

石榴叶提取物诱导前列腺癌细胞凋亡并抑制其增殖转移的研究

邓远乐¹, 李亚丽¹, 郑婷婷¹, 卢明星², 叶庭洪², 谢永美², 阴文娅^{1△}

1. 四川大学华西公共卫生学院 营养与食品卫生毒理学系(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室(成都 610041)

【摘要】 目的 研究石榴叶提取物(pomegranate leaves extract, PLE)对前列腺癌细胞增殖、凋亡及转移能力的影响。方法 采用MTT法检测不同质量浓度PLE(终质量浓度分别为12.5、25、50、100、200 μg/mL)干预作用不同时间(24、48、72 h)对前列腺癌细胞TRAMP-C1、DU145、PC3增殖的影响,克隆形成实验验证PLE对DU145、PC3细胞增殖的长期影响。PLE干预PC3细胞48 h后,Hoechst-33258染色观察细胞核内染色质变化,流式细胞术检测细胞凋亡率变化,细胞划痕实验测试细胞迁移运动能力的变化。结果 与对照组比较,PLE在12.5~200 μg/mL范围内对TRAMP-C1、DU145、PC3细胞增殖具有抑制作用($P < 0.05$);PLE在6.25~100 μg/mL范围内使DU145和PC3集落形成数明显减少($P < 0.01$)。PLE干预48 h后,PC3出现细胞核断裂、产生凋亡小体的现象,随着PLE质量浓度增大,凋亡率逐渐上升($P < 0.05$),同时PC3细胞向划痕区域迁移生长的能力比对照组低($P < 0.01$)。结论 PLE能抑制前列腺癌细胞增殖,同时促进PC3细胞凋亡,减弱其迁移能力。

【关键词】 石榴叶提取物 前列腺癌 PC3 凋亡

The Extract from Punica Granatum (Pomegranate) Leaves Promotes Apoptosis and Impairs Metastasis in Prostate Cancer Cells DENG Yuan-le¹, LI Ya-li¹, ZHENG Ting-ting¹, HU Ming-xing², YE Ting-hong², XIE Yong-mei², YIN Wen-ya^{1△}. 1. Department of Nutrition and Food Hygiene, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy/Collaborative Innovation Center for Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: yinwenya@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of pomegranate leaves extract (PLE) on proliferation, apoptosis and metastasis of prostate cancer cells. **Methods** The proliferation of TRAMP-C1, DU145, PC3 prostate cancer cells treated with different concentrations of PLE (final mass concentrations were 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL, respectively) for different time (24, 48, 72 h) was detected by MTT assay. Colony formation assay was performed to verify the long-term effects of PLE on the proliferation of DU145 and PC3 cells. After being treated with PLE for 48 h, Hoechst-33258 staining was used to observe the changes in the nucleus, the cell apoptotic rate was detected by flow cytometry, and wound-healing migration assay was performed to test the change of migration. **Results** In comparison with the control group, PLE in the range of 12.5-200 μg/mL had a certain inhibitory effect on the proliferation of TRAMP-C1, DU145 and PC3 cells ($P < 0.05$). In the range of 6.25-100 μg/mL, the number of colony formation of DU145 and PC3 was significantly reduced ($P < 0.01$). After PLE treated for 48 h, the apoptotic features of nuclear fragmentation and the formation apoptotic body was observed in PC3. With the increase of concentration, the apoptotic rate increased gradually ($P < 0.05$), and the ability of cells to migrate to the scratch area was significantly weaker than the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** PLE has effect on proliferation, apoptosis and metastasis of prostate cancer cells.

