

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)08-0039-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.08.010



异补骨脂查耳酮对前列腺癌细胞 PC3 增殖、迁移、凋亡、侵袭的影响*

陈胜, 刘云, 王天宝, 高钊, 李云飞[△]

(湖北省十堰市人民医院·湖北医药学院附属人民医院, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨异补骨脂查耳酮对前列腺癌细胞 PC3 增殖、迁移、凋亡和侵袭的影响。方法 实验分为空白组(A组, 等体积培养基), 阿霉素组(B组, 20 $\mu\text{mol/L}$), 异补骨脂查耳酮低、中、高剂量组(C₁组、C₂组、C₃组, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$)。各组细胞以培养基或加入相应药物的培养基处理。采用 CCK-8 法, 测定 450 nm 波长处细胞的吸光度, 并计算细胞存活率; 改良 Matrigel Boyden 室测定法检测细胞侵袭力, 并统计侵袭细胞数; 划痕实验法检测细胞相对迁移力, 并计算相对迁移率; 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 并计算细胞凋亡率; 实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)法检测细胞核因子 κ 2 相关因子(Nrf2)、超氧化物歧化酶 1(SOD1) mRNA 表达水平; Western blot 法检测细胞 Nrf2、SOD1 蛋白表达水平。结果 与 A 组比较, B 组和 C₁组、C₂组、C₃组细胞的存活率、侵袭数、迁移率均显著降低($P < 0.05$), 凋亡率、Nrf2 和 SOD1 mRNA 及其蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 异补骨脂查耳酮可有效抑制 PC3 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 并促进其细胞凋亡, 其机制可能与上调 Nrf2 和 SOD1 蛋白的表达有关。

关键词: 异补骨脂查耳酮; 前列腺癌; 细胞增殖; 细胞迁移; 细胞凋亡; 细胞侵袭; Nrf2; SOD1

Effect of Isopsoraleachalcone on Proliferation, Migration, Apoptosis, and Invasion of Prostate Cancer PC3 Cells

CHEN Sheng, LIU Yun, WANG Tianbao, GAO Yi, LI Yunfei

(Department of Urology, Shiyan People's Hospital · People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000)

Abstract: Objective To investigate the effect of isopsoraleachalcone on proliferation, migration, apoptosis, and invasion of prostate cancer PC3 cells. **Methods** The blank group (group A, equal volume of medium), adriamycin group (group B, 20 $\mu\text{mol/L}$), and low-, medium-, and high-dose isopsoraleachalcone groups (groups C₁, C₂, and C₃, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) were set in the experiment. Cells in each group were treated with the culture medium or culture medium added with corresponding drugs. The absorbance of cells at a wavelength of 450 nm was measured by the CCK-8 assay and the cell survival rate was calculated. The invasiveness of cells was detected by the modified Matrigel Boyden chamber assay, and the number of invading cells was counted. The relative migration force of cells was measured by the scratch assay and the relative migration rate was calculated. The apoptosis of cells was detected by flow cytometry, and the apoptosis rate was calculated. The expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) and superoxide dismutase 1 (SOD1) mRNA were detected by the real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The expression levels of Nrf2 and SOD1 protein were detected by Western blot. **Results** Compared with those in group A, the survival rate, invasiveness, and migration rate of cells in groups B, C₁, C₂, and C₃ were significantly lower ($P < 0.05$); the apoptosis rate, and the expression levels of Nrf2, SOD1 mRNA and protein in groups B, C₁, C₂, and C₃ were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** Isopsoraleachalcone can effectively inhibit the proliferation, migration, and invasion of PC3 cells, and promote their apoptosis. The mechanism may be related to the upregulation of Nrf2 and SOD1 protein expression.

