

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.34.005

# 三白脂素-8 抑制缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 对肾癌细胞解偶联功能的影响<sup>\*</sup>

张永春<sup>1</sup>,谷 江<sup>2</sup>,董安涛<sup>2</sup>,杨锦春<sup>2</sup>

(1. 武警贵州总队医院外二科,贵阳 550005;2. 贵州医科大学附属医院泌尿外科,贵阳 550004)

**[摘要]** **目的** 观察三白脂素-8(Man A)抑制缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )后对肾癌细胞的生长是否有抑制作用,此作用是否与线粒体解偶联功能相关。**方法** 构建高表达 HIF-1 $\alpha$  的肾癌细胞模型,使用不同浓度 Man A 干预转染后的肾癌细胞(转染组)和单纯肾癌细胞(非转染组)。MTT 法检测细胞增殖;RT-PCR 及 ELISA 法检测细胞内 HIF-1 $\alpha$ 、UCP2 的表达;荧光分光光度计检测细胞内 ATP 水平;提取细胞线粒体,分光光度计检测细胞线粒体 mPTP、 $\Delta\Psi_m$  的变化情况。**结果** Man A 干预细胞后,细胞内 HIF-1 $\alpha$ 、UCP2 的表达,ATP 水平在高剂量组显著下降( $P<0.05$ )。Man A 抑制了肾癌细胞的增殖,且在中、高剂量出现显著下降( $P<0.05$ )。Man A 可提高肾癌细胞线粒体 mPTP 开放程度,并导致转染组所有剂量组,非转染组中高剂量组  $\Delta\Psi_m$  降低( $P<0.05$ )。**结论** Man A 可显著抑制肾癌细胞增殖,并影响其线粒体解偶联功能。

**[关键词]** 三白脂素;缺氧诱导因子 1 $\alpha$ ;解偶联蛋白 2;肾癌细胞  
**[中图法分类号]** R737.11      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2018)34-4340-05

## Effect of Man A for inhibiting HIF-1 $\alpha$ on uncoupling function of renal carcinoma cells<sup>\*</sup>

ZHANG Yongchun<sup>1</sup>,GU Jiang<sup>2</sup>,DONG Antao<sup>2</sup>,Yang Jinchun<sup>2</sup>

(1. Second Department of Surgery, Hospital of Guizhou Armed Police Corps, Guiyang, Guizhou 550005, China; 2. Department of Urologic Surgery, Affiliated Hospital, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe whether manassantin A (Man A) inhibiting HIF-1 $\alpha$  having the inhibiting effect on renal carcinoma cells growth and whether this effect being related with the uncoupling function of mitochondria. **Methods** The renal cancer cell models with HIF-1 $\alpha$  high expression was constructed. Different concentrations of Man A solution were used to intervene the transfected renal cancer cell(transfection group) and simple renal cancer cells (non-transfection group). Then the cellular proliferation,expressions of HIF-1 $\alpha$ ,UCP2,mPTP and  $\Delta\Psi_m$  of cell mitochondria and levels of ATP were detected by MTT,RT-PCR,ELISA and fluorescence spectrophotometer respectively. **Results** After Man A intervening the cells,intracellular HIF-1 $\alpha$  and UCP2 expressions,ATP level in the high dose group were decreased significantly ( $P<0.05$ ) Man A inhibited the proliferation of renal carcinoma cells,moreover which in middle and low dosage groups were significantly decreased ( $P<0.05$ ). Man A could increase the mitochondria mPTP open degree of renal cancer cells,and caused the  $\Delta\Psi_m$  decrease in all doses groups of transfection group and the middle and high dose group of the non-transfection group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Man A can significantly inhibit the proliferation of renal carcinoma cells,and influences the uncoupling function of mitochondria.

**[Key words]** manassantin A;hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ;uncoupling protein 2;renal carcinoma cells

缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ -pha,HIF-1 $\alpha$ )是恶性肿瘤细胞在抗乏氧环境下保持增殖的重要基因<sup>[1]</sup>,目前,通过抑制 HIF-1 $\alpha$  达到抑制恶性肿瘤生长的研究正成为研究热点<sup>[2]</sup>。而在 HIF-1 $\alpha$  的有效抑制剂中,三白脂素-8(manassantin A,Man A)是一种由三白草提纯而来植物制剂,对 HIF-1 $\alpha$  的特异性抑制作用很强<sup>[3]</sup>,而对正常细胞的毒性作用很小<sup>[4]</sup>。Man A 可影响线粒体呼吸传递链,抑制细胞线

