

肿瘤机制研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000478

茶多酚联合表柔比星对人膀胱癌 T24 细胞增殖和凋亡的影响及机制

杨帆, 何卫阳, 朱鑫, 刘关羽, 苟欣

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究茶多酚(polyphenols, TP)对表柔比星(epirubicin, EPI)诱导人膀胱癌 T24 细胞增殖及凋亡的影响,探讨两者联合对 T24 细胞生长影响的机制。**方法:**不同浓度 TP 和 EPI 作用膀胱癌 T24 细胞 24 h, MTT 试验选择药物作用浓度 TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$)和 EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)。试验分空白对照组、TP 组(88.8 $\mu\text{mol/L}$)、EPI 组(4.6 $\mu\text{mol/L}$)、联合组(TP 88.8 $\mu\text{mol/L}$ + EPI 4.6 $\mu\text{mol/L}$)共 4 组,处理 T24 细胞 24 h 后, Annexin V-PI 双流式细胞术检测各组细胞凋亡率;处理 T24 细胞 8 h 后,透射电镜观察各组细胞内自噬体的变化;处理稳定表达 GFP-LC3 的 T24 细胞 8 h 后,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 LC3 荧光斑的形成与变化;处理 T24 细胞不同时间, Western blot 技术检测自噬标志蛋白 LC3-II (8 h)、底物蛋白 P62(8 h)、凋亡相关蛋白 CASP3、PARP(16 h)表达变化。**结果:**TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$)联合 EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)处理组较单药组引起的细胞增殖抑制率($F=730.411$, $P=0.000$)和细胞凋亡率($F=161.945$, $P=0.000$)明显提高。EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)单药处理 T24 细胞后引起明显自噬,透射电镜下细胞质内自噬体双层膜结构形成;荧光显微镜下胞质内有明显点状荧光斑聚集形成,且含荧光斑的细胞数量也明显增加,差异有统计学意义($F=41.944$, $P=0.000$);Western blot 结果显示 EPI 组自噬相关蛋白 LC3-II 的表达增多, P62 表达降低。联合 TP 作用后自噬明显减弱,自噬相关蛋白表达降低,而凋亡相关蛋白活性显著增高。**结论:**TP 可以增强 EPI 对膀胱癌 T24 细胞的致凋亡敏感性,其机制与 TP 抑制 EPI 化疗过程中诱导的保护性自噬有关。

【关键词】膀胱癌;自噬;茶多酚;表柔比星**【中图分类号】**R737.14**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-09-17

Effects of tea polyphenols combined with epirubicin on T24 bladder cancer cell line and its mechanism

Yang Fan, He Weiyang, Zhu Xin, Liu Guanyu, Gou Xin

(Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of tea polyphenols (TP) on epirubicin (EPI)-induced cell proliferation and cell apoptosis of human bladder cancer cells T24 *in vitro* and its mechanism. **Methods:** MTT assay was applied to investigate the effects of different levels of tea polyphenols or epirubicin on the T24 cells. The experiment was divided into 4 groups: control group (PBS), TP group (88.8 $\mu\text{mol/L}$), EPI group (4.6 $\mu\text{mol/L}$), and TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) plus EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) group. The proliferation inhibition rate was assayed by MTT; Annexin V-FITC/PI double staining flow cytometry was used to analyze apoptosis. The ultra-structural cellular changes were observed by transmission electron microscope (TEM); The formation of MAP1LC3-II puncta was examined after transfection of a GFP-LC3 plasmid. The levels of LC3-II, P62, CASP3, PARP proteins were detected by Western blot, respectively. **Results:** Treatment with TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) and EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) led to a significant increase of inhibiting rate ($P=0.000$) and a dramatic improvement in apoptotic changes compared to single EPI or TP group ($P=0.000$). Autophagy was observed obviously in bladder cancer cells T24

treated with EPI after 8 h. TEM examination revealed the appearance of autophagosome with double-membrane structure. Immunofluorescence showed that EPI strongly augmented the number of cells with increased GFP-LC3 puncta and GFP-LC3 puncta formation within the cell. Western blot showed the expression of LC3-II was increased in T24 cells after treated with EPI, while the expression of P62 was decreased. TP combined with EPI and single groups both induced the expression

作者介绍: 杨帆, Email: 573469604@qq.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤。

通信作者: 何卫阳, Email: weiyang361@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81372758); 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: cstc2013jcyjA10058); 重庆市卫生局课题资助项目 (编号: 2012-2-001); 重庆市人力资源和保障局课题资助项目 (市级渝助 2013011)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2145.004.html>
(2015-03-08)

of active apoptosis proteins, and the effect was more obvious in TP plus EPI group. **Conclusion:** TP combined with EPI can synergistically inhibit the proliferation and promote cell apoptosis, which may be associated with the reduction of EPI-induced autophagy by TP.

