

- independent parallel pathways in the presence of DNA damage[J]. J Biol Chem, 2014, 289(7):4083-4094
- 8 Budanov AV, Karin M. P53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling[J]. Cell, 2008, 134(3):451-460
 - 9 Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, *et al.* Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD[J]. Science, 2004, 304(5670):596-600
 - 10 Zhang XY, Wu XQ, Deng R, *et al.* Upregulation of sestrin 2 expression via JNK pathway activation contributes to autophagy induction in cancer cells[J]. Cell Signal, 2013, 25(1):150-158
 - 11 Garber ME, Troyanskaya OG, Schluens K, *et al.* Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(24):13784-13789
 - 12 Wachi S, Yoneda K, Wu R. Interactome-transcriptome analysis reveals the high centrality of genes differentially expressed in lung cancer tissues[J]. Bioinformatics, 2005, 21(23):4205-4208
 - 13 Su LJ, Chang CW, Wu YC, *et al.* Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap re-sampling scheme[J]. BMC Genomics, 2007, 8:140
 - 14 Sanli T, Linher-Melville K, Tsakiridis T, *et al.* Sestrin2 modulates AMPK subunit expression and its response to ionizing radiation in breast cancer cells[J]. PLoS One, 2012, 7(2):e32035

(收稿日期:2016-11-24)

(修回日期:2016-12-30)

苦豆碱对膀胱癌 EJ 细胞增殖与凋亡的影响

秦 聪 张 杰 张礼军

摘 要 **目的** 观察苦豆碱对膀胱癌 EJ 细胞增殖与凋亡的影响并探讨其作用机制。**方法** 实验分组如下, A 组:膀胱癌 EJ 细胞不作处理; B 组:加入苦豆碱浓度 25 $\mu\text{mol/L}$; C 组:加入苦豆碱浓度 50 $\mu\text{mol/L}$; D 组:加入苦豆碱浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 。通过 CCK8 检测各组细胞的存活率, 通过流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 通过 Western blot 法检测各组细胞 Bcl-2、Bax、p-Erk1/2 蛋白的表达水平。**结果** CCK8 结果显示, B、C、D 组较 A 组细胞存活率降低 ($P < 0.05$); 流式细胞术结果显示: B、C、D 组较 A 组细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示: B、C、D 组较 A 组 Bcl-2、p-Erk1/2 表达水平降低 ($P < 0.05$), Bax 表达水平增高 ($P < 0.05$)。**结论** 苦豆碱可降低膀胱癌 EJ 的存活率, 诱导其凋亡, 其作用机制可能是通过抑制 Erk1/2 的磷酸化而实现的。

关键词 苦豆碱 膀胱癌 增殖 凋亡

中图分类号 R6 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.012

Effects of Aloperine on Proliferation and Apoptosis of Bladder Cancer EJ Cells. Qin Cong, Zhang Jie, Zhang Lijun. Central Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract Objective To investigate the effect of aloperine on the proliferation and apoptosis of bladder cancer EJ cells and to explore its mechanism. **Methods** The experimental group was as follows: bladder cancer EJ cells were not treated (group A); 25 $\mu\text{mol/L}$ aloperine was added (group B); 50 $\mu\text{mol/L}$ aloperine was added (group C). 100 $\mu\text{mol/L}$ aloperine was added (group D). The survival rate of the cells was detected by CCK8. The apoptosis rate was detected by flow cytometry. The expression levels of Bcl-2, Bax, p-Erk1/2 protein were detected by Western blot. **Results** CCK8 results showed that: B, C, D group compared with A group, the cell survival rate were decreased ($P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of B, C and D group was higher than that of A group ($P < 0.05$). Western blot results showed that: B, C, D group compared with A group the expression of Bcl-2 and p-Erk1/2 levels were reduced ($P < 0.05$), the expression of Bax level was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The survival rate of EJ in bladder cancer can be reduced by aloperine and induce its apoptosis, and inhibiting the phosphorylation of Erk1/2 may be the mechanism.

