

非诺贝特对体外卵巢癌细胞 SKOV3 生长及迁移的作用

王 慧, 贺春花, 白莉萍, 郭清明, 郑 艾[△]

四川大学华西第二医院 妇产科(成都 610041)

【摘要】 目的 初步了解过氧化物酶增殖物激活受体 α (PPARs)激动剂非诺贝特对卵巢癌细胞生长情况的影响。方法 选用卵巢癌细胞 SKOV3 细胞株作为研究对象,选择不同浓度的非诺贝特进行培养,设置对照组(不含非诺贝特),采用 MTT 法测定不同浓度非诺贝特对体外卵巢癌细胞系增殖抑制作用;荧光显微镜观察 Hoechst/碘化丙啶(PI)及 Annexin-V/PI 染色后非诺贝特诱导 SKOV3 细胞凋亡作用;细胞划痕实验观察非诺贝特作用后 SKOV3 细胞的迁移改变。结果 ①MTT 实验中发现,与对照组相比,10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特处理体外卵巢癌细胞 24、48、72 h 后,各浓度对 SKOV3 细胞均产生抑制作用($P < 0.05$)。并随浓度增加,抑制效果增强,24、48、72 h 100 $\mu\text{mol/L}$ 抑制率最高($P < 0.05$),分别为 $55.72\% \pm 0.28\%$ 、 $57.63\% \pm 0.47\%$ 、 $72.41\% \pm 0.62\%$ ($P < 0.05$)。②Hoechst/PI 和 Annexin-V/PI 荧光染色置荧光显微镜下检测示,10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特处理细胞 24 h 后,诱导细胞凋亡,随着非诺贝特药物浓度的增加,SKOV3 细胞凋亡越明显。③划痕损伤实验结果显示,与对照组相比,在 10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特作用于 SKOV3 细胞 24 h 后,细胞迁移距离缩短($P < 0.05$)。结论 非诺贝特对体外卵巢癌细胞 SKOV3 细胞的增殖及细胞迁移均有抑制作用,并一定程度上诱导细胞凋亡。

【关键词】 卵巢癌 非诺贝特 过氧化物酶增殖物激活受体 增殖 凋亡 细胞迁移

Effects of Fenofibrate on the Growth and Migration of Ovarian Cancer Cells *in vitro* WANG Hui, HE Chuan-hua, BAI Li-ping, GUO Qing-ming, ZHENG Ai[△]. Department of Gynecology and Obstetrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△]Corresponding author, E-mail: 894591422@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of fenofibrate, a lipid-lowering drug, on the growth and migration of human ovarian cancer cells SKOV3 *in vitro*. **Methods** A human ovarian cancer cell line (SKOV3) as the research object, was incubated with serum-free media for 24 h. These cells were then treated by appropriate concentrations of fenofibrate for different time, including control and experimental groups. Cell proliferation was evaluated by MTT assay. Apoptosis was detected by Hoechst/PI and Annexin-V/PI fluorescent assay. The migration of cells was measured by the scratch-wound healing assay. **Results** The MTT assay results demonstrated that the fenofibrate (10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$) could inhibit the proliferation of SKOV3 cells after 24, 48 and 72 h treatment ($P < 0.05$). The inhibition rate for 24, 48, 72 h-treatment was $55.72\% \pm 0.28\%$, $57.63\% \pm 0.47\%$, $72.41\% \pm 0.62\%$ respectively ($P < 0.05$). The effects increased with the concentrations. Hoechst/PI and Annexin-V/PI fluorescent assay showed that after stimulus for 24 h, fenofibrate induced apoptosis of SKOV3 cells in a concentration-dependent manner was observed. A significant inhibited cells migration distance ($P < 0.05$) evaluated with scratch-wound healing assay was observed after treatment with fenofibrate (10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. **Conclusion** Lipid-lowering drug fenofibrate can inhibit the growth and migration of human ovarian cancer cell SKOV3 *in vitro*, to some extent induce apoptosis. But the detailed mechanism need to be further studied.

