

米非司酮对前列腺癌 PC-3 细胞周期及其蛋白的影响

张辉 高庆贞 张捷 赵跃然 吕家驹

【摘要】 目的 探讨米非司酮(MIF)对前列腺癌 PC-3 细胞周期及其调控蛋白的影响及其作用机制。方法 MTT 法检测 1、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ MIF 作用于 PC-3 细胞 24 ~ 120 h 的吸光度(A)值,流式细胞仪检测 10、50 $\mu\text{mol/L}$ MIF 作用 PC-3 细胞 48 h 后细胞周期的变化,免疫组化法和 Western blot 法检测 10、50 $\mu\text{mol/L}$ MIF 处理 48 h 后 PC-3 细胞 cyclin D1、bax、bcl-2 蛋白表达的变化情况。

结果 1 $\mu\text{mol/L}$ MIF 作用 24 ~ 120 h 的 A 值与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 组 A 值与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);MIF 对 PC-3 细胞的抑制作用呈时间-剂量依赖性。MIF 作用 48 h 后使 PC-3 细胞停滞于 G_1/G_0 期,并使此期细胞比例从对照组的 27.4% 增加到 10 $\mu\text{mol/L}$ 组的 50.4% 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 组的 59.2%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。处理后 PC-3 细胞中 bcl-2 蛋白和 cyclin D1 蛋白表达量,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而 bax 表达量显著增加。结论 MIF 以时间-剂量依赖性方式抑制前列腺癌 PC-3 细胞的增殖,可能通过下调 cyclin D1 蛋白表达,阻止 PC-3 细胞 G_1 期向 S 期的转换,使其停留于 G_1/G_0 期;同时降低 bcl-2 蛋白的表达及激活 bax 蛋白的表达等抑制前列腺癌 PC-3 细胞增殖。

【关键词】 米非司酮; 雄激素非依赖性; 前列腺肿瘤; 细胞凋亡

Effect of mifepristone on cell cycle arrest and its regulators in prostate cancer cell line PC-3 ZHANG Hui*, GAO Qing-zhen, ZHANG Jie, ZHAO Yue-ran, LÜ Jia-ju. * Department of Urology, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250021, China

Corresponding author: LÜ Jia-ju, Email: kyoto2310@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of mifepristone (MIF) on cell cycle arrest and its regulating proteins in androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. **Methods** The A values of the prostate cancer cells PC-3 in each group with various concentrations (1, 10, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) of MIF at different time intervals (24 - 120 h) were detected with MTT assay. 0.1% ethanol was used in controls. The cell cycles of the PC-3 cells treated with 10 and 50 $\mu\text{mol/L}$ of MIF for 48 h were assessed by flow cytometry (FCM) analysis. Immunohistochemical and Western blot methods were used to determine the expression of cyclin D1, bax and bcl-2 proteins after treatment with 10 and 50 $\mu\text{mol/L}$ of MIF. **Results** The A values of the cancer cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ of MIF were similar to that of controls ($P > 0.05$), while those of the cells treated with 10, 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ of MIF were significantly different from that of controls ($P < 0.01$). MIF markedly inhibited cell proliferation of prostate cancer cells PC-3 in a dose- and time-dependent manner. FCM analysis showed the cell cycle of cancer cells treated with 10 and 50 $\mu\text{mol/L}$ of MIF for 48h were blocked at G_1/G_0 phase, at which the cell ratio increased from 27.4% (controls) to 50.4% (10 $\mu\text{mol/L}$ MIF group) and 59.2% (50 $\mu\text{mol/L}$ MIF group), showing significant difference between the treatment groups and controls ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed the bcl-2 expression decreased from 3.53 ± 0.47 (controls) to 2.03 ± 0.74 and 1.83 ± 0.44 in the cells treated with 10 and 50 $\mu\text{mol/L}$ of MIF, which was significantly different from that of controls ($P < 0.05$); the expression of cyclin D1 in the cells

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471731)

作者单位:250021 济南,山东大学山东省立医院泌尿外科(张辉、高庆贞、吕家驹),中心实验室(张捷、赵跃然)

