

多西紫杉醇联合二烯丙三硫协同诱导前列腺癌细胞凋亡的研究

毛晓鹏, 陈俊星, 莫承强, 庄锦涛, 丘少鹏*
(中山大学附属第一医院泌尿外科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨多西紫杉醇联合二烯丙三硫(DATS)对前列腺癌 PC-3 细胞的协同杀伤效应及其机制。【方法】PC-3 细胞接种 96 孔板, 分别给予多西紫杉醇(5 ~ 60 nmol/L)和 DATS(5 ~ 60 μ mol/L)单药处理 24、48、72 h; 联合用药采用 15 μ mol/L DATS 联合不同浓度多西紫杉醇(5 ~ 60 nmol/L)处理 48 h。MTT 法检测多西紫杉醇和(或)DATS 对 PC-3 细胞生长的影响。DAPI 染色、流式细胞仪检测多西紫杉醇、DATS 及二者联合对 PC-3 细胞凋亡和细胞周期的影响; Western-blot 测定 Bcl-2、Bax、Bcl-xL/xS 及细胞色素 C、caspase-9、caspase-3 的表达及活性变化。【结果】多西紫杉醇、DATS 均能抑制 PC-3 细胞的生长, DATS 可明显提高多西紫杉醇的杀伤效应, DATS(15 μ mol/L)联合多西紫杉醇(10 nmol/L)作用 48 h 的细胞生存率为(50.1 \pm 1.0)%, 低于多西紫杉醇(67.4 \pm 1.0)%和 DATS(69.2 \pm 1.8)%, 二者具有协同抑瘤作用; 联合组使细胞凋亡率及 G₂/M 期细胞比率明显增高, 并更能显著抑制 Bcl-2、Bcl-xL 的表达, 而且联合组使细胞色素 C 的释放及 caspase-9、caspase-3 的裂解活化时间提前了 8 h。【结论】多西紫杉醇及 DATS 共同诱导细胞凋亡是二者发挥协同效应抑制前列腺癌细胞生长的重要机制, 其可能与细胞周期阻滞、Bcl-2、Bcl-xL 的表达降低、细胞色素 C 的释放及 caspase-9、caspase-3 的活性变化有关。

关键词: 前列腺癌; 凋亡; 多西紫杉醇; 二烯丙三硫

中图分类号: R737.25 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2012)06-0728-05

Synergetic Cell Apoptotic Effect Induced by Docetaxel Combined with Diallyl Trisulfide in Prostate Cancer Cells

MAO Xiao-peng, CHEN Jun-xing, MO Cheng-qiang, ZHUANG Jin-tao, QIU Shao-peng*
(Department of Urology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the killing effect of docetaxel combined with diallyl trisulfide (DATS) in prostate cancer cell line PC-3 and further to determine the mechanism. 【Methods】PC-3 cells were treated with various concentrations of docetaxel or (and) DATS. Cell viability was estimated using MTT assay. Apoptotic cells were detected following staining with DAPI. The percentage of sub G1 and cell cycle were confirmed by flow cytometry. Protein levels of apoptosis regulating proteins were determined using Western bolt including Bcl-2, Bax, Bcl-xL/xS, cytochrome c, caspase-9, and caspase-3. 【Results】Docetaxel or DATS alone could inhibit the proliferation of PC-3 cells. For combination group, the cell viability was decreased to (50.1 \pm 1.0)% to compare with (67.4 \pm 1.0)% of docetaxel at 10 nmol/L and (69.2 \pm 1.8)% of DATS at 15 μ mol/L separately and there was a synergistic effect between these two drugs. Apoptotic rate and the cell number in S-phase and G-phase of the combination group were higher than other two drugs. The combination treatment could significantly reduce the Bcl-2, Bcl-xL expression and promote the release of cytochrome c and the cleavage of caspase-9 and caspase-3. 【Conclusion】The combination of docetaxel with DATS can inhibit the proliferation of prostate cancer cells congenously by inducing apoptosis, which may be correlated with S-and G₂-phase arrest, the down-regulation of Bcl-2, Bcl-xL, the release cytochrome c and the activation of caspase-9 and caspase-3.

