

本文引用:李冬,董明国,房志科,黄林石,陈继英.基于线粒体凋亡通路探讨防己诺林碱对前列腺癌PC3细胞的生物学行为的影响[J].湖南中医药大学学报,2023,43(7):1194-1200.

基于线粒体凋亡通路探讨防己诺林碱对前列腺癌 PC3细胞的生物学行为的影响

李冬,董明国,房志科,黄林石,陈继英

广州中医药大学东莞医院,广东 东莞 523005

〔摘要〕 **目的** 基于线粒体凋亡通路探讨防己诺林碱(fangchinoline, FAN)对前列腺癌PC3细胞生物学行为的影响。**方法** 将前列腺癌PC3细胞按照FAN处理浓度分为4组,分别为FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组和FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组,各组依次采用FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ (DMSO替代)、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和20 $\mu\text{mol/L}$ 进行处理,孵育48 h后进行实验。CCK-8法检测PC3细胞增殖,平板克隆法检测PC3细胞克隆形成能力,流式细胞仪检测PC3细胞凋亡,Transwell实验检测PC3细胞侵袭,划痕实验检测PC3细胞迁移,Western blot检测PC3细胞自噬相关蛋白和线粒体凋亡通路蛋白。**结果** 与FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组和FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的PC3细胞增殖能力、克隆形成能力、侵袭和迁移能力明显降低($P<0.001$),凋亡率明显升高($P<0.001$);与FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的PC3细胞增殖能力、克隆形成能力、侵袭和迁移能力明显降低($P<0.001$);与FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组和FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的PC3细胞中P62和Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.001$),LC3B、Bax和Caspase-3蛋白表达明显升高($P<0.001$)。**结论** FAN可能通过线粒体凋亡通路抑制细胞增殖、侵袭和迁移,促进其自噬和凋亡,并呈现剂量依赖性。

〔关键词〕 前列腺癌;防己诺林碱;线粒体凋亡;PC3细胞;增殖;自噬

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.07.007

Effects of fangchinoline on biological behavior of prostate cancer PC3 cells based on mitochondrial apoptosis pathway

LI Dong, DONG Mingguo, FANG Zhike, HUANG Linshi, CHEN Jiyong

Dongguan Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan, Guangdong 523005, China

〔Abstract〕 Objective To explore the effects of fangchinoline (FAN) on the biological behavior of prostate cancer PC3 cells based on mitochondrial apoptosis pathway. **Methods** Prostate cancer PC3 cells were divided into 4 groups according to FAN treatment concentrations, namely FAN 0 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ groups, which were treated with FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ (DMSO replacement), 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$, respectively, then the experiment was carried out after 48 h incubation. The proliferation of PC3 cells was measured by CCK-8 method, the cloning ability of PC3 cells was determined by plate cloning method, the apoptosis of PC3 cells was detected by flow cytometry, the invasion of PC3 cells was checked by Transwell assay, the migration of PC3 cells was examined by scratch assay, and the autophagy related proteins and mitochondrial apoptosis pathway proteins of PC3 cells were measured by Western blot. **Results** Compared with FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ group, the proliferation, clone formation, invasion and migration of PC3 cells in FAN 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ groups were significantly lower ($P<0.001$),

〔收稿日期〕2022-11-30

〔基金项目〕粤莞联合基金青年基金项目(2020A1515111085)。

〔第一作者〕李冬,女,博士研究生,研究方向:中药学,E-mail:hjzbl9@163.com。

and the apoptosis rate was significantly higher ($P<0.001$). Compared with FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ and FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ groups, the proliferation, clone formation, invasion and migration of PC3 cells in FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ group were significantly lower ($P<0.001$). Compared with FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ group, the expressions of P62 and Bcl-2 in PC3 cells in FAN 5 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ groups were significantly lower ($P<0.001$), and the expressions of LC3B, Bax and Caspase-3 proteins were significantly higher ($P<0.001$). **Conclusion** FAN may inhibit cell proliferation, invasion and migration through mitochondrial apoptosis pathway, and promote autophagy and apoptosis in a dose-dependent manner.

