

红景天苷对人肾癌细胞生长、侵袭和迁移的调节作用

赵伟, 王彦, 何涛, 袁朝勇

摘要 目的 探究红景天苷(SD)对人肾癌细胞生长、侵袭和迁移的作用。方法 以0、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ SD作用于体外培养的人肾癌细胞 Ketr-3, 利用 CCK-8 法检测培养不同时间(0、1、2、3、4 d)细胞的增殖情况, 用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力, 用划痕实验检测细胞迁移能力, 用 Western blot 检测 Ki67、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达水平。结果 SD 浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时, Ketr-3 细胞活性降低; SD(2、5、10 $\mu\text{mol/L}$)作用 4 d 后, 与 Control 组比较, SD(2、5、10 $\mu\text{mol/L}$)组 Ketr-3 和 Caki-1 细胞增殖倍数显著降低($P < 0.01$), Ki67 的表达水平显著降低($P < 0.01$); SD(2、5、10 $\mu\text{mol/L}$)作用 24 h 后, Ketr-3 和 Caki-1 细胞侵袭能力明显减弱($P < 0.01$), 与 Control 组相比, SD(5、10 $\mu\text{mol/L}$)组迁移能力均显著减弱($P < 0.01$), VEGF 和 MMP-9 的表达水平显著降低($P < 0.01$)。结论 SD 能够抑制人肾癌细胞 Ketr-3 和 Caki-1 的生长、侵袭和迁移。

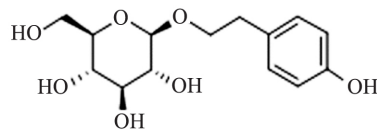
关键词 红景天苷; 人肾癌细胞; 增殖; 侵袭; 迁移

中图分类号 R 736.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)04-0554-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.011

肾细胞癌是一种起源于肾上皮的癌症, 占有肾恶性肿瘤的 90% 以上^[1]。约 30% 的肾细胞癌患者在初次诊断中被诊断为癌症晚期, 由于其预后差, 60% 的患者由于转移性肾细胞癌具有更高的死亡率, 其 5 年生存率低于 10%^[2]。由于肾细胞癌是一种化疗抵抗性癌症, 而手术治疗不能完全清除癌细胞, 且术后复发率达 20%, 导致目前肾细胞癌的治疗效果较差^[3]。因此, 迫切需要探究新的肾癌治疗手段。红景天苷(salidroside, SD)提取于传统中药红景天, 是其重要活性成分之一(图 1), 具有抗缺氧、抗疲劳、抗衰老、防辐射以及保护心血管等重要作用^[4]。已有研究^[5]表明, SD 具有较强抗癌特性,

其能够抑制肿瘤生长、阻滞细胞周期, 在多种癌症中(乳腺癌、肺癌、结肠癌、膀胱癌、胶质瘤等)诱导细胞凋亡。除了能抑制癌细胞的生长, 同样能够抑制肿瘤转移、减少新生血管的形成^[6]。目前 SD 对人肾细胞癌的研究仅限于细胞增殖, 对细胞侵袭和迁移能力的影响尚未见报道。该研究旨在探究 SD 对人肾癌细胞 Ketr-3 的生长、侵袭和迁移的影响, 为将 SD 开发用于肾癌的治疗提供实验依据。



Salidroside C₁₄H₂₀O₇ MW: 300.3

图 1 SD 结构

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人肾癌细胞株 Ketr-3 和 Caki-1 购自美国 ATCC 公司; SD(纯度 > 98%) 购自美国 MedChemExpress 公司; 胎牛血清和 RPMI 1640 细胞培养基购自美国 Cell Signaling Technology 公司; CCK8 试剂盒购自日本株式会社; Ki67、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)一抗购自美国 Millipore 公司; 二抗购自英国 Abcam 公司; Transwell 小室购自美国 Costar 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 Ketr-3 和 Caki-1 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温细胞培养箱中培养。隔天更换培养液, 0.25% 胰酶溶液消化, 以 1:2 的比例传代。

