

非诺贝特抑制STAT3抗人肾透明细胞癌786-O细胞增殖及诱导凋亡的作用

刘桥发¹, 朱 能², 张婵娟^{1, 4}, 石雅宁^{1, 5}, 覃 丽^{1, 3, 6*}

1. 湖南中医药大学 药学院 干细胞中药调控与应用实验室, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学附属第一医院, 湖南 长沙 410208

3. 湖南中医药大学 药学院 药理学教研室, 湖南 长沙 410208

4. 湖南中医药大学 药学院 药剂学教研室, 湖南 长沙 410208

5. 湖南中医药大学 科技创新中心, 湖南 长沙 410208

6. 血管生物学与转化医学湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 探究非诺贝特抗肾透明细胞癌(ccRCC)的作用及潜在机制。方法 通过在线数据库 Swiss Target Prediction、Pharm Mapper、Target Net、Gene Cards、OMIM、TTD等分析非诺贝特、ccRCC和凋亡相关靶点, STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络并通过Cytoscape进行可视化, 采用Metascape平台进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 通过Auto Dock Tools和PyMOL软件进行分子对接。采用CCK-8法检测非诺贝特对人肾透明细胞癌786-O细胞株、人肾皮质近曲小管上皮细胞株(HK-2)活力的影响; 划痕实验、克隆形成实验和流式细胞术分别检测非诺贝特(50、75、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对786-O细胞迁移、增殖、细胞周期的影响; Hoechst33258染色和流式细胞术检测非诺贝特对786-O细胞凋亡的影响; Western blotting检测非诺贝特对786-O细胞信号转导与转录激活因子3(STAT3)、p-STAT3、B细胞淋巴瘤2蛋白(Bcl-2)、Bcl-2关联X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达的影响。结果 网络药理学分析获得非诺贝特、ccRCC和凋亡共同靶点108个, 按照网络拓扑分析结果中的度(degree)值筛选出主要核心靶点为STAT3、EGFR、MMP-9、PPARG、RELA、BCL2L; KEGG富集分析表明JAK2-STAT3信号通路在抗ccRCC中发挥重要作用; 分子对接结果显示非诺贝特与主要核心靶点STAT3、EGFR、MMP9、PPARG、RELA、BCL2L具有良好的结合活性。体外实验结果表明, 与对照组比较, 非诺贝特呈浓度和时间相关性抑制786-O和HK-2细胞的生长($P<0.01$ 、 0.001), 且对786-O细胞活力的抑制作用强于HK-2细胞; 可将786-O细胞周期阻滞在G₁期($P<0.001$); 显著抑制786-O细胞集落形成、迁移能力($P<0.01$ 、 0.001); 显著诱导786-O细胞凋亡($P<0.001$); 显著下调p-STAT和Bcl-2、上调Bax和Caspase-3蛋白表达($P<0.05$)。结论 非诺贝特可能通过下调STAT3抑制ccRCC细胞增殖迁移, 诱导凋亡, 进而发挥抗ccRCC的作用。

关键词: 非诺贝特; 肾透明细胞癌; 增殖; 凋亡; STAT3

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)12-2789-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.12.009

Effect of fenofibrate on proliferation and apoptosis of human renal transparency cell carcinoma 786-O cells by suppressing STAT3

LIU Qiaofa¹, ZHU Neng², ZHANG Chanjuan^{1, 4}, SHI Yaning^{1, 5}, QIN Li^{1, 3, 6}

1. Stem Cell Regulation and Application Laboratory of Traditional Chinese Medicine, School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Pharmacology Teaching and Research Section, School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

收稿日期: 2024-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82274159); 湖南省自然科学基金科药联合基金项目(2022JJ80088); 湖南省卫生健康委员会重点指导课题(202213055529); 湖南省自然科学基金青年项目(2023JJ40485); 湖南省教育厅优秀青年项目(23B0387、22B0355); 中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目(23PTKF1016); 药学一流学科开放基金项目(研究生创新性实验计划重点支持项目, 2021YX07); 湖南省药学一流学科资助项目

第一作者: 刘桥发, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤药理学。E-mail: 1393263419@qq.com***通信作者:** 覃 丽, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向为肿瘤、心血管疾病的发病机制及其中医药防治。E-mail: Lqin@hnuucm.edu.cn

4. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Pharmacy Teaching and Research Section, Changsha 410208, China

5. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

6. Key Laboratory of Vascular Biology and Translational Medicine of Hunan Provincial Universities, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To explore the role and potential mechanism of fenofibrate in the treatment of renal clear cell carcinoma (ccRCC). **Methods** The online databases such as Swiss Target Prediction, Pharm Mapper, Target Net, Gene Cards, OMIM, TTD were used to analyze the targets of fenofibrate, ccRCC and apoptosis. The STRING database was applied to construct a protein-protein interaction (PPI) network and visualized using Cytoscape. Molecular function (GO) and pathway (KEGG) enrichment analysis was performed using the Metascape platform, and Auto Dock Tools and PyMOL software were used for molecular docking. The CCK-8 method was used to detect the effect of fenofibrate on the viability of human renal clear cell carcinoma 786-O cell line and human renal cortical proximal tubular epithelial cell line (HK-2). Scratch assay, clone formation assay, and flow cytometry were used to detect the effects of fenofibrate (50, 75, and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the migration, proliferation, and cell cycle of 786-O cells, respectively. Hoechst33258 staining and flow cytometry were used to detect the effect of fenofibrate on the apoptosis level of 786-O cells. Western blotting was used to detect the effects of fenofibrate on the expression of signal transduction and transcription activator 3 (STAT3), p-STAT3, B-cell lymphoma 2 protein (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and Caspase-3 protein in 786-O cells. **Results** Network pharmacology analysis identified 108 common targets of fenofibrate, ccRCC and apoptosis. Based on the degree values in network topology analysis, the main core targets were selected as STAT3, EGFR, MMP-9, PPARG, RELA and BCL2L. KEGG enrichment analysis revealed that the JAK2-STAT3 signaling pathway played an important role in anti-ccRCC. The molecular docking results showed that fenofibrate had good binding activity with the main core targets STAT3, EGFR, MMP9, PPARG, RELA and BCL2L. The *in vitro* experimental results showed that compared with the control group, fenofibrate inhibited the growth of 786-O and HK-2 cells in a concentration - and time-dependent manner ($P < 0.01, 0.001$), and had a stronger inhibitory effect on the viability of 786-O cells than HK-2 cells, 786-O cell cycle could be arrested in G_1 phase ($P < 0.001$), significantly inhibited the colony formation and migration ability of 786-O cells ($P < 0.01, 0.001$), significantly induced apoptosis in 786-O cells ($P < 0.001$), significantly downregulated p-STAT and Bcl-2, upregulated Bax and Caspase-3 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** Fenofibrate inhibited the proliferation and migration of ccRCC cells, induced apoptosis, and exerted anti-ccRCC effect by downregulation of STAT3.

