

血根碱通过下调 TGF- β 1/Smad 通路抑制紫杉醇耐药卵巢癌细胞生长

王妍妍, 张 琴, 冷天艳, 杨丽华*

昆明医科大学第二附属医院妇科, 昆明 650301

摘要: 培养紫杉醇耐药卵巢癌细胞 A2780/Taxol, 分为对照组与血根碱组, 对照组不加血根碱, 血根碱组应用不同浓度血根碱(0.67 $\mu\text{mol/L}$ 、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 、2.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理, 应用 MTT 法、克隆形成、流式细胞检测和 Western blot 等实验方法检测血根碱对 A2780/Taxol 细胞增殖、凋亡、周期的影响及 Bax、TGF- β 1、Smad3 蛋白的表达情况。结果显示, 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的血根碱可显著抑制 A2780/Taxol 细胞增殖, 与对照组相比, Bax 表达显著上调, TGF- β 1 和 Smad3 蛋白表达水平明显下调($P < 0.05$)。血根碱通过下调 TGF- β 1/Smad 通路, 促进细胞凋亡而抑制紫杉 A2780/Taxol 细胞生长。

关键词: 血根碱; 卵巢癌; 紫杉醇耐药; TGF- β 1/Smad

中图分类号: R737.3

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.7.008

Sanguinarine Inhibits the Growth of Paclitaxel Resistant Ovarian Cells by Down-Regulating the TGF- β 1/Smad Pathway

WANG Yan-yan, ZHANG Qin, LEN Tian-yan, YANG Li-hua*

Department of Gynaecology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650000, China

Abstract: Paclitaxel resistant ovarian cancer A2780/Taxol cells were divided into control group and sanguinarine group. The cells in control group were treated without sanguinarine. The cells in sanguinarine group were treated with different concentrations of sanguinarine (0.67 $\mu\text{mol/L}$, 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 2.0 $\mu\text{mol/L}$). The proliferation, apoptosis, cycle and the expression of Bax, TGF- β 1, Smad3 were determined by MTT, clone formation, flow cytometry and Western blot assays. It was found that the proliferation of A2780/Taxol cells were significantly inhibited by 2.0 $\mu\text{mol/L}$ of sanguinarine. Compared to the control group, the expressions of Bax protein increased and TGF- β 1, Smad3 protein decreased ($P < 0.05$). Hence, it was concluded that sanguinarine can effectively inhibit the growth of A2780/Taxol cells by down-regulating the TGF- β 1/Smad3 pathway and inducing cell apoptosis.

Key words: sanguinarine; ovarian cancer; paclitaxel resistance; TGF- β 1/Smad

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一, 发病率为 2.4% ~ 5.6%, 在女性生殖系统恶性肿瘤中排名第二, 但其死亡率却位居妇科肿瘤之首^[1]。紫杉醇结合铂类药物的联合化疗为卵巢癌综合治理中的重要措施。然而, 紫杉醇耐药极大的降低了卵巢癌患者化疗的敏感性, 影响其临床疗效。目前大量研究发现许多天然药物具有结构多样、毒性低、具有免疫调节功能等优点, 可直接作为抗肿瘤或抗肿

瘤辅助物^[2]。因此, 从天然药物中寻找高效、低度的抗肿瘤药物是当前卵巢癌治疗研究的重要课题之一。血根碱(sanguinarine, SAN)是从博落回中分离出来的异喹啉类生物碱中的苯并菲啶类生物碱, 主要存在于白屈菜的全草, 紫堇的块、根等, 是我国历史悠久的传统药物之一, 目前广泛应用于动物饲料添加剂里。近几年有研究发现血根碱在前列腺癌、黑色素瘤、结肠腺癌、乳腺癌、宫颈癌等多种肿瘤中均有抗肿瘤作用^[3-5]。但血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌是否发挥作用, 其作用机理是什么尚不清楚。因此, 本文选用紫杉醇耐药卵巢癌细胞株 A2780/Taxol, 研究血根碱对其生长的影响及可能机制, 为血根碱用于耐药卵巢癌治疗提供实验依据。

