文章编号:1000-5404(2008)23-2203-04

论著

原花青素对卵巢癌SKOV3细胞增殖和凋亡的影响

池余刚,钟 玲,伍 霞,王 勇 (重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨葡萄籽提取物原花青素对卵巢癌SKOV3细胞增殖和凋亡的影响和机制。**方法** 体外培养的SKOV3细胞与25、50、100、200、400 μg/ml的葡萄籽提取物原花青素共孵育,分别在24、48、72 h时观察细胞形态学变化,MTT检测细胞增殖抑制率,流式细胞和TUNEL分析细胞凋亡,RT-PCR检测survivin在mRNA的表达情况,Western blot检测SKOV3细胞survivin在蛋白水平的表达。**结果** 不同浓度(25、50、100、200、400 μg/ml)原花青素对SKOV3细胞作用48 h的细胞增殖抑制率分别为48.67%、53.85%、67.03%、73.78%、77.39%。流式细胞和TUNEL检测经25 μg/ml原花青素处理24、48 h后SKOV3细胞凋亡率分别为31.98%、45.78%。葡萄籽原花青素还可以明显降低survivin的mRNA和蛋白水平的表达。这些作用均随原花青素浓度和作用时间的延长而增强。**结论** 原花青素可能通过降低survivin的表达,在体外抑制SKOV3细胞增殖,并促进其凋亡。

关键词: 卵巢癌;原花青素;细胞增殖;细胞凋亡;survivin;SKOV3细胞
中图法分类号: R329.28; R73-361; R737.31 **文献标识码:** A

Grape seed proanthocyanidin extract inhibits proliferation and promotes apoptosis of ovary cancer cell line SKOV3

CHI Yu-gang, ZHONG Ling, WU Xia, WANG Yong (Department of Gynecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To study the biological effects of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) on human ovary cancer cells and to explore the molecular mechanism. **Methods** Human ovary cancer cell line SKOV3 were co-cultured with GSPE solution of the terminal concentrations of 25, 50, 100, 200, 400 μg/ml respectively in 96-well plate. At 24, 48, 72 h after coculture, the following parameters were detected: cell growth curve, the inhibition rate of SKOV3 cells by MTT assay, DNA cycle by FCM, the apoptosis of SKOV3 by TUNEL and Annexin-V labeling method, the mRNA and protein expressions of survivin by semi-quantitative RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** GSPE dose-dependently inhibited the proliferation of the SKOV3 cells. Treated by GSPE, the progress of SKOV3 cells at S stage into G/M stage was inhibited. TUNEL showed that treated by 25 μg/ml GSPE for 24, 48 h, the apoptotic rates of SKOV3 cells were 31.98%, 45.78% respectively. Annexin-V showed that after incubation with 25 μg/ml GSPE for 24 h, the apoptotic rate was 14.68%. The survivin mRNA and protein expressions were both down-regulated. **Conclusion** GSPE inhibits the proliferation of malignant human ovary cancer cells and induces their apoptosis. Expression of survivin mRNA and protein may be related to cell growth inhibition and to the apoptosis mediated by GSPE *in vitro*.

Key words: ovary cancers; proanthocyanidin; proliferation; apoptosis; survivin; SKOV3 cells

原花青素(proanthocyanidins,PC)是由不同数量的儿茶素或表儿茶素缩合而成的一大类酚类化合物,其中以葡萄籽和皮含量最为丰富。葡萄籽提取物原花青素[1](grape seed proanthocyanidin extract,GSPE)中含有原花青素在内的多种活性物质,且其含量高,分布广泛。近年来的研究显示,原花青素不仅可抑制皮肤癌、口腔癌、乳腺癌、肝癌、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌等多种肿瘤细胞的生长,诱导多种肿瘤细胞凋亡[2],还可以拮抗化疗药物对正常细胞的毒性作用[3]。这个特性是其他抗肿瘤药物无法比拟的,因此原花青素在抗肿瘤治疗方面有着巨大的潜力。本研究利用体外培养方法探讨GSPE对卵巢癌SKOV3细胞增殖能力和凋亡的影响及其作用机制,为选择治疗卵巢癌及抑制其转移的天然药物提供实验依据。