Key words: isopsoraleachalcone; prostate cancer; cell proliferation; cell migration; cell apoptosis; cell invasion; Nrf2; SOD1

前列腺癌为男性常见泌尿系统恶性肿瘤, 发病人 数在全球老年男性癌症死亡原因中排名第 2, 仅次于肺 癌^[1-2]。但前列腺癌的确切发病机制目前仍不明晰, 确定分子机制对于其早期临床诊断和治疗至关重要。化学药物治疗(简称化疗)、雄激素消融术、放射治疗(简称放疗)和根治性前列腺切除术是治疗雄激素依赖性前列腺癌早期局限性病变的常用方法^[3], 但均不适用于晚期和侵袭性前列腺癌患者, 尤其是当其发展为不可

治愈的激素抵抗亚型时^[4], 前列腺癌从雄激素依赖状态 转变为雄激素非依赖状态为致命的恶化, 不仅加速了 前列腺癌的转移, 还会导致对化疗药物耐药。异补骨脂 查耳酮是补骨脂中的主要生物活性成分, 具有抗炎、抗 氧化、镇痛等作用^[5]。有证据表明, 其在肝癌、胃癌等多 种癌症细胞系中显示出抗癌作用^[6], 但其对前列腺癌的 抗肿瘤作用仍待研究。故本研究中采用不同剂量异补 骨脂查耳酮作用于前列腺癌细胞 PC3, 并研究了其对

* 基金项目: 湖北省教育厅科研计划项目[Q20182101]。

第一作者: 陈胜, 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为泌尿系肿瘤及泌尿系结石的诊疗, (电子信箱)584716404@qq.com。

[△]通信作者: 李云飞, 男, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为泌尿生殖系统疾病的微创治疗, (电子信箱)05113097@163.com。

PC3细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响,以期为临床治疗前列腺癌提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器: BSC - 1100 II B2 - X型生物安全柜、300 L型CO₂细胞培养箱、BKQ - B75型高压蒸汽灭菌锅(山东博科生物产业有限公司); 5320R型离心机(德国Leica公司); 伯乐 Mini - PRO TEAN型电泳仪(美国Bio - Rad公司); EVOS M7000型倒置显微镜(意大利 Thermo Fisher Scientific公司); LAS 4000型成像系统、Bio - Rad微孔板阅读器(美国GE Healthcare公司); BD FACSCanto II型流式细胞仪(美国 Thermo Fisher Scientific公司)。

试剂: 异补骨脂查耳酮(批号为DF - 5612 - D), RNA反转录试剂盒(批号为369487), 二抗(山羊抗兔, 批号为612548), 均购自南京建成生物工程研究所; RPMI 1640培养液(批号为505158), 胎牛血清(FBS, 批号为AF - 5150), 胰蛋白酶(批号为cxz - 10 - 31), 均购自美国Gibco公司; CCK - 8试剂盒(上海优宁维生物有限公司, 批号为631254 - XV); V - 荧光素异硫氰酸酯(FITC)凋亡试剂盒(美国Sun - Shine公司, 批号为456158); RNA提取试剂盒(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号为3156798); 实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)试剂盒(上海优宁维生物有限公司, 批号为YR - 6494); 核因子红系2相关因子(Nrf2)蛋白(批号为LI - 6192)、超氧化物歧化酶1(SOD1)蛋白(批号为OCCX - 6315)和 β - actin蛋白抗体(批号为CB - 68451), 均购自美国Abcam公司。

细胞: PC3细胞株(武汉普诺赛生命科技有限公司)。

1.2 方法

细胞培养与分组: 取PC3细胞株, 复苏后置RPMI 1640培养基中, 于37 °C、5% CO₂条件下培养24 h, 观察细胞覆盖率, 当细胞覆盖率达70%后更换培养基, 加入胰蛋白酶培养。实验分为空白组(A组, 等体积培养基), 阿霉素组(B组, 20 μ mol / L), 异补骨脂查耳酮低、中、高剂量组(C₁组、C₂组、C₃组, 10, 20, 40 μ mol / L)^[7]。

细胞存活率: 采用CCK - 8法。取处于对数生长期的细胞, 加入1 mL胰蛋白酶, 并轻微吹打2 min, 使细胞完全悬浮。将悬浮的细胞转移至1.5 mL离心管, 2 000 r / min离心10 min, 弃上清液, 加入1 mL RPMI 1640培养基, 充分悬浮细胞; 取96孔板, 每孔加入100 μ L细胞悬液, 各组均设6个复孔, 37 °C、5% CO₂条件下培养24 h, 弃去培养基, 加入含相应药物的RPMI 1640培养基培养24 h, 弃去培养基, 加入100 μ L培养液和10 μ L CCK - 8溶液, 持续培养3 h。读取450 nm波长处的吸光度, 并计算细胞存活率, 重复3次。

