DOI:10.15972/j.cnki.43-1509/r.2020.04.013

·论著:妇产科疾病·

褪黑素对卵巢癌SKOV3细胞侵袭、迁移和血管生成的影响

陈亦清,朱雯婷,李振华,岑 怡,严鹏科*
(广州医科大学附属第三医院药剂科,广东 广州 510150)

摘 要: 研究褪黑素对卵巢癌SKOV3细胞侵袭、迁移和血管生成的影响。MTT实验、划痕实验和Transwell侵袭实验分别观察褪黑素对SKOV3细胞增殖、侵袭和迁移的影响。诱导HUVECs成管,观察褪黑素对其影响。Western blot法检测SKOV3细胞内血管内皮生长因子(VEGF)、钙黏附蛋白E(E-cadherin)、基质金属蛋白酶9(MMP9)和波形蛋白(Vimentin)的表达。建立卵巢癌移植瘤模型,免疫组化检测CD31的表达。结果显示,褪黑素能抑制卵巢癌SKOV3细胞的侵袭和迁移,并且明显下调MMP-9、Vimentin和VEGF蛋白的表达,上调E-cadherin的表达。此外,褪黑素抑制了HUVECs的小管生成,体内CD31的免疫组化结果也显示褪黑素能够抑制微血管密度。结果提示,褪黑素能抑制卵巢癌细胞的侵袭、迁移和血管生成。

关键词: 褪黑素; 卵巢癌; 侵袭; 迁移; 血管生成
中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A

Effect of melatonin on invasion, migration and angiogenesis of ovarian cancer SKOV3 cells

CHEN Yiqing, ZHU Wenting, LI Zhenhua, CEN Yi, YAN Pengke*
(*Department of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou* 510150, *Guangdong, China*)

Abstract: To evaluate the effects of melatonin on invasion, migration and angiogenesis of ovarian cancer SKOV3 cells. The effects of melatonin on proliferation, invasion and migration of SKOV3 cells were observed by MTT assay, scratch assay and transwell invasion experiment. Then, the tube formation was observed after treating the HUVECs with melatonin. Western blot was used to detect the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) E-cadherin, matrix metalloprotein-9(MMP-9) and Vimentin protein in SKOV3 cells. The HUVECs was prepared to study effect of melatonin on tube formation ability. In addition, the expression of CD31 was observed in vivo SKOV3 xenograft model. The results showed that melatonin could inhibit the invasion and migration of SKOV3 cells, and down-regulate the expression of proteins such as MMP-9, Vimentin and VEGF, while the expression of E-cadherin increased. Furthermore, melatonin inhibited the tube formation of HUVECs, and the immunohistochemical results of CD31 also showed that melatonin can inhibit microvessel density in vivo. The results suggested that melatonin may inhibit the invasion, migration and angiogenesis of ovarian cancer cells.

Key words: melatonin; ovarian cancer; invasion; migration; angiogenesis

血管生成在肿瘤生长转移扩散中起重要作用,抑制血管生成可预防癌症向恶性转化[1]。临床上已经有血管生成抑制剂被研发使用,但其具有毒性大、疗效有限等缺点。研究发现[2],褪黑素(melatonin,MEL)除了调节睡眠、觉醒周期和昼夜节律等作用外,还具抗炎[3]、抗氧化[4]、抗肿瘤[5-6]等多种药理作用。褪黑素的抗肿瘤活性涉及多种机制,包括对肿瘤细胞增殖的直接抑制,诱导凋亡等[7]。但是,褪黑素是否能抑制卵巢癌侵袭迁移和血管生成尚不明确。因此,本研究拟探讨褪黑素对卵巢癌细胞侵袭、迁移和血管生成的影响及其可能的作用机制,旨在为卵巢癌临床化疗方案的优化提供理论和实验依据。

收稿日期:2020-02-24;**修回日期:**2020-05-04
基金项目:广州医科大学附属第三医院2018年度博士启动科研项目(No.2018B06);广州市科技计划项目(No.201903010014).
* **通信作者,**E-mail:gysyypk@126.com.

