

# 环靶明对前列腺癌 PC3 细胞株生长的影响及其作用机制研究\*

冷俊, 周晔, 施利琴, 张莉

(上海交通大学医学院附属新华医院崇明分院检验科, 上海 202150)

**摘要:**目的 观察环靶明(Cyclopamine)对体外培养的人前列腺癌 PC3 细胞株增生、细胞周期及凋亡率的影响,并初步探讨其可能的作用机制。方法 不同浓度环靶明处理体外培养的前列腺癌 PC3 细胞后,用 MTT 法检测药物处理 24、48 和 72 h 后的细胞增殖活性;流式细胞仪检测药物处理 72 h 后的细胞周期分布和细胞凋亡率;Real-time RT-PCR 法检测用药后细胞 Gli1, Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达变化。结果 经 5、10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  的环靶明处理后,PC3 细胞的生长抑制率明显升高,且与药物浓度高低和作用时间长短呈一定正相关关系;环靶明作用于 PC3 细胞 72 h 后,15  $\mu\text{mol/L}$  环靶明组 G0/G1 期细胞数量增加,S 期、G2/M 细胞数量下降;5、10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  环靶明组的细胞凋亡率分别为  $7.54\% \pm 1.19\%$ 、 $12.47\% \pm 2.11\%$  和  $24.15\% \pm 3.40\%$ ,与对照组相比,差异具有统计学意义( $t=5.414, 7.159, 10.413$ , 均  $P<0.05$ )。明还可在转录水平下调 Bcl-2 mRNA 和上调 Bax mRNA 的表达,促进细胞凋亡。结论 环靶明可抑制 PC3 细胞生长,其作用机制可能与阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡有关。

**关键词:**环靶明;前列腺癌;PC3 细胞;凋亡

中图分类号:R737.25;R730.43 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)02-100-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.02.026

## Study on the Effect and Mechanism of Cyclopamine on Proliferation of PC3 Prostate Cancer Cell Line

LENG Jun, ZHOU Ye, SHI Li-qin, ZHANG Li

(Department of Clinical Laboratory, Chongming Branch of Xinhua Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 202150, China)

**Abstract:** Objective To observe the effects of Cyclopamine on the proliferation, cell cycle and apoptotic rate of PC3 cells cultured in vitro, and to explore its possible mechanism. **Methods** PC3 cells were treated with different concentrations of Cyclopamine. The proliferation activity of PC3 cells was measured by MTT method after 24, 48 and 72 hours of drug treatment. Cell cycle distribution and apoptotic rate were measured by flow cytometry after 72 hours of drug treatment. The expression of Gli1, Bax and Bcl-2 was detected by Real-time RT-PCR. **Results** The growth inhibition rate of PC3 cells treated with 5, 10 and 15  $\mu\text{mol/L}$  cyclopamine was significantly increased, which was positively correlated with drug concentration and duration of action. After 72 hours' cyclopamine treatment, the number of G0/G1 phase cells increased and the number of G2/M phase cells decreased in 15  $\mu\text{mol/L}$  cyclopamine group. The apoptotic rates of 5, 10 and 15  $\mu\text{mol/L}$  cyclopamine group were  $7.54\% \pm 1.19\%$ ,  $12.47\% \pm 2.11\%$  and  $24.15\% \pm 3.40\%$  respectively, which were significantly different from the control group ( $t=5.414, 7.159, 10.413$ , all  $P<0.05$ ). Cyclopamine could also down-regulate Bcl-2 and up-regulate Bax mRNA at transcriptional level, and promote cell apoptosis. **Conclusion** Cyclopamine could inhibit the growth of PC3 cells, and its mechanism may be related to blocking cell cycle and inducing apoptosis.

