

· 妇产科和计划生育用药专栏 ·

熊果酸对人卵巢癌耐药 SKOV3/DDP 裸鼠移植瘤的抑制作用*

杨茗钊¹, 程晓华², 刘丝荪¹, 黄欧平³

(1. 南昌大学第一附属医院妇产科, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院药学部, 南昌 330006; 3. 江西省妇幼保健院妇科, 南昌 330006)

摘要 目的 观察熊果酸对人卵巢癌耐顺铂 SKOV3/DDP 裸鼠移植瘤生长的影响, 探讨其作用途径。**方法** 建立人卵巢癌耐顺铂 SKOV3/DDP 细胞裸鼠异位移植瘤模型, 将 24 只荷瘤鼠随机分为 4 组: 空白对照 (0.9% 氯化钠溶液) 组、顺铂 ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组和熊果酸小剂量 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、大剂量 ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 组, 每组 6 只。腹腔注射给药, 注射量均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 共 15 d。给药后每 3 d 测量肿瘤体积, 并绘制移植瘤生长曲线, 计算各组抑瘤率, 采用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)、Western blotting 法分别检测肿瘤组织 Bcl-2、Bax mRNA 及其蛋白表达水平。**结果** 顺铂组和熊果酸小剂量、大剂量组抑瘤率分别为 33.3%, 43.4%, 71.0%。移植瘤中 Bcl-2 表达均有下降, 而 Bax 表达上调。**结论** 熊果酸对人卵巢癌耐顺铂 SKOV3/DDP 细胞裸鼠移植瘤具有一定的抗瘤活性, 可抑制瘤体生长, 并呈浓度依赖性, 其机制可能与抑制抗凋亡因子 Bcl-2 的表达、增强凋亡促进因子 Bax 的表达有关。

关键词 熊果酸; 癌, 卵巢; 移植瘤; 抗肿瘤活性**中图分类号** R282.71; R965**文献标识码** A**文章编号** 1004-0781(2017)01-0028-04**DOI** 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.01.006

Inhibitory Effect of Ursolic Acid on Drug-resistant SKOV3/DDP Ovarian Carcinoma Xenografts in Nude Mice

YANG Mingfang¹, CHENG Xiaohua², LIU Sisun¹, HUANG Ouping³ (1. Department of Obstetrics and Gynaecology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 3. Department of Gynaecology, Jiangxi Maternal and Child Health Hospital, Nanchang 330006, China)

ABSTRACT Objective To explore the effects and mechanisms of ursolic acid on drug-resistant SKOV3/DDP ovarian carcinoma xenografts in nude mice. **Methods** The models of drug-resistant SKOV3/DDP ovarian carcinoma on athymic mouse were established and randomly divided into four groups with intraperitoneal injection of different drugs: blank control (0.9% sodium chloride solution), cisplatin ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), ursolic acid low dose ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and high dose ($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). All drugs were injected at volumes of $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ per day for 15 days. The tumor volumes were measured during the process of drug treatment every three days. After 14 days, The tumorigenic rate and tumor inhibition rate were calculated. RT-PCR and Western blotting were performed to detect the expression of Bcl-2 and Bax. **Results** Anti-tumor rates of cisplatin group, low dose ursolic acid group, and high dose ursolic acid group was 33.3%, 43.3%, and 71.0%, respectively. Bcl-2 expressions were down-regulated, while Bax expressions were up-regulated in all three groups. **Conclusion**

Ursolic acid has some anti-tumor activity on cisplatin-resistant human ovarian cancer SKOV3/DDP cell in nude mice. It can inhibit tumor growth with dose-effect relationship. The mechanism may be to suppress the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 and to increase the expression of apoptosis-promoting factors Bax.

