

五味子乙素对人卵巢癌 Skov3 细胞株的增殖、凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响

223002 江苏淮安 淮安市妇幼保健院妇产科 曾雯琼, 徐青¹, 许银燕^{2,3}

【摘要】 目的 探讨五味子乙素(Sch B)对人卵巢癌 Skov3 细胞株的增殖、凋亡及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响。方法 采用 0、1.0、10.0、20.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ Sch B 处理 Skov3 细胞,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各浓度处理 24、48、72 和 96h 的增殖抑制率,Annexin-FITC/PI 双染法检测不同浓度处理 48h 后的细胞凋亡情况,流式细胞仪检测各浓度处理 48h 后的细胞周期分布情况,Western blotting 检测各浓度处理 48h 后细胞核 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -连接素(β -catenin)及下游靶分子 C-myc、细胞周期素 D1(Cyclin D1)的蛋白水平,同时于各浓度处理 48h 后检测细胞质和细胞核的糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)活性。结果 Sch B 可呈剂量和时间依赖方式增加细胞增殖抑制率($P < 0.05$),作用 48h 后可呈剂量依赖方式升高早、晚期凋亡率及细胞质/胞核 GSK-3 β 活性($P < 0.05$);除 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 外,其余浓度作用 48h 的 G_0/G_1 期细胞比例均高于 0 $\mu\text{mol/L}$,S 期、 G_2/M 期细胞比例及 β -catenin、C-myc 和 Cyclin D1 蛋白水平均低于 0 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$),且 10.0、20.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ Sch B 间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Sch B 可以抑制 Skov3 细胞株的增殖并促进其凋亡和细胞周期阻滞,以及抑制 Wnt/ β -catenin 通路的激活。

【关键词】 Schisandrin B; 卵巢癌; 增殖; 凋亡; Wnt/ β -catenin 信号通路

中图分类号:R737.31 文献标识码:A 文章编号:1009-0460(2014)07-0589-05

Influences of Schisandrin B on proliferation, apoptosis and Wnt/ β -catenin signaling pathway of Skov3 human ovarian cancer cells

ZENG Wenqiong, XU Qing, XU Yinyan. Department of Obstetrics and Gynecology, Maternal and Children Health Hospital of Huai'an, Huai'an 223002, China

Corresponding author: XU Yinyan, Email: xuyinyan937@126.com

【Abstract】 Objective To explore the influences of Schisandrin B (Sch B) on proliferation, apoptosis and Wnt/ β -catenin signaling pathway of SKOV3 human ovarian cancer cells. **Methods** The SKOV3 cells were treated with different concentrations of Sch B (0, 1.0, 10.0, 20.0, 50.0 $\mu\text{mol/L}$). The MTT was used to measure the proliferation inhibition rates at 24, 48, 72 and 96h treated with different concentrations of Sch B. The Annexin-FITC/PI double staining was employed to detect cell apoptosis at 48h after treatment with different concentrations of Sch B. The cycle distribution at 48h after treatment with Sch B was detected by flow cytometry. The Western blotting was used to measure the nuclear β -catenin protein levels in Wnt/ β -catenin signaling pathway as well as its downstream target C-myc and cyclin D1. The cytoplasm/nucleus activities of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) at 48h after treatment with different concentrations of Sch B were measured by activity assay kit. **Results** The Sch B can increase the proliferation inhibition rates in a dose-and time-dependent manner, and elevate the early and late apoptosis and cytoplasm/nucleus activities of GSK-3 β at 48h after treatment. In addition to 1.0 $\mu\text{mol/L}$, the proportion of cells in G_0/G_1 phase of the remaining concentrations were higher than those of 0 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$), and the proportion of cells in S phase and G_2/M phase and β -catenin, C-myc and Cyclin D1 protein levels were lower than those of 0 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). **Conclusion** Sch B can inhibit the proliferation, promote apoptosis and cell cycle arrest and inhibit the activation of Wnt/ β -catenin pathway.

