

· 论 著 ·

维生素 E 琥珀酸酯对前列腺癌 PC-3 细胞株的生长抑制和诱导凋亡作用

虞力航, 杨波, 王林辉, 孙颖浩*

(第二军医大学长海医院泌尿外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**探讨维生素 E 琥珀酸酯(vitamin E succinate, VES)对于激素非依赖前列腺癌 PC-3 细胞株的生长抑制和诱导凋亡作用。**方法:**将 VES 溶解于无水乙醇,配制成 VES 溶液。取对数生长期的 PC-3 细胞,分别加入 25、50、75、100、125 mg/L VES 溶液,对照组加入 1.25% 浓度乙醇。培养 24、48、72 h 后,采用 MTT 法分析细胞的活力指数和抑制率,采用流式细胞术检测 PC-3 细胞的细胞凋亡率。**结果:**实验组的细胞活力明显低于对照组($P < 0.05$),且与 VES 的作用浓度和作用时间呈负相关,而对对照组的细胞活力与时间呈正相关。实验组的凋亡率较对照组有明显的升高,且与 VES 的浓度和作用时间呈正相关。并且,经 VES 作用 48 h 后,75 mg/L 的 VES 浓度可以对 PC-3 细胞起到一个最佳的诱导凋亡作用,造成 80% 以上的 PC-3 细胞凋亡。**结论:**VES 具有抑制 PC-3 细胞增殖及促进其凋亡的作用。提示其对于前列腺癌的化学预防和杀伤作用具有临床应用前景。

[关键词] 维生素 E 琥珀酸酯;前列腺肿瘤;细胞凋亡**[中图分类号]** R 737.25**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2007)09-0956-04

Vitamin E Succinate inhibits growth and induces apoptosis of prostate cancer cell line PC-3

YU Li-hang, YANG Bo, WANG Lin-hui, SUN Ying-hao* (Department of Urology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the inhibitory and apoptosis-inducing effect of vitamin E succinate (VES) on androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 *in vitro*. **Methods:** VES was dissolved with ethanol to obtain VES solution. PC-3 cells of logarithmic growth phase were treated with various concentrations of VES solution (25, 50, 75, 100, and 125 mg/L); cells in control group were treated with 1.25% ethanol. MTT method was used to measure the viability and inhibitory rate of cells in each group 24h, 48h and 72h after VES treatment; flow cytometry was employed to determine the apoptosis rate of the PC-3 cells. **Results:** The viability of cells in the experimental groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The viability of cells in the experimental groups was negatively correlated with the concentration and exposure period of VES solution; the viability of cells in the control group was positively correlated with the exposure period of VES solution. The apoptosis rate of cells in the experimental groups was much higher than that in the control group; the rate in the experimental group was positively correlated with the concentration and exposure period of VES solution. The optimal induction of apoptosis was achieved after 48 h exposure to 75 mg/L VES solution, with a apoptosis rate above 80%. **Conclusion:** VES can inhibit the proliferation of PC-3 cells and can induce apoptosis of them, which casts new lights on prevention and treatment of prostate cancer.

[KEY WORDS] vitamin E succinate; prostatic neoplasms; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(9):956-959]

前列腺癌是造成男性死亡的十大肿瘤之一,与传统的对抗肿瘤的概念是“寻找和消灭”即寻找肿瘤的病灶和驱除肿瘤的病灶不同的是,现代的对抗肿瘤的概念是“目标和控制”肿瘤,即用遗传学和流行病学的知识和技术,采用化学预防的方法降低肿瘤的发病率和死亡率^[1]。因此寻找一种有严格的选择性,能诱导变异细胞和癌细胞的死亡,并能促进正常细胞分化的化疗药物对于前列腺癌防治具有重要的意义。维生素 E 琥珀酸酯(vitamin E succinate, VES)是维生素 E 的酯化衍生物,根据众多文献报道^[2-3],它的功能有严格的选择性,能诱导变异细胞和癌细胞凋亡。本实验应用 VES 对前列腺癌细胞系 PC-3 细胞进行体外抑制和诱导凋亡实验,探讨

VES 对于前列腺癌的化学预防和治疗上的潜在价值。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 雄激素非依赖型人前列腺癌细胞株 PC-3 由本科保存,用含 10% 胎牛血清(Gibco)的 RPMI 1640 培养基(Gibco 公司产品),37℃,5%CO₂ 培养。

