

## · 基础研究 ·

血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌 A2780/Taxol 细胞生长及 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路抑制的影响

张素仙 王妍妍 张 琴 杨丽华

**摘要** **目的** 探讨血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌 A2780/Taxol 细胞生长及 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路和紫杉醇敏感性的影响。**方法** 将 A2780/Taxol 细胞分为对照组、血根碱组、紫杉醇组、血根碱联合紫杉醇组(简称联合组),对照组加生理盐水,其余 3 组分别应用 2  $\mu\text{mol/L}$  血根碱、2  $\mu\text{g/mL}$  紫杉醇、2  $\mu\text{mol/L}$  血根碱 + 2  $\mu\text{g/mL}$  紫杉醇处理。48 h 后应用倒置显微镜观察 A2780/Taxol 细胞形态、MTT 法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期,Western blot 法检测 Caspase-3、TGF- $\beta_1$ 、Smad7 蛋白表达。**结果** 对照组细胞贴壁生长,边界清楚;血根碱组细胞体积缩小,贴壁数减少;紫杉醇组见细胞呈圆形脱落;联合组上变化最为明显。与对照组比较,3 组均可显著抑制 A2780/Taxol 细胞增殖,上调 Caspase-3、Smad7 蛋白表达、下调 TGF- $\beta_1$  蛋白表达,联合组作用最为明显( $P < 0.05$ )。血根碱组对细胞周期无影响,紫杉醇组及联合组 G0/G1 期、S 期细胞减少,G2/M 期细胞增多。**结论** 血根碱通过抑制 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路,促进 Caspase-3 表达抑制 A2780/Taxol 细胞生长,促进紫杉醇药物敏感性。

**关键词** 血根碱;卵巢癌;紫杉醇;耐药;TGF- $\beta_1$ /Smad 通路

Sanguinarine Inhibited A2780/Taxol Cell Growth and TGF- $\beta_1$ /Smad pathway in Paclitaxel Resistant Ovarian Cancer ZHANG Su-xian, WANG Yan-yan, ZHANG Qin, and YANG Li-hua Department of Gynecology, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming (650101)

**ABSTRACT** **Objective** To study the effect of Sanguinarine on A2780/Taxol cell growth, TGF- $\beta_1$ /Smad pathway, and the sensitivity to paclitaxel in treatment of paclitaxel resistant ovarian cancer. **Methods** A2780/Taxol cells were divided into the control group, the sanguinarine group, the paclitaxel group, the paclitaxel combined sanguinarine group (combined group in short). Normal saline was added to cells in control group. Cells in the rest three groups were added 2.0  $\mu\text{mol/L}$  sanguinarine, 2  $\mu\text{g/mL}$  paclitaxel, and 2.0  $\mu\text{mol/L}$  sanguinarine combined 2  $\mu\text{g/mL}$  paclitaxel respectively. The morphology of A2780/Taxol cells was observed by inverted microscope. The cell proliferation were detected by MTT. The cell cycle was detected by flow cytometry. And the expressions of Caspase-3, TGF- $\beta_1$ , and Smad7 proteins were detected by Western blot. **Results** The cells in control group were adhered to the wall and the boundary was clear. the cell volume decreased and the number of adherent cells decreased in sanguinarine group. The cells in Taxol group fall off were circularly. These changes were most obvious in the combined group. Compared with the control group, the proliferation of A2780/Taxol cells could be significantly inhibited, the expressions of Caspase-3 and Smad7 protein were up-regulated, the expression of TGF- $\beta_1$  protein was down-regulated in the rest 3 groups. The most effect was obviously seen in the combined group ( $P < 0.05$ ). Sanguinarine showed no effect on cell cycle. The cell numbers of G0/G1 and S phase decreased and the cell number of G2/M phase increased in the paclitaxel group and the combined

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(No.D-201633); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项资助项目[No. 2017FE467(-062)]

作者单位: 昆明医科大学第二附属医院妇科(昆明 650101)

通讯作者: 杨丽华, Tel: 138759481789, E-mail: yanglihua0628@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20180119. 094

group. Conclusion Sanguinarine could inhibit the growth of A2780/Taxol cells and enhance the sensitivity of paclitaxel by suppressing TGF- $\beta_1$ /Smad pathway and promoting Caspase-3 expression.

