

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.27.013

Cyclopamine 对前列腺癌 LNCaP 细胞增殖凋亡及 PSAmRNA 基因表达的影响*

吕志勇¹, 吕凌东¹, 吴小侯²

(1. 宁夏医科大学附属医院泌尿外科, 银川 750004; 2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科 400016)

摘要:目的 探讨 Cyclopamine 对前列腺癌 LNCaP 细胞增殖、凋亡的作用及对 PSAmRNA 基因表达的影响。方法 不同水平 Cyclopamine(1、5、10、15 $\mu\text{mol/L}$) 干预 LNCaP 细胞不同时间(24、48、72 h), MTT 法检测其对细胞增殖的抑制, Hoechst33258 染色观察细胞形态变化, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(FQ-RT-PCR)观察 PSAmRNA 基因表达的影响。结果 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 组 Cyclopamine 对 LNCaP 细胞增殖有显著抑制作用, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 10 $\mu\text{mol/L}$ 组于 48 h 达到 IC₅₀; 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 组的 24、48、72 h 凋亡率分别为 37.21%、57.38%、57.98% 和 21.16%、71.31%、72.90%, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。细胞凋亡形态的改变随着 Cyclopamine 水平增大和作用时间的延长也显著增强。PSAmRNA 基因的表达水平随着水平的上升呈现明显的递减趋势, 较对照组显著降低($P < 0.01$); 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 水平的 Cyclopamine 在不同时间段 PSAmRNA 基因的表达均极低。结论 Cyclopamine 能够明显抑制 LNCaP 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡, 并显著下调 LNCaP 细胞 PSAmRNA 基因的表达, 一定水平 Cyclopamine 可能对晚期前列腺癌的治疗有效。

关键词:前列腺肿瘤; 细胞增殖; Cyclopamine

中图分类号: R737.25

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)27-3584-04

Effects of Cyclopamine on proliferation, apoptosis and expression of PSAmRNA in prostate cancer LNCaP cells*

Lv Zhiyong¹, Lv Lingdong¹, Wu Xiaohou²

(1. Department of Urology, Affiliated Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China;

2. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of cyclopamine on the proliferation, apoptosis and the expression of PSAmRNA in prostate cancer LNCaP cells. **Methods** LNCaP cells were interfered with different concentrations of cyclopamine(1, 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$) at the different timepoints(24, 48, 72 h). The proliferation inhibition was measured by the MTT assay; the apoptotic morphological changes were observed by the Hoechst33258 staining method; the apoptosis rate was examined by the flow cytometry; the effects of PSAmRNA gene expression was detected by the FQ-RT-PCR. **Results** 5, 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine groups had obvious inhibition effect on the LNCaP cell proliferation, which had statistically significant difference compared with the control group($P < 0.01$). 10 $\mu\text{mol/L}$ group reached IC₅₀ at 48 h; the apoptosis rates at 24, 48, 72 h in the 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ groups were 37.21%, 57.38%, 57.98% and 21.16%, 71.31%, 72.90% respectively, the difference had statistically significant difference compared with the control group($P < 0.01$). The cellular apoptotic morphological changes were significantly enhanced with the increase of cyclopamine concentration and the extension of action time. The expression level PSAmRNA gene exhibited the obvious decreasing trend with the increase of cyclopamine concentration and was significantly decreased compared with the control group($P < 0.01$). The PSAmRNA gene expression was extremely low in 10, 15 $\mu\text{mol/L}$ cyclopamine at different time period. **Conclusion** Cyclopamine significantly inhibits the proliferation of LNCaP cells, induces apoptosis and obviously down-regulates the PSAmRNA gene expression in LNCaP cells. Certain concentration of cyclopamine may be effective for treating advanced prostate cancer.

