

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00024

· 论 著 ·

双氢青蒿素对前列腺癌裸鼠种植瘤 Bcl-2 和 Bax 表达的调控

李庆春^{1,2}, 高小玲¹, 邹 聪¹, 罗子国^{1*}, 李 剑¹

1. 重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016

2. 重庆西南铝医院, 重庆 401326

[摘要] **目的** 研究双氢青蒿素(DHA)诱导前列腺癌细胞凋亡作用及其机制。**方法** 采用人前列腺癌 PC-3 细胞株建立裸鼠种植瘤模型, 将 20 只模型鼠随机平均分为对照组、溶剂(DMSO)组、DHA 200 μmol/kg 体质量组和 DHA 100 μmol/kg 体质量组, 经 13 d 干预后, 电镜观察肿瘤组织形态学表现; 免疫组化检测凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 的表达水平; TUNEL 法检测肿瘤组织细胞凋亡。**结果** 与对照组及 DMSO 组比较, DHA 治疗组电镜观察肿瘤组织中散在凋亡细胞及凋亡小体; 免疫组化检测凋亡相关基因 Bcl-2 表达减弱、Bax 表达增强, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); TUNEL 检测结果显示肿瘤组织细胞凋亡率明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** DHA 具有较强的诱导前列腺癌细胞凋亡作用, 这种作用可能是通过下调 Bcl-2 和上调 Bax 表达实现的。

[关键词] 双氢青蒿素; 前列腺肿瘤; 细胞凋亡; Bcl-2; Bax

[中图分类号] R 737.25; R 979.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)01-0024-04

Regulatory effects of dihydroartemisinin on Bcl-2 and Bax expression in implanted prostate cancer in nude mice

LI Qing-chun^{1,2}, GAO Xiao-ling¹, ZOU Cong¹, LUO Zi-guo^{1*}, LI Jian¹

1. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Hospital of Chongqing Southwest Aluminum, Chongqing 401326, China

[Abstract] **Objective** To investigate dihydroartemisinin(DHA)-induced apoptosis of human prostate cancer cells and the underlying molecular mechanism. **Methods** Nude mice were implanted with human prostate cancer PC-3 cells to establish tumor-bearing mouse model. Twenty models mice were evenly randomized into four groups: control group, solvent group (DMSO), large dose DHA (200 μmol/kg) group and low dose DHA (100 μmol/kg) group. The implanted tumors were observed on day 13 after drug administration. Morphological changes of PC-3 cells were observed by transmission electron microscope(TEM). The protein expression of apoptosis associated gene Bcl-2 and Bax were examined by immunohistochemical method. Apoptosis was detected by TUNEL assay. **Results** TEM examination revealed scattered apoptotic cells and apoptotic bodies in tumor tissues of mice in the DHA groups; immunohistochemical examination revealed that the protein expression of apoptosis-associated gene Bcl-2 was decreased and that of Bax was increased in DHA groups ($P < 0.05$). TUNEL staining revealed that the rate of cell apoptosis increased significantly in DHA groups ($P < 0.05$). **Conclusion** It is demonstrated that DHA has strong effect in inducing apoptosis in human prostate cancer cell line PC-3 *in vivo*, which might be related to the down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Bax.

[Key words] dihydroartemisinin; prostatic neoplasms; apoptosis; Bcl-2; Bax

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1):24-27]

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性生殖系统常见的恶性肿瘤,近年来全球范围的发病率及病死率不断增高,严重威胁着男性的健康^[1]。青蒿素(artemisinin)及其衍生物双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)等是一类传统抗疟药,随着抗疟机制的深入研究,其抗肿瘤作用备受关注^[2],而在前列腺癌方面的研究却鲜有报道。本研究采用裸鼠种植瘤

模型,观察 DHA 对前列腺癌裸鼠种植瘤的影响,并通过检测种植瘤内 Bcl-2、Bax 的表达及肿瘤细胞凋亡,以期探讨 DHA 的抗癌机制。

1 材料和方法

1.1 材料 4~6 周龄 BALB/c 雄性裸鼠,体质量(17.5±2.3) g,饲养于重庆医科大学动物中心 SPF

[收稿日期] 2009-05-10 **[接受日期]** 2009-09-28

[作者简介] 李庆春, 硕士, 主治医师. E-mail: 695786349@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-68485838, E-mail: luoziguo@cqmu.edu.cn

