

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003172

## 双氢青蒿素联合顺铂对膀胱癌细胞增殖的抑制作用

乔旭华, 谭智勇, 付 什, 王海峰, 左毅刚

(昆明医科大学第二附属医院泌尿外科、云南省泌尿系统疾病临床医学中心、云南省高校膀胱癌基础和临床研究科技创新团队, 昆明 650000)

**【摘要】目的:**初步了解双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)联合顺铂(cisplatin, DDP)抑制膀胱癌细胞增殖、侵袭转移的作用。**方法:**以膀胱癌细胞 T24/5637 为研究对象,通过 CCK-8 分别检测 2 种细胞系对 DDP 及 DHA 的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ );流式细胞仪检测 DHA 与 DDP 单独及联合应用时对 2 种细胞系周期和凋亡的影响;划痕实验、Transwell 实验检测 DHA 与 DDP 单独或联合应用时对膀胱癌细胞迁移、侵袭能力的影响。**结果:**DDP 对 5637 细胞的  $IC_{50}$  为  $17.10 \mu\text{g/mL}$ ,对 T24 细胞的  $IC_{50}$  为  $15.28 \mu\text{g/mL}$ ;DHA 对 5637 细胞的  $IC_{50}$  约为  $24.08 \mu\text{g/mL}$ ,对 T24 细胞的  $IC_{50}$  约为  $32.27 \mu\text{g/mL}$ 。DHA/DDP 单独用药组阻滞  $G_0/G_1$ 、S 期作用弱于联合用药组( $P<0.05$ ),单独用药及联合用药对  $G_2/M$  期的抑制作用无统计学意义。DHA 联合 DDP 可使 T24、5637 细胞凋亡率明显高于 DHA/DDP 单独应用( $P<0.05$ ),DDP 诱导细胞凋亡率明显高于 DHA( $P<0.05$ );在 24 h 时,2 种细胞 DHA 组迁移面积百分比大于 DDP 组( $P<0.05$ )及 DDP+DHA 组( $P<0.05$ ),DDP 组迁移面积百分比大于 DDP+DHA 组( $P<0.05$ )。24 h 后 DHA 组抑制率明显小于 DDP 组( $P<0.05$ )及 DDP+DHA 组( $P<0.05$ ),DDP 组抑制率明显小于 DDP+DHA 组( $P<0.05$ )。**结论:**DDP+DHA 可增强 DDP 抑制膀胱癌细胞增殖,DDP+DHA 可使 DDP 抑制膀胱癌细胞迁移侵袭的作用进一步增强。

**【关键词】**双氢青蒿素;顺铂;膀胱癌细胞增殖;抑制**【中图分类号】**R737.14**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-12-07

## Inhibitory effect of dihydroartemisinin combined with cisplatin on the proliferation of bladder cancer cells

Qiao Xuhua, Tan Zhiyong, Fu Shi, Wang Haifeng, Zuo Yigang

(Department of Urology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Institute of Urology)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effects of dihydroartemisinin (DHA) combined with cisplatin (DDP) on inhibiting the proliferation, invasion and metastasis of bladder cancer cells. **Methods:** The bladder cancer cells T24/5637 were used as research subjects, and half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of DDP and DHA were respectively detected by CCK-8. Flow cytometry was used to detect the effects of DHA and DDP alone or in combination on the cycle and apoptosis of the two cell lines. The effects of DHA and DDP alone or in combination on the migration and invasion of bladder cancer cells were detected by scratch test and Transwell test. **Results:** The  $IC_{50}$  of DDP against 5637 cells and T24 cells were  $17.10 \mu\text{g/mL}$  and  $15.28 \mu\text{g/mL}$ , respectively. The  $IC_{50}$  of DHA was  $24.08 \mu\text{g/mL}$  for 5637 cells and  $32.27 \mu\text{g/mL}$  for T24 cells. The blocking effect of DHA/DDP alone on  $G_0/G_1$  phase was weaker than that of the combination group ( $P<0.05$ ), and there was no statistical significance in the inhibition effect of DHA/DDP alone and in combination on  $G_2/M$  phase. The apoptosis rate of T24 and 5637 cells induced by DHA combined with DDP was significantly higher than that of DHA/DDP alone ( $P<0.05$ ), and the apoptosis rate induced by DDP was significantly higher than that of DHA ( $P<0.05$ ). At 24 h, the percentage of migration area in DHA group was larger than that in DDP group ( $P<0.05$ ) and DDP+DHA group ( $P<0.05$ ), and the percentage of migration area in DDP group was larger than that in DDP+DHA group ( $P<0.05$ ). After 24 h, the inhibitory rate of DHA group was significantly lower than that of DDP group ( $P<0.05$ ) and DDP+DHA group ( $P<0.05$ ), and the inhibitory rate of DDP group was significantly lower than that of DDP+DHA group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** DDP+DHA could enhance the inhibitory effect of DDP on the proliferation of bladder cancer cells, and DDP+DHA could further enhance the inhibitory effect of DDP on the migration and invasion of bladder cancer cells.

