

proBDNF - p75 通路可能起到平衡 mBDNF - TrkB 通路的作用,proBDNF 和 mBDNF 及其受体的相对表达水平决定了这两条通路在细胞存活和增殖中谁的作用为主,而这个平衡是一个动态过程,受细胞生长环境的影响。无 FBS - DMEM 培养时,proBDNF 和 p75NTR 表达均上调,阻断内源性 proBDNF 效应时,C6 细胞存活和增殖均明显增加,提示不同环境下二者的变化,proBDNF - p75NTR 和 mBDNF - TrkB 平衡打破,proBDNF - p75NTR 抑制细胞生长和增殖的作用占优势。这可能有助于解释在一些疾病中,“微环境”的变化,打破了 proBDNF 和 mBDNF 平衡,引起疾病进展。因此,调节 proBDNF 向 mBDNF 的裂解过程或者控制 p75NTR 和 TrkB 之间的平衡,可能成为对一些疾病治疗的新靶点。

志谢:感谢澳大利亚南澳大学生命科学研究院周新富教授提供研究所需的抗体和技术支持。

参考文献

- 1 Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, *et al.* Biosynthesis and post - translational processing of the precursor to brain - derived neurotrophic factor[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (16) : 1260 - 1266
- 2 Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, *et al.* Cleavage of proBDNF by tPA/ plasmin is essential for long - term hippocampal plasticity[J]. Science, 2004, 306 (5695) : 487 - 491
- 3 Kenchappa RS, Zampieri N, Chao MV, *et al.* Ligand - dependent cleavage of the P75 neurotrophin receptor is necessary for NRIF nuclear translocation and apoptosis in sympathetic neurons[J]. Neuron,

- 2006, 50 (2) : 219 - 232
- 4 Teng HK, Teng KK, Lee R, *et al.* ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin[J]. J Neurosci, 2005, 25 (22) : 5455 - 5463
- 5 Fan YJ, Wu LL, Li HY, *et al.* Differential effects of pro - BDNF on sensory neurons after sciatic nerve transection in neonatal rats[J]. Eur J Neurosci, 2008, 27 (9) : 2380 - 2390
- 6 Elmariah SB, Hughes EG, Oh EJ, *et al.* Neurotrophin signaling among neurons and glia during formation of tripartite synapses[J]. Neuron Glia Biol, 2004, 1 (4) : 1 - 11
- 7 Sun Y, Lim Y, Li F, *et al.* ProBDNF collapses neurite outgrowth of primary neurons by activating RhoA[J]. LloS One, 2012, 7 (4) : e35883
- 8 Xu ZQ, Sun Y, Li HY, *et al.* Endogenous proBDNF is a negative regulator of migration of cerebellar granule cells in neonatal mice[J]. Eur J Neurosci, 2011, 33 (8) : 1376 - 1384
- 9 Wei Y, Wang HZ, Zhang FK, *et al.* Enhanced expression of proneurotrophins in elevated introcular pressure - induced rat retinal ischemia[J]. Chin Med J:Engl, 2012, 125 (21) : 3875 - 3879
- 10 Angelo MF, Aviles - Reyes RX, Villarreal A, *et al.* p75 NTR expression is induced in isolated neurons of the penumbra after ischemia by cortical devascularization[J]. J Neurosci Res, 2009, 87 (8) : 1892 - 1903
- 11 Suter - Crazzolaria C, Unsicker K. GDNF mRNA levels are induced by FGF - 2 in rat C6 glioblastoma cells[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1996, 41 (1 - 2) : 175 - 182

(收稿日期:2014 - 07 - 21)

(修回日期:2014 - 09 - 17)

百里醌诱导膀胱癌细胞凋亡作用机制的研究

王大文 朱诗建 木海琦 李 晟 周鹏飞 杨 森 南存金 陈映鹤

摘 要 **目的** 探讨百里醌对人膀胱癌细胞株 BIU - 87 细胞凋亡的影响及对其诱导凋亡的潜在作用机制。**方法** 应用 CCK8 法检测细胞增殖活性,Hoechst33258 染色法检测细胞凋亡,荧光定量 PCR 检测基因 Bcl - 2、Bax、caspase - 3、c - myc mRNA 的表达水平,Wsetern blot 法检测不同浓度百里醌作用后 Bcl - 2、Bax、c - myc 蛋白表达水平的变化。**结果** 细胞增殖抑制曲线结果显示百里醌能明显抑制 BIU - 87 细胞增殖,其 24、48、72h 半数抑制浓度 (IC₅₀) 分别是 38.75 ± 0.58、34.33 ± 1.01 和 32.43 ± 0.71 μmol/L。百里醌能以剂量依赖性方式诱导膀胱癌细胞凋亡。百里醌作用于 BIU - 87 细胞后,Bcl - 2、c - myc mRNA 及 Bcl - 2、c - myc 蛋白的表达量呈浓度依赖性降低,而 caspase - 3、Bax mRNA 及 caspase - 3、Bax 蛋白表达水平呈浓度依赖性递增。**结论** 百里醌能抑制 BIU - 87 细胞的增殖,且能诱导 BIU - 87 细胞的凋亡,其诱导凋亡机制可能与 Bcl - 2、c - myc 表达水平降低及 caspase - 3、Bax 表达水平上调有关。