通信作者:吕家驹, Email: kyoto2310@sina.com

treated with 10 and 50 $\mu\text{mol/L}$ of MIF were significantly decreased to 2.66 ± 0.79 and 1.74 ± 0.56 , as compared with controls (4.27 ± 0.98) ($P < 0.05$); and the expression of bax increased from 1.88 ± 0.50 (controls) to 2.62 ± 0.36 (10 $\mu\text{mol/L}$ MIF group) and 3.78 ± 0.31 (50 $\mu\text{mol/L}$ MIF group). Western blot analysis revealed the ratio of cyclin D1/ β -actin decreased from 0.82 ± 0.15 (controls) to 0.57 ± 0.09 (10 $\mu\text{mol/L}$ MIF group) and 0.42 ± 0.13 (50 $\mu\text{mol/L}$ MIF group) ($P < 0.05$). The ratio of bcl-2/ β -actin in the cells treated with 10 and 50 $\mu\text{mol/L}$ of MIF significantly decreased to 0.59 ± 0.09 and 0.47 ± 0.09 , compared with that of controls (0.78 ± 0.13) ($P < 0.05$). However, the ratio of bax/ β -actin of 50 $\mu\text{mol/L}$ MIF group (0.74 ± 0.11) significantly increased ($P < 0.01$), while the ratio of bax/ β -actin of 10 $\mu\text{mol/L}$ MIF group (0.63 ± 0.09) was similar to that of controls (0.51 ± 0.10). **Conclusions** MIF can inhibit proliferation of androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 in time- and dose-dependent manner. The inhibiting effect is through decreasing cyclin D1 protein expression, which blocks cell cycle progression in G_1/G_0 phase, and through down-regulating bcl-2 and increasing bax protein expression.

[Key words] Mifepristone; Androgen-independent; Prostatic neoplasms; Apoptosis

近年来实验研究表明米非司酮 (mifepristone, MIF) 可诱导某些肿瘤如乳腺癌、脑膜瘤、子宫肌瘤、子宫内膜瘤、前列腺癌等肿瘤的细胞凋亡, 抑制肿瘤生长^[1-5], 但关于它对雄激素非依赖性前列腺癌影响的研究很少。我们通过观察 MIF 对雄激素非依赖性前列腺癌细胞 PC-3 细胞周期及其调控蛋白的影响, 探讨 MIF 对雄激素非依赖性前列腺癌的作用及机理。

材料与方 法

一、细胞株及实验材料

前列腺癌 PC-3 细胞购自中国医学科学院上海细胞生物研究所; MIF 由上海华联制药有限公司赠送; Ham's F12 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 四氮甲唑蓝 (MTT) 购自美国 Sigma 公司; 多克隆兔抗人 cyclin D1 抗体, 单克隆鼠抗人 bax、bcl-2 抗体, 辣根酶标记抗鼠 IgG 二抗, 辣根酶标记抗兔 IgG 二抗 (HRP-抗鼠 IgG 二抗、HRP-抗兔 IgG 二抗)、Western blot Lumious 发光试剂及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉生物工程公司, 免疫组化 SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

二、实验方法

1. 细胞培养: 将 PC-3 细胞置于含 10% 胎牛血清的 Ham F12 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养。

2. MTT 实验^[6]: PC-3 细胞以 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 100 μl 接种于 96 孔板, 贴壁后加入 MIF 使其终浓度分别为 1、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$, 并以 0.1% 乙醇作为对照组。检测 MIF 作用 24 ~ 120 h 后各组癌细胞平均吸

光度 (A) 值, 以时间为横轴, 吸光度 (A) 值为纵轴, 绘制细胞生长曲线。

3. 流式细胞仪凋亡检测: PC-3 细胞 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 100 μl 接种于 6 孔板, 贴壁后给予 10、50 $\mu\text{mol/L}$ MIF 处理 48 h 后, 采用流式细胞仪技术检测细胞周期分布情况。

