

网络出版时间: 2018-1-8 11:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.014.html>

胡桃醌通过 PI3K/AKT 途径促进 前列腺癌 LNCaP 细胞氧化应激

方芳¹, 陈爽¹, 张万生², 方青², 王立国²

摘要 目的 探讨胡桃醌对人前列腺癌 LNCaP 细胞的杀伤活性与其诱导氧化应激反应的相关性及机制。方法 采用 0、6.25、12.5、25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 胡桃醌作用前列腺癌 LNCaP 细胞, MTT 法检测不同剂量胡桃醌对 LNCaP 细胞生长抑制影响; 胡桃醌联合抗氧化剂 NAC 作用细胞后, DCFH-DA 作为荧光探针, 用荧光酶标法检测活性氧(ROS); 胡桃醌联合 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 作用细胞后, Western blot 法检测 p-AKT、AKT 和 Nrf2 蛋白表达变化。结果 与阴性对照组比较, 胡桃醌浓度在 12.5 $\mu\text{mol/L}$ 或以上显著抑制前列腺癌细胞生长($P < 0.05$, $P < 0.01$)。胡桃醌能够促进细胞 ROS 含量($P < 0.01$); 胡桃醌联合抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)导致 ROS 含量下降($P < 0.05$), 细胞存活率升高($P < 0.01$)。胡桃醌抑制 p-AKT 的表达, NAC 能够恢复胡桃醌抑制的 p-AKT 表达。胡桃醌能够抑制细胞核 Nrf2 的表达, 与 PI3K/AKT 抑制剂 LY294002 联合使用进一步抑制了 Nrf2 的表达。结论 胡桃醌能够抑制前列腺癌 LNCaP 细胞增殖, 作用的机制可能与促进 ROS 产生从而抑制 PI3K/AKT 途径, 导致 Nrf2 表达下降有密切关系。

关键词 胡桃醌; 前列腺癌; ROS; PI3K/AKT; Nrf2; 生长抑制
中图分类号 R 73-36

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0063-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.014

胡桃醌是从胡桃楸的外壳中提取的一种活性成分, 具有促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长的作用, 例如, 前列腺癌、肺癌、卵巢癌等细胞, 但具体机制不清^[1-3]。氧化应激诱导的 DNA 损伤能够加速细胞的凋亡, 具有抗肿瘤作用^[4]。该研究在体外利用胡桃醌治疗前列腺癌 LNCaP 细胞, 通过检测细胞增殖、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)及其

相关信号转导通路, 探讨胡桃醌对人前列腺癌 LNCaP 细胞的生长抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂 人前列腺癌 LNCaP 细胞购自中科院上海细胞库; 进口胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclone 公司; RPMI 1640 培养液和胡桃醌、N-乙酰半胱氨酸(NAC)购自美国 Sigma 公司; ROS 试剂盒购自南京碧云天生物科技公司; PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002、p-AKT(473)、AKT 和 Nrf2 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; β -actin 抗体和辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 人前列腺癌 LNCaP 细胞株的培养 细胞采用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养, 隔日换液, 取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 比色法检测细胞活力 取对数生长期细胞, 制备成单细胞悬液, 以 2×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔培养板中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后, 加入分别为 100、50、25、12.5 和 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 胡桃醌培养液, 不加胡桃醌为阴性对照组, 每组设 3 个复孔, 体外继续培养 24 h。酶标仪测定吸光度(A_{570})值。依下列公式计算 LNCaP 细胞的存活率: 存活率(%) = 胡桃醌组平均 A_{570} 值/阴性对照组平均 A_{570} 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 检测 ROS 活性 NAC(0.5 $\mu\text{mol/L}$)预处理细胞 60 min, 然后加入 25 $\mu\text{mol/L}$ 胡桃醌作用细胞 24 h。加入无血清 RPMI 1640 培养液稀释 2', 7'-二氯荧光乙酰乙酸盐(2', 7'-dichlorofluoresceindiacetate, DCFH-DA), 使其终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 h, PBS 洗 3 次, 酶标仪检测荧光强度。

