

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2024.02.002

• 实验研究 •

淫羊藿苷对前列腺癌原位移植瘤小鼠肿瘤生长及细胞周期的影响*

唐荣志 赖海标[△] 黄智峰 刘毅豪 吴惠妃

中山市中医院泌尿外科, 广东中山 528400

摘要 **目的** 探讨淫羊藿苷对前列腺癌原位移植瘤 SCID 小鼠肿瘤生长、细胞周期、磷酸酶及张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)基因表达的影响。**方法** 40 只雄性 SCID 小鼠, 根据随机数字表法随机均分为模型对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组, 每组 10 只。采用 SCID 小鼠前列腺腺体背外侧包膜内注射人前列腺癌 LNCaP 细胞株悬液的方法构建前列腺癌原位移植瘤小鼠模型。造模 2 周后, 模型对照组予以 0.9% 氯化钠注射液, 低剂量组予以 10 mg/kg 淫羊藿苷, 中剂量组予以 40 mg/kg 淫羊藿苷, 高剂量组予以 80 mg/kg 淫羊藿苷。灌胃处理 1 次/d, 治疗时间为 5 周。在灌胃给药治疗前及治疗 5 周后, 分别取各组小鼠 5 只, 对比各组肿瘤质量、肿瘤体积、肿瘤抑制率。采用流式细胞学方法检测 LNCaP 细胞周期, 计算各周期比值。采用实时定量 PCR 检测前列腺肿瘤组织中 PTEN mRNA 相对含量。**结果** 治疗后, 模型对照组肿瘤质量、肿瘤体积较治疗前明显增加($P < 0.05$); 中剂量组及高剂量组肿瘤质量、肿瘤体积较治疗前明显降低($P < 0.05$), 且显著低于模型对照组($P < 0.05$)。中剂量组及高剂量组肿瘤抑制率显著高于低剂量组($P < 0.05$)。中剂量组及高剂量组肿瘤细胞 S 期较治疗前明显增加($P < 0.05$), 且显著高于模型对照组($P < 0.05$); 中剂量组及高剂量组肿瘤细胞 G₀/G₁ 期较治疗前明显减少($P < 0.05$), 且显著低于模型对照组($P < 0.05$)。中剂量组及高剂量组 PTEN mRNA 相对含量较治疗前明显增加($P < 0.05$), 且显著高于模型对照组($P < 0.05$)。**结论** 淫羊藿苷可能通过上调 PTEN 表达、改变细胞周期分布来抑制前列腺癌 LNCaP 细胞增殖, 从而有效抑制前列腺癌原位移植瘤 SCID 小鼠肿瘤生长。

关键词 淫羊藿苷; 前列腺癌; 磷酸酶及张力蛋白同源物; 细胞周期

中图分类号 R285.5; R737.25 **文献标志码** A

Effects of Icaritin on Tumor Growth and Cell Cycle in Prostate Cancer Orthotopic Transplantation Tumor Mice*

TANG Rongzhi, LAI Haibiao[△], HUANG Zhifeng, LIU Yihao, WU Huifei

Department of Urology, Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of icaritin on tumor growth, cell cycle and expression of phosphatase and tensin homolog (PTEN) genes in SCID mice with prostate cancer orthotopic transplantation tumor. **Methods** Forty male SCID mice were randomly divided into model control group, low-dose group, medium-dose group and high-dose group according to the random number table method, with 10 mice in each group. Mouse model of prostate cancer orthotopic transplantation tumor was constructed by injecting human prostate cancer LNCaP cell line suspension into the dorsal lateral capsule of the prostate gland in SCID mice. After 2 weeks of modeling, the model control group was given 0.9% sodium chloride injection, the low-dose group was given 10 mg/kg icaritin, the medium-dose group was given 40 mg/kg icaritin, and the high-dose group was given 80 mg/kg icaritin. Gavage treat-

* 广东省中医药局科研项目 (No. 20222249)

