

重楼皂苷 I 对膀胱癌细胞凋亡的影响

姜福琼, 王剑松*, 邓丹琪, 刘馨

(昆明医科大学第二附属医院, 昆明 650101)

[摘要] **目的:**研究重楼提取物单体重楼皂苷 I 对膀胱癌细胞增殖和凋亡的影响。**方法:**体外培养膀胱尿路上皮细胞癌 BIU-87 细胞株,采用 MTT 法检测重楼皂苷 I 对 BIU-87 细胞增殖的影响,计算半抑制率(IC_{50});采用流式细胞术检测重楼皂苷 I 干预后 BIU-87 细胞凋亡的情况,透射电镜观察细胞超微结构的变化;采用实时定量 PCR 分析凋亡相关基因 Bcl-2 的变化,采用 Western blot 检测蛋白的表达变化。**结果:**重楼皂苷 I 对 BIU-87 细胞的增殖有明显的抑制作用,24,48,72 h 的 IC_{50} 为 9.71, 5.91, 4.68 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。重楼皂苷 I 对 BIU-87 细胞生长的抑制作用表现出时间和浓度依赖性。此外重楼皂苷 I 干预以后,BIU-87 细胞的凋亡率与对照组相比有显著性差异。实时定量 PCR 及 Western blot 的检测可见到凋亡相关基因 Bcl-2 的表达显著降低。**结论:**这些体外实验结果表明,重楼皂苷 I 对膀胱癌有潜在的抗癌作用,下调 Bcl-2 基因的表达是其诱导膀胱癌细胞凋亡的作用机制之一。

[关键词] 膀胱癌; 重楼皂苷 I; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0165-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014180165

Polyphyllin I Affected Apoptosis of Human Urothelial Carcinoma of Bladder

JIANG Fu-qiong, WANG Jian-song*, DENG Dan-qi, LIU Xin

(The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650101, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the potential antitumour effects of polyphyllin I (PP I) on urothelial carcinoma of the bladder. **Method:** Urothelial carcinoma of bladder cell lines BIU-87 were cultured with or without PP I. Cell proliferation were measured by MTT assay. Cell apoptosis and cell cycle were measured by flow cytometry. The changes of cell morphology were observed by transmission electron microscopy. The expression of Bcl-2 was detected by real-time PCR and western blot. **Result:** The results showed that the proliferation of BIU-87 cells were significantly inhibited by PP I. The 50% inhibitory concentrations (IC_{50}) of PP I were 9.71, 5.91, 4.68 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at 24, 48, 72 h. The inhibition rate of PP I was in a manner of dose- and time-dependent. The treatment of PP I led to activation of apoptosis. After being treated with PP I, the apoptotic rate of BIU-87 cells was remarkably higher than that of the control. The results of real-time PCR and western blot showed that the expression of Bcl-2 was decreased in the group of PP I treated. **Conclusion:** These results suggest that PP I potentially has anticancer effects on urothelial carcinoma of the bladder cells *in vitro*. To deregulate the expression of Bcl-2 is one of the potential mechanisms.

[Key words] urothelial carcinoma of bladder; polyphyllin I; proliferation; apoptosis

膀胱癌术后均进行辅助性膀胱灌注治疗,化学药物灌注能降低肿瘤的复发率,但仍有 10% ~ 30% 左右患者会复发,其中约 10% 患者 5 年内会发展为

肌浸润性膀胱癌^[1]。为此,寻找一种有效而且毒副作用小的术后灌注药物已成为膀胱癌治疗的一个热点和重大的课题,是一个迫切需要解决的临床实际

[收稿日期] 20140414(022)

[基金项目] 云南省科技厅基金项目(2012FB045)

