

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.005

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.005

葛根素联合 γ 突触核蛋白siRNA对膀胱癌细胞生长的抑制作用

王国政¹, 沈金贵¹, 邹永平¹, 汪雪¹, 李笑蕾²

(1. 上海市徐汇大华医院泌尿外科, 上海 200237; 2. 吉林大学中日联谊医院神经内科, 长春 130033)

[摘要] 目的: 研究葛根素联合 γ 突触核蛋白(synuclein gamma, SNCG)siRNA对膀胱癌细胞生长的影响。方法: 用0, 100, 200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葛根素培养液培养膀胱癌细胞, 以MTT法检测细胞增殖变化并计算半数抑制浓度。在膀胱癌细胞中转染SNCG siRNA重组慢病毒和阴性对照慢病毒, 以实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和Western印迹法检测干扰效果。用半数抑制浓度的葛根素处理稳定转染SNCG siRNA重组慢病毒的膀胱癌细胞, MTT法检测细胞增殖变化, 平板克隆试验检测细胞克隆形成能力, Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡变化, Western印迹法检测细胞中活化的caspase-3(C-caspase-3)、活化的caspase-9(C-caspase-9)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达水平。结果: 100, 200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葛根素处理后的膀胱癌细胞存活率均低于0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组($P < 0.05$), 其半数抑制浓度为(587.26 \pm 61.45) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。转染SNCG siRNA重组慢病毒的膀胱癌细胞中SNCG表达水平低于转染阴性对照重组慢病毒的膀胱癌细胞($P < 0.05$)。下调SNCG或葛根素处理后的膀胱癌细胞增殖能力和克隆形成能力均降低, 细胞凋亡率升高, 细胞中C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白水平也升高。与下调SNCG或葛根素处理后的膀胱癌细胞比较, 葛根素处理下调SNCG的膀胱癌细胞的增殖和克隆形成能力均降低, 细胞凋亡率升高, 细胞中C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白表达水平也升高。结论: 葛根素联合SNCG siRNA能够抑制膀胱癌细胞生长、诱导膀胱癌细胞凋亡。

[关键词] 膀胱癌; 生长; γ 突触核蛋白; 葛根素

Inhibitory effect of puerarin combined with SNCG siRNA on bladder cancer cell growth

WANG Guozheng¹, SHEN Jingui¹, ZOU Yongping¹, WANG Xue¹, LI Xiaolei²

(1. Department of Urology, Shanghai Xuhui Dahua Hospital, Shanghai 200237;

2. Department of Neurology, China-Japan Friendship Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China)

Abstract **Objective:** To study the effect of puerarin combined with synuclein gamma (SNCG) siRNA on the growth of bladder cancer cells. **Methods:** Bladder cancer cells were cultured with 0, 100, 200, 400, 800 and 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Puerarin culture medium. Cell proliferation was measured by MTT and the median inhibitory concentration was calculated. SNCG siRNA was transfected into bladder cancer cells by recombinant lentivirus and negative control recombinant lentivirus, the jamming effect was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-

收稿日期 (Date of reception): 2018-09-04

通信作者 (Corresponding author): 李笑蕾, Email: yongxing877134@163.com

PCR) and Western blot. The bladder cancer cells stably transfected with SNCG siRNA recombinant lentivirus were treated with Puerarin at half inhibitory concentration. The proliferation of the cells was detected by MTT assay, the colony forming ability of cells was detected by plate cloning test, the apoptosis was used by Annexin V-FITC/PI double staining, the expression levels of C-caspase-3, C-caspase-9 and Bax in the cells were used by Western blot. **Results:** The survival rate of bladder cancer cells treated with 100, 200, 400, 800 and 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puerarin was lower than that treated with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.05$), the half inhibitory concentration was calculated to be $(587.26 \pm 61.45) \mu\text{g}/\text{mL}$. The expression level of SNCG in bladder cancer cells transfected with SNCG siRNA recombinant lentivirus was lower than that in bladder cancer cells transfected with negative control recombinant lentivirus ($P < 0.05$). The cell proliferation and colony formation ability of bladder cancer cells treated with SNCG or puerarin decreased, the rate of apoptosis increased, the level of C-caspase-3, C-caspase-9 and Bax protein also increased. Compared with bladder cancer cells treated with SNCG or puerarin, puerarin decreased the proliferation and colony formation ability of bladder cancer cells which downregulated SNCG. The rate of apoptosis increased, the level of C-caspase-3, C-caspase-9 and Bax protein also increased. **Conclusion:** Puerarin combined with SNCG siRNA can inhibit bladder cancer cell growth and induce bladder cancer cell apoptosis.

