

乳源免疫调节肽提高 DDP 对卵巢癌细胞的影响

周娟¹, 刘琛¹, 顾芳¹, 赵梦静¹, 杨雪¹, 王晶², 秦宜德¹

摘要 目的 观察体外实验中乳源免疫调节肽(PGPIP)与抗癌药物顺铂(DDP)联合用药对卵巢癌细胞增殖和迁移的影响。方法 MTS 检测 DDP 联合 PGPIP 对原代卵巢癌细胞增殖抑制情况,流式细胞术检测 DDP 联合 PGPIP 对原代卵巢癌细胞凋亡率和周期的影响,细胞划痕实验检测细胞迁移能力。结果 MTS 实验表明 PGPIP 联合 DDP 处理组对卵巢癌细胞抑制率显著高于单独用 DDP 组,差异有统计学意义($P < 0.05$),且呈剂量和时间依赖性。流式细胞术显示 PGPIP 可以协同 DDP 促进人原代卵巢癌细胞的凋亡,并使得肿瘤细胞停滞于 G0/G1 期。细胞划痕实验显示联合用药明显抑制细胞的运动能力,与单独用药差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 PGPIP 可以提高 DDP 对原代卵巢癌细胞的作用。

关键词 人原代卵巢癌细胞;联合用药;免疫调节肽;顺铂

中图分类号 R 73-351; R 595.479.1; R 979.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)10-1440-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.10.010

卵巢癌是死亡率最高的妇科恶性肿瘤,其发病率位于女性生殖道恶性肿瘤的前列^[1-2]。现有的治疗主要是手术和化疗两种方式,但化疗很容易出现耐药性,进而治疗效果逐渐降低,导致患者死亡率增高。如何增强卵巢癌对化疗药物的敏感性逐渐成为新的研究方向。乳源免疫调节肽(Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn, PGPIP)来源于牛乳 β -酪蛋白的 63~68 氨基酸残基上的六肽,是一种典型的免疫调节肽。细胞实验研究^[3-4]显示 PGPIP 可以抑制卵巢癌细胞 SKVO3 的侵袭和转移,并促进其凋亡。动物实验^[5-6]显示 PGPIP 具有提高机体免疫力、促进淋巴细胞转化、抗氧化等作用。该研究基于前期研究的基础上,通过 PGPIP 与 DDP 联合用药对卵巢癌细胞增殖和迁移的影响来观察 PGPIP 是否能改善

卵巢癌对 DDP 的耐药性,为临床提高化疗敏感性提供新的研究方向。

1 材料与方法

1.1 人卵巢癌组织 取自安徽医科大学第一附属医院妇产科手术室。

1.2 材料 纯度为 99.6% 的 PGPIP 由上海生工公司合成; McCoy's 5A Medium 培养基(美国 Sigma 公司);小牛血清(杭州四季青公司);顺铂(江苏诺欣药业公司); CellTiter96 AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS)(普洛麦格北京生物技术有限公司);PI 单染周期检测试剂盒(江苏碧云天公司); Annexin V/PI 双染凋亡试剂盒(上海贝博公司)。

1.3 方法

1.3.1 原代细胞培养 卵巢癌手术结束后尽快用预冷的含 10% 血清 DMEM 培养基运送至细胞房,用预冷无菌 PBS 缓慢冲洗癌组织块上的血细胞。无菌操作下将组织块用无菌眼科剪剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右,无菌操作下转移至无菌 50 ml 试管中,加入 1.5% 的胰蛋白酶,消化 40~50 min 后 800 r/min 离心 5 min,弃上清液。将消化结束后的组织块用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基吹打混匀后种于 6 孔板中放于 37 °C、5% CO₂ 温箱培养。48 h 后将未贴壁的组织用 PBS 冲洗去除,贴壁的细胞继续培养至汇合率为 70%~80%,传代后进行下一步实验。

