

· 论 著 ·

# 黄芪甲苷对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖与迁移侵袭作用机制

程燕, 任黔川

西南医科大学附属医院妇科, 四川 泸州 646000

**摘要:** **目的** 探讨黄芪甲苷对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移侵袭能力的影响,并初步探讨其机制。**方法** 选取人卵巢癌 SKOV3 细胞,以黄芪甲苷浓度为 0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg/ml 分别作用于细胞,采用 CCK-8 法及克隆形成实验探讨黄芪甲苷对 SKOV3 细胞增殖能力的影响;采用 Transwell 细胞迁移和侵袭实验观察黄芪甲苷对 SKOV3 细胞迁移、侵袭能力的影响;采用 Western Blot 法检测黄芪甲苷处理后的 SKOV3 细胞肿瘤转移相关蛋白基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9 的表达。**结果** 0.2 mg/ml 浓度以上的黄芪甲苷显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖能力,并存在浓度和时间依赖性;Transwell 迁移实验结果显示,0 mg/ml 黄芪甲苷组穿过小室细胞数为  $97.20 \pm 4.66$ , 0.4 mg/ml 黄芪甲苷组穿过小室的细胞数为  $47.60 \pm 5.41$ ,明显少于 0 mg/ml 黄芪甲苷组 ( $P < 0.01$ )。Transwell 侵袭实验结果显示,0 mg/ml 黄芪甲苷组穿过小室细胞数为  $74.20 \pm 5.45$ ,0.4 mg/ml 黄芪甲苷组穿过小室的细胞数为  $33.20 \pm 4.32$ ,明显少于 0 mg/ml 黄芪甲苷组 ( $P < 0.01$ )。经 0.4 mg/ml 黄芪甲苷处理后 SKOV3 细胞表现出不同程度抑制 MMP2、MMP9 蛋白表达的现象。**结论** 黄芪甲苷可明显抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的体外增殖和迁移、侵袭能力,这可能与其下调 MMP2、MMP9 蛋白的表达有关。

**关键词:** 黄芪甲苷; 卵巢癌; 增殖; 迁移; 侵袭; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶 9

中图分类号: R 737.31 R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2020)06-0743-06

## Mechanism of astragaloside on proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cell SKOV3

CHENG Yan, REN Qian-chuan

*Department of Gynecology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China**Corresponding author: REN Qian-chuan, E-mail: qianchuanren@yeah.net*

**Abstract: Objective** To investigate the effect of astragaloside on the proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cell SKOV3 and its mechanism. **Methods** Human ovarian cancer cell SKOV3 was selected and treated with astragaloside concentration of 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 and 3.2 mg/ml respectively. The effect of astragaloside on the proliferation of SKOV3 was studied by CCK-8 method and clonal formation experiment. Transwell cell migration and invasion experiment were used to observe the effect of astragaloside on the migration and invasion of SKOV3. Western blot was used to detect the expression of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and MMP 9 in SKOV3 treated with astragaloside.

**Results** Astragaloside at a concentration of more than 0.2 mg/ml significantly inhibited the proliferation of SKOV3 in a concentration- and time-dependent manner. Transwell migration showed that the number of cells passing through the chamber in the 0.4 mg/ml astragaloside group was significantly less than that in 0 mg/ml astragaloside group ( $47.60 \pm 5.41$  vs  $97.20 \pm 4.66$ ,  $P < 0.01$ ). The results of Transwell invasion experiment showed that the number of cells passing through the chamber in 0.4 mg/ml astragaloside group was significantly less than that in 0 mg/ml astragaloside group ( $33.20 \pm 4.32$  vs  $74.20 \pm 5.45$ ,  $P < 0.01$ ). After treated with 0.4 mg/ml astragaloside SKOV3 showed inhibition of MMP2 and MMP9 protein expression in varying degrees. **Conclusion** Astragaloside can inhibit the proliferation, migration and invasion of SKOV3 cells in vitro, which may be related to the down-regulation of MMP2 and MMP9 protein expression.

