

丫蕊花甾体皂苷 YB16 对人前列腺癌细胞 PC-3 增殖与凋亡的影响

夏黎, 赵珍东*, 邓晓迎, 杨炳伟, 庄义修
(广东食品药品职业学院, 南药资源保护与利用工程技术开发中心, 广州 510520)

[摘要] 目的:探讨丫蕊花甾体皂苷 YB16 对人前列腺癌细胞 PC-3 增殖与凋亡的影响,并探讨其作用机制。方法:体外培养 PC-3 细胞,给予不同浓度的 YB16($0.125 \sim 16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),以噻唑蓝(MTT)比色法检测 YB16 对 PC-3 的细胞毒性,倒置相差显微镜观察细胞形态变化,吖啶橙(AO)染色、流式细胞术检测 YB16 对 PC-3 的凋亡影响,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 YB16 对 PC-3 细胞 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),B 细胞淋巴瘤-xl(Bcl-xl),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)mRNA 的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bcl-2,Bcl-xl,Bax,激活型 Caspase-3(cleaved-Caspase-3)蛋白表达,并对结果进行分析。结果:YB16 能显著抑制 PC-3 细胞的生长,具有剂量依赖性($P < 0.05$);YB16 能促进细胞的凋亡,相差显微镜,AO 染色法观察可见细胞具凋亡特征性改变;YB16 能下调 Bcl-2,Bcl-xl,上调 Bax,Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达($P < 0.05$)。结论:YB16 能抑制 PC-3 细胞增殖,促进 PC-3 发生凋亡,其机制可能与促进 Caspase-3 表达有关,具有良好的抗肿瘤作用。

[关键词] 丫蕊花甾体皂苷 YB16; 前列腺癌; PC-3 细胞; 细胞凋亡; B 淋巴细胞瘤-2; B 细胞淋巴瘤-xl; Bcl-2 相关 X 蛋白; 半胱氨酸蛋白酶-3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)04-0164-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040164

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161129.1502.034.html>

[网络出版时间] 2016-11-29 15:02

Effect of Steroidal Saponin YB16 of Ypsilandra Thibetica on Proliferation and Apoptosis of Human Prostate Cancer Cells PC-3

XIA Li, ZHAO Zhen-dong*, DENG Xiao-ying, YANG Bing-wei, ZHUANG Yi-xiu
(Guangdong Food and Drug Vocational College, Engineering Center for Protection and Utilization of Herbal Medicinal Resources in South China, Guangzhou 510520, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Ypsilandra thibetica 16 (YB16) extracted from the Ypsilandra thibetica on proliferation and apoptosis of human prostate cancer cells PC-3, and explore its mechanism. **Method:** PC-3 cells were cultured *in vitro* and treated with different concentrations of YB16 ($0.125 \sim 16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The effects of YB16 on PC-3 cytotoxicity were detected by (4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay, and the cell morphology was observed by phase contrast microscope. Acridine orange (AO) staining and flow cytometry were used to detect the apoptosis of PC-3 cells induced by YB16. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA

[收稿日期] 20160417(010)

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(S2012040007924);广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目(YQ2015196);广东省高职院校专业领军人才培养计划项目(2016009);广东省医学科研基金项目(B2012058);广东省中医药局科研项目(20121107);广东食品药品职业学院自然科学研究项目(2011YZ011)

[第一作者] 夏黎,博士,副教授,从事中药活性成分及质量评价研究,Tel:020-28854935,E-mail:xiali516@126.com

[通讯作者] *赵珍东,博士,副教授,从事中药抗肿瘤作用及机制研究,Tel:020-28854936,E-mail:zhaozd2008@126.com

expression levels of B-cell lymphoma 2 gene (Bcl-2), B-cell lymphoma 2 gene-xl (Bcl-xl), Bcl-2 associated X protein (Bax), and cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3) of PC-3 cells, and Western blot was used to detect the protein expression levels of Bcl-2, Bcl-xl, Bax and cleaved-Caspase-3. **Result:** YB16 could significantly inhibit the growth of PC-3 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). YB16 could promote PC-3 cells apoptosis, and PC-3 cells had obvious characteristic apoptosis changes in the observation under phase contrast microscope and AO staining. YB16 could reduce the mRNA and protein expression levels of Bcl-2, Bcl-xl, but increase the mRNA and protein expression levels of Bax, Caspase-3 ($P < 0.05$). **Conclusion:** YB16 can inhibit PC-3 cells proliferation, and induce apoptosis obviously. YB16 has a potential antitumor value, and its mechanism may be associated with promoting Caspase-3 expression.

