论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2124-04

葡萄籽原花青素对人卵巢癌耐药细胞 COC1/DDP 在体外的增殖抑制作用

胡琴琴,钟 玲,徐 蕾,蒋兴伟,池余刚 (重庆医科大学第二附属医院妇产科,重庆 400010)

摘 要:目的 观察葡萄籽来源的原花青素(grape seed proanthocyanidin extract, GSPE)对人卵巢癌耐药细胞 COC1/DDP 在体外的增殖抑制作用,并初步探讨其作用机制。**方法** 以 MTT 法检测不同浓度的 GSPE(0、20、40、80、160、320 μg/ml)不同时间(12、24、36、48、72 h)对 COC1/DDP 的增殖抑制作用,HE 染色观察细胞形态变化,流式细胞仪和 TUNEL 检测细胞周期和凋亡,Western blot 检测细胞内 Caspase-3 蛋白的表达。**结果** GSPE 对 COC1/DDP 具有明显的增殖抑制作用,且呈剂量-时间依赖性,不同浓度 GSPE 能引起细胞形态明显的凋亡改变。流式细胞术和 TUNEL 表明 GSPE 可以诱导细胞凋亡,且随着药物浓度增加,凋亡率升高。Western blot 检测显示随着药物浓度增加,Caspase-3 蛋白表达增加。**结论** 原花青素可以在体外抑制人卵巢癌耐药细胞 COC1/DDP 的增殖并诱导其凋亡,其机制可能与上调 Caspase-3 蛋白表达有关。

关键词: 原花青素;卵巢癌;耐药;凋亡;COC1/DDP

中图法分类号: R282.71; R73-361; R737.31 **文献标识码:** A

Grape seed proanthocyanidin extract inhibits proliferation of cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line COC1/DDP

HU Qin-qin, ZHONG Ling, XU Lei, JIANG Xing-wei, CHI Yu-gang (Department of Gynaecology and Obstertrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) on the proliferation and apoptosis of cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line COC1/DDP and explore the implying molecular mechanism. **Methods** COC1/DDP cells were cultured in the presence of GSPE (at 0, 20, 40, 80, 160 or 320 μg/ml) for 12, 24, 36, 48 or 72 h of culture. The morphological changes of COC1/DDP were observed with HE staining, and the proliferation was measured by MTT assay and cell apoptosis by flow cytometry and TUNEL. Western blot analysis were performed to detect the protein expression of Caspase-3. **Results** GSPE inhibited the growth of COC1/DDP cells in a concentration- and time-dependent manner. Flow cytometry analysis and TUNEL showed that GSPE induced apoptosis of COC1/DDP cells and the percentage of apoptotic cells was increased with the concentration of GSPE administered and also the elongation of treatment time. The expression of caspase-3 was upregulated in the course of COC1/DDP cell apoptosis when treated with GSPE. **Conclusion** GSPE inhibits the proliferation and induces cell apoptosis in the human ovarian cancer cell lines COC1/DDP, probably through upregulating caspase-3 expression.

Key words: proanthocyanidins; ovary cancers; drug resistance; COC1/DDP cells

近年来,葡萄籽来源的原花青素(grape seed proanthocyanidin extract,GSPE)的抗肿瘤活性已有大量的研究,发现 GSPE 在体外对卵巢癌 SKOV3 细胞有增殖抑制作用[1,2],但对卵巢癌耐药细胞株是否有作用目前尚少报道。本研究通过体外实验将 GSPE 与卵巢癌顺铂耐药细胞(COC1/DDP)共同培养,观察其作用,并初步探讨其作用机制,为耐药性卵巢癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

葡萄籽提取物购于天津市尖峰天然产物研究开发有限公司(用双蒸水配成 20 mg/ml 的母液,一次性滤器抽滤,4 ℃保存),卵巢癌耐药细胞株 COC1/DDP,购于重庆医科大学超声研究所,标准胎牛血清购于 TBD 公司,Western blot 配胶试剂盒购于碧云天生物工程研究所,Caspase-3(H-277);SC7148 抗体购于北京中杉公司,溴化噻唑蓝四唑(MTT)等常规试剂均由重庆医科大学基础研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞系的培养与传代 用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37 ℃,5% CO_2 相对湿度 90% 的培养箱中