1 材料与方法

1.1 细胞和主要试剂

人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞;人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs);雌性 BALB/c 裸鼠(广东省动物中心)15 只,4 周龄,体重 18 ~ 20 g。DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素双抗(HyClone 公司);褪黑素(纯度>95%)(Sigma 公司);MTT 粉末(索莱宝);Western 凝胶试剂盒(武汉博士德生物公司);E-钙黏蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloprotein-9, MMP-9)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血小板-内皮细胞粘附分子(platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31)、波形蛋白(Vimentin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)兔抗人单克隆抗体(CST 公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(康为世纪公司);CO_2 恒温培养箱(Thermo);蛋白电泳仪、转膜仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 细胞培养

SKOV3 细胞及 HUVECs 均使用含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL 的高糖 DMEM 培养基,均置于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度的细胞培养箱中培养,1 ~ 2 天更换一次新鲜培养基,待细胞生长融合至 90%,进行细胞传代。

1.3 SKOV3 细胞和 HUVECs 的体外细胞增殖实验

将对数生长期的 SKOV3 或 HUVECs 用胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)消化成细胞悬液,用含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 细胞培养液稀释成 5×10^4 个/mL,每孔 100 μL 加入 96 孔板中,加入不同浓度的褪黑素作用 24 h 后,移除细胞液,每孔加入 100 μL 含 0.5 mg/mL MTT 工作液,5% CO_2、37 ℃ 孵育 4 h。弃去上清,每孔加入 100 μL 二甲亚砜,低速振荡 10 min,使结晶充分溶解。用酶标仪在 570 nm 波长处测定各组样品的吸光度。

1.4 HUVECs 体外的小管生成试验

冰上过夜融化基质胶,将 100 μL 缓冲液和 900 μL BD Matrigel 基质胶缓慢混匀,在预冷的 24 孔板中每孔加入 150 μL 稀释的基质胶溶液,待 37 ℃孵育 60 min 溶液凝固后,成为小管生成的培养基。将褪黑素终浓度为 0、100、200 μg/mL 分别与细胞悬液混合,按照 5×10^5 个/mL 稀释细胞,以 1 mL/孔接种于预先铺好的基质胶的孔里,继续培养 12 h,于倒置显微镜下观察每组细胞的变化并拍照记录小管的形成情况,每孔随机拍 3 个视野。

1.5 划痕试验

将对数生长期的 SKOV3 用胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)消化成细胞悬液,用含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 细胞培养液稀释成 5×10^4 个/mL,每孔 2 mL 接种于 24 孔板,于 37 ℃、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养至细胞贴壁后。用 100 μL 枪头在孔板底部中央划出一条横线,每孔用 PBS 冲洗,在各孔中分别加入终浓度为 0、100、200 μg/mL 的褪黑素,用无血清高糖 DMEM 继续培养,0、12 h 光学显微镜下捕获划痕图像(10×10 倍)。观察每组细胞的迁移情况,通过 ImageJ 软件计算每组细胞划痕的宽度,实验重复 3 次并计算细胞 12 h 的迁移率。

1.6 Transwell 试验

将基质胶用无血清的高糖 DMEM 细胞培养液进行稀释,将稀释的 Matrigel 胶平铺于 Transwell 小室的上室中,于 37 ℃凝固备用,将对数生长期的 SKOV3 细胞用胰蛋白酶-EDTA 消化液(0.25%)消化成细胞悬液,用含有无血清的高糖 DMEM 细胞培养液调整细胞数为 5×10^4 个/mL,取 200 μL 细胞接种于 transwell 上室内,各孔中分别加入终浓度为 0、100、200 μg/mL 的褪黑素,每组设 3 个复室。下室加入 800 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,37 ℃、5% CO_2 培养 36 h 后,将滤膜上层的细胞用棉签抹去,PBS 洗一次,滤膜用甲醇固定 15 min 后,晾干甲醇,用 0.1% 结晶紫染料染色 15 min。于显微镜下选择上下左右中四个不同视野的穿过膜的区域进行拍照。

1.7 Western bolt

各组 SKOV3 细胞,PBS 洗三次,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解 30 min,刮取细胞后,4 ℃、13 000 rpm 离心 15 min 取上清,BCA 试剂盒进行蛋白浓度的测定,取 30 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 液室温封闭 2 h;分别加入兔抗人 E-cadherin(1 ∶ 1 000)、MMP-9(1 ∶ 3 000)、Vimentin(1 ∶ 1 000)、GAPDH(1 ∶ 2 000)单克隆抗体,4 ℃孵育过夜;TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(1 ∶ 5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜,ECL 曝光显影,用 Image J 图像分析软件对蛋白表达条带进行定量、分析。

