

• 临床医学 •

文章编号: 1002-0217(2017) 05-0433-04

沙利度胺抑制卵巢癌细胞 SKOV-3 体外生长的研究

张玲¹ 高红亮² 吴超² 程倩² 虞乐² 李曙²

(1.皖南医学院第二附属医院 妇产科 安徽 芜湖 241000; 2.皖南医学院 病理生理学教研室 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 探讨沙利度胺对卵巢癌细胞株 SKOV-3 的增殖抑制以及凋亡的影响, 为后续临床治疗及基础研究提供依据。方法: 采用 MTT 法测定不同浓度沙利度胺作用于 SKOV-3 细胞株 24 h 后的吸光度, 测定其对 SKOV-3 的增殖抑制率, Tunel 染色法鉴定细胞凋亡, 流式细胞术检测细胞凋亡, Q-PCR 法检测 caspase3 mRNA 表达水平, Western Blot 法检测 caspase3 蛋白表达水平。结果: 沙利度胺的浓度从 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增加至 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对于 SKOV-3 的增殖抑制率从 6.22% 上升至 86%; 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 沙利度胺处理 SKOV-3 24 h 后, 流式细胞术检测其凋亡率上升为 52.66% 明显高于空白对照($P < 0.01$)。Tunel 法在荧光显微镜下观察, 沙利度胺组可见大片绿色荧光。同时, 沙利度胺处理后的 SKOV-3 的 caspase3 mRNA 及蛋白表达量与空白对照组相比也明显上升($P < 0.01$)。结论: 沙利度胺能够抑制卵巢癌细胞 SKOV-3 的增殖并且能够诱导其凋亡。

【关键词】沙利度胺; 卵巢癌细胞; 凋亡**【中图分类号】**R 737.31 **【文献标志码】**A**【DOI】**10.3969/j.issn.1002-0217.2017.05.007*In vitro* inhibiting the proliferation of human ovary cancer cell line SKOV-3 using thalidomide

ZHANG Ling, GAO Hongliang, WU Chao, CHENG Qian, YU Le, LI Shu

Department of Gynecology & Obstetrics, The Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241000, China

【Abstract】Objective: To investigate the effects of thalidomide on inhibiting proliferation and promoting apoptosis of human ovarian cancer cell line SKOV-3 for evidence in clinical use and fundamental research of this drug. **Methods:** MTT assay was performed to detect the absorbance value of different concentration of thalidomide acting on SKOV-3 24 h after administration for measurement of the inhibition rate. TTUNEL apoptosis detecting kit and flow cytometry were used to detect the cell apoptosis, and Q-PCR to detect the level of caspase-3 mRNA expression. Caspase-3 protein level was determined using Western blot. **Results:** MTT results showed that the inhibition rate rose up to 86% from 6.22% with thalidomide concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Apoptosis rate of SKOV-3 was up to 52.66% after thalidomide treatment by final concentration of 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which was significantly higher compared to the control group($P < 0.05$). Large areas of the green fluorescence were observed under fluorescent microscope, and the mRNA and protein levels of caspase-3 in SKOV-3 after thalidomide administration were significantly increased as compared with the blank control group($P < 0.01$). **Conclusion:** Thalidomide is able to inhibit the proliferation and promote apoptosis of ovarian cancer cell line SKOV-3.

【Key words】 thalidomide; ovarian cancer; cell apoptosis

卵巢癌作为一种恶性的生殖肿瘤, 已经成为发达国家妇女肿瘤致死率第五的疾病。在过去的 40 年, 对于卵巢癌的治愈率并没有显著的改善^[1]。目前的治疗手段主要以手术及化疗为主^[2-3]。沙利度胺是一种消旋体谷氨酸衍生物, 具有镇静、止吐作用, 起初用于治疗妊娠呕吐, 因严重致畸事件在 1961 年被禁用^[4-5]。目前, 欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA) 批准其适应证仅限于治疗多发性骨髓瘤, 中国 SFDA 所批准的适应证仅限于控制瘤型麻风反应症。但临床实践中沙利度胺的应用范围已远远超出了 FDA、EMA、SFDA 所批准

的适应证, 在如肾癌、恶性黑素瘤、胶质瘤、淋巴瘤、结直肠癌、肝癌、前列腺癌等实体瘤中的治疗中有一定效果^[6-7]。同时, 近年的研究发现, 沙利度胺具有调节免疫及抗血管生成等作用^[8]。这使得沙利度胺再次成为研究的热点。本研究希望通过分子生物学手段来观察沙利度胺对于卵巢癌细胞株 SKOV-3 增殖凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 人卵巢癌细胞 SKOV-3 购于中科院上海细胞库。沙利度胺购于常州制药厂, 为纯品原料