细胞侵袭力: 采用改良Matrigel Boyden室测定法。

在有基质胶的滤膜上接种处于对数生长期的PC3细胞(5 × 10⁵个 / mL), 制备10% FBS作为趋化剂, 置滤膜下仓室。滤膜在37 °C、5% CO₂条件下, 以培养基或加入相应药物的培养基培养24 h, 染色, 并进行细胞计数(随机在每个滤膜上选择5个视野进行观察, 对每个视野进行细胞计数, 重复6次, 取平均值)。

细胞迁移力: 采用划痕实验法。取处于对数生长期的PC3细胞, 按5 × 10⁵个 / mL的密度接种于6孔板内, 于37 °C、5% CO₂条件下培养48 h, 以培养基或加入相应药物的培养基培养24 h。吸头垂直孔壁划痕, 并加入无血清培养基, 划痕完成后培养48 h, 置显微镜下观察细胞迁移情况, 并计算相对迁移率。

细胞凋亡率: 采用流式细胞术。使用FITC凋亡试剂盒, 将PC3细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次, 用1 × 结合缓冲液以1 × 10⁶个 / mL密度悬浮于400 μ L V - FITC溶液中, 黑暗中室温孵育15 min, 然后加入PI(10 μ L), 4 °C避光孵育5 min, 立即进样分析, 重复3次。

总RNA提取及qPCR: 取出细胞培养皿放入无菌操作台, 弃去培养液, 提取细胞总RNA, 然后反转录成cDNA并于-80 °C保存备用。qPCR反应体系: 引物2.25 μ L, cDNA 3.0 μ L, SYBR Green qPCR SuperMix 17.25 μ L, 去酶水7.5 μ L, 每个样品设6个复孔; 反应条件: 94 °C, 12 min; 96 °C, 12 s, 62 °C, 25 s; 72 °C, 40 s, 35个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法计算mRNA水平, 引物序列见表1。

表1 基因引物序列
Tab. 1 Gene primer sequence

基因	引物序列
Nrf2	F: 5' - ATGCACCGCGACTGATAGTCGC - 3'
	R: 5' - TTCGTCTAGTGTCTGATGCA - 3'
SOD1	F: 5' - GCGGCTAGTGTCTGATGTGCTGTA - 3'
	R: 5' - CGTGATGTAGCTATGCTAGG - 3'
GAPDH	F: 5' - ATCGTTTGAGAGCTCAGG - 3'
	R: 5' - TTCAGCTGCATCGACGAT - 3'

Nrf2和SOD1蛋白表达: 采用Western blot法检测。配置蛋白酶K溶液(1 mL PBS中加入100 μ L蛋白酶K), 弃去培养液, 并加入1 mL蛋白酶K溶液, 悬浮细胞, 并于4 °C、3 000 r / min破碎细胞20 min, 将上清液转移至1.5 mL离心管中。经电泳分离、转膜、封闭后, 用Nrf2, SOD1和 β - actin的抗体(抗体稀释浓度1:5 000)在4 °C条件下孵育12 h, 1%吐温清洗3次, 再用二抗(稀释浓度1:1 000)孵育2 h, 进行成像并观察结果。

1.3 统计学处理

采用SPSS 25.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行单因素方差分析, 多重比较采用LSD - t检验。P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞的存活率与侵袭力

与A组比较,B组和异补骨脂查耳酮各剂量组细胞的存活率、侵袭数均显著降低($P < 0.05$),且异补骨脂查耳酮各剂量组效应呈剂量依赖性。详见表2、图1。

2.2 细胞迁移率

与A组比较,B组和异补骨脂查耳酮各剂量组细胞迁移率均显著降低($P < 0.05$),且异补骨脂查耳酮各剂量组效应呈剂量依赖性。详见表2和图2。

2.3 细胞凋亡率

与A组比较,B组和异补骨脂查耳酮各剂量组细胞凋亡率均显著升高($P < 0.05$),且异补骨脂查耳酮各剂量组效应呈剂量依赖性。详见表2和图3。

2.4 Nrf2 和 SOD1 mRNA 表达水平

与A组比较,B组和异补骨脂查耳酮各剂量组细胞Nrf2和SOD1 mRNA表达水平均显著升高($P < 0.05$),且异补骨脂查耳酮各剂量组效应呈剂量依赖性。详见表3。

