

黄连素联合阿霉素对人前列腺癌细胞的作用

李建昌, 林善鸿, 曾文锋, 秦性璋, 林兴华, 赵玉婉* (广东医科大学附属泌尿外科, 广东湛江 524001)

摘要: **目的** 探讨黄连素联合阿霉素对前列腺癌细胞的影响。**方法** 用黄连素和阿霉素处理前列腺癌细胞株, MTT法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, 蛋白质印迹检测凋亡相关蛋白表达, 化学发光法检测 Caspase 3/7 和 Caspase 8 活性, 线粒体膜电位检测试剂盒检测线粒体膜电位变化。**结果** 黄连素联合阿霉素抑制前列腺癌细胞增殖、促进细胞凋亡, 增加 Bax 表达及 Caspase 3/7、Caspase 8 活性, 降低 Bcl2 表达及线粒体膜电位。**结论** 黄连素联合阿霉素对前列腺癌细胞具有较强杀伤作用。

关键词: 前列腺癌; 黄连素; 阿霉素; 凋亡

中图分类号: R 979

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)05-0529-05

Role of combined berberine and doxorubicin in human prostate cancer cells

LI Jian-chang, LIN Shan-hong, ZENG Wen-feng, QIN Xing-zhang, LIN Xing-hua, ZHAO Yu-wan* (Department of Urology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of combined berberine and doxorubicin on prostate cancer cells. **Methods** Human prostate cancer cell lines were treated with berberine and doxorubicin. The proliferation, apoptosis, apoptotic-related protein expression, caspase-3/7 and caspase-8 activity, and mitochondrial membrane potential were detected by MTT, flow cytometry, Western blot, chemiluminescence, and JC-1 fluorescent method, respectively. **Results** Combined berberine and doxorubicin suppressed cell proliferation, promoted apoptosis, increased Bax expression and caspase-3/7 and caspase-8 activity, and decreased Bcl2 expression and mitochondrial membrane potential. **Conclusion** Combined berberine and doxorubicin can effectively kill prostate cancer cells.

Key words: prostate cancer; berberine; doxorubicin; apoptosis

前列腺癌(PCa)是男性最常见的恶性肿瘤之一。化疗是转移性前列腺癌的治疗方法之一^[1]。作为一线化疗药物,阿霉素(DOX)已被用于治疗急性白血病、乳腺癌、霍奇金淋巴瘤、卵巢癌等^[2],但DOX对心、脑、肝、肾具有较强的毒副作用。黄连素(BBR)作为一种天然产物,具有抑制细胞增殖、诱导凋亡、抑制血管生成和肿瘤转移等作用^[3],且BBR在增强DOX的细胞毒性时具有心脏保护作用,似可成为一种抗癌辅助药物^[4]。目前研究已证实,BBR能够提高DOX在乳腺癌中的疗效,并降低DOX的心脏毒性^[5-6]。本研究旨在探讨黄连素联合阿霉素对PCa细胞的影响,为PCa的治疗提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人PCa细胞系(LNCaP、PC-3、22RV1)购买于中国科学院细胞库(中国上海),均使用RPMI-1640培养基(Waltham, MA, USA)培养,并加入10%胎牛血清(Gibco)、青霉素 100 mg/L 和链霉素 100 g/L(碧云天,中国上海)。

1.2 试剂和抗体

BBR和DOX购买于Solarbio(北京,中国),将其溶解在100%二甲基亚砜(DMSO)中作为储备溶液(BBR 300 mmol/L, DOX 1 mmol/L), -20 °C。Bax、Bcl-2 抗体购买于Cell Signaling Technology(CST), GAPDH 选自 Abcam, 山羊抗兔 IgG-HRP 二抗购于EarthOx(美国)。

1.3 细胞增殖检测

使用MTT法检测人PCa细胞的增殖。PCa细胞系(PC-3/LNCaP: 4×10³ 细胞/孔, 22RV1: 1×10⁴ 细胞/孔)接种在96孔板(NEST)中,培养24 h后,采用不同

