

# 卡铂对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的作用

The Effect of Carboplatin on Endometrial Cancer Cell Line Ishikawa

WANG Yan, PAN Wei-kang, WANG Jin-hua

王艳<sup>1</sup>, 潘伟康<sup>1</sup>, 王金华<sup>2</sup>

(1. 溧阳市人民医院, 江苏 溧阳 213300;

2. 南京医科大学附属江苏省肿瘤医院, 江苏 南京 210009)

**摘要:** [目的] 研究卡铂对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的作用。[方法] 不同浓度卡铂(空白对照组、低剂量卡铂组、高剂量卡铂组)作用 Ishikawa 细胞 48h, Western blot 技术检测卡铂处理后 Ishikawa 细胞株中 bcl-2、bax 蛋白表达的变化; Annexin V-PE 染色后流式细胞仪检测细胞的凋亡情况; PI 染色检测细胞周期变化; Tranwell 肿瘤侵袭实验检测细胞侵袭能力的变化。[结果] 卡铂作用于 Ishikawa 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 31.86 μg/ml。卡铂作用 48h 后, 细胞内 bcl-2 蛋白表达下调, bax 蛋白表达上调(P<0.05)。卡铂可诱导 Ishikawa 细胞凋亡, 空白对照组凋亡率为 3.2%±0.3%, 明显低于低剂量卡铂组的 17.3%±2.8% 和高剂量卡铂组的 50.0%±3.7%(P<0.05)。卡铂作用后细胞周期呈 G<sub>2</sub> 期阻滞, 空白对照组 G<sub>2</sub> 期比例为 28.75%±4.29%, 明显低于低剂量卡铂组的 57.74%±6.42% 和高剂量卡铂组的 78.64%±6.38%(P<0.05); Ishikawa 细胞侵袭能力受到抑制, 相对于空白对照组, 低剂量卡铂组抑制率为 62.00%, 高剂量卡铂组抑制率为 81.33%(P<0.05)。[结论] 卡铂可明显抑制 Ishikawa 细胞生长, 诱导细胞凋亡, 并下调 Ishikawa 细胞中 bcl-2/bax 比例。

**关键词:** 卡铂; 子宫内膜癌; Ishikawa 细胞; bcl-2; bax; 凋亡

**中图分类号:** R737.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)02-0150-04

子宫内膜癌是女性生殖道常见恶性肿瘤之一, 近年来发病率呈逐年上升趋势, 在西方国家已成为发病率最高的妇科肿瘤, 在我国也严重危害中老年妇女的生命健康<sup>[1]</sup>。化疗是子宫内膜癌重要的辅助治疗手段。在众多化疗药物中, 卡铂是目前应用最为广泛和有效的化疗药物之一。本研究利用生物技术验证卡铂在子宫内膜癌细胞株中的作用, 并探讨其可能的作用机制, 为卡铂在子宫内膜癌治疗中的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高分化子宫内膜癌细胞 (Ishikawa 细胞株): 购自美国凯基公司。

药物与试剂: 卡铂为山东齐鲁制药厂产品。小鼠

抗人 bcl-2 单克隆抗体, 小鼠抗人 bax 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体, 山羊抗小鼠 HRP 标记抗体为联科生物有限公司产品。Annexin V-PE 凋亡试剂盒, BCA 蛋白含量检测试剂盒为凯基公司产品。

主要仪器: 化学发光酶标仪 (Promega 公司), 流式细胞仪 (BD 公司), CO<sub>2</sub> 培养箱 311 型 (Thermo Forma Scientific), 荧光定量 PCR 仪 (型号 7500, 美国 ABI 公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞用适量培养液复苏后培养, 将细胞接种于含 10% 灭活的胎牛血清的 DMEM 高糖培养液中, 置 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中常规培养, 细胞贴壁生长, 0.25% 胰酶消化传代。

