

8-氨基异紫堇碱对 HO-8910PM 增殖和迁移的抑制作用

纪武, 王圣坦, 朱根海, 贺国丽, 洪澜, 王雁

摘要 目的 分析 8-氨基异紫堇碱(8-NH₂-ICD) 对人高转移卵巢癌细胞(HO-8910PM) 增殖和迁移的抑制作用。方法

取对数生长期人上皮性卵巢癌(OC) HO-8910PM 细胞 15 株, 分为阴性对照组、药物组, 各组培养 24、48、72 h 后, 采用 CCK-8 检测药物干预后细胞增殖抑制率, Hoechst 染色观察 HO-8910PM 细胞的凋亡形态变化, 流式细胞技术、Transwell 小室分别测定药物作用后细胞周期及迁移能力。结果 随时间、药物浓度增加, HO-8910PM 细胞增殖抑制率增加($P < 0.05$), 在 5~20 $\mu\text{g/ml}$ 范围内有明显量效、时效关系, 至 20 $\mu\text{g/ml}$ 时对细胞增殖抑制作用基本已达最大值; Hoechst 33258 染色表明, 阴性对照组细胞呈弥散均匀的淡蓝色荧光, 添加 8-NH₂-ICD 的细胞株出现细胞核固缩、荧光致密发亮、大小不同颗粒状强蓝色荧光等凋亡形态变化; 8-NH₂-ICD 作用 72 h 后, 与阴性对照组比较, 浓度在 5~20 $\mu\text{g/ml}$ 时对细胞周期作用不明显, 浓度为 40 $\mu\text{g/ml}$ 时 S 期细胞减少, G₀/G₁ 期细胞比例增加, 8-NH₂-ICD 对 HO-8910PM 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期; 处理 24、48、72 h 时药物组侵袭至滤镜下表面的细胞数明显减少, 且低于阴性对照组, 尤其是 48、72 h 时差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 8-NH₂-ICD 可明显抑制人 OC 细胞株 HO-8910PM 的增殖与迁移, 促进细胞凋亡, 且其对 HO-8910PM 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期。

关键词 8-NH₂-ICD; HO-8910PM; 增殖; 迁移; 抑制

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)07-1033-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.006

卵巢癌(ovarian carcinoma, OC) 发病隐匿, 大多数患者就诊时已处于中晚期^[1]。近年来中草药的天然有效成分抗癌效果引起了广泛关注^[2], 其中 8-氨基异紫堇碱(8-amino-isocorydine, 8-NH₂-ICD) 是从罂粟科植物秃疮花中提取的以异紫堇碱为原料, 经化合物化学结构衍生合成而来, 通过对结构的进一步修饰。研究^[3]显示, 8-NH₂-ICD 可抑制人肺癌(A549)、胃癌(SGC7901)、肝癌(HepG2) 细胞系体外生长, 小鼠体内实验也表明异紫堇碱类衍生物为

一种有效的抗癌剂且具有更低的毒副作用。该研究从肿瘤细胞增殖及迁移方面, 探讨 8-NH₂-ICD 对体外培养人高转移卵巢癌-8910PM(human high metastatic ovarian carcinoma-8910PM, HO-8910PM) 细胞株的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人上皮 OC 细胞株 HO-8910PM 由中科院上海细胞库提供, 纯度 > 99%, 以高糖型 DMEM(美国 Gibco 公司) 培养液, 加入 10% 标准胎牛血清(FBS, 美国 Gibco 公司)、青-链霉素(美国 Hyclone 公司), 放置在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度细胞培养箱中培养, 在细胞生长至 80% 融合时, 以 0.25% 胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司) 消化传代。

