

中药槿果藤下调 p-mTOR 抑制肾癌细胞侵袭和迁移

林海¹, 严杰², 应旭旻^{3△}

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 解放军第一一七医院, 浙江 杭州 310004;
3. 杭州市急救中心, 浙江 杭州 310021)

摘要:目的 探讨中药槿果藤对肾癌细胞生物学行为的影响及其相关作用机制。方法 将不同浓度的槿果藤与肾癌细胞共培养, 利用 MTT、Transwell 小室、western blot 法检测槿果藤对肾癌细胞增殖、侵袭、迁移能力以及 mTOR、p-mTOR 蛋白表达的影响。结果 槿果藤可显著抑制肾癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 并呈时间和浓度依赖性, 10、20、40 μg/mL 浓度可显著下调 p-mTOR 表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 但对 mTOR 表达无影响 (P 均大于 0.05)。结论 槿果藤通过下调 p-mTOR 表达抑制肾癌细胞增殖、侵袭和迁移。

关键词: 槿果藤; 肾癌细胞; mTOR; 侵袭; 迁移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)01-0027-04

肾癌是泌尿系统肿瘤中最常见的恶性肿瘤之一, 目前已占成人恶性肿瘤 2%~3%, 与其他肿瘤一样, 多数肾癌患者确诊时已处于晚期, 致死原因与肿瘤发生转移有关^[1]。研究表明, 某些中药提取物可抑制肿瘤增殖、转移、提高肿瘤患者的生存率^[2]。近几年研究发现中药槿果藤 (*Capparis spionosa* L.) 提取物具有抗炎、抗肾小管纤维化、降血糖、抑制胃酸分泌等多种生物学功能^[3], 但对抗肿瘤以及相关作用机制的研究, 国内外鲜有报道。本研究将旨在研究槿果藤提取物是否能抑制肾癌细胞的增殖、侵袭和迁移, 并对槿果藤的可能存在的抗癌机制进行初步研究, 为中药抗肿瘤提供更多的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 槿果藤乙醇提取及分组

称取槿果藤干果切成小片, 加 95% 乙醇于 70℃ 水浴中加热回流 1h, 倾出煎煮液备用, 重复 2 次, 将 2 次煎煮液合并; 于旋转蒸发仪上进行真空浓缩至固态, 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解成 1mg/mL, 过滤器过滤灭菌, -20℃ 保存备用。使用时稀释成药物浓度为 10、20、40 μg/mL 3 组, 0 μg/mL 为空白对照组。

1.1.2 实验材料及仪器

肾癌 786-0 细胞株购自于中国科学院上海细胞所, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养, 传代次数

2-3 次/周。RPMI 1640 培养基 (GIBCO 公司); 胎牛血清 (FBS, GIBCO 公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 杭州化学试剂有限公司); Rapamycin (sigma 公司); Transwell 小室 (Pierce 公司); 二苯基四氮唑溴盐 (MTT, sigma 公司); mTOR、P-mTOR 兔多克隆抗体 (cell signaling 公司); β-action 鼠单克隆抗体 (sigma 公司); 羊抗鼠、羊抗兔 IgG 二抗 (杭州联川生物有限公司); 倒置荧光显微镜 (德国 LEICA), 显微镜呈像系统 (日本 NIKON)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞增殖能力检测

0.25% 胰酶消化细胞后, 用含 10% FBS 血清的培养基终止消化, 吹打重悬后接种于 96 孔板, 每孔细胞数为 5 000 个。孵育 12h 后吸去培养基, 加入含槿果藤 0、10、20、40 μg/mL 培养基 200 μL, 分别在培养 24h、48h、72h 后, 加入于各孔加入 20 μL MTT 溶液 (5mg/mL, 无菌 PBS 配制), 继续培养 4h, 吸去培养基, 各孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 摇床避光轻摇 10min, 每孔吸 100 μL 置于另一 96 孔板内, 酶标仪在 490nm 处检测 OD 值。每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.2 细胞侵袭能力检测

