

贝母素甲对 SKOV3 细胞氟尿嘧啶敏感性的影响

胡锴克<sup>1,3</sup>, 曹静薇<sup>3</sup>, 潘炫豪<sup>3</sup>, 陈松斌<sup>3</sup>, 徐 冶<sup>1,2\*</sup>

(1. 吉林医药学院肿瘤靶向治疗与转化医学实验室, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林医药学院生殖功能损伤中药干预技术重点研究室, 吉林 吉林 132013; 3. 吉林医药学院临床医学部, 吉林 吉林 132013)

**摘要:** **目的** 探讨贝母素甲对人卵巢癌 SKOV3 细胞氟尿嘧啶敏感性的影响。**方法** 细胞随机分为空白对照组, 贝母素甲低、中、高剂量组, 氟尿嘧啶组, 联合用药组, MTT 法检测贝母素甲、氟尿嘧啶单用及两者联用后细胞活性, 细胞划痕实验检测贝母素甲各剂量组细胞迁移和增殖能力, 流式细胞术检测贝母素甲各剂量组细胞周期变化, Western blot 法检测贝母素甲各剂量组 PCNA、Bax、Bcl-2 表达及联合用药组 cleaved-caspase-3 表达。**结果** 随着贝母素甲、氟尿嘧啶浓度升高, 细胞活性下降, 两者联用后抑制效果较单用更显著 ( $P<0.05$ ); 随着贝母素甲浓度升高, 它对细胞迁移和增殖的抑制效果也增加, 细胞被阻滞于 S/G<sub>2</sub> 期, PCNA 表达降低 ( $P<0.05$ ), Bax/Bcl-2 比值有所升高, 但无显著差异 ( $P>0.05$ )。与单用比较, 贝母素甲、氟尿嘧啶联用后 cleaved-caspase-3 表达升高 ( $P<0.05$ )。**结论** 贝母素甲能通过阻滞 SKOV3 细胞周期进展来有效提高它对氟尿嘧啶的敏感性。

**关键词:** 贝母素甲; 人卵巢癌 SKOV3 细胞; 氟尿嘧啶; 敏感性; 细胞周期

**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** B      **文章编号:** 1001-1528(2023)04-1305-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.04.047

女性生殖系统常见的恶性肿瘤有宫颈癌、卵巢癌、子宫肉瘤等, 其中卵巢癌致死率最高<sup>[1]</sup>。卵巢体积小、位置深, 早期恶变无症状而易被患者忽视, 发现时往往难以依靠手术根治, 故化疗成为术后主要辅助治疗手段, 而如何减少化疗药物毒副作用一直是临床肿瘤治疗中的热点问题。近年来, 中药单体成分因其高效低毒、多靶点等特性逐渐在相关研究中得到重视<sup>[2]</sup>。

我国贝母属植物约有 50 种、19 个变种<sup>[3]</sup>, 许多以贝母入药的中药制剂在临床上发挥防病治病作用<sup>[4]</sup>, 其中川贝母、浙贝母药用历史较长<sup>[5]</sup>。目前, 对浙贝母的研究集中于其活性成分的药理作用及药动力学方面<sup>[6]</sup>, 发现它有镇咳、祛痰作用<sup>[7]</sup>, 与宁海白枇杷花配伍有抗炎、抑菌作用<sup>[8]</sup>。贝母素甲是贝母主要活性成分, 属于西藜芦碱类<sup>[9]</sup>, 主要来源于浙贝母、平贝母、湖北贝母、太白贝母、暗紫贝母、川贝母等<sup>[10]</sup>, 具有抗肿瘤<sup>[11]</sup>、逆转耐药<sup>[12]</sup>、抑制增殖<sup>[13]</sup>作用, 可影响乳腺癌细胞周期, 低浓度时 G<sub>1</sub>、S 期细胞比例增加, 而高浓度时 G<sub>1</sub> 期细胞比例增加, S 期细胞比例减少<sup>[14]</sup>。

氟尿嘧啶 (fluorouracil, 5-FU) 是经典的临床肿瘤化疗药物, 也是最常用的尿嘧啶抗代谢药, 主要杀伤 S 期细胞, 故归类于细胞周期特异性药物, 临床上主要用于消化

