DOI:10.16016/j.1000-5404.201503151

论著

硫利达嗪诱导人卵巢癌细胞凋亡及其机制研究

雍 敏[1],田 思[2],朱 江[2],胡丽娜[1],于廷和[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院:妇产科[1],康复科[2])

[摘要] **目的** 探讨多巴胺受体阻断剂硫利达嗪(thioridazine)对卵巢癌细胞株SKOV3、A2780增殖、凋亡的影响及其可能的作用机制。**方法** 用不同浓度硫利达嗪(0、5、10、15、20 μmol/L)作用SKOV3、A2780细胞,CCK8法检测细胞增殖,流式细胞仪及DAPI染色检测细胞凋亡,DCFH-DA法染色检测ROS水平,彗星实验观察细胞核DNA损伤情况,JC-1染色检测线粒体膜电位变化,Western blot检测P53、Bax、Bcl-2、细胞色素C、active Caspase-3蛋白的表达。**结果** 硫利达嗪可抑制人卵巢癌细胞SKOV3、A2780的增殖,呈一定的剂量效应关系($P<0.05$),浓度为15 μmol/L时,可产生明显增殖抑制效应;流式细胞仪检测显示处理组(15 μmol/L硫利达嗪作用24 h)凋亡率明显高于对照组($P<0.05$);DAPI染色结果:处理组出现明显细胞核固缩、碎裂及凋亡小体;DCFH-DA染色处理组ROS水平升高($P<0.05$);彗星实验结果提示处理组出现明显的DNA损伤;JC-1染色发现处理组线粒体膜电位较对照组下降($P<0.05$);Western blot实验发现处理组P53、Bax、胞质细胞色素C、active Caspase-3表达上调,Bcl-2、线粒体细胞色素C表达下调。**结论** 硫利达嗪可能通过诱导细胞内ROS升高损伤DNA,激活线粒体凋亡途径而诱导人卵巢癌SKOV3、A2780细胞凋亡。

[关键词] 硫利达嗪;活性氧物质;DNA损伤;线粒体凋亡途径
[中图法分类号] R73-362;R737.31;R971.41 [文献标志码] A

Thioridazine induce apoptosis in human ovarian cancer cells by elevating reactive oxygen species

Yong Min[1], Tian Si[2], Zhu Jiang[2], Hu Lina[1], Yu Tinghe[1] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, [2]Department of Rehabilitation Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medicine University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of thioridazine, a dopamine D2 receptor (DRD2) inhibitor, on the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cell lines and investigate the potential mechanism. **Methods** After being treated with thioridazine (0, 5, 10, 15 and 20 μmol/L), the proliferation of ovarian cancer cell lines SKOV3 and A2780 was respectively measured by CCK-8 assay, and cell apoptosis was determined by DAPI nuclear staining and flow cytometry. DCFH-DA staining was employed to observe the level of reactive oxygen species (ROS). Comet assay was applied to detected nuclear DNA damage. JC-1 staining was used to detect mitochondrial membrane potential. The expression of P53, Bax, Bcl, cytochrome C and active Casepase-3 was assessed by Western blotting. **Results** The proliferation of SKOV3 and A2780 was suppressed by thioridazine in a dose-dependent manner ($P<0.05$). Flow cytometry indicated that the apoptotic rate was significantly higher in the cells after thioridazine treatment ($P<0.05$), and DAPI staining showed typical apoptotic features, including karyopyknosis, fragmentation, and apoptotic bodies. DCFH-DA staining showed the level of ROS was increased compared to control group ($P<0.05$). Comet assay suggested increased DNA damage, and JC-1 staining indicated decreased mitochondrial membrane potential compared to control group. Western blot analysis found that the expression of P53, Bax, Cytoplasm cytochrome C, active Caspase-3 was increased, while that of Bcl, mitochondrial cytochrome C was decreased. **Conclusion** Thioridazine may induces apoptosis *via* DNA damage and activation of mitochondrial pathway in

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81172492);重庆市科委重点项目(CSTC2012JJB10030)
[通信作者] 胡丽娜,E-mail:hulinapro@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150715.1033.013.html(2015-07-15)

ovarian cancer SKOV3 and A2780 cells

[**Key words**] thioridazine; reactive oxygen species; DNA damage; apoptosis; mitochondrial apoptosis pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81172492) and the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012JJB10030). Corresponding author: Hu Lina, E-mail: hulinapro@163.com

