

· 基础论著 ·

# 顺铂抑制 IL-8 诱导人卵巢癌 SKOV-3 细胞的迁移作用及相关机制的研究

李妍雨 张蓓

**【摘要】 目的** 观察外源性人白细胞介素-8(IL-8)对人卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移的影响,及顺铂对它的干预作用,初步探讨顺铂抑制细胞迁移的机制。**方法** 顺铂处理 SKOV-3 细胞,MTT 法确定顺铂使用的最佳作用浓度;Transwell 法观察顺铂对 IL-8 诱导 SKOV-3 细胞迁移的干预作用;ELISA 法检测顺铂分泌 IL-8 情况;Western blot 法检测 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平。**结果** MTT 结果显示:与对照组相比,顺铂浓度为 100  $\mu$ g/ml 对细胞增殖有显著抑制作用( $P < 0.05$ )。浓度区间在 200 ~ 400  $\mu$ g/ml 的顺铂对细胞的增殖也有抑制作用,该范围内对细胞的生长抑制率无统计学差异( $P > 0.05$ )。浓度为 100  $\mu$ g/ml 的顺铂,分别作用于 SKOV-3 细胞 24 h、48 h、72 h,各时间组比较无统计学差异( $P > 0.05$ )。IL-8(100 ng/L)处理细胞后,SKOV-3 细胞的迁移能力增强,顺铂(100  $\mu$ g/ml)具有抑制 IL-8 诱导的 SKOV-3 细胞迁移的作用,随着浓度的增高,迁移的细胞数由 241.67 减少到 155.99,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。顺铂刺激细胞后,与空白对照组相比,NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平降低( $64.04 \pm 4.6$ )。**结论** IL-8 具有促进人卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移的作用,顺铂可能是通过 NF- $\kappa$ B 细胞信号通路对卵巢癌细胞的迁移起抑制作用。

**【关键词】** 卵巢肿瘤; 顺铂; 白细胞介素 8; 细胞运动

**Mechanisms of DDP inhibiting cell migration in SKOV3 cells induced by extraneous IL-8** LI Yan-yu, ZHANG

Bei. Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China

Corresponding author: ZHANG Bei, Email: bettyzhang10@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the effect of exogenous human interleukin-8 on human ovarian cancer SKOV-3 cell migration and the intervention role of cisplatin on it; to preliminary explore the mechanisms of DDP inhibiting cell migration. **Methods** SKOV-3 cells were treated with DDP. Optimal concentration and effect time of DDP was determined with MTT assay. Transwell assay were used to study the intervention effect of DDP. Western blot assay was applied to detect NF- $\kappa$ B protein expression levels. **Results** MTT assay: compared with the control group, the best concentration of DDP which had a significant inhibitory effect on cell proliferation was 100  $\mu$ g/ml ( $P < 0.05$ ). The concentration of DDP in the range of 200  $\mu$ g/ml to 400  $\mu$ g/ml also had the intervention effect, but cell growth inhibition rate between these groups showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). DDP (100  $\mu$ g/ml) were treated on SKOV-3 cells 24 h, 48 h, 72 h respectively, the inhibition rate of different times showed no significant difference ( $P > 0.05$ ). The migratory ability of cells SKOV-3 was increased when IL-8 (100 ng/L) was added in. DDP (100  $\mu$ g/ml) inhibited IL-8 induced SKOV-3 cell migration, and as the concentration increased the number of cell migration was reduced from 241.67 to 155.99 ( $P < 0.05$ ). Cells dealt with DDP, which NF- $\kappa$ B protein expression level were reduced significantly ( $64.04 \pm 4.6$ ). **Conclusion** IL-8 can promote the migration of human ovarian cancer cells SKOV-3. DDP can inhibit the migration, and this process probably depends on the activating of the NF- $\kappa$ B pathway.

