心、肺、泌尿疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000957

双氢青蒿素对前列腺癌细胞迁移和侵袭能力影响及机制的研究

邹文琴[1],丁 璇[2],唐 溧[1],许 舸[1],罗子国[1]

(1.重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016;2.第三军医大学大坪医院病理科,重庆 400042)

[摘 要]目的:探讨双氢青蒿素(dihydroartemisinin,DHA)对人前列腺癌细胞迁移和侵袭能力的影响及可能机制。方法:人前列腺癌细胞株 PC-3 与 DU145 经不同浓度(0、25、50、100 μmol/L)的 DHA 处理 48 h,运用细胞划痕和细胞侵袭实验检测细胞的迁移和侵袭能力。采用荧光定量 PCR 和 Weston blot 检测波形蛋白(Vimentin)和上皮_钙粘连素(E-Cadherin,CDH1)基因和蛋白表达水平。结果:不同浓度 DHA 均能显著抑制 PC-3 和 DU145 迁移和侵袭能力($P<0.001$)。不同浓度 DHA 均能明显下调 Vimentin mRNA 和蛋白的表达($P<0.05$),上调 CDH1 mRNA 和蛋白的表达($P<0.05$)。结论:双氢青蒿素能显著抑制人前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力,其可能机制是 DHA 干扰 Vimentin 表达及诱导 E-Cadherin 表达,且高浓度 DHA 可能存在其他途径抑制前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力。

[关键词]双氢青蒿素;细胞侵袭;细胞迁移;人前列腺癌;波形蛋白;上皮_钙粘连素

[中图分类号]R737.25 [文献标志码]A [收稿日期]2015-11-09

Influence of dihydroartemisinin on cell migration and invasion in human prostate cancer cells and its probable mechanism

Zou Wenqin, Ding Xuan, Tang Li, Xu Ge, Luo Ziguo

(1. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University; 2. Department of Pathology, Daping Hospital, Third Military Medical University)

[Abstract]***Objective*** To investigate the effects of dihydroartemisinin (DHA) on cell migration and invasion in human prostate cancer cells and its underlying molecular mechanisms. ***Methods*** PC-3 and DU145 cells were treated with different concentrations (0, 25, 50, 100 μmol/L) of DHA for 48 h. The migration and invasion abilities of PC-3 and DU145 cells were examined using the cell migration and invasion assays. Vimentin and E-cadherin (CDH1) mRNA and protein expression levels were determined by RT-qPCR and Western blot respectively. ***Results*** DHA can significantly inhibit cell migration and invasion of PC-3 and DU145 cells ($P<0.001$). The expression levels of Vimentin mRNA and protein were significantly decreased ($P<0.05$), while the expression levels of CDH1 mRNA and protein were increased ($P<0.05$). ***Conclusion*** DHA significantly inhibits the migration and invasion abilities of PC-3 and DU145 cells *in vitro*. These mechanisms may relate with the reduced expression of vimentin and the induced expression of CDH1 by DHA. In addition to inhibitting EMT, high concentration of DHA may inhibit the migration and invasion abilities of PC-3 and DU145 cells by other ways.

[Key words]dihydroartemisinin; cell invasion; cell migration; prostate cancer; vimentin; E-cadherin

前列腺癌(prostate cancer,PCa)是男性泌尿生殖系统常见肿瘤之一,起病较隐匿,一旦确诊半数已处于晚期,约 90%的病人会发生骨转移而死亡[1],严重威胁男性健康,成为泌尿系肿瘤领域的重要难题。上皮间质转化(epithelial mesenchymal transition,EMT),是指上皮细胞通过特定程序转化为间质细胞的过程,并参与多种肿瘤(如前列腺癌、乳腺癌等)的侵袭和转移,在上皮源性肿瘤的发生、发展过程中起重要作用,此过程主要改变包括上皮细胞标志物(E-cadherin、Cytokeratins、E-cadherin/β-catenin 等)表达下调和间质细胞标志物(Vimentin、Fibronectin、

作者介绍:邹文琴,Email:523623760@qq.com,研究方向:双氢青蒿素抗前列腺癌机制的研究。

通信作者:罗子国,Email:luoziguo@cqmu.edu.cn。

基金项目:重庆市科技攻关计划资助项目(编号:cstc2012gg-yyjs10017)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1033.060.html(2016-05-13)

N-cadherin 等）表达上调[2]。

双氢青蒿素（dihydroartemisinin，DHA）作为青蒿素的重要衍生物，其抗疟功效及机制已明确，近年其抗肿瘤作用又备受关注[3]。本课题组前期研究表明，DHA 可通过调节凋亡基因 Bcl-2、Survivin、caspase-3 和促凋亡基因 Bax 等的表达，发挥抗前列腺癌效应[4-6]，但 DHA 是否可能通过抑制 EMT 效应来发挥抗前列腺癌效应，尚未见有关报道。因此，本研究拟选用不同浓度的 DHA 干扰 PC-3 和 DU145 细胞，观察其对前列腺癌细胞 EMT 过程中 E 钙粘蛋白（E-cadherin，CDH1）和波形蛋白（Vimentin）表达的影响，从而探讨其影响细胞迁移和侵袭能力的潜在机制，为寻求安全、高效的抗前列腺癌药物奠定初步实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

