基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1666-04

全反式维甲酸对人卵巢癌细胞株 HO8910 增殖、侵袭能力的影响

赵纯全,沈太敏

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察全反式维甲酸(All-trans retinoic acid,ATRA)对体外培养人卵巢癌细胞株 HO8910 增殖、侵袭能力的影响,为 ATRA 应用于卵巢癌的临床治疗提供实验依据。方法:选用人卵巢癌细胞株 HO8910 进行体外培养,以不同浓度的 ATRA 处理 HO8910 细胞,四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖抑制情况,倒置显微镜进行形态学观察,Transwell 小室体外侵袭实验检测细胞侵袭能力。结果:(1)ATRA 浓度为 10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L 时,均明显抑制 HO8910 细胞的增殖($P<0.05$),并具有时间—剂量依赖性。24、48、72 h ATRA 抑制 HO8910 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 2.331×10^{-5}、0.998×10^{-6}、0.891×10^{-7} mol/L。(2)倒置显微镜可观察到经 10^{-6} mol/LATRA 处理的 HO8910 细胞部分发生形态学的良性分化。(3)体外侵袭实验显示经 10^{-6} mol/L ATRA 处理的 HO8910 细胞,穿膜细胞数目明显减少($P<0.05$)。结论:ATRA 能明显抑制人卵巢癌细胞株 HO8910 的增殖、侵袭能力,有望为 ATRA 应用于卵巢癌的临床治疗提供新的有效的途径。

【关键词】全反式维甲酸;卵巢癌;增殖;侵袭

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-09-25

Effects of all-trans retinoic acid on the human ovarian cancer HO8910 cell line

ZHAO Chun-quan, et al

(*Department of Obstetrics & Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of all-trans retinoic acid on the human ovarian cancer cell line HO8910. *Methods*: The human ovarian cancer cell line HO8910 cultured in vitro were treated with various concentrations of all-trans retinoic acid. The cell proliferation inhibition was detected by MTT assay; The morphologic changes of cell differentiation were observed under inverted microscope; The invasion capability was evaluated by transwell chambers. *Results*: 1.ATRA of 10^{-7} ~ 10^{-5}mol/L inhibited the proliferation of HO8910 cell significantly in a dose-dependent and time-dependent manner ($P<0.05$)and its IC_{50} were 2.331×10^{-5} mol/L、0.998×10^{-6} mol/L、0.891×10^{-7} mol/L at 24 hours、48 hours and 72 hours, separately. 2.Treated by 10^{-6} mol/L ATRA, HO8910 cells showed striking morphological characteristics of differentiation under microscope. 3.The number of invasive cells decreased significantly after treated by 10^{-6} mol/L ATRA ($P<0.05$). *Conclusion*: ATRA can both inhibit the proliferation and invasion of human ovarian cancer cell line HO8910, Which expect to provide an effective and novel approach for clinical treatment of human ovarian cancer.

【Key words】All-trans retinoic acid; Ovarian carcinoma; Proliferation; Invasion

维甲酸(Retinoic acid,RA)属于维生素甲类化合物家族,能抑制肿瘤细胞增殖、侵袭、转移,诱导分化和凋亡。维甲酸类化合物根据结构不同分为三代,以第三代产物全反式维甲酸(All-trans retinoic acid,ATRA)构型最为稳定和常见。1988 年,我国学者应用 ATRA 诱导分化治疗急性早幼粒细胞白血病取得成功,完全缓解率达 88%~91%[1],这一发现极大的推动了 ATRA 治疗恶性肿瘤的实验室和临床研究。众多实验表明 ATRA 对多种肿瘤细胞如肝癌、乳腺癌、肺癌、神经母细胞瘤、绒毛膜癌、甲状腺癌等具有抑制增殖、侵袭作用,而对卵巢癌的作用报道较少。通过研究 ATRA 对人卵巢癌细胞株 HO8910 增殖、侵袭能力的影响,为 ATRA 应用于卵巢癌的临床治疗提供一定的理论依据。

