

胞凋亡及 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2016, 18(8): 42-45.

[6] 韩正怡, 何淑芳, 朱海娟, 等. 微小 RNA-133b-5p 在缺氧复氧诱发大鼠心肌细胞凋亡中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2015, 35(6): 740-743.

[7] Tsend-Ayush E, O'Sullivan L A, Grützner F S, *et al.* RBMX gene is essential for brain development in zebrafish[J]. *Dev Dyn*, 2005, 234(3): 682-688.

[8] 张金龙. RBMX 在大鼠脊髓损伤后的表达[D]. 南通: 南通大学, 2014.

[9] 朱 晶, 万 丽, 徐 玮, 等. 人参首乌方对缺氧复氧诱导的皮质神经细胞凋亡的影响[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(1): 77-83.

[10] 闵 清, 白育庭, 余 薇, 等. 山楂叶总黄酮对缺氧再给氧心肌细胞的保护作用及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(1): 30-33.

[11] 袁 芳. 山楂叶总黄酮对 H₂O₂ 诱导乳鼠心肌细胞氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(4): 368-371; 405.

[12] 纪影实, 李 红, 曲极冰, 等. 山楂叶总黄酮对脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(21): 2743-2746.

[13] 陈颖添, 汤永红. miRNA 与缺血性脑卒中的关系进展研究[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(11): 177-178.

[14] 刘海莉, 李 涛, 王洪杰, 等. miR-133b 在甲基苯丙胺诱导 PC12 细胞凋亡中的调控作用[J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2018, 39(1): 26-33.

[15] 潘永露. ERK 信号通路 with microRNA-133b-5p 在吗啡预处理减轻心力衰竭大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用及其机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.

[16] 程 洁. 吗啡预处理通过调控 miR-133b-5p 减轻心肌细胞缺氧再给氧损伤的作用及机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.

[17] Martínez-Arribas F, Agudo D, Pollán M, *et al.* Positive correlation between the expression of X-chromosome RBM genes (RBMX, RBM3, RBM10) and the proapoptotic Bax gene in human breast cancer[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(6): 1275-1282.

[18] Adamson B, Smogorzewska A, Sigoillot F D, *et al.* A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(3): 318-328.

[19] Shin K H, Kim R H, Kim R H, *et al.* HnRNP G elicits tumor-suppressive activity in part by upregulating the expression of Txnip[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(4): 880-885.

[20] 戴 明. RBMX 在大鼠视网膜光损伤后的表达[D]. 南通: 南通大学, 2015.

葫芦素 B 通过调控 HERG1 对膀胱癌细胞增殖、迁移侵袭和放射敏感性的影响

董建设¹, 李 豪¹, 赵俊峰¹, 陈瑞廷¹, 张林超¹, 贾占奎²
(1. 河南省中医院 泌尿外科, 河南 郑州 450000; 2. 郑州大学第一附属医院 泌尿外科, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 探讨葫芦素 B 通过调控 HERG1 对膀胱癌细胞增殖、迁移侵袭和放射敏感性的影响。**方法** 葫芦素 B (0.1、1、10 μmol/L) 处理膀胱癌细胞 48 h; 将 si-NC、si-HERG1、pcDNA、pcDNA-HERG1 转染至 T24 细胞; 经 pcDNA、pcDNA-HERG1 转染后, 分别加入 10 μg/mL 葫芦素 B 培养 48 h。MMT 法检测各组细胞增殖情况; Transwell 评估细胞的迁移和侵袭变化; 细胞克隆形成实验测定细胞放射敏感性; RT-PCR 检测 T24 细胞 *HERG1* mRNA 表达; Western blot 法检测蛋白表达。**结果** 葫芦素 B 抑制 T24 细胞增殖、迁移、侵袭, *HERG1* mRNA 及蛋白表达, 呈浓度依赖型 ($P<0.05$); 增强 T24 细胞的放射敏感性。抑制 HERG1 表达可抑制 T24 细胞的增殖、迁移和侵袭, 增强其放射敏感性 ($P<0.05$)。过表达 HERG1 逆转了葫芦素 B 抑制 T24 细胞增殖、迁移和侵袭和放疗增敏的作用。**结论** 葫芦素 B 能抑制膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭能力, 并且增强细胞的放射敏感性, 机制可能与调控 *HERG1* 基因有关。

关键词: 葫芦素 B; HERG1; 膀胱癌; 放射敏感性; 增殖; 迁移侵袭

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)06-1449-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.010

收稿日期: 2019-09-26
作者简介: 董建设 (1979—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中西医结合泌尿外科男科。Tel: 13838055805, E-mail: sygm163@163.com

Effects of cucurbitacin B on the proliferation, migration, invasion and radiosensitivity of bladder cancer cells via HERG1 regulation

DONG Jian-she¹, LI Hao¹, ZHAO Jun-feng¹, CHEN Rui-ting¹, ZHANG Lin-chao¹, JIA Zhan-kui²