收稿日期: 2017-03-27 接受日期: 2017-05-02

基金项目: 云南省卫生和计划生育委员会医学学科带头人培养项目(D-201633); 国家自然科学基金地区(81360336); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金项目

* 通信作者 E-mail: yanglihua0628@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

人卵巢癌紫杉醇耐药株 A2780/Taxol 购自上奥陆生物科技有限公司;血根碱购自上海融禾医药科技有限公司;紫杉醇购自海口制药有限公司;二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司;四甲基噻唑淡蓝 (MTT) 购自碧云天生物技术研究所公司;Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒购自 CWBIO 康为世纪公司;鼠抗 Bax、TGF- β 1、Smad3 抗体购自 Abcam 公司;Anti-GAPDH 抗体购自博士德公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠二抗购自艾杰生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养人卵巢癌紫杉醇耐药细胞株 A2780/Taxol, 细胞长满培养瓶底 70% ~ 80% 后,用胰酶消化、收集、离心、传代,取对数生长期细胞用于实验,细胞分为 2 组,对照组、血根碱组,对照组内加生理盐水,不加血根碱,血根碱组分设 3 个浓度组,分别加终浓度为 0.67、1.0、2.0 μ mol/L 的血根碱。

1.3 MTT 法检测细胞增殖情况

取对数生长期 A2780/Taxol, 调整细胞密度为 1×10^4 /mL, 分别接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L, 4 h 后, 各组按照设计分别加药, 培养 12、24、48 h 后, MTT 法检测各组、各时间点细胞增殖情况, 绘制细胞增殖抑制曲线, 实验独立重复 3 次。

1.4 克隆形成实验

取对数生长期 A2780/Taxol, 各组按照设计分别加药, 培养 72 h 后收集各组细胞, 调整细胞浓度 1×10^3 /mL, 分别接种于 6 孔培养板, 每孔 1 mL, 加完全培养基至每孔 2.5 mL。每 4 ~ 5 d 更换培养基 1 次, 当 6 孔板中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养。弃去 6 孔板上清液, 用 PBS 小心浸洗 2 次, 每孔加入甲醇溶液 1 mL, 固定细胞 15 min。弃去固定液, 每孔加入配制好的 Giemsa 染色液 1 mL, 室温充分染色 20 ~ 30 min 后, 流水缓慢冲洗 6 孔板, 通风干燥后进行克隆计数。克隆形成率 (%) = (加药组克隆数/接种细胞数)/(对照组克隆数/接种细胞数) \times 100%。实验独立重复 3 次。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的 A2780/Taxol 细胞, 消化、制成单细胞悬液, 调整细胞浓度至 2.5×10^3 /mL, 加入 6

孔板, 细胞生长至 60% 时, 各组按照设计分别加药, 48 h 后收集并处理细胞, 分别加入 5 μ L Annexin V/FITC 和 10 μ L 20 μ g/mL 的 PI 溶液染色, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。细胞凋亡率 (%) = 凋亡细胞数/总细胞数 \times 100%, 实验独立重复 3 次。

1.6 Western blot 检测 Bax、TGF- β 1、Smad3 蛋白表达

取对数生长期 A2780/Taxol 细胞, 调细胞密度 2×10^6 /mL, 裂解后提取总蛋白。4 °C 下 14000 rpm 离心, 收集上清液, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后转至 PVDF 膜后封闭 60 min。加入稀释的 (1:1000) 抗 Bax、TGF- β 1、Smad3 蛋白的抗体, 4 °C 过夜, PBS 洗膜 5 min \times 3 次。再加入稀释的 (1:2000) 辣根过氧化物酶标记的二抗室温培育 60 min, PBS 洗膜 5 min \times 3 次。发光剂加于 PVDF 膜上, 暗室曝光显示条带。用 Image 对条带灰度进行检测, 并计算相应灰度值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。定量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析; 定性资料采用 χ^2 检验。P < 0.05 表明差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 血根碱抑制紫杉醇耐药卵巢癌细胞增殖