作者简介:池余刚,男,四川省资阳市人,硕士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究。E-mail:chiyugang@163.com
通信作者:钟 玲,电话:(023)63784244,E-mail:zhong9ling@hotmail.com
收稿日期:2007-12-17;修回日期:2008-01-31

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄籽提取物购于天津市尖峰天然产物研究开发有限公司(批号:0701004-19),卵巢癌 SKOV3 细胞由李兰双博士馈赠,标准胎牛血清购于 TBD 公司,Annexin V-FITC 购于晶美生物工程有限公司,TUNEL 试剂盒购于 Promega 公司,RNA 提取试剂盒和 PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司,survivin 抗体(sc-10811)购于北京中杉公司。RPMI1640 培养基、噻唑蓝(MTT)、碘化丙啶(PI)、胰蛋白酶等常规试剂均由重庆医科大学基础研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 SKOV3 细胞置于含 10% 标准胎牛血清的 RPMI1640 培养液,于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养,每隔 48 h 换液 1 次,以 1∶3的比例传代。

1.2.2 细胞 HE 染色观察 取对数生长期细胞,调整细胞数为 1×10^5 ml^{-1}接种于 24 孔板,1 ml/孔。培养过夜后吸去培养液,分别加入 RPMI1640 配制的 25、50、100、200、400 μg/ml 原花青素,各 3 孔,1 ml/孔;另作为对照的 3 孔每孔加 1 ml 1640 培养基。于共孵育 24、48、72 h 后通过 HE 染色,在倒置显微镜下观察细胞形态变化。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖活性 取对数生长期细胞,调整细胞数为 5×10^4 ml^{-1},接种于 96 孔板,培养 24 h 后吸去培养液,分别加入含 10% 标准胎牛血清 RPM11640 配制的浓度为 25、50、100、200、400 μg/ml 原花青素 0.2 ml/孔,各 3 孔,为实验组;对照组 3 孔加入 RPMI1640,0.2 ml/孔。分别于培养 24、48、72 h 后弃上清,加入 5 mg/ml 的 MTT(用 PBS 液配制)20 μl,继续培养 4 h,吸去培养液,各孔加入 0.15 ml DMSO,振摇 10 min,酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度值[$D(490)$]。

细胞增殖抑制率(%) = $1-[D(490)_{实验孔}-D(490)_{空白孔}]/[D(490)_{对照孔}-D(490)_{空白孔}]\times100\%$

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 调整细胞数至 5×10^5 ml^{-1},接种于 6 孔板中,2.5 ml/孔。培养过夜换含 25 μg/ml 原花青素的培养液继续培养,各 3 孔;对照组 3 孔仅加入培养液,各 2.5 ml。在培养 24、48 h 时分别收集细胞,PBS 液洗 2 次,校对细胞数为 10^6 ml^{-1},PI 染液避光染色 30 min,200 目尼龙网过滤,上流式细胞仪检测。分析 SKOV3 细胞凋亡比例。

1.2.5 Annexin-V 和 PI 染色检测细胞凋亡 调整单细胞数 0.5×10^6 ml^{-1},接种于上述制备好的脱落培养皿内,实验组加入 25 μg/ml 的 GSPE,对照组加入相同体积 PBS,作用 24、48 h 后收集细胞。重复 3 次。PI、Annexin-V 双染细胞(Annexin-V 是一种 Ca^{2+} 依赖性结合蛋白,能与翻转到膜外的 Ps 高亲和力特异性合),流式细胞仪检测凋亡的细胞和死亡的细胞。

1.2.6 GSPE 对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡指数的影响 操作方法严格按细胞凋亡检测试剂盒说明书(TUNEL 法)进行。结果判断:细胞核中有绿色荧光者为阳性细胞,即凋亡细胞;蓝色荧光者为活细胞。随机选取 10 个高倍镜视野,每个高倍镜视野的细胞应大于 1 000 个,分别计数总细胞数和凋亡细胞数,计算凋亡指数(AI)。

