维普资讯 http://www.cqvip.c



文章编号:0253 - 3626(2005)01 - 0012 - 04

# 全反式维甲酸对人卵巢癌细胞株 COC1 增殖分化的影响

杨 敏,赵 涌,林 晓

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨全反式维甲酸(ATRA)对人卵巢癌细胞株 COC1 增殖分化的影响。方法:选用人卵巢癌细胞株 COC1 进行体外培养,以不同浓度的 ATRA 处理 COC1 细胞,MTT 比色法检测细胞增殖抑制情况;流式细胞仪进行细胞周期时相分析;光镜及透射电镜进行形态学观察;免疫细胞化学法测定细胞内增殖细胞核抗原 Ki - 67 的表达;酶联免疫法测定培养液中卵巢癌标志物 $CA_{125}$ 水平的变化。结果:ATRA 浓度为 $10^{-7}\sim10^{-5}$mol/L 时,均明显抑制 COC1 细胞的增殖;ATRA 处理 COC1 细胞后 $G_0/G_1$ 期细胞增加,S 期细胞减少。经 ATRA 处理的 COC1 细胞发生显著形态学分化,Ki - 67 表达减弱,培养液中 $CA_{125}$ 的表达水平降低。结论:ATRA 能明显抑制人卵巢癌细胞株 COC1 的生长增殖并诱导部分细胞向良性分化。

【关键词】卵巢肿瘤;维甲酸;增殖;分化

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标识码】A 【收稿日期】2004 - 06 - 04

# The effects of all - trans retinoic acid on proliferation and differentiation in ovarian cancer cell line COC1

*YANG Min, et al*

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of all - trans retinoic acid (ATRA) on prolifetation and differentiation in ovarian cancer cell line COC1 in vitro. *Methods*: Human ovarian cancer cell line COC1 was cultured in medium containing ATRA in different concentrations in vitro. Cell proliferation inhibition was tested by MTT assay. The cell cycle was analyzed by flow cytometry(FCM). Morphological changes of cell differentiation were observed by light and transmission electron microscopy, and the expression of Ki - 67 in cancer cells were measured with SP immunohistochemistry. In addition, $CA_{125}$ expression in the culture medium was measured by ELISA. *Results*: ATRA of $10^{-7}\sim10^{-5}$mol/L inhibited COC1 cell proliferation significantly in a dose - dependent and time - dependent manner. With the increase of ATRA concentrations, the number of cells in $G_0/G_1$ phase were elevated, the number of cells in S phase were obviously decreased. COC1 cells after treated by ATRA showed striking morphological characteristics of differentiation. The expression of Ki - 67 was decreased in COC1 after ATRA treatment. ATRA could also suppress the expression of CA125 tumor marker in COC1 cells. *Conclusion*: ATRA can both inhibit proliferation and induce differentiation of human ovarian cancer cell line COC1. These results may provide an effective and novel approach for clinical treatment of human ovarian cancer.

【Key words】Ovarian neoplasms; Retinoic acid; Proliferation; Differentiation

维甲酸是维生素 A 代谢及化学合成衍生物,近年研究表明其能抑制多种肿瘤细胞的增殖,诱导其分化。临床上已用于治疗急性早幼粒细胞白血病,并取得较好疗效,而维甲酸对卵巢癌的作用及其机制,目前尚无定论。我们以人卵巢癌细胞株 COC1 为模型,探讨 ATRA 对其增殖、分化的影响,为临床应用维甲酸预防和治疗卵巢癌提供实验依据。

作者介绍:杨 敏(1978 - ),女,硕士生,
主要研究方向:女性生殖系统肿瘤病理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人卵巢癌细胞株 COC1 引自重庆医科大学超声研究所,全反式维甲酸(ATRA)、碘化丙啶(PI)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)及二甲亚砜(DMSO)均为 Sigma 公司产品,RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司,小牛血清系杭州四季青生物材料研究所生产,SP 试剂盒、Ki - 67 单抗购自福州迈新生物技术开发公司,$CA_{125}$ 酶联免疫试剂盒为 Bio - Ekon 产品。