[**Keywords**] prostate cancer; fangchinoline; mitochondrial apoptosis; PC3 cells; proliferation; autophagy

前列腺癌是男性泌尿生殖系统高发的一种恶性肿瘤,好发于中老年男性,随着年龄的增高,前列腺癌的发病率逐渐升高^[1]。我国前列腺癌的发病率虽然低于西方国家,但由于部分人群的饮食和生活方式西方化,人口老龄化加剧以及筛查手段的普及,我国前列腺癌的发病率和死亡率呈显著上升趋势^[2]。因该病早期无明显症状,导致大部分患者确诊时已为前列腺癌的中晚期,所以,前列腺癌早期诊断和治疗一直备受临床关注。前列腺癌的发生和进展的过程比较复杂,涉及多种机制的参与,前列腺癌起源于前列腺上皮内瘤变,并受生活方式和饮食等多种因素的驱动^[3]。目前,临床上针对前列腺癌的治疗主要以药物和手术根治性治疗为主要手段^[4],早期通过手术根治性治疗,5年的生存率可以达到95%以上^[5]。但是前列腺癌容易出现骨转移,最后发展为去势抵抗性前列腺癌,可以通过内分泌结合放疗或者化疗的方法来延长患者的生存期,但是化疗方案不仅存在一定的不良反应,还容易产生耐药性等^[6],所以临床需要探索新的治疗方式,对于前列腺癌的治疗具有重要的意义。

防己诺林碱(fangchinoline, FAN)是从防己中提取的一种中药单体,具有较好的药用价值^[7-9]。现代研究表明,FAN具有镇痛、抗血小板聚集、抗炎和降压等作用^[10]。也有研究表明,该药物有抗菌、抗肿瘤的作用^[11],但关于FAN在前列腺癌中的相关作用机制报道较少,所以本研究基于线粒体凋亡通路,探究FAN对前列腺癌细胞PC3增殖、凋亡、侵袭、迁移能力及自噬的影响,进一步阐明其对前列腺癌的治疗作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

实验细胞前列腺癌细胞株PC3来源于中国科学院细胞库(批号:20190117)。

1.2 主要试剂

FAN(成都思科华生物技术有限公司,批号:

20120405);胰蛋白酶、胎牛血清(武汉爱博泰克生物技术有限公司,批号:A1267、A1311);CCK-8增殖检测试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号:18104001、2010201);4%多聚甲醛(成都思科华生物技术有限公司,批号:180319);P62、LC3B、Bcl-2、Bax和Caspase-3一抗(美国SantaCruz公司,批号:B5172、ST005、P0263、BL520B、B40721);辣根过氧化物酶标记的二抗(美国Pierce公司,批号:BL516B);Matrigel胶(北京索莱宝公司,批号:150316)。

1.3 主要仪器

INC0108型CO₂恒温培养箱(德国Mettler公司);Tecan Infinite M200酶标仪(美国Bio-RAD公司);CKX53型倒置相差显微镜(Olympus公司);164-5050电泳仪(北京市六一仪器厂);D2060R型流式细胞仪(艾森生物有限公司)。

1.4 细胞培养和分组

将前列腺癌PC3细胞放在含有10% FBS和1%青霉素、链霉素的RPMI 1640培养基中,置于37℃、5% CO₂的培养箱培养,待PC3细胞融合度达到80%时,进行传代处理。细胞分组:将前列腺癌PC3细胞按照FAN处理浓度分为4组,分别为FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组和FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组,各组依次采用DMSO、5 $\mu\text{mol/L}$ FAN、10 $\mu\text{mol/L}$ FAN和20 $\mu\text{mol/L}$ FAN进行处理,细胞培养箱孵育48 h后进行后续实验。

1.5 CCK-8法检测PC3细胞增殖

将各组PC3细胞经胰蛋白酶消化,以 1×10^4 个细胞/mL每孔接种于96孔培养板中,将不同FAN浓度的PC3细胞设置3个不同的时间点,分别为24、48、72 h,培养一定时间后,弃掉培养基,每孔加入100 μL 的CCK-8试剂和对应的含血清培养基,置于37℃、5% CO₂的培养箱孵育4 h,采用酶标仪测定450 nm波长处细胞的吸光度,记录数值并计算。

1.6 平板克隆法检测PC3细胞克隆形成能力

将各组PC3细胞经胰蛋白酶消化,以 1×10^4 个

细胞/孔接种于 6 孔培养板中,将不同浓度的 FAN 的 PC3 细胞分别设置 3 个复孔,置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱培养 7 d,吸去上清液,采用 4%多聚甲醛固定 15 min,吸去多聚甲醛,5%结晶紫染色 10 min, PBS 清洗,显微镜下观察细胞群落数量,计算细胞克隆的形成数量。