KEYWORDS sanguinarine; ovarian cancer; paclitaxel; drug resistance; TGF- $\beta_1$ /Smad pathway

卵巢癌在女性生殖系统恶性肿瘤发病率中排名第二,但病死率却最高,5 年存活率仅 30%<sup>[1]</sup>。手术、化疗是卵巢癌的主要治疗方式,紫杉醇为一线化疗药物。但其耐药性始终是困扰临床的一个重要问题,耐药的产生常使化疗难以奏效甚至最终导致治疗失败,严重影响着患者的生活质量及生存期<sup>[2]</sup>。因此,寻找高效、低毒的紫杉醇耐药逆转剂具有重要意义。本课题组前期通过生物信息学方法挖掘可能对紫杉醇耐药卵巢癌有潜在治疗作用的药物研究,寻找到一个天然产物血根碱<sup>[3]</sup>。本实验以紫杉醇耐药卵巢癌细胞株 A2780/Taxol 为对象,探讨血根碱对对其生长及化疗敏感性的影响,为血根碱用于卵巢癌治疗提供实验依据。

## 材料与方法

1 细胞及培养 人卵巢癌紫杉醇耐药株 A2780/Taxol 购自上海奥陆生物科技有限公司,购货号:XS-2015-11-02-632,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养,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。

2 药物 血根碱(批号:20150607,纯度>98%,分子式:C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>)购自上海融禾医药科技有限公司,紫杉醇(批号:20150102,纯度 99.6%,分子式:C<sub>47</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>14</sub>)购自海口市制药厂有限公司。

3 试剂及仪器 二甲基亚砜(DMSO)、兔抗 TGF- $\beta$  多克隆抗体购至 Sigma 公司;噻唑蓝(MTT)购自碧云天生物技术研究公司;兔抗 Caspase-3 多克隆抗体购至博奥森,DNA 一步法细胞周期测试盒购至 Sysmex 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。流式细胞仪,CyFlow Space,德国 Partec GmbH 公司;倒置相差荧光显微镜,DMIL LED,德国 LEICA 公司;超净工作台,SPEG AIR TECH,苏州净化设备厂;恒温培养箱,SI6R-2,美国 SheUab 公司;冷冻离心机,D-37520,美国 Thermo 公司;恒温振荡器,TS-211B,上海天呈实验器材制造有限公司。

## 4 方法

4.1 分组 将细胞分为 4 组,对照组、血根碱组、紫杉醇组及血根碱联合紫杉醇组(简称联合组)。

对照组加生理盐水,血根碱组加 2  $\mu$ mol/L 血根碱 10  $\mu$ L,紫杉醇组加 2  $\mu$ g/mL 紫杉醇 10  $\mu$ L,联合组同时加 2  $\mu$ mol/L 血根碱及 2  $\mu$ g/mL 紫杉醇各 10  $\mu$ L,给药剂量依据前期预实验结果。

4.2 细胞增殖 取对数生长期 A2780/Taxol 细胞,调细胞密度为 1  $\times 10^4$ /mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 100  $\mu$ L。4 h 后,各组按照设计分别加药,培养 12、24、48 h 后,采用 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。

4.3 细胞形态 取对数生长期 A2780/Taxol 细胞,调整细胞浓度 1  $\times 10^5$ /mL,加入 6 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,4 h 后各组按照设计分别加药。培养 24 h,将 6 孔板置于倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化。

4.4 细胞周期 取对数生长期的 A2780/Taxol 细胞,调整细胞浓度至 2.5  $\times 10^3$ /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 1 mL DNA 一步法细胞周期检测试剂,避光孵育 10 min,采用流式细胞仪检测细胞各周期的变化。用 Multicycle 细胞周期分析软件对数据进行分析,分别计算 G0/G1、G2/M 和 S 期细胞的相对比例,分析各组细胞周期的变化。实验独立重复 3 次。

