

过夜至细胞完全贴壁后弃上清分别加入不同浓度百里醌(20 μ mol/L、40 μ mol/L和80 μ mol/L)作用24h,或BIU-87细胞经TPA(80nmol/L)预处理1h后,再加入80 μ mol/L百里醌作用24h;同时设置空白调零组(不加细胞加入等量的PBS),以及阴性对照组(加入等量的溶媒),每组设6个复孔;结束培养前4h每孔加入5g/L的MTT液10 μ l后放培养箱继续培养,终止培养后弃上清每孔加DMSO 100 μ l,轻微振荡10min,待孔内结晶完全溶解并色素均匀后上酶标仪于492nm检测各孔光密度值(OD值),记录结果,计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组OD值-空白调零组OD值)/(对照组OD值-空白调零组OD值) $\times$ 100%。

4. 流式细胞术检测细胞凋亡:采用膜联蛋白(annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)双染色法检测细胞早期凋亡。将 4×10^5 个对数生长期BIU-87细胞接种在6孔培养板中,生长至90%融合时,药物处理同上。然后按试剂盒说明以500 μ l的结合缓冲液重悬,按试剂盒说明加入5 μ l annexin V-FITC混匀后,再加入5 μ l PI,混匀后避光,室温反应15min。同时设阴性对照(不加annexin V-FITC和PI),置流式细胞仪测定细胞早期凋亡率。

5. Western blot检测BIU-87细胞中I κ B α 的表达:收集对数生长期的BIU-87细胞,TPA(80nmol/L)预处理1h后,再加入不同浓度百里醌(20、40和80 μ mol/L)作用24h。参照Su

等^[5]的方法分离出细胞质蛋白质,取20 μ g蛋白质经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移至聚偏二氟乙烯滤膜上,与I κ B α 一抗室温孵育3h,再与辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1h,漂洗后进行蛋白印迹法检测,ECL显色,X线胶片曝光。用ImageJ分析软件将每个特异条带灰度值数字化,以 α -微管蛋白(α -tubulin)与目的蛋白灰度值的比值作为蛋白的相对表达量,实验重复3次。

6. 统计学方法:实验所得计量数据均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,采用SPSS 13.0统计软件进行 t 检验和方差检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 百里醌对体外膀胱癌BIU-87细胞增殖的影响:百里醌可显著抑制膀胱癌BIU-87细胞增殖,呈浓度依赖性。BIU-87细胞经不同浓度百里醌(20、40和80 μ mol/L)作用24h后,细胞存活率分别为81.2%、72.5%和58.4%,与对照组相比较,均有统计学意义(图1A);TPA(80nmol/L)单独作用1h对BIU-87细胞无明显增殖抑制作用,而TPA预处理1h后,明显削弱百里醌对膀胱癌BIU-87细胞的增殖抑制作用(图1B)。

