基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1661-05

熊果酸诱导前列腺癌细胞株 PC-3 凋亡的实验研究

夏 阳,苟 欣
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨熊果酸(Ursolic acid,UA)对人前列腺癌细胞株 PC-3 细胞周期、凋亡的影响及其作用机制。方法:人前列腺癌细胞株 PC-3 以不同浓度的 UA 作用不同的时间后,分别使用四甲基偶氮唑蓝比色法(4 methyl thiazolyl tetrazolium assay,MTT),免疫组织化学 SP 法,流式细胞术(Flow cytometry,FCM),Western blot 等实验方法检测 PC-3 细胞的增殖抑制情况,细胞周期和凋亡率的变化,以及细胞内 bcl-2、bax 2 个重要的细胞凋亡相关基因和细胞凋亡相关特殊蛋白 cox-2、caspase 3 表达的变化。结果:UA 对 PC-3 细胞有增殖抑制作用,其作用随着药物浓度和作用时间的增加而增强。24、48 h 和 72 h 3 个时间段 UA 分别作用于 PC-3 细胞后的 IC_{50} 分别为 50.87、37.91 μmol/L 和 27.86 μmol/L;熊果酸作用后 PC-3 细胞周期的主要特点是大量细胞累积于 G_1 期,进入 S 期的细胞减少。UA 能够诱导 PC-3 细胞凋亡,经过 24、48 h 和 72 h 3 个时间段 UA 浓度 50 μmol/L 作用后,细胞凋亡率为 6.21%、7.81%和 13.31%;细胞内 bcl-2 和 cox-2 的表达随着药物浓度增加逐渐减少;bax 和 caspase 3 蛋白的表达随着药物浓度增加逐渐增加。结论:UA 能够抑制 PC-3 细胞的增殖,并使细胞大量累积于 G_1 期,进入 S 期的细胞减少。可能通过使 bcl-2 和 cox-2 的表达减少、bax 和 caspase 3 蛋白的表达增加来诱导细胞凋亡。

【关键词】熊果酸;前列腺癌 PC-3 细胞;凋亡
【中国图书分类法分类号】R737.25 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-24

Empirical study on ursolic acid inducing apoptosis in human prostatic carcinoma cell line PC-3

XIA Yang, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the proliferation inhibition and apoptosis in human prostatic carcinoma cell line PC-3 induced by ursolic acid and their mechanism. *Methods*: PC-3 were treated by ursolic acid with different concentration and time. MTT assay, flow cytometry (FCM), SP method of immunocytochemistry, Western blot were used to observe the cell proliferation inhibition, cell cycle and apoptosisrate, the expressions of bcl-2, cox-2, bax and caspase 3. *Results*: Ursolic acidinhibited the proliferation of PC-3 cells in dosage and time dependent manner. The IC_{50} of PC-3 cells that were treated by ursolic acid for 24, 48 h and 72 h are 50.87, 37.91 μ mol/L and 27.86 μ mol/L. The apoptosis rate of the PC-3 cells hightened with the increasing of the ursolic acid density and time. The apoptosis rates of the PC-3 cells that treated by 50 μ mol/L ursolic acid for 24, 48 h and 72 h are 6.21, 7.81% and 13.31%. Ursolic acid induced a G_1 cell cycle arrest and reduced the cell population in S phase. With the increasing of the medicine density, the expression of bcl-2 and cox-2 was down-regulated, while the expression of bax and caspase 3 up-regulated in the apoptosis. *Conclusion*: Ursolic acid can inhibit proliferation of the PC-3 cells and induced a G_1 cell cycle arrest and reduced the cellpopulation in S phase. It also can induce apoptosis of human prostatic carcinoma through down-regulating the expressions of bcl-2 and cox-2, up-regulating the expression of bax, and caspase3.

