基础研究 文章编号:0253-3626(2010)08-1194-04

芹菜素诱导膀胱癌细胞株 BIU-87 凋亡及机制的研究

姚善华,胡自力,邓新军
(重庆医科大学附属第二医院泌尿外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨芹菜素(Apigenin)在体外诱导膀胱癌细胞株 BIU-87 凋亡的作用及其机制。方法:MTT 法测定不同浓度芹菜素作用后 BIU-87 细胞的生长情况;流式细胞术检测细胞周期情况;Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术观察芹菜素作用后细胞的凋亡情况;RT-PCR 法检测 Survivin mRNA 表达的变化;免疫细胞化学 SP 法检测 Survivin 和 Caspase-3 蛋白表达的变化。结果:①MTT 法证实芹菜素能明显抑制膀胱癌细胞株 BIU-87 的生长。②22.03 μmol/L 芹菜素作用 72 h 后,流式细胞仪检测发现芹菜素可使 BIU-87 细胞阻滞在 G_2/M 期;流式细胞术双染法检测细胞凋亡显示:芹菜素可使 BIU-87 细胞发生凋亡。③RT-PCR 检测发现芹菜素可使 BIU-87 细胞 Survivin mRNA 表达显著减少($P<0.05$),免疫细胞化学 SP 法检测显示 Survivin 蛋白表达亦显著减少($P<0.05$),Caspase-3 蛋白表达则明显增加($P<0.01$)。结论:芹菜素在体外可抑制 BIU-87 细胞增殖,诱导其发生凋亡。芹菜素诱导 BIU-87 细胞发生凋亡的生物学效应可能与 Survivin 的表达下降,Saspase-3 的表达上升有关。

【关键词】芹菜素;膀胱癌;细胞凋亡
【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-12-29

Apigenin-induced apoptosis of bladder cancer cell BIU-87 and its mechanism

YAO Shan-hua, et al
(*Department of Urologic Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the apoptosis of bladder cancer cell BIU-87 induced by apigenin in vitro and its mechanism. *Methods*: The cell proliferation was detected by MTT assay; the cell cycle was measured by flow cytometry; the cell apoptosis was observed by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI double staining; the expression of survivin mRNA was detected by RT-PCR, and the expressions of survivin protein and caspase-3 protein were detected by immunocytochemistry SP assay. *Results*: ①MTT showed that apigenin effectively inhibited the proliferation of BIU-87 cells. ②After 72 hours of 22.03 μmol/L apigegin treatment, it could arrest the BIU-87 cell in G2/M phase which was measured by flow cytometry, and it could make the cell apoptosis which was showed by flow cytometry with Annexin V-FITC and PI. ③Compared with the control group, the expression of survivin mRNA was significantly decreased ($P<0.05$), and so was the expression of survivin protein ($P<0.05$), while that of caspase-3 protein was markly upregulated ($P<0.01$) in the apigenin group. *Conclusion*: Apigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of BIU-87 cells. The molecular mechanism of apigenin inducing the apoptosis of BIU-87 cells may be associated with its action of down-regulating the expression of survivin, and up-regulating the expression of caspase-3.

【Key words】Apigenin; Bladder cancer; Apoptosis

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤,术后高复发率为其显著特点。芹菜素(Apigenin)有多种药理活性,如降血压、镇静、抗菌以及雌激素样作用等,近年来由于发现其对多种肿瘤具有抑制作用,从而引起肿瘤学者的关注。本研究通过对膀胱癌细胞株 BIU-87 的体外实验,探讨芹菜素对膀胱癌的作用效果及机制,为膀胱癌术后的治疗探寻一条新的途径。

作者介绍:姚善华(1980-),男,硕士,
研究方向:男性泌尿生殖系肿瘤。
通讯作者:胡自力,男,教授,E-mail:huzili6767@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

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。芹菜素(陕西慧科植物开发有限公司)纯度为 98%,使用时先用极少量的饱和 NaOH 溶解,再用生理盐水稀释成所需浓度。四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司),RPMI-1640(GIBCO 公司),胰酶(HYCLONE 公司),新生小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),35 mm 培养皿(Corning 公司),Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(Bipec Biopharma 公司),

