

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00487

· 论 著 ·

桥粒胶蛋白-3介导促卵泡激素通过EGFR/Akt信号通路对卵巢癌细胞增殖活性的调控

王婧¹, 余思云², 吴晓蕊¹, 丁一¹, 金志军^{1*}, 刘晓军^{1*}

1. 第二军医大学长征医院妇产科, 上海 200003

2. 上海中医药大学附属上海市中医医院妇科, 上海 200071

[摘要] **目的** 通过检测桥粒胶蛋白-3(Dsc3)在卵巢癌中的表达以及促卵泡激素(FSH)对Dsc3、EGFR/Akt信号通路下游分子以及细胞增殖的影响,探讨Dsc3是否介导FSH通过EGFR/Akt信号通路对卵巢癌细胞增殖活性的调控,进而促进肿瘤的发生。**方法** 免疫组化检测Dsc3在卵巢肿瘤组织中的表达;运用蛋白质印迹分析方法检测Dsc3在6种卵巢肿瘤细胞及卵巢永生上皮细胞中的表达情况和FSH对Dsc3、EGFR的调控,以及干扰Dsc3、EGFR和应用Akt通路阻断剂对信号通路分子的调控;运用MTT方法检测干扰Dsc3、EGFR以及使用Akt阻断剂后对卵巢癌细胞增殖活性的影响。**结果** (1) Dsc3在卵巢癌及交界性卵巢肿瘤中的阳性表达率均高于良性卵巢肿瘤,差异均有统计学意义($P < 0.05$),Dsc3在卵巢癌中的阳性表达率与交界性卵巢肿瘤的差异无统计学意义($P > 0.05$);Dsc3在某些卵巢癌细胞如Hey、HO8910中及交界性卵巢肿瘤细胞MCV152中的表达高于卵巢永生上皮细胞Moody;(2)FSH呈剂量-时间依赖效应上调Dsc3、EGFR的表达;(3)干扰Dsc3后,信号通路分子EGFR、pAkt受到抑制,Akt无明显改变;干扰EGFR后,信号通路分子Dsc3、pAkt受到抑制,Akt无明显改变;应用Akt通路阻断剂后,Dsc3、pAkt受到抑制,Akt无明显改变;以上三种处理均可抑制FSH对Akt信号通路的调控;(4)干扰Dsc3、EGFR,及应用Akt通路阻断剂均可抑制FSH介导的卵巢癌细胞增殖活性($P < 0.05$)。**结论** Dsc3介导FSH通过EGFR/Akt通路调控的卵巢癌细胞增殖活性,进而促进卵巢癌的发展。

[关键词] 卵巢肿瘤;促卵泡刺激素;桥粒胶蛋白3;EGFR/Akt通路;细胞增殖

[中图分类号] R 737.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)05-0487-08

Desmocollin 3 mediates follicle stimulating hormone-induced ovarian epithelial cancer cell proliferation by activating EGFR/Akt signaling pathway

WANG Jing¹, YU Si-yun², WU Xiao-rui¹, DING Yi¹, JIN Zhi-jun^{1*}, LIU Xiao-jun^{1*}

1. Department of Gynecology and Obstetrics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Gynecology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China

[Abstract] **Objective** To explore whether desmocollin 3 (Dsc3) mediates follicle stimulating hormone (FSH)-induced ovarian epithelial cancer cell proliferation by activating EGFR/Akt signaling pathway, thereby promoting tumor growth. **Methods** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of Dsc3 in ovarian tumor tissues; Western blotting analysis was used to detect Dsc3 protein expression in 6 ovarian tumor cell lines and immortalized ovarian epithelial cells, and Dsc3, EGFR expression after FSH treatment. After knock-down Dsc3 and EGFR expression by siRNA and after treatment with PI3K/Akt signaling pathway inhibitor, Western blotting analysis was used to detect the expression of Dsc3, EGFR, Akt and pAkt; MTT assay was used to determine cellular growth. **Results** (1) The positive expression rates of Dsc3 in ovarian cancer tissues and borderline ovarian tumor tissues were significantly higher than that in benign ovarian cyst tissues ($P < 0.05$); and the positive rates were similar between the former two tissues. The expression of Dsc3 in some ovarian cancer cells, such as Hey and HO8910 and borderline ovarian tumor cells MCV152, was higher than that in immortalized ovarian epithelial cells (Moody). (2) FSH up-regulated expression of Dsc3 and EGFR in a dose- and time-dependent manner. (3) Inhibition of Dsc3 by RNA interference inhibited the expression of EGFR and pAkt, but not Akt. Inhibition of EGFR by RNA interference inhibited the expression of Dsc3 and pAkt, but not Akt. Inhibition of PI3K/Akt signaling pathway inhibited the expression of Dsc3 and

[收稿日期] 2013-10-15 **[接受日期]** 2014-02-25

[作者简介] 王婧, 硕士, 住院医师. E-mail: 496364921@qq.com

* 通信作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81885872, E-mail: jzj_888@sohu.com; Tel: 021-81885874, E-mail: 13816122418@163.com

pAkt, but not Akt. The above three methods could all reduce the regulation role of FSH for PI3K/Akt signaling pathway. (4) Inhibition of Dsc3, EGFR and PI3K/Akt signaling pathway could significantly reduce FSH-induced cell proliferation ($P < 0.05$).

