

# 漆黄素及漆黄素纳米粒对卵巢癌细胞作用的研究

郭涛<sup>1,2</sup>, 董雪<sup>3</sup>, 石钢<sup>1,2△</sup>

1. 四川大学华西第二医院 妇科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇女儿童疾病教育部重点实验室(四川大学)(成都 610041); 3. 四川大学华西医院成都上锦南府医院 妇科(成都 611731)

**【摘要】** 目的 探讨一种新的饮食性黄酮类化合物——漆黄素及漆黄素纳米粒对人卵巢癌细胞株 SKOV3 的抗增殖和促凋亡作用。方法 体外实验采用 MTT 法测定漆黄素和漆黄素纳米粒作用后对卵巢癌细胞存活率的影响,选取下一步实验的药物浓度。裸鼠荷瘤后取肿瘤块制成 SKOV3 细胞混合液。取 15 只裸鼠腹腔接种人卵巢癌 SKOV3 细胞混合液肿瘤造模,第 5 天随机分成 3 组尾静脉注射药物,每 3 d 注射 1 次,每次 0.2 mL,共 12 次:A 组为肿瘤模型组(注射 50 mL/L 葡萄糖溶液),B 组为漆黄素组(注射 1.25 mg/kg 漆黄素),C 组为漆黄素纳米粒组(注射 1.25 mg/kg 漆黄素的纳米粒)。治疗结束后记录肿瘤质量,取心、肝、脾、肺和肾切片行 HE 染色观察组织病理损害,肿瘤组织切片通过 Ki67 免疫组织化学染色检测 SKOV3 细胞增殖,TUNEL 法检测 SKOV3 细胞凋亡。结果 MTT 结果显示,随漆黄素及漆黄素纳米粒质量浓度的增加,SKOV3 细胞的存活率减小;漆黄素及漆黄素纳米粒半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值分别为 125~250 μg/mL 和 62.5~125 μg/mL,故选择工作浓度为 125 μg/mL。共 11 只小鼠完成体内肿瘤造模并存活至实验结束(A 组 3 只,B 组 4 只,C 组 4 只)。A 组裸鼠腹腔内散在菜花状肿瘤结节,B、C 组仅见极小颗粒状肿瘤结节,B、C 组腹腔内肿瘤质量相当( $P>0.05$ ),但均低于 A 组( $P<0.05$ )。各组心、肝、脾、肺和肾切片 HE 染色均未见明显损害。与 A 组相比,B 组和 C 组肿瘤组织增殖指数 Ki67 均降低,细胞凋亡率均升高( $P<0.05$ ),但 B 组和 C 组之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 漆黄素及漆黄素纳米粒均具有抗卵巢癌细胞增殖和促进其凋亡的作用,安全性好。