前列腺癌雄激素非依赖性细胞 PC-3 和 DU145 购自中科院上海细胞生物学研究所细胞库；RPMI1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶均购自 Hyclone 公司；Vimentin（货号：EPR3776）和 CDH1（货号：EPR14146）兔抗人单克隆抗体购自英国 Abcam 公司；GAPDH（货号：DB132）内参兔抗多克隆抗体购自北京四正柏生物科技有限公司；辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司；RNAiso Plus、逆转录试剂盒 SYBR Green 及 DEPC 购自 Promega 公司；Vimentin、CDH1 及内参引物购自上海生工生物工程技术有限公司。Transwell 小室购自 Millipore 公司，人工基质胶 E127 购自 Sigma 公司；ChemiDoc XRs 凝胶成像系统、CFX96 实时定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验药物

DHA（生产批号：Lot#SLBG8320V；纯度：≥97%）、二甲基亚砜（DMSO）购自美国 Sigma 公司，DHA 用 DMSO 充分溶解配成 0.1 mol/L 的母液，超声波助溶，4 ℃保存。实验前用 RPMI1640 培养基稀释至所需浓度（DMSO 终体积分数<0.1%）。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人前列腺癌 PC-3 和 DU145 细胞株在 10% Hyclone 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中，37 ℃、5.0% CO_2、饱和湿度条件下培养。本实验分为对照组（0 μmol/L）和实验组（DHA 分别为：25、50、100 μmol/L）。

1.3.2 细胞划痕实验检测 DHA 对 PC-3 和 DU145 细胞的迁移能力的影响 将等密度生长状态良好的 PC-3 和 DU145 细胞（约 5×10^5 个/ml）分别接种于 6 孔板（1 ml/孔）中常规培养 6 h 至 8 h，待细胞均匀平铺于培养板上后，用 10 μl 的枪头在单层细胞上划“#”字，再用 PBS 轻轻清洗 3 次 洗掉脱落的细胞），然后加入不同浓度（0、25、50 和 100 μmol/L）DHA，分别在 0、24、48 h 进行拍照，每孔拍 4 处，应用 Image-Pro-Plus 6.0 图像分析细胞划痕的宽度，计算迁移率。细胞迁移率（%）=（1~24 h 或 48 h 划痕宽度/0 时间点划痕宽度）×100%。如此重复实验 3 次并记录。

1.3.3 Transwell 细胞侵袭实验检测 DHA 对 PC-3 和 DU145 细胞的侵袭能力的影响 ECM 胶和无血清 1640 培养基按 1:7 的比例混合后按总量 33 μl 铺 Transwell 小室内，再将小室置于 24 孔培养板孔内，并将其置于超净台内紫外线照射过夜。用无血清 1640 培养液制备单细胞悬液，细胞密度调整为（约 2.5×10^5 个/ml），在 24 孔板孔内加 600 μl 含 20%FBS 的细胞培养液，在小室内加 400 μl 细胞悬液，加入 DHA，终浓度分别为 0（对照）、25、50、100 μmol/L。常规培养 48 h 后，用浸 PBS 的湿棉签擦去小室孔内未穿过 ECM 胶的细胞。24 孔板内加入无水乙醇 1 ml 后将小室放回孔内，室温固定 20 min，自然晾干后用苏木精染色 20 min，清水漂洗，自然晾干后用伊红染色 20 min，再次清水漂洗后自然风干。将小室置于载玻片上，用显微镜进行观察、计数、拍照，随机选取 6 个 400× 的视野，统计视野内的细胞数，取平均值，如此重复实验 3 次并记录。

1.3.4 qRT-PCR 检测 DHA 对 Vimentin 和 CDH1 转录水平表达的影响 PC-3 和 DU145 细胞按照 1×10^6 个/孔接种到 6 孔板中，分别加入不同浓度的 DHA，每个浓度重复 4 孔，48 h 后收集各组细胞提取总 RNA，用 Promega 逆转录试剂盒合成 cDNA，并用 Promega 的 Green mix 试剂盒分别对 Vimentin 和 CDH1 进行 RT-PCR 扩增，PCR 引物序列及扩增条件分别为：Vimentin 上游引物：5'-CGAAAACACCCTGCAATCTT-3'，下游引物：5'-CTGGATTTCCTCTTCGTG GA-3'；CDH1 上游引物：5'-CAGGTCTCCTCTTGGCTCTG-3'，下游引物：5'-GACCGGTGCAATCTTCAAAA-3'；GAPDH 上游引物：5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3'，下游引物 5'-AGCCTTCTCC ATGGTGGTGAAGAC-3'。反应条件：95 ℃预变 4 min，进行 35 个循环（98 ℃ 10 s，54 ℃ 18 s，72 ℃ 30 s），72 ℃延伸 3 min。根据仪器读取的 C_T 值，采用 $2^{-\Delta\Delta C}$ 法分析，如此实验重复 3 次并记录。

