

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00612

多西环素增加卵巢癌细胞 HO8910 对顺铂化疗敏感性

吴 薇^{1,2△}, 余立华^{2△}, 马 蓓^{2*}, 徐明娟^{1*}

1. 第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433
2. 第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 探讨多西环素对卵巢癌的抗肿瘤作用及可能机制。**方法** 采用 MTT 方法检测多西环素单独作用及与顺铂联合用药时对卵巢癌细胞 HO8910 增殖的影响;采用 RT-PCR 检测卵巢癌细胞 HO8910 中 CXCR4 mRNA 的表达;采用蛋白质免疫印迹法检测多西环素作用后卵巢癌细胞 HO8910 中 CXCR4 表达的改变。**结果** 较低浓度多西环素(10 μg/mL)作用 48 h 后即可抑制卵巢癌细胞 HO8910 的增殖活力($P < 0.01$),当其浓度为 50 μg/mL 时抑制率达(70±2)%。多西环素与顺铂联合用药后对癌细胞的抑制效应大于同一浓度顺铂单独作用时,可提高癌细胞对顺铂的化疗敏感性。多西环素抑制卵巢癌细胞 HO8910 中 CXCR4 的表达。**结论** 多西环素对卵巢癌细胞 HO8910 有明确的抑制增殖作用,能增加癌细胞对顺铂化疗的敏感性。SDF-1/CXCR4 通路可能参与其中。

[关键词] 多西环素;卵巢肿瘤;CXCR4 受体;顺铂;肿瘤抗药性

[中图分类号] R 737.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0612-04

Doxycycline increases chemosensitivity of ovarian cancer HO8910 cells to cisplatin

WU Wei^{1,2△}, YU Li-hua^{2△}, MA Bei^{2*}, XU Ming-juan^{1*}

1. Department of Gynecology and Obstetrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-tumor effect of doxycycline against ovarian cancer cells and the underlying mechanism. **Methods** MTT assay was used to test the tumor cell viability after treated with doxycycline alone or in combination with cisplatin. RT-PCR was used to examine CXCR4 mRNA expression in HO8910 cells. Western blotting analysis was used to determine CXCR4 protein expression after doxycycline treatment. **Results** Treatment with low dose of doxycycline (10 μg/mL) for 48 hours notably inhibited the proliferation of ovarian cancer cell HO8910 ($P < 0.01$), with the inhibition rate being (70±2)% when doxycycline concentration was at 50 μg/mL. Doxycycline combined with cisplatin had greater inhibitory effect against HO8910 cells compared with cisplatin alone at the same concentration. Doxycycline treatment down-regulated CXCR4 expression in HO8910 cells. **Conclusion** Doxycycline has a definite inhibitory effect against proliferation of ovarian cancer HO8910 cells, and it can increase the sensitivity of tumor cells to cisplatin, which may involve SDF-1/CXCR4 signaling pathway.

[Key words] doxycycline; ovarian neoplasms; CXCR4 receptors; cisplatin; neoplasm drug resistance

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6):612-615]

卵巢癌死亡率居妇科肿瘤之首,5 年生存率仅约为 30%^[1]。由于缺乏有效的筛查手段,70% 卵巢癌患者确诊时已属晚期,无法以手术根除治疗^[2]。目前针对卵巢癌主要的治疗方案为手术及术后辅以铂类联合化疗药物紫杉醇为主的化疗^[3]。60%~80% 的患者在接受积极的治疗后能获得临床完全缓解,

然而晚期患者中的 70% 将最终复发并表现为铂类耐药^[4]。绝大多数的铂类耐药性卵巢癌是不能治愈的,其平均生存期约为 2 年^[5]。

顺铂(cisplatin, DDP)是铂类中常用的一线化疗药物,其用于治疗恶性肿瘤的机制主要为与肿瘤细胞 DNA 结合从而导致 DNA 损伤而最终诱导肿

[收稿日期] 2013-03-21 **[接受日期]** 2013-04-23

[基金项目] 上海市科委基金(10411960100);中国癌症基金会(E12012006)。Supported by Fund of Shanghai Science and Technology Committee (10411960100) and Cancer Foundation of China (E12012006)。

