

积雪草酸对前列腺癌细胞增殖及转化生长因子 $\beta 1$ 诱导的上皮间质转化的影响

刘嘉¹, 严宝飞¹, 张景正¹, 周兴宇¹, 曾庆琪^{1,2} (1. 江苏卫生健康职业学院, 江苏 南京 211800; 2. 南京中医药大学第一附属医院, 江苏 南京 210029)

摘要: **目的** 观察积雪草酸对前列腺癌细胞 DU145 和 PC-3 增殖、迁移、侵袭的影响, 并探讨其对上皮间质转化(EMT)的影响和潜在调控机制。**方法** 体外培养 DU145 和 PC-3 细胞, 以不同浓度积雪草酸干预后, 采用 MTT 法检测其对细胞活力的影响; 通过克隆形成实验检测其对细胞克隆形成能力的影响; 通过细胞划痕实验、Transwell 迁移及侵袭实验观察低浓度积雪草酸(10 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)诱导后 DU145 和 PC-3 细胞迁移、侵袭的影响; 采用 Western Blot 法检测 DU145 细胞的血管内皮生长因子 A (VEGFA)和 EMT 相关纤维连接蛋白(Fibronectin)、波形蛋白(Vimentin)、N-钙黏蛋白(N-Cadherin)、Snail 及 E-钙黏蛋白(E-Cadherin)的表达情况。**结果** 积雪草酸可浓度及时间依赖性地抑制 DU145 和 PC-3 细胞增殖, 干预 24、48、72 h 后的 IC_{50} 值分别为 29.10、17.52、11.53 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 27.91、21.43、14.82 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。积雪草酸(10 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能够明显抑制 DU145 及 PC-3 细胞克隆形成能力。与空白组比较, TGF- $\beta 1$ 能够明显促进 DU145 和 PC-3 细胞的划痕愈合($P < 0.01$), 促进 DU145 细胞的侵袭($P < 0.05$), 上调 DU145 细胞内 VEGFA 蛋白和间质指标 Fibronectin、Vimentin、N-Cadherin、Snail 蛋白的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$), 下调上皮指标 E-Cadherin 蛋白表达($P < 0.05$), 进而诱导细胞 EMT 进程。与 TGF- $\beta 1$ 组比较, 10 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的积雪草酸能明显抑制 TGF- $\beta 1$ 诱导后的 DU145、PC-3 细胞划痕愈合及 Transwell 细胞迁移、侵袭($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈现浓度依赖性; $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的积雪草酸能明显下调 TGF- $\beta 1$ 诱导的 DU145 细胞内的 VEGFA、Fibronectin、Vimentin、N-Cadherin、Snail 蛋白表达($P < 0.05$), 上调 E-Cadherin 蛋白表达($P < 0.05$), 进而逆转 TGF- $\beta 1$ 诱导的 EMT 进程。**结论** 积雪草酸可抑制前列腺癌细胞 DU145 和 PC-3 增殖, 并逆转 TGF- $\beta 1$ 诱导的前列腺癌细胞 DU145 的 EMT 进程, 从而发挥其抗前列腺癌细胞侵袭、转移的作用。

关键词: 积雪草酸; 前列腺癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化; 转化生长因子 $\beta 1$

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)02-0151-07

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.02.002

Effects of Asiatic Acid on Proliferation of Prostate Cancer Cells and Epithelial-mesenchymal Transition Induced by TGF- $\beta 1$

LIU Jia¹, YAN Baofei¹, ZHANG Jingzheng¹, ZHOU Xingyu¹, ZENG Qingqi^{1,2} (1. Jiangsu Health Vocational College, Nanjing 211800 Jiangsu, China; 2. The First Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029 Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of asiatic acid(AA) on the proliferation, migration and invasion of human prostate cancer cells DU145 and PC-3, and to explore its effect on epithelial-mesenchymal transition(EMT) and the potential mechanism. **Methods** DU145 and PC-3 cells were cultured in vitro and treated with different

收稿日期: 2021-02-01

作者简介: 刘嘉, 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 中药资源化学研究。Email: liujia402@163.com。共同第一作者: 严宝飞, 男, 硕士, 助教, 研究方向: 中药资源化学研究。Email: baofei@163.com。通信作者: 曾庆琪, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治肿瘤研究。Email: zengq111@126.com。