**Key words:** Astragaloside; Ovarian cancer; Proliferation; Migration; Invasion; Matrix metalloproteinase 2; Matrix metalloproteinase 9

卵巢癌是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一,其发病率位居妇科肿瘤的第二位。因卵巢处于盆腔深部,卵巢癌患者缺乏典型症状及体征,且目前缺乏有效的早期诊断方法,超过 70% 的病例发现时已处于晚期,5 年生存率低于 30%,其死亡率居妇科肿瘤首位<sup>[1]</sup>,严重威胁女性生殖系统健康。根据 2019 年版 NCCN 指南推荐卵巢肿瘤的治疗包括手术治疗、全身静脉以及腹腔化疗、局部姑息放疗、维持治疗等<sup>[2]</sup>。近年来国内外文献大量报道,许多天然药物可用于肿瘤治疗,其具有吸收良好、分布广、排泄和代谢迅速、高效、低毒、免疫调节功能等优点。

黄芪甲苷(又名黄芪皂苷 IV, astragaloside IV)为黄芪的主要活性成分。近年来,国内外报道黄芪甲苷具有广泛的药理作用,包括免疫调节<sup>[3]</sup>、抗炎<sup>[4]</sup>、抗细胞凋亡<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、抗纤维化<sup>[7]</sup>、调节代谢<sup>[8-10]</sup>、抑制肿瘤<sup>[11]</sup>等多种生物学活性。其抑制肿瘤作用成为目前抗癌研究的热点,但目前国内外尚无黄芪甲苷对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖、迁移侵袭作用机制研究的相关报道,因此本文选用卵巢癌 SKOV3 细胞,研究黄芪甲苷对其生物学行为的影响,以期黄芪甲苷用于卵巢癌治疗提供相关理论基础及实验依据。

## 1 材料与方 法

1.1 实验药物 黄芪甲苷(成都普思生物科技,货号 PU0028-0025),分子式 C<sub>41</sub>H<sub>68</sub>O<sub>14</sub>,分子量 784.97,纯度 ≥98%,规格 100 mg。黄芪甲苷用二甲基亚砜(DMSO)溶解,现配现用,剩余药品放置于 -20 ℃ 冰箱避光保存 1 周。临用前用完全培养液分别稀释配成所需的药物浓度。

1.2 细胞来源 人卵巢癌 SKOV3 细胞由西南医科大学中心实验室供给。

1.3 主要试剂 CCK8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(Beyotime 公司,货号 C0037);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime 公司,货号 P0010);ECL 底物液(北京普利莱基因技术,货号 P1050)等。

1.4 主要仪器 超净工作台(苏州集团安泰空气技术,型号 SW-CJ-1FD);酶标仪(Thermo 公司,型号 MULTISKAN MK3);倒置显微镜(OLYMPUS,型号 IX51)等。

### 1.5 方 法

1.5.1 细胞培养 将人卵巢癌 SKOV3 细胞培养于含 1% 青霉素 - 链霉素混合溶液及含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养,当细胞生长密度为 80%,取处于对数生长期细胞用于实验。

1.5.2 CCK-8 法检测细胞活性 设置黄芪甲苷组药物浓度为 0、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg/ml,空白对照组(无卵巢癌 SKOV3 细胞,仅含完全培养基、CCK-8 试剂),其中黄芪甲苷 0 mg/ml 为阴性对照组。取对数期生长的 SKOV3 细胞,用 DMEM/F12 完全培养基调整细胞密度到  $5 \times 10^4$ /ml,接入 96 孔板,每孔 100 μl 细胞悬液,同时设空白组,每组设置 5 个复孔,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养过夜(在细胞孔周围孔内加入 100 μl 无菌 PBS)。弃去旧培养基,PBS 冲洗 1~2 次后,更换为含 1% 胎牛血清的不同浓度的黄芪甲苷完全培养基,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 24、48、72 h。弃去旧培养基,1% 胎牛血清的完全培养基清洗细胞 2 次后,加新鲜完全培养基 100 μl,避光条件下每孔加入 10 μl CCK-8 溶液(注意不要产生气泡),37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4 h,酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处吸光值(OD 值),计算增殖抑制率。

