

洛铂用于治疗宫颈癌的作用机制研究^{*}

昌睿杰¹, 陈秀兰^{2△} (1. 湖北省十堰市太和医院 442000; 2. 湖北省十堰市妇女儿童医院 442000)

【摘要】 目的 探讨洛铂用于治疗宫颈癌的作用机制。**方法** 体外培养宫颈癌 Caski 细胞, 取指数生长期的 Caski 细胞进行实验, 分为实验组和对照组。MTT 比色法检测洛铂对 Caski 细胞增殖的抑制作用; 根据洛铂作用 Caski 细胞的 IC₅₀ 曲线, 选用 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 洛铂作用 24 h 后, 分别收集实验组和对照组细胞, 提取细胞核蛋白、线粒体蛋白, 双向电泳技术分离蛋白质, PDQuest 软件分析洛铂处理前后差异表达的细胞核、线粒体蛋白组, 选取明显表达差异在 2 倍以上的蛋白质斑点, 进行串联飞行时间质谱分析。**结果** 洛铂能够抑制宫颈癌 Caski 细胞的增殖并诱导其凋亡, 随洛铂作用时间和浓度的变化而变化。经 2DE 电泳和串联飞行时间质谱分析后, 成功鉴定了 2 个细胞核蛋白, 4 个线粒体蛋白。**结论** 洛铂能显著抑制宫颈癌 Caski 细胞增殖。洛铂可干扰细胞能量代谢、通过线粒体氧化呼吸链的损伤诱导肿瘤细胞发生凋亡。

【关键词】 洛铂; Caski 细胞; 蛋白质组

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 07. 013 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0896-02

Study on action mechanism of lobaplatin used in treating cervical cancer^{*} CHANG Rui-jie¹, CHEN Xiu-lan^{2△} (1. Shiyan TaiHe Hospital Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Shiyan Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the action mechanism of lobaplatin for the treatment of cervical cancer. **Methods** The cervical cancer Caski cells were cultured in vitro. The exponential growth phase of Caski cells were taken for conducting the experiment and divided into the experimental group and the control group. The inhibiting effect of lobaplatin on the proliferation of caski cells was detected by using the MTT method; according to the IC₅₀ curve of lobaplatin acting on Caski cells, 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lobaplatin was selected for 24 h acting, the cells in the experimental group and the control group were respectively collect for extracting the nucleus protein, mitochondria protein. The two-dimensional electrophoresis was used to separate proteins. The differentially expressed nucleus, mitochondria proteome before and after lobaplatin treatment were analyzed by the PDQuest software. The protein spots with the more than twice of expression differences were selected for conducting the analysis of liquid chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry (LC/MS/MS). **Results** Lobaplatin could inhibit the proliferation of cervical cancer Caski cell and induced its apoptosis, which was changed with the changes of action time and concentration. After 2-DE electrophoresis and LC/MS/MS analysis, 2 nuclear proteins and 4 mitochondrial proteins were successfully identified. **Conclusion** Lobaplatin could significantly inhibit cervical cancer Caski cell proliferation. Lobaplatin could interfere with the cell energy metabolism, induces the tumor cell apoptosis through mitochondrial oxidative respiratory chain damage.

【Key words】 lobaplatin; Caski cell; proteome

我国宫颈癌的发病率在发展中国家居首位^[1-2]。目前治疗宫颈癌最有效的化疗药物是铂类药物^[3]。洛铂是第 3 代铂类衍生物, 疗效好、毒性小, 显示了其在肿瘤治疗中的重要作用, 已有研究表明洛铂对顺铂耐药的卵巢癌细胞的增殖具有抑制作用^[4-5]。本研究对洛铂用于治疗宫颈癌的作用机制进行分析, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 注射用洛铂相对分子质量 397.34, 规格 10 mg。购自海南长安国际制药有限公司, 国药准字 H20080359; Caski 人宫颈癌肠转移细胞, 购自中国科学院上海生命科学院

