

# 丝裂霉素联合塞来昔布对膀胱癌T24细胞增殖的影响研究

孙世宝\*, 盛玉文#, 于立春, 曲更庆, 王庆军(辽宁医学院附属第一医院泌尿外科, 辽宁锦州 121001)

中图分类号 R737.14;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)17-1566-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.17.11

**摘要** 目的:研究体外丝裂霉素(MMC)联合塞来昔布对浅表性膀胱癌T24细胞增殖的影响及其可能机制。方法:体外培养浅表性膀胱癌T24细胞,分为MMC[0(对照组)、2、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ ]组及其与塞来昔布(50  $\mu\text{mol/L}$ )混合组,每个浓度5个复孔,采用MTT法检测作用24 h后细胞的增殖抑制率。采用免疫组化法、实时定量聚合酶链式反应法、酶联免疫吸附测定法检测对照组、MMC(50  $\mu\text{mol/L}$ )组和混合[塞来昔布+MMC(50  $\mu\text{mol/L}$ )]组作用48 h细胞中Bcl-2蛋白、作用24 h细胞血管内皮生长因子(VEGF) mRNA的表达及作用96 h内VEGF蛋白浓度。结果:MMC能明显抑制细胞增殖( $P<0.05$ ),且呈浓度依赖性;塞来昔布能明显增强MMC对细胞的增殖抑制作用( $P<0.05$ );与对照组比较,MMC组和塞来昔布+MMC组细胞中Bcl-2蛋白、VEGF mRNA表达均明显降低( $P<0.05$ ),且后2组组间比较有统计学差异( $P<0.05$ );塞来昔布+MMC组细胞中VEGF蛋白浓度随作用时间延长明显降低( $P<0.01$ )。结论:塞来昔布可协同增强MMC抑制T24细胞增殖的作用,其机制可能与降低Bcl-2、VEGF mRNA表达水平和抑制细胞分泌VEGF蛋白作用有关。

**关键词** 膀胱癌T24细胞;丝裂霉素;塞来昔布;增殖抑制率;Bcl-2;血管内皮生长因子;表达

## Effects of Mitomycin Combined with Celecoxib on the Proliferation of Bladder Cancer Cell Line T24

SUN Shi-bao, SHENG Yu-wen, YU Li-chun, QU Geng-qing, WANG Qing-jun (Dept. of Urology Surgery, The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical College, Liaoning Jinzhou 121001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the effects of mitomycin (MMC) combined with celecoxib on the proliferation of superficial bladder cancer cell line T24 and the possible mechanism. METHODS: The superficial bladder cancer T24 cell line were cultured *in vitro*, and divided into MMC groups [0 (control group), 2, 5, 10, 25 and 50  $\mu\text{mol/L}$ ] and MMC combined with celecoxib (50  $\mu\text{mol/L}$ ) group with each concentration of 5 bores. MTT method was used to detect the proliferation inhibition rate after 24 h. Immunohistochemistry assay, RT-PCR and ELISA method were adopted to detect the expression of Bcl-2 protein after 48 h of treatment and VEGF mRNA after 24 h of treatment and the protein concentration of VEGF within 96 h of treatment in control group, MMC (50  $\mu\text{mol/L}$ ) group and mixture [celecoxib+MMC (50  $\mu\text{mol/L}$ )] group. RESULTS: MMC could inhibit the proliferation of T24 cell ( $P<0.05$ ), in dose dependent manner; celecoxib could significantly enhance the inhibitory effect of MMC ( $P<0.05$ ). Compared with control group, the expression of Bcl-2 protein and VEGF mRNA were decreased significantly in MMC group and celecoxib+MMC group ( $P<0.05$ ); there was statistical significance between the latter 2 groups ( $P<0.05$ ). The concentration of VEGF protein in celecoxib+MMC group was decreased significantly statistically with time ( $P<0.01$ ). CONCLUSIONS: Celecoxib can collaboratively enhance inhibitory effect of MMC on the proliferation of T24 cell. The mechanism may be related to reducing the expression of Bcl-2 and VEGF mRNA and inhibiting the secretion of VEGF protein.