1.5.3 克隆形成实验 参照 CCK-8 实验,设置黄芪甲苷药物组浓度为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg/ml,对照组黄芪甲苷药物浓度为 0 mg/ml。取呈对数期生长的 SKOV3 细胞,用 DMEM/F12 完全培养基将细胞密度调至  $1 \times 10^5$ /ml,每孔 2 ml,种植于 6 孔板,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养过夜,弃去旧培养基,PBS 清洗 1 次,分别加入含相应浓度黄芪甲苷的 DMEM/F12 完全培养基,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h,将药物作用后的细胞分别以 200 个细胞密度接种于 6 孔板中,每组 3 个复孔,加入完全培养基,充分摇晃使细胞分散均匀后,将培养皿置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内,培养 2~3 周,期间视情况 3~4 d 换 1 次液。当出现肉眼可见的克隆时,弃上清,PBS 浸洗 2 次,甲醇固定 15 min。弃固定液,加适量吉姆萨染色液(Giemsa)室温染色 10~30 min,PBS 清洗,通风干燥后进行拍照,计数。克隆形成率(%) = 克隆数/接种细胞数 × 100%。

1.5.4 倒置相差显微镜观察细胞形态 取处于对数期生长的 SKOV3 细胞,用 DMEM/F12 完全培养基将细胞密度调至  $2.5 \times 10^5$ /ml,每孔 2 ml,种植于 6 孔板,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,弃去旧培养基,PBS 清洗 1 次,分别加入含黄芪甲苷 0、0.4 mg/ml 的 DMEM/F12 完全培养基,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 48 h,用倒置显微镜观察细胞形态。

1.5.5 Transwell 迁移实验 取处于对数期生长的 SKOV3 细胞,用 DMEM/F12 完全培养基将细胞密度调至  $2 \times 10^5$ /ml,每孔 2 ml,种植于 6 孔板,37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养过夜。弃去旧培养基,PBS 清

洗 1 次,分别加入含相应浓度黄芪甲苷的 DMEM/F12 完全培养基,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h,收集药物作用后的细胞,无胎牛血清的 DMEM/F12 培养基将细胞密度调至 2 × 10<sup>5</sup>/ml。24 孔板中加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基 800 μl,放入 Transwell 小室(避免产生气泡),1 h 后分别加入 200 μl 各组细胞悬液至 Transwell 上室,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h;取出小室,PBS 小心清洗 1 遍,70% 冰乙醇溶液固定 1 h;弃 70% 乙醇溶液,0.5% 结晶紫室温条件下染色 20 min,PBS 清洗后,干净的湿棉球将上室面的未穿过的细胞和多余的染色剂擦干净,倒置显微镜下拍照、计数。

**1.5.6 Transwell 侵袭实验** 细胞处理方式同 1.5.5。将基质胶(Matrigel)在 4 °C 提前 1 天融化,Transwell 小室、24 孔培养板和枪头在 -20 °C 过夜预冷;在冰上,用无胎牛血清的培养基将基质胶浓度稀释为 1 mg/ml;24 孔板中加入 4 °C 预冷含 10% FBS 的 DMEM/F12 完全培养基 800 μl,放入 Transwell 小室(避免产生气泡),加入 100 μl 浓度为 1mg/ml 的基质胶于 Transwell 上室底部,37 °C,温育 4 ~ 5 h,使聚合成凝胶后,分别加入 200 μl 各组细胞悬液至在 Transwell 上室,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 h;取出小室,用 PBS 小心清洗 1 遍,70% 冰乙醇溶液固定 1 h;弃 70% 乙醇溶液,0.5% 结晶紫染液室温条件下染色 20 min,PBS 清洗后,干净的湿棉球将上室面的未穿过的细胞和多余的染色剂擦干净,倒置显微镜下拍照、计数。

**1.5.7 蛋白质印迹(Western Blot)实验** 用含不同药物浓度的 DMEM/F12 完全培养基,37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养细胞 48 h,弃去旧培养基,4 °C 预冷的 PBS 清洗 3 次,加入含蛋白酶抑制剂(PMSF)的裂解液,于冰上裂解 30 min,期间来回摇动培养皿以充分裂解细胞。细胞刮收集细胞裂解液,超声机粉碎,4 °C,12 000 rpm 离心 5 min(提前开离心机预冷),收集上清。蛋白浓度的测定,PBS 稀释蛋白样品、标准蛋白,加入 96 孔板内,每孔 20 μl;按 50:1 比例将 BCA 试剂盒中 A 液和 B 液进行混合,加入 96 孔板内,每孔 200 μl,37 °C 避光孵育 15 min,酶标仪测定 OD568,计算样品蛋白浓度。蛋白变性,将提取的蛋白上清与 5 × 蛋白上样缓冲液(体积比按照 4:1 混合),沸水浴 10 min。配制分离胶及浓缩胶,电泳分离。转膜,用含 5% 脱脂奶粉的封闭液浸泡 PVDF 膜,室温摇床封闭 2 h。用封闭液稀释(GAPDH、MMP2:1:1 000;MMP9:1:500)相应的一抗,使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中,4 °C 摇床孵育过夜。TBST 充分洗涤 PVDF 膜后置于稀

