

网络出版时间: 2021-8-19 15:19 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1123.018.html>

乳铁蛋白六肽降低人卵巢癌细胞的耐药性及其机制

刘会¹, 郭若文¹, 徐怡², 刘力伟², 刘芸¹, 秦宜德¹

摘要 目的 研究乳铁蛋白六肽(LfcinB4-9)降低人卵巢癌细胞的耐药性并探究其作用可能的机制。方法 MTT检测顺铂(DDP)联合LfcinB4-9对人卵巢癌细胞SKOV3、SKOV3/DDP、CI3K、CI3K/DDP的增殖抑制; HE细胞染色切片实验检测人卵巢癌细胞经加药处理后细胞形态发生的变化; 平板克隆实验检测DDP联合LfcinB4-9对人卵巢癌细胞克隆形成能力的影响; Transwell实验检测DDP联合LfcinB4-9对人卵巢癌细胞侵袭能力的影响; qRT-PCR检测人卵巢癌细胞在LfcinB4-9和DDP联合处理下HSP70、OPTN等基因的表达情况。结果 LfcinB4-9和DDP联合作用对卵巢癌细胞的抑制率明显高于DDP单独作用组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 人卵巢细胞经DDP联合LfcinB4-9作用后细胞形态变化显著大于DDP单独作用组, 与DDP单独组相比, DDP联合LfcinB4-9作用后人卵巢癌细胞克隆形成能力和侵袭能力均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。qRT-PCR实验显示, DDP联合LfcinB4-9时HSP70、OPTN等耐药相关基因表达显著低于对照组和DDP单独组。结论 LfcinB4-9与DDP联合作用后明显增强了卵巢癌细胞对DDP的敏感性, 其作用是通过降低HSP70、OPTN等基因表达, 通过HSP70-耐药蛋白的信号途径来实现的。

关键词 卵巢癌细胞; 乳铁蛋白六肽; 顺铂; 耐药性; 基因表达

中图分类号 R 737.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)10-1595-08
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.017

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中最致命的恶性肿瘤, 目前临床上使用的治疗方法仍然是手术结合化疗^[1], 但是由于卵巢癌极易复发和容易产生耐药性, 所以其预后很差, 患者的5年生存率只有30%左右, 降低卵巢癌对化疗药物的耐药性是当前针对卵巢癌治疗的主要研究方向。乳铁蛋白六肽(lactoferrin hexapeptide, LfcinB 4-9)来源于牛乳铁蛋白抗

菌肽(bovine lactoferricin, LfcinB), 是乳铁蛋白抗菌肽的活性中心, 具有多种生物学活性^[2-4], 其序列为RRWQWR。前期研究^[5]显示LfcinB 4-9具有抗卵巢癌的作用, 虽然作用效果不及目前临床上一线抗癌药物-顺铂(cis-dichlorodiammine platinum, DDP), 但其没有副作用和耐药性而广受关注。LfcinB 4-9和DDP联合使用能否降低卵巢癌细胞的耐药性, 增强卵巢癌对DDP的敏感性仍有待探讨。该研究在前期研究的基础上, 通过LfcinB 4-9和DDP联合作用对卵巢癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响来探索LfcinB 4-9能否改善卵巢癌细胞对DDP的耐药性。

1 材料与方法

1.1 材料 纯度为99.8%的LfcinB 4-9由上海生工公司合成; RPMI-1640培养基、DMEM培养基(美国HyClone公司); 胎牛血清(FBS, 上海四季青公司); DDP(江苏南通诺欣药业公司); Olaparib(D1810190, 上海阿拉丁公司); 逆转录试剂盒(K1622, 美国Thermo Fisher公司); qRT-PCR试剂盒(A6001, 美国Promega公司); Transwell板(美国Costar公司)。

1.2 细胞培养 人卵巢癌细胞株SKOV3、SKOV3/DDP、CI3K、CI3K/DDP均购于中科院细胞库。SKOV3、SKOV3/DDP使用FBS浓度为10%的DMEM培养基, 加入1%的双抗, 置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。CI3K、CI3K/DDP使用FBS浓度为10%的RPMI-1640培养基, 加入1%的双抗, 置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

1.3 细胞增殖实验 将细胞接种于96孔板, 每组6个复孔, 培养过夜后。分为8组: 对照组、5 μmol/L LfcinB 4-9组、DDP(IC₅₀)组、DDP(IC₅₀) + 0.5 μmol/L LfcinB 4-9组、DDP(IC₅₀) + 5 μmol/L LfcinB 4-9组、DDP(IC₅₀) + 50 μmol/L LfcinB 4-9组, Olaparib(IC₅₀)组、DDP(IC₅₀) + Olaparib(IC₅₀)组, 分别培养24、48、72 h后, 每孔加入20 μl MTT置于培养箱中孵育4 h。使用酶标仪检测吸光度(optical density, OD)值, 以空白为对照组, 按照计算公式: 增

2021-07-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81472448)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院¹ 生物化学与分子生物学教研室、² 免疫教研室, 合肥 230032

作者简介: 刘会, 女, 硕士研究生;

秦宜德, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yideqin@ahmu.edu.cn

殖抑制率(%) = $(1 - OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$, 计算卵巢癌细胞增殖抑制率。