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20191498); 国家中医药管理局名医验方评价与转化重点实验室开放课题(NZYJDMF-2020001); 江苏省卫生健康委医学科研项目(重点项目, ZDB2020020); 南京浦口区科技发展社会事业项目(S2020-14)。

concentrations of AA. The effects of AA on cell viability were detected by MTT assay. Colony forming assay was performed to assess the changes in colony forming compatibility of the cells. The effects of cell migration and invasion of AA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and TGF- $\beta 1$ ($5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) on DU145 and PC-3 cells were observed by cell scratching test, Transwell migration and invasion test. The protein expression of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and EMT related Fibronectin, Vimentin, N-cadherin, Snail and E-cadherin in DU145 cells were detected by Western Blot after intervened with AA and TGF- $\beta 1$. **Results** AA significantly inhibited the proliferation of DU145 and PC-3 cells in a concentration-dependent and time-dependent manner, and the IC_{50} values of AA were $29.10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (24 h), $17.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (48 h) and $11.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (72 h) for DU145 cells; $27.91 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (24 h), $21.43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (48 h) and $14.82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (72 h) for PC-3 cells. Compared with control group, TGF- $\beta 1$ significantly promoted the scratched healing of DU145 and PC-3 cells ($P < 0.01$), significantly promoted the expression of VEGFA and interstitial indexes such as Fibronectin, Vimentin, N-cadherin and Snail ($P < 0.05$, $P < 0.01$), significantly inhibited the expression of epithelial index such as E-cadherin in DU145 cells ($P < 0.05$), and then induced the process of EMT. Compared with TGF- $\beta 1$ group, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA could significantly inhibit the scratched healing, migration and invasion of DU145 and PC-3 cells after TGF- $\beta 1$ treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in a concentration-dependent manner. $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AA significantly inhibited the expression of VEGFA, Fibronectin, Vimentin, N-cadherin and Snail ($P < 0.05$), significantly promoted the expression of E-cadherin in DU145 cells after TGF- $\beta 1$ treatment ($P < 0.05$), and then reversed the process of EMT induced by TGF- $\beta 1$. **Conclusion** AA could inhibit the proliferation of DU145 and PC-3 cells. AA could also reverse TGF- $\beta 1$ -induced EMT process of DU145 cells, which could lead to effect of preventing cell migration and invasion.

Keywords: Asiatic acid; prostate cancer; proliferation; migration; invasion; epithelial-mesenchymal transition (EMT); TGF- $\beta 1$

前列腺癌是发生在前列腺的上皮型恶性肿瘤,亦是男科最常见的恶性肿瘤。近年来,我国前列腺癌的发病率和死亡率持续上升,严重影响男性生命健康^[1]。前列腺癌可侵袭至膀胱等邻近器官,亦能通过血液等途径远端转移至骨骼或其他器官,是中晚期前列腺癌患者预后不良最终进展为去势抵抗性前列腺癌的主要原因^[2],故寻找防治前列腺癌转移药物具有重要意义。诸多证据^[3-4]显示,上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肿瘤的发生、转移及恶性转化中都发挥着重要作用,与前列腺癌等恶性肿瘤的发展过程关系密切。

积雪草酸(Asiatic acid)是临床常用中药积雪草的有效成分之一,是一种具有广泛生物活性的五环三萜类化合物(结构见图1)^[5]。现代研究^[6-7]证实,积雪草酸具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、神经保护、保肝、降血脂等药理作用。目前,关于积雪草酸抗肿瘤作用机制的研究主要集中在诱导舌癌、乳腺癌等肿瘤细胞凋亡方面^[8-9],暂未见其对前列腺癌 EMT 作用的研究。因此,本研究拟以体外培养前列腺癌细

胞 DU145 和 PC-3 为对象,观察积雪草酸对 DU145、PC-3 细胞迁移及侵袭能力的影响,并探讨其对 EMT 进程的影响及初步机制,以期积雪草酸临床治疗前列腺癌提供实验支撑。

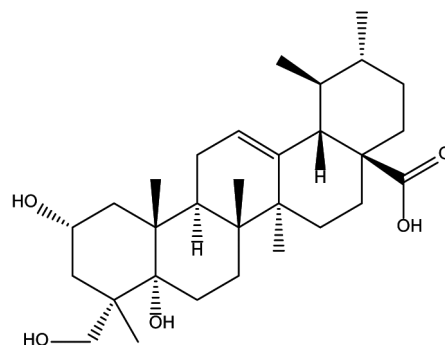


图1 积雪草酸的化学结构

Figure 1 Structure of asiatic acid

1 材料与方法

1.1 细胞株 人前列腺癌细胞 DU145、PC-3,均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC 细胞库),以含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养于 5% CO_2 、湿度