[**Key words**] steroidal saponin YB16; prostate cancer; PC-3 cells; apoptosis; B-cell lymphoma 2 gene (Bcl-2); B-cell lymphoma 2 gene-xl (Bcl-xl); Bcl-2 associated X protein (Bax); cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3)

前列腺癌(PCa)是男性生殖系统常见的恶性肿瘤,在西方国家居男性致死性恶性肿瘤第 2 位^[1]。随着人口老龄化及诊断技术的提高,我国 PCa 的发病率呈现明显持续增长趋势,并呈逐渐年轻化趋势^[2]。根据我国 2015 年国家癌症登记,PCa 发病率位居我国男性癌症的第 7 位,PCa 正成为严重影响我国男性健康的泌尿系恶性肿瘤,多数 PCa 患者确诊时已是晚期^[3-4]。目前药物治疗仍是 PCa 治疗的主要手段,患者在接受化疗药物/靶向治疗后,其临床效果令人失望,大约有半数以上的患者在 1~2 年内死亡。中药应用于肿瘤的治疗已成为一种趋势,中药对 PCa 的作用也越来越受重视,受到国内外的广泛关注,日益成为治疗 PCa 的重要研究方向^[5]。

丫蕊花为百合科丫蕊花属植物丫蕊花的全草,亦称小瓢儿菜、一枝花(广西)、随身丹(四川),别名峨眉石风丹。丫蕊花属植物主要有 6 种,包括丫蕊花、云南丫蕊花、高山丫蕊花、小丫蕊花、甘肃丫蕊花等。在我国四川、广西东北部以及湖南南部为主要分布。据《中华本草》记载,丫蕊花以全草入药,能清热、解毒、散结、利小便,主治療疔,小便不利,水肿^[6],在四川等地民间常用于止血。近年研究表明,甾体皂苷是丫蕊花的主要成分,以往报道对人白血病细胞 K562,胃癌细胞 BGC-823,食管癌细胞 Eca-109 等具有显著的细胞活性^[7-9]。因此,广大学者越来越重视其药用价值,被广泛应用到抗肿瘤方面的研究中,但其抗肿瘤作用及其机制仍未阐明。本课题组从丫蕊花中分离提取得到单体成分丫蕊花甾体皂苷 YB16^[10],属于螺甾烷型甾体皂苷,苷元为薯蓣皂苷元,目前有关 YB16 对 PCa 作用鲜有报道,本研究旨在探讨 YB16 对人 PCa 细胞株(PC-3)的增殖、凋亡的影响,探索 YB16 作为 PCa 治疗

药物的可能性,为丫蕊花抗肿瘤作用提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 丫蕊花甾体皂苷 YB16^[10]由广东食品药品职业学院实验室制备,丫蕊花药材采自四川峨眉山,经广东省中药研究所张现涛教授鉴定为百合科丫蕊花属丫蕊花 *Ypsilandra thibetica* 的干燥全草,取 5 kg 粉碎,用 95% 乙醇浸泡 24 h,渗漉提取,浓缩得到浸膏。将浸膏用水混悬,再用不同极性溶剂(石油醚、乙酸乙酯、正丁醇)依次萃取,将萃取到的正丁醇部位上硅胶柱、反相柱、凝胶柱,分别以三氯甲烷-甲醇、甲醇-水、甲醇反复进行梯度洗脱后获得化合物 YB16,相对分子质量为 1 013.5,根据光谱分析(MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR)确定该化合物为薯蓣皂苷元-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 2)-[α -L-吡喃鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-吡喃鼠李糖基(1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-吡喃葡萄糖苷(YB16),化学结构式见图 1。临用时二甲基亚砜配制成贮存液(10 mmol·L⁻¹), -20℃ 保存。实验前用 1640 完全培养基稀释至所需不同浓度。

