

烟管头草水提物对前列腺癌PC3细胞增殖、迁移与侵袭的影响^Δ

刘波^{1,2*}, 余佳^{1,3}, 王坤³, 晏晨⁴, 黄丽荣⁵, 骆衡^{1,3#}(1. 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室, 贵阳 550014; 2. 贵州医科大学药学院, 贵阳 550025; 3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014; 4. 安顺市人民医院药剂科, 贵州安顺 561000; 5. 贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵阳 550003)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)15-1830-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.15.07



摘要 目的:研究烟管头草水提物(AECC)对前列腺癌PC3细胞增殖、迁移与侵袭的影响。方法:将细胞分为对照组和AECC不同质量浓度组(5、10、20、40、80 μg/L),加入相应药物或培养基培养不同时间(24、48、72 h)后,检测细胞存活率。将细胞分为对照组和AECC低、中、高质量浓度组(20、40、80 μg/L),同法培养24 h后,采用Hoechst 33258染色法和流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况;采用Transwell实验检测细胞迁移数和侵袭数;采用实时荧光定量聚合酶链式反应和Western blot法检测AECC低、中质量浓度组细胞中β-连环蛋白(β-catenin)信号通路相关迁移与凋亡蛋白[β-catenin、基质金属蛋白酶7(MMP-7)、髓细胞瘤病毒致癌基因(c-Myc)、胱天蛋白酶3(caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)]的mRNA和蛋白表达水平。结果:随着给药浓度的增加和作用时间的延长,AECC不同质量浓度组细胞存活率均显著低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且呈不断降低趋势。与对照组比较,AECC各质量浓度组细胞的早期凋亡率(中质量浓度组除外),细胞迁移数和侵袭数,以及AECC低、中质量浓度组细胞中MMP-7、c-Myc(低质量浓度组除外)、Bcl-2(低质量浓度组mRNA除外)的mRNA和蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);AECC各质量浓度组细胞的晚期凋亡率,AECC低、中质量浓度组细胞中β-catenin、caspases-3(低质量浓度组除外)、Bax(低质量浓度组mRNA除外)的mRNA和蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:AECC可抑制PC3细胞的增殖、迁移与侵袭,其作用机制可能与调控β-catenin信号通路相关的迁移与凋亡因子的表达有关。

关键词 烟管头草;前列腺癌PC3细胞;β-连环蛋白;增殖;迁移;侵袭

Effects of Water Extract from *Carpesium cernuum* on Proliferation, Metastasis and Invasion of Prostate Cancer PC3 Cells

LIU Bo^{1,2}, YU Jia^{1,3}, WANG Kun³, YAN Chen⁴, HUANG Lirong⁵, LUO Heng^{1,3}(1. State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China; 2. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 3. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China; 4. Dept. of Pharmacy, Anshun Municipal People's Hospital, Guizhou Anshun 561000, China; 5. College of Food and Pharmaceutical Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China)

- duced production of nitric oxide in macrophage RAW 264.7 cells[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(12): 3785-3787.
- [14] 许莉.金钗石斛化学成分及其应用研究[D].成都:成都中医药大学,2015.
- [15] 唐蕾,吴坚,于顾然,等.益气养阴逐瘀方对LPS诱导的RAW264.7细胞炎症模型体外抗炎活性的影响[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(1):141-148.
- [16] 张赞,黄速,张慧,等.壮药玉叶金花抗炎镇痛作用的谱效关系研究[J].中国药理学通报,2020,36(6):870-874.
- [17] 刘曼,张红霞,周璐,等.受体相互作用蛋白3介导自身免疫性肝炎肝脏单核细胞来源巨噬细胞募集[J].中华消化杂志,2021,41(1):35-42.
- [18] 刘雯,刘云,刘进宝,等.基于灰色关联分析的藤茶不同极性部位在小鼠体内抗炎作用的谱-效关系研究[J].中国药房,2020,31(19):2382-2386.
- [19] 阮沛桦,邓红,傅咏梅,等.基于灰色关联度的叠鞘石斛叶抗氧化部位的筛选[J].热带作物学报,2020,41(8):1700-1707.
- [20] 安忠琦,詹伟,吴庆珊,等.金钗石斛根际可培养细菌多样性及抑菌活性研究[J].云南大学学报(自然科学版),2018,40(3):586-602.