粒体复合物的功能,并降低 ATP 的产量<sup>[3]</sup>。线粒体内膜上的线粒体解偶联蛋白 2(uncoupling protein2,UCP2),通过对线粒体膜通透性转运孔(mitochondrial permeability transition pore,mPTP)的稳定调节,使线粒体产能电势(mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi_m$ )达到动态平衡平衡,以此调节 ATP 的生成<sup>[5]</sup>,并与恶性肿瘤的增殖关系密切<sup>[6]</sup>。鉴于 Man A 和 UCP2 对细胞产能存在可能的相关性,因此本研究

<sup>\*</sup> 基金项目:贵州省科技厅社会攻关计划项目[黔科合 SY 字(2011)3060]。 作者简介:张永春(1980—),主治医师,博士,主要从事泌尿系肿瘤的研究。

将 Man A 和 UCP2 一并引入研究,观察 Man A 对肾癌细胞的抑制作用并与 UCP2 的解偶联功能是否存在联系,并探讨其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 肾癌细胞株(GRC-1)购于上海弗雷堡生物公司,Man A 由武警后勤学院刘英福博士惠赠,RPMI1640 购于 Hyclone 公司,MTT 购于 Sigma 公司,总 RNA 提取试剂盒购于 Fermentas 公司,ELISA 试剂盒购于 R&D 公司,G418 购于 Solarbio 公司,DH5 $\alpha$  菌种为贵州医科大学干细胞实验室提供相关的限制性内切酶、脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染试剂、质粒抽提试剂盒均购于 Invitrogen 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中将肾癌细胞株置入,使用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养液,培养瓶外部环境为 5% CO<sub>2</sub>、37 ℃。换液频率为每 2~3 天 1 次,或消化传代每 2~3 天 1 次,当细胞培养生长为对数期时进行后继试验。

## 1.2.2 质粒构建及其鉴定

**1.2.2.1 HIF-1 $\alpha$ /pcDNA3.0 载体的构建** 氯化钙法制备 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞,保存于 -70 ℃ 低温冰箱。HIF-1 $\alpha$  基因的 CDS 区序列(NM-001530)于 NCBI 获得,引物设计使用 Primer5.0 软件。上游 5'-AAA AAT CTA GAA TGG AGG GCG CCG GCG GCG CGA ACG-3',下游为 5'-CCC CCG GAT CCT CAG TTA ACT TGA TCC AAA GCT CTG-3',引物合成自大连宝生物公司。PCR 扩增及反应条件:预变性 94 ℃、3 min,变性 94 ℃、30 s,退火 53 ℃、30 s,延伸 72 ℃、1 min,全程共 35 个循环。载体及目的基因分别经 BamH1 和 HindIII 进行双酶切,将载体与酶切基因按 3:1 的摩尔比进行过夜连接,外界环境为 16 ℃,设立质粒阳性和阴性对照。取 4  $\mu$ L 将连接产物接种于 100  $\mu$ L 的 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。挑取单菌落扩增并抽提质粒,使用限制性内切酶 Bgl II 进行单酶切鉴定,将重组质粒命名为 HIF-1 $\alpha$ /pcDNA3.0。

**1.2.2.2 鉴定重组质粒序列** 使用 3730XL 型 DNA 自动测序仪测序,由大连宝生物公司进行。

**1.2.3 质粒转染** 肾癌(GRC-1)细胞的转染由脂质体介导:细胞株于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中培养,汇合度达到 90% 后使用胰酶消化,于 24 孔培养板接种,加入无双抗 RPMI1640 及 10% 胎牛血清,48 h 后细胞密度约 80%~90%。A 液(于 147  $\mu$ L 无双抗、无血清的 RPMI1640 培养液中加入 3  $\mu$ L 质粒,静置 5 min)、B 液(于 144  $\mu$ L 无双抗、无血清的 RPMI1640 培养液中加入 6  $\mu$ L Lipofectamine™ 2000,静置 5 min)、C 液(A 液和 B 液混合为 C 液)。将 C 液移入培养板,密度为每孔 100  $\mu$ L,加入无双抗、无血清的 RPMI1640 培养液,密度为每孔 400  $\mu$ L。培养 6 h 后换含 10% 胎牛双抗、血清的 RPMI1640 培养液,24 h 后按 1:10 给予

