黑果枸杞花色苷Pt3G对前列腺癌LNCaP和PC-3细胞增殖与凋亡的影响

李施莹^{1†}, 李占龙^{1†}, 米佳², 禄璐², 闫亚美^{2*}, 曹有龙^{2*}, 冉林武^{1,3*}, 杨文³

1. 宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 银川 750004;

2. 宁夏农林科学院枸杞科学研究所, 银川 750002;

3. 宁夏医科大学实验动物中心, 银川 750004

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: yanyamei@nwbrc.com.cn; caoyoulong@nwbrc.com.cn; rlw@nxmu.edu.cn

2021-08-31 收稿, 2021-10-25 修回, 2021-10-27 接受, 2021-10-28 网络版发表

宁夏回族自治区自然科学基金(2019AAC03147)和宁夏回族自治区重点研发计划(2019BFG02026, 2020BBF02006)资助

摘要 有报道指出, 花色苷对疾病具有一定的化学预防活性. 黑果枸杞富含花色苷, 具有多种生物活性. 本实验前期研究发现, 黑果枸杞花色苷Pt3G可通过ROS/PTEN/PI3K/Akt途径抑制前列腺癌DU145细胞的增殖. 本研究针对另外2种前列腺癌细胞LNCaP和PC-3进一步探讨黑果枸杞花色苷Pt3G抑制前列腺癌细胞的作用及其相关机制. 采用甲基噻唑基四唑比色法检测细胞增殖、流式细胞术和TdT介导的dUTP缺口末端标记技术(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)法检测细胞凋亡以及蛋白印迹法检测相关蛋白的表达. 结果表明, Pt3G以浓度依赖性方式抑制细胞增殖, 其抑制LNCaP和PC-3细胞的半数抑制浓度分别为601.97和445.79 $\mu\text{g/mL}$. 流式细胞术和TUNEL检测发现, Pt3G能够诱导前列腺癌LNCaP和PC-3细胞凋亡, 并促进细胞周期阻滞在S期. 而且, 不同浓度Pt3G处理前列腺癌细胞24 h后, 细胞抗凋亡因子PI3K、*p*-PI3K、Akt、*p*-Akt的表达水平显著降低, 而促凋亡因子Bax、Cytochrome c、caspase 3、cleaved caspase 3的表达显著升高. 此外, 研究还发现, Pt3G可以激活LNCaP和PC-3细胞的PTEN蛋白并刺激细胞ROS的过量产生来诱导LNCaP和PC-3细胞凋亡. 综上, 本研究进一步证明了黑果枸杞花色苷Pt3G可能通过ROS/PTEN/PI3K/Akt/caspase 3途径抑制LNCaP和PC-3细胞增殖并促进细胞凋亡. 因此, 黑果枸杞花色苷Pt3G可能是预防或治疗前列腺癌的一种潜在抗增殖剂.

关键词 黑果枸杞, 花色苷, 细胞凋亡, ROS/PTEN/PI3K/Akt, LNCaP和PC-3细胞

流行病学研究表明, 随着人口老龄化、环境和饮食改变以及肥胖等情况加剧, 前列腺癌在全球范围内的发病率呈递增趋势^[1]. 目前, 前列腺癌的治疗方法如手术、化疗、放疗和激素等能够提高患者的生存率, 但这些治疗方法存在明显的副作用^[2,3]. 因此, 从天然植物中寻找低毒、廉价、具有抗癌作用的活性成分成为预防与治疗前列腺癌的新途径和新策略.

花色苷是一类特殊的水溶性植物色素, 具有抗氧化、抗炎和潜在预防心血管疾病等一系列生物活性^[4]. 多项研究表明, 花色苷对肿瘤细胞具有一定抑制作用, 比如结肠癌、前列腺癌、胃癌、乳腺癌和宫颈癌等^[5]. 黑果枸杞是一种呈紫黑色的球状浆果, 富含花色苷类物质. 据报道, 矮牵牛花素3-O-[6-O-(4-O-(反式-对香豆酰基)- α -L-吡喃鼠李糖基)- β -D-吡喃葡萄糖基]-5-O-[β -

引用格式: 李施莹, 李占龙, 米佳, 等. 黑果枸杞花色苷Pt3G对前列腺癌LNCaP和PC-3细胞增殖与凋亡的影响. 科学通报, 2022, 67: 364–375

Li S Y, Li Z L, Mi J, et al. Effects of *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin Pt3G on the proliferation and apoptosis of prostate cancer LNCaP and PC-3 cells (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 364–375, doi: [10.1360/TB-2021-0696](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0696)

