

白杨素联合氯喹抑制卵巢癌细胞增殖促进凋亡的研究

史于传¹, 何宇¹, 杨阳², 范懿隽¹, 杨芳¹, 詹磊¹, 卫兵¹

摘要 目的 探究白杨素联合氯喹对卵巢癌细胞增殖和凋亡的作用及机制。方法 选取手术切除后卵巢癌标本和正常卵巢标本,使用免疫组化法检测卵巢癌和正常卵巢组织自噬相关蛋白 LC3 的表达水平。使用 CCK-8 法检测卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖。使用 Western blot 和免疫荧光法检测 SKOV3 细胞中 LC3 的表达。使用电镜检测 SKOV3 细胞中自噬小体的数目。使用流式细胞术检测 SKOV3 细胞凋亡情况。结果 LC3 在卵巢癌中的表达量高于其在正常卵巢组织中的表达。分别用 0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的白杨素处理 SKOV3 细胞 24 h,随着浓度增加,细胞增殖能力降低。40 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素处理 SKOV3 细胞 24 h 后,与对照组相比,白杨素上调了 LC3 的表达 ($P < 0.05$)。与对照组比较,白杨素处理 24 h 的 SKOV3 细胞后,透射电镜下可以观察到其中出现较多的自噬小体 ($P < 0.05$),在对照组则未观察到自噬小体的存在。当白杨素与 CQ 联合使用 24 h 后,联合处理组的 LC3 蛋白表达量高于白杨素和氯喹单独处理组 ($P < 0.05$)。白杨素可以诱导 SKOV3 细胞的凋亡,且白杨素 + 氯喹组凋亡比例最高 ($P < 0.05$)。结论 白杨素能够诱导自噬进而抑制卵巢癌细胞增殖和促进凋亡。

关键词 白杨素; SKOV3 细胞; 自噬; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 711.75

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)04-0510-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.002

卵巢癌是威胁女性生命的恶性肿瘤之一^[1]。其发病率位于妇科肿瘤第三^[2]。临床上,其标准的治疗方法为手术治疗联合化疗^[3]。但是卵巢癌对化疗固有的耐药性导致其预后不良^[4-5]。因此,有必要探索新的治疗方法。在自然界中,存在一类具有生物活性的类黄酮物质,白杨素(5,7-二羟基黄酮)就是其中一种^[6]。研究^[7]表明,白杨素具有抗肿瘤活性,能够通过诱导细胞凋亡和细胞周期停滞抑制肿瘤生长。自噬是细胞一种代谢过程,通过分

解、回收再利用,维持细胞内的稳态。先前的一些研究^[8]中报道了白杨素可以促进自噬,从而对肿瘤细胞进行调控。该研究旨在探索白杨素是否通过调控自噬在卵巢癌细胞中发挥作用,以期获得新的有效治疗方法。

1 材料与方法

1.1 细胞系 SKOV3 卵巢癌细胞系购自 Sigma 公司,保存于安徽医科大学第二附属医院中心实验室的液氮罐中。用 McCoy's 5A (上海元培生物科技有限公司)培养基进行复苏和培养,培养基包含了 10% 胎牛血清和 1% 青霉素、链霉素。培养于含有 5% CO_2 的 37 $^{\circ}\text{C}$ 的温箱环境,每天早晚各观察 1 次细胞状态,2~3 d 进行 1 次细胞换液,待细胞生长至 80% 左右,进行后续的实验。使用 DMSO 对白杨素(纯度 $\geq 99.8\%$,货号: HY-14589,美国 MCE 公司)进行稀释,用终浓度为 0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 的白杨素处理 SKOV3 细胞 24 h。氯喹(chloroquine, CQ)购自美国 MCE 公司,使用 DMSO 进行配置,终浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$ 。联合处理时,先用 CQ 对细胞进行 1 h 的预处理,再用白杨素处理 24 h。

