

汉防己丙素干预亚硝基胺致大鼠膀胱癌的作用及机制研究

李家仁, 李林锦*, 朱建龙, 陈合益

温州医科大学温州第三临床学院 温州市人民医院 泌尿外科, 浙江 温州 325000

摘要: **目的** 探讨汉防己丙素(Cyc)干预亚硝基胺(BBN)致大鼠膀胱癌的作用及机制。**方法** 雄性SD大鼠随机分为对照组, 模型组, Cyc低、高剂量(20、40 mg/kg)组, 顺铂(5 mg/kg)组。大鼠ig 0.5 mL BBN(0.4 kg/L), 2次/周, 连续8周, 建立膀胱癌模型。除对照组和模型组ip生理盐水外, 其余各组ip设定剂量的药物, 1次/d, 连续8周。实验结束后, 收集大鼠膀胱组织; 通过HE染色观察大鼠膀胱组织病理变化; 通过免疫组化法检测膀胱组织MMP9、Ki67的表达; 通过免疫印迹法检测膀胱组织KLF4、p21、CyclinD1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Wnt、 β -catenin蛋白的表达。**结果** 与模型组相比, Cyc可有效抑制膀胱炎细胞浸润、促进癌细胞出现不同程度退变、减少质比例; 显著下调膀胱组织MMP9、Ki67的表达($P < 0.05$ 、 0.01); 显著上调膀胱癌组织中KLF4、p21、E-cadherin的表达($P < 0.05$ 、 0.01); 显著下调CyclinD1、Wnt、 β -catenin、N-cadherin、Vimentin的表达($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** Cyc通过促进KLF4表达、阻断Wnt/ β -catenin信号传导、抑制膀胱癌细胞上皮细胞-间充质转化进程, 进而抑制膀胱癌细胞迁移与侵袭能力; 同时通过上调KLF4水平, 调控下游因子p21、CyclinD1表达, 影响膀胱癌细胞的增殖能力, 从而延缓BBN诱导的大鼠膀胱癌的病理进程。

关键词: 膀胱癌; 汉防己丙素; KLF4; 上皮细胞-间充质转化; Wnt/ β -catenin信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)20-5201-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.12

Effect and mechanism of cyclanoline on nitrosamine-induced bladder cancer in rats

LI Jia-ren, LI Lin-jin, ZHU Jian-long, CHEN He-yi

Department of Urology, Wenzhou Third Clinical College, Wenzhou Medical University Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of cyclanoline on nitrosamine (BBN)-induced bladder cancer in rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control group, model group, Cyc-low dose (20 mg/kg) group, Cyc-high dose (40 mg/kg) group and cisplatin (5 mg/kg) group. Rats were intragastrically administered with 0.5 mL BBN (0.4 kg/L, twice a week for 8 weeks) to establish bladder cancer model. In addition to control and model group given with normal saline, the other groups were intraperitoneally injected with drugs (once a day for 8 weeks). The bladder tissue was collected after experiment. HE staining was used to investigate the histopathological changes of the bladder in rats. The expressions of MMP9 and Ki67 were observed by immunohistochemistry method, and the expressions of KLF4, p21, CyclinD1, E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Wnt, β -catenin in the bladder tissues were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, cyclanoline effectively inhibited the infiltration of cystitis cells, promoted the degeneration of cancer cells, and reduced the proportion of cytoplasm. Cyclanoline significantly decreased the expressions of MMP9 and Ki67 ($P < 0.05$, 0.01), up-regulated the expressions of KLF4, p21 and E-cadherin ($P < 0.05$, 0.01), down-regulated the expressions of CyclinD1, Wnt, β -catenin, N-cadherin and Vimentin in bladder cancer tissues ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Cyclanoline promotes the expression of KLF4, inhibits Wnt/ β -catenin signaling transduction and the epithelial cell-mesenchymal transition of bladder cancer cells, thereby inhibiting the migration and invasion of bladder cancer cells. Meanwhile, cyclanoline regulates the expressions of p21 and CyclinD1 by up-regulating KLF4, affects the proliferation of bladder cancer cells, and thereby delays the pathological process of BBN-induced bladder cancer in rats.

