

依维莫司对前列腺癌 PC-3 细胞的抑制和凋亡的影响

黄小兵¹, 朱绍兴², 曾邦伟¹, 林小燕¹, 陈 强¹

(1. 福建医科大学附属协和医院, 福建 福州 350001; 2. 浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨依维莫司对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及 caspase-3 表达的影响。[方法] 体外培养前列腺癌细胞 PC-3, 使用不同浓度依维莫司(0mol/L、 10^{-9} mol/L 和 10^{-8} mol/L)干预细胞, 四氮唑蓝比色法(MTT)和原位细胞凋亡检测法(TUNEL)检测依维莫司对前列腺癌细胞 PC-3 生长抑制和诱导细胞凋亡的作用, 流式细胞术检测其对 caspase-3 活化的情况。[结果] 与对照组比较, 依维莫司对前列腺癌 PC-3 细胞抑制和诱导凋亡作用明显($P<0.05$), 明显增加 caspase-3 的表达($P<0.05$)。[结论] 依维莫司抑制前列腺癌细胞 PC-3 增殖, 可能通过诱导 caspase-3 表达活化增强, 最终导致细胞凋亡。

关键词: 细胞凋亡; 依维莫司; caspase-3; PC-3 细胞; 前列腺肿瘤

中图分类号: R737.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)07-0560-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.07.B007

Effect of Everolimus on the Growth Inhibition and Apoptosis in Prostate Cancer Cell Line PC-3

HUANG Xiao-bing¹, ZHU Shao-xing², ZENG Bang-wei¹, et al.

(1. Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 2. Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of everolimus on the apoptosis and expression of caspase-3 in prostate cancer cell line PC-3. [Methods] Cultures of prostate cancer cells were exposed to everolimus at concentration of 0mol/L, 10^{-9} mol/L and 10^{-8} mol/L respectively. The effects of everolimus on growth inhibition and apoptosis was determined with MTT and Tunnel methods. The activity of caspase-3 were determined by flow cytometry. [Results] Compared with control group, inhibition and apoptosis of PC-3 cells by everolimus were significantly different($P<0.05$), which significantly increased the expression of caspase-3 ($P<0.05$). [Conclusion] Everolimus might inhibit the growth of PC-3 cells, enhance the expression of caspase-3 and lead to the apoptosis of PC-3 cells.

Subject words: cell apoptosis; everolimus; caspase-3; PC-3 cells; prostate neoplasms

前列腺癌是常见泌尿系恶性肿瘤, 而激素非依赖性前列腺癌的治疗是目前研究难点之一^[1]。前列腺治疗的主要方式有: 外科手术、内分泌治疗、放疗和化疗等。近年来, 靶向药物治疗快速发展, 它是在细胞分子水平上, 针对肿瘤细胞内部的一个蛋白分子或是一个基因片段, 来设计相应的治疗药物, 药物进入体内会特异地选择致癌位点相结合发生作用, 使肿瘤细胞特异性死亡, 而不会波及肿瘤周围的正常组织细胞。依维莫司是雷帕霉素(mTOR)抑制剂, 作为一种新型靶向药物, 越来越受重视。本实验通过四氮唑蓝比色法(MTT)、原位细胞凋亡检测法(TUNEL)以及流式细胞术等, 研究不同浓度的依维

莫司抑制激素非依赖性前列腺癌细胞 PC-3 生长以及诱导细胞凋亡的相关机制, 希望为前列腺癌的治疗提供一种新方案。

1 材料与方法

1.1 材料

前列腺癌 PC-3 细胞株购自中国典型培养物保藏中心, 依维莫司购自瑞士诺华公司, TUNEL 购自 Premega 公司, MTT 购自 Biotium 公司, 流式细胞仪购自美国贝克曼/库尔特公司, 酶标仪购自美国 AWARENESS 公司等。

1.2 方法

实验共分为实验组和对照组。实验组依维莫司用二甲基亚砜(DMSO)溶解, DMSO 终浓度 $\leq 0.01\%$,

通讯作者: 黄小兵, 主治医师, 硕士; 福建医科大学附属协和医院肿瘤内科, 福建省福州市新权路 29 号 (350001); E-mail: 13609522917@139.com