[第一作者] 姜福琼,在读博士,Tel:0871-65351281,E-mail:mmwj1528jfq@aliyun.com

[通讯作者] *王剑松,教授,博士生导师,从事泌尿外科学临床研究,Tel:0871-65351281,E-mail:jinsongwang@yahoo.com

问题。

重楼属为百合科植物,在我国有悠久的药用历史,是云南白药、季胜德蛇药片、热毒清和宫血宁、楼莲胶囊等多种中成药的主要原料药材之一。在中国传统医学中,重楼常被组成方剂用于癌症的治疗,如食道癌、喉癌、直肠癌、肺癌、宫颈癌等。现已从重楼属植物中分离鉴定了 80 余种化合物,其中甾体皂苷为该属的主要成分,占总化合物的 70% 以上,是目前认为的主要活性物质^[2]。实验表明重楼皂苷多数具有独特的药理活性,但其抗肿瘤的机制尚不明确,可能通过引起肿瘤细胞凋亡、影响内皮细胞功能等方面抑制肿瘤细胞的生长、侵袭和转移^[3-9]。重楼皂苷 I 是较早分离和鉴定的甾体皂苷之一,是一单体成分,其对膀胱癌的影响尚未见报道,本文拟研究其对膀胱癌的影响及浅析其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞株 人膀胱癌细胞株 BIU-87 来源于云南省泌尿外科研究所细胞库(RAW264.7)。

1.2 样品 重楼皂苷 I (PP I) 由中科院昆明植物研究所惠赠(2011 年 5 月)。

1.3 主要试剂和仪器 丝裂霉素(相对分子质量 300.05,浙江海正药业股份有限公司),MTT(二甲基噻唑二苯基四唑嗅盐,AMRESCO 生产),PBS 液(磷酸盐缓冲液 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4)、胰蛋白酶(0.25%)、DMSO(二甲基亚砜)购自 Sigma 公司,RPMI 1640、胎牛血清、胰蛋白酶、碘化丙啶(propidium iodide,PI)、Tunnel 购自美国 Gibco 公司。总 RNA 提取试剂盒(Trizol[®] Invitrogen[™], Carlsbad, CA, USA)、逆转录试剂盒(iScript[™] RT reagent KitTaKaRa)、PCR 试剂盒(Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with Rox; Invitrogen)、蛋白抽提试剂盒-I(实体组织和细胞蛋白抽提)、兔抗 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗 β -Actin 单克隆抗体、二抗(辣根过氧化物酶标记的人抗兔 IgG)购自美国 Santa Cruz 公司,PVDF 膜购于 Millipore 公司,SuperSignal ECL 发光试剂盒购于 Pierce 公司。METTLERAE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),细胞培养瓶及培养板(美国 Coning 公司),YJ-1450 型医用净化工作台(苏州安泰空气技术有限公司),1.0 R 型低温高速离心机 RPMI 1640(德国 Heraeus 公司),TDL-5A 型台式离心机(中国上海菲恰尔),BB16UV/BB5060UV 型 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司),Thermo705 型超低温冰箱(美国 Thermo),IX-7 型倒置相差显微镜(日

本 Olympus 公司),680 型酶标仪(BIO-RAD 公司)。

1.4 细胞培养 BIU-87 细胞使用含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 完全培养液,置于 37 °C、湿度 95%、5% CO₂ 细胞培养箱培养,细胞冻存于 -70 °C 冰箱或液氮罐保存。

1.5 PP I 对 BIU-87 细胞增殖的影响 胰酶消化对数期细胞,制成细胞悬液,按 4×10^3 个/孔的细胞密度接种到 96 孔平底细胞培养板,培养箱中培养 24 h 后,加入含不同浓度的重楼皂苷 I 的完全培养液(0.25,0.5,1,2,4,8,16 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),之后将 96 孔板置于细胞培养箱孵育 24,48,72 h,之后用酶联免疫检测仪测量各孔的吸光度(A)。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - [(A_{\text{用药组}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$$

对照设置:设相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜为空白对照,丝裂霉素(MMC)为阳性对照药,阳性对照药 MMC 的终浓度梯度同样品,阴性对照为未用药组,实验重复 3 次。

1.6 PP I 对 BIU-87 细胞超微结构的影响 常规培养 BIU-87 细胞后,用重楼皂苷 I ($4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预后 24,48 h,收集贴壁细胞,3.5% 戊二醛固定液固定细胞团,乙醇、丙酮逐级梯度脱水,环氧树脂 618 渗透、包埋,半薄切片,光镜定位,修块,Leica-R 超薄切片机制片,柠檬酸铅-醋酸铀双染色,JEM-1011 透射电镜观察细胞的变化。

1.7 BIU-87 细胞凋亡情况和细胞周期的变化 将对数生长期细胞悬液制备好后,接种到无菌 6 孔板(细胞的密度为 5×10^4 /孔),置培养箱中培养 24 h (5% CO₂,37 °C,湿度 100%)。加入不同浓度重楼皂苷 I (1,2,4,8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 孵育 12,24,48 h,使用 TUNEL,PI 标记后流式细胞仪检测。相同浓度的丝裂霉素(MMC)为阳性对照药。