#### 1.2.2 MTT 检测

取对数生长期的 Ishikawa 细胞, 调整细胞悬液浓度, 接种到 96 孔培养板中, 每孔 200 μl, 贴壁后培

收稿日期: 2012-06-20

基金项目: 江苏省医学重点人才项目 (RC2011091); 江苏省中医药管理局面上基金 (LZ09082); 江苏省“333”工程项目。

通讯作者: 王金华, E-mail: wangjinhua588@163.com

养,加入不同浓度卡铂(0、2、4、8、16、32、64、128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )继续培养48h后,加入20 $\mu\text{l}$  MTT溶液(5 $\text{mg}/\text{ml}$ ,即0.5%MTT)作用4h后弃去上清液,150 $\mu\text{l}$ 二甲基亚砜作用10min,用酶联免疫检测仪570nm处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔(培养基、MTT、二甲基亚砜),对照孔(细胞、相同浓度的药物溶解介质、培养液、MTT、二甲基亚砜)。计算抑制率=[(对照组吸光值-空白组吸光值)-(给药组吸光值-空白组吸光值)]/(对照组吸光值-空白组吸光值) $\times 100\%$ 。计算细胞生存率=实验孔OD值/对照孔OD值 $\times 100\%$ ,以浓度-生存曲线作回归方程,求出半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )。

### 1.2.3 Ishikawa 细胞的药物处理

收集对数生长期细胞,调整细胞悬液浓度,分种于6孔板,每孔2.0ml,1 $\times 10^5$ 个/孔。培养24h后加入铂尔定药物与培养基混合液,设空白对照组、低剂量卡铂组(0.5倍 $\text{IC}_{50}$ )、高剂量卡铂( $\text{IC}_{50}$ ),继续培养48h。收集处理后细胞进行进一步实验。

### 1.2.4 Western blot 检测细胞中蛋白质表达水平

将卡铂处理的细胞用冰PBS洗涤2次,裂解,离心,去上清,用酚试剂法测定蛋白浓度,进行蛋白定量。调节每份样品蛋白浓度,加等量蛋白于上样缓冲液,煮沸,在SDS-PAGE中进行电泳,电泳后转膜,封闭后进行一抗和二抗孵育,加入底物液显色,拍照。蛋白条带用Quantity One软件进行密度扫描分析。目的蛋白的A值与内参 $\beta$ -actin的A值之比即为目的蛋白的相对表达水平。

### 1.2.5 细胞凋亡测定

调整细胞浓度为1 $\times 10^6/\text{ml}$ ,取500 $\mu\text{l}$ 单细胞悬液置于5ml流式管中,每管各加入1 $\mu\text{l}$  Annexin V-PE。黑暗中放置15min后,置流式细胞仪中进行细胞凋亡检测和分析。

### 1.2.6 细胞周期测定

药物作用48h后,离心(2000r/min,5min)后,收集细胞,PBS洗涤后,调整细胞浓度为1 $\times 10^6/\text{ml}$ ;70%乙醇固定,加100 $\mu\text{l}$  RNase A 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30min后,加入400 $\mu\text{l}$  碘化丙啶(PI)染色,流式细胞术(FCM)分析细胞周期。

### 1.2.7 Transwell 测定侵袭能力

无血清培养基与Matrigel基质胶(3:1)混匀,各上室加入30 $\mu\text{l}$ 平铺,孵育0.5~1h至为固态。消化药物处理后细胞,无血清培养基洗3次,稀释成细胞悬液(3 $\times 10^5/\text{ml}$ )。无血清培养基洗Matrigel基质胶洗

1次后,每孔加入100 $\mu\text{l}$ 细胞悬液。下腔室中加入600 $\mu\text{l}$ 含有10%FBS条件培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,孵育24h;取出Transwell小室后用PBS洗2遍,10%甲醇固定10min;PBS洗2次。加入结晶紫(0.1%)染色,室温0.5h,PBS洗2遍,显微镜下观察。

### 1.3 统计学处理

应用统计软件SPSS 18.0行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,组间差异性比较采用方差分析或t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 卡铂作用于 Ishikawa 细胞的 $\text{IC}_{50}$

不同浓度卡铂作用肿瘤细胞48h后,MTT测定细胞生长情况,Ishikawa细胞生长抑制率见Table 1。根据细胞生长抑制状况,绘制浓度-生存曲线(Figure 1),卡铂作用于Ishikawa细胞的 $\text{IC}_{50}$ 为31.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

### 2.2 Western blot 检测细胞中 bcl-2和 bax 表达水平

卡铂处理Ishikawa细胞48h后,细胞中bcl-2和bax蛋白质表达水平发生改变(Figure 2),bcl-2表达

Table 1 The cell proliferation inhibition rate of carboplatin on Ishikawa after treated 48h

Carboplatin concentration( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Inhibition rate(%)
0	0
2	4.35
4	16.19
8	30.97
16	39.61
32	49.71
64	61.31
128	71.00