Key words: prostate neoplasm; apoptosis; docetaxel; diallyl trisulfide

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 728-732]

收稿日期: 2012-06-06

基金项目: 国家自然科学基金(81001146;30872584); 教育部新教师基金(20090171120062); 中央高校基本科研业务费专项资金(11ykpy21)

作者简介: 毛晓鹏, 泌尿外科科学博士, 讲师、主治医师, 研究方向: 泌尿系肿瘤, E-mail: maomao197980@yahoo.cn; * 通信作者: 丘少鹏, 教授, 博士生导师, E-mail: qiushp@mail.sysu.edu.cn

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是男性泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,目前对于晚期或激素难治性前列腺癌仍缺乏有效的治疗方法^[1-2]。多西紫杉醇是目前治疗晚期或激素难治性前列腺癌的重要化疗药物,以其为基础的化疗方案可以延长 PCa 患者的生存时间^[3]。有研究表明,多西紫杉醇联合其他抗肿瘤药物可通过加速肿瘤细胞凋亡而发挥抑制 PCa 细胞生长的协同效应,并证实 Bcl-2 等凋亡相关蛋白的表达在其中发挥了重要的调控作用^[3-5]。二烯丙三硫(diallyl trisulfide, DATS)是大蒜中主要的烯丙基有机硫化物,有研究表明 DATS 也可以通过影响 Bcl-2 家族中凋亡相关蛋白的表达而抑制 PCa 细胞的生长和诱导其凋亡^[6-8]。DATS 与多西紫杉醇是否可以通过共同诱导细胞凋亡而发挥协同抑瘤作用尚不明了,因此本文将从细胞凋亡角度探讨多西紫杉醇联合 DATS 对 PCa 细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

多西紫杉醇、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)购自 Sigma 公司;DATS 购于上海禾丰制药有限公司;MTT 试剂盒购于 Roche 公司;Cytobuster™ 蛋白抽提试剂、细胞浆蛋白分离抽提试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒为 Novagen 公司产品;Bcl-2, Bax, Bcl-xL/Bcl-xS 鼠源性单抗购于 Zymed 公司;细胞色素 C(cytochrome c)、caspase-9、caspase-3 鼠源性单抗为 Santa Cruz 公司产品;ECL 发光试剂盒购于 PIERCE 公司;前列腺癌细胞株 PC-3 由本实验室保存。细胞于含 100 mL/L 胎牛血清(Hyclone)的 RMPI 1640 培养液(Gibco) 37 ℃、体积分数 5% CO₂ 条件下常规培养。

1.2 测定多西紫杉醇、DATS 及两者联合对 PC-3 细胞的杀伤作用

PC-3 细胞以 3.0×10^3 /孔接种 96 孔板,分别给予药物进行处理。单独用药组:多西紫杉醇组:0、5、10、20、30、60 nmol/L 多西紫杉醇处理细胞 24、48、72 h;DATS 组:0、5、10、20、30、60 μ mol/L DATS 处理细胞 24、48、72 h;联合用药组:15 μ mol/L DATS 联合 5~60 nmol/L 多西紫杉醇处理 48 h。MTT 法测定加药后不同时间的吸光度 $D(570 \text{ nm})$,计算细胞存活率。细胞存活率(%)=

药组活细胞 D 值/对照组活细胞 D 值 $\times 100\%$ 。以细胞数减少 50% 的药物浓度确定多西紫杉醇和 DATS 的 IC_{50} 。

1.3 细胞凋亡检测

1.3.1 细胞凋亡率及细胞周期检测 实验分为 4 组:①阴性对照组:未加药物处理,②多西紫杉醇组:加 IC_{50} 多西紫杉醇,③DATS 组:加 IC_{50} DATS,④多西紫杉醇+DATS 组: IC_{50} 多西紫杉醇+ IC_{50} DATS。各组作用 48 h 后,收集细胞,PBS 冲洗,离心,用 700 mL/L 乙醇固定过夜后流式细胞仪(FCM)行 subG1 期细胞比率和细胞周期分析。重复 3 次。

