

## 复方苦参注射液诱导自噬促进膀胱癌细胞凋亡机制的研究

张丽惠, 张琬莹, 张国伟\*, 张苗苗, 秦桂芳

河北大学中医学院, 河北 保定 071000

**摘要:** **目的** 探究复方苦参注射液对膀胱癌 T24 细胞增殖、凋亡及自噬的影响, 并探究其可能的分子机制, 为复方苦参注射液在临床上治疗膀胱癌提供理论依据。**方法** CCK-8 法检测复方苦参注射液对 T24 细胞增殖的影响。流式细胞术检测复方苦参注射液对 T24 细胞凋亡的影响。MDC 染色法检测复方苦参注射液对 T24 细胞自噬的影响。蛋白免疫印迹和免疫荧光实验检测复方苦参注射液对 T24 细胞凋亡关键蛋白和自噬关键蛋白的影响。**结果** 复方苦参注射液能有效抑制 T24 细胞增殖。复方苦参注射液能诱导 T24 细胞发生凋亡和自噬。蛋白免疫印迹和免疫荧光实验结果表明, 随着复方苦参注射液剂量的升高, T24 细胞中 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、自噬选择性底物 (P62) 的表达逐渐下降, B 细胞淋巴瘤 2 相关 X 蛋白 (Bax)、活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cleaved-Caspase 3)、自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 (Beclin1)、微管相关蛋白 B 轻链 3-II (LC3II) 的表达逐渐升高 ( $P < 0.05$ ), Bcl-2/Bax 比值逐渐减小 ( $P < 0.05$ )。**结论** 复方苦参注射液能抑制 T24 细胞的增殖、调节 T24 细胞自噬, 诱导 T24 细胞凋亡。

**关键词:** 复方苦参注射液; 膀胱癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞自噬

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)21-5516-07

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.016

## Study on mechanism of Compound Kushen Injection inducing autophagy to promote apoptosis of bladder cancer cells

ZHANG Li-hui, ZHANG Wan-ying, ZHANG Guo-wei, ZHANG Miao-miao, QIN Gui-fang

College of Chinese Medicine, Hebei University, Baoding 071000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Compound Kushen Injection on proliferation, apoptosis, and autophagy of bladder cancer T24 cells, and to explore the molecular mechanisms involved, and provide theoretical basis for Compound Kushen Injection in clinical treatment of bladder cancer. **Methods** The effect of Compound Kushen Injection on proliferation of bladder cancer cells was detected by CCK-8 method. Flow cytometry was used to detect the effect of Compound Kushen Injection on bladder cancer cell apoptosis. MDC staining was used to detect the effect of Compound Kushen Injection on autophagy of bladder cancer cells. Western blotting and immunofluorescence experiments were used to detect the effect of Compound Kushen Injection on key protein involved in apoptosis and autophagy of bladder cancer cells. **Results** Compound Kushen Injection effectively inhibited the proliferation of bladder cancer T24 cells. Compound Kushen Injection induced bladder cancer cells to undergo apoptosis and autophagy. The results of Western blotting and immunofluorescence experiments showed that as the concentration of Compound Kushen Injection increased, the expressions of Bcl-2 and P62 in bladder cancer T24 cells were gradually decreased, and the expressions of Bax, cleaved-Caspase 3, Beclin1, and LC3II were increased ( $P < 0.05$ ), but Bcl-2/Bax ratio was decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Compound Kushen Injection can inhibit the proliferation of bladder cancer T24 cells, regulate autophagy of bladder cancer T24 cells, and induce bladder cancer T24 cell apoptosis.

**Key words:** Compound Kushen Injection; bladder cancer; cell proliferation; cell apoptosis; cell autophagy

膀胱癌发病率在全球恶性肿瘤发病率中位居第 10 位<sup>[1]</sup>。在我国, 膀胱癌发病率占泌尿生殖系统的首位<sup>[2]</sup>。临床上, 膀胱癌有明确的治疗方案, 但治疗效果不佳<sup>[3]</sup>。长期的随访和进一步治疗给患者的

收稿日期: 2020-03-09

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (H2018201179); 河北省教育厅青年基金资助项目 (QN2019146); 河北省卫生厅科研基金资助项目 (20190948); 河北大学医学学科培育项目 (2020A15); 国家大学生创新创业项目 (2020376)

