

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.08.005

◇ 药学研究 ◇

异丙安替比林通过抑制蛋白激酶 B 通路 诱导人肾癌细胞凋亡和自噬

李明俊,赵冬

作者单位:广东省第二中医院外一科,广东 广州 510095

通信作者:赵冬,男,副教授,硕士生导师,研究方向为中西医结合治疗泌尿外科疾病,E-mail:1050523111@qq.com

基金项目:广东省科技计划项目(20130313c)

摘要:目的 探究异丙安替比林(Propyphenazone)对人肾癌细胞 Caki-1 增殖抑制和凋亡的影响及其分子机制。方法 使用 MTT(四甲基偶氮唑盐)法和克隆形成抑制实验检测异丙安替比林在不同时间和浓度下对 Caki-1 细胞增殖能力的影响;Annexin V-FITC/PI 双染色检测对 Caki-1 细胞凋亡的影响;Hoechst 33342 染色法检测 Caki-1 细胞染色质固缩状态;蛋白质印迹法(Western Blot)检测 Caki-1 细胞的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT(蛋白激酶 B)、磷酸化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 p-AKT 以及 DNA 修复酶 PARP 蛋白表达变化;激光共聚焦显微镜检测 LC3 蛋白在细胞中的点状聚集。结果 MTT 实验结果表明异丙安替比林可抑制人肾癌细胞 Caki-1 的增殖($P < 0.05$),同时,异丙安替比林分别处理 24 h、48 h、72 h 后,所对应的半抑制浓度(IC_{50})分别为 105 μ M、83 μ M、56 μ M;同时,克隆形成抑制实验表明 20 μ M 和 40 μ M 的异丙安替比林处理 Caki-1 细胞后,克隆形成率分别降为 38% ($P < 0.05$) 和 20% ($P < 0.01$);流式结果表明,当使用 0 μ M、40 μ M、80 μ M 和 100 μ M 的异丙安替比林处理 Caki-1 细胞后,细胞凋亡率分别为 7.4%、13.5%、34.5% 和 50.9%;Western Blot 结果表明,随着异丙安替比林浓度的增加,p-AKT 蛋白表达降低,并伴随 DNA 修复酶 PARP 失活。免疫荧光实验结果表明异丙安替比林可能诱导细胞发生自噬。结论 异丙安替比林显著抑制人肾癌细胞 Caki-1 细胞增殖,并通过抑制 AKT 通路诱导肾癌细胞发生凋亡和自噬。

关键词:肾肿瘤; 异丙安替比林; Caki-1 细胞; 细胞凋亡; 自噬; 蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶; 流式细胞术

Propyphenazone induces apoptosis and autophagy through inhibiting AKT signalling pathway in human renal carcinoma cells

LI Mingjun, ZHAO Dong

Author Affiliation: Department of Surgery, Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital,
Guangzhou, Guangdong 510095, China

Abstract: Objective To investigate the effects of propyphenazone on growth and apoptosis, and the antitumor mechanism in Caki-1 cells (human renal carcinoma cells). **Methods** The effects of propyphenazone on proliferation of Caki-1 cells were detected by MTT assay and colony formation assay. Cell apoptosis was analyzed using Annexin V-FITC/PI staining by flow cytometry. The cellular morphology changes of Caki-1 cells were observed by fluorescence microscopy and Hoechst 33342 staining was used to observe chromatin state of Caki-1 cells treated with propyphenazone. The expression of AKT, p-AKT and cleaved-PARP in Caki-1 cells was measured using Western Blot. The punctate dots of LC3 were evaluated using confocal-immunofluorescence. **Results** MTT assay showed that the proliferation of Caki-1 cells was inhibited by propyphenazone in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05$). IC_{50} in different time (24 h, 48 h, 72 h) was 105 μ M, 83 μ M, 56 μ M, respectively. Colony formation assay showed that propyphenazone inhibited colony formation, and colony forming efficiency was decreased to 38% ($P < 0.05$) and 20% ($P < 0.01$) by the treatment of 20 μ M and 40 μ M propyphenazone. Flow cytometry analysis indicated when Caki-1 cells were treated with propyphenazone (0 μ M, 40 μ M, 80 μ M, 100 μ M), apoptosis ratio was 7.4%, 13.5%, 34.5%, 50.9%, respectively. Propyphenazone downregulated the expression of p-AKT with different concentrations. In addition, cleaved-PARP could be detected by western blot, which demonstrated that propyphenazone induced apoptosis. Propyphenazone induced autophagy by increasing LC3 punctate dots. **Conclusion** Propyphenazone significantly inhibited growth of Caki-1, and induced cell apoptosis and autophagy through inhibition of AKT pathway.

