基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1791-03

杨梅素诱导膀胱癌细胞株 BIU-87 凋亡机制研究

韦 伟,姜 庆
(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究杨梅素(Myricetin)诱导膀胱癌细胞株 BIU-87 凋亡的机制。方法:培养人膀胱癌细胞株 BIU-87,加入不同浓度杨梅素干扰,在倒置显微镜下观察细胞形态学变化;并利用 MTT 及 Hoechst 33258 染色法检测杨梅素对膀胱癌细胞株BIU-87 凋亡的影响;后用 RT-PCR 检测细胞凋亡相关基因 survivin 及 caspase-3 转录水平的改变,免疫印迹法检测 survivin 和 caspase-3 的表达情况。结果:杨梅素能诱导 BIU-87 细胞凋亡,并明显抑制 survivin 的转录和表达,同时对 caspase-3 有上调作用。结论:杨梅素能诱导膀胱癌细胞 BIU-87 凋亡,其机制与抑制 survivin 表达,上调 caspase-3 表达有关。

【关键词】杨梅素;膀胱癌;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R694.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-18

Effects of myricetin on the apoptosis of bladder cancer cell BIU-87

WEI Wei, et al
(*Department of Urologic Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the apoptosis effect and mechanism of myricetin on human bladder cancer BIU-87 cell line. *Methods*: BIU-87 cell was cultured and induced with myricetin of concentration gradient. The effect of myricetin on BIU-87 cell apoptosis was observed by MTT and Hoechst staining on inverted microscope. The levels of survivin and caspase-3 mRNA were detected by RT-PCR. The proteins of survivin and caspase-3 were analyzed by Western blot. *Results*: It showed that myricetin remarkably induced apoptosis of BIU-87 cell line. Moreover, myricetin suppressed survivin and up-regulated caspase-3 expression. *Conclusion*: The apoptosis mechanism of myricetin on human bladder cancer BIU-87 cell line involves decreasing the survivin expression and enhancing the expression and activity of caspase-3.

【Key words】Myricetin; Bladder cancer; Cell apoptosis

杨梅素(Myricetin)异名杨梅树皮素、杨梅黄酮、杨梅酮,属黄酮醇类化合物,存在于壳斗科、豆科等植物中,具有降血糖、抗氧化和降低神经性损伤等多种药理学作用,同时其毒性低,因此杨梅素可能会在肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用[1]。有报道提示杨梅素具有抗肿瘤活性,但其抗肿瘤机制研究尚不清楚[2,3]。本文对杨梅素体外诱导人膀胱肿瘤细胞株 BIU-87 细胞凋亡作用及其机制进行了研究,旨在为其用于抗肿瘤治疗方面奠定试验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与药物 膀胱癌细胞株 BIU-87 由重庆医科大学附属第一医院泌尿外科惠赠。杨梅素购于 Sigma 公司,溶于无水乙醇。

1.1.2 试剂与仪器 RPMI1640、小牛血清(FCS)、胰酶购于 GIBCO 公司;MTT 和二甲基亚砜(DMSO)购于 Sigma 公司;survivin 和 caspase-3 单克隆抗体购于 Abcam 公司;Hoechst 33258 染色试剂盒购于碧云天公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠二抗、HRP 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;PCR 引物由 Invitrogen 公司合成;逆转录试剂盒、Trizol RNA 提取试剂盒购于 Invitrogen 公司;蛋白提取试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒购于碧云天公司。倒置荧光显微镜(Motic, China),酶联免疫分析仪(Techan, Austria),凝胶成像系统(Bio-Rad)。

1.2 方法

1.2.1 细胞生长抑制 10%FCS RPMI1640 培养膀胱癌细胞 BIU-87,按每孔 5×10^5 个密度接种于 96 孔板中,培养过夜,后加入杨梅素干扰,按照药物终浓度为 5、10、20、40、80、160、320 μg/ml 分为 8 组,同时设空白组(无细胞和药物)、肿瘤细胞阴性对照组(有细胞但未加药物),每组 6 复孔,培养 48 h,后加入 10 μl MTT(5 g/L),培养 4~6 h 后,阴性对照孔中已形成明显的蓝紫色颗粒结晶时加 100 μl/孔 SDS-HCl 终止反应,于 37℃存放过夜。用酶标仪在 570 nm 波长下测吸光度值(A),按下式计算抑制率(%)=(1- 试验组平均吸光度值/阴性

