

· 基础研究 ·

癌相关成纤维细胞对上皮性卵巢癌细胞耐药性影响及机制初步研究

董丽华, 孙 玮, 傅士龙*

南京医科大学第一附属医院妇科, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**探讨癌相关成纤维细胞(carcinoma-associated fibroblasts, CAFs)对卵巢癌细胞化疗耐药性影响及机制。**方法:**通过CAFs和卵巢癌细胞Ovcar3共培养,采用流式细胞术检测顺铂(cis-diammin-odichloroplatinum, DDP)对共培养前后卵巢癌细胞凋亡率的变化;应用实时定量PCR、Western blot检测DDP对共培养前后卵巢癌细胞中PI3K、AKT、XIAP的mRNA水平及其蛋白水平的变化;以及AKT体外特异性阻断剂LY294002对CAFs引起化疗耐药的逆转作用。**结果:**CAFs与卵巢癌细胞共培养后,DDP诱导的卵巢癌细胞凋亡显著减少($P < 0.05$);共培养组卵巢癌细胞中PI3K及XIAP的mRNA表达水平明显高于对照组($P < 0.05$);共培养后PI3K/XIAP蛋白表达显著升高($P < 0.05$);磷酸化AKT(p-AKT)蛋白表达显著升高($P < 0.01$)。抑制剂LY294002可显著降低XIAP蛋白表达。**结论:**CAFs可通过影响PI3K/AKT/XIAP信号通路,影响卵巢癌化疗耐药效应。

[关键词] 癌相关成纤维细胞;卵巢癌;共培养;化疗耐药

[中图分类号] R737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2019)02-191-05

doi:10.7655/NYDXBNS20190206

Effects and mechanism of carcinoma-associated fibroblasts on chemoresistance of epithelial ovarian cancer cells

Dong Lihua, Sun Wei, Fu Shilong*

Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of carcinoma-associated fibroblasts (CAF) on chemoresistance of epithelial cancer cells and the underlying mechanism. **Methods:** Epithelial ovarian cancer cell Ovcar3 were exposed to cis-diammin-odichloroplatinum (DDP) with various concentrations and different duration, then CAFs cultured with Ovcar3 cell. The apoptosis of Ovcar3 cell was assessed by flow cytometry. The mRNA level of PI3K/AKT/XIAP was detected by real-time PCR. The protein level of PI3K, XIAP, AKT and AKT phosphorylation (p-AKT) was detected by Western blot. Signaling transduction inhibitors, LY294002 was used to block PI3K/AKT signaling pathways. **Results:** After co-culture, CAFs prevent DDP-induced apoptosis by upregulating the mRNA level and protein levels of PI3K/XIAP ($P < 0.05$). In addition, p-AKT was enhanced by CAFs. Remarkably, inhibition of p-AKT by LY294002 can block the effects on DDP-induced XIAP up-regulation. **Conclusion:** These results demonstrate a novel mechanism by which CAFs regulates apoptosis and the possible involvement of the PI3K/AKT/XIAP survival pathway in chemoresistance of epithelial ovarian cancer cells.

[Key words] carcinoma-associated fibroblasts; epithelial ovarian carcinoma; cell coculture; chemoresistance

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(02): 191-195]

卵巢癌是女性生殖系统3大恶性肿瘤之一,发病率居妇科肿瘤的第2位,而病死率高居各类妇科

肿瘤的首位^[1]。化疗在卵巢癌的治疗中具有举足轻重的作用,然而绝大多数患者在经历首次化疗后终将出现化疗耐药,成为卵巢癌治疗的重要难题之一^[2-3]。研究表明,PI3K/AKT信号转导通路可保护细胞免于凋亡,这种抗凋亡作用体现在肿瘤对

[基金项目] 江苏省妇幼保健科研项目(F201438)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: docfusl@163.com

放、化疗的抵抗作用^[4]。X连锁凋亡蛋白(XIAP)是调节癌细胞凋亡的重要基因,过表达 XIAP 可诱导 AKT 磷酸化,使细胞凋亡程序受阻;而下调 XIAP 可通过活化 caspase-3 来诱导 AKT 的剪切,从而引起细胞凋亡^[5],是决定卵巢癌细胞是否对顺铂化疗具有敏感性的重要决定因素之一。

