维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0649-03

藏花素对膀胱移行细胞癌 T24 细胞 VEGF-C 表达水平的影响

吕纯芳,罗春丽,冀慧莹,赵 培

(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 400016)

【摘 要】目的:研究藏花素(Crocin)对膀胱移行细胞癌 T24 细胞血管内皮生长因子 C(Vascular endothelial growth factor,VEGF-C)表达水平的影响。方法:采用 MTT 法测定不同浓度及不同时间藏花素对 T24 细胞抑制率,选出最佳药物浓度和最佳作用时间。用 RT-PCR 和基因芯片分别检测最佳作用时间和最佳药物浓度作用前后 T24 细胞 VEGF-C 的表达。结果:MTT 显示藏花素抑制 T24 细胞生长具有时间和剂量依从性,3mmol/L 藏花素作用 48h 对 T24 细胞的抑制率最高。RT-PCR 显示藏花素组 VEGF-C 表达明显减少,基因芯片扫描结果中藏花素组 VEGF-C 表达也显著下调。结论:藏花素抑制 T24 细胞增殖,可能与下调 VEGF-C 的表达,从而减少肿瘤血管的生成有关。

【关键词】藏花素;膀胱移行细胞癌;表皮生长因子 C

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-12

Effect of crocin on the expression of VEGF-C in the human bladder cancer cell lines T24

LV Chun-fang, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the effect of Crocin on the expression of VEGF-C in transitional cell carcinoma of bladder (TCCB) T24 cell. *Methods*: T24 cells were treated with Crocin. MTT assay was adopted to determine the inhibition rate for selecting the best effect time and concentration of Crocin. The reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) and cDNA microarray were used to evaluate VEGF-C mRNA expression of T24 cells at around the best effect time and as the Crocin concentration reached the best. *Results*: The growth of T24 cells was inhibited significantly($P<0.05$) at 3mmol/L Crocin when treated for 48h. And there was a marked positive correlation between Crocin concentration, time and inhibition rate. RT-PCR showed that VEGF-C mRNA expression in Crocin treated group was significantly lower than that of the control group. The cDNA microarray analysis was coincided well with the RT-PCR data. *Conclusion*: Crocin inhibits the proliferation of T24 cells and the mechanism might be decreasing tumor angiogenesis by down-regulating the expression of VEGF-C.

【Key words】 Crocin; TCCB; VEGF-C

藏红花是一种名贵的中草药,素有"植物黄金"之称,近年来研究表明藏红花粗提物具有广谱的抗癌活性和低毒性。藏花素是从藏红花中提取的主要单一成分,是一种罕见的水溶性类胡萝卜素,具有比藏红花粗提物更好的抑制肿瘤生长的作用,因此 Crocin 被认为是藏红花成分中最有希望的癌症治疗药剂[1]。研究表明:VEGF-C 为 VEGF 家族新成员,具有促进肿瘤血管及淋巴结生成的功能,在肿瘤生长和转移过程中具有重要作用。研究发现 VEGF-C 在膀胱移行细胞癌中高表达[2-4]。本文拟从 Crocin 作用膀胱移行细胞癌(Transitional cell carcinoma of bladder,TCCB)细胞 T24 前后 VEGF-C 的表达情况来探讨 Crocin 对 T24 细胞生长的影响。

1 材料和方法

1.1 主要药品与试剂

Crocin 粉末,规格 1 000mg(美国Sigma 公司):将 1 000mg Crocin 粉末溶于 20ml PBS(0.01mol/L、pH=7.2)中,并加入 62.5mgEDTA 配成贮存液,4℃保存。PBS(0.01mol/L、pH=7.2)

作者介绍:吕纯芳(1977-),女,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤的诊治。
通讯作者:罗春丽,女,教授,E-mail:luochunli79@hotmail.com。
基金项目:重庆市科委自然科学基金(No.CSTC2005BB5309)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