Key words: bladder cancer; cyclanoline; KLF4; epithelial-mesenchymal transition; Wnt/ β -catenin signaling pathway

收稿日期: 2020-01-20

作者简介: 李家仁 (1973—), 本科, 研究方向为泌尿系结石及肿瘤。Tel: 13858859955 E-mail: 157173613@qq.com

*通信作者 李林锦 (1982—), 博士, 研究方向为泌尿系结石及肿瘤。Tel: 13738730586 E-mail: leelinjin@sina.com

膀胱癌是泌尿生殖系统中最常见的恶性肿瘤,每年新发膀胱癌患者数量约 7.6 万例^[1],在全球范围的生殖系统肿瘤中其发病率和死亡率高居首位,好发于老年男性^[2]。膀胱癌发病位置位于膀胱黏膜,病理类型包括膀胱腺癌、膀胱鳞状细胞癌、膀胱尿路上皮癌等,而其中约 90% 患者为膀胱尿路上皮癌。膀胱癌患者临床可见血尿、膀胱刺激症,具有无痛性、间歇性等特点^[3-4]。目前临床常采用经尿道膀胱肿瘤电切术、术后化疗、放疗等,但其效果不佳、复发率较高,严重威胁患者健康^[5]。因此挖掘新的药物对膀胱癌的治疗有重要意义。

防己属于防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根,其味苦、性寒,归膀胱、肺经,具有利尿消肿、祛风湿止痛等功效,常用于治疗水肿、小便不利、湿疮肿毒等,现代药理研究表明其具有良好的抗肿瘤、改善心血管、缓解风湿关节炎等功效^[6]。防己中检测出多种生物碱活性成分,其中汉防己甲素(粉防己碱)、汉防己乙素(防己诺林碱)与汉防己丙素(cyclanoline, Cyc)是重要的双苄基异喹啉类生物碱成分,汉防己甲素和汉防己乙素有良好的抗癌活性,并对膀胱癌有良好的治疗效果^[7-8]。研究表明 Cyc 具有解热、镇痛、降压、舒张平滑肌等功效,但其对膀胱癌的作用尚未揭示。本研究采用 *N*-丁基-*N*-(4-羟丁基)-亚硝基胺(BBN)建立大鼠膀胱癌模型,通过免疫组化、免疫印迹等方法考察 Cyc 抗膀胱癌的作用及机制,为膀胱癌的治疗提供新的策略,也为防己的临床应用补充科学数据。

1 材料与仪器

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,7~8 周龄,购自南京青龙山动物养殖场,动物质量合格证号 SCXK(苏)2017-0001。动物饲养环境为室温 23~26 ℃,相对湿度 40%~70%,自由摄食饮水均用标准饲料。

1.2 药品与试剂

Cyc(批号 B20487,质量分数≥98%)购自上海澄绍生物科技有限公司;顺铂(批号 H37021357)购自齐鲁制药有限公司;BBN(批号 B0938)购自美国 TCI 公司;HE 试剂盒、免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂购自江苏凯基生物技术股份有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 试剂盒、RIPA 裂解缓冲液、GAPDH 抗体,购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL 试剂盒购自美国 Thermo 公司;MMP9

(ab76003)、Ki67(ab16667)、KLF4(ab214666)、p21(ab109199)、E-cadherin(ab212059)、CyclinD1(ab16663)、Wnt(ab15251)、 β -catenin(ab32572)、N-cadherin(ab76011)、Vimentin(ab92547)兔单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;羊抗兔 IgG-HRP 标记二抗(BA1055)购自武汉博士德生物工程有限公司;其他试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器

CUT4062 石蜡切片机(德国 SLEE 公司);十万分之一电子天平(日本岛津公司);DH-250 电热恒温培养箱(北京中兴伟业仪器有限公司);CK40 显微镜(日本 Olympus 公司);AU5800 全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司);Primo R 高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司);电泳仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为对照组、模型组、Cyc 低、高剂量(20、40 mg/kg)组、顺铂(5 mg/kg)组,每组 10 只。BBN 溶于 20%乙醇溶液配制成混悬液(0.4 kg/L)^[9]。除对照组外,其余各组大鼠 ig 0.5 mL BBN 混悬液,2 次/周,连续 8 周。Cyc 溶于生理盐水配制成 2、4 g/L 溶液,分别用于低、高剂量组,顺铂溶于生理盐水配制成 0.2 g/L 溶液^[10-11]。各给药组 ip 2 mL 设定剂量的药物,对照组和模型组 ip 生理盐水,1 次/d,连续 8 周。末次给药后,分离大鼠膀胱组织并称定质量。