作者简介: 张丽惠 (1993—), 女, 河北唐山人, 研究生在读, 从事中西医结合肿瘤研究。Tel: 15932280953 E-mail: ZLH19931007@163.com

\*通信作者 张国伟, 男, 副教授, 硕士生导师, 从事中西医结合基础研究。Tel: 13663125198 E-mail: xxzgw@126.com

家庭经济带来巨大的负担<sup>[4]</sup>。临床上,应用中药辅助治疗肿瘤取得了很好的效果。采用中医中药法治肿瘤能够减轻化疗药物给人体带来的不良反应,降低机体对化疗产生的耐药性<sup>[5]</sup>,增加机体对药物的敏感性<sup>[6]</sup>。复方苦参注射液是由苦参、白土苓经加工精制而成的中药制剂,其入血活性成分苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱和槐定碱均被证实有抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>。临床上复方苦参注射液已被广泛应用于肺癌、胃癌、肝癌、肠癌、乳腺癌、膀胱癌等多种癌症的治疗<sup>[8-9]</sup>。研究表明,复方苦参注射液可能通过抑制血管内皮的生长,诱导膀胱癌 T24 细胞发生缺氧,阻止新血管的生成来促进 T24 细胞凋亡<sup>[10]</sup>。本实验拟用 T24 细胞株作为研究对象,观察复方苦参注射液对 T24 细胞凋亡和自噬的影响,并进一步探究其可能的分子机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人膀胱癌 T24 细胞株购自中国医学科学院肿瘤细胞库。

### 1.2 主要药物与试剂

复方苦参注射液(山西振东制药股份有限公司,规格 5 mL/支,含总生物碱 10.82 mg/mL,批号 20171122);注射用盐酸表阿霉素(辉瑞无锡制药有限公司,规格 10 mg/支,批号 111110502);McCoy's 5A 细胞培养基(美国 Hyclone 公司,批号 AC13430279);CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 FH783);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 VN665);单丹磺酰尸胺(Dansylcadaverine, MDC,北京索莱宝科技有限公司,批号 G0170);RIPA 裂解液(北京 Biosharp 有限公司,批号 68087025);二辛可宁酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 20190711);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号 K5MA6541C);特超敏 ECL 发光试剂盒(中国 Beyotime 生物技术有限公司,批号 030519190801);4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,中科瑞泰生物科技有限公司,批号 6709771);抗荧光淬灭封片剂(北京 Biosharp 有限公司,批号 162504); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤 2 相关 X 蛋白(Bax)、活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cleaved-Caspase 3)、自噬关键分子酵母 Atg6 同系物(Beclin1)、微管相关蛋白 B 轻链 3-II(LC3II)、

自噬选择性底物(P62)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)、FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体均购自北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 bs-0061R、bs-5903R、bs-0127R、bs-0081R、bs-1353R、bs-8878R、bs-2951R、bs-40295G-HRP、bs-0295G。

### 1.3 主要仪器

ACB-4A1 型超净工作台(比利时 Esco 公司);HF160W 型细胞培养箱(上海力康公司);Elx800 型酶标仪(美国 BIO-TEK 公司);DW-86L959W 型超低温冰箱(青岛海尔股份有限公司);TH4-200 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Micro21R 型低温离心机(美国 Thermo Scientific 公司);FACSVerse 型流式细胞仪(美国 BD 公司);JY300C 型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);4200 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);Ni-U 型荧光显微镜(日本尼康公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

T24 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 McCoy's 5A 细胞培养基中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 湿化的细胞培养箱中培养。待细胞生长至对数期使用 0.25% 胰酶消化液进行消化、传代,每 2~3 天进行 1 次传代。取第 3、4 代细胞进行实验。

### 2.2 CCK-8 法检测细胞活性

T24 细胞以 8 000/孔接种于无菌 96 孔板中,待细胞贴壁更换低血清 McCoy's 5A 培养液以做细胞同步化处理。24 h 后加入含有终质量浓度为 40、80、120、160  $\mu$ g/mL 复方苦参注射液的完全培养液培养,同时设置空白组(无 T24 细胞)、对照组(DMSO)和阳性对照组(表阿霉素 5  $\mu$ mol/L),每组设置 4 个复孔。24、48 h 后每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 孵育 2 h,酶标仪在波长 450 nm 处测每孔吸光度(A)值,并计算细胞存活率。用 Prism 5.0 软件计算药物的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.3 倒置显微镜观察细胞形态

