

张文杰, 王祥, 徐晓丽, 等. 丙泊酚对前列腺癌 PC3 细胞恶性生物学行为及 Nrf2/ARE 通路的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2022, 50(3): 350-353.

· 基础医学 ·

DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2022.03.009

丙泊酚对前列腺癌 PC3 细胞恶性生物学行为及 Nrf2/ARE 通路的影响

张文杰, 王祥, 徐晓丽, 郑苈月

(海安市人民医院麻醉科, 江苏省海安市 226600)

[关键词] 丙泊酚; 前列腺癌; 细胞恶性生物学行为; Nrf2/ARE 信号通路

[摘要] **目的** 研究丙泊酚对前列腺癌细胞(PC3)增殖、侵袭和凋亡及 Nrf2/ARE 通路的影响。**方法** 将 PC3 细胞分为空白对照组、丙泊酚低、中、高(2、4、6 mg/L)剂量组和阳性对照组(75 nmol/L 阿霉素)。CCK-8 法检测细胞存活率;改良 Matrigel Boyden 室法测定细胞侵袭力;流式细胞术检测细胞凋亡率;蛋白质印迹法检测核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)和抗氧化反应元件(ARE)蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较,丙泊酚组和阳性对照组 PC3 细胞存活率、侵袭力、Nrf2 和 ARE 蛋白表达水平均显著降低,细胞凋亡率显著升高,且效应呈丙泊酚剂量依赖性($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,丙泊酚低剂量组和中剂量组 PC3 细胞存活率、侵袭力、Nrf2 和 ARE 蛋白表达水平均显著升高,细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$),而丙泊酚高剂量组差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 丙泊酚可有效逆转前列腺癌 PC3 细胞恶性生物学行为,其机制可能与抑制 Nrf2/ARE 信号通路相关蛋白表达有关。

[中图分类号] R737.25

[文献标识码] A

Effects of propofol on malignant biological behavior and Nrf2/ARE pathway of prostate PC3 cell

ZHANG Wenjie, WANG Xiang, XU Xiaoli, ZHENG Xingyue

(Department of Anesthesiology, Haian People's Hospital, Haian, Jiangsu 226600, China)

[KEY WORDS] propofol; prostate cancer; cell malignant biological behavior; Nrf2/ARE signaling pathway

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of propofol on proliferation, invasion, apoptosis and Nrf2/ARE pathway of prostate cancer cell (PC3). **Methods** PC3 cell were divided into blank control group, propofol low, medium, high (2, 4, 6 mg/L) dose group and the positive control group (75 nmol/L doxorubicin), the cell survival rate was detected by CCK-8 method, the cell invasiveness was measured by modified Matrigel Boyden chamber method, the apoptosis rate was detected by flow cytometry, and the protein expressions of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and antioxidant response element (ARE) were detected by Western blot. **Results** Compared with the blank control group, the survival rate, invasiveness, Nrf2 and ARE protein expression levels of PC3 cell in propofol group and positive control group were significantly decreased, and the apoptosis rate was significantly increased. Compared with the positive control group, the survival rate, invasiveness, Nrf2 and ARE Protein expression levels of PC3 cell in the low-dose and medium-dose propofol groups were significantly increased, and the apoptosis rate was significantly decreased ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the high-dose propofol group and the positive control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Propofol can effectively reverse the malignant biological behavior of prostate cancer PC3 cell, and its mechanism may be related to the inhibition of the expression of Nrf2/ARE signal pathway related proteins.

前列腺癌为前列腺上皮恶性细胞肿瘤,前列腺癌变是一个多步骤的过程,包括启动、促进和进展,基因改变的积累导致启动细胞转化为癌前细胞群,

最终形成具有侵袭和转移能力的肿瘤^[1]。癌症患者术后需服用抗癌药物和放射治疗以防止复发和转移,而抗癌药物通常贵且不良反应多,因此迫切

[收稿日期] 2021-06-20

[修回日期] 2021-12-16

[基金项目] 南通市科技计划(指导性)项目(MSZ18176)