1.2 标本收集 选取于安徽医科大学第二附属医院妇产科行卵巢癌手术切除的卵巢组织标本,所有卵巢癌患者术前均未进行化疗等其他治疗且病史详细,病理类型为浆液性卵巢癌。手术病理分期为 I 期。同时选取行双侧附件切除患者(绝经后子宫肌瘤行双侧附件切除)的卵巢组织,经病理诊断为正常卵巢组织。卵巢癌组年龄为 51~61 (56.16 ± 5.37) 岁,正常卵巢组织年龄为 50~59 (54.52 ± 4.62) 岁,差异无统计学意义。两组各 20 例患者,均为绝经后女性,且均无高血压、糖尿病等慢性疾病。两组均选取卵巢皮质进行实验。标本均获得患者知情同意,符合伦理标准(伦理编号: LLSC20180085)。

1.3 免疫组化 将组织石蜡切片脱蜡,置于柠檬酸钠缓冲液(含 0.05% 吐温 20, pH 6.0)中,在高压锅中煮沸 15 min。使用配置的 3% 过氧化氢-甲醇混合物,对内源性过氧化作用进行阻断。正常山羊血清完全覆盖切片,在室温下进行 1 h 的封闭。在初

2022-02-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81802586)

作者单位: 安徽医科大学第二附属医院¹ 妇产科、² 药剂科,合肥 230601

作者简介: 史于传,男,硕士研究生;

卫兵,男,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: weibing1965@163.com

级抗体(LC3 1:100)中孵育8 h,孵育环境为4℃湿盒。在次级抗体中孵育30 min,此步骤在室温下进行。DAB显色,苏木精对细胞核复染。梯度乙醇进行脱水,二甲苯透明。最后中性树胶固定。

1.4 Western blot 检测蛋白表达 向SKOV3细胞中加入蛋白酶抑制剂和RIPA裂解液对细胞进行裂解。通过离心收集的裂解物,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳结束后,使用聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(上海Biosharp公司)进行转膜处理。PVDF膜用5%脱脂牛奶封闭1 h。用TBST洗涤3次,将膜与特异性一级抗体在4℃孵育过夜。次日将膜与次级抗体在37℃孵育2 h。使用ECL化学发光试剂盒观察蛋白质条带。主要抗体GAPDH(AB8245)、LC3B(EPR18709)购自美国Abcam公司。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖 在96孔板上,对处理完成后的SKOV3细胞进行接种。向每个孔中加入10 μl的CCK-8溶液,将细胞在37℃孵育2 h,然后测量混合物在450 nm处的吸光度,以测试细胞增殖情况。

1.6 透射电子显微镜观察细胞形态及自噬小体数目 SKOV3细胞用不同浓度的白杨素处理并在37℃孵育24 h后,收集细胞并用PBS洗涤2次,离心、收集。用2.5%戊二醛固定至少2 h。将细胞团在2%四氧化锇中固定2 h,在不同浓度的乙醇中脱水(每15 min一次20%、40%、60%、70%、80%、90%和100%)。然后将小球包埋在樟木中,用超微粉碎机以70 nm的厚度切片。超薄切片用2%醋酸铀酰和0.2%柠檬酸铅染色。电子显微镜下观察细胞形态及自噬小体数目。

1.7 免疫荧光检测 将SKOV3细胞接种到载玻片上12 h。使用白杨素处理24 h后,用PBS洗涤细胞3次,并在4%多聚甲醛中固定15 min。载玻片中的非特异性结合位点用5%牛血清白蛋白(BSA)阻断30 min。使用LC3(1:200)孵育过夜。用荧光标记的二抗孵育细胞。4',6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)在黑暗中对细胞核进行染色。用蔡司荧光显微镜对样品进行成像处理。

1.8 细胞凋亡检测 根据标准技术对各组的凋亡细胞百分比进行量化。将处理过的细胞用不含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶消化后收集,100 μl的结合缓冲液进行再悬浮处理,加入5 μl Annexin V-FITC和10 μl PI,黑暗环境中孵育15 min。采用Beckman Coulter公司(美国)的Navios流式细胞仪进行流式

细胞检测,凋亡细胞图像使用FlowJo分析。点图上的右下象限和右上象限分别代表早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞。

1.9 统计学处理 使用Prism 8.0软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数比较采用 t 检验。3组或3组以上使用单因素方差分析,多组间两两比较使用Tukey检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 卵巢组织与卵巢癌组织中LC3的表达 免疫组化结果显示,与正常卵巢组织相比,LC3在卵巢癌中具有较高的表达量,见图1。正常卵巢组织LC3表达(1.00 ± 0.08)低于卵巢癌组(2.13 ± 0.11) ($P < 0.01$)。

