

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.33.012

卵巢癌干细胞对化疗药物耐药的机制探讨*

尹龙燕 李莉平 苏宁 杨静 蒋瑶 郭文英

(广州医科大学附属广州市第一人民医院妇产科 广东 广州 510180)

摘要 目的:探讨卵巢癌干细胞(OCSC)对化疗药物的抵抗及其机制。**方法:**采用有限稀释法、单细胞克隆和无血清培养方法从卵巢癌细胞株 OVCAR-3 细胞中分离培养 OCSC。以卡铂和紫杉醇作用于 OCSC 和亲代 OVCAR-3 细胞,采用 MTT 法检测细胞存活率、Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡、JC-1 染色流式细胞术检测细胞线粒体膜电位($\Delta\psi$ m),比色测定试剂盒检测 caspase-3 和 caspase-8 活性。**结果:**有限稀释法、单细胞克隆和无血清培养能从 OVCAR-3 细胞中分离培养 OCSC。与亲代 OVCAR-3 细胞比较,卡铂和紫杉醇作用的 OCSC 的存活率增加、凋亡率下降、 $\Delta\psi$ m 增加、caspase-3 和 caspase-8 活性下降。**结论:**OCSC 通过抑制化疗药物介导的凋亡内源性和外源性通路对化疗药物产生耐药性。

关键词:肿瘤干细胞;卵巢癌;化疗;凋亡

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)33-6450-04

Study of the Mechanisms of Chemotherapy Resistance of Ovarian Cancer Stem Cells*

YIN Long-yan, LI Li-ping, SU Ning, YANG Jing, JIANG Yao, GUO Wen-ying

(Department of Obstetrics and Gynecology, Guangzhou First Municipal People's Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510180, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanisms of chemotherapy resistance of ovarian cancer stem cells. **Methods:** Ovarian cancer stem cells (OCSCs) were isolated from ovarian cancer OVCAR-3 cells with limited dilution, single-cell clone and serum-free culture. OCSCs and OVCAR-3 cells were treated with carboplatin and paclitaxel. Cell viability was examined by MTT assay. Apoptosis was determined using Annexin V-FITC/PI staining and flow cytometry. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ m) was analyzed by JC-1 staining and flow cytometry. Caspase-3 and caspase-8 activity was measured by colorimetric assay kits. **Results:** In comparison to OVCAR-3 cells, the viability and $\Delta\psi$ m of OCSCs significantly increased, whereas the apoptosis rate, caspase-3 and caspase-8 activity of OCSCs markedly decreased. **Conclusion:** OCSCs resist to chemotherapy by inhibition of chemotherapy-induced both intrinsic and extrinsic apoptotic pathways

Key words: Cancer stem cells; Ovarian cancer; Chemotherapy; Apoptosis

Chinese Library Classification: R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)33-6450-04

前言

卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌是女性生殖器常见的三大恶性肿瘤,其中卵巢癌 5 年存活率不到 30%,病死率居妇科恶性肿瘤的首位。全世界每年新发卵巢癌患者大约有 20 万,而死于卵巢癌者将近 11.5 万^[1]。由于缺乏特异性早期诊断方法,70% 的患者确诊时已是卵巢癌晚期^[2]。卵巢癌的治疗主要是采取手术和化疗的综合治疗。细胞减灭术和化疗能消灭大部分癌细胞,有效抑制肿瘤生长,但这些治疗很少能治愈卵巢癌,最终导致致死性多药耐药和肿瘤复发。因此,有必要探索卵巢癌多药耐药和复发的机制,以发现新的有效的治疗手段。

近年来,部分学者提出“肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)”假说。该假说认为:肿瘤中含有极少量但具有无限增殖

潜能的 CSC,这些高致瘤性细胞亚群是肿瘤发生、转移、复发和治疗失败的根源^[3-7]。研究者们已经在多种恶性肿瘤中如乳腺癌、神经胶质瘤、前列腺癌、肝癌、肺癌及头颈鳞状上皮细胞癌等中证实 CSC 的存在^[8]。

在本研究中,我们采用有限稀释法和单细胞克隆培养^[9],结合无血清悬浮培养,分离培养假定的卵巢癌干细胞(ovarian cancer stem cell, OCSC),并采用肿瘤细胞球形形成实验和软琼脂克隆形成实验对其进行了鉴定,此外,从凋亡率、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, $\Delta\psi$ m)和 caspase 等方面探讨 OCSC 对化疗药物耐药的机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

