

# 上皮性卵巢癌细胞原代培养及放化疗相关的 DNA 损伤应答机制的研究\*

王思<sup>1</sup>, 郭莲娣<sup>2</sup>, 贾月改<sup>1</sup>, 杨娟<sup>1</sup>, 王鑫<sup>2</sup>, 刘聪<sup>2,3</sup>, 楼江燕<sup>1,3△</sup>

1. 四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041); 2. 四川大学华西第二医院 西部妇幼研究院 基因组稳定性实验室(成都 610041); 3. 四川大学 出生缺陷与相关妇科疾病教育部重点实验室(成都 610041)

**【摘要】** 目的 通过上皮性卵巢癌组织细胞原代培养,检测 DNA 损伤应答过程中相关蛋白细胞定位的动态变化。**方法** 选取临床新鲜卵巢上皮性肿瘤标本 28 例(交界性浆液囊腺瘤 6 例,高分化浆液腺癌 5 例,中分化浆液腺癌 6 例,低分化浆液腺癌 11 例),组织块经胶原酶 A 消化后培养,比较不同培养基(MCDB/M199 培养基、原代细胞专用培养基、DMEM 培养基)对原代肿瘤细胞正常形态维持、增殖潜力及纤维化的影响。离子射线(X 光)、喜树碱(CPT)处理诱导细胞 DNA 损伤,间接免疫荧光法检测 ATM 蛋白激酶依赖性信号转导通路中 DNA 损伤(双链断裂)应答相关蛋白[p53 结合蛋白 1(53BP1),磷酸化组蛋白 H2AX( $\gamma$ -H2AX)]的应答特征。**结果** MCDB/M199 培养基有利于卵巢上皮性肿瘤细胞维持正常形态并减缓纤维化。未经处理前各级别卵巢肿瘤原代细胞中均存在不同程度的内源性损伤(53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点),且随着肿瘤细胞恶性程度的增加,53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点逐渐增多( $P < 0.05$ )。X 光、CPT 可以在卵巢癌原代细胞中诱导大量 DNA 损伤,提示原代培养的细胞有经典的 DNA 损伤应答反应。**结论** 成功建立了卵巢上皮性肿瘤直接分离培养方法,在卵巢上皮性肿瘤发展过程中,ATM 转导通路检验点信号可被内源性损伤激活,CPT、X 线处理会造成上皮性卵巢癌原代细胞中 ATM 通路的进一步激活来抑制肿瘤增殖,阻止肿瘤进展。

**【关键词】** 卵巢肿瘤 原代细胞培养 DNA 损伤

**DNA Damage Response of Epithelial Ovarian Cancer Cells (Primary Culture) to Chemo-radiotherapy** WANG Si<sup>1</sup>, GUO Lian-di<sup>2</sup>, JIA Yue-gai<sup>1</sup>, YANG Juan<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>2</sup>, LIU Cong<sup>2,3</sup>, LOU Jiang-yan<sup>1,3△</sup>. 1. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Genome Stability Laboratory, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Key Laboratory of Birth and Related Diseases of Women and Children, Sichuan University, Ministry of Education, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: loujiangyanl@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To detect protein dynamic changes of cellular localization and the DNA damage response of epithelial ovarian cancer cells to chemo-radiotherapy. **Methods** 28 specimens of epithelial ovarian cancer were collected, with 6 cases diagnosed as borderline serous cystadenoma, 5 as highly differentiated, 6 as medium differentiated and 11 as poorly differentiated cystadenocarcinoma. Collagenase A was used for digesting tissues before primary culture. We compared the characteristics of cells cultured in different mediums (MCDB/M199 medium, primary culture medium, and DMEM medium) supplemented with multiple growth-promoting factors. The characteristics of cells were examined in terms of the maintenance of normal cell morphology, proliferation potential, and cell fibrosis proteins (53BP1 and  $\gamma$ -H2AX) responsive to DNA damage [those in the ATM checkpoint pathway determined by indirect immunofluorescent staining after treatment with camptothecin (CPT) and X-ray]. **Results** Normal morphology was maintained relatively well in the cells cultured in MCDB/M199 medium and its cell fibrosis was slow compared with the cells cultured in other media. Gradually increased endogenous damage was demonstrated by the expression of 53BP1 and  $\gamma$ -H2AX foci ( $P < 0.05$ ) in all of the ovarian primary cells. After treatment with CPT and ionizing radiation, increased levels of DNA double-strand breaks were observed indicating a classic DNA damage response. **Conclusion** We have successfully established a protocol for the primary culture of

\* 四川省科技厅应用基础项目(No. 2012JY0011)、四川省杰出青年学术技术带头人资助计划(No. 2012JQ0005)和成都市科技局计划项目(No. 11PPYB072SF)资助

△ 通讯作者, E-mail: loujiangyanl@aliyun.com

epithelial ovarian cancer cells, which provides an important platform for characterizing DNA damage responses of the cells. With the progression of epithelial ovarian cancers, the ATM checkpoint pathway is activated by endogenous DNA lesions. This signaling pathway can be further activated by CPT or X-ray irradiation, hampering the growth of tumor cells and further progression of cancers.