Key words: prostate neoplasms; cell proliferation; Cyclopamine

PSAmRNA 在正常人外周血中不表达, 当前列腺癌细胞脱落进入血液循环后, 外周血中才能检测出 PSAmRNA^[1-2]。在外周血液中检测出 PSAmRNA 即意味着前列腺肿瘤细胞发生了微转移^[3]。Hh 信号通路在晚期前列腺癌生长、转移中具有重要作用^[4], Cyclopamine 是其特异性抑制剂^[5]。Cyclopamine 阻断 Hh 信号通路对 PSAmRNA 影响的研究尚未见报道, 本实验采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(FQ-RT-PCR)方法观察不同水平 Cyclopamine(1、5、10、15 $\mu\text{mol/L}$) 在不同作用时间(24、48、72 h) 对前列腺癌 LNCaP 细胞 PSAmRNA 基

因表达的影响, 明确 Cyclopamine 对 PSAmRNA 基因表达有无影响及与时间、水平变化之间的关系。为晚期前列腺癌靶向治疗提供进一步的理论依据, 为将来开展动物实验及联合用药研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人前列腺癌 LNCaP 细胞株购自中科院上海细胞库。Cyclopamine 购自 Biomol 公司, Hoechst33258 试剂盒、MTT 购自 Sigma 公司, 胎牛血清、RPMI1640 培养基购自 Hyclone 公司, Annexin-V 凋亡试剂盒购自 Itrogen 公司, RNA

* 基金项目: 宁夏回族自治区卫生厅重点科研计划项目资助。 作者简介: 吕志勇(1969—), 博士, 主任医师, 主要从事泌尿外科肿瘤临床和基础研究。

提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司, PrimeScript RT reagent Kit(Perfect Real Time), SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)、Premix Ex Taq Version2.0 购自 Takara 公司, 上下游引物均由大连宝生物工程有限公司(Takara)设计合成, 其他化学试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LNCaP 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清 RPMI1640 培养液中, 在 37 °C、5% CO₂ 的孵箱内培养。每 2~3 天 1:2 传代 1 次, 取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 MTT 实验 LNCaP 细胞以 5×10³ 个/mL 密度接种于 96 孔板, 分 5 组, 分别加入终水平 1、5、10、15 μmol/L 的 Cyclopamine(实验组)和 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液(对照组)。培养 24、48、72 h 后每孔加入 20 μL MTT(5 mg/mL)继续培养 4 h, 弃上清加入 100 μL 二甲基亚砷置于微量振荡器上振荡 10 min, 在酶标仪上检测 570 nm 波长的吸光度值(A)。以对照组的 A 值作为对照, 细胞抑制率(IR)用下列公式计算: IR=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%。上述实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞术 实验组加药 24、48、72 h 后, 根据 Annexin-V 凋亡试剂盒说明的操作流程, 标记 Annexin-V-FITC 和 PI, 1 h 内在流式细胞仪检测细胞凋亡率。检测结果的判定: 正常细胞 Annexin-V 阴性、PI 阴性, 早期凋亡 Annexin-V 阳性、PI 阴性, 晚期凋亡 Annexin-V 阳性、PI 阳性, 死亡细胞 Annexin-V 阴性、PI 阳性。

1.2.4 Hoechst33258 染色 在激发波长 350 nm 左右, 发射波长 460 nm 左右荧光显微镜下观察, 细胞发生凋亡时, 会看到凋亡细胞的细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染, 呈强蓝色。

1.2.5 FQ-RT-PCR 检测 PSA mRNA 表达水平

1.2.5.1 总 RNA 提取、纯化及 cDNA 合成 不同水平 Cyclopamine(1、5、10、15 μmol/L)分别作用 24、48、72 h 后 Trizol 法提取总 RNA, 进行纯化, 1% 琼脂糖凝胶检测其完整性, 分光光度计测定其在 260 nm 时的 A 值和水平。

1.2.5.2 FQ-RT-PCR 反应 反应体系: (1) SYBR Premix Ex Taq™, 10.0 μL; (2) PCR 正向引物(10 μmol/L) 0.8 μL; (3) PCR 反向引物(10 μmol/L) 0.8 μL; (4) 范本(cDNA 溶液) 2 μL; (5) dH₂O 6.4 μL。PSA 引物 Forward: 5'-CTG ACT GTC AAG CTG AGG-3'; Reverse: 5'-GAA GAA GGA GGT GTC TGG-3', 产物长度 470 bp; Actin 引物 Forward: 5'-AGC GAG CAT CCC CCA AAG TT-3', Reverse: 5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3', 产物长度 285 bp。