基金项目: 广东医科大学科研基金(No.GDMUM201823),

广东省医学科学技术研究基金(No.A2019319)

收稿日期: 2021-03-29; **修订日期:** 2021-06-12

作者简介: 李建昌(1978-),男,博士,主任医师

通信作者: 赵玉婉,女, E-mail: zhaoyw201@126.com

浓度的BBR (0、3、6、12、24、48 $\mu\text{mol/L}$)联合不同浓度的DOX (0、0.1、0.2、0.5、1、2 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞48 h,以及用BBR 13 $\mu\text{mol/L}$ 和DOX 1 $\mu\text{mol/L}$ 分别处理细胞6、12、24、48、72 h。每孔采用0.5 g/L的MTT孵育细胞4 h,随后用酶标仪(EnSpire 2300 Multilabel Reader, PE)在492 nm处检测吸光度值。评估药物对细胞生存力(%)的影响,并与Control组细胞进行比较,Control组被指定为100%存活率。

1.4 细胞凋亡检测

Annexin V和PI染色检测细胞凋亡。实验分为Control、BBR、DOX和BBR+DOX组。BBR浓度为13 $\mu\text{mol/L}$,DOX为1 $\mu\text{mol/L}$,药物处理PCa细胞24 h后,收集细胞,PBS洗涤。使用Annexin V凋亡试剂盒(BD Pharmingen, USA)检测细胞凋亡,在室温用AV-FITC避光染色15 min后,洗涤细胞并用PI孵育,流式细胞仪分析。

1.5 Caspase 3/7和Caspase 8活性测定

使用Caspase-Glo 3/7和Caspase-Glo 8活性检测试剂盒(Promega Corporation, Madison, WI, USA)测定Caspase 3/7和Caspase 8的活性。实验分为Control、BBR、DOX和BBR+DOX组。将PCa细胞接种到96孔板(NEST Biotechnology Co. Ltd)中,加入BBR、DOX及Caspase-Glo 3/7或Caspase-Glo 8,孵育30 min后使用光度计(Berthold Sirius L, Germany)测量Caspase 3/7和Caspase 8的活性。

1.6 线粒体膜电位的测量

将PCa细胞接种在6孔板(1×10^5 细胞/孔)中并孵育24 h,分别用BBR 13 $\mu\text{mol/L}$ 和DOX 1 $\mu\text{mol/L}$ 处理。实验分为Control、BBR、DOX和BBR+DOX组。采用JC-1检测试剂盒(Berthold Sirius L, Germany)在流式细胞仪(BD, 美国)上检测线粒体膜电位。

1.7 三磷酸腺苷(ATP)检测

使用ATP检测试剂盒(碧云天)检测ATP的变化。实验分为Control、BBR、DOX和BBR+DOX组。分别用BBR 13 $\mu\text{mol/L}$ 和DOX 1 $\mu\text{mol/L}$ 处理的细胞培养板,每孔加入200 μL 裂解液,培养皿置于冰上,使细胞充分裂解,4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g,离心5 min,取上清于EP管中,加入ATP检测工作液;常温放置3~5 min。在EP管中加入20 μL 样品或标准品,立即用移液枪混匀,间隔3~5 s后,用Berthold Sirius L单管式化学发光仪检测。

1.8 蛋白质印迹分析

实验分为Control、BBR、DOX和BBR+DOX组。取出药物处理24 h的细胞使用裂解缓冲液(RIPA, 碧

云天)裂解细胞获得细胞总蛋白,整个过程均在冰上操作。BCA蛋白质测定试剂盒(碧云天,中国)检测蛋白浓度。样品蛋白质通过12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离,并电转移到聚偏二氟乙烯(PVDF, Millipore, USA)膜上,然后用5%脱脂奶粉(1%Tween 20和Tris缓冲盐水)封闭,将封闭后的PVDF膜放入一抗中4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,TBST冲洗PVDF膜3次,每次5 min,然后在室温将其与山羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶二抗(EarthOx, USA)孵育1 h。