Key words: fenofibrate; clear cell renal cell carcinoma; proliferation; apoptosis; STAT3

肾细胞癌(RCC)是起源于肾小管上皮的恶性肿瘤,最常见的组织学类型是肾透明细胞癌(ccRCC),约占RCC的80%^[1-2]。局限性ccRCC可以行肾部分切除术、冷冻消融及主动监测治疗,约35%的患者术后会出现局部浸润或远处转移,最终需要全身系统性治疗。然而ccRCC患者对常规放化疗方法不敏感,且副作用和毒性较大^[2-4]。鉴于ccRCC的高发病率和高死亡率,以及目前缺乏有效治疗手段的情况,寻找有效且安全的防治药物对临床治疗具有重要意义。

ccRCC的发病与脂质紊乱密切相关,非诺贝特是第3代贝特类降脂药,自1975年上市使用以来,已在临床广泛应用于高胆固醇血症和高脂血症的治疗^[5]。此外,非诺贝特被证实具有预防糖尿病视网膜病变、糖尿病肾脏病变、糖尿病心肌病变,以及其他糖尿病微血管并发症的作用。最近的研究表明非诺贝特对肝癌、卵巢癌、乳腺癌、肺

癌、前列腺癌等具有抗肿瘤作用^[6-10]。非诺贝特可通过激活氧化应激反应,抑制雄激素受体表达水平,诱导细胞凋亡,从而发挥抑制雄激素依赖型前列腺癌细胞系LNCaP生长的作用^[11]。然而,非诺贝特抑制ccRCC的作用及机制仍需探讨。

网络药理学是一门新兴的研究手段,融合了分子药理学、网络分析和计算机等多学科知识,其在药物研究中具有大数据分析和高通量筛选的优势,能够基于大数据和组学构建药物-靶点-疾病网络模型,从而预测药物治疗疾病的潜在靶点^[12-13]。本研究应用网络药理学及体外细胞实验探讨非诺贝特对ccRCC细胞迁移、增殖和凋亡的影响,以及其对信号转导和转录活化因子3(STAT3)靶点的作用,以期揭示非诺贝特抗ccRCC的作用及其机制,为ccRCC的治疗提供潜在的策略,拓宽非诺贝特的临床应用范围。

1 材料

1.1 细胞株

人肾透明细胞癌 786-O 细胞株、人肾皮质近曲小管上皮细胞株(HK-2)均购自中国科学院细胞库。

1.2 药品及其试剂

非诺贝特(规格 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\times 1\text{ mL}$ in DMSO, 批号 63763)、顺铂(每瓶 100 mg, 批号 153593)均由美国 MCE 公司生产;RPMI 1640 基础培养基(批号 8123593)、CCK-8 试剂盒(CCK-8, 批号 01A230829)、细胞凋亡检测试剂盒(批号 061923230919)、细胞周期检测试剂盒(批号 012923230607)、0.1% 结晶紫染液(产品编号 WB06010)、Hoechst33258 染色液(产品编号 C1017)均购自上海碧云天生物公司;蛋白裂解液(批号 01408/22222)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 22923)均购自北京康为世纪生物科技有限公司;信号转导与转录激活因子-3(STAT3)抗体(批号 00081195), p-STAT3 抗体(批号 5500001948)购自爱博泰克公司;B 细胞淋巴瘤 2 蛋白(Bcl-2)抗体(批号 00126863)、Bcl-2 关联 X 蛋白(Bax)抗体(批号 00125468)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(批号 00088666)、 β -actin 抗体(批号 00130098)和兔二抗(批号 20000789)均购自武汉三鹰公司。

1.3 仪器

CO_2 培养箱、ST8R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DENLEY DRAGON Wellscan MK 多功能酶标仪(芬兰 Thermo 公司);CKX41 倒置显微镜、荧光倒置显微镜、蛋白电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);5200 荧光及化学发光成像系统(上海天能公司);BD Accuri™ C6 Plus 流式细胞仪(美国 BD 有限公司)。

2 方法

2.1 非诺贝特的相关靶点收集

通过 PubChem 数据库中检索非诺贝特的 Canonical SMILES 号, 导入 Swiss Target Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/index.php>)、Pharm Mapper (<https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>) 和 Target Net (<http://targetnet.scbdd.com/home/index/>) 中获得其相关靶点, 将收集的靶点导入 Uniprot 数据库进行基因标准化处理, 合并去重后得到非诺贝特潜在靶点。

2.2 ccRCC 和凋亡相关靶点收集

运用 Gene Cards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://omim.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/>)

等数据库检索 ccRCC 和凋亡相关靶点, 整合靶点将其导入 Uniprot 数据库进行基因标准化处理, 分别合并去重后得到 ccRCC 和凋亡核心靶点。

2.3 核心靶点筛选及其蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建

将非诺贝特、ccRCC 和凋亡相关靶点取交集做 Venn 图, 获得 3 者的共有靶点, 将共有靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络, 并使用 Cytoscape 进行可视化。

2.4 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析

将交集基因导入 Metascape (<https://metascape.org>) 数据库, 限定物种为 Homo sapiens, 进行 GO 和 KEGG 富集分析, GO 富集分析包括生物过程(BP)、细胞成分(CC)和分子功能(MF)。

2.5 分子对接验证

分子对接主要用于预测小分子与靶蛋白的结合位点及其结合能, 并评估小分子与结合位点的结合亲和力, 结合能量越低表示小分子与靶蛋白结合越稳定, 效果越好^[14]。在 PubChem 数据库中下载非诺贝特小分子的 3D 结构的 SDF 文件, 在 Auto Dock Tools 软件中进行处理及输出为 PDBQT 文件格式。在 PDB 在线蛋白质数据库下载核心靶点的蛋白质 pdb 文件, 利用 Auto Dock Tools 和 PyMOL 软件进行蛋白质加氢加电荷前处理和预测对接口袋, 最后将对接结果进行可视化。

2.6 细胞活力测定实验

将处于对数生长期的 786-O 和 HK-2 细胞消化下来用血球计数板计数, 分别以每孔 8×10^3 个的浓度接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后分别给予 25、50、75、100、125、150、175、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的非诺贝特处理 24、48 h, 对照组不给药。去除培养基加入含 10% 的 CCK-8 试剂的培养基于培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞活力和半数抑制浓度(IC_{50})。

2.7 细胞克隆形成实验

将 786-O 细胞以每孔 1×10^3 个接种于 6 孔板中, 分别给予 50、75、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的非诺贝特和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的顺铂, 对照组不给药。2 d 换 1 次培养基, 培养 1~2 周, 至单个细胞繁殖至肉眼可见的细胞团, 倒掉培养基用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次, 用 4% 的多聚甲醛固定 0.5 h, 固定结束用 PBS 清洗 2 次, 加入 0.1% 的结晶紫染液染色 0.5 h, 用 PBS 清洗结晶紫后即可在显微镜下拍照统计。

2.8 细胞迁移实验

将786-O细胞以每孔 1×10^6 个接种于6孔板中,培养48 h,在6孔板中间进行划痕,再给予50、75、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的非诺贝特和10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的顺铂,对照组不给药。分别于培养0、6、12、24 h进行拍照。

