

马齿苋酰胺 E 干预肾癌的作用机制研究

陈盛烨, 黄 航, 叶挺宇, 潘 悦

温州医科大学第一附属医院 泌尿外科, 浙江 温州 325035

摘 要: 目的 探讨马齿苋酰胺 E 对人肾癌 786-O 细胞增殖、迁移和侵袭的作用及机制。方法 体外培养 786-O 细胞, 给予马齿苋酰胺 E (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 进行干预, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况; 采用划痕实验检测细胞迁移能力; 采用 Transwell 小室法检测细胞侵袭能力; 采用 AO/EB 试剂盒检测细胞凋亡率。建立裸鼠移植瘤肾癌模型, 给予马齿苋酰胺 E (3、15 mg/kg) 进行干预, 测定各组裸鼠肿瘤质量及体积, 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察肿瘤组织病理变化; 采用 Western blotting 法检测 786-O 细胞和荷瘤裸鼠肿瘤组织中细胞增殖标志物如 Ki67、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 及凋亡标志物如活化半胱氨酸蛋白酶-3 (Cleaved Caspase-3)、Cleaved Caspase-9 及侵袭相关蛋白如基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、MMP-9 及希佩尔-林道抑癌基因 (Von Hippel-Lindau, VHL)/缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 通路相关蛋白 VHL、HIF-1 α 的表达情况。结果 马齿苋酰胺 E 显著抑制 786-O 细胞活力 ($P < 0.05$ 、0.01), 下调 Ki67、PCNA 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01); 明显促进 786-O 细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、0.01), 上调 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01); 有效改善 786-O 细胞迁移与侵袭能力 ($P < 0.05$ 、0.01), 显著降低 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01); 显著上调 VHL 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01) 并显著下调 HIF-1 α 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。马齿苋酰胺 E 可有效降低荷瘤裸鼠肿瘤质量与体积 ($P < 0.05$ 、0.01), 抑制肿瘤细胞增殖并促进其凋亡, 显著下调 Ki-67、PCNA、MMP-2、MMP-9、HIF-1 α 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 显著上调 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9、VHL 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 马齿苋酰胺 E 体外可有效抑制 786-O 细胞增殖、迁移与侵袭, 促进 786-O 细胞凋亡, 体内可有效降低荷瘤裸鼠肿瘤质量与体积, 其作用机制可能与调控 VHL/HIF 通路及其下游蛋白表达有关。

关键词: 肾癌; 迁移; 侵袭; 马齿苋酰胺 E; VHL/HIF-1 α 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)06-1672-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.06.016

Effect and mechanism of oleracein E on renal carcinoma

CHEN Sheng-ye, HUANG Hang, YE Ting-yu, PAN Yue

Department of Urological Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of oleracein E on proliferation, invasion, and migration of human renal carcinoma 786-O cells. **Methods** Human renal carcinoma 786-O cells were cultured *in vitro* and treated with oleracein E (10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$) for intervention. CCK-8 method was used to detect cell proliferation; Scratch test was used to detect cell migration ability; Transwell chamber method was used to detect cell invasion ability; AO/EB kit was used to detect cell apoptosis rate. Kidney cancer model of transplanted tumor in nude mice was established and treated with oleracein E (3, 15 mg/kg) for intervention. Weight and volume of tumor in nude mice was determined, pathology changes of tumor tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Western blotting was used to detect expressions of cell proliferation marker such as Ki67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), apoptosis marker such as activated cysteine protease-3 (Cleaved Caspase-3) and Cleaved Caspase-9, invasion-related protein such as matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9, Von Hippel-Lindau (VHL)/hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) pathway related proteins such as VHL and HIF-1 α in 786-O cells and tumor tissues of nude mice. **Results** Viability of 786-O cells was significantly inhibited ($P < 0.05$, 0.01), expressions of Ki-67 and PCNA were down-regulated ($P < 0.05$, 0.01); Apoptosis of 786-O cells was significantly promoted ($P < 0.05$, 0.01), expressions of Cleaved Caspase-3 and Cleaved

收稿日期: 2020-12-01

基金项目: 浙江省教育厅科研项目 (Y202045313)

作者简介: 陈盛烨, 男, 副主任医师, 主要从事泌尿外科的临床与基础研究。Tel: 13857736357 E-mail: 734623202@qq.com

Caspase-9 were up-regulated ($P < 0.05, 0.01$); Migration and invasion ability of 786-O cells were effectively improved ($P < 0.05, 0.01$), expressions of MMP-2 and MMP-9 were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$); VHL protein expression was significantly up-regulated ($P < 0.05, 0.01$) and HIF-1 α protein expression was significantly down-regulated ($P < 0.01$) by oleracein E. Weight and volume of tumor in tumor-bearing nude mice were effectively reduced ($P < 0.05, 0.01$), proliferation of tumor cells was inhibited and apoptosis of tumor cells was promoted, Ki67, PCNA, MMP-2, MMP-9, HIF-1 α expression were significantly down-regulated ($P < 0.05, 0.01$), expressions of Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-9, and VHL were significantly up-regulated ($P < 0.05, 0.01$) by oleracein E. **Conclusion** Oleracein E can effectively inhibit the proliferation, migration, and invasion of 786-O cells *in vitro*, promote the apoptosis of 786-O cells, and effectively reduce the tumor weight and volume of tumor-bearing nude mice *in vivo*, of which mechanism may be related to the regulation of VHL/HIF pathway and its downstream protein expression.