**【Key words】** Ovarian cancer Primary culture DNA damage

全世界范围,每年约有 22 万名妇女被诊断出患有卵巢癌,约 14 万人因该病而死亡<sup>[1]</sup>。上皮性卵巢癌(EOC)作为妇科恶性肿瘤中死亡率最高的疾病之一,越来越受到广泛关注。卵巢癌因其早期无明显症状,诊断时多属晚期<sup>[2]</sup>,手术治疗及术前、术后放化疗为主要治疗手段。然而,目前为止,关于卵巢癌的研究大多数是基于卵巢癌细胞株(如 SKOV3、OVCAR-8/TR 等)建立的<sup>[3,4]</sup>,直接针对卵巢癌原代细胞的研究相对较少,但细胞株各项特征均与患者体内卵巢癌细胞存在明显差异<sup>[5]</sup>。因此进行上皮性卵巢癌细胞原代培养,并研究原代细胞对放化疗作用的反应更有意义。

基因组的不稳定性与肿瘤的发生、发展关系密切<sup>[6]</sup>。DNA 损伤应答机制在基因组稳定性的维持中起重要作用<sup>[7,8]</sup>。放化疗药物治疗肿瘤的机制主要是通过造成严重的、无法修复的 DNA 损伤,通过细胞周期检验点机制诱导细胞凋亡,杀灭肿瘤细胞。然而,上皮性卵巢肿瘤治疗过程中易产生耐药,影响治疗效果,5 年生存率难以提高<sup>[9,10]</sup>。喜树碱(CPT)类药物可通过抑制拓扑异构酶 I 发挥抗肿瘤作用<sup>[11]</sup>,尤其对铂类化疗药物耐药的卵巢癌患者有较好疗效<sup>[12,13]</sup>。目前关于上皮性卵巢肿瘤 DNA 损伤应答反应的具体机制仍不甚明确,特别是对卵巢癌原代细胞的研究十分有限,深入研究卵巢癌的 DNA 损伤应答及细胞周期检验点机制,对于了解卵巢癌的发生、发展及治疗有重要意义。本研究收集了 28 例上皮性卵巢肿瘤标本,进行原代培养,检测其内源性 DNA 损伤,并研究 CPT、离子射线(X 线)处理后的 DNA 损伤应答反应,为卵巢肿瘤的临床放化疗提供研究基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 主要试剂及仪器** MCDB105 培养基(Sigma),M199 培养基(Invitrogen),DMEM 培养基(Hyclone),原代细胞专用培养基(PriCells),胎牛血清 FBS(Gibco 公司),青霉素(100 U/L)/链霉素(100 mg/L)(Invitrogen),霍乱毒素(Sigma,C8052-

2MG),白血病抑制因子(LIF,Millipore),氢化可的松(Sigma)、胰岛素(国产)、肝素(国产)、0.25%胰蛋白酶(E+T,Sigma),胶原酶 A(Sigma),5-溴脱氧尿嘧啶核苷 Brdu(Sigma),40 g/L 多聚甲醛(Sigma),TritonX-100(Keygen),p53 结合蛋白 1(53BP1,Bethyl,A300-272A),磷酸化组蛋白 H2AX( $\gamma$ -H2AX,Millipore,#05-636),羊抗鼠 Brdu 抗体(Roche),细胞角蛋白 7(CK7,国产),磷酸盐缓冲液缓冲液(PBS,海门),荧光素标记羊抗兔二抗 CY3(Sigma),荧光素标记羊抗鼠二抗 FITC(Sigma),CPT(Sigma),4,6-联脒-2-苯基吡啶 DAPI(Vector laboratories)。科研 X 光机(DWX100,北京万东软件技术有限公司)。

**1.1.2 标本来源** 取自 2012 年 11 月至 2013 年 7 月四川大学华西妇女儿童医院妇产科手术切除新鲜标本。术后肿瘤组织病理检查证实均为上皮性卵巢肿瘤,其中交界性囊腺瘤 6 例,高分化浆液性腺癌 5 例,中分化浆液性腺癌 6 例,低分化浆液性腺癌 11 例。患者年龄 22~65 岁,平均 41.7 岁。所有纳入患者术前均未进行过放化疗等治疗。本次试验过程符合本院伦理委员会标准。

