文章编号:1000-5404(2007)01-0043-04

论著

诺帝对HPV16型亚基因永生化人宫颈上皮细胞的诱导分化作用

赵 敬[1],赵 涌[1],卞修武[2] ([1]重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室,重庆 400016;[2]第三军医大学西南医院病理学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 研究诺帝(Nordy)对HPV16型亚基因(E6、E7)永生化人宫颈上皮细胞(H8细胞)的诱导分化作用。**方法** MTT法检测诺帝对H8细胞增殖的抑制作用,流式细胞术(FCM)分析细胞周期,免疫细胞化学S-P法检测增殖细胞核抗原Ki67的表达,TRAP-ELISA法检测端粒酶活性变化。**结果** 诺帝能够明显抑制H8细胞增殖;可阻滞细胞周期于G_0/G_1期,S期细胞减少;细胞核内Ki67蛋白的表达水平明显下降;端粒酶活性明显降低。**结论** 诺帝对H8细胞有诱导分化作用,这种作用可能是通过抑制增殖,阻滞细胞周期,降低端粒酶活性来实现的。

关键词: 诱导分化;宫颈;永生化;HPV
中图法分类号: R329.28; R737.33; R979.12 **文献标识码**: A

Nordy on induced differentiation of HPV16 subgenes-immortalized human endocervical cells

ZHAO Jing[1], ZHAO Yong[1], BIAN Xiu-wu[2] ([1]Department of Pathophysiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, [2]Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Nordy on induced differentiation of HPV16 subgenes-immortalized human endocervical cells (H8 cells). **Methods** After treated with Nordy, the proliferation of H8 was tested with MTT assay. The effect of Nordy on cell cycle of H8 was analyzed by flow cytometer(FCM). The expression of Ki67 of H8 was detected by immunohistochemistry. The activity of telomerase was tested by TRAP-ELISA. **Results** Nordy could inhibit proliferation of H8 cells significantly. H8 cells were arrested in G_0/G_1 phase after Nordy treatment. The Ki67 expression and telomerase activity reduced significantly after Nordy treatment. **Conclusion** Nordy could induce the differentiation of H8 cell lines by inhibiting their proliferation, blocking cell cycle and decreasing telomerase activity.

Key words: induced differentiation; cervix; immortalization; HPV

诺帝(Nordy)是人工合成的新型去甲二氢愈创木酸化合物,分子量为308[1]。去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaretic acid, NDGA)是从常青灌木Larrea divaricata中提取的一种天然成分,是脂氧化酶的强抑制剂,具有抗氧化作用,近年来发现其具有抗肿瘤的作用,如抑制实验诱发的大鼠乳腺癌和大肠癌的发生抑制糖皮质激素诱导的淋巴瘤细胞的增殖以及诱导恶性胶质瘤细胞的分化等[2,3]。而经过人工合成改良后的诺帝,大大提高了其抗肿瘤的活性及降低了毒性。目前国内外尚少见有对宫颈癌前病变诱导逆转分化的体外实验研究。本研究以HPV16型亚基因(E6、E7)永生化人宫颈上皮细胞(H8)为对象,探讨诺帝对其的诱导分化作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 H8细胞株引自三峡大学免疫微生物学教研室。

1.1.2 化学药物及试剂 诺帝由第三军医大学西南医院病理学研究所自行合成、四甲基偶氮唑蓝(MTT)及二甲亚砜(DMSO)均购自Sigma公司,RPMI1640培养基(Gibco公司),小牛血清(杭州四季青生物材料研究所),端粒酶检测试剂盒(TRAP-ELISA)为华美公司产品,Ki 67单抗,通用型ABC试剂

基金项目:重庆市科委攻关课题(2004-27-17)
Supported by the Foundation for the Key Sci & Tech Research Project by Scientific Committee of Chongqing (2004-27-17)
作者简介:赵 敬(1974-),女,重庆市人,硕士,讲师,主要从事肿瘤病理生理方面的研究。电话:(023)68485478
通讯作者:赵 涌, E-mail: blys01@163.com
收稿日期:2006-01-19;修回日期:2006-05-18