**【关键词】** 卵巢癌 漆黄素 漆黄素纳米粒 细胞凋亡

***In vitro and in vivo* Antitumor Effects of Fisetin and Fisetin Nanoparticle on Ovarian Cancer** GUO Tao<sup>1,2</sup>, DONG Xue<sup>3</sup>, SHI Gang<sup>1,2△</sup>. 1. Department of Gynecology, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Woman and Children (Sichuan University), Ministry of Education, Chengdu 610041, China; 3. Department of Gynecology, Cheng Du Shang Jin Nan Fu Hospital, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 611731, China  
△ Corresponding author, E-mail: drshigang@163.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effects of fisetin and fisetin nanoparticle on anti-proliferation and apoptosis induction of human ovarian cancer cell line SKOV3. **Methods** The MTT assay was used to determine the survival rate of SKOV3 cell through apoptosis induction after fisetin and fisetin nanoparticle treatment, and the drug concentration of the next experiment was selected. 15 nude mice vaccinated SKOV3 cells mixture mode randomly into three groups, treatment began on the fifth day, every 3 d injection times, each time 0.2 mL, a total of 12 times. Group A for the control (50 mL/L glucose solution), group B for fisetin (1.25 mg/kg), group C for fisetin nanoparticle (1.25 mg/kg). After the treatment, tumor quality was recorded, and histopathological lesions were observed by HE staining on heart, liver, spleen, lung and kidney sections. The proliferation of SKOV3 cells was detected by Ki67 immunohistochemical staining in tumor tissue sections, and apoptosis of SKOV3 cells was detected by TUNEL assay. **Results** MTT test indicated that fisetin and fisetin nanoparticle had inhibition effect on ovarian cancer cell in a dose-dependent manner. The half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) value for fisetin and fisetin nanoparticle were 125-250 μg/mL and 62.5-125 μg/mL. Therefore, the working concentration was selected as 125 μg/mL. 11 mice were completed and survived until the end of the experiment ( $n=3$  in group A,  $n=4$  in group B,  $n=4$  in group C). Group A nude mice abdominal cavity in cauliflower shape tumor nodules, B and C group only tiny granule tumor nodules, B and C group of intraperitoneal tumor mass is quite ( $P>0.05$ ), but were lower than group A ( $P<0.05$ ). No obvious damage was found in the hepatocytes, liver, spleen, lung, and kidney slices. Compared with group A, Ki67 index in group B and group C decreased, and cell apoptosis rate increased ( $P<0.05$ ), but there was no significant difference between group B and group C ( $P>0.05$ ). After treatment of fisetin and fisetin nanoparticle, heart, liver, spleen, lung and kidney are safe without damage. **Conclusion** Fisetin and fisetin nanoparticle have the effect of anti-ovarian cancer cells, and no organ damage has been found in both.

**【Key words】** Ovarian cancer Fisetin Fisetin nanoparticle Cell apoptosis

卵巢癌是常见的妇科生殖器恶性肿瘤之一,国内外卵巢癌的标准治疗是满意的肿瘤细胞减灭术辅以化疗。紫杉醇的出现使晚期卵巢癌的化疗效果有了很大提高,但是治疗效果仍不满意,化疗药物的副作用一定程度上限制了临床应用<sup>[1]</sup>。漆黄素(3,3',4',7-四羟基黄酮)是一种天然生成的黄酮类化合物,在水果蔬菜中含量丰富<sup>[2]</sup>。漆黄素具有抗肿瘤作用,又兼备毒副作用小的优点<sup>[2-3]</sup>。但漆黄素的水溶性有限,纳米技术可改善漆黄素的水溶性。漆黄素对人卵巢癌的作用目前国内外尚未见报道,本研究通过体内、外试验初步探讨漆黄素及漆黄素纳米粒对人卵巢癌细胞株 SKOV3 抗增殖和促进凋亡作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

漆黄素(纯度 $>0.98$ )及漆黄素纳米粒由四川大学华西药学院制备提供,采用 DMSO 溶解。人卵巢癌细胞 SKOV3 购于美国 ATCC 公司,采用 DMSM 培养基,于 37 °C 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱静置培养。19 只无胸腺雌性裸鼠,6~7 周龄,18~22 g,清洁饲养于四川大学实验动物中心,均获得机构动物保护和利用委员会的批准。

### 1.2 方法

**1.2.1 MTT 法筛选漆黄素和漆黄素纳米粒的工作剂量** 采用 MTT 法测定漆黄素和漆黄素纳米粒作用下 SKOV3 细胞存活率。将 2.5 g/L 胰蛋白酶消化的卵巢癌 SKOV3 对数期细胞铺板于 96 孔板中,置于体积分数为 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱孵育,次日上午加药,漆黄素和漆黄素纳米粒的质量浓度梯度依次为 3.93、7.81、15.63、31.25、62.5、125、250、500 和 1 000 μg/mL,孵育 24 h 每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),孵育 4 h;再加入 150 μL DMSO,在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度(A<sub>490</sub>)值。卵巢癌细胞抑制效应以细胞存活率(以空白对照组的存活率为 100%)表示,细胞存活率 =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{本底}}) / (A_{\text{空白对照组}} - A_{\text{本底}})$ 。选择两组细胞存活率 50% 水平、且两组无统计学差异者为后续实验的药物剂量。

