

米非司酮诱导雄激素非依赖性前列腺癌细胞凋亡的实验研究

张辉 吕家驹 高庆贞 张捷

【摘要】 目的 探讨米非司酮在体外诱导雄激素非依赖性前列腺癌 DU-145、PC-3 细胞凋亡的作用。方法 采用四甲基偶氮唑蓝法检测 1、10、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮作用于前列腺癌 DU-145、PC-3 细胞 24~120 h 的吸光度(A)值,用流式细胞仪检测 10 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮作用 24 和 48 h 后 DU-145、PC-3 细胞凋亡率的变化,采用免疫组化法检测米非司酮作用 DU-145、PC-3 细胞后 bax、bcl-2、血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达的变化。结果 1 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组的 A 值与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);10、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组的 A 值与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。米非司酮对前列腺癌 DU-145、PC-3 细胞的抑制作用呈时间-剂量依赖性。10 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮作用前列腺癌 DU-145 细胞 24 和 48 h 的凋亡率分别为 15.3% 和 30.4%,PC-3 细胞的凋亡率分别为 22.2% 和 32.0%。经 10 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮作用后,DU-145、PC-3 细胞中 VEGF 和 bcl-2 蛋白的表达明显减少,而 bax 的表达显著增加($P < 0.05$)。结论 米非司酮以时间-剂量依赖性方式抑制雄激素非依赖性前列腺癌 DU-145 和 PC-3 细胞的增殖,其作用可能是通过降低 VEGF 蛋白的表达,从而下调 bcl-2、激活 bax 蛋白的表达来实现。

【关键词】 米非司酮; 前列腺肿瘤; 脱噬作用

Induction of apoptosis by mifepristone in androgen-independent prostate cancer cell lines in vitro

ZHANG Hui*, LÜ Jia-ju, GAO Qing-zhen, ZHANG Jie. *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 on cell proliferation of human androgen-independent prostate carcinoma cell lines DU-145、PC-3 in vitro and the possible mechanisms involved. **Methods** The A values of the prostate cancer cells DU-145 and PC-3 in each group with various concentrations (1, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) of mifepristone at various time intervals (24—120 h) were detected with the colorimetric 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The apoptosis rates of the DU-145 and PC-3 cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ of mifepristone for 24 h and 48 h were assessed by flow cytometry analysis technique. Immunohistochemical technique was used to determine the expression of bax, bcl-2 and vascular endothelial growth factor(VEGF) proteins after treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ of mifepristone. **Results** The A values of the cancer cells treated with 1 $\mu\text{mol/L}$ of mifepristone were similar to that of controls, while those of the cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ of mifepristone were significantly different from that of controls ($P < 0.01$). Mifepristone markedly inhibited cell proliferation of prostate cancer cells DU-145 and PC-3 on a dose- and time-depending manner. The apoptosis rates of 10 $\mu\text{mol/L}$ mifepristone for DU-145 cell line at 24 h, 48 h were respectively 15.3%, 30.4% with flow cytometry method and then PC-3 cell line were respectively 22.2%, 32.0%. Immunohistochemical technique showed the expression of bcl-2 and VEGF in the DU-145 and PC-3 cells treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ of mifepristone were significantly decreased, and the expression of bax was increased. **Conclusions** Mifepristone can induce apoptosis of androgen-independent prostate cancer cell lines DU-145 and PC-3 in vitro. The apoptosis effect is time-and-dose dependent. Mifepristone could initiate a cell death command via apoptotic pathways decreasing the expression of VEGF protein, downregulating the expression of bcl-2 protein and increasing the expression of bax protein.

【Key words】 Mifepristone; Prostatic neoplasia; Apoptosis

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、吕家驹、高庆贞), 中心实验室(张捷)

通讯作者: 吕家驹, Email: kyoto2310@sina.com

近年来体外及动物实验研究表明,米非司酮具有诱导一些人体肿瘤如乳腺癌、脑膜瘤、子宫肌瘤、子宫内膜癌等肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤生长的作用^[1-4],但其对前列腺癌的作用研究很少。2004 年 8 月—12 月本研究以 2 种前列腺癌细胞株 DU-145、PC-3 为研究对象,探讨米非司酮对人前列腺癌雄激素非依赖性细胞的抑制作用。