1.4 HE 细胞染色观察细胞形态 将爬片用高锰酸钾浸泡过夜、灭菌、烘干置于 6 孔板底部, 将细胞消化成细胞悬液, 铺在 6 孔板底部制成细胞爬片, 过夜。按照分组加药培养 48 h, 弃去培养基, PBS 洗涤 3 遍, 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 洗涤 3 遍, 加入 0.7% Triton X-100 通透 10 min 后, PBS 洗涤 3 遍。去离子水洗涤 2 遍, 苏木精染色 7 min, 50 ℃ 水蓝化 4 min, 伊红溶液染色 5 min, 最后清水洗涤干净, 烘干封片拍照。

1.5 平板克隆形成实验 将细胞以 1 000 个每孔铺于 6 孔板中, 每组设置 3 个复孔, 按照分组加药培养, 每 2 d 更换 1 次培养基, 培养 2 周。将培养基弃去, 用 PBS 洗涤 3 遍, 用 4% 的多聚甲醛固定 20 min, 结晶紫染色, 清水洗涤干净拍照, 以对照组计算克隆抑制率, 公式为: 用药组克隆抑制率(%) = $1 - (\text{用药组形成的克隆数} / \text{空白对照组形成的克隆数}) \times 100\%$ 。

1.6 Transwell 实验 将 BD 基质胶按照比例配置好加入小室中, 置于细胞培养箱中待凝固, 将 2×10^5 个细胞重悬于 100 μl 无血清培养基中加至 Transwell 小室膜上, 在小室下方加入含 10% FBS 的培养基 500 μl , 每组设置 3 个复孔, 置于培养箱中培养 24 h, 用 PBS 洗涤小室 2 次, 用 4% 的多聚甲醛固定 20 min, 结晶紫染色, 清水洗涤干净拍照。

1.7 qRT-PCR 实验 按照分组处理细胞 48 h, 消化收集、裂解细胞, 提取细胞中的总 RNA。按照逆转录试剂盒中操作步骤采用两步法将 RNA 逆转录成 cDNA, 包括总 RNA 2 μl 、Oligo(DT) 2 μl 、水 9 μl 、65 ℃ 反应 5 min, 置于冰上。加入 $5 \times \text{RB} 4 \mu\text{l}$ 、RI 1 μl 、dNTP(10 mmol/L) 2 μl 、RT 1 μl , 最终体积为 20 μl , 逆转录反应条件为 42 ℃、60 min, 70 ℃、5 min, 生成 cDNA, 并以 cDNA 为模板, 按照 qRT-PCR 试剂盒配置反应体系加入到八连管中, 按照 3 步进行反应: 95 ℃ 预变性 30 s, 以 95 ℃ 变性 20 s、56 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s 进行 40 个循环。每组设置 3 个复孔, 以 β -actin 引物为内参, 目的引物序列

见表 1, 根据实验结果获得 Ct 值, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算基因的相对表达量。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间的差异使用方差分析进行数据分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
OPTN	F: CCAACCTGGACACGTTTACC R: CCTCAAATCTCCCTTTCATGGC
HSF1	F: CCATGAAGCATGAGAATGAGGC R: CTGTGTGACGACTTTCTGTTGC
HSP70	F: ACCTACTCTTGTGTGGGTGTT R: GACATAGCTTGGACTGGTTCC
β -actin	F: GACACTTTCGAACACGTGATAG R: TACAAGTCTGCGTCTTATTGT

2 结果

2.1 LfcinB 4-9 对 DDP 抑制卵巢癌细胞增殖作用的影响 DDP、Olaparib 作用于 4 种细胞各时间段的 IC_{50} 见表 2。通过不同浓度的 LfcinB 4-9 和 DDP IC_{50} 联合作用于人卵巢癌细胞, 以 Olaparib 作为阳性对照, 结果表明细胞的增殖抑制率随着 LfcinB 4-9 浓度增大而显著增高, 表现出与时间呈依赖关系 ($F_{\text{SKOV3}} = 841.1$ 、 $F_{\text{SKOV3/DDP}} = 474.5$ 、 $F_{\text{CI3K}} = 614.2$ 、 $F_{\text{CI3K/DDP}} = 290.5$)。LfcinB4-9 联合 DDP 组与单独使用 DDP 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见图 1。

2.2 LfcinB4-9 对 DDP 诱导卵巢癌细胞的凋亡和坏死的影响 通过 HE 细胞染色切片观察细胞形态变化, 实验结果显示 LfcinB4-9 联合 DDP 组与单独使用 DDP 组相比, 更能诱导细胞凋亡和坏死。LfcinB4-9 联合 DDP 组的 SKOV3、SKOV3/DDP、CI3K、CI3K/DDP 人卵巢癌细胞经染色均表现为核蓝紫红, 核大深染, 细胞核/细胞质比值增大。其中 CI3K、CI3K/DDP 细胞的胞核及胞质着色较于 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞深, 耐药株细胞较于不耐药株细胞染色颜色更偏紫红, 见图 2。

表 2 DDP、Olaparib 作用于 4 种细胞各时间段的 IC_{50} (mmol/L)