KEY WORDS Ursolic acid; Cancer, ovarian; Xenografts; Anti-tumor activity

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤之一, 发病率逐年上升, 在全世界范围内, 卵巢癌的病死率目前位居妇科恶性肿瘤的第 5 位^[1]。目前, 卵巢癌的化疗 (化疗) 占据重要地位, 尽管许多肿瘤患者最初对标准的组合手术和细胞毒性治疗表现出较好的化疗敏感性, 但是因为肿瘤细胞易对化疗药物产生耐药性, 使化疗

药物的疗效受到限制, 近 90% 会再次复发^[2]。

熊果酸是广泛存在于天然植物中的一种五环三萜类化合物。多年来, 熊果酸在抗炎、抗病毒、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化等显示的多种生物学效应而成为研究热点^[3-5]。熊果酸能抑制顺铂耐药人卵巢癌 SKOV3/DDP 细胞增殖, 促进其凋亡^[6], 但其作用机制及在体内抑

制情况尚不明确。笔者通过建立人卵巢癌耐顺铂 SKOV3/DDP 裸鼠移植瘤模型,观察和探讨熊果酸在其体内对人卵巢癌细胞的抑制作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及细胞株 健康 Balb/c 雌性裸鼠,24 只,4~6 周龄,体质量(20 ± 3) g,购于南昌大学医学部实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(赣)2014-0001,饲养于无特定病原体级(SFP)医学动物实验中心。人卵巢癌耐顺铂耐药 SKOV3/DDP 细胞株来源于中国医学科学院肿瘤医院。

1.2 试剂与药物 熊果酸对照品(江西省宜春学院生物工程开发中心,含量约 99.8%,批号:20100103);RPMI 1640 培养液干粉(Hy-Clone 批号:117859);胎牛血清(杭州四季青公司,批号:141012);青霉素(华北制药股份有限公司,批号:20130226)、链霉素(华北制药股份有限公司,批号:20130226);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)试剂盒(Pierce);增强化学发光剂(electro-chemiluminescence, ECL)(Amersham);噻唑蓝(MTT)、兔抗人 β -actin(Sigma 公司);鼠抗人 Bcl-2 单抗(批号:D1410)、鼠抗人 Bax 单抗(批号:D1310-1)、兔抗人 Bcl-2 多抗(批号:C1411)、兔抗人 bax 多抗(SantaCruz 公司)。

1.3 细胞培养 人卵巢癌耐顺铂 SKOV3/DDP 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,并于 37°C 、5% 二氧化碳(CO_2)、饱和湿度培养箱中培养,每 3~5 d 传代一次,取对数生长期的细胞进行实验。

1.4 裸鼠移植瘤模型的建立 取对数生长期的卵巢癌耐顺铂 SKOV3/DDP 细胞, 0.25% 胰酶常规消化细胞后, $800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($r=15 \text{ cm}$) 离心 5 min,弃上清液, 0.9% 氯化钠溶液重悬,计数并调整细胞密度为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于裸鼠右前肢背部皮下,每只 0.2 mL,接种后,观察并记录肿瘤发生的时间,用游标卡尺测量肿瘤的大小,待移植瘤直径约 5.0 mm,表明荷瘤裸鼠模型制备成功,实测移植瘤直径 8~10 mm,备实验用。

收稿日期 2015-11-05 修回日期 2016-05-12

基金项目 * 江西省卫生厅科技计划(20143037);江西省青年科学基金计划(20142BA215019)

作者简介 杨茗钊(1984-),女,江西瑞金人,主治医师,硕士,主要从事妇科肿瘤研究。电话:0791-88695051, E-mail: 649479518@qq.com。

通信作者 程晓华(1979-),男,江西余干人,主管药师,硕士,主要从事临床药理学研究。电话:0791-88695051, E-mail: ncujg2009@163.com。

1.5 实验分组及药物处理 以移植瘤的体积为分组因素,将 24 只成瘤裸鼠按体质量随机分为 4 组,每组 6 只。空白对照组: 0.9% 氯化钠溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;顺铂组($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);熊果酸小剂量组($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);熊果酸大剂量组($60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。各组均为腹腔注射,注射量均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天给药 1 次,持续 15 d,每 3 d 测量肿瘤长、短径。用药结束 2 d 后处死动物,剥离肿瘤组织,称质量。肿瘤体积计算公式:体积 = 长径(a) \times 短径(b)²/2;抑瘤率(%) = (对照组瘤质量 - 实验组瘤质量)/对照组瘤质量 $\times 100\%$ 。

