从而使平衡被打破所引起的，H_2O_2 氧化损伤作用机制可能主要是由 SOD 和过氧化氢酶的降低所致。

参考文献

[1] Mendez R, Grissom M. Disorders of childhood growth and development: childhood obesity[J]. Family Physician Essentials, 2013, 410: 20 – 24.

[2] Martini AC, Tissera A, Estofán D, et al. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients[J]. Fertility and Sterility, 2010, 94(5): 1739 – 1743.

[3] Hofstra J, Loves S, van Wageningen B, et al. High prevalence of hypogonadotropic hypogonadism in men referred for obesity treatment[J]. Netherlands Journal of Medicine, 2008, 66(3): 103 – 109.

[4] Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction[J]. Journal of Andrology, 2008, 29(5): 488 – 498.

[5] 韩飞，周孟良. 过氧化氢诱导 HepG2 细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J]. 食品科学，2011，32(5)：55 – 57.

[6] 李朝晖，王芬，刘水平，等. 过氧化氢诱导 PCl2 细胞损伤的模型的建立[J]. 法医学杂志，2007，23(3)：191 – 192，195.

[7] Ruige JB. Does low testosterone affect adaptive properties of adipose tissue in obese men? [J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2011, 117(1): 18 – 22.

[8] Zhou L, Beattie MC, Lin CY, et al. Oxidative stress and phthalate-induced down-regulation of steroidogenesis in MA-10 Leydig cells[J]. Reproductive Toxicology, 2013, 42: 95 – 101.

[9] 王东，姜丽萍，刘晓芳，等. 鞣花酸对 HEK-293 细胞 DNA 损伤作用[J]. 中国公共卫生，2013，29(11)：1630 – 1632.

[10] 甄亚平，张倩华，吴惠慧，等. 经口摄入全氟辛酸对 SD 大鼠血清总抗氧化能力的影响[J]. 中国食品卫生杂志，2013，25(6)：509 – 512.

收稿日期：2013 – 09 – 15　　（解学魁编辑　郭薇校对）

· 实验研究 ·

芒柄花黄素诱导膀胱癌细胞凋亡作用*

张幸[1]，梁梅花[2]，黄文君[3]，郭艳红[3]，卢慧玲[4]，辛敏[3]

摘　要：目的　探讨芒柄花黄素诱导膀胱癌细胞凋亡的作用及机制。**方法**　采用不同浓度（20、40、80 μmol/L）芒柄花黄素处理膀胱癌细胞，采用噻唑蓝法观察芒柄花黄素对膀胱癌 T-24 和 BIU-87 细胞的增殖的抑制作用，使用流式细胞术及 Hoechst 33258 染色检测 T-24 和 BIU-87 细胞凋亡率，采用 RT-PCR 检测 T-24 细胞 Bcl-2 mRNA 表达；western blot 检测 T-24 细胞 p-p38 蛋白激酶、Bcl-2 蛋白含量变化。**结果**　与对照组比较，40、80 μmol/L 芒柄花黄素组 T-24 和 BIU-87 细胞增殖率下降、细胞凋亡率明显升高，Hoechst33258 染色显示 T-24 细胞呈凋亡状态；40、80 μmol/L 芒柄花黄素组 T-24 细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平[(0.701 ± 0.029)、(0.408 ± 0.036)]均低于对照组，差异均有统计学意义（$P < 0.01$）；与对照组比较，20、40、80 μmol/L 芒柄花黄素组 T-24 细胞 p-p38 蛋白激酶活性水平[(0.483 ± 0.026)、(0.569 ± 0.031)、(0.935 ± 0.037)]均升高，Bcl-2 蛋白含量[(0.998 ± 0.034)、(0.591 ± 0.030)、(0.426 ± 0.027)]均降低，差异均有统计学意义（$P < 0.01$）。**结论**　芒柄花黄素可诱导膀胱癌 T-24 和 BIU-87 细胞凋亡、抑制细胞生长，其机制可能与下调 Bcl-2 蛋白表达并活化 p38 蛋白激酶有关。