4.5 Caspase-3、TGF- $\beta_1$ 、Smad7 蛋白表达 采用 Western blot 检测。取对数生长期 A2780/Taxol 细胞 2  $\times 10^6$ /mL,裂解、提取蛋白。4℃ 14 000 r/min 离心,收集上清液,进行 SDS-PAGE 电泳、转 PVDF 膜、封闭 60 min。加入兔抗人 Caspase-3 多克隆抗体、小鼠抗 Smad7 多克隆抗体、兔抗 TGF- $\beta$  多克隆抗体(1:500);鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体蛋白的抗体(1:1 000),4℃ 过夜,PBS 洗膜 5 min  $\times$  3 次。再加入稀释的(1:2 000)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。

4.6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

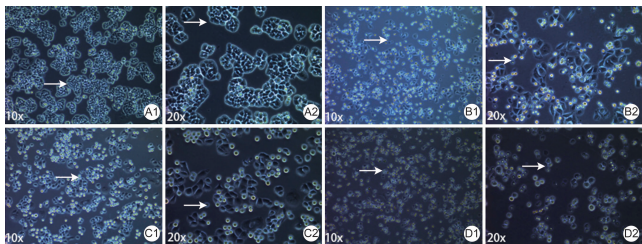
## 结 果

1 4 组 A2780/Taxol 细胞形态观察(图 1) 对照

表 1 各组细胞增殖抑制率比较 (%,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n | 抑制率         |                        |                         |                         |
|-----|---|-------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|     |   | 0 h         | 12 h                   | 24 h                    | 48 h                    |
| 对照  | 3 | 0.00 ± 0.00 | 0.98 ± 0.17            | 1.75 ± 0.43             | 3.18 ± 0.96             |
| 血根碱 | 3 | 0.00 ± 0.00 | 8.12 ± 2.40 * $\Delta$ | 25.69 ± 4.12 * $\Delta$ | 49.39 ± 8.51 * $\Delta$ |
| 紫杉醇 | 3 | 0.00 ± 0.00 | 4.63 ± 1.35 * $\Delta$ | 8.07 ± 2.14 * $\Delta$  | 10.67 ± 3.87 * $\Delta$ |
| 联合  | 3 | 0.00 ± 0.00 | 15.17 ± 2.08 *         | 48.57 ± 2.63 *          | 78.46 ± 3.95 *          |

注:与对照组同期比较, \* $P < 0.05$ ; 与联合组同期比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 下表同



注:A 为对照组,其中 A1  $\times 10$ , A2  $\times 20$ ; B 为血根碱组,其中 B1  $\times 10$ , B2  $\times 20$ ; C 为紫杉醇组,其中 C1  $\times 10$ , C2  $\times 20$ ; D 为联合组,其中 D1  $\times 10$ , D2  $\times 20$

图 1 4 组 A2780/Taxol 细胞形态观察结果

组细胞呈贴壁生长,肿瘤细胞大小形态不一,生长速度快,核质比高,边界清楚,细胞核呈圆形。血根碱组细胞出现细胞核及细胞质皱缩,细胞体积缩小,细胞内空泡增多,细胞松散间隙增大,贴壁数减少,细胞呈圆形漂浮脱落,出现小团聚集现象。紫杉醇组细胞也可见部分细胞呈圆形漂浮脱落。联合组细胞上述变化最为明显。

2 4 组细胞增殖情况比较(表 1) 与对照组比较,各组各时间点细胞增殖均被显著抑制( $P < 0.05$ ),联合组的细胞抑制率明显高于血根碱组、紫杉醇组( $P < 0.05$ )。

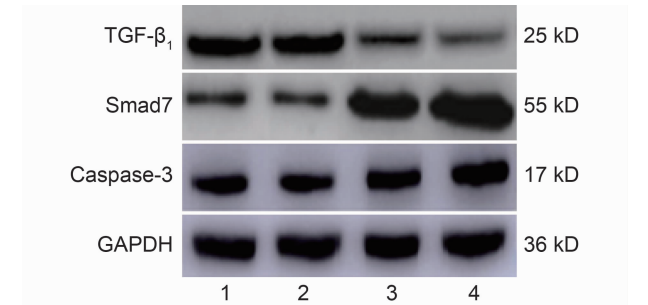
3 4 组 A2780/Taxol 细胞周期比较(表 2) 与对照组比较,血根碱组细胞周期百分比无明显变化( $P > 0.05$ ),紫杉醇组及联合组 G0/G1 期、S 期细胞减少,G2/M 期细胞增多( $P < 0.05$ );与紫杉醇组比较,联合组 G0/G1 期、S 期细胞减少,G2/M 期细胞增多变化更为明显( $P < 0.05$ )。

