

论 著
(基础研究)

橄榄苦苷对体外卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响

谢树红, 黄惠娟, 许玉黎, 郑小花, 杨 帆

【摘要】 目的 探讨不同浓度的橄榄苦苷在不同作用时间对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响。**方法** SKOV3 卵巢癌细胞传代培养后接种于 3 块 96 孔板, 每板实验组细胞用 100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 的橄榄苦苷培养液, 对照组细胞用 McCoy's 5A 完全培养基。CCK-8 检测法测定 24、48、72 h 等 3 个时间点不同药物浓度的 SKOV3 细胞增殖情况。**结果** 相同作用时间下, 与对照组比较, 100、200、400、800 $\mu\text{g/mL}$ 的橄榄苦苷浓度对 SKOV3 细胞的增殖均有抑制作用, 细胞生长 A 值随着药物浓度增大而减小 ($P < 0.05$); 在 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的药物浓度下, 细胞生长 A 值随着作用时间延长而增大 ($P < 0.05$), 当药物浓度达 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞生长迟缓, 至 72 h 细胞 A 值较 24、48 h 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 抑制率随着药物浓度增大而增大 ($P < 0.05$), 与作用时间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 橄榄苦苷对卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖有抑制作用, 具体机制尚待后期实验研究。

【关键词】 橄榄苦苷; 卵巢癌; 细胞增殖**【中图分类号】** R915 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2018)04-0361-04**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2018.04.008Effects of oleuropein on proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells *in vitro*

XIE Shu-hong, HUANG Hui-juan, XU Yu-li, ZHENG Xiao-hua, YANG Fan

(Department of Obstetrics and Gynecology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of different concentration of oleuropein on proliferation of ovarian cancer cell SKOV3 in different time. **Methods** SKOV3 ovarian cancer cells were inoculated in 3 blocks of 96 well plate. Cells of each trial group were treated with 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g/mL}$ oleuropein and vehicle, respectively. The proliferation of SKOV3 cells was determined by using CCK-8 assays after the treatment with indicated concentration of oleuropein for 24, 48, and 72 h. **Results** 100, 200, 400, and 800 $\mu\text{g/mL}$ oleuropein significantly inhibited the proliferation of SKOV3 cells. Optical density (OD) was decreased accompanying with the dose increase of oleuropein ($P < 0.05$). ODs of SKOV3 cells treated with 100, 200, and 400 $\mu\text{g/mL}$ oleuropein were increased for the indicated incubation time ($P < 0.05$). The proliferation of cells treated with 800 $\mu\text{g/mL}$ oleuropein for 72 h was retarded compared with those for 24 h and 48 h ($P < 0.05$). The inhibition rate of cell proliferation was increased with the dose increase of oleuropein treatment ($P < 0.05$). However, there was no significant correlation with the incubation time ($P > 0.05$). **Conclusion** Oleuropein could inhibit the proliferation of ovarian cancer cell SKOV3, the specific mechanisms needs further experimental study.

【Key words】 oleuropein; ovarian cancer; cell proliferation

基金项目: 全军医药卫生课题 (14MS129); 福建省科技计划项目 (2014Y5008)

作者单位: 350025 福州, 南京军区福州总医院妇产科 (谢树红、黄惠娟、许玉黎、郑小花、杨帆)

通信作者: 黄惠娟, E-mail: hhj352@163.com

0 引 言

卵巢癌是女性癌症死亡的第四大原因, 其中卵巢上皮性癌占卵巢恶性肿瘤的 90% 以上, 5 年生存率受分期影响波动于 27%~46%^[1-3]。卵巢癌的基本治疗

原则为广泛肿瘤细胞减灭术辅以顺铂联合紫杉醇的化疗方案,但易发生化疗耐药及癌灶复发,据统计 90% 的晚期卵巢癌患者死亡原因与多药耐药的发展有关^[4]。因此,目前对于卵巢癌的治疗迫切需要寻找一种既有效且不良反应小的新型药,对提升卵巢癌患者的生活质量、生存率等具有重要意义。多方研究表明,富含于天然橄榄油或橄榄叶中的橄榄苦苷在对抗子宫内膜癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、前列腺癌等肿瘤中已显示出积极的抑癌作用。本研究欲通过体外实验进一步探究橄榄苦苷对卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖是否同样有影响以及不同浓度的橄榄苦苷在不同作用时间下细胞改变情况。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药物及试剂 实验用卵巢癌 SKOV3 细胞由福州总医院实验科提供。橄榄苦苷(Funakoshi, Tokyo Japan), McCoy's 5A 培养基(美国 sigma 公司)、胎牛血清(美国 gibco 公司)、青霉素\链霉素双抗溶液(美国 gibco 公司)、0.25% 胰蛋白酶(美国 gibco 公司)、PBS 缓冲液(美国 Hyclone 公司)、cck-8 试剂盒(美国 genview 公司)、DMSO 溶液(二甲基亚砜,南京凯基生物公司)、25 cm² 培养瓶、15 mL 离心管、50 mL 离心管(美国 corning 公司)

