

桃叶珊瑚苷对前列腺癌的抑制作用及机制的体内外研究^Δ

闫本纯^{1,2*}, 何春艳¹, 李宏伟^{1,2}, 南锡浩^{1,2}, 张智慧^{1,2}, 邸彦橙^{1,2}, 田河^{1,2#}(1. 牡丹江医学院附属红旗医院泌尿外科, 黑龙江牡丹江 157000; 2. 牡丹江医学院第一临床医学院, 黑龙江牡丹江 157011)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)13-1618-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.13.13



摘要 目的 探讨桃叶珊瑚苷(AU)调节蛋白激酶B(Akt)/双微体同源基因2(MDM2)/p53信号通路对前列腺癌(PC)细胞增殖和肿瘤生长的影响。方法 将前列腺癌细胞PC3分为对照组、50 μmol/L AU组、100 μmol/L AU组、SC79(Akt激活剂)组(5 μmol/L)、100 μmol/L AU+SC79组,考察各组细胞的克隆能力和增殖能力,检测细胞凋亡率及细胞中Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白表达。建立异种移植肿瘤裸鼠模型,并将建模成功的裸鼠分为肿瘤组、AU组(80 mg/kg)、SC79组(50 mg/kg)和AU+SC79组(80 mg/kg AU+50 mg/kg SC79),每组10只,每天给药1次,共21 d。末次给药后,称定肿瘤质量,检测肿瘤组织中细胞核相关抗原(Ki-67)及Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白表达。结果 细胞实验中,与对照组比较,50 μmol/L AU组、100 μmol/L AU组细胞克隆形成数、增殖率和Akt、MDM2蛋白的磷酸化水平均显著减少/降低($P<0.05$),细胞凋亡率、p53蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),但SC79组各指标变化趋势相反($P<0.05$);100 μmol/L AU+SC79组与100 μmol/L AU组比较,克隆形成数、增殖率和Akt、MDM2蛋白的磷酸化水平均显著增加/升高($P<0.05$),细胞凋亡率、p53蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),但与SC79组比较各指标变化趋势相反($P<0.05$)。体内实验中,与肿瘤组比较,AU组裸鼠的肿瘤质量及组织中Ki-67阳性表达和Akt、MDM2蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$),p53蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),但SC79组裸鼠的上述指标变化趋势相反($P<0.05$);AU+SC79组与AU组比较,裸鼠的肿瘤质量及组织中Ki-67阳性表达和Akt、MDM2蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$),p53蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),但其与SC79组比较各指标变化趋势相反($P<0.05$)。结论 AU可通过抑制Akt/MDM2/p53信号通路从而抑制PC细胞增殖及肿瘤生长。

关键词 桃叶珊瑚苷;Akt/MDM2/p53信号通路;前列腺癌;细胞增殖;肿瘤生长

In vivo and in vitro study on the inhibitory effects and mechanism of aucubin on prostate cancer

YAN Benchun^{1,2}, HE Chunyan¹, LI Hongwei^{1,2}, NAN Xihao^{1,2}, ZHANG Zhihui^{1,2}, DI Yancheng^{1,2}, TIAN He^{1,2}
(1. Dept. of Urinary Surgery, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157000, China; 2. First Clinical Medical College, Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the effects of aucubin (AU) on the proliferation and tumor growth of prostate cancer (PC) cells by regulating the protein kinase B (Akt)/murine double minute2 (MDM2)/p53 signaling pathway. **METHODS** Prostate cancer cell PC3 were separated into control group, 50 μmol/L AU group, 100 μmol/L AU group, SC79 (Akt activator) group (5 μmol/L), and 100 μmol/L AU+SC79 group. The cell cloning and proliferation ability were investigated; the rate of cell apoptosis and the expressions of Akt/MDM2/p53 signaling pathway-related protein were detected. Meanwhile, xenograft tumor models of nude mice were constructed and separated into tumor group, AU group (80 mg/kg), SC79 group (50 mg/kg), and AU+SC79 group (80 mg/kg AU+50 mg/kg SC79), with 10 mice in each group. They were given relevant medicine, once a day, for 21 d. After the last medication, tumor weight was determined, and the expressions of nucleus-associated antigen (Ki-67) and Akt/MDM2/p53 signaling pathway-related protein were detected in tumor tissue. **RESULTS** In the cell experiment, compared with control group, the cell clonal formation number, proliferation rate and phosphorylation levels of Akt and MDM2 protein in 50 μmol/L AU and 100 μmol/L AU groups were significantly decreased ($P<0.05$), while the cell apoptosis rate and p53 protein expression levels were significantly increased ($P<0.05$); however, the change trend of each index in SC79 group was opposite ($P<0.05$). Compared with 100 μmol/L AU group, the cell clonal formation number, proliferation rate and phosphorylation levels of Akt and MDM2 protein in 100 μmol/L AU+SC79 group were significantly increased ($P<0.05$), while cell apoptosis rate and p53 protein expression levels were significantly decreased ($P<0.05$); however, compared with SC79 group, the changing trend of indexes was

the opposite ($P<0.05$). In the *in vivo* experiment, compared with the tumor group, the tumor mass and Ki-67 positive expression and the phosphorylation levels of Akt and MDM2 protein in nude mice of AU group were significantly decreased ($P<0.05$), and the expression level of p53 protein was significantly increased ($P<0.05$), but the changing trend of

