

冬凌草甲素诱导人肾癌 A-704 细胞凋亡及机制研究

顾浩¹, 张晶晶², 胡勇², 张孟伟¹, 樊锐太^{1*}

(1. 郑州大学第一附属医院, 郑州 450052; 2. 汉中市中心医院, 陕西 汉中 723000)

[摘要] 目的: 研究冬凌草甲素 (oridonin, Ori) 对人肾癌细胞的生长抑制、诱导凋亡作用及其机制。方法: MTT 法检测 Ori 对密度为 1×10^4 /mL 的人肾癌 A-704 细胞的生长抑制作用; 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测 Ori 作用于人肾癌 A-704 细胞 24 h 的细胞凋亡率; 实时监测聚合酶链反应 (Real-time PCR) 法检测 $32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori 作用人肾癌 A-704 细胞 24 h 后的 Bcl-2, Bax 及 Caspase-3 基因表达水平的变化。结果: Ori 可显著抑制人肾癌 A-704 细胞的生长, 并呈明显的时间-效应关系和浓度-效应关系, $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori 作用人肾癌 A-704 细胞 60 h 后抑制率为 73%。随着 Ori 作用浓度增加, 凋亡细胞数和坏死细胞数均增加, 浓度越高, 坏死细胞率增加越多, $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori 作用人肾癌 A-704 细胞 24 h 后, 坏死细胞升至 32.4%。随着 $32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori 作用时间延长, 人肾癌 A-704 细胞 Bax, Caspase-3 基因的表达逐渐增强, Bcl-2 基因的表达逐渐减弱 (P 均 < 0.05)。结论: Ori 通过上调 Bax 基因和降低 Bcl-2 基因表达诱导细胞凋亡, 从而抑制人肾癌 A-704 细胞的生长。

[关键词] 冬凌草甲素; 肾癌; 细胞凋亡; Bax; Caspase-3; Bcl-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)17-0250-04

Oridonin Induced Apoptosis of Human Kidney Carcinoma Cells and its Mechanism

GU Hao¹, ZHANG Jing-jing², HU Yong², ZHANG Meng-wei¹, FAN Rui-tai^{1*}

(1. Department of Oncology First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;
2. Central Hospital of Hanzhong, Hanzhong 723000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate apoptosis induction effects of oridonin (Ori) on human kidney carcinoma cells and its mechanisms *in vitro*. **Method:** The MTT assay was used to measure the inhibitory effects of oridonin at the concentration of 1×10^4 /mL on A-704 cells. The apoptosis rate of A-704 cells which were impacted by Ori for 24 hours was examined by Annexin V-FITC/PI staining of Flow cytometry with the increase of the concentration, the number of apoptotic cells and necrotic cells were increased, the higher the concentration, the more the ratio of necrotic cells increased expression of Bax, Caspase-3 and Bcl-2 of A-704 cells which were impacted by $32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oridonin for 24 hours were evaluated by Real-time PCR. **Result:** Ori could inhibit the growth of A-704 cells significantly in a time-dependent and dose-dependent manner. The inhibition rate of A-704 cells which were impacted by $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ oridonin for 24 hours could be reach 73%. With the concentration of Ori increased, the number of apoptotic and necrosis cells both increased. The higher concentration, the more rate of necrotic cells increased. The ratio of necrosis cells of A-704 cells which were impacted by $64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori for 24 hours could be reach 32.4%. Along with the extention of time, Bax and Caspase-3 expressions were up-regulated, Bcl-2 expression was down-regulated (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Ori can inhibit A-704 cells growth by induction of apoptosis in cells via activation of Caspase-3 as well as up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2 gene expression.