【Key Words】 Schisandrin B; Human ovarian cancer; Proliferation; Apoptosis; Wnt/ β -catenin signaling pathway

1 210004 南京医科大学附属南京妇幼保健院妇科

2 210004 南京医科大学附属南京妇幼保健院药学部

3 通讯作者, E-mail: xuyinyan937@126.com

卵巢癌是一种常见的妇科肿瘤,死亡率居妇科肿瘤首位,严重影响患者的生活质量和生育能力^[1]。除手术切除外,化疗是常用的治疗手段,但长期使用毒副作用大,因此需探讨有效的治疗方法^[2]。五味子乙素(Schisandrin B, Sch B)是一种联苯环辛二烯木脂素,具有多种机制的抗肿瘤活性^[3],如其可作为介导肿瘤耐药的 P 糖蛋白和多药耐药蛋白 1 的抑制剂,亦有增强多柔比星诱导的癌细胞凋亡的作用^[4-5]。Sch B 还具有降低顺铂诱导的氧化应激、遗传毒性和神经毒性的优势^[6],提示其在抗肿瘤治疗中有一定的前景。以上证据表明 Sch B 可能存在抗肿瘤作用,但目前对 Sch B 能否抑制卵巢癌的研究较少,因此本研究给予人卵巢癌 Skov3 细胞 Sch B 处理,观察对其增殖及凋亡的影响。鉴于 Wnt/ β -catenin 信号通路介导了包括卵巢癌在内多种恶性肿瘤的恶性行为^[7-8],故本研究还探讨 Sch B 处理对 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -连接素(β -catenin)及下游靶分子 C-myc、细胞周期素 D1(Cyclin D1)蛋白水平和糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)活性的影响,为临床卵巢癌的治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 卵巢癌 Skov3 细胞株购自美国 ATCC 公司, Sch B、Triton X-100、二甲亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)和十二烷基硫酸钠(SDS)均购自美国 Sigma 公司,小牛血清(FCS)购自杭州四季青生物工程材料有限公司,RPMI 1640 培养基和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司,BCA 蛋白定量检测试剂盒购于美国 Pierce 公司,SDS-PAGE 凝胶电泳所有试剂均购自美国 Amresco 公司,Annexin-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自凯基生物, β -catenin 和 Cyclin D1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,C-myc 和内参 GAPDH 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,GSK-3 β 活性检测试剂盒购自美国 GENMED 公司。仪器:电泳仪购于美国 BioRad 公司,ELx800 Mk3 型酶标仪购自美国 BIOTEK 公司,FACS Calibur™流式细胞仪购自美国 BD 公司,5415R 型高速离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.2 细胞培养 将 Skov3 细胞于含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中培养,置于 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中。细胞贴壁生长良好,每 3 天传代 1 次。取对数生长期细胞进行实验。

1.3 细胞增殖检测 0.25%胰蛋白酶消化对数生长期 Skov3 细胞,吹打制备单细胞悬液,按每孔 1×10^5 个的密度接种于 96 孔培养板,24h 后加入 Sch B 使终浓度分别为 0、1.0、10.0、20.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ (0 $\mu\text{mol/L}$ 设为对照组,其余为实验组),在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 24、48、72 和 96h 后,每孔加入 5mg/mL MTT 溶液 10 μl ,4h 后终止培养,采用酶标仪读取 492nm 各浓度的吸光值(A),根据公式计算增殖抑制率。增殖抑制率(%) = (1 - 实验组 A / 对照组 A) \times 100%。每个浓度重复 3 次。

1.4 细胞凋亡率及细胞周期检测 按每孔 1×10^6 个的密度将 Skov3 细胞接种 6 孔培养板中,加入 Sch B 使终浓度分别为 0、1.0、10.0、20.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$,培养 48h 后,依据凋亡检测试剂盒说明书操作,PBS 冲洗细胞 1 次,并加入 Annexin V/FITC 和 PI,染色 15min 后采用流式细胞仪测定凋亡率及细胞周期。每个浓度重复 3 次。

1.5 细胞质/胞核蛋白提取 按每孔 1×10^6 个的密度将 Skov3 细胞接种 6 孔培养板中,收集 0、1.0、10.0、20.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$ Sch B 处理 48h 后的 Skov3 细胞,预冷 PBS 冲洗两次,加入细胞裂解液,将细胞刮下置入裂解 20min,4℃ 下 12 000r/min 离心 5min,取上清即为细胞质蛋白提取物。将细胞沉淀,加入细胞核裂解液,4℃ 下静置 30min,12 000r/min 离心 10min,取上清即为细胞核蛋白提取物。采用 BCA 法测定蛋白浓度,分别将细胞质和细胞核中的蛋白提取物于低温冰箱内保存备用。