4. 细胞免疫组化: PC-3 细胞 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 100 μl 接种于 96 孔板上, 贴壁后给予 10、50 $\mu\text{mol/L}$ MIF 处理 48 h 后, 95% 乙醇固定 30 min, 按照说明书操作, 其中 cyclin D1、bax、bcl-2 抗体的工作浓度分别为 1: 80、1: 100、1: 100。结果判定标准: 胞质呈现棕黄色颗粒为阳性细胞, 按阳性细胞百分比分为 4 级: ① 0 级为无阳性细胞, 计 0 分; ② 1 级为阳性细胞占视野细胞总数 $\leq 25\%$, 计 1 分; ③ 2 级为阳性细胞占视野细胞总数 26% ~ 50%, 计 2 分; ④ 3 级为阳性细胞占视野细胞总数 $> 50\%$, 计 3 分。

5. Western blot 检测: 10、50 $\mu\text{mol/L}$ MIF 作用 PC-3 细胞 48 h 后, 加入裂解液 (500 μl RIPA, 5 μl PMSF) 冰浴中裂解细胞提取蛋白, BCA 法蛋白定量, 按说明书操作, Western blot Lumious 发光试剂检测显影。Alpha 2200 图像分析仪进行成像, 测定 cyclin D1/ β -actin、bcl-2/ β -actin、bax/ β -actin 比值。

三、统计学方法

采用 SPSS10.0 软件进行两因素方差分析和 t 检验。

结 果

一、MIF 对 PC-3 细胞增殖的影响

MIF 浓度 1、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 分别作用于 PC-3 细胞不同时间后各组 A 值见表 1。1 $\mu\text{mol/L}$ 组

与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；而 10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。10 $\mu\text{mol/L}$ MIF 刺激 48 h 后开始出现抑制 PC-3 细胞增殖的作用,并随着 MIF 浓度增加抑制生长的作用越强 ($P < 0.01$)。因此, MIF 抑制前列腺癌 PC-3 细胞的最佳浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$,最佳作用时间为 48 h。

二、MIF 对 PC-3 细胞周期的影响

10 $\mu\text{mol/L}$ MIF 作用 PC-3 细胞 48 h 后, G_0/G_1 期细胞占 50.4%, S 期 36.2%, G_2/M 期 13.4%; 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 G_0/G_1 期占 59.2%, S 期 31.1%, G_2/M 期 9.7%; 对照组分别为 27.4%、45.5% 和 27.1%。MIF 导致 PC-3 细胞被阻滞于 G_1/G_0 期,并随药物浓度升高而增加。MIF 组与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。MIF 组出现凋亡位于 G_0/G_1 期前面的亚二倍体峰。

三、MIF 对 PC-3 细胞中 cyclin D1 蛋白表达的影响

PC-3 细胞经 10、50 $\mu\text{mol/L}$ MIF 处理 48 h 后, cyclin D1 蛋白表达情况见表 2。结果显示 MIF 组 cyclin D1 蛋白表达量与对照组比较均明显减少 ($P < 0.05$)。

四、MIF 对 PC-3 细胞中 bcl-2、bax 蛋白表达的影响

10、50 $\mu\text{mol/L}$ MIF 作用于 PC-3 细胞 48 h 后 bcl-2、bax 蛋白表达量见表 2。MIF 组 bcl-2 表达量比对照组明显减少 ($P < 0.05$)；而 bax 表达则增加。

讨 论

近年来研究发现, MIF 具有潜在的抑制肿瘤生长的作用,并在乳腺癌、子宫内膜癌、前列腺癌治疗方面进行了探索性应用^[1-5],但其对肿瘤细胞生长的影响及在治疗中的价值尚无定论。

本研究结果显示 MIF $> 1 \mu\text{mol/L}$ 均可抑制 PC-3 细胞增殖,其抑制作用随药物浓度和作用时间增加而增加,即表现为剂量-时间依赖性关系。其作用机理目前尚未完全清晰。El Etreby 等^[7]报道 MIF 和三苯氧胺通过诱导 DNA 断裂增加, bcl-2 下调, TGF- β 蛋白激活有效地诱导凋亡,从而抑制前列腺癌 LNCaP、LNCaP-C4, LNCaP-C4-2 3 种细胞的生长。为进一步证实细胞凋亡的存在,本研究采用流式细胞仪检测 10、50 $\mu\text{mol/L}$ MIF 处理 48 h 后 PC-3 细胞的细胞周期分布变化,显示细胞被阻滞于 G_1/G_0 期,其比例呈逐渐增加;同时在 G_1/G_0 期前面可见亚二倍体的凋亡峰,其凋亡率与药物浓度呈正比例关系。以上结果表明 MIF 可抑制 PC-3 细胞的生长。本研究结果与 Thomas 和 Monet^[8]报道 MIF 作用乳腺癌 MCF-7 细胞后可使细胞停滞于 G_1/G_0 期,阻止细胞从 G_1 期向 S 期的转换,最终导致乳腺癌细胞凋亡的研究结果相一致。

