

# 华蟾素抑制肾癌细胞 786-O 增殖及促凋亡作用研究

王名琦 穆素红

150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学附属第一医院肾内一科

**【摘要】** 目的 研究华蟾素(cinobufotalin)对人肾癌细胞 786-O 增殖的抑制作用及凋亡的促进作用,并对其进行作用机制进行探讨。**方法** 将体外培养的肾癌细胞 786-O 分为对照组、1 mg/mL 华蟾素组、10 mg/mL 华蟾素组、100 mg/mL 华蟾素组,分别给予正常培养液、1 mg/mL 华蟾素、10 mg/mL 华蟾素、100 mg/mL 华蟾素处理,观察并计算细胞增殖抑制率,采用流式细胞仪测定细胞凋亡率,采用 Hoechst-PI 核染色法观察细胞核凋亡情况,采用 Western blot 法检测 Survivin 蛋白表达。**结果** 华蟾素对肾癌细胞 786-O 增殖率的抑制作用随浓度的升高逐渐增强,且呈时间依赖性;流式细胞术及 Hoechst-PI 核染色法的检测结果表明,随着华蟾素作用浓度的递增,肾癌细胞 786-O 凋亡率呈剂量依赖性递增;Western blot 结果显示,华蟾素抑制肾癌细胞 786-O 中 Survivin 蛋白的表达。**结论** 华蟾素可通过降低肾癌细胞 786-O 中 Survivin 蛋白的表达,起到抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的作用。

**【关键词】** 华蟾素;肾癌细胞 786-O;增殖;凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2019.11.011

## The study of antiproliferative and apoptosis-promoting effect of cinobufotalin on kidney cancer cells

**786-O** WANG Ming-qi, MU Su-hong. The First Ward of Nephropathy Department, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: MU Su-hong, E-mail:3051136639@qq.com

**【Abstract】 Objective** To study the antiproliferative and apoptosis-promoting effect of cinobufotalin on kidney cancer cells 786-O and its mechanism. **Methods** In vitro cultured kidney cancer cells 786-O were divided into control group, 1 mg/mL cinobufotalin group, 10 mg/mL cinobufotalin group and 100 mg/mL cinobufotalin group. Cell proliferation inhibition rate was calculated, cell apoptosis rate was measured by flow cytometry, nucleus apoptosis were detected by Hoechst-PI nuclear staining, and expressions of the protein Survivin were detected by western blot method. **Results** Cell proliferation inhibition rate increased with cinobufotalin concentrations, and exhibited time-dependent. Flow cytometry and Hoechst-PI nuclear staining test results showed that kidney cancer cells 786-O apoptosis rate increased in a dose-dependent manner as cinobufotalin concentration increased. Western blot showed that cinobufotalin inhibited the expression of survivin. **Conclusions** Cinobufotalin inhibits kidney cancer cells 786-O's proliferation and promotes cancer cell apoptosis by down-regulating the expression of Survivin.

**【Key words】** Survivin; Kidney cancer cells 786-O; Proliferation; Apoptosis

肾癌占成人肾脏恶性肿瘤的 80%~90%,早期和中期肾癌患者没有明显的临床症状,当肾癌进展到转移期,即晚期肾癌时,应采用以化学治疗为主的

综合治疗<sup>[1-2]</sup>。早期、合理的应用一种能够提高肾癌治疗效果及改善患者生存质量的药物,对患者预后至关重要。华蟾素(cinobufotalin)是从中药材蟾皮

中提取的生物制剂,具有抗病毒、减轻炎症反应、抗凋亡、抗肿瘤作用,对食管癌、胆囊癌、肝癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌、宫颈癌及白血病都具有治疗作用<sup>[3-4]</sup>。本研究旨在探讨华蟾素对外培养的肾癌细胞 786-O 增殖和凋亡的影响及其可能机制。

### 材料与方 法

#### 一、材料

人肾癌细胞 786-O(中国科学院上海细胞研究所),华蟾素(安徽淮北金蟾药业,生产批号:Z34020274),二甲基亚砜(杭州四季青公司),胎牛血清(杭州四季青公司)、Annexin-V/PI 试剂盒(北京索莱宝生物公司)及 Hoechst-PI 荧光探针(北京索莱宝生物公司),Survivin 抗体(上海碧云天公司)。