D-吡喃葡萄糖苷](Pt3G, 图S1)是黑枸杞中的主要花色苷, 且具有抗氧化、抗炎等多种生物活性^[6]。本实验前期研究发现, Pt3G能够促进前列腺癌DU145细胞凋亡, 抑制其增殖, 可能的机制与调控ROS/PTEN/PI3K信号通路有关。为了进一步探索黑果枸杞花色苷Pt3G对前列腺细胞的作用及其相关机制, 本研究通过四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)法、流式细胞术、TdT介导的dUTP缺口末端标记技术(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)法、JC-1染色和Western Blot法研究黑果枸杞花色苷Pt3G对前列腺癌LNCaP和PC-3细胞的作用及其潜在作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

(i) 细胞株。雄激素依赖性前列腺癌细胞LNCaP和雄激素非依赖性前列腺癌细胞PC-3购买于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

(ii) 试剂。RPMI-1640培养基、F-12培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司; 青霉素链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶消化液(含EDTA)、0.25%胰蛋白酶消化液(不含EDTA)购自北京索莱宝科技有限公司; MTT试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司; 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自北京博奥拓达科技有限公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自美国Becton Dickinson公司; TUNEL试剂盒购自美国Roche公司; DAPI染色液购自北京索莱宝科技有限公司; RNase/PI细胞周期检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司; ROS检测试剂盒购自南京建成科技有限公司; SDS-PAGE凝胶试剂盒购自美国Bio-Rad公司; JC-1凋亡检测试剂盒、HRP标记山羊抗兔IgG抗体、HRP标记山羊抗鼠IgG抗体购自美国Abbkine公司; Tween-20购自北京博奥拓达科技有限公司; PTEN、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bcl-2、Bax、Cytochrome C、Caspase 3、Cleaved caspase 3抗体购自美国Abcam公司; β -actin一抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 预染蛋白Marker、抗体洗脱液、ECL发光液购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

(iii) 主要仪器。CO₂细胞培养箱、全波长酶标仪购自美国Thermo Fisher Scientific公司; FACS Calibur流式

细胞仪购自美国Becton Dickinson公司; 垂直电泳系统、凝胶成像分析系统、细胞计数仪购自美国Bio-Rad公司; 微量移液器购自德国Eppendorf公司; T25细胞培养瓶、Cell Bind细胞培养瓶、60 mm细胞培养皿、细胞培养板购自成都康宁科技发展有限公司。

1.2 实验方法

(i) 黑果枸杞花色苷Pt3G。黑果枸杞中主要的花色苷单体Pt3G提取和鉴定的主要步骤^[7]: (1) 花色苷用0.5% TFA甲醇溶液提取, 在低于40°C的低压条件下进行浓缩, 得到花色苷粗提物。(2) 花色苷粗提物经XAD-7大孔树脂柱和sephadex LH-20凝胶柱洗脱, 然后通过AKTA半制备型高效液相色谱仪制备主要的花色苷单体。(3) 使用MALDI-TOF-MS测定提取的黑果枸杞花色苷主要单体Pt3G。鉴定提取到的黑果枸杞花色苷主要单体Pt3G的纯度为98%(Pt3G的高效液相色谱图和质谱图等见图S2)。

(ii) 细胞培养。人前列腺癌LNCaP、PC-3细胞分别用RPMI-1640和F-12培养液加入10% FBS与1%青霉素混合液培养。置于37°C、含5% CO₂恒温培养箱中培养。细胞单层贴壁生长, 在细胞铺满培养皿底部70%~80%时, 加入2 mL PBS清洗2次, 用1 mL的胰蛋白酶消化液(含EDTA)消化, 加入完全培养液, 吹吸混匀使其形成单细胞悬液, 以167.7×g的速度离心3 min, 弃去上清液, 收集细胞进行后续试验。

(iii) MTT法测定细胞增值率。采用MTT法测定不同浓度Pt3G溶液处理细胞后的增值率。将细胞调整到浓度为5×10⁴个/mL的细胞悬液中, 然后将200 μ L的细胞悬液(每孔1×10⁴个细胞)置于96孔细胞培养板中。培养24 h后, 再用不同浓度的Pt3G溶液处理细胞24 h。吸弃处理后的培养基, 在96孔板的每孔中加入50 μ L MTT溶液(1 mg/mL)。培养4 h后, 将含有MTT的培养基替换为150 μ L的DMSO, 使甲瓚晶体在避光室温条件下完全溶解20 min。用490 nm的全波长酶标仪测定细胞内形成的溶解度甲瓚的吸光度。所有实验至少重复3次以计算细胞增值率:

$$= (\text{实验组平均}A\text{值}/\text{对照度平均}A\text{值}) \times 100\% \quad (1)$$

(iv) 流式细胞术分析细胞凋亡。通过流式细胞术对Annexin V-FITC/PI染色的PCa细胞进行细胞凋亡分析^[8]。调整细胞悬液浓度为1×10⁶个/mL(每孔含1×10⁶个

细胞)接种到6孔板, 孵育24 h后每孔加入2 mL含不同浓度Pt3G的细胞培养液, 避光培养24 h. 然后使用不含EDTA的胰蛋白酶消化液处理Pt3G干预后的细胞, 并制备浓度为 1×10^6 个/mL的细胞悬液. 取100 μ L的细胞悬液转移到1.5 mL的培养管中, 加入5 μ L的Annexin V-FITC和5 μ L PI. 将样品混合物轻轻重悬, 避光条件下室温孵育15 min. 培养结束后, 向培养管中加入400 μ L的1 $\times$ 缓冲液. 最后使用FACSCalibur流式细胞仪分析染色细胞.