1.3.2 免疫荧光法鉴定细胞 将灭菌后的盖玻片放在 6 孔板孔底部,将原代细胞种于 6 孔板中制成细胞爬片,放于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。弃去培养基, PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定细胞 20 min 后, PBS 洗 3 次,加入 0.7% 的 Triton-100 通透 10 min 后, PBS 洗 3 遍,10% 羊血清封闭 30 min, PBS 洗 3 遍后,加入一抗 CK7(1:200) 4 °C 过夜, PBS 洗 3 遍,加入荧光二抗(1:100) 37 °C 避光孵育 2 h,避光下 PBS 洗 3 遍,避光下 DAPI 染 10 min, PBS 洗 3 遍后将细胞爬片进行封片,立即在荧光显微镜下观察。

1.3.3 MTS 检测联合用药对人原代卵巢癌细胞增

2016-05-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81472448)

作者单位:¹安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院妇产科,合肥 230022

作者简介:周娟,女,硕士研究生;

秦宜德,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yideqin@ahmu.edu.cn

值的影响 原代细胞消化离心后制备成细胞悬液按照每孔1 500个细胞接种于96孔板中,培育过夜。分为5组加药:正常对照组、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-6} mg/ml PGPIP、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-4} mg/ml PGPIP、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-2} mg/ml PGPIP,每组复孔5个,分别培养24、48、72 h后,每孔加入20 μl MTS放于37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱继续孵育4 h。用酶标仪检测各孔的490 nm的吸光度(optical density, OD)值($\text{OD}_{490\text{ nm}}$),以正常对照组计算用药组的生长抑制率。计算公式为:抑制率(%) = $(1 - \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{正常对照组}}) \times 100\%$ 。

1.3.4 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 原代细胞消化离心计数后每孔 1×10^6 接种于6孔板中,培养至细胞完全汇合后,用200 μl 的移液器枪头在6孔板每孔中央的纵轴和横轴方向划一个十字线。用PBS洗2遍后分为5组加药:正常对照组(3%血清培养基)、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-6} mg/ml PGPIP、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-4} mg/ml PGPIP、8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-2} mg/ml PGPIP(药物均用3%血清培养基稀释)。在0、12、24、36 h分别于倒置显微镜下观察并拍照。用Quantity One软件对细胞的迁移距离进行测量,分别测3条线的宽度,取其平均值,计算迁移距离,其计算公式为:迁移距离(mm) = 0 h起始距离 - 各时间段的距离。

1.3.5 Annexin V/PI 双染检测细胞的凋亡 原代细胞消化离心计数后每孔 1×10^6 接种于6孔板中培养过夜,分为5组加药,分组同1.3.3。培养48 h后,用不含EDTA的胰酶消化细胞后用预冷的PBS洗涤2次。每管加入300 μl Binding Buffer和4 μl Annexin V-FITC悬浮细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15 min后加入7.5 μl PI 5 min后在流式细胞仪上进行检测,结果用FlowJo 7.6.1软件进行分析。

1.3.6 PI 单染检测细胞的周期原代细胞消化离心计数后每孔 1×10^6 接种于6孔板中培养过夜,分为5组加药,分组同1.3.3,用药48 h后收集细胞。冷PBS洗涤2次后用70%酒精4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。固定结束后用冷PBS洗涤2次,每管加入16 μl PI染色液、6 μl RNase A、300 μl 染色缓冲液,充分混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min后在流式细胞仪上进行检测,结果用MFLT.32软件进行分析。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用一般线性模型进行析因分析,用单因素方差分析组间差异。

2 结果

2.1 细胞鉴定 组织消化法培养原代卵巢癌细胞48 h,去除未贴壁的组织后,在倒置显微镜下的形态见图1A。将原代细胞制备成细胞爬片后,用特异性抗体CK7、有FITC的二抗鉴定细胞,细胞纯度通过DAPI染色所得细胞核为准来计算。在荧光显微镜下可见:由于卵巢癌细胞表达CK7可见绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光,见图1。原代组织培养所得的细胞为卵巢癌细胞,且纯度较高(96.8%)。

