

黄精凝集素 PCL-2 诱导人前列腺癌 LNCap 细胞凋亡及机制研究

孙婷婷,刘 洋,李卓柯,宗时宇,支文冰,狄志彪,李 晔,张 红*

陕西省中医药研究院,西安 710003

摘要:研究黄精凝集素 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞生物活性和可能的抗肿瘤机制。从黄精药材中提取分离得到黄精凝集素 PCL-2,体外培养 LNCap 细胞,采用 WST-1 和集落形成实验评价 PCL-2 对 LNCap 细胞的增殖作用;2,7-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 荧光探针法检测 LNCap 细胞内 ROS 含量;qRT-PCR 和 Western blot 法检测 PCL-2 对 LNCap 细胞中相关基因和蛋白表达的影响。研究结果显示 PCL-2 能显著抑制 LNCap 细胞的增殖,促进细胞中 ROS 生成;PCL-2 通过上调 LNCap 细胞中 Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 基因 mRNA 和蛋白表达并下调 Bcl-2 基因 mRNA 和蛋白表达水平诱导 LNCap 细胞凋亡。本研究结果表明 PCL-2 诱导 LNCap 细胞凋亡活性作用显著,可作为抑制前列腺癌的潜在药物。

关键词:黄精凝集素 PCL-2;前列腺癌 LNCap;细胞凋亡;机制

中图分类号:R737.25

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)2-0255-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.2.011

Lectin PCL-2 of *Polygonatum cyrtonema* induces apoptosis of human prostate cancer LNCap cells and its mechanism

SUN Ting-ting, LIU Yang, LI Zhuo-ke, ZONG Shi-yu, ZHI Wen-bing, DI Zhi-biao, LI Ye, ZHANG Hong*

Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710003, China

Abstract: In this study, the biological activity of lectin PCL-2 of *Polygonatum cyrtonema* on human prostate cancer LNCap cells and its possible anti-tumor mechanism were explored. PCL-2 was extracted and isolated from *P. cyrtonema* fresh medicinal materials, and LNCap cells were cultured *in vitro*. WST-1 and colony formation experiments were used to detect the proliferation of LNCap cells. The level of ROS in LNCap cells were determined by 2,7-dichlorofluorescein yellow diacetate (DCFH-DA) fluorescence probe method. The expression levels of related genes and proteins in LNCap cells was measured by qRT-PCR and Western blot. Activity study results show that PCL-2 can significantly inhibit the proliferation of LNCap cells, promote the generation of ROS in cells. Mechanism research results show that PCL-2 induces LNCap cells apoptosis by up-regulating the mRNA expression levels of Bax, Caspase-3 and Caspase-9 genes and proteins and down-regulating the mRNA expression levels of Bcl-2 genes and proteins. The results of this study show that PCL-2 has a significant effect in inducing apoptosis of LNCap cells, and it can be used as a potential drug for inhibiting prostate cancer.

Key words: lectin PCL-2 of *Polygonatum cyrtonema*; prostate cancer LNCap cells; apoptosis; mechanism

前列腺癌 (prostate cancer) 是发生于男性前列腺组织的一种恶性肿瘤,近年来随着人口老龄化及饮食结构的改变,前列腺癌在我国的发病率和死亡率呈明显增高的趋势,将成为危害我国男性健康的主要疾病^[1]。前列腺癌的发病机制较为复杂,目前

临床对于前列腺癌的治疗手段主要包括外科手术加术后放疗,但传统治疗模式无法显著提高前列腺癌患者的五年生存率,而药物治疗主要用于不能手术治疗或晚期患者的保守治疗,其显著的不良反应限制了临床治疗效果且尚无有效的根治药物^[2,3]。因此,寻找新的有效的治疗前列腺癌的特效药物成为科学工作者的难题。

近年来,从天然产物中寻找高效低毒的抗癌活性成分逐渐成为研究的热点,寻找抗前列腺癌的药物或有效成分对临床防治前列腺癌具有重要的指导

收稿日期:2021-06-10 接受日期:2021-11-18

基金项目:陕西省重点研发计划(2020SF-217);陕西省中医药管理局项目(2019-ZZ-JC009);2019年医疗服务与保障能力提升补助资金(中医药事业传承与发展部分)“全国中药资源普查项目”(财社[2019]39号)

*通信作者 Tel:86-29-85395696;E-mail:zhanghong919919@163.com

意义。药用植物因资源分布广泛、种类繁多,是抗肿瘤制剂的优势来源。植物凝集素(lectin)是一类糖结合特异性非免疫原性蛋白质或糖蛋白,广泛存在于多种植物中,能凝集红细胞、癌细胞等各种细胞,其作为植物源性蛋白类物质,具有明显的抑制肿瘤细胞增殖和杀伤癌细胞的作用,其对正常细胞的毒害作用和副作用较化疗药物小很多,将其作为一类潜在的抗肿瘤药物进行开发具有极广阔的前景^[4]。

