

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.01.010

冬凌草甲素诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡及其机制

李娜¹, 金平², 张春洁¹

Pro-apoptotic Effect and Its Mechanisms of Oridonin on Human Ovarian Cancer Cell SKOV3

Li Na¹, Jin Ping², Zhang Chun-jie¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, Shenzhen City Maternal and Child Health Hospital

Corresponding Author: Jin Ping, E-mail: pingjin66@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of oridonin which is extracted from Donglingcao on the suppression of growth and induction of apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 cell, and explore its mechanism. **Methods** The growth inhibitory effect of oridonin with or without cisplatin on SKOV3 cells was detected by MTT assay; The morphological and ultrastructural changes of SKOV3 cells were observed by inverted microscope and transmission electron microscope, respectively; The effect of cell cycle and apoptosis rate of oridonin on SKOV3 cells were examined by Flow Cytometry (FCM); The expression of bcl-2, bax and survivin mRNA of SKOV3 cells was detected by quantitative reversed transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR). **Results** (1) MTT assay showed that oridonin could significantly inhibit the proliferation of SKOV3 cells in time and dose-dependent manner, and the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 24, 48, 72 hours were 45.22, 33.85, 22.48 $\mu\text{mol/L}$, respectively; the inhibitory effect of oridonin combined with cisplatin was more obvious than either one used separately. (2) Inverted microscope observed that cell growth was obviously inhibited. (3) Apoptosis morphological changes about vacuolar degeneration, chromatic agglutination and nuclear condensation was detected by electron microscope in oridonin-treated SKOV3 cells. (4) Cell cycle analysis indicated that the oridonin-treated cells were arrested at the S and G_2/M phases. (5) The results of AnnexinV-FITC/PI double-stained represented the apoptosis rate of SKOV3 cells treated with 10, 20 and 30 $\mu\text{mol/L}$ oridonin for 48 hours were $(9.13 \pm 0.91)\%$, $(18.89 \pm 1.79)\%$, $(36.11 \pm 3.01)\%$, respectively, and the apoptotic rate increased significantly compared with control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). (6) QRT-PCR showed that the expression of bcl-2 and survivin declined and bax upregulated in oridonin-treated SKOV3 cells, and the difference was statistically significant compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Oridonin can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of SKOV3 cells, and its mechanism might be related to up-regulate the expression of bax and down-regulate the expression of bcl-2 and survivin.

Key words: Oridonin; Ovarian neoplasms; Apoptosis; bcl-2; bax; survivin

摘要: 目的 观察中药冬凌草的有效提取成分冬凌草甲素对人卵巢癌细胞株 SKOV3 的增殖抑制及诱导凋亡作用, 并探讨其可能的抗肿瘤作用机制。 **方法** 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法观察冬凌草甲素单药及冬凌草甲素联合顺铂对 SKOV3 细胞的增殖抑制情况; 倒置显微镜和透射电子显微镜观察 SKOV3 细胞形态学和超微结构的改变; 流式细胞术 PI 单染检测冬凌草甲素对细胞周期的影响; 流式细胞术 AnnexinV-FITC/PI 双染检测冬凌草甲素对细胞凋亡的影响; 实时荧光定量聚合酶链反应 (QRT-PCR) 检测 SKOV3 细胞 bcl-2、bax、survivin mRNA 的表达水平。 **结果** (1) MTT 结果显示冬凌草甲素对卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖具有明显的抑制作用, 且呈时间剂量依赖性, 24、48、72 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 45.22、33.85、22.48 $\mu\text{mol/L}$; 与顺铂合用具有协同抑制作用。 (2) 倒置显微镜下可见细胞生长明显受抑制。 (3) 透射电子显微镜结果显示, 冬凌草甲素组出现空泡变性, 染色质浓缩, 核染色质边集。 (4) 细胞周期显示冬凌草甲素组细胞周期被阻滞于 S 期和 G_2/M 期。 (5) AnnexinV - FITC / PI 双染检测冬凌草甲素 (10、20、30 $\mu\text{mol/L}$) 作用细胞 48h 后细胞的凋亡率分别为 $(9.13 \pm 0.91)\%$ 、 $(18.89 \pm 1.79)\%$ 、 $(36.11 \pm 3.01)\%$, 明显高于阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (6) QRT-PCR 显示冬凌草甲素组 bcl-2、survivin 基因表达下调, bax 基因表达上调, 与阴性对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 **结论** 冬凌草甲素对人卵巢癌 SKOV3 细胞具有明显的增殖