作者介绍:赵纯全(1963-),男,副教授,

研究方向:妇科肿瘤。

1 材料与方法

1.1 材料

人卵巢癌细胞株 HO8910 由重庆医科大学基础研究所惠赠,ATRA、MTT 及二甲亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司,RPMI 1640 培养基购自 Invitrogen 公司,小牛血清系杭州四季青公司生产,Transwell 小室及重组人工基底膜 Matrigel 购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人卵巢癌细胞株 HO8910 培养于含 10% 小牛血清,100 U/ml 青霉素及 100 U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液中,37℃,5%CO_2 培养箱中贴壁生长。细胞换液为 1 ~ 2 d,传代 3 ~ 5 d,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT 法测定细胞生长抑制率 取对数生长期的 HO8910 细胞,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液配制成 1×10^4 个/ml 的细胞悬液,充分吹打后接种于 96 孔板中,200 μl/孔。将培养板置于 5%CO_2,37℃的孵箱中培养。实验组加入 ATRA,使其终浓度分别为 10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9} mol/L,对照组加等体积无水乙醇(<0.1%)。各组均设 5 个平行孔。继续培养 24、48、72 h,取出培养板弃上清,加入无血清 RPMI1640 培养液 200 μl/孔及 MTT20 μl/孔(浓度为 5 mg/ml),孵育 4 h 后弃去上清液,加入 DMSO150 μl/孔,振荡 10 min,用自动酶标读数仪(Bio-TekEL × 800 UV)在波长 570 nm 时测定每孔吸光度(A)值,计算抑制率。

抑制率 =(1—实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)× 100%

1.2.3 形态学观察 根据 MTT 结果,倒置显微镜下观察 10^{-6} mol/L ATRA 作用 24、48、72 h 后,HO8910 细胞的变化。

1.2.4 侵袭实验 根据 MTT 结果,设 3 个实验组和 1 个对照组,实验组均加入 ATRA,使其终浓度为 10^{-6} mol/L,分别培养 24、48、72 h。制备趋化因子:用含 10%小牛血清、160 U/L 胰岛素的 RPMI-1640 培养 HO8910 细胞,当细胞生长达 80%饱和度时,用生理盐水洗瓶 3 次,然后加无血清 RPMI-1640 液 6 ml,培养 24 h;倾出培养液,离心 2 000 r/min × 5 min,收集上清液,-20℃保存备用。将 Transwell 置于 24 孔板内,人工基底膜 Matrigel 按 40 μl/孔均匀地铺在 Transwell 侵袭小室底部聚碳酯膜上,于 37℃、5%CO_2 孵箱内成胶 30 min,置超净台紫外灯照射过夜;将各处理组细胞,制成单细胞悬液,调整浓度为 5 × 10 个/ml,取 0.2 ml 接种到成胶的 Transwell 小室内;在 24 孔板内(小室下层)加 0.6 ml 趋化因子,培养 24、48、72 h;取出小室固定、HE 染色。结果判定:在光镜下(10 × 40),每个膜分别计数 5 个视野的穿膜细胞数求得单个视野的平均穿膜细胞数。

1.3 统计学处理

所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计学软件进行方差分析,组内多重比较采用 SNK-q 检验。

2 结 果

2.1 ATRA 对人卵巢癌细胞株 HO8910 增殖的影响

当 ATRA 浓度为 10^{-9}~10^{-8} mol/L 时,细胞生长受到轻度抑制。当 ATRA 浓度为 10^{-7}~10^{-5} mol/L 时,对细胞生长有明显的抑制效应。10^{-6} mol/L ATRA 在 48 h 抑制率为 50.65%,10^{-7} mol/L ATRA 在 72 h 抑制率为 53.26%(表 1、图 1)。计算出 ATRA 抑制 HO8910 细胞 24、48、72 h 后,HO8910 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 2.331×10^{-5}、0.998×10^{-6}、0.891×10^{-7} mol/L。结合参考文献[2,3],确定 1×10^{-6} mol/L ATRA 作为进一步实验的浓度。