传代,24 h 后加入含 G418 的维持液进行筛选,每 3~5 天换液 1 次。

**1.2.4 细胞分组与干预** 对 HIF-1 $\alpha$ /pcDNA3.0、空载体质粒使用脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染,对照组为肾癌(GRC-1)细胞,转染效率提示转染成功后,构建高表达 HIF-1 $\alpha$  基因的转染组肾癌细胞,未行基因干预的 GRC-1 细胞定义为非转染组,实验组及对照组分别使用密度为 0、0.1、0.2、0.4  $\mu$ mol/L 的 Man A 溶液进行干预并依次命名为对照组及低、中、高剂量组。

## 1.2.5 检测实验设计指标

**1.2.5.1 半定量 PCR 检测** GRC-1 细胞内 UCP2、HIF-1 $\alpha$  的基因表达 待 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶细胞汇合度达到 90% 后行分组处理,提取 GRC-1 细胞总 RNA,检测 RNA 的完整性与浓度,逆转录及合成 cDNA。引物序列如下所示: $\beta$ -actin(正向 5'-CCC TGG ACT TCG AGC AAG AGA T-3',反向 5'-GTT TTC TGC GCA AGT TAG G-3'),UCP2(正向 5'-GAC CTA TGA CCT CAT CAA GG-3',反向 5'-GTT TTC TGC GCA AGT TAG G-3'),HIF-1 $\alpha$ (正向 5'-TCC AGC AGA CTC AAA TAC AAG AAC-3',反向 5'-GTA TGT GGG TAG GAG ATG GAG ATG-3'),反应条件为:预变性 94 ℃、3 min,变性 94 ℃、30 s,退火 53 ℃、30 s,延伸 72 ℃、1 min,进行 35 个循环,终止反应条件为 72 ℃、5 min;于 2% 琼脂糖凝胶中对 PCR 产物进行电泳,经 Image J 软件行条带分析,将检测基因与  $\beta$ -actin 的光密度比值代表所检测基因的半定量表达。

**1.2.5.2 ELISA 检测** UCP2、HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达 使用细胞裂解液及 PMSF 裂解细胞,离心半径 8.5 cm、12 000 r/min 对细胞离心 5 min,取上清液按每孔 50  $\mu$ L 滴加,分别将相应孔板设空白孔、标准孔及待测样品孔,上述检测严格按照试剂盒说明书的提示操作。

**1.2.5.3 细胞增殖活性的检测** 将细胞接种于 96 孔板,密度约 104 个/孔,均设 6 个复孔,分组处理 24 h 后吸弃原有培养基,加 5  $\mu$ g/L 的 MTT 20  $\mu$ L 及无血清培养基 80  $\mu$ L,孵育 4 h(环境为 37 ℃)后吸弃培养孔内液体,加入二甲亚砜 150  $\mu$ L 后低速震荡(震荡时间为 10 min),酶标仪(490 nm)检测其吸光度(A)值。

**1.2.5.4 细胞内 ATP 水平的检测** 分组处理细胞并消化离心后,加入 520  $\mu$ L 无血清培养基,再加入 520  $\mu$ L 2% 的三氯醋酸后冰浴、离心,时间为 5 min。取 300  $\mu$ L 上清液、300  $\mu$ L NADH 液、10  $\mu$ L 磷酸甘油醛脱氢酶一磷酸甘油激酶进行混合,检测 NADH 下降的 A 值,根据标准曲线计算 ATP 的值。

**1.2.5.5 线粒体提取及鉴定** 实验步骤均于冰面上进行,25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中培养细胞汇合度约 80%

后分组处理,消化离心,裂解,离心半径 9.3 cm、4 000 r/min 条件下离心 10 min。取上清液,离心半径 8.9 cm、10 000 r/min 条件下离心 15 min 后弃上清液,收集所得沉淀。将沉淀均匀涂抹于载玻片,加詹纳斯绿 B 染液(0.02%),浸染 10 min,用 10×40 倍的高倍镜观察,重复 3 次。

**1.2.5.6 mPTP 开放程度的检测** 使用上述方法制备线粒体悬液。将 3 mL 测定介质 P 分别加入分组后的线粒体悬液,摇匀。对照组加入的测定介质 P 为 4 mL,分光光度计(752N 型)于 540 nm 测定 A 值,mPTP 开放程度与 A 值呈负相关。

**1.2.5.7 ΔΨm 的检测** 制备及分组线粒体悬液同上。将 6.6 μL Rh123 加入线粒体悬液中,避光孵育 30 min(37 ℃水浴箱),荧光分光光度计检测其(激发光:480 nm,发射光:525 nm)荧光强度,ΔΨm 的大小与荧光强度呈负相关。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS19.0 进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  描述,两组间比较使用 *t* 检验,采用单因素方差分析对多个不同处理组的计量资料进行比较,使用 LSD 检验进行两两比较,检验水准  $\alpha=0.05$ ,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 对 HIF-1α 重组质粒的鉴定结果** 3730XLDNA 测序仪对送检标本进行测序后符合 Genbank 上的序列,见图 1。