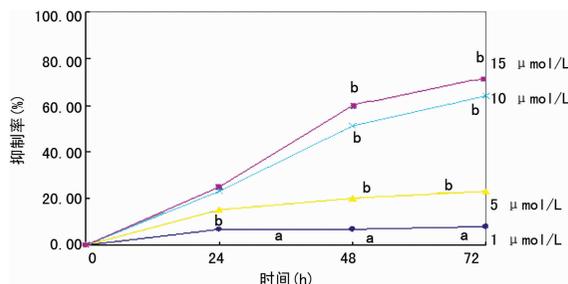
1.2.5.3 PSA、Actin 基因 PCR 检测 反应体系 cDNA 1.0 μL, F 1.0 μL, R 1.0 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1.0 μL, 10× ExTaq Buffer 2.5 μL, TaKaRa ExTaq(5.0 U/μL) 1.0 μL, DdH₂O 12.5 mL。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本均数间比较采用单因素方差分析, P<0.05 为差异有统计学意义。采用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量并取平均值。样品相对表达量=持家基因表达量均值/目的基因表达量均值。

2 结果

2.1 MTT 检测结果 5、10、15 μmol/L 组对 LNCaP 细胞增殖有显著抑制作用, 与对照组相比差异有统计学意义(P<

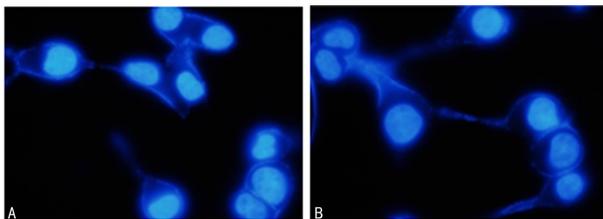
0.01), 其中 10 μmol/L 组于 48 h 达到 IC₅₀。见图 1。



^a: P>0.05, ^b: P<0.01, 实验组与对照组相比较。

图 1 Cyclopamine 作用于 LNCaP 细胞后对增殖的影响

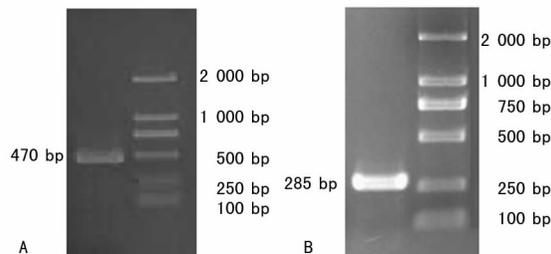
2.2 Hoechst33258 染色结果 结果显示 10、15 μmol/L 水平的 Cyclopamine 与 LNCaP 细胞作用 48 h 时 LNCaP 细胞凋亡形态的改变。见图 2。



A: 10 μmol/L; B: 15 μmol/L。

图 2 不同水平 Cyclopamine 与 LNCaP 细胞作用 48 h Hoechst33258 染色结果(×20)

2.3 总 RNA 提取及细胞因子 PCR 结果 提取的所有样品的总 RNA 质量较好, 反转录合成的 cDNA 质量较好, 完全可以用于后续的荧光定量分析, 见图 3。



