论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1728-04

诺帝对人卵巢癌细胞3AO和SKOV3增殖、周期及Aurora-A表达的影响

贾世军[1],赵 涌[1],卞修武[2] ([1]重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016;[2]第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨抗肿瘤新药诺帝(Nordy)在体外对卵巢癌细胞(3AO黏液性癌,SKOV3浆液性癌)生长的抑制作用及对细胞周期的影响,同时对卵巢癌细胞株中Aurora-A的mRNA和蛋白过表达的抑制作用进行研究。**方法** MTT法检测诺帝对细胞增殖的抑制作用;RT-PCR和Western blot检测Aurora-A的mRNA和蛋白表达情况;流式细胞术分析细胞周期。**结果** 经诺帝作用后Aurora-A的mRNA及蛋白的表达水平显著下降($P<0.01$);诺帝能明显抑制3AO、SKOV3细胞的增殖,阻滞细胞周期于G_0/G_1期($P<0.05$)。**结论** 诺帝对卵巢癌3AO、SKOV3细胞的生长具有明显抑制作用,可以阻滞细胞周期。在诺帝多环节的抑癌机制中,抑制癌细胞株Aurora-A的异常高表达,阻止中心体的异常转变可能是其机制之一。

关键词: 诺帝;卵巢癌;细胞周期;Aurora-A
中图法分类号: R73-354;R737.31;R979.1 **文献标识码:** A

Effects of Nordy on proliferation, cell cycle and Aurora-A expression in human ovarian cancer cell lines 3AO and SKOV3

JIA Shi-jun[1], ZHAO Yong[1], BIAN Xiu-wu[2] ([1]Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Nordy on the proliferation, cell cycle, and the mRNA and protein expressions of Aurora-A in human ovarian cancer cell lines 3AO and SKOV3. **Methods** After being treated with Nordy at the doses of 25, 50 or 100 μmol/L, the proliferation of 3AO and SKOV3 cells were tested with MTT assay; The expression of Aurora-A was detected by RT-PCR and Western blotting; The effect on cell cycle were analyzed by flow cytometry (FCM). **Results** Treated with Nordy, the mRNA and protein level of Aurora-A gene were significantly reduced ($P<0.01$). Nordy inhibited the proliferation of 3AO and SKOV3 cells significantly, and arrested the cell cycle at G_0/G_1 phase ($P<0.05$). **Conclusion** Nordy significantly inhibits the proliferation and blocks cell cycle of 3AO and SKOV3 cells. One of the underlying mechanisms may be through decreasing the expression of Aurora-A at mRNA and protein levels and preventing abnormal division of centrosome.

Key words: Nordy; ovarian cancer; cell cycle; Aurora-A

诺帝(Nordy)是由第三军医大学人工改良合成的新型去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)化合物,相对分子质量为308[1]。NDGA是从常青灌木中提取的一种天然成分。近年来的研究发现其有多种生物学功能,尤其是其抗肿瘤作用。在体外NDGA可以抑制乳腺癌、大肠癌、肾癌、前列腺癌及胶质瘤的发生、发展[2-4]。

Aurora-A基因的表达产物Aurora-A激酶是一种具有调节中心体、微管功能的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其过表达可引起有丝分裂的错误,使正常细胞恶变[5-7]。Aurora-A已被报道在乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、食管癌、神经母细胞瘤、肾癌、胃癌、胰腺癌和黑色素瘤细胞株中高表达[8]。本实验以人卵巢癌细胞(3AO、SKOV3)为对象,探讨诺帝对2株癌细胞中Aurora-A

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划,2002AA001010)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2002AA001010)
作者简介: 贾世军,男,河南省安阳市人,硕士,医师,主要从事妇科肿瘤病理方面的研究。E-mail: 57694967@qq.com
通信作者: 赵 涌,E-mail: blys01@163.com
收稿日期: 2008-12-29;**修回日期:** 2009-05-19

激酶的 mRNA 和蛋白表达的影响机制,以及对细胞增殖及细胞周期的影响。

1　材料与方法

1.1　细胞株、主要药物及试剂

卵巢癌 3AO(黏液性)、SKOV3(浆液性)细胞株,均由重庆医科大学病理生理学教研室提供。诺帝由第三军医大学西南医院病理学研究所自行合成(已获得国家专利)。四甲基偶氮唑蓝(MTT)及二甲亚砜(DMSO)(Sigma 公司),RPMI1640 培养基(Gibco 公司),小牛血清(杭州四季青生物材料研究所),Biozol 总 RNA 提取液(BioFlux 公司),RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司),PRO-PREP 蛋白提取液(北京赛百盛基因技术有限公司),ARK-1(N-20)多克隆抗体(Santa Cruz 公司),β-actin 抗体、辣根过氧化物酶标记的 IgG(购自北京中杉金桥生物技术有限公司),蛋白发光检测试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。

