

网络出版时间: 2021-7-28 11:29 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1031.048.html>

脂质体莪术醇联合顺铂抗人卵巢癌细胞作用和机制研究

张铭勋^{1,2}, 张晨晨³, 蔡泽宇², 宋永红⁴, 吴强², 王晶¹

摘要 目的 研究脂质体莪术醇(LC)联合顺铂抗人卵巢癌细胞的作用和机制。方法 实验以卵巢癌细胞株 SKOV₃ 和 HO8910 为研究对象,以 10 μg/ml LC 为基准,联合不同浓度的顺铂(0、2、4、8、16、32、64 μg/ml)进行分组,MTT、Transwell 和流式法分别检测各组细胞增殖、侵袭、迁移能力和凋亡率的变化,Western blot 检测各组 AKT、p-AKT 和 cleaved-Caspase8、9、3 蛋白表达的变化。结果 MTT 结果显示,与单用顺铂或者 LC 组比较,联合用药组的肿瘤细胞增殖率降低($P < 0.05$),联合用药中顺铂对 SKOV₃ 的 IC₅₀ 为(12.67 ± 2.03) μg/ml [单用顺铂的 IC₅₀: (38.28 ± 5.98) μg/ml];联合用药中顺铂对 HO8910 的 IC₅₀ 为(10.55 ± 1.55) μg/ml [单用顺铂的 IC₅₀: (26.41 ± 2.30) μg/ml]。联合组(8 μg/ml 的顺铂 + 10 μg/ml 的 LC)的卵巢癌细胞侵袭和迁移率均降低($P < 0.05$),凋亡率最高($P < 0.05$)。Western blot 结果提示联合用药组卵巢癌细胞的 p-AKT 蛋白的表达水平降低($P < 0.05$),cleaved-Caspase8、9、3 蛋白水平上升($P < 0.05$)。结论 低剂量 LC 可以增强顺铂抑制人卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭能力,促进肿瘤细胞凋亡,联合用药可能通过 PI3K/AKT 通路促进卵巢癌细胞凋亡。

关键词 卵巢癌; 莪术醇; 顺铂; 凋亡

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)09-1430-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.09.016

卵巢癌的病死率在女性生殖系统恶性肿瘤中排列第二。卵巢癌常用化疗方案是铂类联合紫杉醇,但是部分患者会出现紫杉醇过敏等化疗副反应,需要更换药物,因此,寻找其他中药有效成分具有重要临床意义^[1-2]。莪术醇是衡量中药莪术油药效的重要指标之一。莪术醇在卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、消

化道等上皮性恶性肿瘤中表现出一定的抗肿瘤作用^[3-5]。但是目前关于莪术醇抗卵巢癌的作用机制研究尚少,并且未见其与铂类药物联合治疗卵巢癌的报道。莪术醇不溶于水的理化性质限制了该药物在临床上的使用,基于前期研究结论,纳米制剂脂质体莪术醇(liposome curcuminol, LC)具有良好的抗卵巢浆液性癌的作用^[6],该研究使用 LC 联合顺铂,研究联合用药抗卵巢癌的作用和机制,为该疾病的临床治疗提供新的思路和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人卵巢癌细胞株 SKOV₃ 购自于赛百慷公司,HO8910 由中国科学技术大学附属第一医院赠送。LC 由合肥工业大学合成^[7];顺铂(江苏诺欣);p-AKT (CST, #4060)、AKT (CST, #4691)、cleaved-Caspase3 (CST, #9664)、cleaved-Caspase8 (WL0153)、cleaved-Caspase9 (WL03421)。

1.2 方法

1.2.1 人卵巢癌细胞株的培养 HO8910 使用 DMEM 培养基,SKOV₃ 使用 McCoy's 5A Medium 培养基,培养基均含有 1% 双抗和 10% 胎牛血清,培养在 37 °C,5% CO₂ 的培养箱中,当培养瓶中细胞密度达 80% 时,用胰酶进行消化传代。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖能力 将处于对数生长期细胞,按照每孔 1×10^5 个/孔的密度接种至 96 孔板中培养,按照实验设计分组:空白脂质体组 [0 (对照组)、12.5、25.0、50.0、100.0 μg/ml],顺铂组 [0 (对照组)、2、4、8、16、32、64 μg/ml],LC 组 [0 (对照组)、5、10、20、40、80 μg/ml],不同浓度顺铂 + 10 μg/ml LC 的联合组 [顺铂浓度:0 (对照组)、2、4、8、16、32、64 μg/ml],各组细胞和药物共培养 24 h 后进行检测,每孔加入 10 μl 的 MTT 溶液,培养箱内孵育 4 h,吸尽各孔溶液,加入 150 μl 的 DMSO,室温孵育 15 min,最后使用酶标仪在 570 nm 处测定各孔吸光度(optical density, OD)值。细胞存活率 = $(OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。根据各组中各孔 OD 平均值,计算各组细胞增殖抑制率。