### 1.2 方 法

**1.2.1 原代细胞培养** 将新鲜获取的上皮性卵巢肿瘤组织在细胞间超净工作台用无菌 PBS 液清洗 8 遍,用眼科剪修剪去掉周围坏死组织、血凝块及脂肪组织等,移入另一无菌培养皿中,眼科剪剪碎至 1 mm×1 mm×1 mm,分成 3 等份至 15 mL 离心管中,各加入 0.2 mg/mL 胶原酶 A 溶液 10 mL 吹打均匀,转移至 37 ℃恒温摇床消化 4 h,常温 3 000 r/min,离心 10 min,弃上清,沉淀部分用无菌 PBS 重悬,重复离心 3 次后,分别用 100 mL/L 胎牛血清及 10 mL/L 青霉素/链霉素的 MCDB/M199 培养基、DMEM 培养基,原代细胞专用培养基重悬,转移至直径 3.5 cm 培养皿中,并添加霍乱毒素(100 ng/mL)、LIF(25 ng/mL)、氢化可的松(15  $\mu$ g/mL)、胰岛素(40  $\mu$ g/mL)及肝素(4  $\mu$ g/mL)等细胞生长因子,孵箱(5%CO<sub>2</sub>,37℃)内静置至少 3~4 d 后,换液,多数卵巢癌细胞及少量成纤维细胞贴壁,之后根

据细胞培养基颜色及细胞生长情况每隔 2~3 d 换液,待细胞 80%左右融合时,2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代。因成纤维细胞相比卵巢肿瘤细胞易脱落,采用差速消化法,在倒置显微镜下观察,待成纤维细胞基本消化完成时,吸去上层液体,重新加入胰蛋白酶进行消化。将消化后细胞稀释至  $2 \times 10^5$  /mL,吸取 2 mL 细胞液,加入已覆盖玻片的数个直径 3.5 cm 培养皿中,继续培养。

**1.2.2 Brdu 脉冲标记测定细胞增殖** 采用 Brdu 脉冲标记法测定细胞增殖。传代后覆盖玻片的培养皿中,隔天观察,30%~40%细胞贴壁。实验组加入 50  $\mu$ mol/L Brdu 标记,对照组不标记,1 h 后收样进行免疫荧光染色(Brdu 可参入增殖期细胞染色体中,显示绿色灶点状荧光)。

**1.2.3 X 射线照射** 传代后融合至 80%~90%,生长状态良好的细胞爬片,实验组放置于小型 X 射线照射仪中,照射 2 Gy,1~8 h 后收样,对照组不照射,收样后 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

**1.2.4 药物处理** 孵箱内传代后继续培养的原代细胞,待玻片上细胞融合至 80%~90%时,实验组加入 CPT(终浓度为 2  $\mu$ mol/L)作用 2 h,4 h,8 h 收样,对照组加入等体积的 DMSO 溶剂,4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。

**1.2.5 细胞免疫荧光** 采用间接细胞免疫荧光染色检测细胞增殖、上皮特异性标志 cytokeratin7 (CK7)鉴定以及 DNA 损伤检验点分子(其灶点代表 DNA 双链断裂及复制应激,数量和大小与 DNA 双链断裂数量一致)53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点的观察。将收集好的细胞爬片用 PBS 缓冲液洗 3 遍,加入 0.3%的 TritonX-100 通透 10 min, PBS 洗涤(同前),封闭血清 Blocking Buffer(20 mL/L 驴血清,30 g/L 牛血清白蛋白,0.3 mL/L 的 Triton-100, PBS 稀释)封闭 30 min(Brdu 脉冲标记测定细胞增殖时,封闭前先使用 3 mol/L 盐酸变性 30 min),加入鼠抗人一抗 anti-Brdu(50  $\mu$ mol/L)、CK7(1:500)、 $\gamma$ -H2AX(1:3 000)或兔抗人一抗 53BP1(1:2 000),37  $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,加入 FITC 标记的抗鼠,或 Cy3 标记的抗兔荧光标记抗体,37  $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 30 min, PBS 洗涤 3 次,用 DAPI 抗淬灭溶液封片。荧光显微镜(Olympus, BX51)观察结果并拍照。高倍镜下( $\times 100$  倍)下每例标本取 10 个视野,每个视野计数 5 个肿瘤细胞内 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 免疫荧光染色灶点数。

**1.2.6 统计学方法** 数据采用  $\bar{x} \pm s$  及 95%可信区间(95%CI)表示。多组间比较采用方差分析,两

组间比较采用 Scheffe 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 上皮性卵巢癌细胞采用不同培养基培养后的差异

