

[文章编号] 1671-587X(2024)01-0025-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240104

白屈菜红碱对人卵巢癌SKOV3细胞迁移、侵袭和 上皮-间质转化的影响

周佳¹, 邱智东¹, 林喆¹, 律广富², 许佳明¹, 林贺¹, 王可欣¹, 王雨辰¹, 黄晓巍^{1,3}

(1. 长春中医药大学药学院临床药学与中药药理教研室, 吉林 长春 130117; 2. 长春中医药大学
吉林省人参科学研究院中药药理组, 吉林 长春 130117; 3. 长春中医药大学
东北亚中医药研究院基础研究所, 吉林 长春 130117)

[摘要] **目的:** 探讨白屈菜红碱(CHE)对人卵巢癌SKOV3细胞迁移、侵袭和上皮-间质转化(EMT)的抑制作用, 阐明其相关作用机制。**方法:** 体外培养SKOV3细胞, 分为对照组和2.5、5.0、10.0、20.0及40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组, 采用噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞增殖抑制率。体外培养SKOV3细胞, 分为对照组、转移生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)组、TGF- $\beta 1+5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组和TGF- $\beta 1+10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组, 采用细胞划痕实验检测各组细胞迁移率, Transwell小室实验检测各组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数, Western blotting法检测各组细胞中E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)和波形蛋白(Vimentin)蛋白表达水平, 免疫荧光染色法检测各组细胞中E-cadherin和N-cadherin荧光强度。**结果:** MTT法, 与对照组比较, 5.0、10.0、20.0和40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组细胞增殖抑制率明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。细胞划痕实验, 与对照组比较, TGF- $\beta 1$ 组细胞迁移率明显升高($P<0.01$); 与TGF- $\beta 1$ 组比较, TGF- $\beta 1+5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组和TGF- $\beta 1+10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组细胞迁移率明显降低($P<0.01$)。Transwell小室实验, 与对照组比较, TGF- $\beta 1$ 组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数明显增加($P<0.05$); 与TGF- $\beta 1$ 组比较, TGF- $\beta 1+5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组和TGF- $\beta 1+10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数明显减少($P<0.01$)。Western blotting法, 与对照组比较, TGF- $\beta 1$ 组细胞中E-cadherin蛋白表达水平明显降低($P<0.01$), N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与TGF- $\beta 1$ 组比较, TGF- $\beta 1+5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组和TGF- $\beta 1+10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组细胞中E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P<0.01$), N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显降低($P<0.01$)。免疫荧光染色, 与对照组比较, TGF- $\beta 1$ 组细胞中E-cadherin荧光强度明显降低, N-cadherin荧光强度明显升高; 与TGF- $\beta 1$ 组比较, TGF- $\beta 1+5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组和TGF- $\beta 1+10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE组细胞中E-cadherin荧光强度明显升高, N-cadherin荧光强度明显降低。**结论:** CHE能够抑制人卵巢癌SKOV3细胞增殖、迁移、侵袭和EMT。

[关键词] 白屈菜红碱; 卵巢肿瘤; 上皮-间质转化; 转化生长因子 $\beta 1$; 细胞迁移; 细胞侵袭

[中图分类号] R285.5; R737.31 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-04-01

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(20210402034GH); 吉林省发改委创新能力建设项目(2021C011)

[作者简介] 周佳(1995-), 女, 吉林省长春市人, 在读博士研究生, 主要从事中药药剂和新药开发方面的研究。

[通信作者] 黄晓巍, 主任药师, 博士研究生导师(E-mail: 15948000740@163.com);

王雨辰, 讲师(E-mail: 1533728283@qq.com)

Effect of chelerythrine on migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of human ovarian cancer SKOV3 cells

ZHOU Jia¹, QIU Zhidong¹, LIN Zhe¹, LYU Guangfu², XU Jiaming¹, LIN He¹, WANG Kexin¹,
WANG Yuchen¹, HUANG Xiaowei^{1,3}