阻止细胞 G_1 期向 S 期的转换是通过细胞周期素蛋白 cyclin D1 的调控作用而实现的。目前认为肿瘤细胞的生长与细胞周期紊乱密切相关, cyclin

表 1 对照组与不同浓度 MIF 组作用于 PC-3 细胞不同时间的 A 值 ($\bar{x} \pm s$, 每组 $n = 3$)

分 组	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
对照组	0.15 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01	0.38 \pm 0.14	0.57 \pm 0.01	0.61 \pm 0.02
1 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.14 \pm 0.00	0.19 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01	0.47 \pm 0.01
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.14 \pm 0.01*	0.15 \pm 0.01	0.24 \pm 0.00*	0.31 \pm 0.01*	0.28 \pm 0.14*
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.12 \pm 0.01*	0.09 \pm 0.00*	0.11 \pm 0.00*	0.06 \pm 0.02*	0.03 \pm 0.01*
100 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.11 \pm 0.01*	0.05 \pm 0.00*	0.04 \pm 0.01*	0.02 \pm 0.01*	0.01 \pm 0.00*

注: * 与对照组比较 $P < 0.05$, # 与对照组比较 $P < 0.01$

表 2 MIF 作用 48 h 对 PC-3 细胞中 bcl-2、bax 和 cyclin D1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	免疫组化法			Western blot 法		
	bcl-2	bax	cyclin D1	bcl-2	bax	cyclin D1
对照组	3.53 \pm 0.47	1.88 \pm 0.50	4.27 \pm 0.98	0.78 \pm 0.13	0.51 \pm 0.10	0.82 \pm 0.15
10 $\mu\text{mol/L}$ 组	2.03 \pm 0.74*	2.62 \pm 0.36	2.66 \pm 0.79*	0.59 \pm 0.09*	0.63 \pm 0.09	0.57 \pm 0.09*
50 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.83 \pm 0.44*	3.78 \pm 0.31**	1.74 \pm 0.56**	0.47 \pm 0.09**	0.74 \pm 0.11*	0.42 \pm 0.13**

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$; ** 与对照组比较, $P < 0.01$

D1 的过度表达缩短了 G₁ 期的时限,可使细胞无序地越过 G₁/S 限制点,从而促使细胞增殖^[9,10]。本研究中 MIF 处理过的 PC-3 细胞中 cyclin D1 蛋白表达随着 MIF 浓度增加而呈明显下降趋势。因此, MIF 诱导 PC-3 细胞的凋亡,其机制可能是通过下调 cyclin D1 蛋白表达,使细胞停留在 G₀/G₁ 期而诱导细胞发生凋亡。

bcl-2 和 bax 是调控凋亡的重要基因,绝大多数细胞中 bcl-2 都可以抑制细胞凋亡,而 bax 可以与 bcl-2 形成二聚体拮抗 bcl-2 的功能,从而促进凋亡^[11,12]。本研究结果显示 MIF 处理后 PC-3 细胞中 bcl-2 蛋白表达明显低于对照组,而 bax 蛋白表达显著升高。提示 MIF 可通过下调 bcl-2 蛋白表达,激活 bax 蛋白表达,诱导癌细胞发生凋亡。El Etreby 等^[5,7]也报道 MIF 在体外和体内实验中可通过下调 bcl-2 蛋白表达,激活 TGF-β 蛋白表达来诱导前列腺癌细胞凋亡。

综上所述, MIF 在体外可抑制前列腺癌 PC-3 细胞增殖。其机制可能是通过下调 cyclin D1 蛋白表达,使 PC-3 细胞停留于 G₁/G₀ 期,以及降低 bcl-2 蛋白表达,激活 bax 蛋白表达诱导前列腺癌细胞凋亡。