1.2 VES 溶液的配制 VES 粉剂(BIOMOL 公司

[基金项目] 国家自然科学基金(30400444)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30400444)。

[作者简介] 虞力航,硕士生。E-mail:leonocean@gmail.com

* Corresponding author. E-mail:sunyh@medmail.com.cn

产品),取100 mg加入10 ml无水乙醇震荡溶解后,用0.22 μm 滤膜滤过除菌后,配成VES溶液, -4°C 避光保存。用前取适量,用含10%胎牛血清的RP-MI 1640培养液将其分别稀释成25、50、75、100、125 mg/L。

1.3 MTT法分析VES作用于PC-3细胞后的活力指数和抑制率 将对数生长期的PC-3细胞稀释成 $1.2 \times 10^5/\text{ml}$,按50 μl /孔接种在96孔细胞培养板中,分别加入25、50、75、100、125 mg/L VES溶液,对照组加入1.25%浓度乙醇。实验组和对照组各设平行12孔,分别在培养24 h、48 h、72 h后,每孔加入浓度为5 mg/ml的MTT溶液50 μl ,移入 37°C 孵箱中继续孵育2 h,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加50 μl 的酸化异丙醇,振荡10 min,使结晶充分溶解。用全自动酶标仪测定波长570 nm下的每孔的光密度值(D 值),然后按公式:生长抑制率=(对照组 D_{570} 值-实验组 D_{570} 值)/对照组 D_{570} 值 $\times 100\%$,计算细胞生长抑制率。

1.4 流式细胞术检测PC-3细胞的细胞凋亡率 将对数生长期的PC-3细胞稀释成 $1.2 \times 10^5/\text{ml}$,按1 ml/孔接种在6孔细胞培养板中,分别加入25、50、75、100、125 mg/L VES溶液,对照组加入1.25%浓度乙醇。收集培养24 h、48 h、72 h的细胞。测定前先用去离子水按1:4稀释结合缓冲液(晶美公司产品),用 4°C 预冷的PBS洗2次,用250 μl 结合缓冲液重新悬浮细胞,调节其密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$,取100 μl 的细胞悬液于5 ml流式管中,加入5 μl Annexin V/FITC(晶美公司产品),和10 μl 20 mg/ml的碘化丙锭溶液(晶美公司产品),混匀后于室温避光孵育15 min,在反应管中加400 μl PBS,用流式细胞仪分析。

1.5 统计学处理 应用SPSS 11.0软件进行统计学分析,两组间均数比较应用 t 检验,两组以上均数比较应用方差分析。

2 结果

2.1 VES作用后PC-3细胞的活力 实验组和对照组在VES作用24 h后的 D_{570} 值存在明显的统计学差异($P < 0.05$)。VES作用48 h后的 D_{570} 值在实验组和对照组之间存在明显的统计学差异($P < 0.05$)。在实验组中,75、100、125 mg/L组之间没有明显的统计学差异,但25、50 mg/L组与以上3组之间存在明显的统计学差异($P < 0.05$)。VES作用72 h后的 D_{570} 值实验组和对照组间存在明显的统计学差异。在实验组中,25 mg/L组与其他剂量组之

间存在明显的统计学差异($P < 0.05$),而其他各组之间没有明显的统计差异。实验组和对照组24 h、48 h、72 h的 D_{570} 值详见图1。根据结果所示,相同的作用时间内,细胞的活力随着浓度的升高而减小;而相同的作用浓度下,细胞的活力随着作用时间的延长而减小。根据各组的平均 D_{570} 值,利用公式计算出各组的细胞生长抑制率,发现相同VES作用时间下,细胞的抑制率随浓度升高而增大;相同VES浓度组的细胞抑制率随作用时间的延长而增大,详见图2。根据各实验组的抑制率,计算得出VES作用24 h、48 h、72 h的半数抑制浓度(IC_{50} 值)分别为60.00 mg/L、12.46 mg/L、0.87 mg/L。