1.2.2 细胞毒性实验 以 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{mol/L}$ SD 处理细胞, 每个处理设 6 个复孔。细胞培养 48 h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10 μl , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温细胞培养箱中孵育 2 h 后, 酶标仪测定其在 450 nm 波长处的吸光度(absorbance, A)值。以 0 $\mu\text{mol/L}$ SD 处理为对照计算细胞活性百分比。

1.2.3 实验分组 以 0.25% 胰酶溶液消化, 磷酸

2018-12-10 接收

基金项目: 贵州省科学技术基金 编号: 黔科合基础(2017)0913

作者单位: 遵义医学院第三附属医院(遵义市第一人民医院)泌尿外科, 遵义 563000

作者简介: 赵伟, 男, 主治医师, 本科;

王彦, 男, 副主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: wyly11@163.com

盐缓冲液(PBS)洗涤后,以无血清 RPMI 1640 培养基混悬细胞密度为 1×10^6 个/ml。接种于 96 孔板,每孔 100 μ l,于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 12 h,根据毒性实验结果将细胞分为 Control 组、SD (2 $\mu\text{mol/L}$) 组、SD (5 $\mu\text{mol/L}$) 组和 SD (10 $\mu\text{mol/L}$) 组,分别加入 SD 0 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 和 10 $\mu\text{mol/L}$ 继续培养 24 h,每组 6 个复孔。

1.2.4 细胞增殖实验 分别在细胞培养第 0、1、2、3、4 天,进行 0.25% 胰酶溶液消化,并用酶标仪测定其在 450 nm 波长处的 A 值。各组比较增殖程度,以 Ketr-3 组增值的倍数表示。

1.2.5 细胞侵袭实验 制备细胞悬液,以 0.25% 胰酶溶液消化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,以无血清 RPMI 1640 培养基混悬细胞密度为 1×10^6 个/ml。取 2 ml 细胞混悬液加至 Transwell 小室,基于 1.2.3 分组,添加 SD。于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温细胞培养箱中孵育 24 h。取出 Transwell 小室用棉签小心拭去基质胶及上室细胞,4% 多聚甲醛固定 10 min,结晶紫室温染色 25 min。显微镜下随机选 5 个视野进行拍照计数,计算平均每个视野的细胞数。

1.2.6 细胞划痕实验 用记号笔在 6 孔板背后划平行的直线。取细胞悬液以 0.25% 胰酶溶液消化重悬,接种在培养皿中,且每个加入培养皿内 5×10^5 个细胞。显微镜观察细胞融合度达到 90% 时,用枪头比对着直尺,尽量垂直于背后的横线划痕,吸去培养基,PBS 洗细胞 3 次,加入无血清培养基培养,基于 1.2.3 分组,添加 SD。在 0 h 和 24 h 取样,拍照记录并进行统计学分析。

1.2.7 Western blot 检测蛋白表达 基于 1.2.3 分组及细胞培养。在培养 48 h 后,利用 RIPA 裂解液提取蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白质浓度后调平,每组分别取 30 μg 蛋白用 10% SDS-PAGE 分离蛋白并转移蛋白到 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,加入适宜浓度一抗于 4 $^\circ\text{C}$ 封闭过夜。第 2 天用缓冲液清洗 PVDF 膜 3 次,加入二抗,室温孵育 1 h 后,加入显色液曝光显影。

1.3 统计学处理 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,对数据进行正态分布和方差齐性检验后,符合条件者采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SD 对肾细胞癌细胞活性的影响 CCK8 实验结果表明,SD 浓度在 0 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ 之间时,Ketr-3

细胞活性保持在 80% 以上,当 SD 浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时,Ketr-3 细胞活性降至 80% 以下,浓度达到 50 $\mu\text{mol/L}$ 及以上时,Caki-1 细胞活性降至 80% 以下。故选择 0 $\mu\text{mol/L}$ 为对照组,选择 2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 SD 进行后续试验(图 2)。