1.1.2 主要仪器与试剂 酶标仪(Promega 多功能化学发光仪) 购自美国普洛麦格北京生物技术有限公司; 倒置荧光显微镜(Axio Observer A1) 购自德国 Leica 公司; FACS Calibur Cell Sorting System 型流式细胞仪购自美国 BD 公司。细胞增殖/毒性检测(cell counting kit-8, CCK-8) 试剂盒购自美国 Yeasen 公司; 细胞凋亡 Hoechst 染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分组 取对数生长期的 OC 细胞株 HO-8910PM 进行检测, 试验分为阴性对照组、药物组, 阴性对照组不经药物处理, 仅加 10% FBS 培养液, 药物组中药物浓度梯度依次为 5、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ 。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 在 1.1.1 所述条件下对人上皮性 OC 细胞 HO-8910PM 进行培养, 将对数生长期细胞移入 96 孔细胞培养板, 细胞密度 1×10^5 个/ml, 每孔加入 200 μl 细胞悬液, 培养 12 h 见细胞贴壁后加入配置好的工作浓度药液, 各药物浓度均设 5 个平行复孔, 阴性对照组只加培养液, 不加细胞。于酶标仪 450 nm 处测定各孔吸光度(optical density, OD) 值, 空白对照孔为调零孔。细胞增殖抑制率(%) = (1 - 药物组 OD 值) / 阴性对照组 OD 值 $\times 100\%$, 实验重复 3 次。

2019-02-28 接收

基金项目: 海南省科学技术与发展计划项目(编号: 817316)

作者单位: 海南省人民医院妇科, 海口 570311

作者简介: 纪武, 男, 副主任医师, 硕士, 责任作者, E-mail: dayehu-

bah@163.com

1.2.3 Hoechst 染色观察 HO-8910PM 细胞凋亡形态 将生长稳定的 HO-8910PM 细胞传代至 6 孔板中(底部放置一盖玻片),每孔细胞数量约 10^5 个,培养待细胞贴壁并覆盖培养孔 50% 时,分别按阴性对照组、8-NH₂-ICD 5、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ 5 个分组方式加药处理至 72 h,应用 Hoechst 染色试剂盒进行检测,染色 5 min 吸去染色液,盖上有细胞的盖玻片制备临时装片并观察细胞形态,细胞发生凋亡时,染色质固缩,Hoechst 染色时细胞核呈致密浓染或碎块致密浓染。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期 将培养细胞 HO-8910PM 以 1×10^5 个/ml 密度接种在 6 孔板上,吸去培养基,加入 2 ml 1640 培养液及不同浓度 8-NH₂-ICD 的 1640 培养液,每孔设立 2 个复孔。作用 24 h 后离心收集细胞,应用 PBS 洗涤 1 次,加入预冷 70% 乙醇固定过夜;第 2 天以 2 500 r/min 离心 5 min,收集细胞,PBS 洗涤 1 次,以 0.5 ml PBS 重悬,按照 Cycle Test-Plus DNA Reagent Kit(美国 BD 公司)试剂盒说明书进行染色,以注射器吸取细胞悬液,经尼龙滤网过滤后上流式细胞仪,应用 Mod Fit LT 软件分析各样品中细胞周期分布情况。

1.2.5 Transwell 小室测定细胞迁移能力 将 Matrigel 以无血清培养基稀释至 50 $\mu\text{g/ml}$,每小室加 50 μl 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜风干,第 2 天在超净台照射 2 h,加入 100 μl 含 10 $\mu\text{g/L}$ 牛血清白蛋白的无血清培养液湿化,对照组加入细胞培养液,其他各组加入不同浓度 8-NH₂-ICD,置于培养箱中培养,参照郑爱文等^[4]提出的方法评估细胞侵袭能力。本研究选择

阴性对照组、药物组中 40 $\mu\text{g/ml}$ 8-NH₂-ICD 进行统计学分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,行单因素方差分析、重复测量数据的方差分析、SNK-q 检验,独立两组均数比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖抑制率检测结果 随时间、药物浓度增加,HO-8910PM 细胞增殖抑制率增加($P < 0.05$),在 5 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$ 范围内有明显量效、时效关系,至 20 $\mu\text{g/ml}$ 时对细胞增殖抑制作用基本已达最大值。见表 1。