Taq 酶、*DNase* Ⅰ(RNase free)(TaKaRa 公司),RNA 提取试剂 Tripure reagent(ROCHE 公司),M-Mulv Reverse Transcriptase (Promega 公司),通用型 SP Kit、DAB 和 Survivin 抗体(北京中杉公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将膀胱癌细胞 BIU-87 接种在 50 ml 和 100 ml 培养瓶中,用含有 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液,37℃ 5%CO_2 培养箱内培养。

1.2.2 MTT 法检测芹菜素对膀胱癌细胞 BIU-87 的抑制作用

用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液将对数生长的 BIU-87 细胞调成 5×10^5 个/ml 的细胞悬液,加入 96 孔培养板内,每孔 200 μl。实验设空白组(无细胞和药物)、肿瘤细胞阴性对照组(有细胞但未加药物)及 4 个不同浓度的芹菜素药物实验组,分别加在 96 孔板内,共 3 板,每孔加药 20 μl,其中浓度分别是 20、40、80、160 μmol/L。各组均设 5 个复孔,分别培养 24、48、72 h 后,加入 MTT,每孔加 20 μl,继续培养 4 h,然后弃上清液,每孔加 DMSO 200 μl,自动酶标仪机测 570 nm 下的每孔吸光度值(A)。药物作用效应即抑制率(%)=(1-实验组 A 值/对照组 A 值)×100%,用直线回归方程求得芹菜素分别作用不同时间的半数抑制率 IC_{50},以及药物作用 72 h 的 2/5 IC_{50},实验重复 3 次。以后实验以药物作用 72 h 的 2/5 IC_{50} 为研究对象。

1.2.3 流式细胞术 取对数生长期的 BIU-87 细胞以 5×10^5 个/ml 的浓度分别接种于两个 50 ml 培养瓶中,其中一个培养瓶中加入芹菜素,使其终浓度为 22.03 μmol/L,另一个为空白对照组。作用 72 h 后于流式细胞仪测细胞周期分布,加 Annexin V-FITC 和 PI 后检测细胞凋亡情况。相同实验均重复 3 次。

1.2.4 RT-PCR 检测 Survivin mRNA 22.03 μmol/L 芹菜素作用 72 h,以 Trizol 液提取细胞总 RNA,反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。Survivin 上游引物:5'-TACAGCTTCGCTGGAAACCT-3',下游引物:5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3',扩增片段 251 bp;内参 β-actin 的上游引物:5'- CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3',下游引物:5'-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3',扩增片段为 587 bp。PCR 反应条件:94℃ 3 min,94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 40 s,循环 35 次,72℃延伸 10 min。取 PCR 产物 8 μl 上样,1%琼脂糖上进行凝胶电泳观察结果。用 β-actin 为内参照进行对比检测。应用 Bio-Rad 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)摄取样品电泳图,通过成像分析软件 Quantity One 进行半定量。

1.2.5 免疫细胞化学 SP 法检测 survivin、caspase-3 蛋白 将对数生长期的细胞进行爬片。22.03 μmol/L 芹菜素作用 72 h 后,PBS 洗 3 次,用 4%多聚甲醛固定,按照免疫组化 SP 试剂盒说明进行免疫细胞化学染色,以 PBS 代替一抗作阴性对照。细胞浆着棕黄色为阳性。采用 Image-Pro Plus6 专业图像分析软件,测定并计算平均光密度值。

1.3 统计学处理

数据均采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$),抑制率组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,组内不同时间点比较采用重复测量数据的方差分析;两组均数比较采用 t 检验。所有数据用 SSPS 17.0 统计软件包作数据处理,$P\leq0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 法测抑制率

