

· 论 著 ·

## 青蒿琥酯和 TRAIL 对前列腺癌细胞凋亡诱导作用的实验研究

周天贵<sup>1</sup>, 周承贵<sup>2</sup>, 袁红纲<sup>1△</sup>, 陈先国<sup>3</sup>, 袁 丁<sup>4</sup>

(1. 三峡大学第一临床医学院泌尿外科, 湖北宜昌 443003; 2. 湖北省枝江市安福寺镇中心卫生院外科 443211; 3. 华中科技大学同济医学院同济医院泌尿外科, 武汉 430030; 4. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443003)

**摘要:**目的 探讨青蒿琥酯和肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)对前列腺癌细胞(PC-3、LNCaP)凋亡的诱导作用。方法 培养前列腺癌 PC-3、LNCaP 细胞, 分别加入不同浓度的青蒿琥酯和 TRAIL, 随机分为 7 个组: 对照组、青蒿琥酯 I 组(低剂量组)、青蒿琥酯 II 组(高剂量组)、TRAIL I 组(低剂量组)、TRAIL II 组(高剂量组)、TRAIL(1 ng/mL)加青蒿琥酯(1 mmol/L) I 组及 TRAIL(1 ng/mL)加青蒿琥酯(5 mmol/L) II 组。流式细胞仪检测青蒿琥酯和 TRAIL 诱导前列腺癌细胞凋亡的凋亡率。结果 青蒿琥酯和 TRAIL 均可增加前列腺癌细胞凋亡的凋亡率, 二者联合使用诱导的前列腺癌细胞的凋亡率明显高于两种药物单独使用。结论 青蒿琥酯与 TRAIL 联合使用对前列腺癌存在诱导凋亡的协同作用。青蒿琥酯能诱导提高前列腺癌细胞对 TRAIL 的敏感性, 加强 TRAIL 的诱导肿瘤细胞凋亡的作用。

**关键词:**青蒿琥酯; 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体; 前列腺癌; 细胞凋亡

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)06-0663-03

## Experiment research on inducing apoptosis in prostate cancer cell with artesunate and TRAIL

ZHOU Tian-gui<sup>1</sup>, ZHOU Cheng-gui<sup>2</sup>, YUAN Hong-gang<sup>1△</sup>, et al.

(1. First College of Clinical Medical Science, Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003, China;

2. Anfusi Town Central Hospital of Zhijiang, Hubei 443211, China;

3. Department of Urology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 4. Medical College of Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of artesunate on prostate cancer cell lines PC-3 and LNCaP in vitro. **Methods** Prostate cancer cell lines PC-3 and LNCaP were cultured and divided into seven groups: normal control group, artesunate I group (low doses), artesunate II group (high doses), TRAIL I group (low doses), TRAIL II group (high doses), artesunate plus TRAIL group I, artesunate plus TRAIL group II. Flow cytometry(FCM) was used to examine the apoptosis rate in prostate cancer cell induced by artesunate and TRAIL. **Results** Both artesunate and TRAIL could increase the apoptosis rate in prostate cancer cell, the apoptosis rate using artesunate associated with TRAIL was much higher than that using artesunate or TRAIL alone significantly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** There may be synergistic effect on inducing apoptosis in prostate cancer cell with artesunate and TRAIL. Artesunate can increase the sensitivity of prostate cancer cell to TRAIL, and strengthen the apoptosis induced by TRAIL in prostate cancer cell. Artesunate may be a new preparation for anti-prostate cancer cell with curative effect and little side effect, it may have favourable market prospect.

**Key words:** artesunate; TRAIL; prostate cancer; apoptosis

青蒿素(artemisinin)及其衍生物是我国自主知识产权的高效抗疟疾药。青蒿琥酯(artesunate)是青蒿素的衍生物之一, 化学名称为二氢青蒿素-10- $\alpha$ -琥珀酸单酯(dihydroartemisinin-10- $\alpha$ -succinate)。随着对该药研究的深入, 人们发现其有更广泛的药理效应, 如抗肿瘤、治疗红斑狼疮、抗寄生虫、抗内毒素和治疗皮肤病等<sup>[1]</sup>。

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)<sup>[2]</sup>, 又称为凋亡素 2 配体(Apo2L), 是肿瘤坏死因子超家族成员中继 TNF、FasL 之后发现的第 3 个凋亡分子, 与死亡受体结合能活化 caspase-8, 启动线粒体依赖和线粒体非依赖两种途径诱导细胞凋亡, 还可活化 NF- $\kappa$ B 诱导激酶(NIK), 进而激活 I- $\kappa$ B 蛋白激