基金项目:重庆医科大学校级科研课题(XBYB2008035)
Supported by the Scientific Research Project of Chongqing Medical University (XBYB2008035)

作者简介:胡琴琴,女,湖南省辰溪县人,硕士研究生,主要从事妇科肿瘤方面的研究。E-mail:cxhqq123@163.com

通信作者:钟 玲,电话:(023)63784244,E-mail:zhong9ling@hotmail.com

收稿日期:2009-04-09;修回日期:2009-05-19

培养,细胞呈悬浮生长,隔 24 h 按 1∶2比例离心传代。

1.2.2　MTT 法检测原花青素对 COC1/DDP 增殖的影响　　取对数生长期细胞,以 0.5×10^4/L 细胞浓度接种于 96 孔培养板中,每孔 90 μl,加入浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mg/ml 的原花青素 10 μl/孔,得到终质量药物浓度分别为(20、40、80、160、320 μg/ml),同时设空白对照组,每组设 5 个复孔,各板分别培养 12、24、36、48、72 h 后,各孔加入 MTT 溶液 20 μl,继续培养 4 h 后,加入三联液[3] 100 μl 每孔,37 ℃放置 12 h 后,酶标仪测量波长 570 nm 处的光密度值[D(570)值]。

细胞增殖抑制率(%) = 1 - [D(570)值$_{实验孔}$ - D(570)值$_{空白孔}$]/[D(570)值$_{对照孔}$ - D(570)值$_{空白孔}$] ×100%

1.2.3　HE 染色观察不同浓度 GSPE 作用后细胞形态变化　取对数生长期细胞,以0.5×10^4 L^{-1}细胞数接种于 24 孔培养板,每孔 1 ml,与终质量浓度分别为 40、80、160 μg/ml 的 GSPE 共孵育,各浓度组设 3 个复孔,另设对照孔 3 孔,作用 24 h 后收集细胞,用 PBS 调整细胞数为 $1\times10^5 ml^{-1}$,涂片,HE 染色,观察细胞形态变化。

1.2.4　AnnexinV/PI 染色检测细胞凋亡　　调整细胞数为 $0.5\times10^6 ml^{-1}$在 6 孔板中培养,培养 24 h,分别收集空白对照组及上述 GSPE 作用的 COC1/DDP 细胞,冷 PBS 洗 2 次,校准细胞数为 $1\times10^6 ml^{-1}$,取 100 μl 细胞悬液加入 Annexin V-FITC 和 PI,冰上避光 10 min,加入 400 μl 1 × 冰 binding buffer 轻轻震荡,30 min 内用流式细胞仪检测。

1.2.5　TUNEL 检测凋亡指数　　照细胞凋亡试剂盒说明书进行严格操作。随机选择 10 个高倍镜视野,每个高倍镜视野细胞数量大于 1 000 个,分别计算总细胞数和凋亡数。

凋亡指数(AI,%) = 凋亡指数/总细胞数 ×100%

1.2.6　Western blot 检测 Caspase-3 蛋白的表达　　收集空白对照组以及经各浓度 GSPE 作用 24 h 的细胞各 1 瓶,提取蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,转膜,加入 Caspase-3 兔抗人多克隆抗体,4 ℃过夜,相应的辣根过氧化酶标记的二抗(1∶500)室温孵育 1 h,用免疫印记化学发光试剂盒显色,以内参 β-actin 水平作为定量蛋白质上样对照,每个样本至少重复 3 遍。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件进行 F 检验及 t 检验。

