

苦豆碱抑制膀胱癌 253J 细胞增殖的作用及
机制研究Inhibitory effect and mechanism of aloperin on proliferation of bladder carcinoma
253J cells高义胜^{1a,2}, 李敬东^{1b}, 何相飞^{1a},
高磊^{1a}, 徐纪元^{1a}, 左世帅^{1a}(1. 临沂市人民医院, a. 泌尿外科; b. 肿瘤内
科, 山东 临沂 276000; 2. 广州中医药大学 临沂
市人民医院研究生培养基地, 山东 临沂 276000)GAO Yi - sheng^{1a,2}, LI Jing - dong^{1b},
HE Xiang - fei^{1a}, GAO Lei^{1a},
XU Ji - yuan^{1a}, ZUO Shi - shuai^{1a}(1. a. Department of Urology; b.
Department of Oncology, Linyi People's
Hospital, Linyi 276000, Shandong
Province, China; 2. Graduate Training
Base, Linyi People's Hospital of
Guangzhou University of Traditional
Chinese Medicine, Linyi 276000,
Shandong Province, China)基金项目: 山东省中医药科技发展计划基金资
助项目(M-2022106)作者简介: 高义胜(1986-), 男, 副主任医师, 主
要从事中西医结合防治泌尿系肿瘤
的研究

通信作者: 高磊, 副主任医师

MP: 15953939769

E-mail: westprince@163.com

摘要:目的 探究苦豆碱对膀胱癌细胞生长及内质网应激依赖线粒体途径的调控作用。方法 将253J细胞随机分为对照组、低剂量实验组(25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦豆碱)、中剂量实验组(50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦豆碱)、高剂量实验组(100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦豆碱)、4-PBA组[100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦豆碱 + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-苯基丁酸(4-PBA)]、si-NC组(转染 si-NC + 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦豆碱)、si-CHOP组[转染 si-C/EBP同源蛋白(CHOP) + 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 苦豆碱]。用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)实验检测细胞增殖,用蛋白质印迹法检测相关蛋白表达,用流式细胞术检测细胞凋亡,用JC-1法检测线粒体膜电位(MMP)水平。**结果** 对照组、低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组 EdU 阳性细胞率分别为(37.51 $\pm$ 2.98)%、(29.52 $\pm$ 2.19)%、(23.10 $\pm$ 2.58)%和(12.94 $\pm$ 2.52)%,CHOP蛋白相对表达水平分别为0.29 $\pm$ 0.04、0.53 $\pm$ 0.05、0.71 $\pm$ 0.08和0.90 $\pm$ 0.12;对照组、高剂量实验组、4-PBA组细胞凋亡率分别为(4.79 $\pm$ 0.62)%、(23.01 $\pm$ 2.03)%和(13.75 $\pm$ 1.14)%;对照组、高剂量实验组、si-NC、si-CHOP组细胞CHOP蛋白表达分别为0.30 $\pm$ 0.03、0.92 $\pm$ 0.08、0.91 $\pm$ 0.11和0.20 $\pm$ 0.02,细胞凋亡率分别为(4.39 $\pm$ 0.30)%、(22.11 $\pm$ 1.82)%、(22.65 $\pm$ 2.40)%和(15.32 $\pm$ 1.19)%,线粒体细胞色素C(Cyto-C)蛋白相对表达水平为0.78 $\pm$ 0.07、0.43 $\pm$ 0.05、0.42 $\pm$ 0.05和0.65 $\pm$ 0.06,细胞质Cyto-C蛋白相对表达水平为0.51 $\pm$ 0.06、0.91 $\pm$ 0.10、0.88 $\pm$ 0.05和0.61 $\pm$ 0.04,MMP水平分别为(100.00 $\pm$ 2.79)%、(57.49 $\pm$ 3.34)%、(54.09 $\pm$ 4.32)%和(69.91 $\pm$ 6.81)%;低、中、高剂量组的上述指标分别与对照组比较,4-PBA组的上述指标与高剂量实验组比较,si-CHOP组的上述指标与si-NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。**结论** 苦豆碱可通过上调CHOP介导内质网应激依赖的线粒体凋亡途径抑制253J细胞增殖。

