论著

文章编号:1000-5404(2014)16-1674-05

3,3′-二吲哚甲烷阻断STAT3通路影响卵巢癌细胞增殖、凋亡的实验研究

徐长华,邹明花,张献全 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肿瘤科)

[摘要] **目的** 观测3,3′-二吲哚甲烷(3,3′-Diindolylmethane,DIM)对体外培养的人卵巢癌细胞SKOV3、A2780增殖、凋亡的影响,并观察信号转导和转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3,STAT3)、p-STAT3及凋亡相关蛋白在凋亡过程中的变化,探讨STAT3信号通路在DIM抑制卵巢癌细胞增殖、诱导其凋亡中的作用。**方法** 采用MTT法检测不同浓度(50、100、200、400 μmol/L)的DIM在不同的时间点(24、48、72、96 h)对SKOV3、A2780细胞增殖的影响;倒置显微镜、Hoechst33342染色观察细胞形态的变化;流式细胞术检测DIM对SKOV3、A2780细胞凋亡率和细胞周期的影响;Western blot检测DIM对STAT3、p-STAT3、caspase3、mcl-1、survivin蛋白表达的影响。**结果** DIM对SKOV3、A2780细胞的增殖具有明显的抑制作用,与对照组相比具有显著性差异($P<0.05$或$P<0.01$),并呈现时间和剂量依赖性。分别以100、150 μmol/L DIM作用于SKOV3细胞48 h后,凋亡率分别为(16.41±3.58)%和(31.58±12.35)%,对照组的凋亡率为(5.16±2.07)%,3组间差异有统计学意义($P<0.05$)。75 μmol/L DIM作用于A2780细胞24 h后,G_1、G_2期细胞比例增加,S期细胞比例降低。DIM能上调caspase-3蛋白表达($P<0.05$),下调mcl-1、survivin及p-STAT3蛋白的表达($P<0.05$),但对STAT3总蛋白的表达则无明显影响。**结论** DIM能显著抑制卵巢癌SKOV3、A2780细胞的增殖、诱导其凋亡。上述作用可能是通过抑制STAT3的活化,进而下调mcl-1、survivin蛋白的表达并上调caspase-3蛋白表达而起作用的,DIM有可能成为一种有效的抗卵巢癌药物。

[关键词] 3,3′-二吲哚甲烷;人卵巢癌细胞;增殖;凋亡;信号传导和转录活化因子3

[中图法分类号] R73-361;R737.31;R979.1 [文献标志码] A

3,3′-Diindolylmethane affects proliferation and apoptosis in human ovarian cancer cells by blocking STAT3 signal pathway

Xu Changhua, Zou Minghua, Zhang Xianquan (Department of Oncology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To evaluate the effects of 3,3′-diindolylmethane (DIM) on the proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cell lines SKOV3 and A2780, study the expression of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), p-STAT3 and the proteins related to apoptosis, and determine the role of STAT3 pathway in the antitumor activity of DIM. **Methods** MTT assay was used to examine the effects of DIM at different concentrations (50, 100, 200, and 400 μmol/L) and for different time periods (24, 48, 72 and 96 h) on the proliferation of SKOV3 and A2780 cells. Inversion phase contrast microscopy and Hoechst 33342 staining was used to observe the apoptosis changes of cell morphology. Flow cytometry was used to analyze the apoptotic rate and cell cycle. Western blotting was used to detect the protein levels of STAT3, p-STAT3, caspase-3, mcl-1, and survivin in SKOV3 cells treated with DIM of different concentrations. **Results** Compared with the control group, DIM could significantly inhibit the proliferation of SKOV3 and A2780 cells in time- and dose-dependent manners ($P<0.05$ or $P<0.01$). The apoptotic rate in SKOV3 cells was (5.16±2.07)%, (16.41±3.58)%, and (31.58±12.35)% 48h after treatment by 0, 100 and 150 μmol/L DIM, respectively. Cell cycle analysis indicated that the percentage of A2780 cells in G_1/G_2 phase was increased and that in S phase was decreased after 75 μmol/L DIM treatment for 24 h. DIM also

[基金项目] 重庆市科技攻关项目(CSTC2012gg-yyis10002)

[通信作者] 张献全,电话:023-63693309,E-mail: xqzhng@hotmail.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140513.0854.008.html(2014-05-13)

up-regulated the expression of caspase 3 protein ($P < 0.05$) and down-regulated the expression of mcl-1, survivin and p-STAT3 protein ($P < 0.05$). However, there was no change in the level of total STAT3 protein expression after the DIM treatment. **Conclusion** DIM can effectively inhibit the proliferation and induce the apoptosis in SKOV3 and A2780 cells. The DIM-induced apoptosis may be related to the inhibition of STAT3 activity and then the expression down-regulation of mcl-1 and survivin as well as up-regulation of caspase 3. DIM might be used as a preventive and therapeutic agent against human ovarian cancer.