1.3.2 DAPI 染色 各组作用 48 h 后,用 40 g/L 多聚甲醛液固定细胞,PBS 冲洗,用 10 μ g/mL DAPI 染色,在放大 200 倍的荧光显微镜下检测凋亡细胞,DAPI 染色后细胞核浓缩和碎裂的细胞为阳性细胞。

1.4 Western blot 检测凋亡相关蛋白

各组作用 48 h 后,用预冷的 Cytobuster™ 裂解细胞并分离上清。BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印 PVDF 膜,50 g/L 脱脂奶粉封闭,用 Bcl-2、Bax、Bcl-xL/xS 鼠源性单抗孵育 PVDF 膜 4 ℃ 过夜,羊抗鼠二抗处理 PVDF 膜,ECL 发光液显影、曝光。另外,多西紫杉醇、多西紫杉醇联合 DATS 作用 0、16、24、48 h,按试剂盒说明书提取细胞总蛋白及胞浆蛋白,Western blot 检测胞浆蛋白中 cytochrome C 的释放及总蛋白中 caspase-9、caspase-3 的变化。用 α -tubulin 的表达作为内参。条带密度用 Image-ProPlus 6.0 软件分析。重复 3 次。

1.5 统计分析

计量资料描述采用均数 \pm 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$),应用 SPSS 13.0 统计软件分析,两组均数的比较采用 t 检验,多组均数的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。药物的 IC_{50} 采用 SPSS13.0 统计软件中的剂量-效应关系分析(Probit)方法计算。中效原理^[9]分析得出药物联合作用指数(CI),评价两种药物的协同作用,CI < 1 认为两种药物具有协同作用。CI 的计算公式:CI = $c_1/cx_1 + c_2/cx_2 + c_1c_2/cx_1cx_2$, c_1 和 c_2 是两种药物联合作用的抑制率达到 $x\%$ 时的药物 1 和药物 2 的药物浓度; cx_1 代表药物 1 单独作用的抑制率达到 $x\%$ 时的药物浓度, cx_2 则代表药物 2 单独作用的抑

制率达到 $x\%$ 时的药物浓度。

2 结果

2.1 多西紫杉醇、DATS 及二者联合对 PC-3 细胞的杀伤作用

多西紫杉醇(图 1A)、DATS(图 1B)单独使用均能抑制 PC-3 细胞的生长,两种药物的细胞毒性呈浓度和时间依赖性。多西紫杉醇作用 72 h 的 IC_{50} 为

12 nmol/L; DATS 作用 72 h 的 IC_{50} 为 14 μ mol/L。

DATS (15 μ mol/L) 联合多西紫杉醇 (5 ~ 60 nmol/L) 处理细胞 48 h, 与相应浓度的多西紫杉醇单独用药相比, 细胞生存率明显降低 ($P < 0.05$; 图 1C)。DATS (15 μ mol/L) 联合多西紫杉醇 (10 nmol/L) 的细胞存活率 ($50.1 \pm 1.0\%$) 显著低于多西紫杉醇 ($67.4 \pm 1.0\%$) 和 DATS ($69.2 \pm 1.8\%$) 单独用药组 ($P < 0.05$), 中效原理分析两者具有协同作用 ($CI = 0.45$)。

