

飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞增殖、凋亡的影响及机制研究

叶乐乐^{1,2}, 于德新^{1*} (1.安徽医科大学第二附属医院, 合肥 230601; 2.皖西卫生职业学院附属医院, 安徽 六安 237000)

摘要: 目的 探讨飞燕草素对人膀胱癌细胞株 T24 的增殖抑制作用、诱导凋亡作用及其相关的分子机制。方法 体外培养 T24 细胞, 利用 CCK-8 试验检测飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞的杀伤作用; 利用流式细胞术试验检测细胞凋亡情况、活性氧水平变化; 利用 Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白和信号通路相关蛋白的表达。结果 飞燕草素能够有效抑制人膀胱癌 T24 细胞增殖, IC_{50} 为 $(42.37 \pm 2.82) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 飞燕草素能够通过线粒体依赖性途径诱导 T24 细胞发生凋亡, 使 Cyt-c、cleaved-Caspase-3、PARP 和 Bax 蛋白表达量升高, Bcl-2 表达量降低; 飞燕草素能够降低 T24 细胞中的活性氧水平, 并激活 JNK/STAT3 信号通路。结论 飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞具有良好的杀伤作用, 并能够通过降低 T24 细胞内活性氧水平, 进而调控 JNK/STAT3 信号通路来诱导 T24 细胞发生线粒体依赖性凋亡。

关键词: 飞燕草素; 人膀胱癌 T24 细胞; 活性氧; JNK/STAT3 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2021)04-0409-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.04.005

引用本文: 叶乐乐, 于德新. 飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞增殖、凋亡的影响及机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(4): 409-414.

Study on Effect of Delphinidin on Proliferation and Apoptosis of Human Bladder Cancer T24 cells and Its Mechanism

YE Lele^{1,2}, YU Dexin^{1*} (1. The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China; 2. Affiliated Hospital of West Anhui Health Vocational College, Lu'an 237000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the inhibitory effect of delphinidin on proliferation inhibition and apoptosis induction of human bladder cancer cell line T24 and its related molecular mechanism. **METHODS** T24 cells were cultured *in vitro*, and the killing effect of delphinidin on human bladder cancer T24 cells was detected by CCK-8 assay. Apoptosis and reactive oxygen species levels were detected by flow cytometry. Apoptosis correlation protein and signaling pathway-related proteins expression were detected by Western blotting. **RESULTS** Delphinidin could effectively inhibit the proliferation of human bladder cancer T24 cells with an IC_{50} of $(42.37 \pm 2.82) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; delphinidin could induce apoptosis of T24 cells through mitochondria-dependent pathway, making Cyt-c, cleaved-Caspase-3, PARP and Bax protein expression increased, Bcl-2 expression decreased; delphinidin could reduce reactive oxygen species levels in T24 cells and activate JNK/STAT3 signaling pathway. **CONCLUSION** Delphinidin has a good killing effect on human bladder cancer T24 cells, and can induce mitochondria-dependent apoptosis in T24 cells by decreasing the level of reactive oxygen species in T24 cells and regulating JNK/STAT3 signaling pathway.

KEYWORDS: delphinidin; human bladder cancer T24 cells; reactive oxygen species; JNK/STAT3 signaling pathway

膀胱癌是泌尿生殖系统最常见的恶性肿瘤^[1]。其发病率位居恶性肿瘤的第 9 位, 在男性恶性肿瘤中居第 6 位, 膀胱癌的发病特点是手术复发率高, 预后较差, 正因如此膀胱癌对人类的健康和生命造成了很大的威胁^[2]。目前膀胱癌的治疗手段主要以外科手术为主再辅以药物进行膀胱灌注, 然而目前常见的化疗辅助药物存在较大的不良反应, 因此探究新的肿瘤治疗药物及靶点已成为膀胱癌治疗中的研究热点^[3]。

飞燕草素是花青素中主要单体活性成分, 也是常见花色苷种类中羟基数量最多的一种, 其酚羟基的数量造就了飞燕草素高效的生物学功能^[4]。有研究报道指出, 飞燕草素能抑制恶性胶质瘤增殖, 能够增加 PRAP 酶的裂解和增大 Bax/Bcl2 的比率, 活化 Caspase-3 和 Caspase-9, 抑制 NF- κ B 通路的激活, 从而诱导人前列腺癌细胞 22Rv1 细胞凋亡^[5]。飞燕草素还能够抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路, 发挥抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞活性