**1.2.2 制备荷瘤鼠肿瘤接种造模及分组处理** 19 只裸鼠在饲养室内饲养 1 周后,将人卵巢癌 SKOV3 细胞以  $5 \times 10^6$  细胞/100 μL 一次性注入其中 4 只裸鼠背部皮下,每只裸鼠两个注射点。待肿瘤长至直径约 1 cm 时处死这 4 只裸鼠,收集所有肿瘤切碎

成极细颗粒状,然后用 RPMI-1640 混合至 7.5 mL。混悬液注入剩余 15 只裸鼠腹腔内,每只 0.5 mL。从小鼠腹部扪及肿块,且肿块达 1 cm 左右时判定荷瘤成功。

这 15 只裸鼠随机分成 3 组,每组 5 只,从肿瘤接种至腹腔内第 5 天开始分组尾静脉注射药物进行治疗,每 3 d 注射 1 次,每次 0.2 mL,共 12 次:A 组为肿瘤模型组(注射 50 mL/L 葡萄糖溶液),B 组为漆黄素组,C 组为漆黄素纳米粒组。B 组和 C 组给药浓度按 MTT 实验取 125 μg/mL 计算,每次 0.2 mL,算出单次给药量为 25 μg,裸鼠体质量平均值按 20 g 计算,故漆黄素和漆黄素纳米粒剂量均为 1.25 mg/kg。

**1.2.3 称重和取材** 入组时测裸鼠体质量,注射治疗结束后第 3 天,记录各组裸鼠体质量、食欲情况。之后处死所有裸鼠,收集腹腔内所有肿瘤,同时切除心、肝、脾、肺和肾,记录肿瘤的质量,所有标本固定在 100 mL/L 甲醛溶液中,常规石蜡包埋、切片。

**1.2.4 HE 病理染色** 取标本切片,HE 染色,显微镜观察结果。每只裸鼠每种组织(心、肝、脾、肺和肾)取一张切片,主要观察各组动物的心、肝、脾、肺、肾组织病理损害。

**1.2.5 免疫组化法检测细胞 Ki67 增殖指数** Ki67 是反映细胞增殖活性的良好指标,值越高表示肿瘤细胞增殖多,恶性程度越高。取石蜡包埋的肿瘤组织,免疫组织化学 SP 法染色, Ki-67 抗体(Boaosen,北京)1:100。显微镜下观察结果,阳性细胞在高倍镜下呈棕色。每只裸鼠肿瘤组织取 3 张切片,每张切片随机取 10 个 100 倍镜视野,每个视野计数不少于 100 个细胞。Ki67 增殖指数(%) = 阳性细胞数/计数细胞总数 × 100%。

**1.2.6 TUNEL 法原位检测卵巢癌组织中细胞凋亡** 取石蜡包埋的肿瘤组织,切片予 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(北京中杉金桥有限公司)处理。阳性细胞在荧光镜下呈绿色,表示细胞凋亡。每只裸鼠肿瘤组织取 3 张切片,每张切片随机取 10 个 100 倍镜视野,每个视野计数不少于 100 个细胞。细胞凋亡率(%) = 阳性细胞数/计数细胞总数 × 100%。

**1.2.7 统计学方法** 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较使用方差分析、t 检验及卡方检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 漆黄素及漆黄素纳米粒对 SKOV3 细胞的抑

制作用

MTT 比色法结果显示漆黄素及漆黄素纳米粒对 SKOV3 卵巢癌细胞生长均呈抑制作用；随药物浓度的增加，细胞的存活率减小；漆黄素半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 125~250 μg/mL，漆黄素纳米粒 IC<sub>50</sub>为 62.5~125 μg/mL；在 125 μg/mL 质量浓度下二者对卵巢癌细胞抑制作用差异无统计学意义(图 1)，取此剂量进行下一步实验。