抑制及诱导凋亡作用; 其抗肿瘤机制可能与下调 bcl-2、survivin, 上调 bax 的表达有关。

关键词: 冬凌草甲素; 卵巢肿瘤; 细胞凋亡; bcl-2; bax; survivin

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A

收稿日期: 2012-03-21; 修回日期: 2012-08-16
作者单位: 1. 730000 兰州, 兰州大学第一临床医学院妇产科; 2. 深圳市妇幼保健院妇产科
通信作者: 金平, E-mail: pingjin66@sina.com
作者简介: 李娜 (1984-), 女, 硕士, 主要从事妇科肿瘤的研究

0 引言

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,在妇科恶性肿瘤中占第 3 位,但其死亡率占妇科肿瘤的首位,对女性生命造成了严重的威胁^[1]。其治疗手段是以手术和化疗为主的综合治疗,其中化学治疗多采用以铂类为基础的联合化疗方案。化学药物抗肿瘤作用确切,疗效显著,但不良反应大、长期应用易产生耐药性等。近年来,中药治疗肿瘤因其不良反应小而进入了人们的视野,其治疗肿瘤特别是对诱导细胞凋亡的研究一直受到人们的广泛关注。寻找能够诱导肿瘤细胞凋亡的中药提取物已成为当前肿瘤治疗的热点和方向。冬凌草甲素(Oridonin)是从唇形科香茶菜属植物中分离出的四环二萜类化合物,具有抗炎、抗菌、抗癌等多种效应,研究证明冬凌草甲素对多种肿瘤细胞株具有明显的体外抗肿瘤作用,但对卵巢癌细胞的影响尚未见报道。本实验通过观察冬凌草甲素对卵巢癌 SKOV3 细胞的凋亡作用及对 bcl-2、bax、survivin 基因表达的影响,探讨其可能的作用机制,为冬凌草甲素用于临床抗肿瘤治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

人卵巢癌细胞株 SKOV3 由兰州大学医学实验中心提供;冬凌草甲素(质量分数 $\geq 98\%$)购自南京泽朗医药科技有限公司;注射用顺铂为山东齐鲁制药有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司;胰蛋白酶购自西安科昊生物科技有限公司;青霉素、链霉素及其他无机类试剂均为国产分析纯试剂;四甲基偶氮唑盐(MTT)为美国 Sigma 公司产品;实时荧光聚合酶链反应(QRT-PCR)试剂购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKOV3 细胞株培养在含 10% 胎牛血清、青霉素 100 u/ml 和链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$ 的 RPMI 1640 培养液中,置于 37℃、5% 的 CO_2 的培养箱中培养,隔日 0.25% 胰酶消化传代,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 药物处理 冬凌草甲素用少量二甲基亚砜(DMSO)溶解后,以磷酸盐缓冲液(PBS)配成 1.6 mmol/L 的储存液,使 DMSO 的终浓度 $< 0.05\%$ (体积比),置于 -20℃ 避光保存,顺铂用 0.9% 氯化钠溶液配成 0.5 mg/ml 储存液, -20℃ 保存,两者临用前用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液稀释成所需浓度。

1.2.3 MTT 比色法检测细胞增殖抑制率 收集对数生长期的细胞,0.25% 胰酶消化制成单细胞悬液,以 $(7\sim 8) \times 10^4$ 个/毫升的密度接种于 96 孔板,每孔 100 μl ,随机分为冬凌草甲素组(0、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$),顺铂组(2.5 $\mu\text{g/ml}$),冬凌草甲素