基金项目: 安徽省自然科学基金项目(1508085SQH225)

作者简介: 叶乐乐, 男, 副主任医师 Tel: 13696642258
Tel: 13705690883 E-mail: dxysu@ahmu.edu.cn

E-mail: xjvzb60@163.com

*通信作者: 于德新, 男, 博士, 主任医师, 教授

的作用^[6]。另外飞燕草素具有较强的抗氧化特性,能够清除体内多余的自由基,从而起到健康防护的作用^[7]。然而,有关飞燕草素对膀胱癌 T24 细胞的作用尚不明确,因此本研究旨在探讨飞燕草素对膀胱癌 T24 细胞的增殖抑制作用、诱导凋亡作用及其具体的分子机制,以期为飞燕草素的开发及临床应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞

人膀胱癌 T24 细胞系、人正常膀胱上皮 SV-HUC-1 细胞均购自中国科学院细胞研究所。

1.2 药品与试剂

飞燕草素(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号:2019081754;纯度 $\geq 99.8\%$);5-氟尿嘧啶(5-fluorouridine, 5-FU,批号:2020916478)、F-12K 完全培养基(批号:202062472)、RPMI-1640 培养基(批号:2020932547)、胎牛血清(批号:202036548)均购自美国 Gibco 公司;青-链霉素青链双抗(批号:WHA202006-274)及胰蛋白酶及磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)均购自美国 Hyclone 公司;CCK-8 试剂盒(批号:KTC011001)、Annexin V/PI 试剂盒(批号:BYT001)均购自上海碧云天公司;JC-1 试剂盒(青岛捷世康生物科技有限公司,批号:JSK20200654);所有一抗抗体(批号:202025-895)、HRP 标记山羊抗兔 IgG(批号:115-035-001)和 HRP 标记山羊抗鼠 IgG(批号:115-035-003)均购自美国 Santa 公司;2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA,批号:202011548)、ECL 化学发光试剂(批号:WLA003)均购自中国赛默飞科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞系与细胞培养 人膀胱癌 T24 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素及 100 μ g·mL⁻¹链霉素的 RPMI 1640 培养液培养,人正常膀胱上皮 SV-HUC-1 细胞用 F-12K 完全培养基培养,2 种细胞均在 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。待细胞至对数生长期的时候,按照比例进行传代培养。

1.3.2 CCK-8 法检测飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞增殖的影响 将对数生长期生长状态良好的人膀胱癌 T24 细胞和人正常膀胱上皮 SV-HUC-1 细胞制成的单细胞悬液,每孔 100 μ L 接种至 96 孔板中,每孔中的细胞个数约为 1×10^4 个,待细胞贴壁

生长 24 h 后,分别加入不同浓度的飞燕草素,浓度梯度为 0, 10, 20, 30, 40, 50 μ mol·L⁻¹,对照组加入 DMSO,每组设 8 个复孔。处理 24 h 后,将 10 μ L CCK-8 试剂加入孔中并在 37℃下孵育 2 h。随后,通过酶标仪在 450 nm 处测量吸光度,利用 GraphPad Prism 7.0 软件计算细胞存活率曲线及 IC₅₀ 值。

1.3.3 流式细胞术检测飞燕草素对膀胱癌 T24 细胞凋亡及线粒体膜电位的影响 收集处于对数生长期且生长状态良好的 T24 细胞,以每孔 1×10^5 个接种至 6 孔板,5% CO₂、37℃培养箱中孵育 24 h。为了从时间梯度上验证飞燕草素对膀胱癌 T24 细胞的诱导凋亡作用,用 IC₅₀ 值为终浓度(45 μ mol·L⁻¹)的飞燕草素分别处理 T24 细胞 3, 6, 12 和 24 h,收集细胞并经过 PBS 清洗后,利用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,再加入 3 μ L Annexin V-FITC 与 2 μ L PI,室温避光孵育 15 min,每组加入 300 μ L PBS,转移至流式管后流式细胞仪检测细胞凋亡率,试验重复 3 次,验证 T24 细胞的凋亡情况。随后根据 JC-1 试剂盒说明书检测飞燕草素处理后,T24 细胞线粒体膜电位变化情况。