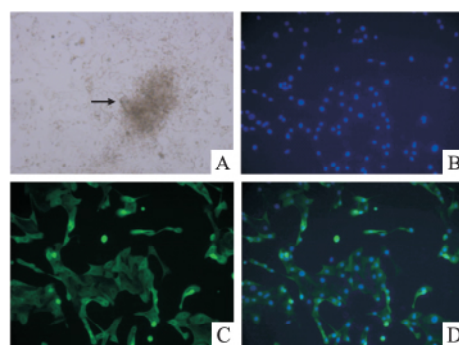


图1 原代细胞鉴定 $\times 100$

A: 组织消化法培养原代卵巢癌细胞(箭头所指为组织块); B: DAPI; C: FITC; D: B和C图叠加

2.2 联合用药对人原代卵巢癌细胞的增殖的影响

实验通过不同浓度的PGPIP与相同浓度的DDP共同作用于人原代卵巢癌细胞,结果显示细胞的生长抑制率随着PGPIP浓度的递增而逐渐增高($F = 203.84$),且随着时间的延长而增高($F = 4848.20$)。以不加药的正常对照组计算生长抑制率并绘制曲线图。联合用药组与DDP单独用药组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图2。

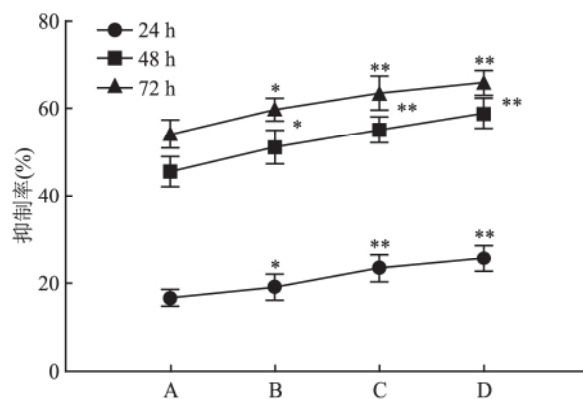


图2 MTS检测联合用药对人原代卵巢癌细胞的增殖影响

A: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP; B: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-6} mg/ml PGPIP; C: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-4} mg/ml PGPIP; D: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP + 10^{-2} mg/ml PGPIP; 与10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DDP组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