黄精为百合科黄精属植物黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua. 的干燥根茎。黄精药用历史悠久,疗效确切,是一味重要的药食两用中药,临床主要用于治疗阴虚燥咳、脾胃虚弱、腰膝酸软等症^[5]。黄精主要含有多糖、皂苷、黄酮、蒽醌及氨基酸类等成分。前期研究发现,黄精中提取物黄精凝集素 PSL 具有显著的凝集活性,可抑制前列腺癌骨转移 PC3 细胞的增殖和 Warburg 效应并通过降低 HK2 的表达抑制肿瘤细胞糖酵解^[6]。目前,黄精凝集素对前列腺癌细胞淋巴结转移细胞 LNCap 的研究报道较少。本研究从黄精鲜药材中提取分离得到一种黄精凝集素 PCL-2,探究 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞凋亡的影响及相关抗肿瘤机制,为抗前列腺癌药物黄精凝集素 PCL-2 的开发提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜黄精药材采购自陕西省红河谷地区,经鉴定为百合科植物多花黄精 *Polygonatum cyrtonema* Hua. 的新鲜根茎。人前列腺癌细胞 LNCap(武汉普诺赛生命科技有限公司)。WST-1 试剂盒、活性氧 ROS 试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒(碧云天生物科技有限公司);SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒、10 × Tris 甘氨酸蛋白电泳液、10 × 电转移缓冲液(凯基生物技术有限公司);蛋白 Marker(美国 Thermo Scientific 公司);5-氟尿嘧啶(5-FU)、20 × TBST 缓冲液、青链霉素混合液(100 ×)(北京索来宝科技有限公司);0.45 μm PVDF 膜(美国 Millipore 公司);超敏 ECL 即用型化学发光试剂盒(博士德生物工程有限公司);DMEM 高糖培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(上海依科赛生物制品有限公司);多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司)。硫酸铵、甲苯、吡啶、甲醇等试剂(国药化学试剂有限公司),所用水为纯净水。

1.2 实验仪器

T100 型梯度 PCR 仪、CFX connect 实时荧光定

量 PCR 仪、ChemiDox XRS 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);T10 basic 高速组织匀浆机(德国 IKA 公司);扫描电镜(ΣIGMA)(德国 ZEISS 公司);Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(帝肯(上海)贸易有限公司);HS840 超净工作台(天津泰斯特仪器有限公司)、Herocell 180 二氧化碳培养箱(上海润度生物科技有限公司);C-P8 研究型倒置显微镜(意大利 OPTIKAGO 公司);YXQ-75SII 立式高压灭菌锅(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司);DW-86L288 超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 黄精凝集素 PCL-2 的制备

取新鲜黄精药材 500 g,低温匀浆,按比例加入 1 000 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0),室温下搅拌提取 6 h,4 °C 放置 24 h,10 000 rpm 离心 15 min,上清液加适量硫酸铵使饱和度为 30%,搅拌 4 h,4 °C 放置 24 h,10 000 rpm 离心 15 min,上清液继续加入硫酸铵沉淀使饱和度为 80%,搅拌 4 h,4 °C 放置 24 h,10 000 rpm 离心 15 min,沉淀用水复溶,3 500 Da 透析 3 天,冻干,即得黄精凝集素 PCL。采用 DEAE-52 纤维素阴离子交换色谱和葡聚糖凝胶 Sephadex G-100 分子筛柱层析依次对 PCL 粗品进行分离纯化,结合红细胞凝集实验确定纯化组分黄精凝集素 PCL-2。采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)测定 PCL-2 的分子量,采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定 PCL-2 纯度。

1.3.2 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞活性的影响

1.3.2.1 人前列腺癌 LNCap 细胞培养

从液氮罐中迅速取出待复苏的人前列腺癌 LNCap 细胞,在 37 °C 水浴锅中迅速解冻复苏,用新鲜的 RPMI-1640 培养液(含 10% 胎牛血清和 1% 双抗)轻微吹打均匀后转移至培养皿中,置于 37 °C、CO₂ 浓度为 5% 的培养箱中进行培养,待细胞贴壁率达到 80% ~ 90% 时对细胞按照以 1:2 ~ 1:3 的比例进行传代 2 ~ 3 代,备用。

1.3.2.2 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞增殖的影响

采用 WST-1 法检测 LNCap 细胞增殖。取对数生长期的 LNCap 细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔板培养 12 h,待细胞正常贴壁生长后,加入 100 μL 用 RPMI-1640 培养液配制的不同浓度 PCL-2 样品(0 ~ 100 μg/mL),以不含血清的 RP-

