

# 基于凋亡和自噬途径的石榴皮多酚对人前列腺癌PC3细胞的抑制作用机制研究<sup>△</sup>

冯甜<sup>1\*</sup>, 刘盟<sup>2#a</sup>, 程路峰<sup>3</sup>, 高晓黎<sup>3</sup>, 杨晓君<sup>1#b</sup> (1.新疆农业大学食品科学与药学学院, 乌鲁木齐 830052; 2.新疆医科大学附属肿瘤医院药学部, 乌鲁木齐 830000; 3.新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)16-1978-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.16.11

**摘要** 目的:基于自噬和凋亡途径研究石榴皮多酚(PPP)对人前列腺癌PC3细胞增殖的抑制作用机制。方法:采用CCK-8法考察不同质量浓度PPP(25~300 μg/mL)作用24、48、72 h对PC3细胞活性的影响,筛选给药浓度和作用时间。将PC3细胞分为对照组(完全培养基)和PPP低、中、高质量浓度组,培养48 h后,采用流式细胞术和Annexin V-FITC/PI染色法分别检测细胞周期分布和凋亡情况,采用Western blotting法检测细胞中凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和自噬相关蛋白LC3、Beclin-1、p62、Atg12、Atg16的表达水平。结果:选择48 h为培养时间,PPP的半数抑制浓度为110 μg/mL,选择50、100、200 μg/mL为低、中、高质量浓度。与对照组比较,PPP低、中质量浓度组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞百分比均显著降低而S期细胞百分比均显著升高,PPP高质量浓度组G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞百分比显著升高,PPP中、高质量浓度组G<sub>2</sub>/M期细胞百分比均显著降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );PPP各质量浓度组细胞凋亡率均显著升高( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。与对照组比较,PPP各质量浓度组的抗凋亡蛋白Bcl-2和自噬相关蛋白p62表达水平均有不同程度的下降,促凋亡蛋白Bax表达水平和自噬相关蛋白LC3-II/LC3-I比值和Beclin-1、Atg5、Atg12和Atg16的表达水平均有不同程度的上升,且PPP高质量浓度组上述指标以及低、中质量浓度组上述部分指标组间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。结论:PPP能抑制人前列腺癌PC3细胞增殖,其机制可能与诱导细胞发生自噬从而促进细胞凋亡有关。

**关键词** 石榴皮多酚;前列腺癌;PC3细胞;凋亡;自噬;机制

- duced by colon irritation during postnatal development[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(5):1276-1285.
- [14] 吕林,唐旭东,王凤云,等.肠易激综合征从脾论治理论探讨[J].*中华中医药杂志*, 2017, 32(3):943-946
- [15] 牛艺璇,孙波,白埔,等.大建中汤的临床应用及现代研究进展[J].*中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9):715-716.
- [16] FAN F, TANG Y, DAI HF, et al. Blockade of BDNF signalling attenuates chronic visceral hypersensitivity in an IBS-like rat model[J]. *Eur J Pain*, 2020, 24(4):839-850.
- [17] LEE IS, CHEOH S, PARK JY. Central and peripheral mechanism of acupuncture analgesia on visceral pain: a systematic review[J]. *Evid-based Compl Alt*, 2019. DOI: 10.1155/2019/1304152.
- [18] 陈继婷,郭维,杨毅.大建中汤对脾阳虚大鼠血清神经递质影响的实验研究[J].*浙江中医杂志*, 2007, 42(5):300-301.
- [19] ZHOU QQ, VERNE GN. New insights into visceral hypersensitivity-clinical implications in IBS[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(6):349-355.
- [20] HORVATHOVA L, TILLINGER A, PADOVA A, et al. Changes in gene expression in brain structures related to visceral sensation, autonomic functions, food intake, and cognition in melanoma-bearing mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2020, 51(12):2376-2393.
- [21] JULIANA DE MATTOS COELHO-AGUIAR, ANA CARINA BON-FRAUCHES, ANA LÚCIA TAVARES GOMES, et al. The enteric glia: identity and functions[J]. *Glia*, 2015, 63(6):921-935.
- [22] MOKHA JS, HVAMS JS. Irritable bowel syndrome[J]. *Clin Evid*, 2017, 341(8844):556-563.
- [23] DELIVANOGLU N, BOZIKI M, THEOTOKIS P, et al. Spatio-temporal expression profile of NGF and the two-receptor system, TrkA and p75NTR, in experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):41-53.
- [24] CIRILLO C, SARNELLI G, TURCO F, et al. Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2011, 23(9):e372-e382.
- (收稿日期:2020-03-26 修回日期:2020-07-02)  
(编辑:邹丽娟)