原代培养细胞静置培养至少 2~3 d 后,倒置显微镜下观察可见多数细胞呈类圆形,成团贴壁生长,折光性强,胞膜清晰,具有典型肿瘤细胞特征。第 4~5 d 可见大量细胞游出,在细胞团周围放射性生长,细胞生长密集,表现出铺路石样特征,肿瘤细胞周围出现部分呈梭形生长的成纤维细胞,8~10 d 可出现细胞完全融合及接触抑制现象。传代后,原代细胞贴壁能力弱,大部分肿瘤细胞漂浮死亡,贴壁较少。倒置显微镜下观察,贴壁细胞生长状态良好。DMEM 培养基及原代细胞专用培养基中成纤维细胞生长旺盛,最后肿瘤细胞完全被成纤维细胞替代。MCDB/M199 培养基中成纤维细胞较少,肿瘤细胞形态维持良好(图 1)。

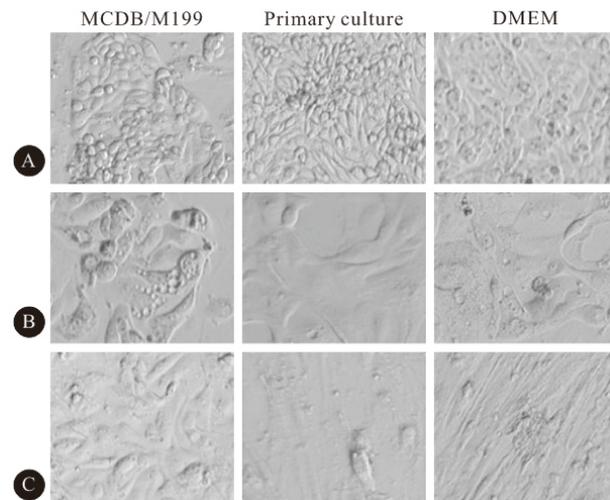


图 1 上皮性卵巢肿瘤细胞在不同培养基中的原代培养。 $\times 100$   
Fig 1 Primary culture of epithelial ovarian tumor in different medium.  $\times 100$

A: Before the passage; B: 7 d after passage; C: 13 d after passage

### 2.2 培养细胞上皮源性鉴定及增殖检测

CK7 免疫荧光检测可见细胞核周围胞浆区域有绿色信号表达,提示培养原代细胞为卵巢上皮性肿瘤细胞(图 2A)。Brdu 脉冲标记检测细胞增殖结果显示,Brdu 参入增殖期细胞染色体中,呈绿色灶点状荧光(图 2B)。