(1. Department of Clinical Pharmacy and Pharmacology of Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 2. Department of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China; 3. Basic Research Institute, Northeast Asia Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the inhibitory effect of chelerythrine (CHE) on the migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of the human ovarian cancer SKOV3 cells, and to clarify the associated mechanism. **Methods:** The SKOV3 cells were cultured *in vitro* and divided into control group and 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, and 40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE groups. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium (MTT) assay was used to detect the inhibitory rates of proliferation of the cells in various groups. The SKOV3 cells were cultured *in vitro* and divided into control group, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) group, TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group, and TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group. Cell scratch assay was used to detect the migration rates of the cells in various groups; Transwell chamber assay was used to detect the numbers of migration and invasion cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin proteins in the cells in various groups; immunofluorescence staining method was used to detect the fluorescence intensities of E-cadherin and N-cadherin in the cells in various groups. **Results:** The MTT assay results showed that compared with control group, the inhibitory rates of proliferation of the cells in 5.0, 10.0, 20.0, and 40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE groups were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). The cell scratch assay results showed that compared with control group, the migration rate of the cells in TGF- β 1 group was increased ($P<0.01$); compared with TGF- β 1 group, the migration rates of the cells in TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group and TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group were significantly decreased ($P<0.01$). The Transwell chamber assay results showed that compared with control group, the numbers of migration and invasion cells in TGF- β 1 group were significantly increased ($P<0.05$); compared with TGF- β 1 group, the numbers of migration and invasion cells in TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group and TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group were significantly decreased ($P<0.01$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression level of E-cadherin protein in the cells in TGF- β 1 group was significantly decreased ($P<0.01$), while the expression levels of N-cadherin and Vimentin proteins were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with TGF- β 1 group, the expression levels of E-cadherin protein in the cells in TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group and TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group were significantly increased ($P<0.01$), and the expression levels of N-cadherin and Vimentin proteins were significantly decreased ($P<0.01$). The immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the fluorescence intensity of E-cadherin in the cells in TGF- β 1 group was decreased, and the fluorescence intensity of N-cadherin was increased; compared with TGF- β 1 group, the fluorescence intensities of E-cadherin in the cells in TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group and TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group were significantly increased, and the fluorescence intensities of N-cadherin were decreased. **Conclusion:** CHE can inhibit the proliferation, migration, invasion, and EMT of the human ovarian cancer SKOV3 cells.

KEYWORDS Chelerythrine; Ovarian neoplasm; Epithelial-mesenchymal transition; Transforming growth factor- β 1; Cell migration; Cell invasion

卵巢恶性肿瘤是女性常见的生殖器官肿瘤之一^[1]。由于卵巢组织结构复杂且周围神经分布少, 卵巢肿瘤很难在发病早期监测到, 60% 以上患者发现即为晚期, 导致卵巢癌的治愈率在妇科肿瘤中最低, 致死率最高^[2]。随着医学的进步, 肿瘤的治疗呈现多样化和个体化, 但在临床实践中, 化疗、放疗和手术切除仍是卵巢癌的主要治疗手段, 且上述方法普遍存在特异性差、不良反应严重和耐药性强等缺陷^[3]。白屈菜红碱 (chelerythrine, CHE) 是一种由罂粟科植物白屈菜中提取的季铵型苯并吡啶类生物碱, 具有抗炎、抗病毒和抗肿瘤作用^[4-7], 但其对卵巢癌细胞增殖、侵袭和转移的影响及作用机制尚未完全阐明。本研究采用转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞发生上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT), 探讨 CHE 对 TGF- β 1 诱导后的 SKOV3 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 的影响, 为抗卵巢癌新药的研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物、主要试剂和仪器 卵巢癌 SKOV3 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司)。CHE (上海源叶生物科技有限公司, 批号: B20052)。胎牛血清 (澳大利亚 Clark 公司), RPMI 1640 培养基 (美国 Hyclone 公司), TGF- β 1 (美国 Cell Signaling 公司), Transwell 小室和 Matrigel 基质胶 (美国 Corning 公司), 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 和 噻唑蓝 (methylthiazolydiphenyl-tetrazolium, MTT) (北京索莱宝科技有限公司), E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、N-钙黏蛋白 (N-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 和 β -肌动蛋白 (β -actin) (武汉三鹰生物技术有限公司), Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 和 Alexa Fluor 647 标记山羊抗兔 IgG (H+L) (上海碧云天生物科技有限公司)。超净工作台 (型号: SW-CJ-1FD, 苏州净化设备公司), 二氧化碳培养箱 (型号: MCO-17AIC, 美国 SANYO 公司), 荧光显微镜 (型号: IX73, 日本 Olympus 公司), 蛋白电泳仪 (型号: BE6085, 美国 Bio-Rad 公司), 多功能化学发光成像仪 (型号: Q9-Aliance, 英国