材料和方法

一、细胞株及实验材料

前列腺癌 DU-145、PC-3 细胞系购自中国医学科学院上海细胞生物研究所;米非司酮由上海华联制药有限公司赠送;Ham's F12 和 RPMI-1640 培养基购自美国 GIBCO 公司;胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司;bax、bcl-2、血管内皮生长因子(VEGF)抗体及二氨基联胺显色试剂盒购自北京中杉生物工程公司;免疫组织化学(免疫组化)试剂盒购自武汉博士德生物工程公司;膜联蛋白 V 细胞凋亡试剂盒购于北京宝赛生物技术有限公司。DG3022 酶联免疫检测仪(南京医用电子仪器公司);Beckman Coulter 流式细胞仪(美国);Thermo Forma CO₂ 培养箱(美国)。

二、方法

1. 细胞培养:将前列腺癌细胞 DU-145 置于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,将 PC-3 细胞置于以含 10% 胎牛血清的 Ham's F12 培养液中,37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养。

2. 米非司酮对前列腺癌 DU-145、PC-3 细胞增殖的影响:采用 MTT 比色分析法。取前列腺癌 DU-145、PC-3 细胞,以 5×10^4 /ml 密度接种于 96 孔板上,每孔 100 μ l,待细胞贴壁后加入米非司酮使其终浓度分别为 1、10、50 和 100 μ mol/L(分别为 1、10、50 和 100 μ mol/L 米非司酮组),对照组加入 0.1% 乙醇 100 μ l。每一药物浓度重复 3 次。检测米非司酮作用 24、48、72、96 和 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. 早期凋亡率的检测:取前列腺癌 DU-145、PC-3 细胞以 5×10^5 /ml 密度接种于 6 孔板上,每孔 1 ml,待细胞贴壁后给予 10 μ mol/L 米非司酮作用 24 和 48 h,不加米非司酮为阴性对照。采用流式细胞仪检测癌细胞早期凋亡率。

4. 凋亡相关蛋白及 VEGF 蛋白的表达:采用免

疫细胞化学染色方法检测 bax、bcl-2、VEGF 的表达。取前列腺癌 DU-145、PC-3 细胞以 5×10^5 /ml 密度接种于 96 孔板上,每孔 100 μ l,待细胞贴壁后给予 10 μ mol/L 米非司酮处理,每个处理重复 3 个孔,作用 48 h 后 95% 乙醇固定 30 min,按照说明书操作(其中 bax、bcl-2、VEGF 抗体的工作浓度均为 1:100)。结果判定标准:采用双盲法观察,每个孔观察 5 个视野。细胞浆中出现黄色颗粒为阳性,将染色强度分为 4 级:① 0 级为无黄色颗粒,② 1 级为淡黄色颗粒,③ 2 级为黄色颗粒,④ 3 级为棕色颗粒,分别计为 0~3 分。将细胞染色阳性百分比分为 3 级:① 0~24% 为 1 级,② 25%~50% 为 2 级,③ 大于 50% 为 3 级,分别计为 1~3 分,两者评分相加为最终评分。

三、统计学方法

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

结 果

一、米非司酮对前列腺癌细胞增殖的影响

在 PC-3 细胞中,1 μ mol/L 米非司酮组的 A 值与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);而 10、50 和 100 μ mol/L 米非司酮组 A 值与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。作用 24 和 48 h,各浓度组间的 A 值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而作用 72 h 后各浓度组的 A 值显著减少,与作用 24 和 48 h 时相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着米非司酮药物浓度的增加和作用时间的延长,PC-3 细胞的抑制率逐渐增加,见表 1。米非司酮对 DU-145 细胞的抑制作用与 PC-3 细胞相似,1 μ mol/L 米非司酮组的 A 值与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);10、50 和 100 μ mol/L 米非司酮组 A 值与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着米非司酮药物浓度的增加和作用时间的延长,其对 DU-145 细胞的抑制作用逐渐增强,见表 1。米非司酮对前列腺癌 PC-3 和 DU-145 细胞的抑制作用呈现时间-剂量依赖性。

二、米非司酮对前列腺癌细胞凋亡率的影响

DU-145 细胞经 10 μ mol/L 米非司酮作用 24 和 48 h 后,细胞凋亡率分别为 15.3% 和 30.4%,与对照组的 2.5% 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);PC-3 细胞凋亡率分别为 22.2% 和 32.0%,与对照组的 5.3% 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

三、米非司酮对前列腺癌细胞中凋亡相关蛋白 bcl-2、bax 及 VEGF 蛋白表达的影响

10 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮作用 48 h 后, DU-145 细胞中 bax 的表达增加,但与对照相比,差异无统计学意义($P > 0.05$);而 bcl-2 蛋白表达和 VEGF 蛋白表达显著降低,与对照比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);在 PC-3 细胞中, bcl-2 蛋白表达减少,与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),但 bax 蛋白

