

白藜芦醇对人卵巢癌 SKOV-3 细胞增殖的影响

李攀¹, 陆晓媛^{2*}

(1. 徐州医学院研究生学院妇产科学专业, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医学院附属医院妇产科, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 研究白藜芦醇(resveratrol, Res)对人卵巢癌 SKOV-3 细胞增殖的影响,并探讨其作用机制。方法 应用 0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ Res 处理 SKOV-3 细胞 24、48、72 h 后,采用四甲基偶氮唑蓝法(MTT)检测细胞生长抑制率;Western blot 检测血管内皮生长因子(VEGF)蛋白的表达。结果 Res 对 SKOV-3 细胞的生长抑制作用存在浓度和时间依赖性($P < 0.05$),Res 作用 SKOV-3 细胞后,VEGF 蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。结论 Res 能明显抑制 SKOV-3 细胞的增殖,其机制可能与下调 VEGF 表达有关。

关键词:白藜芦醇;卵巢癌;血管内皮生长因子;细胞增殖

中图分类号:R737.31 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2065(2012)02-0124-03

Effect of resveratrol on proliferation of ovarian carcinoma cell line SKOV-3

LI Pan¹, LU Xiaoyuan^{2*}

(1. Specialty of Obstetrics and Gynecology, Graduate School of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002)

Abstract: Objective To investigate the effect of resveratrol (Res) on proliferation of ovarian carcinoma cell line SKOV-3, and explore its mechanism. **Methods** Res was prepared at various levels of 0, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol/L}$, to which SKOV-3 cells were respectively exposed for different length of time of 24, 48, and 72 hours. The rate of inhibition (IR) of SKOV-3 cells was determined by MTT. The expression of VEGF protein was identified by Western blot. **Results** The IR of SKOV-3 cells by Res treatment was concentration- and time-dependent ($P < 0.05$). The expression of VEGF protein was also repressed by Res ($P < 0.05$). **Conclusion** Res can suppress ovarian carcinoma cells proliferation and it may be related to the expression down-regulation of VEGF.

Key words: resveratrol; ovarian carcinoma; VEGF; cell proliferation

卵巢癌是女性第五大癌症死亡原因,是妇科癌症首要死亡原因^[1]。因其起病隐匿,就诊时多已为中、晚期,故治愈率低,加之化疗多药耐药的原因,病死率极高,因此迫切需要寻找新的治疗方法,以延缓复发和提高卵巢癌患者的生存率。

白藜芦醇(resveratrol, Res)是1940年首次从毛叶藜芦(veratrum grandiflorum)的根部分离得到的非黄酮类多酚化合物,具有广泛的药理作用,如防治心血管疾病、抗炎、免疫调节、调节脂代谢等^[2]。近年来有研究发现:Res作为一种低毒的天然药物,可抑制多种肿瘤的增殖和诱导肿瘤细胞的凋亡^[3-4]。目前,有关Res作用于卵巢肿瘤方面的研究较少。本研究以人卵巢癌 SKOV-3 细胞为研究对象,探讨 Res 对卵巢癌 SKOV-3 细胞增殖的影响及其可能

的相关分子机制,从而为卵巢癌的预防和治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人卵巢癌细胞 SKOV-3 购自中科院上海细胞库,Res、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自 Sigma 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自北京索莱宝科技有限公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司,鼠抗人血管内皮生长因子(VEGF)单克隆抗体(一抗)购自 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(二抗)购自北京中杉金桥生物技术有限公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 SKOV-3 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱内培养,每 2 天换一次液,当 80% 细胞融合时传代培养。所有实验均采用处于指数生长期的细胞。

1.2.2 MTT 法检测细胞活性 SKOV-3 细胞贴壁生长至 80%~90% 融合时,消化制成 3 × 10⁴/ml 细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 200 μl。贴壁后无血清培养 24 h,细胞同步化后,分别加入终浓度为 10、20、40、80 μmol/L 的 Res,每个浓度设 5 个复孔,对照组加正常培养基,各组继续培养 24、48、72 h 后分别取出 96 孔板,每孔加入浓度为 5 g/L 的 MTT 20 μl,继续培养 4 h,吸弃上清液,每孔加入 150 μl DM-SO,振荡 10 min,用酶标仪测定 490 nm 波长处每孔的光密度值(D),实验重复 3 次。按下列公式计算细胞生长抑制率:抑制率(%) = (1 - D_{用药物组}/D_{对照组}) × 100%。

