

葫芦素 B 对卵巢癌细胞 SKOV3 的生长抑制作用

谭立君, 张大昕, 闫志钧, 任玉欣, 郭俊峰

(哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: [目的] 研究葫芦素 B 对卵巢癌细胞 SKOV3 的生长抑制作用。[方法] 利用 MTT 法检测不同浓度葫芦素 B 对卵巢癌细胞的增殖抑制作用; 流式细胞术检测细胞周期和凋亡情况; 荧光定量 PCR 法测定 STAT3 mRNA 表达水平。[结果] 葫芦素 B 对 SKOV3 细胞的增殖具有抑制作用, 并呈现时间和剂量依赖性 ($P < 0.05$); 随葫芦素浓度的增加, 出现明显的 G₂/M 期细胞阻滞, 细胞凋亡率也随之增加 ($P < 0.05$); STAT3 mRNA 表达量明显下降 ($P < 0.05$)。[结论] 葫芦素 B 抑制 STAT3 的表达, 引起细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡, 抑制卵巢癌细胞的生长。

关键词: 葫芦素 B; 卵巢癌; STAT3 细胞

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)07-0598-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.07.B007

Inhibitory Effect of Cucurbitacin B on Growth of Human Ovarian Cancer SKOV3 Cells *in vitro*

TAN Li-jun, ZHANG Da-xin, YAN Zhi-jun, et al.

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the inhibitory effect of cucurbitacin B on the growth of human ovarian cancer cells. [Methods] Human ovarian cancer SKOV3 cells were treated with cucurbitacin B of different concentrations *in vitro*. MTT assay was used to assay the growth of ovarian cancer cells. Flow cytometry was performed to analyze cell cycle and apoptosis rate. Fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression of STAT3 mRNA. [Results] Cucurbitacin B inhibited SKOV3 cell proliferation in a dose and time dependent manner ($P < 0.05$). With the increasing of cucurbitacin B concentration, SKOV3 cells were arrested at the G₂/M phase, the cell apoptosis increased ($P < 0.05$), and the expression of STAT3 mRNA decreased ($P < 0.05$). [Conclusion] Cucurbitacin B can inhibit STAT3 mRNA expression, arrest cell cycle and induce apoptosis of human ovarian cancer SKOV3 cells.

Subject words: cucurbitacin B; ovarian cancer; STAT3 cell

葫芦素(cucurbitacins)是从葫芦科及其他科属多种植物中提取的成分, 至今已发现 40 多种, 具有多种生物活性。以葫芦素 B 应用最广。近年来的许多研究表明, 葫芦素 B 是 JAK/STAT3 信号通路的特异抑制剂, 能降低多种癌细胞的 STAT3 活化水平, 并降低 STAT3 的 DNA 结合能力和 STAT3 介导的基因转录, 抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制异种移植瘤生长。Saini 等^[1]证实卵巢癌中存在 STAT3 的激活与易位, 且是预后差的因素之一。本研究通过

基金项目: 黑龙江省中医药科研项目(ZHY10-Z80)

通讯作者: 谭立君, 副主任医师, 博士; 哈尔滨医科大学附属第一医院肿瘤科, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街 23 号(150001); E-mail: tlj777@sina.com

收稿日期: 2016-12-16; **修回日期:** 2017-01-12

体外实验探讨葫芦素 B 对卵巢癌细胞的抑制作用, 为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

四甲基偶氮唑蓝(MTT, Fluka 公司, 美国), RPMI-1640 培养基(Gibco 公司, 美国), 胎牛血清(FBS, Gibco 公司), FACScalibur 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司, 美国), 荧光显微镜(Olympus 公司, 日本)。

1.2 细胞培养

人卵巢癌 SKOV3 细胞由中科院上海细胞库提

供,置于含有 10%胎牛血清、200 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养液中。于 37℃、5%CO₂ 温箱中培养,3d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验,每种实验均重复 3 次。

1.3 MTT 法检测葫芦素 B 对卵巢癌细胞的增殖抑制作用

将 2×10^3 /孔 SKOV3 细胞混悬液接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ l,过夜细胞贴壁后加入不同浓度的葫芦素 B 培养液,使其终浓度分别为 0.1、1.0、10.0、100.0 μ mol/L,每组 3 个复孔,设空白对照组和阴性对照组。继续培养 24、48、72h 后,每孔加入 5g/L 的 MTT 溶液 10 μ l,继续培养 4h,加入 SDS100 μ l/孔,培养箱内过夜。用酶标仪(所有波长为 570nm)测 A 值。根据 A 值求出 SKOV3 细胞抑制率,计算公式为抑制率=[(对照组 A 值均数-空白对照组 A 值均数)-(实验组 A 值均数-空白对照组 A 值均数)]/(对照组 A 值均数-空白对照组 A 值均数) $\times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测细胞周期和凋亡