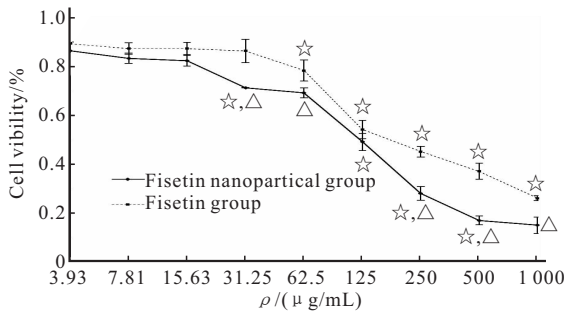


图 1 漆黄素及漆黄素纳米粒各质量浓度对 SKOV3 卵巢癌细胞的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of fisetin and fisetin nanoparticle on SKOV3 ovarian cancer cells

☆  $P < 0.05$ , vs. former concentration in the same group; △  $P < 0.05$ , vs. fisetin group at the same concentration

2.2 裸鼠卵巢癌体内实验

2.2.1 基本情况 实验过程中 2 只 A 组裸鼠、1 只 B 组裸鼠、1 只 C 组裸鼠死亡，退出研究。11 只存活裸鼠肿瘤造模成功，造模成功率 73.3% (11/15)。漆黄素及漆黄素纳米粒并没有导致裸鼠体质量减轻，实验前后 3 组裸鼠体质量变化差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(附表)。

2.2.2 大体观察 处死所有裸鼠后大体肉眼观察，A 组裸鼠腹腔内散在菜花状肿瘤结节，B、C 组仅见极小颗粒状肿瘤结节，3 组裸鼠肝脏表面均未见肿瘤结节。记录裸鼠腹腔内肿瘤质量，B、C 组与 A 组差异有统计学意义( $P > 0.05$ )，C 组肿瘤质量低于 B 组，但差异无统计学意义(附表)。

2.2.3 内脏 HE 染色 各组动物心、肝、脾、肺和肾切片 HE 染色均未见明显异常(图 2)。

2.2.4 肿瘤细胞增殖结果 Ki67 增殖指数，B、C 组低于 A 组( $P < 0.05$ )，B 组和 C 组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(附表、图 3)。

2.2.5 肿瘤细胞凋亡结果 A 组偶见阳性细胞，而在 B、C 组可见明显阳性细胞。B、C 组细胞凋亡率高于 A 组( $P < 0.05$ )，C 组与 B 组差异没有统计学意义(附表、图 4)。

附表 各组裸鼠体质量和肿瘤质量、增殖指数和凋亡率

Table Body mass, tumor mass, Ki67 index and apoptosis rate of rats

Group	n	Body mass/g		Tumor mass/g	Ki67 index/%	Apoptosis rate/%
		Before test	After test			
A	3	19.57±1.36	19.63±1.14	1.30±0.032	50.05±4.13	1.36±0.65
B	4	19.23±0.82	19.45±0.88	0.29±0.022*	12.50±2.81*	22.52±3.20*
C	4	19.50±0.92	19.58±0.70	0.27±0.008*	12.70±3.27*	23.84±2.03*