肿瘤微环境在肿瘤的发生和发展过程中发挥重要作用。癌相关成纤维细胞(carcinoma-associated fibroblasts, CAFs)是肿瘤微环境中最主要的间质细胞,已有研究表明,肿瘤中的 CAFs 可以分泌多种细胞因子,对肿瘤的发生、发展具有明显促进作用^[6]。本研究小组在先前研究中发现,CAF 与卵巢癌细胞共培养可影响卵巢癌细胞的增殖、迁移、侵袭及凋亡^[7]。本文旨在前期研究基础上,进一步探讨 CAFs 与卵巢癌细胞相互作用后对卵巢癌化疗耐药的影响。通过 CAFs 和卵巢癌细胞共培养的方法,采用流式细胞术观察加入顺铂(cis-diamminodichloroplatinum, DDP)作用后卵巢癌细胞的凋亡率改变;应用实时定量 PCR、Western blot 检测加入 DDP 作用后,各卵巢癌细胞中 PI3K、AKT、XIAP 的 mRNA 水平及蛋白水平的变化;以及 AKT 体外特异性阻断剂 LY294002 对 CAFs 引起的化疗反应的逆转作用,以期阐明 CAFs 可通过影响 PI3K/AKT/XIAP 信号通路,影响卵巢癌化疗耐药效应,为逆转卵巢癌化疗耐药提供可能的参考靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

卵巢癌细胞系 Ovar3(中科院上海细胞所); CAFs 和人正常卵巢成纤维细胞(NFs)由本实验小组前期分离、鉴定、培养,冻存后复苏;DMEM/F12(Hyclone 公司,美国),Hepes 缓冲液(Amresco 公司,美国),胎牛血清(FBS,杭州四季青生物制品公司),胰蛋白酶粉(Amresco 公司,美国),I 型胶原酶、DMSO(Sigma 公司,美国),LY294002(CST 公司,美国),荧光定量 PCR(SYBR Premix Ex Taq)、Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒(TaRaKa 公司,日本),Protease Inhibitor Cocktail Kit(Thermo 公司,美国),MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)、DMSO(Sigma 公司,美国),鼠抗人 AKT、PI3K 抗体(CST 公司,美国),鼠抗人 XIAP 抗体(BioWorld 公司,美国),BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 蛋白裂解液、RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen 公司,美国),M-MLV 逆转录酶(Promega 公司,

美国),Oligo(dT)15、10 mmol/L dNTPs、RNase-inhibitor(Toyobo 公司,日本),2×Taq PCR MasterMix(含染料)(北京天根生化科技有限公司),内参 GAPDH(武汉博士德),Annexin V-FITC 试剂盒(上海晶美生物公司),辣根过氧化物酶标记的二抗(Santa Cruz 公司,美国)。倒置相差显微镜及照相系统(Olympus 公司,日本),AlphaImager 图像分析系统(Alpha Innotech 公司,美国),流式细胞仪 BD FACSVantage SE(Becton Dickinson 公司,美国)。PCR 仪、Western blot 电泳系统(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与细胞共培养

卵巢癌 Ovar3 细胞、CAF 和 NFs 细胞培养及共培养均置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱培养,培养基为含 10% 胎牛血清的 DMEM。

1.2.2 流式细胞仪检测顺铂对卵巢癌细胞作用的浓度依赖性

将卵巢癌细胞以 1×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中培养,分为 4 个观察组,每组设 3 个复孔,并设顺铂 4 个浓度梯度为:0、2.5、5.0、10.0 μg/mL;当培养细胞生长 >70% 时,倒出培养皿中的旧培养基,换成不同浓度含顺铂的新培养基继续培养;根据本小组此前预实验^[7],选择 48 h 为顺铂对卵巢癌细胞的最佳作用时间;48 h 后,收集细胞行流式细胞学检查,根据卵巢癌细胞的凋亡情况,确定 DDP 诱导卵巢癌细胞凋亡的合适浓度。

1.2.3 CAFs 与卵巢癌细胞共培养化疗后,检测卵巢癌细胞凋亡情况

DDP 作用 48 h 后,将卵巢癌细胞以 1×10⁵ 个/孔接种于 12 孔板中培养,分为 3 个观察组,同时每组设 3 个复孔;实验组:Ovar3+CAF+DDP;阴性对照组:Ovar3+DDP;空白对照组:Ovar3。当培养细胞生长 >70% 时,倒出培养皿中的旧培养基,加入已选定的适合浓度 DDP 培养液,根据预实验,选定继续培养时间为 48 h;收集不同实验组细胞行流式细胞学检查,根据不同实验组中卵巢癌细胞的凋亡结果,确定最佳 DDP 浓度及最佳作用时间条件下,CAF 对卵巢癌细胞化疗耐药的影响。

