

文章编号:1000-5404(2014)07-0687-04

论著

藤黄酸联合舒尼替尼抑制肾癌细胞的增殖

姜小良,尹志康,谭兵,吴小候 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 探讨藤黄酸联合舒尼替尼抑制肾癌细胞增殖的作用。**方法** 单独或联合应用藤黄酸和舒尼替尼分别作用肾癌786-0细胞株,采用MTT比色法、流式细胞技术分别检测细胞活力和周期变化,Western blot检测与细胞周期及血管形成相关的蛋白变化。构建786-0细胞株裸鼠移植瘤模型,以藤黄酸单独或联合舒尼替尼治疗裸鼠移植瘤,测量移植瘤生长情况,免疫组织化学法检测移植瘤生长和血管生长情况。**结果** 联合应用藤黄酸与舒尼替尼比单药组更显著抑制细胞增殖($P < 0.05$),并且更多的细胞周期聚集于sub-G₁期($P < 0.05$),Western blot显示其与单药组比较Bcl-2表达显著减少,P21表达显著增加,VEGF显著减少($P < 0.05$)。体内实验显示:联合用药组比单药组更能显著抑制裸鼠移植瘤及血管的形成($P < 0.05$)。**结论** 联合应用藤黄酸和舒尼替尼治疗肾癌比单独用药能够更显著抑制肿瘤形成。

[关键词] 藤黄酸;舒尼替尼;肾癌

[中图分类号] R282.71; R737.11; R979.19

[文献标志码] A

Garcinia acid combined with sunitinib inhibits growth in renal carcinoma cell line 786-0

Jiang Xiaoliang, Yin Zhikang, Tan Bing, Wu Xiaohou (Department of Urology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To determine the inhibitory effect of garcinia acid combined with sunitinib on the growth of renal carcinoma cells. **Methods** Garcinia acid alone (0 to 8 $\mu\text{mol/L}$) or in combination with sunitinib (0 to 8 $\mu\text{mol/L}$) were used to treat 786-0 cells. MTT assay and flow cytometry were used to detect changes in cell viability and cycle. Western blotting was used to detect the expression of proteins related to cell cycle and angiogenesis. Xenograft model of 786-0 cells was constructed after treated by garcinia acid alone or in combination with sunitinib. Tumor growth and blood vessel growth in the nude mice were observed and measured by immunohistochemical assay. **Results** The combination of garcinia acid and sunitinib showed more significantly inhibitory effect on cell proliferation, and induced more cells arrested at sub-G₁ phase than monotherapy treatment ($P < 0.05$). Western blotting showed that the cell cycle regulatory protein Bcl-2 was significantly reduced, P21 expression was significantly increased, and VEGF expression was significantly decreased in combined treatment group than in the monotherapy group ($P < 0.05$). Xenograft growth and vascular formation were significantly inhibited in the combined treatment group than a single drug group in renal cell carcinoma transplanted nude mice ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination treatment of garcinia acid and sunitinib significantly inhibits kidney tumor formation than the individual drug alone.

[Key words] garcinia acid; sunitinib; renal cell carcinoma

Corresponding author: Wu Xiaohou, E-mail: 14246385@qq.com

肾癌是一种常见的泌尿系肿瘤,它的传统治疗主要包括放疗、化疗及免疫治疗,但对少部分患者治疗有效。近年来,随着对肾癌分子机制认识的进一步深

入,新的肾癌靶向治疗药物已经对肾癌的治疗手段起到了革命性的改进。在这些药物中,舒尼替尼作为一种酪氨酸激酶抑制剂,从2005年被美国FDA批准应用于临床以来,广泛应用于肾癌的临床治疗,它的主要作用在于能够同时抑制肿瘤的生长及血管形成。但值得注意的是,经过一段时间的治疗,部分患者出现耐

[通信作者] 吴小候, E-mail: 14246385@qq.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1435.019.html> (2014-01-02)

