

结缔组织生长因子促进人卵巢癌细胞系 SKOV3 增殖与迁移

董玲玲^{1*}, 高云², 牛国宇²

(1. 潍坊市中医院 肿瘤中心; 2. 潍坊医学院 公共卫生与管理学院, 山东 潍坊 261000)

摘要:目的 探讨结缔组织生长因子(CTGF)对人卵巢癌细胞系 SKOV3 增殖、迁移能力的影响,并探索其可能机制。方法 用重组人 CTGF (rhCTGF)处理 SKOV3 细胞;利用 CCK-8 法和集落形成实验检测 SKOV3 细胞的增殖;利用细胞划痕实验检测 SKOV3 细胞的迁移;Western blot 检测上皮-间充质转化(EMT)相关蛋白表达。结果 rhCTGF 处理后,SKOV3 细胞的增殖率增高,集落形成、细胞迁移能力增强($P<0.05$)。EMT 相关蛋白 E-cadherin 表达降低,而 Vimentin 表达增高($P<0.05$)。结论 CTGF 能够促进 SKOV3 细胞的增殖及迁移,该作用可能与其调控 EMT 有关。

关键词: 结缔组织生长因子;卵巢癌细胞;增殖;迁移;机制

中图分类号:R737.31 文献标志码:A

Connective tissue growth factor promotes

the proliferation and migration of human ovarian cancer cell line SKOV3

DONG Ling-ling^{1*}, GAO Yun², NIU Guo-yu²

(1. Tumor Center, Weifang Hospital of Traditional Chinese Medicine;

2. School of Public Health and Management, Weifang Medical University, Weifang 261000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of CTGF on proliferation and migration of SKOV3 and the underlying mechanism. **Methods** SKOV3 cells were treated with recombinant human CTGF (rhCTGF). The proliferation of SKOV3 was detected by CCK-8 assay and colony formation assay. The migration of SKOV3 was detected by wound healing assay. The expression of EMT-related proteins was detected by Western blot. **Results** After rhCTGF treatment, the proliferation rate of SKOV3 was increased, the colony formation and migration were enhanced ($P<0.05$). The expression of E-cadherin was decreased and the expression of vimentin was increased, which were related proteins of EMT ($P<0.05$). **Conclusions** CTGF can promote proliferation, growth and metastasis of SKOV3, and that may contribute to the regulation of epithelium-mesenchymal transformation (EMT).

Key words: CTGF; ovarian cancer cell; proliferation; migration; mechanism

上皮性卵巢癌(ovarian cancer)由于侵袭性较强,大多数患者被确诊时已为晚期^[1]。临床迫切需要了解卵巢癌发生发展的分子机制,并进一步确定

诊断和治疗的分子标记和靶点^[2]。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是一种属于 CCN 家族的分泌蛋白,参与肿瘤的增殖、迁移、

收稿日期:2020-03-04 修回日期:2020-05-07

基金项目:潍坊市科技发展计划项目(2019YX015)

*通信作者(corresponding author): yiyang901@126.com

血管生成和转移等^[3-4]。研究发现 CTGF 在卵巢癌的发生发展中起到重要作用^[5-6],但具体机制不清。本研究采用 rhCTGF 刺激卵巢癌细胞 SKOV3,观察 SKOV3 的增殖、迁移能力以及 EMT 相关蛋白的表达变化,初步探索 CTGF 在卵巢癌中的作用,为卵巢癌寻找新的预后标志物和分子治疗靶点提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

重组人 CTGF (rhCTGF) (PeproTech 公司);人卵巢癌细胞系 SKOV3 (山东大学齐鲁医院肿瘤中心实验室惠赠);CCK8 试剂盒 (日本同仁试剂公司);Western blot 相关抗体 (Bioworld 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞的分组及处理:人卵巢癌细胞 SKOV3 培养于加双抗的含 10% FBS 的 DMEM 培养基中。置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养,胰蛋白酶消化传代细胞。实验组用含 rhCTGF (终浓度 500 mg/L) 的 DMEM 培养基培养,对照组含同等量 PBS 的 DMEM 培养基培养。每组实验重复 3 次。

