

[文章编号] 1007-385X(2005)04-0289-03

地衣酸抑制前列腺癌 PC-3M 细胞增殖效应的初步探讨

孙 艳^{1,2}, 王洪军², 张 薇³, 吴 扬⁴, 张志强², 冯 立², 王立强², 吴益民²(1. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 2. 沈阳军区疾病预防控制中心, 沈阳 110034; 3. 东北师范大学, 长春 130000; 4. 吉林大学第一附属医院, 长春 130021)

[摘 要] 目的: 从真菌松萝中提取地衣酸并研究地衣酸对体外培养前列腺癌 PC-3M 细胞增殖的抑制效应。方法: 用细胞培养、细胞生长抑制实验(MTT 法) 观察 PC-3M 细胞形态、细胞生长密度和检测细胞生长抑制率, 用³H-TdR 掺入法测定细胞增殖过程中 DNA 的含量。结果: 与对照组相比, 实验组 PC-3M 细胞形态异常、细胞生长密度降低, 细胞生长抑制率增强, ³H-TdR 掺入量明显减少, 并呈剂量依赖关系, 与地衣酸浓度的相关系数分别为 0.9799 与 -0.9525。结论: 地衣酸对体外培养 PC-3M 细胞具有抑制效应。

[关键词] 前列腺癌; 地衣酸; PC-3M

[中图分类号] R979.1 [文献标识码] A

The Inhibitory Effect of Usnic Acid on Proliferation of the PC-3M Cells

SUN Yan¹, WANG Hong-jun², ZHANG Wei³, WU Yang⁴, ZHANG Zhi-qiang², Feng Li², WANG Li-qiang², WU Yi-min²(1. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. Centre of Disease Prevent and Control of Shenyang Command, Shenyang 110034, China; 3. North China Normal University, Changchun 130000, China; 4. Jilin University First Clinical Hospital, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To extract Usnic acid from usnea longissima ach, and to evaluate the ability of Usnic acid to inhibit growth of human prostate cancer cells PC-3M *in vitro*. **Methods:** The cells were observed by microscope. The cytotoxicity to cancer cells was determined by MTT assay. DNA synthesis was tested by ³H-TdR in incorporation assay in the experiments. **Results:** There were significant differences between PC-3M cells lest group and control group. The Usnic acid had streng thened cytotoxicity, and the rate of ³H-TdR incorporation was lower than that of the control in a dose-dependent manner ($r=0.9799$, $r=-0.9525$). **Conclusion:** The results suggested that the Usnic acid has inhibitory effects on growth of human PC-3M cells *in vitro*.

[Key words] prostate cancer; usnic acid; PC-3M

前列腺癌的发病率在东方国家正逐年增高, 其增长的速度也明显高于西方国家, 已经引起社会公共卫生事业的关注^[1], 目前有关前列腺癌的治疗还没有找到特异的根治方法。地衣酸是中药松萝真菌中一种具有抗革兰氏阳性菌的呋喃类强力抗生素, 1979 年 Takai and Uehara^[2] 等报道了地衣酸具有抗肿瘤活性, 但有关地衣酸抗体外培养的前列腺癌细胞研究国内外尚未见报道。本实验研究了地衣酸抑制前列腺癌细胞 PC-3M 细胞系的生物学效应。

1 材料与方 法

1.1 细胞与药物

细胞为前列腺癌 PC-3M 细胞系。真菌松萝购自黑龙江省大兴安岭林区。地衣酸由沈阳军区疾病预

[基金项目] 日本国际协力事业团(JI - CA) 资助专项技术合作项目第 59 项

[作者简介] 孙 艳(1976-), 齐齐哈尔人, 女, 博士, 讲师, 主要从事天然药物化学的研究

[通讯作者] 王洪军, E-mail: wanghongjun007@ sina. com

防控制中心中心实验室提取,四甲基偶氮唑蓝(MTT)为美国 Sigma 公司产品,³H-TdR 购自上海原子核研究所。

1.2 地衣酸的提取

按醇提冷醇沉淀法进行,具体操作方法参考文献[3]。

1.3 PC-3M 细胞培养

PC-3M 细胞株系人激素非依赖性前列腺癌细胞株,由日本宫城县立癌中心副院长桑原正明教授惠赠。该细胞培养在含有 10% 小牛血清的 IMDM 培养液中,传代时用 0.25% 的胰酶消化后分瓶,每周传代 2 次。

