

淫羊藿苷对人卵巢癌细胞株的肿瘤恶性行为的抑制作用研究*

蒋绍艳, 常宏, 樊丹怡, 邓少洁[△]

南方医科大学深圳妇幼保健院 药剂科 (福田 518028)

【摘要】 目的 探讨淫羊藿苷对人卵巢癌细胞 SKOV3 及多药耐药细胞株 SKVCR 增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响。**方法** 以不同质量浓度淫羊藿苷溶液分别作用于 SKOV3 细胞和 SKVCR 细胞, CCK8 实验检测其抑制率及半数抑制浓度(IC₅₀);并以 0.8 倍 IC₅₀ 质量浓度淫羊藿苷处理细胞, 流式细胞仪检测对细胞增殖和凋亡的影响; Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭能力, 免疫印迹法检测 Caspase-3 蛋白表达水平。**结果** 淫羊藿苷抑制 SKOV3 及 SKVCR 细胞增殖, 且在 5~100 μg/mL 质量浓度范围内呈量效正相关趋势;淫羊藿苷分别以 19.5 μg/mL 和 48.4 μg/mL(0.8 倍 IC₅₀)质量浓度作用于 SKOV3 细胞及 SKVCR 细胞后, SKOV3 及 SKVCR 细胞凋亡率均较对照组增加($P<0.05$);同时, 与对照组相比, 细胞增殖、迁移和侵袭能力均下降($P<0.05$), 免疫印迹结果显示, 淫羊藿苷可增加卵巢癌细胞 Caspase-3 蛋白表达($P<0.05$)。**结论** 淫羊藿苷能抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 及多药耐药细胞株的增殖、迁移和侵袭能力, 并上调 Caspase-3 蛋白表达, 诱导细胞凋亡。

【关键词】 恶性卵巢癌 淫羊藿苷 细胞增殖 凋亡

The Roles of Icaritin on the Proliferation and Apoptosis Abilities of Human Oophoroma Cells and Multi-drug Resistant Cell Line JIANG Shao-yan, CHANG Hong, FAN Dan-yi, DENG Shao-jie[△]. Department of Pharmacy, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital, Southern Medical University, Futian 518028, China

△ Corresponding author, E-mail: 45299307@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of icaritin on the proliferation and apoptosis abilities of human ovarian cancer cells SKOV3 and multi-drug resistant SKVCR cells. **Methods** Human ovarian cancer cells SKOV3 and multi-drug resistant SKVCR cells were treated with various concentrations of icaritin. The inhibitory concentration and the half maximal inhibitory concentration were detected by CCK8 kit. The proliferation and apoptosis abilities of SKOV3 and SKVCR cells were measured by flow cytometry. The migration and invasion abilities of SKOV3 and SKVCR cells were evaluated by Transwell assays. The protein expression level of Caspase-3 was detected by Western blot analysis. **Results** Icaritin significantly suppressed the proliferation abilities of SKOV3 and SKVCR cells in a dose-dependent manner at variant levels from 5-100 μg/mL. SKOV3 and SKVCR cells were treated with 19.5 μg/mL icaritin and 48.4 μg/mL icaritin (0.8×IC₅₀) for 48 h, respectively. The results showed that the cell proliferation, migration and invasion abilities were markedly decreased comparing with control group, and the apoptosis rate was significantly increased as compared with control group ($P<0.05$). Western blot results indicated that icaritin significantly increased the protein expression level of caspase-3 in SKOV3 and SKVCR cells ($P<0.05$). **Conclusion** Icaritin suppressed the proliferation, migration and invasion abilities of human ovarian cancer cells. Increasing expression of Caspase-3 might be the mechanism of its enhancement of apoptosis.