卵巢癌作为妇科三大恶性肿瘤之一,发病率逐年增多,死亡率居妇科恶性肿瘤首位[1],严重威胁女性生命健康。尽管手术辅以放化疗在早期有一定疗效,而继发性耐药严重制约着临床治疗[2]。硫利达嗪作为多巴胺受体阻断剂,主要应用于临床抗精神病治疗。近年研究发现硫利达嗪可抑制包括胃癌、宫颈癌、白血病干细胞等多种肿瘤生长。本研究探讨硫利达嗪对卵巢癌细胞的增殖、凋亡的影响及其可能的作用机制,以期为卵巢癌的治疗提供新的可能。

1 材料与方法

1.1 细胞

人卵巢癌细胞SKOV、A2780购于上海复旦大学细胞库,采用RPMI1640细胞培养基(含10%胎牛血清、50 μg/L青霉素、50 μg/L链霉)置于37 ℃、5% CO_2饱和湿度孵箱常规培养,传代。

1.2 主要试剂

硫利达嗪(纯度99%)、JC-1、DCFH-DA购于美国Sigma公司,胰蛋白酶、胎牛血清、RPMI1640细胞培养基购于美国HyClone公司,CCK-8试剂盒购于日本同仁化学研究所,Annexin V-PI双染检测试剂、ECL发光试剂盒购于美国凯基生物技术有限公司,DAPI购于碧云天公司,P53、Bcl-2、Bax、β-actin抗体及二抗均购于美国Proteintech公司,Cytc、active Caspase-3抗体购于美国Abcam公司。

1.3 CCK8实验检测硫利达嗪对SKOV3、A2780细胞增殖的影响

按5×10^3/孔将SKOV3、A2780细胞接种于96孔板,培养24 h后各孔加入100 μL含不同浓度硫利达嗪[0(对照组)、5、10、15、20 μmol/L]的培养液,继续培养24 h后加入CCK8溶液10 μL/孔,置于37 ℃、5% CO_2环境中孵育2 h。采用酶标仪在波长为450 nm处检测各孔光密度值[$D(450)$],并计算抑制率。

$$抑制率=[1-D(450)_{实验组}/D(450)_{对照组}]\times100\%$$

1.4 硫利达嗪诱导人卵巢癌细胞SKOV3、A2780凋亡检测

取对数生长期的SKOV3、A2780细胞按1×10^5/孔接种于6孔板,处理组予以硫利达嗪15 μmol/L,37 ℃,5% CO_2培养24 h后,收集所有细胞,采用Annexin V-PI双染,流式细胞仪检测细胞凋亡。相同条件下将SKOV3接种于24孔板,相同处理后,弃去培养液,予以PBS液漂洗3次,4%多聚甲醛固定30 min后用0.1% Triton X-100作用2 min,再次以PBS漂洗3次,最后给予终浓度为5 μg/L的DAPI避光染色15 min,荧光显微镜下观察并照相。

1.5 DCFH-DA染色检测活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平

接种SKOV3细胞于96孔板,予以硫利达嗪15 μmol/L,继续培养6 h。弃去培养液,PBS漂洗3次,加入含DCFH-DA的无血清培养基,终浓度为10 μmol/L,于37 ℃孵箱中反应10 min,弃去培养基后PBS漂洗3次,荧光显微镜下观察并照相,酶标仪荧光定量分析(激发波长488 nm,发射波长525 nm)。

1.6 彗星实验检测细胞DNA损伤

收集对照组及处理组细胞;配制1%正常熔点胶及1%细胞均匀混合的低熔点胶,依次铺于载玻片,4 ℃固化20 min;碱性裂解液裂解4 ℃过夜;碱性电泳缓冲液避光解旋20 min;25 V恒压电泳20 min;中性缓冲液漂洗3次后滴加5 μg/L DAPI避光染色15 min,双蒸水漂洗3次后荧光显微镜蓝光激发观察,照相。

1.7 JC-1染色检测线粒体膜电位

接种SKOV3细胞于96孔板,同上处理后继续培养12 h,弃去培养液后以PBS漂洗3次,加入含JC-1的无血清培养基,终浓度为10 μg/mL,于37 ℃孵箱中反应30 min,弃去培养基后PBS漂洗3次。采用酶标仪检测各孔的相对荧光强度值,波长设置参数为:红色荧光(激发波长585 nm,发射波长590 nm),绿色荧(激发波长514 nm,发射波长529 nm)。荧光显微镜下观察并照相。

