

百里醌抑制卵巢癌生长及其机制研究

龚建明, 王 晓, 吴 洁, 黄引平

温州医科大学附属第一医院 妇产科, 浙江 温州 325000

摘 要: **目的** 研究百里醌对卵巢癌生长的影响及其作用机制。**方法** 百里醌作用卵巢癌细胞株 SKOV3 后, CCK-8 法检测细胞增殖; ELISA 法检测细胞凋亡; 荧光探针法检测细胞内活性氧 (ROS) 水平; Western blotting 检测胞核蛋白 Nrf2、胞浆蛋白 Keap1、Akt、p-Akt、NQO1、GCLC 的表达; 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测细胞中 NQO1 和 GCLC mRNA 水平。制备裸鼠卵巢癌皮下移植瘤模型, 观察百里醌对肿瘤生长的影响; 免疫组化检测肿瘤组织 Nrf2、NQO1 和 GCLC 的阳性表达。**结果** 与对照组比较, 百里醌明显抑制 SKOV3 细胞生长 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$); 升高细胞内 ROS 水平 ($P < 0.05$); 下调胞核 Nrf2 蛋白及胞浆 p-Akt 蛋白表达 ($P < 0.05$), 上调 Keap1 蛋白表达 ($P < 0.001$); 下调 NQO1、GCLC 的 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。百里醌抑制裸鼠卵巢癌皮下移植瘤的生长 ($P < 0.01$), 降低肿瘤组织中 Nrf2、NQO1、GCLC 的阳性表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 百里醌抑制卵巢癌生长, 其机制可能是抑制胞核 Nrf2 蛋白表达, 促进癌细胞内 ROS 的产生, 诱导细胞凋亡。

关键词: 百里醌; 卵巢癌; Nrf2; NQO1; GCLC; Keap1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)24-3717-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.018

Inhibition of thymoquinone on tumor growth of ovarian cancer and its mechanism

GONG Jian-ming, WANG Xiao, WU Jie, HUANG Yin-ping

Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of thymoquinone in the growth inhibition of ovarian cancer. **Methods** After ovarian cancer cells SKOV3 were treated with thymoquinone, cell growth was observed by the CCK-8 assay and apoptosis was evaluated by ELISA. ROS in SKOV3 cells was detected by fluorescent probe. The expression of Keap1 protein, nuclear Nrf2 protein, P-Akt protein, Akt protein, NQO1 protein, and GCLC protein in SKOV3 cells was analyzed by Western blotting assay. NQO1 and GCLC mRNA were analyzed by RT-PCR. SKOV3 cells were injected into nude mice to establish engrafted tumor model. Immunohistochemistry was used to detect the positive expression of NQO1, GCLC, and Nrf2 in the ovarian tumors. **Results** Compared with the control group, thymoquinone significantly inhibited the proliferation of SKOV3 cells and increased the apoptosis ($P < 0.05$, 0.01). Thymoquinone could lessen the expression of nuclear Nrf2 protein and P-Akt protein ($P < 0.05$), but significantly increase the expression of Keap1 protein ($P < 0.001$). Protein and mRNA expression of NQO1 and GCLC in SKOV3 cells treated by thymoquinone, were lower than those in the control group ($P < 0.05$, 0.01). The positive expression of NQO1, GCLC, and Nrf2 was also decreased in ovarian tumors after treatment of thymoquinone ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Thymoquinone could inhibit the proliferation of ovarian cancer cells by inhibiting the expression of nuclear Nrf2, increasing the generation of ROS in ovarian cancer cells to promote apoptosis.

Key words: thymoquinone; ovarian cancer; Nrf2; NQO1; GCLC; Keap1

卵巢癌是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一, 发病率仅次于宫颈癌, 死亡率占各类妇科肿瘤的首位, 严重威胁着女性的身体健康和生命安全。手术及化疗可治愈大多数卵巢癌初期患者, 但临床上出现耐药的

患者日益增多, 晚期患者死亡率依然很高。故寻找有效的抗卵巢癌的药物成为热点课题之一^[1]。

随着植物化学技术的进步, 传统医药的化学成分及功效逐渐被发现。黑种草 *Nigella damascene* L.