**Keywords:** cyclopamine; prostate cancer; PC3 cells; apoptosis

近年来,由于人均寿命的增加及诊疗水平的提高,前列腺癌发病率呈显著增长趋势。我国前列腺癌患者在初诊后多采用雄激素阻断为主的综合治疗,但是这类患者经过一定时间后,许多病例仍将进展为雄激素非依赖性的前列腺癌,生存期明显缩短,目前缺乏有效的干预手段<sup>[1]</sup>。鉴于前列腺癌对老年男性健康已造成了重大威胁,因此当前对前列腺癌研究的一个重要方面在于进一步阐明雄激素

非依赖性前列腺癌的发病机制以及寻找更加有效的治疗药物。

环靶明(cyclopamine)是一种来源于藜芦属植物的甾体生物碱,有文献<sup>[2]</sup>报道环靶明可通过抑制 Hedgehog 信号通路来抑制癌细胞的增殖、侵袭和转移。本研究采用环靶明干预体外培养的雄激素非依赖性 PC3 细胞株,观察其对 PC3 细胞生长的影响并探讨其可能的作用机制。

\* 基金项目:上海市崇明区科学技术发展资金项目(项目编号:CKY2014-10)。

作者简介:冷俊(1985—),男,硕士,主管技师,主要从事肿瘤的临床检测和相关基础研究,E-mail:colddog19852000@126.com。

通讯作者:张莉,女,本科,主任技师,主要从事临床免疫检测 and 实验室管理方面的工作,E-mail:cmjyk5590@126.com。

## 1 材料与方法

1.1 材料 人前列腺癌 PC3 细胞株购自中国科学院细胞库;环靶明购自美国 Biomol International 公司;碘化丙啶(PI)、Annexin V 凋亡试剂盒,胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司;总 RNA 抽提试剂 TRIzol 为 Invitrogen 产品;荧光定量 PCR 试剂盒购自大连宝生物公司;F12 培养基为 Gibco 产品;PCR platinum Mix 购自 Tiangen 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养:将 PC3 细胞培养于 F12 培养基,内含 10 ml/dl 的胎牛血清,青、链霉素 100 U/ml,置于 37℃,5 ml/dl CO<sub>2</sub>,100% 饱和湿度的孵箱内培养。视细胞生长情况换液、传代。

1.2.2 MTT 比色法:取对数生长期的 PC3 细胞接种于 96 孔培养板中,每孔约含  $2 \times 10^4$  个细胞,放入培养箱,待细胞贴壁后,分 5 组进行实验:终浓度为 1,5,10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  的环靶明组和只加 F12 培养液的空白组,每组设 3 个复孔。继续培养,在 24,48 和 72 h 各时间点分别取一板进行测定。空白孔调零,490 nm 波长测定各孔吸光度 A 值。环靶明对细胞增殖活性的影响用抑制率表示(抑制率 =  $1 - \text{细胞存活率}$ ,细胞存活率 = 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)。

1.2.3 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期:取对数生长期的 PC3 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/ml 的密度接种于 6 孔培养板内,加药处理,方法同上,环靶明的最终浓度为 1,5,10 和 15  $\mu\text{mol/L}$ ,空白组不加任何药物;将培养板放入 CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养,于 72 h 后回收细胞。以胰酶消化法收集并 4℃ 离心 (1 000 r/min  $\times$  5 min) 细胞, PBS 清洗 3 次, 70 ml/dl 冰乙醇固定,用 RNase A (终浓度为 0.1 g/L) 消化 30 min,加入 0.05 g/L 碘化丙啶(PI) 250  $\mu\text{l}$ ,室温避光染色 30 min 后上机检测。

1.2.4 流式细胞仪(FCM)测定细胞凋亡率:按检测细胞周期方法加药处理细胞 72 h 后,用不含 EDTA 的胰酶进行消化(防止出现假阳性),收集细胞,用预冷的 PBS 洗两遍。加入 500  $\mu\text{l}$  Binding Buffer 重悬细胞,加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{l}$  PI,轻轻混匀,室温避光反应 15 min,在 1 h 内上机检测。

