

扁柏醇体外对肾癌细胞的影响

魏丽娟, 曹子佩, 朱伟智, 姚许平

(宁波市泌尿肾病医院, 浙江 宁波 315100)

摘要: [目的] 探讨扁柏醇对肾癌细胞生长、细胞周期和凋亡的影响及其可能作用机制。[方法] 以人肾癌 786-0 细胞为模型, 应用 MTT 法检测扁柏醇对 786-0 细胞生长抑制, 应用流式细胞术检测经扁柏醇处理后 786-0 细胞周期变化, 应用 AnnexinV/PI 双染法检测扁柏醇诱导肾癌细胞凋亡的发生, 用 western blot 方法分析 PARP、JNK 蛋白表达和活性的变化。[结果] 扁柏醇对 786-0 细胞的生长有明显抑制作用, 呈浓度依赖性和时间依赖性; 随着扁柏醇浓度的增加, 处于 S 期的细胞逐渐增加, 而 G₂/M 期的细胞逐渐减少; 扁柏醇作用后凋亡细胞也明显增加, 并伴随着 cleaved-PARP 的表达增加; p-JNK 蛋白含量随着扁柏醇的浓度增加而升高, 而 JNK 蛋白含量无明显变化。[结论] 扁柏醇能明显抑制人肾癌 786-0 细胞的生长, 可能与扁柏醇将细胞阻滞于 S 期和通过激活 SPAK/JNK 信号通路诱导细胞凋亡有关。**主题词:** 扁柏醇; 肾癌; 细胞周期; 凋亡; SPAK/JNK
中图分类号: R737.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)12-01098-04
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.12.B010

The Effect of Hinokitol on Renal Carcinoma Cell in vitro

WEI Li-juan, CAO Zi-pei, ZHU Wei-zhi, et al.

(Ningbo Urinary and Nephropathy Hospital, Ningbo 315100, China)

Abstract: [Objective] To explore the effect of hinokitol on growth, cell cycle and apoptosis of renal carcinoma cell and its possible mechanism. [Methods] Experiments were performed on human renal carcinoma 786-0 cell. The inhibitory effect of hinokitol on 786-0 cell was evaluated by MTT test. Flow cytometry was used to measure the cell cycle. Apoptosis induction was assessed by Annexin V-FITC/PI double staining assay. The expression and activity of PARP and JNK was detected by Western blot assay. [Results] Hinokitol could inhibit the growth of 786-0 cell in a time and dose dependent manner. With the concentration of hinokitol increasing, S percentage was dramatically increased while G₂/M percentage was significantly decreased. 786-0 cell treated with hinokitol displayed much higher apoptosis than the control group accompanied by increased cleaved-PARP. The expression level of p-JNK was up-regulated and the level of JNK was unchangeable after treatment with evodiamine. [Conclusion] Hinokitol can inhibit the growth of 786-0 cell through cell cycle arrest and apoptosis by activating SPAK/JNK signaling.
Subject words: hinokitol; renal carcinoma; cell cycle; apoptosis; SPAK/JNK

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是起源于肾实质泌尿小管上皮系统的恶性肿瘤, 又称肾腺癌, 简称为肾癌, 约占成人恶性肿瘤的 3%, 占肾脏恶性肿瘤的 80%~90%, 其发病率以每年 2.5% 的速度增加^[1], 由于其发病隐匿以及晚期肾癌对放疗、化疗均不敏感, 死亡率较高, 因而迫切需要寻求一种更为有效的治疗方法。近年来, 天然药物的抗肿瘤研究日益受到重视。扁柏醇(hinokitol)又叫桉木醇、β-侧柏

