

川芎嗪对人肾癌细胞增殖及凋亡的影响

亓俊华 聂 刚 徐秀鹏 周 润 姚 伟 毛 青 罗鹏程

摘 要 **目的** 分析不同浓度川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)对人肾癌细胞系(786-O)增殖及凋亡的影响,并探讨其分子机制。**方法** 体外培养786-O细胞,与不同浓度川芎嗪溶液(0.5 mmol/L、5 mmol/L)及溶剂组(DMSO组)作用24、48和72h后,四甲基偶氮唑盐比色法测定细胞增殖率;细胞计数法检测药物作用48h后的细胞数量变化;DAPI染色观察药物作用48h后细胞核形态;半定量RT-PCR技术和Western blot法检测药物作用48h后凋亡相关基因在转录和翻译水平的改变。**结果** 随着川芎嗪药物浓度的增加,786-O细胞增殖率显著降低,凋亡率增加,细胞数量也显著减少,且胞核出现皱缩或肿胀,核裂增多;凋亡相关基因AIF、caspase-3在转录及翻译水平上均显著增强,无论与空白对照组还是溶剂对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 本研究证实TMP可以显著抑制人肾癌细胞系786-O细胞的增殖,促进其凋亡,为中药抗癌方面的研究提供实验室证据。

关键词 川芎嗪 细胞增殖 细胞凋亡 人肾癌细胞系

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.09.026

Effect of Tetramethylpyrazine on Proliferation and Apoptosis of Human Renal Cell Carcinoma Cells. Qi Junhua, Nie Gang, Xu Xiupeng, et al. Hubei Key Laboratory of Kidney Disease Pathogenesis and Intervention, Hubei 435000, China

Abstract Objective To detect the effects of tetramethylpyrazine (TMP) in different concentrations on proliferation and apoptosis of human renal cell carcinoma cell line (786-O) in vitro and the related molecular mechanism. **Methods** The 786-O cells were cultured in different concentrations of TMP and DMSO for 24, 48, 72h. The growth rate of 786-O were detected by MTT assay. Cell number changes of drug action for 48h were examined by cell counting. Nuclear morphology was observed by DAPI staining. The mRNA levels and protein levels of apoptosis-associated genes of drug action for 48h were detected by RT-PCR and western blot respectively. **Results** With increasing of TMP concentration, the growth rate of 786-O cells decreased gradually, and apoptosis increased. The number of cells was significantly reduced and the nuclear shrinkage or swelling. Apoptosis related genes AIF and Caspase3 were significantly increased in the level of transcription and translation, no matter compared with blank control group or solvent control group ($P < 0.05$). **Conclusion** This study confirmed TMP could decrease the proliferation and increase the apoptosis of 786-O cells.

Key words Tetramethylpyrazine; Cell proliferation; Cell apoptosis; Human renal cell carcinoma cell line

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)占有恶性肿瘤发生率的2.4%,2012年的流行病学统计全球确诊肾癌患者达34万人之多^[1]。至今,肾癌的主要治疗方法是手术切除、放化疗及分子靶向治疗^[2,3]。但上述治疗预后较差且不良反应较大,因此寻求安全且行之有效的治疗方法迫在眉睫。川芎嗪作为传统中药川芎的主要成分,除具有扩张血管、改善微循环等作用外,越来越多的研究者着眼于该药在抗癌方面的

作用。Yi等^[4]的研究显示TMP可以通过ROS/AMPK信号通路还诱导胃腺癌细胞的凋亡。Yeom等^[5]证实TMP可以减弱黑素因子(TRP1、MITF、MAPK)及炎性因子(TNF- α 、IL-1 β 、IL-8、GM-CSF)的表达从而有效地抑制皮肤癌症及炎症的发生。此外,还有大量研究报道了TMP可以抑制乳腺癌、肝癌、肺癌等多种肿瘤的增殖及转移^[6-8]。但是目前尚无TMP与人肾癌细胞增殖相关的文献报道,因此本研究通过设定不同浓度的TMP体外刺激人肾癌细胞系786-O,检测细胞增殖及凋亡的变化,同时检测凋亡相关基因AIF、caspase-3在转录及翻译水平的变化,从而探讨TMP对人肾癌的作用,为中药抗癌提供实验室理论依据。

材料与方法

1. 细胞株、实验药物和试剂:786-O人肾癌细胞

基金项目:黄石市科技计划项目(2015B046-7)

