

七氟醚对卵巢癌干细胞特性及增殖、侵袭迁移能力的影响

黎真真^{1,2}, 邹定全¹

1. 中南大学湘雅二医院 麻醉科, 湖南 长沙 410000

2. 海南省海口市妇幼保健院 麻醉科, 海南 海口 571100

摘要: **目的** 探究七氟醚对卵巢癌细胞 SKOV3 干细胞特性及增殖、侵袭迁移能力的影响。**方法** 常规培养人卵巢癌细胞 SKOV3 于培养瓶中, 分为七氟醚组及对照组, 七氟醚组以 5% CO₂ 和 1% 七氟醚培养 24 h, 对照组仅以 5% CO₂ 培养 24 h, MTT 法检测两组细胞增殖能力的变化, Transwell 侵袭及迁移实验检测细胞侵袭及迁移能力, Western blotting 检测两组细胞干细胞特性相关分子 (Oct4 及 Sox2) 及上皮间充质转化 (EMT) 相关分子 (E-cadherin、Vimentin) 的表达差异。**结果** 七氟醚组细胞 72、96 h 时间点增殖能力显著低于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。七氟醚组穿透 Matrigel 基质胶的细胞数、迁出 Transwell 上小室的细胞数均明显少于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。七氟醚组 Oct4、Sox2、Vimentin 表达均显著低于对照组, E-cadherin 表达显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 七氟醚可通过减轻卵巢癌细胞 EMT 进程及干细胞特性, 抑制细胞增殖及侵袭迁移能力。

关键词: 七氟醚; 卵巢癌; 上皮间充质转化; 肿瘤干细胞特性; 肿瘤增殖与转移

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 06- 1030 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.06.016

Effects of sevoflurane on characteristics of stem cells, proliferation, invasiveness and migration of ovarian cancer cells

LI Zhenzhen, ZOU Dingquan

Department of Anesthesia, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 571111, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of sevoflurane on the characteristics of stem cells, proliferation, invasion and migration ability of ovarian cancer cell SKOV3. **Methods** Human ovarian cancer cells SKOV3 in culture flask were divided into sevoflurane and control group. The sevoflurane group cell was cultured under environment of 5%CO₂ and 1% sevoflurane for 24 h, and the control group cell was cultured under environment of 5%CO₂ for 24 h. MTT method was used to detect the ability of cell proliferation of two groups of cell. Transwell invasion and migration assay were used to detect the ability of cell invasion and migration of two groups of cell. Western blotting was used to detect the expression of stem cell related molecular (Oct4 and Sox2) and epithelial mesenchymal transition (EMT) related molecules (E-cadherin, Vimentin). **Results** The proliferation ability of the sevoflurane group was significantly lower than that of the control group at 72 and 96 h, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The number of sevoflurane cells through the matrigel and transwell chamber were less than control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of molecular stem cell related Oct4 and Sox2 in sevoflurane group were lower than that in control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression of molecular EMT related E-cadherin and Vimentin were lower than that in control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Sevoflurane can inhibit the ability of proliferation, invasion and migration in ovarian cancer cells by reducing the EMT process and stem cell characteristics.

Key words: Sevoflurane; ovarian cancer; epithelial-mesenchymal transition; tumor stem cell characteristics; tumor proliferation and metastasis

卵巢癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率仅次于子宫癌, 死亡率居妇科肿瘤之首, 是恶性程度最高的妇科肿瘤, 严重威胁妇女的生命健康安

全^[1]。病灶的快速生长及侵袭转移是恶性肿瘤的主要症状和致死原因, 而肿瘤干细胞在其过程中扮演着重要角色, 涉及上皮间充质转化 (epithelialmesen-

收稿日期: 2017-12-19

第一作者: 黎真真 (1988—), 女, 本科, 海口人, 住院医师, 产科麻醉。Tel: 13637550812 E-mail: changjiang2607@126.com

chymaltransition, EMT)、免疫逃避等多种生物学过程^[2-3]。七氟醚为常用的吸入性麻醉药物, 研究显示, 其可抑制肿瘤细胞的多种恶性行为^[4-5], 对恶性肿瘤具有潜在的临床应用价值, 但其对于卵巢癌细胞恶性行为的影响及相关机制尚未阐明。因此, 本研究通过体外模型探究了七氟醚对卵巢癌细胞 SKOV3 侵袭迁移能力的影响, 并检测了肿瘤干细胞标志物 Oct4、Sox2 及 EMT 相关标志物 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 表达情况。

