

曲古菌素 A 或金雀异黄素增强维生素 D 对前列腺癌细胞 PC-3 和 DU-145 的生长抑制作用

梁伟 郑杰*

(东南大学基础医学院病理与病理生理学系, 南京 210009)

摘要 探讨 $1\alpha,25$ 二羟维生素 D_3 [$1,25(OH)_2D_3$] 联合曲古菌素 A (trichostatin A, TSA) 或金雀异黄素对维生素 D 不敏感前列腺癌 PC-3 和 DU-145 细胞生长的影响及其作用机制。MTT 和流式细胞术检测显示 $1,25(OH)_2D_3$ 与 TSA 联合后对 PC-3 细胞的生长抑制率以及 $1,25(OH)_2D_3$ 与金雀异黄素联合后对 DU-145 细胞的生长抑制率均高于单独用 $1,25(OH)_2D_3$ 。 $1,25(OH)_2D_3$ 与 TSA 联合对 PC-3 细胞的细胞周期阻滞效果优于单独用 $1,25(OH)_2D_3$, 而对 DU-145 细胞不如单独用 $1,25(OH)_2D_3$ 。RT-PCR 结果显示 $1,25(OH)_2D_3$ 与 TSA 联合用药后, PC-3 细胞 $p21^{cip1}$ mRNA 表达水平比各单独用药组高, 而 DU-145 细胞未见明显变化。PC-3 细胞中 *SMRT* mRNA 表达水平高于 DU-145 细胞, 而 DU-145 细胞中 *CYP24* mRNA 的表达水平高于 PC-3 细胞, TSA 和金雀异黄素可分别抑制 *SMRT* 和 *CYP24* 的表达。另外 ELISA 结果显示金雀异黄素明显下调 DU-145 细胞中的 *CYP24* 表达水平。这些研究结果表明 PC-3 和 DU-145 细胞对维生素 D 不敏感的机制不同, TSA 可增强 $1,25(OH)_2D_3$ 对 PC-3 细胞的生长抑制作用, 而金雀异黄素则可增强 $1,25(OH)_2D_3$ 对 DU-145 细胞的生长抑制作用, 这为临床治疗维生素 D 不敏感肿瘤提供了新的选择。

关键词 维生素 D; 曲古菌素 A; 金雀异黄素; 前列腺癌细胞

维生素 D 是脂溶性维生素, 属类固醇化合物。 $1\alpha,25$ 二羟维生素 D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) 是其活性形式。近期研究表明, 维生素 D 除了在体内钙、磷代谢方面扮演着重要的角色外, 还与肿瘤的发生有着密切的关系。血清中低水平的维生素 D 代谢活性形式 $25(OH)D_3$ 可使发生前列腺癌、乳腺癌的危险性和病死率明显升高^[1]。研究证实, $1,25(OH)_2D_3$ 能够通过其特异受体维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 参与肿瘤细胞的信号转导、调节细胞周期、诱导细胞分化和凋亡^[2]。但维生素 D 的抗肿瘤治疗存在一定的限制, 一方面, 大剂量的维生素 D 可能会引起高钙血症和结石, 另一方面, 某些肿瘤细胞存在对维生素 D 的抑制作用不敏感或抵抗的问题, 例如, 雄激素依赖性前列腺癌细胞 LNCaP 对维生素较敏感, 而雄激素非依赖性前列腺癌 DU-145 和 PC-3 细胞则不敏感^[3]。对维生素 D 不敏感的问题, 研究认为其中的原因可能与基因表达的表观遗传学、维生素 D 代谢转换酶 ($25\text{-hydroxyvitamin } D_3\text{-}24\text{-hydroxylase}$, *CYP24*) 的活性、VDR 的多态性问题等有关。本研究主要从表观遗传学中的组蛋白乙酰化/去乙酰化修饰以及 *CYP24* 活性入手, 探讨 $1,25(OH)_2D_3$ 与组蛋白

去乙酰化酶抑制剂曲古菌素 A (TSA) 或 *CYP24* 酶特异性抑制剂金雀异黄素 (genistein) 联合运用对前列腺癌 PC-3 和 DU-145 细胞生长的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

$1,25(OH)_2D_3$ 、TSA 和金雀异黄素均购自美国 Sigma 试剂公司, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自南京生兴生物试剂公司, RNA 提取试剂 Trizol 购自美国 Invitrogen 公司, 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒购自上海东洋纺 (TOYOBO) 公司, ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。

1.2 细胞培养

PC-3 细胞购于中科院上海生化细胞所, DU-145 细胞由南京市第一人民医院病理科馈赠。两种细胞均置于含 10% 胎牛血清的 F-12 培养基中 (含 0.1% 青霉素、链霉素) 培养, 于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。