系统癌、乳腺癌治疗, 对生殖系统癌如宫颈癌、卵巢癌、绒毛膜上皮癌等也有作用<sup>[15]</sup>, 其治疗卵巢癌时常与铂类联用, 如氟尿嘧啶+甲酰四氢叶酸+奥沙利铂或卡培他滨 (氟尿嘧啶前体)+奥沙利铂<sup>[16]</sup>。本实验使用贝母素甲影响卵巢癌 SKOV3 细胞周期, 并探讨该成分对氟尿嘧啶的协同作用, 以期开发相关肿瘤化疗增敏药物提供依据。

1 材料

1.1 细胞株 人卵巢癌细胞株 SKOV3, 由吉林医药学院肿瘤靶向治疗与转化医学实验室提供。

1.2 试剂与药物 贝母素甲 (纯度>98%, 目录号 M4263)、氟尿嘧啶 (纯度>99%, 目录号 M2289) (美国 AbMole 公司)。RPMI-1640 培养基 (货号 72400120)、胎牛血清 (货号 12483020) (美国 Gibco 公司); MTT、DMSO (美国 Sigma 公司); 流式细胞术细胞周期检测试剂盒 (美国 Merck Millipore 公司); 兔抗 PCNA (目录号 10205-2-AP, 美国 Proteintech 公司); 兔抗 caspase-3 (货号 ab32351, 英国 Abcam 公司); 鼠抗  $\beta$ -actin (货号 21800)、各类二抗 (美国 SAB 公司)。

1.3 仪器 细胞状态分析仪 (美国 Merck Millipore 公司); 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 蛋白电泳仪、蛋白转印仪、酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司);

收稿日期: 2021-05-30  
基金项目: 2020 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (202013706022)  
作者简介: 胡锴克 (1997—), 男, 研究方向为肿瘤化学药物治疗敏感性与耐药。Tel: 18000132117, E-mail: 1349024534@qq.com  
\* 通信作者: 徐 冶 (1972—), 男, 博士, 教授, 研究方向为肿瘤化学药物治疗敏感性与耐药。Tel: 13704429920, E-mail: xuye\_9707@163.com  
网络出版日期: 2022-02-17  
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220216.1615.010.html>

ECL 发光仪（上海天能科技有限公司）；光学倒置显微镜（日本 Olympus 公司）。

2 方法

2.1 细胞培养 将 SKOV3 细胞置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中，以 RPMI-1640 完全培养液（含 10% 胎牛血清、1% 青霉素、链霉素）培养。

2.2 MTT 法检测细胞活力 对数生长期 SKOV3 细胞经胰酶消化后，以 100 μL 含 5×10<sup>5</sup>/mL 细胞的培养液接种于 96 孔培养板中，12~18 h 后待细胞贴壁、形态良好时更换为完全培养基，倍比稀释至浓度为 200、100、50、25、12.5、6.25、3.125 μmol/L，培养 72 h 后加入 1 mg/mL MTT（20 μL/孔），继续培养 4~6 h 后将培养液换为 150 μL DMSO，微量振荡器振荡孔板 10 min 以充分溶解甲臞结晶，在 490 nm 波长处检测各孔吸光度，各浓度设置 3 个复孔，取平均值，计算细胞活性，重复 3 次，公式为细胞活性 = 实验组平均吸光度/对照组平均吸光度。

2.3 细胞划痕实验检测细胞增殖和迁移 在洁净无菌干燥的 6 孔板背面均匀画贯穿孔的横线，每孔加入约 5×10<sup>5</sup> 个细胞，待其继续增殖铺满孔板后，用枪头以垂直于孔板背面横线方向划痕，PBS 清洗 3 次以洗净脱落细胞，更换为完全培养基稀释的各浓度药物，分为空白对照组，贝母素甲低、中、高剂量组（50、100、200 μmol/L），同法继续培养，依次在 0、8、16、24 h 拍照，重复 3 次，采用 Image J 软件量化细胞划痕区域面积，计算 24 h 划痕愈合率，公式为愈合率 = [（0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积）/ 0 h 划痕面积] × 100%。