Key words Aloperine; Bladder cancer; Proliferation; Apoptosis

苦豆碱存在于豆科植物苦豆子中, 且苦豆子叶片

中含苦豆碱较高^[1]。研究表明苦豆碱可以抗 HIV-I 入侵, 可以预防肾缺血再灌注损伤、抗氧化应激, 对多发性骨髓瘤细胞、抗结肠癌细胞具有杀伤作用, 并能缓解疼痛^[2-7]。苦豆碱分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_2$, 分子质量为 232.36 kDa, 本实验主要研究苦豆碱对人膀胱移行上皮细胞癌 EJ 细胞的作用。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81470923)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院泌尿外科

通讯作者: 张杰, 教授、博士生导师, 电子信箱: zhangjiewhu666@

163.com

材料与方法

1. 材料:人移行膀胱细胞癌 EJ 细胞购于 ATCC 细胞库;苦豆碱购于美国 Abcam 公司;胎牛血清、0.25% 胰酶购于美国 Gibco 公司;GADPH、兔抗人 Bcl-2、Bax、p-Erk1/2 抗体购于美国 Abcam 公司;RPMI-1640 培养基、双抗(青霉素-链霉素)购于杭州吉诺生物医药技术有限公司,蛋白 marker、SDS 凝胶配制试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购于武汉谷歌生物有限公司。超净工作台购于苏净安泰空气技术有限公司,冰箱购于容声电器股份有限公司,压力蒸汽灭菌锅购于日本 Sanyo 公司,高温烤箱购于上海精宏实验设备有限公司,微量移液器购于德国 Eppendorf 公司,电子天平购于德国 Sartorius 公司,离心机购于德国 Thermo 公司,超级纯水仪购于美国 Millipore 公司,37℃ 恒温水浴箱购于天津泰斯特仪器有限公司。

2. 膀胱癌 EJ 细胞的培养:膀胱癌 EJ 细胞用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 RPMI-1640 完全培养基,在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养并传代,每 2~3 天传代 1 次,待细胞长至 80% 左右,将细胞接种到 6 孔板中。

3. 细胞处理:实验分为 4 组,A 组:膀胱癌 EJ 细胞不做处理;B 组:加入苦豆碱浓度 25 μmol/L;C 组:加入苦豆碱浓度 50 μmol/L;D 组:加入苦豆碱浓度 100 μmol/L。培养 24h,通过 CCK8 检测各组细胞的增殖能力,通过流式细胞术检测各组细胞凋亡率,通过 Western blot 法检测各组细胞 Bcl-2、Bax、p-Erk1/2 蛋白的表达水平。

4. CCK8 检测细胞存活率:①在 96 孔板种入 100 μl 的细胞悬液,将培养板在培养箱培养 24h;②去除培养液,向培养板中加入 100 μl 含有不同浓度药物的培养液;③将培养板在培养箱孵育 24h;④向每孔加入 10 μl CCK8 溶液(注意不要产生气泡,从此步开始避光);⑤将培养板在培养箱孵育 1h;⑥用酶标仪测定在 450nm 处的吸光度;⑦计算各组细胞存活率。

5. 流式检测各组细胞的凋亡率:①按实验方案诱导凋亡;②用双蒸水将 5 × Binding Buffer 稀释为 1 ×,离心收集(10~50)万个细胞,取 500 μl 的 1 × Binding Buffer 重悬细胞;③每管加入 5 μl FITC 和 10 μl PI;④轻柔涡旋混匀后室温避光孵育 5min;⑤进行流式分析。