级动物室[合格证号:SKXC(京)2002-0003,北京维通利华实验动物技术有限公司];DHA 由重庆医科大学薛斌博士馈赠,采用 DMSO(重庆华立药业股份有限公司)配成浓度为 0.2 mol/L 的溶液备用;TUNEL 凋亡检测试剂盒、免疫组化试剂盒、鼠抗人 Bcl-2 及 Bax 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司;前列腺癌 PC-3 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 动物模型及分组 在前期体外实验的基础上进行动物实验,将收集好的 5×10^6 /ml 的 PC-3 细胞悬液 0.1 ml 注入裸鼠右侧腋窝皮下,饲养约 10 d 左右,肿瘤长至 0.5~0.6 cm 直径大小,选取体质量及瘤质量基本一致的裸鼠 20 只进行药物干预。随机分为对照组、溶剂(DMSO)组、DHA 200 μ mol/kg 体质量组、DHA 100 μ mol/kg 体质量组,每组 5 只;药物治疗采用腹腔注射,隔日 1 次,第 13 天取材。

1.3 取材及标本处理 将裸鼠断颈处死,完整剥离瘤体,取 0.3 cm 厚的组织片浸泡于 4% 的多聚甲醛中固定 24 h,常规处理,石蜡切片。免疫组化 S-P 法(按试剂盒说明书操作)检测 Bcl-2 及 Bax, TUNEL 法(按试剂盒说明书操作)检测细胞凋亡,光镜观察并拍照;同时取 1 mm³ 新鲜肿瘤组织 5 块,4% 戊二醛预固定 4 h,电镜标本常规处理,超薄切片,H-7500 型透射电镜(日本日立公司)观察并拍照。

1.4 图像分析 用 Olympus DP70 图像采集系统对每个标本的每个指标随机取 10 个高倍视野($\times 400$),20 个标本 3 个指标(Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白及 TUNEL)共获得 600 张照片。用北航 CM2000B 生物学图像分析系统对免疫组化照片的阳性产物进行平均光密度值分析,对 TUNEL 照片进行凋亡细胞分析,每个标本的每个指标可获得 10 个数据,取均数后再行统计学处理。

1.5 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,采用多个均数间多重比较的一维方差分析及 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 透射电镜观察 对照组 PC-3 细胞直径 8~14 μ m 大小,呈圆形或椭圆形,较规则,细胞表面有微绒毛,细胞核较大,核仁明显(1~2 个),常染色质丰富,胞质呈均匀中等的电子密度,散在分布有粗面内质网和线粒体,并含有丰富的游离多聚核糖体,可见核分裂相(图 1A)。DHA 两个剂量组可见数量不等、

程度不同的凋亡细胞,浓度越高,凋亡细胞数量越多;早期凋亡细胞表现为细胞基质电子密度变深,细胞核异染色质边集,线粒体内室肿胀,嵴模糊不清,可见微丝微管断裂现象;晚期凋亡细胞基质进一步浓缩,电子密度更深,染色质逐渐凝聚成新月状附于核膜周边,细胞核固缩呈均一的致密物,进而断裂为大小不一的片段,并碎裂成许多小块,直至形成许多大小不等的凋亡小体;凋亡小体内核碎片可有可无,膜完整,线粒体固缩(图 1B)。

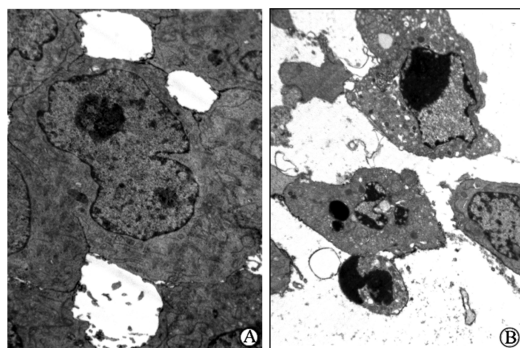


图 1 透射电镜观察 PC-3 细胞形态学改变

Fig 1 Morphological changes of PC-3 cells under transmission electron microscope

A: In control group, a normal PC-3 cell with big karyon and profusion euchromatin; B: In DHA(200 μ mol/kg) group, the scattered apoptotic cells and apoptotic bodies were observed in tumor tissues. Original magnification: $\times 8\ 000$ (A); $\times 6\ 000$ (B)