表 2 4 组 A2780/Taxol 细胞周期百分比比较 (%,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n | G0/G1                   | S                      | G2/M                    |
|-----|---|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 对照  | 3 | 50.98 ± 0.49            | 25.53 ± 4.69           | 21.82 ± 1.52            |
| 血根碱 | 3 | 54.16 ± 2.64            | 23.18 ± 1.88           | 22.66 ± 1.48            |
| 紫杉醇 | 3 | 12.10 ± 2.10 * $\Delta$ | 7.75 ± 4.18 * $\Delta$ | 80.14 ± 2.10 * $\Delta$ |
| 联合  | 3 | 38.79 ± 10.51 *         | 12.45 ± 4.21 *         | 48.76 ± 10.16 *         |

4 4 组 A2780/Taxol 细胞 Caspase-3、TGF- $\beta_1$ 、Smad7 蛋白表达比较(图 2,表 3) 与对照组比

较,紫杉醇组、血根碱组、联合组 Caspase-3、Smad7 显著上调、TGF- $\beta_1$  显著降低( $P < 0.05$ );与联合组比较,血根碱组、紫杉醇组 TGF- $\beta_1$ 、Smad7 蛋白水平差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



注:1 为对照组;2 为血根碱组;3 为紫杉醇组;4 为联合组

图 2 4 组 A2780/Taxol 细胞 Caspase-3、TGF- $\beta_1$ 、Smad7 蛋白表达电泳图

表 3 4 组 A2780/Taxol 细胞 Caspase-3、TGF- $\beta_1$ 、Smad7 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | n | Caspase-3                | TGF- $\beta_1$           | Smad7                    |
|-----|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 对照  | 3 | 0.511 ± 0.038            | 0.832 ± 0.072            | 0.348 ± 0.060            |
| 血根碱 | 3 | 0.635 ± 0.062 * $\Delta$ | 0.343 ± 0.037 * $\Delta$ | 0.989 ± 0.063 * $\Delta$ |
| 紫杉醇 | 3 | 0.573 ± 0.034 * $\Delta$ | 0.805 ± 0.034 * $\Delta$ | 0.327 ± 0.062 * $\Delta$ |
| 联合  | 3 | 0.796 ± 0.073 *          | 0.302 ± 0.049 *          | 1.427 ± 0.075 *          |

讨 论

血根碱是从博落回[*Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.]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(*chelidonium majus* L.)的全草,紫堇的块、根等,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<sup>[4-6]</sup>。为探讨血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌细胞的作用,本实验应用血根碱处理人紫杉醇耐药卵巢癌细胞 A2780/Taxol 细胞,检测血根碱对细胞增殖、形态、细胞周期的影响,发现血根碱能够显著抑制卵巢癌细胞增殖,引起细胞形态明显的改变,但不改变细胞周期。

为探讨血根碱对紫杉醇耐药卵巢癌的可能机制,笔者应用 Enrichr 工具中 CMap 平台分析与血根碱作用相关的基因并对其进行 KEGG 通路分析,发现血根碱对耐药卵巢癌的作用与 TGF- $\beta_1$ /Smad 通路有关<sup>[3]</sup>,该通路通过磷酸化转录因子 Smad 蛋白,启动细胞内传导通路发挥作用。Smad 蛋白有 Smad1-Smad9,活化后的 Smad2、Smad3 与 Smad4 结合完成 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的正调控; Smad7 阻止 Smad2、Smad3 活化,实现对 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的负调控,从而保持 TGF- $\beta$ /Smad 通路的平衡<sup>[7,8]</sup>。大多数肿瘤中 TGF- $\beta$ /Smad 通路被激活,肿瘤细胞凋亡被抑制从而促进肿瘤的发生、发展<sup>[9,10]</sup>。有研究报道认为 TGF- $\beta_1$  作为细胞外基质的组成成分,在一些进展期肿瘤中高表达,诱导肿瘤细胞发生上皮间质转化、出现干细胞特征,实现肿瘤的侵袭转移及耐药<sup>[11]</sup>。本研究 Western blot 实验发现血根碱可下调卵巢癌细胞中 TGF- $\beta_1$ ,上调 Smad7 蛋白表达。提示血根碱可抑制 TGF- $\beta$ /Smad 通路,促进肿瘤细胞凋亡,阻断肿瘤细胞上皮间质转化,逆转肿瘤细胞耐药、增殖等恶性行为。

