

中华真地鳖醇提物对人前列腺癌 PC3 细胞体外作用及其机制研究

张 越^{1,2}, 余 佳², 骆 衡^{2*}, 戴仁怀^{1*}

¹贵州大学昆虫研究所 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025;

²贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 560014

摘要: 探究中华真地鳖醇提物(ESWE)对人前列腺癌 PC3 细胞生长、迁移和侵袭的影响及作用机制。采用 MTT 法检测 ESWE 对 PC3 细胞的毒活性, 流式细胞术、Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡情况, 划痕实验和 Transwell 细胞侵袭实验检测 ESWE 对肿瘤细胞体外迁移和侵袭作用的影响, Western Blot 法测定不同浓度 ESWE 处理 PC3 细胞后, 转移相关蛋白金属基质蛋白 MMP-2 和 MMP-9 的表达。结果表明, ESWE 对人前列腺癌 PC3 细胞的生长、迁移和侵袭有明显的抑制作用, 呈一定的剂量依赖关系, 且能下调转移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 的表达。流式和凋亡染色结果显示, ESWE 不能诱导 PC3 细胞凋亡。综上说明 ESWE 能够抑制人前列腺癌 PC3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 其机制可能与下调 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达有关。

关键词: 中华真地鳖醇提物; 前列腺癌细胞; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号: R932

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)6-1051-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.6.020

Effect and mechanism of ethanol extract from *Eupolyphaga sinensis* Walker on human prostate cancer PC3 cells growth, migration and invasion *in vitro*

ZHANG Yue^{1,2}, YU Jia², LUO Heng^{2*}, DAI Ren-huai^{1*}

¹Institute of Entomology, Guizhou University, The Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of Mountainous Region, Guiyang 550025, China;

²State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550014, China

Abstract: To investigate the effect of *Eupolyphaga sinensis* Walker ethanol extract (ESWE) on human prostate cancer PC3 cells growth, migration and invasion *in vitro*, and to study its mechanism. MTT assay was used to determine the toxicity of ESWE on human prostate cancer PC3 cells. Cell apoptosis were analyzed by flow cytometry and Hoechst 33258 staining. Transwell assay and cell scratch test were used to detect the effect of ESWE on migration and invasion of PC3 cells. Western blot assay were employed to detect the expressions of metastasis related proteins MMP-2 and MMP-9 after different concentrations of ESWE were used to treat human breast cancer. The results showed that ESWE can inhibit the growth, migration and invasion of human prostate cancer PC3 cells in a concentration-dependent manner. Furthermore, ESWE could reduce the protein expression of MMP-2 and MMP-9. The results of flow cytometry and Hoechst 33258 staining showed that ESWE could not induce PC3 cell apoptosis. In conclusion, ESWE can inhibit the proliferation, migration, invasion of human prostate cancer cell line PC3, and the mechanism may be associated with the inhibition of the expression of MMP-2 and MMP-9.

Key words: *Eupolyphaga sinensis* Walker ethanol extract (ESWE); human prostate cancer cell; proliferation; invasion; migration

前列腺癌是一种老年男性发病率较高的恶性肿

瘤, 全世界每年确诊的新病例超过 120 万例^[1]。目前, 早期前列腺癌可以通过前列腺切除术和放化疗来治疗, 而雄激素剥夺疗法是晚期前列腺癌的标准治疗方法^[2,3]。但是, 大部分患者最终死于癌症的复发和转移^[4]。因此, 寻找抑制肿瘤生长与转移的新型药物对前列腺癌治疗具有重要意义。

收稿日期: 2019-12-24 接受日期: 2020-05-15

基金项目: 农业昆虫与害虫防治专业研究生卓越人才计划(黔教研合 ZYRC 字[2013]010 号); 国家自然科学基金青年基金(81702914)