[作者简介] 吴 薇,硕士生。E-mail: wuweiblossom@163.com; 余立华,助教。E-mail: Yu_ljhua@126.com

△共同第一作者(Co-first authors)。

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 021-81870979, E-mail: mmbb@gmail.com; Tel: 021-31162044, E-mail: 13636373419@163.com

瘤细胞凋亡,在临床上可用于包括卵巢癌在内的多种实体肿瘤的化疗。但大部分卵巢癌患者在顺铂初始治疗后很快就会出现耐药现象^[5-7]。而目前针对铂类耐药性卵巢癌的治疗国内外尚无统一方案,所以寻找一种安全有效的,对卵巢癌尤其是铂类耐药性卵巢癌具有明确治疗效果的化疗药物十分有必要。

多西环素(doxycycline, DC)是一种四环素族广谱抗生素,通过抑制细菌蛋白的合成来发挥作用,临床上主要用于感染性疾病的治疗,包括莱姆病、慢性前列腺炎、鼻窦炎、梅毒、衣原体感染、盆腔慢性炎症、粉刺、红斑痤疮和立克次体感染。近年来有研究显示,多西环素除了抗菌作用外还有一定的抗肿瘤作用,其可以抑制口腔鳞状上皮癌细胞的增殖及侵袭,还可以抑制黑色素瘤细胞的侵袭及转移^[8-9]。多西环素联合免疫细胞接种肿瘤患者后可提高肿瘤免疫治疗的疗效^[10]。

多西环素用于治疗卵巢癌国内外尚未见报道,在本次实验中,我们主要观察多西环素对卵巢癌细胞 HO8910 的抑制增殖作用,并进一步研究其与顺铂联合用药时是否能增加卵巢癌细胞对顺铂化疗的敏感性,初步揭示多西环素抗卵巢癌的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料及主要试剂 人卵巢癌细胞株 HO8910 (由第二军医大学基础部病理生理学教研室提供), RPMI 1640 培养液(Gibco 公司),胎牛血清(Sigma 公司),噻唑蓝 MTT(Sigma 公司),羊抗人 CXCR4 多克隆抗体(Cell Signaling Technology 公司),RT-PCR 试剂及引物(上海生工生物工程技术有限公司),盐酸多西环素(Sigma 公司, D9891),顺铂(Sigma 公司, 479306)。

1.2 细胞培养 HO8910 细胞在 37℃、5% CO₂ 湿度恒定培养箱内培养,含 10% 胎牛血清 RPMI 1640 培养液为培养基,对数生长期细胞传代培养。

1.3 MTT 法测定细胞活力 以 1×10^5 /mL 的密度将肿瘤细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μ L,实验设 3 个复孔,重复 3 次。肿瘤细胞孵育过夜后每孔加入特定实验浓度的顺铂及多西环素作用特定时间后,每孔加入 10 μ L MTT(5 mg/mL),继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入 100 mL 二甲亚砜,振荡摇匀,用酶标仪于 490 nm 波长测定光密度值(D 值),按照下列公式计算细胞活力:细胞活力=(实验组 D 值/对照组

D 值) $\times 100\%$,每组的 D 值取 3 个实验复孔的均值。

1.4 RT-PCR 收集对数生长期 HO8910 细胞, TRIzol 法提取总 RNA,反转录合成 cDNA 第一链。以 cDNA 为模板,进行 β -actin 及 CXCR4 基因的扩增,引物序列分别为 β -actin (5'-TGT GTT GGC GTA CAG GTC TTT G-3'), CXCR4(5'-AGC ATG ACG GAC AAG TAC AGG-3'),所得产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,以凝胶成像仪观察结果。