2.2 膀胱组织病理组织学检查

膀胱组织以 10%甲醛固定 24 h,石蜡包埋,连续切片,厚 4 μ m,进行 HE 染色,于光学显微镜下进行观察膀胱组织病理变化。

2.3 免疫组化法检测膀胱组织 MMP9、Ki67 表达

膀胱组织切片脱蜡,加入 3% H₂O₂ 孵育 10 min,随后采用热抗原修复,以 5% BSA 封闭,滴加一抗(1:500)于 4 ℃ 孵育过夜后,滴加二抗室温孵育 30 min, DAB 显色。通过水洗、复染、脱水、透明与封片,于光学显微镜下观察。

2.4 免疫印迹法检测膀胱组织 KLF4、p21、CyclinD1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Wnt、 β -catenin 蛋白表达

称定大鼠膀胱组织 50 mg,加入 RIPA 裂解缓冲液 500 μ L 提取组织蛋白,采用 BCA 法对蛋白进行定量分析。蛋白样本经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯

酰胺凝胶电泳分离,转膜、染色、漂洗,于 5% BSA 中振荡封闭 1 h,滴加一抗(1:1 000)孵育过夜后,滴加羊抗兔 IgG-HRP 标记二抗常温孵育 1 h,随后加入 ECL 显影液。 β -Tubulin 作为内参校正误差,通过 Image J 软件分析条带。

2.5 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

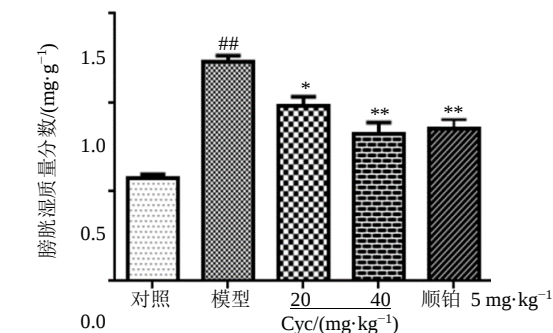
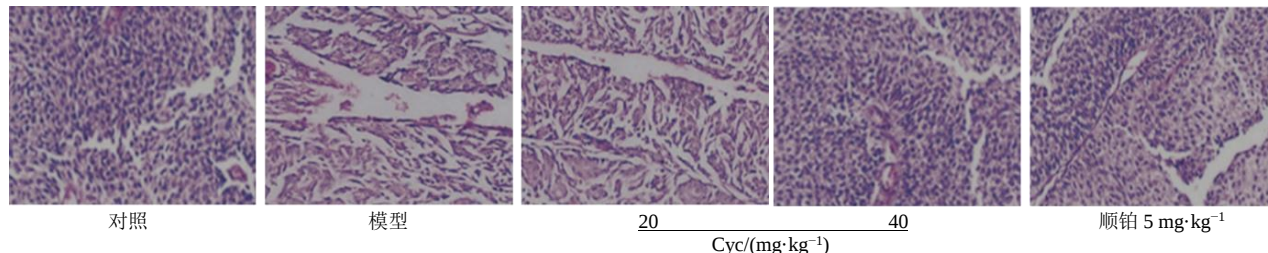
3 结果

3.1 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱湿质量指数的影响

如图 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠膀胱湿质量指数显著提高($P < 0.01$)。与模型组比较,Cyc 低、高剂量组和顺铂组大鼠膀胱湿质量指数显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织病理变化的影响

如图 2 所示,对照组大鼠膀胱组织结构完善,细胞黏膜及间质光滑平整,细胞扁平且排列有序,细胞核呈圆形,无炎性细胞浸润。模型组大鼠膀胱组织上皮细胞高度异型性增生,细胞排列紊乱、大小不一;



与对照组比较: ### $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

$P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱湿质量分数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Fig. 1 Effect of cyclophosphamide on wet weight index in bladder tissue of bladder cancer rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

图 2 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织病理变化的影响 ($\times 200$)
Fig. 2 Effect of cyclophosphamide on pathological changes in bladder tissue of bladder cancer rats ($\times 200$)

