

尼卡地平调节RhoA/ROCK信号通路对膀胱癌细胞增殖、凋亡和化疗耐药性的影响

庞允^{1*} 杨京可² 李荣芳³ 杨浩杰⁴ 李利利⁵ 白婷婷³

(¹西安交通大学医院药剂科, 西安 710049; ²西安市第九医院泌尿外科, 西安 710054; ³西安市第九医院心血管病
院三科, 西安 710054; ⁴西安交通大学医院公卫中心, 西安 710049; ⁵西安交通大学医院体检中心, 西安 710049)

摘要 该文旨在探讨尼卡地平基于RhoA/ROCK信号通路对膀胱癌细胞增殖、凋亡及化疗耐药性的影响。将膀胱癌细胞T24分为对照组、L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、H-尼卡地平组、H-尼卡地平+LPA组、DMSO组、顺铂组、H-尼卡地平+顺铂组、H-尼卡地平+顺铂+LPA组。分别利用CCK-8试剂盒、流式细胞术、划痕实验、Transwell法、Western blot方法检测T24细胞的增殖活性、凋亡、迁移、侵袭能力以及RhoA/ROCK信号通路蛋白表达情况。与对照组比较, L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、H-尼卡地平组细胞D值、划痕愈合率、侵袭细胞数、RhoA及ROCK蛋白表达水平显著降低($P<0.05$), 细胞凋亡率显著升高($P<0.05$); 与H-尼卡地平组比较, H-尼卡地平+LPA组细胞D值、划痕愈合率、侵袭细胞数、RhoA及ROCK蛋白表达水平显著升高($P<0.05$), 细胞凋亡率显著降低($P<0.05$); 与DMSO组比较, 顺铂组细胞D值、划痕愈合率、侵袭细胞数均降低, 凋亡率升高($P<0.05$); 与顺铂组比较, H-尼卡地平组和H-尼卡地平+顺铂组细胞D值、划痕愈合率、侵袭细胞数均降低, 凋亡率升高($P<0.05$); 与H-尼卡地平+顺铂组比较, H-尼卡地平+顺铂+LPA组D值、划痕愈合率、侵袭细胞数均升高, 凋亡率降低($P<0.05$)。尼卡地平可以抑制膀胱癌细胞增殖及其化疗耐药性, 促进细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制RhoA/ROCK信号通路有关。

关键词 尼卡地平; RhoA/ROCK信号通路; 膀胱癌; 增殖; 凋亡; 化疗耐药性

Effects of Nicardipine on Proliferation, Apoptosis and Chemoresistance of Bladder Cancer Cells by Regulating RhoA/ROCK Signaling Pathway

PANG Yun^{1*}, YANG Jingke², LI Rongfang³, YANG Haojie⁴, LI Lili⁵, BAI Tingting³

(¹Department of Pharmacy, Xi'an Jiaotong University Hospital, Xi'an 710049, China; ²Department of Urology, Xi'an No.9 Hospital, Xi'an 710054, China; ³Cardiovascular hospital Department Three, Xi'an No.9 Hospital; ⁴Public Health Center, Xi'an Jiaotong University Hospital, Xi'an 710049, China; ⁵Physical Examination Center, Xi'an Jiaotong University Hospital, Xi'an 710049, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of nicardipine on the proliferation, apoptosis and chemoresistance of bladder cancer cells by regulating RhoA/ROCK signaling pathway. T24 cells of bladder cancer were separated into control group, L-nicardipine group, M-nicardipine group, H-nicardipine group, H-nicardipine+LPA group, DMSO group, cisplatin group, H-nicardipine+cisplatin group, H-nicardipine+cisplatin+LPA group. The proliferation activity, apoptosis, migration, invasion ability, and RhoA/ROCK signaling pathway protein expression of T24 cells were detected using CCK-8 assay kit, flow cytometry, scratch assay, Transwell method, and Western blot, respectively. Compared with the control group, the

收稿日期: 2024-02-27

接受日期: 2024-05-10

*通信作者: Tel: 13379009381, E-mail: pdzmm09@163.com

Received: February 27, 2024

Accepted: May 10, 2024

*Corresponding author. Tel: +86-13379009381, E-mail: pdzmm09@163.com

D value, scratch healing rate, number of invasive cells, and the RhoA and ROCK protein expression levels in the L-nicardipine group, M-nicardipine group, and H-nicardipine group were obviously reduced ($P<0.05$), while the apoptosis rate of cells was obviously increased ($P<0.05$). Compared with the H-nicardipine group, the *D* value, scratch healing rate, number of invasive cells, and the RhoA and ROCK expression levels in H-nicardipine+LPA group were obviously increased ($P<0.05$), while the apoptosis rate of cells was obviously decreased ($P<0.05$). Compared with the DMSO group, the *D* value, scratch healing rate, and number of invasive cells in the cisplatin group were decreased, while the apoptosis rate was increased ($P<0.05$). Compared with the cisplatin group, the *D* value, scratch healing rate, and number of invasive cells in the H-nicardipine group and the H-nicardipine+cisplatin group were decreased, while the apoptosis rate was increased ($P<0.05$). Compared with the H-nicardipine+cisplatin group, the H-nicardipine+cisplatin+LPA group showed an increase in *D* value, scratch healing rate, and number of invasive cells, and a decrease in apoptosis rate ($P<0.05$). Nicardipine can inhibit the proliferation and chemoresistance of bladder cancer cells, and promote cell apoptosis. The mechanism may be related to the inhibition of RhoA/ROCK signaling pathway.