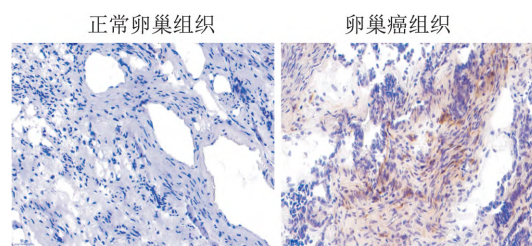


图1 免疫组化检测组织LC3表达 ×200

2.2 白杨素抑制SKOV3细胞的增殖 分别用0、20、40、60、80、100 μmol/L白杨素对SKOV3细胞进行处理,时间为24 h。检测细胞增殖情况,CCK-8结果提示随着浓度增加,细胞增殖降低,见图2。40 μmol/L白杨素抑制SKOV3细胞的增殖,因此,本研究后续实验选取40 μmol/L白杨素进行实验。

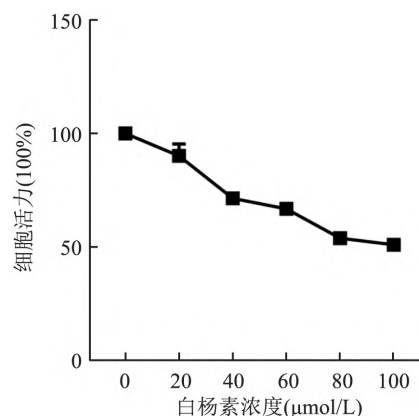


图2 白杨素对细胞增殖影响

2.3 白杨素诱导 SKOV3 细胞自噬的形成 白杨素处理细胞系 (SKOV3) 24 h 后, Western blot 结果提示, 与对照组相比, 白杨素上调了 LC3 蛋白的表达 ($t = 25.86$, $P < 0.05$), 见图 3。免疫荧光提示白杨素诱导 LC3 表达上升, 见图 4。通过透射电镜可以观察到, 与对照组比较, 白杨素处理 24 h 的 SKOV3 细胞出现较多的自噬小体, 在对照组则未观察到自噬小体的存在, 见图 5。另外, 当白杨素与 CQ 联合使用 24 h 后, 联合处理组的 LC3 蛋白表达量高于白杨素和 CQ 单独处理组 ($t = 7.54, 41.79$, $P < 0.05, 0.01$), 见图 6。

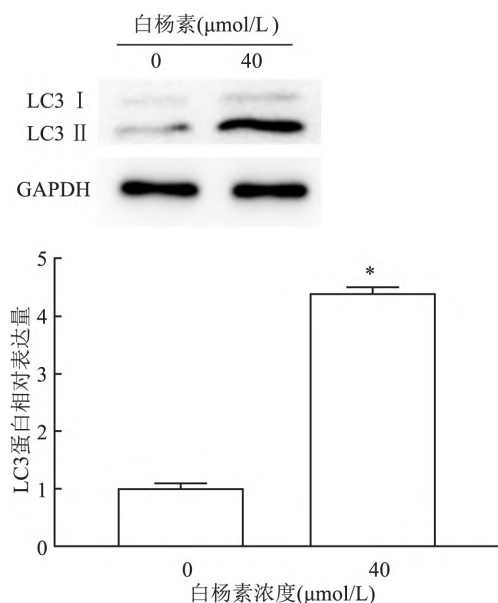


图3 白杨素处理后 LC3 蛋白的表达
与对照组比较: * $P < 0.05$

2.4 白杨素抑制 SKOV3 细胞的增殖和促进细胞凋亡 白杨素与 CQ 联合使用 24 h 后, 联合处理组的细胞增殖低于白杨素和 CQ 单独处理组 ($F = 47.48$, $P < 0.05$), 见图 7。对流式细胞仪的结果进行分析, 白杨素处理 SKOV3 细胞后, 凋亡的细胞增加, CQ 组细胞凋亡比例也高于对照组。白杨素 + CQ 组细胞凋亡比例最高 ($F = 128$, $P < 0.01$), 见图 8。

