

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.17.007

## 华蟾毒它灵降低 ARF6 蛋白的表达抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖\*

刘智慧<sup>1</sup>, 张 蓓<sup>2△</sup>

1. 南京中医药大学, 江苏南京 210023; 2. 徐州市中心医院妇产科, 江苏徐州 221000

**摘要:**目的 探究二磷酸腺苷核糖基化因子 6 (ARF6) 蛋白在人卵巢癌中的表达情况及对患者预后的影响, 并初步探讨华蟾毒它灵 (CINO) 抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的可能机制。方法 免疫组化染色检测人正常卵巢组织及浆液性卵巢癌组织内 ARF6 蛋白的表达情况, 采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析 ARF6 蛋白表达水平对患者预后的影响。选取人卵巢癌细胞 SKOV3, 以 0、0.5、1.0、2.0  $\mu\text{mol/L}$  的 CINO 分别作用于细胞, 采用蛋白质免疫印迹法检测药物处理后的 SKOV3 中 ARF6 蛋白的表达。结果 浆液性卵巢癌组织内 ARF6 蛋白的阳性表达率高于正常卵巢组织, ARF6 蛋白阳性表达的患者 3 年总生存率比阴性表达患者低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 0.5、1.0、2.0  $\mu\text{mol/L}$  的 CINO 均能抑制卵巢癌 SKOV3 细胞中 ARF6 蛋白表达。结论 ARF6 蛋白在浆液性卵巢癌组织中高表达, 且与患者不良预后有关, ARF6 蛋白可能是浆液性卵巢癌患者的早期诊断及预后评价的有效分子标志物。CINO 抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 的体外增殖能力可能与其下调 ARF6 蛋白的表达有关。

关键词: 华蟾毒它灵; 二磷酸腺苷核糖基化因子 6; 卵巢癌; 预后

中图分类号: R271

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)17-2484-03

## Cinobufotalin represses the proliferation of SKOV3 ovarian cancer cell through down-regulated expression of ARF6 protein\*

LIU Zhihui<sup>1</sup>, ZHANG Bei<sup>2△</sup>

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China;

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Central Hospital of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

**Abstract: Objective** To explore the expression of ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) protein in ovarian cancer and its influence on the prognosis of patients. And to explore the mechanism of Cinobufotalin inhibiting the proliferation of SKOV3 cell. **Methods** The expression of ARF6 protein in human normal ovarian tissue and human serous ovarian cancer tissue was detected by immunohistochemical staining. The Kaplan-Meier survival curve method was used to analyze the effect of ARF6 protein on the prognosis of patients. Cell cultures were treated with Cinobufotalin (0, 0.5, 1.0 and 2.0  $\mu\text{mol/L}$ ) for 48 h. Expression of ARF6 protein was evaluated by Western Blot analysis. **Results** The expression of ARF6 protein in serous ovarian cancer tissue was higher than that in normal ovarian tissue, while the 3-year overall survival rate of patients with positive expression of ARF6 protein was lower than the negative expression of ARF6 protein ( $P < 0.05$ ). 0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{mol/L}$  Cinobufotalin could inhibit the expression of protein ARF6 protein in ovarian cancer SKOV3 cells.

**Conclusion** The high expression of ARF6 protein in serous ovarian cancer related to patients' poor prognosis. ARF6 protein might be an effective molecular marker for early diagnosis and prognostic evaluation of patients with serous ovarian cancer. The ability of Cinobufotalin to inhibit the proliferation of ovarian cancer SKOV3 cells in vitro might relate to its down-regulation of the expression of ARF6 protein.

Key words: Cinobufotalin; ADP-ribosylation factor 6; ovarian cancer; prognosis

卵巢癌是一种相对罕见但病死率较高的妇科恶性肿瘤, 70% 的卵巢癌患者就诊时已处于临床晚期。虽然大多数患者经过初始治疗可获得临床缓解, 但仍有 70% 的患者在 3 年内复发, 5 年生存率不足 50%<sup>[1-3]</sup>。二磷酸腺苷核糖基化因子 6 (ARF6) 蛋白与

肿瘤细胞的增殖、侵袭等多种生物学行为和患者预后情况密切相关, 因而, ARF6 蛋白被认为是一种具有潜在应用价值的肿瘤诊断及预后评价因子<sup>[4-5]</sup>。有研究发现, 在子宫内膜癌组织中 ARF6 蛋白高表达, 且与患者预后相关<sup>[6]</sup>, 但 ARF6 蛋白在卵巢癌中的表达及

