

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.10.015

实验研究

消癥汤对膀胱肿瘤 T24 细胞凋亡及相关蛋白 Slit2、Bim、Bad 的影响

尹学来, 刘冬, 李克刚, 张亚强, 刘兵*

(中国中医科学院广安门医院, 北京市西城区广安门内大街北线阁 5 号, 100053)

摘要 目的 探讨消癥汤抑制膀胱肿瘤复发的可能作用机制。方法 取对数生长期膀胱肿瘤 T24 细胞, 调整浓度为 1×10^4 个/ml, 每孔 $200 \mu\text{l}$ 接种于 96 孔板中, 常规培养 24 h 后每孔加入 $200 \mu\text{l}$ 含有不同浓度消癥汤 (药物终浓度分别为 5、10、20、40、80、160、320、640、1280 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的完全培养基, 每种浓度设 5 个平行孔, 干预 24 h 后测定消癥汤对 T24 细胞增殖抑制作用, 并计算消癥汤半数抑制浓度 (IC_{50})。根据结果取低、中、高剂量的消癥汤培养 T24 细胞 24 h, 并设 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 消癥汤做对照, 检测消癥汤对 T24 细胞凋亡的影响, 并测定低、中、高剂量组 Slit2、Bim、Bad 蛋白及基因表达。结果 消癥汤对 T24 细胞的 IC_{50} 为 127.14 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 中剂量取 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 低剂量取 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 高剂量取 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。对照组 T24 细胞凋亡细胞百分比为 $(4.41 \pm 0.50)\%$, 低剂量组为 $(4.47 \pm 0.13)\%$, 中剂量组为 $(11.04 \pm 1.32)\%$, 高剂量组为 $(12.08 \pm 0.55)\%$ 。与对照组比较, 中剂量组和高剂量组凋亡细胞百分比明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与低剂量组比较, 中、高剂量组能够增加与凋亡相关的 Slit2、Bim、Bad 蛋白及基因表达 ($P < 0.05$)。结论 消癥汤能抑制膀胱肿瘤 T24 细胞的增殖, 可能与增加凋亡相关蛋白 Slit2、Bim、Bad 的表达有关。

关键词 膀胱肿瘤; 消癥汤; 细胞凋亡

目前膀胱肿瘤为泌尿生殖系统肿瘤发病率和死亡率第二位的肿瘤^[1], 其中非肌层浸润性膀胱肿瘤 (NMIBC) 大约占 70%^[2], 经尿道膀胱肿瘤切除术 (TURBT) 治疗后有超过 50% 的患者会复发^[3]。目前关于膀胱癌生物学行为研究较多, 认为膀胱肿瘤复发可能与细胞凋亡有关^[4]。消癥汤是中国中医科学院广安门医院刘猷枋教授用于预防 NMIBC 术后复发的经验方。前期临床研究显示, 消癥汤能有效减少 NMIBC 复发, 三年的复发率可在西医标准治疗基础上减少 13.3%^[5]。为探索消癥汤抑制膀胱肿瘤复发的可能作用机制, 本实验观察消癥汤对膀胱肿瘤 T24 细胞的凋亡影响以及对细胞凋亡蛋白 Slit2、Bim、Bad 的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞及药物

T24 细胞, 购于国家实验细胞资源中心 (STR

信息: Amelogenin: X; CSF1PO: 10, 12; D13S317: 12; D16S539: 9; D18S51: 16, 18; D19S433: 13, 14; D21S11: 29; D2S1338: 20, 23; D3S1358: 16; D5S818: 10, 12; D7S820: 10, 11; D₈)。消癥汤水煎剂, 组方: 薏苡仁 30 g, 黄精 15 g, 黄芪 20 g, 白花蛇舌草 15 g, 莪术 9 g, 白头翁 15 g, 猪苓 15 g, 将上述 5 倍剂量的中药置煎煮容器内, 量取 10 倍剂量的双蒸水浸泡 30 min 后, 煮沸, 倒出药液, 再加 10 倍量的水, 继续煮沸, 倒出药液, 合并 2 次药液, 置于旋转蒸发器内制成膏剂, 然后置于真空干燥箱干燥 48 h, 取出研磨成粉剂, 用 DMEM/F12 培养液分别配置成所需的浓度, 然后过滤, 分装至 50 ml 离心管中保存。