1.3.4 流式细胞术检测飞燕草素对膀胱癌 T24 细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平 收集处于对数生长期的 T24 细胞,以每孔 1×10^5 个的密度接种至 6 孔板,于 5% CO₂、37℃培养箱中孵育 24 h。为了从时间梯度上验证飞燕草素对膀胱癌 T24 细胞 ROS 水平的调节作用,用 IC₅₀ 值为终浓度(45 μ mol·L⁻¹)的飞燕草素处理细胞 3, 6, 12 和 24 h,收集细胞,弃去上清后 PBS 洗涤 1 次。加 10 μ mol·L⁻¹的 DCFH-DA,37℃恒温水浴锅中避光孵育 30 min, PBS 洗涤 1 次,500 μ L PBS 重悬细胞,转移至流式管后流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

1.3.5 Western blotting 检测蛋白变化情况 用 IC₅₀ 浓度(45 μ mol·L⁻¹)和低浓度(10 μ mol·L⁻¹)的飞燕草素处理 T24 细胞 3, 6, 12 和 24 h 后,收集细胞于离心管中,提取蛋白。每孔上样 20 μ g,通过 10%~12% SDS-PAGE 胶电泳后转移至 NC 膜上。脱脂乳(5%)封闭 2 h, TBST 洗涤 5 次,每次 6 min。加入一抗(稀释比例为 1:2 000),4℃摇床孵育过夜,次日回收一抗, TBST 洗涤 5 次,每次 6 min,

加入对应二抗, 孵育 2 h 后, TBST 洗涤 5 次, 每次 5 min, 利用 ECL 化学发光显色剂进行显色, 再通过化学发光成像系统进行拍照。内参选择 α -微管蛋白, 并利用 Image J 1.42q 软件对所出条带进行灰度分析。

1.3.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单一样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞的增殖抑制作用

随着飞燕草素处理浓度的增加, T24 细胞的存活率逐渐降低, 说明飞燕草素呈浓度依赖性抑制人膀胱癌 T24 细胞增殖, 与阳性对照药物 5-FU 相比, 具有显著性差异 ($P < 0.001$)。经计算飞燕草素对 T24 细胞的 IC_{50} 值为 $(42.37 \pm 2.82) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 5-FU 对飞燕草素的 IC_{50} 值为 $(68.73 \pm 3.14) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明飞燕草素对 T24 细胞的增殖抑制作用要远远优于 5-FU。CCK-8 结果见图 1A。飞燕草素对于人正常膀胱上皮 SV-HUC-1 细胞的增殖抑制作用要小于 5-FU, 说明飞燕草素的不良反应要小于 5-FU。结果见图 1B。

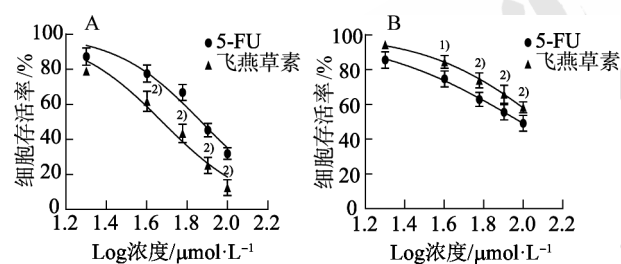


图 1 飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞及正常细胞的增殖抑制作用

A-飞燕草素对 T24 细胞的增殖抑制作用; B-飞燕草素对正常细胞的增殖抑制作用; 与 5-FU 相比, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

Fig. 1 Inhibitory effect of delphinidin on proliferation of human bladder cancer T24 cells and normal cells

A-delphinidin inhibits proliferation of T24 cells; B-delphinidin inhibits proliferation of normal cells; compared with 5-FU, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.001$ 。

2.2 飞燕草素通过线粒体依赖性途径诱导人膀胱癌 T24 细胞凋亡

为了验证飞燕草素抑制 T24 细胞增殖是否通过诱导 T24 细胞发生凋亡实现, 将处理后的 T24 细胞用 Annexin V/PI 染色后利用流式细胞术检测凋亡细胞的数量, 随着飞燕草素处理时间的不断延长, 细胞凋亡数量逐渐增加, 当处理时间为 24 h 时, 细胞凋亡水平达到最高, 结果见图 2A; 随后用 JC-1 试剂盒检测了线粒体膜电位的变化情况,