**【Key words】** dihydroartemisinin; cisplatin; proliferation of bladder cancer cells; inhibition

作者介绍: 乔旭华, Email: 1437687532@qq.com,

研究方向: 泌尿系肿瘤基础研究与应用。

通信作者: 王海峰, Email: highphone@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81860452); 昆医联合专项资助项目(编号: 202001AY070001-163); 昆明医科大学研究生创新基金资助项目(编号: 2021S208)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail//50.1046.R.20230220.0906.010.html>  
(2023-02-21)

青蒿素是从植物黄花蒿茎叶中提取的有过氧基团的倍半萜内酯药物。自屠呦呦研究发现青蒿素可用于治疗疟疾后,青蒿素及其衍生物的生物作用研究吸引了全世界的目光<sup>[1]</sup>。目前很多研究都揭示青蒿素的衍生物如青蒿琥酯、双氢青蒿素(dihydro-artemisinin, DHA)、蒿甲醚等有抗肿瘤作用。DHA 作为肿瘤细胞增殖抑制剂,具有明显的肿瘤选择性,对正常细胞的毒性极低<sup>[2]</sup>。DHA 可通过诱导癌细胞凋亡、细胞周期停滞而起抑制癌细胞增殖、生长、转移和血管形成的作用<sup>[3-4]</sup>。DHA 在膀胱癌中的研究较少, Humphreys C 等<sup>[5]</sup>发现 DHA、青蒿琥酯和蒿甲醚对 RT-112 膀胱癌细胞有毒性,而 DHA 的毒性最强。进一步探究发现 DHA 诱导膀胱癌细胞 EJ-138 和 HTB-9 凋亡有浓度依赖性, DHA 作用于 2 个细胞系可以通过促进癌细胞活性氧的产生、影响线粒体膜电位变化、激活细胞色素 c 的方式诱导癌细胞凋亡<sup>[6]</sup>。Wang T 等<sup>[7]</sup>研究发现 DHA 作用于正常尿路上皮细胞其毒性反应远低于膀胱癌细胞, DHA 作用于 T24 膀胱癌细胞系可以下调赖氨酸去甲基化酶 3A 表达,进而抑制膀胱癌细胞增殖、迁移,以及促进癌细胞凋亡。因此, DHA 有望在未来成为一种安全有效的新型膀胱癌治疗药物,联合其他化疗药物有可能克服或绕过耐药性,进而增加肿瘤化疗耐药敏感性。

膀胱癌的化疗是以顺铂(cisplatin, DDP)为基础的联合用药为主,目前 DDP 联合吉西他滨作为膀胱癌的一线化疗方案,但联合用药副作用大,易发生耐药性。为了给膀胱癌化疗方案提供新的思路,本实验初步探索 DHA+DDP 抑制膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

人膀胱癌细胞 5637 和人膀胱移行细胞癌细胞 T24 由昆明医科大学第二附属医院中心实验室提供。

### 1.2 试剂

二甲基亚砜,规格 125 mL/瓶;RPMI1640 基础培养基,规格 500 mL/瓶;胎牛血清,规格 500 mL/瓶;0.25% 胰酶,规格 100 mL/瓶;PBS,规格 500 mL/瓶;CCK-8 试剂盒,规格 100T;细胞凋亡和细胞周期检测试剂盒,规格 50T;DHA:规格 20 mg/支;DDP,规格 100 mg/瓶。以上试剂均由大连美仑生物技术有限公司提供。Transwell 小室,规格 3422;基质胶 5 mL,由康宁公司提供。

### 1.3 设备

离心机、流式细胞仪、细胞培养箱、显微镜、超净工作台。

### 1.4 实验方法

1.4.1 CCK-8 检测膀胱癌细胞增殖活性 将 2 种细胞分别接入 96 孔板,分成 8 组,每孔 3 个重复,每孔细胞量约 2 500

个,过夜培养后加入不同浓度 DHA(0、0.1、1、10、20、40、80、160  $\mu\text{g/mL}$ )和 DDP(0、2.5、5、10、20、40  $\mu\text{g/mL}$ )各 50  $\mu\text{L}$ ,放回 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱作用 24 h 后,CCK-8 检测细胞增殖活性,细胞活力=(实验孔 OD-空白组 OD)/(对照组 OD-空白组 OD) $\times 100\%$ 。根据 CCK-8 检测结果计算 DHA、DDP 在 2 种细胞中的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ ),筛选出的 DHA、DDP 浓度用于细胞周期、凋亡、侵袭、迁移实验用。进行细胞周期凋亡、侵袭转移实验分组:①DDP 组;②DHA 组;③DDP+DHA 组;④对照组。每组实验都进行 3 个重复。