1.8 SKOV3 体内成瘤和免疫组化

4 周龄 15 只雌性裸鼠,1.0×10^6 对数生长期的

SKOV3细胞悬液注射到裸鼠皮下。3天后随机分3组,每组5只,对照组腹腔注射200 μL生理盐水,治疗组注射200 μL(25 mg/kg)褪黑素,每两天注射一次,三周后断颈处死裸鼠。将肿瘤组织标本进行固定、石蜡包埋、切片,并采用一抗CD31(1∶300)进行免疫组化实验。

1.9 统计学分析

每组实验均重复3次,数据结果用均数±标准差表示。采用Graphpad 6.0软件作图,并用SPSS19.0软件通过 t 检验对SKOV3细胞和HUVECs间的差异进行统计学分析。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 褪黑素抑制HUVECs和SKOV3细胞增殖

不同浓度的褪黑素分别处理卵巢癌SKOV3和HUVECs 24 h后,MTT法检测细胞存活率。如图1A和1B所示,卵巢癌SKOV3和HUVECs在褪黑素浓度较高时才具有细胞毒性,其中SKOV3细胞在浓度为1 600 μg/mL时,细胞存活率为71%($P<0.05$),根据各组细胞存活率结果,为保证一定的细胞存活数量,故选取作用时间为24 h,作用浓度为100、200 μg/mL的褪黑素进行后续实验。

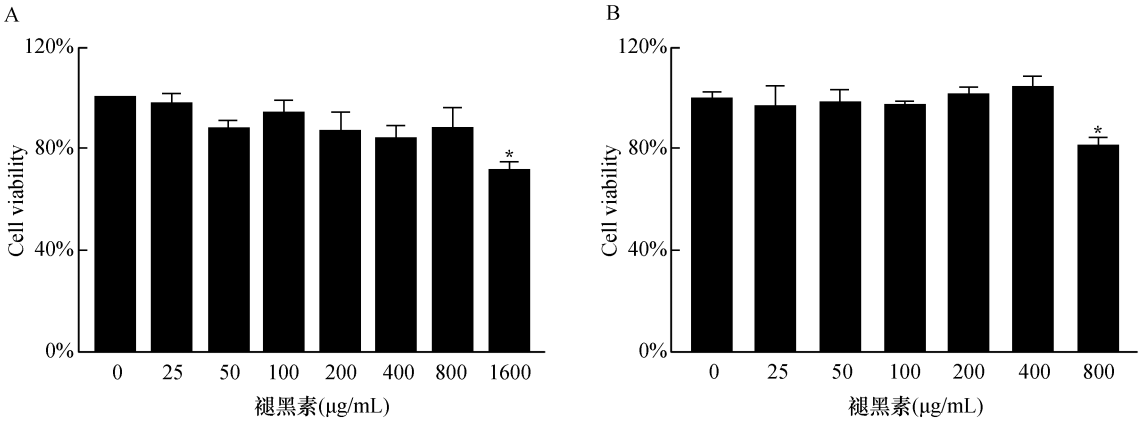

图1 MTT法检测细胞的存活率 A:SKOV3细胞;B:HUVECs

与0 μg/mL组比较,* $P<0.05$

2.2 褪黑素抑制HUVECs体外小管生成

与空白对照组比较,褪黑素浓度为100,200 μg/mL处理组的管腔形成数目较少,而且大多数管腔的大小不及空白组的大,随着褪黑素浓度的增加,细胞虽然有聚集的现象,但未能形成管腔。如图2所示,褪黑素能明显抑制HUVECs的小管生成。