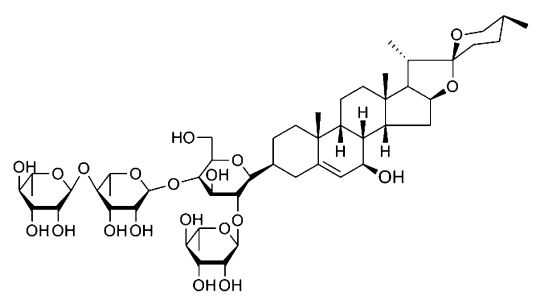


图 1 YB16 化学结构式
Fig.1 Chemical structure of compound YB16

1.2 细胞 PC-3 细胞,购自中山大学实验动物中心。培养时采用 5% 的胎牛血清培养。

1.3 试剂 RMPI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 8115293);胎牛血清(FBS,杭州四季青生物有限公司,批号 150215);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 141119);碘化丙啶(PI),核糖核酸酶(RNase A,上海碧云天研究所,批号均为 C1052);吖啶橙(AO)染色试剂盒(北京斯百汇生物科技公司,批号 BH00213);总 RNA 提取试剂 Trizol 和逆转录-PCR(RT-PCR)试剂盒,DNA marker(北京天根生化科技公司,批号分别为#m1805,#J8221);B 淋巴瘤细胞瘤-2(Bcl-2),B 细胞淋巴瘤-xl(Bcl-xl),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)引物(上海生工生物工程公司,批号均为 930331448);Bcl-2, Bcl-xl, Bax, 激活型 Caspase-3 (cleaved-Caspase-3)抗体(美国 Bioworld 公司,批号分别为 CB36131,CL36131,CA36131,CJ3636131); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(上海碧云天研究所,批号 AF0003);其他所用试剂均为分析纯。

1.4 仪器 CT14RD 型高速台式冷冻离心机, MSC1.2 型超净工作台, Model 311 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Forma 公司);Eclipse Ti-FL 型倒置相差显微镜,Eclipse Ti-FL 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司);Epics-XL 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);Bio-Tek ELX800 型多功能酶标仪, MyCycler 型 PCR 扩增仪, Mini-PROTEAN 型垂直凝胶电泳, Mini-PROT EAN 型电转系统(美国 Bio-Rad 公司);AlphaImager Mini 型凝胶成像系统(美国阿尔法公司),DYCP-31DN 型电泳仪及相关仪器(北京市六一仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞培养 PC-3 细胞贴壁培养于含 5% 胎牛血清,100 kU·L⁻¹青霉素,100 mg·L⁻¹链霉素的 1640 培养基中,在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。传 3~4 代至细胞生长稳定后开始实验。

2.2 细胞生长抑制检测 取对数生长期的 PC-3 细胞,以 7×10³ 个/孔细胞接种于 96 孔培养板,培养 24 h 给药。实验组每组加用含 5% 胎牛血清的 1640 培养基,参照预实验结果,将 YB16 稀释成不同浓度,使其终浓度为 0.125,0.25,0.5,1,2,4,8,16 μmol·L⁻¹,每组设置 3 个复孔,同时设置空白组。继续培养 24 h。加入 MTT 溶液 20 μL,37℃ 孵育 4 h 后,去上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL,避光水平振荡 10 min,于酶标仪 490 nm 波长处读取吸光度 A,取平均值。

细胞存活率 = $(A_{\text{药物组}} - A_{\text{调零孔}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{调零孔}}) \times 100\%$

2.3 形态学观察 PC-3 细胞生长到对数生长期后,调整细胞密度为 4×10⁵ 个/mL,铺于 12 孔板,培养 24 h 后,将细胞分成空白组,YB16 组(根据 MTT 法测定出的 YB16 对 PC-3 细胞生长抑制的有效浓度,确定 YB16 终浓度为 0.75,1.5,3 μmol·L⁻¹),分别加入培养基和相应药物,培养 24 h 后,将细胞置于倒置显微镜下观察。

2.4 AO 染色 细胞铺板同 2.3 项,培养 24 h 后,加入不同浓度 YB16 干预,每孔加入终质量浓度为 30 mg·L⁻¹ 的 AO 染色液 10 μL,避光染色 10 min,置于荧光显微镜观察。

2.5 流式细胞仪检测 PC-3 细胞凋亡 取对数生长期细胞,接种于 6 孔培养板,7×10⁵ 个/孔,分组、药物处理同 2.3 项,收集作用 24 h 的 PC-3 细胞,70% 乙醇固定,混匀,4℃ 保存。检测前经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,加入 PI 染液 0.5 mL,37℃ 避光温浴 30 min,及时在流式细胞仪上(激发波长 488 nm)检测。