(v) TUNEL法检测细胞凋亡. TUNEL法检测细胞的凋亡情况^[9]. 将细胞以 1×10^6 个/mL的密度接种于多聚赖氨酸包被的细胞爬片上. 恒温、恒湿条件孵育24 h后, 每孔加入不同浓度的Pt3G培养液2 mL, 培养24 h. 处理后用4%多聚甲醛室温固定30 min, 用PBS洗涤3次, 30% H₂O₂甲醇孵育15 min. 接下来, 使用0.1% Triton X-100的柠檬酸钠通透液在2~8°C条件下孵育10 min. 孵育后, 按照TdT(1 μ L)和荧光素标记的dUTP溶液(9 μ L)的比例配制TUNEL染色液. 然后, 向每个样品中加入50 μ L TUNEL染色液. 在湿箱中37°C孵育1 h后, 每个样品加入30 μ L DAPI染色液5 min, PBS洗涤细胞后, 在避光条件下使用荧光显微镜观察, 染色后凋亡细胞呈现蓝绿色荧光, 计算各组凋亡细胞的比例并通过统计学方法进行分析.

(vi) 流式细胞术检测细胞周期. 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/mL(每孔含 1×10^6 个细胞)接种到6孔板24 h. 孵育后每孔加入2 mL含不同浓度Pt3G的细胞培养液继续培养24 h. 用预冷的PBS收集细胞, 然后细胞悬液以377.3 $\times$ g的速度离心5 min. PBS洗涤后, 用75%冷乙醇溶液重悬细胞, -20°C固定1 h后, 加入RNase A溶液20 μ L, 37°C孵育30 min, 然后, 每个样品加入400 μ L PI染色液, 避光条件下室温孵育60 min. 最后, 采用流式细胞仪对所有样本进行检测分析.

(vii) JC-1染色检测Pt3G对细胞内线粒体膜电位的影响. 采用JC-1荧光探针检测凋亡细胞线粒体膜电位^[10]. 取对数生长期的LNCaP和PC-3细胞, 用含EDTA的胰蛋白酶消化液消化后制备成细胞悬液, 以 1×10^5 个/mL的细胞密度接种于24孔细胞培养板. 恒温孵育24 h后加入1 mL含不同浓度Pt3G的细胞培养液. 孵育24 h结束后, 阳性组细胞采用10 μ mol/L的CCCp干预25 min, 未处理细胞作为对照组. 干预后, 用500 μ L的JC-1染色液替换含有Pt3G的培养基避光孵育30 min. 孵育后, 弃用染色液, 用PBS洗涤细胞2次. 洗涤后, 用预加

热的DMEM培养基覆盖细胞, 然后在倒置荧光显微镜下观察并拍摄荧光图片(JC-1聚合物, $E_x/E_m = 585/590$ nm, JC-1单体, $E_x/E_m = 510/527$ nm).

(viii) 免疫荧光检测Pt3G对细胞内ROS的影响. 采用DCFH-DA探针检测细胞内ROS. 细胞孵育24 h后, 阳性组细胞用ROS氢供体处理30 min, DMSO对照组使用含DMSO的培养基培养24 h. 处理后用10 μ mol/L DCFH-DA在37°C黑暗中染色25 min. 然后, 用无血清DMEM培养基代替染色溶液. 最后, 利用倒置荧光显微镜观察细胞内ROS的表达情况并拍照.

(ix) Western Blot. 使用500 μ L细胞裂解液在冰上充分裂解LNCaP和PC-3细胞. 在4°C条件下以24148.8 $\times$ g的速度离心10 min, 将总蛋白溶液分装后放置于-80°C保存. 然后用BCA蛋白检测试剂盒测定总蛋白浓度. 等量蛋白质在10% SDS聚丙烯酰胺凝胶中分离, 然后将蛋白质转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上. 室温下用新鲜制备的5%脱脂牛奶阻断蛋白条带1 h. 阻断后, 将PVDF膜与适量的一抗在4°C孵育过夜. 用TBST将PVDF膜冲洗3次, 然后滴加二抗在蛋白条带上, 室温孵育1 h. 用TBST冲洗3次后, 将PVDF膜放入Bio-Rad凝胶成像仪中. 用ECL溶液观察蛋白条带. 利用Image成像系统观察蛋白条带, 使用IPP图像软件通过光密度法进行蛋白表达的定量分析.