△ 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(No.2017-D01C373)

\* 硕士研究生。研究方向:天然产物活性。E-mail:1577610413@qq.com

#a 通信作者:副主任药师,博士。研究方向:肿瘤药理学。E-mail:67848101@qq.com

#b 通信作者:副教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然产物活性。E-mail:1049520138@qq.com

# Study on the Inhibitory Mechanism of Pomegranate Peel Polyphenols on Human Prostate Cancer PC3 Cells Based on Apoptosis and Autophagy Pathway

FENG Tian<sup>1</sup>, LIU Meng<sup>2</sup>, CHENG Lufeng<sup>3</sup>, GAO Xiaoli<sup>3</sup>, YANG Xiaojun<sup>1</sup> (1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Cancer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the inhibitory mechanism of pomegranate peel polyphenols (PPP) on the proliferation of human prostate cancer PC3 cells based on autophagy and apoptosis pathway. METHODS: CCK-8 assay was used to investigate the effects of PPP with different concentrations (25-300  $\mu\text{g/mL}$ ) on PC3 cell activity after culturing for 24, 48, 72 h, so as to screen the drug concentration and treatment time. PC3 cells were divided into control group (complete culture medium), PPP low-, medium- and high-concentration groups. After treated for 48 h, flow cytometry and Annexin V-FITC/PI staining were used to detect cell cycle distribution and apoptosis of PC3 cells. Western blotting assay was used to detect the expression of apoptosis-related protein as Bax, Bcl-2, as well as the expression of autophagy-related proteins as LC3, Beclin-1, p62, Atg12 and Atg16. RESULTS: The culturing time was chosen as 48 h.  $\text{IC}_{50}$  of PPP was 110  $\mu\text{g/mL}$ , and 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$  were chosen as low, medium, high concentrations of PPP. Compared with control group, the percentage of PC3 cells at phase  $\text{G}_0/\text{G}_1$  decreased significantly in PPP low- and medium-concentration groups while increased significantly at phase S; that of PC3 cells at phase  $\text{G}_0/\text{G}_1$  increased significantly in PPP high-concentration group; while that of PC3 cells at phase  $\text{G}_2/\text{M}$  decreased significantly in PPP medium- and high-concentration groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The apoptosis rate of PC3 cells was increased significantly in PPP groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with control group, protein expression of anti-apoptosis protein Bcl-2 and autophagy-related promoting protein p62 were decreased in PPP groups to different extents, while protein expression of promoting-apoptosis protein Bax as well as autophagy-related protein LC3- II/LC3- I ration and protein expression of Beclin-1, Atg5, Atg12 and Atg16 were increased to different extents; there was statistical significance in above indexes in PPP high-concentration group and some of above indexes in PPP low- and medium-concentration groups ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: PPP can inhibit the proliferation of human prostate cancer PC3 cells, mechanism of which may be related to inducing autophagy and promoting apoptosis.

**KEYWORDS** Pomegranate peel polyphenols; Prostate cancer; PC3 cell; Apoptosis; Autophagy; Mechanism

前列腺癌是中老年男性常见的恶性肿瘤,其在我国的发病率也逐渐上升,至今还是临床难以攻克的疑难之症<sup>[1-2]</sup>,因此探索更加高效便捷的治疗方法具有重要意义。有研究表明,前列腺癌的发展与自噬有密切关系<sup>[3]</sup>。自噬是细胞吞噬自身细胞质蛋白或细胞器进入囊泡,与溶酶体形成自噬溶酶体并降解其包裹的内容物的过程,以此可更新细胞器并完成细胞的自身代谢<sup>[4]</sup>。适度自噬能让靶细胞对外界损伤作出反应,使其存活,同时也能够将受损的细胞器清除干净,有利于维持细胞稳态<sup>[5]</sup>。在前列腺癌的治疗过程中,化疗药物能够激活肿瘤细胞自噬,进而诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>;自噬也能通过对受损细胞器的降解和再利用来保护细胞器和细胞成分免受损伤<sup>[7]</sup>,因此自噬作用可能具有重要的临床价值。