1.9 统计学处理

数据分析采用SPSS 20.0软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBR联合DOX对PCa细胞增殖的影响

BBR和DOX以剂量依赖的方式抑制PCa细胞的增殖能力,与单独使用BBR和DOX相比,BBR+DOX能显著降低细胞的增殖能力($P < 0.05$),见图1A~C。经BBR和DOX处理后,细胞的融合显著减少,细胞逐渐收缩,失去正常形状,变成圆形,最终脱离培养皿。与BBR、DOX组相比,BBR+DOX组减少了细胞间的接触,扩散范围更小(图1D)。BBR和DOX以时间依赖的方式抑制细胞增殖($P < 0.05$),见图2。

2.2 BBR联合DOX对PCa细胞凋亡的影响

BBR+DOX组细胞凋亡率明显高于BBR、DOX组,BBR+DOX可显著增加PCa细胞的早期和晚期凋亡率($P < 0.05$),见图3。

2.3 BBR联合DOX对PCa细胞线粒体膜电位和ATP水平的影响

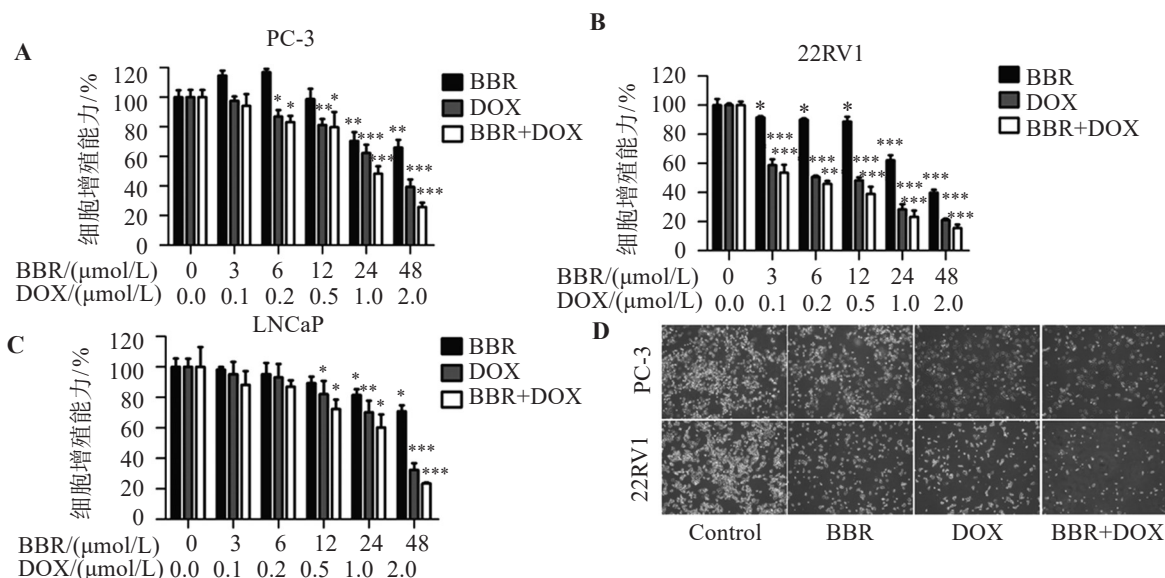
BBR、DOX和BBR+DOX组均能够降低PCa细胞线粒体膜电位和ATP水平,且BBR + DOX组降低更显著($P < 0.05$),见图4。

2.4 BBR联合DOX对凋亡相关蛋白表达水平的影响

与单一药物组相比,BBR+DOX组显著增加了Bax的表达水平,降低了抗凋亡蛋白Bcl2的表达,显著提高了Caspase 3/7和Caspase 8的活性($P < 0.01$),见图5。

