

天南星多糖对人肾癌细胞系 GRC-1 增殖及凋亡作用的影响

唐化勇, 张万生, 于航, 姜爽, 王立国*
(吉林医药学院附属医院, 吉林 132000)

[摘要] **目的:**探讨天南星多糖(ARPS)对人肾癌细胞系 GRC-1 的增殖、凋亡及 Wnt/ β -连接素(β -catenin)信号通路的影响。**方法:**采用 RPMI-1640 培养液常规培养获对数生长期的 GRC-1 细胞后,给予 0, 20, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS 处理, 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS 组为空白组, 细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测各浓度 ARPS 处理 24, 48, 72 和 96 h 的增殖抑制率, 分别采用 Annexin-FITC/PI 双染法和 PI 单染法检测各浓度处理 48 h 后的细胞凋亡率和细胞周期情况, 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测各浓度处理 48 h 后 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 及下游靶分子原癌基因(C-myc), 细胞周期素 D₁(Cyclin D₁)蛋白水平。**结果:**与空白组比较, 在 20 ~ 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ARPS 对 GRC-1 细胞的增殖有明显抑制效果, 细胞增殖抑制率随 ARPS 作用时间的延长和质量浓度的增加而升高, 总体上抑制效应呈剂量和时间依赖的方式, 以上差异均有统计学意义($P < 0.05$), 50 ~ 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS 的早期凋亡率及 20 ~ 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS 的晚期凋亡率和总凋亡率均升高($P < 0.05$), 20, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS 组的 G₀/G₁ 期高于空白组, S 期, G₂ 期/M 期及 β -catenin, C-myc 和 Cyclin D₁ 蛋白水平均低于 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS ($P < 0.05$), 20 ~ 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 各质量浓度间的以上指标的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**ARPS 对人肾癌细胞系 GRC-1 的增殖有一定抑制作用, 同时可诱导细胞凋亡和 G₀/G₁ 期阻滞并可抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活。

[关键词] 天南星多糖; 肾癌; 抗肿瘤; Wnt/ β -连接素(β -catenin)信号通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0155-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140155

Effects of Arisaematis Rhizoma Polysaccharide on Proliferation and Apoptosis of Human Renal Cell Carcinoma Cell Line GRC-1

TANG Hua-yong, ZHANG Wan-sheng, YU Hang, JIANG Shuang, WANG Li-guo*
(Affiliated Hospital of Jilin Medical University, Jilin 132000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore Arisaematis Rhizoma polysaccharide (ARPS) on the proliferation, apoptosis and Wnt/ β -catenin signaling pathway of human renal cell carcinoma cell line GRC-1. **Method:** After entering into the logarithmic growth phase with RPMI-1640 culture fluid under routine condition, the GRC-1 cells were treated with different doses of ARPS (0, 20, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The 0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS group was the blank group. The inhibition rates of proliferation at 24, 48, 72 and 96 h after the treatment were measured by viable cell counting kit assay (CCK-8). The apoptosis rate and cell cycle at 48 h after the treatment were detected by Annexin-FITC/PI double staining and PI staining methods via flow cytometry, respectively. Western blot was employed to detect the expression level of β -catenin in Wnt/ β -catenin signaling pathway and its downstream target molecule C-myc and Cyclin D₁ at 48 h after the treatment. **Result:** Compared with the blank group, ARPS within the range of 20-200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ presented an inhibitory effect on GRC-1 cell proliferation. The proliferation inhibition rate increased with the rise in time and concentration of ARPS in a dose-and time-dependent manner, and the above differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ARPS, the early apoptosis rate of 50-200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS, the late apoptosis rate of 20-200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and the total apoptosis rate were all elevated ($P < 0.05$). There was a higher G₀/G₁ phase ratio than 20, 50, 100, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ARPS groups, and lower S and

[收稿日期] 20150722(001)

[基金项目] 吉林省教育厅"十二五科学技术研究项目"(吉教科合字 2014203);吉林省中医药管理局中医药科技项目(2012163)