作者介绍:韦 伟(1980-),男,硕士,
研究方向:泌尿生殖系肿瘤研究。
通讯作者:姜 庆,男,教授,E-mail:jq163519@163.com。

对照组平均吸光度值）×100%。以此值为纵坐标，用药浓度为横坐标作细胞生长抑制曲线图。重复实验 3 次。

1.2.2 细胞形态学变化的观察 取普通洁净盖玻片于 70% 乙醇中浸泡 30 min，无菌超净台内吹干。将盖玻片置于六孔板内，种入 BIU-87 细胞培养过夜，使细胞于无菌盖玻片上贴壁生长，约为 50%~80%满。后加入杨梅素，按照药物终浓度为 20、40、80 μg/ml 分为 3 组，并设置对照组，培养 48 h 后，用倒置显微镜观察各组细胞形态学改变。吸尽孔中培养液，每孔加 0.5 ml 细胞固定液（0.5%冰醋酸）固定 30 min，去固定液，用磷酸盐缓冲液（Phosphate buffer，PBS）洗涤 2 次×3 min，吸尽液体，加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液于室温染色 5 min，再用 PBS 洗涤 2 次×3 min，滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上，盖上贴有细胞的盖玻片，荧光显微镜下观察细胞形态。

1.2.3 RT-PCR 检测 survivin、caspase-3 mRNA 水平 六孔板中培养膀胱癌细胞，杨梅素不同浓度组（0、20、40、80 μg/ml），作用 48 h，后取各组细胞。用 Trizol 提取各组细胞总 RNA，反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。survivin 上游引物：5'-atgggtgccccgacgttgccc-3'，下游引物：5'-caatccatg-gcagccagctgc-3'，扩增片段 310 bp。PCR 反应条件：94℃ 30 s，56℃ 15 s，72℃ 30 s，循环 30 次。caspase-3 上游引物：5'-atg gagaacactgaaaactcag-3'，下游引物：5'-tcacagcaaaaggagcagttttg -3' 扩增片段 343 bp，PCR 反应条件：94℃ 30 s，55℃ 20 s，72℃ 30 s，循环 30 次。2%琼脂糖凝胶电泳观察结果。重复实验 3 次，以得到稳定结果。

1.2.4 Western blot 检测 survivin、caspase-3 蛋白表达 50 ml 培养瓶培养膀胱癌细胞，按照 0、20、40、80 μg/ml 浓度梯度加药于培养瓶中，培养 48 h 后胰酶消化细胞，取干预后的细胞于 EP 管，每管加入 100 μl 细胞裂解液吹匀，于冰上放置 30 min，后 4℃ 14 000 g 离心 10 min，取上清，后定量。每管取 30 μg 总蛋白加入上样缓冲液煮沸 5 min，经 SDS/PAGE 凝胶电泳，然后电转移至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉封闭 2 h，一抗 1:1 000 稀释 4℃孵育过夜，二抗 1:5 000 稀释室温孵育 2 h，后二氨基联苯胺显色并对结果进行灰度扫描分析。重复实验 3 次，以得到稳定结果。

1.2.5 统计学方法 所有数据均采用均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，数据分析采用统计程序软件包（SPSS 10.0 for Windows）进行方差分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 杨梅素对 BIU-87 细胞增殖的影响

MTT 结果显示杨梅素对 BIU-87 细胞的生长抑制作用呈剂量依赖性（图 1）。可见 40 μg/ml 时，抑制率约为 50%，根据该试验结果，选取 20、40、80 μg/ml 杨梅素浓度进行进一步试验研究。

2.2 杨梅素诱导 BIU-87 细胞形态学变化

倒置显微镜下观察各组浓度杨梅素作用于 BIU-87 细胞 48 h 后细胞形态学改变，随着用药浓度增加，细胞形态逐渐变圆，细胞膜皱缩、发泡，甚至消失，细胞凋亡更明显，见图 2。