研究表明,石榴科石榴属植物石榴(*Punica granatum* L.)的果汁和果皮提取物均能抑制人前列腺癌PC3细胞系的增殖、迁移和集落形成,且果皮提取物比果汁的效果更优<sup>[8]</sup>。为了探讨石榴果皮有效部位的抗肿瘤活性,本课题组开展了前期研究工作,结果发现石榴皮多酚(Pomegranate peel polyphenols, PPP)对PC3细胞具有一定的抑制作用,并可促进其凋亡,表现出一定的抗肿瘤活性<sup>[9-11]</sup>。基于此,本文将基于自噬与凋亡途径研究PPP对人前列腺癌PC3细胞的抑制作用机制,为阐明

PPP治疗前列腺癌的药效机制奠定理论基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HERAcell 150i型CO<sub>2</sub>恒温培养箱、KS12型生物安全柜、iBright FL1000型凝胶制备成像系统(美国Thermo Fisher Scientific公司);ME54E型分析天平(上海升亮电子科技有限公司);4K1S型高速冷冻离心机(美国Sigma公司);SpectraMax M5型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);LSR II型流式细胞仪(美国BD公司);Mini-Protean 1658001型电泳槽(美国Bio-Rad公司)。

### 1.2 药品与试剂

PPP[新疆医科大学药学院自制,批号:20171224,含量:82.7%(采用高效液相色谱法测定,以安石榴苷计)<sup>[12]</sup>]由新疆医科大学药剂教研室常占瑛实验师提供。

RPMI 1640培养基、磷酸盐缓冲液(pH 7.4)、胰蛋白酶(美国Hyclone公司,批号:SH30809.01、SH30256.01B、J170041);胎牛血清(FBS)、青-链霉素双抗(美国Gibco公司,批号:10099141、15140-122);CCK-8细胞增殖检测试剂盒(日本Dojindo公司,批号:KR675);Annexin V/PI试剂盒(上海贝博生物科技公司,批号:BB-4101);山羊抗兔Bax单克隆抗体、山羊抗兔Bcl-2单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:50599-2、12789-1);山

羊抗兔单克隆自噬抗体检测试剂盒(包含多种自噬相关蛋白的一抗及二抗)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗、内参GAPDH(美国CST公司,批号:4445T、7074P2、2118S);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:26616);BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:23227);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

### 1.3 细胞

人前列腺癌PC3细胞株由上海赛百慷生物技术股份有限公司提供(液氮中保存)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养和溶液配制

取LC3细胞进行复苏,加入完全培养基(即含有10%FBS+1%青-链霉素双抗的RPMI 1640培养基),混匀后接种于培养瓶中,在37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养(以下培养条件相同),6h后观察细胞铺板状态,次日换液。取处于对数生长期的细胞用于后续试验。

取PPP粉末,加水制成质量浓度为800 μg/mL的PPP母液;临用时,取该母液用完全培养基稀释,制成相应质量浓度的PPP药液(现用现配),用于后续试验。

### 2.2 PPP对PC3细胞增殖活性的影响考察

采用CCK-8法对细胞增殖活性进行检测。取对数生长期的PC3细胞,计数后,用完全培养基重悬制成5 000个/mL的细胞悬液,按每孔100 μL接种于96孔板中。将细胞分为对照组和不同质量浓度的PPP干预组,培养至细胞贴壁后,弃去培养液,对照组加入完全培养基,PPP干预组加入相应质量浓度的PPP药液(PPP终质量浓度分别为25、50、100、150、200、250、300 μg/mL<sup>[12]</sup>)。每组设置6个复孔进行重复试验。各组细胞分别培养24、48、72 h后,分别加入CCK-8检测试剂10 μL,继续培养2 h后,采用酶标仪在450 nm波长处检测各孔吸光度(OD),OD值越高,即表明细胞活性越高。计算PC3细胞的增殖抑制率:增殖抑制率(%)=(对照组平均OD值-PPP干预组平均OD值)/对照组平均OD值×100%,并据此计算PPP对PC3细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

### 2.3 PPP对PC3细胞周期的影响考察

采用流式细胞术对细胞周期分布进行检测。取对数生长期PC3细胞,用0.25%胰蛋白酶消化后,以完全培养基制成8 000个/mL的细胞悬液,按每孔2 mL接种于6孔板中。将细胞分为对照组和PPP低、中、高质量浓度组,培养至细胞贴壁后,弃去培养液,对照组加入完全培养基,药物组加入低、中、高质量浓度的PPP药液(质量浓度参考“2.2”项下IC<sub>50</sub>值结果的0.5、1.0、2.0倍设置),继续培养48 h。培养完毕后,弃去培养液,用PBS洗2~3次,每次3 mL;以0.25%胰蛋白酶消化细胞后,加入完全培养基3 mL,以1 000 r/min离心5 min;吸弃上清