1.4.2 流式细胞仪检测膀胱癌细胞周期和凋亡 前一天将膀胱癌细胞(T24/5637)以一定数量( $6\times 10^5$ 个/mL)接种于 6 孔板中,在 6 孔板中加入 2 mL 含有血清的培养基中进行培养。次日贴壁后更换无血清培养基,在培养基中加入不同浓度的药物:①1 mL 浓度 2.5  $\mu\text{g/mL}$  DDP+1 mL 培养基;②1 mL 浓度 10  $\mu\text{g/mL}$  DHA+1 mL 培养基;③1 mL 浓度 2.5  $\mu\text{g/mL}$  DDP+1 mL 浓度 10  $\mu\text{g/mL}$  DHA;④对照组加入等体积 DMSO 培养基,形成含有不同终浓度药物的培养体系。放回 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱作用 24 h 后,流式细胞仪检测细胞周期和细胞凋亡。

1.4.3 划痕实验检测细胞迁移能力 用 Marker 笔在 6 孔板背后画横线,每孔穿过 5 条均匀且平行的线。在孔内接种约  $6\times 10^5$  个细胞,培养箱内放置 24 h 培养,24 h 后用 20  $\mu\text{L}$  灭菌枪头垂直孔板背后的黑线划痕,使划痕与标记线相交。划线完成后,使用无菌 PBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,使留下的间隙肉眼即清晰可见,然后按照实验分组加入相应试剂(①1 mL 浓度 2.5  $\mu\text{g/mL}$  DDP+1 mL 培养基;②1 mL 浓度 10  $\mu\text{g/mL}$  DHA+1 mL 培养基;③1 mL 浓度 2.5  $\mu\text{g/mL}$  DDP+1 mL 浓度 10  $\mu\text{g/mL}$  DHA;④对照组加入等体积 DMSO 培养基)。将细胞继续放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。然后在 0、12、24 h 后取出细胞,划痕后 0 h 为起点,倒置显微镜下明场拍照观察(40 倍视野),以划痕两侧细胞相互接触作为观察终点。通过 Image J 软件对各观察时间点的划痕面积进行分析。

1.4.4 Transwell 实验检测细胞侵袭能力 Matrigel 在 4 $^{\circ}\text{C}$  融化,用无血清培养基稀释,稀释比例 1:8。取 50  $\mu\text{L}$  已混合均匀的 Matrigel 加入 Transwell 小室中,使 Matrigel 均匀铺在 Transwell 膜上,铺好后放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱 30 min 使胶体凝固。用无血清培养基将细胞浓度调整为  $1\times 10^5$  个/mL,接种 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液至有 Transwell-Matrigel 小室的 24 孔板,按分组加入相应试剂(在培养基中加入不同浓度的药物:①1 mL 浓度 2.5  $\mu\text{g/mL}$  DDP+1 mL 培养基;②100  $\mu\text{L}$  浓度 10  $\mu\text{g/mL}$  DHA+100  $\mu\text{L}$  培养基;③100  $\mu\text{L}$  浓度 2.5  $\mu\text{g/mL}$  DDP+100  $\mu\text{L}$  浓度 10  $\mu\text{g/mL}$  DHA;④对照组加入等体积 DMSO 培养基),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  培养箱内作用 24 h。24 h 后将 Transwell 小室取出移入加有 1 mL 4% 多聚甲醛固定液的孔内,小心吸干上室液体,往上室小心滴加 200  $\mu\text{L}$  4% 多聚甲醛固定液,室温固定 30 min。将 Transwell 小室取出,吸取固定液,用棉签小心擦去 Matrigel 胶,把小室放入加有 500  $\mu\text{L}$  结晶紫染色液的孔中,室温染色 15 min。染色后 PBS 清洗 3 次,如发现染液有残余可适当增加清洗次数,100 倍镜下观察拍照。随机选取 3 个视野,使用 Image J 软件进行细胞计数分析。

## 1.5 统计学处理

用 SPSS 25.0 进行统计学分析。各组对比用单因素方差分析, 绘图用 Graph-Pad 8.0。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 CCK-8 检测结果

DHA 对膀胱癌细胞 T24 和 5637 增殖的抑制作用随浓度增加而增加, 将 0~160  $\mu\text{g/mL}$  DHA, 0~40  $\mu\text{g/mL}$  DDP 作用于 5637、T24 细胞 24 h 后, DDP 对 5637 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为 17.1  $\mu\text{g/mL}$ , DHA 对 5637 细胞的  $\text{IC}_{50}$  约为 24.08  $\mu\text{g/mL}$ ; DDP 对 T24 细胞的  $\text{IC}_{50}$  为 15.21  $\mu\text{g/mL}$ , DHA 对 T24 细胞的  $\text{IC}_{50}$  约为 32.27  $\mu\text{g/mL}$ 。 $\text{IC}_{50}$  曲线如图 1 所示。