1.2.4 Western blot 法检测 p-AKT 和 Nrf2 的表达 胡桃醌、LY294002(20 $\mu\text{mol/L}$)或胡桃醌联合 LY294002(20 $\mu\text{mol/L}$)作用细胞 24 h 后, 提取细胞总蛋白或细胞核蛋白, 蛋白定量后, 加入 2 $\times$ 上样缓冲液, 煮沸 5 min。经 10% SDS-PAGE 电泳后, 将蛋

2017-10-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81202031); 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(编号: 吉教科合字[2014]第 360 号)

作者单位: ¹ 吉林医药学院检验学院免疫技术教研室, 吉林 132013

² 吉林医药学院附属医院泌尿外科, 吉林 132013

作者简介: 方芳, 女, 博士, 副教授;

王立国, 男, 博士, 主任医师, 责任作者, E-mail: urolancet@sina.com

白转移至 PVDF 膜上;5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, TBST 洗膜,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 稀释一抗 (1:3 000),4 ℃ 过夜;TBST 洗膜后加辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000) 37 ℃ 孵育 2 h, TBST 洗膜,采用 ECL 发光液显色,β-actin 作为内参照,使用 Quantity One 软件扫描并做灰度分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胡桃醌对 LNCaP 细胞生长的影响 终浓度为 6.25、12.5、25、50 和 100 μmol/L 的胡桃醌对 LNCaP 细胞的生长活力具有抑制作用。与阴性对照组比较,胡桃醌浓度 12.5 μmol/L 以上,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 1。

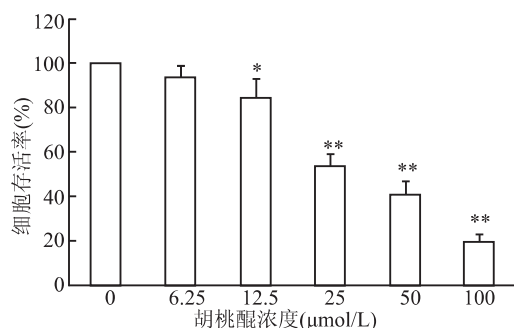


图1 不同浓度胡桃醌对 LNCaP 细胞生长的影响

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 胡桃醌对 ROS 水平和细胞生长的影响 与阴性对照组比较,终浓度为 25 μmol/L 的胡桃醌作用 LNCaP 细胞,导致细胞 ROS 水平显著增高 ($P < 0.01$)。与胡桃醌组比较,胡桃醌联合抗氧化剂 NAC 可降低 ROS 水平 ($P < 0.05$),见图 2;与阴性对照组比较,胡桃醌抑制 LNCaP 细胞生长 ($P < 0.01$)。与胡桃醌组比较,胡桃醌 + NAC 组细胞存活率增高 ($P < 0.01$),见图 3。

2.3 胡桃醌对 p-AKT、AKT 和 Nrf2 蛋白表达的影响 与阴性对照组比较,胡桃醌组 p-AKT/AKT 蛋白表达比例下降 ($P < 0.01$);与胡桃醌组比较,胡桃醌与 NAC 联合使用导致 p-AKT/AKT 蛋白表达比例升高 ($P < 0.05$),见图 4。与阴性对照组比较,胡桃醌能够抑制 Nrf2 的表达,胡桃醌和 LY294002 联合使用进一步抑制了 Nrf2 的表达,见图 5。

