论 著 文章编号:0253-3626(2008)11-1305-04

藏花素对膀胱移行细胞癌的增殖抑制作用

罗春丽[1],赵 培[1],胡宏波[1],吕纯芳[1],冀慧莹[1],吴小候[2]

(1. 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;
2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究藏花素(Crocin)对膀胱移行细胞癌是否具有增殖抑制作用。方法:MTT 法检测藏花素对 T24 细胞增殖的影响;应用形态学手段观察细胞形态学的改变;流式细胞术检测肿瘤细胞周期动力学。荷瘤小鼠模型建立,测定藏花素处理后荷瘤小鼠体内抑瘤率。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;藏花素作用后 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;对照组裸鼠肿瘤的平均体积明显大于藏花素处理组裸鼠肿瘤的平均体积,其差异具有显著性($P<0.05$),裸鼠生长抑制率为 27.8%。结论:体内外实验证明,藏花素对膀胱移行细胞癌的增殖有抑制作用。

【关键词】藏花素;膀胱移行细胞癌;T24 细胞;增殖抑制
【中国图书分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-20

Proliferation inhibitory effect of crocin on transitional cell carcinoma of urinary bladder

LUO Chun-li, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstact】*Objective*: To investigate the proliferation inhibitory effect of crocin on transitional cell carcinoma of urinary bladder(TCCB). *Methods*: MTT assay was used to evaluate the inhibitory effect of Crocin on the proliferation of T24 cells. Microscope was used to observe the morphological changes of the T24 cells. Flow cytometry was used to measure the cell cycle. T24 cells were inoculated in to BALB/c nude mice to establish bladder cancer model. After treatment with Crocin, the inhibitory effects were observed on the growth of tumors. *Results*: The proliferation of T24 cells were inhibited remarkably. Morphological changes of cells were observed. Flow cytometric profiles revealed that crocin led to the increase of the cells in G_0/G_1 phase and the decrease of cells in S phase and G_2/M($P<0.05$), Crocin could inhibit the growth of BALB/c xenograft tumor significant r. The inhibitory rate of tumor was 28.7%. *Conclusion*: Crocin exerts an inhibitory effect on the growth of transitional cell carcinoma of urinary bladder in vitro and vivo.

【Key words】 Crocin; Transitional cell carcinoma of urinary bladder(TCCB); T24 cells; Proliferation inhibition

藏花素(Crocin)是名贵中药材藏红花的化学成分之一,是自然界中罕见的一种水溶性类胡萝卜素。近年来,随着现代医学药学以及分子生物学技术的飞速发展,发现藏红花除了在保护神经系统以及抗心血管系统疾病等方面有良好功效外,在抗肿瘤方面也有功效。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,藏花素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对人膀胱移行细胞癌是否具有抑制作用,为抗肿瘤中药的开发和临床应用提供依据。

作者介绍:罗春丽(1957-),女,教授,
研究方向:膀胱肿瘤基因诊断和治疗。

基金项目:重庆市科委自然科学基金(CSCT 2005BB5309)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、动物及主要试剂 人膀胱移行细胞癌 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。3~4 周龄健康雌性免疫缺陷 BALB/c 裸鼠 15 只(SPF

级），体重（10±2）g 购于中国科学院上海实验动物中心。由本校实验动物中心饲养。RPMI1640 培养基（Gibco 公司），胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司）。藏花素、MTT（四甲基偶氮唑盐）及胰酶（美国 Sigma 公司）。

1.1.2 主要仪器设备 二氧化碳培养箱（Heraeus 德国），倒置显微镜（OLYMPUS 日本），全自动酶标仪、低温离心机（日本 HITACHI）。

1.2 方法

1.2.1 T24 细胞培养 T24 细胞株复苏后以含有 10% FCS、100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液，于 37℃、5%CO_2 饱和湿度的恒温培养箱中培养，接种 48~72 h 进入对数生长期，待细胞长至瓶底 80%~90%时用 0.25%的胰酶将贴壁生长的细胞用直接吹打法传代。

1.2.2 藏花素配制 藏花素为橙黄色粉末。无菌条件下将 1 000 mg 藏花素粉末溶于 20 ml PBS（0.01 mol/L、pH=7.2）中，并加入 62.5 mg EDTA（藏花素的稳定剂）配成 50 mg/ml（50 mmol/L）贮存液，4℃贮存。临用时用 PBS（0.01 mol/L、pH=7.2）稀释为适当浓度。