1.2　细胞培养及实验分组

卵巢癌 3AO、SKOV3 细胞株在含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,37 ℃、5% CO_2 混合气体的孵箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。诺帝以 PBS 配制成 1 mmol/L 储存液 −20 ℃避光保存,实验组使用终浓度分别为 25、50、100 μmol/L,对照组加等体积 PBS。

1.3　MTT 法测定细胞生长曲线

将 3AO、SKOV3 细胞制成单细胞悬液,每孔 3×10^4 接种于 96 孔板,实验组加入诺帝,使其终浓度达到上述各浓度,设 PBS 和 RPMI1640 液对照组。培养 24、48、72、96 h 后,加入 MTT,用自动酶标读数仪(Bio-Tek ELX800UV)测定 490 nm 处光密度值[D(490)],计算抑制率[抑制率(%) = (1 − 实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值) ×100%]。并绘制生长曲线图。

1.4　RT-PCR 检测 3AO、SKOV3 卵巢癌细胞株 Aurora-A mRNA 表达

收集对照组及加药处理 72 h 实验组卵巢癌细胞。提取细胞总 RNA,逆转录,PCR 扩增,琼脂凝胶电泳鉴定。紫外线灯下观察、照相。凝胶电泳图像输入 Quantity One 凝胶分析系统,应用 ID Image Analysis Software 进行表达强度半定量分析,并作统计学分析。

1.5　Western blot 检测 SKOV3、3AO 卵巢癌细胞株 Aurora-A 蛋白表达

收集对照组及加药处理 72 h 实验组卵巢癌细胞,加入蛋白裂解液,获取蛋白样品,进行 SDS-PAGE 电泳,再将蛋白质电转移到 PVDF 膜上,孵育一抗、二抗。洗膜后,用蛋白发光试剂检测,应用 Quantity One 4.6.5 图形扫描分析软件,作半定量及统计学分析。

1.6　流式细胞术测定细胞周期

将 3AO、SKOV3 细胞按 5×10^4/ml 密度接种于 100 ml 培养瓶中,实验组加入诺帝,使其终浓度达到上述各浓度,设对照组;培养 48 h 收集细胞,制备单细胞悬液。流式细胞仪(FCM,美国 FACScan 公司)进行细胞周期分析。

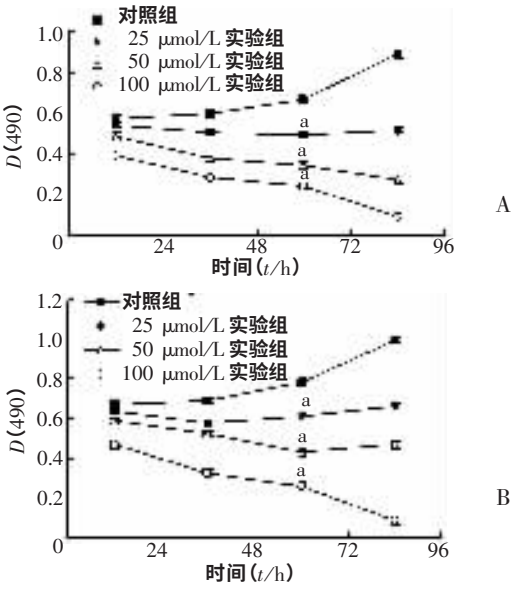
1.7　统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件,多组之间比较采用方差分析,组间比较采用 SNK-q 检验。

2　结果

2.1　诺帝对 3AO 和 SKOV3 细胞的增殖抑制作用

通过 MTT 法可以观察到,对照组细胞生长活跃,经 25、50、100 μmol/L 诺帝处理后,在 24、48、72、96 h 对 3AO 和 SKOV3 细胞生长均有抑制作用,细胞生长均不同程度地减慢,并呈时间、剂量依赖性。经各浓度诺帝作用 72 h 后,3AO 和 SKOV3 细胞生长抑制率分别在 26.55% ~63.68% 和 22.15% ~66.67% 之间。72 h 各浓度实验组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



