

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.18.017

野鸢尾黄素对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移和侵袭的影响

毕彩云,夏 岩[△]

陕西省西安市北方医院妇科,陕西西安 710000

摘 要:**目的** 观察野鸢尾黄素对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响,以及可能的作用机制。**方法** 经不同水平(0、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)的野鸢尾黄素处理 48 h 后,用 CCK-8 实验检测不同野鸢尾黄素水平处理组 SKOV3 细胞的活力。根据上述 CCK-8 实验结果,将实验分为对照组、低剂量组、高剂量组。对照组不加任何药物,选择加野鸢尾黄素后使 SKOV3 细胞的增殖能力下降 1/3、2/3 左右的两个浓度作为低剂量组、高剂量组浓度,处理 48 h。用 Transwell 小室实验检测 SKOV3 细胞的侵袭能力,用细胞划痕实验检测 SKOV3 细胞的迁移能力,免疫印迹实验检测各组 SKOV3 细胞 E-cadherin、N-cadherin 及 β -catenin 蛋白的表达。**结果** 低剂量组、高剂量组的野鸢尾黄素浓度分别为 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 。干预 48 h 后,与对照组相比,低剂量组、高剂量组的 SKOV3 细胞增殖率、侵袭细胞数量、迁移距离均下降,E-cadherin 蛋白水平均上升,N-cadherin、 β -catenin 蛋白水平均下降,差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 野鸢尾黄素可能通过抑制 β -catenin 的表达,从而抑制 SKOV3 细胞的增殖、迁移、侵袭及上皮-间质转化。

关键词:野鸢尾黄素; SKOV3 细胞; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮-间质转化
中图法分类号:R285.5;R737.31 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2022)18-2520-04

Effects of wild tectorigenin on proliferation, migration and invasion of human ovarian cancer SKOV3 cells

BI Caiyun, XIA Yan[△]

Department of Gynecology, Xi'an Municipal North Hospital, Xi'an, Shaanxi 710000, China

Abstract: Objective To observe the effects of wild tectorigenin on proliferation, invasion and migration of ovarian cancer SKOV3 cells and its possible mechanism. **Methods** After 48 h of treatment by different levels (0, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$) of tectorigenin, and the viability of SKOV3 cells in the treatment groups with different levels of wild tectorigenin was detected by CCK-8 test. According to the above CCK-8 pre experiment results, the experiment was divided into the control group, low dose group and high dose group. The control group did not add any drugs, after adding wild tectorigenin, the proliferation ability of SKOV3 cells was decreased by about 1/3 and 2/3, which were treated as the concentrations of the low-dose group and high-dose group for 48 h. The Transwell chamber assay was used to detect the SKOV3 cells invasion ability, the cell scratch assay was used to detect the SKOV3 cells migration ability, and the expression levels of E-cadherin, N-cadherin and β -catenin protein in SKOV3 cells of each group was analyzed by Western blot. **Results** The levels of wild tectorigenin in the low-dose group and high-dose group were 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$, respectively. After 48 h intervention, compared with the control group, the proliferation rate, number of invasive cells and migration distance of SKOV3 cells in the low-dose group and high-dose group were decreased, and the E-cadherin protein level was increased, the levels of N-cadherin and β -catenin protein were decreased, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** Wild tectorigenin inhibits the proliferation, migration, invasion and epithelial mesenchymal transformation of SKOV3 cells possibly by inhibiting the expression of β -catenin.

Key words: wild tectorigenin; SKOV3 cells; proliferation; invasion; migration; epithelial mesenchymal transformation

目前,卵巢癌的标准治疗方法是手术后联合化疗,但因缺乏前期筛查试验及存在很高的复发率,仍然是最致命的妇科癌症^[1-3],因此,寻找新的治疗策略,抑制其复发显得尤为重要。据报道,中药在肿瘤的治疗中具有改善患者生存质量、降低转移复发率等优势。野鸢尾黄素是一种从中药提取的活性黄酮类

化合物,具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤活性。基于此,本研究拟研究野鸢尾黄素对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭及上皮-间质转化(EMT)的影响及可能的调节机制。

1 材料与方法

1.1 材料来源 人卵巢癌 SKOV3 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;FBS、RPMI-1640 培养基、青链霉素均购自美国 HyClone 公司;胰岛素购自美国 Sigma 公司;野鸢尾黄素购自美国 MCE 公司;GAPDH、E-cadherin、N-cadherin、 β -catenin 抗体购自美国 Proteintech 公司;Transwell 小室购自美国 Corning 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人卵巢癌 SKOV3 细胞采用 RPMI-1640 完全培养基于 37℃ 恒温培养箱中培养,待细胞融合度达到 85%~95% 时进行传代及实验。