1.2 方法 ①细胞培养:用含 10% 胎牛血清、1% 双抗溶液配制的 McCoy's 5A 完全培养基将 SKOV3 卵巢癌细胞接种到 25 cm² 的培养瓶中,置于 37 ℃ 的 5% CO₂ 培养箱中。待电子显微镜下观察细胞生长至 80%~90% 汇合度时,用 0.25% 胰酶消化传代,平均 3 d 传代 1 次。②细胞接种:SKOV3 细胞生长至 80%~90% 汇合度后,用 0.25% 胰酶消化成单个细胞,台盼蓝染色计数后重新调整细胞浓度至 5×10⁴ 个/mL,以细胞数 5000 个/孔接种至 96 孔板,即每孔 100 μL 细胞培养液,每组 6 个平行样本,设置 5 个细胞组,包括 4 个不同浓度药物组(药物+培养液+细胞)和 1 个对照组(培养液+细胞)。设 1 个空白组[仅含培养液,用于校正培养液对吸光度(A)的影响],周边空白格以 PBS 缓冲液等体积填充。③CCK-8 法检测细胞增殖变化:接种在 96 孔板的细胞贴壁后,每孔加入 10 μL 不同浓度的橄榄苦苷(800、400、200、100、0 μg/mL),其中橄榄苦苷粉末用 DMSO 有机溶剂溶解,用 McCoy's 5A 培养基稀释

到需要浓度,并确保 DMSO 终浓度<0.1% 以避免对细胞的损害作用。分别培养细胞至 24、48、72 h(观察时间的选择基于 SKOV3 细胞传代时间在 48~72 h)。在相应时间后以换液形式加入含 10% CCK-8 的培养基,置于 37 ℃ 的 5% CO₂ 培养箱中继续培养 60 min 后用酶标仪在 450 nm 测定细胞 A 值。④根据细胞不同生长时间 A 值绘制细胞生长曲线图,并以柱状图比较不同浓度下药物抑制率随时间的变化。其中细胞抑制率的计算公式如下:

抑制率(%) = [1 - (药物组 - 空白组) / (对照组 - 空白组)] × 100%

1.3 统计学分析 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对各组数据进行单因素方差分析,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度橄榄苦苷与作用时间下 SKOV3 细胞生长 A 值比较 相同作用时间下,各药物浓度组与对照组相比,细胞生长受到抑制,A 值随着药物浓度增大而变小,与对照组 A 值比较差异有统计学意义(P<0.05);相同作用浓度下,100、200、400 μg/mL 的细胞可随着作用时间延长 A 值增大,3 个时间 A 值比较差异有统计学意义(P<0.05),在药物浓度 800 μg/mL 时,细胞生长明显受到抑制,在 24 h 和 48 h 内 A 值未发生明显变化(P>0.05),当作用时间达 72 h 时,A 值与 24、48 h 比较差异有统计学意义(P<0.05)。随着药物浓度的增加,细胞生长曲线逐渐降低趋向水平。见表 1、图 1。

表 1 不同浓度橄榄苦苷与作用时间下 SKOV3 细胞生长 A 值($\bar{x} \pm s$)

组别	A 值		
	24 h	48 h	72 h
空白组	0.61±0.01	0.58±0.02	0.57±0.02
对照组	0.89±0.02	1.47±0.06	2.02±0.03
药物组			
100 μg/mL 药物组	0.87±0.01 *	1.40±0.04 **	1.94±0.02 **△
200 μg/mL 药物组	0.83±0.02 *	1.27±0.06 **	1.77±0.10 **△
400 μg/mL 药物组	0.78±0.02 *	1.03±0.07 **	1.39±0.05 **△
800 μg/mL 药物组	0.64±0.02 *	0.64±0.02 *	0.70±0.03 **△

与对照组相比,*P<0.05;同一浓度下,与 24 h 比较,#P<0.05;与 48 h 比较,△P<0.05

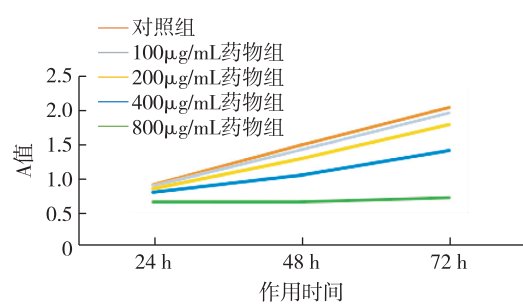


图 1 不同浓度橄榄苦苷与作用时间下的 SKOV3 细胞生长曲线

2.2 不同浓度橄榄苦苷与作用时间下 SKOV3 细胞抑制率比较 在相同作用时间下,细胞生长抑制率随着药物浓度增大而增大,组间两两比较差异有统计学意义($P<0.05$)。在相同浓度下,药物的抑制率并未随着作用时间的延长发生显著差异,不同时间抑制率两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。在 100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度梯度下,细胞抑制率逐渐增大,但抑制率未随作用延长发生显著改变。见表 2。

