

## 三七总皂苷对前列腺癌PC-3细胞增殖及迁移的抑制作用\*

倪晓辰 赵志红 仇 炜 张爱莉

**摘要 目的:**探讨三七总皂苷对人前列腺癌PC-3细胞增殖及迁移的抑制作用,初步研究该药物的作用机制,并为前列腺癌的药物治疗及扩展tPNS的临床应用提供实验依据。**方法:**采用MTT实验、细胞计数、伤口愈合实验等方法检测tPNS对PC-3细胞增殖及迁移的影响;采用Western blot及明胶酶图分析等方法对增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、血管细胞间黏附分子1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)及迁移相关蛋白基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinases 2, MMP-2)等进行检测。通过检测p38 MAPK及ERK途径的磷酸化变化,探讨tPNS对PC-3细胞作用的可能信号途径。**结果:**tPNS可抑制PC-3细胞增殖,随着tPNS浓度(200、400、800 mg/L)的增加,对PC-3细胞的抑制率分别增加至13.0%、29.5%和35.9% ( $P < 0.05$ )。tPNS下调PC-3细胞增殖标志物PCNA的表达水平,该效应呈量效及时效关系。tPNS(200、400、800 mg/L)可显著抑制PC-3细胞迁移。tPNS还可显著下调迁移相关蛋白MMP-2及黏附分子VCAM-1的表达水平。tPNS可显著增加p38 MAPK的磷酸化水平,但对ERK磷酸化影响不明显。**结论:**tPNS抑制人前列腺癌PC-3细胞增殖及迁移活性,这些生物学作用可能与该药抑制PCNA、VCAM-1、MMP-2的表达及激活p38 MAPK信号通路有关。

**关键词** 前列腺癌 三七总皂苷 增殖 迁移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2011.11.010

## Inhibition of the Proliferation and Migration of Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Total Panax Notoginseng Saponins

Xiaochen NI, Zhihong ZHAO, Wei QIU, Aili ZHANG

Correspondence to: Aili ZHANG, E-mail: zal122665@yahoo.com.cn

Department of Urology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

This work was supported by grants from the Hebei Provincial Program for the Subjects with High Scholarship and Creative Research Potential (Key Oncological Subject Foundation of Hebei Province)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of total Panax notoginseng saponins ( tPNS ) on the proliferation and migration of PC-3 cells, and to provide experimental evidence for the use of tPNS in treating prostatic cancer. **Methods:** MTT, cell counting, and wound-healing assays were performed to analyze the effects of tPNS on the proliferation and migration of PC-3 cells. The expression of proliferating cell nuclear antigen ( PCNA ), vascular cell adhesion molecule 1 ( VCAM-1 ), and matrix metalloproteinases 2 ( MMP-2 ) was determined using Western blot analysis or zymography. Activation of p38 MAPK and ERK was also detected by Western blot analysis after tPNS treatment. **Results:** tPNS inhibited the proliferation of PC-3 cells. The inhibition ratios were 13.0%, 29.5%, and 35.9% after the PC-3 cells were treated with tPNS ( 200, 400, and 800 mg/L, respectively ) (  $P < 0.05$  ). PCNA expression was also inhibited in dose- and time-dependent manners. These results indicated that tPNS could significantly inhibit PC-3 cell proliferation via downregulation of PCNA. The migration of PC-3 cells was inhibited after treatment with tPNS. The Western blot and zymography results suggested that tPNS significantly suppressed the expression of the migration-related protein MMP-2. VCAM-1 was also downregulated after tPNS treatment in PC-3 cells. The aforementioned results indicated that tPNS inhibited PC-3 cell migration by suppressing MMP-2 and VCAM-1 expression. The phosphorylation level of the p38 MAPK pathway was dramatically increased at 0.5, 1, 3, and 6 h after tPNS treatment ( 400 mg/L ). However, phosphorylation of the ERK pathway was unaffected. **Conclusion:** tPNS can inhibit the proliferation and migration of PC-3 cells. The underlying mechanism may be related to the expression of PCNA, VCAM-1, and MMP-2 and activation of the p38 MAPK pathway.