【Key words】 Ovarian cancer Fenofibrate Peroxisome proliferator-activated receptors Proliferation Apoptosis Migration

卵巢癌是女性生殖器常见肿瘤之一,在妇科恶性肿瘤中死亡率最高。据 2010 年美国国家癌症数据库统计卵巢癌每年新发病例 21 880 例,占全部新发恶性肿瘤的 3%,每年因卵巢癌死亡人数为

13 850 例,占恶性肿瘤年死亡总人数的 5%^[1]。卵巢癌化疗以铂类药物为主,一线化疗方案为紫杉醇加铂类。但卵巢癌的复发和耐药问题一直存在^[2]。卵巢癌患者总体预后并不理想,需研究新的药物来提高卵巢癌的治疗效果。过氧化物酶增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptors,

[△] 通讯作者, E-mail: 894591422@qq.com

PPARs)的研究将极有可能为卵巢癌的治疗另辟蹊径。近来有研究^[3]显示 PPAR α 受体配体非诺贝特可通过激活 NF-kappa B(NF- κ B)通路,而诱导三阴性(ER、PR 及 HER2 均阴性)乳腺癌细胞的凋亡。但非诺贝特对卵巢癌是否有抗癌效应未曾报道。故本实验采用 MTT 法、Hoechst/碘化丙啶(propidine iodide,PI)和 Annexin-V/PI 荧光检测、细胞划痕损伤实验初步探讨非诺贝特对体外卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖、凋亡及迁移的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人卵巢癌 SKOV3 细胞株由四川大学华西医院心血管实验室 II 提供。

1.1.2 实验试剂 RPMI 1640(美国 Gibco 公司),胎牛血清(民海生物工程有限公司),Hepes(美国 Gibco 公司),台盼蓝(美国 Gibco 公司),羟基脲(美国 Sigma 公司),非诺贝特(美国 Sigma 公司)。MTT(美国 Sigma 公司),Hoechst/PI(碧云天生物技术研究所),Annexin-V/PI(南京凯基生物科技发展有限公司)。倒置显微镜(Olympus TH4-200, Japan),荧光显微镜(Nikon TE200-U, Japan)。

1.2 实验方法

1.2.1 非诺贝特配制 称取非诺贝特 360.83 mg 溶解于 10 mL DMSO 中,配成原浓度 100 mmol/L 溶液,过滤,分装于 EP 管-20℃ 储存备用。临用前再以 1640 培养基稀释 1 000 倍至 100 μ mol/L,然后以 100 μ mol/L 为起始浓度加 1640 培养基按不同比例稀释至实验各浓度。

1.2.2 细胞复苏和培养 将冻存的 SKOV3 细胞 37℃ 水浴溶解,加 10 mL 1640 培养基将冻存的细胞重悬至 15 mL 离心管中,离心(1 400 r/min, 4 min),弃上清液,加 5 mL 完全 1640 培养基,吹散细胞后移至培养瓶中,将培养瓶置于 37℃ 温箱培养。SKOV3 细胞培养于 RPMI1640 培养基,置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中扩增,0.25%胰酶消化传代,每天于倒置显微镜下观察细胞生长状态,并更换培养液。

1.2.3 MTT 法检测非诺贝特对 SKOV3 细胞增殖的影响 将消化好的 SKOV3 细胞按 5×10^3 /孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁后吸净培养基,PBS 洗 2 次,分别加入含非诺贝特终浓度为 10、25、50、75、100 μ mol/L 的 1640 培养基,以不含非诺贝特的 RPMI 1640 加细胞为对照。加药后 24 h、48 h、72 h

轻轻吸净培养液,每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μ L,置温箱继续孵育 4 h,每孔再加 150 μ L DMSO,振荡混匀 10 min,置全自动酶标仪上测定 570 nm 处每孔吸光度(A)值。每个浓度设 5 个复孔,每个 96 孔板设 3 个调零孔。按以下公式计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=[(对照组 A 值-空白孔 A 值)-(实验组 A 值-空白孔 A 值)]/(对照组 A 值-空白孔 A 值) $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞凋亡的检测