1.8 Western blot检测蛋白表达

收集对照组及处理组细胞,提取蛋白并调整各组浓度为3.5 μg/μL;恒压电泳(浓缩胶80 V、1 h,分离胶100 V、1 h),250 mA恒流电转入PVDF膜,5%脱脂牛奶常温封闭2 h,一抗4 ℃过夜,TBST漂洗3×10 min,二抗室温孵育2 h,TBST漂洗3×10 min,采用ECL化学发光法显示条带,用Quantity One软件分析条带灰度值,对比内参β-actin,统计各组蛋白表达量。

1.9 统计学分析

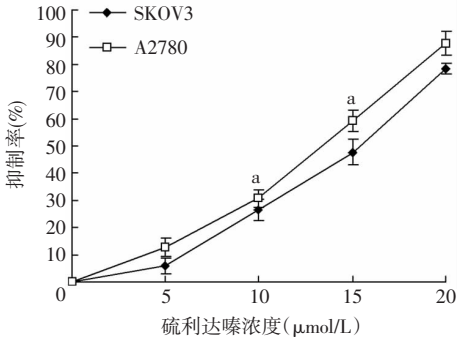
应用SPSS 17.0统计软件,计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,

组间均数比较应用单因素方差分析。

2 结果

2.1 硫利达嗪对人卵巢癌细胞 SKOV3、A2780 增殖的影响

不同浓度硫利达嗪作用 24 h 后，SKOV3、A2780 细胞增殖受到不同程度抑制，呈一定的剂量依赖关系。浓度为 15 μmol/L 时，抑制率分别为(47.73 ±4.65)%、(59.32 ±4.05)%，与对照组相比，差异有统计学意义($P<0.05$，图 1)，选用该浓度进行后续实验。

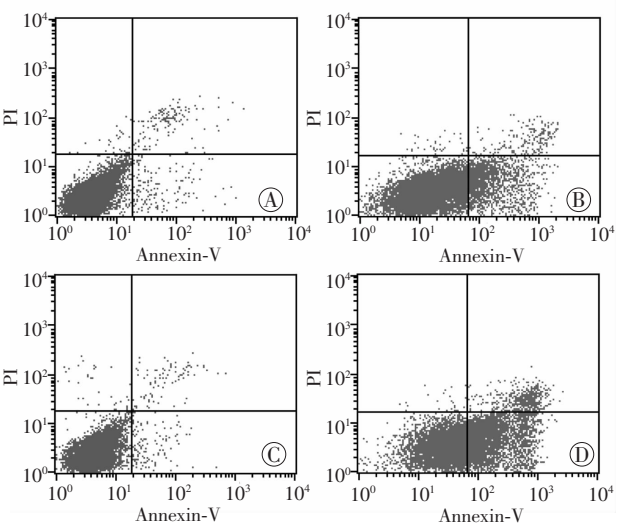


a：$P<0.05$，与对照组(0 μmol/L)比较

图 1 CCK-8 法检测不同浓度硫利达嗪作用 24 h 后对 SKOV3、A2780 细胞增殖抑制的影响

2.2 硫利达嗪对 SKOV3、A2780 细胞凋亡的影响

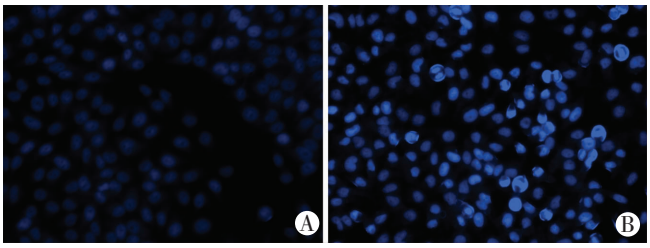
2.2.1 凋亡率检测 流式细胞仪定量检测结果显示，药物处理 24 h 后，与对照组比较，SKOV3 处理组、A2780 处理组凋亡率明显升高[(28.130 ±0.573)% *vs* (2.240 ±0.214)%；(42.086 ±1.525)% *vs* (2.525 ±0.035)%，$P<0.05$]。见图 2。



