

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.25.002

莲心碱对膀胱癌细胞 T24 增殖及其周期的调控*

闫 元¹, 张天禹^{1△}, 谭 宁², 徐 宾¹, 徐伶俐³, 刘晓佳⁴(桂林医学院:1. 附属医院泌尿外科;2. 科学实验中心;3. 附属医院消化内科;
4. 附属医院病理科, 广西桂林 541004)

摘要:目的 通过莲心碱作用于膀胱癌细胞 T24, 研究其对膀胱癌细胞 T24 增殖的影响。方法 使用不同浓度的莲心碱处理膀胱癌细胞 T24, 通过 CCK-8 实验及克隆形成实验, 检测莲心碱对细胞增殖的影响; 对细胞进行 PI 染色后, 使用流式细胞仪, 检测莲心碱对 T24 细胞周期的影响; 通过实时定量 PCR, 检测莲心碱作用后 T24 细胞的 p21 基因 mRNA 的改变。结果 莲心碱对膀胱癌细胞 T24 增殖有明显的抑制作用, 各剂量组(1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0 μg/mL)与甲醇对照组差异有统计学意义($P < 0.05$), 并呈剂量依赖性; 细胞周期检测结果显示, 莲心碱将 T24 细胞阻滞在 S 期; 实时定量 PCR 检测结果显示, 莲心碱提高 T24 细胞 p21 基因的 mRNA。结论 莲心碱对膀胱癌细胞 T24 具有增殖抑制并将其阻滞在 S 期, 该作用机制可能与 p21 表达上调有关。

关键词: 莲心碱; 膀胱肿瘤; 细胞增殖; 细胞周期; p21

中图分类号: R737.14

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)25-3268-04

Regulation of liensinine on T24 bladder cancer cell proliferation and cycle*

Yan Qi¹, Zhang Tianyu^{1△}, Tan Ning², Xu Bing¹, Xu Lingli³, Liu Xiaojia⁴

(1. Department of Urology, Affiliated Hospital; 2. Scientific Experiment Center; 3. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital; 4. Department of Pathology, Affiliated hospital, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract: Objective To study the effect of liensinine on the proliferation of human bladder cancer T24 cells. Methods T24 cells were treated with different concentrations of liensinine. Its influence on the cell proliferation was detected by the CCK-8 experiment and the clonogenic experiment. After staining of T24 cells, the influence of liensinine on the cell cycle was examined by the flow cytometry. The mRNA change of p21 gene was determined by real-time quantitative PCR. Results Compared with the control, liensinine significantly inhibited the proliferation of T24 cells in different doses groups(1.562 5, 3.125 0, 6.250 0, 12.500 0, 25.000 0 μg/mL), the differences had statistical significance and showed the dose-dependence; the cell cycle detection results revealed that liensinine arrested the T24 cells at the S phase; the real-time quantitative PCR detection results showed that liensinine increased mRNA of p21 gene in T24 cells. Conclusion Liensinine inhibits the proliferation of T24 bladder cancer cells and arrests the T24 cells at S phase, its mechanism may be related with the upregulation of p21 expression.

Key words: liensinine; urinary bladder neoplasms; cell proliferation; cell cycle; p21

膀胱癌是发病率仅次于前列腺癌的泌尿生殖道肿瘤, 其中 70%~80% 是浅表性膀胱癌(superficial bladder cancer, SBC)。大多数 SBC 可经尿道肿瘤切除术(transurethral resection, TUR)治愈, 但术后 3~5 年内复发率可高达 60%~90%。目前临床上, 在术后进行膀胱药物灌注, 以化学合成药物为主, 而天然提取药物在膀胱癌术后进行灌注治疗中的应用仍显匮乏。从莲子心提取的莲心碱(liensinine)为一种双苄基四氢异喹啉生物碱, 其分子式为 C₃₇H₄₂N₂O₆。大量体外实验结果表明: 作为双苄基异喹啉类药物粉防己碱和小檗胺能抑制多种肿瘤细胞的增殖^[1-2]。因此, 本研究使用不同浓度莲心碱来研究其对膀胱癌增殖及细胞周期的影响, 为临床抗肿瘤药物的筛选提供依据。

