

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00565

氧化苦参碱体外诱导膀胱癌 T24 细胞凋亡

李 顺*, 魏学斌, 黄世明, 徐留玉, 黄生亮, 赵庆利, 李 青

山东大学附属千佛山医院泌尿外科, 济南 250014

[摘要] **目的** 观察氧化苦参碱对膀胱癌 T24 细胞增殖及凋亡的影响, 并初步探讨其作用机制。**方法** 不同浓度 (0.625、1.25、2.5 mg/mL) 氧化苦参碱作用于膀胱癌 T24 细胞, 采用流式细胞术、光镜及电镜观察其诱导膀胱癌 T24 细胞的凋亡作用。用 RT-PCR 检测细胞凋亡相关基因 *survivin* 及 *caspase-3* 转录水平的改变。免疫印迹法检测 *survivin* 和 *caspase-3* 蛋白的表达情况。**结果** 氧化苦参碱作用人膀胱癌细胞后, 光镜及电镜下均见到典型的细胞凋亡形态, 流式细胞术观察发现凋亡峰。同时观察到氧化苦参碱抑制 *survivin* 的转录和表达, 对 *caspase-3* 有上调作用 ($P < 0.05$)。**结论** 氧化苦参碱可能通过抑制 *survivin*、上调 *caspase-3* 表达诱导膀胱癌 T24 细胞发生凋亡。

[关键词] 氧化苦参碱; 膀胱肿瘤; 凋亡; 存活素; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶

[中图分类号] R 737.14 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)05-0565-04

Oxymatrine induced apoptosis of human bladder cancer cell line T24 *in vitro*

LI Shun*, WEI Xue-bin, HUANG Shi-ming, XU Liu-yu, HUANG Sheng-liang, ZHAO Qing-li, LI Qing

Department of Urology, Qianfoshan Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250014, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of plant alkaloid oxymatrine (OMT) on the proliferation and apoptosis of bladder cancer cell line T24 and the possible molecular mechanism. **Methods** The effects of OMT (0.625, 1.25, 2.5 mg/mL) on the viability and apoptosis of T24 cells were examined by optic, electron microscopy and flow cytometric analysis (FCM). The expression of *survivin* and *caspase-3* genes was detected by RT-PCR, and the protein levels of *survivin* and *caspase-3* were analyzed by Western blotting analysis. **Results** Typical apoptotic morphologies were observed under optic microscope and electron microscope, and the apoptosis peaks were observed by FCM after treatment with OMT. OMT significantly suppressed *survivin* expression and up-regulated *caspase-3* expression ($P < 0.05$). **Conclusion** OMT can induce apoptosis of human bladder cancer T24 cell line by decreasing *survivin* expression and enhancing *caspase-3* expression.

[Key words] oxymatrine; urinary bladder neoplasms; apoptosis; *survivin*; *caspases*

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(5):565-568]

氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)又名苦参素, 是从中药苦豆子中提取的一种生物碱, 其分子式为 $C_{15}H_{24}N_2O_2 \cdot H_2O$, 相对分子质量为 282, 其在体内代谢为苦参碱而发挥作用, 具有抑制胶原活动度、防治肝纤维化等作用^[1]。OMT 体外还对乳腺癌、胰腺癌等肿瘤细胞有明显的抑制作用^[2-3], 其代谢产物苦参碱对膀胱癌的发生发展有抑制作用^[4]。我们的前期研究也发现 OMT 体外能抑制膀胱癌 T24 细胞增殖^[5], 但确切机制仍不明确, 可能与细胞凋亡有关。因此, 本研究进一步采用光镜、电镜、流式细胞术观察 OMT 体外对 T24 细胞增殖的影响, 并采用 RT-PCR 及免疫印迹法测定凋亡相关基因及蛋白的

表达, 探讨 OMT 对 T24 细胞凋亡的影响, 并初步探讨可能的机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 膀胱癌 T24 细胞(重庆医科大学实验诊断教研室惠赠), OMT[宁夏启元药业有限公司, 宁卫药准字(1994)第 000029 号], RMPI 1640 培养液(Gibco 公司), 新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)。Survivin 和 caspase-3 单克隆抗体购于 Abcam 公司, PCR 引物由 Invitrogen 公司合成; 反转录试剂盒、TRIzol RNA 提取试剂盒购于 Invitrogen 公司; 蛋白提取试

[收稿日期] 2012-12-12 **[接受日期]** 2013-03-01

[作者简介] 李 顺, 博士, 主治医师。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0531-89268512, E-mail: 13791077671@163.com

试剂盒、SDS-PAGE 试剂盒购于上海碧云天生物科技有限公司。倒置荧光显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司),酶联免疫分析仪(Techan 公司),凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)。