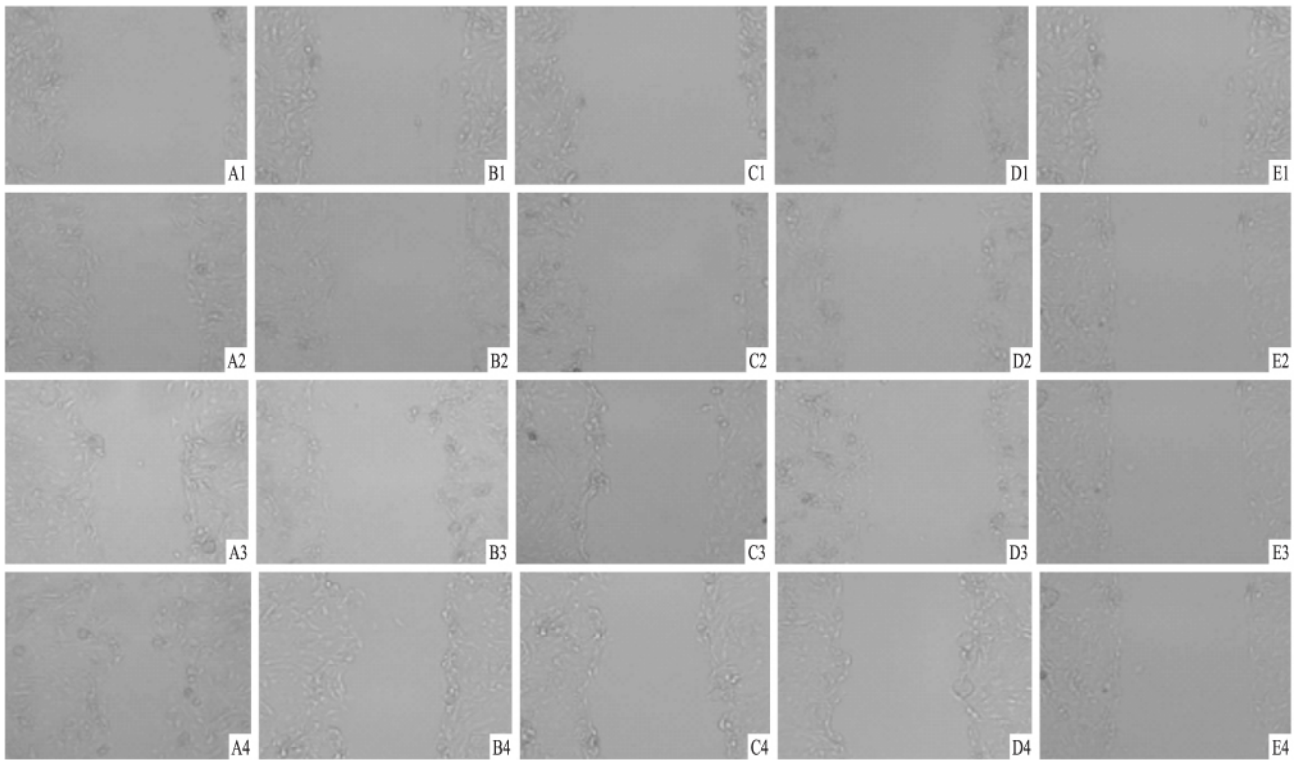


图3 不同浓度 PGPIP 联合的 DDP 对人原代卵巢癌细胞迁移的影响 ×100

A: 正常对照组; B: 8 μg/ml DDP; C: 8 μg/ml DDP + 10⁻⁶ mg/ml PGPIP; D: 8 μg/ml DDP + 10⁻⁴ mg/ml PGPIP; E: 8 μg/ml DDP + 10⁻² mg/ml PGPIP; 1: 0 h; 2: 12 h; 3: 24 h; 4: 36 h

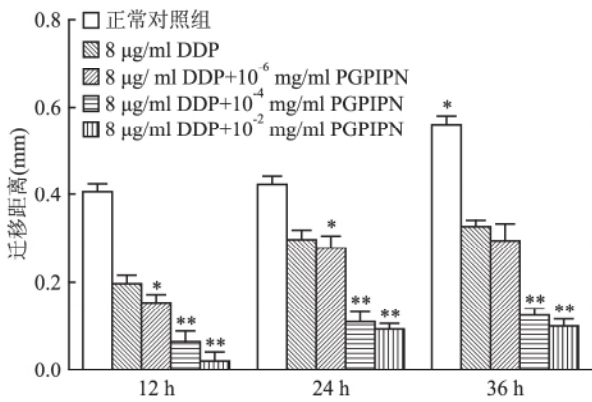


图4 人原代卵巢癌细胞迁移距离与 8 μg/ml DDP 组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

2.3 联合用药对细胞迁移的影响 不同浓度的 PGPIP 与相同浓度的 DDP 共同作用于人原代卵巢癌细胞,结果显示细胞的迁移距离随着 PGPIP 浓度的递增而逐渐减低(12 h: F = 13.35; 24 h: F = 11.64; 36 h: F = 15.30)。显微镜下结果见图 3。以 0 h 为起始距离计算迁移距离,与 8 μg/ml DDP 组比较差异有统计学意义 (P < 0.05),见图 4。结果表明,PGPIP 可以促进 DDP 抑制人原代卵巢癌细胞迁移。

