

# 橄榄苦苷对卵巢癌裸鼠皮下移植瘤抑瘤作用的研究

许玉黎, 黄惠娟, 谢树红, 陈涣涣, 田黎明, 杨帆, 曾小娟

**【摘要】 目的** 观察橄榄苦苷对卵巢癌 SKOV3 裸鼠皮下移植瘤生长的影响, 探讨其作用机制。**方法** 建立卵巢癌 SKOV3 细胞裸鼠皮下移植瘤的模型, 将 20 只荷瘤裸鼠随机分为 2 组, 橄榄苦苷组: 50 mg/(kg·d), 按 10 mL/kg 腹腔内注射; 等渗盐水组: 按 0.9% 氯化钠注射液 10 mL/kg 腹腔内注射。2 组均隔天给药 1 次, 连续给药 8 周, 自由饮水和进食, 标准 SPF 饲养。每周测量裸鼠体重和肿瘤体积各 1 次。处死裸鼠后, 完整分离出肿瘤组织, 计算肿瘤的相对增殖率, 采用 Western blot 法分别检测 2 组肿瘤组织促凋亡因子 Bax、抗凋亡因子 Bcl-2 的表达水平。**结果** 橄榄苦苷组裸鼠在注射药物后 21 d、35 d、56 d 的移植瘤体积明显小于等渗盐水组 ( $P < 0.01$ ); 橄榄苦苷组的相对肿瘤增殖率为 70.3%; 与等渗盐水组比较, 橄榄苦苷组 Bcl-2 蛋白表达下调, 而 Bax 蛋白表达上调。**结论** 橄榄苦苷对卵巢癌 SKOV3 裸鼠皮下移植瘤的生长有抑制作用, 机制可能与抑制抗凋亡因子 Bcl-2 的表达, 增强凋亡促进因子 Bax 的表达有关。

**【关键词】** 橄榄苦苷; 卵巢癌; 移植瘤; 抑瘤

**【中图分类号】** R711.7

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-271X(2018)06-0561-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2018.06.001

## Study on antitumor effects of oleuropein on ovarian cancer subcutaneous transplanted tumor in nude mice

XU Yu-li<sup>1</sup>, HUANG Hui-juan<sup>1</sup>, XIE Shu-hong<sup>1</sup>, CHEN Huan-huan<sup>1</sup>, TIAN Li-ming<sup>2</sup>, YANG Fan<sup>2</sup>, ZENG Xiao-juan<sup>1</sup>  
(1. Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Medical School, Fuzhou General Hospital of Fujian Medical University/Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Fuzhou 350025, Fujian, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, East Hospital Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350025, Fujian, China)

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of oleuropein on the growth of subcutaneously transplanted ovarian cancer SKOV3 in nude mice and to explore its mechanism. **Methods** Established subcutaneous xenograft model of ovarian cancer SKOV3 cells. Twenty nude mice were randomly divided into two groups. Oleuropein group: 50 mg/(kg·d), 10 mL/kg intraperitoneally, saline group: 0.9 % sodium chloride injection 10 mL/kg intraperitoneal injection. Both groups were administered once every other day for 8 weeks, free water intake, and standard SPF feed. The tumor volume and body weight of nude mice were measured and recorded once a week. After the nude mice were sacrificed, the tumor tissues were completely isolated and the relative proliferation rate of the tumors was calculated. Western blot was utilized to detect the expression levels of pro-apoptosis factor Bax and anti-apoptosis factor Bcl-2 in the two groups of tumor tissues. **Results** The tumor volume of oleuropein group in nude mice at 21 days, 35 days and 56 days after injection was significantly smaller than that of saline group ( $P < 0.01$ ); the relative tumor proliferation rate of oleuropein group was 70.3%; compared with saline group, oleuropein group Bax protein expression was up-regulated while Bcl-2 protein expression was down-regulated. **Conclusion** Oleuropein inhibits the growth of ovarian cancer SKOV3 cells subcutaneous transplanted tumor in nude

mice. The mechanism may be related to inhibiting the expression of anti-apoptosis factor Bcl-2 and enhancing the expression of apoptosis-promoting factor Bax.