细胞库, 含有完整的 HPV-16 (每个细胞大约 600 copy) 和 HPV-18 相关序列。

1.2 方法

1.2.1 MTT 比色法检测洛铂对 Caski 细胞最佳抑制浓度和时间 胰酶消化对数生长期细胞, 制备成细胞悬液, 接种在 96 孔板中。设不同洛铂浓度组 (分别为 2、4、6、8、12、16 和 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和对照组 (洛铂 = 0), 每组设 5 个复孔, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱内培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后测定各孔吸光度 A 值 (490 nm)。以上实验重复 4 次, 取平均值。洛铂对宫颈癌 Caski 细胞的抑

^{*} 基金项目: 湖北省十堰市科技局科研立项资助项目 (ZD2012043)。

作者简介: 昌睿杰, 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤疼痛类工作。 △ 通讯作者, E-mail: 267185504@qq.com。

制率=1-(实验组平均 A 值/对照组平均 A 值)×100%。计算洛铂半数抑制率(IC50)^[6]。

1.2.2 按试剂盒提取细胞核、线粒体蛋白,利用双向(2-DE)电泳技术分离蛋白质,PDQuest 软件分析洛铂处理前后差异表达的细胞核、线粒体蛋白组,选取明显表达差异在 2 倍以上的蛋白质斑点,进行串联飞行时间质谱分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 洛铂对宫颈癌 Caski 细胞的细胞毒作用 不同浓度洛铂

表 1 洛铂对宫颈癌细胞的细胞毒作用

洛铂浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	24 h		48 h		2 h	
	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)	OD 值($\bar{x} \pm s$)	抑制率(%)
0	0.495 $\pm$ 0.014	—	0.697 $\pm$ 0.066	—	1.029 $\pm$ 0.065	—
2	0.453 $\pm$ 0.043	8.48	0.407 $\pm$ 0.039	41.75	0.500 $\pm$ 0.010	51.41
4	0.411 $\pm$ 0.062	16.97	0.370 $\pm$ 0.019	46.92	0.271 $\pm$ 0.027	73.66
6	0.379 $\pm$ 0.050	23.43	0.311 $\pm$ 0.008	55.38	0.113 $\pm$ 0.029	89.02
8	0.362 $\pm$ 0.035	26.87	0.166 $\pm$ 0.005	76.18	0.033 $\pm$ 0.016	96.79
12	0.251 $\pm$ 0.033	49.29	0.040 $\pm$ 0.010	94.26	0.015 $\pm$ 0.004	99.61
16	0.140 $\pm$ 0.029	71.72	0.020 $\pm$ 0.009	97.13	0.017 $\pm$ 0.003	99.71
24	0.042 $\pm$ 0.020	91.52	0.011 $\pm$ 0.007	98.42	0.015 $\pm$ 0.002	99.81
32	0.017 $\pm$ 0.007	96.57	0.009 $\pm$ 0.006	98.71	0.010 $\pm$ 0.001	99.90
72	0.011 $\pm$ 0.005	97.63	0.007 $\pm$ 0.002	98.93	0.012 $\pm$ 0.001	99.94

注:—表示无数据。

2.2 Caski 细胞线粒体蛋白的 2-DE 差异蛋白质图谱 分别用对照组和实验组的 Caski 细胞线粒体蛋白进行 2-DE 分离,使用 PDQuest 软件对凝胶图谱进行图像分析(图 1),选取在双向电泳凝胶上重复性好、表达量在 2 倍以上的差异蛋白点进行质谱鉴定,成功鉴定出 5 个蛋白质,有 4 个为线粒体蛋白:线粒体醛脱氢酶、线粒体乙酰辅酶 A 硫酯酶 1、丙酮酸脱氢酶 E1 复合体和 NADPH24-kda 脱氢酶;1 个为基质细胞蛋白。