UVItec 公司), 多功能微孔酶标仪 (型号: Multiskan FC, 美国 Thermo 公司)。

1.2 细胞培养 卵巢癌 SKOV3 细胞采用含 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的 RPMI 1640 培养基在 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.3 MTT 法检测各组细胞增殖抑制率 取对数生长期 SKOV3 细胞, 以 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 96 孔细胞培养板中, 24 h 后向各组加入 0、2.5、5.0、10.0、20.0 和 40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE, 每组 5 个复孔, 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE 组为对照组, 孵育 24、48 和 72 h 后, 每孔加入 10 μL MTT 溶液, 4 h 后弃上清, 加入 150 μL DMSO 充分溶解甲臜, 酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度 (A) 值, 计算各组细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = $[1 - (\text{实验孔 A 值} - \text{空白孔 A 值}) / (\text{对照孔 A 值} - \text{空白孔 A 值})] \times 100\%$ 。

1.4 细胞划痕实验检测各组细胞迁移率 取对数生长期 SKOV3 细胞, 以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔细胞培养板中, 分为对照组、TGF- β 1 组、TGF- β 1 + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE 组和 TGF- β 1 + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE 组。对照组: 无血清培养基培养; TGF- β 1 组: 在细胞培养基中加入 20 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β 1; TGF- β 1 + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE 组: 在细胞培养基中分别加入 20 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β 1 和 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE; TGF- β 1 + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE 组: 在细胞培养基中分别加入 20 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TGF- β 1 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE。干预 24 h 后进行实验。当细胞生长至 80% 融合时, 用 200 μL 移液枪枪头沿小孔中轴划线, PBS 缓冲液润洗后拍照。24 h 后对同一位置再次拍照, 计算细胞迁移率。细胞迁移率 = $(0 \text{ h 空白面积} - 24 \text{ h 空白面积}) / 0 \text{ h 空白面积} \times 100\%$ 。

1.5 Transwell 小室实验检测各组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数 细胞分组见“1.4”。将消化后的 SKOV3 细胞用无血清培养基重悬, 以 $2.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于 Transwell 小室上层, 每孔 100 μL ; 下层分别加入含 10% 血清的培养基配制的 TGF- β 1、TGF- β 1 + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE 和 TGF- β 1 + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE, 每孔 500 μL 。继续培养 24 h 后, PBS 缓冲液清洗小室, 4% 多聚甲醛固定细胞并用结晶紫溶液染色, 棉签轻柔擦去小室上层细胞后, 显微镜下观察并拍照计数。3 个随机选取视野

的穿膜细胞数均值即为迁移和侵袭细胞数,代表细胞迁移和侵袭能力。其中,侵袭实验要提前将小室上层铺好Matrigel基质胶,后续操作同上。

1.6 Western blotting法检测各组细胞中EMT相关蛋白表达水平 细胞分组见“1.4”。将处于对数生长期的SKOV3细胞以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于6孔细胞培养板中,当细胞生长至80%融合时,弃上清,按照分组方法进行给药处理。24 h后,用预冷的PBS缓冲液洗涤细胞,每孔中加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液150 μL ,细胞刮刀收集细胞,12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,得到含有细胞蛋白的上清液。BCA蛋白浓度检测试剂盒测定蛋白质浓度并定量。进行SDS-PAGE电泳时,凝胶浓度为12%,每孔上样量为15 μL ,电泳条件为150 V、80 min;湿法转膜,转膜条件为200 mA、45 min。5%脱脂奶粉封闭2 h, TBST洗涤后,分别加入E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和 β -actin抗体,按照说明书比例稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜;次日回收一抗, TBST洗涤,二抗孵育2 h, ECL发光液显色,多功能化学发光成像仪拍照,采用Image J软件分析蛋白条带灰度值,计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.7 免疫荧光染色法检测各组细胞中E-cadherin和N-cadherin荧光强度 细胞分组见“1.4”。将处于对数生长期的SKOV3细胞以 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 密度接种于6孔细胞培养板中,当细胞生长至80%融合时,弃上清,按照分组方法进行给药处理。24 h后, PBS缓冲液洗涤细胞,4%多聚甲醛固定细胞,并用0.1% Triton X-100进行细胞打孔。5% BSA封闭60 min后,分别加入E-cadherin和N-cadherin抗体,按照说明书比例稀释,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。次日回收一抗, TBST洗涤, Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG (H+L) 孵育E-cadherin组, Alexa Fluor 647标记山羊抗兔IgG (H+L) 孵育N-cadherin组,荧光二抗孵育2 h,并用DAPI染色10 min。采用荧光显微镜对荧光信号进行观察并拍照。采用Image J软件检测荧光强度,以荧光强度表示各组细胞中E-cadherin和N-cadherin蛋白表达情况。

