

• 实验研究 •

曲古抑菌素 A 膀胱灌注对大鼠膀胱癌
生长的抑制作用李功成¹ 潘铁军¹ 田雨冬² 叶章群³

【摘要】 目的:探讨曲古抑菌素 A(TSA)膀胱灌注对大鼠膀胱肿瘤生长的抑制作用和机制。方法:将 42 只雌性 Wistar 大鼠,随机分为对照组和 TSA 组,制作 MNU 诱导大鼠原位膀胱癌模型,在第 10 周分别行生理盐水和 TSA 连续膀胱灌注,每周 1 次,共 7 次。分别在灌注的第 12 周和 17 周进行病理观察、测量膀胱总重量、凋亡指数及 western blot 检测。结果:与对照组相比,TSA 组大鼠膀胱肿瘤小且单发较多。TSA 组大鼠膀胱的重量小于对照组($P<0.05$);TSA 组大鼠膀胱肿瘤的凋亡指数大于对照组($P<0.01$),TSA 组大鼠膀胱肿瘤组织 XIAP 的表达较对照组明显降低。结论:TSA 膀胱灌注可抑制大鼠膀胱肿瘤生长,延缓肿瘤进展,其机制与诱导肿瘤细胞凋亡有关,并可能涉及相关基因 XIAP 表达的调控。

【关键词】 膀胱癌;曲古抑菌素 A;大鼠;凋亡

【中图分类号】 R737.14 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1001-1420(2013)02-0148-04

Inhibitory effect of intravesical instillation of trichostatin
A in rats with bladder cancerLI Gongcheng¹ PAN Tiejun¹ TIAN Yudong² YE Zhangqun³

(¹Department of Urology, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan, 430070, China; ²Department of Urology, the People's Hospital of Zhengzhou; ³Department of Urology, Tongji Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology)

Corresponding author: PAN Tiejun, E-mail: mwkptj@yahoo.com.cn

Abstract Objective: To investigate the effect and mechanism of intravesical instillation of trichostatin A in bladder cancer of rats. **Method:** Forty-two female Wistar rats were randomized into control group and trichostatin A group. Orthotopic bladder tumors were established in rats by intravesical administration of N-methyl-nitrosourea. Rats of control and trichostatin A group received a total of seven times (every week) intravesical instillation of physiologic saline and trichostatin A respectively from the tenth week. Rats were executed in the twelfth and seventeenth week and their weights of bladder, pathologic characters, apoptotic indexes were surveyed. The expression of XIAP protein was detected by Western blot. **Result:** Compared with control group, the bladder tumors of trichostatin A group were small and more single. The bladder weights of trichostatin A group were significantly lower than those in control group ($P<0.05$), but the apoptotic indexes of control group were significantly lower than those in trichostatin A group ($P<0.01$). It was showed by Western blot that the XIAP protein level dropped after Intravesical instillation of trichostatin A. **Conclusion:** Intravesical instillation of trichostatin A can inhibit the growth and progression of bladder tumour by inducing apoptosis in rats with bladder cancer, which might be related to the expression of XIAP.

Key words bladder cancer; trichostatin A; rat; apoptosis

膀胱肿瘤中 70%~80% 为浅表性膀胱癌,行膀胱肿瘤电切术后复发率高,3~5 年内复发率为 50%~70%^[1],术后进行灌注治疗是预防复发的关键之一。曲古抑菌素(trichostatin A, TSA)属异羟肟酸类组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,结构由环、脂肪链和异羟肟酸 3 部分组成,是 HDAC 的可逆抑制剂。多项体外试验表明,TSA 通过去乙酰化作用抑制膀胱癌等多种肿瘤细胞株的生长,研究表明 TSA 是通过诱导膀胱癌细胞分化和(或)凋亡,增加 p21 蛋白表达水平,从而抑制细胞内