素, 在柏科植物心材中提取, 是一种特殊的萜烯类芳香分子, 分子式 C₁₀H₁₂O₂, 分子量 164.20, 易溶于乙醇, 难溶于水, 熔点 50~52℃。扁柏醇对细菌和真菌具有广谱的抑制作用^[2], 对神经有保护作用^[3], 以及抗氧化作用^[3]。实验研究表明扁柏醇对多种不同来源的肿瘤细胞具有抗癌作用, 如恶性黑色素瘤细胞^[4]、结肠癌细胞^[5]、肺腺癌细胞^[6]等。但有关扁柏醇抗肾癌的研究少见报道。本研究主要探讨扁柏醇对肾癌细胞生长、细胞周期和凋亡的影响, 并初步探索其可能的作用机制。

通讯作者: 曹子佩, 主治医师, 硕士; 宁波市泌尿肾病医院泌尿外科, 浙江省宁波市鄞州区前河北路 998 号 (315100); E-mail: lmenbc@163.com

收稿日期: 2017-01-04; **修回日期:** 2017-05-05

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

786-0 肾癌细胞株购自上海中国科学院细胞库, 接种于含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 于 37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养。扁柏醇购自美国 Sigma 公司, 用二甲基亚砜(DMSO)溶解扁柏醇, 储存于 4℃冰箱。胎牛血清(上海 Hyclone 公司), RPMI-1640 培养液(上海 Gibco 公司), 青霉素和链霉素(杭州昊天生物技术有限公司), PBS (武汉博士德生物公司), 胰蛋白酶(南京凯基生物科技发展有限公司), DMSO、MTT (上海 Sigma 公司), 细胞周期检测试剂盒(杭州联科生物技术有限公司), FITC-Annexin-V/PI 凋亡试剂盒(美国 BD 公司), PARP 单克隆抗体、SPAK/JNK 单克隆抗体、p-SPAK/JNK 单克隆抗体(Cell Signaling Technology 生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 扁柏醇对肾癌细胞 786-0 生长抑制作用的检测

取对数生长期的 786-0 细胞, 细胞浓度为 $5 \times 10^4/\text{ml}$ 接种于 96 孔板, 接种量为每孔 100 μl 。待细胞贴壁后弃去培养液, 加入不同浓度扁柏醇, 其终浓度分别为 1、2.5、5、10、25 $\mu\text{mol/L}$, 每个浓度设 6 个复孔, 同时设空白组和对照组, 分别培养 24、48、72h 后, 加 MTT(5mg/ml)10 μl 培养 4h 后弃去上清, 加入 150 μl DMSO, 震荡 10min, 在酶标仪上测定各孔 490nm 处的吸光度 A 值。抑制率 = $1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期的 786-0 细胞接种于 6 孔培养板, 待细胞完全贴壁弃旧培养液, 再加入一定量的无血清 1640 培养液继续培养 24h, 加入 0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 扁柏醇, 给药 24h 后, 用胰蛋白酶消化细胞, 将细胞悬液加入到离心管内, 离心弃去上清, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 加入预冷后的 70%乙醇固定过夜。离心弃固定液后, 用预冷 PBS 缓冲液洗涤 2 次后, 再将细胞重悬于 500 μl PI 染液中, 室温避光染色 30min, 随即用流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.3 Annexin-V/PI 法检测细胞凋亡

取对数生长期的 786-0 细胞接种于 6 孔培养板, 待细胞完全贴壁后弃旧培养液, 再加入 0、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 扁柏醇的 1640 细胞培养液, 继续培养

48h。用不含 EDTA 的胰蛋白酶消化收集细胞悬液, 离心弃去上清, 用 PBS 轻轻重悬细胞并计数, 取 10 万重悬的细胞, 离心弃去上清, 加入 100 μl 缓冲液轻轻重悬细胞, 加入 5 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI, 轻轻混匀, 避光室温孵育 20min。加入 400 μl 的缓冲液, 混匀, 随即用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.4 Western blot 法

