

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00682

# 己酮可可碱抑制人卵巢癌 HO-8910PM 细胞 Annexin II、NF-κB p65 蛋白的表达

## Inhibitory effect of pentoxifylline on expression of Annexin II and NF-κB p65 in human ovarian carcinoma cell line HO-8910PM

谷晓广<sup>1,2</sup>, 李道明<sup>1,2\*</sup>

1. 郑州大学第一附属医院病理科, 郑州 450052  
2. 河南省肿瘤病理重点实验室, 郑州 450052

**[摘要]** **目的** 观察己酮可可碱(PTX)对体外培养的人卵巢癌细胞增殖及其 Annexin II、NF-κB p65 蛋白表达的影响。

**方法** 不同浓度 PTX 作用于人卵巢癌细胞 HO-8910PM, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测其对 HO-8910PM 增殖的影响; 采用免疫细胞化学方法检测 PTX 作用前后 HO-8910PM 细胞 Annexin II、NF-κB p65 蛋白表达的变化。**结果** MTT 结果显示: 不同浓度 PTX(0.25~2.0 mg/ml)作用于 HO-8910PM 细胞 12、24、48、72 h, 均可不同程度抑制细胞增殖, 同一时间段各浓度 PTX 作用组与空白对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 各浓度 PTX 作用组组内两两相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PTX 同一浓度组各时间点两两相比细胞增殖抑制率差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。免疫细胞化学显示: 以不同浓度的 PTX(0.5~2.0 mg/ml)作用 HO-8910PM 细胞 24、48、72 h 后, Annexin II 蛋白较空白对照组有所降低; 同一时间段内 Annexin II 蛋白表达呈浓度依赖性, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 同一剂量组 Annexin II 蛋白表达呈时间依赖性, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。不同浓度 PTX(0.5~2.0 mg/ml)作用于 HO-8910PM 细胞 24、48、72 h 后, NF-κB p65 蛋白的表达均有所降低, 也呈时间和浓度依赖性, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** PTX 可能通过抑制 HO-8910PM 卵巢癌细胞 Annexin II、NF-κB p65 蛋白表达而抑制其增殖。

**[关键词]** 卵巢肿瘤; 膜联蛋白 A2; NF-κB p65 亚基; 免疫细胞化学

**[中图分类号]** R 737.31 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)06-0682-03

Annexin 是一种钙依赖性的磷脂结合蛋白, Annexin II 蛋白是 Annexin 蛋白家族中的重要成员<sup>[1]</sup>, 在细胞膜结构域的建立、DNA 合成及细胞增殖等方面起重要作用<sup>[2]</sup>。己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)是磷酸二酯酶抑制剂, 能增加细胞内 cAMP 浓度, 具有改善血流动力学、免疫抑制、抗纤维化及一定的抗肿瘤作用<sup>[3]</sup>。本研究将不同浓度的 PTX 作用于人卵巢癌细胞 HO-8910PM, 观察其作用效果, 并探讨其可能的作用机制, 为后续肿瘤靶向治疗研究奠定基础。

### 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 RPMI 1640 培养液(Hyclone 公司), 胎牛血清(杭州赛乐生物科技有限公司), 胰蛋白酶(吉诺生物医药技术有限公司), 己酮可可碱(开封市康诺生化制药厂), 四甲基偶氮唑蓝 MTT(Sigma 公司), Annexin II 鼠抗人多克隆抗体(sc-28385, Santa Cruze 公司), 鼠抗人 NF-κB p65 单克隆抗体工作液(D0907, Santa Cruze 公司), S-P 试剂盒、DAB 试剂盒(北京中杉金桥生物公司)。人卵巢癌 HO-8910PM 细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 MTT 法测定细胞生长抑制率 制备单细胞悬液后分别转至 96 孔培养板, 每孔接种细胞  $10^4$  个, 培养过夜后待细胞贴壁后分别加入不同浓度 PTX(0.25、0.5、1.0、1.5、2.0

mg/ml), 作用 12、24、48、72 h 后采用 MTT 法测定细胞生长情况, 每板设空白对照、正常对照。用药终止前 4 h 每孔加 MTT 20 μl, 混匀, 培养箱内培养 4 h 后弃液, 加 DMSO 150 μl 后振荡 10~15 min, 用酶标仪( $\lambda = 490$ )测各孔光密度(D)值, 计算生长抑制率(GI):  $GI\% = (D_{\text{对照}} - D_{\text{实验}}) / D_{\text{对照}} \times 100\%$ 。

