

· 论 著 ·

# 低频超声增强双氢青蒿素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的生物学效应研究

王 婧<sup>1</sup>, 罗子国<sup>2△</sup>, 李 剑<sup>3</sup>

(1. 重庆医科大学附属第一医院超声科 400016; 2. 重庆医科大学生命科学研究院 400016;  
3. 重庆市沙坪坝区人民医院超声科 400030)

**摘要:**目的 研究低频超声能否增强双氢青蒿素(DHA)对前列腺癌 PC-3 细胞种植瘤的致凋亡作用,并探讨其对 DHA 诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡增敏作用的机理。方法 采用前列腺癌 PC-3 细胞建立裸鼠种植瘤模型,20 只实验裸鼠随机分为 4 组:空白对照组、单纯 DHA 组、单纯超声组和超声+DHA 组,经过 13 d 共计 7 次药物或加超声干预后,采用免疫组织化学法(SP)检测凋亡相关基因 Bcl-2、Bax、VEGF、Caspase-3 及 CHOP 的表达水平。结果 观察瘤体外形见空白对照组与单纯超声组肿瘤体积稍大,切开瘤体见内部均有明显液化坏死区域,免疫组织化学结果显示超声+DHA 组、单纯 DHA 组和单纯超声组的 Bcl-2 及 VEGF 表达均低于空白对照组,超声+DHA 组、DHA 组和超声组的 Bax、Caspase-3 及 CHOP 表达均高于空白组。结论 对正常细胞不致明显损伤的低频超声,可致前列腺癌 PC-3 种植瘤细胞相关凋亡基因的改变,DHA 可单独致 PC-3 细胞凋亡及相关基因的改变,超声能明显增强 DHA 诱导前列腺癌 PC-3 种植瘤细胞凋亡作用。

**关键词:**低频超声;双氢青蒿素;前列腺癌;细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.23.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)23-2706-04

## Biology effect research of dihydroartemisinin induce the apoptosis in PC-3 cell lines of prostate cancer enhanced by low frequency ultrasound

Wang Jing<sup>1</sup>, Luo Ziguo<sup>2△</sup>, Li Jian<sup>3</sup>

(1. Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;  
2. Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;  
3. Department of Ultrasound, the People's Hospital of Shapingba District, Chongqing 400030, China)

**Abstract: Objective** To study the enhancement effects of the low frequency ultrasound to the apoptosis induced by dihydroartemisinin in the transplantation human prostate cancer PC-3 cells in nude mice, and to explore the underlying action mechanism. **Methods** Prostate cancer PC-3 cells were transplanted into 20 nude mice to establish the solid tumor mode. These nude mice were randomly divided into 4 groups with 5 mice in each group: control group, dihydroartemisinin group, ultrasound group and ultrasound + dihydroartemisinin group. After 13 days and 7 times drug administration, The positive products of Bcl-2, Bax, VEGF, Caspase-3 and CHOP were tested by immunohistochemical method. **Results** The tumor volume were larger in control group and ultrasound group through observed by tumor contour, and there were liquefaction and necrosis region after incised the tumor tissue. Immunohistochemical examination revealed that the positive products of Bcl-2 and VEGF were decreased in ultrasound+DHA group, DHA group and ultrasound group. Immunohistochemical examination revealed that the positive products of Bax, Caspase-3 and CHOP were significantly increased in ultrasound+DHA group, DHA group and ultrasound group. **Conclusion** The low frequency ultrasound can't cause obvious damage to the normal cell, which could causing the change of the positive products in transplantation human prostate cancer PC-3 cells. The results show that DHA has this action alone, the ultrasound may enhance the apoptosis of PC-3 cells induced by DHA.

**Key words:** low frequency ultrasound; dihydroartemisinin; prostate cancer; apoptosis

前列腺癌(prostatic cancer, PCa)是男性生殖系统最常见的恶性肿瘤,已成为威胁男性健康的一大杀手,寻求高效低毒的治疗方法刻不容缓。研究表明细胞增殖和凋亡失衡与前列腺癌的发生有密切关系<sup>[1-2]</sup>;双氢青蒿素(DHA)是一种传统的抗疟药,近年来研究发现青蒿素及其衍生物除具有抗疟作用外,还存在抗肿瘤的活性。本课题组前期研究表明,双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞及裸鼠种植瘤生长有明显的抑制作用,其作用机理可能通过上调 Bax 和下调 Bcl-2 促进凋亡发生<sup>[3-4]</sup>;对种植瘤生长的抑制还与上调促凋亡相关基因 Caspase-3 和下调抗 Survivin、血管内皮细胞生长因子(vascular