HDAC 的活性,增加细胞内组蛋白的乙酰化程度^[2,3]。值得注意的是 HDAC 抑制剂的这些作用只针对肿瘤细胞而对正常细胞无效,因此其抗肿瘤作用具有很好的选择性。本文拟通过动物实验研究 TSA 膀胱灌注对大鼠膀胱癌的作用,并初步探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TSA 为美国 Sigma 公司产品,用无水乙醇配置成储存液,用 RPMI 1640 培养基稀释成工作液(最大浓度的 TSA 中无水乙醇含量对组织细胞没有影响);N-甲基亚硝基脲(N-methyl-nitrosourea, MNU)美国 Sigma 公司产品, MNU 用

¹ 广州军区武汉总医院泌尿外科(武汉, 430070)

² 郑州市人民医院泌尿外科

³ 华中科技大学同济医学院附属同济医院泌尿外科

通信作者:潘铁军, E-mail: mwkptj@yahoo.com.cn

pH6.0 的枸橼酸缓冲液为溶剂配成浓度为 20 g/L 的溶液;Annexin V-PI 凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物工程有限公司。XIAP 兔抗鼠单克隆抗体为 SANTA 公司产品, GAPDH 单克隆抗体为 PROMAB 公司产品。

1.2 实验动物及分组

Wistar 大鼠 42 只, 雌性, 9~11 周龄, 体重 180~220 g, 由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。大鼠随机分为对照组和 TSA 组, 每组各 21 只。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠膀胱癌模型制作和用药 对照组和 TSA 组均以 MNU 膀胱灌注诱导大鼠膀胱癌, 每两周灌药 1 次, 每次 2 mg/只, 共 4 次, MNU 总量 8 mg, 第 10 周为诱导的终点^[4]。对照组和 TSA 组大鼠于首次灌注 MNU 后第 10 周分别行生理盐水 0.5 ml、TSA 溶液 0.5 ml 膀胱灌注, 每周 1 次, 共 7 次。

1.3.2 病理观察 在 TSA 灌注后的第 2 周, 每组随机抽取 3 只大鼠, 脱白法处死, 解剖膀胱, 在膀胱颈离断尿道, 紧贴膀胱壁离断双输尿管, 取出膀胱, 去除膀胱外脂肪。在膀胱前壁剖开并记录膀胱内情况后, 制作光镜切片, HE 染色, 病理观察。在灌注后的第 7 周处死其余大鼠, 取膀胱, 滤纸吸净液体, 称膀胱总重量, 在病变明显处取材制作石蜡包埋标本块, 常规制作光镜切片, HE 染色, 病理观察。

1.4 流式细胞术(FCM)检测

肿瘤组织以 PBS 漂洗, 置于培养皿中, 研磨过滤, 用眼科剪反复剪碎组织, 并不断以 PBS 冲洗, 吸取滤过的单细胞悬液置离心管中, 离心力 174 g (1 000 r/min) 离心 5 min, 弃上清, 调整待测细胞浓度为 1×10^6 个/ml, 加 0.5 ml Binding Buffer 重悬细胞, 加入 5 μ l 荧光标记的 Annexin V 试剂, 混匀, 加入 5 μ l 碘化丙啶染液(PI), 混匀, 孵育后上流式细胞仪分析。分别检测生理盐水及 TSA 灌注后第 2、7 周细胞凋亡情况。

1.5 Western blot 分析蛋白表达

组织匀浆处理后, 用预冷的 PBS 洗涤, 加 5 倍体积的组织蛋白裂解液, 离心力 25 110 g (12 000 r/min) 离心 2 min。取上清 10 ml 加等体积的 2 $\times$ 上样缓冲液, 煮沸 10 min, 离心取上清。用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳分离后, 将蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上, 脱脂奶粉封闭, 一抗为 1:500 稀释兔抗鼠 XIAP 单克隆抗体, 室温下于摇床孵育 2 h 并洗涤后, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(1:8 000 稀释), 室温下于摇床孵育 1 h 并洗涤后, 免疫印迹化学发光试剂发光, 显影, 定影, 得到胶片。凝胶图像分析仪分析条带灰度。并以

GAPDH 条带作为参照, 分别检测生理盐水及 TSA 灌注后第 2 周, 7 周 XIAP 蛋白表达情况。

1.6 统计学处理

实验数据用 SPSS 16.0 统计软件分析, 采用单因素方差分析进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般状态观察