2.4 联合用药对细胞凋亡的影响 实验通过不同浓度的 PGPIP 与相同浓度的 DDP 共同作用于人原代卵巢癌细胞,结果显示细胞的凋亡率随着 PGPIP 浓度的递增而逐渐增高 (F = 111.20),表明 PGPIP 有协同 DDP 的作用,可以促进原代卵巢癌细胞的凋亡,见图 5。

2.5 联合用药对细胞周期的影响 流式细胞术检测显示,与单独 DDP 组比较,联合用药组随着 PGPIP (10⁻⁶、10⁻⁴、10⁻² mg/ml) 的浓度增加,S 期逐渐下降,结果如下: 9.21%、5.56%、0,而 G1 和 G2 期逐渐增高。实验结果表明 PGPIP 与 DDP 联合使用主要是作用在 G0/G1 期。使得细胞停滞于 G0/G1 期,进而诱导细胞的凋亡并抑制增殖,见图 6。

3 讨论

现有主要治疗卵巢癌的化疗药物有顺铂、紫杉醇等,但由于卵巢癌耐药性的出现,使得顺铂的治疗效果降低,卵巢癌的死亡率也逐年递增。因此临床上急需一种新药物来降低卵巢癌对顺铂的耐药性,减少药物用量,降低患者死亡率。

前期研究^[6-7]表明,PGPIP 能显著促进腹腔巨噬细胞吞噬活性,刺激淋巴细胞转化等。实验^[8]表

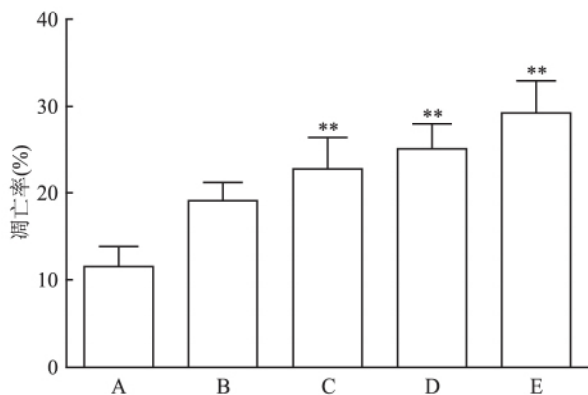
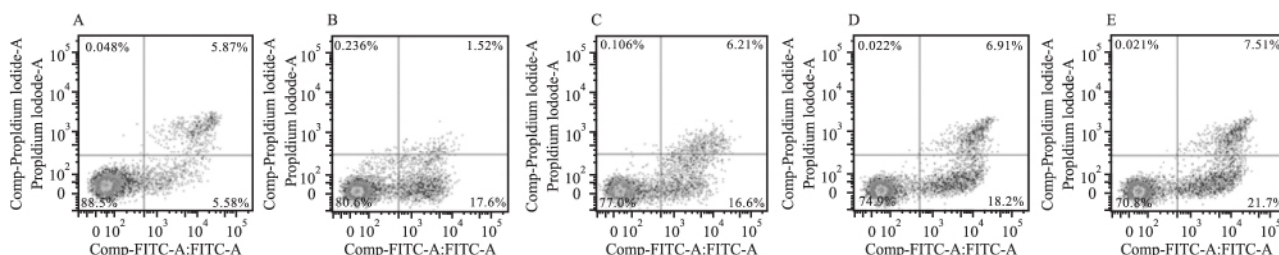


图5 不同浓度的 PGPIPn 联合 DDP 对人原代卵巢癌细胞凋亡的影响

A: 正常对照组; B: 10 µg/ml DDP; C: 10 µg/ml DDP + 10⁻⁶ mg/ml PGPIPn; D: 10 µg/ml DDP + 10⁻⁴ mg/ml PGPIPn; E: 10 µg/ml DDP + 10⁻² mg/ml PGPIPn; 与 10 µg/ml DDP 组比较: ** P < 0.01