### 2.2 流式细胞仪检测膀胱癌细胞周期和凋亡

DDP 与 DHA 固定浓度配比单独和联合作用于膀胱癌细胞 T24/5637 后 24 h 后细胞周期死亡率、各细胞周期的占比影响见图 2, 对统计结果进行单因素方差统计分析得出: DHA、DDP 单独或联合作用于 T24/5637 细胞 24 h 后与对照组比较均可阻止细胞  $\text{G}_0/\text{G}_1$  期 ( $P_{\text{T24DHA}}=0.042$ ,  $P_{\text{T24DDP}}=0.001$ ,  $P_{\text{T24DHA+DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DHA+DDP}}<0.001$ )、S 期 ( $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DHA+DDP}}<0.001$ )、T24 M 期 ( $P_{\text{T24DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DHA+DDP}}<0.001$ ), 但对 5637  $\text{G}_2/\text{M}$  期无统计学意义 ( $P_{\text{5637DHA}}=0.64$ ,  $P_{\text{5637DDP}}=0.880$ ,  $P_{\text{5637DHA+DDP}}=0.330$ ,  $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DHA+DDP}}<0.001$ )。DHA/DDP 单独用药与联合用药组  $\text{G}_0/\text{G}_1$  期比较:  $P_{\text{T24DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DDP}}=0.007$ ,  $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ; DHA/DDP 单独用药与联合用药组 S 期比较:  $P_{\text{T24DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DDP}}=0.015$ ,  $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ; DHA/DDP 单独用药与联合用药组 M 期比较:  $P_{\text{T24DHA}}=0.378$ ,  $P_{\text{T24DDP}}=0.328$ ,

$P_{\text{5637DHA}}=0.878$ ,  $P_{\text{5637DDP}}=0.401$ ; DHA、DDP 单用或联合导致 T24/5637 细胞凋亡率与对照组比较:  $P_{\text{T24DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DHA+DDP}}<0.001$ ;  $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DHA+DDP}}<0.001$ ; DHA、DDP 单用与 DHA+DDP 联用凋亡率比较:  $P_{\text{T24DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DDP}}<0.001$ ;  $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DHA+DDP}}<0.001$ 。结果见图 2。

### 2.3 划痕实验检测膀胱癌细胞迁移能力

通过划痕实验探究 DHA 和 DDP 单用和联合时对膀胱癌细胞的迁移能力影响 (图 3)。以起始划痕面积为 100%, 24 h 为 2 种膀胱癌细胞的观测终点, 迁移面积与起初面积百分比统计柱形图见图 4。加药组与空白组在 12 h、24 h 迁移面积百分比有差异 ( $P_{\text{T24DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DHA+DDP}}<0.001$ ;  $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DHA+DDP}}<0.001$ ); 在 12 h 时, 膀胱癌细胞 5637/T24 DDP 组与 DDP+DHA 组迁移面积百分比无统计学意义 ( $P_{\text{5637}}=0.064$ ,  $P_{\text{T24}}=0.064$ ), 膀胱癌细胞 5637/T24 DHA 组迁移面积百分比大于 DDP+DHA 组 ( $P_{\text{T24}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637}}<0.001$ ); 在 24 h 时, 膀胱癌细胞 5637/T24 DHA 组迁移面积百分比大于 DDP+DHA 组 ( $P_{\text{T24}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637}}<0.001$ ); 膀胱癌细胞 5637/T24 DDP 组迁移面积百分比大于 DDP+DHA 组 ( $P_{\text{T24}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637}}<0.001$ )。

### 2.4 Transwell 实验检测膀胱癌细胞侵袭能力

Transwell 侵袭实验结果见图 5, 穿出膜的细胞与空白组作对比, 抑制率 =  $[1 - (\text{穿出膜的细胞数} / \text{原细胞数})] \times 100\%$ , 抑制率结果作柱形图见图 6。24 h 后 DHA 组、DDP 组、DDP+DHA 组与空白组比较抑制率有统计学意义 ( $P_{\text{T24DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{T24DHA+DDP}}<0.001$ ;  $P_{\text{5637DHA}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DDP}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637DHA+DDP}}<0.001$ ), DHA 组与 DDP+DHA 组抑制率比较有统计学意义 ( $P_{\text{T24}}<0.001$ ,  $P_{\text{5637}}<0.001$ ), DDP 组与 DDP+DHA 组抑制率比较有统计学意义 ( $P_{\text{T24}}<0.007$ ,  $P_{\text{5637}}<0.001$ )。