1.2.3 Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达 分组及处理同上,加药后 48 h 收集细胞,用细胞裂解液抽提细胞总蛋白,BCA 法蛋白定量,与等体积的 2 × SDS 上样缓冲液混合。每泳道 50 μg 蛋白上样进行 SDS-PAGE,电转移至 PVDF 膜后封闭 2 h,加入鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(1:500)和 β-actin 单克隆抗体(1:500)4℃ 孵育过夜,洗涤后,加入 1:1 000 辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,化学发光法检测,暗室压片曝光,显影定影后胶片保存并进行灰

度分析。应用 Image J 分析软件测定各个条带的灰度值并进行统计分析。

1.3 统计学处理 用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计分析。各项计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测结果 结果表明 Res 对 SKOV-3 细胞具有增殖抑制作用,见表 1。随着药物作用浓度增加和时间的延长,其对 SKOV-3 细胞的增殖抑制率也逐渐增强。经多因素方差分析,Res 不同浓度 ($F = 246.608, P < 0.01$)、不同作用时间 ($F = 162.303, P < 0.01$) 对 SKOV-3 细胞增殖的抑制作用差异均有统计学意义。这表明 Res 对 SKOV-3 细胞的增殖抑制呈时间-剂量依赖性。组间两两比较发现,Res 作用后各浓度组各时点间差异均有统计学意义、各时点不同浓度组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 Res 对 SKOV-3 细胞 VEGF 蛋白表达影响 Western blot 检测结果显示,各浓度 Res 对 VEGF 蛋白的表达均有一定的抑制作用 ($P < 0.05$),与对照组相比,差异均有统计学意义。随着 Res 浓度增加,VEGF 表达逐渐降低,表现出浓度依赖性(图 1、表 2);不同 Res 浓度组间两两比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 Res 对 SKOV-3 细胞增殖的抑制率($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	增殖抑制率(100%)		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0	0	0
Res 10 μmol/L	10.39 ± 2.31	16.73 ± 2.95	21.38 ± 3.23
Res 20 μmol/L	15.20 ± 3.41	25.71 ± 1.41	33.83 ± 4.90
Res 40 μmol/L	24.61 ± 2.75	43.51 ± 1.14	54.54 ± 5.16
Res 80 μmol/L	36.40 ± 2.95	52.09 ± 4.09	63.87 ± 3.52

各浓度组不同时间比较: $P < 0.05$; 各时点不同浓度组间比较: $P < 0.05$

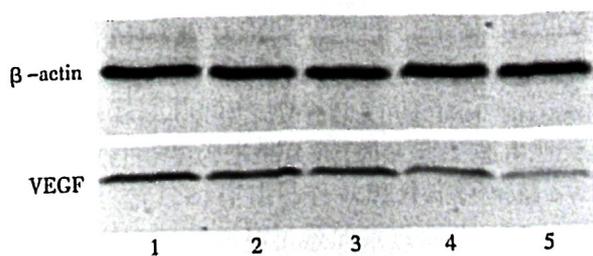


图 1 Res 对 SKOV-3 细胞 VEGF 蛋白表达的影响
1. 对照组; 2. 10 μmol/L Res 组; 3. 20 μmol/L Res 组; 4. 40 μmol/L Res 组; 5. 80 μmol/L Res 组

表 2 Res 对 SKOV-3 细胞 VEGF 蛋白表达的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	VEGF 蛋白表达(%)
对照组	100
Res 10 μmol/L	78.1 ± 3.1
Res 20 μmol/L	61.8 ± 3.1
Res 40 μmol/L	54.3 ± 4.0
Res 80 μmol/L	40.2 ± 4.4

