基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.009

紫龙金逆转人膀胱癌细胞多药耐药研究

王祥卫，张远宁，李　杰，方针强，易善红，叶　钢
（第三军医大学第二附属医院泌尿外科，重庆　400037）

【摘　要】目的：研究中药紫龙金逆转人膀胱癌细胞多药耐药（Multidrug resistance，MDR）机理。方法：应用 MTT 法检测紫龙金的细胞杀伤作用，采用流式细胞仪检测细胞凋亡，RT-PCR 法检测 Bcl-2、Bax 基因 mRNA 水平表达。结果：BIU-87/ADM 细胞生存率为（98.00±1.48）%，加入紫龙金后（浓度分别为 200、500 μg/ml），其细胞生存率分别为（68.14±5.62）%、（52.36±1.87）%，差异显著（$P<0.01$）；流式细胞仪检测发现：经 200、500 μg/ml 的紫龙金处理后，BIU-87/ADM 细胞凋亡率［（17.32±2.35）%、（22.76±3.65）%］明显高于对照组（5.86±1.37）%，差异显著（$P<0.01$）；RT-PCR 结果显示，紫龙金可以下调 Bcl-2 基因的表达，可使 Bax 基因表达增强。结论：紫龙金可通过下调 Bcl-2 基因的表达，增强 Bax 基因表达诱导人膀胱癌多药耐药细胞凋亡。

【关键词】膀胱癌；多药耐药性；紫龙金；细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R737.14　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-07-28

Reversal of multi-drug resistance by Zilongjin in human bladder cancer cell line

WANG Xiang-wei, ZHANG Yuan-ning, LI Jie, FANG Zhen-qiang, YI Shan-hong, YE Gang
(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the reversal of multi-drug resistance by Zilongjin in human bladder cancer cell line. *Methods*: The cytotoxicity of Zilongjin on human bladder cancer cell line BIU-87/ADM was studied by MTT assay. Apoptosis was detected by flow cytometry; expression of Bcl-2/Bax gene was studied by RT-PCR. *Results*: BIU-87/ADM cell survival rate was (98.00±1.48)%. After being treated with Zilongjin, cell survival rate was

作者介绍：王祥卫（1969-），男，副教授，博士，
研究方向：人泌尿系统肿瘤研究。
基金项目：重庆市卫生局中医药科技项目基金资助项目（编号：2009-2-60）。

综上所述，本文进一步证明了 VEGF 与 PCOS 的密切关系，同时表明 VEGF 的生物利用度是增加的，VEGF 的调节作用可能受 sFlt-1 的调节，sFlt-1 也可能直接影响 PCOS 的发生发展，但是通过什么方式影响 PCOS 的发生，则有待进一步的研究证实。

参　考　文　献

[1] Qiao J, Huai F L. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: mpact on oocyte maturation and embryo developmental competence[J]. Human Reproduction Update, 2011, 17(1): 17-33.

[2] Bokal E V, Vrtovec H M, Klun I V, et al. Prolonged HCG action affects antigenic substances and improves follicular maturation, oocyte quality and fertilization competence in patients with polycystic ovarian syndrome[J]. Human Reproduction, 2005, 20(6): 1562-1568.

[3] Pan H A, Wu M H, Cheng Y C, et al. Quantification of doppler signal in polycystic ovary syndrome using three-dimensional power dppler ultrasonography: a possible new marker for diagnosis[J]. Human Reproduction, 2002, 17(1): 201-206.

[4] Paloal P G, Massimiliano M, Cristian M, et al. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian hyperstimu-lation[J]. Gynecological Endocrinology, 2006, 22(8): 465-470.

[5] Lee E J, Oh B, Lee J Y, et al. Association study between single nucleotide polymorphisms in the VEGF gene and polycystic ovary syndrome[J]. Fertility and Sterility, 2008, 89(6): 1751-1759.

[6] Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of hysiological angiogenesis[J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2001, 280(6), 1358-1366.

[7] Holmes D, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: antigenic factors in health and disease[J]. Genome Biology, 2005, 6(2): 209.

[8] Agrawal R, Jacobs H, Panyne N, et al. Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulose cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries[J]. Fertility and Sterility, 2002, 78(6): 1164-1169.

[9] Blerkom J V, Antczak M, Schrander R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics[J]. Human Reproduction, 1997, 12(5): 1047-1055.

