肿瘤分子学相关研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0826-04

葡萄籽提取物诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡及其机制的探讨

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(Grape seed extract,GSE)对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响及其机制。方法:体外培养的 SKOV3 细胞与 25、50、100、200、400 μg/ml 的 GSE 共孵育,分别在 24、48 和 72 h 时观察细胞形态学变化,MTT 检测细胞增殖抑制率,流式细胞仪和 Tunel 分析细胞凋亡,Western-blot 检测 SKOV3 细胞 Caspase-3 在蛋白水平的表达。结果:不同浓度(25、50、100、200、400 μg/ml)GSE 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%和 77.39%。流式细胞和 TUNEL 检测经 25 μg/mlGSE 处理 24、48 h 后,SKOV3 细胞凋亡率分别为:31.98%、45.78%。GSE 还可以明显增强 Caspase-3 蛋白的表达水平。这些作用均随 GSE 浓度和作用时间的延长而增强。结论:GSE 可在体外抑制 SKOV3 细胞增殖,诱导其凋亡。其机制可能与激活 Caspase 途径有关。

【关键词】卵巢癌;葡萄籽提取物;细胞增殖;细胞凋亡;Caspase-3
【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-02-25

Apoptosis-inducing effect of grape seed proanthocyanidin extract on human ovary cancer SKOV3 cells and its mechanism

CHI Yu-gang, et al
(*Department of Obsterics and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the biological effects of grape seed extract (GSE) on the human ovary cancer cells and explore its molecular mechanism. *Methods*: Human ovary cancer cells line SKOV3 were cultured. They were put into 96-well plate and added with solutions of GSE of the terminal concentrations of 25, 50, 100, 200, 400 μg/ml respectively, and 24, 48, 72 hours later cell growth curve was drawn. MTT assay was used for other SKOV3 cells co-incubated with GSE of the terminal concentration of 25, 50, 100, 200, 400 μg/ml respectively so as to calculate the proliferation inhibition rate. SKOV3 cells were treated with GSE of the concentration of 25 μg/ml for 24, 48 hours respectively. Flowcytometry (FCM) was used to analyze the DNA cycle and TUNEL was used to calculate the apoptotic rate. Annexin-V labeling method was used to detect the positive rate of apoptotic cells. SKOV3 cells were treated with GSE of the concentration of 25 μg/ml for 24, 48, 72 hours. Western blotting was used to detect the protein expression of caspase-3. *Results*: GSE dose-dependently inhibited the proliferation of the SKOV3 cells in a dose-dependent manner. Treated by GSE, the progress of cells at stage into G_2/M stage was inhibited. Tunel showed that treated by GSE (25 μg/ml) for 24, 48 h the apoptotic rates of the cells were 31.98% and 45.78%, respectively. Annexin-V showed that after incubation with GSE (25 μg/ml) for 12, 24, 48 h, the apoptotic rate were 6.71%, 19.05%, 36.55%, respectively. Western blotting showed that the caspase-3 protein expression were up-regulated. *Conlusion*: GSE inhibits the proliferation of malignant human ovary cancer cells and induces their apoptosis. Expression of caspase-3 protein may be related to cell growth inhibition and the apoptosis mediated by GSE in vitro.

【Key words】Ovary cancers; Grape seed extract; Cells proliferation; Cells apoptosis; Caspase-3

葡萄籽提取物(Grape seed extract,GSE)中含有包括原花青素(Proanthocyan-idin,PC)在内的多种活性物质[1]。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]。而且可以拮抗化疗药物对正常细胞的毒性作用[3],这个特性是其它抗肿瘤药物无法比拟的。因此 GSE 在抗肿瘤治疗方面有着巨大的潜力,但对卵巢癌细胞的作用少见报道。本文利

作者介绍:池余刚(1982-),男,硕士,
研究方向:妇科肿瘤。
通讯作者:钟 玲,女,主任医师,E-mail:zhong9ling@hotmail.com。

用体外培养法系统研究了 GSE 对 SKOV3 细胞增殖能力和细胞存活量的影响，为葡萄籽在人类癌症治疗中的更广泛应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

GSE 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；Western-blot 试剂盒购买于碧云天试剂公司；Annexin V-FITC 购于晶美生物工程有限公司；TUNEL 试剂盒购于 promega 公司；caspase-3 抗体（cpp32）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医学研究所提供。

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 RPMI 1640 培养液，于 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养，48 h 换液 1 次，以 1:3 的比例传代。