1.2 主要试剂

DMEM/F12 (Invitrogen 公司, 批号 NZM1298); 胰酶 (吉诺生物医药有限公司, 批号 151166); Trizol (Invitrogen 公司, 批号 79408); 胎牛血清 (Hyclone 公司, 批号 NWK0489); Anti-Slit2 抗体 (批号 ab155605)、Anti-Bim 抗体 (批号 ab7888)、Anti-Bad 抗体 (批号 ab32445) 均为 Abcam 公司产

基金项目: 国家自然科学基金 (81250032); 北京市自然科学基金 (7132226, 7112119, 7112118); 北京市中医药科技项目 (JJ2013-63)

* 通讯作者: liubing1040@126.com, (010) 88001040

品; Goat Anti-rabbit IgG, HRP-linked 抗体 (CST 公司, 批号 7074); High Capacity RNA-to-cDNA Kit (批号 4387406)、Bim 基因 (批号 Hs00708019_s1)、GAPDH 基因 (批号 Hs02758991_g1)、Slit2 基因 (批号 Hs01061406_g1)、Bad 基因 (批号 Hs00188930_m1)、TaqMan Gene Expression Master Mix (批号 4391128) 均为 Life Technology 公司产品; MTT (Sigma 公司, 批号 M2128); Annexin V/PI 试剂盒 (BD 公司, 批号 556547)

1.3 主要仪器

MCO-18AIC 细胞培养箱, 日本 Sanyo 公司; DZF-6020 真空干燥箱, 上海一恒科技有限公司; RE 52-05 旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; SIAFRT Synergy HT 多功能酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; PHS-2F 酸度计, 上海雷磁仪器厂; 2020 冰点渗透压仪, 美国 Advanced 公司; NanoDrop 超微量分光光度计, 美国 Thermo Scientific 公司; 6、96 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司; 164-5070 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; IPVH00011 Immobilon-P Transfer Membrane, 美国 Millipore 公司; ImageXpress Micro Widefield High Content Screening System 高内涵系统, 美国 Molecular Devices 公司; Micro-Amp Optical 96-Well Reaction Plate, 美国 Life Technology 公司; Micro Amp Optical Adhesive Film kit, 美国 Life Technology 公司; ChemiDoc XRS 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems, 美国 ABI 公司; FACS Aria Flow Cytometer System 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

1.4 消癥汤对膀胱肿瘤 T24 细胞增殖的影响

取对数生长期 T24 细胞, 消化后用完全培养液制成单细胞悬液, 调整浓度为 1×10^4 个/ml, 每孔 200 μ l 接种于 96 孔板中, 于培养箱内常规培养 24 h。每孔加入 200 μ l 含有不同浓度消癥汤的完全培养基 (药物终浓度为 5、10、20、40、80、160、320、640、1280 μ g/ml), 每种浓度设 5 个平行孔, 空白对照组只加完全培养基, 24 h 后检测, 每孔加入 5mg/ml MTT 10 μ l, 继续培养 4 h, 弃上清; 每孔加入 150 μ l DMSO, 在摇床上振荡 10 min 后, 于酶标仪上 490 nm 波长读取 OD 值, 计算肿瘤细胞抑制率。肿瘤细胞抑制率 (%) = $1 - (\text{给药组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}) / (\text{空白组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值})$ 。采用 SPSS18.0 软件中 Probit 模型计算消癥汤半数抑制浓度 (IC_{50})。