1.2.5 Real-time PCR 检测 Gli1, Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达水平:实验组分别加入终浓度为 1,5,10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  的环靶明混合培养液,对照组加入等量 F12 培养液,于 72 h 后收集细胞。用 TRIzol 试剂抽提细胞总 RNA,按 TaKaRa 公司的 SYBR Prime Script RT-PCR Kit 说明书进行逆转录和实时荧光 PCR。采用 20  $\mu\text{l}$  反应体系,应用

Light Cycler (Roche Diagnostics 公司)进行荧光定量分析。以 GAPDH 为内参,上游引物:5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3',下游引物:5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3',扩增长度为 123bp; Gli1 上游引物:5'-AGCTAGAGTCCAGAGGTTCAA-3',下游引物:5'-TAGACAGAGGTTGGGAGGTAAG-3',扩增长度为 102bp; Bax 上游引物:5'-GTTTCATCCAGGATCGAGC-3',下游引物:5'-GATCATCCTCTGCAGCT CC-3',扩增长度为 138bp; Bcl-2 上游引物:5'-TGTGTG-GAGAGCGTCAACAG-3',下游引物:5'-TCCA-CAAAGCGTCCCAGC-3',扩增长度为 237bp,以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  值分析结果。

1.3 统计学分析 应用 spss17.0 软件对实验数据进行分析。实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间差异采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 环靶明对 PC3 细胞增殖的影响 见图 1。MTT 结果显示:在 1  $\mu\text{mol/L}$  的环靶明组中,PC3 细胞的增殖未受到明显抑制,而经 5,10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  的环靶明处理后,PC3 细胞的生长抑制率明显升高,且与药物浓度高低和作用时间长短呈一定正相关关系。

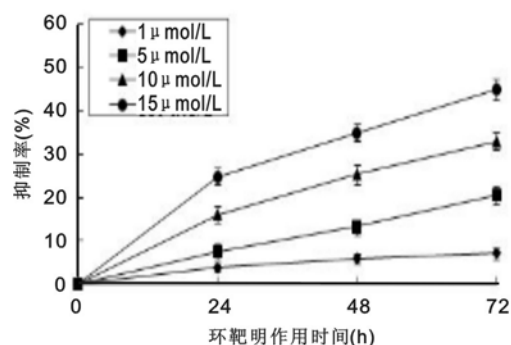


图1 PC3 细胞在经环靶明作用不同时间后的细胞生长抑制率

2.2 环靶明对 PC3 细胞周期的影响 见表 1。流式细胞仪分析显示,PC3 细胞经药物处理后,1,5  $\mu\text{mol/L}$  环靶明组的各期细胞数量无明显变化,而 10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  环靶明组 G0/G1 期细胞数量逐渐增加,S 期、G2/M 细胞数量下降。

2.3 环靶明对 PC3 细胞凋亡率的影响 环靶明作用于 PC3 细胞 72 h 后,对照组,1,5,10 和 15  $\mu\text{mol/L}$  组的凋亡率分别为  $3.55\% \pm 0.46\%$ ,  $4.97\% \pm 1.27\%$ ,  $7.54\% \pm 1.19\%$ ,  $12.47\% \pm 2.11\%$ ,  $24.15\% \pm 3.40\%$ 。除 1  $\mu\text{mol/L}$  组以外( $t = 1.820$ ,  $P = 0.143$ ),其余各组与对照组相比,差异均有统计学意义( $t = 5.414, 7.159, 10.413$ ;  $P =$

