论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2120-04

葡萄籽原花青素对人卵巢癌裸鼠移植瘤细胞增殖和凋亡的影响

徐 蕾,钟 玲,胡琴琴,蒋兴伟,池余刚 (重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨葡萄籽来源的原花青素对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤增殖和凋亡的影响和机制。**方法** 建立24只人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤模型,分成3组($n=8$):原花青素高浓度组(200 mg/kg)、原花青素低浓度组(100 mg/kg)、空白对照组。观察各组裸鼠皮下移植瘤生长情况,HE染色观察肿瘤细胞形态,流式细胞分析细胞凋亡,RT-PCR,Western blot检测肿瘤细胞Bax,Caspase-3在RNA及蛋白水平的表达情况。**结果** 原花青素处理组皮下移植瘤抑瘤率分别为34.303%、28.594%,与对照组相比差异具有显著性($P<0.05$);治疗组肿瘤细胞出现明显的凋亡形态学变化,流式细胞检测治疗组肿瘤细胞凋亡率分别为67.965%,24.650%;原花青素还可以明显增高Bax、Caspase-3 RNA和蛋白的表达,且呈浓度依赖性。**结论** 葡萄籽原花青素对卵巢癌皮下移植瘤生长有抑制作用,并促进其凋亡,其作用可能通过增强Bax、Caspase-3的表达而实现。

关键词: 卵巢癌;原花青素; Bax; Caspase-3;裸鼠

中图法分类号: R282.71; R73-361; R737.31 **文献标识码:** A

Grape seed proanthocyanidin inhibits human ovarian cancer xenograft in nude mice

XU Lei, ZHONG Ling, HU Qin-qin, JIANG Xing-wei, CHI Yu-gang (Department of Gynaecology and Obstertrics, Second Affliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the effects of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) on the growth and apoptosis of the transplanted tumor of human ovary cancer in nude mice and to explore the implying molecular mechanism. **Methods** A human ovarian cancer model was established by subcutaneously human ovary cancer cell line SKOV3 into nude mice. The 24 mice were randomly and equally divided into 3 groups, the high-dose GSPE group (200 mg/kg, HD GSPE), the low-dose GSPE group (100 mg/kg, LD GSPE) and the control group (Normal saline). GSPE solution or normal saline was intragastrically given to the mice at 10 mg/kg. Tumor volume and weight were measured. HE staining was used to observe the tumor cells morphology. Apoptosis of the tumor cells was analyzed by flow cytometry (FCM), semi-quantitative RT-PCR was used to detect the mRNA expressions of Caspase-3 and Bax, and their protein expressions detected by Western blot analysis. **Results** The inhibitory rate in the HD and LD GSPE groups were 34.303% and 28.594% respectively, which was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$). The apoptotic rate in the GSPE groups were 67.965% and 24.650% respectively, which were significantly higher than that of the control group ($P<0.01$). Semiquantitative RT-PCR and Western blot analysis showed that the mRNA and protein expressions of Caspase-3 and Bax were both up-regulated in GSPE groups in a dose-dependent manner. **Conclusion** GSPE inhibits the growth of ovarian cancer by inducing tumor cells apoptosis and inhibiting the growth of human ovarian cancer transplanted tumor in nude mice. Increased expressions of Bax and Caspase-3 may be related to the cell growth inhibition and to the apoptosis mediated by GSPE *in vivo*.

Key words: ovary cancers; proanthocyanidin; Bax; Caspase-3; nude mice

目前卵巢癌的治疗是以手术为主的综合治疗,其中化疗是主要的辅助治疗。但是化疗药物存在一定程度耐药及明显的毒副作用[1],寻找更有效安全的新型化疗药物成为提高卵巢癌综合治疗效果的迫切任务之一。现有实验证明原花青素(proanthoeyanidins,PC)对乳腺癌[2]、卵巢癌[3]、髓性白血病[4]、肝癌[5]等多种肿

基金项目:重庆医科大学校级科研课题(XBYB2008035)
Supported by the Scientific Research Project of Chongqing Medical University (XBYB2008035)

