

蛇葡萄素钠对人膀胱癌 EJ 细胞增殖的抑制作用

豆金彦^{1,2*}, 吴勇杰¹(1. 兰州大学基础医学院, 兰州 730000; 2. 甘肃省中医院药剂科, 兰州 730050)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)16-2199-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.16.13

摘要 目的: 研究蛇葡萄素钠(AMP-Na)对人膀胱癌 EJ 细胞增殖的抑制作用。方法: 体外传代培养 EJ 细胞。以 25、33、43.5、57.4、75.8、100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 培养细胞 24、48、72 h 后, 采用 MTT 法测定细胞活力并计算抑制率。以 0、43.5、57.4、75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 2 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂培养细胞 24 h 后, 采用流式细胞仪检测细胞数并计算细胞凋亡率与细胞周期分布。以 0、43.5、57.4、75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 2 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂培养细胞 24、48 h 后, 采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法测定细胞中 Cyclin D1 mRNA 的表达。结果: 以 25、33、43.5、57.4、75.8、100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 培养细胞 24、48、72 h 后对细胞具有明显抑制作用, 且呈明显的时间依赖关系。以 57.4、75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 培养细胞 24、48 h 后在 G_0/G_1 峰之前出现凋亡峰; 以 75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 培养细胞 24 h 与 43.5、75.8 $\mu\text{g/ml}$ 培养细胞 48 h 后, Cyclin D1 mRNA 的表达减弱($P < 0.05$)。结论: AMP-Na 能高效抑制 EJ 细胞的增殖并促进其凋亡, 其机制可能与诱导细胞凋亡、下调 Cyclin D1 mRNA 表达以及使细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期有关。

关键词 人膀胱癌 EJ 细胞; 蛇葡萄素钠; 流式细胞术; 实时荧光定量聚合酶链反应

Inhibitory Effects of Ampelopsin Sodium on the Proliferation of Human Bladder Cancer Cell Line EJ

DOU Jin-yan^{1,2}, WU Yong-jie¹(1. School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Dept. of Pharmacy, Gansu Provincial Hospital of TCM, Lanzhou 730050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of ampelopsin sodium (AMP-Na) on the proliferation of human bladder cancer cell line EJ. METHODS: Cell line EJ was subcultured *in vitro*. MTT assay was adopted to determine cell viability after the cells were cultured in 25 $\mu\text{g/ml}$, 33 $\mu\text{g/ml}$, 43.5 $\mu\text{g/ml}$, 57.4 $\mu\text{g/ml}$, 75.8 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na for 24 h, 48 h and 72 h, and the inhibition rates were calculated by MTT. After the cells were cultured in 0 $\mu\text{g/ml}$, 43.5 $\mu\text{g/ml}$, 57.4 $\mu\text{g/ml}$ and 75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na and in 2 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin for 24 h, the flow cytometry was applied to determine the cell quantity, and the apoptosis rates and the percentages of cell-cycle distribution were calculated. After the cells were cultured in the above two kinds of culture solution at the above-mentioned concentrations for 24 h and 48 h, the real-time quantitative fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR) technology was used to determine the expression of Cyclin D1 mRNA in the cells. RESULTS: After the cells were cultured in 25 $\mu\text{g/ml}$, 33 $\mu\text{g/ml}$, 43.5 $\mu\text{g/ml}$, 57.4 $\mu\text{g/ml}$, 75.8 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na for 24 h, 48 h and 72 h, AMP-Na showed obvious inhibitory effects on the cells. The effects was obviously time-dependent. After the cells were cultured in 57.4 $\mu\text{g/ml}$, 75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na for 24 h and 48 h, apoptotic peak appeared before G_0/G_1 peak. After the cells were cultured in 75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na for 24 h and in 43.5 $\mu\text{g/ml}$, 75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na for 48 h, the expression of Cyclin D1 mRNA was decreased ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: AMP-Na can effectively inhibit the proliferation of cell line EJ and accelerate its death by a mechanism that may be related to the induction of apoptosis, the reduction of expression of Cyclin D1 mRNA and G_0/G_1 cell cycle arrest.