A：SKOV3 对照组；B：SKOV3 处理组；C：A2780 对照组；D：A2780 处理组

图 2 Annexin V-PI 双染结合流式细胞仪定量检测 15 μmol/L 硫利达嗪作用 24 h 后人卵巢癌细胞 SKOV3、A2780 的凋亡率

2.2.2 DAPI 染色观察硫利达嗪处理后 SKOV3 细胞核形态学变化 药物处理组细胞核浓集、固缩、碎裂，凋亡小体形成(图 3)。

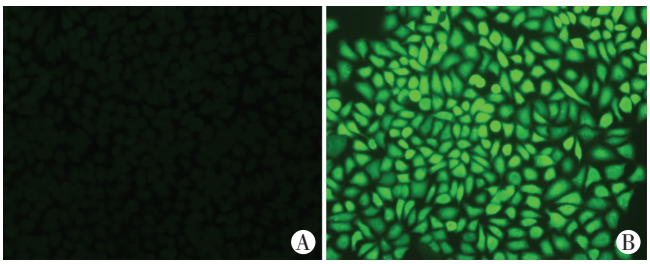


A：对照组；B：处理组

图 3 DAPI 染色观察 15 μmol/L 硫利达嗪作用 24 h 后人卵巢癌 SKOV3 细胞核的形态学变化 (×200)

2.3 硫利达嗪对 SKOV3 胞内 ROS 水平的影响

药物作用 6 h 后，与对照组相比，SKOV3 细胞处理组绿色荧光明显增强(0.252 ±0.011 *vs* 0.041 ±0.001，$P<0.05$，图 4)。

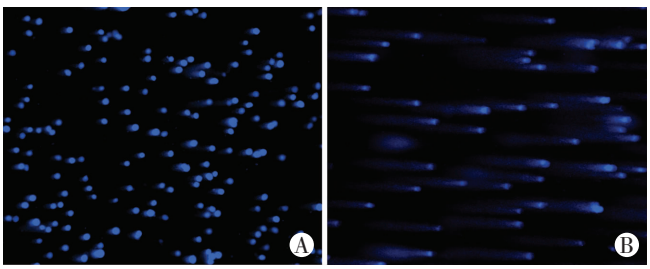


A：对照组；B：处理组

图 4 DCFH-DA 染色观察 15 μmol/L 硫利达嗪作用 6 h 后人卵巢癌细胞 SKOV3 胞内 ROS 产生 (×200)

2.4 硫利达嗪诱导 SKOV3 细胞 DNA 损伤

彗星实验结果显示：药物作用 24 h 后，与对照组相比，处理组出现明显的 DNA 损伤现象(图 5)。

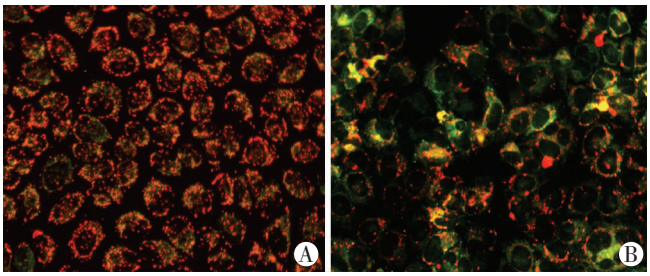


A：对照组；B：处理组

图 5 彗星实验检测 15 μmol/L 硫利达嗪作用 24 h 后诱导人卵巢癌细胞 SKOV3 DNA 损伤 (DAPI 染色 ×200)

2.5 硫利达嗪作用 SKOV3 细胞后线粒体膜电位降低

药物处理 12 h 后，与对照组相比，绿色荧光细胞的比例明显高而橙色荧光细胞的比例则降低，相对荧光值为(0.549 ±0.028) *vs* (1.751 ±0.037)，差异有统计学意义($P<0.05$，图 6)。

