

◇ 基础医学研究 ◇

Propachlor 对前列腺癌细胞 PC3 及 LNCaP 的作用及其可能机制

邵 胜^{1,2}, 徐凌凡¹, 徐 明¹, 张阳阳¹, 张 力^{1,2}, 梁朝朝^{1,2}

摘要 目的 探讨化合物 Propachlor 对前列腺癌的作用及可能的分子机制。方法 用梯度浓度的化合物 Propachlor 处理前列腺癌 PC3 及 LNCaP 细胞株; 使用 CellTiter 方法检测肿瘤细胞的存活率, Western blot 法检测细胞自噬蛋白 LC3-II 的转变情况, 荧光显微镜检测细胞中诱导 LC3 质粒标记绿色荧光蛋白(GFP-LC3) 的表达情况。结果 Propachlor 可以抑制前列腺癌 PC3 及 LNCaP 细胞的存活率, 同时剂量越大肿瘤细胞存活率抑制越明显; Propachlor 可以诱导 PC3 及 LNCaP 肿瘤细胞自噬蛋白 LC3-II 及自噬小体 GFP-LC3 的表达, 诱导自噬效应同 Propachlor 的剂量正相关。结论 化合物 Propachlor 具有抗前列腺癌的生物学效应, 同时该抗肿瘤效应是通过激活细胞内自噬效应产生的。

关键词 前列腺癌; Propachlor; 自噬

中图分类号 R 737.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1045-04

前列腺癌是老年男性一种常见的泌尿外科疾病, 近年来在我国前列腺癌的发病率呈上升趋势。同时有相当一部分前列腺癌发现时已经为晚期, 对现有的外科及内分泌治疗效果均不佳; 因此, 研究开发出新的晚期前列腺癌治疗方法十分必要^[1]。通过高通量筛查的方法, 发现一种新的化合物 Propachlor, 具有抗前列腺癌的生物学效应, 分子式见图 1。自噬是细胞体内一种自身蛋白质的降解过程, 相关的研究^[2]表明诱导肿瘤细胞体内的自噬效应具有抗肿瘤的生物学效应。该研究使用化合物 Propachlor 处理前列腺癌 PC3 及 LNCaP 细胞, 观察化合物 Propachlor 是否通过激活细胞内自噬效应起到抗前列腺癌的生物学效应, 为前列腺癌的治疗提供新的思路与策略。

2015-04-22 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1308085QH132); 国家自然科学基金青年科学基金培养计划(编号: 2012KJ13); 国家临床重点专科建设项目基金(编号: 2100299); 院内博士科研基金(编号: 20120119)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科, 合肥 230022

² 安徽医科大学泌尿外科研究所, 合肥 230032

作者简介: 邵 胜, 男, 医师, 博士;

梁朝朝, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: Liang_chaozhao@163.com

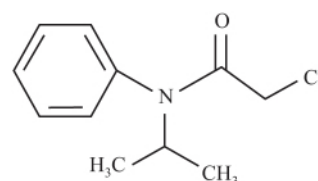


图 1 化合物 Propachlor 的化学结构式

1 材料与方法

1.1 主要实验材料 前列腺癌 LNCaP 细胞购自美国 ATCC 公司; 前列腺癌 PC3 细胞由美国加州大学洛杉矶分校 Jiaoti Huang 教授提供^[3]; 化合物 Propachlor 购自美国 Sigma 公司; CellTiter 购自美国 Promega 公司; LC3 质粒标记绿色荧光蛋白(green-fluorescent-LC3, GFP-LC3) 转染质粒、Lipofectamine 2000 转染试剂购自美国 Invitrogen 公司; 兔抗 LC3 多克隆抗体购自美国 GenScript 公司; 鼠抗 β -actin 抗体、ECL 试剂盒及细胞培养试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞存活率及生长曲线 前列腺癌 PC3 及 LNCaP 细胞分别在含有 5% 胎牛血清的 DMEM 及 RPMI 培养基, 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养, 后使用梯度浓度剂量的化合物 Propachlor(0、2.5、5、10 μ mol/L) 处理 LNCaP 及 PC3 细胞株 24 h, 使用 CellTiter 试剂盒裂解细胞测定细胞 ATP, 检测细胞的相对存活率。后再次使用梯度浓度剂量的化合物 Propachlor(0、2.5、5、10 μ mol/L) 处理 LNCaP 及 PC3 细胞株 1、2、3、4 d, 使用 CellTiter 的方法测定肿瘤细胞的生长曲线。