MI-1640 培养液作为空白对照 (Con), 以 5-FU 作为阳性对照 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置培养箱中培养 24 h, 每个浓度设置 5 个复孔。每孔加入 10 μL WST-1 标记溶液, 继续培养 2 h, 用酶标仪于 450 nm 处测定吸光值, 按照公式: 细胞活力 = $Abs_{\text{样品}}/Abs_{\text{对照}} \times 100\%$ 计算细胞增殖率。

另取对数生长期的 LNCap 细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 接种于 12 孔板, 每孔 1.5 mL, 培养 12 h 后, 加入 1.5 mL 用 RPMI-1640 培养液配制的不同浓度 PCL-2 样品 (0、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 以不含血清的 RPMI-1640 培养液作为空白对照, 以 5-FU 作为阳性对照 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 置培养箱中培养 24 h, 在显微镜下观察细胞形态并拍照。

1.3.2.3 集落形成实验

取对数生长期的 LNCap 细胞, 调整细胞密度为 3×10^6 个/mL, 将细胞接种于 6 孔板, 每孔 2.5 mL, 置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养 12 h 后弃上清, 用 PBS 清洗细胞 1~2 次, 每次 2 mL, 弃 PBS, 加入 2.5 mL 用 RPMI-1640 培养液配制的不同浓度 PCL-2 (0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液, 以不含血清的 RPMI-1640 培养液作为空白对照, 以 5-FU 作为阳性对照 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 继续培养 7 天以形成集落 (每个浓度设置 3 个复孔), 7 天后处理细胞, 每孔加入 1.0 mL 4% 的多聚甲醛, 4 $^\circ\text{C}$ 条件下固定 30 min, 弃多聚甲醛, 用 PBS 清洗三次, 每次 2 mL, 弃 PBS, 每孔加入 500 μL 结晶紫溶液, 室温下染色 20 min, PBS 清洗三次, 相机拍照观察染色情况, 显微镜下计数, 按照下式计算集落形成率: 集落形成率 = 集落数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.3.2.4 活性氧水平 (ROS) 检测

采用 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 荧光探针法^[7]测定不同浓度 PCL-2 对 LNCap 细胞内 ROS 水平的影响。取对数期生长的 LNCap 细胞, 调

整细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 12 h 后, 弃上清液, 每孔加入 1 mL PBS 洗涤细胞, 弃 PBS, 分别加入 1 mL 基础培养基、5-FU (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及不同浓度 (1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 PCL-2 水溶液, 每组设置 3 个复孔。培养 24 h 后弃去上清液, 每孔用 1 mL PBS 洗涤, 弃 PBS, 每孔避光加入 500 μL DCFH-DA 溶液, 37 $^\circ\text{C}$ 条件下孵育 20 min 后弃染色液, 用 1 mL PBS 清洗 1~2 次, 弃 PBS, 向每孔中加入 150 μL RI-PA 细胞裂解液 (每 100 μL 细胞裂解液含 1 μL 苯甲基磺酰氟), 置冰上裂解 15~20 min, 用刮铲小心刮取细胞, 转移至 1.5 mL 无菌离心管中, 于 4 $^\circ\text{C}$ 下 10 000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液 50 μL 转移至 96 孔板中, 采用荧光酶标仪对细胞中 ROS 含量进行定量分析, 以未经 PCL-2 样品处理细胞的裂解液为空白对照, 在激发光 488 nm, 散射光 525 nm 发射波长处检测细胞内的荧光强度, 同时按照 BCA 蛋白测定试剂盒说明书测定每个样品蛋白含量, ROS 含量用每毫克蛋白总荧光强度表示。

1.3.3 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞凋亡相关机制研究

1.3.3.1 PCL-2 对 LNCap 细胞内相关基因 mRNA 表达的影响

取对数生长期 LNCap 细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL, 接种至无菌 24 孔板, 每孔 1 mL, 培养 12 h, 待细胞正常贴壁生长后, 分别加入不同浓度 (1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 PCL-2 各组分样品溶液, 以空白培养基作为空白对照, 5-FU (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作为阳性对照, 培养 24 h, 每组浓度设置 3 个复孔。采用 RNA 提取试剂盒提取各组细胞 RNA 后反转录为 cDNA, 以 GAPDH 为内参进行实时荧光定量 PCR 检测。引物序列如表 1 所示。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Real-time PCR primer sequence