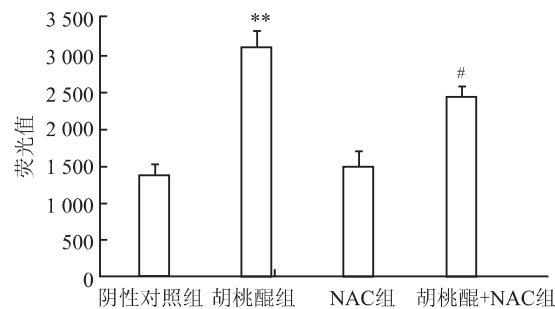


图2 胡桃醌对 LNCaP 细胞的 ROS 作用

与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$; 与胡桃醌组比较: # $P < 0.05$

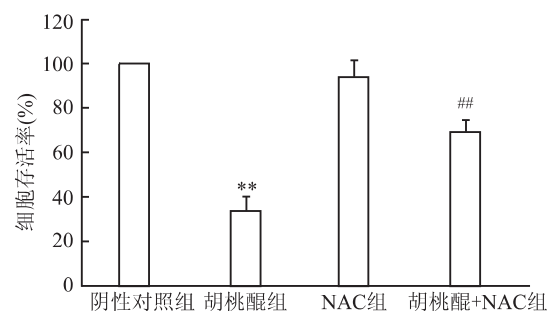


图3 NAC 拮抗胡桃醌抑制 LNCaP 细胞生长作用

与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$; 与胡桃醌组比较: ## $P < 0.01$

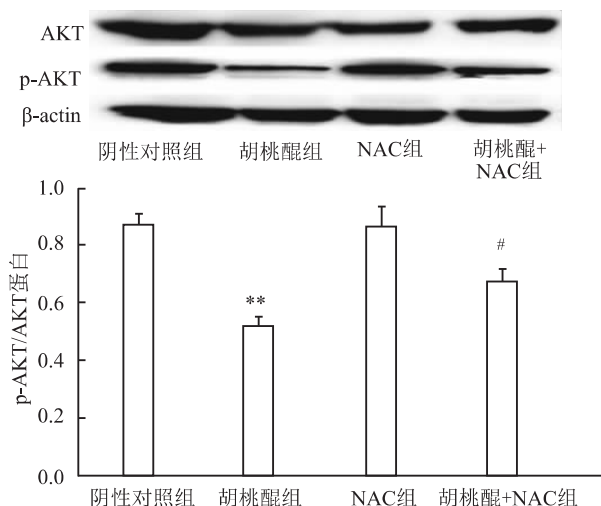


图4 Western blot 检测 LNCaP 细胞中 p-AKT 和 AKT 蛋白表达

与阴性对照组比较: ** $P < 0.01$; 与胡桃醌组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

近年来我国前列腺癌的发病率有明显的上升趋势,一般采用激素、放疗、化疗等方法治疗。但有些患者对化疗药物易产生耐药^[5]。我国的药用植物资源丰富,已发现多种植物成分具有抗癌作用。人们很早就发现核桃楸树皮及果皮具有抗肿瘤、抗炎和杀虫的作用,在中国许多治疗癌症的验方中都含

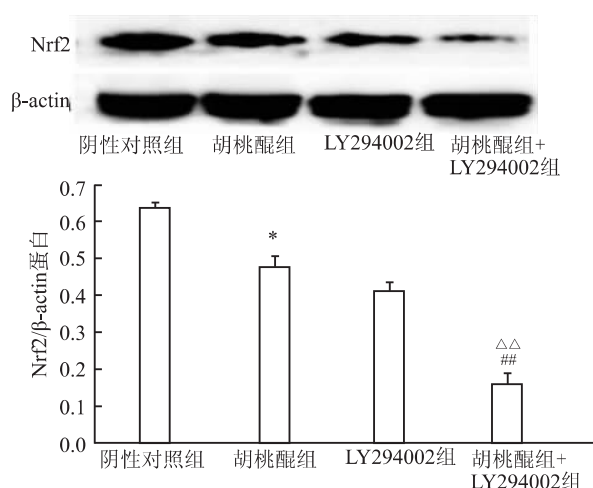


图5 Western blot 检测 LNCaP 细胞中 Nrf2 蛋白表达

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$; 与胡桃醌比较: ## $P < 0.01$; 与 LY294002 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

有核桃楸成分。研究^[6]显示,核桃楸中具有抗肿瘤、抗炎及杀虫作用的有效成分是胡桃醌。课题组前期研究^[1]结果表明,胡桃醌具有抑制前列腺癌细胞增殖和促进前列腺癌细胞凋亡的作用,但机制不清。