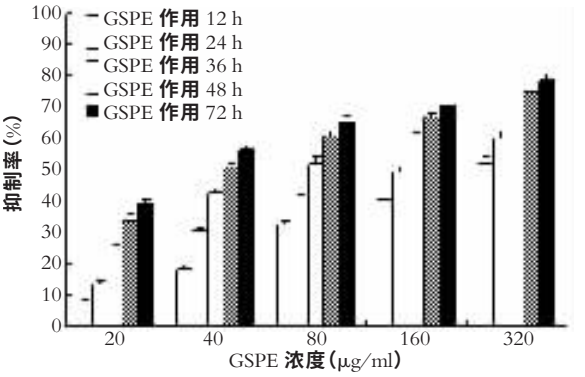
2　结果

2.1　MTT 法检测 GSPE 对细胞的增殖抑制情况

随着 GSPE 浓度的增加和作用时间的延长,COC1/DDP 的增殖抑制率明显增加($P<0.01$),表现为时间-剂量效应(图 1)。

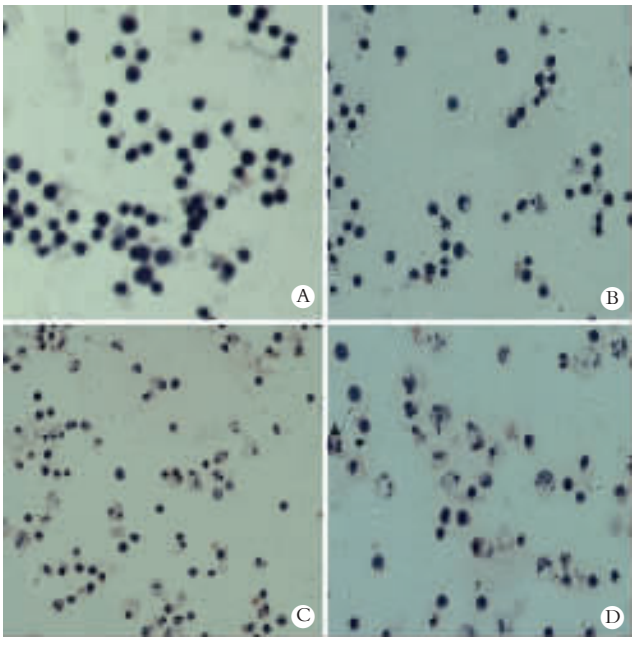
2.2　HE 染色观察 GSPE 作用后细胞形态变化

对照组见细胞核大深染,见核质比失调,偶见瘤巨细胞(图 2A)。经 40 μg/ml 作用 24 h 后的细胞,细胞体积缩小,细胞膜完整,染色质浓缩,细胞质呈淡红色,部分细胞凋亡改变呈散在分布(图 2B);80 μg/ml GSPE 作用的细胞凋亡细胞进一步增多,染色质萎缩成小块,或成不规则块状,包膜完整,形成小突起,细胞质红染,内含小泡,似凋亡小体形成(图 2C);160 μg/ml GSPE 作用的细胞凋亡小体增多,凋亡形态更加明显(图 2D)。



同 GSPE 浓度组不同时间点比较、不同 GSPE 浓度组同时间点比较,$P<0.01$

图 1　GSPE 对 COC1/DDP 的增殖抑制作用



A:对照组;B:GSPE(40 μg/ml);C:GSPE(80 μg/ml);D:GSPE(160 μg/ml)

图 2　HE 染色观察 GSPE 作用后细胞形态变化　(×200)

2.3　Annexin-V/PI 流式分析法检测 GSPE 诱导的 COC1/DDP 细胞凋亡

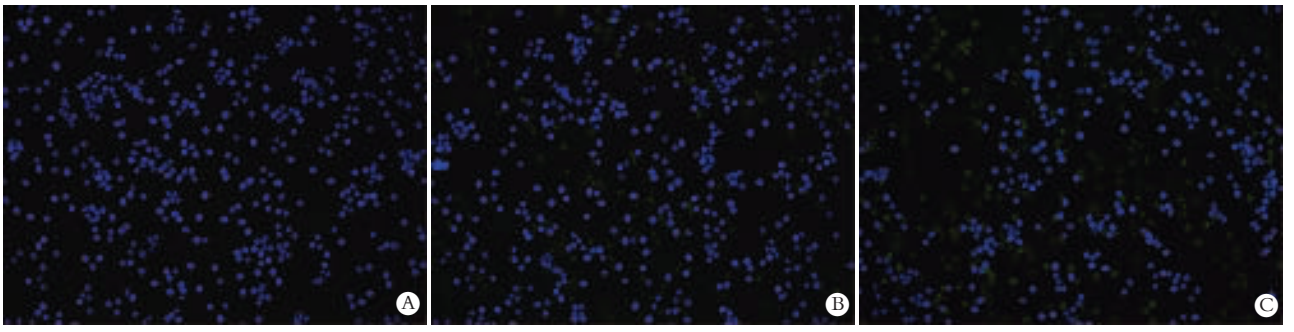
不同浓度 GSPE(0、40、80、160 μg/ml)作用 24 h 后,凋亡率分别为(1.62 ± 0.20)%、(37.61 ± 4.86)%、(44.03 ± 6.18)%、(53.6 ± 4.45)%,结果显示与正常组相比,GSPE 能诱导细胞凋亡,且随着药物浓度增加,凋亡率显著增加。

