

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.07.006

• 基础研究 •

紫铆因抑制膀胱癌细胞增殖的体内外研究

张丽瑞¹, 陈 蔚², 李 琛¹, 李 旭²**Butein Inhibits Cell Proliferation of Bladder Cancer *in vitro* and *in vivo***ZHANG Lirui¹, CHEN Wei², LI Chen¹, LI Xu²

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Medical School of Xi'an Jiaotong University, The

First Affiliated Hospital, Xi'an 710061, China, 2. Center for Laboratory Medicine

Corresponding Author: LI Xu, E-mail: lixu56@mail.xjtu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the effects of Butein on proliferation of BLS cells in human bladder transitional cell carcinoma(BTCC) *in vitro* and on transplantation tumor growth of bladder carcinoma in nude mice. **Methods** BLS cells were treated with Butein at various concentrations. Cell proliferation was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and clone formation assay, and cell cycle was detected by flow cytometry. Western blot was applied to measure phosphorylation of extra cellular signal regulated kinase (ERK1/2), nuclear transcription factor kappa B (NF-κB) p65 expression, Cyclin D1 and COX2 expressions in downstream target genes of NF-κB. Transplanted tumors of bladder cancer in nude mice were constructed. Administration route was intraperitoneal injection. Volume and weight of transplanted tumors were measured. **Results** Butein inhibited cell growth and induced G₂/M cell cycle arrest in bladder cancer cells. Phosphorylation of ERK1/2 and NF-κB p65 intranuclear expression were reduced ($P<0.05$) ; Protein expressions of Cyclin D1 and COX2 were decreased ($P<0.05$) ; Growth of transplant subcutaneous tumor in treatment group was obviously inhibited ($P<0.05$). **Conclusion** Butein has anti-proliferation effect on human bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo* possibly through suppressing ERK and NF-κB activation.

Key words: Butein; bladder transitional cell carcinoma(BTCC);Proliferation

摘要：目的 观察紫铆因对膀胱移行细胞瘤细胞BLS增殖的影响以及对膀胱癌裸鼠移植瘤生长的影响。**方法** 不同浓度紫铆因处理细胞，四甲基偶氮唑蓝比色实验（MTT）及平板克隆形成实验观察细胞增殖能力，流式细胞仪分析细胞周期，蛋白印迹检测核转录因子κB(NF-κB)p65核内表达及细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)的磷酸化程度，并检测NF-κB下游靶基因细胞周期素D1(Cyclin D1)及环氧合酶-2(COX2)的表达。建立膀胱癌裸鼠皮下移植瘤，采用腹腔注射的给药途径，测量移植瘤的体积和重量。**结果** 紫铆因抑制了膀胱癌细胞增殖并诱导G₂/M期细胞周期阻滞。紫铆因处理后NF-κB p65的核内表达及ERK1/2的磷酸化程度下降($P<0.05$)，Cyclin D1及COX2基因表达下调($P<0.05$)，体内实验发现紫铆因治疗组较对照组皮下移植瘤的生长明显受抑制($P<0.05$)。**结论** 紫铆因具有抗膀胱癌细胞增殖作用，可能与其抑制ERK及NF-κB信号激活有关。

关键词：紫铆因；膀胱移行细胞癌；增殖

中图分类号：R73-36; R737.14 文献标识码：A

0 引言

膀胱移行细胞癌(bladder transitional cell carcinoma, BTCC)是泌尿系统最常见的恶性肿瘤，具有复发率高的临床特点。植物多酚紫铆因(Butein)具有抗炎、抗纤维化、抗癌等作用，还是

NF-κB通路的有效抑制剂。NF-κB在膀胱癌中常表现为组成性激活。天然药物紫铆因是否能够抑制膀胱癌细胞的增殖，及其抑瘤机制尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 材料

BLS膀胱移行细胞瘤细胞系来自西安交通大学医学院第一附属医院医学分子中心^[1]。实验动物：6周龄BALB/c-nude裸鼠12只，雌性，平均体质量17~20 g，购自中国科学院上海实验动物中心。紫铆因购自美国Aldrich-Sigma公司，兔抗人组蛋白H3、NF-κB p65、COX2及鼠抗人CyclinD1、

