

新木脂素 VB-1 对人卵巢癌 CoC1 细胞生长的影响

曾凡香,唐爱琼,刘 杰,谢宛玉
(南华大学 第一附属医院 妇产科,湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 研究新木脂素 (VB-1) 对人卵巢癌 CoC1 细胞生长的影响。 **方法** MTT 还原法测定细胞活性;琼脂培养集落形成法检测细胞集落形成能力;碘化丙啶 (PI) 染色、流式细胞术分析细胞周期;Western Blotting 法分析 CDK2、CDK4 和 p21WAF1/CIP1 蛋白表达。 **结果** VB-1 显著抑制 CoC1 细胞活性 ($P<0.01$), 呈浓度依赖性,VB-1 以浓度依赖方式抑制 CoC1 细胞集落形成能力 ($P<0.01$), VB-1 阻滞 CoC1 细胞周期于 G1 期 ($P<0.05$)。 VB-1 下调 CDK2 和 CDK4 蛋白表达 ($P<0.05$), 同时上调 p21WAF1/CIP1 蛋白表达 ($P<0.05$)。 **结论** VB-1 具有抑制 CoC1 细胞生长作用,其作用机制可能与阻滞细胞周期进展相关。

关键词: 卵巢癌; 木脂素; CDK2; CDK4; p21WAF1/CIP1

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 2095-1116(2011)01-0033-04

Effects of Neolignan VB-1 on the Growth of Human Ovarian Cancer CoC1 Cells

ZENG Fan-xiang, TANG Ai-qiong, LIU Jie, et al
(*Department of Gynaecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China*)

Abstract: Objective To investigate whether (VB-1), a neolignan, inhibits the growth of human ovarian cancer CoC1 cells. **Methods** Cell viability was examined using MTT assay. Colony formation in CoC1 cells was detected using colony formation assay in soft agar. Cell cycle was analyzed by flow cytometry (FCM) using PI fluorescence staining. The expression of CDK2, CDK4 and p21WAF1/CIP1 protein was analyzed by Western Blot. **Results** VB-1 significantly inhibited the cell viability in CoC1 cells ($P<0.01$), in a concentration-dependent manner. VB-1 reduced the colony formation in CoC1 cells ($P<0.05$). FCM analysis after PI staining indicated that the percentage of G1 cell population in CoC1 cells was increased by treatment with VB-1 ($P<0.05$). VB-1 obviously decreased the expression of CDK2 and CDK4 protein ($P<0.05$), and upregulated the expression of p21WAF1/CIP1 protein ($P<0.05$). **Conclusion** VB-1 has the inhibitory effects on growth of human ovarian cancer CoC1 cell line, and its mechanisms are involved in arresting the progression of cell cycle.

Key words: ovarian cancer; lignan; CDK2; CDK4; p21WAF1/CIP1

卵巢癌的死亡率位居妇科恶性肿瘤之首^[1], 由于其发病初期症状、体征较为隐蔽而难以发现, 70% 的卵巢癌患者在就诊时已为晚期, 现有化疗药物紫杉醇类和铂类其毒副作用严重, 限制了其临床应用剂量, 故卵巢癌患者的 5 年生存率仅为 20% ~ 30%^[2]。新近研究表明: 从黄荆子乙酸乙酯提取物中得到的黄荆子木脂类化合物对多种肿瘤细胞具有细胞毒性, 其中以 6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-5-甲氧基-3,4-二氢(3R,4S)-2-醛基萘(6-hydroxy-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-hydro-methyl-7-methoxy-3,4-di-hydro-2-naphthaldehyde, VB

-1)的含量最高,并具有很强抗肿瘤活性^[3]。本文主要研究 VB-1 抑制人卵巢癌 CoCl 细胞生长作用,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

VB-1 参照文献[3]方法,由中南大学药学院药物化学系周应军博士提取、分离、纯化、结构确证并惠赠,分子式:C₂₀H₂₀O₆,分子量:354,性状:黄色粉末,纯度:98%。顺铂(DDP)为浙江海门制药厂产品;兔抗人 CDK2、CDK4、P21WAF1/CIP1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;鼠抗人 β-actin 抗体、HRP 标记羊抗兔、羊抗鼠二抗购自华美生物工程公司;BCA 浓度测定试剂盒购自 Pierce Chemical 公司;ECL Western 印迹检测试剂盒购自 NENTM Life Science;MTT 购自 Fluk 公司;碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

人卵巢癌 CoCl 细胞购于中国典型培养物保藏中心(中国武汉市),用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,加 100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素,置于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 MTT 还原法