^Δ 基金项目 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目 (No.2020-KYYWFMY-0030)

* 第一作者 主治医师, 硕士。研究方向: 泌尿生殖系统肿瘤。电话: 0453-6602102

通信作者 副主任医师, 硕士。研究方向: 泌尿肿瘤与结石的基础及临床。电话: 0453-6602102。E-mail: rfrs08@163.com

above indexes of nude mice in SC79 group were opposite ($P<0.05$). Compared with AU group, the tumor mass, Ki-67 positive expression and phosphorylation levels of Akt and MDM2 protein in tumor tissues of nude mice in AU+SC79 group were significantly increased ($P<0.05$), while the expression level of p53 protein was significantly decreased ($P<0.05$); however, compared with SC79 group, the changing trend of above indexes was opposite ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** AU can inhibit PC cell proliferation and tumor growth by inhibiting Akt/MDM2/p53 signaling pathway.

KEYWORDS aucubin; Akt/MDM2/p53 signaling pathway; prostate cancer; proliferation; tumor growth

前列腺癌(prostate cancer, PC)是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤,近几十年来在全球范围内变得越来越普遍,且人口老龄化也是导致PC发病率和死亡率急剧上升的因素之一^[1-2]。早期PC以手术治疗为主,雄激素剥夺疗法是治疗晚期PC的标准方法,但大多数患者会表现出耐药性,使该治法受到极大限制^[3]。因此,进一步了解PC发展的分子机制并寻找更有效的治疗方法至关重要。

桃叶珊瑚苷(aucubin, AU)为环烯醚萜苷类化合物,具有保护神经、抗炎、保肝、抗肿瘤等多种药理作用^[4],且AU毒性低,不易对癌症患者造成二次伤害,是一种非常有前途的抗癌药物^[5]。AU为泌尿系统常用药物车前草的有效成分之一,而车前草可作为PC的预防及预后用药^[6],这提示AU可能会影响PC发展。蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)是一种经典的细胞内关键分子,与肿瘤发生有关^[7]。双微体同源基因2(murine double minute 2, MDM2)是调控肿瘤抑制蛋白p53活性的重要蛋白,也是Akt的重要下游靶标,研究发现,激活Akt可使MDM2发生磷酸化并移位至细胞核,从而抑制p53生物活性,进而影响PC等肿瘤进展^[8-10]。本研究拟通过体内实验研究AU对PC的作用,并基于Akt/MDM2/p53信号通路探讨其具体机制,以期AU治疗PC提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有DTX880型酶标仪、Epics XL型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),Tanon-5200型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂有:AU原料药(美国MedChemExpress公司,批号N20151634,纯度98%),Akt激活剂SC79(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号20220806,纯度97%),荧光素FITC标记膜联蛋白V(Annexin V-FITC)、碘化丙啶(PI)(美国Sigma-Aldrich公司),MTT试剂盒(定州百克赛斯生物科技有限公司,批号CS2905),鼠源细胞核相关抗原(nucleus-associated antigen, Ki-67)、磷酸化Akt(p-Akt)、磷酸化MDM2(p-MDM2)、p53、Akt、MDM2、 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(英国Abcam公司,批号分别为ab16667、ab38449、ab170880、ab26、ab215873、ab259265、ab8226),辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国CST公司,批号C0012)。

1.3 动物

本研究所用动物为SPF级健康雄性BALB/c裸鼠,共40只,体重(20±2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号为SCXK(京)2021-0011。购入后,将裸鼠饲养在特定的无病原体的SPF级动物实验中心,实验环境为12h光/12h暗循环、温度22~25℃、相对湿度55%~60%。饲养期间动物自由饮水和摄食。本研究动物实验符合“3R”原则,并经牡丹江医学院附属红旗医院伦理委员会批准(伦理编号为20220037)。

1.4 细胞

前列腺癌PC3细胞购自美国ATCC公司。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养

将PC3细胞保存在含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 g/mL链霉素的RPMI-1640培养基中,然后置于温度37℃、含5%二氧化碳的培养箱中常规孵育。将细胞传代2~3次后用于后续实验。