1.8 凋亡相关基因检测 常规培养 BIU-87 细胞,用重楼皂苷 I (浓度为 1,4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 干预并孵育 24 h。对照组为不加药组。使用 RNA 提取试剂盒抽提 RNA,cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。按模板(cDNA) 1.0 μL ,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 F 0.25 μL ,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 R 0.25 μL ,2 \times q PCR Mix 12.5 μL ,ddH₂O 11.0 μL 的反应体系,于 SLAN 荧光定量 PCR 仪中,95 °C 15 s 预变性后,95 °C 15 s \rightarrow 60 °C 60 s (荧光检测),40 cycles 进行基因扩增。不加模板用作空白对照,Rps 13 为内参基因。机器自带的 SDS 软件自动分析 Ct value (Ct) 值,relative quantification (RQ) 值 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.9 蛋白的表达情况 按前方法培养和并用重楼皂苷 I 处理 BIU-87 细胞后,裂解细胞、提取细胞蛋白质并测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质并用转移电泳将凝胶上分离到的蛋白质转印至 PVDF 膜上,置于含 5% 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液中封闭 1 h,加入一抗(1:2 000 稀释),37 °C 孵育 2 h, TBS 洗膜,5 min × 4 次。加入人抗兔二抗(1:2 000 稀释),37 °C 孵育 45 min, TBS 洗膜,5 min × 4 次, ECL 显色,经 X 射线片曝光、显影后观察特异性蛋白条带,扫描分析。

2 数据处理

采用 SPSS 19.0 软件 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) 进行统计学分析,计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差齐性检验采用 Levene 检验,方差齐则对多样本资料采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验比较组间差异,方差不齐则采用 Mann-Whitney U 检验比较组间差异,相关性分析采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BIU-87 细胞的增殖抑制 重楼皂苷 I 在 24, 48, 72 h 时对 BIU-87 细胞的抑制作用,通过公式计算生长抑制率,并进行统计学处理,结果见表 1。可见浓度高于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 I 对人膀胱癌 BIU-87 细胞的生长抑制率与对照组相比具有统计学差异。重楼皂苷 I 浓度低于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,即使延长药物作用的时间,其对 BIU-87 细胞的增殖抑制作用没有变化;重楼皂苷 I 浓度在高于 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对膀胱癌细胞株 BIU-87 细胞的增殖有抑制作用,并表现出明显的时间和浓度依赖性;当重楼皂苷 I 浓度高于 $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,作用 48 h 时,重楼皂苷 I 其对 BIU-87 细胞的抑制率达到 70%,随着作用时间的延长,抑制率未见统计学差异。重楼皂苷 I 对 BIU-87 细胞作用 24, 48, 72 h 的 IC_{50} 分别为 8.229, 5.048, 3.999 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 对 BIU-87 细胞超微结构的影响 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的重楼皂苷 I 作用于膀胱癌 BIU-87 细胞后,在 24, 48 h 在电镜下观察:未使用药物干预时,细胞表面有丰富的微绒毛,细胞浆内见多量线粒体,粗面内质网结构完整连续及核糖体均匀分布,细胞核内染色质清晰,核仁明显,核膜清楚,细胞浆染色均匀,细胞间隙清晰,可见幼稚连接。重楼皂苷 I 作用于膀胱癌细胞后 24 h 见到部分细胞体积缩小,微绒毛减少或消失,细胞浆内出现空泡,部分区域胞浆浓缩,部分线粒体肿胀,少数内质网扩张,溶酶体增多,细胞

表 1 重楼皂苷 I 对 BIU-87 细胞生长的抑制情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

PP I / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	生长抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
0	0	0	0
0.25	0.52 ± 0.28	2.01 ± 1.12	3.11 ± 1.82
0.5	1.07 ± 1.04	2.74 ± 1.44	3.76 ± 1.29
1	4.98 ± 2.00	17.21 ± 7.91 ^{1,2)}	25.30 ± 6.28 ^{1,2)}
2	14.74 ± 3.35 ¹⁾	40.06 ± 11.38 ^{1,2)}	42.96 ± 5.31 ^{1,2)}
4	22.11 ± 4.91 ¹⁾	49.07 ± 8.83 ^{1,2)}	66.42 ± 4.17 ^{1,2)}
8	33.30 ± 2.53 ¹⁾	60.22 ± 6.88 ^{1,2)}	77.91 ± 3.42 ^{1,2)}
16	43.92 ± 4.62 ¹⁾	65.99 ± 4.91 ^{1,2)}	80.87 ± 3.92 ^{1,2)}