(x) 统计学方法. 所有实验至少重复3次, 实验数据的分析使用SPSS23.0统计软件, 计量资料结果以 $\bar{X} \pm SD$ ($\bar{X}$ 为均值, SD 为标准差)表示, 多组均数比较用方差分析, 两两比较用最小显著性差异法(least significant difference, LSD). $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞增殖的影响

为了确定Pt3G对前列腺癌LNCaP和PC-3细胞增殖活力的影响, 采用MTT法检测细胞增殖率. 如图1(a), (c)所示, Pt3G以浓度依赖性方式抑制LNCaP和PC-3细胞的生长. 半数抑制浓度IC₅₀值分别为601.97、445.79 μ g/mL. 通过倒置显微镜观察细胞形态学变化, Pt3G处理24 h后, 与对照组相比, 用Pt3G处理后的LNCaP和PC-3细胞形态变得圆而钝, 且数目减少, 细胞贴壁能力下降, 部分细胞呈现漂浮状态.

图 1 (网络版彩色)黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞增殖的影响. (a) LNCaP细胞的增殖率. (b) LNCaP细胞形态学改变. (c) PC-3细胞的增殖率. (d) PC-3细胞形态学改变. 细胞增殖率以 $\bar{X} \pm SD$ 表示($n = 3$); 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 1 (Color online) The effect of Pt3G on the proliferation of prostate cancer LNCaP and PC-3 cells. (a) The cell proliferation rate of LNCaP cells. (b) The morphological changes of LNCaP cells. (c) The cell proliferation rate of PC-3 cells. (d) The morphological changes of PC-3 cells. The rates of cell proliferation were expressed by $\bar{X} \pm SD$ ($n = 3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞凋亡的影响

为了进一步研究黑果枸杞花色苷Pt3G对前列腺癌LNCaP和PC-3细胞增殖的抑制是否归因于细胞凋亡, 使用流式细胞术和TUNEL法检测细胞凋亡. 如图2所示, 与对照组相比, Pt3G处理的细胞中凋亡细胞和死细胞的百分比均显著增加. 用200、400和800 µg/mL Pt3G处理LNCaP细胞24 h后, 细胞凋亡率分别为 $3.57\% \pm 0.25\%$ 、 $8.77\% \pm 0.22\%$ 、 $15.87\% \pm 2.26\%$; 用150、300和600 µg/mL Pt3G处理PC-3 24 h后, 细胞凋亡率分别为 $7.30\% \pm 0.93\%$ 、 $10.50\% \pm 1.07\%$ 、 14.57%

$\pm 1.36\%$.

使用TUNEL法检测LNCaP和PC-3细胞凋亡. 如图3所示, 对照组几乎没有出现发蓝绿色合并荧光的凋亡细胞. 与对照组相比, 随着Pt3G浓度的增加, 凋亡的LNCaP和PC-3细胞数量均显著增加. 综上, 流式细胞术和TUNEL法测定的结果表明, 黑果枸杞花色苷Pt3G显著抑制LNCaP和PC-3细胞的增殖可能是通过诱导细胞凋亡实现的.

2.3 黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞周期的影响

为探究黑果枸杞花色苷Pt3G对前列腺癌LNCaP和

图2 (网络版彩色)流式细胞术检测黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞凋亡的影响. (a) 流式细胞术检测LNCaP细胞凋亡. (b) LNCaP细胞凋亡的比例. (c) 流式细胞术检测PC-3细胞凋亡. (d) PC-3细胞凋亡的比例. 数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示($n = 3$); 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 2 (Color online) The effect of anthocyanin Pt3G on the apoptosis of LNCaP and PC-3 cells detected by flow cytometry. (a) The apoptosis of LNCaP cells was detected by flow cytometry. (b) The proportion of apoptotic cells after Pt3G treatment in LNCaP cells. (c) The apoptosis of PC-3 cells was detected by flow cytometry. (d) The proportion of apoptotic cells after Pt3G treatment in PC-3 cells. All data were expressed as $\bar{x} \pm SD$ ($n = 3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

PC-3细胞增殖的抑制是否归因于细胞周期的阻滞, 通过流式细胞术测定细胞周期变化. 如图4所示, 与对照组相比, 随着黑果枸杞花色苷Pt3G浓度的增加, LNCaP和PC-3细胞处于S期的细胞群百分比显著增加并呈剂量依赖关系.

2.4 黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞内线粒体膜电位的影响

为检测Pt3G干预的LNCaP和PC-3细胞内线粒体膜电位的变化, 用JC-1荧光染料对细胞中线粒体膜电位

进行分析. 如图5所示, Pt3G以剂量依赖的相关性下调LNCaP和PC-3细胞内线粒体的膜电位. 这些结果表明, 黑果枸杞花色苷Pt3G导致LNCaP和PC-3细胞线粒体膜电位的损失.

