

染料木黄酮增强阿比特龙 抑制去势抵抗前列腺癌细胞 22RV1 效应研究

伏天雨 周圆媛 陈 恬 冯海娇 彭 湃 朱彦锋

摘要 目的 研究染料木黄酮增强阿比特龙对去势抵抗前列腺癌(CRPC)细胞的影响及其机制。方法 将 CRPC 细胞株 22RV1 作为体外细胞模型,染料木黄酮和阿比特龙单独或联合使用时,采用 MTT 比色法及免疫细胞化学法检测癌细胞的活力及抗原 Ki-67 表达,反映其增殖情况;通过 Western blot 检测前列腺癌特异性抗原(PSA)、兔抗人增殖细胞核抗原(PCNA)和酶 AKR1C3、CYP17A1 的表达水平;通过 ELISA 实验法检测染料木黄酮与阿比特龙联合作用对 22RV1 细胞裂解液中睾酮水平的影响。结果 MTT 检测结果显示,染料木黄酮和阿比特龙单独或联合使用时,在体外对 CRPC 细胞株 22RV1 细胞活力具有抑制作用($P < 0.05$);与单独使用阿比特龙比较,染料木黄酮能增强阿比特龙对 22RV1 细胞的抑制作用($P < 0.05$);免疫细胞化学法检测结果显示染料木黄酮能增强阿比特龙的抗肿瘤效果,减弱抗原 Ki-67 的表达。但 Western blot 结果显示 CYP17A1 的表达并未明显减弱,PSA、PCNA 和 AKR1C3 的表达随染料木黄酮浓度的增加逐渐下调。ELISA 法检测睾酮水平未明显下降。结论 染料木黄酮可增强阿比特龙在体外对去势抵抗前列腺癌细胞的抑制作用,降低 PSA、PCNA 和 AKR1C3 及抗原 Ki-67 的表达。

关键词 染料木黄酮;阿比特龙;去势抵抗前列腺癌

中图分类号 R 737.25

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)09-1442-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.018

前列腺癌是全球男性人群最常见的泌尿生殖系统的恶性肿瘤。2018 年全球癌症统计报告显示全球新发病例排名第 4 位的是前列腺癌,男性病例中前列腺癌排名第 2 位。我国男性前列腺癌发病率居第 6 位,病死率居第 7 位。2018 年全球新增前列腺

癌患者 127.6 万例,死亡 35.9 万例^[1]。前列腺癌的生长与雄激素睾酮升高有关,去除睾酮是针对晚期前列腺癌的治疗方法。但经过 2~3 年后,肿瘤不再受雄激素的控制,会继续增长。经过初次持续雄激素剥夺治疗后疾病依然进展的前列腺癌,把这个阶段称之为去势抵抗前列腺癌(castration resistant prostate cancer,CRPC)。染料木黄酮(genistein, GEN)是大豆异黄酮中的一种生物学功能成分。研究证明大豆异黄酮可防治与激素有关的癌症,其具有抗前列腺癌的活性,主要表现在抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成和侵袭以及与抗癌药物的协同,对前列腺癌细胞产生拮抗作用^[2-3]。阿比特龙(abiraterone, ABT)可抑制细胞色素 P450c17(CYP17A1),从而降低 CRPC 患者的雄激素水平、前列腺特异性抗原(prostate-specific antigen, PSA)水平,发挥抗肿瘤作用^[4]。目前通过体外实验利用 GEN 增强 ABT 抗 CRPC 作用效果的相关研究甚少。该研究旨在探讨 GEN 可在体外增强 ABT 对 CRPC 细胞的抑制作用,并初步探讨其作用机制。该研究探索了植物化学物质辅助治疗 CRPC 的新方法,从膳食联合用药的角度为防治肿瘤提供了新思路,具有较大的生物医学意义。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 CRPC 细胞株 22RV1(中国科学院上海细胞库),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天),ELISA 试剂盒(中国 Elabscience),GEN 和 DMSO(美国 Sigma),ABT(中国 MCE),无酚红 RPMI-1640 培养液和无酚红 DMEM 高糖培养液(以色列 Biological Industries),胎牛血清(美国 Gibco),蛋白酶抑制剂混合物(中国凯基),Western blot 及 IP 细胞裂解液(中国碧云天),Western blot 化学发光 HRP 底物(美国 Millipore),Anti-PSA(美国 Santa Cruz),增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA),AKR1C3 单抗, Anti-CYP17A1 及 Anti-Ki67(美国 Abcam),Anti- β -actin 和 Anti-GAPDH(中国中杉金桥)。