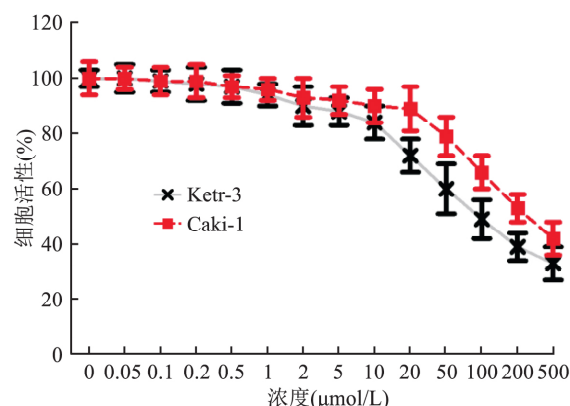


图 2 SD 对 Ketr-3 和 Caki-1 细胞活性的影响

2.2 SD 对肾细胞癌细胞增殖的影响 与 Control 组比较,各浓度 SD (2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 Ketr-3 和 Caki-1 细胞 0 ~ 3 d,SD (2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 组 Ketr-3 和 Caki-1 细胞增殖倍数差异无统计学意义 ($P > 0.05$),作用 4 d 后,SD (2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 组 Ketr-3 和 Caki-1 细胞增殖倍数显著低于 Control 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 3)。同时与 Control 组比较,SD (2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 组 Ketr-3 和 Caki-1 细胞增殖相关蛋白 Ki67 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$),见图 4、表 1、2。

2.3 SD 对肾细胞癌细胞体外侵袭的抑制作用 对 4 组实验细胞经过 24 h 侵袭实验,计数后显示,SD (2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 组 Ketr-3 和 Caki-1 细胞侵袭细胞数均明显低于 Ketr-3 组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 5。

2.3 SD 对肾细胞癌细胞迁移能力的影响 与 Control 组比较,SD (2 $\mu\text{mol/L}$) 处理后其创口愈合率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明 2 $\mu\text{mol/L}$ SD 不能影响 Ketr-3 和 Caki-1 细胞的迁移能力;SD (5、10 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞创口愈合率均显著低于 Control 组 ($P < 0.01$) (图 6)。同时,与 Control 组比较,SD (2、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 组与细胞侵袭和增殖相关蛋白 VEGF 和 MMP-9 的表达水平均显著降低 ($P < 0.01$),见图 4、表 1、2。