1.2.2 CCK-8 实验测定 SKOV3 细胞活力 实验设定为 6 组,取处于对数生长期,生长状态良好的 SKOV3 细胞以 5×10^3 个/100 μ L,接入 96 孔板,37℃ 培养过夜;贴壁后加入不同水平(0、10、25、50、100、200 μ mol/L)的野鸢尾黄素处理 48 h,每孔加入 10 μ L CCK-8 孵育 30 min,并于酶标仪 450 nm 处测定其吸光度,根据吸光度计算不同浓度处理组 SKOV3 细胞活力。

1.2.3 细胞分组与给药方法 根据上述 CCK-8 实验结果,将实验分为对照组、低剂量组、高剂量组。对照组不加任何药物,选择加野鸢尾黄素后使 SKOV3 细胞的增殖能力下降 1/3、2/3 左右的两个浓度为低剂量组、高剂量组浓度,处理 48 h。

1.2.4 细胞侵袭 制备浓度为 2×10^4 /mL 的各组人卵巢癌 SKOV3 细胞无血清细胞悬液。24 孔板底部加 800 μ L RPMI-1640 完全培养基,Transwell 小室上室底部中央垂直加入 100 μ L 1 mg/mL 的 Matrigel,待 Matrigel 干成胶状后在 Transwell 上室分别加入 200 μ L 各组细胞悬液,5%CO₂、37℃ 培养箱培养 24 h。取出 Transwell 小室,PBS 清洗一侧未侵袭细胞,并用 10% 甲醇溶液固定 30 min。切下膜并在膜上滴 1 滴 5% 结晶紫染液,静置染色 20 min,PBS 清洗后于显微镜($\times 40$)下观察拍照。实验重复 3 次。

1.2.5 细胞划痕实验 Marker 笔在 6 孔板背后划线,将人卵巢癌细胞 SKOV3 单细胞悬液(约 2×10^5 个)均匀接种到 6 孔板中培养过夜。第 2 天用枪头比着直尺,垂直于背后的横线划痕。PBS 清洗后加入无血清培养基、拍照,并于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,24 h 后再次拍照,计算迁移距离。

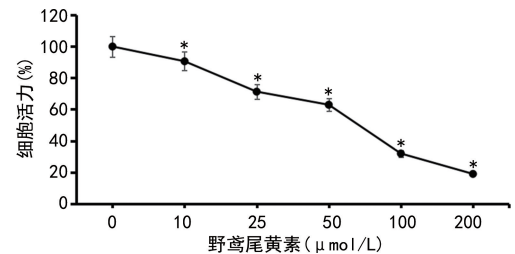
1.2.6 采用免疫印迹实验检测 E-cadherin、N-cad-

herin、 β -catenin 蛋白的表达 各组人卵巢癌 SKOV3 细胞经冰冻 PBS 洗涤,在蛋白裂解缓冲液中提取,用 Bradford 法测定蛋白浓度后,变性并电泳分离。电泳后,蛋白质转移到 PVDF 膜并于 4℃ 过夜孵育内参 GAPDH 及 E-cadherin(1:100)、N-cadherin(1:100)、 β -catenin(1:100)一抗。洗涤后,用辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育 1 h,并用 ECL 化学发光系统观察信号,计算目的蛋白相对于 GAPDH 的表达量,目的蛋白的相对表达量=目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞活性的影响 CCK-8 实验检测野鸢尾黄素处理的 SKOV3 细胞活性,结果显示野鸢尾黄素处理 48 h 后各剂量处理组(0、10、25、50、100、200 μ mol/L)细胞活力分别是(100.0 $\pm$ 4.0)%、(90.6 $\pm$ 2.6)%、(71.2 $\pm$ 3.7)%、(62.6 $\pm$ 2.6)%、(31.8 $\pm$ 6.3)%、(18.8 $\pm$ 6.6)%,其他剂量处理组的 SKOV3 细胞活性与 0 μ mol/L 组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。这提示野鸢尾黄素可抑制 SKOV3 细胞的增殖,基于野鸢尾黄素浓度为 50、100 μ mol/L 处理时,细胞的增殖能力下降 1/3、2/3 左右,所以选择 50 μ mol/L(低剂量组)、100 μ mol/L(高剂量组)进行后续的实验。