表达比对照组显著增加, VEGF 蛋白表达则明显比对照减少($P < 0.01$, 表 2, 图 1 ~ 12)。

讨 论

近年来,我国前列腺癌的发病率有逐年上升的趋势。我国临床上对早期转移性前列腺癌患者主要

表 1 不同浓度米非司酮作用前列腺癌 PC-3、DU-145 细胞不同时间的 A 值($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
PC-3 细胞					
对照组	0.171 \pm 0.008	0.226 \pm 0.039	0.238 \pm 0.009	0.394 \pm 0.019 [*]	0.494 \pm 0.177 Δ
1 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组	0.167 \pm 0.123	0.209 \pm 0.004	0.210 \pm 0.016	0.331 \pm 0.011 Δ	0.329 \pm 0.040 Δ
10 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组	0.143 \pm 0.012 [*]	0.177 \pm 0.003	0.158 \pm 0.018 [#]	0.207 \pm 0.018 ^{#*}	0.148 \pm 0.026 [#]
50 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组	0.134 \pm 0.011 [#]	0.159 \pm 0.011 [#]	0.109 \pm 0.008 ^{#Δ}	0.096 \pm 0.004 ^{#Δ}	0.066 \pm 0.003 ^{#Δ}
100 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组	0.125 \pm 0.005 [#]	0.144 \pm 0.032 [#]	0.091 \pm 0.006 ^{#Δ}	0.027 \pm 0.004 ^{#Δ}	0.018 \pm 0.002 ^{#Δ}
DU-145 细胞					
对照组	0.149 \pm 0.008	0.209 \pm 0.010	0.380 \pm 0.136	0.574 \pm 0.006 [*]	0.611 \pm 0.019 Δ
1 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组	0.144 \pm 0.003	0.193 \pm 0.006	0.237 \pm 0.009	0.481 \pm 0.010 Δ	0.474 \pm 0.013 Δ
10 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组	0.143 \pm 0.009 [*]	0.154 \pm 0.010	0.239 \pm 0.005 [#]	0.311 \pm 0.006 ^{#*}	0.283 \pm 0.145 ^{#*}
50 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组	0.122 \pm 0.007 [#]	0.086 \pm 0.003 [*]	0.106 \pm 0.003 ^{#Δ}	0.058 \pm 0.022 ^{#Δ}	0.033 \pm 0.006 ^{#Δ}
100 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组	0.111 \pm 0.009 [#]	0.052 \pm 0.002 [#]	0.042 \pm 0.008 ^{#*}	0.017 \pm 0.007 ^{#Δ}	0.013 \pm 0.001 ^{#Δ}

注: 1. 与对照组和 1 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组比较, ^{*} $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$ 2. 与 24 和 48 h 比较, Δ $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$

