

小白菊内酯在人膀胱癌 T24 细胞中抑制增殖和诱导凋亡的作用

白宇, 雷永虹, 李瑞乾, 胡礼炳, 王启林

(昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤医院泌尿外科, 云南昆明 650018)

[摘要] **目的** 研究小白菊内酯对膀胱癌 T24 细胞增殖和凋亡的影响及其可能存在机制. **方法** 应用不同浓度的小白菊内酯作用于 T24 细胞, 使用 MTT 法观察 T24 细胞在增殖方面的变化, 流式细胞术检测小白菊内酯对细胞周期和细胞凋亡的影响, 蛋白印迹法检测 NF- κ B 信号通路和 Bcl-2 家族蛋白的变化. **结果** 小白菊内酯对 T24 细胞增殖具有明显抑制作用, 并呈显著浓度依赖性和时间依赖性. 小白菊内酯可以诱导 T24 细胞发生凋亡, 并可以改变 T24 细胞在不同细胞周期的分布, 包括 G1 期细胞所占百分比升高, S 期细胞所占百分比降低, 而 G2/M 期细胞所占百分比无明显改变. 随着小白菊内酯作用浓度的增加, T24 细胞中磷酸化 I κ B α 的表达逐渐降低, 但不影响 I κ B α 的表达. 同时, 小白菊内酯能抑制 Bcl-2 蛋白的表达而促进 Bax 蛋白的表达. **结论** 小白菊内酯能显著抑制 T24 细胞增殖, 诱导 T24 细胞发生凋亡, 其作用机制与可能与抑制 T24 细胞中 NF- κ B 信号通路的激活, 调节 Bcl-2 家族蛋白表达变化有关.

[关键词] 膀胱肿瘤; 小白菊内酯; 凋亡

[中图分类号] R694; R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 07 - 0005 - 04

Effects of Parthenolide in Inhibiting Proliferation and Inducing Apoptosis of T24

BAI Yu, LEI Yong-hong, LI Rui-qian, HU Li-bing, WANG Qi-lin

(Dept. of Urinary Surgery The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming Yunnan 650018, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of parthenolide on growth inhibition, cell apoptosis and corresponding molecular mechanism of human T24 bladder cancer cells. **Methods** The inhibitory effect of parthenolide on human T24 cells was determined by MTT assay. The cell apoptosis and the cell cycle were analyzed by flow cytometry. Alterations in signal pathway of NF- κ B and Bcl-2 family proteins were analyzed by Western blot. **Results** Parthenolide inhibited the proliferation of T24 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. As showed by flow cytometry, parthenolide treatment of the T24 cells led to significant G1-phase cell cycle arrest in a dose-dependent manner and a decrease in cell population in the S-phase, whereas the population of cells in G2/M phase did not change significantly. Flow cytometry also showed a dose dependent increase in T24 cells apoptosis by parthenolide treatment. Western blot analysis indicated a down-regulation of phosphorylated I κ B α in a dose-dependent manner without an effect on I κ B α expression in T24 cells by parthenolide treatment. Parthenolide treatment to T24 cell lines resulted a significant reduction in Bcl-2 protein expression but an increase in Bax protein expression in a dose-dependent manner. **Conclusions** Parthenolide treatment could lead to a significant dose-dependent and time-dependent inhibition in the growth and an increase in apoptosis of human T24 bladder cancer cells. The mechanism of action of parthenolide may be related to inhibition of NF- κ B activation and regulation of Bcl-2 family proteins expression in human T24 bladder cancer cells.

[Key words] Bladder tumor; Parthenolide; Apoptosis

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81201767); 云南省科技厅 - 昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 (2013FZ277)

[作者简介] 白宇 (1979~), 男, 云南昆明市人, 医学博士, 讲师, 主要从事泌尿系肿瘤 RNA 激活和化学预防方面的研究工作.

膀胱移行细胞癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 欧洲最新统计数据表明, 膀胱癌在所有男性恶性肿瘤中排名第 7 位, 在所有女性恶性肿瘤中排名第 17 位^[1]。目前, 中国部分城市疾病发病率报告提示膀胱恶性肿瘤发病率较前相比有明显升高的趋势^[2]。近年来, 随着对膀胱癌的诊断治疗水平的不断提高, 膀胱癌的死亡率已明显降低, 但是非肌层浸润性膀胱癌的复发率仍然很高, 发生其他脏器转移或淋巴结转移膀胱癌的预后仍然较差^[3,4]。因此探索新的治疗方法已经成为泌尿外科医师迫切需要解决的问题。癌症的化学预防定义为利用天然或生物物质来延缓或者逆转癌症发生发展过程, 从而降低恶性肿瘤发生率和死亡率的方法策略。我们希望找到一种天然的植物提取物, 对膀胱恶性肿瘤进行化学预防, 从而改善膀胱癌的预后。

