

- [27] REN YD, YE ZS, YANG LZ, et al. Fecal microbiota transplantation induces hepatitis B virus e-antigen (HBeAg) clearance in patients with positive HBeAg after long-term antiviral therapy [J]. *Hepatology*, 2017, 65(5):1765-1768.
- [28] 薛刘军, 佟强, 王宏刚, 等. 粪菌移植治疗帕金森病一例报道 [J]. *中华神经医学杂志*, 2018, 17(9):953-954.
- [29] D'HAENS GR, JOBIN C. Fecal microbial transplantation for diseases beyond recurrent clostridium difficile infection [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(3):624-636.
- [30] ALLEGRETTI JR, MULLISH BH, KELLY C, et al. The evolution of the use of faecal microbiota transplantation and emerging therapeutic indications [J]. *Lancet*, 2019, 394(10196):420-431.
- [31] 李新贵. 益生菌类微生态制剂的临床应用 [J]. *安徽医药*, 2018, 22(7):1395-1397.
- [32] DEPOMMIER C, EVERARD A, DRUART C, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study [J]. *Nat Med*, 2019, 25(7):1096-1103.
- [33] ROUTH B, LE CHATELIER E, DEROSA L, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors [J]. *Science*, 2018, 359(6371):91-97.
- [34] RAHFELD P, SIM L, MOON H, et al. An enzymatic pathway in the human gut microbiome that converts A to universal O type blood [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4(9):1475-1485.
- [35] 王宏刚, 何兴祥, 王寒, 等. 粪菌移植体系与炎症性肠病的研究进展 [J]. *胃肠病学*, 2019, 24(5):302-306.
- [36] WU TR, LIN CS, CHANG CJ, et al. Gut commensal *Parabacteroides goldsteinii* plays a predominant role in the anti-obesity effects of polysaccharides isolated from *Hirsutiella sinensis* [J]. *Gut*, 2019, 68(2):248-262.
- [37] CHANG CJ, LIN CS, LU CC, et al. *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota [J]. *Nature Communications*, 2015, 6:7489.

(收稿日期:2019-08-09,修回日期:2019-10-12)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.11.004

◇ 药学研究 ◇

α -NETA 在上皮性卵巢癌细胞中功能研究

乔联桥, 吴晓梅, 席晓薇

作者单位: 上海市第一人民医院妇产科, 上海 200080

通信作者: 席晓薇, 女, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为妇科恶性肿瘤的转移机制研究, 耐药性研究, E-mail: xixiaowei1966@126.com

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81302255)

摘要:目的 探讨 α -NETA在上皮性卵巢癌细胞中功能及 α -NETA作为新型化疗药物的可能性及其潜在改造价值。方法 采用CCK8实验方法检测 α -NETA在上皮性卵巢癌细胞株Hey, HO8910中的药物毒性;流式细胞术检测 α -NETA对肿瘤细胞的杀灭效果;体内实验探讨 α -NETA进行体内抗肿瘤的可能性。结果 CCK8检测HO8910的IC50浓度为6.28 $\mu\text{g/mL}$, Hey细胞株IC50浓度26.34 $\mu\text{g/mL}$;流式细胞检测也取得明显的杀灭肿瘤细胞的效果; α -NETA体内动物实验也有效减少了肿瘤重量及体积。结论 α -NETA作为小分子化学药物,其发挥的抗上皮性卵巢癌细胞的新功能,具有一定的临床意义与研究价值。

关键词: 卵巢肿瘤; 流式细胞术; α -NETA; 上皮性卵巢癌; 抗肿瘤

Functional role of α -NETA in epithelial ovarian cancer cells

QIAO Lianqiao, WU Xiaomei, XI Xiaowei

Author Affiliation: Department of Gynaecology and obstetrics, Shanghai General Hospital, Shanghai 200080, China