1.2.4 Real-time RT-PCR 检测卵巢癌细胞内 PI3K、AKT、XIAP 的 mRNA 表达情况

收集上述不同实验组细胞行 real-time RT-PCR 检测;总 RNA 的提取采用 TRIzol 法,按操作说明进行;测定 RNA 纯度,按照设定体系进行反转录,引物序列如下:PI3K 引物序列:5'-GCGACATCAAGC-

CCCAGAA-3', 5'-CGCACCCCAGGGACCATAT-3', 产物大小 288 bp; AKT 引物序列: 5'-CTGGTGGT-CATAAAATAGGCAGG-3', 5'-TCTTGGGAAAAGC-TCTACAGGATAA-3', 产物大小 258 bp; XIAP 引物序列: 5'-AGGGTAGAGTGGGTGTAGTGAGTGT-3', 5'-CTAATGCTGGGGCGGTAGTC-3', 产物大小 175 bp; GAPDH 引物序列: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3', 产物大小 237 bp。两步法 PCR 扩增: 预变性 95 °C 10 s; PCR 反应 95 °C 5 s, 60 °C 31 s, 共 40 个循环。反应结束后确认 Real-time PCR 的扩增曲线和熔解曲线, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析数据。

1.2.5 Western blot 检测卵巢癌细胞内 PI3K、AKT、XIAP 的蛋白表达情况

收集上述不同实验组细胞行蛋白抽提: 根据试剂盒操作说明, 并根据实验需要略加改动, 所得上清液即为细胞蛋白提取液, 吸上清置于 -20 °C 保存。样品蛋白浓度测定按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明进行; 总蛋白和上样缓冲液按比例混合, 95 °C 加热 10 min, 充分变性后于 -20 °C 保存。取等量蛋白质样品, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, PBST 漂洗 3 次, 每次 10 min; 一抗孵育: 封闭结束后, 将 PVDF 膜转至塑料袋中, 加入 PI3K/AKT/p-AKT/XIAP 抗体 (1:50), 4 °C 冰箱过夜; 二抗孵育: 次日取出过夜的 PVDF 膜, TBS 洗膜 4 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:2 000), 37 °C 摇动孵育 1~2 h; 显影: TBS 洗膜 4 次后将 DAB 底物显色试剂盒中 A、B 两种试剂等体积混合, PVDF 膜蛋白面朝上置于发光显影仪的托盘上, 并与混合液充分接触, 迅速放入暗盒中。设置曝光时间, 显影。结果判定: 胶片经凝胶成像分析系统扫描, 用 Bio-Rad 成像分析软件 Quantity One 分析结果, 得出目的蛋白条带相对浓度, 目的蛋白相对表达量 = 目的条带的灰度值 / 同一样本内参的灰度值, 实验重复 3 遍, 取平均值。

1.2.6 检测抑制剂 LY294002 对上述卵巢癌细胞内 XIAP 蛋白表达的影响

实验组加入 PI3K/AKT 通路抑制剂 LY294002 再培养 48 h 后收集细胞; 其他实验组及对照组 DDP 给药及共培养作用时间同上; 收集上述不同实验组细胞行 Western blot 检测蛋白表达水平, 步骤同上述。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间均数

比较采用单因素方差分析, 两组之间比较采用 *t* 检验。采用 SPSS18.0 软件进行统计分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测 DDP 对卵巢癌细胞作用的最佳浓度

DDP 对卵巢癌细胞有显著的促凋亡作用, 流式细胞仪检测结果提示, 在一定浓度范围内, 随着 DDP 浓度增加, 卵巢癌细胞凋亡率也相应增加, 当 DDP 浓度较低时, 肿瘤细胞凋亡不明显, 而当 DDP 浓度太高时, 死亡细胞增加。因此, 给予 DDP 4 个浓度梯度为: 0、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$, 当 DDP 的浓度为 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 流式细胞仪检测结果提示卵巢癌细胞的凋亡率较为适中 (图 1); 因此, 选用 DDP 浓度 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 作为后续实验的最佳实验浓度。