2.2 Bcl-2 和 Bax 的表达 Bcl-2 蛋白反应产物为棕黄色,位于细胞膜及细胞质(图 2A、2B),对照组细胞膜及细胞质呈棕黄色,DHA 两个剂量组细胞膜及胞质内反应产物表达水平不同,剂量越大表达越弱;Bax 蛋白反应产物为棕黄色,位于细胞质(图 2C、2D),对照组及 DMSO 组胞质内阳性产物表达较弱,DHA 两个剂量组胞质内反应产物表达水平不同,剂量越大表达越强。所有图片经体视学分析,平均光密度值见表 1。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 DHA 两个剂量组肿瘤组织中可见大量凋亡细胞,胞核呈棕褐色,较小或碎裂,对照组及 DMSO 组肿瘤组织中凋亡细胞较少(图 3)。各组细胞凋亡率见表 1。

3 讨论

前列腺癌的发病率及病死率都很高,目前尚缺乏有效的治疗药物,因此,寻求高效低毒的治疗用药已成为医务工作者当务之急。研究表明,细胞增殖与凋亡失衡是前列腺癌发生发展的重要机制,抑制

肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡是开发抗肿瘤药物的主要策略^[3]。青蒿素类药物的促凋亡作用已有一些相关报道^[2,4],在前列腺癌方面的研究却较少,而仅有的一些报道也集中在体外实验阶段^[5-7],且未

对其促凋亡机制作深入研究。本研究应用裸鼠种植瘤模型研究 DHA 诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡作用,并对其作用机制进行了初步探讨。

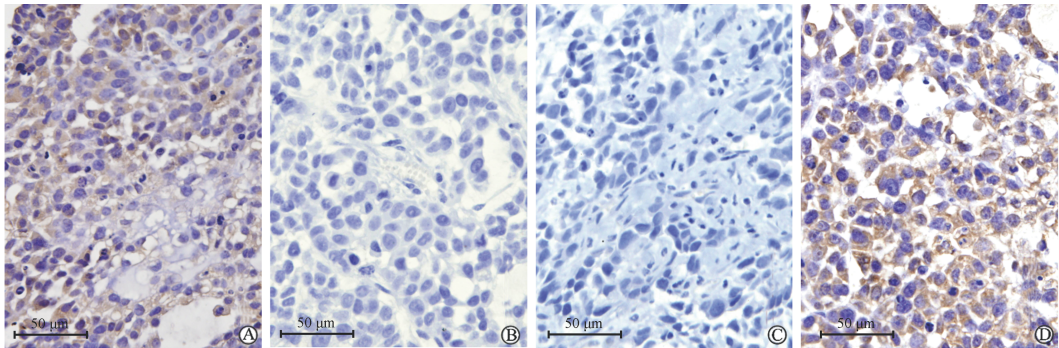


图 2 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达

Fig 2 Expression of Bcl-2 and Bax protein(S-P)

A: Control group showing intensive positive product of Bcl-2 in cytolemma and cytoplasm; B: DHA(200 μmol/kg) group showing faint positive product of Bcl-2 in cytolemma and cytoplasm; C: Control group showing faint positive product of Bax in cytoplasm; D: DHA(200 μmol/kg) group, showing intensive positive product of Bax in cytoplasm

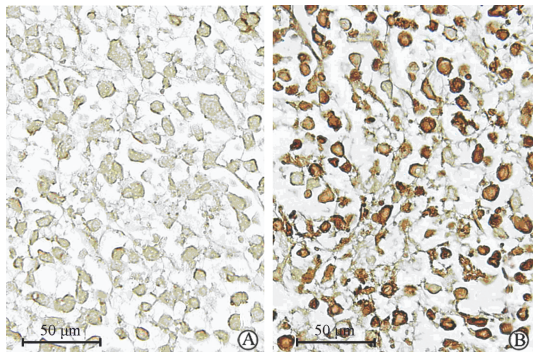


图 3 TUNEL 法检测细胞凋亡

Fig 3 Apoptosis was detected by TUNEL assay

A: In control group, normal PC-3 cells with light dyeing karyon; B: In DHA(200 μmol/kg) group, many scattered apoptotic cells with brown karyon in tumor tissues

