

hepaCAM 与藏花素联合应用对前列腺癌细胞增殖的影响

王胤¹, 杨雪¹, 王晓荣¹, 吴小候², 陈娥¹, 罗春丽¹

(1. 重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)与藏花素联用对前列腺癌(prostate cancer, PCa)细胞 DU145 增殖的影响。**方法:**四甲基偶氮唑盐(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)法检测细胞增殖效应;克隆形成实验检测细胞克隆形成率;实时荧光定量 PCR、Western blot 法检测细胞周期调节因子 cyclinD1 及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达变化。**结果:**hepaCAM 过表达腺病毒与藏花素单独使用均能抑制 PCa 细胞 DU145 的增殖[48 h 抑制率分别为(12.0 ± 2.0)%, (22.0 ± 1.0)%],但两者联用比单独应用效果更加明显[48 h 抑制率为(54.0 ± 1.0)%, $P=0.000$]。Real-time PCR 结果显示, hepaCAM 过表达腺病毒及藏花素联合作用与藏花素单独使用相比, cyclinD1 mRNA 表达下调($P=0.048$);两者联合应用与 hepaCAM 过表达腺病毒或藏花素单独使用相比, PCNA mRNA 水平下调($P=0.047$, $P=0.006$)。Western blot 结果显示, 与单独使用 hepaCAM 过表达腺病毒或藏花素相比, 两者联用组 cyclinD1 蛋白表达明显降低($P=0.002$, $P=0.002$), 同时 PCNA 蛋白表达也降低($P=0.000$, $P=0.003$)。**结论:**hepaCAM 基因过表达腺病毒与藏花素联用对 PCa DU145 细胞增殖的抑制有明显的协同作用, 作用机制与下调 cyclinD1 和 PCNA 的表达有关。

【关键词】肝细胞黏附分子;藏花素;前列腺癌;细胞增殖**【中图分类号】**R737.25**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-12

Effects of hepaCAM combined with crocin on cell proliferation in prostate cancer cell line DU145

Wang Yin¹, Yang Xue¹, Wang Xiaorong¹, Wu Xiaohou², Chen E¹, Luo Chunli¹

(1. Key Laboratory of Clinical Diagnostics Founded by Ministry of Education, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University; 2. Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of hepatocyte cell adhesion molecule (hepaCAM) overexpression adenovirus combined with crocin on cell proliferation in prostate cancer cell line DU145. **Methods:** MTT assay was used to evaluate the effect of cell proliferation. Colony formation test was used to measure colony formation rate of single cell. Real-time quantitative PCR (qPCR) assay and Western blot were used to detect mRNA and protein expression of cyclinD1 and PCNA respectively. **Results:** After being treated with hepaCAM overexpression adenovirus or crocin alone, the proliferation of DU145 cell was inhibited [IR=(12.0 ± 2.0)%, (22.0 ± 1.0)%], but the effect was more remarkable when the cells being treated with hepaCAM overexpression adenovirus and crocin combined [IR=(54.0 ± 1.0)%, $P=0.000$]. Expression of cyclinD1 mRNA was down-regulated after being treated with hepaCAM overexpression adenovirus and crocin combined compared with being treated with crocin alone detected by qPCR ($P=0.048$), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA was down-regulated after being treated with hepaCAM overexpression adenovirus and crocin combined compared with being treated with hepaCAM overexpression adenovirus or crocin alone ($P=0.047$, $P=0.006$). Western blot showed that compared with hepaCAM group or crocin group, expression of cyclinD1 protein was down-regulated in hepaCAM and crocin combined group ($P=0.002$, $P=0.002$), meanwhile expression of PCNA protein was also down-regulated ($P=0.000$, $P=0.003$). **Conclusion:** hepaCAM overexpression adenovirus combined with crocin can inhibit cell proliferation of prostate cancer cell line DU145 and the mechanism is associated with down-regulation of cyclinD1 and PCNA expression.

