

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.03.009

## 异甘草素诱导人卵巢癌细胞株 SKOV3 凋亡及自噬的研究\*

张栋栋<sup>1,4</sup>,付亚杰<sup>2</sup>,陈小芸<sup>1</sup>,鲁永婷<sup>1</sup>,范维<sup>1</sup>,郭钰珍<sup>3,△</sup>

(1. 兰州大学第二临床医学院妇产科学专业 730000; 2. 山东省桓台县人民医院重症医学科 256400; 3. 兰州大学第二医院妇科 730000; 4. 山东省淄博市妇幼保健院 255000)

**摘要:**目的 观察异甘草素(ISL)对人卵巢浆液性乳头状腺癌细胞株 SKOV3 体外增殖的抑制作用,并探讨其可能存在的分子机制。方法 四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法观察 ISL 对 SKOV3 细胞生长的抑制作用;吖啶橙/溴化乙锭双荧光染色后观察细胞形态变化;流式细胞术 Annexin V-FITC/PI 双染检测 ISL 对细胞凋亡的影响;Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 的表达水平。结果 ISL 能够抑制 SKOV3 细胞的增殖,呈时间、剂量依赖性;荧光染色后可见细胞核变圆,碎裂,染色质浓缩;流式细胞仪检测 ISL(5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用于 SKOV3 细胞 48 h 后,凋亡率明显高于 ISL 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ );Western blot 结果显示 ISL(5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用于 SKOV3 细胞 48 h 后 Bcl-2 蛋白的表达下调,Bax、Beclin1、LC3 蛋白的表达上调,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 ISL 对人卵巢癌 SKOV3 细胞具有明显的抑制增殖和诱导凋亡的作用,其抗体外肿瘤机制可能与激活线粒体凋亡通路及自噬通路相关。

**关键词:**卵巢肿瘤;异甘草素;人卵巢癌 SKOV3 细胞;凋亡;自噬

**中图分类号:**R737.3

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2015)03-0315-03

## Pro-apoptosis and pro-autophagy effect of isoliquiritigenin on human ovarian cancer cell lines SKOV3\*

Zhang Dongdong<sup>1,4</sup>, Fu Yajie<sup>2</sup>, Chen Xiaoyun<sup>1</sup>, Lu Yongting<sup>1</sup>, Fan Wei<sup>1</sup>, Guo Yuzhen<sup>3,△</sup>

(1. Major of Gynecology and Obstetrics, the Second Clinical Medicine School of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China; 2. Department of ICU, Huantai People's Hospital, Zibo, Shandong 256400, China; 3. Department of Gynecology, the Second Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China; 4. Zibo Women and children's Hospital, Zibo, Shandong 255000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the proliferation-inhibition activity, pro-apoptosis and pro-autophagy of isoliquiritigenin on ovarian cancer cell lines SKOV3 in vitro, and explore its mechanism. **Methods** The cytotoxic effect of Isoliquiritigenin(ISL) on the SKOV3 cells was tested by the means of MTT. Cell morphology was observed with invert microscope after AO/EB staining. The apoptosis of the SKOV3 cells was detected with flow cytometer. The expression levels of Bax, Bcl-2, Beclin1 and LC3 were detected by Western-blotting. **Results** Different concentrations of ISL(5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) showed the inhibitory effect on SKOV3 cells and presented the characteristic morphological changes of apoptosis under inverted microscope. The FCM analysis showed that the apoptosis rate of the SKOV3 cells was increased after treatment of ISL accompanied a concentration increment and a prolongation of the culture time( $P<0.05$ ). Western-blotting result showed that the expression levels of Bax, Beclin1 and LC3 were increased in SKOV3 treated with ISL (5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), while the expression level of Bcl-2 was significantly decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusion** ISL could inhibit the proliferation of the SKOV3 cells in vitro and induce apoptosis, and that maybe associate with the mitochondrial pathway of apoptosis and autophagy pathway.

