

## 王不留行环肽 B 逆转前列腺癌 C4-2 细胞激素非依赖性生长及作用机制

牟睿宇<sup>1,2,3</sup>, 廖洋<sup>1,2</sup>, 贾春鑫<sup>1,2</sup>, 孔凡铭<sup>1,2,3</sup>, 孙彬栩<sup>1,2,3</sup>, 郭姍琦<sup>1,2,3</sup>, 易丹<sup>1,2,3</sup>, 贾英杰<sup>1,2,3\*</sup>

1. 天津中医药大学第一附属医院 肿瘤科, 天津 300381

2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381

3. 天津市中医肿瘤研究所, 天津 300381

**摘要:** **目的** 明确王不留行逆转人前列腺癌 C4-2 细胞激素非依赖性生长的单体成分, 探究王不留行抑制去势抵抗性前列腺癌发生发展的作用机制。**方法** 采用 CCK-8 法检测王不留行单体成分对 C4-2 细胞增殖的影响; 采用 CCK-8 法联合 Annexin V-APC 法检测王不留行单体成分对 C4-2 细胞雄激素非依赖性生长的作用; 采用 Western blotting 检测磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路和雄激素受体 (androgen receptor, AR) 蛋白表达; 过表达 AR 后, 采用荧光素酶报告基因检测 AR 的转录活性。**结果** 王不留行环肽 B 对 C4-2 细胞增殖的抑制作用最为显著。在有雄激素的条件下, 王不留行环肽 B 对 C4-2 细胞凋亡的诱导作用和对细胞增殖的抑制作用较弱; 王不留行环肽 B 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平降低。过表达 AR 后, 与对照组比较, 双氢睾酮组 AR 蛋白表达水平和相对荧光素酶活力显著升高 ( $P < 0.05$ ), 王不留行环肽 B 组 AR 表达水平和相对荧光素酶活力显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与双氢睾酮组比较, 双氢睾酮+王不留行环肽 B 组 AR 蛋白表达水平和相对荧光素酶活力显著降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 王不留行环肽 B 能明显抑制 C4-2 细胞增殖, 具有逆转 C4-2 细胞激素非依赖性生长的作用, 可以通过 AR 以及 PI3K/Akt 信号通路发挥抑制去势抵抗性前列腺癌发生发展的作用。

**关键词:** 前列腺癌; 王不留行环肽 B; C4-2 细胞; 雄激素; 非依赖性生长; PI3K/Akt 信号通路; 雄激素受体

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)17-5898-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.016

## Mechanism of segetalin B on reversing hormone independent growth of C4-2 prostate cancer cells

MOU Ruiyu<sup>1,2,3</sup>, LIAO Yang<sup>1,2</sup>, JIA Chunxin<sup>1,2</sup>, KONG Fanming<sup>1,2,3</sup>, SUN Binxu<sup>1,2,3</sup>, GUO Shanqi<sup>1,2,3</sup>, YI Dan<sup>1,2,3</sup>, JIA Yingjie<sup>1,2,3</sup>

1. Department of Oncology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381, China

3. Tianjin Cancer Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

**Abstract: Objective** To clarify the monomeric components of *Vaccaria segetalis* on reversing hormone independent growth of human prostate cancer C4-2 cells, and explore the mechanism of *V. segetalis* on inhibiting the occurrence and development of castration resistant prostate cancer. **Methods** CCK-8 method was used to detect the effect of monomeric components of *V. segetalis* on proliferation of C4-2 cells; CCK-8 method combined with Annexin V-APC method was used to detect the effect of monomeric components of *V. segetalis* on androgen independent growth of C4-2 cells; Western blotting was used to detect the expressions of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway and androgen receptor (AR) proteins; After overexpression of AR, the transcriptional activity of AR was detected using luciferase reporter genes. **Results** The inhibitory effect of segetalin B on the proliferation of C4-2 cells was the most significant. Under the conditions of androgens, the induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by segetalin B were relatively weak in C4-2 cells; The expression levels of p-PI3K and p-Akt proteins in segetalin B group were decreased. After overexpression of AR, compared with control group, the expression level of AR protein and relative

收稿日期: 2024-04-26

基金项目: 天津中医药大学第一附属医院拓新工程 (院 YB202125)