Key words: Kidney neoplasms; Propyphenazone; Caki-1 cells; Apoptosis; Flow cytometry; Protein-serine-threonine kinases; Autophagy

虽然,人们对肿瘤的认知和理解已经取得很大的进步,但是,肿瘤依然是威胁人类生命健康的重

要原因之一^[1]。考虑到抗肿瘤药物研发费用高、失败率高和试验周期长等问题,“老药新用”抗肿瘤有望成为一种行之有效的治疗方案^[2]。异丙安替比林(Propyphenazone)是一种安替比林衍生物,并具有与安替比林相类似的解热、镇痛功效^[3]。然而,这种抗炎药物对于肿瘤的作用和机制尚未报道。我们通过一系列体外细胞实验发现,异丙安替比林对肾癌细胞系 Caki-1 的增殖具有抑制作用,并且初步探究了其作用机制,为其抗肿瘤作用以及临床应用的进一步研究奠定基础。

本研究起止时间为 2016 年 12 月至 2017 年 9 月。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂 人肾癌细胞系 Caki-1 和人肝细胞系 LO2 由暨南大学惠赠。异丙安替比林购买自 MCE 公司(货号 HY-A0273)。MTT(四甲基偶氮唑盐)和 Hoechst 33342 购自 Sigma 公司,Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自天津三箭有限公司。

1.2 抗体和仪器 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT(蛋白激酶 B)、磷酸化的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)、DNA 修复酶(PARP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、自噬标志物 LC3 的蛋白一抗均购自 Cell Signaling Technology 公司。超净台购买自江苏苏净集团,细胞培养箱购买自 Thermo Electron Corporation 公司。激光共聚焦显微镜购买自 Olympus 公司。FACS 流式细胞仪购买自 Beckman 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人肾癌 Caki-1 细胞系用 McCoy's 5A 培养基(含有 10% 胎牛血清)、人肝细胞 LO2 细胞系用 DMEM 培养基(含有 10% 胎牛血清)于 37℃、含 5% 二氧化碳的恒温培养箱中培养。培养 2 d 后更换新鲜培养基,当细胞生长到 80% 时,用 0.25% 胰酶消化并传代。

1.3.2 MTT(四甲基偶氮唑盐)实验 生长状态良好的 Caki-1 细胞种于 96 孔板中,每孔先加入 100 μ L 细胞悬液,细胞密度 8 000 个/孔,培养 24 h。待细胞贴壁后再加入不同浓度的异丙安替比林 100 μ L,然后置于培养箱分别培养 24 h、48 h、72 h。MTT 检测前,每孔加入 10 μ L 5 g/L MTT 孵育 4~6 h,弃去上清,每孔加入 100 μ L 二甲基亚砜(DMSO)溶液,结晶充分溶解后,酶联检测仪的波长调整为 570 nm,检测每孔的光密度值(OD 值),然后,计算 Caki-1 细胞增殖率。

1.3.3 克隆形成抑制实验 生长状态良好的人肾癌细胞系 Caki-1,接种于 6 孔板中(600 个细胞/

孔),置于恒温培养箱中,培养 2 周后弃去上清,用磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗 3 遍,加入 75% 乙醇固定 15 min,吸去固定液后,适量 0.1% 结晶紫染色 30 min 后,冲洗,干燥,拍照。

1.3.4 Hoechst 33342 染色 生长状态良好的人肾癌细胞系 Caki-1 置于 5% 二氧化碳培养箱培养 24 h 后,去除培养基,PBS 洗涤 3 遍,加入 Hoechst 33342 避光染色 15 min,流水冲洗干净,晾干,显微镜拍照。

1.3.5 流式细胞术检测细胞凋亡 生长状态良好的人肾癌细胞系 Caki-1 接种于 6 孔板,24 h 后加入不同浓度的异丙安替比林。48 h 后收集细胞,2 000 r/min,离心 5 min,弃去上清,PBS 洗 1 遍,加入 200 μ L Binding Buffer 吹悬细胞,分别加入 1 μ L Annexin V-FITC 和 1 μ L 碘化丙啶(PI),混匀,避光,室温染色 15 min,流式上机检测凋亡比例。

1.3.6 蛋白质印迹法(Western Blot)检测相关信号通路蛋白 人肾癌细胞系 Caki-1 用不同浓度的异丙安替比林处理 24 h 后,PBS 洗 3 遍,加入 RIPA 细胞裂解液(含蛋白酶和磷酸酶抑制剂)冰上裂解 15 min,12 000 r/min,4℃离心 15 min,吸取上清至新的 EP 管,然后,BCA 法测定蛋白浓度。取 25 μ g 蛋白上样跑电泳,转膜,封闭,一抗 4℃孵育过夜,等渗缓冲盐溶液(TBST)洗 4 遍,每遍 5 min,二抗室温孵育至少 1 h,TBST 洗 4 遍,每遍 5 min,化学发光显色。