（责任编辑：关蕴良）

(68.14 ± 5.62)% and (52.36 ± 1.87)%, respectively (P<0.01); apoptosis rate in cell line BIU-87 /ADM (treated with Zilongjin) was (17.32 ± 2.35)% and (22.76 ± 3.65)%, higher than that in control group cell line [(5.86 ± 1.37)%, P<0.01]. Bcl-2 gene expression was decreased, while Bax gene expression was increased according to RT-PCR assay. *Conclusion*: Apoptosis can be induced by Zilongjin through decreasing Bcl-2 and increasing Bax gene expressions in human bladder cancer multi-drug resistance cell line.

【Key words】bladder caner; multidrug resistance; Zilongjin; apoptosis

肿瘤细胞的多药耐药(Multidrug resistance, MDR)是临床肿瘤化疗的严重障碍，深入研究其发生机制及其逆转途径具有重要的意义。我们曾应用阿霉素(Adriamycin, ADM)诱导人膀胱癌敏感细胞株 BIU-87，成功地建立了耐药细胞株 BIU-87/ADM[1]，并进行了逆转的实验研究[2]。目前研究发现，复方中药紫龙金片对肺癌、结肠癌、乳腺癌、胃癌等多种中晚期肿瘤患者具有明显减毒增效作用[3]，但是有关紫龙金片对人膀胱癌 MDR 的逆转研究未见报道。本文应用 MTT 比色法、流式细胞仪检测和 RT-PCR 等方法，对紫龙金诱导的人膀胱癌耐药细胞株 BIU-87/ADM 凋亡进行研究，结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株及细胞培养

人膀胱癌 BIU-87 细胞株引自北京大学泌尿外科研究所。耐药细胞株 BIU-87/ADM 由我科应用 ADM 大剂量冲击结合低浓度诱导敏感细胞株 BIU-87 所建立。细胞置于含 5%CO_2、37℃、饱和湿度的孵箱中培养，每 3 d 换培养液 1 次，细胞融合时，用 0.25%胰蛋白酶消化、传代。

1.2 主要材料

紫龙金药粉(北京大学临床肿瘤学院惠赠)，按照文献[2]的方法将紫龙金药粉配制成浓度分别为 200、500 μg/ml 紫龙金工作液；胎牛血清(GIBCO)；RPMI1640 培养基(GIBCO)；RT-PCR试剂盒(Promega)；AnnexinV-FITC凋亡检测试剂盒(SBA)。

1.3 MTT 比色法检测

预定条件处理(实验组加入 200、500 μg/ml 的紫龙金)24 h 后的 BIU-87/ADM 细胞分别加入 20 μl/孔 MTT(5 g/L)，继续培养 4 h 后弃除上清，加入二甲基亚砜(DMSO)150 μl/孔，平板摇床震摇 10 min，用酶标仪在 492 nm 波长处测定吸光度(A 值)；计算细胞抑制率：抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

1.4 细胞凋亡率的流式细胞仪检测

1.4.1 接种细胞 取对数生长期 BIU-87/ADM 细胞，计数后接种于 6 孔板，5×10^5 个/孔，每孔体积 2 ml，14%小牛血清的 RMPI1640 培养液，37℃、5%CO_2 培养。

1.4.2 加药 5 h 后细胞贴壁，分组加药，在耐药细胞中分别加入 200、500 μg/ml 的紫龙金，对照组加入相当体积的生理盐水。将 6 孔板放入细胞培养箱中，在 5%CO_2、37℃、饱和湿度条件下的培养。

1.4.3 收集细胞 24 h 后取出 6 孔板，D-Hank's 液洗 2 遍，细胞刮收获细胞，加入培养液，稍混匀，转移到离心管内，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 195 μl Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞；加入 5 μl AnnexinV-FITC，轻轻混匀；室温(20℃)，用铝箔纸避光孵育 10 min；1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，加入 190 μl AnnexinV-FITC 结合液轻轻重悬细胞；加入 10 μl 碘化丙啶染色液，轻轻混匀，冰浴避光放置；随即进行流式细胞仪检测。以上实验均重复 3 次。

