

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.004

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.004

甘草甜素抑制人前列腺癌 PC3 细胞生长及其机制

王雪峰, 赵琪

(南阳市第一人民医院泌尿外科, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 探讨甘草甜素(glycyrrhizin)对人前列腺癌细胞株PC3的生长抑制作用, 并初步研究其作用机制。方法: 采用CCK-8法检测不同浓度(5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$)甘草甜素处理不同时间(6, 12, 24, 48 h)对PC3细胞抑制率的影响; 流式细胞仪检测细胞周期的分布情况; Western印迹法检测cyclin D1, P21, p-PI3K, PI3K, p-AKT和AKT蛋白表达水平变化。结果: CCK-8法检测结果显示甘草甜素呈浓度依赖性和时间依赖性抑制PC3细胞的生长, 当浓度到达40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 抑制作用达到最大; 给予甘草甜素干预处理后, PC3细胞周期从G₀/G₁期向S期转换明显受到抑制, cyclin D1蛋白表达显著降低, 而P21表达则明显增加; 此外, 甘草甜素能明显抑制PI3K和AKT的磷酸化水平, 但对PI3K和AKT的蛋白表达没有显著影响。结论: 甘草甜素具有抑制前列腺癌细胞株PC3生长的作用, 其作用机制可能与甘草甜素调控cyclin D1和P21蛋白表达以及PI3K/AKT信号通路激活有关。

[关键词] 甘草甜素; 生长抑制; 细胞周期; PI3K/AKT 通路; 前列腺癌细胞

Effects and mechanisms of glycyrrhizin on human prostate cancer PC3 cells growth

WANG Xuefeng, ZHAO Qi

(Department of Urology Surgery, Nanyang First People's Hospital, Nanyang Henan 473000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effect of glycyrrhizin on cell growth in human prostate cancer cell line PC3 and explore the underlying mechanisms. **Methods:** CCK-8 assay was applied to analyze the inhibition rate of PC3 cells after treated with different concentrations (5, 10, 20, 40 or 80 $\mu\text{mol/L}$) glycyrrhizin for different times (6, 12, 24 or 48 h). Cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Moreover, the protein expressions of cyclin D1, P21, p-PI3K, PI3K, p-AKT and AKT were detected using Western blot. **Results:** CCK-8 assay data showed that glycyrrhizin inhibited PC3 cell growth in a concentration-dependent and time-dependent manner. When the concentration reaches 40 $\mu\text{mol/L}$, the inhibition reaches its maximum. Glycyrrhizin treatment was found to inhibit cell cycle transition from G₀/G₁ to S phase, which was accompanied with decreased cyclin D1 expression and increased P21 expression. Moreover, the phosphorylation of PI3K and AKT were significantly decreased after glycyrrhizin treatment, whereas the expressions of PI3K and AKT remained unchanged.

收稿日期 (Date of reception): 2018-07-25

通信作者 (Corresponding author): 王雪峰, Email: 2655815068@qq.com

Conclusion: Glycyrrhizin inhibits cell cycle transition by regulating expression of cyclin D1 and P21 via inactivation of PI3K/AKT signaling pathway, and thereby attenuating PC3 cell growth.

Keywords glycyrrhizin; growth inhibition; cell cycle; PI3K/AKT signaling pathway; prostate cancer cells

前列腺癌是常见的与男性性激素相关的恶性肿瘤, 其致死率列居各类男性肿瘤的前列, 仅次于肺癌, 严重威胁男性的身体健康^[1]。临床上主要采用手术联合化疗方式治疗前列腺癌, 但是抗肿瘤药物对患者容易产生毒副作用和耐药性, 而且当前前列腺癌转化为非激素依赖性的前列腺癌后, 目前尚无有效的治疗方法^[2]。因此, 寻找新的预防和治疗药物显得尤为重要。近年来, 从天然药物中提取具有抗肿瘤活性的物质逐渐成为治疗癌症的新趋势^[3]。