(1. Department of Urology Surgery, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2. Department of Urology Surgery, The First Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of cucurbitacin B (Cu B) on proliferation, migration, invasion and radiosensitivity of bladder cancer cells (BCCs) and its potential mechanism. **METHODS** Having been treated with Cu B (0.1, 1, 10 μmol/L) for 48 h, T24 cells were transfected with si-NC, or si-HERG1, or pcDNA, or pcDNA-HERG1 respectively. In addition, the pcDNA and pcDNA-HERG1 groups underwent 48 h 10 g/mL Cu B treatment. Determinations of cell proliferation by MMT method, cell migration and invasion changes by Transwell, cell radiosensitivity by cell clone formation experiment, and BCCs *HERG1* mRNA expression by RT-PCR were performed. **RESULTS** Cu B concentration-dependently inhibited T24 cells proliferation, migration and invasion, and the expressions of *HERG1* mRNA and protein ($P<0.05$). It enhanced the radiosensitivity of T24 cells as well. *HERG1* expression inhibition induced inhibition of proliferation, migration and invasion of T24 cells and enhancement in their radiosensitivity ($P<0.05$). *HERG1* overexpression reversed Cu B's effect in inhibiting the proliferation, migration and invasion of T24 cells and improving radiosensitization. **CONCLUSION** Cu B can inhibit the proliferation, migration and invasion of BCCs and enhance their radiosensitivity, and the mechanism may be related to its effect on *HERG1* gene regulation.

KEY WORDS: cucurbitacin B (Cu B); *HERG1*; bladder cancer; radiosensitivity; proliferation; migration and invasion

膀胱癌是泌尿系统常见的恶性肿瘤之一，其治疗策略包括手术、放疗、化疗等，但因其浸润性难根除、放化疗不敏感而导致疗效差、易复发^[1]。增强膀胱癌细胞的放化疗敏感性是提高治疗效果的重要途径之一，研究^[2]发现放疗配合中医药可以提高肿瘤患者生存质量和机体免疫功能、提高对放疗的敏感性及预防肿瘤转移与复发。葫芦素属于葫芦烷型四环三萜类化合物，分离自葫芦科植物，对多种肿瘤具有抑制作用，此类药物还能提高放疗的敏感性，而葫芦素 B 是葫芦素类化合物的一种^[3]。研究发现葫芦素 B 可抑制卵巢癌^[4]、胃癌^[5]、肺癌^[6]、前列腺癌^[7]、结肠癌^[8]等肿瘤细胞的增殖，促进细胞凋亡。葫芦素 B 能够逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/Dox 细胞耐药性^[9]；且能逆转顺铂对胃癌细胞耐药作用^[10]；而葫芦素 B 对膀胱癌增殖、迁移侵袭和放射敏感性的影响还未见报道。人类 *eag* 相关基因 (human ether-a-go-go-related gene, *HERG1*) 是钾离子通道家族成员之一，过表达 *HERG1* 可以增强胰腺癌细胞的放射敏感性^[11]。*HERG1* 对膀胱癌的放射敏感性的作用尚未清楚。

基于以上研究，本实验旨在研究葫芦素 B 和 *HERG1* 对膀胱癌细胞增殖、迁移侵袭和放射敏感性的影响及它们之间的关系。

1 材料

1.1 细胞 膀胱癌细胞 T24 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物与试剂 葫芦素 B (批号 A0649, 四川成都曼斯特生物有限公司); 胎牛血清 (批号 871301)、DMEM 培养 (批号 8112066) 均购自美国 Gibco 公司; RNA 提取试剂盒 (批号 15596026, 美国 Invitrogen 公司); 反转录试剂盒 (批号 RR037 A, 日本 Takara 公司); AceQ qPCR SYBR® Green Mix (货号 Q121-02, 南京诺唯赞生物科技有限公司); Lipofectamine™ 2000 转染试剂盒 (批号 11668-019, 美国 Invitrogen 公司); MTT (批号 9710, 美国 Sigma 公司); 蛋白提取试剂盒 (批号 BC3640, 北京索莱宝科技有限公司); BCA 试剂盒 (批号 0226160511, 上海碧云天生物技术有限公司); Transwell 小室、Matrigel 胶 (批号 353096, 美国 BD 公司); 兔抗人 Cyclin D1

抗体（货号 santa sc-753，广州沛瑜生物制品有限公司）；兔抗人 MMP-2 抗体（货号 santa sc-10736，广州沛瑜生物制品有限公司）；兔抗人 p21 抗体（货号 22780002，上海煊翎生物科技有限公司）；兔抗人 MMP-9 抗体（货号 PAB0982，上海煊翎生物科技有限公司）；兔抗人 HERG1 抗体（货号 sc-1596，美国 Santa Cruz 公司）；兔抗人 GAPDH 抗体（货号 XFC1665，上海信帆生物科技有限公司）；山羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶（HRP，货号 GB23303，塞维尔生物技术有限公司）。

1.3 仪器 PCR 扩增仪（型号 5331，德国 Eppendorf 公司）；酶标仪（型号 MODEL680，美国 Bio-Rad 公司）；倒置显微镜（型号 CKX31-A11PHP，日本 Olympus 公司）；Co60 医疗照射装置（型号 FC-50，中国核动力研究院）。

2 方法

2.1 细胞培养 T24 细胞培养于 DMEM 培养基，其中包含 10% FBS，在 37℃，5% CO₂ 恒温箱常规培养。每 2 ~ 3 天传代 1 次。

2.2 葫芦素 B 储存液制备 称取 20 mg 葫芦素 B，加入 DMSO 溶液 4 mL，配成质量浓度为 5 mg/mL，搅拌均匀后，抽滤无菌培养，-20℃避光保存，使用时按所需浓度按比例稀释。