1.2.3 实验分组 对照组(含有 12.5 μg/ml 裸脂

2021-03-22 接收

基金项目: 安徽省重点研究与开发计划项目(编号: 202004j07020033)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

² 安徽医科大学基础医学院病理教研室,合肥 230032

³ 安徽医科大学第二附属医院病理科,合肥 230601

⁴ 合肥工业大学,合肥 230009

作者简介: 张铭勋,男,硕士研究生;

王晶,女,博士,副主任医师,责任作者, E-mail: sa-brinawangjing@163.com

质体的培养基), LC 组(10 $\mu\text{g/ml}$), 顺铂组(8 $\mu\text{g/ml}$), 联合组(8 $\mu\text{g/ml}$ 的顺铂 + 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 LC), 各组与药物共培养 24 h 后回收细胞。

1.2.4 Transwell 检测细胞迁移和侵袭能力 在预冷条件下给小室铺胶, 然后按照 3×10^5 个细胞/ml 的密度将各组 100 μl 细胞悬液加入小室中, 小室下层加入 500 μl 含有 12% FBS 的培养基, 孵育一定时间后, 结晶紫染色显微镜下观察计数。检测细胞迁移能力时, 小室中不需要基质胶包被基底膜, 其他步骤与侵袭实验相同。

1.2.5 流式检测细胞凋亡 收集各组细胞制成每管有 1×10^5 个细胞的样品备检测, 通过 Annexin-V FITC 和 PI 双染后, 在流式细胞仪上检测各组细胞凋亡率, 并使用 CytExpert 软件进行分析。

1.2.6 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达 收集各组细胞提取蛋白, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 200 mA、100 min 转到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入 GAPDH (1 : 2 000), AKT (1 : 1 000), p-AKT (1 : 2 000), cleaved-Caspase8 (1 : 500), cleaved-Caspase9 (1 : 500), cleaved-

Caspase3 (1 : 1 000) 的一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, 加入二抗, 室温孵育 1 h, ECL 发光显影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 并加用 LSD 检验进行统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 顺铂联合 LC 对卵巢癌细胞增殖能力的影响

如图 1A ~ C 所示, 对于 SKOV₃ 和 HO8910, 联合用药能显著抑制两种卵巢癌细胞的增殖, 差异有统计学意义 ($F_{\text{SKOV}_3} = 84.98, P < 0.05$; $F_{\text{HO8910}} = 177.30, P < 0.05$), 并且药物对细胞增殖的抑制呈浓度梯度依赖性。计算各组 IC_{50} , 对于 SKOV₃ 细胞, 联合用药时顺铂的 IC_{50} 为 $(12.67 \pm 2.03) \mu\text{g/ml}$, 单用顺铂时的 IC_{50} 为 $(38.28 \pm 5.98) \mu\text{g/ml}$; 对于 HO8910 细胞, 联合用药时顺铂的 IC_{50} 为 $(10.55 \pm 1.55) \mu\text{g/ml}$, 单用顺铂时的 IC_{50} 为 $(26.41 \pm 2.30) \mu\text{g/ml}$ 。图 1D 提示不同浓度的裸脂质体对两种细胞增殖抑制不明显。

