

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2017.02.008

根皮素引起前列腺癌 LNCaP 细胞 发生凋亡的机制研究

康 丹,吴朝蒙,曹润恽,王方方,田 倩,刘 平

(南京师范大学生命科学学院,江苏省分子与医学生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 根皮素是存在于苹果、梨等水果及多种蔬菜汁液中的天然活性物质,具有抗肿瘤活性,能够有效地诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖.本研究初步探讨了根皮素诱导前列腺癌 LNCaP 细胞的凋亡和相关分子机制.通过形态学观察、噻唑蓝(MTT)比色实验、CCK-8 实验测定前列腺癌细胞活性;采用 DAPI 染色法测定细胞核凝缩破裂;运用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术测定前列腺癌细胞的凋亡率;再通过 PI 单染流式细胞术测定前列腺癌细胞的周期变化;以及采用 Western blot 检测 PI3K/AKT 信号通路及其下游细胞凋亡相关蛋白和细胞周期相关蛋白的表达.实验结果表明:根皮素诱导前列腺癌 LNCaP 细胞周期阻滞在 G2/M 期,并呈浓度依赖性降低细胞活性、增加细胞核凝缩破裂,显著提高前列腺癌细胞的凋亡率.在分子机制上,根皮素呈现浓度依赖性下调 PI3K/AKT 的活性,从而影响细胞凋亡相关蛋白和细胞周期相关蛋白的表达.因此,根皮素对前列腺癌细胞的生长有显著的抑制作用,对治疗前列腺癌具有潜在的临床应用价值.

[关键词] 根皮素,细胞凋亡,细胞周期,PI3K/AKT 信号通路,前列腺癌

[中图分类号] Q291 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2017)02-0043-08

Molecular Mechanism of Phloretin-Induced Apoptosis in Prostate Cancer LNCaP Cells

Kang Dan, Wu Zhaomeng, Cao Runyi, Wang Fangfang, Tian Qian, Liu Ping

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Phloretin, a natural product found in pears, apples and various vegetables, exerts anti-inflammatory, anti-oxidant and anti-tumor effects. Here, we investigated the molecular mechanism of phloretin-induced apoptosis in prostate cancer LNCaP cells. In this study, effects of phloretin on the viability of prostate cancer cells were investigated by morphological observation, MTT assay and CCK-8 assay, respectively. Effect of phloretin on apoptosis and cell cycle was measured by Flow Cytometry. Furthermore, western blot was employed to investigate the levels of phosphorylation of PI3K and AKT (the activity of PI3K/AKT signaling pathway); and check the expression of cell apoptosis-related and cell cycle-related proteins which were downstream of PI3K/AKT signaling pathway in LNCaP cells. As a result, we found that phloretin significantly blocked cell cycle arrest in G2/M phase by decreasing the protein level of Cyclin B1, and decreased the cell viability and increased the nuclear rupture in a dose-dependent manner; and finally resulted in a significantly apoptosis in LNCaP cells. In molecular level, phloretin showed a dose-dependent down-regulation of the activity of PI3K/AKT via down-regulating the phosphorylation of PI3K and AKT proteins, and then regulated the expression of cell apoptosis-related and cell cycle-related proteins. Therefore, phloretin significantly inhibited cell viability and promoted apoptosis in prostate cancer cells, suggesting that phloretin had potential clinical value for treatment of prostate cancer in clinic.

Key words: phloretin, cell apoptosis, cell cycle, PI3K/AKT signal pathway, prostate cancer

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是西方国家常见的男性恶性肿瘤,是影响男性健康的第二大癌症,引起的死亡人数仅次于肺癌.据相关报道统计,在 2015 年,美国大约有 220 800 例新增前列腺癌患者,有

收稿日期:2016-10-15.

基金项目:国家自然科学基金(81272850,81472415).

通讯联系人:刘平,教授,博士生导师,研究方向:肿瘤发生与发展的分子机制. E-mail:08201@njnu.edu.cn

86 380 人死于前列腺癌^[1]. 随着经济的快速发展及生活水平的提高,在我国罹患前列腺癌的人数逐年增加,已严重威胁我国中老年男性健康^[2]. 目前针对前列腺癌的治疗药物,大多毒性大、疗效低、靶点单一或不明确等,因此寻找有效、安全的天然药物成为研究的焦点.

根皮素是二氢黄酮类化合物,广泛存在于葡萄、苹果、梨子和多种蔬菜等植物的果皮及根皮中,并且是植物产生的一种次级代谢产物,具有低毒副作用^[3]. 已有大量的文献报道,根皮素可诱导多种肿瘤细胞凋亡,包括肺癌、乳腺癌、肝癌和白血病细胞^[4-7]. Ewelina Szliszka 等人的研究发现根皮素能显著增强 TRAIL 诱导的 LNCaP 细胞凋亡和降低细胞毒性^[8]. 然而,关于根皮素诱导前列腺癌 LNCaP 细胞凋亡的具体分子机制尚不明确. 因此本文将以 LNCaP 细胞为作用对象对根皮素的抗肿瘤作用及机制作初步研究.