2.3 细胞转染 取常规培养的 T24 细胞于 6 孔板中，细胞融合至 80% 的生长状态时，用无血清培养基培养 12 h，以同步化细胞。将 si-NC、si-HERG1、pcDNA 和 pcDNA-HERG1 质粒分别转染至 T24 细胞中，分为 si-NC 组、si-HERG1 组、pcDNA 组、pcDNA-HERG1 组，转染通过 Lipofectamine™ 2000 试剂盒，依照说明书的步骤进行操作。经 pcDNA、pcDNA-HERG1 转染后，分别加入 10 μmol/mL 葫芦素 B 培养 48 h，即葫芦素 B+pcDNA 组、葫芦素 B+pcDNA-HERG1 组。

2.4 MTT 法测定细胞增殖 参考谭立君^[4]实验研究方法，取对数生长期 T24 细胞接种于 96 孔板（1×10⁴/孔）培养，DMEM 培养液培养 24 h，加入葫芦素 B（0.1、1、10 μmol/L）培养 48 h；阳性对照药组加入 100 nmol/L 紫杉醇处理 T24 细胞 48 h。每孔加入 20 μL MTT（5 g/L）试剂，孵育 4 h，加入 150 μL DMSO，震荡混匀，在酶标仪测定各孔 450 nm 波长处 OD。每组设 3 个复孔取均值，将对照组细胞抑制率设定为 0。其余各组细胞抑制率=[1-（OD_{实验组}/OD_{对照组}）]×100%。

2.5 RT-PCR 检测 HERG1 mRNA 表达 按照 Trizol 说明书提取 T24 细胞总 RNA，反转录试剂盒逆转录成 cDNA，AceQ qPCR SYBR® Green Mix 试剂盒用于 RT-PCR 扩增。反应程序为 95℃、30 s，60℃、30 s；72℃、30 s，共 40 个循环；60℃延长 5 min。采用 2^{-ΔΔct} 法计算 HERG1 mRNA 相对表达量。HERG1 正向 5'-GTCGACGGACTCGCTTTCT-CAGGT-3'，反向 5'-GCGGCCGCACTGCCCCGGT-3'；β-actin 正向 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'，反向 5'-GCTGTACCTTCACCGTTCC-3'。

2.6 Western blot 检测增殖、迁移侵袭相关蛋白表达 提取各组 T24 细胞蛋白，BCA 蛋白定量试剂盒定量测定。蛋白上样量为 60 μg，SDS-PAGE 分离，采用电转将其转到 PVDF 膜。在 5% 脱脂牛奶封闭液中封闭 1.5 h，加入一抗（Cyclin D1、MMP-2、p21、MMP-9、HERG1、GAPDH），于 4℃条件下孵育过夜；再加入山羊抗兔 IgG-HRP 二抗，在室温条件下孵育 2 h，暗室中显影，定影。采用 Quantity One 软件分析处理蛋白条带的吸光度，将蛋白表达水平表示为目的条带与 GAPDH 条带的比值。

2.7 Transwell 检测细胞迁移、侵袭 用无血清培养基重悬各组 T24 细胞，制成 2×10⁴/mL 细胞悬液。迁移测定实验，Transwell 小室上室接种细胞悬液 200 μL，下室接种含血清培养基 600 μL，37℃孵育 24 h。之后用无菌棉签去除上层 T24 细胞，PBS 充分清洗，依次在 4% 多聚甲醛与 0.1% 结晶紫中固定 30 min、染色 10 min，显微镜随机捕获 5 个视野进行拍照，计算结晶紫其中染色的细胞数目即为迁移细胞数。侵袭测定实验以 1：5 比例加入 RPMI 1640 培养液稀释 Matrigel 后，涂覆 Transwell 上室，干燥后根据上述细胞迁移实验的步骤进行后续操作，统计侵袭细胞数。

2.8 细胞克隆形成实验测定细胞放射敏感性 取各组细胞分别给予 0、2、4、6、8 Gy Co60 医疗装置照射。按照剂量大小分别以 0.3×10³、1×10³、1×10³、3×10³、3×10³ 个细胞接种于 60 mm 培养皿中，孵育 10~14 d。依次使用甲醇和吉姆萨进行固定 15 min，染色 30 min，通过低倍光学显微镜记录多于 50 个细胞的集落。克隆形成率（planting efficiency，PE）=（克隆数/接种细胞数）×100%，存活分数（survial fraction，SF）=照射剂量组的集落数/（该组细胞接种数×未照射组 PE）。采用单击多靶模型拟合细胞存活曲线，

$SF=1-(1-e^{-D/D_0})N$, $D_q=D_0\times\ln N$ 。其中 D 为照射剂量 (Gy), D_0 为平均致死剂量, D_q 为准阈剂量 (代表存活的宽肩度), N 为外推值。放射增敏比 (sensitization enhancement ratio, SER) = 单纯照射组 D_0 /加药联合照射组 D_0 。

2.9 统计学分析 采用 GraphPad Prism5 拟合细胞存活曲线。采用 SPSS 20.00 软件进行分析。计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 以 $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

