论著

文章编号:1000-5404(2008)19-1824-04

藏花素促膀胱移行细胞癌T24细胞凋亡的研究

赵 培,罗春丽,胡宏波,吕纯芳,冀慧莹 (重庆医科大学医学检验系,临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室,重庆市重点实验室,重庆 400016)

摘 要:目的 研究藏花素诱导膀胱移行细胞癌T24细胞凋亡的作用及分子机制。**方法** 通过MTT比色法分析藏花素对T24细胞增殖的影响;应用光镜观察细胞形态学的改变;Annexin V-FITC/PI荧光双标流式细胞术检测T24细胞周期动力学和凋亡诱导率的影响,RT-PCR和Western blot检测凋亡相关基因Bcl-2、Bax的表达变化。**结果** 藏花素能明显抑制T24细胞的增殖,并可导致其形态学的改变;随藏花素作用时间的延长,G_0/G_1期细胞比例逐渐增加,S期和G_2/M期细胞比例逐渐减少,早期凋亡细胞逐渐增多,同时可以上调Bax和下调Bcl-2的基因表达水平。**结论** 藏花素可明显抑制T24细胞的生长,诱导肿瘤细胞凋亡,可能与Bcl-2和Bax等凋亡调控基因有关。

关键词: 藏花素;膀胱移行细胞癌T24细胞;细胞凋亡;Bcl-2;Bax

中图法分类号: R285.5; R73-354; R737.14 **文献标识码:** A

Crocin induces apoptosis of bladder transitional cell carcinoma cell line T24

ZHAO Pei, LUO Chun-li, HU Hong-bo, LU Chun-fang, JI Hui-ying (Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the apoptosis-induced mechanism of crocin on bladder transitional cell carcinoma cell line T24. Methods MTT assay was used to evaluate the inhibitory effect of crocin on the growth of T24 cells. Microscope was used to observe the morphological changes. The changes of cell cycle were measured by flow cytometry. Annexin V-FITC/PI double labeling flow cytometry was used to determine the cell apoptotic percentage. RT-PCR and Western blot were used to detect Bcl-2 and Bax expressions. Results The growth of T24 cells was inhibited remarkably in a dose-dependent and time-dependent manner. Distinct morphological changes of cell apoptosis were observed. Flow cytometric profiles revealed that crocin led to increase of the cells in G_0/G_1 phase and decrease of the cells in S phase, and the percentage of cell apoptosis was also increased. The mRNA and protein expressions of Bax increased and those of bcl-2 decreased. Conclusion Crocin exerts a fine inhibitory effect on the growth of human bladder transitional cell carcinoma cell line T24, maybe due to the apoptosis regulated by Bcl-2 and Bax pathway.

Key words: crocin; transitional cell carcinoma of bladder; apoptosis; Bcl-2; Bax

藏花素(crocin)是中药材藏红花(crocus sativus L, saffron)的化学成分之一,是一种水溶性类胡萝卜素。近年来研究表明,藏花素具有广谱抗癌活性,对白血病、卵巢癌、结肠癌、横纹肌肉瘤和软组织肉瘤等都具有较强的抑制作用,而对正常细胞几乎无毒性[1],因此被认为是一种很有应用前景的抗肿瘤药物。本研究旨在探讨藏花素诱导膀胱移行细胞癌T24细胞的凋亡作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品 藏花素购自美国Sigma公司。1 g藏花素溶于20 ml PBS(0.01 mol/L,pH 7.2)中,并加入62.5 mg EDTA配成50 mmol/L的贮存液,4℃保存。临用时用PBS稀释为适当浓度的工作液。

基金项目:重庆市自然科学基金(CSCT 2005BB5309)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5309)