小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 是艾叶菊属黑叶母菊的提取物, 具有多种药理作用, 包括抑制肿瘤生长、杀菌、抗炎、解痉等等。近年来研究发现, 小白菊内酯在明显抑制肿瘤活性的同时, 不良反应的发生却很少。小白菊内酯抗肿瘤的主要机制是通过抑制 NF- κ B 通路的活性, 进而引起下游蛋白的变化, 最终抑制肿瘤细胞生长, 通过多个途径诱导肿瘤细胞发生凋亡^[5]。

本研究主要通过小白菊内酯对人膀胱癌 T24 细胞进行预处理, 观察肿瘤细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的变化, 并通过蛋白印迹法, 观察 NF- κ B 信号通路和 Bcl-2 家族等蛋白表达的变化。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人膀胱癌 T24 细胞株购自上海细胞生物研究所。小白菊内酯 (Parthenolide): 购自 Sigma 公司, 纯度 > 95%。Bax 鼠单抗和 Bcl-2 鼠单抗: 购自美国 Cell Signaling 公司, p-I κ Ba 鼠单抗和 I κ Ba 兔多抗: 购自美国 Santa-Cruz Biotechnology 公司。

1.2 细 胞 培 养

将 T24 细胞接种于 RPMI 1640 培养液中 (含 10% 小牛血清), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 四 唑 盐 比 色 法 (MTT 法)

取对数生长期的膀胱癌细胞, 胰酶消化后将细胞浓度调整为 5×10^4 /mL。取 96 孔板, 每孔接种 200 μ L 膀胱癌 T24 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养。24 h 后, 取出培养板, 加入不同浓度的小白菊内酯 (设立 4 个浓度: 5, 10, 15 和 20 μ M), 同时设立空白对照组。每组设 4 个平行孔。

置 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱内培养。分别于 24 h, 48 小时和 72 h 后取出 96 孔板, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μ L, 继续培养 4 h。取出 96 孔板, 弃上清液, 每孔加二甲基亚砷 150 μ L, 室温放置 10 min。在 490 nm 波长处用酶联免疫检测仪测定其吸光度 (OD) 值。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{治疗组吸光度值}}{\text{对照组吸光度值}} \times 100\%$$

1.4 流 式 细 胞 术

1.4.1 检测细胞周期 用不同浓度小白菊内酯处理 T24 细胞, 24 h 后收集各组细胞, 用 70% 乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 冰箱存放至少 18 h。经 PBS 洗涤后, 加染液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光染色 30 min 后上机检测细胞周期。分析碘化丙啶 (PI) 荧光强度, 通过专门的软件来分析每个细胞周期的比例。

1.4.2 检测细胞凋亡 用不同浓度小白菊内酯处理 T24 细胞, 24 h 后收集各组细胞。将悬浮细胞用 PBS 洗涤 2 次加入 Binding Buffer 和 FITC 标记的 Annexin-V (20 μ g/mL) 10 μ L, 常温下避光孵育 30 min。重新收集细胞, 用 Binding Buffer 将细胞再次重悬, 加入碘化丙啶 (PI) (50 μ g/mL) 5 μ L。充分混合后上机检测 T24 细胞凋亡情况。

1.5 Western Blotting 蛋白印迹

用不同浓度小白菊内酯处理 T24 细胞, 24 h 后收集各组细胞, 提取细胞蛋白, 调整蛋白浓度。每孔加入 20 μ L 蛋白, 进行电泳、转膜以及封闭, 把膜放入按说明稀释的一抗中, 温和振荡 2~3 h (4 $^{\circ}$ C) 后, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜。次日再温和振荡 (4 $^{\circ}$ C) 2 h, 在 TBS/T 液中洗膜 30 min 后, 把膜置于按说明稀释的二抗中温和振荡 1~2 h, 然后在 TBS/T 中洗膜 30 min, 中间换液 2~3 次。在暗室中通过胶片曝光, 胶片显影及定影, 用扫描仪扫描记录胶片上蛋白印迹的变化。

1.6 统 计 学 分 析

本研究实验获得的各项数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。使用 SPSS 进行方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 四 唑 盐 比 色 法 检 测 小 白 菊 内 酯 对 膀 胱 癌 T24 细 胞 生 长 的 抑 制 作 用