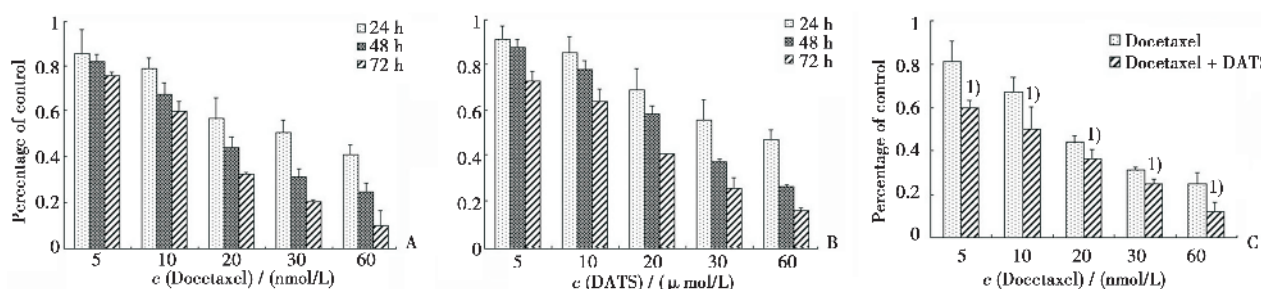


图 1 多西紫杉醇、DATS 及二者联合对 PC-3 细胞的杀伤作用

Fig.1 Growth inhibition of docetaxel, DATS and docetaxel plus DATS

A: Cells were treated with docetaxel (5 ~ 60 nmol/L) at 24, 48, 72 h; B: Cells were treated with DATS (5 ~ 60 μ mol/L) at 24, 48, 72 h; C: Cells were treated with docetaxel (5 ~ 60 nmol/L) plus DATS (15 μ mol/L) at 48 h.

2.2 细胞凋亡

各药物组处理 PC-3 细胞 48 h 后, FCM 分析显示, 与对照组相比, 多西紫杉醇、DATS 及多西紫杉醇联合 DATS 均可以使 G_2/M 期细胞比率增加, 但联合组的 G_2/M 期细胞比率为 ($41.4 \pm 2.7\%$), 明显高于多西紫杉醇 ($20 \pm 2\%$) 和 DATS ($17 \pm 2\%$) 单独用药组 ($P < 0.05$)。多西紫杉醇组、DATS 组的 sub-G1 期细胞比率分别为 ($23.7 \pm 5.6\%$), ($22 \pm 2\%$), 而与单独用药组相比, 多西紫杉醇联合 DATS 组的 sub-G1 期细胞比率 ($44.8 \pm 6.1\%$) 明显增多 ($P < 0.05$; 图 2)。

DAPI 染色分析显示, 与阴性对照组相比, 多西紫杉醇、DATS 及多西紫杉醇联合 DATS 处理组均能观察到增多的凋亡阳性细胞, 细胞核出现浓缩和破碎(图 3 A-D)。

2.3 Bcl-2, Bax, Bcl-xL/xS, cytochrome C, caspase-9, caspase-3 的蛋白表达变化

与对照组相比, 多西紫杉醇、DATS 及多西紫杉醇联合 DATS 作用 48 h 后, 均能降低 Bcl-2、Bcl-xL 的表达, 与单独用药组相比, 联合组更能显著降低 Bcl-2 ($P < 0.05$)、Bcl-xL ($P < 0.05$) 的表达(图 4); 各组的 Bax、Bcl-xS 蛋白表达未见明显变

化(图 4)。多西紫杉醇、多西紫杉醇联合 DATS 作用 0、16、24、48 h, 联合组在 16 h 就可以检测到 cytochrome C 的释放及 caspase-9、caspase-3 的裂解, 时间上早于多西紫杉醇组的 24 h, 表明多西紫杉醇联合 DATS 加速了 cytochrome C 的释放及 caspase-9、caspase-3 的裂解, 见图 5。