MTT 法检测结果显示, 与对照组比较, 2.0 μ mol/L 血根碱处理组各时间点均可显著抑制卵巢癌 A2780/Taxol 细胞增殖 (图 1)。

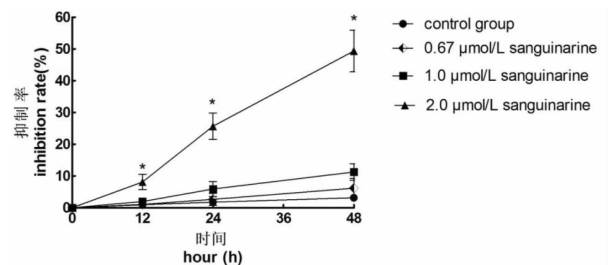


图 1 血根碱抑制 A2780/Taxol 细胞增殖

Fig. 1 The growth of A2780/Taxol cells were inhibited by sanguinarine

注: 与对照组相比, * P < 0.05

Note: compared with control, * P < 0.05

2.2 血根碱抑制紫杉醇耐药卵巢癌细胞克隆形成 克隆形成实验结果显示, 0.67、1.0、2.0 μ mol/L 血根碱处理组和对照组细胞克隆形成率分别为

(57.07 ± 4.91)%、(49.63 ± 7.82)%、(27.67 ± 2.52)%和(61.67 ± 10.41)%，与对照组相比，1.0 μmol/L、2.0 μmol/L 血根碱处理组卵巢癌 A2780/

Taxol 细胞克隆形成率明显降低 ($P < 0.05$) (见图 2)。

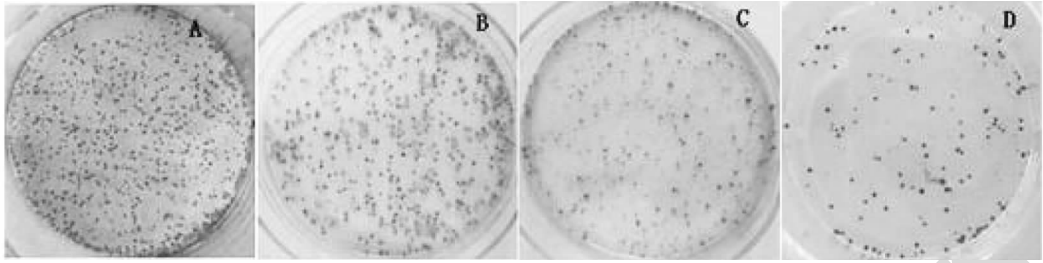


图 2 血根碱抑制卵巢癌 A2780/Taxol 细胞克隆形成

Fig. 2 The clone formation of A2780/Taxol cells were inhibited by sanguinarine

注: A. 对照组; B. 0.67 μmol/L 血根碱处理组; C. 1.0 μmol/L 血根碱处理组; D. 2.0 μmol/L 血根碱处理组

Note: A. Control group; B. Sanguinarine group of 0.67 μmol/L; C. Sanguinarine group of 1.0 μmol/L; D. Sanguinarine group of 2.0 μmol/L

2.3 血根碱促进紫杉醇耐药卵巢癌细胞凋亡

流式仪检测细胞凋亡率,结果显示,0.67、1.0、2.0 μmol/L 血根碱处理组和对照组细胞凋亡率分别为(7.85 ± 2.95)%、(20.58 ± 3.49)%、(57.03 ±

12.91)%和(2.41 ± 1.67)%，与对照组相比,血根碱处理组卵巢癌 A2780/Taxol 细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.01$) (见图 3)。