1.3.7 免疫荧光 生长状态良好的 Caki-1 细胞种于含有玻片的 24 孔板,异丙安替比林处理 24 h 后,吸出原培养基,PBS 洗 2 遍,每遍 3 min。然后,加入 4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 2 遍,每遍 3 min,然后,加入 0.25% Triton X-100 打孔,PBS 洗 2 遍,每遍 3 min。加入 4% 牛血清蛋白(BSA)封闭后孵育一抗(1:200 稀释),室温 1 h,吸出液体,PBS(含 2% Tween 20)洗 2 遍,每遍 3 min。然后,加入二抗(1:200 稀释)室温孵育 1 h。吸出液体,PBS(含 2% Tween 20)洗 2 遍,每遍 3 min。经 DAPI 染核后,再将玻片取出晾干后,置于激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.4 统计学方法 本实验中所有数据采用 SPSS 17.0 进行统计学处理, $\bar{x} \pm s$ 表示,并对数据进行单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验法并行 3 次独立重复试验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异丙安替比林对人肾癌 Caki-1 和人肝细胞 LO2 增殖抑制的影响 MTT 细胞活性实验表明,对照组 Caki-1 细胞增殖率为 100%,异丙安替比林(20、40、80、100 μ M)组处理 24 h 的细胞增殖率分

别为 $(89.1 \pm 3.6)\%$ 、 $(80.5 \pm 6.2)\%$ 、 $(78.5 \pm 3.1)\%$ 、 $(53.2 \pm 2.4)\%$ 。异丙安替比林(20、40、80、100 μM)组处理 48 h 的细胞增殖率分别为 $(84.5 \pm 5.3)\%$ 、 $(82.6 \pm 2.5)\%$ 、 $(73.6 \pm 4.2)\%$ 、 $(40.6 \pm 6.8)\%$ 。异丙安替比林(20、40、80、100 μM)组处理 72 h 的细胞增殖率分别为 $(85.7 \pm 4.9)\%$ 、 $(63.4 \pm 2.1)\%$ 、 $(20.4 \pm 2.8)\%$ 、 $(11.4 \pm 4.1)\%$ 。由此证明,异丙安替比林对 Caki-1 细胞增殖呈现时间依赖性和浓度依赖性的抑制作用。经 SPSS 17.0 软件计算,异丙安替比林处理 24 h 后,对 Caki-1 细胞的半抑制浓度(IC_{50}) = 105 μM ;异丙安替比林处理 48 h 后,对 Caki-1 细胞的 IC_{50} = 83 μM ;异丙安替比林处理 72 h 后,对 Caki-1 细胞的 IC_{50} = 56 μM 。然而,对人正常肝细胞 LO2 无显著增殖抑制作用($P > 0.05$),见图 1。

2.2 异丙安替比林对人肾癌 Caki-1 细胞克隆形成抑制的作用 异丙安替比林作用于 Caki-1 细胞 7 d,与对照组相比,随着异丙安替比林浓度增加,细胞集落克隆数显著减少,并且克隆体积显著变小($P < 0.05$)。20 μM 和 40 μM 的异丙安替比林处理 Caki-1 细胞后,克隆形成率分别降为 38% ($P < 0.05$)和 20% ($P < 0.01$),见图 2。

2.3 异丙安替比林对人肾癌 Caki-1 细胞凋亡形态的影响 Hoechst 33342 染色结果表明,对照组的 Caki-1 细胞核内染色均一,说明细胞状态良好。随着异丙安替比林的浓度增加,Caki-1 细胞核内出现聚集点,说明 Caki-1 细胞发生凋亡,并伴随染色质的固缩,见图 3。

2.4 异丙安替比林对人肾癌 Caki-1 细胞凋亡的影响 Annexin V-FITC/PI 检测凋亡细胞比例,结果表明,Caki-1 细胞在不同浓度的异丙安替比林(40 μM 、80 μM 、100 μM)处理下,随着浓度增加,凋亡的 Caki-1 细胞比例逐渐增加,其中,当使用 0 μM 、40

