

粉防己碱对人膀胱移行细胞癌 BIU-87 细胞裸鼠移植瘤的实验研究

李永生¹, 赵诚², 胡钊² (1. 福建医科大学附属协和医院泌尿外科, 福州 350001; 2. 福建医科大学协和临床医学院泌尿外科, 福州 350001)

摘要: 目的 研究粉防己碱(TET)对人膀胱移行细胞癌 BIU-87 细胞株裸鼠移植瘤的作用机制。方法 14 只裸鼠右后腿背侧皮下接种 BIU-87 移植瘤细胞后随机分为磷酸盐缓冲液(PBS)对照组(7 只)和 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TET 治疗组(7 只)。接种 1 个月后开始, 每 3 d 一次于肿瘤局部注射给予 PBS 或 TET, 每 3 d 测量 1 次肿瘤大小; RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax mRNA 表达; Western-blot 分析 survivin、Capase-3 蛋白表达。结果 TET 对人膀胱癌 BIU-87 细胞裸鼠移植瘤的生长具有抑制作用, 抑制率达 66.6%。RT-PCR 检测结果显示, 与 PBS 对照组相比, TET 能明显下调移植瘤 Bcl-2 mRNA 的表达, 上调 Bax mRNA 的表达($P<0.05$); Western-blot 结果显示经 TET 处理后 survivin 蛋白出现明显下调, 而 Capase-3 蛋白的表达上调明显($P<0.05$)。结论 TET 能够抑制人膀胱癌 BIU-87 细胞裸鼠移植瘤的生长, 其作用的分子机制与下调 Bcl-2、survivin 和上调 Bax、Capase-3 基因表达有关。

关键词: 粉防己碱; 膀胱癌; Bcl-2; Bax; survivin; Capase-3

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2012)12-1070-04

Effect of TET on Xenografted Tumor of Human Bladder Cancer BIU-87 Cells on Nude Mice

LI Yongsheng¹, ZHAO Cheng², HU Zhao² (1. Department of Urological Surgery, Union Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 2. Department of Urological Surgery, Union Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of tetrandrine(TET) on the xenografted tumor of the human bladder cancer BIU-87 cell line on nude mice. **METHODS** Fourteen nude mice which had been inoculated with BIU-87 cells by subcutaneous injection into the right legs were divided into the PBS control group(7 mice) and the 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ TET group(7 mice). After a month of transplanting tumor cell, mice were given PBS or TET into the tumor once every 3 days. Tumor volumes were measured every 3 days. RT-PCR was used to detect Bcl-2 and Bax mRNA expressions. The expressions of survivin and Capase-3 were detected by Western-blot. **RESULTS** TET could inhibit the growth of xenografted tumor of human bladder cancer BIU-87 cells on nude mice, the inhibitory rate was 66.6%. RT-PCR analysis showed that TET significantly reduced tumor Bcl-2 mRNA expression and increased Bax mRNA expression ($P<0.05$); Western-blot showed that after TET treatment, the survivin protein markedly dropped, and Capase-3 protein expression increased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSION** TET can inhibit the growth of xenografted tumor of human bladder cancer BIU-87 cells on nude mice. The molecular mechanism may be reducing the expressions of Bcl-2, survivin, and increasing the expression of Bax, Capase-3.

KEY WORDS: tetrandrine; bladder cancer; Bcl-2; Bax; survivin; Capase-3

粉防己碱(TET), 又名汉防己甲素, 是防己科植物粉防己(*Stephania tetrandra* S. Moore)的块根中提取的双苄基异喹啉生物碱, 是粉防己的主要有效成分, 具有抗炎、镇痛、降血压、阻断钙离子通道等广泛的药理作用^[1-2]。近年来发现 TET 还具有抗肿瘤的作用, 并能逆转肿瘤的多药耐药(multidrug resistance, MDR)^[3], 是目前肿瘤化疗研究的热点药物之一, 具有广泛的应用前景。然而, 有关 TET 对裸鼠移植瘤细胞生长的影响却鲜有报道。本研究将人膀胱癌 BIU-87 细胞株进行裸鼠移植建立模型, 单独应用 TET 对移植瘤进行治疗,