**KEY WORDS** Bladder cancer cell line T24; Mitomycin; Celecoxib; Proliferation inhibition rate; Bcl-2; VEGF; Expression

膀胱癌有75%~85%是浅表性肿瘤<sup>[1]</sup>,是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一,膀胱癌术后灌注化疗是减少复发率及延长复发时间的必要措施。但长期应用丝裂霉素(MMC)灌注化疗会产生一定的副作用和复发风险。肿瘤细胞化疗的同时,耐药性的产生有多重机制,可能涉及到Bcl-2基因的异常表达<sup>[2]</sup>。塞来昔布是一种选择性环氧化酶2(Cyclooxygenase-2, COX-2)抑制剂非甾体消炎药,具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[3]</sup>。近年来发现塞来昔布抑制肿瘤血管生成、增强治疗药物的敏感性与抑制基因Bcl-2的表达有关,Bcl-2的表达可以增强肿瘤的化疗疗效和避免术后复发<sup>[4]</sup>。低剂量的MMC联合使用塞来昔布不但可以提高疗效,而且还可以减少不良反应<sup>[5]</sup>。本研究探

讨MMC与塞来昔布联合使用是否对浅表性膀胱癌T24细胞具有增殖抑制作用,并初步探讨其机制。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

细胞计数仪(美国Beckman公司);CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo forma公司);倒置显微镜(日本Olympus公司);超速离心机(美国Sigma公司);CIAS-1000细胞图像分析系统(北京恒太图像视觉有限公司);PowerPac3000电泳仪、EC-120电泳槽(美国Bio-Rad公司)。

#### 1.2 药品与试剂

MMC原料药(批号:H20020163,纯度:99.9%)、塞来昔布原料药(批号:H20070325,纯度:99.9%)均由海正辉瑞制药有限公司提供;MTT注射用粉末(博大泰恒生物技术有限责任公司);兔抗人Bcl-2多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);TaKaRa RNA、实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)试剂

\* 硕士研究生。研究方向:膀胱肿瘤。电话:0416-4197643。E-mail:434915081@qq.com

# 通信作者:主任医师,硕士研究生导师。研究方向:膀胱肿瘤。电话:0416-4197637。E-mail:Syw9818@163.com

盒(宝生物工程大连有限公司);人细胞血管内皮生长因子(VEGF)、酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(上海众华生物有限公司);二甲基亚砜(DMSO,美国Amresco公司);RPMI 1640培养液(美国Gibco公司)。

### 1.3 细胞

T24细胞由中国科学院上海分院提供。

## 2 方法

### 2.1 溶液的准备

用RPMI 1640培养液将MMC原料药配制成1 000  $\mu\text{mol/L}$ 溶液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,应用时稀释至0、2、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ 。

取塞来昔布原料药,用DMSO溶解配制成100  $\mu\text{mol/L}$ 溶液,应用时稀释至50  $\mu\text{mol/L}$ 。

用0.01  $\mu\text{mol/L}$ 、pH 7.2的磷酸盐缓冲液(PBS)将MTT配制成5  $\mu\text{mol/L}$ 的MTT液。

### 2.2 细胞的培养

T24细胞常规培养于含10%胎牛血清RPMI 1640培养基(加双抗)中,将对数生长期的细胞接种于培养基中,随机分组。

### 2.3 MTT法检测细胞的增殖抑制率

将T24细胞接种于96孔板中,3 000个/孔,置于 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 恒温孵育箱中常规培养12 h,分为MMC[0(对照组)、2、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ ]组及其与塞来昔布(50  $\mu\text{mol/L}$ )混合组,每个浓度5个复孔。先加入50  $\mu\text{mol/L}$ 塞来昔布溶液10  $\mu\text{l}$ 培养8 h后,弃去培养液,再分别加入相应浓度的MMC溶液20  $\mu\text{l}$ ,继续培养24 h;然后每孔均加MTT液20  $\mu\text{l}$ ,培养4 h后终止培养,离心弃去上清液;每孔加入DMSO 150  $\mu\text{l}$ ,振荡10 min使晶体充分溶解。用酶标仪在490 nm波长处测定各孔光密度(OD)值,MMC组和混合组均为试验组。按公式计算各组细胞的增殖抑制率(IR), $\text{IR}=(1-\text{试验组OD值}/\text{对照组OD值})\times 100\%$ 。