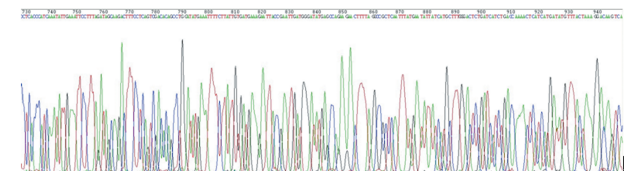


图 1 HIF-1α/pcDNA3.0 质粒的部分测序结果

**2.2 评价 GRC-1 细胞质粒转染的效率** 转染组、非转染组的 HIF-1α 半定量表达分别为  $0.71 \pm 0.09$ 、 $0.42 \pm 0.03$ 。转染组较之非转染组显著增高( $P<0.01$ ),证明高表达 HIF-1α 的肾癌细胞已成功构建,见图 2。

### 2.3 各实验指标的检测结果

**2.3.1 HIF-1α、UCP2 的基因表达结果** 转染组较之非转染组,HIF-1α 基因的表达量显著增高( $P<0.05$ )。转染组细胞 UCP2 基因的表达量虽低于非转

染组,但差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见图 3。

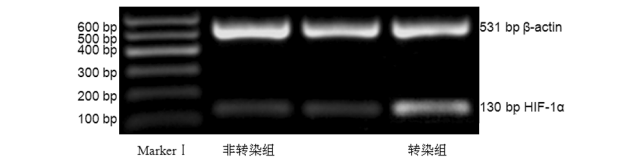


图 2 HIF-1α 的 PCR 电泳图

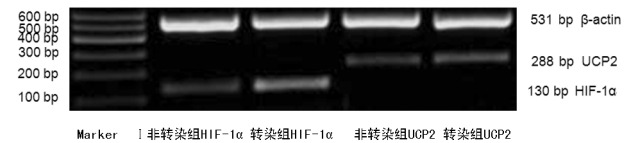
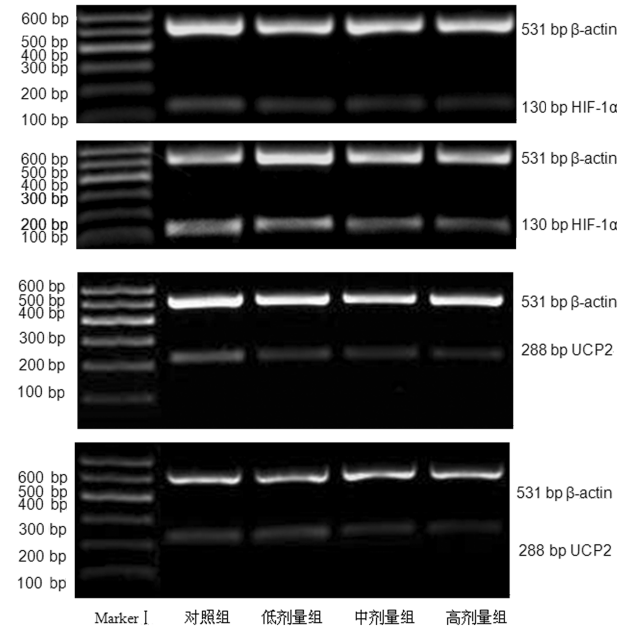


图 3 HIF-1α、UCP2 基因的表达结果

**2.3.2 Man A 干预各组细胞后检测 HIF-1α 和 UCP2 基因表达** 非转染组和转染组细胞较之对照组,HIF-1α 基因在各组细胞的表达随着 Man A 剂量的增加而下降,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。而 UCP2 基因的亦随着 Man A 剂量的增加而逐渐下降,非转染组可在高剂量组出现显著下降( $P<0.05$ )。转染组在中、高剂量组均出现了显著下降( $P<0.05$ ),见表 1 和图 4。