观察其对移植瘤生长的影响, 为 TET 应用于临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

SANYO CO₂ 培养箱(日本 SANYO 公司); TD5A-WS 低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司); 凝胶成像系统(英国 SYNGENE 基因公司); 2720 型普通 PCR 仪(美国 ABI 公司); Eppendorf 5430R 高速离心机(德国 Eppendorf 公司)

1.2 实验动物及瘤株

BALB/C, ♀, 体质量(20±2)g, SPF 级, 购

基金项目: 福建省科技厅青年人才项目(2007F3036)

作者简介: 李永生, 男, 博士, 主任医师 Tel: (0591)83357896 E-mail: lysdr163@163.com

自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物合格证号: SYXK(沪)2008-0001。膀胱移行细胞癌株 BIU-87, 购自武汉细胞典藏中心。

1.3 试剂

TET(成都曼斯特生物科技有限公司, CAS: 518-34-3, 规格: A0065-1g); RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司, 批号: NXCO599); 胎牛血清 FBS(Gibco 公司, 批号: 91110002); 胰酶-EDTA(Hyclone 公司, 批号: J110451)。Survivin, Capseae-3 单克隆抗体(Santa Cruz 公司); 羊抗兔 IgG 二抗(河北博海生物); TRIzol[®] Reagent, Agarose(Invitrogen 公司, 批号: 1382739), RNA 引物由 Invitrogen 公司合成。逆转录试剂盒(Fermentas 公司, 批号: 00065043); PCR 试剂盒(Fermentas 公司, 批号: 00094933), DNA Marker(上海生工)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 人膀胱癌敏感株 BIU-87 细胞株用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养液, 在 37 °C、5%CO₂ 条件下培养, 用 0.25%EDTA-胰酶消化, 2~3 d 传一代。取对数生长期的细胞用于实验。

1.4.2 膀胱癌裸鼠皮下移植瘤模型的建立 选用 6 周龄 BALB/c 裸鼠 14 只, 由本校动物实验中心于 SPF 环境下常规饲养。取对数生长期 BIU-87 细胞, 0.25%胰蛋白酶消化, PBS 洗涤细胞 2 次, 以适量 PBS 溶液重悬、计数, 调整细胞浓度约为 $8 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。用 1 mL 注射器, 于裸鼠右后腿背侧皮下注射细胞悬液 0.1 mL(约 1×10^7 个细胞), 形成皮丘。

1.4.3 分组及处理 接种 2 周后于接种部位可见一小的突起, 以后逐渐明显, 待移植瘤长至 4 mm 时, 随机将 14 只裸鼠分成对照组和 TET 组, 各 7 只。对照组于移植瘤局部注射 PBS, 每隔 3 d 一次, 每次 0.3 mL, 共 21 d。TET 组于移植瘤局部注射 $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 粉防己碱, 每隔 3 d 一次, 每次 0.3 mL, 共 21 d。期间观察裸鼠健康状态(期间未见死亡)及肿瘤生长情况, 每 3 d 测量肿瘤短径(a)及长径(b), 按照 $a^2b/2$ 公式计算肿瘤体积, 绘制移植瘤生长曲线。药物处理结束后第 2 天, 脱颈椎处死裸鼠。无菌条件下小心剥离皮下肿瘤, 部分组织立即放液氮冻存, 剩余组织用 4%多聚甲醛固定 24 h 后, 石蜡包埋切片。肿瘤抑制率: 肿瘤抑制率/%=(1-药物处理组瘤体积平均值/对照组瘤体积平均

值)×100%。

1.4.4 RT-PCR 检测移植瘤组织 Bcl-2、Bax mRNA 的表达 用 DEPC 水处理过匀浆器高温消毒后研磨组织, 用 Trizol 法从移植瘤组织提取总 RNA, cDNA 的合成和 PCR 扩增按照 Fermentas 试剂盒说明书进行。引物: Bcl-2 上游引物: 5'-CAGATGCACCTGACGCCCTT-3', 下游引物: 5'-CCCAGCC TCCGTTATCCTGGA-3'(扩增产物长度: 235 bp)。Bax 上游引物: 5'-TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC-3', 下游引物: 5'-CGTCCCAACCACCCTGGTCT-3'(扩增产物长度: 195 bp)。β-actin 上游引物: 5'-AGCGGGAAATCGTGCGTGAC-3', 下游引物: 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCACATC-3'(扩增产物长度: 471 bp)。PCR 反应条件为: 预变性 94 °C、5 min, 变性 94 °C、1 min, 退火 45 s, 延伸 72 °C、45 s, 最后延伸 10 min, 退火温度 Bcl-2 为 63 °C、Bax 为 57 °C、内参 β-actin 为 60 °C, 总共 33 个循环。PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶(含 Goldview)经电泳检测, 凝胶在紫外线下透视成像拍照, 使用视频图像分析系统进行半定量分析, 目的基因与同一内参照之比表示该基因 mRNA 相对表达水平。