1.2.3 MTT 法观察细胞增殖抑制影响 取对数生长期 T24 细胞，经 0.25%胰酶消化，以 2×10^4 个 /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 浓度的藏花素进行处理，每孔设 5 个复孔。另设对照（未加藏花素处理）和空白（不含细胞的培养液）。分别继续培养 24 h、48 h、72 h 后每孔加入 MTT 20 μl（5 mg/ml），37℃、5%CO_2 恒温培养箱中继续培养 4 h，离心 1 000 r/min，5 min 后小心吸去上清，加入 DMSO 200 μl，充分振荡 15 min，全自动酶标仪（波长 570 nm）测定各孔吸光度值（A 值），细胞生长抑制率计算如下：抑制率 =[($A_{对照}-A_{空白}$)-($A_{处理}-A_{空白}$)]/($A_{对照}-A_{空白}$)×100% 。

1.2.4 图像分析细胞增殖的形态学特征 取对数生长期 T24 细胞，经 0.25%胰酶消化后制成细胞悬液，调整细胞浓度为 1×10^5 个 /ml。将 2 cm×2 cm 大小的盖玻片置于 6 孔板中 ，每孔加入 2 ml 的细胞悬液，制成细胞爬片。37℃、5%CO_2 恒温培养箱中培养 24 h 后，吸净培养液，将对照组和药物处理组分别加入新鲜培养液和 3 mmol/L 藏花素，每组设 6 个平行孔，继续培养 24 h。将爬片取出，PBS 漂洗两次室温风干后置于盖破片上进行 Giemsa 染色，倒置显微镜下观察并拍照。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期变化 将终浓度为 3 mmol/L 的藏花素处理 T24 细胞 0、6、12、24、36 和 48 h 后，收集细胞（1~5）×10^5 个，1 000 r/min 离心 5 min，弃去培养液。乙醇固定后，用 1 ml PI 染液 4℃避光染色 30 min，流式细胞仪检测。

1.2.6 荷瘤小鼠模型建立及分组 在 15 只裸鼠右后腿背侧同一部位内接种 2×10^6 个 T24 细胞 200 μl，接种 14 d 后见接种部位有小的突起，28 d 后 12 只裸鼠移植瘤体积达 100 mm^3（成瘤率 80%）。将 12 只荷瘤小鼠平均随机分为对照组和处理组。对照组：6 只于移植瘤周边注射 PBS，每隔 2 天 1 次，每次 0.5 ml，共 21 d。处理组：6 只于移植瘤周边注射 50 mmol/L 藏花素，每隔 2 天 1 次，每次 0.5 ml，共 21 d。

1.2.7 体内抑瘤率测定 每次处理前用游标卡尺测量裸鼠移植瘤的最大径和最小径，计算瘤体积，并据此绘制移植瘤生长抑制曲线，并计算抑瘤率。并观察裸鼠的进食情况，毛色光泽，精神状态等。移植瘤体积 $V=1/2\times ab^2$（a 最大径，b 最小径），抑瘤率 =（1- 处理组瘤体积均值 / 对照组瘤体积均值）×100%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 软件对实验资料进行单因素方差分析，以 $P<0.05$ 表示存在显著性差异。

2 结 果

2.1 MTT 法检测藏花素对 T24 细胞的生长抑制作用

绘制生长抑制曲线，可见各浓度藏花素对 T24 细胞均有生长抑制作用，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（见图 1）：当药物浓度在 1mmol/L ~ 3mmol/L 之间时，其对 T24 细胞的抑制作用随浓度的升高而增加，其差异具有显著性（$P<0.05$），再提高或降低药物浓度其抑制率的改变不明显（$P>0.05$）。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（$P>0.05$）。经线性回归得到，药物作用 48h 时对 T24 细胞的 IC_{50} 为 1.645 mmol/L。

