

白藜芦醇调节 TLR4/NF- κ B 信号通路影响人前列腺癌 PC3 细胞株凋亡的研究*

冉亨勇¹, 蒲军¹, 李明辉¹, 何毅^{2△}

(1. 邛崃市医疗中心医院肿瘤科, 四川邛崃 610000; 2. 西南医科大学附属医院泌尿外科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨白藜芦醇(Res)影响人前列腺癌 PC3 细胞株增殖和凋亡的机制。**方法** 将人前列腺癌 PC3 细胞株分为阴性对照组, Res 高、中、低剂量组(40、20、10 μ mol/L Res), Toll 样受体 4(TLR4)阻断剂组, 采用 CCK-8 法检测 PC3 细胞株细胞增殖情况; Hoechst33342 荧光染色检测 PC3 细胞株细胞凋亡情况; Western blot 检测 TLR4、核因子- κ B(NF- κ B)、Bcl-2 与 Bax 蛋白表达; ELISA 检测白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达。**结果** Res 能明显抑制 PC3 细胞增殖; Hoechst33342 荧光染色结果显示 Res 各剂量组肿瘤细胞凋亡增加, Bcl-2/Bax 比值降低, TLR4、NF- κ B 表达水平降低, 与阴性对照组比较, Res 20、40 μ mol/L 组差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** Res 能抑制 PC3 细胞增殖, 促进其凋亡, 可能与抑制 TLR4 信号通路, 下调 Bcl-2/Bax 比值, 减少炎症因子表达有关。

[关键词] 白藜芦醇; 前列腺癌; 凋亡; Toll 样受体 4

[中图分类号] R737.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2021)15-2534-05

Effects of resveratrol on apoptosis of prostatic cancer PC3 cell lines via regulating human TLR4/NF- κ B signaling pathway*

RAN Hengyong¹, PU Jun¹, LI Minghui¹, HE Yi^{2△}

(1. Department of Oncology, Qionglai Municipal Medical Center Hospital, Qionglai, Sichuan 610000, China; 2. Department of Urological Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of resveratrol (Res) on the proliferation and apoptosis of prostatic cancer PC3 cell lines via regulating TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Methods** The PC3 cell lines were divided into the negative control group, Res high, middle and low dose groups (40, 20, 10 μ mol/L Res) and Toll-like receptor 4 (TLR4) blocker group. The cell proliferation of PC3 cell lines was detected by the CCK-8 method. The apoptosis of PC3 cell lines was detected by the Hoechst33342 fluorescence staining. The expressions of TLR4, NF- κ B, Bcl-2 and Bax were detected by Western blot; the expressions of IL-6 and TNF- α were detected by ELISA. **Results** Res could significantly inhibit the proliferation of PC3 cells, the Hoechst33342 fluorescence staining results showed that the apoptosis of tumor cells in each Res group was increased, the ratio of Bcl-2/Bax was decreased, the expression levels of TLR4 and NF- κ B were decreased, compared with the negative control group, the differences in the Res 20, 40 μ mol/L groups had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Res can inhibit the proliferation of PC3 cells and promote their apoptosis, which may be related to inhibiting the TLR4 signal pathway, down-regulating the Bcl-2/Bax ratio and reducing the expression of inflammatory factors.

[Key words] resveratrol; carcinoma of prostate; apoptosis; Toll-like receptor 4

白藜芦醇(Resveratrol, Res)化学名为 3, 4', 5-三羟基-1, 2-二苯乙烯, 是一种天然抗氧化物和环氧合酶(cyclooxygenase, COX)抑制剂。Res 在预防慢性炎症疾病、抗冠心病、癌症预防等方面发挥重要作用^[1],

