

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201408004

谭亚芳, 李娟, 胡树枝, 等. 鸦胆子苦醇抑制人前列腺癌 DU145 细胞生长及作用机制[J]. 广西植物, 2015, 35(3): 431–436

Tan YF, Li J, Hu SZ, et al. Inhibitory effects of brusatol on human prostate cancer cells DU145 and its molecular mechanism[J]. *Guihaia*, 2015, 35(3): 431–436

## 鸦胆子苦醇抑制人前列腺癌 DU145 细胞生长及作用机制

谭亚芳<sup>1</sup>, 李娟<sup>1</sup>, 胡树枝<sup>1</sup>, 江仁望<sup>1,2\*</sup>

(1. 暨南大学药学院 中药及天然药物研究所, 广州 510632; 2. 深圳岭南药材资源开发与应用工程实验室, 广东 深圳 518057)

**摘要:** 中药鸦胆子是一种常用的抗肿瘤中草药, 鸦胆子苦醇是来源于鸦胆子的主要成分。该研究探讨了鸦胆子苦醇(brusatol)对人前列腺癌 DU145 细胞的生长抑制及其作用机制。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测鸦胆子苦醇对不同细胞株的生长抑制情况, 以及不同浓度的鸦胆子苦醇对 DU145 细胞的增殖抑制率; 应用 Hoechst 33258 染色法观察鸦胆子苦醇处理 DU145 细胞后所发生的形态学变化; 分别采用 PI 单染及 Annexin-V-FITC 双染法流式细胞术分析细胞周期分布个凋亡率的变化; 以 Western blot 测定鸦胆子苦醇对 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响。结果表明, 鸦胆子苦醇对人前列腺癌 DU145 细胞的抑制作用更为显著, 并且可以时间和剂量依赖性地抑制人前列腺癌 DU145 细胞的生长, 其半数有效抑制浓度  $IC_{50}$  为  $(0.27 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 鸦胆子处理 DU145 细胞后, Hoechst 33258 染色可见到明显的凋亡特征; 细胞周期图中可见明显的亚二倍体峰, 且随着作用时间的延长凋亡比例增加, FCM 检测鸦胆子苦醇作用 24 h 后凋亡图中, 可见凋亡的发生; Western blot 检测表明鸦胆子苦醇处理后可使磷酸化的 p38 和 JNK 表达增加, 使磷酸化的 ERK 表达降低。鸦胆子苦醇能显著抑制 DU145 细胞增殖, 诱导 DU145 细胞凋亡。磷酸化的 P38 和 JNK 的表达增加, 但磷酸化的 ERK 表达下降, 这表明 MAPK 途径的活化可能是鸦胆子苦醇对 DU145 细胞生长抑制的作用机制之一。因此, 鸦胆子苦醇是潜在的抗前列腺癌药物, 有必要进一步在动物水平阐明其抗前列腺癌活性。

**关键词:** 鸦胆子苦醇; 人前列腺癌 DU145 细胞; 凋亡; MAPK**中图分类号:** R285 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2015)03-0431-06

## Inhibitory effects of brusatol on human prostate cancer cells DU145 and its molecular mechanism

TAN Ya-Fang<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, HU Shu-Zhi<sup>1</sup>, JIANG Ren-Wang<sup>1,2\*</sup>( *Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Shenzhen Engineering Laboratory of Lingnan Herbal Resource Development and Application, Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China* )

**Abstract:** Fructus Bruceae is a Chinese Traditional Medicine that commonly used for the treatment of tumor diseases. Brusatol is one of the major active components in Fructus Bruceae. This study was to explore the inhibitory effects of brusatol against proliferation of human prostate cancer DU145 cells, and the molecular mechanism of apoptosis induced by brusatol was further investigated. The inhibitory activities of brusatol against human prostate cancer cells DU145 and PC3, hepatocellular carcinoma cell HepG2, human breast adenocarcinoma cell MCF-7, human colon