Keywords nicardipine; RhoA/ROCK signaling pathway; bladder cancer; proliferation; apoptosis; chemoresistance

膀胱癌是一种常见的泌尿系统方面恶性肿瘤, 且其发病率和死亡率呈现不断增加的趋势^[1]。根据最新的统计数据结果显示, 全球每年新增的膀胱癌患者约为54.9万例, 男性膀胱癌的发病率和死亡率分别为9.6/10万和3.2/10万, 大约是全球女性发病率的4倍^[2]。对于膀胱癌的治疗, 目前主要是进行手术治疗, 并利用化疗进行辅助, 但其治疗效果并不是十分理想^[3]。因此, 对于其分子机制以及治疗靶点的探索是非常必要的。尼卡地平是一种常用的降压药物, 为钙离子拮抗剂, 可以通过对钙离子的抑制来发挥降压的作用^[4]。PARK等^[5]研究发现, 尼卡地平参与神经母细胞瘤细胞凋亡的调节过程。有相关研究发现, 在胰腺癌患者中, 尼卡地平可以逆转胰腺癌的耐药性^[6]。但其在膀胱癌中是否有作用还没有相关研究。在哺乳动物的细胞增殖以及有丝分裂的过程中, RhoA参与并发挥作用, 且RhoA还具有GTP酶的活性, RhoA激活对Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶(Rho-associated coiled-coil kinase, ROCK)具有一定的促进作用^[7]。已有相关研究发现, 在多种恶性肿瘤的发生发展过程中, RhoA/ROCK信号通路发挥重要作用, 且参与细胞凋亡以及其他恶性生物学行为等过程^[8]。研究发现, RhoA/ROCK信号通路参与卵巢癌的发生发展过程^[9]。本研究主要基于RhoA/ROCK信号通路探讨尼卡地平对膀胱癌细胞增殖、凋亡和化疗耐药性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与主要试剂 人膀胱癌细胞株T24细胞(货号: ATCC1057)购自上海北诺生物科技有限公司; RPMI 1640培养基(含10%胎牛血清, 货号: FYP-PLS1368)购自上海富雨生物科技有限公司; 尼卡地平(货号: B73095)购自上海源叶生物科技有限公司; 溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)(货号: DECO2122)购自舜冉(上海)生物科技有限公司; 细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK-8, 货号: BY-Q50356)购自艾美捷科技有限公司; Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(货号: CA1020)购自北京索莱宝科技有限公司; 总蛋白提取试剂盒(货号: 31013-100T)购自上海晶风生物科技有限公司; BCA试剂盒(货号: D2154-01)购自深圳子科生物科技有限公司; RhoA、ROCK、GAPDH抗体(货号: ab54835、ab125025、ab128915)购自Abcam公司。

1.1.2 主要仪器 CO₂细胞培养箱(型号: CellXpert C170i)购自德国Eppendorf公司; 酶标仪(型号: Multiskan™ FC)购自ThermoFisher Scientific公司; 流式细胞仪(型号: NL-CLC 1L-3L)购自Cyttek Biosciences公司; 显微镜(型号: DMi1)购自Labcan Scientific公司; 凝胶成像仪(型号: ZF-208)购自上海金鹏分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 将人膀胱癌T24细胞使

用含有10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基进行培养,并将其置于细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养,培养至细胞的融合率达到80%之后,进一步进行传代培养。将细胞分为对照组、低浓度尼卡地平组(L-尼卡地平组)、中浓度尼卡地平组(M-尼卡地平组)、高浓度尼卡地平组(H-尼卡地平组)和H-尼卡地平+LPA组、二甲基亚砜(DMSO)组、顺铂组、H-尼卡地平+顺铂组、H-尼卡地平+顺铂+LPA组。其中对照组进行正常培养, L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、H-尼卡地平组分别加入2 μmol/L、4 μmol/L、8 μmol/L尼卡地平^[10]进行培养, H-尼卡地平+LPA组加入8 μmol/L尼卡地平 and 50 μmol/L RhoA/ROCK信号通路激活剂LPA进行培养^[11], DMSO组加入含有DMSO的培养基进行培养, 顺铂组加入5 μg/mL顺铂进行培养, H-尼卡地平+顺铂组加入8 μmol/L尼卡地平 and 5 μg/mL顺铂进行培养, H-尼卡地平+顺铂+LPA组分别加入8 μmol/L尼卡地平、5 μg/mL顺铂 and 50 μmol/L LPA进行培养。

1.2.2 CCK-8试剂盒检测T24细胞增殖情况 收集处于对数生长期的T24细胞,并将其接种在96孔板中,进行48 h的培养后,加入CCK-8溶液。在细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中进行孵育,4 h后,使用酶标仪对波长为450 nm处的吸光度(*D*)值进行检测。

1.2.3 流式细胞术检测T24细胞凋亡情况 分别对各组T24细胞进行收集,并将收集的细胞接种于6孔板中,置于细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中进行培养,24 h后,37 °C下用胰蛋白酶对细胞进行消化1~2 min,再制成单细胞悬液,并用预冷的PBS对其进行清洗,室温下3 000 r/min离心5 min,取沉淀,加入195 μL结合缓冲液进行细胞浓度的调整,再分别加入Annexin V-FITC和PI,室温避光反应10 min,细胞凋亡率的检测使用流式细胞仪。

1.2.4 划痕实验检测T24细胞迁移能力 取适量对数生长期的各组T24细胞,接种于6孔板中,在细胞培养箱中进行培养,在培养24 h后,用移液器枪头的尖端对6孔板轻轻划动,并继续培养24 h。对于0 h和24 h的划痕情况用倒置显微镜进行观察,并计算其划痕愈合率(%)。