A:3AO 细胞生长曲线; B:SKOV3 细胞生长曲线

a: $P<0.05$,与对照组比较

图 1　不同浓度诺帝对卵巢癌 3AO、SKOV3 细胞生长的抑制作用

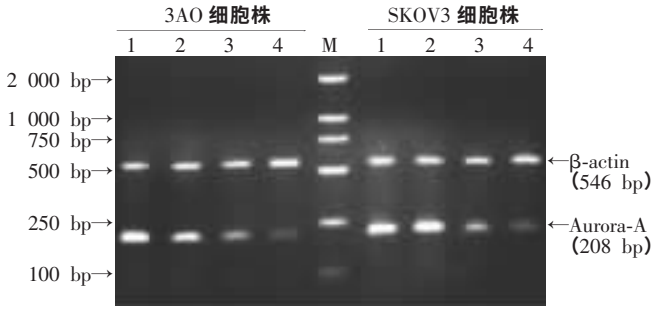
2.2　诺帝对卵巢癌细胞株 Aurora-A mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示,经 25、50、100 μmol/L 诺帝处理 72 h 后,3AO 及 SKOV3 细胞 Aurora-A 的 mRNA 表达呈药物浓度依赖关系(图 2)。2 株细胞各组比较差异均有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,经 25 μmol/L 诺帝处理后其表达差异无统计学意义($P>0.05$);经 50、100 μmol/L 诺帝处理后其表达差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.3　诺帝对 Aurora-A 蛋白表达的影响

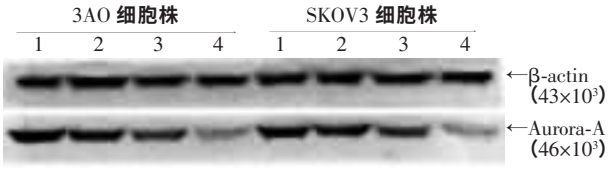
采用 Quantity One 4.6.5 图形扫描分析软件对蛋白条带进行灰度扫描。经诺帝处理 72 h 后,3AO、SKOV3 细胞的 Aurora-A 蛋白表达明显减少,且呈药物浓度依赖关系(图 3)。2 株细胞各药物处理实验组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,3AO 细胞经 25 μmol/L 诺帝处理后 Aurora-A 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),而经 50、100 μmol/L 诺帝处

理后 Aurora-A 蛋白表达差异有统计学意义($P<0.01$)。与对照组比较,SKOV3 细胞经 3 种浓度诺帝处理后,Aurora-A 蛋白表达差异均有统计学意义($P<0.01$)。



M: DNA 标准(DL 2000); 1-4:分别为对照组,25、50、100 μmol/L 诺帝处理实验组

图 2 不同浓度诺帝作用 72 h 对 3AO 及 SKOV3 细胞 Aurora-A mRNA 表达的影响



1-4:分别为对照组,25、50、100 μmol/L 诺帝处理实验组

图 3 不同浓度诺帝作用 72 h 对 3AO 及 SKOV3 细胞 Aurora-A 蛋白表达的影响

2.4 诺帝对 3AO 和 SKOV3 细胞周期的影响

不同浓度诺帝处理 3AO 和 SKOV3 细胞 72 h 后,流式细胞仪检测 2 种细胞周期分布情况(表 1、2)。与对照组相比,实验组 G_0/G_1 期细胞数明显增加,呈浓度依赖性($P<0.05$)。S 期细胞数明显减少($P<0.05$),G_2/M 期变化不大($P>0.05$)。细胞被阻滞在 G_0/G_1 期。

表 1 不同浓度诺帝对 3AO 细胞周期的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	81.36±0.38	12.65±0.36	5.99±0.47
实验组			
25 μmol/L	82.40±0.62[a]	11.36±0.19[a]	6.25±0.65
50 μmol/L	84.79±0.79[b]	9.43±0.83[b]	5.78±0.47
100 μmol/L	86.96±0.31[c]	6.79±0.38[c]	6.25±0.47

a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与 25 μmol/L 实验组比较; c: $P<0.05$,与 50 μmol/L 实验组比较

表 2 不同浓度诺帝对 SKOV3 细胞周期的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	73.07±0.45	18.33±0.34	8.60±0.29
实验组			
25 μmol/L	73.65±0.48[a]	17.67±0.26[a]	8.68±0.68
50 μmol/L	76.59±0.45[b]	14.55±0.42[b]	8.86±0.21
100 μmol/L	79.15±0.13[c]	11.73±0.58[c]	9.37±0.12

a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与 25 μmol/L 实验组比较; c: $P<0.05$,与 50 μmol/L 实验组比较