2.6 PC-3 细胞 Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Caspase-3 mRNA 检测 实验分组、药物干预同 2.3 项,收集经 YB16 处理 24 h 的 PC-3 细胞。细胞总 RNA 抽提并逆转录成 cDNA。按照说明书进行逆转录反应。PCR 扩增:取 10 μmol·L⁻¹ 上游引物 1 μL,10 μmol·L⁻¹ 下游引物 1 μL,加入 cDNA 2.5 μL,2×Taq Mastermix 12.5 μL,加双蒸 H₂O 至 25 μL。引物序列、产物片段长度和反应条件见表 1。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,拍照后用凝胶成像系统进行灰度值的分析。mRNA 相对表达量以目的基因/GAPDH 表示。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Cleaved-Caspase-3 蛋白含量 收集细胞,用细胞裂解液 80 μL 冰上裂解 1 h,12 000×g 低温离心 20 min,收集上清。经 Bio-Rad 法进行蛋白定量后,10% 分离胶和 5% 浓缩胶进行 SDS-PAGE 电泳,转膜。5% 脱脂奶粉封闭 2 h,一抗(1:1 000)4℃ 孵育过夜。PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。以二抗稀释液(1:5 000)温育 2 h 后,PBST 洗涤 3 次。加入 ECL 试剂,显影,定影,扫描记录。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 SNK 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列
Table 1 Primers sequence

引物	序列	退火	循环/个	长度/bp
Bcl-2	5'-TATTGTGGCTGCACTTGCTC-3'	55 ℃ ,30 s	32	281
	5'-GGCCTCTCTTGCGGAGTATT-3'			
Bcl-xl	5'-GGAGCTGGTGGTTGACTTTCT-3'	56. 5 ℃ ,30 s	32	379
	5'-CCGGAAGAGTTCATTCACTAC-3'			
Bax	5'-GGGCTGGACATTGGACTTC-3'	57. 5 ℃ ,30 s	32	246
	5'-TAGGGTCAGAGGCTCATCAA-3'			
Caspase-3	5'-TTGATGCGTGATGTTTCTA-3'	56. 5 ℃ ,30 s	32	223
	5'-CAATGCCACAGTCCAGTTC-3'			
GAPDH	5'-GCCACATCGCTCAGACAC-3'	—	—	610
	5'-CATCACGCCACAGTTTCC-3'			

3 结果

3.1 YB16 对细胞生长抑制的影响 与空白组比较,0. 5 ~ 16 μmol·L⁻¹YB16 干预细胞 24 h,对 PC-3 均有不同程度的抑制作用($P < 0. 05$, $P < 0. 01$),当 YB16 浓度达到 16 μmol·L⁻¹时,细胞增殖明显下降,并且有一定的剂量依赖性。数据分析表明,YB16 对 PC-3 细胞的半数抑制量(IC₅₀)为 3. 91 μmol·L⁻¹。依据 MTT 实验结果,以下实验取 0. 75,1. 5,3 μmol·L⁻¹3 个浓度。见表 2。

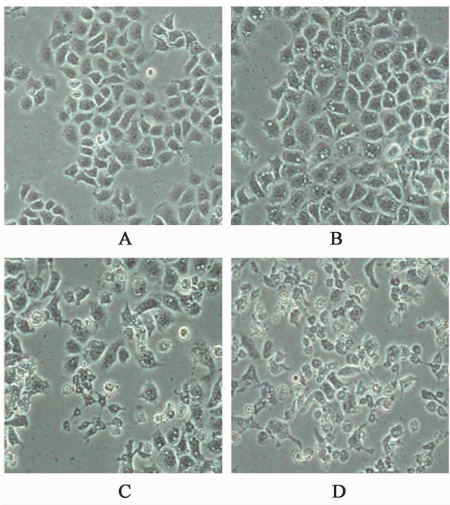
表 2 YB16 对 PC-3 增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Table 2 Effect of YB16 on proliferation of PC-3 cells($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度/μmol·L ⁻¹	A ₄₉₀	抑制率/%
空白		0. 53 ± 0. 16	0
Yb16	0. 125	0. 50 ± 0. 11	5. 43
	0. 25	0. 48 ± 0. 09	9. 81
	0. 5	0. 46 ± 0. 12 ¹⁾	13. 84
	1	0. 44 ± 0. 12 ¹⁾	18. 27
	2	0. 37 ± 0. 15 ²⁾	31. 43
	4	0. 25 ± 0. 10 ²⁾	53. 78
	8	0. 19 ± 0. 07 ²⁾	64. 23
	16	0. 13 ± 0. 01 ²⁾	75. 68