1.2.2 Western blot 检测化合物 Propachlor 处理后肿瘤细胞 LC3 表达 分别使用梯度浓度剂量的化合物 Propachlor(0、2.5、5、10 μ mol/L) 处理培养后的 LNCaP 及 PC3 细胞株 24 h, 使用细胞裂解液(20 mol/L KCl, 150 mol/L NaCl, 1% NP-40, 50 mol/L NaF, 50 mol/L TrisHCl, pH = 7.5, 1 mol/L DTT, 1 mol/L EGTA, 1 $\times$ Protease Inhibitor, 10% Glycerol) 在冰上裂解细胞 5 min, 4 °C、1 500 r/min 离心 15

min, 使用 Bradford Assay 试剂盒对裂解液上清液中蛋白质浓度进行相关测定。等量蛋白的裂解液上样在 15% SDS-PAGE 凝胶, 电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上; 使用脱脂牛奶对 PVDF 膜封闭 1 h, LC3 一抗将封闭的 PVDF 膜进行孵育过夜, PBS 洗涤 30 min, 二抗孵育 30 min, PBS 洗涤约 30 min, 采用 ECL 试剂盒检测 LC3 蛋白质的表达。

1.2.3 免疫荧光检测细胞中自噬小体的表达 肿瘤细胞使用 Lipofectamine 2000 质粒转染试剂转染, 24 h 后更换培养基。分别使用梯度浓度剂量的化合物 Propachlor (0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 处理转染后的 LNCaP 及 PC3 细胞株 24 h。使用 4% 多聚甲醛固定细胞约 30 min, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 再用 DAPI 染色 15 min, 荧光显微镜下观察自噬小体的表达情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 组间比较采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 化合物 Propachlor 抑制前列腺癌细胞生长

使用梯度浓度剂量的化合物 Propachlor (0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 处理培养后的前列腺癌 LNCaP 及 PC3 细胞株 24 h, 发现随着 Propachlor 浓度的增大肿瘤细胞的存活率被抑制的越多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 使用梯度浓度剂量化合物处理前列腺癌 PC3 及 LNCaP 细胞 1、2、3、4 d 后, 肿瘤细胞的生长

曲线进一步表明化合物 Propachlor 可以明显抑制肿瘤细胞的生长, 且随着 Propachlor 剂量的增加, 肿瘤细胞的生长抑制越显著, 见图 2。

2.2 化合物 Propachlor 可以诱导肿瘤细胞自噬蛋白 LC3 的表达 随着浓度的增加肿瘤细胞中 LC3-I 型分子向 LC3-II 型分子转变的趋势越明显, 表明化合物 Propachlor 可以诱导前列腺肿瘤细胞 PC3、LNCaP 的自噬效应, 同时随着 Propachlor 剂量的增加诱导自噬的效应越明显, 见图 3。

2.3 化合物 Propachlor 可以诱导肿瘤细胞自噬小体 GFP-LC3 dots 的表达是自噬小体的一种结构, 在荧光显微镜下一般分布在细胞膜周围呈戒指环样结构, 也可呈多聚点状分布。当前列腺癌细胞 PC3 及 LNCaP 接受化合物 Propachlor 处理后可以诱导 GFP-LC3 的表达; 同时随着 Propachlor 浓度的增加, 诱导表达的 GFP-LC3 分子越多, 表明高剂量的化合物浓度可以诱导较强的自噬效应, 见图 4。

3 讨论

前列腺癌是欧美男性一种常见的恶性肿瘤, 近年来发病率在我国呈上升趋势^[1]。其中有一部分前列腺癌患者发现时已为晚期前列腺癌, 已经失去手术时机; 同时绝大多数前列腺癌患者对目前的内分泌治疗及新型分子药物的治疗均会出现不同程度的耐受, 最终会转变为激素抵抗性前列腺癌 (castra-