**Keywords** Prostate cancer; Total panax notoginseng saponins; Proliferation; Migration

前列腺癌是老年男性常见的泌尿系统恶性肿瘤,近年来发病率逐渐上升,且有年轻化的趋势。由于本病早期临床症状不明显,导致患者就诊时常处

于晚期从而失去手术治疗机会。因此药物治疗对于改善晚期患者的生存质量、延长生存期具有重要意义。

作者单位:河北医科大学第四医院泌尿外科(石家庄市050011)

\* 本文课题受河北省普通高等学校强势特色学科项目资助

通信作者:张爱莉 zal122665@yahoo.com.cn

三七总皂苷(total panax notoginseng saponins, tPNS)是中草药三七根中提取的药用成分。三七总皂苷注射液(又称血塞通注射液)是一种心脑血管疾病治疗药物,已被广泛用于冠心病、脑血栓等心脑血管疾病的治疗。以往研究发现,tPNS可抑制肝癌细胞增殖<sup>[1]</sup>。但该药对于前列腺癌的作用尚不清楚,因此本研究通过观察tPNS对体外培养的人前列腺癌PC-3细胞株增殖及迁移的影响并探讨其作用机制,旨在为前列腺癌的辅助治疗及扩展tPNS的临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 三七总皂苷及细胞培养

三七总皂苷注射液(血塞通注射液 50 mg/mL,生产批号:20090513)由云南昆明兴中制药有限责任公司生产。人前列腺癌PC-3细胞株购于北京协和细胞资源中心。

### 1.2 MTT实验

将处于对数生长期的PC-3细胞接种于96孔板,每孔100  $\mu$ L(约 $1 \times 10^4$ 个细胞),待细胞贴壁后加入不同浓度的tPNS(0、100、200、400、800、1 600 mg/L)分别孵育12、24和48 h。随后每孔各加入MTT溶液(5 mg/mL)20  $\mu$ L于37℃下孵育3 h,小心弃去培养液后每孔各加DMSO 150  $\mu$ L,混匀后在酶标仪上于570 nm处检测吸光度值(OD值)。以上各组均设5个复孔,计算tPNS对PC-3细胞的抑制率。

### 1.3 细胞计数分析

将约 $3 \times 10^4$ 个PC-3细胞接种于12孔板,待细胞贴壁后加入不同浓度的tPNS(0、200、400、800 mg/L)孵育48 h。用400 mg/L tPNS处理细胞12、24和48 h以检测tPNS对PC-3细胞增殖抑制作用的时间特性。将各组细胞用0.25%胰蛋白酶消化并制备成单细胞悬液,经台盼蓝染色后用常规计数法计数未被染色的活细胞数。以上各组均设3个复孔,每孔计数2次取其均值。

### 1.4 Western blot分析

将各组细胞用tPNS处理后,提取细胞总蛋白,煮沸变性后经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。经电转膜、5%脱脂牛奶封闭、一抗、二抗孵育和化学发光等步骤检测PCNA、VCAM-1和MMP-2的表达水平,以不加药组为对照, $\beta$ -actin作为内参照,使用凝胶成像分析系统扫描其灰度值。

### 1.5 伤口愈合实验

将PC-3细胞接种于玻片上,待细胞生长至100%汇合后用无菌吸头在玻片上划痕,用PBS冲洗被刮下的悬浮细胞。之后将玻片置于含不同浓度(0、200、400、800 mg/L)的tPNS中继续孵育。24 h后取出玻

片,经固定和结晶紫染色后于低倍镜下观察伤口愈合情况。任取10个视野计数迁移入损伤区的细胞数量,此实验共重复3次,取均值并以表示细胞的迁移活性。

### 1.6 明胶酶图分析

用不同浓度(0、200、400、800 mg/L)的tPNS孵育细胞24 h,之后各组均取6  $\mu$ L培养液上样于凝胶加样孔内电泳。电泳结束后,凝胶经2.5% Triton X-100漂洗3次,每次15 min;弃去漂洗液,加入反应缓冲液,于37℃下孵育过夜。之后经考马斯亮蓝染色、脱色,直至出现白色清晰条带为止,并扫描其灰度值。

### 1.7 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验数据均采用SPSS 13.0统计软件进行处理。两样本均数间比较采用 $t$ 检验,多样本均数间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),组间比较采用Dunnett  $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 tPNS抑制PC-3细胞增殖