关键词 百里醌 膀胱癌 Bcl - 2 Bax c - myc caspase

基金项目:浙江省中医药科技计划基金资助项目(2011ZB092);浙江省卫生厅基金资助项目(2012KYB134)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院

通讯作者:陈映鹤,硕士生导师,电子信箱:chenyh@ wzhealth. com

中图分类号 R694

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.026

Effects of Thymoquinone on Inducing Bladder Cancer BIU-87 Apoptosis. Wang Dawen, Zhu Shijian, Mu Haiqi, et al. Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effect of thymoquinone (TQ) on the human bladder cancer cell lines (BIU-87) apoptosis and its possible mechanisms of inducing apoptosis. **Methods** Cell proliferation ability was calculated by cell counting kit-8 (CCK8). Hoechst staining was used to observe the apoptosis of BIU-87 cells, treated with different concentrations of TQ. The mRNA expressions of Bcl-2, Bax, c-myc and caspase-3 were detected by real time fluorescent quantitative PCR. The expressions of Bcl-2, bax and c-myc proteins were determined by Western blot. **Results** The results showed that TQ remarkably inhibited the BIU-87 cell proliferation with the IC_{50} of 24h, 48h and 72h respectively were 38.75 ± 0.58 , 34.33 ± 1.01 , $32.43 \pm 0.71 \mu\text{mol/L}$. Apoptosis was induced after treated with TQ. Compared with the blank control group, the mRNA and proteins expressions of Bcl-2 and c-myc obviously decreased in a dose-dependent manner, while the expressions of bax and caspase-3 were upregulated. **Conclusion** TQ could significantly inhibit the proliferation ability of BIU-87 cells, and also induce apoptosis probably by upregulating the expressions of Bax and caspase-3 and downregulating the expressions of Bcl-2 and c-myc.

Key words Thymoquinone; Bladder cancer; Bcl-2; Bax; C-myc; Caspase

百里醌 (thymoquinone) 是从黑种草籽油中分离出来的主要有效成分, 它不仅具有治疗支气管哮喘、湿疹、高血压及抗炎的功效, 还有显著的抑癌作用^[1]。目前国内外对百里醌的药理学研究最多的就是其抗肿瘤作用, 研究证明百里醌能够抑制多种肿瘤细胞的增殖, 如乳腺癌、骨髓瘤和胰腺癌等, 但在膀胱癌中少有研究报道^[2~4]。笔者前期研究发现百里醌能显著诱导膀胱癌 BIU-87 细胞的凋亡, 但其诱导凋亡的机制尚不明确^[5]。本实验主要从诱导细胞凋亡方面研究抗肿瘤药物百里醌对膀胱癌细胞的效应, 并研究其诱导凋亡潜在的分子机制, 同时观察不同浓度下百里醌对膀胱癌细胞增殖的影响。

材料与方法

1. 实验材料: 人膀胱癌细胞系 BIU-87 购自中科院上海细胞库。细胞培养相关材料包括: RPMI1640 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶购自 Gibco 公司, 青、链霉素购自 Invitrogen 公司。百里醌购自 Sigma 公司。CCK8 试剂盒、Hoechst 凋亡检测试剂盒购自碧云天公司, SYBR Green 染料购自罗氏公司。反转录试剂盒购自大连宝生物科技有限公司。实验中使用的抗 Bcl-2、Bax、c-myc 购自 CST 公司。

2. 细胞培养: BIU-87 细胞培养于含 10% 胎牛血清、 $1 \times 10^5 \text{ U/L}$ 青霉素及 100mg/L 链霉素的 RPMI-1640 完全培养基于 5% CO_2 、37℃ 恒温密闭式培养箱内培养传代, 倒置显微镜观察生长情况, 大约 2~3 天传代 1 次, 取处于对数生长期的细胞用于实验。