*通信作者 E-mail: rhdai69@163.com, luoheng@gznp.cn

中华真地鳖 (*Eupolyphaga sinensis* Walker) 隶属蜚蠊目 Blattodea, 鳖蠊科 Corydiidae, 是一种传统的中药材, 被广泛应用于中药处方中。长期的实践表明, 其雌虫可以入药, 具有活血化瘀、消肿散结、下乳痛经等功效^[5,6]。现代药理研究又发现地鳖虫具有广泛的药理作用, 能抗血栓、抗氧化、抗肿瘤^[7,9]。但地鳖虫对前列腺癌是否有作用未见报道。本研究旨在探讨地鳖虫醇提物 (ESWE) 对人前列腺癌 PC3 细胞生长、迁移和侵袭能力的影响, 并对相关机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

地鳖虫雌成虫购自山东临沂; DMEM 培养基、胰酶、青链霉素均购自 Hyclone 公司; BCA 蛋白含量检测试剂盒, 噻唑蓝 (MTT) 均购于北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清 (FBS) 购自于杭州四季青生物科技有限公司; Hoechst 33258 凋亡染色试剂盒购自碧云天公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司; Transwell 侵袭小室购自 Corning 公司; Matrigel 购自 Invitrogen 公司; 抗体 MMP-2、MMP-9 和 β -actin 均购自 Abcam 公司; 抗兔的二抗购自 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 ESWE 的制备

将地鳖虫烘干粉碎, 称取 500 g 干粉, 用 10 倍量 80% 乙醇回流提取 2 h, 过滤, 药渣用 5 倍量 80% 乙醇回流提取 1.5 h, 过滤合并滤液, 然后将上清液减压蒸发, 真空干燥过夜, 所得粉末为 ESWE, 得率为 3.83%。将干燥的粉末用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 并将浓度调至 300 mg/mL, 保存于 4 ℃ 冰箱。

1.3 细胞培养

人前列腺癌细胞 PC3 从贵州省中科院天然产物化学重点实验室 (贵州, 贵阳) 获得, 细胞在含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养, 每 1~2 天换液传代, 取处于对数生长期的细胞用于实验。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板上, 每个浓度设置 5 个复孔, 待细胞过夜生长后, 加入不同浓度的 ESWE, 使其终浓度分别为 0.075、0.15、0.3、0.6、1.2、2.4 mg/mL, 同时加入等量 DMSO 作为对照组, 在 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h。在培养结束后, 加入 30 μ L MTT 溶液, 在培养箱中孵育 4

h, 去上清液, 加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定光吸收度 (OD 值)。据公式(细胞存活率 = 实验组光吸收值/对照组光吸收值 × 100%)计算癌细胞的存活率。

1.5 Annexin V FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡

将细胞以 2×10^5 个/mL 浓度接种于 6 孔板中, 每孔 3 mL, 待细胞贴壁后, 吸掉培养基加入不同浓度的 ESWE (0.25 和 0.5 mg/mL), 对照组加入等量的 DMSO。孵育 24 h 后收集细胞, 用预冷 PBS 洗两次, 加入 1 (Binding 缓冲液调节细胞浓度至 1×10^5 ~ 10^6 个/mL, 随后加入 Annexin V FITC 和 PI 各 5 μ L, 4 ℃ 避光孵育 15 min, 立即在流式细胞仪上检测。

1.6 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡情况

按 1.5 项处理细胞后, 吸尽培养液, 加入 1 mL 固定液, 固定 10 min, 去固定液, 用 PBS 洗两次, 加入 0.5 mL Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min, 去染色液, 用 PBS 洗两次, 滴一滴抗荧光淬灭封片液, 盖上盖玻片后, 在荧光显微镜下检测呈蓝色的细胞核。