盒及 DAB 显色剂均购自中山公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 H8 细胞株在含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中,37 ℃、5% CO_2 混合气体的孵箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。诺帝以 PBS 配制成 5 mmol/L 储存液 -20 ℃避光保存,实验组使用终浓度分别为 10、25、50、75 μmol/L,对照组加等体积 PBS(pH 7.2)。

1.2.2 MTT 法测定细胞生长曲线 按上述培养方法得到 H8 单细胞悬液,以每孔 5×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板,实验组加入不同浓度诺帝,每孔 20 μl,使其终浓度分别达到上述各浓度,实验设 PBS 和 RPMI1640 液对照组,每组均设 5 个平行孔。继续培养 48、72、96 h,取出培养板,每孔加入 20 μl MTT 液(浓度为 5 mg/ml);37 ℃孵育 4 h 终止培养,吸去孔内上清液,每孔加入 DMSO 200 μl,振荡 10 min,用自动酶标读数仪(Bio-TekELX800UV)在波长为 490 nm 时测定每孔的吸光度值[D(490)]。以时间为横轴,每一时相点的平均光密度值为纵轴绘制细胞生长曲线。采用直线回归法推算药物作用的 50% 抑制浓度(IC_{50})。

1.2.3 FCM 测定细胞周期 将 H8 细胞按 5×10^4/ml 密度接种于 50 ml 培养瓶中,实验组加入终浓度为 16 μmol/L 的诺帝(为 1/2 IC_{50}浓度)。设对照组;培养 48、72、96 h 收集细胞悬液,离心 PBS 漂洗,70% 冷乙醇固定,制备单细胞悬液,用缓冲液 37 ℃孵育 60 min,抽取小分子 DNA,然后加入碘化丙啶 PI(购自 CLONTECH 公司)染色液,4 ℃避光染色 20 min 后上机检测,FCM 变异系数纠正于 3% 以下。流式细胞仪(FCM,美国 FASCan Becton Dickinson)进行细胞周期分析。

1.2.4 免疫细胞化学染色 将 H8 细胞按 5×10^4/ml 密度制成细胞爬片,设对照组和终浓度为 16 μmol/L 的实验组,培养 72 h 后,按照免疫细胞化学常规,S-P 法染色,DAB 显色,Ki67 阳性为细胞核着色。采用 CM-200B 生物医学图像分析系统随机计数 500 个细胞,阳性表达率 = (阳性细胞数/500) × 100%。

1.2.5 TRAP-ELISA 法测定端粒酶活性 将细胞以 5×10^4/ml 密度接种于 50 ml 培养瓶内,设实验组和对照组,实验组加入终浓度为 16 μmol/L 的诺帝,设对照组;培养 48、72、96 h。实验组步骤如下:①端粒酶提取:培养细胞经低速离心(4 000 r/min × 10 min)收集细胞约 10^6 个,加 50 μl 裂解液悬浮,置冰浴 30 min,4 ℃,14 000 r/min 离心 20 min,取上清 2 μl 做 TRAP 反应模板。②端粒酶重复序列扩增:取 TRAP 反应管,各加入 45 μl 反应混合物,样品管加 2 μl 已处理的标本,同时设立阴阳对照管,置 25 ℃水浴保温 30 min,即开始 PCR 循环。端粒酶预变性:94 ℃ 120 s;扩增条件:共 35 次循环。变性 94 ℃ 30 s 退火 48 ℃ 30 s 多聚酶反应 72 ℃ 90 s。72 ℃延伸 300 s。③产物杂交检测:按试剂盒说明进行操作。结果判定:波长为 450 nm/630 nm 读取 D(490)。阴性对照 D(490)低于 0.05 时按 0.05 计算,高于 0.05 时按实际值计算。若 D(490)大于 0.3 则判为无效。样本 D(490)大于阴性对照 D(490)的 2.1 倍时判为端粒酶活性阳性。阳性对照为试剂盒本身所设,阴性对照使用同体积裂解液加入反应。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件。吸光度值采用方差分析;组间两两比较用 SNK 法;免疫细胞化学结果分析用秩和检验;多组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 诺帝对 H8 细胞生长的影响