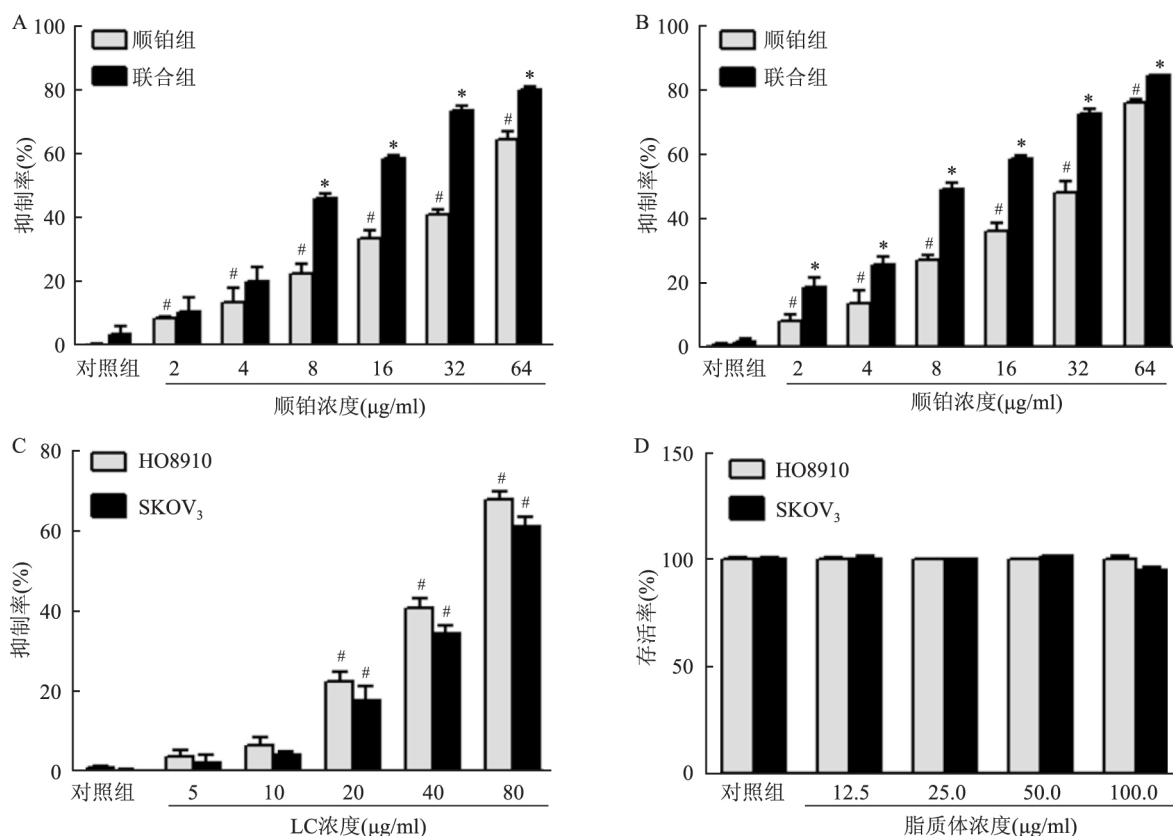


图1 LC联合顺铂对卵巢癌细胞增殖能力的影响

A: LC (10 $\mu\text{g/ml}$) 联合不同浓度顺铂 (0、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{g/ml}$) 对 SKOV₃ 细胞增殖能力的影响; B: LC (10 $\mu\text{g/ml}$) 联合不同浓度顺铂 (0、2、4、8、16、32、64 $\mu\text{g/ml}$) 对 HO8910 细胞增殖能力的影响; C: 不同浓度 LC (5、10、20、40、80 $\mu\text{g/ml}$) 对两种细胞增殖能力的影响; D: 不同浓度裸脂质体 (0、12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/ml}$) 对 SKOV₃ 和 HO8910 细胞增殖的影响; 与顺铂组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$