**【Key words】** oleuropein; ovarian cancer; transplanted tumor; tumor inhibition

**基金项目:** 全军医药卫生科研课题 (14MS129)

**作者单位:** 350025 福州, 福建医科大学福总临床医学院 (南京军区福州总医院) 妇产科 (许玉黎、黄惠娟、谢树红、陈涣涣、曾小娟); 350025 福州, 厦门大学附属东方医院妇产科 (田黎明、杨帆)

**通信作者:** 黄惠娟, E-mail: hhj352@163.com

## 0 引言

卵巢癌是妇科常见的恶性肿瘤之一。近年来,卵巢癌在全世界范围内的发病率逐年上升,因其起病隐匿,确诊时多属晚期,是目前妇科恶性肿瘤中预后最差的癌症,死亡率居妇科恶性肿瘤的首位<sup>[1]</sup>。卵巢癌的常规治疗为肿瘤细胞减灭术辅以顺铂联合紫杉醇的化疗方案,但卵巢癌容易发生化疗耐药和复发,耐药的产生极大地限制了其临床疗效。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裂环烯醚萜苷,具有抗炎、抗氧化、抗骨质疏松<sup>[2]</sup>、抗乳腺癌<sup>[3]</sup>、抗前列腺癌<sup>[4]</sup>、减轻放射性卵巢损伤<sup>[5]</sup>等作用,本课题前期体外实验已证明其能抑制卵巢癌细胞 SKOV3 增殖,但具体机制尚不明确。本实验通过建立卵巢癌 SKOV3 细胞裸鼠移植瘤的模型,探讨橄榄苦苷在其体内对卵巢癌细胞的抑制作用及作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株与实验动物** 卵巢癌 SKOV3 细胞株由南京军区福州总医院实验科提供。4~6 周龄 BALB/C 雌性裸鼠 20 只[许可证号: SCXK(沪)2012-0002], 体重 18~25 g, SPF 级, 购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 在南京军区福州总医院比较医学科 SPF 级环境中饲养, 温度为 20~25 ℃, 相对湿度保持在 40%~70%, 每周更换 2 次消毒的裸鼠垫料、饲料、饮用水, 笼具每周消毒 2 次, 所有进入实验室的物品均经消毒处理, 自由摄水和进食, 标准 SPF 饲料。

**1.2 药物与主要试剂** 橄榄苦苷(Funakoshi, Tokyo Japan), MCCOY'S5A 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)、DMSO 溶液(二甲基亚砷, 南京凯基生物公司)、兔抗人 Bcl-2 单抗(proteintech)、兔抗人 Bax 单抗(proteintech)、Western blot 超敏发光液(PPLYGEN)、二抗、Buffer。

**1.3 细胞培养** 用含 10%胎牛血清、1%双抗溶液配制的 MCCOY'S5A 完全培养基将 SKOV3 卵巢癌细胞接种到 25 cm<sup>2</sup> 的细胞培养瓶中, 置于 37 ℃ 的 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每 3~5 天传代 1 次。取

对数生长期的卵巢癌 SKOV3 细胞, 0.25%胰酶消化细胞后, 800 r/min 离心 5 min, 弃上清液, PBS 缓冲液重悬, 计数并调整细胞浓度为 5×10<sup>6</sup>/mL。

**1.4 卵巢癌裸鼠移植瘤模型的建立** 75%乙醇常规消毒裸鼠右后肢背部的皮肤后, 取 0.2 mL 的卵巢癌 SKOV3 细胞悬液分别注射于 20 只裸鼠的右后肢背部皮下成瘤。注射结束后用夹紧针孔, 防止细胞悬液渗漏。所有裸鼠均在 SPF 级环境中饲养, 每周更换 3 次消毒的裸鼠垫料、饲料、饮用水, 笼具每周消毒 3 次, 所有进入实验室的物品均经消毒处理。日照选择: 开灯、熄灯各 12 h。每天常规观察裸鼠的活动情况、精神状态、饮食、大小便等情况。接种结束约 1 个月后, 20 只裸鼠右后肢背部皮下皆出现粟粒样质硬结节, 分别用游标卡尺测量每只裸鼠荷瘤瘤体直径均值达 8 mm 左右, 即荷瘤模型建立成功。

**1.5 分组及治疗** 将 20 只裸鼠随机分为 2 组, 每组 10 只。橄榄苦苷组: 50 mg/(kg·d), 按 10 mL/kg 腹腔内注射; 等渗盐水组: 按 0.9%氯化钠注射液 10 mL/kg 腹腔内注射。2 组均隔天给药 1 次, 连续给药 8 周。

