cysteine protease

前列腺癌是老年男性泌尿生殖系统常见恶性肿瘤,美国男性肿瘤患者中前列腺癌发病率最高,致死率仅次于肺癌^[1]。中国前列腺癌的发病率目前虽然比较低,但是发达地区前列腺癌发病率增长趋势非常明显^[2]。早期前列腺癌以雄激素依赖性细胞为主,随着内分泌治疗的深入,雄激素依赖性细胞大部分很快凋亡,雄激素非依赖性细胞成为前列腺癌的主要细胞类型^[3]。鉴于雄激素依赖性前列腺癌转化为雄激素非依赖性前列腺癌的机制未明,且雄激素非依赖性前列腺癌对内分泌治疗、放疗化疗等均不敏感^[3],故寻找有效治疗方法具有重要意义。

壁虎又名蝎虎、天龙、守宫,是我国传统治疗肿瘤的中药材,大量临床和基础研究显示其确有抗肿瘤作用^[4-6]。本课题组前期实验证实中药壁虎醇提取物(GAE)能显著抑制 S180 肉瘤生长且对免疫功能无明显影响,其抗肿瘤作用可能与抑制血管生成有关^[7]。但目前壁虎是否对雄激素非依赖型前列腺癌有效、机制如何尚未见报道,作者进行了相关研究。

1 材料

1.1 细胞 前列腺癌 PC-3 细胞系由郑州大学医学院开放实验室惠赠。

1.2 药物及试剂 干无蹼壁虎(安徽省亳州市永刚饮片有限公司,批号 090301),RPMI1640 培养液、胎牛血清(美国 Gibco 公司),二甲亚砜(DMSO)和 MTT 粉剂(美国 Sigma 公司);Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒(南京凯基生物公司),即用型兔抗人半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)多克隆抗体、即用型兔抗人 Fas 多克隆抗体、SP 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 仪器 XSZ-D2 型倒置显微镜(重庆光学仪器厂),ZS 型板式酶标仪(中国科学院生物物理所),86-3 型超声仪(上海超声波仪器厂),超净工作台 SP-DJ-2B 型(浙江省金坛市荣华仪器制造有限公司),AL104 型电子天平(上海有限公司),BI-2000 型生物医学图像分析系统(成都泰盟公司)。

2 方法

2.1 GAE 的制备及药物配制 干无蹼壁虎 1 000 g 粉碎为粗粉,4 000 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)浸泡过夜,超声细胞破碎 30 min,超低温离心机离心(11 000 r·min⁻¹, 20 min, 4 ℃)取上清,加入无水乙醇使其终浓度为 55%,4 ℃放置并 30 min 搅拌一次,4 h 后离心(11 000 r·min⁻¹, 20 min, 4 ℃),取上清液,真空旋转蒸发(55 ℃)回收乙醇,浓缩液冷冻干燥得壁虎醇提取物,-20 ℃保存。实验前用 RPMI 1640 培养液稀释成所需浓度,0.22 μm 滤膜过滤后使用。

2.2 细胞培养 将超低温冰箱冻存的人前列腺癌细胞株 PC-3 迅速放于 37 ℃水浴锅中使其在 1 min 内溶化,复苏后加 RPMI 1640 培养+10%胎牛血清于培养瓶,置 37 ℃,5% CO₂,95%湿度的培养箱,视情况 2~3 d 传代 1 次,实验时选取对数生长期细胞进行。

2.3 MTT 法测定 GAE 对前列腺癌细胞 PC-3 的增殖抑制作用 取对数生长期的细胞,制成密度为 1×10⁴ 个/mL 单细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100 μL。培养 24 h 待细胞贴壁后加药,设空白组和 GAE 浓度梯度组,每组 5 个复孔。分别培养 24,48,72 h,每孔加入 MTT(5 mg·L⁻¹)20 μL,孵育 4 h 终止培养,小心弃上清,每孔加 DMSO 150 μL,摇床振荡 10 min,酶标仪 490 nm 测吸光度 A。

$$\text{抑制率} = \left[\frac{(\text{平均 } A_{\text{空白组}} - \text{平均 } A_{\text{实验组}})}{\text{平均 } A_{\text{空白组}}} \right] \times 100\%$$