收稿日期: 2014-08-20 修回日期: 2014-12-3

基金项目: 国家教育部博士点基金(20114401110005); 中央高校基本科研业务费(11612603); 广东省高层次人才项目(JN2010)。

作者简介: 谭亚芳(1990-), 女, 湖南娄底人, 硕士研究生, 从事中药与天然药物抗肿瘤活性研究, (E-mail) tyf1006903782@163.com。

\*通讯作者: 江仁望, 教授, 从事中药与天然药物活性成分研究, (E-mail) trwjiang@jnu.edu.cn。

adenocarcinoma cell HT-29, human pulmonary carcinoma cell A549 were assessed by MTT assay. The time- and concentration-dependent inhibition by brusatol on the most sensitive DU145 cells were further studied, and Hoechst 33258 staining was used to observe cellular morphologic changes. The distribution of cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry through PI and Annexin-V/FITC-PI double-labeled staining. To further analyze the possible mechanism of cell apoptosis, we investigated the protein expression levels of MAPK signaling pathway in DU145 cells after treatment with brusatol by Western blot. At the same concentration, brusatol showed the most potent inhibition on the proliferation of DU145 cells in the MTT assay. Furthermore, brusatol was found to inhibit DU145 cell growth in a time- and concentration-dependent manner. The  $IC_{50}$  of the 48 h time course was  $(0.27 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Apoptosis was measured by Hoechst 33258 staining, which showed increased fragmented chromatin and apoptotic bodies after the treatment with  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  of brusatol as compared with the solvent control. A typical subdiploid peak was observed by flow cytometry, and the ratio of subdiploid peak was further increased with the time. Apoptosis of DU145 cells was analyzed by AnnexinV/FITC-PI staining and flow cytometry detection. The apoptosis rate was increased from 0.7% to 10.6% after the treatment of brusatol for 24 h, which confirmed that brusatol could induce apoptosis. Western blot analysis showed that brusatol can affect the expression levels of MAPK superfamily at a concentration of  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  after incubation for 45 min, 1.5, 3, 6, 12 and 24 h. Brusatol selectively increased the phosphorylation of p38 and JNK, while decreased the phosphorylation of ERK1/2, all in time-dependent manners. Brusatol could significantly inhibit the proliferation of DU145 cells at a dose- and time-dependent manner, and it could also induce cell apoptosis. The increased phosphorylation of p38 and JNK, while decreased phosphorylation of ERK1/2 suggested that mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway might be involved in the brusatol-induced apoptosis on DU145 cells. Thus brusatol is a potential anticancer drug against the prostate cancer. Further studies to reveal its anticancer properties at the animal level are warranted.

**Key words:** brusatol; human prostate cancer cells DU145; apoptosis; MAPK

前列腺癌是男性泌尿生殖系统常见的恶性肿瘤之一。根据美国的一项调查显示,前列腺癌发病率已经超过肺癌发病率,跃居男性肿瘤之首(Jemal *et al.*, 2009),前列腺癌的治疗一直是个难题,因此寻找高效的抗前列腺癌药物成为研究热点。鸦胆子来源于苦木科植物鸦胆子(*Brucea javanica*)的干燥成熟果实,鸦胆子中的苦木素内酯类化合物具有很好的抗疟疾(O' Neill *et al.*, 1987)、抗肿瘤作用(Yang *et al.*, 1997)、抗烟草花叶病毒(Shen *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010)、抗菌(桂平华等, 2008)、抗白血病(Polonsky *et al.*, 1980)、抗锥体虫病(Bawm *et al.*, 2008),是鸦胆子属植物的一类主要活性成分(丁晨旭等, 2006)。

鸦胆子苦醇(brusatol)是从鸦胆子中提取得到的一种苦木内酯类化合物,目前关于鸦胆子苦醇活性的研究报道有抗白血病(Mata-Greenwood *et al.*, 2002; Cuendet *et al.*, 2004)、抗胰腺癌(Zhao *et al.*, 2011)等,但目前尚未见有鸦胆子苦醇诱导前列腺癌 DU145 细胞凋亡的研究报道。因此本研究初步探讨了鸦胆子苦醇抑制前列腺癌 DU145 细胞生长作用及其作用机制,为鸦胆子苦醇用于前列腺癌的临床治疗提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司; DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清、青霉素、链霉素购自美国 Hyclone 公司; Hoechst 33258 染色液、DNA Ladder 抽提试剂盒购自碧云天生物技术研究; p38、P-p38、ERK、P-ERK、JNK、P-JNK、 $\beta$ -actin 单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔购自 Cell Signaling Technology 公司。