2021-02-06 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目青年科学基金(编号:81402678);四川省科技计划项目应用基础研究(编号:2018JY0508);四川省教育厅自然科学基金(编号:18ZA0145);国家级大学生创新创业训练计划项目实验项目(编号:201713705031、201813705012)

作者单位:成都医学院公共卫生学院,成都 610500

作者简介:伏天雨,女,硕士研究生;

朱彦锋,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:cmc_zhuyanfeng@163.com

1.2 细胞培养 将22RV1用含10%胎牛血清的培养基,置细胞培养箱培养,培养环境为37℃、5% CO₂,传代至所需细胞量备用,选对数生长期细胞进行实验。

1.3 细胞增殖实验 将对数期细胞用胰酶消化,制成细胞悬液。稀释至 5×10^3 个/ml细胞,细胞按5000个/孔的密度接种于96孔板。37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下种板24 h。加入终浓度为0.0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μmol/L的ABT在对应孔,设5个复孔,培养24、48、72 h。配置终浓度为0.0、12.5、25.0、50.0、100.0 μmol/L的GEN,加入对应孔,培养48 h。用40 μmol/L ABT与不同剂量的GEN混合,同样配制培养基,终浓度分别为0、ABT 40 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L,加入对应孔,培育24 h。最终每孔加入100 μl MTT 孵育4 h,再加入150 μl DMSO,用酶标仪检测490 nm处的吸光度。细胞活力 = [(实验孔吸光度 - 空白孔吸光度) / (对照孔吸光度 - 空白孔吸光度)] × 100%。

1.4 免疫细胞化学实验 将22RV1细胞接种于6孔板,每孔20000个。在37℃、5% CO₂及饱和湿度条件下培养24 h。加入100 μl GEN与ABT的混合培养液,终浓度分别为0、ABT 40 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L,并于37℃、5% CO₂培养箱培养48 h,体积分数4%多聚甲醛固定,0.5% Triton-100通透,5% BSA常温下封闭1 h。孵育抗体兔抗人Ki-67单克隆抗体,并于4℃孵箱过夜。在常温下避光孵育1 h二抗山羊抗兔IgG,用DAPI复染,在荧光显微镜下观察并拍照。

1.5 Western blot 检测蛋白的表达 配制40 μmol/L ABT与不同剂量的GEN的混合培养基,终浓度分别为0、ABT 40 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L,在37℃培养箱中培养22RV1细胞48 h,加入预冷的PBS将处理液冲洗3次直至干净。在冰上用裂解液裂解20 min,收集细胞裂解液,7000 r/min离心15 min,用BCA法对上清液进行蛋白定量并分装保存于-70℃待用。制备SDS-PAGE凝胶,利用80 V(浓缩胶)/120 V(分离胶)电压对蛋白质进行分离,100 V电压转膜90 min。PVDF膜用TBST冲洗,用5%

脱脂牛奶封闭,室温震荡1~2 h。TBST洗膜3次,每次5 min,加入一抗(1:1000)4℃过夜。TBST洗膜3次,每次5 min,加入二抗(1:4000)室温孵育1.5 h。TBST洗膜3次,每次10 min。凝胶成像系统成像。

1.6 酶联免疫吸附试验 配制40 μmol/L ABT与不同剂量的GEN的混合培养基,终浓度分别为0、ABT 40 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L,在37℃培养箱中培养22RV1细胞48 h。加入预冷的PBS,处理液冲洗3次至干净。用适量胰酶消化细胞,离心5 min, PBS冲洗3次后重悬。经过反复冻融,提取液再离心5 min,取上清液待用。最终按照试剂盒的具体操作步骤操作,测出标准品和待测样品的吸光度值,并绘制标准曲线图,并计算出样品的浓度。

1.7 统计学处理 采用SPSS 21.0软件对数据进行单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用Dunnett-t检验,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。实验结果图片由GraphPad Prism 6软件制作并导出。