液,再用PBS 1 mL重悬细胞,以1 000 r/min离心5 min;吸弃上清,加入无水乙醇固定过夜;次日加入PI染料,在室温下避光染色30 min,并于2 h内采用流式细胞仪测定细胞周期并计算各时相的细胞百分比。试验重复3次。

### 2.4 PPP对PC3细胞凋亡的影响考察

采用流式细胞术对细胞凋亡情况进行检测。取对数生长期PC3细胞,按“2.3”项下方法消化、接种、分组、给药并培养48 h后再消化、离心。收集细胞,加入Binding Buffer 100 μL、Annexin V-FITC试剂5 μL和PI试剂10 μL,混匀,在室温下避光静置15 min;再加入Binding Buffer 400 μL,用200目筛网滤过。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况并计算细胞凋亡率:细胞凋亡率(%)=细胞凋亡数/细胞总数×100%。试验重复3次。

### 2.5 PPP对PC3细胞凋亡和自噬相关蛋白表达的影响考察

采用Western blotting法对凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2和自噬相关蛋白LC3、Beclin-1、p62、Atg-12、Atg-16的表达水平进行检测。取对数生长期PC3细胞,按照“2.3”项下方法消化、接种、分组、给药并培养48 h后再消化、离心。收集细胞,加入RIPA裂解液100 μL+苯甲基磺酰氟(PMSF)1 μL的混合液进行裂解后,吹打细胞,在冰上放置2~3 h后,以12 000 r/min离心15 min。取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度后,煮沸蛋白使其变性。取变性后的蛋白适量,进行SDS-PAGE,随后转膜1.5 h,再封闭2 h,用TBST缓冲液洗涤之后分别加入Bax、Bcl-2、LC3、Beclin-1、p62、Atg-12、Atg-16和GAPDH的一抗(稀释比例均为1:1 000),4℃下孵育过夜;次日以TBST缓冲液洗涤后,加入相应二抗(稀释比例为1:1 000),37℃下避光孵育2 h,然后加入ECL超灵敏发光液曝光。采用凝胶制备成像系统进行检测,以Image Lab 3.0软件对目标条带进行分析。以GAPDH为内参,按目的蛋白与内参蛋白的灰度值之比表示目的蛋白的表达水平。试验重复3次。

### 2.6 统计学方法

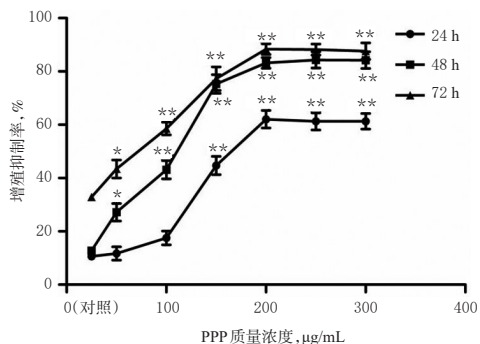
采用SPSS 21.0软件对数据进行统计分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 PPP对PC3细胞增殖活性的影响

与对照组比较,随着PPP质量浓度的升高,细胞的增殖抑制率也逐渐升高;当以200 μg/mL及以上的PPP培养48 h时,细胞增殖抑制率不再明显升高;当以150~300 μg/mL的PPP分别培养24 h及以50~300 μg/mL的PPP分别培养48、72 h时,细胞增殖抑制率均显著低于对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),且PPP作用48、72 h时的细胞增殖抑制率较为接近。因此,后续试验选择48 h为培养时间。此外,根据SPSS 21.0软件计算出PPP对PC3细

胞的 $IC_{50}$ 值为 $110 \mu\text{g/mL}$ ,并据此将后续试验中PPP低、中、高质量浓度分别设定为 $50, 100, 200 \mu\text{g/mL}$ (分别接近于 $0.5, 1.0, 2.0$ 倍 $IC_{50}$ )。PPP对PC3细胞的增殖抑制率见图1。