KEYWORDS Human bladder cancer cell line EJ; Ampelopsin sodium; Flow cytometry; Real-time quantitative fluorescent polymerase chain reaction

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤^[1], 其治疗以卡介苗膀胱腔内灌注最有效, 但副作用太大^[2], 因此, 开发其他治疗方法如调节基因蛋白等, 显得尤为重要。调节细胞周期 $G_0/G_1 \sim S$ 期的异常分布在肿瘤的发生发展中起着重要作用。原癌基因 Cyclin D1 适度适时的表达是细胞周期正常运行的前提, Cyclin D1 蛋白过度表达可能是膀胱癌变的早期事件^[3], 其促进细胞无限制地通过 G_1 期向 S 期转变, 细胞失控性增殖, 使发生突变的基因组 DNA 得不到修复, 突变的积累导致细胞向恶性转化。

二氢杨梅素(3, 5, 7, 3, 4', 5'-六羟基-2, 3-双氢黄酮醇)又名蛇葡萄素(Ampelopsin, AMP), 是一种重要的天然黄酮类单体化合物, 毒性低而来源广泛。AMP 钠(AMP-Na)是

* 主管药师, 硕士研究生。研究方向: 新药药理学。E-mail: djy-217@163.com

兰州大学基础医学院药理教研室为了提高 AMP 的溶解性及稳定性, 而制备的高水溶性钠盐^[4]。

AMP 可抑制小鼠体内黑色素瘤 B16 细胞生长^[5]; 体外试验结果也证实, AMP 对人肝癌 HepG2 细胞、人肺腺癌 GLC-82、SPC-A-1 细胞、人膀胱癌 T24 细胞的增殖均具有明显的抑制作用^[6-8]。兰州大学基础医学院药理教研室体内实验研究发现, AMP-Na iv 给予小鼠后, 在肝、肾、肺、胰腺、膀胱及前列腺组织中分布较多, 且膀胱前列腺组织中药物浓度远高于药物有效浓度且未出现病理改变, 提示 AMP-Na 对治疗膀胱癌具有重要的临床意义。现笔者将 AMP-Na 作用于人膀胱癌 EJ 细胞, 以期得到相应的 AMP-Na 体外试验数据。

1 材料

1.1 仪器

CO₂ 培养箱、ELX800 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek 公

司);Coulter Epics XL 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司);R-G3000 型聚合酶链反应(PCR)扩增仪(上海凯杰生物技术有限公司)。

1.2 药品与试剂

AMP-Na 冻干粉末(批号:121031,规格:180 mg/支,纯度:27.8%)、顺铂(DDP,批号:8030031 DB,规格:10 mg/支)均购自山东齐鲁制药有限公司;RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(兰州荣晔生物科技有限责任公司);MTT(美国 Fluka 公司);十二烷基硫酸钠(SDS,美国 Sigma 公司);RNA 提取液、RNA 逆转录液、cDNA 扩增液、Cyclin D1 试剂盒与引物均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 细胞

EJ 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。

2 方法

2.1 细胞的培养

从液氮罐中取出冻存的 EJ 细胞,立即投入 37 °C 温水中浴中复苏,使细胞冻存液在 1~2 min 内融化。细胞冻存液清洗后,加入 RPMI 1640 完全培养液重悬细胞沉淀至细胞培养瓶中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 细胞抑制率的测定

取对数生长期的 EJ 细胞,用 RPMI 1640 培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于 96 孔培养板中,每孔 90 μl ,移入培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。以 25、33、43.5、57.4、75.8、100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 0.25、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g/ml}$ DDP 分别培养细胞 24、48、72 h,每孔 10 μl 。于试验终止前 4 h 每孔加入 MTT (5 mg/ml) 10 μl ,在 37 °C 继续孵育 4 h,终止培养,每孔加入 10% SDS 100 μl ,37 °C 过夜。次日早晨从培养箱中取出 96 孔培养板,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,于波长 570 nm 处测定光密度以代表细胞活力并计算细胞抑制率。每一质量浓度设 3 孔。

