·基础实验研究论著·

藏花素调控 *deltaN P63* 基因抑制膀胱肿瘤细胞生长的研究*

何云锋，张　尧，陈　刚，赵　培，李家兵，尹志康
（重庆医科大学附属第一医院泌尿外科，重庆 400016）

摘　要：目的　探讨藏花素对膀胱肿瘤细胞 5637 的生长抑制作用及调控机制。**方法**　用 3 mmol/L 藏花素处理膀胱肿瘤细胞 5637 细胞株，采用反转录 PCR（RT-PCR）检测细胞 *deltaN P63* 基因表达的变化，光镜下检测细胞形态改变，流式细胞术检测细胞周期改变，四甲基偶氮唑盐法（MTT）检测细胞增殖改变。**结果**　在一定浓度的藏花素作用下，可见 5637 细胞生长缓慢，deltaN-P63 基因表达下降，G_0/G_1 期细胞数量增加，G_2/M 期细胞数量减少，MTT 检测显示细胞增殖受到抑制。**结论**　藏花素可以抑制膀胱肿瘤细胞增殖和生长，其机制可能与通过下调 *deltaN P63* 基因的表达有关。

关键词：藏花素；　膀胱肿瘤；　*deltaN P63*
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.003　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2014)03-0261-02

Crocin inhibits bladder cell growth through regulation of *deltaN P63* gene*

He Yunfeng, Zhang Yao, Chen Gang, Zhao Pei, Li Jiabing, Yin Zhikan
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing* 400016, *China*)

Abstract: Objective　To detect the inhibition effects and possible mechanism of crocin in bladder cancer 5637 cell line. **Methods**　5637 cells were treated with 3 mmol/L crocin, and the change of *deltaN P63* gene was detected using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), the cell form was observed by microscope, cell cycle was detected by flow cytometry, and cell proliferation was detected by MTT. **Results**　In the optimal concentration of crocin, the growth of 5637 cells became slowly than normal. The expression of *deltaN P63* gene decreased, the cell number of G_0/G_1 was increased but the cell number of G_2/M decreased. MTT result showed that the cell proliferation was inhibited. **Conclusion**　Bladder cancer cell growth and proliferation could be inhibited by crocin, and its possible mechanism is the down regulation of *deltaN P63* gene.

Key words: crocin;　bladder cancer;　*deltaN P63*

在中国，膀胱肿瘤是泌尿系统最常见的肿瘤，其发生、发展与众多的肿瘤基因密切相关。关于膀胱肿瘤治疗的研究主要集中在西医手段，关于传统医学治疗方法的研究和报道较少，本课题组采用中药组分藏花素干预膀胱肿瘤细胞，对其相关机制做了初步的探讨，报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料　膀胱肿瘤细胞株 5637 细胞由中科院上海细胞所提供；细胞培养相关试剂由 Sigma 公司提供；反转录 PCR（RT-PCR）试剂及引物由 Qiagen 公司提供；藏花素的分子式为 $C_{44}H_{64}O_{24}$，相对分子质量为 977.21，为水溶性橙黄色粉末，纯度大于 99%，由 Sigma 公司提供；四甲基偶氮唑盐法（MTT）试剂由 Sigma 公司提供。

1.2　方法

1.2.1　藏花素溶液配制和实验分组　将 1 000 mg 橙黄色藏花素粉末溶于 20 mL PBS（0.01 mol/L、pH＝7.2）中，加入 62.5 mg EDTA（藏花素的稳定剂）配成最终使用浓度 3 mmol/L。将配制好的藏花素溶液，加入传代后贴壁约 60% 的 5637 细胞培养瓶中（作为治疗组），24 h 后光镜下观察细胞生长和形态的改变。反转录 PCR（RT-PCR）检测 *deltaN P63* 基因的改变，流式细胞术检测细胞周期的改变。每组均设空白对照组。