基因 Gene symbol	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
GAPDH	CGGAGTCAACGGATTGCTCGTA	AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC
Bax	ATGGACGGTCCGGGGAG	TCAGCCCATCTTCTTCCA
Bcl-2	CAGCTGCACCTGACG	GCTGGGTAGGTGCAT
Caspase-3	CCTGGTTCATCCAGTCGCTTACAGAATC	TCTGTGCCACCTTTGGTT
Caspase-9	GGATTGGCCCTGGGGATGTTT CA	AGCCCAGTTTCATTGATCACAAGG

1.3.3.2 Western blot 法检测 PCL-2 对 LNCap 细胞内相关蛋白表达的影响

取对数生长期 LNCap 细胞,调整细胞密度为 3×10^6 个/mL,接种至 6 孔板,每孔 2.5 mL,培养 12 h,待细胞正常贴壁生长后,分别加入不同浓度(1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 PCL-2 样品溶液,以空白培养基作为空白对照,5-FU(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为阳性对照,每组浓度设置 3 个复孔,培养 24 h 后,收集提取总蛋白,利用 BCA 蛋白定量法对总蛋白进行定量。用 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白质样品,电泳后,凝胶中的蛋白质转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉孵育 2 h,一抗孵育过夜,将蛋白质样品与二抗孵育 2 h,采用 ECL 进行显影后放入 Bio-Rad 凝胶成像仪中观察并拍照,用凝胶图像处理系统 Quantity One 软件分析目标条带的密度值。

1.3.4 数据分析

实验结果采用平均值 \pm 标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示,实验数据采用 SPSS 19.0 进行统计分析并采用 Graphpad prism 7.0 软件进行绘图。蛋白条带采用 Quantity One 蛋白分析软件进行分析。显著性水平以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 PCL-2 制备

PCL-2 得率为 0.19%,高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)和聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结果表明 PCL-2 分子量为 18.89×10^3 Da,纯度为 97.8%。

2.2 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞活性的影响

2.2.1 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞增殖的影响

如图 1A 所示,空白对照组人前列腺癌 LNCap 细胞呈梭形贴壁生长,与空白组比较,阳性药物 5-FU 组细胞形态丧失,细胞呈皱缩成小球状,细胞大量死亡;PCL-2 低剂量组(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)部分细胞体积缩小呈球状,细胞有死亡趋势;PCL-2 高剂量组(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)细胞皱缩成小球状,偶见有梭形细胞,细胞大量死亡。可见,PCL-2 低剂量(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)时就能诱导 LNCap 细胞死亡。由图 1B 可知,在 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内,与空白组相比,PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞增殖有显著的抑制作用并呈浓度依赖性;当 PCL-2 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,LNCap 细胞活力仅为空白组的 42.56% 和 22.29%;阳性药物组细胞活力为(19.16 \pm 10.41)%。由结果可知,PCL-2 显著抑制 LNCap 细胞增殖($P < 0.01$)。

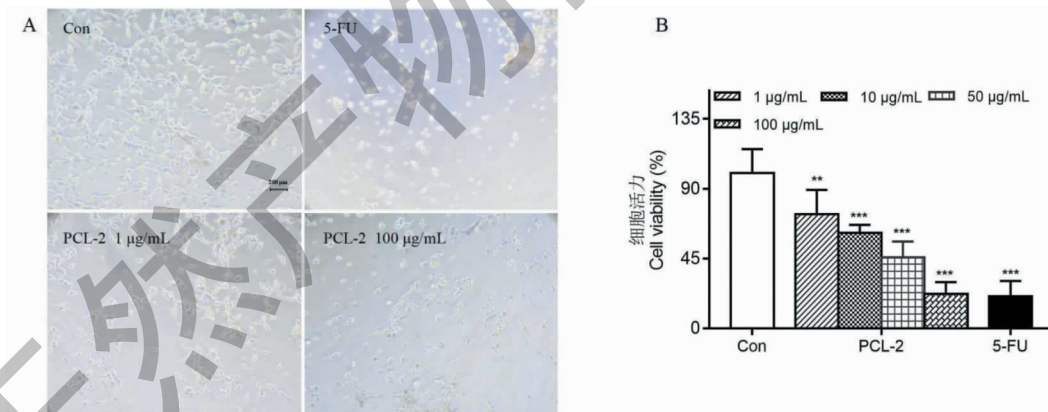


图 1 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

Fig. 1 Effect of PCL-2 on the cell viability of human prostate cancer LNCap cells($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

注:A:PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞形态的影响($\times 200$);B:PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞活力的影响(与空白组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$)。Note:A:The effect of PCL-2 on the morphology of human prostate cancer LNCap cells($\times 200$);B:The effect of PCL-2 on the cell viability of human prostate cancer LNCap cells (compared with control,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$)。