消化细胞后在 Transwell 培养板上室加入 200 μL 无血清及各个药物浓度的培养基制备的细胞

收稿日期: 2014-12-12

作者简介: 林海 (1988-), 男, 浙江杭州人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中医药治疗肾脏疾病。

△通信作者: 应旭旻, E-mail: sanyaacun@126.com

悬液(含 3×10^4 个细胞),下室加入含 10%FBS 及各
个药物浓度的培养基 $600 \mu\text{L}$, 培养 12h 后小心取出
上室, PBS 清洗 3 次, 甲醇固定 30min, 结晶紫染色
45min, PBS 清洗 3 遍, 棉签擦去上室未迁移的细
胞。用显微镜对每个样本取 5 个视野, 使用 Image-
pro Plus 软件计数。

1.2.3 western blot 检测 mTOR、p-mTOR 蛋白表达

2.5×10^5 个细胞接种于 6 孔板, 孵育 12h 后更换
为无血清培养基, 继续培养 24h, 之后加入含有各药
物浓度的培养基 2mL, 设 10ng/mL 雷帕霉素为阳性
药物对照组。药物作用 2h 后, 吸去培养基, 用 1mL
预冷的 PBS 清洗 1 遍, 每孔加 $200 \mu\text{L}$ RIPA 细胞裂
解液, 冰上裂解 30min, 用刮片收集细胞碎片, 4°C 、
12000r/min 离心 15min, 吸取上清 -80°C 保存。BCA
法检测蛋白浓度后, 取 $30 \mu\text{g}$ 总蛋白, 煮沸变形后于
8%SDS-PAGE(80v2h)分离后, 电转至 PVDF 膜上
(380mA2h), 5%脱脂牛奶或牛血清白蛋白封闭 1h,
加入 mTOR、p-mTOR、action(1:1 000 稀释)—抗 4°C
过夜, TBST 清洗 3 次, 每次 5min, 分别加入羊抗兔、
羊抗鼠二抗(1:5 000 稀释)室温孵育 2h, TBST 清洗
3 次, 每次 5min, 加入 ECL 发光液, 凝胶成像系统分
析条带灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS15.0 统计软件进行统计分析。数据统
计采用 $(\bar{x} \pm s)$, 两两比较采用单因素方差分析, 以 $P <$
 0.05 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有非常显
著的统计学意义。

2 结果

2.1 槲果藤对细胞增殖的影响

实验结果表明, 槲果藤对肾癌细胞增殖的抑制
作用呈时间和药物浓度依赖性(见图 1 和表 1)。

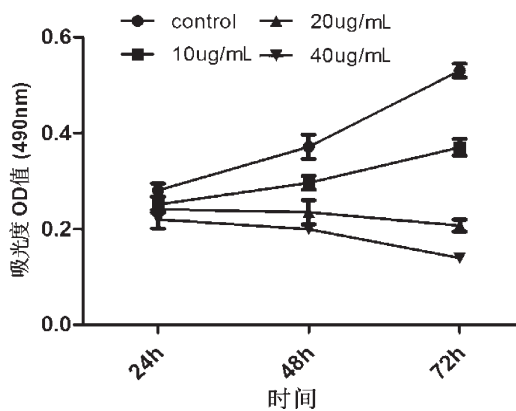


图 1 不同浓度槲果藤对肾癌细胞增殖能力的影响

表 1 不同浓度槲果藤对肾癌细胞增殖能力的影响 $(\bar{x} \pm s)$

组别($\mu\text{g/mL}$)	24h	48h	72h
0	0.28 ± 0.012	0.37 ± 0.026	0.53 ± 0.017
10	0.25 ± 0.014	$0.30 \pm 0.016^*$	$0.37 \pm 0.016^*$
20	0.25 ± 0.013	$0.24 \pm 0.016^*$	$0.21 \pm 0.009^{**}$
40	$0.23 \pm 0.024^*$	$0.20 \pm 0.013^{**}$	$0.14 \pm 0.008^{**}$