[Key words] bladder cancer; autophagy; polyphenols; epirubicin

据报告估测, 2014 年全美将有 74 690 例膀胱癌新发病例, 15 580 位患者会因之去世, 膀胱癌发病率居男性肿瘤第 4 位^[1]。在我国, 膀胱癌是泌尿生殖系统中最常见的恶性肿瘤。化疗是目前主要治疗手段之一, 然而化疗耐药却严重影响了治疗效果, 化疗耐药的原因很多, 研究发现自噬是导致化疗药物抵抗的重要原因^[2-3], 而抑制细胞自噬是对抗肿瘤耐药的潜在途径, 抑制肿瘤细胞自噬联合化疗药物的应用, 有望成为有效的肿瘤治疗策略^[4]。蒽环类抗生素表柔比星(epirubicin, EPI)是表浅膀胱癌术后灌注常用化疗药物, 但其容易产生化疗耐药及毒副反应。研究表明抑制 EPI 化疗过程中诱导的细胞自噬, 可以增强细胞对 EPI 的化疗敏感性^[5-6]。茶多酚(tea polyphenols, TP)是从绿茶中提取出来的最主要成份, 研究证明 TP 可以作为良好的化疗药物增敏剂^[7-8]。设计良好的联合灌注化疗方案, 效果优于单剂化疗, 表现为疗效提高和副作用减少^[9], 本实验联合 TP 和 EPI, 研究 TP 能否增强膀胱癌 T24 细胞对 EPI 致凋亡的敏感性, 并研究自噬在其中的作用, 为克服膀胱癌多药耐药提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人膀胱癌 T24 细胞株由重庆医科大学肿瘤实验室赠予; RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自美国 Hy-Close 公司; MTT 为美国 Amresco 分装; EPI 购自江苏辉瑞制药有限公司; TP, 纯度 $\geq 98\%$ 购自上海永叶生物科技有限公司; 氯喹(chloroquine, CQ)、兔抗人 LC3-II 抗体购自美国 Sigma 公司; 鼠抗人 P62 抗体、鼠抗人 PARP 抗体、兔抗人 CASP3 抗体均购自美国 BD 公司; Actin 抗体购自钟鼎公司; 山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗购自博士德公司; 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司), 荧光显微镜(日本 Olympus 公司), 凝胶成像仪(法国 Vilber Lourmat 公司), 酶标仪(美国 Thermo 公司), 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司), 透射电镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 膀胱癌 T24 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中, 置 37℃, 5%CO₂ 饱和湿度培养箱中常规传代培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测不同剂量 EPI/TP 对 T24 细胞增殖的影响 取对数生长期的膀胱癌细胞, 以 5.0×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板中, 培养 12 h 待细胞贴壁后, 进行药物干预。分别加入不同浓度 TP (44.4、88.9、177.7、355.4、710.8、1 421.6 $\mu\text{mol/L}$), EPI (1.15、2.3、4.6、9.2、18.4、36.8 $\mu\text{mol/L}$), 每组设 4 个复孔, 每孔终体积为 200 μl 。培养 20 h 后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml)20 μl , 继续孵育 4 h 后吸去上清, 每孔加入 150 μl DMSO。用酶标仪于 570 nm 波长条件下测定吸光度值(absorbance, A), 筛选出 EPI/TP 的处理浓度。分空白对照组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) 组、TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$)+TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 组共 4 组, 分别处理 T24 细胞 24 h, 测定各组细胞增殖情况。实验重复 3 次, 取均值。计算各组细胞增殖抑制率, 增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{细胞对照组}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞仪 Annexin V/PI 双标法测细胞凋亡 取对数生长期的膀胱癌 T24 细胞, 分空白对照组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) 组、TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$)+TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 组, 各组经药物作用 24 h 后, 消化离心收集细胞, 按 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒说明进行操作, 1 h 内上流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.2.4 透射电镜扫描 取对数生长期 T24 细胞, 调整好细胞密度后接种于培养瓶中, 每瓶 4 ml 细胞悬液, 细胞贴壁后, 分空白对照组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) 组、TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$)+TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 组, 各组处理 8 h, 收集细胞。PBS 离心洗涤 2 次, 1 000 r/min, 5 min, 然后将细胞收集于离心管中, 加入 2.5% 戊二醛固定 2 h, PBS 洗 3 遍, 再用 4℃ 预冷的 1% 锇酸固定 1 h, 丙酮脱水, 树脂包埋, 超薄切片(50 nm), 经乙酸双氧铀和枸橼酸铅染色, 透射电镜观察细胞超微结构并拍照。