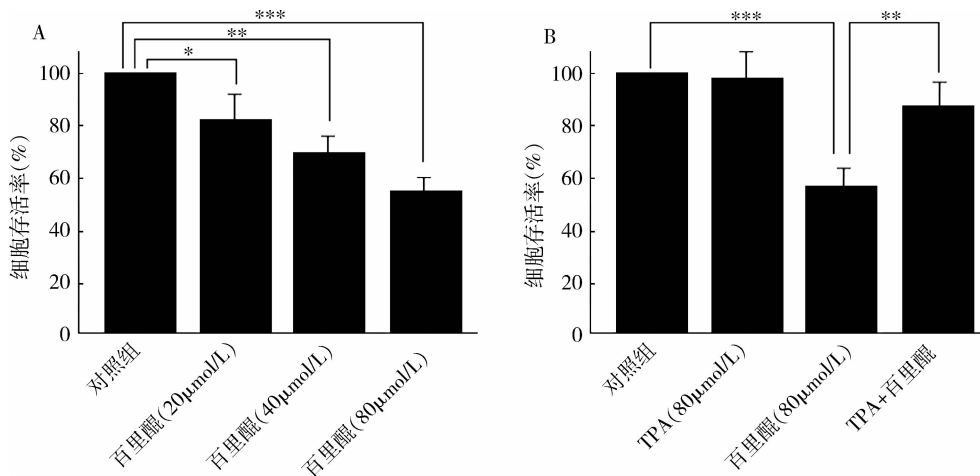


图1 百里醌对体外培养的膀胱癌BIU-87细胞增殖的影响

A. 不同浓度百里醌对膀胱癌BIU-87细胞的增殖抑制作用;B. TPA单独及联合百里醌对BIU-87细胞的增殖抑制作用

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2. 百里醌对膀胱癌BIU-87细胞凋亡的影响:不同浓度百里醌(20、40和80 μ mol/L)作用BIU-87细胞24h后,分别诱导 $(4.6 \pm 1.1)\%$ 、 $(7.8 \pm 1.7)\%$ 和 $(14.3 \pm 2.8)\%$ 的BIU-87细胞发生早期凋亡,与对照组 $(1.6 \pm 0.5)\%$ 相比较,均有显著性差异(图2A);但TPA(80nmol/L)预处理膀胱癌细胞1h后百里醌(80 μ mol/L)再作用24h仅产生 $(6.5 \pm 2.1)\%$ 的早期凋亡细胞,与百里醌(80 μ mol/L)组相比较,有统

计学意义(图2B)。

3. 百里醌对BIU-87细胞质中I κ B α 蛋白表达的影响:Western blotting检测结果表明TPA(80nmol/L)作用1h即可显著抑制BIU-87细胞中I κ B α 的表达;而百里醌可显著上调TPA预处理后的BIU-87细胞中I κ B α 蛋白的表达水平,呈浓度依赖性,以80 μ mol/L百里醌上调I κ B α 作用最为明显(图3)。

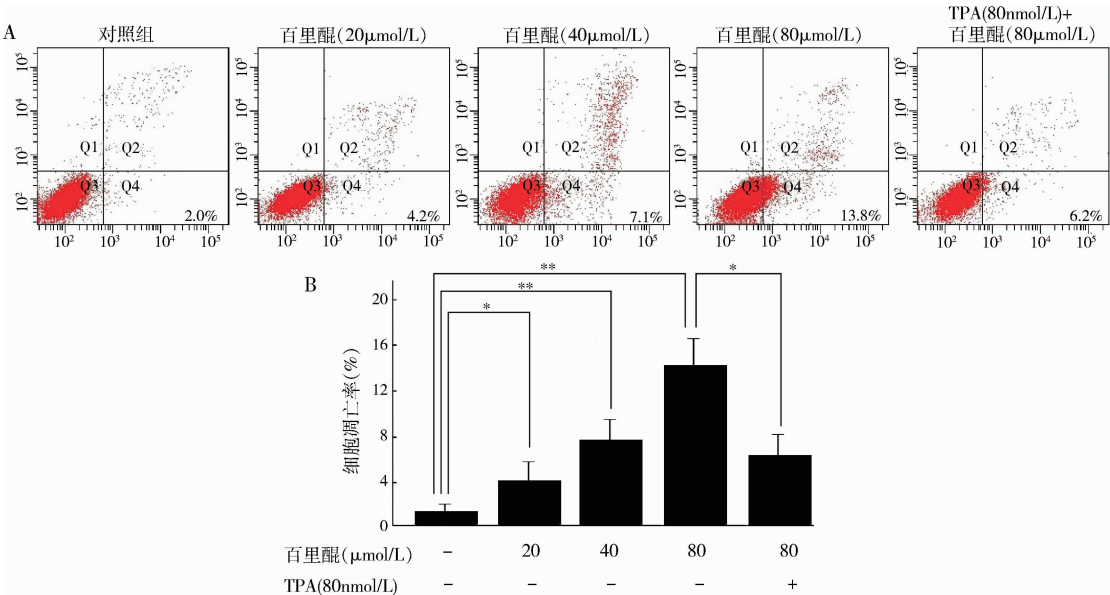


图 2 百里醌对体外培养的膀胱癌 BIU - 87 细胞凋亡的影响

A. 流式细胞术检测膀胱癌 BIU - 87 细胞凋亡; B. 不同浓度百里醌单独及联合 TPA 对 BIU - 87 细胞凋亡率的影响
* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$