1.3.5 免疫印迹检测 DHA 对 Vimentin 和 CDH1 蛋白表达的影响 将等密度生长状态良好的 PC-3 和 DU145 细胞分别接种于 25 cm^2 培养瓶中，分别加入不同浓度的 DHA，48 h 后收集各组细胞，用碧云天的 RIPA 细胞裂解液收集蛋白样品，按 4:1 的比例加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液。沸水浴 15 min 使蛋白质充分变性，然后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。50 μg 总蛋白进行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，蛋白质电转移至 PVDF 膜上，用 5%脱脂牛奶室温封闭 1.5 h；一抗（Vimentin 兔源单抗 1:3 000 稀释，CDH1 兔来源单抗 1:3 000 稀释，内参兔源多抗 GAPDH 1:2 000 稀释）4 ℃孵育过夜，TBST 缓冲液洗膜 3×5 min；HRP 二抗（1:2 000 稀释）37 ℃孵育 1 h，

TBST 缓冲液洗膜 3×5 min；ECL 发光试剂购自碧云天公司；凝胶成像仪显影，采用 Quantity One 图像分析软件对各组蛋白条带进行灰度值测定，分别计算 Vimentin 和 CDH1 蛋白与内参蛋白的比值，由此反映目的蛋白的相对表达量，如此实验重复 3 次并记录。

1.4 统计分析

数据采用 GraphPad Prism 6 软件处理。数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析进行数据检验，组间比较采用 Dunnett-t 检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 DHA 抑制 PC-3 和 DU145 细胞的迁移能力

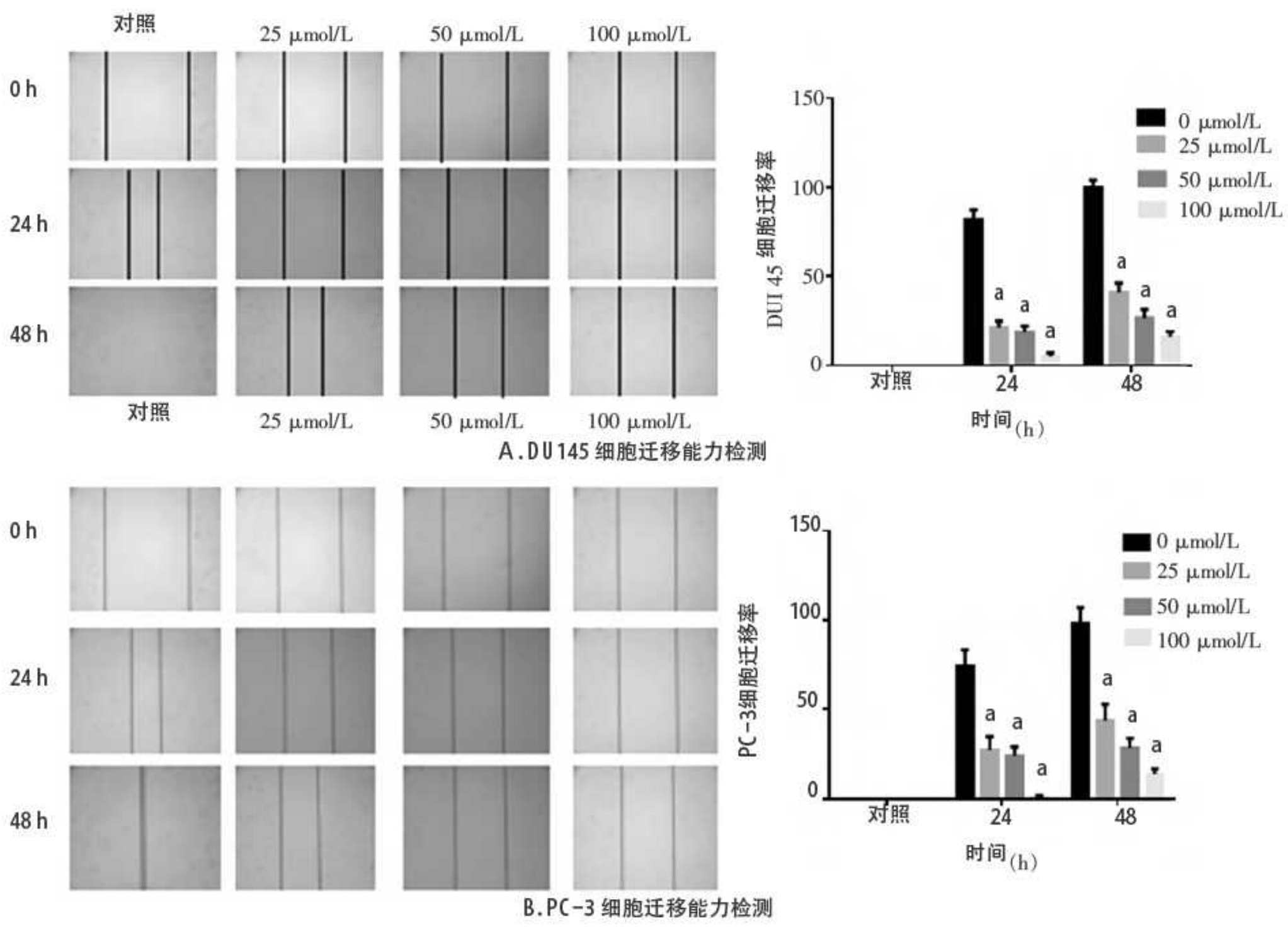
DHA 作用于 PC-3 和 DU145 细胞 24 h 后，与对照组相比，实验组 PC-3 和 DU145 细胞的迁移能力减弱；而 DHA 作用于 PC-3 和 DU145 细胞 48 h 后，正常对照组细胞划痕完全愈合，实验组 PC-3 和 DU145 细胞的迁移能力则明显减弱（如图 1）。随着 DHA 浓度的增高，PC-3 和 DU145 细胞的迁移速度明显下降，且作用时间越长，迁移速度下降越明显，且具有统计学差异（P<0.001）。结果显示，DHA 能抑制 PC-3 和 DU145 细胞的迁移能力，且具有浓度和时间依赖性。

