

网络出版时间:2022-12-26 17:04:30 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1522.014.html

莱菔硫烷对人肾癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制

赵余祥,吴旺宇,虞舟廷,钱伟伟,于德新,张涛

摘要 目的 探讨莱菔硫烷(SFN)对人肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭的影响及作用机制。**方法** 体外培养人肾癌细胞786-O,并将其分为4组:空白对照组、SFN低浓度组(5 $\mu\text{mol/L}$)、SFN中浓度组(10 $\mu\text{mol/L}$)、SFN高浓度组(20 $\mu\text{mol/L}$),用CCK-8检测肾癌细胞786-O增殖活化的情况;分别用细胞划痕、Transwell迁移实验观察SFN对肾癌细胞786-O迁移能力的影响;用Transwell侵袭实验观察SFN对肾癌细胞786-O侵袭能力的影响;运用Western blot和qRT-PCR方法检测SFN对上皮间质转化(EMT)相关蛋白和mRNA表达的影响;用Western blot检测SFN对NF- κ B信号通路相关蛋白表达的影响。**结果** SFN处理24、48、72 h后,肾癌细胞786-O的增殖活性随着SFN浓度的升高而下降;与对照组相比,SFN处理组的肾癌细胞迁移和侵袭能力均显著降低;此外,随着SFN浓度的升高,肾癌细胞786-O中E-cadherin的mRNA及蛋白表达水平逐渐升高,而N-cadherin、Vimentin的mRNA及蛋白表达水平随之降低;NF- κ B信号通路

相关蛋白磷酸化的p65和磷酸化的I κ B α 的蛋白水平随SFN浓度增加而降低。**结论** SFN能够显著抑制人肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭的能力,其可能通过抑制NF- κ B信号通路进而阻碍肾癌的EMT进程来发挥抗肿瘤作用。

关键词 莱菔硫烷;肾癌细胞;上皮间质转化;核因子- κ B

中图分类号 R 737.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0079-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.014

在泌尿系统中,肾癌是一种常见的恶性肿瘤,肾癌的治疗一直是泌尿系统肿瘤研究的热点和难点^[1-2]。莱菔硫烷(sulforaphane, SFN)作为一种天然植物化合物,主要存在于十字花科蔬菜中,具有抗氧化、抗炎作用,能诱导细胞周期停滞和凋亡^[3]。研究^[4]显示植物来源的SFN能够诱导多种肿瘤细胞的凋亡如肺癌、肝癌、胃癌等,进而发挥抗肿瘤作用。SFN最近还被宣布为靶向癌症干细胞的“五大”植物化学物质之一^[5]。然而SFN对肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力的影响以及其相关的潜在机制尚无报道。研究^[6]表明,在癌症中上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)与肿瘤的发生、迁移、侵袭和耐药能力有关。文献^[7]报道,核因子- κ B(Nuclear factor-kappa B, NF- κ B)在许多癌症

2022-09-05 接收

基金项目:安徽医科大学第二附属医院博士科研启动基金(编号:2018BSJJ012);安徽省自然科学基金(编号:2008085MH290)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院泌尿外科,合肥 230601

作者简介:赵余祥,男,硕士研究生;

张涛,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhangtao@ahmu.edu.cn

28 consecutive days using an ultrasound stimulator. The modified neurological functioning score (mNSS) was performed on rats in each group at 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days postoperatively, and then the brains were extracted to detect pathological changes at the injury site and the mRNA and protein expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), growth associated protein-43 (GAP-43), postsynaptic density protein-95 (PSD-95) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) by HE staining, immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR. **Results** Compared with the control group, the mNSS score increased in the TBI group ($P < 0.05$), the expression of GAP-43 and PSD-95 decreased, and the expression of GFAP increased ($P < 0.05$); Compared with the TBI group, the mNSS score of MSC group was lower ($P < 0.05$), the expression of BDNF, GAP-43, PSD-95 increased, and the expression of GFAP decreased ($P < 0.05$); mNSS scores were lower in the combined treatment group than those in the MSC group ($P < 0.05$), the expression of BDNF, GAP-43, PSD-95 increased, and the expression of GFAP decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism by which MSC combined with LITUS exerts neuroprotective effects in TBI may be related to the promotion of BDNF, GAP-43, and PSD-95 expression and reduction of GFAP expression.