95%、37℃恒温细胞培养箱中。

1.2 药物及试剂 积雪草酸(批号: JXCS20200603, 纯度 $\geq 98\%$), 南京春秋生物工程有限公司; 胎牛血清(批号: FSS500), 杭州四季青公司; DMEM 培养基(批号: 1776550), 美国 Gibco 公司; 重组人转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, 批号: 100-21C), 美国 Peprotech 公司; 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 批号: M-2253), 美国 Spectrum Chemical 公司; 二甲基亚砜(DMSO, 批号: 276855), 美国 Sigma 公司; Transwell 嵌套(批号: 01212337)、Transwell 小室(批号: 01212004), 均购自美国 Costar 公司; Matrigel 基质胶(批号: 356234), 美国 BD 公司; 细胞核蛋白抽提试剂盒(批号: P0027)、Giemsa 染液(批号: C0133), 均购自南京碧云天生物技术公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒(批号: 23246)、PVDF 膜(批号: LC2002), 均购自美国赛默飞世尔科技公司; 血管内皮生长因子 A(VEGFA, 批号: 5361)、纤维连接蛋白(Fibronectin, 批号: 3571)、波形蛋白(Vimentin, 批号: 3743)、N-钙黏蛋白(N-Cadherin, 批号: 4762)、Snail(批号: 5813)、E-钙黏蛋白(E-Cadherin, 批号: 3357)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 批号: 3465)、组蛋白 H3(Histone H3, 批号: 6524)抗体, 均购自美国 CST 公司。

1.3 主要仪器 TS100 型倒置显微镜, 日本尼康公司; MINI-4 小型垂直电泳仪, 美国伯乐公司; EnVision 多功能酶标仪, 美国 PE 公司。

1.4 MTT 法检测细胞存活率 收集对数生长期的 DU145 和 PC-3 细胞, 以每孔 100 μL 体积(细胞数为 5 000)接种于 96 孔板中, 分别加入最终浓度为 0、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 积雪草酸干预 24、48、72 h(细胞贴壁后且每孔细胞数约为 70%~80%时加药), 再加入 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT, 继续孵育 4 h; 弃上清液, 加入 DMSO, 采用酶标仪(波长 492 nm)测定各孔吸光度值, 计算: 细胞存活率(%)=(实验组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.5 平板克隆形成实验 收集对数生长期的 DU145 和 PC-3 细胞, 然后接种于 6 孔板中(细胞密度为 $1\times 10^3\cdot\text{mL}^{-1}$), 培养箱过夜培养; 再分别加入不同浓度积雪草酸(10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 空白组加入 1% DMSO, 每 24 h 更换培养液, 连续培养 14 d; 弃上清液, 继续用 4%多聚甲醛固定 30 min, 0.1%结晶紫染色 30 min, PBS 洗涤 3 次, 然后用倒置显微镜观察、拍照。

1.6 细胞划痕实验 收集对数生长期的 DU145 和 PC-3 细胞, 然后接种于 12 孔板中(细胞密度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$), 并在其中放置 Culture-insert 插件(可产生确定的 500 μm “划痕”区域), 底部与板粘贴紧密; 过夜培养至细胞基本融合后, 取出插件, PBS 洗涤细胞 2 次后, 加入不同浓度积雪草酸(10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 TGF- $\beta 1$ (5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 空白组加入 1% DMSO 培养基, 继续培养 24 h; 采用倒置显微镜于 0、24 h 观察并拍照, 计算: 细胞划痕愈合率(%)=(对照组划痕宽度/实验组划痕宽度) $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell 细胞迁移实验 收集对数生长期的 DU145 和 PC-3 细胞, 胰蛋白酶消化, 以无血清培养液重悬, 利用细胞计数仪计数; 以每孔 200 μL (细胞密度为 $2.5\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$)细胞悬液接种于 Transwell 小室上层, 并加入不同浓度积雪草酸(10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 TGF- $\beta 1$ (5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 空白组加入 1% DMSO。将 600 μL 正常培养液(含 10%胎牛血清)加至 Transwell 小室下层, 置于培养箱中培养。24 h 后吸弃培养液, PBS 洗涤小室 3 次, 用棉签去掉小室上层细胞; 继续用 4%多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤小室 3 次, 加入 Giemsa 染色 30 min; PBS 洗涤小室 3 次, 用倒置显微镜观察并随机选择 3 个视野拍照, 计算穿膜细胞数。

1.8 Transwell 小室侵袭实验 用稀释后的 Matrigel 胶(无血清培养基 1:8 稀释)均匀平铺在 Transwell 小室上室内(每孔 50 μL), 培养箱孵育后, 按照“1.7”项下步骤进行细胞侵袭实验。

1.9 细胞核蛋白提取 冰上解冻细胞核蛋白抽提试剂盒, 混匀。取适量试剂 A 及细胞核抽提试剂, 预加入 PMSF 使最终浓度为 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; PBS 清洗 2 次后离心收集药物处理后的细胞 20 μL , 按 1:10 的比例加入 200 μL 已添加 PMSF 的试剂 A, 震荡使细胞沉淀完全分散; 冰浴 15 min, 加入 10 μL 试剂 B, 震荡后冰浴 1 min, 4℃下以 $12\ 000\times g$ 离心 5 min; 吸弃上清, 加入 50 μL 已添加 PMSF 的细胞核蛋白抽提试剂, 震荡 15~30 s 后放回冰浴, 每隔 1~2 min 重复震荡 15~30 s, 共 30 min; 4℃下以 $12\ 000\times g$ 离心 10 min, 吸取细胞核蛋白上清至预冷 EP 管, 待 Snail 蛋白检测用。