Δ 基金项目:贵州省科技计划项目(No.黔科合支撑[2020]4Y161号, No.黔科合基础[2016]1069)

* 硕士研究生。研究方向:中药民族药活性。E-mail:liu041213207@163.com

通信作者:研究员,硕士生导师,博士。研究方向:肿瘤药理学。E-mail:luoheng@gzcnpcn

(收稿日期:2021-04-25 修回日期:2021-06-07)
(编辑:唐晓莲)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of the water extract from *Carpesium cernuum* (AECC) on the proliferation, metastasis and invasion of prostate cancer PC3 cells. METHODS: Cells were divided into control group and different concentration groups of AECC (5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/L}$), and then treated with relevant medicine or medium for different time (24, 48, 72 h). The survival rates of cells were detected. Cells were divided into control group, and AECC low, medium and high concentration groups (20, 40, 80 $\mu\text{g/L}$). After cultured for 24 h, Hoechst 33258 staining and flow cytometry were used to detect the apoptosis of cells. The number of cell metastasis and invasion were detected by Transwell assay. RT-qPCR and Western blot assay were applied to detect the mRNA and protein expression of β -catenin signaling pathway related migration and apoptosis proteins (β -catenin, MMP-7, c-Myc, caspase-3, Bcl-2 and Bax) in AECC low and medium concentration groups. RESULTS: With the increase of the concentration and culture time, the survival rates of cells in AECC different concentration groups were significantly lower than control group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and showed a decreasing trend. Compared with control group, the early apoptosis rate (except the medium concentration group) and the number of cell metastasis and invasion in AECC groups, the mRNA and protein expression of MMP-7, c-Myc (except for the low concentration group) and Bcl-2 (except for mRNA of the low concentration group) in AECC low and medium concentration groups were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). Late apoptosis rate of AECC groups, the mRNA and protein expression of β -catenin, caspases-3 (except for the low concentration group), Bax (except for mRNA of the low concentration group) in AECC low and medium concentration groups were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: AECC could inhibit the proliferation, metastasis and invasion of PC3 cells; the mechanism of which may be associated with regulating the expression of β -catenin signaling pathway related migration and apoptotic factors.

KEYWORDS *Carpesium cernuum*; Prostate cancer PC3 cells; β -catenin; Proliferation; Metastasis; Invasion

前列腺癌是发病率较高的男性恶性肿瘤之一。随着我国社会人口老龄化,前列腺癌发病率和病死率正逐年上升,严重影响男性的生活质量和生命安全^[1]。世界卫生组织统计报告显示,2020年全球范围内前列腺癌患者有141万例,死亡病例为37.5万例^[2]。前列腺癌的发展进程快、易发生转移,后期可形成去势抵抗性前列腺癌,给患者的预后和治疗带来挑战^[3]。目前,临床常用的治疗方法为雄激素剥夺疗法,其中阿比特龙、恩杂鲁胺等一线治疗用药可延长患者总生存期,但在临床上表现出明显的副作用和耐药等问题,影响其临床疗效^[4]。因此,寻求安全有效的抗前列腺癌药物具有重要意义。

烟管头草 *Carpesium cernuum* L.为菊科天名精属多年生草本植物,别名烟袋草、杓儿菜,民族药中也称为野烟叶,广泛分布于我国西南、华中等地,常药用其秋季采摘的干燥全草^[5]。烟管头草味辛,具有清热解毒、破瘀止血、消肿止痛等功效,主要用于治疗感冒发热、牙痛、咽喉肿痛、尿路感染、淋巴结核、皮肤瘙痒、毒蛇咬伤、血淋、乳腺炎等病症^[6-7]。贵州省土家族地区的中医常将烟管头草以水煎煮,用于治疗前列腺癌、乳腺癌、胃癌、直肠癌、肺癌、肝癌等多种癌症,且均具有一定疗效^[8]。本课题组前期研究发现,烟管头草水提物(以下简称“AECC”)对抗前列腺增生细胞具有显著的抑制作用^[9],但其对前列腺癌细胞的增殖、迁移与侵袭的影响及作用机制并不明确。

肿瘤细胞的黏附能力是影响前列腺癌增殖、侵袭与迁移的重要因素,其中 β -连环蛋白(β -catenin)是肿瘤细胞中一类重要的黏附分子,其可抑制迁移相关蛋白基质金属蛋白酶7(MMP-7)和骨髓瘤病毒癌基因(*c-Myc*)的

表达,从而促进胱天蛋白酶3(caspases-3)和B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)等凋亡蛋白的表达,进而抑制细胞增殖、迁移与侵袭^[10-12]。由此可见, β -catenin信号通路与前列腺癌的增殖、迁移与侵袭密切相关。基于此,本文拟研究AECC对前列腺癌细胞增殖、迁移与侵袭的影响,以期对烟管头草的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有3111型二氧化碳细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)、ME204E型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)、SYNERGY-H4型多功能酶标仪(美国Bio-Rad公司)、ECLIPSE TS100-F型倒置生物显微镜(日本Nikon公司)、DMI8型荧光显微镜(德国Leica公司)、AllegraX-15R型高速离心机(美国Beckman公司)、NovoCyte型流式细胞仪(美国ACEA Biosciences公司)、StepOne Plus™型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Abi公司)、JY300HE型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)、Odyssey CLX型双色红外激光扫描成像系统(美国LifeGen Technologies公司)。