1.2.2　RT-PCR　提取细胞总 RNA，并按试剂盒说明进行操作，反转录为 cDNA。*deltaN P63* 引物序列如下，上游：5′-TGC CCA GAC TCA ATT TAG TGA G-3′；下游：5′-TCT GGA TGG GGC ATG TCT TTG C-3′，扩增片段长度为 335 bp。反应条件：94 ℃变性 2 min；95 ℃ 1 min，53.5 ℃ 30 s，72 ℃ 2 min 共 30 个循环；最后 72 ℃ 7 min。取 5 μL PCR 产物做 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，用 BIORAD 图象分析仪观察并拍照。

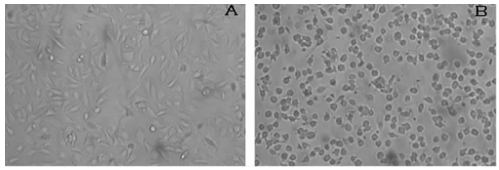
1.2.3　流式细胞术检测细胞周期　3 mmol/L 的藏花素处理 5637 细胞 24 h 后，收集细胞，调整细胞浓度至（1～5）×10^5/mL，以 1 000 r/min，低速离心 5 min，弃去培养液。乙醇固定后，送本校流式细胞检测中心检测细胞周期变化。

1.2.4　MTT 检测细胞增殖　取对数生长期的 5637 细胞，经胰酶消化，以 2×10^4/mL 的密度接种于 96 孔培养板中。常规恒温细胞培养箱中培养 24 h 后，给予 3 mmol/L 浓度的藏花素进行处理，每孔设 5 个复孔。全自动酶标仪（波长 570 nm）测定各孔吸光度（A）。细胞增殖抑制率（%）＝[($A_{对照组}-A_{空白组}$)－($A_{治疗组}-A_{空白组}$)]/($A_{治疗组}-A_{空白组}$)×100%。

2　结　　果

2.1　细胞形态的观察　3 mmol/L 的藏花素处理 5637 细胞 24 h 后，光镜下可见治疗组细胞生长受到抑制，细胞形态不规则，细胞皱缩，见图 1。

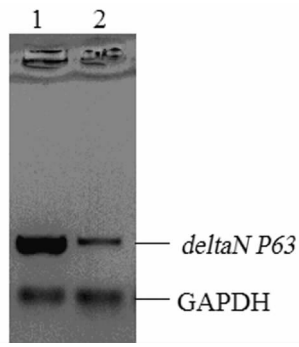
*　基金项目：重庆市卫生局中医药基金资助项目（2009-2-80）。　作者简介：何云锋，男，讲师，主要从事泌尿系统肿瘤学基础的研究。



A：对照组；B：治疗组。

图 1　藏花素处理 24 h 后 5637 细胞形态的改变

2.2 RT-PCR 检测 *deltaN P63* 基因改变　3 mmol/L 的藏花素处理 5637 细胞 24 h 后，治疗组 *deltaN P63* 基因表达较对照组明显下降，见图 2。



1：治疗组；2：对照组；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶，作为内参。

图 2　藏花素处理后 5637 细胞 *deltaN P63* 基因表达的改变

2.3 流式细胞术检测细胞周期　3 mmol/L 的藏花素处理 5637 细胞 24 h 后，治疗组 G_0/G_1 期细胞数量增加，G_2/M 期细胞数量减少，说明一定浓度的藏花素对膀胱肿瘤细胞 5637 的细胞周期有调控作用，见附图 1（见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”）。

2.4 MTT 检测细胞增殖　MTT 检测显示，随着时间的延长，治疗组膀胱肿瘤细胞 5637 的增殖明显受到抑制，而对照组细胞生长正常，见图 3。

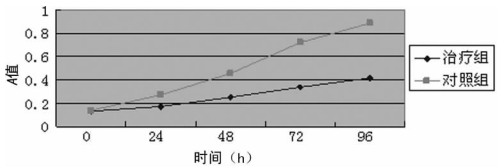


图 3　MTT 检测细胞增殖改变

3　讨　论

藏花素是来源于藏红花和栀子的提取物与活性成分。其化学本质为一种水溶性类胡萝卜素，其化学成分主要为 1 分子藏花酸和 2 分子龙胆二糖通过酯键连接而成，其分子中含有多个共轭双键。因此，藏花素具有广谱抗癌活性，对膀胱肿瘤、白血病、卵巢癌、结肠癌、横纹肌肉瘤和软组织肉瘤等都具有较强的抑制作用，而且几乎无毒性[1-5]。