关键词: 苦豆碱;膀胱癌;内质网应激;线粒体凋亡;增殖

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.05.015

中图分类号:R28 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)05-0676-05

Abstract: Objective To investigate the regulatory effects of aloperin on bladder cancer cell growth and endoplasmic reticulum stress-dependent mitochondrial pathway. **Methods** 253J cells were randomly divided into control group, experimental - L group (25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ aloperin), experimental - M group (50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ aloperin), experimental - H group (100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ aloperin), 4-PBA group [100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ aloperin + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-phenylbutyric acid (4-PBA)], si-NC (transfected with si-NC + 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

aloperin), si-CHOP group [transfected with si-CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) + 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ aloperin]. Cell proliferation was detected by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) assay; protein expression was detected by Western blot assay; apoptosis was detected by flow cytometry; mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by JC-1 assay. **Results** The EdU positive cell rates in control group, experimental-L group, experimental-M group and experimental-H group were $(37.51 \pm 2.98)\%$, $(29.52 \pm 2.19)\%$, $(23.10 \pm 2.58)\%$ and $(12.94 \pm 2.52)\%$, respectively; the expression levels of C/EBP homologous protein (CHOP) were 0.29 ± 0.04 , 0.53 ± 0.05 , 0.71 ± 0.08 , 0.90 ± 0.12 , respectively. The apoptosis rates in control group, experimental-H group and 4-PBA group were $(4.79 \pm 0.62)\%$, $(23.01 \pm 2.03)\%$ and $(13.75 \pm 1.14)\%$, respectively. The expressions of CHOP protein in control group, experimental-H, si-NC and si-CHOP groups were 0.30 ± 0.03 , 0.92 ± 0.08 , 0.91 ± 0.11 and 0.20 ± 0.02 , respectively; the apoptosis rates were $(4.39 \pm 0.30)\%$, $(22.11 \pm 1.82)\%$, $(22.65 \pm 2.40)\%$ and $(15.32 \pm 1.19)\%$, respectively; mitochondrial cytochrome C (Cyto-C) protein levels were 0.78 ± 0.07 , 0.43 ± 0.05 , 0.42 ± 0.05 and 0.65 ± 0.06 ; cytoplasmic Cyto-C protein levels were 0.51 ± 0.06 , 0.91 ± 0.10 , 0.88 ± 0.05 and 0.61 ± 0.04 ; MMP levels were $(100.00 \pm 2.79)\%$, $(57.49 \pm 3.34)\%$, $(54.09 \pm 4.32)\%$ and $(69.91 \pm 6.81)\%$, respectively. The above indexes in the experimental-L, -M, -H groups were compared with the control group, the above indexes in the 4-PBA group were compared with the experimental-H group, and the above indexes in the si-CHOP group were compared with the si-NC group, the differences were statistically significant (all $P < 0.01$). **Conclusion** Aloperin can inhibit the proliferation of 253J cells by up-regulating the endoplasmic reticulum stress-dependent mitochondrial apoptosis pathway mediated by CHOP.

Key words: aloperin; bladder cancer; endoplasmic reticulum stress; mitochondrial apoptosis; proliferation

膀胱癌是发展中国家最常见的泌尿系统癌症之一,尽管膀胱癌诊疗技术已取得很大进步,但膀胱癌致死率仍然很高^[1]。苦豆碱是药用植物苦豆子种子和叶子中发现的一种生物碱,由于其强大的抗癌、抗炎、抗氧化、抗菌和抗病毒特性,研究已经证实苦豆碱可通过多个靶点阻止膀胱癌进展^[2]。内质网应激和线粒体功能障碍是诱导癌细胞凋亡的重要机制^[3],内质网可通过与线粒体的相互作用参与细胞的凋亡过程^[4]。本研究旨在探讨苦豆碱介导内质网应激依赖线粒体途径对膀胱癌细胞的影响。