2.3 Hoechst 33258 染色结果

各诱导组经 Hoechst 33258 荧光染色后进一步观察各组细胞细胞核的形态变化，荧光显微镜下（×400）观察并计数，有弥漫均匀的蓝色荧光判定为正常细胞，细胞核或细胞质内有浓染或碎裂的蓝色致密荧光判定为凋亡细胞。对照组细胞核表面光滑，发出的荧光均匀，药物处理后可诱导核浓缩或碎裂，发出致密的荧光，呈现典型的凋亡改变，并随药物浓度增加凋亡更明显（图 3）。各实验组细胞凋亡率明显高于对照组，统计学处理差异有显著性。

2.4 RT-PCR 检测 survivin、caspase-3 mRNA 水平

PCR 产物凝胶电泳检测，经凝胶成像系统光密度扫描发现：caspase-3 表达水平与用药水平成正比，survivin 表达水平与用药水平成反比。各基因条带与内参条带进行灰度比较，

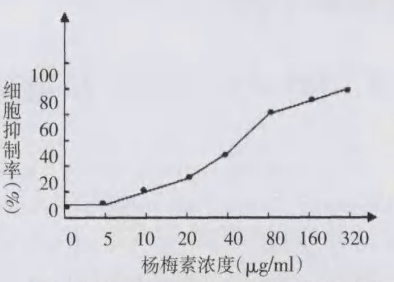
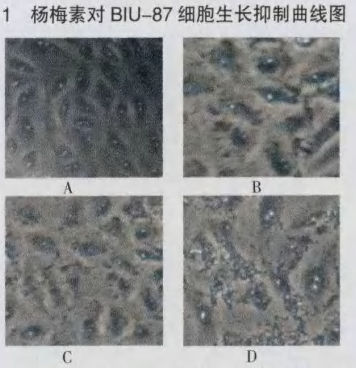
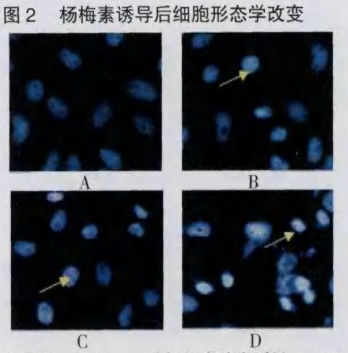


图 1 杨梅素对 BIU-87 细胞生长抑制曲线图



A、B、C、D 分别为 0、20、40、80 μg/ml 杨梅素浓度诱导，×200 倍镜下观察；A 图为对照组，可见细胞形态学正常；B、C、D 为用药组

图 2 杨梅素诱导后细胞形态学改变



A、B、C、D 分别为 0、20、40、80 μg/ml 杨梅素浓度诱导，×400 倍镜下观察；A 图为对照组，染色后可见弥漫均匀的蓝色荧光，为正常细胞；B、C、D 为用药组，染色后可见细胞核或细胞质内有浓染或碎裂的蓝色致密荧光，为凋亡细胞（箭头所指），并随着药物浓度升高可见细胞凋亡更明显

图 3 Hoechst 33258 荧光染色

比值见表 1。以此比值为纵坐标作柱状图,各组间比较 $P<0.05$,见图 4。统计结果显示:各组间差异具有统计学意义,caspase-3 基因水平随用药浓度增加而升高,survivin 基因水平随用药浓度增加而降低。

2.5 Western blot 检测 survivin 和 caspase-3 表达的变化

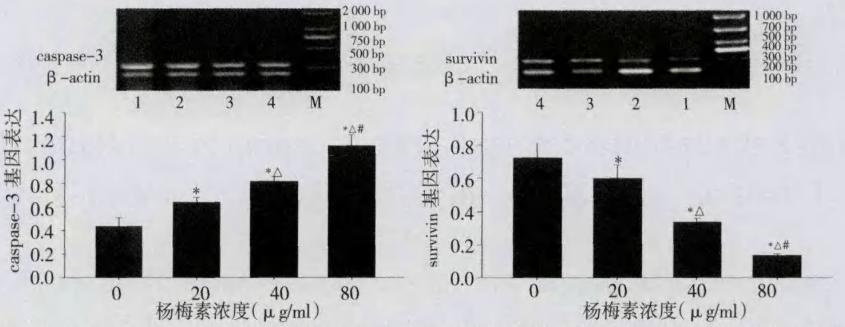
Western blot 检测各浓度组 survivin 和 caspase-3 蛋白表达水平的差异,数据显示杨梅素能剂量依赖性抑制 survivin 表达,同时增强 caspase-3 表达。caspase-3、survivin 蛋白免疫印迹条带分别和内参条带进行灰度比,比值见表 2。以该比值作为纵坐标,作柱状图,各组进行统计学处理,各组间有显著性差异($P<0.05$),见图 5。统计结果显示:各组间差异具有统计学意义,caspase-3 蛋白表达水平随用药浓度增加而升高,survivin 蛋白表达水平随用药浓度降低。