对照组 BIU-87 细胞体外生长活跃,药物组的细胞生长均不同程度地减慢,药物的抑制作用随其浓度和时间的增加而增大,呈剂量-效应、时间-效应依赖性(图 1)。且同一时间不同药物浓度各组之间以及同一药物浓度不同时间之间细胞抑制率有显著差异($P<0.05$)。利用直线回归方程得出,24 h、48 h、72 h 的 IC_{50} 分别为 205.02±20.75、103.76±13.43、85.96±2.54 μmol/L,各时间段 IC_{50} 间差异有统计学意义($P<0.05$)。选取药物作用 72 h 的 2/5 IC_{50}(22.03 μmol/L)为研究对象。

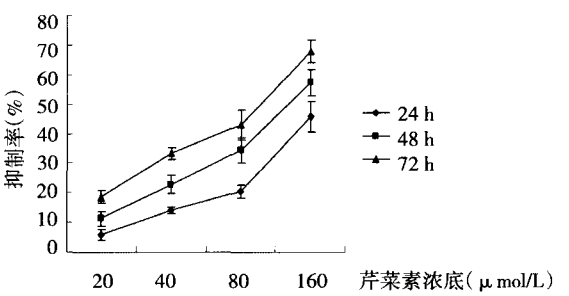


图 1 芹菜素作用于 BIU-87 细胞的生长抑制曲线

2.2 芹菜素对 BIU-87 细胞周期的影响

22.03 μmol/L 芹菜素作用 72 h 后,流式细胞仪结果(表1)显示:G_2/M 期细胞显著增多($P<0.01$),S 期细胞也增多,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 芹菜素对 BIU-87 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC 加 PI 双染法检测 BIU-87 细胞的凋亡结果见图 2。72 h 后,对照组的细胞凋亡率为 8.14%±1.25%,22.031 μmol/L 芹菜素组的细胞凋亡率为 13.77%±1.41%。芹菜素组与对照组相比细胞凋亡率显著增多,2 组比较 $P<0.01$,差异有统计学意义,说明芹菜素可诱导 BIU-87 细胞发生凋亡。

2.4 RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达

通过 RT-PCR 产物凝胶电泳检测,经凝胶成像系统光密度扫描发现:72 h 后,对照组的电泳条带灰度比值(Survivin/β-actin)为(0.493±0.012),22.03 μmol/L 芹菜素组的比值为(0.398±0.020)。芹菜素组与对照组相比,survivin mRNA 的表达量显著下调($P<0.05$),见图 3。

2.5 免疫细胞化学 SP 法检测 Survivin、caspase-3 蛋白表达的变化

Survivin 和 caspase-3 阳性物质呈棕黄色,强阳性呈棕褐

色，主要分布在细胞浆内。经 22.03 μmol/L 的芹菜素处理 72 h 后 Survivin、Caspase-3 蛋白表达平均光密度值分别为（0.078 ± 0.019）、（0.110 ± 0.014），对照组 Survivin、Caspase-3 蛋白表达平均光密度值分别为（0.166 ± 0.027）、（0.053 ± 0.013）。芹菜素组与对照组相比，BIU-87 细胞中 Survivin 的表达明显减弱，而 Caspase-3 的表达明显增强。芹菜素处理组中 Survivin 和 Caspase-3 蛋白表达变化与对照组相比差异均有统计学意义（$P<0.05$）。见图 4、图 5 和表 2。

3　讨　论

膀胱癌是我国常见恶性肿瘤之一，多采用保留膀胱的经尿道电切术进行治疗。而保留膀胱的各种手术治疗后，约 50%的患者在 2 年内肿瘤可能复发[1]，故常采用术后膀胱内药物灌注治疗以预防其复发，但却存在不同程度的多药耐药。芹菜素是天然存在的一种黄酮类化合物，广泛存在于多种水果、蔬菜、豆类和茶叶中，其中芹菜中含量最高。研究发

表 1　22.03 μmol/L 芹菜素对 BIU-87 细胞周期的影响

实验分组	细胞周期分布（%）		
	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	76.15 ± 4.161	16.61 ± 1.404	8.91 ± 2.773
芹菜素组	38.57 ± 5.429	24.42 ± 2.853	37.01 ± 3.124

