

杠柳毒昔通过诱导细胞自噬抑制前列腺癌细胞增殖

王建良¹, 付生军², 李兰兰^{2*}, 李喜香^{1*}

¹甘肃省中医院药学部, 兰州 730035; ²兰州大学第二医院 甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室, 兰州 730030

摘要:检测杠柳毒昔(periplocin, PP)对前列腺癌细胞(prostate cancer, PCa)增殖的抑制作用并探讨其分子机制。体外培养前列腺癌 DU145 和 PC3 细胞, CCK8 实验、克隆形成、3D 基质胶侵袭实验检测杠柳毒昔对前列腺癌细胞增殖、克隆形成、迁移侵袭等作用; 流式细胞术、Hoechst 33258 染色、Western blot 实验确定杠柳毒昔诱导前列腺癌细胞凋亡、诱导凋亡小体形成及细胞凋亡相关蛋白表达水平; RNA-Seq 转录组测序检测杠柳毒昔对前列腺癌细胞基因表达谱影响; DCFH-DA 荧光探针检测杠柳毒昔对细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平影响; Western blot、EGFP-LC3B 融合蛋白表达细胞检测杠柳毒昔对细胞自噬相关蛋白表达及对细胞自噬体形成的影响; 构建裸鼠荷瘤模型检测杠柳毒昔对前列腺癌细胞体内生长抑制作用。研究表明, 杠柳毒昔可浓度依赖性抑制前列腺癌细胞增殖、克隆形成能力及迁移侵袭能力; 诱导细胞凋亡小体产生及凋亡相关蛋白表达; 改变前列腺癌细胞基因表达谱; 浓度依赖性提高前列腺癌细胞内 ROS 水平, 上调自噬标志蛋白 LC3B 和 Beclin-1 表达, 下调自噬降解标志蛋白 p62 表达; 抑制前列腺癌细胞在裸鼠体内生长。本研究发现 PP 可抑制 PCa 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 其分子机制可能为 PP 诱导前列腺癌细胞自噬最终导致细胞死亡。

关键词:前列腺癌; 杠柳毒昔; 细胞凋亡; RNA-Seq; 细胞自噬

中图分类号: R93; R73

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)7-1130-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.7.004

Periplocin inhibits proliferation of prostate cancer cells by inducing autophagy

WANG Jian-liang¹, FU Sheng-jun², LI Lan-lan^{2*}, LI Xi-xiang^{1*}

¹Department of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730035, China;

²Key Laboratory of Urological Disease in Gansu Province, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, China

Abstract: This study investigated the effect of periplocin (PP) on prostate cancer (PCa) cells and explored the molecular mechanisms. CCK8 assay, colony formation and 3D matrix gel invasion assay were applied on *in vitro* cultured DU145 and PC3 cells to evaluate the effect of PP on cell growth, colony formation, migration and invasion of PCa cells; Flow cytometry, Hoechst 33258 staining and Western blot were used to measure the ability of PP induced cell apoptosis, apoptotic body formation and apoptotic proteins expression; RNA-Seq was carried out to figure out the PP-induced transcriptome expression regulation in PCa cells; DCFH-DA fluorescent probe was used to detect the effect of PP on intracellular reactive oxygen species (ROS) level; Western blot and cells expressing EGFP-LC3B fusion protein were used to detect the effect of PP on autophagy related proteins expression and autophagosome formation; A nude mouse tumor bearing model was established to detect the inhibitory effect of PP on the *in vivo* growth of PCa cells. The results showed that PP could inhibit the proliferation, colony formation, migration and invasion of PCa cells in a concentration dependent manner; PP could induce apoptosis, apoptotic body formation and apoptosis-related protein expression in PCa cells. The results of RNA-Seq indicated that PP treatment could alter gene expression profile of PCa cells, and the differential expression genes were mainly enriched in autophagy related signaling pathways. PP could increase the cellular ROS of PCa cells in a concentration dependent manner, up-regulate the expression of autophagy marker proteins LC3B and Beclin-1, and down-regulate the expression of autophagy degradation marker protein p62. PP could inhibit the growth of prostate cancer cells *in vivo*. This study suggests that PP inhibited the proliferation of

收稿日期: 2023-11-21 接受日期: 2024-05-11

基金项目: 甘肃省中医药管理局科研课题(GZKP-2020-29); 甘肃省科技计划自然科学基金(22JR5RA973); 甘肃省科技计划自然科学基金(21JR11RA110); 2021年度省级重点人才项目(2021-17)

*通信作者 Tel: 86-931-5190918; E-mail: lili12@lzu.edu.cn, lixixiang929@163.com

PCa cells and induced apoptosis. The molecular mechanism may be that PP induced PCa cells autophagy and eventually led to cell death.

Key words: prostate cancer; periplodin; apoptosis; RNA-Seq; autophagy

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是男性第二大常见癌症和第五大癌症死因^[1], 随着我国人口老龄化加剧以及饮食结构的改变, PCa 在我国的发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[2], 已成为威胁国民健康的重要因素。目前, PCa 多采用雄激素剥夺治疗 (androgen deprivation therapy, ADT), 包括恩杂鲁胺、阿比特龙等抗雄药物抑制雄激素受体 (androgen receptor, AR) 蛋白的转录调节活性以及近年开发的 ARV-110 等 AR 信号通路抑制药物等^[3]。虽然 ADT 方案对 PCa 有较好的疗效, 但几乎所有患者都不可避免地出现 ADT 的耐受, 最终进展为去势抵抗性前列腺癌 (castration resistant prostate cancer, CRPC)^[4]。而 CRPC 则是 PCa 的主要致死原因。中药在不仅可单独用于前列腺癌治疗, 而且能够在治疗的同时增强和恢复机体免疫功能。因此, 中药成分及制剂在前列腺癌的治疗中发挥了重要作用, 深入了解 PCa 发病机制, 寻找中医药治疗药物具有重大意义。

杠柳毒苷 (periplodin, PP) 是从萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* Bunge 的干燥根皮中分离提取的主要单体化合物^[5], 为一种具有甾核和不饱和五元内酯环结构的甲型强心苷, 是治疗慢性充血性心力衰竭和心脏性浮肿的有效成分之一^[6]。既往研究表明, PP 具有多种药理活性, 包括强心利尿、抗炎、抗肿瘤^[7-9]等。针对吉西他滨耐药胰腺癌细胞的研究显示, PP 可通过调节 Nrf2 介导的信号通路恢复耐药细胞对吉西他滨的敏感性进而可能成为一种新的抗吉西他滨耐药药物^[10], 另研究表明 PP 通过 AMPK/mTOR 信号通路引起细胞凋亡发挥抗胰腺肿瘤活性^[11]。PP 靶向 ERK/p38/JNK 信号通路, 通过 Trail 介导通路激活细胞凋亡诱导人黏液纤维肉瘤细胞周期阻滞^[12]。以上研究显示杠柳毒苷是很有潜力的抗肿瘤化合物。尽管已有诸多 PP 针对多种癌细胞的抗肿瘤活性文献, 然而 PP 抑制前列腺癌细胞的作用研究极少。

近年, 转录组学测序 (RNA-seq) 技术取得了快速发展, 已成为探究基因表达、研究 RNA 生物发生、代谢等领域不可或缺的方法^[13], 并广泛应用于了解生物体在不同环境或条件下如何调节基因表达变

化。本研究采用多种生物实验方法联合转录组学测序对 PP 抑制 PCa 细胞可能的作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞系