AI = 凋亡细胞数/总细胞数

1.2.7 半定量 RT-PCR 检测 GSPE 对 SKOV3 细胞表达凋亡相关基因的变化 GSPE(25 μg/ml)处理 SKOV3 细胞 24、48、72 h 后,同时设空白对照组。按 RNA 提取试剂盒说明提取各总 RNA。cDNA 合成及扩增体系参见说明书。survivin 的引物(正义链:5′-TACAGCTTCGCTGGAAACCT-3′,反义链:5′-AGCCCGGATGATACAAACAG-3′,总 251 bp)由 Invitrogen 公司合成,β-肌动蛋白引物(正义链:5′-GACTACCTCATGAAGGTC-3′,反义链:5′-GATCCACATCTGCTGGAA-3′,总 500 bp)由上海生物工程公司合成。以 β-actin 内参,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,Quantity One 图像分析软件分析,保存结果。

1.2.8 Western blot 检测 GSPE 对 SKOV3 细胞 survivin 表达水平的影响 GSPE(25 μg/ml)处理 SKOV3 细胞 24、48、72 h 后,同时设对照组。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 χ^2 检验、配对的 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 SKOV3 细胞 HE 染色观察

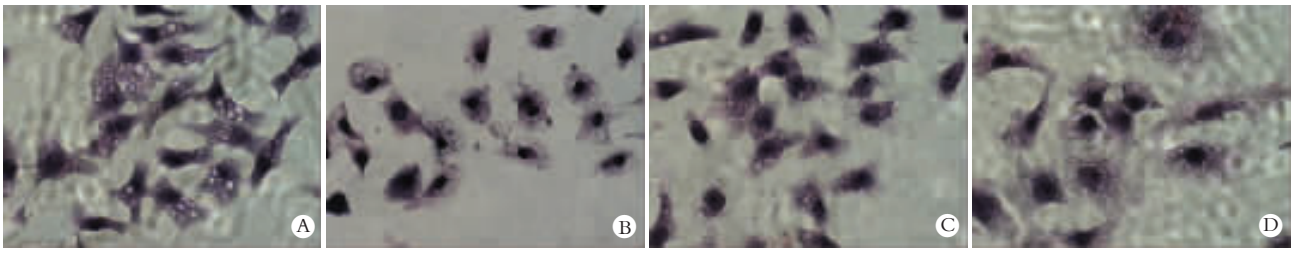
GSPE(25 μg/ml)处理 24 h 后,可见大多数细胞由梭形分支状变圆;细胞膜完整,有发泡现象,细胞间隙明显。48 h 后细胞形态均发生明显改变,细胞多呈类圆形。少数呈梭形,细胞周缘毛糙不规则,细胞质中颗粒较多,细胞核固缩。72 h 后细胞均呈圆形,细胞质中颗粒明显增多,细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体;而对照组细胞贴壁牢,多呈梭形分支状,细胞质中颗粒很少,未见凋亡小体(图 1)。

2.2 SKOV3 细胞增殖抑制情况

随着 GSPE 浓度的增加和作用时间的延长,其对 SKOV3 细胞的增殖抑制率逐渐增高,呈时间剂量效应(表 1)。

2.3 GSPE 对 SKOV3 细胞周期的影响

GSPE(25 μg/ml)作用 24、48 h 后对 SKOV3 细胞周期的影响主要表现在 S 进入 G_2/M 受阻(表 2)。



A:处理 24 h 后; B:处理 48 h 后;C:处理 72 h 后;D:对照组

图 1 25 μg/ml GSPE 处理 SKOV3 细胞病理观察 (HE×400)

表 1　GSPE 对 SKOV3 细胞的增殖率的影响

组别	24 h		48 h		72 h	
	光密度值	增殖抑制率	光密度值	增殖抑制率	光密度值	增殖抑制率
空白对照组	0.498 ± 0.081	–	0.637 ± 0.028	–	0.710 ± 0.023	–
GSPE 浓度(μg/ml)						
25	0.402 ± 0.048	0.193	0.327 ± 0.024	0.487[a]	0.297 ± 0.012	0.582[b]
50	0.327 ± 0.058	0.343[a]	0.294 ± 0.028	0.538[b]	0.267 ± 0.015	0.624[b]
100	0.292 ± 0.039	0.514[b]	0.261 ± 0.021	0.670[b]	0.207 ± 0.023	0.770[b]
200	0.206 ± 0.015	0.586[b]	0.167 ± 0.023	0.738[b]	0.138 ± 0.007	0.806[b]
400	0.178 ± 0.029	0.643[b]	0.144 ± 0.014	0.774[b]	0.097 ± 0.009	0.864[b]