2.1.2 细胞分组及处理

取对数生长期的PC3细胞,分为对照组、50 μ mol/L AU组、100 μ mol/L AU组、SC79组、100 μ mol/L AU+SC79组。其中,50、100 μ mol/L AU组参考前期实验结果和文献方法^[11]分别以含50、100 μ mol/L AU的完全培养基培养48 h;SC79组细胞以含5 μ mol/L SC79的完全培养基培养48 h^[12];100 μ mol/L AU+SC79组细胞以含100 μ mol/L AU和5 μ mol/L SC79的完全培养基培养48 h;对照组细胞以不含药的完全培养基培养48 h。

2.1.3 细胞克隆能力考察

采用平板克隆实验检测。取对数生长期的PC3细胞,用胰蛋白酶消化后,按 1×10^3 个/孔接种在6孔板中,按“2.1.2”项下方法进行分组处理(每组设置6个复孔)。各组继续培养10 d,每隔3 d换液1次,随后将细胞在4℃的10%甲醛中固定10 min,并用1%结晶紫染色30 min,然后置于显微镜下观察。将集落细胞数超过50个的记为有效克隆,统计各组细胞克隆形成数。

2.1.4 细胞增殖率检测

采用MTT法检测。取对数生长期的PC3细胞,按 1×10^4 个/孔接种在96孔板中,除按“2.1.2”项下方法设置组别外,另设空白对照组[不含细胞,仅含20 μ L 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)的培养基]。培养结束后,每孔加入0.5 mg/mL的MTT试剂

20 μL ,继续孵育4 h后,弃去培养基。将反应产物甲贲溶解在100 μL 二甲基亚砜中,使用酶标仪检测450 nm处的吸光度(OD)值,并计算细胞增殖率。细胞增殖率(%)=(实验组OD值-空白对照组OD值)/(对照组OD值-空白对照组OD值) \times 100%。实验重复3次,每次设置2个平行。

2.1.5 细胞凋亡率检测

采用流式细胞术检测。取对数生长期的PC3细胞,按 5×10^6 个/孔接种在6孔板中,按“2.1.2”项下方法进行分组处理。培养结束后,在室温下离心(1 000 \times g,5 min)并收集细胞,将细胞洗涤后,于室温下避光加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI染色,然后在Epics XL型流式细胞仪上测定细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=凋亡细胞数/总细胞数 \times 100%。实验重复3次,每次设置2个平行。

2.1.6 细胞中Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期的PC3细胞,按 2×10^6 个/孔接种在6孔板中,再按“2.1.2”项下方法分组处理。培养结束后,收集细胞并加入裂解液,提取细胞中总蛋白,采用二喹啉甲酸法进行蛋白定量,将蛋白样品与十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺上样缓冲液混合,然后在95 $^{\circ}\text{C}$ 下煮沸5 min,电泳(起始电压为70V,随后调整为130V)分离蛋白并转膜(电流200 mA),用5%脱脂奶粉封闭。将膜与p-Akt(稀释比例1:500)、p-MDM2(稀释比例1:1 000)、p53(稀释比例1:500)、Akt(稀释比例1:500)、MDM2(稀释比例1:500)、 β -actin(稀释比例1:1 000)抗体在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;洗膜后,加入二抗(稀释比例1:2 000),在室温下继续孵育2 h。以化学发光试剂可视化蛋白,并用Image J软件分析条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平,以p-MDM2/MDM2、p-Akt/Akt比值表示MDM2、Akt蛋白的磷酸化水平。实验重复3次,每次设置2个平行。

2.2 动物实验

2.2.1 动物分组与处理

裸鼠适应性饲养1周后开始实验:将PC3细胞悬浮于PBS溶液中,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,按200 μL /只的剂量皮下注射到40只裸鼠的左侧腋窝,建立异种移植肿瘤模型^[13]。本研究成功获得40只异种移植肿瘤裸鼠,其肿瘤直径为0.5~0.6 cm。将建模成功的40只裸鼠按随机数字表法分为肿瘤组、AU组、SC79组、AU+SC79组,每组10只。其中,AU组裸鼠灌胃80 mg/kg AU(以PBS为溶剂),同时腹腔注射等体积PBS^[14];SC79组裸鼠腹腔注射50 mg/kg SC79(以PBS为溶剂),同时灌胃等体积PBS^[15];AU+SC79组裸鼠灌胃80 mg/kg AU,同时腹腔注射50 mg/kg SC79;肿瘤组裸鼠灌胃并同时腹腔注射等体积PBS;每天1次,共21 d。

