

## 新多胺类似物 TBP 对人膀胱移行细胞癌 T24 细胞凋亡及迁移能力的影响\*

杨建林<sup>①</sup> 韩钰<sup>①</sup> 王凯<sup>②</sup> 张贺吉<sup>①</sup> 王艳林<sup>①</sup>

**摘要** 目的:研究新多胺类似物四丁基丙二胺(tetrabutyl propanediamine, TBP)对人膀胱移行细胞癌T24细胞生长、凋亡及迁移能力的影响。方法:MTT比色法分析细胞增殖,流式细胞术分析细胞周期改变,TUNEL法检测细胞凋亡,Western blot用于分析细胞凋亡相关蛋白Bax和细胞色素C的表达水平,Transwell技术检测细胞迁移能力的变化。结果:TBP有效抑制T24细胞增殖及迁移能力。细胞周期分析显示TBP抑制细胞发生G<sub>1</sub>/S期转换,导致S期细胞比例显著性下降,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞比例升高,同时出现SubG<sub>1</sub>亚凋亡峰。TBP处理后,细胞呈现典型凋亡现象,细胞浆中促凋亡蛋白Bax和细胞色素C含量明显升高。结论:TBP能够抑制人膀胱移行细胞癌T24细胞增殖、降低T24细胞迁移能力,诱导细胞凋亡,其机制可能与影响肿瘤细胞的细胞周期,活化线粒体相关的细胞凋亡途径有关。

**关键词** 多胺类似物 四丁基丙二胺 膀胱癌细胞 迁移 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.23.001

### Effects of the New Polyamine Analog Tetrabutyl Propanediamine on the Apoptosis and Migration of Human Bladder Carcinoma T24 Cells

Jianlin YANG<sup>1</sup>, Yu HAN<sup>1</sup>, Kai WANG<sup>2</sup>, Heji ZHANG<sup>1</sup>, Yanlin WANG<sup>1</sup>

Correspondence to: Yanlin WANG; E-mail: fzswangyl@ctgu.edu.cn

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology, Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, China

<sup>2</sup>Wuhan Institute of Technology, Hubei Key Laboratory of Novel Reactor & Green Chemical Technology, Wuhan 430073, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30772590)

**Abstract Objective:** This work aimed to investigate the effects of the new polyamine analog tetra-butyl propanediamine (TBP) on the proliferation, apoptosis, and migration of human bladder carcinoma T24 cells and its potential mechanism. **Methods:** Methyl thi-azolyl tetrazolium was used to analyze cell proliferation, and flow cytometry was performed to assay the cell cycles. Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling assay was used to identify the apoptotic cells. Western blot analysis was used to evaluate the expression of apoptosis-related proteins. The Transwell technique was used to analyze cell migration. **Results:** TBP significantly inhibited the proliferation and migration of T24 cells, and the inhibitory effect was time and dose dependent. The flow cytometry results indicated that TBP interfered with the cell cycles and inhibited G<sub>1</sub>/S transition, which led to increased cell percentage in the G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> phases, as well as decreased cell percentage in the S phase. Meanwhile, the number of apoptotic cells significantly increased. After TBP treatment, observation of the typical behavior of apoptotic cells revealed that the contents of the pro-apoptotic proteins Bax and cytochrome C significantly increased in the cytosol. **Conclusion:** TBP can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of human bladder carcinoma T24 cells by interfering with the cell cycle and activating the mitochondrion-mediated apoptotic pathway.

**Keywords** Polyamine analog; Tetra-butyl propanediamine; Bladder carcinoma; Migration; Apoptosis

肿瘤细胞的快速生长高度依赖于细胞内的多胺(腐胺、精胺和精脒)含量,由此干扰多胺代谢和拮抗多胺促细胞生长与分化的功能成为抗肿瘤药物设计的新靶点和临床治疗的新策略<sup>[1-3]</sup>。目前已经合成一些与天然多胺有相似化学结构的多胺类似物(poly-

amine ana-logue)用于抗多种肿瘤的基础和前期临床研究,其中部分多胺类似物显示出良好的临床应用前景<sup>[4-5]</sup>,但多胺类似物对膀胱癌是否有抗肿瘤效应研究较少,膀胱癌是我国目前常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,全身化疗联合外科手术是主要临床治疗