本研究发现,在一定剂量下,DHA 可诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡;DHA 可有效调控凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达,与 Yamachika 等^[8]的研究结果基本一致。细胞凋亡在肿瘤的发生发展中起着关键性的作用,分子生物学研究表明,细胞凋亡受多种基因调控,而前列腺癌的发生发展与凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 的表达情况密切相关^[9]。本研究 DHA 诱导的前列腺癌 PC-3 细胞凋亡属线粒体介导途径,其机制可能与下调 Bcl-2、上调 Bax 有关。

DHA 对凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 的有效调控成为促凋亡的关键环节。Bcl-2 与 Bax 是 Bcl-2 家族中功能相反的两个重要成员,二者的比例决定着细胞的存亡^[10]。Bcl-2 家族成员的一个显著特征是家族蛋白质分子之间可形成同源或异源二聚体,Bcl-2 与 Bax 的比例又决定着这些二聚体的形成,正是这种二聚反应精细地调控着细胞对凋亡的易感性,决定着细胞的命运。免疫组化结果显示,经 DHA 干预后 PC-3 细胞 Bcl-2 表达减弱,Bax 表达增强,这将使 Bcl-2 同源二聚体减少,异源二聚体增多,进而促进肿瘤细胞凋亡,本研究结果充分反映了这一机制。

Bax 与 Bcl-2 的比值,精细地调节着细胞增殖与凋亡的平衡,同时 DHA 可通过下调 Bcl-2、上调 Bax 来调节线粒体通透性转变通道(mitochondrial permeability transition pores, MPTP) 的开放,MPTP 是位于线粒体内外膜之间的一种非选择性通透性转变通道^[11],Bcl-2 通过 C 末端疏水性氨基酸

表 1 各组药物处理对 Bcl-2、Bax 表达及细胞凋亡的影响

Tab 1 Effects of different drugs on Bcl-2, Bax expression and cell apoptosis

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

Group	Bcl-2	Bax	Apoptosis rate(%)
DHA ($\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$)			
100	0.024 \pm 0.019* Δ	0.102 \pm 0.024* Δ	45.197* Δ
200	0.018 \pm 0.008* Δ	0.131 \pm 0.057* Δ	48.834* Δ
DMSO	0.179 \pm 0.032	0.001 \pm 0.000	2.666
Control	0.162 \pm 0.028	0.001 \pm 0.000	2.962

* P<0.05 vs control group; Δ P<0.05 vs DMSO group. DHA: Dihydroartemisinin; DMSO: Dimethylsulfoxide

锚定于线粒体外膜,而 Bax 则散布于基质中,一些研究者认为,MPTP 的形成是由 Bcl-2 家族蛋白与线粒体外的蛋白相互作用产生的,MPTP 的开放是线粒体凋亡通路的关键步骤^[10,12]。Bax 能够促进线粒体 MPTP 开放,释放凋亡因子细胞色素 C,激活半胱氨酸蛋白酶(Caspase)家族,从而进一步激活下游信号通路并最终引起膜泡形成、核碎裂及细胞凋亡^[13];另外也有研究认为 Bcl-2 蛋白可以抑制 Ca^{2+} 从内质网中的释放,而 Bax 可促使 Ca^{2+} 从内质网中被释放,DHA 下调 Bcl-2、上调 Bax 就能引起线粒体中 Ca^{2+} 的超负荷并导致线粒体 MPTP 的开放及线粒体的肿胀,进而线粒体外膜破裂,膜间隙中的促凋亡蛋白进入细胞质中,导致细胞凋亡^[14-15]。

电镜及 TUNEL 结果显示,PC-3 细胞经 DHA 处理后,线粒体形态及核物质变化最突出,综合免疫组化结果,推测 DHA 可能通过某种机制下调 Bcl-2、上调 Bax,使二者比例失衡,并能够促进内质网内的 Ca^{2+} 释放^[16],使线粒体 MPTP 开放,最终导致线粒体外膜破裂、细胞骨架破坏、DNA 断裂溶解,凋亡物质释放,启动线粒体凋亡途径,并形成凋亡小体,同时 DHA 能够使线粒体膜电位去极化,这将增强电子传递链的功能并提高细胞对药物的敏感性,最终导致线粒体正常功能的丧失。Efferth 等^[17]也认为这一凋亡过程属线粒体介导途径,DHA 通过调节凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 等,激发线粒体释放细胞色素 C,同时激活了一系列复杂的凋亡酶系,最终促发凋亡,本研究结果也充分说明了这一点。