作者单位:435000 黄石,肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室(亓俊华、聂刚、徐秀鹏、周润、姚伟、毛青、罗鹏程);435000 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)皮肤科(聂刚),泌尿外科(毛青、罗鹏程)

通讯作者:罗鹏程,副教授,电子信箱:9405780@qq.com

株购自于 ATCC; 2, 3, 5, 6 - 四甲基吡嗪 (川芎嗪, TMP) 购自美国 Sigma 公司; DMSO 购自美国 Sigma 公司 (货号 D2650); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 粉末购自美国 Sigma 公司 (货号 M2128); DMEM1640 培养液、胎牛血清、0.5% 胰酶、青链霉素购自美国 Gibco 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自中国碧云天公司, 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成, AIF、GAPDH 抗体购自英国 Abcam 公司, DAPI 染液、caspase - 3 抗体购自美国 Biolegend 公司; 荧光二抗购自美国 Bethyl 公司。

2. 方法: (1) 2, 3, 5, 6 - 四甲基吡嗪母液配制: 精密电子秤上称取 TMPZ 粉末 0.136g (TMPZ 分子质量为 136g/mol), 将药品充分溶解于 2ml DMSO 中, 配置成 0.5mol/L 的川芎嗪母液, 0.22 μ m 滤器过滤除菌, 分装并保存于 4℃。(2) MTT 法检测 786 - O 细胞的增殖: 取生长良好的对数生长期的 786 - O 细胞, 0.25% 胰蛋白酶溶液消化, 制备成单细胞悬液后按照每孔 5×10^3 数量接种于 96 孔板中。常规培养过夜后, 吸弃培养液和未贴壁的细胞, 分别按照如下分组加入含药培养基: 空白对照组、0.1% DMSO 组、0.5mmol/LTMP 组、1% DMSO 组、5mmol/LTMP 组, 空白对照组只加等量的细胞和培养液, 另设只含等量培养液的调零空白组, 每个浓度设 5 个复孔。分别培养 24、48、72h 后每孔加 MTT (5mg/ml) 20 μ l, 37℃ 细胞培养箱中孵育 4h, 吸弃培养液, 每孔加 DMSO 溶液 150 μ l, 摇床上避光溶解 10min, 多功能酶标仪上检测 490nm 处各孔吸光度值 (A_{490nm})。(3) 细胞计数法检测 786 - O 细胞的增殖: 常规消化细胞, 制备成单细胞悬液后按照每孔 5×10^3 数量接种于 24 孔板中。培养过夜后, 吸弃培养液和未贴壁细胞, 按上述药物浓度处理, 每组设 3 个复孔, 48h 后常规消化细胞, 分别收集 3 复孔内细胞, 100 μ l 培养液重悬、计数。(4) DPAI 染色观察细胞核形态学变化: 常规培养细胞分别按上述药物浓度处理, 48h 后用 4% 甲醛固定, 2% TritonX - 100 透化打孔, DAPI (1: 1000) 室温避光染核, 倒置荧光显微镜下拍照、记录。(5) RT - PCR 检测凋亡相关基因转录水平的变化: 按照如下浓度药物组: 对照组、0.1% DMSO 组、0.5mmol/L TMP 组、1% DMSO 组、5mmol/L TMP 组处理细胞, 提取细胞总 RNA 并将其反转录为 cDNA, primer5.0 软件设计引物如下: ACTB (155bp) 上游引物: 5' - ACTTAGTTGCGTTACACCCTT - 3', 下游引物: 5' - GTCACCTTCACCGTTCCA - 3'; AIF (114bp) 上游引物: 5' -

CCCGATGTTGGCTATGAA - 3', 下游引物: 5' - TCCTGACTGCTCTGTGGC - 3'; caspase - 3 (130bp) 上游引物: 5' - CGGCTCCTAGCGGATGGGTGCTATT - 3', 下游引物: 5' - AGCAGGGCTCGCTAACTC - 3'; PCR 产物通过 1% 琼脂糖电泳检测, 拍照。(6) Western blot 法检测凋亡相关蛋白的表达: 按照“细胞计数法检测 786 - O 细胞的增殖”项药物浓度处理肾癌细胞株, 提取细胞总蛋白并测定蛋白浓度、分装。取等量蛋白质, 12% SDS - PAGE 胶分离后, 将蛋白半干转到 NC 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭后, 4℃ 过夜孵育 AIF/caspase - 3/GAPDH 抗体, 后用 PBST 洗膜, 室温避光孵育荧光二抗 2h, 洗膜后仪器上读取蛋白条带。