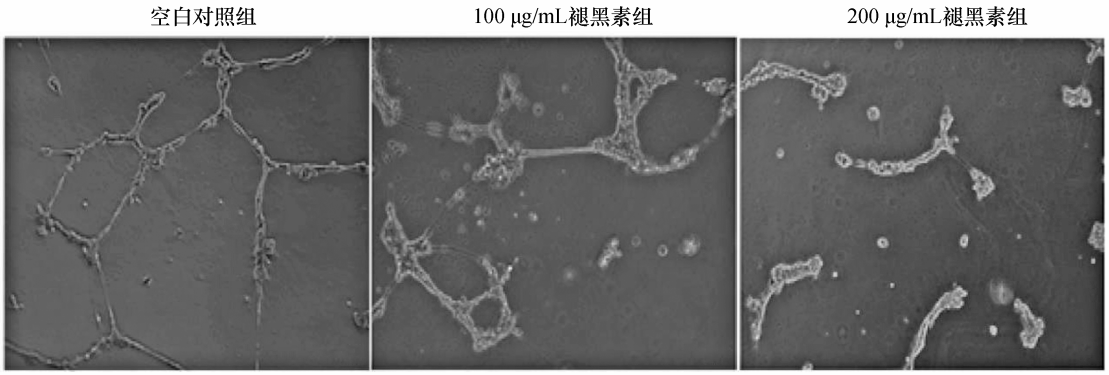

图2 褪黑素对HUVECs小管生成的影响(100×)

2.3 褪黑素抑制SKOV3细胞体外侵袭

Transwell小室实验检测褪黑素对SKOV3细胞侵袭的影响,结果发现,褪黑素处理后,发生侵袭的SKOV3细胞的数目下降。如图3A所示,浓度分别为0,100,200 μg/mL的褪黑素处理36 h后,在显微镜(200×)下每孔随机选择3个视野计数细胞数,三

组细胞的平均穿膜细胞数分别为(149.3±7.6)、(103.7±4.0)和(93±1.7),与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),提示褪黑素能抑制 SKOV3 细胞的侵袭(图 3B)。

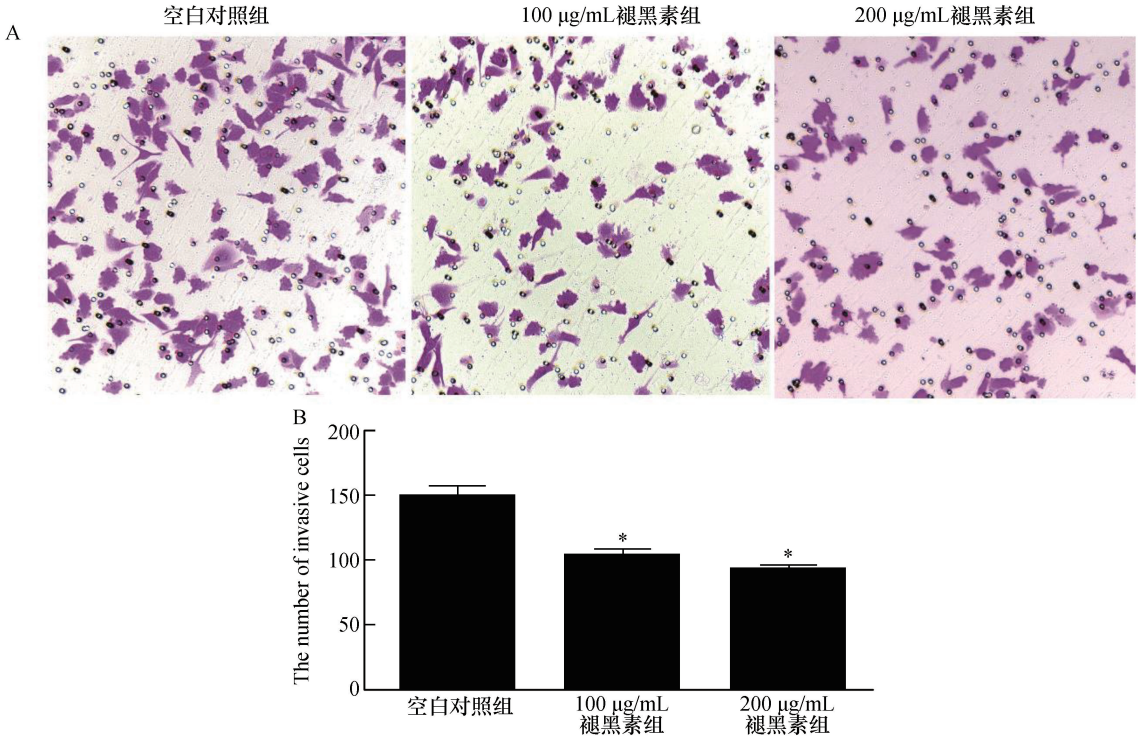

图 3 褪黑素对 SKOV3 细胞侵袭的影响(200×)