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0. 05$,²⁾ $P < 0. 01$ 。

3.2 YB16 对 PC-3 细胞生长的影响 YB16 处理 PC-3 细胞后,随着剂量的增加,细胞凋亡增多。凋亡细胞体积变小、变形,细胞间连接消失,细胞核固缩、核碎裂、可见凋亡小体,细胞数目也减少。空白组 PC-3 细胞形态学无变化。见图 2。

3.3 YB16 诱导 PC-3 细胞凋亡形态的改变 空白组 PC-3 细胞经 AO 染色后,细胞被染成绿色,分布均匀,细胞结构清晰;经 YB16 处理后,随着用药



A. 空白组;B. YB16 0. 75 μmol·L⁻¹组;C. YB16 1. 5 μmol·L⁻¹组;D. YB16 3 μmol·L⁻¹组(图 3 ~ 5 同)

图 2 YB16 对 PC-3 细胞形态学影响(倒置显微镜,×200)
Fig. 2 Effect of YB16 on cell morphology of PC-3 cells(inverted microscope, ×200)

浓度的增加,可见细胞膜完整性受损,细胞核染色质部分浓染,皱缩,变圆;细胞核浓聚,偏位,可见新月形或颗粒状改变。见图 3。

3.4 YB16 对 PC-3 细胞凋亡的影响 YB16 对 PC-3 细胞处理 24 h 后,与空白组比较,YB16(0. 75, 1. 5,3 μmol·L⁻¹)组细胞凋亡率显著升高($P < 0. 01$),表明 YB16 促进了 PC-3 细胞的凋亡。与 YB16(0. 75 μmol·L⁻¹)组比较,YB16(1. 5,3 μmol·L⁻¹)组细胞凋亡率显著上升($P < 0. 05$, $P < 0. 01$)。见表 3。

3.5 YB16 对 PC-3 细胞 Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Caspase-3 mRNA 表达的影响 与空白组比较,YB16 (0. 75,1. 5,3 μmol·L⁻¹)处理细胞 24 h 后,各组

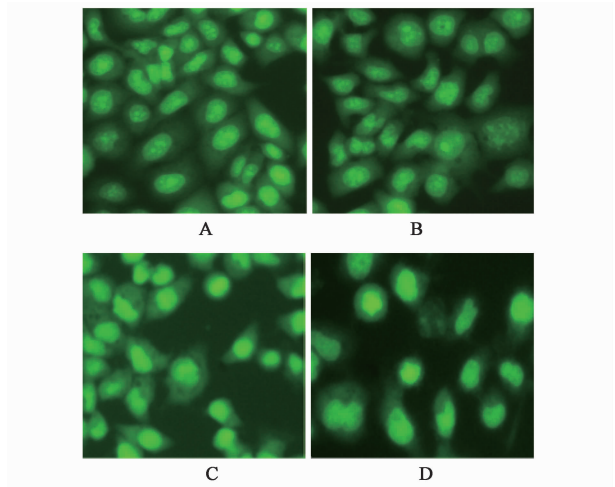


图 3 YB16 对 PC-3 细胞凋亡的影响 (A0, ×200)

Fig.3 Effect of YB16 on apoptosis of PC-3 cells(A0, ×200)

表 3 YB16 对 PC-3 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of YB16 on PC-3 cells apoptosis rate($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白	—	5.2 ± 1.35
Yb16	0.75	$15.9 \pm 2.17^{1)}$
	1.5	$25.8 \pm 2.81^{1,2)}$
	3	$38.4 \pm 1.91^{1,2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 YB16 (0.75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