作者单位:①三峡大学医学院分子生物学研究所(湖北省宜昌市443002);②武汉工程大学新型反应器与绿色化学工艺重点实验室

\*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:30772590)资助

通信作者:王艳林 fzswangyl@ctgu.edu.cn

手段,但疗效差,预后不佳。因此寻找高效低毒的化疗药物对于临床抗膀胱癌治疗具有重要的意义。多胺类似物四丁基丙二胺(tetrabutyl propanediamine, TBP)是一种人工新合成的多胺类似物,本研究分析了TBP对人T24膀胱移行癌细胞生长、凋亡和迁移能力的影响,以期对膀胱移行细胞癌的预防与治疗提供有益的探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及仪器

膀胱癌T24细胞系购自武汉大学细胞典藏中心;TBP由武汉工程大学药理学系合成;3-(4, 5-二甲基噻唑)-2, 5-二甲苯基四氮唑溴盐(MTT)为美国Sigma公司产品;DMEM培养基和胎牛血清为Gibico公司产品;PVDF膜为Millipore公司产品;ECL试剂盒为Thermo公司产品;鼠抗人 $\beta$ -action抗体、Bax和细胞色素C(cytochrome C, Cyt-C)抗体为Santa Cruz公司产品;羊抗鼠IgG-HRP为Jackson公司产品。一步法TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling)细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Transwell培养板为美国Costar公司产品;全波长酶标仪为Thermo公司产品;荧光倒置显微镜为Olympus公司产品;GelLogic-200凝胶图像分析仪为Kodak公司产品;EPLCS XL流式细胞分析仪为Bectm an-Coulter公司产品。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将T24细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养液中于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养,对数生长期时进行细胞学实验。TBP溶于ddH<sub>2</sub>O中,-20℃保存,使用时用DMEM稀释至需要浓度。

1.2.2 MTT法检测肿瘤细胞生长抑制率 将T24细胞接种于96孔细胞培养板,加入3×10<sup>3</sup>个/孔细胞悬液50 μL,培养24 h后加入DMEM分别作为对照组和含不同浓度TBP的DMEM培养液50 μL(TBP终浓度为10~80 μmol/L),每个药物浓度设4个复孔,分别在培养24、48和72 h后,每孔加终浓度为5 mg/mL的MTT孵育4 h,弃去上清液,每孔加DMSO 150 μL,振荡混匀后用酶标仪测波长570 nm的吸光度值(OD值)。肿瘤细胞生长抑制率(IR)=(1-实验孔OD值/对照孔OD值)×100%。

1.2.3 Transwell体外迁移实验 将对数生长期T24细胞换为无血清培养基,饥饿处理4h后消化细胞,用含0.2%BSA的DMEM培养液悬浮,每个培养小室的上槽内加入5×10<sup>4</sup>个/孔细胞悬液200 μL,并加入TBP至浓度为40 μmol/L。培养小室下槽加入800 μL含20%FBS的DMEM培养液,培养18 h。将膜用PBS洗涤2次,多聚甲醛固定30 min,洗涤2次,加入苏木精

染色,室温10 min,清水浸泡20 min,用棉签轻轻擦拭上室内侧面的细胞,同时清水冲洗3~5次,用镊子拨下小室的膜,下侧面向上平铺于载玻片,倒置显微镜下随机选取5个视野观察,计数每个视野的细胞数,取平均数。迁移抑制率=(1-实验组穿膜细胞平均数/对照组穿膜细胞平均数)×100%。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期和凋亡的变化 T24细胞经20、40 μmol/L的TBP处理48h后,用4℃预冷的75%乙醇固定过夜,RNA酶37℃消化1 h后,碘化丙啶(0.5 mg/mL)避光染色30 min,经300目尼龙网过滤后上机检测。

1.2.5 TUNEL法检测细胞凋亡 取对数生长期T24细胞接种于12孔细胞培养板培养过夜,加入终浓度为40 μmol/L TBP继续培养48 h,将细胞用4%多聚甲醛固定30 min,0.1%Triton-100细胞膜打孔处理后,PBS洗涤3次,加入50 μL TUNEL检测液,37℃避光孵育1 h,再次PBS洗涤,倒置荧光显微镜下观察。倒置显微镜下随机选取5个视野观察,计数每个视野的凋亡细胞数,取平均数。