(1:5 000)后的 HRP 标记羊抗小鼠/抗兔的二抗孵育液中,摇床孵育 2 h。TBST 充分洗 PVDF 膜后,滴加工作液(将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1:1 比例混匀)于 PVDF 膜上,放入凝胶成像仪中扫描成像,分析。

**1.6 统计学处理** 使用 SPSS 17.0 软件对结果进行分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,不同时间、不同浓度间的比较采用多因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CCK-8 法检测黄芪甲苷对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖能力的影响** 与对照组相比,0.2 mg/ml 浓度以上的黄芪甲苷显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖能力,并存在浓度和时间依赖性。在相同药物浓度作用下,细胞增殖抑制率随培养时间的增长而增加,具有浓度依赖性。相同培养时间时,细胞增殖抑制率随黄芪甲苷的浓度增加而增加,具有时间依赖性。见图 1。

**2.2 平板克隆实验检测黄芪甲苷对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖能力的影响** 卵巢癌 SKOV3 细胞的克隆形成率随药物浓度的增加而降低,克隆形成体积随药物浓度的增加而减小,与对照组相比,均有统计学差异( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。见表 1、图 2。

**2.3 黄芪甲苷对卵巢癌 SKOV3 细胞形态学的影响** 高倍镜(×200)下,对照组(图 3a)卵巢癌 SKOV3 细胞贴壁生长,细胞呈梭形,形态规则,边界清晰,细胞间呈紧密连接,呈典型癌灶分布,胞浆内染色质丰富。与对照组比较,黄芪甲苷 0.4 mg/ml 组(图 3b)细胞形态不规则,边缘毛糙,细胞质中颗粒增多,可见数个细胞出现破碎现象,细胞碎片漂浮于培养基中。

**2.4 黄芪甲苷对卵巢癌 SKOV3 细胞迁移能力的影响** 黄芪甲苷显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的迁移能力。对照组穿过小室细胞数为  $97.20 \pm 4.66$ ,经 0.4 mg/ml 黄芪甲苷组穿过小室的细胞平均数为  $47.60 \pm 5.41$ ,明显少于对照组( $P < 0.01$ )。见图 4。

**2.5 黄芪甲苷对卵巢癌 SKOV3 细胞侵袭能力的影响** 黄芪甲苷显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的侵袭能力。对照组穿过小室细胞数为  $74.20 \pm 5.45$ ,经 0.4 mg/ml 黄芪甲苷处理后的细胞组穿过小室的细胞数为  $33.20 \pm 4.32$ ,明显少于对照组( $P < 0.01$ )。见图 5。

**2.6 Western Blot 法检测基质金属蛋白酶(MMP)2、MMP9 蛋白的表达** 0.4 mg/ml 黄芪甲苷处理后的 SKOV3 细胞表现出不同程度的抑制 MMP2、MMP9 蛋

白表达现象( $P < 0.05$ )。见图6。

表1 不同浓度的黄芪甲苷对SKOV3细胞克隆形成能力的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

组别	克隆形成率(%)
0 mg/ml 黄芪甲苷组	63.50 ± 1.50
0.2 mg/ml 黄芪甲苷组	55.50 ± 1.00 <sup>a</sup>
0.4 mg/ml 黄芪甲苷组	45.33 ± 1.53 <sup>b</sup>
0.8 mg/ml 黄芪甲苷组	36.83 ± 1.76 <sup>b</sup>
1.6 mg/ml 黄芪甲苷组	28.67 ± 1.76 <sup>b</sup>
3.2 mg/ml 黄芪甲苷组	16.33 ± 1.53 <sup>b</sup>