收稿日期：2013-05-28；修回日期：2014-01-27

基金项目：陕西省科技攻关项目资助课题(2012SF2-03)；西安市科技计划项目资助课题(SF1204(5b))

作者单位：1.710061 西安，西安交通大学医学院第一附属医院妇产科，2.医学转化中心

通信作者：李旭，E-mail: lixu56@mail.xjtu.edu.cn

作者简介：张丽瑞(1975-)，女，博士，主治医师，主要从事肿瘤增殖侵袭分子机制的研究

β -actin、Tubulin购自美国Santa Cruz公司。兔抗人p44/42 MAPK(ERK1/2)及Phospho-p44/42 MAPK(p-ERK1/2)购自美国Cell signaling公司。

1.2 紫铆因工作液的准备

紫铆因相对分子质量272.12, 将5 mg紫铆因溶于230 μ l DMSO中, 配制成(8×10^4) μ M的母液, 置于-20℃冰箱保存。临用时, 以RPMI 1640培养液稀释紫铆因到所需浓度, 保证DMSO的浓度小于1‰, 排除DMSO的细胞毒性作用, 工作液的最大浓度是80 μ M, 即稀释1 000倍。

1.3 细胞生长抑制实验(MTT法)

将细胞按5 000个/孔接种于96孔板, 分别加入终浓度为0、2.5、5、10、20、40、80 μ M的紫铆因培养液。每浓度组均设5个平行孔。培养48 h; 弃上清液, 每孔加入200 μ l无血清培养液及20 μ l MTT溶液继续培养4 h。弃上清液, 加入DMSO, 振荡10 min, 于自动酶标仪上进行比色, 在波长490 nm处测各孔光密度值, 该实验重复3次, 取平均值。

1.4 平板克隆形成试验

取对数生长期的细胞制备成单细胞悬液, 以200个/孔的浓度接种到6孔板, 分别加入10、20、40 μ M的紫铆因, 每组设置5个平行孔, 静止培养2周, 弃培养液, 固定, 染色, 计数, 按下式计算克隆形成率: 克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期

将细胞培养至对数生长期, 无血清RPMI 1640培养液过夜培养, 血清饥饿使细胞同步化在G₀期。弃掉无血清培养液, 加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液。经过恢复期后进行相关实验。加入含20、40、80 μ M的紫铆因培养液, 继续培养24 h。消化制备成单细胞悬液, 用PBS洗两遍, 加入70%冰乙醇固定, 4℃过夜。上机前, 1 000转离心5 min, 弃去乙醇, PBS洗三遍, 加50 μ l PI, 避光30 min, 上机检测细胞周期。重复试验3次。

1.6 蛋白印迹法

提取总蛋白, 测定蛋白浓度; 进行SDS-PAGE电泳, 蛋白电泳转移仪将分离后的蛋白条带转至硝酸纤维素膜上, 一抗4℃冰箱孵育过夜; 二抗室温孵育1.5 h, 暗室中ECL曝光显影。发光成像仪取像并测定条带A值, 以待检基因条带与内参条带的比值作为目的蛋白的相对量。重复实验3次。

1.7 膀胱癌裸鼠移植瘤体内研究

取对数生长期细胞, 用PBS调整浓度到4×

10⁷/ml。将裸鼠常规消毒后, 在裸鼠左后肢皮下接种细胞, 每只8×10⁶/0.2 ml。接种肿瘤细胞后, 在西安交通大学医学院动物中心无菌空气层流室内饲养, 全部实验饲养过程达到SPF(special pathogen free)条件, 定期观察小鼠的精神、饮食及排便等情况, 称量小鼠体质量。接种1周左右, 可见接种部位皮下长出米粒大小的硬结, 待瘤体达到(100~200) mm³时开始治疗。治疗前随机分组, 每组6只, 各组裸鼠治疗前体质量经统计学分析无显著性差异($P>0.05$), 表明各组裸鼠体质量在治疗前具有均衡性。治疗前对照组和紫铆因治疗组间肿瘤体积经统计学分析无显著性差异($P>0.05$)。对照组: 腹腔注射PBS, 二天注射一次。药物组: 腹腔注射PBS稀释的紫铆因, 每只每次40 μ M, 二天给药一次, 连续治疗4周。皮下移植瘤疗效观察: 皮下接种成瘤后, 每三天用游标卡尺测量肿瘤瘤体的长径(a)、短径(b), 按公式求出肿瘤近似体积(V), $V=1/2ab^2$ 。治疗后每日观察裸鼠进食、精神状况及活动情况。实验结束时处死小鼠, 称取瘤体质量。