关键词：芒柄花黄素；膀胱癌细胞；凋亡；p38；Bcl-2

中图分类号：R 181.2+4　**文献标志码**：A　**文章编号**：1001-0580(2015)03-0314-04　DOI：10.11847/zgggws2015-31-03-18

Formononetin-induced apoptosis in bladder cancer cells and its mechanism

ZHANG Xing*, LIANG Mei-hua, HUANG Wen-jun, et al (* *Department of Human Anatomy, College of Basic Medicine, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi Zhuang Autonomous Region* 541004, China)

Abstract: Objective　To explore the underlying mechanism responsible for formononetin-induced apoptosis of bladder cancer cells *in vitro*. **Methods**　Human bladder cancer cells T-24 and BIU-87 were exposed to different doses of formononetin (20, 40, and 80 μmol/L). Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay was applied to determine the effect of formononetin on proliferation of T-24 and BIU-87 cells; the apoptosis was assessed with flow cytometry and Hoechst 33258 staining. Next, the expression level of Bcl-2 mRNA in T-24 cells was analyzed with real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expressions of p-p38 and Bcl-2 proteins in T-24 cells were determined with Western blot. **Results**　Compared with the control group, the formononetin at the doses of 40 and 80 μmol/L significantly suppressed the proliferation of T-24 and BIU-87 cells, while the apoptotic rate increased significantly. The Hoechst 33258 staining results showed that T-24 cells exhibited typical apoptotic morphology. Compared with the control

* **基金项目**：广西高校科学技术研究项目（YB2014270）

作者单位：1. 桂林医学院基础医学院人体解剖学教研室，广西 桂林 541004；2. 桂林医学院基础医学院研究所；3. 桂林医学院基础医学院生理学教研室；4. 桂林医学院基础医学院病理生理学教研室

作者简介：张幸（1979 – ），男，广西桂林人，高级实验师，学士，研究方向：植物雌激素与肿瘤的关系。

通讯作者：辛敏，E-mail：123745733@qq.com

数字出版日期：2015 – 2 – 15 9:57

数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150215.0957.003.html

group, formononetin effectively reduced the expression of Bcl-2 mRNA (0.701 ± 0.029 for 40 μmol/L group and 0.408 ± 0.036 for 80 μmol/L group) in T-24 cells (all $P < 0.01$). Compared with the control group, formononetin effectively increased the expression of P38 protein (0.483 ± 0.026 for 20 μmol/L group and 0.569 ± 0.031 for 80 μmol/L group) in T-24 cells (all $P < 0.01$). Compared with the control group, formononetin effectively reduced expression of Bcl-2 protein (0.998 ± 0.034 for 20 μmol/L group, 0.591 ± 0.030 for 40 μmol/L group, and 0.426 ± 0.027 for 80 μmol/L group) in T-24 cells (all $P < 0.01$). **Conclusion**　Formononetin could inhibit the growth of bladder cancer cells by induction of apoptosis, which may be related to the inhibition of Bcl-2 expression and activation of P38 protein.

Key words: formononetin; bladder cancer cell; apoptosis; P38; Bcl-2

膀胱癌是泌尿系统中最常见的恶性肿瘤之一，好发于 40 ~ 60 岁，发病率男性较女性高 3 倍，患者死亡率高。与膀胱癌有关的因素可能为吸烟、放射、化学毒物、药物。同时，生长因子、细胞因子以及激素等生物活性物质以及这些活性物质介导的信号转导途径发生异常，可引起某些基因的过度扩增，导致正常细胞接受了异常的增殖、分化和生长信号，最终促使细胞发生癌变[1-2]。植物来源的芒柄花黄素，分离自红三叶草，为一种生物活性异黄酮，具有明显的生物功能和抗肿瘤作用[3]。本研究通过观察不同浓度芒柄花黄素作用于膀胱癌 T-24 和BIU-87细胞株后细胞增殖、凋亡变化，T-24 细胞 p38 及 Bcl-2 蛋白表达水平变化，探讨芒柄花黄素对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响及可能机制，结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*主要试剂*　膀胱癌 T-24 与 BIU-87 细胞株（上海细胞生物研究所），芒柄花黄素（ >98.0%）、荧光染料 Hoechst 33258 和噻唑蓝（thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT）（美国 Sigma 公司），V-FITC 凋亡检测试剂盒（上海碧云天研究所），1640 培养基、胎牛血清（美国 HyClone 公司），p-p38 及 Bcl-2 兔抗人多克隆抗体（美国 SantaCruz 公司）。