μM 、80 μM 和 100 μM 的异丙安替比林处理 Caki-1 细胞后,细胞凋亡率分别为 7.4%、13.5%、34.5% 和 50.9%,见图 4。

2.5 Western Blot 检测细胞凋亡相关蛋白表达水平 不同浓度异丙安替比林处理 Caki-1 细胞 24 h,随着药物处理浓度的增加,p-AKT 蛋白表达逐渐降低,但对 AKT 蛋白的表达未有影响,并且 PARP 出现酶切条带,证明异丙安替比林抑制了 AKT 蛋白的活性,并且诱导 Caki-1 细胞发生了凋亡,其中,80 μM 处理细胞后,细胞凋亡最为显著,见图 5。

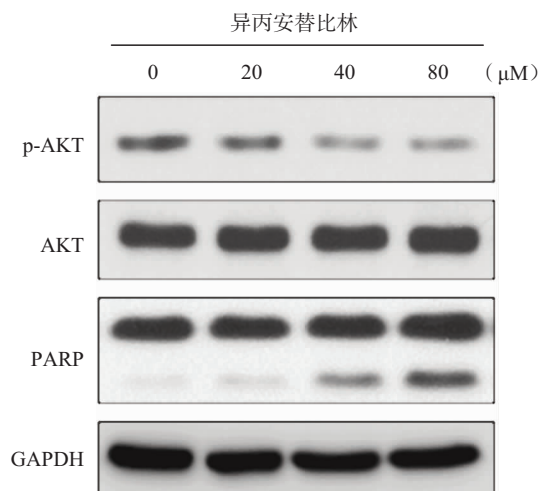


图5 异丙安替比林对人肾癌 Caki-1 细胞凋亡和 AKT 通路的影响

2.6 异丙安替比林诱导人肾癌 Caki-1 细胞自噬 免疫荧光检测发现,异丙安替比林(80 μM)处理人肾癌 Caki-1 细胞 24 h 后,LC3 出现点状聚集现象,而 DMSO 对照组 LC3 呈现弥漫状分布,见图 6。这表明异丙安替比林很可能诱导了 Caki-1 细胞发生了自噬现象。

3 讨论

肾癌是最为常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,居泌尿系统恶性肿瘤第二位^[4],来源于肾上皮组织。

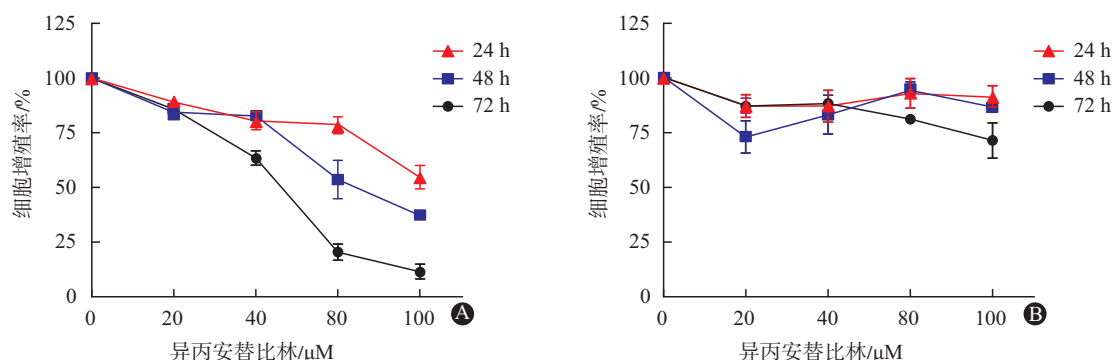


图1 异丙安替比林对人肾癌 Caki-1 (A) 和人肝细胞 LO2 (B) 增殖的影响

流行病学研究表明,仅2012年肾癌发病率占男性恶性肿瘤发病率的第9位,占女性恶性肿瘤发病率的第14位,并仍处于上升趋势^[5]。一旦出现周围组织侵犯或者远端转移,五年生存率小于10%。目前,临床主要治疗策略有:肾脏切除、靶向治疗和免疫治疗^[6]。随之带来的治疗费用高、周期长、耐药风险大等原因,因而迫切需要安全有效的辅助性抗肿瘤药物。

在这里,我们发现一种临床批准使用的抗炎、镇痛药物——异丙安替比林,具有抑制人肾癌细胞系 Caki-1 增殖的作用,并且与克隆形成抑制实验的结果趋势一致。通过流式细胞术发现,异丙安替比林能诱导 Caki-1 细胞的凋亡。进一步的 Hoechst 33342 染色更加表明,异丙安替比林使得 Caki-1 细胞核发生染色质的固缩,并呈现出细胞凋亡的表型。