取对数生长期 CoCl 细胞,以 5 000 个细胞/孔接种于 96 孔细胞培养板。分别加入 200 μL 含标示浓度 VB-1 和 DDP 的培养基。含 0.1% 二甲基亚砷(DMSO)的培养基作为溶媒对照。培养 48 h 后,加入 20 μL 5 mg/mL MTT 溶液,培养 4 h,离心,吸除培养基,加入 100 μL DMSO 溶解沉淀的紫蓝色晶体。用 ELX-800 酶联免疫检测仪在 570 nm 波长测定吸光度(A 值)。按公式 $IR(\%) = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 计算相对细胞活性抑制率。

1.4 琼脂培养集落形成法

取对数生长期 CoCl 细胞,用含 500 个细胞/mL、0.3% 琼脂、10% 小牛血清以及标示浓度 VB-1 和 DDP 的 RPMI-1640 培养基接种于 24 孔细胞培养板,1.0 mL/孔,培养 10 天,计数集落数。按公式 $\text{集落抑制率}(\%) = (1 - A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 计算细胞集落抑制率。

1.5 FCM 分析

取对数生长期的 CoCl 细胞,用含 0.1% 小牛血清培养基培养 24 h,分别加入含标示浓度 VB-1 的

培养基作用 24 h;0.1 % DMSO 作为溶媒对照。收集细胞,用 4℃ 75% 乙醇固定 24 h,经碘化丙啶(PI)染色,用流式细胞仪测定细胞 DNA 含量。

1.6 Western Blotting 分析

取经含标示浓度 VB-1 的培养基孵育 24 h 后的细胞,用细胞裂解液(0.1 mol/L NaCl,0.01 mol/L Tris-Cl(pH 7.6),0.001 mol/L EDTA(pH8.0),1 μg/mL Aprotinin,100 μg/mL PMSF)裂解细胞。细胞裂解液的蛋白样品(50 μg 总蛋白/泳道)10% SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜。分别加入 CDK2、CDK4、P21WAF1/CIP1 和 β-actin 一抗于 37℃ 孵育 2 h;PBS-T 洗膜 15 min,4 次。HRP 标记羊抗兔或羊抗鼠二抗(1:5 000)与膜孵育 1 h,PBS-T 洗膜 15 min,4 次。用增强型化学发光剂检测印迹蛋白。X 线胶片扫描后,用图像分析软件(Alphaimager™ 2200)分析,以处理组灰度面积的乘积/内参照(β-actin)灰度面积的乘积反映相对蛋白表达丰度,以溶媒组为 1.00。

1.7 统计学分析

实验数据录入 Spss 15.0 统计软件,建立数据库,各组实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 One Way ANOVA 行方差分析。 $P < 0.05$ 为统计学意义显著标准。

2 结 果

2.1 VB-1 对 CoCl 细胞活性的影响

MTT 法测定结果显示,VB-1 显著抑制 CoCl 细胞活性($P < 0.01$);VB-1 处理 48 h,随着药物浓度(0.1 ~ 30.0 μmol/L)的增高其相对细胞活性抑制率逐渐升高(表 1),IC₅₀ 为 1.39 μmol/L。

表 1 VB-1 对 CoCl 细胞活性的抑制作用($n=3$)		
组别	浓度(μmol/L)	相对抑制率(%)
DMSO 组		1.2 ± 0.2
顺氯氨铂组	20.0	89.5 ± 14.6 ^a
VB-1 组	0.1	8.6 ± 0.8
	0.3	24.8 ± 3.5 ^{bc}
	1.0	41.9 ± 3.8 ^{bd}
	3.0	67.3 ± 5.2 ^{cd}
	10.0	85.4 ± 11.7 ^{ac}
	30.0	91.5 ± 12.4 ^{ac}

与二甲基亚砷组比较,a: $P < 0.001$;b: $P < 0.01$ 。与 0.1 μmol/L VB-1 组比较,c: $P < 0.001$;d: $P < 0.01$;e: $P < 0.05$;IC₅₀ 为 1.39 μmol/L

2.2 VB-1 对 CoC1 细胞集落形成能力的影响

软琼脂培养集落形成法检测结果表明:VB-1 显著抑制 CoC1 细胞集落形成($P<0.01$),呈浓度依赖性(表 2)。

2.3 VB-1 对 CoC1 细胞周期的影响

PI 染色 FCM 分析结果显示:VB-1 增加 CoC1 细胞系 G1/G0 期细胞百分率($P<0.05$),降低 S 期和 G2/M 细胞百分率($P<0.05$),说明,VB-1 使 CoC1 细胞周期阻滞于 G1/G0 期(图 1,表 3)。