注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图1 PPP对PC3细胞的增殖抑制率( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig 1 Inhibitory rate of PPP on the proliferation of PC3 cells( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.2 PPP对PC3细胞周期分布的影响

与对照组比较,PPP低、中质量浓度组 $G_0/G_1$ 期细胞百分比均显著降低, $S$ 期细胞百分比均显著升高( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ );PPP高质量浓度组 $G_0/G_1$ 期细胞百分比显著升高( $P < 0.05$ );PPP中、高质量浓度组 $G_2/M$ 期细胞百分比均显著降低( $P < 0.01$ )。PPP作用下PC3细胞周期的分布图见图2,不同时相细胞百分比见表1。

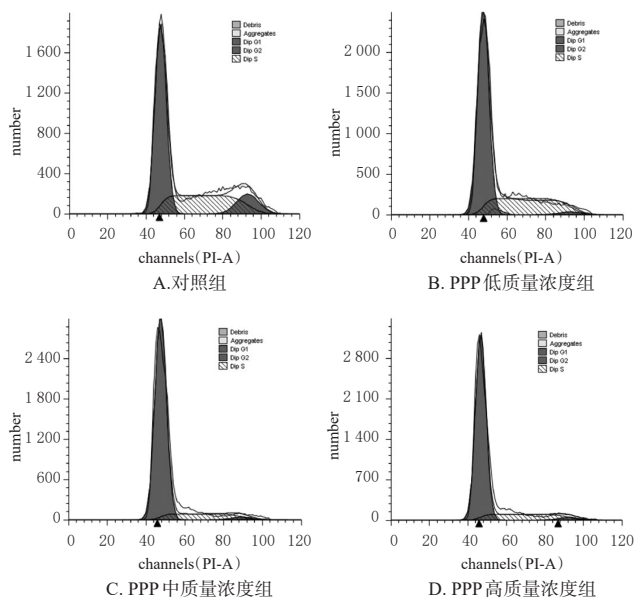


图2 PPP作用下PC3细胞周期的分布图

Fig 2 Cell cycle distribution of PC3 cells after treated with PPP

### 3.3 PPP对PC3细胞凋亡的影响

与对照组比较,PPP低、中、高质量浓度组细胞凋亡率均显著升高( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。PPP作用下PC3细胞凋亡的散点图见图3,细胞凋亡率见表1。

表1 PPP作用下PC3细胞不同时相细胞百分比和凋亡率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 1 Percentage of cells in different cycle phases and apoptosis rate of PC3 cells after treated with PPP( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	各时相细胞百分比, %			细胞凋亡率, %
	$G_0/G_1$ 期	$G_2/M$ 期	S期	
对照组	$75.895 \pm 0.869$	$12.490 \pm 0.537$	$11.620 \pm 1.400$	$1.700 \pm 1.296$
PPP低质量浓度组	$57.605 \pm 2.171^{**}$	$10.435 \pm 1.252$	$31.960 \pm 0.933^*$	$9.350 \pm 1.053^*$
PPP中质量浓度组	$64.990 \pm 2.899^*$	$1.840 \pm 0.212^{**}$	$33.170 \pm 2.687^{**}$	$15.750 \pm 2.369^{**}$
PPP高质量浓度组	$82.680 \pm 2.093^*$	$2.220 \pm 0.141^{**}$	$15.105 \pm 1.959$	$22.950 \pm 1.852^{**}$