Key words: renal cancer; migration; invasion; oleracein E; VHL/HIF-1 α signaling pathway

肾癌是临床常见的泌尿生殖系统恶性肿瘤之一,其发病率在成年人恶性肿瘤中占 2%,据统计,全球每年新增患者 403 262 例、死亡 175 098 例^[1]。30%患者初次诊断时已为晚期,60%确诊患者由于转移性肾癌其 5 年生存率仅为 10%^[2]。吸烟、肥胖、高血压为肾癌的主要诱导因素^[3]。目前临床通常采用手术切除或术后辅助治疗等方式治疗肾癌,但术后复发率仍高达 20%~40%^[4]。近年肾癌分子靶向治疗成为研究热门,然而靶向药物易产生耐药性且价格昂贵,中位缓解率仅为 1.5~2.0 年^[5]。因此寻找疗效佳、不良反应小的治疗药物尤为重要。

传统中医药在改善肾癌患者的临床症状、生存质量等方面表现良好^[6-7]。马齿苋是苋科植物马齿苋 *Portulaca oleracea* L. 的干燥地上部分,又名“长寿菜”,其性寒味酸,具有清热解毒、凉血止血等功效,通常用于治疗热毒血痢、痈肿疔疮、湿疹等^[8]。马齿苋的主要成分为生物碱类、萜类、香豆素类、黄酮类等化合物,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、降血糖、调血脂等多种药理活性^[9-11]。马齿苋酰胺 E 是从马齿苋中提取、分离得到的四氢异喹啉并吡咯烷酮类生物碱^[12],具有良好的抗氧化、抗炎及神经保护作用^[13]。本研究通过体内外实验考察马齿苋酰胺 E 对肾癌的治疗作用及机制,为其临床应用提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 20 只,5 周龄,体重 18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2018-008。动物于无菌层流房中给予无菌水及灭菌颗粒饲料饲养。动物实验经温州医科大学实验动物伦理委员会和温州医科大学实验动物中心批准(2018025)。

1.2 细胞

人肾癌 786-O 细胞购自中国科学院上海细胞所。

1.3 药品与试剂

马齿苋酰胺 E(质量分数 $\geq 98\%$,批号 0464534-5)购自美国 Aurora Fine Chemicals 公司;舒尼替尼(批号 170304)购自美国 MCE 公司;HRP 标记的羊抗兔二抗(批号 20180107)、蛋白抽提试剂盒(批号 20181123)、ECL 发光液(批号 20181121)购自江苏碧云天生物技术公司;AO/EB 试剂盒(批号 20190107)购自北京索莱宝科技有限公司;Ki67 抗体(批号 GR256572-6)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体(批号 GR263410-2)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)抗体(批号 GR276948-1)、MMP-9 抗体(批号 GR274709-18)、活化半胱氨酸蛋白酶-3(Cleaved Caspase-3)抗体(批号 GR213318-5)、Caspase-3 抗体(批号 GR52861-1)、Cleaved Caspase-9 抗体(批号 GR219248-2)、Caspase-9 抗体(批号 GR525572-1)、希佩尔-林道抑癌基因(Von Hippel-Lindau, VHL)抗体(批号 GR254523-1)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)抗体(批号 GR187744-1)购自美国 Abcam 公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(批号 S8946)购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞培养板、Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

1.4 仪器

CKX31 倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、Ti-S 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);Synergy HT 酶标仪(美国 Biotek 公司);Mimi Protean 垂直电泳仪、SEM1-DRY 电转仪(美国 Bio-Rad 公司);SW-CJ-IF 细胞超净工作台(苏州尚田生物技术公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

786-O 细胞用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞活力的影响

取处于对数生长期的 786-O 细胞,以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,培养 24 h。参照文献方法^[14-15],设置对照组、马齿苋酰胺 E (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组及舒尼替尼 (5 $\mu\text{mol/L}$) 组,给药组分别加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h,每孔加入 10 μL CCK8 溶液,孵育 2 h,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.3 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞凋亡的影响

取处于对数生长期的 786-O 细胞,以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 24 孔板中,每孔 500 μL ,培养 24 h,设置对照组、马齿苋酰胺 E (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组及舒尼替尼 (5 $\mu\text{mol/L}$) 组,给药组分别加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。弃去培养基,加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 次,按照 AO/EB 试剂盒说明书检测各组细胞凋亡情况。

2.4 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞迁移的影响

取处于对数生长期的 786-O 细胞,以 $5 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔板中,待细胞融合度为 80%~90% 时,进行划痕。设置对照组、马齿苋酰胺 E (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组及舒尼替尼 (5 $\mu\text{mol/L}$) 组,用 PBS 洗涤 3 次,给药组分别加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,于培养箱中培养,分别于 0、24 h 在显微镜下观察并拍照。