【Key words】Ursolic acid; Prostatic carcinoma cell line PC-3; Apoptosis

熊果酸(Ursolic acid,UA),又称为乌苏酸、乌索酸。为五环三萜酸类化合物。其分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$,分子量 456 kD。其分布广泛,以游离形式或与糖结合成苷的形式存在于约 7 个科 46 个属大约 62 种植物当中。现多从女贞科植物中提炼获得。UA 生物学活性范围很广,具有抑制炎症反应、抗氧化、调节免疫功能及抗肿瘤等作用,近年来医学界对其的研究也越来越多。有研究表明,UA 可以通过降低 DNA 聚合酶及拓扑酶的活性,从而抑制细胞增殖。UA 能

作者介绍:夏 阳(1980-)男,硕士,
研究方向:泌尿外科肿瘤学。
通讯作者:苟 欣,男,教授,E-mail:cymnk@163.com。

够诱导多种肿瘤细胞株发生凋亡甚至出现细胞毒作用。熊果酸能够抑制人乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖并诱导其发生凋亡[1]。熊果酸在体外较高浓度的情况下,对于 T 细胞淋巴瘤细胞株 Jurkat 具有很强的细胞毒作用[2]。熊果酸还能够诱导白血病 HL-60 细胞凋亡[3]。熊果酸还能够明显的增强小鼠的细胞及体液免疫功能[4,5]。UA 能够从预防正常细胞癌变和诱导肿瘤细胞凋亡两个方面发挥抗肿瘤的作用。UA 还可以通过增强碱性神经脂酶的活性来间接激活 caspase 3,8,9 蛋白,从而抑制肿瘤细胞的增殖[6],并能诱导肿瘤细胞凋亡[7,8]。本研究应用 MTT 法、FCM、免疫组化 SP 法以及 Westen blot 等实验方法,通过检测细胞的增殖抑制、周期变化、凋亡相关基因和蛋白表达等情况,探讨 UA 对人前列腺癌细胞株 PC-3 细胞周期、凋亡的影响及其作用机制。旨在为 UA 日后步入临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人前列腺癌 PC-3 细胞株:病理类型为低分化腺癌,购于南京凯基生物科技发展有限公司;UA:美国 Sigma 公司,加入 DMSO 至 5 mmol/L 浓度,-20℃保存。Ham's F12 培养基:南京凯基生物科技发展有限公司。调 pH7.2~7.4, 加入青霉素 100 μl/ml,链霉素 100 μl/ml,正压过滤除菌,-20℃保存;胎牛血清: 杭州四季青生物有限公司,56℃灭活 30 min 以上,-20℃保存;0.25%胰酶:杭州四季青公司,-20℃保存;四甲基偶氮唑蓝(MTT):上海生物工程公司,4℃保存、避光;RNA 酶(RNase)和碘化丙啶(PI):美国 Sigma 公司;SP-9000 免疫组化盒,鼠抗人 bcl-2、cox-2 和 bax,DAB 染色盒:北京中杉生物有限公司;caspase 3:博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 PC-3 细胞用含 10%胎牛血清的 Ham's F12 培养基培养,一般每隔 2 d 换液或传代,取对数生长期细胞用于实验。培养箱 37℃,5%CO_2。

1.2.2 MTT 0.25%胰酶消化收集对数生长期细胞, 制成细胞悬液。并调节细胞浓度至 5×10^4 个 /ml 接种于 96 孔板。96 孔板置于 37℃、5%CO_2 培养箱培养 24 h。根据实验设计加入 UA 10、20、30、40 μmol/L 和 50 μmol/L,对照组不加 UA。每组设 6 个复孔。37℃、5%CO_2 培养箱培养 24、48 h 和 72 h。吸去上清液,每孔加入 200 μl 无血清的 Ham's F12 培养液,再加入 MTT 溶液 20 μl,37℃、5%CO_2 培养箱培养 4 h。吸去上清液,每孔加入 DMSO 200 μl,摇床上低速振荡 10 min。对照组调零,在酶联免疫检测仪 570 nm 处测量各孔的吸光值,每组实验重复 3 次,计算平均值。抑制率=(1- 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%[9]。