endothelial growth factor, VEGF)的表达有关<sup>[4-5]</sup>。

近年来,随着超声生物学效应研究的深入,低频超声被认为是一种肿瘤治疗的新手段。研究表明,正常细胞对低频超声的作用具有相当的抵抗力,而恶性肿瘤细胞对其很敏感。有文献报道<sup>[6-7]</sup>低频超声可打开血脑屏障和血瘤屏障,增加局部的药物浓度,提高化疗药物的疗效。前列腺癌早期多为雄激素依赖型,其发生和发展与雄激素关系密切,但后期多数会转为雄激素非依赖型。本实验选择雄激素非依赖型 PC-3 细胞株建立裸鼠种植瘤模型<sup>[8]</sup>,研究低频超声与 DHA 对 PC-3 细胞的联合作用,并探讨其作用机理。

**作者简介:**王婧(1979~),医师,硕士,主要研究方向为前列腺癌的药物治理及超声在前列腺癌治疗中的应用。△ 通讯作者, Tel: 13808319733; E-mail: luoliangwen@yahoo.com.cn.

1 材料与方 法

1.1 材料与设备 人雄激素非依赖型前列腺癌 PC-3 细胞株(中国科学院上海细胞生物研究所细胞库),双氢青蒿素纯品(重庆华立药业股份有限公司生产),超声波基因转染仪(重庆医科大学超声研究所提供),Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体、Bax 鼠抗人单克隆抗体、VEGF 兔抗人单克隆抗体、Caspase-3 鼠抗人单克隆抗体、Chop 鼠抗人单克隆抗体(均由北京中杉金桥生物技术有限公司提供)。

1.2 实验方法

1.2.1 PC-3 细胞培养 将前列腺癌 PC-3 细胞生长于双抗溶液(其中含青霉素 G 100 IU/mL,链霉素 100 μg/mL)和含 10%胎牛血清(FBS)的 HamF12 培养基中,收集对数生长期细胞,准备进行实验。

1.2.2 动物模型及分组 采用经皮穿刺的方法将 5×10<sup>6</sup> 个/毫升的 PC-3 细胞悬液 0.1 mL 注射于雄性裸小鼠右侧腋窝皮下,注射后继续饲养 7 d 左右。当肿瘤长至直径约 0.5~0.6 cm 时,选取体质量和瘤体大小相当的裸鼠 20 只进行药物干预。随机将动物分组:(1)空白对照组:不作任何处理;(2)单纯 DHA 组:直接以 DHA 处理;(3)单纯超声组:仅予以超声辐照;(4)超声+DHA 组:予以 DHA 及超声辐照。其中 DHA 剂量为 200 μmol/kg,超声辐照(频率:300 KHZ,声强:1.0 W/cm<sup>2</sup>),辐照时间:60 s;腹腔注射给药,隔日一次,共治疗 7 次,第 13 天取材。

1.2.3 免疫组织化学检测 Bcl-2、Bax、VEGF、Caspase-3 及 CHOP 蛋白表达 采用免疫组织化学 SP 法对 Bcl-2、Bax、VEGF、Caspase-3 以及 CHOP 进行检测,精选图片采用北航真彩色医学图像处理系统软件进行平均光密度值的图像分析,每个标本可获得 10 个数据,取均数后再进行统计学处理。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行分析处理,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物生命体征及肿瘤大体形态瘤体重量观察 实验过程中 20 只裸鼠生命体征正常,无 1 例死亡,4 组裸鼠体质量基本一致,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。种植瘤的大体形态观察发现,瘤体多为球形,表面不光滑呈结节状,质地细嫩,边界可见,空白对照组瘤体体积明显大于其他组,切开瘤体,各组均可见中央坏死液化区,但以单纯超声组和超声+DHA 组瘤体组织内液化区较大。

各组种植瘤称重结果经方差分析(表 1),结果表明空白对照组瘤体重量明显大于其他组;单纯 DHA 组和超声组之间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );超声+DHA 组与 DHA 组及