收稿日期: 2013-10-29; **修回日期:** 2013-12-11

最终依维莫司的浓度分别为 10^{-9} mol/L 和 10^{-8} mol/L, 对照组依维莫司 0 mol/L。通过 MTT、TUNEL 以及流式细胞术等方法检测在不同浓度依维莫司作用下对 PC-3 细胞的增殖抑制及诱导凋亡情况。

1.2.1 MTT 法测定依维莫司对前列腺癌细胞 PC-3 的生长抑制效应

取对数生长期的前列腺癌细胞 PC-3 经过 0.25%胰蛋白酶常规消化后以 3×10^3 /孔接种于 96 孔培养板(每孔体积 200 μ l), 在 37℃、5%CO₂ 和饱和湿度条件下培养 24h 后吸除原培养液, 含依维莫司浓度分别为 0 mol/L (对照组)、 10^{-9} mol/L 和 10^{-8} mol/L 的 F12 培养液(无血清培养液)180 μ l, 另设只加培养液不加细胞和药物的为空白组。每组 4 个复孔, 共计 72 孔。将各组细胞继续培养 24h、48h 和 72h 后, 每孔加 MTT 溶液(5g/L)20 μ l, 相同条件下继续培养 4h 后终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入 DMSO 150 μ l, 振荡 10min, 使结晶充分溶解。用酶标仪在 490nm 波长处测定各孔的吸光度 A 值(A₄₉₀)。按下列公式计算细胞存活率: 细胞存活率 $R = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。实验重复 2 次。

1.2.2 TUNEL 法检测依维莫司诱导前列腺癌细胞 PC-3 凋亡的作用

取对数生长期前列腺癌细胞 PC-3 约 1×10^4 /孔接种于预先多聚赖氨酸处理玻片的 6 孔培养板中, 共计 18 孔, 置于 5%CO₂、37℃和饱和湿度条件下培养 24h 后, 弃去原培养液, 加入含依维莫司浓度分别为 0mol/L(对照组)、 10^{-9} mol/L 和 10^{-8} mol/L 的 F12 培养液(无血清培养液), 置于 5%CO₂、37℃和饱和湿度条件下分别培养 24h、48h 和 72h, 设相应时间正常培养的细胞为空白对照组。按说明书进行操作, 取出 6 孔培养板中的玻片, 做好标记, 用含 4%多聚甲醛的 PBS 溶液在室温下固定 25min; 然后用 PBS 洗 5min(浸泡), 重复 2 次。

将玻片置于 0.2%TritonR X-100r PBS 中, 室温渗透 5min; 然后用 PBS 洗 5min(浸泡), 重复 2 次。滴加 Equilibration Buffer 50 μ l 于玻片, 室内平衡 5~10min。

在平衡的同时, 按要求置于冰上配制 TdT 反应混合液, 以每份玻片 Equilibration Buffer 98 μ l、Biotinylated Nucleotide Mix 1 μ l、TdT Enzyme 1 μ l 配制。

TdT 反应混合液每片 100 μ l, 使 TdT 反应混合液分布均匀, 盖上塑料盖片, 勿留气泡, 在 37℃的湿盒中孵育 60min。

倒置显微镜下观察凋亡细胞形态变化并随机计数 5 个视野, 每个视野计数 200 个细胞, 以细胞内出现棕色颗粒者为凋亡细胞, 计算凋亡细胞的阳性率。实验重复 2 次。

1.2.3 流式细胞术检测 caspase-3 活性

将前列腺癌细胞 PC-3 以 1.5×10^5 /瓶接种于 25cm² 细胞培养瓶, 在 37℃、5%CO₂ 和饱和湿度条件下培养 24h 后吸除原培养液, 共计 30 瓶, 分别加入含依维莫司浓度分别为 0mol/L (对照组)、 10^{-9} mol/L 和 10^{-8} mol/L 的 F12 培养液(无血清培养液)5ml, 每种浓度各 2 瓶分两组, 一组为检测组, 一组作同型对照, 分别处理 24h、48h 和 72h。采用 Active Caspase-3 Apoptosis Kit(BD-Pharmingen 公司)测定 caspase-3 活性。实验步骤参见说明书。

每个样本约检测 5×10^3 个细胞。用同型对照组检测值扣除本底, 用阴性对照组确定阴性范围, 采用 MultiCycle for Windows 软件分析。实验重复 2 次。