作者简介:徐 蕾,女,四川省达州市人,硕士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究。E-mail:173786370@163.com
通信作者:钟 玲,电话:(023)63784244,E-mail:zhong9ling@hotmail.com

收稿日期:2009-03-22;修回日期:2009-05-26

瘤细胞都有一定的预防或治疗作用。本实验拟通过葡萄籽来源的原花青素(grape seed proanthocyanidin extract,GSPE)对卵巢癌裸鼠移植瘤生长的实验干预,探讨在体内 GSPE 对卵巢癌 SKOV3 细胞的影响及其可能的作用机制,为卵巢癌化疗新药物选择和开发提供一定的实验依据。

1　材料与方法

1.1　主要材料与试剂

GSPE 购于天津市尖峰天然产物研究开发有限公司,批号:070 1004-19;卵巢癌 SKOV3 细胞,由重庆医科大学李兰双博士馈赠;标准胎牛血清购于 TBD 公司;AnnexinV-FITC, Western-blot 试剂盒购于碧云天生物技术研究所;RT-PCR 试剂盒购于 Promega 公司;Caspase-3、Bax 抗体均为美国 Santa Cruz 生物技术公司产品。BALB/c 裸鼠购自中国医学科学院,许可证号:SCXK(京)2005-00 13,鼠龄 4 ~ 6 周,体质量 17 ~ 21 g,雌性,在重庆医科大学实验动物中心 SPF 级环境内饲养。RPMI1640 培养基、碘化丙啶(PI)、胰蛋白酶、伊红、苏木精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　　卵巢癌 SKOV3 细胞株接种于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,2 ~ 3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞,用 0.25% 胰酶消化后,显微镜下计数板计数,并用 4% 台盼蓝染色计数活细胞数,当细胞活力达到 95% 以上时进行实验。

1.2.2　构建动物模型[6]　　调整细胞浓度为 5×10^6 个/ml,制备单细胞悬液,以 1 ml 空针将其注入实验裸鼠左侧腋窝,每只鼠皮下接种 0.2 ml 细胞悬液,待皮下移植瘤长至直径约 3 mm 时即构建起卵巢癌 SKOV3 小鼠模型。

1.2.3　GSPE 干预实验　　将 24 只模型小鼠分为 3 组,每组 8 只。GSPE 高浓度组:GSPE 溶液以 200 mg/kg 浓度为实验用药标准;GSPE 低浓度组:GSPE 溶液浓度为 100 mg/kg;空白对照组:用生理盐水代替 GSPE 溶液。各组均按 10 ml/kg 体质量每天灌胃 1 次。每隔 2 天测量肿瘤结节的最长径(a)及最短径(b),根据 $V = (a \times b^2)/2$ 计算肿瘤体积,并计算抑瘤率,抑瘤率(%) =(对照组平均体积 - 实验组平均体积)/对照组平均体积 ×100%。GSPE 干预结束后处死小鼠,立即完整剥离瘤体,测量最长径、最短径并称量。同时行病理及流式细胞检测,并冻存部分肿瘤组织进行 RT-PCR 和 Western blot 检测。

1.2.4　HE 染色观察肿瘤细胞病理形态　　各处理组肿瘤组织标本,经 10% 甲醛固定后,制成常规病理石蜡包埋组织块,按切片厚度 5 μm 进行 HE 染色,制成病理切片在光镜下观察。

1.2.5　FCM 法测定肿瘤细胞凋亡　　切取移植瘤组织约 1 mm × 1 mm × 1 mm,用 PBS 洗净积血,按搓网法[7]制成细胞悬液,并按 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测盒说明书操作,上机检测。

1.2.6　RT-PCR 检测 GSPE 对 SKOV3 细胞表达凋亡相关基因的 mRNA 水平变化　　将冻存的各组肿瘤组织用 Trizol 溶液提取总 RNA,按试剂盒说明书采用一步法进行 RT-PCR。以 β-actin 为内参,PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,用紫外透射分析仪观察结果并拍照,Quantity One 图像分析软件分析、保存结果,实验重复 3 次。Bax 的引物序列:上游 5′-TTTTGCTTCAGGGTTTCATC-3′,下游 5′-GACACTCGCTCAGCTTCTTG-3′,产物 114 bp,50 ℃;Caspase-3 的引物序列:上游 5′-CAGAACTGGACTGTGGCATTG-3′,下游 5′-GCTTGTCGGCATACTGTTTCA-3′,产物 192 bp,55 ℃;β-actin 的引物序列:上游 5′-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3′,下游 5′-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3′,产物 272 bp,57 ℃。