2.3 细胞凋亡率与细胞周期百分比的测定

取对数生长期的 EJ 细胞,制备成单细胞悬液,调整细胞浓度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,每 100 ml 培养瓶加入细胞悬液 9 ml,置培养箱中 24 h 使其贴壁。以 0(阴性对照)、43.5、57.4、75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 2 $\mu\text{g/ml}$ DDP(阳性对照)分别培养细胞 24、48 h,每孔 10 μl 。每一质量浓度设 3 孔。以离心半径 13.5 cm、1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞,弃上清,用冷的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)重复洗 2 遍。细胞沉淀中加入 300 μl PBS(pH 7.4),制成细胞悬液。将 0.7 ml 预冷的无水乙醇沿管壁分多次加入,4 °C 固定 24 h 以上,2 周内测定。测定前将细胞沉淀用冷 PBS 液洗 1 遍,弃上清,加入含有核糖核酸酶(RNase,50 mg/L)的碘化丙啶(PI,50 mg/L)溶液 0.5 ml,室温下避光放置 30 min。用 200 目细胞筛过滤后在流式细胞仪上检测(激发波长 488 nm,发射波长 600 nm),用计算机自带 Multicycle (Phoenix Flow System, San Diego, CA, USA)软件分析,计算细胞凋亡率与细胞周期百分比。

2.4 Cyclin D1 mRNA 表达的测定

细胞初步处理与药物作用同“2.3”项下方法。药物分别作用于细胞 24、48 h 后,Trizol 法提取细胞总 RNA,按照试剂盒说明书提供的步骤进行。采用相对定量反应循环值(c_t)比较

法进行实时荧光定量 PCR(RT-PCR)^[9],以在 PCR 扩增反应的指数期得到扩增反应的 c_t 值来反映起始模板的量,并计算相对量。由于 β -actin 作为管家基因,稳定性好,在任何细胞中表达峰度都是一致的,故选择 β -actin 作为内参基因。本试验采用 c_t 值的相对定量法来分析 RT-PCR 结果,通过 PCR 反应得到目的基因在各给药质量浓度下的 c_t 值,用内参基因 β -actin 对目的基因的表达式进行均一化处理,采用 $2^{-\Delta\Delta c_t}$ 法^[10]进行分析。 $2^{-\Delta\Delta c_t}$ 表示目的基因在药物作用下的表达量相对于没有药物作用(阴性对照)细胞表达量的倍数。阴性对照作为参照物, $\Delta\Delta c_t = 0$,故 $2^0 = 1$ 。根据公式,阴性对照目的基因表达量可视为 1,而给药组对于阴性对照表达量的倍数为 $2^{-\Delta\Delta c_t}$ 。各基因的引物序列见表 1。

表 1 各基因的引物序列

Tab 1 Primer sequences of genes

基因名称	引物类别	序列	引物大小, bp
Cyclin D1	上游引物	5'-CACGGCTCACGCTTACCTCA-3'	187
	下游引物	5'-ACTTGCGCTCACAGGACAG-3'	
β -actin	上游引物	5'-GCAAGCAGGAGTATGACGAGT-3'	112
	下游引物	5'-CTGCGCAAGTTAGGTTTTGTC-3'	

2.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞抑制率的测定结果

以 25、33、43.5、57.4、75.8、100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 0.25、0.5、1、2、4、8 $\mu\text{g/ml}$ DDP 培养细胞 24、48、72 h 后对细胞具有明显的抑制作用,且呈明显的时间依赖关系。细胞抑制率的测定结果见表 2。