将 T24 细胞常规接种于 6 孔板中,同步化处理同“2.2”项。根据 CCK-8 实验所得药物抑制 T24 细胞的 IC<sub>50</sub>,选取终质量浓度为 120  $\mu$ g/mL 的复方苦参注射液干预 T24 细胞,24、48 h 后倒置荧光显微镜观察细胞状态。

### 2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

常规培养 T24 细胞,以 2 $\times$ 10<sup>5</sup>/孔均匀接种于 6

孔板中,同步化处理同“2.2”项。加入含有终质量浓度为 40、80、120、160 μg/mL 复方苦参注射液的完全培养液培养 24 h,同时设置对照组(DMSO)。PBS 缓冲液洗涤细胞,使用无 EDTA 的胰蛋白酶消化细胞,1 000 r/min 离心 1 min。加入 1×Annexin V 结合液重悬细胞后加入 5 μL Annexin V-FITC、5 μL PI 混匀,室温避光下培养 15 min,随即用流式细胞仪进行检测。

### 2.5 MDC 染色检测细胞自噬

将细胞接种在放有无菌盖玻片的 24 孔板内,细胞同步处理、分组加药同“2.4”项。取出贴有细胞的盖玻片,用 1×Wash Buffer 清洗玻片,每片盖玻片用 150 μL MDC 进行染色,室温避光染色 30 min。染色结束后用 1×Wash Buffer 清洗,荧光显微镜观察结果。Image J 软件计算相对荧光强度。

### 2.6 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达

细胞同步化处理、分组加药同“2.4”项。PBS 清洗细胞,使用含有 1%蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 蛋白检测法测定各组蛋白质量浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,经转膜将目的蛋白转移至 PVDF 膜上。封闭液封闭 20 min,加入稀释好的 Bcl-2、Bax、Cleaved-Caspase 3、Beclin 1、LC3 和 P62 一抗,4 ℃摇动孵育过夜。次日加入稀释好的二抗,室温摇动孵育 1 h。膜上均匀滴加 ECL 化学发光显影液,避光孵育 2 min 后于化学发光成像系统中显影。Image J 软件进行蛋白条带灰度分析。

### 2.7 免疫荧光染色

将无菌盖玻片放置于 6 孔板中制备细胞爬片,细胞同步处理、分组加药同“2.4”项。PBS 缓冲液清洗细胞爬片。多聚甲醛固定、山羊血清封闭细胞

爬片。将爬片放入湿盒中进行一抗孵育,方法同“2.6”项。此后步骤需要避光,用 PBST 清洗爬片加入稀释好的荧光二抗,孵育 1 h。PBST 缓冲液清洗爬片,滴加 DAPI 室温孵育 5 min,用含抗荧光淬灭剂的封片剂封片,荧光显微镜上观察结果。Image J 软件计算相对荧光强度。

### 2.8 统计学分析

使用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),如果方差齐采用 LSD 法,若方差不齐,采用单因素方差分析 Dunnett's T3 进行两两比较。

## 3 结果

### 3.1 复方苦参注射液对 T24 细胞增殖的影响

如表 1 所示,复方苦参注射液能抑制 T24 细胞增殖,并具有浓度、时间相关性。复方苦参注射液干预 T24 细胞 24、48 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 142.06、81.34 μg/mL。

### 3.2 复方苦参注射液对 T24 细胞形态的影响

复方苦参注射液对 T24 细胞形态学的影响结果如图 1 所示。40×倒置相差显微镜下可见对照组细胞形态正常,贴壁性好,分布均匀,多呈梭形,胞核清晰,胞质均匀透亮。经复方苦参注射液干预 24、48 h 后细胞数量明显减少,部分细胞发生死亡,呈斑块样脱落,细胞形态皱缩,细胞间距增大呈典型凋亡形态改变,并呈现时间相关性。

### 3.3 复方苦参注射液对 T24 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果如表 2 和图 2 所示,与对照组相比,随着复方苦参注射液剂量的增加,T24 细胞凋亡比例逐渐增加。且不同剂量复方苦参注射液组的凋亡率差别具有统计学意义(*P*<0.001)。