1.8 统计学方法

使用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析, 结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析和t检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

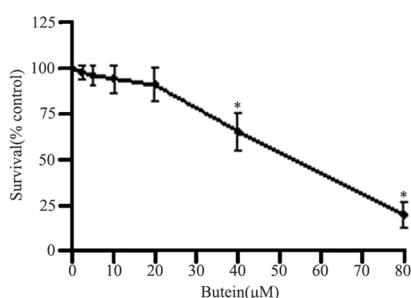
2.1 紫铆因对细胞增殖的抑制作用

不同浓度的紫铆因(2.5、5、10、20、40、80 μ M)作用48 h, MTT法检测结果表明细胞的存活率分别为(98.4±3.5)%、(96.7±5.2)%、(94.7±7.6)%、(91.4±9.24)%、(65.8±10.3)%、(20±6.8)%。紫铆因抑制BLS细胞的增殖呈浓度依赖性方式。当紫铆因40 μ M及80 μ M时对细胞增殖的抑制与对照组(紫铆因0 μ M)相比差异有统计学意义($P=0.00$), 见图1。

2.2 紫铆因对细胞克隆形成能力的抑制作用

用不同浓度的紫铆因(0、10、20、40 μ M)处理细胞, 培养12天, 计算0、10、20 μ M紫铆因作用下克隆形成率分别为(90.6±3.8)%、(51.6±3.0)%、(33.6±6.3)%。当紫铆因浓度为40 μ M时无细胞克隆形成。显示紫铆因以浓度依赖性方式抑制细胞克隆形成能力, 差异有统计学意义($P=0.00$)。

2.3 紫铆因对细胞周期的影响



*: $P=0.00$, Butein 40 μ M and Butein 80 μ M vs. control group

图1 紫铆因对膀胱移行细胞癌细胞增殖的影响

Figure1 Effects of Butein on cell proliferation of bladder transitional cell carcinoma

用20、40、80 μ M的紫铆因处理细胞24 h，流式细胞仪观察细胞周期改变。随剂量的进一步增加，G₂/M期的细胞比例明显增加，见表1。

2.4 紫铆因对NF-κB信号通路的阻断作用

表1 FCM检测膀胱移行细胞癌细胞生长周期

Table1 Cell cycles of bladder transitional cell carcinoma detected by flow cytometry

Butein	G ₁ /G ₀ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)
0	56.73±1.34	29.13±1.11	15.32±0.57
20 μ M	59.55±0.76	22.32±0.57	17.59±2.44
40 μ M	60.16±1.59	5.84±0.77	34.25±1.32*
80 μ M	45.54±2.13	9.13±0.65	45.16±2.49*

Notes: *: $P=0.00$, compared with Butein 0 μ M

20 μ M的紫铆因处理后，蛋白印迹检测细胞核蛋白及胞质蛋白中NF-κB p65的表达，以间接了解NF-κB信号的激活状态，结果显示处理8 h后紫铆因即显著抑制了NF-κB p65的胞核表达($P=0.00$)，对照组与紫铆因组NF-κB p65蛋白胞核内相对表达量分别为(1.03±0.12)及(0.16±0.02)，而紫铆因对胞质内NF-κB p65的表达无显著性影响，见图2。

2.5 紫铆因对ERK信号通路的影响

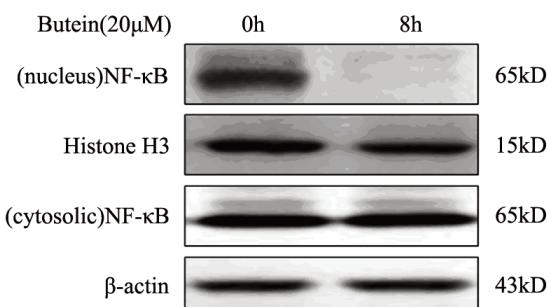
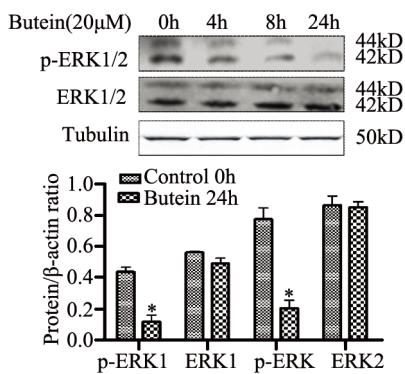


