

## 糖皮质激素抑制人前列腺癌 PC-3 细胞系增殖的可能机制

王燕,陈玉霞,刁飞,卢建\*

(第二军医大学基础医学部病理生理学教研室,上海 200433)

**[摘要]** **目的:**观察地塞米松对前列腺癌 PC-3 细胞中转录因子 NF- $\kappa$ B 及其下游靶基因 cyclinD1 的调节作用,探讨其抑制 PC-3 细胞增殖的可能机制。**方法:**MTT 法检测地塞米松对 PC-3 细胞增殖的影响;转染和报告基因的方法比较多种肿瘤细胞中 NF- $\kappa$ B 的基础转录活性并检测地塞米松对 PC-3 细胞 NF- $\kappa$ B 转录活性的调节;Western 印迹法检测地塞米松对 PC-3 细胞 cyclinD1 蛋白表达的影响。**结果:**地塞米松抑制 PC-3 细胞的增殖;PC-3 细胞中 NF- $\kappa$ B 处于组成型激活状态,地塞米松抑制 PC-3 细胞中转录因子 NF- $\kappa$ B 的转录活性;地塞米松下调 PC-3 细胞中 cyclinD1 蛋白的表达。**结论:**地塞米松抑制前列腺癌 PC-3 细胞的增殖,这可能与其抑制转录因子 NF- $\kappa$ B 的转录活性及其下游的靶基因 cyclinD1 的蛋白表达有关。

**[关键词]** 地塞米松;前列腺肿瘤;细胞增殖

**[中图分类号]** R 737.25 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0885-03

### Inhibitory effects of dexamethasone on growth of human prostate cancer cell line PC-3: the possible mechanism

WANG Yan, CHEN Yu-xia, DIAO Fei, LU Jian\* (Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the regulatory effect of dexamethasone on NF- $\kappa$ B and its target gene cyclinD1 in human prostate cancer cell line PC-3, so as to explore the anti-proliferation mechanism of dexamethasone. **Methods:** The inhibitory effects of dexamethasone on growth of PC-3 cells were determined by MTT. The basic transcriptional activity of NF- $\kappa$ B in many kinds of tumor cells and the effects of dexamethasone on the activation of PC-3 cell NF- $\kappa$ B were determined by reporter gene assay. The expression of cyclinD1 protein was determined by Western blots. **Results:** Dexamethasone inhibited the growth of PC-3 cells and NF- $\kappa$ B was constitutively activated in the PC-3 cells. Dexamethasone also inhibited the activation of NF- $\kappa$ B and down-regulated the expression of cyclinD1 protein in PC-3 cells. **Conclusion:** Dexamethasone can inhibit cell growth of prostate cancer cell line PC-3, which might be related to the inhibitory effect of dexamethasone on the transcriptional activation of NF- $\kappa$ B and cyclinD1 protein.

**[KEY WORDS]** dexamethasone; prostatic neoplasms; cell proliferation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 885-887]

国内外研究发现,糖皮质激素(glucocorticoid, GC)能通过诱导 TGF- $\beta$ 1<sup>[1]</sup>和对细胞周期 G<sub>1</sub>期的阻滞<sup>[2]</sup>抑制细胞的增殖,但作用机制仍然不甚清楚。转录因子 NF- $\kappa$ B 在多种肿瘤细胞中具有促进增殖和抑制凋亡的作用<sup>[3]</sup>,但在雄激素非依赖性前列腺癌(AIPC)细胞如 PC-3 中,NF- $\kappa$ B 是否介导了 Dex 对该细胞增殖的抑制作用并未见报道。本研究主要观察人工合成的 GC——地塞米松(dexamethasone, Dex)对 PC-3 细胞 NF- $\kappa$ B 转录活性的影响,以进一步揭示 GC 抑制细胞增殖的机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 含有转录因子 NF- $\kappa$ B 反应元件(2个拷贝)的荧光素酶(luc)报告基因质粒 pGL3-NF- $\kappa$ B-luc 由我校基础医学部免疫学教研室徐红梅博士馈赠<sup>[4]</sup>;内参照 pRL-TK-Renilla-luc 质粒、双荧光素酶

检测试剂盒、Dex 以及小鼠抗兔 AP(碱性磷酸酶)标记的二抗购自 Sigma 公司;小牛血清购自 PAA 公司,cyclinD1 一抗购自 NeoMarkers 公司。

1.2 细胞及细胞培养 AIPC 细胞株 PC-3(来源于人前列腺癌骨转移组织),人卵巢癌细胞株 HO-8910,人宫颈癌细胞株 HeLa,人肝癌细胞株 SMMC-7721,胰腺癌细胞株 SW-1990 常规培养于含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养基中,在 37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育,每周传代 1~2 次。

1.3 细胞瞬时转染 按 Lipofectamine™2000 转染试剂盒说明书,PC-3 细胞(2×10<sup>5</sup>/孔)接种于 24 孔培养板,24 h 内共转染 400 ng pGL3-NF- $\kappa$ B-luc 质