1.7 细胞划痕实验

对数生长期的 PC3 细胞, 消化调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 在 6 孔板中加入细胞悬液 0.5 mL, 待细胞贴壁形成单层细胞后, 用 20 μ L 无菌移液枪枪头在单层细胞上划痕, PBS 清洗 2 次, 去除划下细胞, 然后加入 ESWE, 终浓度为 0.25 和 0.5 mg/mL, 阴性对照组加入 DMSO, 继续培养 24 h 后在显微镜下观察拍照。使用 Image J 软件统计划痕面积。细胞迁移率 = $(S_{0h} - S_{24h}) / S_{0h}$ 。

1.8 细胞侵袭实验

DMEM 培养基按比例 (1:8) 稀释 Matrigel 胶, 以 50 μ L/孔铺于 Transwell 侵袭小室上室, 待胶干, 加入饥饿处理的细胞, 每孔加入 100 μ L, 细胞浓度为 3×10^5 个/mL。加入不同浓度的 ESWE, 对照组加入等量的 DMSO。CO₂ 培养箱中继续孵育 24 h 后取出小室, 用湿棉棒擦去小室底部膜表面上的细胞, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 自然风干后用 0.1% 结晶紫染小室底部膜 15 min, 漂洗 3 次。将小室滤膜底面朝上, 在显微镜下观察拍照, 并随机取 5 个视野, 使用 Image J 统计穿膜细胞数。

1.9 Western blot 实验

按 2×10^6 个细胞接种于培养皿中, 培养过夜, 待细胞贴壁后加入不同浓度的 ESWE (0.15、0.3、0.6 mg/mL)。加药后 24 h 提取细胞总蛋白, BCA

法进行蛋白定量, SDS-PAGE 电泳分离总蛋白, 转膜, 室温下用 5% BSA 封闭 1 h, 加入相应一抗, 4 °C 过夜。TBST 洗膜三次, 加入二抗(1:30 000)室温孵育 1 h, 蛋白条带用 Odyssey 红外成像仪检测, 拍照。利用 Image J 软件定量分析蛋白条带的灰度值, 以 β -actin 为内参计算蛋白表达的变化。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 21 软件进行统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Graphpad prism 7 辅助作图。

2 结果

2.1 ESWE 对 PC3 细胞增殖的影响

MTT 实验结果发现, 不同浓度的 ESWE 作用 24 h 后, 与对照组相比, ESWE 能够显著抑制人前列腺癌细胞 PC3 的增殖, 且抑制率随着 ESWE 浓度的增加而增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 1)。使用非线性回归分析, 得出 ESWE 对 PC3 细胞的 IC_{50} 为 0.4813 mg/mL, 并将 IC_{50} 值作为后续实验浓度设置的参照。

2.2 ESWE 对 PC3 细胞凋亡的影响

使用流式细胞术检测 Annexin V-FITC/PI 双染

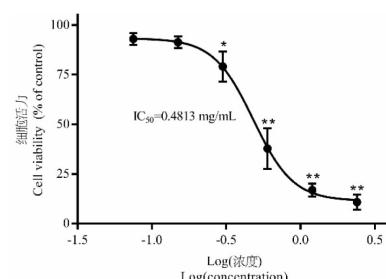


图 1 ESWE 对 PC3 细胞活力的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Inhibitory effect of ESWE on human prostate cancer PC3 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: 与对照组相比, $P < 0.05$, 显著差异; $** P < 0.01$, 极显著差异。Note: * $P < 0.05$, significant difference; ** $P < 0.01$, extremely significant difference.

标记的细胞的凋亡率, 结果表明, 对照组和处理组的细胞凋亡率分别为 7.04%、9.80%、8.55%, 数据间没有差异, 凋亡率没有呈剂量依赖性增长(见图 2)。Hoechst 33258 染色后, 正常细胞的细胞核呈正常的蓝色, 而发生凋亡细胞核会呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 颜色有些发白。如图 2 所示, 随着 ESWE 浓度的增加, PC3 细胞并没有出现致密浓染, 处理组的与对照组染色结果一致。以上结果表明, ESWE 并不是通过诱导 PC3 细胞凋亡而抑制 PC3 细胞生长。