其机制与清除自由基,抑制 COX-2 表达,诱导一氧化氮合成酶合成,抑制脂氧合酶与蛋白激酶 C 表达,抑制脂质过氧化等有关^[2]。男性前列腺癌发病率较高,美国前列腺癌发病率位居男性肿瘤第 2 位,我国前列腺癌发病率也较高^[3]。炎症与前列腺癌的发生密切相关,急性或慢性炎症不仅会导致癌变,还参与前列腺癌进展^[4]。Toll 样受体(toll-like receptor,TLR)是人体参与炎症的主要受体,其中 TLR4 能诱导肿瘤细胞释放多种细胞因子或上调抗凋亡信号等一系列效应^[5]。TLR4 信号通路参与前列腺癌、乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤的发生、发展过程,主要与促进肿瘤细胞的抗原性、增强机体对其免疫清除能力、促进肿瘤细胞增殖、免疫逃逸、凋亡抵抗和侵袭能力等有关。已有研究报道,TLR4 在人前列腺癌 PC3 细胞中通过核因子- κ B(NF- κ B)信号通路促进血管内皮生长因子(VEGF)和白细胞介素(IL)-8 的分泌,影响人前列腺癌 PC3 细胞的生存^[6]。尽管 Res 对前列腺癌有防治作用,但较少有研究探讨其影响前列腺癌细胞凋亡的作用与调节 TLR4/NF- κ B 信号通路的关系,故本研究探讨 Res 是否通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路有关蛋白和炎症因子表达影响前列腺癌细胞凋亡,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司),Res(成都普思生物科技股份有限公司);TAK242(美国 Sigma 公司);CCK-8 试剂盒、Hochest33342 荧光染色试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);兔抗人 β -actin、TLR4、NF- κ B、Bcl-2、Bax 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(英国 Abcam 公司);IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组

人前列腺癌 PC3 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所,选用 RPMI1640 培养基,加入 10% 胎牛血清后在 37 °C、5%CO₂ 条件下常规培养。Res 纯度为 99%,超声助溶于超纯水中。实验取对数生长期细胞,将细胞分为阴性对照组,Res 高、中、低剂量组,TLR4 阻断剂组。阴性对照组细胞常规培养,不做其他处理;Res 各剂量组分别给予 40、20、10 μ mol/L Res 处理 48 h;TLR4 阻断剂组给予 1 μ g/mL TAK242 处理 48 h。

1.2.2 CCK-8 法检测 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株细胞增殖的影响

细胞常规胰酶消化后制成悬液,调整细胞数为

1×10^6 /L,将细胞接种于 96 孔板中,每孔 90 μ L,在 37 °C、5%CO₂ 条件下常规培养 48 h,细胞处理后每孔加入 CCK8 试剂 10 μ L 继续培养 1 h,酶标仪 450 nm 波长下检测各孔吸光度值(A 值),计算细胞生长存活率,细胞存活率 = $A_{\text{给药组}}/A_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$ 。

1.2.3 Hochest33342 荧光染色检测人前列腺癌 PC3 细胞株细胞凋亡

收集细胞悬浮液于 1 mL 培养基中,加入 10 μ L Hochest33342 储存液(100 mg/L,蒸馏水溶解),染色 15 min;将细胞置于冰上冷却后,离心,去上清液,将细胞重悬于 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中,加入 5 μ L 碘化丙啶(PI)储存液(1 g/L,蒸馏水溶解),混匀,避光放置 10 min 后荧光显微镜观察。

1.2.4 Western blot 检测人前列腺癌 PC3 细胞株 TLR4、NF- κ B、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达

细胞处理后弃上清液,每孔加入 50 μ L 裂解液裂解细胞,提取蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法检测蛋白浓度,计算样品加样量。制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶,每孔上样 20 μ L,100 V 电泳 90 min,200 mA 转膜 90 min,5%牛血清清蛋白(BSA)封闭 1 h,一抗按 1:1 000 稀释后同膜一起转入抗体封闭盒内,4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。加入二抗 1:2 000,孵育 1 h,洗膜 4 次,每次 10 min,电化学发光(ECL)显色液显影,以 β -actin 为内参,蛋白条带灰度值用 Image proplus6.0 软件测定,根据 TLR4/ β -actin 和 NF- κ B/ β -actin 条带灰度值比值进行统计学分析。

1.2.5 ELISA 法检测人前列腺癌 PC3 细胞株 IL-6 和 TNF- α 表达

每孔调整细胞数为 1×10^5 /L,接种于 96 孔板,处理细胞后取细胞上清液按 $1\ 000 \times g$ 离心 10 min,每孔加入样品稀释液 40 μ L,待测样品 10 μ L,酶标板轻轻晃动,37 °C 孵育 30 min,撕掉封板膜,弃去液体,甩干,加满洗涤液,静置 30 s 后甩干,反复 3 次,每孔加入酶标液 50 μ L,37 °C 孵育 30 min,洗涤 3 次,加显色液 A 50 μ L,显色液 B 50 μ L,摇匀,37 °C 避光显色,加终止液 50 μ L,空白调零,酶标仪 450 nm 波长下检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析,组间两两比较用 SNK 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株增殖的影响