收稿日期: 2015-06-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81070510)

作者简介: 龚建明, 男, 医师, 硕士, 从事妇科肿瘤及围产医学研究。E-mail: jamydoctor@126.com

主要分布于我国新疆及中东、中亚等地中海沿岸国家,全草均可入药,其种子含油高达30%。近年研究表明黑种草籽具有抗肿瘤、抗氧化、降血糖、调血脂、保肝等多种药理活性^[2]。百里醌是黑种草籽油中分离得到的主要有效物质,具有清除羟自由基和活性氧自由基的能力,以及强大的抗肿瘤效应,可抑制多种恶性肿瘤细胞生长和转移^[3-5]。但其抗肿瘤机制尚未完全明确。本实验观察百里醌体内外对卵巢癌生长的影响,并探讨其作用机制,为百里醌应用于临床治疗卵巢癌提供实验基础。

1 材料

1.1 药品与试剂

百里醌,批号 H47007,质量分数 99%,购自美国 Sigma 公司,以无水乙醇配制成 2 mg/mL 母液,临用时 RPMI 1640 培养基稀释成所需浓度;凋亡 ELISA、CCK-8、活性氧(ROS)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;胎牛血清、RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司;Nrf2、Keap1、Akt、p-Akt、NQO1、GCLC 抗体购自美国 Sigma 公司;胞浆蛋白、磷酸化蛋白提取试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 动物

雌性 BALB/c 裸鼠,8~10 周龄,体质量 18~20 g,购于中国科学院上海实验动物中心。动物合格证号 SCXK(沪)2007-0005。

1.3 细胞

人卵巢癌细胞株 SKOV3 购自中国科学院上海细胞库,培养在含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,37 ℃、5% CO₂ 培养箱下培养。细胞单层贴壁生长,至 70%~80%融合时胰蛋白酶消化传代。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖

收集处于对数生长期的 SKOV3 细胞,制成单细胞悬液,接种到 96 孔板,每孔 5×10^3 个,过夜贴壁后,分组如下:对照组,加入等量的 1%乙醇溶液;百里醌 15、30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 组,加入相

应浓度的百里醌;每组 3 孔。设置空白孔,不加细胞加入等量的 PBS。置 37 ℃培养箱 24 h,药物作用结束前 1 h,各孔加入 CCK-8 溶液 0.01 mL,继续培养 1 h,使用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度(A)值,计算细胞存活率[存活率=(给药组 A 值-空白孔 A 值)/(对照组 A 值-空白孔 A 值)]。

2.2 ELISA 法检测细胞凋亡

实验分为 2 组:对照组,加入等量的 1%乙醇溶液;百里醌组,加入 60 $\mu\text{mol/L}$ 百里醌。药物作用 24 h,细胞凋亡检测按照试剂盒说明书进行。

2.3 细胞内 ROS 的测定

细胞分组及药物处理同“2.2”项,收集各组细胞,1 000 r/min 离心 5 min,得细胞沉淀,避光条件下加入适当体积稀释好的 2,7-二氢二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA),细胞培养箱内孵育 20 min,培养液漂洗 3 次,荧光酶标仪测定荧光强度。

2.4 Western blotting 检测胞核蛋白 Nrf2 及胞浆蛋白 Keap1、Akt、p-Akt、NQO1、GCLC 的表达

细胞分组及药物处理同“2.2”项,收集各组细胞,加入含 PMSF 的细胞裂解液,提取上清液为细胞总蛋白。按试剂盒说明书提取胞浆蛋白及磷酸化蛋白。测量蛋白浓度后取等量蛋白样品上样,10% SDS-PAGE 电泳,半干转膜仪转膜,5%脱脂奶粉封闭后加入一抗 Nrf2、Keap1、Akt、p-Akt、NQO1、GCLC,4 ℃过夜,再度洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h,ECL 显色,X 线胶片曝光,用软件 Quantity One 分析条带灰度值。

2.5 RT-PCR 检测 NQO1、GCLC 基因表达

软件 Primer 3 设计特异性引物,序列见表 1。Trizol 法提取总 RNA,取 2 μL 测定 260、280 nm 处 A 值, A_{260}/A_{280} 值为 1.8~2.0,说明 RNA 纯度较高。应用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒进行逆转录和 PCR。反应条件:95 ℃、1 min,60 ℃、1 min,65 ℃、2 min,循环 40 次。扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶上电泳,以 GAPDH 作为内参,Bio-Rad Gel 凝胶图像分析系统扫描,分析目的基因相对表达水平。