### 1.2 方法

维普资讯 http://www.cqvip.com



1.2.1 细胞培养及实验分组 COC1 细胞株在含有 10%小牛血清、100U/ml 青霉素及 100U/ml 链霉素的 RPMI1640 培养基中,37℃、5%$CO_2$ 混合气体的孵箱中培养。细胞换液为 24h～48h,取对数生长期细胞进行实验。ARTA 以无水乙醇配成 $10^{-2}$mol/L 储存液,－20℃避光保存,实验组使用终浓度分别为 $10^{-5}$mol/L、$10^{-6}$mol/L、$10^{-7}$mol/L、$10^{-8}$mol/L、$10^{-9}$mol/L,对照组加等体积无水乙醇(<0.1%)。

1.2.2 MTT 法测定细胞生长抑制率 按上述培养方法得到 COC1 单细胞悬液,细胞呈悬浮生长,以每孔 $1\times10^5$ 个细胞接种于 96 孔培养板,实验组加入不同浓度 ATRA,每孔 20μl,使其终浓度分别达到上述各浓度,实验设无水乙醇和 RPMI1640 液对照组,每组均设 5 个平行孔。继续培养 1d、2d、3d、4d,取出培养板离心,弃上清,加入 200μl 不含小牛血清的新鲜 RPMI1640 液,每孔加入 20μl MTT 液(浓度为 5mg/ml);孵育 4h 后再次离心 2000r/min×5min,每孔加入 DMSO 200μl,振荡 5min,用自动酶标读数仪(Bio－TekELX800UV)在波长为 570nm 时测定每孔的吸光度(A)值,计算抑制率(%)=(1－实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%。

1.2.3 流式细胞仪测定细胞周期 将 COC1 细胞按 $5\times10^4$ 个/ml 密度接种于 50ml 培养瓶中,实验组加入终浓度为 $10^{-7}$mol/L、$10^{-6}$mol/L、$10^{-5}$mol/L 的 ATRA,设对照组;培养 72h 收集细胞悬液,离心 PBS 漂洗,70%冷乙醇固定,制备单细胞悬液,PI 染色,流式细胞仪(FCM,美国 FASCan Becton Dickinson)上机测定,进行细胞周期分析。

1.2.4 细胞的形态学观察

1.2.4.1 光学显微镜观察 设实验组和对照组,培养 72h 后,收集细胞,调整细胞悬液浓度为 $1\times10^5$ 个/ml,入离心甩片机(军事医学科学院产品)制成细胞涂片,95%乙醇固定,HE 染色,光镜下观察。

1.2.4.2 透射电镜观察 上述方法培养 72h 后收集细胞,按电镜常规固定、包埋、切片、染色,采用 Hitachi－600 透射电子显微镜(日本日立公司生产)观察、摄片。

1.2.5 免疫细胞化学染色 染色前处理与 HE 染色相同,按照常规免疫组化染色(SP 法),DAB 显色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,Ki－67 阳性为细胞核着色。选择 5－10 个高倍镜视野,采用 CM－200B 生物医学图像分析系统随机记数 500 个细胞,阳性表达率=(阳性细胞数/500)×100%。

1.2.6 $CA_{125}$ 抗原测定 取实验组、对照组培养后的培养液,按 $CA_{125}$ 酶联免疫试剂盒说明书操作,用全自动酶标仪(意大利 Bio－Ekon 公司生产)测定结果。

1.3 统计处理

采用 SPSS10.0 软件处理系统进行统计学分析结果。吸光度值采用方差分析;组间两两比较用 SNK 法;免疫细胞化学结果分析用秩和检验;多组间比较采用方差分析。$P<0.05$ 为差异显著,$P<0.01$ 为差异非常显著。

## 2 结 果

### 2.1 ATRA 对 COC1 细胞增殖的影响

MTT 比色法检测 ATRA 对 COC1 细胞增殖影响的结果(见图 1)。从图 1 可以看出,随着作用时间的延长和药物浓度的升高,抑制作用越来越明显,呈明显的时间－剂量依赖关系。