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

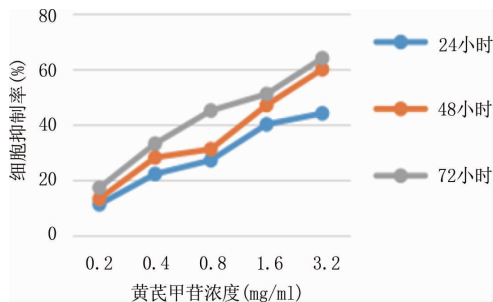


图1 SKOV3细胞在不同时间、不同浓度的黄芪甲苷作用下的抑制率

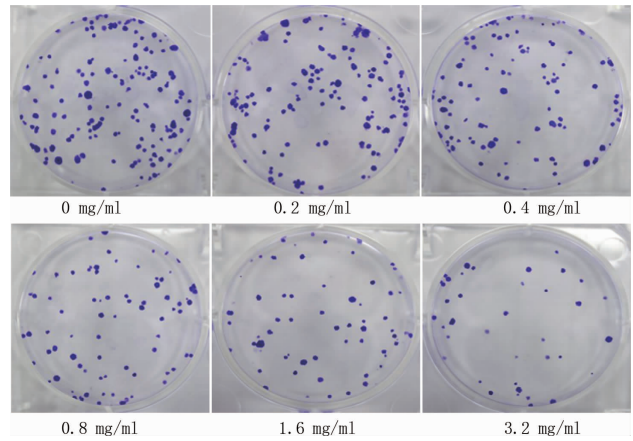
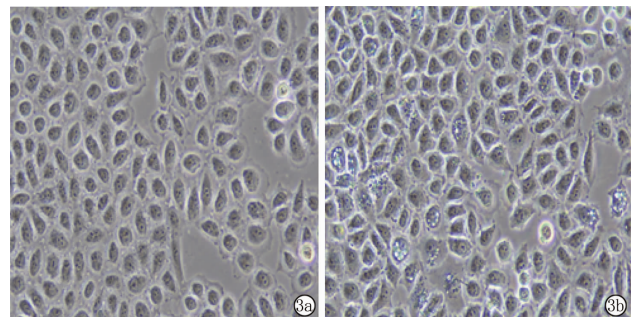
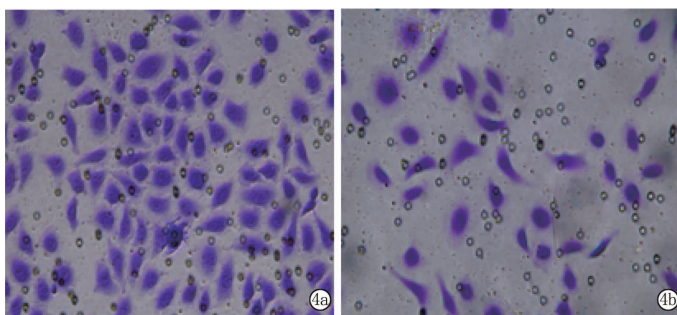


图2 不同浓度黄芪甲苷对SKOV3细胞克隆形成数量和体积的影响



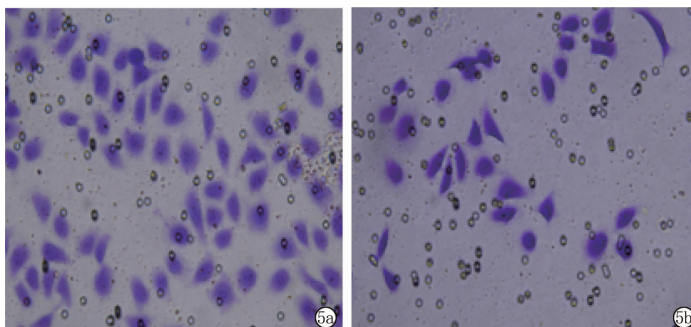
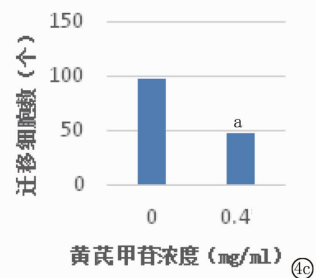
注:3a:黄芪甲苷0 mg/ml;3b:黄芪甲苷0.4 mg/ml。