1.2.5 GFP-LC3 重组质粒在 T24 细胞内的表达和检测 瞬时转染 T24 细胞, T24 细胞计数, 按 1×10^5 个/孔铺 24 孔板, 培养至细胞密度达 30%~50% 时进行转染。各取 50 μl 不含血清的 RPMI1640 培养基分别稀释 1 μg 质粒、1 μl Lipofectamine 2000 试剂, 室温静置 5 min 后混合, 室温下再静置 20 min。转染复合物加入到 24 孔板, 100 μl /孔, 混匀, 孵育 6 h, 换新鲜的含 FBS 的 RPMI1640 培养基, 继续培养 12 h。荧光显微镜下观察细胞转染效果。G418 筛选出稳定转染的细胞, 分空白对照组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) 组、TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$)+TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 组, 不同处理条件培养 8 h。荧光显微镜下观察细胞内是否有绿色荧光蛋白的表达以及细胞内荧光蛋白是否发生点状聚集。

1.2.6 Western blot 检测 TP 作用 T24 细胞 0、2、4、8 h 不同时间 LC3-II 表达变化。再检测 TP 对 3-MA 作用于 T24 细胞的影响, 设空白对照组、EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) 组、TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$)

组、EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)+TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$), 分别收集各组细胞, PBS 洗涤、离心, 加裂解液提取蛋白。BCA 法检测蛋白浓度, 变性后每组取等量蛋白(40 μg)进行 SDS-PAGE 电泳分离, 将蛋白转移至 PDVF 膜上, 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入适当稀释浓度的一抗, 过夜, 复温 1 h, TBS-T 洗涤 3 次, 每次 10 min, 再滴加适当稀释浓度二抗, 37 $^{\circ}\text{C}$ 结合 2 h, TBST 洗涤后显色、曝光。

1.3 统计方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行单因素方差分析检验, 组间两两比较采用 LSD- t 检验, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 TP 增强 EPI 对 T24 细胞的增殖抑制

不同浓度 TP、EPI 处理 T24 细胞 24 h, 各组细胞均受到不同程度的增殖抑制, 不同浓度 EPI 组间有统计学差异(表 1), 不同浓度 TP 组间有统计学差异(表 2)。TP、EPI 半数抑制浓度(IC_{50})分别为(382.62 $\pm$ 6.72) $\mu\text{mol/L}$, (9.16 $\pm$ 0.91) $\mu\text{mol/L}$, 取 EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$ 约为 1/2 IC_{50} 浓度)和低毒剂量浓度 TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$)分别及联合作用 T24 细胞 24 h, 细胞增殖抑制率为: TP 组(0.148 0 $\pm$ 0.009 4), EPI 组(0.331 9 $\pm$ 0.008 1), 合用 TP+EPI 组为(0.469 1 $\pm$ 0.012 9)高于单药组, 单药组与合用组差异有统计学意义(表 3)。

表 1 不同浓度 TP 体外作用 24 h 对膀胱癌 T24 细胞增殖的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effects of different concentrations of TP on cell proliferation of T24 cells after 24 h ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度($\mu\text{mol/L}$)	抑制率	F 值和 P 值
TP 1 组	44.4	0.079 4 $\pm$ 0.001 8 ^a	
TP 2 组	88.9	0.148 0 $\pm$ 0.005 4 ^a	
TP 3 组	177.7	0.321 5 $\pm$ 0.017 6 ^a	$F=1118.157$
TP 4 组	355.4	0.558 0 $\pm$ 0.001 7 ^a	$P=0.000$
TP 5 组	710.8	0.672 1 $\pm$ 0.005 1 ^a	
TP 6 组	1421.6	0.753 1 $\pm$ 0.007 0 ^a	