1.6 免疫印迹 将细胞核蛋白样品与加样缓冲液等体积混合,按照常规方法进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳(浓缩胶和分离胶电压分别为 100 和 80V)。半干转至 PVDF 膜,加适量 β -catenin(稀释比例 1:100)、C-myc(1:300)和 Cyclin D1(1:100)一抗,4℃ 孵育过夜,以 TBST 洗膜 3 次,加入二抗(1:5000),室温下摇荡孵育 2h,ECL 显色,胶片曝光。采用 Gel-Pro analyzer 分析各显影条带光密度,最终结果表示为各目的蛋白与内参 GAPDH 的光密度比值。每个浓度重复 3 次。

1.7 细胞质/胞核 GSK-3 β 活性检测 根据 Pan 等^[9]的报告进行细胞质/胞核 GSK-3 β 活性检测,简述如下:根据试剂盒说明书依次加入检测缓冲液、酶混合物、反应缓冲液及底物,将 50 μg 细胞质/胞核蛋白与以上混合物混匀,在 30℃ 下反应 5min,采用酶标仪读取 340nm 各浓度的吸光值(A),根据公

式计算相对活性。相对活性(%)=(1-实验组 A/对照组 A)×100%。每个浓度重复 3 次。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 19.0 版软件分析。数据以均数±标准差表示,多组比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),两两比较采用 SNK 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sch B 对细胞增殖的影响 采用 0、1.0、10.0、20.0、50.0 μmol/L Sch B 处理 Skov3 细胞 24、48、72 和 96h 后,MTT 检测发现 Sch B 可抑制 Skov3 细胞增殖,且在同一作用时间下,随浓度增加,细胞增殖抑制率升高,呈剂量依赖方式($P < 0.05$);而在同一药物浓度下,随作用时间延长,细胞增殖抑制率亦升高,呈时间依赖的方式($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 Sch B 对细胞凋亡率的影响 采用 0、1.0、10.0、20.0、50.0 μmol/L Sch B 处理 Skov3 细胞 48h 后,采用 Annexin-FITC/PI 双染法检测发现,除 1.0 μmol/L 外,其余浓度的早、晚期凋亡率均高于 0 μmol/L($P < 0.05$),组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