人源前列腺细胞 RWPE-1 和前列腺癌细胞系 DU145 和 PC3 为甘肃省泌尿系统疾病研究重点实验室所保留细胞株, 传代次数不超过 10 代, 细胞用含 10% 胎牛血清的 RMPI-1640 培养基培养, 待细胞生长至对数期进行实验。

1.2 仪器

3111 二氧化碳培养箱 (赛默飞); 多功能连续光谱 (赛默飞); CYTOFLEX 型细胞分析与检测系统 (中国贝克曼库尔特国际贸易有限公司); Gene-GoomeHR 型化学发光凝胶成像系统 (英国 Syngene 公司); NanoDrop 2000 分光光度计 (赛默飞); 倒置荧光显微镜 (奥林巴斯)。

1.3 药物与试剂

杠柳毒苷、嘌呤霉素 (批号: 131114、158056, 上海陶术生物科技有限公司, 纯度 > 98%); 胎牛血清、RMPI-1640 培养基、胰蛋白酶、青链霉素 (批号: 2582168P、8121665、25200056、03702J21, Gibco 公司); CCK8 溶液、FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒、DCFH-DA 活性氧检测试剂盒 (批号: 101835113EF5E、082222221123、111922230307, 碧云天)。

Western blot 所用抗体: Bcl-2 (批号: 9, Cell Signal Technology); PARP (批号: 4, Cell Signal Technology 公司); Caspase 9 (批号: 10003480, Proteintech 公司); P62、LC3B、Beclin-1 (批号: 400000018、3522120103、3522122864, Abclonal Technology); β -actin (批号: 854306, ZSGB-BIO 公司); pCDH-EGFP-LC3B 质粒 (货号: P23666, 武汉森灵生物科技有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 CCK8 实验

分别将正常前列腺细胞 RWPE-1 细胞和前列腺癌 DU145、PC3 细胞接种在 96 孔板中生长过夜, 细胞贴壁后加入不同浓度的 PP (0、0.312 5、0.625、1.25、2.5、5 μ mol/L), 每个药物浓度组设置 6 个复

孔,分别培养 24 h 和 48 h,每孔加入 8 μL CCK8 检测溶液,培养箱中孵育 2 h,酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值。计算 PP 处理后对 DU145 和 PC3 细胞活力的影响。

1.4.2 3D 基质胶迁移侵袭实验

5×10^4 个 DU145 或 PC3 细胞重悬于 10 μL 基质胶中,用移液枪缓缓滴入 24 孔板中定形成基质胶球,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 20 min 待基质胶凝固,再分别加入培养基或不同浓度 PP 溶液,之后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱连续培养,第 3 d 进行换液。在第 6 d 对细胞进行显微拍照,并评估细胞从基质胶球迁移的区域。

1.4.3 平板克隆形成实验

取对数生长期的 DU145 或 PC3 细胞胰酶消化后,完全培养基重悬成细胞悬液,并计数,于 6 孔培养板各实验组接种 800 个细胞/孔,连续培养 10 d,中途每隔 3 d 换新鲜培养液。之后用 4% 多聚甲醛固定 20 min,结晶紫染色 15 min,并拍照。

1.4.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期的 DU145 和 PC3 细胞以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,培养过夜贴壁,加入终浓度为 0、0.25、0.5 $\mu\text{mol/L}$ PP 处理 24 h 后,消化收集细胞,参照 FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒说明进行处理,染色后上机进行检测。

1.4.5 Western blot 检测相关蛋白表达

对数生长期的 DU145 和 PC3 细胞接种于 10 cm 培养皿中,培养贴壁后加入终浓度为 0、0.25、0.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 PP 处理 24 h。收集细胞,RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 法对蛋白定量。之后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入相应的一抗(内参 β -actin 以 1:2 500 稀释,其余一抗以 1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入相应的二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。通过化学发光显色,并进行分析。

1.4.6 RNA-Seq 检测 PP 处理对细胞中基因表达谱影响

使用 Trizol 试剂提取 0.25 $\mu\text{mol/L}$ PP 处理 24 h 的 DU145 和 PC3 细胞中总 RNA(以不加药物组作为对照组,每组三个生物学重复),采用 NanoDrop 2000 检测 RNA 浓度和纯度。使用 Illumina 试剂盒建库,随后用 RNase H 降解 RNA 链,以 dNTPs 为原料合成 cDNA 第 2 条链,并对 cDNA 进行纯化和扩增后获得文库。RT-qPCR 技术对文库有效浓度进

行准确定量(文库有效浓度高于 2 nmol/L),以保证文库质量。库检合格后,对不同文库进行 Illumina 测序(苏州安升达有限公司)。从基因组网站下载参考基因组和基因模型注释文件构建参考基因组的索引,并将配对末端 clean reads 与参照基因组比对,对 3 个复样本之间的基因表达水平采用皮尔逊相关性检验进行分析。

1.4.7 生物信息学分析

PP 处理组与对照组之间差异表达基因(differential expression genes, DEGs)通过 DESeq2 软件分析完成,以 $|\log_2\text{FC}| > 1, P < 0.05$ 为标准筛选差异表达基因。其中 $\log_2\text{FC} > 1$ 的基因被定义为上调基因, $\log_2\text{FC} < -1$ 的基因被定义为下调基因。通过 clusterProfiler(3.4.4)软件进行 DEGs 的基因本体论(Gene Ontology, GO)分析,校正后 $P < 0.05$ 的 GO term 显著富集。GO 数据库包括生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular components, CC)3 部分。同样使用 clusterProfiler(3.4.4)软件分析 DEGs 富集到的京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路, $P < 0.05$ 定义为显著富集。

1.4.8 细胞内活性氧检测

应用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。首先用指定浓度 PP 刺激六孔板中 DU145 或 PC3 细胞 24 h 后,移除细胞培养液,加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 无血清培养基稀释的荧光探针,室温避光孵育 30 min,吸弃探针溶液,无血清培养基洗涤细胞三次,1 500 r/min, 5 min。之后使用流式细胞仪上机检测细胞中 ROS 水平。

1.4.9 慢病毒包装及稳转株筛选

采用三质粒系统在 HEK293T 细胞中转染进行慢病毒包装,并于转染 48 h 后收集病毒上清。使用构建有 pCDH-EGFP-LC3B 的病毒感染 DU145 细胞,之后使用 8 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素对细胞进行筛选,稳定筛选 15 d 后荧光显微镜下观察绿色荧光水平,确定细胞中能稳定表达 EGFP-LC3B 融合蛋白即进行后续实验。

1.4.10 细胞自噬体形成观察

将稳定表达 EGFP-LC3B 融合蛋白的 DU145 细胞接种于 12 孔板中,待细胞过夜贴壁后用 0.25 $\mu\text{mol/L}$ PP 刺激细胞 12 h 后,在荧光显微镜下观察 EGFP-LC3B 绿色斑点形成,以评估细胞自噬水平。

1.4.11 动物实验

动物实验所用裸鼠(BALB/c-Nude)从成都药康生物科技有限公司购买(动物检疫合格证号:3203570780),饲养于兰州大学第二医院实验动物中心 SPF 动物房(实验动物使用许可证:SYXK(甘)2023-0003)。6 周龄雄鼠 8 只,随机分为对照组和药物处理组,每组 4 只。皮下移植瘤模型建模方法:将 2×10^6 个 DU145 细胞接种于小鼠右侧腋下,约 10 d 能摸到肿瘤之后,对照组注射生理盐水(50 μL),实验组注射 5 mg/kg PP 溶液(50 μL),每天腹腔注射一次,连续注射 1 周后使用戊巴比妥钠腹腔过量麻醉处死小鼠,取出肿瘤观察每组肿瘤大小及体积。动物实验已获得兰大二院动物伦理委员会批准(D2023-405)。