Key words traumatic brain injury; low-intensity transcranial ultrasound; mesenchymal stem cells; combined therapy; neurological impairment

中被激活,在肿瘤的发生、增殖、迁移和侵袭中发挥重要作用,并且对 EMT 的诱导和调控至关重要。该研究旨在探讨 SFN 通过抑制 NF- κ B 信号通路负向调控肾癌的 EMT 进程来抑制人肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭的能力。

1 材料与方法

1.1 试剂 人肾癌细胞系 786-O(武汉普诺赛公司);莱菔硫烷(美国 Selleck 公司);BCA 蛋白测定试剂盒(上海碧云天公司);1640 培养液(美国 Hyclone 公司);CCK-8 试剂盒(北京兰杰柯公司);PVDF 膜及化学发光试剂(上海碧云天公司);E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、磷酸化 p65、非磷酸化 p65、磷酸化 I κ B α 、非磷酸化 I κ B α (美国 CST 公司), GAPDH(江苏亲科公司);NF- κ B 抑制剂(PDTC,上海碧云天公司);Transwell 小室(美国 Corning 公司);逆转录和 qRT-PCR 试剂盒(上海新贝公司),引物序列由上海新贝生物公司合成,见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')
E-cadherin	F: CATCGCTTACCATCCTCAG R: ACTCCTGTGTTCTGTTAATGG
N-cadherin	F: CTCCAGAGTTTACTGCCATGAC R: GTAGGATCTCCGCCACTGATT
Vimentin	F: GGACCTCTACGAGGAGAGAT R: GCCTCCAAGGAAGAGACTGA
GAPDH	F: GTCTCTCTGACTTCAACAGCG R: ACCACCCTGTGCTGTAGCCAA

1.2 主要仪器 高压灭菌锅(上海博迅公司);CO₂ 培养箱、酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);千分之一天平(德国赛多利斯公司);实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);低温离心机(德国艾本德公司);化学发光分析仪(上海天能公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中培养细胞。置于 37 °C 的 5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 传代 1 次,隔日更换新鲜培养液,保留 5 代后方可进行后续实验研究。

1.3.2 细胞活性检测(CCK-8) 肾癌细胞 786-O 接种于 96 孔板中,每组设 6 个复孔。设置 SFN 浓度为 0、5、10、20 μ mol/L 组,培养 24 h 后,每孔加入 10 μ l CCK-8 溶液,接种后的 96 孔板置于 37 °C 培养箱中继续培养 2 h。检测 450 nm 处的吸光度,计算

出半数抑制浓度 IC₅₀ 后以该浓度种板并分别培养 24、48、72 h,计算细胞活性。

1.3.3 划痕愈合实验 肾癌细胞 786-O 接种于提前画好横线的 6 孔板中,铺完细胞 24 h 后,用 200 μ l 枪头垂直于 6 孔板底部的横线划两条竖线,PBS 洗涤 3 次后,加入不含血清的 1640 培养基和 0、5、10、20 μ mol/L 浓度的 SFN 培养箱中培养。于 0、12 h 观察划痕愈合的情况。

1.3.4 Transwell 细胞迁移能力实验 提前用不含血清的 1640 培养基水化 Transwell 小室基底膜。将处理好的各组细胞重悬,取 200 μ l 加到小室上室中,再加入适量含血清 1640 培养基到下室中,培养 24 h,小室洗涤后用多聚甲醛室温固定 30 min,待晾干后,再用 0.1% 的结晶紫水溶液染色 20 min,用棉签轻轻除去上室未穿过膜细胞。洗涤后每孔任意选择 5 个视野进行拍照,统计迁移细胞数,计算均值。

1.3.5 Transwell 细胞侵袭能力实验 每个 Transwell 小室上室中加入 50 μ l Matrigel 基质胶(无血清培养液稀释,1:8),室温下 1.5 h 凝固。后面方法同上。

1.3.6 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 将对数期的细胞铺在 6 孔板中,待贴壁后更换含有不同浓度 SFN 的培养液,待细胞长满后,每孔加入 1 ml TRIzol 试剂慢提 RNA。于 260 nm 波长处检测其浓度,按照试剂盒(NovaBio)要求以不超过 50 mg/L 浓度进行逆转录获得 cDNA。再按照 qPCR 试剂盒(NovaBio)要求混合液体,以两步法 PCR 反应程序进行扩增,设置 GAPDH 作为内参,按照 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 的相对表达量。