[**Key words**] 3, 3′-diindolylmethane; human ovarian cancer; proliferation; apoptosis; signal transducer and activator of transcription 3

Supported by the Tackling Project of Science and Technology Development of Chongqing (CSTC2012gg-yyis 10002). Corresponding author: Zhang Xianquan, Tel:86-23-63693309, E-mail: xqzhng@hotmail.com

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,且发病隐匿,易复发、转移[1]。手术和以铂类为基础的化疗仍是卵巢癌治疗的基础,虽然能提高患者的生存率,但仍有部分患者复发转移,特别是全身化疗引起的骨髓抑制、肾功能损害等并发症,严重影响了患者的生活质量,因此,寻求预防和治疗卵巢癌的有效低毒药物具有重要意义[2]。

吲哚-3-甲醇(indole-3-carbinol, I3C)广泛存在于花茎甘蓝等十字花科蔬菜中,是一种重要的抗肿瘤成分[3]。研究证明 I3C 在体外和体内能通过抑制致癌物-DNA 加合物形成[4]、细胞 G_1 期阻滞[5]、诱发细胞凋亡、影响 DNA 修复、抗血管生成、抑制某些雌激素依赖性的肿瘤,进而发挥抗肿瘤作用。3,3′-二吲哚甲烷(3,3′-Diindolylmethane, DIM)是 I3C 经胃酸消化后产生的重要的吲哚类衍生物,其抗肿瘤能力提高,并且可在酸性环境下稳定存在。近年的研究发现,DIM 具有抗乳腺癌、宫颈癌[6]等肿瘤作用,且对正常细胞影响很弱,但 DIM 对卵巢癌细胞增殖和凋亡的影响研究尚少,其机制也尚未阐明。因此,本研究将以人卵巢癌细胞株 SKOV3、A2780 为研究对象,观察 DIM 对卵巢癌细胞的抑制效应,并通过检测凋亡相关蛋白及信号转导和转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、STAT3(phospho Y705)来探讨其分子机制,为卵巢癌的治疗提供新的途径和方法。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

RPMI1640 培养基、胎牛血清及 0.25% 胰蛋白酶均为 Gibco 公司产品。兔抗人 caspase-3、β-actin 单克隆抗体、兔抗人 STAT3、STAT3(phospho Y705)多克隆抗体购于 Abcam 公司,兔抗人 survivin 单克隆抗体、鼠抗人 Mcl-1 单克隆抗体购于 Santa 公司。二抗山羊抗兔、二抗山羊抗鼠由 Abcam 公司惠赠。3,3′-二吲哚甲烷购于 Sigma 公司,凋亡试剂盒、Hoechst33342 染色试剂盒及 MTT 购于碧云天公司。其余试剂均为国产试剂纯。

1.2 细胞培养

人卵巢癌 SKOV3、A2780 细胞购于复旦大学细胞库。细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,置于 37 ℃, 5% CO_2 培养箱,定期换液、传代。

1.3 MTT 检测细胞增殖活性

将处于对数生长期的细胞制成细胞悬液,按 5×10^3/孔将细胞接种于 96 孔板,培养 24 h 后,分不同浓度 DIM 组: 50、100、200、400 μmol/L,每组设 3 个复孔。并留置 3 个未加药孔作为对照组,3 个无细胞空白孔作为调零组。继续培养 24、48、72、96 h,每孔加入 20 μL 5 g/L 的 MTT,于培养箱中孵育 4 h,吸去上清,每孔加入 150 μL DMSO,充分振荡,酶标仪检测各孔 492 nm 处的光密度吸收值[D(492)],按公式"抑制率 = 1 - [实验组 D(492)值 - 调零孔 D(492)值]/[对照组 D(492)值 - 调零孔 D(492)值]" 计算各组抑制率。