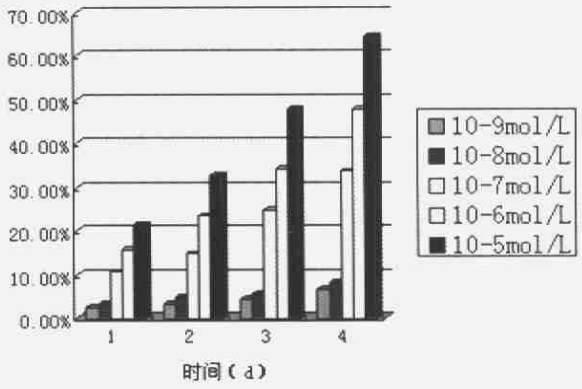



图 1 不同浓度的 ATRA 作用不同时间对 COC1 细胞增殖的影响

### 2.2 ATRA 对 COC1 细胞周期的影响

流式细胞仪检测 COC1 细胞周期分布情况(见表 1)。与对照组相比,$10^{-7}$～$10^{-5}$mol/L 浓度的 ATRA 可以明显改变 COC1 细胞的生长周期,使 $G_0/G_1$ 期细胞由 31.34%增加到 56.92%,S 期的细胞由 58.50%减少为 32.71%,将细胞阻滞于 $G_0/G_1$ 期并呈现明显的剂量依赖关系。

表 1 不同浓度 ATRA 对 COC1 细胞周期的影响

| 组 别 | 细胞周期分布(%) | | |
|---|---|---|---|
| | $G_0/G_1$ | S | $G_2/M$ |
| 对照组 | 31.34% | 58.50% | 10.15% |
| $10^{-7}$mol/L | 37.04% | 53.63% | 9.33% |
| $10^{-6}$mol/L | 42.77% | 51.46% | 5.77% |
| $10^{-5}$mol/L | 56.92% | 32.71% | 10.37% |

### 2.3 形态学观察

2.3.1 光学显微镜观察 对照组 COC1 细胞呈圆形或椭圆形,形态饱满,核大深染,可见明显的核分裂像(见图 2－1)。ATRA 作用 3 天后,可见细胞体积变小且较规则一致,核分裂像明显减少,核/质比例下降。部分细胞表现为细胞质浓缩深染,细胞核染色质致密固缩,聚集于核膜周围(见图 2－2)。

2.3.2 透射电子显微镜观察 对照组细胞大而圆,核大不规则,可见核膜切迹;常染色质发达,可有一

维普资讯 http://www.cqvip.com



个以上的核仁;胞浆中细胞器较少,存在少数散在分布的线粒体,大部分细胞的高尔基复合体不发达(图 3-1)。实验组细胞核较小且规则,核膜皱缩,异染色质增多,核仁减少甚至消失;胞浆内线粒体数量增多,嵴的数量增多,高尔基复合体体积增大,发育完善,粗面内质网增多,游离核糖体明显减少,部分胞浆内出现空泡样变性(图 3-2)