大鼠均在膀胱灌注后 2 h 排尿, 诱癌期间两组大鼠食量、营养状况及体重等一般情况无明显差别。实验过程中有 5 例大鼠由于麻醉或感染等原因死亡。

2.2 大鼠膀胱的病理改变

对照组大鼠均出现肿瘤, 大部分肿瘤组织为多发, 光镜下可见癌组织侵入肌层; TSA 组除 1 只黏膜明显充血、1 只不典型增生外, 17 只大鼠发生肿瘤, 但较对照组小且单发较多。

2.3 各组大鼠膀胱的重量

比较对照组(灌注生理盐水)与 TSA 组(灌注 7 周 TSA)的膀胱重量及凋亡率, 可见 TSA 组的大鼠膀胱的重量 (275.0 ± 6.1) mg 小于对照组 (320.0 ± 7.3) mg ($P < 0.05$), 且凋亡率 TSA 膀胱灌注为 (29.03 ± 4.57)%, 显著高于对照组的 (7.01 ± 1.85)% ($P < 0.01$)。

2.4 TSA 诱导细胞凋亡

Annexin V、PI 双标 FCM 检测结果判断: 左上象限 Annexin V、PI 为细胞收集过程中出现的损伤细胞; 左下象限 Annexin V、PI 代表正常细胞; 右上象限 Annexin V、PI 提示为晚期凋亡细胞和坏死细胞; 右下象限 Annexin V、PI 提示为早期凋亡细胞。检测结果显示, TSA 处理组细胞凋亡率与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1)。

2.5 TSA 处理诱导 XIAP 蛋白表达

Western 印迹法检测结果可见, TSA 组大鼠膀胱肿瘤组织 XIAP 的表达较对照组明显降低, 根据其相应 XIAP 蛋白表达条带与 GAPDH 条带的灰度比值与空白对照的灰度比值之比 (以空白对照的灰度比值为 1) 可以看出 TSA 灌注 7 周后 XIAP 蛋白表达明显下降达 1.64 倍(图 2)。

3 讨论

近年来, HDAC (histone deacetylase) 抑制剂的发现为恶性肿瘤提供了新的治疗途径。HDAC 抑制剂是一类新型、有效的抗肿瘤化合物。这类药物通过促进组蛋白乙酰化, 调节染色质结构而影响基因转录。一般认为它们通过诱导那些参与调节细胞活性的基因表达, 行使抗增殖、促进分化、诱导细胞凋亡的作用^[5]。HDAC 抑制剂的相关研究已成为抗肿瘤药物研究中非常活跃的一个领域^[6]。