0.018, 0.002, 0.000), 且随着浓度的升高, 凋亡率显著增加。

表1 PC3细胞在经环靶明作用72 h后细胞周期的变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

环靶明浓度	G0/G1	G0/G1 vs 对照组		S	S vs 对照组		G2/M	G2/M vs 对照组	
		<i>t</i>	<i>P</i>		<i>t</i>	<i>P</i>		<i>t</i>	<i>P</i>
对照组	48.86±2.72			36.59±3.58			14.55±2.84		
1 μmol/L	49.43±2.92	0.248	0.817	36.63±1.13	0.020	0.985	13.94±1.94	0.309	0.773
5 μmol/L	51.93±3.87	1.124	0.324	34.71±2.09	0.784	0.477	13.36±1.85	0.607	0.577
10 μmol/L	55.75±1.16	4.037	0.016	33.02±2.44	1.426	0.227	11.23±1.61	1.764	0.152
15 μmol/L	63.43±2.76	6.520	0.003	28.43±1.95	3.462	0.026	8.13±1.03	3.688	0.021

2.4 环靶明对细胞中 Gli1, Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达影响 经环靶明作用 72 h 后, Gli1 的 mRNA 表达水平有下降趋势, 但与对照组相比, 仅 15 μmol/L 组的差异有统计学意义 ( $F=1.932$ ); 除 1 μmol/L 组以外, 其他药物浓度干预组 Bax 的

mRNA 表达水平均显著增加 ( $F=133.750$ ), Bcl-2 的 mRNA 表达水平显著下降 ( $F=13.518$ ), 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 且有一定的剂量效应关系。

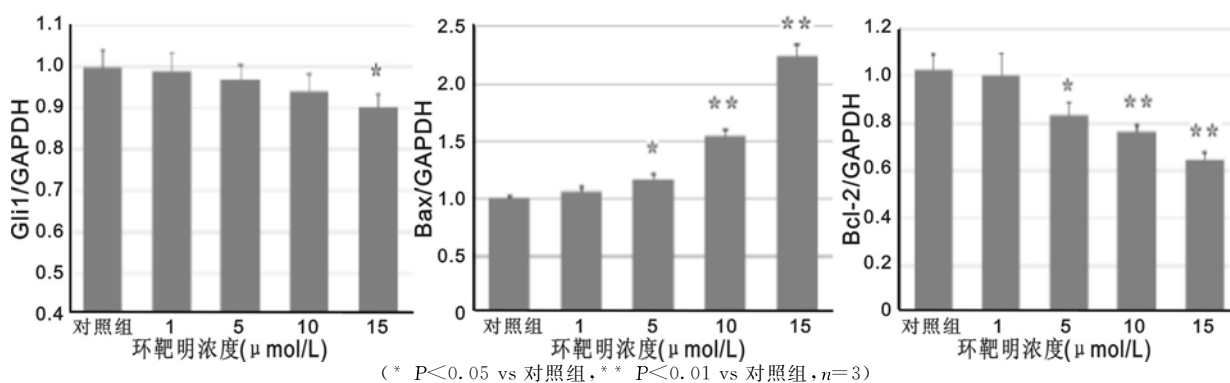


图2 PC3细胞在经环靶明作用72 h后细胞中 Gli1, Bax 和 Bcl-2 的 mRNA 表达水平变化

3 讨论 近年来 Hedgehog 信号通路在前列腺癌发生发展中的作用受到越来越多的重视。正常情况下, 在胚胎发育成熟后, Hedgehog 信号通路便进入了失活状态。在某些因素的作用下, Hedgehog 信号通路被异常激活, 可引起 C-myc, VEGF 等下游靶基因的表达, 导致细胞增殖过度, 诱发肿瘤<sup>[3]</sup>。文献报道 Hedgehog 信号通路的异常活化可诱发多种内胚层肿瘤, 如: 非小细胞肺癌、食道癌、胃癌、结肠癌等<sup>[4-6]</sup>。同样作为内胚层起源的前列腺癌中亦存在相似的变化<sup>[7]</sup>。

由于前列腺癌中存在 Hedgehog 信号通路的异常激活, 那么环靶明作为 Hedgehog 信号通路拮抗剂有可能会成为治疗前列腺癌的有效药物。本研究用 MTT 法证实, 经 5, 10 和 15 μmol/L 的环靶明处理后, 可有效抑制体外培养的 PC3 细胞生长增殖活性, 且抑制率与药物浓度和作用时间呈正相关关系, 与熊永江等<sup>[8]</sup>人的报道一致。