图3 两种浓度黄芪甲苷对卵巢癌SKOV3细胞形态学的影响( $\times 200$ )



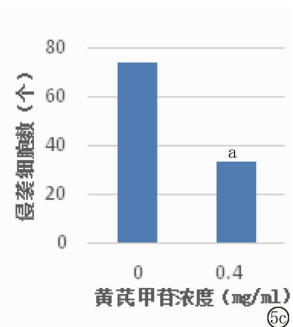
注:4a,4b;Transwell 迁移实验( $\times 100$ ),4a为黄芪甲苷0 mg/ml,4b为0.4 mg/ml;4c:迁移细胞数目,与0 mg/ml组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

图4 两种浓度黄芪甲苷对卵巢癌SKOV3细胞迁移能力的影响



注:5a,5b;Transwell 侵袭实验( $\times 100$ ),5a为黄芪甲苷0 mg/ml,5b为黄芪甲苷0.4 mg/ml;5c:侵袭细胞数目,与0 mg/ml组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

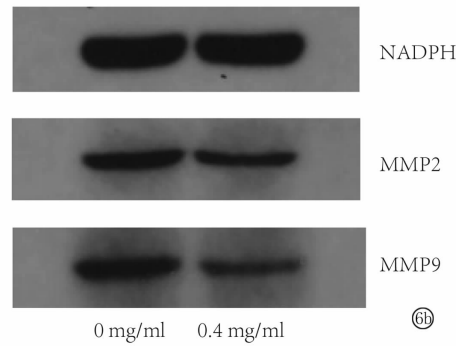
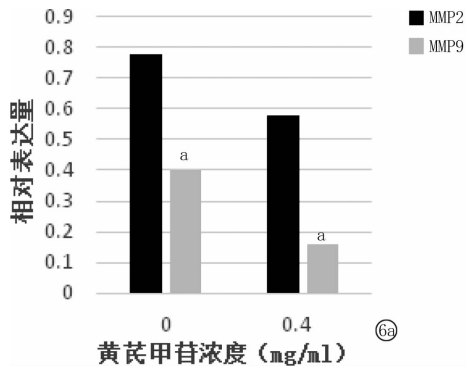
图5 两种浓度黄芪甲苷对卵巢癌SKOV3细胞侵袭能力的影响



### 3 讨论

黄芪,一种传统中药,属豆科植物膜荚黄芪或蒙

古黄芪的干燥根,具有利尿托毒、补气固表、敛疮生肌排脓之功效<sup>[12]</sup>。黄芪甲苷作为其主要活性成分,因具有抗肿瘤活性而成为近年来研究热点。研究发现,



注:6a:两种浓度下 MMP2、MMP9 表达比较;6b:电泳图;与 0 mg/ml 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 6 两种浓度黄芪甲苷对 MMP2、MMP9 蛋白表达的影响

黄芪甲苷在肺癌、肝癌、胃癌、乳腺癌、结直肠癌、食管癌、黑色素瘤等多种肿瘤中均有抗肿瘤效应。如,黄芪甲苷不仅可抑制肺癌细胞的生长、迁移能力,并可通过上调细胞毒性 T 细胞、下调调节性 T 细胞,进而增强抗肿瘤免疫反应<sup>[13-14]</sup>;黄芪甲苷可通过 JNK/c-Jun/AP-1 信号通路,以及 Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -连环蛋白的途径抑制肝癌细胞的侵袭和迁移能力<sup>[11,15]</sup>;黄芪甲苷可通过 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 途径显著抑制胃癌细胞增殖、侵袭和迁移<sup>[16]</sup>等。总结其抗肿瘤作用主要机制包括:(1)抑制肿瘤细胞的增殖;(2)诱导肿瘤细胞的凋亡;(3)抑制肿瘤细胞的侵袭、迁移;(4)逆转肿瘤细胞耐药性,增加其化疗敏感性;(5)调节机体抗肿瘤细胞免疫力;(6)抑制、清除自由基。

卵巢癌的死亡率及预后与肿瘤是否发生转移及复发密切相关,故卵巢肿瘤细胞的侵袭迁移能力是影响患者疗效及预后的重要因素。肿瘤的侵袭转移方式主要包括直接扩散、经脉管扩散和种植转移,是一个多阶段、多步骤、多因素的发展过程。