1.4 MTT 实验

取传代培养 PC-3M 细胞,胰酶消化后计数,用台盼蓝拒染法测得活细胞数为 90% 以上,接种于灭菌 96 孔培养板中,每孔为 1×10^4 。实验组加入不同浓度地衣酸 PBS 悬液,对照组加 PBS 溶液,对照组加入含 0.2% 地衣酸溶剂的培养液。每组设 5 个复孔。各孔用培养液补足至终体积为 200 μ l。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内孵育 24 h 后,加入噻唑蓝 PBS 溶液(5 g/L),每孔 20 μ l,37 $^{\circ}$ C 反应 4 h 后,吸弃培养液及未反应的噻唑蓝,每孔加入 DMSO 溶液 100 μ l,震荡后室温下静止 10 min,用酶标仪于 570 nm 处测定吸收光(A 值),计算细胞生长抑制率,抑制率 ≥ 50 为对地衣酸敏感。

1.5 ³H-TdR 掺入实验

PC-3M 细胞接种于 96 孔灭菌培养板,每孔 10 μ l,细胞数 1×10^4 /孔。实验组加入不同浓度地衣酸 PBS 悬液,对照组加 PBS 溶液,终体积为 200 μ l,每组设 4 个复孔。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱内孵育 24 h,于结束培养 6~8 h 前加入 ³H-TdR,每孔 5 μ l,(3.7×10^4 Bq/ml),培养结束后,取出培养板,弃掉培养液,Hank's 液洗 3 次,胰酶消化后,加培养液终止消化,收集细胞于玻纤滤纸上,用液闪仪测定 cpm 值,即用 cpm 值表示 ³H-TdR 的掺入量。

1.6 统计学分析

用地衣酸干扰体外培养的癌细胞后,前列腺癌 PC-3M 细胞生长抑制率与 ³H-TdR 掺入量的统计学计算,应用 SPSS10.0 软件进行直线相关与回归分析。

2 结果

2.1 地衣酸的提取

按醇提冷醇沉淀法使地衣酸的回收率达 2.6%,高效液相显示地衣酸的纯度达 97.8%。

2.2 地衣酸干预后 PC-3M 细胞的形态学变化

不同浓度地衣酸与 PC-3M 细胞共同培养 24 h 后,

光镜下观察,对照组细胞贴壁,多数呈梭形与多边形,细胞生长状态良好,细胞饱满,数目多,贴壁长满整个瓶壁。而随着地衣酸浓度的增加,细胞贴壁不紧,部分细胞形态超大,细胞出现脱落漂浮现象,与对照组相比细胞数目相对减少,有细胞碎片在培养液中漂浮,细胞内出现散在的颗粒状物质,细胞生长缓慢。

2.3 地衣酸对 PC-3M 细胞的抑制作用

MTT 是一种四甲基偶氮唑盐,分子结构中的四氮唑环可在活细胞线粒体的作用下裂解生成蓝紫色的甲萘结晶物质。由于甲萘生成量与活细胞的数目和功能状态成正比关系,因此,在酶标仪上测定光密度值,用光密度值计算细胞生长抑制率,能反映细胞增殖的活力。不同浓度地衣酸悬液作用于 PC-3M 细胞后,MTT 测定结果,溶剂组与对照组比较差异无变化,说明悬液对肿瘤生长无明显影响。加药组从 20 μ l/ml 起,即对 PC-3M 细胞具有明显的抑制作用,而且随着地衣酸悬液浓度的增加对 PC-3M 的抑制作用也增强,呈剂量依赖性抑制作用(图 1)。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组 A 值均值}}{\text{对照组 A 值均值}}\right) \times 100\%$$

2.4 地衣酸浓度对肿瘤细胞 DNA 合成的影响

当用不同浓度的地衣酸悬液处理后,PC-3M 细胞的 ³H-TdR 的掺入量与对照组比较明显减少,且随着药物浓度的增大而增强, $r = -0.9525, P < 0.001$ (图 2)。统计学分析结果表明,³H 与对照组相比,细胞生长抑制率和 ³H-TdR 掺入量与地衣酸浓度变化的相关系数分别为 0.9799 与 -0.9525。