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

根皮素(Phloretin, Ph)(纯度 $\geq 98\%$)购自美国 Sigma-Aldrich 公司, DMSO 溶解,制备浓度为 100 mmol/L 的储存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用;胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司;电化学发光 ECL 试剂和蛋白质 Marker 购自南京麦高德生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; DAPI 试剂购自北京索莱宝科技有限公司; RPMI-1640 购自维森特生物技术(南京)有限公司; RIPA 裂解液、MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒和 CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术研究; 胰蛋白酶(Trypsin 1:250)购自合肥 Biosharp 生物科技公司.

抗体:兔抗 PARP-1 多克隆抗体、兔抗 AKT 多克隆抗体、兔抗 phospho-AKT(S473)多克隆抗体、兔抗 Survivin 多克隆抗体、鼠抗 Caspase 3 单克隆抗体、鼠抗 Cyclin B1 单克隆抗体、鼠抗 XIAP 单克隆抗体、鼠抗 β -Actin 单克隆抗体、羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶和羊抗鼠 IgG 辣根过氧化物酶均购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;兔抗 phospho-AKT(T308)多克隆抗体购自中国 Bioworld Technology 公司;兔抗 phospho-PI3Kinase p85(Tyr458)/p55(Tyr199)多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗 Caspase 8/p18 多克隆抗体、兔抗 Bcl-2 多克隆抗体、兔抗 BAX 多克隆抗体、兔抗 PI3K p85(alpha)多克隆抗体和鼠抗 Caspase 9/p35/p10 单克隆抗体购自美国 Proteintech Group 公司.

1.2 细胞培养与细胞传代

本研究中所用的细胞株是人正常前列腺基质 WPMY-1 细胞(二倍体细胞株)、前列腺癌 LNCaP 和 CWR-22Rv1 细胞(均从美国 ATCC 中心购买). 用 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI 1640 完全培养液,放置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养. 用 0.25%的胰蛋白酶-EDTA 消化传代, 2 d~3 d 传代一次.

1.3 细胞形态学观察及细胞活性检测

将培养好的细胞接种于 6 孔板中(5×10^5 个/孔),待细胞贴壁后,随机将细胞分为阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)的根皮素处理组,在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中进行培养;根皮素处理细胞 24 h 后,用尼康倒置荧光显微镜观察细胞形态并拍照记录.

将培养好的细胞接种于 96 孔板中(1×10^4 个/孔),待细胞贴壁后,随机将细胞分为阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)的根皮素处理组,每组设 6 个平行孔,在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中进行培养;根皮素处理细胞 24 h 后,吸去旧培养基,加入 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 含血清的新鲜培养基,并加入 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$ MTT 溶液(5 mg/mL)或者加入 10 $\mu\text{L}/\text{孔}$ CCK-8 溶液,轻轻混匀,置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中孵育 4 h. 之后,对于 MTT 实验,小心吸去孔内上清液,每孔加 150 μL DMSO 溶解沉淀物,选择 570 nm 在酶标仪上测定光密度值(OD 值);对于 CCK-8 实验,直接在酶标仪上选择 450 nm 测定光密度值(OD 值). 根据试剂盒使用说明书,将测得的 OD 值换算成细胞活性值并与对照孔的值进行比较.

1.4 DAPI 染色分析细胞凋亡

将培养好的细胞接种于 12 孔板中(2×10^5 个/孔),待细胞贴壁后,随机将细胞分成阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 和 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)的根皮素处理组,在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中进行培养;根皮素处理细胞 24 h 后,吸去旧培养基,每孔加 500 μL 1 \times PBS,将细胞洗 3 次/5 min,去除

1×PBS,加1 mL 4%多聚甲醛,在室温条件下固定 15 min;吸去多聚甲醛,用 1×PBS 洗 3 次/5 min,再加 1 mL 0.5%的 Triton-X-100,在室温下处理细胞 15 min;用 1×PBS 洗 3 次/5 min 之后加入 6 μL 的 DAPI (1 mg/mL),补加 300 μL 的 1×PBS,避光孵育 15 min. 最后在尼康倒置荧光显微镜下观察并拍照.

1.5 流式细胞仪分析细胞凋亡

将培养好的细胞接种于 6 孔板中(5×10^5 个/孔),待细胞贴壁后,随机将细胞分成阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 μmol/L、50 μmol/L 和 100 μmol/L)的根皮素处理组,在 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中进行培养;根皮素处理细胞 24 h 后,用不含 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化收集(注:胰蛋白酶消化时间不宜过长,否则会影响细胞膜上磷脂酰丝氨酸与 Annexin V-FITC 的结合),于室温 2 000 r/min 离心 5 min,收集细胞;用预冷 1×PBS(4 °C)重悬细胞一次,2000 r/min 离心 5 min,洗涤细胞;加入 500 μL 的 1×Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL 的 PI 染色,室温避光,孵育 5 min ~ 15 min;上机前,补加 800 μL 的 1×Binding Buffer;最后在流式细胞仪上分析细胞凋亡情况.