联合顺铂组(10 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素 + 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂),每个浓度设 5 个复孔,同时设置调零孔。24 h 细胞贴壁后吸去原培养液,冬凌草甲素组分别加入终质量浓度为 0、10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素,顺铂组加入终质量浓度为 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 的顺铂,冬凌草甲素联合顺铂组加入终质量浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素 + 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂,设 0 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素为阴性对照组,其余为实验组。待药物分别作用 24、48 和 72 h 后每孔加入 10 μl MTT(5 g/L),继续培养 4 h 后,加入酸化 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)每孔 100 μl 置培养箱次日上机,570 nm 波长处测吸光值(A)。细胞抑制率 = $(1 - \text{给药组 A 的均值} / \text{对照组 A 的均值}) \times 100\%$,通过半数抑制率(IC_{50})计算软件计算出药物作用的 IC_{50} ,实验重复 3 遍。

1.2.4 倒置显微镜观察细胞形态 取对数生长期细胞加入终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素溶液,对照组加新鲜培养液,置于 37℃、5% 的 CO_2 培养箱中培养 48 h。倒置显微镜下观察细胞的贴壁情况和生长情况。

1.2.5 透射电子显微镜观察细胞超微结构 取对数生长期细胞加入终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素溶液,对照组加新鲜培养液,置于 37℃、5% 的 CO_2 培养箱中培养 48 h。取此液离心收集细胞,采用 2.5% 戊二醛液与 1% 锇酸液固定,常规乙醇脱水,LR White 树脂渗透包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,透射电子显微镜观察其变化。

1.2.6 碘化丙啶(PI)单染法检测细胞周期 取对数生长期细胞(1×10^6 个)接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,待细胞贴壁后,更换培养液,加入终浓度为 0、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素溶液,其中 0 为阴性对照,48 h 后收集对照组和实验组细胞,PBS 洗涤,制成单细胞悬液,用 70% 冰乙醇 4℃ 固定过夜,PI 单染检测细胞周期分布情况。

1.2.7 AnnexinV - FITC /PI 双染检测细胞凋亡率 取对数生长期细胞(1×10^6 个)接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,待细胞贴壁后,更换培养液,加入终浓度为 0、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素溶液,其中 0 为阴性对照,48 h 后收集对照组和实验组细胞,PBS 洗涤 2 次,用 AnnexinV - FITC /PI 双标记染色后上机检测细胞凋亡率。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 检测 bcl-2、bax、survivin mRNA 表达 取对数生长期细胞(1×10^6 个)接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,待细胞贴壁后,更换培养液,实验组加入终质量浓度为 20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素,对照组不加药,培养 48 h 后收集各组细胞。(1)引物设计和合成:参考文献^[2],由大连宝生物工程有限公司合成,内参照基因选 $\beta\text{-actin}$,由大连宝生物工程有限公司设计和合成。(2)总 RNA 的制备和 cDNA 合成:Trizol 常规一步法提取

各组细胞总 RNA,紫外分光光度法检测纯度和浓度;取 2 μg 的总 RNA 按试剂说明书配制 10 μl RT 反应液,反应条件:37℃ 15 min;85℃ 5 s。(3)两步法实时荧光定量聚合酶链反应(QRT-PCR):配制 25 μl 反应体系(2×SYBR Premix Ex Taq™ II 12.5 μl、上游引物 1.0 μl、下游引物 1.0 μl、模板 DNA 2.0 μl、dH₂O 8.5 μl)。反应条件:95℃ 预变性 30 s;95℃ 5 s、60℃ 30 s,共 40 个循环。以 β-actin 为内参照。采用比较循环阈值法(2^{-ΔΔCt})分析样本中 bcl-2、bax 和 survivin 的相对含量。具体计算方法如下:设阴性对照为 1,分别将经不同浓度冬凌草甲素处理的 SKOV3 细胞与对照组作比较,得倍数为 N (N = 2^{-ΔΔCt}) 其中 ΔΔCt = (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{冬凌草甲素处理组} - (Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因})_{对照组}。实验重复 3 遍。