【Key words】 Pomegranate leaves extract (PLE) Prostate cancer PC3 Apoptosis

前列腺癌是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一。根据美国癌症学会(ACS)2016年发布的最新调查数据显示,前列腺癌和肺癌、支气管癌、结直肠癌占男性全部癌症病例的44%,前列腺癌单独占据男性新发癌症病例总数的1/5,高居男性死因的第二位^[1]。我国前列腺癌发病率虽低于欧美国家,但随着步入老龄化社会,前列腺癌发病率和死亡率

快速增长,并伴有低龄化趋势^[2]。因其起病隐匿,临床症状无特异性,常误诊为前列腺增生而延误治疗,一旦确诊,一般已是晚期,失去了手术根治的时机。因此,前列腺癌的预防和治疗显得尤为重要。

石榴(*Punicagranatum* L.)为石植科(Punicaceae)石榴属(*Punica* L.)落叶灌木或小乔木,含有多种活性成分,且这些活性物质广泛分布于果皮、汁液、种子、花、叶、根及树皮等多个部位,其根、叶、花、果、种子均可入药^[3]。但目前对石榴的研

究, 主要集中于石榴的花、果汁、皮、种子的功能。研究发现石榴花多酚对糖尿病大鼠的血管内皮有一定的保护作用^[4]; 石榴皮提取物对甲状腺癌具有抗肿瘤和抗转移的作用^[5]; 石榴籽油中含丰富的石榴酸, 能改善高脂饮食诱导小鼠产生的肥胖和胰岛素抵抗^[6]。关于石榴叶功能作用的研究较少, 而其中大部分都以其抗氧化作用及对消化系统疾病、心血管疾病等的预防和治疗作用为主^[7-9], 对其在抗癌方面的功效研究更少。石榴叶中含有多种有效成分, 其中的活性物质主要分为鞣质类、黄酮类、生物碱类等三大类化合物^[10]。因此, 本研究旨在探索石榴叶提取物(pomegranate leaves extract, PLE)对前列腺癌细胞的体外作用及其机制, 探讨 PLE 防治前列腺癌的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

石榴叶: 突尼斯软籽石榴(贵州省, 黔西县); 鼠源前列腺癌细胞 TRAMP-C1、人前列腺癌 DU145、PC3 细胞株; ATCC 公司; 鞣花酸(EA)的标准物质和安石榴甙(PC)的标准物质: 均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 乙腈、甲醇(色谱纯); 二甲亚砜(DMSO)、3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT); 美国 Sigma 公司; 胎牛血清(FBS): 草原绿野生物材料有限公司; 青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶、DMEM 高糖培养基(25 mmol/L)(简称 DMEM)和 RPMI 1640; 美国 HYCLONE 公司; 磷酸缓冲盐溶液(PBS): 成都哈里生物公司; hoechst-33258 染液、Annexin V-FITC; 南京凯基生物科技发展有限公司; 其他试剂均为进口分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 PLE 的制备 取 150 g 新鲜石榴叶, 切成长、宽各 0.5 cm, 放入 800 mL 乙醇与 1 200 mL 水的混合液中, 在 60 °C 温度下, 浸泡提取 2 h。粗提取物经真空过滤浓缩后, 收集到 36 g 棕色固体, 并溶于乙醇中, 在真空状态下蒸发至干粉状态, 避光密封保存于 -20 °C。

1.2.2 PLE 主要成分分析 采用高效液相色谱法(HPLC), 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm); 柱温: 30 °C; 流动相 A 为去离子水: 冰醋酸=99:1(V/V; pH 3), 流动相 B 为甲醇; 流速: 1 mL/min; 洗脱条件: 0~70 min, 5%~44% B; 70~80 min, 44% B; 检测波长: 256 nm。样品和标准溶液的进样量均为 20 μL。样品和流动相

需先透过 0.45 μm 的膜过滤, 再脱气后注入柱。首先建立 EA 和 PC 的标准曲线, 再用高效液相色谱法检测样品中 EA 和 PC 的含量。

1.2.3 细胞培养及分组 DU145 和 PC3 细胞用含有 10% FBS 的 RPMI1640 培养液培养, TRAMP-C1 细胞用含有 10% FBS 的 DMEM 培养液培养。选择对数生长期细胞进行实验。PLE 样品配制: 称量一定量的 PLE 溶解于 DMSO 中, 得到质量浓度为 200 mg/mL 的 PLE 样品, 用配置好的培养基分别梯度稀释至相应的质量浓度。取对数生长期细胞进行实验。实验分为 6 组, 包括不同质量浓度 PLE 的 5 个干预组(终质量浓度分别为 12.5、25、50、100、200 μg/mL)和加入不含有 PLE 的新鲜培养基的对照组。