1.4.12 统计学分析

计量结果采用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析并作图展

示。多组间数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PP 抑制 DU145 和 PC3 细胞的增殖

CCK8 活力检测结果显示不同浓度 PP 处理正常前列腺 RWPE-1 细胞和前列腺癌 DU145、PC3 细胞 24 h 和 48 h 后,PP 在低浓度即可抑制 DU145 和 PC3 细胞活力,而 PP 只有在较高浓度(5 $\mu\text{mol/L}$)时才对正常前列腺细胞 RWPE-1 的细胞活力具有显著抑制作用(见图 1A)。浓度为 0、0.25、0.5 $\mu\text{mol/L}$ PP 处理 RWPE-1、DU145 和 PC3 细胞 24 h 后,显微镜下观察发现 PP 对两种癌细胞具有明显杀伤作用,细胞数量减少,细胞形态改变明显,出现皱缩变圆,甚至有些细胞出现崩解,而正常细胞则无明显变化(见图 1B)。以上结果说明 PP 可以有效抑制 PCa 细胞增殖。

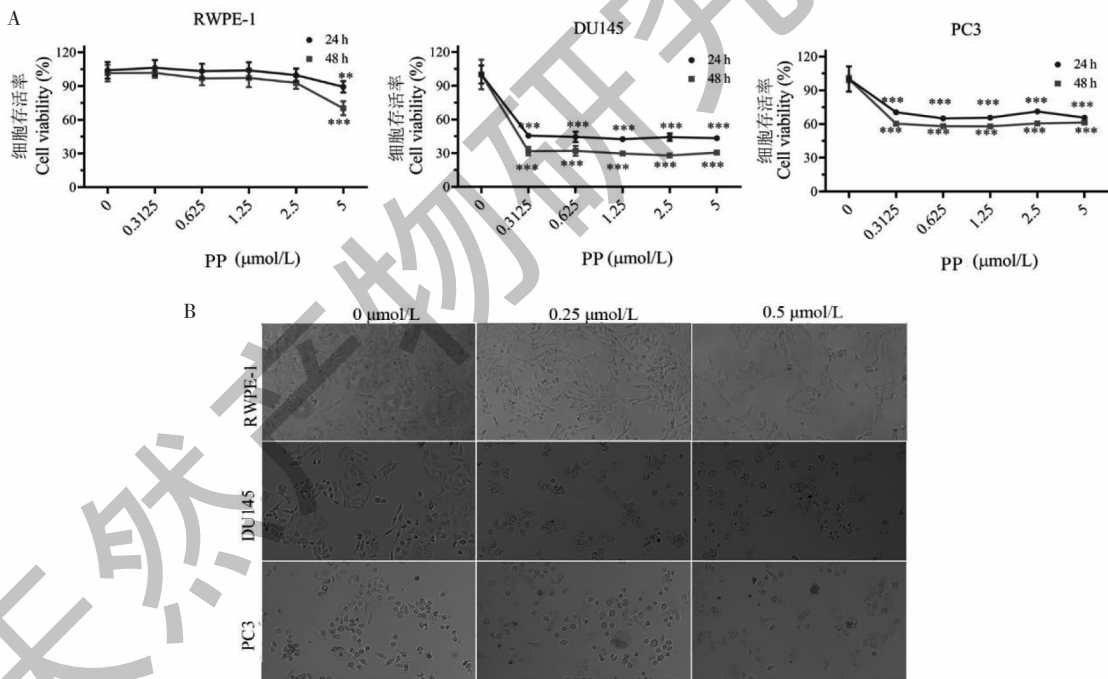


图1 PP对正常前列腺和前列腺癌细胞增殖的作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig.1 Effects of PP on normal prostate and prostate cancer cells proliferation($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 下同。Note: Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, the same below.

2.2 PP 抑制 DU145 和 PC3 细胞的迁移侵袭和克隆形成

3D 基质胶侵袭实验被用来探究 PP 对 PCa 细胞迁移侵袭能力的影响,结果显示,低浓度 0.25

$\mu\text{mol/L}$ PP 即可显著抑制 PCa 细胞的迁移侵袭能力,并且这种抑制作用呈现浓度依赖性。此外,平板克隆形成实验也发现 PP 可以抑制前列腺癌 DU145 和 PC3 细胞的克隆形成能力(见图 2)。

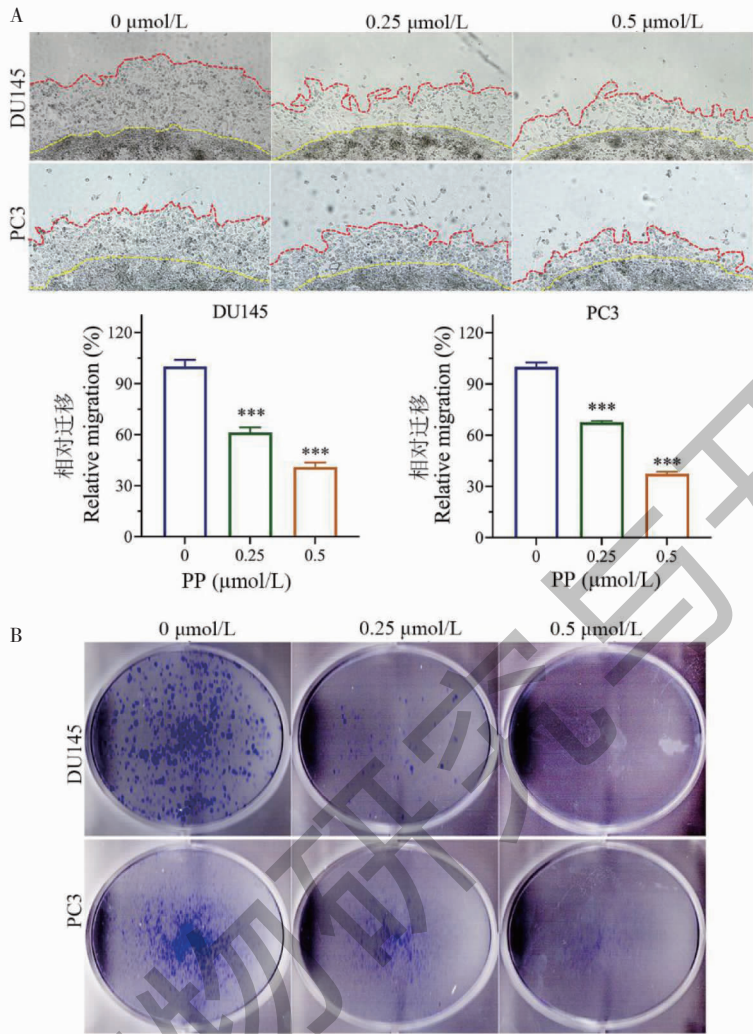


图2 PP抑制PCa细胞迁移侵袭和细胞克隆形成($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 PP suppresses cell migration, invasion and colony formation of PCa cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 PP诱导DU145和PC3细胞凋亡