[第一作者] 唐化勇, 硕士, 主治医师, 从事泌尿系肿瘤的诊治研究, Tel: 18904325227, E-mail: tanghuayong71@126.com

[通讯作者] *王立国, 硕士, 主任医师, 从事泌尿系肿瘤的诊治研究, Tel: 13500995309, E-mail: jlwangliguo@126.com

G₂/M phase and β -catenin, C-myc and Cyclin D₁ protein levels than 0 mg·L⁻¹ ($P < 0.05$). Indexes within the concentration range between 20-200 mg·L⁻¹ were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** ARPS inhibited the proliferation of renal cell carcinoma cell line GRC-1, and induced cell apoptosis and G₀/G₁ arrest, with the effect of inhibiting the activation of Wnt/ β -catenin signaling.

[Key words] Arisaematis Rhizoma polysaccharide; renal cancer; anti-cancer; Wnt/ β -catenin signaling

肾癌的发病率仅次于膀胱癌,为泌尿系统的常见恶性肿瘤之一,严重威胁人类健康^[1]。化疗仍是晚期肾癌或不愿接受手术治疗患者的主要治疗手段,但长期使用化疗药物存在毒副作用大、易产生耐药性等缺点,效果难以令人满意,因此,寻找有效的治疗手段就显得极为必要^[2]。天然植物多糖具有较好的抗肿瘤活性,可抑制肿瘤细胞增殖及诱导凋亡,如红花多糖、人参多糖及川芎多糖等^[3-5]。近年来应用天南星复方治疗宫颈癌、肺癌、肝癌等癌症引起广泛关注,而天南星多糖(ARPS)为其主要活性成分^[6-7]。现有的研究表明,天南星多糖主要是通过增强免疫力而发挥抗肿瘤作用,其作用机制目前并未完全阐述清楚^[8-9]。因此,本文以 ARPS 为研究对象,探讨其对肾癌 GRC-1 细胞增殖及凋亡的影响,同时,鉴于 Wnt/ β -连接素(β -catenin)信号通路介导了多种恶性肿瘤的恶性行为,故本研究又进一步分析了 ARPS 对 GRC-1 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响,为临床研究提供参考。

1 材料

1.1 细胞 人肾癌细胞系 GRC-1 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 药物及试剂 ARPS 由长春中医药大学基础医学院提供(纯度 > 91.5%),活细胞计数试剂盒细胞计数试剂盒(CCK-8)(江苏碧云天生物技术公司,批号 20130416),新生小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所,批号 130624),Annexin V-FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司,批号 20140221); β -连接素(β -catenin),细胞周期素 D₁(Cyclin D₁)及靶分子原癌基因(C-myc)多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-5208, sc-718, sc-764)。

1.3 仪器 ZS-2 型全自动酶标仪(中科院生物物理所),PB203-N 型电子微量天平(瑞士梅特勒-托利多仪器上海有限公司),FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司),BG-sub MIDI 型多用途水平电泳仪(美国 Baygene 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 GRC-1 细胞复苏后,接种于含

10% 新生牛血清、抗生素(100 U·mL⁻¹青霉素和 100 mg·L⁻¹链霉素)的 RPMI 1640 培养液的 50 mL 培养瓶中进行常规培养。培养条件为 5% CO₂,饱和湿度,37 °C 培养箱中培养,正常换液、传代,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 细胞增殖检测 取对数生长期的 GRC-1 细胞,经 0.25% 胰蛋白酶消化后制备单细胞悬液,调整细胞密度至 1 × 10⁵ 个/mL,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板,24 h 后加入 ARPS 溶液(采用完全培养基溶解并制成 10 mg·mL⁻¹储存液)使其终质量浓度分别为 0, 20, 50, 100, 200 mg·L⁻¹(0 mg·L⁻¹设为空白组,其余为实验组),常规培养 24, 48, 72 和 96 h 后,每孔加入 CCK-8(10 μ L),孵育 4 h 后,450 nm 酶标仪检测各浓度的吸光 A,根据公式计算增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.3 细胞凋亡率 将对数生长期的 GRC-1 细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 1 × 10⁶ 个细胞,经不同浓度 ARPS 培养 48 h 后,采用凋亡检测试剂盒避光染色,根据说明书加入 Annexin V/FITC 和 PI 各 5 μ L,染色 15 min 后上流式细胞仪测定凋亡率。以 Annexin V⁺/PI 为早期凋亡细胞,Annexin V⁺/PI⁺ 为晚期凋亡细胞,以两部分之和为总凋亡细胞。

