

复方中药紫龙金对前列腺癌细胞系 LNCaP 的体外作用

李学松¹ 梁云燕² 王代树² 谢贤和³ 师长进¹ 陈捷¹ 孙国锋¹
周利群¹ 薛兆英¹ 那彦群¹ 郭应禄¹

摘要 目的 探讨复方中药紫龙金(简称紫龙金)对雄激素依赖型人前列腺癌细胞系 LNCaP 的体外作用机制。方法 应用 MTT 法、流式细胞术和显微荧光术测定紫龙金对 LNCaP 的增殖、细胞周期分布和诱导凋亡的影响,应用 RT-PCR 方法检测前列腺特异性抗原基因(PSA)和雄激素受体(AR)凋亡相关基因 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响;应用 Western blot 方法测定对 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响。结果 紫龙金对 LNCaP 细胞具有时间和剂量依赖性增殖抑制、G₀/G₁ 期阻滞和诱导凋亡作用,作用 72h 时 IC₅₀ 为 0.79mg/ml,紫龙金可以下调前列腺特异性标志基因 PSA、AR 和凋亡相关基因 bcl-2 的表达,降低 bcl-2 蛋白表达,对 bax 蛋白表达无明显作用。结论 紫龙金可以通过抑制 LNCaP 细胞增殖、G₀/G₁ 期阻滞、诱导凋亡、下调 PSA、AR 和 bcl-2 基因表达,降低 bcl-2 蛋白表达等作用机制发挥抗肿瘤作用。

关键词 复方中药紫龙金,前列腺癌,体外实验,细胞周期,细胞凋亡

In vitro Effect of Zilongjin on Prostate Cancer Cell Line LNCaP LI Xue-song, LIANG Yun-yan, WANG Dai-shu, et al *Institute of Urology, First Hospital, Peking University, Beijing (100034)*

Objective To investigate the effect of Zilongjin (ZLJ) on human androgen-dependent type of prostate cancer cell line LNCaP. **Methods** MTT assay, flow cytometry and fluorescence microscopy were used to observe the effect of ZLJ in anti-proliferation, cell cycle arresting and apoptosis induction. RT-PCR was used to examine the effect of ZLJ on expressions of prostate marker gene (PSA), androgen receptor (AR), apoptosis related genes (bcl-2 and bax), and Western blot assay was used to detect the effect on protein expression of bcl-2 and bax. **Results** ZLJ could cause apparent inhibition on proliferation, induce G₀/G₁ phase arresting and apoptosis in time- and dose-dependent manner on LNCaP cells. The concentration for inhibiting cell growth by 50% (IC₅₀) in 72 hrs was 0.79 mg/ml. ZLJ could down-regulate the expression of PSA, AR, bcl-2 genes and lower bcl-2 protein expression, but showed ineffective on bax protein expression. **Conclusion** ZLJ displays its anti-tumor effects by way of inhibiting the cell proliferation, arresting the G₀/G₁ phase, inducing apoptosis, down-regulating PSA, AR, bcl-2 gene expression and lowering bcl-2 protein expressions.

Key words Zilongjin; prostate cancer; in vitro experiment; cell cycle; cell apoptosis

目前已有的各种治疗方法对晚期前列腺癌患者的疗效都不满意,需要寻找新的临床治疗途径^[1]。中草药是其中最具前景的药物之一。复方中药紫龙金(原名白龙片,下简称紫龙金)在临床应用中初步显示出对晚期前列腺癌有效。本研究探讨了紫龙金对前列腺癌细胞系 LNCaP 的体外作用机制,为其在前列腺癌患者

的临床应用提供理论基础。

材料与方

1 细胞来源及培养 雄激素依赖型人前列腺癌细胞系 LNCaP 由北京大学泌尿外科研究所提供。用含 10% 胎牛血清(Hyclone 公司产品)的 RPMI 1640 培养基(GIBCO 公司产品),在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2 紫龙金工作液配制 紫龙金(由白英、龙葵、黄芪、当归等中药组成,制成粉剂,中新药业天津中药制药厂提供)。将粉剂溶于双蒸水中,高压灭菌促溶后,离心取上清配制成 0.3、0.5、1.0mg/ml 紫龙金工

基金项目 国家自然科学基金资助(No. 39480026)