1.7 流式细胞仪检测 PC3 细胞凋亡

将各组 PC3 细胞以 1×10^5 个细胞/mL/孔接种于 6 孔培养板中,加入 FAN,孵育 48 h 后,PBS 清洗,收于 1.5 mL 的离心管中,向离心管中依次加入 5 μ L AnnexinV-FITC 和 10 μ L PI,避光室温孵育 20 min。孵育完成后,流式细胞仪检测细胞凋亡情况,采用 FlowJo 10.6.2 软件进行数据分析。

1.8 Transwell 实验检测 PC3 细胞侵袭

采用不含血清培养基稀释 Matrigel 胶,将 Transwell 上室平铺 Matrigel 胶 50 μ L,培养基中培养 30 min。将不同 FAN 浓度的 PC3 细胞调整为 1×10^5 /mL,在每个 Transwell 上室加入细胞悬液 200 μ L,下室加入相同药物浓度的正常培养基,设置 3 个复孔,常规培养 24 h 后,吸走培养基,4%多聚甲醛固定 10 min, PBS 清洗,结晶紫染色 10 min, PBS 清洗,显微镜下拍照。

1.9 划痕试验检测 PC3 细胞迁移

将各组 PC3 细胞经胰蛋白酶正常消化,离心处理,4000 r/min,离心半径 10 cm,4 °C 条件下离心 10 min,离心后放在含有血清的 DMEM 高糖培养基重悬细胞,以 5×10^5 个/mL 接种于每孔中,孵育 2 h,在培养板上横线划痕, PBS 清洗,置于 37 °C、5% 的 CO₂ 的培养箱孵育 24 h,于 0 h 和 24 h 在光学显微镜下取样,应用 Image-Pro Plus Version 6.0 软件测量。

1.10 Western blot 检测 PC3 细胞自噬相关蛋白和线粒体凋亡通路蛋白

将各组 PC3 细胞加入 RIPA 蛋白质裂解液进行蛋白质提取,采用 BCA 蛋白质测定试剂盒检测蛋白浓度。上样前向蛋白质样品中加入 5 \times loading buffer,电泳,转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入蛋白 P62(1:1 000 稀释)、LC3B(1:1 000 稀释)、Bcl-2(1:1 000 稀释)、Bax(1:1 000 稀释)和 Caspase-3(1:1 000 稀释)一抗,4 °C 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000 稀释),37 °C 培养箱中孵育 1 h。经 ECL 化学发光显色,凝胶成像, Image J 图像处理软件进行分析处理。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行数据分析,计量资料符合正态分布和方差齐性采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间两两比较采用 *t* 校验,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FAN 对前列腺癌 PC3 细胞增殖的影响

FAN 0 μ mol/L 组、FAN 5 μ mol/L 组、FAN 10 μ mol/L 组和 FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细胞增殖率分别为 $100.00\% \pm 0.00\%$ 、 $77.83\% \pm 21.62\%$ 、 $45.42\% \pm 11.28\%$ 和 $10.47\% \pm 3.59\%$ 。与 FAN 0 μ mol/L 组相比,FAN 5 μ mol/L 组、FAN 10 μ mol/L 组和 FAN 20 μ mol/L 组在 24~72 h 的 PC3 细胞增殖能力明显降低($P < 0.001$);与 FAN 5 μ mol/L 组和 FAN 10 μ mol/L 组相比,FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细胞增殖能力显著降低($P < 0.001$)。

2.2 FAN 对前列腺癌 PC3 细胞克隆形成能力的影响

与 FAN 0 μ mol/L 组相比,FAN 5 μ mol/L 组、FAN 10 μ mol/L 组和 FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细胞克隆形成能力明显降低($P < 0.001$);与 FAN 5 μ mol/L 组和 FAN 10 μ mol/L 组相比,FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细胞克隆形成能力显著降低($P < 0.001$)。详见表 1 和图 1。

2.3 FAN 对前列腺癌 PC3 细胞凋亡的影响

与 FAN 0 μ mol/L 组相比,FAN 5 μ mol/L 组、FAN 10 μ mol/L 组和 FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细胞凋亡率明显升高($P < 0.001$);与 FAN 5 μ mol/L 组和 FAN 10 μ mol/L 组相比,FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细胞凋亡率显著升高($P < 0.001$)。详见表 1 和图 2。