3. 细胞增殖抑制检测 (CCK-8 法): 取对数生长期 BIU-87 细胞, 胰酶消化吹打并充分重悬为单细胞悬液后, 细胞计数板计数, 以 5000/孔接种于 3 个 96 孔板中, 种板后置于 5% CO_2 、37℃ 培养箱培养过夜, 随后加入终浓度分别为 6.25、12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{mol/L}$ 的百里醌, 每孔体积 100L, 每

组设 5 个复孔, 另设空白对照孔和阴性对照孔。于作用 24、48、72h 时, 吸出培养液, 每孔加入含 10 μL CCK-8 的新鲜培养液, 37℃ 孵育 1h。应用酶标仪于 450nm 处测得每孔的吸光度 (A) 值, 重复测量 3 次。

4. Hoechst 试剂盒检测凋亡: 取处于对数生长期的 BIU-87 细胞, 胰酶消化吹打并充分重悬为单细胞悬液后, 细胞计数板计数, 以 5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 种板后置于 5% CO_2 、37℃ 培养箱培养过夜, 随后分别加入含有 DMSO、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 百里醌的培养液, 分组处理 24h 后, 吸出旧培养液, 加入染色液后, 37℃ 培养箱孵育 10min, 弃去染料并用 PBS 清洗 3 遍, 荧光显微镜观察细胞凋亡情况。

5. 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 BIU-87 细胞 Bcl-2、Bax、caspase、c-myc mRNA 的表达: 采用 Trizol 试剂提取 4 组细胞总 RNA, 然后分光光度计分析 RNA 浓度和纯度。按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明书操作, 取 2 μg RNA 为模板反转录合成 cDNA, 反转总体积为 20 μL 。取反转录产物 cDNA 1 μL 进行 PCR 循环。设置反应为 95℃ 10s, 60℃ 10s, 72℃ 10s, 45 个循环。引物由上海英俊公司合成, 引物序列见表 1, 数据采用 Light Cycler 480 Software 分析。

表 1 引物序列

引物	序列 (5'→3')
Gapdh	CGCTGAGTACGTCGTGGAGTC GCTGATGATCTTGAGGCTGTGTC
Bcl-2	GAGCAGACGGATGGA AAAAGGA CAGGGCAAAGAAATGCAAGTGA
Bax	TTTGCTTCAGGGTTTCATCCA GAGACACTCGCTCAGCTTCTTG
caspase-3	AAGCACTGGAATGACATCTCGGT TGGCTCAGAAGCACACAAACAAA

6. Western blot 法检测样品的 Bcl-2、Bax、c-myc 蛋白水

平:不同浓度百里醮作用 BIU - 87 细胞 24h 提取总蛋白质, BCA 试剂盒检测蛋白质浓度,取 60μg 蛋白质经 10% SDS - PAGE 电泳后将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上,一抗孵育过夜,再与二抗室温孵育 2h,漂洗后进行 ECL 显色,上机曝光。

7. 统计学方法:所有数据均输入 SPSS 18.0 统计软件处理。数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组之间样本均比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CCK8 法检测百里醮对 BIU - 87 细胞增殖的影响:百里醮作用于 BIU - 87 细胞 24、48、72h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别是 38.75 ± 0.58 、 34.33 ± 1.01 、 $32.43 \pm 0.71 \mu\text{mol/L}$ 。CCK8 结果显示:与对照组相比,各处理组中 BIU - 87 细胞的增殖均受到抑制 ($P < 0.01$),且随药物浓度增高,抑制程度越明显,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),百里醮能显著抑制 BIU - 87 细胞的增殖,呈浓度依赖性和时间依赖性。细胞增殖抑制率 = (未加药物组吸光度 - 药物处理组吸光度) / 未加药物组吸光度,不同浓度百里醮在不同

时间内对 BIU - 87 细胞增殖抑制率(图 1)。

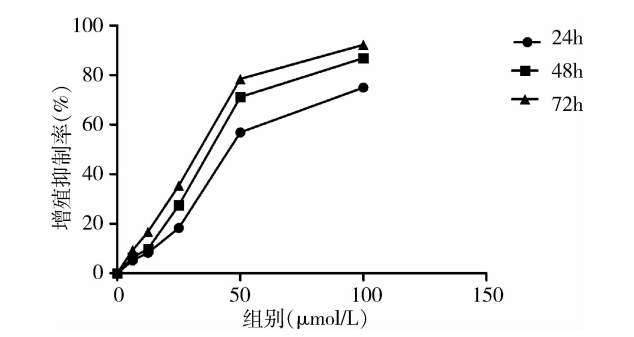


图 1 百里醮对 BIU - 87 细胞的增殖抑制率

2. Hoechst 33258 染色观察百里醮对 BIU - 87 细胞凋亡的影响:与对照组相比,百里醮处理的 BIU - 87 细胞凋亡增多,随百里醮浓度的增高,凋亡细胞数目明显增加。凋亡细胞表现为细胞核固缩、边聚甚至裂解等形态学变化。不同浓度百里醮处理后细胞凋亡情况(图 2)。