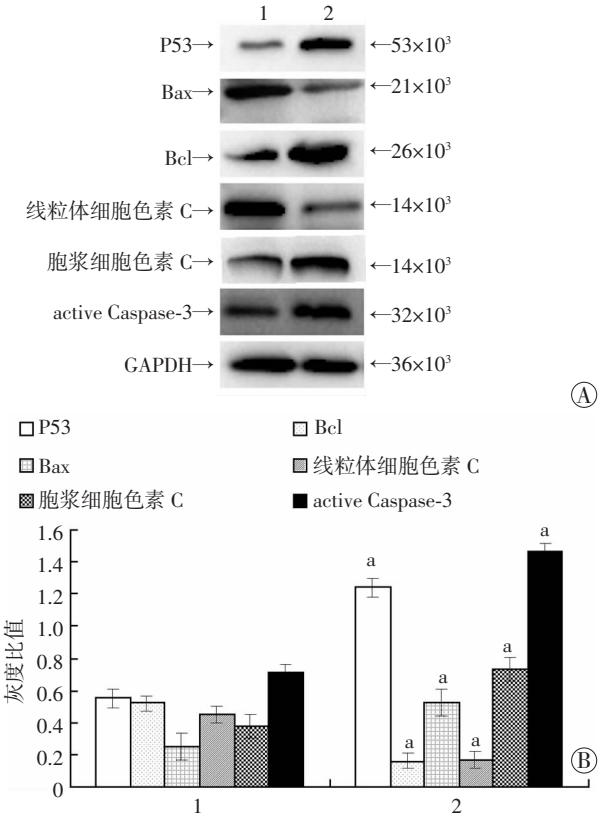


A:对照组;B:处理组

图6 JC-1染色观察15 μmol/L硫利达嗪作用12 h后SKOV3细胞线粒体膜电位变化(×200)

2.6 硫利达嗪线粒体途径凋亡相关蛋白表达的影响

硫利达嗪处理后,与对照组相比,SKOV3细胞P53、Bax、胞浆细胞色素C、active Casepase3分别表达上调约2.26、2.08、1.94、2.05倍;Bcl、线粒体细胞色素C表达下调约3.20、2.65倍,差异有统计学意义($P<0.05$,图7)。



1:对照组;2:处理组 A:Western blot检测;B:半定量分析

a:$P<0.05$,与对照组比较

图7 Western blot检测SKOV3细胞凋亡相关蛋白表达

3 讨论

卵巢癌发病率高,早期发现难,多数患者就诊时已属于Ⅱ/Ⅲ期。传统手术联合放化疗虽在早期有一定疗效,但最终因原发或者继发耐药而失败,5年生存率为20%~30%[3],预后极差。硫利达嗪可阻断多巴胺受体,主要应用于治疗精神分裂症,也被应用于治疗肿瘤性发汗及抑郁[4-5]。近年研究发现,硫利达嗪具有一系列潜在的生物学效应,如降低P-gP水平及DNA损伤,抑制抗氧化剂活性等[6-8],可杀伤包括多种肿瘤细胞如胃癌、宫颈癌等[9-10]。本实验探讨硫利达嗪对卵巢癌细胞增殖凋亡的影响及可能的作用机制,以期为其应用于卵巢癌患者治疗提供一定的理论基础。

本实验结果显示硫利达嗪可明显抑制人卵巢癌细胞SKOV3、A2780的增殖,促进其凋亡发生。实验发现,硫利达嗪处理后,活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平明显升高。ROS可参与广泛的信号转导,在肿瘤形成、侵袭、迁移、凋亡等过程中扮演重要角色[11],ROS急剧升高,可导致不可逆的细胞损伤,成为许多肿瘤药物靶向治疗的目标[12]。ROS还能通过氧化修饰及核酸内切酶的作用导致DNA片段化。若损伤的DNA来不及修复,则可通过复杂的信号转导诱导细胞凋亡[13]。彗星实验结果观察到,处理组出现明显的DNA损伤现象;DNA损伤后可直接触发线粒体途径诱发细胞凋亡[14]。实验中JC-1染色结果表明线粒体膜电位明显下降($P<0.05$),提示硫利达嗪可能触发线粒体凋亡途径的激活。Bcl与Bax的表达在线粒体凋亡途径中起到关键作用[15]。Bax形成同型二聚体增多可增大线粒体膜通透性从而有利于促凋亡物质细胞色素C,凋亡诱导因子释放促进凋亡;Bax和Bcl可形成异型二聚体则出现相反效应[16]。细胞色素C和凋亡诱导因子及Caspase-9结合形成复合物,通过一系列复杂反应激活下游Caspase-3最终诱导凋亡发生[17]。Western blot结果证实硫利达嗪可能通过线粒体途径诱导卵巢癌SKOV3细胞凋亡。

综上所述,多巴胺受体阻断剂硫利达嗪可能通过诱导细胞内ROS升高,损伤DNA,激活线粒体凋亡途径,从而抑制卵巢癌细胞增殖,诱导其凋亡发生。Park等[18]构建人卵巢癌裸鼠皮下成瘤模型,发现硫利达嗪可通VEGFR-2/PI3K/mTOR通路抑制肿瘤生长。Sachlos等[19]发现,硫利达嗪可靶向杀伤人白血病肿瘤干细胞,而正常造血干细胞却不受影响,其原因可能在于白血病肿瘤干细胞表达多巴胺受体,而正常造血干细胞则不表达。多巴胺受体与肿瘤治疗具有相关性[20],硫利达嗪的类似物同样具有肿瘤抑制效应[21],表明多巴胺受体可能成为肿瘤治疗的新靶点,各种靶向多巴胺受体阻断剂可能成为肿瘤治疗新趋势。Gil-Ad等[21]还发现硫利达嗪与异搏定联合可逆转肿瘤化疗耐药,表明硫利达嗪有望成为肿瘤化疗辅助用药。目前,硫利达嗪尚未应用于卵巢癌治疗,其潜在的