2.2 DHA 抑制 PC-3 和 DU145 细胞的侵袭能力

DHA 作用于 PC-3 和 DU145 细胞 48 h 后，与对照组相比，实验组穿过基质胶的 PC-3 和 DU145 细胞明显减少（图 2）。随着 DHA 浓度的增高，PC-3 和 DU145 细胞的侵袭能力明显下降，且具有统计学差异（P<0.001）。结果显示：DHA 能有效抑制前列腺癌细胞的侵袭能力，且具有浓度依赖性。

2.3 DHA 抑制 Vimentin 和促进 CDH1 的 mRNA 和蛋白表达

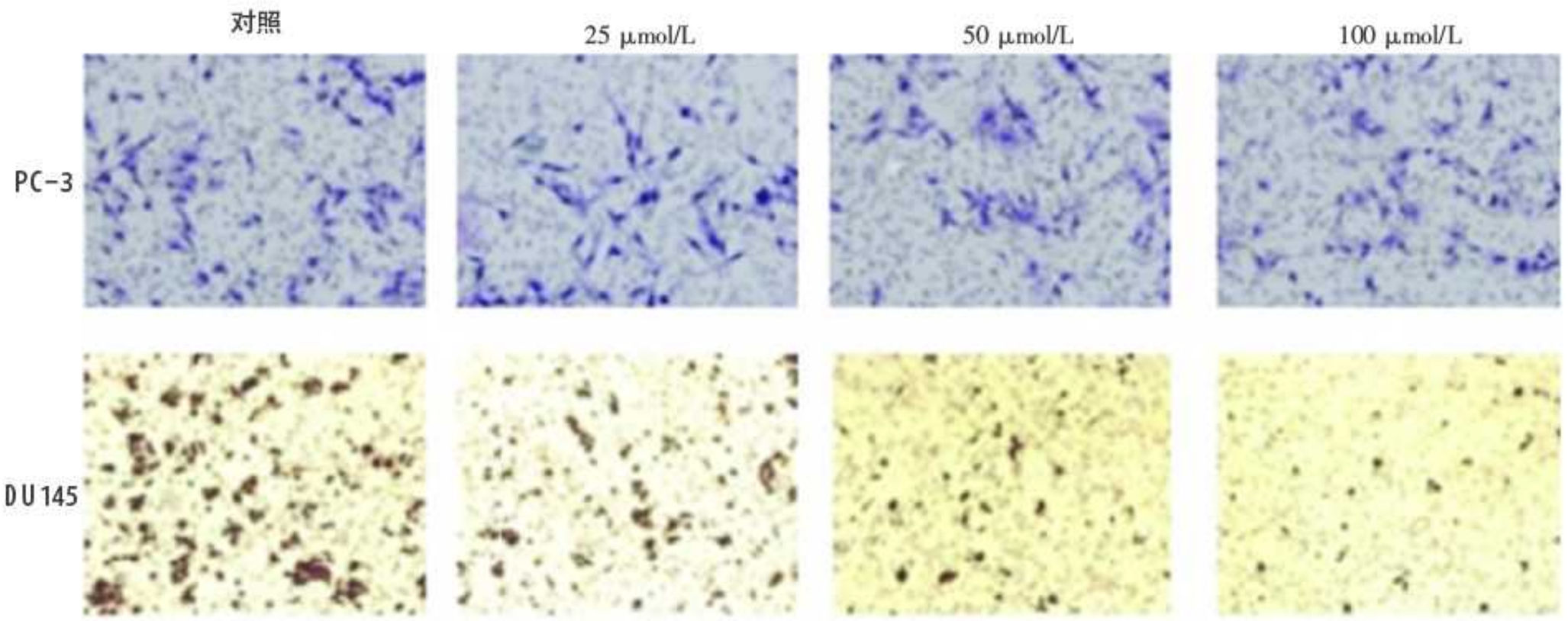
为了进一步探讨 DHA 如何抑制 PC-3 和 DU145 的迁移和侵袭能力，本实验用荧光定量 PCR 和 Western blot 检测与前列腺癌细胞紧密相关的蛋白质标志物 Vimentin 和 CDH1 的 mRNA 水平和蛋白表达水平。DHA 作用于 PC-3 和 DU145 细胞 48 h 后，与对照组相比，DHA 组中 Vimentin 的 mRNA 和蛋白表达水平均下降（图 3），而 CDH1 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高（图 4），具有统计学意义（P<0.05），而 DHA 浓度为 25 μmol/L 时作用最明显。结果显示：不同浓度的 DHA 均能抑制 Vimentin 和促进 CDH1 的 mRNA 和蛋白表达，25 μmol/L 时作用最强。