[作者简介] 张文杰,住院医师,研究方向为麻醉研究,E-mail 为 3446826870@qq.com。

需要新的经济高效的抗癌药物。丙泊酚是一种临床上常用的静脉麻醉药物,有研究表明,丙泊酚可有效抑制子宫内腺癌、胰腺癌、卵巢癌和肺癌细胞增殖、生长和迁移^[2-3]。越来越多研究发现,诱导参与致癌物解毒的抗氧化酶和抗氧化剂与肿瘤的发生发展密切相关,而核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 通过激活位于编码这些酶的启动子区基因的抗氧化反应元件 (antioxidant response element, ARE) 参与氧化应激的调控^[4]。因此,本研究分析丙泊酚对前列腺癌细胞 (prostate cancer cell 3, PC3) 增殖、侵袭和凋亡及 Nrf2/ARE 通路的影响,为前列腺癌的临床治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

丙泊酚购自中国食品药品检定研究院;细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自上海优宁维生物有限公司;FITC 凋亡试剂盒购自美国 Sun-Shine 公司;Nrf2、ARE 蛋白抗体购自美国 Abcam 公司;二抗 (山羊抗兔) 购于武汉三鹰生物有限公司。5320R4℃ 离心机购于德国徕卡公司;伯乐 Mini-PROTEAN 电泳仪购于美国伯乐公司;LAS 4000 成像系统购于美国 GE Healthcare 公司;BD FACSCanto II 流式细胞仪购于美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 细胞培养和分组

前列腺癌 PC3 细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。复苏后的细胞置于 1640 培养基 5% CO₂、37℃ 培养箱中进行培养,24 h 更换培养基,当细胞覆盖 70% 时,加入胰蛋白酶,进行细胞传代。按照处理因素将细胞分为空白对照组 (0 mg/L)、丙泊酚低剂量组 (2 mg/L)、丙泊酚中剂量组 (4 mg/L)、丙泊酚高剂量组 (6 mg/L) 和阳性对照组 (75 nmol/L 阿霉素)。

1.3 CCK-8 法检测细胞存活率

取对数生长期细胞,加入 1 mL 胰蛋白酶吹打 2 min,2 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液,加入 1 mL 1640 培养基,轻微吹打细胞使细胞充分悬浮,将细胞悬液转移到 96 孔板中培养 24 h 弃培养基,每孔加入新 1640 培养基和各组不同处理因素,每组 6 个复孔,培养 24 h,去除培养液。每孔加入 100 μL 培养液和 10 μL CCK-8 溶液,持续培养 3 h,使用 Bio-Rad 微孔板阅读器读取 450 nm 处光密度,重复 3 次,计算细胞存活率。

1.4 改良 Matrigel Boyden 室法测定细胞侵袭性

将各组细胞接种到有基质胶的滤膜上,下室放

入 10% FBS 作为趋化剂。放入培养箱培养 24 h,取出滤膜,并进行染色,倒置显微镜下每个滤膜随机选择 5 个视野计数细胞,重复 3 次取平均值。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

使用 FITC 凋亡试剂盒流式细胞术检测细胞凋亡率。将细胞洗涤 2 次,用 1× 结合缓冲液 1×10⁶ 个/mL 细胞悬浮于 400 μL FITC 溶液中,黑暗中室温孵育 15 min,然后加入染色液 (10 μL),4℃ 避光孵育 5 min,立即用流式细胞仪分析细胞,重复 3 次。

1.6 Western blotting 检测细胞相关蛋白表达

各组细胞弃去培养液,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液和 100 μL 蛋白酶 K 溶液,使细胞悬浮,超声细胞破碎仪作用 2 min 破碎细胞,3 000 r/min 4℃ 离心 20 min,取上清。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜和封闭后用特异性抗体 Nrf2、ARE 和肌动蛋白 (β-actin) 4℃ 孵育 12 h,孵育后的条带清洗 3 次 (1% 吐温),二抗孵育 2 h,观察结果。

1.7 统计学方法

以 $\bar{x} \pm s$ 描述定量数据,多组比较采用单因素方差分析,采用 LSD-t 检验进行多重比较,双侧检验水准 $\alpha = 0.05$,采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 丙泊酚对细胞存活率、侵袭力和凋亡率的影响

与空白对照组比较,丙泊酚组和阳性对照组 PC3 细胞存活率、侵袭力均显著降低,细胞凋亡率显著升高,且效应呈丙泊酚剂量依赖性 ($P < 0.05$)。与阳性对照组比较,丙泊酚低剂量组和中剂量组 PC3 细胞存活率、侵袭力显著升高,细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$),而丙泊酚高剂量组差异无显著性 ($P > 0.05$; 表 1)。