通过 MTT 法测出的 H8 细胞生长曲线(图 1)。由图中可见,10、25、50、75 μmol/L 诺帝处理后,H8 细胞生长曲线下移,与对照组相比,在 24、48、72、96 h 对 H8 细胞生长均有抑制作用($P<0.05$)。细胞数的增加随浓度升高和时间的延长而明显受到抑制。即具有明显的时间浓度依赖性。求得 IC_{50}(96 h) = 32.95 μmol/L。

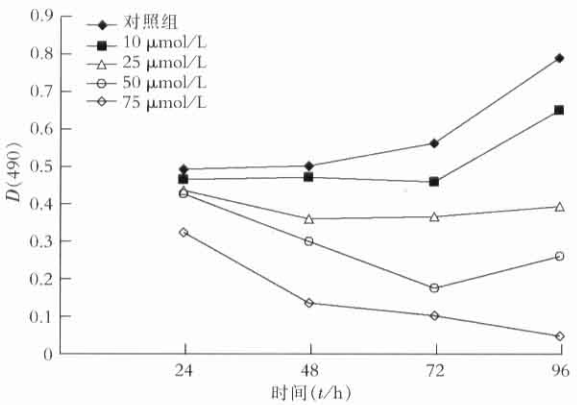


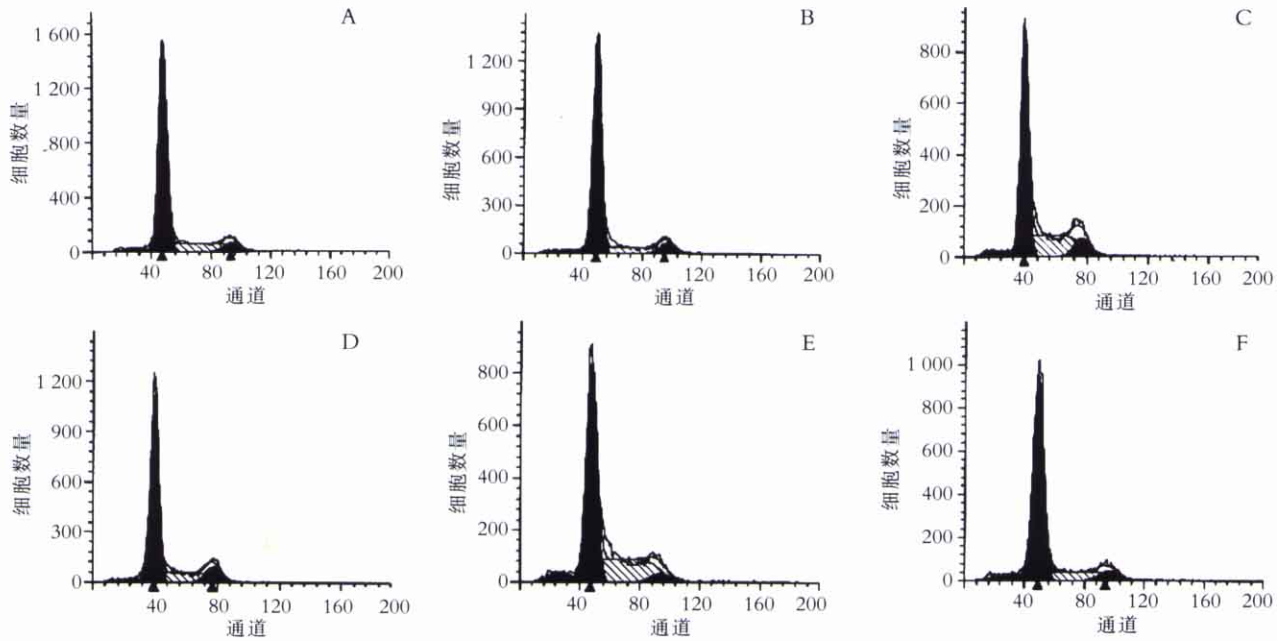
图 1 不同浓度诺帝对 H8 细胞生长曲线的影响

2.2 诺帝对 H8 细胞周期的影响

用 1/2 IC_{50}浓度 16 μmol/L 诺帝处理 H8 细胞 48、72、96 h 后,流式细胞仪检测 H8 细胞周期分布情况(表 1)。与对照组相比,G_0/G_1 期和 G_2/M 期细胞数明显增加,S 期细胞数明显减少,并呈时间依赖性,提示经诺帝作用后 H8 细胞的增殖明显受到抑制,细胞被阻滞 G_0/G_1 期。与对照组相比,差异有显著性($P<0.05$,图 2)。

表 1 诺帝对 H8 细胞的细胞周期影响($\bar{x}\pm s$)

组别	时间(t/h)	细胞周期		
		G_0/G_1	S	G_2/M
对照组	48	73.39 ± 0.01	19.86 ± 0.01	6.75 ± 0.01
	72	57.18 ± 0.01	32.54 ± 0.01	10.28 ± 0.01
	96	59.11 ± 0.02	35.78 ± 0.01	5.11 ± 0.01