2.5 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞侵袭的影响

Transwell 小室中加入 60 μL Matrigel 胶,于培养箱中孵育 5 h。取处于对数生长期的 786-O 细胞,以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 Transwell 小室中,每孔 100 μL 。Transwell 小室下室中加入 1 mL 培养基。设置对照组及马齿苋酰胺 E (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组及舒尼替尼 (5 $\mu\text{mol/L}$) 组,给药组分别加入相应药物,对照组加入不含药物的培养基,培养 24 h。PBS 洗涤,棉签擦拭 Transwell 小室内的细胞,4% 多聚甲醛固定 5 min,吉姆萨染色 8 min, PBS 洗涤,于显微镜下观察并拍照。

2.6 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞 Ki67、PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Caspase-9、VHL 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响

取处于对数生长期的 786-O 细胞,以 $5 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于 6 孔板中,培养 24 h。设置对照组、马齿苋酰胺 E (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组及舒尼替尼 (5 $\mu\text{mol/L}$) 组,给药组分别加入相应药物,对照组加入不含药

物的培养基,培养 24 h,弃去培养基,收集细胞。

各组细胞加入 RIPA 裂解液,离心并提取蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,5% 牛血清白蛋白封闭,分别加入 Ki67、PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Caspase-9、VHL、HIF-1 α 抗体 (1:1000),孵育过夜;TBST 洗涤,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗,于室温孵育 1 h, TBST 洗涤后,滴加 ECL 液进行显影成像,采用 Image J 软件对条带蛋白光密度进行分析。

2.7 荷瘤裸鼠肾癌模型的建立、分组与给药

按照文献方法^[16-18],裸鼠于腹部 sc 100 μL 786-O 细胞 ($2 \times 10^7/\text{mL}$),当瘤体积达到 25 mm^3 时,将裸鼠随机分为对照组和马齿苋酰胺 E 低、高剂量 (3、15 mg/kg) 组及舒尼替尼 (7.5 mg/kg) 组,每组 5 只。马齿苋酰胺 E 溶于 0.5% CMC-Na 溶液分别配制成质量浓度为 0.3、1.5 mg/mL 的溶液,各给药组 ig 2 mL 相应药物,对照组 ig 等体积 CMC-Na 溶液,1 次/d,连续 4 周。给药结束后,裸鼠脱颈椎处死,取瘤组织,称定质量,用游标卡尺测量瘤组织的最长直径与最短直径,计算肿瘤体积。

2.8 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织病理变化的影响

取各组裸鼠瘤组织,除去胞膜,用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片 (厚 4 μm),HE 染色后于显微镜下观察。

2.9 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织 Ki67、PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Caspase-9、VHL 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响

各组裸鼠瘤组织按“2.6”项下方法提取蛋白,并采用 Western blotting 法考察瘤组织 Ki67、PCNA、MMP-2、MMP-9、Cleaved Caspase-3、Caspase-3、Cleaved Caspase-9、Caspase-9、VHL、HIF-1 α 蛋白表达情况。

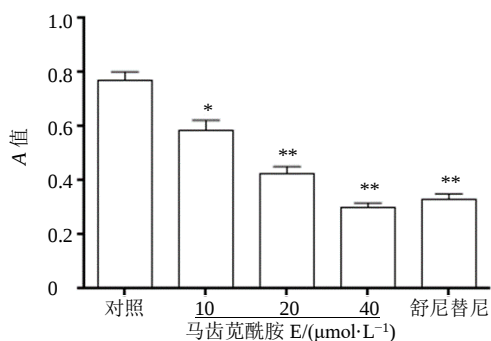
2.10 统计学分析

采用 SPSS 18.0 和 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞增殖和凋亡的影响

如图 1 所示,与对照组比较,马齿苋酰胺 E 可



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as belows

图 1 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Effect of oleracein E on proliferation of 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

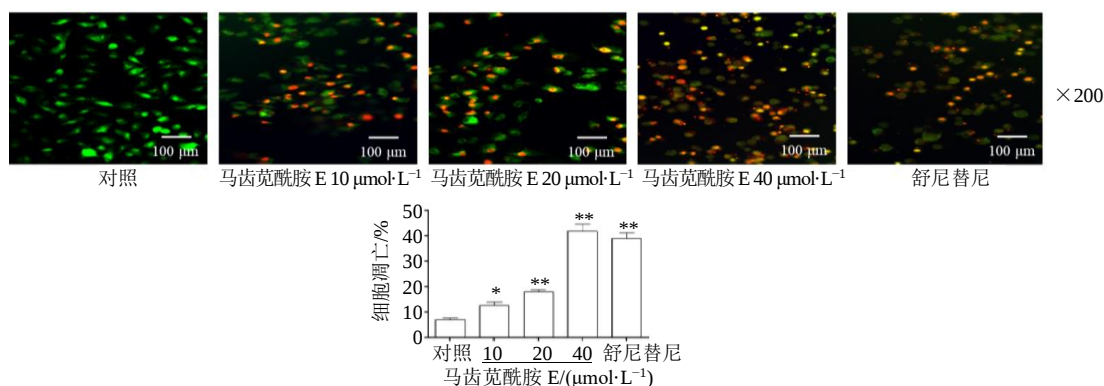


图 2 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of oleracein E on apoptosis of 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