表 1 NQO1、GCLC 引物序列

Table 1 Primer sequences of NQO1 and GCLC

引物名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
NQO1	AGCCGTCATTTGTAAGTCCTG	AATGCTTGATGATCTACTCTTC
GCLC	AGGCCGATAATGAGGACTGGG	CGACCTTATCCACTTTGTACCT
GAPDH	ACCAGCAAGCACACCACGAG	TTCGTCAATACAACCATGATGA

2.6 裸鼠卵巢癌皮下移植瘤模型的制备

将 2×10^6 个 SKOV3 细胞悬浮于 0.2 mL 培养液中,注射到裸鼠腋下皮肤内建立卵巢癌皮下移植瘤模型。接种 2 周后,选择移植瘤直径约为 10 mm 的裸鼠,随机分为对照组和百里醌组,每组 8 只(保证每组至少 5 只成功完成实验)。对照组 ig 1% 无水乙醇 0.2 mL;百里醌组,ig 给药剂量为 20 mg/kg(根据预试验结果确定),每 2 天给药 1 次,给药 2 周;第 8 周处死裸鼠,仔细剥离皮下移植瘤组织并称质量,计算抑瘤率。

抑瘤率=(对照组瘤质量-给药组瘤质量)/对照组瘤质量

2.7 免疫组化检测肿瘤组织中 Nrf2、NQO1 和 GCLC 蛋白表达

取新鲜移植瘤组织,经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,切片,脱蜡水化后,按照免疫组化试剂盒操作步骤进行染色,在高倍镜下随机选择 20 个视野,计算镜下阳性细胞所占比例。

2.8 统计分析

实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS 16.0 软件,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 对 SKOV3 细胞增殖的影响

SKOV3 细胞经浓度为 15、30、60、120 $\mu\text{mol/L}$ 的百里醌作用 24 h 后,细胞存活率分别为 $(85.2 \pm 4.4)\%$ 、 $(75.1 \pm 3.5)\%$ 、 $(54.1 \pm 2.0)\%$ 和 $(34.1 \pm 2.7)\%$ ($n=3$),与对照组比较,差异均显著 ($P<0.05, 0.01$)。百里醌作用 24 h 后 IC_{50} 为 61.4 $\mu\text{mol/L}$,因此选择 60 $\mu\text{mol/L}$ 进行后续实验。

3.2 对 SKOV3 细胞凋亡的影响

60 $\mu\text{mol/L}$ 百里醌作用 SKOV3 细胞 24 h 后,诱导细胞凋亡率为 $(13.7 \pm 1.1)\%$ ($n=5$),与对照组凋亡率 $(3.8 \pm 0.6)\%$ 比较,差异显著 ($P<0.01$)。

3.3 对细胞内 ROS 生成的影响

SKOV3 细胞经百里醌作用 24 h 后,细胞内 DCF 密度值为 $(68.3 \pm 2.7, n=5)$,与对照组 (54.9 ± 4.4) 比较,差异显著 ($P<0.05$)。

3.4 对胞核 Nrf2 蛋白及胞浆 Keap1、p-Akt、Akt 蛋白表达的影响

与对照组比较,百里醌组胞核 Nrf2 蛋白、胞浆 p-Akt 蛋白表达率显著下调 ($P<0.05$);Akt 蛋白表达无显著差异 ($P>0.05$);Keap1 蛋白表达显著上调 ($P<0.001$)。结果见图 1。