1.3 统计学处理

所有数据采用重复测量资料方差分析、LSD 检验等进行统计学分析处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 测定依维莫司对前列腺癌 PC-3 细胞的生长抑制效应

方差分析显示, 时间主效应 ($F=291.16, P < 0.001$)、分组主效应 ($F=2048.38, P < 0.001$) 及时间与分组的交互效应 ($F=40.63, P < 0.001$) 均有统计学意义, 即药物浓度和作用时间对 PC-3 细胞存活率均有影响, 同时药物浓度与作用时间存在交互作用。经 LSD 检验, 不同药物浓度间细胞存活率均有统计学差异 ($P < 0.05$), 0 mol/L 依维莫司对前列腺癌 PC-3 细胞的增殖无明显影响, 10^{-9} mol/L 和 10^{-8} mol/L 依维莫司作用 24h 后, 前列腺癌 PC-3 细胞的存活率开始降低, 生长抑制作用呈现浓度和时间依赖性 (Table 1, Figure 1)。

2.2 TUNEL 检测依维莫司诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的作用

方差分析显示, 时间主效应 ($F=3306.53, P < 0.001$)、分组主效应 ($F=11834.9, P < 0.001$) 及时间与

Table 1 Survival of PC-3 cells with various concentration of everolimus(%)

Time(h)	Everolimus concentration(mol/L)		
	0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸
24	99.13±2.71	89.64±1.27	81.01±0.98
48	97.78±2.15	79.23±0.64	73.52±0.36
72	95.62±2.76	71.09±1.82	68.92±0.73

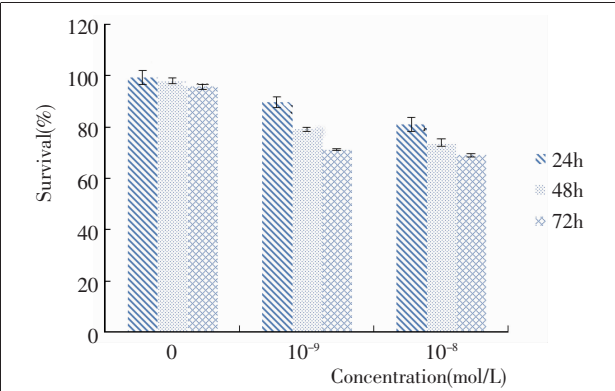


Figure 1 Survival of PC-3 cells with various concentration of everolimus

分组的交互效应 ($F=973.81, P<0.001$) 均有统计学意义。经 LSD 检验, 0mol/L、10⁻⁹mol/L 和 10⁻⁸mol/L 依维莫司任意两组之间 caspase-3 活化阳性率差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 并呈时间依赖性, 同时 10⁻⁸mol/L 依维莫司组凋亡指数率随作用时间变化较其他两组大 (Table 2, Figure 2)。

Table 2 Apoptotic index rate under various concentration of everolimus(%)

Time(h)	Everolimus concentration(mol/L)		
	0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸
24	4.18±0.37	17.39±1.28	21.34±1.02
48	6.17±0.63	24.35±0.53	48.27±0.96
72	7.23±0.92	34.17±0.87	57.04±1.12

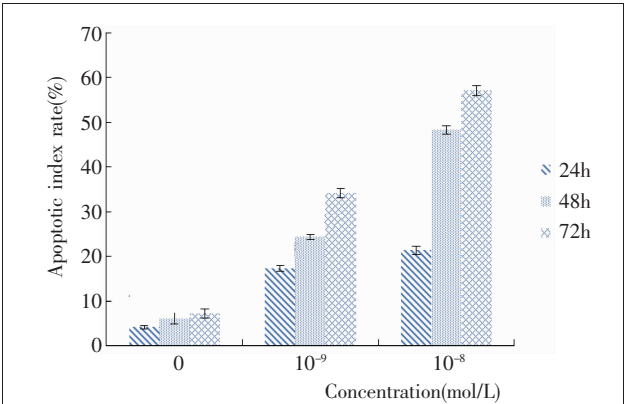


Figure 2 Apoptosis under various concentration of everolimus

2.3 流式细胞术检测 caspase-3 活性

方差分析显示, 时间主效应 ($F=2316.84, P<0.001$)、分组主效应 ($F=9657.16, P<0.001$) 及时间与分组的交互效应 ($F=957.36, P<0.001$) 均有统计学意义, 即药物浓度和作用时间对 caspase-3 活性均有影响, 同时药物浓度与作用时间存在交互作用。经 LSD 检验, 不同药物浓度组织间 caspase-3 阳性率差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。随依维莫司浓度和作用时间的增加, caspase-3 活化阳性率增加; 0mol/L 和 10⁻⁹mol/L 依维莫司作用后 caspase-3 活化阳性率差别不明显; 10⁻⁸mol/L 依维莫司作用后 caspase-3 活化阳性率有显著增强, 呈时间依赖性 (Table 3, Figure 3)。