表 1 不同用药组下基因平均灰度比值

用药分组(μg/ml)	平均灰度比值(基因条带/内参条带)	
	caspase-3/β-actin	survivin/β-actin
0	0.411 0±0.006 1	0.711 0±0.022 3
20	0.623 0±0.012 0	0.601 0±0.031 1
40	0.812 0±0.021 0	0.338 0±0.015 2
80	1.115 0±0.025 0	0.156 0±0.005 1

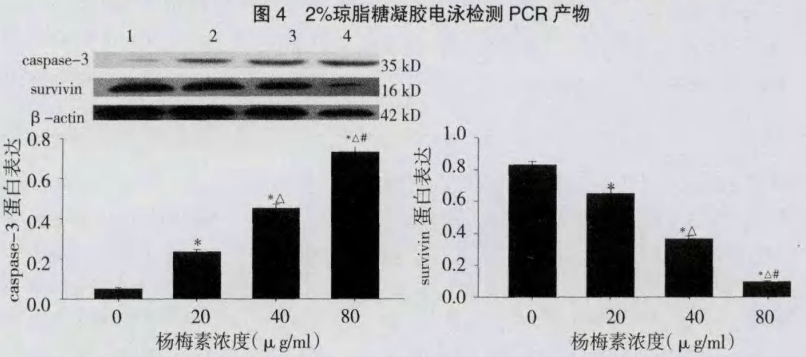
表 2 不同用药组下蛋白平均灰度比值

用药分组(μg/ml)	平均灰度比值(蛋白条带/内参条带)	
	caspase-3/β-actin	survivin/β-actin
0	0.045 0±0.008 7	0.721 0±0.056 0
20	0.233 0±0.012 0	0.593 0±0.045 0
40	0.481 0±0.0231 0	0.330 0±0.034 0
80	1.120 0±0.067 0	0.101 0±0.009 8



M 为 DNA Marker,1、2、3、4 分别为 80、40、20、0 μg/ml 浓度杨梅素诱导细胞组,0 μg/ml 浓度为对照组;为 *$P<0.05$ 和对照组比较,△$P<0.05$ 和 20 μg/ml 浓度组比较,#$P<0.05$ 和 40 μg/ml 浓度组比较

图 4 2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物



1、2、3、4 分别为 0、20、40、80 μg/ml 浓度杨梅素诱导细胞组,0 μg/ml 浓度为对照组,*$P<0.05$ 和对照组比较,△$P<0.05$ 和 20 μg/ml 浓度组比较,#$P<0.05$ 和 40 μg/ml 浓度组比较

图 5 Western blot 检测 survivin 和 caspase-3 蛋白表达

3 讨 论

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,且发病率逐年增加[4]。目前国内外对膀胱癌治疗多采取综合治疗策略,化疗是一种重要手段。化疗虽能有效杀死肿瘤细胞,但同时对机体的正常细胞造成损害,毒副作用明显,而某些中药或天然物质由于来源广、毒性低、抗肿瘤效果明显,在肿瘤治疗中发挥越来越重要的作用。但中药或天然物质成分复杂,其作用多环节、多靶点,且量效关系难以控制,绝大多数药物的作用机理不清。

肿瘤的发生是个多基因、多步骤、多阶段的复杂过程,细胞凋亡在肿瘤的发生发展中主要起负调控作用[5]。因此细胞凋亡的失衡可能导致肿瘤发生并影响肿瘤的生物学行为[6]。细胞凋亡受抑是肿瘤的发病机制之一,其在膀胱癌的发生和发展中可能起着重要的作用[7]。survivin 是新发现的一种凋亡抑制蛋白家族成员,也是迄今发现的最强的凋亡抑制因子,其主要通过在凋亡通路的下游抑制 caspase-3 基因表达来发挥抗凋亡效应[8]。

