

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.20.006

蛇葡萄素对肾癌 786-O 细胞增殖和凋亡的作用*

柯 军¹,冯继红^{2△}

(1. 贵州省人民医院药剂科, 贵阳 550000; 2. 遵义医学院附属医院肿瘤医院, 贵州遵义 563003)

[摘要] **目的** 探讨蛇葡萄素(AMP)对人肾癌 786-O 细胞株增殖与凋亡的作用。**方法** 将不同浓度的 AMP 作用于体外培养的肾癌 786-O 细胞株,采用 MTT 法检测不同浓度的 AMP 对肾癌 786-O 细胞增殖的作用的影响;采用 Annexin V/PI 双染法检测不同浓度的 AMP 对肾癌 786-O 细胞凋亡的作用。**结果** MTT 结果显示 AMP 能显著抑制肾癌 786-O 细胞增殖,半数抑制浓度(IC₅₀)为 17.23 μg/mL;经不同浓度的 AMP 作用 7 h 后,肾癌 786-O 细胞凋亡率明显增加,AMP 浓度为 10 μg/mL 和 20 μg/mL 作用于肾癌 786-O 细胞后,细胞凋亡率升高($P < 0.05$);而 AMP 浓度为 40 μg/mL 和 80 μg/mL 作用细胞后,细胞凋亡率显著升高($P < 0.01$)。**结论** AMP 在体外能显著抑制肾癌 786-O 细胞增殖,且能促进肾癌 786-O 细胞凋亡。

[关键词] 肾肿瘤;细胞增殖;凋亡;蛇葡萄素**[中图分类号]** R373.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)20-2753-03

Effects of ampelopsin on proliferation and apoptosis of human renal cancer cell line 786-O*

Ke Jun¹, Feng Jihong^{2△}

(1. Department of Pharmacy, Guizhou People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550000, China; 2. Cancer Hospital, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of ampelopsin on proliferation and apoptosis of human renal cancer cell line 786-O. **Methods** Different concentrations of ampelopsin were used on the renal cancer cell lines 786-O, MTT method was used to detect the effects of different concentrations of ampelopsin on cell proliferation of renal cancer cell 786-O; Annexin V/PI double staining was used to detect the effects of different concentrations of ampelopsin on cell apoptosis of renal cancer cell 786-O. **Results** The MTT results showed that the ampelopsin could significantly inhibit renal cancer cell proliferation, and IC₅₀ was 17.23 μg/mL. The apoptosis rates of renal cancer cell 786-O increased significantly after 7 h with different concentrations of ampelopsin; the cell apoptosis rates of ampelopsin of 10 μg/mL and 20 μg/mL of renal cancer 786-O cell were increased ($P < 0.05$); the cell apoptosis rate of concentrations of 40 μg/mL and 80 μg/mL increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** Ampelopsin can significantly inhibit the cell proliferation of renal cancer cell 786-O, and can promote renal cancer cell 786-O apoptosis.

[Key words] kidney neoplasms; cell proliferation; apoptosis; ampelopsin

蛇葡萄素(ampelopsin, AMP)其化学名称为 3,5,7,3',4',5'-六羟基-2,3 双氢黄酮醇,是藤茶的主要活性成分。藤茶味甘、性凉,又称为甜茶、甘露茶等,主要分布于广西、湖南、福建等地,具有清热解毒、提高免疫力等作用,多用于上呼吸道感染发热、消炎止痛、消肿利尿等的辅助治疗^[1-3]。已有研究表明,AMP 有抑制人类肿瘤的作用,包括膀胱癌、乳腺癌和肝癌等^[4-7],但 AMP 对肾癌的作用却少见报道。为研究 AMP 对肾癌 786-O 细胞增殖和凋亡的影响,2014 年 2 月至 2015 年 1 月笔者设计并进行了如下药理实验。本研究采用 MTT 法和流式细胞检测方法,探究 AMP 对体外肾癌 786-O 细胞增殖与凋亡的作用,为 AMP 对肾癌的治疗提供一定的实验依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肾癌 786-O 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 主要试剂 含量为 98% 的 AMP(西安瑞林生物科技有限公司);胎牛血清及磷酸盐缓冲液(PBS)购自美国 Hyclone 公司;Annexin V/PI 双染试剂盒(美国 BD 公司);溴化噻唑蓝