1.2.5 Transwell法检测T24细胞侵袭能力 在Transwell的上室加入Matrigel进行预包被,并收集一定量的对数生长期的T24细胞,并用不含有血清的培养基对其进行一定的重悬处理,加至已经进行预包

被的Transwell上室,并在Transwell下室加满含有血清的培养基,置于细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养24 h,37 °C条件下分别加入多聚甲醛进行固定和结晶紫进行染色。在显微镜下观察拍照并对侵袭细胞数进行计算。

1.2.6 Western blot检测RhoA/ROCK信号通路相关蛋白表达情况 使用蛋白裂解液对收集的各组T24细胞进行裂解,提取细胞中的总蛋白,利用BAC试剂盒对其浓度的进行检测,并利用10%的SDS-PAGE对提取得到的蛋白样品进行分离,之后将其转移至聚偏二氟乙烯膜上,并用5%脱脂奶粉室温进行封闭2 h,分别加入(RhoA、ROCK和GAPDH)抗体(1:1 000),4 °C过夜;加入二抗(1:5 000),室温反应2 h。利用凝胶成像仪对蛋白的表达情况进行观察。

1.3 统计学分析 实验数据的处理用SPSS 25.0统计软件进行。计量资料,如划痕愈合率以及侵袭细胞数等,以($\bar{x} \pm s$)表示。各组间比较,如L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、H-尼卡地平组等采用 F 检验(进一步两两比较用SNK- q 检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尼卡地平对T24细胞增殖的影响

与对照组比较,L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、H-尼卡地平组细胞 D 值均降低,且随着尼卡地平浓度的增加, D 值逐渐降低($P < 0.05$);与H-尼卡地平组比较,H-尼卡地平+LPA组的 D 值显著升高($P < 0.05$)。见图1。

2.2 尼卡地平对T24细胞凋亡的影响

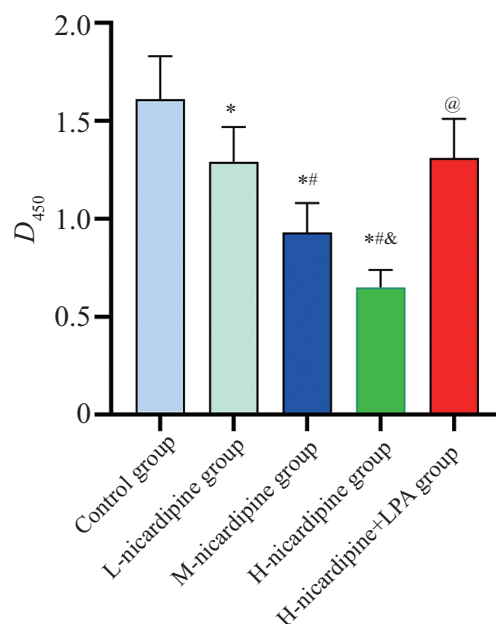
与对照组比较,L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、H-尼卡地平组的细胞凋亡率均升高,且随着尼卡地平浓度的增加,细胞凋亡率逐渐升高($P < 0.05$);与H-尼卡地平组比较,H-尼卡地平+LPA组的细胞凋亡率显著降低($P < 0.05$)。见图2和图3。

2.3 尼卡地平对T24细胞迁移的影响

与对照组比较,L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、H-尼卡地平组的划痕愈合率降低,且随着尼卡地平浓度的增加,划痕愈合率逐渐降低($P < 0.05$);与H-尼卡地平组比较,H-尼卡地平+LPA组的划痕愈合率显著升高($P < 0.05$)。见图4和图5。

2.4 尼卡地平对T24细胞侵袭的影响

与对照组比较,L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与L-尼卡地平组相比; & $P < 0.05$, 与M-尼卡地平组相比; @ $P < 0.05$, 与H-尼卡地平组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with L-nicardipine group; & $P < 0.05$ compared with M-nicardipine group; @ $P < 0.05$ compared with H-nicardipine group.

图1 尼卡地平对T24细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of nicardipine on proliferation of T24 cells