[Key words] oridonin; kidney carcinoma; apoptosis; Bax; Caspase-3; Bcl-2

[收稿日期] 20111118(002)

[第一作者] 顾浩, 主治医师, 从事恶性肿瘤的综合治疗, Tel: 0371-66295947, E-mail: 1262890621@qq.com

[通讯作者] * 樊锐太, 主任医师, 博士生导师, 从事肿瘤放化疗基础和临床研究, E-mail: 409898944@qq.com

近年来肾癌发病率有逐年上升的趋势^[1],因其临床症状出现较晚,一旦确诊即为晚期,丧失了手术治疗的最佳时机,免疫治疗及近年来发展起来的分子靶向治疗在一定程度上提高了晚期肾癌的治疗效果,但其不良反应及经济费用的昂贵都极大影响了疾病的预后。

冬凌草甲素 (oridonin, Ori) 是从中药冬凌草中提取出的一种四环二萜类化合物,其化学结构为 C₂₀H₂₆O₇。除早期研究发现的抗炎、抗菌等多种生物学效应外,近年人们又把焦点集中在它的抗肿瘤活性上^[2-4]。有研究表明,冬凌草甲素对多种组织来源的肿瘤细胞的增殖有抑制作用,如对 Bel-7402, NB49, MB4 等具有明显的抑制作用^[5-8],但其在肾癌中的应用尚未见报道。本实验以人肾癌 A-704 细胞为研究对象,应用 MTT 法、流式细胞仪和 Real-time PCR 法检测探讨 Ori 对人肾癌 A-704 细胞的诱导凋亡作用及其机制,为 Ori 临床治疗晚期肾癌提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞系 人肾癌 A-704 细胞,购自上海雅吉生物科技有限公司。

1.2 药物 Ori 购自西安旭煌生物技术有限公司(纯度 98%),以少量二甲基亚砜(DMSO)溶解后,用磷酸盐缓冲液(PBS)配成 2.5 μmol·L⁻¹的储存液,使用时用细胞培养液稀释,DMSO 终体积分数 < 0.01% (0.01% DMSO 对细胞增殖及分化无影响)。

1.3 试剂 MTT (美国, Sigma 公司), Annexin V-FITC 和碘化丙啶(PI)试剂盒(天津百浩生物科技有限公司),RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司),Real-time PCR 试剂盒,(大连宝生物有限公司),引物设计,上海博尚生物技术公司设计。

1.4 仪器 680 型酶标仪(美国伯乐公司),FACScan 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将人肾癌 A-704 细胞接种于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI-1640 培养液中,在 37 °C 5% CO₂、饱和湿度下培养,1~2 d 换液 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 细胞生长抑制率的测定 采用 MTT 法进行检测。取对数生长期的肾癌 A-704 细胞,用胰酶消化,调整细胞密度为 1 × 10⁴/mL,按每孔 200 μL 接种于 96 孔细胞培养板,使 Ori 最终浓度为 4, 8, 16, 32, 64 μmol·L⁻¹,每种药物浓度为 1 组,每组各设 5 个复孔,同时做空白肾癌 A-704 细胞对照孔,分别培养 12, 24, 36, 48, 60 h 后从培养箱中取出,然后每孔加入 MTT 20 μL (5 g·L⁻¹),再继续孵育 4 h 后终止培养,培养板水平离心,倒掉培养上清液,每孔加 150 μL DMSO,振荡混匀后用酶标仪检测波长 570 nm 条件下的吸光度(A),计算抑制率和半数抑制浓度 IC₅₀。

$$\text{细胞生长抑制率} = (\text{对照组 } A - \text{实验组 } A) / \text{对照组 } A \times 100\%$$