收稿日期: 2009-04-02 接受日期: 2009-06-15

国家自然科学基金资助项目 (No.30540049)

* 通讯作者。Tel: 025-83272358, E-mail: jiezheng54@126.com

1.3 MTT 法检测细胞增殖

取对数生长期细胞常规消化接种于 96 孔培养板 (2×10^4 个/孔), 待细胞贴壁 24 h 后按实验要求加入不同浓度的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、TSA 作为实验组, 并设对照组(含无水乙醇或 DMSO, 终体积分数 $<0.1\%$), 每孔均 200 μl , 各组设 5 个复孔。培养 72 h 后, 加入 20 μl 5 mg/ml MTT 继续培养 4 h, 弃去各孔液体, 每孔加 150 μl DMSO, 在酶标仪(Multiskan MK3-353)上测定 490 nm 处吸光度值。癌细胞存活率($\%$)= 实验组平均吸光度值 / 对照组平均吸光度值 $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测细胞周期

各组细胞培养 72 h 后收集细胞, PBS 洗涤。流式细胞仪的检测操作按文献^[4]。流式细胞仪检测后用 ModFit LT 软件分析细胞周期分布。

1.5 RT-PCR 法定测定 $p21^{cip1}$ 、SMRT、CYP24 的 mRNA 表达水平

药物作用 72 h 后, 各组细胞总 RNA 用 Trizol 法提取, 后逆转录成 cDNA。取 5 μl 逆转录产物进行 PCR 扩增。各基因引物(PCR 引物序列由 primer premier 5.0 软件自行设计、上海英骏公司合成)及退火温度见表 1。反应体积为 25 μl , 经 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 扩增 35 个循环。PCR 产物用含溴乙锭的 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 用上海复日公司生产 Smartview 2001 图像分析处理系统获取各电泳条带光密度值进行 PCR 半定量分析。

1.6 ELISA 法检测细胞内 CYP24 表达水平

药物作用 72 h 后, 用细胞裂解缓冲液将各组细胞裂解, 离心后取上清液, 按 ELISA 试剂盒操作说明检测 CYP24 含量。

1.7 统计学方法

数据结果用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 全部数据用 SPSS10.0 统计软件进行处理, 组间均数比较采用单因素方差分

析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 TSA 抑制 PC-3、DU-145 细胞的生长

MTT 结果显示, 不同浓度的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 TSA 分别单独处理 PC-3 细胞和 DU-145 细胞 72 h 后, 均有不同程度的生长抑制作用, 并呈浓度依赖性(图 1)。图 1A 可以看出, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对两种细胞的生长有一定的抑制作用, 且 PC-3 细胞对维生素 D 的生长抑制作用较 DU-145 细胞略为敏感。在 TSA 组中, 两种细胞反应截然不同(图 1B), 例如在 100 nmol/L TSA 时, PC-3 细胞的存活率仅 66.5%, 而 DU-145 细胞为 90.4% ($P < 0.05$)。

而后, 我们选择 10 nmol/L TSA 与不同浓度的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 配伍同时处理两种细胞 72 h, 进一步观察单独用药组和联合用药组之间的差异。结果显示, 在 1 nmol/L、10 nmol/L 的单独 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 时, PC-3 细胞存活率分别为 89.9% 和 82.3%, 联合用药组分别为 73.5% 和 61.4%, 单独 TSA 组为 84.2% (图 1C), 提示 TSA 能增强维生素 D 对 PC-3 细胞的生长抑制作用 ($P < 0.05$)。而对于 DU-145 细胞, 联合用药组与单独用药组相比, 细胞存活率未见明显差异(图 1D)。

2.2 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 TSA 对 PC-3、DU-145 细胞周期的影响

流式细胞术检测不同浓度 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 与 TSA (10 nmol/L) 合用 72 h 后对 PC-3 和 DU-145 细胞周期的影响。结果显示, 不同浓度的 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 与 TSA 对两种细胞的细胞周期均有一定的影响, 主要表现为在细胞周期 G_1 期发生停滞(表 2)。图 2 和表 2 显示联合用药组中 PC-3 细胞在 G_1 期的细胞数比例为 $80.70\% \pm 6.05\%$, 高于单独 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 组 ($70.28\% \pm$