采用流式细胞仪检测PP处理后PCa细胞凋亡水平,不同浓度PP处理DU145和PC3细胞24 h后,细胞凋亡率均升高,且具有统计学差异($P < 0.05$)。相比之下,PP在PC3细胞中具有更强的诱导细胞凋亡能力,在0.25 μmol/L时凋亡细胞比例显著增高。使用Hoechst 33258染料对PP处理后细胞进行凋亡小体染色,0.5 μmol/L PP刺激DU145和PC3细胞24 h后,细胞核形态发生改变,核皱缩,凝结,碎裂等,与光学显微镜下细胞形态改变相一致(见图3)。采用Western blot检测了DU145和PC3细胞中凋亡相关蛋白的表达变化,可见,0.25 μmol/L PP即可引起DU145细胞中抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平降低。同时剪切的PARP和Caspase-9蛋白表达水平也随着PP浓度增加而升高(见图

4)。以上结果说明PP可诱导PCa细胞DU145和PC3细胞凋亡。

2.4 RNA-Seq分析PP对PCa基因组表达的作用

PP刺激后PCa细胞转录组测序火山图显示,PP处理DU145和PC3细胞后均检测到差异基因改变,其中DU145细胞中检测到4 553个上调基因,5 059个下调基因,PC3细胞中检测到3 793个上调基因,3 063个下调基因(见图5A、5B)。DU145和PC3细胞中差异表达基因的热图分析发现PP处理后两种细胞株的差异表达基因具有相似的表达模式,推测该差异基因具有相似的功能,共同参与同一代谢过程或同一代谢通路(见图5C、5D)。进一步对两种细胞中共同上调和下调基因取交集,发现两种细胞中共同上调的基因有139个,共同下调的基因有1 326个(见图5E、5F)。

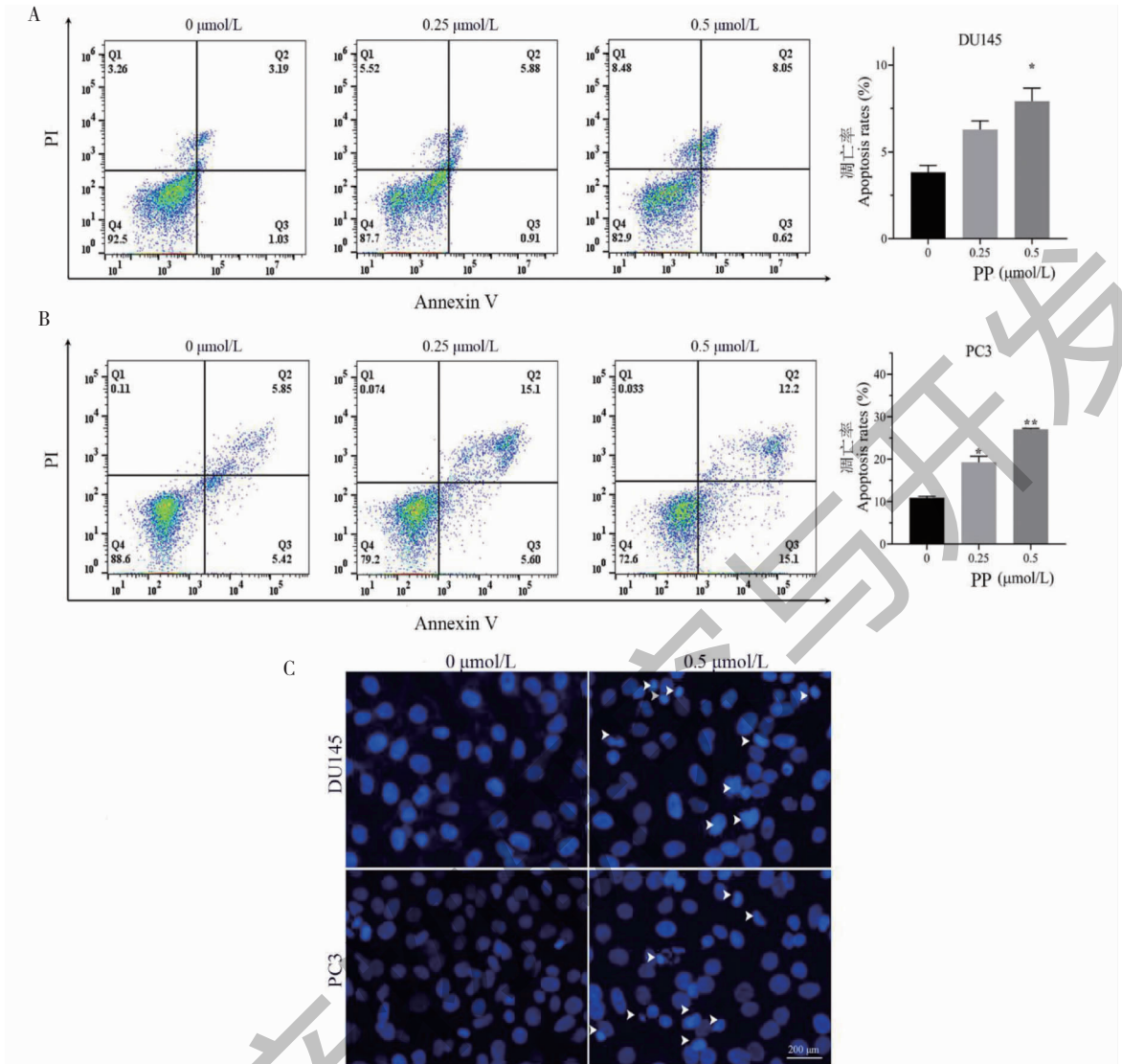
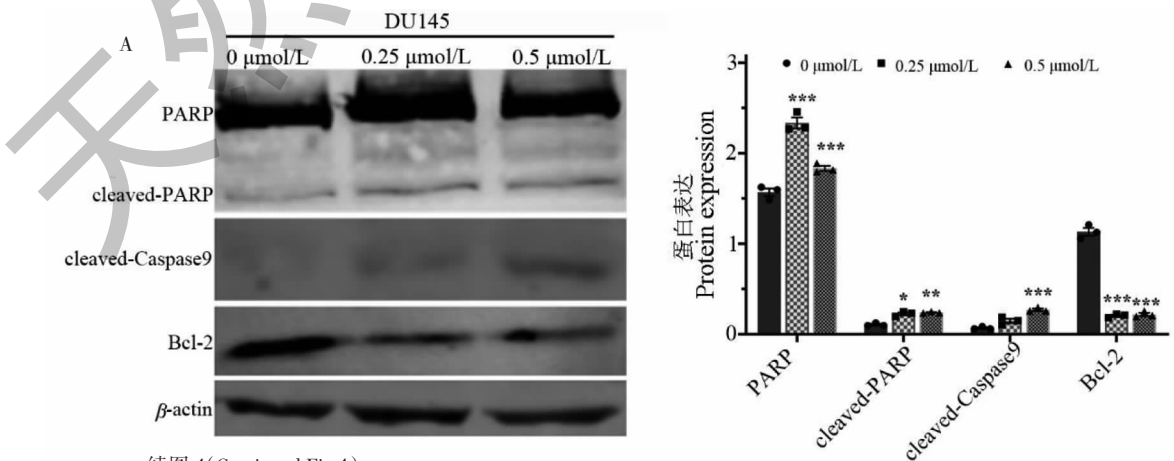


图3 杠柳毒苷诱导前列腺癌细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 PP induces apoptosis in prostate cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