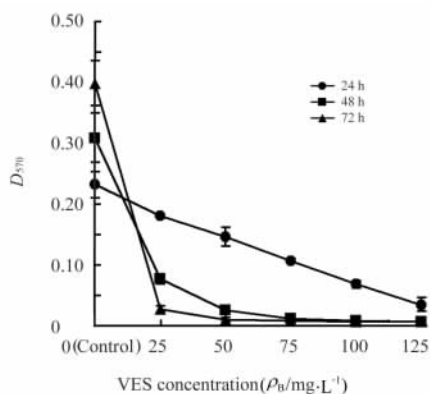


图1 VES作用于PC-3细胞后的细胞活力曲线

Fig 1 Curves of PC-3 cell viability after treated with VES

$n = 12, \bar{x} \pm s$

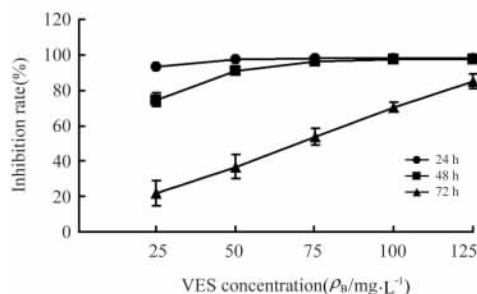


图2 VES作用于PC-3细胞后的细胞抑制率曲线

Fig 2 Curve of inhibition rate of PC-3 cells after treated with VES

$n = 12, \bar{x} \pm s$

2.2 VES作用于PC-3细胞后的细胞凋亡率 对照组和实验组在经VES作用24 h、48 h、72 h后的细胞凋亡率如图3,可以看出,实验组的凋亡率要明显高于对照组的凋亡率。相同的VES作用时间,细胞凋亡率随浓度的升高而增大,相同的VES作用浓

度,细胞凋亡率随作用时间的延长而增大。

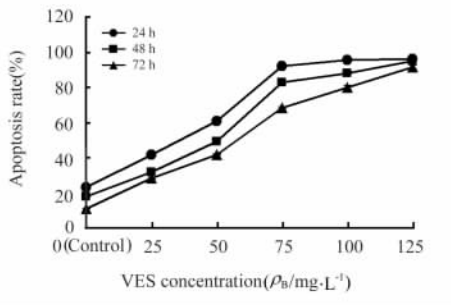


图3 VES作用于PC-3细胞后的凋亡率与剂量、时间依赖关系

Fig 3 Relationship between PC-3 cells apoptosis rate and dose and exposure period of VES

$n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

3.1 VES对于PC-3细胞的抑制作用 由MTT的实验结果,可以很明显地看出,VES对于PC-3细胞具有明显抑制作用,且VES浓度与实验组的细胞活力呈明显负相关,与抑制率呈正相关。而对对照组细胞的活力却随着时间的延长而增大。根据以上结果,可能有以下几方面原因:(1)对照组由于未加VES,因此细胞的增殖未受到影响,从而随着时间的延长,细胞不断的增殖,因而细胞的活力值也不断的上升。(2)实验组中,由于VES具有对变异细胞和肿瘤细胞的杀伤作用^[4-9],浓度越高,其单个PC-3细胞所受到的作用效力也就越强,因而细胞的活力值也就越低。当然,实验组的VES浓度对于机体的毒性作用,还要有待于动物实验进一步的验证。

3.2 VES对于PC-3细胞的促凋亡作用 根据流式细胞仪的分析结果,实验组PC-3细胞经VES作用24h、48h、72h后较对照组相比,均出现明显细胞凋亡,其凋亡率的大小与VES浓度和时间均呈正相关。结合MTT的细胞抑制率,发现抑制率和凋亡率两组数据的百分比没有明显的统计学差异,从而推断,VES主要通过诱导PC-3细胞的凋亡来实现杀伤和抑制细胞增殖的作用。

对于VES对PC-3细胞诱导凋亡作用,国内外也进行了一些相关的研究,但早期文献只对20mg/L以下浓度VES,进行了研究^[10],其48h凋亡率为11%左右,较对照组相比,提高了近10倍。但2006年的国外研究已有VES作用浓度为50mg/L的报道^[11],尽管文中未有PC-3细胞的凋亡数据,但另一种具有高度转移性的前列腺癌细胞AT6.1的实验