### 2.4 免疫组化法检测细胞内Bcl-2蛋白表达

取“2.3”项下对照组、MMC组(50  $\mu\text{mol/L}$ )和混合[塞来昔布(50  $\mu\text{mol/L}$ )+MMC(50  $\mu\text{mol/L}$ )]组细胞给药后48 h的爬片,同时用PBS代替一抗作为阴性对照,染色,加入兔抗人Bcl-2多克隆抗体(1:150稀释,试验按其他比例稀释时Bcl-2蛋白表达阳性率较差),用二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,中性树胶封固,检测各组细胞内Bcl-2蛋白表达阳性率。结果判断标准:凡细胞质中出现明显棕黄色颗粒者,为Bcl-2蛋白阳性细胞。每片观察5个高倍视野,不少于500个细胞。

### 2.5 RT-PCR检测细胞内VEGF mRNA表达

根据Genebank中已知基因序列,设计合成引物如下:VEGF上游引物序列为5'-ATGAACCTTCTGCTGTCTTGG-3',下游引物序列为5'-TCACCGCCTCGGCTTGTCACA-3'; $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)上游引物序列为5'-GATTGGAATCTGGC-TACT-3',下游引物序列为5'-TAGGGCTGAAGCACAGGG-3'。提取“2.3”项下培养24 h后的对照组、MMC(50  $\mu\text{mol/L}$ )组、混合[塞来昔布(50  $\mu\text{mol/L}$ )+MMC(50  $\mu\text{mol/L}$ )]组细胞的总RNA,取1  $\mu\text{g}$  RNA进行逆转录,得到第1段cDNA,产物用于扩增目的基因。反应条件:92  $^{\circ}\text{C}$  5 min,92  $^{\circ}\text{C}$  30 s,58  $^{\circ}\text{C}$  1 min,72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,反复循环30次,72  $^{\circ}\text{C}$  延长10 min,结束反应。PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳40 min,凝胶成像系统检测目的条带和 $\beta$ -actin的OD值,以其比值表示VEGF mRNA

表达,重复操作5次。

### 2.6 ELISA法检测细胞内VEGF蛋白浓度

按ELISA试剂盒建立VEGF蛋白标准曲线,选取“2.3”项下对照组、MMC组(50  $\mu\text{mol/L}$ )和混合[塞来昔布(50  $\mu\text{mol/L}$ )+MMC(50  $\mu\text{mol/L}$ )]组细胞,分别收集作用12、24、36、48、60、72、84、96 h后上层培养基[考虑此试验单独使用MMC对T24细胞分泌VEGF蛋白的抑制作用不明显( $P>0.05$ ),因此检测另外两组],每个时间点设5个复孔,另外设置标准孔、待测样本孔和空白对照孔,按试剂盒说明进行加样、洗板、显色、检测OD值(450 nm)。根据标准曲线计算最终浓度。

### 2.7 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析法,两两比较用 $q$ 检验,方差不齐用Dunnett B检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 T24细胞IR

与对照组比较,MMC组细胞的IR明显增加( $P<0.05$ ),且呈浓度依赖性。与MMC组相应浓度比较,混合组细胞的IR均明显增加( $P<0.05$ ),且呈浓度依赖性。表明塞来昔布能增强MMC对T24细胞的增殖抑制作用,结果见表1。

表1 各组细胞的IR检测结果( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Tab 1 Inhibition rate of T24 bladder cancer cell proliferation in each group ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	MMC, $\mu\text{mol/L}$					
	0	2	5	10	25	50
MMC组	0	1.29 $\pm$ 0.98*	26.48 $\pm$ 0.89*	35.61 $\pm$ 0.81*	52.44 $\pm$ 0.74*	71.65 $\pm$ 0.89*
混合组	4.10 $\pm$ 0.49**	55.06 $\pm$ 0.67*	69.01 $\pm$ 0.79*	77.07 $\pm$ 0.60*	82.04 $\pm$ 0.83*	83.02 $\pm$ 0.63*