1.4 形态学观察

将 3×10^5 SKOV3 细胞接种于 6 孔板内,贴壁后分别用含终浓度 0、75、150 μmol/L DIM 的培养液处理 24、48、72 h,倒置显微镜观察细胞的生长状况。2×10^5 细胞接种于预置盖玻片的 6 孔板中,爬片成功后加入含终浓度 0、75、150 μmol/L DIM 的培养液处理 24 h 后,Hoechst33342 染色,荧光显微镜观察细胞核形态变化并拍照。

1.5 细胞凋亡检测

将处于对数生长期的细胞制成细胞悬液接种于 6 孔板中,使给药前密度达 70% ~ 80%,加不同浓度的 DIM(0、100、150 μmol/L),培养 48 h 后收集细胞。PBS 洗 3 次,胰酶消化细胞,离心后弃上清,沉淀用 PBS 重复洗两次,然后加入 1 mL PBS 重悬。分别加入 195 μL Annexin V-FITC 结合液制成细胞悬液,然后再加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,室温下避光,流式细胞仪检测分析。

1.6 细胞周期检测

另将经 75 μmol/L DIM 干预 24 h 的 A2780 细胞用 PBS 洗 2 次,75% 乙醇固定,4 ℃储存至少 24 h,分析前离心,PBS 漂洗后制成 0.5 mL 细胞悬液,含有 5 mg/L RNAase 酶 37 ℃水浴

30 min,PI 染色(25 mg/L),4 ℃ 黑暗保存 45 min,流式细胞仪分析细胞周期。

1.7 Western blot 检测

经 0、50、100、150、200 μmol/L DIM 处理 SKVO3 细胞 24 h 后,RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后并调整蛋白浓度一致,聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上,室温封闭 1 h,洗膜后,加入一抗,4 ℃过夜,TBST 洗 3 次,加相应二抗孵育 1 h,ECL 法显影。内参选用 β-actin 抗体。用 Quantity One 图像分析软件对条带进行分析。

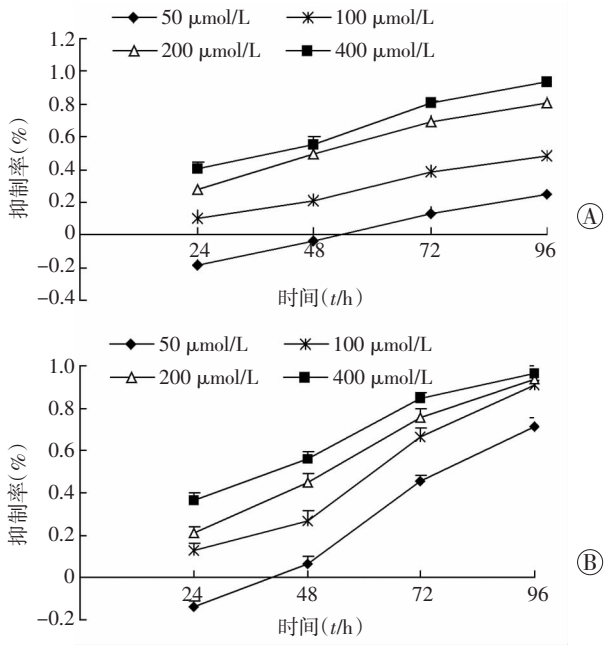
1.8 统计学分析

以上实验均重复 3 次。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 统计软件,生长抑制率采用双因素方差分析,凋亡率、蛋白表达量采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 DIM 对卵巢癌 SKOV3、A2780 细胞生长的影响

细胞培养 24 h 即可观察到在 DIM 高浓度组(≥100 μmol/L)卵巢癌细胞活力降低。但 DIM 在浓度≤50 μmol/L, 处理 24 h 时对 SKOV3 生长起促进作用,而浓度在≥100 μmol/L,对 SKOV3 细胞有明显抑制作用,并且呈浓度及时间依赖性。DIM 对 A2780 细胞也有类似作用。MTT 法测得在不同时间不同浓度 DIM 对两种人卵巢癌细胞株抑制作用的量效曲线。结果如图 1。