### 2.3 培养的上皮性卵巢癌细胞内源性损伤的观察

如图 3 所示,上皮性卵巢癌原代细胞未进行

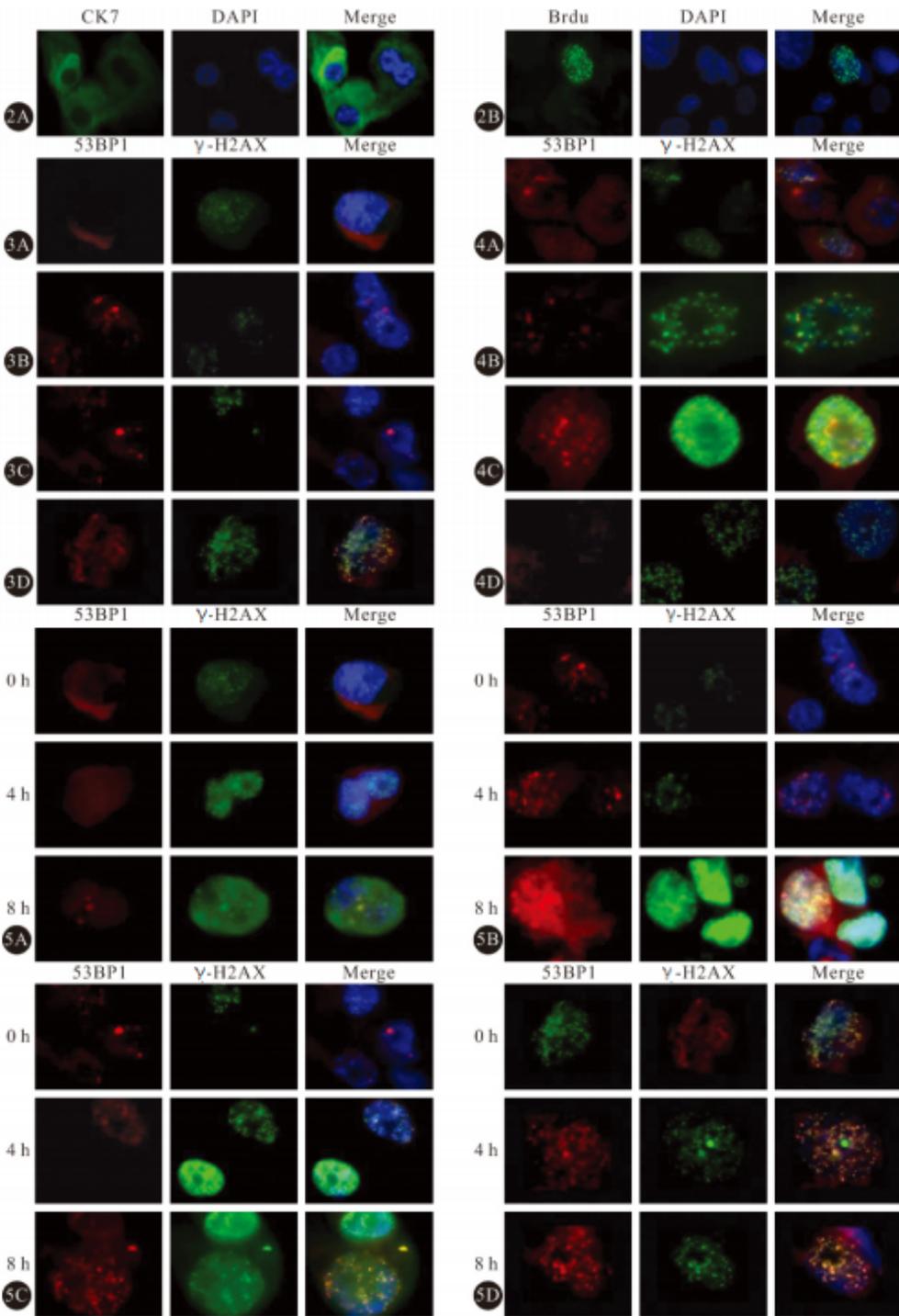


图 2 原代培养细胞 CK7 表达(A)及 BrdU 脉冲标记(B)。×1 000

图 3 卵巢上皮性肿瘤恶性化进程中(A:交界性浆液囊腺瘤;B:高分化浆液腺癌;C:中分化浆液腺癌;D:低分化浆液腺癌)53BP1、γ-H2AX 灶点。×1 000

图 4 X 线照射后 0 h(A)、1 h(B)、4 h(C)、8 h(D), 低分化卵巢浆液腺癌中 53BP1、γ-H2AX 灶点的变化。×1 000

图 5 加入 CPT 处理后 4 h、8 h 各级别卵巢肿瘤(A:交界性浆液囊腺瘤; B:高分化浆液腺癌; C:中分化浆液腺癌; D:低分化浆液腺癌)53BP1、γ-H2AX 灶点的变化。×1 000

Fig 2 Expression of CK7 in the original generation of cultured cells (A) and cell proliferation detected by pulse-labeling of BrdU (B). ×1 000

Fig 3 The immunofluorescence staining of 53BP1 and γ-H2AX showing progression of epithelial ovarian tumors from benign to malignant stages (A:Borderline; B:Highly differentiated ; C: Medium differentiated; D: Poorly differentiated). ×1 000

Fig 4 Changes of 53BP1 and γ-H2AX immunofluorescence staining in poorly differentiated serous adenocarcinoma after 0 h (A), 1 h (B), 4 h (C), and 8 h (D) X-ray irradiations. ×1 000

Fig 5 53BP1 and γ-H2AX were further activated in all stages of ovarian epithelial cancers (A:Borderline;B:Highly differentiated; C:Medium differentiated;D: Poorly differentiated) after 4 h and 8 h CPT treatment. ×1 000

任何处理前(0 h)即有 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点(即存在内源性损伤),且随着肿瘤细胞恶性程度的增加,53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点逐渐增多(交界性浆液囊腺瘤<高分化癌<中分化癌<低分化癌),各组间差异有统计学意义( $P<0.05$ ,表 1)。

**2.4 X 线、CPT 处理培养的上皮性卵巢癌细胞对内源性损伤的影响**

见图 4、图 5。在 X 线处理的低分化卵巢癌细胞中,代表 DNA 双链断裂的 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 迅速

**表 1 不同级别上皮性卵巢肿瘤中 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点数量的比较**  
**Table 1 Comparison of the number of 53BP1 and  $\gamma$ -H2AX foci in different stages of ovarian epithelial cancers**

Group	n	$\bar{x}\pm s$	95%CI	
			(lower, upper)	
<b>53BP1*·#</b>				
Borderline	6	0.23±0.19	-0.17,0.64	
Highly differentiated	5	1.20±0.82	-0.41,2.81	
Medium differentiated	6	4.28±0.85	3.38,5.18	
Poorly differentiated	11	7.50±0.93	6.86,8.13	
<b><math>\gamma</math>-H2AX*·#</b>				
Borderline	6	0.34±0.16	-0.05,0.72	
Highly differentiated	5	1.62±0.67	0.79,2.44	
Medium differentiated	6	6.60±0.71	3.84,7.75	
Poorly differentiated	11	8.91±1.05	7.22,9.32	

