

和厚朴酚促膀胱癌细胞周期停滞及诱导 细胞凋亡的机制研究

宋剑楠^{1△} 钱峰^{2△} 齐涵^{3△} 张士伟¹ 张古田¹ 郭宏骞¹

[摘要] 目的:研究和厚朴酚对膀胱癌细胞的生长抑制作用。方法:采用人类膀胱癌细胞 BIU87,以和厚朴酚进行细胞毒性实验,设定不同药物浓度,经过 24、48、72 h 药物作用,观察细胞生长和死亡状态;药物作用 24 h,进行流式细胞术检测,观察细胞在不同药物浓度作用下的细胞生长周期变化;细胞经过药物作用 72 h,观察细胞在不同药物浓度作用后克隆细胞团数量;细胞加入荧光标记物,选取不同浓度药物各作用 1 h,采用流式细胞仪检测该药物是否促进细胞产生氧自由基以杀伤肿瘤细胞;提取经不同药物浓度作用后的细胞蛋白质,采用蛋白质印迹法检测细胞凋亡蛋白和信号通路的蛋白表达变化情况。结果:该药物对细胞有明显的生长抑制作用;随着浓度的增高,细胞 G₁ 期和 SubG₁ 期比例逐渐增高,细胞克隆团数量呈递减趋势;细胞在药物作用下有明显的 Caspase3、PARP、CyclinD1、Cdk2、P21、P27、Bax/Bcl-2、Bcl-xL 的趋势性表达,同时和厚朴酚促进细胞产生活性氧自由基,激活细胞内 MAPK 信号通路的转导,导致肿瘤细胞死亡。结论:和厚朴酚对人类膀胱癌细胞 BIU87 具有明显的生长抑制作用,该药可使细胞生长在 G₁ 期停滞并诱导细胞凋亡,并通过产生活性氧自由基,激活 MAPK 信号通路相关蛋白的表达,抑制肿瘤细胞生长。

[关键词] 和厚朴酚;膀胱癌细胞;凋亡

doi: 10.13201/j.issn.1001-1420.2015.07.022

[中图分类号] R737.14 **[文献标识码]** A

Effect of honokiol on human bladder cancer cell by arresting cell cycle and inducing apoptosis

SONG Jiannan¹ QIAN Feng² QI Han³ ZHANG Shiwei¹
ZHANG Gutian¹ GUO Hongqian¹

(¹Department of Urology, Nanjing Drum Tower Hospital, Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, 210008, China; ²Hepatology Hospital of Jilin Province; ³Department of Emergency, Second People's Hospital of Lianyungang)

Corresponding author: GUO Hongqian, E-mail: dr.ghq@163.com

Abstract Objective: To study the growth inhibitory effect of honokiol on human bladder cancer cell line BIU87. **Method:** The experiment used cytotoxicity assays to study the effect of honokiol on BIU87's growth in different drug concentrations, and the time of drug treating was 24 h, 48 h, 72 h respectively. BIU87 was affected for 24 h to study cell growth cycle on the different drug concentrations by flow cytometer. After the cells were affected by different concentrations of honokiol for 72 h, we counted cloned clusters of two cell lines. Cells with fluorescent markers in the different drug concentrations were detected whether honokiol promoted this line to produce oxygen radicals that could kill tumor cells. Extracting the protein of BIU87 affected by different drug concentrations, we studied the cell apoptotic protein and cell signaling pathway. **Result:** Experimental results showed a marked cell growth inhibitory effect of honokiol on human bladder cancer, and the data demonstrated significantly changes of cell growth cycle. As the honokiol concentration increased, G₁ and SubG₁ phase in cell cycle gradually increased. There existed apparent expression of apoptosis protein (Caspase3 and PARP) in BIU87 affected by honokiol, and CyclinD1, Cdk2, P21, P27, Bax, Bcl-2/Bcl-xL and MAPK signaling pathway protein JNK, P38, P42 that activated by oxygen free radicals. **Conclusion:** Honokiol inhibits the growth of human bladder cancer cells BIU87 and the drug can cause cell arrest in G₁ and induce cell apoptosis. Through the MAPK signaling pathway activated by oxygen free radicals, the protein JNK, P38, P42 were overexpressed achieving the effect of inhibition on human bladder tumor growth.