【Key words】hepatocyte cell adhesion molecule; crocin; prostate cancer; cell proliferation

作者介绍: 王胤, Email: blairywang@gmail.com,

研究方向: 泌尿系统肿瘤的分子发生机制及干预措施。

通信作者: 罗春丽, Email: luochunli79@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81072086)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000302.html>

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是欧美发达国家中最常见的男性恶性肿瘤,病死率高^[1]。我国 PCa 在男性泌尿、生殖系统恶性肿瘤中发病率已跃居第 2 位,严重影响着我国 50 岁以上男性的健康与生活质量^[2]。目前临床常用治疗雄激素依赖性 PCa 的药物治疗策略为去势与抗雄激素治疗,发展为雄激素非依赖性 PCa 以后,激素治疗效果有限。因此,寻找新的治疗方法延长 PCa 患者的生存期是迫切需要解决的问题,其中基因靶向治疗及中药物治疗是人们比较关注的热点。研究表明:单独感染肝细胞黏附分子(hepatocyte cell adhesion molecule, hepaCAM)过表达腺病毒或加入藏花素都能在一定程度上抑制肿瘤细胞的增殖。但两者联合应用是否有协同作用,对肿瘤细胞增殖抑制效果是否会更加显著还未曾探究。基于此问题,本研究拟将过表达 hepaCAM 腺病毒与中药藏花素分别或协同作用于人 PCa 细胞 DU145,研究两者分别单独使用或联合应用对 DU145 细胞增殖的影响,探讨其调控细胞增殖机制,为基因靶向与中药联合治疗 PCa 奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

PCa DU145 细胞及 hepaCAM 过表达腺病毒(本课题组保存),DMEM/F12 培养基及胎牛血清(美国 Hyclone 公司),PBS(武汉博士德公司)、藏花素(美国 Sigma 公司),PCR 引物合成(英潍捷基贸易有限公司),RT-PCR 试剂盒、Trizol 及荧光定量 PCR 试剂盒(Takara 生物技术有限公司),hepaCAM 兔抗人多克隆抗体(ProteinTect 公司),cyclinD1、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)兔抗人多克隆抗体(eBioscience 公司),化学发光试剂盒(Amersham 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 藏花素溶液的配制 无菌条件下将 1 000 mg 藏花素与 62.5 mg 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(藏花素的稳定剂)溶解于 20 ml PBS(0.01 mol/L, pH=7.2)中,配制成浓度为 50 mg/ml(50 mmol/L)的储存液,4 ℃ 保存。临用时用 PBS 稀释为适当浓度。

1.2.2 细胞培养 人 PCa DU145 细胞(以下称 DU145 细胞)常规培养于 DMEM/F12 完全培养基(含 10%胎牛血清、100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素)中,于 37 ℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养,待细胞贴壁并长至瓶底的 80%~90%后以 0.25%胰酶消化吹打法传代。

1.2.3 筛选藏花素最佳作用浓度及时间 取对数生长期的 DU145 细胞,经 0.25%胰酶消化后接种于 96 孔板中,密度为 3 000 个/孔。37 ℃、5%CO₂ 恒温培养 24 h 后,分别给予 1、2、3、4、5 mmol/L 浓度的藏花素进行处理,每种浓度设 5 个复孔。另设对照组(未经藏花素处理)和调零组(不含细胞的培养液)。各组培养 24、48、72、96 h 后,分别加入四甲基偶氮唑

盐(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)(5 mg/ml) 20 μl,继续培养 4 h 后吸尽上清,每孔加入 150 μl 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),充分振荡 10 min,用全自动酶标仪在波长为 490 nm 处测定各孔吸光度(absorbance, A)值。细胞生长抑制率(inhibition ratio, IR)=[1-(A_{处理}-A_{调零})/(A_{对照}-A_{调零})]×100%。

1.2.4 MTT 法测定 DU145 细胞增殖活性 取对数生长期的 DU145 细胞,经 0.25%胰酶消化后接种于 96 孔板中,密度为 3 000 个/孔。37 ℃、5%CO₂ 恒温培养 24 h 后,分别给予 hepaCAM 基因过表达腺病毒 1 μl、藏花素(终浓度 1 mmol/L)、hepaCAM 基因过表达腺病毒 1 μl+藏花素(终浓度 1 mmol/L)处理,每个处理组设 5 个复孔,同时设置对照组(细胞未经任何处理)和调零组(不含细胞的培养液)。按常规方法操作后,用全自动酶标仪在波长为 490 nm 处测定各孔 A 值并计算细胞生长抑制率。