1.2 主要药品与试剂

烟管头草全草采自贵州省安顺市镇宁县,经贵州中医药大学药学院孙庆文教授鉴定为菊科天名精属植物烟管头草 *C. cernuum* L.的全草。其他药品与试剂有DEME高糖培养基(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号8121156),胎牛血清(杭州天杭四季青公司,批号201020703),胰酶(以色列BI公司,批号2043176),Trizol提取试剂(上海沃凯生物科技有限公司,批号213406),

Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 Becton Dickson 公司,批号 40302ES20),四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、青链霉素混合液、0.1%结晶紫染色液、全蛋白提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 298931、D8370、20201203、P7630、BC3711),Hoechst 33258 染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 C0003、PC0020、P0012AC),PCR 试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 CW2569M),兔 Bcl-2 单克隆抗体、兔 Bax 单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab32124、ab32503),兔 GAPDH 单克隆抗体、兔 caspase-3 单克隆抗体、兔 c-Myc 单克隆抗体、兔 MMP-7 多克隆抗体、兔 β -catenin 单克隆抗体、DyLight™ 800 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(H+L)二抗(美国 CST 公司,批号分别为 5174、9665、13987、71031、8480、5151);PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计与合成,水为纯净水。

1.3 细胞

本研究所用前列腺癌 PC3 细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心,保存于贵州省中国科学院天然产物重点实验室。

2 方法

2.1 AECC 的制备

取烟管头草 1 kg,粉碎,以 2 L 水加热回流提取 1 h,共提取 3 次,过滤;合并 3 次滤液,浓缩,即得烟管头草浸膏(约 246 g)。称取上述浸膏 0.2 g,加入 DMSO 1 mL 溶解,然后加水 49 mL,制成质量浓度为 4.0 g/L 的 AECC 母液,备用。

2.2 细胞培养

PC3 细胞采用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基(简称“完全培养基”),于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.3 PC3 细胞存活率的检测

采用 MTT 法进行检测。取对数生长期 PC3 细胞,以 5 000 个/孔接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h;待细胞贴壁后,随机分为对照组和 AECC 不同质量浓度组(5、10、20、40、80 μ g/L,质量浓度参考文献[9]设置),另设不含细胞只含完全培养基的空白组,每组设置 5 个复孔。对照组加入含 0.1% DMSO 的完全培养基 100 μ L,AECC 各质量浓度组分别加入含相应药物的完全培养基 100 μ L,分别于培养 24、48、72 h 时,向各组细胞加入 MTT 溶液 20 μ L,于 37 °C 条件下孵育 4 h 后,以 2 500 r/min 离心 15 min,弃上

清;沉淀中加入 DMSO 150 μ L,采用酶标仪于 490 nm 波长处测定各孔吸光度(OD),然后按照文献[13]方法,计算细胞存活率[细胞存活率(%)=(OD_{实验组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组}) \times 100%]。上述实验重复 3 次。

2.4 PC3 细胞分组与给药

取对数生长期的 PC3 细胞,以 5 \times 10⁵ 个/皿接种于 60 mm³ 的培养皿中,加入完全培养基 5 mL,于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h;待细胞贴壁后,随机分成对照组和 AECC 低、中、高质量浓度组(20、40、80 μ g/L,质量浓度根据“2.3”项下结果设置),每组设置 3 个平行皿。对照组加入含 0.1% DMSO 的完全培养基 5 mL,AECC 各质量浓度组加入含相应药物的完全培养基 5 mL,培养 24 h 后,进行后续实验。

2.5 PC3 细胞凋亡情况的检测

2.5.1 Hoechst 33258 染色实验 取对数生长期的 PC3 细胞,按“2.3”项下方法接种、分组与给药后,收集细胞,分别取适量制成密度为 1 \times 10⁵ mL⁻¹ 的均匀细胞液;取上述细胞液 10 μ L 滴于载玻片上,加入固定液 10 μ L,固定 20 min;弃固定液,以 PBS 清洗 3 次,每次 5 min;加入 Hoechst 33258 染色液 10 μ L,避光染色 15 min;弃染色液,以 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。取洁净的盖玻片,滴加少许荧光淬灭液,盖于上述载玻片上。采用荧光显微镜进行观察,各组细胞选取 3 个视野,在 DAPI 通道下观察并拍照(镜下调亡细胞呈蓝白色荧光)。上述实验重复 3 次。

2.5.2 流式细胞仪检测实验 取“2.5.1”项下收集的各组 PC3 细胞适量,制成密度为 5 \times 10⁵ mL⁻¹ 的均匀细胞液,按试剂盒说明书相关方法操作后,以 200 目细胞筛过滤,滤液采用流式细胞仪进行检测,并计数各组细胞凋亡率。上述实验重复 3 次。