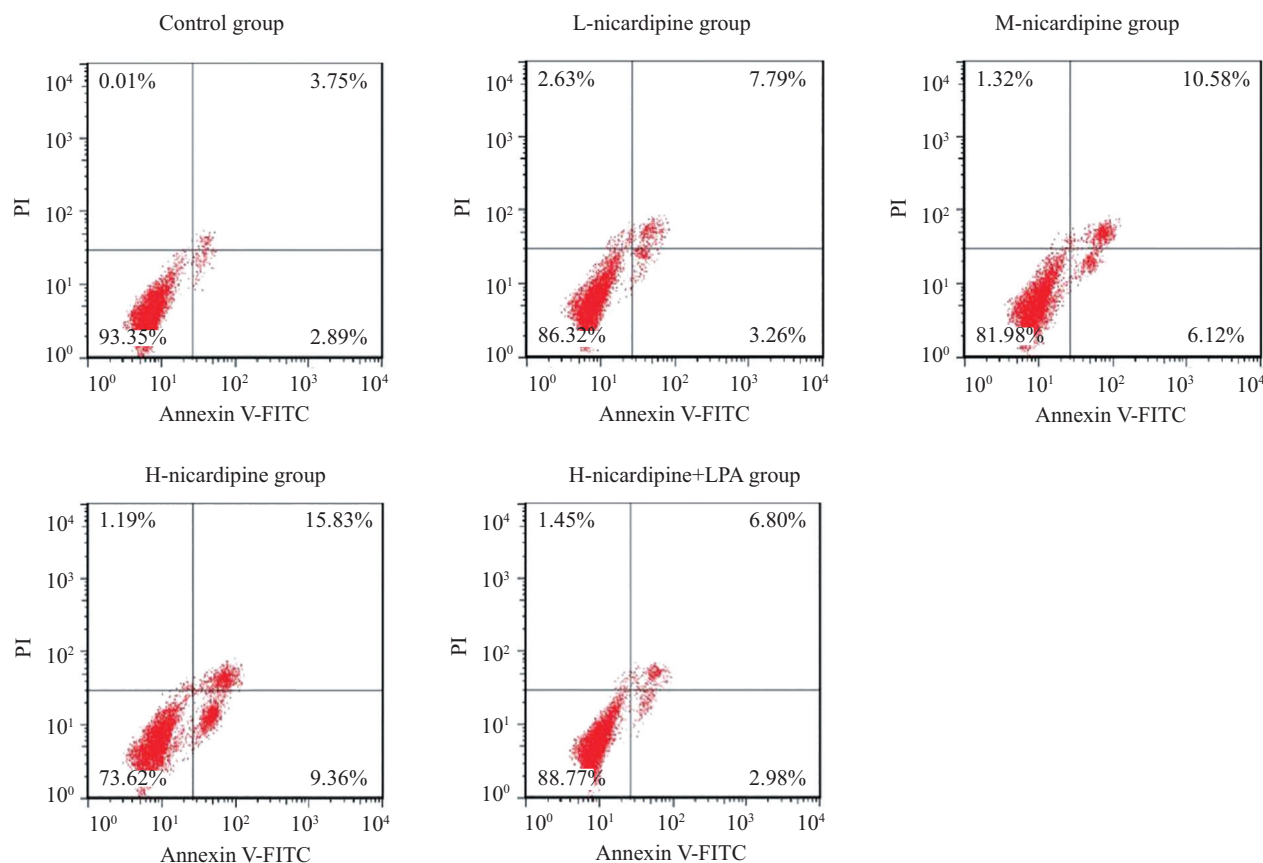
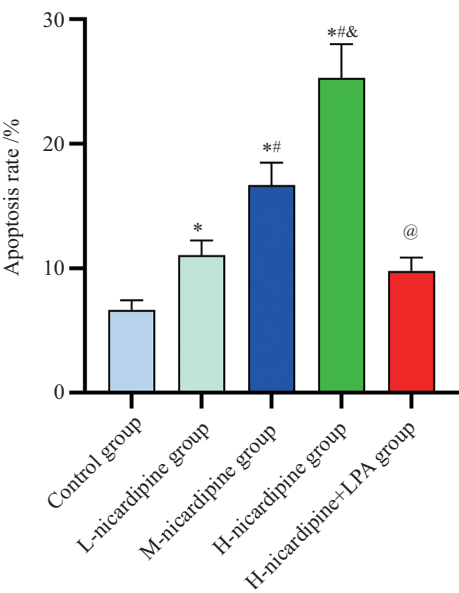


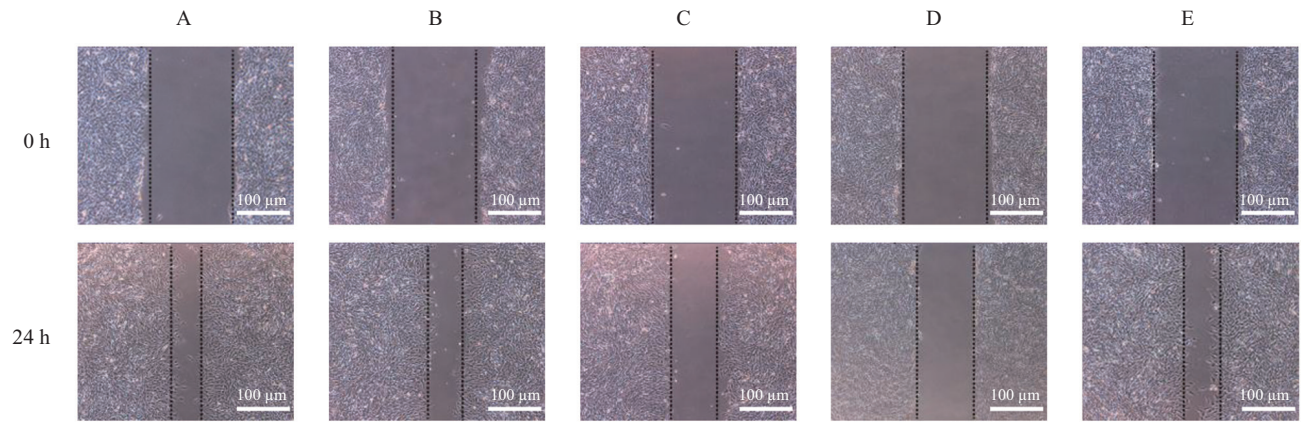
图2 流式细胞术检测T24细胞凋亡

Fig.2 Apoptosis of T24 cells was detected by flow cytometry



* $P<0.05$, 与对照组相比; # $P<0.05$, 与L-尼卡地平组相比; * $P<0.05$, 与M-尼卡地平组相比; @ $P<0.05$, 与H-尼卡地平组相比。
* $P<0.05$ compared with control group; # $P<0.05$ compared with L-nicardipine group; * $P<0.05$ compared with M-nicardipine group; @ $P<0.05$ compared with H-nicardipine group.