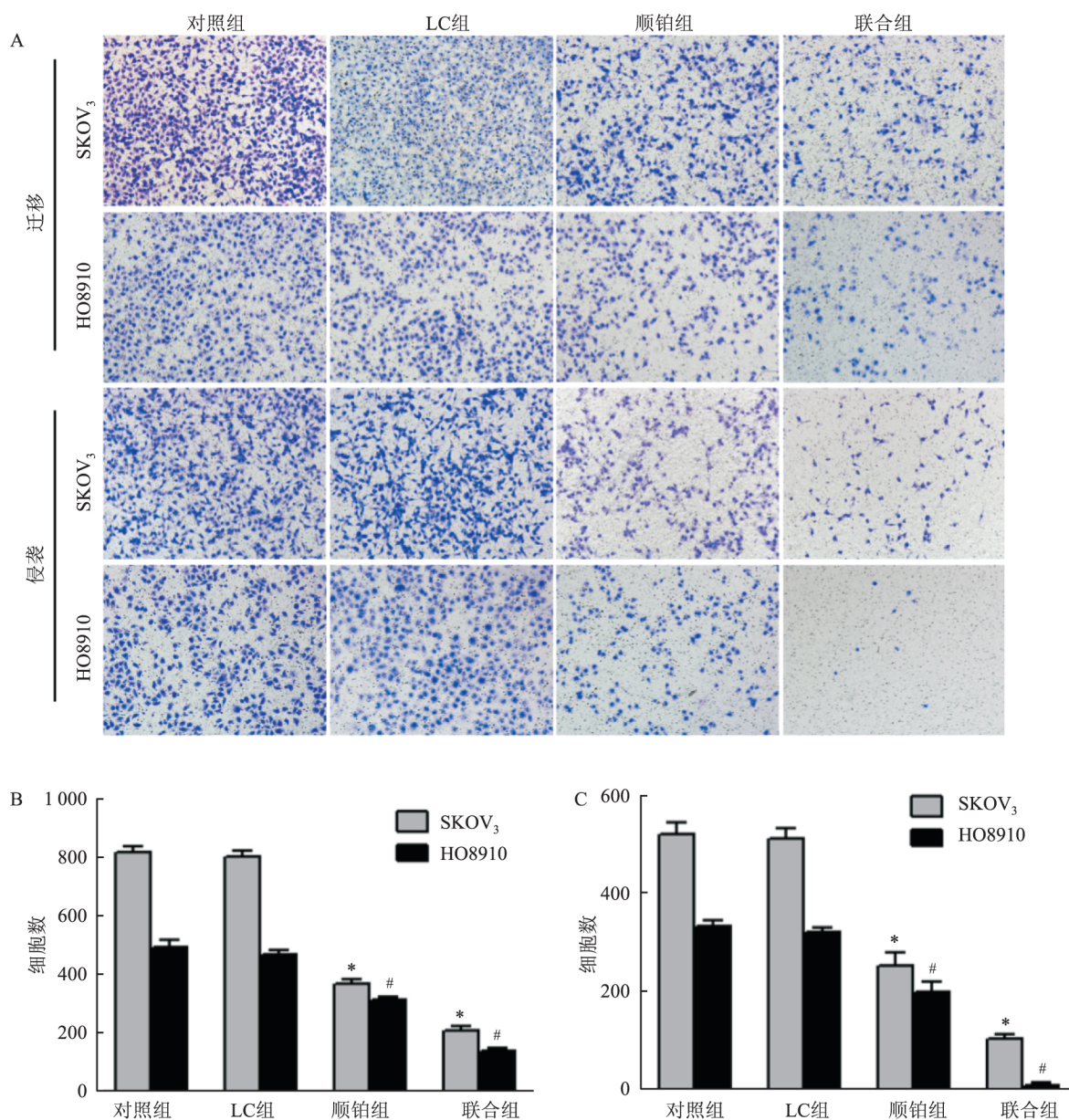


图2 联合用药(8 µg/ml的顺铂+10 µg/ml的LC)对SKOV₃和HO8910细胞迁移和侵袭能力的影响

A: Transwell 检测细胞迁移和侵袭数量图 结晶紫染色 × 100; B: 迁移实验结果统计图; C: 侵袭实验结果统计图; 与对照组比较:

* $P < 0.05$; 与顺铂组比较: # $P < 0.05$

2.2 联合用药对卵巢癌细胞迁移和侵袭能力的影响 联合用药可以降低 SKOV₃ 和 HO8910 细胞的迁移能力, 差异有统计学意义 ($F_{\text{SKOV}_3} = 274.40, P < 0.05$; $F_{\text{HO8910}} = 125.35, P < 0.05$); 联合用药可以降低 SKOV₃ 和 HO8910 细胞的侵袭能力, 差异有统计学意义 ($F_{\text{SKOV}_3} = 87.52, P < 0.05$; $F_{\text{HO8910}} = 148.15, P < 0.05$), 见图2。

2.3 联合用药对卵巢癌细胞凋亡的影响 联合用药组 SKOV₃ 和 HO8910 细胞的凋亡率高于单用顺铂组, 分别为 SKOV₃: (50.87 ± 4.59) % vs (21.05 ± 1.21) %, HO8910: (59.05 ± 1.15) % vs ($30.77 \pm$