3 讨论

卵巢癌已成为我国目前恶性肿瘤中导致女性死亡的首要原因,因此探索卵巢癌新的治疗药物及新的肿瘤标记物和治疗靶点,是目前卵巢癌治疗的研究热点。有研究发现,大多数不同组织类型的原发性上皮性卵巢癌细胞中 Aurora-A 呈现出异常高表达[9],提示其过表达在卵巢癌的发病中可能起了重要作用。

Aurora-A 激酶作为丝氨酸/苏氨酸激酶家族成员之一,是一种与中心体的复制、分离、成熟密切相关的基因,其过表达将导致中心体过度复制,中心体复制或分裂异常形成单级或多级纺锤体,从而引起染色体分离异常,形成异倍体。王苏荣等[9]研究发现,异倍体可以引起抑癌基因的缺失或癌基因的获得或激活,从而引起细胞恶性转化,促进肿瘤的发生。已有许多实验研究表明,Aurora-A 异常表达与恶性肿瘤异倍体之间有明显的相关性。同时,牛春波等[10]发现,细胞内高水平的 Aurora-A 蛋白还能不断促进肿瘤细胞越过 G_2/M 期有丝分裂检测点,出现肿瘤生长失控。伍钢等[11]利用反义寡核苷酸(antisense oligodeoxyneucleotides, ASODN)特异性抑制 Aurora-A 的表达后,发现可以恢复细胞 G_2/M 期检查点的功能,抑制细胞的增殖。由此可以看出抑制 Aurora-A 的表达,将是治疗肿瘤的一个重要途径。

去甲二氢愈创木酸作为抗肿瘤药物,其作用机制广泛。不仅可以通过抑制花生四烯酸的脂氧合酶代谢途径,抑制细胞增殖或诱导细胞凋亡[12],还可以通过改变甲基转移酶的活性等影响细胞基因的甲基化模式,诱导肿瘤细胞分化[13,14],以及作用于细胞周期蛋白,使细胞增殖指数下降,抑制肿瘤细胞的生长增殖[15]。而诺帝作为人工合成改良的 NDGA 化合物,与其天然成分相比,具有高效低毒等特点。通过我们之前的研究,发现诺帝同样可以抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡和分化[16],并且其作用于肿瘤细胞的位点和机制是多种多样的。本实验应用 MTT、FCM、RT-PCR 及 Western blot 等方法,对不同药物浓度的诺帝处理后的 2 株卵巢癌细胞中 Aurora-A 表达的改变进行研究。实验结果显示,经过诺帝处理后的卵巢癌细胞,除低浓度实验组外,与对照组相比,癌细胞中 Aurora-A 的mRNA 和蛋白的表达均不同程度的降低,且差异具有统计学意义($P<0.01$),表明诺帝可以明显抑制细胞中 Aurora-A的 mRNA 和蛋白的异常高表达。经统计学分析检验,其作用效果均与药物浓度呈正相关。结合诺

帝对细胞生长的抑制作用,可以推测降低 Aurora-A 激酶的过表达,很可能是诺帝抑制这 2 株卵巢癌细胞生长的多环节机制之一。

同时 NDGA 作用于癌细胞的另一个机制就是通过促进 P16 蛋白的表达,抑制 CDK4 和 Cyclin D1 蛋白表达,进而降低 CDK4 蛋白激酶活性,使细胞周期阻滞于 G_0/G_1期,达到抑制细胞增殖的目的[15]。我们通过 FCM 检测发现,诺帝可以影响这 2 组卵巢癌细胞的周期,使其明显阻滞于 G_0/G_1期。由于经过诺帝作用后,细胞绝大多数被阻滞于 G_0/G_1期,因而进入下一时相——G_2期的细胞数明显减少,使得通过诺帝对 Aurora-A 表达的抑制以阻滞癌细胞于 G_2/M 期的这条途径并不显著。已有实验证实,利用反义寡核苷酸技术,特异性抑制肺癌细胞中Aurora-A 的表达,可以有效激活 G_2/M 期检测点,进而阻止细胞进入有丝分裂期[12]。由此可以推断,诺帝对细胞周期的影响并不只是单纯作用于 G_0/G_1期,越过 G_0/G_1期细胞将会因为诺帝对 Aurora-A 表达的抑制而进一步被阻滞在 G_2/M 期,从而加强了对细胞增殖的抑制作用,只不过诺帝对 G_2/M 期检测点的激活作用,因前一个细胞周期检测点激活而显得并不突出。