1.2.4 PLE 对前列腺癌细胞增殖的影响 采用 MTT 比色法检测细胞生长情况。收集对数生长期 DU145、PC3 和 TRAMP-C1 细胞, 以 3 000/孔的密度接种于 96 孔培养板, 每孔体积 100 μL, 在 37 °C, 体积分数为 5% CO₂ 的孵箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 按 1.2.3 分组分别加入含有相应质量浓度 PLE 的新鲜培养基, 培养 24、48、72 h 后, 每孔加 20 μL (5 mg/mL) MTT 溶液继续培养 3~4 h。弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 于摇床上震荡 15~20 min 充分溶解结晶物, 在酶标仪 570 nm 处测其吸光度值, 常规计算细胞活性(%)。

采用克隆形成实验观察 PLE 对 DU145、PC3 细胞增殖的长期作用。以 1 000/孔细胞密度接种 DU145 及 PC3 细胞于 6 孔板中, 待 24 h 细胞贴壁后, 按 1.2.3 分组加入含有 PLE 的培养基, 连续培养 15 d, 每 2~3 d 更换一次含相应质量浓度的 PLE 新鲜培养基。培养结束后, 弃去培养液, 用 PBS 液洗两遍, 甲醇固定 15 min, 用结晶紫染色 30 min 左右, 再用 PBS 清洗两遍, 在通风橱内晾干后, 拍照, 观察细胞集落形成的数量、大小。

1.2.5 PLE 对 PC3 细胞形态、数量的影响 收集 PC3 对数生长期细胞, 调整细胞悬液浓度, 以每孔 2×10^5 细胞接种到 6 孔板, 每孔体积 2 mL, 待细胞贴壁后, 弃上清液, 按 1.2.3 分组加入含有 PLE 的培养基培养细胞, 同一条件下培养 48 h 后, 于倒置显微镜下, 用白光观察细胞形态和数量的变化。

1.2.6 PLE 对 PC3 细胞凋亡的影响 收集对数生长期 PC3 细胞, 以每孔 1×10^5 细胞接种于已铺爬片的 6 孔板中, 每孔体积为 2 mL。24 h 后, 待细胞贴壁, 弃上清液, 按 1.2.3 分组加入含有 PLE 的新

鲜培养基培养 48 h, 取出 6 孔板, 一部分采用 Hoechst-33258 染色观察 PLE 对 PC3 细胞凋亡形态的影响。用 PBS 清洗 2 遍后, 每孔加入 1 mL 甲醇在 4 ℃ 固定 15~20 min。再用预冷的 PBS 清洗 2 遍, 每孔滴加 150 μ L Hoechst-33258 染液, 室温染色 10 min 后用蒸馏水清洗爬片。最后在避光的条件下甘油封片, 于正置显微镜下拍照观察细胞核染色质的形态变化。取出 6 孔板另一部分, 采用 Annexin V-PI 染色检测 PC3 细胞凋亡。收集细胞到流式管中, 用预冷的 PBS 清洗 2 遍后加 Binding buffer, 将细胞吹散; 加 Annexin V-FITC 和 PI 每管各 2.5 μ L, 并将细胞悬液混匀, 避光 5 min 后, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.7 细胞划痕实验检测 PLE 对 PC3 细胞迁移运动的影响 收集对数生长期 PC3 细胞, 以每孔 2×10^5 细胞接种于 6 孔板, 每孔体积 2 mL, 待孔板中细胞长至 80% 左右, 用 10 μ L 枪尖于孔板底部划一直线, 使细胞分为两部分。弃上清液, 并用 PBS 液清洗 2 遍。用双无培养基按 1.2.3 分组分别加入含有相应质量浓度 PLE 的新鲜培养基, 培养 48 h 后, 于显微镜下白光拍照, 观察细胞迁移运动情况。