Key words honokiol; bladder cancer cell; apoptosis

¹南京市鼓楼医院泌尿外科(南京,210008)

²吉林省肝胆病医院

³连云港市第二人民医院急诊科

△共同第一作者

通信作者:郭宏骞,E-mail: dr.ghq@163.com

膀胱癌是威胁人类健康的恶性肿瘤之一,根据 2013 年初的国外资料分析,当年北美预计膀胱癌新增病例 140 340 例,其中预计死亡患者 29 790 例^[1]。近年来,我国膀胱癌的发病率呈逐年增高趋

势。目前对于晚期膀胱癌及不可耐受手术治疗的膀胱癌患者主要选择全身化疗,常用化疗方案有甲氨蝶呤+长春新碱+阿霉素+顺铂和氟胞苷+顺铂^[2],但研究资料显示肿瘤细胞对化疗药物均有不同程度的抗药性^[3],同时这些药物具有较严重的不良反应如脱发、呕吐、骨髓抑制及肝肾功能损伤,所以临床工作中需要新型药物用以代替原有膀胱癌化疗用药。和厚朴酚为木兰属植物提取物,其作为草本药物因具有抗感染、抗血栓作用而在远东地区如中国、朝鲜半岛、日本等地广泛使用^[4]。基础研究发现和厚朴酚具有较好的抗皮肤癌、结肠癌、肺癌、乳腺癌作用^[5~9],其抗肿瘤机制之一是通过抑制 ERK1/2 MAPK 信号通路达到抑制肿瘤血管内皮细胞生成作用^[10]。同时有研究表明 ERK1/2 MAPK 信号通路可以在包括膀胱癌在内的肿瘤细胞中被激活进而控制癌细胞的增殖^[11]。本实验研究和厚朴酚抑制肿瘤生长及其作用机制,为临床膀胱癌化疗研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养液购于美国 Wisent 公司,和厚朴酚、四甲基偶氮唑蓝(MTT)为美国 Sigma 公司产品。抗体试剂 PARP、Caspase3、p-P38、p-JNK、P42 由美国 cellsignal 公司提供,P21、P27、P38、JNK 购于美国 bioworld 公司,CyclinD1、CDK2、Rb、Bax、Bcl-2、Bcl-xL 购于美国 santaCRUZ 公司。鼠抗、兔抗购于美国 CST 公司。 β -ACTIN 由美国 ABmax 公司提供。

1.2 细胞系及培养条件

人类膀胱癌细胞 BIU87 由美国模式培养物集存库提供,实验期间置于南京鼓楼医院动物实验中心的 37 °C、5%CO₂ 培养箱中,待细胞长至 80% 培养皿面积时加药实验。

1.3 实验步骤

细胞毒性试验:采用 MTT 法。取对数生长期细胞,接种细胞于三块 96 孔板内,每孔内细胞 1 500 个,每 5 孔为一组。24 小时后加入和厚朴酚,浓度配置为 0 μ g/ml、4.8 μ g/ml、7.2 μ g/ml、9.6 μ g/ml、14.4 μ g/ml、19.2 μ g/ml。三块 96 孔板分别经药物作用 24、48、72 小时后,每孔加 MTT(5 g/L)20 μ l,继续孵育 3 h,吸弃培养液,每孔加入 DMSO 100 μ l,震荡 10 min。用酶标仪(波长 570 nm)测定各孔吸光度值(OD),计算细胞生存率。生存率=给药组 OD 值/对照组 OD 值 \times 100%。