Conclusion Dsc3 can mediate FSH-induced ovarian epithelial cancer cell proliferation by activating EGFR/Akt signaling pathway, and thereby promoting tumor growth.

[Key words] ovarian neoplasms; follicle stimulating hormone; desmocollin3; EGFR/Akt signaling pathway; cell proliferation
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(5): 487-494]

卵巢癌是严重影响女性健康的生殖道恶性肿瘤。高促性腺激素理论认为绝经后高水平的促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 是卵巢癌发生的高危因素, 因此研究了解 FSH 作用的分子生物学机制对卵巢癌的治疗具有重要的指导意义。桥粒胶蛋白-3 (desmocollin 3, Dsc3) 属于钙粘素超家族, 是细胞桥粒的重要组成部分^[1]。近年研究表明, Dsc3 在某些肿瘤发生发展中起到一定作用^[2-6], 但在卵巢癌中的表达情况尚未见报道。有文献报道 Dsc3 同家族分子 Dsc2 的缺失能够促进结肠上皮细胞的体外增殖, 并且通过激活表皮生长因子受体 (EGFR)/丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 信号通路 (EGFR/Akt 信号通路) 促进肿瘤体外生长^[7]。本研究旨在探究 Dsc3 在卵巢癌中的表达情况, 以及 Dsc3 是否也通过 EGFR/Akt 信号通路促进 FSH 调控的卵巢癌细胞增殖活性, 进而促进肿瘤的发生发展。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集 2007—2011 年上海市第一人民医院病理科 72 例患者的石蜡卵巢组织切片标本, 其中 31 例为卵巢恶性上皮性肿瘤, 22 例为卵巢交界性上皮性肿瘤, 另 19 例为良性上皮性肿瘤, 所有病例均有完整的临床病理资料。全部病变组织标本均经 2 位有经验的病理医师盲法确定病理诊断及分级, 所有患者术前均签署了实验研究知情同意书。

1.2 细胞株 上皮性卵巢癌细胞株 Hey、HO8910、ES-2、Skov3、Skov3ip, 卵巢交界性囊腺瘤细胞株 MCV152、卵巢永生化上皮细胞株 Moody 由上海市第一人民医院妇产科丰有吉教授课题组保存。

1.3 主要试剂及材料 正常羊血清购自上海太阳生物技术有限公司; SS LABEL Polymer-HRP 购自 BioGenex 公司; DAB 试剂盒购自上海长岛生物科技有限公司; MCDB109/M199 培养基、DMEM-F12 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司; FSH、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲亚砜 (DMSO) 均购自 Sigma 公司; 免

疫组化试剂盒自 Santa Cruz 公司; Dsc3 多克隆抗体 (鼠抗人)、Dsc3 单克隆抗体 (兔抗人)、EGFR 单克隆抗体 (兔抗人)、Akt 单克隆抗体 (兔抗人) 分别购自 eBioscience、Abcam、Epitomics、R&D 公司, pAkt 单克隆抗体 (兔抗人)、GAPDH 单克隆抗体 (兔抗人) 购自 Cell signaling 公司; lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; siRNA 由上海吉玛制药技术有限公司合成; ECL (electrochemiluminescence, 一般用于蛋白质印迹分析) 发光剂购自 PerkinElmer 公司。

1.4 免疫组织化学检测 应用免疫组织化学 S-P 法染色检测 Dsc3 蛋白的表达。常规脱蜡, 抗原修复采用高温加热法: 切片浸入柠檬酸钠缓冲液 (pH 6.0) 中, 高压锅煮沸 15 min, 室温下自然冷却, 正常山羊血清封闭, 一抗孵育过夜后二抗孵育, 显微镜下 DAB 显色 5~10 min, 苏木精复染 2 min, 盐酸乙醇分化后脱水、封片。Dsc3 鼠抗人多克隆抗体按 1:10 稀释。实验步骤严格按照免疫组化试剂说明进行操作。每张切片随机计数 5 个视野, 以淡黄色至棕黄色或棕褐色着色的卵巢上皮细胞作为阳性细胞, 参照 Remmele 等^[8] 的评分方法, 根据阳性细胞染色百分比及着色深浅评分: (1) 阳性细胞染色百分比 $\leq 30\%$ 为 1 分, $30\% \sim 70\%$ 为 2 分, $>70\%$ 为 3 分; (2) 无染色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色至棕褐色为 2 分。标本最后评分 (1) \times (2), 按分值将表达水平分为: 0 分阴性, 1~3 分弱阳性, 4~6 分强阳性 (1~6 分为阳性)。选择典型视野, 利用显微照相系统照相。