2.4 流式细胞术检测细胞周期 在洁净无菌干燥的 6 孔板中每孔加入约 5.0×10<sup>5</sup> 个细胞，12~18 h 后待其贴壁、形态良好时更换加药培养基，24 h 后胰酶消化并收集细胞，转移 1×10<sup>5</sup>~1×10<sup>6</sup> 细胞至每个 EP 管中，300×g 离心 5 min，1×PBS 清洗 1 次，重悬细胞，缓慢加入冷 75% 乙醇使细胞浓缩至 5.0×10<sup>5</sup>~1.0×10<sup>6</sup>/mL，在 -20 ℃ 下孵育至少 3 h，转移 200 μL 细胞悬液至新管中，300×g 离心 5 min，1×PBS 清洗 1 次，加入 200 μL 细胞周期检测试剂，室温避光孵育 30 min，上机检测，重复 3 次。

2.5 蛋白提取及检测 将对数生长期细胞随机分为空白对照组，贝母素甲低、中、高剂量组（50、100、200 μmol/L），氟尿嘧啶组（5 μmol/L），联合用药组（50 μmol/L 贝母素甲 + 5 μmol/L 氟尿嘧啶），加入对应药物继续培养 24 h 后收集细胞，1 000 r/min 离心 5 min，共 3 次，1 mL 1×PBS 复悬并移入 EP 管中，4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min，弃上清液，加入 100 μL RIPA 蛋白裂解液，冰浴超声破碎处理，破碎后在 4 ℃ 下放置 40 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，取少量上清液检测蛋白浓度，剩余以 4 : 1 比例加入含 β-巯基乙醇的 5×loading buffer，100 ℃ 水浴 30 s，冷却至室温后，在 -20 ℃ 下保存。

2.6 Western blot 法检测增殖和凋亡标志性蛋白表达 配制分离胶及浓缩胶，按照蛋白浓度加入等量蛋白样品后进

行电泳，电泳结束后对照 marker 切下所需分离胶部分，在 4 ℃ 下以 100 V 电压转膜 120 min，PBST 清洗 PVDF 膜数次，放入 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 120 min，封闭后 PBST 洗膜 3 次，加入一抗，在 4 ℃ 下孵育过夜，孵育后回收一抗，PBST 洗膜 3 次，孵育二抗，摇床振荡 120 min，回收二抗，PBST 洗膜 5 次，加显色液显色，曝光并拍照留存记录，重复 3 次，采用 Image J 软件分析印迹灰度，对目的蛋白进行半定量，以 β-actin 为内参。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，数据均以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

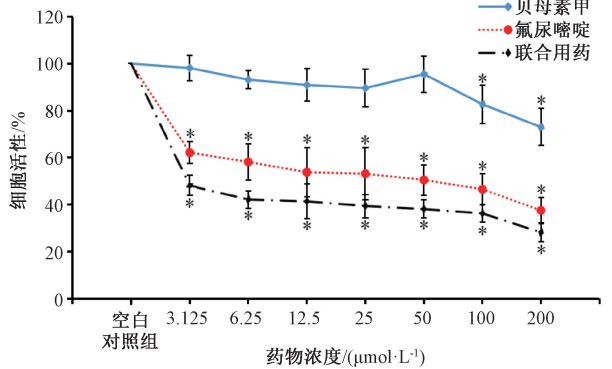
3 结果

3.1 贝母素甲、氟尿嘧啶对 SKOV3 细胞活性的影响

3.1.1 贝母素甲单用 与空白对照组比较，贝母素甲浓度 ≤ 50 μmol/L 时 SKOV3 细胞活性无明显变化 ( $P > 0.05$ )，而 > 50 μmol/L 时 SKOV3 细胞活性降低 ( $P < 0.05$ )，见图 1。

3.1.2 氟尿嘧啶单用 与空白对照组比较，不同浓度氟尿嘧啶干预后 SKOV3 细胞活性均降低 ( $P < 0.05$ )，见图 1。

3.1.3 贝母素甲、氟尿嘧啶联用 本研究选用最大无毒剂量 50 μmol/L 贝母素甲联合各浓度氟尿嘧啶，在后者浓度为 3.125 μmol/L 时 SKOV3 细胞活性降低 ( $P < 0.05$ )，但随着其浓度进一步增加，上述降低趋势反而逐渐减小，见图 1，推测可能是细胞毒性掩盖增敏效果所致。另外，当氟尿嘧啶浓度在 25 μmol/L 以下时，各浓度联合用药的抑制效果均优于单独用药 ( $P < 0.05$ )。在 Western blot 实验中，为便于稀释药物贮存液（浓度为 50 mmol/L），本研究以 5 μmol/L 氟尿嘧啶进行实验。