1.2.4.1 Hoechst/PI 荧光法检测非诺贝特对 SKOV3 细胞凋亡的影响 按 5×10^4 /孔接种 SKOV3 细胞于 24 孔板,细胞贴壁后加入无血清 RPMI 1640 培养 24 h 将细胞周期同步化,分别加入含非诺贝特终浓度为 10、25、50、75、100 μ mol/L 的 1640 培养基,对照组细胞只加 1640 培养基。培养 24 h 后,弃上清液,每孔 1 mL 细胞染色缓冲液重悬细胞,5 μ L Hoechst 染色液,5 μ L PI 缓冲液,混匀,4℃ 孵育 30 min,弃上清染色液,PBS 洗涤 1 次,在 Nikon 倒置荧光显微镜下观察细胞形态变化。染色后凋亡细胞荧光会比正常细胞明显增强(蓝光)。PI 可以将坏死细胞染成红色。

1.2.4.2 Annexin-V/PI 荧光法检测非诺贝特对 SKOV3 细胞凋亡的影响 按 5×10^4 /孔接种 SKOV3 细胞于 24 孔板,细胞贴壁后加入无血清 RPMI 1640 培养 24 h 将细胞周期同步化,分别加入含非诺贝特终浓度为 10、25、50、75、100 μ mol/L 的 1640 培养基,对照组细胞只加 1640 培养基,培养 24 h 后,每孔弃上清液,PBS 洗涤 2 次,每孔加 500 μ L 细胞缓冲液,5 μ L Annexin-V、5 μ L PI,混匀,避光室温孵育 5 min,置 Nikon 倒置荧光显微镜下观察。以标记了的 Annexin-V 作为荧光探针(蓝色)可检测细胞早期凋亡的发生。PI 能够使凋亡中晚期的细胞和死细胞红染。

1.2.5 划痕损伤实验检测非诺贝特对 SKOV3 细胞迁移的作用 将 SKOV3 细胞接种在 6 孔板中,待细胞汇合成单层后用 20 μ L 无菌枪头垂直划痕,PBS 洗 2 次;对照组加 10 mmol/L 羟基脲及含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,实验组分别加入含非诺贝特 10、25、50、75、100 μ mol/L 血清 1640 培养基和 10 mmol/L 羟基脲。倒置相差显微镜下拍照,于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后再在倒置显微镜下拍照。人工随机选视野法计数,随机选取 3 个 100 倍视野,IPP 软件测迁移距离。

1.3 统计学方法

实验重复 3 次,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 非诺贝特对 SKOV3 细胞增殖的影响

MTT 检测发现:与对照组相比,各时点下 10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特对 SKOV3 细胞均产生抑制作用($P < 0.05$)。随浓度增加,抑制效果增强,各时间点均以 100 $\mu\text{mol/L}$ 抑制率最高($P < 0.05$)。但抑制效果与时间关系不明显(附表)。

附表 不同浓度非诺贝特作用不同时间对 SKOV3 细胞增殖及迁移的影响($\bar{x} \pm s$)

Table The migration distance and proliferation activity in SKOV3 cells after treated with fenofibrate at different concentrations and different times

Group	n	Inhibite ratio (%)			Migration distance (μm , 24 h)
		24 h	48 h	72 h	
Control	3	0	0	0	78.35 \pm 0.02
Fenofibrate					
10 $\mu\text{mol/L}$	3	11.73 \pm 0.34 *	21.18 \pm 0.52 * ·■	24.63 \pm 0.84 * ·■	59.47 \pm 0.02 *
25 $\mu\text{mol/L}$	3	17.72 \pm 0.61 *	51.10 \pm 0.50 * ·■	33.57 \pm 0.51 * ·■·★	52.31 \pm 0.03 * ·#
50 $\mu\text{mol/L}$	3	44.01 \pm 0.53 * ·△	51.26 \pm 0.39 * ·■	48.24 \pm 0.73 * ·■·△	39.29 \pm 0.02 * ·#·△
75 $\mu\text{mol/L}$	3	52.73 \pm 0.59 * ·△·▲	50.27 \pm 0.61 *	67.20 \pm 0.49 * ·■·★·△·▲	33.06 \pm 0.03 * ·#·△·▲
100 $\mu\text{mol/L}$	3	55.72 \pm 0.28 * ·△·▲·◇	57.63 \pm 0.47 * ·△·▲·◇	72.41 \pm 0.62 * ·■·★·△·▲·◇	18.73 \pm 0.02 * ·#·△·▲·◇