1.5 细胞培养及处理 Moody 细胞株用含 15% 胎牛血清的 MCDB109/M199 培养液, 余 6 种细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素和 100 U/L 链霉素双抗的 DMEM-F12 培养液, 置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。实验用细胞均处于对数生长期。将 7 种不同病理类型的卵巢组织细胞于同时间, 长满培养皿后收集细胞, 运用蛋白质印迹分析法检测 Dsc3 分子的表达; Hey、HO8910 细胞在血清饥饿 24 h 后, 经浓度分别为 0、20、40、80 IU/L 的 FSH 作用 48

h 及选用最佳作用浓度的 FSH 分别作用 0、24、48、72 h, 收集细胞后, 用蛋白质印迹分析法检测 Dsc3、EGFR 等蛋白分子的表达; 通过 siRNA 干扰法分别干扰 Dsc3、EGFR, 以及应用 PI3K/Akt 通路阻断剂 LY294002 (10 μ mol/L; 购自美国 Selleck 公司) 预处理细胞 1 h 后, FSH 再处理细胞 48 h, 收集细胞, 运用蛋白质印迹分析、MTT 法检测信号通路分子的表达及细胞增殖情况。

1.6 蛋白质印迹分析 收集上述处理后的细胞, 裂解后收集上清液, BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度。将 60 μ g 蛋白上样于 10% SDS-PAGE, 电泳结束后, 将蛋白转印至 PVDF 膜上, 应用稀释的 Dsc3 (1 : 5 000)、EGFR (1 : 1 000)、Akt (1 : 1 000)、pAkt (1 : 1 000)、GAPDH 抗体 (1 : 1 000) 于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 经 TBST 洗涤后, 选择合适的二抗孵育 1 h, 经 TBST 洗涤后, 应用 ECL 化学发光法检测目的蛋白表达情况。实验重复 3 次。

1.7 MTT 实验检测细胞增殖活性 收集 Hey、HO-8910 细胞, 分别接种至 96 孔板中, 每孔加入 200 μ L 铺板使待测细胞密度为 1 000~3 000 个/孔, 边缘孔用无菌 1 \times PBS 填充, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将各孔的培养液补齐到 200 μ L, 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 孵育, 至细胞贴壁。通过 siRNA 干扰法分别干扰 Dsc3、EGFR, 以及应用 PI3K/Akt 通路阻断剂 LY294002 (10 μ mol/L) 预处理细胞 1 h 后, FSH 再处理细胞 48 h, 收集细胞, 每孔 200 μ L, 设 6 个复孔。每孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 继续放入 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 培养 4 h 后, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免

疫检测仪 490 nm 处测量各孔的光密度 (D) 值。

1.8 siRNA 干扰实验 实验分组: siCon 组为转染阴性对照序列的实验组, 对 Dsc3 或 EGFR 无干扰作用; siDsc3 或 siEGFR 组: 转染特异性干扰 Dsc3 或 EGFR 的 siDsc3 或 siEGFR 序列; FSH + siCon 组: 以 FSH 处理的 siCon 组; FSH + siDsc3、FSH + siEGFR; 以 FSH 处理的 siDsc3 或 siEGFR 组。种植于 6 孔板中的 Hey 细胞和 HO8910 细胞经无血清的 OPTI-MEM 培养液饥饿 24 h 后, 当细胞密度达 30%~50% 时, 按 lipofectamine 2000 使用说明书将配置好的 siRNA-脂质体混合物转染细胞。转染 12 h 后加入 40 IU/L FSH 处理 48 h, 提取蛋白, 按上述步骤用蛋白质印迹分析法测定 Dsc3、EGFR、Akt、pAkt 表达; 96 孔板中相同处理的 Hey 细胞和 HO8910 细胞经 FSH 处理 48 h 后, 应用 MTT 检测 Dsc3、EGFR 对细胞增殖的影响。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。免疫组化数据分析采用 Kruskal-Wallis 检验, MTT 检测结果的数据分析采用单因素方差分析。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Dsc3 在不同卵巢肿瘤组织和细胞株中的表达

Dsc3 阳性细胞定位于细胞膜。Dsc3 在卵巢癌组织中的阳性表达率为 77.4% (24/31), 在交界性卵巢肿瘤中的阳性表达率为 81.8% (18/22), 均高于在良性卵巢肿瘤中的表达 [15.8% (3/19)], 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。Dsc3 在卵巢癌中的阳性表达率与交界性卵巢肿瘤比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。代表性的免疫组化染色结果见图 1。

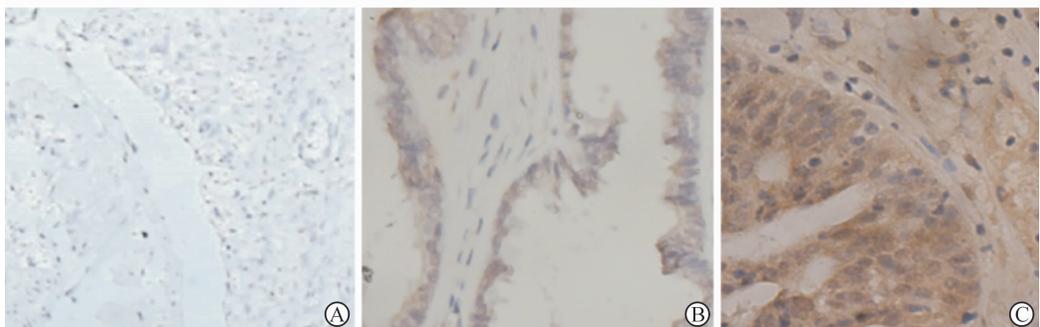


图 1 免疫组化染色检测 Dsc3 在不同卵巢肿瘤组织中的表达 (SP 法)