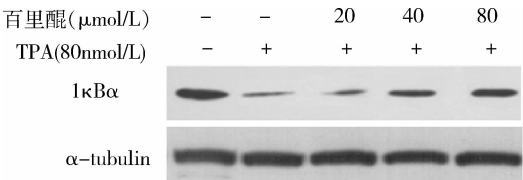


图 3 Western blotting 检测百里醌对膀胱癌 BIU - 87 细胞质中 IκBα 蛋白表达的影响
(以 α - tubulin 为内参)

讨 论

目前大量研究表明百里醌具有明确的抗癌效应,能有效抑制多种恶性肿瘤生长,其抑制肿瘤细胞生长方式以诱导细胞凋亡为主,没有明显的细胞毒性^[2],但尚未有百里醌对膀胱癌生长抑制作用的报道。在本研究 MTT 实验结果首次表明百里醌不仅对体外人膀胱癌 BIU - 87 细胞有明确的增殖抑制作用,同时流式细胞术结果证实百里醌可显著促进细胞凋亡,细胞增殖抑制结果与细胞凋亡数据基本吻合,表明百里醌抑制膀胱癌细胞生长方式可能也是以诱导细胞凋亡方式为主,与文献报道相近^[2~5]。

目前对百里醌抑制肿瘤细胞生长作用机制更多地集中于其诱导细胞凋亡作用机制上,细胞凋亡是一个非常复杂的生理和病理过程,凋亡的发生取决于多种凋亡抑制蛋白和促凋亡蛋白的相互调控。在诸多凋亡调控蛋白中,NF - κB 作为一个转录因子蛋白家

族,与细胞凋亡行为有密切联系;在细胞中 NF - κB 与其抑制蛋白 IκB 家族成员 IκBα 结合成三聚体,以无活性的形式存在于细胞质中,当细胞受到刺激后使 IκBα 磷酸化,并与 NF - κB 解离,活化的 NF - κB 释放并进入细胞核中与相应的靶序列结合;激活后 NF - κB 可调控凋亡抑制蛋白 IAPs 家族和 bcl - 2 家族等^[6],从而在肿瘤细胞耐药和促进肿瘤细胞存活中发挥了重要作用^[2]。因此促进 IκBα 在细胞质中的表达可抑制 NF - κB 的激活,从而有效促进肿瘤细胞凋亡。TPA 可特异性促使 IκBα 磷酸化和降解而激活细胞质中 NF - κB,但目前尚无 TPA 对百里醌抗癌疗效影响的相关报道。在本研究中,笔者首次观察到预处理 TPA 后百里醌对膀胱癌细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用明显减弱,表明促进 IκBα 在细胞质中的表达从而抑制 NF - κB 的激活在百里醌抑制膀胱癌细胞生长中发挥了重要作用。

有研究报道百里醌可显著抑制 NF - κB 在胰腺癌中的激活而有效抑制肿瘤细胞增殖^[2]。在本研究中笔者通过对膀胱癌细胞质成分进行 Western blotting 实验,结果表明,TPA 可明显抑制 IκBα 在膀胱癌细胞中的表达,与文献报道相符^[7];同时本研究首次报道百里醌可显著上调膀胱癌细胞中 IκBα 水平,呈浓度依赖性,进一步表明百里醌可促进 IκBα 的表达从而有效抑制膀胱癌细胞增殖和诱导细胞凋亡。

综上所述,本次实验结果首次表明百里醌不仅可

显著抑制体外膀胱癌细胞生长,还能有效诱导膀胱癌细胞凋亡;同时百里醌对膀胱癌细胞生长和凋亡诱导作用可被 NF- κ B 激活剂 TPA 所阻断;而百里醌可显著诱导膀胱癌细胞质中 I κ B α 的表达。因此,笔者推断上调 I κ B α 在百里醌抑制膀胱癌细胞生长中发挥了一定作用,但还需体内实验进一步证实百里醌抑制膀胱癌生长的生物学效应。