1.8 统计学分析 采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析。各组细胞增殖抑制率、细胞迁移率、迁移和侵袭细胞数及EMT相关蛋白表达水平均符

合正态分布并方差齐,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖抑制率 CHE处理24、48和72 h时,与对照组比较,5.0、10.0、20.0和40.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE组细胞增殖抑制率明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表1。

2.2 各组细胞迁移率 与对照组比较, TGF- β 1组细胞迁移率明显升高($P < 0.01$);与TGF- β 1组比较, TGF- β 1+5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE组和TGF- β 1+10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE组细胞迁移率明显降低($P < 0.01$)。见图1和表2。

表1 各组细胞增殖抑制率

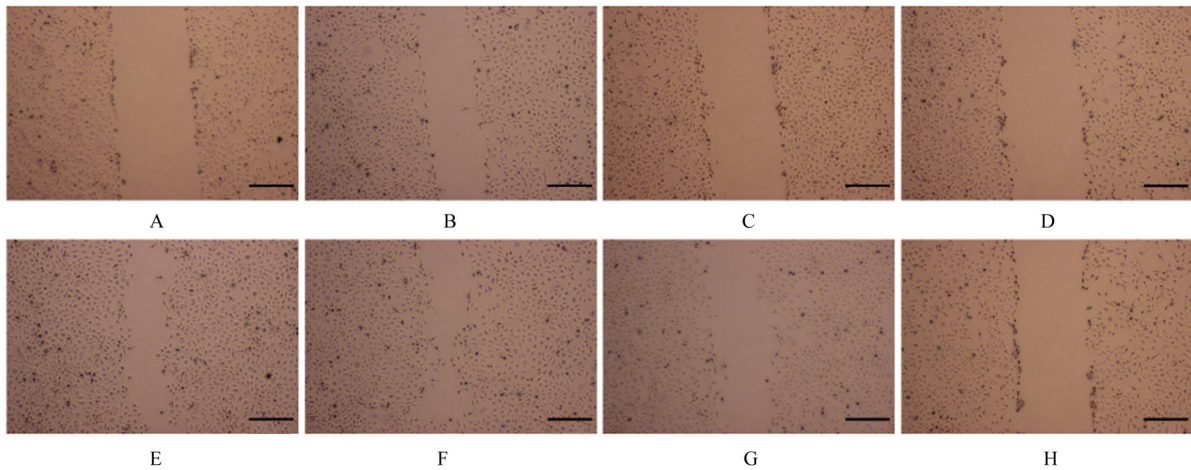
Tab. 1 Inhibitory rates of proliferation of cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Inhibitory rate of proliferation		
	(t/h) 24	48	72
Control	0	0	0
CHE($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
2.5	0.04 \pm 0.03	0.14 \pm 0.11	1.31 \pm 0.13
5.0	0.70 \pm 0.33*	3.34 \pm 1.36*	5.76 \pm 0.82**
10.0	16.65 \pm 2.97**	19.38 \pm 3.65**	29.88 \pm 2.74**
20.0	60.47 \pm 4.92**	83.96 \pm 1.43**	86.24 \pm 3.20**
40.0	83.74 \pm 5.70**	90.93 \pm 0.70**	93.42 \pm 0.89**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

2.3 各组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数 与对照组比较, TGF- β 1组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数明显增加($P < 0.05$);与TGF- β 1组比较, TGF- β 1+5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE组和TGF- β 1+10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数明显减少($P < 0.01$)。见图2和表3。

2.4 各组细胞中EMT相关蛋白表达水平 与对照组比较, TGF- β 1组细胞中E-cadherin蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$), N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与TGF- β 1组比较, TGF- β 1+5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE组和TGF- β 1+10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CHE组细胞中E-cadherin蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$), N-cadherin和Vimentin蛋白表达水平明显降低($P < 0.01$)。见图3和表4。



A—D: 0 h; E—H: 24 h; A, E: Control group; B, F: TGF- β 1 group; C, G: TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group; D, H: TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group.