1.5 蛋白质免疫印迹法 按实验要求将细胞接种于 6 孔板,每孔 1.5 mL,密度为 5×10^6 /mL,实验重复 3 次。肿瘤细胞孵育过夜后加入不同浓度多西环素(0、10、15、20 μ g/mL)处理 48 h 后,抽取空白对照组及不同药物作用组蛋白,变性后进行 SDS-PAGE 分离目的蛋白,转移到硝酸纤维素薄膜上,5% 脱脂奶粉 Tris-HCl 缓冲液+Tween 20(TBST)封闭液封闭 1~2 h,洗膜 TBST 5 min \times 3 次,孵一抗(1:1 000),室温摇床 1 h,4℃ 过夜,洗膜 TBST 5 min \times 3 次,孵二抗(1:1 000),室温摇床 1 h,洗膜 TBST 10 min \times 3 次,显影。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用方差分析。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 顺铂抑制卵巢癌细胞 HO8910 增殖 不同浓度顺铂(0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 μ g/mL)作用 HO8910 细胞 48 h,结果当顺铂浓度高于 1.5 μ g/mL 时,细胞活力呈剂量依赖性下降,此浓度下癌细胞的增殖活力为空白对照组的(59 \pm 7)%,与空白对照组相比差异具有统计学意义($n=9$, $P<0.05$),当顺铂浓度为 2.0 及 2.5 μ g/mL 时,对癌细胞的抑制率分别为(56 \pm 4)%及(79 \pm 3)%($n=9$, $P<0.01$)。

2.2 多西环素抑制卵巢癌细胞 HO8910 增殖 先使用 10 μ g/mL 多西环素作用卵巢癌细胞 HO8910 不同时间(0, 24, 48, 72 h)后,结果显示作用 48 h 及 72 h 后,对癌细胞的抑制率分别为(43 \pm 3)%及(36 \pm 5)%,与空白对照组相比均具有统计学差异($n=9$, $P<0.01$)。我们选取 48 h 作为药物作用的最佳时间,故在后续实验中采用不同浓度多西环素(0、2.5、5.0、7.5、10、20、50 μ g/mL)作用 HO8910 细胞 48 h,结果显示当多西环素浓度高于 10 μ g/mL 可呈剂量依赖性地抑制卵巢癌细胞增殖活力,此浓

度下,癌细胞的增殖活力为空白对照组的(57±5)%,与空白对照组相比差异具有统计学意义($n=9, P<0.05$)。当多西环素浓度为20及50 μg/mL时,对癌细胞的抑制率分别为(60±4)%及(70±2)%($n=9, P<0.01$)。

2.3 多西环素增加卵巢癌细胞 HO8910 对顺铂的化疗敏感性 先选用顺铂作用癌细胞 48 h 后尚未对其增殖活力产生明显抑制效应的浓度 1 μg/mL, 分别联合不同浓度多西环素(2.5、5、7.5、10 μg/mL)作用 HO8910 细胞 48 h, 结果显示, 当 7.5 及 10 μg/mL 多西环素联合 1 μg/mL 顺铂时对癌细胞的抑制效率分别为(39±4)%及(43±2)%, 均高于 1 μg/mL 顺铂单独作用时的(34±4)%, 且差异均具有统计学意义($n=9, P<0.01$)。而后, 将顺铂浓度更换为 1.5 μg/mL 重复以上实验, 结果与上述实验一致, 当 10 μg/mL 多西环素联合顺铂 1.5 μg/mL 作用时对卵巢癌细胞的抑制率(52±1)%也高于 1.5 μg/mL 顺铂单独作用时(41±3)%($n=9, P<0.01$)。结果说明多西环素可以增强卵巢癌细胞对顺铂化疗的敏感性。

2.4 多西环素抑制卵巢癌细胞 HO8910 中 CXCR4 的表达 反转录 PCR 结果显示, 在卵巢癌细胞株 HO8910 中有 CXCR4 mRNA 表达(图 1A), 采用蛋白质印迹法从蛋白水平检测不同浓度多西环素作用卵巢癌细胞 48 h 后对其 CXCR4 表达的影响, 结果显示, 随着多西环素浓度的增加, CXCR4 条带的灰度值逐渐降低, 当多西环素浓度为 20 μg/mL 时, 其条带灰度值较空白对照组降低(图 1B), 说明多西环素可以抑制 HO8910 细胞株中 CXCR4 的表达。