3 讨论

近年来,天然药物因其毒性低、生物活性高而广

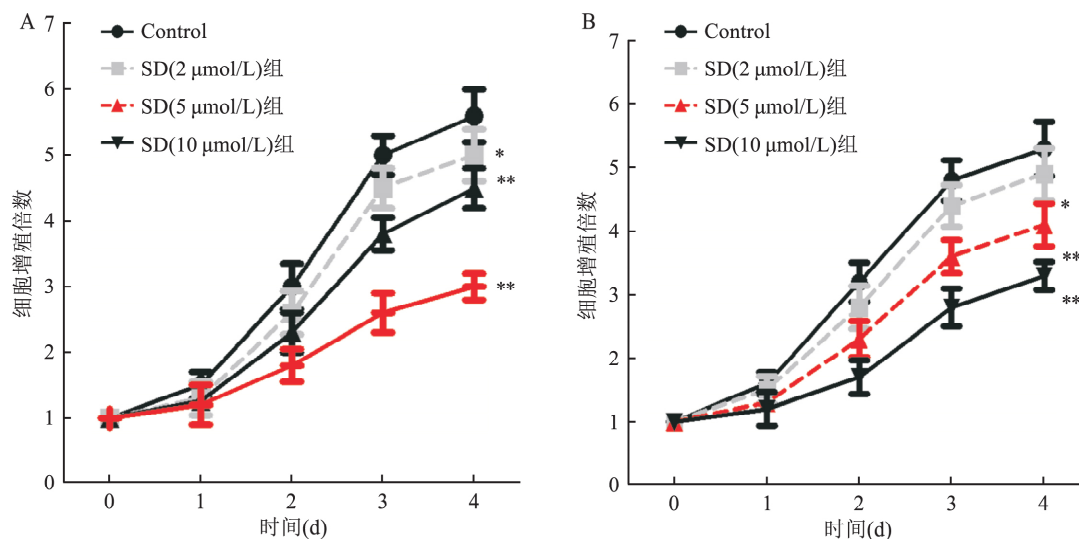


图3 SD对Ketr-3和Caki-1细胞增殖的影响

A: Ketr-3 细胞增殖倍数; B: Caki-1 细胞增殖倍数; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 表1 SD对Ketr-3细胞Ki67、VEGF和MMP-9表达的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

蛋白	Control 组	SD (2 $\mu\text{mol/L}$) 组	SD (5 $\mu\text{mol/L}$) 组	SD (10 $\mu\text{mol/L}$) 组
Ki67	0.64 ± 0.06	$0.45 \pm 0.06^{**}$	$0.31 \pm 0.04^{**}$	$0.25 \pm 0.04^{**}$
VEGF	0.72 ± 0.03	$0.60 \pm 0.04^{**}$	$0.48 \pm 0.04^{**}$	$0.34 \pm 0.03^{**}$
MMP-2	0.75 ± 0.04	$0.58 \pm 0.03^{**}$	$0.41 \pm 0.03^{**}$	$0.35 \pm 0.02^{**}$

与 Control 组比较: ** $P < 0.01$ 表2 SD对Caki-1细胞Ki67、VEGF和MMP-9表达的影响($\bar{x} \pm s$)

蛋白	Control 组	SD (2 $\mu\text{mol/L}$) 组	SD (5 $\mu\text{mol/L}$) 组	SD (10 $\mu\text{mol/L}$) 组
Ki67	0.65 ± 0.06	$0.43 \pm 0.06^{**}$	$0.31 \pm 0.05^{**}$	$0.19 \pm 0.03^{**}$
VEGF	0.72 ± 0.08	$0.55 \pm 0.05^{**}$	$0.41 \pm 0.04^{**}$	$0.26 \pm 0.04^{**}$
MMP-2	0.69 ± 0.06	$0.54 \pm 0.03^{**}$	$0.37 \pm 0.06^{**}$	$0.22 \pm 0.03^{**}$

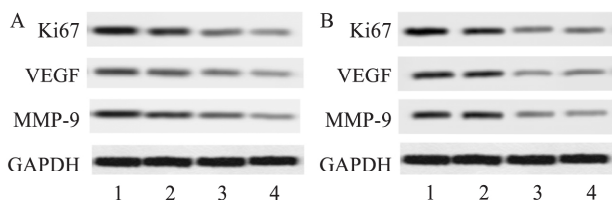
与 Control 组比较: ** $P < 0.01$ 

图4 SD对肾细胞癌细胞中Ki67、VEGF、MMP-9表达的影响

A: Ketr-3 细胞 Ki67、VEGF、MMP-9 的蛋白表达情况; B: Caki-1 细胞 Ki67、VEGF、MMP-9 的蛋白表达情况; 1: Control 组; 2: SD (2 $\mu\text{mol/L}$) 组; 3: SD (5 $\mu\text{mol/L}$) 组; 4: SD (10 $\mu\text{mol/L}$) 组

泛应用于临床和医学研究。红景天是我国传统中药材,SD是从红景天中提取的活性物质,在众多体内和体外实验研究中,都起到多种药理作用,如抗氧化、抗炎、抗病毒、抗癌及细胞凋亡等^[4]。本研究通过 CCK-8 实验证实,0.05 ~ 500 $\mu\text{mol/L}$ SD 能够制