Keywords bladder cancer; growth; synuclein gamma; puerarin

膀胱癌是泌尿系统恶性肿瘤, 提高膀胱癌患者生存期一直是广大医学工作者研究的重点^[1]。葛根素(图1)是提取自中药葛根中的黄酮类化合物, 对于肝纤维化、骨损伤等具有治疗作用^[2-3]。目前有研究^[4]表明: 葛根素具有抗肿瘤生长的作用, 葛根素能够抑制肿瘤细胞增殖并诱导肿瘤细胞凋亡。 γ 突触核蛋白(synuclein gamma, SNCG)是突触核蛋白家族的成员之一, 在正常人体组织中的周围神经系统中广泛表达, 在肾、肝、肺等组织中几乎不表达, 在睾丸、结肠、心脏等组织有较低水平的表达^[5]。近年来的研究^[6-8]表明: SNCG参与癌症的发生, 并在宫颈癌、子宫内膜癌等肿瘤组织中高表达, 下调其表达具有抑制乳腺癌等细胞生长的作用。既往研究^[9]显示: SNCG在膀胱癌组织中高表达, 并且其表达水平的高低与膀胱癌患者复发及病理特征有关, 但目前对于SNCG在膀胱癌细胞生长凋亡中的作用尚不清楚。本研究旨在明确葛根素联合SNCG siRNA对膀胱癌细胞生长凋亡的影响, 为治疗膀胱癌提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

膀胱癌BIU-87细胞购自上海泽叶生物科技有限公司; 活化的caspase-9(C-caspase-9)抗体购自美国Proteintech公司; Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体购自美国Abcam公司; SNCG siRNA重组慢病毒和

阴性对照重组慢病毒购自南京科佰生物科技有限公司; 葛根素购自上海铭博生物科技有限公司; SYBR Green实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自北京博凌科为生物科技有限公司; 引物均由金斯瑞生物科技有限公司合成; Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海美吉生物医药科技有限公司; RIPA蛋白裂解液购自上海翊圣生物科技有限公司; 活化的caspase-3(C-caspase-3)抗体、SNCG抗体购自上海康朗生物科技有限公司; 蛋白凝胶转膜仪、电泳仪均购自美国Bio-rad公司; 7500荧光定量PCR仪购自美国ABI公司; Quanta SC流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司; β -actin抗体购自美国Abnova公司。

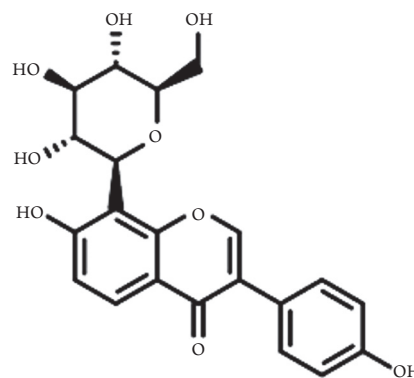


图1 葛根素分子结构

Figure 1 Molecular structure of puerarin

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测葛根素对膀胱癌细胞增殖的影响

BIU-87细胞种植到96孔板中, 细胞贴壁以后, 将孔内的液体吸弃, 添加含有葛根素终浓度为0, 100, 200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的细胞培养液继续培养24 h。取出培养板, 依次在每个孔内添加10 μL 的MTT溶液, 孵育结合4 h, 将上清溶液弃掉, 添加DMSO, 每孔中添加150 μL , 反应10 min后, 此时观察结晶物完全溶液, 将96孔细胞培养板放置于酶标仪中检测490 nm的A值, 用不含细胞的空白孔调零以后, 设置0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用组细胞存活率为100%, 分析100, 200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用组细胞存活率变化情况。