3. 统计学方法: 所得数据采用 SPSS 17.0 统计学软件处理, 测定值以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. MTT 检测不同药物浓度作用后 786 - O 活性的变化: 与空白对照组和溶剂对照组相比, 药物作用 24h 后 786 - O 细胞增殖速度无明显变化 (图 1)。药物作用 48h 和 72h 后, 与空白对照组相比, 虽然溶剂对照组的细胞增殖速率也呈现下降趋势, 但是药物组细胞增殖速率降低更为明显, 且具有浓度依赖性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

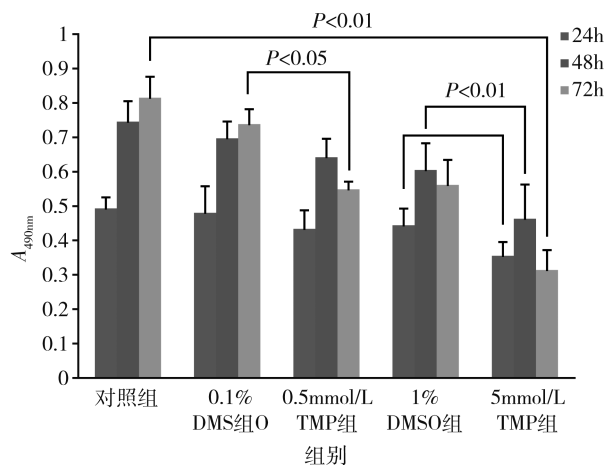


图 1 各组 786 - O 细胞的增殖率

2. 细胞计数法检测 786 - O 细胞数量的变化: 倒置显微镜下细胞计数检测到药物作用 48h 后, 与对照组比较, 细胞数量显著减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2)。

3. DAPI 染色观察细胞核形态: 正常细胞核形态呈椭圆形或圆形, 均匀低密度蓝色荧光, 内有颜色较

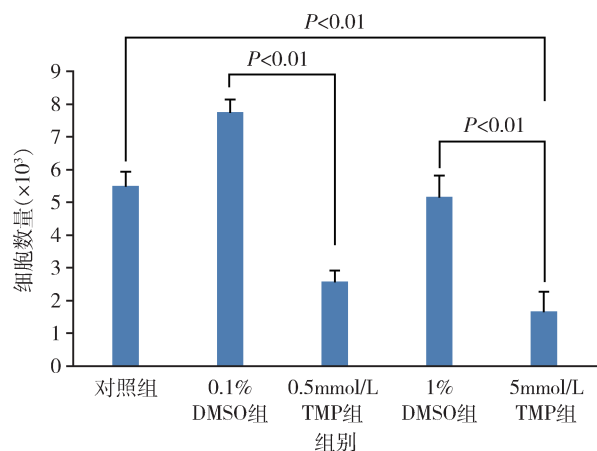


图2 各组786-O细胞的细胞计数(48h)