药。为了能更好地改善患者预后,与其他靶向药物的联合治疗与单独用药相比已经显示出更好的疗效^[1-2]。我们将舒尼替尼与新的抗肿瘤药藤黄酸联合使用抑制肾癌,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人肾癌细胞株 786-0 由重庆医科大学神经病学实验室保存,RPMI1640 培养基购自美国 HyClone 公司,小牛血清及胰酶购自杭州四季青公司,舒尼替尼、藤黄酸、二甲基亚砷(DMSO)、MTT 购自美国 Sigma 公司,舒尼替尼和藤黄酸以 25 mmol/L 分别溶于 DMSO,分装后保存于 -20 °C,P21、VEGF、Bcl-2、Cyclin B1、Ki-67、CD31、 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养与 MTT 分析

人肾癌 786-0 细胞株复苏后置入培养瓶,加入含 10% 小牛血清的 1640 培养基 20 mL,培养瓶置于 5% CO₂、饱和湿度、37 °C 孵箱中常规培养,细胞 2~3 d 传代 1 次。取生长对数期细胞,调整细胞数为 2 × 10⁴/mL,按照每孔 100 μ L 接种于 96 孔板内,培养 1 夜,待细胞贴壁后,分别按空白组(加 5 μ L DMSO 液)、0~8 μ mol/L 藤黄酸处理组、0~8 μ mol/L 舒尼替尼处理组、0~8 μ mol/L 藤黄酸与 0~8 μ mol/L 舒尼替尼联合处理组分别处理细胞,每组设 6 复孔,重复实验 3 次,培养 48 h。在各个时间点移去培养基,加入 MTT 培养 3 h,然后加入 DMSO 液完全溶解 MTT 还原产物,用酶标仪在 570 nm 波长处测各孔光密度值 [D(580)],按公式测定细胞活力: $D(580)_{\text{实验孔}}/D(580)_{\text{对照孔}} \times 100\%$ 。

1.3 细胞周期分析

肾癌 786-0 细胞株按照藤黄酸与舒尼替尼工作浓度分别为 0.5、2 μ mol/L 作用细胞 48 h 后,收集所有细胞并用 80% 乙醇固定,所有其他实验步骤均参照文献[3]操作,用流式细胞仪在激发波长 488 nm 处检测红色荧光,同时检测光散射情况,用分析软件分析细胞周期。

1.4 Western blot 分析细胞周期与血管形成相关蛋白表达

肾癌 786-0 细胞株按照 1.3 方法分组处理 48 h 后,收集所有细胞提取总蛋白,当分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜之后,分别用 P21、VEGF、Bcl-2、Cyclin B1、 β -actin 作为一抗,羊抗兔 IgG-HRP 作为二抗, β -actin 作为内参,在 Odyssey 扫描仪下观察蛋白量。

1.5 小鼠移植瘤生长观察

5 周龄雄性去胸腺的 SPF 级 BALB/c 小鼠 [SCXK(渝)2011-0001] (由重庆医科大学实验动物中心提供) 32 只,体质量 18~22 g,给予无菌水和高压灭菌全价颗粒饲料喂养。将 100 μ L 含 2 × 10⁶ 肾癌 786-0 细胞株的 RPMI1640 培养液与 100 μ L 基质胶混合均匀后注射入裸鼠腹腔皮下,当移植瘤长到约 25 mm³,将小鼠分为 4 组(每组 8 只):未干预组;5 mg/(kg·d) 藤黄酸治疗组,20 mg/(kg·d) 舒尼替尼治疗组,5 mg/(kg·d) 藤黄酸 + 20 mg/(kg·d) 舒尼替尼联合治疗组。藤黄酸溶解于 0.5% 的