基金项目: 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(gxyqZD2016172); 大学生创新训练计划(201510368038; 201610368116)

收稿日期: 2017-06-02

作者简介: 张玲(1978-), 女, 主治医师(电话) 13855308893(电子信箱) 71926023@qq.com;

李曙, 男, 副教授(电子信箱) yxx2003@126.com, 通信作者。

药溶于二甲基亚砜(DMSO)后得终浓度为50mg/mL的溶液。四甲基偶氮唑蓝(MTT)试剂盒,TUNEL凋亡检测试剂盒购于碧云天生物有限公司。凋亡试剂盒购于美国Sigma公司。caspase3一抗购于CST公司,二抗购于碧云天生物有限公司。caspase3引物购于上海生工生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SKOV-3细胞株于含有10%小牛血清的RPMI-1640的培养基中贴壁培养,同时加入双抗(1%青霉素和链霉素),置于37℃、含5%CO₂的培养箱中培养。

1.2.2 增殖抑制率检测 采用MTT法检测不同浓度沙利度胺处理SKOV-3 24 h后的增殖抑制率。将处于对数生长期的SKOV-3细胞消化,种于96孔板中,保持细胞浓度5×10³/孔,培养24 h后,换液,加入沙利度胺终浓度分别为500 μg/mL、250 μg/mL、125 μg/mL、62 μg/mL、31 μg/mL的无血清培养基,每个浓度设3个副孔,培养24 h,加入MTT(5g/L)各20 μL,4 h后,吸出培养液,再在每孔加入DM-SO150 μL,避光轻微振荡5min,使结晶充分溶解,在酶标仪570 nm波长下测吸光度(C)值。细胞增殖抑制率(%)=(对照组C值-实验组C值)/对照组C值×100%。并计算出沙利度胺的IC₅₀。

1.2.3 流式细胞术检测凋亡率 运用Annexin V-FITC/PI双染检测沙利度胺作用于SKOV-3 24 h的凋亡率,沙利度胺作用SKOV-3,24 h后,PBS洗两遍,收集上清液离心,然后用0.25%不含EDTA的胰酶消化,制备单细胞悬液浓度1×10⁶个细胞/mL,离心2000 r/min,5min,PBS洗涤两次,收集细胞,用200 μL缓冲液重悬,分别加入5 μL FITC和10 μL PI,4℃避光孵育15min。用PBS将悬液补充至700 μL,上机检测。

1.2.4 Tunel检测细胞凋亡 采用一步法Tunel细胞凋亡试剂盒检测细胞凋亡,取用处于生长对数期的SKOV-3细胞,消化,种于6孔板中,贴壁培养24 h后,加入沙利度胺作用24 h后,按照试剂盒使用说明完成检测。

1.2.5 Q-pcr检测caspase3表达水平 用300 μg/mL沙利度胺作用处理SKOV-3 24 h,后用Trizol提取药物组与正常对照组细胞RNA。将RNA逆转录为cDNA,条件为:25℃ 10 min,50℃ 30 min,85℃ 5 min。以cDNA作为模板完成实时荧光定量PCR。基因的引物采用Primer5.0软件设计。caspase3的上游引物:5'-GCAAACCTCAGGGAAACATT-3';下游

引物:5'-ACCTGGACAACCTGGAC TTTT-3'。β-actin:的上游引物:5'-GATTACTGCTCTGGCTCCTAGC-3';下游引物:5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGC-3'。

1.2.6 Western blot检测caspase3蛋白表达水平 沙利度胺处理SKOV-3 24 h后,用含有蛋白酶抑制剂的RIPA 1640强裂解液来提取细胞总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度,并将蛋白于-80℃冰箱保存。运用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离所提蛋白,并将蛋白转移至PVDF膜上。用5%BSA封闭2 h后,孵以一抗,4℃摇床过夜。次日,TBST清洗3次,每次5 min。二抗孵育2 h。用冷CCD成像系统观察蛋白表达。结果运用Image J软件分析。

1.2.7 统计学分析 采用SPSS 18.0软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用F检验和q检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 沙利度胺处理后增殖抑制率的比较 通过计算得出沙利度胺的IC₅₀约为300 μg/mL。MTT实验结果显示:通过与空白组比较,沙利度胺处理后的SKOV-3的增殖能力减弱,并呈浓度依赖关系,其中200 μg/mL与500 μg/mL沙利度胺处理组与空白对照组比较差异具有统计学意义(P<0.01)。说明沙利度胺能够有效抑制SKOV-3的增殖,见表1。