克隆形成实验:传代培养的 BIU87 细胞接种于六孔板中,每孔 400 个细胞,24 小时后加入和厚朴酚,药物浓度为 0 μ g/ml、1.8 μ g/ml、2.4 μ g/ml、4.8 μ g/ml、9.6 μ g/ml,作用 72 小时后,吸弃培养液,冰 PBS 夜冲洗后加入甲醇固定克隆细胞团,以

冰 PBS 冲洗去除残液后加入结晶紫染色后冲洗,计算克隆细胞团。

流式细胞仪检测:传代培养的细胞接种于六孔板中,次日加药处理,药物浓度为 0 μ g/ml、4.8 μ g/ml、9.6 μ g/ml、14.4 μ g/ml、19.2 μ g/ml。24 小时后收集细胞,冰 PBS 洗涤 2 次,用 20 °C、70% 的冷乙醇固定,加入 115 ml PI(50 mg/L)染色,混匀后经流式细胞仪分析各期细胞比例。G 峰前面出现的亚 2 倍体峰即为凋亡峰。

细胞内活性氧检测:在 6 cm 培养皿铺入细胞(占培养皿面积约 60%),每盘加入 3 μ l 浓度为 20 mmol/L 的 2',7'-二氢二氯荧光黄双乙酸钠(DCF)于培养液中作用 20 min,在培养液中加入和厚朴酚,浓度为 0 μ g/ml、4.8 μ g/ml、9.6 μ g/ml、19.2 μ g/ml。作用 2 小时后置于冰上,避光,采用 PBS 冲洗 1~2 次,消化并吹打均匀成单细胞液,经流式细胞仪检测,以 DCF 作为探针检测药物作用后细胞内是否产生活性氧自由基。

蛋白印迹法实验:细胞加药后按不同时间,提取细胞总蛋白,用 biorad 法进行定量,取 40 μ g 蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后转移蛋白至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜,TBS 洗 3 次;室温下加入 1:300 一抗激活目的抗体,孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,加入 1:2 000 稀释的二抗,室温孵育 2 h,TBST 洗膜,显色。

1.4 统计学方法

结果数据用 SPSS16.0 软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单向方差分析(One-Way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 和厚朴酚对 BIU87 细胞生长的作用效果

以 BIU87 作为系统模型,采用和厚朴酚进行药物处理,观察其对膀胱癌细胞生长的影响。实验显示,经和厚朴酚(4.8~19.2 μ g/ml)作用后,细胞吸光度(OD 值)随着药物浓度的增加逐渐下降,细胞生长曲线随着药物浓度的升高逐渐下降(图 1A)。实验数据表明,和厚朴酚诱导细胞死亡的剂量随药物作用时间的增加而减小(图 1B),经过 24、48、72 小时的药物作用,BIU87 的半数致死剂量(IC50)值分别为 11.5 μ g/ml、7.2 μ g/ml、7.0 μ g/ml。

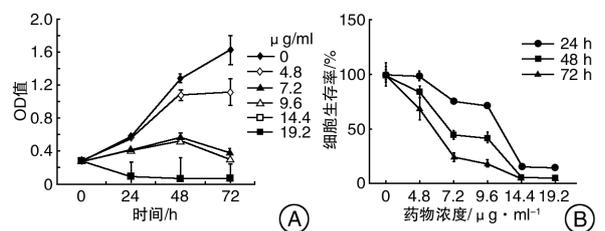


图 1 和厚朴酚对 BIU87 细胞生长的作用效果

2.2 细胞凋亡情况

药物作用细胞 24 小时后,经过流式细胞术检测 BIU87 细胞的生长周期分布表明:和厚朴酚使细胞停滞在 G₀ 期的比例随着药物浓度的升高而增

加,同时 G₂、S 期比例则逐渐减少(图 2A)。细胞在药物浓度为 0、4.8、9.6 μg/ml 时,Sub G₁ 期逐渐增高;在浓度为 19.2 μg/ml 时,Sub G₁ 期明显增高(图 2B)。