**【Key words】** Ovarian neoplasms; Cisplatin; Interleukin-8; Cell movement

卵巢癌是女性生殖系统三大恶性肿瘤之一,可发生在任何年龄,45 岁以上为高峰,近年发病率有上升趋势。由于多数卵巢癌患者临床症状不典型,且尚无成

熟的早期诊断方法,在发现时 70% 均为晚期 (FIGO III 或 IV 期),其 5 年生存率不超过 30%<sup>[1]</sup>,死亡率居妇科恶性肿瘤首位<sup>[2]</sup>,治疗极其困难,严重威胁妇女生命健康。故卵巢癌的侵袭转移和化疗耐药始终是治疗的两大难点。白细胞介素-8 (Interleukin-8, IL-8) 又称 CXCL8,是一种 CXC 型炎症趋化因子。研究表明,卵巢癌患者一致性地高表达 IL-8,腹水中水平明显高于血清,卵巢癌囊液中的 IL-8 水平较良性肿瘤高 13 倍。在卵

DOI:10.3877/ema.j.issn.1674-0785.2013.10.043

作者单位: 221000 江苏省,徐州医学院(李妍雨);徐州市中心医院妇产科(张蓓)

通讯作者: 张蓓, Email: bettyzhang10@163.com

巢癌方面,近年研究表明<sup>[3]</sup>,在卵巢癌中检测到 IL-8 含量的高表达,并发现其与肿瘤的血管生成、生长、转移、复发等密切相关。相关文献报道表明:卵巢癌患者在手术治疗前血清 IL-8 水平非常显著地高于正常人。IL-8 作为肿瘤细胞自分泌的生长因子诱导自身增殖,促进了肿瘤的生长<sup>[4]</sup>。因此,本研究以卵巢癌细胞株 SKOV-3 为实验对象进行研究。研究顺铂抑制 IL-8 诱导的人卵巢癌 SKOV-3 细胞的迁移作用及相关机制,初步探讨 IL-8 在细胞迁移中的信号通路,以期对临床用药和开发提供科学依据并积累实验资料。

## 材料与方 法

1. 材料:RPMI-1640 培养基及胎牛血清(碧云天生物技术研究所),胰蛋白酶(碧云天生物技术研究所),卵巢癌细胞株(SKOV-3 南京凯基),顺铂注射液(江苏豪森药业),细胞裂解液(美国 CST 公司),Transwell 小室(美国 Corning 公司),四甲基偶氮唑盐(MTT),重组人 IL-8,兔抗人 NF- $\kappa$ B p100/p52 Antibody, $\beta$ -action pAb,IL-8 检测试剂盒,BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒、PMSF、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、Western 及 IP 细胞裂解液(碧云天生物技术研究所)。

2. MTT 法检测顺铂对 SKOV-3 细胞的增殖情况:将卵巢癌 SKOV-3 细胞消化,计数后,以  $1 \times 10^4$  个/孔接种于 96 孔板中,48 h 后细胞融合至 80% 左右,加入不同浓度的顺铂(3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400  $\mu\text{g/ml}$ ),24 h、48 h、72 h 后每孔加入 100  $\mu\text{l}$  的 MTT (1 mg/ml),37  $^{\circ}\text{C}$  继续培养 3 h,弃上清每孔,加入 100  $\mu\text{l}$  DMSO,于摇床上摇 10 min,酶标仪比色(波长 490 nm),测光密度值 D490,并分别计算顺铂对 SKOV3 细胞的抑制率。抑制率 =  $1 - (\text{药物组 D490} - \text{空白组 D490}) \times 100\%$ 。通过实验验证顺铂对 SKOV-3 细胞的作用及影响。从而为后续的实验选择最佳浓度和作用时间。

3. Transwell 小室实验检测细胞迁移情况:具体方法参照 Transwell 说明书进行。下室中加入 IL-8 (100 ng/ml),将 SKOV3 细胞悬液接种于上室。孵育 12 h 后,具体方法参照 Transwell 说明书进行。下室中加入 IL-8 (100 ng/ml),将 SKOV3 细胞悬液接种于上室。孵育 12 h 后,向 Transwell 小室的下室中加入含不同浓度的顺铂(50、100、200  $\mu\text{g/ml}$ )的 RPMI-1640 (10% FBS)培养基及空白对照组(不加入顺铂)与 IL-8 共孵育 24 h 培养箱中培养 24 h。设置 4 组,A 组加入顺铂 50  $\mu\text{g/ml}$ ,B 组加入顺铂 100  $\mu\text{g/ml}$ ,C 组加入顺铂 200  $\mu\text{g/ml}$ ,对照组不加入顺铂。取出上室,用棉签擦去微孔上层的细胞,PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛中固