1.4.5 Western-blot 检测移植瘤组织中 survivin 和 Capseae-3 蛋白的表达 取液氮中保存的肿瘤组织提取蛋白质。分别用含 RIPA 的裂解液提取总蛋白, 用二喹林甲酸(bicinchoninic acid, BCA)测量总蛋白量, 取等量总蛋白用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后用 PVDF 膜进行转膜。接着用 Western 封闭液封闭过夜后, 将一抗用封闭液稀释 1 000 倍; 将封闭后的膜直接放入一抗工作液中, 4 °C 反应过夜。然后将羊抗兔 IgG 二抗用 $1 \times \text{TBST}$ 稀释 3 000 倍, 将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中(室温、避光缓慢摇动)作用 60 min。ECL 试剂盒显色, 拍照, 采用美国 UVP 分析仪器, 对胶片进行扫描, 比较各组灰度变化。

1.4.6 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠皮下移植瘤情况

TET 组肿瘤生长缓慢, 治疗 3 周后, 肿瘤平均体积明显小于对照组裸鼠皮下移植瘤体积, 结果见表 1。3 周后, TET 对肿瘤的抑制率达到 66.6%,

表明 TET 可以抑制裸鼠皮下移植瘤的生长。处死动物后, 对照组和 TET 组裸鼠瘤重分别为 $(1.33 \pm 0.27)\text{g}$ 和 $(0.67 \pm 0.10)\text{g}$, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 裸鼠皮下移植瘤平均体积($n=7$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The average volume of transplanting tumor in nude mice($n=7$, $\bar{x} \pm s$)

分组	移植瘤体积/ mm^3			
	3 d	9 d	15 d	21 d
对照组	32.8 ± 4.7	71.2 ± 7.8	109.9 ± 8.6	189.2 ± 15.7
TET 组	22.8 ± 3.5	31.2 ± 3.8	42.3 ± 4.2	63.1 ± 5.3

2.2 RT-PCR 检测移植瘤组织的 Bcl-2、Bax mRNA 的表达

TET 组移植瘤的 Bcl-2 mRNA 表达水平为 0.491 ± 0.017 , 明显低于对照组的 0.587 ± 0.025 ($P < 0.05$); 而 TET 组移植瘤的 Bax mRNA 的表达水平为 0.415 ± 0.007 , 明显高于对照组 0.324 ± 0.020 ($P < 0.05$)。结果见图 1 和图 2。

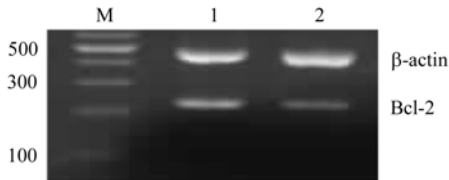


图 1 粉防己碱对移植瘤 Bcl-2 mRNA 的影响

M-标记; 1-对照组; 2-TET 组

Fig 1 Effect of TET on Bcl-2 mRNA expression in tumor

M-marker; 1-control group; 2-TET group

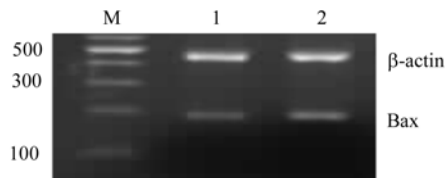


图 2 粉防己碱对移植瘤 Bax mRNA 的影响

M-标记; 1-对照组; 2-TET 组

Fig 2 Effect of TET on Bax mRNA expression in tumor

M-marker; 1-control group; 2-TET group

2.3 Western-blot 检测移植瘤组织的 survivin 和 Caspase-3 蛋白的表达

TET 组移植瘤的 survivin 蛋白表达水平为 0.336 ± 0.016 , 与对照组蛋白表达 0.485 ± 0.009 差异有统计学意义($P < 0.05$); 对照组和 TET 组 Caspase-3 蛋白表达水平分别为 0.543 ± 0.004 和 0.650 ± 0.008 , 二者比较有统计学意义($P < 0.05$), 结果见图 3 和图 4。表明经 TET 处理后 survivin 蛋白的表达受到明显抑制, 而 Caspase-3 蛋白表达水平明显上调($P < 0.05$)。提示粉防己碱可以抑制