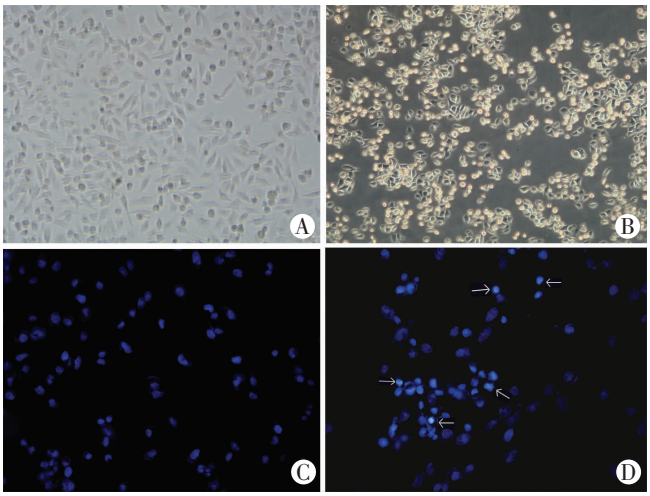
A:DIM 对 SKOV3 细胞作用的量效曲线;B:DIM 对 A2780 细胞作用的量效曲线

图 1 MTT 法检测不同浓度 DIM 对卵巢癌细胞增殖的影响

2.2 DIM 对卵巢癌细胞形态学的影响

倒置显微镜下,对照组 SKOV3 细胞贴壁生长,扁平多角形,胞质饱满,近中央处有圆形的细胞核,呈“铺路石”状生长,生长迅速(图 2A);DIM 浓度高于 100 μmol/L 组细胞生长明显减慢,贴壁细胞由多角形变为圆形,体积缩小,连接松散,且核染色加深(图 2B)。

Hoechst33342 染色后,对照组细胞核着均匀的淡蓝色荧光,(图 2C);DIM 浓度高于 100 μmol/L 组细胞核明显皱缩、变圆,有典型的细胞凋亡核特征即核凝聚并出现凋亡小体(图 2D)。



A:对照组(倒置显微镜);B:150 μmol/L DIM 处理 24 h(倒置显微镜);C:对照组(Hoechst33342 染色);D:150 μmol/L DIM 处理 24 h(Hoechst33342 染色) ↑:示凋亡小体

图 2 DIM 处理 SKOV3 细胞后形态学变化 (×100)

2.3 DIM 对 SKOV3 细胞凋亡率的影响

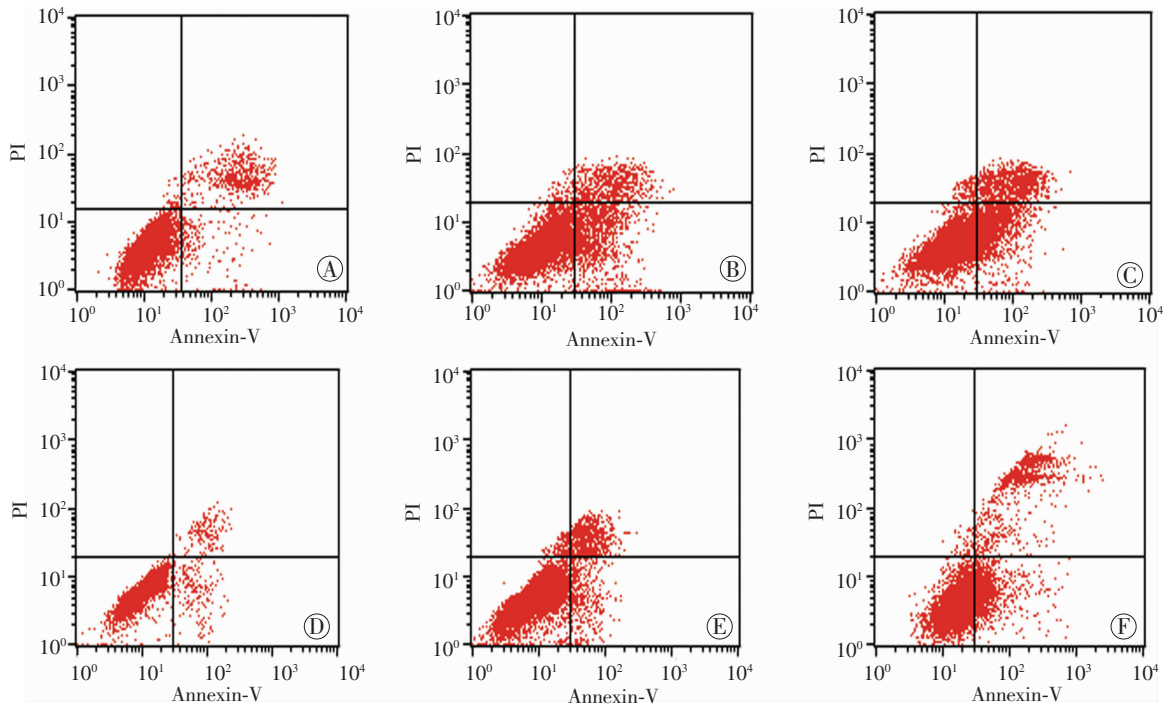
随着 DIM 浓度的增加,卵巢癌细胞呈现以下分布趋势:活细胞的数量逐渐减少;早期凋亡细胞数量逐渐增多;部分凋亡的细胞核膜破裂,进入晚期凋亡期,凋亡的数量也逐渐增多。100、150 μmol/L DIM 作用于 SKOV3 细胞 48 h 后,凋亡率分别为(16.41 ± 3.58)% 和(31.58 ± 12.35)%,对照组凋亡率为(5.16 ± 2.07)%,3 组间差异有统计学意义($P < 0.05$),50、100 μmol/L DIM 作用于 A2780 细胞 48 h 后,凋亡率分别为(13.93 ± 3.06)% 和(23.81 ± 4.49)%,对照组的凋亡率为(4.91 ± 2.56)%,3 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。如图 3。