Table 1 Primer sequences of target genes

Gene	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature ($^{\circ}\text{C}$)	PCR product (bp)
$p21^{cip1}$	TAGCAGCGGAACAAGGAGTCAG	62	263
	CAGTCTAGGTGGAGAAACGGG		
SMRT	GGAATCACGCTCGGAAACAATG	58	420
	GGCGGTCTTTGTACAACCTTCA		
CYP24	CCCCTAGCACCTCGTACCAAC	59	412
	CGTAGCCTTCTTTGCGGTAGTC		
β -actin	CGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACC	58	600
	CATGAAGCATTGCGGTGGACGATG		
β -actin	CTTCTTGGGCATGGAGTC	52	234
	GCCGATCCACACGGAGTA		

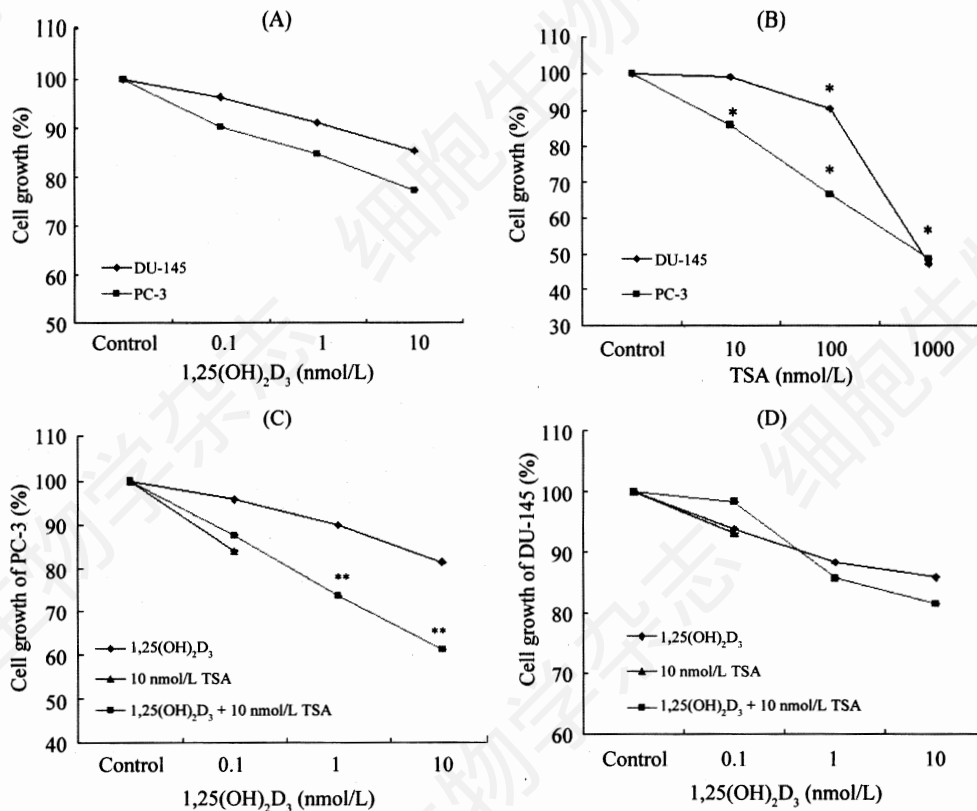


Fig.1 Cell growth curves determined by MTT

A: 1,25(OH)₂D₃ group; B: TSA group; C: 1,25(OH)₂D₃+10 nmol/L TSA on PC-3 cells; D: 1,25(OH)₂D₃+10 nmol/L TSA on DU-145 cell. *P < 0.05, compared with control group; **P < 0.05, compared with the groups of treatment alone.

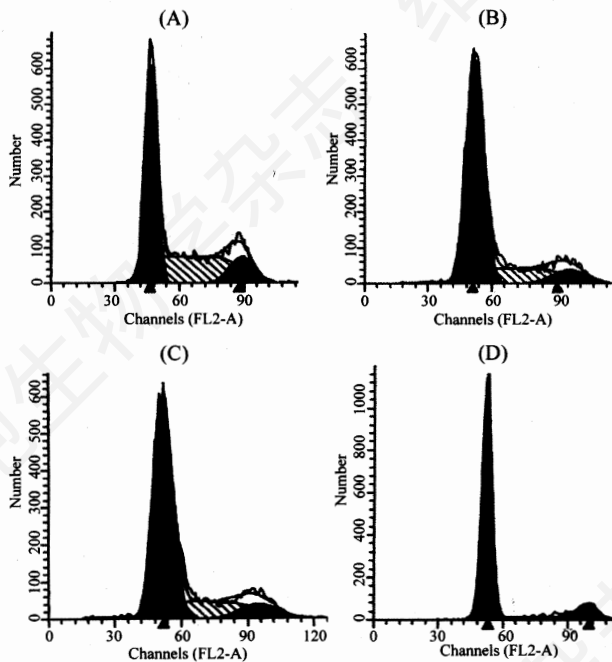


Fig.2 The effect of 1,25(OH)₂D₃ and TSA on the cell cycle of PC-3 cells detected by FCM

A: control; B: 10 nmol/L 1,25(OH)₂D₃; C: 10 nmol/L TSA; D: 10 nmol/L 1,25(OH)₂D₃+10 nmol/L TSA.