表 2 不同浓度橄榄苦苷与作用时间下 SKOV3 细胞抑制率 ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	细胞抑制率		
	24 h	48 h	72 h
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物组	6.46 \pm 10.51	7.62 \pm 7.64	5.39 \pm 3.11
200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物组	21.34 \pm 8.97 *	22.02 \pm 9.01 *	17.24 \pm 7.48 *
400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物组	41.05 \pm 5.32 **	49.10 \pm 9.82 **	43.20 \pm 4.71 **
800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物组	88.44 \pm 6.64 ** Δ	92.80 \pm 3.60 ** Δ	90.72 \pm 2.83 ** Δ

与 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物组比较, * $P<0.05$; 与 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物组比较, # $P<0.05$; 与 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物组比较, $\Delta P<0.05$

3 讨 论

橄榄苦苷是富含于天然橄榄油或橄榄叶中的一种重要的苯酚类呋喃萜苷,更是广泛存在于木犀科的木樨榄属、丁香属、女贞属、木犀属和茉莉属植物中^[5]。目前已证明橄榄苦苷对心、脑、肝、肾、皮肤、骨骼等均具有保护作用,既不对正常组织细胞产生毒副作用又可用于降血压、降血糖、抗肿瘤、治疗阿尔茨海默症及预防骨质疏松症等^[5-8]。本次体外实验发现橄榄苦苷可抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖,0~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时随着药物浓度的增加,细胞生长曲线逐渐降低趋向水平,在 100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度梯度下,细胞抑制率逐渐增大,但抑制率未随作用延长发生显著改变。当药物浓度达 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,48 h 内细胞几乎停止增殖

状态不佳。SKOV3 细胞的正常传代周期为 48~72 h,当培养条件极佳时,甚至可 24 h 增殖至生长高峰传代。我们推测当浓度达 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞生长环境可能出现完全不适合 SKOV3 细胞的生长。由以上实验结果我们推测,橄榄苦苷对 SKOV3 细胞的增殖有抑制作用,抑制强度在 0~800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下呈现出浓度依赖性,而抑制强度可能无时间依赖性。对橄榄苦苷作用时间的分析有 2 点:一是该药物可能确实不具备时间依赖性;二是药物反应迅速,可能在测的第一个时间点 24 h 前就已逐步达到最大作用效应。这一结果的出现给未来橄榄苦苷运用临床治疗卵巢癌患者时,可能不需要考虑药物反应时间即可维持稳定的作用强度。

对该实验的具体作用机制提出以下 2 种设想:橄榄苦苷与雌二醇(E2)具有相同的芳香环结构,这种相似的化学结构导致橄榄苦苷可有微弱的植物雌激素作用或可竞争性结合雌激素受体起拮抗作用。有研究称植物雌激素可以改变基因的表达,使抑癌基因和促癌基因的表达发生改变,从而表现出预防肿瘤和抑制肿瘤生长的作用^[9],如橄榄苦苷可同时通过延缓乳腺癌细胞周期 S 期(在细胞生长分裂时延缓细胞 DNA 的合成)、上调细胞周期蛋白依赖性抑制剂 p21、抑制抗凋亡和促增殖的 NF- κ B 蛋白及抑制主要致癌的靶细胞周期蛋白 D1 共同对细胞增殖起到强烈的抑制作用^[10]。其次研究证明橄榄苦苷通过抑制与乳腺癌肿瘤细胞失控相关的雌激素依赖的 ERK1/2 快速信号的激活^[11],从而在乳腺癌细胞增殖中起到化学预防抑制作用。通过对本实验 SKOV3 细胞生长曲线观察,我们推测卵巢癌与乳腺癌同为激素依赖性肿瘤,橄榄苦苷可能通过延缓 SKOV3 细胞 DNA 的合成等以上作用途径使细胞的生长周期延长从而表现出增殖抑制效果。