1.2.2 细胞形态观察 取对数生长期细胞，调整细胞数为 1×10^5 个 /ml 接种于 24 孔板。培养过夜后吸去培养液，分别加入 RPMI 1640 配制的 25、50、100、200、400 μg/mlGSE，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 个 /ml 接种于 96 孔板，0.2 ml/ 孔，培养 24 h 后，分别加入含 10%标准胎牛血清 RPMI1640 配制的浓度为 25、50、100、200、400 μg/ml PC 0.2 ml/ 孔，各 3 孔，为实验组；对照组 3 孔加入 RPMI 1640，0.2 ml/ 孔。分别于培养 24、48、72 h 后弃上清，加入不含血清的 RPMI 1640 培养液 0.2 ml 并加入 5 mg/ml 的 MTT 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 D_{490} 值。

细胞增殖抑制率%=1-（实验孔 D_{490} 值 - 空白孔 D_{490} 值）/（对照孔 D_{490} 值 - 空白孔 D_{490} 值）× 100%

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期 调整细胞数至 5×10^5 个 /ml，接种于 6 孔板中，2.5 ml/ 孔。培养过夜换含 25 μg/ml PC 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 个/ml，PI 染液避光染色 30 min，200 目尼龙网过滤，上流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.2.5 Annxin-V 和 PI 染色检测细胞凋亡 调整单细胞浓度 0.5×10^6 个 /ml，接种于上述制备好的脱落培养皿内，实验组加入 25 μg/ml 的 GSE，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，流式细胞仪检测早期凋亡细胞。

1.2.6 GSE 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（TUNEL 法）书进行。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 Western-blot 检测 GSE 对 SKOV3 细胞 Caspase-3 表达水平的影响 GSE（25 μg/ml）处理 SKOV3 细胞 24、48、72 h 后，同时设空白对照组。以 β-actin 内参，Quantity One 图像分析软件分析，保存结果。

1.3 统计学处理

采用卡方检验，配对 t 检验，方差分析，应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SKOV3 细胞形态变化

GSE（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，贴壁能力下降，开始出现悬浮细胞。72 h 后几乎所有细胞均呈圆形，细胞质中颗粒明显增多，可见细胞碎片存在，细胞轮廓模糊，出现大量悬浮细胞；而对照组细胞贴壁牢，多呈梭形分支状，胞质中颗粒很少。

2.2 SKOV3 细胞增殖抑制情况

随着 GSE 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）。

表 1 GSE 对 SKOV3 细胞的增殖率的影响

药物浓度	24 h		48 h		72 h	
（25 μg/ml）	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
CK	0.498 ± 0.081		0.630 ± 0.028		0.710 ± 0.023	
25	0.402 ± 0.048	0.193	0.327 ± 0.024	0.487*	0.290 ± 0.012	0.582**
50	0.327 ± 0.058	0.343*	0.294 ± 0.028	0.538**	0.260 ± 0.015	0.624**
100	0.292 ± 0.039	0.514**	0.261 ± 0.021	0.670**	0.200 ± 0.023	0.770**
200	0.206 ± 0.015	0.586**	0.167 ± 0.023	0.738**	0.130 ± 0.007	0.806**
400	0.178 ± 0.029	0.643**	0.144 ± 0.014	0.774**	0.090 ± 0.009	0.864**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$，与空白组比较

2.3　GSE 处理 SKOV3 对细胞周期影响

GSE（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）。

2.4　GSE 诱导 SKOV3 细胞凋亡

将上述 GSE 作用 24、48 h 的细胞用 Annexin-V 和 PI 染色后，流式细胞术（Flowcytome-try，FCM）分析细胞凋亡。结果表明，在 GSE（25 μg/ml）与 SKOV3细胞共孵育 12、24、48 h 后凋亡率分别为6.71%，19.05%，36.55%空白对照组的凋亡率为：0.61%，0.94%，1.22%。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）（图 1）。GSE（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）。