表 1 复方苦参注射液对 T24 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 1 Effect of Compound Kushen Injection on proliferation of T24 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

| 组别      | 剂量/(μg·mL <sup>-1</sup> ) | 细胞存活率%                      |                                |
|---------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
|         |                           | 24 h                        | 48 h                           |
| 对照      | —                         | 99.55±0.61                  | 99.89±0.25                     |
| 表阿霉素    | 5 μmol·L <sup>-1</sup>    | 74.32±1.40 <sup>***</sup>   | 60.08±1.31 <sup>***###</sup>   |
| 复方苦参注射液 | 40                        | 75.67±1.79 <sup>***Δ</sup>  | 64.20±2.29 <sup>***Δ###</sup>  |
|         | 80                        | 66.54±2.62 <sup>***ΔΔ</sup> | 51.19±1.92 <sup>***ΔΔ###</sup> |
|         | 120                       | 58.66±2.27 <sup>***ΔΔ</sup> | 41.57±2.24 <sup>***ΔΔ###</sup> |
|         | 160                       | 46.81±2.67 <sup>***ΔΔ</sup> | 30.06±2.34 <sup>***ΔΔ###</sup> |

与对照组比较: <sup>\*\*\*</sup>*P*<0.001; 与表阿霉素组比较: <sup>Δ</sup>*P*<0.01 <sup>ΔΔ</sup>*P*<0.001; 与同组 24 h 比较: <sup>###</sup>*P*<0.001

<sup>\*\*\*</sup>*P*<0.001 vs control group; <sup>Δ</sup>*P*<0.01 <sup>ΔΔ</sup>*P*<0.001 vs epirubicin group; <sup>###</sup>*P*<0.001 vs the same group for 24 h

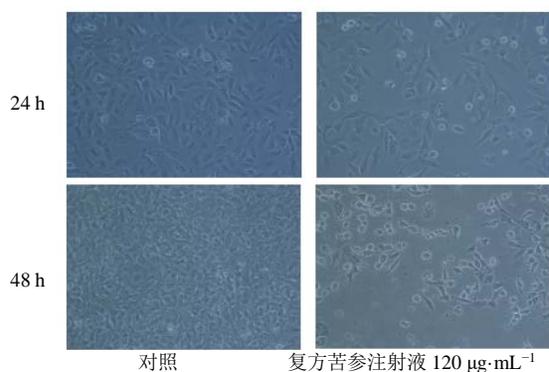


图 1 复方苦参注射液对 T24 细胞形态的影响 (×40)

Fig. 1 Effect of Compound Kushen Injection on morphology of T24 cells (×40)

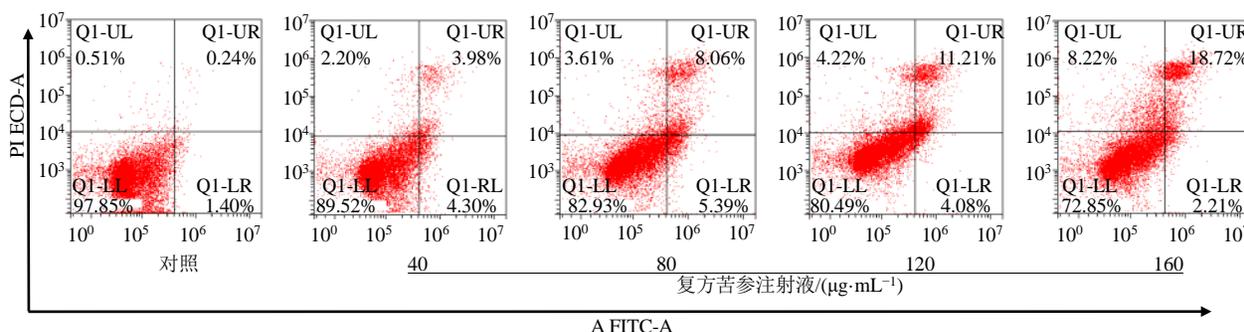


图 2 复方苦参注射液对 T24 细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of Compound Kushen Injection on apoptosis of T24 cells

### 3.4 复方苦参注射液对 T24 细胞自噬的影响

MDC 能够将细胞内形成的自噬体进行特异性染色,发出蓝绿色荧光。表 3 和图 3 表明随着复方苦参注射液干预 T24 细胞剂量的增加,自噬荧光强度逐渐增加 ( $P < 0.05, 0.001$ ),且各组荧光强度的差别具有统计学意义。