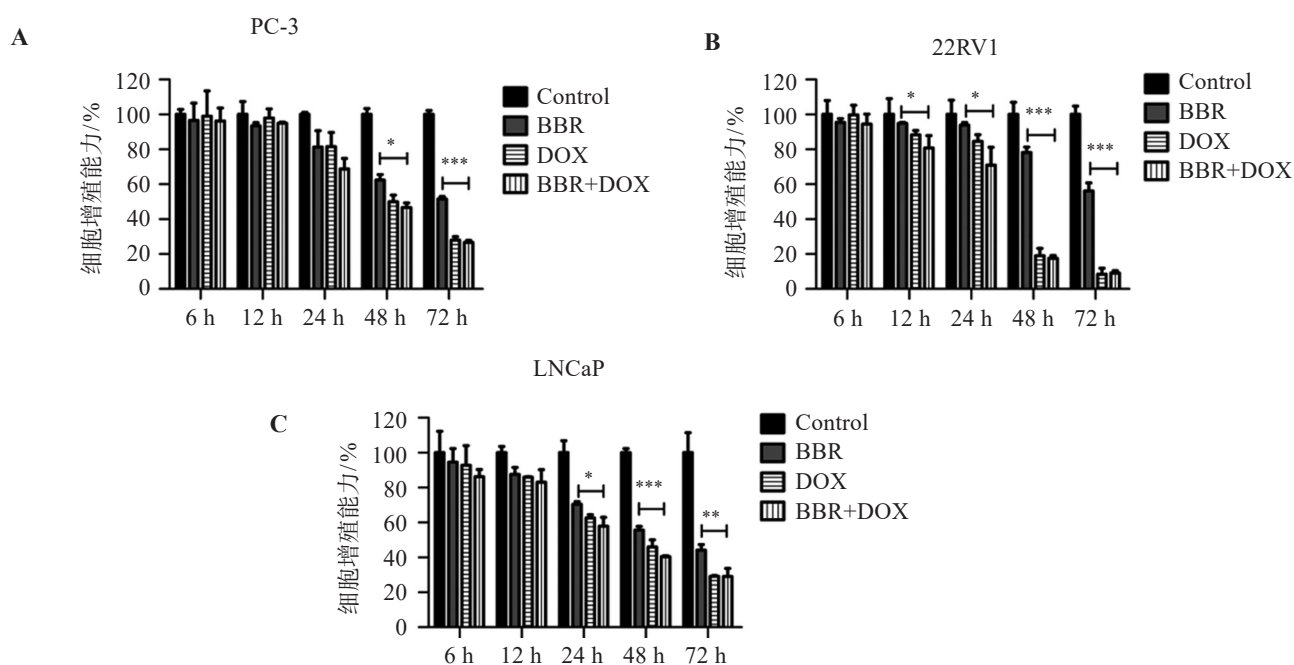
3 讨论

PCa是男性最常见的恶性肿瘤之一,发病率逐年递增^[7]。DOX是PCa化疗中常用的抗肿瘤药物之一,然而化疗的耐药性和不良反应成为PCa治疗的主要



A-C. MTT 法检测细胞增殖能力;D. 倒置相差显微镜($\times 100$ 倍)对细胞拍照;BBR、DOX 和 BBR+DOX 组与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图1 BBR 和 DOX 对 PCa 细胞增殖的影响