随着飞燕草素处理时间的增加, 右上象限的细胞数量逐渐降低, 而右下象限的细胞数量逐渐升高, 说明线粒体膜电位逐渐降低, 细胞发生线粒体依赖性凋亡, 结果见图 2B; 并进一步从分子水平通过 Western blotting 检测凋亡蛋白的表达量变化情况, 随着飞燕草素处理的时间不断增加, 促凋亡蛋白 Bax、Cyt-c、cleaved-Caspase-3 和 cleaved-PARP 表达量升高, Bcl-2、Caspase-3 及 PARP 表达量降低, 与 0 h 相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 结果见图 2C。上述试验结果表明, 飞燕草素能够诱导人膀胱癌 T24 发生线粒体依赖性凋亡。

2.3 飞燕草素降低人膀胱癌 T24 细胞中 ROS 水平

为了探究飞燕草素诱导 T24 细胞发生凋亡是否与细胞内 ROS 水平有关, 以 IC_{50} 浓度的飞燕草素处理 T24 细胞不同时间 (3, 6, 12 和 24 h) 后, 加入 DCFH-DA 荧光探针, 并通过流式细胞术检测细胞内 ROS 水平变化情况。随着飞燕草素处理时间的不断增加, ROS 水平呈现时间依赖性逐渐降低。结果见图 3。

2.4 飞燕草素调节人膀胱癌 T24 细胞中的 JNK/STAT3 信号通路诱导凋亡

为了验证飞燕草素是否通过调节 ROS 水平来诱导 T24 细胞凋亡, 对 ROS 调控的 JNK/STAT3 信号通路进行了检测, 经 IC_{50} 浓度的飞燕草素处理 T24 细胞 3, 6, 12 和 24 h 后, 通过 Western blotting 检测 JNK/STAT3 信号通路相关蛋白的表达量变化。随着飞燕草素处理时间的不断增加, p-JNK 表达量增加, p-STAT3 表达量降低, 与 0 h 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 表明 IC_{50} 浓度的飞燕草素激活了 T24 细胞中的 JNK/STAT3 信号通路, 结果见图 4A~4B。随后, 进一步验证了低浓度 (不影响细胞存活的浓度) 的飞燕草素对 T24 细胞中 JNK/STAT3 信号通路的影响, 结果见图 4C~4D, 低浓度的飞燕草素 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 不会影响 T24 细胞中的 JNK/STAT3 信号通路。

3 讨论

膀胱癌是常见的泌尿系统恶性肿瘤, 该病在早期的时候可以没有任何症状, 随着肿瘤的进展会出现肉眼血尿、疼痛肿胀等症状^[8]。膀胱癌的发生发展与细胞增殖和凋亡息息相关, 多种生长因子、肿瘤基因及它们之间的相互作用在膀胱癌的增殖和凋亡中发挥着重要作用。手术治疗是目前