(MTT)购自美国 Sigma 公司;RPMI-1640 培养基,0.25%胰酶二甲亚砜(DMSO),青霉素、链霉素双抗购自美国 Gibco 公司;其余均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 培养箱(Thermo 公司);电子分析天平(余姚纪铭公司);酶标仪(Bio-TEK 公司);流式细胞仪(Becton Dickinson);台式低速离心机(Thermo 公司);12 孔及 96 孔细胞培养板、培养瓶(美国 Gibco 公司);高压蒸汽灭菌器(韩国 Lab Tech 公司);超低温冰箱(海尔公司);微量加样器(Thermo 公司);超净工作台(苏州安泰公司)。

1.2 方法

1.2.1 AMP、MTT、PI 配制 (1)将 AMP 粉末溶解于 DMSO,制成浓度为 64 mg/mL 的药物原液,保存于 4 °C 低温冰箱,使用时用 RPMI-1640 培养液稀释成所需的药物浓度。(2)用无血清的 RPMI-1640 培养液配制浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,现用现配。(3)将 PI 溶液与 RNaseA 按 1:1 的比例溶解于适量 PBS 中,配制成 PI 染液。

1.2.2 细胞培养 将肾癌 786-O 细胞置于 RPMI-1640 培养基中(含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗),于 5% CO₂、37 °C、饱和湿度的培养箱中进行培养,待细胞长满培养瓶壁时

(70%~80%)进行消化传代(0.25%的胰酶消化),取对数生长期的细胞用于如下实验。将其分为正常组和 AMP 组。

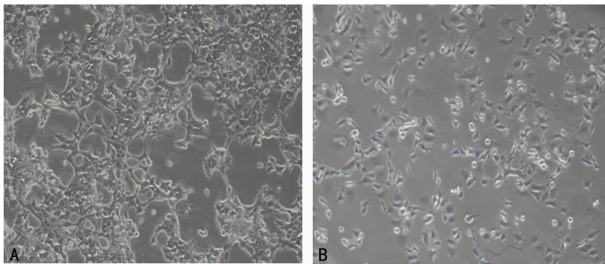
1.2.3 MTT 法检测细胞增殖抑制率 取肾癌 786-O 细胞(对数生长期),将其接种于 96 孔板,调整细胞浓度至 1×10^4 /孔。培养 24 h 后,于每孔内加入适量的 AMP 使其终浓度分别为 0、5、10、15、20、25 和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每组均设 3 个复孔。继续培养 48 h 后,弃去各孔内液体,于每孔内加入浓度为 5 mg / mL 的 MTT 溶液(避光操作)。再次孵育 4 h 后,吸去各孔上清液,每孔内加入 150 μL DMSO 溶液并混匀,待其完全显色后,于酶标仪上用 492 nm 波长测定光密度(OD)值(OD_{492})。该实验重复 3 次,按下述公式计算 AMP 对肾癌 786-O 细胞的增殖抑制率:抑制率 = $(1 - OD_{\text{实验}} / OD_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡率 采用 Annexin V/PI 荧光双染法检测细胞凋亡率。取对数生长期的细胞,用 RPMI-1640 培养液(无血清)调整细胞浓度至 3×10^5 /mL,将其接种于 12 孔细胞培养板上(每孔 1.5 mL),缓慢吹打混匀。过夜培养后,加入不同浓度的 AMP 药液 100 μL ,使其终浓度为 80、40、20、10 及 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (加入 100 μL 同体积 PBS),培养 7 h 后收集各组细胞,PBS 清洗 3 次,用 PBS 调节细胞浓度至 1×10^6 /mL。加入 Annexin V 液和已配置好的 PI 液各 5 μL (避光操作),将其混匀,孵育 20 min(室温避光),于流式细胞仪检测并分析各组细胞凋亡率。该实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析,计数资料用率表示,采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 观察各组肾癌细胞的形态 于倒置相差显微镜下观察,正常肾癌 786-O 细胞呈贴壁生长,形态良好,排列紧密,可见透光性好。经 AMP 处理后,部分细胞失去了贴壁性,呈现悬浮生长;大部分细胞表现为形态皱缩,失去原有形状;细胞内颗粒增多,细胞器形态异常,可见一部分细胞已死亡,见图 1。



A: 正常组; B: AMP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组。

图 1 正常组及 AMP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组 72 h 肾癌 786-O 细胞形态($\times 100$)