### 1.2 细胞培养

人前列腺癌细胞(DU145, PC3)、人肝癌细胞(HepG2)、人乳腺癌细胞(MCF-7)、人结肠癌细胞(HT-29)、人肺癌细胞(A549)购自中国典型培养物保藏中心。以含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素的 DMEM 培养基,于 37 °C、饱和湿度下 5% 的培养箱中培养,细胞呈单层贴壁生长,实验均取对数生长期的细胞。

### 1.3 鸦胆子苦醇的制备

取鸦胆子药材 10 kg,粉碎并用 10 倍量 95%乙

醇渗漉提取, 过滤, 合并提取液, 减压浓缩得浸膏约 800 g。用水混悬, 石油醚萃取 3 次, 合并萃取液, 减压浓缩得石油醚萃取部分 121 g。再用氯仿萃取 3 次, 减压浓缩得氯仿萃取部分 32 g; 最后, 用正丁醇萃取 3 次, 减压浓缩得正丁醇部分 181 g, 水部分 441 g。取正丁醇的萃取部分 86 g, 经大孔树脂 D101 层析, 乙醇水梯度洗脱, 所得馏分进一步使用硅胶柱层析, ODS, 凝胶, 制备型高效液相等多种方法分离纯化, 得到化合物鸦胆子苦醇 32.0 mg。准确称取一定量鸦胆子苦醇溶于 DMSO 配成  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的贮备液, 分装,  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  避光储存备用。实验前用 DMEM 培养基稀释成不同浓度, DMSO 终浓度小于 0.1%。

#### 1.4 鸦胆子苦醇对不同肿瘤细胞株增殖的抑制作用

取生长对数期的前列腺癌细胞 (DU145、PC3)、人肝癌细胞 (HepG2)、人乳腺癌细胞 (MCF-7)、人结肠癌细胞 (HT-29)、人肺癌细胞 (A549) 用质量体积比 0.25% 的胰蛋白酶消化, 并接种于 96 孔板上。接种 24 h 后, 加入不同浓度的待测样品, 并以相同体积比 DMSO 作为对照, 培养 48 h 后, 每孔加入  $50 \mu\text{L}$  MTT 溶液 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 4 h 后离心弃上清液, 加入 DMSO ( $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ), 振荡 5 min 左右, 置酶标仪中测定 OD 值, 波长为 570 nm, 实验重复 3 次, 并计算细胞抑制率, 同时作图并用 SPSS 18.0 软件求得半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

#### 1.5 鸦胆子苦醇对前列腺癌 DU145 细胞增殖的抑制作用

取单层培养的 DU145 细胞 (DMEM, 含 10% 胎牛血清), 用质量体积比 0.25% 的胰蛋白酶消化, 接种于 96 孔板上 (每孔加入细胞悬浮液  $100 \mu\text{L}$ , 细胞数为 3 000 个)。接种 24 h 后, 加入不同浓度待测样品, 共设 6 个药物浓度, 药物最终浓度分别为  $3.125 \times 10^{-8}$ 、 $6.25 \times 10^{-8}$ 、 $12.5 \times 10^{-8}$ 、 $25 \times 10^{-8}$ 、 $50 \times 10^{-8}$  和  $100 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 以相同体积比 DMSO 作为对照, 在培养 48 h 后, 每孔加入  $50 \mu\text{L}$  MTT 溶液 ( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 4 h 后离心弃上清液, 加入 DMSO ( $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ ), 振荡 5 min 左右, 置酶标仪中测定 OD 值, 波长为 570 nm, 实验重复 3 次, 并计算细胞抑制率, 同时作图并用 SPSS 18.0 软件求得半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