1.2.2 CCK-8 检测细胞增殖:将 SKOV3 细胞接种在 96 孔板内,5 000 个/孔,第 1~7 天内检测。加入 10% CCK8 试剂后继续培养 2 h,在酶标仪 450 nm 处检测各孔吸光度值 (A)。

1.2.3 集落形成检测细胞增殖:接种 SKOV3 细胞 500 个/孔在 6 孔板,每组 2 个复孔。一般培养 14 d 内。集落形成后停止培养,固定、染色、拍照。

1.2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移能力:调整细

胞密度为 5.0×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,待细胞汇合度达到 90% 左右时,用 200 μ L 枪头划线,PBS 清洗 3 次。并于划线后 0、24 和 48 h 后拍照记录。

1.2.5 Western blot 检测蛋白:将 SKOV3 细胞接种 24 h 板,完全汇合后 rhCTGF 处理 24 h,提取细胞总蛋白,测定蛋白含量,制胶、上样、电泳、转膜、洗膜,脱脂奶粉封闭 1 h,一抗孵育 4 ℃ 过夜,二抗室温反应 2 h,ECL 曝光成像。

1.3 统计学分析

应用 Image J 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行图片及实验数据分析。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用方差分析,组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结 果

2.1 rhCTGF 促进卵巢癌 SKOV3 细胞增殖

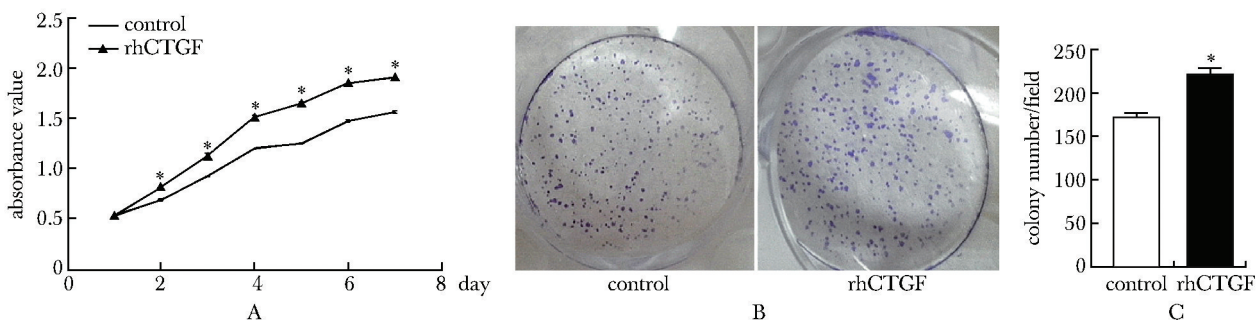
rhCTGF 处理后,SKOV3 细胞的增殖率高于对照组 ($P < 0.05$) (图 1A)。细胞培养 14 d 左右,实验组细胞的克隆形成能力高于对照组 ($P < 0.05$) (图 1B,C)。

2.2 rhCTGF 促进卵巢癌 SKOV3 细胞的迁移能力

与对照组相比,实验组 SKOV3 细胞的迁移率明显提高 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 rhCTGF 影响 EMT 相关蛋白的表达