注: a, 组间差异 $P<0.05$ ($P_{12}=0.009$; $P_{13}=0.000$; $P_{14}=0.000$; $P_{15}=0.000$; $P_{16}=0.000$; $P_{23}=0.000$; $P_{24}=0.000$; $P_{25}=0.000$; $P_{26}=0.000$; $P_{34}=0.000$; $P_{35}=0.000$; $P_{36}=0.000$; $P_{45}=0.012$; $P_{46}=0.000$; $P_{56}=0.000$)

表 2 不同浓度 EPI 体外作用 24 h 对膀胱癌 T24 细胞增殖的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effects of different concentrations of EPI on cell proliferation of T24 cells after 24 h ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度($\mu\text{mol/L}$)	抑制率	F 值和 P 值
EPI 1 组	1.15	0.148 9 $\pm$ 0.009 4 ^a	
EPI 2 组	2.3	0.225 5 $\pm$ 0.010 3 ^a	
EPI 3 组	4.6	0.331 9 $\pm$ 0.004 6 ^a	$F=538.287$
EPI 4 组	9.2	0.542 5 $\pm$ 0.009 8 ^a	$P=0.000$
EPI 5 组	18.4	0.667 8 $\pm$ 0.015 7 ^a	
EPI 6 组	36.8	0.744 7 $\pm$ 0.009 9 ^a	

注: a, 组间差异 $P<0.05$ ($P_{12}=0.000$; $P_{13}=0.000$; $P_{14}=0.000$; $P_{15}=0.000$; $P_{16}=0.000$; $P_{23}=0.007$; $P_{24}=0.000$; $P_{25}=0.000$; $P_{26}=0.000$; $P_{34}=0.000$; $P_{35}=0.000$; $P_{36}=0.000$; $P_{45}=0.000$; $P_{46}=0.000$; $P_{56}=0.001$)

表 3 TP 88.9 $\mu\text{mol/L}$ 、EPI 4.6 $\mu\text{mol/L}$ 分别及联合作用 24 h 对膀胱癌 T24 细胞增殖的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Tab.3 Effects of TP (88.9 $\mu\text{mol/L}$), EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) alone and in combination on cell proliferation of PC-3 cells after 24 h ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度($\mu\text{mol/L}$)	抑制率	F 值和 P 值
TP 1 组	88.9	0.148 0 $\pm$ 0.005 4 ^a	
EPI 2 组	4.6	0.331 9 $\pm$ 0.004 6 ^a	$F=730.411$
TP+EPI 3 组	88.9+2.3	0.469 1 $\pm$ 0.007 4 ^a	$P=0.000$

注: a, 组间差异 $P<0.05$ ($P_{12}=0.000$; $P_{13}=0.000$; $P_{23}=0.000$)

2.2 TP 增加 T24 细胞对 EPI 的凋亡敏感性

空白对照组细胞凋亡率(1.293 3 $\pm$ 0.176 7), TP 组(4.943 3 $\pm$ 0.522 7), EPI 组(11.703 3 $\pm$ 0.315 7), TP+EPI 组(20.586 7 $\pm$ 0.666 7), 组间差异有统计学意义($F=161.945$, $P=0.000$)。联合用药组细胞凋亡率明显高于其余各组, 差异有统计学意义($P=0.000$; $P=0.000$; $P=0.000$)(图 1)。

2.3 电镜下 TP 抑制 EPI 诱导的膀胱癌 T24 细胞自噬

透射电镜下观察, 空白对照组细胞内细胞膜、细胞器、细胞核等结构均正常; EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)作用 T24 细胞 8 h 后, 观察到胞质中出现大的膜状空泡, 成双层膜结构并弯曲延展, 包裹部分胞质成分和细胞器, 而 TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$)作用 T24 细胞 8 h 后, 细胞内结构同于空白对照组, 未发现自噬体结构。EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)、TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$)联合作用 8 h, 仅在个别视野出现单个自噬体, 自噬较 EPI 单药组明显减弱(图 2)。