表2 各组细胞的存活率、侵袭数、迁移率及凋亡率比较($\bar{X} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of the survival rate, invasiveness, migration rate, and apoptosis rate of cells in each group ($\bar{X} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	存活率(%)	侵袭数(个)	迁移率(%)	凋亡率(%)
A组	0	100.00 \pm 0.00	197.69 \pm 14.56	60.33 \pm 7.84	0.43 \pm 0.07
B组	20	51.68 \pm 6.87 [*]	72.98 \pm 8.37 [*]	25.45 \pm 3.91 [*]	18.46 \pm 2.31 [*]
C ₁ 组	10	74.29 \pm 8.29 [*]	126.82 \pm 12.19 [*]	49.94 \pm 5.80 [*]	3.64 \pm 0.32 [*]
C ₂ 组	20	63.16 \pm 6.24 [*]	90.66 \pm 10.10 [*]	38.12 \pm 4.09 [*]	12.26 \pm 1.33 [*]
C ₃ 组	40	52.84 \pm 6.18 [*]	74.79 \pm 8.63 [*]	27.16 \pm 3.90 [*]	17.64 \pm 1.92

注:与A组比较,^{*} $P < 0.05$ 。表3同。

Note: Compared with those in group A, ^{*} $P < 0.05$ (for Tab. 2 - 3).

2.5 Nrf2 和 SOD1 蛋白表达水平

与A组比较,B组和异补骨脂查耳酮各剂量组细胞Nrf2和SOD1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$),且异补骨脂查耳酮各剂量组效应呈剂量依赖性。详见表3、图4。

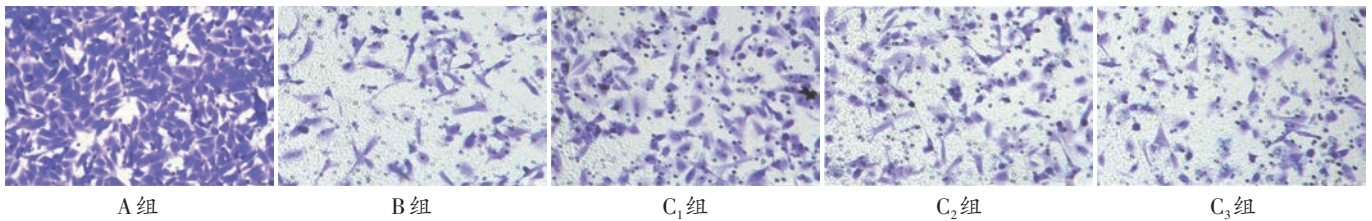


图1 细胞侵袭情况($\times 100$)

Fig. 1 Cell invasiveness ($\times 100$)

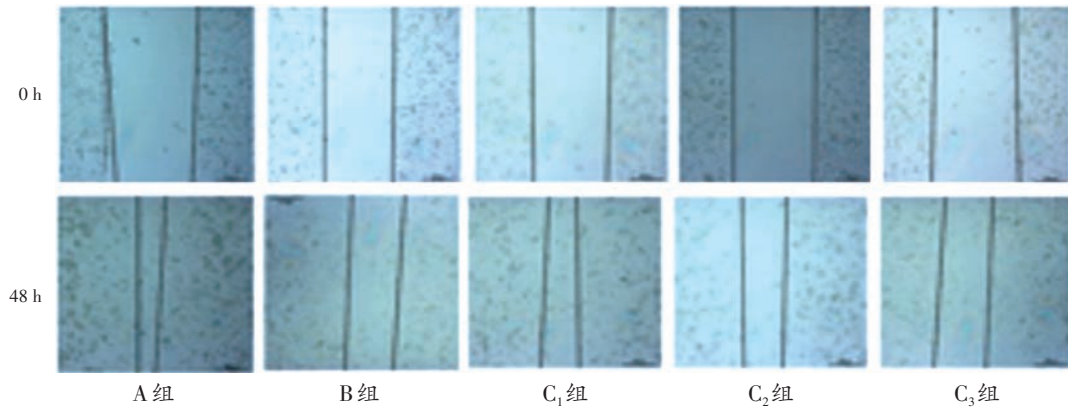


图2 细胞迁移情况($\times 100$)