1.5 Annexin V/PI 双染法检测消癥汤对 T24 细胞凋亡的影响

根据 1.4 的研究结果, 取低、中、高剂量的消癥汤培养 T24 细胞 24 h, 并设 0 μ g/ml 消癥汤做对照。胰酶消化后离心收集细胞; 用 PBS 洗涤细胞二次后加入 $1 \times$ Binding Buffer 1 ml, 细胞计数, 取 2×10^5 个细胞加入流式管; 加入 5 μ l Annexin V 混匀后, 避光孵育 5 min 后加入 5 μ l Propidium Iodide, 混匀后避光孵育 10 min, 加入 300 μ l 的 $1 \times$ Binding Buffer; 在 1 h 内上流式细胞仪检测。

1.6 Western blot 法测定 T24 细胞中 Slit2、Bim、Bad 蛋白表达

用 RIPA 取培养在不同浓度消癥汤 (低、中、高剂量) 培养 24 h 后细胞的总蛋白, BCA 法蛋白定量, 10% SDS-聚丙烯酰胺电泳分离, 转移到 PVDF 膜上, 脱脂奶粉封闭膜 1 h, 加一抗 (Slit2、Bim 稀释倍数为 500, Bad 稀释倍数为 2000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加二抗 (稀释倍数均为 1 : 8000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 凝胶成像系统下曝光成像。利用 Image J 1.48V (由美国 NIH 提供) 对 WB 条带进行灰度分析。相对光密度值 = (处理组目标蛋白光密度值/处理组内参蛋白光密度值) / (空白组目标蛋白光密度值/空白组内参蛋白光密度值)

1.7 RT-PCR 法测定 T24 细胞中 Slit2、Bim、Bad 基因表达

将不同浓度消癥汤 (低、中、高剂量) 处理 24 h 后 T24 细胞, 用 Trizol 从细胞中提取总 RNA, 测定 RNA 浓度, 采用 1.0% 琼脂糖凝胶, 100V 电压电泳检测 RNA 的完整性, 然后反转录为 cDNA。实验中同步进行对照管家基因 GAPDH 的定量检测, 并采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[8] 计算基因表达量。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 满足正态性和方差齐性时用 LSD 法, 方差不齐选用 Dunnett's 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度消癥汤对膀胱肿瘤 T24 细胞增殖抑制率比较

浓度为 5、10、20、40、80、160、320、640、1280 μ g/ml 的消癥汤对膀胱肿瘤 T24 细胞抑制率分别为 0、20.60%、30.45%、40.32%、65.64%、

70.72%、88.63%、92.88%、96.66%，因此，消癥汤能够抑制膀胱肿瘤 T24 细胞增殖，并随着浓度增加抑制率增加，根据统计结果得出 IC_{50} 为 127.14 $\mu\text{g/ml}$ ，为便于计算中剂量取 120 $\mu\text{g/ml}$ ，低剂量取 60 $\mu\text{g/ml}$ ，高剂量取 240 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 不同浓度消癥汤对 T24 细胞凋亡影响

对照组 T24 细胞凋亡细胞百分比为 (4.41 ± 0.50) %，低剂量组为 (4.47 ± 0.13) %，中剂量组为 (11.04 ± 1.32) %，高剂量组为 (12.08 ± 0.55) %。与对照组比较，低剂量组凋亡细胞百分比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，而中剂量组和高剂量组凋亡细胞百分比明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 不同浓度消癥汤对 T24 细胞中 Slit2、Bim、Bad 蛋白表达的影响

表 1 示，与低剂量组比较，高、中剂量组 Slit2、Bim、Bad 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$)，表明中、高剂量消癥汤增加 Slit2、Bim、Bad 蛋白表达效果更好。

表 1 各组膀胱肿瘤 T24 细胞 Slit2、Bim、Bad 蛋白表达灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Slit2	Bim	Bad
低剂量组	3	0.4255 ± 0.0077	0.4118 ± 0.0064	0.4120 ± 0.0091
中剂量组	3	0.4823 ± 0.2122*	0.5812 ± 0.0182*	0.4789 ± 0.0060*
高剂量组	3	0.6463 ± 0.0066*	0.7393 ± 0.0093*	0.5888 ± 0.0069*