表 2 VB-1 对 CoC1 细胞集落形成能力的抑制 (n=9)

组别	浓度 (μmol/L)	集落数 (个)	集落抑制率 (%)
DMSO 组		183 ± 26	0.0
顺氯氨铂组	20.0	37 ± 8 ^a	79.8
VB-1 组	0.1	169 ± 18	7.6
	1.0	97 ± 13 ^{bc}	46.9
	10.0	42 ± 5 ^{ad}	77.0

与 DMSO 组比较,a: $P<0.001$;b: $P<0.01$;与 0.1 μmol/L VB-1 组比较,c: $P<0.05$;d: $P<0.01$

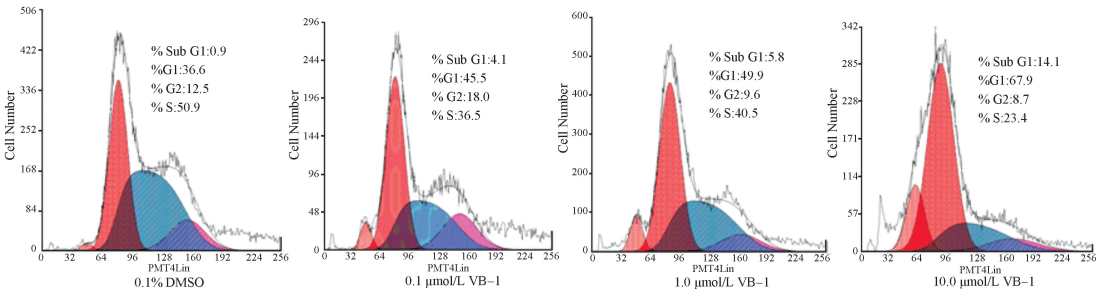


图 1 VB-1 诱导 CoC1 细胞周期 G1 期阻滞

表 3 VB-1 对 CoC1 细胞周期分布的影响 (% ,n=3)

组别	浓度(μmol/L)	G1	G1/G0	G2/M	S
DMSO 组		1.23 ± 0.28	38.1 ± 7.56	15.4 ± 4.32	47.2 ± 6.32
VB-1 组	0.1	4.32 ± 0.85 ^a	46.8 ± 8.21	13.5 ± 2.65	41.5 ± 5.28
	1.0	6.42 ± 1.32 ^a	52.6 ± 9.24 ^a	10.6 ± 1.53 ^a	38.1 ± 6.26 ^a
	10.0	16.7 ± 3.52 ^b	69.5 ± 12.3 ^b	8.4 ± 1.32 ^b	22.6 ± 7.25 ^b

与 DMSO 组比较,a: $P<0.05$;b: $P<0.01$

2.4 VB-1 对 CDK2 和 CDK4 蛋白表达的影响

用不同浓度的 VB-1 作用于 CoCk 细胞 24 h 后,Western Blot 检测发现,CDK2、CDK4 蛋白表达随着 VB-1 在一定浓度范围内(0.1 ~ 10.0 μmol/L)的增加而递减(图 2)。

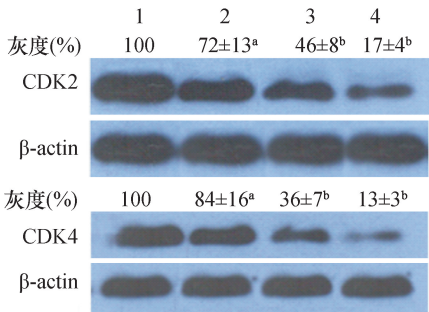


图 2 VB-1 下调 CoC1 细胞 CDK2 和 CDK4 蛋白表达(n=3)

1:DMSO; 2: 0.1 μmol/L VB-1; 3: 1.0 μmol/L VB-1; 4: 10.0 μmol/L VB-1; 与 DMSO 组比较,a: $P<0.05$;b: $P<0.01$

2.5 VB-1 对 CoC1 细胞 p21WAF1/CIP1 蛋白表达的影响

不同浓度的 VB-1 孵育 CoC1 细胞 24 h,Western 印迹检测表明,p21WAF1/CIP1 蛋白表达随着 VB-1 在一定范围内浓度(0.1 ~ 10.0 μmol/L)的增加而依次上升(图 3)。