羧甲基纤维素钠溶液中,5 mg/kg 灌胃,舒尼替尼溶解于 20 mmol/L 柠檬酸盐缓冲液,然后 20 mg/kg 每天 1 次口服给药,未干预组予以同等剂量的羧甲基纤维素钠溶液或者柠檬酸盐缓冲液处理,处理组均每天用药,连续 4 周。用游标卡尺测量肿瘤尺寸,肿瘤体积计算公式: $\pi/6 \times \text{最长径} \times \text{最短径}^2$,每周测量小鼠体质量,到第 28 天时取移植瘤并称质量,置于 -80 °C 冰箱保存。

1.6 免疫组织化学分析

移植瘤经 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,按照 4 μ m 厚度连续切片,免疫组化步骤均按试剂盒说明进行,所用一抗为鼠源性单克隆 Ki-67 抗体和兔源性多克隆 CD31 抗体,Ki-67 染色随机观察 4 个视野,以 Ki-67 阳性细胞数占所有细胞的百分比计算染色指数,微血管密度评分参照文献[4]。

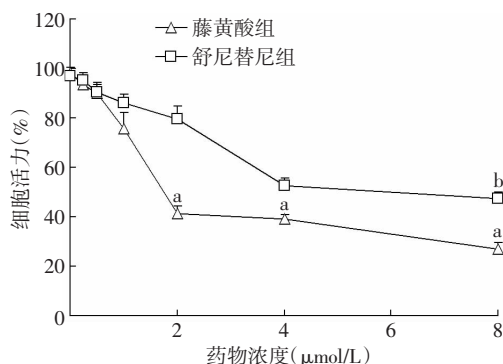
1.7 统计学方法

使用软件 PRISM 5.0 进行图表制作及统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 藤黄酸与舒尼替尼联合处理对肾癌 786-0 细胞株生长活性的影响

MTT 结果显示,当藤黄酸与舒尼替尼的浓度分别低于 0.5、2 μ mol/L 处理肾癌 786-0 细胞株 48 h,与对照组细胞相比,细胞增殖未见明显抑制 ($P = 0.087、0.065$),随着两者浓度逐渐增大,细胞明显随着药物浓度增加而抑制率增加。见图 1。选择藤黄酸与舒尼替尼浓度分别为 0.5、2 μ mol/L 作用细胞 48 h,发现两者联合处理比单独用药更显著抑制细胞增殖 [(63.2 ± 5.7)% vs (90.4 ± 4.1)%、(89.8 ± 3.7)%], $P = 0.021、0.034$ 。流式细胞术显示与对照组和单药处理组相比,联合处理组能显著抑制细胞于 sub-G₁ 期 ($P = 0.021、0.038、0.027$,表 1)。



a: $P < 0.05$, 与 <1 μ mol/L 藤黄酸组比较; b: $P < 0.05$, 与 <4 μ mol/L 舒尼替尼组比较

图 1 不同药物浓度对肾癌 786-0 细胞株抑制 48 h 后细胞活力的影响

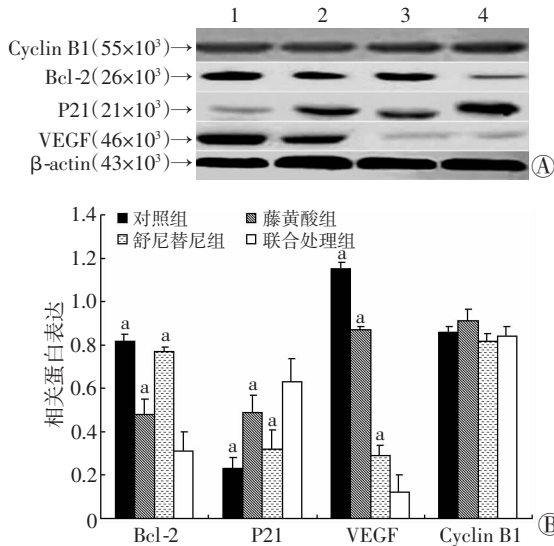
表 1 各药物处理组细胞周期分布 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	G ₂ /M	S	G ₁	sub-G ₁
对照组	40.42 ± 4.34	18.47 ± 4.11	37.66 ± 1.12	3.45 ± 3.45 ^a
藤黄酸组	26.36 ± 2.12	21.68 ± 3.98	41.34 ± 3.24	10.62 ± 4.56 ^a
舒尼替尼组	12.22 ± 3.78	25.67 ± 6.54	44.67 ± 7.56	17.44 ± 1.12 ^a
联合处理组	21.84 ± 1.23	19.28 ± 5.45	31.45 ± 2.11	27.43 ± 3.11