* 基金项目:广州市卫生局西医类一般引导项目(20131A011004)

作者简介:尹龙燕(1971-),女,本科,学士,妇产科主治医师,主要研究方向:卵巢癌,

E-mail:584926298@qq.com,电话:13650831819 81048096

(收稿日期:2014-04-06 接受日期:2014-04-30)

卵巢癌 OVCAR-3 细胞株为 Scien cell 公司产品。胎牛血清和 DMEM/F2 培养基购于 GIBCO 公司, 重组人碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和重组人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)为 PeproTech 公司产品, B27 购于 Invitrogen 公司, 胰岛素、紫杉醇和卡铂购于 Sigma 公司, AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海贝博生物科技有限公司, JC-1 购自 Molecular Probes 公司, caspase-3 和 caspase-8 比色测定试剂盒购自 BioVSION 公司,

1.2 有限稀释法、单细胞克隆和无血清悬浮培养分离 OCSC

采用有限稀释法, 将卵巢癌细胞置于超低粘附力的 96 孔培养板, 1 cell/well, 采用含有 5 μ g/ml 的胰岛素、20 ng/ml 的 EGF、20 ng/ml 的 bFGF 和 2% 的 B27 的 DMEM/F2 培养基培养, 每 3 天添加新鲜培养基, 分离培养 OCSC。并利用肿瘤细胞球形成实验, 即在上述培养条件下能否形成悬浮的肿瘤细胞球囊, 对分离的 OCSC 进行初步鉴定^[4]。

1.3 软琼脂克隆形成实验

取 1 mL 含 10% 胎牛血清和 0.6% 琼脂的 DMEM 培养基置于 35 mm 的 6 孔培养板, 再加入 1 mL 含 5×10^3 的球体细胞或卵巢癌 OVCAR-3 细胞、10% 胎牛血清和 0.3% 琼脂的 DMEM, 21 天后在显微镜下观察细胞克隆数, 对球体细胞的干细胞特性进行进一步鉴定。

1.4 MTT 法检测细胞存活率

取对数期生长的球体细胞或 OVCAR-3 细胞, 接种于 96 孔平底细胞培养板内, 使每孔细胞密度为 2×10^4 个, 加入不同浓度的紫杉醇 (10、20、40、80 nmol/l) 或卡铂 (5、10、20、40 μ mol/l), 孵育 48 h。离心吸掉上清 100 μ L, 各孔加入 20 μ L MTT (终浓度为 1 mg/ml), 混匀后继续培养 4 h, 每孔加入 1 mM 的 DMSO 100 μ L, 震荡充分混合溶解后, 在 BIO-RAD 酶标仪上测 A490 值。计算细胞存活率, 细胞存活率 = 实验组 A490 值 / 对照组 A490 值 $\times 100\%$ 。

1.5 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡

1×10^6 的球体细胞或 OVCAR-3 细胞与 20 μ mol/l 的卡铂或 40 nmol/l 的紫杉醇作用 48 h, 离心收集细胞, 预冷的 PBS 离心洗涤细胞 2 次, 重悬于 300 μ L binding buffer 中, 然后分别加入 10 μ L Annexin V 和 5 μ L PI 染液, 混匀后室温避光静置 15 min, 最后加入 200 μ L binding buffer, 30 min 内流式细胞仪检测。其中, AnnexinV+PI- 细胞即为凋亡细胞。每个样品的数据统计使用 10^4 个细胞。获取的数据用 CELLQuest 软件分析。

1.6 JC-1 染色流式细胞术检测 $\Delta\psi$ m

球体细胞或 OVCAR-3 细胞与卡铂或紫杉醇作用 48 h, 收集细胞重悬于 PBS 中, 细胞浓度为 5×10^5 个/mL, 离心弃上清, 加入 1 μ mol/l 的 JC-1 工作液 1 mL, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 避光轻轻振荡 30 min, PBS 离心洗涤细胞 2 次, 然后用流式细胞仪检测, 获取的数据用 CELLQuest 软件分析。FL2 平均荧光强度指示 $\Delta\psi$ m。

1.7 caspase-3 和 caspase-8 活性检测

方法按试剂盒说明书步骤进行, 在 BIO-RAD 酶标仪上测 A405 值, 通过计算实验组 A405 值 / 未加药阴性对照组 A405 值来确定实验组 caspase-3 和 caspase-8 的活性。