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

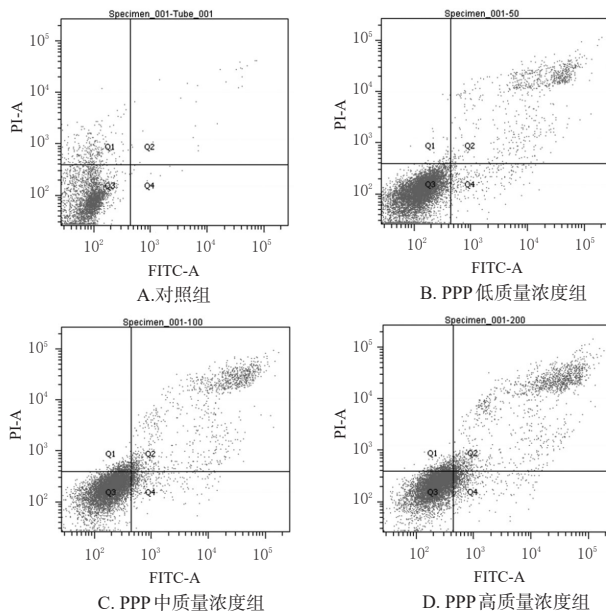


图3 PPP作用下PC3细胞凋亡的散点图

Fig 3 Scatter plots of the apoptosis of PC3 cells after treated with PPP

### 3.4 PPP对PC3细胞凋亡及自噬相关蛋白表达的影响

3.4.1 凋亡相关蛋白 与对照组比较,PPP各质量浓度组细胞中Bax蛋白表达水平均呈升高趋势,其中PPP高质量浓度组Bax蛋白表达水平较对照组显著升高( $P < 0.05$ );PPP各质量浓度组细胞中Bcl-2蛋白表达水平均呈下降趋势,其中PPP中、高质量浓度组Bcl-2蛋白表达水平均较对照组显著降低( $P < 0.05$ )。PPP作用下PC3细胞中凋亡相关蛋白表达的电泳图见图4,蛋白表达水平检测结果见表2。

3.4.2 自噬相关蛋白 与对照组比较,PPP各质量浓度组细胞中LC3- II/LC3- I比值和Beclin-1、Atg12、Atg16蛋白表达水平总体呈升高趋势,其中PPP高质量浓度组LC3- II/LC3- I比值和Atg12、Atg16蛋白表达水平以及PPP中、高质量浓度组Beclin-1蛋白表达水平均较对照组显著升高( $P < 0.05$ );PPP各质量浓度组细胞中p62蛋白表达水平均较对照组显著降低( $P < 0.05$ )。PPP作用下PC3细胞中自噬相关蛋白表达的电泳图见图5,蛋白

表达水平见表3。

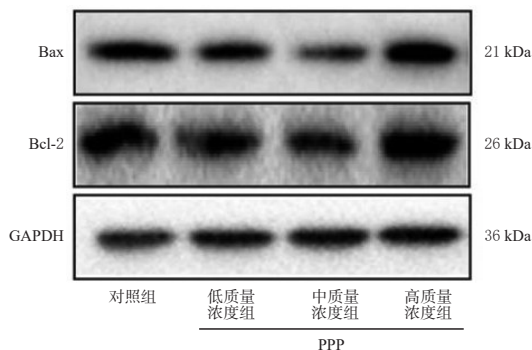


图4 PPP作用下PC3细胞中凋亡相关蛋白表达的电泳图

Fig 4 Electrophoretic diagrams of apoptosis-related protein expression in PC3 cells after treated with PPP

表2 PPP作用下PC3细胞凋亡相关蛋白的表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 2 Expression of apoptosis-related protein in PC3 cells after treated with PPP ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	Bax	Bcl-2
对照组	0.749 ± 0.394	1.948 ± 0.661
PPP低质量浓度组	0.793 ± 0.259	1.598 ± 0.570
PPP中质量浓度组	0.825 ± 0.386	1.217 ± 0.020*
PPP高质量浓度组	1.224 ± 0.429*	1.136 ± 0.132*

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

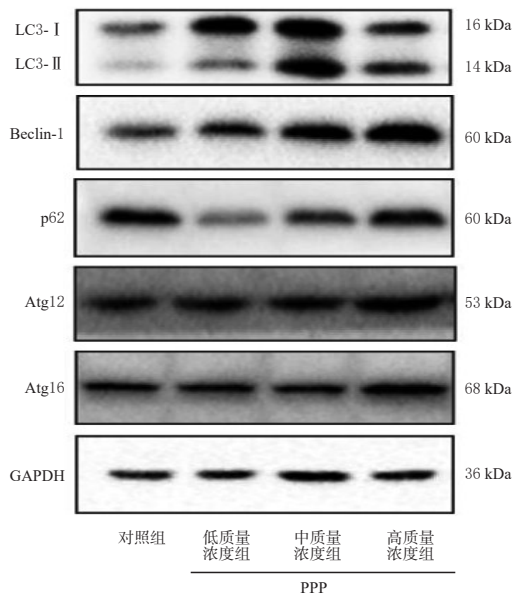


图5 PPP作用下PC3细胞中自噬相关蛋白表达的电泳图

Fig 5 Electrophoretic diagrams of autophagy-related protein expression in PC3 cells after treated with PPP