2.4 Hoechst33342 荧光染色观察细胞凋亡 取洁净盖玻片 70%乙醇中浸泡 5 min,PBS 洗涤 3 遍,细胞培养液洗涤 1 遍,置 6 孔板。种植 1×10⁵ 个/mL 细胞悬液培养 1 mL 过夜,加不同浓度的 GAE 诱导细胞凋亡 24 h,弃培养液,PBS 洗涤,4%多聚甲醛固定 10 min。去固定液,PBS 洗 2 遍,加入终浓度为 20 mg·L⁻¹ 的 Hoechst 染色液,染色 30 min,手动晃动数次,PBS 洗两遍。置盖玻片盖于载玻片,荧光显微镜下凋亡细胞并计数。

细胞凋亡率 = (凋亡细胞数 / 观察细胞总数) × 100%

2.5 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测细胞凋亡率 6 孔板种植细胞, GAE 诱导细胞凋亡 72 h, 收集细胞。800 RPM 离心 7.5 min, 弃上清。预冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀, 室温避光孵育 10 min, 加入 5 μL PI 后混匀室温避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测。

2.6 免疫细胞化学染色检测 Caspase-3, Fas 蛋白表达情况 细胞爬片, 不同浓度的 GAE 诱导细胞凋亡 72 h。PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛固定 10 min。取出盖玻片, 按照说明书 SP 法免疫化学染色, DAB 显色, 苏木素复染。在胞浆或胞膜出现棕色颗粒为

Caspase-3, Fas 阳性表达。每张爬片随机选取 6 个不同部位, 显微镜下拍照, 应用生物学图像分析系统对免疫组化阳性细胞进行分析, 测定阳性细胞的平均光密度值。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计分析软件分析, 计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行 *t* 检验及方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肿瘤细胞的增殖抑制作用 浓度 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 g·L⁻¹ 的 GAE 分别作用于人前列腺癌 PC-3 细胞 24, 48, 72 h, PC-3 细胞的增殖受到不同程度的抑制, 抑瘤率随药物浓度、作用时间的增加而增大, 呈一定剂量依赖性和时间依赖性。见表 1。

表 1 GAE 对前列腺癌 PC-3 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effects of GAE on proliferation inhibition in prostate cancer PC-3 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

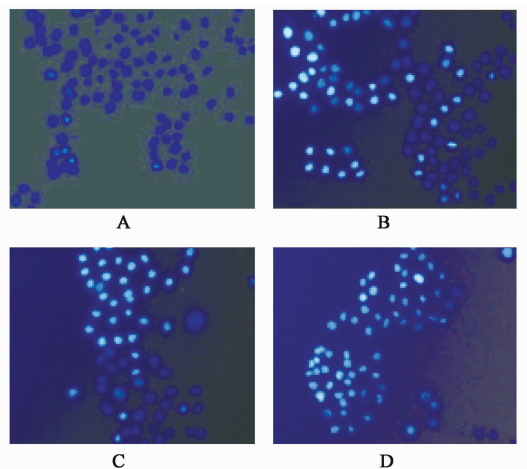
组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	24 h		48 h		72 h	
		A	抑瘤率/%	A	抑瘤率/%	A	抑瘤率/%
空白	-	0.08 ± 0.04	-	0.16 ± 0.01	-	0.40 ± 0.01	-
GAE	3.5	0.32 ± 0.03	-	0.14 ± 0.02 ¹⁾	10.2	0.18 ± 0.02 ²⁾	54.6
	4.0	0.18 ± 0.03	-	0.11 ± 0.01 ¹⁾	31.1	0.17 ± 0.02 ²⁾	56.8
	4.5	0.09 ± 0.02	-	0.10 ± 0.01 ²⁾	33.9	0.14 ± 0.03 ²⁾	63.9
	5.0	0.06 ± 0.03 ¹⁾	22.1	0.08 ± 0.01 ²⁾	47.6	0.02 ± 0.01 ²⁾	95.1
	5.5	0.04 ± 0.03 ²⁾	49.2	0.03 ± 0.01 ²⁾	79.6	0.02 ± 0.01 ²⁾	95.5