3.3 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织中 MMP9、Ki67 表达的影响

如图 3 所示,对照组大鼠膀胱组织中几乎无 MMP9 阳性细胞表达,且仅有少量 Ki67 阳性细胞表达。与对照组比较,模型组大鼠膀胱组织中 MMP9、Ki67 水平显著上调($P < 0.01$)。与模型组比较,Cyc 低、高剂量组和顺铂组大鼠膀胱组织中 MMP9、Ki67 水平显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.4 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织中 KLF4、p21、CyclinD1 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组大鼠膀胱组织中 KLF4、p21 蛋白表达显著降低,CyclinD1 蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,Cyc 低、高剂量和顺铂组均可显著上调大鼠膀胱组织 KLF4 水平,并显著下调 CyclinD1 水平($P < 0.05$ 、

0.01)。Cyc 高剂量和顺铂可显著上调大鼠膀胱组织 p21 蛋白表达($P < 0.01$)。

3.5 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组大鼠膀胱组织中 E-cadherin 表达显著下调,N-cadherin、Vimentin 表达显著上调($P < 0.01$)。与模型组比较,Cyc 低、高剂量和顺铂均显著上调大鼠膀胱组织中 E-cadherin 水平并显著下调 Vimentin 水平($P < 0.05$ 、 0.01)。Cyc 高剂量和顺铂可显著下调大鼠膀胱组织中 N-cadherin 水平($P < 0.01$)。

3.6 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织中 Wnt、 β -catenin 蛋白表达的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组大鼠膀胱组织中 Wnt、 β -catenin 表达显著上调($P < 0.01$)。

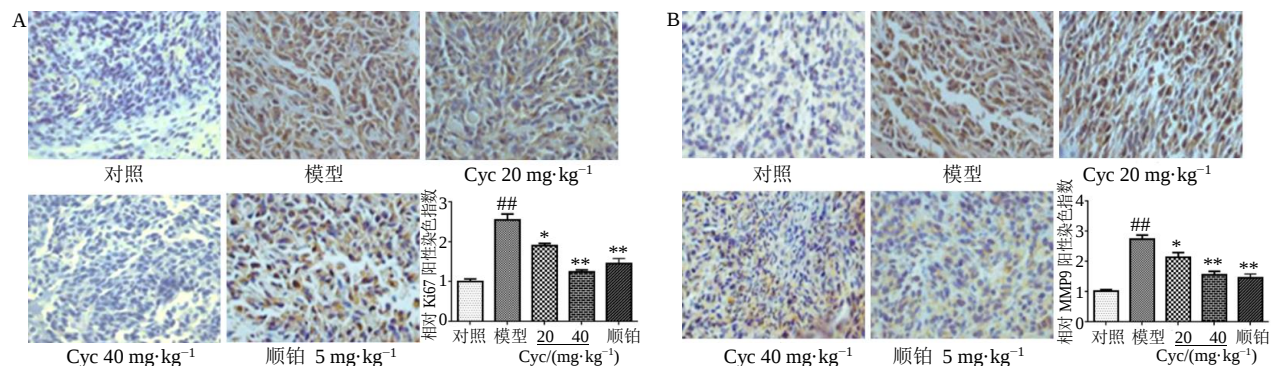


图 3 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织 MMP9 (A) 和 Ki67 (B) 表达的影响 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of cyclanoline on expressions of MMP9 (A) and Ki67 (B) in bladder tissue of bladder cancer rats ($\times 400$; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

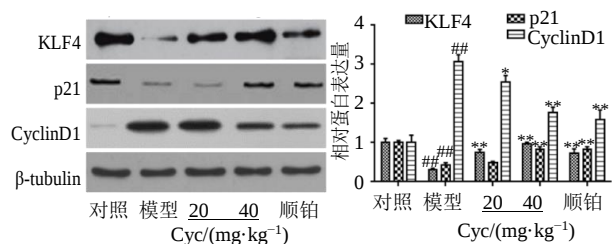


图 4 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织 KLF4、p21、CyclinD1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of cyclanoline on KLF4, p21 and CyclinD1 expressions in bladder tissue of bladder cancer rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