2.2 形态学观察

倒置显微镜下,对照组细胞呈梭形,体积大,长势旺盛,密度较大,呈复层生长,常重叠呈簇状,胞浆较丰富,饱满而透亮。ATRA 作用 24 h 后,未观察到明显细胞形态改变。48 h 后,可见细胞变小变圆,长势较弱,密度减小。72 h 后,细胞出现脱壁,可见部分圆形漂浮的细胞,其胞浆内见许多颗粒(见图 2)。

表 1 MTT 法检测 ATRA 对 HO8910 增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	24 h		48 h		72 h	
	吸光度值 (A_{570})	抑制率 (%)	吸光度值 (A_{570})	抑制率 (%)	吸光度值 (A_{570})	抑制率 (%)
对照组	0.221 ± 0.033	0	0.456 ± 0.028	0	0.652 ± 0.026	0
10^{-9}	0.210 ± 0.045	4.23	0.415 ± 0.032	9.04	0.581 ± 0.045*◆	10.88
10^{-8}	0.205 ± 0.035◆	6.96	0.395 ± 0.056*◆	13.49	0.490 ± 0.035*◆	24.91
10^{-7}	0.191 ± 0.021▲	13.21	0.302 ± 0.052▲◆	33.74	0.305 ± 0.052▲◆	53.26
10^{-6}	0.187 ± 0.023▲	15.20	0.225 ± 0.021▲◆	50.65	0.252 ± 0.012▲◆	61.35
10^{-5}	0.181 ± 0.025▲	18.05	0.175 ± 0.035▲◆	61.59	0.195 ± 0.032▲◆	70.11

注:*与对照组比较,$P<0.05$;▲与对照组比较,$P<0.05$。*组间比较,$P<0.05$;▲组间比较,$P<0.05$;◆组间比较,$P<0.05$

2.3 ATRA 对 HO8910 细胞侵袭能力的影响

与对照组比较，ATRA 作用 24、48、72 h 后，HO8910 细胞侵袭穿膜细胞数明显下降，有显著性差异($P<0.05$)。随着时间延长，穿膜细胞数逐渐减少，组间比较差异具有统计学意义($P<0.05$)(表 3，图3)。

表 2 ATRA 作用于 HO8910 细胞的侵袭能力($\bar{x}\pm s$)