时间(h)	DDP 作用于 4 种细胞				Olaparib 作用于 4 种细胞			
	SKOV3	SKOV3/DDP	CI3K	CI3K/DDP	SKOV3	SKOV3/DDP	CI3K	CI3K/DDP
24	90.946	103.371	42.922	56.354	553.840	824.541	352.267	415.320
48	16.610	18.710	22.560	24.587	162.320	185.444	170.572	192.340
72	9.366	12.078	11.057	13.672	73.455	53.716	119.859	141.230

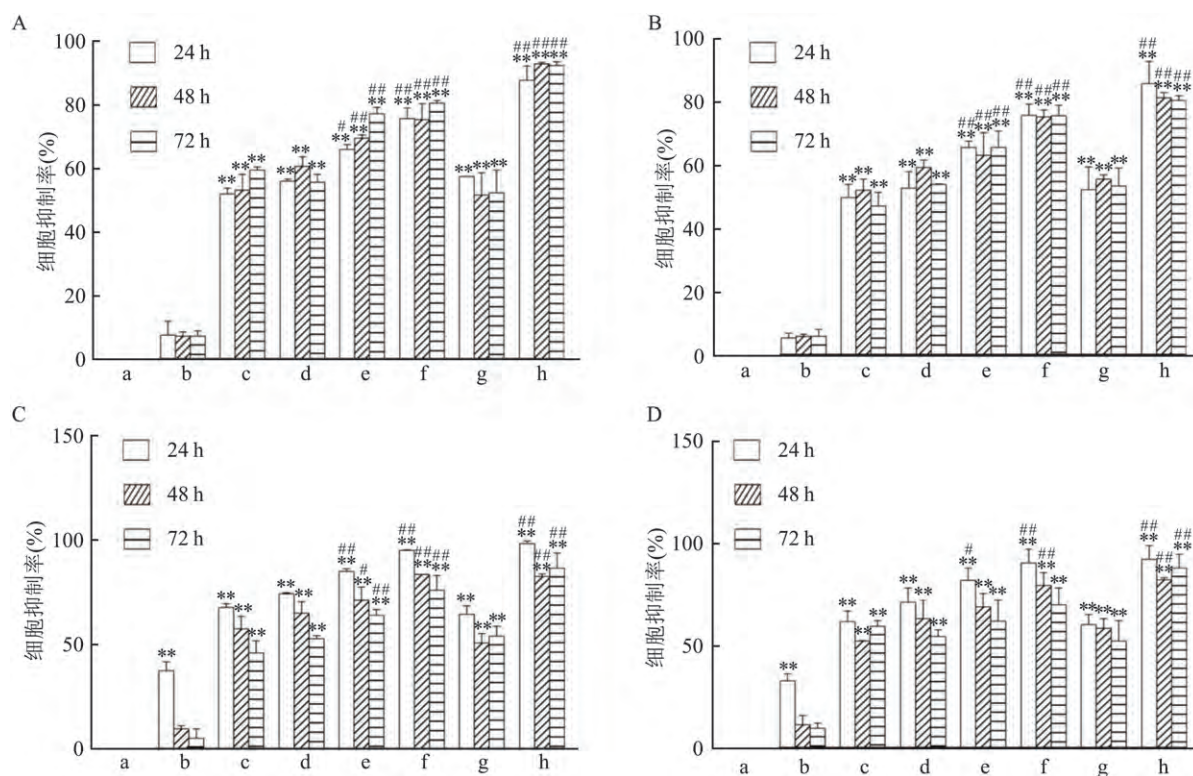


图1 MTT 检测联合用药对4种细胞增殖能力的影响

A: SKOV3; B: SKOV3/DDP; C: CI3K; C: CI3K/DDP; a: 对照组; b: 5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; c: DDP(IC_{50}) 组; d: DDP(IC_{50}) + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; e: DDP(IC_{50}) + 5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; f: DDP(IC_{50}) + 50 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; g: Olaparib(IC_{50}) 组; h: DDP(IC_{50}) + Olaparib(IC_{50}) 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 DDP(IC_{50}) 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