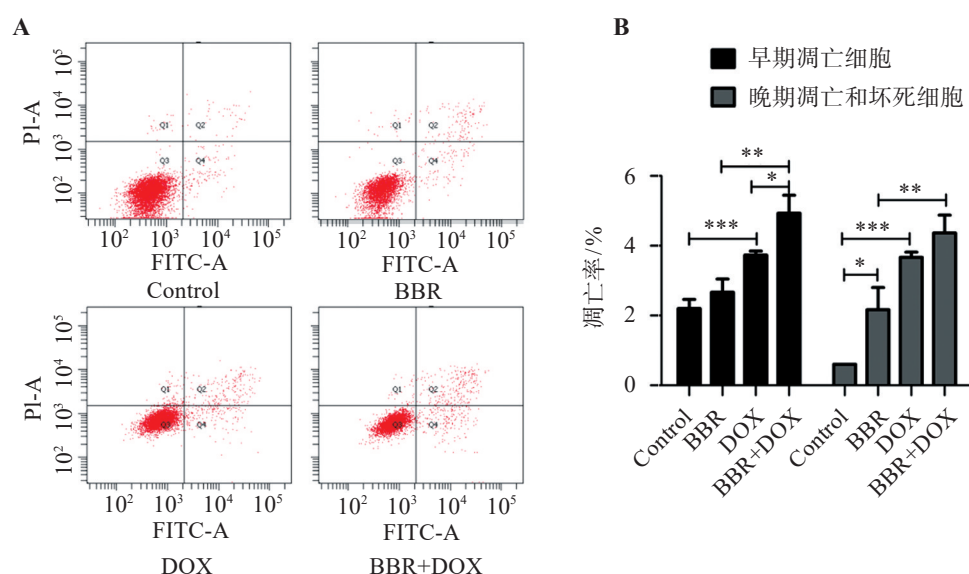


BBR+DOX 组与 BBR、DOX 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 BBR 联合 DOX 以时间依赖的方式抑制细胞增殖

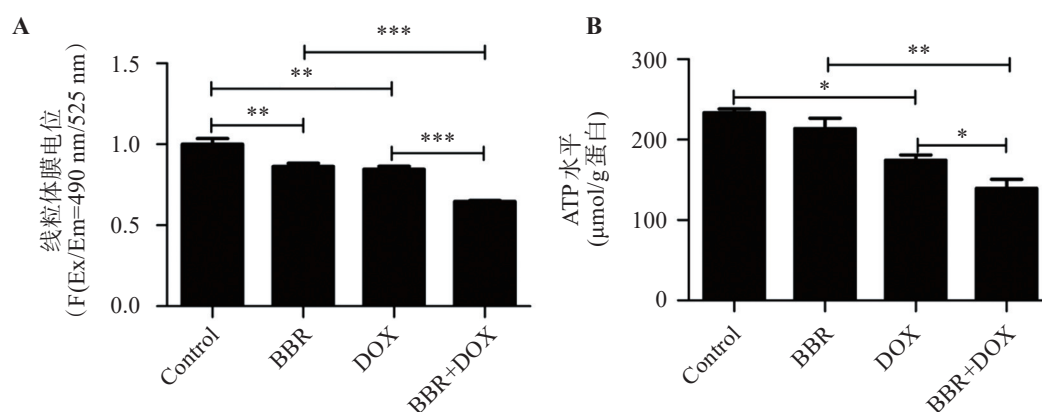
问题^[8]。据报道, BBR 作为一种潜在的化疗辅助药物, 可发挥显著的抗肿瘤作用, 并降低化疗药物对心脏和肝脏的毒性^[6]。因此, 我们评估了 BBR 与 DOX 联合应用对 PCa 细胞的影响及其潜在的作用机制。凋亡是程序性细胞死亡的过程, 已被确定为癌症预防的关键^[9-10]。本研究结果表明, BBR 对 PCa 细胞增殖的抑制呈时间和浓度依赖性。虽然低水平的 BBR 对

PCa 细胞的作用有限, 但它显著增加了细胞凋亡水平和细胞对 DOX 的敏感性。BBR 增强了线粒体膜电位和 ATP 水平的耗竭, 这是细胞凋亡早期的标志^[11]。Patil 等^[12]研究表明, BBR 能够刺激细胞间活性氧的积累, 并进一步导致人胶质母细胞瘤和乳腺癌中线粒体依赖的凋亡。Ca²⁺ 是细胞凋亡途径的参与者, 线粒体中 Ca²⁺ 的大量积累会增加 Ca²⁺ 的释放并且促进细胞