2.11%)或单独 TSA 组(64.55%±3.17%), 同时 S 期和 G₂ 期的细胞比例减少; 但在 DU-145 细胞(图 3 和表 2), 联合用药组在 G₁ 期的细胞数比例为 61.78%±2.18%, 却低于单独用 1,25(OH)₂D₃ 组(65.90%±2.09%) (P < 0.05)。

2.3 RT-PCR 检测 *p21^{cip1}*、*SMRT* 和 *CYP24* 的 mRNA 表达变化

p21^{cip1} 属于细胞周期依赖性蛋白激酶抑制剂 (cyclin dependent kinase inhibitor, CDKI) 成员之一, 负责调节细胞生长。RT-PCR 结果显示, 在单独 1,25(OH)₂D₃ 组和 1,25(OH)₂D₃ 与 TSA 联合用药组中, PC-3 细胞的 *p21^{cip1}* 相对表达量分别比对照组增高了 1 倍和 1.36 倍 (P < 0.05), 而 DU-145 细胞各组未见明显差异(图 4A)。

为探究 PC-3 细胞对 1,25(OH)₂D₃ 不敏感的机制是否与组蛋白去乙酰化有关, 我们选择组蛋白去乙酰化复合物中具有代表性的辅助抑制因子之一 SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors), 了解其在两种细胞中表达情况。实验结果发现(图 4B), 对照组以及单独 1,25(OH)₂D₃ 组中, PC-3 细胞 *SMRT* mRNA 相对表达量明显高于 DU-145

Table 2 Cell cycle distribution ($\bar{x}\pm s$)

Group	PC-3			DU-145		
	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)	G ₀ /G ₁ (%)	S (%)	G ₂ /M (%)
Control	50.60±5.37	37.12±1.99	12.28±6.54	51.83±2.31	40.29±2.58	7.88±3.68
10 nmol/L 1,25(OH) ₂ D ₃	70.28±2.11	21.02±6.24	8.70±4.23	65.90±2.09	11.70±3.01	22.40±3.67
10 nmol/L TSA	64.55±3.17	22.75±3.14	12.70±2.75	60.34±2.56	31.76±5.53	7.90±3.71
10 nmol/L 1,25(OH) ₂ D ₃ +10 nmol/L TSA	80.70±6.05*	9.26±5.09*	10.04±5.13*	61.78±2.18*	29.35±4.58*	8.87±2.03*

* $P<0.05$, compared with the group of 10 nmol/L 1,25(OH)₂D₃.

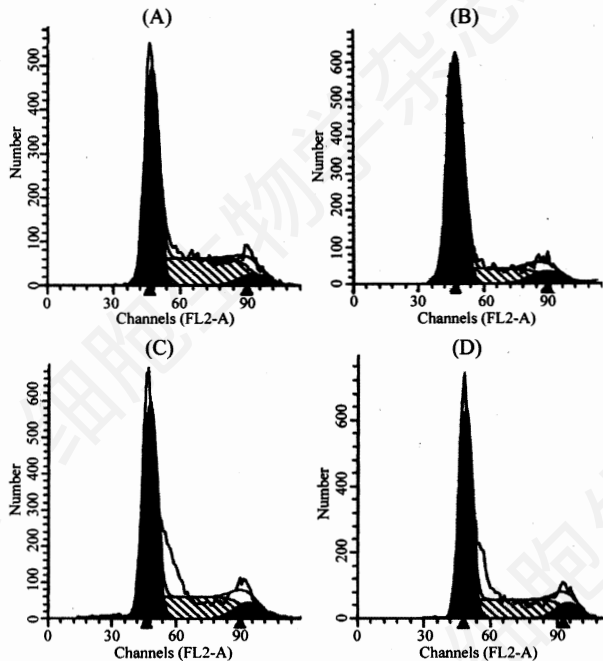


Fig.3 The effect of 1,25(OH)₂D₃ and TSA on the cell cycle of DU-145 cells detected by FCM

A: control; B: 10 nmol/L 1,25(OH)₂D₃; C: 10 nmol/L TSA; D: 10 nmol/L 1,25(OH)₂D₃+10 nmol/L TSA.