2.6 PC3 细胞迁移能力的检测

将 PC3 细胞以 DMEM 高糖培养基培养 24 h,使其处于饥饿状态;然后以 1 \times 10⁵ 个/孔接种于 Transwell 小室上层,培养 24 h 使细胞贴壁,同时在 Transwell 小室下层加入完全培养基 750 μ L。按“2.4”项下方法分组、给药后,取出小室,用棉签擦拭小室上层内侧底部细胞以清除未迁移的细胞,然后置于甲醇中固定 15 min,再以 0.1% 结晶紫染色液染色 20 min。在显微镜下选取 3 个视野进行观察(迁移细胞被染成紫色),计算各组细胞迁移数。上述实验重复 3 次。

2.7 PC3 细胞侵袭能力的检测

将 Matrigel 胶低温解冻后,加入 6 倍体积 DMEM 高糖培养基稀释混匀。将稀释后的 Matrigel 胶铺于 Transwell 小室滤膜上层,放至凝固;然后后续操作同“2.6”项下方法。在显微镜下选取 3 个视野进行观察,计算各组细胞侵袭数。上述实验重复 3 次。

2.8 PC3 细胞中 β -catenin 信号通路相关基因 mRNA 表达的检测

采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 进行检测。取对数生长期的 PC3 细胞,按“2.4”项下方法分组与给药(因烟管头草高质量浓度组细胞存活数较少,无法提取相关基因 mRNA 和蛋白,故后续仅进行其低、中质量浓度组的相关检测);收集各组细胞,分别加入 Trizol 试剂提取总 RNA,再逆转录合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L)为:cDNA 模板 2 μ L、 $2\times$ UltraSYBR Mixture (High Rox) 25 μ L、上下游引物各 1 μ L、ddH₂O 21 μ L(PCR 引物序列和产物长度见表 1)。PCR 扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,70 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 40 次。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 β -catenin、MMP-7、c-Myc、caspase-3、Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达水平。上述实验重复 3 次。

表 1 PCR 引物序列和产物长度

Tab 1 PCR primer sequence and product length

基因名称	引物序列	产物长度, bp
β -catenin	上游:5'-GGCTCTTGTGCGTACTGTCC-3'	109
	下游:5'-GGCCATCTCTGCTTCTTGGT-3'	
MMP-7	上游:5'-CATGATTGGCTTGGCGGAG-3'	150
	下游:5'-AGACTGTACCATCCGCTCA-3'	
c-Myc	上游:5'-GCCAGAGGAGGAACAGGCTA-3'	130
	下游:5'-TGGACGGACAGGATGTATGC-3'	
caspase-3	上游:5'-GAAATTGTGGAATTGATGCGTGA-3'	164
	下游:5'-CTACAACGATCCCCCTGAAAA-3'	
Bcl-2	上游:5'-GTACTTAAAAATACAACATCACAG-3'	148
	下游:5'-CTTGATTCTGGTGTTCCTCC-3'	
Bax	上游:5'-CCCAGAGGCTTTTTCCGAG-3'	155
	下游:5'-CCAGCCCATGATGGTCTCTGAT-3'	
GAPDH	上游:5'-TGTTCTCATGGGTGTGAAC-3'	274
	下游:5'-ATGACCTTGGCCACAGCCCT-3'	

2.9 PC3 细胞中 β -catenin 信号通路相关蛋白表达的检测

采用 Western blot 法进行检测。取对数生长期的 PC3 细胞,按“2.4”项下方法接种、分组与给药后,收集细胞;采用全蛋白提取试剂盒提取蛋白,以 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白经变性后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳,转膜,以 5% 脱脂牛奶封闭 1 h;以 TBST 缓冲液洗涤 10 min \times 3 次,加入 β -catenin、MMP-7、c-Myc、caspase-3、Bcl-2、Bax、GAPDH 一抗(稀释比例均为 1:1 000),于 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜;以 TBST 缓冲液洗涤 10 min \times 3 次,加入二抗(稀释比例为 1:30 000),避光孵育 2 h;以 TBST 缓冲液洗涤 10 min \times 3 次,经双色红外激光扫描成像仪成像。采用 Image J 1.8.0 软件进行分析,以目标蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。上述实验重复 3 次。

2.10 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7.0 进行数据的统计分析。数

据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 AECC 对 PC3 细胞增殖的影响

培养 24、48、72 h 后,与对照组比较,AECC 各质量浓度组细胞存活率均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且随 AECC 质量浓度的增加和作用时间的延长,细胞存活率呈下降趋势,详见表 2。当 AECC 质量浓度为 20 μ g/L、作用 24 h 时,细胞存活率为(69.45 \pm 0.92)%,提示该质量浓度提取物对 PC3 细胞有显著的抑制作用,因此分别设置 20、40、80 μ g/L 为 AECC 的低、中、高质量浓度,并选择 24 h 为其作用时间。