2.4 细胞周期 收集经不同浓度 ARPS 培养 48 h 后的 GRC-1 细胞,调整细胞密度为 1.0 × 10⁶ 个/mL,冰浴 20 min,洗细胞 2 次后加入 PI 进行染色(50 mg·L⁻¹),4 °C 避光孵育 30 min,在流式细胞仪上进行检测,采用 Cell Quest 软件分析细胞周期。

2.5 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 收集不同浓度 ARPS 培养 48 h 后的 GRC-1 细胞,采用预冷 PBS 冲洗后,加入细胞裂解液进行裂解,4 °C 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后,弃沉淀,采用 BCA 法检测上清液的蛋白浓度,调整每份样本的蛋白浓度后加入等体积加样缓冲液,煮沸后每孔加样蛋白质 20 μ g,经 10% SDS-PAGE 电泳后半干转至 PVDF 膜,根据膜面积加适量 β -catenin, C-myc 和 Cyclin D₁ 一抗(除 β -catenin 稀释度为 1:200,其余均为 1:100)4 °C 过夜,加入适量二抗室温孵育 2 h,增强型化学发光试剂(ECL)发光试剂盒显色,暗室内曝光于胶片上,采

用美国 Media Cybernetics 公司 Gel-Pro Analyzer V4.0 图像分析软件系统分析各显影条带的光密度,以各目的蛋白与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)蛋白光密度的比值进行半定量分析。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 版软件进行统计学分析,统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数差异性比较用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 GRC-1 细胞增殖的影响 采用 0, 20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ARPS 处理 GRC-1 细胞,分别在 24, 48, 72 和 96 h 后行 CCK-8 检测发现,ARPS 对 GRC-

1 细胞的增殖有显著抑制效果,细胞增殖抑制率随 ARPS 作用时间的延长和浓度的增加而升高,总体上抑制效应呈剂量和时间依赖的方式,以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3.2 对 GRC-1 细胞凋亡的影响 采用 0, 20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ARPS 处理 GRC-1 细胞,在 48 h 后行 Annexin-FITC/PI 双染法检测发现,50, 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ARPS 处理后的早期凋亡率均高于 0 和 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,差异有统计学意义($P < 0.05$);20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ARPS 处理后的晚期凋亡率和总凋亡率均高于 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,且 20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 各质量浓度间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同质量浓度 ARPS 处理对 GRC-1 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	早期	晚期	总凋亡
空白	-	3.13 ± 0.56	1.23 ± 0.25	4.19 ± 0.64
ARPS	20	5.61 ± 1.19	4.52 ± 0.73 ¹⁾	9.73 ± 1.30 ¹⁾
	50	11.35 ± 2.13 ^{1, 2)}	7.25 ± 1.01 ^{1, 2)}	16.59 ± 2.52 ^{1, 2)}
	100	18.11 ± 1.61 ^{1, 2, 3)}	9.24 ± 2.26 ^{1, 2, 3)}	26.61 ± 3.07 ^{1, 2, 3)}
	200	23.18 ± 3.72 ^{1, 2, 3, 4)}	13.50 ± 3.31 ^{1, 2, 3, 4)}	34.76 ± 4.86 ^{1, 2, 3, 4)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与 ARPS 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较²⁾ $P < 0.05$;与 ARPS 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较³⁾ $P < 0.05$;与 ARPS 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.3 对 GRC-1 细胞周期的影响 采用 0, 20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ARPS 处理 GRC-1 细胞,在 48 h 后采用流式细胞仪检测发现,与空白组比较,20, 50,