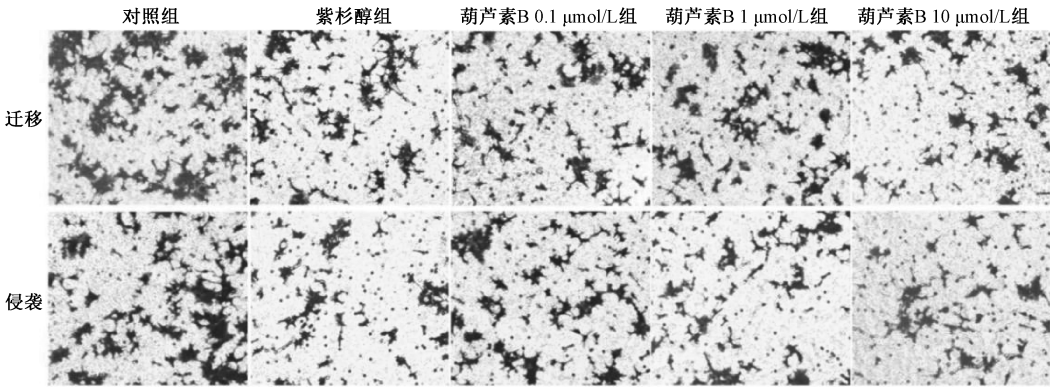


图 1 葫芦素 B 对 T24 细胞迁移侵袭的影响
Fig. 1 Effects of Cu B on T24 cells migration and invasion

表 1 葫芦素 B 对 T24 细胞增殖和迁移侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Tab. 1 Effects of Cu B on T24 cells proliferation, migration and invasion ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	增殖抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
对照组	0	112.49±11.37	98.76±9.43
紫杉醇组	45.32±4.31 *	48.49±5.13 *	39.64±3.42 *
葫芦素 B 0.1 μmol/L 组	6.47±0.82 *	89.33±8.42 *	76.58±7.11 *
葫芦素 B 1 μmol/L 组	21.49±2.18 *#	68.54±7.37 *#	61.75±6.27 *#
葫芦素 B 10 μmol/L 组	41.69±4.11 *##	52.41±5.36 *##	43.72±4.58 *##

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与葫芦素 B 0.1 μmol/L 组比较, # $P<0.05$;与葫芦素 B 1 μmol/L 组比较, Δ $P<0.05$ 。

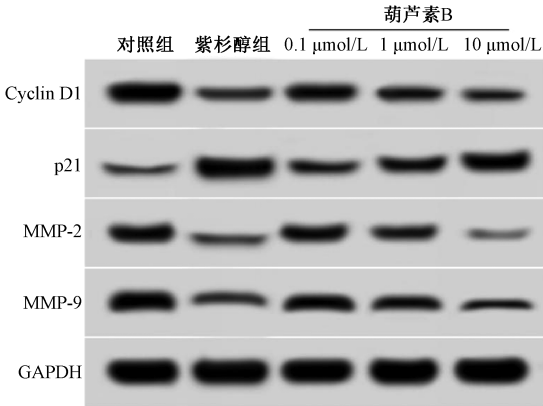


图 2 Western blot 检测增殖、迁移侵袭相关蛋白表达
Fig. 2 Expression of proliferation, migration and invasion-associated proteins determined by Western blot

3.2 葫芦素 B 对 T24 细胞放射敏感性的影响 细胞克隆形成实验后, 通过单击多靶模型拟合计算得

3 结果

3.1 葫芦素 B 对 T24 细胞增殖、迁移、侵袭的影响 葫芦素 B (0.1、1、10 μmol/L) 及紫杉醇抑制 T24 细胞增殖、迁移、侵袭, 呈浓度依赖型 ($P<0.05$), 见图 1、表 1。Western blot 结果显示 (图 2、表 2), 与对照组比较, 葫芦素 B (0.1、1、10 μmol/L) 及紫杉醇抑制 T24 细胞 Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达, 促进 p21 蛋白表达 ($P<0.05$)。

出 (表 3), 在膀胱癌细胞中对对照组、葫芦素 B (0.1、1、10 μmol/L) 组 D_0 值分别是 2.855、1.939、1.619、1.288, 0.1、1、10 μmol/L 葫芦素 B 放射增敏比 (SER) 分别是 1.472、1.764、2.216。细胞存活拟合曲线 (图 3) 显示, 在同一剂量照射下, 葫芦素 B 联合照射组存活率明显小于单纯照射对照组, 细胞的存活曲线明显下移; 且随着照射剂量和葫芦素 B 浓度的增加, 曲线下移的趋势呈现直线型。可见, 葫芦素 B 对 T24 细胞具有辐射增敏作用。

3.3 葫芦素 B 对膀胱癌细胞中 HERG1 表达影响 如图 4、表 4 所示, 与对照组比较, 葫芦素 B 组 HERG1 mRNA 及蛋白表达降低, 且呈浓度依赖性 ($P<0.05$)。葫芦素 B 抑制膀胱癌细胞中 HERG1 表达。

表 2 葫芦素 B 对 T24 细胞增殖、迁移侵袭相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab. 2 Effects of Cu B on the expression of T24 cells proliferation, migration and invasion-associated proteins($\bar{x}\pm s, n=12$)