1.2.2 SNCG siRNA 转染

BIU-87细胞分成4组, 分别为NC, puerarin, SNCG siRNA, Combination。SNCG siRNA, Combination为稳定转染SNCG siRNA慢病毒载体的BIU-87细胞; NC, puerarin为稳定转染阴性对照慢病毒载体的BIU-87细胞; puerarin, Combination细胞在实验0 h时更换为含有587 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葛根素的含药培养液。慢病毒感染步骤如下: BIU-87细胞密度为约40%时添加慢病毒液[感染复数(multiplicity of infection, MOI)=40], 继续孵育24 h后, 将孔内的慢病毒液吸弃, 添加新鲜的细胞培养液, 用嘌呤霉素筛选抗性细胞记为稳定感染慢病毒的细胞株。NC, SNCG siRNA细胞用qRT-PCR和Western印迹法检测干扰效果, 步骤如下: 1)qRT-PCR。NC, SNCG siRNA细胞用冰预冷PBS洗涤以后, 添加TRIzol裂解液, 按照常规方法提取细胞中的总RNA。RNA溶解在DEPC水中, 紫外分光光度计测定RNA样品的 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 的比值均符合实验要求(1.8~2.0)。用cDNA合成试剂盒进行反转录, 步骤同试剂盒说明书。以SYBR Green qRT-PCR分析计算SNCG mRNA表达情况, 设置 β -actin为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算SNCG相对表达水平。SNCG上游5'-ATGGATGTCTTCAAGAAGGG-3', 下游5'-CTAGTCTCCCCACTCTGGG-3'。 β -actin上游5'-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3', 下游5'-CGTGAGAAGGTCGGAAGGAA-3'。2)Western印迹法。NC, SNCG siRNA细胞中分别添加RIPA蛋白裂解液, 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中高速离心并收集蛋白上清。各组蛋白样品定量用BCA蛋白浓度检测试剂盒。分别配制5%上层胶和10%下层胶。蛋白样品同等体积的上样缓冲液(loading buffer)混合以后, 放在100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸反应5 min。按照每孔上样泳道中添加30 μg 蛋白样品进行上样, 在上层胶中以

90 V的电压电泳(约30 min), 在下层胶中用120 V的电压电泳至结束。将PVDF膜裁剪成与凝胶大小相同的形状, 置于转移缓冲液中浸泡。设置转膜电流为300 mA, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中将蛋白电转移到PVDF膜上, 转膜50 min。转膜结束后取出PVDF膜, 置于含有5%牛血清白蛋白封闭液的平皿内, 在室温条件下孵育2 h; PVDF膜再放置于含有1:1 000稀释的SNCG一抗中, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中过夜反应; PVDF膜置于1:2 000稀释的二抗反应液中继续孵育2 h。用ECL方法显色以后, 管家基因 β -actin作为参照, 分析SNCG蛋白相对表达水平。

1.2.3 MTT 实验检测葛根素联合 SNCG siRNA 对细胞增殖能力影响

BIU-87细胞培养至对数期以后, 按照NC, puerarin, SNCG siRNA, Combination分组方法接种到96孔板内, 每个孔内添加4 000个细胞, 继续孵育培养24 h后, 按照上述1.2.1中MTT法检测细胞存活率。设置NC组细胞存活率为100%, 分析puerarin, SNCG siRNA, Combination组细胞存活率变化情况。

1.2.4 平板克隆试验检测葛根素联合 SNCG siRNA 对细胞克隆形成能力的影响

BIU-87细胞培养至对数期以后, 按照NC, puerarin, SNCG siRNA, Combination分组方法接种到6孔板内, 每孔中加入500个细胞, 放在37 $^{\circ}\text{C}$, 5%CO₂培养箱内培养, 当出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。把孔内的培养液吸弃, 以PBS将细胞洗3次, 添加甲醇固定20 min后, 用Giemsa染液染色, 在空气中干燥。计数肉眼可见的细胞克隆数目。