\* 基金项目: 江苏省社会发展面上项目 (BE2019636)。

作者简介: 刘智慧, 女, 硕士研究生在读, 主要从事中西医结合妇科学。△ 通信作者, E-mail: docmissliu@163.com。

本文引用格式: 刘智慧, 张蓓. 华蟾毒它灵降低 ARF6 蛋白的表达抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(17): 2484-

对患者预后的评价作用尚不完全清楚。华蟾毒它灵(CINO)是从中药蟾酥中提取的丁二烯内酯,由蟾酥制成的中成药,如华蟾素注射液、华蟾素胶囊等对卵巢癌、子宫内膜癌、宫颈癌均有较好疗效<sup>[7-8]</sup>。国外文献报道,超过 0.5 μmol/L 的 CINO 可抑制人卵巢癌细胞 SKOV3、CRL1978 和 CRL11731 的增殖、迁移和侵袭<sup>[9]</sup>,但其可能的作用机制,国内外报道较少。本研究拟研究 CINO 抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 增殖的可能机制,以期 CINO 用于卵巢癌治疗提供理论依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2015 年 1 月至 2017 年 12 月于徐州市中心医院确诊的 45 例新发卵巢癌患者纳入癌症组,均为接受手术治疗并完成标准化疗的浆液性卵巢癌患者,排除合并其他恶性肿瘤、严重心脑血管疾病、免疫疾病及失访患者,年龄 26~81 岁,中位年龄 54 岁。选取因其他生殖器官病变接受手术的 45 例非卵巢癌患者纳入对照组,均为因子宫肌瘤、腺肌症、宫颈病变行子宫附件切除术的患者,年龄 19~83 岁,中位年龄 51 岁。两组研究对象年龄比较,差异无统计学意义( $P=0.281$ )。本研究经徐州市中心医院医学伦理委员会批准后开展,所有患者自愿参与本研究,并签署知情同意书。

**1.2 仪器与试剂** 人卵巢癌细胞 SKOV3 由徐州医科大学中心实验室提供。ARF6 蛋白多克隆抗体购自 Thermo Fisher 公司,批号 PA5-44191;兔超敏两步法免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 PV-9001;McCoy's 5a 培养基购自 Thermo Fisher 公司,批号 12330031;胎牛血清购自 Hyclone 公司,批号 SH30396.03;CINO 购自 Med Chem Express 公司,批号 1108-68-5;二甲基亚砜(DMSO)购自 Aladdin 公司,批号 D103277;二喹啉甲酸(BCA)蛋白水平检测试剂盒购自 Beyotime 公司,批号 P0010;SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒购自 Beyotime 公司,批号 P0012A;ECL 底物液购自南京聚康医药化工有限公司,批号 WBKLS0050。CO<sub>2</sub> 培养箱、超净工作台、MD Spectramac M3 多功能酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司,Power Supplies Basic 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统 170-4150 购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 免疫组化染色检测** 所有手术切除标本固定完善,并进行石蜡包埋,制作成 4 μm 的连续组织切片。严格按免疫组化染色检测试剂盒说明书配制成 1:100 的 ARF6 蛋白抗体,检测组织切片中 ARF6 蛋白。每张切片均在高倍镜(×400)下随机选取 10 个视野进行阅片。以 >10% 癌细胞胞质呈棕黄色染色为 ARF6 蛋白阳性的判断标准,否则判定为阴性。以超过 50% 以上视野的判定结果为最终染色判断结果。

**1.3.2 细胞培养** 将人卵巢癌细胞 SKOV3 置于含双抗及 10% 胎牛血清的 McCoy's 5a 培养基中,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。将 CINO 溶于 DMSO 中,设置 0、0.5、1.0、2.0 μmol/L 4 组药物处理人卵巢癌细胞 SKOV3 48 h,取对数生长期细胞用于实验。