甘草甜素(glycyrrhizin)是甘草的根茎中提取的三萜类化合物, 临床上主要用于治疗慢性乙肝^[4]。近年来, 多项研究^[5-7]证实甘草甜素在抗炎、抗病毒、免疫调节以及防止癌症等方面具有广泛的药理作用。目前研究^[7-8]认为甘草甜素可抑制非小细胞肺癌、前列腺癌等肿瘤细胞的生长, 其作用机制可能与抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡有关。尽管如此, 甘草甜素的抗癌机制研究目前并不深入和完善。本研究主要探讨甘草甜素对人前列腺癌 PC3 细胞生长的抑制作用及其作用机制, 以期甘草甜素可作为临床治疗前列腺癌新的天然药物提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 材料

电子天平购自美国 Sartorius 公司; 细胞超净台购自苏州尚田生物技术公司; 酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司; CO₂ 细胞培养箱购自德国 Heraeus 公司; 移液器购自德国 Eppendorf 公司; 台式离心机和流式细胞分析仪购自美国 Thermo 公司; 垂直电泳装置和凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

甘草甜素购自上海将来实业有限公司(批号 130526); 人前列腺癌细胞株 PC3 购自中国科学院上海细胞库; Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素、胰酶和磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 Invitrogen 公司; CCK-8 试剂盒购自中国广州奕源生物有限公司; 细胞周期检测试剂盒购自中国南京凯基生物公司; 兔抗人 cyclin D1, P21, p-PI3K, PI3K, p-Akt,

Akt 和 GAPDH 抗体购自美国 CST 公司; HRP 标记抗兔二抗、细胞裂解和 ECL 发光液购自江苏碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 PC3 细胞株培养于含 10% 胎牛血清、青霉素(100 U/mL)和链霉素(100 U/mL)的 DMEM 培养基中, 于 37 °C 和 5% CO₂ 恒温培养箱中孵育, 每天换液一次。

1.2.2 细胞生存率检测

将 PC3 细胞(5 000 个/孔)接种于 96 孔板中, 待细胞长至 80% 融合度时, 换用无血清 DMEM 培养基同步化 24 h, 之后分别给予 5, 10, 20, 40, 80 μmol/L 甘草甜素药物处理, 分别处理 6, 12, 24, 48 h。待以上处理结束后, 于每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL, 反应 2 h 后, 用酶标仪在波长为 450 nm 处测定吸光度值。细胞的生存率 = 100% × (加药组 - 对照组) / (对照组 - 空白组), 而生长抑制率 = 100% - 细胞生存率。

1.2.3 细胞周期分布检测

将 PC3 细胞接种到 6 孔板, 以 2.0 × 10⁶ 个/mL 接种, 培养 48 h 待细胞贴壁后弃去培养液, 改用无血清 DMEM 培养基同步化 24 h, 加入 10, 20, 40 μmol/L 甘草甜素药物处理 48 h。随后用 0.2% 胰酶消化 5 min 后, 1 000 r/min 离心 5 min 收集各组细胞, PBS 洗 3 次, 然后用含 70% 乙醇的 PBS 于 4 °C 固定细胞 12 h, 吸出乙醇, PBS 洗 3 次, 1 000 r/min 离心 5 min, 避光加入 PI 染色液, 室温孵育 30 min, 用流式细胞仪检测细胞周期的分布。

1.2.4 Western 印迹法检测

PC3 细胞融合至约 80%, 分别加入 10, 20, 40 μmol/L 甘草甜素药物处理 48 h。吸出细胞培养基, 用冰 PBS 洗细胞 3 次, 加入适量细胞裂解液于冰上裂解 30 min, 将细胞刮下, 4 °C, 12 000 r/min, 离心 12 min, 吸取上清。BCA 法进行蛋白定量, 使每个样品的上样量一致。样品按比例与 5 × 上样缓冲液混合, 100 °C 变性 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶中以 80 V 恒压, 分离胶中以 100 mV 恒压进行。电泳结束后, 取下分离胶, 置于滤纸-胶膜-滤纸的电转盒中, 在 200 mA 恒流电转 90 min,