1.2.5 流式细胞术检测葛根素联合 SNCG siRNA 对细胞凋亡的影响

NC, puerarin, SNCG siRNA, Combination细胞按照上述方法处理培养24 h后, 把培养液上清吸除, 添加PBS洗涤2次, 用含有0.02%ETDA的0.25%胰蛋白酶消化液将细胞消化以后, 1 000 r/min离心10 min, 把上清溶液吸弃。添加100 μL 的结合缓冲液混匀, 继续添加10 μL 的Annexin V-FITC和PI工作液, 放在室温、避光反应15 min。继续添加400 μL 的结合缓冲液混合后, 立即用流式细胞仪检测各组细胞凋亡变化。

1.2.6 Western 印迹法检测葛根素联合 SNCG siRNA 对细胞中 C-caspase-3, C-caspase-9, Bax 蛋白表达的影响

NC, puerarin, SNCG siRNA, Combination按照上述方法处理培养24 h后, 用Western印迹法

检测细胞中C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白水平, 步骤同1.2.2。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析, 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组数据采用独立样本 t 检验, 多组差异比较采用单因素方差分析, 组间比较采用SNK- q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度葛根素处理后膀胱癌细胞的增殖情况

100, 200, 400, 800, 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的葛根素处理24 h后的膀胱癌细胞存活率低于0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葛根素处理组, 葛根素能够抑制膀胱癌细胞增殖(表1)。葛根素半数抑制浓度为(587.26 \pm 61.45) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 后续选用587 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 葛根素处理膀胱癌细胞。

表1 不同浓度的葛根素处理后膀胱癌细胞的存活率变化

Table 1 Survival rate of bladder cancer cells treated with different concentrations of puerarin

葛根素处理浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	存活率/%
0	100.00
100	88.24 \pm 7.46*
200	72.15 \pm 6.32*
400	59.26 \pm 5.10*
800	41.20 \pm 4.82*
1 600	30.15 \pm 6.23*
F	71.157
P	<0.001

与0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相比, * $P<0.05$ 。

Compared with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, * $P<0.05$.

2.2 SNCG siRNA 对膀胱癌细胞中 SNCG 表达的影响

膀胱癌细胞中转染SNCG siRNA后, 细胞中的SNCG mRNA和蛋白表达水平均降低, SNCG siRNA能够成功下调膀胱癌细胞中SNCG的表达(图2, 表2)。

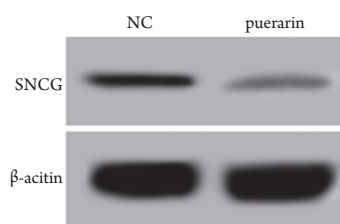


图2 Western印迹法检测SNCG siRNA对膀胱癌细胞中SNCG蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of SNCG siRNA on the expression of SNCG protein in bladder cancer cells detected by Western blot

表2 SNCG siRNA转染后膀胱癌细胞中SNCG表达变化

Table 2 Expression of SNCG in bladder cancer cells after transfection of SNCG siRNA

组别	SNCG mRNA	SNCG蛋白
NC	1.00	0.36 \pm 0.05
Puerarin	0.29 \pm 0.06*	0.13 \pm 0.03*

与NC相比, $t_1=20.496$, $t_2=6.832$, * $P<0.05$ 。

Compared with NC, $t_1=20.496$, $t_2=6.832$, * $P<0.05$.

2.3 葛根素联合 SNCG siRNA 对膀胱癌细胞增殖能力的影响

膀胱癌细胞中转染SNCG siRNA后, 细胞存活率降低; 葛根素处理24 h后的膀胱癌细胞的存活率也降低; 葛根素联合SNCG siRNA处理24 h后的膀胱癌细胞存活率下降更多(表3)。表明葛根素和SNCG siRNA具有协同抑制膀胱癌细胞增殖的作用。

表3 葛根素联合SNCG siRNA对膀胱癌细胞存活率影响

Table 3 Effect of puerarin combined with SNCG siRNA on survival rate of bladder cancer cells

组别	存活率/%
NC	100.00
Puerarin	51.26 \pm 6.98*
SNCG siRNA	68.48 \pm 6.82*
Combination	41.25 \pm 4.13* ^{&}
F	70.878
P	<0.001

与NC相比, * $P<0.05$; 与SNCG siRNA, puerarin相比, * $P<0.05$ 。

Compared with NC, * $P<0.05$; compared with SNCG siRNA and puerarin, * $P<0.05$.