1.6 流式细胞仪分析细胞周期

将培养好的细胞接种于 6 孔板中(5×10^5 个/孔),待细胞贴壁后,随机将细胞分成阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 μmol/L、50 μmol/L 和 100 μmol/L)的根皮素处理组,在 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中进行培养;根皮素处理细胞 24 h 后,用不含 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶消化细胞,于室温 2 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集细胞. 用预冷 1×PBS(4 °C)重悬细胞一次,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清;加入 500 μL 70%的无水乙醇 4 °C 固定过夜,4 °C 离心机 2 000 r/min 离心 5 min,用预冷 1×PBS(4 °C)重悬细胞一次,2 000 r/min 离心 5 min,去除 1×PBS,加入 100 μL RNase A,37 °C 水浴 30 min,最后加入 200 μL PI 染色,混匀后 4 °C 避光孵育 20 min;加 800 μL 的 1×PBS,混匀;在流式细胞仪上检测细胞周期情况.

1.7 免疫印迹(Western blot)分析

将培养好的细胞接种于 6 孔板中(5×10^5 个/孔),待细胞贴壁后,随机将细胞分成阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 μmol/L、50 μmol/L 和 100 μmol/L)的根皮素处理组,在 5% CO₂、37 °C 细胞培养箱中进行培养;根皮素处理细胞 24 h 后,去除培养液,用 1×PBS 漂洗细胞 2 次,加入 120 μL/孔的细胞裂解液 RIPA(加有预冷的 PMSF);将细胞裂解液转移至 1.5 mL 的离心管中,置于冰上放置 30 min,每隔 10 min 悬混一次,使细胞裂解充分;12 000 r/min 离心 10 min,取上清;以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,使用 DC 法对样品进行总蛋白浓度的测定,-20 °C 保存待用;制备 SDS-PAGE 胶,胶浓度的大小依据检测蛋白质的分子量大小;取 20 μg 总蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳;电泳结束后,将蛋白质转移至 PVDF 膜上;用含 2%脱脂奶粉的 1×PBS 室温封闭 1 h;PBST 清洗 3 次后,4 °C 孵育一抗过夜;第二天 PBST 清洗 3 次后,室温孵育二抗 1 h;ECL 进行化学发光显色、拍照,并对条带进行灰度分析.

1.8 统计学分析

应用 GraphPad Prism 6.0 软件对研究结果进行数据统计分析. 本研究中的各项实验均独立重复 3 次,对实验结果均做 *t* 检验分析;实验误差 $p < 0.05$ 认为有统计学意义. 处理组和对照组比较, * 表示 $p < 0.05$.

2 实验结果

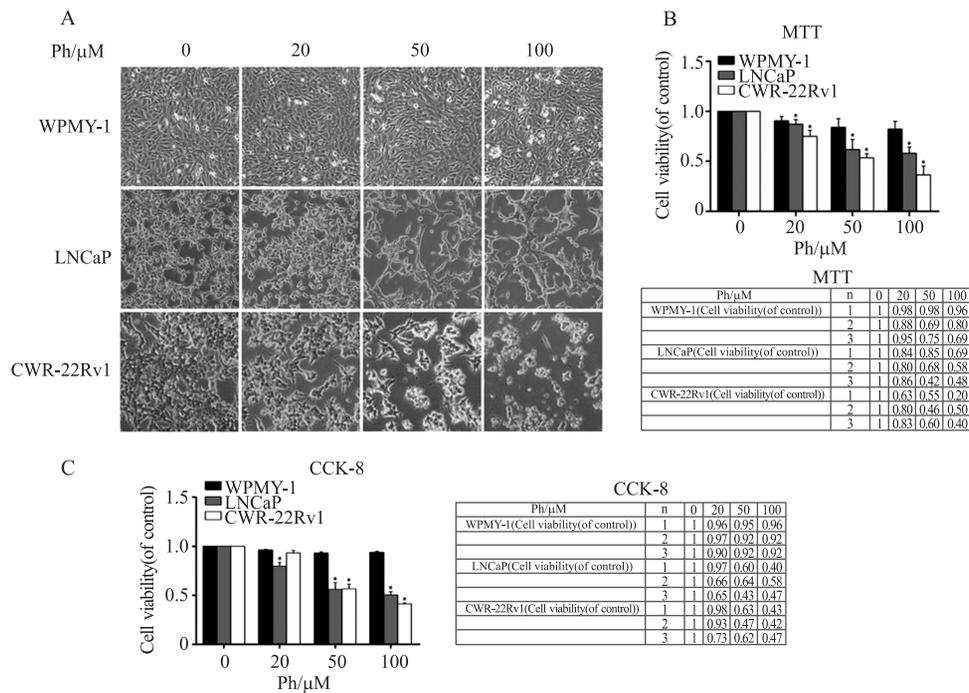
2.1 根皮素对前列腺癌细胞的形态和细胞活性的影响

以阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 μmol/L、50 μmol/L 和 100 μmol/L)的根皮素处理组对人正常前列腺上皮 WPMY-1 细胞和前列腺癌 LNCaP 细胞、CWR-22Rv1 细胞处理 24 h 后,光镜下可见(图 1A),当根皮素浓度为 100 μmol/L 时,对 WPMY-1 细胞形态及生长无影响,但对前列腺癌 LNCaP 和 CWR-22Rv1 细胞都有明显的影响,而且随着根皮素浓度的增加,细胞的贴壁能力下降程度也逐渐加大.