2.4　TUNEL 检测凋亡指数

GSPE(40、160 μg/ml)作用 COC1/DDP 细胞 24 h 后,凋亡率分别为 36.27%、54.68%,对照组未见凋亡(图 3)。

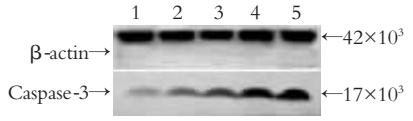
2.5　Western blot 检测不同浓度 GSPE 作用 24 h 后 Caspase-3 蛋白表达

以内参 β-actin 内参为蛋白标准,Quantity One 图像分析软件重复 5 次进行灰度值测定。不同浓度 GSPE(0、20、40、80、160 μg/ml)处理 24 h 后 Caspase-3 蛋白标化灰度值分别为(0.226 ± 0.041)、(0.359 ± 0.085)、(0.527 ± 0.113)、(0.794 ± 0.029)、(0.876 ± 0.042),结果显示随着 GSPE 浓度增大,Caspase-3 蛋白表达增加($P<0.05$,图 4)。



A:空白对照组 蓝色荧光代表活细胞;B:GSPE(40 μg/ml) 绿色荧光代表凋亡细胞;C:GSPE(160 μg/ml) 绿色荧光明显增多

图3 TUNEL 检测 GSPE 对细胞凋亡的影响 (×200)



1~5:GSPE 浓度为 0、20、40、80、160 μg/ml 各组

图4 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白表达

3 讨论

卵巢癌是目前严重威胁女性生命的恶性肿瘤,死亡率居女性生殖系统肿瘤之首[4]。随着手术治疗的进步及化疗药物的开发,卵巢癌的治疗效果有了很大改善,但患者的5年生存率仍然很低,其重要原因就是化疗耐药性的产生[5]。目前临床上针对卵巢癌的是以铂类等为基础的联合化疗,卵巢癌细胞对顺铂等一线化疗药物的耐药成为卵巢癌治疗失败的主要原因之一。寻找高效低毒的化疗药物和耐药逆转剂成为卵巢癌治疗的一个主要方向,但是现有的耐药逆转剂因毒副作用大使临床应用受到很大限制,从天然物质中寻找具有潜在抗肿瘤作用的药物是肿瘤治疗的一个新发展方向。

GSPE 具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、心血管保护作用等多种生物学功效[6],能抑制肿瘤细胞生长,促进肿瘤细胞凋亡的作用[7],并能拮抗化疗药物对正常细胞的毒性作用[8]。GSPE 作为一种天然药物,药理作用广泛,符合人们对安全性的需要,有望成为新的抗肿瘤药物。

本实验用 GSPE 独立作用于卵巢癌顺铂耐药细胞,通过 MTT 试验和细胞生长抑制率测定,结果表明 GSPE 在体外对 COC1/DDP 有明显的增殖抑制作用,而且这种抑制作用随着其浓度的增大和作用时间的延长而增强,光镜观察发现 GSPE 能引起细胞明显的凋亡形态改变,随着药物浓度加大,凋亡小体增多,形态改变更加明显。进一步用流式细胞仪检测发现 GSPE 能够诱导 COC1/DDP 细胞凋亡,与对照组相比,有明显差异。本实验中,GSPE 作用的 COC1/DDP 细胞经 TUNEL 染色后,结果显示明显的凋亡变化,且随着 GSPE 浓度增大,凋亡指数增加。