1.3.7 Western blot 在不同浓度(0、5、10、20 μ mol/L) SFN 的 786-O 细胞中加入 RIPA 裂解液提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。进行凝胶电泳后,转膜,脱脂奶粉封闭 1 h。洗膜后一抗孵育 4 °C 过夜。次日洗膜 3 次后二抗孵育 1.5 h,洗膜 3 次后显影。结果采用 Image J 软件进行灰度值分析,以 GAPDH 作为内参。

1.4 统计学处理 采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间差异采用独立样本 *t* 检验,多组间差异使用单因素方差分析。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义,所有实验至少独立进行 3 次重复。

2 结果

2.1 SFN 对 786-O 细胞增殖能力的影响 不同浓

度(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)的SFN(含FBS)处理肾癌细胞786-O 24 h后,采用CCK-8法检测,结果显示5、10及20 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞活性与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,细胞活性明显降低($F = 161.80, P < 0.05$),其中半数抑制浓度 IC_{50} 是10.38 $\mu\text{mol/L}$,用 IC_{50} 浓度的SFN(含FBS)处理肾癌细胞786-O各24、48、72 h后,结果显示随着作用时间的延长,细胞增殖活性不断下降($F = 45.50, P < 0.05$),因此,SFN对肾癌细胞786-O的抑制作用呈浓度-时间依赖性。见图1。

2.2 SFN对786-O细胞迁移能力的影响 不同浓度SFN处理肾癌细胞786-O后,用细胞划痕愈合实验观察细胞的迁移能力的变化。用不同浓度(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)SFN(不含FBS)处理细胞后,划痕的愈合的能力随剂量的增大而降低($F = 66.36, P < 0.05$),结果表明SFN显著降低肾癌细胞786-O的迁移能力。Transwell迁移实验也证实了上述结果($F = 57.16, P < 0.05$),见图2。

2.3 SFN对786-O细胞侵袭能力的影响 不同浓度SFN处理肾癌细胞786-O后,通过Transwell实验观察细胞的侵袭能力的改变。结果显示,经不同梯度浓度(0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)SFN处理的细胞穿过Matrigel基质胶侵袭的数目逐渐减少($F = 93.98, P < 0.05$)。以上数据表明,肾癌细胞786-O穿过基质胶的侵袭能力被SFN有效抑制,见图3。

2.4 SFN对786-O细胞中EMT相关mRNA表达

的影响 利用qRT-PCR实验检测了EMT过程相关mRNA表达的改变。结果显示,经过0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ SFN处理之后,EMT水平被明显抑制,具体表现在E-cadherin mRNA表达水平上升($F = 56.35, P < 0.05$),同时N-cadherin和Vimentin mRNA表达都有不同程度的下降($F = 96.40, F = 54.31, P < 0.05$),见图4。