2 结果

2.1 ABT对22RV1细胞活力有抑制作用 使用MTT比色法检测不同浓度的0.0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μmol/L ABT处理22RV1细胞24、48、72 h的细胞活性。结果显示ABT对22RV1细胞增殖具有抑制作用,且剂量越高,抑制作用越强、作用时间越长,抑制作用越强,呈明显的剂量、时间依赖关系(图1)。

2.2 GEN可增强ABT对22RV1细胞的抑制作用 配制40 μmol/L ABT与不同剂量的GEN的混合培养基,终浓度分别为0、ABT 40 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L,在体外对22RV1细胞处理48 h。MTT结果显示,GEN可在体外抑制CRPC细胞的活力,并可增强ABT对22RV1细胞的抑制作用(图2)。

2.3 GEN可增强ABT对Ki-67的抑制作用 配制40 μmol/L ABT与不同剂量的GEN的混合培养基,终浓度分别为0、ABT 40 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L,处理22RV1细胞48 h。免疫细胞化学法结果显示,GEN可增强ABT对Ki-67的抑制作用(图3)。

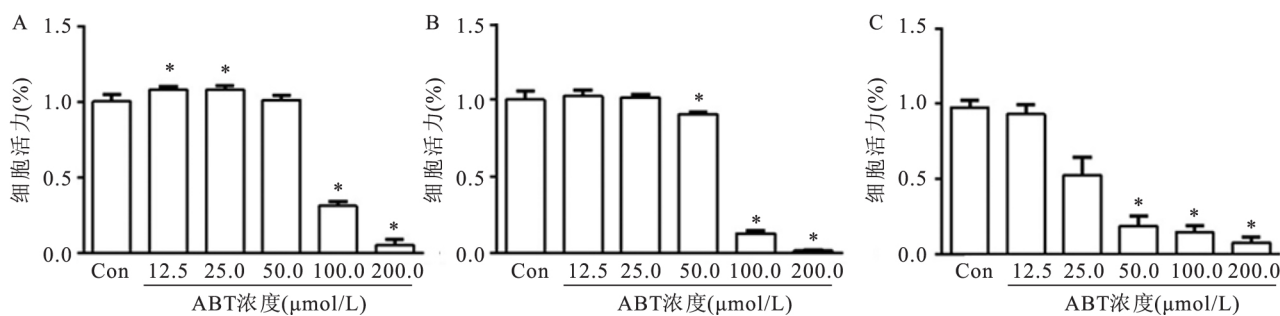


图1 ABT对22RV1细胞增殖能力的影响

A: ABT对22RV1处理24 h后增殖能力的影响; B: ABT对22RV1细胞处理48 h增殖能力的影响; C: ABT对22RV1细胞处理72 h增殖能力的影响; 与Con组比较: * $P < 0.05$

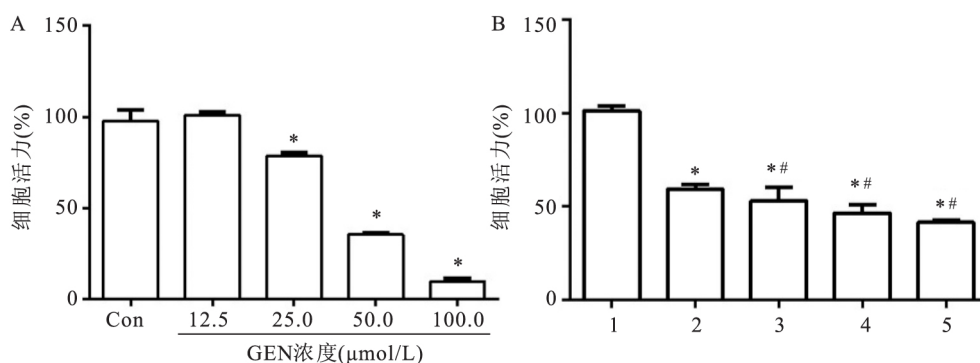


图2 GEN联合ABT对CRPC细胞活力的影响

A: GEN对22RV1细胞活力的影响; B: GEN联合ABT对22RV1细胞增殖能力的影响; 1: control组; 2: ABT 40 μmol/L; 3: ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L; 4: ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L; 5: ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L; 与control组比较: * $P < 0.05$; 与ABT组比较: # $P < 0.05$