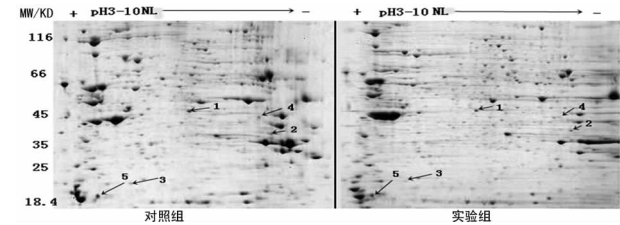


图 1 线粒体蛋白双向电泳图谱

3 讨 论

细胞增殖是生命活动的基础,肿瘤细胞特性是细胞逃逸正常细胞增殖调控体系,而自主地无限生长,失去正常分化的能力,甚至回到胚胎细胞状态。化疗药物铂类属于非周期特异性药物,即对肿瘤各期细胞均有杀伤作用。刘萍萍等^[7]研究表明,洛铂对顺铂耐药的卵巢癌细胞株体外生长有明显抑制增殖作用,其抑制率呈现明显的时间和剂量依赖关系。本研究采用不同浓度洛铂作用于宫颈癌 Caski 细胞株,分别观察用药 24、48、72 h 后结果表明,洛铂明显抑制 Caski 细胞的增殖,并且抑

(实验组)作用宫颈癌细胞株 Caski 分别达到 24、48、72 h 后,各实验组与对照组(洛铂=0)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明洛铂明显抑制 Caski 细胞的增殖(表 1)。随着药物作用时间的延长和药物浓度的增加,抑制率相应增加。16、24、32 $\mu\text{g/mL}$ 洛铂的同一浓度作用细胞 48 h 和 72 h 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各组洛铂作用 24、48、72 h 在同一浓度上比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。从两两比较结果来看,洛铂 12、16、24、32 $\mu\text{g/mL}$ 作用 72 h 时,差异无统计学意义($P > 0.05$),即药物到达一定浓度后,抑制率随药物浓度增加变化不明显。

制率有时间和剂量依赖关系。两两比较结果显示,洛铂 12、16、24、32 $\mu\text{g/mL}$ 作用 72h 后,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明药物达到一定浓度后,抑制率随药物浓度的增加变化不明显,所以当抑制率达到一定程度后,再增加化疗药物剂量时,抑制率增加不明显。

亚细胞技术手段在研究肿瘤发生和发展过程中蛋白浓度水平及功能变化方面得到越来越多的重视和应用^[8]。结合亚细胞蛋白质组分离技术,有可能发现更多以往在全细胞水平上未能发现的蛋白浓度变化,这在研究肿瘤生物标志物及肿瘤发生机制,药物作用机制及作用后蛋白质的翻译修饰等方面具有重要作用,从而为开发肿瘤生物标志物等提供更多的线索。本研究结果显示,12 $\mu\text{g/mL}$ 洛铂作用宫颈癌细胞 24 h 后,实验组中共有 4 个线粒体差异表达蛋白,均表达下调:线粒体醛脱氢酶、丙酮酸脱氢酶 E1 复合体、线粒体乙酰辅酶 A 硫酯酶 1、和 NADPH24-kda 脱氢酶。这些酶在洛铂作用后出现下调,说明此时线粒体氧化磷酸化功能下降。细胞的有氧呼吸主要在线粒体中进行,有氧呼吸的主要途径是三羧酸循环,这个过程各种酶类的变化会导致呼吸链的失调,进而导致细胞代谢紊乱。本次研究中,线粒体氧化呼吸链的各种酶类发生变化,线粒体中与细胞增殖、能量代谢等相关的许多蛋白质也有可能发生了变化。因此,线粒体损伤不仅可导致细胞能量代谢障碍,而且还可诱导细胞凋亡的发生,从分子水平上深入研究洛铂诱导 Caski 细胞能量代谢障碍及细胞凋亡,有(下转第 901 页)

脑科学杂志,2014,23(6):519-521.