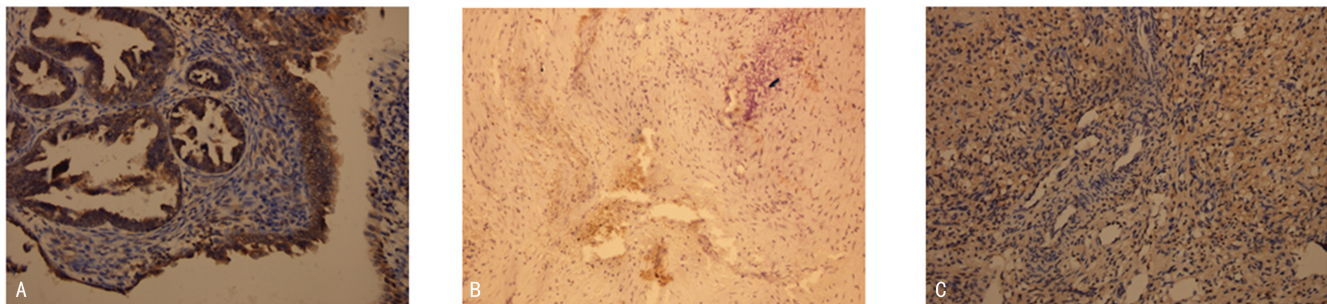
**1.3.3 蛋白质免疫印迹法检测** 用适量胰蛋白酶消化液消化细胞后,将其移至离心管中,加入配制好的冷裂解缓冲液振荡离心取上清液,蛋白定量用 BCA 法。SDS-PAGE 凝胶电泳后电转 1 h,加入含 5% 脱脂奶粉的封闭液,摇床振荡 1.5~2.0 h,加入一抗(1:1 000),4 °C 摇床孵育过夜,TBST 洗涤 3 次后,加入二抗(1:8 000),常温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次后加入 ECL 显色液于暗室中曝光,荧光采集图像并分析。

**1.3.4 随访** 随访所有患者至 2020 年 12 月 30 日,分析患者生存情况。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;Kaplan-Meier 生存曲线分析患者总生存率。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 卵巢癌组织与正常卵巢组织中 ARF6 蛋白表达差异** 免疫组化检测结果显示,ARF6 蛋白表达于细胞质中,卵巢癌组织中 ARF6 蛋白的阳性表达率为 53.33%(24/45),而正常卵巢组织中 ARF6 蛋白的阳性表达率仅为 15.56%(7/45),差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。进一步分析卵巢癌的病理分级发现,低分化卵巢癌组织 ARF6 蛋白阳性率为 61.10%,中高分化卵巢癌组织 ARF6 蛋白阳性率为 48.10%,差异无统计学意义( $P = 0.393$ )。



注:A为卵巢癌组织中 ARF6 蛋白阳性表达;B为卵巢癌组织中 ARF6 蛋白阴性表达;C为正常卵巢组织中 ARF6 蛋白阴性表达。

图 1 不同卵巢组织中 ARF6 蛋白的表达(×200)

## 2.2 ARF6 蛋白的表达与卵巢癌患者预后的关系

45 例浆液性卵巢癌患者中,存活 21 例,死于肿瘤 24 例,3 年生存率为 53.33%。Kaplan-Meier 生存分析显示,ARF6 蛋白阳性表达患者的生存率低于 ARF6 蛋白阴性表达患者,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 2。

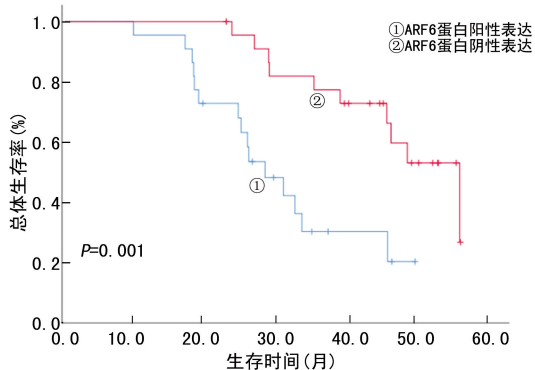


图 2 不同 ARF6 蛋白表达情况患者的生存率分析

## 2.3 不同水平 CINO 对人卵巢癌细胞 SKOV3 中 ARF6 蛋白表达的影响

采用 0、0.5、1.0、2.0  $\mu\text{mol/L}$  的 CINO 分别作用于人卵巢癌细胞 SKOV3, 各组细胞中 ARF6 蛋白的相对表达水平分别为  $0.75 \pm 0.42$ 、 $0.57 \pm 0.23$ 、 $0.42 \pm 0.03$ 、 $0.07 \pm 0.01$ , ARF6 蛋白表达水平随药物水平增加而降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。