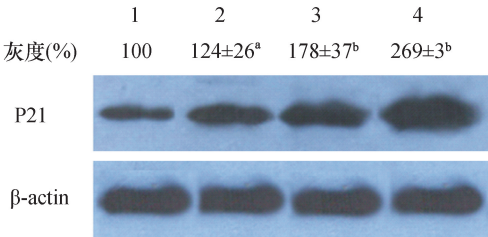


图 3 VB-1 上调 CoC1 细胞 p21WAF1/CIP1 蛋白表达(n=3)

1:DMSO; 2: 0.1 μmol/L VB-1; 3: 1.0 μmol/L VB-1; 4: 10.0 μmol/L VB-1; 与 DMSO 组比较,a: $P<0.05$;b: $P<0.01$

木脂素(lignans)是一类由两分子苯丙素衍生物(即C6-C3单体)聚合而成的天然化合物,多数呈游离状态,少数与糖结合成苷而存在于植物的木部和树脂中。木脂素类化合物具有抗肿瘤、抗病毒、保护肝脏、抗氧化、血小板活化因子拮抗活性等药理作用,尤其是在抗肿瘤、抗病毒方面发挥着重要的作用^[4,5]。研究表明,VB-1通过降低Bcl-2/Bax的比值以及活化Caspase,促进细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用^[3]。本研究结果表明,VB-1可抑制体外培养的CoC卵巢癌细胞增殖,且在一定浓度范围内(0.1~30 μmol/L)呈浓度依赖性。进一步证实了研究结果的可重复性。同时VB-1也以浓度依赖方式抑制CoC1细胞集落形成,说明VB-1能有效抑制人卵巢癌细胞生长。

在肿瘤发生发展过程中,细胞周期失调是很常见的事件。药物通过影响肿瘤基因表达产物来调控细胞周期各个点,调控肿瘤细胞周期启动、运行和终止^[6]。有研究发现木脂素类化合物牛蒡子苷能阻滞胰腺癌细胞CAPAN-1细胞和肝癌Hep G2细胞周期于G0/G1期并诱导细胞凋亡^[7,8]。本研究使用流式细胞术行细胞周期分析显示:VB-1使G0/G1期CoC1细胞的比例增加,S期和G2/M期细胞比例相应下降,阻止细胞周期的进展,说明VB-1抑制细胞生长可能与其阻滞细胞周期的有序运行有关。细胞周期是一个多因素调节的复杂过程。这些因素包括细胞周期蛋白(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖激酶(CDK)和细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子(CDI)三大类。细胞增殖和生长的主要调控点在G1期,Cyclin D/CDK4、Cyclin E/CDK2为G1期的限速步骤。CDK2、CDK4的激活可产生许多细胞周期相关蛋白,从而启动G1期并进入S期。p21WAF1/CIP1蛋白为CDI的主要家族成员之一,它主要结合和钝化CDK2-Cyclin E、CDK4-Cyclin D

复合物,阻滞细胞周期的进行,诱导细胞停滞在G1期。本文的实验结果显示:VB-1使人卵巢癌细胞中CDK2和CDK4蛋白的表达下调,p21WAF1/CIP1蛋白表达上调,且呈浓度依赖效应。CDK2、CDK4蛋白表达的降低及p21WAF1/CIP1蛋白表达上调抑制了CDK2、CDK4活性,从而诱导细胞周期停滞在G1期。

总之,VB-1能抑制卵巢癌细胞CoC1细胞的增殖和生长。VB-1下调CDK2、CDK4蛋白的表达,上调p21WAF1/CIP1蛋白的表达,可能是VB-1阻止细胞周期进展的机制之一。本文的研究结果为VB-1抗卵巢癌作用的机制提供了初步的实验依据。

参考文献:

- [1] 曹泽毅. 妇产科学. 第2版[M]. 北京:人民卫生出版社,2004. 2154.
- [2] Mliedzinska-maciejewska M, Weislo G. Mechanism of multidrug resistance of ovarian cancer[J]. Przegł Lek, 2002, 59:854-858.
- [3] Zhou YJ, L Ellie YI, Cao JG, et al. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15 (16): 5161-6169.
- [4] 韩果萍, 周华凤. 木脂素类化合物的药理研究进展[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2005, 33: 142-144.
- [5] 吴立军, 吴继洲, 王锋鹏, 等. 天然药物化学. 第4版[M]. 北京:人民出版社, 2003. 142-143.
- [6] Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 36(1): 60-65.
- [7] 郑国灿. 牛蒡子苷对胰腺癌细胞抑制作用及其作用机理的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2384-2385.
- [8] 郑国灿. 牛蒡子苷诱导人肝癌HepG2细胞凋亡的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(3): 586-587, 590.

(此文编辑 朱雯霞)