Abstract: Objective Explore α -NETA potential as a new type of chemotherapy drug and its potential transformation value. **Methods** The drug toxicity of α -NETA in epithelial ovarian cancer cell lines Hey, HO8910 was detected by CCK8 (Cell Counting Kit-8) assay. The killing effect of α -NETA on tumor cells was detected by flow cytometry. Explore the function of anti-tumor of α -NETA in vivo experiments. **Results** The IC50 (half maximal inhibitory concentration) concentration of HO8910 detected by CCK8 was 6.28 $\mu\text{g/mL}$, and the IC50 concentration of Hey cell line was 26.34 $\mu\text{g/mL}$. The flow cytometry also achieved obvious effect of killing tumor cells. The α -NETA in vivo animal experiment also showed the antitumor effect. **Conclusion** α -NETA is a small molecule chemical that plays a new role in anti-tumor cells as a new type of chemotherapy drug and its potential transformation value.

Key words: Ovarian neoplasms; Flow cytometry; α -NETA; Epithelial ovarian cancer; Anti-tumor

卵巢恶性肿瘤是全世界女性生殖器官最常见的恶性肿瘤之一,有研究显示,化疗耐药是卵巢癌

高死亡率的重要原因之一^[1]。因此,寻找研发更加有效敏感的化疗药物,开发新的治疗手段,对广大

卵巢癌病人有着深刻意义。

α -NETA (N, N, N-trimethyl-y-oxo-1-naphthalene-propanaminiumiodide) 作为小分子化学药物, 是一种乙酰胆碱转移酶抑制剂 (Choline Acetyl Transferase, ChAT) ($IC_{50} = 9 \mu\text{mol/L}$), 一般用于神经细胞功能实验的实验室研究^[2], 2017 年有报道发现化疗药物与细胞凋亡之间存在相关关系^[3]。研究发现其有发挥杀灭肿瘤细胞的新功能。 β -arrestin2 是一类 Arrestin 家族成员, 它不仅参与调节 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 的脱敏和内化, 还可以作为支架蛋白转导细胞信号通路^[4-8]。有研究证实, β -arrestin 2 以及 β -arrestin 1 具有抗细胞焦亡作用, 同时 β -arrestin 2 可以通过多种途径调节免疫反应, 如抑制 NF-KB 活化、调节趋化因子受体介导的免疫细胞趋化等, 同时还与免疫系统疾病、炎症、肿瘤等相关^[4-8]。本研究自 2015 年 1 月至 2016 年 1 月研究 α -NETA 在上皮性卵巢癌细胞中的功能。

1 材料与方法

1.1 材料 上皮性卵巢癌细胞株: HO8910 和 Hey 细胞株购买自美国 ATCC 公司。Moody 从本实验室获取。裸鼠 BALB/c 经上海市第一人民医院动物实验动物中心申请获取。细胞培养液采用 DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium Dulbecco) (购买于 Gibco) 加 10% FBS 加 1% 双抗生素。抗体 anti- β -arrestin2, anti-GAPDH, α -NETA 购买于 Abcam 公司。

1.2 CCK8 (Cell Counting Kit-8) 培养皿中培养细胞至融合度约 90%。胰酶消化细胞, 配制细胞悬液, 约 $2 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5/\text{mL}$ 左右。在 96 孔板中铺板, 培养箱培养 24 h。用 DMEM 空白培养基配制 α -NETA 药物浓度梯度液 (5, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$), 更换细胞培养液, 加入药物浓度梯度液, 每孔 100 μL 。将培养板在培养箱孵育 24 h。向每孔加入 10 μL CCK8 溶液。将培养板在培养箱内孵育 1~4 h。用酶标仪测定吸光度。

1.3 流式细胞死亡检测 配制细胞悬液六孔板铺板, 保持细胞密度约 70%, 培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% 二氧化碳) 培养 24 h。根据 IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) 使用空白 DMEM 稀释 α -NETA 母液, 实验组三孔更换加入药物的空白培养液, 使用空白培养基设立三孔对照组。培养箱内孵育 24 h 后分别消化两组细胞配制细胞悬液。按表 1 设计加入 Annexin V 与核酸染料。轻轻混匀, 室温避光放置 15 min, 1 h 内上机操作检测。