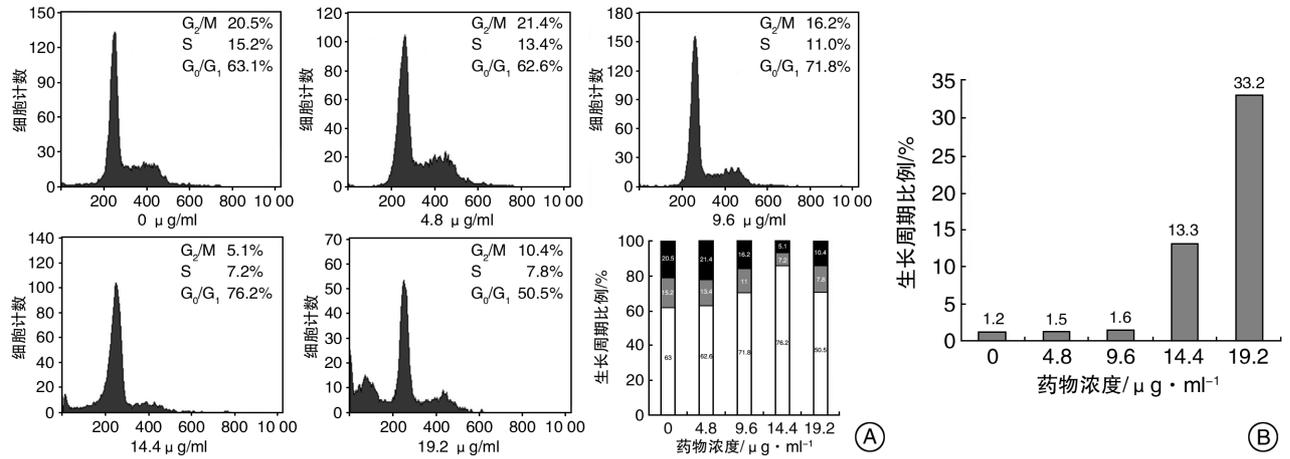


图 2 和厚朴酚对 Biu-87 细胞周期变化的作用效果

2.3 克隆形成实验情况

在克隆形成实验中,我们发现,在药物作用时间相同的情况下,随着和厚朴酚作用浓度的增加,肉眼即可观察到细胞克隆团数量逐渐递减(图 3)。

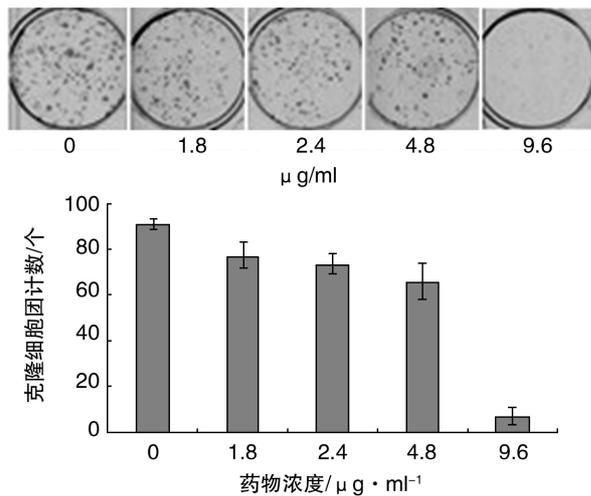


图 3 BIU87 细胞在不同药物浓度作用下,肉眼观察克隆细胞团计数逐渐减少

2.4 活性氧自由基荧光标记实验

荧光探针法是一种灵敏的、可提供细胞内靶分子时空信息的活性氧自由基(ROS)检测法,可用作检测细胞内 ROS 的水平。实验中用不同药物浓度处理过的细胞经荧光标记后在流式细胞仪上检测,我们发现随着和厚朴酚浓度的增高,数据峰值逐渐右偏,说明这时的细胞内活性、自由基随药物作用浓度的增加而升高(图 4)。