将 SKOV3 细胞接种于 6 孔培养板中(1.0×10^5 /孔)培养 24h,每孔分别加入不同浓度的葫芦素 B,并设空白对照,继续培养 24h。用 0.25%胰酶消化收集细胞,然后用预冷的 PBS 溶液(pH7.4)洗 2 次,2000rpm 离心 5min,加入 500 μ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞,调成 1×10^6 /ml 的单细胞悬液。取其 100 μ l,加入 5 μ l Annexin V-FITC 染液和 5 μ l PI 染液,轻轻摇匀,室温避光孵育 15min,上机检测。用 CELL Quest 软件分析数据结果。

1.5 荧光定量 PCR 法测定 STAT3 mRNA 表达水平

取对数生长期的 SKOV3 细胞,以 2×10^5 /ml 的浓度接种于培养瓶中,隔夜后,分别加入 0、0.1、1.0、10.0、100.0 μ mol/L 葫芦素 B 培养 24h 和 48h 后提取各组总 RNA,应用荧光定量 PCR 检测 STAT3 基因表达量。

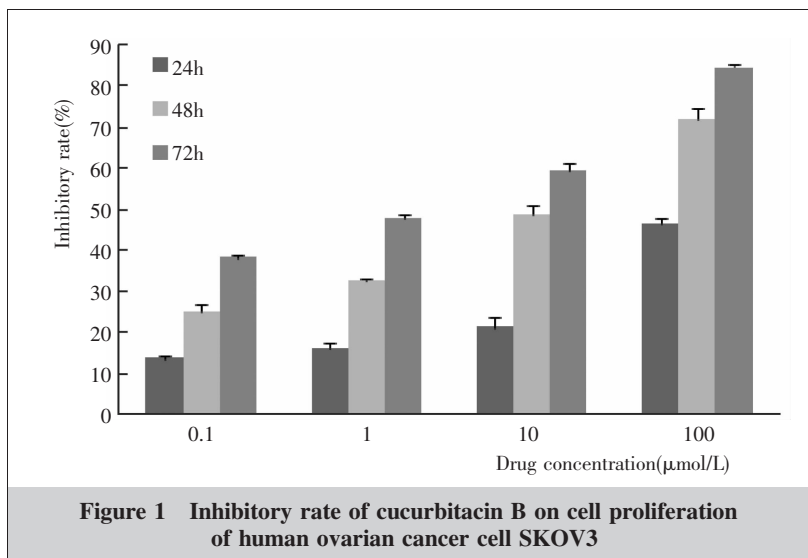
1.6 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 19.0 数据统计软件进行 ANOVA 方差分析、LSD-*t* 检验和 *q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 葫芦素 B 对 SKOV3 细胞的增殖抑制作用

MTT 实验结果显示葫芦素 B 对 SKOV3 细胞的增殖具有抑制作用,并呈现时间和剂量依赖性,即随着药物浓度的增加及作用时间的延长,葫芦素 B 的抑制率也随之增加(Figure 1)。ANOVA 方差分析示不同剂量组之间、不同时间组之间及其与对照组之间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



2.2 葫芦素 B 对 SKOV3 细胞周期分布和凋亡的影响

对照组和各浓度组 G₀/G₁ 期、G₂/M 期和 S 期细胞比例详见 Table 1。随葫芦素 B 浓度的增加,G₂/M 期的细胞比例逐渐升高,G₀/G₁ 期细胞比例逐渐降低($P < 0.05$)。Annexin V-FITC/PI 染色显示葫芦素 B 可以引起细胞凋亡,对照组、0.1 μ M、1.0 μ M、10.0 μ M 葫芦素 B 作用于 SKOV3 细胞 24h 后细胞凋亡率分别为 4.92%、10.75%、22.30%、29.23%($P < 0.05$)。

Table 1 Influence of different concentrations of cucurbitacin B on cell cycle of ovarian cancer cell ($\bar{x} \pm s$)

Concentration	G ₀ /G ₁ stage	G ₂ /M stage	S stage
Control Group	75.29 $\pm$ 8.31	7.25 $\pm$ 2.62	15.53 $\pm$ 3.70
Cucurbitacin 0.1 μ mol/L	60.42 $\pm$ 5.17 ^a	16.19 $\pm$ 1.27 ^d	17.32 $\pm$ 4.27
Cucurbitacin 1 μ mol/L	40.71 $\pm$ 4.31 ^b	33.40 $\pm$ 3.89 ^c	28.73 $\pm$ 8.17
Cucurbitacin 10 μ mol/L	23.68 $\pm$ 4.82 ^c	54.62 $\pm$ 4.72 ^f	16.43 $\pm$ 2.50

compared with control group, $P_a=0.0228$, $P_b=0.0003$, $P_c=0.0000$, $P_d=0.0009$, $P_e=0.0000$, $P_f=0.0000$.