空白对照组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 各组药物处理对裸鼠及种植瘤生长的影响 (n=5,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	裸鼠体质量(g)	肿瘤质量(g)
空白对照组	24.90±2.62	2.311±0.132
单纯 DHA 组	23.50±2.15	1.031±0.462 <sup>ab</sup>
单纯超声组	23.30±2.46	1.771±0.357
超声+DHA 组	24.00±2.52	0.523±0.125 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与单纯超声组比较。

2.2 免疫组织化学法(SP)

2.2.1 Bcl-2 表达 Bcl-2 的蛋白反应产物主要位于细胞膜及细胞浆,通常呈棕色。在空白对照组,其细胞膜及细胞浆内呈深棕色,单纯 DHA 组细胞膜及胞浆内反应产物颜色较浅,单纯超声组和超声+DHA 组蛋白反应产物颜色深浅不一,超声组较 DHA 组偏深,但较空白对照组浅,而超声+DHA 组颜色最浅(图 1)。

2.2.2 Bax 表达 Bax 蛋白反应产物主要位于细胞浆,通常表现呈棕色。在空白对照组,其细胞浆内呈浅棕色弱阳性,DHA 组细胞膜及胞浆内反应产物颜色较深,呈深棕色,超声组和超声+DHA 组蛋白反应产物颜色深浅不一,均较 DHA 组及空白对照组深,超声+DHA 组颜色最深(图 2)。

2.2.3 Caspase-3 表达 Caspase-3 蛋白反应产物主要位于细胞浆,通常表现呈棕黄色。空白对照组内细胞浆呈浅灰色,单纯 DHA 组内反应产物呈棕黄色,比空白对照组深,单纯超声组和超声+DHA 组蛋白反应产物颜色深浅不一,超声组较 DHA 组偏浅,但较空白对照组深,而超声+DHA 组颜色最深(图 3)。

2.2.4 VEGF 表达 VEGF 的蛋白反应产物主要位于细胞浆,通常呈棕色,以胞浆内含有棕黄色或棕褐色的、颗粒状、定位明确、染色明显的瘤细胞为阳性细胞。在空白对照组,其细胞膜及细胞浆内呈深棕色,DHA 组细胞膜及胞浆内反应产物颜色较浅,单纯超声组和超声+DHA 组蛋白反应产物颜色深浅不一,超声组较 DHA 组偏深,但较空白对照组浅,而超声+DHA 组颜色最浅(图 4)。

2.2.5 CHOP 表达 各实验组与空白对照组相比 CHOP 表达明显增强,以超声+DHA 组作用更明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),单纯 DHA 和超声组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。CHOP 蛋白反应产物为棕黄色,主要表达于细胞核,对照组细胞内无特异性染色。

