

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00395

促性腺激素释放激素类似物逆转卵巢癌细胞对顺铂的耐药性

王丹, 惠宁*, 吴东

第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433

[摘要] **目的:** 研究促性腺激素释放激素(GnRH)类似物曲谱瑞林(triptorelin)体外逆转卵巢癌细胞顺铂耐药的效果, 并探讨其作用机制。**方法:** 体外建立卵巢癌顺铂耐药细胞系模型 OVCAR-3/CDDP; MTT 法检测单独使用曲谱瑞林或顺铂及两药联合使用时对 OVCAR-3/CDDP 细胞的抑制作用; 流式细胞术检测不同加药组细胞的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)表达改变。**结果:** (1) 卵巢癌 OVCAR-3/CDDP 细胞耐药指数为 13.42; (2) 顺铂与曲谱瑞林联合化疗逆转倍数为 3.91; (3) OVCAR-3/CDDP 细胞 EGFR 表达在两药联合处理组降低最明显。**结论:** 曲谱瑞林能部分逆转 OVCAR-3/CDDP 细胞对顺铂的耐药性, 且此作用可能与下调细胞 EGFR 表达有关。

[关键词] 曲谱瑞林; 卵巢肿瘤; 顺铂; 耐药性

[中图分类号] R 737.31

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)04-0395-04

GnRH analog resensitizes cisplatin-resistant human ovarian cancer cells

WANG Dan, HUI Ning*, WU Dong

Department of Gynecology and Obstetrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of GnRH analog triptorelin in resensitizing cisplatin-resistant human ovarian cancer cells and to discuss the related mechanism. **Methods:** Cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line OVCAR-3/CDDP was established *in vitro*. MTT assay was used to assess the inhibitory effects of triptorelin, cisplatin alone or a combination of both on OVCAR-3/CDDP cells. Flow cytometry was employed to observe the expression changes in epidermal growth factor receptor (EGFR) in different groups. **Results:** The drug resistant index of OVCAR-3/CDDP cells was 13.42. The resensitizing fold of cisplatin combined with triptorelin was 3.80. The expression of EGFR had the most prominent decrease in OVCAR-3/CDDP cells in the combination group. **Conclusion:** Triptorelin can partially resensitize cisplatin-resistant OVCAR-3/CDDP cells, which might be related to the down-regulation of EGFR.

[KEY WORDS] triptorelin; ovarian neoplasms; cisplatin; drug tolerance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(4): 395-398]

促性腺激素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)是下丘脑分泌的一种十肽激素,其主要功能是调节垂体前叶促性腺激素的分泌,从而对生殖轴起作用^[1-2]。GnRH及其人工合成的类似物可以通过与人类一些恶性肿瘤细胞表面的GnRH受体结合,直接抑制肿瘤的增殖^[3-4]。在卵巢癌组织中,约80%的细胞系有GnRH及其受体的表达^[5]。研究报道,GnRH类似物对卵巢癌细胞系的抗增殖作用与抑制表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)信号转导网络密切相关^[6-8]。正常卵巢上皮组织EGFR表达量很低或缺如,但70%~100%的卵巢癌组织有EGFR高水

平表达^[9-10],临床表现为对化疗的耐药性增加。当下调或抑制EGFR表达时,可以增加肿瘤细胞对化疗的敏感性^[11-12]。GnRH类似物作为化疗逆转剂逆转人类乳腺癌细胞的多药耐药性已得到证实^[13],而GnRH类似物对卵巢癌耐药细胞的化疗逆转作用,迄今少有文献报道。本实验通过建立临床上最常见的卵巢癌顺铂耐药的体外细胞模型,观察GnRH类似物曲谱瑞林(triptorelin)对逆转卵巢癌细胞顺铂耐药的效果,为卵巢癌临床联合化疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 药品和试剂 曲谱瑞林购自辉凌(德国)制药公

[收稿日期] 2007-10-26

[接受日期] 2008-04-09

[作者简介] 王丹,硕士生,主治医师. E-mail: wangdanown@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). 021-25070640, E-mail: huin1956@yahoo.com.cn

司;顺铂(cisplatin, CDDP)购自山东齐鲁制药厂; RPMI1640 培养液及胎牛血清为 Gibco 公司产品;四甲基偶氮唑盐(MTT)为 Sigma 公司产品;兔抗人 EGFR 单克隆抗体(RPE)购自德国 MorphoSys 生物技术公司。