Res 各剂量组人前列腺癌 PC3 细胞株的细胞存活率为 70.10%~78.35%;与阴性对照组相比,10 μ mol/L 及以上 Res 剂量组能抑制人前列腺癌 PC3 细胞株增殖,呈剂量依赖性,差异有统计学意义($P <$

0.05), 见表 1。

表 1 Res 对人前列腺 PC3 细胞株增殖影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	A ₄₅₀	存活率 (%)
阴性对照组	0.93 ± 0.05	100.00
TLR4 阻断剂组	0.67 ± 0.06 ^b	67.01
Res 10 μmol/L 组	0.75 ± 0.04 ^a	78.35
Res 20 μmol/L 组	0.71 ± 0.06 ^a	74.22
Res 40 μmol/L 组	0.62 ± 0.06 ^b	70.10

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

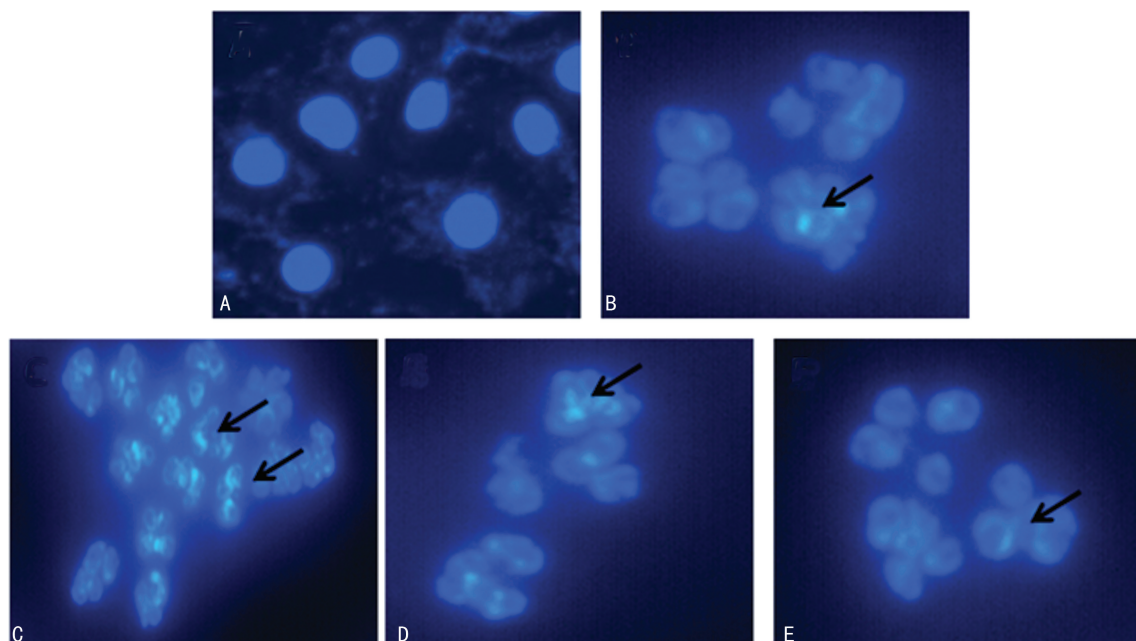
2.2 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株细胞凋亡的影响

实验结果显示阴性对照组细胞呈浅蓝色, 凋亡细

胞较少; Res 各剂量组可见凋亡细胞呈亮蓝色, 并可见细胞核固缩、核碎裂等现象。Res 各剂量组抑制 Bcl-2 表达, 促进 Bax 表达, 各剂量组 Bcl-2/Bax 比值降低, 除 Res 10 μmol/L 组外, 与阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1、2, 表 2。

2.3 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株细胞 TLR4 及 NF-κB 表达的影响

Res 各剂量组、TLR4 阻断剂组 TLR4 相对表达水平明显降低 ($P < 0.05$); Res 20、40 μmol/L 剂量组、TLR4 阻断剂组 NF-κB 相对表达水平明显降低 ($P < 0.05$); Res 各剂量组与 TLR4 阻断剂组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 3、表 2。