a: $P < 0.05$, 与联合处理组比较

2.2 细胞周期相关蛋白及血管形成相关蛋白表达变化

Western blot 结果显示:联合处理组与对照组及单独用药组相比较,能显著降低 Bcl-2 ($P=0.032, 0.023, 0.045$) 与 VEGF 蛋白表达 ($P=0.042, 0.026, 0.041$), 显著升高 P21 蛋白表达 ($P=0.011, 0.024, 0.047$), 而 Cyclin B1 蛋白表达变化不明显 ($P=0.066, 0.073, 0.085$)。见图 2。



A: Western blot 检测结果; 1: 对照组; 2: 藤黄酸组; 3: 舒尼替尼组; 4: 联合处理组; B: 半定量分析结果; a: $P < 0.05$, 与联合处理组比较

图2 Western blot 检测单药与联合用药处理细胞 786-0 细胞株 48 h 后各蛋白表达变化

2.3 移植瘤形成分析

对移植瘤的药物干预发现:与对照组及单独处理组比较,联合处理组能显著抑制移植瘤的体积 ($P=0.028, 0.033, 0.041$) 和质量 ($P=0.048, 0.031, 0.011$), 见图 3。为了进一步对移植瘤的增殖及血管形成情况进行分析,于 28 d 时摘除移植瘤,对移植瘤进行免疫组织化学分析,结果显示:联合处理组平均每 4 个高倍视野的 Ki-67 阳性细胞数量百分比 [(16.7 ± 2.4)%] 明显少于单独用药组 [(67.4 ± 3.2)%], (76.5 ± 4.5)%] 及对照组 [(86.3 ± 1.6)%] 移植瘤 ($P=0.018, 0.023, 0.004$), 联合用药组由 CD31 标识的微血管密度 (11.2 ± 6.4) 也明显少于单独用药组 (34.7 ± 3.6, 42.1 ± 6.8) 及对照组 (57.3 ± 2.7) 移植瘤 ($P=0.008, 0.013, 0.011$)。

3 讨论

近十年来,以酪氨酸酶抑制剂为代表的针对肾癌的靶向治疗药物已被证实有效并逐渐在临床上推广。作为一种新型的小分子酪氨酸酶抑制剂,舒尼替尼能对 40% 的肾癌患者有效并成为转移性肾癌的一线用药^[5-6]。然而,因部分肾癌患者对舒尼替尼耐药并最终在治疗过程中出现进展,因此,为进一步改善这部分患者的预后,新的治疗策略显得尤为重要。研究^[1-2]表明舒尼替尼联合贝伐单抗、索拉非尼等药物治疗能比舒尼替尼单独用药更能显著抑制肾癌的发展。藤黄酸作为一种植物藤黄的有效成分,已有一系列研究显