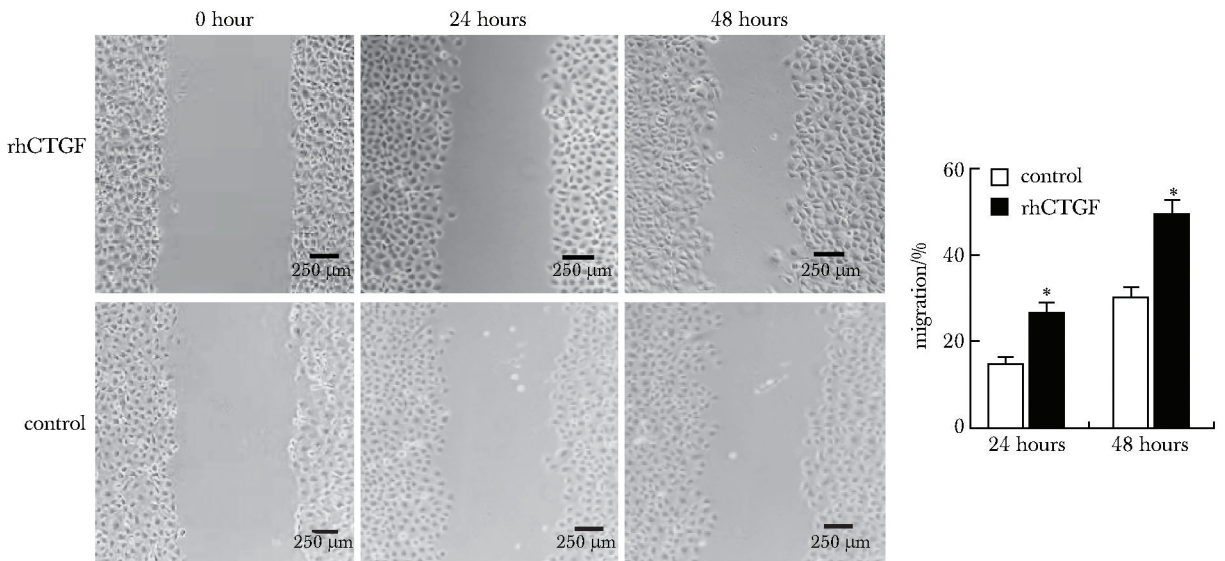
rhCTGF 处理后 EMT 相关标志物 E-cadherin 蛋白表达水平显著低于对照组 ($P < 0.05$),而 Vimentin 蛋白表达水平显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 3)。



* $P < 0.05$ compared with control group

图 1 CCK8 法 (A) 和克隆形成实验 (B,C) 分别检测 SKOV3 细胞的增殖和克隆形成能力

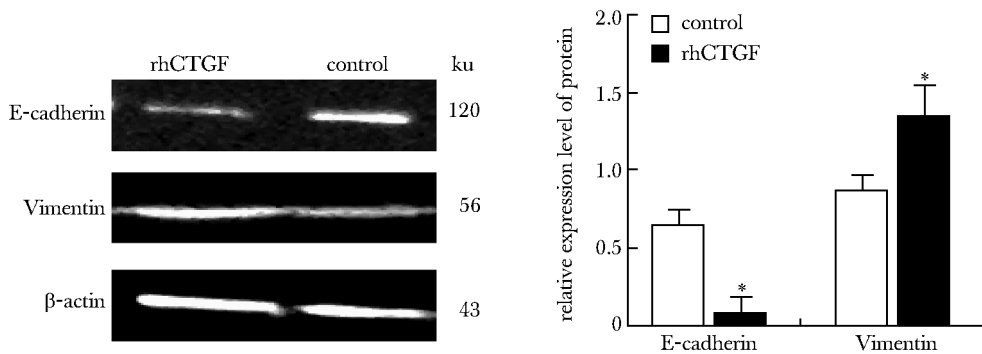
Fig 1 Proliferation and colony formation abilities of SKOV3 were detected by CCK8 assay (A) and colony-forming assay (B,C), respectively



* $P < 0.05$ compared with control group

图2 划痕愈合实验检测 SKOV3 细胞迁移能力

Fig 2 Migration ability of SKOV3 was detected by wound healing assay ($\times 100$)



* $P < 0.05$ compared with control group

图3 蛋白质印迹法检测 SKOV3 细胞中 EMT 相关蛋白的表达

Fig 3 The expressions of EMT related proteins (including E-cadherin, Vimentin) in SKOV3 was detected by Western blot