定 10 min 后苏木精染色 15 min,PBS 再洗涤 3 次。倒置显微镜 200 倍视野下计数上室微孔下层的细胞。计数 5 个视野细胞的平均数,实验重复 3 次。

4. ELISA 法检测 IL-8 含量:收集对数增殖期 SKOV-3 细胞,以含 100 ml/L 小牛血清的 RPMI-1640 培养液调整细胞数为  $5 \times 10^4$  /ml,分别接种于 6 孔细胞培养板,5 ml/孔,然后加入顺铂(终浓度分别为 6.25、12.5、25、50 和 100  $\mu\text{g/ml}$ ),同时设不加药的空白对照孔,继续于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 48 h 后分别取细胞培养上清各 3 ml,离心 1500 r/min  $\times$  10 min,吸上清 2 ml 进行细胞因子 IL-8 的检测。检测方法严格按试剂操作说明书进行,每样本检测重复 3 次。每组实验重复 3 次,取平均值。计算:用标准品制备标准曲线,将检测样本所得 OD 值根据标准曲线查找相应的 IL-8 浓度。

5. Western blot 法检测 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平:分为 A、B、C、D、E、F 六组:A:空白对照,不加任何干预因素,每孔加入细胞上清 100  $\mu\text{g/L}$ 。B:以顺铂浓度 6.25  $\mu\text{g/ml}$  加入 96 孔细胞培养板中,处理细胞 24 h 后收集上清。C:以顺铂浓度 12.5  $\mu\text{g/ml}$  加入 96 孔细胞培养板中,处理细胞 24 h 后收集上清。D:以顺铂浓度 25  $\mu\text{g/ml}$  加入 96 孔细胞培养板中,处理细胞 24 h 后收集上清。E:以顺铂浓度 50  $\mu\text{g/ml}$  加入 96 孔细胞培养板中,处理细胞 24 h 后收集上清。F:以顺铂浓度 100  $\mu\text{g/ml}$  加入 96 孔细胞培养板中,处理细胞 24 h 后收集上清将含量测定后的蛋白样品与  $5 \times$  Loading buffer 混合,于 100  $^{\circ}\text{C}$  煮沸 5 min,12 000 r/m 离心 5 min,取 20  $\mu\text{l}$  样品上清缓慢加样,并加入蛋白质 Marker。电泳后转入 PVDF 膜上,转膜结束后,取出 PVDF 膜,在室温浸置于用 TBST 配制的 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 2 h。将 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 一抗稀释液,4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱孵育过夜;将一抗孵育后的膜置于盛有 TBST 溶液的平皿中,摇床摇动,10 min  $\times$  3 次;然后将膜封闭于用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释二抗溶液中,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h;将膜置于盛有 TBST 溶液的平皿中,摇床摇动,10 min  $\times$  3 次。显色。按照 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒操作手册进行显色。Quantity One 软件得到的条带进行灰度分析。

6. 统计学分析:采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,实验数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间均数比较用单因素方差分析(One-Way ANOVA)(两两比较用 LSD 或 Dunnett T3 法),相关性检验用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. MTT 法检测顺铂对 SKOV-3 细胞的生长抑制作

用:为了选择合适的浓度以及排除时间对于本实验的影响,我们用 MTT 法检测了顺铂处理 SKOV-3 细胞 24, 48, 72 h 后细胞增殖情况。结果如图 1 所示,与对照组相比,顺铂在 200 ~ 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  浓度区间内,对细胞的生长抑制率无统计学差异( $P > 0.05$ ),而顺铂 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  对细胞增殖有显著抑制作用( $P < 0.05$ )。因此,本文选取顺铂浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。选取该浓度顺铂作用于 SKOV-3 细胞后 24, 48, 72 h 与对照组相比, $P < 0.05$ , 48, 72 h 组无统计学差异,可排除时间对于本实验的影响。