酶(I- $\kappa$ B kinase, I $\kappa$ K), I $\kappa$ B 磷酸化后降解并释放出 NF- $\kappa$ B<sup>[3]</sup>。活化的 NF- $\kappa$ B 与细胞核内靶基因顺式调节元件  $\kappa$ B 位点结合, 通过调节这些基因的转录来调控 TRAIL 诱导的细胞凋亡<sup>[4]</sup>。

TRAIL 对肿瘤细胞呈高选择性的杀伤效应, 可大量快速诱导其凋亡, 而正常细胞则可逃逸它的杀伤作用。TRAIL 诱导 T 淋巴白血病细胞凋亡, 机制涉及 NF- $\kappa$ B 表达增加及 caspase-3 和 caspase-8 的活化<sup>[5]</sup>。TRAIL 蛋白可显著抑制前列腺癌细胞 PC-3M 生长<sup>[6]</sup>。TRAIL 可诱导前列腺癌细胞凋亡, 受体 DR5 和 caspase-8 表达水平<sup>[7]</sup>, caspase-3、bcl-2 的表达程度起关键作用<sup>[8]</sup>。

近 20 余年来的实验及临床研究表明, 青蒿琥酯对多种肿瘤有生长抑制和诱导细胞凋亡作用<sup>[9-11]</sup>, 但关于青蒿琥酯与前

△ 通讯作者, E-mail: yuanhonggang2003@sina.com.

列腺癌关系的报道较少,并且关于联合使用青蒿琥酯与 TRAIL 诱导前列腺癌凋亡的研究在国内外报道较少。

本实验分别选择雄激素非依赖性细胞株 PC-3 和雄激素依赖性前列腺癌细胞株 LNCaP 为研究对象,观察不同浓度青蒿琥酯和 TRAIL 对前列腺癌细胞凋亡的影响,以期为临床使用青蒿琥酯和 TRAIL 治疗前列腺癌提供理论依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 青蒿琥酯注射液购自桂林南药股份有限公司(批号 030801),人前列腺癌 PC-3 细胞株购自中国典型物培养中心(CTCC),人前列腺癌 LNCaP 细胞由华中科技大学同济医学院泌尿外科实验室惠赠,碘化丙锭购自华美生物工程公司(PD)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 分组与细胞培养** 随机分为 7 个组:对照组、青蒿琥酯 I 组(低剂量组)、青蒿琥酯 II 组(高剂量组)、TRAIL I 组(低剂量组)、TRAIL II 组(高剂量组)、TRAIL(1 ng/mL)加青蒿琥酯(1 mmol/L) I 组及 TRAIL(1 ng/mL)加青蒿琥酯(5 mmol/L) II 组。人前列腺癌 PC-3 细胞及 LNCaP 细胞均培养于含 10%小牛血清(杭州四季青)的 RPM1640 培养基(Gibco)中,添加 100 u/mL 青霉素及 100 u/mL 链霉素,37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的条件下常规培养,取指数生长期约 5 × 10<sup>6</sup>/mL 细胞传代及接种于 24 孔板中,培养 12h 后加入不同浓度青蒿琥酯及 TRAIL 蛋白。

**1.2.2 流式细胞术(FCM)对 PC-3 细胞及 LNCaP 细胞的凋亡率的测定** 经各浓度药物处理 24 h 后的 PC-3 细胞及 LNCaP 细胞,消化分离为 1 × 10<sup>6</sup>/mL 的单细胞悬液,离心后用 0.1 mol/L 的 PBS 液洗涤 3 次,700 mL/L 乙醇固定 30 min,10 g/L 的 Triton 100 处理 10 min,10 g/L 的 RNase 1 mL 处理 10 min,2.5 g/L 的碘化丙锭染色 30 min,采用美国 Coulter 公司 EPL CS XL 型流式细胞仪分析,重复实验 3 次,结果取平均值。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS12.0 统计软件进行处理,所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 不同浓度青蒿琥酯及 TRAIL 作用的 PC-3 细胞凋亡率

除 TRAIL I 组以外,其余各组与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )(表 1);青蒿琥酯 I 组与青蒿琥酯 II 组、TRAIL I 组与 TRAIL II 组、TRAIL(1 ng/mL)加青蒿琥酯(1 mmol/L) I 组与 TRAIL(1 ng/mL)加青蒿琥酯(5 mmol/L) II 组两两之间比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。PC-3 细胞凋亡率随着青蒿琥酯及 TRAIL 剂量的增加而增大,具有良好的量效关系;在 TRAIL 浓度一定的情况下,凋亡率随着青蒿琥酯浓度的增大而增大( $P < 0.01$ )(图 1),结果说明青蒿琥酯及 TRAIL 均对 PC-3 细胞具有促进凋亡作用。