[3] Wang GC,Zheng JH,Yang B,et al. Impacts of histological prostatitis on sexual function and lower urinary tract symptoms in patients with benign prostatic hyperplasia[J]. Urology,2013,82(5):1094-1097.

[4] Mo MQ,Long LL,Xie WL,et al. Sexual dysfunctions and psychological disorders associated with type III a chronic prostatitis;a clinical survey in China[J]. Int Urol Nephrol,2014,46(12):2255-2261.

[5] Lee JH, Lee SW. Relationship between premature ejaculation and chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. J Sex Med,2015,12(2):216.

[6] 梁国庆,沈育忠,李建辉,等. 中老年男性 ED 患者血清雄激素水平分析[J]. 中华男科学杂志,2014,20(2):186-188.

[7] Kahraman H,Sen B,Koksal N,et al. Erectile dysfunction and sex hormone changes in chronic obstructive pulmonary disease patients[J]. Multidiscip Respir Med,2013,8(8):66.

[8] Mitkov MD. Effect of transdermal testosterone or alpha-lipoic acid on erectile dysfunction and quality of life in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Folia Med,2013,55(1):55-63.

[9] 沈育忠,郑俊彪,李建辉,等. 血清睾酮水平与中老年男性勃起功能障碍的相关性研究[J]. 浙江医学,2015,37(8):636-638.

[10] Naidan N,Rivaad OE,Muukhai N,et al. Testosterone Deficiency with Erectile Dysfunction in Mongolian Men[J]. World J Mens Health,2013,31(2):170-175.

[11] Rosenblatt A,Faintuch J,Cecconello I. Sexual hormones and erectile function more than 6 years after bariatric surgery[J]. Surg Obes Relat Dis,2013,9(5):636-640.

[12] 周莉,骆永伟,王永,等. 雌激素诱导 SD 大鼠前列腺炎与内环境改变的关系[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(2):33-37.

[13] Maiorino MI. Lifestyle modifications and erectile dysfunction;what can be expected[J]. Asian J Androl,2014,17(1):5-10.

(收稿日期:2015-09-06 修回日期:2015-11-15)

(上接第 897 页)
助于洛铂的作用机制,可能为肿瘤的预防和治疗预防提供科学依据。

参考文献

[1] Yan GR,Xiao CL,He GW,et al. Global phosphoproteomic effects of natural tyrosine kinase inhibitor genistein on signaling pathways[J]. Proteomics,2010,10(5):976-986.

[2] Leth LR,Lund RR,Dizel HJ. Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery[J]. Mol Cell Proteomics,2010,9(7):1369-1382.

[3] Shi JF,Qiao YL,Smith JS,et al. Epidemiology and prevention of human Papillomavirus and cervical cancer in China and Mongolia[J]. Vaccine,2008,26(12):53-59.

[4] Chaiyarit S,Thongboonkerd V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study[J]. Anal Biochem,2009,394(2):249-258.

[5] Andronikos NM,Chen EI,AIK N. Proteomics-based discovery of a novel,struct-ucturally unique,and envelopmentally regulated plasminogen receptor. Plg-RKT. a major regulator of cell surface plasminogen activation[J]. Blood,2010,115(7):1319-1330.

[6] 赵斌,葛金芳,朱娟娟,等. 小议在 MTT 法测细胞增殖抑制率中 IC50 的计算方法[J]. 安徽医药,2007,11(9):834-836.

[7] 刘萍萍,张灿珍,王羽丰. 洛铂诱导顺铂耐药卵巢癌 SK-OV3/DDP 细胞的凋亡[J]. 肿瘤防治研究,2007,34(11):829-832.

[8] Arcinas A,Yen TY,Kebebew E,et al. Cell surface and secreted protein profiles of human thyroid cancer cell lines-reveal distinct glycoprotein patterns[J]. J Proteome Res,2009,8(8):3958-3968.

(收稿日期:2015-06-04 修回日期:2015-11-18)

医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。