2.4 葛根素联合 SNCG siRNA 对膀胱癌细胞克隆形成能力的影响

膀胱癌细胞中转染SNCG siRNA后, 细胞克隆形成数目减少; 葛根素处理24 h后的膀胱癌细胞克隆形成数目也减少; 葛根素联合SNCG siRNA处理24 h后的膀胱癌细胞克隆形成数目下降更多(表4)。表明葛根素和SNCG siRNA具有协同抑制膀胱癌细胞克隆形成能力的作用。

2.5 葛根素联合 SNCG siRNA 对膀胱癌细胞凋亡的影响

膀胱癌细胞中转染SNCG siRNA后, 细胞凋亡率升高; 葛根素处理24 h后的膀胱癌细胞凋亡率也升高; 葛根素联合SNCG siRNA处理24 h后的膀胱癌细胞

凋亡率升高更多(表4, 图3)。表明葛根素和SNCG siRNA具有协同促进膀胱癌细胞凋亡的作用。

2.6 葛根素联合 SNCG siRNA 对膀胱癌细胞中 C-caspase-3, C-caspase-9, Bax 蛋白表达的影响

膀胱癌细胞中转染SNCG siRNA后, 细胞中 C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白水平升高; 葛根素处理24 h后的膀胱癌细胞中 C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白水平也升高; 葛根素联合SNCG siRNA处理24 h后的膀胱癌细胞中 C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白水平升高更多(表5, 图4)。表明葛根素和SNCG siRNA具有协同诱导膀胱癌细胞中 C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白表达的作用。

表4 葛根素联合SNCG siRNA对膀胱癌细胞克隆形成能力和凋亡率的影响

Table 4 Effect of puerarin combined with SNCG siRNA on colony forming ability and apoptosis rate of bladder cancer cells

组别	克隆形成数目	凋亡率/%
NC	415.23 ± 38.26	2.45 ± 0.28
Puerarin	291.40 ± 21.63*	26.12 ± 1.32*
SNCG siRNA	324.17 ± 35.11*	17.89 ± 1.93*
Combination	216.55 ± 20.76* ^{&}	34.16 ± 4.97* ^{&}
F	22.629	72.778
P	<0.001	<0.001

与NC相比, * $P < 0.05$; 与SNCG siRNA, puerarin相比, [&] $P < 0.05$ 。

Compared with NC, * $P < 0.05$; compared with SNCG siRNA and puerarin, [&] $P < 0.05$.

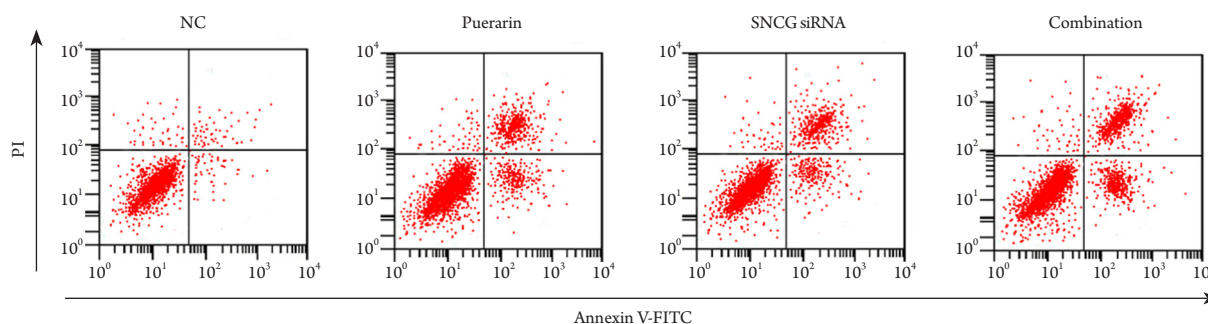


图3 流式细胞术检测葛根素联合SNCG siRNA对膀胱癌细胞凋亡的影响

Figure 3 Effect of puerarin combined with SNCG siRNA on apoptosis of bladder cancer cells by flow cytometry

表5 葛根素联合SNCG siRNA对膀胱癌细胞中C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白水平的影响