2.2.2 集落形成实验

如图 2A 所示,正常对照组 LNCap 细胞呈现蓝紫色,说明培养 7 天内细胞能够正常生长。阳性对照组细胞颜色变淡,细胞有脱落的现象。PCL-2 组

细胞数量随着给药浓度增加蓝紫色颜色逐渐变浅,当浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,出现细胞大量脱落,几乎没有蓝紫色出现。由图 2B 可知,与空白组相比,经不同浓度 PCL-2 处理后的 LNCap 细胞,细胞集落形

成率显著降低 ($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性, 当 PCL-2 浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$, 细胞集落形成率为 33.59% , 与阳性药物组比较无显著性差异

(29.64% , $P > 0.05$), 结果进一步表明 PCL-2 具有抑制 LNCap 细胞增殖的作用。

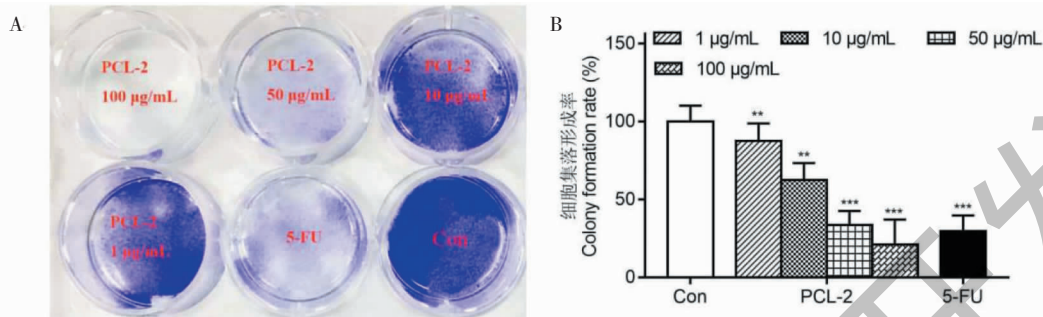


图2 集落形成实验 ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

Fig. 2 Colony forming experiment ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

注:A:PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞集落形成的影响;B:LNCap 细胞集落形成率(与空白组相比, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)。Note: A:The effect of PCL-2 on the colony formation of human prostate cancer LNCap cells;B:The colony formation rate of LNCap cells(compared with control, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$)。

2.2.3 活性氧水平 (ROS) 检测

如图3所示,与空白对照组相比,PCL-2 各剂量组细胞中 ROS 含量呈剂量依赖趋势 ($P < 0.01$), 在 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内,ROS 含量分别为 (122.18 ± 5.67)%、(138.64 ± 10.22)%、(160.62 ± 10.34)% 及 (182.87 ± 11.48)%, 阳性组中 ROS 含量为 (215 ± 9.88)%。由结果可知,PCL-2 显著促进 LNCap 细胞中 ROS 生成,诱导细胞凋亡。

如图4A、4B所示,在 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,与空白组相比,PCL-2 各剂量组 Bax 基因 mRNA 表达量随浓度升高而显著增加 ($P < 0.01$), 当 PCL-2 样品浓度为 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞中 Bax 表达量为 (178.43 ± 12.77)%, 阳性组 Bax 表达量为 (199.34 ± 6.96)%;在浓度 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,与空白组相比,PCL-2 各剂量组 Bcl-2 基因 mRNA 表达量随浓度升高而显著降低 ($P < 0.01$), 其表达量分别为 (88.50 ± 9.17)%、(80.45 ± 6.75)%、(66.59 ± 7.98)% 及 (56.98 ± 12.09)%, 阳性组 Bcl-2 基因 mRNA 表达量为 (50.64 ± 11.03)%。如图4C、4D所示,在浓度 $1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内,与空白组相比,PCL-2 各剂量组 Caspase-3、Caspase-9 基因 mRNA 表达量随浓度升高而显著增加 ($P < 0.01$), 当浓度为 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时, LNCap 细胞中 Caspase-3、Caspase-9 基因 mRNA 表达量分别为 (340.42 ± 16.61)% 和 (225.92 ± 8.98)%。由结果可知,PCL-2 通过上调 Bax、Caspase-3 及 Caspase-9 基因 mRNA 表达,下调 Bcl-2 基因 mRNA 表达水平诱导人前列腺癌 LNCap 细胞凋亡。

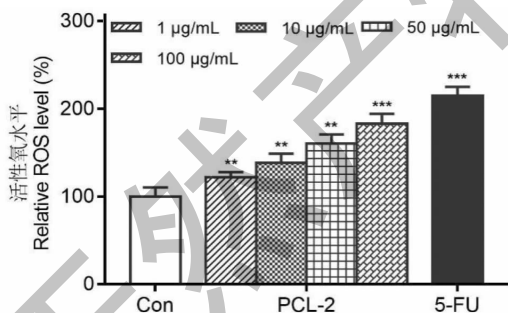


图3 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞中 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