此外,MTT(图 1B)和 CCK-8(图 1C)分析结果也表明,前列腺癌细胞活性随着根皮素浓度的增加而显著降低,并呈现为根皮素浓度依赖性($p < 0.05$). 这些结果说明:根皮素抑制前列腺癌细胞的生长,且对癌细胞生长的抑制作用呈现根皮素浓度依赖性,而对正常细胞影响很小. 接下来,选取一株前列腺癌 LNCaP 细胞进行有关根皮素影响前列腺癌细胞生长和活性的分子机制研究.

2.2 根皮素对前列腺癌 LNCaP 细胞凋亡的影响

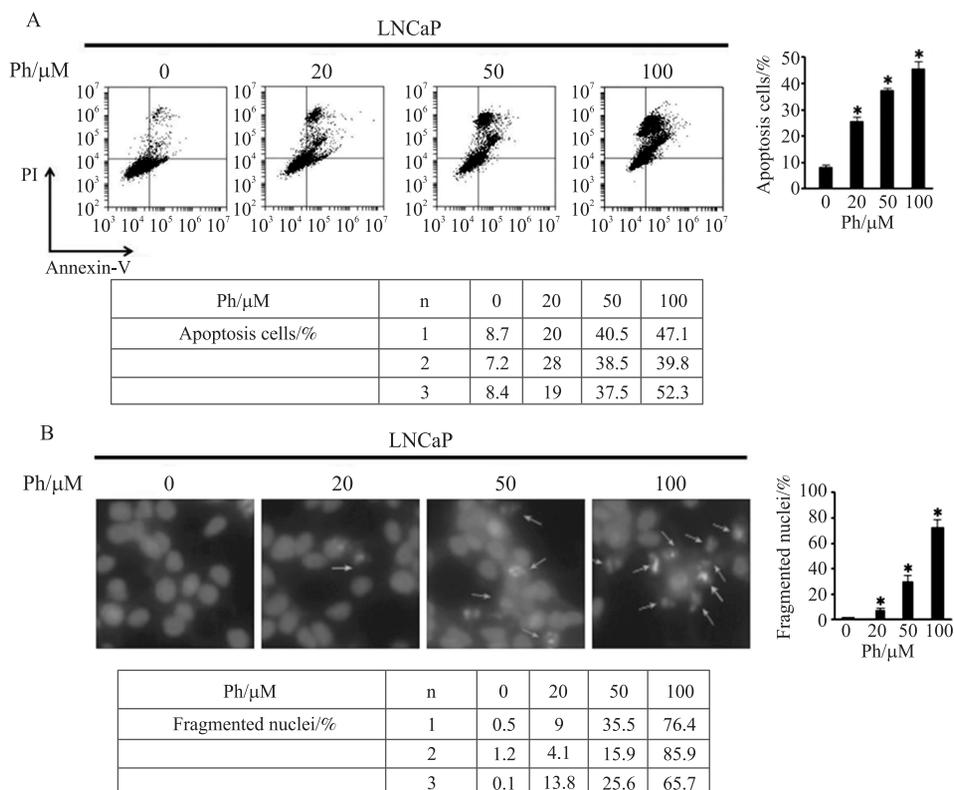
采用 AnnexinV-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果显示(图 2A),以阴性对照组(0.1%



A, 细胞形态学观察(×100); B, C, MTT 和 CCK-8 检测细胞活性实验结果. $n = 3$, $*p < 0.05$ 处理组和对照组比较
 A, Observation of cell morphology(×100); B, C, MTT and CCK-8 results of cell viability. $n = 3$, $*p < 0.05$ vs control group

图 1 根皮素对前列腺癌细胞形态及细胞活性的影响

Fig. 1 Effects of phloretin on the morphology and survival of prostate cancer cells



A, LNCaP 细胞凋亡的流式细胞术和统计分析结果; B, DAPI 染色和统计分析 LNCaP 细胞核破裂数(×400). $n = 3$, $*p < 0.05$ 处理组和对照组比较

A, Flow Cytometry results and statistics analysis of cells apoptosis; B, DAPI staining results and statistics analysis of nuclear condensation rupture number in LNCaP cells(×400). $n = 3$, $*p < 0.05$ vs control group

