

# OSTP 增强紫杉醇诱导卵巢癌 A2780 细胞凋亡的作用

卢雪琳 杨 陈 梁晓秋 刘小敏 周建斌

**摘要 目的** 研究卵巢癌特异性结合肽(OSTP)及联合紫杉醇对卵巢癌 A2780 细胞生长及凋亡的影响。**方法** 体外培养卵巢癌 A2780 细胞,随机分为 4 组:溶剂对照组(1640 和 0.1% DMSO 组)、OSTP 组、紫杉醇组、OSTP 联合紫杉醇组。采用四甲基偶氮唑盐(MTT 法)检测 OSTP 对 A2780 细胞生长的影响;用 Annexin - V - FITC 和 PI 双染法标记 A2780 细胞,通过流式细胞仪检测细胞凋亡情况。**结果** MTT 法检测 OSTP 以不同浓度作用于卵巢癌 A2780 细胞时,可对该细胞的生长起到抑制作用,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。应用流式细胞技术检测细胞凋亡发现:不同浓度的 OSTP(20、40、80、160、320  $\mu\text{mol/L}$ )对 A2780 细胞的凋亡率分别 7.88%、8.348%、8.727%、9.393% 和 10.68%,与对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),提示 OSTP 可诱导细胞凋亡。OSTP 和紫杉醇联合应用,在不同的预处理组(加 OSTP 80  $\mu\text{mol/L}$  0、3、6、12h)后再加紫杉醇 10  $\mu\text{mol/L}$  作用 48h,结果发现细胞凋亡率分别是 39.40%、53.09%、48.18% 和 45.62%,均高于 OSTP 和紫杉醇单独用药及两者的凋亡率相加值,且差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。提示 OSTP 能增强紫杉醇诱导的卵巢癌 A2780 细胞凋亡作用。**结论** OSTP 对卵巢癌 A2780 细胞有生长抑制及凋亡作用,尤其是 OSTP 能增强紫杉醇诱导卵巢癌 A2780 细胞凋亡的作用,对于探讨和开发 OSTP 作为靶向化疗增敏剂治疗卵巢癌有良好的应用前景。

**关键词** 卵巢癌 A2780 细胞 OSTP 紫杉醇 细胞凋亡

[中图分类号] R737

[文献标识码] A

**OSTP Enhances Paclitaxel – induced Apoptosis in the Ovarian Cancer A2780 Cell.** Lu Xuelin, Yang Chen, Liang Xiaoqiu, et al. *Cancer Research Institute of University of South China, Hunan 421001, China*

**Abstract Objective** We have firstly screened and identified the ovarian cancer specific targeting peptide (OSTP) in the preliminary work. In this study, we would investigate further the effect of OSTP combined with paclitaxel on the growth and apoptosis of ovarian cancer A2780 cells. **Methods** Ovarian cancer A2780 cells were cultured in vitro and then randomly divided into four groups: control group (included 1640 and 0.1% DMSO); OSTP group; paclitaxel group; OSTP combined with paclitaxel group. MTT – assay was used to measure the inhibition ability of OSTP in A2780 cells proliferation. Annexin – V – FITC and PI double staining were used to label A2780 cells and FCM was used to detect the cell apoptosis. **Results** We detected that different concentrations of OSTP had an inhibited effect on the ovarian cancer A2780 cell by MTT – assay, and compared with the control group, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). The results of FCM showed that the apoptosis rates of different concentrations of OSTP (20, 40, 80, 160, 320  $\mu\text{mol/L}$ ) on A2780 cell were 7.88%, 8.348%, 8.727%, 9.393% and 10.68%, and compared with the control group, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). It suggested us that OSTP could induce cell apoptosis, but the effect of apoptosis was not very strong. In different pretreatment groups (add OSTP 80  $\mu\text{mol/L}$  0h, 3h, 6h, 12h) plus paclitaxel 10  $\mu\text{mol/L}$ , the apoptosis rates were respectively 39.40%, 53.09%, 48.18% and 45.62%. They were higher than OSTP and paclitaxel monotherapy and even their added value, and the difference was statistically significant ( $P < 0.001$ ). It was suggested that OSTP could enhance paclitaxel – induced apoptosis in the ovarian cancer A2780 cell. **Conclusion** OSTP had an effect of growth inhibition and apoptosis on ovarian cancer A2780 cells, especially OSTP could enhance paclitaxel – induced apoptosis in the ovarian cancer A2780 cell. For the study and development of OSTP, it has a good application prospect as a targeting chemotherapy sensitizing agent for the treatment of ovarian cancer.