1.2.3 FCM 检测细胞周期及细胞凋亡的改变 以含 10%胎牛血清的 Ham's F12 培养液配制对数生长期细胞悬液,浓度为 1×10^6 个 /ml,200 ml 培养瓶中加入 20 ml 细胞悬液。细胞悬液于培养箱中培养 24 h, 观察细胞贴壁后弃去培养液,加入无血清的培养液及各组不同浓度 UA 10,20,30,40 μmol/L 和 50 μmol/L。再分别培养 24、48 h 和 72 h。培养至规定时间后,0.25%胰酶消化细胞,1 000 r/min 离心 10 min。弃去上清液,PBS 液洗涤 2 次后再 2 000 r/min 离心 2 min。细胞悬液吸入 EP 管中,2 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液。缓慢加入 70%冰乙醇 1 ml,固定时间 1 h。PBS 液洗涤 2 次,加入与细胞悬液等体积的 PI 染液,4℃保存 30 min。样品送 FCM 检测。使用 ModFit 软件检测细胞凋亡率及周期分布率。

1.2.4 免疫细胞化学 SP 法 浓硫酸浸泡盖玻片过夜后,自来水洗净,蒸馏水洗 3 次。烘干,打包消毒。盖玻片放入 6 孔板内。以 1×10^6个/ml 的浓度将对数生长期的细胞接种于 6 孔板。培养箱内培养 24 h。培养至规定时间后,观察细胞贴壁,更换培养液。按实验分组加入不同浓度的 UA 10、20、30、40 μmol/L 和 50 μmol/L。培养箱内培养 24 h。PBS 液冲洗 3 次,95%乙醇固定 30 min。细胞爬片用 PBS 液冲洗 3 次,每次 5 min。0.3%过氧化氢孵育 10 min。蒸馏水冲洗,PBS 液浸泡 5 min 以上。滴加封闭,用正常血清室温下培养 10~15 min,弃去。滴加一抗,37℃培养 1~2 h。PBS 液冲洗 3 次,每次 3 min。滴加二抗,室温下培养 10~15 min。PBS 液冲洗 3 次,每次 3 min。滴加辣根霉标记链霉卵白素工作液,室温下培养 10~15 min。PBS 液冲洗 3 次,每次 3 min。DAB 显色,自来水冲洗后中性树胶封片。计算 HSCORE。公式:积分 =(i+1)× 阳性反应细胞%;i 为染色强度, 染色强度自轻到重分为 0、1、2、3 4 个等级。

1.2.5 Western blot 对数生长期的 PC-3 细胞在培养瓶中配至 5×10^6 个/mL 浓度, 培养至贴壁, 加入 UA 至浓度为 10、20、30、40 μmol/L 和 50 μmol/L,并设空白对照组。培养箱中培养 24 h。培养规定时间后先将 EP 管置于冰上,再将细胞置于 EP 管中。10 000 r/min 离心 5 min,PBS 液洗涤 2 次,弃去上清液。滴加蛋白裂解液 200 μl,充分混合后于静置于冰浴下裂解 30 min。4℃下 12 000 r/min离心 3 min,用新 EP 管收集上清液。-70℃保存。以 Bradford 法计算蛋白浓度及加样量。10 μl 样品加入 ddH_2O 50 μl,再加入考马斯亮蓝 G-250 1 ml,混匀后室温下静置 10 min。以蒸馏水 60 μl 加入空白对照管作为对照。根据紫外分光光度计测定的蛋白浓度制作标准曲线。密封垫上相应的玻板槽内嵌入洁净的玻板。夹心制胶板中加入配制的 8%聚丙烯酰胺分离胶, 于室温下垂直方向放置 60 min,使分离胶完全聚合。聚合的分离胶上灌注 4%积层胶,并立即将干净梳子插入积层胶中,其间不得有气泡。然后把梳子齿间的空隙用积层胶填满。室温下凝胶垂直放置。样品处理::样品中加入 1:1 比例的 2×SDS 缓冲液,100℃下 5 min。待样品冷却后,10 000 r/min 离心 30 s。分离胶和积层胶电压分别为为 80、50 V。电泳完毕后的凝胶置于 60 mA 电流,4℃下转印至 PVDF 膜,过夜。4℃下用封闭液封闭转印完毕的 PVDF,过夜。分别依次加入一抗和二抗,每次均在室温下培养 1 h。PBST 液漂洗 3 次。DAB 显色。