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的影响 不同质量浓度的 GAE 作用 PC-3 细胞 48 h 后, 空白组细胞核呈圆形或椭圆形, 疏松均匀, 蓝色荧光。实验组细胞部分发生典型的凋亡形态学改变, 胞核缩小, 出现核分叶, 呈不规则新月形或球形, 呈高亮蓝色荧光。见图 1。

3.3 对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡率的影响 3.5, 4.0, 5.0 g·L⁻¹ 的 GAE 作用 PC-3 细胞 48 h 后早期细胞凋亡 (FITC⁺PI⁻) 分别为 6.51%, 12.48% 和 22.81% ($P < 0.01$), 细胞总死亡率 (FITC⁺PI⁻ 与 FITC⁺PI⁺ 之和) 分别为 14.65%, 21.95% 和 40.17%。空白组早期凋亡细胞和总死亡细胞分别为 1.51% 与 2.46%, 各加药组与空白组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。见图 2。

3.4 对 Caspase-3, Fas 蛋白表达的影响 免疫组化结果显示, 3.5, 4.0, 5.0 g·L⁻¹ 的 GAE 作用 PC-3 细胞 48 h 后, 与空白组相比, GAE 组细胞在胞浆或胞膜中出现棕色颗粒且随着药物浓度增加, 其颜色加



A. 空白组; B. GAE 3.5 g·L⁻¹ 组; C. GAE 4.0 g·L⁻¹ 组; D. GAE 5.0 g·L⁻¹ 组 (图 2 同)

图 1 GAE 对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig.1 Effects of GAE on apoptosis in prostate cancer PC-3 cells (IF, ×400)

深、颗粒增大。行图文分析结果见表 2, 各组表达差别有统计学意义 ($P < 0.05$)。

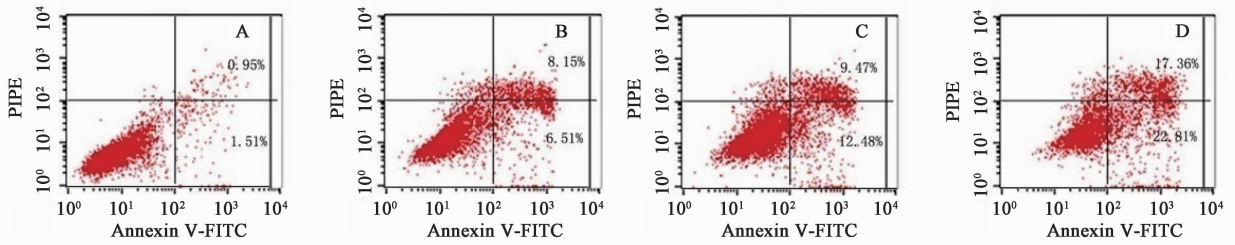


图 2 GAE 对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡率的影响

Fig. 2 Effects of GAE on apoptosis rate in prostate cancer PC-3 cells

表 2 GAE 对 PC-3 细胞 Caspase-3, Fas 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effects of GAE on expression of Caspase-3, Fas protein in prostate cancer PC-3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	Caspase-3	Fas
空白	-	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01
GAE	3.5	0.18 ± 0.01 ¹⁾	0.20 ± 0.01 ¹⁾
	4.0	0.22 ± 0.01 ¹⁾	0.22 ± 0.01 ¹⁾
	5.0	0.25 ± 0.01 ¹⁾	0.27 ± 0.02 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