**Key words:** ovarian cancer; isoliquiritigenin; the SKOV3 cells; apoptosis; autophagy

异甘草素(isoliquiritigenin, ISL)是一种黄酮类化合物,是甘草中重要的活性成分之一,具有多种药理活性,诸如抗肿瘤、抗病毒、抗自由基、松弛血管、抑制脂质过氧化等。其中抗肿瘤作用是近年来的研究热点<sup>[1-3]</sup>。研究证明 ISL 对多种肿瘤细胞具有明显的体外抑制作用,但对卵巢癌细胞的影响尚未见报道。本试验初步观察 ISL 对人卵巢癌细胞株 SKOV3 增殖的影响,探讨其可能的抗肿瘤的作用机制,为 ISL 的临床应用提供试验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 人卵巢癌细胞株 SKOV3 由兰州大学基础医学院惠赠;ISL 为天津马克生物技术有限公司产品[高效液相色谱法(HPLC) $\geq 98\%$ ,批号:GC-20120203];胎牛血清购自杭州四季青公司;DMEM 培养基购自 Gibco 公司;二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司;Annexin V-

FITC/PI 凋亡检测试剂盒购于南京凯基;兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、兔抗人 Bax 抗体、兔抗人 Bcl-2 抗体、兔抗人 Beclin1 抗体、兔抗人 LC3 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology(CST)公司,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司。

## 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养** 用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 DMEM 培养液在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱中培养,胰酶消化传代,取对数生长期的细胞用于试验。

**1.2.2 MTT 法检测细胞生长情况** 取对数生长期的 SKOV3 细胞,以  $1 \times 10^4$  个/孔加入 96 孔板,待细胞过夜贴壁后,试验组分别加入不同浓度的 ISL,使其终浓度分别为 5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,阴性对照组加入 0.01% 的 DMSO,空白对照组加入等

\* 基金项目:兰州大学第二医院院内基金资助(YJzy2013-08)。 作者简介:张栋栋(1986-),住院医师,硕士,主要从事妇科肿瘤方向研究。

△ 通讯作者, Tel:13609348578; E-mail:guoyz@lzu.edu.cn。

体积的 DMEM 培养液, 每组设 5 个复孔, 于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养 6、12、24、48 h 后, 每孔加入 20 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT, 继续培养 4 h, 弃上清液, 然后每孔再加入 150 μL DMSO, 振荡 3 min, 使结晶溶解, 用酶标仪于 490 nm 处检测吸光度 A 值, 以 A<sub>490nm</sub> 值的大小反映活细胞的多少。细胞抑制率 = (1 - 试验组 A 值 / 空白对照组 A 值) × 100%。试验重复 3 次, 取平均值。

**1.2.3 形态学观察** 倒置光学显微镜观察不同浓度 ISL (0、5、10、20 μg/mL) 作用 48 h 后, SKOV3 形态学变化。吖啶橙/溴化乙锭双荧光染色后, 再次观察细胞形态学变化, 并拍照。

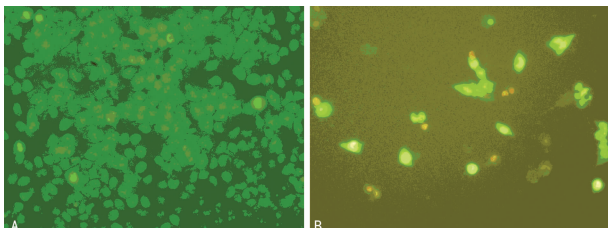
**1.2.4 Annexin V FITC/PI 双染色检测细胞凋亡率** 收集不同浓度 ISL (0、5、10、20 μg/mL) 作用 48 h 后的细胞, 用不含乙二胺四乙酸 (EDTA) 的胰酶消化, 收集细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗 2 遍 (1 500 r/min 离心 5 min)。500 μL 缓冲液重悬细胞, 加入 5 μL Annexin V FITC 和 5 μL PI, 混匀后避光孵育 5 min, 1 h 内上流式细胞仪 (FCM) 检测细胞凋亡率。