1.2.6 Western blot检测凋亡相关蛋白表达 40 μmol/L TBP作用T24细胞48 h后收集细胞,分为两份,一份用细胞裂解液(10 mmol/L HEPES, pH为7.2, 210 mmol/L D-mannitol, 70 mmol/L Sucrose, 5 mmol/L Sodium succinate, 0.2 mmol/L EGTA, 100 mg/L Digitonin)在冰浴裂解20 min,12 000 r/min离心10 min,取上层胞浆裂解液作为Cyt-C的检测样品;另一份用细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, pH为8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.2%NP40)冰上裂解30 min,离心取上清作为Bax的检测样品,考马斯亮蓝染色测定蛋白总含量,加入上样缓冲液沸水中水浴5 min使得蛋白变性,在10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶100 V电压下垂直电泳分离蛋白,再将其于60 V转印1.5 h到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭1 h后,分别加鼠抗人Cyt-C、抗人Bax抗体作用过夜,羊抗鼠IgG-HRP二抗反应2 h, TBST洗涤2次,ECL显影压胶片。

### 1.3 统计学分析

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,重复实验3次,应用SPSS 13.0软件进行单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 TBP有效抑制人膀胱癌T24细胞增殖

不同浓度的TBP作用T24细胞24、48、72 h后,随着药物浓度的增高和时间的延长,对T24细胞的生长有明显的抑制作用,且呈时间和浓度依赖性,当80 μmol/L TBP作用72 h时,细胞存活率仅为20.61%,抑制率高达79.39%,各时间组与浓度组之间比较差异具有统计学意义( $P<0.05$ ,图1)。

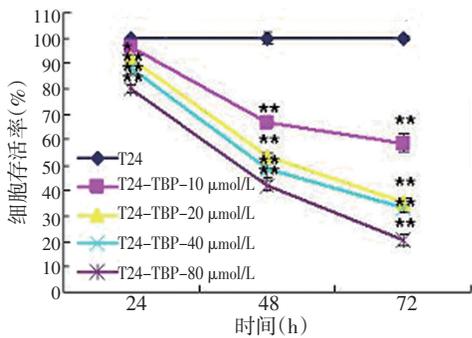
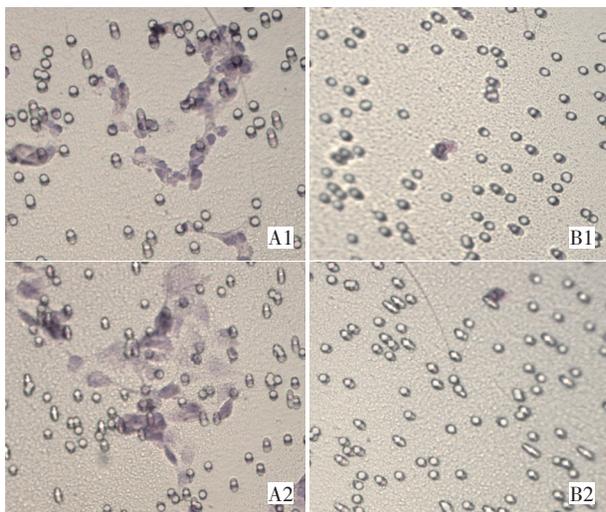


图1 TBP抑制T24细胞存活率的比较 (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ )  
Figure 1 Inhibitory action of TBP on the growth of T24 cells, compared with the 0 mol/L group

### 2.2 TBP抑制T24细胞的迁移能力

小室迁移实验显示,与对照组相比 40  $\mu\text{mol/L}$  TBP处理细胞组迁移细胞数下降了86.8%,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ,图2),提示TBP显著抑制了膀胱癌T24细胞的迁移能力。



A1, A2: 未处理的T24细胞; B1, B2: 40  $\mu\text{mol/L}$  TBP处理的T24细胞  
图2 Transwell技术检测TBP对T24细胞迁移能力的影响( $\times 200$ )  
Figure 2 Results of the Transwell chamber assay for T24 cells

### 2.3 TBP对T24细胞周期的影响

TBP处理后48 h后,  $G_0/G_1$ 期的T24细胞显著增多,分裂期S期的细胞数明显减少,部分细胞发生凋亡,在  $G_0/G_1$  峰之前的位置出现亚凋亡峰(Sub $G_1$ 峰)。而且随TBP使用浓度增高,细胞周期变化显著性增强( $P<0.01$ ,表1)。