2.5　免疫印迹检测 SKOV3 细胞 Caspase-3 蛋白的表达

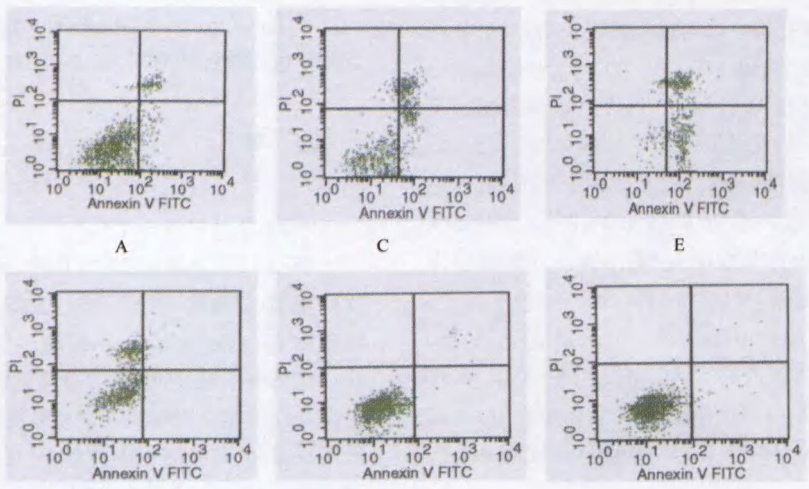
GSE 介导 SKOV3 细胞凋亡基因 Caspase-3 蛋白表达上调（如图 3）。经过 Quantity One 图像分析软件重复 10 次进行灰度值测定，实验组与对照组差异具有统计学意义（P<0.05）（图 3）。

3　讨　论

卵巢癌诊治的现状仍不容乐观，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/效比的基础上，提高卵巢癌患者的生存率和生活质量，仍是我们今后需要深入研究的重点。目前大约有 2 000 多种天然和合成的化学物质在特定临床前研究中表现出化学预防作用[3]。多年来人们对从众多不同植物中提取出的 PC 进行了大量研究。GSE 得到了最为深入和广泛的关注。GSE 具有多种生物活性，致突试验、致畸试验和长期毒性试验均

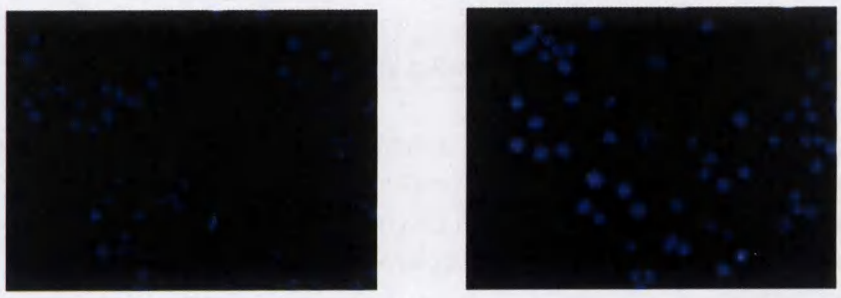
表 2　25 μg/ml GSE 处理 SKOV3 后对细胞周期分布情况的影响

细胞周期比率	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



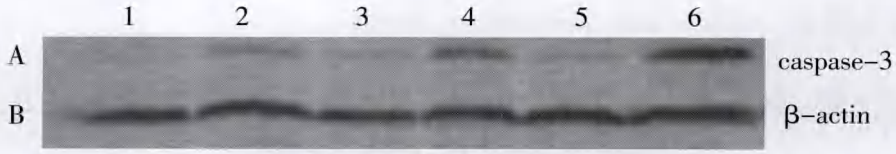
A. GSE 处理 SKOV3 细胞 12 h；B. SKOV3 空白对照培养 12 h；C. GSE 处理 SKOV3 细胞 24 h；D. SKOV3 空白对照培养 24 h；E. GSE 处理 SKOV3 细胞 48 h；F. SKOV3 空白对照培养 48 h