\*  $P_1$ (ANOVA) $<0.05$ , #  $P_2$ (Scheffe) $<0.05$ .  $P<0.05$ , is considered as statistically significant

**表 3 CPT 处理后不同恶性程度上皮性卵巢肿瘤中 53BP1 与  $\gamma$ -H2AX 灶点数量的比较**

**Table 3 Comparison of the number of 53BP1 and  $\gamma$ -H2AX foci in different stages of ovarian epithelial cancers after CPT treatment**

Group	n	$\bar{x}\pm s$		95%CI (lower, upper)	
		53BP1	$\gamma$ -H2AX	53BP1	$\gamma$ -H2AX
<b>Borderline*·#</b>					
0 h	6	0.23±0.19	0.34±0.16	-0.17,0.64	-0.05,0.72
4 h	6	1.37±0.37	1.27±0.29	0.98,1.75	0.96,1.57
8 h	6	3.18±0.69	3.34±0.39	2.45,3.90	2.92,3.74
<b>Highly differentiated*·#</b>					
0 h	5	1.20±0.82	1.62±0.67	0.16,0.23	0.79,2.44
4 h	5	4.10±0.45	4.86±0.38	3.54,4.65	4.38,5.34
8 h	5	9.76±0.62	8.76±0.74	8.99,10.53	7.84,9.68
<b>Medium differentiated*·#</b>					
0 h	6	4.28±0.85	6.60±0.71	3.38,5.18	3.84,7.75
4 h	6	9.00±1.03	9.45±0.74	7.91,10.08	8.67,10.23
8 h	6	18.55±2.33	16.42±0.97	16.21,20.89	15.39,17.44
<b>Poorly differentiated*·#</b>					
0 h	11	7.50±0.93	8.91±1.05	6.86,8.13	7.22,9.32
4 h	11	19.93±1.51	22.25±2.14	18.91,20.94	20.81,23.69
8 h	11	31.75±2.83	34.56±4.69	29.85,33.65	31.41,37.72

\*  $P_1$ (ANOVA) $<0.05$ , #  $P_2$ (Scheffe) $<0.05$ .  $P<0.05$  is considered as statistically significant. CI:Confidence interval

**3 讨论**

基因组稳定性的丧失是肿瘤发生、发展的原因之一。细胞周期检验点机制在内源性 & 外源性损伤

聚集在断裂点周围,并形成灶点,照射后 1 h、4 h DNA 损伤灶点逐渐增多,4 h 达高峰,少数细胞出现泛核磷酸化,8 h 后减弱(图 4),差异有统计学意义( $P<0.05$ ,表 2)。CPT 加药处理后 4 h,在各级别卵巢上皮性肿瘤中,53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点与处理前相比增加,直至处理后 8 h,未见明显减弱(图 5),差异均有统计学意义( $P<0.05$ ,表 3)。

**表 2 X 线照射后低分化上皮性卵巢肿瘤中 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点数量的比较**

**Table 2 Comparison of the number of 53BP1 and  $\gamma$ -H2AX foci in poorly differentiated ovarian epithelial cancer after X-ray irradiation**

Group	n	$\bar{x}\pm s$	95%CI	
			(lower, upper)	
<b>53BP1*·#</b>				
0 h	11	7.50±0.93	6.86,8.13	
1 h	11	13.04±1.29	12.17,13.91	
4 h	11	20.09±2.33	18.52,21.66	
8 h	11	5.34±1.53	4.31,6.37	
<b><math>\gamma</math>-H2AX*·#</b>				
0 h	11	8.91±1.05	7.22,9.32	
1 h	11	20.56±3.05	18.51,22.61	
4 h	11	46.61±5.19	43.13,50.11	
8 h	11	13.97±1.29	13.10,14.84	

\*  $P_1$ (ANOVA) $<0.05$ , #  $P_2$ (Scheffe) $<0.05$ .  $P<0.05$ , is considered as statistically significant. CI: Confidence interval

诱导的 DNA 损伤应答过程中起重要作用,主要通过各种分子之间相互影响发挥信号转导,致细胞周期停滞,修复损伤,当损伤严重,无法修复时,则启动细胞凋亡,保证遗传信息的稳定传递<sup>[14]</sup>。这主要依