2.5 黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞ROS产生的影响

用DCFH-DA荧光染料测定细胞内ROS的含量. 如图6所示, 细胞内的荧光强度随Pt3G浓度增加而增加. DMSO作为DCFH-DA荧光染料的溶剂不会影响细胞

图 3 (网络版彩色)流式细胞术检测黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞凋亡的影响. (a) TUNEL法检测LNCaP细胞凋亡. (b) LNCaP细胞的凋亡率. (c) TUNEL法检测PC-3细胞凋亡. (d) PC-3细胞的凋亡率. 细胞凋亡率用 $\bar{X} \pm SD$ 表示($n = 3$); 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 3 (Color online) The effect of anthocyanin Pt3G on the apoptosis of LNCaP and PC-3 cells detected using the TUNEL assay. (a) The apoptosis in LNCaP cells was detected using the TUNEL assay. (b) The proportion of apoptotic cells after Pt3G treatment in LNCaP cells. (c) The apoptosis in PC-3 cells was detected using the TUNEL assay. (d) The proportion of apoptotic cells after Pt3G treatment in PC3 cells. The proportion of apoptotic cells was expressed by $\bar{X} \pm SD$ ($n = 3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

中ROS的产生. 这些结果表明, 黑果枸杞花色苷Pt3G诱导LNCaP和PC-3细胞ROS产生具有剂量依赖性.

2.6 黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞PTEN/PI3K/Akt信号通路的影响

有研究表明, PTEN可以通过阻滞PI3K/Akt途径的活化来实现抗肿瘤细胞增殖的作用. 如图7所示, 与对照组相比, 用不同浓度的Pt3G处理LNCaP和PC-3细胞24 h后, 可显著提高PTEN的表达水平, 明显下调抗凋亡因子PI3K、 p -PI3K、Akt、 p -Akt的表达水平. 此外,

对PTEN/PI3K/Akt途径下游凋亡相关因子的表达情况进行检测. 与对照组相比, 黑果枸杞花色苷Pt3G能显著提高促凋亡因子Bax、Cytochrome c、caspase 3、cleaved caspase 3的表达, 降低抗凋亡因子Bcl-2的表达水平. 上述结果表明, 黑果枸杞花色苷Pt3G可以通过调节PTEN/PI3K/Akt途径中凋亡相关因子的表达, 从而实现抑制LNCaP和PC-3细胞增殖的作用.

3 讨论

研究表明, 植物来源的天然产物具有潜在的抗癌

图 4 (网络版彩色)黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞周期的影响. (a) 流式细胞术检测LNCaP细胞周期的变化. (b) LNCaP细胞在细胞周期各阶段的百分比. (c) 流式细胞术检测PC-3细胞周期的变化. (d) PC-3细胞在细胞周期各阶段的百分比. 数据以 $\bar{x} \pm SD$ 表示($n = 3$); 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 4 (Color online) The effect of anthocyanin Pt3G on cell cycle of LNCaP and PC-3 cells. (a) The cell cycle of LNCaP cells was tested using flow cytometry. (b) The percentage of LNCaP cells in each phase of the cell cycle. (c) The cell cycle of PC-3 cells was tested using flow cytometry. (d) The percentage of PC-3 cells in each phase of the cell cycle. All data were expressed as $\bar{x} \pm SD$ ($n = 3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

作用. 因此, 近年来, 人们越来越关注使用植物天然化合物进行化学预防. 流行病学研究和体外实验结果表明, 来自不同天然植物的花色苷对前列腺癌具有一定的预防和治疗功效^[11]. 黑果枸杞也称黑枸杞, 是茄科枸杞属灌木植物, 其成熟果实富含花色苷类物质^[12]. 近年来, 越来越多的报道表明, 黑果枸杞中的花色苷具有抗氧化、抗炎和降血脂等多种生物学活性^[13]. 本研究中, 黑果枸杞花色苷Pt3G使用AKTA半制备型高效液相色谱仪制备, 经MALDI-TOF-MS鉴定为矮牵牛花素3-O-[6-O-(4-O-(反式-对香豆酰基)- α -L-吡喃鼠李糖基)- β -D-

吡喃葡萄糖基]-5-O-[β -D-吡喃葡萄糖基], 与前期报道具有一致性^[14]. 最近的研究表明, B环上含有两个羟基的花色苷可以通过抑制细胞增殖而发挥抗肿瘤的作用^[15]. 此外, 花色苷的酰基化对抑制肿瘤细胞增殖也具有关键作用^[16]. 本研究使用的黑果枸杞花色苷Pt3G的B环上存在两个羟基并具有酰基化结构^[7], 通过激活PTEN表达、抑制抗凋亡因子PI3K和Akt表达, 进而促进下游的caspase 3表达诱导细胞凋亡.

