

# Vasohibin-1 重组腺病毒对人卵巢癌 SKOV-3 细胞增殖的影响

李 荣, 吴裕中, 吴 强

(南京医科大学附属肿瘤医院, 江苏省肿瘤医院, 江苏 南京 210009)

**摘 要:** [目的] 研究内源性血管生成抑制因子 vasohibin-1 对人卵巢癌 SKOV-3 细胞体外增殖能力的影响。[方法] 体外培养 SKOV-3 细胞, 用 vasohibin-1 重组腺病毒感染 SKOV-3 细胞, 采用蛋白质印迹法检测 SKOV-3 细胞中 vasohibin-1 蛋白的表达水平, 应用 CCK-8 法检测不同时间点 vasohibin-1 重组腺病毒对 SKOV-3 细胞增殖的抑制能力。[结果] 感染 48h 后, 在 SKOV-3 细胞中 vasohibin-1 蛋白表达量与对照组相比显著性增加 ( $P<0.05$ ); 25MOI vasohibin-1 重组腺病毒感染 SKOV-3 细胞 24h 时, 过表达组与阴性对照相比, 两者之间没有统计学差异 ( $P=0.065$ ); 余各组间相比差异均具有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 且抑制能力随 MOI 增大而增加 ( $P<0.05$ ), 随时间的延长而增加 ( $P<0.05$ )。[结论] Vasohibin-1 过表达能够抑制 SKOV-3 细胞的增殖能力, 并具有浓度和时间依赖性, 可为卵巢癌的治疗提供新思路。

**关键词:** 卵巢肿瘤; SKOV-3 细胞; vasohibin-1; 腺病毒; 细胞增殖

**中图分类号:** R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)01-0001-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2014.01.B001

## Effects of Vasohibin-1 Recombinant Adenovirus on Proliferation of Human Ovarian Cancer SKOV-3 Cells

LI Rong, WU Yu-zhong, WU Qiang

(Nanjing Medical University Subsidiary Cancer Hospital, Jiangsu Cancer Hospital, Nanjing 210009, China)

**Abstract:** [Purpose] To investigate the effects of the endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin-1 on proliferation of the human ovarian cancer SKOV-3 cells. [Methods] SKOV-3 cells were cultured in vitro, then transfected by vasohibin-1 recombinant adenovirus. The expression of vasohibin-1 protein in SKOV-3 cells was confirmed by Western blot. The inhibition of proliferation in SKOV-3 cells were estimated by CCK8 in different times. [Results] Compared with control group, the expression of vasohibin-1 protein increased significantly after transfection for 48h ( $P<0.05$ ). There was no statistical difference between overexpression group and negative control group after 25MOI vasohibin-1 recombinant adenovirus transfected SKOV-3 cells for 24h ( $P=0.065$ ); but the other groups had statistical significance and the inhibition of vasohibin-1 recombinant adenovirus on the proliferation of SKOV-3 cells increased with the growth of MOI and with the time prolonging ( $P<0.05$ ). [Conclusion] Overexpression of vasohibin-1 could inhibit the proliferation of SKOV-3 cells, with dose- and time- dependent manners, which may provide a new idea for ovarian cancer treatment.

**Subject words:** ovarian neoplasms; SKOV-3 cells; vasohibin-1; adenovirus; cell proliferation

卵巢癌是常见的妇科肿瘤, 同时也是引起妇女

死亡的最主要的妇科肿瘤之一。尽管积极的手术治疗及术后联合应用铂类和紫杉类药物化疗已提高了患者的预后, 但仍有 70% 的卵巢癌患者在 2 年内复发, 且复发后预后极差<sup>[1]</sup>。因此, 寻找其它有效的、新的治疗方法是十分必要的。

Vasohibin 是 Watanabe 等<sup>[2]</sup>于 2004 年发现的新的血管生成调节蛋白, 包括 vasohibin-1 (VASH1) 和 vasohibin-2 (VASH2)。Vasohibin-1 编码的蛋白质是