### 2.4 TBP诱导T24细胞凋亡

TUNEL法检测细胞凋亡可见,40  $\mu\text{mol/L}$  TBP处理细胞72 h后,大多数细胞呈现红色荧光,提示细胞内基因组DNA发生DNA片段化降解,与正常对照细胞相比红色荧光有显著性差异( $P<0.01$ ,图3)。Western blot检测结果显示,胞浆中促凋亡蛋白Bax表达量

显著上升,细胞色素C也从线粒体大量转移至胞浆中( $P<0.01$ ,图4),提示TBP有可能通过线粒体介导的途径诱导细胞凋亡。

表1 TBP对T24细胞周期的影响

Table 1 Effects of TBP on the cell cycle and apoptosis of T24 cells

TBP(mol/L)	Sub $G_1$	$G_0/G_1$	S	$G_2$
0	0.37 $\pm$ 0.55	50.08 $\pm$ 0.84	38.18 $\pm$ 1.10	11.75 $\pm$ 1.13
20	10.50 $\pm$ 0.20**	59.87 $\pm$ 0.81**	31.27 $\pm$ 1.53**	8.87 $\pm$ 0.75*
40	14.53 $\pm$ 1.19**	68.13 $\pm$ 1.19**	19.60 $\pm$ 1.05**	12.27 $\pm$ 0.73

注:与0  $\mu\text{mol/L}$ 组细胞相比\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

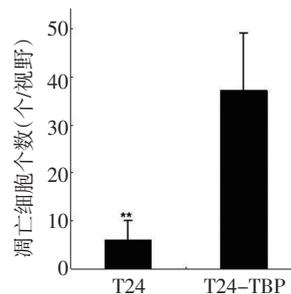
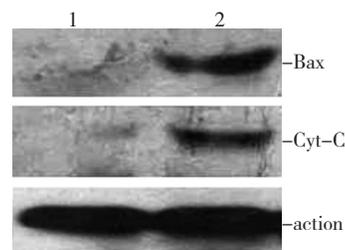


图3 TUNEL法检测T24细胞凋亡

Figure 4 TUNEL assay was performed to observe apoptosis of T24 cells



1: 未处理的T24细胞; 2: 40  $\mu\text{mol/L}$  TBP处理48 h的T24细胞

图4 Western blot 检测T24细胞的胞浆内Bax和细胞色素C水平

Figure 4 Western blot analysis results of the expression of Bax and Cyt-C proteins in the cytosol of T24 cells

## 3 讨论

膀胱癌发病率在我国男性泌尿生殖系统肿瘤中占居首位,其中以移行细胞癌为主。该肿瘤目前治疗方法以手术为首选,其次为膀胱灌注、化疗等,但晚期患者手术往往疗效不佳,复发率高。因此,寻找不良反应小且有较高疗效的新药用于膀胱灌注以及全身化疗对于膀胱癌临床治疗具有重大意义。多胺代谢途径是近年来研究较多的抗肿瘤治疗的新靶点,多胺类似物即是通过干扰肿瘤细胞内多胺代谢而抑制肿瘤生长的一类新型药物。多胺类似物是与天然多胺具有相似结构的小分子化合物,通过干扰多胺代谢而耗竭细胞内多胺库,或者竞争性抑制多胺的正常功能而阻遏肿瘤细胞增殖<sup>[6-8]</sup>。TBP是新近合成的一种腐胺对称性修饰物。本实验室在前期研究中发现TBP能够高效抑制骨髓瘤MG63细胞以及

肝癌 HEPG2 细胞增殖,诱导细胞发生凋亡<sup>[9-10]</sup>。为进一步分析 TBP 在肿瘤治疗中的潜在应用价值,本实验研究了 TBP 对人膀胱移行细胞癌 T24 细胞的影响,结果发现,TBP 对 T24 细胞的生长有显著性抑制作用,且这种抑制呈时间和剂量依赖性。TBP 可阻滞细胞周期中的 G<sub>1</sub>/S 期转换,导致 G<sub>1</sub> 期细胞增多而 S 期细胞减少。