注：与空白对照组比较，\* $P < 0.05$ 。

图 1 贝母素甲、氟尿嘧啶对 SKOV3 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

3.2 贝母素甲对 SKOV3 细胞增殖和迁移的影响 与空白对照组比较，贝母素甲各剂量组 24 h 划痕愈合率降低 ( $P < 0.05$ )，但对细胞增殖和迁移的抑制作用不呈浓度依赖性，见图 2、表 1。

3.3 贝母素甲对 SKOV3 细胞周期的影响 与空白对照组比较，贝母素甲中、高剂量组 SKOV3 细胞 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例下降，S 期细胞比例升高 ( $P < 0.05$ )，高剂量组 G<sub>2</sub> 期细

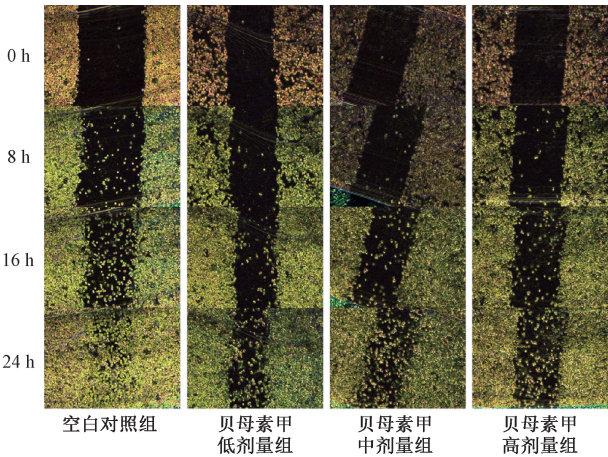


图 2 各组 SKOV3 细胞划痕 (×100)

表 1 贝母素甲对 SKOV3 细胞划痕愈合的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	细胞愈合率/%
空白对照组	—	93.60±7.82
贝母素甲低剂量组	50	40.80±6.30*
贝母素甲中剂量组	100	50.00±10.95*
贝母素甲高剂量组	200	32.08±5.56*

注：与空白对照组比较，\* $P<0.05$ 。  
胞比例升高 ( $P<0.05$ )，并且对细胞周期的阻滞作用呈浓度依赖性，见图 3、表 2。

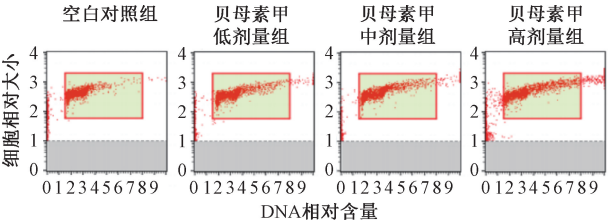


图 3 各组 SKOV3 细胞周期

表 2 贝母素甲对 SKOV3 细胞周期的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	( $G_0/G_1$ )/%	S/%	( $G_2/M$ )/%
空白对照组	—	86.13±5.26	9.30±3.04	3.73±2.25
贝母素甲低剂量组	50	76.50±3.05	13.53±1.79	8.07±2.64
贝母素甲中剂量组	100	73.43±4.57* 15.87±0.59*		8.77±2.81
贝母素甲高剂量组	200	72.30±3.20* 14.70±1.84*		10.00±2.25*

注：与空白对照组比较，\* $P<0.05$ 。  
3.4 贝母素甲、氟尿嘧啶对 SKOV3 增殖和凋亡蛋白表达的影响  
3.4.1 贝母素甲单用 与空白对照组比较，贝母素甲中、高剂量组 SKOV3 细胞 PCNA 表达降低 ( $P<0.05$ )；与贝母素甲高剂量组比较，低、中剂量组 SKOV3 细胞 PCNA 表达升高 ( $P<0.05$ )，即呈浓度依赖性。另外，与空白对照组比较，贝母素甲各剂量组 SKOV3 细胞 Bax/Bcl-2 比值有所升高，但无显著差异 ( $P>0.05$ )，见图 4、表 3。  
3.4.2 贝母素甲、氟尿嘧啶联用 与空白对照组比较，联合用药组 SKOV3 细胞 cleaved-caspase-3 蛋白表达升高