2.2 细胞凋亡形态观察结果 细胞经 Hoechst 33258 染色后,于荧光显微镜下观察,发现阴性对照组细胞呈弥散均匀的淡蓝色荧光,添加 8-NH₂-ICD 的细胞株出现细胞核固缩、荧光致密发亮、大小不同颗粒状强蓝色荧光等凋亡形态变化(如箭头所示),尤其随 8-NH₂-ICD 浓度增加,凋亡进程加快,染色质凝聚现象及凋亡小体明显增多,凋亡小体释放增多,细胞膜变形更明显。见图 1。

2.3 细胞周期检测结果 流式细胞术检测结果显示 8-NH₂-ICD 作用 72 h 后,与阴性对照组比较,浓度在 5 ~ 20 $\mu\text{g/ml}$ 时对细胞周期作用不明显,浓度为 40 $\mu\text{g/ml}$ 时 S 期细胞减少, G_0/G_1 期细胞比例增加,差异有统计学意义($P < 0.05$) 8-NH₂-ICD 对 HO-8910PM 细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期。见表 2、图 2。

表 1 细胞增殖抑制率检测结果($\bar{x} \pm s$, % $n=3$)

8-NH ₂ -ICD 浓度($\mu\text{g/ml}$)	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
5	21.03 \pm 2.21	35.04 \pm 3.66*	54.19 \pm 5.53*#	51.041	<0.001
10	27.57 \pm 2.85 Δ	46.85 \pm 4.71* Δ	63.84 \pm 6.49*# Δ	40.922	<0.001
20	35.26 \pm 3.29 Δ \blacktriangle	68.85 \pm 6.92* Δ \blacktriangle	81.27 \pm 8.27* Δ \blacktriangle	40.118	<0.001
40	44.19 \pm 4.15 Δ \blacktriangle \star	79.19 \pm 8.05* Δ \blacktriangle \star	82.19 \pm 8.34* Δ \blacktriangle \star	26.501	<0.001
F 值	29.151	32.836	10.690	-	-
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	-	-

同一浓度与 24 h 比较: * $P < 0.05$; 同一浓度与 48 h 比较: # $P < 0.05$; 同一时点与 5 $\mu\text{g/ml}$ 比较: Δ $P < 0.05$; 同一时点与 10 $\mu\text{g/ml}$ 比较: \blacktriangle $P < 0.05$; 同一时点与 20 $\mu\text{g/ml}$ 比较: \star $P < 0.05$

表 2 细胞周期检测结果($\bar{x} \pm s$, % $n=3$)

组别	药物浓度	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
阴性对照	-	60.014 \pm 6.121	29.914 \pm 3.110	10.072 \pm 1.106
药物	5 $\mu\text{g/ml}$	58.465 \pm 5.943	30.694 \pm 3.122	10.841 \pm 1.129
	10 $\mu\text{g/ml}$	59.725 \pm 6.019	28.029 \pm 2.910	12.246 \pm 1.341
	20 $\mu\text{g/ml}$	63.557 \pm 6.425	23.220 \pm 2.435	13.223 \pm 1.369
	40 $\mu\text{g/ml}$	67.895 \pm 6.802*	21.439 \pm 2.211*	10.666 \pm 1.185