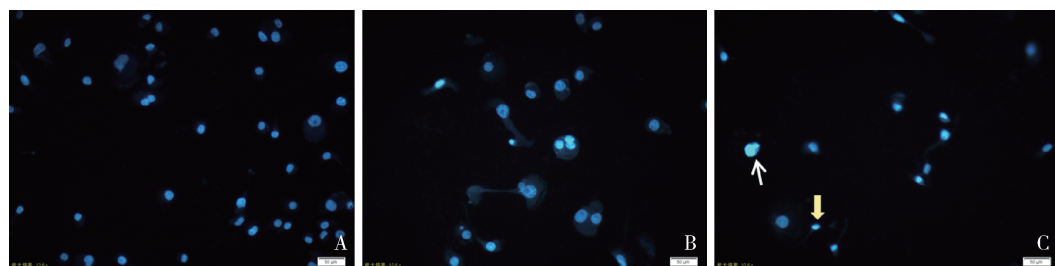


图3 786-O细胞核形态变化

A. 对照组; B. 0.5mmol/L TMP组; C. 5mmol/L TMP组

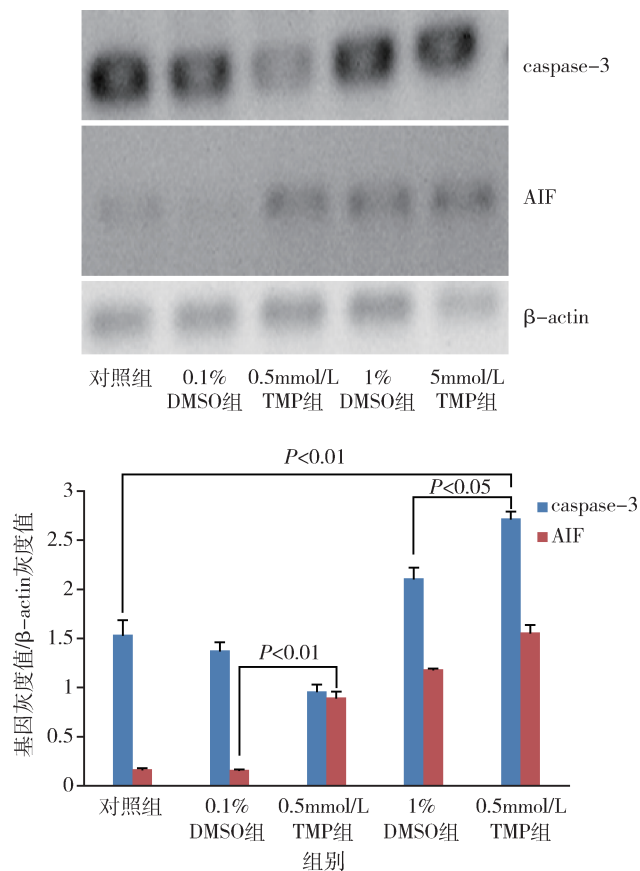


图4 RT-PCR检测凋亡相关基因的转录水平

深的细小蓝色颗粒(图3A)。而随着药物浓度的增加细胞核形态发生改变,如核肿胀、染色质浓缩、核固缩(图3C),甚至核碎裂成分叶状。

4. RT-PCR检测凋亡相关基因转录水平的变化:不同浓度DMSO和TMP作用于786-O细胞48h后,凋亡基因AIF、caspase-3的RNA水平与空白对照组相比均有所增加,其中药物组的增幅更为显著,且与DMSO溶剂对照组比较,药物组RNA水平显著增加,且差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。

5. Western blot法检测凋亡相关蛋白的表达:不同浓度TMPZ干预48h后,无论是与空白对照组还是相同浓度的溶剂对照组相比,凋亡蛋白AIF和

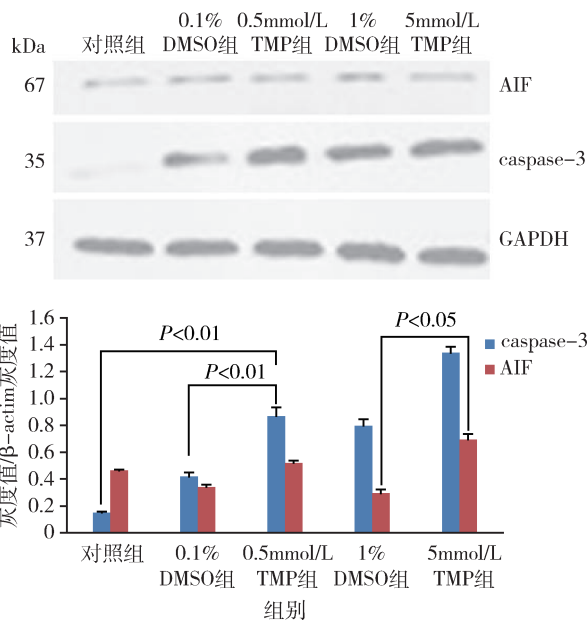


图5 Western blot法检测各组凋亡相关蛋白AIF/caspase-3的表达

caspase-3的蛋白表达量均显著增强($P < 0.05$),其中高药物浓度组凋亡蛋白的表达量更强(图5)。

讨 论

肾透明细胞腺癌是目前最常见的肾癌组织学亚

型, 占所有肾癌的 80%。不同于大多数实体瘤, 肾癌细胞中存在多药耐药基因, 对肿瘤放疗和化疗具有天生的抗性, 虽然和手术联合治疗可以缓解病情进展, 但肿瘤转移的发生率较高。因此, 本研究采用人肾透明细胞腺癌细胞株 786-O 作为研究载体, 中药单体川芎嗪作为研究主体旨在探究川芎嗪对人肾癌细胞凋亡及增殖的影响。