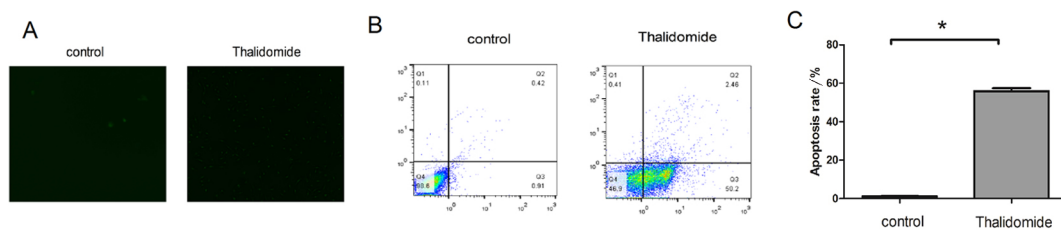
表1 沙利度胺不同浓度组细胞增殖抑制率的比较

组别	OD值($\bar{x} \pm s$)	抑制率/%
沙利度胺组		
500 μg/mL	0.1880±0.05544*	86
250 μg/mL	0.7882±0.11743*	42.5
125 μg/mL	1.1616±0.14238*	15.2
62 μg/mL	1.2696±0.11874	7.42
31 μg/mL	1.2860±1.17831	6.22
空白对照组	1.3714±0.08133	0.00
F	68.406	
P	<0.001	

* 为与空白对照组比较 P<0.05。

2.2 沙利度胺处理后对SKOV-3细胞凋亡的影响

采用一步法Tunel凋亡染色和流式细胞术检测沙利度胺处理后的SKOV-3的凋亡率。在荧光显微镜下观察,沙利度胺处理组在镜下可见大量绿色荧光,说明凋亡率增加(图1A)。结果显现沙利度胺处理24 h后的凋亡率可达到52.66%,高于空白对照组(图1B),差异具有统计学意义(P<0.01)。

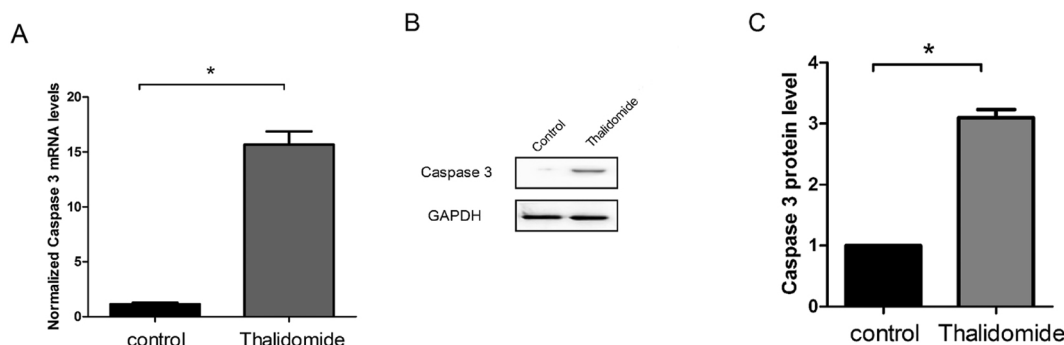


A.空白对照与沙利度胺处理组 TUNEL 法凋亡检测的比较; B、C.流式细胞术检测空白对照与沙利度胺处理组的凋亡率。* $P < 0.01$ vs control。

图1 沙利度胺处理后对 SKOV-3 细胞凋亡的影响

2.3 沙利度胺处理后 caspase3 表达水平的比较
采用 Q-PCR 法分析沙利度胺处理组与空白对照组之间 caspase3 mRNA 的表达水平,发现沙利度胺处理组的 SKOV-3 细胞的 caspase3 的表达水平要远远高于正常细胞(图 2A)。差异具有统计学意义($P <$

0.01)。沙利度胺处理组与空白对照组的 caspase3 表达量,通过 Western Blot 结果显示,沙利度胺处理组的 caspase3 的表达量明显高于空白对照组(图 2B、C)。差异具有统计学意义($P < 0.01$)。说明沙利度胺能够促进 SKOV-3 的凋亡。