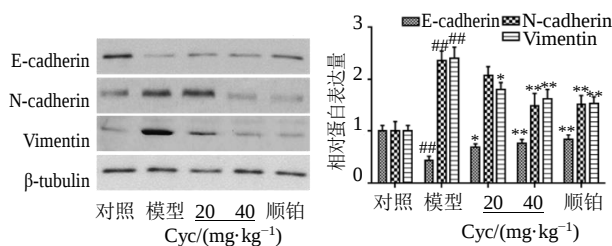


图 5 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of cyclanoline on E-cadherin, N-cadherin and Vimentin expressions in bladder tissue of bladder cancer rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

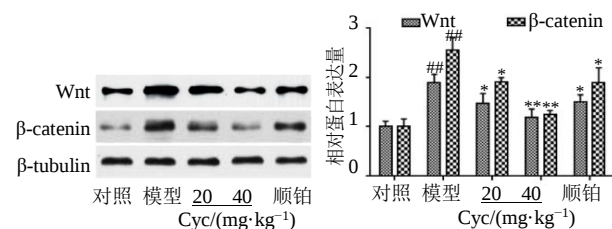


图 6 Cyc 对膀胱癌大鼠膀胱组织 Wnt、 β -catenin 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of cyclanoline on Wnt and β -catenin expressions in bladder tissue of bladder cancer rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与模型组比较, Cyc 低、高剂量和顺铂组均显著下调大鼠膀胱组织中 Wnt 水平, 并显著下调大鼠膀胱组织中 β -catenin 水平 ($P < 0.05, 0.01$)。

4 讨论

膀胱癌是泌尿系统中较常见的恶性肿瘤, 90% 患者为移行上皮细胞癌, 其次为鳞癌、腺癌。膀胱癌不仅发病率高, 复发率也极高, 10%~20% 患者进行浅表性膀胱癌术后复发时已转为浸润性癌。肌层浸润性膀胱癌恶性程度高、转移复发迅速、进展快, 5 年生存率仅为 25%^[12-13]。随着对膀胱癌病因的深入研究, 膀胱癌与职业暴露、空气污染、遗传易感性、药物、性别、吸烟等因素密切相关^[14]。目前的治疗方法仍以电切术和膀胱灌注卡介苗、丝裂霉素等药物为主, 但其极高的复发率、严重的毒副作用 (如尿血、尿痛、免疫抑制)、昂贵的费用, 进一步加重患者的压力, 因此寻找更有效的治疗方法及抗膀胱癌药物尤其重要。中医药对于治疗膀胱癌、提升患者生存质量有独特优势^[15]。中医认为膀胱癌属“尿血”“血淋”“癃闭”等范畴, 病机为湿热下注、肾阴亏虚, 临床常采用补益脾肾、清利湿热、泻火祛瘀等治法^[16]。防己味苦、性寒, 具有利水消肿、祛风湿止痛等功效, 常用于治疗小便不利、湿疮肿毒等, 对膀胱癌有良好的治疗效果^[7,17]。BBN 诱导的膀胱癌模型与临床较为相似^[18], 本研究通过建立 BBN 诱导的大鼠膀胱癌模型, 对防己中重要成分 Cyc 的抗膀胱癌作用及机制开展了深入研究。

膀胱癌病变是多因素、多步骤、多阶段的发展进程, 各种促癌因子、抑癌因子负责调控膀胱癌细胞生长、增殖、分化等信号传导。KLF4 为 Krüppel 样因子中的重要成员, 影响细胞周期的调控、细胞凋亡、分化, 在多种癌细胞增殖过程中发挥抑癌作

用。研究表明, KLF4 在正常膀胱上皮细胞中高水平表达, 但在肿瘤组织中低水平表达, 且随肿瘤发展 KLF4 表达逐步降低^[19-20], 因此 KLF4 是重要的膀胱癌抑制因子。免疫印迹结果表明, 膀胱癌大鼠膀胱中 KLF4 表达显著降低, Cyc 显著上调膀胱组织中 KLF4 水平。膀胱组织病理结果可见 Cyc 可有效缓解大鼠膀胱癌的病理进程, 逆转膀胱的癌症病变。由此提示, Cyc 可能通过上调 KLF4 从而治疗膀胱癌。