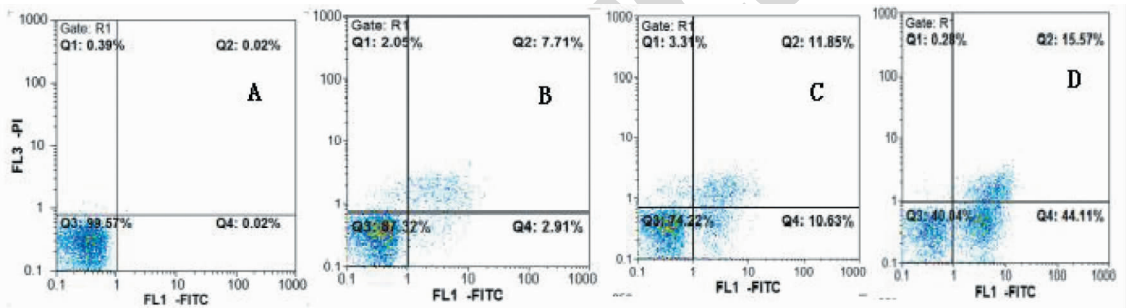


图 3 血根碱促进卵巢癌 A2780/Taxol 细胞凋亡

Fig. 3 The apoptosis rate of A2780/Taxol cells were enhanced by sanguinarine

注: A. 对照组; B. 0.67 μmol/L 血根碱处理组; C. 1.0 μmol/L 血根碱处理组; D. 2.0 μmol/L 血根碱处理组

Note: A. Control group; B. Sanguinarine group of 0.67 μmol/L; C. Sanguinarine group of 1.0 μmol/L; D. Sanguinarine group of 2.0 μmol/L

2.4 血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌细胞周期的影响

流式仪检测细胞周期,结果显示,各浓度血根碱

处理组和对照组相比,细胞周期百分比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 4,表 1。

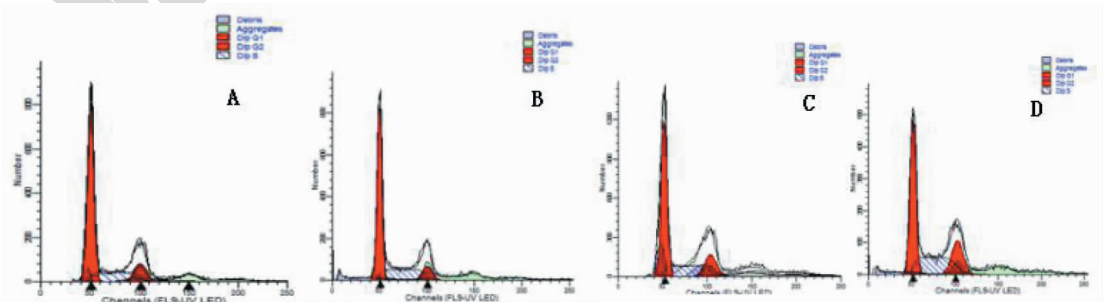


图 4 血根碱对卵巢癌 A2780/Taxol 细胞周期的影响

Fig. 4 The effect of sanguinarine on A2780/Taxol cells cycle

注: A. 对照组; B. 0.67 μmol/L 血根碱处理组; C. 1.0 μmol/L 血根碱处理组; D. 2.0 μmol/L 血根碱处理组

Note: A. Control group; B. Sanguinarine group of 0.67 μmol/L; C. Sanguinarine group of 1.0 μmol/L; D. Sanguinarine group of 2.0 μmol/L

表 1 血根碱对卵巢癌 A2780/Taxol 细胞周期的影响
Table 1 The effect of sanguinarine on A2780/Taxol cells cycle

分组 Group	细胞周期百分比 Cell cycle distribution		
	G0/G1	S	G2/M
对照组 Control group	50.98 ± 0.49	25.53 ± 4.69	21.82 ± 1.52
血根碱 Sanguinarine (μmol/L)	0.67	25.12 ± 5.11	19.32 ± 1.78
	1.0	47.97 ± 5.34	26.71 ± 3.41
	2.0	54.16 ± 2.64	23.18 ± 1.88