2.9 流式细胞术检测细胞周期和凋亡

将786-O细胞以每孔 1×10^6 个接种于6孔板中,培养24 h,给予50、75、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的非诺贝特处理24 h,对照组不给药。收集上清液培养基于离心管中,将6孔板中的细胞用胰酶消化下来和上清液中的细胞合并,在 $1\,000 \times g$ 离心条件下离心3 min得到细胞,细胞用预冷的PBS清洗3次,然后进行固定和染色即可进行上机检测。

2.10 Hoechst 33258染色实验

细胞接种、分组及给药方式同“2.9”项,用PBS洗涤细胞2次,加入Hoechst 33258染色液于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20~30 min,孵育完成后弃掉染色液,用PBS再清洗细胞3次,在荧光显微镜下拍照。

2.11 Western blotting 法检测 STAT3、STAT3、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达

细胞接种、分组及给药方式同“2.9”项,收集细胞,用RIPA裂解液在冰上裂解0.5 h,在冷冻离心机 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min取上清液即为总蛋白,用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度,配平蛋白浓度。取20 μg 蛋白进行蛋白上样电泳,转膜1.5 h将蛋白转印于PVDF膜上,5%的脱脂牛奶封闭2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜,TBST洗膜10 min $\times$ 3次,二抗孵育1 h,TBST洗膜10 min $\times$ 3次,进行曝光。曝光所得蛋白条带结果用Image J对其进行灰度统计。

2.12 统计学分析

所有实验结果均采用GraphPad Prism软件进行统计分析,计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析比较各组实验数据的差异。

3 结果

3.1 非诺贝特诱导凋亡抗ccRCC关键靶点筛选

在Swiss Target Prediction、Pharm Mapper和Target Net等数据库获取非诺贝特的靶点,去除重复值后共获得473个相关靶点。在Gene Cards、OMIM、TTD等数据库获取ccRCC和凋亡相关靶点,去重及标准化后分别得到4 439和2 860个,将3者靶点做Venn图得到共有靶点108个(图1)。

3.2 PPI网络构建与核心靶点的筛选

为进一步研究非诺贝特治疗ccRCC的作用机

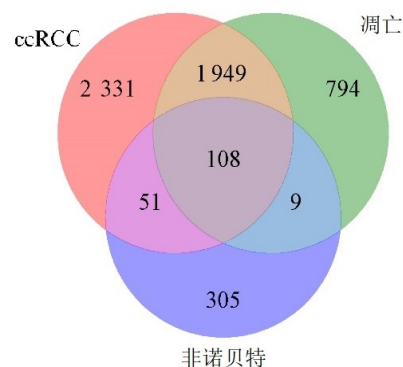


图1 非诺贝特、ccRCC与凋亡交集基因 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of intersection genes of fenofibrate, ccRCC and apoptosis

制,将108个共有靶点导入STRING在线数据库进行PPI网络可视化,将数据导入Cytoscape工具根据相关度筛选出核心靶点(图2),该网络共有107个节点,767条边。根据度(Degree)值排名前10的核心基因,主要核心靶点有STAT3、EGFR、MMP9、PPARG、RELA、BCL2L1和JAK2(图3)。

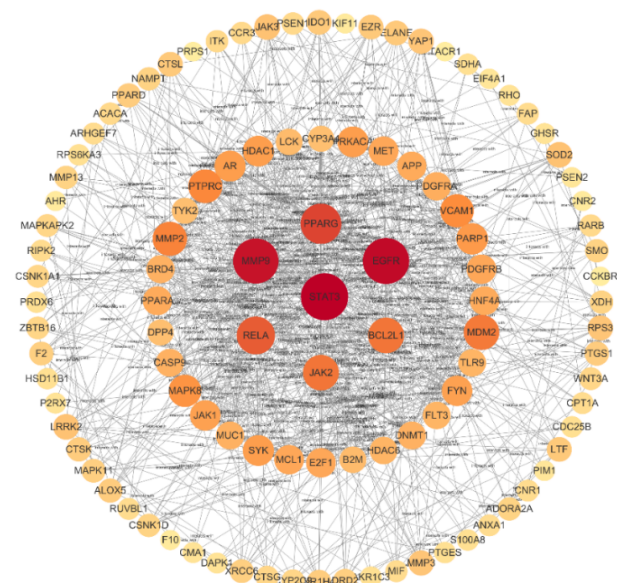


图2 非诺贝特干预ccRCC的靶点PPI网络图

Fig. 2 Fenofibrate for ccRCC target PPI network map

3.3 GO和KEGG富集分析

将交集基因通过Metascape数据库进行GO和KEGG富集分析,并以 $P < 0.01$ 作为条件,筛选分析结果,最终GO功能共获得1 526条,其中BP 1 309条,CC 102条,MF 115条,分别选取其前10的条目通过作图可视化(图4)。KEGG富集分析共得到144条通路,筛选出前10条通路进行可视化(图5),结果表明靶点主要富集在脂质代谢、miRNA、蛋白多糖和JAK-STAT信号通路等。

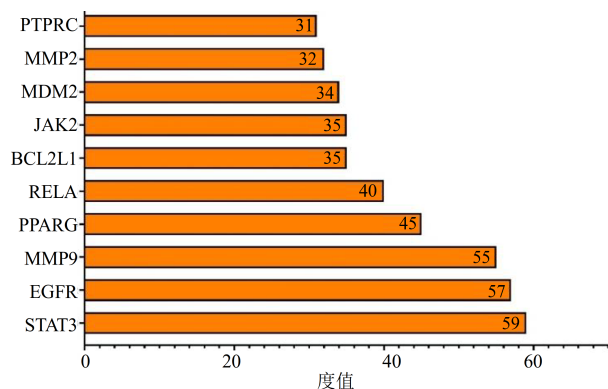


图3 非诺贝特干预ccRCC的PPI网络核心靶点分析
Fig. 3 Analysis of the core targets of PPI network in ccRCC intervention with fenofibrate