A: 阴性对照组; B: TLR4 阻断剂组; C: Res 40 μmol/L 组; D: Res 20 μmol/L 组; E: Res 10 μmol/L 组。

图 1 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株细胞凋亡的影响 (Hoechst33342 荧光染色, ×400)

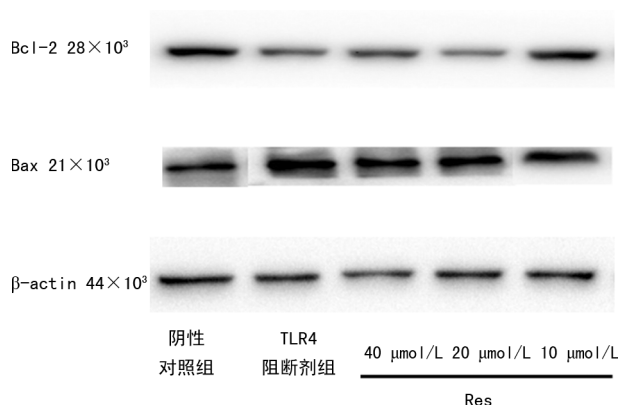


图 2 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株细胞 Bcl-2/Bax 表达的影响

2.4 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株炎症因子表达的影响

与阴性对照组比较, Res 各剂量组 IL-6、TNF-α 水平均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株 TLR4、NF-κB 表达及 Bcl-2/Bax 的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	TLR4/ β-actin	NF-κB/ β-actin	Bcl-2/ Bax
阴性对照组	1.57 ± 0.11	1.72 ± 0.11	0.86 ± 0.03
TLR4 阻断剂组	0.42 ± 0.04 ^b	1.15 ± 0.04 ^b	0.67 ± 0.03 ^b
Res 10 μmol/L 组	0.75 ± 0.07 ^a	1.56 ± 0.07	0.78 ± 0.03
Res 20 μmol/L 组	0.67 ± 0.07 ^a	1.32 ± 0.04 ^a	0.73 ± 0.03 ^a
Res 40 μmol/L 组	0.61 ± 0.02 ^b	1.27 ± 0.02 ^b	0.68 ± 0.03 ^b

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

表 3 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株 IL-6 和 TNF-α 表达的影响 ($n = 3, \bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

组别	IL-6	TNF-α
阴性对照组	574.37 ± 30.43	332.47 ± 21.43
TLR4 阻断剂组	345.23 ± 21.12 ^b	152.56 ± 27.22 ^b

续表 3 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株 IL-6 和 TNF- α 表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s, \text{ng/mL}$)

组别	IL-6	TNF- α
Res 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	471.65 \pm 24.54 ^a	234.76 \pm 37.03 ^a
Res 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	412.74 \pm 35.52 ^a	219.78 \pm 31.42 ^a
Res 40 $\mu\text{mol/L}$ 组	321.73 \pm 31.36 ^b	155.74 \pm 26.51 ^b

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与阴性对照组比较。

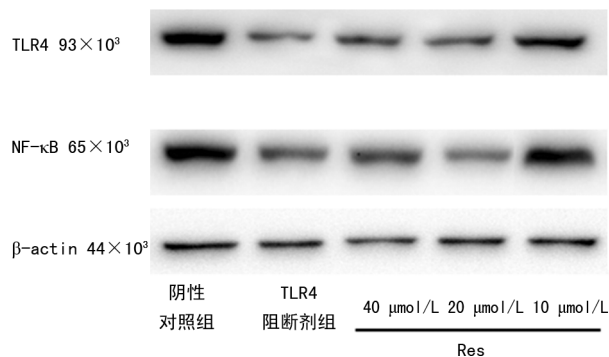


图 3 Res 对人前列腺癌 PC3 细胞株细胞 TLR4 及 NF- κ B 表达的影响

3 讨论

前列腺癌是目前男性发病率较高的肿瘤之一,尤其在北美和欧洲地区^[7]。目前其治疗仍以手术、化疗等方式为主。尽管近年来不断有新的化疗药物被批准用于治疗前列腺癌,如多西他赛、卡巴西他赛,但前列腺癌仍是男性因癌症死亡的第五大原因,占男性癌症病死率的 6.6%^[8];而在亚洲国家,前列腺癌 1 年、5 年和 10 年存活率分别为 81.0%、61.9% 和 36.2%^[9]。