3 讨论

以多西紫杉醇为基础的联合化疗是唯一被证实为可以延长前列腺癌(PCa)患者生存期的有效方案^[3]。目前研究认为多西紫杉醇的作用机制主要包括: ①通过抑制 Bcl-2、Bcl-xL 蛋白, 诱导细胞凋亡; ②阻止微管解聚, 稳定微管, 从而使有丝分裂过程停滞, 细胞被阻滞在 G_2/M 期, 进而导致细胞凋亡。因此, 有研究报导将针对上述靶点的抗肿瘤药物与多西紫杉醇联合可以获得协同抑制前列腺癌细胞生长的良好效果^[10-11]。大蒜中的活性成分二烯丙三硫(DATS)也可以通过诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞来抑制肿瘤细胞的生长^[6-8]。目前尚未有多西紫杉醇联合 DATS 治疗前列腺癌的研究报导。本研究结果显示多西紫杉醇或 DATS 均

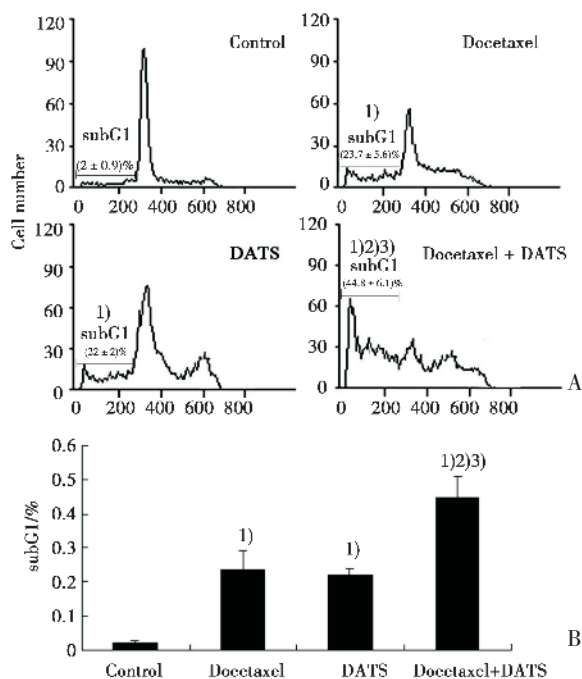


图 2 多西紫杉醇、DATS 及二者联合对 subG1 的影响

Fig.2 Effect of docetaxel, DATS and docetaxel plus DATS on subG1 population

A: Flow cytometric assay. The subG1 population appeared in cells exposed to docetaxel (12 nmol/L), DATS (14 μmol/L) and docetaxel plus DATS at 48 h. B: The percentage of subG1 were indicated in cells exposed to docetaxel, DATS and docetaxel plus DATS at 48 h. 1) compared with control, $P < 0.05$; 2) compared with docetaxel group, $P < 0.05$; 3) compared with DATS group, $P < 0.05$.

可以抑制 PCa 细胞的生长, 而且 DATS 可以使多西紫杉醇的抑瘤效果明显增强, 中效原理分析证实二者可发挥协同效应, 提高彼此对 PCa 细胞的杀伤作用。凋亡是抗肿瘤药物杀伤肿瘤细胞的重要机制之一, sub G1 期凋亡峰的出现、核浓缩、核碎裂等都是凋亡的典型特征^[8]。因此本实验通过进一步研究发现多西紫杉醇、DATS 及二者联合均可诱导 PCa 细胞发生凋亡, 但联合组的细胞凋亡率最高, 表明 DATS 使多西紫杉醇诱导细胞凋亡的作用明显增强, 因此本研究认为共同诱导细胞凋亡可能是二者发挥协同抑瘤效应的重要机制。

细胞周期阻滞是抗肿瘤药物抑制肿瘤细胞生长分化的机制之一, 其中 G₂/M 期阻滞与凋亡关系密切。我们在实验中发现多西紫杉醇或 DATS 均可以使 G₂/M 期细胞增多, 这与其他学者的研究结果类似^[11-12], 而本实验还发现与单独用药组相比, 多西紫杉醇联合 DATS 组可以使更多的细胞阻滞