注:与 0 μ mol/L 组相比, * $P < 0.01$ 。

图 1 CCK-8 实验检测 SKOV3 细胞的活力

2.2 野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞侵袭的影响 细胞侵袭实验显示,对照组、低剂量组、高剂量组侵袭的 SKOV3 细胞数量分别是(104.00 $\pm$ 3.33)个、(83.00 $\pm$ 3.33)个、(51.00 $\pm$ 2.66)个,与对照组相比,低剂量组、高剂量组 SKOV3 细胞的侵袭能力均下降($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞迁移的影响 细胞迁移实验显示,对照组、低剂量组、高剂量组 SKOV3 细胞 24 h 迁移的距离分别是(336 $\pm$ 7) μ m、(170 $\pm$ 17) μ m、(76 $\pm$ 5) μ m,与对照组相比,低剂量组、高剂量组 SKOV3 细胞的迁移能力均下降,差异均有统计学意

义($P<0.01$),见图 3。

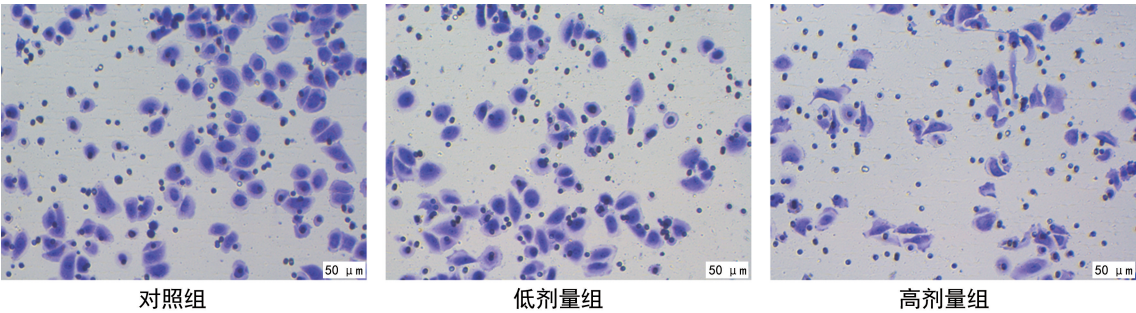


图 2 Transwell 小室实验检测野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞侵袭能力的影响($\times 40$)