作者简介: 牟睿宇 (1991—), 男, 博士, 主治医师, 从事中西医结合防治前列腺癌的临床与基础研究。E-mail: mouruiyu@163.com

\*通信作者: 贾英杰 (1960—), 男, 博士, 主任医师, 从事中西医结合防治恶性肿瘤的临床与基础研究。E-mail: jiayingjie1616@sina.com

luciferase activity in dihydrotestosterone group were significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the expression level of AR and relative luciferase activity in segetalin B group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ); Compared with dihydrotestosterone group, the expression level of AR protein and relative luciferase activity in dihydrotestosterone + segetalin B group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Segetalin B can significantly inhibit the proliferation of C4-2 cells, reverse the hormone independent growth of C4-2 cells, and exert an inhibitory effect on the occurrence and development of castration resistant prostate cancer through AR and PI3K/Akt signaling pathway.

**Key words:** prostate cancer; segetalin B; C4-2 cells; androgens; independent growth; PI3K/Akt signaling pathway; androgen receptor

前列腺癌发病率逐年升高,最新美国癌症统计数据表明在美国男性中前列腺癌的发病率为20%,已经超过肺癌,排名第1;前列腺癌死亡率为10%,仅次于肺癌,位列第2<sup>[1]</sup>。我国肿瘤研究数据显示,前列腺癌的发病率增长速度比欧美等发达国家更为迅速,已超过膀胱恶性肿瘤成为男性泌尿系统恶性肿瘤首位<sup>[2]</sup>。大多数前列腺癌患者确诊时已属于晚期阶段,多采用内分泌治疗作为一线治疗手段。尽管以内分泌治疗为主的治疗方案在临床中取得不俗的成效,但经过2年的治疗,前列腺癌细胞会对雄激素剥夺产生耐受,从而导致疾病的恶化,进展为去势抵抗性前列腺癌(castration-resistant prostate cancer, CRPC)<sup>[3]</sup>。天津中医药大学第一附属医院贾英杰教授结合临床实践与古籍经典,认为虚、毒、瘀、湿是前列腺癌的病机要素,四者相互影响、相互交织、互为因果并贯穿疾病始终。基于上述病因病机提出“健脾即是补肾”的前列腺癌核心治则,并总结出健脾利湿化痰方专利处方<sup>[4]</sup>。前期研究表明健脾利湿化痰方对人前列腺癌 C4-2 细胞具有很好的抑制作用,其中王不留行是方中抑制 C4-2 细胞增殖作用最佳的单味中药,能够增加 C4-2 细胞对雄激素的敏感性,可能对 C4-2 细胞的雄激素非依赖性生长具有逆转作用<sup>[5]</sup>。本研究继续选取激素非依赖性 C4-2 细胞进行研究,旨在明确王不留行逆转 C4-2 细胞激素非依赖性生长的中药单体成分,探究王不留行抑制 CRPC 发生发展的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

C4-2 细胞购自天津泰润隆科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

王不留行环肽 A (批号 210908, 质量分数  $\geq 98\%$ )、王不留行环肽 B (批号 211102, 质量分数  $\geq 98\%$ )、王不留行黄酮苷 (批号 211228, 质量分数  $\geq 98\%$ ) 购自成都埃法生物科技有限公司; 特级胎牛血清 (批号 HS0502F)、青霉素 (批号 03-036-1D)、

链霉素 (批号 03-036-1D)、RPMI 1640 培养基 (批号 11875101)、活性炭/葡聚糖处理血清 (SH30068.02)、Annexin V/PI 试剂盒购自以色列 BioInd 公司; 胰蛋白酶 (批号 25200056) 购自美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒购自日本 DOJINDO 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 2118)、磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase, p-PI3K) 抗体 (批号 13857)、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt) 抗体 (批号 9271)、雄激素受体 (androgen receptor, AR) 抗体 (批号 19672)、抗兔二抗 (批号 2298) 购自美国 CST 公司; PI3K/Akt 通路的激动剂胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 重组蛋白 (批号 HY-P700093AF)、PI3K 抑制剂 LY294002 (批号 HY-10108)、双氢睾酮 (批号 HY-B0935) 购自美国 MedChemExpress 公司; 萤火虫荧光素酶报告基因检测试剂盒 (批号 026182440019) 购自上海碧云天生物技术有限公司; RIPA 裂解液 (批号 R0010)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 220510)、分离胶配制试剂盒 (批号 220312) 购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.3 仪器