Table 5 Effects of puerarin combined with SNCG siRNA on the levels of C-caspase-3, C-caspase-9 and Bax proteins in bladder cancer cells

组别	C-caspase-3	C-caspase-9	Bax
NC	0.12 ± 0.02	0.18 ± 0.04	0.19 ± 0.03
Puerarin	0.29 ± 0.04*	0.40 ± 0.05*	0.34 ± 0.05*
SNCG siRNA	0.23 ± 0.02*	0.38 ± 0.03*	0.33 ± 0.02*
Combination	0.45 ± 0.06* ^{&}	0.68 ± 0.09* ^{&}	0.72 ± 0.10* ^{&}
F	37.917	38.718	44.899
P	<0.001	<0.001	<0.001

与NC相比, * P <0.05; 与SNCG siRNA, puerarin相比, [&] P <0.05。

Compared with NC, * P <0.05; compared with SNCG siRNA and puerarin, [&] P <0.05.

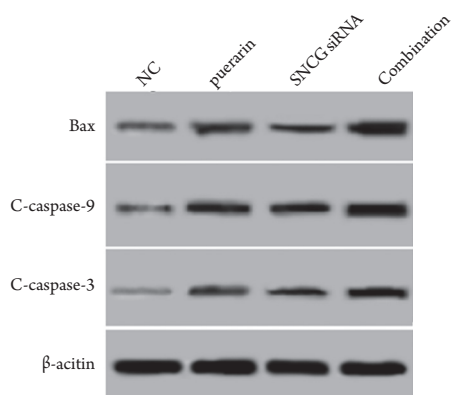


图4 Western印迹法检测葛根素联合SNCG siRNA对膀胱癌细胞中C-caspase-3, C-caspase-9, Bax蛋白水平影响

Figure 4 Effect of puerarin combined with SNCG siRNA on the levels of C-caspase-3, C-caspase-9, Bax in bladder cancer cells detected by Western blot

3 讨论

葛根素是一种提取至野葛植物干燥根中的4-7-二羟基-8- β -D-葡萄糖基异黄酮, 具有降血糖、扩张冠脉、改善微循环等作用^[10-11]。葛根素具有抗肿瘤作用, 其抗癌活性远远高于葛根提取物, 葛根素干扰后的肺癌细胞出现明显的凋亡峰, 同时葛根素还具有抑制卵巢癌、胶质瘤等多种肿瘤细胞生长的功效^[12-15]。本研究结果表明: 不同浓度的葛根素处理后的膀胱癌细胞的增殖能力降低, 同时葛根素还可以诱导膀胱癌细胞凋亡和抑制膀胱癌细胞克隆形成, 说明葛根素具有抗膀胱癌细胞活性。

SNCG基因含有4个内含子和5个外显子, 其

启动子的上游含有一个GC富集区域, 该区域能够与转录因子SP1结合, 在AUG起始密码子附近含有突触核蛋白特征序列^[16]。SNCG在人体的三叉神经节、丘脑、大脑黑质等组织中高表达, 而在其他组织中的表达水平极低, 甚至不表达^[17]。研究^[18-20]表明: SNCG与骨肉瘤、乳腺癌、胃癌等的发生有关, 其在多种恶性肿瘤组织中高表达。一项乳腺癌相关的研究^[21]表明: SNCG siRNA可以下调乳腺癌细胞的增殖能力, 并诱导乳腺癌细胞凋亡。另一项膀胱癌相关的研究^[9]表明: 癌组织中SNCG阳性表达率超过90%, 而癌旁组织中检测不到SNCG的表达, SNCG可能参与膀胱癌细胞的生长和抗凋亡。本研究结果显示: 下调SNCG表达后的膀胱癌细胞的增殖和克隆形成能力均降低, 细胞凋亡增多, 说明下调SNCG具有抗膀胱癌生长的作用, SNCG在膀胱癌中可能发挥癌基因的作用。