1.2.7　Western blot 检测 Caspase-3,Bax 蛋白表达变化　　冻存的各组肿瘤组织加入 PMSF 裂解液提取总蛋白,按常规方法进行操作,用免疫印记 ECL 化学发光试剂盒显色,每个样本至少重复 3 遍。

1.3　统计学分析

结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,各组间差异比较行单因素方差分析。

2　结果

2.1　GSPE 对移植瘤生长的影响

肿瘤细胞接种后 1 周长成粟粒大小,后逐渐于局部呈膨胀性生长,2 ~ 3 周后体积逐渐增大,质硬,活动,与胸壁不粘连。不同处理对裸鼠皮下移植瘤生长影响见表 1,可见 GSPE 高浓度组移植瘤体积最小,治疗组与对照组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。GSPE 高、低浓度组移植瘤瘤质量分别为(0.498 ± 0.014) g、(0.512 ± 0.006) g,与对照组瘤质量[(1.217 ± 0.059)g]比较,差异具有显著性($P < 0.05$)。GSPE 高、低浓度组移植瘤体积及瘤质量之间差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1　不同处理对裸鼠移植瘤生长的影响($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	移植瘤体积(mm^3)	抑瘤率(%)
GSPE 高浓度组	399.210 ± 23.744[a]	34.303
GSPE 低浓度组	433.898 ± 19.943[a]	28.594
空白对照组	607.653 ± 27.446	–

a:$P < 0.05$,与空白对照组比较

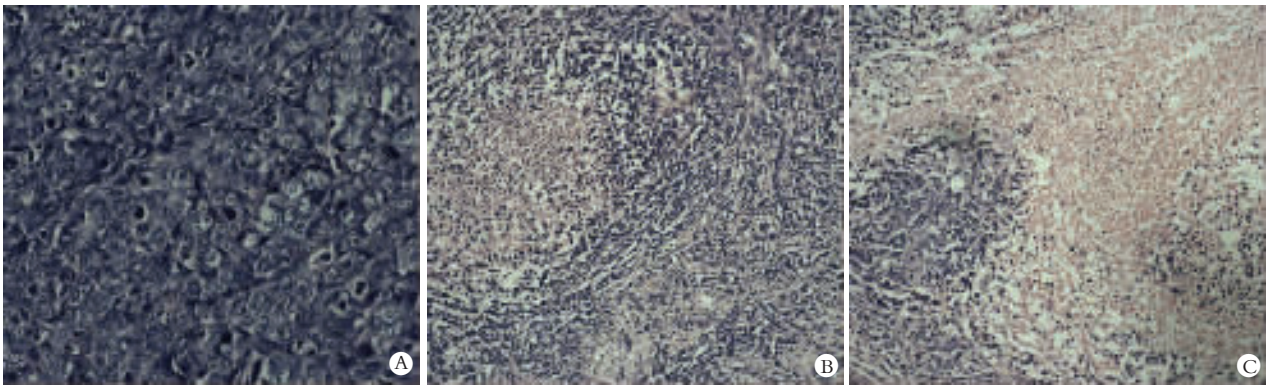
2.2　移植瘤光镜观察结果

空白对照组肿瘤细胞异形性明显(图 1A)。癌细胞大小和形态不一致,细胞染色较深,可见瘤巨细胞。癌细胞核体积增大,细胞核和细胞浆比例增大,核的大小、形状、染色不一,可见巨核、多级核。核仁肥大,核分裂相增多,可见病理性核分裂相,间质内淋巴细胞少见。GSPE 高、低浓度组内均可见癌细胞排列较规整,异型性不明显,病理性核分裂较少,癌巢内坏死面积增大,呈红染无结构组织,间质可见较多的淋巴细胞等炎细胞浸润,其中以 GSPE 高浓度组最为显著,细胞普遍发生变性坏死的现象(图 1B、C)。