ZF-288 型全自动凝胶成像分析系统 (上海嘉鹏科技有限公司); IX73 型倒置荧光显微镜 (美国 BIGCO 公司); 3-16L 型台式高速低温冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); 1703930 型小型转印槽转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); 160i CR 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱、1410101 型酶标仪 (美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

C4-2 细胞用含 10%胎牛血清及 1%双抗 (青霉素和链霉素) 的 RPMI 1640 培养基, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。待细胞长满瓶底 85%~90%并处于对数生长期时, 弃去培养液,

以 0.25%胰蛋白酶消化和传代处理。

## 2.2 CCK-8 法检测王不留行单体成分对 C4-2 细胞增殖的影响

选取对数生长期、生长良好的 C4-2 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化后进行细胞计数。以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,常规培养 24 h。弃去培养液,分别加入不同浓度(50、100、200、400、800、1 600、3 200  $\mu\text{mol/L}$ )的王不留行黄酮苷或王不留行环肽 A 或王不留行环肽 B,另设置不含药物的对照组,每组 3 个复孔。给药 24 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液(5 mg/mL),避光孵育 2.5 h,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

## 2.3 CCK-8 联合 Annexin V-APC 法检测王不留行环肽 B 对 C4-2 细胞雄激素非依赖性生长的作用

### 2.3.1 CCK-8 法检测王不留行环肽 B 对 C4-2 细胞活力的影响

选取对数生长期、生长良好的 C4-2 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化后进行细胞计数。以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,常规培养 24 h。设置对照组和王不留行环肽 B(200、400  $\mu\text{mol/L}$ )组,弃去培养液,分别用含雄激素的培养基和不含雄激素的培养基(活性炭/葡聚糖处理)培养,然后按照分组给予王不留行环肽 B 处理 24 h,另设置不含药物的对照组,每组 3 个复孔。加入 CCK-8 试剂,采用酶标仪检测细胞活力。

### 2.3.2 Annexin V-APC 法检测王不留行环肽 B 对 C4-2 细胞凋亡的影响

选取对数生长期、生长良好的 C4-2 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化后进行细胞计数。以  $3 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,每孔 2.5 mL,常规培养 24 h。设置对照组和王不留行环肽 B(200、400  $\mu\text{mol/L}$ )组,弃去培养液,分别用含雄激素的培养基和不含雄激素的培养基(活性炭/葡聚糖处理)培养,然后按照分组给予王不留行环肽 B 处理 24 h,另设置不含药物的对照组,每组 3 个复孔。收集细胞,用  $1 \times \text{Binding Buffer}$  缓冲液制成 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液加入 Falcon 试管中,冰上避光加入 Annexin V 和碘化丙啶(PI)染料各 5  $\mu\text{L}$ ,再加入  $1 \times \text{Binding Buffer}$  缓冲液 400  $\mu\text{L}$ 。避光孵育 20 min,用流式细胞仪进行检测。

## 2.4 Western blotting 检测 PI3K/Akt 通路、AR 蛋白表达

设置对照组、王不留行环肽 B(200  $\mu\text{mol/L}$ )

组、王不留行环肽 B(200  $\mu\text{mol/L}$ ) + IGF-1(100 ng/mL)组和王不留行环肽 B(200  $\mu\text{mol/L}$ ) + LY294002(50  $\mu\text{mol/L}$ )组。给予药物处理 24 h 后,收集细胞,加入裂解液后提取总蛋白,测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,分别加入 p-PI3K(1:500)、p-Akt(1:500)、GAPDH(1:1 000)抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;TBST 洗涤 3 次后,加入二抗,于室温孵育 1 h,滴加荧光试剂,采用凝胶成像系统显影,分析条带灰度值。

设置对照组、双氢睾酮(10 nmol/L)组、王不留行环肽 B(200  $\mu\text{mol/L}$ )组、双氢睾酮(10 nmol/L) + 王不留行环肽 B(200  $\mu\text{mol/L}$ )组。过表达 AR 后,给予药物处理 24 h,收集细胞,提取蛋白,检测各组 AR 蛋白表达。

