

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.12.002

## 毒毛花苷通过 Nrf2 抑制子宫内膜癌细胞增殖活性\*

陈佩琴 吕 牧 黄宝珠 张箴波<sup>△</sup> 李静婕<sup>△</sup>

(上海交通大学附属第一人民医院妇产科 上海 201620)

**摘要 目的:**通过研究毒毛花苷对核因子 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)的抑制作用,深入探讨其抑制子宫内膜癌细胞增殖的作用机制。**方法:**(1)采用细胞增殖实验观察不同浓度的毒毛花苷对 Ishikawa 细胞增殖的影响;(2)通过克隆形成实验观察毒毛花苷对 Ishikawa 细胞增殖的作用;(3)采用蛋白免疫印迹法检测经毒毛花苷处理后, Ishikawa 细胞 Nrf2 蛋白表达水平的变化。**结果:**经毒毛花苷处理后, Ishikawa 细胞增殖受到显著抑制且呈剂量依赖性。Nrf2 蛋白表达下调。**结论:**毒毛花苷可能通过下调 Nrf2 蛋白水平,从而抑制子宫内膜癌的恶性生物学行为。

**关键词:**毒毛花苷;核因子 2 相关因子 2;子宫内膜癌;增殖

**中图分类号:**R-33;R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)12-2208-04

## Ouabain Inhibit the Proliferation of Endometrial Cells through Nrf2 Down-regulation\*

CHEN Pei-qin, LÜ Mu, HUANG Bao-zhu, ZHANG Zhen-bo<sup>△</sup>, LI Jing-jie<sup>△</sup>

(Department of Obstetrics and Gynecology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 201620, China)

**ABSTRACT Objective:** By studying the inhibitory effect of Ouabain on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), the mechanism of how it suppresses endometrial cancer cell proliferation is deeply explored. **Methods:** (1) Cell proliferation experiments were used to observe the effect of Ouabain on the proliferation of Ishikawa cells; (2) Colony formation assays were used to observe the effect of Ouabain on the proliferation of Ishikawa cells; (3) Western blotting assays were used to detect the changes of Nrf2 protein level in Ishikawa cells after treatment with Ouabain. **Results:** After treatment with Ouabain, the proliferation of Ishikawa cells was markedly inhibited in a concentration dependent manner, and the expression of Nrf2 protein was down-regulated. **Conclusion:** Our finding suggested that Ouabain may inhibit the malignant biological behavior of endometrial cancer by down-regulating Nrf2.

**Key words:** Ouabain; Nrf2; Endometrial Cancer; Proliferation

**Chinese Library Classification (CLC):** R-33; R737.33 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2022)12-2208-04

### 前言

子宫内膜癌(Endometrial cancer, EC)是严重影响女性健康的生殖道恶性肿瘤之一,一般在发达国家高发<sup>[1]</sup>。但随着近年我国经济水平的快速提升,国民饮食结构以及生活方式的西方化,EC 出现发病率升高和发病年轻化的趋势<sup>[2]</sup>。年轻的 I 型 EC 或增生性病变患者增多,保留生育功能的大剂量孕激素冲击疗法日益得到重视。但临床研究显示,经保守治疗后仍有约 30% 患者产生孕激素抵抗,导致治疗失败<sup>[3]</sup>。因此,探索孕激素抵抗的机制以及孕激素增敏治疗方法是治愈和改善预后的关键。核因子 E-2- 相关因子 2 (Nuclear Factor - Erythroid 2 - related factor - 2, Nrf2)是具有抗氧化功能的机体保护性蛋白<sup>[4]</sup>。但有研究发现在肿瘤组织中 Nrf2 的高表达可促进肿瘤的发展,增加其耐药性<sup>[5]</sup>。Kwak 等人的研究结果显示,敲减 Nrf2 后,卵巢癌细胞对顺铂和阿霉素的敏感性增强<sup>[6]</sup>。