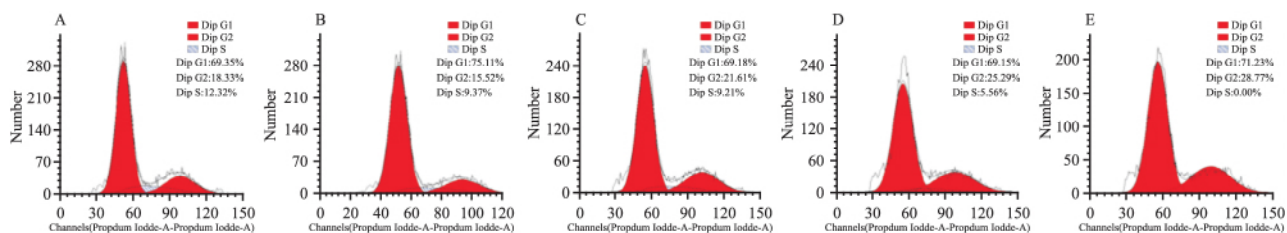


图6 不同浓度 PGPIPn 联合 DDP 对人原代卵巢癌周期的影响

A: 正常对照组; B: 10 µg/ml DDP; C: 10 µg/ml DDP + 10⁻⁶ mg/ml PGPIPn; D: 10 µg/ml DDP + 10⁻⁴ mg/ml PGPIPn; E: 10 µg/ml DDP + 10⁻² mg/ml PGPIPn

明 PGPIPn 也可通过下调 Bcl2 去诱导卵巢癌凋亡。研究^[3]表明 PGPIPn 不能抑制小鼠永生化纤维细胞 MEFS 以及正常人肝细胞 LO2 的生长。

本研究显示不同浓度的 PGPIPn 与相同浓度的 DDP 共同作用于人原代卵巢癌细胞后,增殖抑制作用比单独用药强且呈时间剂量依赖关系。细胞迁移能力也显著低于单独用药组。细胞的凋亡率随着 PGPIPn 浓度的递增而逐渐增高,表明 PGPIPn 有协同 DDP 的作用,可以促进人原代卵巢癌细胞的凋亡。实验结果表明,PGPIPn 可以增强顺铂对人原代卵巢癌细胞作用,增强卵巢癌对顺铂的敏感性。因此可以降低顺铂的用量,进而降低化疗药物的毒副作用。但具体相关机制还需进一步的研究,其机制可能与 STATs 有关。研究^[9-11]已证实 STAT3 与卵巢癌、骨髓瘤、乳腺癌以及其它癌细胞的增殖、侵袭和转移能力有关。研究^[12]显示 STAT3 通过影响 CyclinD1 的表达进而对细胞 G1 期进入 S 期产生影响。实验^[13]显示,阻断 STAT3 通路能诱导耐药肿

瘤细胞凋亡,其机制主要是通过 STAT3 影响 Caspase 家族成员的表达。

由于 PGPIPn 的低毒副作用并且来源广泛,因此其临床应用前景比较广阔,同时也为研发卵巢癌化疗辅助药物提供新的思路。

参考文献

- [1] 连利娟,林巧雅. 妇科肿瘤学[M]. 3版. 北京:北京人民卫生出版社,2002:405.
- [2] 糜若然,瞿全新. 妇科肿瘤基因诊断与治疗[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:304-5.
- [3] 魏彩,秦宜德,郑欣,等. 乳源免疫调节肽体外抑制人卵巢癌细胞侵袭和转移[J]. 中国药理学通报,2013,29(1):42-8.
- [4] 郑欣,何晓光,张文晓,等. 免疫调节肽对卵巢癌 SKVO3 细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 安徽医科大学学报,2013,48(7):758-62.
- [5] 顾芳,秦宜德,董华胜,等. 乳源免疫调节肽抗人卵巢癌的实验研究[J]. 实用妇产科杂志,2009,25(9):856-9.
- [6] 李素萍,秦宜德,董琼珠,等. 饲喂乳源免疫调节肽对大鼠生长