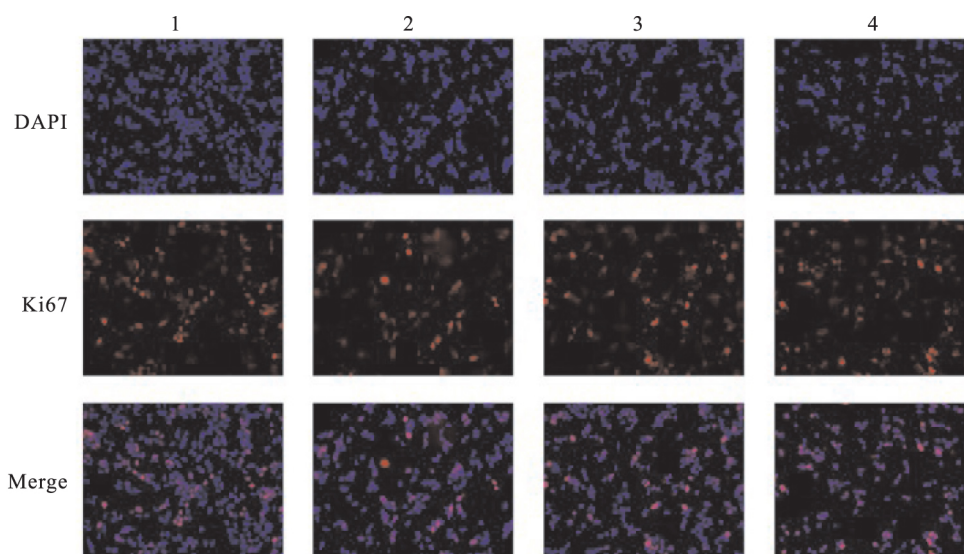


图3 GEN和ABT联合作用对22RV1细胞Ki-67表达的影响 ×200

1: control组; 2: ABT 40 μmol/L; 3: ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L; 4: ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L

2.4 GEN和ABT未能在体外显著降低22RV1细胞中的睾酮水平 配制40 μmol/L ABT与不同剂量的GEN的混合培养基,终浓度分别为0、ABT 40 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L、ABT

40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L处理22RV1细胞24 h,ELISA法检测22RV1细胞裂解液中的睾酮水平,发现睾酮水平未显著下降,差异无统计学意义(图4)。

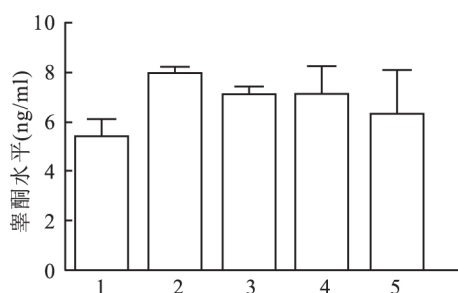


图4 GEN和ABT联合作用对22RV1细胞睾酮合成的影响

1: control 组; 2: ABT 40 μmol/L; 3: ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L; 4: ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L; 5: ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L

2.5 GEN和ABT未能显著降低CRPC细胞中CYP17A1的表达 研究中配制40 μmol/L ABT与不同剂量的GEN的混合培养基,终浓度为0、ABT 40 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L、ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L,培养22RV1细胞48 h。用Western blot法检测细胞中PCNA、PSA、CYP17A1和AKR1C3的表达。实验结果显示,GEN和ABT联合时未能降低细胞中CYP17A1的表达,但对PCNA、PSA和AKR1C3有抑制作用(图5)。

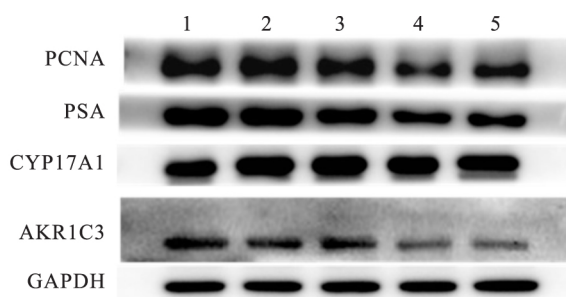


图5 GEN和ABT联合或单独处理对22RV1细胞PCNA、PSA、CYP17A1和AKR1C3表达的影响

1: control 组; 2: ABT 40 μmol/L; 3: ABT 40 μmol/L + GEN 12.5 μmol/L; 4: ABT 40 μmol/L + GEN 25.0 μmol/L; 5: ABT 40 μmol/L + GEN 50.0 μmol/L