MTT结果显示,tPNS处理PC-3细胞48 h,当tPNS浓度 $\geq 200$  mg/L时细胞增殖活力被抑制( $P < 0.05$ ),随tPNS浓度(200、400、800、1 600 mg/L)增加,tPNS对PC-3细胞的抑制率也逐渐增加(13.0%、29.5%、35.9%、69.6%),该药在48 h时的IC<sub>50</sub>值为931.3 mg/L。而tPNS处理PC-3细胞12 h和24 h,分别在较高浓度(1 600 mg/L和400 mg/L)才有明显的抑制作用。细胞计数结果显示,tPNS处理48 h,随tPNS浓度增加(200、400、800 mg/L)存活细胞数(抑制率分别为19.0%、33.9%及37.8%)较对照组显著降低( $P < 0.05$ )。镜下见随tPNS浓度增加,细胞密度逐渐降低,贴壁性减弱,球形细胞数增多。用400 mg/L tPNS处理PC-3细胞12、24、48 h,在24 h和48 h时存活细胞数较对照组降低(抑制率分别为34.3%及35.2%)( $P < 0.05$ )。以上结果表明,tPNS有抑制PC-3细胞增殖的作用,且随tPNS剂量的增加该作用呈增强趋势。Western blot结果显示,随着tPNS剂量及时间的延长,增殖标志基因PCNA的表达水平被抑制(图1),表明tPNS抑制PC-3细胞增殖的作用可能与该药抑制PCNA的表达有关。

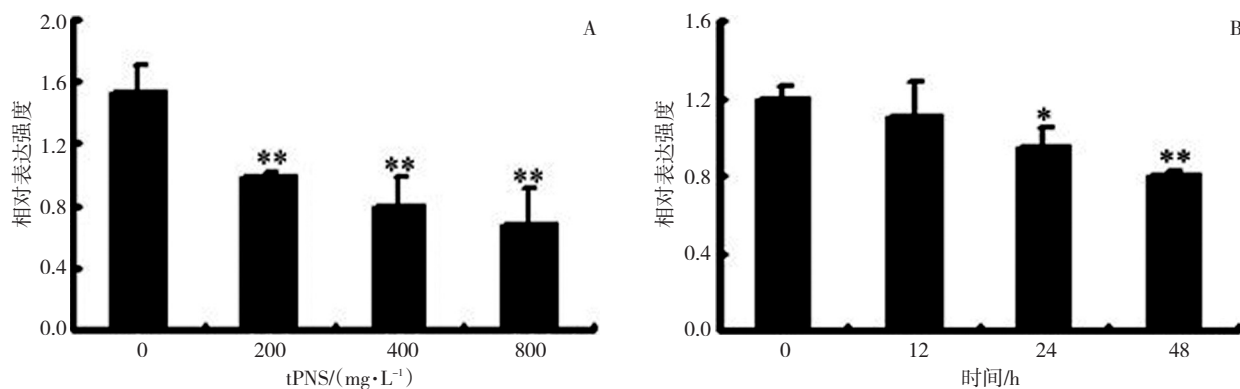
### 2.2 tPNS抑制PC-3细胞迁移

伤口愈合实验结果显示,tPNS处理PC-3细胞24 h,迁移入损伤区的细胞数较对照组显著降低( $P < 0.01$ ,图2),表明tPNS可以显著抑制PC-3细胞迁移。Western blot结果显示,tPNS可显著抑制MMP-2的表达水平( $P < 0.01$ )。明胶酶图分析结果显示,在tPNS处理后的PC-3细胞培养液中,MMP-2的明胶酶

活性与对照组相比被显著抑制( $P<0.01$ ,图3)。Western blot 结果显示,tPNS可抑制VCAM-1的表达水平( $P<0.01$ )且随剂量和时间的增加,该作用逐渐增强(图4)。以上结果表明,tPNS抑制PC-3细胞迁移的作用可能与该药抑制MMP-2及VCAM-1的表达有关。

### 2.3 tPNS对p38 MAPK及ERK信号转导通路的影响

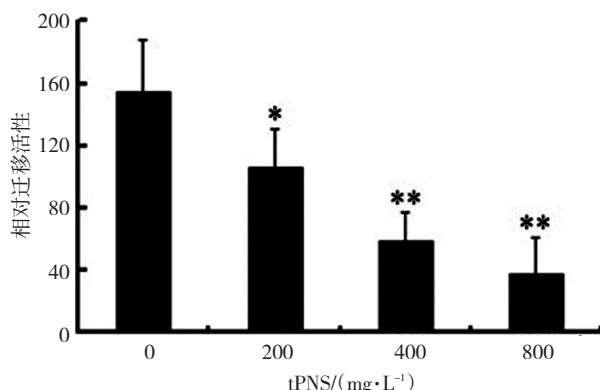
MAPK信号通路是影响细胞增殖的重要途径。结果显示,tPNS处理0.5 h后,p38 MAPK磷酸化水平达高峰,之后开始降低,但在6 h时仍然维持较高水平( $P<0.05$ ,图5),而对ERK的磷酸化无明显影响( $P>0.05$ ,图5)。因此推测,p38 MAPK通路可能是tPNS生物学作用的信号通路之一。



