

白茅根中芦竹素激活多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶诱导人前列腺癌细胞凋亡

陈大可

温州市人民医院 泌尿外科, 浙江 温州 325000

摘要: **目的** 研究白茅根 *Imperatae Rhizoma* 中的三萜类化合物芦竹素对人前列腺癌 PC3 细胞的作用, 为三萜类化合物在抗肿瘤方面的应用提供新的依据。 **方法** 芦竹素从白茅根中提取分离得到。用不同浓度 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 的芦竹素处理 PC3 细胞, 采用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞增殖率; 通过流式细胞术 Annexin V/PI 双染色检测细胞凋亡和细胞周期分布情况; Western blotting 法检测多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 (PARP) 及与细胞凋亡相关的其他蛋白表达量的变化。 **结果** 芦竹素能够剂量和时间依赖性地抑制 PC3 细胞的增殖, 并可诱导 PC3 细胞凋亡。浓度为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的芦竹素作用 PC3 细胞 24 h 后, 细胞凋亡率显著增加至 13.7%、37.2%、61.6%, 明显高于对照组凋亡率 (3.5%); 经过 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 芦竹素分别处理 24 h 后, PC3 细胞中凋亡蛋白标志物 PARP 裂解量升高, 且呈剂量依赖性。 **结论** 芦竹素能抑制 PC3 细胞的增殖并诱导其凋亡, 推测其作用机制与激活 PARP 有关。

关键词: 白茅根; 芦竹素; 三萜; 前列腺癌; 凋亡; 多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)06-1183-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.06.021

Apoptotic effect of arundoin on human prostatic cancer cells by activating Poly ADP ribose polymerase

CHEN Da-ke

Urinary Surgery Department, Wenzhou Municipal People's Hospital, Wenzhou 325000, China

Abstract: **Objective** To study the potential apoptotic effect of arundoin on human prostatic cancer cells. **Methods** Arundoin was isolated and purified from the crude ethanol extract of *Imperatae Rhizoma*. Human prostatic cancer cell line PC3 was treated with arundoin. The relative cell viabilities were determined by MTT assay; Apoptosis was analyzed by Annexin V/PI dual staining with flow cytometry; The protein expression levels of Poly ADP ribose polymerase (PARP) and other apoptotic related proteins were detected by Western blotting. **Results** Arundoin (20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$) reduced the viability of PC3 cells dose- and time-dependently. Moreover, arundoin induced apoptosis in PC3 cells. Western blotting analysis showed that arundoin up-regulated the expression level of PARP in a dose-dependent manner. In addition, apoptosis related proteins such as Bax, Bcl-2, and casapases were all affected by arundoin. **Conclusion** Arundoin could induce apoptosis in human prostatic cancer cells, which provides novel information for clinical application of arundoin and its preparations for the prostatic cancer patients.

Key words: *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb.; arundoin; triterpenoid; prostate cancer; apoptosis; Poly ADP ribose polymerase

前列腺癌是男性泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一, 临床发病率较高^[1]。近年来前列腺癌呈发病率上升和发病年轻化的趋势。前列腺癌治疗的传统模式为外科手术加术后局部或全身的放疗, 并具有一定的疗效。由于化学药品具有毒性大、容易耐药等缺陷, 目前临床治疗前列腺癌的效果不理想, 仍然亟需高效、低毒、特异性的前列腺癌治疗药物。在

临床上前列腺癌的药物治​​疗主要用于不能手术治疗或晚期患者的姑息治疗, 现有化学药品如氟他胺片等对前列腺癌的临床疗效并不理想^[2], 因此从天然产物中寻找抗癌活性成分是近年来研究的热点^[3]。

白茅根 *Imperatae Rhizoma* 具有凉血止血、清热利尿的功效, 也是具有清热解毒、利湿通淋功效的宁泌泰胶囊的重要组成。芦竹素是白茅根中特有的五环三

收稿日期: 2016-10-10

作者简介: 陈大可 (1976—), 男, 副主任医师, 从事泌尿外科的临床和基础研究。Tel: 15858010818 E-mail: cdk11777@163.com

萜类化合物^[4]，其生物活性研究较少。本实验以人前列腺癌 PC3 细胞系为研究对象，研究芦竹素对前列腺癌 PC3 细胞增殖及凋亡的影响，拟初步揭示其抗前列腺癌的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 芦竹素的制备

