

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.005

华蟾素对卵巢癌细胞增殖侵袭能力的抑制作用*

陈永宏,高月[△],陈祿娅

(重庆市北碚区中医院,重庆 400700)

摘要:目的 探讨华蟾素对卵巢癌 SKOV-3 细胞系增殖能力及侵袭能力的影响及其作用机制。方法 将对照组、低、中、高剂量组 SKOV-3 细胞分别加入含有质量浓度为 0, 0.1, 1.0, 10.0 mg/L 华蟾素的培养液,培养 24, 48, 72 h 后,检测其增殖抑制率、凋亡率和细胞侵袭能力,以及 SKOV-3 细胞 Bcl-2, Bax, E-cadherin 和基质金属蛋白酶-7(MMP-7)蛋白的表达情况。结果 经不同质量浓度华蟾素处理不同时间后,SKOV-3 细胞侵袭力随着药物质量浓度的升高和处理时间的延长而显著降低,增殖抑制率和凋亡率显著升高;细胞 E-cadherin 及 Bax 蛋白表达量随着药物质量浓度的升高和处理时间的延长而显著升高,MMP-7 和 Bcl-2 蛋白表达量随药物质量浓度的升高和处理时间的延长而显著降低。结论 华蟾素可通过调节卵巢癌细胞的凋亡能力而抑制其增殖能力和侵袭能力。

关键词:华蟾素;卵巢癌;凋亡;侵袭力;作用机制

中图分类号:R932;R285.5;R273

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0017-04

Inhibitory Effect of Cinobufacini on Proliferation and Invasion of Oophoroma Cells

CHEN Yonghong, GAO Yue, CHEN Luya

(Beibei District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing, China 400700)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of cinobufacini on the proliferation and invasion of oophoroma SKOV-3 cells. **Methods** SKOV-3 cells were cultured in medium containing 0, 0.1, 1, 10 mg/L cinobufacini for 24, 48, and 72 h respectively. The proliferation inhibition rate, apoptotic rate and invasive ability of SKOV-3 cells were detected, and the expression of Bcl-2, Bax, E-cadherin and matrix metalloproteinase-7(MMP-7) protein was also detected. **Results** The invasiveness of SKOV-3 cells decreased significantly with the increase of drug concentration and treatment time, and the proliferation inhibition rate and apoptosis rate increased