细胞。还可以看出,单独 TSA 组以及与 1,25(OH)₂D₃ 合用组,两种细胞的 *SMRT* mRNA 相对表达量均有下降。与对照组相比,PC-3 细胞分别下降了 1.56 倍和 1.8 倍,DU-145 细胞下降了 0.87 倍和 1.18 倍,PC-3 细胞下降更明显($P<0.05$)。

随后,我们在检测 1,25(OH)₂D₃、TSA 的作用下两种细胞中 *CYP24* mRNA 表达情况(图 4C)。在各组中,DU-145 细胞的 *CYP24* mRNA 相对表达量均高于 PC-3 细胞,特别是单独 1,25(OH)₂D₃ 组和联合用药组中两种细胞差异较明显,在这两组中 DU-145 细胞中相对表达量分别比 PC-3 细胞高 1.52 倍和 1.71 倍($P<0.05$)。

另外,在运用 *CYP24* 抑制剂金雀异黄酮后,DU-145 细胞和 PC-3 细胞的 *CYP24* mRNA 表达均被抑制,

Table 3 ELISA analysis of CYP24 levels (ng/ml) ($\bar{x}\pm s$)

Group	DU-145	PC-3
Control	11.15±1.47	7.58±1.54
10 nmol/L 1,25(OH) ₂ D ₃	15.78±0.76*	8.46±0.78
10 μmol/L genistein	7.96±1.23**	5.02±1.31
10 nmol/L 1,25(OH) ₂ D ₃ +10 μmol/L genistein	7.17±1.07**	4.97±1.27

* $P<0.05$, compared with control group of DU-145 cells; ** $P<0.05$, compared with control group and the group of 10 nmol/L 1,25(OH)₂D₃ in DU-145 cells.

且 DU-145 细胞下降更为明显(图 4D)。与对照组相比,单独金雀异黄酮组和与 1,25(OH)₂D₃ 联合用药组中,DU-145 细胞的 *CYP24* mRNA 相对表达量分别下降了 0.74 倍和 0.81 倍,而 PC-3 细胞分别下降了 0.42 倍和 0.25 倍($P<0.05$)。

2.4 细胞内的 CYP24 表达水平检测

ELISA 结果显示,DU-145 细胞的 *CYP24* 表达水平比 PC-3 细胞高。使用 1,25(OH)₂D₃ 处理后,*CYP24* 表达水平略有升高,这种现象在 DU-145 细胞更为明显,提示 1,25(OH)₂D₃ 能诱导 *CYP24* 表达。在用金雀异黄酮作用 72 h 后,两种细胞中的 *CYP24* 表达水平均有下降,且 DU-145 下降更为显著(表 3) ($P<0.05$)。

2.5 1,25(OH)₂D₃ 和金雀异黄酮对 PC-3、DU-145 细胞生长的影响

根据上述实验结果,我们又用 MTT 法检测不同浓度 1,25(OH)₂D₃ 与 10 μmol/L 金雀异黄酮单独或联合试用后对两种细胞的生长情况的影响。结果发现,1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 与 10 μmol/L 金雀异黄酮的联合用药组的 DU-145 细胞存活率分别为 80.2%、70.3%、64.3%,单独的 1,25(OH)₂D₃ 组分别为 93.1%、89.5%、84.7%,单独金雀异黄酮组为 86.4% (图 5A),而联合用药与单独用药对 PC-3 细胞的生长抑制未见明显差异($P<0.05$) (图 5B)。说明 1,25(OH)₂D₃ 与金雀异黄酮可对 DU-145 细胞生长有协同抑制作用,而金雀异黄酮并不能增强 1,25(OH)₂D₃ 对 PC-3 细胞的生长抑制作用。