**Key words** Ovarian cancer; Ovarian cancer specific targeting peptide (OSTP); Paclitaxel; Apoptosis

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,因其

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81101988);湖南省教育厅课题项目(12C0350)

作者单位:421000 衡阳,南华大学肿瘤研究所(卢雪琳、杨陈、梁晓秋、刘小敏);南华大学附属第二医院妇产科(周建斌)

通讯作者:梁晓秋,电子信箱:1441321263@qq.com

早期多无明显临床症状和体征,且无有效的早期诊断方法,确诊时约有 60% ~ 70% 的患者已出现广泛转移,导致其病死率位居妇科恶性肿瘤第 1 位,且 5 年生存率仍在 25% ~ 30% 之间<sup>[1~3]</sup>。目前卵巢癌治疗模式一般为肿瘤细胞减灭术联合放化疗。患者预后在很大程度都取决于肿瘤细胞对化疗药物的敏感度。

但是肿瘤细胞的耐药及对化疗药物的不良反应,往往会影响化疗的效果<sup>[4]</sup>。所以化疗增敏剂显得尤为重要,也越来越受到重视。

本实验室利用体内噬菌体展示肽库技术,筛选得到了具有生物学活性的 OSTP,并通过体内外实验进一步对其进行了鉴定,结果表明 OSTP 对卵巢癌 A2780 细胞具有特异结合作用,并且石蜡切片显示 OSTP 与人体卵巢癌组织细胞有很好的靶向效应<sup>[5]</sup>。本研究从细胞生物学水平探讨 OSTP 是否对卵巢癌 A2780 细胞有生长抑制作用,及联合紫杉醇用药是否会产生协同作用和对细胞凋亡的影响。有望为 OSTP 应用于卵巢癌的临床化疗增敏治疗提供理论依据和实验参数。

### 材料与方法

1. 实验材料:卵巢癌 A2780 细胞为本室保存;紫杉醇购自百灵威科技有限公司;RPMI1640 培养基和新生小牛血清均购自美国 GIBCO 公司;胰蛋白酶购自碧云天公司;二甲基噻唑二苯基四唑溴盐 (MTT) 购自 Sigma 公司;Annexin - V - FLUOS 凋亡检测试剂盒购自 Roche 公司。

2. 肽合成:将筛选的 OSTP 送与生工生物工程(上海)有限公司通过固相多肽合成方法合成稳定的链状结构,并进行高效液相色谱(HPLC)分析和质谱分析。

3. 细胞培养:卵巢癌 A2780 细胞培养于含 12% 小牛血清、100U/ml 链霉素、100U/ml 青霉素的 RPMI1640 培养基中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养,细胞贴壁生长至 80% 左右时加 0.25% 胰酶消化传代,1 周传代 2 次。

4. 实验分组:实验随机分为 4 组:溶剂对照组(1640 和 DMSO 组)、OSTP 组、紫杉醇组、OSTP 联合紫杉醇处理组。

5. 药物配制与方法:OSTP 溶于水,故可用 RPMI 1640 溶解并过滤,每次实验前用 RPMI 1640 稀释配成相应的工作浓度。紫杉醇不溶于水,用适量 DMSO 溶解后再用无血清的培养基即 RPMI 1640 稀释至工作浓度并过滤。所有试验中的 DMSO 终浓度均小于 0.01%,该浓度的 DMSO 对实验结果无显著影响。