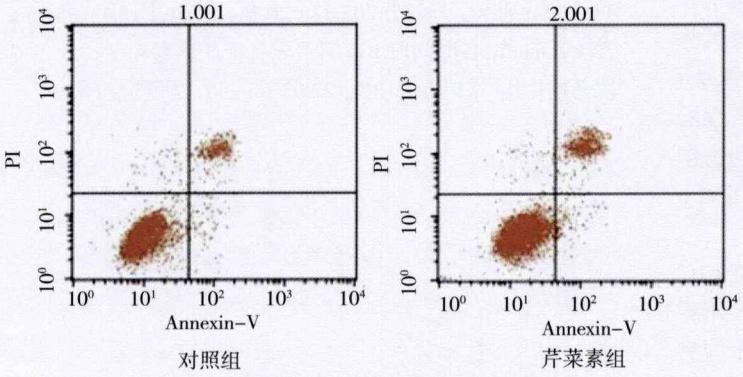
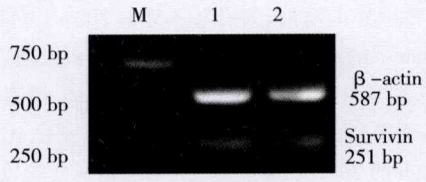
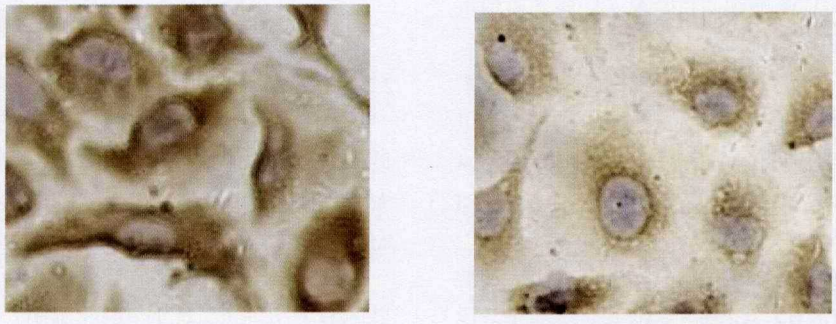


图 2　FCM 检测细胞凋亡结果



M. DNA marker；1. 对照组；2. 芹菜素组

图 3　β-actin 和 survivin 电泳图



对照组　　芹菜素组

图 4　对照组和芹菜素组的 survivin 蛋白表达图像（SP × 200）



对照组　　芹菜素组

图 5　对照组和芹菜素组的 caspase-3 蛋白表达图像（SP × 200）

表 2 芹菜素作用后 survivin 和 caspase-3 蛋白表达的平均光密度值

实验分组	蛋白表达平均光密度值	
	Survivin	Caspase-3
对照组	0.166 ± 0.027	0.053 ± 0.013
芹菜素组	0.078 ± 0.019	0.110 ± 0.014

现,芹菜素对多种恶性肿瘤如胃癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌等具有抑制作用,可诱导肿瘤细胞发生凋亡,具有抗突变[2,3]、抗氧化[4]、抑制肿瘤细胞血管形成、侵袭和转移[5,6]、降低肿瘤细胞的多重耐药性[7]以及减少抗肿瘤药物(如丝裂霉素和环磷酰胺等)对正常细胞的毒性[2]等作用,为预防膀胱癌术后复发提供了一种新选择。

本实验通过 MTT 法证实芹菜素对膀胱癌细胞的生长有明显的抑制作用,且呈剂量 - 效应和时间 - 效应关系。通过流式细胞术发现,22.03 μmol/L 芹菜素作用 72 h 后,BIU-87 细胞 G_2/M 期比例由 8.91% ± 2.773%上升至 37.01% ± 3.124%,差异有统计学意义(P<0.01),说明芹菜素作用后细胞发生 G_2/M 期阻滞。Annexin V-FITC 加 PI 双染法证实芹菜素可诱导膀胱癌细胞发生凋亡。因而芹菜素可能通过使膀胱癌细胞发生 G_2/M 期阻滞,使肿瘤细胞不能进行有丝分裂,同时诱导肿瘤细胞发生凋亡,从而抑制肿瘤细胞增殖,发挥抗肿瘤作用。