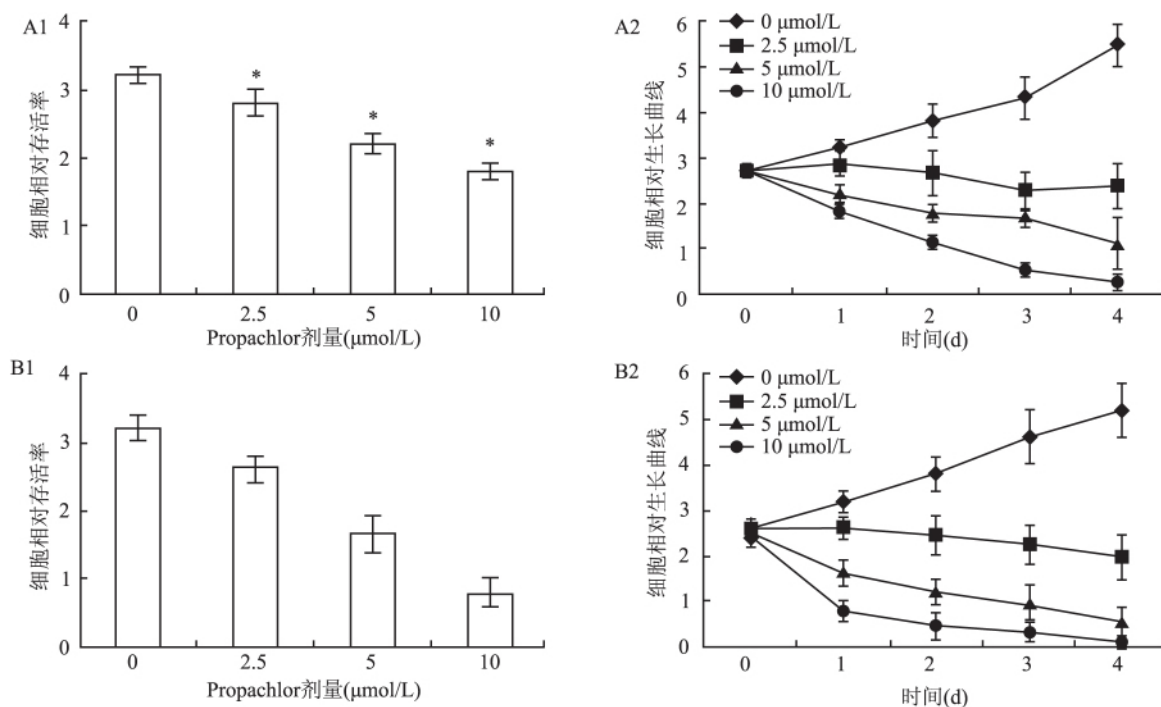


图2 前列腺癌 PC3 及 LNCaP 细胞经梯度浓度 Propachlor 处理后的相对存活率及相对生长曲线

A: PC3; B: LNCaP; 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 比较: * $P < 0.05$

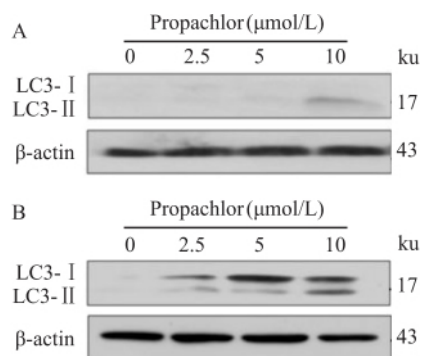


图3 Western blot 检测自噬蛋白 LC3-II 的表达

A: LNCaP; B: PC3

tion resistant prostate cancer, CRPC) [2,4-7]。因此,十分有必要发现新型的化合物去治疗前列腺癌,尤其是晚期前列腺癌 CRPC。

通过高通量筛查的实验方法发现一种新的化合物 Propachlor 具有较强的抗前列腺癌的生物学效应,可以明显抑制前列腺癌细胞 PC3、LNCaP 的存活率;对肿瘤细胞的生长曲线也可以明显抑制。进一步研究表明 Propachlor 对前列腺癌细胞生长的抑制是通过诱导了肿瘤细胞体内的自噬效应完成的。自噬发生过程主要是吞噬需要降解的细胞器、蛋白质等形成自噬体,并与内体形成所谓的自噬内体,最后与溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物,以实现细胞稳态和细胞器的更新 [6-7]。同时细胞体内的自噬效应同细胞内磷脂酰肌醇激酶-蛋白激酶 A-雷帕霉素 (PI3K-Akt-mTOR) 下游等多条信号转导通路的调节有着密切的相关性;有研究表明诱导自噬可以起到抗肿瘤的作用,亦有相关的研究表明抑制自噬也可以起到抑制肿瘤的生物学