稀释为应用浓度;四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)及胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);RPMI1640 及胎牛血清(美国 Gibco 公司);TRIzol(Invitrogen 公司);基因表达谱芯片 CSC-GE-80(深圳微芯生物科技责任有限公司);通用逆转录聚合酶链反应 RT-PCR 试剂盒(Takara 生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人膀胱移行细胞癌 T24 细胞株,以下简称 T24 细胞(重庆医科大学传染病研究所)常规培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,于 37℃、5%CO_2 条件下孵育生长。

1.2.2 Crocin 对 T24 细胞增殖活性的检测 取对数生长期 T24 细胞,经 0.25%胰蛋白酶消化制成细胞悬液,调整细胞浓度 1×10^4 个 /ml。调零组:只加 200μl RPMI1640 培养基。对照组:加 180μl 细胞悬液和 20μl RPMI1640 培养基。Crocin 处理组:每孔 180μl 细胞悬液,常规培养 24h 后分别加入 20μl 不同浓度的 Crocin,使之终浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0mmol/L,每个浓度设 3 个平行孔。各组培养 24h、48h、72h 后,分别加入 MTT 20μl(5mg/ml)继续培养 4h,离心弃上清,加 DMSO 150μl,充分振荡 10min,全自动酶标仪(波长 570nm)测定各孔吸光度值(A 值),计算细胞生长抑制率 $=[1-(A_{处理}-A_{调零})/(A_{对照}-A_{调零})]\times100\%$。

1.2.3 VEGF-C mRNA 表达的检测 在基因库查找人类 VEGF-C(Accession:BC035212)基因序列,利用 primer5 设计 VEGF-C 特异引物序列,经 BLAST 检索后由 Takara 生物技术有限公司合成。选取人源 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照物。VEGF-C 上游引物:5'-CAATCAGTTTTGCCAATCACAC-3',下游引物:5'-AGCCTTCTGGCGGTTCGT-3',584bp;β-actin 上游引物:5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3',下游引物:5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTG-3',543bp。用 TRIzol 分别提取对照组(常规培养 48h 的 T24 细胞)和实验组(3 mmol/L Crocin 作用下培养 48h 的 T24 细胞)总 RNA。RT 反应条件:37℃ 15min;85℃ 5s。PCR 反应条件:94℃预变性 3min,94℃变性 30s,62℃退火 30s,72℃延伸 45s,35 个循环后 72℃再延伸 5min。PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,180V,电泳 10min,在 BIO-RAD 成像仪上成像分析,以特异性扩增产物条带与相应内参物条带吸光度比值测定 VEGF-C mRNA 的表达量,分析 VEGF-C 的表达。

1.2.4 基因芯片差异表达谱分析 VEGF-C (1)总 RNA 的提取与鉴定:75ml 培养瓶常规培养 T24 细胞,用 TRIzol 分别提取对照组(常规培养 48h 的 T24 细胞)和实验组(3mmol/L Crocin 作用下培养 48h 的 T24 细胞)的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测总 RNA 质量。(2)探针标记及芯片杂交:各组逆转录生成 cDNA,以 Cy5 标记对照组,Cy3 标记实验组。将标记好的探针等量混匀,加在预杂交好的基因芯片上,盖玻片封片,置于杂交仓中,42℃杂交 16h。杂交结束后,洗片、晾干。(3)检测与分析:用 Gen Ⅲ Microarray Scanner 扫描芯片,应用 Array Vision 图像分析软件分析 Cy3,Cy5 2 种荧光强度的信号和比值。用 384 个质控基因对 Cy3、Cy5 进行均衡,同时对原始数据进行均一化处理以校正 Cy3、Cy5 标记体系间的系统误差。计算 Cy3/Cy5 比值大于 2 或小于 0.5 的基因点为差异表达基因。