*基金项目:重庆市基础研究与前沿探索项目[cstc2018jcyjAX0100]。

第一作者:陈永宏,男,大学本科,副主任医师,研究方向为临床病理学,(电子信箱)chengyonghong001@sina.com。

[△]通信作者:高月,女,博士研究生,副主任技师,研究方向为病理检验,(电子信箱)moon19740000@163.com。

~~~~~

- the hippocampus[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 201: 73-81.
- [3] 张博, 黄树明, 徐红丹, 等. Synapsin1 磷酸化参与开心散改善 A $\beta$  诱发的小鼠记忆障碍[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2019, 21(11): 2286-2292.
- [4] 徐飞. 开心散对 AD 大鼠海马神经元凋亡相关蛋白及 P38MAPK 影响的实验研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [5] DU A, DAI X, DONG J, et al. Effects of aminooxyacetic acid on hippocampal mitochondria in rats with chronic alcoholism: the analysis of learning and memory-related genes[J]. J Integr Neurosci, 2019, 18(4): 451-462.
- [6] 李牧函. 6 首开心散类方对阿尔茨海默症的药理作用及机制初探[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [7] MAYNARD ME, REDELL JB, KOBORI N, et al. Loss of PTEN-induced kinase 1 (Pink1) reduces hippocampal tyrosine hydroxylase and impairs learning and memory[J]. Exp Neurol, 2020, 323: 113081.
- [8] MEHDIZADEH H, POURAHMAD J, TAGHIZADEH G, et al. Mitochondrial impairments contribute to spatial learning and memory dysfunction induced by chronic tramadol administration in rat: Protective effect of physical exercise[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2017, 79(Pt B): 426-433.
- [9] 许玉珉. 开心散对东莨菪碱致认知障碍模型小鼠学习记忆的影响及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [10] 杨依, 桑旭星, 方芳. 开心散活性成分及药理作用研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1420-1424.
- [11] SCHORMANN W, HARIHARAN S, ANDREWS DW. A reference library for assigning protein subcellular localizations by image-based machine learning[J]. J Cell Biol, 2020, 219(3): e201904090.
- [12] XU YM, WANG XC, XU TT, et al. Kai Xin San ameliorates scopolamine-induced cognitive dysfunction[J]. Neural Regen Res, 2019, 14(5): 794-804.
- [13] ZHANG L, HUANG L, WANG J, et al. Sevoflurane postconditioning improves spatial learning and memory ability involving mitochondrial permeability transition pore in hemorrhagic shock and resuscitation rats[J]. Brain Behav, 2020, 10(1): e01501.
- [14] 刘明, 闫娟娟, 周小江, 等. 开心散对慢性应激抑郁模型大鼠学习记忆的影响[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(16): 2439-2443.