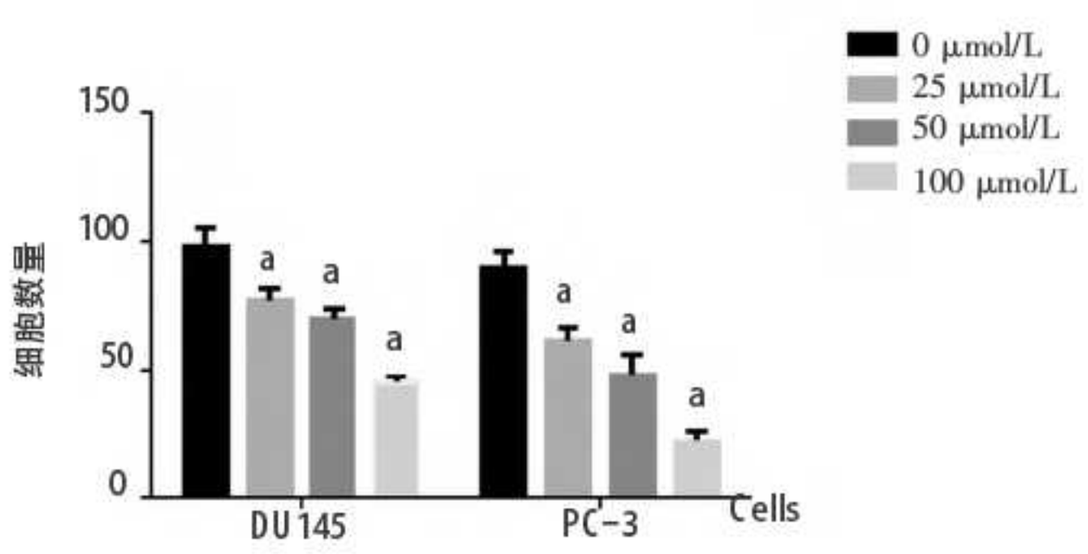


a：与对照组相比，P<0.001（n=3）

图 1 不同浓度 DHA 干扰后，DU145 和 PC-3 细胞的迁移能力

Fig.1 Migration ability of DU145 and PC-3 treated with dihydroartemisinin (DHA) detected by cell migration assay





a：与对照组相比，$P<0.001$（$n=3$）

图 2　不同浓度 DHA 干扰后，光镜下 DU145 和 PC-3 的细胞数目

Fig.2　Number of DU145 and PC-3 after dihydroartemisinin (DHA) treatment counted by cell counting plate