3.5 对 NQO1 和 GCLC mRNA 和蛋白表达的影响

与对照组比较,百里醌组 NQO1、GCLC mRNA 和蛋白表达均下调,差异显著 ($P<0.05, 0.01$)。结果见图 2、3。

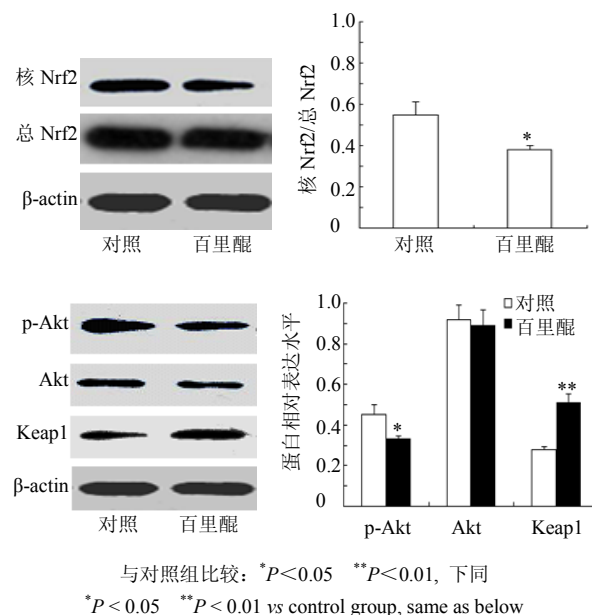


图 1 百里醌对 SKOV3 细胞胞核蛋白 Nrf2 及胞浆蛋白 Keap1、p-Akt、Akt 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 1 Effect of thymoquinone on protein expression of nuclear Nrf2 as well as Keap1, p-Akt, and Akt in SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

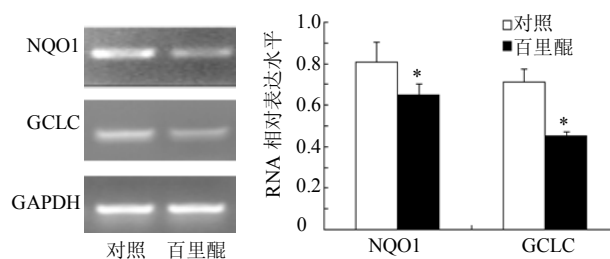


图 2 百里醌对 SKOV3 细胞中 NQO1 和 GCLC mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 2 Effect of thymoquinone on expression of NQO1 and GCLC mRNA in SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

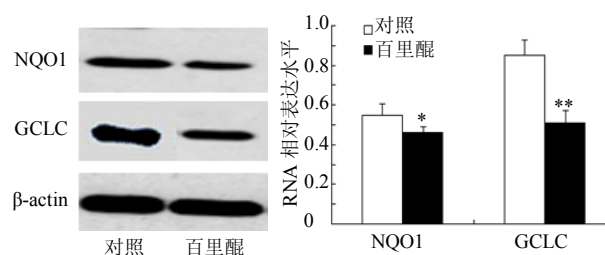


图 3 百里醌对 SKOV3 细胞中 NQO1 和 GCLC 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Effect of thymoquinone on expression of NQO1 and GCLC proteins in SKOV3 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.6 对裸鼠卵巢癌皮下移植瘤生长的抑制作用

百里醌组平均肿瘤质量为 (0.43 ± 0.06) g, 与对照组 $[(0.79 \pm 0.10)$ g] 比较, 瘤质量明显减轻 ($P < 0.01$), 抑瘤率为 45.6%。

3.7 对肿瘤组织 Nrf2、NQO1 和 GCLC 表达的影响

免疫组化染色可见百里醌组肿瘤组织中 Nrf2、

NQO1 和 GCLC 阳性表达率分别为 $(28.5 \pm 2.9)\%$ 、 $(27.0 \pm 3.4)\%$ 和 $(17.6 \pm 1.6)\%$, 对照组中分别为 $(36.9 \pm 3.9)\%$ 、 $(44.4 \pm 5.0)\%$ 和 $(31.4 \pm 3.8)\%$; 与对照组比较, 百里醌组肿瘤组织中 Nrf2、NQO1 和 GCLC 阳性表达率均下降, 差异显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 4。