\*  $P < 0.05$ , vs. group A

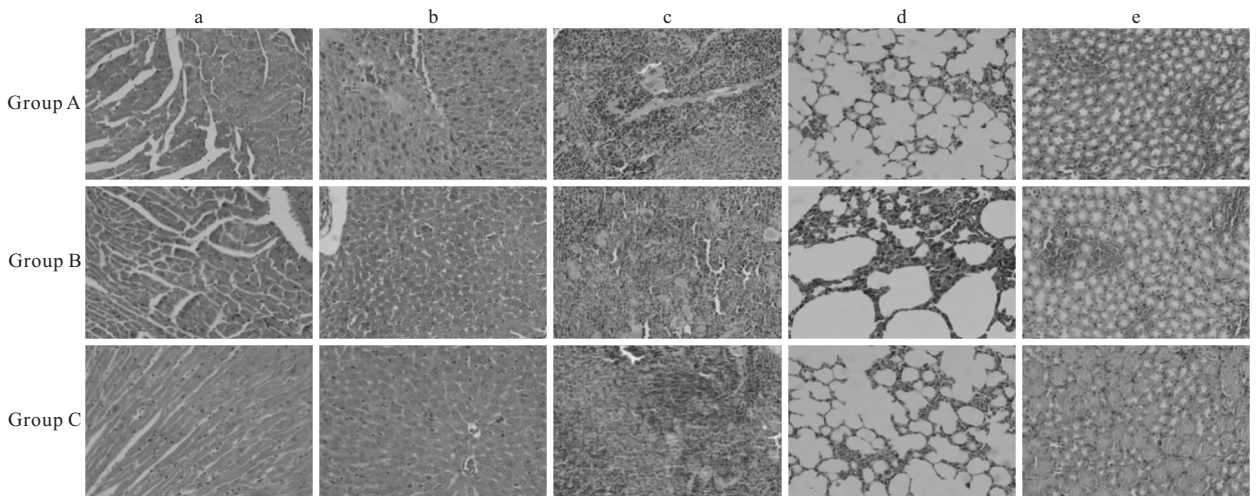


图 2 各组动物心(a)、肝(b)、脾(c)、肺(d)和肾(e)切片。HE ×40

Fig 2 Nude heart (a), liver (b), spleen (c), lung (d) and kidney (e) slices of each group. HE ×40

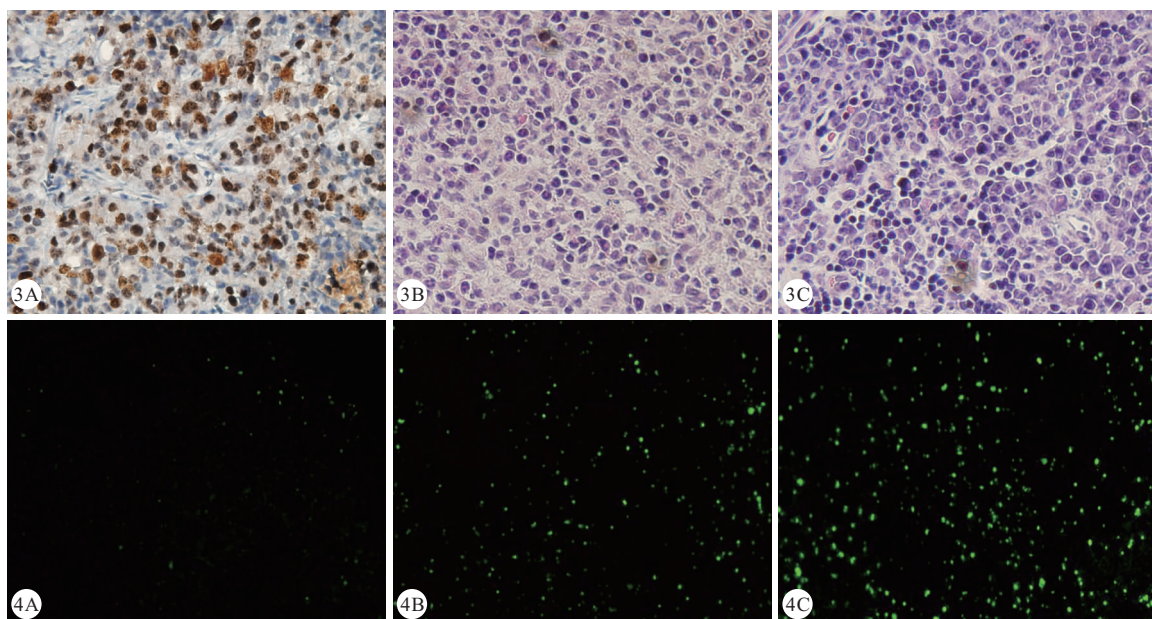


图 3 肿瘤组织切片免疫组化 Ki67 表达。SP  $\times 100$

Fig 3 The expression of immunohistochemistry Ki67 in tumor tissue. SP method.  $\times 100$