3 讨论

卵巢癌是一个“沉默的妇女杀手”, 由于其发现时间晚, 同时缺乏有效的治疗方法, 死亡率一直居高不下^[2]。因此, 迫切需要寻求新的治疗方案。白杨素是一种具有生物活性的类黄酮物质, 对多种肿瘤存在抑制作用, 在本实验中, 白杨素能够降低卵巢癌细胞的增殖能力, 促进卵巢癌细胞的凋亡, 这说明白杨素具有卵巢癌细胞杀伤作用。然而具体的机制尚不明确。

自噬作为一种细胞调控机制, 通过降解和回收受损细胞器、畸形蛋白或局部细胞质来维持细胞内稳态, 这是一个高度动态的多步骤生物学过程。先前的研究^[9-10]表明, 自噬水平的变化能够影响卵巢癌细胞的增殖、迁移等特征。

本实验显示经由白杨素处理后, SKOV3 细胞的自噬水平有所升高。主要表现在 LC3 蛋白水平的升高和电镜下可以观察到的自噬小体数目的增加。LC3 作为自噬小体上一个重要的标志蛋白, 其表达

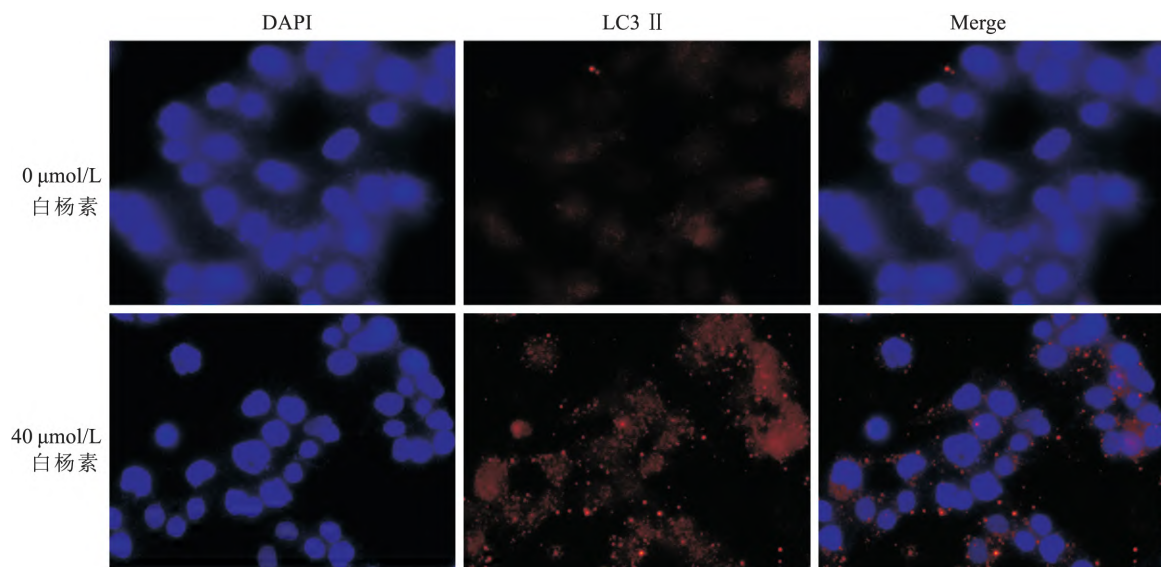


图4 免疫荧光检测 LC3 的表达 ×400

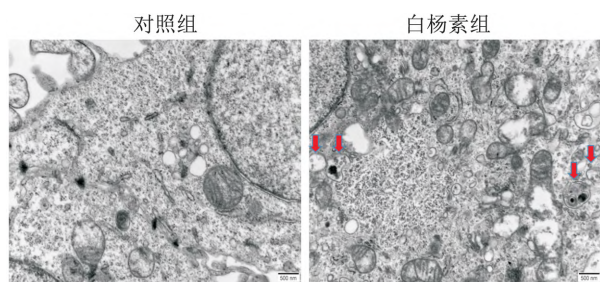


图5 SKOV3 细胞超微结构

箭头: 自噬小体

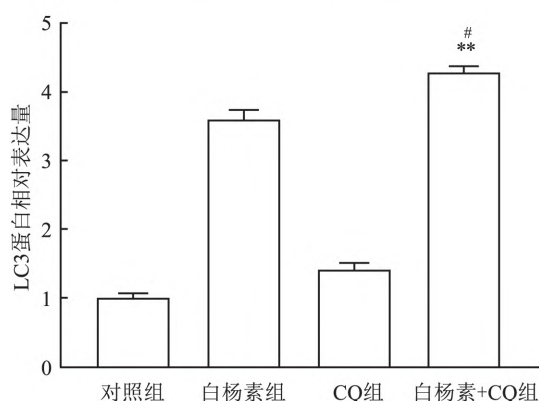
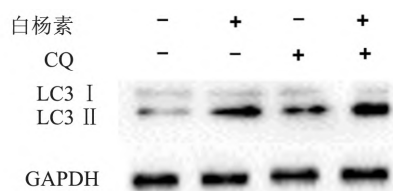


图6 LC3 蛋白的表达

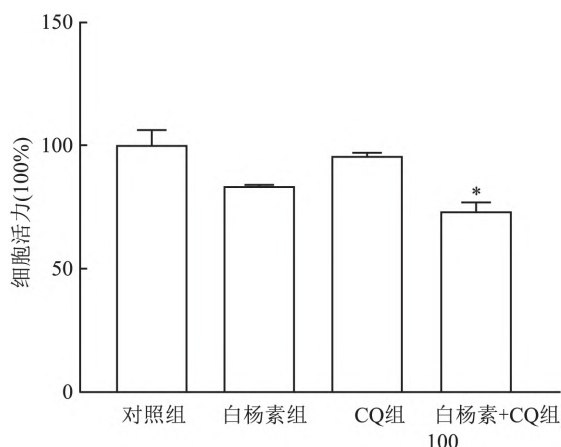