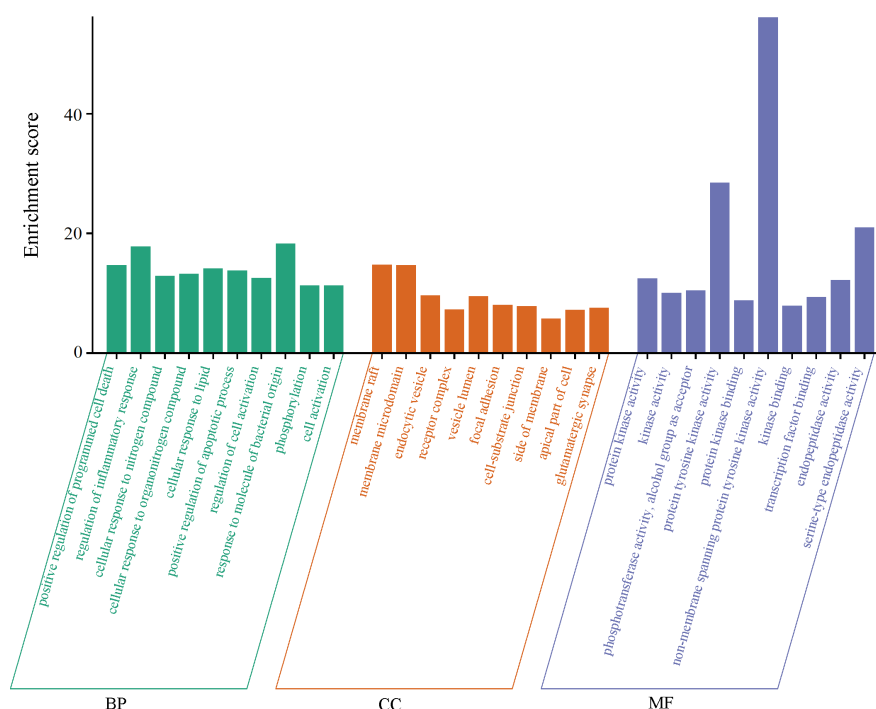


图4 非诺贝特干预ccRCC靶点的GO富集分析
Fig. 4 GO enrichment analysis of ccRCC targets intervened by fenofibrate

如表2所示, 100~200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非诺贝特对786-O细胞活力的抑制作用强于HK-2细胞, 说明非诺贝特($>100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对ccRCC细胞具有较强的选择性杀伤作用, 选用50、75、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非诺贝特进行后续细胞实验。

3.6 非诺贝特阻滞细胞周期和集落形成能力

与对照组比较, 非诺贝特75、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 G_1 期百分率显著增加($P<0.001$), 表明非诺贝特可将786-O细胞周期阻滞在 G_1 期(图8-A)。克隆形成实验结果显示, 与对照组比较, 非诺贝特显著抑制786-O细胞集落形成能力(图8-B, $P<0.01$ 、 0.001)。结果表明, 非诺贝特通过阻滞细胞周期, 抑制

3.4 非诺贝特与核心靶点结合能力预测

通过分子对接预测非诺贝特与核心靶点STAT3、EGFR、MMP9、PPARG、RELA、BCL2L1的结合能力, 结果如图6及表1所示, 非诺贝特与6个关键靶点均有较强的结合能力(对接结合能小于 $-20.92 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), 氢键是其结合的主要作用力, 且非诺贝特与JAK-STAT信号通路中的STAT3靶点也有较强的结合能力。

3.5 非诺贝特抑制ccRCC和HK-2细胞的生长

与对照组比较, 非诺贝特呈浓度和时间相关性抑制786-O和HK-2细胞的生长(图7), 大于100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组均差异显著($P<0.01$ 、 0.001); 24 h和48 h的 IC_{50}

ccRCC细胞增殖而发挥抗肿瘤作用。

3.7 非诺贝特抑制ccRCC细胞迁移实验

划痕实验结果(图9)表明, 与对照组比较, 非诺贝特干预24 h可显著抑制786-O细胞迁移($P<0.001$)。

3.8 非诺贝特对ccRCC细胞凋亡的影响

Hoechst 33258染色结果(图10-A)显示, 与对照组比较, 非诺贝特显著增加786-O细胞中核致密浓染和碎块状细胞的数量, 提示非诺贝特可促进ccRCC细胞凋亡。流式细胞术结果(图10-B)显示, 与对照组比较, 非诺贝特组786-O细胞凋亡率显著增加($P<0.001$), 其中100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率增

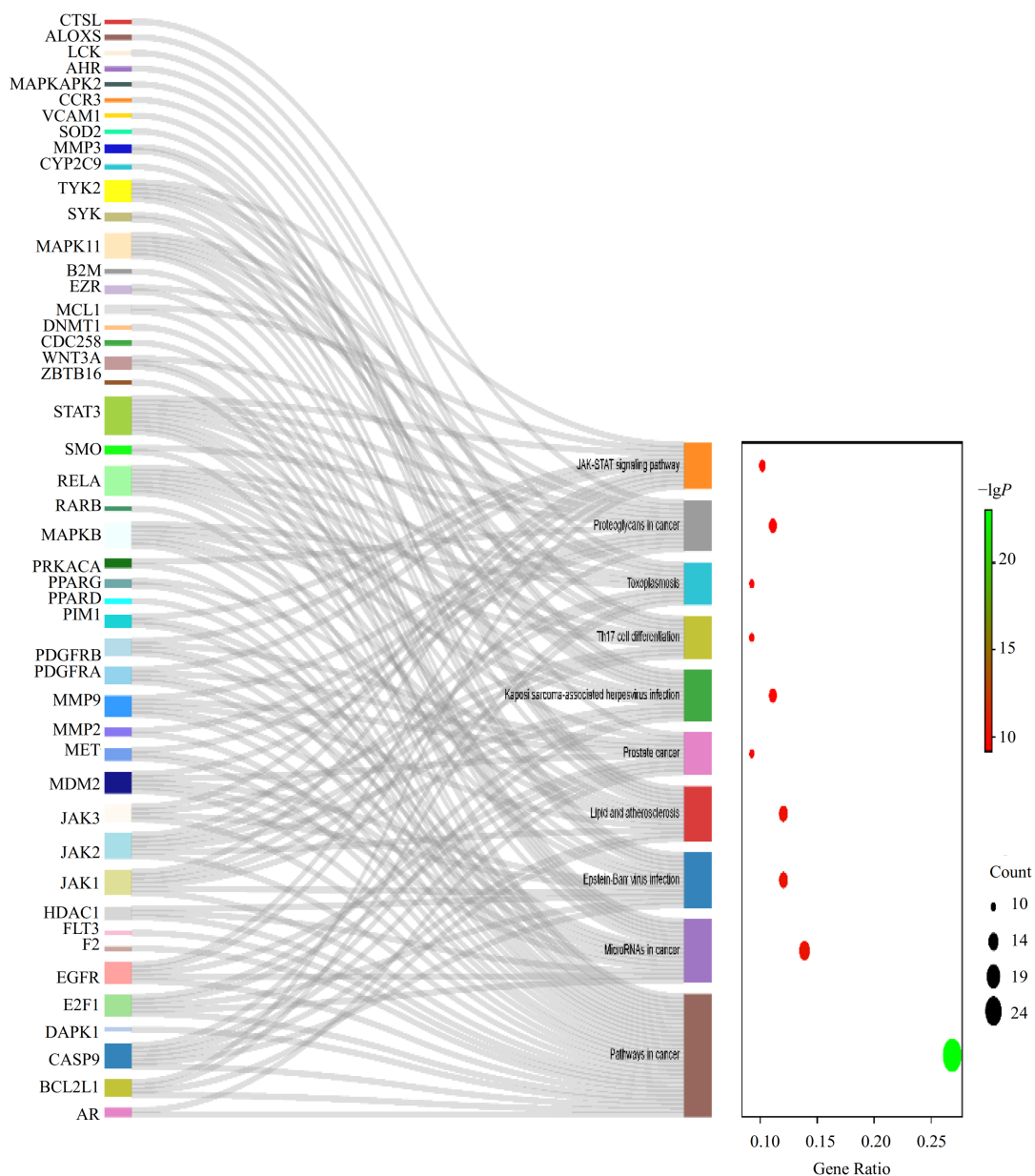


图5 非诺贝特干预ccRCC靶点的KEGG通路富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of KEGG pathway in ccRCC targets intervened by fenofibrate