人肾癌细胞 Ketr-3 和 Caki-1 的细胞活性。本研究选择 2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度进行后续试验。

抑制肿瘤细胞的生长是防治肿瘤恶化的最主要的目标,异常的细胞增殖是癌症发展的标志。研究^[5]表明,SD (10、20、50 $\mu\text{g/ml}$) 能够显著抑制人结肠癌细胞 SW1116 的增殖。本文结果显示,SD 能够明显抑制人肾癌细胞和 Caki-1 的增殖,且抑制作用呈现时间和浓度依赖性。Lv et al^[6] 研究发现,SD (20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$) 能够显著抑制人肾癌细胞 A498 和 786-0 的增殖,本实验研究结果与之一致。Ki67 是存在于增殖细胞核中的一种非组蛋白性核蛋白。研究^[7]证实,Ki67 能够定义细胞增殖状态并且是肾细胞癌预后标志物,高水平 Ki67 能够反映高的细胞增殖情况,与多种恶性肿瘤的发展、转移相关。本实验显示,SD 能够显著降低人肾癌细胞

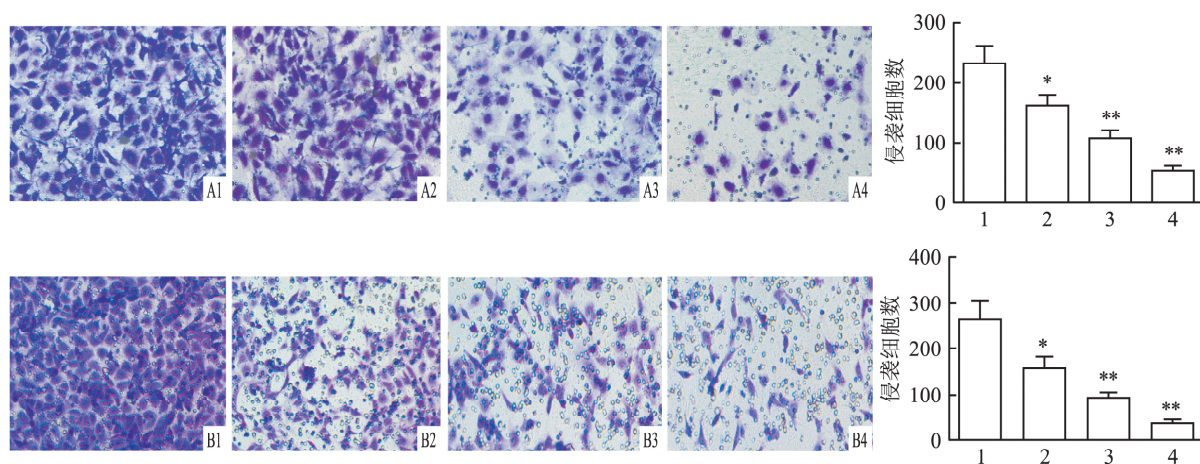


图5 SD对Ket-3和Caki-1细胞侵袭能力的影响 ×400

A: Ket-3 细胞侵袭情况; B: Caki-1 细胞侵袭情况; 1: Control 组; 2: SD(2 μmol/L) 组; 3: SD(5 μmol/L) 组; 4: SD(10 μmol/L) 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