1.2.5 克隆形成实验 取对数生长期的 DU145 细胞,经 0.25%胰酶消化后以 400 个/孔的密度接种于 6 孔板中,37 ℃、5%CO₂ 恒温培养 24 h 后,分别给予 hepaCAM 过表达腺病毒 5 μl、藏花素(终浓度 1 mmol/L)、hepaCAM 过表达腺病毒 5 μl+藏花素(终浓度 1 mmol/L)处理,每个处理组设 3 个复孔,同时设置对照组(细胞未经任何处理)。连续培养 7 d 后换液,再继续培养 7 d(共计 14 d)。取出 6 孔板,弃掉上清液, PBS 清洗 5 min×3 次;每孔加入 1 ml 4%多聚甲醛固定 5 min; PBS 清洗 1 次;每孔加入 1 ml 结晶紫染色液染色 7 min; PBS 清洗 5 min×3 次;拍照并计数克隆形成数。克隆形成率=(克隆形成数/400)×100%。

1.2.6 Real-time PCR 检测 cyclinD1 和 PCNA mRNA 的表达 在 75 ml 培养瓶中常规培养 DU145 细胞。每 2 d 传代 1 次。传代后 24 h,挑选状态良好的 DU145 细胞,更换 DMEM/F12 培养基的同时,分别加入 hepaCAM 过表达腺病毒 10 μl、藏花素(终浓度 1 mmol/L)、hepaCAM 过表达腺病毒 10 μl+藏花素(终浓度 1 mmol/L),对照组细胞不作任何处理。继续于 37 ℃、5%CO₂ 恒温培养 48 h 后,Trizol 法提取总 RNA,逆转录为 cDNA。引物序列 β-actin:上游:5'-TGACG-TGGACATCCG-CAAAG-3',下游:5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3', 205 bp; hepaCAM:上游:5'-TACTGTAGATGTGCCCATTTCG-3',下游:5'-CTTCTGGTTTCAGGCGGTC-3', 461 bp; cyclinD1:上游:5'-GCTGGAGCCCCGTGAAAAGA-3',下游:5'-CTCCG-CCTCTGGCATTTCG-3', 247 bp; PCNA:上游:5'-CAGGGCT-CCATCCTCAAGAA-3',下游:5'-GGTAC-ATCTGCAGACA-TACT-3', 680 bp。扩增条件为:95 ℃ 3 min, 95 ℃ 10 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s 共 39 个循环, 72 ℃ 时采集荧光。根据仪器读取的 CT 值,采用 2^{-ΔΔCT} 法分析。

1.2.7 Western blot 检测 cyclinD1 和 PCNA 蛋白表达 按常规方法提取各处理组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。以 100 μg 蛋白上样量进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),湿转法将蛋白转自聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,1%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后加入 1:1 000 稀释兔抗人 cyclinD1、PCNA 多克隆抗体 4 ℃ 过夜; TBST 漂洗 5 min×3 次,加入 1:1 000 稀释的 HRP-羊抗兔

IgG 室温孵育 1 h; TBST 漂洗 5 min $\times$ 3 次, ECL 化学发光剂于暗室中曝光和显影。

1.3 统计学方法

应用统计软件 SPSS 17.0 进行数据处理, 计数资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 不同处理因素在不同时间对细胞抑制率的影响数据采用重复测量方差分析, 组间均数比较采用 SNK- q 法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结 果

2.1 筛选藏花素最佳作用浓度及时间

MTT 法结果显示, 藏花素对 PCa DU145 的生长具有抑制作用且随着作用浓度的增加及作用时间的延长抑制作用逐渐增强。在藏花素浓度为 1 mmol/L 作用 48 h 时, 已达到半

数抑制率 (52.49%), 延长作用时间并不能显著提高抑制率, 据此本实验选择浓度为 1 mmol/L 的藏花素作用 48 h 为后续实验的最佳作用浓度和时间 (表 1、表 2)。

2.2 单独与协同作用对不同处理组 DU145 细胞增殖调控的影响

MTT 结果显示, hepaCAM 过表达腺病毒及藏花素分别或联合作用于 DU145 细胞后发现: 尽管单独使用细胞明显受到抑制且随着时间的推移抑制率增加, 但两者联用应用对 DU145 细胞增殖抑制更加明显, 与单独使用比较差异有统计学意义 (表 3、表 4、图 1)。克隆形成实验显示, hepaCAM 过表达腺病毒及藏花素联用时克隆形成率为 $(6.5 \pm 0.9)\%$, 与对照组 [克隆形成率为 $(34.5 \pm 2.2)\%$] 相比克隆形成率降低明显 ($P=0.003$); 与单独使用 hepaCAM 基因过表达腺病毒组 [克隆形成率为 $(16.5 \pm 1.6)\%$] 或单独使用藏花素组 [克隆形成率为 $(13.8 \pm 0.7)\%$] 相比克隆形成率降低更明显 ($P=0.014$ 、 $P=0.003$) (图 2、图 3)。