材料与方法

1 材料

细胞 人膀胱癌 253J 细胞株,美国 ATCC 公司产品。

药物与试剂 苦豆碱,规格:每瓶 20 mg,纯度:98%,批号:20240111,上海源叶生物科技有限公司生产;4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid,4-PBA),规格:每瓶 5 g,纯度:97%,批号:20240209,上海源叶生物公司生产。5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine,EdU)细胞增殖检测试剂盒,上海碧云天生物公司生产;兔 C/EBP 同源蛋白(CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)、葡萄糖调节蛋白 78(glucose-regulating protein 78,

GRP78)、磷酸化-PERK-真核翻译起始因子 2 α (phosphorylated-PERK-eukaryotic translation initiation factor 2 α ,p-eIF2 α)、转录活化因子 4(transcription activating factor 4,ATF4)、细胞色素 C(cytochrome C,Cyto-C)、裂解的聚腺苷酸二磷酸核糖聚合酶(cleaved-polyadenylate diphosphate ribose polymerase,Cl-PARP)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein,Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)一抗及二抗,均为武汉博士德生物公司生产;兔抗磷酸化蛋白激酶 R 样内质网激酶(phosphorylated-protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase,p-PERK)、裂解的胱天蛋白酶-3(cleaved-cysteine aspartate proteinase-3,Cl-caspase-3),均为美国 CST 公司生产;细胞线粒体分离试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒,均为上海爱必信生物公司生产。

仪器 CKX53 荧光显微镜,日本奥林巴斯公司产品;UVP Gelstudio touch 凝胶成像仪,德国耶拿公司产品;CytoFLEX 流式细胞仪,美国 Beckman 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养与转染^[5-6]

用 DMEM 培养基培养 253J 细胞(培养基中含

10%的胎牛血清),并置于培养箱中常规培养(37℃, 5% CO₂)。取胰酶消化的253J细胞,用转染试剂(Lipofectamine 2000)将si-NC或si-CHOP质粒转染至细胞。

2.2 细胞分组与处理方法

将253J细胞随机分为对照组、低剂量实验组、中剂量实验组、高剂量实验组、4-PBA组、si-NC、si-CHOP组。对照组的细胞进行常规培养,低、中、高剂量实验组细胞分别用25.0、50.0和100.0 μmol·L⁻¹苦豆碱处理细胞24 h,4-PBA组细胞用100 μmol·L⁻¹苦豆碱和20 μmol·L⁻¹的内质网应激抑制药4-PBA共同处理细胞24 h,si-NC组细胞将si-NC质粒转染至细胞48 h后用100 μmol·L⁻¹苦豆碱继续处理24 h,si-CHOP组细胞将si-CHOP质粒转染至细胞48 h后用100 μmol·L⁻¹苦豆碱继续处理24 h。

2.3 EdU实验检测细胞增殖^[7]

将253J细胞接种在6孔板中(每孔5×10⁵个细胞),分组处理后用EdU试剂培养箱孵育细胞4 h,离心后去除EdU试剂,然后用4%的多聚甲醛固定细胞15 min,加入通透剂(Trionx-100,0.5%)处理15 min,之后加入Click反应液孵育0.5 h后进行4',6-联脒-2'-苯基吲哚(4',6-diamidino-2'-phenylindole,DAPI)核染,最后荧光显微镜观察。

2.4 蛋白质印迹法检测细胞蛋白表达

裂解各组细胞提取总蛋白,对总蛋白定量后配胶进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳参考文献[6]的方法。其中Cyto-C蛋白的检测首先用线粒体分离试剂盒分离线粒体和细胞质,然后按照上述步骤分别检测线粒体、胞质中Cyto-C的表达。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡^[8]