1.3 统计学方法

应用统计软件 SPSS 10.0 进行统计分析,$P<0.05$ 表示有

表 1 不同浓度 Crocin 在不同时间对 T24 细胞的抑制率

组别	24h [d]		48h [e]		72h [e]	
	吸光度	抑制率(%)	吸光度	抑制率(%)	吸光度	抑制率(%)
调零组	0.130±0.009	-	0.183±0.003	-	0.154±0.004	-
对照组	0.890±0.122	-	1.323±0.014	-	1.379±0.124	-
A [a]	0.790±0.061	9.13	1.263±0.022	5.29	1.314±0.089	5.31
B [b]	0.721±0.012	18.63	1.011±0.012	27.37	1.085±0.034	24.00
C [b]	0.731±0.032	17.26	0.983±0.026	29.82	0.933±0.008	36.41
D [b]	0.599±0.056	35.43	0.868±0.041	39.91	0.918±0.026	37.63
E [b]	0.546±0.006	42.73	0.750±0.062	50.26	0.761±0.055	50.45
F [b]	0.421±0.009	59.89	0.646±0.074	59.36	0.579±0.013	65.31
G [c]	0.382±0.043	65.26	0.573±0.031	65.79	0.557±0.014	67.10
H [c]	0.334±0.029	71.87	0.545±0.077	68.25	0.499±0.034	71.84
I [c]	0.324±0.025	73.29	0.485±0.053	73.51	0.449±0.071	75.92
J [c]	0.339±0.028	71.18	0.468±0.032	75.00	0.421±0.016	78.20

A 至 J 组 Crocin 浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0mmol/L;1. A 组与对照组比较,$P>0.05$; 2. B、C、D、E、F 组与对照组比较,$P<0.05$; 3. G 组与 H 组与 I 组与 J 组比较,$P>0.05$; 4. 24h 与 48h 和 72h 比较,$P<0.05$; 5. 48h 与 72h 比较,$P>0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

统计学意义，数据描述采用$\bar{x} \pm s$表示。采用单因素方差分析，两两比较采用方差分析内的 SNK 法。

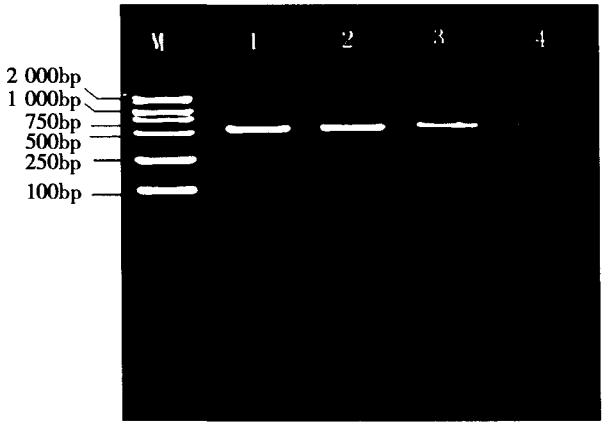
2 结 果

2.1 不同浓度不同时间 Crocin 对 T24 细胞的生长抑制率(见表 1)

由表 1 可见 Crocin 浓度和作用时间在一定范围内时，Crocin 对 T24 细胞的生长抑制作用具有剂量依赖性。MTT 结果显示 3mmol/L 藏花素作用 T24 细胞 48h 的抑制率与对照组相比有显著意义($P<0.05$)。因此选择 Crocin 浓度为 3mmol/L、作用时间 48h 作为后续实验的最佳作用浓度和最佳作用时间。

2.2 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 结果显示实验组 VEGF-C mRNA 电泳条带较对照组明显亮度减低(如图 1)，实验组 VEGF-C/β-actin OD 值为 0.549 ± 0.072，对照组 VEGF-C/β-actin OD 值为 0.939 ± 0.043，差异有统计学意义($P<0.05$)。



M. DNA Marker; 1. 对照组 β-actin; 2. 实验组 β-actin; 3. 对照组 VEGF-C; 4. 实验组 VEGF-C

图 1 RT-PCR 检测 VEGF-C 表达

2.3 基因芯片分析

所有样品总 RNA 均有清晰的 28S 和 18S 条带，OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.6~2.0 之间，样品质检结果合格。芯片扫描结果显示 8 064 个基因中 Crocin 处理组与对照组共有 836 个差异表达基因，上调基因有 486 个，下调基因有 350 个。候选基因 VEGF-C 在 Crocin 处理组中显著下调，Cy3/Cy5 比值为 0.36。基因芯片与 RT-PCR 结果相一致，多角度从分子水平证实 Crocin 作用 T24 细胞可使 VEGF-C 表达下调。