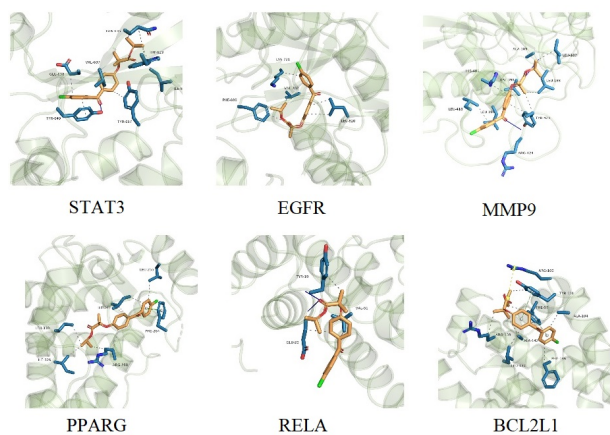


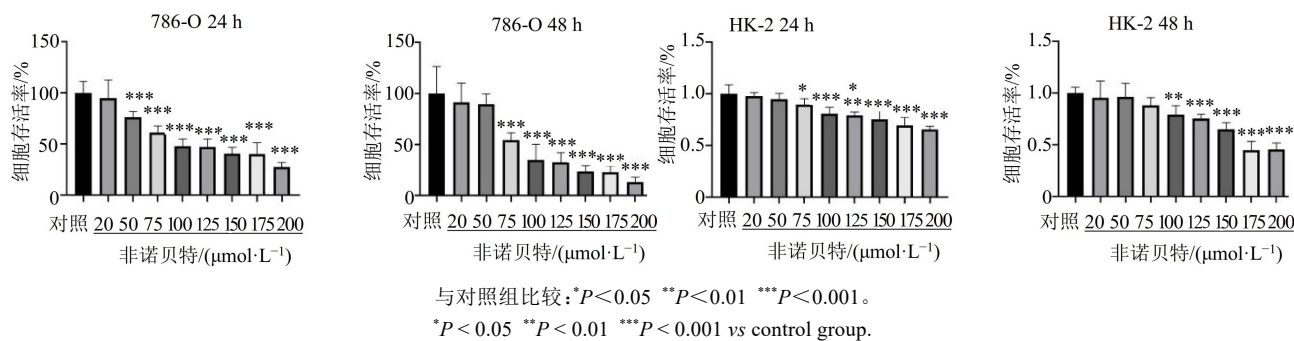
图6 非诺贝特与核心靶点的分子对接

Fig. 6 Molecular docking of fenofibrate and core targets

表1 非诺贝特与核心靶点蛋白分子对接结果

Table 1 Molecular docking results of fenofibrate and core target proteins

靶点(PDB 编号)	结合能(kcal·mol ⁻¹)
STAT3(6NJS)	-6.1
EGFR(1M17)	-7.8
MMP9(2OVX)	-9.1
PPARG(1KUN)	-8.9
RELA(6QHL)	-5.4
BCL2L1(3QKD)	-7.9

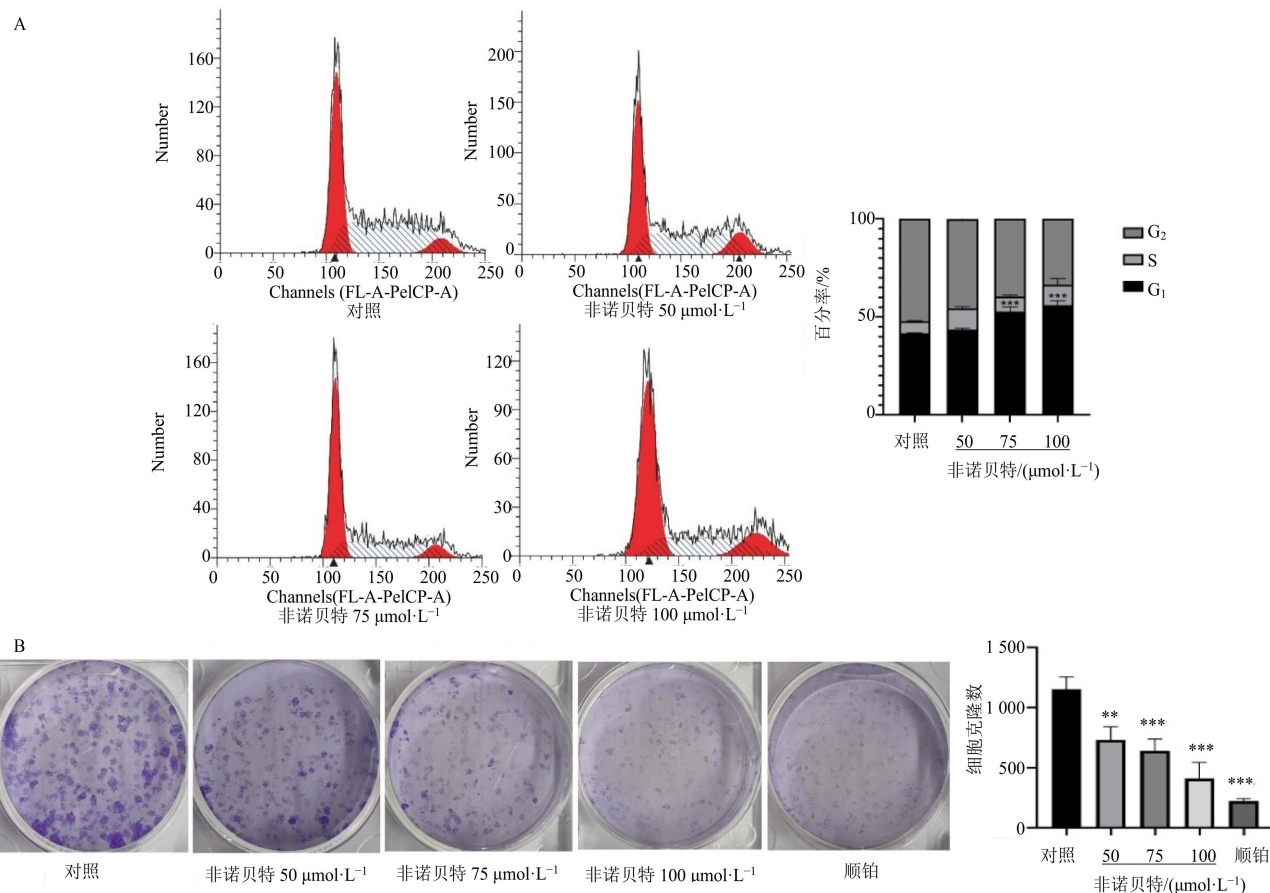
图7 非诺贝特抑制786-O和HK-2细胞生长($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 7 Fenofibrate inhibited growth of 786-O and HK-2 cells *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)表2 非诺贝特处理786-O和HK-2细胞的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 IC_{50} of 786-O and HK-2 cells treated by fenofibrate ($\bar{x} \pm s, n=3$)