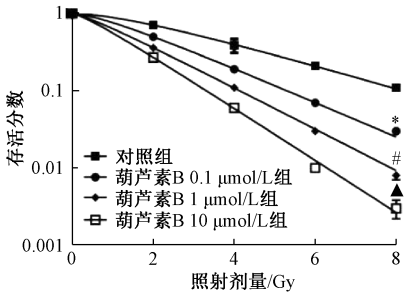
组别	Cyclin D1	p21	MMP-2	MMP-9
对照组	0.75±0.07	0.25±0.03	0.66±0.06	0.71±0.07
紫杉醇组	0.31±0.03 *	0.69±0.06 *	0.21±0.02 *	0.24±0.03 *
葫芦素 B 0.1 μmol/L 组	0.62±0.06 *	0.39±0.04 *	0.51±0.05 *	0.58±0.05 *
葫芦素 B 1 μmol/L 组	0.53±0.05 *#	0.51±0.06 *#	0.37±0.04 *#	0.41±0.03 *#
葫芦素 B 10 μmol/L 组	0.34±0.03 *#▲	0.66±0.06 *#▲	0.22±0.03 *#▲	0.27±0.02 *#▲

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与葫芦素 B 0.1 μmol/L 组比较,# $P<0.05$;与葫芦素 B 1 μmol/L 组比较,▲ $P<0.05$ 。

表 3 单击多靶模型参数

Tab. 3 Click on multi-target model parameters

组别	D ₀ /Gy	D _q /Gy	N	SF ₂	k	SER
对照组	2.855	1.659	1.788	0.707	0.350	—
葫芦素 B 0.1 μmol/L 组	1.939	0.875	1.570	0.499	0.516	1.472
葫芦素 B 1 μmol/L 组	1.619	0.426	1.301	0.360	0.618	1.764
葫芦素 B 10 μmol/L 组	1.288	0.361	1.323	0.270	0.776	2.216



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与葫芦素 B 0.1 μmol/L 组比较,# $P<0.05$;与葫芦素 B 1 μmol/L 组比较,▲ $P<0.05$ 。

图 3 不同剂量照射后 T24 细胞的存活曲线
Fig. 3 Survival curve for T24 cells exposed to different doses of irradiation

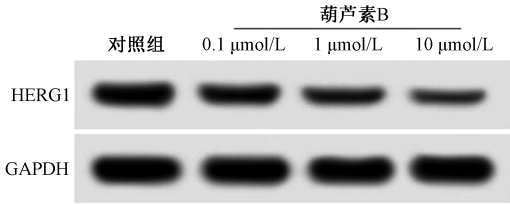


图 4 Western blot 检测 HERG1 蛋白表达
Fig. 4 Determination of HERG1 protein expression by Western blot

表 4 葫芦素 B 对 T24 细胞中 HERG1 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab. 4 Effects of Cu B on T24 cells HERG1 expression ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	HERG1	HERG1
对照组	1.02±0.09	0.82±0.08
葫芦素 B 0.1 μmol/L 组	0.81±0.08 *	0.61±0.06 *
葫芦素 B 1 μmol/L 组	0.59±0.05 *#	0.42±0.04 *#
葫芦素 B 10 μmol/L 组	0.33±0.03 *#▲	0.28±0.03 *#▲

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与葫芦素 B 0.1 μmol/L 组比较,# $P<0.05$;与葫芦素 B 1 μmol/L 组比较,▲ $P<0.05$ 。

3.4 抑制 HERG1 表达对 T24 细胞增殖和迁移侵袭的影响 与 si-NC 组比较, si-HERG1 组 T24 细胞抑制率增加, 迁移、侵袭细胞数减少, HERG1、Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低, p21 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 见图 5~6、表 5~6。

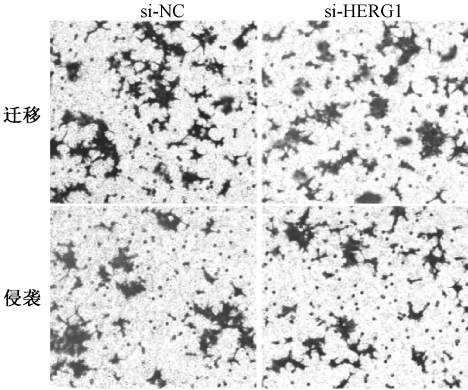


图 5 抑制 HERG1 表达对 T24 细胞迁移侵袭的影响
Fig. 5 Effects of inhibited HERG1 expression on T24 cells migration and invasion

表 5 抑制 HERG1 表达对 T24 细胞增殖和迁移侵袭的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 5 Effects of inhibited HERG1 expression on T24 cells proliferation and migration ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
si-NC	5.14±0.56	102.97±9.54	91.47±9.32
si-HERG1	38.49±3.57 *	56.89±5.37 *	47.25±4.38 *

注:与 si-NC 组比较,* $P<0.05$ 。

3.5 抑制 HERG1 表达对 T24 细胞放射敏感性的影响 细胞克隆形成实验后, 通过单击多靶模型拟合计算得出 (表 7), 在 T24 细胞中 si-NC 组和 si-HERG1 组的 D₀ 值分别是 2.669、1.456,