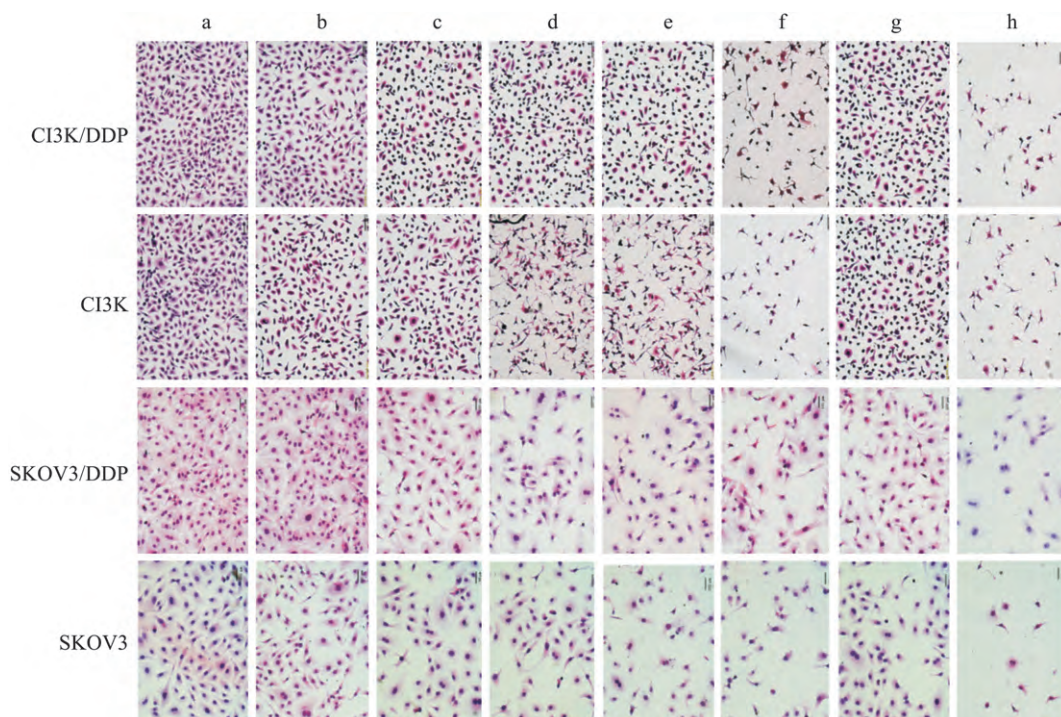


图2 HE 细胞切片实验检测联合用药对人卵巢细胞形态的影响 $\times 100$

A: SKOV3 ; B: SKOV3/DDP ; C: CI3K ; C: CI3K/DDP; a: 对照组; b: 5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; c: DDP(IC_{50}) 组; d: DDP(IC_{50}) + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; e: DDP(IC_{50}) + 5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; f: DDP(IC_{50}) + 50 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; g: Olaparib(IC_{50}) 组; h: DDP(IC_{50}) + Olaparib(IC_{50}) 组

2.3 LfcinB 4-9 对 DDP 抑制卵巢癌细胞克隆形成的影响 实验结果显示与对照组比较,加药组细胞克隆形成能力显著降低,且 LfcinB4-9 联合 DDP 组与单独使用 DDP 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),见图 3。

2.4 LfcinB 4-9 对 DDP 抑制卵巢癌细胞侵袭能力的影响 通过 Transwell 实验检测细胞侵袭能力,结果显示加药培养细胞 48 h 后,和单独使用 DDP 组比较,LfcinB4-9 联合 DDP 组细胞侵袭能力明显下降($P < 0.01$),见图 4。

2.5 LfcinB 4-9 对人卵巢癌细胞的 OPTN、HSF1、HSP70 基因表达的影响 用 qRT-PCR 检测人卵巢

细胞中 OPTN、HSF1、HSP70 的 mRNA 水平。结果显示,OPTN 基因在联合用药组的表达水平低于单独使用 DDP 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),HSF1 和 HSP70 在联合用药处理后表达量明显降低且低于单独使用 DDP 组,表明在联合处理后相关基因表达均被抑制。在 SKOV3、SKOV3/DDP 细胞株中基因表达量比在 CI3K、CI3K/DDP 细胞株中略高。见图 5。