A:结晶紫染色(200×);B:定量分析侵袭细胞数目,与空白对照组比较,* $P<0.05$

2.4 褪黑素抑制 SKOV3 细胞体外迁移

细胞划痕试验显示,如图 4A 所示,划痕 12 h 后,褪黑素组的卵巢癌细胞向中央迁移的距离较空白对照组明显减少,三组卵巢癌细胞向划痕中央迁移的距离分别为(86.94±7.15)μm、(47.55±15.45)μm 和(53.70±4.72)μm,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$,图 4B),随着褪黑素浓度的增加,划痕愈合度也随之降低,褪黑素能抑制 SKOV3 细胞的迁移。

2.5 褪黑素对 SKOV3 细胞中 E-cadherin、MMP-9、Vimentin、VEGF 蛋白表达量的影响

Western blot 实验结果显示(图 5),褪黑素处理卵巢癌细胞后,SKOV3 细胞内 Vimentin、MMP-9 和 VEGF 的表达明显降低,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$),而 E-cadherin 的表达显著增强($P<0.05$)。

2.6 褪黑素对体内抗血管生成的影响

将每组小鼠的肿瘤切片进行 CD31 免疫组化,测定微血管密度作为衡量肿瘤血管生成的指标。免疫组化结果显示,CD31 阳性着色部位主要为血管内皮细胞的细胞膜和细胞浆,并且细胞膜着色比

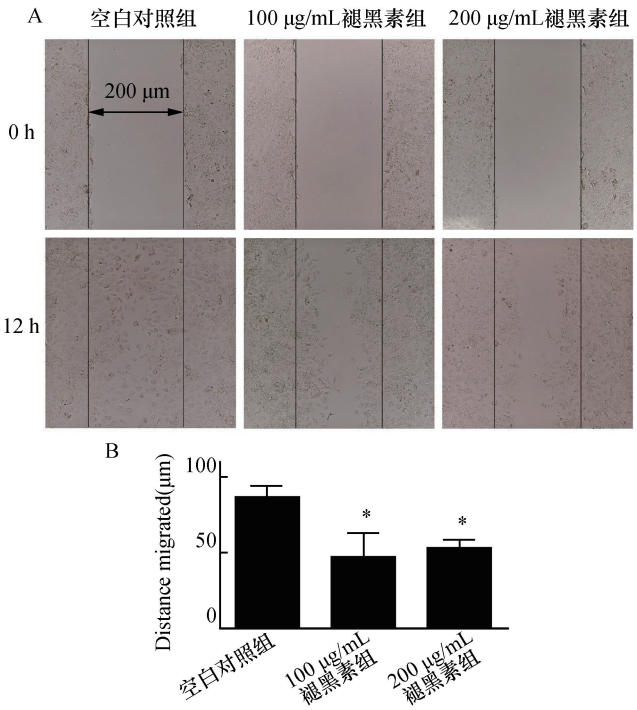

图 4 褪黑素对 SKOV3 细胞迁移的影响(100×)