6. Western blot 法检测各组 Bcl-2、Bax、p-Erk1/2 蛋白的表达水平:(1)蛋白样品制备:提取蛋白用 BCA 浓度测定法检测各组蛋白浓度。加入上样

缓冲液后于热快中煮 10min 使蛋白变性。(2)凝胶配制:按照 SDS-PAGE 试剂盒说明书中剂量首先配制 15ml 浓度为 12% 的分离胶,放置 30min 后配制 6ml 浓度为 5% 的浓缩胶,加浓缩胶后迅速插梳子,放置 30min 后拔除梳子。(3)上样和电泳:将配电泳液倒入电泳槽,将一定量的蛋白加入上样孔。上样时,两端各加入 3 μl 的 marker。在浓缩胶时电压尽量低,约 70V,当进入分离胶后可调高电压至 100~120V。通常在溴酚蓝至底层胶时停止电泳。(4)转膜:提前切好 PVDF 膜,勿用手直接触摸,在左上角做标记后于甲醇中激活 3min,切胶并将条带贴于相应分子质量位置。转膜恒流 200mA,整个过程于冰上完成。根据分子质量大小定转膜时间,高分子质量需要转膜时间长些,低分子质量蛋白转膜时间短些。(5)封闭:配好 5% 脱脂奶粉封闭液,于摇床摇匀,将膜放入 TBS 洗液中稍微漂洗,将膜于封闭液中在低速摇床上封闭 1h。若背景深,可适当延长时间。(6)一抗孵育:参考 Bcl-2、Bax、p-Erk1/2 一抗说明书,按说明书用一抗稀释液稀释。从封闭液中取膜,用 TBS 清洗后将膜投入相应的一抗中,于 4℃ 低温摇床上过夜。(7)二抗孵育:将膜取出,用 TBS 液清洗 3 遍,每遍 10min。用二抗稀释液稀释二抗,将膜放入二抗中,于低速摇床上室温避光孵育 1h。将条带取出放入 TBS 洗涤液中清洗 3 遍,每遍 10min,此过程避光。(8)蛋白检测:利用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫膜,读取灰度值。

7. 统计学方法:所有数据均使用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. CCK8 检测结果:A、B、C、D 4 组细胞存活率分别为 100%、86.85% ± 1.69%、80.16% ± 2.12%、69.11% ± 2.14%,B、C、D 组细胞存活率与 A 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2. 流式检测结果:A、B、C、D 4 组细胞凋亡率分别为 4.61% ± 1.85%、12.33% ± 2.12%、18.35% ± 2.45%、29.10% ± 3.16%。B、C、D 组细胞凋亡率与 A 组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