2.3 葫芦素 B 对 SKOV3 细胞的 STAT3 mRNA 表达的影响

与对照组相比,葫芦素 B 对 STAT3 mRNA 表达

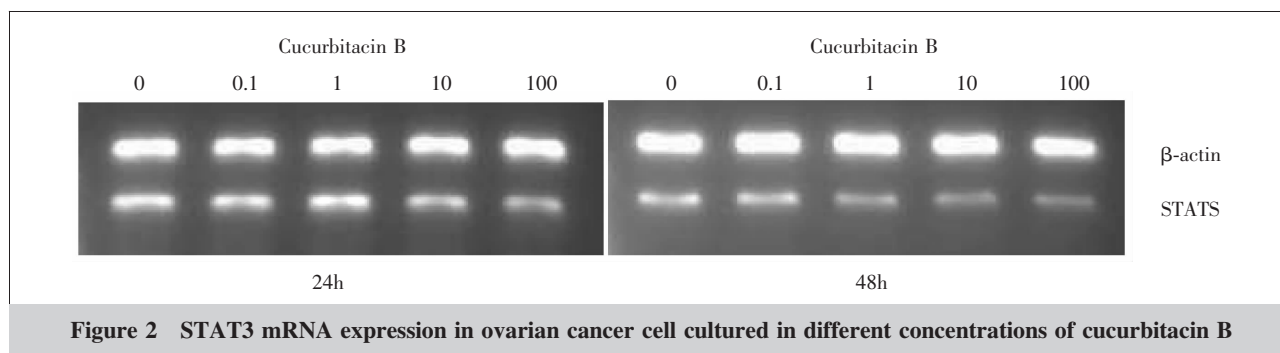


Figure 2 STAT3 mRNA expression in ovarian cancer cell cultured in different concentrations of cucurbitacin B

量的影响呈明显的时间和剂量依赖关系,即随浓度增加及不同浓度的葫芦素 B 均随作用时间的增加, STAT3 mRNA 表达量明显下降 ($P < 0.05$) (Figure 2)。

3 讨论

葫芦素 B 是从葫芦科及其他科属多种植物中提取的 40 多种葫芦素成分之一,具有多种生物活性。多项研究表明,葫芦素 B 能抑制多种肿瘤细胞增殖^[2-4]。本实验从细胞水平,采用 MTT 法证实葫芦素 B 对 SKOV3 细胞增殖具有抑制作用,并呈时间和剂量依赖性,随药物浓度增加和作用时间延长,可见葫芦素 B 对卵巢癌细胞的抑制率也随之增加。Liu 等^[4]研究葫芦素 B 在体内外对喉癌细胞的增殖都有抑制作用,体外细胞实验对 Hep-2 细胞的明显增殖抑制作用,亦呈现剂量和时间依赖性,体内抑瘤实验结果也证明葫芦素 B 可以在活体内剂量依赖性抑制喉癌生长。张萌等^[5]研究葫芦素 B 对胃癌细胞的增殖抑制作用也呈现剂量和时间依赖性,与本文结果类似。

本研究中采用流式细胞仪检测到不同浓度的葫芦素 B 作用于卵巢癌细胞,随浓度的增加,出现明显的 G_2/M 期细胞阻滞,同时伴有明显的 G_0/G_1 期细胞减少,细胞凋亡率也随着葫芦素 B 浓度的增加而增加。由此可见,葫芦素 B 作用于卵巢癌细胞 SKOV3 后,发生细胞周期阻滞,肿瘤细胞增殖受到抑制,加之葫芦素 B 会引起细胞凋亡增加,肿瘤细胞的生长受到抑制。有研究也显示葫芦素 B 作用于胃癌细胞、喉癌细胞和肝癌细胞引起凋亡,同样呈现剂量依赖性^[4]。有文献报道葫芦素 B 引起乳腺癌细胞凋亡和 G_2/M 期阻滞^[6]。