1.3 统计学处理

全部实验结果数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用

SPSS 统计软件进行 t 检验，检验结果以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法检测抑制细胞增殖作用

UA 作用于 PC-3 细胞相同时间段不同浓度之间增殖抑制的差异有统计学显著性（$P<0.05$），说明 UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用有浓度依赖性。24、48 h 和 72 h 的 IC_{50} 分别为 50.87、37.91 μmol/L 和 27.86 μmol/L，三者差异有统计学显著性（$P<0.05$），说明 UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用有时间依赖性（图 1）。总而言之，浓度及作用时间均对 UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用产生影响。药物浓度越高，作用时间越长，UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用越强，反之则 UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用越弱。

2.2 FCM 检测细胞周期及凋亡率的变化

PC-3 细胞经 UA 处理后，细胞周期的主要特点是大部分细胞累积于 G_1 期，进入 S 期的细胞减少。PC-3 细胞的凋亡率同样受到 UA 浓度及作用时间的影响。其变化趋势与其增殖抑制作用相同，亦即细胞凋亡率随着药物浓度及作用时间的增加而升高，反之则降低（表 1、2、3）。24、48 h 和 72h 3 个时间段 50 μmol/L 熊果酸作用于 PC-3 细胞后凋亡率分别为 6.21%、7.81%和 13.31%。各时间段内数据以及各时间段之间数据差异有统计学显著性（$P<0.05$）。

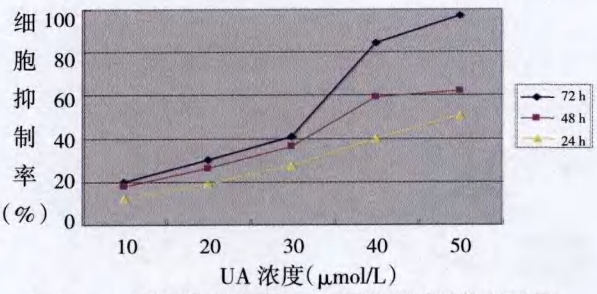


图 1 UA 对人前列腺癌 PC-3 细胞增殖的抑制作用

2.3 免疫组化 SP 法检测 bcl-2、cox-2 和 bax 的表达

PC-3 细胞经不同浓度 UA 处理 24 h 后，bcl-2（图 2）和 cox-2（图 3）的得分情况提示其表达随着药物浓度的升高逐渐降低。熊果酸浓度 50 μmol/L 时，得分均不到对照组的 50%；bax（图 4）的表达随着药物浓度的升高逐渐升高（表 4）。熊果酸浓度 50 μmol/L 时，得分超过对照组 2 倍。各组数据差异有统计学显著性（$P<0.05$）。

2.4 Western blot 检测 caspase 3 蛋白表达

PC-3 细胞经不同浓度 UA 处理 24 h 后，caspase 3 蛋白表达随着 UA 浓度增加逐渐增加（图 5）。Quantity One 分析软件测定各条带灰度值，并计算相应 caspase 3 与 β-actin 条带灰度的比值。与对照组的灰度比值相比，其差异异有统计学显著性（$P<0.05$）。