1.5 RT-PCR 法检测基因 mRNA 水平表达

紫龙金工作液作用后的 BIU-87/ADM 细胞，按照Promega 公司试剂盒说明进行总 RNA 提取产物后，进行 RT-PCR 反应，Bcl-2 引物：上游 5'-AGATGGCGAATGACCAGC-3'，下游 5'-CAGGTAACAAAACCCCACAGC-3'，产物大小577 bp；Bax 引物：上游 5'-GTTTCATCCAGGATCGAGC-3'，下游 5'-GGAAGTCCAATGTCCAGC-3'，产物大小 345 bp；β-actin 引物：上游 5'-ACCAACTGGGACGACATGG-3'，下游 5'-GCG-TACAGGGATAGCACAGC-3'，产物大小 203 bp；反应条件：Tm，60℃；35 个循环。反应产物于 1%琼脂糖凝胶电泳，析出条带成像并分析。

1.6 统计学方法

所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，应用 SPSS 13.0 软件进行方差分析。

2 结 果

2.1 紫龙金对 BIU-87/ADM 细胞生存率的影响

BIU-87/ADM 细胞生存率为(98.80 ± 1.48)%，加入不同浓度紫龙金后(浓度分别为 200、500 μg/ml)，其细胞生存率分别为(68.14 ± 5.62)%、(52.36 ± 1.87)%；紫龙金可显著抑制 BIU-87/ADM 细胞生存率(P<0.01)。

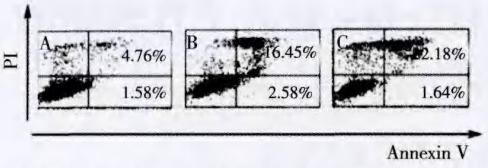
2.2 紫龙金对 BIU-87/ADM 细胞凋亡的诱发作用

应用 AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒，观察流式细胞仪对不同浓度紫龙金处理 24 h 后的 BIU-87/ADM 细胞进行检测(图 1)，试验结果发现：经 200、500 μg/ml 的紫龙金处理后，BIU-87/ADM 细胞凋亡率(17.32 ± 2.35)%、(22.76 ± 3.65)%明显高于对照组(5.86 ± 1.37)%，差异有统计学意义(P<0.01)，其细胞凋亡率随紫龙金剂量增加而升高，说明紫龙金可通过诱导BIU-87/ADM 细胞发生凋亡而逆转其耐药性。

2.3 紫龙金对 BIU-87/ADM 细胞 Bcl-2、Bax 基因表达影响

RT-PCR 结果显示，紫龙金可以下调 Bcl-2 基因的表达，

随紫龙金作用浓度增加其下调作用增强；紫龙金可使 Bax 基因表达增强。



A. 对照组（n=3）；B. 紫龙金组（200 μg/ml，n=3）；C. 紫龙金组（500 μg/ml，n=3）

图 1　流式细胞仪检测紫龙金处理 24 h 后的 BIU-87/ADM 细胞



1. 对照组；2. 200 μg/ml 紫龙金组；3. 500 μg/ml 紫龙金组

图 2　RT-PCR 检测 BIU-87/ADM 细胞 Bcl-2/Bax 基因表达

3　讨　论

近年来随着细胞凋亡研究的深入，人们发现许多化疗药物是通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥抗癌效应的。目前开发抗肿瘤中药是肿瘤研究的新方向。复方中药紫龙金片是由北京大学肿瘤医院与天津市中新制药厂联合研制的中成药，由白英、龙葵、黄芪、当归等组成。临床应用研究表明单独或者与细胞毒化疗药物联合应用于肺癌、结肠癌、乳腺癌、胃癌等多种中晚期肿瘤患者具有明显减毒增效作用[4,5]。研究证实紫龙金对胃肠道肿瘤具有体外抑制增殖，促进肿瘤细胞分化的作用；分子机理研究表明紫龙金可多靶位调节癌细胞的各途径，发挥正负平衡调节作用[6]。前列腺癌基础研究显示紫龙金具有抑制前列腺癌细胞增殖、抑制集落生长、G_0/G_1 期阻滞、诱导凋亡等作用；可以调节 PSA、AR、Bcl-2、Bax 和 p16基因表达[7]。