A.沙利度胺处理组与空白对照组 caspase3 mRNA 表达水平的比较; B、C.沙利度胺处理组与空白对照组 caspase3 蛋白表达水平的比较。

* $P < 0.01$ vs control。

图2 沙利度胺处理后 caspase3 表达水平的比较

3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤之一,发病率位居所有生殖器官恶性肿瘤的第三位。早期卵巢癌无明显典型症状,发现时,基本已属晚期,对妇女的生命健康造成了巨大的威胁^[9-10]。沙利度胺最初作为镇静剂治疗妊娠呕吐,因有致畸作用(婴儿海豹肢)而被禁用。肿瘤患者多有免疫机能的异常,正常情况下肿瘤与宿主的免疫防御之间处于动态平衡。这种平衡遭到破坏,可使肿瘤处于优势地位而得以发生增殖、扩散和转移。研究显示,沙利度胺对淋巴细胞有调节作用,能诱导细胞毒 T 细胞的增殖,降低 CD4+ 和 CD8+ 细胞的比例,从而增加 IFN- γ 和 IL-2 的分泌,IFN- γ 和 IL-2 本身具有直接抗肿瘤的作用。此外,通过增强 NK 细胞活性还可以达到间接抗肿瘤的效果。另一方面,临床前和临床的证据显示,沙利度胺能够诱导 T 淋巴细胞分泌 IL-2 和 IFN- γ ,它们又会反馈刺激 T 细胞增殖,进而增强机体的抗肿瘤免疫作用^[11-13]。故我们希望通过了解沙利度胺在处理卵巢癌细胞 SKOV-3 后对其的增殖与凋亡的影响,从而为沙利度胺更好地用于临床抗肿瘤应用以及基础研究提供依据。在本研究

中我们发现,沙利度胺处理 SKOV-3 24 h 后,细胞的增殖抑制率随沙利度胺浓度的上升而上升,在沙利度胺的浓度达到 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,增殖抑制率即可达到 42%,说明沙利度胺对 SKOV-3 细胞的增殖具有一定的抑制作用。另外通过流式检测,发现经过沙利度胺处理后的 SKOV-3 的凋亡率与空白对照组比较明显上升。表明沙利度胺能够有效地诱导 SKOV-3 的凋亡。经典的凋亡途径分为两条,分别为胞外途径以及胞内途径,死亡受体与配体的结合最终导致死亡信号的传递,死亡受体的死亡结构域(death domain, DD)与信号传导分子结合,形成死亡诱导信号复合物,最终导致了 caspase3 及下游的 caspase 的活化。同时有大量研究表明,在多种细胞及各种因素的刺激下, caspase3 是凋亡的关键执行者。故我们通过 Western Blot 及 Q-PCR 检测 caspase3 在沙利度胺处理组中的表达情况。结果发现经过沙利度胺处理后的 SKOV-3, caspase3 的表达量明显升高,说明通过沙利度胺的处理,能有效地激活 caspase3,引起 SKOV-3 的凋亡。但是其中具体的分子机制尚不清楚,有待于后续研究证实。通过本实验,希望能够为以后沙利度胺更好地应用于临床提供研究基础。

(下转第 439 页)

路的活性,引发宫颈癌细胞的异常增殖,进而导致癌症的发生。而 Lgr5 与 Wnt3a 之间的关系则需进一步的实验进行论证。

综上所述,检测宫颈组织的 β -catenin、Wnt3a 和 Lgr5 有助于给我们提供宫颈癌早期诊断及治疗的思路,宫颈癌的 Wnt 信号通路研究仍处于早期阶段,本研究的数据仅表明了 β -catenin、Wnt3a 和 Lgr5 可能促进宫颈癌的发生发展,而对于这 3 个指标如何相互促进肿瘤发生发展的确切机制及分子基础尚未完全了解。因此,需要进一步的实验来探索 Wnt 信号通路中各介质与宫颈癌的关系。

【参考文献】

[1] JAZI MS, NAJAFI SM. Beta-catenin Forms Protein Aggregation at High Concentrations in HEK293T Cells [J]. Iran J Med Sci, 2017, 42(1) : 66-72.
 [2] 潘刘翊,姚敏,顾娟娟,等. Wnt 通路关键信号分子 Wnt3a 在肝细胞性肝癌组织中的表达及临床病理学特征 [J]. 南通大学学报(医学版), 2016, 36(4) : 249-252.
 [3] CARMOM KS, LIN Q, GONG X, et al. LGR5 Interacts and Cointernalizes with Wnt Receptors To Modulate Wnt/ β -catenin Signaling [J]. Molecular & Cellular Biology, 2012, 32(11) : 2054-2064.
 [4] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准 [J]. 中国癌症杂志, 1996, 6(4) : 229-231.
 [5] CUI N, YANG WT, ZHENG PS. Slug inhibits the proliferation and tumor formation of human cervical cancer cells by up-regulating the p21/p27 proteins and down-regulating the activity of the Wnt/ β -