记录相应数据后统计分析作图。

表 1 流式细胞死亡检测过程中加入试剂名称

管号	名称	染料	
1	阴性对照	—	—
2	单阳 1	AV-FITC	—
3	单阳 2	—	PI
4	样本	AV-FITC	PI

1.4 体内动物实验 取 15 只雌性免疫缺陷裸鼠 (BALB/c) 用于异种移植研究。每 5 只小鼠圈养在一个笼子中, 每天 12 h 昼夜交换模式, 可以随意获取食物和无菌水。将 α -NETA 溶于 99.5% 甲醇 (上海世益化学品有限公司), 用 Opti-MEM (Gibco 31985070, USA) 配制溶液为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 。使用 PBS 配制 HO8910 细胞悬液, 每只小鼠在左腋窝皮下注射约 1×10^7 HO8910 细胞。每日称重小鼠并每隔一天测量肿瘤。肿瘤体积计算: 瘤体积 (mL) = 长 $\times$ (宽)² $\times 0.5$ 。2 周后, 将 15 只小鼠随机分成三组, (对照组, 实验组 1 和实验组 2)。当肿瘤达到 $\geq 0.15 \text{ mL}$ 的体积时, 用药物治疗小鼠。实验组 1 ($n = 5$) 每只小鼠每天注射 50 μL α -NETA 工作溶液, 对照组 ($n = 5$) 皮下注射与实验组相同浓度的载体液体。实验组 2 ($n = 5$) 在 1 周前以与对照组相同的方式进行治疗, 并且在 1 周后进行与实验组 1 相同的治疗。根据伦理准则, 当肿瘤达到 2 mL 体积或直径超过 2 cm 时, 处死动物, 然后切除肿瘤。将肿瘤在冰箱中于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻。密切监测小鼠的体重减轻和其他毒性迹象。通过 Kruskal-Wallis 检验将三组的统计学 (肿瘤体积, 肿瘤重量和小鼠体质量) 用于比较分析。

1.5 统计学方法 使用 SPSS 和 GraphPad Prism 软件进行统计分析和制作图表。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 t 检验。多组间比较采用 Kruskal-Wallis 检验。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α -NETA 诱导上皮性卵巢癌细胞死亡 图 1A 所示为 100 倍显微镜下杀灭效果。使用 CCK8 对 HO8910, Hey 和正常卵巢细胞株 Moody 细胞系进行细胞毒性测定 (图 1B)。同时, 进行 IC_{50} 计算: HO8910 = 6.28 $\mu\text{g/mL}$, Hey = 26.34 $\mu\text{g/mL}$, Moody = 45.29 $\mu\text{g/mL}$ (1 μM α -NETA = 369.24 mg; 1 mg α -NETA = 0.27 μmol)。用浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$ α -NETA 的空白培养基处理 HO8910 24 h (与对照相同浓度的甲醇), 并使用流式细胞仪进行死亡率测定 (图 1C)。 α -NETA 组的死亡率 46.8% 远高于对照组的 2.8%。所有实验进行了 3 次以上的独立重复实验。

2.2 α -NETA可抑制体内肿瘤生长 在免疫缺陷小鼠BALB/c异种移植模型中检测 α -NETA在体内作用效果。HO8910细胞用于皮下肿瘤形成。通过瘤内注射方式给药。图2A为动物实验周期图。图2B示,与对照组相比,实验组1(治疗1周)和实验组2(治疗2周)的肿瘤体积($P=0.007$)和肿瘤重量($P=0.004$)都有所减少。Kruskal-Wallis检验三组间比较, $P<0.01$ 。 α -NETA使用浓度未观察到小鼠中毒或者死亡现象。