- [15] ZHOU X, WANG J, LU Y, et al. Anti-depressive effects of Kai-Xin-San on lipid metabolism in depressed patients and CUMS rats using metabolomic analysis[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 252: 112615.

(收稿日期: 2020-03-31)

significantly with the increase of drug concentration and treatment time. The expression of E-cadherin and Bax increased significantly with the increase of drug concentration and treatment time, while the expression of MMP-7 and Bcl-2 decreased significantly with the increase of drug concentration and treatment time. **Conclusion** Cinobufacini can inhibit the proliferation and invasiveness of oophoroma cells by regulating the apoptotic ability of oophoroma cells.

**Key words:** cinobufacini; oophoroma; apoptosis; invasiveness; mechanism

卵巢癌是最常见的妇科恶性肿瘤,由于其侵袭能力强,转移快,死亡率高,且在我国发现时间相对较晚,多处于中晚期,手术治疗效果较差,有些患者甚至已失去了手术治疗的机会<sup>[1-2]</sup>。华蟾素的主要有效成分包括甾类强心苷和生物碱<sup>[3]</sup>。研究证明,其对肝癌细胞和喉癌细胞的DNA合成、RNA合成有较强的抑制作用<sup>[4-5]</sup>,且对上述2种肿瘤细胞的分化和凋亡具有调控作用<sup>[6]</sup>。但目前,尚未见其对卵巢癌细胞增殖凋亡及侵袭作用的影响研究。本研究中探讨了华蟾素对卵巢癌细胞SKOV-3细胞系增殖凋亡和侵袭作用的影响。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:JK-JH01型超净工作台(安徽杰克欧德实验室设备有限公司);RYX-50型实验室培养箱(北京鑫润科诺仪器仪表有限公司);PH100型倒置显微镜(凤凰光学股份有限公司);TMS-2040型流式细胞分析仪(苏州陶迈森科学仪器有限公司);BG-XM496型酶标仪(厦门西谷生物工程有限公司);DYCZ-40G型蛋白电泳系统(北京六一仪器厂)。

试剂:华蟾素(安徽金蟾生化股份有限公司,国药准字Z34020273,规格为每支5 mL);四氮唑(MTT)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号为C0009);小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司);RPMI1640培养基(北京亚米生物科技有限公司,批号为C11875500BT);凋亡细胞检验试剂盒(广州威佳科技有限公司,批号为JXA005);Bcl-2蛋白检验试剂盒(上海西唐生物科技有限公司,批号为F15155),Bax蛋白检验试剂盒(北京白奥莱博科技有限公司,批号为KFS216-VGC);E-cadherin(批号为14472S)和基质金属蛋白酶-7(MMP-7,批号为3801S),均购自北京生物通生物科技有限公司。

细胞:SKOV-3细胞系(美国Sciencell研究室)。

### 1.2 方法

细胞培养:将对数生长期的SKOV-3细胞分为对照组(A组),低、中、高剂量组(B<sub>1</sub>组,B<sub>2</sub>组,B<sub>3</sub>组)。A组细胞用仅含有10%小牛血清去蛋白的1640培养基培养;B<sub>1</sub>组,B<sub>2</sub>组,B<sub>3</sub>组分别用含有0.1,1.0,10.0 mg/L华蟾素的上述培养基培养。于37℃及5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

MTT法检测:将各组细胞以1×10<sup>5</sup>/L的浓度在96孔板中分别培养24,48,72 h,按试剂盒使用说明用100 μL MTT溶液进行染色,染色3 min,于显微镜下使用血细

胞计数板进行计数。

细胞存活率(%)=(总细胞数-蓝色细胞数)/细胞总数×100%

细胞增殖抑制率(%)=(对照组相应细胞存活率-实验组相应细胞存活率)/对照组相应细胞存活率×100%