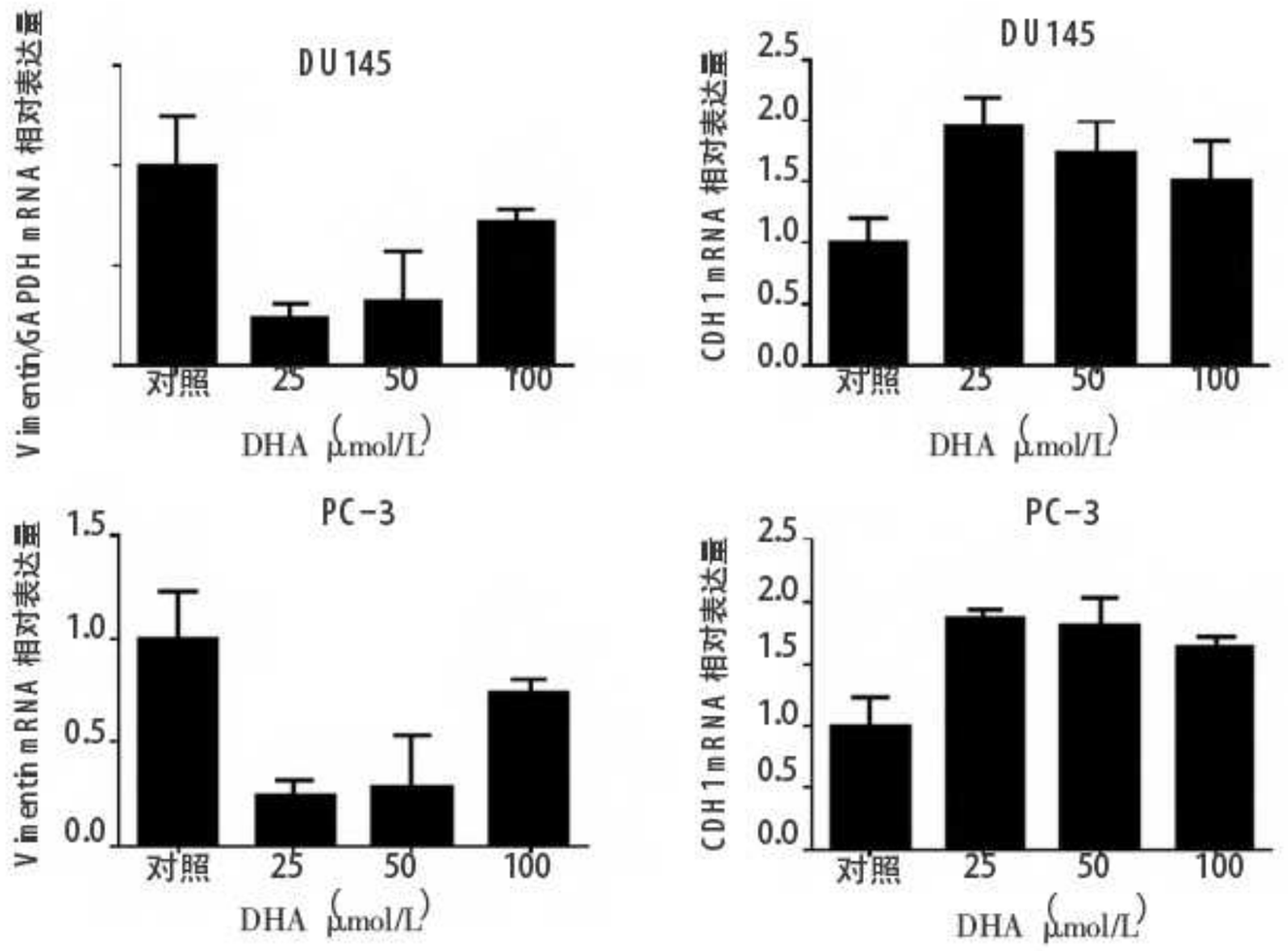
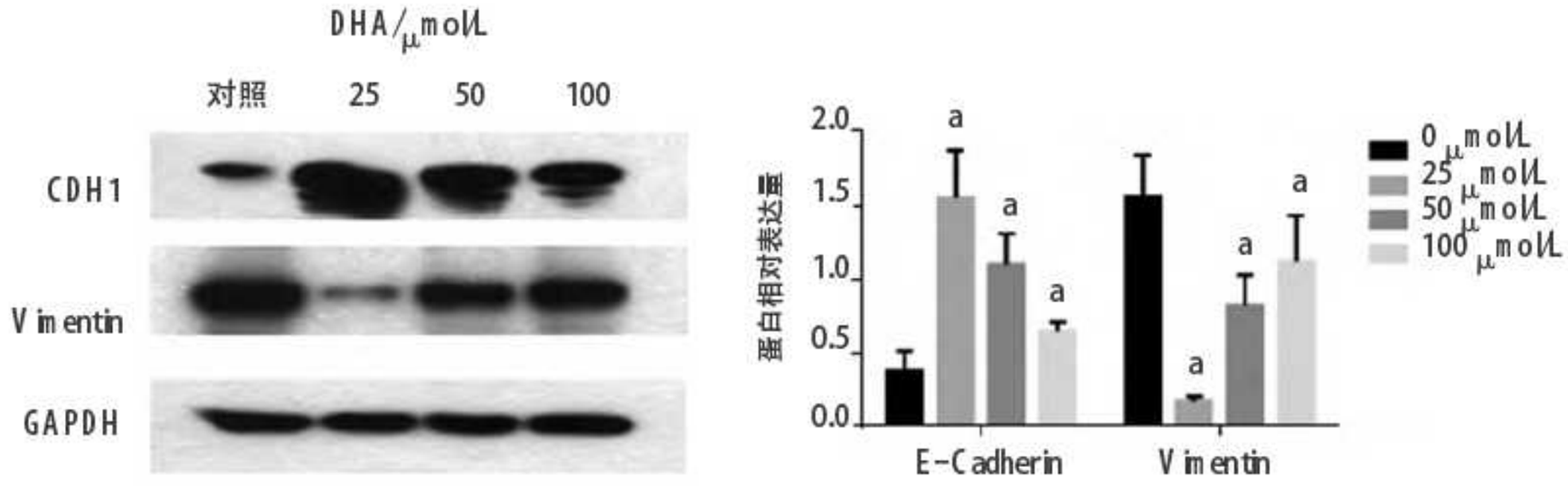
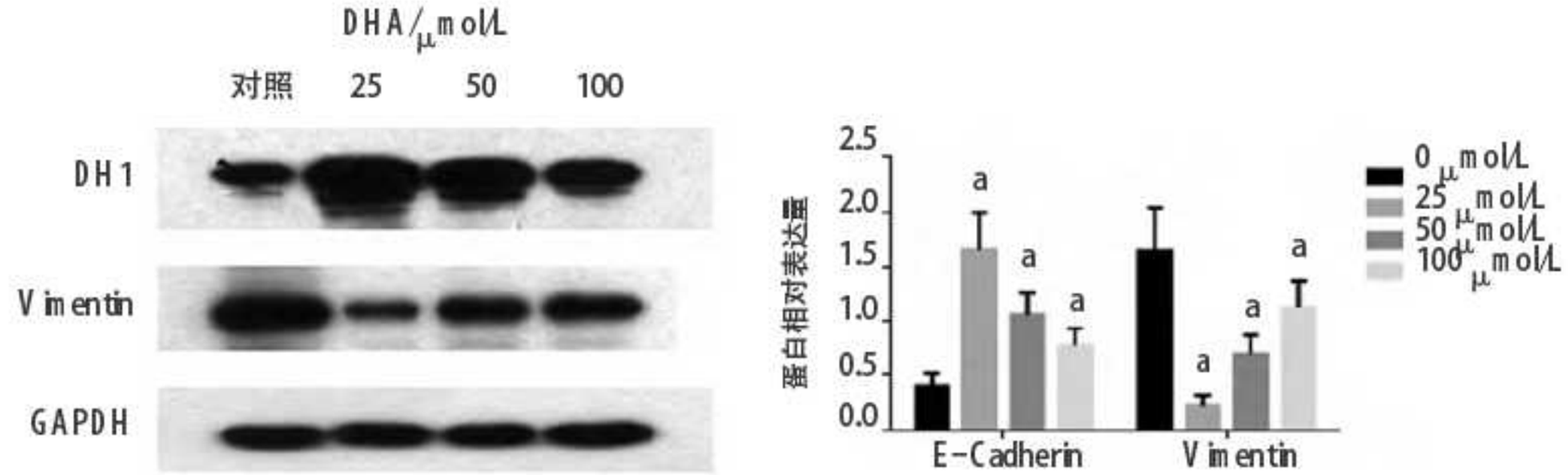