大量临床试验表明,中药在预防前列腺癌方面具有积极作用,许多从中草药提取的化合物已被证明可通过不同途径抑制前列腺癌的发生、发展,有望在未来用于前列腺癌的临床治疗^[10]。Res 的抗炎、抗氧化和抗肿瘤作用一直是肿瘤防治的研究热点,目前已有研究证实 Res 对癌症的防治具有有益作用,而且不良反应少。一项为期 10 年的流行病学研究表明,通过食用葡萄而非葡萄酒摄入 Res 的女性患乳腺癌的风险降低了 50% 以上^[11]。Res 的一些 I 期和 II 期临床试验也正在进行中。本研究结果显示,10 $\mu\text{mol/L}$ 及以上浓度的 Res 即可抑制人前列腺癌 PC3 细胞株的生长,促进细胞凋亡,提示 Res 具有抑制人前列腺癌 PC3 细胞株生长,促进其凋亡的作用。

凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 是反映凋亡发生、发展的经典蛋白,因此进一步分析 Res 对凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 是否产生影响。Bcl-2 具有抑制细胞凋亡,延长细胞生存期的作用。Bax 则是促进细胞凋亡蛋白,具有对抗 Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的作用。Bcl-2 与 Bax 形成二聚体的比例决定了细胞凋亡与存活的状态,即当 Bcl-2/Bax 比值增加,细胞存活率高,Bcl-2/Bax 比值

降低,细胞存活率则降低^[12]。本研究结果显示,Res 能抑制 Bcl-2 表达,促进 Bax 表达,降低了 Bcl-2/Bax 比例,提示 Res 促进人前列腺癌细胞凋亡的作用与此有关。

临床前研究表明,慢性炎症与前列腺癌进展有关,如在前列腺肿瘤标本和切除的组织中发现慢性炎症,其他分子、实验和临床的证据也表明慢性炎症和前列腺癌风险呈正相关^[13],提示炎症可能是前列腺癌发生的驱动因素。炎性介质被认为是参与前列腺癌发生、发展的因素,有可能成为治疗干预的靶点;而炎症相关的白细胞局部浸润、信号分子(包括细胞因子和趋化因子)产生,则与下游效应器如 NF- κ B、Wnt 通路激活有关^[14]。TLR4 信号通路也是参与炎症发生、发展的重要通路,已有研究显示前列腺癌细胞中 TLR2、4、9 的激活可能促进肿瘤生长^[15]。故本研究进一步分析 Res 是否通过影响 TLR4 通路蛋白表达,影响下游炎性因子,从而达到抑制前列腺癌细胞增殖的作用。因此,检测了 TLR4、NF- κ B、IL-6 和 TNF- α 的表达。结果显示,Res 干预后前列腺癌细胞中 TLR4 蛋白表达水平明显降低,与使用 TLR4 抑制剂相似,同时下游 NF- κ B 蛋白表达水平和炎性因子(IL-6、TNF- α)表达水平也明显降低,提示 Res 抑制肿瘤细胞生长可能与阻断 TLR4,以及抑制下游 NF- κ B 蛋白表达和炎性因子 IL-6 和 TNF- α 表达有关。

综上所述,Res 能抑制人前列腺癌 PC3 细胞增殖,促进其凋亡,可能与抑制 TLR4、NF- κ B 蛋白,下调 Bcl-2/Bax 比值,减少炎性因子 IL-6 和 TNF- α 表达有关,其是否涉及其他信号通路尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] LIN P H, LIN S K, HSU R J, et al. Spirit-quieting traditional Chinese medicine may improve survival in prostate cancer patients with depression[J]. J Clin Med, 2019, 8(2): 218.
- [2] MALAGUARNERA L. Influence of resveratrol on the immune response[J]. Nutrients, 2019, 11(5): 946.
- [3] WANG N, XU L, WANG J S, et al. Traditional Chinese medicine on treating pain caused by prostate cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(44): e17624.
- [4] HAYASHI T, FUJITA K, MATSUSHITA M, et al. Main inflammatory cells and potentials of anti-inflammatory agents in prostate cancer[J].