2.3　GSPE 对移植瘤细胞周期和细胞凋亡的影响

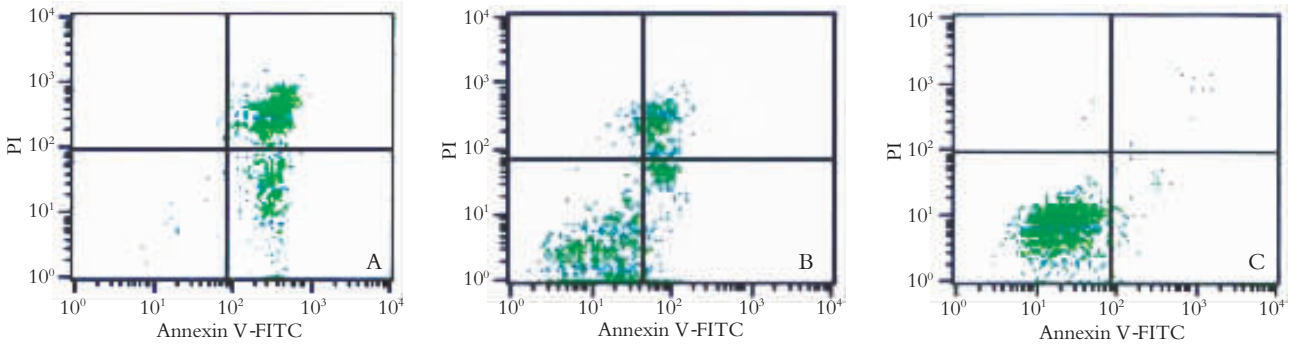
2.3.1　GSPE 干预对肿瘤细胞周期的影响　　与对照组比较,GSPE 处理组 S 期、G_0/G_1 期减少,而 G_2/M 期增多,差异均有显著性意义($P < 0.01$),细胞被阻滞在 G_2/M 期,随着 GSPE 浓度的增加,G_0/G_1 期细胞比例下降和 G_2/M 期细胞比例升高越明显(表 2),GSPE 处理组间差异有显著性($P < 0.01$)。

2.3.2　GSPE 诱导肿瘤细胞凋亡　　将各组肿瘤细胞用 Annexin-V 和 PI 染色后,FCM 分析细胞凋亡。结果表明,GSPE 高、低浓度组凋亡率分别为 67.965%、24.650%,空白对照组的凋亡率为 0.756%(图 2),与对照组相比,GSPE 处理组出现了较多凋亡和死亡的细胞,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



A:空白对照组(HE×200);B:GSPE 低浓度组(HE×100);C:GSPE 高浓度组(HE×100)

图1　各组肿瘤细胞的形态学改变

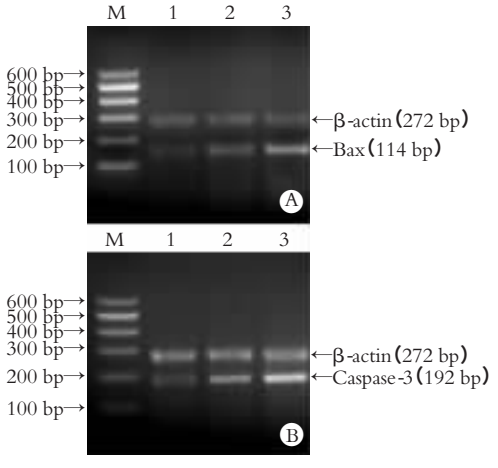


A:GSPE 高浓度组;B:GSPE 低浓度组;C:空白对照组

图2　各组肿瘤细胞的凋亡情况

2.4　GSPE 对 SKOV3 细胞凋亡基因表达的影响

2.4.1　RT-PCR 法检测凋亡基因的 mRNA 表达　治疗组的 SKOV3 细胞 Bax,Caspase-3 基因 mRNA 表达明显增高(图3),治疗组与对照组 Bax 和 Caspase-3 条带的积分光密度(Bax/β-actin 和 Caspase- 3/β-actin)标化后,GSPE 高、低浓度组分别为(1.248±0.019)、(1.082±0.001)、(1.254±0.043)、(0.972±0.044)。两种基因表达较对照组[(0.810±0.022),(0.675±0.006)]的差异有统计学意义($P<0.01$),同时随 GSPE 浓度升高,治疗组间基因表达差异有显著性($P<0.01$)。