同时应用流式细胞仪检测血根碱、紫杉醇处理 A2780/Taxol 细胞周期的影响,发现血根碱组 A2780/Taxol 细胞周期各期细胞百分比与对照组相比未见明显差异,提示血根碱不影响细胞周期。而紫杉醇组 G2/M 期细胞百分比明显增加,与文献<sup>[11]</sup>报道的紫杉醇使肿瘤细胞周期阻滞于 G2/M 期的结论相符,说明紫杉醇通过将肿瘤细胞阻滞于 G2/M 期而发挥抗肿瘤特性,G2/M 期是 DNA 合成后期,是有丝分裂的准备期。血根碱联合紫杉醇组与单独使用紫杉醇组比较,细胞周期中 G0/G1 期细胞比例显著增加,而 G2/M 期细胞比例逐渐降低,说明血根碱联合紫杉醇处理 A2780/Taxol 细胞后,可使细胞周期阻滞于 G0/G1 期,G0/G1 期的主要功能是迅速合成 RNA 和蛋白质,为下阶段 S 期的 DNA 复制作好物质和能量的准备,而 DNA 复制所需要的酶都在这 S 期合成;一旦 G0/G1 期及 S 期被阻滞,细胞合成所需的关键酶及蛋白有可能终断,而干扰肿瘤细胞的增殖,使其进入暂不增殖或直接转变为不增殖细胞,最终失去分裂能力,终身处于 G0/G1 期,最后通过分化、衰老直至死亡。

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细胞作用及机制,需要在多个耐药卵巢癌细胞系及卵巢癌

的移植瘤模型中进一步研究。

利益冲突:无。

## 参 考 文 献

- [1] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
- [2] 王新宇, 谢幸. 妇科恶性肿瘤的非手术治疗[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(3): 163-165.
- [3] 梁宏. 基于生物信息学挖掘卵巢癌顺铂耐药机制及潜在治疗药物[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016.
- [4] Kalogris C, Garulli C, Pietrella L, et al. Sanguinarine suppresses basal-like breast cancer growth through dihydrofolate reductase inhibition [J]. Biochem Pharmacol, 2014, 90(3): 226-234.
- [5] Gatti L, Cossa G, Tinelli S, et al. Improved apoptotic cell death in drug-resistant non-small-cell lung cancer cells by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-based treatment [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2014, 348(3): 360-371.
- [6] Eid SY, El-Readi MZ, Eldin EE, et al. Influence of combinations of digitonin with selected phenolics, terpenoids, and alkaloids on the expression and activity of P-glycoprotein in leukaemia and colon cancer cells [J]. Phytomedicine, 2013, 21(1): 47-61.
- [7] Lonn P, Moren A, Raja E, et al. Regulating the stability of TGF beta receptors and Smads [J]. Cell Res, 2009, 19(6): 21-35.
- [8] Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of tgfbeta in the tumor microenvironment [J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(11): 788-799.
- [9] 高向朋, 刘清, 刘涛, 等. TGF- $\beta_1$ /Smad7 信号通路在食管鳞癌上皮间质转化中的作用 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2015, 36(1): 78-87.
- [10] Yi EY, Park SY, Jung SY, et al. Mitochondrial dysfunction induces EMT through the TGF- $\beta$ /Smad/Snail signaling pathway in Hep3B hepatocellular carcinoma cells [J]. Int J Oncol, 2015, 47(5): 1845-1853.
- [11] 刘先芳, 梁敬钰, 孙建博. 紫杉醇: 具有里程碑意义的天然抗癌药物 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2017, 19(6): 941-949.

(收稿: 2017-05-12 在线: 2018-06-01)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