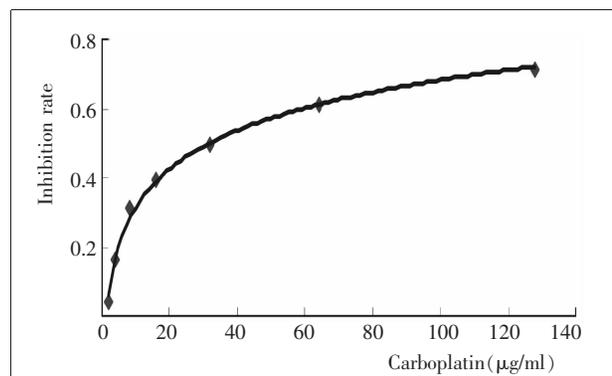


Figure 1 The dose-proliferation curve of carboplatin on Ishikawa after treated 48h

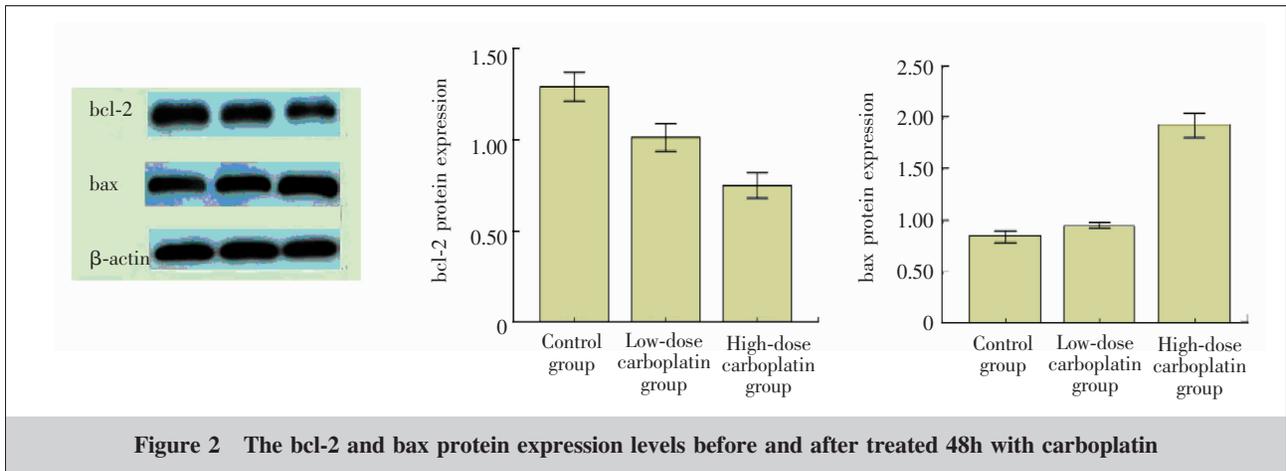


Figure 2 The bcl-2 and bax protein expression levels before and after treated 48h with carboplatin

量明显下调,各组间有统计学差异( $P<0.05$ );而 bax 表达量上调,各组间有统计学差异( $P<0.05$ ),且呈浓度依赖性。进一步研究表明,bcl-2/bax 比率随着卡铂浓度升高而显著下降( $P<0.01$ )。

### 2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

不同浓度卡铂处理 Ishikawa 细胞 48h 后,流式细胞仪检测结果显示各组细胞凋亡率有显著性差异( $P<0.05$ )(Table 2)。卡铂对 Ishikawa 细胞的凋亡诱导效应呈浓度依赖性。

### 2.4 流式细胞仪检测细胞周期

经卡铂处理 Ishikawa 细胞 48h 后,流式细胞仪检测各组细胞周期变化显示卡铂处理后细胞  $G_1$  期细胞减少, $G_2$  期细胞明显增多(Table 3),均有统计学差异( $P<0.05$ )。卡铂可以将 Ishikawa 细胞阻滞在  $G_2$  期,且阻滞效应呈浓度依赖性。

### 2.5 Transwell 测定侵袭能力

卡铂处理 Ishikawa 细胞 48h 后,计数等量细胞

加到预先铺好的基质胶的 Transwell 小室上,24h 后甲醇固定,染色,通过显微镜观察细胞穿过微孔膜情况并计数。相对于空白对照组,低剂量卡铂组的穿膜细胞抑制率为 62.00%,高剂量卡铂组的穿膜细胞抑制率为 81.33%,与空白对照组比较,均有统计学差异( $P<0.05$ )(Figure 4)。