3.50) %, 差异有统计学意义 ($F_{\text{SKOV}_3} = 226.77, P < 0.05$; $F_{\text{HO8910}} = 337.68, P < 0.05$)。见图3。

2.4 Western blot 检测各组细胞内凋亡相关蛋白的表达 SKOV₃ 和 HO8910 细胞内 p-AKT 的蛋白水平在顺铂组和联合组出现下降, 并且联合组的表达量低于单用顺铂组, 差异有统计学意义 ($F_{\text{SKOV}_3} = 1695.62, P < 0.05$; $F_{\text{HO8910}} = 245.31, P < 0.05$)。凋亡相关蛋白 cleaved-Caspase8、9、3 的表达量在顺铂组和联合组呈增高趋势, 并且联合组的凋亡相关蛋白表达量与顺铂组比较, 差异有统计学意义 ($F_{\text{cas8-SKOV}_3} = 270.32, P < 0.05$; $F_{\text{cas9-SKOV}_3} = 118.37, P$

<0.05 ; $F_{\text{cas3-SKOV}_3} = 288.34, P < 0.05$; $F_{\text{cas8-HO8910}} = 348.36, P < 0.05$; $F_{\text{cas9-HO8910}} = 105.01, P < 0.05$; $F_{\text{cas3-HO8910}} = 89.57, P < 0.05$ 。见图4。

3 讨论

据报道,2019年美国新发卵巢癌21 750例,死亡13 940例,卵巢癌发病率占女性恶性肿瘤的2.5%,致死率占总数的5%,在中国45~50岁女性中卵巢癌致死率位居恶性肿瘤第5位,因此,卵巢癌是一种致死率较高的女性恶性肿瘤^[1]。卵巢癌一线治疗方案为铂类联合紫杉醇,但是患者如果出现铂类耐药或者对紫杉醇过敏,可供选择的二线药物种类较少,因此,寻找新的卵巢癌治疗药物是研究热点。中医中药在治疗妇科肿瘤方面历史悠久,临床上早已有使用莪术抗妇科肿瘤的临床经验,中医理论认为,莪术味辛、苦、温,归肝、脾经,具有行气破血、消积止

痛的功效,它的提取物莪术油作为抗肿瘤药物在1977年被中国药典收藏,莪术醇是莪术油的重要活性成分。研究发现莪术醇可以抗卵巢癌,它可以通过PI3K/AKT和JAK2/STAT3通路,抑制卵巢癌细胞株SKOV₃的增殖、侵袭能力,促进卵巢癌细胞凋亡^[2]。前期研究已经合成了稳定的LC,并发现脂质体运载莪术醇可以通过内质网PERK-ATF4-CHOP途径促进卵巢癌细胞凋亡,尤其对原代卵巢高级别浆液性腺癌细胞有较好的抗肿瘤作用,同时莪术醇对正常卵巢细胞呈低毒性^[3]。莪术醇不仅具有抗肿瘤作用,还能作为一线化疗药物的增敏剂。有研究报道称莪术醇可以增加肺癌细胞对塞来西布化疗的敏感性^[4],可以通过PI3K/AKT途径抑制结肠癌细胞增殖发挥抗肿瘤作用^[5]。本研究发现,莪术醇可以增强顺铂抑制卵巢癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力,促进卵巢癌细胞凋亡,不同的细胞株对联合