Fig. 2 Cell migration ($\times 100$)

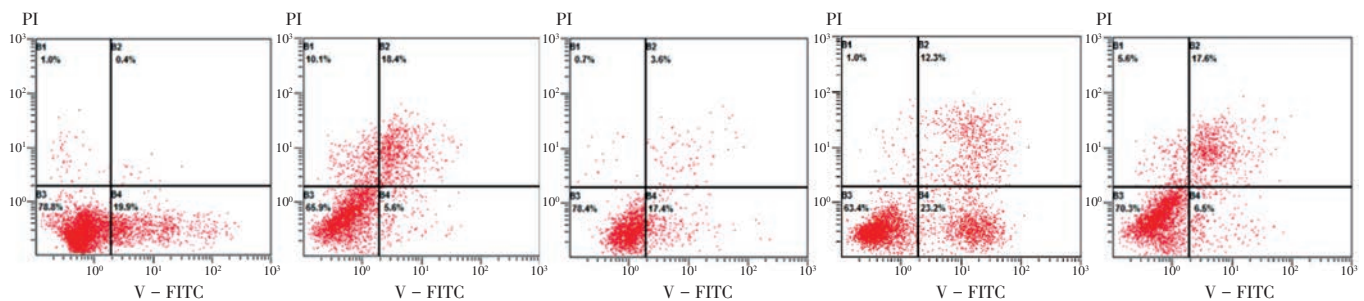


图3 流式细胞图

Fig. 3 Flow cytometry

表3 各组细胞Nrf2和SOD1 mRNA及蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s$)
Tab. 3 Comparison of Nrf2, SOD1 mRNA and protein expression levels of cells in each group ($\bar{X} \pm s$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol/L}$)	mRNA		蛋白	
		Nrf2	SOD1	Nrf2	SOD1
A组	0	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	0.21 \pm 0.03	0.17 \pm 0.02
B组	20	1.64 \pm 0.12*	1.70 \pm 0.14*	0.78 \pm 0.08*	0.87 \pm 0.09*
C ₁ 组	10	1.15 \pm 0.10*	1.14 \pm 0.13*	0.34 \pm 0.04*	0.32 \pm 0.04*
C ₂ 组	20	1.32 \pm 0.10*	1.39 \pm 0.15*	0.49 \pm 0.04*	0.44 \pm 0.05*
C ₃ 组	40	1.57 \pm 0.12*	1.65 \pm 0.13*	0.72 \pm 0.09*	0.86 \pm 0.10*

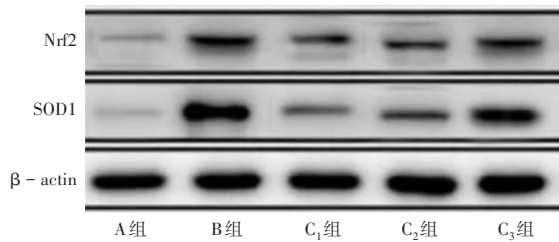


图4 Nrf2和SOD1蛋白表达印迹图

Fig. 4 Western blot of Nrf2 and SOD1 protein expression

3 讨论

据统计,2018年全球新增前列腺癌病例近130万例,占男性恶性肿瘤发病人数的13.5%^[8]。前列腺癌病程进展缓慢,早期无明显临床症状,因此患者易错过最佳治疗时机,当肿瘤细胞发生迅速的增殖和扩散,导致患者出现排尿异常等一系列临床症状时,疾病多已进展至晚期^[9]。前列腺癌为涉及多基因、多因素、多途径的复杂疾病,其分子机制仍未知^[10]。在过去的几十年里,许多从药用植物中提取的天然成分,由于其肿瘤选择性和细胞毒性特性,在多种肿瘤模型中可靶向多种信号通路,其中多种天然成分已被证实可用于前列腺癌的治疗^[11]。本研究中发现,随着异补骨脂查耳酮剂量的增加,PC3细胞存活率逐渐降低,表明异补骨脂查耳酮对PC3细胞生存具有明显的抑制作用。