图2 蛋白印迹检测紫铆因对膀胱移行细胞癌中NF-κB p65表达的作用

Figure2 Effects of Butein on NF-κB p65 expression in bladder transitional cell carcinoma detected by Western blot

20 μ M的紫铆因分别处理BLS细胞0、4、8、24 h，Western bolt检测ERK1/2，磷酸化ERK1/2和内参β-actin的表达。发现紫铆因对ERK1/2的表达没有显著影响，而抑制了磷酸化ERK1/2的表达水平，呈时间依赖性方式，其中作用24 h后磷酸化ERK1/2的表达水平与对照组(紫铆因0 h)相比差异有统计学意义($P=0.00$)，见图3。



*: $P=0.00$, compared with Butein 0 h

图3 蛋白印迹检测紫铆因对膀胱移行细胞癌中ERK1/2信号的作用

Figure3 Effects of Butein on ERK1/2 and p-ERK1/2 of bladder transitional cell carcinoma detected by Western blot

2.6 紫铆因抑制了NF-κB下游靶基因的表达

20 μ M紫铆因处理24 h后，紫铆因处理组和未处理组细胞中Cyclin D1蛋白相对表达量为(0.98±0.16)和(0.23±0.04)。COX2蛋白相对表达量为(0.87±0.11)和(0.29±0.06)，提示紫铆因显著抑制了Cyclin D1($P=0.02$)及COX2的表达($P=0.01$)，见图4。

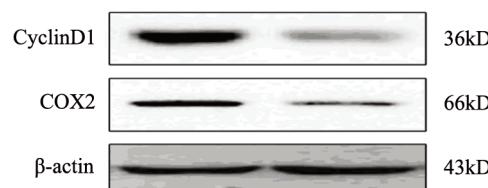


图4 蛋白印迹检测膀胱移行细胞癌中CyclinD1及COX2的表达

Figure4 Effects of Butein on CyclinD1 and COX2 expression in bladder transitional cell carcinoma detected by Western blot

2.7 紫铆因对膀胱癌裸鼠皮下移植瘤的抑制作用

每只裸鼠皮下注射 8×10^6 癌细胞后，各组裸鼠未出现消瘦、行动迟缓等症状。接种7天后可观察到皮下小结节，成瘤率100%，治疗后每日观察两组裸鼠进食、精神状况及活动情况无明显变化。治疗后，各组裸鼠肿瘤体积均逐渐增大，瘤体起初为椭圆形，以后生长渐不规则，凸凹不平。对

照组肿瘤生长较快，紫铆因组治疗2周后肿瘤生长停止并呈缩小趋势，统计学分析显示治疗结束后，治疗组肿瘤体积均小于对照组($P=0.00$)，比较切除肿瘤标本的重量，显示紫铆因治疗组的移植瘤重量明显小于对照组($P=0.00$)，见表2。

表2 紫铆因对膀胱癌裸鼠移植瘤生长的作用

Table2 Effects of Butein on transplanted tumor growth of bladder carcinoma in nude mice

Groups	Tumor size before treatment(mm^3)	Tumor size after treatment(mm^3)	Tumor weight after treatment(g)
Control	134.07±44.07	523.33±67.34	0.113±0.003
Butein	140.23±40.22	245.69±58.95**	0.054±0.007**