表 2 不同质量浓度 AECC 作用不同时间后对 PC3 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Effects of different concentrations of AECC for different time on survival rate of PC3 cells($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	细胞存活率		
	培养 24 h	培养 48 h	培养 72 h
对照组	98.28 \pm 1.93	99.40 \pm 1.21	101.12 \pm 1.09
AECC 5 μ g/L 组	94.55 \pm 1.13*	93.94 \pm 2.02*	94.21 \pm 2.67*
AECC 10 μ g/L 组	88.48 \pm 3.74*	83.51 \pm 4.041**	82.43 \pm 4.731**
AECC 20 μ g/L 组	69.45 \pm 0.92**	58.52 \pm 1.67**	40.18 \pm 1.28**
AECC 40 μ g/L 组	50.08 \pm 1.55**	40.21 \pm 4.48**	28.09 \pm 1.86**
AECC 80 μ g/L 组	36.61 \pm 3.68**	29.88 \pm 2.49**	18.50 \pm 1.36**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

3.2 AECC 对 PC3 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色结果显示,对照组细胞形态饱满、染色面积广;烟管头草各质量浓度组随给药浓度增加,细胞数目减少,染色面积减少,凋亡细胞呈现较强蓝白色荧光,详见图 1。流式细胞仪检测结果显示,与对照组比较,AECC 各质量浓度组细胞早期凋亡率(中质量浓度组除外)均显著降低,晚期凋亡率均显著升高($P<0.01$),详见表 3、图 2。

3.3 AECC 对 PC3 细胞迁移和侵袭能力的影响

与对照组比较,AECC 各质量浓度组细胞的迁移数和侵袭数均显著降低($P<0.01$),详见表 4、图 3。

3.4 AECC 对 PC3 细胞中 β -catenin 信号通路相关基因 mRNA 和蛋白表达的影响

与对照组比较,AECC 中剂量组细胞中 MMP-7、c-Myc、Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), β -catenin、caspase-3、Bax 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$);AECC 低剂量组细胞中 MMP-7 的 mRNA 和蛋白表达水平以及 Bcl-2 的蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$), β -catenin 的 mRNA 和蛋白表达水平以及 Bax 的蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),详见表 5、表 6、图 4。

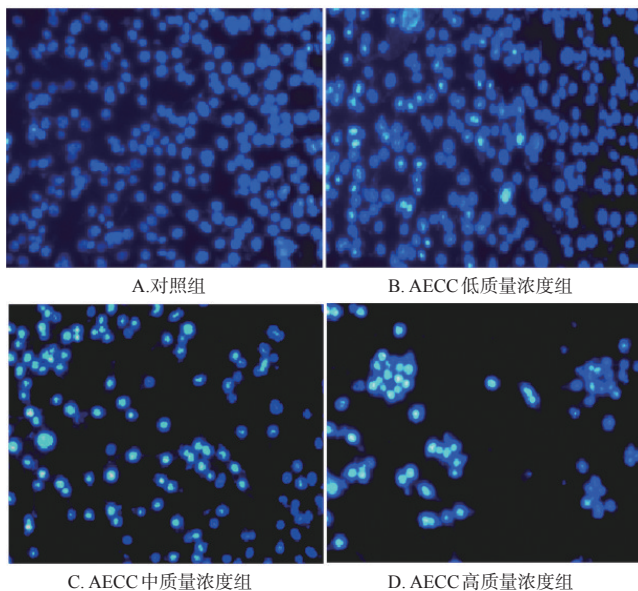


图1 AECC对PC3细胞凋亡影响的显微图(Hoechst 33258染色, ×200)

Fig 1 Micrographs of the effects of AECC on the apoptosis of PC3 cells (Hoechst 33258 staining, ×200)

表3 各组细胞凋亡率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 3 Apoptosis rate of PC3 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率
对照组	0.61 ± 0.05	3.04 ± 0.47
AECC低质量浓度组	0.26 ± 0.04**	6.38 ± 0.16**
AECC中质量浓度组	3.41 ± 0.40**	29.79 ± 1.10**
AECC高质量浓度组	0.13 ± 0.05**	44.78 ± 2.58**

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. control group, ** $P < 0.01$

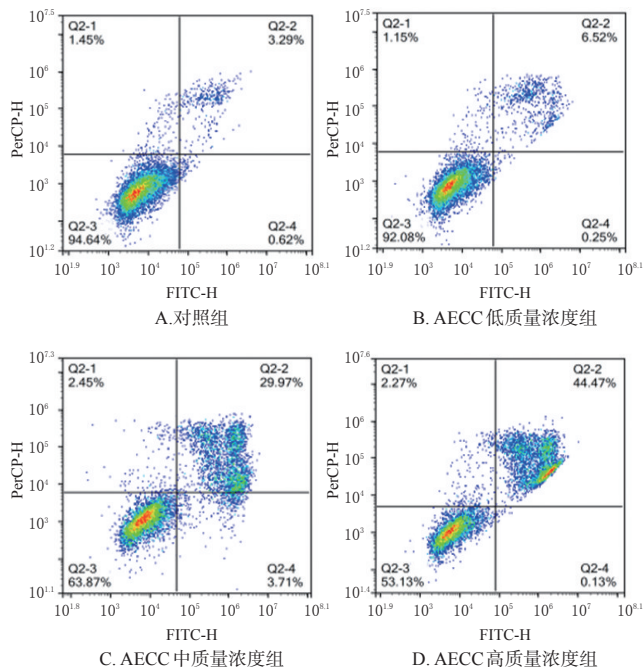


图2 AECC对PC3细胞凋亡影响的流式图

Fig 2 Flow chart of the effects of AECC on the apoptosis of PC3 cells

表4 各组PC3细胞迁移数和侵袭数的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \text{个}$)