组间两两比较: P 均 < 0.05

3 讨论

Res 是一种天然植物抗毒素,主要存在于葡萄、花生、红葡萄酒、虎杖、决明子等食物和药物中,早期研究表明 Res 具有清除自由基、抗氧化、抗炎、抗血小板聚集、抗动脉粥样硬化等多方面药理活性。随着国内外对 Res 抗肿瘤活性及其机制的深入研究,近年研究认为其是目前继紫杉醇后又一新的绿色抗癌药。有研究表明 Res 可明显抑制乳腺癌、神经胶质瘤、肝癌等肿瘤细胞的增生^[5-7],还可通过降低基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 表达和活性抑制多种肿瘤细胞侵袭^[8]。近年来研究表明 Res 对肿瘤细胞有抑制增殖、诱导凋亡作用,对正常细胞影响较小^[9]。本研究结果发现,Res 对卵巢癌 SKOV-3 细胞增殖具有抑制作用,且随药物浓度的增加、作用时间延长,抑制率升高,呈时间和剂量依赖关系。

VEGF 是目前所知的作用最强、选择性最高的内皮细胞丝裂原,是最强的血管生成促进因子,在肿瘤新生血管生成过程中起着至关重要的作用。以往研究已经证实卵巢癌组织中高表达 VEGF,并影响患者的生存率^[10]。本研究通过不同浓度的 Res 处理卵巢癌 SKOV-3 细胞后,采用 Western blot 法检测 VEGF 蛋白表达水平,结果发现,卵巢癌细胞 VEGF 蛋白被有效地抑制,且呈药物浓度依赖性。提示 Res 可能通过调控 VEGF 蛋白的表达来实现抑制卵巢癌细胞的增殖。

本研究初步阐述了 Res 调控卵巢癌细胞增殖的可能机制之一,为 Res 的临床应用提供了一定的实验基础。但是,Res 影响细胞增殖的因素众多,程序复杂,上述研究因素是否能真正抑制患者肿瘤细胞的增殖,从而进一步影响肿瘤患者的预后,以及其确

切机制,有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] Liu B, Nash J, Runowicz C, et al. Ovarian cancer immunotherapy: opportunities, progresses and challenges [J/OL]. J Hematol Oncol, 2010,3:7.
- [2] Lin HY, Tang HY, Davis FB, et al. Resveratrol and apoptosis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011,1215:79-88.
- [3] Gupta SC, Kannappan R, Reuter S, et al. Chemosensitization of tumors by resveratrol [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011,1215:150-160.
- [4] Athar M, Back JH, Tang X, et al. Resveratrol: a review of pre-clinical studies for human cancer prevention [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007,224(3):274-283.
- [5] Proviciali M, Re F, Donini A, et al. Effect of resveratrol on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice [J]. Int J Cancer, 2005,115(1):36-45.
- [6] Jiang H, Zhang L, Kuo J, et al. Resveratrol-induced apoptotic death in human U251 glioma cells [J]. Mol Cancer Ther, 2005,4(4):554-561.
- [7] 黄晓丹,张秀华,浦福兴,等.白藜芦醇对人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖影响的研究[J].医学研究生学报,2011,24(10):1026-1029.
- [8] Tang FY, Chiang EP, Sun YC. Resveratrol inhibits heregulin- β 1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and cell invasion in human breast cancer cells [J]. J Nutr Biochem, 2008,19(5):287-294.
- [9] Jia L, Yu W, Wang P, et al. Critical roles for JNK, c-Jun, and Fas/FasL-Signaling in vitamin E analog-induced apoptosis in human prostate cancer cells [J]. Prostate, 2008,68(4):427-441.
- [10] 罗斐,伍钢,李贵玲,等.上皮性卵巢癌组织 P-gp 与 Bcl-2 及 VEGF 表达及其临床意义的研究[J].中华肿瘤防治杂志,2008,15(5):367-370.

收稿日期:2012-01-03 修回日期:2012-02-15

本文编辑:孙立杰

标引关键词须知

标引关键词应针对文章的重点内容,请尽量使用最新版美国国立医学图书馆编辑的《Index Medicus》中的医学主题词表(MeSH)内所列的词。如果最新的 MeSH 中尚无相应的词,处理办法有:①可选用直接相关的几个关键词组配。②如果无法组配,可选用最直接的上位关键词。关键词中的缩写词应按 MeSH 还原为全称,如“HBsAg”应标引为乙型肝炎表面抗原。