3 讨 论

Crocin 是藏红花的主要活性成分之一，属于类胡萝卜素类化合物，分子式为 $C_{44}H_{64}O_{24}$，分子量 977.21，为橙黄色粉末。具有多不饱和共轭烯结构，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[5]。Garcia-Olmo DC[6]发现接受 Crocin 治疗的结肠腺癌雌性小鼠肿瘤生长缓慢，存活期延长，无其他毒副作用。Escribano[7]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。研究表明，藏花素可以抑制肿瘤细胞的生长，其抗癌作用可能与对肿瘤细胞的强烈细胞毒性有关[1]。本实验亦进一步证实 Crocin 具有抑制 T24 细胞增殖的作用，且该作用在一定时间和药物浓度范围与时间、剂量呈依赖性。

抑制血管的生成已成为近年来抗肿瘤治疗研究的热点，肿瘤血管的形成主要受 VEGF 因子的调节，其中 VEGF-C 为 VEGF 家族的新成员，是调控血管生成的重要因子。肿瘤细胞能够产生和分泌多种血管生成因子，通过旁分泌方式作用于血管内皮细胞诱导新生血管形成[8,9]。VEGF-C 通过促进肿瘤新生血管形成，增加血管通透性，从而为肿瘤细胞提供更充足的营养成分和氧气，加快了癌细胞的增殖。而瘤细胞骤然增加，反过来又强力地诱导新生血管形成。因此，通过抑制 VEGF 的表达或阻止其与受体的结合，达到抗血管生成从而抑制肿瘤生长的目的，这已成为当前抗肿瘤尤其是耐药肿瘤治疗的重要策略[10]。

本实验结果显示 Crocin 能抑制 T24 细胞的增殖，且 Crocin 作用组 VEGF-C 表达量显著降低。由此推测，Crocin 可能与下调 VEGF-C 的表达，从而减少肿瘤血管和淋巴结的新生，抑制 T24 肿瘤的增殖和发展。提示 Crocin 可作为 VEGF-C 抑制剂减少 T24 细胞分泌 VEGF-C，可在一定程度上抑制 T24 细胞的增殖。其具体作用机制及疗效有待于进一步深入探讨。

参 考 文 献

[1] Abdullaev FI, Espinosa-Aguirre JJ. Biomedical properties of

(下转第 656 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

苗。

实验采用的穿梭表达载体 pGEX-1λT 含有 GST 基因，可将外源基因表达为 GST(分子质量单位为 26ku)的融合蛋白，表达效率高，操作简便。GST 分子量大，结构复杂，免疫动物制备抗体时，免疫原性强，用于基础免疫更有利于激发特异性回忆反应[12]。将重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 转入 BL21 中，用 IPTG 诱导表达，表达产物经 SDS-PAGE 电泳，在分子质量单位约为 92ku 处有目的蛋白条带，与预期表达蛋白大小(65+1+26=92ku)相符；而未诱导的 BL21 无目的蛋白条带，可能是表达的目的蛋白较少，导致 SDS-PAGE 不能检测。图像软件系统分析发现，EmⅡ/3/GST 融合蛋白占 BL21 全菌总蛋白的 22%，且在 IPTG 诱导 3～5h 蛋白表达量最高，提示重组质粒 pGEX-EmⅡ/3 能在 BL21 中高效表达，不同的诱导时间蛋白表达效率不同。Western blot 分析发现 BL21 中表达的 EmⅡ/3/GST 融合蛋白可被泡球蚴病鼠血清特异识别，提示 BL21 中表达的重组抗原能够正确折叠，保持着具有活性的免疫功能区，具有特异抗原性，为多房棘球绦虫重组 Bb-EmⅡ/3 疫苗的开发利用提供了坚实的理论基础。

参 考 文 献

[1] 王昌源，陈雅棠，余登高，等.多房棘球绦虫 ELP 重组蛋白疫苗免疫 BALB/c 小鼠引起的免疫应答[J]. 免疫学杂志，2003；19(4)：285-288，292.