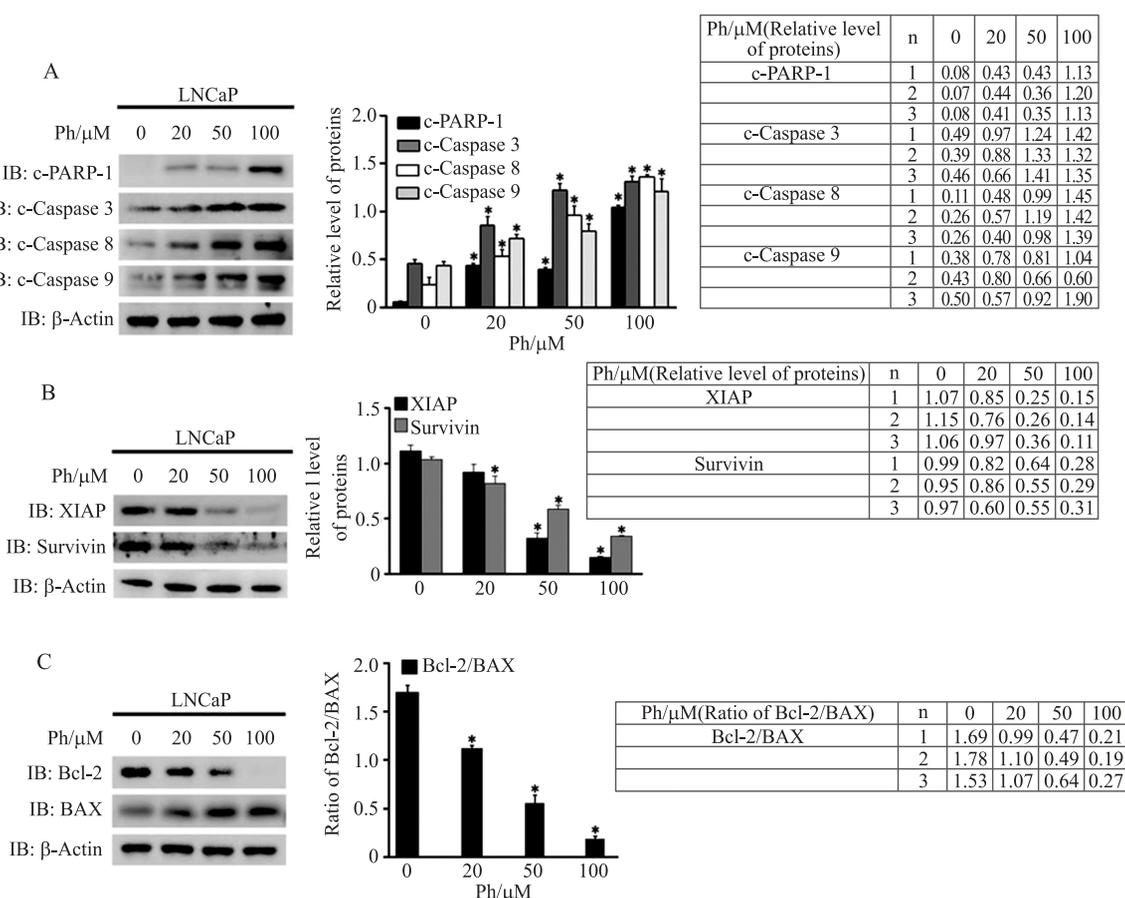
图 2 根皮素对 LNCaP 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of phloretin on apoptosis of LNCaP cells

DMSO)和不同浓度(20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$)的根皮素处理组处理细胞 24 h 后,LNCaP 细胞凋亡率随着根皮素的浓度增加而显著增加,当根皮素的浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,LNCaP 细胞的凋亡率增加到 46.4% ($p<0.05$). 同样,不同浓度的根皮素处理过的 LNCaP 细胞进行 DAPI 染色分析细胞核凝缩破裂情况. 如白色箭头所示(图 2B),根皮素的处理促进细胞核的凝缩和破裂,并且当根皮素浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞核凝缩和破裂百分比增加到 76% ($p<0.05$).

2.3 根皮素对前列腺癌 LNCaP 细胞凋亡相关蛋白的影响

以阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$)的根皮素处理组处理细胞 24 h 后,Western blot 检测结果显示(图 3A 和 3B),一系列细胞凋亡的末端效应蛋白酶 c-PARP-1、c-Caspase 3、c-Caspase 8 和 c-Caspase 9 的蛋白水平随着根皮素浓度的增加而显著增加($p<0.05$);受 PI3K/AKT 调控的蛋白 XIAP 和 Survivin 的表达都明显受到根皮素的抑制,其下降程度呈现根皮素浓度依赖性 ($p<0.05$). 此外,Bcl-2/BAX 的比值随着根皮素浓度的增加而显著减少($p<0.05$)(图 3C).



