

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.004>

胡椒碱对卵巢癌细胞株SKOV-3侵袭与凋亡的影响及其机制

许静, 郭哲, 孙慧霞, 梁殿迅

(南阳市中心医院妇产科, 河南 南阳 473000)

[摘要] 目的: 观察胡椒碱对卵巢癌细胞株SKOV-3的侵袭与凋亡的影响并讨论其作用机制。方法: CCK-8法检测不同浓度的胡椒碱(0, 5, 10和20 $\mu\text{mol/L}$)对SKOV-3细胞作用不同时间(12, 24和36 h)后, SKOV-3细胞存活率的变化; Transwell小室法与TUNEL法分别检测SKOV-3细胞侵袭能力与凋亡能力的变化; Western印迹检测p-PI3K与p-Akt蛋白表达水平的变化。结果: CCK-8法结果显示胡椒碱随浓度增加与培养时间增长, 对SKOV-3细胞存活率的抑制程度增强; 采用10 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱培养SKOV-3细胞36 h后, SKOV-3细胞的细胞侵袭数明显降低, 细胞凋亡数明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); p-PI3K与p-Akt蛋白表达水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 胡椒碱能够抑制卵巢癌细胞SKOV-3的增殖与侵袭能力, 其增加凋亡能力可能与抑制PI3K/Akt信号通路有关。

[关键词] 胡椒碱; 卵巢癌细胞; PI3K/Akt信号通路

Effect and mechanism of piperine on invasion and apoptosis of SKOV-3 ovarian cancer cell line

XU Jing, GUO Zhe, SUN Huixia, LIANG Dianxun

(Department of Obstetrics and Gynecology, Nanyang City Center Hospital, Nanyang Henan 473000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of piperine on SKOV-3 ovarian cancer cell line invasion and apoptosis and to explore the underlying mechanisms. **Methods:** SKOV-3 cells were treated with different concentrations of piperine (0, 5, 10 or 20 $\mu\text{mol/L}$) for different times (12, 24 or 36 h), cell viability was assessed by CCK-8 assay. The invasion and apoptosis of SKOV-3 cells were determined with Transwell and TUNEL staining, respectively. The protein expression of p-PI3K and p-Akt were examined by Western blot. **Results:** CCK-8 results showed that piperine decreased the viability of SKOV-3 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. After treatment with 10 $\mu\text{mol/L}$ of piperine for 36 h, cell invasion was significantly inhibited, whereas the apoptotic cell number was markedly increased. Moreover, the protein expression of p-PI3K and p-Akt were significantly decreased after piperine treatment. **Conclusion:** Piperine can inhibit SKOV-3 cell viability and invasion, and increase cell apoptosis, which may through inhibition of PI3K/Akt signaling pathway.

Keywords piperine; ovarian cancer cells; PI3K/Akt signaling pathway

收稿日期 (Date of reception): 2017-06-01

通信作者 (Corresponding author): 许静, Email: 3111685775@qq.com

卵巢癌是一种易于转移并广泛散播的肿瘤, 70%患者确诊时已是晚期。卵巢癌成为女性生殖道癌症病死率最高的恶性肿瘤。恶性肿瘤的主要特点之一是转移, 治疗比较困难。癌细胞的侵袭转移过程非常复杂, 涉及许多生物分子间的相互作用。

胡椒碱是由胡椒属植物中提取的生物碱, 多项动物实验研究^[1-2]证明: 胡椒碱具有多种药理学作用, 如抗氧化、抗菌、抗肿瘤与抗惊厥等。而胡椒碱毒副作用小, 因此其抗肿瘤的作用逐渐得到学者的关注, 成为研究的热点。国外学者研究^[1]发现胡椒碱对B16F-10黑色素瘤诱导的肺转移具有抑制作用, 能够明显降低肿瘤的形成, 延长荷瘤小鼠的存活期。已有研究^[2]表明胡椒碱对多种肿瘤细胞具有诱导凋亡的作用, 但其具体的诱导凋亡机制尚未明确。近年来, 在多种恶性肿瘤细胞中发现PI3K/Akt信号转导通路的异常激活, 如子宫内膜癌和乳腺癌等恶性上皮性肿瘤, 在恶性肿瘤细胞的增殖以及侵袭转移过程中发挥重要作用^[3]。