流式细胞分析:调整各组细胞浓度为1×10<sup>5</sup>/L,接种在12孔板后,相应条件下培养24,48,72 h。然后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤重悬,调整细胞浓度为2×10<sup>6</sup>/L,加入Annexin V-FITC抗体和碘化丙啶在室温避光条件下孵育30 min。使用流式细胞分析仪进行检测,采用WinMDI 2.9和FCS Express V3软件进行分析。

蛋白质印迹(WB)法检测蛋白表达量:将各组细胞分别培养相应时间后,提取细胞蛋白组分,检测蛋白含量,将各组细胞提取的蛋白质进行SDS-PAGE电泳分离,每孔加入蛋白40 μg。电泳结束后将蛋白质转移至硝酸纤维素膜,按试剂说明先后用相应一抗、二抗进行孵育显色,最后显影。

蛋白相对表达量=蛋白表达量<sub>实验组</sub>/蛋白表达量<sub>对照组</sub>×100%

细胞侵袭力检测:将各组细胞在相应培养条件下培养24,48,72 h后,将细胞洗涤后用DMEM培养基调整细胞浓度为3×10<sup>5</sup>/mL,根据分组加入华蟾素调整药物质量浓度分别为0,0.1,1.0,10.0 mg/L。细胞悬液准备完毕后,准备Transwell,配置完毕,每个小室内加入各组相应的细胞悬液100 μL,再将小室放置在盛有75 mL含15%胎牛血清的DMEM培养基的24孔板内,37℃及5%CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h,4%甲醛固定小室内细胞20 min,染色计数,每个膜分别取5个视野计数,取平均数。

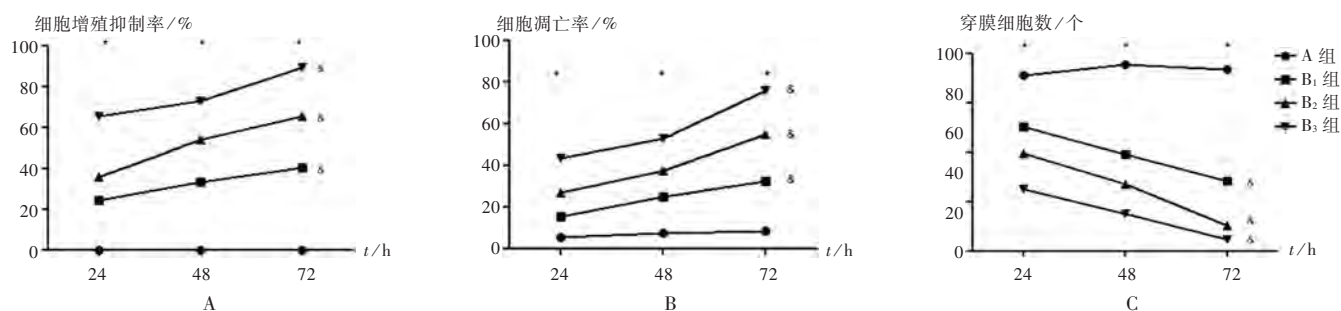
### 1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行t检验;计量资料采用方差检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对SKOV-3细胞增殖作用的影响

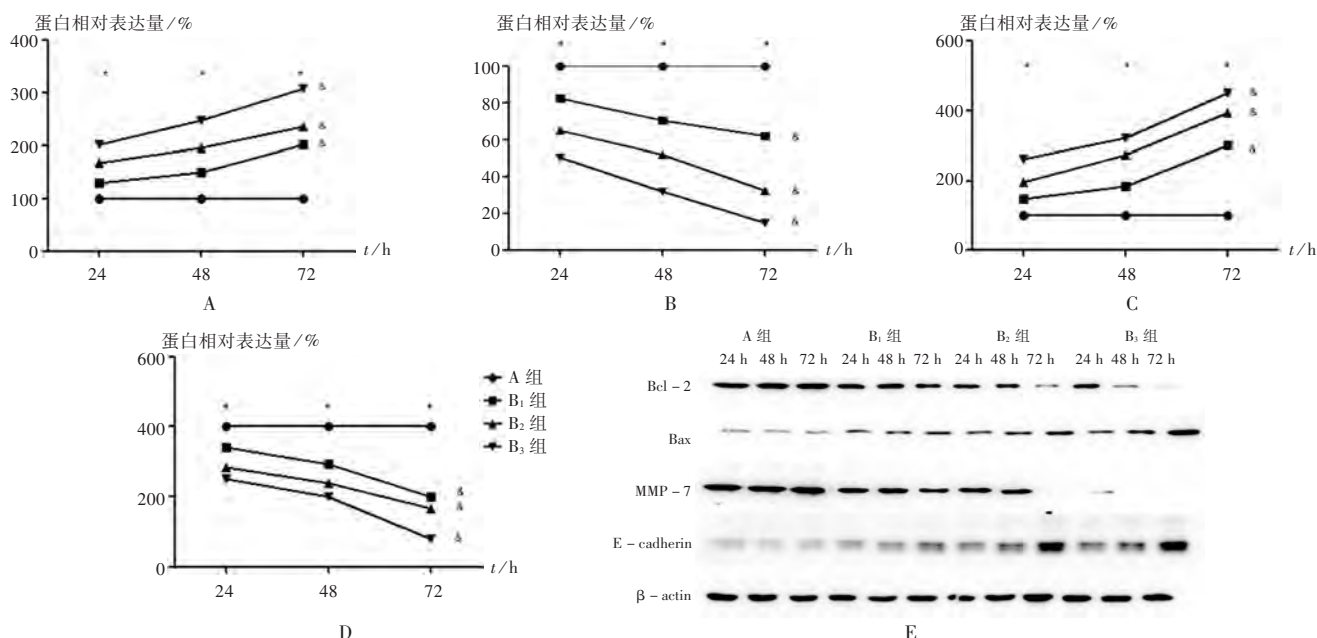
各组细胞在相应条件下分别培养24,48,72 h后,在相同培养时间内,4组细胞间增殖抑制率存在显著差异,A组细胞增殖抑制率显著低于B<sub>1</sub>组,B<sub>2</sub>组,B<sub>3</sub>组,随着药物质量浓度的升高,B<sub>1</sub>组,B<sub>2</sub>组,B<sub>3</sub>组的增殖抑制率也显著升高,且组间存在显著差异( $P < 0.05$ );使用相同药物质量浓度干预的条件下,随着培养时间的延



A. 细胞增殖抑制率 B. 细胞凋亡率 C. 穿膜细胞数

注:组间比较,\* $P < 0.05$ ;组内各时段比较,& $P < 0.05$ 。

图1 各组细胞不同处理时间下增殖抑制率、凋亡率和穿膜细胞数比较



A. Bax 蛋白 B. Bcl-2 蛋白 C. E-cadherin 蛋白 D. MMP-7 蛋白 E. 蛋白质印迹图

注:组间比较,\* $P < 0.05$ ;组内各时段比较,& $P < 0.05$ 。

图2 各组细胞不同处理时间下各蛋白表达情况

长,细胞增殖抑制率显著升高。详见图1A。

## 2.2 对 SKOV-3 细胞凋亡作用的影响

SKOV-3 细胞经不同质量浓度的华蟾素干预后,4 组细胞凋亡率存在显著差异。其中,B<sub>1</sub> 组凋亡率显著高于 A 组,B<sub>2</sub> 组高于 B<sub>1</sub> 组,B<sub>3</sub> 组高于 B<sub>2</sub> 组;随着培养时间的延长,组内细胞凋亡率也显著升高。详见图1B。

## 2.3 对 SKOV-3 细胞侵袭性的影响

相同培养时间内,随着华蟾素质量浓度的升高,穿膜细胞数显著减低,A 组显著多于 B<sub>1</sub> 组,B<sub>1</sub> 组显著多于 B<sub>2</sub> 组,B<sub>2</sub> 组显著多于 B<sub>3</sub> 组;在相同药物质量浓度条件下,随着培养时间的延长,B<sub>1</sub> 组,B<sub>2</sub> 组,B<sub>3</sub> 组穿膜细胞数显著减少,而 A 组穿膜细胞数随着培养的时间延长未见明显变化。详见图1C。

## 2.4 对 SKOV-3 细胞凋亡及侵袭相关蛋白表达的影响

在相同培养时间下,随着华蟾素质量浓度的升高,

SKOV-3 细胞 Bax 蛋白和 E-cadherin 蛋白表达量显著升高,A 组显著低于 B<sub>1</sub> 组,B<sub>1</sub> 组显著低于 B<sub>2</sub> 组,B<sub>2</sub> 组显著低于 B<sub>3</sub> 组;而 Bcl-2 蛋白和 MMP-7 蛋白表达量显著降低,A 组显著高于 B<sub>1</sub> 组,B<sub>1</sub> 组显著高于 B<sub>2</sub> 组,B<sub>2</sub> 组显著高于 B<sub>3</sub> 组。随着培养时间的延长,A 组细胞 4 种蛋白表达量均未出现明显变化,B<sub>1</sub> 组,B<sub>2</sub> 组,B<sub>3</sub> 组细胞 Bax 蛋白和 E-cadherin 蛋白表达量显著升高,Bcl-2 蛋白和 MMP-7 蛋白表达量显著降低。详见图2。