效应;认为自噬是在肿瘤细胞生长的调控中起到双刃剑的作用 [8-14]。目前,已有研究 [8] 表明多种化合物均具有不同程度诱导、抑制细胞自噬的作用。蛋白 LC3 为自噬小体形成过程中一种重要的蛋白分子,其生物学形式具有 LC3-I 及 LC3-II 两种形式,LC3-II 型蛋白具有较强的生物学活性;目前普遍认为在自噬的形成过程中普遍存在着 LC3-I 型分子向 LC3-II 型分子的转变,因此 LC3-II 与 LC3-I 分子之间的比例与细胞体内自噬诱导的程度呈正相关性。

使用梯度浓度剂量的化合物 Propachlor (0、2.5、5、10 μmol/L) 处理培养后的前列腺癌 LNCaP 及 PC3 细胞株 24 h,在 PC3 及 LNCaP 细胞中均发现 LC3-I 型蛋白向 LC3-II 型蛋白的转变,同时随着化合物剂量的增加,LC3-I 型向 LC3-II 转变的趋势越明显,表明化合物 Propachlor 可以诱导自噬效应,自噬的诱导同化合物的浓度剂量呈正相关性。化合物均存在着相关的细胞毒性效应并且细胞毒性效应与其剂量呈正相关性,因此对化合物 Propachlor 诱导肿瘤细胞自噬的生物学效应仍应进一步评价其对细胞的细胞毒性效应。当细胞体内诱导自噬后自噬体形成最终会和溶酶体相结合形成自噬溶酶体,自噬溶酶体可聚集形成点状结构;带有 GFP 标记的 LC3 蛋白分子在荧光显微镜下即可表现出点状结构 [8],进一步从形态学角度证明化合物 Propachlor 可以诱导前列腺癌 PC3 及 LNCaP 细胞的自噬效应,同时诱导的自噬效应同化合物的浓度呈正相关性。前列腺癌为前列腺恶性肿瘤中最为常见的一种病理学类型,LNCaP 细胞为一种腺癌细胞可以代表临床上绝大多数前列腺恶性肿瘤的生物学性状;因此可以进