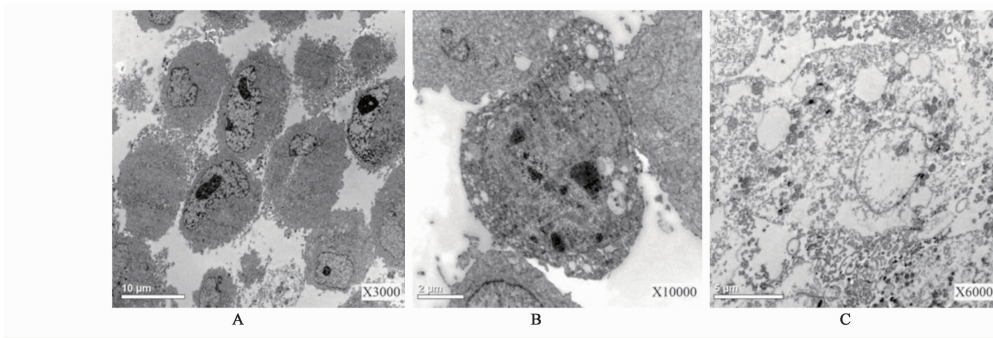
注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 24 h 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

核膜皱缩,染色质成块状,有的细胞核碎裂、溶解,呈现出凋亡的现象。重楼皂苷作用 48 h 时电镜观察到细胞形态不一致,细胞膜皱缩,部分结构不完整、模糊;细胞浆水肿变性,线粒体肿胀,数目减少,细胞器数量减少,溶酶体增多;核染色质呈块状边集于核膜,部分核碎裂、溶解,可见出泡现象及凋亡小体形成现象(图 1)。

3.3 对 BIU-87 细胞凋亡和细胞周期的影响 使用重楼皂苷 I ($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用于膀胱癌细胞后 12, 24, 48 h, 细胞的凋亡比率为 14.3%, 43.9%, 76.7%;不同浓度的重楼皂苷 I (浓度分别为 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用于膀胱癌细胞 24 h, 细胞的凋亡比率分别为 20.4%, 44.0%, 79.0%, 90.1%。随着重楼皂苷 I 作用时间的延长和浓度的升高,细胞的凋亡比率逐渐增加 ($P < 0.05$)。

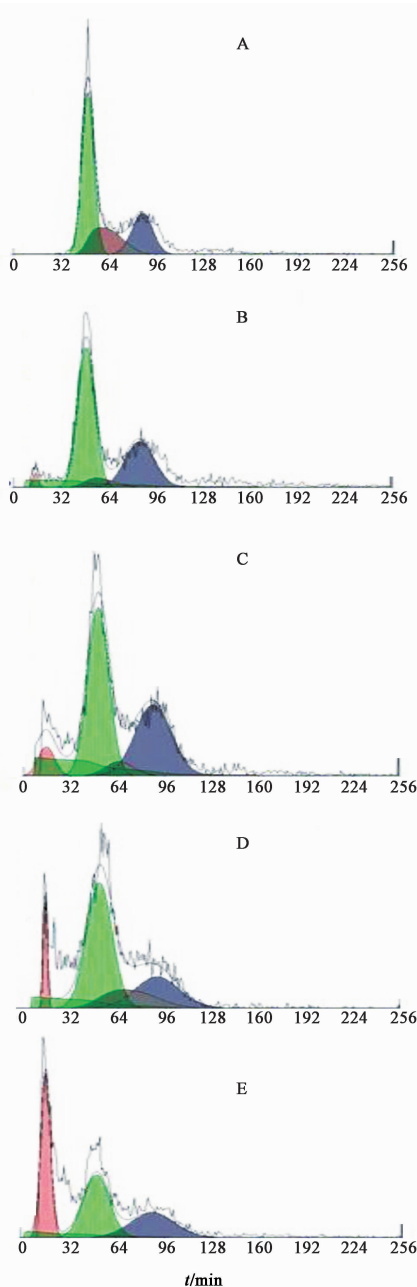
未用重楼皂苷对照组,处于 G_0/G_1 期的细胞比例是 53.7%, 处于 G_2/M 期的是 23.3%;用不同浓度重楼皂苷 I (1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用于人膀胱癌细胞 24 h 后,用 PI 和 TUNEL 标记后,流式细胞仪检测结果。重楼皂苷 I 作用于膀胱癌细胞后,引起 BIU-87 阻滞于 G_2/M , 并随着重楼皂苷 I 浓度的升高,这种阻滞作用更加明显(图 2)。