## 3 讨论

华蟾素是从蟾蜍皮肤及腮腺提取的脂溶性成分,主要成分包括生物碱和强心甙,其中吡啶生物碱为抗肿瘤主要成分<sup>[7]</sup>,可用于肝癌、鼻咽癌及食管癌的治疗<sup>[8-10]</sup>。华蟾素对肿瘤细胞具有调整细胞周期进程、阻碍细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[11-13]</sup>。

本研究结果发现,华蟾素有抑制肿瘤细胞增殖的作

用,且随着其质量浓度的升高和培养时间的延长,其增殖抑制作用更显著。可见,华蟾素对卵巢癌细胞增殖有抑制作用,且存在质量浓度和时间依赖性。华蟾素处理细胞后,细胞凋亡率显著升高,且随着药物质量浓度的升高、作用时间的延长而显著增高,提示华蟾素促进卵巢癌细胞凋亡的作用呈质量浓度和时间依赖性。

本研究结果显示,华蟾素有抑制肿瘤细胞 Bcl-2 蛋白表达和促进 Bax 蛋白表达的作用,且存在时间和质量浓度依赖性,这与文献[14-15]的报道一致。提示华蟾素抑制卵巢癌细胞增殖、促进其凋亡的作用与调控 Bcl-2 家族蛋白相关。

本研究结果显示,华蟾素可有效抑制肿瘤细胞侵袭性,且呈质量浓度和时间依赖性。E-cadherin 蛋白是介导细胞间黏附的一种蛋白受体,其表达下降是很多肿瘤细胞侵袭性升高的重要分子机制<sup>[16]</sup>。MMP-7 蛋白对于细胞外基质的重要成分如 IV 型胶原蛋白、弹力素、层粘连蛋白等均有较强的分解作用,MMP-7 高表达对于多种肿瘤细胞突破血管壁或淋巴管壁进行远处播散有重要作用<sup>[17-18]</sup>。提示华蟾素可有效抑制 MMP-7 表达升高、E-cadherin 蛋白表达,从而降低卵巢癌细胞的侵袭性,且呈质量浓度和时间依赖性。

综上所述,华蟾素对卵巢癌 SKOV-3 细胞系有抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,与其下调 Bcl-2 蛋白表达、上调 Bax 蛋白表达相关;同时,还具有抑制 SKOV-3 细胞系侵袭性的作用,与其下调细胞 MMP-7 蛋白表达、上调 E-cadherin 蛋白表达相关。且均呈质量浓度和时间依赖性。

#### 参考文献:

- [1] 俞 弋,高 彤,孙谔谔,等. 血小板活化因子促进卵巢癌细胞增殖相关机制初步研究[J]. 现代妇产科进展,2019(9): 681-684.
- [2] 温 勇,刘春源,邢青青. 柚皮苷对人卵巢癌细胞 SKOV3 增殖、凋亡及迁移的影响[J]. 临床肿瘤学杂志,2017(12): 1085-1090.
- [3] 吕 勇,李文翠,辛士刚,等. ICP-AES 测定华蟾素和细胞银两种抗癌药物中的元素[J]. 化学研究与应用,2018(1): 101-104.
- [4] QI F, WANG J, ZHAO L, et al. Cinobufacini inhibits epithelial-mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma cells through c-Met/ERK signaling pathway[J]. BST, 2018, 12(3): 291-297.
- [5] SHEN Z, LI Y, ZHAO C, et al. miR494BAG1 axis is involved in cinobufacini-induced cell proliferation and apoptosis in gastric cancer[J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(5): 7435-7441.
- [6] XIA JF, INAGAKI Y, GAO JJ, et al. Combination of Cinobufacini and Doxorubicin Increases Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma

Cells through the Fas- and Mitochondria-Mediated Pathways[J]. American Journal of Chinese Medicine, 2017, 45(7): 1537-1556.

- [7] CHEN DY, ZHANG R, LIU Y, et al. Effects of cinobufacini injection on hepatocarcinoma cell proliferation, invasion and metastasis[J]. Rsc Advances, 2016, 6(85): 82417-82424.