Tab 4 The number of PC3 cell migration and invasion ($\bar{x} \pm s, n=3, \text{cell}$)

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
对照组	412.31 ± 48.21	391.28 ± 36.67
AECC低质量浓度组	286.16 ± 17.21**	261.44 ± 24.33**
AECC中质量浓度组	151.53 ± 18.93**	168.62 ± 12.51**
AECC高质量浓度组	93.67 ± 10.86**	72.58 ± 8.31**

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. control group, ** $P < 0.01$

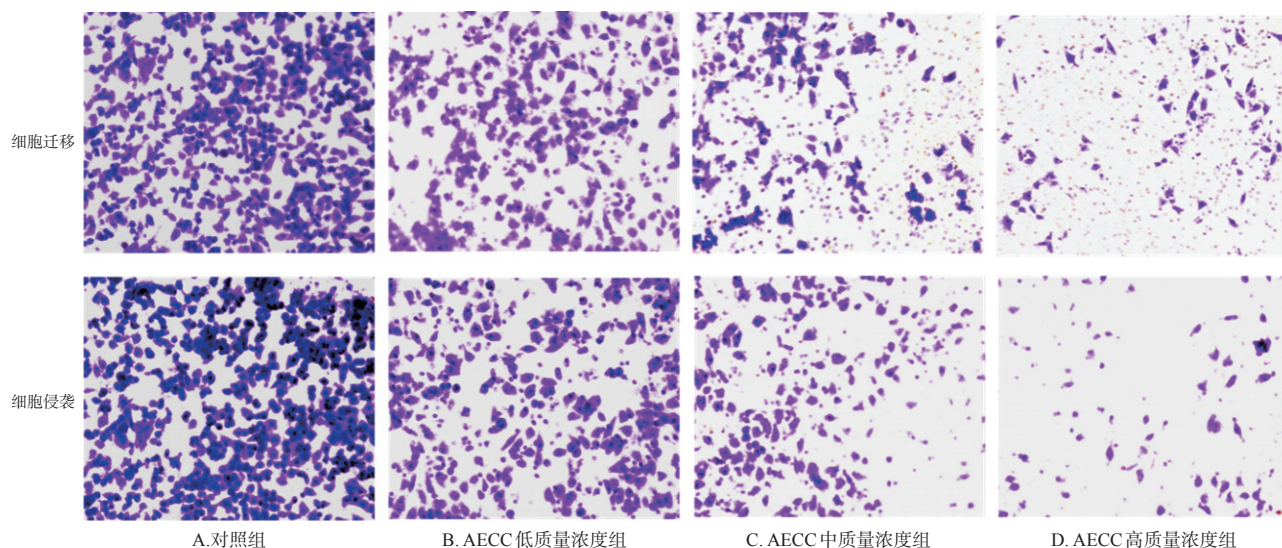


图3 AECC对PC3细胞迁移和侵袭能力影响的显微图(结晶紫染色, ×200)

Fig 3 Micrographs of the effects of AECC on migration and invasion ability of PC3 cell (crystal violet staining, ×200)

表5 各组PC3细胞 β -catenin通路相关基因mRNA表达水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 5 The mRNA expression of β -catenin pathway related gene in PC3 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	β -catenin	MMP-7	c-Myc	caspase-3	Bcl-2	Bax
对照组	0.60±0.06	1.24±0.11	1.76±0.13	1.27±0.06	1.23±0.21	1.11±0.03
AECC低质量浓度组	0.82±0.03*	0.84±0.17*	1.72±0.10	1.44±0.29	1.08±0.09	1.19±0.02
AECC中质量浓度组	1.22±0.08**	0.49±0.08**	1.46±0.12*	1.81±0.17**	0.66±0.13**	1.30±0.06**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

表6 各组PC3细胞 β -catenin通路相关蛋白表达水平的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 6 The expression of β -catenin pathway related protein in PC3 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	β -catenin	MMP-7	c-Myc	caspase-3	Bcl-2	Bax
对照组	0.32±0.13	1.38±0.13	1.18±0.23	0.82±0.06	0.23±0.08	0.17±0.03
AECC低质量浓度组	0.66±0.14*	1.12±0.23*	1.14±0.10	1.01±0.18	0.08±0.03*	0.28±0.04*
AECC中质量浓度组	0.98±0.12**	0.83±0.15**	0.94±0.03*	1.35±0.10**	0.02±0.01**	0.54±0.04**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Note: vs. control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$