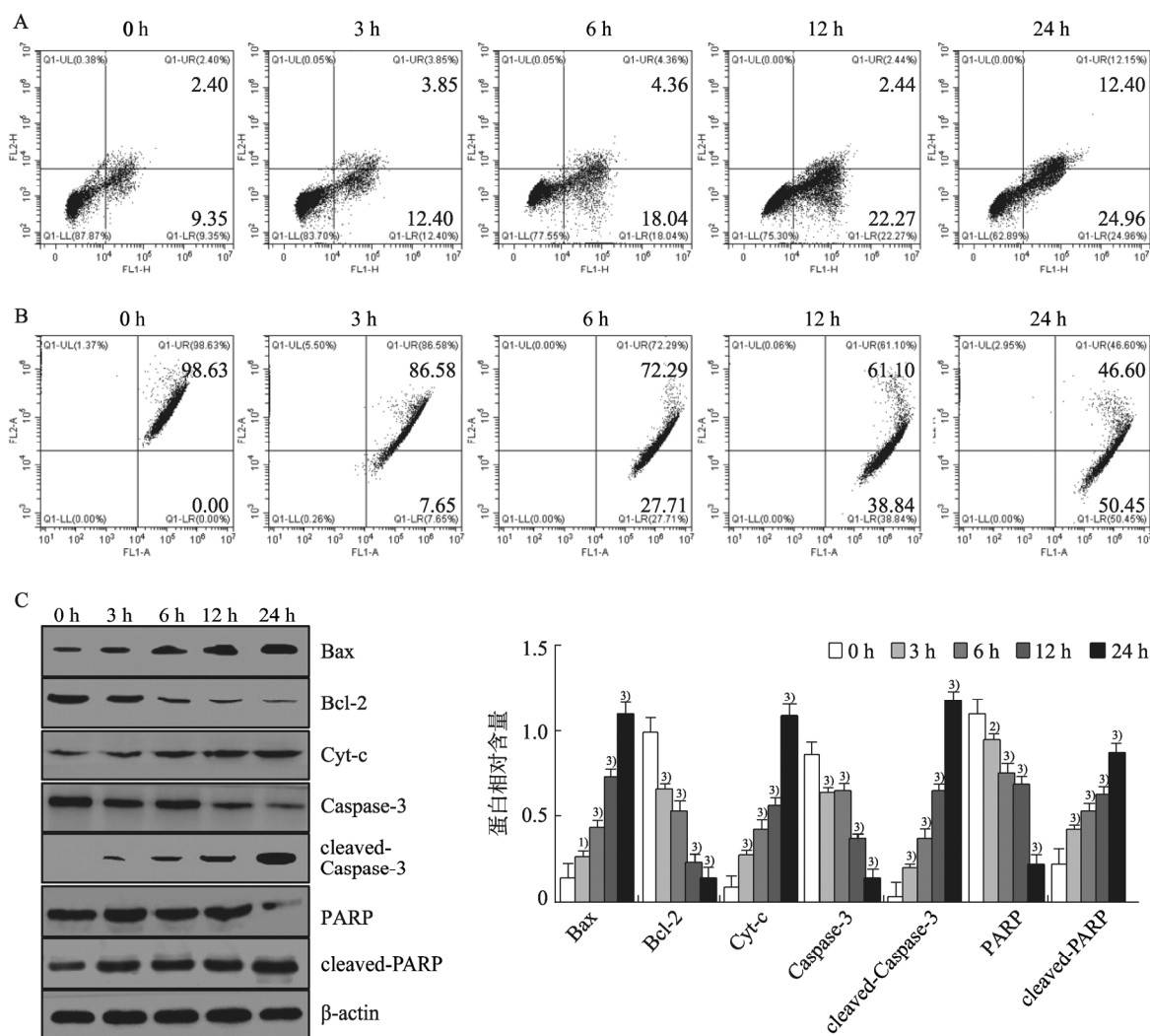


图 2 飞燕草素通过线粒体依赖性途径诱导人膀胱癌 T24 细胞凋亡

A-流式细胞术检测细胞凋亡情况；B-JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位变化情况；C-Western blotting 检测细胞凋亡相关蛋白的表达量变化情况；与 0 h 相比，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 2 Delphinidin induced apoptosis of human bladder cancer T24 cells through a mitochondrial-dependent pathway

A-flow cytometry to detect apoptosis; B-JC-1 kit to detect changes in mitochondrial membrane potential; C-Western blotting to detect changes in the expression of apoptosis-related proteins; compared with 0 h, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

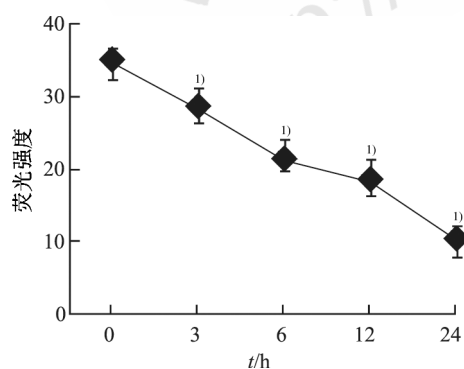


图 3 飞燕草素处理后 T24 细胞 ROS 水平变化情况
与 0 h 相比，¹⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 3 Changes of ROS levels in T24 cells after treatment with delphinidin

Compared with 0 h, ¹⁾ $P<0.001$.