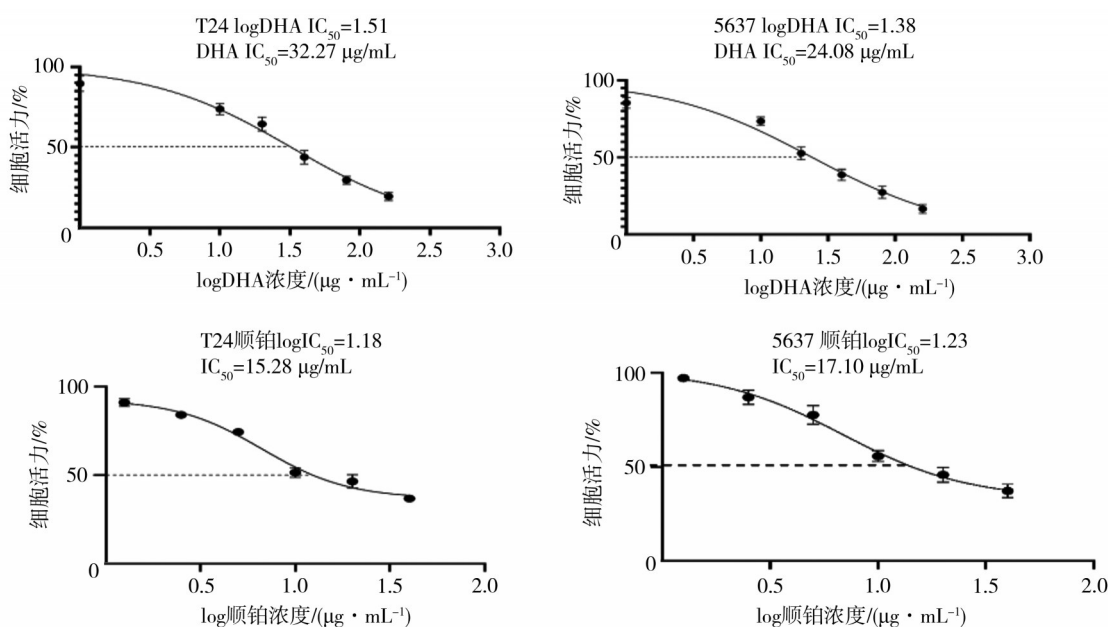


图 1 5637/T24 细胞分别加入 DDP、DHA 培养 24 h 后的  $\text{IC}_{50}$  曲线



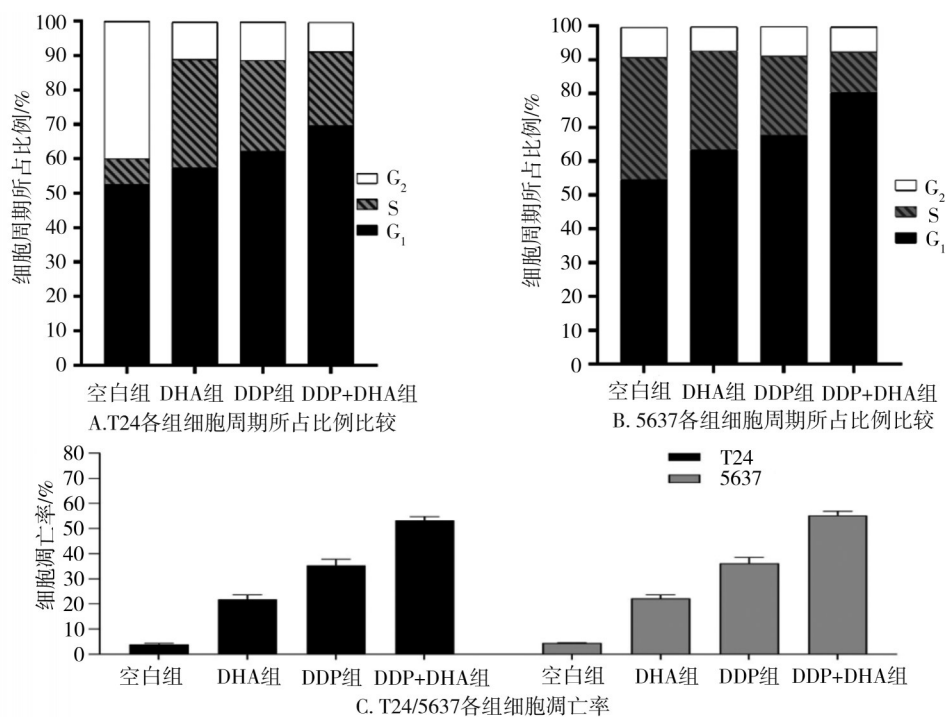


图2 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡统计图

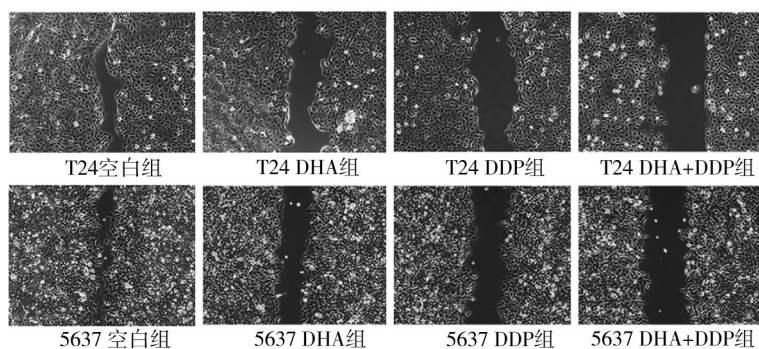


图3 24 h 时 T24/5637 各组细胞划痕黑白转换图

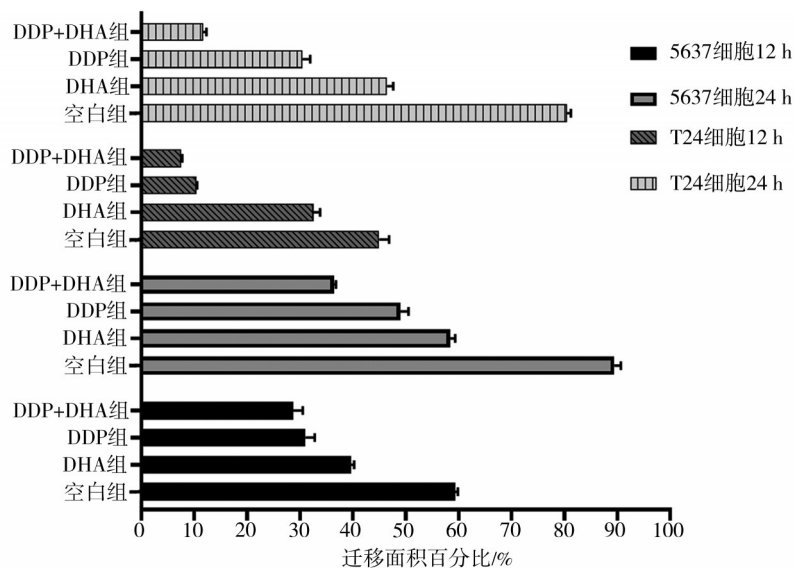


图4 12 h、24 h 时 T24/5637 各组细胞迁移面积百分比柱形图

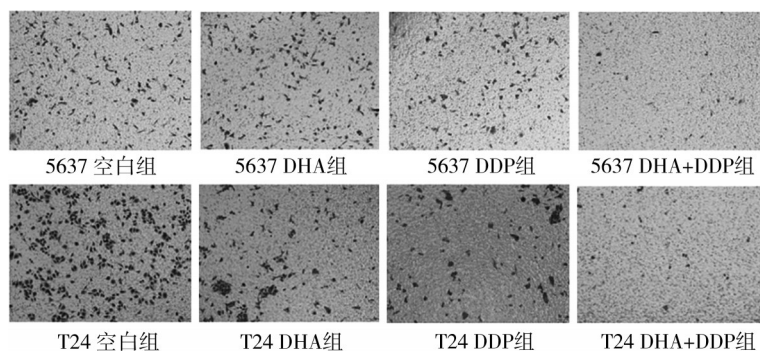


图5 T24/5637 细胞 Transwell 侵袭实验黑白转换图

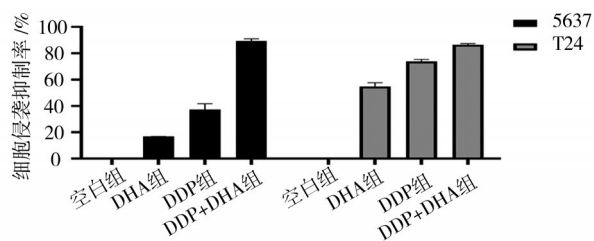


图6 24 h 时 T24/5637 各组细胞侵袭抑制率柱形图

### 3 讨论

膀胱癌是泌尿系最常见的癌症之一,2020 全球癌症数据统计显示膀胱癌在死亡率和发病率排在第 12 位,中国膀胱癌新发病例 85 694 例,占全球的 14.9%,中国膀胱癌死亡病例 39 393 例,占全球的 18.5%。未来 5 年,我国膀胱癌新发和死亡病例仍将持续增长。随着人口老龄化,未来 5 年中国膀胱癌新发和死亡病例预计超过 10 万和 4.8 万<sup>[8-9]</sup>。膀胱癌目前在临床病理上分为肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer, MIBC)和非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)。虽然大约 75% 的膀胱癌患者是 NMIBC,但 NMIBC 治愈率高死亡率低<sup>[10]</sup>。