6. 观察指标:(1) MTT 法观察 OSTP 对 A2780 细胞生长的影响:收集对数期的培养细胞,用胰酶消化并制成单细胞悬液,调整细胞浓度至  $5 \times 10^4/\text{ml}$ ,以每孔 100 μl 种于 96 孔板中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中孵育过夜,待细胞贴壁后加药处理,分别加入不同浓度的 OSTP(0.01、0.1、1、10、100 μmol/L)、紫杉醇(0.01、0.1、1、10、100 μmol/L)、溶剂对照组(1640 和 DMSO 组),每组设置 5 个平行复孔。置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 48h 后,每孔加入 MTT 20 μl(5 mg/ml),继续培养 4h;弃去上清后,每孔加入 DMSO 150 μl,振摇 10 min,酶标仪检测波长 570 nm 的各孔吸光度值,重复实验 3 次。计算细胞抑制率,并确定药物的 IC<sub>50</sub> 值。计算公式为:细胞存活率(%) = 实验组吸光度值 / 对照组吸光度值。细胞

抑制率(%) = 1 - 细胞存活率。(2) 流式细胞术检测 OSTP 以及 OSTP 联合紫杉醇作用卵巢癌 A2780 细胞的凋亡情况:收集对数期细胞,以  $1 \times 10^6/\text{ml}$  的浓度,每孔 1 ml 接种于六孔板中,培养箱中孵育 24h 后行加药处理,分别加入 80 μmol/L OSTP、10 μmol/L 紫杉醇和 OSTP(80 μmol/L)预处理(0、3、6、12 h)后联合紫杉醇(10 μmol/L)作用 A2780 细胞 48h 后收集细胞,用胰酶消化制成单细胞悬液,1000 r/min 离心 5 min,用 PBS 洗涤,并加入 Annexin - V - FITC 和 PI 孵育,按照细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,最后用流式细胞仪进行样本分析。

7. 统计学方法:实验结果数据应用 SPSS 18.0 统计软件包处理,计量资料用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,各组之间采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),率的资料用卡方检验,方差分析后两两比较采用 LSD-t 检验,当  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 结 果

1. 质谱分析:成功合成 OSTP,通过 HPLC 分析,纯度 > 95%。质谱分析显示,分子质量为 797.96。性状为白色粉末。

2. OSTP 对卵巢癌 A2780 细胞的生长抑制作用:应用 MTT 法检测不同浓度(0.01、0.1、1、10、100 μmol/L)的 OSTP 和紫杉醇分别作用于卵巢癌 A2780 细胞时,结果显示 OSTP 可对 A2780 细胞有生长抑制作用,不同浓度的 OSTP 作用于 A2780 细胞,其细胞存活率分别为 72.64%、67.32%、63.92%、59.23% 和 42.68%,则其抑制率分别是 27.36%、32.68%、36.08%、40.77%、57.32%。同理,不同浓度的紫杉醇对 A2780 细胞的抑制率分别是 33.64%、38.00%、43.17%、52.26%、72.79%,如图 1 所示。OSTP 与对照组相比,差异具有统计学差异 ( $P < 0.01$ )。根据结果,我们计算出短肽的 IC<sub>50</sub> 值为 78.18 μmol/L。

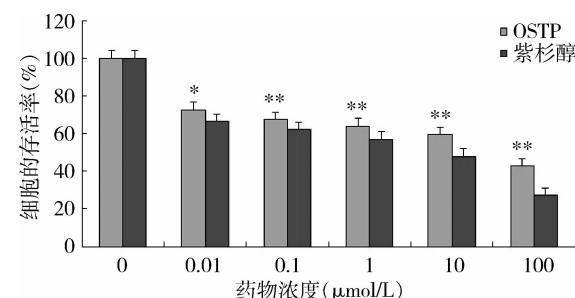


图 1 OSTP 对卵巢癌 A2780 细胞的生长抑制作用

与对照组(0 μmol/L)相比, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$

3. OSTP 对卵巢癌 A2780 细胞的凋亡作用:不同浓度的 OSTP(20、40、80、160、320 μmol/L)作用于卵巢癌 A2780 细胞 48h 后的细胞凋亡率,结果显示,与

对照组相比,OSTP 对 A2780 细胞有一定的促进凋亡作用( $P < 0.05$ )。随着浓度的增加,细胞的凋亡率增加

不是很明显,提示 OSTP 具有一定的促进卵巢癌 A2780 细胞凋亡的作用(表 1 和图 2)。

表 1 OSTP 作用卵巢癌 A2780 细胞的细胞凋亡率( $\bar{x} \pm s$ )