扁柏醇作用 24h 后收集细胞, 加入蛋白裂解液冰上裂解 1h, 4℃下 12 000rpm 离心 15min, 小心吸取去上清得到蛋白样品。用 BCA 试剂盒测定样本蛋白浓度后, 加入加样缓冲液共沸 5min, 上样 60 μg , 在 12% SDS-PAGE 凝胶中进行蛋白垂直电泳分离, 电转至 PVDF 膜上, 用 5%脱脂奶粉 TBST 液室温封闭 1h, 一抗 4℃孵育过夜, TBST 漂洗 3 遍, 然后用二抗封闭液室温孵育 1h, 用 TBST 漂洗 3 遍后, 用增强型化学发光试剂盒进行发光反应, 再放到放入凝胶成像仪中曝光, 拍照并保存图片。

1.3 统计学处理

每项实验至少独立重复 3 次。采用 SPSS16.0 软件处理, 所有数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扁柏醇对 786-0 细胞的生长抑制作用

MTT 实验结果显示, 扁柏醇能明显抑制 786-0 细胞的生长, 且随着浓度的升高和干预时间的延长, 其抑制作用更加明显。给药 24、48、72h 的 IC₅₀ 分别为 19.62、11.42、7.77 $\mu\text{mol/L}$, 见 Table 1。

Table 1 Impact of Hinokitol on 786-0 cell proliferation(%)

Groups ($\mu\text{mol/L}$)	24h	48h	72h
1	5.15 $\pm$ 6.75	6.56 $\pm$ 1.95 ^a	7.30 $\pm$ 2.09 ^a
2.5	4.56 $\pm$ 15.86	17.94 $\pm$ 12.77 ^a	35.92 $\pm$ 3.04 ^a
5	19.55 $\pm$ 5.27 ^a	41.52 $\pm$ 11.08 ^a	62.48 $\pm$ 9.86 ^a
10	43.49 $\pm$ 4.92 ^a	62.70 $\pm$ 11.52 ^a	77.19 $\pm$ 7.64 ^a
25	45.07 $\pm$ 2.58 ^a	75.17 $\pm$ 16.05 ^a	86.54 $\pm$ 16.02 ^a

Note: a: compared with control group, $P < 0.05$.

2.2 细胞周期的变化

流式细胞分析术结果显示, 扁柏醇作用 24h 后, 各浓度组各周期内的细胞数量发生明显变化, 随着药物浓度的增加, S 期细胞逐渐增加而 G₂/M 期细胞逐渐减少 ($P < 0.05$), G₀/G₁ 期无明显变化 ($P > 0.05$),

见 Table 2。

Table 2 Cell cycle effects of Hinokitol on 786-0 cell after 24h(%)

Groups(μmol/L)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	51.27±3.79	23.67±0.71	22.23±4.94
2.5	49.18±1.86	26.97±1.96	20.03±1.42
5	45.90±2.04	30.23±2.55 ^a	18.30±2.46
10	43.93±3.74	42.10±1.45 ^a	9.40±2.79 ^a

Note:a;compared with control group,P<0.05.

2.3 扁柏醇可以诱导 786-0 细胞凋亡

与对照组相比,2.5、5、10μmol/L 扁柏醇处理 48h 的 786-0 细胞凋亡明显增加,分别从对照组 2.43%±0.73%增加到 15.97%±2.66%、18.57%±5.47% 和 20.33%±6.03%(P<0.05,Figure 1)。采用 Western blot 法检测 PARP 蛋白的表达水平,结果显示,扁柏醇作用后细胞内 cleaved-PARP 表达水平升高,见 Figure 2。