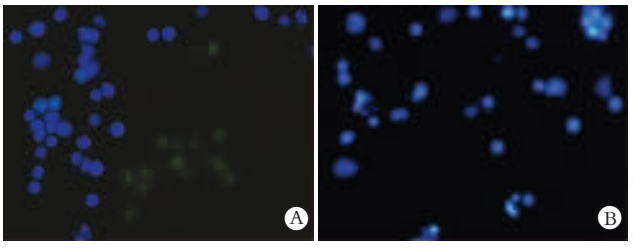
a:$P<0.05$, b: $P<0.01$,与空白对照组比较

表 2　25 μg/ml GSPE 处理 SKOV3 后对细胞周期分布情况的影响

组别	24 h			48 h		
	S	G	M	S	G	M
实验组	43.09	56.91	0.00	86.39	13.17	0.44
对照组	83.33	13.40	3.27	93.00	0.67	6.33

2.4　GSPE 诱导 SKOV3 细胞凋亡

将上述原花青素作用24、48 h 的细胞用 Annexin-V 和 PI 染色后,FCM 分析细胞凋亡。结果表明,在 GSPE(25 μg/ml)与 SKOV3 细胞共孵育 24、48 h 后凋亡率分别为 14.68%、30.07%,空白对照组的凋亡率为 0.78%、1.38%。与对照组相比,原花青素组出现了较多凋亡和死亡的细胞,差异具有统计学意义($P<0.01$)。GSPE(25 μg/ml)处理卵巢癌 SKOV3 细胞 24、48 h 后,TUNEL 检测凋亡率分别为 31.98%、45.78%。空白对照组未见凋亡(图 2)。

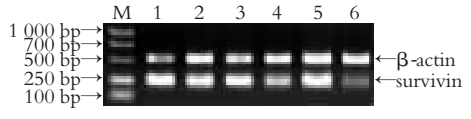


A:GSPE(25 μg/ml)处理 48 h; B:空白对照组培养 48 h,未见绿色荧光

图 2　TUNEL 检测 GSPE 对 SKOV3 细胞凋亡的影响　绿色荧光代表凋亡细胞,蓝色荧光代表活细胞　(×200)

2.5　GSPE 对 SKOV3 细胞抗凋亡基因表达的影响

GSPE 介导 SKOV3 细胞抗凋亡基因 survivin 表达下调(图 3)。经过 Quantity One 图像分析软件重复 10 次进行灰度值测定,实验组与对照组差异具有统计学意义($P<0.05$)。

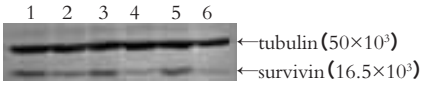


M: DNA 标准(DL2000);1: 空白对照组 24 h; 2: GSPE 处理 24 h; 3: 空白对照组 48 h;4: GSPE 处理 48 h;5: 空白对照组 72 h; 6: GSPE 处理 72 h

图 3　GSPE 对 SKOV3 细胞 mRNA 表达的影响

2.6　免疫印迹检测 GSPE 对 SKOV3 细胞抗凋亡 survivin 蛋白的表达

GSPE 介导 SKOV3 细胞抗凋亡基因 survivin 蛋白表达下调(图 4)。经过 Quantity One 图像分析软件重复 10 次进行灰度值测定,实验组与对照组差异具有统计学意义($P<0.05$)。



1: 空白对照组 24 h;2:GSPE 处理 24 h;3: 空白对照组 48 h; 4:GSPE 处理 48 h;5: 空白对照组 72 h; 6: GSPE 处理 72 h