取253J细胞接种在6孔板中,分组处理后磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)清洗干净,消化后离心收集细胞,加入结合缓冲液悬浮细胞,加入Annexin V-FITC 5 μL对细胞标记,然后加入PI 5 μL标记细胞,10 min后流式细胞仪检测,上机前加入结合缓冲液200 μL。

2.6 JC-1实验检测细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,MMP)水平^[9]

收集处理后的各组253J细胞,用JC-1工作液(500 μL)孵育细胞,37℃下孵育30 min,然后用缓冲液(1×)清洗2次,用荧光显微镜观察。正常细胞中的JC-1聚集体和凋亡细胞中的JC-1单体分别呈现红色荧光和绿色荧光。

3 统计学处理

用SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用独立t检验。

结 果

1 苦豆碱体外抑制253J细胞增殖

对照组细胞为常规培养,低、中、高剂量实验组细胞分别用25.0、50.0和100.0 μmol·L⁻¹苦豆碱处理细胞24 h,4-PBA组细胞用100 μmol·L⁻¹苦豆碱和20 μmol·L⁻¹4-PBA细胞24 h,si-NC组细胞转染si-NC后用100 μmol·L⁻¹苦豆碱处理24 h,si-CHOP组细胞转染si-CHOP后用100 μmol·L⁻¹苦豆碱处理24 h。

对照组和低、中、高剂量实验组EdU阳性细胞率分别为(37.51±2.98)%、(29.52±2.19)%、(23.10±2.58)%和(12.94±2.52)%,低、中、高剂量实验组细胞EdU阳性细胞率与对照组相比均显著降低(均 $P<0.001$);低、中、高剂量实验组间比较,细胞EdU阳性细胞率差异均达到显著水平(均 $P<0.001$)。

2 苦豆碱激活253J细胞内质网应激相关通路

低、中、高剂量实验组细胞CHOP、GRP78、p-PERK、p-eIF2α、ATF4蛋白相对表达水平均较对照组显著升高(均 $P<0.001$);低、中、高剂量实验组间比较,细胞上述蛋白相对表达水平差异均有统计学意义($P<0.01$, $P<0.001$),见表1。

3 抑制苦豆碱激活的内质网应激可减少253J细胞凋亡

高剂量实验组细胞CHOP、Cl-caspase-3、Cl-PARP蛋白相对表达水平及凋亡率相比对照组均显著升高(均 $P<0.001$);4-PBA组细胞CHOP、Cl-caspase-3、Cl-PARP蛋白相对表达水平及凋亡率相比高剂量实验组均显著降低(均 $P<0.001$),见表2。

4 抑制CHOP表达削弱苦豆碱对253J细胞凋亡的影响

高剂量实验组细胞CHOP、Cl-caspase-3、Cl-PARP蛋白相对表达水平及凋亡率相比对照组均显著升高(均 $P<0.001$);si-CHOP组细胞CHOP、Cl-caspase-3、Cl-PARP蛋白相对表达水平及凋亡率相比si-NC组均显著降低(均 $P<0.001$),见表3。

5 抑制CHOP表达削弱苦豆碱诱导的线粒体功能障碍

高剂量实验组胞质Cyto-C、Bax蛋白相对表达

表1 各组细胞内质网相关蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 Comparison of endoplasmic reticulum related protein expression in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	CHOP	GRP78	p - PERK/PERK	p - eIF2 α /eIF2 α	ATF4
Control	0.29 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.05
Experimental - L	0.53 $\pm$ 0.05 ***	0.49 $\pm$ 0.05 ***	0.44 $\pm$ 0.07 ***	0.46 $\pm$ 0.06 ***	0.36 $\pm$ 0.05 ***
Experimental - M	0.71 $\pm$ 0.08 * * * * *	0.65 $\pm$ 0.08 * * * * *	0.52 $\pm$ 0.04 * * * * *	0.59 $\pm$ 0.05 * * * * *	0.49 $\pm$ 0.04 * * * * *
Experimental - H	0.90 $\pm$ 0.12 * * * * * $\Delta\Delta$	0.95 $\pm$ 0.11 * * * * * $\Delta\Delta\Delta$	0.86 $\pm$ 0.07 * * * * * $\Delta\Delta\Delta$	0.78 $\pm$ 0.11 * * * * * $\Delta\Delta\Delta$	0.61 $\pm$ 0.08 * * * * * $\Delta\Delta\Delta$