图 1　膜联蛋白 V 检测 GSE（25 μg/ml）处理 SKOV3 诱导细胞凋亡



A. GSE（25 μg/ml）处理 SKOV3 细胞 48 h，绿色荧光代凋亡细胞，蓝色荧光代表活细胞；B. SKOV3 细胞空白对照组培养 48 h，仅见蓝色荧光

图 2　TUNEL 检测 GSE 对 SKOV3 细胞凋亡的影响



A 组分别为 GSE(25 μg/ml)处理 SKOV3 细胞 24、48、72 h; 1、3、5 为对照组; 2、4、6 为实验组; B 组为 β-actin

图 3 免疫印迹方法检测 GSE 处理 SKOV3 细胞的 caspase-3 的表达变化

证实其无毒副作用,符合人们对安全性的需要。

本研究通过活体观察表明,PC 作用效果明显,加药后 24 h,倒置显微镜下即可发现 SKOV3 细胞形态学有明显改变,细胞膜皱缩,体积缩小。同时采用 MTT 法观察了 GSE 卵巢癌细胞增殖的作用,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 GSE 呈时间和剂量依赖性抑制 SKOV3 细胞增殖。实验从形态学角度证实了 GSE 有诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的作用。25 μg/ml GSE 12 h 就可引起细胞凋亡,但作用较弱,相同浓度下随着药物作用时间的增加,细胞的凋亡率显著增加,与对照组比较,有显著差异。48 h 细胞凋亡率明显高于 24 h 和 12 h 细胞的凋亡率。说明 GSE 诱导卵巢癌SKOV3 细胞凋亡有明显时间依赖性。进一步分析表明 GSE 对 SKOV3 细胞周期的影响主要表现在 S 进入 G_2/M 受阻。GSE 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]。

Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用,其中 Caspase-3 为关键的执行分子,它在凋亡信号传导的许多途径中发挥功能。caspase-3 正常以酶原(32 kD)的形式存在于胞浆中, 在凋亡的早期阶段, 它被激活, 活化的 caspase-3 由两个大亚基(17 kD)和两个小亚基(12 kD)组成,裂解相应的胞浆胞核底物, 最终导致细胞凋亡。本实验通过 Western-blot 发现 GSE 可明显的激活卵巢癌 SKOV3 细胞中 caspase-3 在蛋白水平的表达。进一步推断:GSE 可能是通过 Caspase-3 途径诱导卵巢癌 SKOV3 细胞的凋亡。有研究报道[5] GSE 诱导人口腔鳞癌细胞 HSC-2 及涎腺癌细胞 HSG 凋亡,其作用机制可能是通过激活 Caspase,从而上调 caspase 在蛋白和分子水平的表达。使 cytokeratin 18 发生降解从而促进凋亡;同时对正常龈成纤维细胞 HGF 具有保护作用。同时也有发现 GSE 能抑制人非雄激素依赖性前列腺癌细胞株 PC-3 细胞增殖[6],诱导 PC-3 细胞凋亡呈剂量与时间依赖性抑制人前列腺癌 DU145 细胞生长,其作用机制很可能是 GSE 损伤前列腺癌细胞的线粒体,促使细胞色素 C 释放,从而激活 Caspases 介导的细胞凋亡途径诱导前列腺癌细胞的凋亡。此外,GSE 可以对急性髓性白血病[7],结肠直肠癌[8]和乳腺癌[9]等多种肿瘤细胞都可以通过激活细胞凋亡基因家族中的 caspase-3 基因,从而启动细胞的凋亡过程。

Caspase-3 虽然是凋亡介导的关键环节,但也有研究[10]发现完全阻断 Caspase-3 并不能够完全抑制 GSE 诱导的肿瘤细胞凋亡,所以 GSE 诱导的细胞的凋亡或许不仅仅是一种单一的机制,还需要我们进一步的研究。

综上所述,GSE 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,其诱导凋亡的机制可能与激活卵巢癌细胞中 Caspase-3 的表达有关。为卵巢癌化疗的新药物选择提供了新的参考,但尚需进一步深入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] 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.

[2] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, et al. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds[J]. Ann NYA cad Sci, 2002, 957(14): 260-270.

[3] 陈小芬,汤为学,李龙江,等.姜黄素对人卵巢癌细胞株 SKOV3 的抗增殖作用[J].重庆医科大学学报,2005,30(2):256-259.

[4] Faria A, Calhau C, de Freitas V, et al. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(6): 2392-2397.

[5] 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, 2000, 48(5): 687-693.

[6] Kaur M, Agarwal R, Agarwal C, et al. 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.

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

[8] Manjinder K, Rana P. Singh, Mallikarjuna Gu, et al. Grape seed extract inhibits in vitro and in vivo growth of human colorectal carcinoma cells[J]. Clinical Cancer Research, 2006, 15(12): 6194-6202.

[9] Sudheer K, Manjeshwar S, Baliga, et al. Grape seed proanthocyanidins induce apoptosis and inhibit metastasis of highly metastatic breast carcinoma cells[J]. Carcinogenesis, 2006, 8(27): 1682-1691.

[10] Agarwal C, Singh R P, Agarwal R, et al. Grape seed extract induces apoptotic death of human prostate carcinoma DU145 cells via caspases activation accompanied by dissipation of mitochondrial membrane potential and cytochrome c release[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(11): 1869-1876.

(责任编辑:冉明会)