1 材料与方

1.1 材料 人 T24 膀胱癌细胞株购自中国科学院上海生命科学院细胞资源中心; 莲心碱购自上海源叶有限公司, 货号: YY90562, 将莲心碱溶于甲醇, 配成 20 mg/mL 存储液; DMEM

高糖培养液购自 GIBCO 公司, 货号: C11995500BT; 胎牛血清 FBS 购自 Corille 公司, 货号: C1015-05; CCK-8 试剂盒购自上海同仁化学研究所, 货号: CK04; PrimeScript™ RT Master Mix(Perfect Real Time)购自大连宝生物公司, 货号: RR036A; SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 购自宝生物公司, 货号: RR820A; 琼脂糖购自 BIOWEST, 货号: 111760; Trizol 提取盒购自 MRC 公司, 货号: TR118。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 T24 细胞接种于含 10% 胎牛血清的经改良的 DMEM 培养液中, 在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度下培养, 选用对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 细胞增殖实验 取对数生长期的 T24 细胞, 以 0.25% 胰蛋白酶室温消化后, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液配成单细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 1 000 个。待细胞贴壁后加入莲心碱, 使终浓度为 1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0 μg/mL, 每一浓度设 3 个复孔。甲醇对照

组加入等体积的甲醇。实验终止时,吸去含药培养基,在每孔加入 100 μL Cell Counting Kit-8(CCK-8)检测试剂,继续培养 2 h 后,置光栅型连续波长酶标仪(infinite M200 PRO 仪器),读取各孔在 450 nm 波长处吸光值,所有结果重复 3 次,分别记录加药后 2 h 及第 1、3 天数并计算细胞抑制率。细胞抑制率(%)=(甲醇对照组 OD450 值-莲心碱组 OD450 值)/甲醇对照组 OD450 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 克隆形成实验 取对数生长期细胞用胰蛋白酶消化,以 1 200 个/孔细胞接种于 6 孔培养板中。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育箱中培养,待细胞 24 h 贴壁后加入工作液,使莲心碱终浓度为 1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,继续培养 7 d。终止实验后弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次,加 4% 多聚甲醛固定 15 min,弃去固定液,加入结晶紫染色液染色 15 min,洗去染色液,空气干燥,拍摄图像。然后加入 10% 的冰醋酸 2 mL,静置 30 min,待结晶紫溶解后,取 100 μL 于 96 孔板中,使用光栅型连续波长酶标仪(infinite M200 PRO 仪器),记录各孔在 560 nm 波长处吸光值并计算克隆抑制率,所有结果重复 3 次。克隆抑制率(%)=(甲醇对照组 OD560 值-莲心碱组 OD560 值)/甲醇对照组 OD560 值 $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞周期检测 取 T24 以 2×10^5 个/皿接种至 6 cm 培养皿后加入莲心碱溶液,具体步骤见 1.2.3 部分。继续培养 48 h 后收集细胞,采用 75% 冰冻无水乙醇固定,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。检测前用 PBS 洗去固定液,每管加入 500 μL 染液(PI 终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,RNaseA 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。染色后以 300 目筛网过滤,用流式细胞仪(BD FACS Aria III)检测,数据采用 Multicycle DNA 软件进行测定与分析。