本研究还进一步检测了葛根素处理下调SNCG后的膀胱癌细胞生长和凋亡情况, 结果显示: 下调SNCG和葛根素具有协同抑制膀胱癌细胞生长和诱导膀胱癌细胞凋亡的作用, 靶向SNCG联合葛根素可能是膀胱癌治疗的潜在途径。caspase-3和caspase-9分别是caspase凋亡反应的下游执行因子和上游起始因子, 二者在正常情况下以没有活性的酶原形式存在, 只有被活化后才可以诱导细胞凋亡发生^[22-23]。Bax是一种促凋亡蛋白, 是Bcl-2蛋白家族的成员之一, Bax蛋白表达水平越高, 细胞凋亡水平越高^[24]。本研究结果还表明: 下调SNCG和葛根素联合还可以促进细胞中活化的caspase-3, caspase-9和Bax蛋白表达, 提示下调SNCG和葛根素联合可能通过调控caspase凋亡反应和Bax蛋白表达诱导膀胱癌细胞凋亡。

综上所述, 葛根素和下调SNCG均能够抑制膀胱癌细胞生长并诱导膀胱癌细胞凋亡, 且二者联合具有协同抗膀胱癌细胞生长的作用, 靶向SNCG和葛根素联合可能是治疗膀胱癌的潜在途径, 这为膀胱癌的治疗提供了新方向, 为以后研究SNCG在肿瘤发生中的作用机制奠定了基础。本研究初步探讨了葛根素和下调SNCG对膀胱癌细胞生长的作用, 没有对其具体的调控机制进行探讨, 没有在多株膀胱癌细胞中进行验证, 后续研究会对上述部分进行具体探索。

参考文献

1. 孙明, 潘春雨, 刘学锋, 等. 长链非编码RNA在泌尿系统恶性肿瘤中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(7): 1165-1168.
SUN Ming, PAN Chunyu, LIU Xuefeng, et al. The research progress of long non-coding RNA in the urinary malignant tumors[J]. Journal of Modern Oncology, 2016, 24(7): 1165-1168.
2. Zhang S, Ji G, Liu J. Reversal of chemical-induced liver fibrosis in Wistar rats by puerarin[J]. J Nutr Biochem, 2006, 17(7): 485-491.
3. Zhang Y, Zeng X, Zhang L, et al. Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/Akt pathway in rat calvaria osteoblasts[J]. Planta Med, 2007, 73(4): 341-347.
4. Jiang K, Chen H, Tang K, et al. Puerarin inhibits bladder cancer cell proliferation through the mTOR/p70S6K signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2018, 15(1): 167-174.
5. 李燕, 寿成超. SNCG基因的研究进展[J]. 宁夏医科大学学报, 2004, 26(5): 383-386.
LI Yan, SHOU Chengchao. Research progress of SNCG gene[J]. Journal of Ningxia Medical University, 2004, 26(5): 383-386.
6. Mhawech-Fauceglia P, Wang D, Syriac S, et al. Synuclein- γ (SNCG) protein expression is associated with poor outcome in endometrial adenocarcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2012, 124(1): 148-152.
7. 史松青, 王德尚. 宫颈癌组织突触核蛋白- γ 表达与临床病理因素相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(1): 45-48.
SHI Songqing, WANG Deshang. Expression of SNCG in cervical carcinoma tissues and its relationship with clinical pathological features[J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2013, 20(1): 45-48.
8. Liu J, Spence MJ, Zhang YL, et al. Transcriptional suppression of synuclein γ (SNCG) expression in human breast cancer cells by the growth inhibitory cytokine oncostatin M[J]. Breast Cancer Res Treat, 2000, 62(2): 99-107.
9. 陈志刚, 纪志刚, 王清海, 等. SNCG在膀胱癌中的表达及临床意义[J]. 现代泌尿外科杂志, 2016, 21(6): 427-432.
CHEN Zhigang, JI Zhigang, WANG Qinghai, et al. SNCG expression and clinical significance in bladder carcinoma[J]. Journal of Modern Urology, 2016, 21(6): 427-432.
10. 王东红, 王春爱, 薛建军. 葛根素的研究进展[J]. 西部中医药, 2017, 30(1): 139-142.
WANG Donghong, WANG Chun'ai, XUE Jianjun. Study development of puerarin[J]. Western Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 30(1): 139-142.
11. 刘景文. 葛根素在冠心病治疗中应用及研究进展[J]. 中国处方药, 2017, 15(3): 16-17.
LIU Jingwen. Application and research progress of puerarin in the treatment of coronary heart disease[J]. China Prescription Drug, 2017, 15(3): 16-17.
12. 羊轶驹, 孙振球. 葛根素与三氧化二砷协同作用通过Akt/p38途径促进人胶质瘤细胞凋亡[J]. 中国肿瘤临床, 2012, 29(24): 2059-2062.
YANG Yiju, SUN Zhenqiu. Puerarin synergizes with arsenic trioxide for the apoptosis of human glioblastoma cells through the protein kinase/p38 mitogen-activated protein kinases pathway[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2012, 29(24): 2059-2062.
13. 马小乐, 于医瑕, 张宇, 等. 葛根素对人类胃癌细胞MGC-803和AGS增殖与凋亡的影响[J]. 肿瘤研究与临床, 2013, 25(9): 585-587.
MA Xiaole, YU Yixia, ZHANG Yu, et al. Effect of puerarin on proliferation and apoptosis of human gastric cancer MGC-803 and AGS cells[J]. Cancer Research and Clinic, 2013, 25(9): 585-587.
14. 韩洁, 俞超芹, 沈慰, 等. 葛根素抑制卵巢癌细胞HO-8910侵袭及转移的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(7): 632-635.
HAN Jie, YU Chaoqin, SHEN Wei, et al. Inhibitory effects of puerarin on invasion and metastasis of oophoroma cells HO-8910[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2009, 29(7): 632-635.
15. 张蕾, 李娟, 王彦平, 等. 葛根素对人小细胞肺癌H446细胞增殖与凋亡的影响及其作用机制研究[J]. 中国实用医药, 2009, 4(34): 17-19.
ZHANG Lei, LI Juan, WANG Yanping, et al. Effect of puerarin on proliferation and apoptosis in human small cell lung cancer H446 cells and its possible active mechanisms[J]. China Practical Medical, 2009, 4(34): 17-19.
16. Liu C, Qu L, Zhao C, et al. Extracellular gamma-synuclein promotes tumor cell motility by activating β 1 integrin-focal adhesion kinase signaling pathway and increasing matrix metalloproteinase-2, -9 protein secretion[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 117.
17. Wang C, Yao L, Chan WY, et al. Characterization of three synuclein genes in *Xenopus laevis*[J]. Dev Dyn, 2011, 240(8): 2028-2033.
18. Wang L, Gao H, Gong N, et al. Downregulation of microRNA-497 is associated with upregulation of synuclein γ in patients with