* $P < 0.05$, vs. control (0 $\mu\text{mol/L}$ fenofibrate); # $P < 0.05$, vs. 10 $\mu\text{mol/L}$ fenofibrate at the same time point; △ $P < 0.05$, vs. 25 $\mu\text{mol/L}$ fenofibata at the same time point; ▲ $P < 0.05$, vs. 50 $\mu\text{mol/L}$ fenafibrate at the same time point; ◇ $P < 0.05$, vs. 75 $\mu\text{mol/L}$ fenofibrate at the same time point; ■ $P < 0.05$, vs. 24 h on the same concentration; ★ $P < 0.05$, vs. 48 h on the same concentration

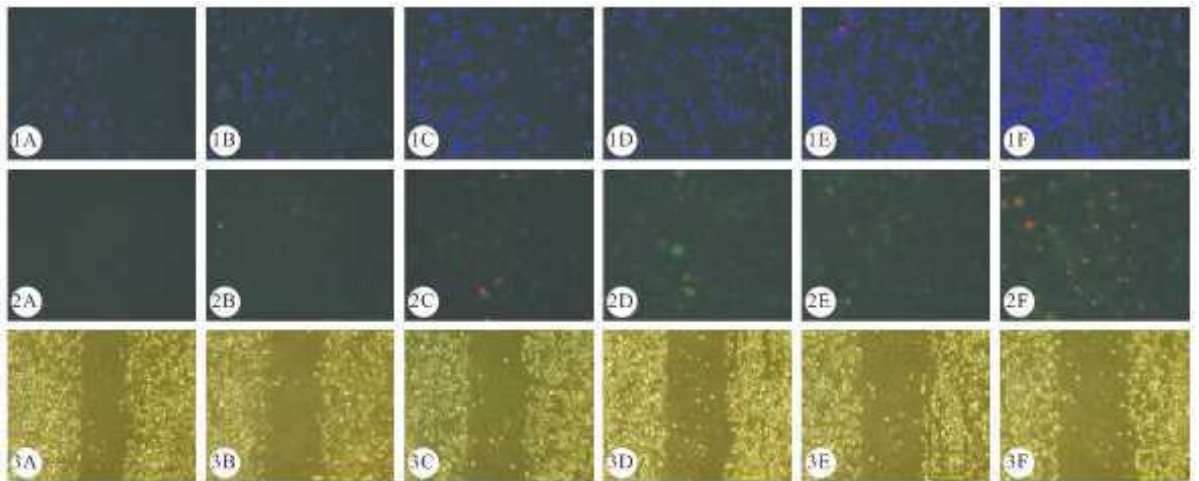


图 1 不同药物浓度的非诺贝特刺激 SKOV3 细胞 24 h 后 Hoechst/PI 荧光染色。×200

图 2 非诺贝特刺激 SKOV3 细胞 24 h 后 Annexin-V/PI 荧光染色。×200

图 3 非诺贝特刺激 SKOV3 细胞 24 h 的划痕损伤实验。倒置荧光显微镜 ×100

Fig 1 Hoeschst/PI fluorescent staining after the SKOV3 cells was treated with different concentration of fenofibrate for 24 h. ×200

Fig 2

Annexin-V/PI fluorescent staining after the SKOV3 cells was treated with different concentration of fenofibrate for 24 h. ×200

Fig 3

The scratch damage test after the SKOV3 cells was treated with different concentrations of fenofibrate for 24 h. Inverted flurescence microscopy ×100