**[基金项目]** 国家自然科学基金(30470671)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30470671)。

**[作者简介]** 王燕,硕士。

\* Corresponding author. E-mail: lujian326@yahoo.com

粒和 1 ng pRL-TK-Renilla-luc 质粒。其他肿瘤细胞的处理同 PC-3 细胞。6 h 后换以含 1% 去激素血清的 RPMI 1640 培养基, 37°C 恢复 6 h, 0、0.1、1、10、100、1 000 nmol/L Dex 分别处理 18 h, 或者 100 nmol/L Dex 处理 0、4、8、12、18、24 h, 对照细胞加与 Dex 等体积的无水乙醇。双荧光素酶检测系统检测荧光素酶的活性。

1.4 细胞增殖实验(MTT 法) PC-3 细胞( $1 \times 10^4$ /孔)接种于 24 孔板内, 无血清 RPMI 1640 培养基饥饿细胞 24 h 后, 分别换成含 5% 去激素血清和 0、0.1、10、100 nmol/L Dex 的培养液, 对照细胞加与 Dex 等量的无水乙醇, 每一浓度设 4 个平行孔。隔日换液, 细胞分别培养 2、4、6 d 后, 加 300  $\mu$ l 含 5 mg/ml MTT 溶液(30  $\mu$ l)的培养液, 继续培养 4 h, 弃去上清, 加 DMSO 300  $\mu$ l 每孔, 振荡混匀后用酶联检测仪检测 570 nm 波长处的 D 值。

1.5 Western 印迹法 PC-3 细胞接种于 6 孔板, 同上用 0、0.1、1、10、100、1 000 nmol/L Dex 处理细胞 24 h, 100 nmol/L Dex 处理细胞 0、4、8、12、24、36 h, 裂解液裂解细胞后超声, 10 000 r/min 离心 10 min, 得上清液为待检蛋白样品, 沸水浴加热上清液使样品变性, 经 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜至硝酸纤维膜上, 然后与 cyclinD1 一抗反应过夜, 免疫复合物与 AP 标记的兔二抗反应并显色。

1.6 统计学处理 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有实验至少重复 3 次, 两两比较用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 Dex 抑制人前列腺癌 PC-3 细胞的增殖(MTT 法) 与对照细胞相比, 1、10 和 100 nmol/L Dex 在第 6 天对 PC-3 细胞的增殖抑制率分别是(15.5  $\pm$  0.6)%、(24.9  $\pm$  0.7)%、(45.4  $\pm$  0.8)% , 均有显著性差异( $P < 0.01$ )。见图 1。

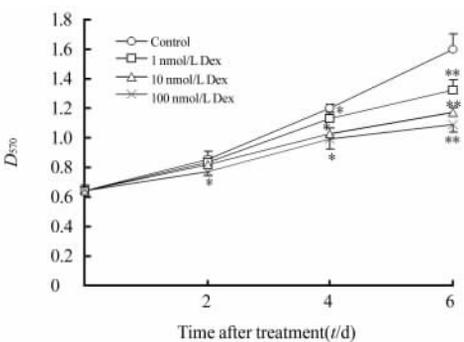


图 1 Dex 抑制人前列腺癌 PC-3 细胞的增殖

Fig 1 Dex inhibited growth of PC-3 cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group;  $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.2 PC-3 细胞中 NF- $\kappa$ B 基础转录活性的检测 PC-3 细胞 NF- $\kappa$ B 的基础转录活性分别是卵巢癌 HO-8910 细胞、宫颈癌 HeLa 细胞、肝癌 SMMC-7721 细胞和胰腺癌 SW-1990 细胞的 15.1、13.2、8.8 和 2.1 倍, 这表明 PC-3 细胞中 NF- $\kappa$ B 处于组成型激活状态。

2.3 Dex 抑制 PC-3 细胞中 NF- $\kappa$ B 的转录活性 Dex 能够以时间和浓度依赖的方式抑制 NF- $\kappa$ B 报告基因的转录活性, 100 nmol/L Dex 处理细胞 18 h, NF- $\kappa$ B 的转录活性抑制率为(38  $\pm$  1.8)% ( $P < 0.01$ )。

2.4 Dex 抑制 PC-3 细胞中 cyclinD1 的表达 Dex 能够以时间和浓度依赖性方式抑制 cyclinD1 蛋白的表达。其中, 100 nmol/L Dex 处理 24 h 组的 cyclinD1 的表达量为对照的(71  $\pm$  1.3)% ( $P < 0.05$ )。见图 2。

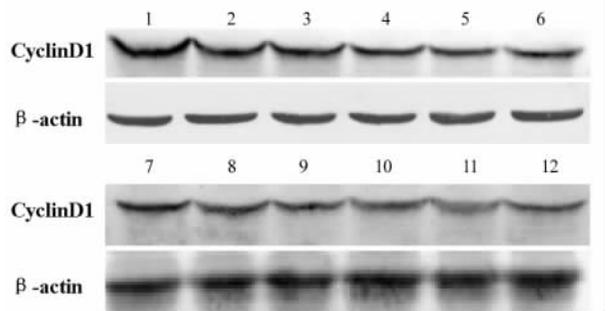


图 2 Dex 以浓度依赖(A)和时间依赖(B)的方式下调 PC-3 细胞中 cyclinD1 蛋白的表达

Fig 2 Dex down-regulated expression of cyclinD1 protein in a dose-(A) and time-(B) dependent manner in PC-3 cells