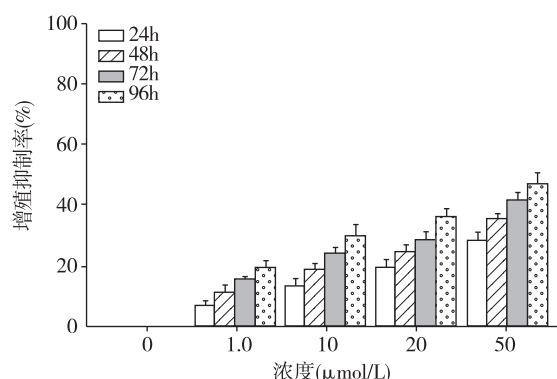


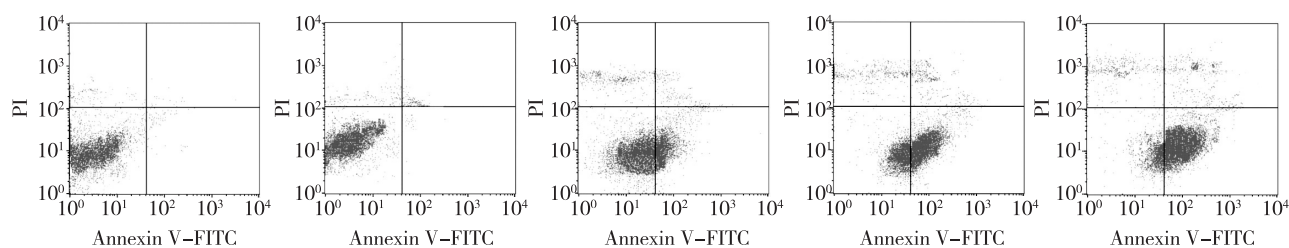
图 1 不同浓度 Sch B 处理后细胞增殖抑制情况

2.3 Sch B 对细胞周期的影响 采用 0、1.0、10.0、20.0、50.0 μmol/L Sch B 处理 Skov3 细胞 48h 后,采用流式细胞仪检测发现,除 1.0 μmol/L 外,其余浓度 G_0/G_1 期比例均高于 0 μmol/L, S 期和 G_2/M 期比例均低于 0 μmol/L ($P < 0.05$); 10.0、20.0、50.0 μmol/L 处理后 G_0/G_1 期比例亦高于 1.0 μmol/L, S 期和 G_2/M 期比例均低于 1.0 μmol/L ($P < 0.05$),但 20.0、50.0 μmol/L 两浓度间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1、图 2。

表 1 不同浓度 Sch B 作用 48h 对细胞凋亡率及细胞周期的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

浓度(μmol/L)	细胞凋亡率		细胞周期		
	早期	晚期	G_0/G_1	S	G_2/M
0	4.32±1.07	2.38±0.89	42.83±6.65	38.69±3.45	19.43±2.37
1.0	6.74±1.72	4.56±1.48	44.27±4.50	37.21±3.62	17.68±2.28
10.0	14.69±2.38 ^a	9.39±1.73 ^a	51.90±3.32 ^a	33.58±2.74 ^a	12.39±1.25 ^a
20.0	23.55±4.73 ^a	11.67±2.58 ^a	58.17±4.79 ^a	27.08±2.96 ^a	8.28±2.28 ^a
50.0	28.37±5.76 ^a	15.04±2.62 ^a	65.96±5.34 ^a	24.10±1.35 ^a	5.42±1.19 ^a

注:与 0 μmol/L 比较, ^a: $P < 0.05$

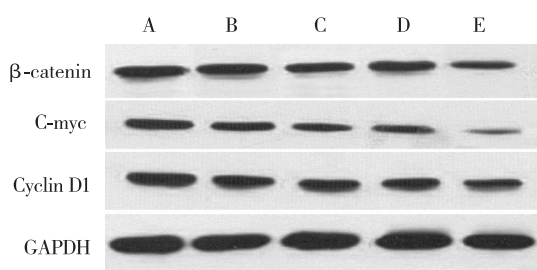


由左至右依次为:0、1.0、10.0、20.0、50.0 μmol/L Sch B

图 2 各组 Sch B 处理 48h 后流式细胞检测情况

2.4 Sch B 对 Wnt/β-catenin 信号通路的影响 除 1.0 μmol/L 外, Sch B 处理 48h 后的 β-catenin、C-myc 和 Cyclin D1 的蛋白水平均低于 0 μmol/L, 10.0、

20.0、50.0 μmol/L 处理后 3 蛋白水平亦低于 1.0 μmol/L, 且该 3 浓度组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3、表 2。



注:由 A 至 E 为 0、1.0、10.0、20.0、50.0 μmol/L Sch B

图 3 Sch B 处理 48h 后 Wnt/β-catenin 信号通路蛋白 Western blotting 检测情况

表 2 不同浓度 Sch B 对 Wnt/β-catenin 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

浓度 (μmol/L)	β-catenin	C-myc	Cyclin D1
0	0.35±0.03	0.27±0.04	0.37±0.04
1.0	0.32±0.02	0.24±0.05	0.35±0.03
10.0	0.27±0.04 ^a	0.16±0.02 ^a	0.27±0.02 ^a
20.0	0.22±0.03 ^a	0.12±0.03 ^a	0.20±0.04 ^a
50.0	0.16±0.02 ^a	0.09±0.01 ^a	0.15±0.02 ^a

注:与 0 μmol/L 比较, ^a:*P*<0.05

2.5 Sch B 对细胞质/胞核 GSK-3β 活性的影响

采用 0、1.0、10.0、20.0、50.0 μmol/L Sch B 处理 Skov3 细胞 48h 后,采用试剂盒检测细胞质/胞核 GSK-3β 发现 Sch B 可增强细胞质/胞核 GSK-3β 活性,且在同一作用时间下,随浓度增加,GSK-3β 活性升高,呈剂量依赖方式(*P*<0.05)。见图 4。