1 材料

1.1 实验细胞

人卵巢癌细胞 SKOV3(上海酶研生物科技有限公司)。

1.2 主要仪器

麻醉机、七氟醚挥发罐 (美国 Datex); 1300 生物安全柜 (美国 Thermo Scientific); BJPX-200 生化培养箱 (山东博科); CX23 光学显微镜 (日本 Olympus); 5424r 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf); 电泳仪、转膜仪、GelDoc XR 凝胶成像仪及 T10 细胞计数仪 (美国 Bio-Rad); GloMax 酶标仪 (美国 Promega)。

1.3 主要试剂

吸入用七氟醚 (上海恒瑞医药); 1640 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶 (美国 Gibco); 30%聚丙烯酰胺、过硫酸铵、Tris 碱、RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒等 (上海碧云天); MTT 试剂盒、蛋白酶抑制剂 cocktail 及蛋白 marker (美国 Sigma); Matrigel 基质胶 (美国 Becton Dickinson); β -actin (ab8226)、Oct4 (ab18976)、Sox2 (ab92494)、E-cadherin 抗体 (ab15148)、Vimentin 抗体 (ab92547)、鼠二抗 (ab6728) 及兔二抗 (ab150077), 均购自美国 Abcam。

2 方法

2.1 细胞的培养及处理

SKOV3 细胞采用 1640 培养基+10%胎牛血清, 1:2 传代培养, 常规培养环境为 37 °C、5% CO₂、100%相对湿度。将细胞传代培养后, 分为七氟醚组及对照组, 七氟醚组细胞在 37 °C、5% CO₂、1%七氟醚^[6]及 100%相对湿度条件下处理 24 h (预实验设置 6、12 及 24 h 3 个给药时间, 给药时间设置为 24 h, 细胞 72 h 增殖及转移能力显著下调), 对照组细胞仍在常规环境下培养 24 h。

2.2 MTT 实验检测细胞增殖能力

将按照“2.1”项方法处理好的七氟醚组及对照组细胞, 0.5 mL 胰蛋白酶消化并重悬后进行细胞计数, 1×10^3 /孔接种至 96 孔板, 每组设置 5 个平行孔及 5 个时间点 (0、24、48、72 及 96 h)。接种至 96 孔板 24 h 细胞均贴壁后, 弃去培养基, 更换为 MTT 与 1640 培养基+10%胎牛血清 1:9 的混合液, 37 °C 孵育 2 h, 摇匀后多孔酶标仪检测 490 nm 的吸光度 (*A*) 值, 以此时为 0 h 时间点。在 24、48、72、96 h 后分别以同样的方法检测 490 nm 的 *A* 值, 以各时间点与 0 h *A* 值的比值表示细胞相对增殖能力。

2.3 Transwell 侵袭及迁移实验检测细胞侵袭迁移能力

稀释基质胶至 50 mg/L, 将其与 4 °C 无血清 1640 培养基混合均匀, 取 70 μ L 均匀铺胶于 2 只 Transwell 上小室, 置于生化培养箱中孵育 4 h。4 h 后, 将处理好的七氟醚组及对照组细胞, 0.5 mL 胰蛋白酶消化后室温 1 000 r/min 离心细胞 5 min, PBS 洗细胞 3 次, 1640 培养基+1%胎牛血清重悬细胞并细胞计数。两组各取 1×10^5 个细胞分别加入 2 只已铺胶的 Transwell 上小室, 进行 Transwell 侵袭实验; 另取 2 只未铺胶的 Transwell 小室分别加入 3×10^4 个细胞, 作为 Transwell 迁移实验; 在相应的 24 孔板中加入 1640 培养基+10%胎牛血清, 培养 24 h 后, 无水乙醇固定细胞 29 min, 0.1%结晶紫染色 30 min, 200 $\times$ 光镜下计数, 随机统计中间和四周 5 个视野的细胞数, 求其平均值及标准差。

2.4 Western Blotting 实验检测细胞蛋白表达

收集按照“2.1”项下方法处理好的七氟醚组及对照组细胞, 0.5 mL 胰蛋白酶消化后室温 1 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗细胞 3 次, 0.1 mL RIPA 裂解液重悬细胞, 置于冰上裂解 2 h, 期间不断混匀, 20 000 $\times$ g, 4 °C 离心 15 min, 取上清。BCA 法检测上清液总蛋白浓度, 将两组细胞总蛋白调整至 2.5 μ g/ μ L, 加入 loading buffer, 100 °C 蛋白变性 5 min。20 μ L 上样体积, 5 μ L 蛋白 Marker 上样体积, 100 V 10%丙烯酰胺凝胶电泳, 300 mA 稳流转 PVDF 膜 2 h, 根据 Marker 剪取目的条带: 包括 β -actin 42 kDa、Oct4 45 kDa、Sox2 34 kDa、E-cadherin 135 kDa、Vimentin 57 kDa。5%脱脂牛奶封闭 3 h, 相应抗体室温孵育 2 h (工作浓度为 1:1 000), PBS 洗膜 3 次, 二抗孵育 1 h (工作浓度为 1:2 000), PBS 洗膜 3 次, ECL 化学发光液曝光显影, ImageLab 4.2