1.6 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测移植瘤组织中 Bax、Bcl-2 mRNA 的表达 按 Trizol 试剂说明步骤提取移植瘤组织的总 RNA,按反转录试剂盒说明进行逆转后,进行 RT-PCR。 β -Actin 引物:上游 5'-GCATTGTAACCA ACTGGGAC,下游 5'-GCGTAACCCTCATAGATGGGC-3';Bax 上游引物序列为 5'-ATGGACGGGT CCGGGGAGCA-3',下游引物序列为 5'-TGCTCGATCCTGGATGAAACCCT-3';Bcl-2 上游引物序列为 5'-TCGCC- CTGTGGATGACTGAG-3',下游引物序列为 5'-CAGAGTCTTCAGAGACAGCCAGGA-3'。RT-PCR 反应体系: $10 \times \text{PCR buffer } 2 \mu\text{L}$, $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化镁 $2 \mu\text{L}$, $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶 $0.1 \mu\text{L}$, ddH₂O $11.3 \mu\text{L}$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs $2 \mu\text{L}$, cDNA $1 \mu\text{L}$, 上、下游引物各 $1 \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 预变性 3 min, 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s, 30 次循环;最后 72°C 延伸 5 min。取 RT-PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳成像,采用 Bio-Rad 凝胶扫描成像分析系统进行成像及 Image pro plus 6.0 进行图像分析,分别测定目的基因(Bcl-2、Bax)和 β -Actin 条带吸光度值,计算 Bcl-2、Bax mRNA 的相对表达量,相对表达量 = 目的基因条带吸光度值/ β -Actin 条带吸光度值。

1.7 Western blotting 法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达

液氮中取适量肿瘤组织,加入 RIPA 裂解液后进行超声裂解, $14\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ($r=10 \text{ cm}$) 离心 15 min,取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度,加入适量蛋白上样缓冲液,煮沸 10 min,进行 Western blotting 实验,将制备好的电泳凝胶进行拔梳上样,电泳结束后进行转膜,膜于含 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭液室温封闭 1 h,一抗 4°C 孵育过夜,0.1% TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;二抗室温孵育 1 h,同样 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,采用增强 ECL 法 Bio-Rad 显影仪进行显色成像。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 版统计软件进行

统计分析,计量资料均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间治疗前后瘤体积、体质量、抑瘤率等均采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 瘤质量、瘤体积的比较 24 只裸鼠皮下接种人卵巢癌肿瘤细胞均有瘤长出,接种成功率 100%。给药期间观测裸鼠瘤体积、肿瘤生长情况,绘制肿瘤生长曲线,其体质量变化趋势相同,组间差异无统计学意义,由肿瘤生长曲线可看出,空白对照组移植瘤随生长时间延长呈递增性增长,而顺铂组和熊果酸小、大剂量组肿瘤生长明显减慢,大剂量熊果酸对肿瘤的生长抑制作用更强(图 1);各组取出瘤体的质量也显著小于空白对照组($t = 8.512, 10.021, 12.135$, 均 $P < 0.05$)。根据公式计算各实验组的肿瘤生长抑制率,结果见表 1。

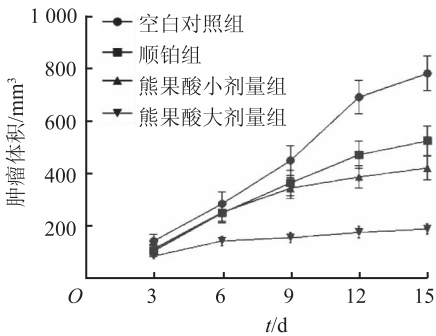


图 1 4 组荷瘤裸鼠移植瘤生长曲线

Fig. 1 Growth curve of transplantation tumor in four groups of nude mice

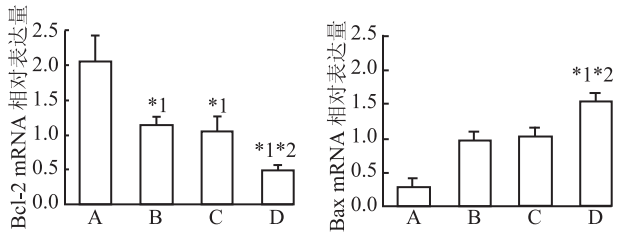
表 1 4 组裸鼠移植瘤的体积、质量及抑瘤率

Tab. 1 Volume, quality and inhibitory rate of transplantation tumor in four groups of nude mice