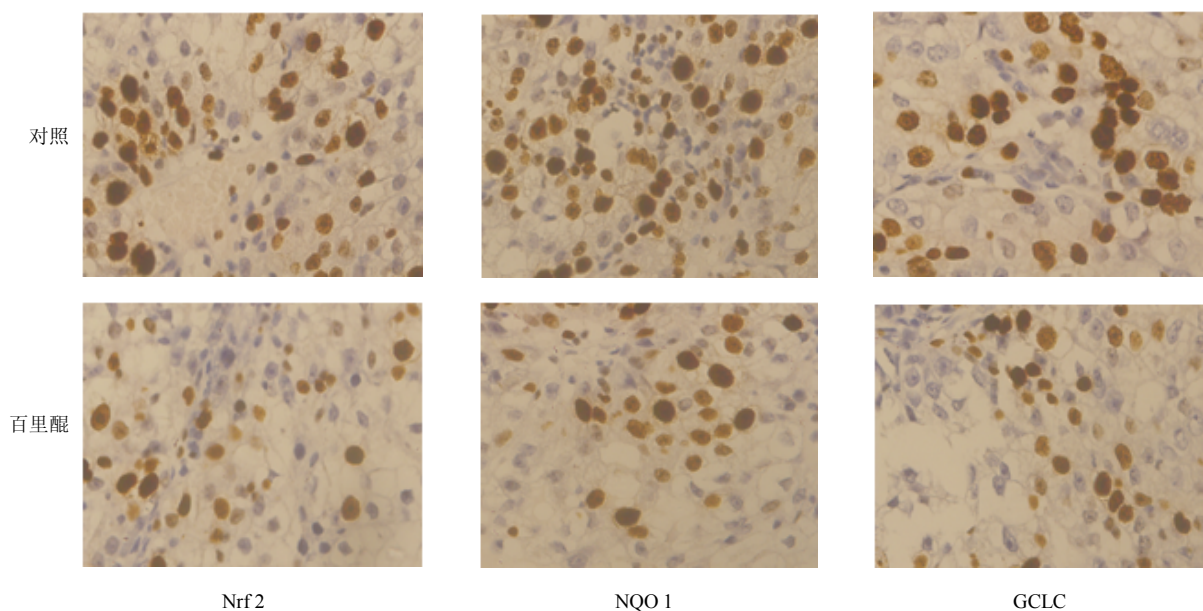


图4 百里醌对肿瘤组织中 Nrf2、NQO1 和 GCLC 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of thymoquinone on expression of Nrf2, NQO1, and GCLC in tumor tissue ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

本实验结果表明, 百里醌能抑制体外卵巢癌细胞的生长, 同时细胞凋亡检测表明百里醌能有效诱导卵巢癌细胞凋亡。在体内移植瘤模型中, 也观察到百里醌明显抑制卵巢癌移植瘤生长。进一步研究发现百里醌的抗肿瘤机制可能与其氧化应激相关。

氧化应激是体内的 ROS 超过了机体的抗氧化防御机制的一种病理状态, 为了减少 ROS 对细胞的损害, 细胞内有一系列有效的抗氧化防御体系。NQO1、GCLC 等抗氧化酶均能降低过氧化物的形成, 保护细胞膜结构和功能完整^[6]。

NQO1 酶属于 II 相解毒酶, 能够借助 NADH 或 NADPH 作为电子供体, 催化醌类化合物的还原反应。体内的醌类被还原有 2 种方式: 一种是单电子反应, 生成活泼的半醌类物质, 进而产生大量 ROS, 对细胞造成氧化损伤; 另一种是双电子还原反应, 由 II 相解毒酶催化, 醌类直接被还原成氢醌, 氢醌稳定易被排泄。NQO1 酶能催化后一种反应, 避免生成大量的 ROS, 从而保护细胞不被氧化损伤。

还原型谷胱甘肽 (GSH) 具有较强的抗氧化能力, 能使细胞免受各种有害物质 (如氧化剂、亲电子物质等) 的损伤, 通过谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的催化作用清除体内多余的氧自由基。 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -GCS) 是合成 GSH 的限速酶, 其催化亚基 GCLC 具有全酶活性。GCLC 是通过合成 GSH 实现其抗氧化作用^[7]。

本实验结果显示百里醌作用于卵巢癌 SKOV3 细胞后, 细胞内 ROS 水平明显升高, 而细胞内 NQO1、GCLC mRNA 和蛋白水平均下降; 免疫组化结果显示百里醌能明显抑制抗氧化酶 NQO1、GCLC 在体内肿瘤中的表达。百里醌使体内外卵巢癌抗氧化酶的表达减少, 使体内清除氧自由基的能力下降, 增加 ROS 的产生, 促进卵巢癌细胞的凋亡。