1.2 T24 细胞的形态学观察 制备细胞爬片(分别加入不同的处理因素)瑞氏染色,分别在低倍和高倍镜及油镜下观察细胞形态变化并摄相。以 OMT 质量浓度为 1.25、2.5 mg/mL 分为两个实验组,培养 72 h 收集细胞,1% 钼酸固定再用乙醇丙酮梯度脱水,618 环树脂包埋超薄切片,经枸橼酸铅染色,电镜下观察细胞形态学变化。

1.3 流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡 将细胞同步化培养 24 h,加入 OMT 使其质量浓度为 1.25、2.5 mg/mL 两个实验组。再培养 72 h,收集细胞,把细胞缓慢加入到 -20℃ 预冷的 70% 乙醇固定,将等体积的细胞悬液和碘化丙啶(PI)染液混匀,染色 30 min。混合液过 300 目尼龙网。把样品放入流式细胞仪的样品室,以激发波长为 488 nm 测定,并用 Modfit 2.0 软件分析细胞周期分布及凋亡情况。

1.4 RT-PCR 检测 *survivin* 和 *caspase-3* 基因表达水平 6 孔板中培养膀胱癌细胞,设立阴性对照组(0 mg/mL)及 OMT 不同浓度组(0.625、1.25、2.5 mg/mL),作用 48 h 后取各组细胞。TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,按照反转录试剂盒标准反应条件反转录为 cDNA。引物设计和合成由济南博尚生物技术有限公司完成, *survivin* 上游引物:5'-GCC CAG TGT TTC TTC TGC TT-3', 下游引物:5'-CCG GAC GAA TGC TTT TTA TG-3'; *caspase-3* 上游引物:5'-GAG TGC TCG CAG CTC ATA CCT-3', 下游引物:5'-CCT CAC GGC CTG GGA TTT-3'; *GAPDH* 上游引物:5'-AGC CAC ATC GCT CAG ACA C-3', 下游引物:5'-GCC CAA TAC GAC CAA ATC C-3'。采用 TaKaRa SYBR[®] Premix *Ex Taq*[™] II,以 cDNA 为模板,采用两步法实时定量 PCR 反应,每次在延伸阶段读取吸光度(D)值。PCR 反应条件:预变性 95℃ 30 s;变性 95℃ 5 s,退火 60℃ 20 s,循环 40 次。实验结束统计每个样本的目的与内参比值,确定目的基因的表达水平。重复实验 3 次,以得到稳定结果。

1.5 蛋白质印迹法检测 *survivin*、*caspase-3* 蛋白的表达情况 培养瓶培养膀胱癌细胞,设立阴性对照

组(0 mg/mL),按照 0.625、1.25、2.5 mg/mL OMT 浓度梯度加药于培养瓶中,培养 48 h 后胰酶消化细胞,取干预后的细胞于 EP 管。每管加入 100 μL 细胞裂解液(含苯甲基磺酰氟)吹匀。于冰上放置 30 min 后,4℃ 14 000 × g 离心 10 min,取上清,采用 BCA 法测定蛋白浓度。每管取 30 μg 总蛋白加入上样缓冲液煮沸 5 min,经 SDS-PAGE,然后电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h。一抗 1:1 000 稀释 4℃ 孵育过夜,二抗 1:5 000 稀释室温孵育 2 h,后二氨基联苯胺显色并对结果进行灰度扫描分析。重复实验 3 次,以得到稳定结果。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 光镜下:OMT 作用 72 h 后,T24 细胞变为不规则状,体积缩小,胞质浓缩,胞核凝聚,染色质致密聚集成板块状,位于核周膜成新月状,形成凋亡小体(图 1A)。电镜下:癌细胞核质比例缩小,核仁减小,胞质浓缩,核染色质浓缩呈半月形,核仁裂解,进而细胞膜内陷细胞自行分割为多个具有完整膜性结构、内含各种细胞成分的凋亡小体(图 1B)。

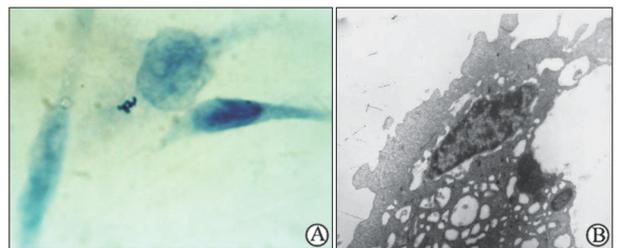


图 1 1.25 mg/mL OMT 作用 72 h 后
瑞氏染色(A)及电镜观察(B)
Original magnification: ×1 000(A), ×8 000(B)