软件分析条带灰度值, 重复扫描 3 次取平均值。

2.5 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验。

3 结果

3.1 两组细胞增殖能力比较

七氟醚组细胞在 72 及 96 h, 相对增殖能力均显

著低于对照组细胞, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.2 两组细胞侵袭能力的比较

七氟醚组及对照组穿透 Matrigel 基质胶的细胞数分别为 (33.1 ± 5.8) 个及 (72.3 ± 7.4) 个, 七氟醚组显著少于对照组, 差异显著 ($P < 0.05$), 见图 1。

表 1 七氟醚组及对照组细胞各时间点相对增殖能力及比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Relative proliferation ability of cells at each time point in sevoflurane and control group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量	相对增殖能力				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照	—	1.000 ± 0.114	1.912 ± 0.362	4.063 ± 0.427	8.324 ± 0.631	16.348 ± 1.495
七氟醚	1%	1.000 ± 0.173	1.722 ± 0.312	3.674 ± 0.458	$6.850 \pm 0.539^*$	$13.010 \pm 1.197^*$

与对照组比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group

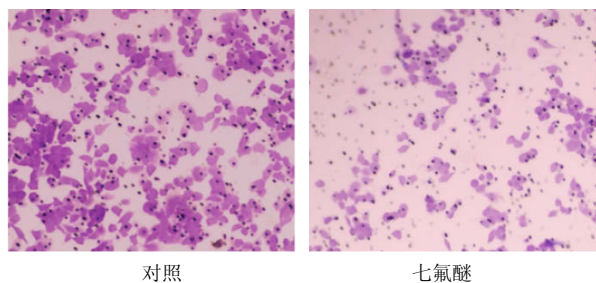


图 1 七氟醚组及对照组细胞侵袭细胞 ($200 \times$)

Fig. 1 Invasiveness cells in sevoflurane and control groups ($200 \times$)

3.3 两组细胞迁移能力的比较

七氟醚组及对照组迁出 Transwell 上小室的细胞数分别为 (54.6 ± 9.2) 个及 (84.0 ± 10.5) 个, 七氟醚组显著少于对照组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。

3.4 两组细胞干细胞特性相关分子表达的比较

七氟醚组细胞 Oct4、Sox2 及 Vimentin 表达水平均显著低于对照组, 而 E-cadherin 表达水平高于对照组细胞, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3、表 2。

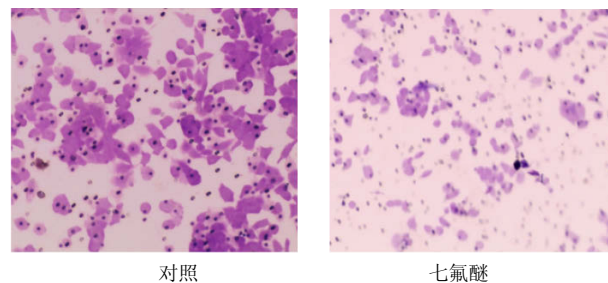


图 2 七氟醚组及对照组细胞迁移细胞数及比较 ($200 \times$)

Fig. 2 Migration cells in sevoflurane and control groups ($200 \times$)

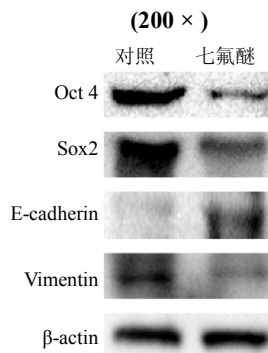


图 3 七氟醚组及对照组细胞干细胞特性相关分子表达情况

Fig. 3 Expression of cell stem cell characteristics related molecules in sevoflurane and control groups

表 2 七氟醚组及对照组细胞干细胞特性相关分子表达及比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Expression of cell stem cell characteristics related molecules in sevoflurane and control groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	Oct4/ β -actin	Sox2/ β -actin	E-cadherin/ β -actin	Vimentin/ β -actin
对照	—	0.430 ± 0.053	0.372 ± 0.041	0.084 ± 0.028	0.302 ± 0.027
七氟醚	1%	$0.265 \pm 0.026^*$	$0.169 \pm 0.030^*$	$0.153 \pm 0.024^*$	$0.237 \pm 0.033^*$