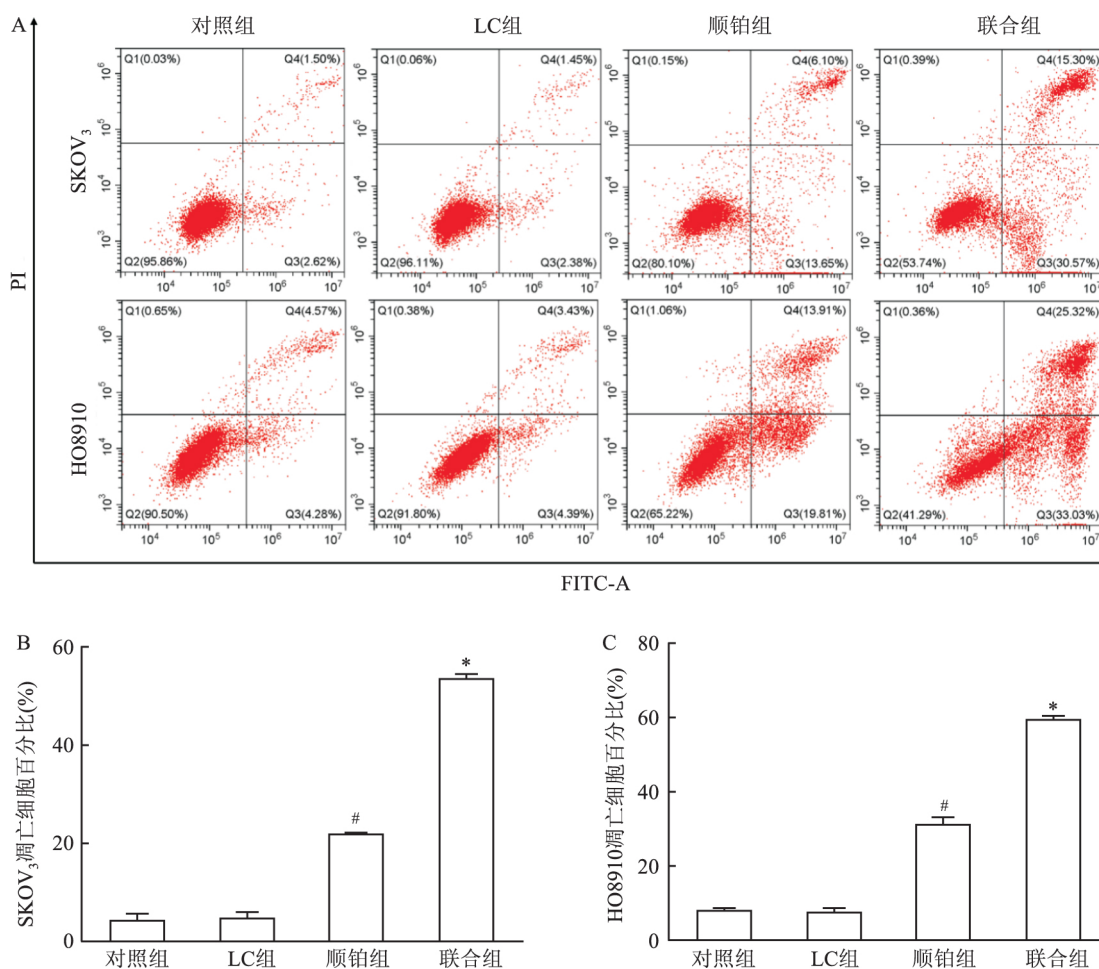


图3 联合用药对卵巢癌细胞 SKOV₃ 和 HO8910 凋亡的影响

A: Annexin-V FITC/PI 双染法实验结果图; B: SKOV₃ 细胞株联合用药实验结果统计图; C: HO8910 细胞株联合用药实验结果统计图; 与顺铂组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$