1 材料与方法

1.1 细胞来源与试剂

人卵巢上皮癌细胞株SKOV-3购自中国科学院上海细胞所, 胡椒碱、10%胎牛血清购自美国Sigma公司; RPMI1640培养基购自北京鼎国生物有限公司; CCK-8试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; Transwell小室购自美国Corning公司; p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, p-mTOR, mTOR和 β -actin抗体购自美国Santa Cruz公司。

1.2 细胞培养与传代

将SKOV-3细胞株置于含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中, 于37 °C, 5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养, 待细胞融合至80%~90%时, 用0.25%胰酶消化3 min, 进行传代。

1.3 CCK-8 法检测细胞增殖率

将处于对数生长期的SKOV-3细胞接种于96孔板, 每孔 1×10^5 个细胞, 置于37 °C, 5%CO₂的恒温培养箱中孵育, 当细胞贴壁后, 更换培养基, 分别加入胡椒碱使最终浓度分别为0, 5, 10, 20 μ mol/L, 每组设6个平行孔, 每组细胞分别培养12, 24和36 h后, 更换培养基, 加入10 μ L

CCK-8检测液, 继续孵育1 h, 酶标仪检测波长为450 nm各孔的吸收值(A), 计算存活率。存活率= $A_{\text{实验组平均值}}/A_{\text{对照组平均值}} \times 100\%$ 。

1.4 实验分组

实验共分为3组, 对照组、溶剂组加入等剂量溶剂HBSS缓冲液, 加药组给予10 μ mol/L胡椒碱培养24 h。

1.5 Transwell 小室检测细胞侵袭能力

将处于对数生长期的SKOV-3细胞接种于预铺Matrigel胶(1%胎牛血清)Transwell上室中, 每孔 5×10^5 个细胞; 下室加入含10%胎牛血清的培养基, 孵育24 h后, 弃去培养基, 将上室用0.1%结晶紫染色10 min, 用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞, PBS洗涤, 400倍显微镜下随机5个视野观察细胞, 计数, 并拍照。

1.6 TUNEL 检测细胞凋亡

将细胞接种于已灭菌的培养皿中, 1×10^5 个/孔, 待细胞贴壁后, 加入胡椒碱使最终浓度为20 μ mol/L, 培养36 h。用4%多聚甲醛4 °C固定30 min, 0.1%Triton X-100冰浴2 min, 分别加入50 μ L TUNEL检测液, 继续置于37 °C避光孵育60 min, PBS洗涤, 加入DAPI染液(10 mg/L)孵育15 min, 抗荧光淬灭剂封片, 采用共聚焦激光扫描显微镜观察各组细胞的凋亡情况, 统计细胞凋亡率。

1.7 Western 印迹检测蛋白表达水平

收集各组细胞, 加入细胞裂解缓冲液, 提取蛋白, 通过分光光度测定仪进行蛋白定量, 各组取50 μ g蛋白进行凝胶电泳分离, 完成后电转至硝酸纤维素膜, 加入含封闭液的器皿中, 室温封闭2 h, 加入相应一抗, 4 °C孵育过夜, PBS洗涤3次, 加入对应二抗, 37 °C孵育1 h, PBS洗膜3次, 避光加入按照说明书比例新鲜配置的显影液, 曝光, 采用Quantity One图像分析软件对实验结果进行分析。

1.8 统计学处理

采用SPSS16.0统计软件对实验数据进行分析, 实验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 满足方差齐性的多组数据采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胡椒碱对 SKOV-3 细胞存活率的影响

培养相同时间, 随着胡椒碱浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降; 20 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱处理后细胞存活率略低于 10 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱, 差异无统计学意义; 同一药物浓度, 随着时间延长, 细胞的存活率逐渐下降(图1)。12 h 的 IC_{50} 为 16.35 $\mu\text{mol/L}$, 24 h 的 IC_{50} 为 8.99 $\mu\text{mol/L}$, 36 h 的 IC_{50} 为 6.57 $\mu\text{mol/L}$ 。