芦竹素由白茅根[2015 年 7 月购自浙江省杭州市国大药房，批号 1507003，产地湖北，由浙江中医药大学尹华教授鉴定为禾本科植物白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb. 的干燥根茎]经加热回流提取法制备。取 3 kg 白茅根，加 95%乙醇 15 L 加热回流提取 3 次，提取时间分别为 60、30、30 min，合并 3 次提取液后滤过除渣，得到白茅根粗提物，减压浓缩回收乙醇。再通过硅胶柱色谱，以氯仿-甲醇为洗脱剂梯度洗脱，分段收集，再通过半制备型 HPLC 分离，以 C₁₈ 柱为色谱柱，以甲醇-水（60：40）为流动相洗脱，得到纯化合物，波谱数据与文献报道^[4]一致，证实为芦竹素（arundoin），质量分数>95%（HPLC 法）。使用时样品溶解于二甲基亚砜（DMSO），用 DMEM 培养液稀释至所需浓度。

1.2 细胞

人前列腺癌细胞系 PC3 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.3 主要试剂

RPMI 1640 培养液购自北京四季青生物材料研究所；噻唑蓝（MTT）试剂盒购于华蓝化学科技有限公司（上海）；青霉素、链霉素、胎牛血清购自 Invitrogen 公司；实验所用抗体包括多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶（PARP）、cleaved PARP、Caspase-3、Caspase-9、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Bcl-2、Bax、GAPDH 购自美国 Cell Signaling Technology 公司；AnnexinV/PI 细胞凋亡检测试剂盒以及细胞浆蛋白抽提试剂盒购于碧云天生物技术有限公司（上海）；其他试剂（分析纯）购于北京试剂厂。

1.4 仪器

Agilent 1260 Infinity 液相色谱仪（安捷伦科技有限公司）；Agilent C₁₈ 半制备色谱柱；海尔超低温冰箱 DW-86L286（南京贝登生物科技有限公司）；岛津半微量分析天平 AUW120D（岛津企业管理有限公司）；Eppendorf-5418 高速离心机（深圳市赛亚泰科仪器设备有限公司）；UV-1800 分光光度仪（岛

津企业管理有限公司）；DYY-6D 三恒电泳仪（北京市六一仪器厂）；YQX-1 厌氧培养箱（上海海向仪器设备厂）；BD FACSCanto II 流式细胞仪（上海碧迪医疗器械有限公司）；HNY-100D 台式全温度恒温高速培养摇床（杭州艾普仪器设备有限公司）；XFS-280A 高压蒸汽灭菌锅（常州市万丰仪器制造有限公司）。

1.5 细胞培养

将 PC3 细胞培养于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 PMI 1640 培养液中，置于 37 ℃、含 5% CO₂、湿度饱和的细胞培养箱内，取对数生长期细胞用于实验。

1.6 细胞增殖抑制实验

取对数生长期的 PC3 细胞，浓度为 1×10^5 /mL，分别接种于 96 孔板（200 μL/孔），细胞贴壁后每孔加入终浓度为 0（对照）、20、40、80 μmol/L 的芦竹素。各浓度均设 6 个复孔，分别继续培养 24、48、72 h，以同体积 RPMI 1640 培养液为空白对照。于各组实验结束前 4 h 加入 MTT 试剂 20 μL/孔，继续孵育 4 h，吸掉上清，加入 DMSO 150 μL/孔，摇床上振荡 10 min，待结晶完全溶解后在酶标仪上检测 570 nm 处的吸光度（A）值，计算细胞增殖率。

细胞增殖率=(实验组 A 值-空白孔 A 值)/(对照组 A 值-空白孔 A 值)

1.7 细胞凋亡及细胞周期的检测

将对数生长期的 PC3 细胞，以 1×10^6 /mL 浓度接种于 6 孔细胞培养板内，待细胞贴壁后分别加入终浓度为 0（对照）、20、40、80 μmol/L 的芦竹素，继续培养细胞 24 h 后，收集细胞，离心固定后加入 Annexin V-FITC 和 PI，室温避光条件下染色。筛网滤过后送流式细胞仪进行细胞凋亡的检测。