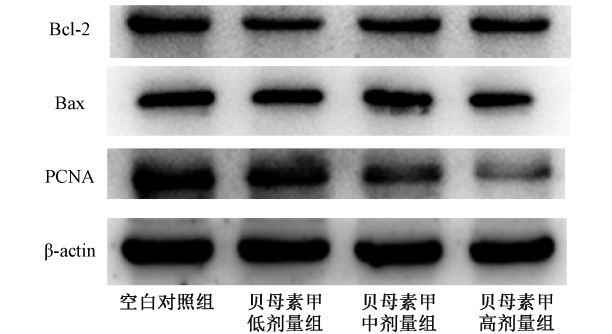


图 4 各组 SKOV3 细胞增殖和凋亡蛋白表达

表 3 贝母素甲单用对 SKOV3 增殖和凋亡蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	PCNA	Bax/Bcl-2
空白对照组	—	0.96±0.07	0.86±0.19
贝母素甲低剂量组	50	0.80±0.09 <sup>#</sup>	0.89±0.13
贝母素甲中剂量组	100	0.66±0.10* <sup>#</sup>	1.03±0.09
贝母素甲高剂量组	200	0.40±0.10*	0.96±0.25

注：与空白对照组比较，\* $P<0.05$ ；与贝母素甲高剂量组比较，<sup>#</sup> $P<0.05$ 。  
( $P<0.05$ )；与联合用药组比较，贝母素甲低剂量组 SKOV3 细胞 cleaved-caspase-3 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ )，见图 5、表 4。

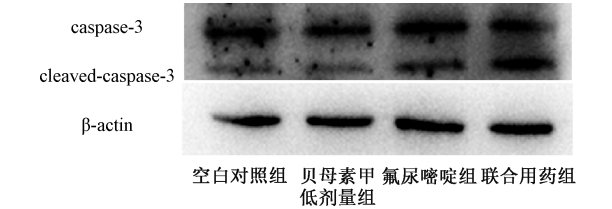


图 5 各组 SKOV3 细胞 cleaved-caspase-3 蛋白表达

表 4 贝母素甲、氟尿嘧啶联用对 SKOV3 细胞 cleaved-caspase-3 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	cleaved-caspase-3
空白对照组	—	0.49±0.25
贝母素甲低剂量组	50	0.64±0.14 <sup>△</sup>
氟尿嘧啶组	5	0.79±0.17
联合用药组	50+5	1.13±0.08*

注：与空白对照组比较，\* $P<0.05$ ；与联合用药组比较，<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

4 讨论

抗肿瘤药物在肿瘤的综合治疗中占有重要地位，经典药物有氟尿嘧啶、顺铂、紫杉醇等。化疗药物具有杀伤肿瘤细胞的作用，但也存在一些缺点，如非选择性分布、药物毒性、对正常组织的意外副作用等，限制了临床应用。这些副作用和毒性暂时是不可避免的，并有可能导致化疗失败。如何减少药物的毒副作用属于前沿热点，近年来研究发现，中药与化疗药物联合应用如川芎嗪、熊果酸联合铂类药物，能够显著提高化疗药物对肿瘤细胞的杀伤效果，对于恶性肿瘤的治疗表现出理想的研究价值<sup>[12,17-18]</sup>。



对贝母属植物的研究目前多集中于其传统的镇咳平喘和抗炎等药理作用，尤其是作为单体的贝母素甲，对其抗肿瘤作用的研究仍处于起步阶段。研究发现，单独使用贝母素甲对肿瘤的抑制作用并不显著<sup>[17]</sup>。从给药剂量角度而言，作为一种抑制药物的效果较差，所需剂量过高，与顺铂、阿霉素和紫杉醇等药的有效浓度差距可达成百甚至上千倍，反而可将其视为低毒性的增敏剂联合传统化疗药物使用。考虑到贝母素甲可以改变肿瘤细胞的细胞周期，本研究认为使用贝母素甲代替原本的同步化药物（如羟基脲等）可以减轻化疗药物联合使用造成的骨髓抑制、胃肠道反应等副作用。