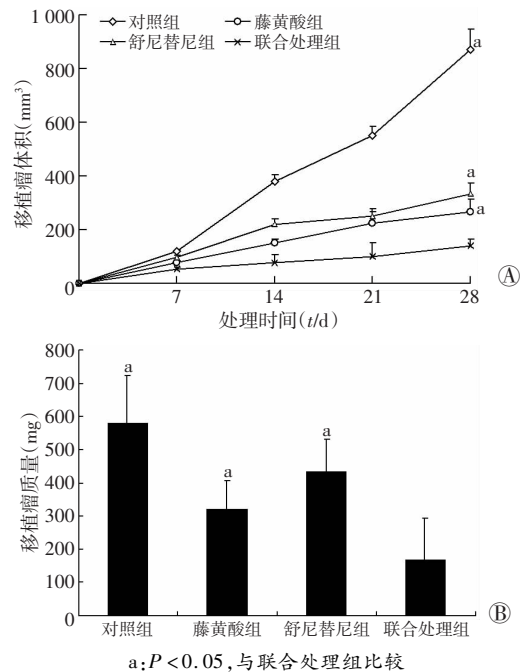


图3 单药或联合用药处理小鼠肾癌移植瘤 28 d 后移植瘤体积(A)和质量(B)变化
a: $P < 0.05$, 与联合处理组比较

示其能够显著抑制肝癌、肺癌及胃癌等恶性肿瘤的发展^[7-9],它能够抑制肿瘤细胞的生长,却并不影响动物的造血及免疫系统功能。目前,针对藤黄酸抗乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、鼻咽癌、肝癌等作用已进行了一系列研究^[10-14],但其抗肿瘤作用机制并不明确。近期研究表明其作用机制很可能与细胞凋亡及血管形成相关。本研究发现:一定浓度的藤黄酸与舒尼替尼均能抑制肾癌细胞 786-0 细胞的增殖,而两者联合使用能够更显著抑制细胞增殖,这种增殖的抑制可能与更强的细胞周期 sub-G₁ 期阻滞有关。为了进一步分析其增殖抑制的机制,我们使用 Western blot 法检测其周期关键调控蛋白的变化,作为一种原癌基因, Bcl-2 除能够抑制细胞凋亡,还能够加强细胞对抗各种有毒物质的能力,使其下调能够提高肿瘤细胞对各种抗肿瘤药物的敏感性。本研究发现联合用药组比对照组及单独用药组的 Bcl-2 蛋白表达水平更低,可能细胞的增殖及周期变化与 Bcl-2 的变化相关。P21 作为一种细胞依赖性激酶抑制剂成员,它能同时诱导细胞 G₁ 和 G₂ 期停滞,而 Cyclin B1 是一种细胞 G₂ 期向 M 期转化的关键调控基因。本研究发现联合用药组比对照组及单独用药组的 P21 蛋白表达水平有较明显增加,而 Cyclin B1 的表达未见明显变化,这些也与实验中细胞周期变化一致,同时还发现与血管形成密切相关蛋白 VEGF 表达在联合用药组显著降低。为了进一步在体内实验中验证联合用药组与单独用药组的差别,我们用肾癌 786-0 细胞株构建裸鼠移植瘤模型,发现联合用药组比单独用药组和对照组的移植瘤体积和质量都明显减

少,而裸鼠的体质量未见明显减轻,证实联合用药在不带来明显副作用的前提下能够比单独用药更能够抑制肾癌的生长。为进一步分析这种抗瘤机制,我们切取移植瘤,并用免疫组织化学法检测 Ki-67 和 CD31 表达水平。Ki-67 作为一种细胞增殖相关标记物,其表达水平降低常常意味着细胞增殖能力的下降,而 CD31 标记的微血管密度常常与血管形成能力密切相关。我们发现在联合用药组的两者评分比对照组和单独用药组显著降低,进一步证实藤黄酸与舒尼替尼联合用药比单独用药更有效抑制肾癌的发展。

本研究虽然只对藤黄酸和舒尼替尼的联合抗肾肿瘤用药做了一些初步的研究,但其对于将来两者的临床联合用药起到一定的借鉴作用。

参考文献:

[1] Dudek A Z, Zolnieriek J, Dham A, et al. Sequential therapy with sorafenib and sunitinib in renal cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2009, 115(5): 61-67.

[2] Feldman D R, Baum M S, Ginsberg M S, et al. Phase I trial of bevacizumab plus escalated doses of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(9): 1432-1439.