Fig 1 Expression of Dsc3 in different ovarian tissues determined by immunohistochemical staining (SP method)

A: Benign ovarian cyst tissues; B: Borderline ovarian tumor tissues; C: Ovarian cancer tissues. Original magnification: $\times 100$

用蛋白质印迹分析法检测 Dsc3 在 7 种不同卵巢组织细胞株中的蛋白表达情况,结果(图 2)表明 Dsc3 在卵巢癌细胞株 Hey、HO8910、Skov3、Skov3ip 以及在卵巢交界性囊腺瘤细胞株 MCV152 中的表达均高于卵巢永生上皮细胞株 Moody 和卵巢癌细胞株 ES-2。

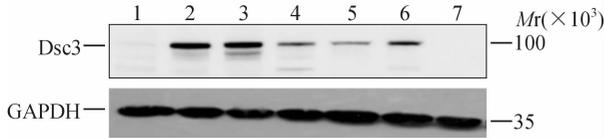


图 2 蛋白质印迹分析检测 Dsc3 在不同卵巢组织细胞株中的表达

Fig 2 Expression of Dsc3 in different ovarian cell lines detected by Western blotting analysis

1: ES-2; 2: HO8910; 3: Skov3ip; 4: Skov3; 5: MCV152; 6: Hey; 7: Moody

2.2 不同浓度 FSH 对 Dsc3、EGFR 表达的影响

蛋白质印迹分析结果(图 3)显示,不同浓度的 FSH 作用于 Hey 细胞和 HO8910 细胞 48 h 后,两种细胞的 Dsc3、EGFR 表达随 FSH 浓度的升高而逐渐增加,在一定范围内呈剂量依赖性。Dsc3 在 FSH 浓度为 40 IU/L 时表达量最高,浓度为 80 IU/L 时略有下降。

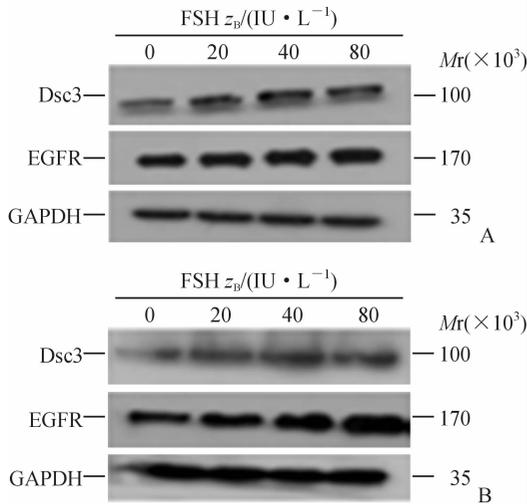


图 3 蛋白质印迹分析检测不同浓度 FSH 对 Dsc3、EGFR 表达的影响

Fig 3 Effect of different concentrations of FSH on Dsc3 and EGFR expression as detected by Western blotting analysis

FSH; Follicle stimulating hormone; Dsc3; Desmocollin 3; EGFR; Epidermal growth factor receptor. A; Hey cells; B; HO8910 cells

2.3 不同作用时间的 FSH 对 Dsc3、EGFR 表达的影响 蛋白质印迹分析结果(图 4)显示,选择 FSH 的最佳浓度 40 IU/L,分别作用于 Hey 细胞和 HO8910 细胞 24、48 h 后,两种细胞的 Dsc3、EGFR 的表达随 FSH 作用时间的延长而逐渐增加,呈时间依赖性,48 h 时 Dsc3 表达最高,72 h 时有所下降。

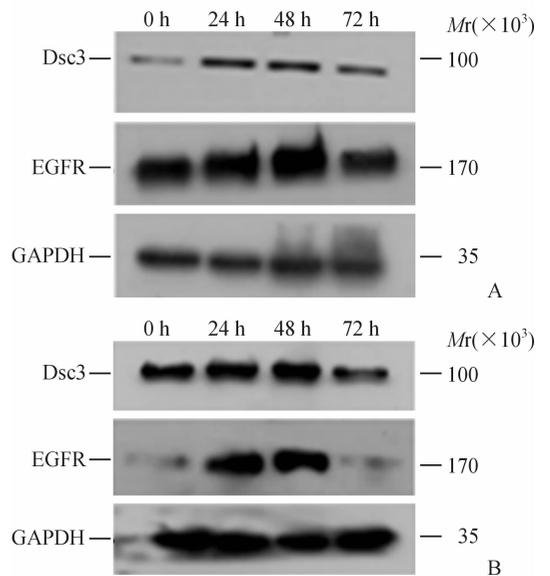


图 4 蛋白质印迹分析检测不同作用时间的 FSH (40 IU/L)对 Dsc3、EGFR 表达的影响

Fig 4 Dsc3 and EGFR expression in Hey cells and HO8910 cells treated with FSH (40 IU/L)

for different periods as detected by Western blotting analysis FSH; Follicle stimulating hormone; Dsc3; Desmocollin 3; EGFR; Epidermal growth factor receptor. A; Hey cells; B; HO8910 cells