Caspase 是细胞凋亡调控的关键,Caspase-3 是 Caspases 家族中最重要的凋亡效应蛋白,当细胞受到凋亡刺激时,Caspase-3 被激活成有活性的亚单位,进一步激活内源性核酸内切酶,进而诱导凋亡的发生[9]。研究表明在卵巢癌耐顺铂 COC1/DDP 细胞系中,Caspase-3 的活性明显低于敏感卵巢癌细胞系,这可能是由于在耐药细胞株中,细胞受顺铂刺激后,Caspase-3 依赖的信号传递被阻滞,抑制凋亡的发生而产生耐药[10]。

本实验发现 GSPE 能上调 COC1/DDP 细胞中 Caspase-3 蛋白的表达,提示 GSPE 诱导 COC1/DDP 的凋亡作用可能与激活 Caspase-3 蛋白有关。国外有研究发现,GSPE 对人上皮细胞癌细胞株 A431[11]、人前列腺癌细胞 DU145[12] 的诱导凋亡作用中,GSPE 可能通过 Caspase-3 蛋白激活的凋亡通路诱导肿瘤细胞凋亡。通过 Caspase 途径诱导肿瘤细胞凋亡,可能是 GSPE 的作用机制之一。池余刚等[1]在 GSPE 对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响中的研究中发现 GSPE 可能通过降低 survivin 表达,间接抑制 Caspase-3 的活性而促进凋亡。

综上所述,GSPE 可以在体外对卵巢癌耐药细胞株有明显的增殖抑制及诱导凋亡作用,但其作用机制及药理作用尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 池余刚,钟 玲,伍 霞,等. 原花青素对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(23): 2203-2206.

[2] 徐 蕾,钟 玲,胡琴琴,等. 葡萄籽原花青素对人卵巢癌裸鼠移植瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2120-2123.

[3] 周建军, 乐秀芳, 韩家娴, 等. 评价抗癌物质活性的改良 MTT 方法[J]. 中国医药工业杂志, 1993, 24(10): 455-457.

[4] Parkin D M, Bray F, Ferlay J, *et al*. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.

[5] Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, *et al*. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discov-

ery of reversal agents[J]. Med Res Rev, 2005, 25(4): 453 - 472.
[6] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S J, *et al*. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: impoaance in human health and disease prevention[J]. Toxicology, 2000, 148(2 - 3): 187 - 197.
[7] Sharma G, Tyagi A K, Singh R P, *et al*. Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells[J]. Breast Cancer Res Treat, 2004, 85(1): 1 - 12.
[8] Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, *et al*. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 957: 260 - 270.
[9] Karajewska M, Wang H G, Krajewski S, *et al*. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease[J]. Cancer Res, 1997, 57(8): 1605 - 1613.
[10] Yang X, Fraser M, Moll U M, *et al*. Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3126 - 3136.
[11] Meeran S M, Katiyar S K. Grape seed proanthocyanidins promote apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells through alterations in Cdki-Cdk-cyclin cascade, and caspase-3 activation *via* loss of mitochondrial membrane potential[J]. Exp Dermatol, 2007, 16(5): 405 - 415.
[12] Kaur M, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells: possible role of ataxia telangiectasia mutated-p53 activation [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(5): 1265 - 1274.

（编辑　龙　亮）

文章编号:1000-5404(2009)21-2127-01

个案与短篇

43 例睾丸扭转的诊断与治疗

王　彪[1],孙爱斌[1],卢根生[2]　([1]四川省大竹县人民医院泌尿外科,四川 大竹 635100;[2]第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所,重庆 400038)

睾丸扭转发病率约 1/4 000,青少年为该病高发年龄段,约占 65%[1]。若认识不足,初诊时易误诊而延误治疗,其常可导致患侧睾丸坏死切除或导致睾丸萎缩而失去挽救睾丸的机会。1996 年 6 月至 2008 年 10 月我院共收治 43 例,现报告如下。