相比之下,MIBC 具有明显的肿瘤异质性,恶性程度较高,易发生早期转移,致死率极高。可手术切除的 MIBC 以新辅助化疗联合手术切除为主要治疗方案,不可手术治疗的 MIBC 以全身系统治疗为主<sup>[11]</sup>。目前 MIBC 的新辅助化疗或辅助化疗均以 DDP 为基础的联合化疗方式为主,目前 DDP 联合吉西他滨是膀胱癌化疗的标准一线方案,目前一些临床研究都揭示了吉西他滨联合 DDP 的治疗方案优于培美曲塞联合 DDP、DDP 联合甲氨蝶呤和长春花碱及阿霉素<sup>[12-13]</sup>。DDP 联合吉西他滨虽作为一线化疗方案,但有易发生耐药、化学毒性反应大等弊端,需要不断探索联合 DDP 可增加化疗敏感性且化学毒性低的新药作为膀胱癌化疗

的二线治疗方案或者新的替代化疗方案。

细胞周期是细胞生命的基本过程,细胞周期停滞可以直接抑制细胞生长。目前有研究表明 DHA 在食管癌<sup>[14]</sup>、卵巢癌<sup>[15]</sup>等癌症中可阻滞癌细胞周期。本研究通过流式细胞检测发现 DHA 可以阻滞膀胱癌细胞 T24/5637 于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、S 期( $P < 0.05$ ),再次论证 DHA 确实可以抑制膀胱癌细胞的生长,本研究未对 DHA 阻滞癌细胞周期机制深入探究。本研究发现 DDP 抑制膀胱癌细胞生长的作用弱于 DHA 联合 DDP( $P < 0.05$ ),DHA 联合 DDP 主要阻滞膀胱癌细胞 T24/5637 的周期于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期。这表明 DHA 可能通过某种机制调节 DDP 对膀胱癌细胞的化疗敏感性,这需要更多的研究佐证。