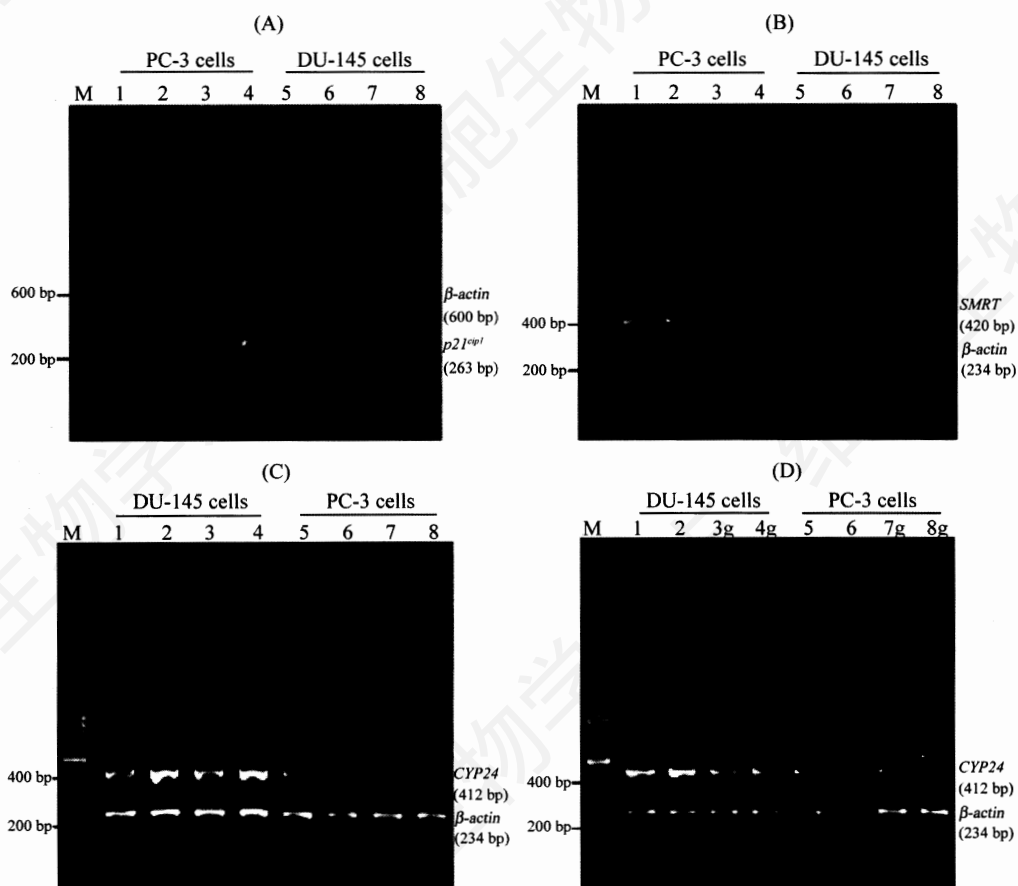


Fig.4 RT-PCR analysis of $p21^{cip1}$, $SMRT$ and $CYP24$ expression on PC-3 and DU-145 cells

A: expression profiles of $p21^{cip1}$ treated with $1,25(OH)_2D_3$ and TSA; B: expression profiles of $SMRT$ treated with $1,25(OH)_2D_3$ and TSA; C: expression profiles of $CYP24$ treated with $1,25(OH)_2D_3$ and TSA; D: expression profiles of $CYP24$ treated with $1,25(OH)_2D_3$ and genistein. M: marker; 1, 5: control; 2, 6: 10 nmol/L $1,25(OH)_2D_3$; 3, 7: 10 nmol/L TSA; 3g, 7g: 10 μ mol/L genistein; 4, 8: 10 nmol/L $1,25(OH)_2D_3$ +10 nmol/L TSA; 4g, 8g: 10 nmol/L $1,25(OH)_2D_3$ +10 μ mol/L genistein.

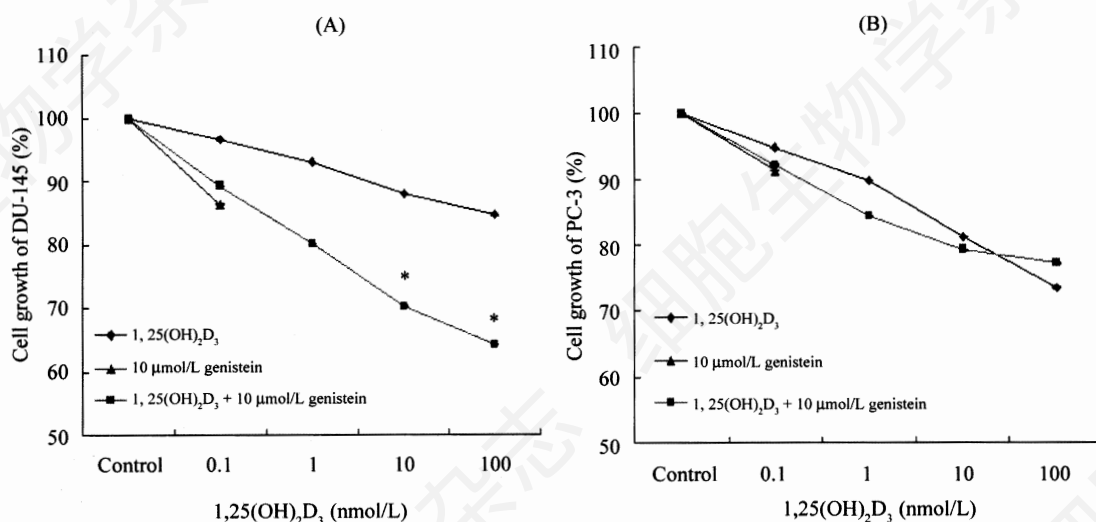


Fig.5 Inhibitory effect of $1,25(OH)_2D_3$ and genistein on DU-145 cells (A) and PC-3 cells (B)

* $P < 0.05$, compared with the groups of treatment alone.