1.10 Western Blot 法检测 DU145 细胞 EMT 相关蛋白的表达 收集对数生长期 DU145 细胞, 接种于 6 孔板中(细胞密度 $2\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$), 培养 24 h 后加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 积雪草酸和 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ TGF- $\beta 1$, 空白

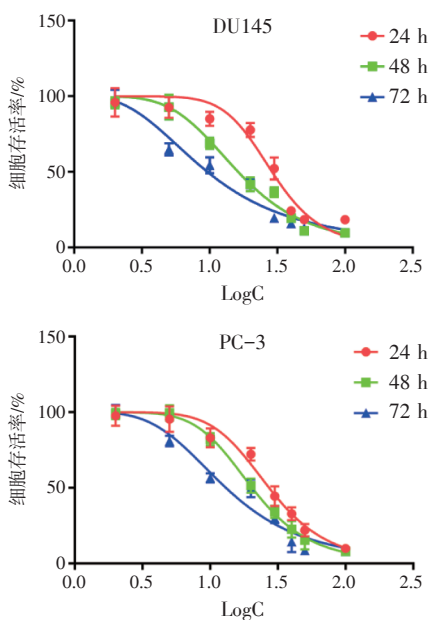
组加入 1% DMSO。作用 24 h 后, 收集各组培养细胞, 采用总蛋白分离提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒提取各组细胞总蛋白并测定蛋白浓度。蛋白上样量 30 μg , 使用 10% SDS-PAGE 凝胶, 80 V 运转 25 min 后, 120 V 运转 65 min, 将胶上分离的蛋白条带转移至 PVDF 膜上; PBS(5%脱脂奶粉)封闭 2 h, 以一抗(1:1 000 稀释比例)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜(4 次, 每次 5 min); 以 HRP 标记的二抗(1:1 000 稀释比例)孵育 2 h, TBST 洗膜(4 次, 每次 5 min); ECL 化学发光法显影后, 采用 ChemiScope3300mini 成像系统分析结果, 以 GAPDH/Histone H3 为内参, 以目的蛋白条带与 GAPDH/Histone H3 条带的灰度比值为蛋白相对表达量。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 t 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞增殖的影响

结果见图 2。积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞增殖均有显著的抑制作用, 积雪草酸干预 DU145 细胞 24、48、72 h 后的 IC_{50} 值分别为 29.10、17.52、11.53 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;



注: LogC 表示积雪草酸浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的对数值

图 2 积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 2 Effects of asiatic acid on cell viability of DU145, PC-3 cells($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

干预 PC-3 细胞 24、48、72 h 后的 IC_{50} 值分别为 27.91、21.43、14.82 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 且呈现浓度依赖性及时间依赖性。

2.2 积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞克隆形成的影响 结果见图 3。与空白组相比, 积雪草酸(10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 DU145 和 PC-3 细胞克隆形成均有明显抑制作用。