2.2.2 肿瘤质量测定

末次给药2 h后,处死裸鼠,收集瘤块并称重。

2.2.3 肿瘤组织中Ki-67蛋白表达检测

采用免疫组化法检测。取出部分肿瘤组织,用PBS洗涤,在室温下用10%中性甲醛固定过夜,制作石蜡切片,切片经梯度乙醇脱水及3%过氧化氢灭活内源性过氧化酶后,将切片与Ki-67抗体(稀释比例1:500)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,然后加入羊抗鼠IgG二抗(稀释比例1:1 000)孵育2 h。最后,按照二氨基联苯胺试剂盒方法对切片进行染色,在光学显微镜下观察并拍照,阳性细胞呈褐色。应用Image J软件计算Ki-67阳性细胞比例。

2.2.4 肿瘤组织中Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白表达检测

将肿瘤组织用裂解液裂解后,提取组织中总蛋白。然后按“2.1.6”项下方法进行Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白检测。

2.3 统计学方法

采用SPSS 26.0软件对数据进行统计分析。各组实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-*q*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞实验结果

3.1.1 AU对PC3细胞增殖的影响

与对照组比较,50 $\mu\text{mol/L}$ AU组、100 $\mu\text{mol/L}$ AU组细胞克隆形成数、增殖率均显著减少/降低($P<0.05$),SC79组细胞克隆形成数、增殖率均显著增加/升高($P<0.05$);100 $\mu\text{mol/L}$ AU+SC79组细胞克隆形成数、增殖率与100 $\mu\text{mol/L}$ AU组比较均显著增加/升高($P<0.05$),但与SC79组比较均显著减少/降低($P<0.05$)。结果见图1、表1。

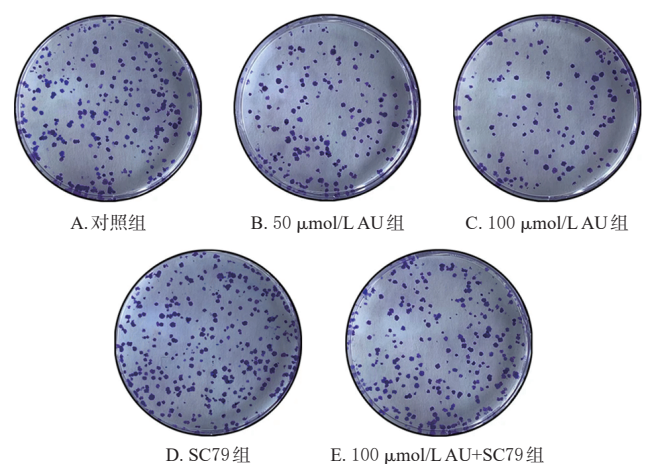


图1 各组细胞的克隆形成情况观察

3.1.2 AU对PC3细胞凋亡的影响

与对照组[(13.52 \pm 1.38)%, $n=6$]比较,50 $\mu\text{mol/L}$ AU组、100 $\mu\text{mol/L}$ AU组细胞凋亡率[分别为(21.57 \pm 2.25)%、(34.05 \pm 3.44)%, $n=6$]均显著升高($P<0.05$),

表1 各组细胞的克隆形成数、增殖率测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	细胞克隆形成数/个	细胞增殖率/%
对照组	125.05 ± 12.74	94.08 ± 5.01
50 μmol/L AU组	80.44 ± 8.31 ^a	68.52 ± 6.92 ^a
100 μmol/L AU组	51.42 ± 5.44 ^a	44.16 ± 5.03 ^a
SC79组	175.24 ± 18.04 ^a	121.55 ± 8.55 ^a
100 μmol/L AU+SC79组	118.62 ± 12.03 ^{bc}	91.52 ± 5.22 ^{bc}

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与100 μmol/L AU组比较, $P < 0.05$; c: 与SC79组比较, $P < 0.05$ 。

SC79组细胞凋亡率[(6.44 ± 0.68)% , $n=6$]显著降低($P < 0.05$) ; 100 μmol/L AU+SC79组细胞凋亡率[(12.81 ± 1.31)% , $n=6$]与100 μmol/L AU组比较显著降低($P < 0.05$) , 但与SC79组比较显著升高($P < 0.05$)。结果见图2。