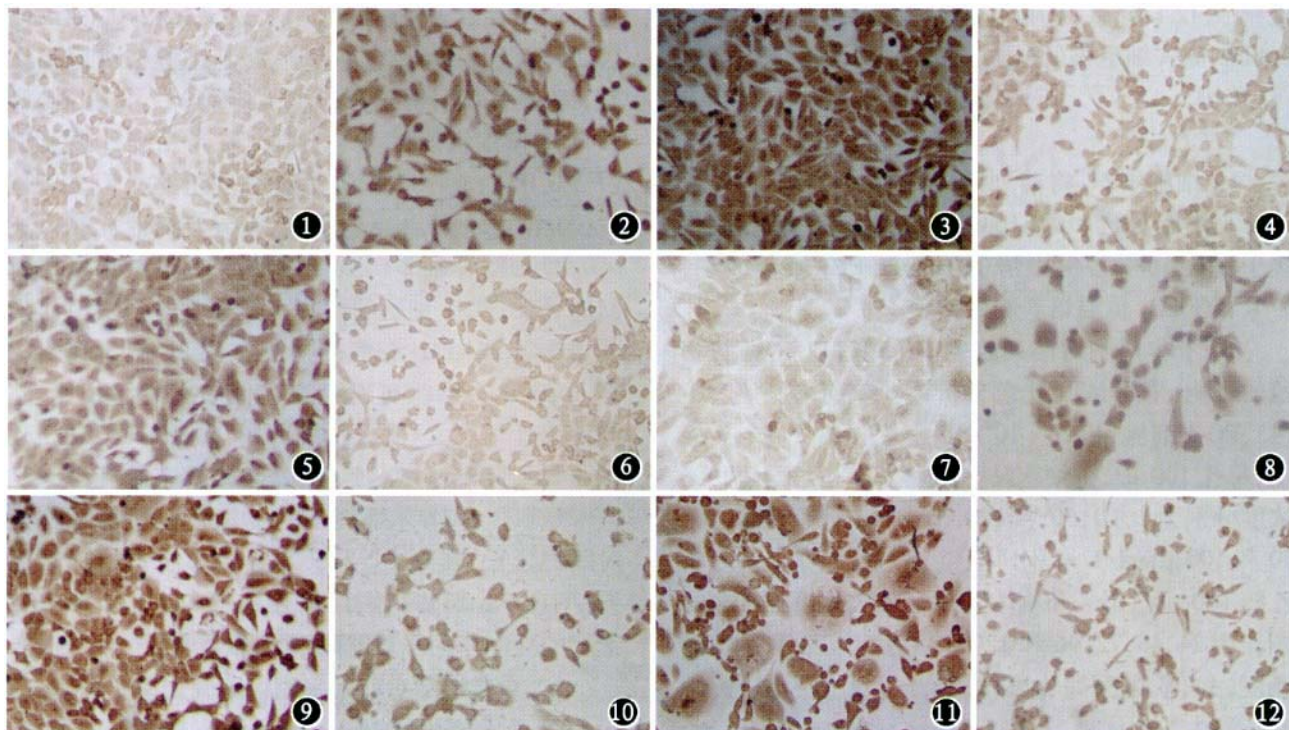


图 1 ~ 6 10 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮组作用前列腺癌 DU-145 细胞 48 h, 对照细胞胞浆 bax 蛋白染色为阳性(图 1), 米非司酮作用后癌细胞着色较对照加重, 且细胞数量减少(图 2); 对照细胞胞浆 bcl-2 蛋白染色阳性(图 3), 米非司酮作用后癌细胞染色较对照明显减弱, 且染色阳性细胞减少(图 4); 对照细胞胞浆 VEGF 蛋白染色阳性(图 5), 米非司酮组作用后癌细胞着色变淡, 细胞数量减少(图 6)(免疫组化 $\times 100$) 图 7 ~ 12 10 $\mu\text{mol/L}$ 米非司酮作用前列腺癌 PC-3 细胞 48 h, 对照细胞胞浆 bax 蛋白染色阳性(图 7) 米非司酮作用后细胞着色比对照加重, 且细胞数量减少(图 8); 对照细胞胞浆 bcl-2 蛋白染色阳性(图 9) 米非司酮组作用后细胞染色比对照明显减弱, 且染色阳性细胞减少(图 10); 对照细胞胞浆 VEGF 蛋白染色阳性(图 11), 米非司酮作用后癌细胞着色变淡, 细胞数量减少(图 12)(免疫组化 $\times 100$)

表 2 米非司酮对前列腺癌 DU-145 和 PC-3 细胞 bcl-2、bax、VEGF 蛋白表达的影响(染色评分 $\bar{x} \pm s$ $n=3$)

类别	bcl-2	bax	VEGF
DU-145 细胞			
对照	3.53 ± 0.47	2.48 ± 0.11	3.46 ± 0.31
米非司酮	2.03 ± 0.74	3.92 ± 0.97	1.97 ± 0.29
t 值	2.964	2.555	6.080
P 值	0.041	0.063	0.004
PC-3 细胞			
对照	3.39 ± 0.27	2.62 ± 0.36	3.47 ± 0.15
米非司酮	1.93 ± 0.94	3.78 ± 0.13	1.88 ± 0.56
t 值	2.578	5.249	4.750
P 值	0.061	0.006	0.009

采用内分泌激素治疗,但这部分前列腺癌会逐渐转变成激素非依赖性,而目前对激素非依赖性前列腺癌尚无特异有效的治疗方法。近来研究表明,米非司酮对多种人体肿瘤的形成和生长具有潜在的选择性抑制作用,并已在乳腺癌、脑膜瘤、子宫内腺癌治疗等方面进行探索性应用^[1-4]。米非司酮抑制上述肿瘤细胞增殖,可能主要与其拮抗孕激素作用有关。但 Brodin 等^[5]报道,前列腺癌 LNCaP、PC-3、DU-145 细胞 3 个株细胞中均无雌、孕激素受体的表达。Lin 等^[6]报道 1 ~ 10 μmol/L 米非司酮能有效地抑制前列腺癌 PC-3 细胞的生长,但其作用的机制尚不清楚。因此,本研究试图研究米非司酮抑制非激素依赖性前列腺癌细胞增殖作用的机制。