与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与MMC组比较: \*\* $P<0.05$

vs. control group: \* $P<0.05$ ; vs. MMC group: \*\* $P<0.05$

### 3.2 T24细胞内Bcl-2蛋白表达

结果表明,对照组、MMC组和混合组细胞内Bcl-2蛋白表达阳性率分别为(90.23 $\pm$ 6.17)%、(45.23 $\pm$ 7.87)%、(35.69 $\pm$ 6.30)%。与对照组比较,MMC组和混合组细胞内Bcl-2蛋白表达阳性率明显降低( $P<0.05$ )。与MMC组比较,混合组细胞内Bcl-2蛋白表达阳性率明显降低( $P<0.05$ )。表明塞来昔布能协同MMC降低Bcl-2蛋白的表达。显微镜图见图1。

### 3.3 T24细胞内VEGF mRNA表达

结果表明,对照组、MMC组和混合组细胞内VEGF mRNA表达分别为0.97 $\pm$ 0.10、0.36 $\pm$ 0.04、0.29 $\pm$ 0.03。与对照组比较,MMC组和混合组细胞内VEGF mRNA表达明显降低( $P<0.05$ )。与MMC组比较,混合组细胞内VEGF mRNA表达明显降低( $P<0.05$ )。表明塞来昔布能增强MMC对T24细胞内VEGF mRNA表达的抑制作用。电泳图见图2。

### 3.4 T24细胞内VEGF蛋白质量浓度

与对照组比较,混合组细胞内VEGF蛋白质量浓度随作用时间延长明显降低,24 h后比较均有显著性差异( $P<0.01$ ),且呈时间依赖性。混合组细胞内VEGF蛋白的低表达可能与塞来昔布增强MMC对T24细胞VEGF mRNA表达的抑制作用有关,结果见表2。

## 4 讨论

有研究<sup>[6-7]</sup>表明,化疗、放疗过程中出现的肿瘤细胞凋亡率下降可能和Bcl-2有关<sup>[7]</sup>,其机制可能是COX-2上调Bcl-2的表

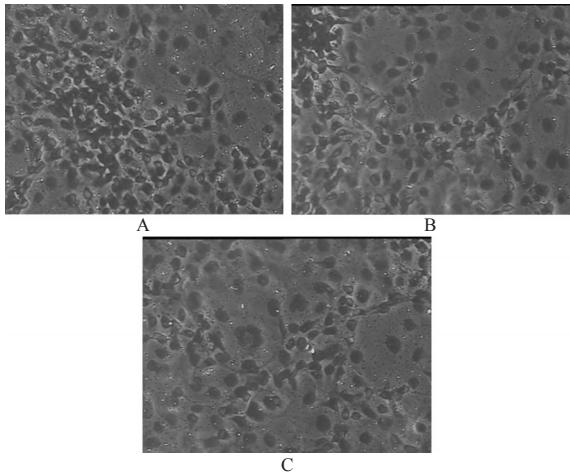


图1 各组细胞免疫组化的显微镜图( $\times 400$ )  
A. 对照组; B. MMC组; C. 混合组

Fig 1 Microscopic images of cell immunohistochemical expression in each group ( $\times 400$ )

A. control group; B. MMC group; C. mixture group

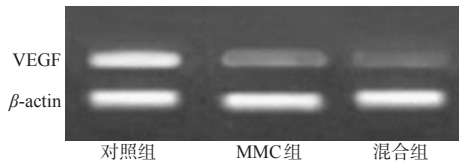


图2 各组细胞内 VEGF mRNA 表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of mRNA expression of VEGF in each group

表2 作用不同时间两组细胞内 VEGF 蛋白浓度( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 2 VEGF protein concentration of 2 groups at different time( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

时间, h	平均 VEGF 蛋白的质量浓度, mg/L	
	混合组	对照组
12	3.714 $\pm$ 0.051	3.906 $\pm$ 0.050
24	3.348 $\pm$ 0.048*	3.911 $\pm$ 0.096
36	3.201 $\pm$ 0.036*	3.865 $\pm$ 0.072
48	2.891 $\pm$ 0.031*	3.899 $\pm$ 0.065
60	2.561 $\pm$ 0.025*	3.853 $\pm$ 0.082
72	1.672 $\pm$ 0.017*	3.885 $\pm$ 0.076
84	0.605 $\pm$ 0.021*	3.789 $\pm$ 0.059
96	0.077 $\pm$ 0.012*	3.901 $\pm$ 0.062