#### 二、方法

1. 细胞培养 将肾癌细胞 786-O 培养于 RPMI1640 培养基(含 10% 胎牛血清,青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL)中,培养箱内温度为 37℃,CO<sub>2</sub>体积分数为 5%,每 3 d 传代 1 次,更换新鲜培养液,取对数期生长的细胞进行实验,细胞密度达到 80%左右,用胰酶消化进行实验。

2. 肾癌细胞 786-O 分组 细胞接种于 96 孔板中,共分 4 组,每组 5 个复孔:(1)对照组:以正常培养液培养;(2)华蟾素组:依华蟾素浓度不同分为 3 个亚组(1 mg/mL、10 mg/mL 及 100 mg/mL)。

3. 细胞生长抑制曲线的测定 肾癌细胞 786-O 接种于 96 孔板中,每孔 200 μL,细胞密度为 1×10<sup>4</sup>个/L,每组分别培养 12 h、24 h、48 h,收集细胞并计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率=1-(华蟾素组平均活细胞数/对照组的平均活细胞数)×100%。

4. Annexin-V/PI 流式检测细胞凋亡 取生长状态良好的细胞,以 3×10<sup>5</sup>/mL 浓度接种于 6 孔板,每孔 2 mL。将不同浓度的华蟾素作用于细胞 48 h 后,0.1%胰酶(不含 EDTA)消化各组细胞后制备细胞悬液。移液管吸取细胞悬液并转移至离心管中,1 000 r/min 离心后收集细胞,分别加入 5 μL Annexin-V 和 10 μL Annexin-PI 染料后充分混匀避光反应 15 min,于 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡。

5. Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡 细胞接种于 6 孔板中,调整细胞密度至 3×10<sup>5</sup>/mL。不同浓度的华蟾素作用于细胞 48 h,收集细胞然后用 PBS 洗涤细胞两次,在 150 μL 的 Binding Buffer 中加入 2 μL Hoechst-PI 染液,避光反应 5 min 后,荧光显微镜下观察结果并拍照。

6. Western blot 法检测肾癌细胞 786-O 内 Survivin 的蛋白表达 将 3×10<sup>5</sup>/mL 浓度的肾癌细胞 786-O 接种于 6 孔板,每孔 2 mL,每组培养 48 h 后终止培养,弃去原培养基并加入预冷的 PBS 轻轻漂洗 2 次,弃去漂浮及坏死细胞,各孔分别加入裂解液 50 μL 裂解 10 min,冰浴上用细胞刮刀轻轻刮擦培养板底部,PBS 轻轻冲洗培养板底部,收集刮下来的细胞以 12 000 r/min 离心 10 min,加入上样缓冲液,行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后用 5%的脱脂奶粉 4℃封闭 2 h,加一抗过夜,TBST 溶液洗涤 3 次后,室温下加入二抗孵育 1 h,采用 ECL 化学发光法自显影并采集图像。

#### 三、统计学处理

采用 SPSS 17.0 对实验数据进行分析,符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 法, $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 结 果

#### 一、不同浓度华蟾素对肾癌细胞 786-O 增殖率的影响

不同浓度华蟾素(1 mg/mL、10 mg/mL 及 100 mg/mL)作用肾癌细胞 786-O 不同时间(12 h、24 h、48 h)后,绘制增殖抑制曲线,结果显示,随华蟾素浓度的升高,药物对细胞增殖率抑制作用逐渐增强,且呈时间依赖性( $P < 0.01$ )。(图 1)