赖 ATM 和 ATR 两条通路,其中 ATM 通路通过同源重组、非同源末端连接修复 DNA 双链断裂是维持基因组稳定性的重要途径<sup>[15-17]</sup>。ATM 通路可以特异性的感知这种损害,DNA 损伤检验点分子 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 可被迅速募集到 DNA 双链断裂侧面,诱导 DNA 损伤修复或激活 p53 等途径诱导细胞衰老或凋亡<sup>[18,19]</sup>。若 DNA 损伤检验点存在缺陷,造成的 DNA 损伤未完全修复,DNA 损伤积累并传递给子代细胞,最终导致肿瘤发生。

本研究采用胶原酶 A 酶解组织块法进行上皮性卵巢肿瘤细胞原代培养,并添加不同细胞生长促进因子,可获得活性较高、数量较多的原代细胞。胶原酶 A 作用温和,是一种细胞培养中常用的分离方法,与胰酶消化法相比较,对上皮细胞损伤小,培养成功率高<sup>[20]</sup>。上皮性卵巢癌细胞原代培养,要点如下:①标本取材应选取大体标本中菜花样肿瘤组织,注意无菌操作,取下标本需放入含双倍双抗的 PBS 缓冲液中,冰盒运送,尽快开始进行细胞原代培养处理(20 min 内)。②组织块处理时需在 37 °C 恒温摇床消化 4 h,时间太短细胞周围结缔组织消化不完全,不利于细胞贴壁,消化时间过长,对细胞损伤大。③细胞接种后应该在培养箱内严格静置至少 2~3 d 后,方可换液。④原代细胞消化传代时应在显微镜下观察,避免消化过度,加入含血清的培养基中和时,吹打应轻柔。⑤消化后的传代细胞培养时可适量加入霍乱毒素、LIF 及氢化可的松等细胞生长促进因子。⑥进行原代细胞培养时,培养细胞发现污染,必须立即弃掉。

进行体外原代细胞培养是研究上皮性卵巢肿瘤发生发展机制及放化疗反应的重要途径。相比细胞系,原代培养细胞更加接近人体内肿瘤细胞特性,更适宜用于实验研究及指导临床治疗。MCDB/M199 培养基因为不适于血液系统等细胞生长,杂质细胞在第一次换液后可被基本清除<sup>[21]</sup>。与 DMEM 培养基和原代细胞专用培养基相比,MCDB/M199 培养基也更有利于维持原代上皮性卵巢肿瘤细胞形态,更适宜用于原代细胞培养。另外,通过利用不同细胞对于胰酶敏感性的差异,采用差速消化法进行细胞纯化,能有效去除肿瘤细胞中的成纤维细胞,与其他纯化方法相比较,花费少,实验操作过程简单。

本研究结果显示,在未经处理的原代细胞中,随着卵巢肿瘤临床恶性程度进展,代表 DNA 双链断裂的 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 灶点在损伤位点的募集逐渐增多,说明原代上皮性卵巢肿瘤细胞自身不断积累

大量内源性 DNA 损伤。Naruke 等<sup>[22]</sup>对不同恶性程度的皮肤肿瘤、甲状腺肿瘤进行的免疫荧光分析也发现相似结果。然而早期 Bartkova 和 Gorgoulis 等<sup>[23,24]</sup>对膀胱肿瘤、乳腺癌等的研究却表明:在肿瘤恶性化进程中,DNA 损伤应答逐渐减弱。这可能是上皮性卵巢肿瘤发展进程中有别于其他某些肿瘤的重要特点:上皮性卵巢肿瘤在发生发展早期可能已经存在 DNA 损伤检验点机制或诱导凋亡机制的严重缺陷,进而积累大量未经修复的内源性损伤,肿瘤细胞复制错误多,基因组不稳定,突变潜能高。另外,我们的实验发现,对于 X 线诱导的损伤,低分化上皮性卵巢肿瘤细胞的 DNA 双链断裂损伤位点在处理逐渐增加,8 h 后明显减弱,表明 ATM 通路对于离子射线诱导的 DNA 损伤激活迅速,并可有效启动损伤应答机制,促进损伤修复。上皮性卵巢肿瘤强大的细胞周期检验点激活能力及 DNA 损伤修复能力可能是其对放射治疗不敏感的原因之一。Gamper 等<sup>[25]</sup>的研究也发现类似结果。喜树碱类药物可特异性抑制拓扑异构酶 I 的活性,阻碍 DNA 复制及损伤修复,最终引起细胞凋亡。CPT 药物的持续处理可使上皮性卵巢肿瘤原代细胞中 ATM 通路激活,募集大量 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 因子到损伤位点,修复损伤 DNA。至处理后 8 h,标记 DNA 双链断裂位点的 53BP1、 $\gamma$ -H2AX 信号高度激活,显示原代培养的卵巢癌细胞对喜树碱类药物有较为正常的应答反应,并有抑制细胞增殖,启动细胞凋亡的能力。这些结果支持喜树碱类药物用于对铂类耐药的上皮性卵巢肿瘤的治疗。因此,在上皮性卵巢癌的临床治疗中,也可以通过放大或者减少 DNA 损伤应答级联反应中关键蛋白的活性,改善治疗效果。本研究在上皮性卵巢肿瘤原代培养基础上,初步研究了放化疗相关的 DNA 损伤应答反应,但在肿瘤发生发展过程中存在的更多、更复杂的 DNA 损伤应答信号分子如何动态变化,如何相互影响,以及它们在基因组稳定性维持、肿瘤发生发展及治疗中的重要作用等仍需进一步探究。