- osteosarcoma[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(6): 3761-3766.
19. Min L, Ma RL, Yuan H, et al. Combined expression of metastasis related markers Naa10p, SNCG and PRL-3 and its prognostic value in breast cancer patients[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(7): 2819-2826.
 20. Yanagawa N, Tamura G, Honda T, et al. Demethylation of the synuclein gamma gene CpG island in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(7): 2447-2451.
 21. 任涛, 王仙凤, 唐勇全. siRNA-SNCG增加乳腺癌细胞放射敏感性的实验研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(14): 2215-2218.
REN Tao, WANG Xianfeng, TANG Yongquan. siRNA-mediated suppression of SNCG promotes radiosensitivity in breast cancer MDA-MB231 cells[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2017, 25(14): 2215-2218.
 22. Checinska A, Hoogeland BS, Rodriguez JA, et al. Role of XIAP in inhibiting cisplatin-induced caspase activation in non-small cell lung cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 313(6): 1215-1224.
 23. Liu H, Zhou Y, Tang L. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2445-2454.
 24. Han X, Cong H. Enterovirus 71 induces apoptosis by directly modulating the conformational activation of pro-apoptotic protein Bax[J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(3): 422-434.

本文引用: 王国政, 沈金贵, 邹永平, 汪雪, 李笑蕾. 葛根素联合 γ 突触核蛋白siRNA对膀胱癌细胞生长的抑制作用[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(12): 2558-2565. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.005

Cite this article as: WANG Guozheng, SHEN Jingui, ZOU Yongping, WANG Xue, LI Xiaolei. Inhibitory effect of puerarin combined with SNCG siRNA on bladder cancer cell growth[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(12): 2558-2565. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.12.005