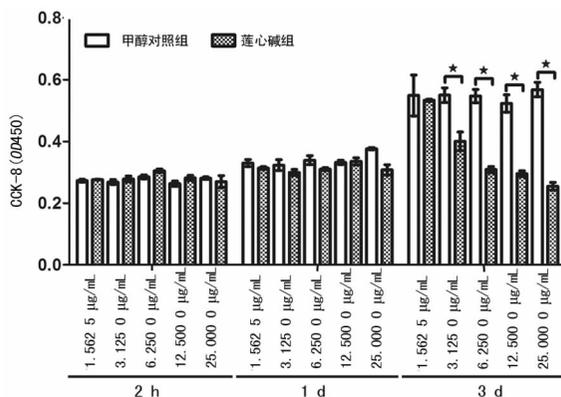
1.2.5 实时定量 PCR 实验 取 T24 以 2×10^5 个/皿接种至 6 cm 培养皿后加入莲心碱溶液,具体步骤见 1.2.3 部分。继续培养 48 h 后,使用 Trizol 提取细胞总 RNA。反转录成 cDNA 后,按 SYBR Premix Ex TaqTM II 说明书进行实时荧光定量 PCR 检测,内参照为 β -actin。引物如下,p21:5'-TGT CTT GTA CCC TTG TGC CTC GCT CA -3'(上游),5'-AGG GCT TCC TCT TGG AGA AGA TCA GC -3'(下游);p27:5'-CTC TGA GGA CAC GCA TTT GGT GGA -3'(上游),5'-GGC ATT TGG GGA ACC GTC TGA AAC -3'(下游); β -actin-160:5'-AAG TGT GAC GTG GAC ATC CGC AAA G -3'(上游),5'-ACT TGC GCT CAG GAG GAG CAA TGA T -3'(下游)。采用美国 ABI 7500Fast 实时荧光定量 PCR 仪进行检测,反应条件:55 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40 个循环。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。2 d 后分别提取莲心碱组及甲醇对照组 mRNA,使用实时定量 PCR 检测 p21、p27 mRNA 表达水平并将 β -action mRNA 表达水平设置成对照组。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组不同时间 T24 细胞的细胞增殖比较 在加入莲心碱后 3 d 时,可发现莲心碱对 T24 细胞增殖的抑制作用随着莲心碱浓度的增加而明显。分别用 1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的莲心碱干预后,T24 细胞抑制率

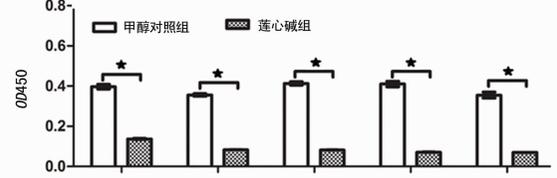
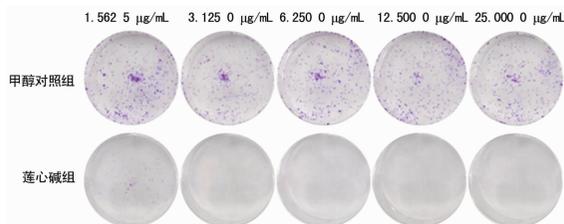
分别为(-0.5 \pm 24.5)%、(26.51 \pm 14.28)%、(43.26 \pm 5.00)%、(42.93 \pm 8.51)%、(55.11 \pm 3.01)%。1.562 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莲心碱组与同浓度甲醇对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 莲心碱组相对于甲醇对照组表现出明显差异,有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



*: $P < 0.05$.

图 1 两组不同时间 T24 细胞的细胞增殖比较

2.2 两组 T24 细胞克隆形成比较 结果显示:(1)不同浓度的甲醇对照组的细胞克隆计数肉眼观和吸光度值上差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)莲心碱组相对于甲醇对照组有差异,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。(3)T24 细胞克隆抑制率随着莲心碱浓度增高而增高。1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的莲心碱干预 T24 细胞 7 d 后,克隆抑制率分别为(65.46 \pm 0.68)%、(76.65 \pm 0.85)%、(80.21 \pm 0.67)%、(82.62 \pm 1.02)%、(80.31 \pm 1.81)% ,见图 2。



*: $P < 0.05$.