$$\text{半数抑制浓度 } IC_{50} = \log - 1 [X_m - i(\Sigma P - 0.5)]$$

重复 4 次,取平均值。其中 X_m:Ori 最大浓度的对数值;i:各浓度倍比浓度的对数值;ΣP:各组生长抑制率之和;0.5:经验常数。

2.3 细胞凋亡检测 采用 Annexin V-FITC/PI 双染色法:人肾癌 A-704 细胞接种于 6 孔板(5 × 10⁵ 个/孔),细胞培养箱培养 24 h;然后用 Ori (4, 8, 16, 32, 64 μmol·L⁻¹) 分别作用 24 h 后,用 PBS (pH 7.41) 冲洗细胞,胰酶消化,1 000 r·min⁻¹ (r = 22.5 cm) 离心 5 min,4 °C PBS 冲洗 2 遍,接着将细胞重悬于 200 μL 的缓冲液,分别加入 10 μL 的 Annexin V-FITC 和 PI,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,离心细胞混合液,取细胞沉淀涂片在 1 h 内上机检测,其中 0 μmol·L⁻¹为对照组。实验重复 3 次。

2.4 细胞总 RNA 抽提及实时监测聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 将人肾癌 A-704 细胞接种于 6 孔板上(5 × 10⁵ 个/孔),在细胞培养箱内培养 24 h,然后用 32 μmol·L⁻¹ Ori 分别作用 0, 6, 12, 24 h 后,按照 RNA 提取试剂盒和 Real time PCR 试剂盒说明提取 RNA 和进行实时监测聚合酶链式反应。反应条件为 94 °C 预变性 2 min,然后 94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 循环,后 72 °C 末延伸 10 min。引物序列见表 1。

表 1 聚合酶链式反应引物序列

基因	上游引物(5'-, -3')	下游引物(5'-, -3')	产物长度/bp
Bcl-2	GAACCATCATGGGCTGGACA	CCTTAATGTCACGCACGA	200
Bax	CCTTGGCATGAGATGCAGGA	CCACAAAAGATGGTCAACGGTCTG	132
Caspase-3	ATACTCCTCCATCAAATAG	AACATCACAAAACCATAATC	410

2.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较方法用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有显著差异。

3 结果

3.1 对人肾癌 A-704 细胞的生长抑制 4, 8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori 对细胞生长无明显的抑制作用, 16, 32, 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori 作用于人肾癌 A-704 细胞后,在同一

药物浓度时,随着时间的延长, Ori 对细胞的生长抑制显著增强,且差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。在同一作用时间点,随着药物浓度的增大, Ori 对细胞的生长抑制作用明显增强,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。即 Ori 对细胞的生长抑制作用具有明显的时间和剂量依赖性。冬凌草甲素作用于人肾癌 A-704 细胞的 IC_{50} 17.13 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

表 1 不同浓度 Ori 于不同作用时间对人肾癌 A-704 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	不同作用时间的抑制率/%				
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h
4	8 ± 0.23	8 ± 0.35	9 ± 0.78	9 ± 1.01	11 ± 0.37
8	8 ± 0.38	9 ± 0.81	10 ± 1.03	10 ± 0.37	16 ± 2.63
16	9 ± 0.58	20 ± 0.76	23 ± 3.05	28 ± 2.48	25 ± 3.40
32	12 ± 1.23	43 ± 2.56	52 ± 5.36	60 ± 6.23	59 ± 7.05
64	4 ± 0.94	65 ± 4.25	72 ± 4.19	75 ± 8.67	73 ± 5.83

3.2 细胞凋亡检测 16, 32, 64 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori 作用人肾癌 A-704 细胞 24 h 时,流式细胞检查结果见表 2,在相同药物浓度作用下,细胞凋亡率随时间延长而增加。在不同药物浓度作用下,随着 Ori 浓度的提高,死亡细胞总数、凋亡细胞数和坏死细胞数均逐渐增加,即 A-704 的凋亡细胞比率和坏死细胞比率均提高,与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$);且随着药物浓度的提高,凋亡细胞比例和坏死细胞的比例逐渐接近。见表 2。

表 3 32 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ori 作用不同时间各基因升高/下降倍数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