[△] 通信作者, Corresponding author, E-mail: lhb8829@163.com

ment once a day for 5 weeks. Before and after 5 weeks of gavage treatment, 5 mice in each group were taken and compared for tumor mass, tumor volume, and tumor inhibition rate. Flow cytometry was used to detect the cell cycle of LNCaP and calculate the ratio of each cycle. Real time quantitative PCR was used to detect the relative content of PTEN mRNA in prostate tumor tissue. **Results** After treatment, tumor mass and volume in the model control group were significantly increased compared to before treatment ($P < 0.05$). Tumor mass and volume in the medium-dose and high-dose groups were significantly reduced compared to before treatment ($P < 0.05$), and were significantly lower than those in the model control group ($P < 0.05$). The tumor inhibition rates in the medium-dose and high-dose groups were significantly higher than those in the low-dose group ($P < 0.05$). The S phase of tumor cells in the medium-dose and high-dose groups was significantly increased compared to before treatment ($P < 0.05$), and was significantly higher than that in the model control group ($P < 0.05$). The G_0/G_1 phase of tumor cells in the medium-dose and high-dose groups was significantly reduced compared to before treatment ($P < 0.05$), and was significantly lower than that in the model control group ($P < 0.05$). The relative content of PTEN mRNA in the medium-dose and high-dose groups was significantly increased compared to before treatment ($P < 0.05$), and was significantly higher than that in the model control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Icariin might inhibit the proliferation of prostate cancer LNCaP cells by upregulate PTEN expression and alter cell cycle distribution, thereby effectively inhibit the growth of prostate cancer orthotopic transplantation tumor in SCID mice.

Key words icariin; prostate cancer; phosphatase and tensin homolog; cell cycle

在男性罹患的肿瘤中,前列腺癌(prostatic cancer, PCa)是发病率及死亡率仅次于肺癌的恶性肿瘤,对男性生命健康产生巨大威胁。通过研究前列腺癌原位移植瘤,我们发现前列腺癌细胞株的生长、迁移和侵袭会被淫羊藿苷的生物学活性影响而受到一定程度的抑制^[1]。淫羊藿又名仙灵脾、刚前,包括淫羊藿苷、淫羊藿次苷在内的一系列黄酮苷类成分为其主要活性成分,具有增加心脑血管血流量、加强人体造血功能、提升人体免疫功能、促进骨代谢的作用。淫羊藿苷及其代谢产物的细胞毒性不高,其抗肿瘤作用机制表现为通过多种信号通路抑制细胞活力、调控肿瘤细胞凋亡^[2]。人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN)基因属抑癌基因,雄激素受体(androgen receptor, AR)过度表达和 PTEN 基因缺失可导致前列腺癌的肿瘤细胞无限生长^[3]。同时通过调查研究我们发现,正常人的 PTEN 基因突变率明显低于 PCa 患者^[4]。目前针对前列腺癌裸鼠与 PTEN 基因相关性的研究鲜有报道,本课题组为弥补这一缺憾,特从 PTEN 表达等方面入手探究淫羊藿苷对前列腺癌原位移植瘤 SCID 小鼠肿瘤生长、细胞周期的影响及可能的作用机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SCID 品系小鼠 40 只,雄性,鼠龄为 5~6 周,体重

(20.00±1.50)g,购自广东省医学实验动物中心,实验动物许可证号 SYXK(鄂)2022-011。在基础医学院机能实验中心饲养并进行实验,实验前适应性饲养 1 周,在实验中遵循 3R 原则,给予动物人道关怀并保证动物的福利。实验和饲养期间,饲料为标准颗粒饲料,自由饮水;动物房自然采光,相对湿度 60%,温度 22~24℃;安静通风的动物房内,昼夜规律为 12 h。本实验经过本院医院伦理委员会批准(No. 2023 019013)。

1.2 药品及试剂

淫羊藿苷标准品(北京索莱宝科技有限公司);人前列腺癌 LNCaP 细胞株(南京赛泓瑞生物科技有限公司);无水乙醚、EDTA、胎牛血清(FBS)(杭州昊鑫生物科技股份有限公司);RPMI-1640 细胞培养基(赛默飞公司);PTEN、AR、PSA 和磷酸化 AR(p-AR)检测用试剂盒(北京凯瑞基生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