细胞凋亡是发生在生理和病理条件下的一种程序性细胞死亡. 其在多种疾病的发病机制中扮演至关重要

图 5 (网络版彩色)黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞线粒体膜电位的影响. (a) JC-1染色检测LNCaP细胞线粒体膜通透性的改变. (b) JC-1染色检测PC-3细胞线粒体膜通透性的改变

Figure 5 (Color online) The effect of anthocyanin Pt3G on mitochondrial membrane potential of LNCaP and PC-3 cells. (a) The mitochondrial membrane potential in LNCaP cells was detected by JC-1 fluorescence. (b) The mitochondrial membrane potential in PC3 cells was detected by JC-1 fluorescence

要的角色. 通过流式细胞术检测细胞凋亡, 结果发现, Pt3G以剂量依赖性方式诱导LNCaP和PC-3细胞凋亡的发生. 同时, 通过TUNEL法进一步证实Pt3G可以诱导LNCaP和PC-3细胞DNA片段的形成, 并以浓度依赖性的方式促进细胞凋亡. 此外, 细胞周期结果表明, Pt3G

具有显著增加S期细胞百分比和降低LNCaP、PC-3细胞G2期比例的作用. 这些结果也支持了TUNEL和流式细胞术对细胞凋亡的观察. 总之, 这些结果表明, Pt3G通过诱导LNCaP和PC-3细胞凋亡来抑制细胞生长. 本研究证明, Pt3G可能通过体外诱导细胞凋亡抑制前列

图 6 (网络版彩色)黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞内ROS产生的影响. (a) LNCaP细胞内ROS的表达水平. (b) LNCaP细胞内ROS含量的差异统计分析. (c) PC-3细胞内ROS的表达水平. (d) PC-3细胞内ROS含量的差异统计分析. 数据以 $\bar{X} \pm SD$ 表示($n = 3$); 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 6 (Color online) The effect of anthocyanin Pt3G on ROS production in LNCaP and PC-3 cells. (a) The content of ROS in LNCaP cells was detected using an inverted fluorescence microscope. (b) The intracellular ROS levels in LNCaP cells were analyzed using SPSS software. (c) The content of ROS in PC3 cells was detected using an inverted fluorescence microscope. (d) The intracellular ROS levels in PC3 cells were analyzed using SPSS software. All data were expressed as $\bar{X} \pm SD$ ($n = 3$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

腺癌LNCaP和PC-3细胞生长,但未进行体内实验,接下来我们将进一步研究和探索Pt3G对小鼠异种移植模型的前列腺癌细胞的增殖作用.此外,现有的关于花色苷应用于人体肿瘤预防与治疗作用的研究非常有限.最近的研究表明,花色苷的摄入量与乳腺癌和结直肠癌呈反比关系,对这两种癌症的预防和治疗起有益作用,且对乳腺癌患者放疗后的皮肤毒性问题有一定作用,可阻止放疗诱导产生的总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯的中度增加,同时具有良好的耐受性和安全性^[17],但是具体机制还不清楚. Pt3G具有抗氧化、抗炎和降血脂等多种生物学活性特点,其在人体前列腺癌的作用也还需要进一步的研究和验证.

PTEN是通过负调节PI3K/Akt信号通路抑制癌细

胞增殖的关键基因^[18].最近的研究表明, PTEN介导的PI3K/Akt通路在前列腺癌细胞的凋亡中起重要作用^[19]. 本研究表明, Pt3G可激活PTEN的表达,然后较高的PTEN表达可以抑制PI3K和Akt的磷酸化激活.许多研究表明,失活的磷酸化Akt通过增加促凋亡Bax表达和降低抗凋亡Bcl-2表达来诱导线粒体外膜通透性增加^[20]. 我们的研究表明, Pt3G处理LNCaP、PC-3细胞的Bcl-2和Bax受PI3K与Akt的低表达调节.此外,细胞色素c从受损的线粒体释放到细胞质中,会导致caspase 3的激活. 本研究中Pt3G能够增加细胞色素c的释放,然后激活caspase 3的级联反应.