1.2　*细胞培养*　使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 1640 培养基，将膀胱癌 T-24 与BIU-87 细胞在含 5% CO_2 的 37 ℃培养箱中常规培养传代。

1.3　*指标与方法*

1.3.1　T-24 和 BIU-87 细胞增殖活性检测　采用 MTT 法，收集对数生长期细胞，调整细胞悬液浓度，按 5×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板中，每孔加入 100 μL 细胞悬液；待细胞贴壁后分别加入含芒柄花黄素的完全培养基，每孔 100 μL，使芒柄花黄素终浓度分别为 20、40、80 μmol/L，另设对照组（加入等体积的完全培养基），每组设 3 个副孔；分别培养 24、48、72 h 后弃上清，每孔加入 20 μL MTT 溶液（5 mg/mL），37 ℃孵育 4 h，弃培养液，每孔加入 150 μL二甲基亚砜，置摇床上低速振荡 10 min，用酶标仪测定 490 nm 处吸光度（*A*）值，实验独立重复 3 次。

1.3.2　T-24 与 BIU-87 凋亡率检测　采用流式细胞术，收集消化后细胞，调整细胞浓度，以 1×10^6 个/孔接种到 6 孔板中；待细胞贴壁后，加入含芒柄花黄素（20、40、80 μmol/L）的完全培养基，对照组（加入同体积完全培养基），每组设 3 个副孔，继续培养 48 h 后，收集细胞，用预冷的磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）洗涤 3 次，annexin V-FITC 及碘化丙啶（50 μg/mL）室温避光染色15 min，用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.3　T-24 细胞凋亡形态学观察　采用 Hoechst 染色法，接种对数生长期细胞至 6 孔板，12 h 贴壁后，每孔加入不同浓度芒柄花黄素的完全培养基，使终浓度为 20、40、80 μmol/L，对照组加入完全培养基，继续孵育 48 h 后，吸尽培养液，先后加入固定液和 Hoechst 33258 染色液；荧光显微镜检测，激发波长 350 nm，观察细胞核变化。

1.3.4　T-24 细胞 Bcl-2 mRNA 表达检测　采用逆转录聚合酶链式反应（reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR），20、40、80 μmol/L 芒柄花黄素处理 T-24 细胞 48 h，用 trizol 提取 T-24 细胞总 RNA，采用紫外分光光度计测总 RNA 纯度和含量，将总 RNA 逆转录为 cDNA，加入目的基因引物进行扩增，扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶分析系统记录分析；以 β-actin 为内参照，计算 Bcl-2 相对表达量。

1.3.5　T-24 细胞 p38 及 Bcl-2 蛋白表达检测　采用 Western blot 法，20、40、80 μmol/L 芒柄花黄素处理 T-24 细胞 48 h 后，裂解细胞，提取总蛋白，考马斯亮兰法检测样品蛋白浓度；以 3∶1 体积比与上样缓冲液混合，取 20 μL 上样；浓缩胶电泳电压为 80 V，分离胶为 130 V，电泳 4 h 后用聚偏二氟乙烯膜半干转，转膜 1.5 h，然后聚偏二氟乙烯膜用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h，然后加入 p-38 抗体（抗体稀释度 1∶500）或 Bcl-2 抗体（抗体稀释度 1∶500）4 ℃过夜，Tris 缓冲盐溶液洗膜 10 min × 3 次，辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（稀释度 1∶5 000）室温反应 1 h，超敏化学发光法显色，凝胶分析系统分析记录条带光密度，用图像分析系统分析，以相应蛋白条带的积分光密度值表示检测蛋白相对强度。