组别	1640 对照组	OSTP( $\mu\text{mol/L}$ )				
		20	40	80	160	320
凋亡率 (%)	4.67 $\pm$ 0.24	7.88 $\pm$ 0.64 *	8.34 $\pm$ 0.26 **	8.73 $\pm$ 1.35 **	9.39 $\pm$ 0.63 *	10.68 $\pm$ 0.46 **

与 1640 对照组相比, \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$

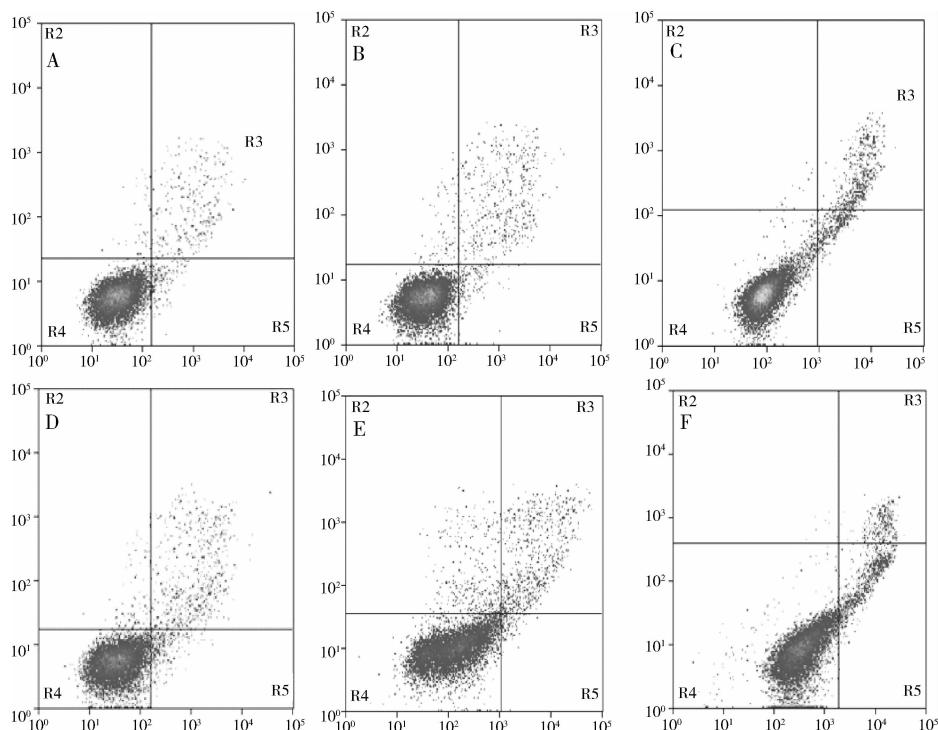


图 2 OSTP 处理卵巢癌 A2780 细胞后的凋亡流式检测图

A. 1640 对照组; B. OSTP 20  $\mu\text{mol/L}$ ; C. OSTP 40  $\mu\text{mol/L}$ ; D. OSTP 80  $\mu\text{mol/L}$ ; E. OSTP 160  $\mu\text{mol/L}$ ; F. OSTP 320  $\mu\text{mol/L}$

4. OSTP 联合紫杉醇对卵巢癌 A2780 细胞的凋亡作用:流式细胞术检测结果显示,OSTP 和紫杉醇联合应用,在不同的预处理组(加 OSTP 80  $\mu\text{mol/L}$  0、3、6、12h)后再加紫杉醇 10  $\mu\text{mol/L}$  作用 48h,细胞凋亡率分别是 39.40%、53.09%、48.18% 和 45.62%,OSTP (80  $\mu\text{mol/L}$ ) 和紫杉醇 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 单独作用 A2780 细胞的凋亡率分别是 8.73% 和 20.63%,经两两比较,预处理组的细胞凋亡率均高于 OSTP 和紫杉醇单独用药组及两者的凋亡率相加值,且差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。说明 OSTP 与紫杉醇联合作用可产生协同作用,OSTP 能增强紫杉醇诱导的卵巢癌 A2780 细胞凋亡作用。并且发现在预处理 3h 组中,对细胞的凋亡效果最好(表 2、图 3)。