3 讨 论

UA 分布广泛，以游离形式或与糖结合成苷的形式存在于约 7 个科 46 个属大约 62 种植物当中。现多从女贞科植物中提炼获得。UA 为五环的三萜系化合物，具有抗炎、抗氧化、免疫调节及抗肿瘤等多种生物学活性。UA 对于多种肿瘤具

表 1 UA 作用 24 h 对人前列腺癌 PC-3 细胞周期的影响

UA（μmol/L）	细胞周期分布率（%）			凋亡率（%）
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	
对照组	55.33 ± 1.51	33.68 ± 1.23	10.99 ± 1.27	0.12 ± 0.08
10	56.73 ± 1.23	32.37 ± 1.54	11.90 ± 1.09	0.22 ± 0.02[a]
20	57.96 ± 1.51[a]	30.29 ± 1.65[a]	12.75 ± 1.39	0.29 ± 0.06[b]
30	60.19 ± 1.43[b]	26.16 ± 1.26[b]	13.65 ± 1.24[a]	1.67 ± 0.33[b]
40	62.69 ± 1.5[b]	22.26 ± 1.48[b]	15.05 ± 1.22[b]	5.45 ± 0.51[b]
50	64.71 ± 1.71[b]	20.40 ± 1.62[b]	14.89 ± 1.19[b]	6.21 ± 1.03[b]

实验组与对照组比较 a:$P<0.05$，b:$P<0.01$

表 2 UA 作用 48 h 对人前列腺癌 PC-3 细胞周期的影响

UA（μmol/L）	细胞周期分布率（%）			凋亡率（%）
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	
对照组	57.33 ± 1.22	34.08 ± 1.21	8.59 ± 1.31	0.12 ± 0.05
10	58.46 ± 1.23	33.41 ± 1.60	9.17 ± 1.12[d]	0.23 ± 0.07[a]
20	59.98 ± 1.52[a]	31.54 ± 1.32[a]	9.48 ± 1.44[d]	0.31 ± 0.09[b]
30	62.25 ± 1.68[b]	27.96 ± 1.21[b]	9.79 ± 1.02[d]	1.81 ± 1.18[a]
40	65.37 ± 1.47[bc]	20.34 ± 1.46[b]	11.59 ± 1.68[ad]	6.65 ± 1.22[b]
50	69.36 ± 1.51[bd]	17.95 ± 1.69[bc]	14.69 ± 1.62[b]	7.81 ± 1.53[b]

实验组与对照组比较 a. $P<0.05$，b. $P<0.01$；与 24 h 组比较 c. $P<0.05$，d. $P<0.01$

表 3 UA 作用 72 h 对人前列腺癌 PC-3 细胞周期的影响

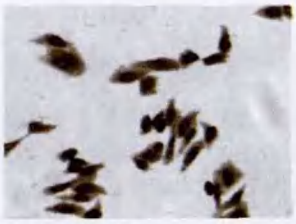
UA(μ mol/L)	细胞周期分布率(%)			凋亡率(%)
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期	
对照组	56.27 ± 1.12	33.31 ± 1.73	10.36 ± 1.27	0.13 ± 0.07
10	59.84 ± 1.61[bd]	31.14 ± 1.48[a]	9.13 ± 1.22[d]	0.25 ± 0.03[b]
20	61.77 ± 1.64[bd]	27.35 ± 1.42[bc]	10.69 ± 1.04[c]	0.42 ± 0.08[bc]
30	65.28 ± 1.53[bd]	20.66 ± 1.38[bd]	14.15 ± 1.67[b]	3.81 ± 1.37[bd]
40	72.44 ± 1.86[bd]	15.24 ± 1.11[bd]	12.07 ± 1.32[d]	9.02 ± 1.48[bd]
50	78.23 ± 1.92[bd]	11.79 ± 0.98[bd]	9.98 ± 1.26[d]	13.31 ± 1.65[bd]

实验组与对照组比较 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 24 h 组比较 c:$P<0.05$,d:$P<0.01$