本实验利用杨梅素诱导膀胱癌细胞株 BIU-87 凋亡,并对其诱导凋亡的分子机理进行探究。选择不同浓度杨梅素诱

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1794-04

注射 YVAD-CHO 后癫痫大鼠海马组织细胞形态及 Caspase-3表达的改变

陈 博,谢延风,唐文渊,石全红,詹 彦
(重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨癫痫大鼠单侧海马注射 Caspase-3抑制剂 YVAD-CHO 后海马组织形态及 Caspase-3表达的改变。方法:将 YVAD-CHO 注射入癫痫大鼠模型单侧海马,HE 染色观察组织形态学变化, 免疫组化法观察 Caspase-3蛋白的表达及相应的改变。结果:HE 染色显示,干预组 1 大鼠海马安蒙角(Cornu ammonis,CA)1-CA3 区神经细胞胞质浓染,核固缩等改变,与模型组比较明显减少;免疫组化显示干预组 1 海马区 Caspase-3蛋白的表达较模型组明显减少。结论:YVAD-CHO 可在体内抑制大鼠海马神经元凋亡。

【关键词】癫痫;组织形态;凋亡;Caspase-3
【中国图书分类法分类号】R742.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-23

Changes of super microstructure of hippocampus and expressions of Caspase-3 in epileptic rats after injection of YVAD-CHO

CHEN Bo, et al
(*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of super microstructure of hippocampus and expression of Caspase-3 in epileptic rats after injection of YVAD-CHO. *Methods*: YVAD-CHO was injected into unilateral hippocampus of rats in intervention group 1. The changes of super microstructure were studied by HE staining. The changes of expressions of Caspase-3 protein were studied by immunohistochemistry method. *Results*: HE staining indicated

作者介绍:陈 博(1979-),男,硕士,
研究方向:癫痫外科。
通讯作者:谢延风,男,教授,E-mail:3058@163.com。

导细胞,利用 MTT 结果选择最佳的用药浓度。各用药组细胞在倒置显微镜下观察,随着用药浓度的增加,膀胱癌细胞出现明显的凋亡。RT-PCR 检测结果显示,随着用药浓度的增加,caspase-3 mRNA 表达上调,而 survivin mRNA 表达下调;免疫印迹检测结果显示, 随着杨梅素浓度升高 caspase-3 蛋白表达显著增高,survivin 蛋白表达显著下降,且呈一定的剂量依赖性。这一结果提示杨梅素能明显诱导 BIU-87 膀胱癌细胞凋亡,其凋亡机制与 caspase-3 和 survivin 这对基因具有显著的相关性,但其明确机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Jung S K, Lee K W, Byun S, et al. Myricetin inhibits UVB-induced angiogenesis by regulating PI-3 kinase in vivo[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(5): 911-917.

[2] Ko C H, Shen S C, Hsu C S, et al. Mitochondrial dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochromec, and caspase cascade[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(6): 913.

[3] Ko C H, Shen S C, Lee T J, et al. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity incolorectal carcinoma cells[J]. Molecular cancer therapeutics, 2005, 4(2): 281.

[4] Mountzios G, Bamias A, Dalianis A, et al. Endocardial metastases as the only site of relapse in a patient with bladder carcinoma: a case report and review of the literature[J]. Int J Cardiol, 2010, 140(1): 4-7.

[5] Mitza A, McGuirk M, Hockenberry T N, et al. Human survivin is negatively regulated by wild type p53 and participates in p53 depend apoptotic pathway[J]. Oncogene, 2002, 21(17): 2613-2622.

[6] Daniel J C, Smythe W R. The role of Bcl-2 family members in non-small cell lung cancer[J]. Semin Thorac Cardiovase Surg, 2004, 16(1): 19-27.

[7] Sun L M, Huang H Y, Huang E Y, et al. A prospective study to assess the bladder distension effects on dosimetry in intracavitary brachytherapy of cervical cancer via computed tomography-assisted techniques[J]. Radiother Oncol, 2005, 77(1): 77-82.

[8] Shin S, Sung B J, Cho Y S, et al. An anti-apoptotic protein human surviving is a direct inhibitor of caspase-3 and 7[J]. Biochem, 2001, 40(4): 1117-1123.

(责任编辑:关蕴良)