我们通过查阅文献,发现临床上用以治疗心律失常的药物毒毛花苷可抑制 Nrf2 的表达及活性<sup>[7]</sup>。因此,我们通过观察毒毛花苷处理子宫内膜癌细胞 Ishikawa 后其增殖速度、克隆形成能力、Nrf2 蛋白表达水平的变化来研究毒毛花苷在子宫内膜癌治疗中的可行性,为提升子宫内膜癌治愈率、改善预后提供新的方法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 胎牛血清, DMEM 培养液 (Gibco, 美国), BCA 蛋白检测试剂盒 (碧云天, 中国), Dual-Luciferase<sup>®</sup> 报告基因检测系统 (Promega, 美国), Nrf2、Tubulin、GAPDH、 $\beta$ -actin—抗试剂 (Cell Signaling Technology, 美国), 毒毛花苷 (Sigma-Aldrich, 美国)。

1.1.2 仪器及设备 恒温二氧化碳培养箱 (Thermo, 美国), 蛋

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81872111;81672562);国家重点研发计划项目(2019YFC1005200;2019YFC1005201)

作者简介:陈佩琴(1994-),女,硕士研究生,主要研究方向:妇科肿瘤和 IVF 保育治疗, E-mail: pamelachan2630@163.com

<sup>△</sup> 通讯作者:张箴波(1979-),男,博士,教授,主要研究方向:妇科肿瘤和 IVF 保育治疗, E-mail: zhangzhenbozzb@shsmu.edu.cn;

李静婕(1987-),女,博士,副教授,主要研究方向:妇科肿瘤和 IVF 保育治疗, E-mail: jingjie.li@shgh.cn

(收稿日期:2021-11-28 接受日期:2021-12-23)

白电泳槽、电泳仪、ECL 发光显影仪(Bio-Rad,美国),低温离心机、移液枪(Eppendorf,德国),酶标仪(Biotek,美国)等。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株为本课题组保存,使用含 10%的胎牛血清、100 U/L 青霉素和 100 U/L 链霉素双抗的 DMEM 培养液培养。实验所使用的 MDA-MB-231 报告细胞为本实验室构建的含 NQO1 启动子区域荧光素酶报告基因的乳腺癌细胞。培养条件设定为 37℃,5% CO<sub>2</sub>。待细胞处于对数生长期时用于下列实验。

**1.2.2 Western blot 法检测 Nrf2 蛋白及其下游激活基因蛋白表达** 应用不同浓度(1,10,100 nM)的毒毛花苷处理 Ishikawa 细胞 48 小时,收集细胞。提取处理细胞总蛋白后,BCA 法测定蛋白浓度,将 30 μg 蛋白上样于 10%的凝胶进行电泳。电泳结束后,采用 300 mA 恒流转膜 90 分钟将蛋白转印至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 60 分钟后,将含目的蛋白的条带置入相应的抗体稀释液中孵育过夜;用 TBST 液洗涤条带 3 次,每次 10 分钟;根据一抗抗体种属选择相应二抗,室温孵育 1 小时;用 TBST 液洗涤条带 3 次,每次 10 分钟,ECL 发光显影;采用 Photoshop 软件测量灰度值后,计算目的蛋白灰度与内参蛋白灰度的比值。

**1.2.3 Nrf2 活性检测** 于 6 孔板中接种 6×10<sup>6</sup> 个处于对数生长期的 MDA-MB-231 细胞,并于每孔中加入 2 mL 培养液;待细胞贴壁后加入不同浓度的毒毛花苷处理 48 小时;弃掉培养液,PBS 清洗后于每孔中加入 100 μL 裂解缓冲液;置于摇床上裂解 30 分钟;吸取 10 μL 上清于空白板中,每孔加入 100 μL Firefly Luciferase Buffer,混匀;使用酶标仪检测荧光值,记录数据后进行统计分析。