2.2 不同浓度 AMP 抑制增殖的作用 经不同浓度 AMP 处理后,肾癌 786-O 细胞的增殖抑制率,见表 1。当 AMP 浓度在 5~30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,随着 AMP 浓度升高,肾癌 786-O 细胞抑制作用逐渐增强,即两者呈量效关系,其半数抑制浓度(IC_{50})为 17.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3 不同浓度 AMP 对肾癌细胞凋亡的作用 经不同浓度 AMP 处理 72 h 后,凋亡的肾癌 786-O 细胞明显比 AMP 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组增多,见表 2。不同浓度的 AMP 对肾癌 786-O 细胞凋亡率的作用不同。通过各组间进行两两比较,AMP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 AMP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组差异无统计学意义($P > 0.05$),AMP 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和 AMP 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间差异无统计学意义($P > 0.05$);但 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AMP 组分别与 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AMP 组两两比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。由图 3 条形统计图可以看出,AMP 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 AMP 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组肾癌 786-O 细胞的凋亡率明显高于 AMP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、AMP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),即 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AMP 较 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AMP 更能有效地促进肾癌 786-O 细胞凋亡。

表 1 不同浓度 AMP 对人肾癌 786-O 细胞的增殖抑制作用($\bar{x} \pm s$)

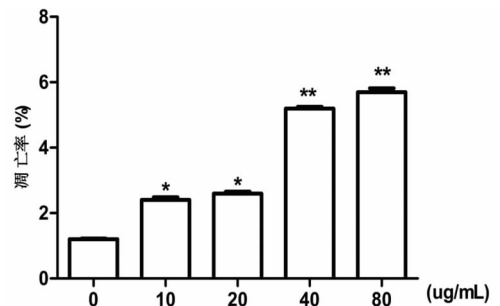
组别	n	抑制率/%
AMP 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	—
AMP 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	6.45 \pm 1.01
AMP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	11.27 \pm 3.42
AMP 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	30.13 \pm 7.37
AMP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	62.76 \pm 9.02
AMP 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	85.23 \pm 5.22
AMP 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	95.23 \pm 4.28

—: 表示此项无数据。

表 2 不同浓度 AMP 对人肾癌 786-O 细胞的凋亡作用

组别	n	凋亡率/%
AMP 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	1.1%
AMP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	2.4%*
AMP 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	2.6%*
AMP 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	5.2%**
AMP 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	3	5.7%**

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMP 组比较。



*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, 与 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AMP 组比较。

图 2 不同浓度 AMP 对人肾癌 786-O 细胞凋亡率的比较

3 讨 论

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)即肾癌,是最常见的肾实质恶性肿瘤,在成年人恶性肿瘤中约占 2%~3%,近年来发病率逐渐升高^[8]。迄今为止,肾癌的主要临床治疗手段仍是外科手术,内科化疗及放疗治疗均不能有效根治肾癌。然而,随着生物—心理—社会医学模式的建立,改善中晚期癌症患者的生活质量日益受到重视。生物治疗已经成为中晚期肾癌治疗的研究热点及临床治疗的新方向。

目前,抗肿瘤药物的研究热点主要集中在寻求治疗效果显著、毒性小、不良反应少、安全的抗肿瘤药物,而这些药物的有效成分多是从天然植物中提取出的。黄酮类药物多与糖结合成苷类而普遍存在于植物中,小部分以游离态的形式存在,是植物的次生代谢化合物^[9]。该类化合物结构复杂、数量和种类繁多,具有抗肿瘤、消炎止痛及抗氧化等多种药理功效^[10]。黄酮的主要的药理成分是 AMP,其普遍存在于藤茶等植物中且含量十分丰富^[11]。已有研究表明,AMP 不仅可显著抑制消化

道肿瘤细胞增殖,还可显著抑制其他系统肿瘤细胞,但具体的分子机制仍未阐明^[4-7,12-15]。

本研究通过观察细胞形态、MTT 实验发现,AMP(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用 72 h 后,能明显抑制肾癌 786-O 细胞;AMP 浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞抑制率可达到 90% 以上,大部分细胞失去活性或死亡;表明 AMP 能显著抑制肾癌 786-O 细胞增殖。流式 Annexin V/PI 双染法是测定细胞凋亡的敏感的方法之一,通过双重荧光标记(Annexin V-FITC 和 PI)可以清楚辨别并统计出早期凋亡细胞的比例。本研究采用流式细胞学方法,探究 AMP 对体外肾癌 786-O 细胞凋亡的作用。经 AMP 处理 72 h 后,即可发现肾癌细胞的凋亡率显著上升,在一定的浓度范围内达到最大凋亡率,如 10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,肾癌细胞凋亡率不会随着 AMP 的浓度增加而增加,而浓度为 40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 能有效促进肾癌 786-O 细胞凋亡,这可能跟 AMP 的量效浓度有关^[8-10]。

综上所述,AMP 可显著抑制肾癌细胞增殖,促进肾癌细胞凋亡,从而起到抗肿瘤的作用,为 AMP 的生物治疗作用提供一定的实验依据,为泌尿系统常见恶性肿瘤肾癌的治疗提供了新的线索。然而 AMP 作用于肾癌的具体分子机制目前仍不明确,需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 付明,黎晓英,王登守,等. 显齿蛇葡萄叶中黄酮类化合物的研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(7):574-575.
- [2] 姚欣,周春权,林静瑜,等. 复方藤茶的药理实验[J]. 福建中医学院学报,2007,17(6):31-33.
- [3] 陈晓明,倪峰. 藤茶药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2010,22(1):16-17.
- [4] 周春权,姚欣,陈晓明,等. 藤茶提取物的抗肿瘤作用研究[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(6):640-642.