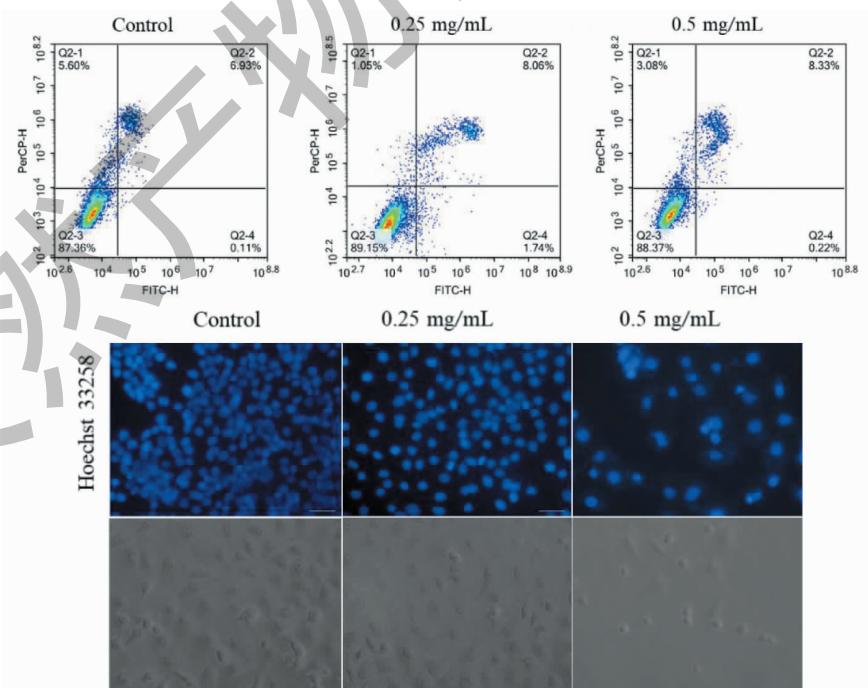


图 2 ESWE 对 PC3 细胞凋亡的影响 (200 \times)

Fig. 2 Effect of ESWE on the apoptosis of PC3 cells (200 \times)

2.3 ESWE 对 PC3 细胞迁移能力的影响

由图 3 可知,随着 ESWE 处理浓度的增加,PC3 细胞迁移能力降低。与对照组比较,低浓度 0.25 mg/mL 处理组能够显著抑制 PC3 细胞向划痕区域迁移($P < 0.01$)。由此可见,ESWE 能够显著抑制前列腺癌细胞 PC3 的横向迁移,并呈浓度依赖性。