表 1 丙泊酚对细胞存活率、侵袭力和凋亡率的影响

分组	细胞存活率/%	侵袭细胞数/个	细胞凋亡率/%
空白对照组	98.35±8.72	175.31±14.13	13.55±3.21
阳性对照组	32.12±6.88 ^a	68.57±10.28 ^a	60.04±5.13 ^a
丙泊酚低剂量组	76.75±8.01 ^{ab}	125.75±13.57 ^{ab}	22.19±3.59 ^{ab}
丙泊酚中剂量组	52.11±7.19 ^{abc}	96.22±13.09 ^{abc}	39.79±4.07 ^{abc}
丙泊酚高剂量组	32.04±6.89 ^{acd}	69.11±10.13 ^{acd}	59.88±5.17 ^{acd}

注:a 为 $P < 0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与阳性对照组比较;c 为 $P < 0.05$,与丙泊酚低剂量组比较;d 为 $P < 0.05$,与丙泊酚中剂量组比较。

2.2 丙泊酚对细胞 Nrf2、ARE 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,阳性对照组和丙泊酚组

Nrf2、ARE 蛋白表达水平显著降低,且呈丙泊酚剂量依赖性($P<0.05$);丙泊酚高剂量组与阳性对照组阿霉素作用效果相似($P>0.05$;图 1 和表 2)。

表 2 丙泊酚对 PC3 细胞 Nrf2、ARE 蛋白表达的影响

分组	Nrf2/ β -actin	ARE/ β -actin
空白对照组	0.82 $\pm$ 0.08	0.96 $\pm$ 0.08
阳性对照组	0.16 $\pm$ 0.04 ^a	0.29 $\pm$ 0.05 ^a
丙泊酚低剂量组	0.67 $\pm$ 0.07 ^a	0.83 $\pm$ 0.08 ^a
丙泊酚中剂量组	0.40 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.62 $\pm$ 0.07 ^{ab}
丙泊酚高剂量组	0.18 $\pm$ 0.05 ^{abc}	0.37 $\pm$ 0.06 ^{abc}

注:a 为 $P<0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.05$,与丙泊酚低剂量组比较;c 为 $P<0.05$,与丙泊酚中剂量组比较。

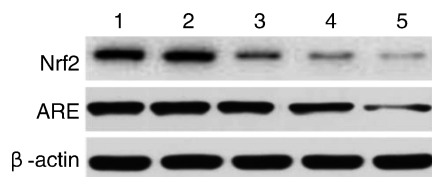


图 1 不同剂量丙泊酚作用后前列腺癌 PC3 细胞蛋白印迹图

1 为空白对照组;2 为丙泊酚低剂量组;3 为丙泊酚中剂量组;
4 为丙泊酚高剂量组;5 为阳性对照组。

3 讨论

前列腺癌是最常见的恶性肿瘤,也是发达国家男性癌症死亡的第二大原因^[5]。前列腺癌病程进展缓慢,早期无明显的临床症状,因此患者容易错过早期的最佳治疗时间,当肿瘤细胞发生迅速增殖和扩散,导致患者出现排尿异常等一系列临床症状时,往往已经到了疾病晚期,使得病情加重^[6]。据统计,2018 年前列腺癌全年全球近 130 万新增病例,占男性恶性肿瘤发病率的 13.5%,位居第二^[7]。因此了解和评价其具体作用机制,寻找有效的、新的检测方法来提高前列腺癌早期发现率、预后预测及个性化治疗是一个迫切的问题。丙泊酚是一种全身镇静催眠药,广泛应用于全身麻醉的诱导和维持。越来越多的证据表明丙泊酚有几种非麻醉作用,近年来研究发现,丙泊酚具有抑制癌细胞增殖、黏附、转移和诱导癌细胞凋亡等潜在的抗癌作用^[8]。有研究报道,丙泊酚可通过降低经脂多糖处理的非小细胞肺癌细胞中 HIF-1 的表达来抑制细胞侵袭和逆转。此外,丙泊酚可抑制肺癌、胰腺癌和宫颈癌细胞的生存能力并诱导其凋亡^[9]。本研究检测了不同剂量梯度的丙泊酚对前列腺癌 PC3 细