- [5] 倪峰,姚欣,郭丹,等. 蛇葡萄素对人前列腺癌 PC3 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中药药理与临床,2012,28(3):39-41.
- [6] 姚欣,倪峰,郭丹,等. 蛇葡萄素对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 福建中医药大学学报,2014,24(1):22-24.
- [7] 龙云,杨泽娟,耿焱,等. 蛇葡萄素对人膀胱癌 T24 细胞株凋亡的作用研究[J]. 吉林医学,2012,33(22):4709-4711.
- [8] Guo YL,Zhou LQ. Campbell-walsh urologk[M]. 9th Ed. Beijing:Beijing Medical University Press,2009:1668.
- [9] 曹良启,王晓黎,刘德育. 黄酮类化合物诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J]. 中药材,2004,27(10):785-788.
- [10] 李云霞,贺文智,索全伶,等. 黄酮类化合物活性及构效关系研究概况[J]. 内蒙古石油化工,2004,30(2):10-12.
- [11] 何桂霞,裴刚,周天达,等. 显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J]. 中国中药杂志,2000,25(7):423-425.
- [12] 郑作文,郭成贤,唐云丽,等. 藤茶蛇葡萄素抗人胃癌细胞作用的实验研究[J]. 中国药物应用与监测,2007,4(1):29.
- [13] 刘德育,罗曼,谢冰芬,等. 蛇葡萄素的抗肿瘤作用研究[J]. 癌症,2001,20(12):1372-1375.
- [14] 张琼,刘德育. 蛇葡萄素改变 Be1-2/Bax 表达和激活 Caspase-3 诱导人肝癌细胞 Be1-7402 凋亡[J]. 中国药理学通报,2009,25(11):1502-1506.
- [15] 吕建军,任润珍,刘凯,等. 蛇葡萄素(AMP)对 SPC-A-1 细胞增殖的抑制作用[J]. 中国老年学杂志,2010,30(6):798-800.

(收稿日期:2015-01-28 修回日期:2015-03-26)

(上接第 2752 页)

- compounds that bind to GRP78[J]. Br J Cancer,2013,109(2):433-443.
- [6] Takada A,Miki T,Kuno A,et al. Role of ER stress in ventricular contractile dysfunction in type 2 diabetes[J]. PLoS One,2012,7(6):e39893.
- [7] Lakshmanan AP,Harima M,Suzuki K,et al. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum, (ER) stress contribute to diabetic cardiomyopathy in the trans-genic non-obese type 2 diabetic rats;a differential role of unfolded protein response,UPR) signaling proteins[J]. Int J Biochem Cell Biol,2013,45(2):438-447.
- [8] Ortiz C,Cardemil I. Heat-shock responses in two leguminous plants;a comparative study[J]. Exp Bot,2001,52(361):1711-1719.
- [9] Koenig U,Eckhart L,Tschachle E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene [J]. Biochem Biophys Res Commun,2001,285(5):1150-1154.
- [10] Hitomi J,Katayama T,Taniguchi M,et al. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 viacaspase-12 [J]. Neurosci Lett,2003,357(2):127-130.
- [11] Scott AM. The inflammatory caspases: guardians against

infections and sepsis[J]. Cell Death Differ,2007,14(1):23-31.

- [12] Sanges D,Comitato A,Tammaro R,et al. Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor(AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(46):17366-17371.
- [13] Bitko V,Barik S. An Endoplasmic reticulum-specific stress-activated Caspase (Caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus[J]. J Cell Biochem,2001,80(3):441-454.
- [14] 汪兴伟,刘海峰,徐梅,等. 大黄对慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛胆碱能神经的影响[J]. 重庆医学,2008,37(15):1685-1686.
- [15] 刘哈,高云. 大黄素药理作用的分子机制研究进展[J]. 中国药理学通报,2009,25(12):1552-1555.
- [16] Ma T,Qi QH,Xu J,et al. Signal pathways involved in emodin induced contraction of smooth muscle cells from rat colon[J]. World J Gastroenterol,2004,10(10):1476-1479.

(收稿日期:2015-01-11 修回日期:2015-03-12)