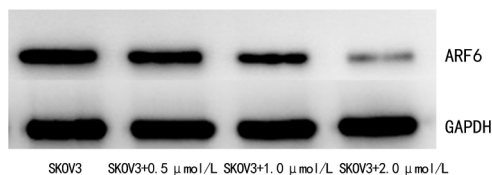


图 3 不同水平 CINO 对人卵巢癌细胞 SKOV3 中 ARF6 蛋白表达的影响

## 3 讨论

蟾酥是由蟾蜍科中华大蟾蜍的干燥表皮和腺体分泌物提取,一直被认为是具有解毒、消肿、止痛等功能的中药成分。蟾酥具有明显抑制肿瘤的作用,CINO 作为蟾酥中的活性成分,其抗肿瘤活性也是近年来的研究热点<sup>[10]</sup>。EMAM 等<sup>[11]</sup>分析了 CINO 对人淋巴瘤 U937 细胞和 HeLa 细胞的作用,发现 CINO 诱导了胱天蛋白酶依赖性凋亡,其研究初步揭示了 CINO 对细胞凋亡信号传导的内在和外途径。在固有途径中,CINO 导致基质金属蛋白酶(MMP)下降,同时释放细胞色素 c 和激活 caspase-3,导致 DNA 片段化和细胞死亡。在外源性途径中,CINO 引起了跨膜蛋白 FAS 的上调,从而启动了细胞内信号级联反应,导致了死亡诱导信号复合物(DISC)的形成。DISC 激活 procaspase-8,导致 caspase-3 激活,随后 DNA 断裂,细胞死亡。

从药用动植物中提取的化合物已成为前沿医学研究热点,这些化合物显示出抗氧化、抗炎、抗增殖和诱导细胞凋亡的特性,可以使癌症患者获益<sup>[12-13]</sup>。CINO 影响不同的癌细胞信号传导,可能是卵巢癌的潜在治疗药物。

本研究结果表明,ARF6 蛋白在浆液性卵巢癌中高表达,在不同病理分级卵巢癌组织中无明显差异,但和患者的预后息息相关,ARF6 蛋白高表达患者的预后情况较差。中药成分 CINO 可以下调人卵巢癌细胞 SKOV3 中 ARF6 蛋白的表达。因此,笔者提出一种猜想:CINO 抑制人卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖可能与其下调 ARF6 蛋白的表达有关。CINO 是目前市面上广泛用于癌症的中药成分,了解其作用机制对于抗癌及抑癌药物的研发非常重要,但更为详细的调节机制有待进一步探讨。

由于组织标本库的局限性,本研究仅选取浆液性卵巢癌进行研究,更多病理类型卵巢癌及更大样本的卵巢癌研究数据尚需进一步探索。

## 参考文献

- [1] 刘畅浩,林少丹,林仲秋.《PARP 抑制剂在卵巢癌中的应用:ASCO 指南》解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2020,36(9):835-839.
- [2] 丁秋花,史道华. 卵巢癌多药耐药分子机制的研究进展[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2020,27(7):807-812.
- [3] MOORE K, COLOMBO N, SCAMBIA G, et al. Maintenance olaparib in patients with newly diagnosed advanced ovarian cancer[J]. N Engl J Med, 2018,379(26):2495-2505.
- [4] 单雄威,于小明,王广发,等. 二磷酸腺苷核糖基化因子 6 与肿瘤侵袭和转移关系的研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(13):2036-2038.
- [5] HSU W C, LI W M, LEE Y C, et al. microRNA-145 suppresses cell migration and invasion in upper tract urothelial carcinoma by targeting ARF6[J]. FASEB J, 2020, 34(4):112-126.
- [6] 陈东梅,马宜红,李振镇. ARF6 在人子宫内膜癌中的表达及对患者预后的影响[J]. 中华内分泌外科杂志, 2016, 10(4):325-328.
- [7] 陈永宏,高月,陈禄娅. 华蟾素对卵巢癌细胞增殖侵袭能力的抑制作用[J]. 中国药业, 2020,29(17):17-20.
- [8] 李茜,刘春燕,崔健. 华蟾素胶囊联合 TN 化疗方案对中晚期宫颈癌放疗患者血清 SCC、TSGF 水平及生存质量的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2019,27(6):1052-1057.
- [9] AFROZE S H, PEDDABOINA C, MCDOWELL A B, et al. Different effects of in vitro treatment with cinobufotalin on three types of ovarian cancer cells[J]. Anticancer Res, 2018,38(10):5717-5724.
- [10] MAO Y, PENG X, XUE P, et al. Network pharmacology study on the pharmacological mechanism of cinobufotalin injection against lung cancer[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020,2020:1246742.
- [11] EMAM H, ZHAO Q L, FURUSAWA Y, et al. Apoptotic cell death by the novel natural compound, cinobufotalin [J]. Chem Biol Interact, 2012,199(3):154-160.
- [12] 周世月,邵莹莹,李媛,等. 中药有效成分纳米制剂抗肿瘤的研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2020,39(4):374-380.
- [13] 刘曾晶,张梦林,康前前,等. 基于数据挖掘的抗肿瘤中药方剂用药规律分析[J]. 亚太传统医药, 2020,16(8):143-146.