A-F: 0, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol/L}$ fenofibrate

3 讨论

本研究旨在采用不同浓度非诺贝特(PPAR α 受体激动剂)作用于体外培养的人卵巢癌细胞 SKOV3,并和正常培养条件下的卵巢癌细胞比较,

2.2 非诺贝特对 SKOV3 细胞凋亡的影响

Hoechst/PI 和 Annexin-V/PI 荧光染色置荧光显微镜下检测示,10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特处理细胞 24 h 后,诱导细胞凋亡,随着非诺贝特药物浓度的增加,SKOV3 细胞凋亡越明显(图 1、图 2)。

2.3 非诺贝特对 SKOV3 细胞迁移的影响

划痕损伤实验结果显示,与对照组相比,在 10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特作用于 SKOV3 细胞 24 h 后,细胞迁移距离缩短($P < 0.05$),差异有统计学意义(附表,图 3)。

以初步了解非诺贝特对卵巢癌细胞生长情况的影响。

非诺贝特是 PPAR α 的激动剂,临床上主要用于降低血甘油三酯。肥胖增加多种肿瘤的发病风险,其核心机制为胰岛素抵抗,此外脂肪素、NF- κ B、

氧化应激、肥胖相关炎症因子、胰岛素样生长因子、性激素等也发挥着重要作用^[4]。细胞内高脂状态可刺激氧化应激反应增加,导致脂质氧化产物的过度产生,最终造成细胞DNA受损。高甘油三酯及其代谢物可激活蛋白激酶C和MAPK途径,因而具有潜在的促有丝分裂作用和致癌效应^[5]。以上均为与PPAR α 相关的肿瘤研究奠定了理论基础。近年多个研究证实PPARs与肿瘤如结肠癌、子宫内膜癌及卵巢癌等的发生有着复杂的关系^[3,6-8],为此研究提供了探索道路。本实验MTT实验结果显示10 $\mu\text{mol/L}$ 非诺贝特在24 h即可对SKOV3细胞生长产生抑制作用。随着浓度的增加,抑制率增强。这证实非诺贝特对体外卵巢癌细胞系SKOV3的增殖有明显抑制作用。Drukala等^[9]在胶质瘤的研究中指出非诺贝特能强烈抑制其细胞活性,涉及到活性氧的积累、严重的线粒体功能障碍及ATP生成缺乏,且非诺贝特相对全身毒性低,其有潜力应用于临床中的脑肿瘤。Tenenbaum等^[10]在前瞻性的调查中指出苯扎贝特对结肠癌发展具有保护作用,此作用与抑制肿瘤血管形成密切相关。Lvan等^[11]研究发现多个Notch通路上的靶基因以及PPARG、CCND1和RUNX1参与的通路的表现改变,可能导致这些通路的激活以及高级别浆液性卵巢癌患者的低生存率。由此可推测非诺贝特通过参与某些信号通道产生肿瘤细胞毒性作用及抑制肿瘤血管形成作用,从而产生抑制卵巢癌细胞增殖生存的作用。

本研究通过Hoechst/PI和Annexin-V/PI荧光检测凋亡,非诺贝特作用24 h后,随着非诺贝特浓度的增加,SKOV3细胞的凋亡信号越明显。凋亡是细胞程序化死亡,在肿瘤发展中起着重要作用。Saidi等^[8]在子宫内膜癌的研究中指出非诺贝特能阻滞细胞周期于G₁/S,下调细胞周期蛋白Cyclin D1,从而抑制内膜癌细胞的增殖并能诱导凋亡。Yokoyama等^[7]发现PPAR联合环格列酮可以通过降低COX-2、mPGES和EP3的表达而抑制PGE2的活性,以此可诱导肿瘤细胞凋亡。由此可推测非诺贝特可诱导异常的肿瘤细胞周期调控为正常状态,使过度增殖的肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞过度增殖,达到趋于正常细胞周期调控状态,从而具有抗肿瘤效应。