2.4 FAN 对前列腺癌 PC3 细胞侵袭和迁移的影响

与 FAN 0 μ mol/L 组相比,FAN 5 μ mol/L 组、FAN 10 μ mol/L 组和 FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细胞侵袭和迁移能力明显降低($P < 0.001$);与 FAN 5 μ mol/L 组和 FAN 10 μ mol/L 组相比,FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细胞侵袭和迁移能力显著降低($P < 0.001$)。详见表 1 和图 3—4。

2.5 FAN 对前列腺癌 PC3 细胞自噬相关蛋白的影响

与 FAN 0 μ mol/L 组相比,FAN 5 μ mol/L 组、FAN 10 μ mol/L 组和 FAN 20 μ mol/L 组的 PC3 细

表 1 各组前列腺癌 PC3 细胞克隆形成能力、凋亡、侵袭和迁移对比 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	克隆形成数量/个	凋亡率/%	侵袭数量/个	迁移率/%
FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组	152.75 \pm 24.29	5.94 \pm 1.25	168.29 \pm 36.74	173.47 \pm 41.63
FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	125.48 \pm 18.17*	15.78 \pm 2.49*	124.63 \pm 31.57*	118.36 \pm 21.54*
FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	87.59 \pm 11.68* [#]	24.83 \pm 3.76* [#]	109.42 \pm 23.51* [#]	75.46 \pm 12.81* [#]
FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	49.24 \pm 5.79* ^{#Δ}	31.97 \pm 4.52* ^{#Δ}	78.27 \pm 7.96* ^{#Δ}	31.64 \pm 5.27* ^{#Δ}
F 值	39.487	17.953	48.571	65.384
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,* $P<0.001$;与 FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,[#] $P<0.001$;与 FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ^{Δ} $P<0.001$ 。

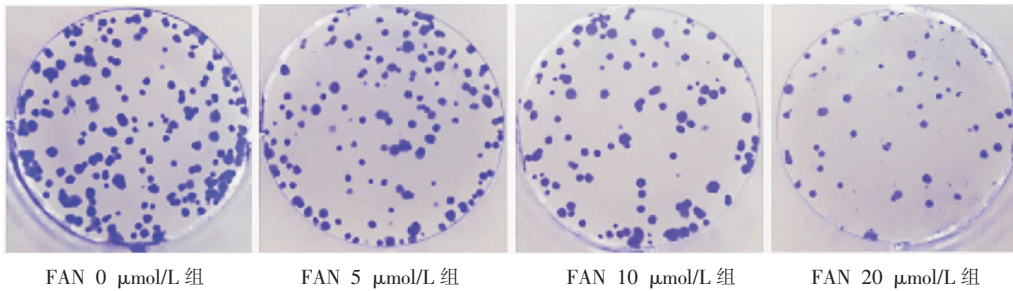


图 1 各组前列腺癌 PC3 细胞克隆形成能力 ($n=5$)

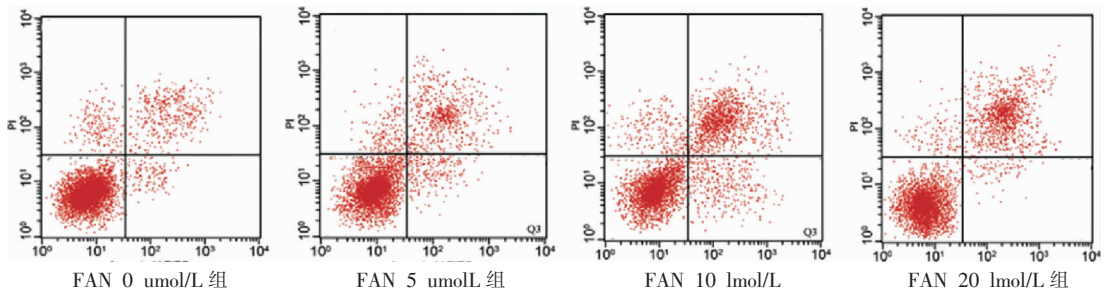


图 2 各组前列腺癌 PC3 细胞凋亡情况 ($n=5$)

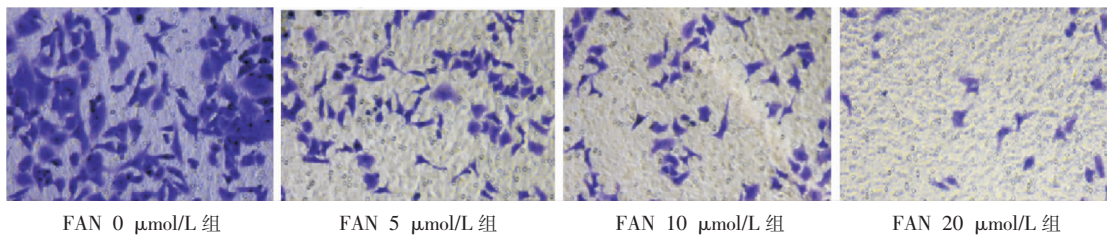


图 3 各组前列腺癌 PC3 细胞侵袭情况 ($n=5$)