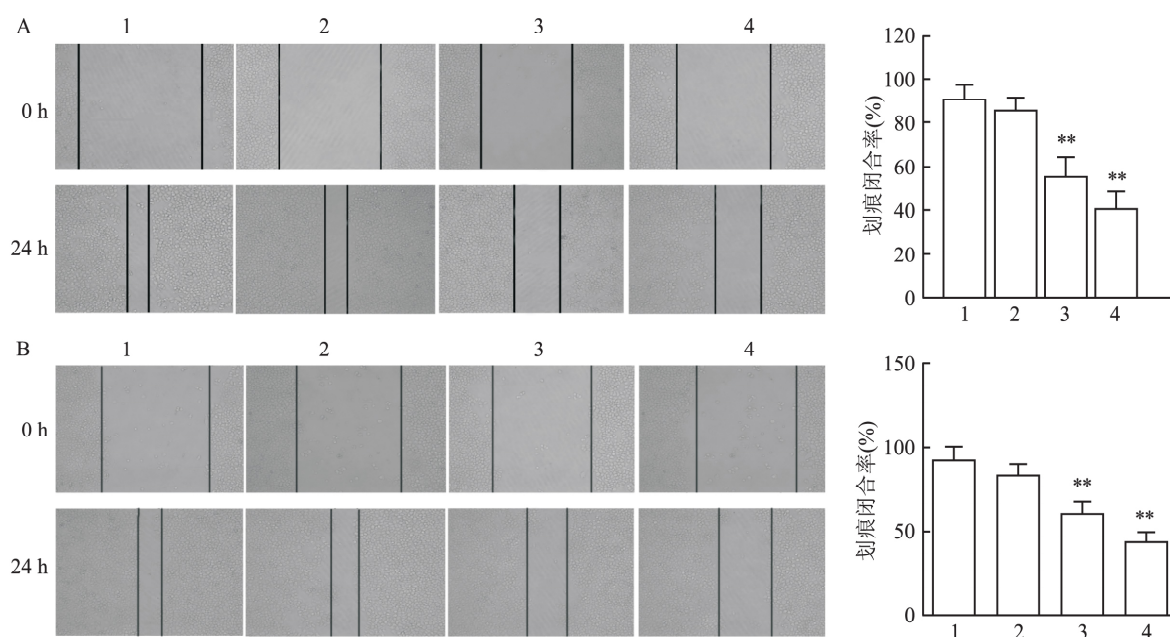


图6 SD对Ket-3和Caki-1细胞迁移能力的影响 ×200

A: Ket-3 细胞迁移情况; B: Caki-1 细胞迁移情况; 1: Control 组; 2: SD(2 μmol/L) 组; 3: SD(5 μmol/L) 组; 4: SD(10 μmol/L) 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

Ket-3 和 Caki-1 中 Ki67 的蛋白表达水平,说明 SD 能够抑制 Ket-3 细胞的增殖,这与本实验细胞增殖结果相呼应。

Transwell 侵袭实验结果表明,SD 能显著减弱人肾癌细胞 Ket-3 和 Caki-1 的体外侵袭能力。划痕实验结果显示,SD 能够显著减弱人肾癌细胞 Ket-3 和 Caki-1 的体外迁移能力。研究^[10]显示,肿瘤的生长、侵袭和迁移与癌症的转移有关。Sun et al^[11] 研究发现,SD 能够抑制人纤维肉瘤细胞 HT1080 的增殖,并且减弱其侵袭和迁移能力。肿瘤细胞的侵袭

和迁移能力是多步骤、多因素的复杂过程。基质金属蛋白酶在肿瘤细胞的侵袭、迁移过程中都起到关键作用^[12],主要通过降解基底膜以及其他细胞外基质成分促进癌细胞的侵袭和迁移^[11]。MMP-9 是 MMPs 家族中的 IV 型胶原蛋白酶,对恶性肿瘤的侵袭和迁移起着重要作用。Sun et al^[11] 研究发现,SD 处理能够降低人纤维肉瘤细胞 HT1080 的 MMP-9 的活性。VEGF 被称为血管通透因子,其能够提高血管的通透性,为肿瘤的浸润及转移提供合适的基础^[12]。Bhattacharya et al^[13] 在结直肠癌细胞研究中