图 2 两组 T24 细胞克隆形成比较

2.3 两组 T24 细胞周期检测 结果显示,甲醇对照组与莲心碱组组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。T24 细胞在 1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的莲心碱干预后,其 S 期细胞群明显增加,占有比例为(23.11 \pm 0.57)%、(24.91 \pm 1.10)%、(32.10 \pm 5.18)%、(53.09 \pm 3.91)%、(55.97 \pm 0.45)% ,呈剂量依赖性,见图 3。

2.4 两组 T24 细胞的 p21、p27 基因 mRNA 水平比较 与甲醇对照组相比,莲心碱组 p21 基因的 mRNA 随着药物浓度升高而明显上调,并明显高于甲醇对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),而 p27 基因的 mRNA 未见明显差异,见图 4。

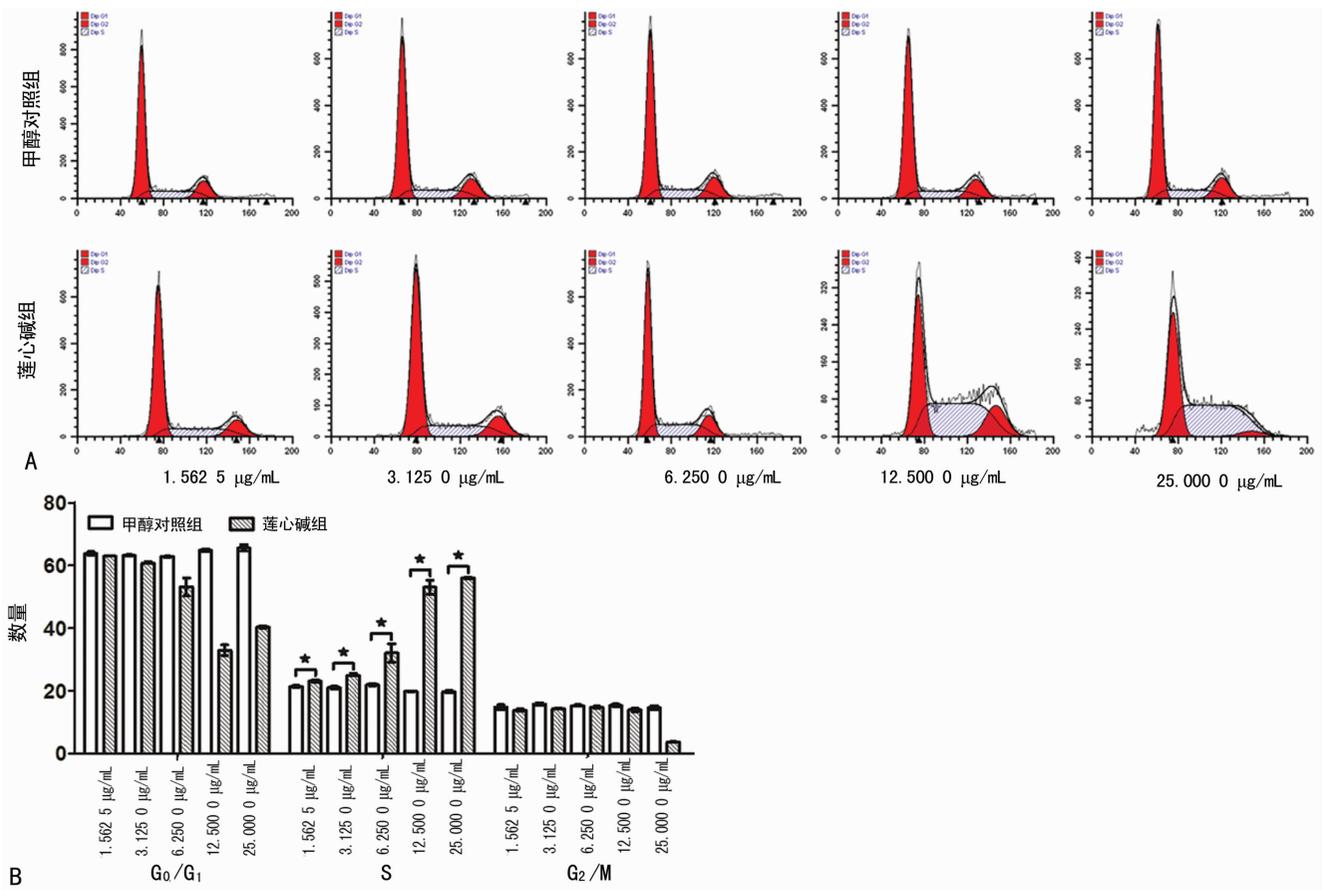
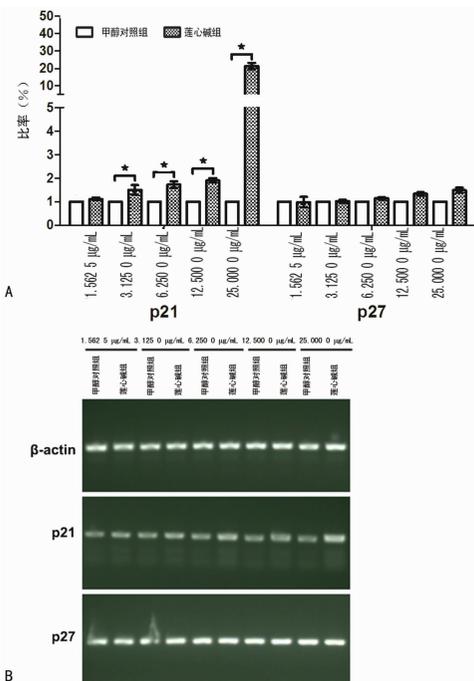