表 1 藏花素对 DU145 细胞生长的影响

Tab.1 Effect of crocin on DU145 cell proliferation

组别	24 h		48 h		72 h		96 h	
	IR (%)	P 值 ^a	IR (%)	P 值 ^a	IR (%)	P 值 ^a	IR (%)	P 值 ^a
A	37.5 $\pm$ 2.6	—	52.5 $\pm$ 2.5	—	49.3 $\pm$ 1.4	—	53.8 $\pm$ 1.0	—
B	59.4 $\pm$ 5.8	0.166	75.7 $\pm$ 2.7	0.006	91.2 $\pm$ 2.2	0.001	96.3 $\pm$ 0.5	0.000
C	64.3 $\pm$ 2.7	0.004	81.4 $\pm$ 0.8	0.016	91.4 $\pm$ 2.6	0.002	97.2 $\pm$ 0.4	0.000
D	74.1 $\pm$ 2.0	0.001	84.2 $\pm$ 1.2	0.005	92.4 $\pm$ 1.3	0.000	97.5 $\pm$ 0.9	0.000
E	74.2 $\pm$ 1.2	0.004	91.7 $\pm$ 2.0	0.001	93.7 $\pm$ 1.1	0.000	98.0 $\pm$ 0.5	0.000

注: A~E 组藏花素浓度分别为 1、2、3、4、5 mmol/L; a, 同一时间点与 A 组比较; —, 无此项目

表 2 藏花素对 DU145 细胞生长影响资料重复测量方差分析结果

Tab.2 ANOVA for repeated measurement of data concerning the effect of crocin on DU145 cell proliferation

变异来源	SS	ν	MS	F 值	P 值
处理	1.357	4	0.339	597.734	0.000
时间	0.604	3	0.201	468.959	0.000
处理 $\times$ 时间	0.075	12	0.006	14.536	0.000
重复测量误差	0.013	30	0.000	—	—

表 3 各处理组中 DU145 细胞抑制率

Tab.3 DU145 cell inhibitory rate in each group

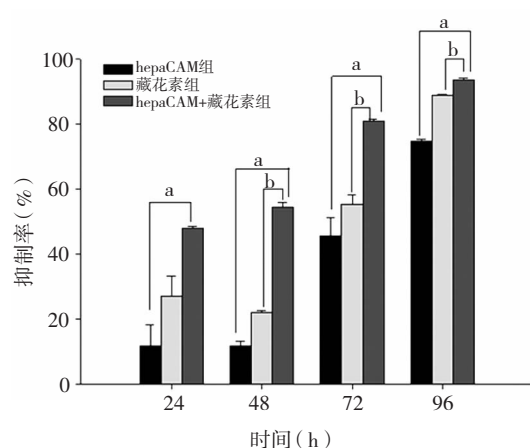
组别	hepaCAM IR (%)	P 值 ^a	藏花素 IR (%)	P 值 ^b	hepaCAM+藏花素 IR (%)
24 h	12.0 $\pm$ 6.0	0.030	27.0 $\pm$ 6.0	0.079	48.0 $\pm$ 0.0
48 h	12.0 $\pm$ 2.0	0.000	22.0 $\pm$ 1.0	0.000	54.0 $\pm$ 1.0
72 h	46.0 $\pm$ 6.0	0.023	55.0 $\pm$ 3.0	0.011	81.0 $\pm$ 1.0
96 h	75.0 $\pm$ 1.0	0.000	89.0 $\pm$ 0.0	0.001	94.0 $\pm$ 0.0

注: a, hepaCAM 组与 hepaCAM+ 藏花素组比较; b, 藏花素组与 hepaCAM+ 藏花素组比较

表 4 DU145 细胞抑制率资料重复测量方差分析结果

Tab.4 ANOVA for repeated measurement of data concerning the DU145 cell inhibitory rate in each group