A、B、C, LNCaP 细胞中细胞凋亡相关蛋白表达的 Western blot 及灰度分析结果. $n=3$, $*p<0.05$ 处理组和对对照组比较

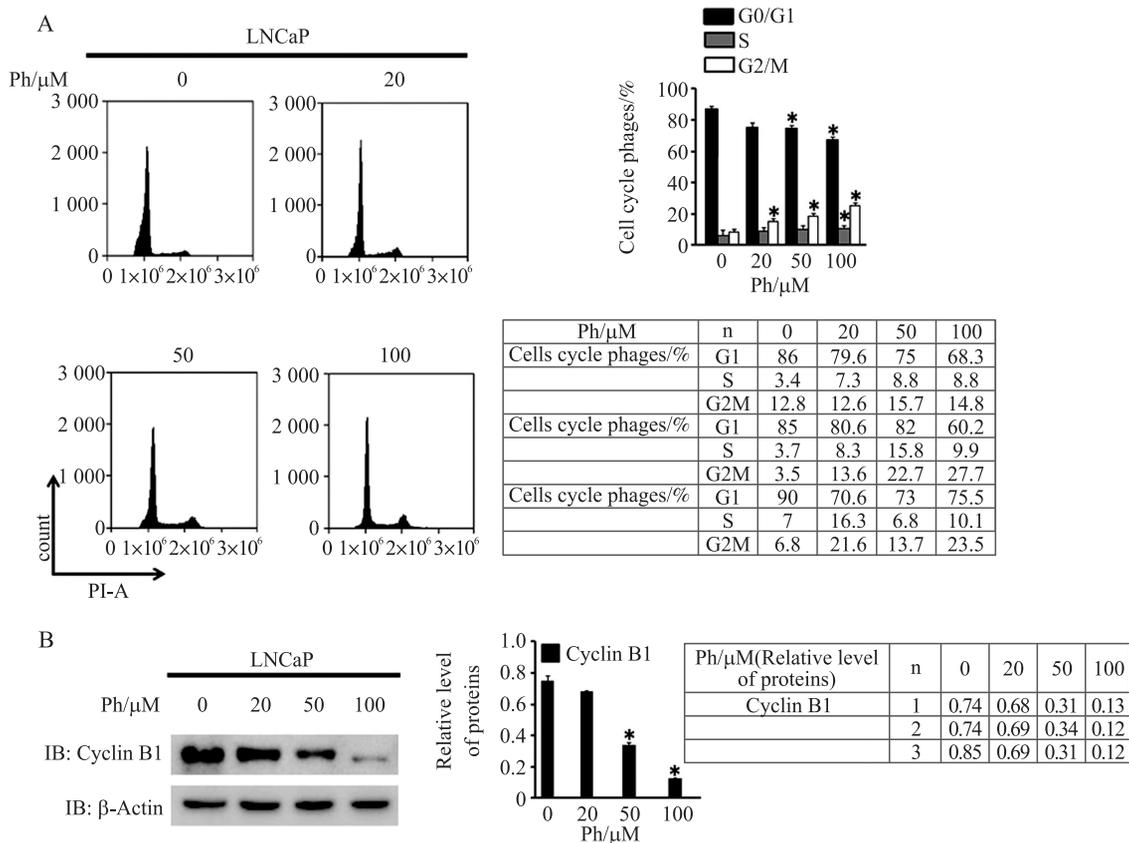
A、B、C, Western blot and densitometric analysis of the expression of cell apoptosis-related proteins in LNCaP cells. $n=3$, $*p<0.05$ vs control group

图 3 根皮素对 LNCaP 细胞中细胞凋亡相关蛋白表达情况的影响

Fig. 3 Effect of phloretin on the expression of cell apoptosis-related proteins in LNCaP cells

2.4 根皮素对前列腺癌 LNCaP 细胞周期的影响

采用 PI 单染流式细胞术检测细胞周期变化,结果显示(图 4A),以阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$)的根皮素处理组处理细胞 24 h 后,处于 G2/M 期其细胞数量随着根皮素浓度的增加而显著增加($p<0.05$),其中 G0/G1 期所占比例从 87% 下降到 68%,S 期和 G2/M 期所占比例分别从 4.7% 和 7.7% 增加到 9.6% 和 22%. 此外,Western blot 检测结果显示(图 4B),随着根皮素处理浓度的增加,细胞周期相关蛋白 Cyclin B1 的表达量显著降低($p<0.05$). 以上实验结果表明根皮素能够促进 LNCaP 细胞发生细胞周期阻滞.