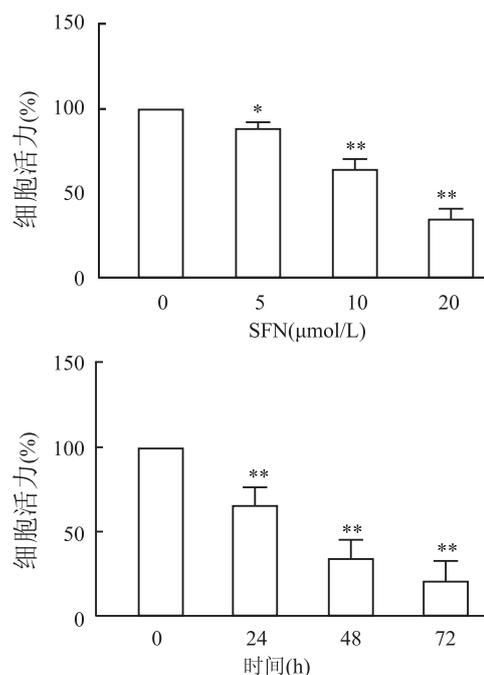


图1 SFN对786-O细胞增殖能力的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

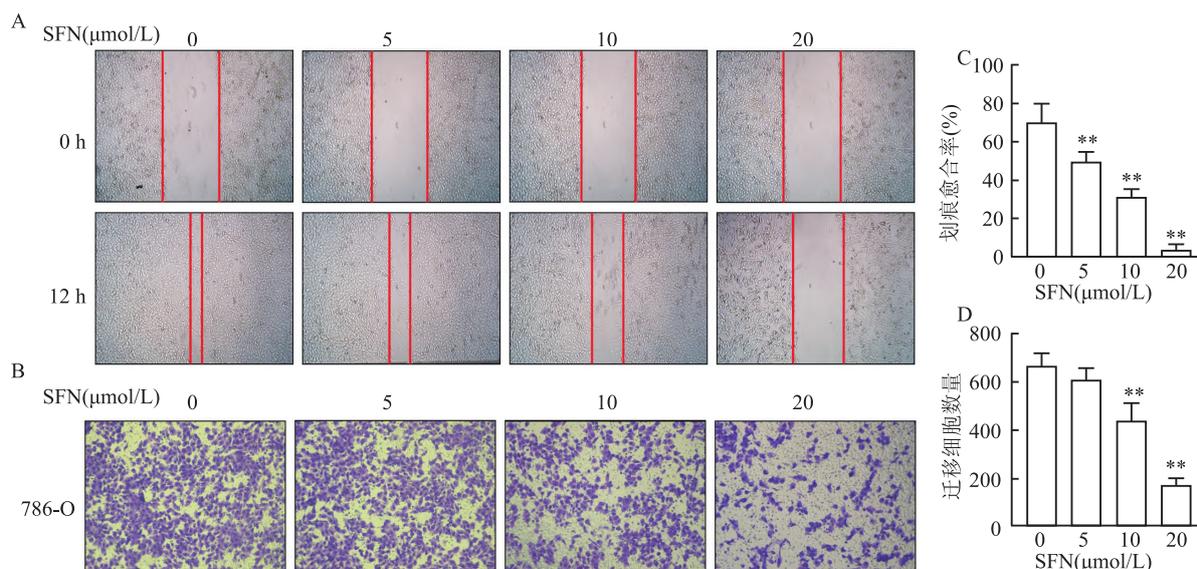


图2 SFN对786-O细胞迁移能力的影响

A:786-O细胞划痕愈合实验的代表性图像 $\times 40$;B:786-O细胞Transwell迁移实验的结果 $\times 200$;C:786-O细胞划痕愈合实验的定量统计图;D:786-O细胞Transwell迁移实验的定量统计图;与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.5 SFN 对 786-O 细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响 结果显示,经过 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ SFN 处理之后,EMT 被明显抑制,具体表现在 E-cadherin 蛋白的表达水平上升($F = 15.53, P < 0.05$),同时 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达均有不同程度的下降(F

$= 14.99, F = 14.93, P < 0.05$),见图 5。

2.6 SFN 对 786-O 细胞中 NF- κB 信号通路相关蛋白表达的影响 结果显示,经过 0、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ SFN 处理之后,NF- κB 信号通路被显著抑制,磷酸化 p65 和磷酸化 I $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白表达随着浓度增加而下

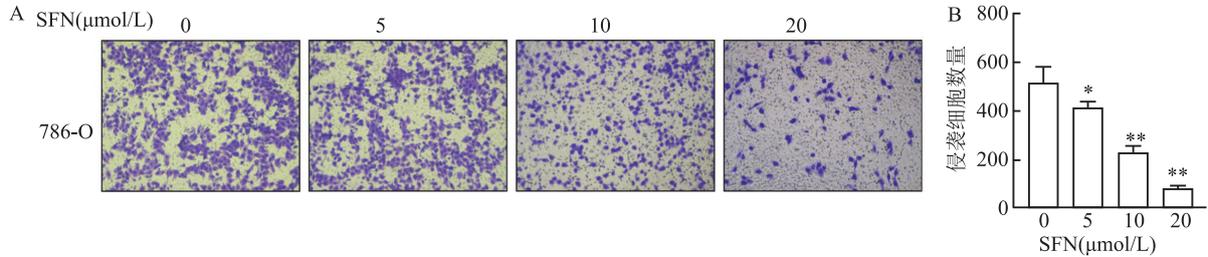


图 3 SFN 对 786-O 细胞侵袭能力的影响

A:786-O 细胞 Transwell 侵袭实验的结果 $\times 200$;B:786-O 细胞 Transwell 侵袭实验的定量统计图;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