表 4 UA 作用 24 h 后人前列腺癌 PC-3 细胞中 bcl-2, cox-2 和 bax 的得分

UA(μ mol/L)	bcl-2	cox-2	bax
对照	2.472 ± 0.138	2.627 ± 0.168	1.220 ± 0.126
10	2.263 ± 0.129[a]	2.386 ± 0.114[a]	1.357 ± 0.163
20	1.977 ± 0.167[b]	2.006 ± 0.143[b]	1.530 ± 0.172[a]
30	1.672 ± 0.144[b]	1.843 ± 0.176[b]	1.772 ± 0.194[b]
40	1.219 ± 0.148[b]	1.433 ± 0.152[b]	2.123 ± 0.205[b]
50	1.141 ± 0.126[b]	1.219 ± 0.155[b]	2.546 ± 0.238[b]

实验组与对照组比较 a:$P<0.05$;b:$P<0.011$



对照组



UA(50 μ mol/L)作用组

图 2 人前列腺癌 PC-3 细胞中 bcl-2 的表达(SP×200)



对照组



UA(50 μ mol/L)作用组

图 3 人前列腺癌 PC-3 细胞中 cox-2 的表达(SP×200)

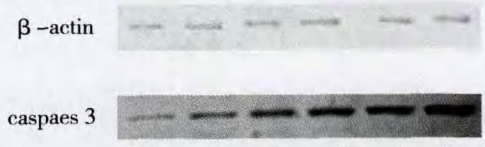


对照组



UA(50 μ mol/L)作用组

图 4 人前列腺癌 PC-3 细胞中 bax 的表达(SP×200)



C. control(0 μmol/L); 1. 10 μmol/L; 2. 20 μmol/L; 3. 30 μmol/L; 4. 40 μmol/L; 5. 50 μmol/L

图 5 Western-blot,UA 处理人前列腺癌 PC-3 细胞 24 h 后 caspase 3 蛋白的表达

有多样的抗肿瘤活性。UA 可以升高细胞内钙离子浓度,激活半胱天冬酶的蛋白酶解级联反应,诱导肺癌细胞 A-549、白血病细胞 P-388 等多种肿瘤细胞凋亡[10]。已有多次研究表明,经 UA 处理后的肝癌 HepG2 细胞、人子宫内膜癌细胞及子宫颈癌细胞 l2-1、人脑胶质母细胞瘤和神经母细胞瘤、膀胱癌细胞 T24 等均有细胞坏死表现,镜下可以观察到细胞膜破裂、内质网和线粒体肿胀、崩解、脂滴游离、空泡化等细胞坏死的典型征象。UA 对侵袭性最强的人 HT1080 纤维瘤细胞实施处理,结果提示与肿瘤侵袭发展为性密切相关的基质金属酶 9 基因的表达降低,肿瘤的侵袭性也随之降低[11]。从以上多个研究的结果可以发现,UA 对多种肿瘤有多样的抗癌活性。

在本次研究中,UA 作用于 PC-3 细胞相同时间段不同浓度之间增殖抑制率有统计学显著性的差异,说明 UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用有浓度依赖性。24、48 h 和 72 h 的 IC_{50} 为 50.87、37.91 μmol/L 和 27.86 μmol/L,三者差异有统计学显著性,说明 UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用有时间依赖性。总而言之,浓度及作用时间均对 UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用产生影响。药物浓度越高,作用时间越长,UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用越强,反之则 UA 对 PC-3 细胞的增殖抑制作用越弱。PC-3 细胞经 UA 处理后,细胞周期的主要特点是大部分细胞累积于 G_1 期,进入 S 期的细胞减少。

PC-3 细胞的凋亡率同样受到 UA 浓度及作用时间的影响。其变化趋势与其增殖抑制作用相同，亦即细胞凋亡率随着药物浓度及作用时间的增加而升高，反之则降低。24、48 h 和 72 h 3 个时间段 50 μmol/L 熊果酸作用于 PC-3 细胞后凋亡率分别为 6.21%、7.81%和 13.31%。细胞累积于 G_1 期，其有丝分裂减少，或者发生分化，或者进入凋亡过程。