3 讨论

DDP 是目前临床上治疗卵巢癌通用的一线药物,但由于耐药性的出现,使得治疗效果降低,临床上卵巢癌病死率逐年递增。所以急需降低卵巢癌对

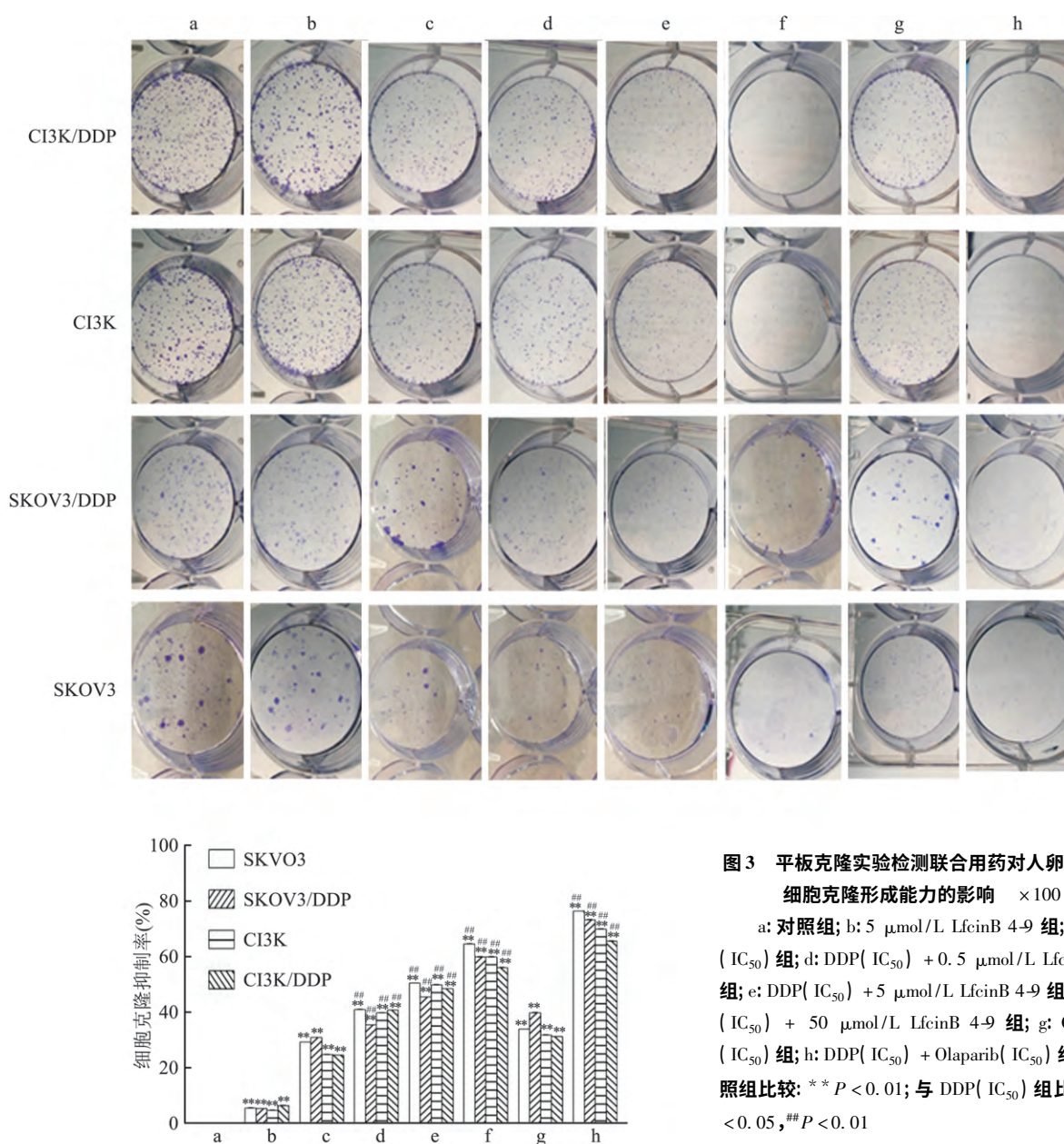


图3 平板克隆实验检测联合用药对人卵巢细胞克隆形成能力的影响 ×100

a: 对照组; b: 5 μmol/L LfcinB 4-9 组; c: DDP (IC₅₀) 组; d: DDP (IC₅₀) + 0.5 μmol/L LfcinB 4-9 组; e: DDP (IC₅₀) + 5 μmol/L LfcinB 4-9 组; f: DDP (IC₅₀) + 50 μmol/L LfcinB 4-9 组; g: Olaparib (IC₅₀) 组; h: DDP (IC₅₀) + Olaparib (IC₅₀) 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 DDP (IC₅₀) 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