**1.2.5 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 的表达变化** 取对数生长期的 SKOV3 细胞, 以 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔接种于 6 孔板, 24 h 细胞贴壁后换液, 加入不同浓度的 ISL, 使其终浓度分别为 0、5、10、20 μg/mL, 继续培养 48 h, 弃上清液, PBS 清洗 3 遍, 用干净滤纸吸净 PBS, RIPA (含 cocktail) 裂解液冰上裂解细胞提取蛋白, 蛋白质定量试剂盒 BCA 法蛋白定量, 蛋白变性, 十二烷基酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转膜到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。转膜成功后, 50 g/L 脱脂奶封闭 2 h, 分别加入一抗 Bcl-2、Bax、GAPDH、Beclin1、LC3 [均为兔抗原, 50 g/L 牛血清清蛋白 (BSA) 1 : 1 000 稀释], 4 ℃ 条件下孵育过夜, 洗膜, 二抗 (1 : 5 000 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔) 孵育 1 h, 洗膜, 滴加 ECL 超敏化学发光剂, 暗盒曝光显影, 采用 ImageJ 软件进行定量分析。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析, 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验, 检验水准  $\alpha = 0.05$ , 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 形态学观察** 各加药组细胞经 ISL 分别作用 6、12、24、48 h 后, 光镜下均可见细胞皱缩变圆, 体积缩小, 细胞质内可见较多颗粒、空泡, 胞核不清, 细胞脱壁浮起并出现片状无细胞生长区。空白对照组细胞则贴壁生长, 几乎无脱落, 细胞完整, 胞质饱满, 胞核清晰圆润, 相邻细胞生长融合成片, 可见核分裂相。48 h ISL 20 μg/mL 组, 吖啶橙/溴化乙锭双染后在荧光显微镜下观察, 空白对照组活细胞, 核染色质着绿色并呈正常结构; 早期凋亡细胞, 核染色质着绿色呈固缩状或圆珠状; 晚期凋亡细胞, 核染色质为橘红色并呈固缩状或圆珠状, 如图 1 所示。



A: 空白对照组 48 h; B: ISL 20 μg/mL 组 48 h。

图 1 吖啶橙/溴化乙锭双染后观察 SKOV3 细胞的形态改变 (×200)

**2.2 ISL 对人卵巢癌 SKOV3 细胞体外增殖的抑制作用** 5、

10、20 μg/mL 的 ISL 对人卵巢癌 SKOV3 细胞均有明显抑制作用, 且随着 ISL 浓度的增加和培养时间的延长, 抑制作用明显增强。20 μg/mL 的 ISL 作用 48 h, 对细胞的抑制率可达 68.07%, 见表 1。阴性对照组和空白对照组的 A<sub>490nm</sub> 值差异无统计学意义, 提示 0.01% DMSO 对 SKOV3 细胞无抑制作用。

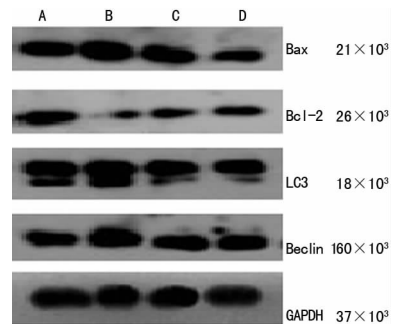
表 1 ISL 对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	抑制率 (%)			
	6 h	12 h	24 h	48 h
ISL 0 μg/mL 组	0.27 ± 1.16	-0.68 ± 1.52	1.16 ± 2.06	1.59 ± 1.31
ISL 5 μg/mL 组	5.32 ± 3.93 <sup>a</sup>	7.19 ± 3.86 <sup>a</sup>	12.32 ± 4.99 <sup>a</sup>	28.48 ± 5.07 <sup>a</sup>
ISL 10 μg/mL 组	6.77 ± 3.52 <sup>a</sup>	18.42 ± 4.37 <sup>a</sup>	28.01 ± 5.04 <sup>a</sup>	47.95 ± 6.31 <sup>a</sup>
ISL 20 μg/mL 组	19.37 ± 4.28 <sup>a</sup>	24.92 ± 5.06 <sup>a</sup>	37.56 ± 5.86 <sup>a</sup>	68.07 ± 6.17 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与 ISL 0 μg/mL 组比较。

**2.3 Annexin V FITC/PI 双染色流式细胞仪分析 ISL 对 SKOV3 细胞凋亡的影响** Annexin V FITC/PI 双染色, 流式细胞仪检测不同浓度 ISL 作用于 SKOV3 细胞 48 h 后凋亡率变化, 结果显示 ISL (5、10、20 μg/mL) 作用于 SKOV3 细胞 48 h 后, 凋亡率明显高于 ISL 0 μg/mL 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且随 ISL 浓度增加细胞凋亡率明显增高。