2.2 FCM 检测结果 OMT 处理组 T24 细胞出现 G₀/G₁ 期阻滞,S 期细胞较阴性对照组下降(P < 0.05),1.25 mg/mL OMT 处理 72 h 后,G₁ 期前出现特征性的亚二倍峰(凋亡峰),细胞凋亡率为 5.37%,而阴性对照组和 2.5 mg/mL OMT 处理组未见有亚二倍峰。

2.3 RT-PCR 检测 *survivin*、*caspase-3* mRNA 水平 结果(图 2)表明:*caspase-3* 表达水平与 OMT

浓度成正比, *survivin* 表达水平与 OMT 浓度成反比。 *Caspase-3* mRNA 水平随 OMT 浓度增加而升高, *survivin* mRNA 水平随 OMT 浓度增加而降低, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

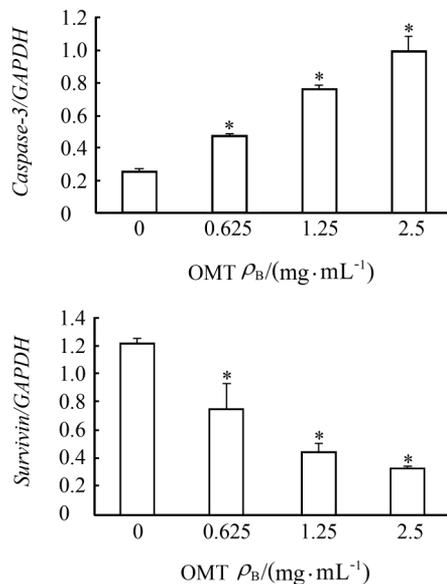


图2 *Caspase-3* 及 *survivin* mRNA 表达水平

* $P < 0.05$ 与阴性对照组 (OMT 浓度为 0 mg/mL) 比较, $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 蛋白质印迹法检测 *survivin*、*caspase-3* 蛋白的表达 结果(图3)表明: OMT 呈剂量依赖性抑制 *survivin* 蛋白表达, 同时增强 *caspase-3* 蛋白表达, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

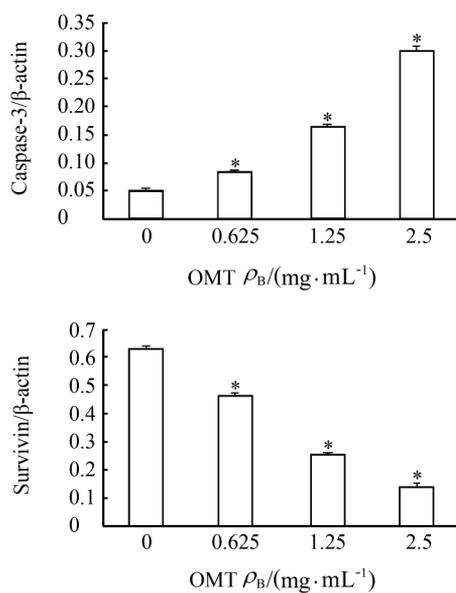


图3 *Caspase-3* 及 *survivin* 蛋白表达水平

* $P < 0.05$ 与阴性对照组 (OMT 浓度为 0 mg/mL) 比较, $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

在我国膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 90% 为移行细胞癌, 其中 80% 为浅表性膀胱癌, 手术切除可取得较好的近期疗效, 但术后复发率高, 3~5 年内复发率为 50%~70%, 并且约 30%~40% 的复发肿瘤恶性程度增高、浸润能力增强^[5]。膀胱腔内灌注化疗是当前预防膀胱癌复发最常用的方法, 但目前常用的化疗药物对癌细胞杀伤缺乏靶向性, 毒副作用大, 存在不同程度的多药耐药。寻找高效低毒药物是当前研究的热点, 中药具有低毒特点, OMT 实验证实其具有抗肿瘤作用^[6], 这为新膀胱灌注药物的研究提供参考。

本实验结果显示 OMT 对 T24 细胞增殖有抑制作用, 并且其抑制作用随浓度的增加而增强。本实验还观察到 OMT 可诱导 T24 细胞凋亡, 凋亡率为 5.37%。本研究检测了与凋亡密切相关的 *survivin* 和 *caspase-3* 在 T24 细胞中表达的变化, 发现随着用药浓度的增加, *survivin* mRNA 表达下调, 而 *caspase-3* mRNA 表达上调; 免疫印迹检测结果显示, 随着 OMT 浓度升高, *caspase-3* 蛋白表达增强, *survivin* 蛋白表达降低, 并且呈一定的剂量依赖性。