Notes: **: $P=0.00$, compared with control group

3 讨论

在目前的肿瘤治疗中，存在着作用小、费用高、不良反应大的缺点，寻找高效、价廉、不良反应相对小的天然药物有着非常重要的意义。紫铆因是一种植物多酚，是漆树科植物漆树（*rhus verniciflua stokes*）皮的主要活性成分。在亚洲是一种中药，在韩国也被用于食品添加剂。许多体外研究发现紫铆因除了具有抗炎及抗纤维化作用，可以抑制包括乳腺癌、前列腺癌、肝癌等许多种人类肿瘤细胞的增殖^[2-4]，本研究结果显示，膀胱癌细胞的存活率及克隆形成率随着紫铆因处理浓度的增加逐渐下降，显示出明显的剂量依赖关系；体内实验证实紫铆因对膀胱移行细胞癌皮下移植瘤有明显的抑制作用，这些结果表明紫铆因显著地抑制了膀胱癌细胞的增殖能力。细胞经药物作用后，发生DNA损伤，细胞会启动细胞周期检查点，产生细胞周期阻滞，从而抑制了细胞的增殖。本实验采用流式细胞术测定紫铆因不同处理浓度下细胞处于细胞周期各时相的百分比。结果表明：紫铆因处理细胞后G₂/M期细胞明显增多，提示紫铆因可能通过阻滞细胞在G₂/M期发挥生长抑制作用。

ERK是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)家族的主要成员，是调节细胞周期及促进细胞增殖分化的重要因子^[5]。紫铆因是特异性的酪氨酸激酶抑制剂。它抑制了表皮生长因子(EGF)受体的磷酸化激活^[6]。Yang等^[7]研究发现紫铆因通过调控MAPK通路抑制了乳腺癌细胞的增殖，本研究证实紫铆因显著抑制了ERK1/2的磷酸化。ERK1/2作为传递细胞增殖信号的重要因子，也在NF-κB的激活中发挥重要作用^[8]。NF-κB是重要的核转录因子，最常见的形式是由p50和

p65组成的异源二聚体，与其抑制蛋白IκBs形成复合物，以非活性形式存在于细胞质中，受到各种活化因素的作用后，NF-κB被激活进入到核内，调控多种涉及细胞增殖、存活、肿瘤侵袭和转移及肿瘤血管形成等基因的表达。由于基因突变、慢性炎性反应等因素所致的NF-κB异常活化可促进细胞增殖、加速肿瘤细胞转移、提高肿瘤细胞对放、化疗的抗性，最终促进肿瘤的发生与发展，因此，NF-κB活性抑制剂将有助于肿瘤的防治^[9]。研究表明紫铆因通过直接抑制IKKβ的磷酸化抑制了NF-κB的活性以及NF-κB调控基因的表达^[10]。NF-κB在膀胱癌中常表现为组成性激活，我们的数据进一步证实紫铆因抑制了膀胱癌细胞中NF-κB活性。这些结果暗示紫铆因发挥抗癌作用可能涉及ERK1/2和NF-κB两条信号通路。

Cyclin D1基因中有NF-κB连接位点，NF-κB通过调控Cyclin D1参与细胞周期的调控，促进细胞增殖^[11]。COX2也是NF-κB的重要下游靶点，COX2在正常组织中基本不表达，而在炎性反应和多数肿瘤组织中高表达，通过启动炎性反应，促进肿瘤细胞增殖及肿瘤微血管形成影响肿瘤发生发展^[12]。那么紫铆因是否抑制这些蛋白的表达，我们通过蛋白印迹检测了紫铆因处理组和未处理组细胞中Cyclin D1及COX2参与肿瘤增殖的蛋白表达，发现紫铆因处理后Cyclin D1及COX2显著下调。

综上所述，本研究发现紫铆因在膀胱癌细胞中通过阻断ERK1/2和NF-κB信号通路，继而下调Cyclin D1及COX2细胞增殖相关基因而发挥了明显的抗膀胱癌增殖作用。因此，紫铆因作为一种天然化合物有望成为膀胱癌治疗中的辅助用药。

参考文献：

- [1] Yang YC, Li X, Chen W. Differential expression of immune-associated genes in two subcloned cell lines from a same human bladder cancer[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2006, 22(5): 625-7.[杨玉琮,李旭,陈蔚.免疫相关基因在同一膀胱癌亚克隆细胞株中的差异表达[J].细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(5): 625-7.]
- [2] Lau GT, Huang H, Lin SM, et al. Butein downregulates phorbol 12-myristate 13-acetate-induced COX-2 transcriptional activity in cancerous and non-cancerous breast cells[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 648(1-3): 24-30.
- [3] Chua AW, Hay HS, Rajendran P, et al. Butein downregulates chemokine receptor CXCR4 expression and function through suppression of NF-κB activation in breast and pancreatic tumor cells[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(10): 1553-62.