- [8] WEI XL, SI N, ZHANG YF, et al. Evaluation of Bufadienolides as the Main Antitumor Components in Cinobufacin Injection for Liver and Gastric Cancer Therapy[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169141.
- [9] FUJIMAKI K, YAO G. Crack the state of silence: Tune the depth of cellular quiescence for cancer therapy[J]. Molecular & Cellular Oncology, 2017, 5(1): e1403531.
- [10] 姜 怡,吴立波,沈丽萍,等. 中医综合维持治疗方案对晚期非小细胞肺癌患者血清中可溶性细胞毒 T 淋巴细胞相关抗原 4 的影响及其与预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(10): 757-762.
- [11] CHEN D, CHEN J, GUO Y, et al. Cinobufacini promotes apoptosis of bladder cancer cells by influencing the expression of autophagy-related genes[J]. Oncology Letters, 2018, 15(5): 7104-7110.
- [12] MA L, SONG B, JIN H, et al. Cinobufacini induced MDA-MB-231 cell apoptosis-associated cell cycle arrest and cytoskeleton function[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2012, 22(3): 1459-1463.
- [13] WU Q, LIN WD, LIAO GQ, et al. Antiproliferative effects of cinobufacini on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells detected by atomic force microscopy[J]. World Journal of Gastroenterology, 2015, 21(3): 854-861.
- [14] ASHKENAZI A, FAIRBROTHER WJ, LEVERSON JD, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2017, 16(4): 273.
- [15] RENAULT TT, DEJEAN LM, MANON S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2[J]. Mechanisms of Ageing & Development, 2017, 161(Pt B): 201-210.
- [16] YUE B, QIU S, ZHAO S, et al. LncRNA-ATB mediated E-cadherin repression promotes the progression of colon cancer and predicts poor prognosis[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2016, 31(3): 595-603.
- [17] ZENG Y, YAO XH, CHEN L, et al. Sphingosine-1-phosphate induced epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma via an MMP-7/syndecan-1/TGF- $\beta$  autocrine loop[J]. Oncotarget, 2016, 7(39): 63324-63337.
- [18] XU CL, WANG JZ, XIA XP, et al. Rab11-FIP2 promotes colorectal cancer migration and invasion by regulating PI3K/AKT/MMP7 signaling pathway[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2016, 470(2): 397-404.

(收稿日期:2020-01-11)