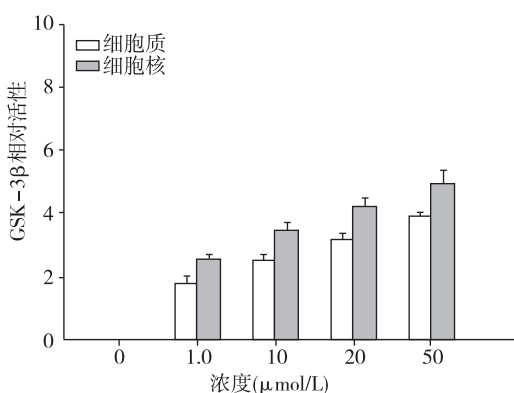


图 4 不同浓度 Sch B 对细胞质/胞核 GSK-3β 活性的影响

3 讨论

除常用化疗药物外,对肿瘤细胞有抑制作用的生化药物目前受到广泛关注,尤其是从天然植物药

材中研发的有效抗肿瘤成分^[10]。Sch B 是一种联苯环辛二烯木脂素,为五味子成熟干燥果实经脱脂后提取的木脂素类药理活性物质,具有多种抗肿瘤活性,如可抑制癌细胞的侵袭转移、逆转多药耐药及增强化疗药物的抗肿瘤效果等^[4-6]。同时 Sch B 还有降低顺铂诱导的氧化应激、遗传毒性和神经毒性的优势^[6],以上均提示 Sch B 可能具有较好抗肿瘤的效果。卵巢癌是女性中排名第 7 位的恶性肿瘤,世界发病率为 6.3/10 万,死亡率为 308/10 万,因缺乏有效的筛查手段,约 70% 卵巢癌患者就诊时已属晚期^[11]。目前常规治疗手段效果不理想,易复发、发生转移等,严重影响患者的生活质量,故急需探讨有效的治疗手段。鉴于 Sch B 可能具有较好抗肿瘤的效果,故本研究采用 Sch B 处理卵巢癌 Skov3 细胞。

恶性肿瘤的发生与细胞的过度增殖有关,同时凋亡减少也是肿瘤的基本特征。本研究采用 Sch B 处理卵巢癌 Skov3 细胞发现其可呈剂量和时间依赖的方式抑制细胞增殖,具体表现在可升高 Skov3 细胞的增殖抑制率,提示 Sch B 可抑制卵巢癌 Skov3 细胞增殖。同时作用 48h 后可呈剂量依赖的方式升高早、晚期凋亡率,提示 Sch B 可促进卵巢癌 Skov3 细胞凋亡。化疗药物可通过影响肿瘤细胞的细胞周期来发挥抗肿瘤作用^[12]。Sch B 处理可影响 Skov3 细胞的细胞周期,如导致细胞 G₀/G₁ 期比例升高,S 期、G₂/M 期比例降低,表明 Sch B 处理可增加停滞在 G₀/G₁ 期的细胞比例,来抑制肿瘤细胞的生长,推测其主要作用于 G₀/G₁ 期。以上表明 Sch B 对卵巢癌 Skov3 细胞的抗肿瘤效果较为全面,对细胞增殖、凋亡及细胞周期均有影响。

Wnt/β-catenin 信号转导通路在生物发育、细胞转运及细胞凋亡等生命过程中发挥重要作用,其异常活化与肿瘤的发生、发展有关。以往的研究表明,大多数肿瘤细胞的 Wnt/β-catenin 通路是激活的,且在肿瘤细胞增殖、迁移和凋亡中发挥了重要作用^[7-8,13],而相关研究提示联苯环辛二烯木脂素类可抑制人结肠癌 HCT116 细胞的 Wnt/β-catenin 信号通路来发挥抗肿瘤的作用^[14]。故本研究推测 Sch B 对卵巢癌 Skov3 细胞的 Wnt/β-catenin 通路也有抑制作用。β-catenin 是 Wnt/β-catenin 信号通路的重要组成部分,而 C-myc、Cyclin D1 是该信号下游的主要蛋白,GSK-3β 对该信号通路有负性调节作用^[15-17]。本研究发现 Sch B 处理 48h 后的 β-

catenin、C-myc 和 Cyclin D1 蛋白水平均降低,而 GSK-3 β 活性升高,提示 Sch B 对 Wnt/ β -catenin 通路有抑制作用。越来越多的抗肿瘤药物与策略提倡从不同水平阻断 Wnt/ β -catenin 信号转导通路而发挥抗肿瘤作用。故充分了解其调控机制,对于以 Wnt/ β -catenin 信号转导通路为靶点的抗肿瘤药物的设计具有重要意义。