2.4 ATRA 对增殖细胞核抗原 Ki-67 表达的影响

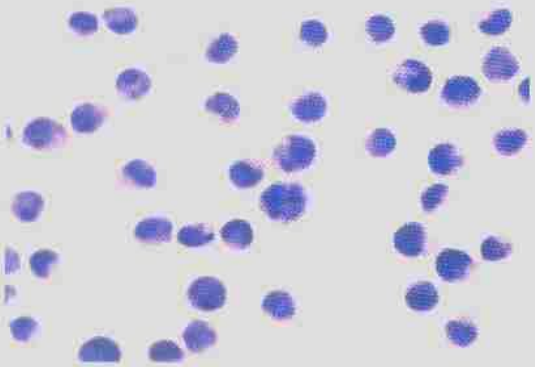


图 2-1 光镜下对照组 COC1 细胞 HE×200

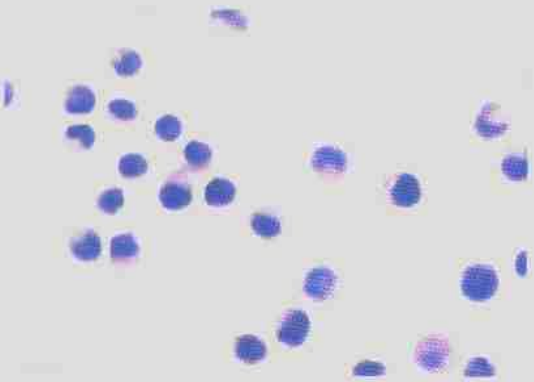


图 2-2 光镜下 $10^{-5}$mol/L ATRA 处理 3 天的 COC1 细胞 HE×200

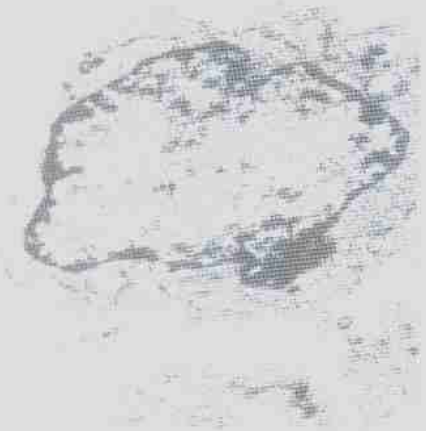


图 3-1 对照组 COC1 细胞超微结构 TEM×8000



图 3-2 ATRA 作用后观察 COC1 超微结构 TEM×8000

免疫细胞化学观察显示,Ki-67 在对照组瘤细胞内表达较强,呈棕黄色分布于细胞核内,其阳性表达率为 83.45%;经 ATRA 处理后,细胞 Ki-67 表达明显减弱,当 ATRA 为 $10^{-5}$mol/L 时,其阳性表达率下降到 40.01%(见表 2)

2.5 ATRA 对 COC1 细胞 $CA_{125}$ 表达的影响

不同浓度 ATRA 处理 COC1 细胞 72h 后,培养液中 $CA_{125}$ 水平较对照组减低($P<0.05$)见(表 2)。当 ATRA 为 $10^{-5}$mol/L 时,$CA_{125}$ 水平明显低于对照组和 $10^{-6}$mol/L 浓度组($P<0.01$)。随 ATRA 浓度的增加,瘤细胞 $CA_{125}$ 分泌量明显下降,同时 $CA_{125}$ 的分泌量与增殖细胞核抗原 Ki-67 及 $CA_{125}$ 的表达呈现正相关($rs=0.972$, $P<0.01$)。

表 2 不同浓度的 ATRA 对 COC1 细胞 Ki-67 及 $CA_{125}$ 表达的影响

| 组别 | Ki-67(%) | $CA_{125}$(mU/ml) |
|---|---|---|
| 0mol/L | 83.45±0.88 | 27.50±1.15 |
| $10^{-7}$mol/L | 69.50±1.03△ | 17.67±0.93△ |
| $10^{-6}$mol/L | 55.53±1.26△★ | 14.37±1.22△ |
| $10^{-5}$mol/L | 40.01±0.84△★ | 7.40±0.80△★ |