实验组	48	75.62 ± 0.02	16.69 ± 0.03	7.69 ± 0.02
	72	68.20 ± 0.01	20.35 ± 0.02	11.45 ± 0.02
	96	73.18 ± 0.01	19.29 ± 0.02	7.53 ± 0.02



A：48 h 对照组；B：48 h 处理组；C：72 h 对照组；D：72 h 处理组；E：96 h 对照组；F：96 h 处理组

图 2　诺帝对 H8 细胞的细胞周期分布的流式图

2.3　诺帝对 H8 细胞 Ki67 蛋白表达的影响

免疫细胞化学观察显示，Ki67 在对照组细胞内呈强表达，呈棕黄色分布于细胞核内（图 3），其阳性表达率为 68.15%；经 16 μmol/L 诺帝处理 96 h 后，H8 细胞 Ki67 蛋白表达明显减弱（图 4），阳性表达率下降到 10.03%，与对照组相比差异显著（$P<0.05$）。

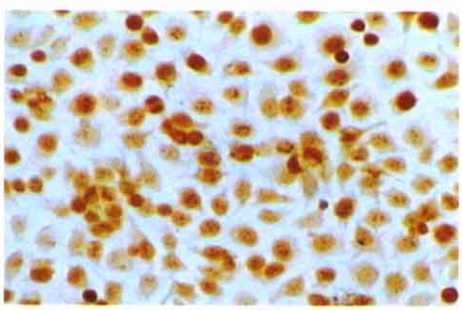


图 3　对照组细胞 Ki16 呈强阳性表达　（S-P×200）

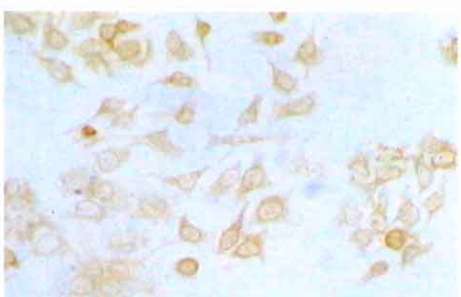


图 4　诺帝处理 96 h 后细胞 Ki16 表达明显减弱　（S-P×200）

2.4　诺帝对 H8 细胞端粒酶活性的影响

用 16 μmol/L 诺帝处理 H8 细胞不同时间后，分别检测 H8 细胞端粒酶活性。可见对照组 H8 细胞端粒酶活性较高，且不同时间其活性无明显变化（$P>0.05$）。而实验组端粒酶活性则明显下降，与对照组相比有显著性差异（$P<0.05$），并随时间延长作用更为明显，显示细胞分化程度增加。不同时间段两两比较差异显著（$P<0.05$，表 2）。