将蛋白从胶转移到膜上, 并将膜置于含5%脱脂奶粉中室温封闭1 h。根据实验需要加入不同浓度的一抗, 4 ℃孵育过夜, 随后室温孵育HRP标记二抗1 h。在暗室中用ECL发光液的A液和B液1:1混匀, 洒在膜的蛋白面, 使X胶片感光并用凝胶成像系统进行灰度分析。

1.3 统计学处理

采用SPSS 11.0软件进行分析。所有实验数据以均数±标准误($\bar{x} \pm \text{SEM}$)表示, 采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘草甜素对前列腺癌细胞生存率的影响

CCK-8实验结果显示(图1): 甘草甜素呈时间依赖性减少PC3细胞的生存率, 药物抑制率逐渐增加($P < 0.05$)。同时, 随着甘草甜素药物处理浓度的逐渐增加(5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$), PC3细胞的生长抑制率也逐渐增加($P < 0.05$), 但40和80 $\mu\text{mol/L}$ 两组间差异并没有统计学意义($P > 0.05$), 因此后续选用10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度梯度做进一步检测。

2.2 甘草甜素对前列腺癌细胞周期分布的影响

应用流式细胞术分析甘草甜素处理PC3细胞48 h后, 细胞周期的变化(图2)显示: 对照组, 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理组G₀/G₁期细胞数所占百分比分别是(52.26±4.52)%, (59.31±4.01)%, (79.39±4.13)%, (85.47±6.17)%, S期所占百分比分别是(39.22±3.01)%, (32.15±2.94)%, (24.31±2.02)%和(16.22±2.07)%, 说明给予甘草甜素处理后, 其可抑制细胞周期从G₀/G₁期向S期转换($P < 0.05$), 但对G₂/M期的细胞数并没有显著的影响($P > 0.05$)。

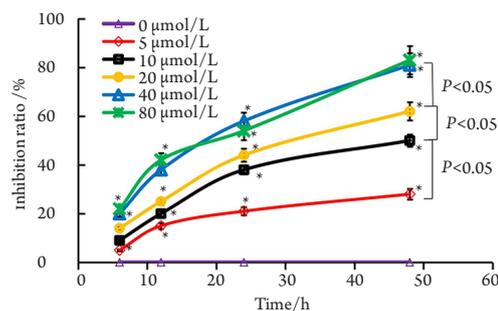


图1 甘草甜素对PC3细胞抑制率的作用($n=6$)

Figure 1 Effect of glycyrrhizin on the inhibition rate of PC3 cells ($n=6$)

与0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $*P < 0.05$ 。

Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$, $*P < 0.05$.