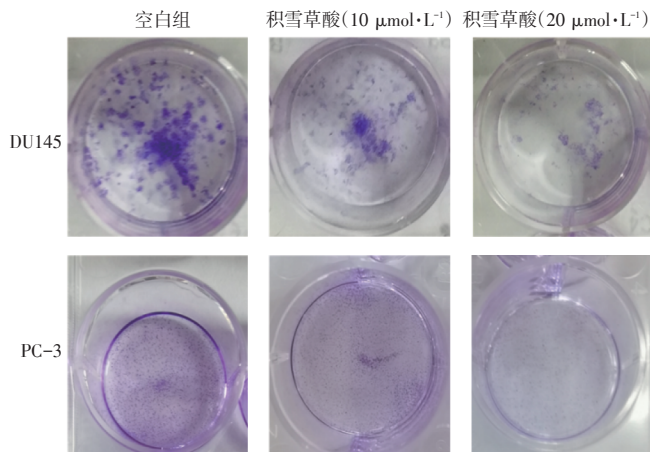


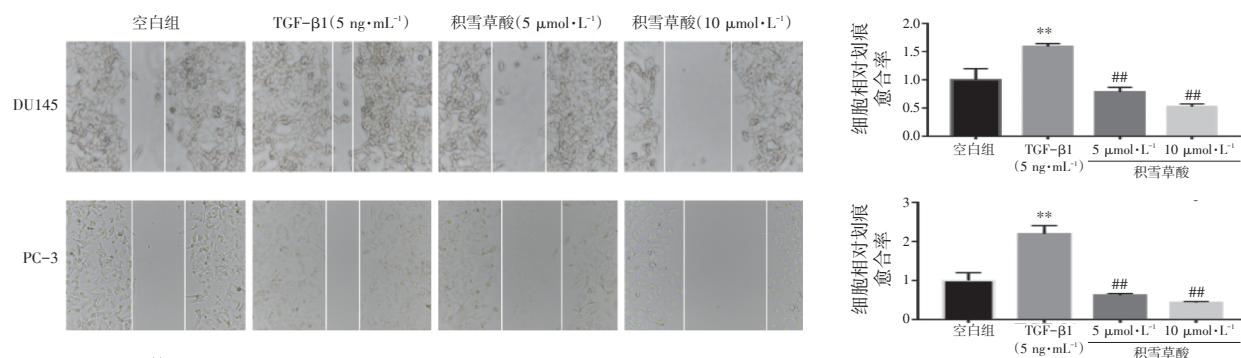
图 3 积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞克隆形成的影响

Figure 3 Effects of asiatic acid on colony-forming ability of DU145, PC-3 cells

2.3 积雪草酸对 TGF- β 1 诱导的 DU145 和 PC-3

细胞迁移、侵袭的影响 DU145 和 PC-3 细胞划痕实验结果见图 4, Transwell 迁移实验结果见图 5。与空白组比较, TGF- β 1(5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)组的细胞划痕愈合能力均明显增强($P < 0.01$), 穿越 Transwell 小室的相应细胞数量有增多但差异无统计学意义($P > 0.05$), 说明 TGF- β 1 能够促进前列腺癌 DU145 和 PC-3 细胞的迁移。与 TGF- β 1(5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)组比较, 不同浓度的积雪草酸(10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)干预后, 细胞划痕愈合能力明显减弱($P < 0.01$), 穿越 Transwell 小室的相应细胞数量均明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明积雪草酸能有效抑制 TGF- β 1 诱导的前列腺癌 DU145 和 PC-3 细胞的迁移。

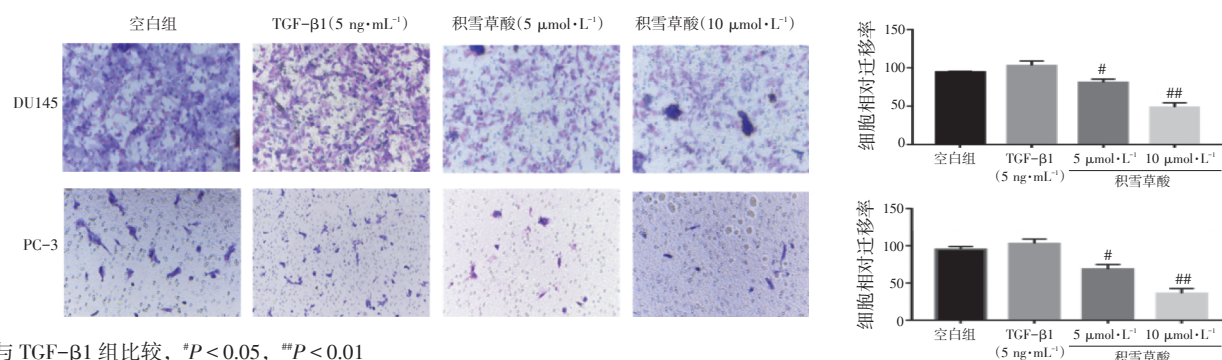
DU145 和 PC-3 细胞的 Transwell 侵袭实验结果见图 6。与空白组比较, TGF- β 1(5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)组穿越 Transwell 小室的相应细胞数量增多, 尤其是 DU145 细胞($P < 0.05$), 说明 TGF- β 1 能够促进前列腺癌细胞的侵袭。与 TGF- β 1(5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)组比较, 不同浓度的积雪草酸(10、20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)干预后, 穿越 Transwell 小室的相应细胞数量均明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明积雪草酸能有效抑制 TGF- β 1 诱导的前列腺癌 DU145 和 PC-3 细胞的侵袭。



注: 与空白组比较, ** $P < 0.01$; 与 TGF-β1 组比较, ## $P < 0.01$

图 4 积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞划痕愈合能力的影响($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