本实验划痕损伤实验结果显示随着非诺贝特浓度增高,体外SKOV3细胞的迁移距离越小。虽然非诺贝特目前暂不能应用于肿瘤临床,但通过本实验非诺贝特抑制体外卵巢癌细胞的增殖和迁移作用,我们看到了其可能的作用通路,即可能激活PPAR α 受体,然而其具体机制需进一步研究。

Grabacka等^[12]发现非诺贝特抑制瘤细胞的迁移,这种效应能被PPAR抑制剂GW9662逆转;并说明PPAR依赖的抗转移活性是通过下调Akt磷酸化实现的。可见非诺贝特可通过参与某些信号通道抑制肿瘤细胞迁移活性,具有抗肿瘤细胞转移效应。

总之,本课题组在前人未探讨非诺贝特作用于卵巢癌细胞的基础上作了初步的探究,通过MTT、Hoechst/PI和Annexin-V/PI、划痕损伤实验等发现非诺贝特能抑制体外卵巢癌细胞的增殖及迁移,其有可能成为治疗卵巢癌的新药物,甚至可能增加化疗药的作用,但本实验仅单独使用非诺贝特作用于体外卵巢癌细胞,其和化疗药物联合作用如何未研究。并且凋亡检测只是定性,而没有流式细胞仪定量检测结果。同时,未完成的机制和通路也是我们以后需要进一步深入研究的着手点。

参 考 文 献

- 1 Jema A, Siegel R, Xu JQ, *et al.* Cancer statistics 2010. *CA Cancer J Clin*, 2010; 60(5): 277-300.
- 2 丁滨. 卵巢癌治疗研究进展. *人民军医*, 2011; 54(3): 237-239.
- 3 Li T, Zhang Q, Zhang J, *et al.* Fenofibrate induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells via activation of NF-kappa B pathway. *BMC Cancer*, 2014; 14(1): 96-108.
- 4 Paz-Filho G, Lim EL, Wong ML, *et al.* Associations between adipokines and obesity-related cancer. *Front Biosci*, 2011; 16(4): 1634-1650.
- 5 谷晓媛, 林万隆, 倪克樑. 肥胖与肿瘤的关系: 病理生理学及生物学机制. *世界肿瘤杂志*, 2009; 8(2): 4-7.
- 6 蔡莉, 王娅兰, 林晓. PARP抑制剂5-AIQ对小鼠结肠癌CT26细胞PARP/NF- κ B复合物和NF- κ B活性的影响. *基础医学与临床*, 2008; 28(11): 1156-1159.
- 7 Yokoyama Y, Xin B, Shigeto T, *et al.* Combination of ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, and cisplatin enhances the inhibition of growth of human ovarian cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011; 137(8): 1219-1228.
- 8 Saidi SA, Holland CM, Charnock-Jones DS, *et al.* *In vitro* and *in vivo* effect of the PPAR-alpha agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. *Mol Cancer*, 2006; 5(1): 13-29.
- 9 Drukala J, Urbanska K, Wilk A, *et al.* ROS accumulation and IGF-IR inhibition contribute to fenofibrate/PPAR α -mediated inhibition of glioma cell motility *in vitro*. *Mol Cancer*, 2010; 9(1): 159-173.
- 10 Tenenbaum A, Boyko V, Fisman EZ, *et al.* Does the lipid-lowering pe-Roxisome proliferator-activated receptors ligand bezafibrate prevent colon cancer in patients with coronary artery disease? *Cardiovasc Diabetol*, 2008; 7(3): 18-35.
- 11 Lvan C, Hu W, Bottsford-Miller J, *et al.* Epigenetic analysis of the Notch superfamily in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2013; 128(3): 506-511.
- 12 Grabacka M, Przemyslaw MP, Urbanska K, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor α activation decreases metastatic potential of melanoma cells *in vitro* via down regulation of Akt. *Clin Cancer Res*, 2006; 12(10): 3028-3035.

(2013-10-10收稿, 2014-03-17修回)

编辑 吕熙