Fig. 3 The effect of PCL-2 on ROS in human prostate cancer LNCap cells ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

注:与空白组相比, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

Note:Compared with control, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

2.2.4 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞凋亡的相关机制研究

2.2.4.1 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞中相关基因 mRNA 表达的影响

2.2.4.2 Western blot 法检测 PCL-2 对 LNCap 细胞中相关蛋白表达的影响

如图5A、5B所示,与空白组相比,当 PCL-2 浓度为 $10, 100 \mu\text{g}/\text{mL}$, Bcl-2 蛋白表达水平显著下调并呈一定的浓度依赖性 ($P < 0.01$), 阳性组 Bcl-2 蛋白表达水平为最低。PCL-2 显著上调 Bax 蛋白表

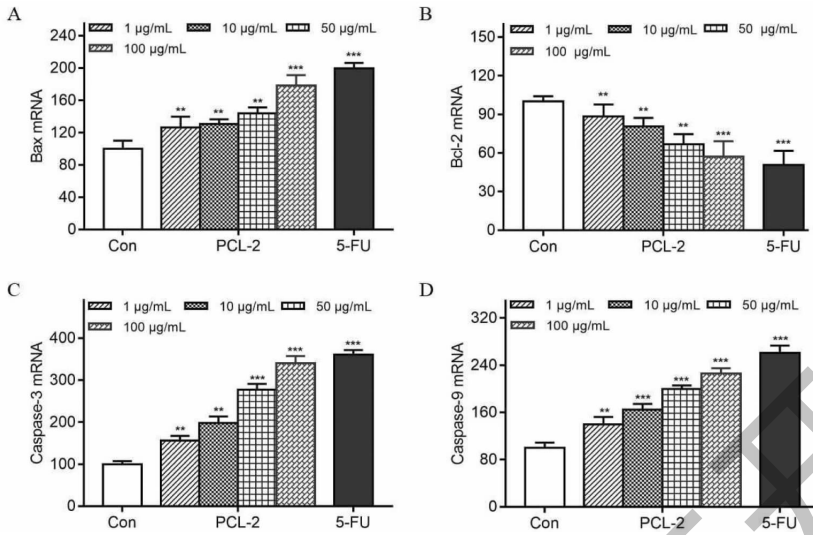


图4 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞中 Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

Fig. 4 The effect of PCL-2 on the mRNA expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 genes in human prostate cancer LNCap cells ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

注:与空白组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。 Note: Compared with control, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

达水平且 Bax/Bcl-2 比值显著增加 ($P < 0.01$), 当浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ 时, Bax/Bcl-2 比值相比于空白组增加了 77.18%。在 $10 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, PCL-2 显著上调活化 Caspase-3 和活化 Caspase-9 蛋

白表达量 ($P < 0.01$), 当 PCL-2 浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ 时, 活化 Caspase-3 和活化 Caspase-9 蛋白表达量分别为空白组的 3.19 倍和 2.06 倍。由结果可知, PCL-2 可通过下调 Bcl-2 蛋白表达, 上调 Bax、活化 Caspase-3 和活化 Caspase-9 蛋白表达诱导人前列腺癌 LNCap 细胞凋亡。

3 讨论与结论

前列腺癌在我国发病率逐年升高, 是引起男性死亡的第二大肿瘤杀手^[8]。目前, 国内外在前列腺癌研究方面已经做了大量的工作, 研究表明前列腺癌 LNCap 细胞系广泛用于前列腺癌发展转移的分子机制、药物筛选及药物评价等研究, 已成为目前研究前列腺癌最常用的细胞系^[9]。黄精凝集素 PCL-2 为从黄精鲜药材中提取所得的一种糖蛋白类成分, PCL-2 对前列腺癌 LNCap 细胞增殖和凋亡的作用机制未见有深入研究。本研究中 WST-1 实验和集落形成实验结果表明 PCL-2 显著抑制 LNCap 细胞增殖并呈浓度依赖性。

细胞凋亡是细胞维持稳定的内部环境的机制之一, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为抗肿瘤研究的热点, 同时也是评价抗癌药物有效性的重要指标之一^[10]。细胞凋亡受多种基因调控, 是一个复杂且涉及多条通路的过程。ROS 是由氧直接或间接转变的氧自由基及其衍生物, 在细胞信号转导、维持机体平衡起重要的作用。线粒体为 ROS 产生的主要部位, ROS