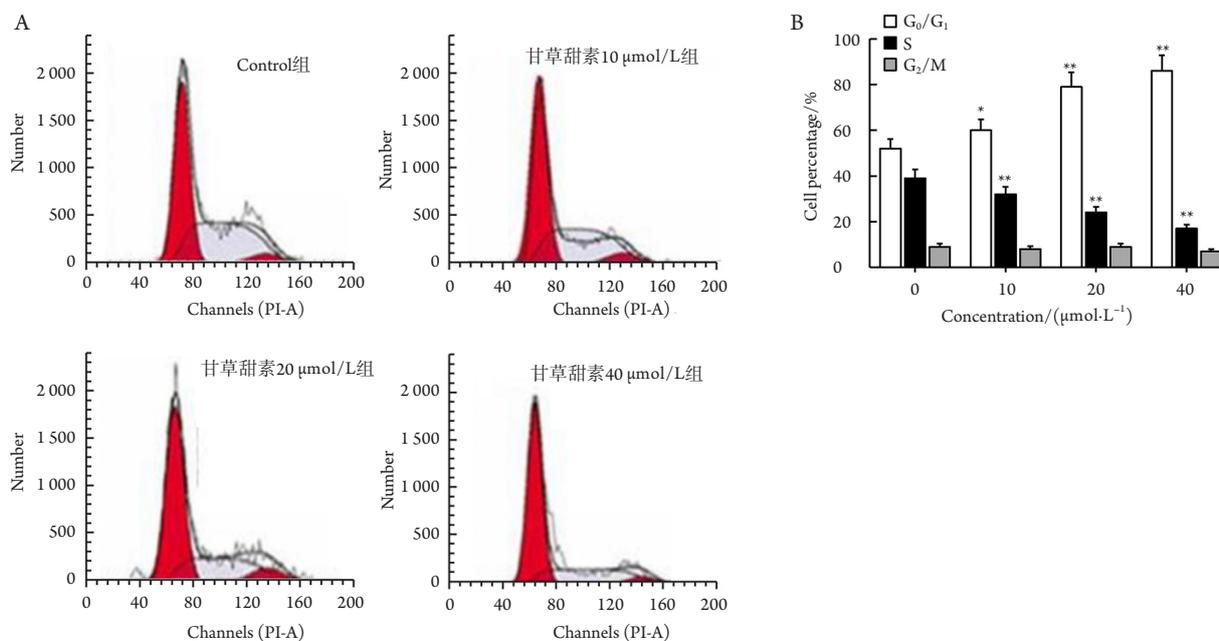


图2 甘草甜素对PC3细胞周期分布的作用($n=6$)

Figure 2 Effect of glycyrrhizin on the cell cycle distribution of PC3 cells ($n=6$)

(A)典型的细胞周期分布图; (B)细胞周期分布的统计分析。与Control组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

(A) Relative image of cell cycle distribution; (B) Statistical analysis of cell cycle distribution. Compared with control, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$.

2.3 甘草甜素对细胞周期相关蛋白表达的影响

在细胞周期 G_0/G_1 期向 S 期转换中起重要作用的是细胞周期素 cyclins 以及周期素依赖激酶抑制蛋白 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKIs), 因此我们进一步分析甘草甜素对 PC3 细胞中 cyclin D1 以及 P21 蛋白表达的影响。Western 印迹结果显示 (图 3): 给予药物处理 48 h 后, 与对照组相比, 甘草甜素呈浓度依赖性地减少 cyclin D1 的蛋白表达 ($P < 0.05$); 相反, P21 蛋白表达随着甘草甜素浓度的增加而逐

渐增加 ($P < 0.05$)。

2.4 甘草甜素对 PI3K/AKT 通路的影响

为进一步分析甘草甜素对细胞周期影响的机制, 检测与细胞周期 G_0/G_1 期向 S 期转换调控相关的 PI3K-Akt 信号通路。所有组间 PI3K, AKT 蛋白表达条带灰度值差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 4), 但 p-PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达水平随着甘草甜素处理浓度的逐渐增加而逐渐减少 ($P < 0.05$), 提示甘草甜素可抑制 PI3K-AKT 信号通路的激活。

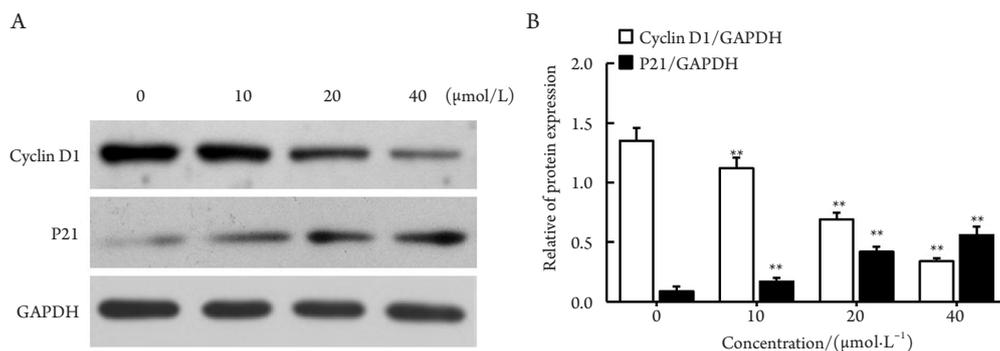


图3 甘草甜素对cyclin D1和P21蛋白表达的影响($n=4$)

Figure 3 Effect of glycyrrhizin on the expressions of cyclin D1 and P21 in PC3 cells ($n=4$)

(A) Cyclin D1 与 P21 蛋白的 Western 印迹条带; (B) Cyclin D1 与 P21 的统计分析。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $**P < 0.01$ 。

(A) Western blot band of cyclin D1 and P21; (B) Statistical analysis of cyclin D1 and P21. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$, $**P < 0.01$.