1.8 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 各组间数据采用随机区组(无重复数)设计的双因素方差分析或独立样本 t 检验进行分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 卵巢癌细胞株 OVCAR-3 细胞成球能力

我们采用有限稀释和无血清悬浮培养方法, 试图从单个的 OVCAR-3 细胞中克隆培养具有自我更新能力的肿瘤球体细胞。我们发现, 480 个孔中有 11 个孔的单个细胞 (大约 2.3%) 最终能形成悬浮生长的球体细胞。图 1A 代表在无血清培养基中生长的单个细胞。单个细胞逐渐克隆生长, 大约在无血清培养第 35 天左右形成典型的未分化的球体细胞。球体一般由 100-200 个细胞组成, 细胞结合紧密, 球体直径约 20-30 μ m, 细胞球周边细胞较亮, 中心区细胞密度高, 透光性差 (图 1B)。

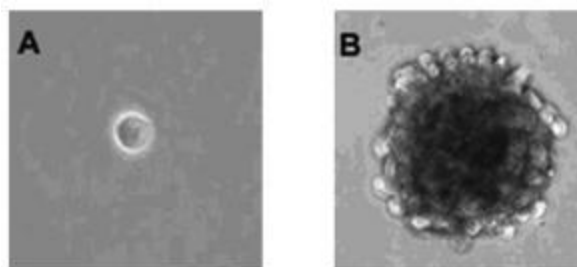


图 1 肿瘤细胞球形成实验

Fig 1 Tumor sphere generation analysis

(A) Limiting dilution and a single-cell clonogenic culture in serum-free medium ($\times 400$). (B) Tumor sphere generated from a single-cell culture in tumor sphere medium ($\times 200$)

2.2 球体细胞软琼脂克隆形成

为了进一步鉴定培养的球体细胞的自我更新能力, 我们比较了球体细胞与亲代卵巢癌细胞在软琼脂上形成的克隆数。与亲代卵巢癌 OVCAR-3 细胞比较, 球体细胞在软琼脂上能形成跟多的克隆, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 2)。

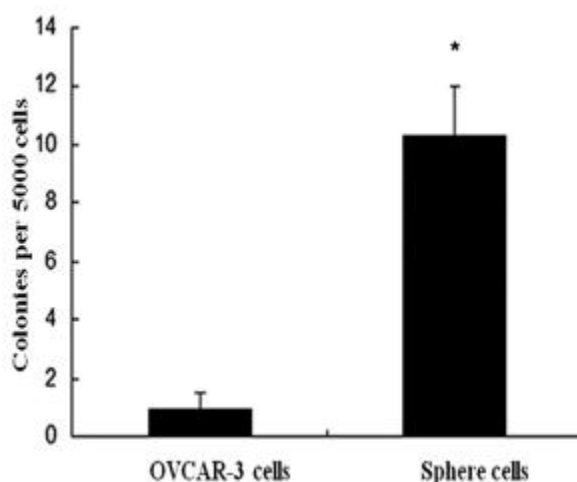


图 2 软琼脂克隆形成实验

Fig 2 Soft agar clonogenic assay. * $P < 0.01$ vs. OVCAR-3 cells

2.3 化疗药物敏感性实验

结果采用随机区组(无重复数)设计的双因素方差分析。各浓度卡铂能显著降低 OVCAR-3 细胞的存活率,且浓度越大,存活率越低(P 均 <0.01);20 μM 的卡铂能显著降低球体细胞的存活率,且浓度越大,存活率越低(P 均 <0.01);在同一浓度卡铂的作用下,球体细胞的存活率较 OVCAR-3 细胞明显增高(P 均 <0.01)(图 3A)。

与此类似,各浓度紫杉醇能显著降低 OVCAR-3 细胞的存活率,且浓度越大,存活率越低(P 均 <0.01);40 nM 的紫杉醇能显著降低球体细胞的存活率,且浓度越大,存活率越低(P 均 <0.01);在同一浓度紫杉醇的作用下,球体细胞的存活率较 OVCAR-3 细胞明显增高(P 均 <0.01)(图 3B)。