- 和免疫的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2005, 40(6): 499 - 501.
- [7] 董华胜, 秦宜德, 李素萍, 等. 乳源免疫调节肽具有促进体内外淋巴细胞转化的作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(1): 73 - 7.
- [8] Wang W, Gu F, Wei C, et al. PGPIP_N, a therapeutic hexapeptide, suppressed human ovarian cancer growth by targeting Bcl2 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60701.
- [9] Fofaria N M, Srivastava S K. STAT3 induces anoikis resistance, promotes cell invasion and metastatic potential in pancreatic cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(1): 142 - 50.
- [10] Lee H T, Xue J, Chou P C, et al. Stat3 orchestrates interaction between endothelial and tumor cells and inhibition of Stat3 suppresses brain metastasis of breast cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(12): 10016 - 29.
- [11] Bonastre E, Verdura S, Zondervan I, et al. PARD3 inactivation in lung squamous cell carcinomas impairs STAT3 and promotes malignant invasion [J]. *Cancer Res* 2015, 75(7): 1287 - 97.
- [12] Fletcher S, Drewry J A, Shahani V M, et al. Molecular disruption of oncogenic signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protein [J]. *Biochem Cell Biol*, 2009, 87(6): 825 - 33.
- [13] 王天晓, 刘迎滑, 时小燕, 等. 冬凌草甲素下调 STAT3-HK II 通路诱导 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 397 - 402.

Immunomodulating Peptide enhance the effect of DDP on ovarian cancer cells

Zhou Juan, Liu Chen, Gu Fang, et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the concomitant therapy effect of immunomodulating peptide (PGPIP_N) and anti-cancer drug cisplatin (DDP) on the proliferation and migration of ovarian cancer cells *in vitro*. **Methods** The inhibitory action of DDP with PGPIP_N on the proliferation of primary ovarian cancer cells were detected by MTS. Apoptotic ratios and cell cycle of primary ovarian cancer cells were measured by flow cytometry. Cell scratch assays were carried out to test cells' migration. **Results** The result of MTS showed that the inhibition rate of the concomitant group against ovarian cancer cells was significantly higher than the group treated only with DDP. The difference was significant ($P < 0.05$) and in a dose and time dependent manner. Flow cytometry results showed that PGPIP_N could promote the apoptosis of human primary ovarian cancer cells by DDP, and the cycle of cells was arrested in G₀/G₁ phase. Cell scratch assays showed that concomitant therapy significantly inhibited cell movement, of which the difference from the group treated only with DDP of statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** PGPIP_N can improve the effect of DDP on primary ovarian cancer cells.

Key words human primary ovarian cancer cells; drug combination; PGPIP_N; DDP

(上接第 1439 页)

cDNA clone plasmids (pLX304-*glipr1*) were used as template to amplify the *glipr1* (M) fragment by PCR. The fragment was cloned into the pET-15b vector and expressed in *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3). The GLIPR1 (M) protein was purified by Ni affinity chromatography and was used as antigen to prepare polyclonal antibody. Western blot analysis was used to check the specificity of the antibody and detect the expression of GLIPR1 in A549, PC14, LNCaP, PC3 and U87 cells. **Results** Expression vector pET-15b-*glipr1* (M) was successfully constructed, and the purified GLIPR1 (M) protein was obtained, the polyclonal anti-GLIPR1 antibody was successfully prepared and could be used to check the expression of GLIPR1 in cancer cell lines. GLIPR1 was highly expressed in U87 cells. **Conclusion** The GLIPR1 (M) protein and the polyclonal anti-GLIPR1 antibody are successfully prepared, which lays the foundation for the research of GLIPR1 function mechanism.

Key words GLIPR1; protein expression; polyclonal antibody