图3 尼卡地平对T24细胞凋亡的影响
Fig.3 Effect of nicardipine on apoptosis of T24 cells



A: 对照组; B: L-尼卡地平组; C: M-尼卡地平组; D: H-尼卡地平组; E: H-尼卡地平+LPA组。
A: control group; B: L-nicardipine group; C: M-nicardipine group; D: H-nicardipine group; E: H-nicardipine +LPA group.

图4 各组T24细胞的迁移能力(划痕实验)

Fig.4 Migration ability of T24 cells in each group (scratch test)

H-尼卡地平组的侵袭细胞数减少, 且随着尼卡地平浓度的增加, 侵袭细胞数逐渐减少($P<0.05$); 与H-尼卡地平组比较, H-尼卡地平+LPA组的侵袭细胞数显著增加($P<0.05$)。见图6和图7。

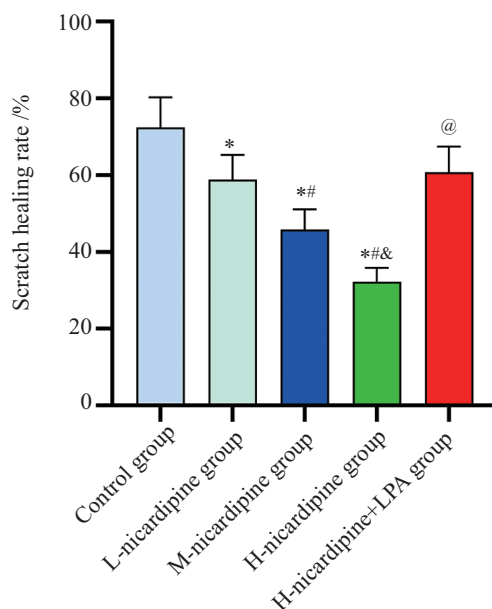
2.5 尼卡地平对T24细胞中RhoA/ROCK信号通路的影响

与对照组比较, L-尼卡地平组、M-尼卡地平组、H-尼卡地平组RhoA、ROCK蛋白表达水平均降低, 且随着尼卡地平浓度的增加, RhoA、ROCK蛋白表

达水平逐渐降低($P<0.05$); 与H-尼卡地平组比较, H-尼卡地平+LPA组的RhoA、ROCK蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。见图8、图9和图10。

2.6 尼卡地平对T24细胞化疗耐药性的影响

与DMSO组比较, 顺铂组细胞D值、划痕愈合率、侵袭细胞数均降低, 凋亡率均升高($P<0.05$); 与顺铂组比较, H-尼卡地平组和H-尼卡地平+顺铂组细胞D值、划痕愈合率、侵袭细胞数降低, 凋亡率升高($P<0.05$); 与H-尼卡地平+顺铂组比较, H-尼卡地



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与L-尼卡地平组相比; & $P < 0.05$, 与M-尼卡地平组相比; @ $P < 0.05$, 与H-尼卡地平组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with L-nicardipine group; & $P < 0.05$ compared with M-nicardipine group; @ $P < 0.05$ compared with H-nicardipine group.