MMPs 在自然界中保持高度的进化保守,属于依赖锌的内肽酶类。MMPs 能降解体内诸多成分,其中包括细胞外基质 (ECM)、细胞因子、生长因子、细胞黏附分子及髓磷脂等。人体内可表达 25 种 MMPs,根据底物不同将 MMPs 分为明胶酶类: MMP2、MMP9、胶原酶类: MMP1、MMP8 等、膜型基质金属蛋白酶类 (MT-MMP): 如 MMP14、MMP15、MMP17 等、间质溶素类: MMP7、MMP26、基质分解素类: MMP3、MMP10 和其他类型基质金属蛋白酶: MMP12、MMP19、MMP20 等<sup>[17]</sup>。研究发现, MMPs 可由肿瘤细胞直接或通过诱导基质细胞分泌,进而 MMPs 通过降解基底膜、上调表皮生长因子及血管内皮生长因子的表达水平,促进肿瘤血管生长及肿瘤侵袭和转移。Roine 等<sup>[18]</sup>发现 MMP-2 的基因多态性与肿瘤微血管和淋巴管的生成有关; Nguyen 等<sup>[19]</sup>发现 MMP-14 活化可体内体外促进肝癌细胞生长和侵袭。另,肿瘤细

胞也可通过 MMPs 抑制免疫细胞的清除作用而发生免疫逃逸<sup>[20]</sup>。

有研究发现黄芪甲苷可通过调节基质金属蛋白酶的表达来影响肿瘤细胞迁移和侵袭能力。Jiang 等<sup>[21]</sup>指出黄芪甲苷可通过抑制 ERK1/2 和 JNK 的活化,下调 MMPs 表达,进而抑制乳腺癌细胞的增殖和侵袭能力。黄芪甲苷可通过降低 MMP2、MMP9 的表达,从而削弱肝癌 MHCC97-H 细胞的侵袭能力<sup>[22]</sup>。Cheng 等<sup>[14]</sup>发现黄芪甲苷可通过蛋白激酶 (PKC- $\alpha$ -pERK1)/2-NF- $\kappa$ B 通路降低 MMP2 和 MMP9 的表达,进而抑制肺癌 A549 细胞的迁移侵袭。但黄芪甲苷是否对卵巢癌 SKOV3 细胞具有抗癌作用及其机制尚不清楚。

本实验通过 CCK-8 法检测发现 0.2 mg/ml 浓度以上的黄芪甲苷显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖能力,并存在浓度和时间依赖性。在相同药物浓度作用下,细胞增殖抑制率随培养时间的延长而增加,具有浓度依赖性。相同培养时间时,细胞增殖抑制率随黄芪甲苷的浓度增加而增加,具有时间依赖性。平板克隆实验发现卵巢癌 SKOV3 细胞的克隆形成率随黄芪甲苷药物浓度的增加而降低,且均具有统计学意义。进一步行 Transwell 实验发现,经 0.4 mg/ml 黄芪甲苷处理后的细胞在迁移、侵袭实验中穿过小室的细胞均明显少于对照组,黄芪甲苷显著抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的迁移、侵袭能力。为探讨黄芪甲苷抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的体外增殖和迁移、侵袭能力的机制,本研究进一步进行 Western Blot 法检测 MMP2、MMP9 蛋白的表达,结果显示,黄芪甲苷处理后的 SKOV3 细胞表现出不同程度抑制 MMP2、MMP9 蛋白表达的现象,这一结果提示黄芪甲苷抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的体外增殖和迁移、侵袭能力,可能与其下调 MMP2、MMP9 蛋白的表达有关。