3 讨论

1,25(OH)₂D₃在前列腺癌细胞中的生物学效应主要是通过其细胞核内受体VDR与靶基因上的DNA特异性核苷酸序列,即维生素D反应元件(1 α ,25(OH)₂D₃-responsive element, VDRE)相互作用来介导基因的表达调控。这些基因与1,25(OH)₂D₃调节细胞周期、诱导细胞凋亡和分化诱导、抑制细胞增殖有关。而在雄激素依赖性前列腺癌细胞发展成为雄激素非依赖性的癌细胞过程中,其对1,25(OH)₂D₃抑制增殖作用的敏感性也发生了明显的变化。曾经认为这种不敏感的原因与细胞中的VDR含量有关,但研究证实在DU-145细胞中,VDR的表达量并不低于LNCaP细胞。1,25(OH)₂D₃可明显抑制LNCaP细胞的增殖,而DU-145细胞对1,25(OH)₂D₃极不敏感^[5]。本实验即探讨雄激素非依赖性前列腺癌细胞对1,25(OH)₂D₃抑制作用敏感性的差异和对1,25(OH)₂D₃不敏感可能的机制。

组蛋白乙酰化/去乙酰化修饰所引起的染色质结构改变,在真核生物基因表达调控中发挥着重要作用。研究发现,肿瘤细胞的组蛋白大部分呈低乙酰化状态,而组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)异常活化所导致的基因表达失控(如某些抑癌基因的转录抑制)与癌症的发生密切相关^[5]。我们推测可能是由于组蛋白去乙酰化酶异常活化,并募集各协同抑制因子(如SMRT),导致核小体结构紧密,阻碍VDR与VDRE的结合形成转录起始复合物,从而抑制了有关影响肿瘤细胞增殖的靶基因(如*p21^{cip1}*)的转录,这可能成为PC-3、DU-145等雄激素非依赖性前列腺癌细胞对1,25(OH)₂D₃的抑癌作用不敏感的重要因素。本实验发现1,25(OH)₂D₃与TSA合用后,PC-3细胞的生长以及细胞周期均得到有效的抑制,比单独1,25(OH)₂D₃组和TSA组有明显的提高,说明TSA有协同抑制作用。而且在RT-PCR结果中,我们也发现1,25(OH)₂D₃与TSA合用后,与单独用药组相比,PC-3细胞的*p21^{cip1}* mRNA表达增强,且SMRT的mRNA表达下降,而DU-145细胞的*p21^{cip1}*、SMRT的mRNA表达变化并未有明显差异。这一方面说明PC-3细胞对1,25(OH)₂D₃不敏感可能与基因的组蛋白修饰有关;另一方面也提示虽然同是雄激素非依赖性前列腺癌细胞,但对1,25(OH)₂D₃的不敏感机制也许不尽相同。组蛋白乙酰化酶抑制剂与1,25(OH)₂D₃合用可以解决PC-3细胞对1,25(OH)₂D₃不敏感的问题,但DU-145细胞可能需要对其不敏感的机制进行进一步研究。

CYP24属于细胞色素P-450酶类,参与了体内1,25(OH)₂D₃水平的调节。当体内1,25(OH)₂D₃水平较高时,1,25(OH)₂D₃及其受体VDR可以通过对CYP24转录水平的调控,诱导其表达合成,上调的CYP24可将活性形式的1,25(OH)₂D₃的C-24位羟基化而使其失活转化为1,24,25(OH)₃D₃,从而维持体内1,25(OH)₂D₃水平的平衡。有文献报道DU-145细胞中此酶的活性较其他前列腺癌细胞高^[6],我们推测可能是由于它的存在削弱了1,25(OH)₂D₃的抑制作用。同时,本实验流式细胞术发现1,25(OH)₂D₃与TSA联合用药组对DU-145细胞的细胞周期阻滞效果不如单独用1,25(OH)₂D₃组,这也许是因为在TSA抑制组蛋白去乙酰化而促进乙酰化的作用下,受维生素D调控的各靶基因转录活性得到恢复,使得其中之一的CYP24表达增强,进而大部分维生素D被代谢转换为非活性形式,从而进一步削弱了1,25(OH)₂D₃对DU-145细胞的作用。本实验结果显示,不论是对照组还是1,25(OH)₂D₃单独组,与PC-3细胞相比,DU-145细胞的CYP24均有较高表达量,在运用CYP24特异性抑制剂金雀异黄素后,DU-145细胞CYP24表达水平就明显降低,而且1,25(OH)₂D₃与金雀异黄素联合用药可协同抑制DU-145细胞的生长,说明了DU-145对1,25(OH)₂D₃不敏感的原因与其代谢酶CYP24的活性有密切的关系。