注: 与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

2.2 槲果藤对肾癌细胞侵袭和迁移能力的影响

统计结果显示, 药物组穿膜细胞数分别为 $463 \pm$
 24.54 , 367 ± 42.17 , 174 ± 47.56 个, 较对照组 ($613 \pm$
 52.41 个)穿膜细胞数明显减少(P 值分别为 $P < 0.05$,
 $P < 0.01$, $P < 0.01$), 差异具有统计学意义(见图 2)。

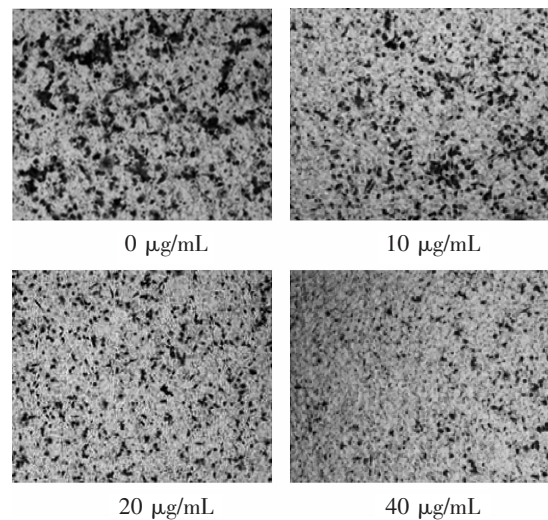


图 2 不同浓度槲果藤对肾癌细胞侵袭
和迁移能力的影响($\times 100$ 倍)

2.3 槲果藤对肾癌细胞 mTOR、p-mTOR 蛋白表达的
影响

结果表明, 用槲果藤 10, 20, $40 \mu\text{g/mL}$ 浓度作用
2h 后, 各药物组 mTOR 蛋白表达与对照组相比, 无
统计学差异($P > 0.05$); 雷帕霉素组和 3 个槲果藤药
物组 p-mTOR 蛋白表达分别为 0.093 ± 0.06 , $0.216 \pm$
 0.015 , 0.114 ± 0.008 , 0.098 ± 0.012 , 与对照度 ($0.797 \pm$
 0.024) 相比, P 值分别为 $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P <$
 0.01 差异具有统计学意义(见图 3)。

3 讨论

槲果藤(*Capparis spionosa* L.)在我国传统医药
中将其用于祛风、散寒、消肿、活血、止痛等治疗,
国外传统医药中也有使用记载, 在印度槲果藤被
称为“Aranda”, 被用于治疗肿胀、生疮、蛇虫咬伤、

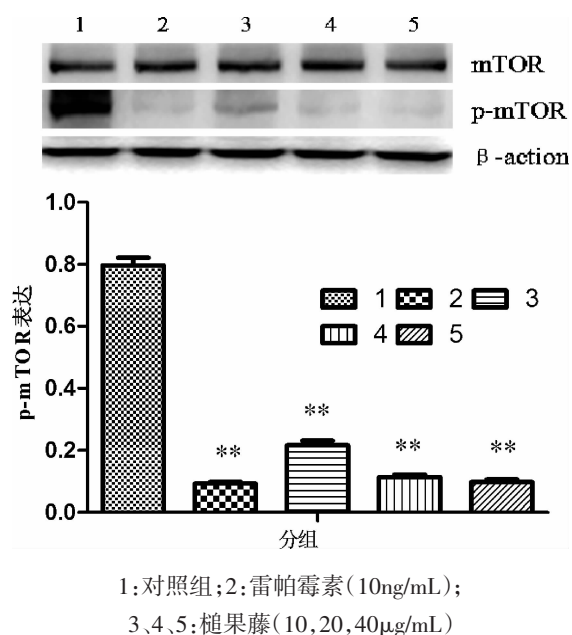


图3 不同浓度槲果藤对肾癌细胞 mTOR、p-mTOR 表达的影响

半身不遂、天花、霍乱等疾病^[4]。近年来研究发现,槲果藤提取物富含黄酮类、皂苷类、挥发油、生物碱等成分,具有抗氧化、抗动脉硬化、利尿、免疫抑制等多种生物学功能^[5],但国内外对其抗肿瘤功能研究极少。