通过 MTT 法, 笔者观察到不同浓度的小白菊内酯在不同的作用时间, 对 T24 细胞的抑制效果 (表 1、图 1)。5~20 μ M 浓度的小白菊内酯对

T24 细胞作用 24 h 后的存活率由 92.43% 降低至 34.19%，在相同浓度水平上，随着作用时间的延长，T24 细胞的存活率明显降低。由此可见，小白

菊内酯对 T24 细胞具有生长抑制作用，且呈现出明显的浓度依赖性和时间依赖性。

表 1 MTT 法检测小白菊内酯对膀胱癌 T24 细胞抑制作用

Tab. 1 The inhibitory effect of parthenolide on human T24 bladder cancer cells by MTT assay

浓度 (μM)	24 h	48 h	72 h
5	92.43 \pm 4.07*	69.00 \pm 7.18*	66.71 \pm 6.09*
10	66.96 \pm 5.61*	46.94 \pm 5.91*	45.56 \pm 9.08*
15	49.56 \pm 2.21*	27.15 \pm 2.24*	21.08 \pm 4.97*
20	34.19 \pm 3.93*	13.94 \pm 1.65*	7.16 \pm 2.50*

与对照组 (小白菊内酯浓度为 0) 比较, * $P < 0.05$.

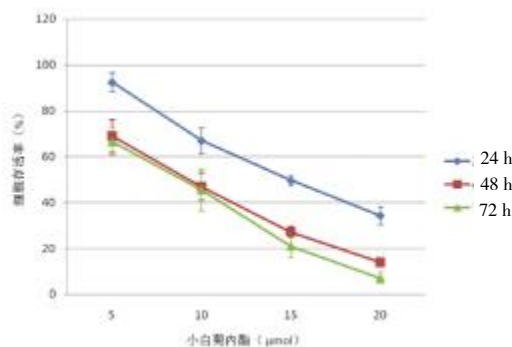


图 1 MTT 法检测小白菊内酯对膀胱癌 T24 细胞抑制作用的量效时效关系曲线

Fig. 1 Dose-effect and time-effect curve of parthenolide on T24 cells by MTT assay

2.2 流式细胞术检测小白菊内酯对 T24 细胞周期及细胞凋亡的影响

收集不同浓度小白菊内酯处理 24 h 后的细

胞，用流式细胞仪检测后发现：小白菊内酯可以使 G1 期细胞增多，S 期细胞减少，并表现出明显的浓度依赖性，而 G2/M 期细胞所占比例无明显变化 (见表 2)。

2.3 小白菊内酯对 T24 细胞 NF- κ B 信号通路的影响

收集不同浓度小白菊内酯处理 24 h 后的细胞，通过蛋白印迹法检测细胞内 NF- κ B 信号通路的变化后发现，小白菊内酯能降低 T24 细胞中磷酸化 I κ B α (p-I κ B α) 的表达，并呈浓度依赖性，而不影响 I κ B α 的表达 (见图 2)。

2.4 小白菊内酯对 T24 细胞 Bcl-2 家族蛋白表达的影响

收集不同浓度小白菊内酯处理 24 h 后的细胞，用蛋白印迹法检测 T24 细胞内 Bcl-2 家族蛋白变化后发现，小白菊内酯可以明显降低 Bcl-2 蛋白的表达，而增高 Bax 蛋白的表达，并呈浓度依赖性 (见图 3)。

表 2 小白菊内酯对 T24 细胞周期及细胞凋亡的影响

Tab. 2 Effect of parthenolide on cell cycle and apoptosis of T24 cell

浓度 (μM)	G1	S	G2/M	凋亡率 (%)
0	46.5 \pm 3.6	47.6 \pm 3.1	15.3 \pm 2.9	6.9 \pm 1.2
5	55.4 \pm 4.5*	41.6 \pm 4.2	16.5 \pm 3.7	20.8 \pm 2.3*
10	68.4 \pm 5.6*	21.3 \pm 2.1*	7.9 \pm 1.8*	38.4 \pm 2.1*
15	75.9 \pm 3.2*	23.7 \pm 3.4*	12.8 \pm 2.3	50.7 \pm 4.5*
20	78.2 \pm 4.9*	18.9 \pm 3.6*	18.5 \pm 2.5	58.9 \pm 5.1*

与对照组 (小白菊内酯浓度为 0) 比较, * $P < 0.05$.