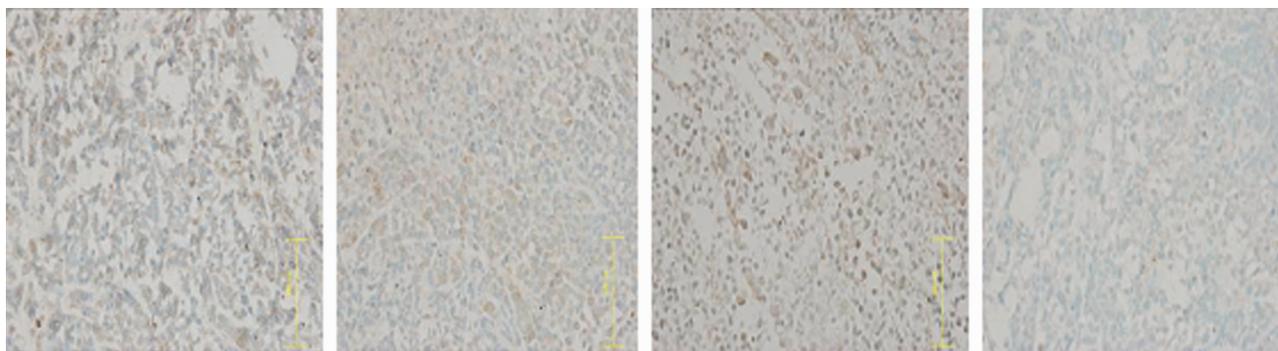


图 1 免疫组织化学法测定各组 Bcl-2

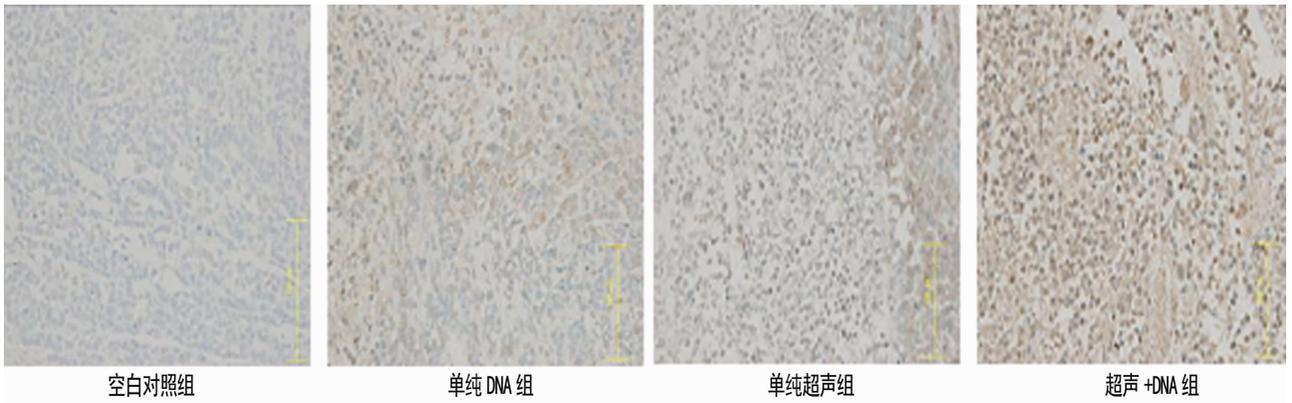


图 2 免疫组织化学法测定各组 Bax

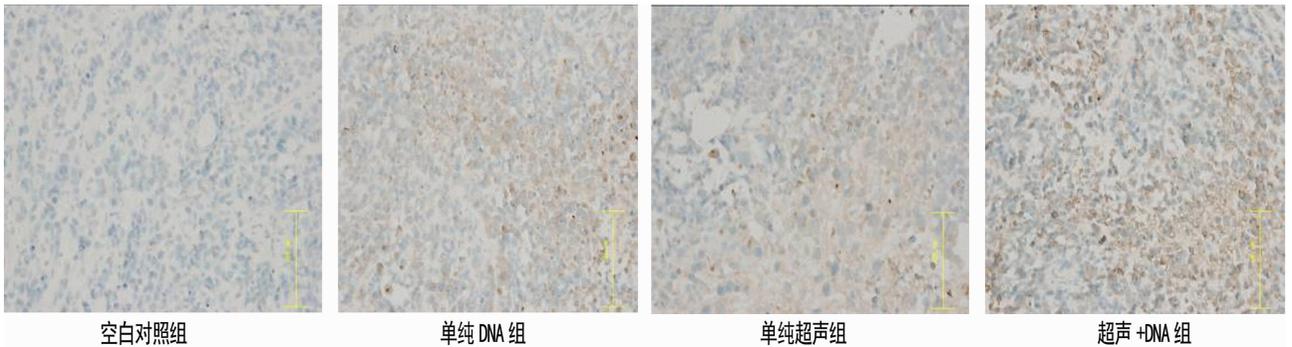


图 3 免疫组织化学法测定各组 Caspase-3

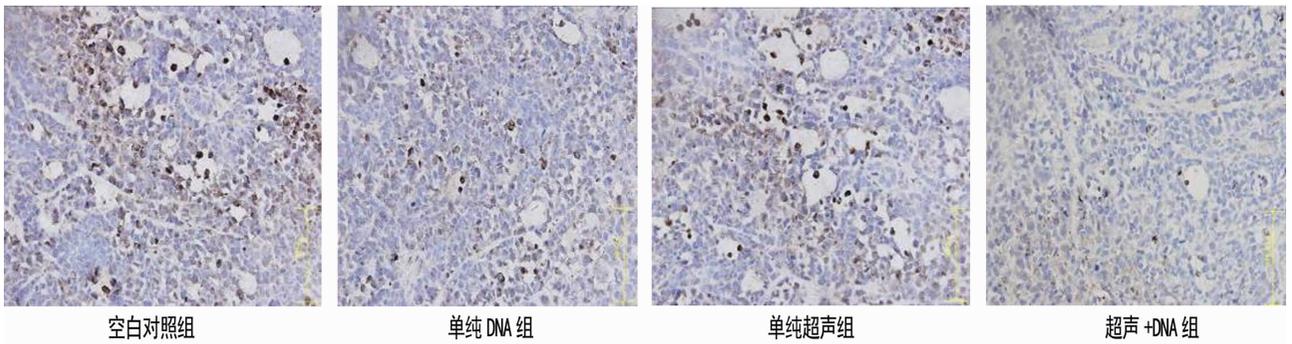


图 4 免疫组织化学法测定各组 VEGF

**2.3 图像分析** 各组随机拍摄 10 张图片,经图像体视分析平均光密度值(表 2),经统计学分析超声+DHA 组的平均光密度值与空白对照组及单纯超声组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );超声组与空白对照组之间平均光密度值比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ );单纯超声组和 DHA 组之间平均光密度值比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 各组处理后对种植瘤 5 种相关蛋白表达的影响( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

指标	空白对照组	单纯 DHA 组	单纯超声组	超声+DHA 组
Bcl-2 蛋白	0.16±0.03	0.03±0.01	0.05±0.01 <sup>a</sup>	0.02±0.02 <sup>ab</sup>
Bax 蛋白	0.00±0.00	0.07±0.00	0.10±0.00 <sup>a</sup>	0.19±0.02 <sup>ab</sup>
Casp-3 蛋白	0.01±0.05	0.07±0.01	0.04±0.02 <sup>a</sup>	0.12±0.04 <sup>ab</sup>
VEGF 蛋白	0.13±0.02	0.07±0.02	0.08±0.03 <sup>a</sup>	0.06±0.02 <sup>ab</sup>