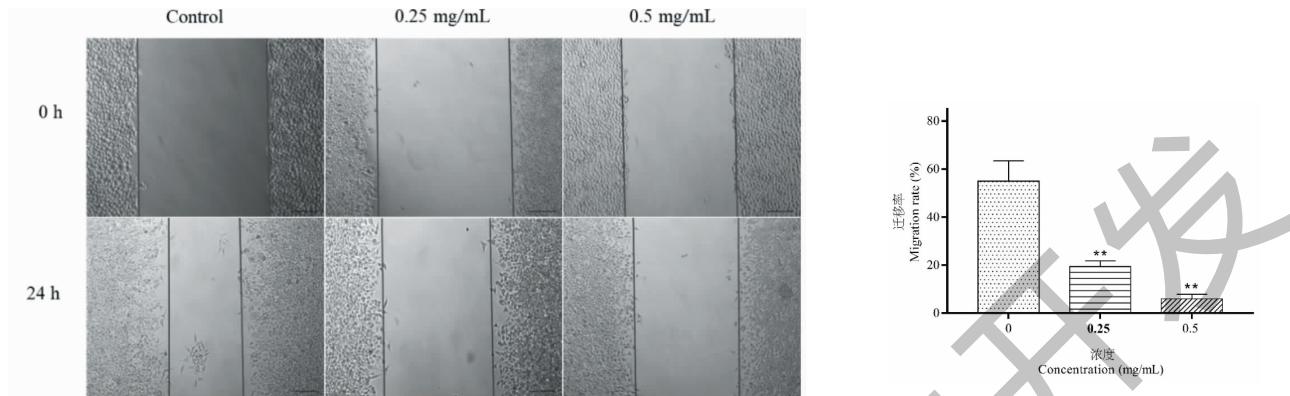


图 3 ESWE 对人前列腺癌细胞 PC3 迁移的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of ESWE on migration of PC3 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$, 极显著差异。Note: ** $P < 0.01$, extremely significant difference.

2.4 ESWE 对 PC3 细胞侵袭能力的影响

Transwell 细胞侵袭实验发现,ESWE 能够显著抑制 PC3 细胞从上室侵袭到下室,差异具有统计学

意义($P < 0.01$)。与对照组相比,低浓度 0.25 mg/mL 处理组显著抑制 PC3 细胞侵袭($P < 0.01$)。上述实验表明,ESWE 能够抑制 PC3 细胞的侵袭能力。

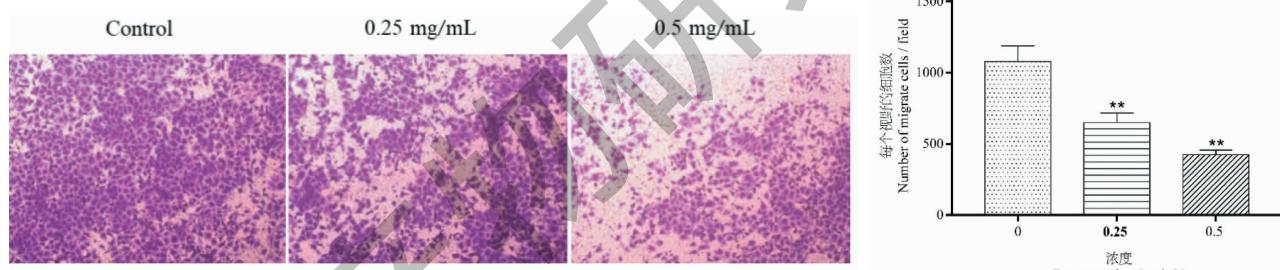


图 4 ESWE 对 PC3 细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 The effect of ESWE on invasion of PC3 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$, 极显著差异。Note: ** $P < 0.01$, extremely significant difference.

2.5 ESWE 对 PC3 细胞转移相关蛋白表达的影响

Western blot 实验发现,如图 5 所示,ESWE 能够明显抑制前列腺癌细胞 PC3 中转移相关蛋白 MMP-2、MMP-9 的表达。0.15 mg/mL 剂量组的细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达与对照组无显著性差异。ESWE 中、高浓度组 MMP-2、MMP-9 的表达均低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,ESWE 对 PC3 细胞的侵袭抑制作用与下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达有关。

3 结论

基质金属蛋白酶(MMPs)在肿瘤的进展、浸润和转移中的作用已经得到公认。研究表明,MMPs

与肺癌、结直肠癌、胃癌、甲状腺癌、卵巢癌、前列腺癌等恶性肿瘤的发生发展及预后密切相关^[10,11]。MMPs 主要功能是降解细胞外基质(ECM),使肿瘤细胞可以通过蛋白水解修饰的 ECM 迁移和渗透到血液或淋巴,除此之外,还参与调节生长、血管生成、免疫应答、存活和上皮间充质转换^[12,13]。MMPs 家族可促进肿瘤细胞的生长,抑制肿瘤细胞的凋亡,辅助肿瘤细胞免疫逃逸^[14]。因此,基质金属蛋白酶被认为是潜在的肿瘤生物学标志物,其中,MMP-2 和 MMP-9 是目前研究较多的肿瘤标记物,也被认为是潜在的治疗靶点。