膀胱癌主要治疗手段，但其具有术后复发率高的弊端。故寻找更加有效的膀胱癌治疗药物，并充分了解其治疗机制成为临床治疗膀胱癌的热点^[9]。肿瘤细胞具有较强的持续增殖能力，因此抑制肿瘤细胞增殖或者诱导其凋亡已经成为抗肿瘤药物的开发方向^[10]。飞燕草素是一种广泛存在的花色苷单体，其特殊的化学结构早就成就了它广泛的高效的生物活性，飞燕草素能够通过各种机制抑制多种肿瘤细胞增殖并诱导肿瘤细胞发生凋亡^[11]。本研究结果显示，飞燕草素能够在体外有效抑制人膀胱癌 T24 细胞增殖，且抑制作用随药物浓度的增加而增强，并且其抑制作用要大于阳性对照药物 5-FU；同样对飞燕草素的不良反应进行了检测，

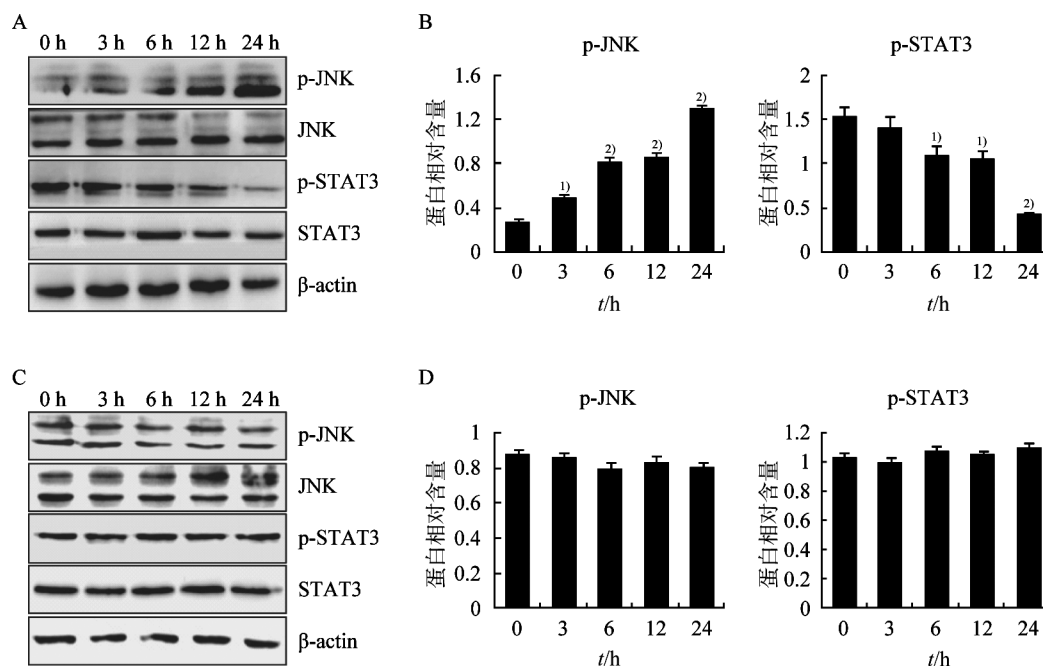


图 4 飞燕草素调节人膀胱癌 T24 细胞中的 JNK/STAT3 信号通路诱导凋亡
A-IC₅₀ 浓度(45 μmol·L⁻¹)的飞燕草素对 T24 细胞中 JNK/STAT3 通路相关蛋白的表达量变化情况;B-图 A 蛋白的定量分析;C-低浓度(10 μmol·L⁻¹)的飞燕草素对 T24 细胞中 JNK/STAT3 通路相关蛋白的表达量变化;D-图 C 蛋白的定量分析;与 0 h 相比, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.001。
Fig. 4 Delphinidin induced apoptosis by regulating JNK/STAT3 signaling pathway in human bladder cancer T24
A-the changes of JNK/STAT3 pathway-related protein expression in T24 cells with IC₅₀ concentration of delphinidin(45 μmol·L⁻¹); B-quantitative analysis of protein of fig. A; C-the changes in the expression of JNK/STAT3 pathway-related proteins in T24 cells at low concentrations of delphinidin(10 μmol·L⁻¹); D-quantitative analysis of protein of fig. C; compared with 0 h, ¹⁾P<0.01, ²⁾P<0.001.