图5 尼卡地平对T24细胞迁移的影响

Fig.5 Effect of nicardipine on migration of T24 cells

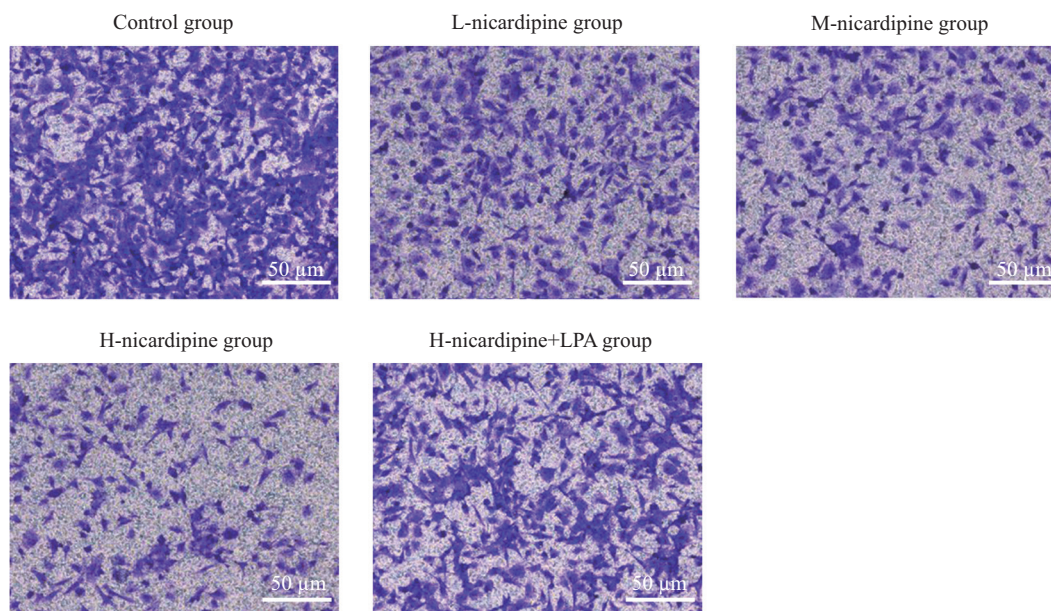


图6 各组T24细胞的侵袭能力

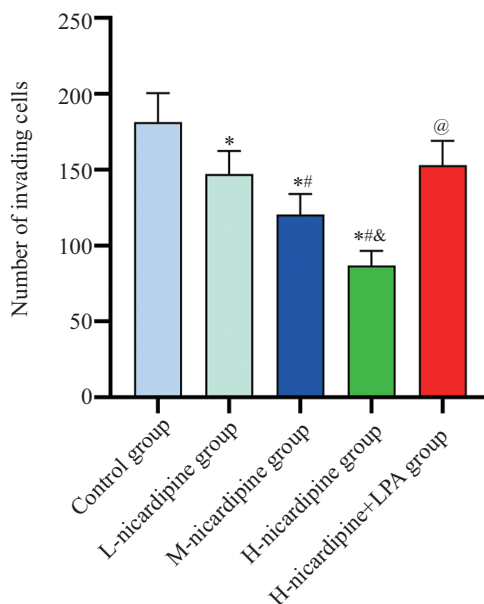
Fig.6 Invasion ability of T24 cells in each group

平+顺铂+LPA组 D 值、划痕愈合率、侵袭细胞数均升高, 凋亡率均降低($P < 0.05$)。见表1。

3 讨论

一般认为膀胱癌的发病与较高年龄、吸烟、职业以及接触化学物质等多种因素有关^[12]。目前对于

膀胱癌的增殖、迁移以及侵袭等的相关机制的研究是一个热点^[13]。常规的化疗方案存在较大的不良反应以及容易产生一定的耐药性, 导致治疗的效果相对较差^[14]。因此, 对于膀胱癌发生发展涉及的相关机制进行深入研究, 对为其早期的诊断以及治疗提供一定的理论依据非常重要。

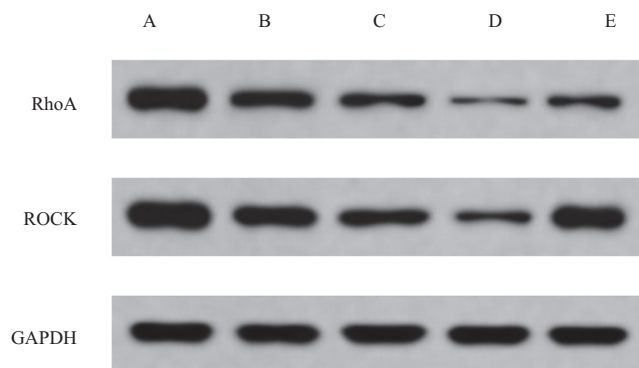


* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与L-尼卡地平组相比; & $P < 0.05$, 与M-尼卡地平组相比; @ $P < 0.05$, 与H-尼卡地平组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with L-nicardipine group; & $P < 0.05$ compared with M-nicardipine group; @ $P < 0.05$ compared with H-nicardipine group.

图7 尼卡地平对T24细胞侵袭的影响

Fig.7 Effect of nicardipine on invasion of T24 cells



A: 对照组; B: L-尼卡地平组; C: M-尼卡地平组; D: H-尼卡地平组; E: H-尼卡地平+LPA组。

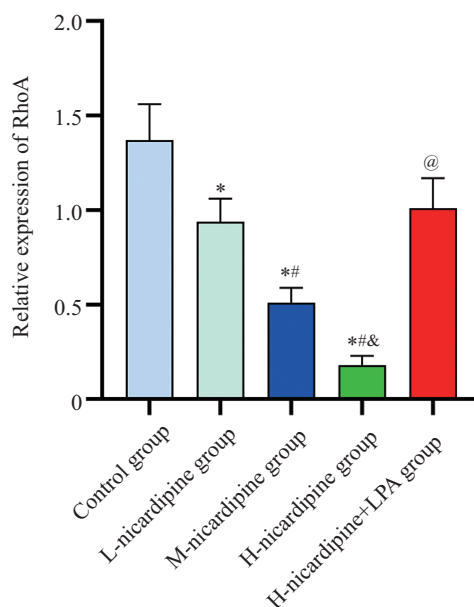
A: control group; B: L-nicardipine group; C: M-nicardipine group; D: H-nicardipine group; E: H-nicardipine+LPA group.

图8 Western blot检测T24细胞中RhoA、ROCK蛋白表达情况

Fig.8 Western blot analysis of RhoA and ROCK protein expression levels in T24 cells

尼卡地平是在临床上用于治疗心绞痛以及高血压的常用药物, 且根据相关研究报道, 已有研究者将尼卡地平应用于抗肺癌产品的制备中^[15]。据相关研究报道, 尼卡地平能够逆转肝癌的耐药性^[16]。刘伟等^[17]研究发现, 尼卡地平对胶质瘤细胞的耐药性也具有一定的逆转作用。在本研究中, 为了探究尼卡地平对T24细胞的影响, 分别使用不同浓度的尼卡地平对T24细胞进行处理, 为了保证其实验设计的合理性和可靠性, 其实验方法参考相关文献[10], 发现尼卡地平呈现浓度依赖性地降低T24细胞的D值、

划痕愈合率、侵袭细胞数以及升高细胞凋亡率, 表明尼卡地平对膀胱癌细胞的凋亡具有促进作用, 且对细胞增殖、迁移和侵袭等恶性生物学行为具有抑制作用, 进一步说明了尼卡地平发挥抗肿瘤的作用。顺铂是一种具有细胞毒性的化疗药物, 会对肿瘤细胞的DNA进行损伤, 进一步促进肿瘤细胞凋亡的发生^[18-19]。在针对膀胱癌患者的治疗方法中, 基础的化疗方案非常重要, 因此本研究也对其化疗耐药性进行了研究。本研究结果显示, 与DMSO组比较, H-尼卡地平组、顺铂组、H-尼卡地平+顺铂组的D值、