Table 3 Positive rate of caspase-3 in various concentration of everolimus(%)

Time(h)	Everolimus concentration(mol/L)		
	0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸
24	3.72±0.37	6.17±0.83	11.78±0.35
48	5.11±0.12	8.23±1.01	25.12±0.72
72	8.43±0.51	10.46±0.29	39.45±0.61

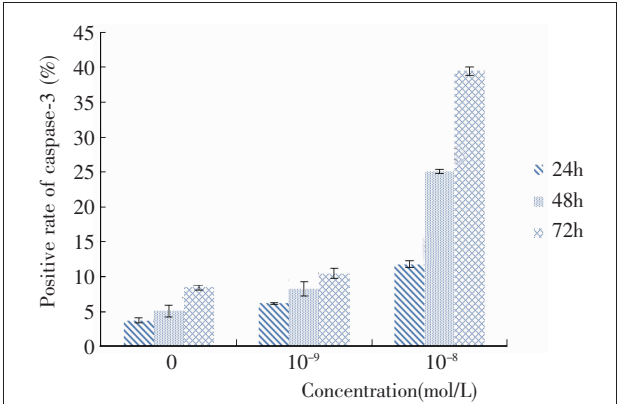


Figure 3 Positive rate of caspase-3 in various concentration of everolimus(%)

3 讨论

早期前列腺癌有手术和药物等治疗方式, 疗效较好, 但是到了晚期, 肿瘤一般转变为激素非依赖性, 预后较差。PC-3 细胞是雄激素非依赖性, 本研究依维莫司对其的作用, 以探索前列腺癌治疗的新方式。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序死亡过程, 它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等。凋亡途径分别通过内源性途径和外源性途径, 最

后在 caspase-3 处汇合,激活 caspase,开始不可逆的凋亡过程。Caspase-3 引起上述细胞凋亡相关变化的全过程尚不完全清楚,可能与灭活或下调 DNA 修复有关的酶等因素相关^[2,3]。

依维莫司是雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 抑制剂, mTOR 是 PI3K/AKT 通路下游区的丝氨酸—苏氨酸激酶。依维莫司对于细胞作用主要表现在以下方面: ①与 FKBP-12 蛋白结合,抑制 mTOR 的活性;②作用于 S6 核糖体蛋白激酶和 4E-BP 蛋白,使其活性降低,进而抑制蛋白合成^[4];③减少相关因子的表达,如血管内皮生长因子的表达等^[4,5]。Easton 等^[6]研究者证实:mTOR 能抑制细胞增殖、减少新生血管生成以及抑制细胞糖代谢过程。孙少梅等^[7]研究者发现:依维莫司作为 mTOR 抑制剂为乳腺癌的治疗提供了新的选择,它不仅预防内分泌治疗的抵抗,甚至在有些内分泌治疗抵抗的乳腺癌中可以产生良好的抑制肿瘤生长的作用。张旭^[8]相关研究证实:依维莫司在转移性肾癌中安全,不存在人种差异,对提高患者的治疗依从性、改善患者的生活质量有积极的意义。依维莫司临床上主要用来预防肾移植和心脏移植手术后的排斥反应^[9],但近几年来也进行了依维莫司对胃癌、肾细胞癌、神经内分泌肿瘤、淋巴瘤等研究,表明依维莫司对肿瘤细胞抑制作用明显,为肿瘤的治疗开拓了新的领域^[10,11]。