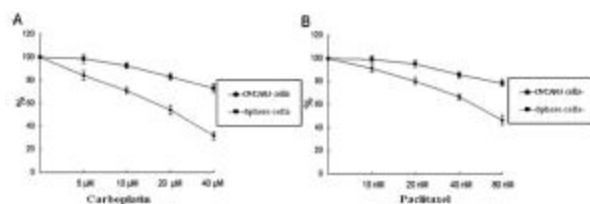


图 3 化疗药物对 OVCAR-3 细胞和球体细胞存活率的影响

Fig 3 Effects of chemotherapy drugs on the viability of OVCAR-3 cells and tumor spheres

2.4 化疗药物对细胞凋亡的作用

在 20 μM 的卡铂的作用下,球体细胞的凋亡率显著低于亲代 OVCAR-3 细胞的凋亡率($P < 0.01$);同样,在 40 nM 的紫杉醇的作用下,球体细胞的凋亡率明显低于亲代 OVCAR-3 细胞的凋亡率($P < 0.01$)(图 4)。

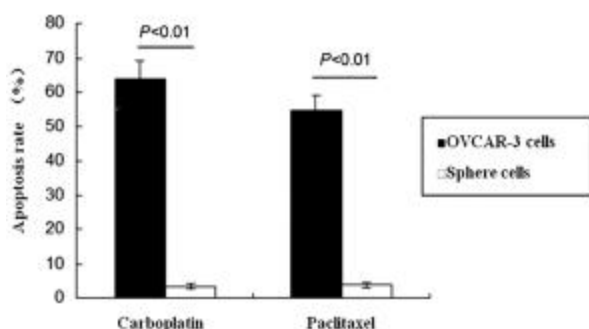


图 4 化疗药物对 OVCAR-3 细胞和球体细胞凋亡率的影响

Fig 4 Effects of chemotherapy on the apoptosis of OVCAR-3 cells and tumor spheres

2.5 化疗药物对细胞 $\Delta\psi\text{m}$ 的影响

在 20 μM 的卡铂的作用下,球体细胞的 $\Delta\psi\text{m}$ 显著高于亲代 OVCAR-3 细胞的 $\Delta\psi\text{m}$ ($P < 0.01$);同样,在 40 nM 的紫

杉醇的作用下,球体细胞的 $\Delta\psi\text{m}$ 明显高于亲代 OVCAR-3 细胞的 $\Delta\psi\text{m}$ ($P < 0.01$)(图 5)。

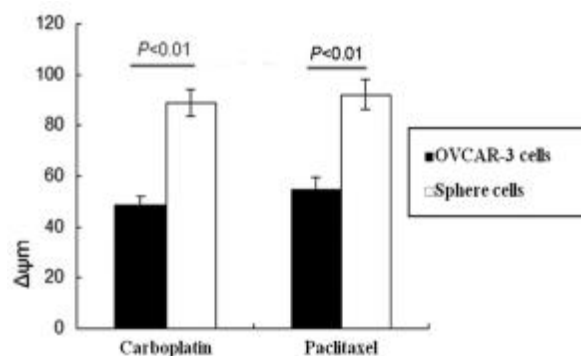


图 5 化疗药物对 OVCAR-3 细胞和球体细胞 $\Delta\psi\text{m}$ 的影响

Fig 5 Effects of chemotherapy on the $\Delta\psi\text{m}$ of OVCAR-3 cells and tumor spheres

2.6 化疗药物对细胞 caspase-3 活性的影响

在 20 μM 的卡铂的作用下,球体细胞的 caspase-3 活性显著低于亲代 OVCAR-3 细胞的 caspase-3 活性($P < 0.01$);同样,在 40 nM 的紫杉醇的作用下,球体细胞的 caspase-3 活性明显低于亲代 OVCAR-3 细胞的 caspase-3 活性($P < 0.01$)(图 6)。

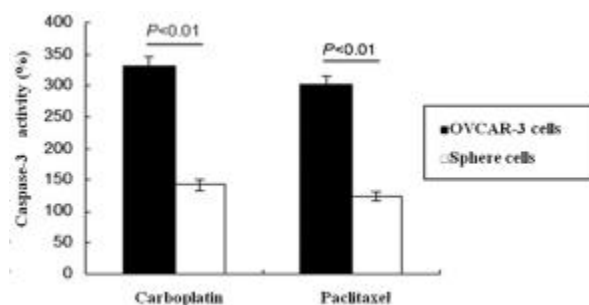


图 6 化疗药物对 OVCAR-3 细胞和球体细胞 caspase-3 活性的影响

Fig 6 Effects of chemotherapy on the caspase-3 activity of OVCAR-3 cells and tumor spheres