图 1 细胞划痕实验检测各组细胞划痕愈合情况(Bar=200 μm)

Fig. 1 Scratch healing of cells in various groups detected by cell scratch assay(Bar=200 μm)

表 2 各组细胞迁移率

Tab. 2 Migration rates of cells in various groups
($n=3, \bar{x}\pm s, \eta/\%$)

Group	Migration rate
Control	44.77 \pm 0.18
TGF- β 1	55.92 \pm 2.32*
TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE	26.94 \pm 2.28 Δ
TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE	12.10 \pm 2.73 Δ

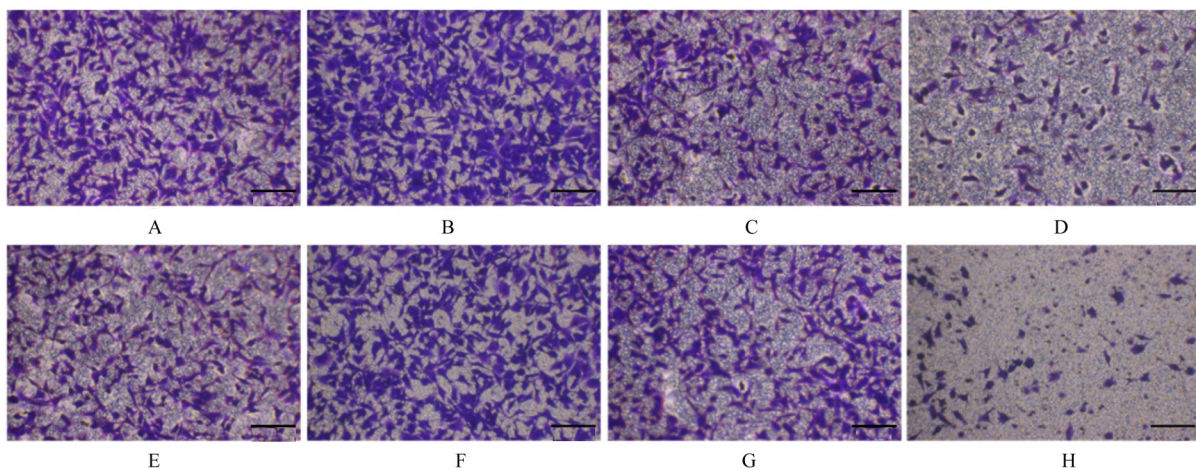
* $P<0.01$ vs control group; $\Delta P<0.01$ vs TGF- β 1 group.

2.5 各组细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 荧光强度与对照组比较, TGF- β 1 组 E-cadherin 荧光强

度明显降低, N-cadherin 荧光强度明显升高; 与 TGF- β 1 组比较, TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE 组和 TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE 组细胞中 E-cadherin 荧光强度明显升高, N-cadherin 荧光强度明显降低。见图 4。

3 讨论

CHE 是中药白屈菜的主要活性成分之一, 具有抗炎、抗菌和抗病毒等多种药理活性^[8-11]。近年来研究^[12-18]显示: CHE 在抗肿瘤方面表现出很强的生物活性, 可以通过不同的机制广泛地抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭, 在宫颈癌、肺癌和肝癌



A—D: Migration; E—H: Invasion; A, E: Control group; B, F: TGF- β 1 group; C, G: TGF- β 1+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group; D, H: TGF- β 1+10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CHE group.

图 2 各组细胞迁移和侵袭情况(结晶紫, Bar=200 μm)

Fig. 2 Migration and invasion of cells in various groups(Crystal violet, Bar=200 μm)

表3 各组细胞中迁移细胞数和侵袭细胞数

Tab. 3 Numbers of migration and invasion cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	Number of migration cells	Number of invasion cells
Control	365.67 ± 17.04	222.67 ± 32.88
TGF-β1	432.67 ± 20.21*	342.33 ± 61.23*
TGF-β1 + 5 μmol·L ⁻¹ CHE	233.00 ± 19.08 [△]	143.33 ± 22.03 [△]
TGF-β1 + 10 μmol·L ⁻¹ CHE	99.33 ± 10.97 [△]	84.33 ± 6.81 [△]

* $P < 0.05$ vs control group; [△] $P < 0.01$ vs TGF-β1 group.

表4 各组细胞中EMT相关蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of EMT related proteins in cells in various groups ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin
Control	0.46 ± 0.02	0.72 ± 0.01	0.86 ± 0.02
TGF-β1	0.31 ± 0.02**	0.92 ± 0.01**	0.91 ± 0.01*
TGF-β1 + 5 μmol·L ⁻¹ CHE	0.54 ± 0.01 [△]	0.31 ± 0.02 [△]	0.75 ± 0.03 [△]
TGF-β1 + 10 μmol·L ⁻¹ CHE	0.62 ± 0.01 [△]	0.16 ± 0.01 [△]	0.36 ± 0.01 [△]

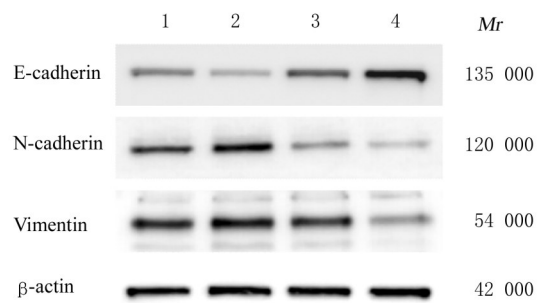
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.01$ vs TGF-β1 group.Lane 1: Control group; Lane 2: TGF-β1 group; Lane 3: TGF-β1 + 5 μmol·L⁻¹ CHE group; Lane 4: TGF-β1 + 10 μmol·L⁻¹ CHE group.