2.4 DIM 对 A2780 细胞周期的影响

用 75 μmol/L DIM 作用于 A2780 细胞后 24 h,流式细胞仪分析表明,S 期细胞明显减少,G_1、G_2期细胞明显增多。和对照组比较有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

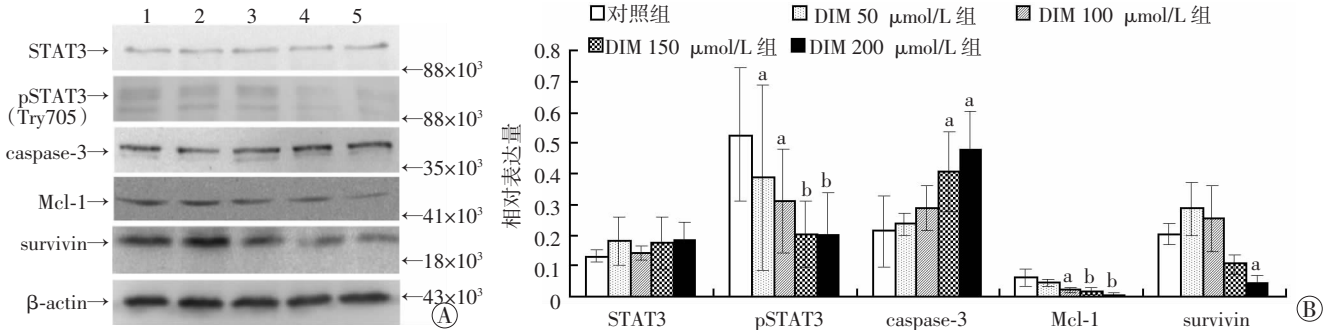
2.5 DIM 对卵巢癌 SKOV3 细胞 STAT3、p-STAT3、caspase-3、mcl-1、survivin 蛋白表达的影响

SKOV3 细胞经不同浓度 DIM 作用 24 h 后,STAT3 随 DIM 浓度的增高表达量无明显变化($P > 0.05$)。p-STAT3(Try705)随 DIM 浓度的增高表达量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。当 DIM 浓度≥100 μmol/L 时,caspase-3 明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。mcl-1 随 DIM 浓度的增高表达量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。当 DIM 浓度较低(≤50 μmol/L)时,survivin 表达量略有升高,差异无统计学意义($P = 0.148$);而当 DIM 浓度进一步升高时,survivin 逐渐下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。如图 4。



A:SKVO3 细胞对照组;B:100 μmol/L DIM 作用于 SKOV3 细胞;C:150 μmol/L DIM 作用于 SKOV3 细胞;D :A2780 细胞对照组;E:50 μmol/L DIM 作用于 A2780 细胞;F:100 μmol/L DIM 作用于 A2780 细胞