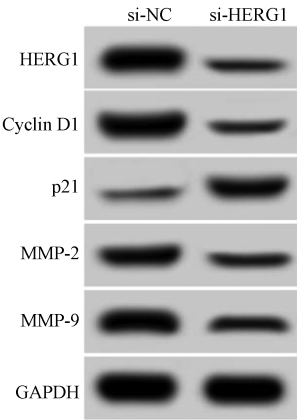


图 6 Western blot 检测 HERG1 和增殖、迁移侵袭相关蛋白表达

Fig. 6 Expression of HERG1 and proliferation, migration and invasion-associated proteins determined by Western blot

表 6 抑制 HERG1 表达对 T24 细胞增殖、迁移侵袭相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 6 Effects of inhibited HERG1 expression on expression of T24 cells proliferation, migration and invasion-related proteins ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

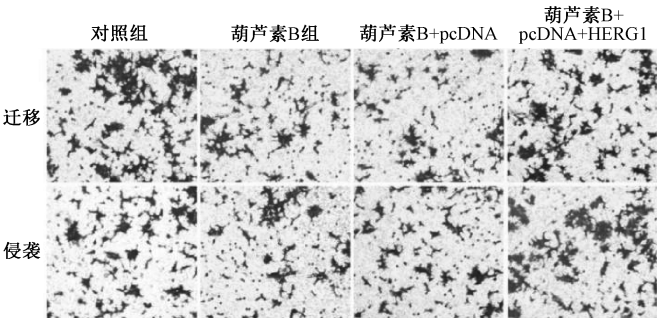
组别	HERG1	Cyclin D1	p21	MMP-2	MMP-9
si-NC	0.79±0.07	0.72±0.07	0.23±0.03	0.68±0.06	0.73±0.07
si-HERG1	0.31±0.03	0.36±0.04*	0.59±0.05*	0.32±0.03*	0.36±0.04*

注:与 si-NC 组比较, * $P<0.05$ 。

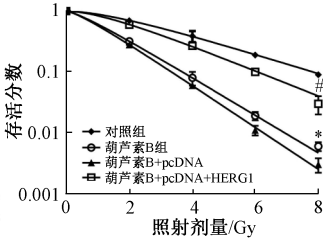
表 7 单击多靶模型参数

Tab. 7 Click on multi-target model parameters

组别	D_0/Gy	D_q/Gy	N	SF_2	k	SER
si-NC	2.669	1.635	1.845	0.693	0.375	-
si-HERG1	1.456	0.463	1.374	0.330	0.687	1.833



A. T24细胞迁移、侵袭情况



B. 存活曲线

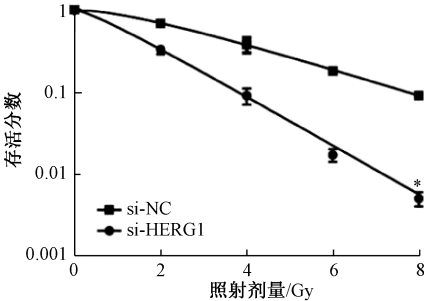
注:与对照组比较, * $P<0.05$; 与葫芦素 B+pcDNA 组比较, # $P<0.05$ 。

图 8 HERG1 过表达逆转了葫芦素 B 对 T24 细胞迁移侵袭和放射敏感性的作用

Fig. 8 HERG1 overexpression reverses the effect of Cu B on T24 cells migration, invasion and radiosensitivity

细胞克隆形成实验后, 通过单击多靶模型拟合计算得出 (表 10), 在膀胱癌细胞中对照组、葫芦素 B 组、葫芦素 B+pcDNA 组和葫芦素 B+pcDNA-

si-HERG1 组的放射增敏比 (SER) 是 1.833。细胞的存活拟合曲线 (图 7) 显示, 在同一剂量照射下, si-HERG1 联合照射组的存活率明显小于单纯照射 si-NC 组, 细胞的存活曲线明显下移; 且随着照射剂量的增加, 曲线下移的趋势呈现直线型。抑制 HERG1 表达对膀胱癌细胞具有辐射增敏作用。



注:与 si-NC 组比较, * $P<0.05$ 。

图 7 不同剂量照射后 T24 细胞的存活曲线

Fig. 7 Survival curve for T24 cells exposed to different doses of irradiation

3.6 HERG1 过表达逆转了葫芦素 B 对 T24 细胞增殖、迁移侵袭和放射敏感性的作用 与葫芦素 B+pcDNA 组, 葫芦素 B+pcDNA-HERG1 组膀胱癌细胞抑制率降低, 迁移、侵袭数量升高, HERG1、Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达升高, p21 蛋白表达降低 ($P<0.05$), 见图 8~9、表 8~9。

HERG1 组的 D_0 值分别是 2.690、1.409、1.260、2.072, 葫芦素 B 组、葫芦素 B+pcDNA-HERG1 组的放射增敏比 (SER) 分别是 1.909、0.608。细

表 8 HERG1 过表达逆转了葫芦素 B 对 T24 细胞增殖、迁移侵袭的作用 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab. 8 HERG1 overexpression reverses the effect of Cu B on T24 cells proliferation, migration and invasion($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	抑制率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
对照组	0	108.46±10.32	92.43±8.39
葫芦素 B 组	41.59±4.21 *	51.69±5.36 *	41.37±4.52 *
葫芦素 B+pcDNA	43.67±4.05	47.98±5.17	38.69±4.11
葫芦素 B+pcDNA-HERG1	15.98±1.64 [#]	82.64±7.22 [#]	71.35±7.24 [#]