离心机(南京善本生物科技有限公司, TGL-16R);生物组织自动脱水机(邢台智冠机械科技有限公司, ZT-12P);光学显微镜(深圳市叁诺西努科技有限公司, EM-3000);电子分析天平(沈阳德克天平仪器有限公司, TP-214);电泳仪(济南泰医生物技术有限公司, JS-power300);转移电泳槽(温州星创自动化设备有限公司, VE-186)。

1.4 造模、分组及用药

采用随机数字表法将 40 只 SCID 雄性小鼠随机

均分为模型对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组，每组 10 只。采用 SCID 小鼠前列腺腺体背外侧包膜内注射人前列腺癌 LNCaP 细胞株悬液的方法构建前列腺癌原位移植瘤小鼠模型。先将冻存的人前列腺癌 LNCaP 细胞株于 37℃ 速融，接种于 RPMI-1640 培养液中复苏，培养箱恒温 37℃、通 5%CO₂，培养 3 d，每天换 RPMI-1640 培养液 1 次；0.25% EDTA 消化，离心、弃去上清液，将收集的人前列腺癌 LNCaP 细胞株用 RPMI-1640 培养液调制成 2×10⁷ 个/mL 的细胞悬液备用。SCID 小鼠术前 12 h 禁食不禁水，乙醚麻醉后固定，进行下腹部消毒，然后切开皮肤并分离腹膜，此时充盈的膀胱会向外突出，用无菌棉签将膀胱推向尾端以充分暴露小鼠生殖腺叶状肉红色前列腺腺体，每侧前列腺腺体背外侧包膜内注射 25 μL 人前列腺癌 LNCaP 细胞株。注射造模后还原组织器官并分层缝合皮肤，单笼饲养造模后小鼠。实验操作均为无菌状态下进行，注意避免感染。

2 周后，模型对照组予以 0.9% 氯化钠注射液灌胃处理，低剂量组予以 10 mg/kg 淫羊藿苷灌胃处理，中剂量组予以 40 mg/kg 淫羊藿苷灌胃处理，高剂量组予以 80 mg/kg 淫羊藿苷灌胃处理。均 1 次/d，治疗时间为 5 周。

表 1 引物序列表

名称	序列(5'to 3')	扩增度(bp)
PTEN	上游引物 5'-GGTCTCGCAGCATAACGTGA-3'	235
	下游引物 5'-GTTAGCTCTGGTCGACCATT-3'	
β-actin	上游引物 5'-CACCTGGCAGCCATAGCC-3'	110
	下游引物 5'-ACCCATGCCCACCATCACG-3'	
U6	上游引物 5'-CTCGGATCGGCAGCTCT-3'	75
	下游引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	

1.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行分析，符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组内治疗前后比较采用配对样本 *t* 检验；多组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD-*t* 检验；以 *P* < 0.05 提示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 淫羊藿苷对肿瘤生长的影响

治疗后，模型对照组肿瘤质量、肿瘤体积较治疗前明显增加(*P* < 0.05)。中剂量组及高剂量组肿瘤质量、肿瘤体积较治疗前明显降低(*P* < 0.05)，且显著低于模型对照组(*P* < 0.05)。中剂量组及高剂量组肿瘤