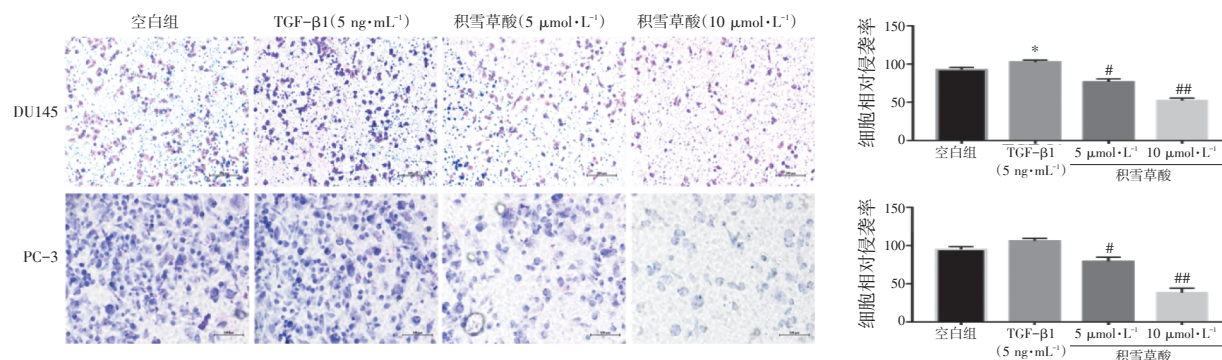
Figure 4 Effect of asiatic acid on scratch healing ability of DU145, PC-3 cells($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: 与 TGF-β1 组比较, * $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 5 积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞迁移能力的影响($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 Effect of asiatic acid on migration of DU145, PC-3 cells($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与 TGF-β1 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 6 积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞侵袭能力的影响($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

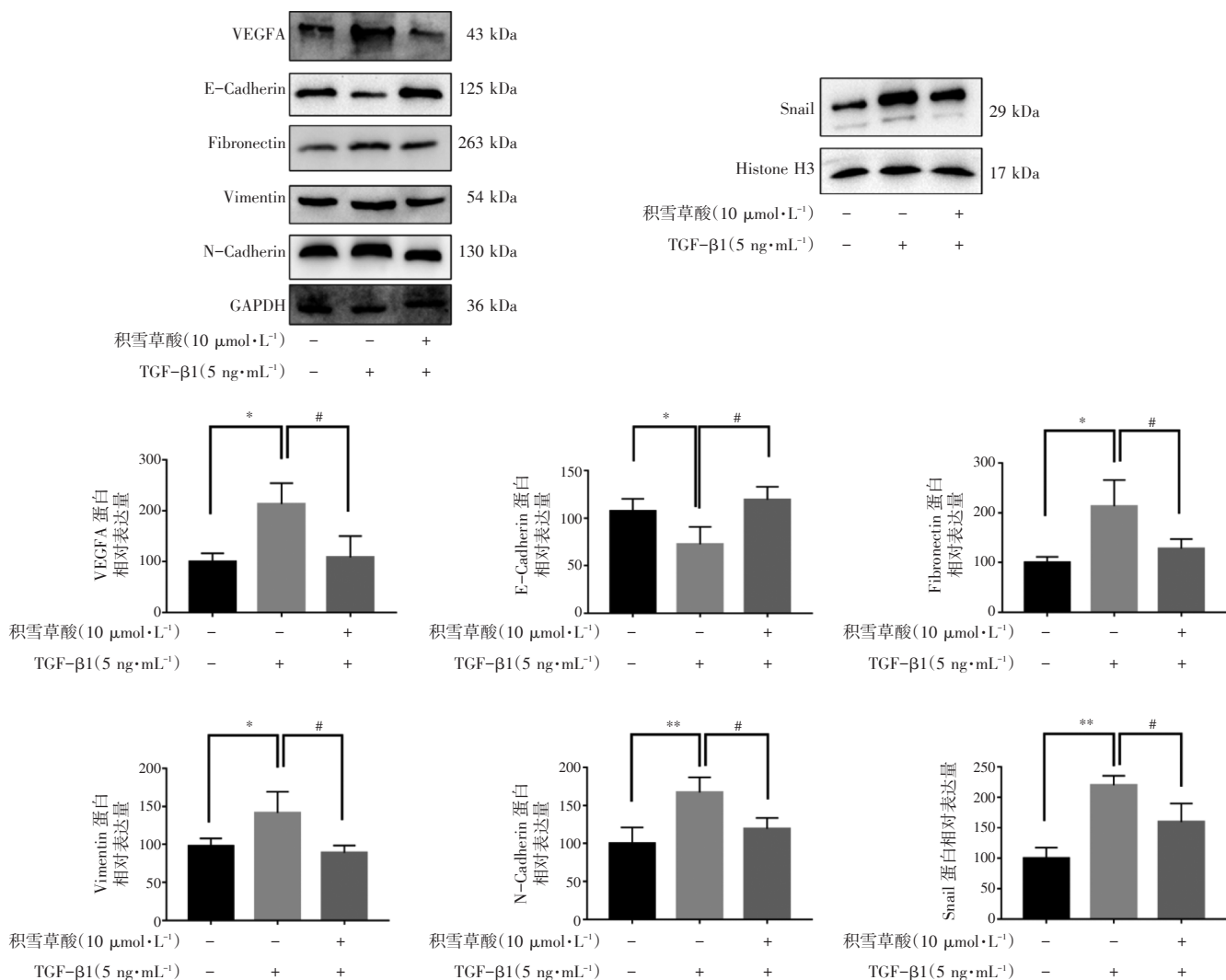
Figure 6 Effect of asiatic acid on invasion of DU145, PC-3 cells($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 积雪草酸对 TGF-β1 诱导的前列腺癌 DU145 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 结果见图 7。与空白组比较, TGF-β1(5 ng·mL⁻¹)诱导后, DU145 细胞的 EMT 相关 Fibronectin、Vimentin、N-Cadherin、Snail 等间质指标蛋白表达明显上调($P < 0.05$, $P < 0.01$), VEGFA 蛋白表达明显上调($P < 0.05$), 而上皮指标 E-Cadherin 蛋白表达明显下调($P < 0.05$), 说明 TGF-β1 能够促进前列腺癌 DU145 细胞的 EMT 进程。与 TGF-β1(5 ng·mL⁻¹)组比较, 10 μmol·L⁻¹ 积雪草酸干预后, DU145 细胞的 Fibronectin、Vimentin、