CHOP 蛋白	0.00±0.00	0.20±0.02	0.16±0.04 <sup>a</sup>	0.24±0.03 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与单纯超声组比较。

### 3 讨论

肿瘤的发生、发展不仅由细胞过度增殖所致,还与细胞凋

亡的正常调控机制紊乱有关<sup>[9-10]</sup>。细胞凋亡对多细胞生物个体的发育成熟起重要作用,在肿瘤的发生、抗肿瘤药物研制等方面更具有重大意义。前列腺癌的发生、发展、转归与许多肿瘤相关基因如 Bcl-2、Bax、Survivin、VEGF 等相关<sup>[11-13]</sup>。研究表明,细胞增殖与凋亡失衡是前列腺癌发生、发展的重要机制,抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡是开发治疗前列腺癌特别是激素非依赖性癌药物的主要策略。

超声治疗作为近年来兴起的非侵入性肿瘤治疗技术在肿瘤治疗中已显示应用前景,其被认为是一种很有希望的肿瘤治疗新手段<sup>[14]</sup>,超声在抗癌治疗应用的临床前研究涉及基因治疗、化疗增效、声动力治疗等。曾有报道采用低频超声对卵巢癌进行了大量的体内、体外研究,认为经超声辐照后增强阿霉素对肿瘤细胞毒作用确切,但在对前列腺癌领域的研究很少。经前期试验已证实 DHA 诱导前列腺癌 PC-3 实体瘤细胞凋亡作用确切<sup>[15]</sup>,而目前仍未查到应用超声辐照辅助 DHA 治疗前列腺癌的报道。

大量研究表明,在恶性肿瘤治疗过程中,由于联合应用时,

较低剂量细胞毒药物即可达到单用药物时高剂量药物对癌细胞的杀伤效果,故对正常细胞、组织的毒副作用也会减少,这将提高患者对药物治疗的耐受性<sup>[16]</sup>。有研究证实低剂量超声可提高细胞膜通透性,细胞膜通透性的增加有助于药物进入细胞内,超声辐照可起到与压力波相似的作用,这种膜通透性增加的原因可能与空化效应对细胞膜的损伤有关,特别是使用频率较低的超声波时,更易产生空化效应,超声辐照可使细胞间黏附能力降低,使细胞更易脱落,这种作用在低频超声更加明显,超声可以提高细胞内药物聚集量,从而增强抗肿瘤药物诱导的细胞损伤<sup>[17]</sup>。