表 2 OSTP 与紫杉醇联合应用对卵巢癌

A2780 细胞的凋亡率(% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡率	P
1640 对照组	5.80 $\pm$ 0.57	
0.1% DMSO	6.76 $\pm$ 1.18	
OSTP 80 $\mu\text{mol/L}$	8.73 $\pm$ 1.35	< 0.05 *
紫杉醇 10 $\mu\text{mol/L}$	20.63 $\pm$ 0.05	< 0.001 #
(OSTP 联合紫杉醇) 预处理 0h 组	39.40 $\pm$ 0.19	< 0.001 △
(OSTP 联合紫杉醇) 预处理 3h 组	53.09 $\pm$ 0.28	< 0.001 △
(OSTP 联合紫杉醇) 预处理 6h 组	48.18 $\pm$ 0.27	< 0.001 △
(OSTP 联合紫杉醇) 预处理 12h 组	45.62 $\pm$ 0.59	< 0.001 △

\* 与 1640 对照组相比较, # 与 0.1% DMSO 比较, △ 与 紫杉醇 10  $\mu\text{mol/L}$  比较

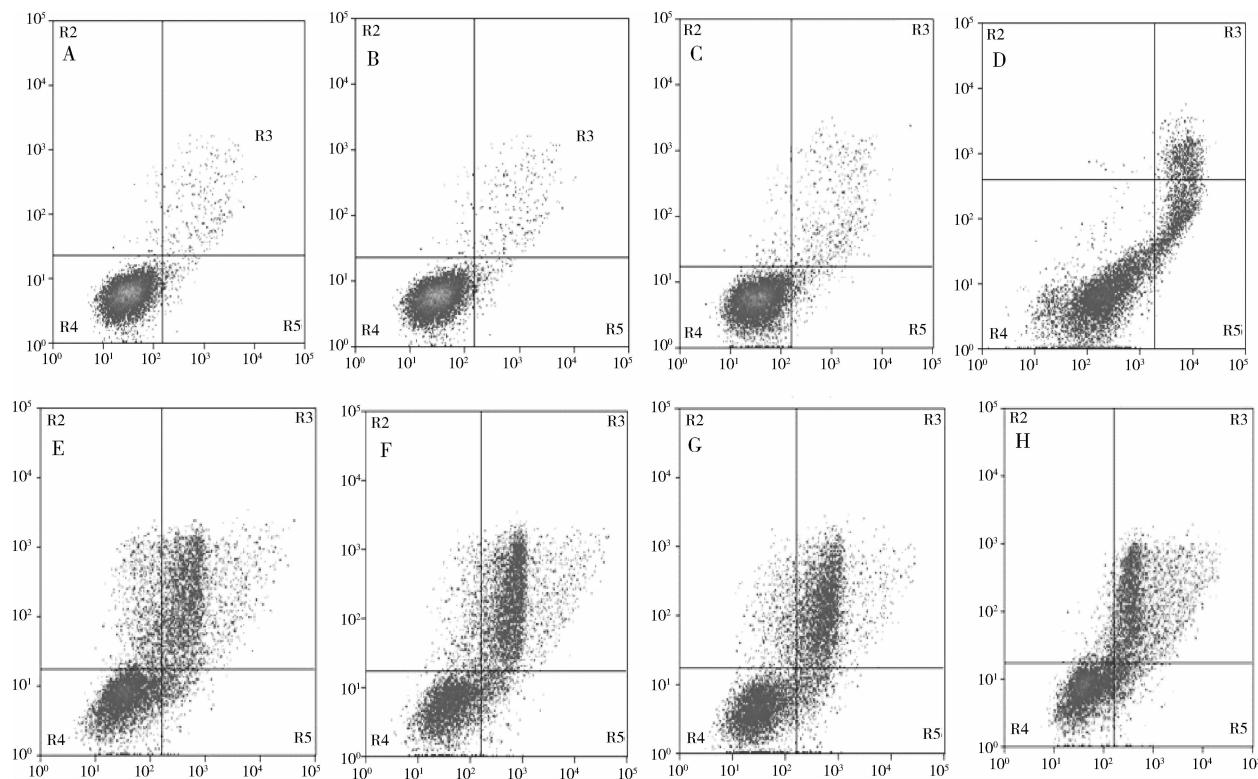


图 3 OSTP 联合紫杉醇对卵巢癌 A2780 细胞的凋亡作用

A. 1640; B. 0.1% DMSO; C. OSTP80 μmol/L; D. 紫杉醇 10 μmol/L; E. 预处理 0h 组; F. 预处理 3h 组; G. 预处理 6h 组; H. 预处理 0h 组

## 讨 论

卵巢癌是妇科常见肿瘤,具有起病隐匿、组织类型多、早期缺乏有效的诊断指标,且易发生转移及对化疗药物产生耐受,致其在妇科恶性肿瘤中具有高病死率,成为影响预后的关键因素<sup>[6]</sup>。紫杉醇是卵巢癌的一线化疗药物,会给患者带来毒性不良反应如诱导神经病变等<sup>[7,8]</sup>。并且在一一线化疗获得完全缓解的卵巢癌患者中,仍有 80% 的患者在 2 年内复发,且复发后易出现化疗耐药,因此患者的预后取决于化疗的疗效。研究新的高效化疗药物或者是新的药物能增加化疗药物的敏感度显得格外重要<sup>[9]</sup>。

目前已进行广泛研究的化疗增敏剂有喹啉类如奎尼丁、奎宁等和长春新碱联用有较强的化疗增敏作用;抗 DR5 单克隆抗体,联合顺铂可增强其细胞毒作用,起到化疗增敏作用<sup>[10,11]</sup>。

在前期工作中,本研究组通过噬菌体随机肽库筛选获得 OSTP,并对其活性进行了初步鉴定。本实验在前期工作的基础上,将不同浓度的 OSTP(0.01、0.1、1、10、100 μmol/L)作用于卵巢癌 A2780 细胞,MTT 法检测不同浓度的 OSTP 对 A2780 细胞有生长抑制作用,OSTP 的 IC<sub>50</sub> 为 78.18 μmol/L。将其与紫