1.8 Western blotting 检测蛋白表达量的变化

以 20、40、80 μmol/L 的芦竹素处理 24 h 后收集细胞，参照试剂盒说明书进行细胞浆蛋白抽提操作，提取细胞总蛋白并测定浓度，蛋白样品加入 1/5 体积的 5×上样缓冲液，沸水煮沸 5 min，根据蛋白浓度以每孔 20 μg 上样，进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后电转至 PVDF 膜上，用室温封闭 1 h，加入 1：1 000 稀释的 PARP 蛋白，4 ℃过夜。以 GAPDH 分别作为内参，TBST 洗膜 3 次，加入 1：1 000 稀释的辣根酶标记的兔抗山羊 IgG，室温孵育 2 h，同样洗膜 3 次，ECL 发光液显色，观察各条带深浅变化。

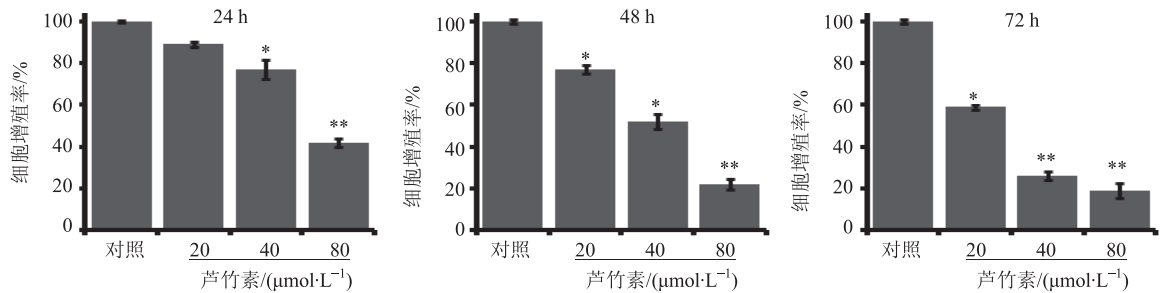
1.9 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 芦竹素对 PC3 细胞增殖的影响

不同浓度芦竹素分别处理细胞 24、48、72 h, 在 20~80 $\mu\text{mol/L}$ 内均可不同程度抑制 PC3 细胞增殖, 且随着芦竹素浓度和处理时间的升高, 抑制细胞增殖作用也逐渐增强, 呈浓度和时间依赖效应。见图 1。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 3 同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as figure 3

图 1 不同浓度芦竹素分别处理 24、48、72 h 后对 PC3 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effects of arundoin (20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$) treated for 24, 48, and 72 h on cell proliferation of PC3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 芦竹素对 PC3 细胞凋亡和细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of arundoin on apoptosis and cycle distribution of PC3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞凋亡率/%	细胞周期分布/%		
			G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	—	3.50±0.08	41.32±0.81	40.07±0.55	18.52±0.94
芦竹素	20	13.70±1.94*	52.33±1.87	35.09±0.83	13.28±0.55*
	40	37.20±3.90**	67.47±1.36*	26.25±0.85*	7.63±0.63**
	80	61.60±3.25**	75.64±2.23**	22.76±0.72**	3.77±0.43**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 芦竹素对 PC3 细胞内 PARP 以及 cleaved PARP 表达量的影响

通过 Western blotting 测定, 发现未用芦竹素处理的 PC3 细胞中 cleaved PARP 几乎没有表达。芦竹素 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 PC3 细胞 24 h 后, PC3 细胞 cleaved PARP 表达量呈剂量依赖性增加(图 2)。

2.4 芦竹素对 PC3 细胞内与凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 测定发现经过芦竹素 (20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, PC3 细胞中 cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 表达量显著上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量下降, 而促凋亡蛋白 Bax 表达量升高 (图 3)。

2.2 芦竹素对 PC3 细胞凋亡及细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示, 芦竹素能诱导 PC3 细胞凋亡。如表 1 所示, 芦竹素 (终浓度分别为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 PC3 细胞 24 h 后, 细胞凋亡 (早期凋亡+晚期凋亡) 率均明显高于对照组, 且其作用具有明显剂量依赖性。细胞周期检测发现, 不同浓度芦竹素处理 24 h 后, PC3 细胞的 G₀/G₁ 期细胞比例增加, 同时 G₂/M 期与 S 期细胞比例减少, 提示芦竹素能使 PC3 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期, 从而抑制细胞增殖, 如表 1 所示。