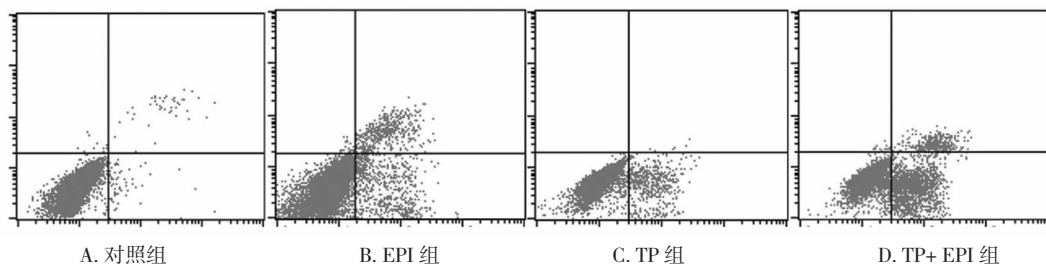


图 1 不同药物组处理 T24 细胞 24 h 凋亡值

Fig.1 Apoptosis rate of T24 after being treated with different drugs for 24 h

2.4 GFP-LC3-Ⅱ 转染

荧光显微镜下可见瞬时转染 GFP-LC3 重组质粒与空载质粒 GFP-C1 的 T24 细胞,空载组荧光强度和转染率稍高(图 3)。EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)单药作用 T24 细胞 8 h,镜下可见多个明亮的绿色荧光聚集体,单个细胞内 LC3-Ⅱ 荧光斑的数量和带 LC3-Ⅱ 荧光斑细胞的数量均明显增加;TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$)作用 8 h 组,镜下同于空白对照组,绿色荧光蛋白弥散分布在细胞浆中,无荧光聚集体形成;EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)与 TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$)联合作用组荧光聚集明显减少。组间比较有统计学意义

($F=1118.157, P=0.000$)。EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)单药组 LC3-Ⅱ 荧光斑点数量高于其余各组, EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)+TP(88.8 $\mu\text{mol/L}$)合用组与其余各组对比有统计学意义($P=0.000; P=0.000; P=0.000$)(图 4)。

2.5 Western blot

EPI(4.6 $\mu\text{mol/L}$)单药处 T24 细胞 0、2、4、8 h,结果 LC3-Ⅱ 表达量随着时间延长而增加,处理 8 h 引起自噬标志蛋白 LC3-Ⅱ 表达明显增加, P62 蛋白表达减弱。为进一步确认 LC3-Ⅱ 的升高是因自噬引起的,溶酶体抑制剂氯喹(CQ,

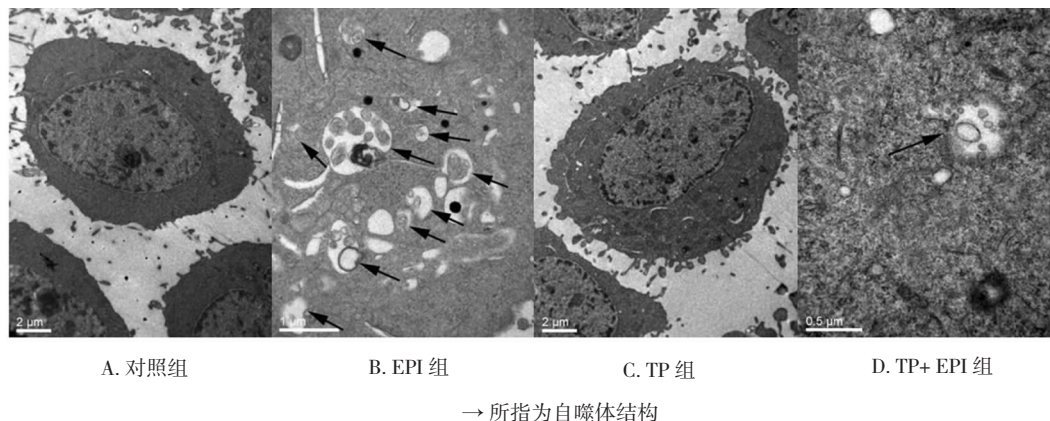
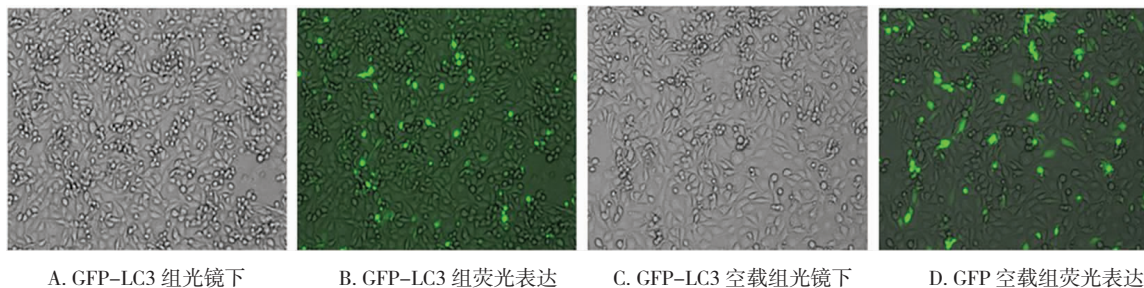