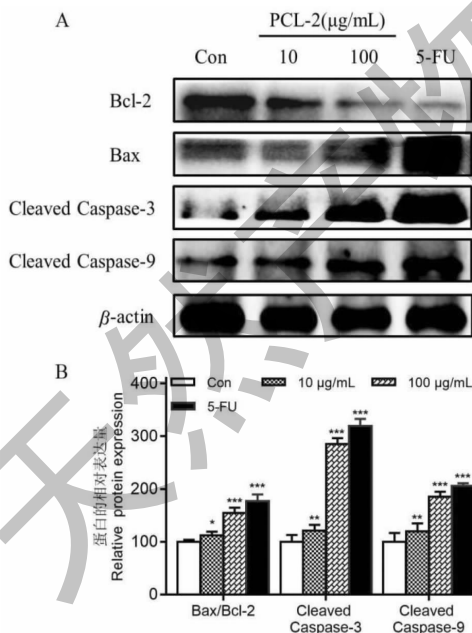


图5 PCL-2 对人前列腺癌 LNCap 细胞中相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

Fig. 5 Effect of PCL-2 on the expression of related proteins in human prostate cancer LNCap cells ($\bar{x} \pm s, n \geq 3$)

注:与空白组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

累积引起线粒体膜电位的崩解进而触发细胞凋亡, ROS 聚集被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件之一^[11,12]。Bcl-2 蛋白家族是一个特殊的蛋白家族,其中 Bad、Bid 及 Bax 具有促进细胞凋亡的作用,而 Bcl-2、Bcl-w 具有抑制细胞凋亡的作用。Bcl-2 是一种内膜蛋白,在多种肿瘤细胞中表达,可通过阻止细胞色素 C 的释放,增强线粒体膜电位,抑制钙离子释放,进而发挥抗凋亡作用;Bax 的作用与 Bcl-2 相反,通过促进细胞色素 C 的释放,激活细胞凋亡效应因子 Caspase,改变细胞膜通透性进而促进细胞凋亡,研究表明细胞中 Bcl-2 和 Bax 比例的改变可调节细胞凋亡^[13,14]。Caspase 家族与细胞凋亡密切相关,被认为是细胞凋亡信号转导的共同通路,其中 Caspase-3 是凋亡的执行因子,该蛋白的活化是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志^[15,16]。有研究发现 ROS 诱导癌细胞凋亡最常见的方式是由 Caspases 家族诱导的程序性细胞死亡,除此之外,ROS 可通过下调 Bcl-2 以及上调 Bax 和 Bad 诱导细胞发生凋亡^[17,18]。研究发现利妥昔单抗通过抑制 Bcl-2 蛋白表达和激活 p38-MAPK 信号通路导致 ROS 的累积进而促进细胞凋亡^[19]。本研究采用 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 荧光探针法测定细胞中 ROS 水平,研究表明 PCL-2 能显著促进 LNCap 细胞中 ROS 的产生和积累,并呈明显的剂量依赖性。LNCap 细胞经 PCL-2 作用后,随着给药浓度升高,Bax 基因 mRNA 和蛋白表达水平上调,Bcl-2 基因 mRNA 和蛋白表达水平降低,活化 Caspase-3 和活化 Caspase-9 蛋白表达量增加。由此可见,LNCap 细胞中 ROS 累积引起 Bax 和 Bcl-2 蛋白水平变化,进而启动 Caspase 级联反应,激活 Caspase-9 和 Caspase-3,从而诱导 LNCap 细胞凋亡。

黄精在我国资源丰富,主要分布于陕西、云南、贵州、四川等地,为陕西省道地药材之一。黄精凝集素 PCL-2 提取分离纯化方法简单且得率高,可用于大量制备样品。由本研究结果可知黄精凝集素 PCL-2 具有显著诱导人前列腺癌 LNCap 细胞凋亡作用,具有开发为抗前列腺癌药物的潜力,本研究为临床应用黄精凝集素治疗前列腺癌提供了新的线索。本文仅在体外细胞水平对 PCL-2 抗人前列腺癌活性及机制进行了初步探索,其具体作用机制以及在体内动物水平抗肿瘤活性还需要进一步研究。