参考文献

- 1 Banerjee S, Padhye S, Azmi A, *et al.* Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62(7):938-946
- 2 Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, *et al.* Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13):5575-5583
- 3 Rooney S, Ryan MF. Effects of alpha-hederin and thymoquinone,

constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines [J]. *Anti-cancer Res*, 2005, 25(3B):2199-2204

- 4 Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, *et al.* In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone [J]. *Int J Oncol*, 2003, 22(1):107-113
- 5 Su YT, Chang HL, Shyue SK, *et al.* Thymoquinone induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(2):229-241
- 6 Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: the enemy within [J]. *Cancer Cell*, 2004, 6(3):203-208
- 7 Huang Q, Shen HM, Ong CN. Inhibitory effect of emodin on tumor invasion through suppression of activator protein-1 and nuclear factor-kappaB [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(2):361-371

(收稿:2011-04-21)

(修回:2011-04-25)

帕利哌酮缓释片与氯氮平对首发精神分裂症患者心电图影响的对比分析

王晓敏 宫本宏 黄 晓 黄文武

摘 要 目的 探讨帕利哌酮对首发精神分裂症患者心电图(ECG)的影响。**方法** 将140例首发精神分裂症患者随机分为两组,每组70例,分别给予帕利哌酮和氯氮平治疗。于治疗前和治疗后的第4、8周末定期进行心电图检查,并对两组患者的心电图结果进行对比分析。**结果** 服药后两组患者的心电图均有不同程度的改变,但帕利哌酮组所致心电图改变明显低于氯氮平组($P < 0.01$),以窦性心动过速、窦性心动过缓和ST-T改变为主。**结论** 帕利哌酮对首发精神分裂症患者心电图的影响显著低于氯氮平,安全性相对较大。

关键词 帕利哌酮 氯氮平 精神分裂症 心电图

A Comparative Study of EKG Changed by Paliperidone and Clozapine in the Treatment of the Primary Schizophrenic Patients. Wang Xiaomin, Gong Benhong, Huang Xiao, Huang Wenwu. Wenzhou Kangning Hospital, Zhejiang 325007, China

Abstract Objective To study the effects of Paliperidone on ECG in the primary schizophrenia patients. **Methods** Totally 140 cases of primary schizophrenic patients were randomly divided into two groups with each group of 60 cases patients respectively treated with Paliperidone and Clozapine. All the patients were carried ECG before treatment, 4 and 8 weeks later. The results were processed by statistical methods. **Results** Both Paliperidone and Clozapine had effects on ECG. But compared to the Clozapine group, the Paliperidone group had less and smaller changes of ECG ($P < 0.01$) which was mainly sinustachycardia, sinusbradycardia and the changes of ST-T. **Conclusion** Compared to Clozapine, Paliperidone had less and smaller effects on EKG in the primary schizophrenic patients and was much safer for treatment.

Key words Paliperidone; Clozapine; Schizophrenia; Electrocardiogram (ECG)

精神分裂症是一种常见的精神障碍,有研究指出

一般人群的终身患病率约为1%,其主要特征为认知功能损害,可出现妄想并产生慢性认知、行为和情绪障碍,从而影响生活的多个方面。目前的治疗通常需要抗精神病药联合社会心理治疗^[1]。帕利哌酮缓释

基金项目:2010年度温州市医药卫生科学研究项目(2010B075)

作者单位:325007 浙江省温州康宁医院

百里醌抑制膀胱癌细胞生长的实验研究

木海琦 杨 森 王怡君 陈映鹤

摘 要 **目的** 探讨百里醌对体外膀胱癌细胞株 BIU-87 生长的影响及其机制。**方法** 百里醌单独作用人膀胱癌细胞株 BIU-87 及预处理 NF- κ B 激活剂 TPA 后百里醌再作用 BIU-87 细胞,四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测细胞增殖;流式细胞术检测细胞凋亡;Western blotting 检测膀胱癌细胞质中 I κ B α 蛋白表达。**结果** 与对照组相比较,百里醌可显著抑制体外膀胱癌细胞株 BIU-87 生长,并明显诱导细胞凋亡;预处理 TPA 可显著削弱百里醌对 BIU-87 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用;百里醌干预后膀胱癌细胞质中 I κ B α 的表达明显上调。**结论** 百里醌可显著抑制体外膀胱癌细胞生长,并诱导细胞凋亡,该作用可能通过促进其胞质中 I κ B α 的表达而实现。