$\bar{x} \pm s, n = 6$				
组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)	瘤体积/ mm^3	瘤质量/g	抑瘤率/%
空白对照组	-	780.5 ± 48.3	0.69 ± 0.08	-
顺铂组	4	524.4 ± 52.8	0.46 ± 0.10	33.3
熊果酸				
小剂量组	30	421.8 ± 46.2	0.39 ± 0.06	43.4
大剂量组	60	156.8 ± 38.4	0.20 ± 0.04	71.0

2.2 RT-PCR 检测移植瘤组织中 Bax、Bcl-2 mRNA 表达 RT-PCR 检测结果:空白对照组、顺铂组和熊果酸小、大剂量组 Bcl-2 mRNA 表达量分别为 $2.05 \pm 0.37, 1.14 \pm 0.12, 1.05 \pm 0.21, 0.48 \pm 0.08$ 。顺铂组和熊果

酸小、大剂量组的 Bcl-2 mRNA 转录强度与空白对照组比较均差异有统计学意义($t = 5.187, 5.407, 9.432$, 均 $P < 0.01$);熊果酸大剂量组分别与顺铂组和熊果酸小剂量组比较差异有统计学意义($t = 6.710, 8.250$, 均 $P < 0.01$)。Bax mRNA 的表达量分别为 $0.29 \pm 0.03, 0.97 \pm 0.06, 1.01 \pm 0.15, 1.52 \pm 0.25$ 。顺铂组和熊果酸小、大剂量组的 Bax mRNA 转录强度与空白对照组比较均差异有统计学意义($t = 13.670, 10.722, 8.733$, 均 $P < 0.01$),熊果酸大剂量组分别与顺铂组和熊果酸小剂量组比较差异有统计学意义($t = 3.929, 3.409$, 均 $P < 0.05$)。见图 2。



A. 空白对照组;B. 顺铂组;C. 熊果酸小剂量组;D. 熊果酸大剂量组;与空白对照组比较, $^{*1}P < 0.01$;与顺铂组、熊果酸小剂量组比较, 均 $^{*2}P < 0.05$

图 2 4 组荷瘤裸鼠移植瘤组织 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 表达

A. blank control group; B. cisplatin group; C. low-dose ursolic acid group; D. high-dose ursolic acid group; Compared with blank control group, $^{*1}P < 0.01$; compared with cisplatin group and low-dose ursolic acid group, $^{*2}P < 0.05$

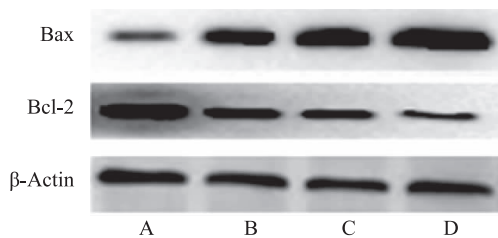
Fig. 2 The mRNA expression of Bcl-2 and Bax in transplantation tumor of four groups of nude mice

2.3 Western blotting 检测移植瘤组织中 Bax、Bcl-2 蛋白表达 结果显示,与空白对照组比较,顺铂组和熊果酸小、大剂量组 Bcl-2 蛋白表达下调;Bax 蛋白表达上调,其中以熊果酸大剂量组上调最为显著。见图 3。

3 讨论

肿瘤的发生、发展、消退与细胞凋亡异常有较密切的联系,肿瘤细胞的增殖和凋亡的失衡是肿瘤发生发展的重要环节。Bcl 作为一种抑癌基因,可以通过抑制线粒体膜电位下降,阻止线粒体细胞色素 C 的释放抑制半胱氨酰天冬氨酸酶-3 (cysteiny aspartate specificproteases-3, caspase-3) 的激活;此外, Bcl-2 亦可直接抑制线粒体细胞色素 C 的释放减少 caspase-3 激活^[7]。Caspase 家族在细胞凋亡的信号传导中具有关键作用,而 caspase-3 是 caspase 家族中最重要的细胞凋亡执行者之一,在蛋白酶级联切割过程中处于核心