肿瘤杀伤效应有着广阔的临床应用前景,深入探讨其作用机制及可能给肿瘤患者带来的各种影响将为该药物应用于临床提供更有利的证据。

参考文献:

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, *et al*. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69 - 90.
[2] Shih K K, Chi D S. Maximal cytoreductive effort in epithelial ovarian cancer surgery[J]. J Gynecol Oncol 2010, 21: 75 - 80.
[3] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al*. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87 - 108.
[4] Cowap J, Hardy J. Thioridazine in the management of cancer-related sweating [J]. J Pain Symptom Manage, 1998, 15 (5): 266.
[5] Ly K L, Chidgey J, Addington-Hall J, *et al*. Depression in palliative care: a systematic review. Part 2. Treatment[J]. Palliat Med, 2002, 16(4): 279 - 284.
[6] Kamiwatari M, Nagata Y, Kikuchi H, *et al*. Correlation between reversing of multidrug resistance and inhibiting of [3H] azidopine photo labeling of P-glycoprotein by newly synthesized dihydropyridine analogues in a human cell line [J]. Cancer Res, 1989, 49(12): 3190 - 3195.
[7] Pantazaki A A, Lialiaris T S. A combined biochemical and cytogenetic study of thioridazine-induced damage to nucleic acids[J]. Mutagenesis, 1999, 14(2): 243 - 248.
[8] Rodrigues T, Santos A C, Pigoso A A, *et al*. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms[J]. Br J Pharmacol, 2002, 136(1): 136 - 142.
[9] Mu J, Xu H, Yang Y, *et al* . Thioridazine, an antipsychotic drug, elicits potent antitumor effects in gastric cancer [J]. Oncol Rep, 2014, 31(5): 2107 - 2114.
[10] Mao M, Yu T, Hu J, *et al*. Dopamine D2 receptor blocker thioridazine induces cell death in human uterine cervical carcinoma cell line SiHa[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2015, [Epub ahead of print].
[11] Sullivan L B, Chandel N S. Mitochondrial reactive oxygen species and cancer[J]. Cancer Metab, 2014, 2: 17.
[12] Klaunig J E, Wang Z, Pu X, *et al*. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 254(2): 86 - 99.
[13] Huang W, Yang X, Yao S, *et al*. Reactive oxygen species burst induced by aluminum stress triggers mitochondria-dependent programmed cell death in peanut root tip cells [J]. Plant Physiol Biochem, 2014, 82: 76 - 84.
[14] De-Zio D, Cianfanelli V, Cecconi F. New insights into the link between DNA damage and apoptosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 19(6): 559 - 571.
[15] Moldoveanu T, Follis A V, Kriwacki R W, *et al*. Many players in BCL-2 family affairs [J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(3): 101 - 111.
[16] Oltrai Z N, Millimau C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed Cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609 - 619.
[17] Wang H, Yang Y, Chen H, *et al*. The predominant pathway of apoptosis in THP-1 macrophage-derived foam cells induced by 5-aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy is the mitochondria-caspase pathway despite the participation of endoplasmic reticulum stress[J]. Cell Physiol Biochem, 2014, 33(6): 1789 - 1801.
[18] Park M S, Dong S M, Kim B R *et al* Thioridazine inhibits angiogenesis and tumor growth by targeting the VEGFR-2/PI3K/mTOR pathway in ovarian cancer xenografts[J]. Oncotarget, 2014, 5(13): 4929 - 4934.
[19] Sachlos E, Risueno R M, Laronde S, *et al*. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells[J]. Cell, 2012, 149(6): 1284 - 1297.
[20] Gatto F, Hofland L J. The role of somatostatin and dopamine D2 receptors in endocrine tumors[J]. Endocr Relat Cancer, 2011, 18(6): R233 - R251.
[21] Gil-Ad I, Shtaif B, Levkovitz Y, *et al*. Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth[J]. Oncol Rep, 2006, 15(1): 107 - 112.

(收稿:2015-03-22;修回:2015-04-15)
(编辑 吴培红)