#### 4 讨论

研究发现,PPP具有抑制肿瘤细胞增殖及促进其凋

表3 PPP作用下PC3细胞自噬相关蛋白的表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 3 Expression of autophagy-related protein in PC3 cells after treated with PPP ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	LC3-II/LC3-I	Beclin-1	p62	Atg12	Atg16
对照组	0.349 ± 0.045	0.523 ± 0.204	1.252 ± 0.546	0.520 ± 0.160	0.433 ± 0.081
PPP低质量浓度组	0.419 ± 0.023	0.685 ± 0.264	0.659 ± 0.511*	0.500 ± 0.167	0.501 ± 0.042
PPP中质量浓度组	0.565 ± 0.106	0.955 ± 0.305*	0.656 ± 0.378*	0.725 ± 0.215	0.515 ± 0.133
PPP高质量浓度组	0.825 ± 0.130*	1.181 ± 0.350*	0.591 ± 0.463*	0.963 ± 0.086*	0.875 ± 0.120*

注:与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

Note: vs. control group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

亡的作用<sup>[13]</sup>。细胞增殖抑制是药物抑制作用的综合性表现之一,其机制可能与细胞凋亡、周期阻滞、坏死及衰老等原因有关。有研究表明,干预及调节肿瘤细胞的周期进而阻滞其生长是目前肿瘤治疗的重要方法<sup>[14]</sup>。但目前并未见从分子机制方面报道PPP对人前列腺癌PC3细胞的促凋亡作用。因此,本研究采用CCK-8法检测了不同质量浓度PPP对PC3细胞增殖活性的影响,结果显示PPP能抑制PC3细胞增殖;当PPP质量浓度为200~300 μg/mL、作用时间为48~72 h时,细胞增殖抑制率基本到达平台期,且IC<sub>50</sub>为110 μg/mL,因此以50、100、200 μg/mL的PPP作用48 h进行后续试验。细胞凋亡和周期阻滞试验的结果显示,PPP能有效阻滞PC3细胞由G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期向S期转化,阻止细胞生长,并诱导其凋亡。

现有研究表明,细胞凋亡与自噬活性的调控有关,自噬水平的下调可以促进前列腺癌细胞的生长,通过药物等干预方式上调自噬水平后,能诱导细胞凋亡<sup>[15-17]</sup>。在此基础上,本研究将PPP作用于PC3细胞,并通过检测细胞自噬水平来探索自噬活性对PPP诱导PC3细胞凋亡的影响,为阐明PPP抑制肿瘤细胞增殖的机制提供依据。Bax和Bcl-2是细胞凋亡相关的重要标志性蛋白,其中促凋亡蛋白Bax接收到诱导凋亡信号后,能激活Caspase家族从而导致细胞凋亡;而抗凋亡蛋白Bcl-2能影响线粒体膜的通透性,从而抑制Caspases的激活,进而抑制细胞凋亡<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,与对照组比较,随着PPP质量浓度的升高,PC3细胞中Bax的表达水平有不同程度的升高,Bcl-2的表达水平有不同程度的降低,表明PPP可诱导前列腺癌细胞的凋亡。

自噬本身作用机制及其在肿瘤中的作用非常复杂<sup>[18]</sup>,作为诱导细胞发生自噬的标志性蛋白,LC3、Beclin-1是反映细胞自噬水平的重要标志<sup>[19]</sup>。其中,LC3分为I型和II型,LC3-I在磷脂酰乙醇胺的酯化作用下转化为LC3-II,而LC3-II/LC3-I比例的升高是自噬水平上升的标志<sup>[20]</sup>。另一自噬标志蛋白p62是细胞自噬的降解底物,当自噬作用增强时,p62的降解增加,细胞中的p62蛋白表达水平随之下降<sup>[21]</sup>。在本研究中发现,与对照组相比,自噬主要标志蛋白LC3-II/LC3-I比值和Beclin-1表达水平在PPP各质量浓度组细胞中均有不同程度的升高,表明细胞自噬水平升高;p62表达水平则显

著降低,说明p62被降解,从而诱导细胞发生凋亡。这一结果与宋峰等<sup>[19]</sup>的研究一致。除此之外,自噬体的形成还有赖于自噬相关基因(ATG)相关蛋白的共价结合<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,与对照组比较,自噬相关蛋白Atg12和Atg16表达水平明显提高,说明在药物干预过程中PC3细胞形成了自噬体<sup>[21]</sup>。这进一步表明了PPP可能是通过诱导自噬进而促进凋亡这一机制而对PC3细胞增殖产生了抑制作用。

综上所述,PPP能抑制人前列腺癌PC3细胞增殖,其机制可能与诱导细胞发生自噬从而促进细胞凋亡有关。然而,PPP诱导自噬从而抑制肿瘤发展的相关机制尚不完全清楚,还需进一步深入研究。

### 参考文献

[1] REBBECK TR, DEVESA SS, CHANG BL, et al. Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of African descent[J]. *Prostate Cancer*, 2013. DOI:10.1155/2013/560857.