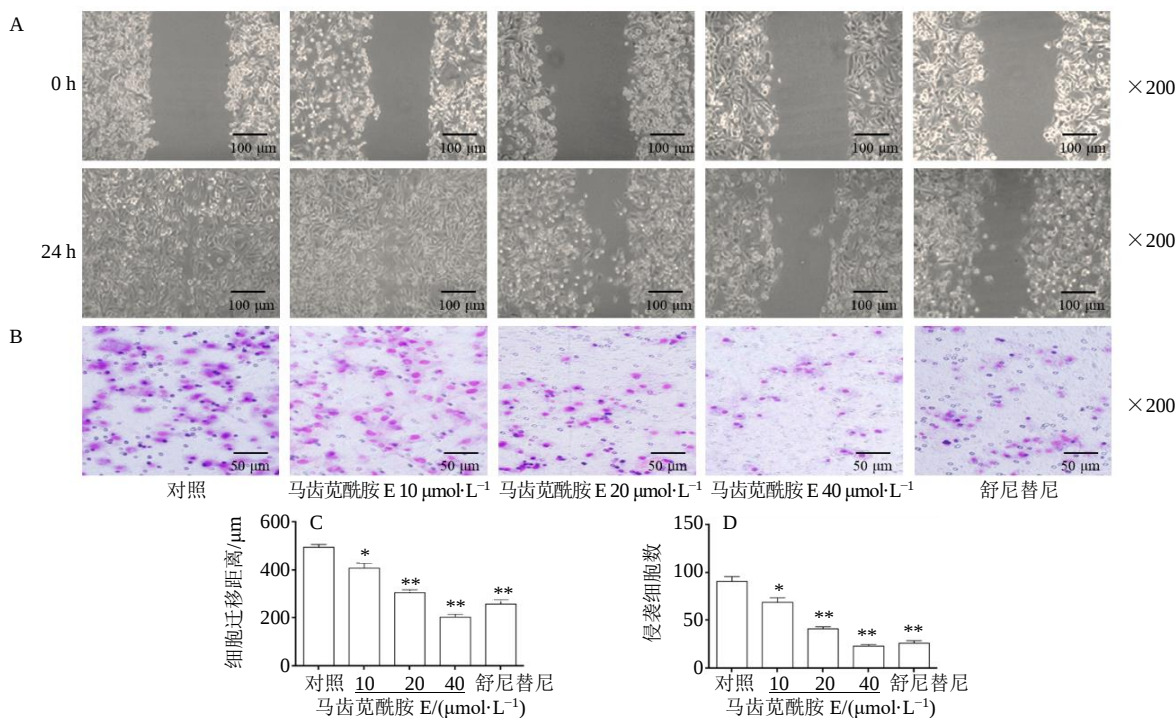


图 3 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞迁移 (A, C) 与侵袭 (B, D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of oleracein E on migration (A, C) and invasion (B, D) of 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

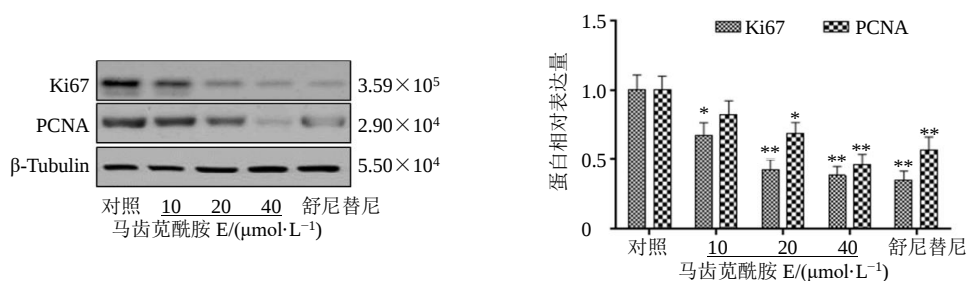
显著抑制 786-O 细胞活力 ($P < 0.05$ 、 0.01), 呈剂量相关性; 如图 2 所示, 马齿苋酰胺 E 可显著促进 786-O 细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、 0.01), 呈剂量相关性。

3.2 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞迁移与侵袭能力的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 马齿苋酰胺 E 显著抑制 786-O 细胞的迁移与侵袭 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性。