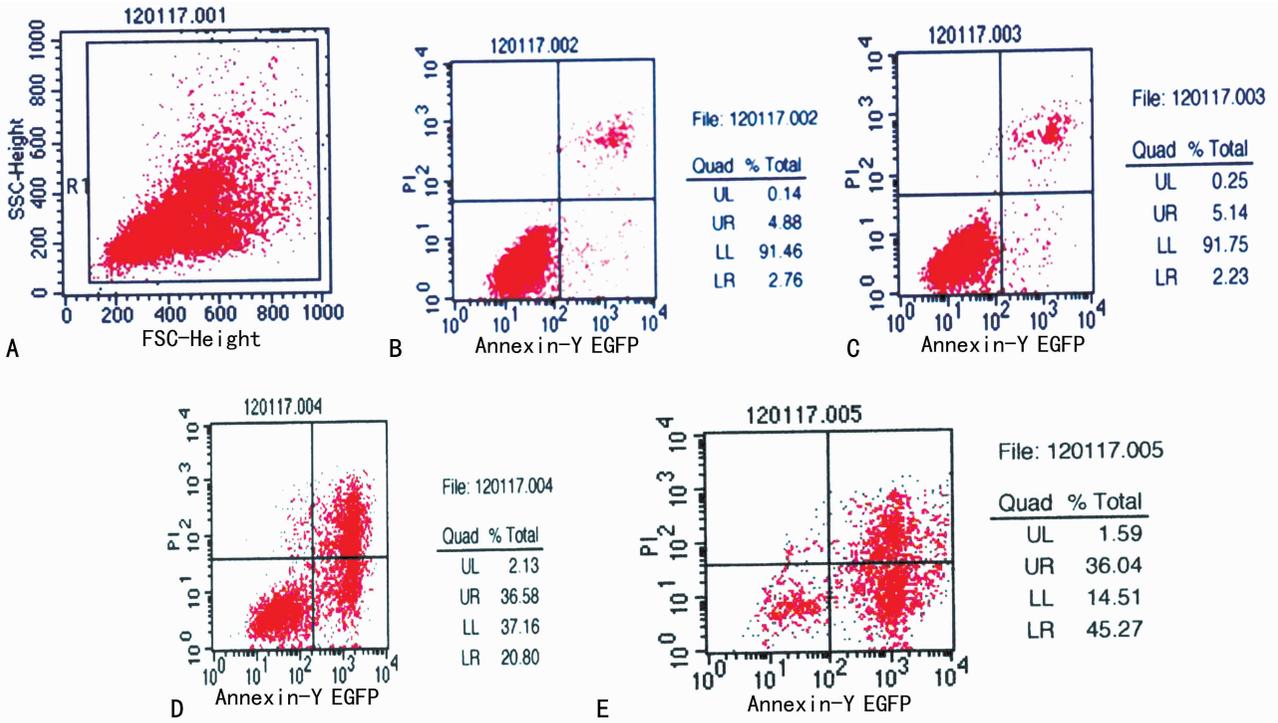
A: PSA PCR 结果图; B: β-actin PCR 结果。

图 3 总 RNA 提取及细胞因子 PCR 结果

2.4 流式细胞仪分析结果 不同水平(1、5、10、15 μmol/L) Cyclopamine 作用 LNCaP 细胞 48 h 后细胞凋亡率分别为 7.37%、7.56%、57.38%, 和 71.31%, 其中 10、15 μmol/L 组的 24、48、72 h 凋亡率分别为 37.21%、57.38%、57.98% 和 21.16%、71.31%、72.90%, 与对照组相比差异有统计学意义(P<0.01), 见图 4。

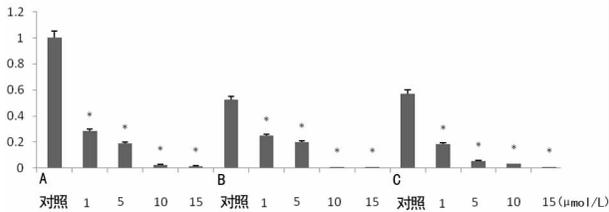
2.5 荧光定量分析结果 PSA 基因的溶解、扩增曲线良好, 溶解 Tm 值稳定, 峰值单一, 说明扩增效率一致, 并且产物的特异性良好。

2.6 Cyclopamine 对前列腺癌 LNCaP 细胞 PSA mRNA 表达的影响 随着 Cyclopamine 水平的上升, PSA mRNA 的表达呈现递减趋势, 较对照组显著降低(P<0.01)。水平为 10 μmol/L 时在不同时间段 PSA mRNA 的表达均极低。见图 5。



A: 对照组; B: 1 $\mu\text{mol/L}$; C: 5 $\mu\text{mol/L}$; D: 10 $\mu\text{mol/L}$; E: 15 $\mu\text{mol/L}$.