- Cancers (Basel), 2019, 11(8):1153.
- [5] ZHAO R, ZHANG T, MA B, et al. Antitumor activity of portulaca oleracea L. polysaccharide on HeLa cells through inducing TLR4/NF- κ B signaling[J]. Nutr Cancer, 2017, 69(1): 131-139.
- [6] LIU J, HU S, CUI Y, et al. Saturated fatty acids up-regulate COX-2 expression in prostate epithelial cells via toll-like receptor 4/NF- κ B signaling[J]. Inflammation, 2014, 37(2): 467-477.
- [7] CULP M B, SOERJOMATARAM I, EFSTATHIOU J A, et al. Recent global patterns in prostate cancer incidence and mortality rates [J]. Eur Urol, 2020, 77(1): 38-52.
- [8] TAITT H E. Global trends and prostate cancer: a review of incidence, detection, and mortality as influenced by race, ethnicity, and geographic location[J]. Am J Mens Health, 2018, 12(6): 1807-1823.
- [9] HASSANIPOUR S, DELAM H, ARAB-ZOZANI M, et al. Survival rate of prostate cancer in Asian countries: a systematic review and meta-analysis[J]. Ann Glob Health, 2020, 86(1): 1-13.
- [10] WANG X, FANG G, PANG Y. Chinese medicines in the treatment of prostate cancer: from formulas to extracts and compounds[J]. Nutrients, 2018, 10(3): 283.
- [11] CHAPLIN A, CARPÉNÉ C, MERCADER J. Resveratrol, metabolic syndrome, and gut microbiota[J]. Nutrients, 2018, 10(11): 1651.
- [12] LI J, LIU F, JIANG S, et al. Berberine hydrochloride inhibits cell proliferation and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer via the suppression of the MMP2 and Bcl-2/Bax signaling pathways [J]. Oncol Lett, 2018, 15(5): 7409-7414.
- [13] GAO S, ZHAO Z, WU R, et al. MicroRNA-194 regulates cell viability and apoptosis by targeting CDH2 in prostatic cancer[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 4837-4844.
- [14] LIU J M, LIN P H, HSU R J, et al. Complementary traditional Chinese medicine therapy improves survival in patients with metastatic prostate cancer [J]. Medicine, 2016, 95(31): e4475.
- [15] ZHAO S, ZHANG Y, ZHANG Q, et al. Toll-like receptors and prostate cancer [J]. Front Immunol, 2014, 5: 352.
- (收稿日期: 2020-12-18 修回日期: 2021-04-08)
-
- (上接第 2533 页)
- WOODWARD F N. Manufacture of algal chemicals. III. laboratory: scale isolation of laminarin from brown marine algae[J]. J Chem Technol Biotechnol, 2007, 1(9): 414-424.
- [17] NGUYEN S G, KIM J, GUEVARRA R B, et al. Laminarin favorably modulates gut microbiota in mice fed a high-fat diet[J]. Food Funct, 2016, 7(10): 4193-4201.
- [18] LIU X, LIU H, ZHAI Y, et al. Laminarin protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in MRC-5 cells possibly via regulating NRF2[J]. PeerJ, 2017, 5: e3642.
- [19] JIANG H, LIANG S, YAO X R, et al. Laminarin improves developmental competence of porcine early stage embryos by inhibiting oxidative stress[J]. Theriogenology, 2018, 115: 38-44.
- [20] CUONG D X. Laminarin (beta-glucan) of brown algae sargassum mcclurei: extraction, antioxidant activity, lipoxygenase inhibition activity, and physicochemistry properties [J]. World J Food Sci Technol, 2020, 4(1): 31-39.
- [21] 施恩, 张毅, 田少奇, 等. 羧甲基壳聚糖促进小鼠皮肤毛囊再生修复的组织形态学研究[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(24): 4614-4622.
- [22] DAI T Q, ZHANG L L, AN Y, et al. In vitro transdifferentiation of adipose tissue-derived stem cells into salivary gland acinar-like cells [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(5): 2908-2924.
- (收稿日期: 2020-10-13 修回日期: 2021-03-08)