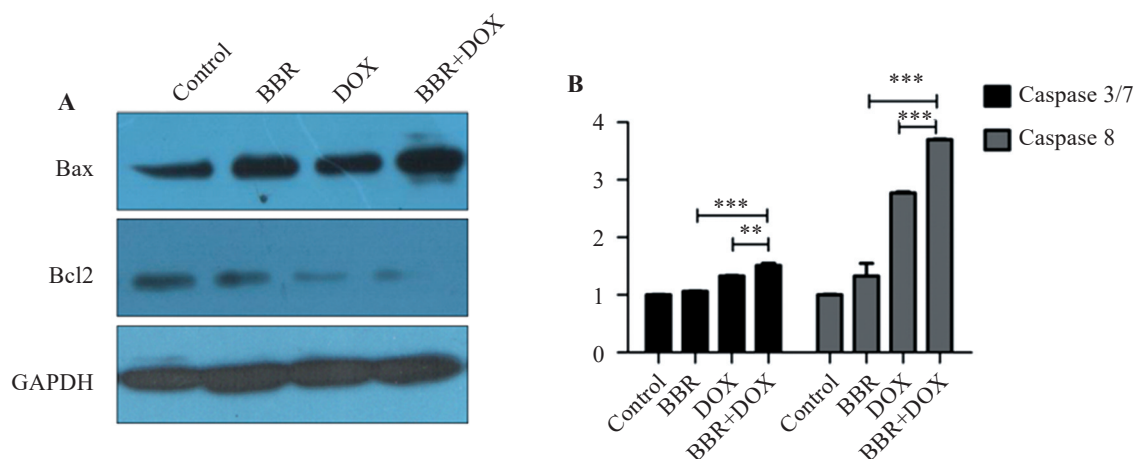
A. 直方图的右下象限表示早期凋亡细胞, 右上象限表示晚期凋亡和坏死细胞; B. 为 A 图的量化图; BBR、DOX 和 BBR+DOX 组与 Control 组比较, BBR+DOX 组与 BBR、DOX 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图3 BBR联合DOX对PCa细胞凋亡的影响



A. 线粒体膜电位水平; B. ATP 水平; BBR、DOX 和 BBR+DOX 组与 Control 组比较, BBR+DOX 组与 BBR、DOX 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图4 BBR联合DOX对PCa细胞线粒体膜电位和ATP水平的影响



A. 蛋白印迹法检测 Bcl2、Bax 蛋白水平; B. Caspase 3/7 和 Caspase 8 活性检测; BBR+DOX 组与 BBR、DOX 组比较: ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

图5 BBR联合DOX对凋亡相关蛋白表达水平的影响

凋亡^[13]。BBR能够通过增加Ca²⁺的产生和释放,在多种癌症细胞中促进细胞凋亡,包括胃癌细胞、口腔癌细胞、舌鳞癌细胞、胶质母细胞瘤等^[14-17]。在启动线粒体凋亡途径的过程中,决定性事件是线粒体外膜通透性的改变。当线粒体外膜通透性增加时,线粒体膜间空间蛋白(尤其是细胞色素c)被释放到细胞质中,从而激活Caspase家族蛋白,导致数百种不同的蛋白质被裂解,从而导致细胞快速死亡^[18]。此外,线粒体外膜通透性还受到BCL-2蛋白家族成员的高度调控。该家族蛋白可分为促凋亡蛋白(Bax和Bak)和抗凋亡Bcl2蛋白。Bax和Bak蛋白的激活能够增加线粒体外膜的通透性,而Bcl2蛋白能够抑制Bax和Bak蛋白的活性^[19]。本研究结果表明,BBR提高了DOX诱导的促凋亡蛋白Bax的表达水平,降低了抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,导致线粒体功能障碍,进一步导致Caspase家族蛋白的活化,包括Caspase 3/7和Caspase 8。