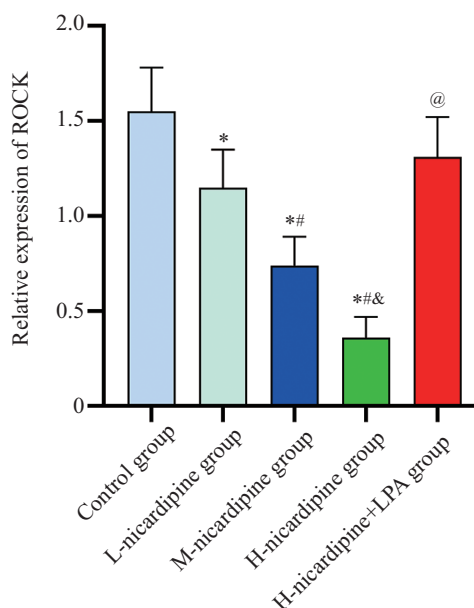


* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与L-尼卡地平组相比; * $P < 0.05$, 与M-尼卡地平组相比; @ $P < 0.05$, 与H-尼卡地平组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with L-nicardipine group; * $P < 0.05$ compared with M-nicardipine group; @ $P < 0.05$ compared with H-nicardipine group.

图9 各组T24细胞中RhoA蛋白水平

Fig.9 RhoA protein levels in T24 cells in each group



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与L-尼卡地平组相比; * $P < 0.05$, 与M-尼卡地平组相比; @ $P < 0.05$, 与H-尼卡地平组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with L-nicardipine group; * $P < 0.05$ compared with M-nicardipine group; @ $P < 0.05$ compared with H-nicardipine group.

图10 各组T24细胞中ROCK蛋白水平

Fig.10 ROCK protein levels in T24 cells of each group

划痕愈合率、侵袭细胞数均降低, 凋亡率均升高, 且H-尼卡地平+顺铂组较顺铂组D值、划痕愈合率、侵袭细胞数降低, 凋亡率升高更为显著。这提示尼卡地平可以抑制膀胱癌细胞的顺铂化疗耐药性。

RhoA属于Rho蛋白亚型的一种, 在多种肿瘤细胞中表达水平升高, 且编码该蛋白的基因被认为是一种癌基因, RhoA被激活后, 会与ROCK中的RhoA结合域相互作用, 进一步激活ROCK^[20]。HERBERT

表1 尼卡地平对T24细胞化疗耐药性的影响

Table 1 Effect of nicardipine on resistance to T24 cells chemotherapy

组别 Group	D值 D value	凋亡率/% Apoptosis rate /%	划痕愈合率/% Scratch healing rate /%	侵袭细胞数 Number of invading cells
DMSO group	1.62±0.23	6.56±0.78	72.65±7.85	180.23±19.11
Cisplatin group	1.15±0.15*	13.69±1.52*	53.61±5.62*	125.24±13.37*
H-nicardipine group	0.65±0.09 [#]	25.29±2.71 [#]	32.28±3.56 [#]	86.92±9.70 [#]
H-nicardipine+cisplatin group	0.18±0.05 [#]	32.76±3.51 [#]	22.73±2.39 [#]	61.27±6.38 [#]
H-nicardipine+cisplatin+LPA group	0.62±0.08 ^{&}	25.17±2.68 ^{&}	31.76±3.42 ^{&}	85.33±9.51 ^{&}

**P*<0.05, 与DMSO组相比; [#]*P*<0.05, 与顺铂组相比; [&]*P*<0.05, 与H-尼卡地平+顺铂组相比。
**P*<0.05 compared with DMSO group; [#]*P*<0.05 compared with cisplatin group; [&]*P*<0.05 compared with H-nicardipine+cisplatin group.

等^[21]研究发现, RhoA通过对ROCK表达的调控, 会进一步对细胞有丝分裂过程产生一定的影响。已有相关研究发现, RhoA在肌动蛋白的表达以及细胞骨架结构的调整中都发挥一定的作用^[22]。也有相关研究发现, 在多种恶性肿瘤中, 通过激活RhoA/ROCK信号通路对肿瘤细胞的上皮-间质转化产生一定的影响^[23]。本研究发现, 与对照组相比, 经过尼卡地平处理的T24细胞的RhoA、ROCK蛋白表达水平显著降低, 表明尼卡地平对RhoA/ROCK信号通路具有一定的抑制作用。为了进一步对该通路的作用进行验证, 本研究利用RhoA/ROCK信号通路激活剂LPA进行回补实验验证, 结果发现, 与H-尼卡地平组相比, H-尼卡地平+LPA组D值、划痕愈合率、侵袭细胞数升高, 细胞凋亡率降低; 且与H-尼卡地平+顺铂组比较, H-尼卡地平+顺铂+LPA组的D值、划痕愈合率、侵袭细胞数均升高, 凋亡率均降低。由此推测尼卡地平对膀胱癌细胞的增殖、凋亡以及化疗耐药性的作用可能与RhoA/ROCK信号通路被抑制有关。进一步证实了尼卡地平可以通过抑制RhoA/ROCK信号通路从而抑制膀胱癌细胞的增殖及其化疗耐药性, 最终促进细胞凋亡。但是本研究仅仅在体外进行了细胞实验, 后续会进一步在体内动物实验上进行验证。

综上所述, 尼卡地平抑制膀胱癌细胞的增殖及其化疗耐药性, 促进细胞凋亡, 其作用机制可能与抑制RhoA/ROCK信号通路有关。

参考文献 (References)

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7-33.