1. 凋亡相关蛋白 bcl-2、bax 的作用:El Etraby 等^[7]报道米非司酮抑制 LNCaP、LNCaP-C4、LNCaP-C4-2 细胞的增殖呈时间-剂量依赖性方式,且此抑制作用与孕激素和糖皮质激素受体水平无关。因此,考虑米非司酮对激素非依赖性前列腺癌 PC-3 和 DU-145 细胞的生长也有抑制作用。本研究结果显示,10 μmol/L 以上的米非司酮对雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 和 DU-145 细胞均有不同程度的抑制作用,且其抑制作用随药物浓度的增加而增强,即呈现出剂量依赖性关系,同时,其抑制作用也随着时间的延长而增强,即表现出时间的依赖性关系。

El Etraby 等^[7]报道米非司酮在体外可能是通过增加细胞 DNA 片段,下调 bcl-2 蛋白的表达,以及激活转化生长因子 β₁ 蛋白的表达来抑制前列腺癌细胞增殖和凋亡的。bcl-2 基因产物可抵抗细胞程序性死亡,延长细胞寿命,导致细胞数目增多,从而增加肿瘤发生的机会^[8]。本研究结果显示,10 μmol/L 米非司酮作用 48 h 后 DU-145、PC-3 细胞中 bcl-2 蛋白表达明显下降,而 bax 蛋白表达显著高

于对照组,提示米非司酮可能通过 bcl-2、bax 途径介导激素非依赖性前列腺癌细胞凋亡的发生。

2. VEGF 蛋白的作用:VEGF 在调控肿瘤血管生成方面有着重要作用,肿瘤的发生、发展、浸润、转移又依赖于肿瘤血管生成,因此 VEGF 对肿瘤细胞具有重要作用^[9]。Hyder 等^[10]报道米非司酮在乳腺癌 T47-D 细胞中可以下调孕激素对 VEGF mRNA 的上调作用,使 VEGF 表达下降,从而抑制肿瘤生长和扩散。Li 等^[11]报道米非司酮可能通过减少 bcl-xL 和 VEGF 蛋白的表达来抑制胃癌 MKN-45 细胞在体内外的生长增殖。本组研究中米非司酮作用 DU-145 和 PC-3 细胞 48 h 后 VEGF 蛋白表达明显下降 ($P < 0.01$)。Hyder 等^[12]报道 VEGF 可以通过调节 bcl-2 等凋亡相关蛋白的表达,促进血管内皮细胞增殖,从而抑制内皮细胞的凋亡。

参 考 文 献

- 1 Klijn JG, 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 leiomyoma to the antiprogesterone RU486: dose-re-response effect. *Fertil Steril*, 1995, 64:187-190.
- 5 Brodin J, Skoog L, Ekman P. Immunohistochemistry and biochemistry in detection of androgen, progesterone, and estrogen receptors in benign and malignant human prostatic tissue. *Prostate*, 1992, 20:281-295.
- 6 Lin MF, Kawachi MH, Stallup MR, et al. Growth inhibition of androgen-insensitive human prostate carcinoma cells by a 19-norsteroid derivative agent, mifepristone. *Prostate*, 1995, 26:194-204.
- 7 El Etraby 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.
- 8 Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, et al. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res*, 2000, 60:6052-6060.
- 9 Hyder SM, Huang JC, Nawaz Z, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by estrogens and progestins. *Environ Health Perspect*, 2000, 108:785-790.
- 10 Hyder SM, Chiappetta C, Stancel GM. Pharmacological and endogenous progestins induce vascular endothelial growth factor expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer*, 2001, 92:469-473.
- 11 Li DQ, Pan LH, Shao ZM. Inhibitory effects of mifepristone on the growth of human gastric cancer cell line MKN-45 in vitro and in vivo. *Chin Med Sci J*, 2004, 19:237-242.
- 12 Hyder SM, Chiappetta C, Stancel GM. Induction of the angiogenic factor VEGF in the uterus by the antiprogesterin onapristone. *Cancer Lett*, 2000, 156:101-107.

(收稿日期 2005-08-11)

(本文编辑 姜民慧)