1.3 免疫细胞化学观察细胞 Annexin II、NF-κB p65 蛋白的表达 采用免疫细胞化学 S-P 法, 细胞爬片, 3%过氧化氢室温孵育 20 min, Annexin II 多克隆抗体按 1:250 稀释孵育, 4℃过夜; DAB 显色, 苏木精复染, 中性树胶封片。用已知 Annexin II 蛋白阳性表达的上颌鳞状上皮乳头状瘤作阳性对照, PBS 替代一抗作空白对照。

1.4 结果判定 参照文献<sup>[4]</sup>, Annexin II、NF-κB p65 蛋白阳性颗粒均定位于胞质, 呈棕黄色。每片随机观察 5 个视野, 计数 500 个细胞中染色阳性细胞数, 阳性细胞数  $< 5\%$  为 0 分, 阳性细胞数  $5\% \sim 25\%$  为 1 分,  $26\% \sim 50\%$  为 2 分,  $51\% \sim 75\%$  为 3 分,  $> 75\%$  为 4 分。按照胞质染色着色深浅评分: 无色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。染色强度评分与阳性细胞数比例的评分相加之和  $< 2$  分为阴性(-), 2~3 分为弱阳性(+), 4~5 分为中度阳性(++), 6~7 分为强阳性(+++)。

**[收稿日期]** 2009-11-08 **[接受日期]** 2010-01-05

**[作者简介]** 谷晓广, 硕士生. E-mail: gxg\_198273@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0371-66862531, E-mail: Lidaoming@zzu.edu.cn

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组以上的均数间比较采用方差分析, 以  $\alpha=0.05$  为检验水准。

## 2 结果

2.1 PTX 对肿瘤细胞增殖的影响 MTT 法检测结果(表 1)表明: 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml 的 PTX 作用于 HO-8910PM 细胞 12、24、48、72 h 均可不同程度地抑制细胞增

殖, PTX 各浓度作用组细胞增殖率与空白对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 各浓度作用组间两两相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。0.25 mg/ml PTX 作用 12、24 h 细胞抑制率差异无统计学意义, 作用 48、72 h 细胞抑制率差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml 的 PTX 各作用时间点两两相比细胞增殖抑制率差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 不同浓度 PTX 不同作用时间对 HO-8910PM 细胞的增殖抑制率的影响

( $n=6, \bar{x} \pm s, \%$ )

组别	作用时间 $t/h$			
	12	24	48	72
空白对照组	0	0	0	0
PTX 作用组				
0.25 mg/ml	4.63±0.12	5.30±0.44	11.07±0.71*	18.13±0.25*
0.5 mg/ml	7.00±0.36*	12.70±1.08*	19.43±1.05*	25.83±0.40*
1.0 mg/ml	12.53±1.12*	20.40±0.90*	35.40±3.24*	44.20±3.53*
1.5 mg/ml	30.37±0.91*	45.00±2.49*	55.77±3.01*	62.77±2.67*
2.0 mg/ml	35.60±1.35*	49.33±0.78*	64.93±3.98*	73.93±3.72*

PTX: 己酮可可碱. \*  $P < 0.05$  与空白对照组相比

2.2 PTX 对肿瘤细胞 Annexin II 蛋白表达的影响 结果(图 1, 表 2)表明: Annexin II 蛋白阳性表达于细胞质, 阳性染色呈棕黄色颗粒; 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml PTX 作用于人卵巢癌细胞 24、48、72 h 后, Annexin II 蛋白表达均有所降低, 各剂量组与空白对照组相比, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );

在每个时间段内随着药物浓度的增加, Annexin II 蛋白表达均降低; 各剂量组间两两相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 在每个作用浓度内随着时间延长, Annexin II 蛋白表达均降低, 3 个时间段两两相比差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