发现与 5-FU 相比,飞燕草素的不良反应较小,经计算飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞的 IC₅₀ 为 (42.37±2.82)μmol·L⁻¹,其数值要远远低于阳性对照药物 5-FU 的(68.73±3.14)μmol·L⁻¹,说明在同等浓度下,飞燕草素对膀胱癌 T24 细胞的杀伤作用更大,具有更强的开发前景。IC₅₀是指存活 50%(相对对照组)时的给药浓度,直接反映药物对细胞杀伤作用的强弱,凋亡试验中,一般的细胞存活率要控制在 50%左右,>80%凋亡细胞过少,<20%细胞损伤过于严重,因此在接下来的试验中选取了 IC₅₀ 值浓度进行了时间梯度试验。

细胞凋亡是基因控制下的细胞程序性死亡,是维持内环境稳定的重要机制。线粒体在调节细胞凋亡中至关重要,在线粒体依赖性凋亡过程里,线粒体通透性增加,线粒体膜电位降低,导致 Cyt-c、Bax 等促凋亡因子从线粒体释放到胞质中进而引发 Caspase 级联反应,最终诱导细胞凋亡,因此线粒体膜电位的降低通常被看作是细胞凋亡早期的一个标志性事件^[12]。此外,线粒体依赖性凋亡受到 Caspase 家族蛋白、Bcl-2 家族蛋白及细胞色素 C 等多种蛋白的调控。Caspase-3 在 Caspase 家族级联反应中处于核心位置,作为凋亡的执行

蛋白,Caspase-3 的活化后能够扩大 Caspase 级联反应,激活 PAPR 蛋白,使细胞 DNA 断裂,胞质浓缩,细胞凋亡^[13]。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族中最重要的 2 个成员,主要分布于细胞质中的线粒体上,Bcl-2 与 Bax 通过形成同源二聚体而调节细胞凋亡。Cyt-c 是细胞凋亡不可缺少的因子,在细胞凋亡中起着关键信号放大的作用^[14]。从本实验结果中可以看出:飞燕草素能够以时间的梯度诱导 T24 细胞凋亡,并且在对 T24 细胞进行 JC-1 检测后发现,飞燕草素能够显著降低 T24 细胞的线粒体的膜电位,随后 Western blotting 试验结果表明,飞燕草素处理后,T24 细胞中 Bcl-2 和 Caspase-9 蛋白表达水平降低,Bax、Cyt-c、Caspase-3 和 PAPR 蛋白表达量升高,因此可以推断飞燕草素可能通过线粒体途径诱导 T24 细胞凋亡。

氧化应激与多种肿瘤的发病及进展有密切的关系,ROS 生成是氧化应激的主要特征,是细胞内级联反应信号的调节者^[15]。不同肿瘤细胞中的 ROS 水平是不同的,在早先的研究中,人们把 ROS 当成一种细胞中的有害物质,认为 ROS 水平的升高会影响到细胞的生命进程,因此有一些学者将诱导细胞 ROS 水平升高来作为治疗癌症的方向^[16],但

是最新的研究表明, 过高的 ROS 会对肿瘤细胞的存活起到一个保护作用甚至促进肿瘤细胞的增殖。虽然目前尚不能完全解释 ROS 在肿瘤细胞中的作用, 但是不可否认的是, ROS 水平的变化将导致肿瘤细胞内部活性的变化^[17]。因此进一步研究了飞燕草素对人膀胱癌 T24 细胞中 ROS 水平的影响, 从试验结果可以看出, 与对照组相比, 飞燕草素能够显著降低 T24 细胞的 ROS 水平, 提示了飞燕草素能够通过降低 ROS 含量来诱导 T24 细胞凋亡。JNK 在许多肿瘤细胞凋亡上起着非常重要的作用, 其活性直接影响着细胞凋亡情况^[18]; STAT3 信号通路被证实在肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡等多种病理生理过程起着重要的作用^[19], 以上 2 条信号通路的共同点是都受到细胞中 ROS 水平的影响, 因此, 本研究进一步检测了受 ROS 调控的 JNK/STAT3 信号通路, 从试验结果中可以看出, 随着飞燕草素处理时间的不断延长, p-JNK 的表达量逐渐升高, p-STAT3 的表达量逐渐降低, 说明 JNK 和 STAT3 信号通路被飞燕草素激活, 并通过这 2 条信号通路来调控细胞凋亡; 低浓度 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的飞燕草素不能引起 JNK/STAT3 信号通路蛋白的变化, 说明只有在一定浓度条件下, 飞燕草素才能调控 JNK/STAT3 信号通路, 未来的实验中, 将针对飞燕草素对 T24 细胞作用的浓度和作用时间进行探索。