[2] 李文桂，王 鸿，朱佑明.多房棘球绦虫重组 BCG-EmⅡ/3 疫苗免疫小鼠后 IgG 及其亚类和 IgE 的动态观察[J]. 中国病原生物学杂志，2007；2(3)：197-199.

[3] Missich R，Sgorbati B，Donald JL，et al. Transfection of Bifidobacterium longum with pRM2，a constructed Escherichia coli-Bifidobacteria longum shuttle vector[J]. Plasmid，1994；32(2)：208-211.

[4] 王昌源，陈雅棠，黄爱龙，等.多房棘球绦虫 elp 基因在真核细胞 COS7 中的表达[J]. 中国寄生虫病防治杂志，2003；16(1)：38-42.

[5] 李文桂，陈雅棠.双歧杆菌生物学作用研究进展[J]. 地方病通报，2006；21(1)：85-88.

[6] Yazawa K，Fujimori M，Amino J，et al. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy：selective localization and growth in hypoxic tumours[J]. Cancer Gene Ther，2000；7(2)：269-274.

[7] 徐根兴.转人实体瘤内皮抑制因子(Endostatin)基因双歧杆菌的方法[J]. 发明专利公告，1999；15(20)：20.

[8] 韩庆旺，徐根兴，徐叶芬，等.大肠杆菌－双歧杆菌穿梭表达载体的构建及内皮抑素基因的表达[J]. 生物技术通讯，2006；17(1)：18-21.

[9] 郭志英，易 成，王树人，等.婴儿双歧杆菌胞嘧啶脱氨酶肿瘤靶向性基因治疗系统的构建[J]. 中国肺癌杂志，2004；7(2)：95-98.

[10] Vogel M，Gottstein B，Muller N，et al. Production of a recombinant antigen of echinococcus multilocularis with high immunodiagnostic sensitivity and specificity[J]. Mol Biochem Parasitol，1988；31(2)：117-125.

[11] Felleisen R，Gottstein B. Comparative analysis of full-length antigenII/3 from Echinococcus multilocularis and E. granulosus[J]. Parasitol，1994；109(2)：223-232.

[12] Lacham-Kaplan O，Chy H，Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes[J]. Stem Cells，2006；24(2)：266-273.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 651 页)

saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials[J]. Cancer Detect Prev，2004；28(6)：426-432.

[2] Zu X，Tang Z，Li Y，et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in bladder transitional cell cancer and its relationship to lymph node metastasis[J]. BJU Int，2006；98(5)：1090-1093.

[3] Suzuki K，Morita T，Tokue A. Vascular endothelial growth factor-C(VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Int J Urol，2005；12(2)：152-158.

[4] 祖雄兵，齐 琳，叶章群，等. VEGF-C 在膀胱移行细胞癌中的表达及其临床意义[J]. 临床泌尿外科杂志，2004；19(9)：551-554.

[5] He SY，Qian ZY，Tang FT，et al. Effect of crocin on experimental atherosclerosis in quails and its mechanisms[J]. Life Sci，2005；77(8)：907-921.

[6] Garcia-Olmo DC，Riese HH. 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.

[7] Escribano J，Alonso GL，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.

[8] Saleh M，Stacker SA，Wilks AF. Inhibition of growth of C6 glioma cells in vivo by expression of antisense vascular endothelial growth factor sequence[J]. Cancer Res，1996；56(2)：393-401.

[9] Yang SX，Chen JH，Jiang XF，et al. Bian XW.Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor[J]. Biochem Biophys Res Commun，2005；335(2)：523-528.

[10] Zhu Z，Rockwell P，Lu D，et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced receptor activation with anti-kinase insert domain-containing receptor single-chain antibodies from a phage display library[J]. Cancer Res，1998；58(15)：3209-3214.

(责任编辑：关蕴良)