**基金资助:** 江苏省科技厅社会发展项目资助课题 (BS2006072, BS2002058); 江苏省中医药局课题 (LZ13234, H07029); 江苏省肿瘤医院课题 (ZS201202, ZM201103)

**通讯作者:** 吴强, 主任医师, 博士; 南京医科大学附属肿瘤医院江苏省肿瘤医院妇瘤外科, 江苏省南京市玄武区百子亭 42 号 (210009); E-mail: qiangw88@126.com  
吴裕中, 副主任医师, 副教授; 南京医科大学附属肿瘤医院妇瘤外科, 江苏省南京市玄武区百子亭 42 号 (210009); E-mail: yuzhongwu1127@126.com

**收稿日期:** 2013-09-07; **修回日期:** 2013-10-26

一个内皮组织衍生的特异性抑制血管新生的分泌性蛋白质,是迄今为止发现的惟一个以负反馈为作用机制调节血管新生的基因。体内、体外实验证实该蛋白不但能直接抑制内皮细胞的迁移、增生、内皮网及血管的形成,同时还能通过负反馈调节血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)间接抑制血管生成<sup>[3]</sup>。Vasohibin-1的表达与卵巢癌的预后相关,同时最近国外报道,zeste的同源基因组蛋白甲基化转移酶-2(enhancer of zeste homolog-2, ZEH2)的表达增加提示卵巢癌预后不良,原因是ZEH2介导沉默肿瘤血管中vasohibin-1的表达<sup>[4]</sup>。卵巢癌作为血管依赖性肿瘤,抑制其血管的生成就可以抑制肿瘤的发展。本实验体外观察vasohibin-1重组腺病毒对卵巢癌SKOV-3细胞增殖能力的影响,以期对卵巢癌的靶向治疗提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

RPMI-1640培养基、胎牛血清购自Hyclone公司;胰蛋白酶裂解液、CCK8试剂盒、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司;蛋白裂解液购自上海凯基公司;vasohibin-1鼠抗人抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记驴抗鼠二抗购自Santa Cruz;GADPH鼠抗购自Abcam;vasohibin-1重组腺病毒由上海生博生物公司构建。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

SKOV-3细胞用含10%胎牛血清(FBS)、90% RPMI-1640及100U青链霉素培养液培养于T25培养瓶,培养瓶置于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱,1~2d换液,2~3d传代,按1:2比例传代,取处于对数生长期的细胞进行实验。

#### 1.2.2 细胞病毒感染复数(multiplicity of infection, MOI)检测

取对数期生长的SKOV-3细胞,以每孔 $5 \times 10^3$ 个细胞接种于96孔板,每孔加培养液100 $\mu$ l,以25、50、75、100MOI的vasohibin-1重组腺病毒感染SKOV-3细胞,置于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱内培养24h、48h。倒置荧光显微镜下观察细胞形态、感染后荧光强弱及带绿色荧光的细胞数,计算感染率,感染率=

GFP阳性细胞数/总细胞数。确定细胞感染所需的MOI(感染效率最高,且细胞生长良好)。

#### 1.2.3 感染人卵巢癌SKOV-3细胞

取对数期生长的SKOV-3细胞,以每孔 $5 \times 10^5$ /孔的浓度接种于6孔板,按100、75、50MOI的感染细胞,分别设过表达组(Ad组)、阴性对照组(NC组)和空白对照组(Con组)。感染后置于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱,培养48h,期间于24h及48h观察荧光并拍照。

#### 1.2.4 蛋白印迹法(Western blot)检测vasohibin-1过表达情况

收集75MOI感染的各组细胞,经细胞裂解液处理,离心后取上清,并用BCA法测蛋白浓度,12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电转至硝酸纤维素膜上,用5%脱脂牛奶封闭后,鼠抗人vasohibin-1单克隆抗体4℃过夜,之后用辣根过氧化物酶标记的驴抗鼠IgG(孵育1h),ECL法显影,胶片经Quantity One成像分析系统扫描分析。同法检测感染后细胞GADPH的表达水平,结果以经GADPH校正后的相对表达量表示,独立实验重复3次。