癌细胞内高表达的 Aurora-A 可以导致细胞发生中心体异常,形成单极或多极纺锤体,引起染色体分离异常,形成异倍体[17-20],进而激活了癌基因,抑制抑癌基因。在有丝分裂增殖过程中,Aurora-A 的异常高表达又不断促进基因组损伤的细胞越过有丝分裂的检测点,使之进入新的细胞周期而不断增殖,生长失控。诺帝作为一种有多个作用机制的抗肿瘤新药,对 Aurora-A 激酶的影响通过本次实验首次得到验证,虽然诺帝作用于 Aurora-A 激酶的通路亟待阐明,但是我们相信随着对诺帝以及 Aurora 激酶家族研究的不断深入,其有望成为诺帝治疗肿瘤方面具有重大的意义及应用前景的新的靶点。

参考文献:

[1] Xia Y M, Cao X P, Peng K, *et al*. An efficient synthetic method of Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)[J]. Chin Chem Lett, 2003, 14(4): 359-360.

[2] 夏光涛, 张源潮, 武森森, 等. 脂氧合酶抑制剂 NDGA 对 HT-29 结肠癌细胞诱导凋亡的研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2006, 9(1): 27-29.

[3] Matsuyama M, Yoshimura R, Mitsuhashi M, *et al*. 5-Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human renal cell carcinoma and induce apoptosis through arachidonic acid pathway[J]. Oncol Rep, 2005, 14(1): 73-79.

[4] Tong W G, Ding X Z, Adrian T E. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 296(4): 942-948.

[5] Kamada K, Yamada Y, Hirao T, *et al*. Amplification/overexpression of Aurora-A in human gastric carcinoma: potential role in differentiated type gastric carcinogenesis[J]. Oncol Rep, 2004, 12(3): 593-599.

[6] Okamura H, Katabuchi H. Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian carcinogenesis[J]. Int Rev Cytol, 2005, 242: 1-54.

[7] Yakushijin Y, Hamada M, Yasukawa M. The expression of the Aurora-A gene and its significance with tumorgenesis in non-Hodgkin's lymphoma[J]. Leuk Lymphoma, 2004, 45(9): 1741-1746.

[8] Jeng Y M, Peng S Y, Lin C Y, *et al*. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6): 2065-2071.

[9] 王苏荣, 刘国红, 王　波. Aurora A 在原发性上皮性卵巢癌组织中的表达[J]. 基础医学与临床, 2006, 26(4): 435-436.

[10] 牛春波, 贾飞勇, 岳　英, 等. Aurora-A 基因在卵巢癌组织中的表达及其临床病理意义[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2008, 34(4): 653-656.

[11] 伍　钢, 孟　睿, 答邦明, 等. Aurora A 反义寡核苷酸对人肺癌细胞系 A549 细胞生长与细胞周期的影响[J]. 临床肿瘤学杂志, 2007, 12(6): 407-412, 416.

[12] 未德成, 王忠荣, 张燕敏, 等. 脂氧合酶抑制剂 NDGA 对人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞生物学特性的影响[J]. 临床小儿外科杂志, 2008, 7(1): 7-9.

[13] 卢佳友, 卞修武, 赵　雯, 等. NDGA 诱导人胶质瘤细胞株分化过程中基因组甲基化及甲基转移酶的变化及意义[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(4): 283-286.

[14] 赵　敬, 赵　涌, 卞修武. 诺帝对 HPV16 型亚基因永生化人宫颈上皮细胞的诱导分化作用[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(1): 43-46.

[15] 郭德玉, 陈意生, 卞修武, 等. 去甲二氢愈创木酸对恶性胶质瘤细胞周期的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2000, 27(1): 1-3.

[16] 陈　炜, 赵　涌, 赵　敬, 等. 诺帝对 HPV 16 亚基因永生化人宫颈上皮细胞增殖、凋亡和分化的影响[J]. 肿瘤, 2008, 28(1): 13-16.

[17] Lo Y L, Yu J C, Chen S T, *et al*. Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the mitosis-regulating gene Aurora-A/STK15/BTAK[J]. Int J Cancer, 2005, 115(2): 276-283.

[18] Ke Y M, Dou Z, Zhang J, *et al*. Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division[J]. Cell Res, 2003, 13(2): 69-81.

[19] Fraizer G C, Diaz M F, Lee I L, *et al*. Aurora-A/STK15/BTAK enhances chromosomal instability in bladder cancer cells[J]. Int J Oncol, 2004, 25(6): 1631-1639.

[20] 李留霞, 赵艳萍, 文建国, 等. 卵巢上皮性癌组织中水通道蛋白 3 的表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2008, 43(2): 329-332.

(编辑　汪勤俭)