AKT,也称为蛋白激酶 B,是 PI3K/AKT 信号通路的关键蛋白,是细胞重要的生存通路,与多种细胞生物学进程相关,如葡萄糖代谢、细胞凋亡、细胞增殖和细胞迁移等^[7]。AKT 可分为 3 个亚型: AKT1、AKT2 和 AKT3^[8]。AKT1 主要通过抑制凋亡并且诱导胞内蛋白合成来促进细胞的生存。AKT2 主要参与胰岛素信号的转导。AKT3 的功能未知,尚未有大量的研究报道。AKT 与人类多种肿瘤相关,而磷酸化的 AKT 是其活化形式,当 AKT 激活后,会通过磷酸化下游 Forkhead 家族的转录因子,导致细胞凋亡相关基因的转录表达下调,从而促进细胞的增殖^[9]。细胞凋亡包括死亡受体介导的细胞凋亡、B 淋巴细胞瘤-2(BCL-2)家族介导的内源性凋亡和内质网压力(ER-Stress)介导的细胞凋亡。其中,内源性凋亡主要由 BCL-2 家族调节,通过半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-9(Caspase-9)和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(Caspase-3)的级联反应,导致下游 DNA 修复酶 PARP 失活,最终使得细胞发生凋亡^[10-12]。我们通过 Western Blot 发现,异丙安替比林对人肾癌 Caki-1 细胞 AKT 蛋白表达未有影响,但是显著下调磷酸化 AKT 的表达,进而抑制了 AKT 蛋白活性,并促进 PARP 切割失活,这些结果均与细胞凋亡的表型一致。

LC3 由 MAP1LC3A 基因编码,是自噬体膜的内在组件,主要参与自噬泡的形成过程。LC3 被认为是细胞自噬分子标志物,并在自噬领域中被广泛研究^[13]。当细胞发生自噬时,LC3 由 I 型转变为 II 型,并与 p62(自噬底物识别受体)结合,并被包裹于自噬体内膜,此时,LC3 会在细胞中发生点状聚集^[14-15]。本研究发现,异丙安替比林处理 Caki-1 细

胞后,通过激光共聚焦显微镜能够明显观察到 LC3 的点状聚集,意味着细胞在药物处理条件下发生了自噬。

综上所述,异丙安替比林能抑制人肾癌细胞的增殖,并通过抑制 AKT 和 PARP 活性而促进细胞发生凋亡和自噬。本研究工作将有助于异丙安替比林作为廉价抗癌药物或辅助抗癌药物的研究和开发。

(本文图 2~4, 6 见插图 8-3)

参考文献

- [1] HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer; the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [2] SKROTT Z, MISTRIK M, ANDERSEN KK, et al. Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4 [J]. *Nature*, 2017, 552(7684): 194-199.
- [3] RADWAN MF, DALBY KN, KAOUD TS. Propyphenazone-based analogues as prodrugs and selective cyclooxygenase-2 inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5(9): 983-988.
- [4] 植凡, 李先承, 梁辉. 肾癌根治术中淋巴结清扫对生存预后的影响[J]. *安徽医药*, 2015, 19(11): 2119-2122.
- [5] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide; sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386. DOI:10.1002/ijc.29210.
- [6] MOUALLEM NE, SMITH SC, PAUL AK. Sarcomatoid renal cell carcinoma; biology and treatment advances [J]. *Urol Oncol*, 2018, 36(6): 265-271.
- [7] MANNING BD, TOKER A. AKT/PKB signaling; navigating the network [J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405.
- [8] HONARDOOST M, SMAH R. Triangle of AKT2, miRNA, and tumorigenesis in different cancers [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, 185(2): 524-540.
- [9] LIEN EC, DIBBLE CC, TOKER A. PI3K signaling in cancer; beyond AKT [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 62-71.
- [10] DANIAL NN. Bcl-2 family proteins; critical checkpoints of apoptotic cell death [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(24): 7254-7263.
- [11] DANIAL NN, KORSMEYER SJ. Cell death; critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.
- [12] JORGENSEN I, RAYAMAJHI M, MIAO EA. Programmed cell death as a defence against infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(3): 151-164.
- [13] KOSTER S, KLEVORN T, PAPAVINASASUNDARAM K, et al. Consequence of enhanced LC3-trafficking for a live, attenuated M. tuberculosis vaccine [J]. *Vaccine*, 2018, 36(7): 939-944.
- [14] DUPONT N, ORHON I, BAUVY C, et al. Autophagy and autophagic flux in tumor cells [J]. *Methods Enzymol*, 2014, 543: 73-88.
- [15] KLIONSKY DJ, ABDALLA FC, ABELIOVICH H, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8(4): 445-544.

(收稿日期: 2018-02-12, 修回日期: 2018-03-21)