1.3 统计学方法

所有实验结果均来自 3 次以上独立实验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PLE 中主要成分的分析

PLE 经 HPLC 分析, 最后测得 PLE 中 PC 和 EA 的含量分别为 39.6 mg/g 和 32.0 mg/g。

2.2 PLE 对 TRAMP-C1、DU145、PC3 细胞增殖的影响

见图 1。结果显示, PLE 干预前列腺癌细胞 24 h, 与对照组比较, 随着 PLE 干预质量浓度的升高, 3 种细胞的 PLE 干预组(除 TRAMP-C1 细胞在 PLE 质量浓度为 200 μ g/mL 时)细胞活性受到抑制 ($P < 0.05$)。PLE 干预 48 h 和 72 h, 三种细胞的干预组与对照组比较, 细胞活性均受到抑制 ($P < 0.05$)。PC3 细胞 PLE 的增殖抑制作用在 3 个时间点均呈现质量浓度依赖性, 因此后续研究选用 PC3 细胞进行实验。

见图 2。PLE 干预 DU145 及 PC3 细胞 15 d,

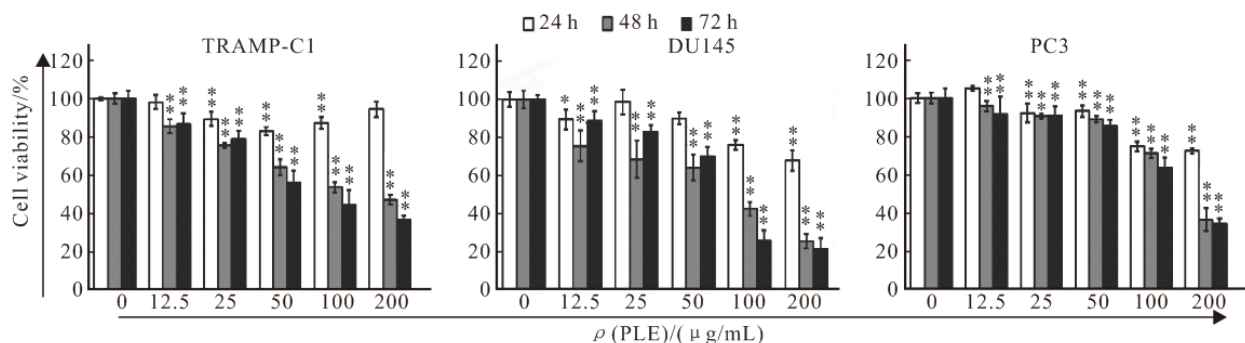


图 1 PLE 对 TRAMP-C1、DU145、PC3 细胞活性的影响

Fig 1 Effects of PLE on TRAMP-C1, DU145 and PC3's cell viability

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control group (PLE 0 μ g/mL)

干预组与对照组相比, 集落形成数量差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 且集落大小也明显减小。当干预组 PLE 质量浓度达到 25 μ g/mL 时, 两种细胞的集落形成数量均为 0。

2.3 PLE 对 PC3 的细胞形态、数量的影响

见图 3。与对照组相比, 干预组的细胞密度逐渐减小, 细胞发生体积变小、形态变圆的变化, 高剂量干预组 (PLE 100、200 μ g/mL) 出现了许多漂浮的死细胞。

2.4 PLE 对 PC3 细胞凋亡的影响

如图 4 所示, 经 Hoechst-33258 染色后, 对照组 PC3 的细胞核呈圆形或椭圆形, 为均匀的蓝色荧光, 染色质分布均匀, 无明显的核染色质形态学改变的现象; 而经 PLE 干预 48 h 的 PC3 细胞, 出现了典型的细胞凋亡形态: 细胞核开始逐渐缩小, 细胞核染色质逐渐出现高度凝聚、边缘化, 并有凋亡小体的产生, 随 PLE 干预质量浓度的增加, 变化更加明显。