[2] CRAWFORD ED, STONE NN, EVAN YY, et al. Challenges and recommendations for early identification of metastatic disease in prostate cancer[J]. *Urology*, 2014, 83(3):664-669.

[3] 项荣,孟昭玥,胡艳.自噬与前列腺癌[J].*肿瘤*, 2012, 32(12):1035-1038.

[4] 郑祖国,张评沛.细胞自噬形成机制及其功能研究进展[J].*中国细胞生物学学报*, 2016, 38(12):1541-1548.

[5] KLIONSKY DJ, EMR SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation[J]. *Science*, 2000, 290(5497):1717-1721.

[6] FULDA S, KÖGEL D. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy[J]. *Oncogene*, 2015, 34(40):5105-5113.

[7] 王燕燕,李荣,李平利,等.自噬调控在前列腺癌化疗耐药中作用的研究进展[J].*山东医药*, 2018, 58(44):106-109.

[8] CHAVES FM, PAVAN ICB, SALVINO DA SILVA LG, et al. Pomegranate juice and peel extracts are able to inhibit proliferation, migration and colony formation of prostate cancer cell lines and modulate the Akt/mTOR/S6K signaling pathway[J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2020, 75(1):54-62.

[9] 郑欣,常占瑛,阿依居来克·卡得尔,等.水质对石榴皮中

安石榴苷提取纯化工艺的影响[J].*食品安全质量检测学报*, 2019, 10(4):934-937.

[10] 布鲁根,常占瑛,刘盟,等.石榴皮多酚提取物亚急性毒性试验研究[J].*新疆医科大学学报*, 2017, 40(4):498-502.

[11] 刘盟,王春梅,宋建忠,等.石榴皮多酚对人前列腺癌PC-3荷瘤小鼠合理剂量及毒性作用研究[J].*新疆医科大学学报*, 2019, 42(8):1054-1057.

[12] 郑欣,刘盟,常占瑛,等.石榴皮多酚纯化物对LO2肝细胞的损伤影响[J].*新疆医科大学学报*, 2019, 42(2):230-233.

[13] GREEN DR, GALLUZZI L, KROEMER G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging[J]. *Science*, 2011, 333(6046):1109-1112.

[14] 曲范杰,张捷,时淑珍,等.比卡鲁胺对三阴性乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖抑制和诱导凋亡的影响[J].*中国当代医药*, 2019, 26(36):47-49.

[15] TANG X, JIA J, LI F, et al. Salen-Mn compounds induces cell apoptosis in human prostate cancer cells through promoting AMPK activity and cell autophagy[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49):86277-86286.

[16] TAN J, JIANG X, YIN G, et al. Anacardic acid induces cell apoptosis of prostatic cancer through autophagy by ER stress/DAPK3/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3):1373-1382.

[17] 高国栋,张庆云,易利,等. Cyr61在前列腺癌组织中的表达及其对前列腺癌细胞增殖、上皮间质转化和自噬的影响[J].*广东医学*, 2019, 40(11):1535-1541.

[18] FARROW JM, YANG JC, EVANS CP. Autophagy as a modulator and target in prostate cancer[J]. *Nat Rev Urol*, 2014, 11(9):508-516.

[19] 宋峰,王瑾,王丽,等.自噬促进IL-1 $\beta$ 诱导的大鼠INS-1胰岛 $\beta$ 细胞凋亡[J].*中国药理学通报*, 2019, 35(11):1564-1569.

[20] KLIONSKY DJ, ABDELMOHSEN K, ABE A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy: 3rd edition[J]. *Autophagy*, 2016, 12(1):1-222.

[21] 王镜翔,胡伟,李霞.自噬在前列腺癌发生发展和治疗中的研究进展[J].*现代肿瘤医学*, 2020, 28(4):668-672.

(收稿日期:2020-02-25 修回日期:2020-07-07)

(编辑:段思怡)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