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$

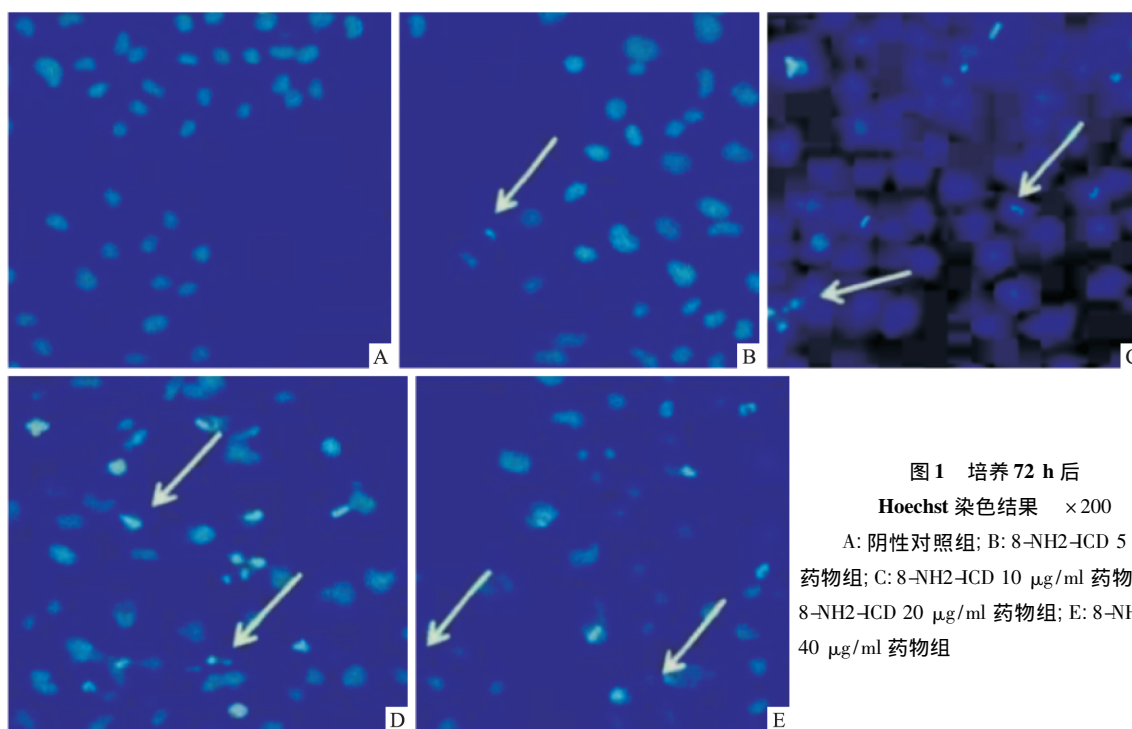


图1 培养72 h后
Hoechst 染色结果 ×200
A: 阴性对照组; B: 8-NH₂-ICD 5 μg/ml
药物组; C: 8-NH₂-ICD 10 μg/ml 药物组; D:
8-NH₂-ICD 20 μg/ml 药物组; E: 8-NH₂-ICD
40 μg/ml 药物组

表3 细胞迁移能力检测结果($\bar{x} \pm s$, 个/视野, $n=3$)

组别	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
阴性对照	187.94 ± 19.23	182.14 ± 18.67	184.39 ± 18.66	0.072	0.931
药物(40 μg/ml)	174.15 ± 18.32	134.94 ± 14.15*	89.56 ± 9.37* #	25.862	<0.001
t 值	0.899	3.490	7.866	-	-
P 值	0.419	0.025	<0.001	-	-

与24 h比较: * $P < 0.05$; 与48 h比较: # $P < 0.05$

2.4 细胞迁移能力检测结果 Transwell 小室检测结果显示,处理24、48、72 h时药物组侵袭至滤镜下表面的细胞数明显减少,且均低于阴性对照组,尤其是48、72 h时差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3、图3。

3 讨论

OC 发病率仅次于宫颈癌、乳腺癌,寻找新的治疗方案迫在眉睫^[5]。我国药材资源丰富,尤其是西北地区天然草药及其有效成分的抗病毒、抗癌效果已得到广泛关注,其中秃疮花具有清热解毒、消肿止痛、杀虫等功能,含有异紫堇碱、紫堇碱等活性成分^[6],研究^[7]表明异紫堇碱不仅通过将细胞周期阻滞于G₂/M期及诱导细胞凋亡而抑制肝癌细胞增殖,也能通过靶向诱导耐药性侧群细胞相关因子凋亡,但其有效剂量200 μmol/L于临床治疗而言为相对高剂量,为减少异紫堇碱剂量及改进抗癌活性,将异紫堇碱通过化学修饰、结构改造得到8-NH₂-ICD。