图 4 不同水平 Cyclopamine 作用 LNCaP 细胞 48 h 后细胞凋亡散点图



A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h. * : $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 5 不同的水平 Cyclopamine 作用 LNCaP 细胞在不同时间 PSAmRNA 基因的表达图

3 讨 论

我国前列腺癌发病率近年呈显著增长趋势,大部分患者初诊时已为晚期,丧失了手术机会,内分泌治疗在初期有一定作用,但经过中位时间 14~30 个月后,几乎所有病变最终发展为趋势抵抗性前列腺癌,尚无有效的治疗方法,已成为危害老年男性健康的重大疾病。因此寻找新型的治疗晚期前列腺癌的策略和药物,阻止前列腺癌的进展是当前前列腺癌研究的重要内容。Hh 信号通路在晚期前列腺癌生长、转移中具有重要作用。Karhadkar 等^[6]的研究发现持续性的 Hh 信号通路激活可使前列腺祖细胞产生癌变。而通道活性的持续增高会导致未转移的前列腺癌发生广泛转移,控制该通路的活性可能抑制肿瘤的转移和侵袭力。若该信号通路被抑制,也许会为晚期前列腺癌提供新的很有希望的靶向性治疗手段和方法。研究证实^[4,7]进展期前列腺癌和转移性前列腺癌中 Hh 信号通路普遍过度活化,前列腺癌转移灶中 Hh 信号通路的活性明显高于原发灶中 Hh 信号通路的活性,Hh 信号通路在前列腺癌临床治疗抵抗、转移和恶化中起关键作用。Cyclopamine 是从藜芦属植物内分离得到的一种异甾体类生物碱^[5]。基础研究证实 Cyclopamine 通过特异性对抗 Hh 信号通路中膜蛋白 Smo,使

依靠 Smo 的细胞内信号转导的肿瘤基因的转录与表达受到抑制来抑制通路的活性^[8-9]。

血清 PSA 主要以复合前列腺抗原形式存在^[10],PSAmRNA 在正常人外周血中不表达,当前列腺癌细胞脱落进入血液循环后,外周血中才能检测出 PSAmRNA^[1]。因而,在外周血中检测出 PSAmRNA 说明血中存在着前列腺癌细胞,即意味着前列腺肿瘤细胞发生了微转移^[11-12]。研究证实 PSAmRNA 在前列腺癌分期、疗效监测及预后上有重要的意义^[13]。前列腺癌向远处转移主要是通过血液转移的方式,前列腺癌最常见的骨转移即是肿瘤细胞经血液转移的结果。现有的临床研究发现大约有 60% 的前列腺癌患者在明确诊断时就已经发生了转移,已属晚期前列腺癌患者,没有有效的治疗方式,一般情况下预后不良。Hh 信号通路阻断对前列腺癌 LNCaP 细胞 PSAmRNA 表达的调控及影响条件的研究国内外尚未见报道。本实验探讨不同水平 Cyclopamine(1,5,10,15 $\mu\text{mol/L}$)在不同作用时间(24,48,72 h)对人前列腺癌 LNCaP 细胞增殖和凋亡的作用及对 PSAmRNA 基因表达的影响。结果显示 5、10、15 $\mu\text{mol/L}$ 组 Cyclopamine 对 LNCaP 细胞增殖有显著抑制作用,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),10 $\mu\text{mol/L}$ 组于 48 h 达到 IC₅₀;10,15 $\mu\text{mol/L}$ 组 24,48,72 h 凋亡率分别为 37.21%、57.38%、57.98% 和 21.16%、71.31%、72.90%,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。细胞凋亡形态的改变随着 Cyclopamine 水平增大和作用时间的延长也显著增强。PSAmRNA 基因的表达水平随着水平的上升呈现明显的递减趋势,较对照组显著降低($P < 0.01$),值得注意的是 10、15 $\mu\text{mol/L}$ 水平的 Cyclopamine 在 3 个时间段 PSAmRNA 基因的表达量均极低。

本实验表明一定水平的 Cyclopamine 能够明显抑制 LNCaP 细胞的增殖,诱导细胞凋亡,并显著下调 LNCaP 细胞

PSAmRNA 基因的表达,一定水平 Cyclopamine 可能对转移性前列腺癌的治疗有效。

参考文献:

- [1] 张利,王东文. 外周血 PSAmRNA 检测在前列腺癌微转移中的意义[J]. 国外医学:泌尿系统分册,2004,9(5):605-607.
- [2] Straub B, Muller M, Krause H, et al. Detection of prostate-specific antigen RNA before and after radical retropubic prostatectomy and transurethral resection of the prostate using "light-cycler"TM-based quantitative real-time polymerase chain reaction[J]. Urology,2001,58(5):815-820.
- [3] Cardillo MR, Di Silverio F, Gentile V. Reliability of PSA circulating cells as markers of metastatic prostate cancer [J]. Scand J Clin Lab Invest,2004,64(7):687-689.
- [4] Shaw G, Price AM, Ktori E, et al. Hedgehog signalling in androgen Independent prostate cancer [J]. Eur Urol, 2008,54(6):1333-1343.
- [5] Chen JK, Taipale J, Cooper MK, et al. Inhibition of hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to smoothed[J]. Genes Dev,2002,16(21):2743-2748.
- [6] Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis [J]. Nature,2004,431(79):707-712.
- [7] Sheng T, Li C, Zhang X, et al. Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer [J]. Mol Cancer, 2004,3:29.
- [8] Mimeault M, Johansson SL, Vankatraman G, et al. Com-

bined targeting of epidermal growth factor receptor and hedgehog signaling by gefitinib and cyclopamine cooperatively improves the cytotoxic effects of docetaxel on metastatic prostate cancer cells[J]. Mol Cancer Ther,2007,6(3):967-978.

- [9] Shaw G, Prowse DM. Inhibition of androgen-independent prostate cancer cell growth is enhanced by combination therapy targeting Hedgehog and ErbB signalling [J]. Cancer Cell Int,2008,8:3.
- [10] 胡望平,冯福英,叶桂云,等. 血清 c-PSA 及 C/T 在提高前列腺癌诊断特异性中的探讨[J]. 第三军医大学学报,2007,29(18):1815-1817.
- [11] Rubenstein M, Hollowell CM, Guinan P. Increased prostate-specific membrane antigen expression in LNCaP cells following treatment with bispecific antisense oligonucleotides directed against bcl-2 and EGFR[J]. Med Oncol, 2010,27(4):1212-1218.
- [12] Zhang LG, Wang CY, Yang R, et al. Real-time quantitative RT-PCR assay of prostate-specific antigen and prostate-specific membrane antigen in peripheral blood for detection of prostate cancer micrometastasis[J]. Urol Oncol,2008,26(6):634-640.
- [13] Michel V, Licon-Munoz Y, Trujillo K, et al. Inhibitors of vacuolar ATPase proton pumps inhibit human prostate cancer cell invasion and prostate-specific antigen expression and secretion[J]. Int J Cancer,2013,132(2):E1-10.

(收稿日期:2014-03-27 修回日期:2014-05-13)

(上接第 3583 页)

参考文献:

- [1] Seneviratne CJ, Wang Y, Jin L, et al. Candida albicans biofilm formation is associated with increased anti-oxidative capacities[J]. Proteomics,2008,8(14):2936-2947.
- [2] Zaoutis TE, Argon J, Chu J, et al. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: A propensity analysis [J]. Clin Inf Dis,2005,41(9):1232-1239.
- [3] Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem [J]. FEMS Yeast Res,2006,6(7):979-986.
- [4] Di BG, Pompilio A, Picciani C, et al. D'antonio D, piccolomini R. biofilm formation by the emerging fungal pathogen trichosporon asahii: development, architecture, and antifungal resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006,50(10):3269-3276.
- [5] Davis SR. An overview of the antifungal properties of alliin and its breakdown products--the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic[J]. Mycoses, 2005,

48(2):95-100.

- [6] Sardi Jde C, Pitanguí Nde S, Rodríguez-Arellanes G, et al. Highlights in pathogenic fungal biofilms[J]. Rev Iberoam Micol,2014,31(1):22-29.
- [7] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms[J]. Annu Rev Microbiol,1995,49:711-745.
- [8] Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, et al. Antifungal susceptibility of Candida albicans in biofilms[J]. Mycoses, 2012,55(3):199-204.
- [9] Fayyaz M, Mirza IA, Ikram A, et al. Pathogens causing blood stream infections and their drug susceptibility profile in immunocompromised patients[J]. J Coll Physicians Surg Pak,2013,23(12):848-851.
- [10] Haghghi F, Mohammadi SR, Mohammadi P, et al. The evaluation of Candida albicans biofilms formation on silicone catheter, PVC and glass coated with Titanium dioxide nanoparticles by XTT method and ATPase assay[J]. Bratisl Lek Listy,2012,113(12):707-711.

(收稿日期:2014-03-25 修回日期:2014-05-17)