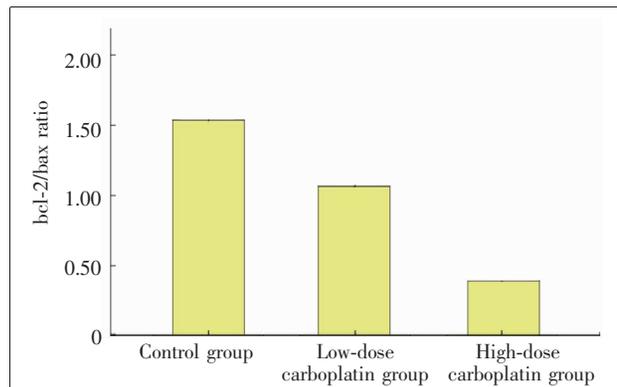


Figure 3 The ratio of bcl-2 and bax protein expression levels treated with carboplatin

Table 2 The apoptosis rates of Ishikawa cells treated with carboplatin

Group	Apoptosis rates
Control group	3.2±0.3
Low-dose carboplatin group	17.3±2.8*
High-dose carboplatin group	50.0±3.7*

\*:compare with control group, $P<0.05$

Table 3 The cell cycles of Ishikawa cells treated with different concentration of carboplatin

Group	$G_1$ (%)	S(%)	$G_2$ (%)
Control group	44.92±4.82	26.34±3.46	28.75±4.29
Low-dose carboplatin group	13.57±2.16*	28.69±4.64*	57.74±6.42*
High-dose carboplatin group	4.64±2.02*	16.71±2.86*	78.64±6.38*

\*:compare with control group, $P<0.05$

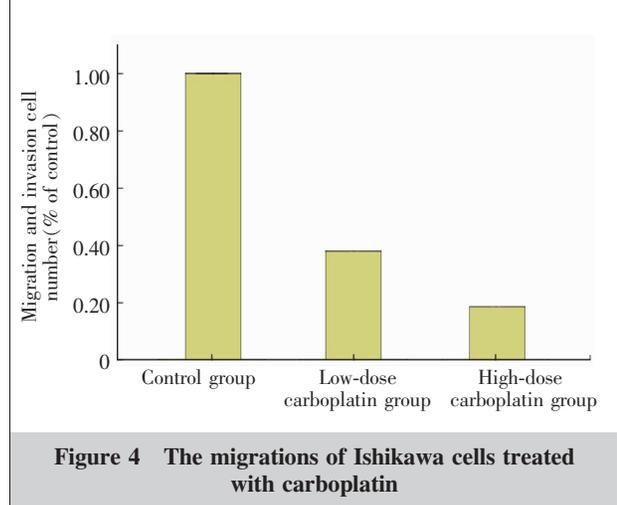


Figure 4 The migrations of Ishikawa cells treated with carboplatin

### 3 讨论

近年来,子宫内膜癌发病呈上升趋势。虽然子宫内膜癌总体治疗效果较好,但部分分化较差、病期较晚和复发性子宫内膜癌治疗效果不尽人意,而化疗在这些患者治疗中有着重要的意义。铂类药物,尤其卡铂由于在其它肿瘤如卵巢癌等肿瘤中作用肯定,且副作用小,被临床广泛使用<sup>[2]</sup>,近年来,卡铂在子宫内膜癌的化疗中逐渐被广泛应用<sup>[3-4]</sup>。本研究发现,卡铂对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞具有较高的杀灭作用,并且呈剂量依赖性,无论是高剂量还是低剂量的卡铂均能明显诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡,引起细胞 G<sub>2</sub> 期阻滞,从而抑制肿瘤细胞的生长,并且可降低肿瘤细胞侵袭能力。