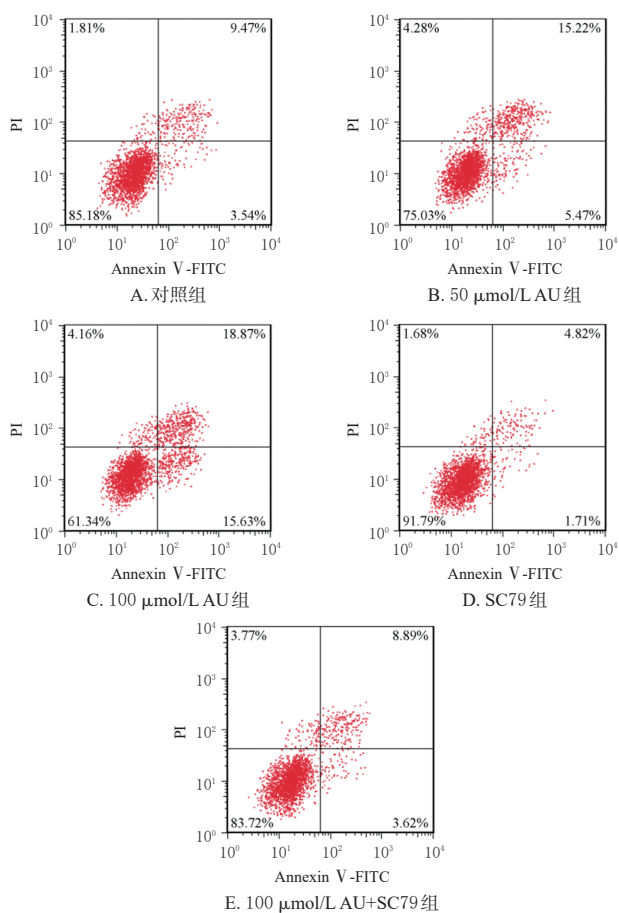
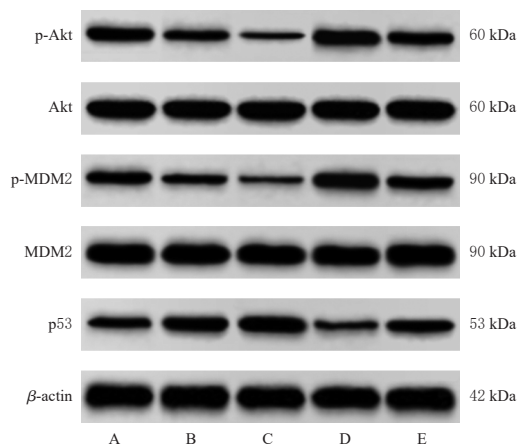


图2 各组细胞凋亡检测的流式细胞图

3.1.3 AU对PC3细胞中Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较, 50 μmol/L AU组、100 μmol/L AU组细胞中p53蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$) , Akt、MDM2蛋白的磷酸化水平均显著降低($P < 0.05$) , 而SC79组细胞中上述指标变化与2个AU给药组相反($P < 0.05$) ; 100 μmol/L AU+SC79组与100 μmol/L AU组比较, 细胞中p53蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$) , Akt、MDM2蛋白的磷酸化水平均显著升高($P < 0.05$) ,

但与SC79组比较细胞中上述指标变化相反($P < 0.05$)。结果见图3、表2。



A: 对照组; B: 50 μmol/L AU组; C: 100 μmol/L AU组; D: SC79组; E: 100 μmol/L AU+SC79组。

图3 各组细胞中p-Akt、p-MDM2、p53、Akt、MDM2蛋白表达的电泳图

表2 各组细胞中Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

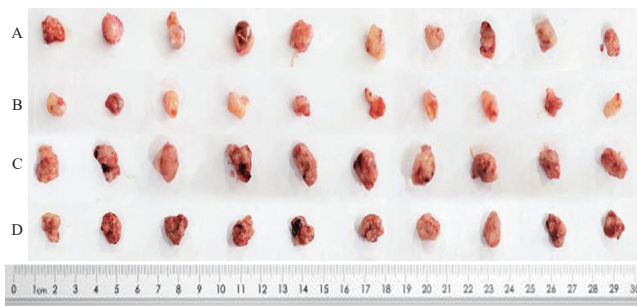
组别	p-Akt/Akt	p-MDM2/MDM2	p53/β-actin
对照组	0.62 ± 0.07	0.57 ± 0.06	0.48 ± 0.05
50 μmol/L AU组	0.41 ± 0.05 ^a	0.38 ± 0.04 ^a	0.66 ± 0.07 ^a
100 μmol/L AU组	0.18 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.02 ^a	0.84 ± 0.09 ^a
SC79组	0.85 ± 0.09 ^a	0.79 ± 0.08 ^a	0.25 ± 0.03 ^a
100 μmol/L AU+SC79组	0.59 ± 0.06 ^{bc}	0.55 ± 0.06 ^{bc}	0.51 ± 0.06 ^{bc}

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与100 μmol/L AU组比较, $P < 0.05$; c: 与SC79组比较, $P < 0.05$ 。