续图4 (Continued Fig.4)

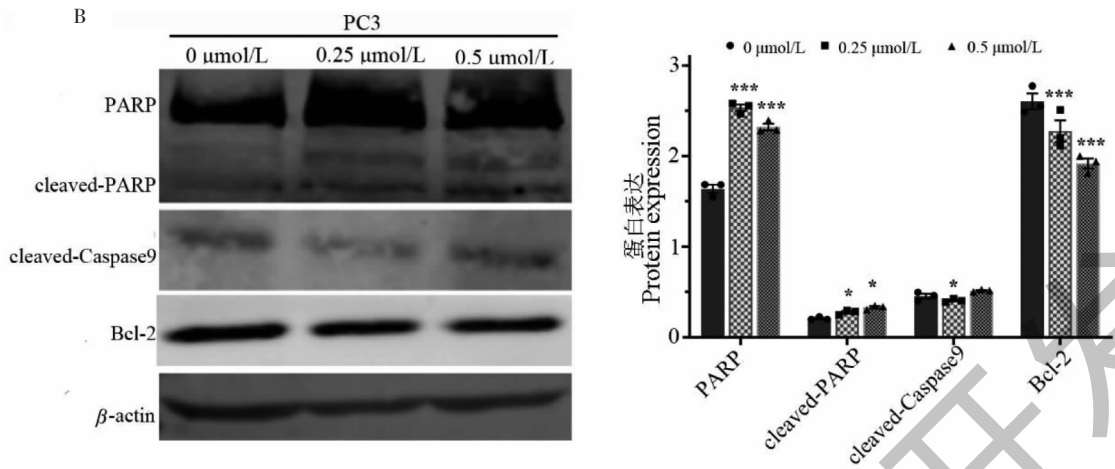
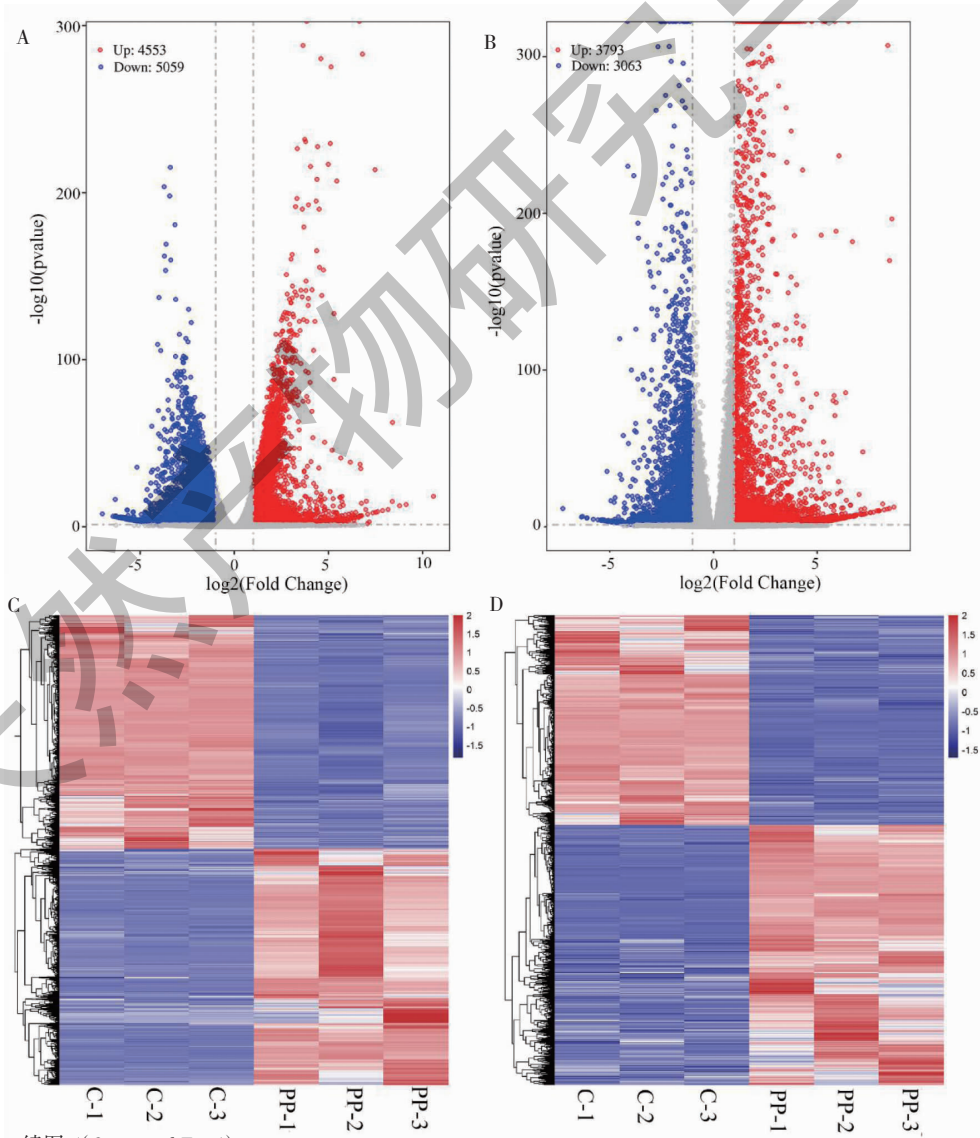


图4 Western blot 检测 PP 诱导后 PCa 细胞中凋亡相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Expression levels of apoptosis-related proteins in PCa cells after PP treatment ($\bar{x} \pm s, n=3$)



续图 5 (Continued Fig.5)

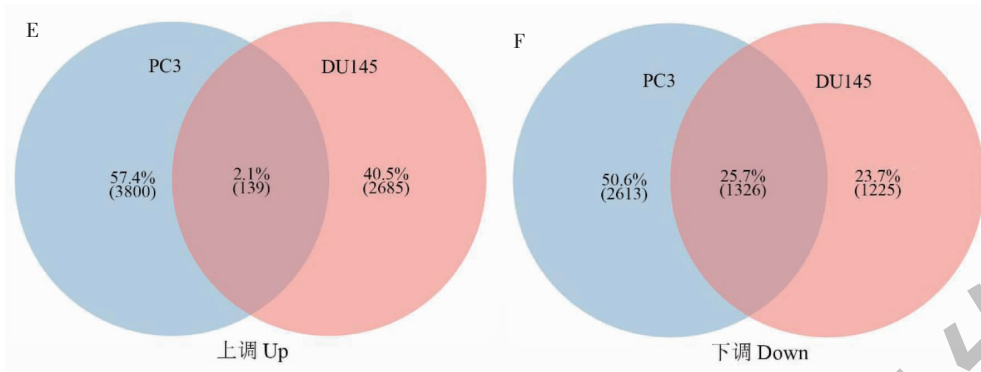


图5 PP刺激后PCa细胞基因表达变化RNA-Seq结果

Fig. 5 RNA-Seq results of PCa cells after treatment with PP

2.5 差异表达基因的KEGG信号通路富集分析

KEGG信号通路富集结果显示,在所富集到的信号通路中,差异基因显著富集在动物细胞自噬、线粒体自噬、cAMP信号通路、AMPK信号通路、mTOR信号通路、溶酶体信号通路等。而这些信号通路最

终都与细胞自噬信号通路密不可分,分别是自噬通路上游调节信号通路或者自噬通路的下游信号,如溶酶体信号通路。KEGG富集结果提示PP刺激PCa细胞之后,细胞的自噬信号通路发生显著改变(见图6)。