本组资料通过前期工作证实 3 mmol/L 为藏花素作用于膀胱肿瘤细胞的最佳浓度[1-3]。在此基础之上，通过培养膀胱肿瘤细胞 5637，当细胞传代培养贴壁生长至培养容器的 60% 左右的时候，加入 3 mmol/L 的藏花素，结果发现，膀胱肿瘤细胞形态改变，细胞变得不规则，细胞增殖和生长明显受到抑制。推测其原因可能与减少 G_2/M 期细胞数和诱导细胞凋亡的发生，同时还与凋亡相关蛋白如肿瘤坏死因子（TNF）-α、BCL-XL、CD95 和胱天蛋白酶-3 及相应的信号通路有关[6-7]。另外藏花素可以通过提高谷胱苷肽还原酶（GST）和 γ-谷氨酰转肽酶合成酶（γ-GCS）等的活性，增强癌细胞抗氧化，淬灭氧自由基功能来抑制肿瘤细胞生长[8]。

deltaN P63 是 P63 基因的两个亚型之一，已经被证明是膀胱肿瘤的癌基因，*deltaN P63* 上调可以促进膀胱肿瘤的发生、发展，甚至导致其转移和复发，而下调 *deltaN P63* 的表达可以抑制其恶性生物学行为[9-11]。本组资料发现当藏花素处理细胞 24 h 后，膀胱肿瘤癌基因 *deltaN P63* 的表达明显下降。因此推测藏花素可能对膀胱肿瘤细胞具有一定的抑制作用，而且这种作用可能与抑制癌基因 *deltaN P63* 的表达有关。但藏花素如何导致 *deltaN P63* 的具体机制仍不明确，值得进一步探讨。

参考文献

[1] 吕纯芳，罗春丽，冀慧莹，等. 藏花素对膀胱移行细胞癌 T24 细胞 VEGF-C 表达水平的影响[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(6)：649-651.

[2] 赵培，罗春丽，吴小候，等. 藏花素对膀胱移行细胞癌 T24 细胞增殖和凋亡的影响及作用机制研究[J]. 中国中药杂志，2008，33(15)：1869-1873.

[3] 罗春丽，赵培，胡宏波，等. 藏花素对膀胱移行细胞癌的增殖抑制作用[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(11)：1305-1308.

[4] Alavizadeh SH, Hosseinzadeh H. Bioactivity assessment and toxicity of crocin: A comprehensive review[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 64(3): 65-80.

[5] Karami M, Bathaie SZ, Tiraihi T, et al. Crocin improved locomotor function and mechanical behavior in the rat model of contused spinal cord injury through decreasing calcitonin gene related peptide (CGRP)[J]. Phytomedicine, 2013, 21(1): 62-67.

[6] D'alessandro AM, Mancini A, Lizzi AR, et al. Crocus sativus stigma extract and its major constituent crocin possess significant antiproliferative properties against human prostate cancer[J]. Nutr Cancer, 2013, 65(6): 930-942.

[7] Tamaddonfard E, Farshid AA, Ahmadian E, et al. Crocin enhanced functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats[J]. Iran J Basic Med Sci, 2013, 16(1): 83-90.

[8] Sun Y, Xu HJ, Zhao YX, et al. Crocin exhibits antitumor effects on human leukemia HL-60 cells in vitro and in vivo[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 10(1): 690164.

[9] He Y, Wu X, Tang W, et al. Impaired delta NP63 expression is associated with poor tumor development in transitional cell carcinoma of the bladder[J]. J Korean Med Sci, 2008, 23(5): 825-832.

[10] He YF, Tian DY, Yi ZJ, et al. Upregulation of cell adhesion through delta Np63 silencing in human 5637 bladder cancer cells [J]. Asian J Androl, 2012, 14(5): 788-792.

[11] Tran MN, Choi W, Wszolek MF, et al. The p63 protein isoform ΔNp63α inhibits epithelial-mesenchymal transition in human bladder Cancer cells: role of MIR-205[J]. J Biol Chem, 2013, 288(5): 3275-3288.

（收稿日期：2013-10-22）