ROS 是决定细胞生存状态的重要物质。适当的 ROS 可以促进肿瘤细胞的存活,但如果细胞过度累积 ROS 是导致细胞损伤直至死亡的重要因素^[7]。本研究结果表明,胡桃醌对 LNCaP 细胞具有抑制作用,并且呈剂量依赖关系;且经胡桃醌刺激 24 h 后, LNCaP 细胞内 ROS 水平显著升高,应用 ROS 抑制剂 NAC 能拮抗 ROS 水平及胡桃醌抑制细胞生长的作用。

PI3K/AKT 信号途径在肿瘤细胞中起着重要的调节作用,具有促进肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、血管生成的作用。本研究表明,胡桃醌作用细胞后能够抑制 p-AKT 的表达。在胡桃醌和 NAC 联合处理 LNCaP 细胞后, p-AKT 的表达水平增加。Nrf2 是维护氧化还原平衡的关键调节因子,尤其是在持续激

活 PI3K-AKT 信号的条件下。活化的 PI3K-AKT 通路增强 Nrf2 在核内的积累,使 Nrf2 促进具有抗氧化、抗炎、抗凋亡基因的表达^[8-9]。本研究结果表明, PI3K/AKT 途径抑制剂 LY294002 能够降低 Nrf2 的表达,胡桃醌与 LY294002 联合使用进一步抑制了 Nrf2 的表达。

综上所述,笔者推测胡桃醌能够抑制前列腺癌细胞的增殖,具体机制可能与其促进前列腺癌细胞内 ROS 异常积累,抑制 PI3K/AKT 途径,导致 Nrf2 活性下降有密切关系。

参考文献

- [1] 方芳,王立国,张巍,等. 胡桃醌对人前列腺癌 PC-3 细胞抑制作用[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(10): 1458-60.
- [2] 刘元银,雷淑慧,杨燕,等. 胡桃醌通过降低 AKT 活性抑制肺癌 A549 细胞增殖[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(8): 1032-7.
- [3] Fang F, Qin Y, Qi L, et al. Juglone exerts antitumor effect in ovarian cancer cells[J]. Iran Basic Med Sci, 2015, 18(6): 544-8.
- [4] Lancelot S, McLean, Cheri N, et al. Ary hydrocarbon receptor ligand 5F 203 induces oxidative stress that triggers DNA damage in human breast cancer cells[J]. Chem Res Toxicol, 2015, 28(5): 855-71.
- [5] Semenas J, Allegrucci C, Boorjian S A, et al. Overcoming drug resistance and treating advanced prostate cancer[J]. Curr Drug Targets, 2012, 13(10): 1308-23.
- [6] Bertin C, Yang X, Weson L A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere[J]. Plant Soil, 2003, 256: 67-83.
- [7] Maillet A, Yadav S, Loo Y L, et al. A novel Osmium-based compound targets the mitochondria and triggers ROS-dependent apoptosis in colon carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(6): e653.
- [8] Mitsuishi Y, Taquchi K, Kawatani Y, et al. Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming[J]. Cancer Cell, 2012, 22(1): 66-79.
- [9] Niture S K, Khatri R, Jaiswal A K. Regulation of Nrf2-an update[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 66(8): 36-44.

Juglone promote oxidative stress through PI3K/AKT pathway in prostate cancer cell

Fang Fang¹, Chen Shuang¹, Zhang Wansheng², et al

(¹Dept of Immunology Technology, Jilin Medical College, Jilin 132013;

²Dept of Urinary Surgery, The Affiliated Hospital of Jilin Medical College, Jilin 132013)

Abstract Objective To investigate the killing activity of Juglone in human prostate cancer LNCaP cell and the