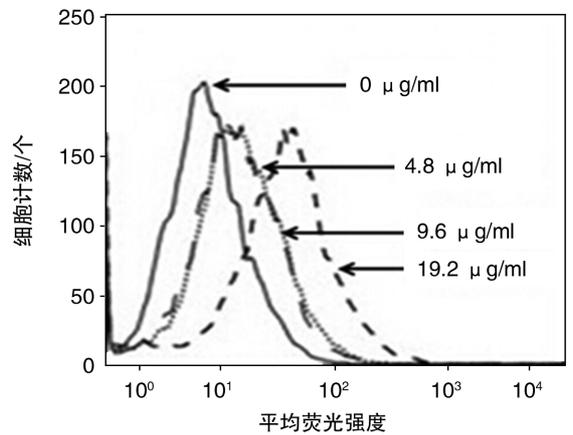


图 4 BIU87 细胞产生的活性氧自由基水平随着药物作用浓度的增加而升高

2.5 蛋白印迹法试验结果

在给药 48 小时后,凋亡蛋白 PARP 在最高药物浓度下(19.2 μg/ml)出现对应的剪切条带,同时发现激活 PARP 凋亡蛋白的上游分子 Caspase 3 表达相应蛋白,出现剪切条带。BIU87 细胞在经过和厚朴酚作用 24 小时后,作为细胞周期调节因子的 Cyclin D1、Cdk2 蛋白的表达随着药物浓度的增加而减少。细胞周期抑制蛋白 P21、P27 在 BIU87 膀胱癌细胞中的表达随着和厚朴酚浓度的升高而增加。Rb 作为抗肿瘤基因表达 Rb 蛋白从而抑制细胞恶性增殖,我们发现在和厚朴酚作用 8 小时后随着药物浓度的增高,Rb 蛋白表达增加。而在炎症细胞因子信号传递级联反应下游发挥作用的 P38 的表达水平随着和厚朴酚作用浓度的增加而升高。

在 MAPK 通路中,我们发现药物作用后,JNK 出现了选择性剪切条带。细胞外调节蛋白激酶 ERK (P42/P44)蛋白在经过药物处理后,发现经过蛋白印迹检测发现出现剪切条带。Bcl-2、Bcl-xL 蛋白随药物浓度增高而表达水平降低,Bax 则随细胞凋亡而表达增强(图 5)。