图 2 T24 细胞的超微结构

Fig.2 Ultra-structural cellular changes in T24 cells



A、B:瞬时转染 GFP-LC3 的 T24 细胞;C、D:瞬时转染空载 GFP 的 T24 细胞

图 3 瞬时转染 GFP 的 T24 细胞 (100 ×)

Fig.3 T24 transiently transfected with GFP (100 ×)

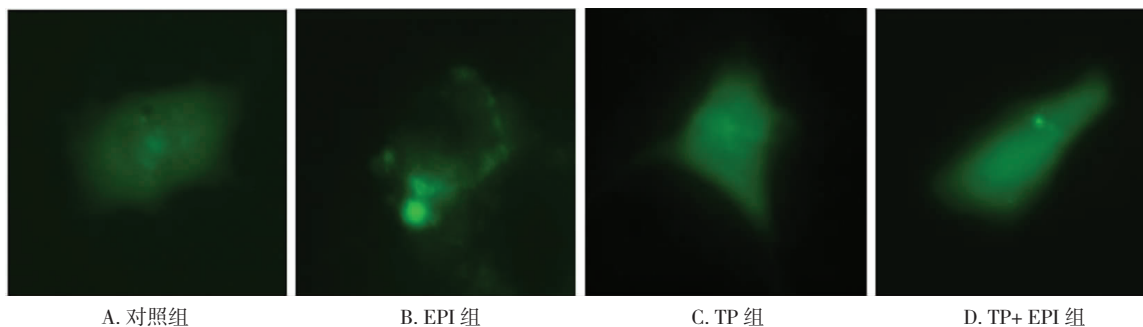
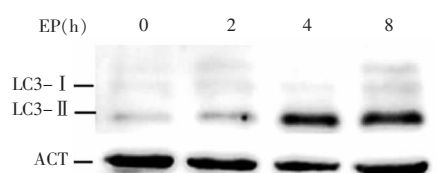


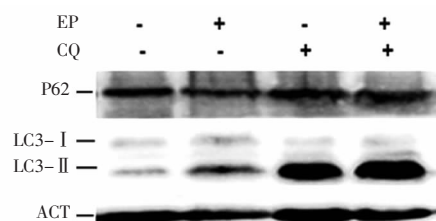
图 4 2 药对稳定表达 GFP-LC3 的 T24 细胞内 LC3-Ⅱ 表达的影响 (400 ×)

Fig.4 Effects of TP and EPI on expression of LC3-Ⅱ in T24 stably transfected with GFP-LC3 (400 ×)

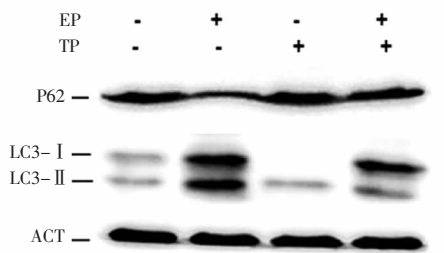
20 $\mu\text{mol/L}$) 预先处理 T24 细胞 30 min, 然后加入 EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) 联合作用检测自噬潮。结果 CQ+EPI 组 LC3-II 表达量较 CQ 单药组更高, EPI 组则相对较低, 说明 EPI 引起了自噬潮, LC3-II 的表达升高是因自噬引起, 而非自噬下游通路受阻, LC3-II 降解障碍所致 (图 5A、图 5B)。TP (88.8 $\mu\text{mol/L}$) 和 EPI (4.6 $\mu\text{mol/L}$) 分别及联合作用 T24 细胞 24 h, 与 EPI 单药组相比, 联合药物组自噬标志蛋白 LC3-II 明显下降, P62 表达同于空白对照组, 凋亡蛋白 cleaved-PARP、CASP3-active 表达明显升高 (图 5C、图 5D)。