2. IL-8 对 SKOV-3 细胞迁移作用的影响及顺铂对 IL-8 促 SKOV-3 细胞迁移作用的干预:Transwell 小室实验结果如图 2, 3 所示,从上述结果中可以看出, C 组检验结果与对照组相比, $P < 0.05$ ,说明 C 组与对照组之间差异具有统计学意义, A 组与对照组相比, $P > 0.05$ ,差异无统计学意义。通过实验表明,高浓度的顺铂有抑制卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移的作用,该作用随着浓度的增加而加强。

3. 顺铂对 SKOV-3 细胞分泌 IL-8 的影响:如表 1 所示,空白对照组以及加入不同浓度的顺铂对 SKOV-3 细胞分泌 IL-8 影响不明显,各组之间比较无统计学差异( $P > 0.05$ )。结合 Transwell 小室实验进一步说明,顺铂对于卵巢癌 SKOV-3 细胞分泌 IL-8 无影响,顺铂可以抑制 IL-8 诱导的卵巢癌细胞的迁移,因此顺铂作用于卵巢癌细胞,不产生对于恶性肿瘤细胞有害的 IL-8,同时可以抑制恶性肿瘤细胞的迁移。

表 1 顺铂对 SKOV-3 细胞分泌 IL-8 的影响( $\text{ng}/\text{L}, \bar{x} \pm s, n = 9$ )

顺铂浓度	IL-8 含量
100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	231.8 $\pm$ 5.2
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	239.8 $\pm$ 6.2
25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	233.4 $\pm$ 7.6
12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	231.2 $\pm$ 5.8
6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	229.9 $\pm$ 6.1
0	232.5 $\pm$ 6.5

4. 顺铂对 NF- $\kappa\text{B}$  蛋白表达水平的影响:如图 4 所示,使用不同浓度顺铂刺激细胞后,与空白对照组相比, NF- $\kappa\text{B}$  蛋白表达水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明顺铂可以减低 NF- $\kappa\text{B}$  蛋白表达水平,提示顺铂可能通过激活 NF- $\kappa\text{B}$  通路进而抑制卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移及增殖。

## 讨 论

卵巢癌死亡率长期居于女性生殖系统三大恶性肿瘤首位,目前,传统的肿瘤治疗模式(手术、化疗和放疗)是治疗卵巢癌的主要手段,但对正常组织的损伤则

是不可避免的。随着肿瘤免疫学的飞速发展,肿瘤生物治疗将作为手术、化疗、放疗等传统治疗方法的重要补充,在控制微小残余癌灶,延缓复发,提高生存期和生存质量等方面发挥越来越重要的作用,是近十多年来发展较快的一项新型抗癌疗法。其中以细胞因子为主的免疫疗法及其抗肿瘤作用愈加为人们所重视。因此,找到卵巢癌增殖、转移中的细胞因子靶点是突破传统治疗,提高患者生存率的关键。

顺铂为铂的金属络合物,能与 DNA 结合,导致 DNA 双链间交联,可抑制细胞的有丝分裂与增殖,为一种细胞周期非特异性药物,可用于多种肿瘤的化疗,是目前卵巢癌治疗中的一线化疗药物。本文通过 MTT 法筛选出合适的浓度以排除顺铂作用时间对于本实验的影响。目前已发现肿瘤微环境中炎症细胞各自产生的如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 等细胞因子和趋化因子可促进细胞生长和抑制突变细胞凋亡,在恶性肿瘤的生长与转移中起重要作用<sup>[5]</sup>。本文通过 Transwell 实验证实了外源性的 IL-8 可以促进卵巢癌 SKOV-3 细胞的迁移作用;而当加入顺铂后,发生迁移的细胞数量明显减少,说明顺铂具有抑制 SKOV-3 细胞迁移的作用。ELISA 结果表明,顺铂对于卵巢癌 SKOV-3 细胞分泌 IL-8 无影响,顺铂可以抑制 IL-8 诱导的卵巢癌细胞的迁移,因此顺铂作用于卵巢癌细胞,不产生对于恶性肿瘤细胞有害的 IL-8,同时可以抑制恶性肿瘤细胞的迁移。