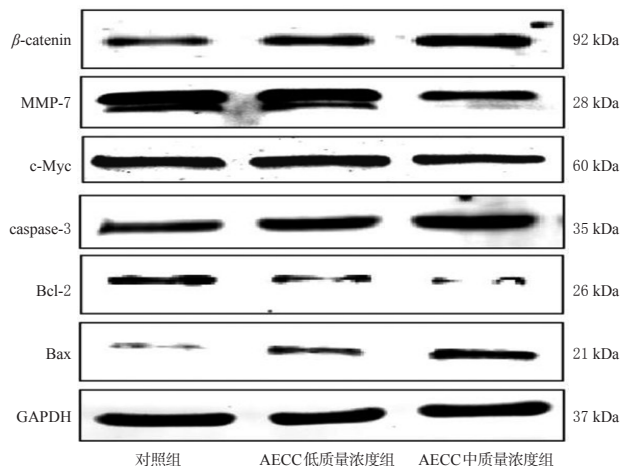


图4 AECC对PC3细胞中 β -catenin通路相关蛋白表达影响的电泳图

Fig 4 Electrophoretograms of the effects of AECC on the expression of β -catenin pathway related proteins in PC3 cells

4 讨论

前列腺癌是全球男性最常见的恶性肿瘤之一,且随着人们饮食习惯的改变,前列腺癌患者不断增多;其潜伏期长,大部分患者早期无明显症状,但当确诊病情时,却已发展至晚期^[14-15]。与此同时,化疗带来的耐药性等问题也会使得前列腺癌复发,进而导致病情恶化^[16],故寻求安全有效的前列腺癌治疗药物受到广泛关注。相关研究表明,肿瘤细胞的黏附能力与肿瘤的发生发展关系密切^[17],因此抑制肿瘤细胞的黏附能力可作为肿瘤的防治的策略之一。

AECC具有清热解毒、止痛等作用^[7]。本研究探讨

了AECC对人前列腺癌PC3细胞增殖、迁移与侵袭的影响。MTT实验结果显示,随AECC浓度和作用时间的增加,AECC各质量浓度组细胞的存活率均显著低于对照组,且呈不断降低的趋势,说明其对PC3细胞的增殖具有抑制作用。Hoechst染色和流式细胞仪检测结果显示,AECC各质量浓度组PC3细胞的早期凋亡率(中质量浓度组除外)均显著降低,晚期凋亡率均显著升高($P<0.01$),说明其具有诱导细胞凋亡的作用,且主要作用于细胞凋亡晚期。Transwell实验结果显示,AECC各质量浓度组细胞迁移数和侵袭数均显著降低,说明其具有抑制细胞迁移与侵袭的作用。

肿瘤细胞的黏附能力是评价肿瘤恶性进展的一个重要指标,其中黏附因子 β -catenin的上调能促进其在细胞质中的积累,进而抑制迁移因子(如MMP-7、c-Myc等)的释放,增强细胞间的黏连,影响细胞迁移与侵袭能力^[18-19]。其中,MMP-7作为基质金属蛋白酶,能降解细胞外基质蛋白;c-Myc作为一种可易位原癌基因,能影响肿瘤新血管的生成;两者下调均能抑制细胞迁移和侵袭^[20-21]。线粒体途径和caspase途径能协同诱导细胞凋亡^[22-23]。其中,caspase-3属于caspase家族的“明星分子”,其产生的促凋亡片段诱导细胞凋亡,现已成为肿瘤治疗的重要靶点^[24]。Bcl-2和Bax作为相互拮抗的同源调控因子,两者形成二聚体后可调控线粒体膜电位,进而改变膜通透性,从而诱导细胞凋亡^[25-26]。随着Bax/Bcl-2二聚体的表达量增加,其能激活caspase-3,开启凋亡级联反应,进而促进细胞凋亡^[27]。有研究显示, β -catenin通路的活化能诱导caspase途径和线粒体途径,影响细胞黏附,进而抑制细胞增殖^[28]。由此可见, β -catenin信号通路的活化可促进肿瘤细胞的黏附作用,进而抑制细胞增殖、迁移和侵袭。本研究发现,经AECC干预后,PC3细胞中MMP-7、c-Myc(低质量浓度组除外)、Bcl-2(低质量浓度组除外)的mRNA和蛋白的表达水平均显著降低, β -catenin、caspase-3(低质量浓度组除外)、Bax的mRNA和蛋白表达水平均显著升高,说明AECC抑制PC3细胞迁移、侵袭的作用可能与调控 β -catenin信号通路有关。

综上所述,AECC可抑制PC3细胞的增殖、迁移与侵袭,其作用机制可能与调控 β -catenin信号通路相关的迁移与凋亡因子的表达有关。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] WHO. Prostate cancer[EB/OL].[2021-05-02]. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/27Prostate-factsheet.pdf>.