## 2.5 荧光素酶报告基因检测 AR 的转录活性

采用荧光素酶报告基因检测 C4-2 细胞 AR 的转录活性。设置对照组、双氢睾酮(10 nmol/L)组、王不留行环肽 B(200  $\mu\text{mol/L}$ )组、双氢睾酮(10 nmol/L) + 王不留行环肽 B(200  $\mu\text{mol/L}$ )组,细胞转染 ARE 质粒过表达 AR 后,给予药物处理 24 h,收集细胞,裂解细胞,取上清液待测。将多功能酶标仪测定间隔设为 2 s,测定时间设为 10 s,检测波长设定为 560 nm。每个样品测定时,取样品 100  $\mu\text{L}$ ,加入 100  $\mu\text{L}$  荧光素酶检测试剂,混匀后等待 1~2 s,测定各孔的 A 值。

## 2.6 统计学分析

采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析,计量资料符合正态分布用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较采用两独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

## 3 结果

### 3.1 王不留行单体成分(王不留行环肽 A、王不留行环肽 B 和王不留行黄酮苷)对 C4-2 细胞增殖的影响

如表 1 所示,王不留行环肽 A、王不留行环肽 B 和王不留行黄酮苷对 C4-2 细胞均具有抑制作用,且呈剂量相关性。王不留行环肽 A、王不留行黄酮苷作用于 C4-2 细胞 24 h 的半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)未测出,王不留行环肽 B 作用于 C4-2 细胞 24 h 的 IC<sub>50</sub> 为 507  $\mu\text{mol/L}$ 。王不留行环肽 B 对 C4-2 细胞增殖的抑制作用最为显著,故对王不留行环肽 B 进行后续研究。

表1 王不留行单体成分对C4-2细胞增殖的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 1 Effect of single components of *Vaccaria segetalis* on proliferation of C4-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	抑制率/%
王不留行环肽 A	50	7.65 ± 5.85
	100	7.89 ± 6.91
	200	13.16 ± 2.79
	400	17.47 ± 2.86
	800	24.75 ± 5.94
	1 600	32.95 ± 6.05
王不留行环肽 B	50	13.99 ± 2.53
	100	22.69 ± 3.71
	200	25.30 ± 3.21
	400	33.39 ± 4.16
	800	52.87 ± 3.15
	1 600	59.06 ± 0.60
王不留行黄酮苷	50	4.89 ± 2.12
	100	8.86 ± 3.10
	200	14.58 ± 4.56
	400	17.44 ± 3.20
	800	28.77 ± 3.31
	1 600	34.24 ± 3.22
	3 200	34.62 ± 0.99

3.2 王不留行环肽 B 逆转 C4-2 细胞激素非依赖性生长

如表 2 所示, 分别用含雄激素和不含雄激素的培养基处理 C4-2 细胞, 然后给予不同浓度的王不留行环肽 B 干预后, 细胞活力均降低, 王不留行环肽 B 浓度为 200、400  $\mu\text{mol/L}$  时, 不含雄激素组细胞活力显著低于含雄激素组 ( $P < 0.05$ )。表明相比于不含雄激素, 在有雄激素的条件下王不留行环肽 B 对 C4-2 细胞的增殖抑制作用较弱。