图3 Western blotting法检测各组细胞中EMT相关蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of EMT related proteins in cells in various groups

等多种常见肿瘤中可通过促细胞凋亡、改变细胞周期、诱导自噬发生和激活线粒体凋亡等多种途径发挥抗肿瘤作用。卵巢癌是女性最致命的妇科癌症之一，由于卵巢癌临床症状隐匿和早期筛查困难，易转移和复发，其5年生存率 $< 50\%$ [19-20]。虽然可以采取减瘤术结合化疗和维持治疗等综合疗法治疗卵巢癌，但多数患者会在3年内出现复发和转移 [21]。肿瘤细胞的侵袭和转移已经成为癌症患者死亡的主要因素 [22]。因此，探索更多的能够有效抑制卵巢癌细胞增殖、侵袭和转移的药物，可以为治疗提供更多选择。本研究采用MTT法检测CHE对卵巢癌SKOV3细胞增殖抑制率的影响，当CHE浓度超过 $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，SKOV3细胞增殖抑制率呈剂量-时间依赖性升高，表明CHE可以抑制卵巢癌细胞增殖。

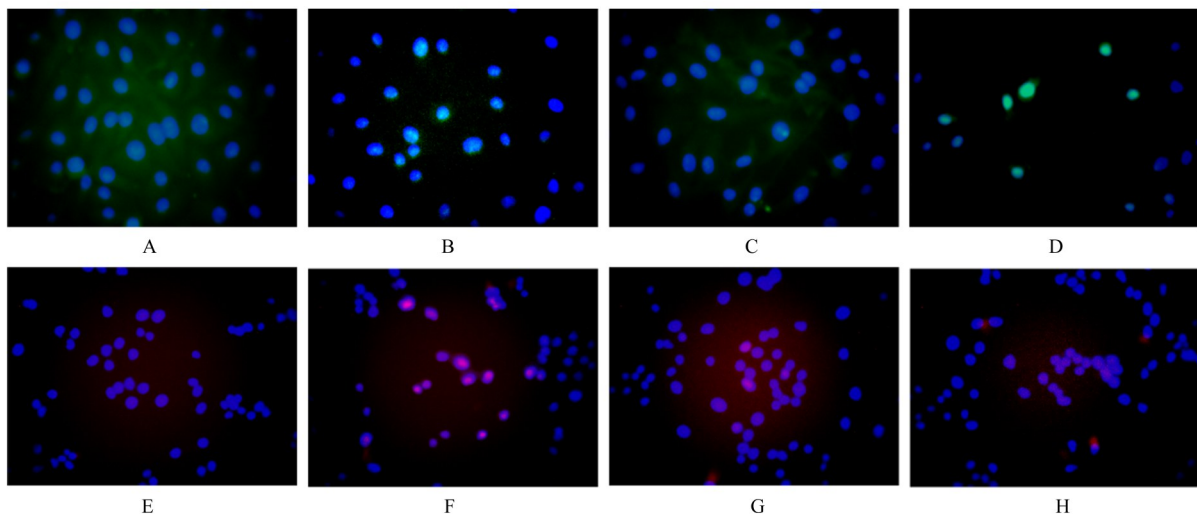
A—D: E-cadherin; E—H: N-cadherin; A, E: Control group; B, F: TGF-β1 group; C, G: TGF-β1 + 5 μmol·L⁻¹ CHE group; D, H: TGF-β1 + 10 μmol·L⁻¹ CHE group.