注：与低剂量组比较，* $P < 0.05$

2.4 不同浓度消癥汤对 T24 细胞中 Slit2、Bim、Bad 基因表达的影响

表 2 示，与低剂量组比较，高、中剂量组 Slit2、Bim、Bad 基因表达明显升高 ($P < 0.05$)，表明中、高剂量消癥汤增加 Slit2、Bim、Bad 基因表达效果更好。

表 2 各组膀胱肿瘤 T24 细胞 Slit2、Bim、Bad 基因表达比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	Slit2	Bim	Bad
低剂量组	3	1.497 ± 0.447	1.457 ± 0.203	0.560 ± 0.230
中剂量组	3	3.738 ± 0.259*	4.026 ± 0.557*	3.566 ± 0.144*
高剂量组	3	8.779 ± 0.355*	5.583 ± 0.954*	7.834 ± 0.641*

注：与低剂量组比较，* $P < 0.05$

3 讨论

目前 NMIBC 治疗难点在于膀胱肿瘤复发。细胞凋亡信号通路与膀胱肿瘤复发密切相关^[1]。目前认为细胞凋亡信号通路中的蛋白可以作为判断患

者复发情况的指标^[2]。Slit2 是一种分泌型糖蛋白，分布于细胞表面，涉及到多个细胞信号途径，有研究认为它是一种肿瘤抑制因子，能够调节肿瘤的侵袭、转移能力，对干细胞有“化学排斥”的作用^[3-5]。当细胞受到凋亡刺激时如细胞因子撤除、化疗药物作用、紫外线照射等，可通过各种信号途径激活 Bim 分子，活化的 Bim 分子从微管蛋白复合体上释放，移位于线粒体膜，通过抑制抗凋亡分子和活化 BAK/BAX 促凋亡分子而发挥促凋亡作用^[6]。当细胞缺失 Bim 基因时对凋亡刺激因子有着高度抵抗性^[7]。Bad 基因通常在肿瘤组织中下调，可通过天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶家族成员作用调控磷酸化过程促进细胞凋亡^[8]。

消癥汤是刘猷枋教授临床用于预防 NMIBC 术后复发的经验方，刘教授认为，膀胱癌术后复发的核心病机为正气不足，湿毒内蕴，癥积复聚，提出益气、利湿、解毒、散结为治疗膀胱癌术后的基本治法，在此基础上组方消癥汤。方中薏苡仁健脾渗湿为君药；伍以黄精、黄芪补气益血；白花蛇舌草解毒软坚为臣药；佐以莪术破血行气、白头翁解毒散结、猪苓利水渗湿，诸药合用，共达补气益血、解毒利湿之功，体现了中医扶正培本、祛邪不伤正的原则。

本实验研究结果表明，消癥汤能够在体外抑制膀胱肿瘤 T24 细胞的增殖，并增加膀胱肿瘤 T24 细胞的凋亡，而 Slit2、Bim、Bad 是凋亡途径中的关键蛋白，消癥汤能够增加 Slit2、Bim、Bad 在膀胱肿瘤 T24 细胞中表达，并且以中、高剂量效果最好，说明消癥汤增加膀胱肿瘤 T24 细胞凋亡的途径可能是增加 Slit2、Bim、Bad 在膀胱肿瘤 T24 细胞中表达。本实验通过研究消癥汤对膀胱肿瘤细胞 T24 的增殖影响，流式细胞学检测细胞凋亡情况，验证了影响细胞凋亡的相关蛋白和基因，本研究结果显示，消癥汤有效降低 NMIBC 术后复发机制可能是增加膀胱肿瘤细胞的凋亡。

参考文献

- [1] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] WITJES JA, COMPÉRAT E, COWAN NC, et al. EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines [J]. Eur Urol, 2014, 65(4): 778-792.
- [3] SU SF, DE CASTRO ABREU AL, CHIHARA Y, et al. A panel of three markers hyper- and hypomethylated in urine