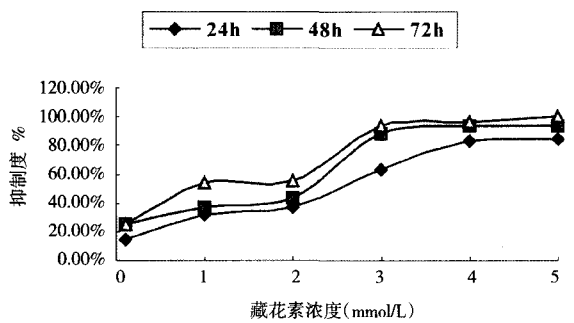


图 1 藏花素作用于 T24 细胞的生长抑制曲线

2.2 细胞增殖的形态学分析

3 mmol/L 藏花素处理后，T24 细胞形态有明显改变，未用药组 T24 细胞形态无改变。形态学分析表明：藏花素能够抑制细胞增殖。结果见图 2。

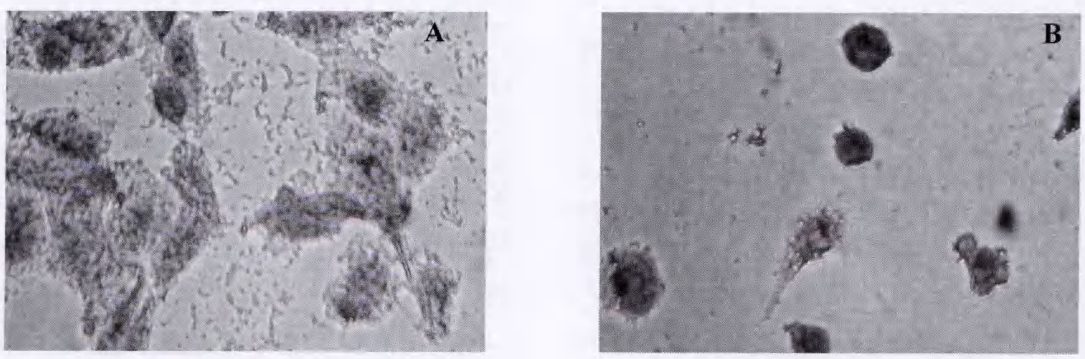
2.3 藏花素对 T24 细胞细胞周期分布的影响

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

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)	细胞周期分布%		
	G_0/G_1 phase	S phase	G_2/M phase
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*	14.39 ± 3.98*	7.42 ± 1.78*
36	84.43 ± 6.72*	10.26 ± 3.84*	5.30 ± 1.67*
48	86.26 ± 6.89*	9.80 ± 3.27*	3.94 ± 1.20*

注：24 h、36 h、48 h 与 0 h 相比，*P<0.05



A. 对照组 T24 细胞　　B. 藏花素处理 T24 细胞

图 2 Crocin 处理后 Giemsa 染色 T24 细胞形态改变(×400)



A. 对照组 移植瘤体积　　B. 处理组 移植瘤体积变小

图 3 藏花素 50 mmol/L 处理组和对照组裸鼠移植瘤体积比较

少(见表 1),并在 48 h 出现了明显的亚二倍体峰(sub-G1 峰)。

2.4 藏花素的体内抑瘤作用

接种 14 d 后可见接种部位有小的突起，以后逐渐明显,28 d 后 12 只裸鼠移植瘤体积均达 100 mm^3 以上,余 2 只未成瘤,1 只死亡,接种成功率为 80%。处理组(对照组)裸鼠每隔两天分别于肿瘤周边注射 1 次 50 mmol/L 藏花素或 PBS 0.5 ml,共 21 d。每次注射前用游标卡尺测量移植瘤的最大径和最小径(图 2A、B),计算移植瘤体积(表 2)。治疗后期实验组裸鼠肿瘤较对照组生长缓慢,其中 1 只于治疗 12 d 后肿瘤消失。从治疗第 12 d 开始到治疗结束对照组裸鼠肿瘤的平均体积明显大于实验组裸鼠肿瘤的平均体积(图 2B),其差异具有显著性(P<0.05)。治疗结束后裸鼠生长抑制率为 27.8%。治疗期间没有出现死亡裸鼠。

3 讨 论

膀胱肿瘤是最常见的泌尿系恶性肿瘤之一,其

表 2 裸鼠移植瘤生长体积(mm^3)

时间	对照组	处理组
用药前	189.58 ± 38.26	153.02 ± 33.45#
第 3 d	267.04 ± 33.40	321.05 ± 42.33#
第 6 d	379.5 ± 54.45	390.23 ± 42.26#
第 9 d	488.68 ± 42.15	435.7 ± 51.92#
第 12 d	513.18 ± 62.33	352.45 ± 43.82*
第 15 d	550.44 ± 59.86	367.72 ± 57.12*
第 18 d	598.48 ± 67.69	403.77 ± 75.35*
第 21 d	602.66 ± 90.32	434.92 ± 82.15*