3.3 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞增殖相关蛋白表达的影响

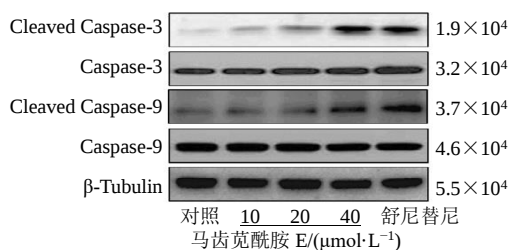
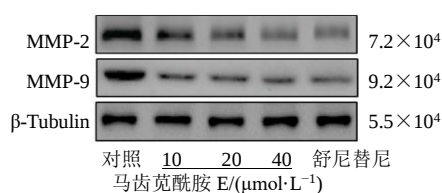
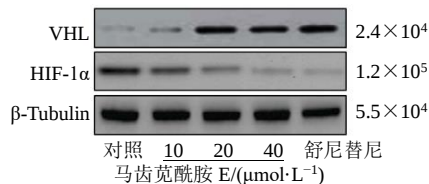
如图 4 所示, 与对照组比较, 马齿苋酰胺 E (20、40 $\mu\text{mol/L}$) 显著降低 Ki67、PCNA 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 马齿苋酰胺 E (10 $\mu\text{mol/L}$) 显著

图 4 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞 Ki67 及 PCNA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Effects of oleracein E on expressions of Ki67 and PCNA in 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

降低 Ki67 蛋白表达水平 ($P<0.05$)。

3.4 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,马齿苋酰胺 E(20、40 $\mu\text{mol/L}$)显著升高 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、0.01),马齿苋酰胺 E (10 $\mu\text{mol/L}$)显著升高 Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平 ($P<0.05$)。

图 5 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞 Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 Effect of oleracein E on expressions of Caspase-3 and Caspase-9 in 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)图 6 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞 MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 6 Effect of oleracein E on expressions of MMP-2 and MMP-9 in 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)图 7 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞 VHL 及 HIF-1α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 7 Effect of oleracein E on expressions of VHL and HIF-1α in 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.5 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞迁移及侵袭相关蛋白表达的影响

如图 6 所示,与对照组比较,马齿苋酰胺 E 显著降低 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、0.01),呈剂量相关性。

3.6 马齿苋酰胺 E 对 786-O 细胞 VHL/HIF-1α 相关蛋白表达的影响

如图 7 所示,与对照组比较,马齿苋酰胺 E 显

著升高 VHL 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低 HIF-1 α 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 呈剂量相关性。

3.7 马齿苋酰胺 E 对裸鼠肿瘤大小的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 马齿苋酰胺 E 可明显降低裸鼠的瘤质量与瘤体积 ($P < 0.05$ 、 0.01), 呈剂量相关性。

3.8 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织病理变化的影响

如图 9 所示, 对照组裸鼠肿瘤组织中瘤细胞形态不规则, 细胞排列紊乱、大小不一, 未见凋亡细胞; 细胞核呈圆形, 核内常染色质丰富, 且核仁明显。各给药组裸鼠肿瘤组织中瘤细胞核内染色质凝

聚, 细胞坏死、凋亡明显, 细胞器肿胀, 部分瘤细胞仅留有裸核, 偶见少量炎性细胞浸润。

3.9 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织增殖相关蛋白表达的影响

如图 10 所示, 与对照组比较, 马齿苋酰胺 E 显著降低 Ki67、PCNA 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 呈剂量相关性。

3.10 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织凋亡相关蛋白表达的影响

如图 11 所示, 与对照组比较, 马齿苋酰胺 E 显著升高 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 呈剂量相关性。

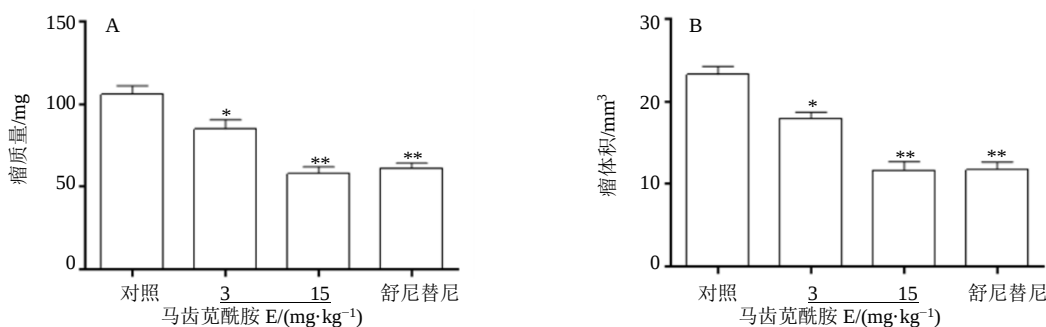


图 8 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠肿瘤质量 (A) 与体积 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 8 Effect of oleracein E on weight (A) and volume (B) of tumor in tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

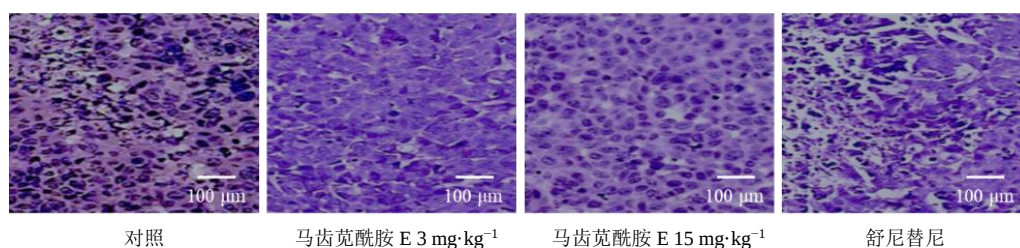


图 9 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织病理变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 9 Effect of oleracein E on pathological changes of tumor tissue in tumor-bearing nude mice (HE, $\times 200$)