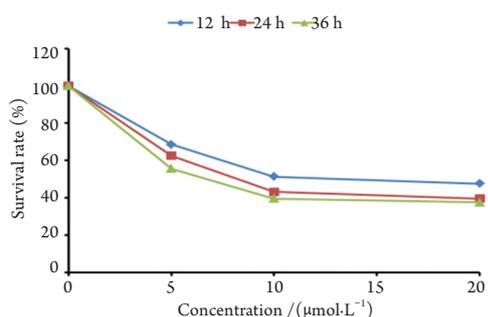


图1 胡椒碱对SKOV-3细胞存活率的影响($n=3$)

Figure 1 Survival rate of SKOV-3 after treated by Piperine ($n=3$)

2.2 胡椒碱对 SKOV-3 细胞侵袭能力的影响

Transwell侵袭实验结果显示, 10 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱培养细胞 24 h 后, 细胞侵袭数显著低于对照组与溶剂组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 其中对照组和溶剂组之间的细胞侵袭数差异无统计学意义($P>0.05$, 图2)。

2.3 胡椒碱对 SKOV-3 细胞凋亡的影响

TUNEL实验结果显示: 采用 10 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱培养细胞 24 h 后, 细胞凋亡数显著高于对照组与溶剂组, 差异有统计学意义($P<0.05$), 而对照组和溶剂组之间的细胞凋亡差异无统计学意义($P>0.05$, 图3)。

2.4 p-PI3K 与 p-Akt 蛋白表达水平的变化

Western印迹实验结果显示: SKOV-3细胞中 p-PI3K与p-Akt蛋白表达水平显著升高, 10 $\mu\text{mol/L}$ 胡椒碱培养SKOV-3细胞 24 h 后, 细胞中 p-PI3K与 p-Akt蛋白表达水平明显降低($P<0.05$), 其中对照组和溶剂组之间蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$, 图4)。

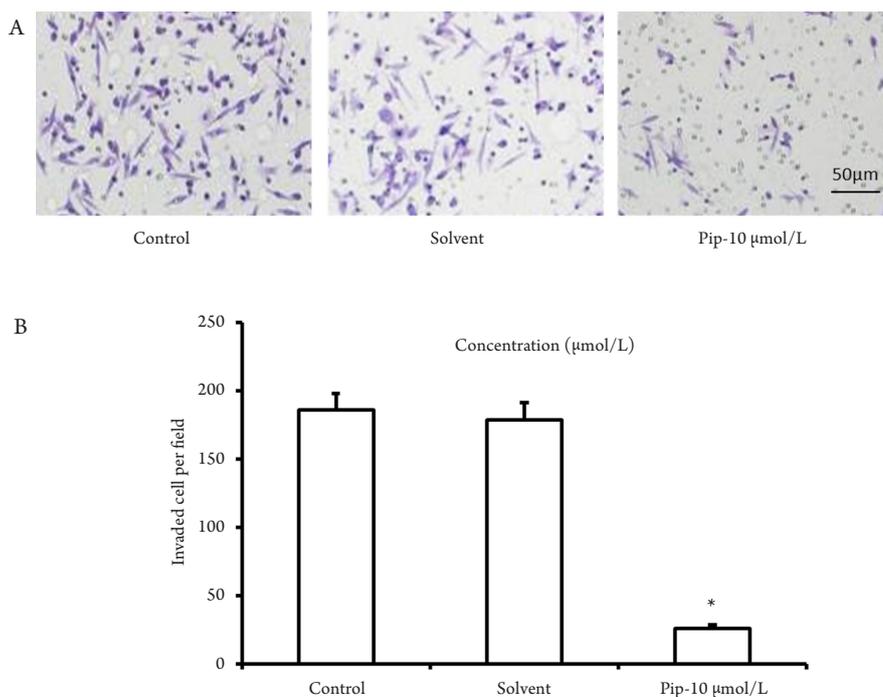


图2 胡椒碱对SKOV-3细胞侵袭能力的影响

Figure 2 Invasion of SKOV-3 after treated by piperine

(A) 细胞侵袭图片($\times 200$); (B) 细胞侵袭统计图。与对照组相比, $*P<0.05$, $n=3$ 。

(A) Representative images of cell invasion ($\times 200$); (B) Statistical analysis of cell invasion. Compared with the control group, $*P<0.05$, $n=3$.