3. Western blot 法检测结果:B、C、D 组较 A 组 Bcl-2、p-Erk1/2 表达水平降低($P < 0.05$),Bax 表达水平升高($P < 0.05$,图 2)。

讨 论

Lin 等^[8]研究发现苦豆碱可诱导人早幼粒白血

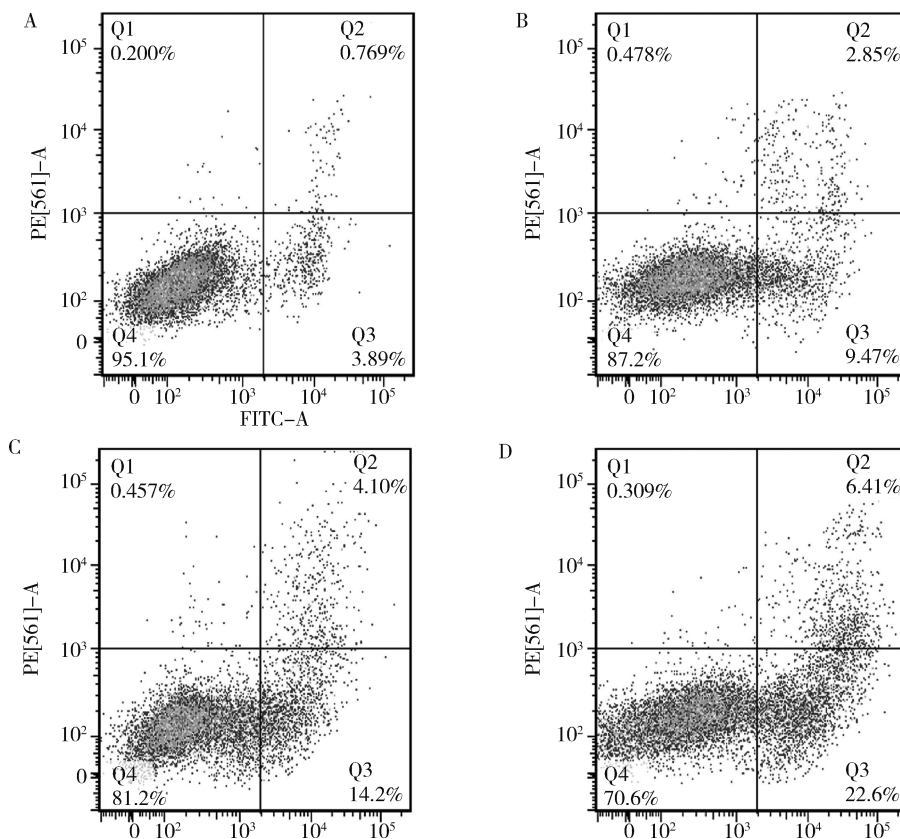


图1 各组细胞凋亡率

A. 对照组; B. 苦豆碱浓度 25 $\mu\text{mol/L}$ 组; C. 苦豆碱浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 组; D. 苦豆碱浓度 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; B、C、D 组与 A 组比较, $P < 0.05$

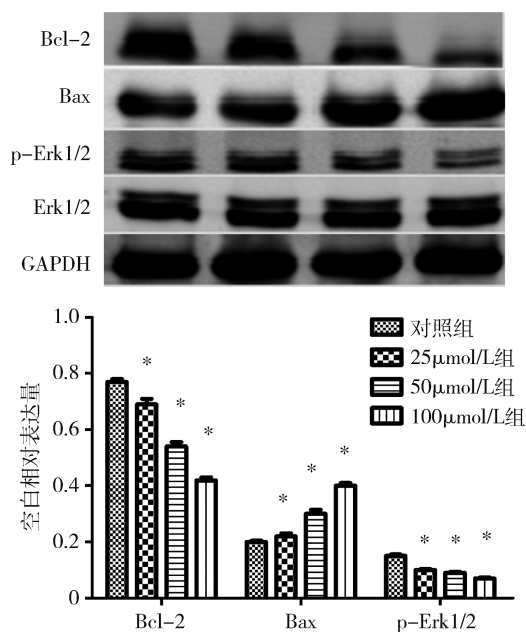


图2 各组细胞蛋白相对表达量

与 A 组比较, * $P < 0.05$

细胞 HCT116 细胞, 会使 Bax 表达上调, Bcl-2 表达下调, 可诱导结肠癌细胞凋亡, 且随着药物浓度加大, 癌细胞凋亡率增加。Wang 等^[5] 通过体内和体外实验研究发现, 苦豆碱可抑制多发性骨髓瘤细胞增殖并诱导其凋亡, 并呈现出时间和剂量效应。也有研究表明苦豆碱可提高体内 IL-10 的水平, 并抑制其他炎症因子的产生而发挥抗炎作用^[9-11]。在本实验中, 笔者发现用苦豆碱处理人膀胱癌 EJ 细胞后, 大部分细胞的胞质中出现空泡变性, 随着药物浓度的增加, 细胞漂浮的数量增多, 细胞凋亡率增加, 说明苦豆碱对膀胱癌 EJ 细胞生长具有较好的抑制作用。随着科技的进步, 传统中药的有效成分提取水平不断提高, 为中药成分的研究打下了重要基础, 也推动了化学合成药物的发展^[12-15]。目前苦豆碱肠溶胶囊已经研制成功, 苦豆碱的更多药物剂型将用于临床^[16]。

综上所述, 苦豆碱可通过增加 Bax 表达, 降低 Bcl-2 表达, 抑制 Erk1/2 的磷酸化从而诱导人膀胱癌 EJ 细胞凋亡, 具有较大的临床应用价值, 可能会成为膀胱癌灌注化疗的新药物。