- [4] Rajendran P, Ong TH, Chen L, et al. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation by butein inhibits growth of human hepatocellular carcinoma *in vivo*[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(6): 1425-39.
- [5] Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases[J]. Science, 2002, 298(5600): 1911-2.
- [6] Yang EB, Zhang K, Cheng LY, et al. Butein, a specific protein tyrosine kinase inhibitor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 245(2): 435-8.
- [7] Yang LH, Ho YJ, Lin JF, et al. Butein inhibits the proliferation of breast cancer cells through generation of reactive oxygen species and modulation of ERK and p38 activities[J]. Mol Med Rep, 2012, 6(5): 1126-32.
- [8] Nakano H, Shindo M, Sakon S, et al. Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(7): 3537-42.
- [9] Mang YX, Li M. Progress in NF- κ B Targeting Drugs for the Prevention and Treatment of Tumor[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2006, 33(6): 465-7. [马艳霞, 李敏. NF- κ B与肿瘤防治药物研究进展[J]. 肿瘤防治研究, 2006, 33(6): 465-7.]
- [10] Pandey MK, Sandur SK, Sung B, et al. Butein, atetrahydroxychalcone, inhibits nuclear factor (NF)- κ B and NF- κ B-regulated gene expression through direct inhibition of IkappaBalpha kinase beta on cysteine-179 residue[J]. J Biol Chem, 2007, 282(24): 17340-50.
- [11] Dahlman JM, Wang J, Bakkar N, et al. The RelA/p65 subunit of NF- κ B specifically regulates cyclin D1 protein stability: implications for cell cycle withdrawal and skeletal myogenesis[J]. J Cell Biochem, 2009, 106(1): 42-51.
- [12] Wang S, Liu Z, Wang L, et al. NF- κ B signaling pathway, inflammation and colorectal cancer[J]. Cell Mol Immunol, 2009, 6(5): 327-34.

[编辑校对: 周永红]

• 消息会讯 •

《肿瘤防治研究》杂志征订征稿启示

《肿瘤防治研究》杂志创刊于1973年, 是我国第一本独立的全国性肿瘤专业学术刊物。由国家卫生和计划生育委员会主管, 中国抗癌协会、湖北省肿瘤医院主办。杂志是北大中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、中国科学引文数据库来源期刊(CSCD)、湖北省优秀医学期刊、中国抗癌协会系列刊物。被美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrich PD)、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JST)、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、英国《全球健康》(Global Health)及国内所有大型数据库收录。

杂志主要报道肿瘤基础研究及临床诊疗方面的新理论、新成果、新技术、新经验、新进展。以肿瘤临床、科研工作者为主要读者对象。

主要栏目有专家论坛、专题研究、基础研究、临床研究、临床诊断、临床应用、流行病学、综述、技术交流、短篇论著、研究简报、病例报道、指南与解读、消息会讯等。

2008年杂志建成自己的独立网站(<http://www.zlfzyj.com>), 2009年开始文章的DOI中文注册工作, 随之杂志的所有编辑出版工作转移到了网络平台, 作者投稿查稿、专家审稿工作均通过网络完成, 读者亦可通过网站免费阅读和下载本刊文章。2014年杂志开始为每篇文章生成二维码, 并提供html格式全文。

2015年我们将组织更多优秀的专题研究回馈广大读者, 希望朋友们能一如既往地给予本刊以热忱的关注, 将优秀稿件投往《肿瘤防治研究》以支持我国学术期刊的发展, 订阅《肿瘤防治研究》以关注我国肿瘤事业取得的进步。

邮发代号: 38-70; 国外代号: MO6482

定价: 15.00 元/册; 出版周期: 月刊

中国标准连续出版物号: ISSN 1000-8578 CN 42-1241/R; CODEN ZFYHAB

投稿网站: <http://www.zlfzyj.com>; E-mail: zlfzyjzz@vip.163.com

电话/传真: 027-87670126

通信地址: 430079 武汉市洪山区卓刀泉南路116号 《肿瘤防治研究》编辑部