2.3 α -NETA通过 β -arrestin 2介导杀死肿瘤细胞 将 α -NETA处理后的HO8910细胞与对照组细胞进行WB检测,结果发现处理组HO8910细胞 β -arrestin 2表达增加(图3A)。同样检测CMKLR1的

表达情况,结果差异无统计学意义(数据未展示)。这表明 β -arrestin 2作为一个与细胞膜表面的G蛋白偶联受体CMKLR1密切相关的蛋白参与了杀死肿瘤细胞的过程。同时,根据之前化疗药物与细胞焦亡相关的报道^[3],对 α -NETA处理后的上皮性卵巢癌细胞HO8910进行显微镜下观察,发现产生有细胞焦亡相关的特征性大泡(图3B)。

3 讨论

本研究的开端起源于一个偶然的发现。 α -NETA是CMKLR1的一个新型抑制剂可以通过调节 β -arrestin2抑制CMKLR1活性^[2]。起初我们推测,CMKLR1被 α -NETA处理后会可能会抑制上皮性卵巢癌细胞迁移,于是我们进行了细胞划痕实验,但

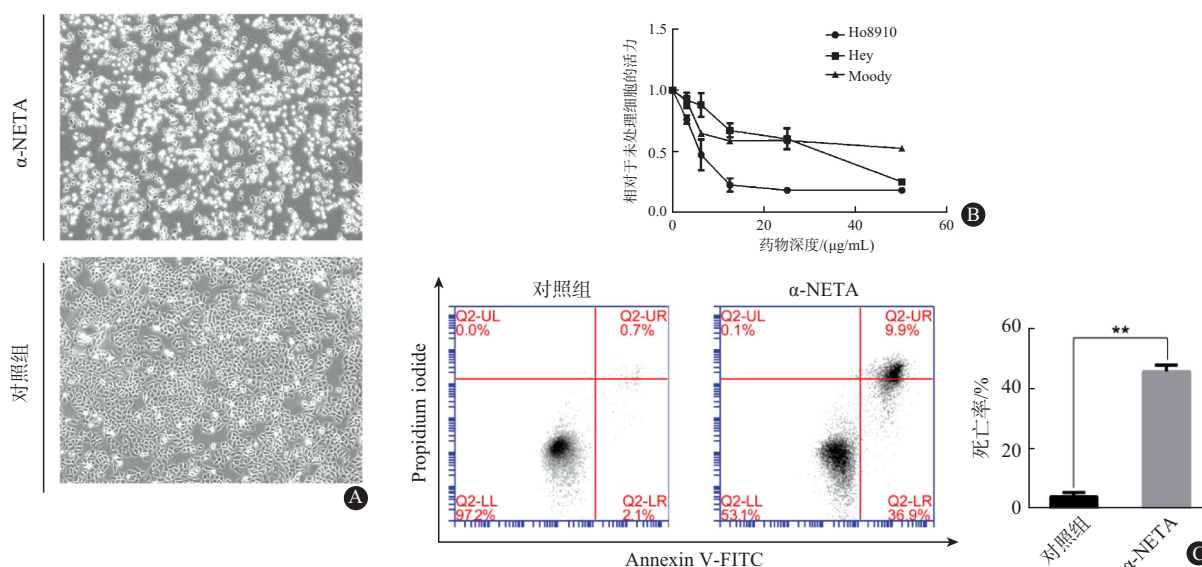
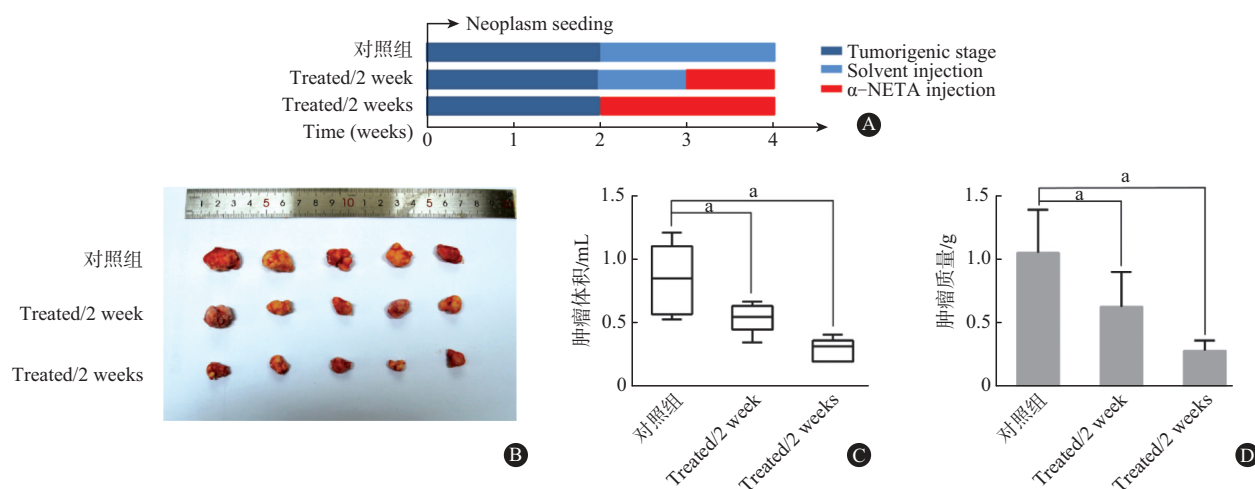