A: Group A; B: Group B; C: Group C

图 4 TUNEL 法检测卵巢癌细胞凋亡。 $\times 100$

Fig 4 The apoptosis of ovarian cancer cells by TUNEL

### 3 讨论

本研究探讨漆黄素及漆黄素纳米粒对人卵巢癌细胞 SKOV3 抗增殖和凋亡诱导的影响,体外研究结果发现,漆黄素和漆黄素纳米粒抑制卵巢癌细胞增殖,这与其他研究结果一致<sup>[2-3]</sup>。本研究中,漆黄素及漆黄素纳米粒  $IC_{50}$  分别为 125~250 和 62.5~125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,当药物浓度达到 31.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  后二者抗肿瘤作用差异均有统计学意义(其中 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度下漆黄素纳米粒细胞存活率低于漆黄素,但差异无统计学意义),这与已有的漆黄素及漆黄素纳米粒在其他肿瘤中研究结果相同<sup>[4]</sup>。以前的研究表明,漆黄素纳米粒在水中的溶解度较漆黄素高,可在血液循环中停留更长时间,从而保持一定的药物浓度,增加口服药物的生物利用度及保持特定释放,因此文献认为漆黄素纳米粒具有更强的抑制肿瘤细胞作用<sup>[4-5]</sup>。为了客观、有效比较剂型对治疗的影响,排除浓度的干扰,我们选择了两种药物  $IC_{50}$  的交点 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  进行后续实验。

本研究进行了动物实验,建立了卵巢癌裸鼠模型分析漆黄素和漆黄素纳米粒对 SKOV3 细胞的作用。结果表明漆黄素组和漆黄素纳米粒组可降低肿瘤质量、降低 SKOV3 细胞增殖指数、提高 SKOV3 细胞凋亡率,且对内脏组织无异常损伤。这表明漆

黄素和漆黄素纳米粒对卵巢癌治疗的安全性和有效性与已有的其他恶性肿瘤的研究结果一致<sup>[5]</sup>。增殖和凋亡所涉及的细胞内信号转导过程为一系列激发机制。恢复和激发肿瘤细胞的凋亡能力,诱导细胞凋亡是肿瘤防治的有效方法。近期研究发现漆黄素对前列腺癌、结直肠癌、膀胱癌等各种肿瘤均有抗细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用<sup>[6-7]</sup>。查阅文献发现,漆黄素抑制卵巢癌细胞增殖及促进凋亡的作用与先前对肺癌、结直肠癌、前列腺癌等肿瘤中的研究结果相同<sup>[8]</sup>。先前研究中漆黄素通过对细胞周期蛋白依赖激酶有抑制作用,使细胞周期停滞在  $G_2/M$  期,抑制细胞增殖<sup>[9]</sup>;增加 P21 蛋白水平,抑制环氧酶 2 (COX-2)和 Wnt/表皮细胞生长因子受体(EGFR)/核因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )家族信号通路,诱导结肠癌细胞凋亡和抑制了癌细胞的增殖,起到抗结肠癌的作用<sup>[10-11]</sup>。最近对乳腺癌的研究显示,漆黄素可通过调节磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路,下调 p-PI3K、p-Akt、及 p-mTOR,调节 Bax 和 B 淋巴细胞瘤(Bcl)家族的表达,进而抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡,发挥有效的抗肿瘤作用<sup>[12]</sup>。

总结起来,漆黄素的作用机制,可能是调节各种细胞信号转导通路,使细胞周期停滞,抑制细胞生长及 DNA 合成,增加 P53 和 P21 蛋白的表达,调节

Bcl 家族的表达,同时调节凋亡线粒体通路,诱导细胞凋亡<sup>[3,9]</sup>,发挥了有效的细胞毒性作用。

尽管文献认为漆黄素纳米粒具有更强的抑制肿瘤细胞作用<sup>[4-5]</sup>,但从本实验结果看,B、C组的肿瘤质量,增殖指数、细胞凋亡差异无统计学意义,即漆黄素集纳米粒与漆黄素的抗肿瘤作用差异没有统计学意义。其原因可能与二者在相同质量浓度下动物体内细胞膜的通透性、细胞内外物质转运机制及体内复杂环境等因素有关。