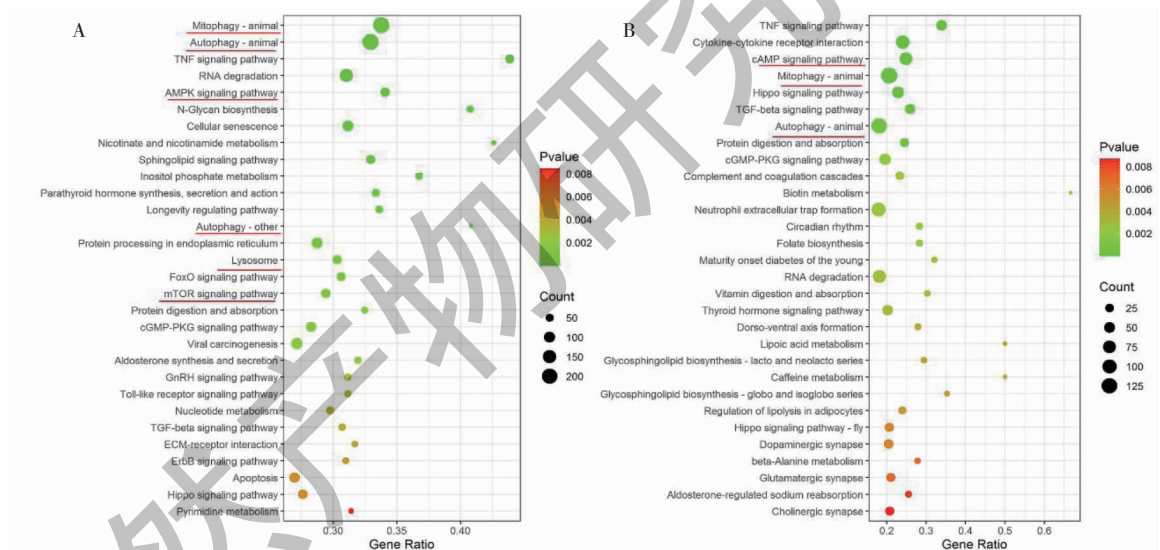


图6 PP刺激DU145(A)和PC3(B)细胞后差异表达基因的KEGG信号通路富集结果

Fig. 6 Enrichment of KEGG signaling pathways of differentially expressed genes after PP treatment in PCa DU145 (A) and PC3 (B) cells

注:图中红色直线指示细胞自噬相关信号通路。Note: The red lines in the figure indicate autophagy related signaling pathways.

2.6 PP对PCa细胞中自噬相关基因表达的影响

PP刺激DU145和PC3细胞后,自噬标记物LC3(MAP1LC3B)和P62(SQSTM1)均升高,提示细胞自噬水平改变。而对自噬起始具有抑制作用的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)表达水平降低,参与自噬成核、自噬泡延伸过程的ATG12和ATG101的表达升高。综合以上,可推测PP刺激PCa细胞后,引起细胞自噬水

平改变。参与自噬降解的酸性组织蛋白酶C(cathepsin C, CTSC)、酸性组织蛋白酶D(cathepsin D, CTSD)等表达均升高,提示细胞的降解水平有提高。此外,CTSD在不同的生理和病理条件下还具有促凋亡和促增殖的双重功能,也可能是CTSD表达升高的原因之一。同时抗凋亡基因BCL2A1表达水平降低,这一结果与图4中Western blot结果一致(见图7)。

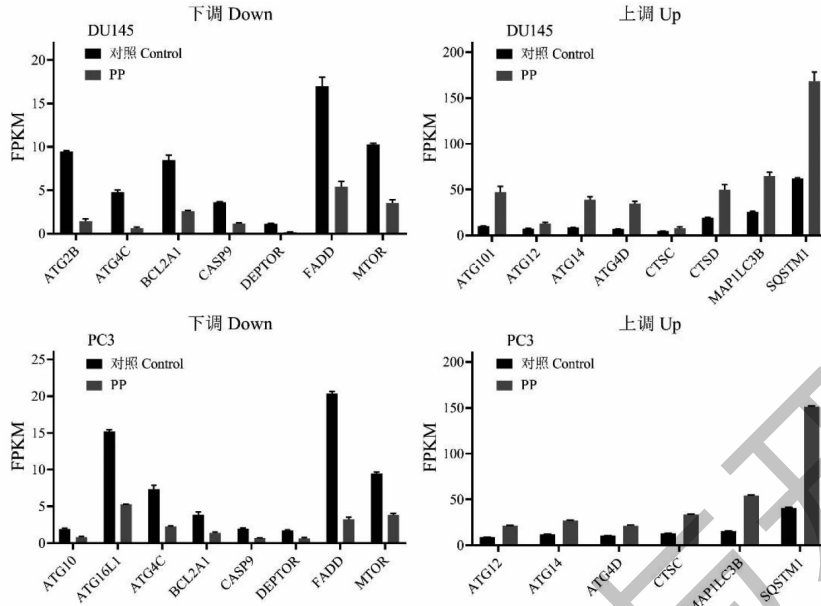


图7 PP刺激PCa细胞后自噬相关基因的表达变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Expression of autophagy related genes in PCa cells stimulated by PP($\bar{x} \pm s, n=3$)

注: FPKM 为每千个碱基的转录每百万映射读取的片段。Note: FPKM is fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments.

2.7 PP诱导前列腺癌细胞自噬

采用DCFH-DA荧光探针检测不同浓度PP处理前列腺癌细胞后细胞内ROS水平,结果显示PP处理后前列腺癌DU145和PC3细胞中ROS显著升高,提示细胞处于氧化应激状态(见图8)。Western blot检测结果显示细胞自噬标志蛋白LC3和Beclin-1在PP处理后表达上调,而参与自噬降解的标志蛋

白p62在PP处理后表达下调,提示PP可能通过诱导前列腺癌细胞过度自噬最终导致细胞死亡(见图9A、9B)。PP刺激稳定表达EGFP-LC3B融合蛋白的DU145细胞12h后,荧光显微镜观察EGFP-LC3B自噬体形成,结果显示0.25 $\mu\text{mol/L}$ PP处理12h后细胞中EGFP-LC3B绿色荧光斑点显著增加,提示细胞形成大量自噬小体(见图9C)。