图 3　qRT-PCR 检测不同浓度 DHA 干扰 DU145 及 PC-3 后 Vimentin 和 CDH1 的 mRNA 表达

Fig.3　Expression levels of Vimentin and CDH1 mRNA in prostate cancer DU145 and PC-3 cells treated with dihydroartemisinin (DHA) detected by qRT-PCR



A.DU145 细胞中蛋白差异表达



B.PC-3 细胞中蛋白差异表达

a：与对照组相比，$P<0.05$（$n=3$）

图 4　Western blot 检测不同浓度 DHA 干扰后 Vimentin 和 CDH1 蛋白的表达

Fig.4　Expression levels of Vimentin and CDH1 proteins treated with dihydroartemisinin (DHA) detected by Western blot

3　讨　论

近年来，前列腺癌的发病率在我国呈明显上升趋势[7]。侵袭和迁移是恶性肿瘤显著的生物学特性之一[8]，也是导致前列腺癌发生转移，最终导致患者死亡的重要原因。因此，寻求一种安全、高效的抗前列腺癌药物，研究其对前列腺癌细胞侵袭和转移的抑制作用及机制，对前列腺癌的防治具有极其重要的意义。青蒿素是我国最先研究并被国际社会普遍公认的抗疟药物，DHA 是青蒿素的衍生物，近年来 DHA 抗肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡及对种植瘤抑制作用的研究成为热点。

本研究采用不同浓度的 DHA 干扰 PC-3 和 DU145 细胞，细胞划痕试验及细胞侵袭实验结果显示两种细胞的迁移和侵袭能力均受到明显抑制，初步证实 DHA 可有效抑制前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力。上皮细胞间质转化（epithelial mesenchymal transition，EMT）在恶性肿瘤发生侵袭和转移中也发挥重要作用[9]，CDH1 和 Vimentin 是其关键蛋白之一。细胞表面跨膜糖蛋白 CDH1 是上皮细胞间连接的重要成分，其高表达可以抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力[10]。Vimentin 是间质细胞来源的中间丝蛋白，是细胞内一种相对稳定的骨架成分，其高表达可促进肿瘤细胞的迁移和侵袭能力[11]。研究证实，EMT 可以分别通过 TGF-β（Alk3/Alk5）和 Wnt/Fzd 受体调节 TCF/LEF1 的表达，并间接影响 Vimentin 的表达，EMT 也能通过 Integrin 受体调节 Snail/Slug 的表达，并间接影响 CDH1 的表达[12]。在 EMT 调节中，CDH1 蛋白的高表达和 Vimentin 蛋白的低表达均能抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭能力[12-13]。本研究结果显示，以不同浓度的 DHA 干扰 PC-3 和 DU145 细胞后，Vimentin mRNA 和蛋白表达水平均受到抑制，而 CDH1 mRNA 和蛋白表达水平均显著增强。抑制 Vimentin 表达，前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力受到抑制。相反，CDH1 的表达水平增高时，前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力也受到抑制。在 EMT 调节中，CDH1 的高表达和 Vimentin 的低表达均能抑制前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力，与文献中结论高度一致[12-13]（见图 5）。因此，本研究进一步证实 DHA 可通过抑制 EMT 效应抑制 PC-3 和 DU145 细胞的迁移和侵袭能力。