国内杨海帆等^[6]研究发现,槲果藤提取物对肝癌、卵巢癌、胃癌等多种肿瘤细胞株的增殖均具有较为明显抑制能力。Yu-Bin Ji 等^[7]发现槲果藤中的硒基—槲果藤多糖 (seleno-Capparis spionosa L. Polysaccharide, Se-CSPS)在体内外实验中均可抑制肝癌细胞增殖,通过破坏细胞膜的稳定性从而引起肿瘤细胞凋亡。本研究通过乙醇提取法提取槲果藤中药用成分,并利用 MTT、transwell 小室等实验证实,槲果藤可有效抑制肾癌细胞的增殖、侵袭和迁移,并呈时间和浓度依赖性,与上述研究结果相一致。

虽然上述国内外研究及本实验方法均证实槲果藤能抑制肾癌细胞增殖和迁移,然而槲果藤具体的抗癌机制尚不明确。研究表明,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)与肿瘤增殖、侵袭和转移密切相关,是肿瘤周期进展的核心调控者,阻断 PI3K/AKT/mTOR 信号通路可抑制肿瘤细胞增殖和转移,甚至诱导细胞凋亡^[8]。国内外研究显示一些植物药可通过抑制 mTOR 或 p-mTOR 表达从而抑制细胞增殖和转移^[9]。如 Li YC 等^[10]研究发现白花丹素

(Plumbagin)可阻断 PI3K/AKT/mTOR 信号通路引起肺癌细胞凋亡。而 Han S 等^[11]发现一叶秋碱(L-securinine)也可通过该信号通路促进人类急性骨髓性白血病细胞 HL-60 细胞凋亡。此外,国内何聪等^[12]研究显示,中药姜黄素(Curcumin)可诱导 mTOR 下调从而促进肺癌 A549 细胞自噬和凋亡。这些研究提示,中药槲果藤的抗肿瘤作用也可能是通过抑制 mTOR 或 p-mTOR 蛋白水平表达来实现。我们将槲果藤提取物与血清饥饿后的肾癌细胞共培养 2h 后,利用 western blot 法检测 mTOR、p-mTOR 蛋白表达变化,发现各浓度的槲果藤均可显著下调 p-mTOR 表达水平 (P 值分别为 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$),对 mTOR 表达则无显著影响 (P 均大于 0.05),这与 mTOR 抑制剂—雷帕霉素抑制 p-mTOR 表达的作用相似,从而在分子水平证实槲果藤可通过调控 p-mTOR 水平来抑制细胞增殖、侵袭和迁移。

综上所述,阻止 mTOR 磷酸化激活可能是槲果藤抑制肾癌细胞增殖、侵袭和迁移的作用机制之一,这为中药抗癌提供了更多理论依据。至于槲果藤其他的抗肿瘤机制还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Chen S, Jin B, Xu L, et al. Cystic renal cell carcinoma: a report of 67 cases including 4 cases with concurrent renal cell carcinoma[J]. BMC Urol, 2014, 14(1): 87.
- [2] Liao MJ, Ye MN, Zhou RJ, et al. Yiqi formula enhances the antitumor effects of erlotinib for treatment of triple-negative breast cancer xenografts[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014; 1-8.
- [3] Xiaolu Feng, Jincal Lu, Hailiang Xin, et al. Anti-arthritis Active Fraction of Capparis Spinosa L. Fruits and Chemical Constituents[J]. Yakugaku Zasshi, 2011, 131(3): 423-429.
- [4] Gadgoli CI, Mishra SH. Antihepatotoxic activity of p-methoxy benzoic acid from Capparis spinosa [J]. J Ethnopharmacol, 1999, 66(2): 187-192.
- [5] 张华,朱晓薇,甘永祥,等. 不同提取方法对槲果藤指标成分及主要药效的影响[J]. 中成药, 2010, 32(2): 298-300.
- [6] 杨海帆,于蕾,庞琳琳,等. 野西瓜正丁醇提取物的化学成分与抗肿瘤作用[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2009, 25(3): 264-267.
- [7] Yu-Bin Ji, Fang Dong, Lang Lang, et al. Optimization of Synthesis, Characterization and Cytotoxic Activity of Seleno-Capparis spionosa L. Polysaccharide[J]. Int. J Mol Sci, 2012, 13: 17275-17289.
- [8] Ferreira GM, Martinez M, Camargo IC, et al. Melatonin At-