**2.2 不同浓度青蒿琥酯及 TRAIL 作用的 LNCaP 细胞凋亡率** 除 TRAIL I 组及 TRAIL II 组以外,其余各组与对照组相比差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )(表 1);青蒿琥酯 I 组与青蒿琥酯 II 组、TRAIL(1 ng/mL)加青蒿琥酯(1 mmol/L) I 组与 TRAIL(1 ng/mL)加青蒿琥酯(5 mmol/L) II 组两两之间比

较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );TRAIL I 组与 TRAIL II 组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。LNCaP 细胞凋亡率随着青蒿琥酯及 TRAIL 剂量的增加而增大,具有良好的量效关系;在 TRAIL 浓度一定的情况下,凋亡率随着青蒿琥酯浓度的增大而增大( $P < 0.01$ )(图 2),结果说明青蒿琥酯及 TRAIL 均对 LNCaP 细胞具有促进凋亡作用。可见,青蒿琥酯与 TRAIL 联合使用对前列腺癌存在诱导凋亡的协同作用。青蒿琥酯可以增加 TRAIL 对前列腺癌细胞的敏感性,可能可以逆转耐药细胞株对 TRAIL 的敏感性。

表 1 青蒿琥酯与 TRAIL 对前列腺癌细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分组	PC-3	LNCaP
对照组	3.86 ± 1.21	3.76 ± 1.25
青蒿琥酯 I 组	11.62 ± 1.41*	8.47 ± 1.25*
青蒿琥酯 II 组	17.67 ± 1.63*	11.09 ± 0.89*
TRAIL I 组	5.32 ± 1.20	4.03 ± 1.05
TRAIL II 组	13.99 ± 1.49*	5.98 ± 1.25
TRAIL 加青蒿琥酯 I 组	33.39 ± 1.37*	25.04 ± 1.25*
TRAIL 加青蒿琥酯 II 组	38.40 ± 1.51*	33.36 ± 1.13*

\*:与对照组比较, $P < 0.01$ 。

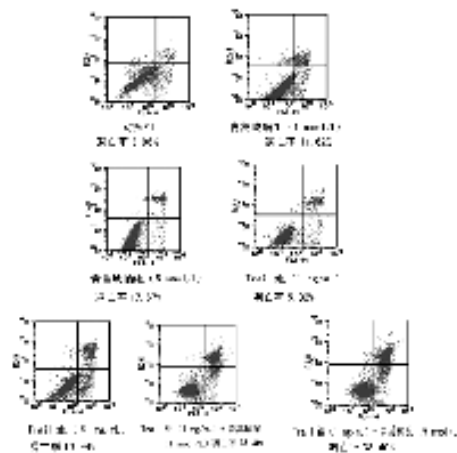


图 1 不同浓度青蒿琥酯及 TRAIL 作用于 PC-3 细胞

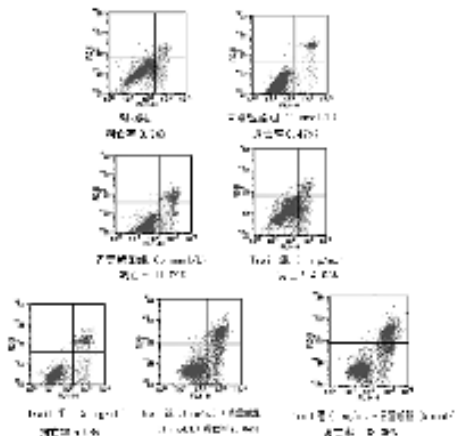


图 2 不同浓度青蒿琥酯及 TRAIL 作用于 LNCaP 细胞

## 3 讨 论

前列腺癌是老年男性常见肿瘤之一,在导致男性死亡的肿瘤性疾病中仅次于肺癌,近 10 多年来前列腺癌的发病率有逐年升高的趋势,在有些国家其发病率已达 1%,在我国也有逐年上升的趋势。目前对前列腺癌的治疗措施包括手术治疗和药物治疗。由于前列腺癌主要发生于老年男性患者,且易发生骨转移,因此手术治疗具有很大的局限性<sup>[12]</sup>。而前列腺癌经雄激素抑制药物治疗一段时间后,可能会转化为激素非依赖性肿瘤,雄激素抑制疗法就失去了治疗作用<sup>[13]</sup>。虽然对抑制前列腺癌的药物研究已做了大量工作,但目前对激素非依赖性前列腺癌仍缺乏有效的药物治疗措施<sup>[14]</sup>。因此,研究新的疗效确切、不良反应较小的抗前列腺癌新药仍是目前研究的主要任务。

青蒿琥酯是青蒿素的衍生物,具有显著的抗疟疾作用。近期研究发现,青蒿素及其衍生物对多种肿瘤细胞均有一定的抑制作用<sup>[9-11]</sup>;青蒿素抗肿瘤的作用机制,研究提示可能是通过抑制细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡来实现的<sup>[14-16]</sup>。

