

中国乡村医师,2005;7(23):54.

2 陈颖. 夏滕口服液对自发性高血压大鼠血压、血浆 NO 及 ET 的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2006;12(5):364.

3 Kubo T, Hagiwara Y. Enhanced activity of angiotensin II-sensitive neurons in the anterior hypothalamic area of spontaneously hypertensive rats [J]. Brain Res,2004;10(20):140-6.

4 Jennings G. New definitions in cardiovascular risk management; is it time for angiotensin II receptor blockers to become first-line medication [J]? Eur Heart J Suppl,2003;14(5):3-11.

[2007-03-01 收稿 2007-06-04 修回]

(编辑 胡国义)

吴茱萸碱诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡机制的实验研究

张辉 吕家驹¹ 丁森森¹ 张捷² 赵跃然² (山东省立医院器官移植中心, 山东 济南 250021)

【摘要】 目的 探讨吴茱萸碱诱导人前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的不同机制。方法 应用 MTT 法检测吴茱萸碱对 PC-3 细胞生长的抑制作用, Western blot 法检测吴茱萸碱诱导 PC-3 细胞凋亡的信号通路。结果 吴茱萸碱($\geq 1 \mu\text{mol/L}$)明显抑制 PC-3 细胞生长,吴茱萸碱作用 24 h 后, caspase 蛋白酶凋亡通路被激活, caspase-3 和 caspase-9 的表达增加,同时 bcl-2 蛋白表达减少而 bax 蛋白表达增加。结论 吴茱萸碱对前列腺癌 PC-3 细胞主要是通过激活 caspase 通路及下调 bcl-2 表达和增加 bax 表达等信号通路诱导细胞凋亡。

【关键词】 吴茱萸碱;前列腺癌;PC-3 细胞;凋亡

【中图分类号】 R737.25 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9202(2007)13-1230-02

近年来研究表明,从传统中草药吴茱萸中分离出的、有生物活性的生物碱吴茱萸碱具有抗肿瘤的作用,但报道较少。Ogasawara 等^[1]报道吴茱萸碱在体内可以抑制大鼠结肠癌 26-L5 细胞的转移与浸润。本研究着重探讨吴茱萸碱对激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 吴茱萸碱购自中国药品生物制品鉴定所; Ham's F12 培养基 (GIBCO, USA); 胎牛血清 (Hyclone, USA); 四氮甲唑啉 (MTT) 购自美国 Sigma 公司; 鼠抗 bax、bcl-2 单克隆抗体, 兔抗 caspase-3、caspase-9 多克隆抗体, 鼠抗 β -actin 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔及兔抗鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Santa Cruz Biotechnology (USA); DC3022 酶联免疫检测仪; Thermo Forma CO₂ 恒温培养箱; Bio-Rad 电泳-转膜槽。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 前列腺癌 PC-3 细胞系购自中国医学科学院上海细胞生物研究所。将 PC-3 细胞置于含 10% 胎牛血清的 Ham's F12 培养液中, 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养。

1.2.2 MTT 试验 取第 4~6 代的前列腺癌 PC-3 细胞, 消化、计数, 以 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 细胞密度 $100 \mu\text{l}$ 接种于 96 孔板上, 每孔 $100 \mu\text{l}$, 待 24 h 细胞处于贴壁状态后向培养细胞中加入不同浓度的吴茱萸碱 $100 \mu\text{l}$, 其终浓度分别为: 0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入 0.5% 乙醇, 并设空白对照。每一药物的各个浓度重复 3 次。放置 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养 24、48、72、96 h 后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) $20 \mu\text{l}$, 37℃ 继续培养 4 h

后吸弃上清液, 然后再每孔加入 $150 \mu\text{l}$ 10% SDS, 37℃ 过夜后振荡 15 min, 使结晶充分溶解。选择 570 nm 波长在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收 A 值, 记录结果。细胞增殖指数 = 药物组吸光度 A 值/对照组 0 h 吸光度 A 值, 以时间为横轴, 细胞增殖指数为纵轴, 绘制细胞生长曲线。