提示:VES作用48h后的凋亡率较对照组提高近3倍,这与我们的实验结果较为吻合。但遗憾的是文中实验组只分为25mg/L、50mg/L进行比较,不利于观察不浓度梯度的VES对前列腺癌细胞的诱导凋亡情况。本研究从浓度及时间上分别用MTT和流式细胞术的方法探讨VES对于PC-3细胞的诱导凋亡作用,并且发现,当作用48h以后,75、100、125mg/L浓度组的细胞活力已没有统计学差异,而75mg/L组较50mg/L组相比仍具有明显的统计学差异,其中细胞凋亡率是对照组的 (4.62 ± 0.12) 倍,较50mg/L组的 (2.76 ± 0.08) 倍,又提高了 (1.86 ± 0.04) 倍。因此,可以推断:作用48h后,75mg/L浓度的VES对于PC-3细胞起到一个最佳的诱导凋亡作用,造成80%以上的PC-3细胞凋亡。

目前对于VES诱导PC-3细胞凋亡的机制仍然不十分明确,有人认为VES能通过Fas信号通路诱导前列腺细胞凋亡^[12]。部分学者还指出VES可以通过对细胞生长周期调节蛋白D1、D2、E等的调节,使细胞生长周期在G₁、S期间产生阻滞,从而抑制细胞的生长^[13]。另外,还有学者提出VES还能抑制前列腺癌细胞表面雄激素受体的功能以及PSA的表达^[14]。

总之,通过以上实验表明,VES具有抑制PC-3细胞增殖及促进其凋亡的作用。且其诱导PC-3细胞凋亡与VES的浓度和作用时间呈正相关。且经VES作用48h后,VES诱导凋亡的最佳浓度为75mg/L,能造成80%以上的PC-3细胞凋亡。因此,对VES进行深入的临床应用研究,将为前列腺癌的预防和治疗开辟一条新的途径。

[参考文献]

- [1] Prevention of cancer in the next millennium: Report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research[J]. Cancer Res, 1999, 59: 4743-4758.
- [2] Burton G W, Traber M G. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability[J]. Annu Rev Nutr, 1990, 10: 357-382.
- [3] Neuzil J, Kagedal K, Andera L, et al. Vitamin E analogs: a new class of multiple action agents with anti-neoplastic and anti-atherogenic activity[J]. Apoptosis, 2002, 7: 179-187.
- [4] Quin J, Engle D, Litwiller A, et al. Vitamin E succinate decreases lung cancer tumor growth in mice[J]. J Surg Res, 2005, 127: 139-143.
- [5] 李 焱, 吴 坤, 于卫平. 诱导胃癌细胞凋亡中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的表达[J]. 中华预防医学杂志, 2003, 37: 112-114.
- [6] 刘柏合, 吴 坤, 赵丹阳. 维生素E琥珀酸酯诱导人胃癌细胞凋亡的研究[J]. 卫生研究, 2000, 29: 234-236.

- [7] Barnett K T, Fokum F D, Malafa M P. Vitamin E succinate inhibits colon cancer liver metastases[J]. J Surg Res, 2002, 106:292-298.
- [8] Malafa M P, Neitzel L T. Vitamin E succinate promotes breast cancer tumor dormancy[J]. J Surg Res, 2000,93:163-170.
- [9] Anderson K, Simmons-Menchaca M, Lawson K A, et al. Differential response of human ovarian cancer cells to induction of apoptosis by vitamin E Succinate and vitamin E analogue, alpha-TEA[J]. Cancer Res, 2004,64:4263-4269.
- [10] 陈捷,李学松,孙国锋,等. 维生素E琥珀酸酯对前列腺癌PC-3细胞及其鸡胚绒毛膜尿囊膜移植瘤的影响[J]. 实用癌症杂志, 2004,19:347-350.
- [11] Malafa M P, Fokum F D, Andoh J, et al. Vitamin E succinate suppresses prostate tumor growth by inducing apoptosis[J]. Int J Cancer, 2006,118:2441-2447.
- [12] Israel K, Yu W, Sanders B G, et al. Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: role for Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis [J]. Nutr Cancer, 2000,36:90-100.
- [13] Ni J, Chen M, Zhang Y, et al. Vitamin E succinate inhibits human prostate cancer cell growth *via* modulating cell cycle regulatory machinery [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003,300:357-363.
- [14] Zhang Y, Ni J, Messing E M, et al. Vitamin E succinate inhibits the function of androgen receptor and the expression of prostate-specific antigen in prostate cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002,99:7408-7413.
- [15] Basu A, Imrhan V. Vitamin E and prostate cancer: is vitamin E succinate a superior chemopreventive agent[J]? Nutr Rev, 2005,63:247-251.

[收稿日期] 2007-01-16

[修回日期] 2007-06-18

[本文编辑] 曹静