1.2 细胞系与细胞培养 人类卵巢低分化浆液性囊腺癌细胞 OVCAR-3 购于中国科学院上海生命科学院细胞所(ovary, adenocarcinoma, ATCC HTB-161),于含 10%胎牛血清、青霉素、链霉素各 100 U/ml 的 RPMI1640 培养液中贴壁生长,置 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,0.25%胰蛋白酶消化传代。

1.3 耐药细胞系的建立 采用浓度梯度递增法,取对数生长期(细胞密度 70%~80%时)的卵巢癌 OVCAR-3 细胞,加入 DDP 注射液,使 DDP 浓度为 0.25 μmol/L,作用 48 h,更换培养液继续培养,待细胞恢复生长后重复这样的处理,细胞在同样药物浓度下基本无死亡时提高药物浓度,每次提高约 50%,反复传代,增加 DDP 浓度,直至 DDP 终浓度为 3 μmol/L,细胞基本无死亡,以这一浓度再作用 6 次,细胞无死亡,继续在不含药液的培养基中培养 2 个月,检测仍保持相似的耐药性,且细胞状态良好,称其为 OVCAR-3/CDDP 细胞。

1.4 实验分组 选取两药的血药峰值浓度(C_{max})作为联合作用的基础。常规用药情况下,顺铂的 C_{max}(C_{max-D})为 2.5~3 mg/L(约 8.3~10 μmol/L);曲谱瑞林的 C_{max}(C_{max-T})为 13.15 ng/ml(约 10 nmol/L)。本实验选用 C_{max-D}=10 μmol/L, C_{max-T}=10 nmol/L。设计 0.01、0.1、10、100 倍 C_{max} 共 5 个浓度梯度,分为:(1)顺铂处理组;(2)曲谱瑞林处理组;(3)相同梯度倍数相加两药联合处理组;(4)OVCAR-3/CDDP 组;(5)OVCAR-3 组。除 V 组为 OVCAR-3 细胞外,其余各组均选用 OVCAR-3/CDDP 细胞。

1.5 细胞周期分析 取对数生长期的 OVCAR-3 细胞和 OVCAR-3/CDDP 细胞各 1×10⁶ 个,加入 70%冷乙醇(4℃)固定过夜,RNA 酶 A 37℃水浴 30 min,加入碘化丙啶,4℃避光染色 30 min,以流式细胞仪测定细胞的周期分布及细胞凋亡情况。

1.6 MTT 法检测 IC₅₀、耐药指数(RI)、化疗逆转倍数(RR)及评价两药联合的协同作用 胰蛋白酶消化处于对数生长期的 OVCAR-3、OVCAR-3/CDDP 细胞,调整细胞密度接种 96 孔板,每孔加入 2×10⁴ 个细胞,置于 37℃、5%CO₂ 条件下培养 24 h,待细胞贴壁后,弃培养基,按上述分组方法加药继续培养 96 h,各组每一浓度设 5 个重复孔,空白对照组为生理盐水组。实验终止前每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μl,37℃孵育 4 h,取出 96 孔板,弃去培养液,每孔加入

200 μl DMSO。微量震荡仪震荡 10 min,酶联免疫检测仪在 492 nm 波长测每孔的光密度值(D 值)。计算相对抑制率,相对抑制率%=(1-加药组 D 值/对照组 D 值)×100%,计算出每一药物质量浓度的百分抑制率。采用 Excel 软件加权线性回归法计算出 50%抑制率时的药物浓度即 IC₅₀。按下列公式计算耐药指数(RI)和化疗逆转倍数(RR):RI=OVCAR-3/CD-DP 细胞的 IC₅₀/OVCAR-3 细胞的 IC₅₀,RR=IC₅₀(顺铂处理组)/IC₅₀(顺铂+曲谱瑞林联合处理组)。按金正均^[14]的方法评价联合方案的协同作用,即根据金氏公式求 q 值进行判断:q 值 = E(a+b)/(Ea+Eb-Ea×Eb)[Ea 和 Eb 为各药单独时的抑制率,E(a+b)为两药联合应用的抑制率]。当 q>1 为协同作用,q<1 为拮抗作用,q=1 为相加作用。

1.7 EGFR 流式免疫荧光测定 顺铂组、曲谱瑞林组、两药联合组、未加药组各自加药 1 h 后,用胰酶消化分别制成各含 1×10⁶ 个细胞的悬液,用 PBS 液离心洗涤 2 次,14 000×g,5 min,弃去上清,制成 100 μl PBS 中含 1×10⁶ 个细胞的悬液,加入兔抗人 EGFR 单克隆抗体(RPE)静置 30 min 后,再次用 PBS 液离心洗涤 1 次,14 000×g,5 min,弃去上清,制成 300 μl PBS 细胞悬液,采用美国 BD 公司生产的流式细胞仪 FACSCaliburi 上机分析。标记好的细胞应用 Cell quest 软件程序进行资料处理。测定每组样品 EGFR 阳性细胞率以及单个细胞表达 EGFR 的平均荧光强度,以此表示 EGFR 相对含量。