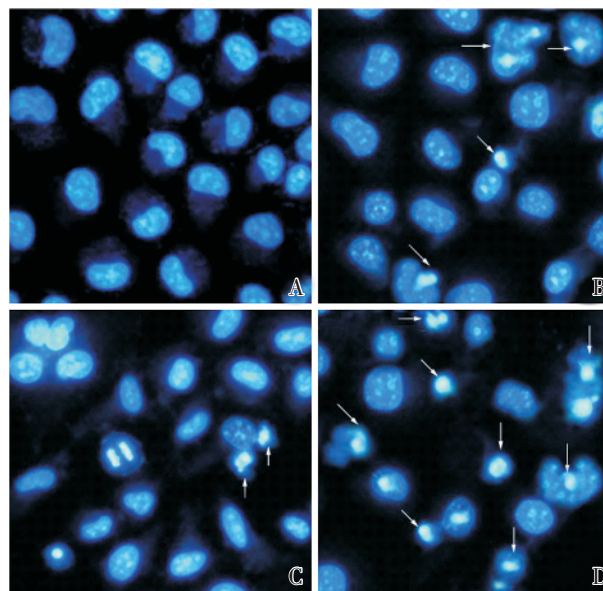


图 3 DAPI 染色检测多西紫杉醇、DATS 及二者联合诱导细胞凋亡

Fig.3 Apoptosis induced by docetaxel, DATS and docetaxel plus DATS

The apoptotic cells are indicated by arrows. A: Negative control; B: docetaxel group; C: DATS group; D: docetaxel plus DATS group; × 200.

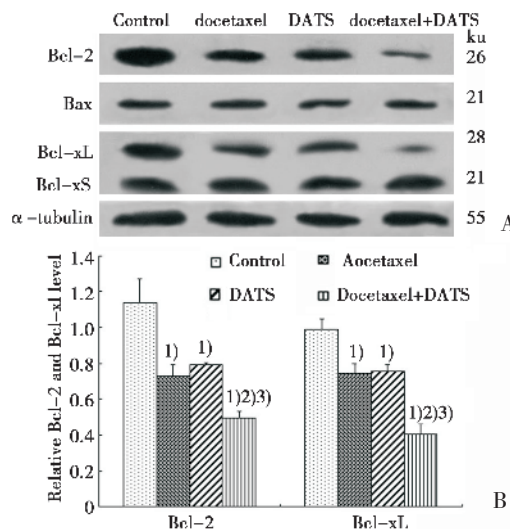


图 4 多西紫杉醇、DATS 及二者联合作用后 Bcl-2, Bax, Bcl-xL/xS 表达变化

Fig.4 Expression of Bcl-2, Bax, Bcl-xL/xS after docetaxel, DATS and docetaxel plus DATS treatment

A: Bcl-2, Bax, Bcl-xL/xS expression. B: Relative level of Bcl-2 and Bcl-xL; 1) compared with control, $P < 0.05$; 2) compared with docetaxel group, $P < 0.05$; 3) compared with DATS group, $P < 0.05$.

在 G₂/M 期, 提示 DATS 可能是通过提高多西紫杉醇的细胞周期阻滞能力, 从而使 PCa 细胞更易发

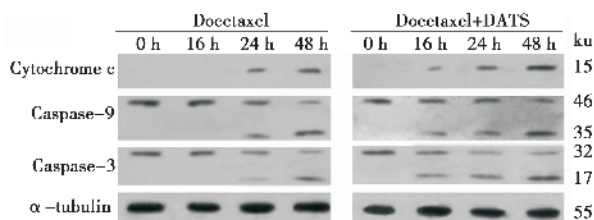


图 5 多西紫杉醇、多西紫杉醇联合 DATS 作用后细胞色素 C 的释放及 caspase-9、caspase-3 的裂解

Fig.5 The release of cytochrome c and the cleavage of caspase-9 and caspase-3 after docetaxel and docetaxel plus DATS treatment