A, LNCaP 细胞周期变化的流式细胞术和统计分析结果; B, LNCaP 细胞中细胞周期相关蛋白 CyclinB1 的 Western blot 及灰度分析结果. $n=3$, $*p<0.05$ 处理组和对照组比较

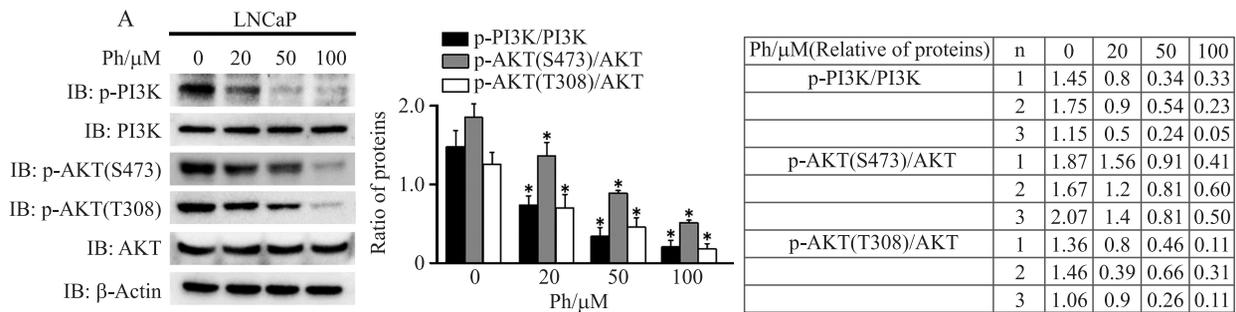
A, Flow Cytometry results and statistics analysis of the chang of cell cycle; B, Western blot and densitometric analysis of the protein expression of Cyclin B1 in LNCaP cells. $n=3$, $*p<0.05$ vs control group

图 4 根皮素对 LNCaP 细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of phloretin on cell cycle in LNCaP cells

2.5 根皮素调节 PI3K/AKT 信号通路的活性

为探究根皮素诱导 LNCaP 细胞凋亡和周期阻滞的分子机制,我们采用 Western blot 技术对 PI3K/AKT 信号通路及其活性表达进行分析,结果发现(图 5A),以阴性对照组(0.1% DMSO)和不同浓度(20 μmol/L、50 μmol/L 和 100 μmol/L)的根皮素处理组处理细胞 24 h 后,PI3K(P85 亚基)和 AKT(包括 S473 和 T308 两个位点)的磷酸化明显受到抑制,其磷酸化水平与总蛋白的比值随着根皮素浓度的增加而显著减少($p<0.05$);但 PI3K(P85 亚基)和 AKT 的总蛋白水平不受根皮素的影响。



A, LNCaP 细胞中 PI3K 及 AKT 蛋白的磷酸化和总蛋白表达的 Western blot 及灰度分析结果. $n=3$, $*p<0.05$ 处理组和对照组比较

A, Western blot and densitometric analysis of the protein expression of the phosphorylation status of PI3K, AKT and total PI3K, AKT. $n=3$, $*p<0.05$ vs control group

图 5 根皮素对 PI3K/AKT 信号通路的影响

Fig. 5 Effect of phloretin on regulation the activity of PI3K/AKT signal pathway

3 讨论

前列腺癌是欧美男性中常见的一种恶性肿瘤. 在中国前列腺癌发病率低于西方国家,但随着人们生活水平的提高,其发病率在我国逐年提高^[2]. 前列腺癌的化疗药物大多毒性大,因此寻找有效、安全的天然药物成为肿瘤治疗研究的焦点. 根皮素可以降低化疗药物对正常细胞的伤害,从而降低药物的毒副作用,且有一定的化疗增敏作用^[3]. 据报道,在前列腺癌细胞中,根皮素不仅能抑制前列腺癌细胞的生长,还能增加 TRAIL 诱导 LNCaP 细胞发生凋亡^[8]. 在本研究中,分别从细胞形态、细胞活性、细胞核破裂、细胞凋亡、细胞周期以及细胞凋亡相关蛋白和细胞周期相关蛋白几方面,探讨了根皮素对前列腺癌 LNCaP 细胞的影响,并初步探究了根皮素诱导前列腺癌细胞凋亡的分子机制. 从细胞形态上看,根皮素对前列腺正常细胞没有影响,但能显著抑制前列腺癌 LNCaP 和 CWR-22Rv1 细胞的生长;MTT 和 CCK-8 实验结果也表明,根皮素对前列腺正常细胞活性影响很小,但能显著抑制前列腺癌细胞活性. 而关于根皮素对前列腺肿瘤细胞具有选择性地抑制生长和诱导凋亡作用的分子机制,也即根皮素具有差异性地作用于前列腺正常细胞和肿瘤细胞的分子机制,还有待进一步地探索研究.