有研究表明,细胞内活性氧是诱导细胞凋亡的细胞信号级联的重要介质,一些药物通过增加细胞内活性氧事件表现出抗癌作用^[12]。目前,Nrf2/抗氧化反应元件(ARE)通路被认为是抗氧化损伤和炎症的重要细胞防御系统之一,因此其失调与许多人类疾病,尤其是癌症有关^[13]。在非应激条件下,Nrf2被Keap1隔离,并在静息状态下锚定在细胞质中,而在氧化应激条件下,Nrf2被激活并从Keap1结合中分离,然后转移到细胞核中,与ARE结合,并促进下游抗氧化蛋白的表达,包括SOD1^[14]。除减轻氧化应激外,Nrf2的激活还可防止炎症,Nrf2的失活将导致氧化应激反应水平升高,随后细胞因子的产生增加^[15]。既往研究表明,Nrf2/ARE信号通路的激活可预防早期癌症的发生,越来越多的临床研究表明,与良性前列腺增生相比,在人类前列腺

癌组织中观察到高Nrf2表达^[16]。SOD1是机体内主要的抗氧化酶之一,在调节机体氧化应激反应和清除氧自由基方面具有重要作用,同时,SOD1基因的5'端具有特异性ARE序列,可与Nrf2相结合^[17]。本研究中检测了细胞内Nrf2和SOD1的表达水平,并检测了各组细胞的侵袭及迁移水平。结果提示,异补骨脂查耳酮可激活Nrf2/ARE信号通路,从而升高Nrf2、ARE转录及翻译水平,同时显著降低PC3细胞的迁移及侵袭能力,机制可能是异补骨脂查耳酮通过激活Nrf2/ARE信号通路降低细胞氧化应激反应水平,从而抑制肿瘤细胞转移,初步提示异补骨脂查耳酮可能通过调节细胞氧化应激水平来发挥其作用。本研究中还发现,异补骨脂查耳酮可提高PC3细胞的凋亡水平,因此其可能是通过促进凋亡,同时降低细胞转移和生存能力来抑制肿瘤的发展。

综上所述,异补骨脂查耳酮可有效抑制PC3细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并促进其凋亡,其机制可能与上调Nrf2和SOD1蛋白的表达有关。

参考文献

- [1] GANDAGLIA G, LENI R, BRAY F, et al. Epidemiology and Prevention of Prostate Cancer[J]. Eur Urol Oncol, 2021, 4(6): 877 - 892.
- [2] NAKAJIMA K, MIZOKAMI A, MATSUYAMA H, et al. Prognosis of patients with prostate cancer and bone metastasis from the Japanese Prostatic Cancer Registry of Standard Hormonal and Chemotherapy Using Bone Scan Index Cohort Study[J]. Int J Urol, 2021, 28(9):955 - 963.
- [3] UMEMORI M, KURATA M, YAMAMOTO A, et al. The expression of MYC is strongly dependent on the circular PVT1 expression in pure Gleason pattern 4 of prostatic cancer[J]. Med Mol Morphol, 2020, 53(3):156 - 167.
- [4] LEU WJ, WANG CT, HSU JL, et al. Ascleposide, a natural cardenolide, induces anticancer signaling in human castration-resistant prostatic cancer through Na⁺ / K⁺ - ATPase internalization and tubulin acetylation[J]. Prostate, 2020, 80(4): 305 - 318.
- [5] LI B, XU N, WAN Z, et al. Isobavachalcone exerts antiproliferative and proapoptotic effects on human liver cancer cells by targeting the ERKs / RSK₂ signaling pathway [J]. Oncol Rep, 2019, 41(6):3355 - 3366.
- [6] WANG M, LIN L, LU JJ, et al. Pharmacological review of isobavachalcone, a naturally occurring chalcone[J]. Pharmacol Res, 2021, 165:105483.
- [7] 肖毅,李佩佩,周劲,等. 异补骨脂查耳酮对鼻咽癌CNE1细胞增殖和转移的影响及作用机制的研究[J]. 中国药师, 2021, 24(9):1623 - 1629.
- [8] SMITH WH, CESARETTI JA, CHIN CP, et al. Salvage Low Dose Rate Brachytherapy for Intraprostatic Local Prostate Cancer Recurrence following Definitive External Beam Radiation