3.2 动物实验结果

3.2.1 AU对裸鼠肿瘤质量的影响

与肿瘤组[(0.63 ± 0.07) g, $n=10$]比较, AU组裸鼠的肿瘤质量[(0.42 ± 0.05) g, $n=10$]显著降低($P < 0.05$) , 但SC79组裸鼠的肿瘤质量[(0.88 ± 0.09) g, $n=10$]显著升高($P < 0.05$) ; AU+SC79组裸鼠的肿瘤质量[(0.64 ± 0.07) g, $n=10$]与AU组比较显著升高($P < 0.05$) , 但与SC79组比较显著降低($P < 0.05$)。结果见图4。



A: 肿瘤组; B: AU组; C: SC79组; D: AU+SC79组。

图4 各组裸鼠的肿瘤大小观察

3.2.2 AU对裸鼠肿瘤组织中Ki-67蛋白表达的影响

与肿瘤组[(41.52 ± 4.22)% , $n=10$]比较, AU组裸鼠肿瘤组织中Ki-67蛋白的阳性表达[(25.37 ± 2.64)% , $n=$

10]显著减弱,但SC79组裸鼠肿瘤组织中Ki-67阳性表达[(58.52±5.91)%,*n*=10]显著增强(*P*<0.05);AU+SC79组裸鼠肿瘤组织中Ki-67阳性表达[(40.28±4.18)%,*n*=10]与AU组比较显著增强(*P*<0.05),但与SC79组比较显著减弱(*P*<0.05)。结果见图5。

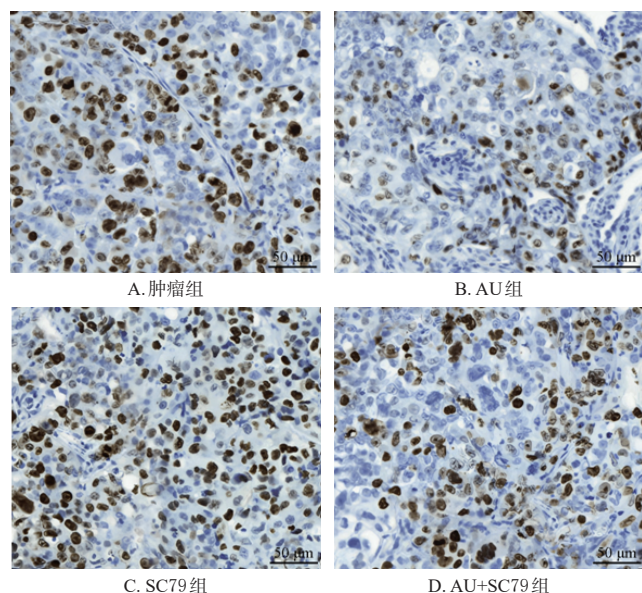
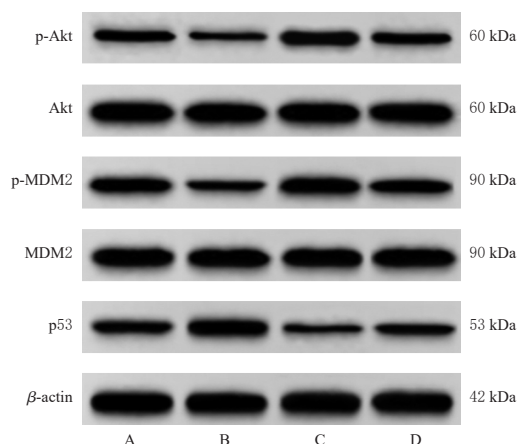


图5 各组裸鼠肿瘤组织中Ki-67蛋白表达观察结果(免疫组化法)

3.2.3 AU对裸鼠肿瘤组织中Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白表达的影响

与肿瘤组比较,AU组裸鼠肿瘤组织中p53蛋白表达水平显著升高(*P*<0.05),Akt、MDM2蛋白的磷酸化水平均显著降低(*P*<0.05),而SC79组裸鼠肿瘤组织中上述指标变化与AU组相反(*P*<0.05);AU+SC79组与AU组比较裸鼠肿瘤组织中p53蛋白表达水平显著降低,Akt、MDM2蛋白的磷酸化水平均显著升高(*P*<0.05),但与SC79组比较裸鼠肿瘤组织中上述指标变化相反(*P*<0.05)。结果见图6、表3。