有证据表明,细胞内ROS可诱导PTEN基因的激活并抑制导致细胞凋亡的Akt通路^[21]. 本研究表明,黑果

图 7 黑果枸杞花色苷Pt3G对LNCaP和PC-3细胞中PTEN/PI3K/Akt通路相关蛋白表达的影响。(a) LNCaP细胞中抗凋亡和促凋亡因子的表达情况。(b) LNCaP细胞中蛋白相对表达水平的直方图。(c) PC-3细胞中抗凋亡和促凋亡因子的表达情况, β -actin为内参蛋白。(d) PC-3细胞中蛋白相对表达水平的直方图。所有数据均表示为 $\bar{x} \pm SD (n = 3)$; 与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Figure 7 The effect of anthocyanin Pt3G on the expression of PTEN/PI3K/Akt pathway-related proteins in LNCaP and PC-3 cells. (a), (c) The expression levels of anti-apoptotic and pro-apoptotic factors in LNCaP cells and PC-3 cells. (b), (d) Histograms of the relative expression level of each protein were the mean of three independent experiments. β -actin was the internal reference protein. All data were expressed as $\bar{x} \pm SD (n = 3)$; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$

枸杞花色苷Pt3G可以刺激LNCaP和PC-3细胞产生ROS。因此, 我们推测, Pt3G激活PTEN/PI3K/Akt/caspase 3通

路可能通过诱导ROS过量产生, 导致前列腺癌LNCaP和PC-3细胞凋亡。

参考文献

- 1 Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70: 7–30
- 2 Chang J I C, Bucci J. Unusual side effect from a luteinizing hormone-releasing hormone agonist, leuporelin, in the treatment of prostate cancer: A case report. *J Med Case Rep*, 2016, 10: 323

- 3 Artibani W, Porcaro A B, De Marco V, et al. Management of biochemical recurrence after primary curative treatment for prostate cancer: A Review. *Urol Int*, 2018, 100: 251–262
- 4 Fang J. Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab Rev*, 2014, 46: 508–520
- 5 Zhang Y, Vareed S K, Nair M G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sci*, 2004, 76: 1465–1472
- 6 Yan Y M, Dai G L, Ran L W, et al. Analysis of polyphenol composition in wild *Lycium ruthenicum* from different habitats (in Chinese). *Sci Agric Sin*, 2014, 47: 4540–4550 [闫亚美, 戴国礼, 冉林武, 等. 不同产地野生黑果枸杞资源果实多酚组成分析. 中国农业科学, 2014, 47: 4540–4550]
- 7 Tang J, Yan Y, Ran L, et al. Isolation, antioxidant property and protective effect on PC12 cell of the main anthocyanin in fruit of *Lycium ruthenicum* Murray. *J Funct Foods*, 2017, 30: 97–107
- 8 Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin Hematol*, 2001, 38: 179–193
- 9 Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, et al. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol*, 2012, 887: 41–47
- 10 Sivandzade F, Bhalerao A, Cucullo L. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe. *Bio-protocol*, 2019, 9: 3128
- 11 Yan G, Ru Y, Wu K, et al. GOLM1 promotes prostate cancer progression through activating PI3K-AKT-mTOR signaling. *Prostate*, 2018, 78: 166–177
- 12 Yan Y M, Feng D P, Chen X Y, et al. Research progress on intervention effect of *Lycium ruthenicum* anthocyanins on obesity (in Chinese). *J Food Sci Technol*, 2020, 38: 21–26 [闫亚美, 冯丹萍, 陈晓燕, 等. 黑果枸杞花色苷的肥胖干预作用研究进展. 食品科学技术学报, 2020, 38: 21–26]
- 13 Chen C L, Li F Q, Diao Q, et al. Optimization and physicochemical properties of *Lycium barbarum* anthocyanins microcapsules (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2020, 46: 208–214 [陈程莉, 李丰泉, 刁倩, 等. 黑枸杞花青素微胶囊优化及理化特性分析. 食品与发酵工业, 2020, 46: 208–214]
- 14 Song N, Yang H P, Pang W, et al. Mulberry extracts alleviate $\alpha\beta_{25-35}$ -induced injury and change the gene expression profile in PC12 cells. *Evid Based Complement Altern Med*, 2014, 2014: 150617
- 15 Fan Z Y, Liu J J. Effects of purple sweet potato anthocyanins on proliferation and apoptosis of lung cancer cells by regulating the expression of KTN1-AS1 (in Chinese). *Food Drug*, 2021, 23: 10–16 [范智彦, 刘金菊. 紫甘薯花色苷通过调控KTN1-AS1表达对肺癌细胞的增殖和凋亡的影响. 食品与药品, 2021, 23: 10–16]
- 16 Lü L, Lu J, Zhang H, et al. Acylation of 25-hydroxyprotopanaxatriol with aromatic acids increases cytotoxicity. *Fitoterapia*, 2019, 137: 104279
- 17 Bracone F, De Curtis A, Di Castelnuovo A, et al. Skin toxicity following radiotherapy in patients with breast carcinoma: Is anthocyanin supplementation beneficial? *Clin Nutr*, 2021, 40: 2068–2077
- 18 Liu Z, Xu Z, Tian Y, et al. ZNF277 regulates ovarian cancer cell proliferation and invasion through inhibition of PTEN. *OncoTargets Ther*, 2019, 12: 3031–3042
- 19 van Duijn P W, Ziel-van der Made A C J, van der Korput J A G, et al. PTEN-mediated G1 cell-cycle arrest in LNCaP prostate cancer cells is associated with altered expression of cell-cycle regulators. *Prostate*, 2010, 70: 135–146
- 20 Zhang C, Chen H, He Q, et al. Fibrinogen/AKT/Microfilament axis promotes colitis by enhancing vascular permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2021, 11: 683–696
- 21 Luo Z, Xu X, Sho T, et al. ROS-induced autophagy regulates porcine trophectoderm cell apoptosis, proliferation, and differentiation. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 2019, 316: C198–C209