如图 1 所示, 分别用含雄激素和不含雄激素的

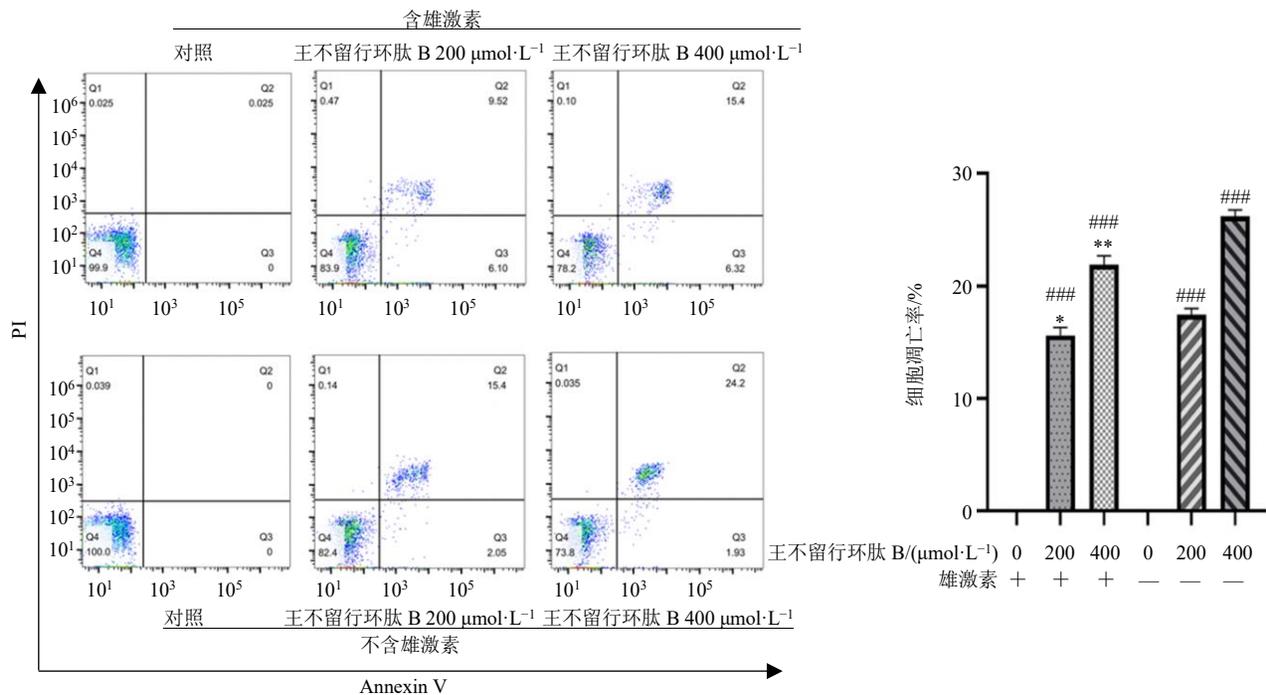
表 2 王不留行环肽 B 对雄激素处理下 C4-2 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Table 2 Effect of segetalin B on viability of C4-2 cells under androgen treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )**

组别	浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	A 值	
		含雄激素	不含雄激素
对照	—	1.42 ± 0.10	1.40 ± 0.14
王不留行环肽 B	200	1.23 ± 0.06*	0.92 ± 0.04 <sup>△</sup>
	400	1.08 ± 0.04* <sup>△▲</sup>	0.74 ± 0.11 <sup>△▲</sup>

与不含雄激素的相同处理组比较: \* $P < 0.05$ ; 与同一雄激素条件下对照组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与同一雄激素条件下王不留行环肽 B (200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组比较: <sup>▲</sup> $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs same treatment group without androgen; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs control group under same androgen conditions; <sup>▲</sup> $P < 0.05$  vs segetalin B (200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group under same androgen conditions.



与不含雄激素的相同处理组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与同一雄激素条件下对照组比较: <sup>###</sup> $P < 0.001$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs same treatment group without androgen; <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group under same androgen conditions.

图 1 王不留行环肽 B 对雄激素处理下 C4-2 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of segetalin B on apoptosis of C4-2 cells under androgen treatment ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

培养基处理 C4-2 细胞, 然后给予不同浓度的王不留行环肽 B 干预后, 细胞凋亡率均显著高于对照组 ( $P < 0.001$ )。不含雄激素组细胞凋亡率显著高于含雄激素组 ( $P < 0.05, 0.01$ )。表明相比于不含雄激素, 在有雄激素的条件下王不留行环肽 B 对 C4-2 细胞凋亡的诱导作用较弱。

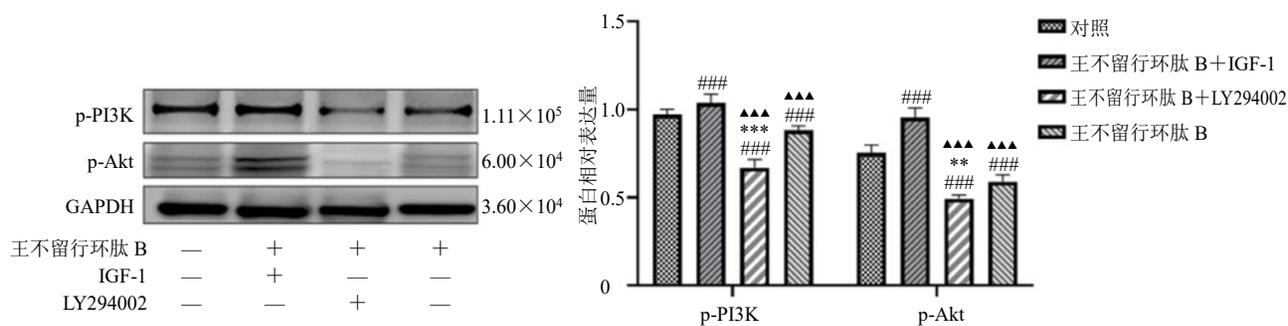
### 3.3 王不留行环肽 B 对 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 王不留行环肽 B 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.001$ ); 与王不留行环肽 B 组比较, 王不留行环肽 B 联合 IGF-1 组 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平升高, 王不留行环肽 B 联合 LY294002 组 p-PI3K、p-Akt

蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.01, 0.001$ )。提示王不留行环肽 B 可以通过抑制 PI3K/Akt 通路影响 C4-2 细胞。

### 3.4 王不留行环肽 B 对 AR 蛋白表达的影响

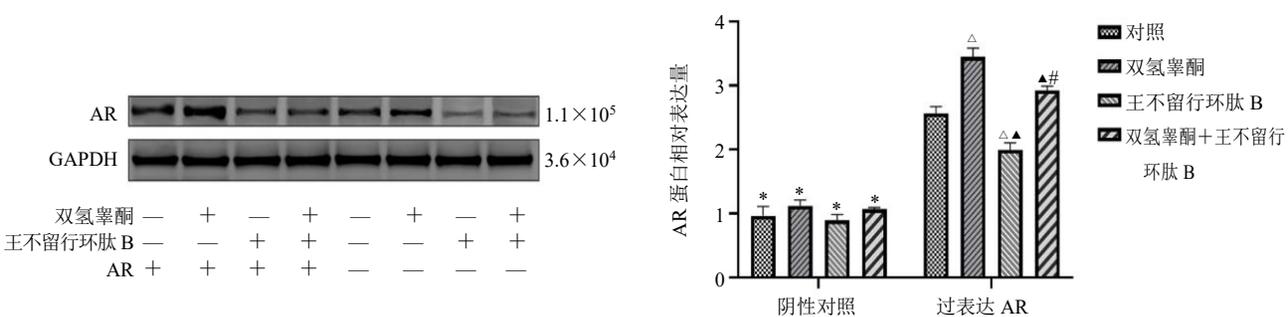
如图 3 所示, 过表达 AR 后, 各组 AR 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ ), 与对照组比较, 双氢睾酮组 AR 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 王不留行环肽 B 组 AR 蛋白表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与双氢睾酮组比较, 王不留行环肽 B 组和双氢睾酮+王不留行环肽 B 组 AR 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与王不留行环肽 B 组比较, 双氢睾酮+王不留行环肽 B 组 AR 蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。



与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与王不留行环肽 B 组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与王不留行环肽 B 联合 IGF-1 组比较: ▲▲▲ $P < 0.001$ 。  
### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs segetalin B group; ▲▲▲ $P < 0.001$  vs segetalin B combined with IGF-1 group.

图 2 王不留行环肽 B 对 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of segetalin B on PI3K/Akt pathway related protein expressions ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



与过表达 AR 的相同组别比较: \* $P < 0.05$ ; 与过表达 AR 的对照组比较: △ $P < 0.05$ ; 与过表达 AR 的双氢睾酮组比较: ▲ $P < 0.05$ ; 与过表达 AR 的王不留行环肽 B 组比较: # $P < 0.05$ , 图 4 同。

\* $P < 0.05$  vs same group with overexpressed AR group; △ $P < 0.05$  vs control group with overexpressed AR group; ▲ $P < 0.05$  vs dihydrotestosterone group with overexpressed AR group; # $P < 0.05$  vs segetalin B group with overexpressed AR group, same as Fig. 4.