图 4　Western blot 检测 GSPE 处理 SKOV3 细胞的 survivin 的表达变化

3　讨论

卵巢癌治疗以手术为主,化疗是卵巢癌最重要的辅助治疗手段。如何利用新的敏感药物设计出抗肿瘤活性最佳,而毒性及耐药性最小的联合化疗方案,从而在最大限度的降低价效之比的基础上,提高卵巢癌患者的生存率和生活质量,是我们深入研究的重点。40 多年来人们对从众多不同植物中提取出的原花青素进行了大量研究,GSPE 得到了最为深入和广泛的关注。GSPE 具有多种生物活性,致突试验、致畸试验和长期毒性试验均证实其无毒副作用,符合人们对安全性的需要。GSPE 作为一种天然药物,属于典型的多酚类化合物,体内、外试验证明其具有抗氧化,选择性的抑制肿瘤细胞生长,促进肿瘤细胞的凋亡的功效,对正常的组织和细胞没有杀伤作用[4]。

本研究采用 MTT 法观察了原花青素抗 SKOV3 细胞增殖的作用,作用时间越长,药物浓度越高,抑制细胞增殖现象越明显。显示原花青素呈时间和剂量依赖性抑制 SKOV3 细胞增殖。同时通过 HE 染色、流式细胞仪检测和 TUNEL 检测均发现原花青素具有诱导 SKOV3 细胞凋亡的能力,并且随着原花青素作用时间的延长,SKOV3 细胞发生凋亡的比率也随之增加,与对照组比较,有显著差异。进一步分析表明 GSPE 对 SKOV3 细胞周期的影响主要表现在 S 进入 G_2/M 受阻。证实了 GSPE 在体外对卵巢癌 SKOV3 抑制作用与诱导细胞进入程序化死亡有关。

survivin 基因是新近发现的凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)基因家族的新成员,该基因表达的 Survivin 蛋白是迄今为止相对分子质量最小,也是抗凋亡作用最强的凋亡抑制蛋白。研究表明[5] survivin 在正常卵巢组织基本不表达,从良性肿瘤到交界性肿瘤,再到上皮性卵巢癌的表达是一个渐进升高的过程。同时 survivin 的表达强度与卵巢肿瘤的恶性程度及发展趋势成明显正相关[6]。McKay 等[7]发现在卵巢癌细胞系中提高 Procaspase-3 将导致 survivin 转录的提高,这将抑制内源性 survivin 的活性,最终导致卵巢癌的细胞死亡。说明了降低细胞周期依耐性的 survivin 的表达可以明显的促进卵巢癌细胞的凋

亡,抑制卵巢肿瘤的生长。GSPE 抑制卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和诱导凋亡是否与 survivin 有关系,是本研究需要回答的另一个问题。同一浓度不同时间段与 GSPE 作用后,RT-PCR 和 Western blot 都同时发现:GSPE 可明显的下调 survivin 在分子和蛋白水平的表达。

survivin 抑制凋亡的机制与 IAP 家族其他成员一样,可直接作用于细胞色素 C 从线粒体向细胞质释放过程的末期。细胞凋亡调控中最关键的分子群是 Caspase 家族。国外研究表明:survivin 与 Caspase 特异性结合,抑制 Caspase-3、Caspase-7 的活性,从而阻断各种刺激(如 Fas、Caspase、Bax 或某些化疗药物)诱导的细胞凋亡过程[8]。另一方面:survivin 也可通过 p21 间接抑制 Caspase,survivin 与细胞周期调控因子 CDK4 结合形成 survivin-CDK4 复合体,使 p21 从 CDK4 复合体中释放出来,p21 进而与线粒体 Caspase-3 结合,抑制其活性,阻断细胞的凋亡过程。目前国外的研究表明,GSPE 可以对于人口腔鳞癌细胞[9]、急性髓性白血病[10]、前列腺癌[11]和结肠直肠癌[12]等多种肿瘤细胞通过激活细胞凋亡基因家族中的 Caspase-3 家族,从而启动细胞的凋亡过程。GSPE 虽然可以下调卵巢癌 SKOV3 细胞中 survivin 的表达,但是否通过激活 Caspase 家族发挥作用还需要进一步的研究。

综上所述,葡萄籽提取物原花青素在体外可以明显抑制卵巢癌细胞 SKOV3 细胞的增殖并诱导其凋亡,其机制可能与下调卵巢癌细胞中 survivin 的表达有关。为卵巢癌化疗的新药物选择提供了新的参考,但尚需进一步研究其抗肿瘤的机制及其在体内的详细药理过程。

参考文献:

[1] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S J, *et al*. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention[J]. Toxicology, 2000, 148 (2-3):187-197.