catenin signaling pathway via the trans-suppression Akt1/p-Akt1 expression [J]. Oncotarget, 2016, 7(18) : 26152-26167.
 [6] SHIOHARA A, YOKOYAMA Y, WAN X, et al. Cytoplasmic/nuclear expression without mutation of exon 3 of the beta-catenin gene is frequent in the development of the neoplasm of the uterine cervix [J]. Gynecologic Oncology, 2001, 82(3) : 450.
 [7] QI L, SUN B, LIU Z, et al. Wnt3a expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and promotes colon cancer progression [J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2014, 33(1) : 107.
 [8] DENYSENKO T, ANNOVAZZI L, CASSONI P, et al. WNT/ β -catenin Signaling Pathway and Downstream Modulators in Low- and High-grade Glioma [J]. Cancer Genomics & Proteomics, 2016, 13(1) : 31.
 [9] BARKER N, VAN ES JH, JAKS V, et al. Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling Lgr5+ve stem cells [J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008, (73) : 351-356.
 [10] FUKUMA, MARIKO, EFFENDI, et al. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells [J]. Experimental Cell Research, 2013, 319(3) : 113-121.
 [11] WANG Z. Lgr5-Positive Cells are Cancer-Stem-Cell-Like Cells in Gastric Cancer [J]. Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology, 2014, 36(6) : 2447-2455.
 [12] MICHELOTTI G, JIANG X, SOSA JA, et al. LGR5 is associated with tumor aggressiveness in papillary thyroid cancer [J]. Oncotarget, 2015, 6(33) : 34549-34560.
 [13] SCHNEIKERT J, BEHRENS J. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development [J]. Gut, 2007, 56(3) : 417-425.

(上接第 435 页)

【参考文献】

[1] ROJAS V, HIRSHFIELD KM, GANESAN S, et al. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(12) : 2113.
 [2] BAX HJ, JOSEPHS DH, PELLIZZARI G, et al. Therapeutic targets and new directions for antibodies developed for ovarian cancer [C]//mAbs. Taylor & Francis, 2016, 8(8) : 1437-1455.
 [3] 刘云,杜成,刘文超. 卵巢癌治疗新进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(4) : 553-556.
 [4] BAUDITZ J. Effective treatment of gastrointestinal bleeding with thalidomide-Chances and limitations [J]. World journal of gastroenterology, 2016, 22(11) : 3158.
 [5] MELLIN GW, KATZENSTEIN M. The saga of thalidomide. Neuropathy to embryopathy, with case reports of congenital anomalies [J]. N Engl J Med, 1962, 267: 123.
 [6] ARAIH, FURUSUA, NISHINOT, et al. Thalidomide prevents the progression of peritoneal fibrosis in mice [J]. Acta Histochem Cytochem, 2011, 44(2) : 51-60.
 [7] RUAN J, MARTIN P, COLEMAN M, et al. Durable Responses with the Metronomic Regimen RT-PEPC in Elderly Patients with Recurrent Mantle Cell Lymphoma Cancer [J]. Cancer, 2010, 116

(11) : 2655-2664.
 [8] LI TH, HUANG CC, YANG YY, et al. Thalidomide Improves the Intestinal Mucosal Injury and Suppresses Mesenteric Angiogenesis and Vasodilatation by Down-Regulating Inflammation-Related Cascades in Cirrhotic Rats [J]. PloS one, 2016, 11(1) : e0147212.
 [9] HENNESSY BT, COLEMAN RL, MARKMAN M. Ovarian cancer [J]. The Lancet, 2009, 374(9698) : 1371-1382.
 [10] COPUR M S, GAUCHAN D, RAMAEKERS R, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary debulking surgery for stage IIIC ovarian cancer [J]. Journal of Clinical Oncology, 2016, 35(7) : 802-803.
 [11] QUACH H, RITCHIE D, STEWART AK, et al. Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma [J]. Leukemia, 2010, 24(1) : 22.
 [12] XU Y, SUN J, SHEARD MA, et al. Lenalidomide overcomes suppression of human natural killer cell anti-tumor functions by neuroblastoma microenvironment-associated IL-6 and TGF β 1 [J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2013, 62(10) : 1637-1648.
 [13] SIM GC, WU S, JIN L, et al. Defective STAT1 activation associated with impaired IFN- γ production in NK and T lymphocytes from metastatic melanoma patients treated with IL-2 [J]. Oncotarget, 2016, 7(24) : 36074.