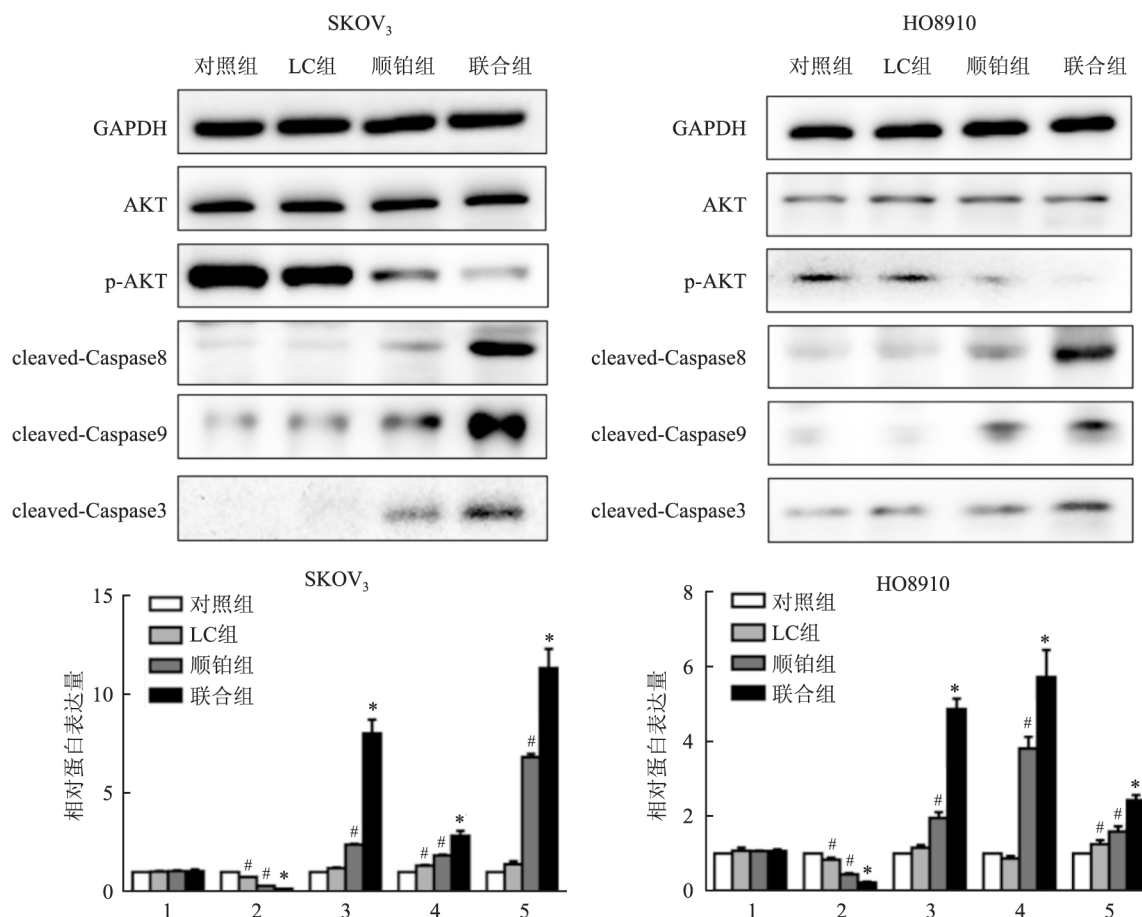


图4 Western blot 检测 SKOV₃ 和 HO8910 细胞的 AKT、p-AKT、cleaved-Caspase8、9、3 蛋白水平

1: AKT; 2: p-AKT; 3: cleaved-Caspase8; 4: cleaved-Caspase9; 5: cleaved-Caspase3; 与顺铂组比较: * $P < 0.05$; 与对照组比较: # $P < 0.05$

用药的反应不一样,HO8910 细胞株对联合用药较为敏感,而 SKOV₃ 细胞株对顺铂的敏感性稍差,但是顺铂和莪术醇联合使用能显著抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭能力。两药联合使用时顺铂和莪术醇药物浓度均较低,因此可以降低药物的不良反应,减少药物的毒副作用。

PI3K/AKT 信号通路在细胞存活、增殖、迁移以及蛋白质合成方面发挥重要作用,AKT 的 Thr308 位点可以被 PDK1 磷酸化而被活化,活化后的 AKT 可以结合下游受体调控细胞周期,加速细胞周期从 G1 期到 S 期的转换,从而促进细胞增殖。另外也可以通过影响核转录因子和基质金属蛋白酶相关途径促进细胞的侵袭,还可以通过磷酸化 Caspase9 或调控 Bcl-2 家族的蛋白活性,调控 Caspase-9 的活性,从而调控凋亡级联反应的激活,有研究发现 p-AKT 的表达与卵巢癌的分化程度,临床分期,化疗药物耐药以及生存期相关^[9],抑制 AKT 的磷酸化是治疗卵巢上皮性恶性肿瘤的重要靶点^[10-11]。本实验结果提示,顺铂和 LC 的联合使用可以抑制 AKT 的磷酸化

水平,对 AKT 蛋白水平没有影响,并且促进凋亡启动蛋白 Caspase8,9 和凋亡执行蛋白 Caspase3 的表达,因此推测顺铂与 LC 的联合用药可能通过抑制 AKT 的磷酸化来促进卵巢癌细胞的凋亡,但是联合用药如何抑制 AKT 磷酸化的分子机制仍待进一步研究。