补充材料

图S1 黑果枸杞花色苷Pt3G的化学结构

图S2 黑果枸杞花色苷粗提物和花色苷主要单体的HPLC和质谱图

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “黑果枸杞花色苷Pt3G对前列腺癌LNCaP和PC-3细胞增殖与凋亡的影响”

Effects of *Lycium ruthenicum* Murray anthocyanin Pt3G on the proliferation and apoptosis of prostate cancer LNCaP and PC-3 cells

Shiying Li^{1†}, Zhanlong Li^{1†}, Jia Mi², Lu Lu², Yamei Yan^{2*}, Youlong Cao^{2*}, Linwu Ran^{1,3*} & Wen Yang³

¹ School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

² Goji Berry Research Institute, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750002, China;

³ Laboratory Animal Center, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: yanyamei@nwbrc.com.cn; caoyoulong@nwbrc.com.cn; rlw@nxmu.edu.cn

Lycium ruthenicum Murray (*L. ruthenicum*), known as “black Goji”, has been widely distributed in northwest of China. The fruit of *L. ruthenicum* has been used as a traditional Chinese medicine for a long time. Many modern studies indicated that the fruit of *L. ruthenicum* has a variety of biological activities such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, neuroprotective, and potential prevention of cardiovascular disease. The fruit of *L. ruthenicum* is black in color and rich in anthocyanins. It has been reported that petunidin 3-*O*-[6-*O*-(4-*O*-(*trans*-*p*-coumaroyl)- α -l-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside]-5-*O*-[β -D-glucopyranoside] (Pt3G) is the main constituent of anthocyanins in fully ripe fruits of *L. ruthenicum*. In our previous study, we found that the Pt3G from the fruit of *L. ruthenicum* could inhibit the proliferation of prostate cancer DU145 cells through ROS/PTEN/PI3K/Akt pathway. To further explore the mechanisms underlying the inhibitory effect of Pt3G on proliferation of prostate cancer cells, the prostate cancer LNCaP and PC-3 cells were used in this study. MTT assay was used to determine the proliferation rate of cells treated with different concentrations of Pt3G solution. To verify whether the inhibitory effect of Pt3G on the proliferation of prostate cancer cell is due to apoptosis, flow cytometric analysis and TUNEL assay were used to detect cell apoptosis, and the Western Blot analysis was used to detect the expression of apoptosis related proteins. The mitochondrial membrane potential in LNCaP and PC-3 cells was analyzed with JC-1 fluorescent dye. Our results showed that Pt3G inhibited the proliferation of LNCaP and PC-3 cells in a concentration dependent manner. The half inhibitory concentrations (IC₅₀) of Pt3G against LNCaP and PC-3 cells were 601.97 and 445.79 μ g/mL at 24 h after treatment, respectively. Flow cytometry and TUNEL results showed that the mean percentages of apoptotic cells were significantly increased in the Pt3G treated LNCaP and PC-3 cells as compared to the control group. Furthermore, Pt3G could lead to excess reactive oxygen species (ROS) generation, decreased the mitochondrial membrane permeability and was able to induce prostate cancer cells arrest in S phase after 24 h treatment. Western Blot analysis showed that the expression levels of tumor suppressor PTEN in prostate cancer cells were significantly increased after Pt3G treatment. Moreover, Pt3G treatment significantly up-regulated the expression levels antiapoptotic factors PI3K, *p*-PI3K, Akt and *p*-Akt and down-regulated the expression levels proapoptotic factors Bax, cytochrome c, caspase 3 and cleaved caspase 3 in prostate cancer cells treated with Pt3G for 24 h. Taken together, these findings suggest that the Pt3G could inhibit cell proliferation and induce apoptosis of prostate cancer cells line, and its anti-tumor mechanisms may be through ROS/PTEN/PI3K/Akt signal pathway. Although the anthocyanin Pt3G from the fruit of *L. ruthenicum* has a chemopreventive activity against prostate cancer cells lines, its anti-tumor mechanisms needs to be further clarified in the future.

Lycium ruthenicum Murray, anthocyanin, apoptosis, ROS/PTEN/PI3K/Akt, LNCaP and PC-3 cells

doi: [10.1360/TB-2021-0696](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0696)