本实验显示,不同浓度青蒿琥酯及 TRAIL 作用的 LNCaP 细胞凋亡率,除 TRAIL I 组及 TRAIL II 组以外,其余各组与对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );LNCaP 细胞凋亡率随着青蒿琥酯及 TRAIL 剂量的增加而增大,具有良好的量效关系;在 TRAIL 浓度一定的情况下,凋亡率随着青蒿琥酯浓度的增大而增大( $P < 0.01$ ),结果说明青蒿琥酯及 TRAIL 均对 LNCaP 细胞具有促进凋亡作用。

青蒿琥酯和 TRAIL 均可增加前列腺癌细胞凋亡的凋亡率,二者联合使用诱导的前列腺癌细胞的凋亡率明显高于两种药物单独使用。可见,青蒿琥酯与 TRAIL 联合使用对前列腺癌存在诱导凋亡的协同作用。青蒿琥酯可以增加 TRAIL 对前列腺癌细胞的敏感性,可能与逆转耐药细胞株对 TRAIL 的敏感性有关。青蒿琥酯能诱导提高前列腺癌细胞对 TRAIL 的敏感性,加强 TRAIL 的诱导肿瘤细胞凋亡的作用。青蒿琥酯可以增强 TRAIL 对前列腺癌细胞的杀伤效应,效果优于两种药物单独使用。青蒿琥酯有望成为新的疗效确切、不良反应较小的抗前列腺癌新药,具有良好的市场社会前景。

本实验为青蒿琥酯用于前列腺癌的治疗提供了实验依据,为将青蒿琥酯作为抗肿瘤药物运用于临床奠定了实验基础。

## 参考文献:

- [1] 张晓艳,王新华. 青蒿的传统应用与青蒿素的现代研究[J]. 中华医药杂志,2004,5(1):23.
- [2] 于超,魏莲枝. 肿瘤细胞 TRAIL 信号传递途径中抗凋亡机制的研究进展[J]. 重庆医学,2006,35(7): 655.
- [3] Thomas G, Maria-Emily G, Demetrios K, et al. Rel/NF-

$\kappa$ B/I $\kappa$ B signal transduction in the generation and treatment of human cancer[J]. Cancer Lett,2002,181:1.

- [4] Aldieri E, Atragene D, Bergandi L, et al. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF- $\kappa$ B activation[J]. FEBS Lett,2003,552(2-3):141.
- [5] 祝瑾,李宁川,程宏. TRAIL 诱导白血病细胞凋亡的分子机制研究[J]. 实用临床医药杂志,2004,8(3):36.
- [6] 陈江,陈晓春,曾甫清. TRAIL 抑制人前列腺癌细胞 PC-3M 体外生长的实验研究[J]. 肿瘤防治研究,2004,31(7):395.
- [7] Hesry V, Piquet-Pellorce C, Travert M, et al. Sensitivity of prostate cells to TRAIL-induced apoptosis increases with tumor progression;DR5 and caspase 8 are key players[J]. Prostate,2006,66(9):987.
- [8] Munshi A, Pappas G, Honda T, et al. TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2[J]. Oncogene,2001,20(29):3757.
- [9] Wang Q, Wu LM, Zhao Y, et al. The anticancer effect of artesunate and its mechanism[J]. Yao Xue Xue Bao, 2002,37(6):477.
- [10] Dell'Eva R, Pfeffer U, Vené R, et al. Efferth T inhibition of angiogenesis in vivo and growth of Kaposi's sarcoma xenograft tumors by the anti-malarial artesunate[J]. Biochem Pharmacol,2004,68(12):2359.
- [11] Parekh HS, Liu G, Wei MQ, et al. A new dawn for the use of traditional Chinese medicine in cancer therapy[J]. Mol Cancer,2009,20(8):21.
- [12] Cao D, Hafez M, Berg K, et al. Little or no residual prostate cancer at radical prostatectomy: vanishing cancer or switched specimen? A microsatellite analysis of specimen identity[J]. Am J Surg Pathol,2005,29(4):467.
- [13] Nasu Y, Kumon H. Prostate cancer gene therapy[J]. Nippon Rinsho,2005,63(3):485.
- [14] Singh NP, Lai H. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells[J]. Anticancer Res,2004,24(4):2277.
- [15] Li Y, Shan F, Wu JM, et al. Novel antitumor artemisinin derivatives targeting G1 phase of the cell cycle[J]. Bioorg Med Chem Lett,2001,11(1):5.
- [16] 李哲,袁守军,聂丽平,等. 青蒿琥酯诱导肿瘤细胞凋亡与抑制存活蛋白表达有关[J]. 中国临床药理学杂志,2004,9(6):607.

(收稿日期:2009-08-30 修回日期:2009-12-30)

《重庆医学》——中国科技论文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!