survivin 蛋白的表达, 上调 Caspase-3 蛋白表达, 促进细胞凋亡, 进而抑制了移植瘤细胞的增殖。

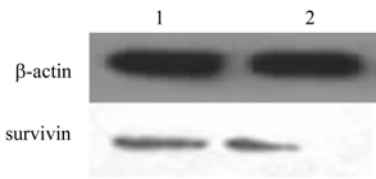


图 3 粉防己碱对移植瘤 survivin 蛋白表达的影响

M-标记; 1-对照组; 2-TET 组

Fig 3 Effect of TET on survivin protein expression in tumor

M-marker; 1-control group; 2-TET group

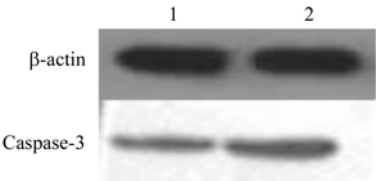


图 4 粉防己碱对移植瘤 Caspase-3 蛋白表达的的影响

M-标记; 1-对照组; 2-TET 组

Fig 4 Effect of TET on Caspase-3 protein expression in tumor

M-marker; 1-control group; 2-TET group

3 讨论

膀胱癌是泌尿生殖系统中最常见的恶性肿瘤。大多数膀胱癌为移行细胞癌(transitional cell carcinoma, TCC), 所占比例超过 95%, 其余鳞癌及腺癌各占 2.0%~3.0%^[4]。目前膀胱癌主要采取手术治疗为主, 辅以化疗、免疫治疗、放疗等多种方法联合治疗模式^[5]。但是以 MVAC 和 GC 方案为代表的膀胱癌联合化疗方案存在不良反应较大、长期预后欠佳等不足, 利用新手段新方法进行膀胱癌治疗的研究十分必要。中草药由于具有杀灭肿瘤细胞、提高免疫力、不良反应小的特点而受到世界各国肿瘤研究者的关注。本实验通过建立膀胱移行细胞癌 BIU-87 细胞株的裸鼠移植瘤模型观察 TET 的抗癌作用, 采用肿瘤局部注射 TET 溶液的方式, 从处理后第 10 天开始, TET 处理组裸鼠移植瘤的体积就开始明显小于对照组, 其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。这说明粉防己碱能够抑制移植瘤细胞的生长, 而且在局部用药期间裸鼠生长状态良好, 无死亡现象发生, 也证实了其体内使用的安全性。

Bcl-2 家族是和细胞凋亡密切相关的一类基因, Bcl-2、Bax 分别是 Bcl-2 基因家族中最具有代表性的抑制凋亡和促进凋亡的基因。Cory 等^[6]认为 Bax 是 Bcl-2 活性主要调控因子, Bcl-2/Bax 比

值对决定细胞是否凋亡有重要意义。当 Bcl-2 高表达时可以与 Bax 结合成异源二聚体,抑制细胞凋亡,而当 Bax 在细胞内超表达,形成同源二聚体时,细胞对死亡信号的反应增强,从而促进细胞向凋亡的方向发展。本实验 RT-PCR 检测显示,TET 组移植瘤体积明显小于对照组体积,相应 Bcl-2 mRNA 表达水平下降,而 Bax mRNA 表达水平升高($P<0.05$)。其中一个重要原因可能是与 Bcl-2/Bax 异源二聚体形成减少,而 Bcl-2/Bax 同源二聚体的比例增加导致细胞发生凋亡有关。