组别	侵袭细胞数
对照组	178 ± 9.1*
24 h 组	135 ± 4.5*▲
48 h 组	97 ± 5.2*▲
72 h 组	41 ± 2.6*▲

*同对照组比，$P<0.05$；▲组间比较，$P<0.05$

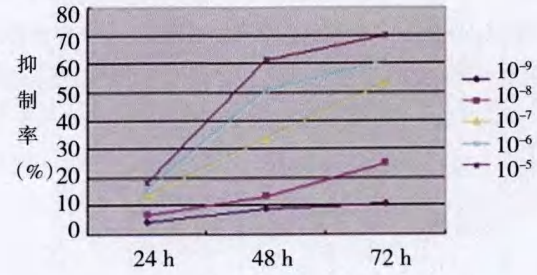


图 1 ATT 法测细胞增殖活性

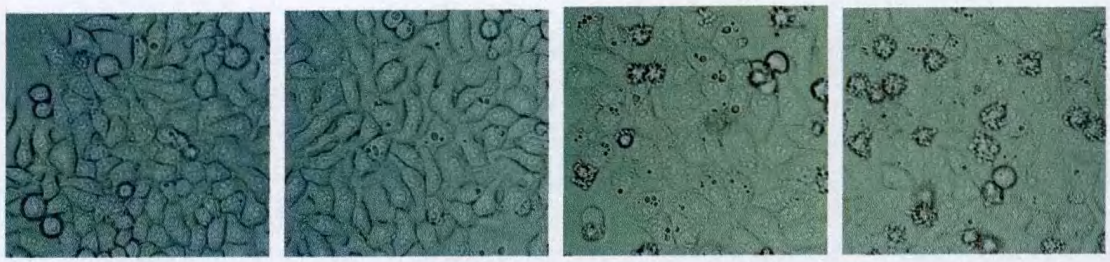


图 2 倒置显微镜下不同时间组 HO8910 细胞的形态学变化

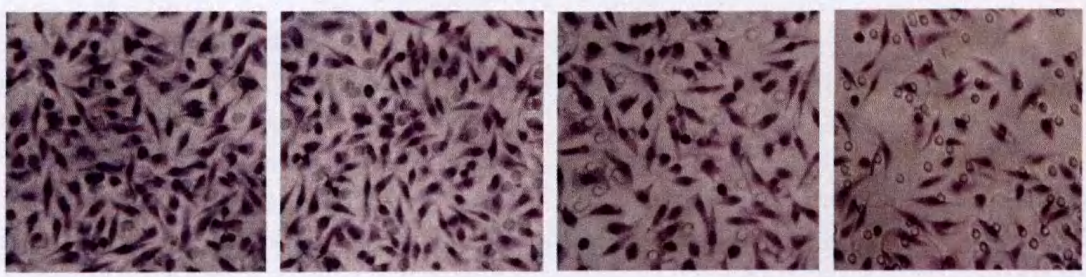


图 3 不同时间组 HO8910 细胞的侵袭表现(HE×100)

3 讨 论

3.1 全反式维甲酸对人卵巢癌细胞株 HO8910 增殖的抑制作用

抗肿瘤药物对肿瘤细胞抑制方式有多种，如诱导细胞分化、凋亡和坏死均为肿瘤生长抑制方式，抑制仅是一笼统的概念。目前研究认为：分化、凋亡和坏死有时相伴发生，以何种抑制方式为主，主要与药物浓度和作用时间有关。目前对药物诱导肿瘤细胞分化和凋亡的关系仍不完全清楚。但这些抑制方式对临床治疗肿瘤有指导意义。如诱导分化，对正常细胞杀伤小、安全，但因存在“反分化现象”，故可能存在复发与耐药问题[4]。诱导凋亡，药物用量比诱导分化大，对正常细胞可能有影响，但细胞凋亡属不可逆死亡，不存在复发，能彻底治愈癌症并解决耐药问题。而细胞坏死，一般药物用量大，正常细胞也被杀伤，并且坏死产生的物质能引起炎症反应而进一步破坏周围组织，在治疗中应避免这种现象发生。故研究全反式维甲酸对 HO8910 细胞量效关系很有必要。

本研究结果表明：ATRA 浓度为 10^{-9}、10^{-8} mol/L 时，HO8910 细胞生长受到轻度抑制，与对照组相比，无显著性差异。当 ATRA 浓度为 10^{-7}~10^{-5} mol/L 时，对 HO8910 细胞生长有明显的抑制效应。10^{-6}mol/L 的 ATRA 作用 48 h 后，细胞抑制率为 50.65%；10^{-7} mol/L 的 ATRA 作用 72 h 后，细胞抑制率为 53.26%。计算出 24、48、72 h ATRA 抑制

HO8910 细胞增殖的 IC_{50} 值分别为 2.331×10^{-5}、0.998×10^{-6}、0.891×10^{-7} mol/L。结合参考文献[2,3],确定 1×10^{-6} mol/L ATRA 作为进一步实验的浓度。

本实验可以同时观察到 ATRA 抑制 HO8910 生长。倒置显微镜下,ATRA 处理后的肿瘤细胞变小变圆,长势较弱,密度减小,可见部分圆形漂浮的细胞,其胞浆内见许多颗粒。

3.2 全反式维甲酸对人卵巢癌细胞株 HO8910 侵袭潜能的抑制作用

侵袭是恶性肿瘤的一个重要特征,是癌细胞发生转移的先决条件。肿瘤的侵袭是一个极为复杂的多步骤过程,其中,细胞外基质和基底膜重塑是癌细胞侵袭的关键环节。基底膜是癌细胞侵袭的天然屏障,通过调控肿瘤细胞与基底膜的粘附、破坏由细胞间基质、基底膜组成的细胞外间质屏障参与肿瘤的侵袭过程。本实验选用重组人工基底膜 Matrigel 作为粘附基质,其成分与组织基底膜相似,在 37℃时呈胶冻状,可较好地模拟组织基底膜,用作观察细胞同细胞外基质间地相互作用,用于 Transwell 双室联合培养系统反应肿瘤细胞的侵袭运动能力。