图 1 不同浓度地衣酸处理 PC-3M 细胞 24 h 后细胞的抑制率

Fig.1 The inhibitory rate 24 h after PC-3M cell treated with Usnic acid

3 讨论

前列腺癌是随着社会的变迁,饮食结构欧美化而

上升为我国男性肿瘤增长速度最快的常见肿瘤之一。目前在前列腺癌的治疗上仍以外科手术与内分泌治疗为主,药物为辅助治疗,尽管药物治疗前列腺癌的广告铺天盖地,但均未能取得令人满意的治疗效果。Periera^[4]等人在1994年曾报道地衣酸粗提物具有抗肿瘤的活性, Proksa and Proksova^[5]等人也于1999年提出

扰后对肿瘤细胞DNA合成的影响,³H-TdR的掺入量检测也显示出体外培养PC-3M细胞中³H-TdR的掺入量与对照组比较明显减少,说明地衣酸是通过干扰DNA合成来抑制细胞增殖的,这可能是地衣酸作用细胞后,抑制了癌细胞的DNA复制与RNA转录的能力,导致前列腺癌细胞增殖减慢或者加速肿瘤细胞的凋亡。在细胞增殖周期中,DNA复制的关键在于DNA合成,用地衣酸干扰肿瘤细胞的DNA合成将会使细胞不能完成正常的增殖周期,使癌细胞的蛋白质合成流产,PC-3M细胞的³H-TdR的掺入量与对照组比较明显减少的事实说明地衣酸直接抑制了癌细胞的DNA复制。至于抑制细胞增殖的方式和途径尚需进一步实验研究。上述结果提示我们地衣酸的抗肿瘤活性是在分子水平上影响细胞增殖生长的。因此,地衣酸抗肿瘤效应的机理虽然还不完全清楚,有待进一步实验观察,但体外抗肿瘤的药理作用是非常肯定的。

图2 不同浓度地衣酸处理PC-3M细胞
24 h后³H-TdR掺入量

Fig. 2 The ³H-TdR incorporation 24 h after
PC-3M cells treated with Usnic acid

地衣酸具有明显的抗肿瘤效应,其抗肿瘤机制各家学说不一,有学者认为地衣酸抑制肿瘤细胞增殖过程中RNA转录,也有学者提出是干扰DNA合成。细胞增殖周期中最为关键的是DNA合成,如果由于外界因素的作用使DNA合成减慢或者受到抑制,那么将会影响细胞正常周期的增殖。本实验结果表明体外培养的人激素非依赖性前列腺癌细胞株PC-3M细胞对照组生长状态良好,密度适宜。而用地衣酸处理的PC-3M细胞,细胞萎缩,发生死亡。Campanella与Delfini^[6]等人在2002年报道地衣酸体外抗肿瘤的作用靶点主要在细胞的RNA转录,细胞在增殖过程中使RNA转录受到抑制,促使肿瘤细胞生长周期受阻,最终导致死亡。本文应用细胞生长抑制实验显示出随着地衣酸悬液浓度的增加对PC-3M细胞的抑制作用也增强的结果,最大抑制率可达80%以上,且生物学效应呈剂量依赖性抑制关系。本研究利用³H-TdR掺入法研究地衣酸干

[参考文献]

- [1] 张灵, 计国义, 李晓萌, 等. tPSA/tPSA 比值优化前列腺癌早期诊断作用的研究[J]. 中华男科学杂志, 2004, 10(8): 582-586.
- [2] Takai M, Uehara Y, Beisler JA. Usnic acid derivatives as potential antineoplastic agents [J]. J Med Chem, 1979, 22(11): 1380-1384.
- [3] 刘壬澎, 刘文和, 官恩厚. 从松萝中制取抗菌物质地衣酸[J]. 药学通报, 1964, 10(3): 127-129.
- [4] Periera EC, Nascimento SC, Lima RC, et al. Analysis of usnea fasciata crude extracts with antineoplastic activity[J]. Tokai J Exp Clin Med, 1994, 19(1-2): 47-52.
- [5] Proksa B, Proksova A. Preparation and antineoplastic activity of acylhydrazones of R-and S-usnic acid[J]. Ceska Slov Farm, 1999, 48(5): 233-236.
- [6] Campanella L, Delfini M, Ercole P, et al. Molecular characterization and action of usnic acid: A drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription[J]. Biochimie, 2002, 84(4): 329-334.

[收稿日期] 2005-09-10

[修回日期] 2005-10-16

[本文编辑] 王莹

欢迎订阅《中国肿瘤生物治疗杂志》