N-Cadherin、Snail 及 VEGFA 蛋白表达明显下调($P < 0.05$), 而 E-Cadherin 蛋白表达则明显上调($P < 0.05$), 说明积雪草酸能够逆转 TGF-β1 诱导的前列腺癌 DU145 细胞的 EMT 进程。

3 讨论

前列腺癌是常见的发生于男性群体中的恶性肿瘤, 尽管对其诊断和治疗已取得较大进展, 然而部分患者确诊时已处于中晚期, 出现转移或放化疗后转移, 极大缩短了患者的 5 年生存率, 且多数可发



注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 TGF-β1 组比较，# $P < 0.05$

图 7 积雪草酸对 TGF-β1 诱导的 DU145 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 7 Effect of asiatic acid on the expression of EMT-related proteins in TGF-β1-induced DU145 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

展为去势抵抗性前列腺癌^[2]。值得注意的是，转移性去势抵抗性前列腺癌是导致前列腺癌患者死亡的主要原因，而骨转移为绝大多数此类患者的转移类型^[10]。诸多研究^[3-4, 11]显示，上皮间质转化(EMT)水平与上皮来源肿瘤迁移及突破细胞外基质屏障的能力有关，肿瘤细胞通过穿透邻近基质进入循环系统，成为循环肿瘤细胞而远端转移至骨骼或其他器官，最终形成临床可见的转移灶。因此，抑制前列腺癌的 EMT 能力成为抗前列腺癌药物研究的重要思路。

中医药治疗疾病具有多靶点、多途径的特点^[12]，其在预防肿瘤转移与复发方面具有优势^[13]。DU145 与 PC-3 细胞来源于前列腺癌患者的脑部转移病灶与骨转移灶，具有较强转移性，且缺乏激素敏感性。积雪草酸是临床常用中药积雪草的有效成分之一，具有显著的抗肿瘤活性^[8-9]。本课题组预实验发现，积

雪草酸能抑制 DU145 和 PC-3 细胞增殖并通过线粒体凋亡途径诱导其凋亡，故本研究在此基础上观察了积雪草酸对 DU145 和 PC-3 细胞迁移及侵袭能力的影响，并探讨其对前列腺癌细胞 EMT 进程的影响和潜在调控机制。

本研究结果显示，经 TGF-β1 诱导的 DU145 和 PC-3 细胞迁移、侵袭能力增强，同时 DU145 细胞内的 EMT 相关标志蛋白——上皮细胞指标 E-Cadherin 蛋白表达下调，而间质指标 Fibronectin、Vimentin、N-Cadherin、Snail 蛋白表达明显上调。上述结果与相关研究^[14-15]报道的 TGF-β1 诱导肿瘤细胞上皮间质转化的模型实验结果一致，即 TGF-β1 可诱导前列腺癌细胞的 EMT 进程，进而提高前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力。而经积雪草酸干预后，前列腺癌 DU145 和 PC-3 细胞的迁移和侵袭能力显著降低，

DU145 细胞 EMT 分子标志物的表达显著逆转,表明积雪草酸可抑制前列腺癌 DU145 细胞的 EMT 进程并降低其迁移和侵袭能力。

VEGFA 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子,与肿瘤细胞和内皮细胞的增殖及存活密切相关,是调控多种恶性肿瘤如肺癌、乳腺癌等的 EMT 进程的重要因素^[16-18]。研究^[19-20]显示,VEGFA 与 VEGFR2 受体结合,可激活 PI3K/AKT 信号通路,促进 FLJ10540 的表达和 PI3K 复合物的形成,从而促进结肠癌和肺癌的迁移、侵袭及 EMT 进程。本研究中,积雪草酸可明显抑制 TGF- β 1 诱导的 DU145 细胞内 VEGFA 的表达,提示抑制 VEGFA 的表达可能是积雪草酸逆转 TGF- β 1 诱导的 EMT 进程的可能机制。