基因	作用时间/h		
	6	12	24
Bcl-2	↓ 0.58 ± 0.09 ¹⁾	↓ 0.40 ± 0.07 ¹⁾	↓ 0.29 ± 0.11 ¹⁾
Bax	↑ 2.10 ± 0.35 ¹⁾	↑ 2.41 ± 0.23 ¹⁾	↑ 3.01 ± 0.41 ¹⁾
Caspase-3	↑ 1.87 ± 0.27 ¹⁾	↑ 1.98 ± 0.42 ¹⁾	↑ 2.20 ± 0.35 ¹⁾
Bax/Bcl-2	↑ 4.62 ± 0.72 ¹⁾	↑ 6.05 ± 1.65 ¹⁾	↑ 11.4 ± 1.28 ¹⁾

表 2 不同浓度 Ori 作用 24 h 后对人肾癌 A-704 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡细胞 /%	坏死细胞 /%	死亡细胞 总比例/%
对照	0	1.30 ± 0.40	0.31 ± 0.30	1.70 ± 0.50
	16	25.3 ± 2.50 ²⁾	6.20 ± 1.80 ²⁾	33.3 ± 3.60 ²⁾
Ori	32	37.3 ± 6.10 ²⁾	22.1 ± 3.10 ²⁾	59.8 ± 5.20 ²⁾
	64	46.3 ± 5.90 ²⁾	32.4 ± 2.80 ²⁾	81.7 ± 4.90 ²⁾

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.3 人肾癌 A-704 细胞 Bcl-2, Bax 和 Caspase-3 基因表达的变化 Ori 能显著降低 A-704 细胞 Bcl-2 表达,升高 Bax 表达,从而升高 Bax/Bcl,同时升高 Caspase-3 的表达。呈现明显的时间-效应关系。见表 3。

4 讨论

Ori 具有广泛的生物活性,体外药理学研究显示, Ori 对常见的 20 多种人癌细胞株的生长有明显的抑制作用^[9-14]。但对肾癌的研究鲜有报道,本实验应用 MTT 法研究 Ori 对人肾癌 A-704 细胞的生长

抑制作用,结果表明, Ori 能够抑制人肾癌 A-704 细胞的生长,且具有明显的剂量和时间依赖性。

Annexin V 是一种相对分子质量为 35.8 KD 的 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,能与细胞凋亡过程中翻转到膜外的磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 特异结合。FITC-Annexin V 结合到凋亡细胞后,在蓝色光的激发下,发出绿色荧光,区分出凋亡细胞与正常细胞。碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 是一种核酸染料,它不能穿透完整细胞膜,但对凋亡晚期细胞和死细胞的破损细胞膜能够穿透,并使细胞核红染。将 Annexin V-FITC 与 PI 匹配使用,可以将凋亡早期的细胞和晚期的细胞区分开来。故本实验采用流式细胞术 AV-P I 双染色法检测了不同浓度 Ori 作用 24 h 后人肾癌 A-704 细胞株凋亡比率和坏死比率。结果发现,随着 Ori 浓度的增加,凋亡细胞比率和坏死细胞比率均有不同程度的升高,但二者之间的差值呈减小趋势,即坏死细胞比率随浓度增加的幅度较凋亡细胞比率增加的幅度大。表明低浓度时, Ori 主要诱发人肾癌 A-704 细胞凋亡,而高浓度