**1.2.4 细胞增殖实验** 不同浓度的毒毛花苷对 Ishikawa 细胞增殖的影响:将 5×10<sup>3</sup> 个细胞接种于含 100 μL DMEM 培养液

的 96 孔板中培养。待细胞贴壁后换液,培养液中加入不同浓度的毒毛花苷,使其终浓度分别为 0,1 nM,10 nM,100 nM。每个浓度设置 5 个重复孔。加药 48 小时后,弃去原培养液后每孔加入 100 μL 10%的三氯乙酸溶液固定 1 小时。用去离子水冲洗晾干后,每孔加入 0.4% 磺酰罗丹明 B(Sulforhodamine B, SRB) 100 μL 染色 30 分钟。弃去染液,用 1%乙酸冲洗后室温晾干。每孔加入 100 μL Tris-base 碱液,在摇床上震荡 20 分钟后测量 540 nm 处光吸收值。

**1.2.5 细胞克隆形成实验** 不同浓度的毒毛花苷对 Ishikawa 细胞侵袭能力的影响:将 800 个细胞接种于六孔板中;待细胞贴壁后换液,培养液中加入不同浓度的毒毛花苷母液,使其终浓度为 0,5 nM,15 nM,20 nM,每组设置 3 个重复孔。培养 14 天,用 PBS 洗涤,每孔加入 1 mL 4%多聚甲醛固定 30 分钟后,用 PBS 洗涤并加入 1 mL 结晶紫染液后用 PBS 洗涤晾干,拍照观察并计数。

## 1.3 统计学处理

采用 GraphPad prism5 对数据进行分析绘图。采用 SPSS 统计学软件进行 one way ANOVA 及独立样本 t 检验分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 毒毛花苷对子宫内膜癌细胞株 Ishikawa 中 Nrf2 及其下游靶蛋白表达的影响

为了探究毒毛花苷对 Nrf2 蛋白表达的影响,使用不同浓度的毒毛花苷处理 Ishikawa 细胞 48 小时,收集蛋白进行定量分析,结果如图所示。图 1A 表示随着毒毛花苷浓度增加,Nrf2 蛋白表达下降。在毒毛花苷浓度为 1 nM 时,即有抑制 Nrf2 表达效果,且抑制效果呈剂量依赖效应。图 1B 为各次重复实验中,Nrf2 以及下游蛋白灰度统计分析图。

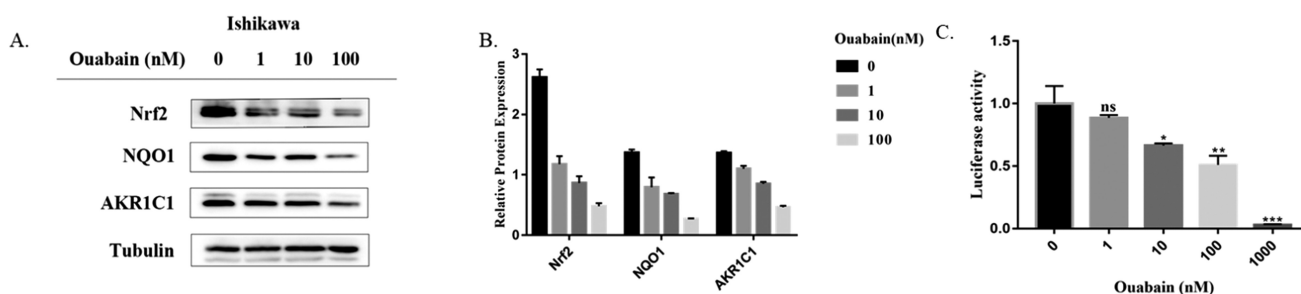


图 1 毒毛花苷抑制 Nrf2 表达及其活性

A B.免疫印迹实验 表明毒毛花苷抑制 Nrf2 及其下游基因蛋白的表达

C.荧光素酶报告基因实验表明毒毛花苷抑制 Nrf2 活性

Fig.1 The effect of Ouabain on the protein expression of Nrf2 and its downstream gene and the activity of Nrf2

A B.Ouabain inhibits the protein expression of Nrf2 and its downstream gene

C. Ouabain inhibits the activity of Nrf2

注:与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ .

### 2.2 毒毛花苷对子宫内膜癌细胞株 Ishikawa 中 Nrf2 活性的影响

为了进一步探究毒毛花苷对 Nrf2 活性的影响,拟用浓度

梯度的毒毛花苷处理稳定转染有 NQO1 启动子区域 ARE 的荧光素酶报告基因的 MDA-MB-231 细胞 48 小时,收集其裂解液后测量其荧光发光值。如图 1C 表示,随着毒毛花苷浓度增加,

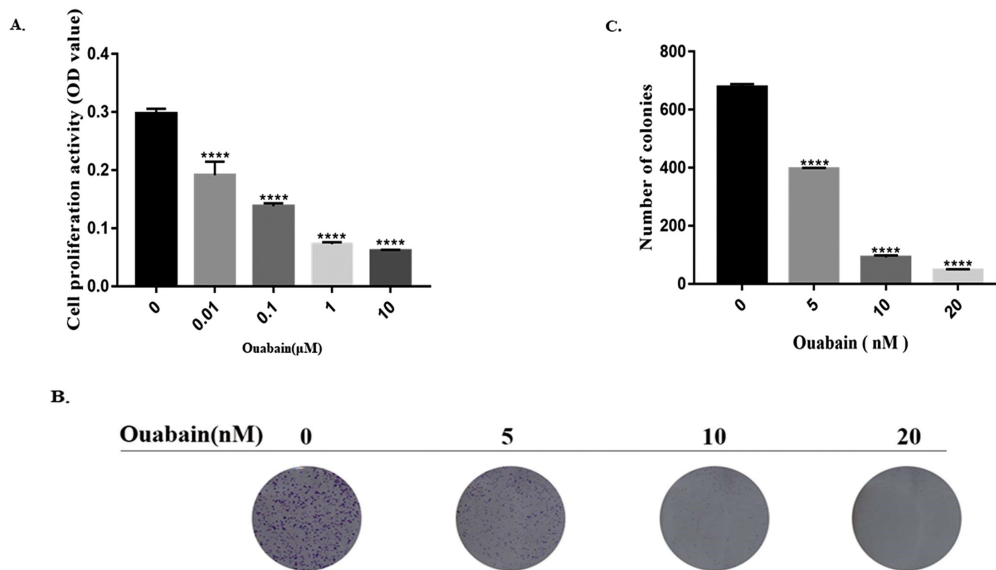


图2 不同浓度的毒毛花苷对 Ishikawa 细胞增殖活性的影响

A. SRB 实验表明毒毛花苷抑制 Ishikawa 细胞增殖; B 和 C 平板克隆形成实验表明毒毛花苷抑制 Ishikawa 细胞的克隆形成能力

Fig.2 The effect of Ouabain on proliferation of Ishikawa cells

A. SRB experiments showed that Ouabain inhibited the proliferation of Ishikawa cells. B and C. Colony formation experiments showed that Ouabain inhibited the proliferation of Ishikawa cells.

注:与对照组相比,\*\*\*\* $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group,\*\*\*\* $P < 0.001$ .