综上所述,本研究结果表明积雪草酸在体外有明显抑制前列腺癌细胞 DU145 和 PC-3 增殖的作用。同时,低浓度积雪草酸亦能抑制 TGF- β 1 诱导的前列腺癌细胞 DU145 和 PC-3 的迁移、侵袭能力,并可逆转 TGF- β 1 诱导的 DU145 细胞的 EMT 进程,其机制可能与积雪草酸抑制 VEGFA 蛋白表达有关。后续可对积雪草酸调控 VEGFA 抑制前列腺癌转移的作用机制进行更深入的研究,以期积雪草酸的临床应用提供更多的依据。

参考文献:

- [1] 曾庆琪. 前列腺癌的中医药诊治[J]. 中国肿瘤外科杂志, 2019, 11(5): 309-312.
- [2] KARIMI D, NIR G, FAZLI L, et al. Deep learning-based gleason grading of prostate cancer from histopathology images-role of multiscale decision aggregation and data augmentation[J]. IEEE J Biomed Health Inform, 2020, 24(5): 1413-1426.
- [3] ODERO-MARAH V, HAWSAWIO, HENDERSON V, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and prostate cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2018, 1095: 101-110.
- [4] MONTANARI M, ROSSETTI S, CAVALIERE C, et al. Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview[J]. Oncotarget, 2017, 8(21): 35376-35389.
- [5] 陈翠莎, 杨丽飞, 刘莎, 等. 基于质量综合评价的积雪草干燥方法筛选研究[J]. 中草药, 2019, 50(20): 4911-4919.
- [6] CHEN D, ZHANG X Y, SUN J, et al. Asiatic acid protects dopaminergic neurons from neuroinflammation by suppressing mitochondrial ROS production[J]. Biomol Ther (Seoul), 2019, 27(5): 442-449.
- [7] 冯旭, 郭飞飞, 赵龙, 等. 积雪草酸药理作用及其结构修饰的研究

进展[J]. 中草药, 2014, 45(7): 1037-1042.

- [8] GOU X J, BAI H H, LIU L W, et al. Asiatic acid interferes with invasion and proliferation of breast cancer cells by inhibiting WAVE3 activation through PI3K/AKT signaling pathway[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: e1874387.
- [9] 董易, 褚冬青, 马春宇, 等. 积雪草酸对人舌癌 TCA-8113 细胞增殖、凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(11): 1596-1601.
- [10] TABLAZON I L, HOWARD L E, DE HOEDT A M, et al. Predictors of skeletal-related events and mortality in men with metastatic, castration-resistant prostate cancer: results from the shared equal access regional cancer hospital (SEARCH) database[J]. Cancer, 2019, 125(22): 4003-4010.
- [11] REN D, YANG Q, DAI Y, et al. Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF- κ B signaling pathway[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 117.
- [12] 刘嘉, 严宝飞, 曾明月, 等. 黄芩-金银花药对治疗新型冠状病毒肺炎潜在作用机制的网络药理学研究[J]. 世界中医药, 2020, 15(4): 502-511.
- [13] 张英, 侯炜, 林洪生. 中医药治疗恶性肿瘤临床研究成果与思考[J]. 中医杂志, 2014, 55(6): 523-525.
- [14] LI L, QI L, LIANG Z, et al. Transforming growth factor- β 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells[J]. Int J Mol Med, 2015, 36(1): 113-122.
- [15] ZHANG X, LIU L, DENG X, et al. MicroRNA 483-3p targets Pard3 to potentiate TGF- β 1-induced cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells[J]. Oncogene, 2019, 38(5): 699-715.
- [16] ANDREZZI M, QUAGLIZGA L, GSPONER J R, et al. VEGFA gene locus analysis across 80 human tumour types reveals gene amplification in several neoplastic entities[J]. Angiogenesis, 2014, 17(3): 519-527.
- [17] WANG R, ZHANG J, CHEN S, et al. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression[J]. Lung Cancer, 2011, 74(2): 188-196.
- [18] LEWIS J S, LANDERS R J, UNDERWOOD J C E, et al. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas[J]. J Pathol, 2015, 192(2): 150-158.
- [19] CHEN C H, LAI J M, CHOU T Y, et al. VEGFA upregulates FLJ10540 and modulates migration and invasion of lung cancer via PI3K/AKT pathway[J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5052.
- [20] 方淑芬, 熊树华, 黄欧平, 等. lncRNA SBF2-AS1 通过调控 miR-140-5p/VEGFA 分子轴促进宫颈癌 HeLa 细胞上皮间质转化[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(12): 1331-1336.

(编辑: 邹元平)