△代表与对照组比较,$P<0.01$ ★代表组内比较,$P<0.01$

Ki-67 表达采用免疫细胞法,$CA_{125}$ 表达采用酶联免疫吸附实验

## 3 讨 论

卵巢癌治疗目前主要采用手术切除辅以化疗,后者主要是通过抑制肿瘤细胞增殖而达到使肿瘤减小或消退作用,但毒副作用较大。近年来研究发现,

维普资讯 http://www.cqvip.com



维甲酸可阻滞多种实体肿瘤细胞生长并诱导其分化[1~3]。因此,利用毒副作用小的 ATRA 抑制卵巢癌细胞增殖,可为临床防治卵巢癌提供一条新的途径。

研究对肿瘤细胞增殖抑制作用是筛选抗肿瘤药物的一个基本指标。本实验结果显示:ATRA 对 COC1 细胞生长有明显的抑制效应,并且 ATRA 的这种抑制作用呈现明显的时间 - 剂量依赖关系,这与 Voigt A 等[4]研究 ATRA 对成神经细胞瘤的生长抑制作用相近。流式细胞仪检测发现,ATRA 处理后,$G_0/G_1$ 期细胞比例明显增多,S 期细胞比例减少,提示 ATRA 可抑制卵巢癌细胞株 COC1 的分裂生长,改变其增殖动力学。Ki - 67 是一种增殖细胞相关的核抗原,存在于细胞周期的活性阶段 $G_1$、$G_2$、S 和 M 期,而在 $G_0$ 期细胞中无表达[5]。本实验免疫细胞化学结果显示经 ATRA 处理后,COC1 细胞 Ki - 67 表达明显降低,进一步证实 ATRA 对人卵巢肿瘤的恶性增殖活性具有显著的抑制作用。

细胞形态学改变是细胞分化的表型特征,形态学上成熟程度是推断细胞恶性与否及分化诱导成功与否的重要指标[6]。光镜下观察可发现与对照组相比,经 ATRA 处理后的肿瘤细胞体积明显缩小,多核瘤细胞和瘤巨细胞减少,核分裂像偶见。电镜下,经 ATRA 处理后,COC1 细胞核较小且规则,异染色质增多,核仁减少甚至消失,胞浆内出现发育良好的线粒体、高尔基复合体等细胞器。此类结果均表明 ATRA 能部分逆转卵巢癌细胞的形态与超微结构恶性表型特征,与一些分化诱导剂如苯乙酸钠处理卵巢癌细胞产生相似的细胞学形态与超微结构变化[7]。

$CA_{125}$是卵巢上皮退行性分化的肿瘤标志物,在卵巢癌细胞及病人血清中常高表达,在人体正常卵巢组织及血清中不表达或低表达,与卵巢癌细胞的恶性程度密切相关,其敏感性可达 81%,$CA_{125}$的分泌量对观察疗效及预后有重要的意义[8]。实验结果显示,COC1 细胞经 ATRA 处理 72h 后,$CA_{125}$分泌量较对照组明显减少,且与增殖细胞核抗原 Ki - 67 的表达呈正相关,表明 ATRA 能抑制肿瘤细胞增殖,且诱导细胞向良性方向分化。

实验结果表明 ATRA 可抑制人卵巢癌细胞株 COC1 增殖、细胞形态出现一定程度的良性分化和相应的功能改变。随着研究的深入,ATRA 在卵巢癌临床防治上将具有更广泛的应用。

## 参 考 文 献

[1] Esdar C, Milasta S, Maelicke A, et al. Differentiation - associatal apoptosis of neural stem cells is effected by Bcl - 2 over expression: impact on cell lineage determination[J]. Eur J Cell Biol, 2001; 80(8): 539 - 553.

[2] Xu XC, Liu X, Tahara E, et al. Expression and up - regulation of retinoic acid retinoic acid receptor - beta is associated with retinoid sensitivity and colony formation in esophageal cancer cell lines[J]. Cancer Res, 1999; 59(10): 2477 - 2483.

[3] Zhao X, Demary K, Wong L, et al. Retinoic acid receptor - independent mechanism of apoptosis of melanoma cells by the retinoid CD437(AHPN)[J]. Cell Death Differ, 2001; 8(9): 878 - 886.

[4] 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.

[5] Goff B, Ries J, Els L, et al. Immunophenotype of ovarian cancer as predictor of clinical outcome: evaluation at primary surgery and second - look procedure[J]. Gynecol Oncol, 1998; 70(3): 378 - 385.

[6] 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000; 166 - 168.

[7] Melichar B, Ferrandina G, Verschraegen CF, et al. Growth inhibitory effects of aromatic fatty, acids on ovarian tumor cell lines[J]. Clin Cancer Res, 1998; 4(12): 3069 - 3076.

[8] Rai A, Zhang Z, Rosenzweig J, et al. Proteomic approaches to tumor marker discery[J]. Arch Pathol Lab Med, 2002; 126 (12): 1518 - 1526.