作者简介:赵 培,女,河北省石家庄人,硕士研究生,主要从事膀胱癌基因诊断和治疗方面的研究。电话:(023)68485223

通信作者:罗春丽,电话:(023)68485223, E-mail:luochunli79@126.com

收稿日期:2007-09-17;修回日期:2007-10-18

1.1.2　细胞株与培养　　膀胱移行细胞癌 T24 细胞(以下简称 T24 细胞)购自重庆医科大学病毒性肝炎研究所。培养于体积分数为 0.1 的 FCS、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 PBMI1640 培养基中,37℃、5% CO_2 条件下培养,接种 48 h 进入对数生长期,待细胞长至瓶底 80% ~90% 时,用质量分数为 0.25% 的胰酶将贴壁生长的细胞用直接吹打法传代。

1.2　方法

1.2.1　藏花素对 T24 细胞增殖作用影响　　取对数生长期 T24 细胞,以 2×10^4/ml 的密度接种于 96 孔培养板中。37℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养 24 h 后,分别给予 1、2、3、4、5 mmol/L 浓度藏花素处理,设 5 个复孔。另设对照(未加藏花素)和空白(加培养液)。全自动酶标仪(波长 570 nm)测定各孔吸光度值(A 值),计算细胞生长抑制率。

抑制率(%) = [($A_{对照}$ − $A_{空白}$) − ($A_{处理}$ − $A_{空白}$)] / ($A_{对照}$ − $A_{空白}$) ×100%

1.2.2　藏花素对 T24 细胞形态学的影响　　取对数生长期 T24 细胞,调整细胞浓度为 1×10^5/ml,将 2 cm×2 cm 大小盖玻片置于 6 孔板中,每孔加入 2 ml 细胞悬液,制成细胞爬片,37℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养 24 h 后,加藏花素使终浓度为 3 mmol/L,同时设对照组。爬片干燥后直接倒置显微镜观察或吉姆萨(Giemsa)染色后观察。

1.2.3　藏花素对 T24 细胞周期变化的影响　　将终浓度为 3 mmol/L的藏花素处理 T24 细胞在 0、6、12、24、36、48 h 后,收集细胞(1 ~5) $\times10^5$ 个,1 000 r/min 离心 5 min,弃培养液。乙醇固定,用 1 ml PI 染液 4℃避光染色 30 min,流式细胞仪检测。

1.2.4　Annexin V-FITC/PI 荧光双标流式细胞术检测藏花素对 T24 的诱导凋亡作用　将终浓度为 3 mmol/L的藏花素处理 T24 细胞在 0、6、12、24、36、48 h 后,收集细胞(1 ~5) $\times10^5$ 个。用 Annexin V-FITC/PI 荧光双染试剂盒检测。

1.2.5　RT-PCR 检测藏花素对 T24 细胞 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响　　将终浓度为 3 mmol/L 的藏花素作用 T24 细胞 12、24、48 h 后,收集细胞 10^6 个,用 Trizol 提取总 RNA,AMV 逆转录酶转录为 cDNA, *Taq* 酶进行 PCR 反应,凝胶成像仪拍照并分析。引物序列及主要反应参数为:Bcl-2 正义:5′-GACCTAGTACCCACTGAGATT-3′,反义:5′-CCAGACATTCGGAGACCA-3′,目的片段 447 bp。Bax 正义:5′-TTTTGCTTCAGGGTTTCATC-3′,反义:5′-GACACTCGCTCAGCTTCTTG-3′,目的片段 114 bp。β-actin 正义:5′-GTGGACATCCGCAAAGAC-3′,反义:5′-AAAGGGTGTAACGCAACTAA-3′,目的片段 302 bp。

1.2.6　Western blot 检测细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达　　终浓度为 3 mmol/L 的藏花素作用 T24 细胞 12、24、48 h 后,细胞裂解液提取胞浆蛋白,Bradford 法测定含量后,取等质量的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分离,半干法转膜(220 mA 2 h)后封闭 1 h,然后加入兔抗人 Bcl-2、Bax、内参 β-actin 一抗(1∶200)溶液 37℃振摇孵育 2 h,PBST 洗膜后,再与 HRP-山羊抗兔 IgG(1∶1 000)溶液 37℃振摇孵育 1 h。DAB 显色,自来水冲洗并照相。

1.3　统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件对实验资料进行进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　MTT 法检测藏花素对 T24 细胞的生长抑制作用