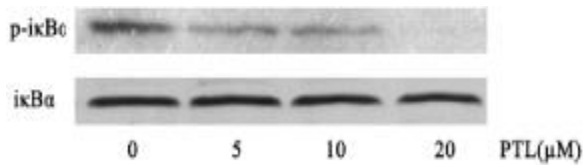


图 2 小白菊内酯对 T24 细胞 NF- κ B 信号通路的影响

Fig. 2 Effect of parthenolide on NF- κ B signaling pathway of T24 cells

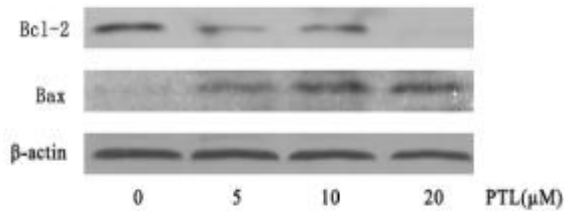


图 3 小白菊内酯对 T24 细胞 Bcl-2 家族蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of parthenolide on Bcl-2 family protein expression of T24 cells

3 讨论

小白菊内酯作为一种天然的植物提取物, 已经被多个研究证明对肝癌、胰腺癌、结肠癌、脑胶质瘤、卵巢癌等多种恶性肿瘤具有生长抑制作用和诱导肿瘤细胞发生凋亡的作用^[6], 而其对膀胱癌的作用研究, 国内外尚不多见. 在本研究中, 笔者发现小白菊内酯可以明显抑制膀胱癌 T24 细胞的生长活性, 并诱导膀胱癌细胞发生凋亡.

NF- κ B 是细胞凋亡调控中的重要途径, NF- κ B 的持续激活状态可以促使染色体发生重新排列和变异, 促进细胞增殖, 诱导细胞发生癌变. 对于癌细胞来说, NF- κ B 信号通路的激活可以使细胞避免凋亡发生、促进血管生成和细胞的转移^[7]. 多个研究均已证明, 恶性程度较高的实体瘤均有较高的 NF- κ B 表达水平. 这项研究表明, 小白菊内酯能明显降低 T24 细胞中磷酸化 I κ B α 的表达, 并呈浓度依赖性, 但不影响 I κ B α 的表达, 提示小白菊内酯可以抑制膀胱癌 T24 细胞中 NF- κ B 信号通路的激活.

Bcl-2 家族是细胞凋亡过程中起到关键作用的一组蛋白, 有研究表明, Bcl-2 家族是 NF- κ B 通路下游的重要介导者, NF- κ B 通路的激活可以正性调节 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白, 而负性调节促凋亡蛋白^[8]. Bcl-2 基因家族中的促凋亡蛋白包括

Bad, Bax, Bak 等, 抗凋亡蛋白包括 Bcl-2, Bcl-xl 等^[9]. 在笔者的研究中, 小白菊内酯能明显降低 T24 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 而增强促凋亡蛋白 Bax 的表达, 均呈浓度依赖性. 由此可见, 小白菊内酯可以通过抑制 Bcl-2 家族中抗凋亡蛋白表达而增强促凋亡蛋白的表达来诱导膀胱癌细胞发生凋亡.

综上所述, 本研究发现, 小白菊内酯能通过抑制 NF- κ B 通路从而影响 T24 细胞中 Bcl-2 家族蛋白的变化, 使抗凋亡蛋白表达降低, 而促凋亡蛋白表达增加, 最终导致凋亡的发生.

[参考文献]

- [1] BABJUK M, BURGER M, ZIGEUNER R, et al. EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013 [J]. *Eur Urol*, 2013, 64 (4): 639 - 653.
- [2] 张薇, 项永兵, 刘振伟, 等. 1973-1999 年上海市区老年人恶性肿瘤发病趋势分析 [J]. *中华老年医学杂志*, 2005, 24(9): 701 - 704.
- [3] ASHUGHYAN V R, MARIHART S, DJAVAN B. Chemopreventive trials in urologic cancer [J]. *Rev Urol*, 2006, 8 (1): 8 - 13.
- [4] PECTASIDES D, PECTASIDES M, NIKOLAOU M. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy in muscle invasive bladder cancer: literature review [J]. *Eur Urol*, 2005, 48 (1): 60 - 67.
- [5] POZAROWSKI P, HALICKA D H, PARZYKIEWICZ Z. NF- κ B inhibitor sesquiterpene parthenolide induces concurrently a typical apoptosis and cell necrosis: difficulties in identification of dead cells in such cultures [J]. *Cytometry*, 2003, 54(2): 118 - 124.
- [6] KARIN M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression [J]. *Nature*, 2006, 441 (7092): 431 - 436.
- [7] WAN F, LENARDO M J. The nuclear signaling of NF- κ B: current knowledge, new insights, and future perspectives [J]. *Cell Res*, 2010, 20(1): 24 - 33.
- [8] PALOMBELLA V J, RANDO O J, GOLDBERG A L, et al. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- κ B 1 precursor protein and the activation of NF- κ B [J]. *Cell*, 1994, 78(5): 773 - 785.
- [9] ROSSE T, OLIVIER R, MONNEY L, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [J]. *Nature*, 1998, 391(6666): 496 - 499.

(2014-04-11 收稿)