3 讨论

上皮性卵巢癌是妇科肿瘤中致死性最高的恶性肿瘤。多年来,卵巢癌的治疗得到长足的进展,但晚期卵巢癌的总生存期仍不尽人意^[7]。CTGF 在卵巢癌发生、发展中的作用被很多学者探索,部分学者认为它在卵巢癌的发生发展中起到抑制作用^[8-9],

但近年来越来越多的证据表明它为促癌因子^[10-11]。本研究利用外源性 rhCTGF 处理卵巢癌细胞 SKOV3 后细胞增殖及迁移能力明显增强,E-cadherin 表达下调,Vimentin 的表达上调。综上可见,CTGF 可能通过诱导 EMT 促进卵巢癌细胞的增殖和迁移,有望成为上皮性卵巢癌新的预后标记及分子靶向治疗研究的新方向。

参考文献:

[1] Siegel R, DeSantis C, Virgo K, *et al.* Cancer treatment

and survivorship statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2012,

- 62:220-241.
- [2] Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, *et al.* Focus on epithelial ovarian cancer[J]. *Cancer Cell*,2004,5:19-24.
- [3] Shimbo A, Kajiyama H, Tamauchi S, *et al.* Expression of connective tissue growth factor as a prognostic indicator and its possible involvement in the aggressive properties of epithelial ovarian carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2019, 42: 2323-2332.
- [4] Cheng JC, Chang HM, Leung PCK. Connective tissue growth factor mediates TGF- β 1-induced low-grade serous ovarian tumor cell apoptosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 85224-85233.
- [5] Moran-Jones K, Gloss BS, Murali R, *et al.* Connective tissue growth factor as a novel therapeutic target in high grade serous ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 44551-44562.
- [6] Wang L, He J, Xu H, *et al.* MiR-143 targets CTGF and exerts tumor-suppressing functions in epithelial ovarian cancer[J]. *Am J Transl Res*,2016,8:2716-2726.
- [7] Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian cancer: an integrated review[J]. *Semin Oncol Nurs*,2019,35:151-156.
- [8] Chu CY, Chang CC, Prakash E, *et al.* Connective tissue growth factor (CTGF) and cancer progression [J]. *J Biomed Sci*,2008,15:675-685.
- [9] Jacobson A, Cunningham JL. Connective tissue growth factor in tumor pathogenesis[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*,2012.doi:10.1186/1755-1536-5-S1-S8.
- [10] Tan G, Cao X, Dai Q, *et al.* A novel role for microRNA-129-5p in inhibiting ovarian cancer cell proliferation and survival via direct suppression of transcriptional co-activators YAP and TAZ[J]. *Oncotarget*,2015,6:8676-8686.
- [11] Wang L, He J, Xu H, *et al.* miR-143 targets CTGF and exerts tumor-suppressing functions in epithelial ovarian cancer[J]. *Am J Transl Res*, 2016,8:2716-2726.

本刊稿件格式要求(1)

1.1 题名:应与内容相符,言简意赅,体现创新点或主要结论,避免过大、空泛,一般不超过 20 个汉字,不用副标题。英文题名应与中文一致,除专有名词外,只第 1 个词的首字母大写,其他均小写。

1.2 基金:在首页页脚标注所受资助的基金项目及编号。

例:基金项目:国家自然科学基金(39470325)。

1.3 作者:应是对文章做出贡献、能对内容负责者,一般 ≤ 7 个。如有不同单位作者,在右上角标注不同数字以区别。通信作者以“*”标注。作者英文的“姓”需用全称并且大写,“名”的第 1 个字拼音的首字母大写,后面均用小写,两字之间用连字符。

例:WANG Xiao-san。

1.4 作者单位:

1.4.1 中文:写标准全称(由大单位到小单位,中间用空格隔开)、所在省份、城市及邮编。如有不同单位,以作者右上角标的数字对应标注单位。

例:华中科技大学 同济医学院 1. 免疫学系;2. 病理生理学系,湖北 武汉 430022

1.4.2 英文:由小单位到大单位,中间用“,”隔开,省份略去。每个实义词的首字母大写。

例:1. Department of Immunology;2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China