本实验中通过 MTT 检测,证实依维莫司对前列腺癌 PC-3 细胞的生长抑制作用;通过 TUNEL 法以及流式细胞术检测 caspase-3 活性,证实依维莫司增强 caspase-3 活性进而诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡,其作用效果与药物浓度和作用时间成正相关。推测依维莫司对于前列腺癌 PC-3 细胞主要通过以下机制:①与 FKBP-12 蛋白结合,抑制 mTOR 的活性,抑制 mTOR 下游有两个主要的靶分子(核糖体 S6 激酶和蛋白质翻译起始因子 eIF4E 结合蛋白 1),进而抑制 40S 核糖体亚单位 S6 蛋白发生磷酸化过程,影响 mRNA 的翻译,导致细胞有丝分裂障碍;②依维莫司抑制 mTOR 的活性,影响纺锤体的重新组建^[12,13];③通过内源性或是外源性途径,最终作用于 caspase-3,导致细胞凋亡。在后续的研究中,我们拟进一步探讨以下方面:①依维莫司抗肿瘤作用最佳的血药浓度;②依维莫司通过哪些信号传导通路抑制细胞的生长;③依维莫司诱导细胞凋亡的具体途径

等,全面系统研究依维莫司对激素非依赖性前列腺癌的作用。

参考文献:

- [1] Yu Y, Shi W. DNA vaccines; new strategies for the treatment of prostate cancer[J]. International Journal of Biologicals, 2011, 34(3): 151-155. [于洋, 施维. DNA 疫苗: 前列腺癌治疗的新策略 [J]. 国际生物制品学杂志, 2011, 34(3): 151-155.]
- [2] Yi TN, Zhou YF, Wu G. Research of caspase family and apoptosis[J]. Foreign Medical Sciences (Cancer Section), 2001, 28(1): 39-42. [易铁男, 周云峰, 伍钢. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展 [J]. 国外医学肿瘤学分册, 2001, 28(1): 39-42.]
- [3] Zhao YG, Xu JX. Mitochondrial, active oxygen and apoptosis[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2001, 28(2): 168-171. [赵云罡, 徐建兴. 线粒体, 活性氧和细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 168-171.]
- [4] Dazert E, Hall MN. mTOR signaling in disease [J]. Curr Opin Cell Biol, 2001, 23(6): 744-755.
- [5] Ryan DP, Appleman LJ, Lynch T, et al. Phase I clinical trial of bortezomib in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors[J]. Cancer, 2006, 107(10): 2482-2489.
- [6] Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy [J]. Oncogene, 2006, 25(48): 6436-6446.
- [7] Sun SM, Huo JG. Research progress of everolimus in breast cancer [J]. China Medical Herald, 2012, 9(8): 8-9. [孙少梅, 霍介格. 依维莫司用于乳腺癌的研究进展[J]. 中国医药导报, 2012, 9(8): 8-9.]
- [8] Zhang X. Comparison of security and management experience of adverse reactions in Chinese and foreign studies of metastatic renal cell carcinoma with everolimus[J]. Chinese Journal of Urology, 2013, 34(6): 470-473. [张旭. 转移性肾细胞癌依维莫司中外研究安全性比较及不良反应管理经验[J]. 中华泌尿外科杂志, 2013, 34(6): 470-473.]
- [9] Majewski M, Korecka M, Joergensen J, et al. Immunosuppressive TOR kinase inhibitor everolimus (RAD) suppresses growth of cells derived from posttransplant lymphoproliferative disorder at allograft-protecting doses [J]. Transplantation, 2003, 75(10): 1710-1717.
- [10] Liu Y, Zhu ZA, Cui T, et al. Effects of everolimus in combined with cisplatin on apoptosis and Bcl-2, Bax expression of human gastric cancer SGC7901 cell[J]. Chongqing Medicine, 2013, 42(2): 138-142. [刘莹, 朱祖安, 崔涛, 等. 依维莫司联合顺铂对人胃癌 SGC7901 细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 表达的影响[J]. 重庆医学, 2013, 42(2): 138-142.]
- [11] Mayerhofer M, Aichberger KJ, Florian S, et al. Identification of mTOR as a novel bifunctional target in chronic myeloid leukemia: dissection of growth-inhibitory and VEGF-suppressive effects of rapamycin in leukemic cells [J]. FASEB J, 2005, 19(8): 960-962.
- [12] Lapasset L, Pradet-Balade B, Verge V, et al. Cyclin B synthesis and rapamycin-sensitive regulation of protein synthesis during starfish oocyte meiotic divisions[J]. Mol Reprod Dev, 2008, 75(11): 1617-1626.
- [13] Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive[J]. Nat Cell Biol, 2004, 6(11): 1122-1128.