关键词 膀胱癌 百里醌 I κ B α

An Experimental Study on Anti-tumor Effect of Thymoquinone on Bladder Cancer *in vitro*. Mu Haiqi, Yang Sen, Wang Yijun, Chen Yinghe. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325027, China

Abstract **Objective** To investigate the effect and the mechanism of thymoquinone in the growth inhibition of bladder cancer *in vitro*. **Methods** After being treated with thymoquinone, or pretreated with NF- κ B activator TPA, human bladder cancer cell line BIU-87 then got treatment of thymoquinone. The cellular proliferation was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The flow cytometry was used to determine apoptosis in bladder cancer cells. Western blotting was used to detect the expression of I κ B α in bladder cancer cells. **Results** The proliferation of bladder cancer cells was inhibited significantly by thymoquinone. Apoptosis rate induced by the thymoquinone was markedly higher than that of control. However, being pretreated with TPA could significantly attenuate the anti-proliferation and apoptosis induction effects of thymoquinone on the human bladder cell line BIU-87. The expression of I κ B α was up-regulated in BIU-87 cells after treatment of thymoquinone. **Conclusion** Thymoquinone exerts anti-tumor activity in bladder cancer *in vitro*, which may be related to up-regulation of I κ B α .

Key words Bladder cancer; Thymoquinone; I κ B α

百里醌 (thymoquinone) 系来自西方国家的一种名为 *Nigella sativa* 的植物提取物,化学式为 $C_{10}H_{12}O_2$ (2-异丙基-5-甲基-1,4-苯并醌)。千百年来主要用于支气管哮喘、痢疾、头痛、湿疹、高血压及肥胖的治疗^[1]。

近年有研究报道称百里醌具有强大的抗癌效应,在对胰腺癌的治疗上甚至与吉西他滨 (gemcitabine) 和奥沙利铂 (oxaliplatin) 这两种化疗药物有相似的疗效^[2]。另外在对乳腺癌、卵巢癌和肺癌细胞的体外试验中,百里醌都显示出十分明显的抑制肿瘤细胞恶性增殖的能力^[3-5]。但百里醌对膀胱癌细胞增殖抑制作用尚未有见报道。为此,本研究探讨百里醌抗体

外膀胱癌细胞生长的作用及其可能机制。

材料与方法

1. 材料:胎牛血清、RPMI-1640 培养基和含 0.25% EDTA 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;MTT 试剂盒、细胞质蛋白抽提试剂盒和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物发展有限公司;I κ B α 和 α -tubulin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;NF- κ B 激活剂 TPA (12-O-十四烷酰佛波醋酸酯-13) 和百里醌购自美国 Sigma 公司,TPA 用 DMSO 配成 30 μ mol/L 的贮存液,百里醌用无水乙醇配制成 10mmol/L 的贮存液,-20℃ 冰箱保存,用时用不含血清的 RPMI-1640 培养基稀释成所需浓度。

2. 细胞培养:人膀胱癌细胞株 BIU-87 购自中科院上海细胞库,细胞培养在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中,加入含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,生长至 70%~80% 培养瓶面积时胰蛋白酶消化传代。

3. MTT 法检测细胞增殖:取对数生长期 BIU-87 细胞,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基制备单细胞悬液,以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中,每孔体积 200 μ l;

基金项目:浙江省卫生厅资助项目 (2008A122);浙江省医学会资助项目 (2008ZYC23)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院

通讯作者:陈映鹤,主任医师,硕士生导师,电子信箱:1007882803

@qq.com