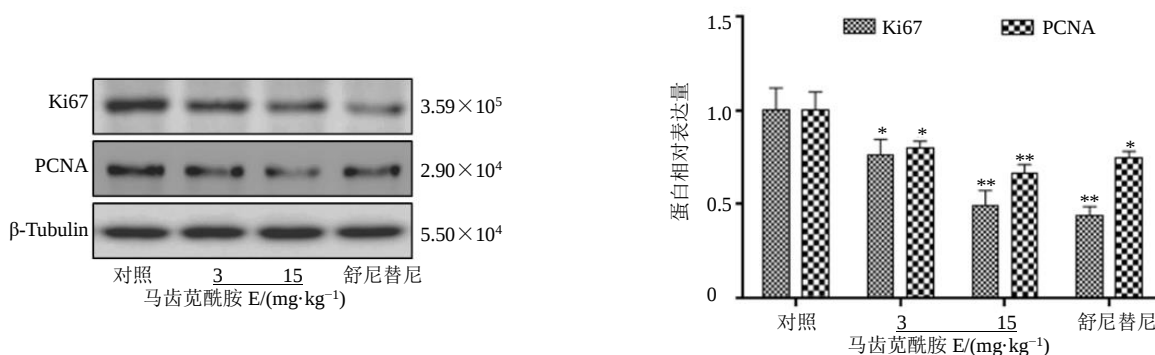


图 10 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织 Ki67 及 PCNA 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 Effect of oleracein E on expressions of Ki67 and PCNA in tumor tissue of tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

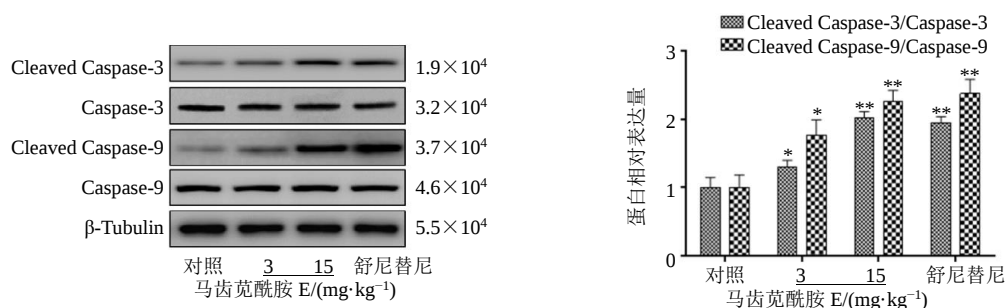


图 11 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织 Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 11 Effect of oleracein E on expressions of Caspase-3 and Caspase-9 in tumor tissue of tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.11 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织迁移及侵袭相关蛋白表达的影响

如图 12 所示, 与对照组比较, 马齿苋酰胺 E (15 mg/kg) 显著降低 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平 ($P<0.01$), 马齿苋酰胺 E (3 mg/kg) 显著降低 MMP-9 蛋白表达水平 ($P<0.05$), 且呈剂量相关性。

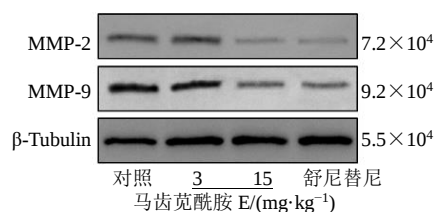


图 12 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织 MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 12 Effect of oleracein E on expressions of MMP-2 and MMP-9 in tumor tissue of tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

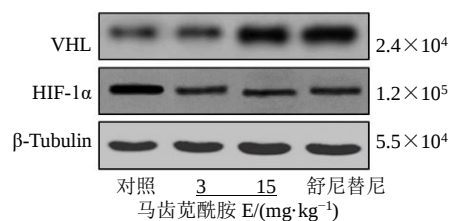


图 13 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织 VHL 及 HIF-1α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

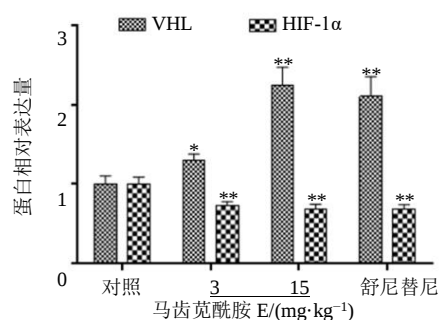
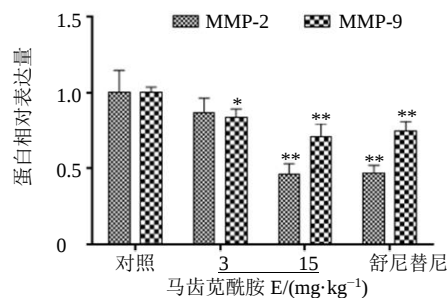
Fig. 13 Effect of oleracein E on expressions of VHL and HIF-1α in tumor tissue of tumor-bearing nude mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