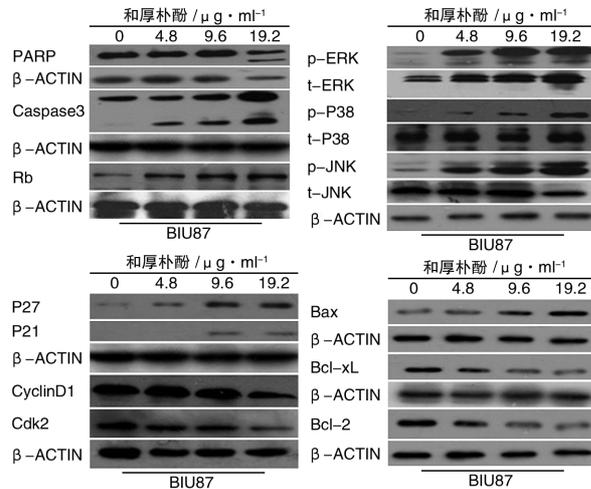


图 5 细胞经药物处理后的特定蛋白趋势性表达

3 讨论

本实验中的细胞毒性试验数据证明和厚朴酚具有抑制细胞生长作用,可有效抑制人膀胱癌细胞 BIU87。在蛋白印迹法中,我们检测到作为凋亡蛋白 PARP 的小条带,说明细胞在和厚朴酚作用下产生了凋亡蛋白,而诱导 PARP 表达的上游分子 Caspase3 在检测中发现蛋白表达,这证明和厚朴酚可诱导膀胱癌细胞 BIU87 凋亡。肿瘤细胞的恶性增殖通常是因为细胞增殖和凋亡互相作用机制的失控所导致的^[12],研究表明在人类多种癌细胞中,细胞周期调控以及细胞生存相关蛋白的表达经常频繁改变^[13~15]。细胞周期的调控是通过细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(Cdks)和细胞周期蛋白抑制剂三者的相互作用实现的^[14,16]。在经过和厚朴酚作用后,BIU87 的生长在 G₁ 期间出现停滞,CyclinD1、Cdk2 蛋白表达水平降低,周期素依赖性激酶抑制因子 P21、P27 则随着药物浓度的增加而增高,说明和厚朴酚可以抑制 CyclinD1、Cdk2 的表达,诱导 P21、P27 的表达水平增高从而使细胞周期停滞在 G₁ 期。所以,我们认为和厚朴酚可以通过降低细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶的表达以及上调细胞周期蛋白抑制剂的表达水平,诱导人类膀胱癌细胞 BIU87 细胞周期停滞在 G₁ 期。随着细胞在 G₁ 期停滞,细胞会进入修复或启动凋亡程序以维持细胞功能完整性或消除已突变、错配的癌前基因^[17]。所以,诱导细胞

凋亡是细胞防止癌变的保护性机制^[13],而本实验说明该药物可以增强细胞凋亡。凋亡蛋白基因(Bax)与抗凋亡蛋白基因(Bcl-2 和 Bcl-xL)的动态平衡是细胞存活的重要保证,这种互相制衡的过程控制着启动凋亡程序的 Caspase 蛋白表达^[18,19]。在和厚朴酚作用于细胞后,Bcl-2 家族蛋白中的 Bax/Bcl-2 和 Bax/Bcl-xL 比率上升,激活了 Caspase 蛋白表达,因此我们认为和厚朴酚具有促凋亡效果。视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)是一种肿瘤抑制蛋白,其功能是防止细胞恶性增殖,抑制细胞周期进程^[20],通过检测 Rb 蛋白的表达,我们发现其表达量随着和厚朴酚药物浓度的增高而升高,说明和厚朴酚可诱导细胞内 Rb 基因表达相关蛋白抑制肿瘤细胞增殖。MAPK,即有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases)存在于大多数细胞内,可将细胞在外界收到的刺激信号转导至细胞内引起生物学反应。其信号通路由三条并行的信号通路,即 ERK(P42/P44)通路、JNK 通路、P38 通路组成,三条路通在接受外界刺激后上调表达 JNK、P38、ERK(P42/P44)蛋白,促进细胞凋亡^[21]。所以,我们通过检测发现 JNK、P38、ERK(P42/P44)蛋白随着药物浓度增高而增加,这说明和厚朴酚在刺激肿瘤细胞后,导致 MAPK 通路的信号转导,促进 BIU87 细胞内 JNK、P38、ERK(P42/P44)蛋白过度表达导致细胞凋亡。根据相关研究成果^[22],细胞内产生活性氧自由基后可激活 MAPK 通路的信号转导,我们在活性氧自由基检测中发现经过标记的 BIU87 细胞的荧光强度峰值在药物浓度(0 μg/ml、4.8 μg/ml、9.6 μg/ml、19.2 μg/ml)增高时右移,说明随着药物浓度增高时,细胞内的活性氧自由基含量逐渐增高,在药物浓度 19.2 μg/ml 时细胞荧光强度曲线较对照曲线明显右移,所以本实验证明了和厚朴酚可以明显诱导细胞产生活性氧自由基,激活 MAPK 通路的信号转导促进肿瘤细胞死亡。

通过本次实验,我们认为和厚朴酚可以促使人类膀胱癌细胞 BIU87 细胞停滞在 G₁ 期并诱导细胞凋亡;同时和厚朴酚还可以通过诱导 BIU87 细胞产生活性氧自由基(ROS),激活细胞内 MAPK 信号通路,上调表达蛋白 JNK、P38、ERK(P42/P44)水平以促进肿瘤细胞的凋亡。