图 3 两组 T24 细胞周期检测

A: 各组细胞 G₁、G₂、G₃ 细胞群分布, G₁ 和 G₂ 期细胞由红色部分表示, S 期群细胞由黑白条代表; B: 细胞 G₁、G₂ 和 S 细胞群的比例分布图; *: P < 0.05。



A: 各组 p21、p27 基因比率; B: 各组 p21、p27、β-actin PCR 测定; *: P < 0.05。

图 4 两组 T24 的 p21、p27 mRNA 水平比较

3 讨论

膀胱癌是常见的泌尿系肿瘤,其发病率仅次于前列腺癌的泌尿生殖道肿瘤。早期膀胱癌术后膀胱癌的复发率高(50%~

70%),且复发肿瘤恶性及侵袭性提高,因此寻找新天然药物及其提取物为癌症的治疗提供了新的思路。苄基异喹啉类生物碱(benzylisoquinoline alkaloids, BA)在自然界来源广泛其显著的细胞毒性早在 20 世纪 60 年代就引起了研发者的关注。粉防己碱(Tet)、小檗胺(Ber)等和莲心碱(Lie)一样是双苄基异喹啉中具有代表性的抗肿瘤化合物。有文献报道:Tet 在体外对肝癌细胞具有抗增殖作用并将其阻滞在 G₂/M 期, Tet 和顺铂相比作用剂量小,药效好等特点^[1]。Ber 可以将细胞周期阻滞在 M/G₁ 和 S/G₂ 期,进而抑制肝癌和人结肠癌细胞增殖^[2-3]。同时,有研究表明:甲基莲心碱通过激活 p38 MAPK 信号通路、Phospho-p21(Ser130)而延长 p21 蛋白半衰期来提高 p21 蛋白浓度从而使细胞周期 G₁ 期停滞,抑制成骨肉瘤细胞的生长^[4]。本次实验结果显示:莲心碱对 T24 细胞的增殖具有抑制作用,呈剂量依赖性;而细胞周期检测结果显示膀胱癌细胞 T24 经莲心碱干预后,细胞周期阻滞在 S 期。