2.7 化疗药物对细胞 caspase-8 活性的影响

在 20 μM 的卡铂的作用下,球体细胞的 caspase-8 活性显著低于亲代 OVCAR-3 细胞的 caspase-8 活性($P < 0.01$);同样,在 40 nM 的紫杉醇的作用下,球体细胞的 caspase-8 活性明显低于亲代 OVCAR-3 细胞的 caspase-8 活性($P < 0.01$)(图 7)。

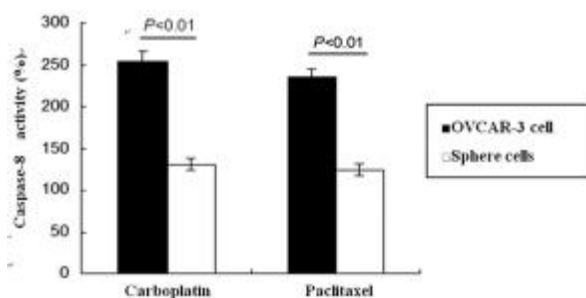


图 7 化疗药物对 OVCAR-3 细胞和球体细胞 caspase-8 活性的影响

Fig 7 Effects of chemotherapy on the caspase-8 activity of OVCAR-3 cells and tumor spheres

3 讨论

近年来,研究者们对 OCSC 进行了系列研究。Bapat 等首次^[10]从晚期卵巢癌患者的腹水中分离得到干细胞样克隆,这些细胞克隆以球体形式在体外以安克雷奇-非依赖性方式生长,并能在动物体内连续移植形成移植瘤,且在动物模型中形成的移植瘤与其原发肿瘤在组织病理学和细胞结构上非常相似。因此,他们得出结论,干细胞的形成可能是卵巢癌发生的潜在机制,卵巢癌干细胞持续形成与转化导致卵巢癌侵袭性增加。

Baba 等^[11-13]研究发现 CD133⁺ 卵巢癌细胞能分裂生成 CD133⁺ 和 CD133⁻ 子细胞,而 CD133⁻ 细胞则只能对称分裂生成 CD133⁻ 子细胞,少量的 CD133⁺ 细胞与 CD133⁻ 细胞相比,能形成侵袭度更高的肿瘤移植瘤,因此推断,CD133 能够作为卵巢癌发生细胞(ovarian cancer-initiating cell)的表面标志,从而进行区分。与此研究不同的是,Kusumbe 等^[14]报道,CD133⁺ 卵巢癌细胞本身不具有致瘤性,但具有潜在的促血管生成作用,并通过促进血管生成而最终能导致肿瘤的增大及转移。Shi 等^[15]采用肿瘤细胞球形成实验分离得到 CD44⁺CD24⁻ 卵巢癌干细胞样细胞,这些球体细胞和 CD24⁻ 细胞对免疫缺陷小鼠产生强的致瘤性;CD44⁺CD24⁻ 细胞表达干细胞标志,对卡铂和紫杉醇表现出明显的抗性,并且能分化为 CD44⁺CD24⁺ 细胞。由此可见,研究者已经证实 OCSC 的存在,但研究结果不尽相同,对 OCSC 所致的卵巢癌发生和多药耐药的机制还有待深入研究。在本研究中,我们对 OCSC 进行了分离培养和鉴定,并探讨了 OCSC 对化疗药物耐药的机制。

我们采用有限稀释法、单细胞克隆和无血清悬浮培养从卵巢癌细胞株 OVCAR-3 细胞成功分离了 OCSC。分离培养的 OCSC 细胞能在无血清培养基中形成具有自我更新能力的球体细胞。此外,我们通过软琼脂克隆培养发现球体细胞较之亲代 OVCAR-3 细胞形成更多的细胞克隆,进一步证实分离培养的球体细胞具有自我更新的能力。

并且,我们对分离的 OCSC 对化疗药物的抵抗特性进行了探讨和机制研究。我们发现,与亲代 OVCAR-3 细胞比较,卡铂和紫杉醇作用的球体细胞存活率更高,而凋亡率更低,说明 OCSC 较之卵巢癌细胞对化疗药物具有更强的抵抗性。