A:非转染组 HIF-1α;B:转染组 HIF-1α;C:非转染组 UCP2;D:转染组 UCP2

图 4 Man A 干预后 HIF-1α、UCP2 的基因表达

表 1 Man A 对各组肾癌细胞内 HIF-1α、UCP2 基因表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	非转染组 HIF-1α 基因	转染组 HIF-1α 基因	非转染组 UCP2 基因	转染组 UCP2 基因
对照组	6	0.41±0.05	0.75±0.11	0.55±0.07	0.52±0.06
低剂量组	6	0.32±0.04 <sup>a</sup>	0.63±0.02 <sup>a</sup>	0.53±0.04	0.51±0.09
中剂量组	6	0.24±0.01 <sup>ab</sup>	0.49±0.08 <sup>ab</sup>	0.51±0.03	0.44±0.02 <sup>a</sup>
高剂量组	6	0.16±0.07 <sup>abc</sup>	0.37±0.06 <sup>abc</sup>	0.43±0.11 <sup>a</sup>	0.41±0.01 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: $P<0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与低剂量比较;<sup>c</sup>: $P<0.05$ ,与中剂量组比较

表 2 Man A 对各组肾癌细胞内 HIF-1α、UCP2 蛋白表达的影响(̄x±s,pg/mL)

组别	n	非转染组 HIF-1α 蛋白	转染组 HIF-1α 蛋白	非转染组 UCP2 蛋白	转染组 UCP2 蛋白
对照组	6	8.3±1.2	15.1±0.9	10.9±0.7	11.4±0.5
低剂量组	6	7.8±1.1	11.7±1.2 <sup>a</sup>	9.8±0.3	10.7±0.4
中剂量组	6	6.4±0.2 <sup>ab</sup>	9.2±0.4 <sup>ab</sup>	9.3±0.3	10.1±0.6
高剂量组	6	4.1±0.3 <sup>abc</sup>	7.2±1.1 <sup>abc</sup>	8.4±0.6 <sup>a</sup>	9.3±0.3 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:*P*<0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:*P*<0.05,与低剂量比较;<sup>c</sup>:*P*<0.05,与中剂量组比较

**2.3.3 Man A 干预细胞后 HIF-1α、UCP2 的蛋白表达水平** 非转染组和转染组细胞较之对照组,HIF-1α 的蛋白表达量随 Man A 剂量的增加而下降,非转染组除低剂量组外,其余各组 HIF-1α 蛋白表达量差异均有统计学意义(*P*<0.05);与对照组相比,非转染组和转染组细胞各剂量组 UCP2 蛋白的表达量,随着 Man A 剂量的增加而逐渐下降,但均仅在高剂量组出现明显差异(*P*<0.05),见表 2。

**2.3.4 Man A 干预各组细胞后检测细胞内 ATP 水平** 非转染组和转染组细胞较之对照组,细胞内 ATP 水平随着 Man A 剂量的增加而下降,在高剂量组出现明显差异(*P*<0.05),见表 3。

表 3 Man A 对各组细胞内 ATP 水平的影响(̄x±s,mmol/L)

组别	n	非转染组	转染组
对照组	6	0.077±0.006	0.084±0.005
低剂量组	6	0.074±0.002	0.081±0.002
中剂量组	6	0.071±0.003	0.078±0.002
高剂量组	6	0.063±0.002 <sup>a</sup>	0.072±0.004 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:*P*<0.05,与对照组比较

**2.3.5 Man A 干预各组细胞后检测细胞增殖活性** 各实验组较之对照组,其 A 值均增高,且随着 Man A 剂量的增加而逐渐下降,两组细胞在中、高剂量组均出现显著下降,差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 4。

表 4 Man A 对各组肾癌细胞增殖活性的影响(̄x±s)

组别	n	非转染组 A 值	转染组 A 值
对照组	6	0.231±0.019	0.306±0.028
低剂量组	6	0.227±0.015	0.297±0.016
中剂量组	6	0.194±0.021	0.263±0.024
高剂量组	6	0.182±0.011 <sup>a</sup>	0.229±0.013 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:*P*<0.05,与对照组比较

**2.3.6 线粒体在镜下的形态学鉴定** 根据染色(詹纳斯绿 B)结果显示:细胞中提取的线粒体在外形上呈圆形、椭圆形和杆状,见图 5。

**2.3.7 Man A 干预各组细胞后 mPTP 的变化情况** 与各自的对照组相比,两组细胞随着 Man A 给药浓度的逐渐增加吸光度逐渐降低。非转染组的中、高

剂量组,转染组 3 个实验组差异均有统计学意义(*P*<0.05)。A 值在各转染组中显著高于相同剂量非转染组(*P*<0.05)。

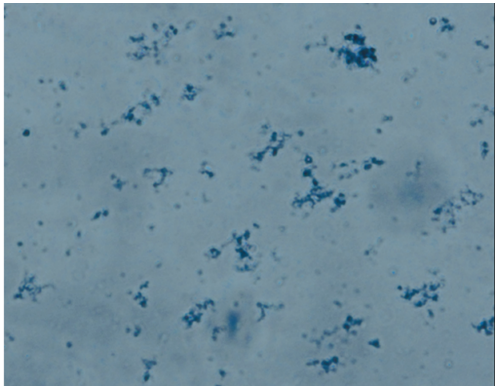


图 5 线粒体的镜下染色(×400)