近年来, 恶性肿瘤、糖尿病及脑血管疾病已成为危害人类生命的“三大杀手”, 其中肾癌是临床常见的恶性肿瘤^[19]。根据病理分型, 肾癌可分为透明细胞癌、乳头状癌、嫌色细胞癌等^[20]。由于肾癌属于化疗抵抗性癌症, 手术治疗不能彻底清除癌细

3.12 马齿苋酰胺 E 对荷瘤裸鼠瘤组织 VHL/HIF-1α 相关蛋白表达的影响

如图 13 所示, 与对照组比较, 马齿苋酰胺 E 显著升高 VHL 蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 显著降低 HIF-1α 蛋白表达水平 ($P<0.01$), 且呈剂量相关性。



胞, 因此肾癌易复发、预后较差^[21]。传统中医认为肾癌具有腰痛、血尿、肿块等症状, 与“尿血”“肾积”“腰痛”等病相关, 临床通常治法主要包括健脾益肾、清热利湿、活血化瘀等^[22-23]。随着传统中药的深入开发, 中药的多靶点及整体调理功能在肿

瘤治疗中备受关注^[24]。马齿苋是我国历代本草医书中记载的中草药，其重要成分马齿苋酰胺 E 具有良好的药理活性^[13]，本研究通过体外培养肾癌 786-O 细胞及体内建立荷瘤裸鼠模型，深入探讨马齿苋酰胺 E 抗肾癌的活性及作用机制。

Ki67 及 PCNA 作为生物标志物广泛应用于肿瘤的诊治^[25]。Ki67、PCNA 是评价细胞增殖状态的关键指标，Ki67、PCNA 表达越高，癌细胞增殖指数越强^[26]。本研究结果显示，马齿苋酰胺 E 可有效抑制 786-O 细胞增殖，下调 Ki67、PCNA 蛋白表达水平。诱导细胞凋亡是抗肿瘤药物研发的重要手段，细胞凋亡途径可分为线粒体途径和外源性死亡受体介导的信号传导途径，抗肿瘤药物能够通过上述细胞程序激活 Cleaved Caspase-9，诱导 Cleaved Caspase-3 活化，从而促进肿瘤细胞凋亡^[27-28]。本研究结果显示，马齿苋酰胺 E 可有效诱导 786-O 细胞凋亡，上调 Caspase-3 及 Caspase-9 的活化水平，表明马齿苋酰胺 E 通过下调 Ki67、PCNA 表达，促进 Caspase-3、Caspase-9 活化，从而调节 786-O 细胞增殖与凋亡的平衡。肿瘤的转移、侵袭与细胞外基质降解有关，作为降解细胞外基质的关键酶，当 MMP 分泌增加时可加剧肿瘤侵袭^[29-30]。本研究结果显示，马齿苋酰胺 E 可有效下调 786-O 细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达，抑制细胞的迁移与侵袭，表明马齿苋酰胺 E 通过抑制 MMP-2、MMP-9 表达，从而抑制 786-O 细胞迁移与侵袭能力。VHL/HIF 信号通路在肾癌的发生、发展过程中起着关键调控作用^[31-32]。VHL 作为重要的抑癌因子，其异常表达可导致 HIF-1 α 处于稳定状态，降解减少。HIF-1 α 的累积可激活一系列缺氧反应基因转录，诱导肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡并促进肿瘤细胞迁移与侵袭，最终导致肾癌的发生与发展^[33-34]。本研究结果显示，马齿苋酰胺 E 可有效上调 786-O 细胞中抑癌因子 VHL 蛋白表达，抑制其下游蛋白 HIF-1 α 表达，表明马齿苋酰胺 E 可通过调控 VHL/HIF-1 α 信号通路，从而抑制 786-O 细胞增殖、迁移与侵袭，并促进细胞凋亡。裸鼠肾癌移植瘤模型结果显示，马齿苋酰胺 E 可有效降低裸鼠肿瘤组织质量与体积，抑制肿瘤组织内部细胞增殖并促进肿瘤细胞凋亡，调控 VHL/HIF-1 α 信号通路相关蛋白的表达，与体外实验结果一致。