1.2.3 Western blot 检测 将吴茱萸碱 (1、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用 PC-3 细胞 24、48 h 后, 分别冷 PBS 洗涤, 加入蛋白裂解液 (500 μl RIPA, 5 μl PMSF) 冰浴中裂解细胞, 并用超声细胞裂解器超声, 4℃ 1 000 g 离心 15 min, 收集上清即为蛋白, BCA 法蛋白定量, 取总蛋白 50 μl 的样品先进行 70 min 10% SDS-PAGE 电泳, 然后 50 min 电转移至 NC 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 用 5% 脱脂牛奶稀释的一抗封闭过夜 (鼠抗 bcl-2、bax 单克隆抗体以 1:800, 兔抗 caspase-3、caspase-9 分别以 1:1 000 和 1:2 000), HRP 标记的羊抗兔及兔抗鼠 IgG 二抗作用封闭 1 h, Western blot Luminol reagent 检测显影。Alpha2200 图像分析仪进行成像, 测定 bcl-2、bax、caspase-3、caspase-9 与 β -actin 比值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件两因素方差分析和 t 检验进行统计学分析。

2 结 果

2.1 吴茱萸碱对 PC-3 细胞增殖的影响 药物刺激 24 h 后, 吴茱萸碱在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度作用 PC-3 细胞后增殖, 与对照组相比较无统计学意义; 而在 1 $\mu\text{mol/L}$ 以上的浓度对 PC-3 细胞的增殖存在明显的抑制作用, 即随着吴茱萸碱药物浓度的增加抑制增殖的作用则越强 ($P < 0.01$, 图 1), 吴茱萸碱抑制细胞 PC-3 的生长作用可以持续至 96 h。

2.2 吴茱萸碱诱导 PC-3 细胞凋亡过程中 bax、bcl-2 蛋白的表达 在 PC-3 细胞经吴茱萸碱 (1、10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后, bax 蛋白的表达呈现随着药物浓度的增加而呈增加的趋势 (图 2)。但 bcl-2 蛋白的表达则随着吴茱萸碱浓度的增加而呈现递减的

1 泌尿外科 2 中心实验室

作者简介:张辉(1976-),男,博士,主治医师,主要从事泌尿系统肿瘤及肾移植的研究。

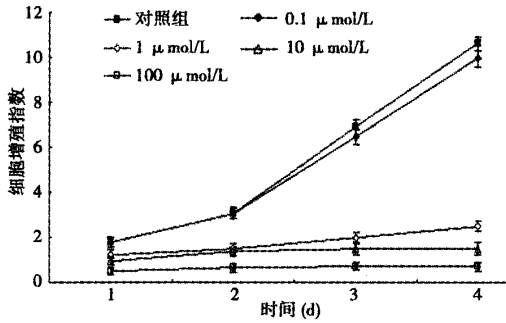


图 1 吴茱萸碱处理后 PC-3 细胞的增殖情况

现象,可持续至 48 h。

2.3 吴茱萸碱诱导 PC-3 细胞凋亡过程中 caspase-3、caspase-9 蛋白的表达 PC-3 细胞经吴茱萸碱(1、10 μmol/L)处理 24 h 后即可观察到 procaspase-9 蛋白的表达随着吴茱萸碱浓度的增加而呈现减少,而 caspase-9 蛋白的表达则随药物浓度的增加而成比例增加趋势。吴茱萸碱可以导致 procaspase-3 蛋白的表达减少,并随着药物浓度的增加而更加明显(图 2)。

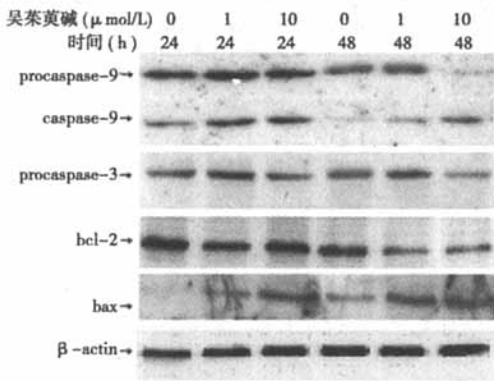


图 2 吴茱萸碱处理不同时间后 PC-3 细胞 caspase-3、caspase-9、bax、bcl-2 蛋白的表达

3 讨论

吴茱萸碱是自传统中草药吴茱萸中分离出的最主要的、具有生物活性的生物碱之一。近年来,Ogasawara^[1,2]、张莹^[3,4]等报道其具有抗肿瘤的作用。本研究结果显示,吴茱萸碱(≥1 μmol/L)显著抑制前列腺癌 PC-3 细胞的生长,并随着剂量和时间的增加,其抑制作用更加显著,存在剂量-时间依赖性,与费晓方^[5]、Zhang^[6]等报道的结果相一致。