8-NH₂-ICD 属于前期筛选的异紫堇碱衍生物,易溶于水,且化学性质稳定,已有研究^[8]表明8-NH₂-ICD 对人乳腺癌细胞、宫颈癌细胞等癌细胞均有不同程度抑制作用。本研究选择了具有较强侵袭及转移生长潜能的人OC细胞株HO-8910PM进行研究,结果显示随时间、8-NH₂-ICD 药物浓度增加,HO-8910PM 细胞增殖抑制率增加,在5~20 μg/ml 范围内有明显量效、时效关系,至20 μg/ml 时8-NH₂-ICD 对细胞增殖抑制作用基本已达最大值,表明8-NH₂-ICD 对人OC细胞株HO-8910PM 有明显抑制作用,且在5~20 μg/ml 范围内呈时间与剂量依赖性,20 μg/ml 时抑制作用最大,可将其作为理想治疗剂量。

细胞凋亡是多种细胞调控机体发育、维护内环境稳定、由基因控制的细胞主动死亡过程,本研究中Hoechst 33258 染色显示,添加8-NH₂-ICD 的细胞株细胞核呈现固缩、荧光致密发亮等凋亡形态变化,随8-NH₂-ICD 浓度增加,凋亡进程加快,染色质凝聚现

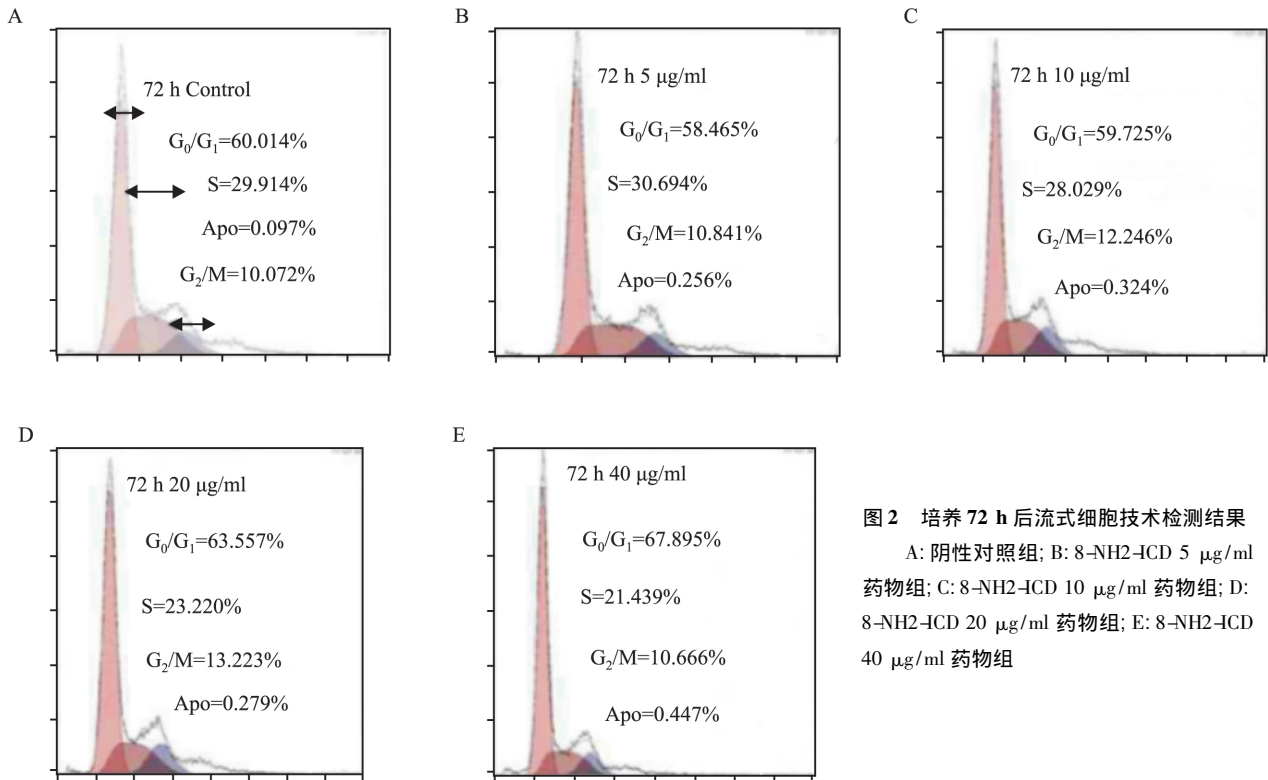


图2 培养 72 h 后流式细胞技术检测结果
A: 阴性对照组; B: 8-NH₂-ICD 5 μg/ml 药物组; C: 8-NH₂-ICD 10 μg/ml 药物组; D: 8-NH₂-ICD 20 μg/ml 药物组; E: 8-NH₂-ICD 40 μg/ml 药物组