3.4 对凋亡相关基因 Bcl-2 的影响 提取总 RNA 后电泳可见两条明亮的电泳条带,无 DNA 条带污染及降解,将 RNA 提取后转录成 cDNA,之后行免疫荧光实时定量 PCR 检测,采用看家基因 Rps 13 为内参基因,计算 Ct , RQ。结果显示:作用 24 h, 低浓度及高浓度重楼皂苷 I 组 (1, 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与对照组相比 Bcl-2 在低浓度时, RQ 减少约 40%, 当重楼皂苷浓度为 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, RQ 减少近 10 倍 ($P < 0.01$)。Western blot 结果亦见到 Bcl-2 的表达显著降低 ($P < 0.05$, 图 3)。



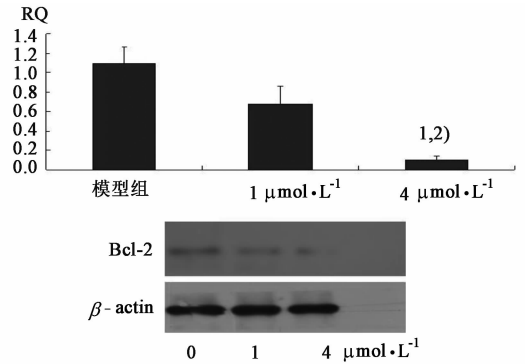
A. 未用药组; B. 重楼皂苷 I 作用 24 h; C. 重楼皂苷 I 作用 48 h

图 1 重楼皂苷 I 对 BIU-87 细胞超微结构的影响



A. 对照组; B-E. 重楼皂苷 I 浓度分别为 1, 2, 4, 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 2 重楼皂苷 I 对人膀胱细胞 BIU-87 细胞周期的影响



与对照组相比¹⁾ $P < 0.01$, 与 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比²⁾ $P < 0.01$

图 3 重楼皂苷 I 对 Bcl-2 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

细胞增殖是生命的基本特征,快速而无限增殖是恶性肿瘤的特点之一。因此,抑制肿瘤细胞的异常增殖则是评价药物是否有抗肿瘤作用的重要标准之一^[10]。实验中使用 MTT 法检测后见到重楼皂苷 I 对膀胱癌细胞株 BIU-87 细胞的增殖有抑制作用,并表现出明显的时间和浓度依赖性。

细胞的增殖是通过细胞周期来实现的,细胞在异常情况下,如药物的干预可能造成 DNA 复制缺陷或者 DNA 损伤时,细胞周期的进程就会发生停滞,如果不能及时完成修复,细胞的增殖就会受到抑制,进而引起细胞凋亡^[11]。笔者用流式细胞术检测重楼皂苷 I 作用于膀胱癌细胞后发现重楼皂苷 I 将膀胱癌细胞阻止于 G_2/M 期,进而诱发细胞凋亡。凋亡的细胞会出现一系列的形态学变化,透射电子显微镜观察可见凋亡细胞体积变小,细胞质浓缩、细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体。本文研究中,重楼皂苷 I 作用于膀胱癌细胞后,见到出泡现象及凋亡小体形成现象等典型的凋亡的电镜下改变。同时实验中采用了 PI 和 TUNEL 双重染色后流式细胞仪检测细胞的凋亡情况,看到随着重楼皂苷 I 作用时间和浓度的升高,膀胱癌细胞的凋亡比率亦不断增加,提