1.3 统计学方法

采用统计软件 SPSS 17.0 进行数据分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,两组均数比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冬凌草甲素对 SKOV3 细胞生长抑制作用

2.1.1 冬凌草甲素单药对 SKOV3 细胞增殖的影响 在 10~50 μmol/L 浓度范围内的冬凌草甲素对 SKOV3 细胞具有明显的抑制作用,与阴性对照

组比,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。并且随着冬凌草甲素浓度的增加和作用时间的延长,抑制作用逐渐增强,呈时间和剂量依赖性,见表 1。冬凌草甲素作用 SKOV3 细胞 24、48、72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 45.22、,33.85、22.48 μmol/L。

2.1.2 冬凌草甲素联合顺铂对 SKOV3 细胞增殖的影响 冬凌草甲素联合顺铂用药的抑制作用明显高于单独用药的抑制作用,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。协同效应采用金氏公式计算: $q = Ea + b / (Ea + Eb - Ea \times Eb)$,其中 *Ea* 为冬凌草甲素(10 μmol/L)的抑制率,*Eb* 为顺铂(2.5 μg/ml)的抑制率,*Ea* + *b* 为两者联合作用的抑制率。*q* > 1.15 为协同效应,1.15 > *q* > 0.85 为相加效应,*q* < 0.85 为拮抗效应。冬凌草甲素联合顺铂 24、48、72 h 的 *q* 值分别为 1.163、1.180、1.216 均 > 1.15。合用对 SKOV3 细胞有协同抑制作用,且有时间依赖性,72 h 作用最明显。

2.2 倒置显微镜观察细胞生长情况

镜下见阴性对照组细胞贴壁生长旺盛,细胞间连接紧密,密度较大呈复层性生长,形态多样,呈多角形或梭形,胞膜清晰,胞质饱满,具有较好的折光性;冬凌草甲素组细胞密度明显减少,间隙增宽,伪足回缩,细胞变圆、悬浮,胞质减少,折光性差,细胞生长抑制明显,见图 1。

表 1 冬凌草甲素对 SKOV3 细胞的增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Inhibitory effect of oridonin on SKOV3 cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

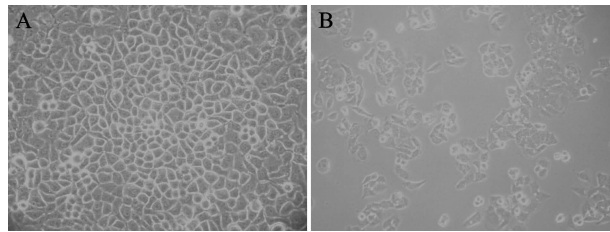
Groups	Concentration (μmol/L)	OD			Inhibitory rate(%)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control	0	0.720 ± 0.017	0.837 ± 0.015	0.979 ± 0.024	0	0	0
Oridonin	10	0.671 ± 0.019*	0.735 ± 0.026*	0.797 ± 0.033*	6.89	12.12	18.54
	20	0.596 ± 0.038*	0.643 ± 0.020*	0.603 ± 0.036*	17.27	23.17	38.36
	30	0.520 ± 0.020*	0.547 ± 0.037*	0.415 ± 0.032*	27.80	34.26	57.63
	40	0.397 ± 0.020*	0.327 ± 0.035*	0.222 ± 0.032*	44.93	60.94	77.31
	50	0.297 ± 0.025*	0.227 ± 0.035*	0.120 ± 0.035*	58.73	72.91	87.78

Note: * : *P* < 0.05, vs. control group

表 2 冬凌草甲素联合顺铂对 SKOV3 细胞的增殖抑制作用(*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)
Table 2 Inhibitory effect of oridonin combined with cisplatin on SKOV3 cells(*n* = 5, $\bar{x} \pm s$)