【Key words】 Oophoroma Icaritin Cell proliferation Apoptosis

卵巢癌是女性恶性肿瘤疾病中死亡率最高的疾病之一。目前,卵巢癌的主要治疗策略是肿瘤减灭术联合铂剂、紫杉醇化疗,该方法在卵巢癌患者人群有效率为 80%,在进展期患者中的有效率为 40%~60%^[1]。临床观察显示,近年来卵巢癌患者中位生存

期有延长,但大部分患者仍出现复发,或由于对化疗药物耐药以致病情进展。化疗药物耐药是卵巢癌治疗有效率低下和不良预后的重要因素。因此,积极探索新的治疗药物是改善卵巢癌预后的重要手段^[2]。

淫羊藿(herba epimedii hrevicornus)是传统中药。现代药理学研究发现,淫羊藿在抗肿瘤、抗骨质疏松、调节性激素水平等方面均有良好作用^[3]。近年研究发现,淫羊藿的主要活性成分淫羊藿苷(icaritin)对食管癌、乳腺癌、成神经管细胞癌等癌细

* 深圳市科技研发资金基础研究项目 (No. 20160427191320225)资助

△ 通信作者, E-mail: 45299307@qq.com

细胞的增殖具有抑制作用^[4]。雌激素被认为是卵巢癌的致病因素之一^[5],而淫羊藿苷对性激素的调节作用及抗肿瘤作用已有报道^[6],为此,本研究探讨淫羊藿苷对人卵巢癌 SKOV3 细胞及多药耐药细胞株 SKVCR 细胞增殖和凋亡的作用,以期探索淫羊藿苷对化疗药物敏感株和耐药株的有效性,为卵巢癌治疗的药物选择提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验药物和细胞 淫羊藿苷(纯度 $\geq 98\%$,批号 110737-201516,淡黄色针状结晶粉末,不溶于水)购自上海纯优生物科技有限公司。人卵巢癌 SKOV3 细胞(ATCC, HTB-77)和人卵巢癌多药耐药细胞 SKVCR 购自中科院上海生物细胞库[SKVCR 细胞系具有对顺铂、长春新碱等药物耐药特性,其对顺铂的半数抑制浓度(IC_{50})为(51.52 ± 3.68) $\mu\text{g/mL}$,对长春新碱的 IC_{50} 为(168.47 ± 17.19) $\mu\text{g/mL}$]。

1.1.2 主要试剂和仪器 RPMI1640 培养基(批号 1517016)、胎牛血清(FBS,批号 1715752)(美国 Gibco 公司),胰蛋白酶(上海源培生物科技有限公司,批号 G40308),磷酸盐缓冲液(PBS,美国 HyClone 公司,批号 NAF1410),DMSO(美国 Sigma 公司,批号 RNBC9664)、Annexin V FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号 20150119)、Cell Counting Kit-8(CCK-8,批号 20150221,江苏凯基生物科技股份有限公司),BCA 试剂盒(大连宝生物工程股份有限公司,批号 T9300A),单克隆抗体 Caspase-3(美国 CST 公司),单克隆抗体 GAPDH、羊抗兔 IgG-HRP 标记二抗(Santa Cruze 公司),EdU 细胞增殖流式检测试剂盒(北京宝赛生物技术有限公司),Transwell 小室(北京优尼康生物科技有限公司)。Countess™ 细胞计数仪(LIFE invitrogen Countess),Bio-Rad 多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),流式细胞仪(BD FACS Calibur)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKOV3 和 SKVCR 细胞培养于含 10% 灭活 FBS、100 U/mL 青霉素、链霉素双抗的 RPMI1640 培养基中,于 37 °C 条件下在体积分数 5% CO_2 孵箱中常规培养,每 2 d 换液传代。

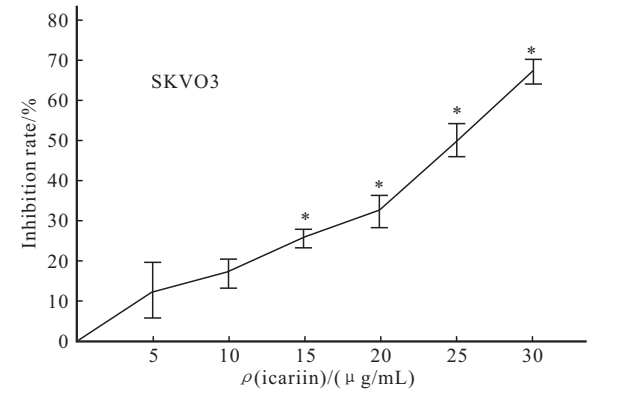
1.2.2 CCK8 法检测淫羊藿苷对卵巢癌细胞增殖的影响 取对数生长期 SKOV3 和 SKVCR 细胞,以密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液接种于 96 孔板,