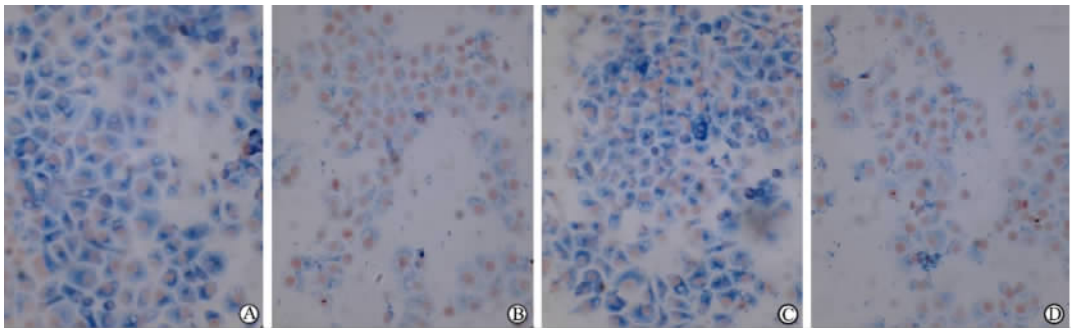


图 1 Annexin II 蛋白(A,B)、NF-κB p65 蛋白(C,D)的表达

A,C: 空白对照组; B,D: 2.0 mg/ml PTX 作用 48 h. PTX: 己酮可可碱. Original magnification:  $\times 400$

表 2 不同浓度 PTX 作用下人卵巢癌细胞 Annexin II 蛋白的表达

( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	作用时间 $t/h$			F 值	P 值
	24	48	72		
空白对照组	9.43±0.76	8.85±0.36	8.37±0.42	5.78	0.14
PTX 作用组					
0.5 mg/ml	6.51±0.21	5.28±0.31	4.52±0.44	36.83	0.00
1.0 mg/ml	4.23±0.26	3.68±0.31	2.75±0.26	43.75	0.01
1.5 mg/ml	2.98±0.21	2.27±0.23	1.17±0.20	111.64	0.00
2.0 mg/ml	2.23±0.21	1.87±0.30	0.63±0.27	71.79	0.00
F 值	355.22	579.79	532.32		
P 值	0.00	0.00	0.00		

PTX: 己酮可可碱

2.3 PTX对肿瘤细胞NF-κB p65蛋白表达的影响 结果(图1,表3)表明: NF-κB p65蛋白阳性表达于细胞质,阳性染色呈棕黄色颗粒; 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/ml PTX作用于人卵巢癌细胞24、48、72 h后,NF-κB p65蛋白表达均有所降低,各剂量组与空白对照组相比,差异均有统计学意义( $P <$

0.05)。在每个时间段内随着药物浓度的增加,NF-κB p65蛋白表达均降低,不同浓度两两相比差异均有统计学意义( $P <$  0.05); 在每个浓度内随着时间延长,NF-κB p65蛋白表达均降低,3个时间段两两相比差异均有统计学意义( $P <$  0.05)。

表3 不同浓度PTX作用下人卵巢癌细胞NF-κB p65蛋白的表达

( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	作用时间 $t/h$			F 值	P 值
	24	48	72		
空白对照组	9.62±0.31	9.56±0.40	9.74±0.27	0.38	0.69
PTX作用组					
0.5 mg/ml	7.18±0.41	6.06±0.38	4.60±0.47	46.93	0.00
1.0 mg/ml	4.54±0.21	3.82±0.42	3.02±0.63	14.01	0.01
1.5 mg/ml	3.54±0.30	2.24±0.23	1.40±0.22	91.30	0.00
2.0 mg/ml	2.92±0.19	2.48±0.37	1.24±0.95	10.62	0.02
F 值	451.32	344.88	170.27		
P 值	0.00	0.00	0.00		