变异来源	SS	ν	MS	F 值	P 值
处理	0.680	2	9.438	7 312.137	0.000
时间	2.029	3	0.676	694.907	0.000
处理 $\times$ 时间	0.075	6	0.013	12.861	0.000
重复测量误差	0.018	18	0.001	—	—



a, hepaCAM 组与 hepaCAM+ 藏花素组比较, $P < 0.05$;
b, 藏花素组与 hepaCAM+ 藏花素组比较, $P < 0.05$

图 1 MTT 法检测各处理组中 DU145 细胞抑制率

Fig.1 DU145 cell inhibitory rate in each group

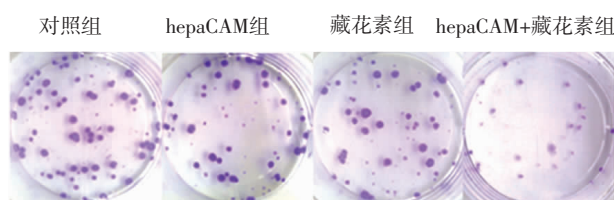
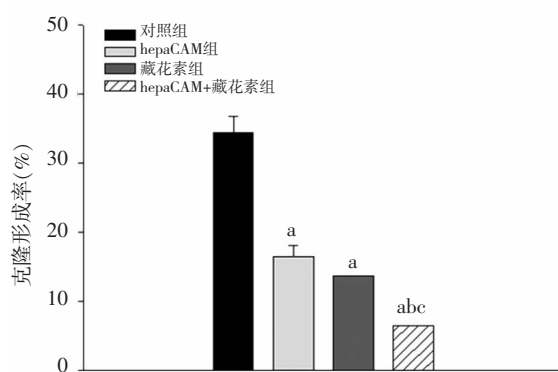


图 2 克隆形成实验结果

Fig.2 Results of colony formation test



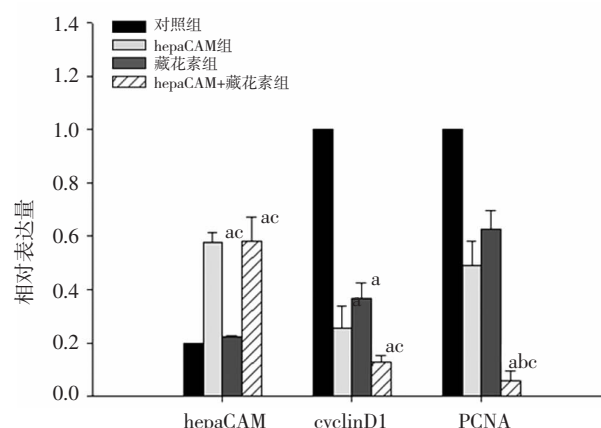
a, 与对照组比较, $P < 0.05$; b, 与 hepaCAM 组比较, $P < 0.05$;
c, 与藏花素组比较, $P < 0.05$

图 3 各组克隆形成率

Fig.3 Colony formation rate in each group

2.3 单独与协同作用对增殖相关基因 cyclinD1 及 PCNA mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示, cyclinD1 及 PCNA mRNA 在各组中均有表达, 与空白组相比较, hepaCAM 基因过表达腺病毒及藏花素联合组中 cyclinD1 mRNA 表达下调 (mRNA 相对表达量为 0.127 ± 0.02 , $q = -0.873$, $P = 0.002$), PCNA mRNA 表达下调 (mRNA 相对表达量为 0.059 ± 0.036 , $q = -0.941$, $P = 0.003$); 与 hepaCAM 基因过表达腺病毒组 (cyclinD1 mRNA 相对表达量为 0.254 ± 0.083 , PCNA mRNA 相对表达量为 0.490 ± 0.092) 相比, PCNA mRNA 表达下调 ($q = -0.431$, $P = 0.047$); 与藏花素组 (cyclinD1 mRNA 相对表达量为 0.368 ± 0.056 , PCNA mRNA 相对表达量为 0.628 ± 0.069) 相比, cyclinD1 mRNA 表达下调 ($q = -0.241$, $P = 0.048$), 同时 PCNA mRNA 表达也下调 ($q = -0.569$, $P = 0.006$), 差异均有统计学意义 (图 4)。



a, 与对照组比较, $P < 0.05$; b, 与 hepaCAM 组比较, $P < 0.05$;
c, 与藏花素组比较, $P < 0.05$

图 4 各组中不同 mRNA 的表达

Fig.4 Different mRNA expression in each group

2.4 单独与协同作用对增殖相关基因 cyclinD1 及 PCNA 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 与 hepaCAM 基因过表达腺病毒或藏花素分别单独作用 DU145 细胞相比, hepaCAM 基因过表达腺病毒及藏花素联合作用后, cyclinD1、PCNA 蛋白相对表达量明显降低 ($P < 0.05$) (表 5、图 5、图 6)。