每孔 100 μL ,在体积分数 5% CO_2 孵箱 37 °C 条件培养 24 h,贴壁后加入不同质量浓度淫羊藿苷溶液。SKOV3 细胞分别加入终质量浓度为 0、5、10、15、20、25、30 $\mu\text{g/mL}$ 的淫羊藿苷溶液(RPMI1640 培养基稀释);SKVCR 细胞分别加入终质量浓度为 0、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 淫羊藿苷溶液。每组样本 6 复孔,培养 48 h 后,加入 CCK-8 溶液 20 μL /孔,继续孵育 4 h 后,酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值(A 值),计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率($\%$) = $(1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$,并计算淫羊藿苷的 IC_{50} 。

1.2.3 流式细胞术检测淫羊藿苷对卵巢癌细胞增殖与凋亡的影响 取对数期生长的 SKOV3 细胞和 SKVCR 细胞,贴壁后分别加入淫羊藿苷溶液(通过 1.2.2 得出 IC_{50} ,取其 0.8 倍 IC_{50} 质量浓度值,即分别采用淫羊藿苷 19.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 48.4 $\mu\text{g/mL}$ 溶液)作用于 SKOV3 细胞及 SKVCR 细胞和等体积 RPMI 1640 培养基(作为对照),培养 48 h 后采用 EdU 细胞增殖流式检测方法,将原 RPMI1640 培养基换为以 RPMI 1640 培养基 1000 : 1 比例配制的 EdU 培养基,每孔 1 mL,孵育 2 h。收集细胞至流式管中,洗涤后 PBS 重悬,体积分数 4% 多聚甲醛固定,2 mg/mL 甘氨酸中和 5 min,洗涤后 0.5% TritonX-100 渗透剂室温孵育 10 min,洗涤后 Apollo 染色,上机检测细胞增殖情况(以 M1 期百分率反映细胞增殖)。采用 Annexin V 方法流式细胞术检测细胞凋亡,培养 48 h 的细胞,胰酶消化,1 500 r/min 离心 5 min,收集细胞至流式管,洗涤后加入 Annexin V FITC 避光孵育 30 min,每管加入 100 $\mu\text{g/mL}$ PI 2 μL ,上机检测凋亡率。

1.2.4 Transwell 实验检测淫羊藿苷对卵巢癌细胞迁移和侵袭能力的影响 在 Transwell 下室加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基,在 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上室侧均匀铺上 60 μL 用不含血清 RPMI1640 培养基 1 : 1 稀释的 Matrigel 基质胶(迁移实验省略此步骤),分别接种淫羊藿苷处理组(0.8 倍 IC_{50} 质量浓度值作用于 SKOV3 和 SKVCR 细胞)及对照组(等体积溶剂)培养 48 h 后的 SKOV3 细胞和 SKVCR 细胞, 1×10^5 细胞/室,培养 24 h 后,棉签拭去 Matrigel 基质胶和上室侧细胞,洗涤后,用体积分数为 4% 多聚甲醛将小室固定 20 min,然后用结晶紫染色液染色 7 min,再用流水冲掉多余染料,将小室取出并晾干后,显微镜下观察、计数细胞、拍照记录并分析。

1.2.5 免疫印迹法检测淫羊藿苷对卵巢癌细胞 Caspase-3 表达的影响 取 SKOV3 和 SKVCR 细胞消化、计数, 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 培养 48 h 后, 加入淫羊藿苷处理组 (0.8 倍 IC_{50} 质量浓度值, 即分别为淫羊藿苷 19.5 $\mu\text{g/mL}$ 和 48.4 $\mu\text{g/mL}$ 作用于 SKOV3 和 SKVCR 细胞) 及对照组 (等体积溶剂), 培养 48 h 后收集细胞。采用 BCA 法检测蛋白含量, 蛋白煮沸变性, 上样、电泳, 至溴酚蓝抵达分离胶底部时停止电泳, 转膜, 用含 5% 脱脂奶粉的封闭液室温封闭 2 h, Caspase-3 为一抗 (1 : 800), GADPH 为内参, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗涤后加入二抗 (1 : 500) 室温轻摇 1 h, ECL 显色, 用凝胶成像仪拍照并测定各显色条带的灰度值, 以目的条带与 GADPH 灰度值的比值为目的蛋白的相对含量。