M:DNA 标准;1:空白对照组;2:GSPE 低浓度组;3:GSPE 高浓度组

A:RT-PCR 检测 Bax 的表达;B:RT-PCR 检测 Caspase-3 的表达

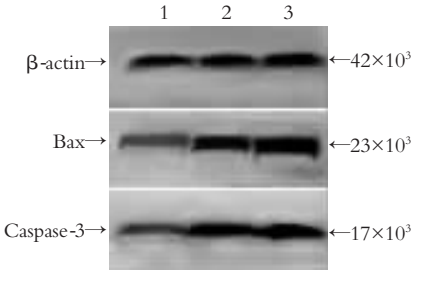
图3　各组肿瘤细胞凋亡基因的 mRNA 表达

表2　不同处理对肿瘤细胞周期分布的影响($n=8,\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1期	S 期	G_2/M 期
GSPE 高浓度组	70.820±2.679[ab]	8.312±1.550[ab]	0.950±1.076[ab]
GSPE 低浓度组	6.250±0.537[a]	5.065±0.375[a]	8.165±0.177[a]
空白对照组	50.918±1.226	11.438±1.045	38.230±0.721

a:$P<0.01$,与空白对照组比较;b:$P<0.01$,与 GSPE 低浓度组比较

2.4.2　Western blot 检测凋亡基因的蛋白表达　治疗组的 SKOV3 细胞 Bax 和 Caspase-3 基因蛋白表达明显增高(图4)。治疗组与对照组 Bax 和 Caspase-3 条带的积分光密度标化后,GSPE 高、低浓度组分别为(0.861±0.038)、(0.774±0.025)和(0.997±0.036)、(0.956±0.019)。两种基因表达较对照组[(0.585±0.019),(0.852±0.023)]的差异有统计学意义($P<0.01$),治疗组间基因表达差异有显著性($P<0.01$)。



1:空白对照组;2:GSPE 低浓度组;3:GSPE 高浓度组

图4　各组肿瘤细胞凋亡基因的蛋白表达

3　讨论

原花青素是广泛存在于多种植物中的一种酚类聚合物,尤以葡萄皮、葡萄籽中含量最多,具有很强的生理活性和药理作用,并可通过抗氧化,诱导和促进细胞凋亡,调节癌基因和抑癌基因的表达等多种途径对多种肿瘤细胞增殖凋亡产生影响[8]。

本课题组前期研究发现,GSPE 可在体外呈时间和剂量依赖性抑制卵巢癌 SKOV3 细胞增殖,诱导 SKOV3 细胞凋亡。同时通过 Western blot 和 RT-PCR 检测证实了 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及影响凋亡调节基因的表达有关[3]。这些都为研究 GSPE 对在体卵巢癌细胞的影响提供了可靠的实验室依据。

本实验观察到经 GSPE 处理后的瘤块体积、质量与对照组比较具有显著性差异,说明 GSPE 能明显抑制肿瘤的生长。Annexin V-FITC 细胞凋亡检测表明,治疗组与空白对照组的凋亡细胞率,治疗组之间的凋亡细胞率比较均具有显著性差异。说明 GSPE 能促进肿瘤细胞的凋亡,且随处理浓度增加这种凋亡促进作用更明显。HE 染色观察结果从形态学方面也证实了这一结论。FCM 法分析其增殖周期提示 GSPE 可能通过抑制 DNA 合成作用使细胞分裂被阻滞在 G_2/M 期,从而达到抑制肿瘤细胞增殖,诱发凋亡的作用。