位置,发挥着重要的作用,一旦 caspase 被激活就会导致细胞死亡。同时,Bcl-2 家族蛋白质表达在肿瘤细胞凋亡中亦扮演着非常重要的角色,Bcl-2 和 Bax 同属 Bcl-2 家族,而 Bax 为 Bcl-2 家族中非常重要的成员,Bax 能与 Bcl-2 结合形成二聚体,从而抑制细胞增殖或促进细胞凋亡。研究表明,Bax 表达增加、Bcl-2 表达减少促进细胞凋亡的主要途径是通过激活 caspase-3 而实现的。卵巢癌和其他许多肿瘤已被证明过度表达了 Bcl-2 和(或)其家庭成员^[8-10]。熊果酸作为五环三萜类天然化合物的代表,以其毒副作用低、生物活性高而成为备受关注的研究热点。亦有研究显示熊果酸可以通过激活 Bcl-2 相关 X 蛋白和蛋白水解激活 caspase-3,从而下调 Bcl-2、上调 Bax 的表达抑制 SNU-484 胃癌细胞的增殖,有效诱导其细胞凋亡^[11]。



A. 空白对照组;B. 顺铂组;C. 熊果酸小剂量组;D. 熊果酸大剂量组

图 3 4 组荷瘤裸鼠移植瘤组织 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

A. blank control group; B. cisplatin group; C. low-dose ursolic acid group; D. high-dose ursolic acid group

Tab. 3 Protein expression of Bax and Bcl-2 in transplantation tumor of four groups of nude mice

本研究成功建立了人卵巢癌耐药 SKOV3/DDP 裸鼠移植瘤模型,观察了熊果酸对移植瘤生长及凋亡相关基因表达的影响。结果显示,熊果酸能明显抑制移植瘤的生长,且呈剂量相关性;同时,可上调移植瘤组织 Bax mRNA 和蛋白表达,下调 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达,说明熊果酸能改变人卵巢癌耐药 SKOV3/DDP 细胞裸鼠移植瘤组织中凋亡相关基因的表达,可能是通过诱导凋亡抑制人卵巢癌裸鼠耐药 SKOV3/DDP 移植瘤

的生长,发挥抗肿瘤作用。研究中也发现大剂量熊果酸抑制肿瘤生长作用明显强于顺铂,其是否能逆转人耐顺铂卵巢癌对顺铂的耐药性,为耐顺铂卵巢癌的治疗提供新思路还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] LANDEN C N JR, BIRRE R M J, SOOD A K. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(6): 995 - 1005.
- [2] OZOLS R F. Systemic therapy for ovarian cancer: current status and new treatments [J]. Semin Oncol, 2006, 33 (Suppl): 3 - 11.
- [3] 周蕾, 刘卓刚. 熊果酸抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 医药导报, 2011, 30(4): 490 - 494.
- [4] KIM S H, HONG J H, LEE Y C. Ursolic acid, a potential PPAR γ agonist, suppresses ovalbumin induced airway inflammation and Penh by down-regulating IL-5, IL-13, and IL-17 in a mouse model of allergic asthma [J]. Eur J Pharmacol, 2013, 701(1/3): 131 - 143.
- [5] 程晓华, 熊玉卿. 五环三萜皂苷的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 792 - 795.
- [6] 杨茗钊, 刘丝荪. 熊果酸对顺铂耐药人卵巢癌 SKOV3/DDP 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2011, 51(5): 15 - 18.
- [7] 胡瑾, 张晓丽, 张辉. 牛痘疫苗致炎皮提取物注射液对大鼠脑挫伤皮质细胞凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达的影响 [J]. 医药导报, 2013, 32(4): 435 - 437.
- [8] MARX D, MEDEN H. Differential expression of apoptosis-associated genes bax and bcl-2 in ovarian cancer [J]. Methods Mol Med, 2001, 39(5): 687 - 691.
- [9] 颜明, 李洪志, 刘洁婷, 等. 黄芩苷对 SH-SY5Y 细胞损伤的 Bcl-2 和 Bcl-xL mRNA 基因表达的影响 [J]. 医药导报, 2012, 31(7): 843 - 845.
- [10] WANG H, ZHANG Z, WEI X, et al. Small-molecule inhibitor of Bcl-2 (TW-37) suppresses growth and enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells [J]. J Ovarian Res, 2015, 8(1): 3 - 8.
- [11] KIM E S, MOON A. Ursolic acid inhibits the invasive phenotype of SNU-484 human gastric cancer cells [J]. Oncol Lett, 2015, 9(2): 897 - 902.