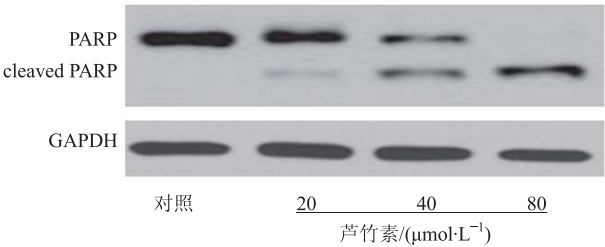


图 2 芦竹素对 PC3 细胞 PARP 及 cleaved PARP 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of arundoin on protein expression of PARP and cleaved PARP

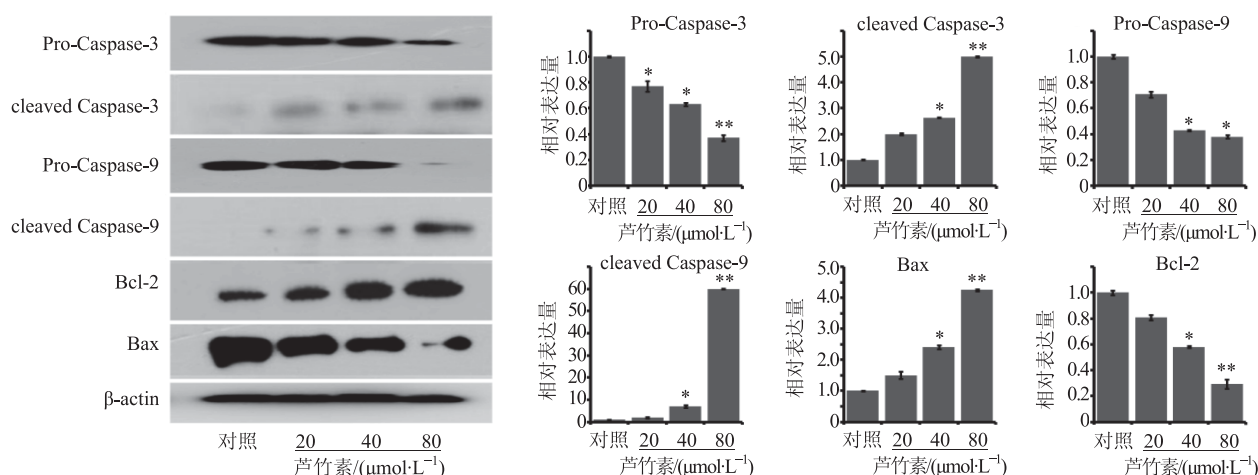


图 3 芦竹素对 PC3 细胞内 Caspases 和 Bcl-2 家族蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of arundoin on protein expression of Caspases and Bcl-2 family proteins ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

前列腺癌是指发生在前列腺的上皮性恶性肿瘤,其中前列腺腺癌占 95%以上。全球前列腺癌患者发病率一直呈上升趋势^[5-6]。如今,前列腺癌患者最佳治疗手段的选择依然面临很大的挑战^[7]。中医药包括民族医药是用来防治疾病的有力武器,与化学药品相比,中药除了有着来源广泛、价格低廉和毒副作用少等优点外,在减轻癌症患者临床症状,在提高生存质量,提高免疫力,增强放、化疗敏感性,减轻放、化疗不良反应等很多方面都具有优势。近年来中药及其有效部位或成分抗癌研究工作取得了一系列的成果,已成为肿瘤医学的研究热点之一^[8-11]。

近年来,从药用植物的次生代谢产物中已分离出许多抗肿瘤活性较高的生物活性物质,这表明药用植物已成为药物开发的重要资源。从植物尤其是药用植物中寻找高活性的化合物有重要意义,从中发现了很多有前景的抗肿瘤活性成分。前列腺是人体中具有内、外双重分泌功能的性分泌腺,前列腺腺体的中间有尿道穿过,扼守着尿道上口,所以,前列腺有病,排尿首先受影响。白茅根具有凉血止血、清热利尿的功效,也是具有清热解毒、利湿通淋功效的宁泌泰胶囊的重要组成。本研究选择人前列腺癌细胞为研究对象,检测白茅根中存在的天然五环三萜类化合物芦竹素的抗肿瘤作用,旨在揭示芦竹素在前列腺癌治疗中的作用机制。通过 MTT 实验,发现芦竹素可以显著降低 PC3 细胞活力(呈时间及剂量依赖性)。进而通过流式细胞术检测了