[3] Abdelnour-Berchtold E, Cerantola Y, Roulin D, et al. Rapamycin-mediated FOXO1 inactivation reduces the anticancer efficacy of rapamycin[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(3): 799-804.

[4] Miyake M, Anai S, Fujimoto K, et al. 5-fluorouracil enhances the antitumor effect of sorafenib and sunitinib in a xenograft model of human

renal cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2012, 3(6): 1195-1202.

[5] Motzer R J, Michaelson M D, Redman B G, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *J Clin Oncol*, 2006, 24(1): 16-24.

[6] Motzer R J, Rini B I, Bukowski R M, et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma[J]. *JAMA*, 2006, 295(21): 2516-2524.

[7] Zhang L, Yi Y, Chen J, et al. Gambogic acid inhibits Hsp90 and de-regulates TNF-alpha/NF-kappaB in HeLa cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 403(3/4): 282-287.

[8] Wang T, Wei J, Qian X, et al. Gambogic acid, a potent inhibitor of survivin, reverses docetaxel resistance in gastric cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2008, 262(2): 214-222.

[9] Gu H, Rao S, Zhao J, et al. Gambogic acid reduced bcl-2 expression via p53 in human breast MCF-7 cancer cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(12): 1777-1782.

[10] 陆彬彬, 刘新姿, 王娟, 等. 新藤黄酸抑制人乳腺癌细胞株 MCF-7 增殖的实验研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(8): 691-694.

[11] 周兰贞, 晏烽根, 李庆林. 新藤黄酸诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的作用机制研究[J]. *肿瘤*, 2011, 31(7): 580-584.

[12] 唐冬, 吕磊, 曾甫清, 等. 藤黄酸抑制前列腺癌 PC-3 细胞增殖并诱导其细胞凋亡[J]. *肿瘤*, 2011, 31(8): 688-692.

[13] 柏志全, 李华荣, 张海峰, 等. 氯通道在藤黄酸诱导低分化鼻咽癌细胞凋亡中的作用[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(8): 1304-1308.

[14] 刘卫海, 肖国丽, 赖小平, 等. 新藤黄酸诱导 HepG2 细胞凋亡与 Bax 及 Bcl-2 的关系[J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(3): 439-440.

(收稿:2013-10-02;修回:2013-12-09)

(编辑 龙 亮)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)07-0690-01

颌下腺导管巨大结石 1 例

谢 卡 (402160 重庆,重庆医科大学附属永川医院口腔科)

[关键词] 颌下腺导管结石;第三磨牙舌侧;口底;巨大

[中图分类号] R781.75 [文献标志码] B

1 临床资料

患者,女性,42岁,因左侧颌下区反复肿胀疼痛1年余,加重5d,于2014年2月19日到我院口腔科门诊就医。患者1年前出现左侧颌下区肿胀伴疼痛,进食时肿痛愈发明显,1年来肿胀疼痛反复发作,经外院多次静脉输液抗感染治疗,5d前患者复又出现左侧颌下区肿胀,外院抗感染治疗后肿胀未消退,遂到我院求治。检查发现患者左侧颌下区肿胀,可扪及颌下腺肿胀,触痛明显,挤压左侧颌下腺管口无明显液体溢出。口内见左侧舌下一黄白色质硬物,如图1可见该硬物位于第三磨牙舌侧,部分穿出颌下腺导管及口底黏膜外露于口底。于局麻下

行左侧颌下腺导管结石摘除术。取出结石如图2,体积约2.0 cm×1.2 cm×1.0 cm,质量约1.5 g,结石取出后挤压左侧颌下区,又见一小块结石自口内颌下腺管口排出,约0.6 cm×0.4 cm×0.1 cm,并伴有带乳白色豆渣样物的浑浊液体溢出。



图1 颌下腺导管巨大结石患者口内见结石位于第三磨牙舌侧,已冲破口底黏膜

[通信作者] 谢 卡, E-mail: 19410555@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140327.1544.001.html(2014-03-27)

(下转 695 页)