**2.4 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 的表达变化** ISL 作用于 SKOV3 细胞 48 h 后, 提取蛋白, Western blot 检测 Bcl-2、Bax 及 Beclin1、LC3 的表达, 结果发现 ISL 处理细胞后, 随着浓度的增加, Bax、Beclin1、LC3 的表达增加, Bcl-2 的表达下降, ISL 5、10、20 μg/mL 组分别与 0 μg/mL 组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。



A: ISL 0 μg/mL 组; B: ISL 20 μg/mL 组; C: ISL 10 μg/mL 组; D: ISL 5 μg/mL 组。

图 2 ISL 作用于 SKOV3 细胞株后 Bax、Bcl-2、LC3、Beclin1 蛋白水平变化

## 3 讨 论

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一。在美国, 上皮性卵巢癌是妇科肿瘤中病死率最高的恶性肿瘤, 每年大约有 22 000 例新发病例和 16 000 例死亡病例<sup>[4-6]</sup>。我国发病患者数逐年递增。由于卵巢位于盆腔深部, 早期症状不明显, 同时缺乏可靠的筛选方法, 大多数患者在就诊时已到了晚期, 治愈率很低<sup>[4-6]</sup>。目前对于卵巢癌主要的处理方法是外科手术, 辅以铂类药物为基础的联合化疗。尽管临床常用化疗药物抗肿瘤的作用比较明确, 但存在着不良反应大, 长期应用产生耐药性等缺点。很多病例多因铂类化疗药耐药性的产生而导致治疗失败、癌症复发, 故 5 年生存率仅 30%~45%<sup>[4]</sup>。因此, 寻找新的疗效好、不良反应小的化疗药物成为近年的研究热点。而中药因为具有不良反应小、不易产生耐药等优点受到人们的

关注,其中黄酮类化合物的抗肿瘤作用成为近年的研究热点。国内外研究表明,黄酮类化合物能抑制多种肿瘤细胞的增殖。ISL 作为一种黄酮类化合物,具有多种药理活性,其中抗肿瘤作用备受关注。本试验研究发现,ISL 可使 SKOV3 细胞增殖受到明显抑制,具有明显的量效和时效关系。同时 ISL 可使 SKOV3 细胞凋亡率增加,随着药物浓度增高,细胞凋亡率增加更为显著。形态学观察结果也显示细胞发生凋亡改变,提示凋亡可能是 ISL 抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的作用机制之一。

关于凋亡机制的研究,可以通过检测死亡受体通路的相关蛋白或基因(如:Fas)的表达<sup>[7]</sup>,也可以通过检测线粒体凋亡途径的相关蛋白或基因(如:Bcl-2、Bax)的表达,亦可以检测内质网通路的相关基因或蛋白的表达,以进一步明确其促凋亡的机制<sup>[8-9]</sup>。本研究分析 ISL 处理后对常见的促凋亡基因 Bax 和抑制凋亡基因 Bcl-2 蛋白水平的影响,发现其可上调 Bax 的蛋白水平,降低 Bcl-2 的蛋白水平,表明 ISL 可激活 SKOV3 细胞的死亡受体途径。本研究结果显示 ISL 可以促进 SKOV3 的自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 的表达,随着药物浓度的增加,其表达量呈上升趋势,同时 SKOV3 的凋亡率也增加。提示 ISL 可以促进 SKOV3 自噬活性,从而使其凋亡。自噬现象最初被认为是细胞的另外一种凋亡方式,目前研究表明,自噬可以维持细胞新陈代谢,但是当自噬过度活跃时则会促进细胞发生自噬性凋亡<sup>[10-11]</sup>。凋亡和自噬都可以诱发细胞的程序性死亡,但是二者的关系仍不明确,但二者在某些情况下可以相互拮抗或促进<sup>[12]</sup>。自噬对肿瘤细胞的作用不尽相同<sup>[13-14]</sup>。

动物实验表明,ISL 具有毒性低、不良反应小的特点<sup>[3]</sup>,为临床治人卵巢癌提供了更广阔的思路,有着更卓越的临床应用价值。本试验为今后进一步研究 ISL 的抑瘤机制和探索开发人卵巢癌新的药物治疗提供了初步的试验依据。

#### 参考文献:

[1] 张晶,杨静,汤宏斌. 异甘草素对人宫颈癌细胞增殖的抑制作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2005,19(6):436-442.