2.2 CAFs 共培养对 DDP 诱导卵巢癌细胞凋亡的影响

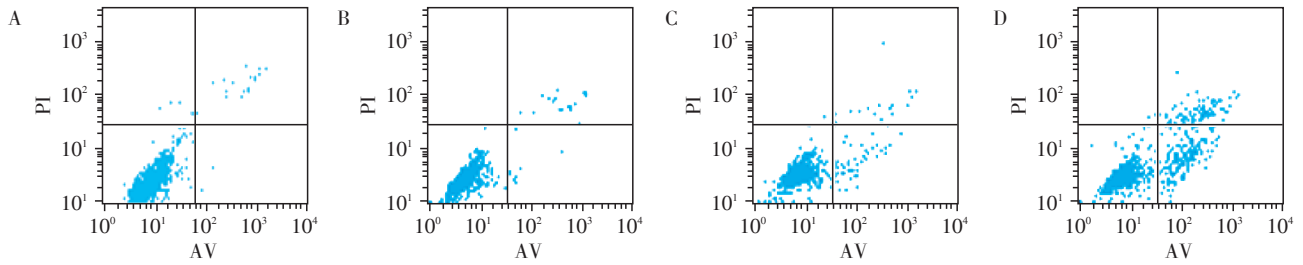
选用最佳 DDP 浓度 5.0 $\mu\text{g/mL}$, 最佳培养时间 48 h, 观察 CAFs 与卵巢癌细胞共培养后, DDP 诱导卵巢癌细胞凋亡情况。结果显示: 卵巢癌细胞与 CAFs 共培养后, DDP 诱导的细胞凋亡显著减少 ($P < 0.05$, 图 2), 说明 CAFs 有逆转 DDP 诱导卵巢癌细胞凋亡的作用。

2.3 CAFs 共培养对卵巢癌细胞 PI3K/AKT/XIAP 基因 mRNA 表达的影响

结果显示, 与 CAFs 共培养后, 卵巢癌细胞 PI3K 基因 mRNA 的表达明显高于未共培养组 ($P < 0.05$, 图 3), 卵巢癌细胞 XIAP 基因 mRNA 的表达较未共培养的卵巢癌细胞显著升高 ($P < 0.05$, 图 3), AKT 基因的 mRNA 表达与非共培养组比较有所升高, 但差异无统计学意义。

2.4 Western blot 检测共培养后 PI3K/AKT/p-AKT/XIAP 蛋白的表达

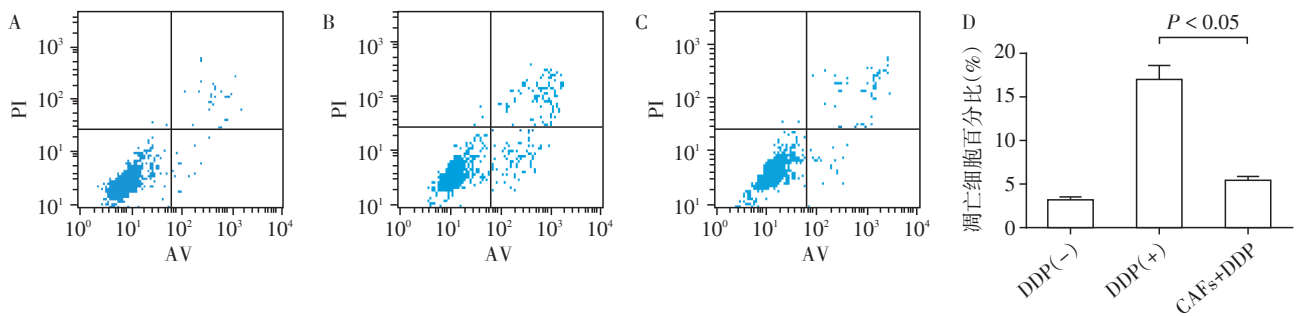
结果显示: 与 Real-time PCR 结果一致, 共培养后 PI3K/XIAP 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4), 共培养前后总的 AKT 蛋白表达量无明显变化, 但磷酸化 AKT (p-AKT) 蛋白表达显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4)。此外, 加入 PI3K/AKT/p-AKT/XIAP 通路抑制剂 LY294002 后, XIAP 蛋白表达明显降低, 说明 LY294002 可阻断 XIAP 的表达, 具有逆转细胞凋亡的潜能, 但加入 CAFs 共培养后, 这种逆转作用被抵消, 说明 CAFs 分泌的某种生长因子作用于 PI3K/AKT/XIAP 信号转导通路, 影响了卵巢癌细胞的凋亡。