图1 α -NETA细胞学药物毒性检测:A为100倍显微镜下浓度12.5 μ g/mL α -NETA作用HO8910细胞24 h后实验组与对照组效果图,B为对HO8910,Hey卵巢癌细胞株以及正常卵巢细胞株Moody进行CCK8毒性检测,C为流式细胞仪进行死亡率测定



注:HO8910细胞用于皮下肿瘤形成。小鼠总数量为15只,随机分为三组,每组5只

图2 α -NETA体内动物实验:A为体内实验周期图表。B为小鼠肿瘤离体照片,从上到下分别为对照组,治疗组1(Treated/1 week),治疗组2(Treated/2 week)。C为三组肿瘤体积的统计分析($P=0.007$)。D为三组肿瘤质量的统计分析($P=0.004$)。Kruskal-Wallis检验三组间比较, $P<0.01$

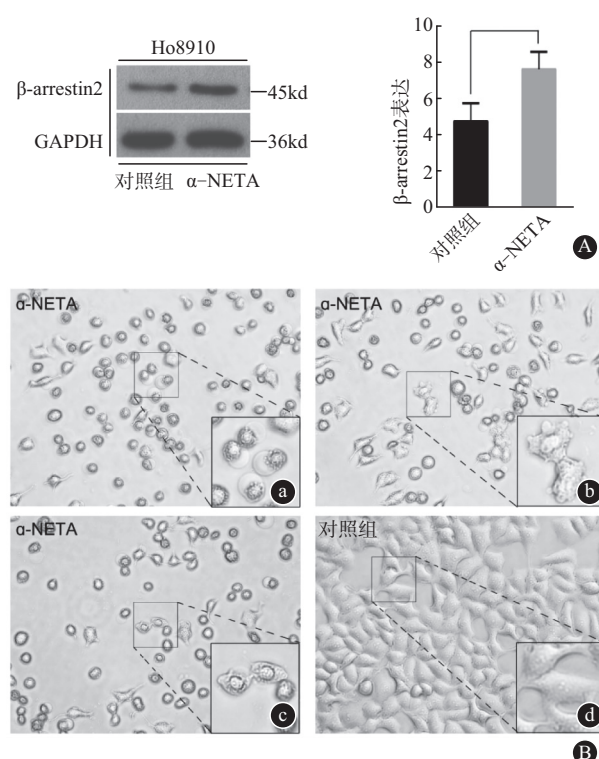


图3 α -NETA杀灭肿瘤细胞相关通路探究:A为对 α -NETA处理后细胞蛋白进行3次独立重复WB检测结果发现处理组HO8910细胞较对照组 β -arrestin 2表达增加, $P < 0.05$,B为显微镜下200倍镜像观察,可见 α -NETA处理组中有与细胞焦亡相关特征性大泡产生,见图a, b, c右下角所示。对照组无相关现象(见图d)