1.5 检测指标

在灌胃给药治疗前及治疗 5 周后，分别取各组小鼠 5 只，处死后摘取小鼠前列腺腺体，剥取前列腺上的肿瘤瘤体并编号。每个瘤体用滤纸吸干后称重，获得肿瘤瘤体质量。

测量前列腺瘤体的长、短径，每个瘤体各测 3 次后取平均值，通过公式^[5]计算获得肿瘤瘤体体积。瘤体体积 = (长 × 宽 × 高 × π) / 6。

计算各组小鼠肿瘤生长抑制率^[6]。肿瘤抑制率 = (1 - 实验组平均瘤重 / 模型组平均瘤重) × 100%。

采用流式细胞学方法检测 LNCaP 细胞周期，计算各周期比值。

采用实时定量 PCR 检测前列腺肿瘤组织中 PTEN mRNA 相对含量。将大鼠前列腺肿瘤瘤体剪碎后加入裂解液，冲打混匀，使用细胞/组织 miRNA 提取试剂盒从总样本中提取 miRNA，用 TRIzol 试剂提取样品中的总 RNA，取 1 μg RNA 用高效 cDNA 一链合成试剂盒逆转录合成 cDNA；根据说明书，在 ABI7500 系统上使用实时定量 PCR 扩增预混液进行 RT-qPCR 检测基因表达，β-actin 和 U6 用作对照，结果通过 2^{-ΔΔCt} 方法计算。引物序列见表 1。

抑制率显著高于低剂量组(*P* < 0.05)。见表 2、表 3。

表 2 各组肿瘤质量、肿瘤体积比较(*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	肿瘤质量(mg)	肿瘤体积(mm ³)
模型对照组	治疗前	103.23 ± 12.13	17.33 ± 1.82
	治疗后	118.32 ± 13.24*	20.43 ± 2.88*
低剂量组	治疗前	102.93 ± 12.83	17.02 ± 1.80
	治疗后	101.32 ± 12.24	18.23 ± 1.92
中剂量组	治疗前	103.02 ± 12.21	17.40 ± 1.89
	治疗后	85.24 ± 8.93* [△]	11.37 ± 1.42* [△]
高剂量组	治疗前	102.32 ± 12.32	17.20 ± 1.79
	治疗后	84.13 ± 8.87* [△]	10.22 ± 1.39* [△]

与治疗前比较* *P* < 0.05，与模型对照组比较[△] *P* < 0.05

2.2 淫羊藿苷对 LNCaP 细胞周期的影响

治疗后,中剂量组及高剂量组肿瘤细胞 S 期较治疗前明显增加($P<0.05$),且显著高于模型对照组($P<0.05$)。中剂量组及高剂量组肿瘤细胞 G_0/G_1 期较治疗前明显减少($P<0.05$),且显著低于模型对照组($P<0.05$)。见表 4。

2.3 淫羊藿苷对 PTEN 表达的影响

治疗后,中剂量组及高剂量组 PTEN mRNA 相对含量较治疗前明显增加($P<0.05$),且显著高于模型对照组($P<0.05$)。见表 5。

表 3 各组肿瘤抑制率比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	肿瘤抑制率(%)
模型对照组	—
低剂量组	14.35±1.33
中剂量组	21.43±2.32▲
高剂量组	22.03±2.31▲

与低剂量组比较▲ $P<0.05$

表 4 各组 LNCaP 前列腺癌细胞周期变化($n=5, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	S 期	G_0/G_1 期
模型对照组	治疗前	17.32±1.88	53.92±5.43
	治疗后	18.32±1.92	60.24±6.23
低剂量组	治疗前	18.02±1.92	53.28±5.32
	治疗后	19.15±0.21	58.22±6.21
中剂量组	治疗前	18.01±1.90	54.13±5.46
	治疗后	39.24±4.62*△	34.28±3.82*△
高剂量组	治疗前	18.03±1.92	54.02±5.37
	治疗后	40.33±4.72*△	35.10±3.78*△

与治疗前比较* $P<0.05$,与模型对照组比较△ $P<0.05$

表 5 各组前列腺肿瘤组织中 PTEN mRNA 相对含量比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	时间	PTEN mRNA 相对含量
模型对照组	治疗前	0.36±0.12
	治疗后	0.37±0.08
低剂量组	治疗前	0.38±0.10
	治疗后	0.41±0.11
中剂量组	治疗前	0.38±0.09
	治疗后	0.92±0.04*△
高剂量组	治疗前	0.37±0.11
	治疗后	0.93±0.03*△