3 讨论

临床研究证明GEN被认为是具有抗癌活性的天然药物,是抗肿瘤药物的先导植物型化合物之一^[5]。研究表明使用GEN可使22RV1细胞阻滞在G₂/M期,抑制Ki-67的表达,抑制CRPC细胞的增殖,最终达到抗前列腺癌的效果^[6]。GEN可能通过调控ER-akt、PSA、p21、Cyclin D1和CDK4的表达来抑制前列腺癌细胞的增殖,显示抗前列腺癌效

果^[7]。此外临床上已有研究针对二期双盲临床试验,证实了GEN对前列腺癌患者的安全性和有效性^[8]。临床研究的初步结果肯定了GEN作为化学预防药物的潜力,并鼓励进一步的研究。

GEN和ABT都能通过抑制前列腺癌细胞的增殖,发挥抗肿瘤效应。有研究显示,GEN可以在体外抑制雄激素细胞的增殖^[9]。Ki-67是一种反映肿瘤细胞增殖情况的核抗原^[10]。本研究采用免疫组化法检测时,发现联合用药时,ABT的浓度一定时,随着GEN的浓度增加,抗原Ki-67的表达减少,表明GEN可增强ABT的抗CRPC能力。PCNA是增殖细胞核抗原,在肿瘤细胞增殖上起关键作用,是反映肿瘤细胞增殖的良好指标。本研究中GEN可增强ABT降低PCNA的能力,说明GEN能够增强ABT抗CRPC细胞增殖。血清PSA是前列腺癌的特异性标志物,是检测和早期发现前列腺癌最重要的指标之一。与正常人比较,前列腺癌患者的PSA水平较高,测量PSA的水平有助于前列腺癌的筛选^[11]。本研究中免疫印迹实验法检测前列腺癌特异性抗原PSA的表达,发现联合用药时随GEN剂量的增加,PSA的表达逐渐减弱,GEN可增强ABT的能力。ABT是CYP17酶抑制剂,与雄激素合成限速酶CYP17不可逆结合,抑制相关酶活性,进而阻断雄激素的合成,抑制前列腺癌细胞的增殖^[12]。CYP17A1是治疗前列腺癌的重要靶点,可产生癌细胞生长所需的雄激素。ABT是CYP17A1抑制剂,它含有一种类似于内源性CYP17A1底物的甾体支架^[13]。在本研究中通过免疫印迹实验法检测CYP17A1的表达,未发现CYP17A1的表达减弱。原因可能是ABT是CYP17A1抑制剂,仅抑制CYP17A1的酶活性,使其失活导致不能进行后续反应,因而对CYP17A1的表达不会产生直接影响。AKR1C3是雄激素合成最后两步的关键酶,在CRPC中高表达。本研究发现GEN和ABT作用于22RV1细胞后,抑制AKR1C3的表达。类似有研究证明异黄酮类化合物对去势抵抗性前列腺癌靶标AKR1C3具有较强的体外抑制活性作用^[14]。另有研究发现AKR1C3可以克服ABT耐药性并提高晚期前列腺癌患者的生存率^[15]。

本研究发现,与单独使用ABT比较,GEN和ABT联合作用时更能降低PCNA、PSA、CYP17A1和AKR1C3及抗原Ki-67的表达,发挥更强的抑制作用,说明GEN能够增强ABT对CRPC细胞的抑制作用。CRPC是前列腺癌发展的后期阶段,使用内分