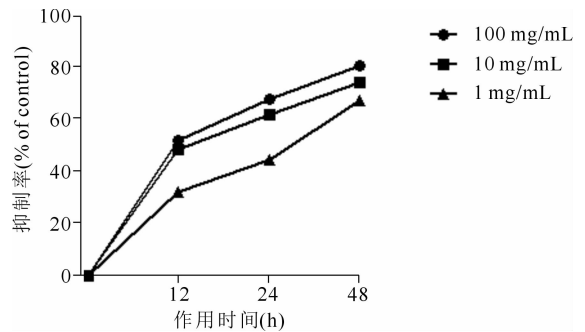


图 1 肾癌细胞 786-O 增殖抑制曲线

#### 二、华蟾素促进肾癌细胞 786-O 凋亡

流式细胞仪的检测结果表明,与对照组细胞凋亡率(4.7±2.3)%比较,随着华蟾素浓度的递增,肾癌细胞 786-O 凋亡率呈剂量依赖性递增,1 mg/mL 华蟾素组凋亡率为(22.7±3.6)%,10 mg/mL 华蟾素组凋亡率为(36.6±3.4)%,100 mg/mL 华蟾素组凋亡率为(55.4±4.1)%。(图 2)

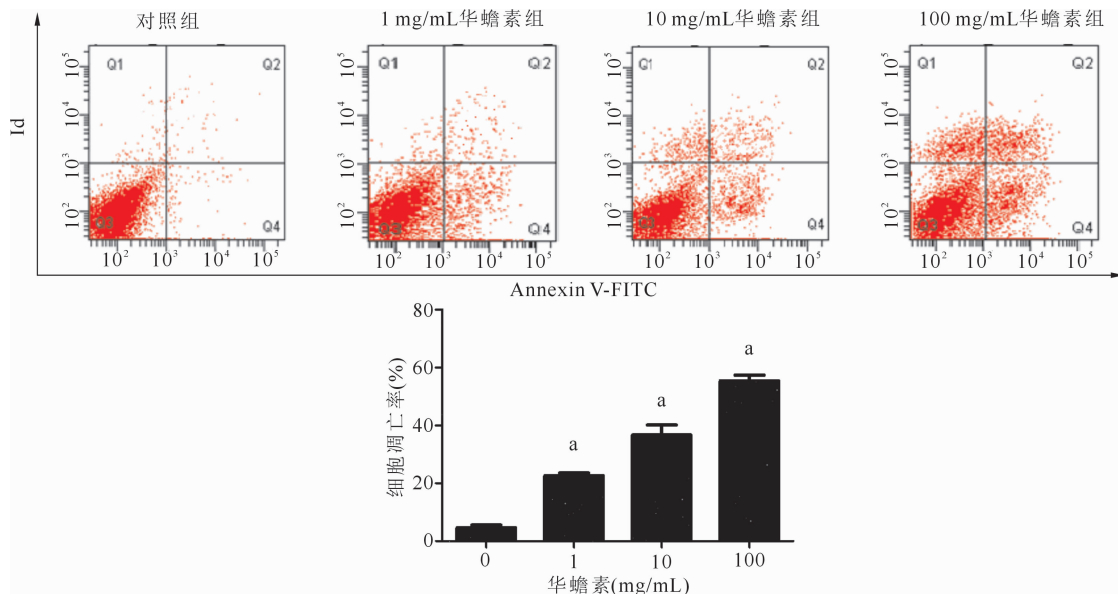
#### 三、Hoechst-PI 核染色法观察各组肾癌细胞 786-O 凋亡

Hoechst-PI 染色剂能穿过细胞膜嵌入细胞核 DNA, 凋亡细胞核发出明亮的蓝色荧光, 可见核碎片, 染色质浓缩、边集, 呈团块状, 坏死细胞核呈红色高荧光。结果可见对照组仅有数个凋亡细胞核呈现明亮的蓝色荧光, 采用华蟾素干预后, 凋亡细胞核数量增加, 且红色高荧光的坏死细胞也逐渐增多, 本项观察结果与采用流式细胞术得到的结果相一致, 随着华蟾素作用浓度的递增, 发生凋亡反应的肾癌细

胞 786-O 核数量亦递增。(图 3)