PTX: 己酮可可碱

### 3 讨论

人Annexin II的基因位于15q21-q22,含1.4 kb编码基因<sup>[1]</sup>,Annexin II蛋白表达异常与肿瘤的发生、发展有着密切关系<sup>[5-6]</sup>,Rengifo-Cam等<sup>[7]</sup>研究发现: Annexin II蛋白通过激活MAPK/ERK的信号转导途径激活NF-κB,从而介导胃泌素对AR42J胰腺癌细胞系的增殖和抗凋亡作用。PTX能抑制IκBα的磷酸化及降解,从而抑制内毒素诱导的NF-κB的激活<sup>[8]</sup>。而PTX能否抑制体外培养卵巢癌细胞内Annexin II蛋白的表达国内外尚未见报道。

本研究结果显示,不同浓度的PTX作用人卵巢癌细胞不同时间后,均不同程度地抑制细胞增殖,其抑制作用与浓度、作用时间有关,呈浓度和时间依赖性;随着时间的延长和浓度的增加,肿瘤细胞Annexin II、NF-κB p65蛋白的表达均有所降低,也呈现时间和浓度依赖性。PTX可通过抑制Akt/NF-κB信号转导通路抑制支气管平滑肌细胞、胰腺癌细胞的增殖<sup>[9-10]</sup>。因此,本研究结果提示,PTX可能通过抑制Annexin II表达阻止NF-κB激活,从而发挥对人卵巢癌细胞的增殖抑制作用,但确切机制仍有待进一步探讨。

#### [参考文献]

[1] Romay-Penabad Z, Montiel-Manzano M G, Shilagard T, Pappalardo E, Vargas G, Deora A B, et al. Annexin A2 is involved in antiphospholipid antibody-mediated pathogenic effects *in vitro* and *in vivo*[J]. *Blood*,2009,114:3074-3083.  
 [2] Sharma M C,Sharma M. The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target[J]. *Curr Pharm Des*,2007,13:3568-3575.  
 [3] Buszewska M E, Strzelecka-Kiliszek A, Tylki-Szymańska A,

Bandorowicz-Pikula J. Annexins in Niemann-Pick type C disease[J]. *Postepy Biochem*,2007,53:169-173.  
 [4] 娄欣,张红,曹学全,孙森森,高冬玲,张岚,等. 组织蛋白酶B特异性siRNA对食管癌EC9706细胞组织蛋白酶B基因表达的影响[J]. *郑州大学学报:医学版*,2007,42:14-17.  
 [5] Zhang F, Zhang L, Zhang B, Wei X, Yang Y, Qi R Z, et al. Anxa2 plays a critical role in enhanced invasiveness of the multidrug resistant human breast cancer cells[J]. *J Proteome Res*, 2009,8:5041-5047.  
 [6] Ohno Y, Izumi M, Kawamura T, Nishimura T, Mukai K, Tachibana M. Annexin II represents metastatic potential in clear-cell renal cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*,2009,101:287-294.  
 [7] Rengifo-Cam W, Umar S, Sarkar S, Singh P. Antiapoptotic effects of progastrin on pancreatic cancer cells are mediated by sustained activation of nuclear factor- $\kappa$ B[J]. *Cancer Res*,2007, 67:7266-7274.  
 [8] Kim M O, Moon D O, Heo M S, Lee J D, Jung J H, Kim S K, et al. Pectenotoxin-2 abolishes constitutively activated NF- $\kappa$ B, leading to suppression of NF- $\kappa$ B related gene products and potentiation of apoptosis[J]. *Cancer Lett*,2008,271: 25-33.  
 [9] Chiou Y L, Shieh J J, Lin C Y. Blocking of Akt/NF- $\kappa$ B signaling by pentoxifylline inhibits platelet-derived growth factor-stimulated proliferation in Brown Norway rat airway smooth muscle cells[J]. *Pediatr Res*,2006,60:657-662.  
 [10] Arita Y, Ito T, Oono T, Kawabe K, Hisano T, Takayanagi R. Lysophosphatidic acid induced nuclear translocation of nuclear factor- $\kappa$ B in Panc-1 cells by mobilizing cytosolic free calcium[J]. *World J Gastroenterol*,2008,14:4473-4479.

[本文编辑] 贾泽军