1　临床资料

本组 43 例,年龄 11 ~ 51 岁,平均 21.3 岁,其中 < 23 岁者 33 例。左侧 30 例,右侧 13 例。病程 3 h ~ 32 d,其中 4 例 < 6 h,5 例 6 ~ 12 h,34 例 > 12 h。本组 9 例睾丸复位成功者中 6 例为首次确诊者;首次确诊 10 例,其确诊时间 4 h ~ 3 d,其中 < 10 h 确诊的 7 例中有 5 例复位成功。初诊误诊为睾丸炎或附睾炎 23 例,肾绞痛 6 例,急腹症 1 例,睾丸附件扭转 1 例,肠炎 1 例,腹股沟疝 1 例。其中 31 例误诊患者均在外院或诊所抗感染治疗无效后转诊我科确诊,其转诊时距发病已达 10 h 至 32 d。

患者均有阴囊疼痛肿胀,疼痛有绞痛、胀痛,亦有剧痛、隐痛,以剧痛、绞痛为多,16 例有向同侧腹股沟、下腹部或会阴部放射,3 例伴恶心、呕吐,1 例有发热;起病均为突然性,15 例夜间睡眠时发病,7 例活动时发病,2 例起床时,2 例有阴囊外伤,1 例有腹痛史,16 例无明显诱因。查体:均有睾丸触痛或压痛,41 例阴囊肿胀,15 例睾丸抬高,1 例横位,5 例睾丸上精索有增粗,Prehn 征阳性 33 例。阴囊皮肤发红 7 例,睾丸附睾扪不清 26 例,提睾肌反射均消失。阴囊彩超:30 例患侧睾丸增大,回声不均匀,能量图显示睾丸血流信号不明显或消失;睾丸血流减少 7 例,2 例明显减少,3 例睾丸血流改变不明显,1 例睾丸周围血流丰富。9 例血常规 WBC > 10×10^9/L,尿常规均正常。

2　结果

诊断一旦明确或高度怀疑者均立即手术。本组所有病例均行彩色多普勒血流动态显像(color Doppler flow imaging, CDFI)检查,39 例经彩超检查确诊,其 CDFI 提示睾丸血流减少或消失。仅 3 例睾丸血流改变不明显,但睾丸扭转不除外,均行手术探查。复位后,探查见睾丸发黑或色泽灰暗则采取以温盐水纱布湿敷 10 ~ 20 min,睾丸恢复红润则保留睾丸并固定加对侧睾丸固定,术后 5 d 彩超复查复位后的睾丸血流正常;反之则行睾丸切除加对侧睾丸探查固定,切除的睾丸术后病检证实睾丸缺血坏死。

本组 9 例睾丸复位成功,其中 6 例为首次确诊者;首次确诊 10 例,确诊时间 4 h ~ 3 d,其中 < 10 h 确诊的 7 例中有 5 例睾丸复位成功。睾丸扭转 90° 3 例,180° 9 例,270° 4 例,360° 19 例, > 360° 8 例;顺时针扭转 11 例,逆时针扭转 30 例,1 例已自行复位,1 例隐睾扭转已无法辨认。42 例睾丸扭转均发生于鞘膜内。1 例隐睾扭转为腹外型。

3　讨论

睾丸扭转后坏死切除率高,初诊误诊率高。文献[2 - 4]统计睾丸扭转后坏死切除率在 70% 以上,误诊率大于 40%。本组睾丸切除率 79.07%,在院外及我院初诊误诊率共达 76.74%。

3.1　诊断

本组病例左侧 69.77%,可能与左侧精索稍长有关。在夜间、晨起或无明诱因下突发睾丸隐痛或剧痛,一般无腰痛,查体时睾丸触痛明显,Prehn 征阳性是睾丸扭转的特征,是极其重要的诊断依据;疼痛时可向同侧腹股沟、下腹部或会阴部放射,伴恶心、呕吐,阴囊肿胀,但无特异性。Kaddish 等[5]认为精索触痛,提睾肌反射消失常有助诊断,本组提睾肌反射均消失。睾丸

(下转 2130 页)

作者简介:王　彪,男,四川省达州市人,主治医师,主要从事泌尿外科临床诊治方面的研究。E-mail: wangbiao.1975@163.com

收稿日期:2009-04-12;修回日期:2009-05-15