胞的影响,发现丙泊酚可明显影响前列腺癌 PC3 细胞增殖和侵袭能力,并且随着丙泊酚干预剂量的增加,其对前列腺癌 PC3 细胞增殖和侵袭的抑制效果越明显,表明丙泊酚可有效缓解前列腺癌 PC3 细胞的增殖速度,同时通过抑制其侵袭能力以达到阻止肿瘤细胞扩散的可能。同时本研究通过流式细胞仪检测了丙泊酚对前列腺癌 PC3 细胞凋亡的影响,结果发现,丙泊酚可增加细胞凋亡率,并呈剂量效应关系,进一步说明了丙泊酚对前列腺癌的抑制作用,通过增加其细胞凋亡率以达到缓解疾病进程的目的。

在临床实践中,常静脉给予丙泊酚,因其起效短、恢复快而被广泛应用于各种手术中,近年来,其抗肿瘤作用已成为研究热点^[10]。多项研究表明,丙泊酚具有抗氧化作用,主要作用于线粒体复合物 I,降低细胞内活性氧水平。Nrf2/ARE 信号通路与机体氧化应激密切相关,Nrf2 是机体中维持细胞氧化还原平衡的关键翻译因子^[11]。Nrf2/ARE 信号通路的异常高表达在多种癌症的转移过程中起着关键作用^[12]。Nrf2 表达的增加,可诱导其下游基因磷酸酰胺腺嘌呤二核苷酸还原酶-1 和血红素氧化酶-1 的表达,造成机体氧化应激进一步加重,从而反向调控受体 ARE 的表达,机体的异常氧化应激反应,可导致肿瘤细胞增殖和迁移活性增加,从而导致疾病加重^[13]。因此,本文检测了 Nrf2 和其下游 ARE 蛋白的表达,发现在未对前列腺癌 PC3 细胞进行任何处理时,Nrf2 和 ARE 蛋白均呈现高表达状态,当给予丙泊酚干预后,Nrf2 和 ARE 表达均下调,且具有明显剂量依赖性,表明丙泊酚可能通过调节 Nrf2/ARE 信号通路来降低细胞内氧化应激反应,减少细胞氧化应激因子的表达,从而抑制前列腺癌 PC3 细胞增殖和侵袭,并促进其凋亡。

综上所述,本研究结果表明丙泊酚可有效抑制前列腺癌 PC3 细胞增殖与侵袭,并促进其凋亡,其作用效果与丙泊酚的剂量密切相关。此外,本研究结果表明丙泊酚的抑制增殖与侵袭以及促凋亡的作用,可能与通过调控细胞 Nrf2/ARE 信号通路来抑制其氧化应激有关,其具体作用机制后续将深入探究,以期临床上前列腺癌的治疗提供新的方向和实验依据。

参考文献

- [1] EFFENBERGER K, SCHROEDER C, HANSEN A, et al. Improved risk stratification by circulating tumor cell counts in pancreatic cancer [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(12): 2844-2850.

- [2] DU Q, LIU J, ZHANG X E, et al. Propofol inhibits proliferation, migration, and invasion but promotes apoptosis by regulation of Sox4 in endometrial cancer cells[J]. *Brazil J Med Biol Res*, 2018, 51(4): 6803-6815.
- [3] LIU W Z, LIU N. Propofol inhibits lung cancer A549 cells growth and epithelial-mesenchymal transition process by up-regulation of microRNA-1284[J]. *Oncol Res*, 2018, 27(1): 1-8.
- [4] BAK M J, VAN-LONG T, KO S Y, et al. Induction of Nrf2/ARE-mediated cytoprotective genes by red ginseng oil through ASK1-MKK4/7-JNK and p38 MAPK signaling pathways in HepG2 cells[J]. *J Ginseng Res*, 2016, 40(4): 423-430.
- [5] THEIL G, SCHIETINGER C. Evaluation of ex vivo and in vivo biomarkers in different stages of prostatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(13S): 1064-1064.
- [6] TEO M Y, RATHKOPF D, KANTOFF P. Treatment of advanced prostate cancer[J]. *Annu Rev Med*, 2019, 70: 479-499.
- [7] SMITH W H, CESARETTI J, CHIN C P, et al. Salvage low dose rate brachytherapy for prostate cancer recurrence following definitive external beam radiation therapy[J]. *Radiother Oncol*, 2021, 155(3): 42-47.
- [8] LI H, LU Y, PANG Y, et al. Propofol enhances the cisplatin-induced apoptosis on cervical cancer cells via EGFR/JAK2/STAT3 pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 86: 324-333.
- [9] LIU Z M, ZHANG J, HONG G C, et al. Propofol inhibits growth and invasion of pancreatic cancer cells through regulation of the miR-21/Slug signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(10): 4120-4133.
- [10] HUANG X, TENG Y, YANG H, et al. Propofol inhibits invasion and growth of ovarian cancer cells via regulating miR-9/NF- κ B signal[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2016, 49(12): e5717.
- [11] LIU Y W, LIU X L, KONG L, et al. Neuroprotection of quercetin on central neurons against chronic high glucose through enhancement of Nrf2/ARE/glyoxalase-1 pathway mediated by phosphorylation regulation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 2145-2154.
- [12] BECHER R, VALEN H, OLDERBØ B P, et al. The dental monomer 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) causes transcriptionally regulated adaptation partially initiated by electrophilic stress[J]. *Dent Mater*, 2019, 35(1): 125-134.
- [13] WANG X, SAUD S M, ZHANG X, et al. Protective effect of Shaoyao decoction against colorectal cancer via the Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 241: 111981.