作者单位 1. 北京大学第一医院(100034); 2. 北京大学肿瘤医院、北京大学泌尿外科研究所、北京市肿瘤防治研究所; 3. 福建医科大学协和临床医学院

通讯作者 李学松, Tel: 13621298753; E-mail: pineneedle@sina.com

万方数据

作液。

3 紫龙金对 LNCaP 细胞的增殖抑制作用 采用 MTT 法测定,即取对数生长期 LNCaP 细胞,每孔 4 000 个细胞传于 96 孔培养板,24h 后对照组换培养液,实验组加入不同浓度的紫龙金,于 24、48 和 72h 后应用 MTT 法比色检测细胞活力。每孔中加入 MTT(Sigma 公司产品) $50\mu\text{l}$ (2.5mg/ml),培养 4h 后吸去培养液,加 DMSO $100\mu\text{l}$,摇床振荡使蓝紫色沉淀颗粒完全溶解,在酶标仪(Bio-Rad 550)上测定 OD 值,计算细胞存活率,绘制曲线并计算 IC_{50} ,细胞存活率(%)=实验组的 OD 值/对照组的 OD 值 $\times 100\%$ 。

4 细胞周期分布和凋亡比例检测 应用流式细胞技术,即收集作用到预定时间的 LNCaP 细胞,70% 冷乙醇 4°C 固定 24h 以上,上机前用 PBS 洗 3 次,加 $100\mu\text{g/ml}$ RNA 酶(Sigma 公司产品), 37°C 消化 30min,酶切 RNA,加 $50\mu\text{g/ml}$ 碘化丙啶(PI, Sigma 公司产品),避光 4°C 染色 30min 以上,经尼龙网过滤后,用流式细胞仪(EPICS XL, COULTER 公司产品)测定,计算出细胞周期分布和凋亡情况。

5 细胞染色质凝集观察 采用显微荧光术,即收集作用到预定条件的 LNCaP 细胞,以 DNA 特异性结合的荧光染料 Hoechst-33342(Sigma 公司产品) $2\mu\text{g/ml}$ 及终浓度为 $40\mu\text{g/ml}$ 的 PI 于 37°C 染色 10min。滴片后在荧光显微镜(Olympus 公司产品)下紫外光激发观察细胞核 DNA 荧光,区别正常、坏死与凋亡细胞,计数 20 个视野(总细胞数 >200 个),统计凋亡细胞占总细胞数的百分比,并拍摄照片。

6 前列腺特异性抗原(protatic specific antigen, PSA)雄激素受体(androgen receptor, AR) bcl-2 和 bax 基因 mRNA 水平表达检测 采用 RT-PCR 法,即收集作用到预定时间的 LNCaP 细胞,按 SV Total RNA Isolation System 试剂盒(Promega 公司产品)说明书提取总 RNA。分光光度法测定 RNA 浓度后取 $1\mu\text{g}$ 应用 Reverse Transcription System 试剂盒(Promega 公司产品)进行逆转录反应,第一链 cDNA 于 -20°C 保存。应用 Omega 2.0 软件进行引物设计,各基因引物特征见表 1。按 PCR Master Mix(Promega 公司产品)说明书进行 PCR 反应,反应条件为: 94°C , 4min; 94°C 45s; $56.8\sim 59.6^\circ\text{C}$ 45s; 72°C 60s (25~32 个循环); 72°C 5min; 4°C 保存。PCR 产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中 50V 电压下电泳约 30min 后,用 UVP Imagestore 7500(Life Science)成像系统成像,分析条带。选用 β -actin 为内参照基因。

7 西方数据 bax 蛋白表达测定 采用 Western

表 1 各基因引物特征

基因名称	引物碱基序列	退火温度 ($^\circ\text{C}$)	循环数	PCR 产物 大小(bp)
PSA	5'-CTGACTGTCAAGCTGAGG-3' 5'-GAAGAAGGAGGTGTCTGG-3'	58.1	25	470
AR	5'-ACAAGTCCCGATGTACAGC-3' 5'-AGCCCAGCAAATAGAATTCAGG-3'	57.8	25	593
bcl-2	5'-AGATGGCGAATGACCAGC-3' 5'-CAGGTAACAAAACCCACAGC-3'	56.8	32	577
bax	5'-GTTTCATCCAGGATCGAGC-3' 5'-GGAAGTCCAATGTCCAGC-3'	59.6	32	345
β -actin	5'-ACCAACTGGGACGACATGG-3' 5'-GCGTACAGGGATAGCACAGC-3'	59.6	25	203

blot 方法。作用到预定条件的 LNCaP 细胞,用单去污蛋白裂解缓冲液裂解,提取总蛋白,应用 Bradford 比色法测定蛋白浓度后取 $40\mu\text{g}$ 蛋白样品经 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 8V/cm 电压进行电泳分离,之后电转移至硝酸纤维素滤膜(S&S 公司产品)上,分别与 bcl-2 和 bax 抗体(Santa Cruz 公司产品)进行反应,以 β -actin 为内参照。应用 ECL Western Blot 化学发光试剂盒(Amersham Pharmacia 公司产品)检测信号。