Survivin 是 1997 年 Altieri 等^[7]在研究效应细胞蛋白酶受体-1(effector cell protease receptor-1, EPR-1)的 cDNA 时因具有强大的抗细胞凋亡功能,在人类基因组库中筛选克隆时首先被发现。survivin 属于凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的重要成员,但是与其他 IAP 不同,survivin 只含有一个与 XIAP 的第二个 BIR 结构域(BIR2)氨基酸序列类似的结构域,没有其他 IAP 固有的羧基末端环指(与锌结合的结构域),而代之以羧基末端卷曲结构。但是,研究证实 XIAP 的 BIR2 对抑制 caspase 来说足以单独发挥作用,可参与包括凋亡在内的多种细胞生理过程^[8]。目前已知外源性和内源性凋亡通路分别通过 Caspase-3 和 Caspase-7 发挥其凋亡功能。进一步研究证明 survivin 可以直接抑制各种凋亡途径的终末效应蛋白 Caspase-3 和 Caspase-7^[9]。本实验通过 Western-blot 检测结果显示,经 TET 处理后 survivin 蛋白的表达受到明显抑制,而 Caspase-3 蛋白表达水平明显上调($P<0.05$)。提示粉防己碱可以抑制

survivin 蛋白的表达,上调 Caspase-3 蛋白表达,促进细胞凋亡,进而抑制了移植瘤细胞的增殖。

综上所述,TET 能抑制 BIU-87 细胞裸鼠移植瘤的生长,这一作用可能与 TET 通过调控 Bcl-2/Bax 的比例,诱导 BIU-87 细胞的凋亡有关;再者通过抑制 survivin 基因的表达及上调 Caspase-3 基因的表达,进而增加肿瘤的凋亡。

REFERENCES

- [1] KWAN C Y, ACHIKI F L. Tetrandrine and related bis-benzylisoquinoline alkaloids from medicinal herbs: cardiovascular effects and mechanisms of action [J]. *Acta Pharmcol Sin*, 2002, 23(12):1057-1068.
- [2] LI J Y, LI Y S, HUANG Y Q. Progress of research on anti-tumor effect and mechanisms of tetrandrine [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2011, 28(3): 205-208.
- [3] HOU Y, GUO T, WU C, et al. Effect of tetrandrine combined with epirubicin on the growth of human breast carcinoma multidrug resistance cell line [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2008, 128(4): 663-666.
- [4] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2007 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(1): 43-66.
- [5] GROESMAN H B, DINNEY C P. If cystectomy is insufficient, what is an urologist to do [J]. *Urol Oncol*, 2003, 21(6): 475-478.
- [6] CORY S, ADAMS J M. Killing cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch [J]. *Cancer Cell*, 2005, 8(1): 5-6.
- [7] AMBROSINI G, ADIDA C, ALTIERI D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921.
- [8] GAO Z, TIAN Y, WAN G J, et al. A dimeric Smac/diablo peptide directly relieves caspase-3 inhibition by XIAP. Dynamic and cooperative regulation of XIAP by Smac/Diablo [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(42): 30718-30727.
- [9] SHIN S, SUN G B J, CHO Y S, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of Caspase-3 and -7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4): 1117-1123.

收稿日期: 2011-09-22

香椿子总多酚对佐剂型关节炎大鼠的治疗作用

杨艳丽^{1,2}, 陈超^{2*} (1.宜昌市中心人民医院, 湖北 宜昌 443003; 2.三峡大学医学院药理学教研室, 湖北 宜昌 443002)

摘要: 目的 研究香椿子总多酚(TSTP)对佐剂型关节炎大鼠的治疗作用。方法 6 周龄 Wistar 大鼠 50 只, SPF 级, 随机分为 5 组, 每组 10 只: 正常组、模型组、雷公藤甲素组、TSTP 低剂量组和 TSTP 高剂量组。正常组在左后肢足垫部皮下注射 0.1 mL 生理盐水, 其余组在左后肢足垫部皮下注射 0.1 mL 弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant, FCA)诱导建立大鼠佐剂型关节炎模型。大鼠致炎后第 8 天开始灌胃治疗, 正常组和模型组均给予 0.5%羧甲基纤维素钠(10 mg·kg⁻¹)、雷公藤甲素组给予雷公藤甲素(20 mg·kg⁻¹)、TSTP 低剂量组给予 TSTP(35 mg·kg⁻¹)、TSTP 高剂量组给予 TSTP(70 mg·kg⁻¹),

作者简介: 杨艳丽, 女, 硕士生 Tel: (0717)6857659 E-mail: 66901570@qq.com *通信作者: 陈超, 男, 博士, 教授 Tel: (0717)6397466 E-mail: chaochen1954@163.com