(上接第 314 页)

痛组分的中枢作用机制研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(2):25-28.

[5] 左仁云. 罗非西布的药理及临床[J]. 中国新药杂志,2000,9(9):601-604.

[6] 胡然,库宝善,朱素君,等. 贯叶连翘提取物和盐酸赖氨酸复合物的镇痛作用研究[J]. 中国临床康复,2003,7(26):3600-3601.

[7] 王瑞,王妹,睢大箕. 纳洛酮心血管保护作用研究进展[J]. 武警医学院学报,2011,22(10):907-908.

[8] Leppert W. The role of opioid receptor antagonists in the treatment of opioid-induced constipation: a review [J]. Adv Ther,2010,27(10):714-730.

[9] Hunskaar S,Fasmer OB,Hole K. Formalin test in mice:a useful technique for evaluating mild analgesic[J]. J Neurosci Methods,1985,14(1):69-76.

[10] 孙波,李兆申. 非甾体类抗炎药与胃肠道损伤[J]. 上海医院药学,2000,11(3):17-21.

[11] 颜文革,张守芳. 非甾体抗炎药机理进展[J]. 沈阳药科大学学报,2001,18(1):64-67.

[2] 陈朋,张娟,王振华,等. 异甘草素对 HeLa 细胞氧化还原状态的影响[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2726-2728.

[3] 金文伟,李湧健. 甘草抗肿瘤活性成分研究近况[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(4):163-166.

[4] Jemal A,Siegel R,Ward E,et al. Cancer statistics,2006 [J]. CA Cancer J Clin,2006,56(2):106-130.

[5] Ozols RF,Bookman MA,Connolly DC,et al. Focus on epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Cell,2004,5(1):19-24.

[6] Cannistra SA. Cancer of the ovary[J]. N Engl J Med,2004,351(24):2519-2529.

[7] 伍俊,易震南,胡成平. 曲古抑素 A 激活 FAS 途径促使 A549/CDDP 细胞凋亡[J]. 重庆医学,2011,40(23):2294-2296,2393.

[8] 胡辉,荆绪斌,蔡先彬,等. 姜黄素氧化损伤线粒体诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡的研究[J]. 重庆医学,2012,03(3):269-270,274.

[9] Brunelle JK,Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. J Cell Sci,2009,122(4):437-441.

[10] Kroemer G,Levine B. Autophagic cell death:the story of a misnomer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2008,9(12):1004-1010.

[11] Liang C. Negative regulation of autophagy[J]. Cell Death Differ,2010,17(12):1807-1815.

[12] Xie M,Morales CR,Lavandero S,et al. Tuning flux:auto-phagy as a target of heart disease therapy[J]. Curr Opin Cardiol,2011,26(3):216-222.

[13] Jin S,Dipaola RS,Mathew R,et al. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death[J]. J Cell Sci,2007,120(Pt 3):379-383.

[14] Jin S,White E. Role of autophagy in cancer management of metabolic stress[J]. Autophagy,2007,3(1):28-31.

(收稿日期:2014-09-13 修回日期:2014-11-14)

[12] Malmberg AB,Yaksh TL. Cyclooxygenase inhibitor and the spinal release of prostaglandin E<sub>2</sub> and amino acids evoked by paw formalin injection:a microdialysis study in unanesthetized rats[J]. J Neurosci,1995,15(8):2768-2776.

[13] Malmberg AB,Yaksh TL. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats[J]. Br J Pharmacol,1995,114(5):1069-1075.

[14] Jain NK,Patil CS,Singh A,et al. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway [J]. Brain Res,2001,909(1/2):170-178.

[15] Kuroda R,Kawao N,Yoshimura H,et al. Secondary somatosensory cortex stimulation facilitates the anti-nociceptive effect of the NO synthase inhibitor through suppression of spinal nociceptive neurons in the rat[J]. Brain Res,2001,903(1/2):110-116.

(收稿日期:2014-09-11 修回日期:2014-11-10)