进一步研究发现卡铂可以改变肿瘤细胞中 bcl-2 和 bax 表达,在给予卡铂处理 48h 后,肿瘤细胞死亡率显著增加,同时伴有细胞中 bcl-2 蛋白表达降低,bax 蛋白表达升高,bcl-2/bax 比率下调。bcl-2 和 bax 在肿瘤凋亡中发挥着重要作用,在肿瘤凋亡调节中,bcl-2 承担着抗凋亡的作用,在许多类型的细胞受到外界刺激时能保护细胞免于凋亡;而 bax 是促细胞死亡的调节因子。bcl-2 和 bax 是一对正负调节因子,形成了一个凋亡调节系统,bcl-2 与 bax 的比例调节了凋亡的发生与否。Sakuragi 等<sup>[5]</sup> 通过 PCR 检测发现 bcl-2 和 bax 在整个月经期均有表达,且在分泌期 bcl-2/bax 比率较增殖期下调,推测 bcl-2 与 bax 作为凋亡调节基因可能参与了正常子宫内膜的生长调节。而在子宫内膜癌研究中同样发现,bcl-2 的胞质过度表达在子宫内膜癌的癌变过程中起作用,随着肿瘤的进展,bcl-2 的胞质表达减少,而核表达与淋巴血管间隙侵犯和盆腔淋巴结转移呈正相关<sup>[6]</sup>。Vaskivuo 等<sup>[7]</sup> 及 Amalinei 等<sup>[8]</sup> 研究结果显示 bcl-2/bax 比率在子宫内膜癌患者子宫内膜中低于正常子宫内膜和子宫内膜增生症患者中的水平。在卡铂应用于卵巢癌的研究中也显示 bcl-2、bax 的表达与卵巢癌对化疗的原发抗药性密切相关<sup>[9]</sup>,并可通过预测 bcl-2、bax 在晚期卵巢癌患者中表达作为化疗敏感性及预后的指标<sup>[10]</sup>。相关研究证实 bcl-2/bax 比率决定肿瘤对治疗的反应且 bcl-2/bax 比率失衡可改变化疗敏感性而影响其临床过程<sup>[11]</sup>。bcl-2/bax 比率作为铂类药物是否敏感、有效的指标之一,对于子宫

内膜癌患者,化疗前后检测 bcl-2/bax 比率或许可以早期判断子宫内膜癌的预后。

由于子宫内膜癌的治疗是一个综合治疗的过程,个体差异显著,目前卡铂在子宫内膜癌的临床治疗中显现出一定的实用价值,但因其与顺铂交叉耐药等因素,仍无法彻底改变子宫内膜癌的预后。bcl-2 靶向治疗是否能有效地增加子宫内膜癌对于化疗药物的敏感性,有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Yu HL, Lu X. Application of platinum anticancer agents in the treatment of gynecologic oncology [J]. World Clinical Drugs, 2008, 29(7): 399-404. [于海林, 鹿欣. 铂类药物在妇科肿瘤治疗中的应用 [J]. 世界临床药物, 2008, 29(7): 399-404.]
- [3] Alektiar KM, Makker V, Abu-Rustum NR, et al. Concurrent carboplatin/paclitaxel and intravaginal radiation in surgical stage I - II serous endometrial cancer [J]. Gynecol Oncol, 2009, 112(1):142-145.
- [4] Sorbe B, Andersson H, Boman K, et al. Treatment of primary advanced and recurrent endometrial carcinoma with a combination of carboplatin and paclitaxel-long-term follow-up [J]. Int J Gynecol Cancer, 2008, 18(4):803-808.
- [5] Sakuragi N, Salah-eldin AE, Watari H, et al. Bax, bcl-2, and p53 expression in endometrial cancer [J]. Gynecol Oncol, 2002, 86(3):288-296.
- [6] Ohkouchi T, Sakuragi N, Watari H, et al. Prognostic significance of bcl-2, p53 overexpression, and lymph node metastasis in surgically staged endometrial carcinoma [J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(2):353-359.
- [7] Vaskivuo TE, Stenback F, Tapanainen JS. Apoptosis and apoptosis-related factors bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma [J]. Cancer, 2002, 95(7):1463-1471.
- [8] Amalinei C, Cianga C, Balan R, et al. Immunohistochemical analysis of steroid receptors, proliferation markers, apoptosis related molecules, and gelatinases in non-neoplastic and neoplastic endometrium [J]. Ann Anat, 2011, 193(1):43-55.
- [9] Baekelandt M, Kristensen GB, Nesland JM, et al. Clinical significance of apoptosis-related factors p53, Mdm2, and bcl-2 in advanced ovarian cancer [J]. J Clin Oncol, 1999, 17(7):2061.
- [10] Xiang J, Gomez-Navarro J, Arafat W, et al. Pro-apoptotic treatment with an adenovirus encoding Bax enhances the effect of chemotherapy in ovarian cancer [J]. J Gene Med, 2000, 2(2):97-106.
- [11] Lohmann CM, League AA, Clark WS, et al. bcl-2: bax and bcl-2: Bcl-x ratios by image cytometric quantitation of immunohistochemical expression in ovarian carcinoma: correlation with prognosis [J]. Cytometry, 2000, 42(1):61-66.