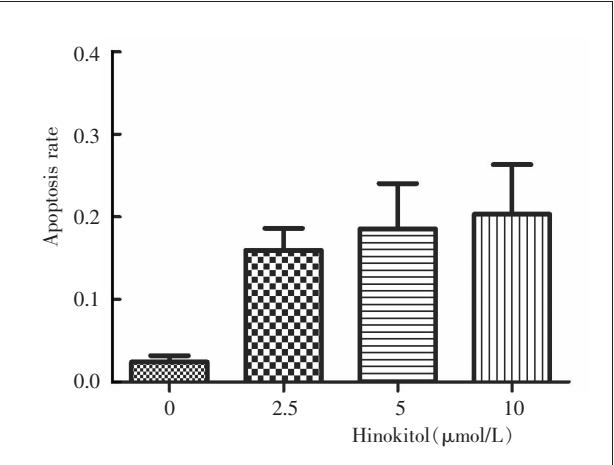


Figure 1 The effect of Hinokitol on the cell apoptosis of 786-0 cell

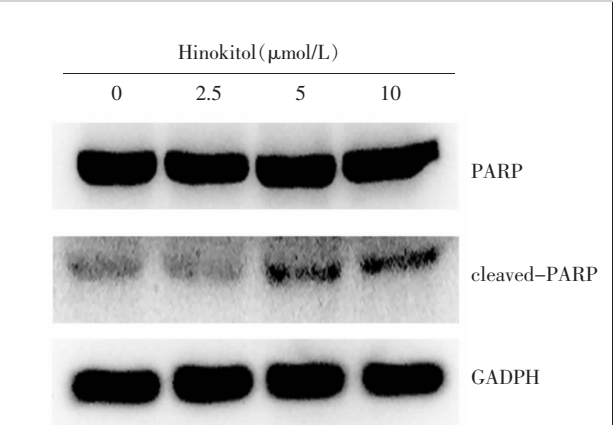


Figure 2 The expression of PARP and cleaved-PARP in 786-0 cell with Hinokitol

2.4 SPAK/JNK 表达和活性的变化

扁柏醇处理 786-0 细胞 24h 后,采用 Western blot 法检测 SPAK/JNK 蛋白的表达和活性,结果如 Figure 3 所示,随着扁柏醇浓度的增加,JNK 蛋白表达水平无明显变化,但 p-JNK 表达逐渐增加。

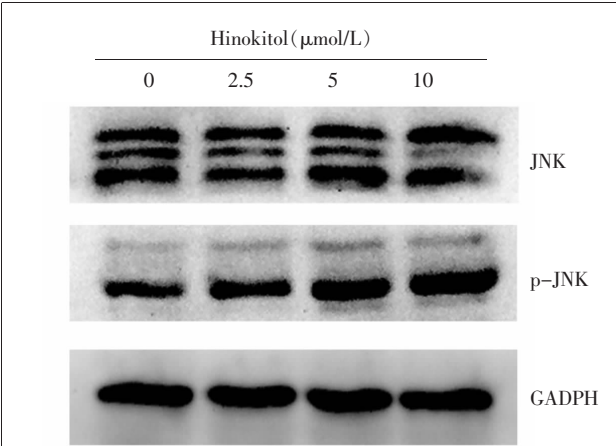


Figure 3 The expression of JNK and p-JNK in 786-0 cell with Hinokitol

3 讨论

本研究结果显示扁柏醇能明显抑制肾癌 786-0 细胞的生长,并呈剂量和时间依赖性。许多肿瘤是由于增殖周期调控紊乱而引起细胞增殖过多导致的,而临床上许多抗肿瘤的药物的通过诱导细胞周期阻滞从而抑制肿瘤细胞增殖生长。Liu 等^[4]研究发现扁柏醇处理人黑色素瘤细胞后,G₁ 期细胞明显增加,S 期细胞明显减少,G₂/M 期细胞无明显变化。本研究结果显示,扁柏醇可以使 786-0 细胞 S 期细胞明显增加,G₂/M 期细胞显著减少,而 G₀/G₁ 期细胞无明显变化。表明扁柏醇在不同细胞中引起的细胞周期阻滞并不完全一致。