发现, siRNAs 对 VEGF 的消耗显著减弱了结直肠癌细胞的迁移和侵袭能力。Sun et al^[7] 研究发现, SD (10、20、50 $\mu\text{g/ml}$) 处理人结肠癌细胞 SW1116 能显著下调 VEGF 的表达。本实验结果显示, SD 能够显著抑制人肾癌细胞 Ketr-3 和 Caki-1 中 MMP-9 和 VEGF 蛋白的表达, 提示 SD 可能通过抑制 MMP-9 和 VEGF 的蛋白表达, 减弱人肾癌细胞 Ketr-3 和 Caki-1 的侵袭和迁移能力。

参考文献

- [1] Hsieh J J, Purdue M P, Signoretti S, et al. Renal cell carcinoma [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3: 17009.
- [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): 775–80.
- [3] Khan M I, Sobocinska A A, Brodaczewska K K, et al. Involvement of the CB2 cannabinoid receptor in cell growth inhibition and G_0/G_1 cell cycle arrest *via* the cannabinoid agonist WIN 55,212–2 in renal cell carcinoma [J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 583.
- [4] Hu X, Zhang X, Qiu S, et al. Salidroside induces cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(1): 62–7.
- [5] Wu D M, Han X R, Wen X, et al. Salidroside protection against oxidative stress injury through the Wnt/ β -catenin signaling pathway in rats with parkinson's disease [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 1793–806.
- [6] Sun K X, Xia H W, Xia R L. Anticancer effect of salidroside on colon cancer through inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 615–21.
- [7] Lv C, Huang Y, Liu Z X, et al. Salidroside reduces renal cell carcinoma proliferation by inhibiting JAK2/STAT3 signaling [J]. *Cancer Biomark*, 2016, 17(1): 41–7.
- [8] Dudderidge T J, Stoeber K, Loddo M, et al. Mcm2, Geminin, and KI67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(7): 2510–7.
- [9] Clark A G, Vignjevic D M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 36(1): 13–22.
- [10] Sun C, Wang Z, Zheng Q, et al. Salidroside inhibits migration and invasion of human fibrosarcoma HT1080 cells [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3–4): 355–63.
- [11] Shimada T, Nakamura H, Yamashita K, et al. Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human oral squamous cell carcinomas: implications for lymph node metastasis [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2000, 18(2): 179.
- [12] Bhattacharya R, Xia L, Fan F, et al. Abstract 3255: inhibition of intracrine VEGF signaling prevents colorectal cancer cell migration and invasion [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(14 Supplement): 3255.

Effects of salidroside on cell growth, invasion and migration in human renal cell carcinoma cells

Zhao Wei, Wang Yan, He Tao, et al

(Dept of Urology Surgery, The Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College,
First People's Hospital of Zunyi, Zunyi 563000)

Abstract Objective To investigate the effects of salidroside (SD) on cell growth, invasion and migration in human renal cell carcinoma cells. **Methods** After treated with 0, 2, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ SD for 0, 1, 2, 3, 4 days, the rate of cell growth was detected by CCK-8 assay. Transwell assay was used to investigate the effects of SD on cell invasion. Wound healing assay was used to investigate the effects of SD on cell migration. The effects of SD on protein expressions of Ki67, VEGF, MMP-9 were determined by Western blot assay. **Results** After treated with SD ($>20 \mu\text{mol/L}$), cell viability was declined compared with Control group. After treated with SD (2, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) for 4 days, cell growth (folds) of Ketr-3 and Caki-1 cells was decreased significantly compared with group Control ($P < 0.01$). Protein expression of Ki67 was decreased significantly compared with Control group ($P < 0.01$). After treated with SD (2, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, the ability of cell invasion of Ketr-3 and Caki-1 cells was weakened ($P < 0.01$). Compared with Control group, the ability of migration in SD (5, 10 $\mu\text{mol/L}$) group were decreased significantly ($P < 0.01$). Protein expressions of VEGF and MMP-9 were decreased significantly compared with Control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Salidroside can inhibit cell growth, invasion and migration in human renal cell carcinoma Ketr-3 and Caki-1 cells.

Key words salidroside; human renal cell carcinoma cell; proliferation; invasion; migration