8 统计学方法 应用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,两组间均数比较应用 t 检验,两组以上均数比较应用方差分析。

结 果

1 紫龙金对 LNCaP 的增殖抑制作用 见图 1。紫龙金对 LNCaP 的增殖抑制作用具有时间依赖性和剂量依赖性,即紫龙金作用 72h 对 LNCaP 的 IC_{50} 为 0.79 mg/ml 。

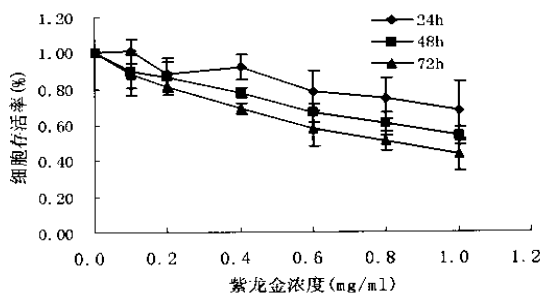


图 1 不同浓度的紫龙金对 LNCaP 细胞增殖抑制的影响

2 紫龙金对 LNCaP 细胞周期分布和诱导凋亡的作用 流式细胞术检测显示紫龙金诱导凋亡作用也具有时间依赖性和剂量依赖性,直方图(图略)中可以观察到小凋亡峰;紫龙金作用后 G_0/G_1 期细胞比例增加, G_2/M 期比例降低,对 S 期无明显影响(见表 2、表 3)。

表 2 不同剂量紫龙金对 LNCaP 细胞周期分布和凋亡比例的影响 (%)

组 别	作用时间 (d)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	凋亡比例
对 照	2	65.90	17.30	16.80	0.62
紫龙金 0.3mg/ml	2	69.60 *	21.00	9.40 *	3.89 *
0.5mg/ml	2	73.20 *	16.20	10.60 *	4.28 *
1.0mg/ml	2	73.80 *	14.90	11.40 *	11.30 *

注 :与对照组比较 , * P < 0.05

表 3 0.5mg/ml 紫龙金作用不同时间对 LNCaP 细胞周期分布和凋亡比例的影响 (%)

组别	作用时间 (d)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	凋亡比例
对照	2	65.90	17.30	16.80	0.62
紫龙金	2	73.20 *	16.20	10.60 *	4.28 *
对照	4	66.20	17.90	15.90	0.92
紫龙金	4	72.80 *	17.60	9.60 *	5.89 *
对照	6	69.90	19.00	11.10	0.61
紫龙金	6	71.00	18.40	10.60	18.60 *

注 :与对照组同期比较 , * P < 0.05

3 紫龙金对细胞及染色质凝集状态的影响

LNCaP 细胞随紫龙金作用浓度增高出现不同程度的凋亡改变 ,光镜下观察细胞收缩变圆 ,脱离培养瓶壁 ,悬浮到培养液中 ,荧光显微镜观察到典型凋亡细胞染色质凝集成点状或斑块状 ,坏死细胞被 PI 红染。计数结果显示对照组、紫龙金 0.3、0.5 和 1.0mg/ml 作用 2 天后典型凋亡细胞比例分别为(1.0 ± 0.8)%、(4.5 ± 3.2)%、(8.5 ± 4.1)%和(16.0 ± 6.6)% ,组间比较差异有显著性(P < 0.01)。

4 紫龙金对 AR、PSA、bcl-2 和 bax 基因 mRNA

水平表达的影响 RT-PCR 结果显示 ,紫龙金可以下调 PSA、AR 和 bcl-2 基因的表达 ,随紫龙金作用浓度增加其下调作用增强 ,紫龙金对 bax 基因表达没有明显影响(见图 2)。