A: 无顺铂作用; B: 顺铂 2.5 μg/mL; C: 顺铂 5.0 μg/mL; D: 顺铂 10.0 μg/mL。

图1 流式细胞仪检测卵巢癌细胞对DDP的浓度依赖性

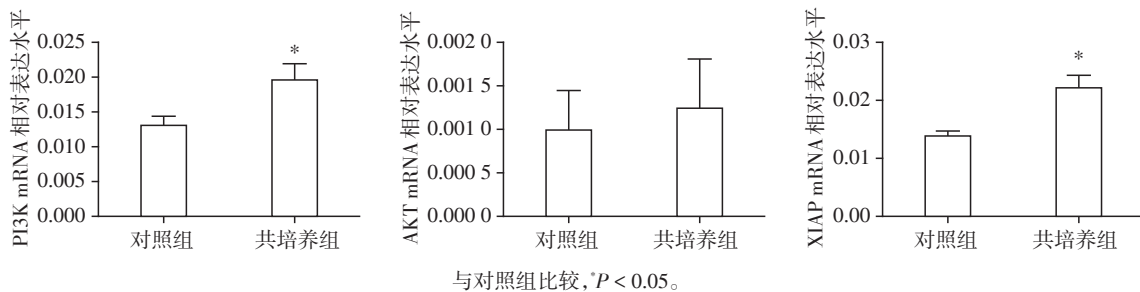
Figure 1 The optimal concentration of DDP was assessed by the conjugated human annexin V and propidium iodide double staining method



A: DDP(-); B: DDP(+); C: DDP+CAF; D: 各组凋亡率比较。

图2 共培养后DDP诱导卵巢癌细胞凋亡结果分析

Figure 2 The apoptosis was assessed by the conjugated human annexin V and propidium iodide double staining method



与对照组比较, *P < 0.05。

图3 共培养前后PI3K/AKT/XIAP基因mRNA的表达变化

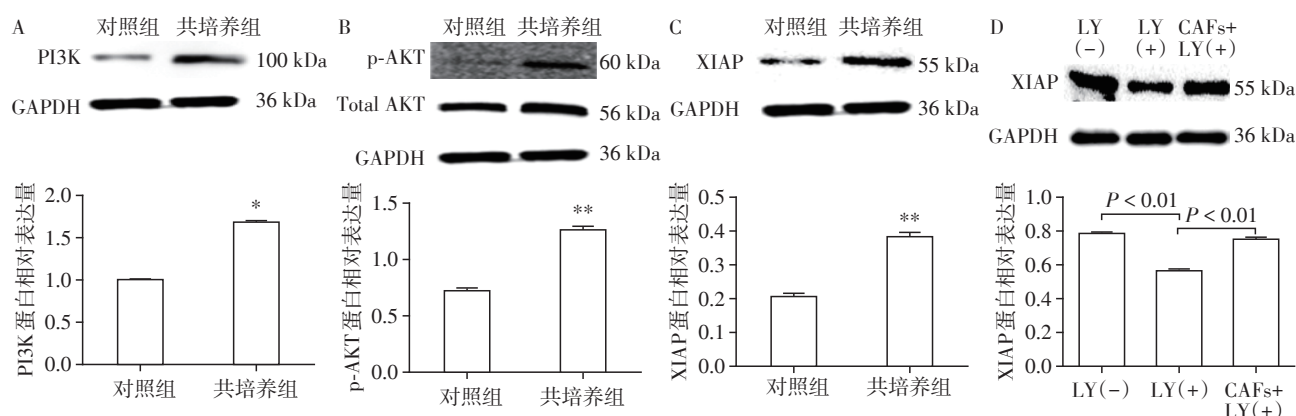
Figure 3 The mRNA level of PI3K/AKT/XIAP was detected by real-time PCR

3 讨论

卵巢癌化疗耐药是多方面的、多基因、多因素、多水平共同参与的结果,而肿瘤微环境所引起的相关卵巢癌耐药机制尚需进一步阐明。已有研究表明, CAFs可影响乳腺癌对紫杉醇化疗药物的耐药作用, CAFs通过相关信号转导通路影响肿瘤的化疗抵抗^[8]。CAFs可以分泌多种细胞生长因子,但是其对卵巢癌细胞生物学行为的影响具体是由哪些因子引起的,这些因子又是如何作用于卵巢癌细胞发挥作用的,需要进一步研究。多数研究认为, PI3K/AKT信号转导途径是保护细胞免于凋亡的,其异常激活导