#### 1.6 鸦胆子苦醇处理后的细胞形态学观察

采用 Hoechst 33258 荧光染色法, 取对数生长期细胞接种于六孔板上, 待细胞长至 80% 时, 加入

终浓度为  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鸦胆子苦醇作用 24 h 后, 吸尽培养液, 加入 4% 多聚甲醛固定 20 min。去除固定液, 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min, 吸尽液体, 加入  $0.5 \text{ mL}$  Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min, 荧光显微镜下观察。

#### 1.7 PI 单染流式细胞术检测细胞周期

取对数期生长的 DU145 细胞接种于 6 孔板, 待细胞长至 80% 时, 加入终浓度为  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鸦胆子苦醇, 分别作用 6、12、24 h 后, 用胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤后加入 70% 乙醇,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  固定过夜。检测前离心去掉乙醇并用 PBS 洗涤 2 次, 加入含 RNaseA 的碘化丙啶 (PI) 染色液  $500 \mu\text{L}$ , 室温避光染色 30 min, 流式细胞仪 (型号 Beckman Gallios) 检测, Wincycle32 软件分析亚二倍体峰。

#### 1.8 Annexin-V-FITC 双染法流式细胞术流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数期生长的 DU145 细胞接种于 6 孔板, 待细胞长至 80% 左右, 分别加入终浓度  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鸦胆子苦醇, 作用 24 h 后, 胰酶消化收集细胞。用 PBS 洗 1 次,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 加  $200 \mu\text{L}$  binding 缓冲液重悬细胞, 加  $5 \mu\text{L}$  Annexin V-FITC, 室温避光孵育 10 min,  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 弃上清, 加  $200 \mu\text{L}$  binding 缓冲液重悬细胞, 加入  $5 \mu\text{L}$  PI, 上机检测。

#### 1.9 蛋白免疫印迹实验 (Western blot)

DU145 细胞经终浓度  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鸦胆子苦醇分别处理 0、0.75、1.5、3、6、12、24 h 后, 用胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入细胞裂解液, 冰上裂解细胞 30 min。BCA 法测定蛋白质浓度。用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质。电泳后将蛋白转印纸硝酸纤维素膜上, 封闭后一抗  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h 后 ECL 显色。

## 2 结果与分析

#### 2.1 鸦胆子苦醇对不同肿瘤细胞株增殖的抑制作用

经检测得 DU145 细胞、PC3 细胞、HepG2 细胞、MCF-7 细胞、HT-29 细胞、A549 细胞的半数抑制浓度分别为  $(0.27 \pm 0.03) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(0.55 \pm 0.06) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(3.21 \pm 0.22) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(0.90 \pm 0.09) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(0.96 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(0.70 \pm 0.06) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 结果如图 1 所示, 其中鸦胆子苦醇对前列腺癌 DU145、PC3 细胞的抑制作用最为显

著,并且 DU145 细胞对鸦胆子苦醇更为敏感。

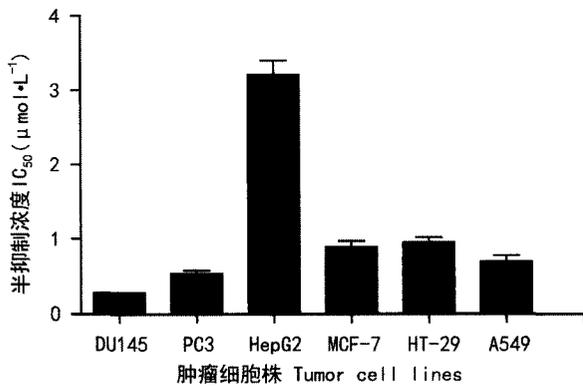


图1 鸦胆子苦醇对不同肿瘤细胞株的半数抑制浓度  
Fig. 1 Half inhibitory concentration of brusatol inhibiting different tumor cell lines