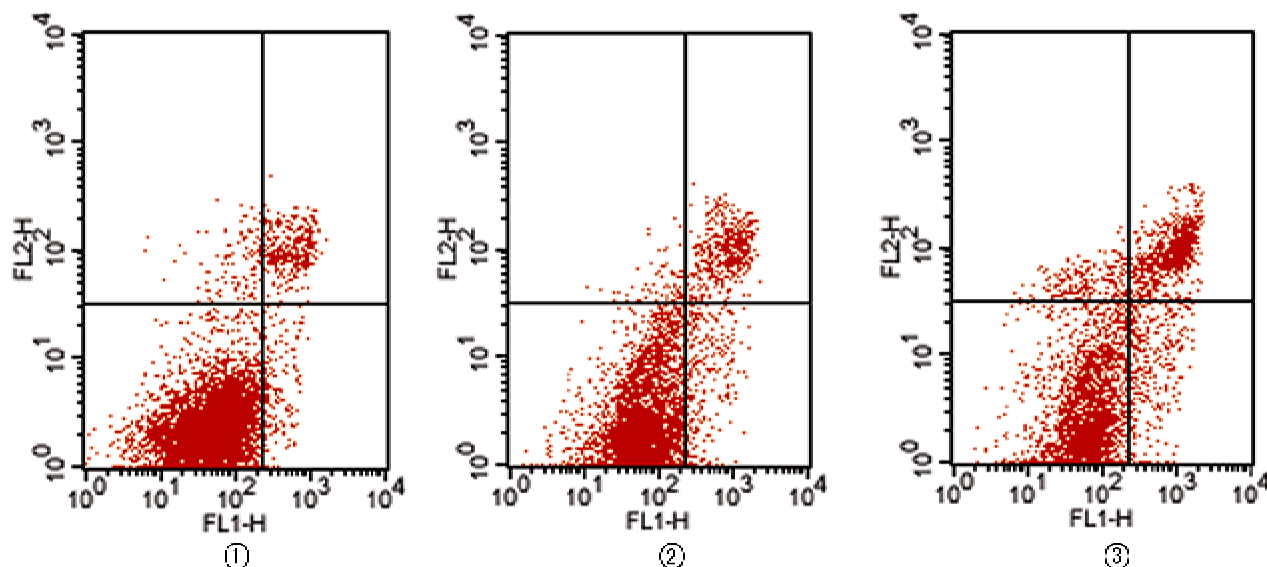
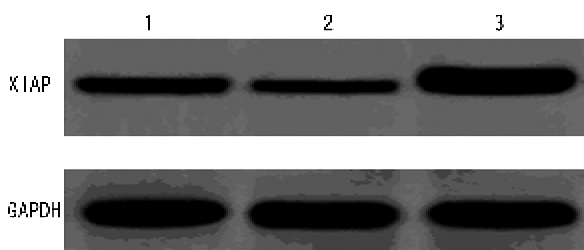


图 1 TSA 膀胱灌注前后凋亡率的变化(①~③分别为对照组、TSA 灌注 2 周组、TSA 灌注 7 周组)



1: TSA 灌注 2 周; 2: TSA 灌注 7 周; 3: 对照组

图 2 TSA 膀胱灌注前后 XIAP 蛋白表达的变化

TSA 属异羟肟酸类 HDAC 抑制剂,对血液系统肿瘤和实质性肿瘤均有较强的抑制作用^[7]。本研究中,对照组的病理学检查结果提示膀胱肿瘤呈浸润性发展。在 TSA 组肿瘤生长明显受到抑制,膀胱总重量低于对照组,肿瘤病理进展也减缓,说明 TSA 可抑制膀胱肿瘤生长,延缓肿瘤进展。

最新证据表明,当某一化疗药物的抗癌作用是通过诱发凋亡实现时,那么这一途径被认为是最佳控制癌症的途径^[8,9]。本研究进一步证实了 TSA 的诱导凋亡作用,FCM 检测结果显示 TSA 组瘤细胞的凋亡指数高于对照组,这可能与 TSA 具有的诱导肿瘤细胞凋亡作用有关。TSA 引起细胞凋亡的机制可能与其诱导凋亡相关因子的表达有关。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)是一类在结构上具有同源性的细胞内源性凋亡抑制蛋白家族。XIAP 是 IAP 家族中最有效力的 caspase 抑制物,其生物学功能多样,对肿瘤发生、发展及预后有多方面的影响。XIAP 的 N 末端有 3 个 BIR 结构域:BIR1、BIR2 和 BIR3。XIAP 的 BIR3 结合 caspase9, BIR2 结合 caspase3 和 7。XIAP 通过 BIR3、BIR2 结合 caspase 后可以抑制

其活性,进而发挥抗凋亡作用^[10]。XIAP 在绝大多数的人类恶性肿瘤细胞均存在高表达^[11]。抑制 XIAP 能促使多种 XIAP 高表达的肿瘤细胞凋亡并促进肿瘤细胞对凋亡诱导药物的敏感性^[12]。本研究中经 western blot 检测发现 TSA 可使 XIAP 蛋白的表达明显降低,提示 TSA 可通过抑制 XIAP 表达,进而活化 caspases 级联反应形成瀑布放大效应使细胞凋亡。

研究表明, TSA 在较低剂量下对膀胱癌即有明显的生长抑制作用,并且可能通过诱导细胞凋亡而发挥抗膀胱癌作用,其作用机制涉及 XIAP 蛋白表达的调控。这些均为进一步揭示 HDAC 抑制剂的抗肿瘤机制提供了可靠的实验依据。