细胞凋亡是指在多种基因严格控制下，在外源性或内源性刺激下发生的细胞自然死亡过程，与坏死不同，凋亡具有细胞自我毁灭性及严格程序性的特点，所以又称为程序性细胞死亡（Programmed cell death，PCD）。凋亡对于生物体控制正常细胞数量、促使细胞新旧代谢、稳定内环境、调控机体正常生长发育的重要作用毋庸置疑。目前探明的主要有 3 条信号传导途径：(1)经死亡受体介导的传导途径。它主要的传导对象是外源性信号。死亡受体也是 1 个蛋白族群，都是跨膜存在，其效应物质也多种多样，其中 caspase 8 是比较重要的。(2) 经线粒体介导的传导途径。它的传导对象是内源性信号。其效应物质是细胞色素 C，进而激活 caspase 9。(3)经内质网介导的传导途径。它的传导对象仍然是内源性信号。其的效应物质是 Ca^{2+}，进而激活 caspase 12。尽管上述 3 条途径起始位置及效应物质各不相同，但是它们之间可以通过如 Ca^{2+} 与细胞色素 C，caspase 8 与 Ca^{2+}，caspase 8 与细胞色素 C 等经过复杂的链条相互联系，相互影响。这 3 条途径都需要最终激活下游的 caspase 3，从而进入共同的凋亡途径导致细胞凋亡[12]。bcl-2 是最早被发现的癌基因之一，对细胞增殖没有直接作用，但它可以抑制各种因素引致的细胞凋亡[13]。bcl-2 高表达已经成为许多恶性肿瘤的特点之一。它抑制凋亡的机制可能是阻碍线粒体释放细胞色素 C 到胞质中，而细胞色素 C 可以激活 caspase 蛋白家族，细胞色素 C 减少则 caspase 蛋白家族的激活同样减少，细胞的凋亡活动也就受到抑制。Bax 与 bcl-2 属于同一族，bax 对 bcl-2 有强力拮抗作用，能够直接促使细胞凋亡，与 bcl-2 共同调控细胞增殖与死亡的趋向[14]。从某种程度上说，bcl-2 与 bax 的比值决定了细胞生命过程的走向。bcl-2/bax 保持稳定，细胞凋亡就处于平衡状态，细胞存活量也维持平衡；bcl-2/bax 升高，细胞凋亡减少，存活量增加；bcl-2/bax 降低，细胞凋亡增加，存活量减少[15]。研究发现 bcl-2 及 bax 基因在淋巴瘤、胸腺瘤和鳞状上皮的基底细胞、神经组织、唾液腺导管上皮等组织均有同时表达，也可见于胶质病、胃癌、乳腺癌等肿瘤组织[16]。Cox-2 最先在炎症反应的细胞中发现其表达增加。对于肿瘤组织，首先在直肠癌细胞中发现 cox-2 高表达，而后在许多种癌组织甚至癌前病变中也发现其有高表达，其在肿瘤实质和血管中均有分布。Cox-2 与其他凋亡基因不同，它是通过催化多种化学产物，这些化学产物再作用于其他的凋亡相关基因、凋亡相关蛋白或者直接作用于肿瘤，这种间接的形式来参与调控细胞的凋亡活动的。研究发现其中最重要的产物是 PGE2 和 VEGF。多种肿瘤包括前列腺癌的发生、发展和转移都与 PGE2 的浓度异常升高有关[17]。众所周知 VEGF 能够促进组织血管生成。Cox-2 可以诱导肿瘤细胞增加 VEGF 的合成，从而使肿瘤血管生成加速，最终促进肿瘤的生长。