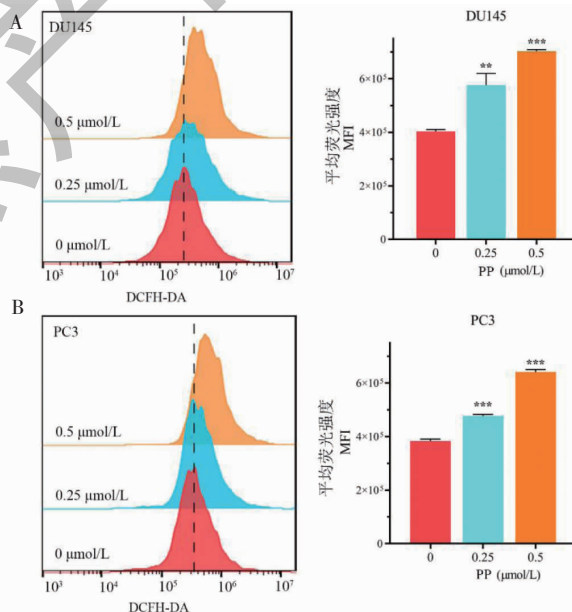


图8 PP可诱导前列腺癌细胞ROS升高

Fig. 8 PP induces ROS increase in prostate cancer cells

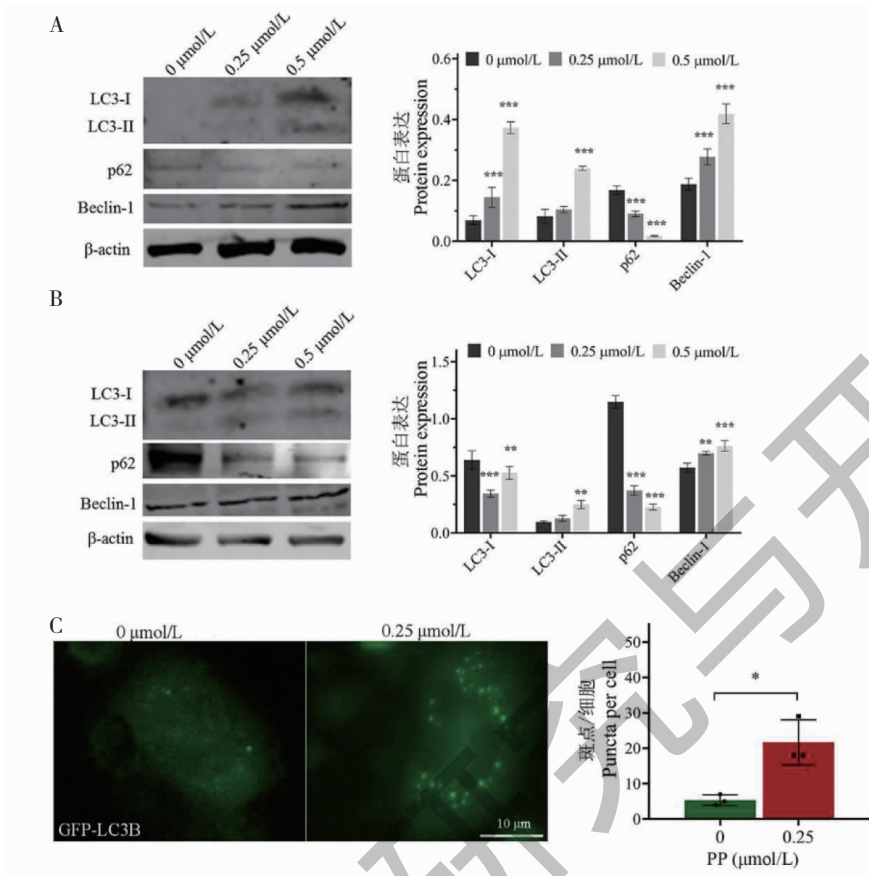


图9 PP处理后前列腺癌细胞中自噬相关蛋白表达和自噬小体形成($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Autophagy-related proteins expression and autophagosomes formation in PP-treated Pca cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.8 PP在体内抑制DU145细胞增殖

与对照组小鼠相比,实验组小鼠在注射PP(5 mg/kg)后肿瘤体积明显缩小,肿瘤生长明显受到抑

制。通过对肿瘤分离,称重分析发现,与对照组相比,PP处理后肿瘤重量明显减小(见图10)。

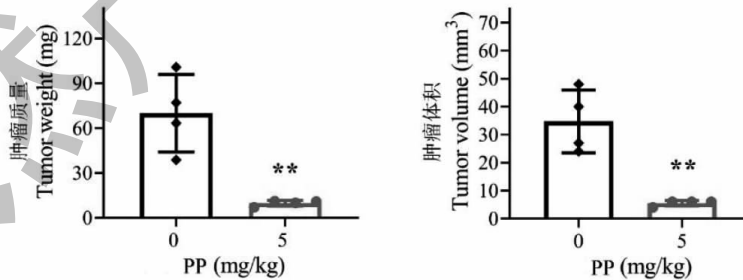


图10 PP抑制前列腺癌DU145细胞移植瘤生长($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 10 PP inhibits the growth of DU145 cell *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=4$)

3 讨论与结论

近年来,天然活性产物抗肿瘤研究受到广泛重视,我国拥有丰富的药用植物资源,因此抗癌产物的开发潜力巨大。杠柳毒苷是天然单体成分,可作为一种安全、廉价和容易获得的新型治疗药物来

源^[14,15]。杠柳毒苷是从香加皮中分离出来的一种强心剂类固醇,具有包括强心、抗炎、伤口愈合活性和抗癌等多种生物学效应^[16]。关于PP抗肿瘤作用已在多种癌症模型中得到证实。本研究中,我们采用体内外生物实验联合RNA-Seq方法探究杠柳毒

苷对前列腺癌 DU145 和 PC3 细胞增殖的影响,并探讨其抗肿瘤作用的可能机制。

本研究采用体外生物实验联合 RNA-Seq 方法探究 PP 对前列腺癌 DU145 和 PC3 细胞增殖的影响。CCK8 结果显示,随着 PP 浓度升高,前列腺癌 DU145 和 PC3 细胞活力呈剂量依赖性降低,说明 PP 可以抑制 PCa 细胞增殖。肿瘤恶性程度与肿瘤细胞迁移侵袭能力显著相关,通过抑制肿瘤细胞迁移侵袭也是中药活性成分抗肿瘤的作用之一。采用 3D 基质胶侵袭实验、划痕实验及孔板克隆形成实验证实 PP 也可浓度依赖性地抑制 PCa 细胞迁移侵袭和克隆形成能力。

细胞凋亡被认为是防止肿瘤出现的重要机制,而肿瘤细胞的特征之一是抑制凋亡^[17]。本研究中,Annexin V/PI 双染料检测结果显示 PP 可以诱导前列腺癌 DU145 和 PC3 细胞凋亡。同时 Western blot 结果显示,PP 处理之后可以下调前列腺癌 DU145 和 PC3 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,同时上调 cleaved PARP 的表达,而 PARP 的切割是凋亡发生的重要指标^[18],以上结果均表明 PP 可以诱导 PCa 细胞凋亡。为进一步揭示 PP 在 PCa 中的作用机制,对 PP 处理后的 PCa 细胞进行转录学检测,并对差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析。PP 处理 PCa 细胞之后,自噬信号通路的一些关键基因显著差异表达,参与自噬起始、成核和延伸的基因 ATG12、ATG5、ATG14 等表达显著上调,对自噬过程起负向调节作用的 mTOR 表达下调,说明 PP 处理可诱导细胞自噬。通过检测细胞内总 ROS 水平、自噬相关蛋白表达水平及荧光显微镜观察细胞自噬小体形成进一步证实 PP 刺激前列腺癌细胞后引起细胞自噬,而过度自噬可最终会导致细胞死亡。

此前,有研究显示杠柳毒苷等强心苷类具有一定肾毒性和心脏毒性,在一定程度限制了杠柳毒苷的研究进展。近年来,诸多研究报道杠柳毒苷具有强效抗肿瘤作用,动物实验显示杠柳毒苷在不引起明显体内毒性的低浓度下具有强效抗胰腺癌作用^[10]。针对多发性骨髓瘤研究显示杠柳毒苷通过下调细胞黏附分子表达在一定程度逆转多发性骨髓瘤细胞对硼替佐米的耐药,而对小鼠内脏无明显毒副作用^[19]。杠柳毒苷可引起 LGALS3 介导的溶酶体自噬而抑制结肠癌进展。同时,给裸鼠连续两周腹腔注射 15 mg/kg/day 杠柳毒苷,通过对小鼠体重、小鼠主要脏器病理特征、血液生化指标等检测发