图 3 王不留行环肽 B 对 AR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of segetalin B on AR protein expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.5 荧光素酶活性检测情况

如图 4 所示, 过表达 AR 的情况下, 对照组、双氢睾酮组、王不留行环肽 B 组和双氢睾酮+王不留行环肽 B 组相对荧光素酶活力均显著高于对应的

无转染组 ( $P < 0.05$ )。过表达 AR 后, 与对照组比较, 双氢睾酮组相对荧光素酶活力显著升高 ( $P < 0.05$ ), 王不留行环肽 B 组相对荧光素酶活力显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与双氢睾酮组比较, 王不留行环肽

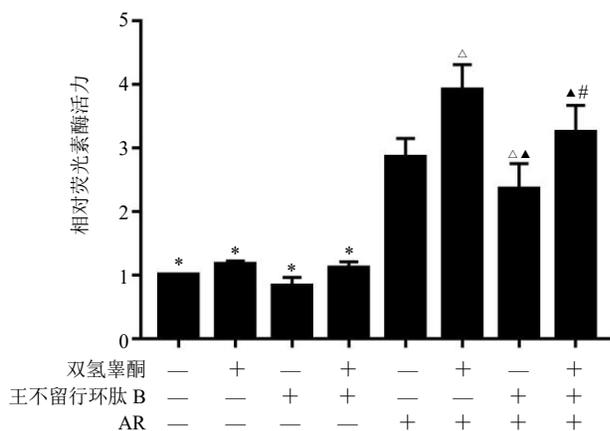


图4 各组 C4-2 细胞相对荧光素酶活力 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Relative luciferase activity in C4-2 cells of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

B 组和双氢睾酮+王不留行环肽 B 组相对荧光素酶活力显著降低 ( $P < 0.05$ )；与王不留行环肽 B 组比较，双氢睾酮+王不留行环肽 B 组相对荧光素酶活力显著升高 ( $P < 0.05$ )。表明王不留行环肽 B 可以逆转双氢睾酮诱导的 AR 表达水平升高。

#### 4 讨论

脾肾虚亏是前列腺癌的主证，前列腺癌是否发病的决定因素在于正气，特别是肾气的强弱。结合患者临床表现对 CRPC 的本质病机进行概括和浓缩，“脾虚湿困、气虚毒瘀”是 CRPC 的核心病机，贾英杰教授创新性地在 CRPC 的治疗中提出“补肾不如补脾、健脾即是补肾”的理论，并确立“健脾利湿、解毒祛瘀”为 CRPC 的基本治则，组方健脾利湿化瘀方为治疗 CRPC 的基础方。课题组前期通过动物实验研究证实健脾利湿化瘀方及拆方组均具有一定的抑瘤作用，其中化瘀组的王不留行对 C4-2 细胞的抑制作用最佳，且能够增加 C4-2 细胞对雄激素的敏感性。因此，继续选取表达 AR 受体的激素非依赖性 C4-2 细胞，进一步探索王不留行发挥逆转激素非依赖性生长作用的最佳单体成分及其可能的通路机制。

课题组前期研究发现王不留行 3 种单体成分均可抑制 C4-2 细胞的增殖，且具有多靶点作用<sup>[6]</sup>，其中王不留行环肽 B 的作用最为显著，但缺乏相关佐证的研究。王贵民等<sup>[7]</sup>对治疗前列腺疾病的中药进行用药规律研究，结果显示王不留行是在前列腺癌治疗中的核心单味药。通过对王不留行进行系统地提取分离，得到 2 种活性较高的成分，鉴定为王不留行环肽 A、王不留行环肽 E，并证实该 2 种成分

具有抑制血管生成的作用。董红敬等<sup>[8]</sup>通过高效液相色谱法测定王不留行中王不留行环肽 A 是王不留行的活性较高的成分，花慧等<sup>[9]</sup>进一步研究发现王不留行环肽 A 具有抑制血管生成的作用。魏薇<sup>[10]</sup>研究显示，王不留行环肽 A、B 具有较强的雌激素样作用。以上研究提示王不留行可能通过血管生成、诱导凋亡等途径发挥出更加显著的抑制细胞增殖的作用。然而，本研究结果显示 3 种王不留行单体成分实际产生效应的药物浓度相对较高，加之目前国内对于王不留行单体成分治疗 CRPC 的基础研究有所欠缺，还需进一步从多个维度及水平进行验证。