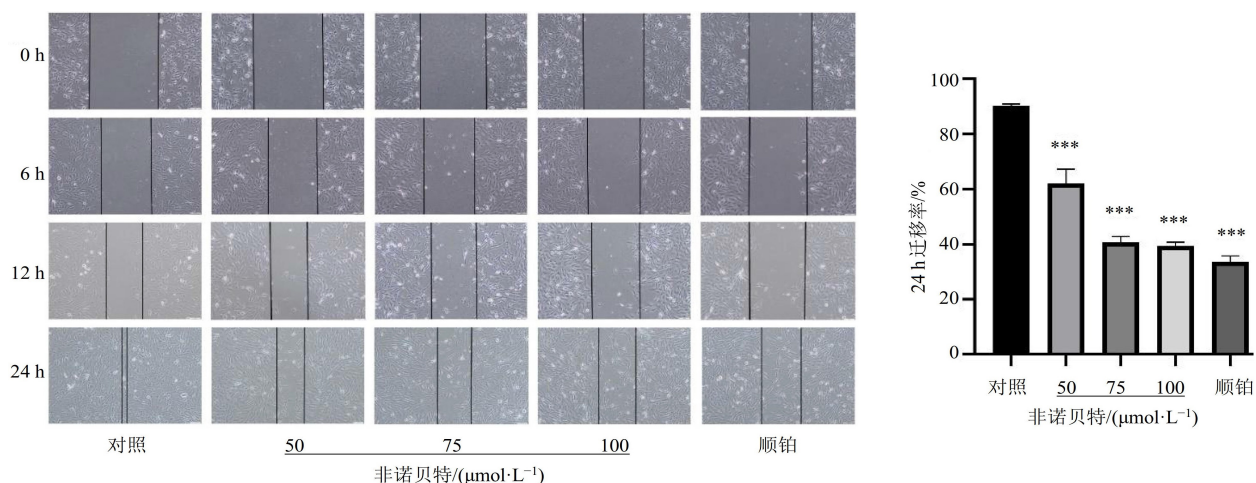
t/h	$IC_{50}/(\mu mol \cdot L^{-1})$	
	786-O	HK-2
24	110.56 ± 13.92	280.63 ± 12.67
48	86.30 ± 28.19	163.79 ± 11.82

加了27%。

3.9 非诺贝特对STAT3、p-STAT3、Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白水平的影响

如图11所示,与对照组比较,100 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 非诺贝特显著下调p-STAT和Bcl-2、上调Bax和Caspase-3蛋白表达($P < 0.05$)。结果表明非诺贝特通过抑制STAT3,诱导786-O细胞凋亡发挥抗ccRCC作用。

图8 非诺贝特对786-O细胞周期和增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 8 Effects of fenofibrate on cell cycle and proliferation of 786-O cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

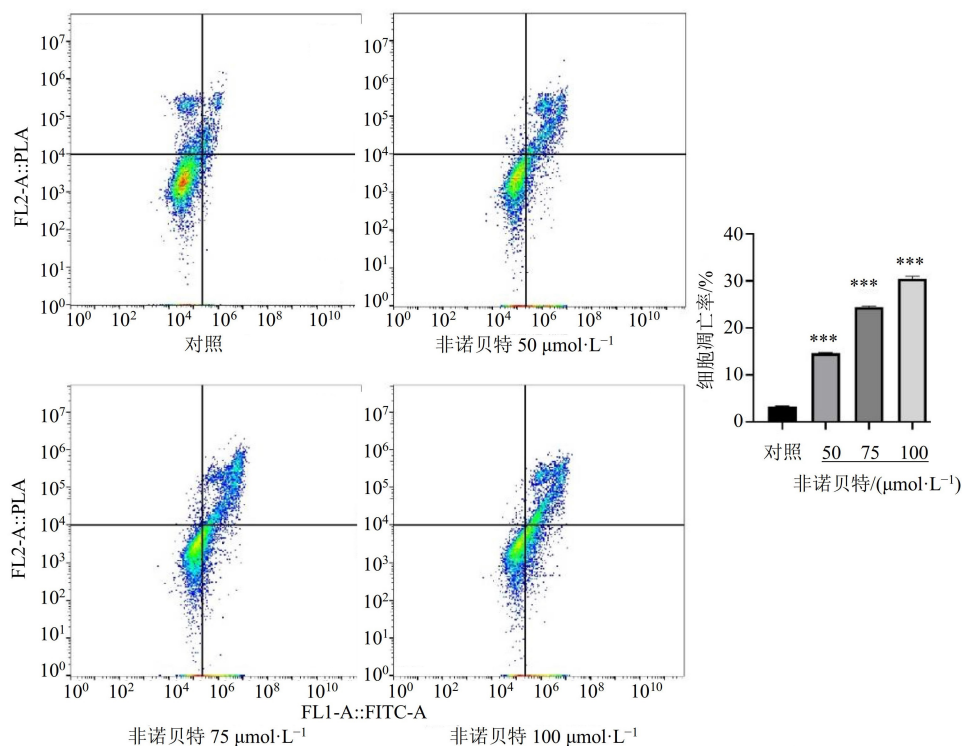
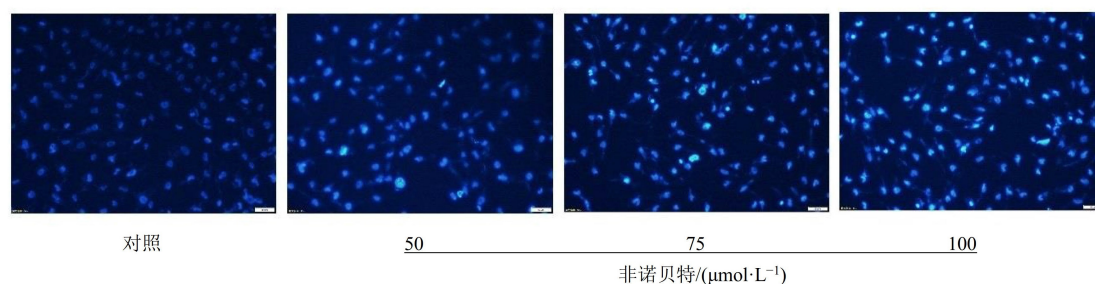


与对照组比较:*** $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group.

图9 非诺贝特对786-O细胞迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 9 Effects of fenofibrate on 786-O cell migration ($\bar{x}\pm s, n=3$)



与对照组比较:*** $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group.