PLE 干预 PC3 细胞 48 h 后, 如图 5 所示, 对照组细胞凋亡比例为 $3.52\% \pm 1.19\%$, 随着 PLE 干预质量浓度的增大, 细胞凋亡比例上升, 与对照组比

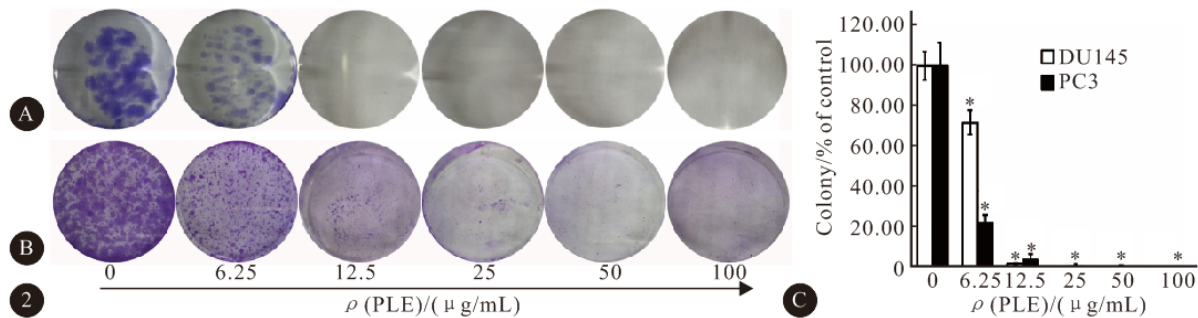


图 2 PLE 对 DU145(A)、PC3(B)集落形成的影响及其统计图(C) 荧光显微镜下观察 PLE 对 PC3 细胞核的影响。×20

Fig 2 Effects of PLE (0-100 μg/mL) on colony formation in DU145 (A) and PC3 (B) cells, diagram is presented (C) too Fig 3 Cell morphologic changes of PC3 cells after being treated with PLE under bright light. ×10 Fig 4 The nuclear changes of PLE treated PC3 cells under fluorescence microscope. ×20

图 3 光镜下观察 PLE 对 PC3 细胞形态的影响。×10

* P<0.01, vs. control group (PLE 0 μg/mL); A-F in fig 3 and fig 4; PLE 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL

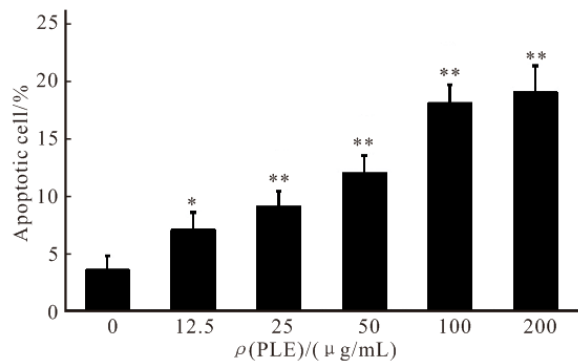


图 5 PLE 对 PC3 细胞凋亡的影响

Fig 5 Effect of PLE on apoptosis of PC3

* P<0.05, * * P<0.01, vs. control group (PLE 0 μg/mL)

较差异均有统计学意义(P<0.05), PLE 各质量浓度组间差异也有统计学意义(P<0.05)。

2.5 PLE 对 PC3 细胞迁移运动的影响

结果如图 6 所示, PLE 干预 PC3 细胞 48 h 后, 干预组在 PLE 12.5~200 μg/mL 范围内, 随着 PLE 质量浓度的增加, 细胞向划痕区域迁移生长的能力逐渐降低, 与对照组相比, 差异有统计学意义(P<0.01)。PLE 各质量浓度组间, 除 25 μg/mL 与 50 μg/mL 组间差异无统计学意义(P>0.05)外, 其余组间差异有统计学意义(P<0.05)。