生长抑制曲线显示各浓度藏花素对 T24 细胞生长均有抑制作用,各浓度组与对照组相比均具有显著性差异($P<0.05$),并呈时间和剂量依赖性(图 1)。当药物浓度在 1 ~3 mmol/L 时,对 T24 细胞抑制作用随浓度升高而增加,其差异具有显著性($P<0.05$)。继续提高或降低药物浓度其抑制率改变不明显($P>0.05$)。同一浓度组对 T24 细胞的抑制作用在 48 h 内随作用时间的延长而增加($P<0.05$),再延长作用时间其抑制率变化不明显($P>0.05$)。根据药物作用 48 h 的抑制率,由 SPSS 10.0 软件里的 probit 变换求出半数抑制浓度(IC_{50})为 2.30 mmol/L。

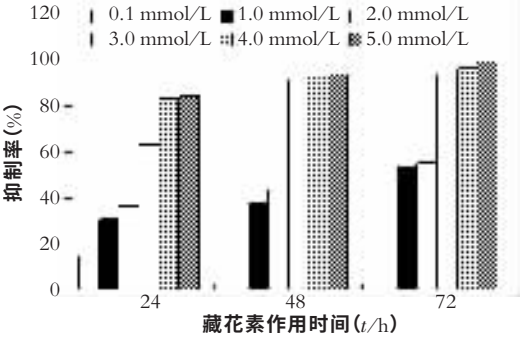
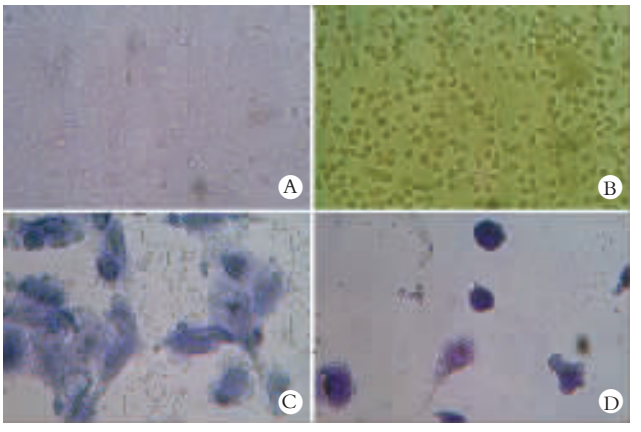


图 1　藏花素作用于 T24 细胞时间依赖性和剂量依赖性

2.2　藏花素对 T24 细胞形态的影响

光镜下观察到对照组未加药处理的 T24 细胞呈梭形贴壁生长(图 2A),Giemsa 染色可见 T24 细胞轮廓清晰、细胞质丰富、细胞核深染(图 2C);而实验组 3mmol/LCrocin 处理 48h 后的 T24 细胞皱缩变圆(图 2B),并随培养时间的延长逐渐脱落死亡,Giemsa 染色可见 T24 细胞变圆、细胞质减少、细胞核不清,部分细胞细胞质有泡状突起(图 2D)。



A:未处理 T24(倒置显微镜×100);B:加 3mmol/L 藏花素处理后 T24 细胞(倒置显微镜×100);C:未处理 T24 细胞(Giemsa 染色×400);D:3mmol/L 藏花素处理后 T24 细胞(Giemsa 染色×400)

图 2　3 mmol/L 藏花素处理组和对照组 T24 细胞形态变化

2.3 藏花素对T24细胞细胞周期分布的影响

流式细胞检测发现藏花素对T24细胞周期的影响存在时间依赖性。随作用时间的延长，G_0/G_1期细胞比例逐渐增加，S期和G_2/M期细胞比例逐渐减少(表1)，并在48 h出现了明显的亚二倍体峰(sub-G_1峰)。

表1 3 mmol/L藏花素处理不同作用时间对T24细胞周期分布的影响(%)