#### 1.2.5 CCK-8检测人卵巢癌SKOV-3细胞增殖抑制能力

取对数期生长的SKOV-3细胞以 $5 \times 10^3$ /孔的浓度接种于96孔板,每孔加培养液100 $\mu$ l,24h后予换液,并按MOI分别为25、50、100、200加入vasohibin-1重组腺病毒。实验设为调零组(仅有培养液)、过表达组(Ad组)(含细胞、培养液及vasohibin-1重组腺病毒)、阴性对照组(NC组)(含细胞、培养液及Ad-GFP)及空白对照组(Con组)(含细胞及培养液)。每个MOI设4个重复孔。加入腺病毒后震荡96孔板并放入培养箱中培养24h、48h、72h。取出96孔板,每孔加入10 $\mu$ lCCK-8,继续培养4h后用酶标仪测定在450nm处的吸光度,独立实验重复3遍,分别计算不同时间点各组增殖抑制率。抑制率(%)=[1-(OD<sub>Ad组(NC组)</sub>-OD<sub>调零组</sub>)/(OD<sub>Con组</sub>-OD<sub>调零组</sub>)] $\times 100\%$ 。

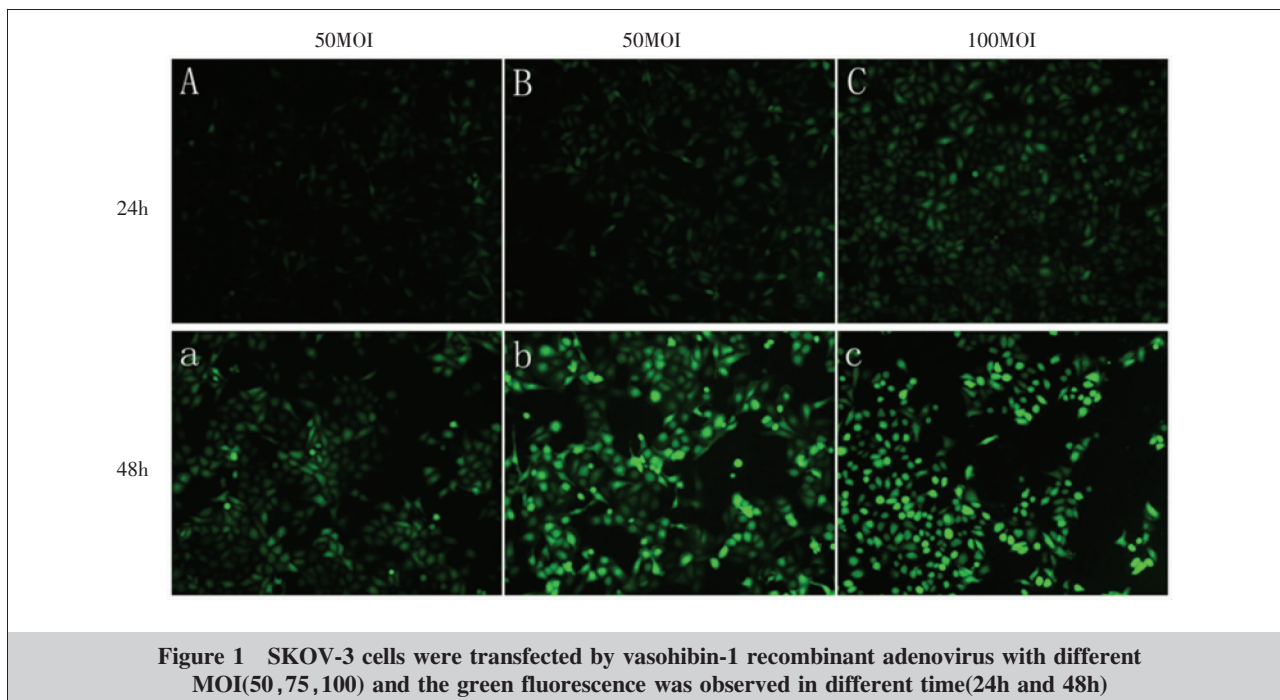
### 1.3 统计学处理

独立实验重复3次。应用SPSS17.0统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析及LSD-t检验, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Vasohibin-1重组腺病毒感染Skov3-细胞