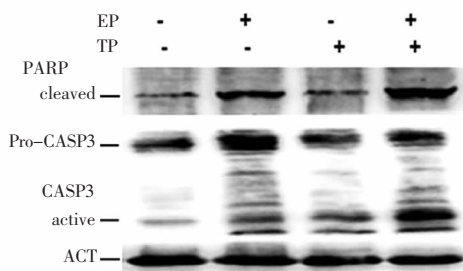
A. EPI 作用 T24 不同时间对 LC3 蛋白的影响



B. EPI 联合 CQ 引起自噬潮



C. TP 抑制 EPI 引起的细胞自噬



D. TP 联合 EPI 作用 T24, 增加 CASP3、PARP 蛋白的表达

图 5 两药对膀胱癌 T24 细胞 LC3-II、P62、CASP3、PARP 蛋白表达的 Western blot 结果

Fig.5 Effects of TP and EPI on expression of proteins of LC3-II、P62、CASP3 and PARP detected by Western blot

3 讨论

化疗对膀胱癌的控制和复发起着重要作用。新辅助化疗可降低肿瘤的分期, 提高部分膀胱切除率, 降低术中、术后的复发转移。膀胱内术后灌注化疗可降低肿瘤复发的机会及手术切除过程中肿瘤细胞种植转移的几率, 然而化疗药物耐药及其毒副作用, 限制了化疗的效果。如何提高化疗敏感性, 降低化疗药物毒副作用是近年来的研究热点。

自噬是以胞质内出现双层膜结构包裹长寿命蛋白和细胞器的自噬体为特征的细胞“自我消化”过程, 自噬与肿瘤的发生和发展具有重要关系, 是目前国际肿瘤研究领域的热点。研究发现肿瘤细胞受到损伤因素诱导时, 自噬可以成为细胞应激条件下的 1 种保护性反应。抑制自噬可以提高化疗药物诱导的细胞凋亡。众多研究证明, 化疗药物在作用肿瘤细胞的同时可以诱导自噬, 而联合应用自噬抑制剂 3MA、CQ、羟基氯喹, 或通过沉默自噬关键基因 ATG5、ATG6、ATG7、ATG8 等抑制自噬均能显著提高放化疗的效果, 并逆转放化疗的耐药^[10-13]。这提示肿瘤细胞在应对化疗药物杀伤的时候, 通过激活自噬维持细胞稳态, 适应细胞微环境的变化, 以此耐受化疗药物的细胞毒性。肿瘤细胞发生保护性自噬可能是细胞耐药的重要机制, 因此可以尝试抑制细胞自噬达到减少细胞耐药, 改善化疗效果。

EPI 是 1 种蒽环类抗生素, 为阿霉素的同分异构体, 毒性较阿霉素低, 是当前治疗多种癌症的临床一线用药。EPI 是表浅膀胱癌术后灌注常用化疗药物, 但其容易产生化疗耐药及毒副反应。研究发现 EPI 可以诱导乳腺癌细胞自噬, 抑制自噬能显著增强 EPI 的细胞毒性^[5-6]。孕酮可以抑制 EPI 作用肝癌细胞时引起的自噬, 增加肝癌细胞对 EPI 的凋亡敏感性^[14]。EPI 化疗过程中自噬的激活可能与其化疗耐药相关。因此可以尝试抑制 EPI 化疗过程中引起的细胞自噬, 降低肿瘤细胞的自我保护作用, 提高化疗效果。

TP 是从绿茶中提取出来的最主要成分。研究表明 TP 是 1 种高效低毒的抗癌药物, 可以作为 1 种很有前途的肿瘤化疗协同药物, 起到化疗药物增敏作用^[15-16]。这提示可以尝试 TP 联合化疗药物治疗肿瘤。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是 TP 的主要成分,据报道 EGCG 通过抑制自噬协同多柔比星杀伤肝癌 Hep3B 细胞^[17]。提示 TP 可以抑制自噬,增加化疗敏感性。