1.2.6 统计学方法 连续变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异检验采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK8 法检测淫羊藿苷对卵巢癌细胞增殖的影响

见图 1。淫羊藿苷一定质量浓度范围内 (5 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$) 对 SKOV3 和 SKVCR 细胞均有生长抑制作用, 且呈量效正相关趋势 ($P < 0.05$)。淫羊藿苷对 SKOV3 细胞的 IC_{50} 为 24.4 $\mu\text{g/mL}$, 对 SKVCR 细胞的 IC_{50} 为 60.5 $\mu\text{g/mL}$ 。

EdU 细胞增殖流式检测结果显示 (附表, 图 2), 与相应的对照组比较, 在淫羊藿苷 (0.8 倍 IC_{50} 质量

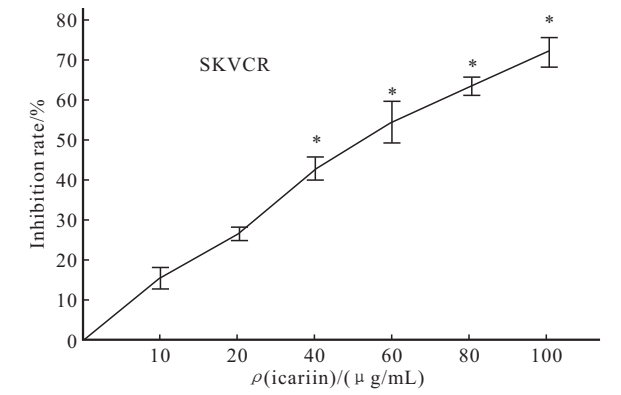


图 1 不同质量浓度淫羊藿苷对 SKOV3 和 SKVCR 细胞的抑制率
Fig 1 The inhibition rate of different concentrations of icariin on SKOV3 and SKVCR cells
* $P < 0.05$, vs. other concentrations

浓度值) 分别作用于 SKOV3 和 SKVCR 细胞) 作用下, M1 期 SKOV3 细胞和 SKVCR 细胞减少 ($P < 0.05$), 即细胞增殖均出现抑制, 表明 0.8 倍 IC_{50} 质量浓度的淫羊藿苷, 能抑制 SKOV3 细胞和对顺铂、长春新碱具有耐药性的 SKVCR 细胞系。

2.2 淫羊藿苷对 SKOV3 和 SKVCR 细胞凋亡的影响

结果显示, 淫羊藿苷作用 48 h 后, SKOV3 和

SKVCR 细胞凋亡率较对照组均增加 ($P < 0.05$, 附表, 图 3)。结果表明, 0.8 倍 IC_{50} 质量浓度值的淫羊藿苷对卵巢癌药物敏感株和多药耐药株均具有良好的促凋亡作用。

2.3 淫羊藿苷对 SKOV3 和 SKVCR 细胞迁移和侵袭的影响

见附表和图 4、图 5。淫羊藿苷处理 48 h 后, SKOV3 和 SKVCR 细胞迁移和侵袭数均较对照组

附表 淫羊藿苷对 SKOV3 细胞和 SKVCR 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Index	SKOV3 cells		SKVCR cells	
	Control group	Icariin group	Control group	Icariin group
M1/%	34.9 $\pm$ 2.2	12.5 $\pm$ 2.2*	30.6 $\pm$ 2.0	10.7 $\pm$ 2.0**
Cell apoptosis rate/%	10.5 $\pm$ 1.3	36.8 $\pm$ 1.4**	10.5 $\pm$ 1.0	41.9 $\pm$ 1.3**
Cell migration/cells	84.0 $\pm$ 2.9	48.25 $\pm$ 4.0**	137.0 $\pm$ 6.6	69.0 $\pm$ 14.5**
Cell invasion/cells	58.0 $\pm$ 2.6	26.75 $\pm$ 2.5**	107.0 $\pm$ 2.9	43.3 $\pm$ 2.2*

* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, vs. control group

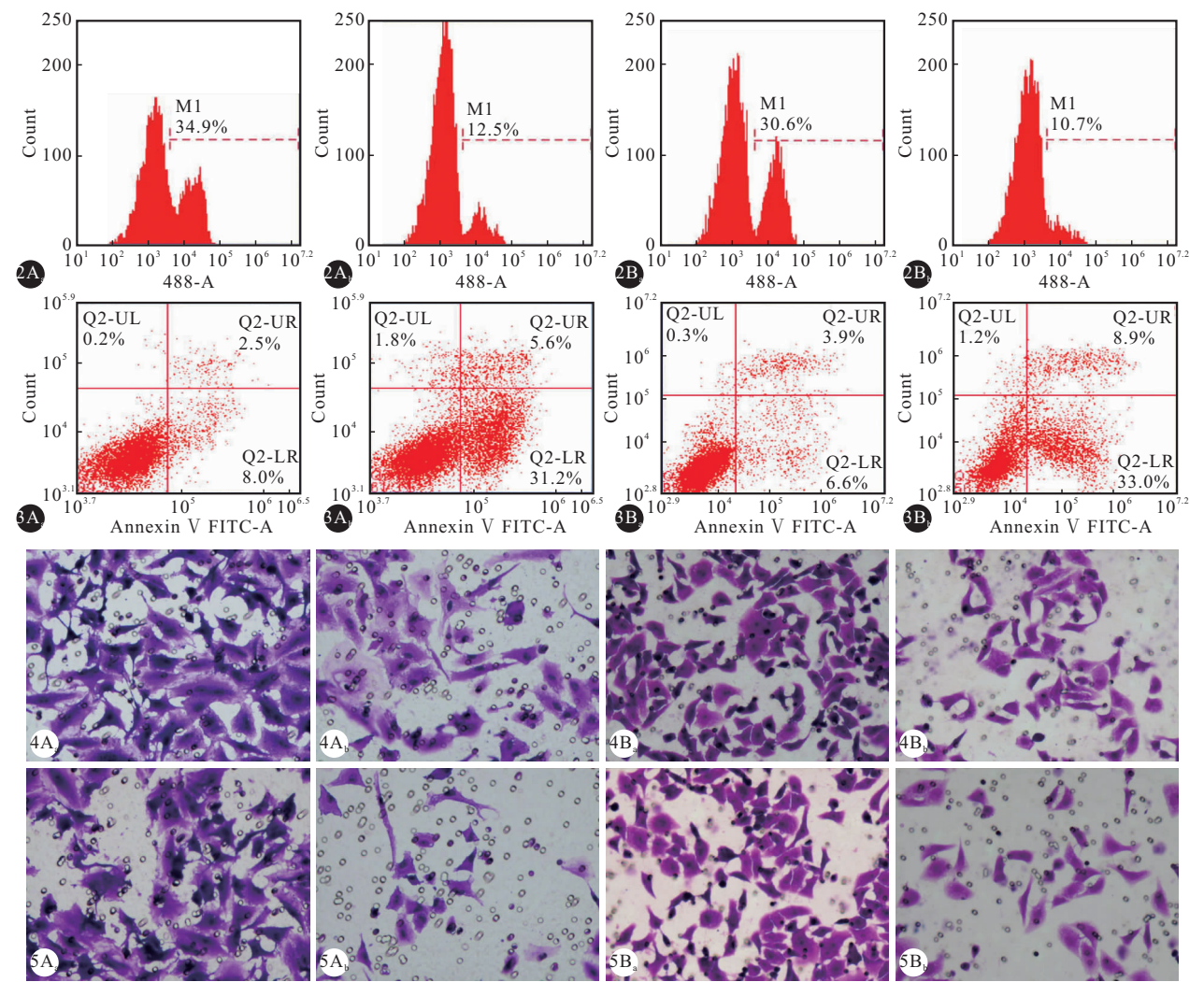


图 2 流式细胞仪检测淫羊藿苷处理 48 h 后 SKOV3 和 SKVCR 细胞增殖 图 3 流式细胞仪检测淫羊藿苷处理 48 h SKOV3 和 SKVCR 细胞凋亡 图 4 Transwell 实验检测淫羊藿苷处理 48 h 后 SKOV3 和 SKVCR 细胞迁移能力 图 5 Transwell 实验检测淫羊藿苷处理 48 h 后 SKOV3 和 SKVCR 细胞侵袭能力