Bcl-2, Bcl-xl mRNA 表达下调 ($P < 0.01$), Bax, Caspase-3 mRNA 基因表达显著上调 ($P < 0.01$)。与

表 4 YB16 对 PC-3 细胞 Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Caspase-3 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of YB16 on mRNA expression levels of Bcl-2, Bcl-xl, Bax and Caspase-3 in PC-3 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2/GAPDH	Bcl-xl/GAPDH	Bax/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
空白	—	0.316 ± 0.006	0.618 ± 0.008	0.34 ± 0.005	0.421 ± 0.008
YB16	0.75	$0.269 \pm 0.007^{1)}$	$0.564 \pm 0.006^{1)}$	$0.396 \pm 0.007^{1)}$	$0.585 \pm 0.007^{1)}$
	1.5	$0.258 \pm 0.009^{1)}$	$0.539 \pm 0.007^{1,2)}$	$0.445 \pm 0.005^{1,3)}$	$0.593 \pm 0.008^{1)}$
	3	$0.224 \pm 0.006^{1,2)}$	$0.389 \pm 0.008^{1,3)}$	$0.502 \pm 0.008^{1,3)}$	$0.637 \pm 0.006^{1,3)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 YB16 (0.75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (图 5 同)。

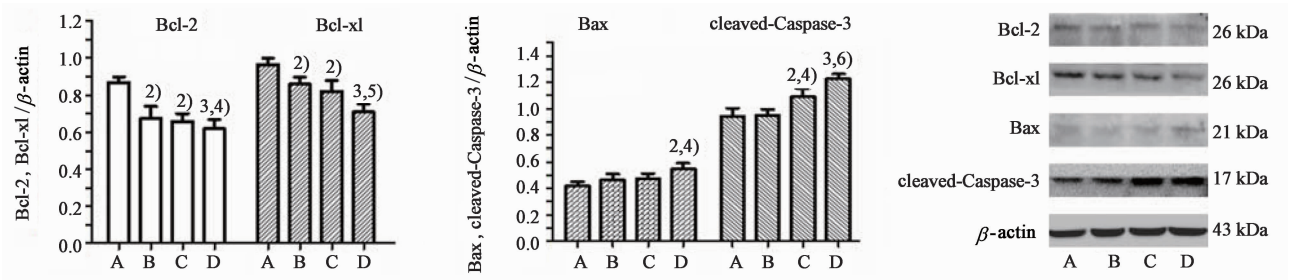


图 5 YB16 对 PC-3 细胞 Bcl-2, Bcl-xl, Bax, cleaved-Caspase-3 蛋白水平表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig.5 Effect of YB16 on protein expression levels of Bcl-2, Bcl-xl, Bax, and cleaved-Caspase-3 in PC-3 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

YB16 (0.75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较, YB16 (3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 Bcl-2, Bcl-xl 基因表达下降, Bax, Caspase-3 表达上升 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 4, 表 4。

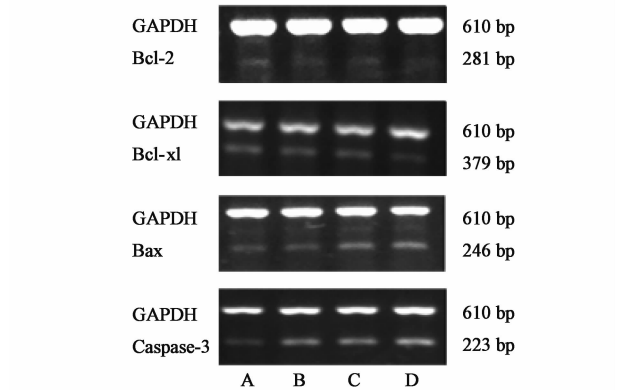


图 4 YB16 对 PC-3 细胞 Bcl-2, Bcl-xl, Bax, Caspase-3 mRNA 表达电泳

Fig.4 Effect of YB16 on mRNA expression levels of Bcl-2, Bcl-xl, Bax, and Caspase-3 in PC-3 cells