DHA 可作为抗癌剂诱导癌细胞凋亡,在膀胱癌中也有诱导癌细胞凋亡的作用,且对正常尿路上皮细胞无毒性作用<sup>[7,16]</sup>。本研究进一步揭示了 DDP 可诱导膀胱癌细胞 T24/5637 凋亡。DDP 是治疗膀胱癌、血液癌、乳腺癌、宫颈癌等人类癌症的基础用药。DDP 诱导癌细胞凋亡主要的分子作用机制与细胞凋亡的内在和外在途径诱导有关,也有研究表明与细胞自噬有关,调节 DDP 诱导细胞凋亡的敏感性是解决 DDP 发生耐药的途径之一<sup>[17]</sup>。本研究发现 DDP 联合 DHA 诱导膀胱癌细胞 T24/5637 凋亡率明显高于 DDP 单独应用,说明 DHA 可促进 DDP 诱导膀胱癌细胞 T24/5637 凋亡,但未进一步探究 DHA 与 DDP 联合应用时的最适浓度,以及 DHA 是通过何种途径增强 DDP 诱导膀胱癌细胞凋亡的敏感性。

肿瘤的侵袭和转移是恶性肿瘤最显著的生物学特征,是导致恶性肿瘤患者死亡的主要原因,膀胱癌有高侵袭和高转移的生物学特性,NMIBC 虽不能危及生命但有高复发率的特性,10%~20% 的 NMIBC 会进展为 MIBC。MIBC 有高转移倾向,死亡率高<sup>[18]</sup>。因此,不断探究膀胱癌侵袭和转移的治疗方案有望降低膀胱癌的死亡率。目前的研究表明

以 DDP 为基础用药的联合用药对膀胱癌的侵袭转移治疗效果较好,如以 DDP 为基础用药的新辅助化疗方案,对膀胱癌肿瘤可以起到降低肿瘤分期的作用<sup>[19]</sup>。既往研究表明 DHA 可以抑制膀胱癌细胞的迁移和侵袭,本研究再一次验证了 DHA 可以抑制膀胱癌细胞 T24/5637 迁移和侵袭<sup>[7]</sup>。12 h DDP、DHA 单用或联合应用时对 2 种膀胱癌细胞的迁移抑制作用无统计学意义,其原因考虑是 2 种膀胱癌细胞生长时间不足,故侵袭实验观测终点设在 24 h,在侵袭及迁移实验统计图中也可看出 5637 比 T24 更适合行侵袭迁移实验。这与 Yang NG 等<sup>[20]</sup>的研究结果一致。本研究中,24 h DDP 联合 DHA 抑制膀胱癌细胞迁移和侵袭作用明显强于 2 种药物单独应用,故推测 DDP 联合 DHA 可以增强 DDP 抑制膀胱癌细胞侵袭和转移的作用。