参考文献

- [1] Lheureux S, Braunstein M, Oza A M. Epithelial ovarian cancer: evolution of management in the era of precision medicine [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(4): 280-304.
- [2] Torre L A, Trabert B, De Santis C E, et al. Ovarian cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(4): 284-96.
- [3] Wei W, Rasul A, Sadiqa A, et al. Curcumin: from plant roots to cancer roots [J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(8): 1600-9.
- [4] 戴凌虹, 孙云, 陈样艳. 莪术醇对人卵巢癌 SKOV₃ 细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响 [J]. 温州医科大学学报, 2019, 49(10): 740-3.
- [5] 汤欣, 韩凤娟, 李威, 等. 莪术醇对人卵巢癌 SKOV₃ 细胞株 JAK2/STAT3 信号通路影响的研究 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2013, 14(1): 43-6.

- [6] Wang J, Song Y H, Zhang M X, et al. A liposomal curcumin nano-composite for magnetic resonance imaging and endoplasmic reticulum stress-mediated chemotherapy of human primary ovarian cancer [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(18): 2938–47.
- [7] Cai F, Chen M, Zha D, et al. Curcumin potentiates celecoxib-induced growth inhibition and apoptosis in human non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(70): 115526–45.
- [8] Liu H, Wang J, Tao Y, et al. Curcumin inhibits colorectal cancer proliferation by targeting miR-21 and modulated PTEN/PI3K/Akt pathways [J]. *Life Sciences*, 2019, 211: 354–61.
- [9] 孙丽丽, 朱慧敏, 庞丽娟, 等. 磷酸化 AKT 在卵巢癌中表达的临床意义及其与新癌基因 REDD1 表达的相关性研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(12): 1766–70.
- [10] Wu Y H, Huang Y F, Chen C C, et al. Comparing PI3K/Akt inhibitors used in ovarian cancer treatment [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 206.
- [11] Caumanns J J, Van Wijngaarden A, Kol A, et al. Low-dose triple drug combination targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway and the MAPK pathway is an effective approach in ovarian clear cell carcinoma [J]. *Cancer Letters*, 2019, 461: 102–11.

Effect and mechanism of liposome curcumin combined with cisplatin on human ovarian cancer cells

Zhang Mingxun^{1,2}, Zhang Chenchen³, Cai Zeyu², et al

(¹Dept of Obstetrics and Gynecology, The First Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Dept of Pathology,

The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To study the effect and mechanism of liposomal curcumin (LC) combined with cisplatin on human ovarian cancer cells. **Methods** The experiment took ovarian cancer cell lines SKOV₃ and HO8910 as the research objects, combined with different concentrations of cisplatin (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64) $\mu\text{g/ml}$ based on 10 $\mu\text{g/ml}$ LC for grouping. MTT, Transwell and flow cytometry assay were used to detect cell proliferation, invasion, migration and apoptosis ability respectively in each group. Western blot assay was used to detect AKT, p-AKT and cleaved Caspase 8, 9, 3 protein expression in each group. **Results** MTT results showed that compared with the cisplatin alone or LC group, the tumor cell proliferation rate of the combined drug group reduced ($P < 0.05$), the IC₅₀ of cisplatin to SKOV₃ in the combination was (12.67 ± 2.03) $\mu\text{g/ml}$ (vs the IC₅₀ of cisplatin alone: (38.28 ± 5.98) $\mu\text{g/ml}$), the IC₅₀ of cisplatin to HO8910 in the combination was (10.55 ± 1.55) $\mu\text{g/ml}$ [vs IC₅₀ of cisplatin alone: (26.41 ± 2.30) $\mu\text{g/ml}$]. In the combination group (8 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin + 10 $\mu\text{g/ml}$ LC), the invasion and migration rates of ovarian cancer cells reduced ($P < 0.05$), and the apoptosis rate was the highest ($P < 0.05$). Western Blot results showed that the expression level of p-AKT protein in ovarian cancer cells in the combined drug group decreased ($P < 0.05$), and the protein levels of cleaved-Caspase8, 9, 3 increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Low-dose LC can enhance the ability of cisplatin to inhibit the proliferation, migration and invasion of human ovarian cancer cells, and promote tumor cell apoptosis. The combination of drugs may promote apoptosis of ovarian cancer cells through the PI3K/AKT pathway.

Key words ovarian cancer; curcumin; cisplatin; apoptosis