2.5 血根碱上调紫杉醇耐药卵巢癌细胞 Bax 表达, 下调 TGF-β1、Smad3 蛋白表达

Western blot 检测结果显示: 1.0、2.0 μmol/血

根碱组, 卵巢癌 A2780/Taxol 细胞 Bax 表达上调, TGF-β1 和 Smad3 蛋白表达水平明显下调, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 5, 表 2。

表 2 血根碱对卵巢癌 A2780/Taxol 细胞 Bax、TGF-β1、Smad3 蛋白表达的影响
Table 2 The effects of sanguinarin on Bax, TGF-β1 and Smad3 expressions of A2780/Taxol

分组 Group	Bax	TGF-β1	Smad3
对照组 Control group	0.592 ± 0.047	0.917 ± 0.091	0.935 ± 0.064
血根碱 Sanguinarine (μmol/L)	0.67	0.865 ± 0.073	0.870 ± 0.081
	1.0	0.719 ± 0.080 *	0.607 ± 0.042 *
	2.0	0.834 ± 0.066 *	0.533 ± 0.027 *

注: 与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

Note: compared with control, * $P < 0.05$.

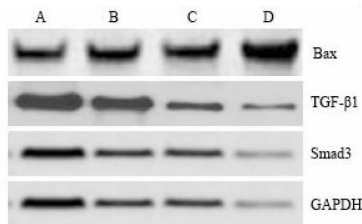


图 5 血根碱上调紫杉醇耐药卵巢癌细胞 Bax 表达, 下调 TGF-β1、Smad3 蛋白表达

Fig. 5 The Bax expressions were up-regulated and TGF-β1, Smad3 expressions were down-regulated by sanguinarine

注: A. 对照组; B. 0.67 μmol/L 血根碱处理组; C. 1.0 μmol/L 血根碱处理组; D. 2.0 μmol/L 血根碱处理组

Note: A. Control group; B. Sanguinarine group of 0.67 μmol/L; C. Sanguinarine group of 1.0 μmol/L; D. Sanguinarine group of 2.0 μmol/L

3 讨论与结论

我们前期研究通过生物信息学方法挖掘可能对卵巢癌有潜在治疗作用的药物, 寻找到一个天然产物血根碱^[6]。近几年有研究发现血根碱可抑制多

种肿瘤的生长, 如张瑞等报道血根碱通过下调 DUSP4/ERK 通路抑制胃癌细胞生长及侵袭^[7], 杨静等报道血根碱可能通过下调 Wnt/β catenin 信号通路抑制肺癌干细胞的增殖、浸润^[8]。血根碱对耐药卵巢癌是否发挥作用, 其作用机理是什么尚不清楚。

为探讨血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌细胞的抗肿瘤作用及可能的机制, 本研究通过检测血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌细胞 A2780/Taxol 增殖、克隆形成、凋亡的作用以及对细胞周期的影响, 发现血根碱能够显著抑制 A2780/Taxol 细胞增殖、克隆形成, 促进肿瘤细胞凋亡, 并上调卵巢癌细胞中 Bax 表达水平, 下调 TGF-β1、Smad3 蛋白水平, 对细胞周期没有影响。

TGF-β1 广泛存在于细胞中, 在诱导 EMT 促进肿瘤侵袭、转移中发挥重要作用^[9], Smad 作为 TGF-β 信号通路中关键物质, 亦在与 EMT 发生相关信号通路中发挥关键性作用^[10]。Smad3 作为正性调控分子, 在 Smad 蛋白介导的信号通路中发挥正性促进作用, 可促进 TGF-β 与受体的结合而正性调控 TGF-β1/Smad 信号通路, 激活 TGF-β1/Smad 信号通