图4 各组细胞中E-cadherin和N-cadherin荧光强度(免疫荧光, ×100)

Fig. 4 Fluorescence intensities of E-cadherin and N-cadherin in cells in various groups (immunofluorescence, ×100)

在恶性肿瘤的治疗中,除抑制细胞增殖外,阻断细胞的侵袭也是预后的决定因素之一^[23]。研究^[24]表明:EMT是导致卵巢癌细胞侵袭和转移的主要原因。EMT是一种动态且可逆的分子机制,在正常生理状态下,发挥着胚胎发生、器官发育和伤口愈合等基本生理作用。当肿瘤发生时,EMT的原始功能被肿瘤细胞利用,肿瘤的侵袭能力增加^[25-27]。本研究选用EMT强诱导剂TGF- β 1诱导卵巢癌细胞发生EMT,采用细胞划痕实验和Transwell小室实验检测CHE处理后SKOV3细胞迁移和侵袭能力的变化情况,结果显示:CHE可以抑制TGF- β 1对SKOV3的EMT促进作用,减少迁移和侵袭细胞数,表明CHE能够抑制卵巢癌SKOV3细胞的迁移和侵袭。

在肿瘤EMT的进程中,细胞形态学发生改变,失去极性、黏性和细胞间连接,上皮标志物E-cadherin表达水平降低,间充质标志物N-cadherin和Vimentin表达水平升高^[28]。E-cadherin是一种钙依赖性胞间连接蛋白,在EMT触发时,其上游的转录因子Snail、Slug和E盒结合锌指蛋白(zinc finger E-box binding homeobox, ZEB)及TGF- β 均可下调E-cadherin的表达^[29]。研究^[30]表明:EMT参与癌细胞的侵袭转移级联反应,在此阶段,癌细胞将扩散到周围的基质环境中并发生内渗,通过体液循环向远处细胞转移,导致原发癌症演变为更高级别的肿瘤。因此,抑制肿瘤的EMT过程是抑制肿瘤转移的重要手段。本研究采用Western blotting法和免疫荧光染色法检测各组细胞中EMT主要生物标志物的表达情况,结果显示:CHE可以通过增加E-cadherin表达并减少N-cadherin和Vimentin表达,逆转卵巢癌SKOV3细胞EMT的进程。

综上所述,CHE能够抑制SKOV3细胞增殖、迁移和侵袭活性,阻止或缓解SKOV3细胞EMT的发生。本研究结果为CHE治疗卵巢癌的研究提供了理论依据,CHE有望作为一种新型抗卵巢癌的药物在临床中应用,但关于其具体作用机制还有待进一步研究。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

周佳参与选题、数据收集整理和论文撰写,邱智东、林喆和黄晓巍参与指导论文撰写和提供基金资助,律广富和王

雨辰参与实验操作和研究过程,许佳明和林贺参与论文审核,王可欣参与论文中数据的统计学分析。

[参考文献]

- [1] 王 稳, 王兴国, 刘淑娟, 等. 交界性卵巢肿瘤诊治中国专家共识(2022年版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38(12): 1185-1194.
- [2] 贾艳艳. PDLIM4在卵巢癌中的临床意义及其调控肿瘤生长和转移的机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2020.
- [3] DHALI WAL D, SHEPHERD T G. Molecular and cellular mechanisms controlling integrin-mediated cell adhesion and tumor progression in ovarian cancer metastasis: a review [J]. Clin Exp Metastasis, 2022, 39(2): 291-301.
- [4] VALIPOUR M, ZARGHI A, EBRAHIMZADEH M A, et al. Therapeutic potential of chelerythrine as a multi-purpose adjuvant for the treatment of COVID-19 [J]. Cell Cycle, 2021, 20(22): 2321-2336.
- [5] LIN Y L, ZHANG Q Z, XIE B F, et al. Chelerythrine-induced apoptotic cell death in HepG2 cells involves the inhibition of Akt pathway and the activation of oxidative stress and mitochondrial apoptotic pathway [J]. Antioxidants, 2022, 11(9): 1837.
- [6] GONG Y, YIN S L, SUN S J, et al. Chelerythrine reverses the drug resistance of resistant *Candida albicans* and the biofilm to fluconazole [J]. Future Microbiol, 2022, 17: 1325-1333.
- [7] QIAN W D, HUANG J, ZHANG J N, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities and mechanism of action of chelerythrine against carbapenem-resistant *Serratia marcescens* in vitro [J]. Microb Drug Resist, 2021, 27(8): 1105-1116.
- [8] CHO O, LEE J W, KIM H S, et al. Chelerythrine, a novel small molecule targeting IL-2, inhibits melanoma progression by blocking the interaction between IL-2 and its receptor [J]. Life Sci, 2023, 320: 121559.
- [9] WANG M Z, MA B, NI Y F, et al. Restoration of the antibiotic susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum β -lactamases *Escherichia coli* through combination with chelerythrine [J]. Microb Drug Resist, 2021, 27(3): 337-341.
- [10] 贾茗博, 孙 莹, 王 莹, 等. 氯化两面针碱通过JAK2/STAT3信号通路对胶质瘤细胞上皮-间质转化的抑制作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2021, 47(1): 73-81.
- [11] 王培卿, 尹震花, 康文艺. 白屈菜红碱药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2745-2749.