## 参 考 文 献

- 1 Jemal A, Bray F, Center MM, *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011; 61(2): 69-90.
- 2 Coleman RL, Monk BJ, Sood AK, *et al.* Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat Rev Clin Oncol*, 2013; 10(4): 211-24.
- 3 Ricciardelic C, Ween MP, Lokman NA, *et al.* Chemotherapy-induced hyaluronan production: a novel chemoresistance

- mechanism in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 2013; 13(1): 476-481.
- 4 Lincet H, Kafara P, Giffard F, *et al.* Inhibition of Mcl-1 expression by citrate enhance the effect of Bcl-xL inhibitors on human ovarian carcinoma cells. *J Ovarian Res*, 2013; 6(1): 72-78.
- 5 Dunfield LD, Shepherd, TG, Nachtigal MW, *et al.* Primary culture and mRNA analysis of human ovarian cell. *Biol Proced Online*, 2002; 4(3): 55-61.
- 6 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009; 461(7267): 1071-1078.
- 7 Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. *Science*, 2002; 297(5581): 547-551.
- 8 Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 2003; 421(6922): 499-506.
- 9 Haley S. Knowledge essential to ovarian cancer care. *Nurs Times*, 2000; 96(5): 41-42.
- 10 Jabłońska E, Chłosta M, Pawlega J. Ovarian cancer—therapeutic options after the failure of the first line of treatment. *Ginekol Pol*, 2004; 75(1): 58-64.
- 11 Morris EJ, Geller HM. Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J Cell Biol*, 1996; 134(3): 757-770.
- 12 Safra T, Berman T, Yachnin A, *et al.* Weekly topotecan for recurrent ovarian, fallopian tube and primary peritoneal carcinoma: tolerability and efficacy study—the Israeli experience. *Int J Gynecol Cancer*, 2013; 23(3): 475-480.
- 13 Pecorelli S, Ray-Coquard I, Tredan O, *et al.* Phase II of oral gimatecan in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube or peritoneal cancer, previously treated with platinum and taxanes. *Ann Oncol*, 2010; 21(4): 759-765.
- 14 Pabla N, Huang S, Mi QS, *et al.* ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 2008; 283(10): 6572-6583.
- 15 Bartek J, Lukas J. Mammalian G<sub>1</sub> and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *J Curr Opin Cell Biol*, 2001; 13(6): 738-747.
- 16 Jeggo PA, Lubrich M. Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. *DNA Repair (Amst)*, 2006; 5(9-10): 1192-1198.
- 17 Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, *et al.* Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003; 4(9): 712-720.
- 18 Duckworth BC, Weaver JS, Ruderman JV, *et al.* G<sub>2</sub> arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99(26): 16794-16799.
- 19 Badgwell DB, Lu Z, Le K, *et al.* The tumor-suppressor gene ARHI (DIRAS3) suppresses ovarian cancer cell migration through inhibition of the Stat3 and FAK/Rho signaling pathways. *Oncogene*, 2011; 31(1): 68-79.
- 20 Tanaka K, Iwasaki K, Feghali KE, *et al.* Comparison of characteristics of periodontal ligament cells obtained from outgrowth and enzyme-digested culture methods. *Arch Oral Biol*, 2011; 56(4): 380-388.
- 21 Shepherd TG, Theriault BL, Campbel EJ, *et al.* Primary culture of ovarian surface epithelial cells and ascites-derived ovarian cancer cells from patients. *Nat Protoc*, 2006; 1(6): 2643-2649.
- 22 Naruke Y, Nakashima M, Suzuki K, *et al.* Alteration of p53 binding protein 1 expression during skin carcinogenesis association with genomic instability. *Cancer Sci*, 2008; 99(5): 946-951.
- 23 Bartkova J, Horejs Z, Koed K, *et al.* DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005; 434(7035): 864-870.
- 24 Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 2005; 434(7035): 907-913.
- 25 Gamper AM, Rofougaran R, Watkins SC, *et al.* ATR kinase activation in G<sub>1</sub> phase facilitates the repair of ionizing radiation-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 2013; 36(5): 626-645.

(2013-10-10 收稿, 2013-12-06 修回)

编辑 沈进