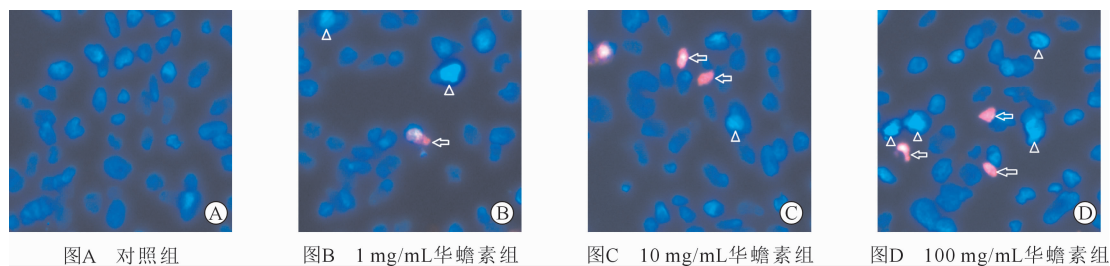
#### 四、华蟾素对 Survivin 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 对照组 Survivin 蛋白相对表达量为  $(98.3 \pm 2.4)\%$ , 华蟾素对肾癌细胞 786-O 中 Survivin 蛋白表达具有明显的抑制作用, 伴随华蟾素作用浓度增加, Survivin 蛋白相对表达量逐渐降低, 分别为  $(69.7 \pm 3.9)\%$ 、 $(52.3 \pm 2.7)\%$ 、 $(29.7 \pm 2.8)\%$ 。(图 4)



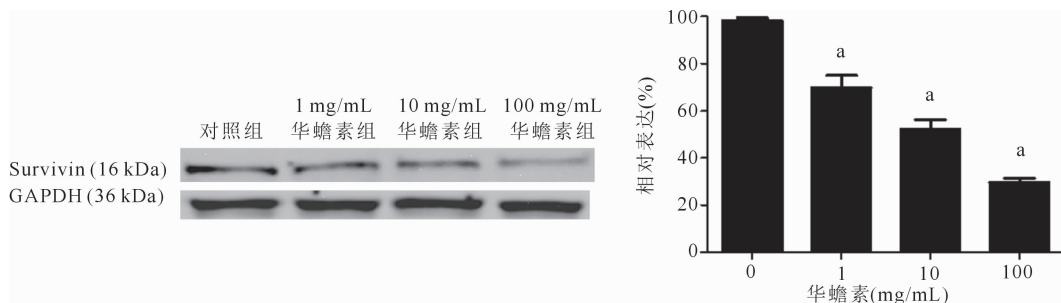
注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$

图 2 华蟾素对肾癌细胞 786-O 凋亡率的影响



注: 图 A 为对照组, 图 B 为 1 mg/mL 华蟾素组, 图 C 为 10 mg/mL 华蟾素组, 图 D 为 100 mg/mL 华蟾素组; 三角符号表示凋亡细胞, 箭头符号表示坏死细胞

图 3 华蟾素对肾癌细胞 786-O 凋亡的影响



注: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$

图 4 华蟾素对肾癌细胞 786-O 中 Survivin 蛋白表达水平的影响

## 讨 论

对于晚期肾癌患者来说,接受手术和放射治疗后癌症仍难免复发,化学治疗及靶向治疗在晚期肾癌的治疗中,逐渐发挥重要作用<sup>[5]</sup>。手术和放射治疗均为通过局部治疗的方式杀灭残存癌细胞,而化学治疗是全身治疗,对于临床检查不能发现的潜在性病灶也有治疗作用<sup>[6]</sup>。传统化学治疗药物均有不同程度的毒副作用,在杀伤肿瘤细胞的同时,对人体正常细胞及组织(如软骨细胞、淋巴细胞、血细胞等)也有杀伤作用,这一不良反应可能会使人体免疫系统遭到破坏,进而促进癌细胞扩散,造成严重后果<sup>[7-8]</sup>。近年来,一些学者将华蟾素应用于体外培养的胶质瘤细胞,发现华蟾素可通过调控线粒体途径相关凋亡蛋白有效促进胶质瘤细胞凋亡的作用<sup>[9]</sup>。

华蟾素的主要成分是生物碱及蟾毒灵,具有提高宿主免疫力、减轻组织水肿、减轻炎症、止痛、抗肿瘤等多种作用。华蟾素抗肿瘤作用体现在多个方面:干扰细胞生长周期,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞转移,逆转肿瘤细胞多药耐药性及抑制肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的合成等<sup>[10-11]</sup>。由于华蟾素是一种天然易获得的抗癌药物,具有低毒、价格低廉的特点,其研究和应用前景广阔。在本实验中,将不同浓度的华蟾素作用于肾癌 786-O 细胞后,细胞增殖呈抑制趋势,且伴随作用时间延长,抑制作用增强。