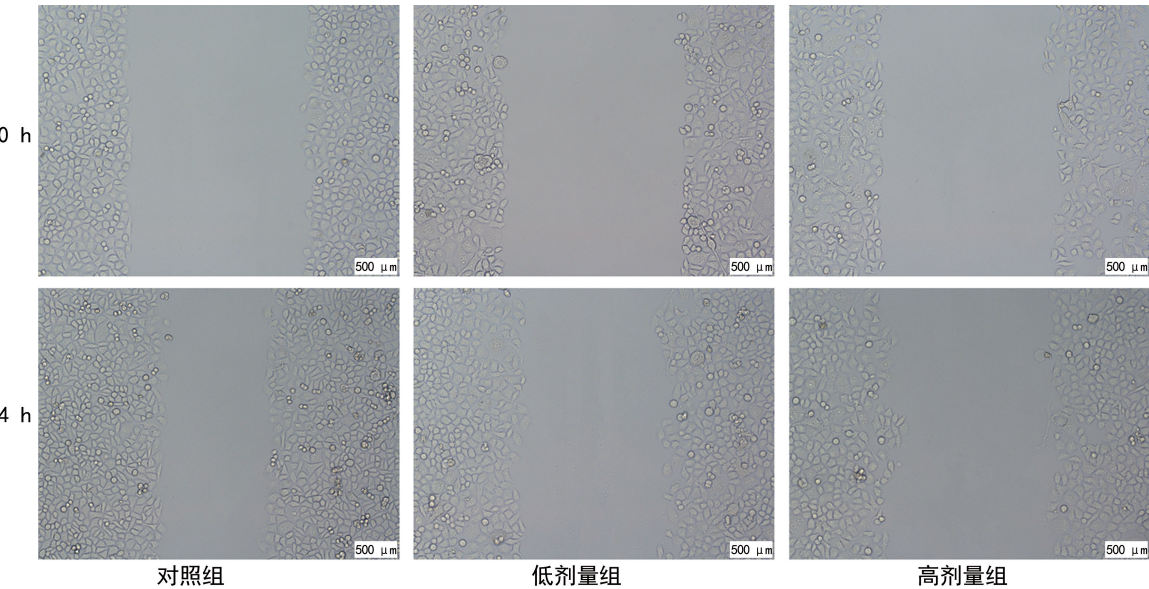


图 3 细胞划痕实验检测野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞迁移能力的影响

2.4 野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞 E-cadherin、N-cadherin 表达的影响 对照组、低剂量组、高剂量组 E-cadherin 蛋白水平分别为 0.24 ± 0.05 、 0.52 ± 0.06 、 0.64 ± 0.06 , N-cadherin 蛋白水平分别为 0.53 ± 0.06 、 0.30 ± 0.06 、 0.22 ± 0.05 。与对照组相比,低剂量组、高剂量组细胞的 E-cadherin 蛋白表达均上升, N-cadherin 蛋白表达均下降,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见图 4。

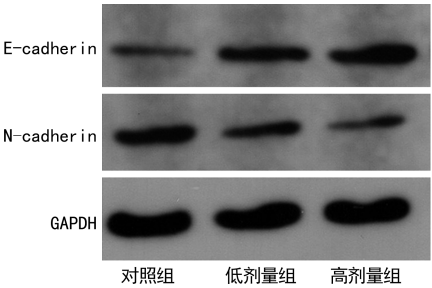


图 4 免疫印迹实验检测野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞 E-cadherin、N-cadherin 表达的影响

2.5 野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞 β -catenin 蛋白的影响 采用免疫印迹实验检测 SKOV3 细胞 β -catenin 蛋白的表达,结果显示对照组、低剂量组、高剂量组 β -

catenin 蛋白的水平分别为 0.47 ± 0.06 、 0.35 ± 0.06 、 0.31 ± 0.05 ,与对照组相比,低剂量组、高剂量组 SKOV3 细胞的 β -catenin 蛋白表达均下降,差异均有统计学意义($P<0.01$)。见图 5。

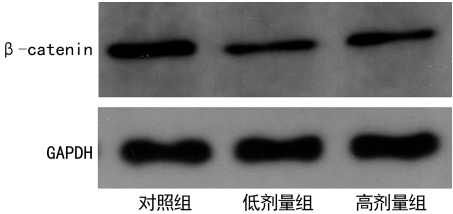


图 5 免疫印迹实验检测野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞 β -catenin 蛋白表达的影响

3 讨 论

卵巢癌是对女性健康影响最大的恶性肿瘤之一,虽然传统的治疗策略在一定程度上提高了卵巢癌患者的总生存率,但是肿瘤的侵袭、转移、复发等恶性表型特征使得其病死率居高不下^[1-3]。

野鸢尾黄素是一类从植物中提取的多酚类化合物,其结构与内源性雌激素相似,已被证实具有多种生物活性并被应用于多种疾病的治疗^[4-10]。ZENG 等^[9]研究表明野鸢尾黄素通过下调蛋白激酶 B

(AKT)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路以及上调 Caspase 家族的表达和(或)活性来抑制人乳腺癌细胞的增殖、侵袭、迁移。YE H 等^[11]研究表明野鸢尾黄素通过 G₀/G₁ 期细胞周期阻滞抑制胶质母细胞瘤细胞的增殖。GUO 等^[12]研究表明,野鸢尾黄素对骨肉瘤细胞(Saos2 和 U2OS)的增殖具有一定的抑制作用,且具有剂量依赖性和时间依赖性,同时显著抑制 OS 细胞的迁移和侵袭,上调 Cleaved Caspase 3 的表达,下调 MMP-1、MMP-2 和 MMP-9 的表达,从而发挥对骨肉瘤细胞的调节作用。由此推测野鸢尾黄素可能对卵巢癌发挥抑制作用,本研究中采用 CCK-8 实验检测野鸢尾黄素对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响,结果显示野鸢尾黄素抑制 SKOV3 细胞的增殖并表现出浓度依赖性,同时野鸢尾黄素的加入抑制了 SKOV3 细胞的侵袭、迁移。

EMT 在肿瘤的发生、发展中发挥重要作用,EMT 促进癌症转移和复发^[13-15]。为了评估野鸢尾黄素对 SKOV3 细胞迁移和侵袭的抑制作用是否与 EMT 相关,采用免疫印迹实验检测 EMT 标志物(E-cadherin、N-cadherin)的表达,结果显示野鸢尾黄素增加了 E-cadherin 的表达,降低了 N-cadherin 的水平。