表 5 细胞行 Man A 干预后 mPTP 的变化(̄x±s)

组别	n	非转染组 A 值	转染组 A 值
对照组	6	0.097±0.024	0.253±0.029
低剂量组	6	0.092±0.016	0.194±0.033 <sup>a</sup>
中剂量组	6	0.075±0.028 <sup>ab</sup>	0.141±0.046 <sup>ab</sup>
高剂量组	6	0.063±0.031 <sup>ab</sup>	0.093±0.027 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>:*P*<0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:*P*<0.05,与低剂量比较;<sup>c</sup>:*P*<0.05,与中剂量组比较

**2.3.8 ΔΨm 在 Man A 干预细胞后的变化** 各实验组随着 Man A 给药浓度的增加,其荧光强度亦增强,与对照组比较,中、高剂量组差异有统计学意义(*P*<0.05),见表 6。

表 6 细胞行 Man A 干预后 ΔΨm 的变化(̄x±s)

组别	n	非转染组荧光度	转染组荧光度
对照组	6	69.31±0.51	37.15±0.42
低剂量组	6	73.47±0.56	34.87±0.21 <sup>a</sup>
中剂量组	6	86.59±0.14 <sup>ab</sup>	28.45±0.22 <sup>ab</sup>
高剂量组	6	98.16±0.67 <sup>abc</sup>	21.72±0.58 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>:*P*<0.05,与对照组比较;<sup>b</sup>:*P*<0.05,与低剂量比较;<sup>c</sup>:*P*<0.05,与中剂量组比较

3 讨 论

恶性肿瘤的能量代谢、细胞增殖、凋亡等在很大程度上依赖 HIF-1α 来维持<sup>[7]</sup>。机体低氧状态时,HIF-1α 生成增加,以维持细胞的氧自稳和能量代谢

平衡<sup>[8]</sup>。HIF-1 $\alpha$  是公认的肿瘤适应低氧环境重要调节剂<sup>[9]</sup>,缺氧环境可促使 HIF-1 $\alpha$  在细胞中稳定表达,促进肿瘤发生转移等恶性倾向,产生放化疗抗药性<sup>[10]</sup>。目前,国内外针对有效抑制 HIF-1 $\alpha$  的功能,达到抑制肿瘤生长的研究逐渐成为热点<sup>[2]</sup>,但尚未针对肾癌细胞进行过相关研究。因此,本实验将 HIF-1 $\alpha$  的植物抑制剂 Man A 引入了肾癌细胞的研究中。

Man A 于 1983 年首次被报道从三白草中提取出的一种双新木脂体,在亚洲国家作为传统中药运用于治疗水肿、黄疸、淋病等多种疾病<sup>[12]</sup>。多项研究均证实 Man A 对 HIF-1 $\alpha$  有强烈的抑制作用<sup>[3]</sup>,有报道发现 Man A 可影响线粒体呼吸传递链(ETC),抑制细胞线粒体复合物的功能,并降低 ATP 产量<sup>[5]</sup>。线粒体解偶联蛋白 2(UCP2)是线粒体内膜上的一种质子转运蛋白,介导跨线粒体内膜的质子流,使呼吸链与 ATP 产生解偶联<sup>[13]</sup>,是线粒体呼吸功能、ATP 生成的关键调节蛋白。基于 Man A、UCP2 均对线粒体内外膜电势、ATP 生成等有生理作用具有功能上的交叉点,故本实验将 UCP2 作为 Man A 干预肾癌细胞后的观察指标,判断 UCP2 是否在 Man A 干预肾癌细胞后出现改变,以资推断 Man A 抑制 HIF-1 $\alpha$  后,UCP2 是否参与其作用机制。