1.8 统计学处理 数据使用 Excel 软件的加权线性分析和 SPSS 10.0 统计软件处理,t 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 建立耐药细胞系 OVCAR-3/CDDP 并检测其特性 采用浓度梯度法对 OVCAR-3 细胞进行体外诱导,历时 10 个月获得其耐药细胞亚系,在浓度为 3 μmol/L 的顺铂环境下能生长良好,于无药培养基中培养 2 个月耐药性稳定,命名为 OVCAR-3/DDP 细胞。细胞周期(表 1)分析结果表明:OVCAR-3 细胞经过 DDP 诱导后细胞对数生长期的增殖速度减慢,FCM 显示:相对于 OVCAR-3 细胞,其顺铂耐药株 OVCAR-3/DDP 细胞多数分布于 G₀/G₁ 期,细胞主要处于潜伏期,增殖缓慢,S 期细胞数目明显减少,从而避开顺铂主要作用的细胞周期 S 期,且细胞凋亡率下降。MTT 增殖实验分析结果表明:OVCAR-3 细胞对顺铂的 IC₅₀ 为(6.22±0.05) μmol/L, OVCAR-3/CDDP 对顺铂的 IC₅₀ 为(83.48±0.37) μmol/L,耐药指数(RI)为 13.42。

表1 OVCAR-3和耐药细胞系 OVCAR-3/CDDP的细胞周期

Tab 1 Cell cycle of OVCAR-3 and OVCAR-3/CDDP cells

(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Cell	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
OVCAR-3	48.77±3.26	34.84±2.68	16.39±0.59
OVCAR-E/CDDP	75.92±2.36*	17.61±1.69**	6.47±0.70**

* P<0.05, ** P<0.01 vs OVCAR-3 cell

2.2 曲谱瑞林对 OVCAR-3/DDP 细胞顺铂作用的影响
 2.2.1 各组细胞生长情况比较 OVCAR-3/CDDP 的顺铂组、曲谱瑞林组细胞生长状况与未加药组接近,两组间各时间点的生长抑制率比较,差异均无显著性(P>0.05);OVCAR-3/CDDP 的两药联合组细胞生长受到较明显抑制,差异均有显著性(P<0.05,图1)。

2.2.2 曲谱瑞林对 OVCAR-3/CDDP 细胞顺铂耐药性的逆转作用 与两药单用相比,加以曲谱瑞林联合用药培养后,OVCAR-3/CDDP 细胞对顺铂的 IC₅₀显著下降[联合用药组为(21.33±0.031) μmol/L,CDDP 组为(83.48±0.365) μmol/L,曲谱瑞林组为∞,P<0.01],化疗逆转倍数(RR)为3.91,q值=1.75>1,表明曲谱瑞林与顺铂对卵巢癌

耐药细胞具有协同作用,曲谱瑞林可以部分逆转 OVCAR-3/CDDP 细胞的耐药性。

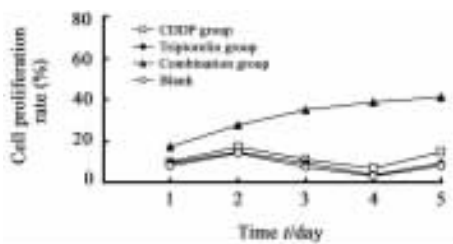


图1 四组细胞的生长抑制率比较

Fig 1 Inhibitory rates in 4 groups

n=5

2.3 EGFR 在 OVCAR-3/DDP 细胞中表达阳性率和表达水平的改变 与空白对照组相比较,顺铂、曲谱瑞林单独处理组及两药联合处理组表达 EGFR 的耐药细胞的阳性率及耐药细胞平均表达 EGFR 的荧光强度均减少,但两药单独处理组之间比较无显著差异(P>0.05);两药单独处理组分别与空白对照组比较,各自差异也不显著(P>0.05);而两药联合处理组不论与单药处理组比较,还是与空白对照组比较,差异均显著(P<0.01),可见曲谱瑞林+顺铂可显著下调耐药细胞 EGFR 的表达(图2)。