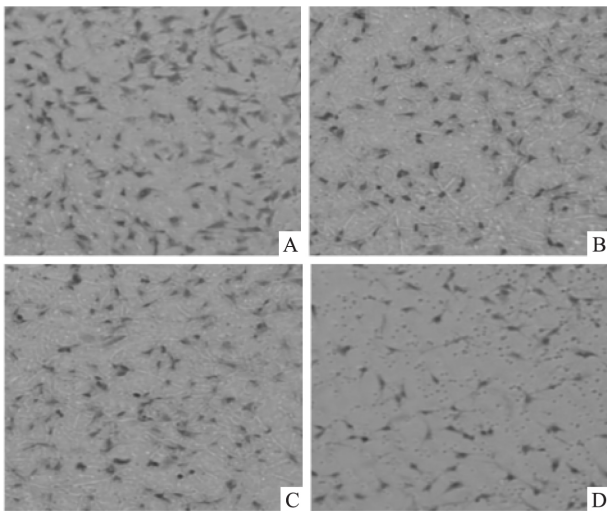


图3 细胞迁移能力检测结果 ×200

A: 阴性对照组; B: 8-NH₂-ICD 5 μg/ml 药物组; C: 8-NH₂-ICD 10 μg/ml 药物组; D: 8-NH₂-ICD 20 μg/ml 药物组; E: 8-NH₂-ICD 40 μg/ml 药物组

象及凋亡小体明显增多,细胞膜变形更明显,因此 8-NH₂-ICD 可较好促进 HO-8910PM 细胞凋亡,这与梁雪霏^[9]的研究结论相近。流式细胞检测显示 8-NH₂-ICD 作用 72 h 后,与阴性对照组相比,浓度在 5 ~ 20 μg/ml 时对细胞周期作用不明显,浓度为 40 μg/ml 时 S 期细胞减少, G₀/G₁ 期细胞比例增加, 8-

NH₂-ICD 将 HO-8910PM 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期,这可能是因为该期细胞多处于 DNA 合成前期,绝大多数细胞处于静止期,从而使细胞不能进入 S 期及 G₂/M 期进行 DNA 合成,细胞分裂,导致细胞无法进入下一个合成周期,因此较好地抑制细胞增殖,促进其凋亡。癌细胞的侵袭与转移特性为肿瘤细胞重要的生物学特征^[10],本研究表明,处理 24、48、72 h 时 40 μg/ml 药物组侵袭至滤镜下表面的细胞数明显减少,且均低于阴性对照组,与闫倩^[11]报道的 8-NH₂-ICD 经异紫堇碱结构修饰后抗癌活性提高,可抑制肿瘤细胞生长的结论相符。因此 8-NH₂-ICD 能有效抑制人 OC 细胞株 HO-8910PM 的迁移,发挥其抗肿瘤效应^[12],鉴于本研究 HO-8910PM 细胞株数量少,关于其作用机制仍有待深入研究。

本实验研究表明,8-NH₂-ICD 能通过将人 OC 细胞株 HO-8910PM 阻滞于 G₀/G₁ 期而可较好抑制细胞的增殖、迁移,促进癌细胞凋亡,这为 OC 的治疗提供了新途径。

参考文献

[1] Gotimer K F, Bondoc C, Chalas E, et al. Self reported quality of life among patients who have undergone outpatient IP chemotherapy for ovarian cancer[J]. *Obste Gynecol* 2016, 127, Suppl 1: 4s.