时诱发细胞坏死。提示:Ori 除主要诱发人肾癌 A-704 细胞的凋亡,尚有直接的细胞毒作用。

细胞凋亡作为一种有别于坏死的细胞死亡方式,最早于 1972 年由 Kerr 等人提出,是一个主动的、受多种基因调控、多种酶参与的复杂过程,涉及一系列信号传递系统的调节。Bcl-2 是目前发现的抗凋亡作用较强的基因之一,其抗凋亡的机制是通过形成 Bcl-2/Bcl-2 同源二聚体或者是形成 Bcl-2/Bax 异源二聚体的方式来抑制细胞凋亡^[15]。抗凋亡蛋白表达减少后,可使与其结合的 Bax 游离出来,组成寡聚体在线粒体外膜上形成孔道。线粒体来源的 caspase 激活物(如细胞色素 C 等)可由此通道释放放入细胞质,最终引起细胞凋亡^[16]。本研究结果表明,Ori 能够明显降低人肾癌 A-704 细胞 Bcl-2 的表达,升高 Bax 的表达,从而升高 Bax/Bcl-2 比值,同时 Caspase-3 的表达也出现相应的增加,由此推断,Ori 可能通过上调 Bax 和 Caspase-3,下调 Bcl-2 的基因表达诱导细胞的凋亡。

综上所述,Ori 能明显抑制人肾癌 A-704 细胞生长和诱导人肾癌 A-704 细胞凋亡,其机制可能与 Bax 基因表达的上调和 Bcl-2 基因表达的下调相关。

[参考文献]

- [1] 葛宏发,李慎勤. 泌尿外科疾病诊断和鉴别诊断 [M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2001:199.
- [2] Cui Q, Tashiro S, Onodera S, et al. Autophagy preceded apoptosis in Oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(5):859.
- [3] Hu H, Yang Y B, Xu X D, et al. Oridonin induces apoptosis via PI3K/Akt pathway in cervical carcinoma Hela cell line [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(11):1819.
- [4] Huang J, Wu L, Tashiro S, et al. Reactive oxygen species mediate Oridonin-induced HepG2 apoptosis through p53, MAPK, and mitochondrial signaling pathways[J]. Pharmacol Sci, 2008, 107(4):370.

- [5] 车宪平,韩瑞发,周晶,等. 冬凌草甲素诱导膀胱癌 MB49 细胞凋亡及机制研究[J]. 中草药, 2008, 29(8):1219.
- [6] 张俊峰,刘加军,陆敏强,等. 冬凌草甲素抑制人肝癌 BEL-7402 细胞生长及诱导细胞凋亡的机制研究[J]. 中草药, 2006, 37(10):1517.
- [7] 刘加军,黄仁魏,林东军,等. 冬凌草甲素对白血病 NB4 细胞的诱导凋亡作用(英文)[J]. 中草药, 2005, 36(8):1188.
- [8] 郭萍,李玉山,郭远强. 冬凌草化学成分和药理活性研究进展[J]. 药物评价研究, 2010, 33(2):144.
- [9] Chen J H, Wang S B, Chen D Y, et al. The inhibitory effect of oridonin on the growth of fifteen human cancer cell lines[J]. Chin J Clni Oncol, 2007, 4(1):403.
- [10] Liu J J, Wu X Y, Pan X L, et al. Anti-proliferation effect of oridonin on HL-60 cells and its mechanism[J]. Chin Med Sci J, 2004, 19(2):134.
- [11] Liu J J, Huang R W, Lin D J, et al. Anti-proliferation effects of oridonin on HPB-ALL cells and its mechanisms of action[J]. Am J Hematol, 2006, 81(2):86.
- [12] Ikezoe T, Chen S S, Tong X J, et al. Oridonin induces growth inhibition and apoptosis of a variety of human cancer cells[J]. Int J Oncol, 2003, 23(4):1187.
- [13] Zhang J F, Liu J J, Liu P Q, et al. Oridonin inhibits cell growth by induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells [J]. Hepatol Res, 2006, 35(2):104.
- [14] Chen S, Gao J, Halicka H D, et al. The cytostatic and cytotoxic effects of oridonin(Rubescenin), a diterpenoid from Rabdosiarubescens, on tumor cells of different lineage[J]. Int J Oncol, 2005, 26(3):579.
- [15] 冯晓帆,张立德. 补脾方药对大鼠脾细胞中 PKC, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):206.
- [16] Joslyn K, Brunell E, Anthony L. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family [J]. Cell Sci, 2009, 122(4):437.

[责任编辑 聂淑琴]