A:细胞划痕实验(100×);B:细胞横向迁移的定量分析

与空白对照组比较,* $P<0.05$

胞浆重。血管呈条索状或者具有明显的管腔,在卵巢癌组织中的微血管形态不规则,分布不均(图6),而褪黑素给药组卵巢癌组织的微血管密度明显低于正常卵巢癌组织。

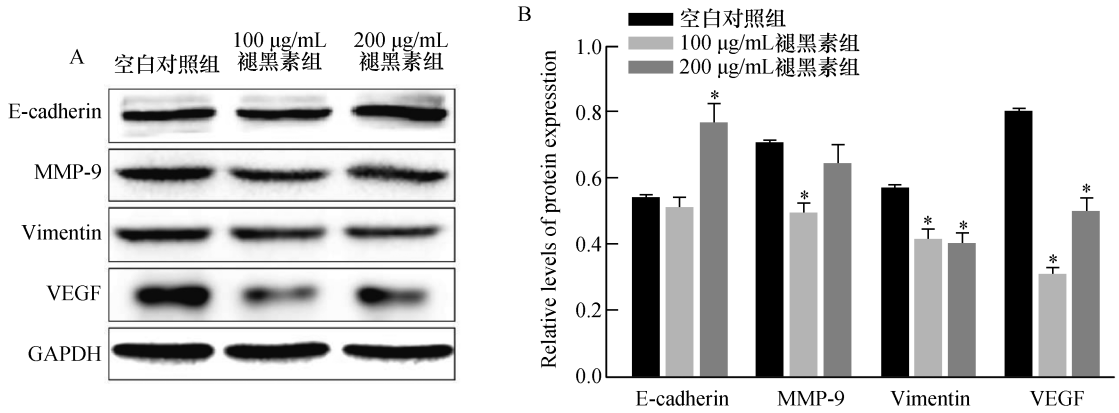

图5 褪黑素对SKOV3细胞内E-cadherin、MMP9、Vimentin和VEGF蛋白表达水平的影响

A:E-cadherin、MMP9、Vimentin和VEGF蛋白的表达;B:蛋白的定量分析. 与空白对照组比较,* $P<0.05$

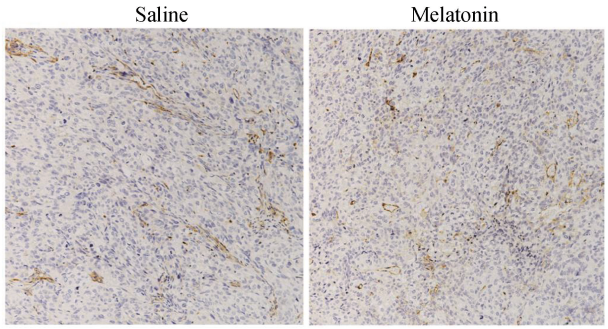

图6 卵巢癌组织中CD31的表达(200×)

3 讨 论

卵巢癌是女性生殖器官常见、致命的恶性肿瘤之一,转移速度快[8]。本文的研究发现较高浓度的褪黑素对卵巢癌SKOV3细胞有一定的毒性,且褪黑素能抑制卵巢癌SKOV3细胞的迁移,这与其抑制肿瘤的血管生成和上皮间质转化相关[9]。

血管生成是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管[10],主要包括:内皮细胞从已存在的血管中解离,消化细胞外基质,迁移到管腔内,最后进行再建模等,在这些过程中,内皮细胞的生长、迁移和成管对血管生成至关重要。因此本文作者利用了HUVECs体外模拟褪黑素对血管生成的影响。结果显示,较高浓度的褪黑素对HUVECs细胞的生长具有一定的抑制作用,低浓度的褪黑素能抑制小管形成。此外,在血管形成前[11-12],处于低氧环境的肿瘤组织会产生大量的VEGF与血管中内皮细胞的配体结合而促使其进行增殖、迁移。本实验结果显示,VEGF在卵巢癌细胞中呈显著高表达,低浓度的褪黑素能抑制SKOV3细胞VEGF的表达,进一步地抑制了血管的生成。

既然新生血管对维持肿瘤的生长和转移发挥了重要的作用,褪黑素抑制了肿瘤的血管生成,那么褪黑素是否能抑制卵巢癌SKOV3细胞的侵袭和迁移呢?研究结果表明,较低剂量的褪黑素就具有明显的抑制侵袭和迁移的效果,同时考察上皮细胞间质转型的相关蛋白,包括Vimentin和MMP-9等,发现褪黑素能够明显的降低这些蛋白的表达,上调E-cadherin的表达,达到很好的逆转上皮细胞间质转型,从而抑制卵巢癌的迁移。

最后,利用体内裸鼠的瘤体检测CD31的表达情况。CD31在血管和淋巴管内皮细胞均有阳性表达,是内皮细胞标记物[13],参与血管生成,并且在肿瘤和血管内皮细胞之间起到桥梁作用,为肿瘤细胞的转移创造条件。CD31高表达的卵巢上皮癌恶性程度高,与转移相关[14],本文的实验表明褪黑素能抑制体内的卵巢癌实体瘤的微血管密度,但若要全面了解褪黑素体内抗血管生成的作用[15]并且抑制卵巢癌侵袭迁移的活性,还需要进一步的研究。