亚凋亡峰和 TUNEL 分析均提示,TBP 处理可诱导 T24 细胞发生凋亡。对胞浆中 Bax 和 Cyt-C 的含量分析也进一步支持这一结论。Bax (Bcl-2 associated x protein) 是 Bcl-2 蛋白的家族成员,在正常情况下,Bax 以单体形式存在于胞浆中,若 Bax 高表达,则形成 Bax-Bax 同源二聚体转运到线粒体膜,形成跨膜离子通道,并引起 Cyt-C 释放到胞浆中,Cyt-C 随后激活多种 Caspase,最终导致细胞发生凋亡。本研究发现 TBP 处理 T24 细胞后,可上调促凋亡的 Bax 基因表达,胞浆中 Cyt-C 含量也显著增高,提示 TBP 可能通过线粒体途径诱导人膀胱癌 T24 细胞发生凋亡。

肿瘤迁移能力是指恶性肿瘤细胞能够从原发部位经淋巴、血液、体腔等途径播散到其他部位,这是其区别于正常细胞的重要生物学特征。正是由于恶性肿瘤具有远处迁移与浸润性生长的能力,导致临床上常见的恶性肿瘤转移、扩散和复发。因此抑制肿瘤的迁移能力也是抗肿瘤治疗的关键问题之一。本研究通过 Transwell 技术检测了 TBP 对人膀胱癌 T24 细胞迁移能力的影响,结果显示 TBP 能够有效抑制 T24 细胞的迁移能力,迁移抑制率高达 86.8%。

综上所述,TBP 能够有效抑制人膀胱移行细胞癌 T24 细胞增殖、降低 T24 细胞迁移能力和诱导 T24 细胞凋亡,其机制可能与抑制肿瘤细胞周期,活化线粒体介导的凋亡途径有关。本实验结果显示 TBP 是一种很有潜力的抗膀胱癌药物。

#### 参考文献

- 1 Casero RA Jr, Woster PM. Recent advances in the development of polyamine analogues as antitumor agents[J]. *J Med Chem*, 2009, 52(15): 4551-4573.
- 2 Agostinelli E, Marques MP, Calheiros R, et al. Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology[J]. *Amino Acids*, 2010, 38(2):393-403.
- 3 Birkholtz LM, Williams M, Niemand J, et al. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities[J]. *Biochem*, 2011, 438(2):229-244.
- 4 Choi W, Gerner EW, Ramdas L, et al. Combination of 5-fluorouracil and N1, N11-diethylnorspermine markedly activates spermidine/spermine N1-acetyltransferase expression, depletes polyamines, and synergistically induces apoptosis in colon carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(5):3295-3304.
- 5 Allen WL, McLean EG, Boyer J, et al. The role of spermidine/spermine N1-acetyltransferase in determining response to chemotherapeutic agents in colorectal cancer cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(1):128-137.
- 6 Casero RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyper proliferative diseases[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(5):373-390.
- 7 Huang Y, Pledge A, Casero RA Jr, et al. Molecular mechanisms of polyamine analogs in cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2005, 16(3): 229-241.
- 8 Chaturvedi R, de Sablet T, Peek R, et al. Spermine oxidase, a polyamine catabolic enzyme that links *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer risk[J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(1):48-56.
- 9 张贺吉,王凯,韩钰,等. 四丁基丙二胺对人 MG63 骨髓瘤细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(1): 974-977.
- 10 杨建林,韩钰,王凯,等. 新多胺类似物四丁基丙二胺对人肝癌 HepG2 细胞增殖级侵袭迁移的影响[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(8):1350-1354.

(2012-06-20 收稿)

(2012-11-07 修回)

(本文编辑:张佷)

## · 简 讯 ·

### 题名的规范

题名应简明、具体、确切,能概括论文的特定内容,有助于选定关键词,符合编制题录、索引和检索的有关原则。题名应该避免使用公式和不常见的缩略词、字符、代号等。必要时,可使用本行业通用缩写词。题名一般不宜超过 20 字。若题名语意未尽,可以用副题名补充说明论文中的特定内容;一般不要用陈述句,因为题名主要起标示作用,而陈述句容易使题名具有判断式的语义,且不够精炼和醒目。少数情况(评述性、综述性和驳斥性)下可以用疑问句做题名,因为疑问句有探讨性语气,易引起读者兴趣。同一篇论文的英文题名与中文题名内容上应一致,凡可用可不用的冠词均不用。