炎症是涉及各种炎症细胞和炎症因子的病理生理反应。目前研究认为炎症在肿瘤的发生发展中起着至关重要的作用,炎症诱发肿瘤的机制可能包含两个主要方面:首先,肿瘤组织微环境的炎症细胞产生活性氧簇(ROS)和活性氮簇(NOS),导致细胞 DNA 损伤;其次,炎症细胞释放的细胞因子及趋化因子等增强了细胞增殖信号,促进细胞的快速增殖和分化,从而抑制细胞的凋亡<sup>[6]</sup>。

近年研究揭示<sup>[7]</sup>,肿瘤相关炎症涉及转录因子核因子途径。NF- $\kappa\text{B}$  参与免疫细胞的分化、增殖、活化,并参与某些细胞的生长调控以及具有抗细胞凋亡作用,在许多炎症反应细胞因子的激活过程中起核心作用<sup>[8]</sup>。

IL-8 的表达主要受激活蛋白(AP-1)和 NF- $\kappa\text{B}$  调控,它需要与两种 G 蛋白偶联受体 CXCR1 和 CXCR2 结合发挥生物学作用。

近年研究表明<sup>[9]</sup>,在多种恶性肿瘤组织中如黑色素瘤、胃肠道肿瘤、甲状腺癌、卵巢癌、肺癌等中均检测到 IL-8 含量的高表达,并发现其与肿瘤的血管生成、生长、转移、复发等密切相关。相关文献报道表明:卵巢癌患者在手术治疗前血清 IL-8 水平非常显著地高于正

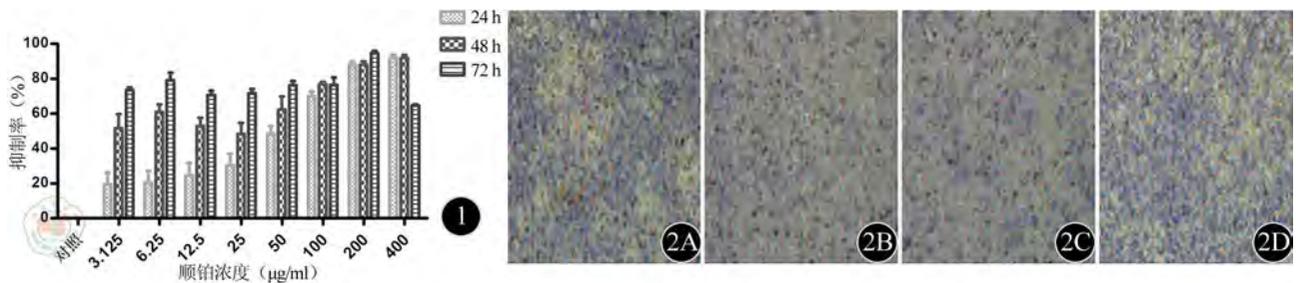


图1 顺铂对SKOV-3细胞株抑制率影响 图2 顺铂抑制IL-8诱导的人卵巢癌SKOV-3细胞迁移。2A: A组, 顺铂50 µg/ml, IL-8 100 ng/ml; 2B: B组, 顺铂100 µg/ml, IL-8 100 ng/ml; 2C: C组, 顺铂200 µg/ml, IL-8 100 ng/ml; 2D: 对照组, IL-8 100 ng/ml