以25、50、75、100MOI的vasohibin-1重组腺病



**Figure 1** SKOV-3 cells were transfected by vasohibin-1 recombinant adenovirus with different MOI(50,75,100) and the green fluorescence was observed in different time(24h and 48h)

病毒感染 SKOV-3 细胞,培养 24h、48h 后,于倒置荧光显微镜下观察可见 25、50、75、100MOI 均见绿色荧光且荧光逐渐增强,感染率达 100%,因 100MOI 有少数细胞变圆死亡,故 MOI 选 75,感染效率达 100%。

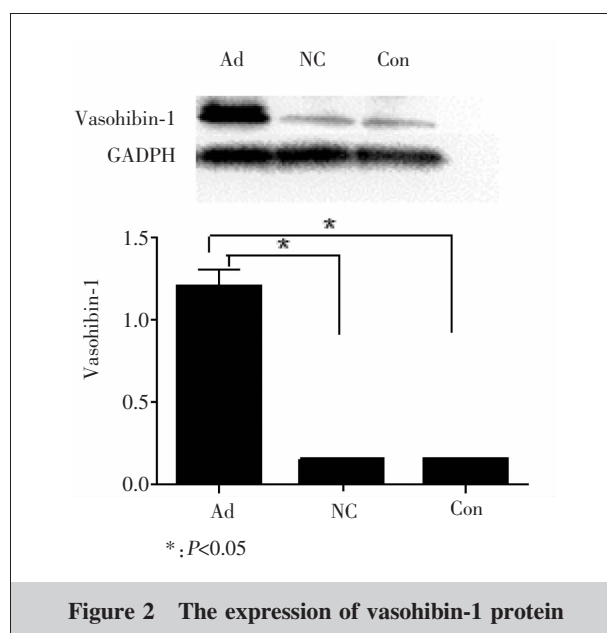
以 100、75、50MOI 感染 SKOV-3 细胞发现,相同感染时间下,随 MOI 增加荧光增强;相同 MOI 时,随着感染时间增加荧光逐渐增强(Figure 1)。

## 2.2 Vasohibin-1 腺病毒感染 SKOV-3 细胞后 vasohibin-1 的表达

Western blot 检测发现,过表达组的目的蛋白表达量显著升高,相对值( $1.1990 \pm 0.18685$ )与阴性对照组( $0.1542 \pm 0.01059$ )和空白对照组( $0.1607 \pm 0.00502$ )相比较,差异具有统计学意义( $P=0.000, P<0.05$ )。阴性对照组与空白对照组相比较,差异无统计学意义( $P=0.642$ )(Figure 2)。

## 2.3 CCK8 检测 vasohibin-1 对卵巢癌 SKOV-3 细胞的增殖的抑制能力

根据 CCK8 测的 OD 值结果,计算各组抑制率(Table 1)。25MOIvasohibin-1 重组腺病毒感染 SKOV-3 细胞 24h 时,过表达组与阴性对照相比,两者之间没有统计学差异( $P=0.065$ );余各组间相比均具有统计学意义( $P=0.000, P<0.05$ )。结果表明 vasohibin-1 重组腺病毒对 SKOV-3 细胞增殖的抑制随 MOI 增