Fig 2 Flow cytometry was used to detect the proliferation abilities of SKOV3 and SKVCR cells treated with icariin for 48 h Fig 3 Flow cytometry was used to detect the apoptosis abilities of SKOV3 and SKVCR cells treated with icariin for 48 h Fig 4 Transwell assay was performed to detect the migration abilities of SKOV3 and SKVCR cells treated with icariin for 48 h Fig 5 Transwell assay was performed to detect the invasion abilities of SKOV3 and SKVCR cells treated with icariin for 48 h

A_a: Control group (SKOV3); A_b: Icariin treatment group (SKOV3); B_a: Control group (SKVCR); B_b: Icariin treatment group (SKVCR)

减低,差异有统计学意义($P<0.05$),说明淫羊藿苷对卵巢癌药物敏感株 SKOV3 和多药耐药株 SKVCR 细胞系均具有较强的迁移侵袭抑制能力。

2.4 淫羊藿苷对 SKOV3 细胞、SKVCR 细胞 Caspase-3 蛋白表达的影响

见图 6。结果显示,淫羊藿苷处理 48 h 后, Caspase-3 蛋白在 SKOV3 细胞(对照组 0.42 ± 0.10 , 淫羊藿苷组 0.81 ± 0.10 , $P<0.01$)和 SKVCR 细胞表达(对照组 0.29 ± 0.05 , 淫羊藿苷组 0.74 ± 0.17 , $P<0.05$)增加。

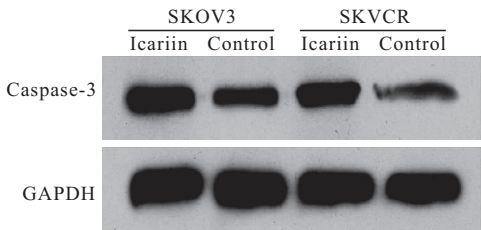


图 6 Western blot 检测细胞 Caspase-3 蛋白表达

Fig 6 Western blot assay was performed to detect the protein expression level of Caspase-3

3 讨论

在全球范围内,卵巢癌是一种死亡率最高的妇科恶性肿瘤之一,又由于早期发病并无明显症状,因而多数患者确诊时已经是晚期,导致预后非常差,5 年生生存率仅为 25% 左右^[7];虽说目前不断有新药被研发使用,但对于主流化疗药物的失敏,仍然是晚期卵巢癌患者预后生存差的重要原因^[8]。目前,如何应对化疗药物耐药一直是癌症治疗中的棘手问题。

研究表明,淫羊藿苷在食管癌、肝癌、肺癌等多种疾病中的抗肿瘤作用已得到广泛认可^[9-12]。但对肿瘤的抑制作用机制比较复杂。据报道,淫羊藿苷能够通过上调 miR-519d 的表达,抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖、迁移和侵袭能力^[12]。同时,淫羊藿苷在胆囊癌中通过抑制核转录因子 kappa B (NF- κ B) 表达,上调 Caspase-3 表达水平,促进细胞凋亡,最终发挥抗肿瘤效果^[13]。另有研究表明,淫羊藿苷可通过调控 microRNA-21,干预靶基因人类第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (PTEN)、半胱氨酸蛋白基因 (RECK) 和原癌基因 Bcl-2 的表达水平,进而影响卵巢癌细胞增殖及凋亡能力^[14]。在本研究中,我们采用淫羊藿苷,同时对人卵巢癌 SKOV3 细胞及多药耐药株 SKVCR 细胞进行干预,以研究其抗肿瘤作用。结果显示,淫羊藿苷对人卵巢癌 SKOV3 细胞和多药耐药株 SKVCR 细胞均有增殖抑制作用和凋亡促进作用,并呈现出明显的量效正相关趋势,两种细胞的淫羊藿苷半抑制浓度 IC₅₀ 分别为 24.4 μ g/mL 和 60.5 μ g/mL。这与淫羊藿苷在食管癌、肝癌和肺癌中的结果一致。有研究发现,淫羊藿苷诱导细胞凋亡可能是其抗卵巢癌的作用机制^[14-15]。本研究发现淫羊藿苷促进细胞凋亡蛋白 Caspase-3 的表达,表明淫羊藿苷可能通过 Caspase-3 促进卵巢癌细胞的凋亡。在胆囊癌中也发现淫羊藿苷上调 Caspase-3 的表达,进而促进细胞凋亡^[13],说明 Caspase-3 在淫羊藿苷引起的肿瘤细胞凋亡中发挥重要作用。另一方面,淫羊藿苷对人卵巢癌 SKOV3 细胞株和多药耐药株 SKVCR 细胞的迁移和侵袭能力有明显的抑制作用,提示淫羊藿苷能抑制卵巢癌的进展,可能在耐药卵巢癌的治疗中发挥抑制肿瘤的作用。本研究首次发现,淫羊藿苷对药物敏感株和多药耐药株均具有明显的促进凋亡、抑制增殖的作用,同时对迁移和侵袭能力也有显著抑制效应。我们将进一步利用裸鼠体内模型验证淫羊藿苷在卵巢癌中的抑制作