细胞周期也可以称为细胞增殖的过程,它是指细胞先将承载遗传信息的 DNA 双倍复制,后通过有丝分裂的方式将遗传信息分配到子代细胞中。当细胞周期发生异常改变时,细胞不协调地增生,遗传物质变异的细胞就不能凋亡,就可能出现新生肿瘤。细胞周期受到周期蛋白依赖激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKI)的调节,其在体外通过与 CDKs、cyclins 或 cyclin-CDKs 复合物的结合达到抑制 CDK 催化外源性底物的活性,进而调控细胞周期进程。CDKI 主要包含两个家族:CIP 家族和 INK4 家族,CIP 家族包括 p27 及 p21 基因^[5]。

p21WAF1/CIP1 基因定位于人染色体 6p21.2, 其 DNA 长度 85 kb。p21 基因的表达产物 p21 蛋白定位于细胞核中, 其 N 末端能与细胞周期素 D、E(cyclinD、cyclinE) 结合, C 末端能与增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 结合, 中间第 49~72 氨基酸与细胞周期依赖性蛋白激酶 2(cyclin dependent kinase2, CDK2) 结合。当细胞 DNA 损伤时, p53 会启动 p21 的表达, p21 抑制 cyclinE-CDK2 活性, 使 RB 低磷酸化, 细胞不能进入 S 期, 停滞于 G₁ 期, 使细胞生长停止。也有学者提出不同的见解: p21 蛋白作用的机制会随着 DNA 损伤发生的时期不同而不同; 如果 DNA 的损伤发生在 S 期之前, p21 蛋白主要通过 CDK/cyclin 结合并抑制其功能使细胞周期停滞于 G₁ 期; 如果 DNA 的损伤发生在 S 期, p21 蛋白主要是通过 PCNA 的结合来抑制 DNA 的合成^[6]。有文献报道: 肝癌在细胞奥沙利铂作用后, p53 和 p21 表达水平同时上升, 细胞被阻滞在 S 期^[7]。p21 表达水平提高与 cyclinA、cyclinE、Cdk2 的表达水平下降可能导致结肠癌细胞的 S 期阻滞^[8]。此外, 2004 年 Radhakrishnan 等^[9]发现, p21 蛋白能提高 E2F-1(调节细胞周期最重要的转录因子) 活性, 进而细胞阻滞在 S 期。本次试验结果显示: 在莲心碱作用下膀胱癌细胞 T24 后 p21 mRNA 表达水平有明显改变 ($P < 0.05$)。

p27 基因定位于人染色体 12p13, 包含两个外显子和内含子。p27 蛋白 N 末端有两个 Ser 磷酸化位点, 具有 CDK 激酶抑制活性。153~169 处的 17 个氨基酸残基为 p21 家族成员共有, 与细胞周期调控密切相关。p27 的 C 末端有一个 Thr 磷酸化位点, 与 H1 组蛋白磷酸化抑制作用有关, 可参与底物的反馈调节。p27 在不同细胞周期中均参与调控: G₁ 期与 cyclinD-CDK4 结合, G₁ 后期与 cyclinE-CDK2 结合, 抑制其活性。其 C 末端抑制 CDK2-Thr160 磷酸化作用, 而抑制 CDK2 激酶的活性。而 p27 的过表达可抑制有丝分裂原刺激的 CDK2 和 PCNA 表达升高^[10]。有文献报道: 磷酸化的 p27 可与 CDK2/cyclin E 或磷酸化的 CDK2/cyclin E 结合形成 CDK2/cyclinE/p27 复合物, 该复合物丧失酶动力活性^[11]。而 cyclin E/Cdk2 磷酸化也是保证 S 期顺利进展的必要步骤。Li 等^[12]发现 cyclin E 和 CDK2 表达下调和 p27 kip1 表达上调, 可能激活 p27kip1/cyclin D1/E-CDK2 通路, 导致肝癌细胞 S 期细胞周期阻滞。此外, 也有文献指出: p21(waf1/cip1) 和 p27(kip1) 共同参与了 cyclinA、cyclin E 和 CDK-2 表达的下调, 导致细胞 S 期阻滞^[13]。本次试验显示: 在莲心碱作用下膀胱癌细胞 T24 后 p27 mRNA 表达水平未有明显改变。