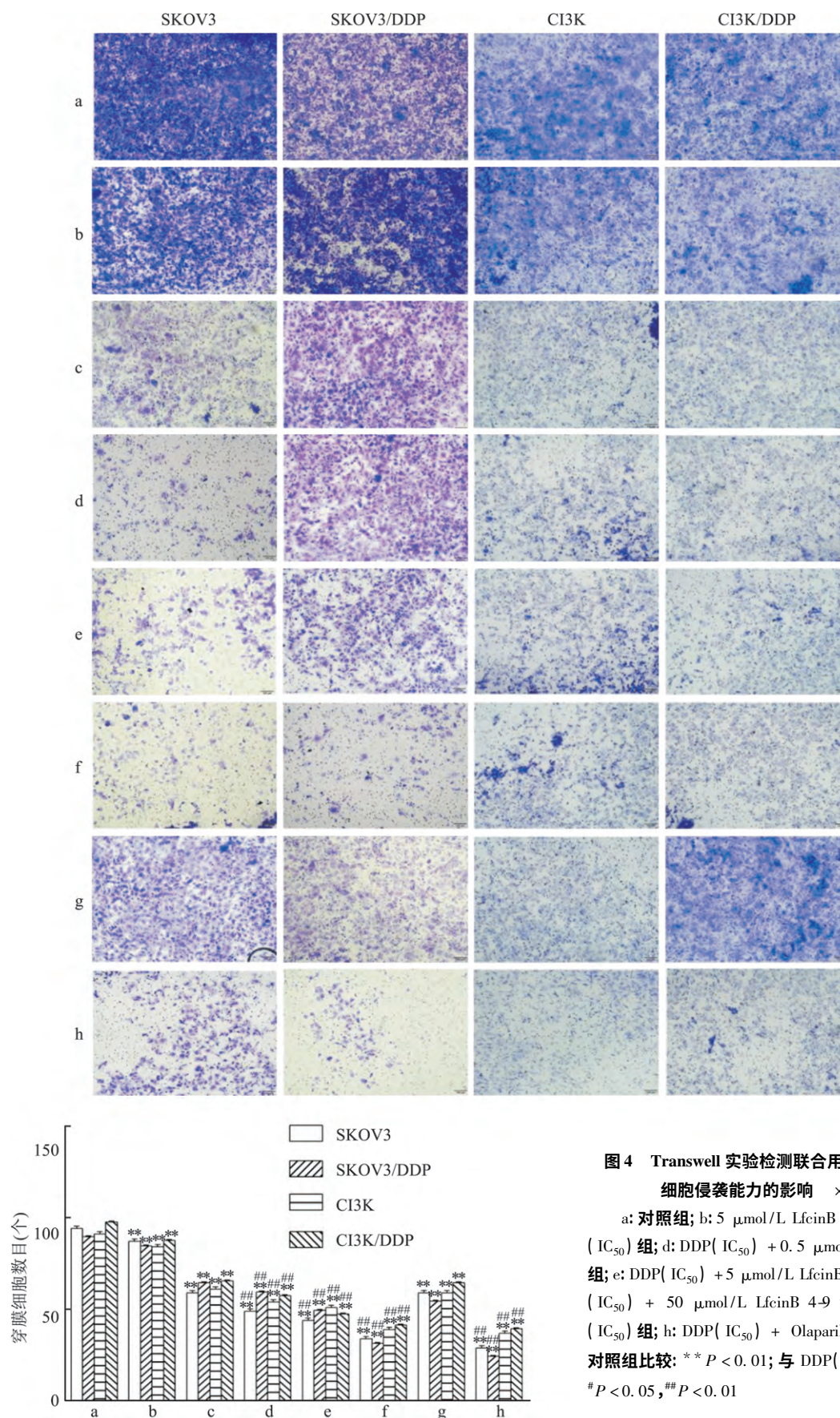


图4 Transwell 实验检测联合用药对人卵巢细胞侵袭能力的影响 $\times 100$

a: 对照组; b: 5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; c: DDP (IC_{50}) 组; d: DDP(IC_{50}) + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; e: DDP(IC_{50}) + 5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; f: DDP(IC_{50}) + 50 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; g: Olaparib (IC_{50}) 组; h: DDP(IC_{50}) + Olaparib(IC_{50}) 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 DDP(IC_{50}) 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

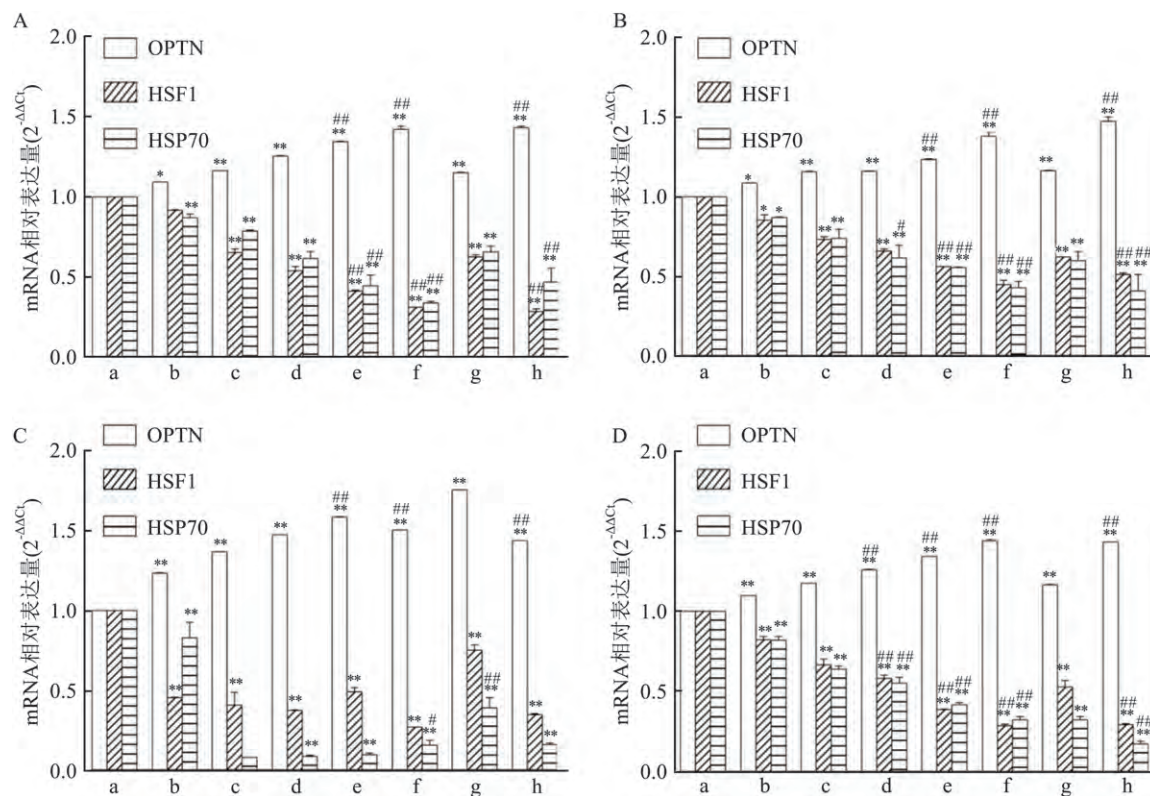


图5 联合用药后四种细胞中 OPTN、HSF1、HSP70 基因的表达情况

A: SKOV3; B: SKOV3/DDP; C: C13K; D: C13K/DDP; a: 对照组; b: 5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; c: DDP (IC_{50}) 组; d: DDP (IC_{50}) + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; e: DDP (IC_{50}) + 5 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; f: DDP (IC_{50}) + 50 $\mu\text{mol/L}$ LfcinB 4-9 组; g: Olaparib (IC_{50}) 组; h: DDP (IC_{50}) + Olaparib (IC_{50}) 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DDP (IC_{50}) 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