本研究还用流式细胞术检测环靶明对 PC3 细胞周期和凋亡率的影响, 低浓度的环靶明 (1, 5 μmol/L) 作用 72 h 对 PC3 的细胞周期影响不明

显, 自 10 μmol/L 起, 环靶明可将 PC3 细胞阻滞于 G1 期, G0/G1 期细胞数量逐渐增加, S 期、G2/M 细胞数量逐渐下降。陈新宇等<sup>[9]</sup>人报道 8 μmol/L 环靶明作用 48h 对 PC3 细胞周期分布影响较弱, 两者间的差异可能与药物浓度高低和作用时间长短有关系。5, 10, 15 μmol/L 环靶明作用 PC3 细胞 72 h 后, 细胞的凋亡率明显增加, 说明环靶明可诱导其凋亡, 且随着药物浓度增大, 细胞凋亡率升高, 有一定的浓度依赖关系。文献报道<sup>[10]</sup>, 环靶明处理前列腺癌 DU145 细胞后凋亡率亦明显升高, 升高程度与药物浓度呈正相关, 与本研究结果类似。

本研究进一步检测了 Hedgehog 通路下游转录因子 Gli1 和凋亡相关基因 Bax, Bcl-2 的 mRNA 表达水平。Bax 和 Bcl-2 是线粒体凋亡途径中重要的调控蛋白, Bax 可诱导细胞凋亡, 而 Bcl-2 则抑制细胞凋亡, 两者的平衡在决定细胞是否发生凋亡中起重要作用<sup>[11]</sup>。在许多肿瘤中存在 Bcl-2 表达升高, 而 Bax 表达下降<sup>[12-13]</sup>。本研究发现, 经 5, 10 和 15 μmol/L 环靶明处理 72 h 后, PC3 细胞中 Bax

的 mRNA 表达水平显著上升,而 Bcl-2 的 mRNA 表达水平则显著下降,两者的平衡被打破,对细胞凋亡的发生有促进作用。Gill 的 mRNA 表达水平有下降趋势,但与对照组相比,仅 15  $\mu\text{mol/L}$  组的差异有统计学意义,推测在环靶明抑制 PC3 细胞株生长的过程中,Hedgehog 信号通路的下调可能并非占主导作用。

综上所述,本研究证明环靶明对前列腺癌 PC3 细胞株的增殖有明显抑制作用,其作用机制可能与影响细胞周期、提高 Bax 和下调 Bcl-2 基因表达水平、进而诱导细胞凋亡有关,为寻找非雄激素依赖性前列腺癌的治疗药物提供了一定的实验依据。