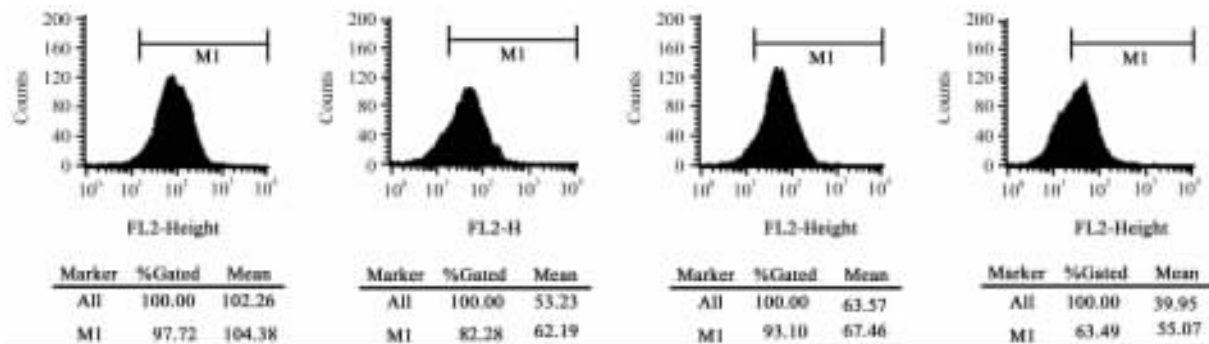


图2 EGFR 在 OVCAR-3/CDDP 细胞中表达的流式细胞术结果

Fig 2 Flow-cytometry analysis of EGFR expression in parental OVCAR-3 cells and in cultured subline OVCAR-3/CDDP cells

A: OVCAR-3/CDDP(Blank); B: OVCAR-3/CDDP(CDDP); C: OVCAR-3/CDDP(Triptorelin); D: OVCAR-3/CDDP(Combination). Values for mean fluorescence of surface expression were as above

3 讨论

临床上对卵巢癌的化疗主要采用铂类(顺铂/卡铂)、烷化剂(环磷酰胺/梅法兰)、抗代谢类化合物(5-FU)、生物碱类(长春新碱、长春花碱)和萘环类(多柔比星及其类似物)等药物的联合应用。而顺铂广泛用于上皮性卵巢癌的临床治疗。尽管新型化疗药物紫杉醇目前在临床已得到了广泛的应用,但总

的5年生存率却无明显提高,究其原因仍然是肿瘤细胞在多次化疗后出现获得性耐药。因此,在没有新的、更有效的化疗药问世之前,发掘和筛选有效的化疗增敏剂,显得尤为迫切。

建立稳定的卵巢癌耐药体外模型,是深入探讨卵巢癌顺铂的耐药机制、寻找有效的化疗逆转药物的前提条件。我们采用国际上通用的浓度梯度法,诱导出对顺铂耐药的卵巢癌细胞亚系 OVCAR-3/

CDDP,在 3 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂存在的情况下能生长良好,耐药指数为 13.42 倍。细胞周期分析结果表明:OVCAR-3 细胞经过 CDDP 诱导后细胞对数生长期的增殖速度减慢,相对于 OVCAR-3 细胞,其顺铂耐药株 OVCAR-3/CDDP 细胞多数分布于 G_0/G_1 期,细胞主要处于潜伏期,增殖缓慢,S 期细胞数目明显减少,从而避开顺铂主要作用的细胞周期 S 期,且细胞凋亡率下降。

GnRH 是神经内分泌调节系统相互联系的重要信号分子,近年来,激素和上皮性卵巢癌(epithelial ovarian cancer,EOC)关系的研究资料证实,GnRH 及其类似物与性激素依赖性肿瘤细胞的增殖调控密切相关,其机制包括直接对癌细胞产生抗增殖作用^[15]。GnRH 及其人工合成的 GnRH 类似物现广泛用于性早熟、辅助生育、预防化疗期间卵巢早衰以及 GnRH 受体表达阳性的性激素依赖性肿瘤(如前列腺癌、乳腺癌、子宫内膜癌等)的临床治疗^[16]。研究表明^[17-18],EGFR 在正常组织中含量很低,但在许多恶性肿瘤细胞(特别是在上皮性起源的肿瘤)中过量表达。GnRH 能有效减少 EGF 诱导的 EGFR 酪氨酸磷酸化,抑制 EGFR 诱导的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的活化,并能拮抗卵巢癌、子宫内膜癌细胞生长因子诱导的 c-fos 的生成^[19]。2005 年,Günthert 等^[13]研究发现 GnRH 类似物能逆转人类乳腺癌细胞对三苯氧胺的耐药性。本实验表明,曲谱瑞林对亲本细胞 OVCAR-3 和 OVCAR-3/CDDP 细胞无明显抑制作用,但与顺铂并用后能显著增加耐药细胞对顺铂的敏感性,部分逆转细胞的耐药性,与顺铂具有协同作用。加用曲谱瑞林后,耐药细胞 EGFR 表达明显降低,提示其逆转作用可能与下调肿瘤细胞 EGFR 的表达进而抑制生长因子诱导的有丝信号转导通路有关。