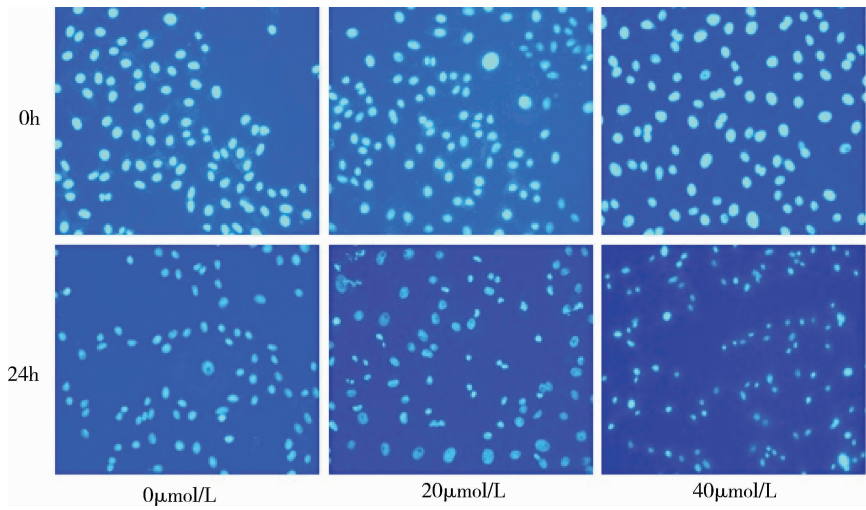


图 2 Hoechst 染色检测百里醮作用 24h 后 BIU - 87 细胞的凋亡情况 (Hoechst 染色, × 400)

3. 荧光定量 PCR 检测 Bcl - 2、Bax、caspase - 3、c - myc mRNA 的表达:在百里醮的作用下,Bcl - 2 和 c - myc mRNA 的表达水平随药物浓度的增加而呈递减趋势,而 Bax 和 caspase - 3 mRNA 表达水平则随药物浓度的增加而呈递增趋势(表 2)。

4. Western blot 法检测 Bcl - 2、Bax、c - myc 蛋白水平:经百里醮的干预后,BIU - 87 细胞中 Bcl - 2 蛋白和 c - myc 蛋白的表达减少。百里醮浓度越高,其表达水平的降低越明显。相反,百里醮浓度越高,Bax 蛋白表达水平也越高。Bcl - 2、c - myc 蛋白水平在

表 2 荧光定量 PCR 法检测百里醮作用后 BIU - 87 细胞 Bcl - 2、Bax、caspase - 3 和 c - myc mRNA 表达水平的变化 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl - 2	Bax	caspase - 3	c - myc
对照组	9.16 ± 0.02	1.02 ± 0.03	4.50 ± 0.02	1.82 ± 0.04
20μmol/L	9.10 ± 0.03	1.08 ± 0.05	5.42 ± 0.05 **	1.29 ± 0.03 **
40μmol/L	4.75 ± 0.01 **	1.11 ± 0.02 *	6.45 ± 0.04 **	0.93 ± 0.06 **
80μmol/L	1.99 ± 0.02 **	7.27 ± 0.01 **	9.38 ± 0.02 **	0.61 ± 0.01 **

与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

低浓度百里醮(A 组)作用下即明显降低 ($P < 0.01$),浓度越高降低越明显 ($P < 0.01$), Bax 蛋白水平在低

浓度药物(A组)作用下即升高明显($P < 0.05$),浓度越高升高越明显($P < 0.01$,图3)。

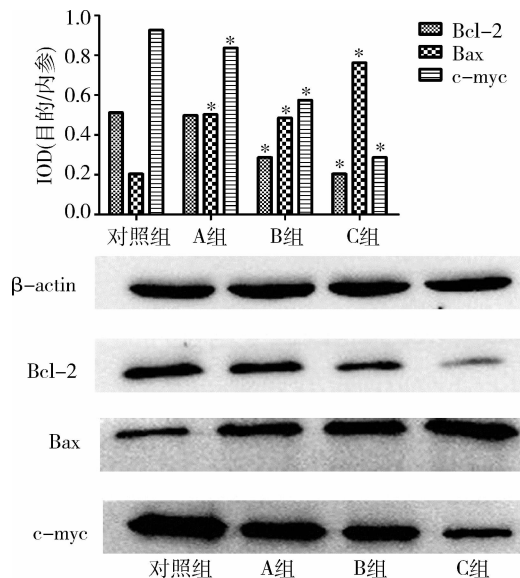


图3 Western blot法检测百里醌作用后BIU-87细胞Bcl-2、Bax和c-myc表达水平的变化
与对照组相比,* $P < 0.01$;对照组.0 $\mu\text{mol/L}$;
A组.20 $\mu\text{mol/L}$;B组.20 $\mu\text{mol/L}$;C组.20 $\mu\text{mol/L}$