表 5 各组中不同蛋白的表达水平

Tab.5 Different protein expression in each group

组别	hepaCAM	P 值	CyclinD1	P 值	PCNA	P 值
对照组	0.76 ± 0.05	0.002 ^a	1.52 ± 0.01	0.000 ^a	1.38 ± 0.01	0.000 ^a
hepaCAM	1.31 ± 0.04	0.657 ^b	0.96 ± 0.00	0.002 ^b	1.24 ± 0.01	0.000 ^b
藏花素	0.70 ± 0.06	0.002 ^c	0.90 ± 0.00	0.002 ^c	0.79 ± 0.01	0.003 ^c
hepaCAM+crocin	1.00 ± 0.29	—	0.65 ± 0.01	—	0.62 ± 0.00	—

注: a. 对照组与 hepaCAM+ 藏花素组比较; b. hepaCAM 组与 hepaCAM+ 藏花素组比较; c. 藏花素组与 hepaCAM+ 藏花素组比较; —, 无此项目

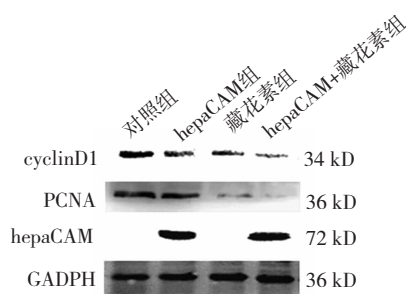


图 5 Western blot 检测各组中相关蛋白的表达

Fig.5 Protein expression in each group detected by Western blot

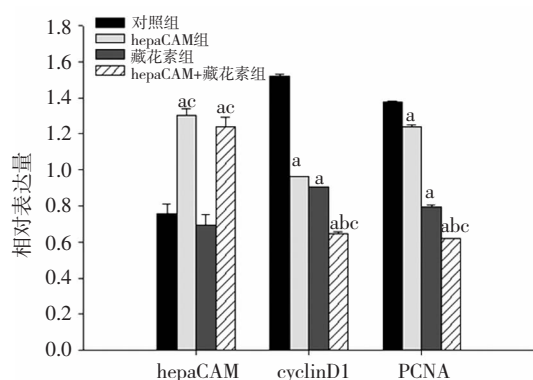
a, 与对照组比较, $P < 0.05$; b, 与 hepaCAM 组比较, $P < 0.05$;c, 与藏花素组比较, $P < 0.05$

图 6 各组中不同蛋白的表达

Fig.6 Different protein expression in each group

3 讨论

hepaCAM 是 2005 年 Moh 等^[3]从人类肝脏中分离定位于人类染色体 11q24 上新的抑癌基因,其编码产物为一类跨膜糖蛋白。研究表明,hepaCAM 在正常肝脏组织中呈高表达,在肝癌组织中呈低表达;转染野生型 hepaCAM 后有助于细胞与基质的黏附^[4]。hepaCAM 在膀胱癌中呈低表达,伴随着血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达升高,转染野生型 hepaCAM 使其过表达后,VEGF 的表达明显下降且膀胱癌细胞 T24 的增殖明显受到抑制^[5];hepaCAM 与膀胱癌患者组织中 mTOR 的高磷酸化相关,并能通过 AMPK/mTOR 通路抑制膀胱癌细胞的增殖^[6];hepaCAM 还能通过下调 P21 的表达等一系列通路使膀胱癌细胞 BIU-87 的增殖能力减弱^[7-8]。在肾癌中,hepaCAM 的表达也明显降低,转染 hepaCAM 基因后,可使肾癌细胞 7860 及 RC-2 阻滞在 G0/G1 期,细胞的增殖能力减弱,这与其 hepaCAM 在转录后水平调节下调 c-myc 的表达有关^[9-10]。在乳腺癌细胞中 hepaCAM 不仅可以抑制细胞生长,

还可通过 P53/21 通路诱导细胞衰老^[11]。hepaCAM 还与恶性胶质瘤细胞 U373-MG 的分化相关,细胞的分化程度随着 hepaCAM 表达量的升高而趋于显著,且高表达的 hepaCAM 能抑制胶质瘤细胞的增殖^[12]。以上研究表明,hepaCAM 能抑制多种肿瘤细胞的增殖。