路,促进肿瘤细胞增殖、发生、发展^[11]。本研究细胞显示,血根碱下调 TGF- β 1、Smad3 表达,提示血根碱通过 TGF- β 1/Smad 信号通路促进肿瘤细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤效应。

Bax 属于 Bcl-2 基因家族成员,具有诱导线粒体渗透性改变释放细胞色素 C、激活促凋亡蛋白 Caspase-9,而表现出促细胞凋亡作用。本研究中应用血根碱后肿瘤细胞 Bax 表达增加,与流式细胞仪检测的血根碱可促进肿瘤细胞凋亡的结果一致。另外,我们的实验结果显示血根碱对肿瘤细胞的周期没有影响,提示血根碱通过促进肿瘤细胞凋亡而对卵巢癌 A2780/taxol 细胞发挥直接作用,而非通过周期阻滞发挥作用。

总之,血根碱通过下调 TGF- β 1、Smad3 表达,抑制 TGF- β 1/Smad 通路,促进肿瘤细胞凋亡而抑制卵巢癌 A2780/Taxol 细胞增殖、克隆形成,从而发挥抗肿瘤效应。本研究为紫杉醇耐药卵巢癌的治疗提供了新的候选药物,值得进一步研究。但由于本研究只做了单一细胞系,且只有体外实验,如要进一步确定血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌的抗肿瘤作用,后续实验需要研究多个耐药卵巢癌细胞系,并且需要在卵巢癌的移植瘤模型中进一步研究。

参考文献

- 1 Miller KD, Siegel RL, Lin CC, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 271-289.
- 2 Jiang XP, Rui XH, Guo CX, *et al.* A network meta-analysis of eight chemotherapy regimens for treatment of advanced ovarian cancer. *Oncotarget*, 2016, Accepted.
- 3 Gu S, Yang XC, Xiang XY, *et al.* Sanguinarine-induced apop-

- 4 Le JS, Jung WK, Jeong MH, *et al.* Sanguinarine induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-9-dependent pathway. *Int J Toxicol*, 2012, 31(1): 70-77.
- 5 Sun M, Liu C, Nadiminty N, *et al.* Inhibition of Stat3 activation by sanguinarine suppresses prostate cancer cell growth and invasion. *Prostate*, 2012, 72(1): 82-89.
- 6 Liang H(梁宏), Zhao HB(赵洪波), Yang LH(杨丽华). Ming mechanism and potential therapeutic drugs for cisplatin resistant ovarian cancer based on bioinformatics. *Med Inf* (医学信息), 2016, 29(25): 3-5.
- 7 Zhang R, Wang G, Zhang PF, *et al.* Sanguinarine? inhibits growth and invasion of gastric cancer cells via regulation of the DUSP4/ERK pathway. *J Cell Mol Med*, 2016, Accepted.
- 8 Yang J, Fang Z, Wu J, *et al.* Construction and application of a lung cancer stem cell model: antitumor drug screening and molecular mechanism of the inhibitory effects of sanguinarine. *Tumour Biol*, 2016, 37: 13871-13883.
- 9 Gao XP(高向朋), Liu Q(刘清), Liu T(刘涛), *et al.* Activation of TGF- β 1/Smad7 signaling in Kazakh' ESCC through epithelial mesenchymal transition. *J Sun yat-sen Univ, Med Sci* (中山大学学报, 医学版), 2015, 36: 78-87.
- 10 Yi EY, Park SY, Jung SY, *et al.* Mitochondrial dysfunction induces EMT through the TGF- β /Smad/Snail signaling pathway in Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*, 2015, 47: 1845-1853.
- 11 Kong D, Zhang F, Shao J, *et al.* Curcumin inhibits cobalt chloride-induced epithelial-to-mesenchymal transition associated with interference with TGF- β /Smad signaling in hepatocytes. *Lab Invest*, 2015, 95: 1234-1245.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

广西科学院

重庆市药物种植研究所

中国科学院广西植物研究所

昆明医科大学药学院