### 3.5 复方苦参注射液对 T24 细胞蛋白表达的影响

如表 4 和图 4~5 所示,与对照组相比,复方苦参注射液能降低 T24 细胞 Bcl-2 和 P62 蛋白表达水平,增加 Bax、cleaved-Caspase 3、Beclin1、LC3II 的蛋白表达水平。一定浓度下与对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

### 3.6 免疫荧光染色结果

如表 5 和图 6~7 所示,复方苦参注射液组与对照组 FITC 标记的绿色荧光表达强度不同。结果表明,与对照组相比,120 µg/mL 复方苦参注射液干预 24 h 后, T24 细胞 Bcl-2、P62 表达量下降, Bax、cleaved-Caspase 3、Beclin1、LC3II 表达量均增加,差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

表 2 复方苦参注射液对 T24 细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Compound Kushen Injection on apoptosis rate of bladder cancer T24 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别      | 剂量/(µg·mL <sup>-1</sup> ) | 凋亡率%            |
|---------|---------------------------|-----------------|
| 对照      | —                         | 0.62 ± 0.11     |
| 复方苦参注射液 | 40                        | 7.99 ± 0.70***  |
|         | 80                        | 13.01 ± 0.64*** |
|         | 120                       | 15.80 ± 0.48*** |
|         | 160                       | 21.06 ± 0.44*** |

与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group

表 3 复方苦参注射液对 T24 细胞自噬的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of Compound Kushen Injection on autophagy of T24 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别      | 剂量/(µg·mL <sup>-1</sup> ) | 相对荧光强度         |
|---------|---------------------------|----------------|
| 对照      | —                         | 1.00           |
| 复方苦参注射液 | 40                        | 1.26 ± 0.06*   |
|         | 80                        | 1.35 ± 0.08*   |
|         | 120                       | 1.64 ± 0.14*** |
|         | 160                       | 2.16 ± 0.14*** |

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$

\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group

## 4 讨论

近年来,随着现代生物学及分子技术水平迅速发展,传统的中医药体系逐渐与细胞凋亡、自噬这些微观辨证思想结合<sup>[11]</sup>。研究发现,在肿瘤的治疗上,运用中医药疗法能诱导癌细胞凋亡,调节凋亡和自噬信号通路<sup>[12]</sup>。细胞凋亡过程非常复杂, Bcl-2 他成员抑制凋亡,如 Bcl-2、Bag-1 和 Mcl-2<sup>[13-14]</sup>。Caspase 3 是参与细胞凋亡的关键蛋白酶,细胞在发