与对照组比较: $^*P < 0.05$

$^*P < 0.05$ vs control group

4 讨论

卵巢癌细胞恶性程度高,以恶性增殖、转移及复发为主要特征,其发生及行为调控机制尚不完全明确。近年来有研究指出,肿瘤干细胞是控制肿瘤恶性行为的关键因素,包括赋予其无限增殖能力及形成新的肿瘤细胞的能力,促进肿瘤细胞异质性的发生^[7]。Oct4 及 Sox2 是干细胞中表达的重要的细胞因子。Oct4 基因位于 6p21.31 染色体上,是 POU 家族的转录因子之一,其可与 DNA 结合,调控下游 Tgf- β 及 Wnt 信号通路,维持细胞多分化潜能及自我更新能力,主要表达于胚胎干细胞及生殖干细胞,在已分化的细胞中不表达^[8]。Sox2 基因位于 3q26.3 染色体,其可与 Oct4 结合形成复合物,维持 Oct4 的稳定性,并与 Oct4 产生协同作用,共同维持细胞的干细胞特性^[9]。基于恶性肿瘤的干细胞特征逐渐被人们所认识,Oct4 及 Sox2 也被发现在多种恶性肿瘤中重新表达,包括非小细胞肺癌、结直肠癌及卵巢癌等,并在其中发挥重要的促细胞增殖转移及放化疗抵抗的作用:Oct4 和 Sox2 均被发现高表达于非小细胞肺癌,且与患者临床分期及不良预后密切相关^[10]。体外研究显示,Oct4 可通过促进细胞 EMT 增强非小细胞肺癌增殖侵袭能力,并介导细胞吉非替尼抵抗的发生^[11-12]。Oct4 及 Sox2 在结直肠癌中表达上调,并与肿瘤大小、淋巴结转移正相关^[13],体外干扰 Oct4 的表达可显著抑制结直肠癌细胞 EMT 进程及侵袭迁移能力^[14]。Oct4 和 Sox2 也被发现参与卵巢癌细胞发生发展,Oct4 高表达于卵巢癌组织,并与患者不良预后显著相关^[15]。体外分离卵巢癌干细胞 (Oct4 阳性细胞),发现 E-cadherin 表达显著下调,提示其对卵巢癌细胞 EMT 进程的发生的介导作用^[16],且卵巢癌干细胞体内增殖转移能力均显著上调,表明卵巢癌干细胞对卵巢癌发生发展的重要作用。Sox2 不仅通过协同 Oct4 促进卵巢癌干细胞特性的维持^[17],还可通过 Src 激酶途径促进细胞转移能力的增强^[18]。

EMT 是上皮细胞恶性转变的重要过程,使上皮细胞具有间质细胞的特性,包括转移能力及耐药性的增强^[19],E-cadherin 及 Vimentin 均为 EMT 重要的标志物:E-cadherin 是上皮细胞表达的重要黏附分子之一,其参与细胞间的紧密连接,在上皮来源肿瘤细胞中表达往往下调,导致细胞间的粘附减弱,细胞易于脱落和迁移;Vimentin 高表达于间质细胞中,负责维持细胞骨架的完整性,其在肿瘤细胞中

表达上调,可促进细胞活动性增强^[20]。肿瘤 EMT 进程与其干细胞特性密切相关,肿瘤干细胞不仅存在较高的 EMT 进程,EMT 相关分子同样可影响肿瘤的干细胞特性^[21]:体外干扰 E-cadherin 的表达可促进乳腺癌的干细胞特性,进而介导细胞恶性行为的增强^[22];肝癌细胞细胞表面 Vimentin 表达与细胞 Sox2 及 Oct4 表达显著正相关^[23],提示 Vimentin 对肿瘤干细胞特性的促进作用。

七氟醚血气分配系数低,患者诱导及苏醒快,是临床上常用的吸入性麻醉剂,近年研究显示,其在体外可通过不同途径抑制多种恶性肿瘤细胞的恶性行为,包括抑制肺癌细胞缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 及 p38 MAPK 表达,进而抑制细胞增殖转移能力及促进细胞放疗敏感性^[4-5];七氟醚可促进骨肉瘤细胞 MG63 的凋亡,并抑制增殖,促进细胞顺铂化疗敏感性^[24]。但其对卵巢癌细胞恶性行为的影响及相关机制尚不明确。