图10 非诺贝特对786-O细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 10 Effects of fenofibrate on 786-O cell apoptosis ($\bar{x}\pm s, n=3$)

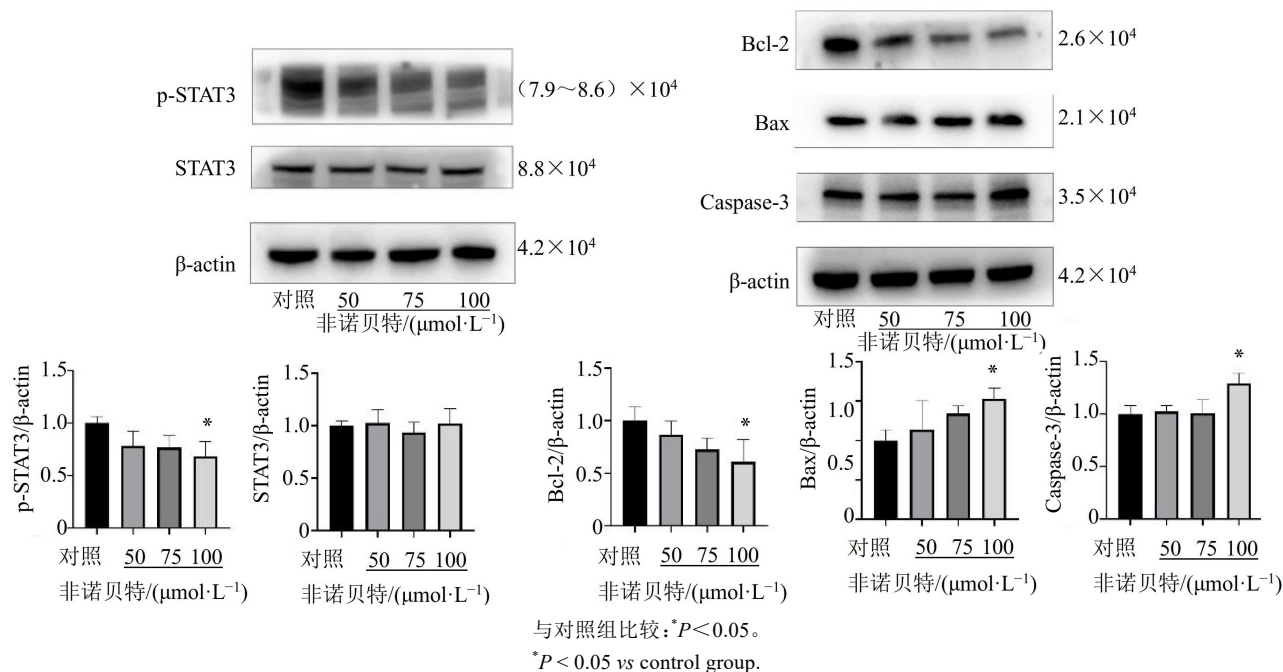


图11 非诺贝特对786-O细胞STAT3、p-STAT3、Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Effect of fenofibrate on protein expression levels of STAT3, p-STAT3, Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

文献报道非诺贝特通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期,抑制肿瘤细胞侵袭迁移,发挥抑制肝癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌和胶质母细胞瘤等多种类型肿瘤的作用^[6-7,9-10,15]。然而其对ccRCC的抗肿瘤作用尚未见文献报道。本研究通过在线数据库获得非诺贝特、ccRCC与凋亡相关靶点,取其交集获得核心靶点108个,采用PPI网络分析和KEGG通路富集分析得出非诺贝特抗ccRCC的关键靶点STAT3等,发现STAT3是非诺贝特诱导凋亡发挥抗ccRCC作用的潜在靶点。

非诺贝特诱导ccRCC细胞凋亡的核心靶点有STAT3、EGFR、MMP9、PPARG、RELA、BCL2L1和JAK2。STAT3是最常见的转录因子之一,参与细胞生长、凋亡和血管生成等过程^[16-17]。STAT3的激活可上调ccRCC细胞抗凋亡蛋白Bcl-2和周期调节因子细胞周期蛋白D1基因(CCDN1)的表达^[18]。表皮生长因子受体(EGFR)在肿瘤中过度表达,其可能是ccRCC的潜在预后生物标志物和新治疗靶点^[19]。研究表明基质金属蛋白酶9(MMP-9)可通过调节ccRCC中肿瘤免疫浸润促进肿瘤进展^[20]。过氧化物酶体增生激活受体 γ (PPARG)在葡萄糖代谢和脂质稳态中起着关键作用,可通过参与免疫过程在ccRCC中发挥重要作用^[21-22]。P65是NF- κ B家族成员之一,参与肿瘤的发生和凋亡、细胞生长分化等

多种生物学过程,在ccRCC肿瘤组织中高表达,可能是ccRCC治疗的分子靶点^[23-24]。GO富集分析结果表明BP主要涉及程序性细胞死亡调节、炎症反应的调节等,CC主要涉及膜筏、膜微区、内细胞囊泡、受体复合体等,MF主要涉及蛋白激酶活性、激酶活性等。KEGG通路富集结果显示JAK2-STAT3信号通路在非诺贝特抗ccRCC中发挥重要作用,在细胞增殖、凋亡、侵袭迁移和免疫应答等活动中起着重要的作用^[25]。此外,在ccRCC中抑制JAK2-STAT3信号通路可诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用^[26-28]。因为非诺贝特干预ccRCC靶点PPI网络图中STAT3的degree值最大排名第一,提示STAT3为非诺贝特诱导ccRCC凋亡最相关的核心靶点。分子对接同时验证了非诺贝特与STAT3等核心靶点的亲和能力较强,且通过体外细胞实验也进一步验证了该靶点在诱导ccRCC凋亡中的关键作用,初步证实本研究网络药理学预测的可行性,表明STAT3在非诺贝特抗ccRCC中发挥着重要作用。

研究表明非诺贝特能够阻滞血管肉瘤和头颈部鳞状细胞癌细胞周期发挥抗增殖作用^[29-30]。本研究也发现了非诺贝特呈时间和剂量相关性抑制786-O和HK-2细胞增殖活性,且明显抑制786-O细胞的迁移能力,其抑制效果与顺铂的效果相近。非诺贝特可将786-O细胞的细胞周期阻滞在G₁期发挥抗ccRCC增殖作用。研究表明STAT3的丝氨酸

727(S727)磷酸化可促进ccRCC细胞的侵袭性,且其磷酸化与ccRCC患者的总生存率呈负相关性^[31-32]。本研究也发现非诺贝特可显著抑制STAT3的磷酸化,下调Bcl-2,上调Bax和Caspase-3,并且显著诱导凋亡,提示非诺贝特可抑制ccRCC细胞增殖迁移、诱导其凋亡。