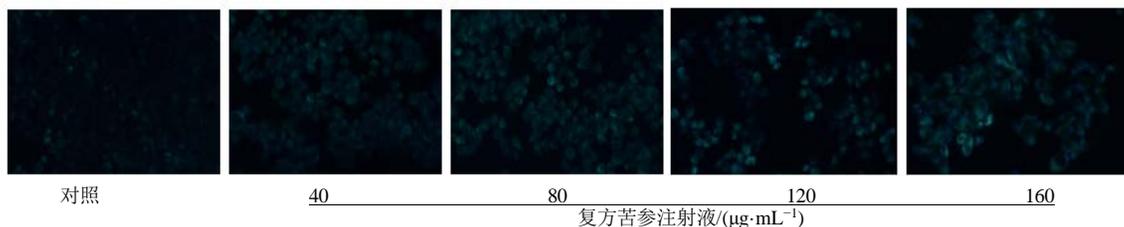


图 3 复方苦参注射液对 T24 细胞自噬的影响

Fig. 3 Effect of Compound Kushen Injection on autophagy of T24 cells

表 4 复方苦参注射液对 T24 细胞凋亡、自噬关键蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effects of Compound Kushen Injection on apoptosis and autophagy key protein expression of T24 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别      | 剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 蛋白相对表达量      |               |                   |               |               |               |
|---------|---|--------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|
|         |   | Bcl-2        | Bax           | cleaved-Caspase 3 | P62           | Beclin1       | LC3II         |
| 对照      | —                                       | 0.89 ± 0.03  | 0.53 ± 0.04   | 0.76 ± 0.04       | 0.50 ± 0.03   | 0.50 ± 0.02   | 0.48 ± 0.04   |
| 复方苦参注射液 | 40                                      | 0.86 ± 0.05  | 0.66 ± 0.03*  | 0.79 ± 0.04       | 0.69 ± 0.05*  | 0.65 ± 0.07*  | 0.71 ± 0.03*  |
|         | 80                                      | 0.80 ± 0.04* | 0.70 ± 0.03*  | 0.87 ± 0.03*      | 0.77 ± 0.04*  | 0.74 ± 0.03*  | 0.86 ± 0.01*  |
|         | 120                                     | 0.72 ± 0.04* | 0.79 ± 0.05*  | 1.00 ± 0.08*      | 0.89 ± 0.01*  | 0.88 ± 0.03*  | 0.96 ± 0.04** |
|         | 160                                     | 0.52 ± 0.06* | 0.91 ± 0.06** | 1.02 ± 0.08*      | 0.91 ± 0.04** | 1.02 ± 0.10** | 1.07 ± 0.07** |

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

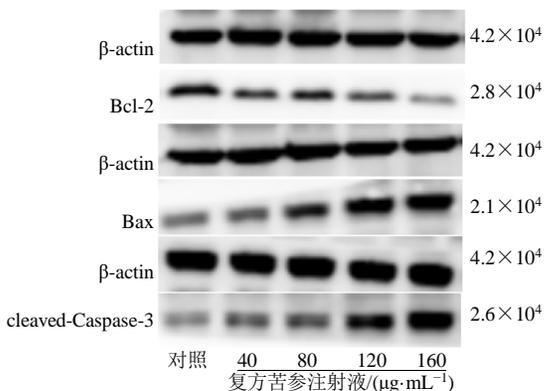


图 4 复方苦参注射液对 T24 细胞凋亡相关蛋白表达的影响  
Fig. 4 Effect of Compound Kushen Injection on expression of apoptosis-related proteins in T24 cells

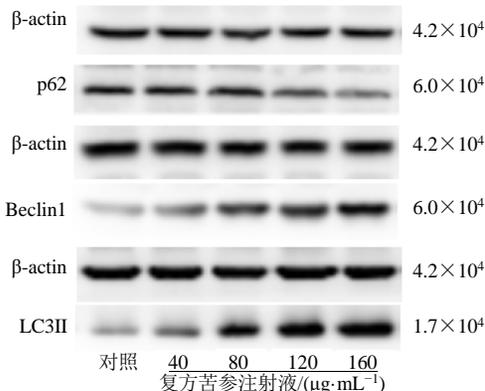


图 5 复方苦参注射液对 T24 细胞自噬相关蛋白表达的影响  
Fig. 5 Effect of Compound Kushen Injection on expression of autophagy-related proteins in T24 cells

表 5 复方苦参注射液对 T24 细胞蛋白表达的平均相对荧光强度 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Average relative protein fluorescence intensity of Compound Kushen Injection after intervention of T24 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别      | 剂 量/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) | 相对荧光强度          |                 |                   |                 |                 |                 |
|---------|--|-----------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|         |  | Bcl-2           | Bax             | cleaved-Caspase 3 | P62             | Beclin1         | LC3II           |
| 对照      | —  | 47.27 ± 1.36    | 44.27 ± 3.68    | 38.35 ± 2.41      | 43.35 ± 3.62    | 45.20 ± 3.13    | 46.19 ± 0.82    |
| 复方苦参注射液 | 120                                      | 29.03 ± 1.60*** | 88.86 ± 1.39*** | 93.23 ± 2.24***   | 33.03 ± 2.38*** | 87.71 ± 2.09*** | 88.39 ± 1.88*** |