A: 肿瘤组; B: AU组; C: SC79组; D: AU+SC79组。

图6 各组细胞中p-Akt、p-MDM2、p53、Akt、MDM2蛋白表达的电泳图

表3 各组裸鼠肿瘤组织中Akt/MDM2/p53信号通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	p-Akt/Akt	p-MDM2/MDM2	p53/β-actin
肿瘤组	0.55±0.06	0.67±0.07	0.37±0.04
AU组	0.28±0.03 ^a	0.34±0.04 ^a	0.61±0.07 ^b
SC79组	0.78±0.08 ^a	0.88±0.09 ^a	0.19±0.02 ^c
AU+SC79组	0.59±0.06 ^{bc}	0.61±0.07 ^{bc}	0.34±0.04 ^{bc}

a: 与肿瘤组比较,*P*<0.05;b: 与AU组比较,*P*<0.05;c: 与SC79组比较,*P*<0.05。

4 讨论

前列腺是男性生殖系统中重要的实质性器官,前列腺癌是男性癌症相关死亡的第二大原因,被认为是一种雄激素依赖性癌症^[16]。大多数PC患者被确诊时已经转移或处于局部晚期,目前的治疗方法虽然在一定程度上提高了患者存活率,但可能会引起尿频和尿急等副作用,影响患者的生活质量,并存在复发、并发症等风险^[17]。因此,寻找和开发有效治疗PC的药物已迫在眉睫。

近年来,植物提取物和中草药因其副作用较小,已成为治疗肿瘤的潜在候选物。AU是一种环烯醚萜苷,是从中草药中分离出来的天然化合物,具有抗肿瘤、骨质疏松、抗炎、保肝、抗氧化等多种生物学特性^[18]。本研究中的平板克隆形成实验及MTT实验结果表明,经AU干预后,PC3细胞克隆、增殖能力降低,表明AU可抑制PC细胞增殖。流式细胞术检测结果显示,AU处理细胞后,PC3细胞凋亡率升高,表明AU可诱导PC3细胞凋亡。Ki-67是细胞核内与增殖相关的核蛋白,可反映肿瘤细胞增殖活性^[19]。动物实验结果进一步显示,裸鼠肿瘤组织中Ki-67蛋白表达下调,表明AU可抑制异种移植肿瘤生长。以上结果提示,AU可能具有抗PC的作用。

Akt是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,可参与DNA损伤反应的传导,且其被证实可负向调节p53蛋白表达。p-Akt可诱导MDM2发生磷酸化,从而使MDM2蛋白从细胞质转移到细胞核,在细胞核中MDM2可降解p53蛋白并参与p53蛋白表达的负向调控^[20]。p53蛋白作为肿瘤抑制因子,通常在多种人类癌症中突变或功能失活,进而影响DNA损伤反应的修复过程。本研究通过体内外实验发现,AU可抑制裸鼠肿瘤组织及PC3细胞中Akt、MDM2蛋白磷酸化,促进p53蛋白表达,这提示AU可能是通过调节Akt/MDM2/p53信号通路发挥抗PC作用。SC79是一种特异性Akt活化剂,可用于增强各种生理和病理条件下Akt活性。本研究通过体内外实验验证,结果显示,单独加入SC79可激活Akt/MDM2信号通路,进而抑制p53蛋白表达,促进PC细胞恶性发展及肿瘤生长,但联合AU处理后,上述作用效果被扭转。这表明AU可能是通过抑制Akt/MDM2/p53信号通路实现抗PC作用。