表 2　诺帝作用后 H8 细胞端粒酶活性的改变[D(490)，$\bar{x}\pm s$]

组别	48 h	72 h	96 h
对照组	0.617±0.009	0.607±0.040	0.616±0.025
实验组	0.424±0.007[a]	0.315±0.009[ab]	0.138±0.007[abc]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与诺帝处理 48 h 比较；c：$P<0.05$，与诺帝处理 72 h 比较

3　讨论

我国宫颈癌特别是 35 岁以下年轻女性的宫颈癌发病率近年来不断增高。WHO 确认 HPV 是引起宫颈癌变的首要因素[4]。尤其是 HPV16、18 型与宫颈癌关系密切，其早期基因 E6、E7 可改变宿主细胞的生长模式，使宿主细胞发生非典型性增生，引起宫颈上皮内瘤（CIN）和宫颈癌[5,6]。在体外 HPVE6、E7 基因转染，可使宫颈上皮细胞转变为永生化细胞。而本实验使用的 H8 细胞就是中国妇女正常宫颈上皮细胞在体外转染了 HPV16E6、E7 基因后转变成的永生化细胞株。在一些促癌因子作用下即可转化为癌细胞。因此被视为

一种癌前状态的细胞。抑制癌前病变不让其转化为癌，或将癌前病变诱导分化为正常细胞，是癌症研究的一个重要方向。

去甲二氢愈创木酸作为脂氧化酶的强抑制剂已应用多年。Wilson 等[7]发现其具有诱导分化作用，并提示其可能是一种很有发展前景的癌分化诱导剂。卢佳友等[8]报道用去甲二氢愈创木酸诱导人恶性胶质瘤细胞系 SHG44 的分化具有明显的作用。诺帝是人工合成改良的去甲二氢愈创木酸化合物，与其天然成分相比，具有更高效、低毒的特点。如果其能够诱导宫颈永生化细胞向正常宫颈上皮细胞逆转分化，这对由 HPV 感染引起的宫颈癌的预防和早期治疗，将具有重大的意义和应用前景。

细胞分化的一个基本指标即细胞的增殖抑制作用。通过 MTT 法结果显示 10～75 μmol/L 的诺帝对 H8 细胞的生长均有抑制效应，且呈明显的时间剂量依赖性。而 FCM 的检测显示，G_0/G_1 期细胞明显增加，S 期细胞比例则明显下降，提示诺帝可抑制 H8 细胞的分裂生长，改变其增殖的动力学。Ki67 是一种增殖细胞相关的核抗原，存在于细胞周期活性阶段 G_1、G_2、S 和 M 期，而在 G_0 期细胞中则未见表达，故被认为是最具有前途的细胞增殖标记之一[9]。本实验通过免疫细胞化学检测结果显示经诺帝处理后，H8 细胞 Ki67 蛋白表达明显减弱，进一步证实诺帝对 H8 细胞的增殖活性具有显著的抑制作用。