综上所述，马齿苋酰胺 E 可通过下调 Ki67、PCNA 蛋白表达水平，抑制 786-O 细胞增殖；通过

上调 Cleaved Caspase-3、Cleaved Caspase-9 蛋白表达水平，促进 786-O 细胞凋亡；下调 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平，抑制 786-O 细胞迁移与侵袭；并可通过调控 VHL/HIF-1 α 信号通路，从而治疗肾癌。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Lou S, Ren L, Xiao J, et al. Expression profiling based graph-clustering approach to determine renal carcinoma related pathway in response to kidney cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012, 16(6): 775-780.
- [3] 赵振威, 李延江. 肾细胞癌流行病学研究进展 [J]. *山东医药*, 2013, 53(7): 95-97.
- [4] Janzen N K, Kim H L, Figlin R A, et al. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease [J]. *Urol Clin North Am*, 2003, 30(4): 843-852.
- [5] Lecis D, Sangaletti S, Colombo M P, et al. Immune checkpoint ligand reverse signaling: Looking back to go forward in cancer therapy [J]. *Cancers*, 2019, 11(5): 624.
- [6] 刘睿, 邓跃毅. 肾癌术后的中医药治疗体会 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(7): 629.
- [7] 周小海. 浅谈中医治疗肾肿瘤 [J]. *医学信息*, 2014, 27(27): 527.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 49-50.
- [9] 王天宁, 刘玉婷, 肖凤琴, 等. 马齿苋化学成分及药理活性的现代研究整理 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(6): 224-234.
- [10] 秦月雯, 侯金丽, 王萍, 等. 马齿苋“成分-活性-中药功效-疾病”研究进展及关联分析 [J]. *中草药*, 2020, 51(7): 1924-1938.
- [11] 鲍守民, 贾红梅, 邹忠梅, 等. 马齿苋生物碱的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(6): 1174-1182.
- [12] Xiang L, Xing D, Wang W, et al. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(21): 2595-2601.
- [13] 李玲玉. 马齿苋酰胺 E 和马齿苋提取物的神经保护和抗炎活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [14] 孙洪祥. 马齿苋酰胺 E 对帕金森病模型的保护作用研究 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [15] Wen J, Li H Z, Ji Z G, et al. Human urothelial carcinoma cell response to sunitinib malate therapy *in vitro* [J]. *Cancer Cell Int*, 2015, 15: 26.
- [16] 姜小良, 尹志康, 谭兵, 等. 藤黄酸联合舒尼替尼抑制

- 肾癌细胞的增殖 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(7): 687-690.
- [17] Li L, Jiao Y, Jin T, *et al.* Phenolic alkaloid oleracein E attenuates oxidative stress and neurotoxicity in AlCl₃-treated mice [J]. *Life Sci*, 2017, 191: 211-218.
- [18] 孙飞达. 舒尼替尼对裸鼠肾癌干预的实验研究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2012.
- [19] Farhadieh R D, Smee R, Ow K, *et al.* Down-regulation of KAI1/CD82 protein expression in oral cancer correlates with reduced disease free survival and overall patient survival [J]. *Cancer Lett*, 2004, 213(1): 91-98.
- [20] 牛少曦, 马鑫, 张瑜, 等. miR-223 在肾透明细胞癌中的表达与功能 [J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(3): 338-342.
- [21] Khan M I, Sobocińska A A, Brodaczewska K K, *et al.* Involvement of the CB₂ cannabinoid receptor in cell growth inhibition and G₀/G₁ cell cycle arrest via the cannabinoid agonist WIN55,212-2 in renal cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 583.
- [22] 周微红, 奚颖. 周维顺治疗肾癌经验 [J]. 江西中医药, 2012, 43(2): 12.
- [23] 崔虎军. 中医药治疗肾癌浅探 [J]. 实用中医内科杂志, 2008, 22(3): 39-40.
- [24] Nice E C, Fabri L, Hammacher A, *et al.* The purification of a Rap1 GTPase-activating protein from bovine brain cytosol [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(3): 1546-1553.
- [25] 马志君, 吉洁. Ki67 与肿瘤关系的研究进展 [J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(7): 15-17.
- [26] 余苗萃, 姜毅, 刘涛, 等. 肠艾舒对小鼠 CT-26 大肠癌组织 Ki67 和 PCNA 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(4): 52-54.
- [27] Le T D, Jin D, Rho S R, *et al.* Capsaicin-induced apoptosis of FaDu human pharyngeal squamous carcinoma cells [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(4): 834-841.
- [28] Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. *Science*, 2004, 305(5684): 626-629.
- [29] Tang S W, Yang T C, Lin W C, *et al.* Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 138-145.
- [30] Kawata N, Nagane Y, Hirakata H, *et al.* Significant relationship of matrix metalloproteinase 9 with nuclear grade and prognostic impact of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 for incidental clear cell renal cell carcinoma [J]. *Urology*, 2007, 69(6): 1049-1053.
- [31] 涂福平, 黄莉, 王祥财. 缺氧环境下 VHL 和 HIF-1 α 的变化 [J]. 医疗装备, 2017, 30(5): 93-94.
- [32] Liu Q, Tong D, Liu G, *et al.* HIF2A germline-mutation-induced polycythemia in a patient with VHL-associated renal-cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(12): 944-947.
- [33] Lontos M, Trigka E A, Korkolopoulou P, *et al.* Expression and prognostic significance of VEGF and mTOR pathway proteins in metastatic renal cell carcinoma patients: A prognostic immunohistochemical profile for kidney cancer patients [J]. *World J Urol*, 2017, 35(3): 411-419.
- [34] Cho H, Du X L, Rizzi J P, *et al.* On-target efficacy of a HIF-2 α antagonist in preclinical kidney cancer models [J]. *Nature*, 2016, 539(7627): 107-111.

[责任编辑 李亚楠]