综上所述,AU可通过抑制Akt/MDM2/p53信号通路对PC发挥抗肿瘤作用。这为AU抗肿瘤的临床应用提供了依据,但是否涉及其他作用机制,仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] LEI Y H, CHAN M, LIU H Y, et al. Evodiamine as the active compound of *evodiae fructus* to inhibit proliferation and migration of prostate cancer through PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway[J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 4399334.
- [2] 刘波, 余佳, 王坤, 等. 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[J]. *中国药房*, 2021, 32(15):1830-1836.
- LIU B, YU J, WANG K, et al. Effects of water extract from *Carpesium cernuum* on proliferation, metastasis and invasion of prostate cancer PC3 cells[J]. *China Pharm*, 2021, 32(15):1830-1836.
- [3] LIU L N, ZHANG Y, HU X, et al. MiR-138-5p inhibits prostate cancer cell proliferation and chemoresistance by targeting APOBEC3B[J]. *Transl Oncol*, 2023, 35: 101723.
- [4] 韩曼飞, 张刘强, 李医明. 天然桃叶珊瑚苷及其衍生物的化学结构和药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2017, 48(19):4105-4113.
- HAN M F, ZHANG L Q, LI Y M. Research progress on chemical structures and pharmacological effects of natural aucubin and its derivatives[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(19):4105-4113.
- [5] SHAO M, KUANG Z Y, WANG W L, et al. Aucubin exerts anticancer activity in breast cancer and regulates intestinal microbiota[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022:4534411.
- [6] 赵军军, 鲁兰, 卢欢, 等. 车前草基于GEO芯片数据前列腺癌特征基因的生物信息学分析[J]. *江西中医药大学学报*, 2022, 34(6):70-74.
- ZHAO J J, LU L, LU H, et al. Bioinformatics analysis of prostate cancer genes based on GEO databases of *Plantaginis Herba*[J]. *J Jiangxi Univ Chin Med*, 2022, 34(6): 70-74.
- [7] SONG M Q, BODE A M, DONG Z G, et al. Akt as a therapeutic target for cancer[J]. *Cancer Res*, 2019, 79(6): 1019-1031.
- [8] GUPTA A, SHAH K, OZA M J, et al. Reactivation of p53 gene by MDM2 inhibitors: a novel therapy for cancer treatment[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019, 109:484-492.
- [9] CHIBAYA L, KARIM B, ZHANG H, et al. MDM2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(4):e2003193118.
- [10] HAN C T, SCHOENE N W, LEI K Y. Influence of zinc deficiency on Akt-MDM2-p53 and Akt-p21 signaling axes in normal and malignant human prostate cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(5):C1188-C1199.
- [11] 冯淑炯, 江巧丽. 桃叶珊瑚苷对人结肠癌HT-29细胞恶性生物学行为及SCAP/SREBP-1通路的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2021, 31(6):509-514.
- FENG S J, JIANG Q L. Aucubin regulates malignant biological behavior of human colon cancer HT-29 cells possibly via SCAP/SREBP-1 pathway[J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med*, 2021, 31(6):509-514.
- [12] 黄超, 方兴刚, 陈璐, 等. 益母草碱调节Akt/MDM2/p53信号通路对脑胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响[J]. *疑难病杂志*, 2023, 22(10):1090-1097.
- HUANG C, FANG X G, CHEN L, et al. The effect of Leonurine regulation on the Akt/MDM2/p53 signaling pathway on the malignant biological behavior of glioma cells[J]. *Chin J Difficult Complicat Cases*, 2023, 22(10): 1090-1097.
- [13] CHENG J, SUN Y, ZHAO H C, et al. Niraparib restrains prostate cancer cell proliferation and metastasis and tumor growth in mice by regulating the lncRNA MEG3/miR-181-5p/GATA6 pathway[J]. *PeerJ*, 2023, 11:e16314.
- [14] 夏红丽, 田俊斌, 李治琴. 桃叶珊瑚苷对膝关节炎小鼠的作用及机制实验研究[J]. *陕西医学杂志*, 2023, 52(9): 1150-1154, 1167.
- XIA H L, TIAN J B, LI Z Q. Effects and mechanism of aucubin on knee osteoarthritis in mice[J]. *Shaanxi Med J*, 2023, 52(9):1150-1154, 1167.
- [15] 陈姣蓉, 洪小平, 段妍君, 等. 蛇床子素对特异性皮炎小鼠皮肤屏障及慢性瘙痒的作用[J]. *中成药*, 2021, 43(12):3489-3492.
- CHEN J R, HONG X P, DUAN Y J, et al. Effects of osthole on skin barrier and chronic itching in mice with specific dermatitis[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(12): 3489-3492.
- [16] ZHANG D, ZHAO K, HAN T, et al. Bisphenol A promote the cell proliferation and invasion ability of prostate cancer cells via regulating the androgen receptor[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 269(1):115818-115829.
- [17] CAO H W, FENG Y G, SUN P, et al. Zhoushi qiling decoction inhibits proliferation of human prostate cancer cells through IL-6/STAT3 pathway[J]. *J Cancer*, 2023, 14(12):2246-2254.
- [18] LIAO Y H, CHEN F, TANG H S, et al. Extraction and purification of aucubin from *Eucommia ulmoides* seed druff in natural deep eutectic solvents using macroporous resins [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(1):1723-1737.
- [19] 田莉, 赵济华, 徐晋珩, 等. lncRNA OSTN-AS1下调miR-4461表达促进前列腺癌LNCaP细胞增殖、迁移和侵袭[J]. *医学分子生物学杂志*, 2023, 9(3):215-220.
- TIAN L, ZHAO J H, XU J H, et al. LncRNA OSTN-AS1 promotes the proliferation, migration and invasion of prostate cancer LNCaP cell by down-regulating miR-4461[J]. *J Med Mol Biol*, 2023, 9(3):215-220.
- [20] HE S L, WANG W P, YANG Y S, et al. FAM3B promotes progression of oesophageal carcinoma via regulating the Akt-MDM2-p53 signaling axis and the epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 1375-1385.

(收稿日期:2024-02-27 修回日期:2024-05-30)
(编辑:林 静)