注:与对照组比较,**P*<0.05;与葫芦素 B+pcDNA 组比较,[#]*P*<0.05。

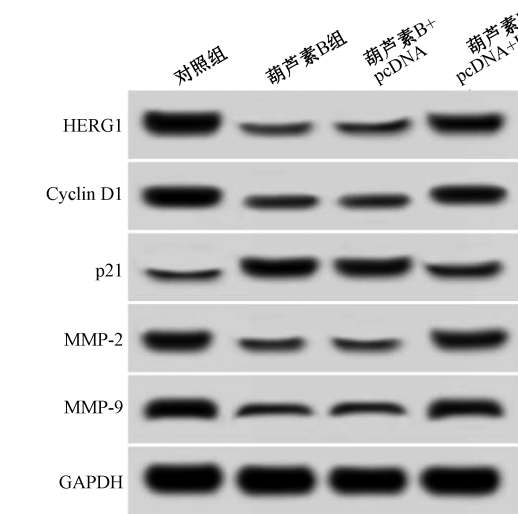


图 9 Western blot 检测 HERG1 和增殖、迁移侵袭相关蛋白的表达

Fig. 9 Expression of HERG1 and proliferation, migration and invasion-associated proteins determined by Western blot

表 9 HERG1 过表达逆转了葫芦素 B 对 T24 细胞增殖、迁移侵袭相关蛋白表达的作用 ($\bar{x}\pm s, n=12$)

Tab. 9 HERG1 overexpression reverses the effect of Cu B on expression of T24 cells proliferation, migration and invasion-related proteins ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	HERG1	Cyclin D1	p21	MMP-2	MMP-9
对照组	0.83±0.08	0.74±0.07	0.23±0.02	0.67±0.06	0.73±0.07
葫芦素 B 组	0.27±0.03 *	0.33±0.03 *	0.63±0.06 *	0.24±0.03 *	0.28±0.03 *
葫芦素 B+pcDNA	0.25±0.02	0.30±0.03	0.65±0.05	0.21±0.03	0.25±0.03
葫芦素 B+pcDNA-HERG1	0.71±0.07 [#]	0.62±0.06 [#]	0.39±0.04 [#]	0.52±0.05 [#]	0.58±0.05 [#]

注:与对照组比较,**P*<0.05;与葫芦素 B+pcDNA 组比较,[#]*P*<0.05。

表 10 单击多靶模型参数

Tab. 10 Click multi-target model parameters

组别	D ₀ /Gy	D _q /Gy	N	SF ₂	k	SER
对照组	2.690	1.704	1.884	0.703	0.372	—
葫芦素 B 组	1.409	0.466	1.392	0.320	0.710	1.909
葫芦素 B+pcDNA	1.260	0.456	1.436	0.280	0.794	—
葫芦素 B+pcDNA-HERG1	2.072	1.361	1.929	0.603	0.483	0.608

人卵巢癌紫杉醇耐药细胞 A2780/Taxol 的凋亡^[16]。本实验通过用不同浓度葫芦素 B 处理膀胱癌细胞,检测葫芦素 B 对膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响,结果显示,紫杉醇和不同浓度葫芦素 B 处理的膀胱癌细胞,细胞增殖抑制率显著升高,细胞

胞的存活拟合曲线(图 8B)显示,在同一剂量照射下,葫芦素 B 联合照射组的存活率明显小于单纯照射对照组,细胞的存活曲线明显下移;而葫芦素 B+pcDNA-HERG1 照射组的存活率大于葫芦素 B+pcDNA 照射组。HERG1 过表达逆转了葫芦素 B 对膀胱癌细胞增殖、迁移和侵袭的抑制及放射增敏的作用。

4 讨论

膀胱癌是威胁人类健康的恶性肿瘤之一,其术后复发率和病死率高,严重影响患者的生活质量^[12]。葫芦素 B 是从中草药中提取的一种化合物,具有抗肿瘤活性作用^[13]。葫芦素 B 通过调节 sestrin-3 可抑制肺癌细胞增殖,诱导细胞凋亡^[14]。葫芦素 B 能明显抑制食管鳞癌 EC109 细胞的增殖和迁移,与射线联合使用时能诱导细胞凋亡,引起 G2/M 期细胞阻滞,且随药物浓度增加放射敏感性增强,具有放射增敏效应^[15]。葫芦素 B 还可诱导

迁移和侵袭数量显著降低,且 Cyclin D1、MMP-2 和 MMP-9 表达显著降低,p21 表达显著升高。说明紫杉醇和葫芦素 B 均能抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭,且葫芦素 B 对膀胱癌的抑制作用呈浓度依赖性。而且本研究结果还发现,随着照射剂