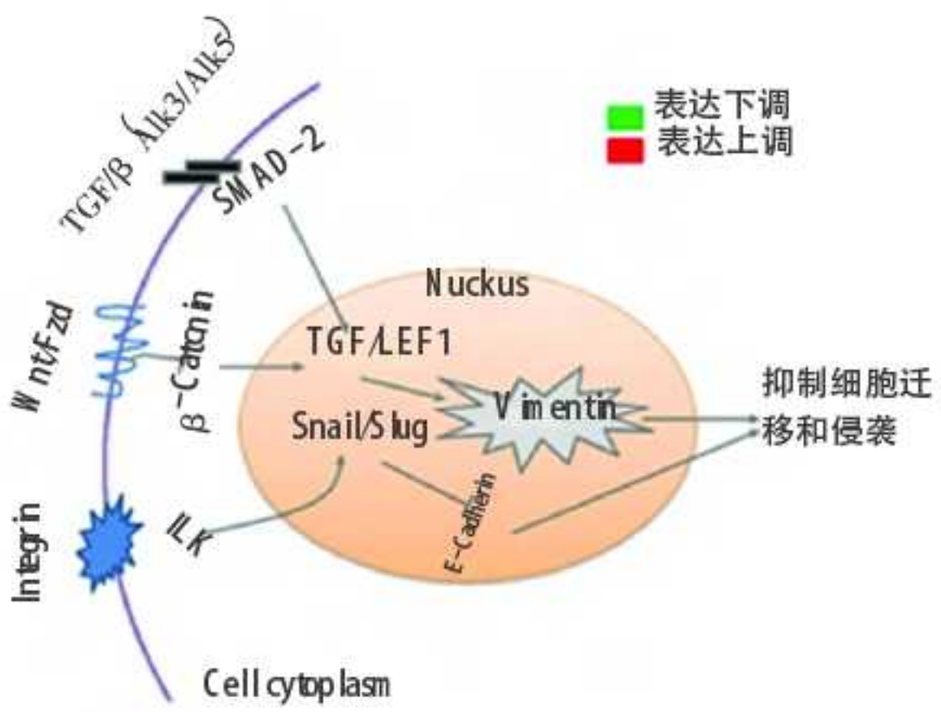


图 5 DHA 可能通过调节 CDH1 和 Vimentin 抑制 PC-3 和 DU145 细胞的迁移和侵袭能力[12-13]

Fig.5 DHA may inhibit the cell migration and invasion of human prostate cancer cell PC-3 and DU145 by regulating the expressions of CDH1 and Vimentin

本研究结果显示 DHA 浓度为 25 μmol/L 时抑制 Vimentin 和促进 CDH1 的 mRNA 和蛋白表达最明显，DHA 呈高浓度时抑制 Vimentin 和促进 CDH1 的 mRNA 和蛋白表达作用减弱，即 25 μmol/L DHA 抑制 EMT 效应的能力最强，高浓度 DHA 抑制 EMT 效应的能力下降；但不同浓度 DHA 均能显著抑制前列腺癌 PC-3 和 DU145 细胞的迁移和侵袭能力，且具有浓度依赖性。有研究报道 UCH-L3[14]、mTOR[15]、FoxM1[16]等的高表达也能逆转 EMT，抑制前列腺癌细胞的迁移和侵袭能力。因此，高浓度 DHA 有可能通过诱导 UCH-L3、mTOR、FoxM1 等其他途径影响 EMT 效应。

综上所述，本实验于体外证实了 DHA 能显著抑制前列腺癌 PC-3 和 DU145 细胞的迁移和侵袭能力，干扰 Vimentin 表达及诱导 CDH1 表达，抑制 EMT 效应；25 μmol/L DHA 抑制 EMT 的能力最强，高浓度 DHA 抑制 EMT 能力下降，但高浓度 DHA 是否还可以通过诱导 UCH-L3、mTOR、FoxM1 等其他途径影响 EMT 效应还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Peng XS，Guo W，Liu TJ，et al. Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT[J]. PLoS One，2011，6(5)：e20341.

[2] Byles V，Zhu L，Lovaas JD，et al. SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis[J]. Oncogene，2012，31(43)：4619-4629.

[3] Singh NP，Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells[J]. Anticancer Res. 2004，24(4)：2277-2280.

[4] 高小玲，罗子国，王丕龙，等. 双氢青蒿素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及其机制研究[J]. 中草药，2010，41(1)：81-85.

[5] 李庆春，高小玲，邹 聪，等. 双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞体内生长及 Caspase-3 表达的影响[J]. 第四军医大学学报，2009，30(5)：435-438.

[6] 李庆春，高小玲，石之虎，等. 双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞生长及 Survivin 表达的影响[J]. 中国生物制品学杂志，2009，22(1)：61-64.

[7] 梁朝朝，周 骏，张 力. 前列腺癌诊疗的现状与未来[J]. 临床泌尿外科杂志，2014，29(8)：657-660.

[8] Han T，Kang D，Ji DK，et al. How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion?[J]. Cell Adhesion Migration，2013，7(5)：395-403.

[9] Thiery JP，Acioque H，Ruby YJ，et al. Epithelial-mesenchym transitions in development and disease[J]. Cell，2009，139(5)：871-890.

[10] Korpal M，Lee ES，Hu GH，et al. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2[J]. J Biol Chem，2008，283(22)：14910-14914.

[11] Gilles C，Polette M，Zahm JM，et al. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration[J]. Journal of Cell Science，1999，112(24)：4615-4625.

[12] Kokkinos MI，Wafai R，Wong MK，et al. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer-observations in vitro and in vivo.[J]. Cells Tissues Organs，2007，185(185)：191-203.

[13] Onder TT，Gupta PB，Mani S，et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways[J]. Cancer Res，2008，68(10)：3645-3654.

[14] Song HM，Lee，JE，Kim JH. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 regulates EMT process and cancer metastasis in prostate cell lines[J]. Biochem Biophys Res Commun，2014，452(3)：722-727.

[15] Chen XG，Cheng HY，Pan TF，et al. mTOR regulate EMT through RhoA and rac1 pathway in prostate cancers[J]. Mol Carcinog，2015，54(10)：1086-1095.

[16] Wang YR，Yao BW，Wang Y，et al. Increased FoxM1 expression is a target for metformin in the suppression of EMT in prostate cancer [J]. International Journal of Molcular Medicine，2014，33(6)：1514-1522.

责任编辑 张辉洁）