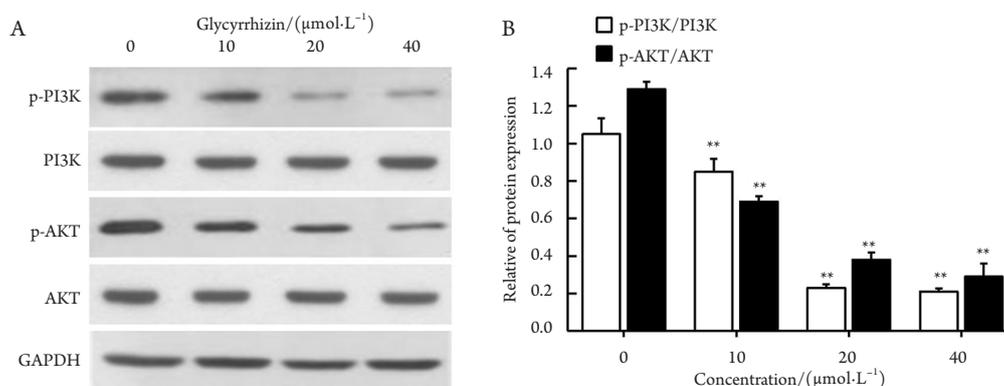


图4 甘草甜素对PI3K/AKT通路的影响($n=5$)

Figure 4 Effect of glycyrrhizin on the PI3K/AKT pathway in PC3 cells ($n=5$)

(A) PI3K, p-PI3K, AKT 和 p-AKT 蛋白的 Western 印迹条带; (B) p-PI3K 和 p-AKT 的蛋白表达统计分析。与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, $**P < 0.01$ 。

(A) Western blot band of PI3K, p-PI3K, AKT and p-AKT; (B) Statistical analysis of the p-PI3K and p-AKT protein expression. Compared with 0 $\mu\text{mol/L}$, $**P < 0.01$.

3 讨论

目前我国前列腺癌发病率虽然低于欧美地区, 但近20年来其发病率逐年上升, 严重危害我国男性的健康^[9]。作为一种从天然药物中提取出来的化合物, 目前体外研究^[8]发现甘草甜素能促使前列腺癌细胞凋亡, 表明其可能具有作为前列腺癌治疗药物或者是辅助治疗药物的潜力。然而目前研究还远未足以解释甘草甜素抗肿瘤的所有机制。因此本实验首先验证甘草甜素对前列腺癌细胞株PC3细胞生长的抑制作用, 并证实甘草甜素可以显著抑制PC3细胞的生长。同时, 该作用效应具有一定的时间和剂量依赖性, 但甘草甜素对细胞生长的抑制效应在40和80 $\mu\text{mol/L}$ 两种剂量间差异无统计学意义, 提示甘草甜素体外抑制PC3细胞生长的最大效应的剂量应该小于或等于40 $\mu\text{mol/L}$ 。

为进一步分析甘草甜素抑制前列腺癌细胞生长的机制, 本研究观察甘草甜素对细胞周期的影响。真核细胞增殖是通过细胞周期的运转实现的, 按时间顺序可将细胞周期确定为DNA合成前期(G_1 期)、合成期(S期)、合成后期(G_2 期)和分裂期(M期)。处在 G_1 期的细胞也可以进入静止状态(G_0 期), 在适当刺激因子的诱导下, 细胞又可以从 G_0 期恢复到 G_1 期, 并由此进入细胞周期^[8]。结果显示甘草甜素能抑制细胞周期从 G_0/G_1 期向S期转换, 减少处于S期DNA复制的细胞比例。进一步, 我们发现甘草甜素通过减少细胞周期素cyclin D1从而抑制细胞通过 G_1/S 节点进入S期, 相反另外一个重要的抑制细胞周期CDKI蛋白P21表达却显著增加。这部分结果说明甘草甜素是通过控制细胞周期从 G_0/G_1 期向S期的周期调控蛋白, 从而抑制前列腺癌细胞的生长。