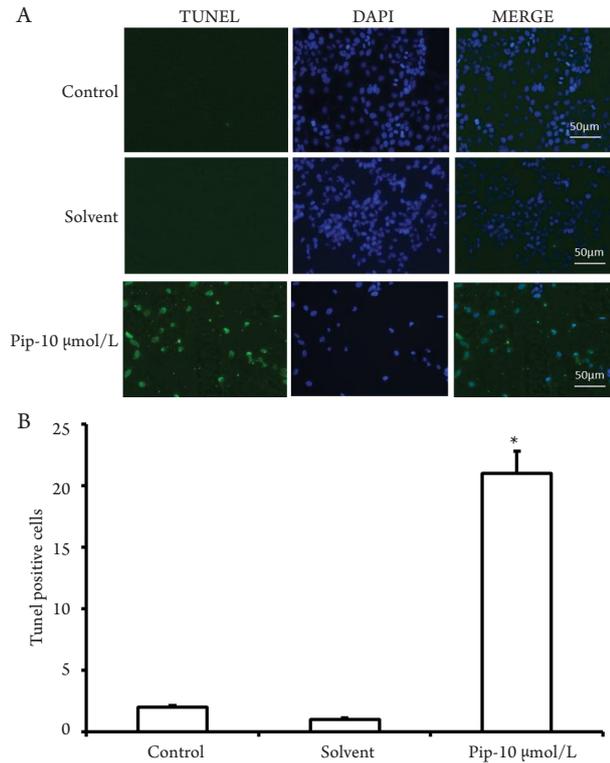


图3 胡椒碱对SKOV-3细胞凋亡的影响
Figure 3 Apoptosis of SKOV-3 after treated by piperine
 (A) 细胞TUNEL染色图片($\times 200$); (B) TUNEL阳性细胞统计图。与对照组相比, $*P < 0.05, n = 3$ 。
 (A) Representative images of TUNEL staining($\times 200$); (B) Statistical analysis of TUNEL staining positivity cells. Compared with the control group, $*P < 0.05, n = 3$.

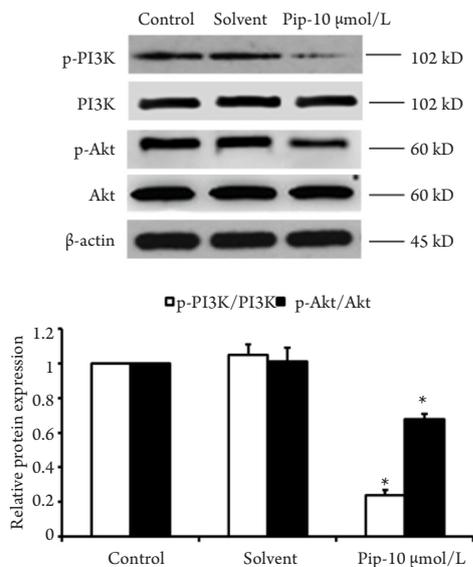


图4 p-PI3K与p-Akt蛋白表达水平的变化
Figure 4 Relative protein expression of p-PI3K and p-Akt
 与对照组相比, $*P < 0.05, n = 3$ 。
 Compared with the control group, $*P < 0.05, n = 3$.

3 讨论

本研究发现胡椒碱能够一定程度抑制卵巢癌细胞SKOV-3的存活率, 并与药物浓度呈负相关, 随着药物干预时间延长, SKOV-3的存活率下降; 由于 $20 \mu\text{mol/L}$ 胡椒碱处理后细胞存活率略低于 $10 \mu\text{mol/L}$ 胡椒碱, 因此后续选用 $10 \mu\text{mol/L}$ 胡椒碱进行研究。另外, 胡椒碱对卵巢癌细胞SKOV-3的侵袭能力具有抑制作用, 并增加细胞凋亡数, 因此推测胡椒碱对SKOV-3细胞具有加速凋亡的作用。