泌治疗是现有的主要治疗方法,如采用 GEN 联合相应药物提升治疗效果,则可为 CRPC 的临床治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] 王宁,刘硕,杨雷,等. 2018 全球癌症统计报告解读[J/CD]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, 5(1): 87-97.
- [2] Zhang Q, Feng H, Qluwakemi B, et al. Phytoestrogens and risk of prostate cancer: an updated meta-analysis of epidemiologic studies [J]. *Int J Food Sci* 2017, 68(1): 28-42.
- [3] Tuli H S, Tuorkey M J, Thakral F, et al. Molecular mechanisms of action of genistein in cancer: recent advances [J]. *Front Pharmacol* 2019, 10: 1336.
- [4] Stein M N, Patel N, Bershadskiy A, et al. Androgen synthesis inhibitors in the treatment of castration-resistant prostate cancer [J]. *Asian J Androl* 2014, 16(3): 387-400.
- [5] Shanmugam M K, Lee J H, Chai E Z P, et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds [J]. *Semin Cancer Biol* 2016, 41: 35-47.
- [6] 李飞, 朱彦峰, 陈静瑶, 等. 染料木黄酮对去势抵抗前列腺癌 22RV1 细胞增殖的影响 [J]. 郑州大学学报(医学版), 2017, 52(4): 393-8.
- [7] Kang N H, Shin H C, Oh S, et al. Soy milk digestion extract inhibits progression of prostate cancer cell growth *via* regulation of prostate cancer specific antigen and cell cycle-regulatory genes in human lncap cancer cells [J]. *Mol Med Rep* 2016, 14(2): 1809-16.
- [8] Lazarevic B, Boezelijn G, Diep L M, et al. Efficacy and safety of short-term genistein intervention in patients with localized prostate cancer prior to radical prostatectomy: a randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 clinical trial [J]. *Nutr Cancer* 2011, 63(6): 889-98.
- [9] 曹玉霖, 李飞, 赵欢, 等. 染料木黄酮通过 PI3K/AKT 途径抑制雄激素非依赖性 LNCaP 细胞 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(7): 1017-21.
- [10] 宋伟强, 李哲贤, 任志龙, 等. COX-2、Ki-67 在前列腺癌组织中的表达及其临床意义分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(9): 1060-3, 1068.
- [11] 易聪, 邓旭. 血清 PSA、雄激素受体在前列腺癌患者中的表达及意义 [J]. 中国卫生工程学, 2020, 19(2): 259-60.
- [12] 李乾坤, 姜永光. 去势抵抗前列腺癌治疗现状及研究进展 [J]. 国际泌尿系统杂志, 2020, 40(3): 553-7.
- [13] Malikova J, Brixius-Anderko S, Udhane S S, et al. Cyp17a1 inhibitor abiraterone, an anti-prostate cancer drug, also inhibits the 21-hydroxylase activity of Cyp21a2 [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 174: 192-200.
- [14] 郑雪花, 姜赞, 王小雨, 等. 黄酮类化合物对 AKR1C3 抑制作用的研究 [J]. 今日药学, 2018, 28(8): 505-9.
- [15] Lu S, Dong Z. Additive effects of a small molecular pten inhibitor pten-i1s and DNA damaging agents on growth inhibition and dna damage in prostate and lung cancer cells [J]. *PLoS One* 2019, 14(10): e0223894.

Genistein enhances the anti-castration effect of abiraterone against prostate cancer cell 22RV1

Fu Tianyu, Zhou Yuanyuan, Chen Tian, et al

(Dept of Public Health, Chengdu Medical College, Chengdu 610500)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of genistein flavone on the castrated resistance of abiraterone to prostate cancer cells. **Methods** Using CRPC cell line 22RV1 as an *in vitro* cell model, when genistein and abiraterone were used alone or in combination, MTT colorimetry and immunocytochemistry were used to detect the viability of cancer cells and the expression of antigen Ki-67 to reflect their proliferation; The expression levels of PSA, PCNA, AKR1C3 and CYP17A1 were detected by Western blot; the combined effect of genistein and abiraterone on the level of testosterone in 22RV1 cell lysate was detected by ELISA. **Results** MTT test results showed that genistein and abiraterone, when used alone or in combination, can inhibit the viability of the CRPC cell line 22RV1 *in vitro* ($P < 0.05$); compared with abiraterone alone, genistein could enhance the inhibitory effect of abiraterone on 22RV1 cells ($P < 0.05$); the results of immunocytochemical detection showed that genistein could enhance the expression of abiraterone and weaken the antigen Ki-67. However, Western blot results showed that the expression of CYP17A1 was not significantly weakened, and the expression of PSA, PCNA and AKR1C3 gradually decreased with the increase of genistein concentration. The testosterone level detected by ELISA did not decrease significantly. **Conclusion** Genistein can enhance the inhibitory effect of abiraterone on castration-resistant prostate cancer cells *in vitro* and reduce the expression of PSA, PCNA, AKR1C3 and antigen Ki-67.

Key words genistein; abiraterone; castration to resist prostate cancer