前期实验结果显示 DHA 能通过下调 Bcl-2、VEGF,上调 Bax、Caspase-3 而有效地促使前列腺癌 PC-3 细胞的凋亡,凋亡途径多为线粒体途径。本实验显示低频超声能够由于其空化作用对肿瘤细胞产生液化、坏死,促进肿瘤细胞的凋亡,将超声辐照和 DHA 联合应用后,低频超声的空化作用使 DHA 对凋亡相关因子的调控更明显,与 DHA 组及超声组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),其作用机理可能是增加细胞膜的通透性及药物浓度,促使 DHA 抗肿瘤凋亡作用的产生,DHA 能上调 CHOP 蛋白的表达,说明 DHA 诱导 PC-3 细胞凋亡可能与内质网应急有关。其中,超声组与 DHA 组比较差异无统计学意义,说明低频超声能作用于肿瘤细胞,能产生和 DHA 相似的抗凋亡作用,但作用没有联合应用后增强更明显。因此,低频超声和抗肿瘤药物的联合应用能够有效地增强药物对肿瘤细胞的作用,为今后药物的合适剂量研究提供了参考。

综上所述,低频超声能增强 DHA 在细胞水平上对前列腺癌 PC-3 细胞的影响,表现为抑制细胞增殖并诱导凋亡。在分子水平上,表现为对凋亡相关基因(Bcl-2、Bax、VEGF、Caspase-3 及 CHOP)的有效调控,而肿瘤细胞凋亡相关基因又通过抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡并抑制肿瘤血管生成来杀灭癌肿,但其确切机制尚需进一步研究。随着研究的不断深入,超声辅助药物治疗有望成为治疗恶性肿瘤的有效方法。

#### 参考文献:

- [1] Catz SD, Johnson JL. BCL-2 in prostate cancer; a minireview[J]. *Apoptosis*, 2003, 8(1): 29-37.
- [2] Califice S, Waltregny D, Castronovo V, et al. Prostate carcinoma cell lines and apoptosis; a review[J]. *Rev Med Liege*, 2004, 59(12): 704-710.
- [3] 李庆春,高小玲,石之虎,等. 双氢青蒿素对前列腺癌 PC-3 细胞在体生长干扰的研究(摘要)[J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(suppl): 35-37.
- [4] 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): 448-451.
- [5] 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.
- [6] Shang X, Wang P, Liu Y, et al. Mechanism of low frequency ultrasound in opening blood-tumor barrier by tight junction[J]. *J Mol Neuro Sci*, 2011, 43(3): 364-369.
- [7] Choi JJ, Pernot M, Small SA, et al. Noninvasive, transcranial and localized opening of the blood-brain barrier using focused ultrasound[J]. *Med Biol*, 2007, 33(1): 95-104.
- [8] 徐鸿绪,王晓波,陈凌武. 荷人前列腺癌裸鼠移植瘤模型的建立及其应用研究[J]. *实用癌症杂志*, 2006, 21(4): 337-339.
- [9] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biol*, 2008, 9(3): 231-241.
- [10] Helleday T, Petermann E, Lundin C, et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(3): 193-204.
- [11] Jiao Y, Ge CM, Meng QH, et al. Dihydroartemisinin is an inhibitor of ovarian cancer cell growth[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(7): 1045-1056.
- [12] Mu D, Chen W, Yu B, et al. Calcium and survivin are involved in the induction of apoptosis by dihydroartemisinin in human lung cancer SPC-A-1 cells[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2007, 29(1): 33-38.
- [13] Efferth T. Mechanistic perspectives for 1, 2, 4-trioxanes in anti-cancer therapy[J]. *Drug Resist Updat*, 2005, 8(1/2): 85-97.
- [14] 于廷和,蔡汉钟. 低频超声对卵巢癌细胞的生物学效应[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2000, 22(4): 237-239.
- [15] 李庆春,罗子国. 青蒿素对肿瘤细胞凋亡相关基因的调控[J]. *国际中医中药杂志*, 2008, 30(2): 119-121.
- [16] 于廷和,蔡汉钟,伍烽,等. 低频超声增强阿霉素对卵巢癌细胞毒作用研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2001, 23(1): 26-28.
- [17] 杨艳,刘帅,于庭和,等. 超声增强顺铂对耐药性卵巢癌细胞的 DNA 损伤效应[J]. *中国超声医学杂志*, 2008, 24(10): 875-877.

(收稿日期:2013-01-11 修回日期:2013-05-22)

(上接第 2705 页)

- [13] Sathish N, Yuan Y. Functional characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus small capsid protein by bacterial artificial chromosome-based mutagenesis[J]. *Virology*, 2010, 407(2): 306-318.
- [14] Zheng ZM. Split genes and their expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(3): 173-184.
- [15] Cha-Aim K, Hoshida H, Fukunaga T, et al. Fusion PCR via novel overlap sequences[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 852: 97-110.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-22)