- [12] YANG T F, XU R, SU Q, et al. Chelerythrine hydrochloride inhibits proliferation and induces mitochondrial apoptosis in cervical cancer cells via PI3K/BAD signaling pathway [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 68: 104965.
- [13] WANG J H, SONG Y J, ZHANG N, et al. Using liposomes to alleviate the toxicity of chelerythrine, a natural PKC inhibitor, in treating non-small cell lung cancer[J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 658543.
- [14] CAO L L, LIANG Y B, ZHAO F J, et al. Chelerythrine and Fe₃O₄ loaded multi-walled carbon nanotubes for targeted cancer therapy [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12(6): 1312-1322.
- [15] CHEN Z X, YANG H, ZHANG Q L, et al. Chelerythrine inhibits stemness of cancer stem-like cells of osteosarcoma and PI3K/AKT/mTOR signal [J]. *J Oncol*, 2022, 2022: 6435431.
- [16] CHEN N Z, QI Y L, MA X, et al. Rediscovery of traditional plant medicine: an underestimated anticancer drug of chelerythrine [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 906301.
- [17] TANG Z H, CAO W X, WANG Z Y, et al. Induction of reactive oxygen species-stimulated distinctive autophagy by chelerythrine in non-small cell lung cancer cells[J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 367-376.
- [18] PLAZAS E, AVILA M M C, MUÑOZ D R, et al. Natural isoquinoline alkaloids: Pharmacological features and multi-target potential for complex diseases [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 177: 106126.
- [19] DOHERTY J A, PERES L C, WANG C, et al. Challenges and opportunities in studying the epidemiology of ovarian cancer subtypes [J]. *Curr Epidemiol Rep*, 2017, 4(3): 211-220.
- [20] MELAMED A, RAUH-HAIN J A, GOCKLEY A A, et al. Association between overall survival and the tendency for cancer programs to administer neoadjuvant chemotherapy for patients with advanced ovarian cancer[J]. *JAMA Oncol*, 2021, 7(12): 1782-1790.
- [21] 陈立兰, 狄文. 柠檬酸合成酶对卵巢癌SKOV3细胞上皮间质转化的影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2022, 30(17): 3065-3068.
- [22] HUANG Y, LI C Q, ZHANG X, et al. Nanotechnology-integrated ovarian cancer metastasis therapy: insights from the metastatic mechanisms into administration routes and therapy strategies [J]. *Int J Pharm*, 2023, 636: 122827.
- [23] YOUSEFI M, DEHGHANI S, NOSRATI R, et al. Current insights into the metastasis of epithelial ovarian cancer - hopes and hurdles [J]. *Cell Oncol*, 2020, 43(4): 515-538.
- [24] YEUNG T L, LEUNG C S, YIP K P, et al. Cellular and molecular processes in ovarian cancer metastasis. A Review in the Theme: cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 309(7): C444-C456.
- [25] ANTONY J, THIERY J P, HUANG R Y. Epithelial-to-mesenchymal transition: lessons from development, insights into cancer and the potential of EMT-subtype based therapeutic intervention [J]. *Phys Biol*, 2019, 16(4): 041004.
- [26] ASHRAFIZADEH M, MIRZAEI S, HASHEMI F, et al. New insight towards development of paclitaxel and docetaxel resistance in cancer cells: EMT as a novel molecular mechanism and therapeutic possibilities [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 141: 111824.
- [27] 白丽娜, 刘颖, 唐春晓, 等. 可利霉素对胰腺癌细胞生物学功能的影响 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(12): 2793-2801.
- [28] 李 晓, 孙 莹, 宋燕珂, 等. PDGF-D通过Notch1信号通路对肿瘤细胞上皮-间质转化调控作用的研究进展 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(1): 265-270.
- [29] PAL M, BHATTACHARYA S, KALYAN G, et al. Cadherin profiling for therapeutic interventions in epithelial mesenchymal transition (EMT) and tumorigenesis [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 368(2): 137-146.
- [30] GALVÁN J A, ZLOBEC I, WARTENBERG M, et al. Expression of E-cadherin repressors SNAIL, ZEB1 and ZEB2 by tumour and stromal cells influences tumour-budding phenotype and suggests heterogeneity of stromal cells in pancreatic cancer [J]. *Br J Cancer*, 2015, 112(12): 1944-1950.