- sediments accurately predicts bladder cancer recurrence [1]. Clin Cancer Res, 2014, 20(7): 1978-1989.
- [4] BLICK C, RAMACHANDRAN A, MCCORMICK R, et al. Identification of a hypoxia-regulated miRNA signature in bladder cancer and a role for miR-145 in hypoxia-dependent apoptosis [J]. Br J Cancer, 2015, 113(11): 634-644.
- [5] 刘兵, 张亚强, 卢建新, 等. 消癥汤联合羟喜树碱膀胱灌注预防浅表性膀胱癌术后复发疗效观察 [J]. 北京中医药, 2014, 33(2): 90-93.
- [6] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [7] CHE X, YANG D, ZONG H, et al. Nuclear cIAP1 overexpression is a tumor stage-and grade-independent predictor of poor prognosis in human bladder cancer patients [J]. Urol Oncol, 2012, 30(4): 450-456.
- [8] KIM HK, ZHANG H, LI H, et al. Slit2 inhibits growth and metastasis of fibrosarcoma and squamous cell carcinoma [J]. Neoplasia, 2008, 10(12): 1411-1420.
- [9] GÖHRIG A, DETJEN KM, HILFENHAUS G, et al. Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer [J]. Cancer Res, 2014, 74(5): 1529-1540.
- [10] WESTPHAL D, DEWSON G, CZABOTAR PE, et al. Molecular biology of Bax and Bak activation and action [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(4): 521-531.
- [11] REN D, TU HC, KIM H, et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX-and BAK-dependent cell death program [J]. Science, 2010, 330(6009): 1390-1393.
- [12] DATTA SR, KATSOV A, HU L, et al. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation [J]. Mol Cell, 2000, 6(1): 41-51.

Impact of *Xiaozheng Decoction* (消癥汤) on T24 Apoptosis and Related Proteins Slit2, Bim and Bad in Bladder Cancer

YIN Xuelai, LIU Dong, LI Kegang, ZHANG Yaqiang, LIU Bing

(Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100053)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Xiaozheng Decoction* (消癥汤) inhibiting recurrence of bladder cancer. **Methods** Bladder cancer T24 cells of logarithmic phase were extracted. The concentration after regulating was 1×10^4 cells/ml. The cells were inoculated in 96-well plates, 200 μ l in each pore. After 24 hours of routine culture, complete medium 200 μ l containing *Xiaozheng Decoction* in different concentration (with final concentration of drug 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, or 1280 μ g/ml) was added to each pore. Five parallel pores of each concentration were designed. After intervention for 24 hours, the inhibition effect of *Xiaozheng Decoction* on T24 cell multiplication was examined with methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method. The *Xiaozheng Decoction* concentration of median lethal dose (IC_{50}) was calculated. According to the results, T24 cells were cultured with low, medium and high dose of *Xiaozheng Decoction* for 24 hours. 0 μ g/ml of *Xiaozheng Decoction* was designed as control. The impact of *Xiaozheng Decoction* on T24 apoptosis was examined with Annexin V/propidium iodide (PI) double staining method. The expressions of Slit2, Bim, and Bad proteins and genes in the low, medium and high dose groups were detected with Western blot and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods. **Results** IC_{50} of *Xiaozheng Decoction* to T24 cells was 127.14 μ g/ml, 120 μ g/ml of medium dose, 60 μ g/ml of low dose, and 240 μ g/ml of high dose. The percentage of apoptotic cells of T24 cells in the control group was $(4.41 \pm 0.50) \%$, $(4.47 \pm 0.13) \%$ in the low dose group, $(11.04 \pm 1.32) \%$ in the medium group, and $(12.08 \pm 0.55) \%$ in the high dose group. Compared with the control group, the percentage of apoptotic cells in the medium and high dose groups increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the low dose group, the expressions of Slit2, Bim, and Bad proteins and genes which were related to apoptosis in the medium and high dose groups increased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Xiaozheng Decoction* might inhibit the proliferation of bladder cancer T24 cells. It might be related to increasing the expressions of apoptosis related proteins, such as Slit2, Bim and Bad.

Keywords bladder cancer; *Xiaozheng Decoction* (消癥汤); apoptosis

(收稿日期: 2015-08-04; 修回日期: 2015-11-19)

编辑: 邓媛