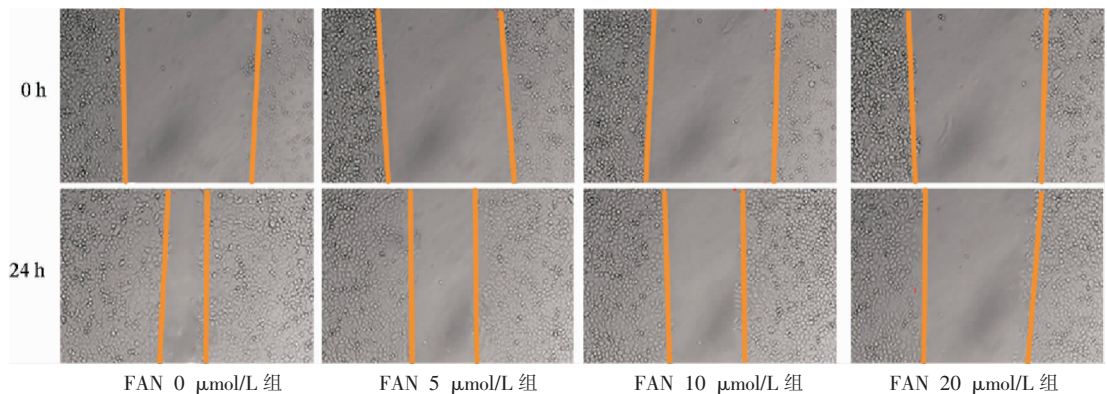


图 4 各组前列腺癌 PC3 细胞迁移情况 ($n=5$)

胞 P62 蛋白表达明显降低 ($P<0.001$), LC3B 蛋白表达明显升高 ($P<0.001$); 与 FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的 PC3 细胞 P62 蛋白表达显著降低 ($P<0.001$), LC3B 蛋白表达显著升高 ($P<0.001$)。详见表 2 和图 5。

表 2 各组前列腺癌 PC3 细胞自噬相关蛋白 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	P62	LC3B
FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.49 \pm 0.27	0.46 \pm 0.11
FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.24 \pm 0.21*	1.07 \pm 0.13*
FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.95 \pm 0.16*#	1.59 \pm 0.25*#
FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.46 \pm 0.08*##	1.87 \pm 0.32*##
<i>F</i> 值	9.275	11.792
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001

注: 与 FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P<0.001$, 与 FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, # $P<0.001$, 与 FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ## $P<0.001$ 。

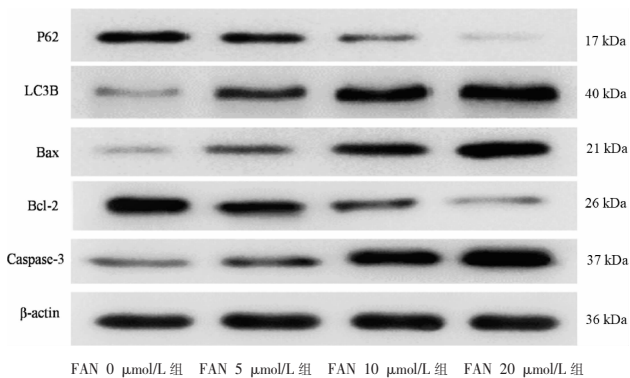


图 5 各组前列腺癌 PC3 细胞自噬相关蛋白及线粒体凋亡通路蛋白的表达 ($n=5$)

2.6 FAN 对前列腺癌 PC3 细胞线粒体凋亡通路蛋白相对表达的影响

与 FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组和 FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的 PC3 细胞 Bcl-2 蛋白表达明显降低 ($P<0.001$), Bax 和 Caspase-3 蛋白表达明显升高 ($P<0.001$); 与 FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的 PC3 细胞 Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P<0.001$), Bax 和 Caspase-3 蛋白表达显著升高 ($P<0.001$)。详见表 3 和图 5。