2.4 干扰 Dsc3 对 FSH 调控的 AKT 信号通路蛋白分子表达的影响 蛋白质印迹分析结果(图 5)显示,干扰 Dsc3 对 Hey 细胞和 HO8910 细胞的 EGFR、pAkt 在蛋白水平的表达有抑制作用,对 Akt 作用不明显,且 FSH(40 IU/L)对 EGFR、pAkt 的上调作用被抑制,对 Akt 作用不明显。

2.5 干扰 EGFR 对 FSH 调控的 AKT 信号通路蛋白分子表达的影响 蛋白质印迹分析结果(图 6)显示,干扰 EGFR 对 Hey 细胞和 HO8910 细胞的 pAkt、Dsc3 蛋白水平的表达有抑制作用,对 Akt 作用不明显,FSH(40 IU/L)对 pAkt、Dsc3 的上调作用被抑制,对 Akt 作用不明显。

2.6 阻断 PI3K/Akt 通路对 FSH 调控的通路信号分子蛋白表达的影响 蛋白质印迹分析结果(图 7)

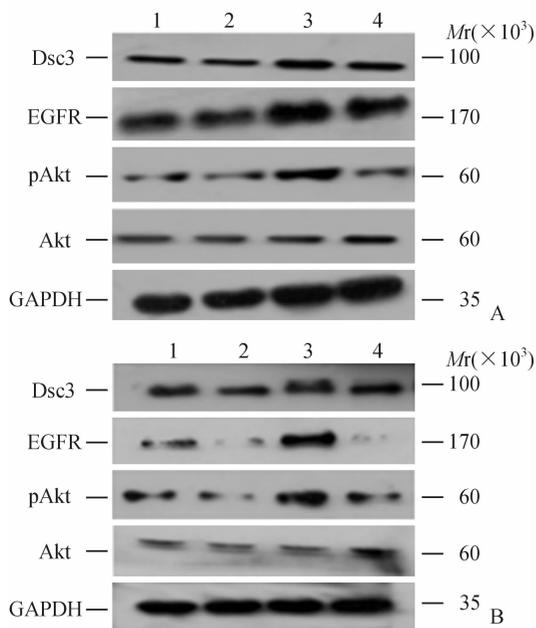


图5 蛋白质印迹分析检测干扰 Dsc3 对 FSH(40 IU/L) 调控的 AKT 信号通路蛋白分子表达的影响

Fig 5 RNA interference of Dsc3 regulates PI3K/Akt signaling pathway protein regulated by FSH (40 IU/L) as detected by Western blotting analysis

FSH: Follicle stimulating hormone; Dsc3: Desmocollin 3; EGFR: Epidermal growth factor receptor; Akt: Serine/threonine kinase; pAkt: Phosphorylated Akt. A: Hey cells; B: HO8910 cells. 1: siCon; 2: siDsc3; 3: siCon + FSH; 4: siDsc3 + FSH

显示,应用 PI3K/Akt 通路阻断剂 LY294002 阻断 PI3K/Akt 通路后,pAkt、Dsc3 蛋白表达下调,Akt 蛋白表达持平,FSH(40 IU/L)对 pAkt、Dsc3 的上调作用被抑制,对 Akt 作用无明显变化。

2.7 分别干扰 Dsc3、EGFR 以及应用 PI3K/Akt 通路阻断剂对卵巢癌细胞增殖的抑制作用 MTT 检测结果(图 8)显示, siDsc3、siEGFR、LY294002 分别与 siCon 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$); siDsc3 + FSH、siEGFR + FSH、LY294002 + FSH 分别与 siCon + FSH 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$); siCon + FSH 与 siCon、siDsc3 + FSH 与 siDsc3、siEGFR + FSH 与 EGFR、LY294002 + FSH 与 LY294002 比较,差异亦均有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明分别干扰 Dsc3、EGFR,应用 PI3K/Akt 通路阻断剂 LY294002 后,对卵巢癌细胞增殖有抑制作用,同时也减弱了 FSH 对卵巢癌细胞的增殖作用。

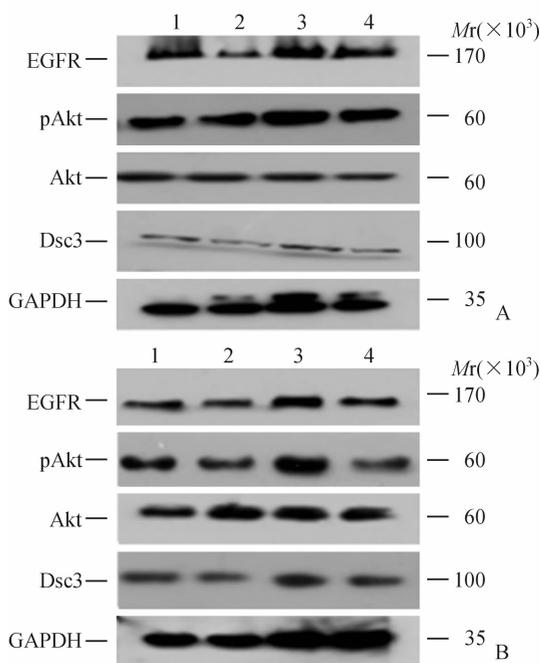


图6 蛋白质印迹分析检测干扰 EGFR 对 FSH (40 IU/L) 调控的 AKT 信号通路蛋白分子表达的影响

Fig 6 RNA interference of EGFR regulates PI3K/Akt signaling pathway regulated by FSH(40 IU/L) as detected by Western blotting analysis