100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ARPS 处理后的 G_0/G_1 期升高, S 期和 G_2/M 期均降低,且 20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 各质量浓度间的差异明显($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同质量浓度 ARPS 处理对 GRC-1 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	G_0/G_1	S	G_2/M
空白	-	38.04 ± 4.26	36.32 ± 4.732	21.34 ± 2.84
ARPS	20	43.36 ± 3.74 ¹⁾	33.52 ± 3.74 ¹⁾	17.63 ± 2.18 ¹⁾
	50	49.95 ± 5.09 ^{1, 2)}	29.56 ± 3.52 ^{1, 2)}	12.76 ± 1.53 ^{1, 2)}
	100	57.66 ± 6.48 ^{1, 2, 3)}	24.98 ± 2.96 ^{1, 2, 3)}	9.31 ± 1.28 ^{1, 2, 3)}
	200	62.14 ± 5.73 ^{1, 2, 3, 4)}	21.07 ± 2.45 ^{1, 2, 3, 4)}	7.02 ± 1.14 ^{1, 2, 3, 4)}

3.4 对 GRC-1 的 Wnt/ β -catenin 信号通路影响 采用 0, 20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ARPS 处理 GRC-1 细胞,在 48 h 后行 Western blot 检测发现,与空白组比较,20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ARPS 处理后的 β -catenin, C-myc 和 Cyclin D₁ 蛋白水平均降低,且 20, 50, 100, 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 各质量浓度间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1, 表 3。

4 讨论

过度增殖是恶性肿瘤的基本特征之一,采用有效的抑制增殖手段是控制肿瘤恶性增长的可行措施^[10]。本研究采用 ARPS 处理肾癌 GRC-1 细胞后,发现该药物对 GRC-1 细胞有抑制效应,凋亡减少与

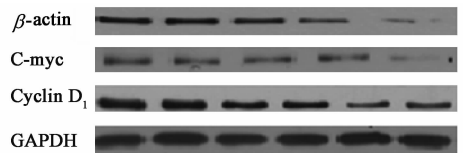


图 1 不同质量浓度 ARPS 处理对 GRC-1 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白的影响

Fig. 1 Effects of different concentration of ARPS on Wnt/ β -catenin signaling pathway in GRC-1 cells(X-ray)

恶性肿瘤的发生发展有关^[11], 本研究发现给予 ARPS 处理后,除较低质量浓度外,其余质量浓度的早、晚期凋亡率及总凋亡率均升高,表明在一定浓度下,ARPS 可诱导 GRC-1 细胞凋亡。除影响增殖和

表 3 不同 ARPS 处理对 GRC-1 细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of different concentration of ARPS on Wnt/ β -catenin signaling pathway in GRC-1 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	β -catenin	C-myc	Cyclin D ₁
空白	-	0.37 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.45 ± 0.04
ARPS	20	0.31 ± 0.04 ¹⁾	0.24 ± 0.02 ¹⁾	0.36 ± 0.05 ¹⁾
	50	0.25 ± 0.03 ^{1, 2)}	0.20 ± 0.03 ^{1, 2)}	0.29 ± 0.04 ^{1, 2)}
	100	0.19 ± 0.02 ^{1, 2, 3)}	0.15 ± 0.05 ^{1, 2, 3)}	0.24 ± 0.03 ^{1, 2, 3)}
	200	0.12 ± 0.03 ^{1, 2, 3, 4)}	0.11 ± 0.03 ^{1, 2, 3, 4)}	0.17 ± 0.02 ^{1, 2, 3, 4)}

凋亡外,部分化疗药物可通过影响细胞周期来发挥抗肿瘤作用^[12]。ARPS 处理后可升高 G₀/G₁ 期细胞比例,而降低 S, G₂/M 期细胞比例,提示 ARPS 可通过影响细胞周期来抑制其生长,推测其主要在 G₀/G₁ 期发挥作用。以上表明 ARPS 对肾癌 GRC-1 细胞的抗肿瘤效果较为全面,对细胞增殖、凋亡及细胞周期均有影响。