1.4　统计分析　数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，各组间比较采用单因素方差分析与 Dunnet-t 检验，$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

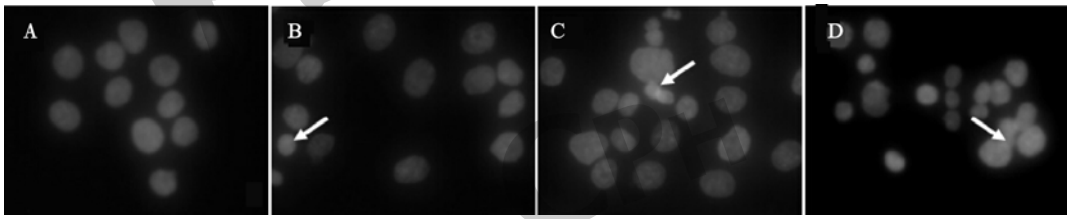
2.1　芒柄花黄素对 T-24 与 BIU-87 细胞增殖能力影响（表 1）　与对照组比较，芒柄花黄素处理组（20 ~ 80 μmol/L）T-24 细胞与 BIU-87 细胞数目显著减少，细胞增殖能力受到明显抑制（$P < 0.05$），其抑制作用呈剂量依赖性。

表 1　芒柄花黄素对 T-24 与 BIU-87 细胞增殖能力影响（$A, \bar{x} \pm s, n = 3$）

组别（μmol/L）		T-24			BIU-87		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组		0.441 ± 0.023	0.645 ± 0.018	0.852 ± 0.019	0.511 ± 0.024	0.762 ± 0.019	0.903 ± 0.022
芒柄花黄素组	20	0.369 ± 0.025[a]	0.474 ± 0.021[a]	0.637 ± 0.031[a]	0.443 ± 0.021[a]	0.573 ± 0.025[a]	0.721 ± 0.027[a]
	40	0.354 ± 0.021[a]	0.407 ± 0.029[a]	0.482 ± 0.033[a]	0.382 ± 0.016[a]	0.509 ± 0.025[a]	0.557 ± 0.023[a]
	80	0.328 ± 0.027[a]	0.374 ± 0.021[a]	0.362 ± 0.024[a]	0.333 ± 0.025[a]	0.414 ± 0.021[a]	0.486 ± 0.022[a]

注：与对照组比较，a $P < 0.05$。

2.2　芒柄花黄素对 T-24 与 BIU-87 细胞凋亡率影响（图 1、表 2）　结果显示，对照组 T-24 细胞较少出现细胞核裂解或细胞皱缩，而芒柄花黄素处理的 T-24 细胞中可见细胞核碎裂和细胞皱缩；与对照组比较，各剂量芒柄花黄素处理的 T-24 与 BIU-87 细胞凋亡率均明显升高，差异均有统计学意义（$P < 0.01$）。



注：A：对照组；B、C、D：20、40、80 μmol/L 芒柄花黄素组。

图 1　芒柄花黄素对 T-24 细胞凋亡影响（Hoechst 染色，×200）

表 2　芒柄花黄素对 T-24 与 BIU-87 细胞凋亡率影响（%，$\bar{x} \pm s, n = 3$）

组别（μmol/L）		T-24 细胞凋亡率	BIU-87 细胞凋亡率
对照组		1.85 ± 0.64	2.46 ± 1.42
芒柄花黄素组	20	5.21 ± 1.12	2.99 ± 1.52[a]
	40	18.32 ± 1.87[a]	15.75 ± 2.74[a]
	80	29.99 ± 2.56[a]	20.47 ± 2.99[a]