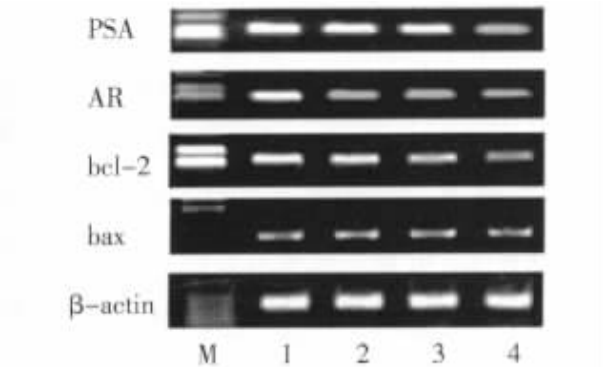


图 2 紫龙金对 PSA、AR、bcl-2 和 bax 基因 mRNA 水平表达的影响
注 :β-actin 为内参照基因 ;M 为 Marker,1 为对照,2、3、4 分别为紫龙金 0.5、1.0mg/ml 作用 2 天

5 紫龙金对 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响 与对照组比较 ,紫龙金 0.3mg/ml 和 0.5mg/ml 作用 2 天后 bcl-2 蛋白表达水平降低 ,bax 蛋白表达水平变化不明显(见图 3)。紫龙金在蛋白水平对 bcl-2 和 bax 的影响与 mRNA 水平相一致。

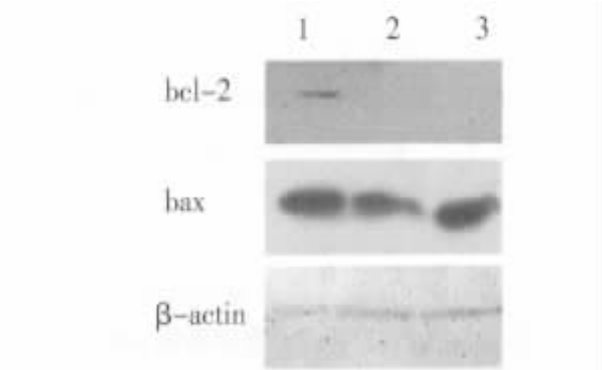


图 3 紫龙金对 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响
注 :β-actin 为内参照基因 ;1 为对照,2、3 分别为紫龙金 0.3、0.5mg/ml 作用 2 天

讨 论

前列腺癌在欧美地区是男性发病率最高的恶性肿瘤 ,在我国其发病率也呈上升趋势。流行病学调查显示饮食因素与前列腺癌的发生有很强的相关性。提示植物制剂可能对前列腺癌的预防、治疗和防止肿瘤进展方面有一定的作用。因此 ,近些年复方中药在东西方国家越来越广泛地用于治疗前列腺癌^[2]。

紫龙金由白英、龙葵、黄芪、当归等中药组成 ,具有益气养血、清热解毒和化瘀消 的功 效 ,临床研究显示与细胞毒化疗药物联合应用于肺癌、结肠癌、乳腺癌、胃癌等多种中晚期肿瘤患者具有明显减毒增效作用^[3]。对胃肠道肿瘤研究显示紫龙金具有体外抑制增殖 ,促进肿瘤细胞分化的作用 ,可以多靶位综合调节癌细胞的各层次分子 ,发挥正负平衡调节作用。如使两条膜信号传导通路中的 cAMP-PKA 上调 ,DAG-PKC 下调 ;可以抑制癌基因 c-H-ras 和 c-myc 表达 ,增强抑癌基因 p53、p16、Rb 表达等^[4-6]。紫龙金对转移性前列腺癌细胞 PC-3M-1E8 具有抑制增殖和降低侵袭能力的作用^[7]。

本研究结果显示紫龙金对 LNCaP 细胞具有明显的体外增殖抑制活性 ,可以使 LNCaP 细胞阻滞在 G₀/G₁期 ,此外还具有一定程度的诱导凋亡作用。通过 DNA 特异性结合的荧光染料 Hoechst-33342 和 PI 联染 ,观察到典型的凋亡细胞染色质聚集改变。提示紫龙金可以通过周期阻滞和诱导凋亡途径发挥增殖抑

制活性进而达到抗肿瘤作用。

LNCaP 细胞表达 AR, 其增殖呈雄激素依赖性, AR 表达下调会降低 LNCaP 细胞对雄激素的反应。同时 AR 通过与 PSA 启动子区域的特异性序列结合对 PSA 转录活性进行调控, 增强 PSA 的转录活性^[8]。目前公认 PSA 水平反应前列腺癌患者的肿瘤负荷, PSA 水平降低与前列腺癌患者的预后改善相关, 因而 PSA 水平成为前列腺癌临床治疗中非常重要的疗效评定指标。本研究显示紫龙金可以降低前列腺特异性基因 PSA、AR 表达, 提示紫龙金可能通过下调 AR 途径导致 PSA 转录合成降低, 发挥治疗前列腺癌的作用。