中华真地鳖是我国的食药用昆虫之一,在中药

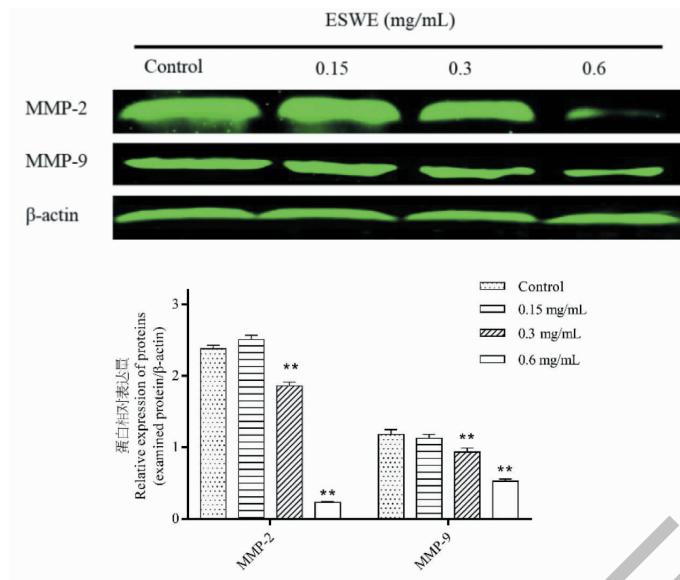


图 5 ESWE 对人前列腺癌细胞 PC3 转移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 The effect of ESWE on expression of MMP-2 and MMP-9 in PC3 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组相比, ** $P < 0.01$, 极显著差异。Note: ** $P < 0.01$, extremely significant difference.

中用于治疗骨伤、血瘀、免疫性疾病。现代药理学研究表明,地鳖虫具有明显的药理活性,能抑制多种肿瘤的生长^[15-17]。Zhan 等^[15]研究了地鳖虫醇提物对基质细胞衍生因子 SDF-1 α 诱导的两种乳腺癌细胞株(MDA-MB-435s 和 MDA-MB-231)的迁移、侵袭的影响,结果表明该醇提物能显著抑制两种细胞的迁移与侵袭,其机制包括下调与肿瘤转移相关的趋化因子受体 CXCR4 的转录和蛋白水平的表达,以及抑制侵袭相关的基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 的表达。Zhang 等^[16]发现地鳖虫 70% 乙醇提取物可以抑制 SMMC-7721 细胞纵向迁移,其机制可能与下调细胞中一些生长和转移因子(PLG、NF κ B、P53、MMP-2、MMP-9、CXCR4)的表达有关。

因此,本研究选用了具有高转移能力的人前列腺癌细胞 PC3 作为细胞模型,探究 ESWE 影响前列腺癌发生和发展的作用机制。本实验采用 MTT 法、流式细胞术、Western blot 等实验方法研究 ESWE 对 PC3 细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移及转移相关蛋白的影响。结果表明,ESWE 能抑制人前列腺癌 PC3 细胞增殖、侵袭、迁移,并呈现浓度依赖性。流式和凋亡染色结果显示,ESWE 抑制 PC3 细胞增殖不是通过诱导 PC3 细胞凋亡而导致的。ESWE 可降低 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平。与对照组相比,ESWE 中、高剂量组细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达显著降低($P < 0.01$)。