生凋亡。

抗肿瘤药物诱导细胞凋亡的重要通路之一是通过线粒体途径,从细胞色素 C 的释放、caspase-9 的裂解到最终激活凋亡执行分子 caspase-3 从而促使细胞发生凋亡,而 Bcl-2 家族蛋白对这种凋亡途径起着至关重要的调节作用,并且是调控肿瘤化疗抗性的潜在分子靶点。本研究发现,与多西紫杉醇单独作用相比,多西紫杉醇联合 DATS 使细胞色素 C 的释放时间及 caspase-9、caspase-3 的裂解时间提前了 8 h,提示多西紫杉醇联合 DATS 可加速诱导 PCa 细胞发生凋亡。另外,我们还发现多西紫杉醇、DATS 及二者联合均可抑制 Bcl-2、Bcl-xL 的蛋白表达,联合组的这种抑制效果明显高于单独用药组,而 Bcl-2、Bcl-xL 属于 Bcl-2 家族中的凋亡抑制蛋白,表明多西紫杉醇联合 DATS 可通过共同抑制 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达而促进 PCa 细胞发生凋亡。

我们分析多西紫杉醇与 DATS 协同抑制 PCa 细胞生长的可能机制有:①两者均可使细胞周期阻滞在 G₂/M 期,从而使 PCa 细胞更易发生凋亡;②两者联合可协同抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xL 的表达,增强 PCa 细胞对化疗药物的敏感性,同时促进了线粒体凋亡通路上关键分子的活化,进而加速了 PCa 细胞的凋亡。虽然本研究证实上述可能是多西紫杉醇与 DATS 协同抑制 PCa 细胞生长的机制之一,然而其机制可能还与其他信号通路有关,我们在未来的工作中将进一步深入二者发挥协同作用的机制探讨。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics,

2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.

- [2] Marech I, Vacca A, Ranieri G, et al. Novel strategies in the treatment of castration-resistant prostate cancer [J]. Int J Oncol, 2012, 40(5): 1313-1320.
- [3] Berthold DR, Pond GR, Soban F, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(2): 242-245.
- [4] Bassoy EY, Baran Y. Bioactive sphingolipids in docetaxel-induced apoptosis in human prostate cancer cells [J]. Biomed Pharmacother, 2012, 66(2): 103-110.
- [5] Makhov P, Kutikov A, Golovine K, et al. Docetaxel-mediated apoptosis in myeloid progenitor TF-1 cells is mitigated by zinc: potential implication for prostate cancer therapy [J]. Prostate, 2011, 71(13): 1413-1419.
- [6] 郝建伟, 丘少鹏, 毛晓鹏, 等. 二烯丙三硫抑制人前列腺癌细胞生长 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2010, 30(2): 186-189; 194.
- [7] Chen M, Li B, Zhao X, et al. Effect of diallyl trisulfide derivatives on the induction of apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 363(1-2): 75-84.
- [8] Kim SH, Bommarreddy A, Singh SV, et al. Garlic constituent diallyl trisulfide suppresses x-linked inhibitor of apoptosis protein in prostate cancer cells in culture and in vivo [J]. Cancer Prev Res, 2011, 4(6): 897-906.
- [9] Nakagawa, H, Tsuta K, Kiuchi K, et al. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines [J]. Carcinogenesis, 2001, 22(6): 891-897.
- [10] Henry JY, Lu L, Adams M, et al. Lenalidomide enhances the anti-prostate cancer activity of docetaxel in vitro and in vivo [J]. Prostate, 2012, 72(8): 856-867.
- [11] Reiner T, de las Pozas A, Gomez LA, et al. Low dose combinations of 2-methoxyestradiol and docetaxel block prostate cancer cells in mitosis and increase apoptosis [J]. Cancer Lett, 2009, 276(1): 21-31.
- [12] Herman-Antosiewicz A, Kim YA, Kim SH, et al. Diallyl trisulfide-induced G₂/M phase cell cycle arrest in DU145 cells is associated with delayed nuclear translocation of cyclin-dependent kinase 1 [J]. Pharm Res, 2010, 27(6): 1072-1079.

(编辑 徐杰)