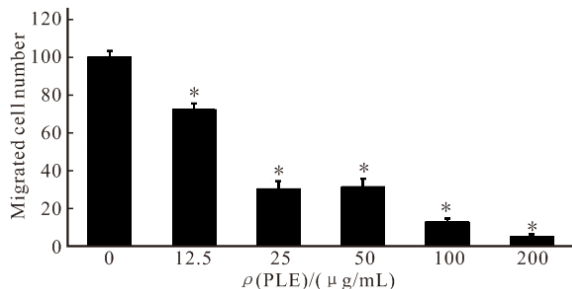
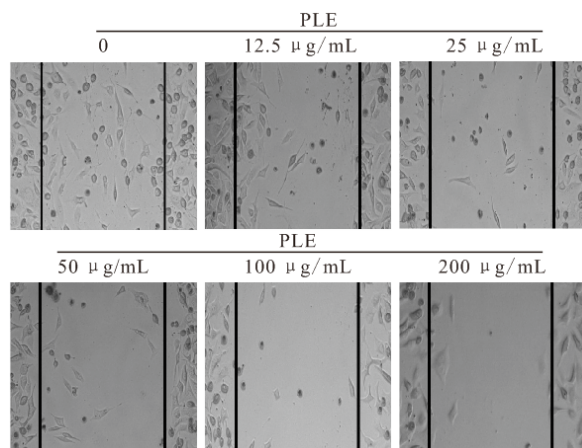


图 6 PLE 对 PC3 迁移运动的影响。×10

Fig 6 Changes of migration of PLE treated cells. ×10

* P<0.01, vs. control group (PLE 0 μg/mL)

3 讨论

前列腺癌是中老年男性常见的恶性肿瘤,其发病机制尚未完全清楚,早期常无明显症状使其不易被发现,且易发生转移,这些特点共同导致了前列腺癌的高死亡率^[11-12]。通常癌症治疗所使用的药物,在杀死癌细胞的同时也会对人体正常细胞产生较大的毒副作用。因此,研究出疗效好且毒性低的抗癌药物具有重要意义。近年来,诱导肿瘤细胞的凋亡受到各领域学者的广泛关注。随着植物化合物研究的不断深入,植物来源的抗癌药物的研究和开发逐渐成为研究热点^[13],越来越多的研究表明植物化合物能够抑制癌细胞的增殖^[14],植物中的天然化合物可引发许多肿瘤细胞的凋亡。

随着对石榴研究的不断深入,发现石榴具有广泛的药用价值。石榴叶作为石榴的不可食部分具有较多的生物学活性,LI 等^[15]研究发现 PLE 对人正常肝细胞(LO2)、人胚肾细胞(HEK293)和非洲猴肾细胞(Vero)无明显的细胞毒性,同时对非小细胞肺癌的增殖与转移具有抑制作用。

细胞的无限增殖是恶性肿瘤的生物学特性之一,对癌细胞生长抑制的程度可初步反映药物对肿瘤的治疗效果。而诱导细胞凋亡是目前抗肿瘤的主要机制,细胞凋亡时,会发生细胞形态学的改变。本研究首次将 PLE 作用于前列腺癌细胞,结果表明 PLE 在 12.5~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内对 TRAMP-C1、DU145、PC3 细胞增殖具有一定的抑制作用,总体呈时间剂量依赖性趋势。此外,随着 PLE 质量浓度的增加,细胞凋亡的典型特征更明显:细胞核发生裂解,周围有凋亡小体产生,而且细胞的凋亡率逐渐增加,表明 PLE 在体外可诱导前列腺癌细胞凋亡。

转移是恶性肿瘤的生物学特征之一,也是肿瘤临床治疗的难题、增加患者痛苦和造成其死亡的重要原因,因此降低癌细胞转移能力对癌症的治疗具有重要意义。本研究在探索 PLE 对于前列腺癌细胞增殖、凋亡的作用基础上,初步检测其对 PC3 细胞迁徙能力的影响。结果发现,经 PLE 干预后,PC3 细胞向划痕区迁移生长的能力明显降低,且呈质量浓度依赖性方式,揭示 PLE 能抑制 PC3 细胞的迁移生长,这与 LI 等^[15]的研究结果一致,PLE 可能是有效的肿瘤转移抑制剂。