本研究再一次对 DDP/DHA 可抑制膀胱癌细胞增殖进行验证,且 DDP 抑制膀胱癌细胞增殖的作用明显强于 DHA,故 DHA 不能替代 DDP 作为单独的化疗药物。通过对细胞周期、凋亡侵袭转移的实验,首次揭示了 DHA 联合 DDP 可增强 DDP 抑制膀胱癌细胞增殖的作用,不足的是未进行与 DDP 联合吉西他滨联合用药作对比,但目前可以肯定的是 DHA 对正常组织细胞的毒性远低于吉西他滨。进一步探究 DHA 联合 DDP 抗膀胱癌肿瘤的机制有一定的临床应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] 朱乘光,任 彪,程 磊,等. 青蒿素及其衍生物对口腔相关微生物的影响[J]. 四川大学学报(医学版),2020,51(6):760-766.  
Zhu CG, Ren B, Cheng L, et al. Effects of artemisinin and its derivatives on oral microbes[J]. J Sichuan Univ (Med Sci), 2020, 51(6):760-766.
- [2] Malami I, Bunza AM, Alhassan AM, et al. Dihydroartemisinin as a potential drug candidate for cancer therapy: a structural-based virtual screening for multitarget profiling[J]. J Biomol Struct Dyn, 2022, 40(3):1347-1362.
- [3] Hu H, Wang ZD, Tan CL, et al. Dihydroartemisinin/miR-29b combination therapy increases the pro-apoptotic effect of dihydroartemisinin on cholangiocarcinoma cell lines by regulating Mcl-1 expression[J]. Adv Clin Exp Med, 2020, 29(8):911-919.
- [4] Liu YM, Gao SJ, Zhu J, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer via inhibition of the hedgehog signaling pathway[J]. Cancer Med, 2018, 7(11):5704-5715.
- [5] Humphreys C, Cooper AJ, Barbu E, et al. Artemisinins as potential anticancer agents: uptake detection in erythrocytes using Fourier transform infrared spectroscopy and cytotoxicity against bladder cancer cells[J]. J Clin Pathol, 2016, 69(11):962-967.
- [6] Poupel F, Aghaei M, Movahedian A, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis in human bladder cancer cell lines through reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential, and cytochrome C pathway[J]. Int J Prev Med, 2017, 8:78.
- [7] Wang T, Luo RT, Li W, et al. Dihydroartemisinin suppresses bladder cancer cell invasion and migration by regulating KDM3A and p21[J]. J Cancer, 2020, 11(5):1115-1124.
- [8] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.
- [9] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7):783-791.
- [10] Patel VG, Oh WK, Galsky MD. Treatment of muscle-invasive and advanced bladder cancer in 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(5):404-423.
- [11] 何 旺,黄 健. 2020 版 EAU 膀胱癌指南更新解读之一[J]. 中华泌尿外科杂志, 2020, 41(7):492-493.  
He W, Huang J. Update of the EAU Bladder Cancer Guidelines 2020[J]. Chin J Urology, 2020, 41(7):492-493.
- [12] Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, et al. European association of urology guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2020 guidelines[J]. Eur Urol, 2021, 79(1):82-104.
- [13] Roberts JT, von der Maase H, Sengeløv L, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine/cisplatin and methotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatin in patients with locally advanced and metastatic bladder cancer[J]. Ann Oncol, 2006, 17(Suppl 5):v118-v122.
- [14] Ma Q, Liao HB, Xu L, et al. Autophagy-dependent cell cycle arrest in esophageal cancer cells exposed to dihydroartemisinin[J]. Chin Med, 2020, 15:37.
- [15] Li BN, Bu SX, Sun JY, et al. Artemisinin derivatives inhibit epithelial ovarian cancer cells via autophagy-mediated cell cycle arrest[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(12):1227-1235.
- [16] Li QR, Ma Q, Cheng JB, et al. Dihydroartemisinin as a sensitizing agent in cancer therapies[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14:2563-2573.
- [17] Tchounwou PB, Dasari S, Noubissi FK, et al. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy[J]. J Exp Pharmacol, 2021, 13:303-328.
- [18] Martinez Rodriguez RH, Buisan Rueda O, Ibarz L. Bladder cancer: present and future[J]. Med Clin (Barc), 2017, 149(10):449-455.
- [19] Rimar KJ, Glaser AP, Kundu S, et al. Changes in lean muscle mass associated with neoadjuvant platinum-based chemotherapy in patients with muscle invasive bladder cancer[J]. Bladder Cancer, 2018, 4(4):411-418.
- [20] Yang NG, Gao J, Hou RZ, et al. Grape seed proanthocyanidins inhibit migration and invasion of bladder cancer cells by reversing EMT through suppression of TGF- $\beta$  signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021:5564312.

(责任编辑:唐秋姗)