Groups	OD			Inhibitory rate(%)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A	0.720 ± 0.017	0.837 ± 0.015	0.979 ± 0.024	0	0	0
B	0.671 ± 0.019*	0.735 ± 0.026*	0.797 ± 0.033*	6.89	12.12	18.54
C	0.582 ± 0.015*	0.565 ± 0.015*	0.560 ± 0.017*	19.22	32.46	42.82
B + C	0.513 ± 0.018*△#	0.435 ± 0.022*△#	0.321 ± 0.017*△#	28.83	47.96	67.16

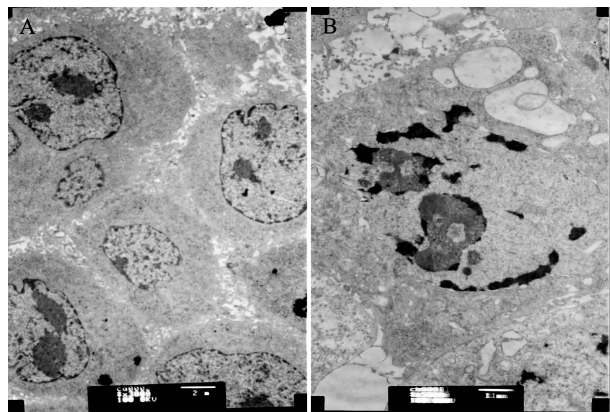
Note: A: control, B: Oridonin 10 μmol/L, C: cisplatin 2.5 μg/ml; * : *P* < 0.05, vs. A; △ : *P* < 0.05, vs. B; # : *P* < 0.05, vs. C



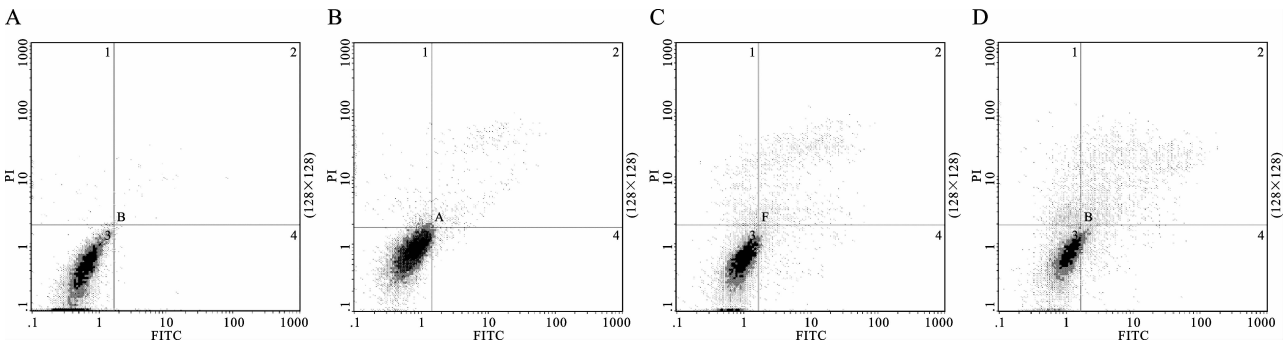
A: control group; B: treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin
图 1 倒置显微镜下观察 SKOV3 细胞的形态改变 ($\times 10$)
Figure 1 The morphologic change of SKOV3 cells by inverted microscope ($\times 10$)

2.3 透射电子显微镜观察分析

透射电子显微镜下观察 SKOV3 细胞超微结构的改变。透射电子显微镜观察对照组 SKOV3 细胞核膜清楚,核内染色质分布均匀,可见核仁,细胞质内有丰富的核糖体;给药组细胞核膜模糊,核内染色质凝聚聚集明显,胞膜部分有破损,胞质出现空泡变性,呈现典型的中晚期凋亡形态改变,见图 2。



A: control group ($\times 3\,000$); B: treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin ($\times 5\,000$)
图 2 透射电子显微镜下观察 SKOV3 细胞的超微结构变化
Figure 2 The ultrastructural change of SKOV3 cells by transmission electron microscope



A: control group; B: treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin; C: treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin; D: treated with 30 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin
图 3 冬凌草甲素作用 48 h 后 AnnexinV-FITC/PI 双染检测 SKOV3 细胞死亡率
Figure 3 The apoptosis rate of SKOV3 cells treated with Oridonin for 48 h detected by AnnexinV-FITC/PI double-stained