注：处理组与对照组相比较 *$P<0.05$；#$P>0.05$ 处理组与对照组相比较

中以膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of the bladder,TCCB)最为常见。资料表明单纯手术切除后复发率达 57%~75%,随着肿瘤复发率和病理分级增高,其中 25%~65%可发展为侵润癌,而化疗药物对肿瘤细胞杀伤缺乏靶向性,毒副作用大,存在不同程度的多药耐药。研究表明:祖国传统医学中 600 多种中草药具有不同程度的杀伤癌细胞的作用,由于毒副作用小、能增强机体免疫力、降低化疗副作用、降低复发及提高生成率的特点而备受世界各国肿瘤研究者的关注。膀胱移行细胞癌手术切除、化疗结合中草药治疗是具有中国特色的治疗模式,因此,发现高效毒性低的中草药是提高膀胱移行细胞癌的整体疗效不可忽视的问题。

在众多的抗癌中草药中,藏红花和栀子可称得上是"抗癌奇葩"。藏红花及栀子粗提物具备抗肿瘤活性的特点在国内外得到了广泛的证实。早已证实藏红花粗提物对体外培养的人类多种肿瘤细胞如人宫颈癌细胞株(Hela 细胞)、人神经母细胞瘤细胞(SK-N-SH 细胞)和人肝癌细胞(HepG2)的活性有抑制作用,并存在剂量依赖关系[1,2]。体内实验也进一步证实藏红花粗提物有抑制肿瘤增殖的作用[3,4]。由于天然中草药成分复杂,治疗缺乏靶向性,因此,天然药物的单一成分的研究越来越受到研究者的青睐,实践证明中草药某种活性成分更能有效抑制或杀伤肿瘤细胞。

研究发现,藏红花和栀子的提取物与活性成分藏花素能显著抑制 HeLa 细胞的增殖。藏花素处理的 HeLa 细胞胞质中出现空泡,同时胞质的量减少,细胞收缩和核固缩,具备明显的细胞凋亡特征。Garcia 等[5]将纯化的藏花素应用于大鼠结肠癌模型,结果发现藏花素处理组生存期明显延长,肿瘤的体积明显减小。同时在藏花素作用于正常大鼠的实验中发现,尽管采用相当剂量的藏花素长期处理后仍未发现有害的代谢改变,证实了藏花素不存在或存在较小的细胞毒性。裸鼠的移植性肿瘤也验证了藏花素可使荷瘤小鼠生存期显著延长。但是藏花素能否抑制膀胱移行细胞癌增殖,国内外尚无报道。

本研究用膀胱移行细胞癌 T24 细胞为模型,用不同方法在体内外观察藏花素对膀胱移行细胞癌增殖抑制的作用,结果表明:藏花素对体外培养的 T24 细胞有明显的抑制作用,藏花素作用后细胞核固缩,细胞变圆坏死,证明了藏花素对 T24 细胞的杀伤作用,体内实验也进一步证实藏花素小鼠移植瘤有抑制作用,抑瘤率 27.8%。这些结果可能说明藏花素可能通过激活细胞内途径,从而启动肿瘤细胞的自杀机制达到抑制细胞增殖的作用。细胞周期变化显示藏花素可使 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,揭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。本研究证实藏花素对膀胱移行细胞癌增殖有明显的抑制作用,有望成为治疗膀胱移行细胞癌的高效无毒的天然药物,但对其机制的探讨还有待进一步的深入研究。

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] Abdullaev F I,Riveron-Negrete L,Caballero-Ortega H,et al. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron(Crocus sativus L)[J]. Toxicol In Vitro,2003,17(5-6):731-736.

[3] Das I,Chakrabarty R N,Das S. Saffron can prevent chemically induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2004,5(1):70-76.

[4] Premkumar K,Abraham S K,Santhiya ST,et al. Inhibition of genotoxicity by saffron(Crocus sativus L) in mice[J]. Drug Chem Toxicol,2001,24(4):421-428.

[5] 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,1999,5(2):120-126.

(责任编辑:冉明会)