本研究对七氟醚在卵巢癌细胞中的生物学作用及对干细胞特性的影响进行了探究,结果显示,七氟醚同样可有效降低卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖及转移能力,同时可下调细胞 Oct4、Sox2 及 Vimentin 的表达,上调细胞 E-cadherin 的表达,提示七氟醚可通过抑制 SKOV3 细胞的干细胞特性,进而发挥抑癌作用。我们将通过进一步实验探究七氟醚影响卵巢癌干细胞特性的具体机制,为揭示七氟醚在卵巢癌中的潜在应用价值提供实验依据。

参考文献

- [1] Miller K D, Siegel R L, Lin C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
- [2] Nieto M A, Huang R Y J, Jackson R, et al. EMT: 2016 [J]. Cell, 2016, 166(1):21-45.
- [3] Beatty G L, Gladney W L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(4):687-692.
- [4] Liang H, Yang C X, Zhang B, et al. Sevoflurane suppresses hypoxia-induced growth and metastasis of lung cancer cells via inhibiting hypoxia-inducible factor-1 α [J]. J Anesth, 2015, 29(6): 821-830.
- [5] Liang H, Gu M, Yang C, et al. Sevoflurane inhibits invasion and migration of lung cancer cells by inactivating the p38 MAPK signaling pathway [J]. J Anesth, 2012, 26(3): 381-392.

- [6] Sugimoto H, Kawaraguchi Y, Nomura Y, et al. Exposure to 1 % Sevoflurane for 6 Hours Enhances Proliferation of Human Colon Cancer Cells [J]. *Masui*, 2015, 64(4): 357-361.
- [7] Wang T, Shigdar S, Gantier M P, et al. Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42): 44191-44206.
- [8] Villodre E S, Kipper F C, Pereira M B, et al. Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis [J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 51(3): 1-9.
- [9] Liu K C, Lin B S, Zhao M, et al. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1264-1271.
- [10] Li X, Wang J, Xu Z, et al. Expression of Sox2 and Oct4 and their clinical significance in human non-small-cell lung cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 7663-7675.
- [11] Kobayashi I, Takahashi F, Nurwidya F, et al. Oct4 plays a crucial role in the maintenance of gefitinib-resistant lung cancer stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(1): 125-132.
- [12] Chen Z S, Ling D J, Zhang Y D, et al. Octamer-binding protein 4 affects the cell biology and phenotypic transition of lung cancer cells involving β -catenin/E-cadherin complex degradation [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(3): 1851-1858.
- [13] Padin-Iruegas M E, Herranz-Carnero M, Aguin-Losada S, et al. Prognostic value of changes in the expression of stem cell markers in the peripheral blood of patients with colon cancer [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6): 2467-2481.
- [14] Dai X, Ge J, Wang X, et al. OCT4 regulates epithelial-mesenchymal transition and its knockdown inhibits colorectal cancer cell migration and invasion [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(1): 155-160.
- [15] Simonsson S, Svensson F, Vizlin-Hodzic D, et al. The embryonic stem cell protein Oct4 may be a prognostic biomarker for ovarian cancer [J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(4): 24.
- [16] Yan H C, Fang L S, Xu J, et al. The identification of the biological characteristics of human ovarian cancer stem cells [J]. *Riv Eur Sci Med Farmacol*, 2014, 18(22): 3497-3503.
- [17] Zhang Z, Zhu Y, Lai Y, et al. Follicle-stimulating hormone inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by regulating the OCT4 stem cell signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(4): 1194-1204.
- [18] Wang X, Ji X, Chen J, et al. SOX2 enhances the migration and invasion of ovarian cancer cells via src kinase [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99594.
- [19] Mitra A, Mishra L, Li S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(13): 10697.
- [20] Chaw S Y, Majeed A A, Dalley A J, et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(10): 997-1006.
- [21] Xin Y, Leong T W, Tsukasa S, et al. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells [J]. *Nature*, 2015, 525(7568): 256-260.
- [22] Mukherjee S, Mazumdar M, Chakraborty S, et al. Curcumin inhibits breast cancer stem cell migration by amplifying the E-cadherin/ β -catenin negative feedback loop [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(5): 1-19.
- [23] Mitra A, Satelli A, Xia X, et al. Cell-surface Vimentin (csVim): A mislocalized protein for isolating cs Vimentin(+) CD133(-) novel stem-like hepatocellular carcinoma cells expressing EMT markers [J]. *Int J Cancer*, 2015, 137(2): 491-495.
- [24] 邹海町, 孙 丽, 陶 蕾, 等. 七氟醚、异氟醚对骨肉瘤 MG63 细胞增殖、凋亡及化疗敏感性的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(23): 4419-4423.