综上所述,中华真地鳖 80% 乙醇提取物在体外抑制人前列腺癌 PC3 细胞增殖、侵袭和转移,其作用机制可能与抑制转移相关蛋白 MMP-2 和 MMP-9 的表达有关,但具体深入的机制还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-E386.
- 2 Sebesta EM, Anderson CB. The surgical management of prostate cancer [J]. Semin Oncol, 2017, 44: 347-357.
- 3 Saad F, Fizazi K. Androgen deprivation therapy and secondary hormone therapy in the management of hormone-sensitive and castration-resistant prostate cancer [J]. Urology, 2015, 86: 852-861.
- 4 Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, et al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer [J]. N Engl J Med, 2012, 367: 203-213.
- 5 Zhang CX, Tang XD, Cheng JA. The utilization and industrialization of insect resources in China [J]. Entomol Res, 2010, 38(s1): 38-47.
- 6 Ge GF, Yu CH, Yu B, et al. Antitumor effects and chemical compositions of *Eupolyphaga sinensis* Walker ethanol extract [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141: 178-182.
- 7 Yang H, Wang Y, Xiao Y, et al. A bi-functional anti-throm-

- bosis protein containing both direct-acting fibrin(ogen)olytic and plasminogen-activating activities [J]. PLoS One, 2011, 6 (3): e17519.
- 8 Tang QF, Dai Y, Xue LL. Immunomodulatory effects of orally administered aqueous extract from *Eupolyphaga sinensis* Walker [J]. Afr J Biotechnol, 2010, 9: 8682-8686.
- 9 Dai B, Qi J, Liu R, et al. *Eupolyphaga sinensis* Walker demonstrates angiogenic activity and inhibits A549 cell growth by targeting the KDR signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2014, 10: 1590-1596.
- 10 Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 1993, 4: 197-250.
- 11 Curran S, Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis [J]. J Pathol, 1999, 189: 300-308.
- 12 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001, 17: 463-516.
- 13 Huang W, Feng H, Zheng Y, et al. The inhibitory effect and mechanism of euscaphic acid on human hepatocarcinoma HepG2 Cells [J]. Nat Prod Res (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1502-1508.
- 14 Zheng H, Takahashi H, Murai Y, et al. Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma [J]. Anticancer Res, 2006, 6: 3579-3583.
- 15 Zhan YZ, Zhang H, Liu R, et al. *Eupolyphaga sinensis* Walker ethanol extract suppresses cell growth and invasion in human breast cancer cells [J]. Integr Cancer Ther, 2016, 15: 102-112.
- 16 Zhang YM, Zhan YZ, Zhang DD, et al. *Eupolyphaga sinensis* Walker displays inhibition on hepatocellular carcinoma through regulating cell growth and metastasis signaling [J]. Sci Rep, 2014, 4: 5518.
- 17 Dai B, Zhan Y, Qi J, et al. *Eupolyphaga sinensis* Walker inhibits human chronic myeloid leukemia cell K562 growth by inducing G2-M phase cell cycle arrest and targeting EGFR signaling pathway and in S180 tumor-bearing mice [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 37: 1177-1185.

(上接第 927 页)

- 15 Lei XR. Role of pain-related molecules in hippocampus involved in moxibustion analgesia [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (成都中医药大学), 2019.
- 16 Wang Q, Liu MY, Han LY, et al. Mechanism of Duantengyimu Decoction in treating rheumatoid arthritis based on network pharmacology approach [J/OL]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2019, 25 (24): 150-158.
- 17 Xu ZX, Zhang HY, Chen GJ, et al. Research progress of glucose metabolism in RA [J]. Current Immunol (现代免疫学), 2019, 39: 318-321.
- 18 Cannon GW, Wang BC, Park GS, et al. Remission in rheumatoid arthritis patients treated with etanercept monotherapy: clinical practice and clinical trial experience [J]. Clin Exp Rheumatol, 2013, 31: 919-925.
- 19 Chen XY, Chen M, Li J, et al. Role of MAPK signal transduction in synoviocytes of rheumatoid arthritis [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报) 2006, 22: 1424-1428.
- 20 Adler RA, Fuleihan EH, Bauer DC, et al. Managing osteoporosis patitntd after long-term bisphosphonate treatment: report of a task force of the American society for bone and mineral research [J]. J Bone Miner Res, 2016, 31 (1): 16-35.