芦竹素对细胞的凋亡作用,发现芦竹素可以诱导 PC3 细胞凋亡。

细胞凋亡是多细胞机体维持内环境稳定的重要自我调节机制,诱导细胞凋亡已成为肿瘤治疗的热点,亦成为评估抗癌药物作用能力的重要指标^[12-13]。本研究发现芦竹素在 20~80 $\mu\text{mol/L}$ 均能抑制 PC3 细胞的增殖,且呈现明显的剂量依赖效应:芦竹素处理 PC3 细胞 24 h 后可诱导凋亡,且随着药物浓度的升高细胞凋亡率增加。

PARP 是半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)的切割底物,在 DNA 损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用^[14]。本研究通过免疫印迹实验发现,芦竹素呈时间依赖性地增加 PC3 细胞中 PARP 的活性形式 cleaved PARP 的表达量。芦竹素可以浓度依赖地增加 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性形式 cleaved Caspase-3 和 Caspase-9 的表达量,提示芦竹素可能是通过增强细胞 Caspase 活性从而促进细胞凋亡。此外,芦竹素可以浓度依赖地上调促凋亡蛋白 Bax 的表达量,而下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达量。这进一步验证了芦竹素具有诱导 PC3 细胞凋亡的活性。

综上所述,芦竹素具有抗前列腺癌细胞的作用。本研究为临床应用白茅根制品治疗前列腺癌患者提供了一定的参考,也为更合理使用白茅根及其制剂提供了新的依据。

参考文献

- [1] Schellhammer P F. A Urologist's personal view of prostate cancer [J]. *Turk J Urol*, 2016, 42(3): 121-126.
- [2] Nakai Y, Tanaka N, Anai S, et al. A randomized control

- trial comparing the efficacy of antiandrogen monotherapy: Flutamide vs. Bicalutamide [J]. *Horm Cancer*, 2015, 6(4): 161-167.
- [3] Gee A, Challapalli A, Bahl A. Health-related quality of life in men with metastatic castration-resistant prostate cancer [J]. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 2015, 15(6): 941-949.
- [4] Nishimoto K, Ito M, Natori S, *et al.* The structure of arundoin, the triterpene methyl ether from *Imperata cylindrica* var. *media* and *arundo conspicua* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1965, 27(7): 2245-2251.
- [5] Sweeney K, Halldén G. Oncolytic adenovirus-mediated therapy for prostate cancer [J]. *Oncol Viroth*, 2016, 5(1): 45-57.
- [6] Stephan C, Jung K, Ralla B. Current biomarkers for diagnosing of prostate cancer [J]. *Future Oncol*, 2015, 11(20): 2743-2755.
- [7] Moltzahn F, Dal Pra A, Furrer M, *et al.* Urethral strictures after radiation therapy for prostate cancer [J]. *Investig Clin Urol*, 2016, 57(5): 309-315.
- [8] Vue B, Zhang S, Chen Q H. Synergistic effects of dietary natural products as anti-prostate cancer agents [J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(12): 2179-2188.
- [9] Obeid J, Hu Y, Slingluff C L. Vaccines, adjuvants, and dendritic cell activators-current status and future challenges [J]. *Semin Oncol*, 2015, 42(4): 549-561.
- [10] 吴沁航, 符士源. 雷公藤甲素抗卵巢癌的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 1049-1052.
- [11] 赵琛, 苏光悦, 赵余庆. 人参皂昔及其衍生物抗结肠癌作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2477-2483.
- [12] Fan H, Liang Y, Jiang B, *et al.* Curcumin inhibits intracellular fatty acid synthase and induces apoptosis in human breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 2651-2656.
- [13] Besbes S, Mirshahi M, Pocard M, *et al.* New dimension in therapeutic targeting of BCL-2 family proteins [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(15): 12862-12871.
- [14] Jubin T, Kadam A, Jariwala M, *et al.* The PARP family: insights into functional aspects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cell growth and survival [J]. *Cell Prolif*, 2016, 49(4): 421-437.