作用时间(h)	G_0/G_1	S	G_2/M
0	61.02±5.90	28.02±4.20	10.96±2.80
12	68.94±6.20	22.10±4.10	8.96±1.90
24	78.20±6.54[a]	14.39±3.98[a]	7.42±1.78[a]
36	84.43±6.72[a]	10.26±3.84[a]	5.30±1.67[a]
48	86.26±6.89[a]	9.80±3.27	3.94±1.20[a]

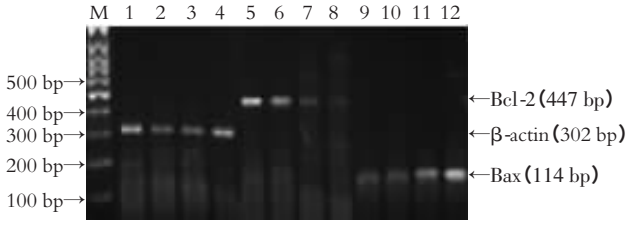
a:$P<0.05$,与对照组(0 h)相比

2.4 藏花素诱导T24细胞凋亡

Annexin V-FITC/PI荧光双标流式细胞术检测发现:藏花素处理后0、6、12、24、36、48 h后,初期凋亡的细胞(AnnexinV+/PI-)所占百分比分别为3.74%、3.63%、7%、13.26%、14%、19.21%,可见T24细胞的凋亡率随时间延长而逐渐增加。

2.5 RT-PCR检测藏花素对T24细胞Bcl-2、Bax mRNA表达的影响

3 mmol/L的藏花素作用于T24细胞0、12、24、48 h后,Bcl-2的mRNA表达下降,而Bax的mRNA表达上调(图3)。将电泳条带用Quantity One 4.4.0软件分析后得出Bcl-2/Bax平均OD值的比值,0、12、24、48 h的比值分别为(1.16±0.14)、(1.13±0.10)、(0.77±0.10)和(0.53±0.12),发现Bcl-2/Bax的OD比值呈降低趋势。24 h和48h处理组与对照组的差异具有显著性($P<0.05$)。

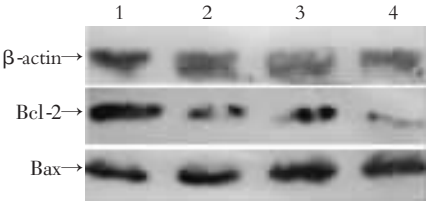


M:DNA标准;1-4:对照、12、24、48 h处理组β-actin表达;5-8:对照、12、24、48 h处理组Bcl-2表达;9-12:对照、12、24、48 h处理组Bax表达

图3 对照组与3 mmol/L藏花素不同时间处理后Bcl-2、Bax电泳图

2.6 藏花素对T24细胞Bcl-2和Bax蛋白表达的影响

Western blot检测细胞3 mmol/L的藏花素处理T24细胞0、12、24、48 h后,Bcl-2、Bax蛋白表达(图4)。结果显示:不同时间藏花素处理组Bcl-2蛋白表达均下降,而Bax蛋白表达上调。用Quantity One 4.4.0软件对Western blot成像图谱进行分析得到各处理组蛋白显色后平均光密度值,Bcl-2/Bax蛋白表达光密度比值,在0、12、24、48 h的比值分别为(1.35±0.14)、(1.22±0.13)、(0.93±0.10)、(0.15±0.06),呈降低趋势,24、48 h处理组与对照组的差异具有显著性($P<0.05$)



1:对照;2:12 h;3:24 h;4:48 h

图4 Western blot分析藏花素不同时间处理后Bcl-2、Bax蛋白表达

3 讨论

膀胱肿瘤是常见的泌尿系恶性肿瘤之一,其中以膀胱移行上皮细胞癌(transitional cell carcinoma of the bladder,TCCB)最为常见。目前国内外主要采用肿瘤手术切除结合膀胱内化学药物灌注进行治疗,然而化疗药物缺乏靶向性,毒副作用大,易出现不同程度的多药耐药。因此,寻找高效无毒的天然药物,并揭示其抗癌机制成为近年来研究的热点。