与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group

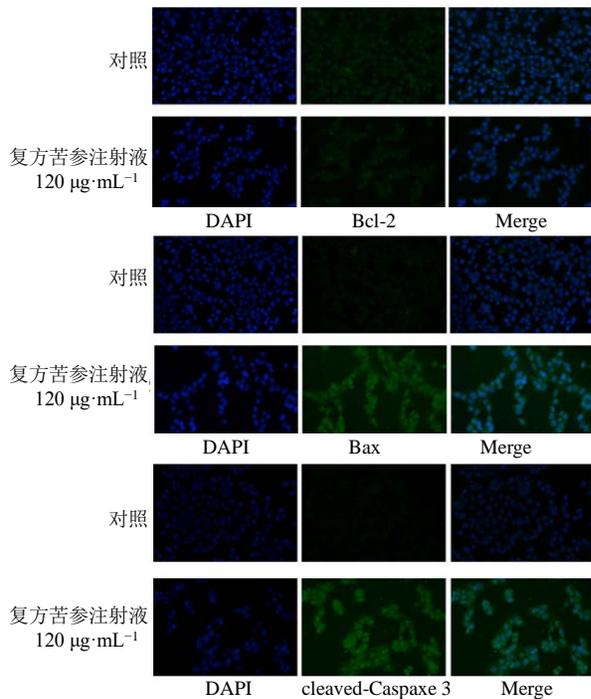


图 6 复方苦参注射液干预 T24 细胞后凋亡相关蛋白表达的免疫荧光结果

Fig. 6 Immunofluorescence results of apoptosis-related protein expression after intervention of Compound Kushen Injection on T24 cells

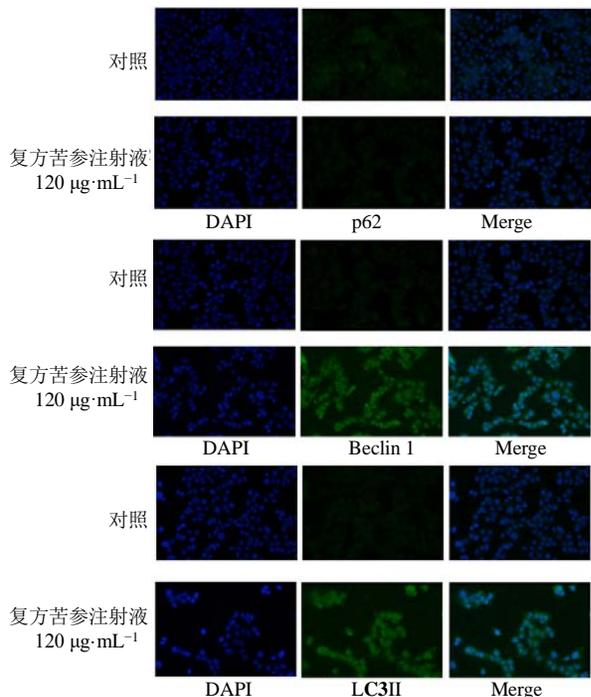


图 7 复方苦参注射液干预 T24 细胞后自噬相关蛋白表达的免疫荧光结果

Fig. 7 Immunofluorescence results of autophagy-related protein expression after intervention of Compound Kushen Injection on T24 cells

生凋亡时才能生成激活型 Caspase 3<sup>[15]</sup>。Beclin1 是第 1 个被发现的参与调控疾病的必要自噬基因<sup>[16]</sup>。Beclin1 蛋白表达的增加能够抑制肿瘤的发生发展<sup>[17]</sup>。LC3 是目前用来检测自噬可靠的标志物，通过监测 LC3II 与内参基因相对表达量的变化为检测细胞内自噬进展的标准。P62 是自噬降解底物，通常随着自噬增强，P62 表达减弱<sup>[18]</sup>。研究表明，许多中药有效成分都有调节肿瘤细胞自噬的作用<sup>[19]</sup>。复方苦参注射液多种入血活性成分亦有调节自噬，促进肿瘤细胞凋亡的作用。如苦参碱能够通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导非小细胞癌 A549 产生自噬，进而促进细胞凋亡<sup>[20]</sup>。氧化苦参碱能够减轻砷导致的肝细胞 HSC 产生的自噬，从而抑制肝纤维化<sup>[21]</sup>。槐果碱能够上调 LC3II 进而上调自噬，促进胃癌细胞凋亡<sup>[22]</sup>。