PI3K/AKT信号通路在细胞周期 G_1/S 转换调控中起重要作用^[10-11]。这些信号通常被生长因子或活性物质与其受体结合后所引发, 向下传递过程中可以分为很多不同的分支, 经过复杂的信号级联反应向细胞核中心集中, 引起细胞周期素cyclins表达改变以及CDKI的相应变化, 从而推动细胞从 G_1 期进入S期复制DNA^[12]。本研究结果证实甘草甜素能剂量依赖性地抑制PI3K以及下游分子AKT蛋白的磷酸化水平, 说明甘草甜素可能是通过抑制PI3K/AKT信号通路的激活从而参与调控细胞周期蛋白的表达。

另外, 本研究尚有研究不足之处: 1) 体外研究, 未进行在体研究; 2) 只在PC3细胞上进行研

究, 并未在其他前列腺癌细胞上进行; 3) 未研究40 $\mu\text{mol/L}$ 甘草甜素是否对正常细胞产生毒性作用。这些将是下步研究的重点。

综上所述, 本研究验证了甘草甜素对前列腺癌细胞株PC3的生长具有抑制作用。其机制可能是通过抑制PI3K/AKT通路, 减少细胞周期素cyclin D1表达, 促进周期负性调节蛋白P21表达, 使细胞周期 G_1/S 转换受阻, 最后抑制细胞的生长。但具体的机制还需进行更深入的研究。

参考文献

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Allen C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(4): 524-548.
2. Graça I, Pereira-Silva E, Henrique R, et al. Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer[J]. *Clin Epigenetics*, 2016, 8: 98.
3. Yu H, Hou Z, Tian Y, et al. Design, synthesis, cytotoxicity and mechanism of novel dihydroartemisinin-coumarin hybrids as potential anti-cancer agents[J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 151: 434-449.
4. Lin CC, Wang PH. Intravenous glycyrrhizin improved serum transaminases rapidly in a chronic hepatitis B patient with acute exacerbation[J]. *J Formos Med Assoc*, 2015, 114(2): 188-189.
5. Fu Y, Zhou E, Wei Z, et al. Glycyrrhizin inhibits the inflammatory response in mouse mammary epithelial cells and a mouse mastitis model[J]. *FEBS J*, 2014, 281(11): 2543-2557.
6. Han S, Sun L, He F, et al. Anti-allergic activity of glycyrrhizic acid on IgE-mediated allergic reaction by regulation of allergy-related immune cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7222.
7. Wu X, Wang W, Chen Y, et al. Glycyrrhizin suppresses the growth of human NSCLC cell line HCC827 by downregulating HMGB1 level[J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 6916797.
8. Thirugnanam S, Xu L, Ramaswamy K, et al. Glycyrrhizin induces apoptosis in prostate cancer cell lines DU-145 and LNCaP[J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(6): 1387-1392.
9. Sakamoto S. Editorial comment to epidemiology of prostate cancer in Asian countries[J]. *Int J Urol*, 2018, 25(6): 531-532.
10. Ren C, Ren T, Yang K, et al. Inhibition of SOX2 induces cell apoptosis and G_1/S arrest in Ewing's sarcoma through the PI3K/Akt pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2016, 35: 44.
11. Yang X, Ye X, Sun L, et al. Downregulation of serum RAB27B confers improved prognosis and is associated with hepatocellular carcinoma

progression through PI3K-AKT-P21 signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(37): 61118-61132.

12. Zhou CH, Xiang M, He SY, et al. Crocetin inhibits cell cycle G1/

S transition through suppressing cyclin D1 and elevating p27kip1 in vascular smooth muscle cells[J]. *Phytother Res*, 2010, 24(7): 975-981.

本文引用: 王雪峰, 赵琪. 甘草甜素抑制人前列腺癌PC3细胞生长及其机制[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(11): 2308-2313. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.004

Cite this article as: WANG Xuefeng, ZHAO Qi. Effects and mechanisms of glycyrrhizin on human prostate cancer PC3 cells growth[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(11): 2308-2313. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.004