综上所述，UA 对多种肿瘤细胞均有抗肿瘤活性作用。本实验 UA 能够抑制 PC-3 细胞增殖，并且诱导其发生凋亡。作用机制可能是通过使 PC-3 细胞内 bcl-2 表达减少和 bax 的表达增加，即 bcl-2/bax 下降，并使 cox-2 的表达减少，通过上述的复杂途径活化 caspase 蛋白家族，尤其是关键的 caspase 3，最终激活 caspase 级联反应诱导细胞凋亡。但由于细胞凋亡是一个极其复杂的过程，UA 在体内对细胞凋亡的影响以及其详细机制尚有待进一步研究。这也将是我们下一步研究的方向。

参 考 文 献

[1] 吴其年，黄 炜，杨凤仪. 熊果酸对人乳腺癌细胞增殖、凋亡和细胞内游离 Ca^{2+} 的影响 [J]. 肿瘤学杂志，2004，10(3)：145-147.

[2] 李 杰，许良中，朱伟萍. 熊果酸与齐墩果酸体外抗 jurkat 淋巴瘤细胞的研究 [J]. 中国癌症杂志，1999，9(5-6)：395-397.

[3] Choi B,Park R,Pae H,et al. Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 Cells[J]. Pharmacology & Toxicology,2000,86(2):53.

[4] 冯英杰，任会勋，袁育康，等. 熊果酸免疫调节作用的初步研究 [J]. 西安交通大学学报，2006，27(6)：541-543.

[5] 王晓芹，高 宁，熊果酸诱导人急性白血病细胞凋亡及其作用机制[J].第三军医大学学报，2009，31(2)：105-108.

[6] Novotny L,Vachalkova A,Biggs D. Ursolic acid:an antitumorigenic and chemopreventive activity[J]. Minireview.Neoplasma,2001,48(4):241.

[7] 刘 琼，叶秀峰，张 徽，熊果酸抑制胶质瘤裸鼠移植瘤生长及其机制的初步探讨[J].第三军医大学学报，2009，31(11)：1041-1044.

[8] Andersson D,Liu J,Nilsson A,et al. Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase [J]. Anticancer Research,2003,23(4):3317.

[9] 沈 宜，汤为学，段 红，等.中效原理在顺铂、足叶乙甙对人肺癌细胞株(PAa)相互作用中的应用[J]. 重庆医科大学学报，2000，25(2)：118-120.

[10] Lee K H,Lin Y M,Wu T S,et al. The cytotixic principle of prunella vulgaris, psychotria serpens,and HyptiS capitata:ursolic acid and related derivatives [J]. Planta Med,1988,54(4):308-311.

[11] Cha H J,Bae S K,Lee H Y,et al.Anti-invasive activity of ursolic acid correl ates with the reduced expression of matrix metalloproteinase[J].Cancer Res,1996, 56(10):2281-2284.

[12] Gup T S. Molecular signaling in death recep tor and mitochondrial pathways of apop tosis [J]. Int J Oncol,2003,22(1):15-20.

[13] Korsmeyer S J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes:regulations of cell death[J]. Blood,1992,80(4):879-886.

[14] Krajewski S,Kr ewska M,Shabaik A,et al. Immunohistochemical determin ation of in vivo distribution of Bax,a dominant inhibitor of Bcl-2[J]. Am J Pathol, 1994,145(6):1323-1336.

[15] S. J. Korsmeyer,J. R. Shutter,D. J. Veis,et al. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death[J].Semin Cancer Biol,1993,4(6): 327-332.

[16] 欧阳淼，张桂英，徐美华.大肠黏膜癌变过程中 Bcl-2 及 Bar 的表达及其相关性研究[J].中国现代医学杂志，2003，13(17)：130-132.

[17] Schrey M P,Patel K V. Prostaglandin E2 production and metabolism in human breast cancer cells and breast fibmblasts. Regulation by inflanrnatory mediators[J]. Br J Cancer, 1995, 72(6): 1412-1419.

（责任编辑：关蕴良）