端粒酶在超过 80% 以上永生化细胞系及大多数肿瘤组织中可检测到活化状态。而大多数正常体细胞则表达为阴性。普遍认为其在肿瘤细胞的恶性进展和细胞永生化的维持中起重要作用，是恶性肿瘤诊断的标记物和治疗的新靶点[10,11]。Wang 等[12]研究发现，端粒酶的表达与宫颈癌的发生有密切联系。端粒酶在宫颈癌发生早期即癌前病变 CIN 时即激活。CIN Ⅰ的端粒酶水平明显低于Ⅱ～Ⅲ级的患者，认为其可以作为监测 CIN 病程发展的标志物之一。我们用小剂量 16 μmol/L 诺帝作用于人宫颈永生化细胞株 H8 48、72、96 h 后，发现其可下调端粒酶活性，且具有时间依赖性。以往的研究表明，端粒酶活性表达与细胞周期密切相关，肿瘤细胞被阻滞于 S 期时其端粒酶的活性最高，是细胞 DNA 复制与合成组蛋白及非组蛋白时期；而细胞阻滞于 G_0/G_1 和 G_2/M 期时，其端粒酶活性则明显降低。这一点与 FCM 检测结果完全吻合：小剂量诺帝可以使 H8 细胞阻滞于 G_0/G_1 期，提示诺帝可明显抑制 H8 细胞在 S 期进行 DNA 合成，下调端粒酶的活性。

综上所述，诺帝可以诱导 HPV16 型亚基因永生化人宫颈上皮细胞 H8 的分化，其机制可能是通过降低 Ki67 蛋白的表达，下调端粒酶活性表达，进而使细胞增殖受阻于 G_0/G_1 期达到抑制细胞增殖、诱导分化的目的。由于宫颈部位便于局部检查和给药，用诺帝开发研制针对宫颈上皮内瘤（CIN）的局部治疗药物，防止其进一步癌变，有较好的应用前景。

参考文献：

[1] Xia Y M, Cao X P, Peng K, *et al*. An efficient synthetic method of Nordihydroguaiaretic acid (NDGA)[J]. Chin Chem Lett, 2003, 14(4): 359－360.

[2] Mccormick D L, Spicer A M. Nordihydroguaiaretic acid suppression of rat mammary carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea[J]. Cancer Lett, 1987, 37(2): 139－146.

[3] Birkenfeld S, Zaltsmam Y A, Krispin M, *et al*. Antitumor effects of inhibitors of arachidonic acid cascade on experimentally induced intestinal tumors[J]. Dis Colon Rectum, 1987, 30(1): 43－46.

[4] 杨 君，周德平，彭建华，等. 阴道镜用于子宫颈 HPV 亚临床感染的诊断分析[J]. 第三军医大学学报，2004，26(22)：2079－2080.

[5] Song S, Pitot H C, Lambert P F. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals[J]. J Virol, 1999, 73(7): 5887－5893.

[6] Tenti P, Pavanello S, Padovan L, *et al*. Analysis and clinical implications of P53 gene mutations and human papillomavirus type 16 and 18 infection in primary adenocarcinoma of the uterine cervix[J]. Am J Pathol, 1998, 152(4): 1057－1063.

[7] Wilson D E, Anderson K M, Seed T M, *et al*. Ultrastructural evidence for differentiation in a human glioblastoma cell line treated with inhibitors of eicosanoid metabolism[J]. Neurosurgery, 1990, 27(4): 523－531.

[8] 卢佳友，卞修武，赵 雯，等. NDGA 诱导人胶质瘤细胞株分化过程中基因组甲基化及甲基转移酶的变化及意义[J]. 第三军医大学学报，2003，25(4)：283－286.

[9] Duchrow M, Schluter C, Key G, *et al*. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1995, 43(2): 117－121.

[10] Ault K A, Allen H K, Phillips S L, *et al*. Telomerase activity as a potential diagnostic marker for triage of abnormal Pap smears[J]. J Low Genit Tract Dis, 2005, 9(2): 93－99.

[11] Klingelhutz A J, Foster S A, Mcdougall J K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16 [J]. Nature, 1996, 380(6569): 79－82.

[12] Wang S Z, Sun J H, Zhang W, *et al*. Telomerase activity in cervical intraepithelial neoplasia[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(2): 202－206.

（编辑 薛国文）