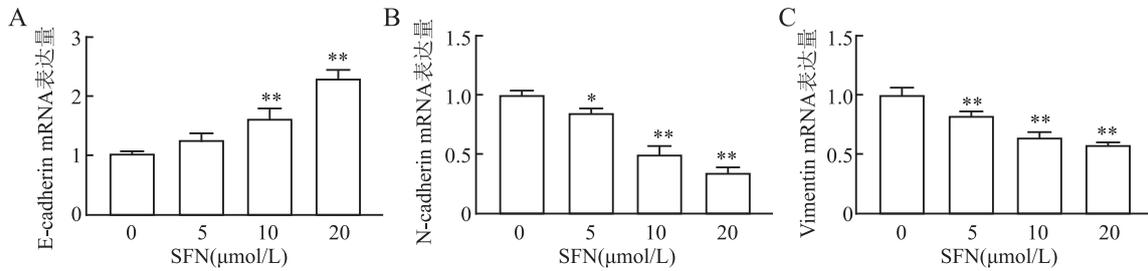


图 4 SFN 对 786-O 细胞中 EMT 相关 mRNA 表达的影响

A;E-cadherin;B;N-cadherin;C;Vimentin;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

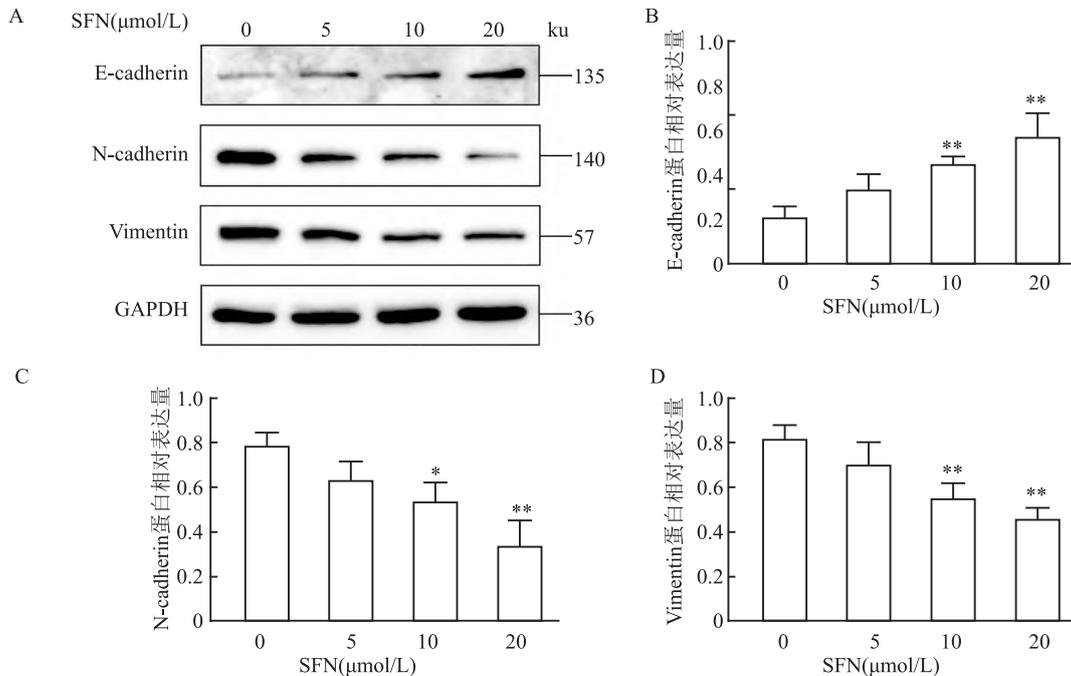


图 5 SSFN 对 786-O 细胞中 EMT 相关蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 786-O 细胞中 EMT 相关蛋白的表达结果;B ~ D:E-cadherin、N-cadherin、Vimentin 的蛋白相对表达量;与对照组比较:

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

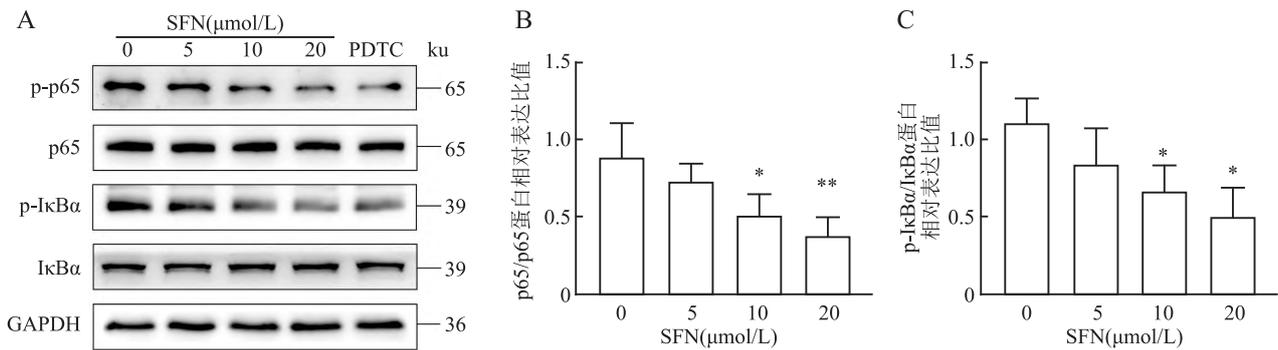


图6 SFN对786-O细胞中NF- κ B信号通路相关蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 786-O 细胞中磷酸化 p65、磷酸化 I κ B α 蛋白的表达结果; B、C: 磷酸化 p65 与非磷酸化 p65 的蛋白表达比值、磷酸化 I κ B α 与非磷酸化 I κ B α 的蛋白表达比值; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

降 ($F = 6.498$, $F = 5.715$, $P < 0.05$), 见图 6。

3 讨论

肾癌是泌尿系统常见的一种恶性肿瘤, 根据 2020 年全球癌症统计数据, 全世界新发生肾癌病例有 431 288 例 (男性 271 249 例, 女性 160 039 例), 死亡 179 368 例 (男性 115 600 例, 女性 63 768 例)^[2]。肾癌肿瘤特异性死亡率很高, 严重威胁人类生命健康。研究^[8]证明, 肾癌对于放疗都不敏感, 靶向治疗后易出现耐药, 预后较差, 近年来寻找治疗肾癌的有效新药已经成为越来越重要的研究方向。已有文献^[4]报道 SFN 可以诱导多种癌细胞凋亡产生抑癌效应, 但是 SFN 在肾癌中的作用尚不明确, 故本研究拟通过探讨 SFN 在肾癌细胞中的作用, 有望能给肾癌治疗提供新的选择。

研究^[6]表明, EMT 与癌症的增殖、迁移和侵袭以及耐药性相关。在发生 EMT 的癌细胞中, 其 E-cadherin 蛋白表达水平降低而 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平升高^[9]。SFN 已被证明可以增加子宫内膜癌细胞和肺癌细胞中 E-cadherin 表达, 并降低 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白水平^[10-11]。

核因子- κ B (Nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 于 1986 年首次被发现, 与细胞凋亡、病毒复制、肿瘤发生、炎症和各种自身免疫性疾病有关^[12]。NF- κ B 转录因子由 P65 (RELA)、REL-B、REL (c-REL)、NF- κ B1 (p50/p105) 和 NF- κ B2 (p52/p100) 等 5 个成员组成^[13]。研究^[6]表明, NF- κ B 可以通过上调与细胞增殖、迁移、血管生成和抑制细胞凋亡相关的基因来影响肿瘤的发生过程, 并在 EMT 进程中发挥作用。NF- κ B 的激活被证明能促进多种肿瘤的发生, 其结构性激活被证明是促进肿瘤发生过程的重要机

制^[14]。有证据^[15]表明, SFN 单独使用或者与肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体联合使用能通过抑制 NF- κ B 活性、肿瘤血管生成、增殖和诱导凋亡来降低肿瘤生长, 而对正常组织未产生毒性损害。但是 SFN 对人肾癌细胞的增殖、迁移和侵袭的抑制作用能否通过 NF- κ B 信号通路发挥作用, 目前尚未有相关的研究。本研究的实验结果显示, SFN 显著抑制了肾癌细胞 786-O 的增殖、迁移和侵袭, 减少了 EMT 相关蛋白的表达, 显示 SFN 有效抑制肾癌细胞 786-O 增殖、迁移和侵袭的能力。为了进一步研究 SFN 在抑制肾癌细胞进展中作用机制, 课题组对 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达进行了检测, 结果显示, 随着 SFN 浓度的增加, 相关蛋白的蛋白表达量明显下降。实验结果显示 NF- κ B 在 SFN 对肾癌细胞的抑制作用中发挥了重要的作用。