[参考文献]

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30.
- 2 Rosenberg J E, Carroll P R, Small E J, et al. Update on chemotherapy for advanced bladder cancer [J]. J Urol, 2005, 174(1): 14-20.
- 3 Yang S, Song B, Dai S, et al. Effects of hypoxia-inducible factor-1α silencing on drug resistance of human pancreatic cancer cell line Patu8988/5-Fu[J]. Hepatogas-

- troenterology, 2014, 61(136): 2395–2401.
- 4 Hahm E, Singh S. Honokiol causes G0-G1 phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells in association with suppression of retinoblastoma protein level phosphorylation and inhibition of E2F1 transcriptional activity[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(10): 2686–2695.
 - 5 Chen X R, Lu R, Dan H X, et al. Honokiol: a promising small molecular weight natural agent for the growth inhibition of oral squamous cell carcinoma cells[J]. *Int J Oral Sci*, 2011, 3(1): 34–42.
 - 6 Chen F, Wang T, Wu Y F, et al. Honokiol: a potent chemotherapy candidate for human colorectal carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(23): 3459–3463.
 - 7 Chilampalli C, Zhang X, Fahmy H, et al. Chemopreventive effects of combination of honokiol and magnolol with α -santalol on skin cancer developments[J]. *Drug Discov Ther*, 2013, 7(3): 109–115.
 - 8 Park E J, Min H Y, Chung H J, et al. Down-regulation of c-Src/EGFR-mediated signaling activation is involved in the honokiol-induced cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 277(2): 133–140.
 - 9 Yang S E, Hsieh M T, Tsai T H. Down-modulation of Bcl-XL, release of cytochrome c and sequential activation of caspases during honokiol-induced apoptosis in human squamous lung cancer CH27 cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 63(9): 1641–1651.
 - 10 Kim G D, Bae S Y, Park H J, et al. Honokiol inhibits vascular vessel formation of mouse embryonic stem cell-derived endothelial cells via the suppression of PECAM and MAPK/mTOR signaling pathway[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2012, 30(3): 758–770.
 - 11 Bailey K, Wallace K, Smeester L, et al. Transcriptional modulation of the ERK1/2 MAPK and NF- κ B pathways in human urothelial cells after trivalent arsenical exposure: Implications for urinary bladder cancer[J]. *J Can Res*, 2012, 21(1): 57–68.
 - 12 Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674.
 - 13 Call J A, Eckhardt S G, Camidge D R. Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment[J]. *Lancet Oncol*, 2008, 9(10): 1002–1011.
 - 14 Kastan M B, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 316–323.
 - 15 Vermeulen K, Van Bockstaele D R, Berneman Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer[J]. *Cell Prolif*, 2003, 36(3): 131–149.
 - 16 Satyanarayana A, Kaldis P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms [J]. *Oncogene*, 2009, 20(28): 2925–2939.
 - 17 Chen C Y, Hsu Y L, Chen Y Y, et al. Isokotomolide A, a new butanolide extracted from the leaves of *Cinnamomum kotoense*, arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of p53/p21 and the initiation of mitochondrial system in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 574(2-3): 94–102.
 - 18 Fong W F, Tse A K, Poon K H, et al. Magnolol and honokiol enhance HL-60 human leukemia cell differentiation induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(2): 427–441.
 - 19 Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression[J]. *Nature*, 2006, 441(7092): 431–436.
 - 20 McConnell E J, Devapatla B, Yaddanapudi K, et al. The soybean-derived peptide lunasin inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by suppressing phosphorylation of the retinoblastoma protein[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(7): 4649–4662.
 - 21 Cassidy H, Radford R, Slyne J, et al. The role of MAPK in drug-induced kidney injury [J]. *J Signal Transduct*, 2012, 2012:463617.
 - 22 Lan A, Liao X, Mo L, et al. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25921.

(收稿日期:2014-10-17)