FSH: Follicle stimulating hormone; Dsc3: Desmocollin 3; EGFR: Epidermal growth factor receptor; Akt: Serine/threonine kinase; pAkt: Phosphorylated Akt. A: Hey cells; B: HO8910 cells. 1: siCon; 2: siDsc3; 3: siCon + FSH; 4: siEGFR + FSH

3 讨论

卵巢癌在妇科恶性肿瘤中的病死率高居首位,主要由于卵巢深藏盆腔,难以早期发现病变,缺乏早期预警,以致确诊时多数已属晚期。因此,了解卵巢癌发病的分子基础,寻找早期诊断方法,将有助于针对特定靶点的药物研发和进行有效的治疗。卵巢是 FSH 的主要靶器官体^[9],FSH 促进正常卵巢细胞和卵巢癌细胞增殖;流行病学研究显示绝经后妇女的卵巢癌发病率明显高于生育期妇女^[10],围绝经和绝经妇女体内血清高 FSH 浓度与卵巢癌发生发展密切相关,李连香等^[11]的研究表明,在良性与恶性上皮性卵巢肿瘤患者、良性与交界性上皮性卵巢肿瘤患者的血清和肿瘤组织液之间,FSH 浓度均存在显著差异($P < 0.05$),且随着恶性程度的增高,FSH 浓度也呈增高趋势。FSH 在促进卵巢癌发展中的作用

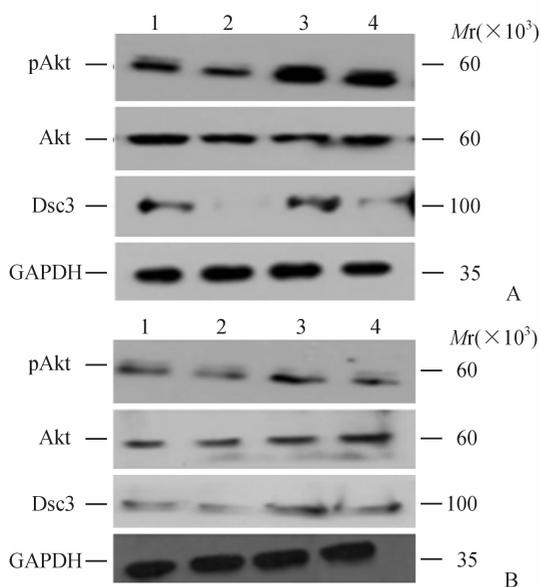


图 7 蛋白质印迹分析检测阻断 PI3K/Akt 通路对 FSH (40 IU/L) 调控的通路信号分子蛋白表达的影响

Fig 7 Effect of blocking PI3K/Akt signaling pathway on protein of FSH(40 IU/L) signaling pathway as detected by Western blotting analysis

Con: Control; FSH: Follicle stimulating hormone; Dsc3: Desmocollin 3; Akt: Serine/threonine kinase; pAkt: Phosphorylated Akt. A: Hey cells; B: HO8910 cells. 1: Con; 2: Ly 294002; 3: Con+FSH; 4: Ly 294002+FSH

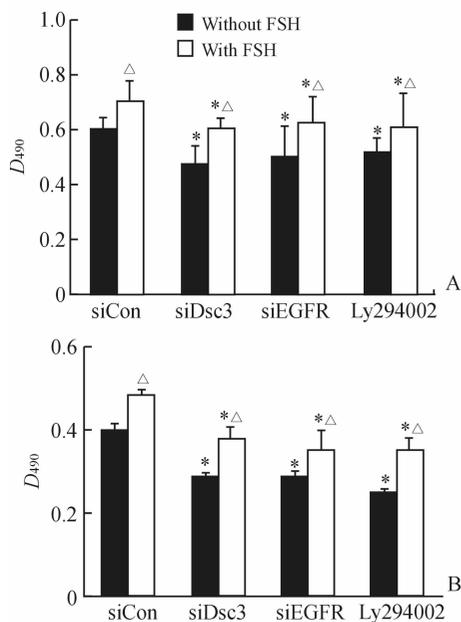


图 8 MTT 法检测卵巢癌细胞增殖活性

Fig 8 Ovarian cancer cell proliferation as detected by MTT

FSH: Follicle stimulating hormone. A: Hey cells; B: HO8910 cells. * $P < 0.05$ vs siCon group; $\Delta P < 0.05$ vs the same group without FSH. $n = 8, \bar{x} \pm s$