**Figure 2** The expression of vasohibin-1 protein

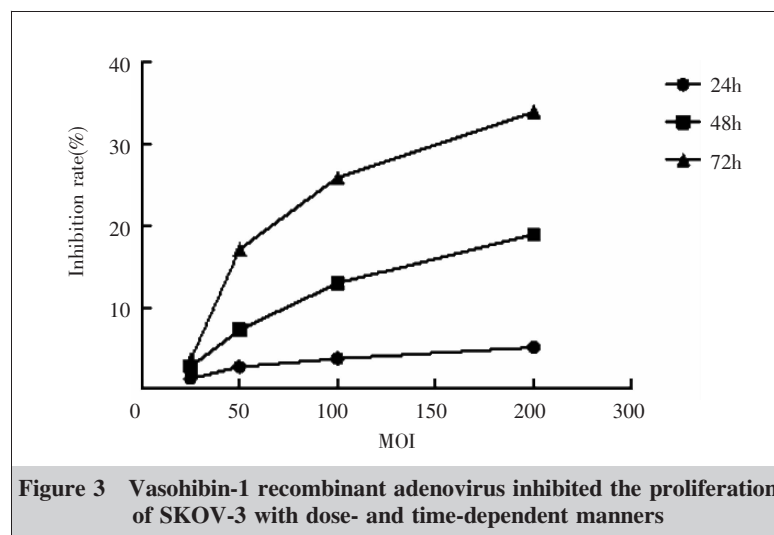
大而增加( $P=0.000, P<0.05$ );随着时间的延长而增加( $P=0.000, P<0.05$ ),具有浓度和时间依赖性(Figure 3)。

## 3 讨论

绝大多数晚期卵巢癌容易复发,并可发展为耐药,目前临床上耐药性和复发性卵巢癌的治疗仍十

**Table 1 The inhibition rate of different groups**

| Groups |        | Inhibition rate(%) |                 |                 |
|--------|--------|--------------------|-----------------|-----------------|
|        |        | 24h                | 48h             | 72h             |
| NC     | 25MOI  | 1.1590±0.18807     | 0.8747±0.60482  | 0.8424±0.64677  |
|        | 50MOI  | 1.1074±0.09342     | 1.1199±0.35359  | 0.5606±0.52368  |
|        | 100MOI | 1.0256±0.04712     | 0.8100±0.07230  | 0.7447±0.53252  |
|        | 200MOI | 1.0951±0.08838     | 0.6050±0.49789  | 0.8884±0.47131  |
| Ad     | 25MOI  | 1.3945±0.12895     | 2.8477±0.24966  | 3.6130±1.97507  |
|        | 50MOI  | 2.8238±0.43563     | 7.3566±2.22637  | 17.1738±1.06508 |
|        | 100MOI | 3.8021±0.44135     | 13.0601±1.62937 | 25.9554±0.89243 |
|        | 200MOI | 5.1802±0.54393     | 18.9695±0.99410 | 33.9714±1.63666 |



分棘手。生物靶向治疗的出现给卵巢癌的治疗带来了新的希望,其中最成功的靶向治疗是抑制血管生成,通过作用于肿瘤内皮细胞,阻止其增殖、迁移、出芽及形成新生血管,并引导不成熟内皮细胞趋向凋亡,抑制肿瘤细胞生成和转移,具有良好的特异性和针对性,达到治疗恶性肿瘤的目的。

Vasohibin-1 作为内源性血管生成抑制剂,不仅能够抑制新生血管的生成,还可以抑制肿瘤淋巴管生成和淋巴结的转移<sup>[5]</sup>。利用小鼠肝癌 H22 细胞建立肿瘤模型,与阴性对照组相比,注射 vasohibin-1 重组腺病毒的小鼠,癌组织的微血管密度与数量均明显减少,而且显著延长了实验动物的生存期<sup>[6]</sup>。另有研究发现,与正常乳腺组织比,浸润性导管癌样本中,外源性增加 vasohibin-1,可减少血管数量,缩小肿瘤体积<sup>[7]</sup>,也有研究称在脉絡膜及闭塞性细支气管炎中 vasohibin-1 均发挥其抑制新生血管形成的作用<sup>[8,9]</sup>。