上皮细胞-间充质转化 (EMT) 与肿瘤细胞的增殖、侵袭和浸润密切相关, 在膀胱癌疾病进程中发挥着重要的调控作用^[21-22]。EMT 诱导细胞内上皮表型特征标志物 E-cadherin 合成减少, 继而使其极性和黏附性降低; EMT 也可诱导细胞内间充质表型特征标志物 N-cadherin、Vimentin 合成增加^[23]。研究发现, 过表达 KLF4 基因可抑制膀胱癌细胞的 EMT, E-cadherin 蛋白表达增加, 与细胞内游离的 β -catenin 结合成 E-cadherin/ β -catenin 复合体, 复合体加强细胞间的完整性与黏附性, 从而削弱癌细胞的侵袭与转移能力^[24-25]。结果表明 Cyc 可显著下调膀胱癌组织中 N-cadherin、Vimentin 的表达, 上调 E-cadherin 表达, 提示 Cyc 可逆转膀胱癌大鼠体内 EMT 进程。MMP9 通过降解细胞外基质, 参与肿瘤细胞黏附、血管侵入, 从而使肿瘤细胞发生侵袭和转移^[26]。膀胱癌中 β -catenin 表达下降, 其下游的 MMP9 表达也随之降低^[24]。Cyc 显著抑制膀胱癌大鼠膀胱组织中 Wnt、 β -catenin 的表达, 显著下调膀胱癌大鼠膀胱组织中 MMP9 水平, 提示 Cyc 可通过调控 KLF4/Wnt/ β -catenin 信号通路, 减少 MMP9 分泌, 逆转 EMT 进程, 继而抑制膀胱癌细胞的迁移与浸润, 从而发挥抗癌作用。

CyclinD1 为细胞周期启动蛋白, 促使细胞从 G₁ 期进入 S 期, 缩短 S 期, 从而促进细胞增殖。p21 是细胞周期调控蛋白, 可与 Cdk-cyclin 复合物结合使细胞停滞在 G₁ 期, 从而抑制细胞增殖。上调上游信号 KLF4 可有效促进 p21 表达, 并抑制 CyclinD1 表达, 抑制肿瘤细胞的增殖能力^[27]。Cyc 显著上调 p21 表达, 下调 CyclinD1 表达, 表明 Cyc 可通过 KLF4 靶点调控膀胱癌细胞周期, 使其阻滞于 G₁ 期, 抑制癌细胞增殖。Ki67 作为膀胱癌临床诊疗过程中的重要标志物, 与肿瘤的进展呈正相关^[28]。Cyc 显著下调 Ki67 水平, 确证了 Cyc 对细胞增殖的抑制作用。

汉防己甲素主要通过调控 AMPK/mTOR 信号通路, 诱导膀胱癌细胞凋亡, 同时逆转膀胱癌细胞耐药性^[29-30]; 汉防己乙素通过调控 mTOR 信号传导, 抑制膀胱癌细胞自噬, 并激活 Caspase 途径, 促进细胞凋亡^[31]。本研究发现 Cyc 可有效缓解膀胱癌大鼠的疾病进程, 促进膀胱癌组织中抑癌因子 KLF4 的表达。Cyc 对膀胱癌的具体干预机制可能与介导膀胱癌组织 KLF4/Wnt4/ β -catenin 信号传导, 调控 EMT 进程、MMP9 分泌, 抑制癌细胞的迁移与浸润能力有关。此外, 本研究揭示了 Cyc 可通过作用于 KLF4, 调控细胞周期调节蛋白 p21、CyclinD1 表达, 从而抑制膀胱癌细胞的增殖能力。本研究初步阐释了 Cyc 的抗癌机制, 为膀胱癌患者的治疗提供了新的药物研发方向, 也同时为中药防己的临床应用补充了科研数据。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] 周商言, 张曼. AG490 在人膀胱癌细胞株 Pumc-91 中 STAT3 的抑制作用 [J]. 标记免疫分析与临床, 2016, 23(4): 451-454.
- [3] 余婧, 孙丽. 中老年体检人群 CCL18 和 CEA 表达水平检测在膀胱癌的应用价值 [J]. 检验医学与临床, 2017, 14(7): 1006-1008.
- [4] 李芬, 王美英, 张振. 长链非编码 RNA 与膀胱癌的研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(5): 703-706.
- [5] Turner R M, Kwok C S, Chen-Turner C, et al. Thiazolidinediones and associated risk of bladder cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2014, 78(2): 258-273.
- [6] 王蓉, 马腾茂, 刘飞, 等. 防己的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 634-639.
- [7] 刘嘉琪, 张雅男, 赵婉, 等. 粉防己化学成分及药理学研究进展 [J]. 中医药学报, 2017, 45(3): 100-103.
- [8] 于有江, 罗雪, 叶记林, 等. 汉防己乙素对人肺癌 95D 细胞凋亡的诱导作用及机制 [J]. 山东医药, 2017, 57(38): 5-7.
- [9] 李彩霞, 曾星, 黄羽, 等. 猪苓及猪苓多糖对 BBN 诱导的膀胱癌大鼠胸腺、脾指数及 CD86 表达的影响 [J]. 免疫学杂志, 2012, 28(2): 116-119.
- [10] Tomita M, Kozuka M, Lu S T. Studies on the alkaloids of menispermaceae plants [J]. *Yakugaku Zasshi*, 1967, 87(3): 315-316.
- [11] 李研. 白藜芦醇对荷卵巢癌大鼠免疫功能的影响