2.4 冬凌草甲素对 SKOV3 细胞周期的影响

冬凌草甲素作用于 SKOV3 细胞 48 h 后,流式细胞仪测定细胞周期分布发现,随着药物浓度的增高, G_0/G_1 期细胞比例减少,S 期、 G_2/M 期比例增多,细胞周期被阻滞于 S 期和 G_2/M 期,见表 3。

Oridonin ($\mu\text{mol/L}$)	Cell cycle distribution(%)		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0(control)	64.17	34.89	0.94
10	56.50	41.81	1.69
20	47.52	48.23	4.25
30	42.44	48.85	8.71

2.5 冬凌草甲素对 SKOV3 细胞凋亡的影响

冬凌草甲素作用于 SKOV3 细胞 48 h 后,流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果显示,冬凌草甲素能够诱导细胞凋亡,且随着浓度的增高,凋亡率增高,与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 4、图 3。图 3 中,左上象限代表收集过程中损伤的细胞;右上象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞;左下象限代表活细胞数;右下象限代表早期凋亡细胞。

Oridonin($\mu\text{mol/L}$)	Apoptosis rate(%)
0(control)	1.15 $\pm$ 0.076
10	9.13 $\pm$ 0.91 [*]
20	18.89 $\pm$ 1.79 ^{*Δ}
30	36.11 $\pm$ 3.01 ^{*Δ#}

Note: ^{*}: $P<0.05$, vs. control group; ^{Δ} : $P<0.05$, vs. 10 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin; [#]: $P<0.05$, vs. 20 $\mu\text{mol/L}$ Oridonin

2.6 冬凌草甲素对 SKOV3 细胞 bcl-2、bax、survivin mRNA 表达的影响

实时荧光定量 PCR 结果表明:与对照组相比,SKOV3 细胞经 20、30 μmol/L 的冬凌草甲素处理 48 h 后,bcl-2 的表达明显下调,分别是对照组的(0.67±0.06)、(0.34±0.04)倍,bax mRNA 的表达显著上调,分别是对照组的(1.61±0.16)、(2.39±0.18)倍,survivin 的表达明显下调,分别是对照组的(0.72±0.06)、(0.28±0.05)倍,冬凌草甲素组各基因表达与阴性对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 5。

表 5 QRT-PCR 检测 SKOV3 细胞 bcl-2、bax、survivin mRNA 的表达水平($n=3,\bar{x}\pm s$)

Table 5 The expression of bcl-2, bax and survivin mRNA of SKOV3 cells by QRT-PCR($n=3,\bar{x}\pm s$)

Oridonin (μmol/L)	Relative expression amount of mRNA		
	bcl-2	bax	survivin
0(control)	1	1	1
20	0.67±0.06*	1.61±0.16*	0.72±0.06*
30	0.34±0.04*△	2.39±0.18*△	0.28±0.05*△

Note: * : $P<0.05$, vs. control group; △ : $P<0.05$, vs. 20 μmol/L oridonin

3 讨论

冬凌草又名冰凌草,学名碎米亚,系唇形科香茶菜属植物。该植物广泛分布于我国黄河流域及其以南地区。通常取其干燥地上部分入药,味甘苦,性微寒,具有清热解毒、消炎止痛、健胃活血及抗肿瘤等功效。冬凌草主要的化学成分为贝壳杉烯类的二萜,包括冬凌草甲素、乙素、丙素、丁素、戊素等,其中最重要的抗癌有效成分确定为冬凌草甲素。研究发现冬凌草甲素具有独特而明显的抗肿瘤活性,对多种肿瘤细胞均有显著的抑制或杀伤作用,且低毒,对人体重要脏器如骨髓、肝、肾等无明显损伤。国内外的研究表明,冬凌草甲素能抑制前列腺癌^[3]、乳腺癌^[4]、直肠癌^[5]、胃癌^[6]、宫颈癌^[7]、淋巴细胞白血病^[8]、人多发性骨髓瘤^[9]等多种肿瘤细胞增殖,并诱导凋亡。