USPIO 增强 MRI 在兔动脉粥样硬化斑块模型的观察研究

张 勇¹, 李小鹏¹, 徐智超¹, 朱华庆², 胡孝朋³

摘要 目的 探讨单纯高脂饮食建立兔动脉粥样硬化模型的可行性以及超小顺磁性氧化铁(USPIO)增强磁共振成像(MRI)在兔动脉粥样硬化(AS)斑块研究中的价值。方法 挑选30只健康的雄性新西兰大白兔作为研究对象,使用随机分组法分为两组,其中实验组20只,对照组10只。实验组通过单纯高脂饲料饲养的方法建立兔AS模型,对照组不作其他干预。观察USPIO增强前后动脉斑块的MRI表现,与病理结果进行比较和分析。结果 实验组成功建立兔AS模型,其中14例形成AS斑块,USPIO增强T2WI序列表现为斑块中央信号减低,血管壁信噪比值在96h降低最低,较增强前信号差异有统计学意义($P < 0.05$),而对照组在增强前后管壁信号无变化。USPIO增强PJN 2D-TOF序列表现为管壁点状充盈缺损。病理检查显示USPIO颗粒主要沉积在内膜下。结论 单纯高脂饮食可以建立兔AS模型,USPIO增强MRI能反映出兔AS斑块情况,有助于对AS病变诊断作出评估。

关键词 动脉粥样硬化; 磁共振成像; 超微超顺磁性氧化铁;

动物模型

中图分类号 R 972.6; R 814.46; R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0066-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.015

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种由动脉壁脂质沉积引起的慢性血管病,而巨噬细胞在AS的发病机制中发挥着核心作用,其积极参与动脉壁的低密度脂蛋白的摄取和脂质的积累,同时抗炎的巨噬细胞也与斑块的稳定性相关^[1]。发现和分析AS斑块的成分,评估其易损性对于心脑血管事件的诊治有重要意义。目前对易损斑块缺乏有效的、可重复性检测技术,因而限制了对于斑块特征性有价值的前瞻性研究的开展。而超小顺磁性氧化铁(ultrasmall superparamagnetic iron oxide, USPIO)是一种新的磁共振增强成像剂,本身具有被巨噬细胞吞噬的特性,使得USPIO增强磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)可用于显示AS斑块内的巨噬细胞,从而对AS早期斑块情况作出诊断及评估。该研究拟通过建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型,同时采用USPIO增强MRI检测兔AS斑块的形态和成分,评估USPIO在AS斑块检测中的可行性,旨在为动脉粥样硬化易损斑块的早期发现、诊断提供相关理

2017-09-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81570419); 2015年度安徽医科大学临床科学研究项目(编号:2015xkj096)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 老年心内科、³ 磁共振室, 合肥 230022

² 安徽医科大学生化教研室, 合肥 230032

作者简介: 张 勇,男,副教授,责任作者, E-mail: 8338740@qq.com

correlation between oxidative stress and its mechanism. **Methods** LNCaP cells were treated with 0, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ Juglone. MTT assay was used to determine the growth of LNCaP cells treated with different concentrations of Juglone. Reactive oxygen species (ROS) was detected using fluorescence microplate reader with 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA) as fluorescent probe after treating LNCaP cells with Juglone and NAC. The expression levels of p-AKT, AKT and Nrf2 proteins were examined in LNCaP cells that were cultured with Juglone and LY294002 using Western blot. **Results** Compared with the control group, the concentration of Juglone in more than 12.5 $\mu\text{mol/L}$ could significantly inhibit the growth of LNCaP cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The ROS levels were increased in Juglone group compared with control group ($P < 0.01$). Compared with the Juglone group, ROS levels was inhibited ($P < 0.05$) and increased the cell proliferation rates by combination use with NAC ($P < 0.01$). Juglone inhibited expression of p-AKT and addition of NAC resorted the Juglone inhibition of p-AKT expression. Nrf2 expression were down-regulated in cell nucleus treated with Juglone and then inhibition of PI3K/AKT with LY294002 augmented Juglone-mediated function. **Conclusion** Juglone could significantly inhibit the growth of LNCaP cells and the effect may be related to promoted ROS levels through PI3K/AKT pathway and then inhibit the Nrf2 expression.

Key words Juglone; prostate cancer; reactive oxygen species; PI3K/AKT; Nrf2; growth inhibition