(此文编辑 朱雯霞)

(上接第 344 页)

[参考文献]

- [1] 李论, 戴金龙, 胡硕, 等. 磁共振弥散张量成像在脑胶质瘤诊断中应用价值研究[J]. *创伤与急危重病医学*, 2018, 6(6): 422-423.
- [2] SHINNO N, KIMURA H, SADA R, et al. Activation of the dickkopf1-CKAP4 pathway is associated with poor prognosis of esophageal cancer and anti-CKAP4 antibody May be a new therapeutic drug[J]. *Oncogene*, 2018, 37(26): 3471-3484.
- [3] 朱锦舟, 张慧娟, 奚黎婷, 等. 血清细胞骨架蛋白 4 检测对肝细胞癌的诊断价值[J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(17): 84-87.
- [4] 于炳文, 刘建雄. CKAP4/p63 在肿瘤中的研究进展[J]. *甘肃医药*, 2019, 38(10): 873-875, 889.
- [5] GU X, GONG H, SHEN L, et al. miR-129-5p inhibits human glioma cell proliferation and induces cell cycle arrest by directly targeting DNMT3[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 44(1): 265-266.
- [6] 李德培, 陈银生, 郭玲玲, 等. 脑胶质瘤的临床疗效和预后因素分析[J]. *中华神经外科杂志*, 2018, 34(9): 905-909.
- [7] DAVIES E, CLARKE C, HOPKINS A. Malignant cerebral glioma-II: perspectives of patients and relatives on the value of radiotherapy[J]. *BMJ*, 1996, 313(771): 1512-1516.
- [8] JI C X, FAN Y H, XU F, et al. MiR-375 inhibits glioma cell proliferation and migration by downregulating RWDD3 in vitro[J]. *Oncol Rep*, 2018, 39(4): 1825-1834.
- [9] GAO L, WANG Q, REN W, et al. The RBP1-CKAP4 axis activates oncogenic autophagy and promotes cancer progression in oral squamous cell carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(6): 488-504.
- [10] 张卢舜, 李育庄, 李春辉. 胃癌中 NPR-A、P38MAPK 及细胞骨架 Tubulin- α 的表达及意义[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(16): 2570-2574.
- [11] ZHAO F, CHEN T, JIANG N. CDR1as/miR-7/CKAP4 axis contributes to the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm by regulating the proliferation and apoptosis of primary vascular smooth muscle cells[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(6): 3760-3766.
- [12] CHEN Y, ZHANG Q, ZHOU Y, et al. Inhibition of miR-182-5p attenuates pulmonary fibrosis via TGF- β /Smad pathway[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2020, 39(5): 683-695.
- [13] 刘锦燕, 赵璐涛, 王恒如, 等. 细胞骨架相关蛋白 4 对肿瘤诊断和预后的作用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2020, 40(2): 255-258.
- [14] 解学军, 张冰. 外泌体 MiR-1246 促进星形胶质瘤细胞增殖与侵袭的研究[J]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2018, 8(5): 292-296.
- [15] 符黄德, 罗起胜, 邓元央, 等. 肝癌衍生生长因子和血管内皮生长因子在脑胶质瘤中的表达及其与肿瘤微血管密度的相关性研究[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(17): 2019-2023.

(此文编辑 朱雯霞)