1-6: 0, 0.1, 1, 10, 100, 1 000 nmol/L Dex, respectively; 7-12: 0, 4, 8, 12, 24, 36 h after treatment of Dex, respectively

## 3 讨论

PC-3 细胞是雄激素非依赖性前列腺癌(AIPC)细胞。NF- $\kappa$ B 是一个多功能的转录因子, 与肿瘤的增殖促进和凋亡抑制等有关<sup>[3]</sup>。国外的研究表明在 AIPC 细胞(如 PC-3 细胞)中 NF- $\kappa$ B 是组成型激活的<sup>[5]</sup>。NF- $\kappa$ B 在多种肿瘤细胞中, 能通过促进多种下游靶基因的表达, 如促进增殖的基因 c-myc、cyclinD1 和 IL-6; 抗凋亡基因 Bcl-2; 促进血管形成基因 IL-8、VEGF; 促进转移和侵袭的基因 MMP9、uPA、uPA 受体等, 促进肿瘤的发生发展<sup>[6~8]</sup>。

GC 能够抑制多种肿瘤细胞的增殖, 但是作用机制仍然不甚清楚。已证明 GC 能通过抑制 NF- $\kappa$ B 的

活性发挥其抗炎作用,也有报道在 AIPC 细胞系 DU145 中,GC 能抑制 NF- $\kappa$ B 的核转位<sup>[9]</sup>。本实验采用含有 NF- $\kappa$ B 反应元件的荧光素酶报告基因,检测了地塞米松对 NF- $\kappa$ B 转录活性的影响,结果证实地塞米松能够抑制 NF- $\kappa$ B 的转录活性,我们还证实, Dex 能抑制 PC-3 细胞中 NF- $\kappa$ B 靶基因 cyclinD1 蛋白的表达。这些结果提示 GC 抑制 NF- $\kappa$ B 的转录活性可能是 GC 抑制 PC-3 细胞增殖的重要机制之一。由于目前 AIPC 没有有效的治疗药物,GC 能抑制 AIPC 的增殖为 GC 今后用于 AIPC 治疗提供了可能性和理论依据。

### [参考文献]

- [1] 石冰,孙晋虎,王大章,等. 地塞米松和维生素 B<sub>12</sub> 对 A 系小鼠胚胎颞突细胞生长因子基因表达的影响[J]. 四川大学学报(医学版),2003,34:27-30.
- [2] Kuang X, Yan M, Liu N, et al. Control of Atm<sup>-/-</sup> thymic lymphoma cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by dexamethasone [J]. Cancer Chemother Pharmacol,2005,55:203-212.
- [3] Hiscott J, Grandvaux N, Sharma S, et al. Convergence of the NF-kappaB and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1010:237-248.
- [4] Xu H, An H, Yu Y, et al. Ras participates in CpG ligodeoxynucleotide signaling through association with toll-like receptor 9 and promotion of interleukin-1 receptor-associated kinase/tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 complex formation in macrophages[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 36334-36340.
- [5] Le Page C, Koumakpayi IH, Lessard L, et al. EGFR and Her-2 regulate the constitutive activation of NF-kappaB in PC-3 prostate cancer cells[J]. Prostate,2005,65:130-140.
- [6] Li Y, Wei Z, Meng Y, et al. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis[J]. World J Gastroenterol, 2005,11:2117-2123.
- [7] Yang J, Wu H, Qian L, et al. Increased expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-C and VEGF receptor-3 in prostate cancer tissue are associated with tumor progression[J]. Asian J Androl,2006,8:169-175.
- [8] Huang J, Yao J, Zhang L, et al. Differential expression of interleukin-8 and its receptors in the neuroendocrine and non-neuroendocrine compartments of prostate cancer [J]. Am J Pathol, 2005,166:1807-1815.
- [9] Nishimura K, Nonomura N, Satoh E, et al. Potential mechanism for the effects of dexamethasone on growth of androgen-independent prostate cancer[J]. J Natl Cancer Inst,2001,93:1739-1746.

[收稿日期] 2006-04-18

[修回日期] 2006-07-04

[本文编辑] 尹茶

## 我校承办第三届中波军事医学研讨会

应总后卫生部邀请,波兰军队卫生部部长康德拉克准将率卫生代表团一行6人,于今年7月2日至7月7日来华访问并参加由总后卫生部主办、我校承办的第三届中波军事医学研讨会。

本届中波军事医学研讨会主题为“灾害医学及维和行动卫勤保障”,议题包括多国维和行动卫勤保障;生物突发事件与生物防御;呼吸与感染性疾病的预防与处理;战创伤与复合伤救治。波兰军队卫生代表团全体成员、总后卫生部副部长袁永林少将和来自南京军区、沈阳军区、各军医大学、总后直属医院等80名与会代表参加了会议。此次会议的成功举办,增进了中波两国、两军的相互了解和友谊,促进了两国、两军卫勤部门的交流与合作。