图 3 不同浓度 DIM 处理 SKOV3、A2780 细胞 48 h 后流式细胞仪检测结果



1:对照组;2 :DIM 50 μmol/L 组;3:DIM 100 μmol/L 组;4:DIM 150 μmol/L 组;5:DIM 200 μmol/L 组;A :Western blot 检测结果;B: 半定量分析结果 a :$P<0.05$,与对照组(DIM 0 μmol/L)比较;b:$P<0.01$,与对照组(DIM 0 μmol/L)比较

图 4 Western blot 检测 DIM 对 SKOV3 细胞 STAT3、p-STAT3、caspase3、Mcl-1、survivin 蛋白表达影响

表 1 DIM 对 A2780 细胞周期的影响(%)

组别	G_1	S	G_2
对照组	47.18 ± 12.21	35.66 ± 8.20	17.18 ± 7.69
75 μmol/L DIM 组	61.41 ± 13.15[a]	14.25 ± 2.69[a]	24.34 ± 10.48

a: $P<0.05$,与对照组(DIM 0 μmol/L)比较

3 讨论

本研究显示,当 DIM 的浓度达到 100 μmol/L 以上时,其能够有效抑制卵巢癌 SKOV3、A2780 细胞的增殖,随着 DIM 浓度的不断增加,其抑制卵巢癌细胞增殖的效应也逐渐增强,呈现一定的浓度相关性,此与 Kandala 等[7]的报道类似,提示 DIM 具有治疗卵巢癌的前景。当以 200 μmol/L 的 DIM 处理卵巢癌细胞24 h,细胞存活率均大于 50%,故我们选用低于 200 μmol/L 的浓度处理细胞进行后续实验,观察药物作用后细胞的生物学功能变化情况。本实验中发现 DIM 对 SKOV3 细胞株与 A2780 细胞抑制作用存在明显差异,对 A2780 的作用强于 SKOV3,这可能与不同细胞生物学特性不同有关。本研究还显示低浓度长时间[如(100 ~ 200) μmol/L DIM 作用于卵巢癌细胞 72 h 以上]也可以达到较高的抑制率,为临床维持治疗提供理论基础。形态学观察可见,经 DIM 作用后,SKOV3 细胞出现体积缩小、细胞间连接消失、核质浓缩、核边集及核碎裂

等凋亡征象。在实验过程中,未见到大片脱壁、肿胀漂浮的死细胞,表明 DIM 抗肿瘤不是以细胞毒作用为主,而是诱导肿瘤细胞凋亡。流式细胞术也证实了这一点:处理 24 h 后,卵巢癌细胞凋亡率随药物浓度的增高而增高。细胞周期研究显示,随着 DIM 浓度的增高,G_1期细胞比例增高,S 期细胞比例降低,说明 DIM 可以调节 G_1/S 转换,使肿瘤细胞发生 G_0/G_1期阻滞,抑制肿瘤细胞的增殖,导致卵巢癌细胞发生凋亡。

STAT3 信号通路参与多种细胞增殖、分化和凋亡的调控[8],其激活后表现为磷酸化即 p-STAT3(Tyr705),近年的研究提示 STAT3 在卵巢癌中表达明显增高[9]。本研究显示,DIM 处理卵巢癌细胞后,伴随卵巢癌细胞增殖的受抑制和凋亡的增加,p-STAT3 在 SKOV3 卵巢癌细胞中的表达也显著降低,而总 STAT3 则无明显变化,提示 DIM 是通过减少 STAT3 的活化而起作用的,JAK2/STAT3 信号通路是 DIM 抑制卵巢癌细胞增殖的一条重要途径。