3 讨论

多西环素是临床上常用的抗生素, 虽然近年来有报道显示其具有一定的抗肿瘤作用, 但关于多西环素抗肿瘤的相关机制目前尚不清楚。以往的研究显示在主动脉平滑肌细胞中, 多西环素可以通过上调基质金属蛋白酶抑制因子 1(TIMP-1)的表达来抑制 MMPs 的分泌^[11], 而在人口腔鳞状细胞癌中, 多西环素可通过下调 MMP-9 及 MMP-2 的表达来抑制肿瘤细胞的侵袭^[8]。我们的实验首次证实多西环素可以抑制卵巢癌细胞 HO8910 的增殖, 其与顺铂联合用药时能增加顺铂的化疗效应。

人类趋化因子 SDF-1 及其受体 CXCR4 与人类多种肿瘤转移密切相关, CXCR4 在一些肿瘤细胞系、原发肿瘤组织均呈高表达。SDF-1 在肿瘤细胞潜在转移靶器官的表达量比非常规转移靶器官高, 肿瘤细胞利用 CXCR4 与其天然配体间的趋化效应实现远距离转移。目前已有研究证实 SDF-1/CXCR4 与卵巢癌细胞增殖及转移均密切相关^[12]。70%~90%的卵巢癌细胞分泌 SDF-1^[13], 在卵巢癌患者恶性腹水中也发现高水平的 SDF-1^[14]。PI3K/Akt 及 ERK 通路可以参与铂类耐药的发生^[15-16], 而 SDF-1α/CXCR4 通路可以引起钙离子活化, 导致细胞内 cAMP 降低, 从而激活包括 PI3K/Akt 及 ERK 在内的多条信号通路^[17-18]。这些研究提示 SDF-1/CXCR4 细胞通路可能参与了卵巢癌顺铂耐药的过程。由此我们设想, 多西环素对卵巢癌细胞的抑制作用可能也是通过 SDF-1/CXCR4 通路实现。我们的实验证实, 卵巢癌细胞 HO8910 中有 CXCR4 mRNA 及蛋白的表达, 多西环素作用后 CXCR4 蛋白表达降低, 提示多西环素可能通过对 SDF-1/CXCR4 通路的调节进一步激活下游一些信号通路, 如 PI3K/Akt 或 ERK, 进而增加卵巢癌细胞对顺铂化疗的敏感性。铂类耐药的产生虽然包括药物浓度蓄积减少、细胞解毒或代谢功能增强、DNA 损伤的修复以及激活细胞中一些与细胞凋亡相关的信号通路^[19], 但具体机制尚需进一步深入的研究。

综上所述, 我们的实验首次证实多西环素可抑制卵巢癌细胞 HO8910 的增殖, 其与顺铂联合用药对顺铂的化疗起到一定的增敏作用; 多西环素对卵巢癌细胞的抑制作用可能通过抑制 CXCR4 的表达实现。

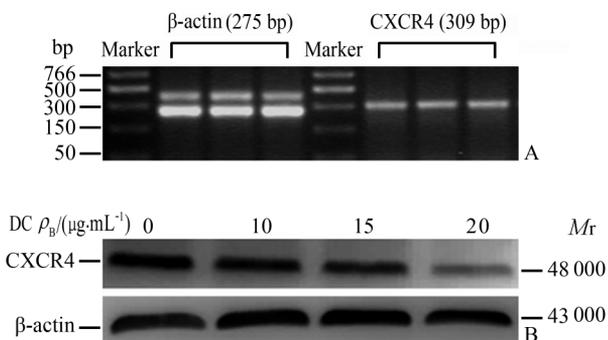


图 1 多西环素对卵巢癌细胞中 CXCR4 表达的影响

Fig 1 Effect of doxycycline on CXCR4 expression in ovarian cancer cells

DC: Doxycycline. A: CXCR4 mRNA expression in ovarian cancer cells; B: Doxycycline inhibited CXCR4 expression in ovarian cancer cells