为了进一步检测不同浓度华蟾素对肾癌细胞 786-O 凋亡的影响,本研究分别采用了流式细胞技术及 Hoechst-PI 核染色法观察细胞凋亡。流式细胞术检测结果表明,随着华蟾素浓度的递增,肾癌细胞 786-O 凋亡率呈剂量依赖性递增。Hoechst-PI 核染色结果与流式细胞术所得结果一致,表明华蟾素可以剂量依赖性促进肾癌细胞 786-O 凋亡。

本实验中,我们还检测了细胞内凋亡抑制蛋白家族成员 Survivin 的蛋白表达情况,以期明确华蟾素抑制肾癌细胞 786-O 增殖的具体机制。Survivin 是目前发现最强的凋亡抑制因子,与肿瘤细胞的浸润转移及增殖分化密切相关<sup>[12]</sup>。有学者研究了 Survivin 基因在肾透明癌细胞中的表达,结果发现肾癌细胞 786-O 转染 Survivin 基因后,细胞增殖率明显下降,细胞凋亡率升高,说明 Survivin 基因过表达显著促进细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本研究结果显示,随着

华蟾素浓度的增加,肾癌细胞 786-O 中 Survivin 蛋白表达水平呈剂量依赖性递减。

综上,本研究初步证实华蟾素对肾癌细胞 786-O 具有抑制增殖与促进凋亡的作用,为今后预防和治理肾癌提供了一定方向。

## 参 考 文 献

- [1] 何德娇,杨定平,刘红燕,等.二甲双胍通过调节组蛋白乙酰化抑制肾癌细胞 786-O 迁移和侵袭[J]. 临床肾脏病杂志, 2019, 19(3): 197-201.
- [2] Gallardo E, Méndez-Vidal MJ, Pérez-Gracia JL, et al. SEOM clinical guideline for treatment of kidney cancer (2017) [J]. Clin Transl Oncol, 2018, 20(1): 47-56.
- [3] Cheng L, Chen YZ, Peng Y, et al. Ceramide production mediates cinobufotalin-induced growth inhibition and apoptosis in cultured hepatocellular carcinoma cells [J]. Tumour Biol, 2015, 36(8): 5763-5771.
- [4] Kai S, Lu JH, Hui PP, et al. Pre-clinical evaluation of cinobufotalin as a potential anti-lung cancer agent [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 452(3): 768-774.
- [5] Sánchez-Gastaldo A, Kempf E, González Del Alba A, et al. Systemic treatment of renal cell cancer: A comprehensive review [J]. Cancer Treat Rev, 2017, 60: 77-89.
- [6] Syed JS, Lebacle C, Shuch B. Barriers to pre-treatment genomic characterization of the small renal mass [J]. Oncotarget, 2019, 10(18): 1667-1668.
- [7] Bacolod MD, Barany F, Pilonis K, et al. Pathways-and epigenetic-based assessment of relative immune infiltration in various types of solid tumors [J]. Adv Cancer Res, 2019, 142: 107-143.
- [8] Wang D, Xiao ZJ, Shou JZ, et al. Clinical analysis of 8 cases of the mixed epithelial and stromal tumour family of kidney [J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2019, 99(10): 771-774.
- [9] 兰勇,程帆.华蟾素对肾癌细胞增殖的影响[J].实用临床医药杂志, 2015, 19(7): 83-86.
- [10] 刘旭,邵瑞,田晓轩,等.华蟾素抗肿瘤研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2019, 25(5): 229-234.
- [11] 郭晓宇,田芳,朱学军,等.华蟾素抗肿瘤研究进展[J].现代中药研究与实践, 2018, 32(5): 82-86.
- [12] Mazur J, Roy K, Kanwar JR. Recent advances in nanomedicine and survivin targeting in brain cancers [J]. Nanomedicine (Lond), 2018, 13(1): 105-137.
- [13] 陆毅,姚晖,王曙. Survivin 基因及蛋白表达与人 786-O 肾透明细胞癌细胞增殖、凋亡的相关性研究 [J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(8): 1223-1226, 1248.

(收稿日期:2019-04-01)