藏花素是藏红花的主要活性成分之一,属于类胡萝卜素类化合物,分子式为 $C_{44}H_{64}O_{24}$ 。我国传统医学认为藏红花性味甘平、能活血化瘀、解郁开结,大量实验也证实其具有抗心肌缺血、调节血脂、抗动脉粥样硬化等广泛的药理作用^[13-14]。近年来研究发现藏花素还具有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡进而抗肿瘤形成的作用^[15-16]。藏花素可以通过调控 PI3K/AKT 通路减少视网膜缺血/再灌注引起的视网膜神经节细胞凋亡^[17]。在人白血病细胞 HL-60 中,加入藏花素可使细胞的增殖能力减弱、凋亡增多,减弱或增多的程度呈浓度、时间依赖性;用 HL-60 细胞异种移植裸鼠致瘤后,注射不同剂量的藏花素可使肿瘤的重量减轻、体积减小以及肿瘤组织中 Bcl-2 表达下降、Bax 表达上升^[18]。在肝癌细胞 HepG2 中,藏花素可通过抑制端粒酶和 hTERT 抑制细胞增殖^[19]。在口腔鳞癌细胞 Tca8113 中,藏花素能抑制其细胞增殖与核酸合成,并显著诱导细胞的早期及晚期凋亡增加^[20];藏花素能在细胞及小鼠体内实验中抑制道尔顿淋巴瘤的生长^[21]。本课题组前期研究也证实了藏花素能抑制膀胱癌的增殖^[22],以上研究也充分证明了藏花素抗肿瘤效应。

cyclinD1 是 1991 年发现的细胞周期蛋白,含 295 个氨基酸,由染色体 11q13 上的 CCND1 (PRAD1) 基因编码,在静止细胞中不表达。它是细胞增殖的正性调控因子,正常情况下 cyclinD1 在 G1 期是稳定的,在促丝裂信号刺激下合成增多,通过 p16-cyclinD1-CDK4-Rb 途径,导致细胞周期中的 G1 期缩短,引起 S 期进程相关基因转录,细胞分裂速度加快,在肿瘤的发生发展过程中起着重要作用。cyclinD1 在研究甲状腺癌时被发现,近年来越来越多的研究发现其与子宫内膜癌、膀胱癌、胆囊癌等多种肿瘤具有相关性^[23-25]。PCNA 存在于正常增殖细胞及肿瘤细胞内,作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白直接参与 DNA 合成复制,在细胞增殖的启动上起重要作用,是反应细胞增殖状态的良好指标^[26]。PCNA 在细胞周期由 G1 期向 S 期转化时发生磷酸化,激活 DNA 复制因子,促进细胞增殖,属于细胞周期调控的始动因素。研究表明,PCNA 异常表达于多种恶性肿瘤,其表达强度与肿瘤恶性程度和预后密切相关,抑

制 PCNA 异常表达可阻滞恶性肿瘤的无限增殖^[27]。上述 2 种分子在许多肿瘤中都呈高表达且都与细胞增殖密切相关^[28-29],检测 cyclinD1 与 PCNA 的表达可以反映细胞的增殖情况。