如前所述,1,25(OH)₂D₃治疗肿瘤存在一定的副作用,即长期高剂量的1,25(OH)₂D₃会引起高钙血症或结石,Trump等^[7]在用骨化三醇对43例确诊为雄激素非依赖性前列腺癌病人的临床治疗中发现,若以22 μ g(约为52 nmol)的剂量给予14天,将有30%的患者出现高钙血症的临床症状,而若以70 μ g(约为168 nmol)的剂量治疗同样天数将导致几乎所有患者出现高钙血症。因此,如何降低副作用的有害影响,又能达到抑制肿瘤的效果,从而提高1,25(OH)₂D₃在治疗肿瘤方面的利用价值成为今后研究的方向。本实验采用低剂量的1,25(OH)₂D₃与TSA、金雀异黄素配伍,既增强了1,25(OH)₂D₃抑制肿瘤的效果,又避免了用高浓度1,25(OH)₂D₃带来的副作用。

总之,与普通的放疗化疗相比,运用1,25(OH)₂D₃治疗肿瘤由于其创伤性小、又无明显毒副作用而日益受到关注。而对1,25(OH)₂D₃抗肿瘤机制及其安全有效的给药方式的深入研究,将其应用于临床治疗各种肿瘤提供更多理论和实验依据。

参考文献(References)

- [1] Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma, *Clin Cancer Res*, 2000, 6(2): 498-504
- [2] Bouillon R, Eelen G, Verlinden L, *et al.* Vitamin D and cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006, 102(1-5): 156-162
- [3] Lou YR, Qiao S, Talonpoika R, *et al.* The role of vitamin D3 metabolism in prostate cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 92(4): 317-325
- [4] 卢航青, 郑杰. 全反式维甲酸和 $1\alpha,25$ 二羟维生素 D3 对肝癌细胞 HepG2 生长的协同抑制作用, *癌症*, 2006, 25(12): 1470-1476
- [5] Zhao XY, Feldman D. The role of vitamin D in prostate cancer, *Steroids*, 2001, 66(3-5): 293-300
- [6] Khorchide M, Lechner D, Cross HS, *et al.* Epigenetic regulation of vitamin D hydroxylase expression and activity in normal and malignant human prostate cells, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2005, 93(2-5): 167-172
- [7] Trump DL, Potter DM, Muindi J, *et al.* Phase II trial of high-dose, intermittent calcitriol ($1,25$ dihydroxyvitamin D3) and dexamethasone in androgen-independent prostate cancer, *Cancer*, 2006, 106(10): 2136-2142

Trichostatin A and Genistein Enhance the Anti-proliferative Effect of Vitamin D on Prostate Cancer Cells

Wei Liang, Jie Zheng*

(Department of Pathology and Pathophysiology, School of Basic Medical Science, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract To investigate the effect of vitamin D on vitamin D-insensitive prostate cancer cell lines by co-treatment with trichostatin A (TSA) and genistein and the possible mechanisms. MTT assay and flow cytometry showed the growth inhibition rate of combination of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and TSA in PC-3 cells, and that of combination of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and genistein in DU-145 cells were both higher than that of using $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alone. Compared to using $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alone, co-treatment with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and TSA induced G_0/G_1 phase arrest in PC-3 cells. By contrast, this effect of cell cycle arrest was weaker in DU-145 cells. RT-PCR showed $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ induced *p21^{cip1}* mRNA expression in PC-3 cells by co-treatment with TSA, but not in DU-145 cells. Furthermore, the *SMRT* mRNA expression of PC-3 cells was higher than that of DU-145 cells, and the *CYP24* mRNA expressed higher in DU-145 cell than that in PC-3 cells. TSA and genistein inhibited the expression of *SMRT* and *CYP24* mRNA, respectively. In addition, ELISA demonstrated that genistein down-regulated CYP24 protein levels of DU-145 cells obviously. This investigation indicated that the mechanism for $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -insensitivity in prostate cancer cells was different. TSA could enhance the anti-proliferative effect of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on PC-3 cells, while genistein could make the same effect on DU-145 cells. These findings may provide novel chemotherapeutic regime for $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -insensitive cancers.

Key words vitamin D; trichostatin A; genistein; prostate cancer cells

Received: April 2, 2009 Accepted: June 15, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30540049)

*Corresponding author. Tel: 86-25-83272358, E-mail: jiezheng54@126.com