综上, 飞燕草素可以抑制膀胱癌 T24 细胞的增殖并诱导其凋亡, 其作用机制可能是通过降低细胞中的 ROS 水平, 进而激活细胞中的 JNK/STAT3 信号通路, 降低线粒体膜电位, 激活线粒体依赖性凋亡途径, 最终诱导膀胱癌 T24 细胞的凋亡来实现的。本研究结果初步证明了飞燕草素具有一定的抗膀胱癌活性, 其作为花青素的有效成分, 为花青素辅助膀胱癌治疗提供了一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] GRAYSON M. Bladder cancer[J]. *Nature*, 2017, 551(7679): S33. Doi: 10.1038/551S33a.
- [2] SMITH A B. Recent developments in the management of bladder cancer: Introduction[J]. *Urol Oncol*, 2018, 36(3): 95-96.
- [3] KUTWIN P, KONECKI T, CICHOCKI M, et al. Photodynamic diagnosis and narrow-band imaging in the management of bladder cancer: A review[J]. *Photomed Laser Surg*, 2017, 35(9): 459-464.
- [4] WANG H, ZHU H P, LI W Z, et al. Analysis of anthocyanin in bilberry extract and its antioxidant activity *in vitro*[J]. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技), 2019, 40(23): 60-65.
- [5] YANG Y, CHEN X M, SHEN Y L. Research on the delphinidin-glucoside protects vascular endothelial cells against high glucose-induced injury[J]. *J Jinhua Polytech*(金华职业技术学院学报), 2019, 19(3): 82-85.
- [6] JIANG T T, BAI J Y, REN Q M, et al. Delphinidin suppresses breast cancer by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2019, 31(6): 981-985.
- [7] 吴嵩林, 韩彬, 彭佳媛, 等. 飞燕草素对 HER-2 阳性乳腺癌的抑制效应及分子机制研究[J]. *天津医药*, 2018, 46(9): 910-915.
- [8] PIAO X M, BYUN Y J, KIM W J, et al. Unmasking molecular profiles of bladder cancer[J]. *Investig Clin Urol*, 2018, 59(2): 72-82.
- [9] BUTT S U, MALIK L. Role of immunotherapy in bladder cancer: Past, present and future[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 81(4): 629-645.
- [10] LIM W C, KIM H, KIM Y J, et al. Delphinidin inhibits BDNF-induced migration and invasion in SKOV₃ ovarian cancer cells[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(23): 5337-5343.
- [11] CHEN J, ZHOU J, LI F, et al. Delphinidin induces autophagy in HER-2⁺ breast cancer cells via inhibition of AKT/mTOR pathway[J]. *J Central South Univ(Med Ed)*(中南大学学报: 医学版), 2017, 42(3): 264-270.
- [12] CHENG L J, YANG L, JIANG L, et al. Mechanism of apoptosis of human gastric cancer cell line SGC-7901 induced by sophorolipid through mitochondrial pathway[J]. *J Shanxi Med Univ*(山西医科大学学报), 2019, 50(4): 427-432.
- [13] YU Y, XU L, LIU S B, et al. Induction effect of myricetin on apoptosis of human ovarian cancer SKOV₃ cells by promoting DRP1-dependent mitochondrial fission[J]. *J Jilin Univ: Med Ed*(吉林大学学报: 医学版), 2018, 44(5): 903-907, 1115.
- [14] LI Y F, WANG X D, LIANG Y J, et al. Arsenic trioxide induced cell apoptosis by mitochondria dependent pathway in KB and KBv200 cells[J]. *Chin J Cancer*(癌症), 2004, 23(6): 631-634.
- [15] MOLONEY J N, COTTER T G. ROS signalling in the biology of cancer[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018(80): 50-64.
- [16] DE SÁ JUNIOR P L, CÂMARA D A D, PORCACCHIA A S, et al. The roles of ROS in cancer heterogeneity and therapy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 2467940. Doi: 10.1155/2017/2467940.
- [17] RAZA M H, SIRAJ S, ARSHAD A, et al. ROS-modulated therapeutic approaches in cancer treatment[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(9): 1789-1809.
- [18] SUN Z L, DONG J L, WU J. Juglanin induces apoptosis and autophagy in human breast cancer progression via ROS/JNK promotion[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(85): 303-312.
- [19] CHEN W, LI P, LIU Y, et al. Isoalantolactone induces apoptosis through ROS-mediated ER stress and inhibition of STAT3 in prostate cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 309. Doi: 10.1186/s13046-018-0987-9.

收稿日期: 2020-02-11

(本文责编: 蔡珊珊)