与对照组比较: \* $P < 0.01$

vs. control group: \* $P < 0.01$

达使 Bcl-2 高表达而抑制细胞的凋亡, 从而促进肿瘤的发生发展。关于这点本试验结果一致, 即对照组 Bcl-2 蛋白的表达明显高于 MMC 组和混合组 ( $P < 0.05$ ), MMC 组和混合组细胞 IR 明显低于对照组 ( $P < 0.05$ )。

VEGF 是内皮细胞的特异性有丝分裂源, 也是一种有效的血管形成和通透性诱导因子。一方面 VEGF 可以促进肿瘤细胞生长、转移; 另一方面, VEGF 一直作用于肿瘤细胞, 促进肿瘤细胞的分裂增殖。在人的膀胱癌、子宫内膜癌等研究中均见报道<sup>[8-9]</sup>。Bcl-2 基因表达对 VEGF 产生有抑制作用, Bcl-2 缺失的肿瘤细胞的 VEGF 出现高活性<sup>[10]</sup>。血管新生的调控除了和 Bcl-2、VEGF 等有关之外, 还受其他多种因素的共同调

节。研究<sup>[11]</sup>表明, VEGF 的高表达可能与 COX-2 本身或其代谢产物前列腺素 E2 (PGE2) 有关。本研究通过 ELISA 法检测 VEGF 蛋白也可以得到证实, 混合组 VEGF 蛋白和药物的作用时间具有相关性。目前还未见报道说明 VEGF 与 Bcl-2 之间有直接相关性。

提高膀胱癌灌注化疗和减少术后肿瘤的复发及增强化疗药物的敏感性, 是一个可以深入研究的问题。本试验在体外环境下采用塞来昔布联合 MMC 研究对 T24 细胞的增殖抑制作用。塞来昔布是一种常用的抗炎、镇痛及退热药, 此联合使用对增强 MMC 对膀胱癌的化疗疗效和避免术后复发、改善患者生存质量具有一定的意义, 同时小剂量的使用 MMC 对降低化疗费用有一定的帮助。

### 参考文献

- [1] 滕东海, 张雁钢, 王晓锋, 等. 吡柔比星与丝裂霉素 C 对膀胱癌 T24 细胞株抑制作用的实验研究[J]. 现代泌尿外科杂志, 2011, 11(16): 536.
- [2] Ghassemifar R, Forster L, Finlayson J, et al. Differential expression of the Bcl-2 and Bax isoforms in CD19 positive B-lymphocytes isolated from patients diagnosed with chronic lymphocytic leukaemia[J]. *Pathology*, 2012, 44(7): 632.
- [3] Ke HL, Tu HP, Lin HH, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) up-regulation is a prognostic marker for poor clinical outcome of upper tract urothelial cancer[J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(9): 4 111.
- [4] 周斌, 沈海波, 曾彦恺, 等. 吡柔比星联合塞来昔布对膀胱癌 5637 细胞株的作用[J]. 肿瘤, 2010, 6(30): 467.
- [5] 张坚, 徐卓群, 胡强, 等. 选择性环氧合酶 2 抑制剂对人膀胱癌细胞 T24 增殖和凋亡的作用[J]. 癌症, 2007, 26(4): 377.
- [6] Rahman M, Chan APK, Tai IT. A peptide of SPARC interferes with the interaction between caspase8 and Bcl2 to resensitize chemoresistant tumors and enhance their regression in vivo[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11): 1.
- [7] Ma L, Xie YL, Yu Y, et al. Apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells induced by mitomycin combined with sulindac[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(12): 1 829.
- [8] 罗波, 孙立江. 膀胱移行细胞癌组织 VEGF 和 COX-2 表达及意义[J]. 青岛大学医学院学报, 2009, 45(1): 29.
- [9] 仲剑, 孙志华, 吴强, 等. 雷公藤甲素对子宫内内膜癌抑制作用的裸鼠体内研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29(6): 775.
- [10] 强占荣, 覃泱, 林中, 等. 选择性 COX-2 抑制剂防治胃癌的研究现状[J]. 西部医学, 2010, 22(5): 939.
- [11] 梁平, 靳风烁, 吴刚, 等. COX-2 和 EGFR 在膀胱移行细胞癌组织中的表达及其相关性研究[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9): 857.

(收稿日期: 2012-11-28 修回日期: 2012-12-20)