- [J]. 医学研究杂志, 2016, 45(5): 122-125.
- [12] 牛吉瑞, 王海, 范欣荣, 等. 肌层浸润性膀胱癌患者根治性膀胱切除术的预后分析 [J]. 中国医药, 2015, 10(9): 1344-1346.
- [13] 王博, 林建勋, 于浩, 等. CD8⁺ T 细胞的分布特征及其与膀胱癌预后关系的研究 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2015, 36(7): 500-504.
- [14] 白云金, 李金洪, 魏强. 膀胱癌病因学研究进展 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2014, 19(10): 693-697.
- [15] 刘生锋, 刘泰荣, 殷嫦娥, 等. 中药抗膀胱癌实验研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(1): 151-155.
- [16] 刘春萍, 曾星. 中医药抗膀胱癌的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2016(5): 1184-1186.
- [17] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [18] Wang X, Liang Z, Xu X, *et al.* miR-148a-3p represses proliferation and EMT by establishing regulatory circuits between ERBB3/AKT2/c-myc and DNMT1 in bladder cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): e2503.
- [19] 李晓光. 初发非肌层浸润性膀胱癌中 KLF4、E-cadherin 的表达及其关系探讨 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2018.
- [20] 王得胜. KLF4 及 E-cadherin 在复发非肌层浸润性膀胱癌中表达检测及意义 [D]. 遵义: 遵义医学院, 2018.
- [21] Pang X, Fu X, Chen S, *et al.* Overexpression of CIP2A promotes bladder cancer progression by regulating EMT [J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(3): 289-295.
- [22] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- [23] 席剑铭, 张能, 李晓光, 等. 过表达 KLF4 通过 Wnt/ β -catenin 信号途径调控膀胱癌细胞上皮间质转化及迁移 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(8): 862-867.
- [24] Du Y H, Wang Y C, Zhang F, *et al.* Regulation of metastasis of bladder cancer cells through the WNT signaling pathway [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(11): 8839-8844.
- [25] Yang X Z, Cui S Z, Zeng L S, *et al.* Overexpression of Rab1B and MMP9 predicts poor survival and good response to chemotherapy in patients with colorectal cancer [J]. *Aging*, 2017, 9(3): 914-931.
- [26] 罗艺洪, 李秋芬. miR-200b 通过调控 KLF4 作用于 p21 及 Cyclin-D1 对子宫内膜癌细胞周期的影响 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(20): 14-16.
- [27] Ohtani M, Kakizoe T, Sato S, *et al.* Strain differences in mice with invasive bladder carcinomas induced by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl) nitrosamine [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1986, 112(2): 107-110.
- [28] Wang L, Feng C, Ding G, *et al.* Ki67 and TP53 expressions predict recurrence of non-muscle-invasive bladder cancer [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4): 2989-2995.
- [29] Kou B, Liu W, Xu X, *et al.* Autophagy induction enhances tetrandrine-induced apoptosis via the AMPK/mTOR pathway in human bladder cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 3137-3143.
- [30] 黄玉清. 粉防己碱逆转膀胱癌耐药细胞株 BIU-87/ADM 的凋亡抗性及其机制的初步研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2011.
- [31] Fan B, Zhang X Y, Ma Y L, *et al.* Fangchinoline induces apoptosis, autophagy and energetic impairment in bladder cancer [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 1003-1011.