荧光值下降,即NQO1转录减少,表明Nrf2的活性受到抑制( $P < 0.05$ )。

### 2.3 毒毛花苷对子宫内膜癌细胞株 Ishikawa 增殖的影响

如前所示,毒毛花苷能抑制Nrf2的表达及其活性,而Nrf2高表达是子宫内膜癌恶性行为的特征之一,所以我们拟探索毒毛花苷能否抑制子宫内膜癌细胞Ishikawa细胞增殖,结果如下。图2A表示不同浓度的毒毛花苷处理Ishikawa细胞48小时后,与对照组相比,毒毛花苷能显著抑制子宫内膜癌细胞Ishikawa的增殖,且呈现剂量依赖效应( $P < 0.01$ )。如图2B示,经5 nM, 10 nM, 20 nM的毒毛花苷处理后,Ishikawa细胞的克隆形成数目显著减少。图2C为重重复实验中克隆数目的统计图,克隆数目差异有统计学差异( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

年轻的子宫内膜增生和子宫内膜癌患者往往更倾向于保留生育功能的保守治疗,而保守治疗的基础方式是大剂量孕激素治疗。治疗过程中出现孕激素抵抗与Nrf2的表达密切相关,Nrf2高表达可促进孕激素耐药,而下调Nrf2可增加子宫内膜癌对孕激素的敏感性<sup>[8,9]</sup>。鉴于Nrf2可促进子宫内膜增生,寻找靶向Nrf2的药物成为降低孕激素抵抗效应、提升治愈率的治疗新方向。

目前,已发现的Nrf2抑制剂较多但成为临床联合抗癌用药仍有困难。鸦胆子苦醇(Brusatol)是明确的Nrf2抑制剂且体内和体外的实验都表明Brusatol能有效抑制肿瘤细胞代谢和增殖<sup>[10,11]</sup>。但其抑制肿瘤增长机制不明确,一项生物信息学研究指出Brusatol的靶标蛋白有464种,虽然这一假设未经生物

学研究证实,但暗示脱靶可能成为Brusatol应用中的难题<sup>[12]</sup>。以地塞米松为代表的糖皮质激素以受体依赖的方式抑制Nrf2,但鉴于糖皮质激素在抗癌治疗中作用未明确且其副作用较多,临床联合应用仍有风险<sup>[13]</sup>。Ochratoxin A (OTA)是一种真菌来源的真菌毒素,也显示出Nrf2抑制作用<sup>[14]</sup>。有实验指出,OTA可以降低肾脏中Nrf2调节基因的表达但同时引起肾脏中的DNA氧化性损伤且长期接触OTA可能会增强Nrf2的体细胞突变或者通过选择性作用Keap1导致组成型Nrf2活化<sup>[15]</sup>。所以OTA的复杂和不明确的效果以及其高毒性,限制了OTA作为Nrf2抑制剂的进一步发展。一些天然黄酮类化合物被报道具有Nrf2抑制活性,但在不同的研究中类黄酮对Nrf2的活性影响并不一致,这影响了其临床应用的可能<sup>[16,17]</sup>。

毒毛花苷是强心苷类药物的一种,它通过抑制钠-钾-泵治疗心脏衰竭,在临床中应用较多<sup>[18]</sup>。近年来,毒毛花苷的抑癌作用逐渐被发掘;其已被验证在体外可通过抑制黏着斑减缓肺癌细胞生长速度<sup>[19,20]</sup>;另外已有研究证实裸鼠体内毒毛花苷可通过加速凋亡和减缓肿瘤转移速度控制肝癌的发展,且比起正常细胞,肿瘤细胞更易受强心苷类药物影响<sup>[21]</sup>。基于抗癌作用的强心苷类药物研究已在进行临床实验研究<sup>[22]</sup>。综上所述,毒毛花苷作为抑制子宫内膜癌生长的临床用药具有前景。

### 参考文献(References)

- [1] Kvaskoff M, Mahamat-Saleh Y, Farland L V, et al. Endometriosis and cancer: a systematic review and meta-analysis [J]. Hum Reprod Update, 2021, 27(2): 393-420
- [2] Ruiz M P, Huang Y, Hou J Y, et al. All-cause mortality in young women with endometrial cancer receiving progesterone therapy [J].