Control group: Routine culture; Experimental - L group: 25.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ alopurin; Experimental - M group: 50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ alopurin; Experimental - H group: 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ alopurin; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with experimental - L group, *** $P < 0.01$, **** $P < 0.001$; Compared with experimental - M group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; CHOP: CCAAT - enhancer - binding protein homologous protein; GRP78: Glucose - regulating protein 78; p - PERK: Phosphorylated - protein kinase R - like endoplasmic reticulum kinase; p - eIF2 α : Phosphorylated - PERK - eukaryotic translation initiation factor 2 α .

表2 各组细胞凋亡率及相关蛋白的比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of apoptosis rate and related proteins in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	CHOP	Cl - caspase - 3	Cl - PARP	Apoptosis rate (%)
Control	0.32 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.04	4.79 $\pm$ 0.62
Experimental - H	0.89 $\pm$ 0.09 ***	0.88 $\pm$ 0.10 ***	0.79 $\pm$ 0.06 ***	23.01 $\pm$ 2.03 ***
4 - PBA	0.63 $\pm$ 0.04 ***	0.49 $\pm$ 0.06 ***	0.45 $\pm$ 0.05 ***	13.75 $\pm$ 1.14 ***

Dose and n refer to table 1; 4 - PBA group: 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ alopurin + 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ER stress inhibitor 4 - phenylbutyric acid (4 - PBA); Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with experimental - H group, *** $P < 0.001$; CHOP: CCAAT - enhancer - binding protein homologous protein; Cl - caspase - 3: Cleaved - Cysteine aspartate proteinase - 3; Cl - PARP: Cleaved - polyadenylate diphosphate ribose polymerase.

表3 各组细胞相关蛋白表达及凋亡的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Comparison of related protein expression and apoptosis in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	CHOP	Cl - caspase - 3	Cl - PARP	Apoptosis rate (%)
Control	0.30 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.04	4.39 $\pm$ 0.30
Experimental - H	0.92 $\pm$ 0.08 ***	0.90 $\pm$ 0.07 ***	0.76 $\pm$ 0.07 ***	22.11 $\pm$ 1.82 ***
si - NC	0.91 $\pm$ 0.11	0.87 $\pm$ 0.12	0.78 $\pm$ 0.10	22.65 $\pm$ 2.40
si - CHOP	0.20 $\pm$ 0.02 ***	0.43 $\pm$ 0.04 ***	0.41 $\pm$ 0.02 ***	15.32 $\pm$ 1.19 ***

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with si - NC group, *** $P < 0.001$.

表4 各组细胞内质网相关蛋白表达及线粒体膜电位(MMP)水平的比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Comparison of endoplasmic reticulum related protein expression and mitochondrial membrane potential(MMP) level in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	Cytosol - Cyto - C	Mito - Cyto - C	Bax	Bcl - 2	MMP (%)
Control	0.51 $\pm$ 0.06	0.78 $\pm$ 0.07	0.26 $\pm$ 0.03	0.77 $\pm$ 0.05	100.00 $\pm$ 2.79
Experimental - H	0.91 $\pm$ 0.10 ***	0.43 $\pm$ 0.05 ***	0.86 $\pm$ 0.06 ***	0.33 $\pm$ 0.03 ***	57.49 $\pm$ 3.34 ***
si - NC	0.88 $\pm$ 0.05	0.42 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.11	0.32 $\pm$ 0.04	54.09 $\pm$ 4.32
si - CHOP	0.61 $\pm$ 0.04 ***	0.65 $\pm$ 0.06 ***	0.51 $\pm$ 0.08 ***	0.55 $\pm$ 0.07 ***	69.91 $\pm$ 6.81 ***

si - NC group: Transfected with si - NC + 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ alopurin; si - CHOP group: Transfected with si - CCAAT - enhancer - binding protein homologous protein (CHOP) + 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ alopurin; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with si - NC group, *** $P < 0.001$; Cyto - C: Cytochrome C; BCL - 2; B - cell lymphoma - 2; Bax; Bcl - 2 associated X protein.