现均无明显毒副作用^[20]。以上研究表明,杠柳毒苷可在不引起无明显毒副作用的浓度下发挥体内体外抗肿瘤作用。

综上,本研究通过流式细胞检测、Hoechst 染色、Western blot 等不同实验方法证实 PP 可抑制 PCa 细胞增殖、迁移、侵袭、克隆形成能力及诱导 PCa 细胞凋亡。转录组学结果证明 PP 作用于 PCa 细胞可引起细胞基因差异表达,这些差异表达基因大部分富集在与细胞自噬相关的 cAMP、AMPK、线粒体自噬等信号通路,ROS 水平及自噬标志物蛋白表达水平以及 LC3B 绿色荧光斑点形成进一步证实 PP 处理诱导细胞自噬。因此,PP 通过诱导细胞自噬水平变化而对 PCa 细胞具有杀伤作用。动物实验验证 PP 可明显抑制肿瘤的生长。本实验丰富了 PP 抗肿瘤的研究,探讨了杠柳毒苷抑制 PCa 细胞增殖的作用机制,为进一步研究提供了参考。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71:209-249.
- 2 Sun DQ, He L, Cao MM, et al. Cancer burden in China: trends, risk factors and prevention[J]. Cancer Biol Med, 2020, 17:879-895.
- 3 Jia XJ, Han X. Targeting androgen receptor degradation with PROTACs from bench to bedside[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 158:114112.
- 4 Armstrong AJ, Lin P, Tombal B, et al. Five-year survival prediction and safety outcomes with enzalutamide in men with chemotherapy-naïve metastatic castration-resistant prostate cancer from the PREVAIL trial[J]. Eur Urol, 2020, 78:347-357.
- 5 Lv AQ, Huang YJ, Huang XN, et al. The effects of glycoside on the proliferation, apoptosis and migration of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43:197-201.
- 6 Chen HH, Wang XM, Pan GX, et al. Detection of the human plasma protein binding rate of periplocin, periplocyarin and periplongenin[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报), 2017, 19:32-35.
- 7 Zhang WJ, Song ZB, Bao YL, et al. Periplongenin induces necroptotic cell death through oxidative stress in HaCaT cells and ameliorates skin lesions in the TPA- and IMQ-induced psoriasis-like mouse models[J]. Biochem Pharmacol, 2016,

- 105:66-79.
- 8 Lei L, Zhao LM, Dai SL, et al. Periplocin extracted from Cortex Periplocae induced apoptosis of gastric cancer cells via the ERK1/2-EGR1 pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38:1939-1951.
 - 9 Deng YR. Comparison of the effect of cardiac glycosides in periplocae cortex on isolated heart in rats [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2011, 29:2633-2635.
 - 10 Bae ES, Byun WS, Ock CW, et al. Periplocin exerts antitumor activity by regulating Nrf2-mediated signaling pathway in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells [J]. Biomed Pharmacother, 2023, 157:114039.
 - 11 Xie GY, Sun LX, Li YL, et al. Periplocin inhibits the growth of pancreatic cancer by inducing apoptosis via AMPK-mTOR signaling [J]. Cancer Med, 2021, 10:325-336.
 - 12 Lohberger B, Bernhart E, Stuedl N, et al. Periplocin mediates TRAIL-induced apoptosis and cell cycle arrest in human myxofibrosarcoma cells via the ERK/p38/JNK pathway [J]. Phytomedicine, 2020, 76:153262.
 - 13 Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2017, 8: 10.1002/wrna.1364.
 - 14 Gupta M, Chandan K, Sarwa M. Natural products and their derivatives as immune check point inhibitors: targeting cytokine/chemokine signalling in cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 86:214-232.
 - 15 Fang JK, Silva M, Lin RH, et al. Artemisinin reverses glucocorticoid-induced injury in bone marrow-derived mesenchymal stem cells through regulation of ERK1/2-CREB signaling pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 5574932.
 - 16 Yang L, Jin L, K Zhou, et al. A review on phytochemistry and pharmacology of Cortex Periplocae [J]. Molecules, 2016, 21: 1702.
 - 17 Li LL, Fu SJ, Wang JL, et al. SRT1720 inhibits bladder cancer cell progression by impairing autophagic flux [J]. Biochem Pharmacol, 2024, 222:116111.
 - 18 Wang L, Lu CB. Molecular mechanism of sophoridine in the treatment of prostate cancer based on cell experiments *in vitro* and network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2024, 36:528-539.
 - 19 Aziz A, Wang H, Wang Y, et al. Periplocin overcomes bortezomib resistance by suppressing the growth and down-regulation of cell adhesion molecules in multiple myeloma [J]. Cancers, 2023, 15:1526.
 - 20 Wang K, Fu SY, Dong LX, et al. Periplocin suppresses the growth of colorectal cancer cells by triggering LGALS3 (galactin 3)-mediated lysophagy [J]. Autophagy, 2023, 19: 3132-3150.
-
- (上接第 1256 页)
- 13 Yu AX, Ma JM, Cheng J, et al. Analysis of the chemical components in *Citrus reticulata* Blanco pulp based on HPLC-DAD-ESI-MS/MS combined with molecular network technology [J]. Mod Food Sci Technol(现代食品科技), 2023, 39: 272-287.
 - 14 Guo YX, Zhang SH, Wang AQ, et al. Pharmacodynamic substances and therapeutic potential of Wuji Pills: based on UPLC-Q-TOF/MS and network pharmacology [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47:6720-6729.
 - 15 Chen Y, Yan JL, Liu J, et al. Serum pharmacochimistry of Loki zupa compound [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2022, 20:772-778.
 - 16 Yang TM, Liu YC, Liang L, et al. UPLC-QTOF-MS-based study of the differences in chemical composition of normal and Huanglongbing navel oranges [J]. Nanchang Univ Med Sci(南昌大学学报:理科版), 2022, 46:454-463.
 - 17 Yan Y, Li XH, Wang X, et al. Analysis of main chemical components of Ciwujia injection based on UPLC-MS and study on its anti-depression effect [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2022, 45:1332-1342.
 - 18 Ju BW, Yang JH, Hu JP. Effects of *Cistanche deserticola* phenylethanoid on the expression of β -amyloid protein in the hippocampus of APP/PS1 transgenic mice [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:1155-1162.
 - 19 Li B, Duan XF, Wang XL. Impacts of verbascoside on bone erosion and JNK/ERK pathway in rheumatoid arthritis mice [J]. Curr Immu(现代免疫学), 2023, 43:514-521.
 - 20 Li F, Cheng Y, Li Y, et al. Geniposide alleviates diabetic nephropathy of mice through AMPK/SIRT1/NF- κ B pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 886:173449.
 - 21 Kim Y, Song SH, Seong EY, et al. Akt1 is involved in renal fibrosis and tubular apoptosis in a murine model of acute kidney injury-to-chronic kidney disease transition [J]. Exp Cell Res, 2023, 424:113509.
 - 22 Xu Z, Jia K, Wang H, et al. METTL14-regulated PI3K/Akt signaling pathway via PTEN affects HDAC5-mediated epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells in diabetic kidney disease [J]. Cell Death Dis, 2021, 12:32.