ATRA 在胚胎及成年组织中有多种生物学活性,如在细胞增生、凋亡、分化、生殖、维持细胞正常功能等方面发挥重要作用[5]。目前众多实验表明 ATRA 能抑制多种肿瘤细胞增殖如肝癌[6]、乳腺癌[6]、肺癌[6]、神经母细胞瘤[7]、绒毛膜癌[8]、甲状腺癌[9]、黑色素瘤[10]、骨髓瘤[10]、肾癌等[10]。本实验显示,1×10^{-6} mol/L ATRA 作用于 HO8910 细胞 24、48、72 h 后,侵袭穿膜细胞数较对照组均有明显减少,并随时间增长,穿膜细胞数逐渐下降,各组比较有显著性差异($P<0.05$)。表明 ATRA 对人卵巢癌细胞株HO8910 的侵袭能力有抑制作用。这与 Soprano KJ 等的研究一致[11]。

目前,运用诱导剂抑制肿瘤细胞增殖、诱导分化与凋亡,已成为肿瘤化学防治中的新思路,越来越受到重视。ATRA 作为一种较新的诱导剂能抑制肿瘤细胞增殖、诱导分化和凋亡,并且能抑制肿瘤细胞侵袭、转移。本实验研究 ATRA 对人卵巢癌细胞株 HO8910 的作用,旨在为后续相关实验提供新的思路,并为卵巢癌治疗的临床用药提供一定的理论依据。

参 考 文 献

[1] Huang M E, Ye Y C, Chen S R, et al. Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia[J]. Blood, 1988, 72(2): 567-578.

[2] Xu M J, Cui Y, Hui N, et al. Effects of retinoic acid on proliferation and differentiation of a human ovarian carcinoma cell line: 3AO[J]. Chin Med Sci J, 2005, 20(1): 51-54.

[3] Purev E, Soprano D R, Soprano K J. Effect of all-trans retinoic acid on telomerase activity in ovarian cancer cells[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2004, 23(2): 309-316.

[4] Sanchez-Martin M. Brain tumour stem cells: implications for cancer therapy and regenerative medicine[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2008, 3(3): 197-207.

[5] Campo-Paysaa F, Marlétaz F, Laudet V, et al. Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins [J]. Genesis, 2008, 46(11): 640-656.

[6] Lin L M, Li B X, Xiao J B, et al. Synergistic effect of all-trans-retinoic acid and arsenic trioxide on growth inhibition and apoptosis in human hepatoma, breast cancer, and lung cancer cells in vitro [J]. World J Gastroe nterol, 2005, 11(36): 5633-5637.

[7] Voigt A, Zintl F. Effects of retinoic acid on proliferation, apoptosis, cytotoxicity, migration, and invasion of neuroblastoma cells[J]. Med Pediatr Oncol, 2003, 40(4): 205-213.

[8] Chiu P M, Feng H C, Benbrook D M, et al. Effect of all-trans retinoic acid on tissue dynamics of choriocarcinoma cell lines: an organotypic model[J]. J Clin Pathol, 2006, 59(8): 845-850.

[9] Zhang Y, Jia S, Liu Y, et al. A clinical study of all-trans-retinoid-induced differentiation therapy of advanced thyroid cancer[J]. Nucl Med Commun, 2007, 28(4): 251-255.

[10] Kast R E. Potential for all-trans retinoic acid (tretinoin) to enhance interferon-alpha treatment response in chronic myelogenous leukemia, melanoma, myeloma and renal cell carcinoma[J]. Cancer Biol Ther, 2008, 7(10): 1515-1519.

[11] Soprano K J, Purev E, Vuocolo S, et al. Rb2/p130 and protein phosphatase 2A: key mediators of ovarian carcinoma cell growth suppression by all-trans retinoic acid[J]. Oncogene, 2006, 25(38): 5315-5325.

(责任编辑:关蕴良)