橄榄苦苷水解后生成游离的羟基酪醇(hydroxytyrosol, HT)^[12],实验表明 HT 可通过调节亲癌和抑癌信号通路阻滞肿瘤细胞的循环及诱发其凋亡^[13-15],包括乳腺癌 MCF-7 细胞^[16]、HL60 白血病细胞^[17]、黑色素瘤细胞^[18]、结肠癌细胞^[17,19-20]。实验发现在结肠癌细胞中 HT 通过缩短表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的半衰期来加速 EGFR 的降解,而 EGFR 在细胞中表达下降可抑制肿瘤细胞的增殖^[21]。卵巢癌细胞中存在多种原癌基因和抑癌基因,并且有

60%以上的卵巢上皮性癌存在 EGFR 的过度表达^[22]。因此我们推测,橄榄苦苷对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的抑制作用也可能是通过水解后生成 HT,通过 HT 对细胞中原癌基因或抑癌基因的调节如下调 EGFR 从而抑制肿瘤细胞的增殖。以上两种机制推断均有待于下一步实验研究证明。

综上,橄榄苦苷作为抗肿瘤药物具有广阔的前景,特别是针对妇科恶性肿瘤术后的患者,橄榄苦苷在未来临床的运用不仅能抗肿瘤,还可预防因手术造成的绝经后骨质疏松^[23],在妇科方向具有绝对的优势。

[参考文献]

- [1] Sankaranarayanan R, Ferlay J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2006, 20(2): 207-225.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [3] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(5): 283-298.
- [4] Shen YF, Suib SL, Occelli ML. Ursolic acid from *Oldenlandia diffusa* induces apoptosis via activation of caspases and phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 beta in SKOV3 ovarian cancer cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(7): 1022-1028.
- [5] 陈青霞,刘慧兰,黄惠娟,等.橄榄苦苷对成骨细胞增殖的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(5): 599-602.
- [6] 刘天亮,王玲洁,宋宗辉,等.橄榄苦苷的药理作用及其研究进展[J]. *西南国防医药*, 2016, 26(6): 685-687.
- [7] 刘慧兰,黄惠娟,李宝恒,等.橄榄苦苷对成骨细胞 OPG/RANKL mRNA 的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(6): 649-652.
- [8] 高梦颖,黄惠娟,谢树红.橄榄苦苷对破骨细胞增殖影响的实验研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(7): 896-899.
- [9] Carrera-González MP, Ramírez-Expósito MJ, Mayas MD, et al. Protective role of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol on cancer[J]. *Trends Food Sci Tech*, 2013, 31(2): 92-99.
- [10] Elamin MH, Daghestani MH, Omer SA, et al. Olive oil oleuropein has anti-breast cancer properties with higher efficiency on ER-negative cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 53(3): 310-316.
- [11] Sirianni R, Chimento A, De LA, et al. Oleuropein and hydroxytyrosol inhibit MCF-7 breast cancer cell proliferation interfering with ERK1/2 activation[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2010, 54(6): 833-840.
- [12] 赵鑫,张学兰,姜秋,等.橄榄苦苷与羟基酪醇的大鼠在体胃肠吸收比较[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(16): 6-9.
- [13] Casaburi I, Puoci F, Chimento A, et al. Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: a review of in vitro studies[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(1): 71-83.
- [14] Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, et al. Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21 (WAF1/Cip1) and p27 (Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells[J]. *J Nutr*, 2008, 138(1): 42-48.
- [15] Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, et al. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells[J]. *BMC Cancer*, 2007, 9(7): 80-99.
- [16] Bouallagui Z, Han J, Isoda H, et al. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(1): 179-184.
- [17] Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, et al. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis[J]. *Eur J Cancer Prev*, 2002, 11(4): 351-358.
- [18] D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, et al. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(7): 908-919.
- [19] Corona G, Deiana M, Incani A, et al. Hydroxytyrosol inhibits the proliferation of human colon adenocarcinoma cells through inhibition of ERK1/2 and cyclin D1[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(7): 897-903.
- [20] Guichard C, Pedruzzi E, Fay M, et al. Dihydroxyphenylethanol induces apoptosis by activating serine/threonine protein phosphatase PP2A and promotes the endoplasmic reticulum stress response in human colon carcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(9): 1812-1827.
- [21] Terzuoli E, Giachetti A, Ziche M, et al. Hydroxytyrosol, a product from olive oil, reduces colon cancer growth by enhancing epidermal growth factor receptor degradation[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(3): 519-529.
- [22] Skirmisdóttir I, Sorbe B, Seidal T. The growth factor receptors HER-2/neu and EGFR, their relationship, and their effects on the prognosis in early stage (FIGO I-II) epithelial ovarian carcinoma[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2001, 11(2): 119-129.
- [23] 郑小花,黄惠娟.左归丸联合橄榄油对大鼠去势后骨组织和骨密度的影响[J]. *东南国防医药*, 2014, 16(1): 10-13.

(收稿日期:2017-11-20; 修回日期:2018-01-24)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一超)