鉴于川芎嗪粉末极难溶于水相, 研究中采用 DM-SO 作为溶剂进行药物溶解, 因而组别设计过程中选用了空白对照组及相应溶剂浓度的 DMSO 作为溶剂对照组 (0.5 mmol/L TMPZ 工作液 DMSO 含量为 0.1%, 5 mmol/L TMPZ 工作液 DMSO 含量为 1%) 以排除药物之外的成分对肾癌细胞的影响。MTT 结果检测到药物刺激 24h 后各组别之间细胞增殖率几乎无任何改变, 而时长延长至 48、72h 后, 虽然溶剂对照组与空白对照组相比细胞增殖率均呈现显著降低, 这或许是由于 DMSO 作为有机溶剂对细胞生长及增殖具有一定的毒性的缘故, 但笔者也观察到川芎嗪药物组无论与空白对照组还是相应浓度的溶剂对照组相比, 细胞的增殖率均显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1), 同时细胞计数数据 (图 2) 也佐证了川芎嗪单体可以显著抑制人肾癌细胞的增殖, 并且随着时间的增加显著增强, 同时较高药物浓度的细胞抑制作用更强。倒置荧光显微镜的观察结果也显示随着药物浓度的增加, 786-O 细胞出现核固缩、染色体浓缩、核肿胀等一系列细胞凋亡相关信号 (图 3)。

细胞凋亡又称为细胞程序性死亡, 可以由多条信号通路诱导发生, caspase 信号通路是真核细胞的凋亡密切相关, caspase-3 更是细胞凋亡的主要执行者^[9]。此外, 凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 是一类存在于线粒体内外膜之间的保守的黄素蛋白, 是 caspase 非依赖性细胞凋亡因子^[10]。本研究分别通过 RT-PCR 和蛋白印记实验证实药物作用后, caspase-3 和 AIF 无论在转录水平还是蛋白翻译水平均较对照组显著增加, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4、图 5)。

综上所述, 川芎嗪可以通过 caspase 信号通路和 caspase 非依赖性信号通路共同作用来抑制人肾癌细

胞株的增殖, 促进其凋亡。虽然溶剂对照组和空白对照组相比细胞的增殖及凋亡也受到一定的影响, 但药物处理组的作用更为显著, 本研究在一定程度上为川芎嗪抵抗肾癌提供了实验室依据。

参考文献

- 1 Vermassen T, De Meulenaere A, Van de Walle M, *et al.* Therapeutic approaches in clear cell and non-clear cell renal cell carcinoma[J]. *Acta Clin Belg*, 2016, 17: 1-7
- 2 Langrand-Escure J, Vallard A, Rivoirard R, *et al.* Safety assessment of molecular targeted therapies in association with radiotherapy in metastatic renal cell carcinoma: a real-life report[J]. *Anticancer Drugs*, 2016, 27(5): 427-432
- 3 Ivanyi P, Beutel G, Drewes N, *et al.* Therapy of treatment-related hypertension in metastatic renal-cell cancer patients receiving sunitinib[J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2016, S1558-7673(16): 30313-30315
- 4 Yi B, Liu D, He M, *et al.* Role of the ROS/AMPK signaling pathway in tetramethylpyrazine-induced apoptosis in gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(2): 583-589
- 5 Yeom GG, S Min, SY Kim. 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine of Ephedra sinica regulates melanogenesis and inflammation in a UVA-induced melanoma/keratinocytes co-culture system[J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 18(2): 262-269
- 6 Zhang Y, Liu X, Zuo T, *et al.* Tetramethylpyrazine reverses multidrug resistance in breast cancer cells through regulating the expression and function of P-glycoprotein[J]. *Med Oncol*, 2012, 29(2): 534-538
- 7 Wang XB, Wang SS, Zhang QF, *et al.* Inhibition of tetramethylpyrazine on P-gp, MRP2, MRP3 and MRP5 in multidrug resistant human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(1): 211-215
- 8 Zheng CY, Xiao W, Zhu MX, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-2 by tetramethylpyrazine and its effects on A549 cell invasion and metastasis[J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(6): 2029-2037
- 9 Cai SP, Cheng XY, Chen PJ, *et al.* Transmembrane protein 88 attenuates liver fibrosis by promoting apoptosis and reversion of activated hepatic stellate cells[J]. *Mol Immunol*, 2016, 80: 58-67
- 10 Qu X, Ding X, Duan M, *et al.* Influenza virus infection induces translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) in A549 cells: role of AIF in apoptosis and viral propagation[J]. *Arch Virol*, 2016, 11(6): 1-7

(收稿日期: 2016-12-02)

(修回日期: 2017-01-11)