与白杨素组比较: # $P < 0.05$; 与 CQ 组比较: ** $P < 0.01$ 

图7 SKOV3 细胞增殖

与白杨素组比较: * $P < 0.05$

量的增加从侧面也可反映自噬小体数目的增加。同时,细胞中自噬小体数目的增加又可以归结于两种原因:一种是自噬流的增加,表现为自噬小体合成的

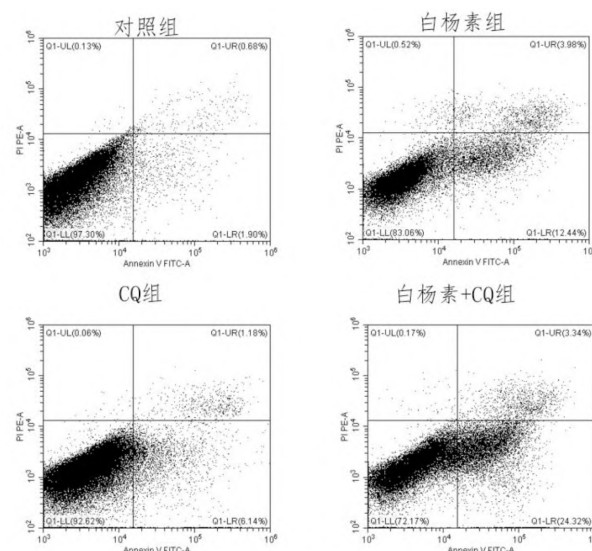


图8 白杨素对 SKOV3 细胞凋亡影响

增加;另一种是自噬小体分解被抑制,细胞内的自噬小体通过累积而增多。作为自噬的抑制剂,CQ的主要作用是抑制自噬小体和溶酶体的融合,从而抑制自噬小体的降解。本实验表明白杨素联合CQ使用后,LC3的表达水平较单独白杨素处理组升高。这表明白杨素可使自噬流增加,而不是抑制自噬小体的分解。

自噬是一把双刃剑,自噬的增加一方面可以促进肿瘤细胞的凋亡。另一方面,具有保护作用的自噬也能协助肿瘤细胞对不良外界环境产生一定的抵抗^[11]。为了明确白杨素诱导自噬所发挥的作用,课题组使用CQ来抑制自噬,结果显示当自噬被抑制后,卵巢癌细胞的凋亡增多,这说明白杨素诱导的自噬是具有保护作用的。当这种具有保护作用的自噬被抑制后,细胞的凋亡能够进一步的上升,其可能的原因为白杨素杀伤肿瘤细胞时,癌细胞通过增加自噬来为自身生长提供所需的营养,一定程度上抵消药物的杀伤作用,当CQ抑制了这种自噬,细胞失去了这种保护作用,导致白杨素的药效增强。