壁虎又名蝎虎、天龙、守宫,是我国传统的治疗肿瘤的中药材,《四川中药志》关于其功效有“驱风,破血积包快,治肿瘤”的记载。临床报道证明,它对许多病症疗效确切,而且毒性甚小,特别对瘰疬癌肿等方面有独特的疗效,是一味重要的抗癌动物药^[8]。考虑壁虎对多种实体肿瘤良好的治疗作用,但对激素非依赖性前列腺癌的疗效如何尚无报道,作者进行了相关研究。MTT 法显示 GAE 体外可以显著抑制激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞的增殖,最高达 95.5% 且有浓度和时间依赖性。Hoechst33342 荧光染色和 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪检测结果显示 GAE 体外可诱导 PC-3 细胞发生不同程度的凋亡。故 GAE 可能是通过诱导 PC-3 细胞凋亡从而达到抗肿瘤作用。

细胞凋亡 (apoptosis), 又称程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD), 指细胞在凋亡因子刺激下启动内部机制而引发主动死亡过程^[9]。与机体的发育,生理功能的发挥,疾病的发生发展有密切联系,同时凋亡的发生需要多种因素的参与和密切调控。细胞凋亡大多数通过含半胱氨酸的天冬氨酸酶 (Caspase) 介导的信号途径完成, Caspase 家族在介导细胞凋亡的启动和执行过程中起着非常重要的作用^[10]。其中 Caspase-3 作为凋亡过程中的关键效应分子,它在激活后可以切割胞内底物,破坏细胞代

谢和结构,导致出现典型的凋亡现象^[11]。本研究把 Caspase-3 作为了解 GAE 体外可诱导 PC-3 细胞凋亡分子机制的切入点,发现 Caspase-3 蛋白的表达随着药物浓度的增加而增强,说明 GAE 体外可诱导 PC-3 细胞凋亡和 Caspase-3 蛋白相关。

死亡受体介导的信号通路是 Caspase 家族介导细胞凋亡的重要信号途径之一。死亡受体介导的信号通路主要有三部分组成,上游的死亡诱导信号复合体 (death-inducing signaling complex) 和下游的 D 通道和 M 通道^[12]。当 Fas 和相应配体 (FasL) 结合后活化死亡诱导信号复合体,激活起始 Caspase-8 和 10 等,进而直接 (通过 D 通道) 或间接 (M 通道) 激活效应 Caspase-3,启动细胞凋亡^[12]。作者试验证实不同浓度的 GAE 作用 PC-3 细胞后 Fas 蛋白的表达增加,结合 Caspase-3 蛋白的表达情况,笔者推测 GAE 体外诱导激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞凋亡可能和死亡受体介导的信号通路相关。值得提出的是,在 M 通道中, Caspase-8 可活化 Bid 进而和 Bax 结合,同时 Bcl-2 可抑制 Bid 和 Bax 结合^[12]。本课题组王晓兰在用 GAE 处理人食管鳞癌 EC9706 细胞是发现与空白组比较,细胞内 Bcl-2 蛋白无明显变化,而 Bax 蛋白表达升高^[13],提示 D 通道和 M 通道均可能在壁虎醇提物诱导细胞凋亡的过程中发挥作用。

诱导肿瘤细胞凋亡是目前治疗肿瘤的主要手段之一,但目前诱导肿瘤凋亡的西药多因合并严重的副作用而限制其临床应用。从中药中提取高效低度的抗肿瘤药物已经成为国内外研发新药的重要途径,壁虎作为一味高效低度的抗肿瘤药材^[4]无疑是一个理想的药源。但壁虎成分复杂,研究表明壁虎含有组织胺类、蛋白质、氨基酸、微量元素,含维生素 C、维生素 D、脂肪、粗纤维、胡萝卜素等^[14],且目前对抗肿瘤的活性成分研究较少。笔者应用醇提的方法初步筛选了有效成分,并证明其能诱导前列腺癌细胞 PC-3 凋亡,机制和死亡受体介导的信号通路有