讨 论

膀胱癌的发生率在我国男性泌尿生殖系统的恶性肿瘤中占据首位,所有恶性肿瘤中居第8位,其在恶性肿瘤发生率中的构成比为2.50%^[6]。研究表明,近年来膀胱癌的发生率在城市与农村均呈现逐年增长趋势,应引起重视^[6]。目前对膀胱癌的治疗,无论是手术治疗还是放疗、化疗,都对患者的身体有很大的影响。当前对膀胱癌,尤其是侵袭性膀胱癌尚无有效药物治疗,因此寻找有效药物治疗膀胱癌是当前亟待解决的问题。肿瘤增殖与凋亡的动态平衡失调是其无限增殖的基础,肿瘤的转移是其具有侵袭力的主要机制之一。因此,诱导肿瘤细胞凋亡以及抑制肿瘤细胞增殖和迁移是目前抗肿瘤药物研究的热点。

线粒体外膜通透化是哺乳动物线粒体途径细胞凋亡中一个关键性因素。线粒体外膜通透化使促凋亡因子从线粒体膜间隙释放引起一系列caspase的活化,进而诱导凋亡的发生。Bcl-2家族是线粒体外膜通透化的主要调节者,由促凋亡蛋白Bax和抗凋亡蛋白如Bcl-2组成^[7]。本研究结果显示百里醌能使BIU-87细胞的Bcl-2 mRNA和蛋白水平下调,而上调Bax mRNA和蛋白水平,且呈浓度依赖性。由于Bcl-2家族主要通过线粒体途径介导凋亡,因此百

里醌可能通过线粒体途径诱导膀胱癌细胞的凋亡。caspase的级联激活在细胞凋亡过程中发挥着至关重要的作用,caspase-3的激活是其重要环节之一^[8]。本研究发现百里醌能显著降低caspase-3 mRNA的表达,随着百里醌浓度增加其表达水平降低越明显。这提示我们百里醌可能通过调节Bcl-2家族引起caspase-3的激活从而诱导细胞凋亡。c-myc是一种常见的原癌基因,是myc基因家族的重要成员之一。c-myc可通过激活Bax引起线粒体外膜通透化使细胞色素C释放,最终导致caspase级联反应诱导细胞凋亡^[9]。Bcl-2和Bcl-XL等抗凋亡蛋白也可通过抑制细胞色素C的释放而抑制c-myc介导的凋亡,c-myc还可以通过其他不同的途径分别调控凋亡和增殖^[9]。本研究发现百里醌能显著降低c-myc的表达水平,说明c-myc表达水平下调可能参与百里醌诱导膀胱癌细胞凋亡的过程。

综上所述,本研究表明,百里醌能诱导膀胱癌细胞的凋亡,并能抑制其增殖。此外,百里醌参与诱导膀胱癌细胞凋亡的机制可能与线粒体途径密切相关,但其具体的作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- 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
- Rajput S, Kumar BN, Dey KK, *et al.* Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G(1) arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells[J]. *Life Sciences*, 2013, 93(21): 783-790
- Peng L, Liu A, Shen Y, *et al.* Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF-kappaB pathway[J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(2): 571-578
- Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, *et al.* Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies[J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(5): 1419-1431
- 木海琦, 杨森, 王怡君, 等. 百里醌对人膀胱癌细胞体内外作用及其机制的研究[J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(6): 392-396
- 韩苏军, 张思维, 陈万青, 等. 中国膀胱癌发病现状及流行趋势分析[J]. *癌症进展*, 2013, 11(1): 89-95
- Xu G, Shi Y. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis[J]. *Cell Res*, 2007, 17(9): 759-771
- Nunez G, Benedict MA, Hu Y, *et al.* Caspases: the proteases of the apoptotic pathway[J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3237-3245
- 白阳, 叶健, 王敬泽. c-myc功能及其下游靶点[J]. *细胞生物学杂志*, 2007, 29(2): 191-196

(收稿日期:2014-08-24)

(修回日期:2014-09-16)