Survivin 基因是新近发现的一种凋亡抑制因子, 同时也是迄今发现的作用最强的凋亡抑制因子^[6]。膀胱癌组织中 *survivin* 表达量明显高于正常组织, 并且其表达与膀胱癌患者的临床分期和肿瘤分化程度均有一定相关性, 在低分化和临床分期越高的膀胱癌患者中 *survivin* 表达越高^[8]。细胞凋亡的发生需激活 *caspase*。 *Caspase* 属于半胱氨酸蛋白酶, 具有严格的底物特异性, *caspase-3* 是细胞凋亡过程中必不可少的蛋白酶, 是凋亡发生的直接限速酶, 其表达的高低决定了凋亡的发生程度^[9-10]。 *Survivin* 蛋白通过 *caspase* 通路抑制凋亡, 可以直接抑制凋亡终末效应器, 干扰内源性凋亡信号通路上游启动因子 *caspase-9* 的活化及直接抑制凋亡信号通路下游共同的终末效应因子 *caspase-3*、*caspase-7*, 从而阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程。 *Survivin* 还可竞争性地结合 p21-cdk4 复合物上的 cdk4, 使 p21 从 cdk4 的复合体中释放出来, 释放的 p21 与 *caspase-3* 形成复合物, 抑制 *caspase-3* 活性, 从而间接抑制细胞凋亡。结果提示 *survivin* 基因可通过多重途径抑制凋

亡,促进肿瘤的形成^[11-13]。

综上所述,OMT能抑制T24膀胱癌细胞增殖,诱导凋亡,其诱导凋亡机制可能与抑制survivin、提高caspase-3表达有关,但其明确机制还有待进一步研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 蔡雄,王国俊,瞿瑶,樊成辉,张瑞祺,徐文胜. 苦参素注射液治疗慢性乙型肝炎临床疗效分析[J]. 第二军医大学学报,1997,18:47-49.

Cai X, Wang G J, Qi Y, Fan C H, Zhang R Q, Xu W S. Clinical efficacy of kurorinone in the treatment of chronic hepatitis B[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 1997, 18: 47-49.

[2] Ling Q, Xu X, Wei X, Wang W, Zhou B, Wang B, et al. Oxymatrine induces human pancreatic cancer PANC-1 cells apoptosis via regulating expression of Bcl-2 and IAP families, and releasing of cytochrome c[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30:66.

[3] Zhang Y, Piao B, Zhang Y, Hua B, Hou W, Xu W, et al. Oxymatrine diminishes the side population and inhibits the expression of β -catenin in MCF-7 breast cancer cells [J]. Med Oncol, 2011, 28(Suppl 1):S99-S107.

[4] 邓宁,高华,国亚芳,邱晓峰,冯军,郑萍,等. 苦参碱调控环氧化酶-2的表达及对大鼠膀胱癌抑制作用的初步研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28:375-378.

[5] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南:山东科学出版社, 2004:965-970.

[6] 李顺,张毅,黄世明,赵庆利,李青,魏学斌,等.

苦参素对膀胱癌 T24 细胞影响的研究[J]. 山东医药, 2007,47:29-30.

[7] Li J, Wang H, Ma Z, Fan W, Li Y, et al. TAT-Apoptin induces apoptosis in the human bladder cancer EJ cell line and regulates Bax, Bcl-2, caspase-3 and survivin expression[J]. Exp Ther Med, 2012, 3:1033-1038.

[8] Chen X, Wang Y, Luo H, Luo Z, Zhang T, Yang N, et al. β -elemene acts as an antitumor factor and downregulates the expression of survivin, Bcl-xL and Mta-1[J]. Mol Med Report, 2012, 6:989-995.

[9] unze D, Erdmann K, Froehner M, Wirth M P, Fuessel S. siRNA-mediated inhibition of antiapoptotic genes enhances chemotherapy efficacy in bladder cancer cells [J]. Anticancer Res, 2012, 32:4313-4318.

[10] Jiang B, Li E H, Lu Y Y, Jiang Q, Cui D, Jing Y F, et al. Inhibition of fatty-acid synthase suppresses P-AKT and induces apoptosis in bladder cancer[J]. Urology, 2012, 80:484, e9-e15.

[11] Plissonnier M L, Fauconnet S, Bittard H, Lascombe I. The antidiabetic drug ciglitazone induces high grade bladder cancer cells apoptosis through the up-regulation of TRAIL[J]. PLoS One, 2011, 6:e28354.

[12] Kawata N, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Tsuruta H, Maita S, et al. Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility [J]. Int J Cancer, 2011, 129:1872-1880.

[13] Lin X, Wu G, Huo W Q, Zhang Y, Jin F S. Resveratrol induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in bladder carcinoma cells[J]. Int J Urol, 2012, 19:757-764.

[本文编辑] 贾泽军