EPI 和 TP 的作用机制不同,毒性相异符合联合用药原则。众多研究证明 TP 是良好的化疗药物协同剂,TP 几乎无毒副作用,联合应用可以降低 EPI 的用量,减少化疗药物的不良反应,同时利用两者对细胞自噬的不同反应,改善化疗耐药,提高化疗效果,达到低剂量高效率的目的。本实验结果显示:TP 和 EPI 联合应用时,对 T24 细胞的增殖抑制率和细胞凋亡率明显高于单药组;EPI 处理 T24 细胞,透射电镜下观察到有自噬体的形成;GFP-LC3-Ⅱ转染,出现明显的 LC3-Ⅱ荧光斑聚集;Western blot 结果显示 LC3-Ⅱ表达增强,P62 表达下降,EPI 联合 CQ 引起了自噬潮,这些结果都证明,EPI 诱导膀胱癌 T24 细胞凋亡的同时,也诱导了细胞自噬,而 TP 单药处理组除在凋亡相关蛋白的表达上略高外,其它结果均同于空白对照组。TP 和 EPI 联合应用后,细胞自噬指标的表达降低,而凋亡相关蛋白 CASP3-Active、PARP-Cleaved 表达明显升高。说明 TP 可以抑制自噬,EPI 诱导的自噬在化疗过程中对肿瘤细胞有保护作用,当 EPI 联合 TP,自噬被抑制后,T24 细胞的凋亡率升高,凋亡相关蛋白的表达明显增加与此结果相符。综上所述,TP 可以抑制 EPI 诱导的保护性自噬增加膀胱癌 T24 细胞的凋亡。TP 和 EPI 联合应用为膀胱癌术后灌注化疗提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics, 2014[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] Sui X, Chen R, Wang Z, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment[J]. Cell Death Dis, 2013(4): e838.
- [3] Turcotte S, Giaccia AJ. Targeting cancer cells through autophagy for anticancer therapy[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 246-251.
- [4] Yang ZJ, Chee CE, Huang S, et al. Autophagy modulation for cancer therapy[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(2): 169-176.
- [5] Sun WL, Chen J, Wang YP, et al. Autophagy protects breast cancer cells from epirubicin-induced apoptosis and facilitates epirubicin-resistance development[J]. Autophagy, 2011, 7(9): 1035-1044.
- [6] Chittaranjan S, Bortnik S, Dragowska WH, et al. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(12): 3159-3173.
- [7] Chen D, Wan SB, Yang H, et al. EGCG, green Tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment[J]. Adv Clin Chem, 2011(53): 155-177.
- [8] Fujiki H, Suganuma M. Green tea: an effective synergist with anti-cancer drugs for tertiary cancer prevention[J]. Cancer Lett, 2012, 324(2): 119-125.
- [9] Chen CH, Yang HJ, Shun CT, et al. A cocktail regimen of intravesical mitomycin-C, doxorubicin, and cisplatin (MDP) for non-muscle-invasive bladder cancer[J]. Urol Oncol, 2012, 30(4): 421-427.
- [10] Xi G, Hu X, Wu B, et al. Autophagy inhibition promotes paclitaxel-induced apoptosis in cancer cells[J]. Cancer Lett, 2011, 307(2): 141-148.
- [11] Liu D, Yang Y, Liu Q, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells[J]. Med Oncol, 2011, 28(1): 105-111.
- [12] Ambjorn M, Eilerskov P, Liu Y, et al. IFNβ1/interferon-β-induced autophagy in MCF-7 breast cancer cells counteracts its proapoptotic function[J]. Autophagy, 2013, 9(3): 287-302.
- [13] He W, Wang Q, Xu J, et al. Attenuation of TNFSF10/TRAIL-induced apoptosis by an autophagic survival pathway involving TRAF2- and RIPK1/RIP1-mediated MAPK8/JNK activation[J]. Autophagy, 2012, 8(12): 1811-1821.
- [14] Chang WT, Cheng HL, Hsieh BS, et al. Progesterone increases apoptosis and inversely decreases autophagy in human hepatoma HA22T/VGH cells treated with epirubicin[J]. Scientific World Journal, 2014, doi: 10.1155/2014/567148. [Epub ahead of print].
- [15] Suganuma M, Saha A, Fujiki H. New cancer treatment strategy using combination of green tea catechins and anticancer drugs[J]. Cancer Sci, 2011, 102(2): 317-323.
- [16] Landis-Piwowar K, Chen D, Foldes R, et al. Novel epigallocatechin gallate analogs as potential anticancer agents: a patent review (2009-present)[J]. Expert Opin Ther Pat, 2013, 23(2): 189-202.
- [17] Chen L, Ye HL, Zhang G, et al. Autophagy inhibition contributes to the synergistic interaction between EGCG and doxorubicin to kill the hepatoma Hep3B cells[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85771.

(责任编辑:关蕴良)