参考文献

1 Liu XD, Wang YQ, Xie BT, et al. Curcumin inhibits the

- growth of prostate cancer cell line LNCaP [J]. *Chin J Cancer Prev Treat* (中华肿瘤防治杂志), 2016, 23(2): 21-22.
- 2 Devlin N, Herdman M, Pavesi M, et al. Health-related quality of life effects of enzalutamide in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: an in-depth post hoc analysis of EQ-5D data from the PREVAIL trial [J]. *Health Qual Life Out*, 2015, 18: 475-483.
- 3 Patel HRH, Mirsadraee S, Emberton M. The patient's dilemma: prostate cancer treatment choices [J]. *J Urology*, 2003, 169: 828-833.
- 4 Liu DL, Lv H, Li TT, et al. Research progress of plant lectins inducing tumor cell apoptosis and autophagy [J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2012, 28: 669-671.
- 5 Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I* (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- 6 Zhang H, Du X, Sun TT, et al. Lectin PCL inhibits the Warburg effect of PC3 cells by combining with EGFR and inhibiting HK2 [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37: 1765-1771.
- 7 Liu Q, Hu YY, Cao YF, et al. Chicoric acid ameliorates lipopolysaccharide-induced oxidative stress via promoting the Keap1/Nrf2 transcriptional signaling pathway in BV-2 microglial cells and mouse brain [J]. *J Agr Food Chem*, 2017, 65: 338-347.
- 8 Zhang Y, Yu J, Luo H, et al. Effect and mechanism of ethanol extract from *Eupolyphaga sinensis* Walker on human prostate cancer PC3 cells growth, migration and invasion *in vitro* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32: 1051-1056.
- 9 Lin YR, Shen E, Hu B. Biological characteristics of three common prostate cancer cell lines LNCap, PC3 and DU145 [J]. *Chin J Clin* (中华临床医师杂志), 2013, 7: 4980-4982.
- 10 Hackshaw-Mcgeagh LE, Perry RE, Leach VA, et al. A systematic review of dietary, nutritional, and physical activity interventions for the prevention of prostate cancer progression and mortality [J]. *Cancer Causes Control*, 2015, 26: 1521-1550.
- 11 Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction [J]. *Apoptosis*, 2000, 5: 415-418.
- 12 Deng S, Tang S, Zhang S, et al. Furazolidone induces apoptosis through activating reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway and suppressing PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 75: 173-186.

- 13 Kollek M, Müller A, Egle A, et al. Bcl-2 proteins in development, health and disease of the hematopoietic system [J]. FEBS J, 2016, 283:2779-2810.
- 14 Chen DK. Effects of arundoin on cell apoptosis and expression of Bcl-2/Bax in prostate cancer cells [J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med (中国中西医结合外科杂志), 2016, 22:575-579.
- 15 Yang XH, Todd L, Sladek, Liu XD, et al. Reconstitution of Caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis [J]. Cancer Res, 2001, 61:348-354.
- 16 Wu N, Zhang T, Liu WJ. Oridonin induces apoptosis and cycle arrest in prostate cancer cells through TPX2 [J]. J Clin Exp Med (临床和实验医学杂志), 2019, 18:2632-2636.
- 17 Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29(3/4):323-333.
- 18 Luanpitpong S, Chanvorachote P, Stehlik C, et al. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells [J]. Mol Biol Cell, 2013, 24:858-869.
- 19 Alas S, Ng CP, Bonavida B. Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8:836-845.

综合脂质组学和转录组学研究揭示柴胡皂苷 A 和 D 对非酒精性脂肪肝的治疗作用

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 现在正迅速成为慢性肝病最突出的原因之一, 并构成全球肝脏恶性肿瘤的主要危险因素。因其高度流行、潜在侵袭性和进展性而受到越来越多的关注, 其中抑制肝内脂质积累被认为是 NAFLD 的主要治疗策略。柴胡皂苷 A (SSa) 和柴胡皂苷 D (SSd) 是柴胡皂苷中的主要成分, 具有抗炎、抗氧化、免疫调节、抗癌和保肝作用。然而, 关于柴胡皂苷对 NAFLD 的潜在影响和作用机制, 目前暂不清楚。

来自北京中医药大学刘闰平教授团队和山东大学孙蓉教授团队比较了 SSa 和 SSd 对高脂饮食和葡萄糖-果糖水诱导的 NAFLD 小鼠模型中肝脏脂质积累的保护作用。结果发现, SSa 和 SSd 均可以改善脂肪变性与炎症反应。通过肝脏转录组学和脂质靶向代谢组学的整合运用, 合作团队基本阐明了两种活性成分调节肝脏脂质代谢的作用模式。其中, SSa 对于甘油三酯和磷脂类脂质合成和降解的作用显著强于 SSd; 而 SSd 可以更加显著地促进过氧化物酶体对超长链脂肪酸的降解作用和 CPT1 α 依赖的脂肪酸 β 氧化。同时, SSa 和 SSd 均可通过调节 SREBP-1 的剪切体活化水平, 抑制脂肪酸生物合成, 最终恢复肝脏脂质稳态。此外, 该合作团队进一步通过 CHIP-seq 数据库的生物信息学分析, 预测了 SSa、SSd 及其体内代谢物的潜在分子靶标, 并通过药理学干预手段在肝原代细胞平台上进行了机制验证。相关研究发表在《Acta Pharmaceutica Sinica B》杂志上。

胡乃华编译自: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8642447/>

原文标题: Integrative lipidomic and transcriptomic study unravels the therapeutic effects of saikosaponins A and D on non-alcoholic fatty liver disease