藏花素有抗心肌缺血、调节血脂、抗动脉粥样硬化等广泛的药理作用[2]。Garcia-Olmo等[3]发现接受Crocin治疗的结肠腺癌雌性小鼠存活期延长而且肿瘤生长缓慢,且无其他毒副作用。Escribano等[4]研究发现,用Crocin处理过的Hela细胞出现溶胀和胞浆膜破裂,核固缩,促进细胞凋亡。本研究结果表明藏花素对T24细胞有明显的抑制作用,有时间依赖性和剂量依赖性;藏花素作用后细胞核固缩,细胞变圆坏死,有力的证明了藏花素对T24细胞的杀伤作用。细胞周期变化显示:藏花素可使得G_0/G_1期细胞比例逐渐增加,S期和G_2/M期细胞比例逐渐减少,呈明显的G_0/G_1期阻滞现象,提示其可以使处于分裂期的细胞数减少,从而抑制肿瘤细胞的生长。Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术结果显示凋亡率随藏花素作用时间的延长而逐渐增加,48 h时的凋亡率达19.21%,提示藏花素可能通过诱导T24细胞凋亡来抑制肿瘤生长,有望成为抗膀胱肿瘤的高效无毒的天然药物。

目前临床应用的大多数抗肿瘤药物具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。肿瘤的发生、发展不仅与肿瘤细胞分化异常、细胞增殖过度有关,还与细胞凋亡减少有关。若增殖与凋亡二者之间动态平衡失调,则可导致肿瘤发生。为进一步探讨藏花素诱导T24细胞凋亡的机制,我们采用RT-PCR和Western blot方法检测了与凋亡关系密切的Bcl-2、Bax。有研究报道凋亡的分子机制可能是下调了Bcl-2和上调了Bax的表达[5]。

Bcl-2 和 Bax 均是 Bcl-2 家族成员[6],具有 21% 的同源结构域,但对凋亡的调节作用相反。Bcl-2 是特异性抑制细胞凋亡的基因,Bax 的生物学作用是拮抗 Bcl-2,促进细胞凋亡。Bcl-2 与 Bax 表达水平的高低与直接调控凋亡有关。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。因此 Bcl-2 与 Bax 的比例在凋亡调节过程中起关键作用[7]。本实验结果显示经藏花素处理后,T24 细胞中 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达减少,而 Bax 的表达增加,Bcl-2/Bax 表达的比例相应减少,因此推测可能是 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,使得细胞向凋亡的方向发展。

由此我们推测,藏花素可能通过调控 Bcl-2、Bax 的表达来诱导 T24 细胞凋亡,从而抑制肿瘤的生长。

参考文献:

[1] Abdullaev-Jafarova F, Caballero-Ortega H, Riveron-Negrete L, *et al*. *In vitro* evaluation of the chemopreventive potential of saffron[J]. Rev Invest Clin, 2002, 54(5): 430 - 436.

[2] He S Y, Qian Z Y, Tang F T, *et al*. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms[J]. Life Sci, 2005, 77(8): 907 - 921.

[3] Garcia-Olmo D C, Riese H H, Escribano J, *et al*. Effects of long-term treatment of colon adenocarcinoma with crocin, a carotenoid from saffron (Crocus sativus L.): an experimental study in the rat[J]. Nutr Cancer, 1999, 35(2):120 - 126.

[4] Escribano J, Alonso G L, Coca-Prados M, *et al*. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (Crocus sativus L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro[J]. Cancer Lett, 1996, 100(1 - 2): 23 - 30.

[5] Campbell K L, McTiernan A, Li S S, *et al*. Effect of a 12-month exercise intervention on the apoptotic regulating proteins Bax and Bcl-2 in colon crypts: a randomized controlled trial[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007,16(9):1767 - 1774.

[6] Faucher K, Rabinovitch-Chable H, Cook-Moreau J, *et al*. Overexpression of human GPX1 modifies Bax to Bcl-2 apoptotic ratio in human endothelial cells[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 277(1 - 2):81 - 87.

[7] Hou Q, Cymbalyuk E, Hsu S C, *et al*. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: roles in cytochrome C release and Bax regulation[J]. Apoptosis, 2003, 8(6):617 - 629.