表 2 细胞抑制率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Determination results of cell inhibition rates ($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	不同时间点的细胞抑制率, %		
	24 h	48 h	72 h
AMP-Na			
25	-4.30 ± 3.14	5.24 ± 1.65	17.50 ± 4.51
33	7.52 ± 0.71	12.93 ± 3.04	38.98 ± 1.27
43.5	22.14 ± 2.86	41.13 ± 1.27	55.91 ± 1.31
57.4	47.80 ± 1.16	80.49 ± 4.91	83.07 ± 1.39
75.8	65.39 ± 1.16	84.01 ± 1.66	86.87 ± 3.11
100	77.42 ± 2.22	86.29 ± 0.49	91.95 ± 0.49
DDP			
0.25	5.75 ± 0.91	7.59 ± 3.79	13.36 ± 1.51
0.5	9.87 ± 1.05	32.41 ± 3.83	28.38 ± 1.55
1	30.70 ± 1.34	43.53 ± 3.37	44.61 ± 1.58
2	38.49 ± 0.61	55.93 ± 3.22	54.77 ± 2.43
4	48.17 ± 3.53	65.24 ± 2.32	76.05 ± 2.40
8	65.21 ± 1.80	79.69 ± 1.57	89.77 ± 0.59

3.2 细胞凋亡率的测定结果

以 43.5、57.4、75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 2 $\mu\text{g/ml}$ DDP 培养细胞 24、48 h 后,细胞出现明显凋亡,与阴性对照比较,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。细胞凋亡率的测定结果见表 3。

表3 细胞凋亡率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab 3 Determination results of apoptosis rates($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	不同时间点的细胞凋亡率, %	
	24 h	48 h
0(阴性对照)	2.40 \pm 0.98	1.87 \pm 0.38
43.5(AMP-Na)	5.43 \pm 1.61*	7.57 \pm 1.54**
57.4(AMP-Na)	6.70 \pm 0.78**	8.30 \pm 1.41**
75.8(AMP-Na)	9.83 \pm 2.31**	9.43 \pm 1.54**
2(DDP)	6.90 \pm 2.40	7.10 \pm 1.13**

注:与阴性对照比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: vs. negative contral, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.3 细胞周期分布的测定结果

培养细胞 24、48 h 后, 57.4、75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 2 $\mu\text{g/ml}$ DDP 可使细胞阻滞于 G₁ 期, 即在 G₀/G₁ 峰之前出现凋亡峰; 与阴性对照比较, G₀/G₁ 比例升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 且随质量浓度的增加, 阻滞作用逐渐增强。75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 可同时减少 S 期细胞数, 与阴性对照比较, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。43.5(24 h)、57.4(48 h) $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 2 $\mu\text{g/ml}$ DDP 可减少 G₂ 期细胞数, 与阴性对照比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。各周期细胞百分比在 48 h 时变化幅度较 24 h 时更为明显。细胞周期分布的测定结果(作用 24、48 h)见表 4、表 5。

表4 作用 24 h 时细胞周期分布的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab 4 Determination results of cell-cycle distribution after 24 h culture($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	各周期细胞百分比, %		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂
0(阴性对照)	41.87 \pm 1.43	45.33 \pm 7.70	14.77 \pm 1.23
43.5(AMP-Na)	45.37 \pm 6.27	44.73 \pm 8.56	5.10 \pm 1.48*
57.4(AMP-Na)	52.13 \pm 2.45**	41.47 \pm 4.40	6.37 \pm 2.86
75.8(AMP-Na)	62.37 \pm 1.31**	30.97 \pm 2.33**	6.67 \pm 2.72
2(DDP)	48.90 \pm 3.39*	51.10 \pm 3.39	0 \pm 0.00*

注:与阴性对照比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: vs. negative contral, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表5 作用 48 h 时细胞周期分布的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab 5 Determination results of percentages of cell-cycle distribution after 48 h culture($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	各周期细胞百分比, %		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂
0(阴性对照)	42.63 \pm 4.57	43.87 \pm 7.54	14.90 \pm 1.88
43.5(AMP-Na)	43.57 \pm 4.56	50.90 \pm 3.29	7.57 \pm 2.68
57.4(AMP-Na)	62.83 \pm 1.65**	35.87 \pm 2.90	4.30 \pm 1.41*
75.8(AMP-Na)	71.53 \pm 4.02**	19.00 \pm 5.09**	9.43 \pm 1.39
2(DDP)	98.7 \pm 0.85**	1.30 \pm 0.85**	0 \pm 0.00*