本实验结果表明,hepaCAM 过表达腺病毒与藏花素联用能通过下调 cyclinD1、PCNA 的表达抑制 PCa 细胞 DU145 增殖,抑制作用强于 hepaCAM 过表达腺病毒或藏花素单独使用,其具体作用机制及能否应用于临床还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008[J]. CA Cancer J Clin, 2008, 58(2): 71-96.
- [2] 宋琳衍. 我国前列腺癌的诊断与治疗最新近况[J]. 中国医药指南, 2012, 10(36): 50-52
- [3] Moh MC, Lee LH, Shen S, et al. Cloning and characterization of hepaCAM, a novel Ig-like cell adhesion molecule suppressed in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2005, 42(6): 833-841.
- [4] Moh MC, Tian Q, Zhang T, et al. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM modulates cell adhesion and motility through direct interaction with the actin cytoskeleton[J]. J Cell Physiol, 2009, 219(2): 382-391.
- [5] Yang S, Wu X, Luo C, et al. Expression and clinical significance of hepaCAM and VEGF in urothelial carcinoma[J]. World J Urol, 2010, 28(4): 473-478.
- [6] Wang Q, Luo C, Wu X, et al. hepaCAM and p-mTOR closely correlate in bladder transitional cell carcinoma and hepaCAM expression inhibits proliferation via an AMPK/mTOR dependent pathway in human bladder cancer cells[J]. J Urol, 2013, 190(5): 1912-1918.
- [7] He Y, Wu X, Luo C, et al. Functional significance of the hepaCAM gene in bladder cancer[J]. BMC Cancer, 2010(10): 83.
- [8] Xu B, He Y, Wu X, et al. Exploration of the correlations between interferon- γ in patient serum and HEPACAM in bladder transitional cell carcinoma, and the interferon- γ mechanism inhibiting BIU-87 proliferation[J]. J Urol, 2012, 188(4): 1346-1353.
- [9] Zhang QL, Luo CL, Wu XH, et al. HepaCAM induces G1 phase arrest and promotes c-Myc degradation in human renal cell carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(10): 2910-2919.
- [10] Xun C, Luo C, Wu X, et al. Expression of hepaCAM and its effect on proliferation of tumor cells in renal cell carcinoma[J]. Urology, 2010, 75(4): 828-834.
- [11] Moh MC, Zhang T, Lee LH, et al. Expression of hepaCAM is down-regulated in cancers and induces senescence-like growth arrest via a p53/p21-dependent pathway in human breast cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2008, 29(12): 2298-2305.
- [12] Lee LH, Moh MC, Zhang T, et al. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule hepaCAM induces differentiation of human glioblastoma U373-MG cells[J]. J Cell Biochem, 2009, 107(6): 1129-1138.
- [13] Razavi BM, Hosseinzadeh H, Movassaghi AR, et al. Protective effect of crocin on diazinon induced cardiotoxicity in rats in subchronic exposure[J]. Chem Biol Interact, 2013, 203(3): 547-555.
- [14] Shirali S, Zahra Bathaie S, Nakhjavani M. Effect of crocin on the insulin resistance and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Phytother Res, 2013, 27(7): 1042-1047.
- [15] Li CY, Huang WF, Wang QL, et al. Crocetin induces cytotoxicity in colon cancer cells via p53-independent mechanisms[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8): 3757-3761.
- [16] Xu HJ, Zhang KP, Zhong R, et al. Influence of crocin on proliferation in vitro and function of dendritic cells derived from bone marrow of children with acute leukemia[J]. Journal of Experimental Hematology, 2012, 20(1): 57-61.
- [17] Qi Y, Chen L, Zhang L, et al. Crocin prevents retinal ischaemia/reperfusion injury-induced apoptosis in retinal ganglion cells through the PI3K/AKT signalling pathway[J]. Exp Eye Res, 2013(107): 44-51.
- [18] Sun Y, Xu HJ, Zhao YX, et al. Crocin exhibits antitumor effects on human leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013(2013): 690164.
- [19] Nourini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(5): 2305-2309.
- [20] Sun J, Xu XM, Ni CZ, et al. Crocin inhibits proliferation and nucleic acid synthesis and induces apoptosis in the human tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(10): 2679-2683.
- [21] Bakshi HA, Sam S, Feroz A, et al. Crocin from Kashmiri saffron (Crocus sativus) induces in vitro and in vivo xenograft growth inhibition of Dalton's lymphoma (DLA) in mice[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2009, 10(5): 887-890.
- [22] Zhao P, Luo CL, Wu XH, et al. Proliferation apoptotic influence of crocin on human bladder cancer T24 cell line[J]. China J Chin Mater Med, 2008, 33(15): 1869-1873.
- [23] Liang S, Mu K, Wang Y, et al. CyclinD1, a prominent prognostic marker for endometrial diseases[J]. Diagn Pathol, 2013(8): 138.
- [24] Seiler R, Thalmann GN, Rotzer D, et al. CCND1/CyclinD1 status in metastasizing bladder cancer: a prognosticator and predictor of chemotherapeutic response[J]. Mod Pathol, 2014, 27(1): 87-95.
- [25] Srivastava V, Patel B, Kumar M, et al. Cyclin D1, retinoblastoma and p16 protein expression in carcinoma of the gallbladder[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(5): 2711-2715.
- [26] Nguyen HD, Bielinsky AK. HDM2 ERKs PCNA[J]. J Cell Biol, 2010, 190(4): 487-489.
- [27] Dirim A, Haberal AN, Goren MR, et al. VEGF, COX-2, and PCNA expression in renal cell carcinoma subtypes and their prognostic value[J]. Int Urol Nephrol, 2008, 40(4): 861-868.
- [28] Liu W, Ren H, Ren J, et al. The role of EGFR/PI3K/Akt/cyclinD1 signaling pathway in acquired middle ear cholesteatoma mediators[J]. Inflamm, 2013, 2013: 651207.
- [29] Chandrasekaran P, Jakkula LU, Ahmed I, et al. Differential Effects of β -catenin and NF- κ B Interplay in the regulation of cell proliferation, inflammation and tumorigenesis in response to bacterial infection[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79432.

(责任编辑:唐宗顺)