本研究表明复方苦参注射液能通过上调 Beclin1、LC3II 表达，下调 P62 表达来诱导 T24 细胞中自噬。通过上调 cleaved-Caspase 3 和 Bax 的表达，减少抑凋亡因子 Bcl-2 的表达，降低 Bcl-2/Bax 的比值来促进凋亡。虽然细胞凋亡和自噬分别涉及到的机制不同，但二者的通路中存在相同的刺激因子和调节蛋白，在促进细胞死亡中有着交互作用的关系<sup>[23]</sup>。临床上，应用复方苦参注射液膀胱灌注或静脉注射来治疗膀胱癌已经起到了较好的疗效<sup>[24]</sup>。本研究为今后运用复方苦参注射液治疗和辅助治疗膀胱癌提供了理论依据，不失为应用中西医结合疗法通过调节肿瘤细胞自噬，促进肿瘤细胞凋亡治疗癌症的新思路。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 赫捷, 陈万青. 2017 中国肿瘤登记年报 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [3] 黄传书, 蒋国松, 黄超. 膀胱癌治疗基础及临床转化研究的前沿和热点 [J]. *临床泌尿外科杂志*, 2017, 32(10): 735-740.
- [4] 陈真真. 膀胱癌术后患者反刍性沉思、心理韧性与创伤后成长的关系研究 [D]. 延吉: 延边大学, 2018.
- [5] 汤涛, 董伟, 张婧, 等. 中药单体成分逆转肿瘤多药耐药的研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48(4): 792-797.
- [6] 李云祥, 梁引库, 高飞雄, 等. 中药治疗乳腺癌疾病研

- 究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 211-219.
- [7] Gao L, Wang K X, Zhou Y Z, *et al.* Uncovering the anticancer mechanism of Compound Kushen Injection against HCC by integrating quantitative analysis, network analysis and experimental validation [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 624-639.
- [8] He R R, Ou S Y, Chen S C, *et al.* Network pharmacology-based study on the molecular biological mechanism of action for Compound Kushen Injection in anti-cancer effect [J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e918520.
- [9] 王君, 任毅. 复方苦参注射液联合 ET 方案治疗乳腺癌的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(7): 2137-2141.
- [10] 张林超, 孙继建, 潘世杰, 等. 复方苦参注射液对膀胱癌细胞增殖、侵袭的影响及相关机制分析 [J]. 中药材, 2017, 40(5): 1208-1211.
- [11] 胡朋言, 王伟, 梁雪, 等. 细胞自噬与相关中医辨证体系的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(9): 2217-2219.
- [12] 王晓燕, 张曦文, 李卫东, 等. 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路探讨中医药通过活性氧介导的内质网应激调控细胞自噬和凋亡抑制结肠癌转移的研究概况 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(1): 40-44.
- [13] Adriana M C, Gabriela M M, Sumiko M, *et al.* Pro-apoptotic signals of the bcl-2 gene family in the rat uterus occurs in the night before the day of estrus and precedes ovulation [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2003, 208(1/2): 31-39.
- [14] 姚鲲, 杨莹, 胡荣, 等. TIEG1 对 HL-60 细胞凋亡及 Bcl-2/Bax 表达的影响 [J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(3): 587-590.
- [15] 李静岩. Caspase-3 与肿瘤关系的研究 [J]. 医学综述, 2005, 11(5): 430-432.
- [16] Liang X H, Jackson S, Seaman M, *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1 [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 672-676.
- [17] Yue Z, Jin S, Yang C, *et al.* Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15077-15082.
- [18] 吕晓希, 胡卓伟. 自噬流的检测方法 [J]. 药学学报, 2016, 51(1): 45-51.
- [19] 佳娜提·达吾列提, 姜楠, 寇俊萍, 等. 调节细胞自噬的中药有效成分研究进展 [J]. 中草药, 2014, 45(16): 2283-2292.
- [20] 郝艳梅, 殷红梅, 朱超莽, 等. 苦参碱通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路促进非小细胞肺癌 A549 细胞的自噬和凋亡 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(7): 760-765.
- [21] 马子华, 张景允, 杨柳, 等. 氧化苦参碱干预神经星状细胞活化中细胞自噬的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(9): 1662-1667.
- [22] Huang Y J, Chen X H, Guo G H, *et al.* Sophocarpine inhibits the growth of gastric cancer cells via autophagy and apoptosis [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2019, 1(24): 616-627.
- [23] Zhu H, Zhang Y M. Life and death partners in post-PCI restenosis: Apoptosis, autophagy, and the cross-talk between them [J]. *Cur Drug Targets*, 2018, 19(9): 1003-1008.
- [24] 赵东, 斯晓芳. 复方苦参注射液膀胱灌注结合放疗综合治疗中晚期膀胱癌的疗效分析 [J]. 医药前沿, 2015(23): 209-210.