在对 GSPE 引起肿瘤细胞凋亡的机制研究中,我们选取了 Bax 和 Caspase-3 基因来进行探讨。Bax 是 Bcl-2 基因家族中的凋亡促进因子。其促凋亡机制是直接激活死亡效应因子 Caspase 或是通过改变细胞膜通透性引起细胞色素 C 释放并使某些离子和小分子物质通过细胞膜[9]。Roy 等[10]研究 JB6 C141 细胞时发现,原花青素可以增加 Bax 蛋白表达,诱导细胞的凋亡。而 Caspase 蛋白的表达是各种细胞凋亡机制的最后共同通路。其中 Caspase-3 为凋亡信号传导途径中关键的执行分子。Caspase-3 正常以酶原(32×10^3)的形式存在于细胞质中,在凋亡的早期阶段,它被激活,活化的 Caspase-3 由两个大亚基(17×10^3)和 2 个小亚基(12×10^3)组成,裂解相应的细胞质、细胞核底物,最终导致细胞凋亡[11]。研究表明 GSPE 可通过激活 Caspase-3 启动细胞凋亡程序,诱导人宫颈癌[12],结肠直肠癌[13]等多种肿瘤细胞的凋亡。还可通过增加 Bax/Bcl 的比例,最终激活 Caspase-3,引起细胞凋亡,达到抗肿瘤的作用[14]。

本实验通过 RT-PCR 和 Western blot 来检测各处理组凋亡调节基因在 RNA 和蛋白水平上表达的改变。结果表明,治疗组肿瘤细胞 Bax 和 Caspase-3 基因表达增高,且在核酸和蛋白水平上具有一致性。同时药物浓度越高,基因表达增高越明显,显示 GSPE 能上调肿瘤组织中的凋亡因子的表达,从而抑制卵巢癌细胞增殖,且这种作用表现出剂量依赖效应。

综上所述,在动物实验中,GSPE 可以明显抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖并诱导其凋亡,其诱导凋亡的机制可能与激活卵巢癌细胞中 Bax,Caspase-3 的表达有关。但 GSPE 是通过同时影响 Bax 及 Caspase-3 途径,还是通过上调 Bax 进而激活 Caspase-3 途径起到促进细胞凋亡,抑制细胞增殖的作用,还需通过实验进一步研究和证实。

参考文献:

[1] Yap T A, Carden C P, Kaye S B. Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(3): 167 - 181.

[2] Mantena S K, Baliga M S, Katiyar S K. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells[J]. Carcinogenesis,2006, 27(8): 1682 - 1691.

[3] 池余刚,钟　玲,伍　霞,等. 原花青素对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报,2008, 30(23): 2203 - 2206.

[4] 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.

[5] 杜　宏,张　娜,高　霞,等. 莲房原花青素对人肝癌细胞 HepG2 生长及凋亡的作用[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(6): 891 - 893.

[6] 徐　梅,吴　强,朱孝荣,等. 人卵巢癌细胞株荷皮下瘤裸鼠模型的建立[J]. 江苏医药, 2005, 31(9): 714.

[7] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,2007: 53.

[8] He F, Pan Q H, Shi Y, *et al*. Chemical synthesis of proanthocyanidins *in vitro* and their reactions in aging wines[J]. Molecules, 2008, 13(12): 3007 - 3032.

[9] Sharpe J C, Arnoult D, Youle R J. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1644(2 - 3): 107 - 113.

[10] Roy A M, Baliga M S, Elmets C A, *et al*. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis through p53, Bax, and caspase 3 pathways[J]. Neoplasia, 2005, 7(1): 24 - 36.

[11] Aquino-Esperanza J A, Aguirre M V, Aispuru G R, *et al*. *In vivo* 5-fluorouracil-[corrected]induced apoptosis on murine thymocytes: involvement of FAS, Bax and Caspase3[J]. Cell Biol Toxicol, 2008, 24(5): 411 - 422.

[12] 黄雪坤,李光仪. 原花青素对宫颈癌 Hela 细胞 livin 和 caspase-3 基因表达的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(19): 2349 - 2353.

[13] 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.

[14] Ruvolo P P, Deng X, May W S. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis[J]. Leukemia, 2001, 15(4): 515 - 522.

(编辑　栾　嘉)