总之,BBR似可通过线粒体依赖性途径抑制PCa细胞的增殖,增强DOX的抗癌作用。这些潜在的机制仍需进一步的研究阐明,并确定BBR联合DOX的临床相关性。

参考文献:

- [1] DAMODARAN S, LANG J M, JARRARD D F. Targeting metastatic hormone sensitive prostate cancer: chemohormonal therapy and new combinatorial approaches [J]. J Urol,2019, 201(5):876-885.
- [2] MEREDITH A M, DASS C R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic Doxorubicin in cellular metabolism [J]. J Pharm Pharmacol,2016, 68(6):729-741.
- [3] CASEY S C, AMEDEI A, AQUILANO K, et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment [J]. Semin Cancer Biol,2015,35(Suppl):S199-S223.
- [4] TONG N, ZHANG J, CHEN Y, et al. Berberine sensitizes multiple human cancer cells to the anticancer effects of Doxorubicin in vitro [J]. Oncol Lett, 2012,3(6):1263-1267.
- [5] TONG N N, ZHANG J, CHEN Y R, et al. Berberine reverses Doxorubicin resistance by inhibiting autophagy through the PTEN/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer [J]. Onco Targets Ther,2020,13:1909-1919.
- [6] WU Y Z, ZHANG L, WU Z X, et al. Berberine ameliorates Doxorubicin-Induced cardiotoxicity via a SIRT1/p66Shc-mediated pathway [J]. Oxid Med Cell Longev,2019(1):1-14.
- [7] TEOH J Y C, HIRAI H W, HO J M W, et al. Global incidence of prostate cancer in developing and developed countries with changing age structures [J]. PloS One, 2019, 14(10): e0221775.
- [8] GORINI S, DE ANGELIS A, BERRINO L, et al. Chemotherapeutic drugs and mitochondrial dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018,2018:1-15.
- [9] WANG Y, ZHONG J, BAI J J, et al. The application of natural products in cancer therapy by targeting apoptosis pathways [J]. Current Drug Metabolism,2018,19(9):739-749.
- [10] ASHKENAZI A, DIXIT V M. Death receptors: signaling and modulation [J]. Science,1998,281(5381):1305-1308.
- [11] WU C C, BRATTON S B. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species [J]. Antioxid Redox Sign,2013,19(6):546-558.
- [12] PATIL J B, KIM J, JAYAPRAKASHA G K. Berberine induces apoptosis in breastcancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway [J]. Eur J Pharmacol,2010,645 (1-3):70-78.
- [13] JEONG S Y, SEOL D W. The role of mitochondria in apoptosis[J]. BMB Rep,2008,41(1):11-22.
- [14] LIN J P, YANG J S, LEE J H, et al. Berberine induces cell cycle arrest and apoptosis in human gastric carcinoma SNU-5 cell line[J]. World J Gastroenterol,2006,12(1):21-28.
- [15] LIN C C, YANG J S, CHEN J T, et al. Berberine induces apoptosis in human HSC-3 oral cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway[J]. Anticancer Res,2007, 27(5A):3371-3378.
- [16] HO Y T, LU C C, YANG J S, et al. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells[J]. Anticancer Res,2009,29(10):4063-4070.
- [17] EOM K S, KIM H J, SO H S, et al. Berberine-induced apoptosis in human glioblastoma T98G cells is mediated by endoplasmic reticulum stress accompanying reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction[J]. Biol Pharm Bull, 2010,33(10):1644-1649.
- [18] TAIT S W, GREEN D R. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2010,11(9): 621-632.
- [19] BONNEAU B, PRUDENT J, POOGEOGIEV N, et al. Non-apoptotic roles of Bcl-2 family: The calcium connection [J]. Biochim Biophys Acta,2013, 1833(7):1755-1765.