示重楼皂苷 I 引起了膀胱癌细胞的凋亡,从而发挥抑制膀胱癌细胞增殖的作用。

在以往的研究中显示,Bcl-2 在膀胱癌组织中的表达明显高于在正常膀胱黏膜中的表达,Bcl-2 蛋白表达随癌细胞的低分化和恶性程度的提高而提升^[12]。Bcl-2 基因不仅在单发膀胱癌也在多原发膀胱癌发生、发展过程中起作用,多原发膀胱癌组织中 Bcl-2 的表达与单发膀胱癌组织中的表达有统计学差异,且多原发膀胱癌组织中 Bcl-2 表达高于单发膀胱癌^[13]。近年研究认为在浸润性膀胱癌中 Bcl-2 的表达,可能与肿瘤患者的放、化疗抵抗密切相关,是浸润性膀胱癌患者保存膀胱术后放、化疗预后不良的一个独立的预后指标^[14-15]。因此 Bcl-2 在膀胱癌的发生、发展、治疗及预后的评价中都有着重要的位置。所以笔者选取了 Bcl-2 基因进行初步的研究分析。本研究中通过实时定量 PCR 和 Western blot 的分析看到重楼皂苷 I 作用于膀胱癌细胞后 Bcl-2 基因的复制和蛋白的表达均显著降低,因此重楼皂苷 I 通过下调 Bcl-2 的表达,诱发细胞凋亡是其抑制膀胱癌细胞增殖、发挥抗肿瘤作用的机制之一。但是重楼皂苷 I 的抗肿瘤作用机制是非常复杂的,文中仅对其中一小部分进行了研究,之后将进一步开展后续研究,逐渐揭开其作用机制的面纱。

[参考文献]

[1] Castellano D, Carles J, Esteban E, et al. Recommendations for the optimal management of early and advanced urothelial carcinoma [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2012,38(5):431.

[2] 刘海,张婷,陈筱清,等. 云南重楼的甾体皂苷类成分[J]. *中国天然药物*,2006,4(4):264.

[3] Shuli M, Wenyuan G, Yanjun Z, et al. Paris saponins inhibiting carcinoma growth and metastasis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Arch Pharm Res*,2011,34(1):43.

[4] Xiao X, Zou J, Bui-nguyen T M, et al. Paris saponin II of Rhizoma Paris-a novel inducer of apoptosis in human ovarian cancer cells[J]. *Biosci Trends*,2012,6(4):201.

[5] 吴夏慧,胡文静,薛娇,等. 六种天然皂苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2011,19(10):2113.

[6] Wu S, Gao W, Qiu F, et al. Simultaneous quantification of polyphyllin D and paris H, two potential antitumor active components in paris polyphylla by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and the application to pharmacokinetics in rats[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012,905(15):54.

[7] 林云华,钱晓萍. 中药重楼抗肿瘤作用的研究进展[J]. *医学综述*,2013,19(13):2358.

[8] Yue G, Wei J, Qian X, et al. Synergistic anticancer effects of polyphyllin I and evodiamine on freshly-removed human gastric tumors[J]. *P Los One*, 2013,8(6):e65164.

[9] Gao M, Cheung K L, Lau I P, et al. Polyphyllin D induces apoptosis in human erythrocytes through Ca²⁺ rise and membrane permeabilization[J]. *Arch Toxicol*, 2012,86(5):741.

[10] 周斌兵,Haiying Zhang, Marc Damelin,等. 肿瘤始发细胞:抗肿瘤药物研发和评价的挑战与机遇[J]. *药品评价*,2012,33(9):4.

[11] 邹向阳,李连宏. 细胞周期调控与肿瘤[J]. *国际遗传学杂志*,2006,20(1):70.

[12] 江浙,江桂英,周丽梅,等. 膀胱癌 CK20 和 Bcl-2 的表达和临床意义[J]. *当代医学*,2011,17(11):48.

[13] 祝庆亮,谷江,张永春,等. 多原发膀胱癌与单发膀胱癌中 P53、Bcl-2、C-erbB-2、EGFR 的表达及临床意义[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2012,32(7):989.

[14] Sun B, Moibi J A, Mak A, et al. Response of bladder carcinoma cells to TRAIL and antisense oligonucleotide, Bcl-2 or clusterin treatments[J]. *J Urol*,2009,181(3):1361.

[15] Karamitopoulou E, Rentsch C A, Markwalder R, et al. Prognostic significance of apoptotic cell death in bladder cancer: a tissue microarray study on 179 urothelial carcinomas from cystectomy specimens[J]. *Pathology*, 2010,42(1):37.

[责任编辑 邹晓翠]