#### 参考文献:

- [1] 宋振国,赵鹏程,王卫国,等. 去甲斑蝥素联合紫杉醇对激素抵抗性前列腺癌患者的临床疗效研究[J]. 癌症进展,2018,16(6):719-721,796.  
SONG Zhenguo, ZHAO Pengcheng, WANG Weiguo, et al. Clinical efficacy of norcantharidin combined with paclitaxel in patients with hormone refractory prostate cancer[J]. Oncology Progress, 2018, 16(6): 719-721, 796.
- [2] 刘曼,程玉,田焕娜,等. Hh 信号通路特异性抑制剂环靶明对胃癌细胞侵袭转移的影响及其机制探讨[J]. 山东医药,2018,58(2):17-20.  
LIU Man, CHENG Yu, TIAN Huanna, et al. Effects of cyclopamine on invasion and migration of gastric cancer cells[J]. Shandong Medical Journal, 2018, 58(02): 17-20.
- [3] 李博飞,戴正宽,陈斌,等. Hedgehog 信号通路于肝癌的发生发展[J]. 世界最新医学信息文摘(电子版),2017,17(68):80-82.  
LI Bofei, DAI Zhengkuan, CHEN Bin, et al. Advances on hedgehog signaling pathway in the development and progression of hepatocellular carcinoma [J]. World Latest Medicine Information (Electronic Version), 2017, 17(68): 80-82.
- [4] LEE J J, PERERA R M, WANG Huaijun, et al. Stromal response to hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(30): E3091-E3100.
- [5] 崔宏伟,师迎旭,张满,等. Hedgehog 信号通路分子在食道鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 中国医学创新,2015,12(31):1-3.  
CUI Hongwei, SHI Yingxu, ZHANG Man, et al. Expression of hedgehog signaling molecules and their clinical significance in esophageal squamous cell carcinomas [J]. Medical Innovation of China, 2015, 12(31): 1-3.
- [6] JIANG W G, YE Lin, RUGE F, et al. Expression of sonic hedgehog (SHH) in human lung cancer and the impact of Yangzheng Xiaoji on SHH-mediated biological function of lung cancer cells and tumor growth [J]. Anticancer Research, 2015, 35(3): 1321-1331.
- [7] 申利贤,周斌,李海艳,等. 前列腺癌发生发展相关信号转导通路的研究进展[J]. 肿瘤药学,2016,6(2):96-102.  
SHEN Lixian, ZHOU Bin, LI Haiyan, et al. Advances in the signal transduction pathway related to the development of prostate cancer [J]. Anti-tumor Pharmacy, 2016, 6(2): 96-102.
- [8] 熊永江,刘纯青,戴志红,等. 三氧化二砷联合环靶明协同抑制 PC3 细胞生长及其机制的实验研究[J]. 现代泌尿外科杂志,2015,20(8):584-587.  
XIONG Yongjiang, LIU Chunqing, DAI Zhihong, et al. An experimental study on synergism between arsenic trioxide and cyclopamine in the inhibition of PC3 cell survival and its Mechanisms [J]. Journal of Modern Urology, 2015, 20(8): 584-587.
- [9] 陈新宇,熊永江,张翊,等. 三氧化二砷联合 Cyclopamine 对 PC3 细胞细胞周期影响及其机制的实验研究[J]. 四川医学,2016,37(1):35-38.  
CHEN Xinyu, XIONG Yongjiang, ZHANG Xuan, et al. An experimental study on the effects of arsenic trioxide combined with cyclopamine on cell cycle of PC3 cells and its mechanisms [J]. Sichuan Medical Journal, 2016, 37(1): 35-38.
- [10] 彭庆. 抑制 Hedgehog 信号通路对前列腺癌 DU145 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 解剖学研究,2017,39(2):129-132.  
PENG Qing. Effects of cyclopamine on proliferation and apoptosis of prostate cancer DU145 cell [J]. Anatomy Research, 2017, 39(2): 129-132.
- [11] 王丽平,付蕾,叶淑柯,等. 叶黄素对人前列腺癌 PC3 细胞增殖和凋亡影响的机制 [J]. 肿瘤防治研究,2018,45(5):274-279.  
WANG Liping, FU Lei, YE Shuke, et al. Effect of lutein on proliferation and apoptosis of human prostate cancer PC3 cell line and related mechanism [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2018, 45(5): 274-279.
- [12] 柴春艳,王甜,刘娅萍,等. WWOX 蛋白及 Bcl-2 蛋白在支气管肺癌中的表达及临床意义 [J]. 现代检验医学杂志,2017,32(1):61-65.  
CHAI Chunyan, WANG Tian, LIU Yaping, et al. Expression and clinical significance of WWOX protein and Bcl-2 protein in primary lung cancer [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 61-65.
- [13] EBRAHIM A S, SABBAGH H, LIDDANE A, et al. Hematologic malignancies: newer strategies to counter the BCL-2 protein [J]. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2016, 142(9): 2013-2022.

收稿日期:2019-02-03

修回日期:2019-02-21