杉醇联合应用,在不同的预处理时间(加 OSTP 后 0、3、6、12h)加紫杉醇处理 A2780 细胞 48h 后,结果显示 OSTP 联合紫杉醇联合作用可产生协同作用,且预处理组的细胞凋亡率均高于单药作用及单药相加的作用,并且差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。OSTP 可能引发紫杉醇促进细胞凋亡新的信号通路、抗癌活性更高及具有更强的 DNA 亲和力等,这尚需进一步的研究。同时这也为探讨和开发 OSTP 联合紫杉醇应用于卵巢癌的化疗奠定了一定的基础。本实验对 OSTP 联合紫杉醇对卵巢癌细胞作用的研究仅停留在细胞水平,下一步本研究组将通过生物信息学和芯片等方法来进一步研究 OSTP 促进对卵巢癌细胞的凋亡作用的机制。

## 参考文献

- 1 赵霞, 钟茜. 卵巢癌早期筛查的争议与展望 [J]. 西部医学, 2009, 21(1):1~2
- 2 Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277~300
- 3 Choi M, Fuller CD, Thomas CR, et al. Conditional survival in ovarian cancer: results from the SEER dataset 1988~2001 [J]. Gynecol Oncol, 2008, 109(2):203~209
- 4 Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment [J]. Urol Oncol, 2008, 26(1):57~64

- 5 杨陈,何晓娟,卢雪琳,等.卵巢癌特异性结合肽 OSTP 的鉴定 [J].中南医学科学杂志,2013,2:109~112
- 6 Cannistra SA. Cancer of the ovary [J]. N Engl J Med, 2004, 351(24):2519~2529
- 7 赵营,黄守松,杜佩妍.紫杉醇作为一线药物在卵巢癌化疗中的应用[J].国际医药卫生导报,2007;13(15):101~104
- 8 Gornstein E, Schwarz TL. The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions [J]. Neuropharmacology, 2014, 76:175~183
- 9 阮雯聪.卵巢癌多耐药机制及其逆转药物的应用[J].山东医药, 2012, 52(19):95~96
- 10 Solary E, Mannone L, Moreau D, et al. Phase I study of cinchonine, a multidrug resistance reversing agent, combined with the CHVP regimen in relapsed and refractory lymphoproliferative syndromes [J]. Leukemia, 2000, 14(12):2085~2094
- 11 Straughn JM Jr, Oliver PG, Zhou T, et al. Anti-tumor activity of TRA-8 anti-death receptor (DR5) monoclonal antibody in combination with chemotherapy and radiation therapy in a cervical cancer model [J]. Gynecol Oncol, 2006, 101(1):46~54