卵巢癌组织的生长、浸润和转移过程依赖于肿

瘤血管的形成。有研究通过检测上皮性卵巢癌标本后发现<sup>[10]</sup>,卵巢癌的 vasohibin-1 mRNA 表达明显高于正常卵巢组织;且 VEGF 蛋白水平与 vasohibin-1 mRNA 水平( $r=0.692, P<0.01$ )和免疫组化评分( $r=0.702, P<0.01$ )显著相关。证实 VEGF 诱导产生 vasohibin-1 在卵巢癌中存在,如果外源性过量表达 vasohibin-1 或增加 VEGF 的诱导刺激,vasohibin-1 可发挥负反馈调节抑制肿瘤血管生成的潜能,起到一定的抗血管生成的作用。

目前基因靶向治疗常用的载体是腺病毒载体,腺病毒是一种非整合型双链 DNA 病毒,用于研究的腺病毒是安全的,对人无致病、致畸、致癌的潜在危害,且可以高效地把目的基因转入靶细胞。故本研究通过构建编码 vasohibin-1 重组腺病毒,感染人卵巢癌 SKOV-3 细胞,分析其对 SKOV-3 细胞增殖能力的影响,以期对卵巢癌的靶向治疗提供新思路。本研究选用人卵巢癌 SKOV-3 细胞作为目的细胞,以

MOI 为梯度用 vasohibin-1 重组腺病毒感染 SKOV-3 细胞,利用倒置荧光显微镜观察细胞生长状态及绿色荧光携带情况,最终确定 MOI 取 75(感染效率最高,且细胞生长良好),继而后续实验均以 75MOI 进行。利用蛋白印迹法验证了 vasohibin-1 重组腺病毒可以有效地在目的细胞中过表达;采用 CCK-8 检测不同时间点(分别为 24h、48h、72h)及不同 MOI(分别为 25MOI、50MOI、100MOI、200MOI)下 vasohibin-1 重组腺病毒对 SKOV-3 细胞增殖的抑制情况,结果发现在 25MOI 感染细胞 24h 时 Ad 组与 NC 组之间无统计学意义,但是随着 MOI 增大及感染时间的延长,vasohibin-1 重组腺病毒对 SKOV-3 细胞的增殖的抑制能力逐渐增加,说明此抑制作用具有时间及浓度依赖性。本文利用重组腺病毒感染细胞,可以使 vasohibin-1 稳定高效地表达,对人相对安全,且操作相对简单;同时设定 Ad-GFP 为阴性对照组,可以排除病毒自身对细胞的影响,空白对照的设置更有利于证实上述结果。

Vasohibin-1 作为内源性的血管生成抑制剂,不仅抑制血管生成的范围广,而且还能抑制淋巴管的生成及淋巴结的转移。目前 vasohibin-1 在妇科肿瘤领域研究较少,未有利用其腺病毒进行相关研究的,本研究证实,vasohibin-1 重组腺病毒可以在人卵巢癌 SKOV-3 细胞过表达,且能抑制其增殖。而肿瘤细胞不断增殖,是肿瘤血管形成的基础,也在肿瘤侵袭、转移中起重要作用。本研究为进一步的动物模型体内试验建立了基础。期望通过一系列的研究,为将 vasohibin-1 蛋白研发成为抗卵巢癌的新药提供理论支持。