- tenuates Her-2, p38 MAPK, p-AKT, and mTOR Levels in Ovarian Carcinoma of Ethanol-Preferring Rats[J]. *J Cancer*, 2014, 5(9): 728-735.
- [9] 马岩, 李玛琳. 中药及提取物阻滞胃癌细胞周期及其机制的研究进展[J]. *云南中医学院学报*, 2014, 37(3): 94-97.
- [10] Li, YC, He SM, He ZX, et al. Plumbagin induces apoptotic and autophagic cell death through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2013, 344(2): 239-259.
- [11] Han S, Zhang G, Li M, et al. L-securinine induces apoptosis in the human promyelocytic leukemia cell line HL-60 and influences the expression of genes involved in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(5): 2245-2251.
- [12] 何聪, 陈清勇, 王剑, 等. 姜黄素下调 mTOR 诱导人肺癌 A549 细胞自噬的研究 [J]. *肿瘤学杂志*, 2014, 20(5): 363-368.

(编辑: 杨阳)

*Capparis spinosa*L. Inhibit the Invasion and Metastasis of Renal Cell Carcinoma through Down-regulation of p-mTOR

LIN Hai¹, YAN Jie², YING Xu-min³

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. The 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310004, China; 3. Hangzhou Emergency Medical Center, Hangzhou 310021, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the effect of *Capparis spinosa*L. on the proliferation, invasion and metastasis on the renal cell carcinoma 786-0 cells and reveal the mechanisms. **Methods** The cells were treated with different concentrations of *Capparis spinosa*L. The proliferation, invasion and metastasis were detected by MTT, Transwell assay and the level of mTOR and p-mTOR protein was detected by Western blot. **Results** *Capparis spinosa*L. inhibited the proliferation, invasion and metastasis of 786-0 cells depend on the time and drug concentration, 10, 20, 40ug/ml of the drug can significantly down-regulated the level of p-mTOR protein ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), but the drug has no effect on the expression of the mTOR protein ($P > 0.05$). **Conclusion** *Capparis spinosa*L. inhibit the proliferation, invasion and metastasis of 786-0 cells may through down-regulated the level of p-mTOR protein.

KEY WORDS: *Capparis spinosa*L.; renal cell carcinoma; mTOR; invasion; metastasis

(原文见第 23 页)

Quzhazhigan for Injection with Common Infusion Compatibility Test

TANG Jia-yue^{1,2}, FANG Fang², CHEN Yun-jian²

(1. Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China;

2. Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming 650100, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the stability of compatible Quzhazhigan for injection with 0.9% sodium chloride injection, 5% glucose injection, 10% glucose injection, under four conditions. **Methods** Quzhazhigan for injection was mixed with 5% and 10% glucose infusions, and 0.9% sodium chloride Injection at the room temperature, 2~8°C in dark, room temperature in dark, room temperature in strong light conditions, within 8h after which the changes of appearance, pH value, the changes of degradation products and the changes of Quzhazhigan contents in them were determined by HPLC. **Results** There are no significant changes in appearance, pH value of the mixture solutions, degradation products and Quzhazhigan contents in them within 8h after they were prepared at the 2~8°C in dark, room temperature in dark conditions. **Conclusion** The test that prompts Quzhazhigan for injection can be mixed with the 3 infusions for clinical use within 8h at the 2~8°C in dark, room temperature in dark conditions. And its are available for clinical use compatibility reference.

KEY WORDS: Quzhazhigan; compatibility; stability