(收稿日期:2013-10-13)

(修回日期:2013-10-23)

## 进展期胃癌应用 SOX 方案新辅助化疗对手术相关并发症的影响

李 涛 冯道夫 梁美霞 李 婷 陈 凛 袁 静 郭 旭

**摘要 目的** 评估 AJCC II ~ III 期进展期胃癌应用替吉奥胶囊联合注射用奥沙利铂(SOX 方案)新辅助化疗对术后相关并发症发生率的影响。**方法** 回顾性研究分析解放军总医院普通外科 2012 年 2 月 ~ 2013 年 9 月收治入组的 170 例进展期胃癌临床病例资料。研究分为新辅助组(实验组)和单纯手术组(对照组)。新辅助组 80 例胃癌患者分别予以 2~4 个周期 SOX 方案新辅助化疗并进行外科手术。单纯手术组(对照组)为 90 例直接进行外科手术患者,对新辅助化疔疗效和术后并发症的发生情况进行综合并进行统计学分析。**结果** 实验组患者对比临床和病理学 TNM 分期,肿瘤降期明显( $P < 0.05$ )。实验组患者手术时间和失血量较对照组相比,分别具有统计学差异( $P = 0.017$ ;  $P = 0.05$ )。两组术后并发症发病率无统计学差异( $P = 0.704$ ),其中在最为关注的手术相关并发症中,吻合口瘘的发生率无统计学差异(0% vs 2.2%,  $P = 0.499$ );术后出血发生率亦相近(3.8% vs 1.1%,  $P = 0.343$ )。**结论** 进展期胃癌应用 SOX 方案新辅助化疗后肿瘤降期明显,并不会提高术后并发症的发生。

**关键词** 胃癌 新辅助化疗 手术 并发症

[中图分类号] R735 [文献标识码] A

Complications after Radical Gastrectomy with SOX Neoadjuvant Chemotherapy for Advanced Gastric Cancer Li Tao, Feng Daofu, Liang Meixia, et al. Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

**Abstract Objective** To evaluate the impact of S-1 combined with oxaliplatin (SOX regimen) as neoadjuvant chemotherapy on the morbidity of related complications after radical gastrectomy. **Methods** We randomly assigned 80 patients to the neoadjuvant group and 90 patients to surgery-alone group from February 2012 to September 2013. The patients in the neoadjuvant group had been received D<sub>2</sub> radical gastrectomy after preoperative chemotherapy. In the neoadjuvant group, the treatment was performed 2~4 cycles before surgery. The complications after D<sub>2</sub> surgery were statistically analyzed for the patients of two groups. **Results** There were no differences in the morbidity of complications between neoadjuvant and surgery-alone groups ( $P = 0.704$ ). For the significant surgical complications, the incidence of anastomotic fistula was of no difference between two groups (0% vs 2.2%,  $P = 0.499$ ). Also, the morbidity of postoperative hemorrhage was similar (3.8% vs 1.1%,  $P = 0.343$ ). **Conclusion** SOX regimen as neoadjuvant chemotherapy did not impove post-operative morbidity compared with surgery alone.

**Key words** Advanced gastric cancer; Neoadjuvant chemotherapy; Surgery; Complication

基金项目:全军医学科技青年培育项目计划(13QNP185);解放军总医院临床科研扶持基金资助项目(2012FC-TSYS-2028)

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院普通外科(李涛、梁美霞、冯道夫、李婷、陈凛),病理科(袁静),消化内科(郭旭);300071 南开大学医学院(冯道夫、李婷)

通讯作者:李涛,电子信箱:lithbj301@sina.com;陈凛,电子信箱:chenlinbj@vip.sina.com