本实验进而通过对 survivin 和 caspase-3 两种基因的研究阐述芹菜素引起膀胱癌细胞凋亡的可能机制。Survivin 是至今发现的凋亡抑制蛋白家族(Inhibitor of apoptosis protein,IAP)中作用最强的凋亡抑制蛋白之一,广泛表达于多种肿瘤组织,在膀胱癌中高度表达,而在正常膀胱黏膜组织不表达,且多种研究表明其表达的程度与肿瘤的发展及预后密切相关[8-10]。凋亡抑制蛋白家族可以通过 Caspase 途径来实现其抗凋亡作用。Caspase 通常以酶原的形式存在,在正常组织和肿瘤组织中均可有表达,一旦对细胞重要成分执行致命性切割的 Caspase 被激活,即可引起细胞凋亡,又因其本身可自我活化,故细胞凋亡可呈级联放大效应。Caspase-3 在此效应中处于关键位置,大多数触发细胞凋亡的因素最终均需要通过 Caspase-3 介导的信号传导途径导致细胞凋亡。本实验 RT-PCR 结果显示:芹菜素作用于 BIU-87 细胞后 survivin mRNA 的表达降低;免疫细胞化学 SP 法显示:survivin 蛋白表达降低,caspase-3 蛋白表达增强。表明芹菜素可能通过降低 survivin 的表达,使肿瘤细胞的凋亡抑制作用减弱,然后上调 caspase-3 的表达,促使肿瘤细胞发生凋亡。

本研究证实芹菜素可明显抑制膀胱癌细胞的增殖,诱导其发生凋亡,有望成为预防和治疗膀胱癌的天然药物。但是其抑制肿瘤生长和诱导凋亡的确切作用机制目前尚未完全明确,因此对其机制的探讨以及芹菜素更广阔的使用价值还有待更深入研究。

参 考 文 献

[1] 吴在德,吴肇汉,郑 树,等.外科学[M].第 6 版.北京:人民卫生出版社,2003.714-715.

[2] Siddique Y H,Beg T,Afzal M.Antigenotoxic effect of apigenin against anti-cancerous drugs[J].Toxicol In Vitro,2008,22(3): 25-31.

[3] Khan T H, Jahangir T,Prasad L,et al. Inhibitory effect of apigenin on benzo (a)pyrene-mediated genotoxicity in Swiss albino mice [J].J Pharm Pharmacol,2006,58(12):1655-1660.

[4] Kang S S, Lee J Y,Choi Y K,et al. Neuroprotective effects of flavones on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblostoma cells[J]. Bioorg Med Chem Lett,2004,14(9):2261-2264.

[5] Liu L Z,Fang J,Zhou Q,et al.Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells:implication of chemoprevention of lung cancer[J].Mol Pharmacol, 2005,8(3):635-643.

[6] Lindenmeyer F,Li H,Menashi S,et al. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production[J].Nutr Cancer, 2001,39(1):139-147.

[7] Chan K F,Zhao Y,Burkett B A,et al. Flavonoid dimers as bivalent modulators for P-glycoprotein-based multidrug resistance:synthetic apigenin homodimers linked with defined-length poly (ethylene glycol) spacers increase drug retention and enhance chemosensitivity in resistant cancer cells[J]. J Med Chem,2006,49(23):6742-6759.

[8] Rosenblatt R,Jonmarker S,Lewensohn R,et al. Current status of prognostic immunohistochemical markers for urothelial bladder cancer[J]. Tumour Biol,2008,29(5):311-322.

[9] Weiss C,von Römer F,Capalbo G,et al. Survivin expression as a predictive marker for local control in patients with high-risk T1 bladder cancer treated with transurethral resection and radiochemotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,2009,74(5):1455-1460.

[10] Nouraee N,Mowla S J,Ozhand A,et al. Expression of survivin and its spliced variants in bladder tumors as a potential prognostic marker[J]. Urol J,2009, 6(2):101-108.

(责任编辑:冉明会)