机制,已有很多文献报道,如盛林等^[12]研究发现,FSH 通过蛋白激酶 C 介导的信号转导途径,可刺激卵巢上皮癌细胞增殖;冯怡雯等^[13]研究表明,FSH 通过特异 AT 序列结合蛋白 1 调控上皮性卵巢癌 ES-2 细胞的增殖和侵袭活性等。有关 FSH 作用机制的研究虽多,但仍未完全阐明。

近年研究表明,Dsc3 与某些肿瘤的发生发展可能有一定的相关性^[14-15]。Dsc3 的 DNA 甲基化可导致其在结直肠癌中表达下调^[2];Dsc3 的缺失导致 K-Ras 原癌基因介导的皮肤肿瘤发生率增高^[3];Dsc3 在低分化的胰腺导管癌^[5]及在近半数未分化的肺大细胞癌^[6]中高表达。然而,Dsc3 在卵巢癌中的表达情况较少有报道,故本研究对此进行了探讨。本研究预实验结果表明,Dsc3 在卵巢癌及交界性卵巢肿瘤中的阳性表达率均高于良性卵巢肿瘤 ($P < 0.05$)。选用卵巢永生上皮细胞、交界性卵巢肿瘤细胞及卵巢癌细胞共 7 种进行 Dsc3 的蛋白质印迹分析发现,Dsc3 在卵巢癌细胞株 Hey、HO8910、Skov3、Skov3ip 以及在卵巢交界性囊腺瘤细胞株 MCV152 中表达均高于卵巢永生上皮细胞 Moody 和卵巢癌细胞株 ES-2 ($P < 0.05$)。

有文献报道,Dsc3 同族分子 Dsc2 的缺失可通过激活 EGFR/Akt 信号通路使结肠上皮细胞体外增殖,并转化为恶性表型^[7]。本课题旨在探究 Dsc3 在卵巢癌中是否也通过 EGFR/Akt 信号通路促进 FSH 调控的卵巢癌细胞增殖活性,进而促进肿瘤发生发展。本研究首先运用蛋白质印迹分析方法检测 FSH 对 Dsc3 以及信号通路分子 EGFR 在蛋白水平的影响。流行病学调查发现,卵巢癌在伴有 FSH 增高的人群中发病率增高;在正常月经中,排卵前 FSH 在血中浓度约为 5~20 IU/L,而排卵前升高亦不超过 30 IU/L,绝经后或卵巢功能衰退患者血 FSH 浓度可 ≥ 40 IU/L^[16],而 Halperin 等^[17]发现,卵巢癌患者血清中 FSH 浓度达 (24.74 ± 18.7) IU/L。Zheng 等^[18]和宋光辉等^[19]研究了两种卵巢癌细胞株在 FSH 浓度 < 160 IU/L 范围内的细胞增殖情况,发现均在 FSH 浓度为 40 IU/L 时最强;其后,随 FSH 浓度增加各细胞株增殖并不进一步增加。因此,本研究选取 20、40、80 IU/L 为 FSH 对卵巢癌细胞的作用浓度。在胡琢瑛等^[20]的研究中,不同浓度的 FSH 作用于卵巢癌细胞株 24、48、72 h 后,通过

MTT 比色法显示,细胞增殖活性均较对照组升高,但仅 40 IU/L 浓度的 FSH 作用 48 h 时差异有统计学意义。因此本实验选 24、48、72 h 作为 FSH 作用的时间点。本研究结果表明 FSH 对 Dsc3、EGFR 的表达有上调作用,并呈一定的剂量-时间依赖性,选取 FSH 对 Dsc3 表达影响的较佳浓度 40 IU/L 与较佳时间 48 h 进行后续实验。本研究又通过分别干扰 Dsc3 和 EGFR,研究这两个分子是否对信号通路分子产生影响,结果表明干扰 Dsc3 后对 EGFR、pAkt 在蛋白水平的表达有抑制作用,对 Akt 无明显作用,FSH 对 EGFR、pAkt 的上调作用被抑制,对 Akt 作用不明显;干扰 EGFR 后对 pAkt、Dsc3 在蛋白水平的表达有抑制作用,对 Akt 无明显作用,FSH 对 pAkt 的上调作用被抑制,对 Akt 作用不明显。同样,将干扰实验应用到 MTT 检测细胞增殖情况,结果表明分别干扰 Dsc3 和 EGFR 后,对卵巢癌细胞增殖有抑制,并且 FSH 作用后能明显促进细胞增殖 ($P < 0.05$)。之后进一步实验证明通过 PI3K/Akt 通路是否能影响细胞增殖,故应用该信号通路阻断剂 LY294002 处理细胞,蛋白质印迹分析结果表明阻断该通路后 pAkt、Dsc3 表达下调, Akt 无明显变化,FSH 对 pAkt、Dsc3 的上调作用被抑制,对 Akt 无明显影响,MTT 实验进一步证实阻断该通路后,卵巢癌细胞的增殖相比对照受抑制,FSH 作用后增殖活性较对照明显升高 ($P < 0.05$),从而说明 PI3K/Akt 信号通路确实介导了卵巢癌细胞的增殖。