参 考 文 献

- 1 Klijn JC, Setyono-Han B, Sander HJ, et al. Pre-clinical and clinical treatment of breast cancer with antiprogesterins. *Hum Reprod*, 1994, 9: 181-189.
- 2 Schneider CC, Gibb RK, Taylor DD, et al. Inhibition of endometrial cancer cell lines by mifepristone (RU486). *J Soc Gynecol Investig*,

- 1998, 5:334-338.
- 3 Grunberg SM, Weiss MH, Spitz IM, et al. Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogesterone agent mifepristone. *J Neurosurg*, 1991, 74:861-866.
- 4 Murphy AA, Morales AJ, Kettel LM, et al. Regression of uterine leiomyomata to the antiprogesterone RU486; dose-response effect. *Fertil Steril*, 1995, 64:187-190.
- 5 El Etreby MF, Liang Y, Lewis RW. Induction of apoptosis by mifepristone and tamoxifen in human LNCaP prostate cancer cells in culture. *Prostate*, 2000, 43:31-42.
- 6 司徒镇强, 吴军正, 主编. 细胞培养. 西安: 世界图书出版社西安公司, 2004. 250-252, 346-350.
- 7 El Etreby MF, Liang Y, Johnson MH, et al. Antitumor activity of mifepristone in the human LNCaP, LNCaP-C4, and LNCaP-C4-2 prostate cancer models in nude mice. *Prostate*, 2000, 42:99-106.
- 8 Thomas M, Monet JD. Combined effects of RU486 and tamoxifen on the growth and cell cycle phases of the MCF-7 cell line. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 75:865-870.
- 9 Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, et al. The DNA damage checkpoint and human cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2000, 65:489-498.
- 10 Vermeulen K, van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 2003, 36:131-149.
- 11 Hockenbery DM, Giedt CD, O'Neill JW, et al. Mitochondria and apoptosis: new therapeutic targets. *Adv Cancer Res*, 2002, 85: 203-242.
- 12 MacCarthy-Morrogh L, Mouzakiti A, Townsend P, et al. Bcl-2 related proteins and cancer. *Biochem Soc Trans*, 1999, 27:785-789.

(收稿日期:2006-01-05)

(本文编辑:张玲媛)

· 国外期刊文摘 ·

慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征患者症状与前列腺周围括约肌超声改变的相关性

[Dellabella M, et al. *J Urol*, 2006, 176:112]

作者探讨慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征患者前列腺周围括约肌超声图像的变化,了解这种改变的发生几率,并将超声检查标准化,评价超声改变与患者症状的相关性。37 例慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征的患者和 23 例健康志愿者入组。经直肠超声检测前列

腺体积、尿道周围低回声区域体积、前列腺后唇厚度、膀胱颈厚度、逼尿肌厚度和前纤维肌基质回声强度,同时测定患者尿流率和排尿后剩余尿量。采用国际前列腺症状评分表 (IPSS) 和美国国立卫生研究院慢性前列腺炎评分 (NIH - CPSI) 评价患者症状。所有检查均由 3 名操作人员独立完成。结果:37 例患者中 36 例存在尿道周围低回声区域。操作者之间和操作者自身在超声检查参数方面无明显差异。超声检查发现慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征患者剩余尿量、逼尿肌厚度、尿道周围低回声区域、前列腺后唇厚度、膀胱颈厚度和前纤维肌基质回声强度较健康对照组均有所增加。多

因素分析结果提示,尿道周围低回声区域体积是 NIH-CPSI 疼痛、尿流和总评分的独立预测因子,前列腺后唇厚度是 IPSS 评分的惟一预测因子。尿道周围低回声区域体积、前列腺后唇厚度和膀胱颈厚度能准确地鉴别慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征患者。作者认为,通过超声检查慢性前列腺炎/慢性盆腔疼痛综合征患者的膀胱颈-后尿道部,能够发现健康人不具备的一些损害和改变。通过测定尿道周围低回声区域体积、前列腺后唇厚度和膀胱颈厚度能够帮助诊断,同时可以更好地理解慢性非细菌性前列腺炎炎复杂生理生理机制。

(叶雄俊摘译 张小东校)