与治疗前比较* $P<0.05$,与模型对照组比较△ $P<0.05$

3 讨论

作为一种多发于老年男性群体、在前列腺上发生的上皮恶性肿瘤,PCa 发病率在全球男性患有的全部恶性肿瘤中排名第二。我国 PCa 发生率最近几年维持在较快的增长速度^[7],对中国老年男性泌尿系统健康造成了严重威胁。在现代医学背景下,在 PCa 发病早期,临床上通常使用根治性治疗方法进行治疗,如放射性粒子植入、根治性前列腺切除术、根治性外放射治疗等;而在中期通常使用内分泌治疗结合放疗、手术结合放疗等综合治疗方法;在晚期,几乎所有患者最终都会演变成为激素抵抗性 PCa 或激素非依赖性 PCa,而传统的去势治疗方案包含了手术去势和药物去势 2 种方式^[8]。

伴随着中医药抗肿瘤研究的一步步发展,中医药治疗 PCa 的优势也逐渐显现出来。中医药对于抑制 PCa 骨转移、提高患者生存质量、减弱放疗不良反应、提高患者免疫功能、增加患者生存期等方面都起到了促进作用^[9]。老年男性作为 PCa 的高发人群,发病的根本原因之一是年老体虚。大量患者在发现时已处于晚期转移阶段,病邪的“长驱直进”由正气大虚所致。作为一种常见的补阳类中药材,淫羊藿中的主要活性有效成分淫羊藿苷,已被证实具有较强的抗肿瘤活性,对常见恶性肿瘤如肺癌、肝癌、胃癌、宫颈癌、乳腺癌等肿瘤细胞均可起到一定的抑制效果^[10],其作用机制主要表现在抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移,诱导肿瘤细胞凋亡、分化,使得机体免疫力得到增强等,对癌症通路的多个方面均有涉及,证实了中药多通路、多靶点发挥作用的特点。研究^[11]发现,淫羊藿苷抑制前列腺癌 LNCaP 细胞增殖的机制与 PTEN 高表达并抑制雄激素受体信号通路中 AR 的磷酸化而在 S 期阻滞癌细胞增殖存在紧密的联系;体外实验^[12]也表明,淫羊藿含药血清对于前列腺癌 PC-3 细胞的增殖产生了明显的抑制作用。

1997 年,3 个不同的研究小组发现 10 号染色体(10q23)上存在 1 个抑癌基因——PTEN 基因^[12]。研究^[13]表明,PTEN 通过使细胞内蛋白酪氨酸去磷酸,从而加速细胞凋亡进程,调控细胞周期和改变细胞黏附力,从而对肿瘤细胞生长、转移产生抑制作用。近些年的研究表明在前列腺癌患者的病理组织中 PTEN 也存在异常表达的情况,马东升等^[14]对前列腺癌组织中 PTEN 抑癌基因蛋白表达的检测发现,在良性前列腺增生中 PTEN 基因蛋白表达显著高于 PCa, PTEN 蛋白表达阳性率与肿瘤细胞分化程度、临床分

型呈现负相关。Wang L 等^[15]认为前列腺癌 Gleason 评分与 PTEN 蛋白呈负相关,前列腺癌 Gleason 评分 ≥ 7 分时,这种相关性更为明显,甚至可造成 PTEN 表达缺失;同时也与患者预后密切相关,PCa 患者预后越好,其 PTEN 蛋白表达水平越高;由此可推论 PTEN 表达的缺失是 PCa 不良预后的病理标志物。本研究结果显示,中剂量组及高剂量组 PTEN mRNA 相对含量较治疗前明显增加,且显著高于模型对照组;提示淫羊藿苷促进了前列腺肿瘤组织中 PTEN 高表达。

增殖失控是恶性肿瘤的重要特征之一。细胞分化周期中,肿瘤增殖与 G₀/G₁期、S 期周期紊乱存在显著相关性。细胞凋亡、分化与增殖失控会受到 G₀/G₁期、S 期周期紊乱的影响,进而诱发肿瘤无限制分化、增殖甚至恶化、转移的产生^[16]。因此恶性肿瘤生长最基本的生物学特征就是细胞周期调控的紊乱,也就是肿瘤细胞失控性增殖。本研究结果显示,中剂量组及高剂量组肿瘤质量、肿瘤体积较治疗前明显降低,且显著低于模型对照组。中剂量组及高剂量组肿瘤抑制率显著高于模型对照组。中剂量组及高剂量组肿瘤细胞 S 期较治疗前明显增加,且显著高于模型对照组;中剂量组及高剂量组肿瘤细胞 G₀/G₁期较治疗前明显减少,且显著低于模型对照组。提示淫羊藿苷对前列腺 LNCaP 细胞增殖起到了抑制作用。