本次实验明确了莲心碱对膀胱癌 T24 细胞增殖的抑制作用和细胞周期 S 期阻滞, 初步探讨了其作用机制可能与 p21 的 mRNA 上调有关, 但其具体作用机制尚待进一步研究。

参考文献:

[1] Ng LT, Chiang LC, Lin YT, et al. Antiproliferative and apoptotic effects of tetrandrine on different human hepa-

toma cell lines[J]. *Am J Chin Med*, 2006, 34(1):125-135.

[2] Wang L, Cao H, Lu N, et al. Berberine inhibits proliferation and down-regulates epidermal growth factor receptor through activation of Cbl in colon tumor cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56666.

[3] Yip NK, Ho WS. Berberine induces apoptosis via the mitochondrial pathway in liver cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(3):1107-1112.

[4] Zhang X, Liu Z, Xu B, et al. Neferine, an alkaloid ingredient in lotus seed embryo, inhibits proliferation of human osteosarcoma cells by promoting p38 MAPK-mediated p21 stabilization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 677(1/3):47-54.

[5] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(6):400-414.

[6] 杨安强, 郑兴征, 潘晓琳, 等. 细胞周期调控基因 p21WAF1/CIP1 与肿瘤的关系[J]. *现代肿瘤医学*, 2006, 14(2):243-245.

[7] 高洁, 汪蕊, 杨清玲, 等. 奥沙利铂对肝癌细胞 HepG2 细胞周期的影响[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2013, 42(4):437-442, 460.

[8] Lee YS, Choi KM, Kim W, et al. Hinokitiol inhibits cell growth through induction of S-phase arrest and apoptosis in human colon cancer cells and suppresses tumor growth in a mouse xenograft experiment[J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(12):2195-2202.

[9] Radhakrishnan SK, Feliciano CS, Najmabadi F, et al. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle[J]. *Oncogene*, 2004, 23(23):4173-4176.

[10] 冉肇力, 何国祥, 王耿, 等. 腺病毒介导 p27 基因转染对离体血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *重庆医学*, 2008, 37(4):396-398.

[11] Xu X, Nakano T, Wick S, et al. Mechanism of Cdk2/cyclin E inhibition by p27 and p27 phosphorylation[J]. *Biochemistry*, 1999, 38(27):8713-8722.

[12] Li YG, Ji DF, Zhong S, et al. Polysaccharide from *Phellinus linteus* induces S-phase arrest in HepG2 cells by decreasing calreticulin expression and activating the P27kip1-cyclin A/D1/E-CDK2 pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 150(1):187-195.

[13] Yadav V, Sultana S, Yadav J, et al. Gatifloxacin induces S and G2-phase cell cycle arrest in pancreatic Cancer cells via p21/p27/p53[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47796.

(收稿日期:2014-04-03 修回日期:2014-06-16)

(上接第 3267 页)

[12] 李谋多, 乔翠霞, 曾科, 等. 103 例慢性乙型肝炎病毒携带者中医证候调查[J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(2):248-250.

[13] 毛桂红, 施维群, 张磊. 慢性乙型肝炎病毒携带者的中医药治疗现状及展望[J]. *江西中医药*, 2010, 41(6):76-78.

[14] 贺松其. 慢性乙型肝炎辨治探析[J]. *山东中医杂志*,

2003, 22(3):131-132.

[15] 吴淑琼, 张振鄂, 朱毅. 肝纤维化指标与中医辨证分型的关系[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2000, 10(2):48-49.

(收稿日期:2014-04-26 修回日期:2014-06-02)