关,这为从壁虎中提取新药和激素非依赖前列腺癌的治疗提供了新的思路和依据。但壁虎抗肿瘤的有効成分究竟为何,是否存在抗前列腺癌的其他机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2):71-96.
[2] 叶定伟. 前列腺癌的流行病学和中国的发病趋势 [J]. 中华外科杂志, 2006, 44(6):362-364.
[3] Feldman B J, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2001(1):34-45.
[4] Liu F, Wang J G, Wang S Y. Antitumor effect and mechanism of Gecko on human esophageal carcinoma cell lines *in vitro* and xenografted sarcoma 180 in Kunming mice [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(25):3990-3996.
[5] 谢斌,高志芹,石剑飞,等. 无蹼壁虎抗肿瘤活性成分对 HepG2 细胞增殖、迁移及凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(1):101-105.
[6] 崔永玲. 金龙胶囊结合中药辨证治疗食管癌 60 例

疗效观察 [J]. 北京中医, 2006, 25(6):381-382.
[7] 宋佳玉,王建刚,张清伟,等. 壁虎醇提物对小鼠肾包膜下移植 S180 肉瘤的抑制作用 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7):1694-1695.
[8] 叶云珍. 中药壁虎的研究进展 [J]. 中药材, 2009, 32(7):1160-1163.
[9] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(6805):770-776.
[10] Robertson G S, Crocker S J, Nicholson D W, et al. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis [J]. Brain Pathol, 2000, 10(2):283-292.
[11] Olster B M, Fiskum G. Mitochondrial mechanisms of neural cell apoptosis [J]. J Neurochem, 2004, 90(6):1281-1289.
[12] Okazaki N, Asano R, Kinoshita T, et al. Simple computational models of type I/type II cells in Fas signaling-induced apoptosis [J]. J Theor Biol, 2008, 250(4):621-633.
[13] 王晓兰,王建刚,宋佳玉,等. 壁虎醇提物对人食管鳞癌细胞 EC9706 的作用和体内抗肿瘤活性 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16):2175-2179.
[14] 陈明,黄坚航. 中药壁虎现代研究进展 [J]. 世界科学技术——中药现代化, 2001, 3(4):53-56.

[责任编辑 周冰冰]

《中国实验方剂学杂志》入选“2015—2016 RCCSE 中国核心学术期刊”

由武汉大学中国科学评价研究中心(RCCSE)、武汉大学图书馆、中国科教评价网(www.nseac.com)共同研制的第4版《RCCSE 中国学术期刊评价研究报告——权威、核心学术期刊排行榜(2015—2016)》已于2015年1月13日公布,《中国实验方剂学杂志》被评定为“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”,在参评的112本中医学与中药学类期刊中综合排名第15名。

本次学术期刊评价在重点突出期刊学术影响力的同时,也注重了对期刊网络传播效率和期刊即时反应速率的考察,主要评价指标有:总被引频次、2年影响因子、即年指标、基金论文比、Web即年下载率、二次文献转载量(或国外重要数据库收录情况)和专家定性评价。参评期刊共6201种,排名前5%的“RCCSE 中国权威学术期刊”(A⁺)316种,排名前5%~20%的“RCCSE 中国核心学术期刊”(A)和排名前20%~30%的“RCCSE 中国核心学术期刊(扩展版)”(A⁻)共1572种,准核心的学术期刊1848种(B⁺),一般期刊1828(B)种,较差期刊637种(C)。

“RCCSE 中国核心学术期刊”是继“中文核心期刊(北大)”和“中国科技核心期刊”之后国内推出的又一核心期刊评价体系。