此外,我们对 OCSC 对化疗药物抵抗的机制进行了探讨。研究表明,卡铂和紫杉醇均能显著降低卵巢癌 OVCAR-3 细胞的 $\Delta\psi m$ 。 $\Delta\psi m$ 的下降,使得线粒体外膜渗透(mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP)^[16],从而释放细胞色素 c^[17],经过一系列的信息传导,形成凋亡体,继而活化 caspase-3,构成线粒体介导的细胞凋亡通路(内源性通路)。但是,球体细胞的 $\Delta\psi m$ 较 OVCAR-3 细胞明显增加,说明球体细胞能在一定程度上抑制化疗药物所致的线粒体介导的细胞凋亡。

我们还发现,卡铂和紫杉醇能明显增加 OVCAR-3 细胞 caspase-8 和 caspase-3 的活性。caspase-8 的活化直接激活下游效应 caspase-3,从而介导细胞凋亡的外源性通路^[18-20]。而球体细胞的 caspase-8 和 caspase-3 的活性较亲代 OVCAR-3 细胞明显下降,说明 OCSC 能够抑制化疗药物所致的细胞凋亡的外源性通路。

综上所述,我们采用有限稀释、单细胞克隆和无血清培养方法能够从卵巢癌细胞株 OVCAR-3 细胞中成功分离培养得到 OCSC,并发现 OCSC 通过抑制化疗药物介导的细胞凋亡的

内源性和外源性通路从而对化疗药物产生耐药性。

参考文献(References)

- [1] Ozols RF. Challenges for chemotherapy in ovarian cancer[J]. Ann Oncol, 2006, 17(Suppl 5): v181-v187
- [2] Ouellet V, Zietarska M, Portelance L, et al. Characterization of three new serous epithelial ovarian cancer cell lines[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 152-169
- [3] Dontu G. Breast cancer stem cell markers - the rocky road to clinical applications[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(5): 110-111
- [4] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Nature medicine, 2011: 313-319
- [5] Merlos-Suá rez A, Barriga FM, Jung P, et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse[J]. Cell stem cell, 2011, 8(5): 511-524
- [6] Pece S, Tosoni D, Confalonieri S, et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content[J]. Cell, 2010, 140(1): 62-73
- [7] Valent P, Bonnet D, De Maria R, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details[J]. Nature Reviews Cancer, 2012, 12(11): 767-775
- [8] Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift[J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 1883-1890
- [9] Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(36): 13427-13432
- [10] Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, et al. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3025-3029
- [11] Baba T, Convery PA, Matsumura N, et al. Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133⁺ ovarian cancer cells [J]. Oncogene, 2009, 28(2): 209-218
- [12] Silva IA, Bai S, McLean K, et al. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival[J]. Cancer res, 2011, 71(11): 3991-4001
- [13] Kryczek I, Liu S, Roh M, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells [J]. Int J Cancer, 2012, 130(1): 29-39
- [14] Kusumbe AP, Mali AM, Bapat SA. CD133-expressing stem cells associated with ovarian metastases establish an endothelial hierarchy and contribute to tumor vasculature[J]. Stem Cells, 2009, 27(3): 498-508
- [15] Shi MF, Jiao J, Lu WG, et al. Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(22): 3915-3925
- [16] Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Green DR. Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: The innocent bystander scenario[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(8): 1396-1402
- [17] Lucken-Ardjomande S, Martinou JC. Newcomers in the process of mitochondrial permeabilization[J]. J Cell Sci, 2005, 118(pt 3): 473- 483
- [18] Sun Y, Lin Y, Li H, et al. 2, 5-Hexanedione induces human ovarian granulosa cell apoptosis through BCL-2, BAX, and caspase-3 signaling pathways[J]. Archi toxicol, 2012, 86(2): 205-215
- [19] Song Y-H, Jeong S-J, Kwon H-Y, et al. Ursolic acid from Oldenlandia diffusa induces apoptosis via activation of caspases and phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 beta in SK-OV-3 ovarian cancer cells[J]. Biological & pharmaceutical bulletin, 2011, 35(7):1022-1028
- [20] Nieminen AI, Partanen JJ, Klefstrom J. c-Myc blazing a trail of death: coupling of the mitochondrial and death receptor apoptosis pathways by c-Myc[J]. Cell Cycle, 2007, 6(20): 2464-2472