内分泌治疗现已成为癌症研究中十分活跃的领域之一,充分了解 GnRH 药物的作用机制可以为临床化疗耐药的逆转提供可靠的依据。若能与化疗联用来提高肿瘤细胞程序化死亡的概率,不仅能为抗肿瘤研究提供新的方向,对改善卵巢癌的预后也将是一种前景广阔的治疗手段。

[参考文献]

- Gadducci A, Cosio S, Gargini A, Genazzani A R. Sex-steroid hormones, gonadotropin and ovarian carcinogenesis: a review of epidemiological and experimental data[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2004, 19: 216-228.
- Rzepka-Górska I, Chudecka-Glaz A, Kosmider M, Malecha J. Effectiveness of combined treatment in patient with advanced ovarian carcinoma [J]. *Ginek Pol*, 2002, 73: 691-697.
- Gründker C, Günthert A R, Westphalen S, Emons G. Biology of the GnRH system in gynecological cancers[J]. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146: 1-14.
- Olive D L. Optimizing gonadotropin-releasing hormone agonist therapy in women with endometriosis[J]. *Treat Endocrinol*, 2004, 3: 83-89.
- Sugiyama M, Imai A, Takahashi S, Hirano S, Furui T, Tamaya T. Advanced indications for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogues in gynecological oncology (review)[J]. *Int J Oncol*, 2003, 23: 445-452.
- Leung P C, Choi J H. Endocrine signaling in ovarian surface epithelium and cancer [J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13: 143-62.
- Grundker C, Emons G. Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovarian cancer[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1: 65.
- Grundker C, Volker P, Emons G. Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein $\alpha(\text{I})$ -mediated activation of phosphotyrosine phosphatase[J]. *Endocrinology*, 2001, 142: 2369-2380.
- Nielsen J S, Jakobsen E, Hølund B, Bertelsen K, Jakobsen A. Prognostic significance of p53, Her-2, and EGFR overexpression in borderline and epithelial ovarian cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2004, 14: 1086-1096.
- Psyrrri A, Kassar M, Yu Z, Bamias A, Weinberger P M, Markakis S, et al. Effect of epidermal growth factor receptor expression level on survival in patients with epithelial ovarian cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 8637-8643.
- Park S J, Armstrong S, Kim C H, Yu M, Robertson K, Kelley M R, et al. Lack of EGF receptor contributes to drug sensitivity of human germline cells[J]. *Br J Cancer*, 2005, 92: 334.
- Chan J K, Pham H, You X J, Cloven N G, Burger R A, Rose G S, et al. Suppression of ovarian cancer cell tumorigenicity and evasion of cisplatin resistance using a truncated epidermal growth factor receptor in a rat model[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 3243-3248.
- Günthert A R, Gründker C, Olota A, Läsche J, Eicke N, Emons G. Analogs of GnRH-I and GnRH-II inhibit epidermal growth factor-induced signal transduction and resensitize resistant human breast cancer cells to 4OH-tamoxifen[J]. *Eur J Endocrinol*, 2005, 153: 613-625.
- 金正均. 合并用药中的相加[J]. *中国药理学报*, 1980, 1: 70.
- Eicke N, Günthert A R, Emons G, Gründker C. GnRH-II agonist [D-Lys6]GnRH-II inhibits the EGF-induced mitogenic signal transduction in human endometrial and ovarian cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29: 1223-1229.
- Lahlou N. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of triptorelin[J]. *Ann Urol (Paris)*, 2005, 29: S78-S84.
- Jiang Q, Zhou C, Bi Z, Wan Y. EGF-induced cell migration is mediated by ERK and PI3K/AKT pathways in cultured human lens epithelial cells[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2006, 22: 93-102.
- Shankar D B, Li J, Tapang P, Owen McCall J, Pease L J, Dai Y, et al. ABT-869, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor: inhibition of FLT3 phosphorylation and signaling in acute myeloid leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109: 3400-3408.
- Leung P C, Choi J H. Endocrine signaling in ovarian surface epithelium and cancer[J]. *Hum Reprod Update*, 2007, 13: 143-162.