凋亡的减少也是恶性肿瘤发生的原因之一,而临床上放疗、化疗就是通过促进诱导肿瘤细胞凋亡而发挥抗肿瘤的作用。凋亡的发生主要通过两条经典的通路,即外源性死亡受体介导的凋亡信号通路和内源性线粒体介导的凋亡信号通路,两条通路最终共同激活 caspase3,caspase3 作用于 PARP 后时期发生裂解最终诱导细胞发生凋亡,因此 cleaved-PARP 是细胞发生凋亡的标志^[7]。Lee 等^[5]研究发现扁柏醇能通过线粒体介导的凋亡途径诱导人结肠癌

细胞发生凋亡。本研究结果显示,扁柏醇能够诱导肾癌细胞发生凋亡,并伴随着 cleaved-PARP 增加。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路是一条重要信号传导通路,在细胞的增殖、分化、凋亡及肿瘤转移等过程中发挥着重要作用,而 JNK/SPAK 是 MAPK 家族的重要成员,其位于细胞质,属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其活化是通过其氨基酸残基端的磷酸化。当细胞受到细胞因子、应激及化疗药物等多种因素刺激时,JNK 通过磷酸化反应被激活,然后转移到细胞核,促进转录因子 c-Jun、ATF-2、Elk-1 等基因的表达,从而促进细胞的凋亡^[8-11]。本研究发现扁柏醇作用肾癌细胞 24h 后,SPAK/JNK 蛋白表达水平无明显变化,但 p-JNK 表达逐渐增加,提示扁柏醇能够激活 SPAK/JNK 信号通路,诱导肾癌细胞凋亡。

综上所述,扁柏醇不仅能将肾癌细胞阻滞于 S 期,还能通过激活 SPAK/JNK 信号通路诱导肾癌细胞的凋亡,从而抑制肾癌细胞的生长。

参考文献:

- [1] Gupta K, Miller JD, Li JZ, et al. Epidemiologic and socioeconomic burden of metastatic renal cell carcinoma (mRCC): A literature review [J]. *Cancer Treat Rev*, 2008, 34(3): 193-205.
- [2] Arima Y, Nakai Y, Hayakawa R, et al. Antibacterial effect of beta-thujaplicin on staphylococci isolated from atopic dermatitis: relationship between changes in the number of viable bacterial cells and clinical improvement in an eczematous lesion of atopic dermatitis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51(1): 113-122.
- [3] Koufaki M, Theodorou E, Alexi X, et al. Synthesis of tropolone derivatives and evaluation of their in vitro neuroprotective activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2010, 45 (3): 1107-1112.
- [4] Liu S, Yamauchi H. p27-Associated G1 arrest induced by hinokitiol in human malignant melanoma cells is mediated via down-regulation of pRb, Skp2 ubiquitin ligase, and impairment of Cdk2 function [J]. *Cancer Lett*, 2009, 286 (2): 240-249.
- [5] Lee YS, Choi KM, Kim W, et al. Hinokitiol inhibits cell growth through induction of S-phase arrest and apoptosis in human colon cancer cells and suppresses tumor growth in a mouse xenograft experiment [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76 (12): 2195-2202.
- [6] Li LH, Wu P, Lee JY, et al. Hinokitiol induces DNA damage and autophagy followed by cell cycle arrest and senescence in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8).
- [7] Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. *Ann Rev Cell Dev Bi*, 1999, 15: 269-290.
- [8] Bogoyevitch MA, Ngoei KRW, Zhao TT, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: Recent advances and challenges [J]. *BBA-Proteins Proteom*, 2010, 1804(3): 463-475.
- [9] Brnjic S, Olofsson MH, Havelka AM, et al. Chemical biology suggests a role for calcium signaling in mediating sustained JNK activation during apoptosis [J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(5): 767-774.
- [10] Severin S, Ghevaert C, Mazharian A. The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(1): 17-26.
- [11] Yu MK, Lee YH, Yoon MR, et al. Attenuation of AH26-induced apoptosis by inhibition of SAPK/JNK pathway in MC-3T3 E1 cells [J]. *J Endodont*, 2010, 36(12): 1967-1971.