本文研究的结果显示低浓度的褪黑素具有良好的抑制卵巢癌侵袭、迁移和血管生成的能力。此外,许多文献报道[16]褪黑素还可以联合化疗药物使用,减轻化疗药物的副作用。例如,前期研究发现减少顺铂对卵巢癌的损伤,保留女性生育功能[17]。

褪黑素的抗氧化能力可以减轻化疗药物紫杉醇引起神经疼痛的发展[18]。总的来说,褪黑素有望成为新的治疗卵巢癌的化疗辅助药物。

参考文献:

[1] FAROOQ M, ABUTAHA N, MAHBOOB S, et al. Investigating the antiangiogenic potential of rumex vesicarius (humeidh), anticancer activity in cancer cell lines and assessment of developmental toxicity in zebrafish embryos[J]. Saudi J Biol Sci, 2020, 27(2): 611-22.

[2] VRIEND J, REITER RJ. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome [J]. J Pineal Res, 2015, 58(1):1-11.

[3] BURCHAKOY DI, USPENSKAVA YB. Antioxidant, anti-inflammatory and sedative effects of melatonin: results of clinical trials [J]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2017, 117(4. Vyp. 2): 67-73.

[4] REITER RJ, MAYO JC, TAN D, et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers [J]. J Pineal Res, 2016, 61(3):253-78.

[5] ZAKKI SA, MUHAMMAD JS, LI J, et al. Melatonin triggers the anticancer potential of phenylarsine oxide via induction of apoptosis through ROS generation and JNK activation [J]. Metallomics, 2020, 12(3):396-407.

[6] ZHANG J, XIE T, ZHONG X, et al. Melatonin reverses nasopharyngeal carcinoma cisplatin chemoresistance by inhibiting the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(6):5423-38.

[7] BU LJ, YU HQ, FAN LL, et al. Melatonin, a novel selective ATF-6 inhibitor, induces human hepatoma cell apoptosis through COX-2 downregulation [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(6):986.

[8] KIM SJ, ROSEN B, FAN I, et al. Epidemiologic factors that predict long-term survival following a diagnosis of epithelial ovarian cancer[J]. Br J Cancer, 2017, 116(7):964-71.

[9] KUNZ M, HARTMANN A. Angiogenesis--anti-angiogenesis. Significance for tumor growth and metastasis [J]. Der Hautarzt, 2002, 53(6):373-84.

[10] BELYAKOVA KL, STEPANOVA OI, SHEVELEVA AR, et al. Interaction of NK cells, trophoblast, and endothelial cells during angiogenesis[J]. Bull Exp Biol Med, 2019, 167(1):169-76.

[11] ABDALLA AME, XIAO L, ULLAH MW, et al. Current challenges of cancer anti-angiogenic therapy and the promise of nanotherapeutics[J]. Theranostics, 2018, 8(2):533-48.

[12] CHEN W, SUN C, LI W. Mechanism of FGF7 gene silencing in regulating viability, apoptosis, invasion of retinoblastoma cell line HXO-Rb44 and angiogenesis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2020, 24(7):3538-47.

[13] PUSZTASZERI MP, SEELENTAG W, BOSMAN FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues[J]. J Histochem Cytochem, 2006, 54(4):385-95.

[14] GU H, SHEN Q, MEI D, et al. Melatonin inhibits TE-1 esophageal cancer cells metastasis by suppressing the NF-κB signaling pathway and decreasing MMP-9[J]. Ann Clin Lab Sci, 2020, 50(1):65-72.

[15] BHATTACHARVA S, PATEL KK, DEHARI D, et al. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects [J]. Mol Cell Biochem, 2019, 462(1-2):133-55.

[16] KHAKSAR M, ORYAN A, SAYYARI M, et al. Protective effects of melatonin on long-term administration of fluoxetine in rats[J]. Exp Toxicol Pathol, 2017, 69(8):564-74.

[17] JANG H, LEE O, LEE Y, et al. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary[J]. J Pineal Res, 2016, 60(3):336-47.

[18] GALLEY HF, MCCORMICK B, WILSON KL, et al. Melatonin limits paclitaxel - induced mitochondrial dysfunction in vitro and protects against paclitaxel - induced neuropathic pain in the rat [J]. J Pineal Res, 2017, 63(4): e12444.

(本文编辑:蒋湘莲)