现有研究已发现非诺贝特可通过影响活性氧(ROS)、核因子- κ B(NF- κ B)、苏氨酸蛋白激酶(AKT)和AMP依赖的蛋白激酶(AMPK)等途径发挥对肝癌、乳腺癌、前列腺癌和胶质母细胞瘤等的抗肿瘤作用。但尚无文献报道其在肾癌中的研究,对ccRCC的抗肿瘤效果目前也尚不清楚。本研究首次发现非诺贝特可能通过抑制STAT3磷酸化,诱导凋亡,抑制细胞增殖和迁移,发挥抗ccRCC作用。本研究为拓展非诺贝特新药理作用提供参考,同时也为抗ccRCC提供了潜在的防治策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xu S X, Liu D Z, Chang T H, et al. Cuproptosis-associated lncRNA establishes new prognostic profile and predicts immunotherapy response in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Front Genet*, 2022, 13: 938259.
- [2] Zhang C J, Zhu N, Long J, et al. Celastrol induces lipophagy via the LXR α /ABCA1 pathway in clear cell renal cell carcinoma [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(9): 1472-1485.
- [3] Krishna C, DiNatale R G, Kuo F S, et al. Single-cell sequencing links multiregional immune landscapes and tissue-resident T cells in ccRCC to tumor topology and therapy efficacy [J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(5): 662-677.e6.
- [4] Hsieh J J, Purdue M P, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17009.
- [5] 李建军, 石文娜. 依折麦布联合非诺贝特治疗混合型高脂血症及颈动脉斑块的临床疗效及安全性 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(4): 720-722.
Li J J, Shi W N. Clinical efficacy and safety of ezetimibe combined with fenofibrate in the treatment of mixed hyperlipidemia and carotid plaque [J]. *Chin J Gerontol*, 2020, 40(4): 720-722.
- [6] You B J, Hour M J, Chen L Y, et al. Fenofibrate induces human hepatoma Hep3B cells apoptosis and necroptosis through inhibition of thioesterase domain of fatty acid synthase [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3306.
- [7] Wang H, He C H, Bai L P, et al. Effects of fenofibrate on the growth and migration of ovarian cancer cells *in vitro* [J]. *J Sichuan Univ Med Sci Ed*, 2014, 45(5): 789-792.
- [8] Li T, Zhang Q L, Zhang J, et al. Fenofibrate induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells via activation of NF- κ B pathway [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 96.
- [9] Wang M S, Han Q S, Jia Z R, et al. PPAR α agonist fenofibrate relieves acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer by promoting apoptosis via PPAR α /AMPK/AKT/FoxO1 pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(1): 167-176.
- [10] Lian X, Gu J L, Gao B S, et al. Fenofibrate inhibits mTOR-p70S6K signaling and simultaneously induces cell death in human prostate cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(1): 70-75.
- [11] Lian X, Wang G, Zhou H L, et al. Anticancer properties of fenofibrate: A repurposing use [J]. *J Cancer*, 2018, 9(9): 1527-1537.
- [12] 聂绍燕, 范苏苏, 朱钰珊, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨喜炎平注射液防治急性肺损伤的机制 [J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(6): 1165-1171.
Nie S Y, Fan S S, Zhu Y S, et al. Mechanism of Xiyanping injection in treatment of acute lung injury using network pharmacology and molecular docking analysis [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(6): 1165-1171.
- [13] 周吉, 郭振宇, 李浩颖, 等. 基于网络药理学和分子对接的鼓槌石斛素治疗宫颈癌作用机制探讨及实验验证 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(5): 959-970.
Zhou J, Guo Z Y, Li H Y, et al. Exploring mechanism of action and experimental validation of chrysotoxine against cervical cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Drug Eval Res*, 2024, 47(5): 959-970.
- [14] Song S Y, Wen F, Gu S P, et al. Network pharmacology study and experimental validation of Yiqi Huayu Decoction inducing ferroptosis in gastric cancer [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 820059.
- [15] Lin C, Lai S W, Shen C K, et al. Fenofibrate inhibits hypoxia-inducible factor-1 α and carbonic anhydrase expression through activation of AMP-activated protein kinase/HO-1/Sirt1 pathway in glioblastoma cells [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(12): 2551-2561.
- [16] Kim C, Baek S H, Um J Y, et al. Resveratrol attenuates constitutive STAT3 and STAT5 activation through induction of PTP ϵ and SHP-2 tyrosine phosphatases and potentiates sorafenib-induced apoptosis in renal cell carcinoma [J]. *BMC Nephrol*, 2016, 17: 19.
- [17] Beebe J D, Liu J Y, Zhang J T. Two decades of research

- in discovery of anticancer drugs targeting STAT3, how close are we? [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 191: 74-91.
- [18] Fathi N, Rashidi G, Khodadadi A, et al. STAT3 and apoptosis challenges in cancer [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 993-1001.
- [19] Singh D, Attri B K, Gill R K, et al. Review on EGFR inhibitors: Critical updates [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(14): 1134-1166.
- [20] Guo L Y, An T, Zhou H B, et al. MMP9 and TYROBP affect the survival of circulating tumor cells in clear cell renal cell carcinoma by adapting to tumor immune microenvironment [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 6982.
- [21] Wu Y F, Song T, Liu M W, et al. *PPARG* negatively modulates *Six2* in tumor formation of clear cell renal cell carcinoma [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38(7): 700-707.
- [22] 郭鑫, 宗欢欢, 李杜达, 等. *PPAR γ* 在肿瘤中的双重作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(2): 460-468.
- Guo X, Zong H H, Li D D, et al. The dual role of *PPAR γ* in tumors [J]. *Chin J Cell Biol*, 2021, 43(2): 460-468.
- [23] Ren C E, Han X, Lu C, et al. Ubiquitination of NF- κ B p65 by FBXW2 suppresses breast cancer stemness, tumorigenesis, and paclitaxel resistance [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(2): 381-392.
- [24] Djordjević G, Matusan-Ilijas K, Sinozić E, et al. Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor-kappaB in renal cell tumors [J]. *Croat Med J*, 2008, 49(5): 608-617.
- [25] Jin Y, Kang Y L, Wang M H, et al. Targeting polarized phenotype of microglia *via* IL6/JAK2/STAT3 signaling to reduce NSCLC brain metastasis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 52.
- [26] Zhou W B, Bi X J, Gao G J, et al. miRNA-133b and miRNA-135a induce apoptosis *via* the JAK2/STAT3 signaling pathway in human renal carcinoma cells [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2016, 84: 722-729.
- [27] Chae I G, Song N Y, Kim D H, et al. Thymoquinone induces apoptosis of human renal carcinoma Caki-1 cells by inhibiting JAK2/STAT3 through pro-oxidant effect [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 139: 111253.
- [28] Banerjee K, Resat H. Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review [J]. *Int J Cancer*, 2016, 138(11): 2570-2578.
- [29] Majeed Y, Upadhyay R, Alhousseiny S, et al. Potent and *PPAR α* -independent anti-proliferative action of the hypolipidemic drug fenofibrate in VEGF-dependent angiosarcomas *in vitro* [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6316.
- [30] Liu J, Ge Y Y, Zhu H C, et al. Fenofibrate increases radiosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma *via* inducing G2/M arrest and apoptosis [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(16): 6649-6655.
- [31] Arévalo J, Campoy I, Durán M, et al. STAT3 phosphorylation at serine 727 activates specific genetic programs and promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) aggressiveness [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 19552.
- [32] Arévalo J, Lorente D, Trilla E, et al. Nuclear and cytosolic pS727-STAT3 levels correlate with overall survival of patients affected by clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 6957.

[责任编辑 兰新新]