参考文献

- [1] Torre L A, Trabert B, Desantis C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 284-96.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Wang L, Wang Q, Xu Y, et al. Advances in the treatment of ovarian cancer using PARP inhibitors and the underlying mechanism

- of resistance[J]. *Curr Drug Targets*, 2020, 21(2): 167 – 78.
- [4] 江 玉, 孙 磊, 张 英, 等. 肿瘤相关成纤维细胞与上皮性卵巢癌顺铂耐药性的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 255 – 60.
- [5] 孙 磊, 张 英, 朱 颖, 等. CCL23 及其受体 CCR1 与上皮性卵巢癌细胞顺铂耐药的研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 272 – 6.
- [6] Lin Y M, Chen C I, Hsiang Y P, et al. Chrysin attenuates cell viability of human colorectal cancer cells through autophagy induction unlike 5-fluorouracil/oxaliplatin[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1763.
- [7] Feng X, Qin H, Shi Q, et al. Chrysin attenuates inflammation by regulating M1/M2 status *via* activating PPAR γ [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 89(4): 503 – 14.
- [8] Liu J, Ren Y, Hou Y, et al. Dihydroartemisinin induces endothelial cell autophagy through suppression of the Akt/mTOR pathway [J]. *J Cancer*, 2019, 10(24): 6057 – 64.
- [9] 冉 艳, 卢明珊, 曾德亮, 等. 七氟烷通过诱导 SIRT1 依赖型自噬减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(1): 103 – 9.
- [10] Zou S H, Du X, Sun F D, et al. Cisplatin suppresses tumor proliferation by inhibiting autophagy in ovarian cancer *via* long non-coding RNA RP11 – 135L22.1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(4): 928 – 35.
- [11] Shi Y, He R, Yang Y, et al. Potential relationship between Sirt3 and autophagy in ovarian cancer [J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5): 162.

Chrysin inhibits proliferation and promotes apoptosis of ovarian cancer cells by inducing autophagy

Shi Yuchuan¹, He Yu¹, Yang Yang², Fan Yijun¹, Yang Fang¹, Zhan Lei¹, Wei Bing¹
(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, ²Dept of Pharmacy, The Second Affiliated
Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of chrysin and chloroquine (CQ) on the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells. **Methods** Ovarian cancer specimens and normal ovarian specimens were selected after surgical resection and immunohistochemical experimental methods was used to detect the expression level of autophagy-related protein LC3 in ovarian cancer and normal ovarian tissues. The CCK-8 method was used to detect the proliferation of ovarian cancer cell SKOV3. Western blot and immunofluorescence were used to detect the expression of LC3 in SKOV3 cells. An electron microscope was used to detect the number of autophagosomes in SKOV3 cells. Flow cytometry was used to detect SKOV3 cell apoptosis. **Results** The expression level of LC3 in ovarian cancer was higher than that in normal ovarian tissues. SKOV3 cells were treated with chrysin at concentrations of 0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours. As the concentration increased, cell proliferation decreased significantly. Compared with the control group, 40 $\mu\text{mol/L}$, chrysin significantly up-regulated the expression of LC3 after 24 hours ($P < 0.05$). Compared with the control group, after 24 hours of SKOV3 cells treated with chrysin-themum, more autophagosomes were observed under transmission electron microscope ($P < 0.05$), but no autophagosome was observed in the control group. When chrysin and chloroquine were used in combination for 24 hours, the expression of LC3 protein in the combined treatment group was higher than that in the chrysin and CQ treatment group ($P < 0.05$). Chrysin could obviously induce apoptosis of SKOV3 cells, and the group of Chrysin + CQ showed the highest proportion of apoptosis ($P < 0.05$). **Conclusion** Chrysin can induce autophagy to inhibit the proliferation of ovarian cancer cells and promote apoptosis.

Key words chrysin; SKOV3 cells; autophagy; proliferation; apoptosis