PI3K/Akt信号转导通路是细胞生存的主要信号通路之一, 在细胞增殖、分化与凋亡中发挥重要的作用。当细胞出现凋亡, 释放出具有酪氨酸激酶活性受体激活的物质, 活化后的受体特异性地结合PI3K亚基, 激活的PI3K与下游Akt的PH结构域结合, 使Akt产生磷酸化, 过度活化的Akt激活下游的mTOR, 引起肿瘤细胞的快速增殖、癌蛋白分泌增加、细胞周期加快, 利于肿瘤的迅速发展, 如Bad, NF- κ B等蛋白磷酸化发挥抗凋亡作用^[4]。PI3K的p85调节亚单位是许多细胞质和受体酪氨酸激酶的磷脂蛋白底物, 当细胞外的配体与相应的受体结合后, 受体被激活发生同源或异源寡聚化或者使受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)自身酪氨酸残基磷酸化或者导致与受体偶联激酶的酪氨酸残基磷酸化^[5]。近年来研究^[6-7]发现在多种恶性肿瘤细胞中, 如乳腺癌和子宫内膜癌等恶性上皮性肿瘤中发现PI3K/Akt信号通路过度激活, 并在肿瘤细胞的增殖、迁移与侵袭过程中发挥重要作用。国内学者^[8]研究发现: PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002对卵巢癌细胞SKOV3和CAOV3的增殖与侵袭能力具有明显的抑制作用, 表明卵巢癌细胞的增殖与侵袭能力与PI3K/Akt信号通路的激活具有非常紧密的联系。Western印迹结果显示: 经胡椒碱干预后, SKOV-3细胞中PI3K与Akt的磷酸化水平均下降, 推测胡椒碱可能是通过抑制肿瘤细胞的增殖与加速肿瘤细胞的凋亡而发挥作用, 其可能与抑制PI3K/Akt信号通路有关。

综上所述, 胡椒碱具有降低卵巢癌细胞SKOV-3存活率的作用, 并与药物浓度和作用时间有关, 通过抑制PI3K/Akt信号通路, 增加肿瘤细胞的凋亡率。

参考文献

1. Pradeep CR, Kuttan G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice[J]. Clin Exp Metastasis, 2002, 19(8): 703-708.
2. Sunila ES, Kuttan G. Immunomodulatory and antitumor activity of Piper longum Linn and piperine[J]. J Ethnopharmacol, 2004, 90(2/3): 339-346.
3. Lin Q, Wang Y, Chen D, et al. Cisplatin regulates cell autophagy in endometrial cancer cells via the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway[J]. Oncol Lett, 2017, 13(5): 3567-3571.
4. Tang B, Tang F, Wang Z, et al. Upregulation of Akt/NF- κ B-regulated inflammation and Akt/Bad-related apoptosis signaling pathway involved in hepatic carcinoma process: suppression by carnosic acid nanoparticle[J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 6401-6420.
5. Hassan B, Akcakanat A, Holder AM, et al. Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2013, 22(4): 641-664.
6. 郭瑞霞, 魏丽惠, 王建六, 等. 17 β -雌二醇对子宫内膜癌细胞磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B信号传导通路的激活作用[J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(7): 469-473.
7. GUO Ruixia, WEI Lihui, WANG Jianliu, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B(PI3K-PKB) induced by 17 β -estradiol in endometrial carcinoma cell (Ishikawa)[J]. Chinese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2004, 39(7): 469-473.
8. Liu Y, Wang R, Zhang L, et al. The lipid metabolism gene FTO influences breast cancer cell energy metabolism via the PI3K/AKT signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2017, 13(6): 4685-4690.
9. Fu YL, Zhang QH, Wang XW, et al. Antidiabetic drug metformin mitigates ovarian cancer SKOV3 cell growth by triggering G2/M cell cycle arrest and inhibition of m-TOR/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(5): 1169-1175.

本文引用: 许静, 郭哲, 孙慧霞, 梁殿迅. 胡椒碱对卵巢癌细胞株 SKOV-3 侵袭与凋亡的影响及其机制[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(8): 1571-1575. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.004

Cite this article as: XU Jing, GUO Zhe, SUN Huixia, LIANG Dianxun. Effect and mechanism of piperine on invasion and apoptosis of SKOV-3 ovarian cancer cell line[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(8): 1571-1575. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.08.004