诱导凋亡是治疗肿瘤的重要途径之一, bcl-2 家族中的 bcl-2 和 bax 是调控凋亡的重要基因, 绝大多数细胞中 bcl-2 都可以抑制细胞凋亡, 而 bax 可以促进凋亡^[9]。有研究发现, 正常的前列腺上皮细胞在发展为雄激素依赖性和非依赖性癌的过程中 bcl-2 表达逐渐升高^[10]。LNCaP 细胞中 bcl-2 过表达会促使其向雄激素非依赖型转化, 并增加其恶性度^[11]。相反, 应用反义寡核苷酸封闭 bcl-2 基因, 使 bcl-2 表达下调可以促进 LNCaP 细胞凋亡, 并且可以抵消雄激素的保护作用^[12]。本研究发现紫龙金可以通过下调细胞凋亡抑制基因 bcl-2 以及降低其蛋白表达途径促进 LNCaP 凋亡发挥治疗作用。

参 考 文 献

- 1 Rosenbaum E, Carducci MA. Pharmacotherapy of hormone refractory prostate cancer: new developments and challenges. Expert Opin Pharmacother 2003; 4(6): 875—887.
- 2 Da La Taille A, Buttyan R, Hayek O, et al. Herbal therapy PC-SPES: In vitro effects and evaluation of its efficacy in 69 patients with prostate cancer. J Urol 2000; 164: 1229—1234.
- 3 章新奇, 刘淑俊, 梁云燕, 等. 白龙片配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤的临床研究. 中国中西医结合杂志 1998; 18(1): 24—25.
Zhang XQ, Liu SJ, Liang YY, et al. Clinical study on treatment of middle and advanced stage cancers by Bailong tablet combined with chemotherapy. Chin J Integr Tradit West Med 1998; 18(1): 24—25.
- 4 谷善青, 梁云燕, 王代树, 等. 复方白龙片对人胃癌细胞两条

信号通路的调控. 中国中西医结合杂志 1997; 17(7): 404—406.

- Gu SQ, Liang YY, Wang DS, et al. Regulation of compound Bailong tablet on cAMP-PKA and DAG-PKC signal pathways of human gastric cancer cells. Chin J Integr Tradit West Med 1997; 17(7): 404—406.
- 5 李宝元, 梁云燕, 王代树, 等. 中药白龙与环六亚甲基二乙酰胺对人胃癌不同周期细胞生长与表型调节的共性研究. 中国中西医结合杂志 2001; 21(5): 354—358.
Li BY, Liang YY, Wang DS, et al. Regulative effect of Bailong and hexamethylene bisacetamide on growth and phenotype of human gastric cancer cells in cell cycle. Chin J Integr Tradit West Med 2001; 21(5): 354—358.
- 6 王代树, 施学东, 梁云燕, 等. 中药白龙与 HMBA 对人癌周期 CKI-p16 的调控. 中国中西医结合杂志 2001; 21(10): 763—766.
Wang DS, Shi XD, Liang YY, et al. Regulation of Chinese medicine Bailong and hexamethylene bisacetamide on cyclin dependent kinase inhibitor p16 genes in human cancer cell. Chin J Integr Tradit West Med 2001; 21(10): 763—766.
- 7 师长进, 俞莉章, 那彦群, 等. 中药紫龙金对转移性前列腺癌体外增殖及侵袭能力的影响. 中华外科杂志 2003; 41(6): 473.
Shi CJ, Yu LZ, Na YQ, et al. In vitro anti-proliferation and anti-invasion effects of Chinese herbal medicine Zilongjin on metastatic prostate cancer. Chin J Surg 2003; 41(6): 473.
- 8 Leutjens KB, Eekelen CC, Korput HA. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. J Biol Chem 1996; 271: 6379—6388.
- 9 Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular apoptosis: a discourse on the bcl-2 family and cell death. Blood 1996; 88: 386—401.
- 10 Furuya Y, Krajewski S, Epstein JI, et al. Expression of bcl-2 and progression of human and rodent prostatic cancers. Clin Cancer Res 1996; 2: 389—398.
- 11 Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, et al. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. Cancer Res 1995; 55: 4438—4445.
- 12 Berchem GJ, Bosseler M, Sugars LY, et al. Androgens induce resistance to bcl-2-mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells. Cancer Res 1995; 55: 735—738.

(收稿 2003-09-16 修回 2004-03-10)