## 2.2 不同浓度鸦胆子苦醇对 DU145 细胞增殖的抑制作用

图2显示,  $3.125 \times 10^{-8}$ 、 $6.25 \times 10^{-8}$ 、 $12.5 \times 10^{-8}$ 、 $25 \times 10^{-8}$ 、 $50 \times 10^{-8}$  和  $100 \times 10^{-8}$  mol·L<sup>-1</sup> 鸦胆子苦醇对 DU145 细胞具有不同程度的抑制作用,呈时间和剂量依赖性地抑制 DU145 细胞的生长,其半数有效抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为  $(0.27 \pm 0.04) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 经观察,我们选择  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鸦胆子苦醇浓度作为后续实验的药物剂量。

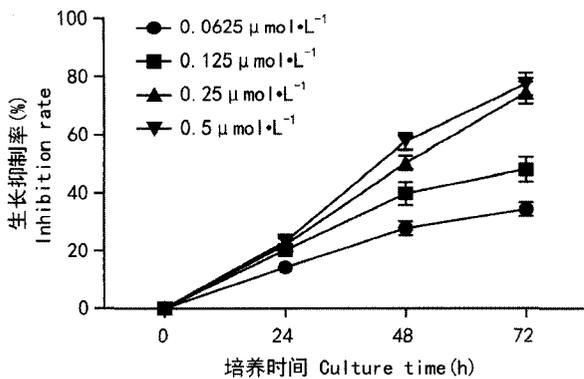


图2 不同浓度鸦胆子苦醇抑制 DU145 细胞的时效和量效关系

Fig. 2 Inhibiting effects of brusatol on the proliferation of DU145 cells in dose- and time dependent manner

## 2.3 Hoechst 33258 荧光染色检测鸦胆子苦醇对 DU145 细胞形态的影响

经 Hoechst 33258 染色发现,正常细胞呈均匀弥散荧光,而经  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鸦胆子苦醇处理 24 h 后,可以观察到细胞核呈碎片状,呈现致密浓染的

颗粒状荧光,此为典型的细胞凋亡特征(图3)。

## 2.4 鸦胆子苦醇对 DU145 细胞周期的影响

我们进一步考察了鸦胆子苦醇对 DU145 细胞周期的影响,如图4所示,  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鸦胆子苦醇分别处理 6、12、24 h 后,通过亚二倍体峰检测其凋亡率分别为  $(0.16 \pm 0.04)\%$ 、 $(1.46 \pm 0.11)\%$ 、 $(8.58 \pm 0.32)\%$ 、 $(14.46 \pm 1.20)\%$ ,即随着作用时间的增加,亚二倍体峰明显增加,即在鸦胆子苦醇作用 24 h 后凋亡最明显。

## 2.5 鸦胆子苦醇对 DU145 细胞凋亡的影响

为进一步确认凋亡的发生,采用 Annexin-V-FITC 双染法检测鸦胆子苦醇对 DU145 细胞凋亡的影响,如图5所示,  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  鸦胆子苦醇作用 24 h 后,与对照组相比凋亡明显,对照组凋亡率为 1.7%,加药组凋亡率为 10.6%,这也印证了鸦胆子苦醇可以诱导 DU145 细胞发生凋亡。

## 2.6 鸦胆子苦醇诱导 DU145 细胞凋亡可能的作用机制

通过 Western blot 检测鸦胆子苦醇对 p38、ERK 及 JNK 及其磷酸化活性形式表达的影响,结果如图6。以终浓度为  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鸦胆子苦醇分别处理 0、0.75、1.5、3、6、12、24 h 后检测得, P-p38、P-JNK 的表达呈明显的递增趋势,表明两者均被激活。P-ERK 在 12 h 后呈明显的减弱趋势,表明活性被抑制,由此可知, P-p38、P-ERK 及 P-JNK 均参与了鸦胆子苦醇诱导细胞凋亡的过程。