关于漆黄素及漆黄素纳米粒卵巢癌抗肿瘤作用的研究,之前未见报道。我们从体外实验及卵巢癌裸鼠模型证实了漆黄素及漆黄素纳米粒抗人类卵巢癌细胞作用,填补了此领域的空白。然而,本研究有一定的局限性。首先,由于一些客观因素的限制,我们没有深入比较漆黄素及漆黄素纳米粒在卵巢癌中的抗肿瘤作用,未对漆黄素及漆黄素纳米粒抗卵巢癌的作用和其他抗肿瘤药物比较,即,漆黄素的抗肿瘤作用的强弱尚未得到比较和评估。其次,本研究只是一个对漆黄素及漆黄素纳米粒的抗肿瘤效应的初步探索,其抗肿瘤机制需要进一步研究。

综上,漆黄素及漆黄素纳米粒均具有抗卵巢癌细胞的作用,二者均未发现器官损害。漆黄素及漆黄素纳米粒可能成为一种安全有效的卵巢癌预防和治疗药物。

### 参 考 文 献

- [1] XIAO K, LI Y, LEE JS, *et al.* "OA02" peptide facilitates the precise targeting of paclitaxel-loaded micellar nanoparticles to ovarian cancer *in vivo*. *Cancer Res*, 2012, 72(8): 2100-2110.
- [2] PAL HC, ATHAR M, ELMETS CA, *et al.* Fisetin inhibits UVB-induced cutaneous inflammation and activation of PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathways in SKH-1 hairless mice. *Photochem Photobiol*, 2015, 91(1): 225-234.
- [3] CHOU RH, HSIEH SC, YU YL, *et al.* Fisetin inhibits migration and invasion of human cervical cancer cells by down-regulating urokinase plasminogen activator expression through suppressing the p38 MAPK-dependent NF- $\kappa$ B signaling pathway. *PLoS One*, 2013, 8(8): e71983 [2018-01-14]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071983>.
- [4] RAGELLE H, CRAUSTE-MANCIET S, SEGUIN J, *et al.* Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. *Int J Pharm*, 2012, 427(2): 452-459.
- [5] JAIN AK, DAS M, SWARNAKAR NK, *et al.* Engineered PLGA nanoparticles: an emerging delivery tool in cancer therapeutics. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2011, 28(1): 1-45.
- [6] HADDAD AQ, FLESHNER N, NELSON C, *et al.* Antiproliferative mechanisms of the flavonoids 2, 2'-dihydroxychalcone and fisetin in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer*, 2010, 62(5): 668-681.
- [7] CHEN WS, LEE YJ, YU YC, *et al.* Enhancement of P53-mutant human colorectal cancer cells radiosensitivity by flavonoid fisetin. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2010, 77(5): 1527-1535.
- [8] SYED DN, ADHAMI VM, KHAN MI, *et al.* Inhibition of Akt/mTOR signaling by the dietary avonoid setin. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(7): 995-1001.
- [9] SMITH ML, MURPHY K, DOUCETTE CD, *et al.* The dietary flavonoid fisetin causes cell cycle arrest, caspase-dependent apoptosis, and enhanced cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in triple-negative breast cancer cells. *J Cell Biochem*, 2016, 117(8): 1913-1925.
- [10] LEU JD, WANG BS, CHIU SJ, *et al.* Combining fisetin and ionizing radiation suppresses the growth of mammalian colorectal cancers in xenograft tumor models. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 4975-4982.
- [11] CHEN Y, WU Q, Song L, *et al.* Polymeric micelles encapsulating fisetin improve therapeutic effect in colon cancer. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(1): 534-542.
- [12] SUN X, MA XM, LI QW, *et al.* Anti-cancer effects of setin on mammary carcinoma cells via regulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway; *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Mol Med*, 2018; 811-820 [2018-01-14]. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3654>.

(2018-02-27 收稿, 2018-04-03 修回)

编辑 吕熙