3.6 YB16 对 PC-3 细胞 cleaved-Caspase-3, Bcl-2, Bcl-xl, Bax 蛋白表达的影响 与空白组比较, YB16 (0.75, 1.5, 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 PC-3 细胞 24 h 后, Bcl-2, Bcl-xl 蛋白表达下降, Bax, cleaved-Caspase-3 蛋白表达上升 ($P < 0.01$)。与 YB16 (0.75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组比较, YB16 (3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 Bcl-2, Bcl-xl 蛋白表达明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$); Bax, cleaved-Caspase-3 蛋白表达显著上升 ($P < 0.01$)。见图 5。

4 讨论

癌症是全世界最致命的疾病之一,会导致严重的健康问题,是人类死亡的第二大主因。PCa 是男性常见的恶性肿瘤,近年来,由于环境、生活方式等因素的改变,PCa 的发病率在近年来呈现持续快速增长趋势,严重威胁男性健康。目前,癌症的治疗方法多用化疗、放疗等,由于其严重的副作用,对机体危害极大。从天然药物中提取的抗肿瘤成分能减轻癌症治疗中的不良反应和毒副作用^[11]。由于这类成分具有疗效突出、不良反应小等特点,在治疗肿瘤的药物使用中,植物来源的药物使用率越来越高^[12]。我国药用植物种质资源丰富,倘若能将中药中抗肿瘤有效成分分离出来,明确其抗肿瘤作用及机制,为癌症的治疗提供新的药物,对于抗肿瘤药物的研发和肿瘤的治疗意义重大。已有研究表明,中药成分淫羊藿苷^[13],山楂提取物^[14],槲皮素^[15]等成分具有良好的抗肿瘤作用。可见,中药活性成分展示出良好的抗癌前景。

皂苷是苷元为三萜或螺旋甾烷类化合物的一类糖苷,主要分布于陆地高等植物中,也少量存在于海星和海参等海洋生物中。苷元为螺旋甾烷类(C-27 甾体化合物)的皂苷称为甾体皂苷,广泛存在于薯蓣科,百合科和玄参科等。研究表明,甾体皂苷如重楼皂苷^[16],蒺藜甾体皂苷^[17],薯蓣皂苷元^[18]等具有抗肿瘤活性。YB16 是从百合科植物丫蕊花中提取分离的甾体皂苷,极有可能具有抗肿瘤活性,有望成为抗肿瘤药物。实验采用 MTT 法,被公认为是检测体外抗肿瘤活性的方法,具有简便快速且观察终点客观等优点。实验结果表明,YB16 在 0.125 ~ 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对 PC-3 细胞均有抑制生长作用,其抑制率与药物浓度均呈明显的依赖关系。观察细胞形态,可见 YB16 能使 PC-3 细胞出现凋亡形态学改变,与 MTT 法结果相吻合,证实 YB16 可促进 PC-3 细胞凋亡的活性。

促进肿瘤细胞凋亡是目前研究药物抗癌活性的热点之一,PI 作为是一种对 DNA 染色的细胞核染色试剂,常用于细胞凋亡检测,不能通过活细胞膜,但能穿过破损的细胞膜从而产生红色荧光。本实验用 PI 染色检测,空白组细胞凋亡率为 5.15%,随着 YB16 浓度的增加,细胞的凋亡率明显升高,高剂量组为 38.4%,表明 YB16 显著促进了 PC-3 细胞的凋亡。

Bcl-2 基因家族包括凋亡抑制基因(Bcl-2, Bcl-xl 等)和凋亡促进基因(Bax, Bad 等)。Bcl-2 是细胞

凋亡蛋白抑制因子家族中的重要成员,其编码的蛋白可抑制细胞凋亡,促进细胞存活,抑制 Bcl-2 的表达,有助于癌症的治疗。Bcl-xl 亦具有抑制细胞凋亡作用,在肿瘤形成过程中的作用被广泛研究。Bax 属于促凋亡基因, Bax 表达升高能促进细胞凋亡。Bax/Bcl-2 是细胞发生凋亡的关键因素。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最关键的执行分子之一,cleaved-Caspase-3 常作为细胞凋亡的一个重要参考指标。因此,cleaved-Caspase-3 被认为是一个具有潜力的治疗靶点^[19]。本实验结果显示 YB16 能下调 Bcl-2, Bcl-xl 基因和蛋白的表达,促进 Bax, Caspase-3 基因和蛋白的表达,可能是 YB16 促进 PCa 发生凋亡,发挥抗肿瘤作用的重要机制之一。