本研究以人卵巢癌 SKOV3 细胞为研究对象,探讨了冬凌草甲素对其生长抑制及诱导凋亡作用并分析了其可能的作用机制。MTT 法测定结果显示,在冬凌草甲素 10~50 μmol/L 浓度范围内,SKOV3 细胞的增殖抑制呈显著的浓度、时间依赖趋势。冬凌草甲素联合顺铂的抑制作用明显高于单独用药的抑制作用。倒置显微镜观察结果从形态学上证实,冬凌草甲素可明显的抑制细胞增殖。细胞凋

亡是一种细胞程序性的死亡过程,是机体清除衰老、损伤和突变细胞的重要方式。目前大多数学者认为细胞凋亡受抑是肿瘤发生的重要原因。流式 Annexin V - FITC /PI 双染结果显示,冬凌草甲素可诱导 SKOV3 细胞凋亡,且随着浓度的升高,凋亡率越大。透射电子显微镜观察,加药组细胞核膜模糊,核内染色质凝聚边集明显,胞质出现空泡变性,呈现典型的中晚期凋亡形态改变。上述实验结果表明,冬凌草甲素对 SKOV3 细胞具有显著的增殖抑制作用,并诱导其凋亡。

细胞周期调节在正常细胞增殖和肿瘤发生中起至关重要的作用,曾蓉等^[10]研究发现冬凌草甲素可诱导人多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞阻滞在 G₂/M 期,Wang 等^[11]研究发现冬凌草甲素可诱导肝癌 HepG2 细胞发生 G₂/M 期阻滞。本研究结果显示,SKOV3 细胞经冬凌草甲素处理后,细胞被阻滞于 S 期和 G₂/M 期,表现为 G₀/G₁ 期细胞比例减少,S 期、G₂/M 期比例增多,且阻滞比例随着药物作用浓度的增加均升高。冬凌草甲素对 SKOV3 细胞的增殖抑制作用可能与其导致 S 期和 G₂/M 期阻滞有关。

卵巢癌的发生与多种癌基因的激活和抑癌基因的失活有关,在多种基因作用下,细胞异常增殖和凋亡抑制是其发生的重要机制。bcl-2 基因家族是最重要的凋亡调控基因,Bcl-2 家族成员存在于线粒体外膜上,包括促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白,前者包括 Bax、Bad、Bak 等,后者包括 Bcl-x_L、Bcl-2 和 Mcl-1 等,两者的比例决定了细胞的命运。当接受上游信号后,促凋亡蛋白如 Bax 表达发生改变,会从胞质转到线粒体膜上与 Bcl-2 或 Bcl-x_L 形成二聚体,改变了线粒体膜的通透性,引起细胞色素 C 的释放;释放的细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子 1(Apoptotic proteaseactivating factor-1, Apaf-1)结合,激活 Caspase 9,进而通过级链反应激活下游的 Caspase 3,最终导致细胞凋亡^[12-13]。实时荧光定量 PCR 检测 SKOV3 细胞在不同浓度冬凌草甲素作用 48 h 后,bcl-2 mRNA 表达减少,而 bax mRNA 表达增加,降低了 bcl-2/bax 的比例,从而诱导细胞凋亡。Survivin 是凋亡抑制蛋白家族中的重要一员,是内源性 Caspase 效应酶抑制物,限制 Caspase 级联反应,起抑制凋亡的作用^[14]。研究显示^[15]:Survivin 具有抑制细胞凋亡,促进细胞转化、参与细胞的有丝分裂、血管的生成和肿瘤细胞耐药性的产生等作用。实时荧光定量 PCR 检测 SKOV3 细胞在不同浓度冬凌草甲素作 48 h 后,survivin mRNA 水平呈浓度依赖性下降,提示冬凌草甲素能够抑制 survivin 表

达。综上所述,冬凌草诱导 SKOV3 细胞凋亡可能是通过抑制 bcl-2、survivin 等抑制凋亡基因的表达,促进 bax 促凋亡基因的表达来实现的。

综上所述,冬凌草甲素对人卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖抑制作用和诱导凋亡效应可能是通过调节细胞周期和 bcl-2、bax、survivin 基因的表达来实现的。我们的研究表明,冬凌草甲素是一种潜在的卵巢癌治疗药物和化疗增敏药物,但其体内作用机制是否与体外实验一致及临床疗效还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Mozzeti S, Ferlini C, Concolino P, et al. Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(1):298-303.