本研究着眼于探索王不留行单体成分逆转激素非依赖性生长作用的具体机制，首先发现王不留行环肽 B 可以通过抑制 PI3K/Akt 通路影响癌细胞生长。PI3K/Akt 通路是癌症发生发展过程的主要信号通路之一，而 PTEN 缺失导致的 PI3K/Akt 信号通路异常激活是前列腺癌最常见驱动因素<sup>[11]</sup>。既往已有研究证实王不留行可以降低磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular regulated protein kinase, p-ERK)、p-Akt 的表达，这与本研究结果一致<sup>[12]</sup>。此外，本研究发现王不留行环肽 B 可以逆转双氢睾酮诱导的 AR 表达水平升高，由此发挥逆转 C4-2 细胞雄激素非依赖性生长的作用。在 CRPC 的发展中，肿瘤会继续依赖于 AR 信号，此时 AR 及其相关信号通路呈现出多种形式的变化，包括 AR 扩增、基因突变以及与生长因子的交叉作用<sup>[13]</sup>。同样有证据表明，前列腺癌经过内分泌治疗后疾病发生进展，产生内分泌治疗耐药性，往往会伴随 AR 蛋白表达水平显著升高<sup>[14]</sup>。Montgomery 等<sup>[15]</sup>研究发现，通过基因扩增和增强转录诱导的 AR 过表达可以使 AR 对低水平雄激素产生超敏反应。以上研究均提示 AR 信号通路在前列腺癌去势抵抗阶段仍发挥巨大的作用，仍可以持续诱导肿瘤细胞增殖。

综上，王不留行环肽 B 能明显抑制 C4-2 细胞增殖，具有逆转 C4-2 细胞激素非依赖性生长的作用，可以通过 AR 信号通路以及 PI3K/Akt 信号通路发挥抑制 CRPC 发生发展的作用。本研究从分子生物学水平明确王不留行环肽 B 治疗 CRPC 可能的作用机制，为后续研究奠定基础，对于中西医结合防治肿瘤具有重要意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] Siegel R L, Giaquinto A N, Jemal A. Cancer statistics, 2024

- [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12-49.
- [2] Chen W Q, Zeng H M, Zheng R S, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2007 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2012, 24(1): 1-8.
- [3] Leiblich A, Hellberg J E E U, Sekar A, *et al.* Mating induces switch from hormone-dependent to hormone-independent steroid receptor-mediated growth in *Drosophila* secondary cells [J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(10): e3000145.
- [4] 张瑶, 李小江, 贾英杰. 中医“健脾利湿化痰法”在前列腺癌治疗中的运用 [J]. *天津中医药*, 2021, 38(3): 317-321.
- [5] 牟睿宇, 贾英杰, 孙彬栩, 等. 健脾利湿化痰方对人前列腺癌 C4-2 细胞雄激素非依赖性生长的影响 [J]. *中医杂志*, 2019, 60(11): 964-968.
- [6] 牟睿宇, 李小江, 郭姗姗, 等. 王不留行作用于 C4-2 细胞株的基因靶点研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2022, 49(11): 156-162.
- [7] 王贵民, 李廷保. 中医药治疗前列腺疾病用药规律的数据挖掘研究 [J]. *西部中医药*, 2014, 27(5): 77-80.
- [8] 董红敬, 李佳, 郭英慧, 等. 高效液相色谱法测定王不留行中王不留行环肽 A 和王不留行环肽 B [J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(5): 793-796.
- [9] 花慧, 冯磊, 张小平, 等. 王不留行中抑制血管生成的活性物质研究 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(3): 698-700.
- [10] 魏薇. 中药王不留行的研究进展 [J]. *中国医药指南*, 2014, 12(16): 87-88.
- [11] Qi Z, Xu Z H, Zhang L Z, *et al.* Overcoming resistance to immune checkpoint therapy in PTEN-null prostate cancer by intermittent anti-PI3K $\alpha/\beta/\delta$  treatment [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 182.
- [12] 马丽萍, 邱丽颖, 冯磊, 等. 王不留行提取物抑制人微血管内皮细胞活性的研究 [J]. *中成药*, 2013, 35(11): 2315-2319.
- [13] Mellado B, Codony J, Ribal M J, *et al.* Molecular biology of androgen-independent prostate cancer: The role of the androgen receptor pathway [J]. *Clin Transl Oncol*, 2009, 11(1): 5-10.
- [14] Haapala K, Kuukasjärvi T, Hyytinen E, *et al.* Androgen receptor amplification is associated with increased cell proliferation in prostate cancer [J]. *Hum Pathol*, 2007, 38(3): 474-478.
- [15] Montgomery R B, Mostaghel E A, Vessella R, *et al.* Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: A mechanism for castration-resistant tumor growth [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(11): 4447-4454.

[责任编辑 李亚楠]