水平相对对照组均显著升高,线粒体 Cyto - C、Bcl - 2 (均 $P < 0.001$),见表4。

蛋白相对表达及 MMP 均显著降低(均 $P < 0.001$);

si - CHOP组胞质 Cyto - C、Bax 蛋白相对表达水平相

比 si - NC 组均显著降低(均 $P < 0.001$);线粒体

Cyto - C、Bcl - 2 蛋白相对水平及 MMP 均显著升高

讨 论

苦豆子是一种具有解热、抗炎、镇痛作用的传统

中药,苦豆碱是从苦豆子中提取的一种生物碱^[10]。苦豆碱已被证实在多种癌症中的抗肿瘤作用。ZHANG等^[11]在最近的研究中表明苦豆碱可通过抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡在膀胱癌细胞中发挥抗癌作用。在本研究中,观察到不同剂量的苦豆碱处理253J细胞后,细胞增殖率随着苦豆碱剂量的增加逐渐降低,这表明苦豆碱可剂量依赖性抑制253J细胞增殖,发挥其抑癌作用,这与已有的研究结果一致^[11]。

内质网是钙的储存库,负责细胞内蛋白质的合成和转运,内质网应激可导致内质网在终末期发生功能障碍,包括钙离子从内质网释放到细胞质中,以及内质网应激相关信号通路的激活;高表达的PERK可以磷酸化eIF2 α ,进而激活ATF4的表达,ATF4可以转位到细胞核中,上调CHOP的表达,其中CHOP被认为是最重要的促凋亡蛋白,可以启动ER介导的细胞凋亡^[12-13]。在本研究中观察到,苦豆碱可明显上调253J细胞中CHOP、GRP78、p-PERK、p-eIF2 α 、ATF4蛋白的表达,这提示,苦豆碱可能通过激活内质网应激进而诱导细胞凋亡。本研究用内质网应激抑制药4-PBA处理后,4-PBA可明显抑制苦豆碱对CHOP及促凋亡蛋白Cl-caspas-3、Cl-PARP表达和凋亡率的诱导作用,这再次证实了苦豆碱可通过激活内质网应激诱导癌细胞凋亡,在膀胱癌中发挥抗肿瘤作用。

CHOP是内质网应激激活的主要促凋亡因子,在内质网应激条件下,CHOP被强烈激活,研究表明CHOP的高表达在线粒体功能障碍和caspase活化中也起着重要作用^[14]。本研究发现,抑制CHOP的表达可明显减弱苦豆碱对253J细胞Cl-caspas-3、Cl-PARP蛋白水平及凋亡率的诱导作用,这表明苦豆碱可通过激活CHOP活化caspase级联反应诱导细胞253J凋亡。抗凋亡蛋白Bcl-2可以降低线粒体通透性并抑制细胞凋亡,而促凋亡蛋白Bax可以通过增加线粒体通透性和细胞色素C的释放来加速细胞凋亡^[15],在正常状态下,MMP升高,Cyto-C不能穿过线粒体外膜,而线粒体功能发生障碍可导致MMP降低,Cyto-C从线粒体转位到细胞质,可以与凋亡酶激活因子1相互作用,形成凋亡小体,而凋亡小体又可以激活caspase-3,进一步激活caspase级联反应,诱导凋亡^[16]。本研究中,苦豆碱可显著上调胞质Cyto-C、Bax蛋白表达,抑制Bcl-2、线粒体Cyto-C蛋白表达并降低MMP,表明苦豆碱可通过增加Bax/Bcl-2比例和Cyto-C释放来触发线粒体依赖性凋亡途径。