实验结果提示,成功构建高表达 HIF-1 $\alpha$  的肾癌细胞株中 UCP2 的基因表达量出现了上升趋势,但未出现显著差异,提示 HIF-1 $\alpha$  的表达增高和 UCP2 无明显关系;当实验中给予 Man A 进行干预后,HIF-1 $\alpha$  的基因及蛋白表达量均出现显著下降,符合 Man A 作为 HIF-1 $\alpha$  阻断剂的理论前提。UCP2 的基因及蛋白表达量出现下降趋势,特别是在高剂量 Man A 干预后出现了显著下降,这可能与 Man A 影响了线粒体膜电势,并降低 ATP 的生成,负反馈于 UCP2 造成,亦可能是 Man A 直接作用于 UCP2,降低其基因及蛋白的表达。但此项结果尚需对 UCP2 的基因进行调控并完善其他指标后才能明确判定。在检测细胞 ATP 产量时发现,随着 Man A 干预剂量的不断增加,两组细胞的 ATP 水平逐渐减少,在高剂量组可出现显著下降,符合以往研究对 Man A 生理功能的描述。为了探讨 Man A 对肾癌细胞 ATP 产量影响的具体机制,本研究检测了线粒体解偶联功能相关指标 mPTP 及  $\Delta\Psi_m$ 。实验结果提示,Man A 可提高 mPTP 开放程度,并导致  $\Delta\Psi_m$  的降低,并因此降低了线粒体内外膜电势,造成 ATP 产量的减少。这一现象与 UCP2 表达降低的结果是符合的。线粒体解偶联功能的改变可能是 Man A 抑制了 UCP2 的表达造成,亦有可能是 Man A 直接作用于线粒体后导致,且并不能判断是否因 Man A 抑制了 HIF-1 $\alpha$  后带来的产能影响。需进一步实验明确。

HIF-1 $\alpha$  有利于肾癌细胞在低氧环境下的生存<sup>[14]</sup>,而找到抑制 HIF-1 $\alpha$  的药物对于肿瘤的生长势必产生负向调节的作用。Man A 属三白草属提取的植物制剂,目前有较多的萃取及合成方法<sup>[15]</sup>,长期运用于其他疾病的治疗,未见不良反应的报道。结合以往研究以及本实验的结果证实,Man A 可有效抑制 HIF-1 $\alpha$  及肾癌细胞的生长和产能,其具体作用机制与线粒体解偶联功能关系密切,但其具体作用与 UCP2 的关系尚需进一步研究证实,这也为本课题组下一步的实验提出了方向和要求。

## 参考文献

- [1] TANG C X, LEI H, ZHANG J F, et al. Montelukast inhibits hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  translation in prostate cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2018, 30(4):1-7.
- [2] WILSON W R, HAY M P. Targeting hypoxia in cancer therapy[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(6):393-410.
- [3] MA Y, MIN H K, OH U, et al. The lignan manassantin is a potent and specific inhibitor of mitochondrial complex I and bioenergetic activity in mammals[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(51):20989-20997.
- [4] HAHM J C, LEE I K, KANG W K, et al. Cytotoxicity of neolignans identified in *Saururus chinensis* towards human cancer cell lines[J]. *Planta Med*, 2005, 71(5):464-469.
- [5] XU Y, FEINGOLD P L, SURMAN D R, et al. Bile acid and cigarette smoke enhance the aggressive phenotype of esophageal adenocarcinoma cells by downregulation of the mitochondrial uncoupling protein-2[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(60):101057-101071.
- [6] MADREITER-SOKOLOWSKI C T, GYÖRFFY B, KLEC C, et al. UCP2 and PRMT1 are key prognostic markers for lung carcinoma patients[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46):80278-80285.
- [7] ZHU J N, HUANG Z X, ZHANG M Z, et al. HIF-1 $\alpha$  promotes ZEB1 expression and EMT in a human bladder cancer lung metastasis animal model[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3):3482-3489.
- [8] HIMMS-HAGEN J, HARPER M E. Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001, 226(2):78-84.
- [9] SEMENZA G L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9):3664-3671.
- [10] WATABE T, KANAI YASUKAZU, IKEDA H, et al. Quantitative evaluation of oxygen metabolism in the intratumoral hypoxia: 18F-fluoromisonidazole and 15O-labelled gases inhalation PET[J]. *EJNMMI Res*, 2017, 7(1):16.
- [11] RAO K V, ALVAREZ F M. Manassantins A/B and saucerneol: novel biologically active lignoids(下转第 4348 页)

水平,说明组织蛋白酶 S 可能是 CⅡ量减少的主要因素。但细胞培养上清中 CⅡ量减少是由于分泌减少还是分泌后被破坏需深一步研究。随后收集各组软骨细胞,裂解提取 RNA 后进行 CⅡ的 RT-PCR 检测,发现各组间 RT-PCR 水平相似,说明 CⅡ在转录水平上未发生变化,因此认为 CⅡ主要是在合成后受到破坏。当然,本研究中还存在不足,即未对组织蛋白酶 S 的活性进行检测,不能反映组织蛋白酶 S 在病变中的功能变化,这将是下一步研究的重点。