- Am J Obstet Gynecol, 2017, 217(6): 669 e1- e13
- [3] Wei J, Zhang W, Feng L, et al. Comparison of fertility-sparing treatments in patients with early endometrial cancer and atypical complex hyperplasia: A meta-analysis and systematic review [J]. Medicine, 2017, 96(37): e8034
- [4] Muri J, Kopf M. Redox regulation of immunometabolism [J]. Nature reviews Immunology, 2021, 21(6): 363-81
- [5] Rojo De La Vega M, Chapman E, Zhang D D. NRF2 and the Hallmarks of Cancer[J]. Cancer Cell, 2018, 34(1): 21-43
- [6] Manandhar S, Lee S, Kwak M-K. Effect of stable inhibition of NRF2 on doxorubicin sensitivity in human ovarian carcinoma OV90 cells [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(5): 717-726
- [7] Matthews J H, Liang X, Paul V J, et al. A Complementary Chemical and Genomic Screening Approach for Druggable Targets in the Nrf2 Pathway and Small Molecule Inhibitors to Overcome Cancer Cell Drug Resistance[J]. ACS Chem Biol, 2018, 13(5): 1189-1199
- [8] Fan R, Wang Y, Wang Y, et al. Mechanism of progestin resistance in endometrial precancer/cancer through Nrf2-survivin pathway [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(3): 1483-1491
- [9] Wang Y, Wang Y, Zhang Z, et al. Mechanism of progestin resistance in endometrial precancer/cancer through Nrf2-AKR1C1 pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 10363-10372
- [10] Cai S J, Liu Y, Han S, et al. Brusatol, an NRF2 inhibitor for future cancer therapeutic[J]. Cell Biosci, 2019, 9: 45
- [11] Ren D, Villeneuve N F, Jiang T, et al. Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(4): 1433-8
- [12] Li W, Wang S, Qiu C, et al. Comprehensive bioinformatics analysis of acquired progesterone resistance in endometrial cancer cell line[J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 58
- [13] Ki S H, Cho I J, Choi D W, et al. Glucocorticoid receptor (GR)-associated SMRT binding to C/EBPbeta TAD and Nrf2 Neh4/5: role of SMRT recruited to GR in GSTA2 gene repression [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(10): 4150-4165
- [14] Limonciel A, Jennings P. A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity[J]. Toxins (Basel), 2014, 6(1): 371-379
- [15] Cavin C, Delatour T, Marin-Kuan M, et al. Reduction in antioxidant defenses may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity [J]. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 2007, 96(1): 30-39
- [16] Yao J, Zhao L, Zhao Q, et al. NF- $\kappa$ B and Nrf2 signaling pathways contribute to wogonin-mediated inhibition of inflammation-associated colorectal carcinogenesis[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1283
- [17] Qian C, Wang Y, Zhong Y, et al. Wogonin-enhanced reactive oxygen species-induced apoptosis and potentiated cytotoxic effects of chemotherapeutic agents by suppression Nrf2-mediated signaling in HepG2 cells[J]. Free Radic Res, 2014, 48(5): 607-621
- [18] Botelho A F M, Pierezan F, Soto-Blanco B, et al. A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential[J]. Toxicon, 2019, 158: 63-68
- [19] Rimpelová S, Zimmermann T, Drašar P B, et al. Steroid Glycosides Hyrcanoside and Deglucohyrcanoside: On Isolation, Structural Identification, and Anticancer Activity[J]. Foods, 2021, 10(1): 136
- [20] Schneider N F Z, Cerella C, Simões C M O, et al. Anticancer and Immunogenic Properties of Cardiac Glycosides[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2017, 22(11): 1932
- [21] Song Y, Lee S Y, Kim S, et al. Inhibitors of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase exhibit antitumor effects on multicellular tumor spheroids of hepatocellular carcinoma[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 5318
- [22] Yosifov D Y, Idler I, Bhattacharya N, et al. Oxidative stress as candidate therapeutic target to overcome microenvironmental protection of CLL[J]. Leukemia, 2020, 34(1): 115-27