细胞凋亡是一个复杂的过程,可通过多条途径实现,其中死亡受体/caspase-8 途径和线粒体-细胞色素 C/caspase-9/caspase-3 途径是其中最重要的两条途径。一种途径是具有特殊配体的细胞表面死亡受体参与导致 caspase 激活的途径,该配体可使 caspase-8 激活;另一种凋亡途径为生长因子的撤退或放射线及药物所诱导的途径,它可使细胞色素 C 从线粒体中释放至胞浆中,从而激活 caspase-9。一旦 caspase-8 或 caspase-9

被激活,它们进入共同的凋亡途径,即激活下游的效应 caspase,如 caspase-3、caspase-6 和 caspase-7,一些研究也已报道吴茱萸碱能够诱导各种不同的肿瘤细胞发生凋亡过程。费晓方等^[5]报道可通过 caspase 信号传导途径诱导人子宫颈癌 HeLa 细胞发生凋亡。最近 Wang 等^[7]报道茱萸碱可以通过 IL-1 调节途径增加 Fas 配体的表达,从而进一步诱导黑色素瘤 A375-S2 细胞发生凋亡过程。

bcl-2 家族是凋亡过程中主要的调控因子,该家族成员可以调节细胞色素 C 的释放同时也可直接或间接激活 caspase。抗凋亡蛋白 bcl-2 与促凋亡蛋白 bax 间的比例在维持体内平衡中起重要作用,促凋亡蛋白占优势时可促进细胞凋亡,反之则促进细胞生长^[8]。Pidgeon 等^[9]报道在雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 和 DU-145 细胞中 Baicalein 和 BHPP 增加 bcl-2 mRNA 和蛋白的表达,减少 bax mRNA 和蛋白的表达。本组研究显示吴茱萸碱可下调 PC-3 细胞中 bcl-2 蛋白表达的水平,同时激活 bax 蛋白的表达,因此使 bax/bcl-2 比值显著增高,有利于促进细胞凋亡。

综上,本研究证实了吴茱萸碱在前列腺癌 PC-3 细胞中抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡的作用,并证实了吴茱萸碱是通过释放细胞色素 C 激活 caspase-9 和其他下游调控 caspase,以及下调抗凋亡蛋白 bcl-2 和增加促凋亡蛋白 bax 诱导前列腺癌细胞 PC-3 凋亡。

4 参考文献

- Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Screening of natural compounds for inhibitory activity on colon cancer cell migration[J]. Biol Pharm Bull, 2001;24(6):720-3.
- Ogasawara M, Matsubara T, Suzuki H. Inhibitory effects of evodiamine on in vitro invasion and experimental lung metastasis of murine colon cancer cells[J]. Biol Pharm Bull, 2001;24(8):917-20.
- 张莹,张起辉,吴立军,等. 吴茱萸碱诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡过程中非 caspase 调控因素[J]. 中国药理学通报, 2004;20(1):61-4.
- 张莹,张起辉,吴立军,等. 吴茱萸碱诱导 A375-S2 细胞死亡过程中对 ERK 激酶的调控[J]. 中国病理生理杂志, 2004;20(12):2175-9.
- 费晓方,王本祥,池岛乔. 吴茱萸碱诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的机制研究[J]. 药学报, 2002;37(9):673-6.
- Zhang Y, Zhang QH, Wu LJ, et al. Atypical apoptosis in L929 cells induced by evodiamine isolated from Evodia rutaecarp[J]. J Asian Nat Prod Res, 2004;6(1):19-27.
- Wang C, Wang MW, Tashiro S, et al. Evodiamine induced human melanoma A375-S2 cell death partially through interleukin 1 mediated pathway[J]. Biol Pharm Bull, 2005;28(6):984-9.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, et al. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and trigger cytochrome c release from mitochondria[J]. J Biochem, 2000;345(Pt 2):271-8.
- Pidgeon GP, Kandouz M, Meram A, et al. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells[J]. Cancer Res, 2002;62(9):2721-7.

[2006-01-23 收稿 2006-03-27 修回]

(编辑 牛铁兵)