Bcl-2 是抑制细胞凋亡的重要基因，是决定肿瘤预后的重要指标，该基因表达增强能显著抑制细胞凋亡[8]。将该基因转入对化疗敏感的淋巴瘤细胞能产生抗药性[9]。说明 Bcl-2 基因表达增强与 MDR 形成密切相关。我们前期的研究表明：Bcl-2 基因在耐药细胞 BIU-87/ADM 中的高表达是导致其细胞凋亡受抑制的重要原因[10]。Bcl-2 基因可能通过以下途径参与人膀胱癌细胞 MDR 的产生：在应用 ADM 诱导 BIU-87/ADM 细胞 MDR 形成过程中，最初呈 Bcl-2 低表达的细胞出现明显凋亡，随时间的延长，该细胞株的 Bcl-2 基因表达逐步增强，阻止或减少了细胞凋亡的发生，从而产生 MDR 现象。因此，Bcl-2 基因表达状况不仅可以作为判断肿瘤细胞有无 MDR 现象发生的一个客观指标，而且在进一步探索如何降低 Bcl-2 基因表达，诱导细胞凋亡，从而克服 MDR 方面同样具有重要价值。Bax 基因是 Bcl-2 基因家族的另一成员，其与 Bcl-2 基因形成异二聚体，对细胞凋亡进行调控，它的过表达可拮抗 bcl-2 的保护效应使细胞趋于凋亡，在体内 Bcl-2 基因与 Bax 基因相互拮抗，Bcl-2/Bax 来决定细胞是否发生凋亡，研究证实 Bcl-2/Bax 比值降低，可使肿瘤细胞发生凋亡[11]。

Bc1-2 表达下调及 Bax 表达上调可以促进细胞凋亡，增强对化疗药物的敏感性。本研究结果表明，紫龙金可通过下调 Bcl-2 基因的表达和促使 Bax 基因表达增强，诱导人膀胱癌耐药细胞株 BIU-87/ADM 凋亡，这就为临床紫龙金逆转人膀胱癌 MDR 提供了有力的证据和支持，为下一步研究奠定了基础。

参　考　文　献

[1]　杨唐俊，范立新，杨清浩.人膀胱癌 BIU-87 细胞系多重抗药性的形成[J].中华泌尿外科杂志，1996，17(9)：527.

[2]　王祥卫，杨唐俊，何　斌，等.抗 APO-1 单抗诱导人膀胱癌多药耐药细胞凋亡的研究[J].中国肿瘤生物治疗杂志，2000，7(1)：60-62.

[3]　束家和，吴丽英，周荣耀.紫龙金片对中晚期肺癌化疗减毒增效作用的临床观察[J].中国肿瘤临床，2002，29(8)：593-594.

[4]　李学松，梁云燕，王代树，等.中药紫龙金对前列腺癌细胞体外增殖和侵袭的抑制作用[J].中国中西医结合杂志，2005，25(1)：116-119.

[5]　章新奇，刘淑俊，梁云燕，等.白龙片配合化疗治疗中晚期恶性肿瘤的临床研究[J].中国中西医结合杂志，1998，18(1)：24-25.

[6]　邹珊珊，徐　榕，何琪杨.复方中药紫龙金克服肿瘤细胞多药耐药性的机制[J].中国中西医结合杂志，2010，30(6)：601-606.

[7]　樊粉霞，卫　玮，柳惠图，等.紫龙金对 BGC-823 细胞增殖的抑制作用及对 p16（INK4α）启动子活性的影响[J].北京师范大学学报（自然科学版），2010，46(1)：68-71.

[8]　Muilenburg D J，Coates J M，Virudachalam S，et al.Targeting Bcl-2-mediated cell death as a novel therapy in pancreatic cancer[J].Journal of Surgical Research，2010，163(2)：276-281.

[9]　Yakirevich E，Sabo E，Naroditsky I，et al.Resnick. Multidrug resistance-related phenotype and apoptosis-related protein expression in ovarian serous carcinomas[J].Gynecologic Oncology，2006，100(1)：152-159.

[10]　王祥卫，杨唐俊，何　斌，等.bcl-2 基因表达在人膀胱癌多药耐药现象中的意义[J].中华泌尿外科杂志，1999，20(4)：234-236.

[11]　Panasiuk A，Dzieciol J，Panasiuk B，et al.Expression of p53，Bax and Bcl-2 proteins in hepatocytes in non-alcoholic fatty liver disease[J].World J Gastroenterol，2006，12(38)：6198-6200.

（责任编辑：关蕴良）