**1.6 观察指标** 每天观察荷瘤裸鼠的活动情况、对外界刺激的反应、饮食水及瘤体表面皮肤变化, 每周称取裸鼠体重 1 次并测量肿瘤体积 1 次, 绘制移植瘤生长曲线。方法如下: 常规乙醇消毒裸鼠右后肢背部皮肤后, 清楚地暴露肿瘤, 用游标卡尺(精度为 0.01 mm)测量肿瘤的最长径 a 和最短径 b, 肿瘤体积 =  $a \times b^2 / 2$ 。用药结束后 3 d, 处死所有裸鼠, 消毒肿瘤部位后轻轻剥离下肿瘤组织, 计算肿瘤的相对增殖率, 公式为:

$$\text{相对增殖率} = T/C \times 100\%$$

T 为橄榄苦苷组移植瘤体积的平均值, C 为等渗盐水组移植瘤体积的平均值。若此数值小于 1, 则表明橄榄苦苷组的移植瘤体积较等渗盐水组明显缩小。将剥离下的肿瘤组织置于 -80 ℃ 冰箱中保存。

**1.7 Western blot 法检测肿瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达** ①蛋白提取。取适量肿瘤组织剪碎成匀浆, 加入 RIPA 裂解液(含 PMSF)裂解, 然后在 4 ℃ 下 12 000 rpm 离心 15 min, 取上清分装于 0.5 mL 离心管中, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。②配胶。10%分离胶(tris pH8.8), 一板 5 mL; 5%浓缩胶(tris pH6.8), 一板 2 mL。先分离胶后浓缩胶。③电泳。

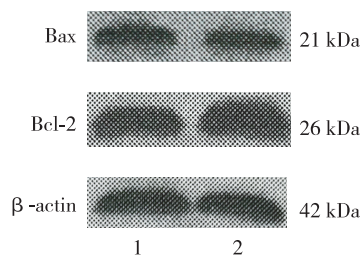
样品准备:蛋白+Buffer 混匀,100 ℃煮沸 3 min,取出至室温。将玻璃板及胶取下,装入电泳槽,拔梳上样,跑至溴酚兰刚跑出即可终止电泳。④转膜。准备好 PVDF 膜(硝酸纤维素膜),负:黑,海绵,滤纸,胶,膜,滤纸,海绵,白:正。放入转膜槽中,电流 150 mA,1.5 h。⑤封闭。膜放 TBST 配制的 5%牛奶(脱脂奶粉)封闭,室温下放摇床 1 h。⑥加抗体:一抗 Bcl-2 配制比:1:1000,1 uLab+1 mL5%牛奶,一抗 Bax 配制比:1:2000,1 uLab+2 mL5%牛奶。取出膜放 TBST 过一下,放封口膜,加一抗大约 2 mL,封口。放 4 ℃摇床摇过夜(130 转左右)。取出膜,用 TBST 洗 3 次,每次 10 min。制备二抗 1:5000,用 5%牛奶配制,加二抗,室温下摇床 1 h。倒掉二抗取出膜, TBST 洗 10 min,3 次。⑦显影。准备好显影液、定影液、水,放暗房。配制发光底物:A+B:1:1(配完后避光)。准备暗盒,铺上保鲜膜。膜放保鲜膜上,滴加发光底物反应 3 min。盖上保鲜膜,不要有气泡,用粘纸黏上。移至暗房,放上胶片,曝光 4 min,胶片放显影液 2 min,定影液 1 min,烘干,将胶片进行扫描,用图像处理系统分析目标带的灰度值。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件对各数据进行统计分析,组间治疗前后体重、瘤体积变化采用单因素方差分析,组间均数比较采用 LSD-*t* 检验,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 裸鼠一般情况观察 2 组裸鼠在卵巢癌移植瘤模型建立后约 1 个月,对外界刺激反应尚可,进食量无明显变化,可出现行动迟缓。所有裸鼠移植瘤的表面皮肤未见明显破溃化脓等,20 只裸鼠皮下移植瘤均有瘤体长出,成瘤率 100%,实验期间无裸鼠死亡。

2.2 裸鼠体重的比较 注射药物后 2 组裸鼠的体重比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表 1。



1: 橄榄苦苷组;2:等渗盐水组

图 2 裸鼠移植瘤 WB 条带灰度分析图

表 1 注射药物后裸鼠体重的比较( $\bar{x} \pm s$ ,g)

组别	<i>n</i>	21 d	35 d	56 d
橄榄苦苷组	10	22.70±1.33	23.50±1.08	23.80±0.78
等渗盐水组	10	22.80±2.34	23.90±1.66	22.80±1.81

2.3 裸鼠移植瘤的体积变化 2 组裸鼠的移植瘤体积比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。2 组的移植瘤体积均呈递增趋势,橄榄苦苷组移植瘤生长速度较等渗盐水组明显减缓,见图 1。肉眼观察完整剥离下的肿瘤组织,淡红色,呈球状或椭圆状,表面尚光滑,将组织剖开可见呈鱼肉状,内有多发质硬乳头状结节。