顺铂的耐药性,提高患者生存率。

本实验显示不同浓度的 LfcinB 4-9 与 DDP 的 IC_{50} 联合作用于人卵巢癌细胞,结果表明,LfcinB 4-9 可以增强 DDP 对人卵巢癌细胞的作用,提高卵巢癌细胞对 DDP 的敏感性,但相关的具体机制比较复杂,还需要进一步探索。化疗耐药是一种多基因多水平多种因素共同作用的过程,有多种细胞信号传导分子和途径涉及药物耐药性,其中包括多药耐药基因 (*MDR1*)、Bcl-2 蛋白家族、AKT 等凋亡相关基因。相关研究表明 *MDR1* 在肿瘤细胞中的高表达是产生肿瘤耐药性以致化疗失败的重要原因^[7], *MDR1* 编码一种跨膜相关的糖蛋白,类似于 ATP 依赖性的外排泵能够将细胞内的药物泵出体外,从而提高细胞耐药性,而 *OPTN* 基因的表达下降或不表达能够影响 *MDR1* 基因的表达上升。Bcl-2 蛋白家族可以通过抑制毒性刺激后的细胞凋亡来诱导化学疗法的耐药性,从而防止细胞死亡。相关研究显示, Bcl-2-a1 在细胞系中的过度表达可增强对不同癌症药物的耐药性,而 *OPTN* 基因的表达下降或不表达

能够影响 Bcl-2 基因的表达上升。AKT 基因参与线粒体介导的各种途径的细胞凋亡,通过磷酸化或者直接作用于细胞死亡因子来调节细胞凋亡。而相关研究^[8]表明 *OPTN* 基因可能通过抑制 AKT 蛋白表达,从而借助于 PI3K/AKT 途径促进肿瘤细胞的凋亡。其具体机制有待进一步研究。

人 *OPTN* 基因位于 10 号染色体上,由 5'UTR 中的 3 个非编码外显子和 13 个外显子组成,其表达的蛋白 OPTN 有 577 个氨基酸,大小为 66 ku。OPTN 具有膜运输、维持高尔基体、胞吐作用和蛋白质分泌、细胞分裂控制等多种作用^[7-8],在有关研究中 OPTN 被鉴定为选择性自噬受体^[9],可与多泛素化的底物结合,并将它们带到和微管相关蛋白 1 的轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light 3, LC3) 相互作用区的自噬体,可用于清除药物、受损的线粒体和 ER 处降解蛋白簇等功能^[10]。从公开可用的人类癌症数据中查找到, *OPTN* 基因在癌细胞均高表达,这与患者的生存率降低有关,同时也可能使 *OPTN* 成为有吸引力的治疗靶标,对于肿瘤发生或

肿瘤干性,在 Ser177 处 OPTN 的磷酸化起着关键作用,并在有丝分裂中起到巨大作用且诱导 OPTN 易位进入核,从而克服耐药性和更具攻击性的癌症,本实验中研究 OPTN 基因对卵巢癌细胞的增殖与耐药机制的影响,并从实验结果中可以看出 OPTN 基因的表达抑制了肿瘤细胞的增殖,降低了肿瘤细胞的耐药性,将为临床上的治疗提供重要理论依据。

热休克蛋白家族(heat shock proteins, HSP)是转录程序中主要的调控因子,作为分子伴侣,促进其他蛋白质的折叠、组装、运输和降解。相关研究^[11-12]表明热休克因子 1(heat shock transcription factor1, HSF1)、热休克蛋白 70(heat shock protein70, HSP70)在卵巢癌细胞中的高表达可能与癌症的形成与转移密切相关,HSF1、HSP70 在癌细胞中的高表达可能通过提供对化学疗法的抗性而导致肿瘤发生和转移,在相关研究中表明 HSF1 不仅借助于保护癌症中的蛋白质稳态而起着一般促癌因子的作用^[9],并且还起到破坏蛋白质稳态和引起淀粉样蛋白生成,可能是对抗恶性肿瘤的一种新型治疗策略。HSP 则可以通过外泌体被分泌到细胞外。胞外的 HSP 不仅可以通过外泌体介导的传输诱导促炎性细胞因子,也可以抑制蛋白质错误折叠和聚集在受体细胞,通过 HSP 的非细胞自主作用,HSF1 可通过产生炎性微环境并维持肿瘤的整体蛋白质组学稳定性来促进肿瘤进展。

由于 LfcinB 4-9 对正常细胞无毒性且来源广泛,因而在临床上有广阔的应用前景,也为卵巢癌化疗辅助药物研发提供了新的方向。

参考文献

- [1] Brasseur K, Gévry N, Asselin E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers [J]. *Oncotarget*,