本研究中 DMSO 组与对照组各指标差异均无统计学意义,这说明 DMSO 对 PC-3 细胞凋亡没有影响;本研究大小剂量组各指标差异虽无有统计学意义,但实验数据显示大剂量 DHA 对凋亡率及凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 的影响较大,这可能预示着小剂量 DHA(100 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体质量)是动物模型的最佳剂量,而大剂量(200 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 体质量)可能已进入 DHA 疗效的平台期。

综上所述,DHA 对 PC-3 细胞的影响在细胞水平上表现为抑制细胞增殖并诱导凋亡,在分子水平上表现为对凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 的有效调控,对其确切机制的研究仍在进行当中,随着研究的不断深入,DHA 有望成为治疗前列腺癌的有效手段。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58: 71-96.
- [2] Zhou H J, Wang W Q, Wu G D, Lee J, Li A. Artesunate inhibits

- angiogenesis and downregulates vascular endothelial growth factor expression in chronic myeloid leukemia K562 cells[J]. Vascul Pharmacol, 2007, 47(2-3): 131-138.
- [3] Tapia-Vieyra J V, Mas-Oliva J. Apoptosis and cell death channels in prostate cancer [J]. Arch Med Res, 2001, 32: 175-185.
- [4] Mercer A E, Maggs J L, Sun X M, Cohen G M, Chadwick J, O'Neill P M, et al. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds[J]. J Biol Chem, 2007, 282: 9372-9382.
- [5] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, Chitambar C R. The anti-malarial artesunate is also active against cancer[J]. Int J Oncol, 2001, 18: 767-773.
- [6] Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, Gebhart E, Rauch P, Weber H O, et al. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines[J]. Mol Pharmacol, 2003, 64: 382-394.
- [7] Posner G H, McRiner A J, Paik I H, Sur S, Borstnik K, Xie S, et al. Anticancer and antimalarial efficacy and safety of artemisinin-derived trioxane dimmers in rodents [J]. J Med Chem, 2004, 47: 1299-1301.
- [8] Yamachika E, Habte T, Oda D. Artemisinin: an alternative treatment for oral squamous cell carcinoma [J]. Anticancer Res, 2004, 24: 2153-2160.
- [9] Banerjee P P, Banerjee S, Brown T R. Bcl-2 protein expression correlates with cell survival and androgen independence in rat prostatic lobe [J]. Endocrinology, 2002, 143: 1825-1832.
- [10] Chen T, Li M, Zhang R, Wang H. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13: 1358-1370.
- [11] Scorrano L, Petronilli V, Di Lisa F, Bernardi P. Commitment to apoptosis by GD3 ganglioside depends on opening of the mitochondrial permeability transition pore[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 22581-22585.
- [12] Kubli D A, Ycaza J E, Gustafsson A B. Bnip3 mediates mitochondrial dysfunction and cell death through Bax and Bak[J]. Biochem J, 2007, 405: 407-415.
- [13] Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c[J]. Nature, 1998, 391: 496-499.
- [14] Huang X, Zhai D, Huang Y. Study on the relationship between calcium-induced calcium release from mitochondria and PTP opening[J]. Mol Cell Biochem, 2000, 213(1-2): 29-35.
- [15] Scorrano L, Oakes S A, Opferman J T, Cheng E H, Sorcinelli M D, Pozzan T, et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+} : a control point for apoptosis[J]. Science, 2003, 300: 135-139.
- [16] Mu D, Zhang W, Chu D, Liu T, Xie Y, Fu E, et al. The role of calcium, P38 MAPK in dihydroartemisinin-induced apoptosis of lung cancer PC-14 cells [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2008, 61: 639-645.
- [17] Efferth T, Giaisi M, Merling A, Krammer P H, Li-Weber M. Artesunate induces ROS-mediated apoptosis in doxorubicin-resistant T leukemia cells[J]. PLoS One, 2007, 2: e693.