3 讨论

前列腺癌就是发生于男性前列腺组织中的恶性肿瘤, 是前列腺腺泡细胞异常无序生长的结果^[12]。前列腺癌的发病率具有明显的地理和种族差异, 是西方国家常见的恶性肿瘤之一, 现已经成为男性死亡的第二大原因^[13]。前列腺癌的发展与前列腺组

表 3 各组前列腺癌 PC3 细胞线粒体凋亡通路蛋白 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	Bax	Bcl-2	Caspase-3
FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.69 \pm 0.05	1.61 \pm 0.35	0.97 \pm 0.11
FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.03 \pm 0.06*	1.32 \pm 0.27*	1.29 \pm 0.22*
FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.36 \pm 0.25*#	1.07 \pm 0.19*#	1.46 \pm 0.27*#
FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.52 \pm 0.29*##	0.85 \pm 0.14*##	1.65 \pm 0.31*##
<i>F</i> 值	6.863	8.274	7.219
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与 FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, * $P<0.001$; 与 FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, # $P<0.001$; 与 FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, ## $P<0.001$ 。

织的炎症具有一定的相关性^[14], 在临床上, 许多慢性炎症在后期使致癌因子在种族、年龄、遗传、饮食以及生活方式等因素的影响下, 发生和发展成为肿瘤^[15]。其中, 家族遗传是前列腺癌的第二大影响因素, 控制着 5% 的前列腺癌的遗传易感性^[16]。另外, 前列腺癌是睾酮依赖性恶性肿瘤, 在日常饮食中摄入高纤维、低脂肪食物可以减少血液中 70% 的睾酮, 抑制前列腺癌的发生^[17]。近年来, 我国前列腺癌的发病率明显低于西方国家, 但是随着工业的发展, 致癌因素增多, 导致我国前列腺癌的发病率和死亡率逐年上升^[18]。据调查统计, 我国前列腺癌的发病率位于第 5 位, 死亡率位居第 9 位, 严重威胁着男性的健康^[19]。因此, 前列腺癌的治疗已经受到了国内外学者的高度重视, 已成为肿瘤研究的热点之一。

天然产物及其结构修饰衍生物一直是研发抗肿瘤新药的自然宝库, 包括紫杉醇类化合物、长春碱类化合物等挽救和延长了无数肿瘤患者的生命, 一直在临床上占据重要地位^[20]。防己始载于《神农本草经》中李当之《药录》, 归膀胱、肺经, 味苦性寒^[21]。防己分为汉防己和木防己两大类, 汉防己是防己科植物粉防己的干燥根, 主要成分为 FAN 和粉防己碱^[22]。实验表明, FAN 具有抗氧化、抗炎镇痛、免疫调节、抗肿瘤和诱导细胞自噬等作用^[23]。相关研究表明, FAN 可通过线粒体凋亡途径诱导细胞凋亡和降低磷酸化 Akt 来抑制乳腺癌细胞增殖^[24]。也有研究报道, FAN 以剂量依赖性地抑制人宫颈癌细胞的黏附、迁移和侵袭能力, 而没有明显的细胞毒作用, 作为治疗宫颈癌转移的候选药物^[25]。另有研究表明, FAN 可以抑制肺癌 H1299 和 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进其凋亡^[26]。

本研究通过体外实验首先验证了 FAN 对前列

腺癌 PC3 细胞增殖、克隆形成、凋亡、侵袭和迁移的影响,结果显示,与 FAN 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组、FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组和 FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组 PC3 细胞增殖能力、克隆形成能力、侵袭和迁移能力明显降低,PC3 细胞凋亡率明显升高;与 FAN 5 $\mu\text{mol/L}$ 组和 FAN 10 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,FAN 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的 PC3 细胞增殖能力、克隆形成能力、侵袭和迁移能力显著降低,细胞凋亡率显著升高。从而说明,随着 FAN 浓度的逐渐升高,PC3 细胞增殖能力、克隆形成能力、侵袭和迁移能力逐渐降低,而 PC3 细胞凋亡率逐渐升高。随后验证了 FAN 对前列腺癌 PC3 细胞自噬的影响,结果显示,FAN 浓度越高,自噬相关蛋白 P62 蛋白表达越低,而 LC3B 蛋白表达越高。细胞自噬是生物体内细胞组分降解及循环的重要通路,自噬的主要功能是清除细胞内的大蛋白及损伤的细胞器,以保持细胞内营养物质的再利用及细胞内稳态的维持^[27]。相关研究表明,肿瘤细胞内的自噬与肿瘤的生长与发展密切相关^[28]。LC3B、P62 是最常用于检测的自噬相关蛋白,LC3B 是细胞自噬过程的重要调控因子,与自噬过程的发生密切相关^[29],而 P62 的最突出的作用就是作为细胞选择性自噬的底物^[30]。上述结果表明,FAN 具有诱导细胞自噬的作用。