综上所述,本实验证实了黄芪甲苷可明显抑制卵巢癌 SKOV3 细胞的体外增殖和迁移、侵袭能力,其可

能与其下调 MMP2、MMP9 蛋白的表达有关。可为下一步寻找卵巢癌的新疗法提供一定的理论基础及实验依据。但其更为详细的调节机制有待进一步探讨。

## 参考文献

- [1] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016 [J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66 (4): 271 - 289.
- [2] 卢淮武, 林仲秋. 《2018 NCCN 卵巢癌包括输卵管癌及原发性腹膜癌临床实践指南》解读[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2018, 34(5): 526 - 536.
- [3] Li JF, Huang LF, Wang SZ, et al. Astragaloside IV attenuates inflammatory reaction via activating immune function of regulatory T-cells inhibited by HMGB1 in mice [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54 (12): 3217 - 3225.
- [4] Li CJ, Yang FL, Liu F, et al. NRF2/HO-1 activation via ERK pathway involved in the anti-neuroinflammatory effect of Astragaloside IV in LPS induced microglial cells [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 666: 104 - 110.
- [5] Yao XM, Liu YJ, Wang YM, et al. Astragaloside IV prevents high glucose-induced podocyte apoptosis via downregulation of TRPC6 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 5149 - 5156.
- [6] Li M, Li HY, Fang F, et al. Astragaloside IV attenuates cognitive impairments induced by transient cerebral ischemia and reperfusion in mice via anti-inflammatory mechanisms [J]. *Neurosci Lett*, 2017, 639: 114 - 119.
- [7] Che XJ, Wang Q, Xie YY, et al. Astragaloside IV suppresses transforming growth factor- $\beta$ 1 induced fibrosis of cultured mouse renal fibroblasts via inhibition of the MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(4): 1260 - 1266.
- [8] Guo HJ, Cao AL, Chu S, et al. Astragaloside IV attenuates podocyte apoptosis mediated by endoplasmic Reticulum stress through upregulating sarco/endoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase 2 expression in diabetic nephropathy [J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 500.
- [9] Zhou B, Zhou DL, Wei XH, et al. Astragaloside IV attenuates free fatty acid-induced ER stress and lipid accumulation in hepatocytes via AMPK activation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38 (7): 998 - 1008.
- [10] Zhang SP, Tang FT, Yang YH, et al. Astragaloside IV protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by regulating NF- $\kappa$ B/PGC-1 $\alpha$  signaling mediated energy biosynthesis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118759.
- [11] Wang PP, Luan JJ, Xu WK, et al. Astragaloside IV downregulates the expression of MDR1 in Bel-7402/FU human hepatic cancer cells by inhibiting the JNK/c-Jun/AP-1 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2761 - 2766.
- [12] 曹玉冰. 黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(5): 954 - 960.
- [13] Zhang AL, Zheng YH, Que ZJ, et al. Astragaloside IV inhibits progression of lung cancer by mediating immune function of Tregs and CTLs by interfering with IDO [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(11): 1883 - 1890.
- [14] Cheng XD, Gu JF, Zhang MH, et al. Astragaloside IV inhibits migration and invasion in human lung cancer A549 cells via regulating PKC- $\alpha$ -ERK1/2-NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23(1): 304 - 313.
- [15] Qin CD, Ma DN, Ren ZG, et al. Astragaloside IV inhibits metastasis in hepatoma cells through the suppression of epithelial-mesenchymal transition via the Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1725 - 1735.
- [16] Zhu JH, Wen K. Astragaloside IV inhibits TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition through inhibition of the PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathway in gastric cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(7): 1289 - 1296.
- [17] Liu Y, Xu B, Wu N, et al. Association of MMPs and TIMPs with the occurrence of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis [J]. *Can J Cardiol*, 2016, 32(6): 803 - 813.
- [18] Roine I, Pelkonen T, Lauhio A, et al. Changes in MMP-9 and TIMP-1 concentrations in cerebrospinal fluid after 1 week of treatment of childhood bacterial meningitis [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(7): 2340 - 2342.
- [19] Nguyen AT, Chia J, Ros M, et al. Organelle specific O-glycosylation drives MMP14 activation, tumor growth, and metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(5): 639 - 653. e6.
- [20] Singh D, Srivastava SK, Chaudhuri TK, et al. Multifaceted role of matrix metalloproteinases (MMPs) [J]. *Front Mol Biosci*, 2015, 2: 19.
- [21] Jiang K, Lu Q, Li Q, et al. Astragaloside IV inhibits breast cancer cell invasion by suppressing Vav3 mediated Rac1/MAPK signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 42: 195 - 202.
- [22] 马鹏飞, 阮柏, 王德盛, 等. 黄芪甲苷对肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响及其机制研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(5): 1012 - 1015.

收稿日期: 2019 - 10 - 15 编辑: 王娜娜