表 2 注射药物后裸鼠移植瘤体积的变化( $\bar{x} \pm s$ ,cm<sup>3</sup>)

组别	<i>n</i>	21 d	35 d	56 d
橄榄苦苷组	10	0.37±0.08 *	0.40±0.08 *	0.43±0.06 *
等渗盐水组	10	0.48±0.04	0.59±0.04	0.69±0.06

与等渗盐水组比较, \*  $P<0.05$

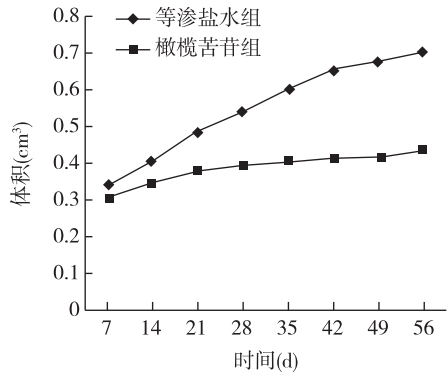
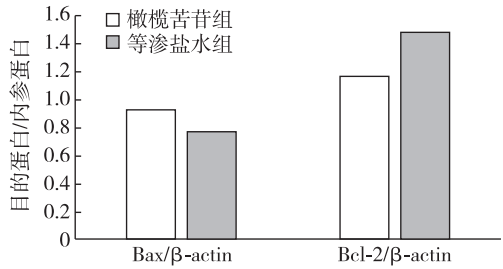


图 1 裸鼠移植瘤体积的生长曲线

2.4 裸鼠移植瘤的相对增殖率 计算出移植瘤的相对增殖率为 70.3%,结果表明与等渗盐水组比较,橄榄苦苷组的移植瘤体积明显缩小。

2.5 Western blot 法检测肿瘤组织 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达 与等渗盐水组比较,橄榄苦苷组 Bcl-2 蛋白表达下调,而 Bax 蛋白表达上调。见图 2。





### 3 讨 论

橄榄苦苷是一种无毒的裂环烯醚萜苷类化合物,裂环烯醚萜是环戊单萜衍生物中的一类化合物,是由环烯醚萜类化合物裂环而成,只占环烯醚萜类的很少一部分<sup>[6]</sup>,为橄榄叶中的有效成分。随着国内外学者的不断深入挖掘,橄榄苦苷的药理活性可体现在对心脑血管等器官的保护作用、降压降糖、抗肿瘤等方面,其中尚未报道橄榄苦苷抗卵巢癌的作用机制。本课题前期体外实验已证实橄榄苦苷可抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖,并且抑制作用呈现出浓度依赖性。

Hamdi 等<sup>[7]</sup>发现,橄榄苦苷是一种有效的抗癌化合物,能直接破坏细胞中的肌动蛋白微丝,抑制肿瘤细胞株的增殖和迁移,橄榄苦苷能不可逆的包围癌细胞,阻止其复制、运动和侵袭,而这些在正常细胞中是可逆的。Giner 等<sup>[8]</sup>通过橄榄苦苷干预小鼠肠炎型结直肠癌模型的研究发现,橄榄苦苷可抑制结直肠肿瘤的生长,机制可能与降低肠道相关 IL-6、干扰素  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 、IL-17A 以及 COX-2、Bax 蛋白和增殖细胞核抗原蛋白的表达,下调 NF-KB、Wnt/ $\beta$ 、PI3K/Akt 信号转导以及转录激活因子 3 (STAT3) 的表达。Bulotta 等<sup>[9]</sup>研究也证实,橄榄苦苷抑制甲状腺癌细胞增殖的机制可能与其抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。Kimura 等<sup>[10]</sup>研究橄榄苦苷对长期紫外线照射下裸鼠皮肤肿瘤体积的影响,发现橄榄苦苷能显著抑制皮肤癌变和肿瘤的生长,可能与阻止血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9、MMP-13 及 COX-2 的表达有关。

卵巢癌是一种多基因、多阶段作用的疾病,癌基因的激活和抑癌基因的失活在卵巢癌的发生发展和治疗预后中起重要作用<sup>[11]</sup>。Bcl-2 和 Bax 是两类典型的抑凋亡和促凋亡蛋白,Bax 和 Bcl-2 通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡。当 Bax 形成同源二聚体时诱导细胞凋亡;Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体时则实现了 Bcl-2 抑制细胞凋亡的功能。王颖欣等<sup>[12]</sup>实验研究显示,Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白在正常卵巢组织中均无阳性表达,而 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白在卵巢癌组织中有较高水平表达。Hassan 等<sup>[13]</sup>实验研究得出,橄榄苦苷诱导乳腺癌细胞凋亡的机制与 p53 调控 Bax 和 Bcl-2 基因表达的通路有