[2] Ahamed M, Akhtar MJ, Siddiqui MA, et al. Oxidative stress mediated apoptosis induced by nickel ferrite nanoparticles in cultured A549 cells[J]. Toxicology, 2011, 283(2-3):101-8.

[3] Li J, Yang LY, Wu HT. Oridonin induced the apoptosis of PC-3 cells and its mechanism[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban), 2011, 36(8):754-9. [李进, 杨罗艳, 吴洪涛. 冬凌草甲素诱导人雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及其机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2011, 36(8):754-9.]

[4] Feng FF, Zhang DR, Tian KL, et al. Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by oridonin nanosuspension[J]. Drug Deliv, 2011, 18(4):265-71.

[5] Gao FH, Hu XH, Li W, et al. Oridonin induces apoptosis and senescence in colorectal cancer cells by increasing histone hyperacetylation and regulation of p16, p21, p27 and c-myc[J]. BMC Cancer, 2010, 10:610-21.

[6] He XJ, Wang HJ, Xia YJ, et al. Empirical study of oridonin-induced gastric cancer cells MKN45 apoptosis[J]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi, 2009, 12(6):607-10. [何徐军, 王惠菊, 夏英捷, 等. 冬凌草甲素诱导胃癌细胞 MKN45 凋亡的实验研究[J]. 中华胃肠外科杂志, 2009, 12(6):607-10.]

[7] Hu HZ, Yang YB, Xu XD, et al. Oridonin induces apoptosis via PI3K/Akt pathway in cervical carcinoma HeLa cell line[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(11):1819-26.

[8] Liu JJ, Zhang JF, Lin DJ, et al. Anti-proliferation effect of oridonin on Nalm-6 cells and its mechanisms of action[J]. Zhonghua Zhong Liu Fang Zhi Za Zhi, 2009, 16(13):966-9. [刘加军, 张俊峰, 林东军, 等. 冬凌草甲素对 Nalm-6 细胞的增殖抑制作用及其作用机制[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(13):966-9.]

[9] Qu J, Guo KY, Wu BY, et al. Oridonin induces apoptosis of human multiple myeloma ARH-77 cells and its possible mechanism[J]. Zhongguo Zhong Liu Sheng Wu Zhi Liao Za Zhi, 2010, 17(2):134-8. [曲佳, 郭坤元, 吴秉毅, 等. 冬凌草甲素诱导人多发性骨髓瘤 ARH-77 细胞凋亡及其可能机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(2):134-8.]

[10] Zeng R, Yi S, Chen Y, et al. Effects of Oridonin on Cell Cycle and Apoptosis of Multiple Myeloma Cells[J]. Huazhong Ke Ji Da Xue Xue Bao (Yi Xue Ban), 2011, 40(5):505-8. [曾蓉, 易莎, 陈燕, 等. 冬凌草甲素对多发性骨髓瘤细胞细胞周期和凋亡的影响及其机制研究[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2011, 40(5):505-8.]

[11] Wang H, Ye Y, Chui JH, et al. Oridonin induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK and p53 signaling pathways in HepG2 cells[J]. Oncol Rep, 2010, 24(3):647-51.

[12] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within[J]. Science, 1998, 281(5381):1312-6.

[13] Chang HK, Shin MS, Yang HY, et al. Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(8):1597-602.

[14] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1):33-42.

[15] Pisarev V, Yu B, Salup R, et al. Full-length dominant-negative survivin for cancer immunotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(17):6523-33.

[编辑:刘红武;校对:杨 卉]