综上所述, SFN 对人肾癌细胞 786-O 的增殖、迁移和侵袭能力有着显著的抑制作用, 其机制可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路的相关基因的表达进而负向调控肾癌细胞的 EMT 进程来实现。预期的实验结果有利于为肾癌的临床治疗提供一个新的方向和新的作用靶点, 然而其具体的作用机制仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] Rosiello G, Larcher A, Montorsi F, et al. Renal cancer: overdiagnosis and overtreatment[J]. World J Urol, 2021, 39(8): 2821-3.
- [2] 李天宇, 汪鑫, 张森, 等. 去乙酰化酶 SIRT6 通过激活 PI3K-AKT 通路促进肾癌细胞增殖、迁移[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(12): 1914-9.
- [3] Schepici G, Bramanti P, Mazzon E. Efficacy of sulforaphane in neurodegenerative diseases[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(22):

- 8637.
- [4] Zheng Z, Lin K, Hu Y, et al. Sulforaphane metabolites inhibit migration and invasion *via* microtubule-mediated Claudins dysfunction or inhibition of autolysosome formation in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4): 259.
- [5] Naujokat C, McKee D L. The "Big Five" phytochemicals targeting cancer stem cells: curcumin, EGCG, sulforaphane, resveratrol and genistein[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(22): 4321 – 42.
- [6] 李欣颖, 郝小惠, 张劲松, 等. LPA 在小鼠矽肺模型的表达及其对小鼠肺上皮细胞 EMT 影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(5): 771 – 5.
- [7] Ren D, Yang Q, Dai Y, et al. Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis *via* NF- κ B signaling pathway[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 117.
- [8] Yuan Z X, Mo J, Zhao G, et al. Targeting strategies for renal cell carcinoma: from renal cancer cells to renal cancer stem cells[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7:423.
- [9] Pan G, Liu Y, Shang L, et al. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(3):199 – 217.
- [10] Rai R, Gong E K, Mangiaracina B D, et al. Preclinical efficacy and involvement of AKT, mTOR, and ERK kinases in the mechanism of sulforaphane against endometrial cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(5):1273.
- [11] Chen Y, Chen J Q, Ge M M, et al. Sulforaphane inhibits epithelial-mesenchymal transition by activating extracellular signal-regulated kinase 5 in lung cancer cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 72: 108219.
- [12] Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences[J]. *Cell*, 1986, 46(5): 705 – 16.
- [13] Yu H, Lin L, Zhang Z, et al. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209.
- [14] Rasmi R R, Sakthivel K M, Guruvayoorappan C. NF- κ B inhibitors in treatment and prevention of lung cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110569.
- [15] Hu X, Xiao Y, Sun J, et al. New possible silver lining for pancreatic cancer therapy: Hydrogen sulfide and its donors[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(5): 1148 – 57.

The effects of sulforaphane on proliferation, migration and invasion of human renal carcinoma cells and its mechanism

Zhao Yuxiang, Wu Wangyu, Tuo Zhouting, Qian Weiwei, Yu Dexin, Zhang Tao

(Dept of Urology, The Second Affiliated Hospital of Ahui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effects of sulforaphane (SFN) on proliferation, migration and invasion of human renal carcinoma cells and its mechanism. **Methods** The cultured human renal carcinoma cells 786-O were divided into control group (0 μ mol/L) and SFN group (5, 10, 20 μ mol/L). The activated proliferation of cells was detected by CCK-8; the effect of SFN on migration of 786-O cells was detected by scratch healing assay and Transwell cell migration assay; the effect of SFN on the invasion ability of 786-O cells was detected by Transwell cell invasion ability assay; Western blot and qRT-PCR were used to detect the effects of SFN on the expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins and mRNA. The effect of SFN on the expression of NF- κ B signaling pathway was detected by Western blot. **Results** After SFN treatment for 24, 48 and 72 h, the proliferation activity of 786-O cells decreased with the increase of SFN concentration; compared with the control group, the cell migration and invasion ability of SFN-treated group were significantly reduced; with the increase of SFN concentration, the mRNA and protein expression levels of E-cadherin in 786-O cells increased, while the mRNA and protein expression levels of N-cadherin and Vimentin decreased; the levels of NF- κ B signaling pathway related protein phosphorylated p65 and phosphorylated I κ B α decreased with the increase of SFN concentration. **Conclusion** SFN may inhibit the proliferation, migration and invasion of human renal carcinoma cells by regulating the EMT process of renal carcinoma through inhibition of NF- κ B signaling pathway.

Key words sulforaphane; kidney cancer cells; EMT; nuclear factor kappa B predominate