## 3 讨论

目前发现天然产物可以通过多种方式发挥抗肿瘤的作用,如抑制肿瘤细胞增殖和诱导分化,诱导细胞凋亡,抗肿瘤细胞粘附与浸润转移等。本研究发现鸦胆子苦醇可以抑制 DU145 细胞的生长,并且具有时间和剂量依赖性。经  $0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鸦胆子苦醇处理 DU145 细胞 24 h 后, Hoechst 33258 荧光染色研究发现,鸦胆子苦醇可以诱导 DU145 细胞发生典型的核破碎,呈现致密浓染的颗粒状荧光。流式细胞术检测发现,随着时间的增长,凋亡峰比例在逐渐增加,以上均说明鸦胆子苦醇可以诱导 DU145 细胞凋亡的发生。前列腺癌的发生、发展是个复杂的过程,多种信号转导通路可能参与其中 (Karhadkar *et al.*, 2004)。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 信号途径存在于生物体的大多数细胞内,是真核生物细

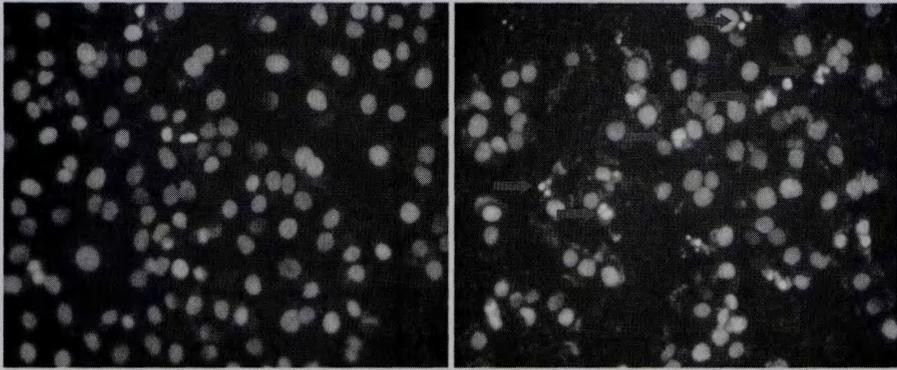


图 3 鸦胆子苦醇处理 DU145 细胞 24 h 后的形态变化 左:对照; 右: 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 24 h。下同。  
Fig. 3 Morphological changes in DU145 cells treated with brusatol for 24 h  
Left: Control; Right: 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h. The same below.

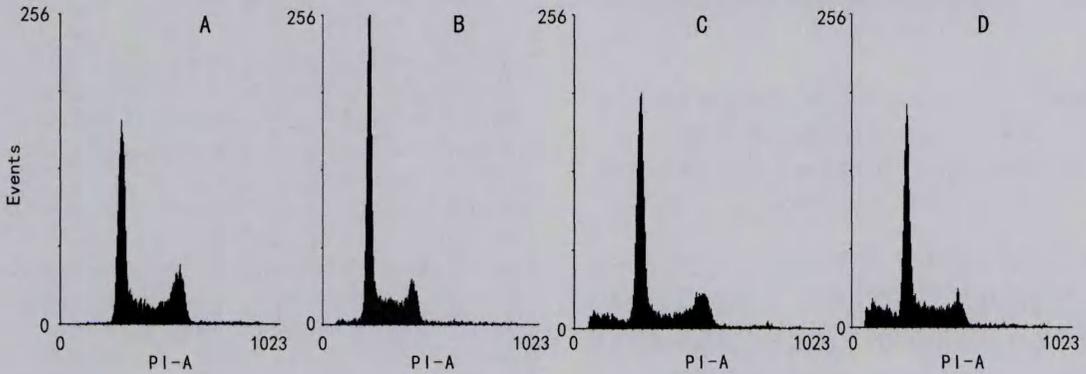


图 4 流式细胞仪检测鸦胆子苦醇作用 6、12、24 h 后 DU145 细胞 DNA 直方图分布  
A. 对照; B. 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 6 h; C. 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 12 h; D. 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  作用 24 h。  
Fig. 4 DNA histograms of DU145 cell after treatment with brusatol for 6, 12 and 24 h by FCM  
A. Control; B. 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 6 h; C. 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 12 h; D. 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  for 24 h.