Nrf2 属于 CNC 转录因子家庭成员, 是参与细胞内抗氧化应激反应的一种重要转录因子。Nrf2 包括 6 个功能域, 分别命名为 Neh1~Neh6, 正常情况下, Nrf2 主要定位于细胞质内, 活性由负性调节蛋白 Keap1 调控。Nrf2 包括 2 个重要的保守区域,

与 Keap1 相互作用后被固定于细胞质中的位点上,同时可被 Keap1 通过泛素化迅速降解^[8-10]。

当细胞受到激活剂的信号攻击后,激活 PI3k/Akt 途径,使位于细胞质的 Akt 转移到细胞膜上获得催化,Akt 通过蛋白激酶对其 Ser473 和 Thr308 磷酸化而被激活^[11-12]。p-Akt 可使下游靶基因产物 Nrf2 磷酸化,活化的 Nrf2 从 Keap1 中解离,易位进入细胞核,与小 Maf 蛋白等结合成异二聚体,识别抗氧化反应元件 ARE,从而激活多种抗氧化基因和 II 相酶基因的转录,如 NQO1、GCLC、SOD 等^[13]。这些酶直接和间接地参与 ROS 的清除,增加 GSH 和 NADPH 的合成,还可以加速致癌物的排除。

本实验结果表明,与对照组相比,百里醌组细胞核 Nrf2 蛋白表达明显减少,而 Keap1 蛋白表达显著增加。这表明百里醌干预后 SKOV3 细胞内 Nrf2 在核内表达减少,可能是由于 Keap1 蛋白表达增加,加强了对 Nrf2 的结合抑制,并通过泛素化促进其降解。本实验同时发现,与对照组相比,百里醌组 p-Akt 蛋白表达亦减少,这表明百里醌可能同时通过抑制 Akt 的磷酸化,来减少 Nrf2 的活化。进而减少抗氧化酶 NQO1、GCLC 等在体内的表达,使肿瘤体内氧化与抗氧化失衡,产生大量的 ROS,促进肿瘤细胞凋亡。

综上所述,百里醌可能通过促进 Keap1 蛋白表达、抑制 Akt 磷酸化、进而抑制 Nrf2 核转位,减少多种抗氧化酶和 II 相酶的表达,促进卵巢癌细胞内 ROS 水平增加,诱导凋亡。

参考文献

- [1] 田红,于鹏,吴小茗,等. 卵巢癌的治疗药物研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(1): 103-107.
- [2] 信学雷,薛慧清,阿吉艾克拜尔·艾萨,等. 黑种草属植物研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(6): 1514-1517.
- [3] Banerjee S, Padhye S, Azmi A, et al. Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62(7): 938-946.
- [4] Ravindran J, Nair H B, Sung B, et al. Thymoquinone poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles exhibit enhanced anti-proliferative, anti-inflammatory, and chemosensitization potential [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(11): 1640-1647.
- [5] Banerjee S, Kaseb A O, Wang Z, et al. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(13): 5575-5583.
- [6] Martin K R, Barrett J C. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2002, 21(2): 71-75.
- [7] Franklin C C, Backos D S, Mohar I, et al. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase [J]. *Mol Aspects Med*, 2009, 30(1/2): 86-98.
- [8] Surh Y J, Kundu J K, Na H K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cell-ular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals [J]. *Planta Med*, 2008, 74(13): 1526-1539.
- [9] Wang X J, Hayes J D, Wolf C R. Generation of a stable antioxidant response element-driven reporter gene cell line and its use to show redox-dependent activation of Nrf2 by cancer chemotherapeutic agents [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(22): 10983-10994.
- [10] Mann G E, Niehueser-saran J, Wastson A, et al. Nrf2/ARE regulated antioxidant gene expression in endothelial and smooth muscle cells in oxidative stress implications for atherosclerosis and preeclampsia [J]. *Acta Physiol Sin*, 2007, 59(2): 117-127.
- [11] Na H K, Kim E H, Jung J H, et al. (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 476(2): 171-177.
- [12] Mo L, Yang C, Gu M, et al. PI3K/Akt signaling pathway induced heme oxygenase-1 upregulation mediates the adaptive cytoprotection of hydrogen peroxide preconditioning against oxidative injury in PC12 cells [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(2): 314-320.
- [13] Bryan H K, Olayanju A, Goldring C E, et al. The Nrf2 cell defence pathway: keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(6): 705-717.