用,以揭示淫羊藿苷在卵巢癌及其增敏方面的潜力。

参 考 文 献

- [1] 杨念念, 严亚琼, 龚洁, 等. 中国 2003~2007 年卵巢癌发病与死亡分析. 中国肿瘤, 2012, 21(6): 401-405.
- [2] 田红, 于鹏, 吴小茗, 等. 卵巢癌的治疗药物研究进展. 现代药物与临床, 2015, 30(1): 103-107.
- [3] 赵文静, 王历, 王芝兰, 等. 淫羊藿的药理作用及临床应用研究进展. 中医药信息, 2016, 33(2): 105-108.
- [4] CHEN M, WU J, LUO Q, *et al.* The anticancer properties of Herba Epimedii and its main bioactive components icariin and icarisiside II. *Nutrients*, 2016, 8(9): 563 [2017-08-21]. <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/9/563>. doi: 10.3390/nu8090563.
- [5] LINDGREN PR, BACKSTROM T, CAJANDER S, *et al.* The pattern of estradiol and progesterone differs in serum and tissue of benign and malignant ovarian tumors. *Int J Oncol*, 2002, 21(3): 583-589.
- [6] 张春年, 王建中. 介导细胞凋亡的 caspase-3 在卵巢癌中的表达和放疗敏感性的关联性研究. 东南大学学报(医学版), 2017, 36(2): 176-181.
- [7] 李巍, 崔恒, 冯捷, 等. 卵巢癌诊断的研究进展. 中华妇产科杂志, 2005, 40(7): 496-498.
- [8] 田佳, 周英琼. 卵巢癌对顺铂耐药分子机制的研究进展. 华夏医学, 2013, 26(6): 1194-1199.
- [9] LIU Y, HUANG L, HAO B, *et al.* Use of an osteoblast overload damage model to probe the effect of icariin on the proliferation, differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells through the wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4): 1605-1615.
- [10] WANG QS, WANG GF, ZHOU J, *et al.* Colon targeted oral drug delivery system based on chitosan/alginate microspheres loaded with icariin in the treatment of ulcerative colitis. *Int J Pharm*, 2016, 515(1/2): 176-185.
- [11] 纪昕, 李伟皓, 王崇, 等. 淫羊藿苷对食管癌细胞 EC9706 增殖与凋亡的影响. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3): 143-147.
- [12] 李经纬, 王诗卓, 赵福杰. 淫羊藿苷上调 miR-519d 表达抑制人 SKOV3 卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭. 解剖科学进展, 2015, 21(5): 471-474.
- [13] ZHANG DC, LIU JL, DING YB, *et al.* Icariin potentiates the antitumor activity of gemcitabine in gallbladder cancer by suppressing NF-kappaB. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(2): 301-308.
- [14] LI J, JIANG K, ZHAO F. Icariin regulates the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cells through microRNA-21 by targeting PTEN, RECK and Bcl-2. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 2829-2836.
- [15] LIU H, LIU H, XIONG Y, *et al.* Icariin improves osteoporosis, inhibits the expression of PPAR γ , C/EBP α , FABP4 mRNA, N1CD and jagged1 proteins, and increases Notch2 mRNA in ovariectomized rats. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1360-1368.

(2018-02-27 收稿, 2018-05-11 修回)

编辑 沈进