[参考文献]

- 1 Hara I, Miyake H, Takechi Y, et al. Clinical outcome of conservative therapy for stage T₁, grade 3 transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Int J Urol*, 2003, 10: 19-24.
- 2 Li G C, Zhang X, Pan T J, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of p21WAF1 and G1 cell cycle arrest [J]. *Int J Urol*, 2006, 13: 581-586.
- 3 Wetzel M, Premkumar D R, Arnold B, et al. Effect of trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, on glioma proliferation in vitro by inducing cell cycle arrest and apoptosis[J]. *J Neurosurg*, 2005, 103: 549-556.
- 4 Yaman O, Ozdiler E, Sozen S, et al. Transmurally absorbed intravesical Chemotherapy with dimethylsulfoxide in an animal model[J]. *Int J Urol*, 1999, 6: 87-92.
- 5 Hess-stumpp H. Histone deacetylase inhibitors and cancer: from cell biology to the clinic[J]. *Eur J Cell Biol*, 2005, 84: 109-121.

- 6 Richon V M, O'Brien J P. Histone deacetylase inhibitors; a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8: 662—664.
- 7 Minucci S, Pelicci P G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6: 38—51.
- 8 Fishel M L, Newell D R, Griffin R J, et al. Effect of cell cycle inhibition on Cisplatin-induced cytotoxicity [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312: 206—213.
- 9 McKnight J J, Gray S B, OKane H F, et al. Apoptosis and chemotherapy for bladder cancer[J]. J Urol, 2005, 173: 683—690.
- 10 Scott F L, Denault J B, Riedl S J, et al. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites; evolutionarily conserved mechanism of IAPs[J]. EMBO J, 2005, 24: 645—655.
- 11 Tamm I, Kornblau S M, Segall H, et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6: 1796—1803.
- 12 Korga A, Korobowicz E, Dudka J. Role of mitochondrial protein Smac/Diablo in regulation of apoptotic pathways[J]. Pol Merkur Lekarski, 2006, 20: 573—576.

(收稿日期: 2012-07-21)

使用泌尿外科及其相关标准医学名词

医学名词的标准使用对医学论文十分重要,可以起到临床继续教育的作用。医学论文使用的是书面语言,其名词的使用也必须标准化,规范化,不宜使用口语化名词。下面将泌尿外科方面使用不够标准和规范的名词收集整理如下,并将规范化名词予以对照,希望作者参照使用。

宜用	不宜用	宜用	不宜用	宜用	不宜用
直肠阴道隔	直肠阴道膈	前哨淋巴结	信号淋巴结	附睾结核	结核性附睾炎
化学睾丸切除	化学性阉割	性腺发育不全	特纳综合征	皮质醇增多症	库欣综合征
迪特尔危象	游走肾危象	肾素瘤	球旁细胞瘤	肾错构瘤	肾血管平滑肌脂肪瘤
海绵肾	髓质海绵肾	肾积脓	脓肾	原发复合征	原发综合征
脐区	中腹部	精直小管	直细精管	综合征	综合症
直肠阴道隔	直肠阴道膈	腹主动脉	主动脉腹部	变移上皮	移行上皮
血流动力学	血液动力学	血常规	血象	血红蛋白	血色素
肛提肌	提肛肌	苏木精	苏木素	适应证	适应症
肾衰竭	肾功能衰竭	神经元	神经原	肾素瘤	球旁细胞瘤
剖宫产术	剖腹产术	泌尿器	泌尿器官	内镜	内窥镜
原淋巴细胞	淋巴母细胞	尿生殖膈	尿生殖隔	库欣综合征	皮质醇增多综合征
抗结核	抗痨	抗生素	抗菌素	瘢痕	疤痕
精子减少	精子减少症	前列腺增生	前列腺增生症	苏木精-伊红染色	HE 染色
阴茎缺如	先天性阴茎缺如	造口术	造瘘术	隐睾	隐睾症