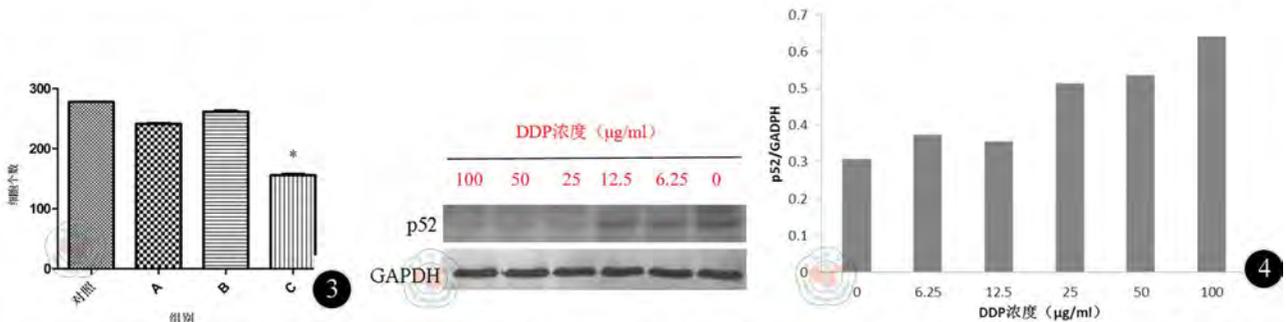


图3 顺铂对IL-8促SKOV-3细胞迁移作用的干预。与对照组比较, \*P<0.05 图4 不同浓度顺铂对NF-κB蛋白表达水平的影响

常人。IL-8 作为肿瘤细胞自分泌的生长因子诱导自身增殖,促进了肿瘤的生长<sup>[10]</sup>。

诱导癌细胞分泌 IL-8 的信号通路复杂。炎症因子如 TNF-α、脂多糖均能通过 NF-κB 信号通路,诱导 IL-8 的表达<sup>[9]</sup>。另外,MAPK 信号通路与 IL-8 也密切相关,p38MAPK、ERK1/2 磷酸化水平改变后通过调节 IL-8 mRNA 的稳定性<sup>[10-11]</sup>,具有促进肿瘤细胞的迁移作用。本文通过 Western blot 法提示了顺铂可能通过激活 NF-κB 通路进而抑制卵巢癌 SKOV-3 细胞迁移及增殖。

包括卵巢癌在内的恶性肿瘤细胞是个多基因、多步骤的发展过程。特别是卵巢癌这种检出困难,扩散较快,发现多为晚期的恶性肿瘤细胞严重威胁人们的生命。所以寻找合适的治疗靶点是卵巢癌治疗中的关键问题以及最新进展。通过实验证明,IL-8 有促进卵巢癌细胞迁移的作用,同时实验证明,顺铂对于 IL-8 的生成没有影响,因此顺铂用于卵巢癌患者的预防转移的作用相对安全。通过本实验,可以提高人们对于IL-8 进一步的认识,同时提示抗炎治疗在卵巢癌的综合治疗中起着重要的作用,从控制卵巢癌转移的角度出发,也为我们在寻找卵巢癌治疗的道路上找到一个新的通路。

### 参 考 文 献

[1] Morotti M, Valenzano MM, Venturini PL, et al. Pemetrexed disodium in ovarian cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21:

437-449.

[2] Ratto GB, Costa R, Vassallo G, et al. Twelve-year experience with left atrial resection in the treatment of non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 2004, 78: 234-237.

[3] 孙晓明, 罗南萍. IL-8 在不同肿瘤患者血清中的表达. *放射免疫学杂志*, 2010, 23: 245-247.

[4] 朱学文. 卵巢癌患者手术治疗前后血清 CA125、VEGF 和 IL-8 水平检测的临床意义. *淮海医药*, 2011, 3: 19-20.

[5] Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res*, 2006, 4: 221-233.

[6] Li QQ, Chen ZQ, Cao XX, et al. Involvement of NF-kappaB/miR-448 regulatory feedback loop in chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells. *Cell Death Differ*, 2011, 18: 16-25.

[7] Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer; IL-6 and STAT3 complete the link. *Cancer Cell*, 2009, 15: 79-80.

[8] Bartels M, Schweda AT, Dreikhausen U, et al. Peptide-mediated disruption of NFkappaB/NRF interaction inhibits IL-8 gene activation by IL-1 or Helicobacter pylori. *J Immunol*, 2007, 179: 7605-7613.

[9] Subramaniam D, Ramalingam S, May R, et al. Gastrin-mediated interleukin-8 and cyclooxygenase-2 gene expression; differential transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Gastroenterology*, 2008, 134: 1070-1082.

[10] Lee JW, Wang P, Kattah MG, et al. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol*, 2008, 181: 6536-6545.

[11] Estrada Y, Dong J, Ossowski L. Positive crosstalk between ERK and p38 in melanoma stimulates migration and in vivo proliferation. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2009, 22: 66-76.

(收稿日期:2013-01-28)

(本文编辑: 戚红丹)