Wnt/ β -catenin 信号通路已被证明有助于 EMT 的转移,同时 Wnt/ β -catenin 通路在卵巢癌的进程中发挥重要调节作用^[16]。因此,为了进一步验证野鸢尾黄素抑制 EMT 的过程与 Wnt/ β -catenin 信号通路相关,本研究采用免疫印迹实验检测 Wnt/ β -catenin 信号通路的核心分子 β -catenin 的表达,结果显示野鸢尾黄素可抑制 β -catenin 的表达。

综上所述,本研究观察了野鸢尾黄素对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、侵袭和迁移能力,以及 E-cadherin、N-cadherin、 β -catenin 蛋白表达的影响,结果显示野鸢尾黄素可能通过抑制 β -catenin 蛋白的表达,从而抑制 SKOV3 细胞的增殖、侵袭、迁移及 EMT。

参考文献

- [1] STEWART C, RALYEA C, LOCKWOOD S. Ovarian cancer: an integrated review [J]. Semin Oncol Nurs, 2019, 35(2): 151-156.
- [2] HAUNSCHILD C E, TEWARI K S. Bevacizumab use in the frontline, maintenance and recurrent settings for ovarian cancer[J]. Future Oncol, 2020, 16(7): 225-246.
- [3] TATE S, NISHIKIMI K, MATSUOKA A, et al. Aggressive surgery for advanced ovarian cancer decreases the risk of intraperitoneal recurrence[J]. Int J Clin Oncol, 2020, 25(9): 1726-1735.
- [4] LIU E Y, ZHENG Z X, ZHENG B Z, et al. Tectorigenin, an isoflavone aglycone from the rhizome of belamcanda

- chinensis, induces neuronal expression of erythropoietin via accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha[J]. Phytother Res, 2020, 34(6): 1329-1337.
- [5] YANG S, MA C, WU H, et al. Tectorigenin attenuates diabetic nephropathy by improving vascular endothelium dysfunction through activating adipor1/2 pathway [J]. Pharmacol Res, 2020, 153: 104678.
- [6] MOQBEL S A A, XU K, CHEN Z, et al. Tectorigenin alleviates inflammation, apoptosis, and ossification in rat tendon-derived stem cells via modulating Nf-Kappa B and Mapk pathways[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 568894.
- [7] YAO X, LI K, LIANG C, et al. Tectorigenin enhances Pdx1 expression and protects pancreatic beta-cells by activating Erk and reducing Er stress [J]. J Biol Chem, 2020, 295(37): 12975-12992.
- [8] GONG P, DENG F, ZHANG W, et al. Tectorigenin attenuates the Mpp(+)-induced Sh-Sy5Y cell damage, indicating a potential beneficial role in Parkinson's disease by oxidative stress inhibition[J]. Exp Ther Med, 2017, 4(5): 4431-4437.
- [9] ZENG L, YUAN S, SHEN J, et al. Suppression of human breast cancer cells by tectorigenin through downregulation of matrix metalloproteinases and MAPK signaling in vitro[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 3935-3943.
- [10] AMIN A, MOKHDOMI T A, BUKHARI S, et al. Tectorigenin ablates the inflammation-induced epithelial-mesenchymal transition in a co-culture model of human lung carcinoma[J]. Pharmacol Rep, 2015, 67(2): 382-387.
- [11] YE H L T, HSU L S, CHUNG Y H, et al. Tectorigenin inhibits glioblastoma proliferation by G0/G1 cell cycle arrest[J]. Medicina (Kaunas), 2020, 56(12): 681.
- [12] GUO Y, CHEN Y H, CHENG Z H, et al. Tectorigenin inhibits osteosarcoma cell migration through downregulation of matrix metalloproteinases in vitro[J]. Anticancer Drugs, 2016, 27(6): 540-546.
- [13] DONGRE A, WEINBERG R A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(2): 69-84.
- [14] ZHANG Y, WEINBERG R A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities [J]. Front Med, 2018, 12(4): 361-373.
- [15] DU B, SHIM J S. Targeting epithelial-mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer[J]. Molecules, 2016, 21(7): 965-972.
- [16] AREND R C, LONDONO-JOSHI A I, STRAUGHN J M, et al. The Wnt/Beta-catenin pathway in ovarian cancer: a review[J]. Gynecol Oncol, 2013, 131(3): 772-779.