Wnt/ β -catenin 信号通路在细胞增殖、凋亡中发挥重要作用,其水平异常与肿瘤的发生、发展有关^[13]。既往研究表明,肾癌细胞中该通路处于激活状态,抑制该通路的活化是治疗肾癌的可行措施^[14]。 β -catenin 为 Wnt/ β -catenin 通路的组成成分^[13],故本研究检查 ARPS 处理对 β -catenin 的影响,同时鉴于 C-myc, Cyclin D₁ 为该通路的下游蛋白^[14]。本研究发现 ARPS 处理 48 h 后的 β -catenin, C-myc, Cyclin D₁ 蛋白水平均降低,提示 ARPS 对 Wnt/ β -catenin 通路有抑制作用。目前,从细胞信号通路水平来探讨抑癌策略已成为研究热点,尤其提倡针对 Wnt/ β -catenin 信号通路来研究或设计抗肿瘤药物,故表明可以作用于 Wnt/ β -catenin 靶点的 ARPS 具有较好的应用前景。

综上所述,ARPS 对肾癌 GRC-1 细胞的增殖有一定抑制作用,同时可诱导细胞凋亡和 G₀/G₁ 期阻滞并可抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活。

[参考文献]

[1] Tan X, Liu Y, Hou J, et al. Targeted therapies for renal cell carcinoma in Chinese patients: focus on everolimus [J]. *Oncol Targets Ther*, 2015, 8: 313-321.

[2] 种铁,牛建强,王子明,等. 苦参碱抑制人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株增殖和促凋亡的实验研究[J]. *中西医结合学报*, 2006, 4(4): 388-391.

[3] 张晓莉,赵富生,武庚,等. 红花多糖对小鼠 Lewis 肺癌移植瘤生长及转移的影响[J]. *国际免疫学杂志*, 2010, 33(6): 486-489.

[4] 李珊珊,金银萍,姚春林,等. 人参多糖的结构与活性

研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39 (24): 4709-4715.

[5] 王景春,刘蔚,杨瑞玲,等. 川芎多糖对人肝癌细胞 HepG2 增殖及凋亡的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(5): 461-464.

[6] Huang C F, Yang R S, Liu S H, et al. Evidence for improved neuropharmacological efficacy and decreased neurotoxicity in mice with traditional processing of *Arisaematis Rhizoma* [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39 (5): 981-998.

[7] 杨宗辉,尹建元,魏征人,等. 天南星提取物诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及其机制的实验研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2007, 27(2): 142-144.

[8] Chen G, Xu J, Miao X, et al. Characterization and antitumor activities of the water-soluble polysaccharide from *Arisaematis Rhizoma* [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(1): 67-72.

[9] 姜爽,李建睿,苑广信,等. 天南星多糖对荷瘤小鼠的抗肿瘤活性 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(18): 5183-5184.

[10] Kuo H S, Hsu F N, Chiang M C, et al. The role of Cdk5 in retinoic acid-induced apoptosis of cervical cancer cell line [J]. *Chin J Physiol*, 2009, 52(1): 23-30.

[11] 赵陈琛,顾康生. PI3K/Akt/mTOR 在表阿霉素抑制 Jurkat 细胞增殖和诱导凋亡中的作用 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2012, 17(9): 780-784.

[12] Zhao B, Li L, Liu J, et al. Exposure to perfluorooctane sulfonate in utero reduces testosterone production in rat fetal Leydig cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (1): e78888.

[13] Stewart D J, Chang D W, Ye Y, et al. Wnt signaling pathway pharmacogenetics in non-small cell lung cancer [J]. *Pharmacogenomics J*, 2014, 14(6): 509-22.

[14] 牛志宏,丁森森,高德轩,等. 肾癌组织 WISP-1 表达及其临床意义的探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(16): 1238-1241.

[责任编辑 周冰冰]