致卵巢癌细胞耐药,这种抗凋亡作用在肿瘤的发生、增殖、侵袭、转移及放化疗抵抗中发挥重要作用^[9]。

PI3K/AKT信号转导通路是癌细胞生命活动的基础,其中PI3K/AKT这条经典的信号通路在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用。PI3K/AKT信号转导通路在多种恶性肿瘤中的过度表达,提示其与肿瘤的发生、发展密切相关,是与细胞增殖和细胞凋亡关系最密切的信号转导通路之一,其异常激活能使细胞异常增殖和分化,促进肿瘤细胞生长^[4]。本文通过CAF和卵巢癌细胞体外间接共培养的方法,探讨CAF与卵巢癌细胞体外间接共培养对卵巢癌DDP化疗耐药的影响,进一步阐明PI3K/AKT/XIAP信号



A:PI3K 蛋白表达变化;B: 总体和磷酸化 AKT 蛋白表达变化;C:XIAP 蛋白表达变化;D:加入 LY294002 后 XIAP 蛋白表达变化。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图4 共培养后 PI3K/AKT/p-AKT/XIAP 蛋白表达情况

Figure 4 The protein level of PI3K, XIAP, AKT, and p-AKT was detected by Western blot

通路在该过程中所起的重要作用。

Real-time PCR 检测发现:共培养以后卵巢癌细胞 XIAP 基因的 mRNA 表达较未共培养的卵巢癌细胞显著升高($P < 0.05$), AKT 基因的 mRNA 表达共培养后有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。为了进一步探讨 PI3K/AKT/XIAP 信号转导通路是否在蛋白水平上也有变化,进行了 Western blot 的检测,结果与 Real-time PCR 一致,共培养后 PI3K/p-AKT/XIAP 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),共培养前后总的 AKT 蛋白表达量无明显变化。

该实验表明,卵巢癌细胞与 CAFs 共培养可以减少 DDP 刺激的卵巢癌细胞凋亡,同时,PI3K/AKT 信号转导通路上主要信号分子表达发生变化,其中以其下游信号分子 XIAP 的变化最明显。由此可以推测,CAF 对卵巢癌细胞生物学行为的影响,可能机制是 CAFs 通过分泌某些生长因子作用于卵巢癌细胞表面的受体,激活 PI3K/AKT/XIAP 信号转导通路,使信号通路分子表达发生变化来实现的, XIAP 可能在 CAFs 诱导的肿瘤耐药起到了重要作用。

当然,由于 CAFs 与肿瘤细胞的交互作用中存在着复杂的信号转导网络,所以 CAFs 对卵巢癌细胞信号转导通路的影响可能并不局限于 PI3K/AKT/XIAP 通路。因此,有必要进一步更深入地研究 CAFs 与卵巢癌细胞间其他复杂的信号转导通路,为逆转卵巢癌的化疗耐药,从 CAFs 着手寻找新的可能干预靶点^[10]。

[参考文献]

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1):7-30

[2] Thibault B, Castells M, Delord JP, et al. Ovarian cancer microenvironment: implications for cancer dissemination and chemoresistance acquisition [J]. Cancer Metastasis Rev, 2014, 33(1): 17-39

[3] Li SS, Ma J, Wong AST. Chemoresistance in ovarian cancer: exploiting cancer stem cell metabolism [J]. J Gynecol Oncol, 2018, 29(2): e32

[4] Cheaib B, Auguste A, Leary A. The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges [J]. Chin J Cancer, 2015, 34(1): 4-16

[5] Miyamoto M, Takano M, Iwaya K, et al. X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis as a key factor for chemoresistance in clear cell carcinoma of the ovary [J]. Br J Cancer, 2014, 110(12): 2881-2886

[6] Leung CS, Yeung TL, Yip KP, et al. Cancer-associated fibroblasts regulate endothelial adhesion protein LPP to promote ovarian cancer chemoresistance [J]. J Clin Invest, 2018, 128(2): 589-606

[7] Fu S, Dong L, Sun W, et al. Stromal-epithelial crosstalk provides a suitable microenvironment for the progression of ovarian cancer cells *in vitro* [J]. Cancer Invest, 2013, 31(9): 616-624

[8] Yu T, Yang G, Hou Y, et al. Cytoplasmic GPER translocation in cancer-associated fibroblasts mediates cAMP/PKA/CREB/glycolytic axis to confer tumor cells with multidrug resistance [J]. Oncogene, 2017, 36(15): 2131-2145

[9] Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, et al. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2015, 137(1): 173-179

[10] Miao L, Liu Q, Lin CM, et al. Targeting tumor-associated fibroblasts for therapeutic delivery in desmoplastic tumors [J]. Cancer Res, 2017, 77(3): 719-731

[收稿日期] 2018-09-03