细胞凋亡是一种必不可少的程序性细胞死亡途径,线粒体、内质网应激和死亡受体是 3 条主要的凋亡通路^[31]。线粒体作为调节细胞存活和凋亡的重要细胞器,在抗癌药物发挥药理作用过程中扮演关键的角色^[32],一旦线粒体分裂和融合之间的平衡被打破,线粒体结构功能将受损,释放凋亡相关因子,凋亡因子在细胞凋亡过程中发挥着至关重要的作用^[33]。本研究结果显示,FAN 浓度越高,Bcl-2 蛋白表达越低,而 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达越高。当接收到凋亡信号时,线粒体的 Bcl-2 等癌基因蛋白的表达减小,Bax 等促凋亡蛋白的水平升高,促使线粒体膜极化,诱导 Caspase-3 的激活,促进某些相关蛋白穿过线粒体膜^[34]。

综上所述,FAN 可能通过线粒体凋亡通路抑制细胞增殖、侵袭和迁移,促进其自噬和凋亡,并呈现剂量依赖性,对前列腺癌具有一定的辅助治疗价值。

参考文献

- [1] 赵新军,李 循,王书恒,等. VPRBP 蛋白与 Abl 激酶诱发、抑制前列腺癌的一种物理机制[J]. 原子与分子物理学报, 2022, 39(5): 13-21.
- [2] 刘冬梅,徐 强,李 峰. 土荆皮乙酸诱导人前列腺癌细胞系 DU145 凋亡[J]. 基础医学与临床, 2022, 42(10): 1555-1560.
- [3] 蔡国强. 乌头碱对前列腺癌细胞增殖、侵袭与凋亡的影响及其机制[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(9): 2263-2266.
- [4] 李进岚,方 晓,黄银芳,等. 舒芬太尼通过 Notch 信号通路对前列腺癌细胞的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(12): 1344-1348.
- [5] 佟丽斐,张 霞,杨玉蝶,等. 敲低 lncRNASNHG7 通过抑制 ROCK1 降低前列腺癌细胞增殖和迁移能力[J]. 中国医科大学学报, 2022, 51(4): 301-305, 312.
- [6] 叶大文,张兆存,赵海峰,等. 与前列腺癌恩杂鲁胺耐药相关铁死亡基因的生物信息学分析[J]. 山东医药, 2022, 62(29): 24-27.
- [7] 王斐然,张会敏,林永强,等. 防己诺林碱药理作用研究进展[J]. 食品与药品, 2022, 24(5): 476-480, 10004.
- [8] 吴秋华,王 春,王 志,等. 防己诺林碱与牛血清白蛋白相互作用的研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, 27(12): 2498-2501.
- [9] 宋英莉,王洪一,马书丹,等. 防己诺林碱对增生性瘢痕的抑制作用[J]. 中国美容整形外科杂志, 2018, 29(5): 297-300.
- [10] 胡屹屹,何孔旺,倪艳秀. 苦参碱、水苏碱和防己诺林碱抗细菌内毒素的作用研究[J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(1): 129-133.
- [11] 望永鼎,刘文华,翟一飞,等. 防己诺林碱对结肠癌细胞恶性生物学行为及 HIF-1 α /VEGF/Akt 通路的相关性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(24): 3042-3047.
- [12] 牛潇菲,张 畅,李小江. 基于 CiteSpace 的中医药治疗前列腺癌可视化分析[J]. 中医药导报, 2021, 27(8): 160-164, 187.
- [13] MA J, SHAYITI F, MA J, et al. Tumor-associated macrophage-derived CCL5 promotes chemotherapy resistance and metastasis in prostatic cancer[J]. Cell Biology International, 2021, 45(10): 2054-2062.
- [14] LEU W J, WANG C T, HSU J L, et al. Ascleposide, a natural cardenolide, induces anticancer signaling in human castration-resistant prostatic cancer through Na⁺/K⁺-ATPase internalization and tubulin acetylation[J]. Prostate, 2020, 80(4): 305-318.
- [15] MARENGHI C, NICOLAI N, BADENCHINI F, et al. Reclassification due to upgrading during active surveillance protocols in low risk prostatic cancer: The role of number of repeat biopsies in the long terms[J]. European Urology Supplements, 2019, 18(1): e1709.
- [16] CHEN Z Q, HU H Y. Identification of prognosis biomarkers of