- [3] GIACINTI S, POTI G, ROBERTO M, et al. Molecular basis of drug resistance and insights for new treatment approaches in mCRPC[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38 (11) : 6029-6039.
- [4] WANG K, RUAN H, XU T, et al. Recent advances on the progressive mechanism and therapy in castration resistant prostate cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 3167-3178.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第七十五卷[M].北京:科学出版社,1979:296.
- [6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草[M].上海:上海科学技术出版社,1999:760.
- [7] 滕崇德,李继瓚,杨懋琛,等.清热解毒药烟管头草:二[J]. *山西医药杂志*,1976(S1):24-25.
- [8] 朱国豪,杜江,张景梅,等.土家族医药[M].贵阳:中医古籍出版社,2018:407-408.
- [9] 王坤,吴琼,耿瑞,等.烟管头草粗提物体外抗前列腺增生活性及机制研究[J].*天然产物研究与开发*,2019,31(3) : 517-522.
- [10] 李秀,聂敏海,刘旭倩,等. E-钙黏蛋白、 β -连环素和基质金属蛋白酶-7 与口腔鳞状细胞癌分化程度的关系[J].*西南医科大学学报*,2020,43(2):124-129.
- [11] YANG T W, GAO Y H, MA S Y, et al. Low-grade slightly elevated and polypoid colorectal adenomas display differential β -catenin-TCF/LEF activity, c-Myc, and cyclin D₁ expression[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(17) : 3066-3076.
- [12] YE X, LIN J, LIN Z, et al. Axin1 up-regulated 1 accelerates stress-induced cardiomyocytes apoptosis through activating Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359(2):441-448.
- [13] 张彦,祝晨蓀.雷公藤红素对体外人肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J].*中国药房*,2017,28(10):1342-1345.
- [14] 吴汉潮,张雄伟,王强.前列腺癌诊断方法研究进展[J].*中外医学研究*,2021,19(7):188-190.
- [15] 张凡,郭玉玮,刘广超,等.生酮饮食抗肿瘤治疗研究进展[J].*癌变·畸变·突变*,2020,32(3):241-245.
- [16] 杨龙雨禾,张贵福,王跃强,等.去势抵抗性前列腺癌治疗进展[J].*浙江医学*,2020,42(24):2702-2704.
- [17] 李珍玲,金仁顺.上皮特异性黏附分子在前列腺癌中的表达及意义[J].*中华男科学杂志*,2015,21(4):320-324.
- [18] 陈昌国,陈秋圆.细胞间黏附分子 1 及血清可溶性细胞间黏附分子 1 与肿瘤关系的研究进展[J].*国际检验医学杂志*,2018,39(11):1370-1374.
- [19] MORGAN C, JENKINS S A, KYNASTON H G, et al. The role of adhesion molecules as biomarkers for the aggressive prostate cancer phenotype[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (12):e81666.
- [20] JI Q, LIU X, FU X, et al. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ β -catenin signal pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (11):e78700.
- [21] WANG T L, OUYANG C S, LIN L Z. β -asarone suppresses Wnt/ β -catenin signaling to reduce viability, inhibit migration/invasion/adhesion and induce mitochondria-related apoptosis in lung cancer cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106:821-830.
- [22] KOVURU N, RAGHUWANSHI S, SHARMA D S, et al. Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis and caspase activation is mediated through mitochondria during megakaryocyte differentiation[J]. *Mitochondrion*, 2020, 50:115-120.
- [23] LEE D, LEE Y H, LEE K H, et al. Aviculin isolated from induce apoptosis in breast cancer cells through mitochondria-mediated caspase activation pathway[J]. *Molecules*, 2020, 25(7):1708.
- [24] BEROSKE L, VAN DEN W T, STROOBANTS S, et al. Molecular imaging of apoptosis: the case of caspase-3 radiotracers[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(8):3948.
- [25] GIMÉNEZ C A, DANIAL N N. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by Bcl-2 family proteins[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(4):165-175.
- [26] SIMONYAN L, LÉGIOT A, LASCU I, et al. The substitution of proline 168 favors Bax oligomerization and stimulates its interaction with LUVs and mitochondria[J].*Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2017, 1859 (6) : 1144-1155.
- [27] 李骏飞,郑小蓉,姜建伟,等.基于 Bax/Bcl-2-caspase-3 通路芍药软肝方抑制裸鼠肝癌生长及机制研究[J].*中国现代医生*,2021,59(7):38-45.
- [28] FU F, DENG Q, LI R, et al. AXIN2 gene silencing reduces apoptosis through regulating mitochondria associated apoptosis signaling pathway and enhances proliferation of ESCs by modulating Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(1) : 418-427.

(收稿日期:2021-02-11 修回日期:2021-05-03)
(编辑:唐晓莲)