肿瘤细胞的一个主要特征是抗凋亡作用. Bcl-2 蛋白家族根据功能和结构的不同分成两类,分别是促凋亡蛋白(如 BAX、BAK、Bim 等)和抗凋亡蛋白(如 Bcl-2、Bcl-xL 等). 在调控肿瘤凋亡的过程中,凋亡的关键是 Bcl-2 和 BAX 表达量的比例^[9]. 有研究表明,外源性细胞凋亡途径是指 Fas-L→Caspase 8→Caspase 6/Caspase 7→Caspase 3/PARP-1,而内源性线粒体凋亡途径是指 Caspase8→BAX/Bak→Cytochrome C/AIF→Smac/DIABLO→Caspase 9→Caspase 3/PARP-1,这两条凋亡途径最终发生细胞凋亡的生物学效应^[10]. 为确定根皮素诱导前列腺癌细胞凋亡是否与这两条凋亡途径均相关,本文利用 Western blot 技术检测了此两条凋亡途径中的相关蛋白,实验结果表明,根皮素处理 LNCaP 细胞后,一方面提高了 c-Caspase 9、c-Caspase 3 和 c-PARP-1 的蛋白水平;另一方面,根皮素抑制了抗凋亡蛋白 XIAP 和 Survivin 的表达,降低了 XIAP 和 Survivin 的蛋白水平. 此外,Bcl-2/BAX 的比值显著降低. 这些结果充分说明:根皮素能够通过外源性细胞凋亡途径和内源性线粒体凋亡途径共同作用,进而诱发前列腺癌细胞发生凋亡. 据报道 TRAIL 基因可分别诱导外源性和内源性细胞凋亡途径^[10]. 那么,根皮素是否通过 TRAIL 基因调控细胞生长和凋亡,有待进一步探索.

PI3K/AKT 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,主要调节促生存信号网络和影响各种细胞过程,包括细胞增殖、存活、凋亡和蛋白质的翻译^[11],使 AKT 成为一个潜在的治疗或预防癌症靶^[12]. Western blot 结果显示,随着根皮素药物浓度的增加,p-PI3K、p-AKT(S473)和 p-AKT(T308)的水平均有明显下降并呈现浓度依赖性,而 PI3K 和 AKT 的总蛋白量无明显变化. 可见,根皮素处理前列腺癌细胞后,药物分子可以通过下调 PI3K 和 AKT 磷酸化水平而抑制信号通路 PI3K/AKT 的活性,进而影响细胞存活和生长,并阻滞细胞周期转换. 在本实验中检测了 PI3K 的其中一个下游激酶 AKT,但 PI3K 也可以调节 RAF/ERK 信号途径^[13]. 那么,根皮素是否也可以通过 PI3K/RAF/ERK 信号途径调节细胞生长存活能力呢?有待进一步研究.

总之,本研究结果表明,根皮素对前列腺癌细胞的生长具有明显的抑制作用,并能有效促进前列腺癌细胞发生凋亡,而同时对正常前列腺细胞几乎没有不利影响;说明根皮素可能在临床上治疗前列腺癌方面具有良好的应用前景,同时也为根皮素开发为临床药物提供了理论参考. 对于根皮素在体内是否能抑制前列腺癌细胞的生长仍须做大量的工作.

[参考文献]

- [1] ITO K. Prostate cancer in Asian men[J]. Nature reviews urology,2014,11(4):197.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics,2016[J]. Ca a cancer journal for clinicians,2016,66(1):7.
- [3] CHOI B M, XIAO Y C, SHANG S G, et al. Anti-apoptotic effect of phloretin on cisplatin-induced apoptosis in HEI-OC1 auditory cells[J]. Pharmacological reports,2011,63(3):708-716.
- [4] MIN J, LI X, HUANG K, et al. Phloretin induces apoptosis of non-small cell lung carcinoma A549 cells via JNK1/2 and p38

- MAPK pathways[J]. *Oncology reports*,2015,34(6):2 871-2 879.
- [5] KIM M S,KWON J Y,KANG N J,et al. Phloretin induces apoptosis in H-Ras MCF10A human breast tumor cells through the activation of p53 via JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling[J]. *Annals of the New York academy of sciences*,2009,1171(1):479-483.
- [6] WU C H,HO Y S, TSAI C Y, et al. *In vitro* and *in vivo* study of phloretin-induced apoptosis in human liver cancer cells involving inhibition of type II glucose transporter[J]. *International journal of cancer*,2009,124(9):2 210-2 219.
- [7] KOBORI M,IWASHITA K,SHINMOTO H,et al. Phloretin-induced apoptosis in B16 melanoma 4A5 cells and HL60 human leukemia cells[J]. *Bioscience biotechnology and biochemistry*,1999,63(4):719-725.
- [8] SZLISZKA E,CZUBA Z P,MAZUR B,et al. Chalcones and dihydrochalcones augment TRAIL-mediated apoptosis in prostate cancer cells[J]. *Molecules*,2010,15(8):5 336.
- [9] ADAMS J M,CORY S. The Bcl-2 protein family:arbiters of cell Survival[J]. *Science*,1998,281(5 381):1 322-1 326.
- [10] 冷向锋,程继义. TRAIL与前列腺癌[J]. *国际泌尿系统杂志*,2003,23(3):231-233.
- [11] TESTA J R,BELLACOSA A. AKT plays a central role in tumorigenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98(20):10 983-10 985.
- [12] GUANG H X,MICHAEL J,ALFONSO B,et al. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*,2001,98(1):247.
- [13] SUN H,KING A J,DIAZ H B,et al. Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase,Cdc42/Rac and Pak[J]. *Current biology*,2000,10(5):281-284.

[责任编辑:黄 敏]