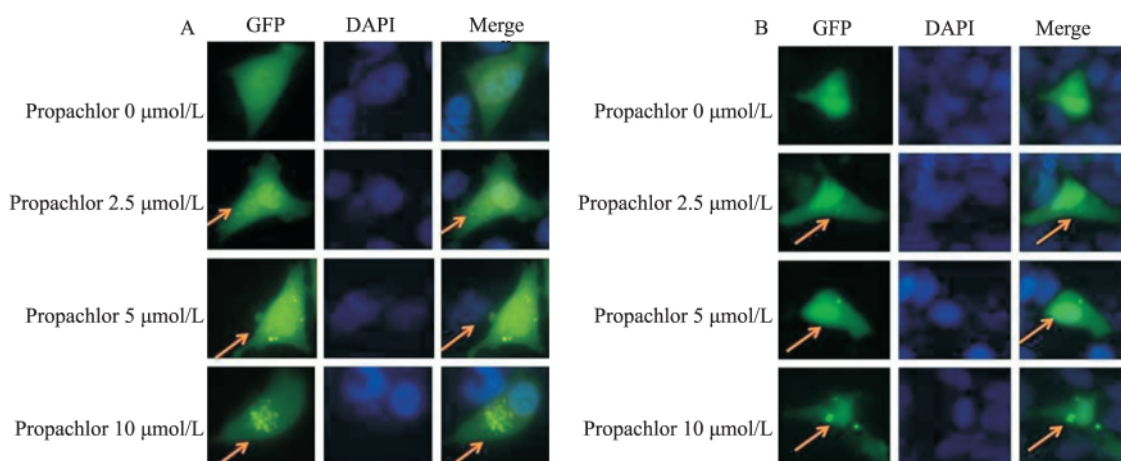


图4 荧光显微镜检测自噬小体 GFP-LC3 dots 的表达 ×400

A: LNCaP; B: PC3

一步使用肿瘤患者的前列腺癌细胞株去检测化合物 Propachlor 抗前列腺癌生物学效应及诱导自噬情况; 临床上有相当一部分前列腺癌为 CRPC 及对晚期的内分泌治疗均不佳, 有相关研究^[3] 表明前列腺癌 PC3 细胞具备前列腺小细胞癌的生物学特性, 因此化合物 Propachlor 对前列腺小细胞癌也可存在通过诱导自噬抗肿瘤生长的生物学效应。可以进一步建立前列腺癌小鼠动物模型, 在前列腺癌患者的细胞中检测化合物 Propachlor 抗肿瘤及诱导自噬的生物学效应, 为前列腺癌的治疗提供新的策略与新思路。

参考文献

- [1] Ryan C J, Smith M R, de Bono J S, et al. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(2): 138–48.
- [2] Loblaw D A, Walker-Dilks C, Winquist E, et al. Systemic therapy in men with metastatic castration-resistant prostate cancer: a systematic review [J]. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2013, 25(7): 406–30.
- [3] Tai S, Sun Y, Squires J M, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma [J]. *Prostate*, 2011, 71(15): 1668–79.
- [4] Xu J, Mo Z, Ye D, et al. Genome-wide association study in Chinese men identifies two new prostate cancer risk loci at 9q31.2 and 19q13.4 [J]. *Nat Genet*, 2012, 44(11): 1231–5.
- [5] Scher H I, Fizazi K, Saad F, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy [J]. *N Engl J Med*, 2012, 367(13): 1187–97.
- [6] Lian J, Wu X, He F, et al. A natural BH3 mimetic induces autophagy in apoptosis-resistant prostate cancer *via* modulating Bcl-2–Beclin1 interaction at endoplasmic reticulum [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(1): 60–71.
- [7] de Bono J S, Logothetis C J, Molina A, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(21): 1995–2005.
- [8] Kaini R R, Sillerud L O, Zhaorigetu S, et al. Autophagy regulates lipolysis and cell survival through lipid droplet degradation in androgen-sensitive prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2012, 72(13): 1412–22.
- [9] Turner L S, Cheng J C, Beckham T H, et al. Autophagy is increased in prostate cancer cells overexpressing acid ceramidase and enhances resistance to C6 ceramide [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2011, 14(1): 30–7.
- [10] Lozy F, Karantz V. Autophagy and cancer cell metabolism [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 23(4): 395–401.
- [11] Bhutia S K, Das S K, Azab B, et al. Autophagy switches to apoptosis in prostate cancer cells infected with melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 (mda-7/IL-24) [J]. *Autophagy*, 2011, 7(9): 1076–7.
- [12] Turner L S, Cheng J C, Beckham T H, et al. Autophagy is increased in prostate cancer cells overexpressing acid ceramidase and enhances resistance to C(6) ceramide [J]. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2011, 14(1): 30–7.
- [13] Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress [J]. *Autophagy*, 2007, 3(1): 28–31.
- [14] Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. *Science*, 2004, 306(5698): 990–5.

The function and possible mechanism of Propachlor on anti-prostate cancer LNCaP and PC3 cells

Tai Sheng^{1,2}, Xu Lingfan¹, Xu Ming¹, et al

(¹Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²The Urological Institute of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract *Objective* To explore the mechanism of Propachlor anti-prostate cancer. *Methods* The LNCaP and PC3 cells were treated with Propachlor with the gradient concentration. The CellTiter was performed to test the cell variability, and the western blot was also performed to detect the LC3–II conversion. The GFP-LC3 was observed under the fluorescence microscope. *Results* The PC3 and LNCaP cells variability was inhibited with the Propachlor, and little cell variability was linked with high concentration Propachlor. The Propachlor might induce the PC3 and LNCaP cells autophagy with LC3–II conversion and GFP-LC3 dots increase, which was also linked with high concentration Propachlor. *Conclusion* The compound Propachlor may be anti-prostate cancer *via* induction of autophagy among prostate cancer cells.

Key words prostate cancer; Propachlor; autophagy