survivin 和 Mcl-1 都是凋亡抑制基因。Mcl-1 是 Bcl-2 家族中的成员,Bhattacharya 等[10]的研究证实其受到 STAT3 信号转导通路的调控,抑制 STAT3 的激活可以引起肿瘤细胞中 Mcl-1 的表达下降。Survivin 是凋亡抑制蛋白(IAPs)家族中的一员,主要通过与以 caspase-3 为代表的天冬氨酸特异性的半胱氨酸酶(caspase)直接或间接作用以实现对细胞凋亡的抑制,同时参与对细胞周期的调控[11]。Gritsko 等[12]证实 STAT3 可以直接作用于 survivin 启动子并调控其基因的表达。由于 Survivin mRNA 在 G_2/M 期呈特异性表达,G_1期几乎不表达,这种表达调控主要发生在转录水平[13]。本研究显示,高于 100 μmol/L 的 DIM 作用于卵巢癌细胞后显著抑制了 p-STAT3 及 Mcl-1、Survivin 蛋白的表达,并促进了 caspase-3 蛋白的表达,导致了卵巢癌细胞的凋亡及细胞周期阻滞于 G_1期。提示 DIM 可能是通过阻断 JAK/STAT3 信号通路下调 Mcl-1、Survivin 等蛋白的表达并上调 caspase-3 蛋白表达,进而促进卵巢癌细胞凋亡并导致了周期阻滞。对于本研究中出现的 50 μmol/L DIM 作用于 SKOV3 细胞 24 h 后 Survivin 表达略有升高,其具体机制尚不明确,可能是细胞在凋亡早期的一种代偿机制。

总之,本研究结果显示 DIM 能够抑制卵巢癌 SKOV3、A2780 细胞的增殖,且抑制作用呈剂量和时间依赖性。DIM 对卵巢癌细胞的增殖抑制作用可能与其诱导细胞凋亡及细胞周期阻滞有关。并且对不同细胞效果存在一定的差异。其通过抑制 STAT3 的活化下调 Mcl-1、Survivin 蛋白的表达,上调 caspase-3 蛋白表达水平起作用。提示 STAT3 信号通路是 DIM 作用于卵巢癌细胞增殖、凋亡的重要通路,为 DIM 在临床的应用提供了一定的理论基础。

参考文献:

[1] Gu L, Feng J, Xu H, *et al*. Polyphyllin I inhibits proliferation and metastasis of ovarian cancer cell line HO-8910PM *in vitro*[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(3): 325-333.

[2] Cho S H, Park M H, Lee H P, *et al*. (E)-2, 4-Bis (p-hydroxyphenyl)-2-butenal enhanced TRAIL-induced apoptosis in ovarian cancer cells through downregulation of NF-κB/STAT3 pathway[J]. Arch Pharm Res, 2014, 37(5): 652-661.

[3] Sarkar F H, Li Y, Wang Z, *et al*. Cellular signaling perturbation by natural products[J]. Cell Signal, 2009, 21(11): 1541-1547.

[4] 戈畅, 樊赛军. 吲哚-3-甲醇(I3C)抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国肺癌杂志, 2009, 12(9): 1044-1046.

[5] Raj M H, Abd-Elmageed Z Y, Zhou J, *et al*. Synergistic action of dietary phyto-antioxidants on survival and proliferation of ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2008, 110(3): 432-438.

[6] 李源, 朱俊勇, 陈祖华, 等. 3, 3'-二吲哚甲烷对宫颈癌 SiHa 细胞增殖抑制的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(9): 775-779.

[7] Kandala P K, Srivastava S K. Diindolylmethane suppresses ovarian cancer growth and potentiates the effect of cisplatin in tumor mouse model by targeting signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)[J]. BMC Med, 2012, 10: 9.

[8] 王晓飞, 郭变琴, 张曦文, 等. 联氨基姜黄素抑制 STAT3 信号通路对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞侵袭迁移性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(2): 111-115.

[9] Fujiwara Y, Takaishi K, Nakao J, *et al*. Corosolic acid enhances the antitumor effects of chemotherapy on epithelial ovarian cancer by inhibiting signal transducer and activator of transcription 3 signaling[J]. Oncol Lett, 2013, 6(6): 1619-1623.

[10] Bhattacharya S, Ray R, Johnson L R. STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells[J]. Biochem J, 2005, 392(Pt 2): 335-344.

[11] 余畅, 邓华瑜. JAK 抑制剂 AG490 诱导乳腺癌细胞凋亡及对 Survivin 表达的影响[J]. 癌症, 2006, 25(10): 1227-1231.

[12] Gritsko T, Williams A, Turkson J, *et al*. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(1): 11-19.

[13] O'Connor D S, Wall N R, Porter A C, *et al*. A $p34^{cdc2}$ survival checkpoint in cancer[J]. Cancer Cell, 2002, 2(1): 43-54.

(**收稿**:2014-01-10;**修回**:2014-03-05)

(编辑 王 红)