病 HL-60 细胞凋亡, 而且会使 HL-60 细胞自噬增加。Zhang 等^[6] 研究发现将苦豆碱作用于人结肠癌

参考文献

- 1 魏蕾初,邓虹珠,张丽,等. HPLC 测定苦豆子不同部位中苦豆碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,4:140-143
- 2 Dang Z, Zhu L, Lai W, *et al.* Aloperine and its derivatives as a new class of HIV-1 entry inhibitors[J]. ACS Med Chem Lett,2016,7(3):240-244
- 3 Hu S, Zhang Y, Zhang M, *et al.* Aloperine protects mice against ischemia reperfusion (IR)-induced renal injury by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling and AP-1 activity[J]. Mol Med,2015,8(5):566-572
- 4 Ma NT, Zhou R, Chang RY, *et al.* Protective effects of aloperine on neonatal rat primary cultured hippocampal neurons injured by oxygen-glucose deprivation and reperfusion[J]. J Nat Med,2015,69(4):575-583
- 5 Wang H, Yang S, Zhou H, *et al.* Aloperine executes antitumor effects against multiple myeloma through dual apoptotic mechanisms[J]. J Hematol Oncol,2015,8(3):26
- 6 Zhang L, Zheng Y, Deng H, *et al.* Aloperine induces G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 human colon cancer cells[J]. Int J Mol Med,2014,33(6):1613-1620
- 7 Xu YQ, Jin SJ, Liu N, *et al.* Aloperine attenuated neuropathic pain induced by chronic constriction injury via anti-oxidation activity and suppression of the nuclear factor kappa B pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2014,451(4):568-573
- 8 Lin Z, Huang CF, Liu XS, *et al.* In vitro anti-tumour activities of quinolizidine alkaloids derived from *Sophora flavescens* Ait[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol,2011,108(5):304-309
- 9 Yuan XY, Ma HM, Li RZ, *et al.* Topical application of aloperine improves 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice[J]. Eur J Pharmacol,2011,658(2-3):263-269
- 10 Lin WC, Lin JY. Five bitter compounds display different anti-inflammatory effects through modulating cytokine secretion using mouse primary splenocytes in vitro[J]. J Agric Food Chem,2011,59(1):184-192
- 11 Zhou Y, Wang H, Liang L, *et al.* Total alkaloids of *Sophora alopecuroides* increases the expression of CD4⁺ CD25⁺ Tregs and IL-10 in rats with experimental colitis[J]. Am J Chin Med,2010,38(2):265-277
- 12 Cheng Y, Chen H, Li Y, *et al.* Separation and determination of aloperine, sophoridine, matrine and oxymatrine by combination of flow injection with microfluidic capillary electrophoresis[J]. Talanta,2004,63(2):491-496
- 13 Chen X, Yi C, Yang X, *et al.* Liquid chromatography of active principles in *Sophora flavescens* root[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2004,812(1-2):149-163
- 14 Yamauchi S, Omi Y. Synthesis of an optically pure synthetic intermediate of aloperine from a yeast-reductive product[J]. Biosci Biotechnol Biochem,2005,69(8):1589-1594
- 15 Passarella D, Angoli M, Giardini A, *et al.* Concise total synthesis of (+/-)-aloperine and 6-epi-aloperine[J]. Org Lett,2002,4(17):2925-2928
- 16 魏蕾初. 苦豆碱肠溶胶囊的研制[D]. 广州:南方医科大学,2013

(收稿日期:2016-10-23)

(修回日期:2016-11-07)

单侧经皮椎弓根下入路椎体成形术治疗老年胸椎骨质疏松性骨折

陈伟富 王章富 洪正华 米 爽 陈海啸

摘要 **目的** 探讨经皮单侧椎弓根下入路椎体成形术治疗胸椎骨质疏松性骨折临床疗效和安全性。**方法** 2014年3月~2015年10月在笔者医院6例胸椎骨质疏松性骨折患者被随机分为两组,其中单侧经椎弓根下入路组32例,双侧经椎弓根34例。对两组患者的临床资料进行前瞻性分析,比较两组患者的临床疗效及安全性。**结果** 所有患者均获得1年以上随访,两组患者术前临床资料差异无统计学意义($P>0.05$)。两组患者骨水泥注射量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组患者术后VAS、ODI评分均较术前明显改善,但两组患者术中、术后24h VAS、ODI评分,单侧组小于双侧组,两组差异有统计学意义($P<0.05$),而其他时间点比较,差异无统计学意义。两组患者手术时间、术中透视次数、骨水泥渗漏发生率,单侧组小于双侧组,两组差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 经皮单侧胸椎椎弓根下入路椎体成形术治疗骨质疏松性骨折具有损伤小、手术时间短、骨水泥渗漏发生率低、术后恢复更快的优点。

关键词 单侧经皮胸椎椎弓根下入路 椎体成形术 骨质疏松性骨折

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81272059)

作者单位:317000 临海,温州医科大学附属台州医院骨科

通讯作者:洪正华,主任医师,电子信箱:hongzh@enzemed.com