综上所述,Sch B 可抑制 Skov3 细胞增殖、促进凋亡和细胞周期阻滞,并抑制 Wnt/ β -catenin 通路激活。

参考文献

- [1] 张纪妍,隋丽华,陈杰,等.Pokemon 在卵巢癌中的表达及临床意义[J].临床肿瘤学杂志,2014,19(2):149-151.
- [2] 王秀,李东红.卵巢癌保留生育功能手术效果及预后评价[J].中国计划生育和妇产科,2009,1(2):12-17.
- [3] Xu Y, Liu Z, Sun J, et al. Schisandrin B prevents doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity and enhances its anticancer activity in vivo [J/OL]. PLoS One, 2011, 6(12) [2013-07-09]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3229562>.
- [4] Liu Z, Zhang B, Liu K, et al. Schisandrin B attenuates cancer invasion and metastasis via inhibiting epithelial-mesenchymal transition [J/OL]. PLoS One, 2012, 7(7) [2014-01-08]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3405072>.
- [5] Fong WF, Wan CK, Zhu GY, et al. Schisandrol A from Schisandra chinensis reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by affecting Pgp-substrate complexes[J]. Planta Med, 2007, 73(3):212-220.
- [6] Giridharan VV, Thandavarayan RA, Bhilwade HN, et al. Schisandrin B, attenuates cisplatin-induced oxidative stress, genotoxicity and neurotoxicity through modulatingNF- κ B pathway in mice[J].Free Radic Res, 2012, 46(1):50-60.
- [7] Bodnar L, Stanczak A, Cierniak S, et al. Wnt/ β -catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2014, 7(1):16-19.
- [8] Galuppo R, Maynard E, Shah M, et al. Synergistic inhibition of HCC and liver cancer stem cell proliferation by targeting RAS/RAF/MAPK and WNT/ β -Catenin pathways [J]. Anticancer Res, 2014, 34(4):1709-1713.
- [9] Pan X, Gong N, Zhao J, et al. Powerful beneficial effects of benfotiamine on cognitive impairment and beta-amyloid deposition in amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mice [J]. Brain, 2010, 133(5):1342-1351.
- [10] 袁太宁.中药抗肿瘤作用机理研究进展[J].江苏中医药,2009,41(3):79-80.
- [11] 许天敏,崔满华,曹宏,等.晚期卵巢癌多学科联合手术治疗体会[J].中华医学杂志,2012,92(3):214-216.
- [12] 樊锐太,胡勇,刘俊启,等.硼替佐米对 U87 胶质瘤放射增敏及细胞周期分布的影响[J].第三军医大学学报,2012,34(8):758-760.
- [13] Tai WP, Hu PJ, Wu J, et al. The inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway in human colon cancer cells by sulindac [J]. Tumori, 2014, 100(1):97-101.
- [14] Kang K, Lee KM, Yoo JH, et al. Dibenzocyclooctadiene lignans, gomisins J and N inhibit the Wnt/ β -catenin signaling pathway in HCT116 cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 428(2):285-291.
- [15] 肖忠盛,王松,梁庆模,等.奥曲肽对结肠癌 SW480 细胞 Wnt 通路 β -catenin/TCF 及下游靶基因表达的影响[J].中国肿瘤外科杂志,2013,5(6):366-370.
- [16] Wang S, Bao Z, Liang QM, et al. Octreotide stimulates somatostatin receptor-induced apoptosis of SW480 colon cancer cells by activation of glycogen synthase kinase-3 β , A Wnt/ β -catenin pathway modulator [J]. Hepatogastroenterology, 2013,60(127):1639-1646.

收稿日期:2014-04-14; 修回日期:2014-05-19