从本研究上看,巨噬细胞和肥大细胞均对软骨细胞分泌 CⅡ的影响较大,他们可能是影响软骨功能的主要细胞类型,而在抑制了组织蛋白酶 S 功能后,CⅡ的分泌量恢复正常,说明组织蛋白酶 S 很有可能是 CⅡ破坏的主要因素,因此针对组织蛋白酶 S 的特异性治疗有可能是未来研究的方向。

参考文献

[1] DAVIGNON J L,RAUWEL B,DEGBOE Y,et al. Modulation of T-cell responses by anti-tumor necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis;a review[J]. *Arthritis Res Ther*,2018,20(1):229.

[2] KERKMAN P F,FABRE E,VAN DER VOORT E I,et al. Identification and characterisation of citrullinated antigen-specific B cells in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2016, 75 (6): 1170-1176.

[3] NEHMAR R,MARIOTTE A,DE CAUWER A,et al. Therapeutic perspectives for interferons and plasmacytoid dendritic cells in rheumatoid arthritis[J]. *Trends Mol Med*,2018,24(4):338-347.

[4] SUURMOND J,VAN DER VELDEN D,KUIPER J,et al. Mast cells in rheumatic disease[J]. *Eur J Pharmacol*, 2016,778:116-124.

[5] VERZIJL N,DEGROOT J,THORPE S R,et al. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products[J]. *J Biol Chem*,2000,275(50):39027-

39031.

[6] MENG Z,EDMAN M C,HSUEH P Y,et al. Imbalanced Rab3D versus Rab27 increases cathepsin S secretion from lacrimal acini in a mouse model of Sjogren's Syndrome[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2016,310(11):942-954.

[7] RUPANAGUDI K V,KULKARNI O P,LICHTNEK-ERT J,et al. Cathepsin S inhibition suppresses systemic lupus erythematosus and lupus nephritis because cathepsin S is essential for MHC class II-mediated CD4 T cell and B cell priming[J]. *Ann Rheum Dis*,2015,74(2):452-463.

[8] WEITOFT T,LARSSON A,MANIVEL V A,et al. Cathepsin S and cathepsin L in serum and synovial fluid in rheumatoid arthritis with and without autoantibodies[J]. *Rheumatology*,2015,54(10):1923-1928.

[9] SEVENICH L,BOWMAN R L,MASON S D,et al. Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S[J]. *Nat Cell Biol*,2014,16(9):876-888.

[10] WU H X,CHENG X W,HU L A,et al. Cathepsin S activity controls Injury-Related vascular repair in mice via the TLR2-Mediated p38MAPK and PI3K-Akt/p-HDAC6 signaling pathway[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016,36(8):1549-1557.

[11] PANWAR P,DU X,SHARMA V,et al. Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers[J]. *J Biol Chem*,2013,288(8):5940-5950.

[12] JIE L G,HUANG R Y,SUN W F,et al. Role of cysteine rich angiogenic inducer 61 in fibroblast like synovial cell proliferation and invasion inrheumatoid arthritis[J]. *Mol Med Rep*,2015,11(2):917-923.

[13] WILKINSON R D,WILLIAMS R,SCOTT C J,et al. Cathepsin S;therapeutic,diagnostic,and prognostic potential[J]. *Biol Chem*,2015,396(8):867-882.

(收稿日期:2018-06-18 修回日期:2018-10-23)

(上接第 4344 页)

from saururus cernuus [J]. *Tetrahedron Letters*,1983, 24:4947-4950.

[12] KWON D Y,LEE H E,WEITZEL D H,et al. Synthesis and biological evaluation of manassantin analogues for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  inhibition[J]. *J Med Chem*, 2015,58(19):7659-7671.

[13] DONADELLI M,DANDO I,FIORINI C,et al. UCP2,a mitochondrial protein regulated at multiple levels[J]. *Cell Mol Life Sci*,2014,71(7):1171-1190.

[14] WU S,JIANG F,WU H,et al. Prognostic significance of hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  expression in patients with clear cell renal cell carcinoma[J]. *Mol Med Rep*,2018,17 (3):4846-4852.

[15] LAI F,LIU Q,LIU X,et al. LXy6090-a novel manassantin A derivative-limits breast cancer growth through hypoxia-inducible factor-1 inhibition[J]. *Onco Targets Ther*,2016,24(9):3829-3840.

(收稿日期:2018-06-18 修回日期:2018-10-19)