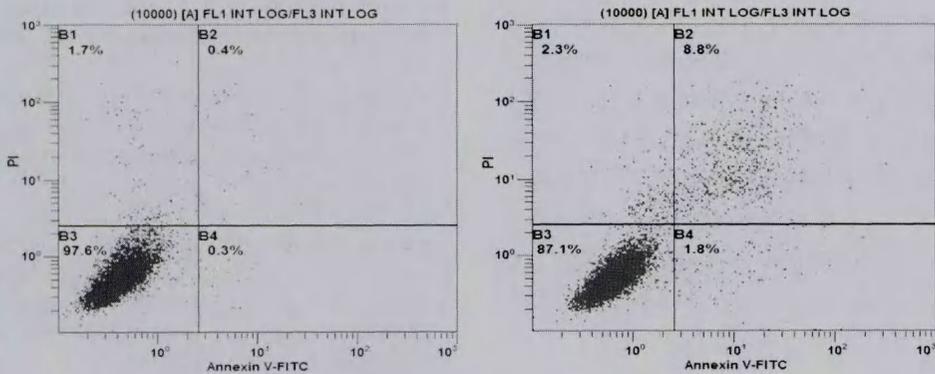


图 5 流式细胞仪检测鸦胆子苦醇作用 24 h 后细胞凋亡率  
Fig. 5 Apoptosis rate induced by brusatol for 24 h examined by FCM

胞重要的信号转导通路。MAPK 蛋白家族调节着细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种重要的细胞生理、病理过程 (Kim *et al.*, 2010;

Ono *et al.*, 2000)。MAPK 级联反应的激活在整个前列腺癌的过程中有着重要的作用, 与前列腺癌细胞的发生、增殖、复发紧密相连 (Ricote *et al.*,

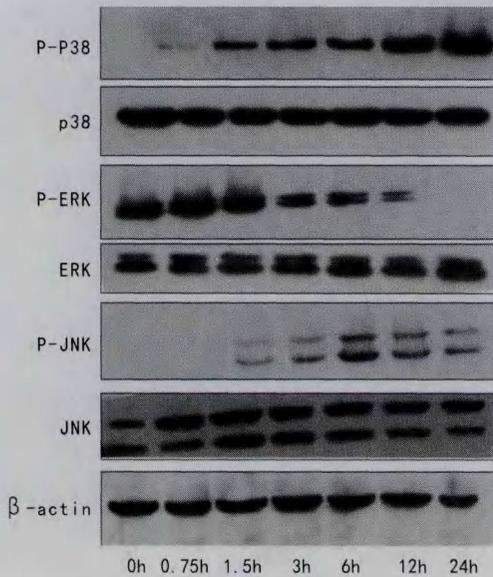


图 6 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鸦胆子苦醇处理 DU145 细胞 0~24 h 后 p38、ERK、JNK 的表达

Fig. 6 Expression of P38, ERK and JNK in DU145 cells with 0.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  brusatol treated for 0–24 h

2006)。在前列腺癌中,ERK、JNK 和 p38MAPK 三条信号通路的表达与激活不同。有研究发现,ERK 能够调控细胞增殖,ERK 的激活对细胞起保护作用 (Pagè *et al.*, 1993), Ras-MAPK 是前列腺癌重要的信号转导系统。JNK 和 p38 同时激活则诱导细胞凋亡 (Wang *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 1995)。本文考察 MAPKs (即 ERK、JNK、p38) 在鸦胆子苦醇诱导的 DU145 细胞凋亡中的作用。其中鸦胆子苦醇处理 DU145 细胞 24 h 内, p38、JNK 其活化形式表达量均呈明显递增趋势, 而 ERK 的活化则受到抑制。这些结果表明, MAPK 被激活且参与了鸦胆子苦醇诱导 DU145 细胞凋亡的过程, MAPK 途径的活化可能是鸦胆子苦醇对 DU145 细胞生长抑制的作用机制之一。鸦胆子苦醇可以通过诱导细胞凋亡, 抑制前列腺癌细胞的生长, 是潜在的治疗前列腺癌的药物, 本课题组将进一步在动物水平深入研究。