信号转导和转录激活因子 (signal transducers

and activators of transcription, STATs) 是 1992 年研究干扰素诱导基因转录时首次鉴定的一个胞浆蛋白家族,是根据它们在信号转导中的作用来命名的,它们接收特异细胞表面受体的信号以诱发细胞内的转录改变^[7]。目前已确认了 7 种不同的 STAT 分子,包括 STAT1、2、3、4、5a、5b 和 6。其中 STAT3 是重要成员,最早是 1994 年在细胞因子信号系统中发现的^[8,9],包括 STAT3 α 、STAT3 β 和 STAT3 γ 。研究发现 STAT3 具有强烈的抑制细胞凋亡、促进细胞增殖的作用。其在多种肿瘤细胞和组织中都有过度激活,如胃癌、肠癌、淋巴瘤、卵巢癌、脑瘤、非小细胞肺癌和各种白血病、乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌、恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤等。STAT3 已被认为是一种癌基因^[10],其持续性活化导致控制细胞增殖和凋亡的基因的表达,能够促使培养细胞发生恶性转化并能在裸鼠中形成肿瘤。STAT3 与肿瘤的关系及靶向 STAT3 的肿瘤治疗已成为一个研究热点^[10-12]。本研究中葫芦素 B 作用于 SKOV3 细胞后,STAT3 mRNA 的表达量明显下降,随浓度增加和作用时间延长,其下降的更明显,说明葫芦素 B 能抑制 SKOV3 细胞 STAT3 mRNA 表达,从而引起细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡,进而抑制卵巢癌细胞的生长。至于具体相关的分子生物学机制,还有待于进一步研究。

综上所述,葫芦素 B 在体外细胞实验中对卵巢癌细胞 SKOV3 具有生长抑制作用,与其引起细胞周期阻滞和诱导细胞凋亡有关,其分子机制考虑与葫芦素 B 抑制了 STAT3 mRNA 的表达有关。

参考文献:

- [1] Saini U, Naidu S, Einaggar AC, et al. Elevated STAT3 expression in ovarian cancer ascites promotes invasion and metastasis; a potential therapeutic target [J]. *Oncogene*,

- 2017,36(2):168-181.
- [2] Duangmano S,Sae-Lim P,Suksamrarn A,et al. Cucurbitacin B inhibits human breast cancer cell proliferation through disruption of microtubule polymerization and nucleophosmin/B23 translocation[J].BMC Complement Altern Med,2012,12:185.
 - [3] Zhang M,Bian ZG,Zhang Y,et al. Cucurbitacin B inhibits proliferation and induces apoptosis via STAT3 pathway inhibition in A549 lung cancer cells [J]. Mol Med Rep,2014,10(6):2905-2911.
 - [4] Liu T,Zhang M,Zhang H,et al. Inhibitory effects of cucurbitacin B on laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Eur Arch Otorhinolaryngol,2008,265(10):1225-1232.
 - [5] Zhang M,Bian ZG,He P. Effects of cucurbitacin B on proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma BGC-823 cells[J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies,2016,19(5):548-552.[张萌,边志刚,何平.葫芦素 B 对人胃癌 BGC-823 细胞增殖及凋亡的影响[J].实用药物与临床,2016,19(5):548-552.]
 - [6] Duangmano S,Sae-Lim P,Suksamrarn A,et al. Cucurbitacin B causes increased radiation sensitivity of human breast cancer cells via G2/M cell cycle arrest[J]. J Oncol,2012,2012:601682.
 - [7] Siveen KS,Sikka S,Surana R,et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer:role of synthetic and natural inhibitors[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1845(2):136-154.
 - [8] Siveen KS,Nguyen AH,Lee JH,et al. Negative regulation of signal transducer and activator of transcription-3 signalling cascade by lupeol inhibits growth and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells [J]. Br J Cancer,2014,111(7):1327-1337.
 - [9] Siveen KS,Sikka S,Surana R,et al. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer:role of synthetic and natural inhibitors[J]. Biochim Biophys Acta,2014,1845(2):136-154.
 - [10] Geiger JL,Grandis JR,Bauman JE. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer:barriers and innovations [J].Oral Oncol,2016,56:84-92.
 - [11] Feng T,Cao W,Shen W,et al. Arctigenin inhibits STAT3 and exhibits anticancer potential in human triple-negative breast cancer therapy[J].Oncotarget,2016,2016:3134919.
 - [12] Han TJ,Cho BJ,Choi EJ,et al. Inhibition of STAT3 enhances the radiosensitizing effect of temozolomide in glioblastoma cells in vitro and in vivo [J]. J Neurooncol,2016,130(1):89-98.

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。
2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。
3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。
4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。
5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。
6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。
7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。