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] Bray F, Ren J S, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132: 1133-1145.
- [2] Vaughan S, Coward J I, Bast RC Jr, Berchuck A, Berek J S, Brenton J D, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 719-725.
- [3] Suh D H, Kim K, Kim J W. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2011[J]. *J Gynecol Oncol*, 2012, 23: 53-64.
- [4] Gubbels J A, Claussen N, Kapur A K, Connor J P, Pantankar M S. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer[J]. *J Ovarian Res*, 2010, 3: 8.
- [5] Qadri I, Iwahashi M, Capasso J M, Hopken M W, Flores S, Schaack J, et al. Induced oxidative stress and activated expression of manganese superoxide dismutase during hepatitis C virus replication: role of JNK, p38 MAPK and AP-1[J]. *Biochem J*, 2004, 378: 919-928.
- [6] Minet E, Michel G, Mottet D, Piret J P, Barbieux A, Raes M, et al. c-JUN gene induction and AP-1 activity is regulated by a JNK-dependent pathway in hypoxic HepG2 cells[J]. *Exp Cell Res*, 2001, 265: 114-124.
- [7] Judson I, Kelland L R. New developments and approaches in the platinum arena[J]. *Drugs*, 2000, 59: 29-36.
- [8] Shen L C, Chen Y K, Lin L M, Shaw S Y. Anti-invasion and anti-tumor growth effect of doxycycline treatment for human oral squamous-cell carcinoma--*in vitro* and *in vivo* studies [J]. *Oral Oncol*, 2010, 46: 178-184.
- [9] Sun T, Zhao N, Ni C S, Zhao X L, Zhang W Z, Su X, et al. Doxycycline inhibits the adhesion and migration of melanoma cells by inhibiting the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK)[J]. *Cancer Lett*, 2009, 285: 141-150.
- [10] Tang H, Sampath P, Yan X, Thorne S H. Potential for enhanced therapeutic activity of biological cancer therapies with doxycycline combination[J]. *Gene Ther*, doi: 10. 1038/gt. 2012. 96. [Epub ahead of print]
- [11] Yao J S, Shen F, Young W L, Yang G Y. Comparison of doxycycline and minocycline in the inhibition of VEGF-induced smooth muscle cell migration [J]. *Neurochem Int*, 2007, 50: 524-530.
- [12] Barbieri E, Bajetto A, Florio T. Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target [J]. *J Oncol*, 2010, 4: 26956.
- [13] Lau B, Kane A. SDF1/CXCL12 is involved in recruitment of stem-like progenitor cells to orthotopic murine malignant mesothelioma spheroids [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30: 2153-2160.
- [14] Miyanishi N, Suzuki Y, Simizu S, Kuwabara Y, Banno K, Umezawa K. Involvement of autocrine CXCL12/CXCR4 system in the regulation of ovarian carcinoma cell invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 403: 154-159.
- [15] Nonaka M, Itamochi H, Kawaguchi W, Kudoh A, Sato S, Uegaki K, et al. Activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway overcomes cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells [J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2012, 22: 922-929.
- [16] Yoon H, Min J K, Lee J W, Kim D G, Hong H J. Acquisition of chemoresistance in intrahepatic cholangiocarcinoma cells by activation of AKT and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405: 333-337.
- [17] Ganju R K, Brubaker S A, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, et al. The α -chemokine, stromal cell-derived factor-1 α , binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 23169-23175.
- [18] Sotsios Y, Whittaker G C, Westwick J, Ward S G. The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes [J]. *J Immunol*, 1999, 163: 5954-5963.
- [19] Ohmichi M, Hayakawa J, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y. Mechanisms of platinum drug resistance [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2005, 26: 113-116.

[本文编辑] 尹 茶