- prostatic cancer in a cohort of 498 patients from TCGA[J]. *Current Problems in Cancer*, 2019, 43(6): 100503.
- [17] MONTERISI S, COLOMBO P, DUGA S, et al. Tissue specific NKX3.1 positive circulating tumor cells isolated by ISET in prostatic cancer patients[J]. *European Urology Supplements*, 2019, 18(1): e477-e478.
- [18] 杨明, 朱旭东, 沈炀, 等. MYBL2 在前列腺癌患者组织中高表达并与不良预后相关[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(8): 1109-1118.
- [19] 朱涵菁, 杨艳. 前列腺癌根治术后生化复发的影响因素及随访管理的研究进展[J]. *中国男科学杂志*, 2022, 36(3): 91-96.
- [20] 何丽, 林永红, 李笑晓, 等. 防己诺林碱联用紫杉醇对耐药卵巢癌 SKOV3/ADM 细胞作用机制的初步研究[J]. *中国计划生育和妇产科*, 2017, 9(6): 59-62.
- [21] 刘冰天, 张艳辉, 王炳高. 防己诺林碱诱导乳腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. *中国现代普通外科进展*, 2016, 19(8): 589-591.
- [22] XIANG X C, TIAN Y H, HU J N, et al. Fangchinoline exerts anticancer effects on colorectal cancer by inducing autophagy via regulation AMPK/mTOR/ULK1 pathway[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2021, 186: 114475.
- [23] JUNG Y Y, SHANMUGAM M K, CHINNATHAMBI A, et al. Fangchinoline, a bisbenzylisoquinoline alkaloid can modulate cytokine-impelled apoptosis via the dual regulation of NF- κ B and AP-1 pathways[J]. *Molecules*, 2019, 24(17): 3127.
- [24] 张艳辉, 郝翠, 王炳高, 等. 防己诺林碱诱导人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 凋亡的作用机制[J]. *癌症进展*, 2017, 15(3): 250-254, 282.
- [25] 蔡鑫, 熊蓉, 范佳杨, 等. 防己诺林碱对宫颈癌 HeLa 细胞的作用及其机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(12): 1531-1534.
- [26] 陈澜涛, 颜巍, 刘静蕾, 等. 防己诺林碱对肺癌 H1299 和 A549 细胞的作用及其分子机制研究[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2020, 34(2): 126-132.
- [27] MA R Y, YU D D, PENG Y, et al. Resveratrol induces AMPK and mTOR signaling inhibition-mediated autophagy and apoptosis in multiple myeloma cells[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2021, 53(6): 775-783.
- [28] WU M, LIU Z B, ZHANG S J. Down-regulation of hsa_circ_0045474 induces macrophage autophagy in tuberculosis via miR-582-5p/TNKS2 axis[J]. *Innate Immunity*, 2022, 28(1): 11-18.
- [29] 何丽, 于燕妮, 郭莉莉, 等. LC3B、P62、Beclin1 在慢性氟中毒大鼠肝脏中的表达及自噬在氟中毒肝损伤中的作用[J]. *中华地方病学杂志*, 2021, 40(5): 355-362.
- [30] 王娇, 张莉, 李颖, 等. 自噬受体蛋白 p62 的表达及功能研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2022, 38(6): 715-719.
- [31] MAZ J, LU L, YANG J J, et al. Lariciresinol induces apoptosis in HepG2 cells via mitochondrial-mediated apoptosis pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2018, 821: 1-10.
- [32] HU G L, ZHANG J L, XU F F, et al. Stomatin-like protein 2 inhibits cisplatin-induced apoptosis through MEK/ERK signaling and the mitochondrial apoptosis pathway in cervical cancer cells[J]. *Cancer Science*, 2018, 109(5): 1357-1368.
- [33] ZHANG Y, WANG Y Y, ZHAO Y X, et al. Novel camphor-based pyrimidine derivatives induced cancer cell death through a ROS-mediated mitochondrial apoptosis pathway[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(51): 29711-29720.
- [34] 张婷婷, 刘文洪, 周琢艳, 等. 基于线粒体凋亡通路探讨仙鹤草促 HepG2 细胞凋亡的机制[J]. *中药材*, 2018, 41(9): 2185-2189.

(本文编辑 苏维)