## 参考文献:

- [1] Tummala MK,Mcguire WP. Recurrent ovarian cancer[J]. Clin Adv Hematol Oncol,2005,3(9):723-736.
- [2] Watanabe K,Hasegawa Y,Yamashita H,et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis[J]. J Clin Invest,2004,114(7):898-907.
- [3] Kern J,Bauer M,Rychli K,et al. Alternative splicing of vasohibin-1 generates an inhibitor of endothelial cell proliferation,migration,and capillary tube formation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2008,28(3):478-484.
- [4] Lu C,Han HD,Mangala LS,et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2[J]. Cancer Cell,2010,18(2):185-197.
- [5] Heishi T,Hosaka T,Suzuki Y,et al. Endogenous angiogenesis inhibitor vasohibin1 exhibits broad-spectrum anti-lymphangiogenic activity and suppresses lymph node metastasis[J]. Am J Pathol,2010,176(4):1950-1958.
- [6] Li D,Zhou K,Wang S,et al. Recombinant adenovirus encoding vasohibin prevents tumor angiogenesis and inhibits tumor growth[J]. Cancer Sci,2010,101(2):448-452.
- [7] Tamaki K,Moriya T,Sato Y,et al. Vasohibin-1 in human breast carcinoma: a potential negative feedback regulator of angiogenesis[J]. Cancer Sci,2009,100(1):88-94.
- [8] Wakusawa R,Abe T,Sato H,et al. Suppression of choroidal neovascularization by vasohibin-1,a vascular endothelium-derived angiogenic inhibitor [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2011,52(6):3272-3280.
- [9] Watanabe T,Okada Y,Hoshikawa Y,et al. A potent anti-angiogenic factor,vasohibin-1,ameliorates experimental bronchiolitis obliterans [J]. Transplant Proc,2012,44 (4): 1155-1157.
- [10] Zhang JR,Li SD,Yang YX,et al.Expression of vasohibin-1 and its relationship with clinicopathologic characteristics in epithelial ovarian cancers [J]. Progress in Modern Biomedicine,2010,10(1):121-124.[张佳荣,李双弟,杨懿霞,等. Vasohibin-1 基因在上皮性卵巢癌中的表达和临床病理意义[J]. 现代生物医学进展,2010,10(1):121-124.]

## 《肿瘤学杂志》投稿须知

- 1.文稿务必材料可靠,数据准确,论点清楚,论据充足,结论明确。
- 2.文字通顺、准确和简练,重点突出,层次清楚。论著需附结构式摘要,包括目的、方法、结果、结论四部分。中文摘要 200~300 字;英文摘要务必与中文摘要一一对应翻译。英文摘要前加英文文题、作者姓名汉语拼音、单位英文全称、所在城市名及邮政编码。
- 3.图表请附中英文各一份,包括图表的题目、内容及注释。
- 4.所列参考文献限作者亲自阅读的已发表的近 3 年文献为主,按文内引用先后顺序列于文末,并在正文内引文处右上角以[ ]号注明序号。具体格式举例如下:  
期刊:[序号]作者(3 位以下全部写出,不同作者姓名中间加逗号,英文文献作者为姓全称,加名缩写;3 位以上时只写前 3 位,于后加“等.”或“et al.)文题[J].刊名(英文为缩写),年,卷(期):起页-止页。  
书籍:[序号]作者.书名[M].版本.出版地(即城市名):出版者,出版年.起页-止页。  
学位论文:[序号]作者.学位论文名[D].城市:培养单位,年。  
电子文献:[序号]作者.题名[电子文献类型].可获得的网址,发表或更新的日期。  
其中,电子文献类型,是网上期刊时,用[J/OL];是网上电子公告时,用[EB/OL];是网上联机数据库时,用[DB/OL]。  
特别注意的是,所有中文文献,需同时附原刊物中的英文翻译。
- 5.有通讯作者的文稿,请在文章首页左下角注明通讯作者职务、职称、学位、工作单位(详细到科室)、详细通讯地址(邮编)和 E-mail。
- 6.本刊启用稿件远程处理系统,只接受网上投稿,网址 <http://www.chinaoncology.cn>。不再接收电子邮件投稿和纸质稿。  
网上投稿成功 1 周内,请将稿件处理费 20 元通过邮局汇款至编辑部(务必注明第一作者姓名、稿号和详细地址);并将单位介绍信邮寄至编辑部。若文稿内容受国家或省、厅级项目资助,请附上基金项目批文的复印件,并在正文首页脚注中说明。
- 7.编辑部对来稿有文字修改权,凡涉及内容的修改,则提请作者考虑,文责自负。文稿一般不退,请作者自留底稿。来稿一经录用,收取一定版面费,发表后寄赠当期杂志 2 册并酌付稿酬。