A: 剂量效应; B: 时间效应; \*与0 mg/L组相比  $P<0.05$ , \*\*与0 mg/L组相比  $P<0.01$

图1 tPNS对PC-3细胞PCNA的表达

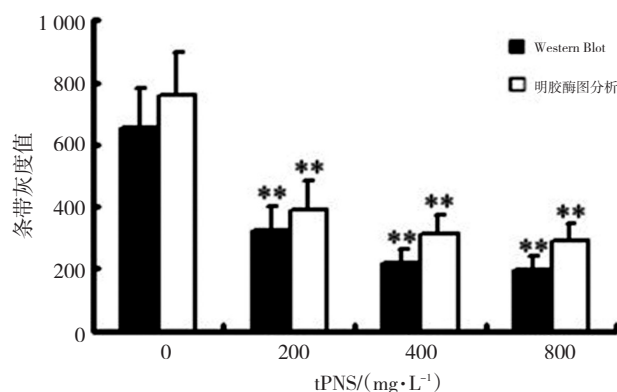
Figure 1 The effects of tPNS on PCNA expression in PC-3 cells



\*与0 mg/L组相比  $P<0.05$ , \*\*与0 mg/L组相比  $P<0.01$

图2 tPNS对PC-3细胞迁移的影响

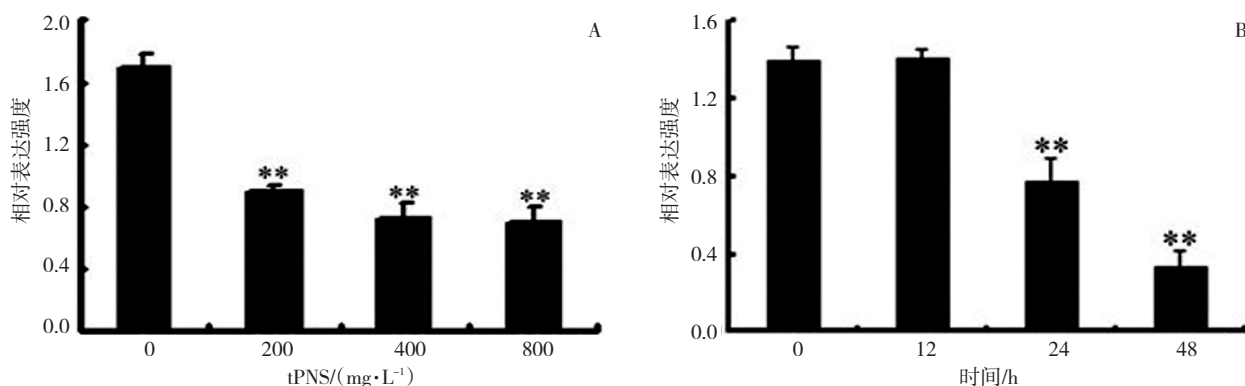
Figure 2 The effects of tPNS on PC-3 migration



\*\*与0 mg/L组相比  $P<0.01$

图3 tPNS对PC-3细胞MMP-2表达的影响

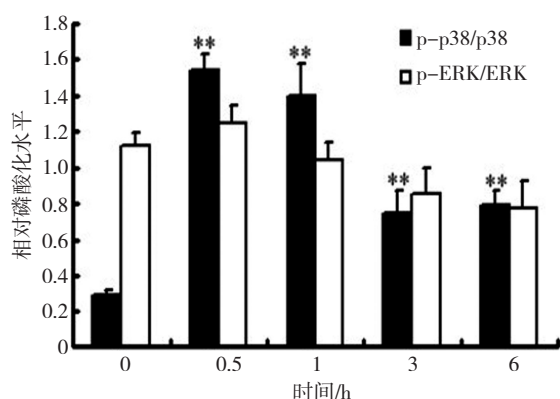
Figure 3 The effects of tPNS on MMP-2 expression in PC-3 cells



A: 剂量效应; B: 时间效应; \*\*与0 mg/L组相比  $P<0.01$

图4 tPNS对PC-3细胞VCAM-1表达的影响

Figure 4 The effects of tPNS on VCAM-1 expression in PC-3 cells



\*\*与0 h组相比 $P < 0.01$

图5 tPNS诱导p38 MAPK途径的磷酸化水平

Figure 5 tPNS induces phosphorylation of p38 MAPK pathway

### 3 讨论

前列腺癌的早期治疗主要以手术治疗为主。对于中晚期患者,内分泌治疗是重要的治疗方法。但部分患者在内分泌治疗的过程中逐渐转为激素非依赖型,表现为对内分泌治疗敏感性降低。因此,在治疗过程中应用作用较为缓和的药物阻止前列腺癌细胞的增殖和侵袭能力,是前列腺癌的重要辅助治疗措施。