- [2] 郭华, 张旭, 董辉, 等. 枸杞多糖联合紫杉醇对人上皮性卵巢癌 HO-8910PM 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2017, 39(6): 631-5.
- [3] Zhong M, Liu Y, Liu J, et al. Isocorydine derivatives and their anti-cancer activities[J]. *Molecules* 2014, 19(8): 12099-115.
- [4] 郑爱文, 李涛, 陈雅卿, 等. 消癌平联合顺铂对高转移人卵巢癌 HO-8910PM 细胞的抑制作用[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(1): 11-6.
- [5] Lee J Y, Kim E Y, Jung K W, et al. Trends in gynecologic cancer mortality in East Asian regions[J]. *J Gynecol Oncol*, 2014, 25(3): 174-82.
- [6] 陈正山. 秃疮花提取物抗肿瘤活性及其作用机理的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2002.
- [7] Lu P, Sun H, Zhang L, et al. Isocorydine targets the drug-resistant cellular side population through PDCD4-related apoptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Med* 2012, 18(1): 1136-46.
- [8] 杨世英, 柳军玺, 张鑫, 等. 异紫堇碱衍生物抗菌及抗肿瘤作用的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(1): 79-83.
- [9] 梁雪霏. 异紫堇碱在宫颈癌 SiHa 细胞中通过逆上皮间充质转化途径实现抗癌作用[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.
- [10] 符伟玉, 曾振飞, 兰柳波, 等. RNA 干扰 Gα13 对人卵巢癌 HO-8910PM 细胞侵袭转移的影响[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(1): 90-6.
- [11] 闫倩. 异紫堇碱衍生物的合成及抗肿瘤活性研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [12] 陈亚丽. 秃疮花生物碱有效部位的分离纯化和 8-乙酰氨基异紫堇碱的药理学研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016.

Inhibitory effect of 8 - amino - isocorydine on proliferation and migration of HO - 8910PM

Ji Wu, Wang Shengtian, Zhu Genhai, et al

(Dept of Gynecology, People's Hospital of Hainan, Haikou 570311)

Abstract Objective To analyze the inhibitory effect of 8-amino-isocorydine (8-NH₂-ICD) on the proliferation and migration of highly metastatic human ovarian cancer cell line (HO-8910PM). **Methods** Fifteen human epithelial ovarian cancer HO-8910PM cell lines in logarithmic growth phase were divided into the negative control group and the drug group. The inhibition rate of cell proliferation was detected by CCK-8 after 24 h, 48 h and 72 h of culture. The apoptotic morphological changes of HO-8910PM cells was observed by Hoechst staining. The cell cycle and migration capacity were determined by flow cytometry and Transwell chamber after drug action. **Results** The proliferation inhibition rate of HO-8910PM cells increased with time and drug concentration ($P < 0.05$). There was a significant dose-effect and time-effect relationship in the range of 5 to 20 μg/ml. The inhibition of cell proliferation was basically the maximum at 20 μg/ml. Hoechst 33258 staining showed that cells in the negative control group showed diffusely uniform light blue fluorescence, and the cell line added with 8-NH₂-ICD showed apoptotic morphological changes such as nucleus pyknosis, dense and bright fluorescence, different sizes and granular blue fluorescence. The effect on cell cycle was not obvious at a concentration of 5 to 20 μg/ml compared with the negative control group after 72 h of 8-NH₂-ICD. The S phase cells were decreased at a concentration of 40 μg/ml. The proportion of cells in G₀/G₁ phase increased, and the cell cycle arrest of 8-NH₂-ICD against HO-8910PM was in G₀/G₁ phase. The number of cells invaded to the lower surface of the drug group was significantly reduced after 24 h, 48 h and 72 h of treatment, and it was lower than that in the negative control group, the difference was statistically significant especially at 48 h and 72 h ($P < 0.05$). **Conclusion** 8-NH₂-ICD can significantly inhibit the proliferation and migration of HO-8910PM, promote cell apoptosis. Its cycle arrest to the HO-8910PM cell is in G₀/G₁ phase.

Key words 8-NH₂-ICD; HO-8910PM; proliferation; migration; inhibition