### 参考文献:

Bawm S, Matsuura H, Elkhateeb A, *et al.* 2008. In vitro anti-trypanosomal activities of quassinoid compounds from the fruits of a medicinal plant, *Brucea javanica* [J]. *Vet Parasitol*, **158**(4): 288–94

Cuendet M, Gills JJ, Pezzuto JM. 2004. Brusatol-induced HL-60 cell differentiation involves NF- $\kappa$ B activation [J]. *Cancer Lett*, **206**(1): 43–50

Ding CX (丁晨旭), Suo YR (索有瑞). 2006. Advances in studies on chemical constituents and pharmacology of *Brucea javanica* (中药鸦胆子化学成分及药理学研究进展) [J]. *Chin J Integr Med* (中成药), **26**(1): 117–120

Gui PH (桂平华), Zhu SZ (朱世珍), Li ZC (李智成). 2001. Study on the antibacterial effect of *Brucea javanica* on *Helicobacter pylori* *in vitro* (中药鸦胆子对幽门螺旋杆菌体外抗菌作用的研究) [J]. *J Mathem Med* (中国医学检验杂志), **2**(6): 397–398

Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* 2009. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, **59**: 225–249

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, *et al.* 2004. Hedgehog signaling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis [J]. *Nature*, **431**(7 009): 707–712

Kim EK, Choi EJ. 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1 802**(4): 396–405

Mata-Greenwood E, Cuendet M, Sher D, *et al.* 2002. Brusatol-mediated induction of leukemic cell differentiation and G(1) arrest is associated with down-regulation of c-myc [J]. *Leukemia*, **16**(11): 2 275–2 284

O'Neill MJ, Bray DH, Boardman P, *et al.* 1987. Plants as sources of antimalarial drugs. Part 4: Activity of *Brucea javanica* fruits against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* *in vitro* and against *Plasmodium berghei* *in vivo* [J]. *J Nat Prod*, **50**(1): 41–48

Ono K, Han J. 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. [J]. *Cell Sign*, **12**: 1–13

Page G, Lenormand P, L'Allemain, *et al.* 1993. Mitogen-activated protein kinases p42<sup>mapk</sup> and p44<sup>mapk</sup> are required for fibroblast proliferation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**(18): 8 319–8 323

Polonsky J, Varenne J, Prange T, *et al.* 1980. Anti leukemic quassinoids: structure (x-ray analysis) of bruceine C and revised structure of bruceantoin [J]. *Tetrahedron Lett*, **21**(19): 1 853–1 856

Ricote M, Garcia-Tunon I, Bethencourt F, *et al.* 2006. The p38 transduction pathway in prostatic neoplasia [J]. *J Pathol*, **208**(3): 401–407

Shen JG, Zhang ZK, Wu ZJ, *et al.* 2008. Antiphytoviral activity of bruceine-D from *Brucea javanica* seeds [J]. *Pest Manag Sci*, **64**(2): 191–196

Wang Y, Su B, Sah VP, *et al.* 1998. Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase 7, a specific activator for c-jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells [J]. *J Biol Chem*, **273**(10): 5 423–5 426

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, *et al.* 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis [J]. *Science*, **270**: 1 326–1 331

Yan XH, Chen J, Di YT, *et al.* 2010. Anti-tobacco mosaic virus (TMV) Quassinoids from *Brucea javanica* (L.) Merr [J]. *J Agric Food Chem*, **58**(3): 1 572–7

Yang Z, Xie H, Wang J, *et al.* 1997. Chemical studies of the active antitumor constituents from the fruit of *Brucea javanica* (II) [J]. *Shenyang Yaokexue Xuebao*, **14**(1): 46–47, 51

Zhao M, Lau ST, Leung PS, *et al.* 2011. Seven quassinoids from *Fructus Bruceae* with cytotoxic effects on pancreatic adenocarcinoma cell lines [J]. *Phytother Res*, **25**(12): 1 796–1 800