量和葫芦素 B 浓度的增加, 细胞存活曲线下移, 放射增敏比升高。说明葫芦素 B 对膀胱癌细胞具有放射增敏作用, 增强了膀胱癌 T24 细胞的放射敏感性。

有研究发现 HERG1 在大肠癌中高表达, 可作为其诊断和治疗的生物学标志物和治疗靶点^[17]。HERG1 在口腔鳞状细胞癌和乳腺癌的上调表达, 与其预后相关^[18-19]。HERG1 在结肠癌中高表达, 敲低可以抑制细胞增殖, 与利鲁唑可降低结直肠癌细胞顺铂耐药的能力^[20]。本研究发现, 抑制 HERG1 表达, 细胞增殖抑制率显著升高, 细胞迁移和侵袭数量显著降低, 且 Cyclin D1、MMP-2、MMP-9 表达显著降低, p21 表达显著升高。说明抑制 HERG1 表达可抑制膀胱癌细胞的增殖、迁移和侵袭。本实验还发现抑制 HERG1 表达可增强膀胱癌细胞的放射敏感性。HERG 与葫芦素 B 的相互影响还未见相关报道, 本实验结果显示在葫芦素 B 处理的膀胱癌细胞中 HERG1 低表达; 过表达 HERG1 逆转了葫芦素 B 对膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移和侵袭抑制和放疗增敏的作用。提示葫芦素 B 可能通过调控 HERG1 的表达影响膀胱癌细胞的增殖、迁移、侵袭和放射敏感性。

综上所述, 葫芦素 B 具有抑制膀胱癌 T24 细胞增殖、迁移和侵袭的作用, 还可提高细胞的放射敏感性, 并且其作用机制可能与调控 HERG1 的表达有关, 将可为膀胱癌的预防和治疗提供新思路。

参考文献:

[1] 李 波. 晚期膀胱癌的临床治疗进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2017, 37(4): 614-616.

[2] 黄 伟, 钱 梦, 谢 鸣. 肿瘤放射治疗配合中药增效减毒的临床研究进展[J]. 中国药师, 2017, 20(8): 1374-1381.

[3] 王文雪, 牟艳玲, 姚庆强. 葫芦素类化合物的抑瘤作用及其作用机制和联合用药研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2712-2717.

[4] 谭立君, 张大昕, 闫志钧, 等. 葫芦素 B 对卵巢癌细胞 SKOV3 的生长抑制作用[J]. 肿瘤学杂志, 2017, 23(7): 598-601.

[5] 张 萌, 边志刚, 何 平. 葫芦素 B 对人胃癌 BGC-823 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(5): 548-552.

[6] 张 萌, 边志刚, 何 平. 葫芦素 B 通过激活线粒体途径诱导人肺癌 NCI-H460 细胞凋亡[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(3): 265-269.

[7] 张 萌, 边志刚, 张 毅, 等. 葫芦素 B 诱导 G2/M 期阻滞抑制人前列腺癌 DU145 细胞增殖并诱导细胞凋亡研究[J]. 中国医刊, 2016, 51(2): 63-67.

[8] 张国建, 阎庆辉, 黄 琛, 等. 葫芦素 B 对人结肠癌细胞株 LS174-T 的生长抑制作用[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(12): 2751-2753.

[9] 蔡 芬, 段 超, 黄秋月, 等. 葫芦素 B 逆转人乳腺癌细胞 MCF-7/Dox 多柔比星耐药的作用及机制研究[J]. 湖北医药学院学报, 2017, 36(1): 28-35; 104.

[10] 季娟丽, 张云飞, 司 渊, 等. 葫芦素 B 抑制人顺铂耐药胃癌细胞的作用及机制研究[J]. 湖北医药学院学报, 2017, 36(5): 386-390.

[11] 倪 猛, 杨 峥, 王红建, 等. miR-96 通过靶向 HERG1 对胰腺癌细胞系 PANC-1 放疗敏感性的影响[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2017, 26(6): 693-695.

[12] 刘春萍, 曾 星. 免疫疗法抗膀胱癌的研究进展[J]. 医学研究杂志, 2017, 46(12): 11-14.

[13] Zhou J, Zhao T, Ma L, *et al.* Cucurbitacin B and SCH772984 exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activities by suppressing EGFR, PI3K/Akt/mTOR, STAT3 and ERK signaling[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(61): 103167-103181.

[14] Khan N, Jajeh F, Khan M I, *et al.* Sestrin-3 modulation is essential for therapeutic efficacy of cucurbitacin B in lung cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(2): 184-195.

[15] 潘丁龙. 葫芦素 B 对食管鳞癌细胞放射敏感性影响的相关研究[D]. 福州: 福建医科大学, 2015.

[16] 曲迎春. 葫芦素 B 对卵巢癌紫杉醇耐药细胞凋亡诱导作用及其机制研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2015.

[17] 赖洁莹, 郝丽萍, 宋思宇. HERG1 基因在大肠癌表达的敏感性与特异性[J]. 吉林医学, 2016, 37(4): 827-829.

[18] Fernández-Valle Á, Rodrigo J P, Rodriguez-Santamarta T, *et al.* HERG1 potassium channel expression in potentially malignant disorders of the oral mucosa and prognostic relevance in oral squamous cell carcinoma[J]. *Head Neck*, 2016, 38(11): 1672-1678.

[19] Iorio J, Meattini I, Bianchi S, *et al.* hERG1 channel expression associates with molecular subtypes and prognosis in breast cancer[J]. *Cancer Cell Int*, 2018, 18: 93.

[20] Fortunato A. The role of hERG1 ion channels in epithelial-mesenchymal transition and the capacity of riluzole to reduce cisplatin resistance in colorectal cancer cells[J]. *Cell Oncol*, 2017, 40(4): 367-378.