综上所述,本研究发现 PLE 具有较好的抑制肿瘤细胞增殖和良好的抗转移潜力,且石榴叶具有相

对安全、来源广泛、成本低的特点,提示了 PLE 具有开发成为治疗前列腺癌新药的潜力,为前列腺癌的治疗和石榴叶的综合利用提出了新的思路。但其抗肿瘤作用及其作用机制有待更进一步的实验证实。

参 考 文 献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, *et al.* Cancer statistics in China. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] ISMAIL T, SESTILI P, AKHTAR S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(2): 397-405.
- [4] 魏媛媛, 李 潇, 闫 冬, 等. 石榴花多酚对 2 型糖尿病大鼠血管内皮的保护作用. *中药药理与临床*, 2010, 26(4): 25-27.
- [5] LI Y, YE T, YANG F, *et al.* Punicagranatum (pomegranate) peel extract exerts potent antitumor and anti-metastasis activity in thyroid cancer. *RSC Advances*, 2016, 6(87): 84523-84535 [2017-03-21]. <http://pubs.rsc.org/-/content/articlehtml/2016/ra/c6ra13167k>. doi: 10. 1039/C6RA13167K.
- [6] VROEGRIJK IO, VAN DIEPEN JA, VAN DEN BERG S, *et al.* Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(6): 1426-1430.
- [7] 张立华, 孙晓飞, 张艳侠, 等. 石榴叶茶与绿茶在抗氧化活性方面的比较研究. *现代农业科学*, 2008(3): 40-42.
- [8] 李定格, 张增敏, 陈晓建, 等. 石榴叶水浸剂对大鼠胃酸分泌和实验性胃溃疡作用的研究. *中药药理与临床*, 2003, 19(6): 23-24.
- [9] 孟 甄, 孙立红, 陈芸芸, 等. 石榴叶鞣质对高血脂高血糖模型动物脂代谢的影响. *中国实验方剂学杂志*, 2005, 11(1): 22-24.
- [10] 王彩云. 石榴叶多酚的提取富集工艺及其药理作用研究. 北京: 北京林业大学生命科学与技术学院, 2013 [2017-03-15]. <http://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10022-1013214046.htm>.
- [11] LONG Z, CHEN B, LIU Q, *et al.* The reverse-mode NCX1 activity inhibitor KB-R7943 promotes prostate cancer cell death by activating the JNK pathway and blocking autophagolux. *Oncotarget*, 2016, 7(27): 42059-42070.
- [12] SALEEM M, ADHAMI VM, ZHONG W, *et al.* A novel biomarker for staging human prostate adenocarcinoma: overexpression of matriptase with concomitant loss of its inhibitor, hepatocyte growth factor activator inhibitor-1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(2): 217-227.
- [13] TOSHIYA K, TESTUYA T, AKIRA H, *et al.* Cancer chemoprevention through the induction of apoptosis by natural compounds. *Journal of Biophysical Chemistry*, 2012, 3(2): 156-173 [2017-03-21]. http://file.scirp.org/Html/7-7100133_19431.htm. doi: 10. 4236/jbpc. 2012. 32018.
- [14] 钟 静, 刘 杉, 杨 应, 等. 小檗碱对人前列腺癌细胞株 PC3 增殖、凋亡的影响及其机制. *山东医药*, 2016(27): 41-43.
- [15] LI Y, YANG F, ZHENG W, *et al.* Punicagranatum, (pomegranate) leaves extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and inhibits migration and invasion in non-small cell lung cancer *in vitro*. *Biomed Pharmacother*, 2016, 80: 227-235 [2017-03-21]. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.023>.

(2017-06-20 收稿, 2017-10-15 修回)

编辑 沈 进