[2] Zhang Y J, Nagao T, Tanaka T, *et al*. Antiproliferative activity of the main constituents from Phyllanthus emblica[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27(2): 251-255.

[3] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, *et al*. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds[J]. Ann NY Acad Sci, 2002, 957: 260-270.

[4] Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, *et al*. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds[J]. Food Chem Toxicol, 2002, 40(5):599-607.

[5] Sui L, Dong Y, Ohno M, *et al*. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors[J]. Int J Oncol, 2002, 21(2):315-320.

[6] 陈 莹,钟 玲,王 勇,等. RNA 干扰沉默 survivin 基因在抑制卵巢癌裸鼠移植瘤中的作用[J]. 第三军医大学学报,2007,29(6):530-533.

[7] McKay T R, Bell S, Tenev T, *et al*. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases survivin transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, survivin T34A; a combination gene therapy strategy[J]. Oncogene, 2003, 22(23):3539-3547.

[8] Altieri D C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8581-8858.

[9] Ito H, Kobayashi E, Takamatsu Y, *et al*. Polyphenols from Eriobotrya japonica and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2000, 48(5):687-693.

[10] Hu H, Qin Y M. Grape seed proanthocyanidin extract induced mitochondria-associated apoptosis in human acute myeloid leukaemia 14.3D10 cells[J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(5): 417-421.

[11] Kaur M, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells: possible role of ataxia telangiectasia mutated-p53 activation [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(5):1265-1274.

[12] Kaur M, Singh R P, Gu M, *et al*. Grape seed extract inhibits *in vitro* and *in vivo* growth of human colorectal carcinoma cells[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(20 Pt 1):6194-6202.

(编辑 王小寒)

(上接2202页)

激素影响肝脏的代谢、合成和分泌功能,从而导致孕妇体内某些功能发生变化。在妊娠妇女体内绝大多数凝血因子,如因子Ⅱ、Ⅴ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅻ浓度增加,导致机体凝血功能增强。本研究结果显示妊娠期妇女 PT、APTT 和 TT 与对照组相比无显著性差异,但血浆 Fbg 增加,这一方面是生理性合成增加用于孕妇分娩时消耗;另一方面为随着妊娠进展孕妇体内纤溶恬性逐渐降低所致,虽然 Fbg 增加了,但由于纤溶恬性下降,纤维蛋白原降解产物并不增多,故 TT 无明显变化[1]。血浆 Fbg 含量升高,可使血液黏度增高,红细胞聚集增高,血小板聚集增高,Fbg 在血小板的聚集过程中起着重要作用,血小板被激活时,其膜上形成 Fbg 受体 GPIb/Ⅲa,通过 Fbg 的连接作用形成血小板聚集体,最终成为血栓[2]。妊娠期妇女凝血功能有增强的趋势,血液处于高凝状态,有利于产后快速有效止血,但是有可能发展成妊高征,也可能发生弥散性血管内凝血(DIC)或栓塞,甚至危及母婴生命[3]。妊娠期妇女要密切注意血栓前状态的出现。我们认为,不易普及检测凝血因子的单位, PT、APTT、TT 和 Fbg 是监测妊娠期妇女凝血状态的有效指标。

关键词: 妊娠;凝血酶原时间;活化部分凝血酶时间;凝血酶时间;纤维蛋白原

中图法分类号: R714.12 **文献标识码:** B

参考文献:

[1] 张一鸣,虞 斌,傅云峰,等. 正常妊娠期和产褥期妇女凝血功能的调查分析[J]. 镇江医学院学报, 2001, 11(5): 606-607.

[2] 林向华,梁穆兴,段朝晖,等. 妊娠期妇女凝血指标变化的临床意义[J]. 血栓与止血学, 2003, 9(1): 21-22.

[3] 高建钢,张丽英,周银锁,等. 妊娠期凝血指标临床观察[J]. 内蒙古医学院学报,2004, 26(1): 32-33.

(编辑 龙 亮)