综上所述,淫羊藿苷可能通过上调 PTEN 表达、改变细胞周期分布来抑制前列腺癌 LNCaP 细胞增殖,从而有效抑制前列腺癌原位移植瘤 SCID 小鼠肿瘤生长。

参 考 文 献

- [1] 何华琼,饶红,郑君,等.淫羊藿苷对前列腺癌原位移植瘤模型小鼠雄激素受体信号通路的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2019,21(4):641-646.
- [2] 栾玉玲,陈皖晴,冯煜.淫羊藿苷调控髓源抑制细胞功能抑制大肠癌转移的研究[J].中成药,2023,45(3):768-774.
- [3] Yan Y, Huang H. Interplay among PI3K/AKT, PTEN/FOXO and AR signaling in prostate cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1210: 319-331.
- [4] Ding Y, Li N, Dong B, et al. Chromatin remodeling AT-

Pase BRG1 and PTEN are synthetic lethal in prostate cancer[J]. J Clin Invest, 2019, 129(2): 759-773.

- [5] 李秋洋,周晓东,罗文,等.高强度聚焦超声治疗及控制兔肝 VX2 肿瘤发展的实验研究[J].中国超声医学杂志,2008,24(5):395-398.
- [6] 司海龙,陈玉,苟涛,等.培元抗癌汤通过 PI3K-AKT-mTOR 信号通路调节 Lewis 肺癌自噬抑制肿瘤生长和转移的实验研究[J].北京中医药大学学报,2021,44(8):722-728.
- [7] 顾成元,秦晓健,黄永墙,等.我国部分省市前列腺癌精准筛查初步结果分析[J].中华医学杂志,2019,99(42):3292-3297.
- [8] Sekhoacha M, Riet K, Motloung P, et al. Prostate cancer review: genetics, diagnosis, treatment options, and alternative approaches[J]. Molecules, 2022, 27(17): 5730.
- [9] 赵杉,黄浩然,王如然,等.扶正消瘀方联合常规西医治疗前列腺增生术后湿热瘀毒型前列腺癌的临床研究[J].河北中医,2022,44(11):1790-1794.
- [10] 齐芸,郑永先.淫羊藿苷抗肿瘤作用机制研究进展[J].中医药导报,2022,28(8):153-157.
- [11] 饶红,武福云,何华琼.淫羊藿苷对前列腺癌原位移植瘤 SCID 小鼠脂肪酸合成酶和 LNCaP 细胞生物学行为的影响[J].实用药物与临床,2018,21(5):498-501.
- [12] Lee KS, Lee HJ, Ahn KS, et al. Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 pathway mediates icariside II induced apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells[J]. Cancer Lett, 2009, 280(1): 93-100.
- [13] 翟文静,袁林,李洪昌,等.去泛素化酶 OTUD3 调控 PTEN 肿瘤相关突变体蛋白稳定性的研究[J].军事医学,2023,47(4):282-288.
- [14] 马东升,高溪媛,阿依达娜·居马别克,等. PTEN(-)/PI3K-AKT-mTOR 信号传导通路在前列腺癌发生与演变中的机制[J].中国药物与临床,2021,21(22):3684-3687.
- [15] Wang L, Wang C, Sarwar MS, et al. PTEN-knockout regulates metabolic rewiring and epigenetic reprogramming in prostate cancer and chemoprevention by triterpenoid ursolic acid[J]. FASEB J, 2022, 36(11): e22626.
- [16] 刘志斌,靳松,牛亦农.苯乙基异硫氰酸酯对良性前列腺上皮细胞增殖凋亡的影响及相关机制研究[J].首都医科大学学报,2021,42(6):961-966.

(收稿日期:2023-11-24)