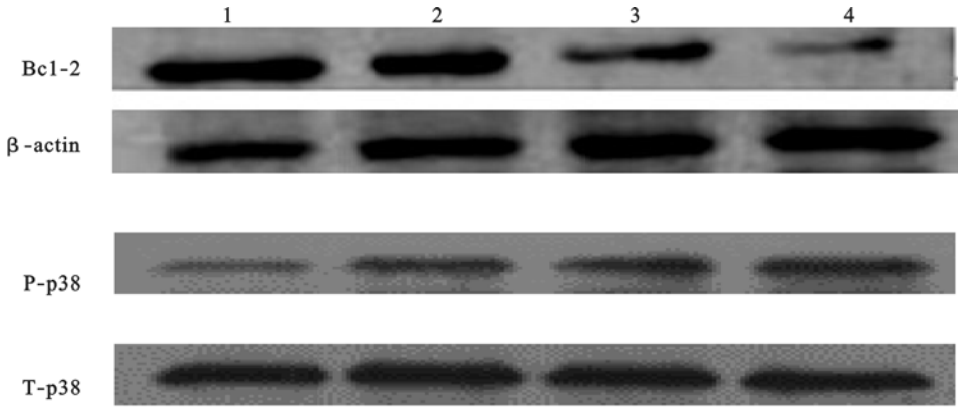
注：与对照组比较，a $P < 0.01$。

2.3　芒柄花黄素对 T-24 细胞 Bcl-2 mRNA 表达影响　RT-PCR 检测结果表明，经不同浓度芒柄花黄素（0、20、40、80 μmol/L）处理 T-24 细胞 48 小时后，T-24 细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平分别为（0.873 ± 0.031）、（0.856 ± 0.048）、（0.701 ± 0.029）、（0.408 ± 0.036）；与对照组比较，40、80 μmol/L 芒柄花黄素组 T-24 细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平降低，差异均有统计学意义（$P < 0.01$）。

2.4　芒柄花黄素对 T-24 细胞 Bcl-2、p-38 表达影响（图 2）　Western blot 结果表明，对照组、20、40、80 μmol/L芒柄花黄素组 T-24 细胞 Bcl-2 与 p-p38 蛋白表达水平分别为（1.203 ± 0.023）、（0.998 ± 0.034）、（0.591 ± 0.030）、（0.426 ± 0.027）和（0.326 ± 0.027）、（0.483 ± 0.026）、（0.569 ± 0.031）、（0.935 ± 0.037），与对照组比较，各芒柄花黄素组 T-24 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平下降，p-p38 蛋白表达水平升高，差异均有统计学意义（$P < 0.01$）。

3　讨　论

抗凋亡是肿瘤细胞发生机制的重要环节[4]。在癌变过程中，癌细胞失控生长会逐渐形成恶性癌，并进一步侵入附近组织[5]。目前，临床应用的化疗方法疗效有限，且对体内主要器官可产生毒性[6-7]。近年来，人们致力于寻求抑制肿瘤发生和转移的新天然药物[8]。芒柄花黄素是中药红三叶草的主要活性成分。研究表明，芒柄花黄素可以防止血管生成和癌转移，并在临床中已用于转移性结肠癌的治疗[9]。MTT 是一种比色分析，可反映细胞增殖能力[10]，还可用于评估药物的细胞生长抑制效应[11]。本研究结果显示，芒柄花黄素作用 72 h，明显著抑制膀胱癌 T-24 与 BIU-87 细胞增殖能力，并可促进T-24 细胞凋亡。B 细胞淋巴瘤 2（B cell lymphana 2，Bcl -2）是最重要的细胞凋亡调节蛋白之一，它具有



注：1：对照组；2 ~ 4：20、40、80 μmol/L 芒柄花黄素组。

图 2　芒柄花黄素对 T-24 细胞 Bcl-2、p-p38 蛋白表达影响

很强的抗凋亡特性[12]。Bcl-2 蛋白与各种癌变，包括慢性淋巴细胞性白血病、乳腺癌、肺癌和前列腺癌有关[13]。本研究结果表明，经芒柄花黄素处理后，T-24 细胞 Bcl-2 mRNA 水平与 Bcl-2 蛋白表达呈剂量依赖性下降，提示芒柄花黄素可能通过下调 Bcl-2 蛋白表达而诱导 T-24 细胞凋亡。

丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）是一组可被多种信号激活的丝/苏氨酸激酶，在细胞内经双重磷酸化活化后可调节细胞的多种生物活性，如促进增殖分化、诱导基因转录、抑制凋亡、调节周期等。MAPK 信号转导通路非常保守，在细胞信号转导通路中，MAPK 处于细胞质部分的终末位置，活化后可以转到核内，调节基因表达。迄今为止，已发现 p38、ERK5、ERK 以及 JNK4 个亚族[14-16]。目前认为，p38 激酶通路在炎症反应、细胞生长、细胞分化和细胞死亡诸多过程中起关键作用[17-18]，p38 蛋白激酶的活化，有助于抑制细胞增殖和癌变[19]。本研究结果显示，经芒柄花黄素处理后，T-24 细胞 p38 蛋白激酶表达呈剂量依赖性增高，提示，诱导 p38 蛋白激酶表达可能是芒柄花黄素诱导 T-24 细胞凋亡的主要机制之一。

参考文献

[1] Umar A, Dunn BK, Greenwald P. Future directions in cancer prevention[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(12): 835 – 848.
[2] Shao H, Huang Q, Liu ZJ. Targeting Notch signaling for cancer therapeutic intervention[J]. Adv Pharmacol, 2012, 65: 191 – 234.
[3] Yu J, Zhao P, Niu J, et al. Research on phytoestrogenic effect of formononetin[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2010, 35(22): 3060 – 3064.
[4] Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Magalska A, et al. Curcumin induces caspase-3-dependent apoptotic pathway but inhibits DNA fragmentation factor 40 / caspase-activated DNase endonuclease in human Jurkat cells[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(4): 927 – 934.
[5] Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity[J]. Cell, 2011, 147: 992 – 1009.
[6] Peters BG. An overview of chemotherapy toxicities[J]. Top Hosp Pharm Manag, 1994, 14: 59 – 88.
[7] Torrisi JM, Schwartz LH, Gollub MJ, et al. CT findings of chemotherapy-induced toxicity: what radiologists need to know about the clinical and radiologic manifestations of chemotherapy toxicity[J]. Radiology, 2011, 258: 41 – 56.
[8] El-Bayoumy K, Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds[J]. Mutat Res, 2004, 551(1 – 2): 181.
[9] Auyeung KK, Law PC, Ko JK. Novel anti-angiogenic effects of formononetin in human colon cancer cells and tumor xenograft[J]. Oncol Rep, 2012, 28: 2188 – 2194.
[10] Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction[J]. Biotechnol Annu Rev, 2005, 11: 127 – 152.
[11] Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay[J]. Methods Mol Biol, 2011, 731: 237 – 245.
[12] Luo S, Rubinsztein DC. Apoptosis blocks beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL[J]. Cell Death Differ, 2010, 17: 268 – 277.
[13] Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 1126 – 1132.
[14] Oeztuerk-Winder F, Ventura JJ. The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation[J]. Biochem J, 2012, 445(1): 1 – 10.
[15] De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches[J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16 Suppl 2: S17 – 27.
[16] del Barco Barrantes I, Nebreda AR. Roles of p38 MAPKs in invasion and metastasis[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(1): 79 – 84.
[17] 穆润清，贺安宁，王丽，等. MAPK 和 MPF 对小鼠受精卵有丝分裂期作用[J]. 中国公共卫生，2006，22(5)：594 – 595.
[18] 杨学森，龚茜芬，张广斌，等. 电磁辐射对大鼠海马 MAPK 信号通路的影响[J]. 中国公共卫生，2005，21(6)：693 – 695.
[19] Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9: 537 – 549.

收稿日期：2014 – 11 – 17　　（解学魁编辑　郭薇校对）