本实验研究贝母素甲单独和联合氟尿嘧啶使用对体外卵巢癌 SKOV3 细胞的作用，认为其机制为贝母素甲改变 SKOV3 细胞周期，从而抑制细胞 PCNA 蛋白表达，并对低剂量氟尿嘧啶起到增敏作用。贝母素甲低剂量能增强氟尿嘧啶作用，可能是通过使细胞停留在 S 期而较多摄入氟尿嘧啶所致。但可以确定的是，低剂量贝母素甲联合氟尿嘧啶可提高对 SKOV3 细胞抑制效果。尽管随着氟尿嘧啶的浓度上升到 25  $\mu\text{mol/L}$ ，联合使用氟尿嘧啶和贝母素甲相较单独使用氟尿嘧啶的效果无明显差异，但在临床对患者的治疗中，高剂量同时也会带来大量的毒副作用。综合考量药物作用和副反应，临床应用时低剂量所产生的效果理应优于高剂量。本实验可为临床优化卵巢癌化疗提供新的思路，降低癌症患者在化疗过程中出现的毒副作用，进一步改善临床肿瘤治疗方案。

参考文献：

[ 1 ] 谢 幸,孔北华,段 涛. 妇产科学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.

[ 2 ] 汤 涛,董 伟,张 婧,等. 中药单体成分逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(4): 792-797; 846.

[ 3 ] 赵 婉,姜 海,王知斌,等. 贝母属植物的药理作用概述[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(11): 97-100.

[ 4 ] 徐东铭,徐雅娟. 贝母属植物中生物碱的研究进展[J].

中草药, 1991, 22(3): 132-139.

[ 5 ] 赵 倩,李 波,关 瑜,等. 贝母属药材化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2020, 29(5): 57-60.

[ 6 ] 佟晓琳. 浙贝母主要成分血浆药代动力学及肿瘤耐药细胞抑制研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2016.

[ 7 ] 王翰华,杨晓春,崔明超. 浙贝母叶与浙贝母花醇提物的止咳、化痰及平喘活性研究[J]. 天津医药, 2016, 44(10): 1225-1228.

[ 8 ] 王翰华,杨晓春,崔明超,等. 浙贝母花与宁海白枇杷花配伍的抗炎及抗菌作用[J]. 中成药, 2018, 40(1): 46-50.

[ 9 ] 朱卫丰,廖梅香. 异甾体类生物碱的研究进展[J]. 亚太传统医药, 2008, 4(1): 40-43.

[ 10 ] 朱晓琳,陈 渊,赵 伟. 贝母素甲药理作用的研究进展[J]. 药物生物技术, 2018, 25(6): 561-564.

[ 11 ] 张玉人,林洪生,张 英. 贝母素甲、贝母素乙对 4T1 乳腺癌细胞炎性微环境的干预调节作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(11): 1504-1506.

[ 12 ] 唐晓勇. 浙贝母碱逆转肺癌 A549/DDP 细胞株多药耐药及其机理研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2012.

[ 13 ] 张 宇,陈信义. 贝母甲素抑制 AML-KG-1a 细胞增殖与诱导细胞凋亡研究[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(4): 325-329.

[ 14 ] 湛海燕,陈信义. 贝母素甲抑制人乳腺癌细胞 MCF-7/TAM 增殖及其对细胞凋亡的影响[J]. 中医学学报, 2012, 40(4): 12-15.

[ 15 ] 杨宝峰,陈建国. 药理学[M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.

[ 16 ] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 卵巢癌诊疗规范(2018 年版)[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2019, 5(2): 87-96.

[ 17 ] 胡凯文,郑洪霞,齐 静,等. 浙贝母碱逆转白血病细胞多药耐药的研究[J]. 中华血液学杂志, 1999, 19(12): 33-34.

[ 18 ] 张 婕,齐 聪. 熊果酸联合顺铂对卵巢癌干细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(10): 1655-1661.