(编辑　龙　亮)

(上接 1817 页)

本病好发于一侧的四肢长骨,下肢骨与上肢骨的受累比例为 3∶1,颅骨、脊柱及肋骨受累少见,偶有侵犯椎体、手部和足部的报道[1-3]。此类患者就诊年龄多在成年后,但追问病史大多在 20 岁以前。半数以上的患者有肢体钝痛,劳累后加重。年龄越大,疼痛越明显。患肢关节活动受限多是由于关节周围骨质增生及软组织内骨沉积所致。皮肤和皮下组织可被累及,形成纤维化,造成关节挛缩,影响关节功能,有的甚至造成肢体不等长[3,4]。部分患者会出现肢体的弯曲畸形。过分的异常骨质增生可压迫神经、血管而引起神经疼痛或淤血、水肿。

本病的 X 线平片表现具有明显的特征[1-6]:①长骨改变:在受累骨干骨质增生区表现出骨堆积,其边缘凹凸不平或呈波浪状,骨增生堆积酷似蜡烛上的溶蜡下淌,自上而下,跳跃关节间隙,累及另一骨干,由髋臼直达足趾尖。增生的骨质密度很高,呈无结构的象牙样致密影,看不到骨纹理。②短、扁骨多以内膜性增生为主要表现。③骨关节及其周围软组织改变。病变虽然累及整个肢体骨骼,即使关节两端相对应的骨性关节面发生填充样骨质增生堆积,关节间隙仍正常,关节面仍保持光滑、清晰。

CT 对本病的诊断无重要帮助。放射性核素骨扫描可通过显示放射性药物的异常摄取,确定其他部位的受累骨。MRI 所有序列均显示受累区域为低信号强度,在判断软组织受累情况时有重要作用,特别是拟定手术的患者[1,3]。本病的临床表现多无特异性,蜡泪样骨病的诊断主要依据 X 线平片检查,结合骨骼受累区域的形态、密度、病灶的选择性分布等特征性表现,X 线平片即可作出确诊。

目前尚无根治蜡泪样骨病的方法。其治疗因临床表现的程度不同而异。在急性疼痛期可给予药物镇痛和理疗缓解疼痛[1,3]。而对于疼痛剧烈、和关节运动受限、关节畸形明显者,可考虑手术治疗,如清除钙化的软组织、肌腱延长术、筋膜切开与关节囊切开术、矫正性截骨术、交感神经切断术、甚至截肢[6]。而 Moulder 等[4]报道 1 例患者因蜡泪样骨病造成膝关节周围软组织挛缩,行关节置换,收到较好效果。本例膝关节有轻度的功能障碍,但行走和日常生活没有明显受限,疼痛可通过药物控制,且患者拒绝手术,因而采用保守治疗。

关键词:蜡泪样骨病;诊断;治疗

中图法分类号:R681　　**文献标识码**:B

参考文献:

[1] Motimaya A M, Meyers S P. Melorheostosis involving the cervical and upper thoracic spine: radiographic, CT, and MR imaging findings[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2006, 27(6): 1198 - 2000.

[2] Woolridge B, Stone N C, Denic N. Melorheostosis isolated to the calcaneus: a case report and review of the literature[J]. Foot Ankle Int, 2005, 26(8): 660 - 663.

[3] Sommer A, Voelker T, Scheer I, *et al*. Melorheostosis of the hand in a 7-year-old girl[J]. Pediatr Radiol, 2005, 35(12): 1215 - 1219.

[4] Moulder E, Marsh C. Soft tissue knee contracture of the knee due to melorheostosis, treated by total knee arthroplasty[J]. Knee, 2006, 13(5): 395 - 396.

[5] 郭彦杰, 张长青. 蜡泪样骨病的临床特征及 X 线诊断——附 1 例报告[J]. 国际骨科学杂志, 2008, 29(2): 136 - 137.

[6] Graham L E, Parke R C. Melorheostosis-an unusual cause of amputation[J]. Prosthet Orthot Int, 2005, 29(1): 83 - 86.

(编辑　汪勤俭)