是我们发现用 α -NETA处理卵巢癌细胞后,发现细胞停止生长,甚至死亡。经过反复实验验证之后,发现这并非一个偶然现象。

随后,我们进行了体内动物实验,发现了特定浓度下 α -NETA的抗肿瘤作用。但是对于每一个小分子化疗药物,不可避免地一个问题就是药物的副作用表现,即毒性表现。我们通过小鼠活动力,体重等指标观察发现,与对照组相比, α -NETA治疗后的小鼠体重上升不明显,而且实验组小鼠有弓背表现,虽然并未发现影响小鼠活力,但是我们推测 α -NETA还是存在一定的毒性或者是神经性毒副作用。但是这并不能否定 α -NETA作为一个新型抗肿瘤小分子化学药物的可能性。

更进一步地,我们在细胞死亡通路研究检测中发现了 β -arrestin2的差异表达,在之前文献报道中有提及, α -NETA可以通过调节 β -arrestin2在细胞膜内富集与CMKLR1细胞膜内羧基末端结合,从而导

致CMKLR1,G蛋白偶联受体的失活。 α -NETA在此过程中扮演了G蛋白偶联受体的配体,替代chemerin与其产生竞争与CMKLR1结合发挥作用。该细胞通路被此前文献证明确实是存在的^[9],但是该通路的作用仅仅是被证明是抑制肿瘤细胞迁移,抑制肿瘤细胞增殖的作用。总之,本课题研究发现了 β -arrestin2可能参与了细胞死亡,之前有文献报道过Arrestin家族蛋白参与抑制细胞凋亡^[4-8]。但同时也有文献报道化疗药物所致细胞死亡属于细胞焦亡^[3]。所以,本课题要完全确定 α -NETA介导细胞死亡是哪种细胞死亡方式,还需要后续深入研究。但是, α -NETA作为小分子化学药物,其发挥的抗肿瘤细胞的新功能,是具有一定的临床意义与研究价值的。

参考文献

- [1] JAYSON GC, KOHN EC, KITCHENER HC. Ovarian cancer [J]. Lancet, 2014, 384(9951): 1376-1388.
- [2] GRAHAM KL, ZHANG JV, LEWÉN S, et al. A novel CMKLR1 small molecule antagonist suppresses CNS autoimmune inflammatory disease [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(12): e112925. DOI: 10.1371/journal.pone.0112925.
- [3] WANG Y, GAO W, SHI X, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin [J]. Nature, 2017, 547(7661): 99-103.
- [4] DEFEA KA, VAUGHN ZD, O' BRYAN EM, et al. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta-arrestin-dependent scaffolding complex [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(20): 11086-11091.
- [5] NIETO GUTIERREZ A, MCDONALD PH. GPCRs: Emerging anti-cancer drug targets [J]. Cell Signal, 2018, 41: 65-74.
- [6] O' HAYRE M, DEGESE MS, GUTKIND JS. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer [J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 27: 126-135.
- [7] REVANKAR CM, VINES CM, CIMINO DF, et al. Arrestins block G protein-coupled receptor-mediated apoptosis [J]. J Biol Chem, 2004, 279(23): 24578-24584.
- [8] SHENOY SK, LEFKOWITZ RJ. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction [J]. Trends Pharmacol Sci, 2011, 32(9): 521-533.
- [9] TÜMMER C, SNAPKOV I, WICKSTRÖM M, et al. Inhibition of chemerin/CMKLR1 axis in neuroblastoma cells reduces clonogenicity and cell viability in vitro and impairs tumor growth in vivo [J]. Oncotarget, 2017, 8(56): 95135-95151.

(收稿日期:2019-06-17,修回日期:2019-08-06)