tPNS是多种皂苷类化合物的混合药物<sup>[2]</sup>。已有研究表明,tPNS及其部分单体具有抗肝癌<sup>[1]</sup>、宫颈癌<sup>[3]</sup>及结直肠癌<sup>[4]</sup>等恶性肿瘤的功能。本研究发现,tPNS具有抑制前列腺癌PC-3细胞增殖的作用。PCNA是细胞增殖的重要标志物,该蛋白是DNA聚合酶的辅助因子。以往研究发现,PCNA的表达水平在多种肿瘤组织中上调<sup>[5]</sup>。本研究发现,tPNS降低PC-3细胞中PCNA的表达,表明tPNS抑制PC-3细胞增殖的机制与该药抑制PCNA表达有关。恶性肿瘤细胞具有侵袭和转移的能力,因此应用药物阻断细胞迁移是预防前列腺癌细胞转移的重要策略。本研究发现,tPNS可显著抑制PC-3细胞的迁移能力,随tPNS剂量的增加,该效应逐渐增强。VCAM-1是一种重要的黏附分子,该分子的高表达可促进前列腺癌细胞免疫逃逸和肿瘤复发<sup>[6-7]</sup>。MMP-2是一种外分泌蛋白酶,该蛋白在大肠癌、肝癌等肿瘤组织中均有高表达<sup>[8-9]</sup>,MMP-2通过降解细胞外基质成分促进肿瘤细胞迁移。本研究发现,tPNS可抑制PC-3细胞VCAM-1及MMP-2的表达水平。因此推测,tPNS抑制前列腺癌PC-3细胞迁移的机制可能与抑制VCAM-1及

MMP-2的表达有关。

MAPK信号通路参与多种与肿瘤增殖、凋亡及迁移等生物学过程相关的调控。该通路现已分离出多条反应途径,如ERK1/2、JNK、p38 MAPK等<sup>[10]</sup>。p38 MAPK信号通路与细胞应激有关,因此选择性激活该途径可能是肿瘤治疗的新靶点。本研究发现,使用tPNS处理PC-3细胞后,p38 MAPK磷酸化水平升高,因此初步推测tPNS可能通过激活p38 MAPK途径发挥对PC-3细胞的抑制作用。

综上所述,tPNS通过抑制增殖相关蛋白PCNA、黏附分子VCAM-1、迁移相关蛋白MMP-2的表达及激活p38 MAPK通路来抑制人前列腺癌PC-3细胞增殖和迁移的活性、降低前列腺癌的恶性程度。因此,推测tPNS在前列腺癌的药物化疗方面有较好的应用前景。

### 参考文献

- 尚西亮,傅华群,刘佳,等.三七总皂甙对人肝癌细胞的抑制作用[J].中国临床康复,2006,10(23):121-123.
- Chen W, Dang Y, Zhu C. Simultaneous determination of three major bioactive saponins of *Panax notoginseng* using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and a pharmacokinetic study[J]. Chin Med, 2010, 5: 12.
- Yang ZG, Sun HX, Ye YP. Ginsenoside Rd from *Panax notoginseng* is cytotoxic towards HeLa cancer cells and induces apoptosis[J]. Chem Biodivers, 2006, 3(2): 187-197.
- Wang CZ, Luo X, Zhang B, et al. Notoginseng enhances anti-cancer effect of 5-fluorouracil on human colorectal cancer cells[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2007, 60(1): 69-79.
- 郑红兵,张素丽.Cyclin G1和PCNA在子宫肌瘤中的表达及临床意义[J].中国肿瘤临床,2007,34(1):34-37.
- Wong CP, Bray TM, Ho E. Induction of proinflammatory response in prostate cancer epithelial cells by activated macrophages[J]. Cancer Lett, 2009, 276(1): 38-46.
- Shariat SF, Karam JA, Walz J, et al. Improved prediction of disease relapse after radical prostatectomy through a panel of preoperative blood-based biomarkers[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(12): 3785-3791.
- 熊枝繁,李杰,曹仕琼,等.CD147和MMP-2在大肠癌组织中的表达及血清水平变化的意义[J].中国肿瘤临床,2008,35(18):1064-1067.
- 赵秀兰,杜静,赵学铭,等.VEGF和MMP-2表达与肝细胞肝癌复发和预后的关系[J].中国肿瘤临床,2008,35(16):934-937.
- Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1802(4): 396-405.

(2011-02-21收稿)

(2011-04-06修回)

(杨红欣校对)