虽然本实验证实 YB16 对人 PC-3 细胞具有显著的抑制增殖,促进细胞凋亡作用,为丫蕊花抗 PCa 提供了实验依据,但 YB16 抗肿瘤作用机制仍未明了,PCa 的发生与发展经历一系列复杂的过程,细胞内信号通路的异常是 PCa 发生发展的重要机制之一。研究表明,Wnt 信号通路,Notch 信号通路和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路与 PCa 的发生、浸润、转移等有密切关系^[20],这将是本课题组进一步研究的切入点之一。同时,从丫蕊花中分离、富集更多的 YB16 成分,开展整体实验,探索其抗 PCa 的疗效和作用机制,还有诸多工作。

[参考文献]

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(1): 7-30.

[2] SHI J, ZHUANG Y, LIU Y, et al. Systematic analysis on the GSTM1 null phenotype and prostate cancer risk in Chinese people [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(5): 2009-2011.

[3] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国前列腺癌发病现状和流行趋势分析 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2013, 18(4): 330-334.

[4] PANG C, GUAN Y, LI H, et al. Urologic cancer in China [J]. Jpn J Clin Oncol, 2016, 46(6): 497-501.

[5] 罗花, 邓家刚, 杜正彩, 等. 中药治疗前列腺癌的作用机制及临床应用研究进展 [J]. 广西中医药, 2015, 38(5): 11-14.

[6] 夏黎, 郭强, 张水英, 等. 百合科药用植物丫蕊花的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3413-3418.

[7] XIE B B, LIU H Y, NI W, et al. Ypsilandroside C-G, five new spirostanol saponins from *Ypsilandra tibetica* [J]. Steroids, 2009, 74(12): 950-955.

[8] LIU H Y, CHEN C X, LU Y, et al. Steroidal and

pregnane glycosides from *Ypsilandra thibetica* [J]. Nat Prod Bioprospect,2012,2(1):11-15.

[9] SI Y A, YAN H, NI W, et al . Two new steroidal saponins from ypsilandra thibetica [J]. Nat Prod Bioprospect,2014,4(6):315-318.

[10] XIA L,OUYANG P Y,GAO W,Yi T,et al. Rapid and sensitive determination of the major steroidal saponins of *Ypsilandra thibetica* Franch by Ultra High-Performance Liquid Chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry[J]. J Chromatogr Sci,2016,54(6):1010-1015.

[11] Sultana S,Asif H M,Nazar H M,et al. Medicinal plants combating against cancer-a green anticancer approach [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15 (11): 4385-4394.

[12] WANG C Y,BAI X Y,WANG C H. Traditional Chinese medicine;a treasured natural resource of anticancer drug research and development[J]. Am J Chin Med,2014,42(3):543-559.

[13] 纪昕,李伟,王崇,等. 淫羊藿苷对食管癌细胞 EC9706 增殖与凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(3):143-147.

[14] 彭芳华,马玄,胡秀英. 山楂乙醇提取物对肝癌细胞 HepG2 凋亡及相关因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(7):169-172.

[15] YANG F, SONG L, WANG H, et al. Quercetin in prostate cancer; Chemotherapeutic and chemopreventive effects, mechanisms and clinical application potential (Review) [J]. Oncol Rep,2015,33(6):2659-6268.

[16] LONG F Y, CHEN Y S, ZHANG L, et al. Pennogenyl saponins induce cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. J Ethnopharmacol,2015,162:112-120.

[17] WEI S, Fukuhara H, CHEN G, et al. Terrestrosin D, a steroidal saponin from *Tribulus terrestris* L. , inhibits growth and angiogenesis of human prostate cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. Pathobiology, 2014, 81 (3): 123-132.

[18] CHEN P S, SHI Y W, HUANG H C, et al. Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression [J]. PLoS One, 2011, 6 (5): e20164.

[19] HU Q, PENG J, LIU W, et al. Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall survival in several cancer types [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7 (8): 5057-5070.

[20] 申利贤,周斌,李海艳,等. 前列腺癌发生发展相关信号转导通路的研究进展[J]. 肿瘤药学,2016,6(2):96-102.

[责任编辑 张丰丰]