[2] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin,

2024, 74(3): 229-63.

[3] NADAL R, BELLMUNT J. Management of metastatic bladder cancer [J]. Cancer Treat Rev, 2019, 76(1): 10-21.

[4] 朱娟. 丹参注射液联合尼卡地平治疗妊娠期高血压的临床效果[J]. 中国当代医药 (ZHU J. Clinical effect of Danshen injection combined with Nicardipine on hypertensive disorder complicating pregnancy [J]. China Modern Medicine), 2019, 26(22): 129-31.

[5] PARK H J, KIM H J. Inhibitory effect of nicardipine on rotenone-induced apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(3): 941-6.

[6] 杨军, 石欣, 严伟, 等. 尼卡地平对胰腺癌Patu8988株培美曲塞耐药的逆转作用[J]. 世界华人消化杂志 (YANG J, SHI X, YAN W, et al. Nicardipine reverses the resistance of human pancreatic carcinoma Patu8988 cell line to pemetrexed [J]. World Chinese Journal of Digestology), 2010, 18(2): 132-6.

[7] BASANT A, GLOTZER M. Spatiotemporal regulation of RhoA during cytokinesis [J]. Curr Biol, 2018, 28(9): R570-80.

[8] 刁岩, 赵阳, 靳耀锋, 等. RhoA/ROCK信号通路在乳腺癌中的作用及其临床意义[J]. 肿瘤药学 (DIAO Y, ZHAO Y, JIN Y F, et al. The relationship of RhoA/ROCK signaling pathway related proteins with the clinical stage and metastasis of breast cancer [J]. Anti-Tumor Pharmacy), 2018, 8(5): 755-8.

[9] WEI X, LOU H, ZHOU D, et al. TAGLN mediated stiffness-regulated ovarian cancer progression via RhoA/ROCK pathway [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2021, 40(1): 292.

[10] CHEN Y C, CHEN J H, TSAI C F, et al. Nicardipine inhibits breast cancer migration via Nrf2/HO-1 axis and matrix metalloproteinase-9 regulation [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(1): 710978.

[11] 许海, 段刚峰. 溶血磷脂酸调控RhoA/ROCK2信号通路对乳腺癌细胞增殖的影响[J]. 基础医学与临床 (XU H, DUAN G F. Influence of lysophosphatidic acid on proliferation of breast cancer cell by adjusted RhoA/ROCK2 signal pathway [J]. Basic and Clinical Medicine), 2013, 33(1): 106-10.

[12] LENIS A T, LEC P M, CHAMIE K, et al. Bladder cancer: a review [J]. JAMA, 2020, 324(19): 1980-91.

[13] LI M S, WANG Y X, LIU Y L, et al. Low expression of hsa_circ_0018069 in human bladder cancer and its clinical significance [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019(1): 1-9.

[14] 金乾, 武跃清, 秦克松, 等. 浅表性膀胱癌经尿道膀胱肿瘤电切术联合丝裂霉素C及干扰素治疗效果与复发原因[J]. 中国临床医生杂志 (JIN G, WU Y Q, QIN K S, et al. Effect of transurethral resection of bladder tumor combined with mitomycin C and

- interferon on the treatment of superficial bladder cancer and the cause of recurrence [J]. Chinese Journal of Clinicians, 2018, 46(1): 65-7.
- [15] SHI Y Y, SONG Z J. Applications for nicardipine in preparing antitumor cancer products [P]. US2018185346A1. [2018-07-05].
- [16] 刘伟, 只达石. 尼卡地平联合威猛逆转 C6/VM-26 耐药并诱导凋亡研究 [J]. 中华神经外科疾病研究杂志 (LIU W, ZHI D S. Study on resistance and apoptosis of NCDP combined with VM-26 reverse C6/VM-26 [J]. Chinese Journal of Neurosurgical Diseases Research, 2005, 4(6): 512-5.
- [17] 刘伟, 魏盾, 孙续腾. 尼卡地平和 VM-26 逆转 C6/VM-26 耐药性研究 [J]. 北华大学学报 (自然科学版) (LIU W, WEI D, SUN X T. On nicardipine combining with VM 26 reverse C6/VM 26 resistance [J]. Journal of Beihua University, Natural Science), 2002, 3(3): 206-9.
- [18] VITALE I, GALLUZZI L, CASTEDO M, et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(6): 385-92.
- [19] GALLUZZI L, VITALE I, ABRAMS J M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1): 107-20.
- [20] AKTAS S, UN I, OMER BARLAS I, et al. Evaluation of the RhoA/Rho-kinase pathway in the uterus of the rat model of polycystic ovary syndrome [J]. Reprod Biol, 2019, 19(1): 45-54.
- [21] HERBERT L M, RESTA T C, JERNIGAN N L, et al. RhoA increases ASIC1a plasma membrane localization and calcium influx in pulmonary arterial smooth muscle cells following chronic hypoxia [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 314(2): C166-76.
- [22] MATSUKAWA T, MORITA K, OMIZU S, et al. Mechanisms of RhoA inactivation and CDC42 and Rac1 activation during zebrafish optic nerve regeneration [J]. Neurochem Int, 2018, 1(112): 71-80.
- [23] LI X, LIU J, CHEN B. A positive feedback loop of Profilin-1 and RhoA/ROCK1 promotes endothelial dysfunction and oxidative stress [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 23(12): 1-9.