综上所述,本研究结果表明 Dsc3 确实介导了 FSH 通过 EGFR/Akt 通路并调控的卵巢癌细胞增殖活性,进而促进卵巢癌的发展。但是,Dsc3 是否会影响卵巢癌或者其他肿瘤细胞的侵袭、凋亡、增殖等,本实验并未进行研究并且目前尚少有研究及报道,另外该家族的蛋白在肿瘤细胞发生发展中所起的作用,文献记载也不多,这是我们今后可以考虑的研究方向。通过我们的进一步研究,如果能证实 Dsc3 对肿瘤细胞的调控的机制,将更有效的指导临床应用。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Aoyama Y, Yamamoto Y, Yamaguchi F, Kitajima Y. Low to high Ca^{2+} -switch causes phosphorylation and association of desmocollin 3 with plakoglobin and desmoglein 3 in cultured keratinocytes[J]. *Exp Dermatol*, 2009, 18: 404-408.
- [2] Cui T, Chen Y, Yang L, Knösel T, Zöller K, Huber O, et al. DSC3 expression is regulated by p53, and methylation of DSC3 DNA is a prognostic marker in human colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2011, 104: 1013-1019.
- [3] Chen J, O'Shea C, Fitzpatrick J E, Koster M I, Koch P J. Loss of desmocollin 3 in skin tumor development and progression[J]. *Mol Carcinog*, 2012, 51: 535-545.
- [4] Wang L, Liu T, Wang Y, Cao L, Nishioka M, Aguirre R L, et al. Altered expression of desmocollin 3, desmoglein 3, and β -catenin in oral squamous cell carcinoma: correlation with lymph node metastasis and cell proliferation[J]. *Virchows Arch*, 2007, 451: 959-966.
- [5] Hamidov Z, Altendorf-Hofmann A, Chen Y, Settmacher U, Petersen I, Knösel T. Reduced expression of desmocollin 2 is an independent prognostic biomarker for shorter patients survival in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2011, 64: 990-994.
- [6] Monica V, Ceppi P, Righi L, Tavaglione V, Volante M, Pelosi G, et al. Desmocollin-3: a new marker of squamous differentiation in undifferentiated large-cell carcinoma of the lung[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22: 709-717.
- [7] Kolegraff K, Nava P, Helms M N, Parkos C A, Nusrat A. Loss of desmocollin-2 confers a tumorigenic phenotype to colonic epithelial cells through activation of Akt/ β -catenin signaling [J]. *Mol Biol Cell*, 2011, 22: 1121-1134.
- [8] Remmele W, Stegner H E. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue][J]. *Pathologe*, 1987, 8: 138-140.

- [9] Syed V, Ulinski G, Mok S C, Yiu G K, Ho S M. Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 61:6768-6776.
- [10] Stadel B V. Letter: the etiology and prevention of ovarian cancer[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 1975, 123: 772-774.
- [11] 李连香, 陈丽宏, 王亚琴, 郭 剑. FSH 在上皮性卵巢肿瘤中的表达及意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17: 927-928.
- [12] 盛 林, 刘东远, 沈 铿. 卵泡刺激素介导卵巢上皮性癌细胞增殖的初步研究[J]. *中华妇产科杂志*, 2004, 38: 752-755.
- [13] 冯怡雯, 魏桢楠, 祝 颖, 周冬梅, 吴 凌, 杨 婷, 等. FSH 通过 SATB1 调控上皮性卵巢癌 ES-2 细胞的增殖和侵袭活性[J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11: 2801-2805.
- [14] Tsuta K, Tanabe Y, Yoshida A, Takahashi F, Maeshima A M, Asamura H, et al. Utility of 10 immunohistochemical markers including novel markers (desmocollin-3, glypican 3, S100A2, S100A7, and Sox-2) for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung[J]. *J Thorac Oncol*, 2011, 6: 1190-1199.
- [15] Oshiro M M, Kim C J, Wozniak R J, Junk D J, Muñoz-Rodríguez J L, Burr J A, et al. Epigenetic silencing of DSC3 is a common event in human breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2005, 7: R669-R680.
- [16] 曾泽毅. 中华妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1755-1761.
- [17] Halperin R, Hadas E, Langer R, Bukovsky I, Schneider D. Peritoneal fluid gonadotropins and ovarian hormones in patients with ovarian cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 1999, 9: 502-507.
- [18] Zheng W, Lu J J, Luo F, Zheng Y, Feng Y J, Felix J C, et al. Ovarian epithelial tumor growth promotion by follicle-stimulating hormone and inhibition of the effect by luteinizing hormone [J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 76: 80-88.
- [19] 宋光辉, 刘惜时. 卵泡刺激素对上皮性卵巢癌细胞株的增殖及 E-钙粘素表达的影响[J]. *实用妇产科杂志*, 2004, 20: 294-297.
- [20] 胡琢瑛, 邓晓谷, 姚珍薇. 生殖激素对卵巢癌细胞株 HO-8910 体外生长的调控[J]. *重庆医科大学学报*, 2004, 29: 148-152.

[本文编辑] 商素芳