- 2017, 8(3): 4008–42.
[2] Arias M, Hilchie A L, Haney E F, et al. Anticancer activities of bovine and human lactoferrin-derived peptides [J]. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95(1): 91–8.
[3] Zhou J, Yang X, Zhang W, et al. Construction of an anticancer fusion peptide (ACFP) derived from milk proteins and an assay of anti-ovarian cancer cells *in vitro* [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(4): 635–43.
[4] Jiang R, Lönnnerdal B. Bovine lactoferrin and lactoferricin exert antitumor activities on human colorectal cancer cells (HT-29) by activating various signaling pathways [J]. *Biochem Cell Biol*, 2017, 95(1): 99–109.
[5] 徐 怡, 阮 昕, 汪慎葵, 等. 乳源六肽增加人卵巢癌细胞对顺铂的敏感性 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(8): 1221–6.
[6] Wang S H, Yu J. Structure-based design for binding peptides in anti-cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2018, 156: 1–15.
[7] 王 鹏, 陈 曦, 徐 怡, 等. 敲低和敲除 OPTN 基因 SKOV3 细胞的构建及其对抗癌药物敏感性的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(9): 1315–20.
[8] 陈 曦, 王 鹏, 徐 怡, 等. 过表达 OPTN 和 TAU-P301-L 基因腺相关病毒构建与鉴定 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(11): 1649–54.
[9] Dokladny K, Zuhl M N, Mandell M, et al. Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: heat shock response and autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(21): 14959–72.
[10] Richter B, Sliter D A, Herhaus L, et al. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(15): 4039–44.
[11] Chea C, Miyauchi M, Inubushi T, et al. Molecular mechanism of inhibitory effects of bovine lactoferrin on the growth of oral squamous cell carcinoma [J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0191683.
[12] Kumar S, Stokes J 3rd, Singh U P, et al. Targeting Hsp70: a possible therapy for cancer [J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(1): 156–66.

Lactoferrin hexapeptide reduces the drug resistance of human ovarian cancer cells and its mechanism

Liu Hui¹, Guo Ruowen¹, Xu Qia², et al

(¹Dept of Biochemistry and Molecular Biology, ²Dept of Immunology, School of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study lactoferrin hexapeptide (LfcinB 4-9) to reduce the drug resistance of human ovarian cancer cells and explore its possible mechanism of action. **Methods** MTT was used to detect the proliferation inhibition of cis-dichlorodiammine platinum (DDP) combined with LfcinB4-9 in human ovarian cancer cells

(下转第 1611 页)

Correlation between occlusal contacts from over-erupted third molar and temporomandibular disorders

Su Yiling, Hou Aibing, Wang Nan

(Dept of Oral General, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the correlation between occlusal contacts from over-erupted third molar and temporomandibular disorders (TMD). **Methods** 45 patients with TMD were selected as experimental group: 15 cases (group A) with unilateral mandibular third molar over-eruption, 15 cases (group B) with unilateral maxillary third molar over-eruption, 15 cases (group C) with unilateral mandibular and the contralateral maxillary third molar over-eruption, and 15 cases with normal occlusion as control group. Data of occlusal contacts were recorded with T-scan III. Craniomandibular index (CMI), visual analogue scale (VAS) and mandibular motor function before and after the extraction were evaluated. **Results** In each experimental group, the movement of center of force increased, and the closure time, lateral disclosure time and protrusive disclosure time were longer than those in the control group ($P < 0.05$). The asymmetry index of contact in each experimental group increased ($P < 0.05$). The incidence of premature contact, protrusive interference and lateral interference in each experimental group were significantly higher than those in normal control group ($P < 0.05$), and there was no significant difference in the incidence of premature contact and lateral interference between experimental group and control group after extraction ($P < 0.05$). The CMI and VAS of TMD patients decreased significantly 1 month after the extraction. The maximum vertical opening, protrusive and lateral distance increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Bilateral occlusal symmetry and balance are poor in patients with third molar(s) over-eruption. Occlusal interference caused by the over-erupted third molar(s) is closely related to the clinical symptoms of TMD. Removing the over-erupted third molar(s) can better improve the opening type and vertical opening of the patients with TMD, and relieve the joint noise and pain to a certain extent.

Key words third molar; occlusion; temporomandibular disorders; correlation

(上接第 1601 页)

SKOV3, SKOV3/DDP, CI3K, CI3K/DDP. The morphologic changes of human ovarian cells were detected by HE staining and section assay. The effect of DDP combined with LfcinB4-9 on the clone formation ability of human ovarian cancer cells was detected by plate cloning assay; Transwell assay was used to detect the effect of DDP combined with LfcinB4-9 on the invasion ability of human ovarian cancer cells. qRT-PCR was used to detect the expression of HSF1, HSP70, OPTN and other genes in human ovarian cancer cells treated with LfcinB4-9 and DDP.

Results The results showed that the combined effect of LfcinB4-9 and DDP had a significantly higher inhibitory rate on ovarian cancer cells than that of DDP alone ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The cell morphology of human ovarian cells was significantly changed after DDP combined with LfcinB4-9. Compared with DDP alone group, the clone formation ability and invasion ability of human ovarian cancer cells were significantly reduced by DDP combined with LfcinB4-9 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The qRT-PCR assay showed that the expressions of HSF1, HSP70, OPTN and other drug-resistant related genes in DDP combined with LfcinB4-9 were significantly lower than those in the control group and DDP alone group. **Conclusion** The combined effect of LfcinB4-9 and DDP significantly enhances the sensitivity of ovarian cancer cells to DDP. Its effect is achieved by reducing the expression of HSF1, HSP70, OPTN and other genes through the signalling pathway of HSF1-HSP70-resistant protein.

Key words ovarian cancer cells; lactoferrin hexapeptide; cis-dichlorodiammine platinum; drug resistance; gene expression