注:与阴性对照比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Note: vs. negative contral, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.4 Cyclin D1 mRNA 表达的测定结果

培养细胞 24 h 后, 与阴性对照比较, 75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 与 2 $\mu\text{g/ml}$ DDP 可使 Cyclin D1 mRNA 表达减弱, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。培养细胞 48 h 后, 与阴性对照比较, 43.5、75.8 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na 可使 Cyclin D1 mRNA 表达减弱, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Cyclin D1 mRNA 表达的测定结果见表 6。

4 讨论

表6 Cyclin D1 mRNA 表达的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Tab 6 Determination results of expression of cyclin D1 mRNA($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	不同时间点 Cyclin D1 mRNA 相对表达量($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	
	24 h	48 h
0(阴性对照)	1	1
43.5(AMP-Na)	0.96 \pm 0.04	0.70 \pm 0.08*
57.4(AMP-Na)	0.81 \pm 0.08	0.70 \pm 0.06
75.8(AMP-Na)	0.70 \pm 0.12*	0.66 \pm 0.06*
2(DDP)	0.75 \pm 0.05*	0.67 \pm 0.14

注:与阴性对照比较, * $P<0.05$

Note: vs. negative contral, * $P<0.05$

AMP-Na 能够明显抑制 EJ 细胞增殖, 具有较强的细胞毒活性。本研究结果提示, 其作用机制可能有以下几个方面: (1) 诱导细胞凋亡, 并具有一定的时间-浓度依赖性; (2) 使 Cyclin D1 mRNA 的表达减弱, 从而抑制 G₁ 期向 S 期的转变, 进而抑制肿瘤细胞的增殖; (3) 将细胞周期阻滞于 G₁ 期, 减慢其增殖速度。

笔者选择了 EJ 细胞进行试验, 后期将以 AMP-Na 作用于人膀胱癌 5637、BIU-87 细胞进行后续研究。AMP-Na 对多种细胞的细胞毒活性及其诱导凋亡的机制, 可能还与其他因素影响有关, 如线粒体膜电位的变化、细胞内多基因的调控等, 但其具体机制还需进一步探讨。

参考文献

- [1] 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析[J]. 癌症进展, 2013, 11(1): 90.
- [2] 刘俊江, 李双利, 李守宾. 膀胱癌患者术后不同剂量卡介苗腔内灌注所产生的免疫效果及副作用比较[J]. 中国药房, 2007, 18(5): 360.
- [3] Yang CC, Chu KC, Chen HY, *et al.* Expression of p16 and cyclin D1 in bladder cancer and correlation in cancer progression[J]. *Urol Int*, 2002, 69(3): 190.
- [4] 秦红岩. 高水溶性蛇葡萄素钠盐的制备及其抗肿瘤活性研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2013.
- [5] 刘德育, 罗曼. 血清药理学方法研究蛇葡萄素抗 B16 黑色素瘤的作用[J]. 中药材, 2000, 24(5): 348.
- [6] 王敏, 潘晓婧, 孟冰琦, 等. 蛇葡萄素钠诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡和对 CyclinD1 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(6): 30.
- [7] 徐明丽, 韩伟, 吴勇杰. 蛇葡萄素钠协同卡铂抑制人肺癌 SPC-A-1 细胞增殖[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(8): 890.
- [8] 龙云, 杨泽娟, 耿焱. 蛇葡萄素对人膀胱癌 T24 细胞株凋亡的作用研究[J]. 吉林医学, 2012, 33(22): 4 709.
- [9] 萨姆布鲁克·J, 拉塞尔·DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 518.
- [10] 王行, 王惠民. 实时定量 PCR 技术的方法学分类[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(1): 71.

(收稿日期: 2014-09-08 修回日期: 2014-11-21)

(编辑: 张 静)