关,是通过上调 p53 和 Bax、下调 Bcl-2 基因的表达来诱导肿瘤细胞凋亡。Liu 等<sup>[14]</sup>发现,橄榄苦苷可抑制胶质瘤细胞的生长和侵袭,机制可能与其可显著抑制 Akt 信号转导通路,伴上调 Bax 和下调 Bcl-2 的表达、抑制 MMP-2、MMP-9 表达有关,还发现橄榄苦苷诱导细胞凋亡可能与 p53 基因的表达关系不大。

本研究通过建立起卵巢癌 SKOV3 细胞裸鼠皮下移植瘤的模型,观察橄榄苦苷对移植瘤体积生长及 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响。实验结果显示,橄榄苦苷组裸鼠移植瘤体积明显小于等渗盐水组,与等渗盐水组比较,橄榄苦苷组 Bcl-2 蛋白表达下调,而 Bax 蛋白表达上调。由此可得,橄榄苦苷对卵巢癌 SKOV3 裸鼠皮下移植瘤的生长有抑制作用,机制可能是通过诱导凋亡抑制卵巢癌 SKOV3 裸鼠皮下移植瘤的生长,从而发挥抗肿瘤的作用。有研究发现<sup>[15]</sup>,正常卵巢组与卵巢瘤组比较,PI3K mRNA 在卵巢癌组织中的表达明显增高,这表明在卵巢浆液性囊腺癌中 PI3K 基因表达增强。近年来,PI3K/Akt 信号通路在许多癌症中过度表达,抑制此途径被认为是癌症治疗的重要靶点<sup>[16]</sup>。综上,我们推测橄榄苦苷抗卵巢癌的机制可能也与抑制 PI3K/Akt 信号通路有关。

近年来,橄榄苦苷的药理活性备受国内外学者的重视,但其抗肿瘤的作用仍处于实验研究阶段,且针对橄榄苦苷的药理活性及毒理学研究有限,因此还需要更多的深入实验进一步证明橄榄苦苷的抗肿瘤作用及安全性。橄榄苦苷作为一种无毒的天然药物,它可能成为具有潜在应用前景的辅助抗卵巢癌新药,其抗卵巢癌的作用机制和临床疗效尚有待进一步探究。

### [参考文献]

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7-30.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease[J]. *Endocr Rev*, 2008, 29(4):155-192.

- [5] 陈桂莲,黄惠娟,田黎明.橄榄苦甙对卵巢辐射损伤的防治效果[J]. 东南国防医药,2017,19(6):576-580.
- [6] 陈千良,孙文基.裂环烯醚萜类化合物研究进展[J].现代药物与临床,2003,18(2):58-63.
- [7] Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(3):769-778.
- [8] Giner E, Recio MC, Rios JL, *et al.* Chemopreventive effect of oleuropein in colitis-associated colorectal cancer in c57bl/6 mice[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(2):242-255.
- [9] Bulotta S, Corradino R, Celano M, *et al.* Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells[J]. *J Mol Endocrinol*, 2013, 51(1):181-189.
- [10] Kimura Y, Sumiyoshi M. Olive leaf extract and its main component oleuropein prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin damage and carcinogenesis in hairless mice[J]. *J Nutr*, 2009, 139(11):2079-2086.
- [11] 关 婷.细胞凋亡与卵巢肿瘤[J].国外医学妇幼保健分册, 2000,11(2):54-56.
- [12] 王颖欣,韩 萍,陈 燕.Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义[J].西部医学,2011,23(5):814-816,819.
- [13] Hassan ZK, Elamin MH, Omer SA, *et al.* Oleuropein induces apoptosis via the p53 pathway in breast cancer cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2013, 14(11):6739-6742.
- [14] Liu M, Wang J, Huang B, *et al.* Oleuropein inhibits the proliferation and invasion of glioma cells via suppression of the AKT signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(4):2009-2016.
- [15] 张晓霞,费军伟,高咏梅,等.磷脂酰肌醇 3-激酶在卵巢癌中的表达[J].中国实用妇科与产科杂志,2008,24(11):851-852.
- [16] Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 109(2):314-341.

(收稿日期:2018-04-09; 修回日期:2018-07-09)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:吕镗烽)