本研究结果表明,苦豆碱可在膀胱癌中诱导细胞毒性,激活内质网应激依赖的线粒体凋亡途径发挥抗

肿瘤作用。

参考文献:

- [1] DOBRUCH J, OSZCZUDLOWSKI M. Bladder cancer: Current challenges and future directions[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57(8):749.
- [2] 邱明宁. 苦豆碱抗膀胱癌活性及其作用机制研究[D]. 陕西 咸阳:西北农林科技大学, 2019.
- [3] 施亚敏, 李新存, 聂安政, 等. 重楼皂苷II通过线粒体与内质网应激途径诱导骨肉瘤细胞凋亡的研究[J]. *中国药理学杂志*, 2024, 59(1):29—38.
- [4] 魏文杰, 胡小波, 曹朝晖. 内质网-线粒体相互作用对1型糖尿病发生与发展的影响[J]. *微生物学免疫学进展*, 2022, 50(2):96—99.
- [5] 徐律, 张伟, 胡志, 等. *lncRNA CTD-2196E14.5*通过海绵吸附miR-744-5p抑制膀胱癌细胞的增殖和侵袭[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(23):4233—4238.
- [6] 狄倩. E3泛素连接酶SIAH1在膀胱癌中的功能研究及泛素化底物探索[D]. 山东 济南:山东大学, 2021.
- [7] 陈君, 李林艳, 赵晓勇, 等. 罗哌卡因通过AKT/GSK-3 β / β -catenin信号通路对膀胱癌细胞生长和化疗效果影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2023, 30(20):1208—1222.
- [8] 梁宇, 李鸿, 朱帅, 等. 醋酸落叶松酯抑制膀胱癌细胞增殖及诱导凋亡的机制研究[J]. *肿瘤药理学*, 2023, 13(3):282—289.
- [9] 田朝晖, 廖生伟, 夏伟, 等. 竹节香附素A体外诱导乳腺癌细胞凋亡的作用机制研究[J]. *世界中医药*, 2023, 18(15):2166—2172.
- [10] TAHIRM, ALI S, ZHANG W, et al. Aloperine: A potent modulator of crucial biological mechanisms in multiple diseases[J]. *Biomedicine*, 2022, 10(4):905.
- [11] ZHANG L, LIANG J, LIU X, et al. Aloperine exerts antitumor effects on bladder cancer *in vitro* [J/OL]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:10351—10360. 2020-10-13 [2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33116615/>.
- [12] 张勇涛, 李霞, 李晓齐, 等. 内质网应激通路相关蛋白IRE1、PERK、ATF6在舌鳞癌中的表达及其功能的生物信息学分析[J]. *生物化工*, 2023, 9(5):1—6, 18.
- [13] 韦丽, 张建军, 吴锋, 等. 柚皮苷调节PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP轴对甲状腺癌细胞增殖凋亡迁移侵袭的影响[J]. *河北医学*, 2022, 28(8):1268—1274.
- [14] 徐思. ATF4/CHOP轴调控线粒体未折叠蛋白反应在甲基汞致神经细胞凋亡中的机制研究[D]. 辽宁 沈阳:中国医科大学, 2023.
- [15] ALOTAIBI A A, BEPARI A, ASSIRI R A, et al. *Saussurea lappa* exhibits anti-oncogenic effect in hepatocellular carcinoma, HepG2 cancer cell line by Bcl-2 mediated apoptotic pathway and mitochondrial cytochrome C release[J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2021, 43(2):1114—1132.
- [16] SHAKERI R, KHEIROLLAHI A, DAVOODI J. Apaf-1: Regulation and function in cell death [J/OL]. *Biochimie*, 2017, 135:111—125. 2017-02-09 [2024-07-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28192157/>.

(收稿日期 2024-09-06)