文章编号:1000-5404(2007)20-1985-03

论著

地塞米松对宫颈癌移植瘤生长及凋亡的影响

曾建华[1],钟　玲[1],徐　波[2]　([1]重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010;[2]深圳市妇女儿童医院妇产科,深圳 518028)

提　要:目的　探讨不同时间使用地塞米松对宫颈癌 HeLa 细胞移植瘤生长及凋亡的影响。**方法**　BALB/c 裸鼠皮下接种 HeLa 细胞,于成瘤后测量肿瘤直径,不同时间(第 6 天和第 16 天)开始经腹腔内注射相同剂量地塞米松(15 mg·kg^{-1}·d^{-1}),连用 10 d,对肿瘤进行透射电镜观察及原位细胞凋亡检测(Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling,TUNEL)凋亡小体数目。**结果**　不同时间使用地塞米松体内注射均抑制宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠移植瘤生长,诱导肿瘤细胞凋亡;不同时间药物注射肿瘤的体积大小有差异($P<0.01$);早期注射抑瘤率高(94.36%),电镜下凋亡小体明显,TUNEL 检测凋亡小体数目较多;晚期注射抑瘤率低(53.57%),只有早期凋亡表现,TUNEL 检测凋亡小体数目较少,组间比较有显著性差异($P<0.01$)。**结论**　不同时间地塞米松体内注射均能抑制肿瘤生长,诱导凋亡发生,并存在时间依从性。

关键词: 宫颈肿瘤;HeLa 细胞;裸鼠;地塞米松;凋亡
中图法分类号: R73-352;R737.33;R977.1　　**文献标识码:** A

Effect of Dexamethasone on tumor volume and apoptosis of transplanted HeLa cells in mice

ZENG Jian-hua[1], ZHONG Ling[1], XU Bo[2]([1]Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, [2]Department of Obstetrics and Gynecology, Shenzhen Women and Children's Hospital, Shenzhen 518028, China)

Abstract: Objective　To investigate the effects of dexamethasone on the growth of cervical cancer induced by HeLa cells transplanted into BALB/c mice. **Methods**　HeLa cells were inoculated subcutaneously into BALB/c mice. Dexamethasone (15 mg·kg^{-1}·d^{-1}) was injected intraperitoneally from the 6th or the 16th day after tumor inoculation for 10 days continuously. Diameter of tumors was measured every two or three days. Apoptotic bodies were observed by transmission electron microscopy and counted by TUNEL. **Results**　Dexamethasone repressed the growth of cervical cancer and induced tumor cell apoptosis, but the tumor volumes were of statistical difference between the two groups of different injection start time ($P<0.01$). The inhibition rate of tumor in mice receiving Dexamethasone early was 94.36%; Obvious apoptotic bodies were observed under EM and the number of apoptotic bodies was more. The inhibition rate of tumor in mice receiving Dexamethasone late was 53.57%; Early apoptosis was observed and the number of apoptotic bodies was less. **Conclusion**　Dexamethasone can repress cervical tumor growth and induce tumor cell apoptosis in a time-dependent manner.

Key words: cervical cancer; HeLa cell; nude mouse; Dexamethasone; apoptosis

地塞米松是调节生长、发育、分化以及内环稳境定的重要激素,对几乎所有细胞的生长及分化都有调节作用,它是治疗淋巴细胞白血病的主要药物之一,也是临床上应用最广泛的激素类药物,并对许多组织来源的肿瘤细胞均有增殖抑制作用和诱导分化作用。前期研究已证明不同剂量地塞米松体内、体外用药能诱导凋亡发生,显著抑制肿瘤生长,并存在剂量依赖效应[1]。本实验通过裸鼠移植瘤模型进一步研究

作者简介:曾建华(1966-),男,重庆市铜梁县人,硕士,主治医师,主要从事宫颈肿瘤方面的研究。电话:13508386578,E-mail:zengjianhua6177@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-09-05;修回日期:2007-01-05

不同时间注射地塞米松对宫颈癌生长及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂及仪器

地塞米松磷酸钠注射液(批号2005080139),购于西南药业股份有限公司产品;原位细胞凋亡检测试剂盒(TUNEL 试剂盒,Cat. No. 11684817910)购于罗氏公司;仪器为 HITACHI-H-7500 透射电子显微镜。

1.2 实验细胞

人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞,由重庆医科大学基础医学研究所细胞培养室存。常规方法复苏、培养、传代、接种。

1.3 实验动物

5~6 周龄清洁级雌性 BALB/c 裸鼠 18 只,体质量 14~18 (16.5±1.38) g。购于上海,由重庆医科大学实验动物中心代养。

1.4 动物模型的建立及处理

每只裸鼠右腋下近背部皮下接种 HeLa 细胞 3×10^7/0.3 ml。从接种第 4 天成瘤后开始用游标卡尺测量肿瘤直径,每 2~3 天 1 次,计算肿瘤体积。肿瘤体积(V) = 长 × 宽^2/2。用药前查随机数字表随机分为 A、B、C 共 3 组,每组 6 只。A 组从第 6 天、B 组从第 16 天开始用药,药物剂量为每只 0.25 mg(15 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$),溶液量均为 0.4 ml,经腹腔内注入,每天 1 次,连用 10 d,停药后 24 h 处死,采集肿瘤标本。C 组为未用药观察组,每天腹腔内注入等量生理盐水作对照。

1.5 标本处理

肿瘤标本送电镜、HE 染色及 TUNEL 检测凋亡小体数目;计算抑瘤率。抑瘤率 = $(1-V_T/V_C)\times100\%$,V_T 为用药组平均体积,V_C 为未用药组平均体积。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用统计学软件 SPSS 10.0 进行小样本均数 t 检验。

2 结果

2.1 一般情况

全部裸鼠都有肿瘤生长,成瘤率 100%。肿瘤标本经 HE 染色检查均为上皮性肿瘤。

2.2 肿瘤体积

于接种 HeLa 细胞后的第 6、16、26 天测量肿瘤体积(表 1)。接种约 3 d 后肿瘤逐渐增大,不同时间用药其体积增长不同。接种后第 6 天 3 组体积无显著性差异($P>0.05$);第 16 天 A 组(用药后)体积与 B、C 组(未用药)体积相比有差异($P<0.01$),B 组体积与 C 组体积相比无显著性差异($P>0.05$);第 26 天 B 组(用药后)体积与 C 组(未用药)体积相比有显著性差异($P<0.01$)。A 组、B 组的抑瘤率分别为 94.36% 和 53.57%。

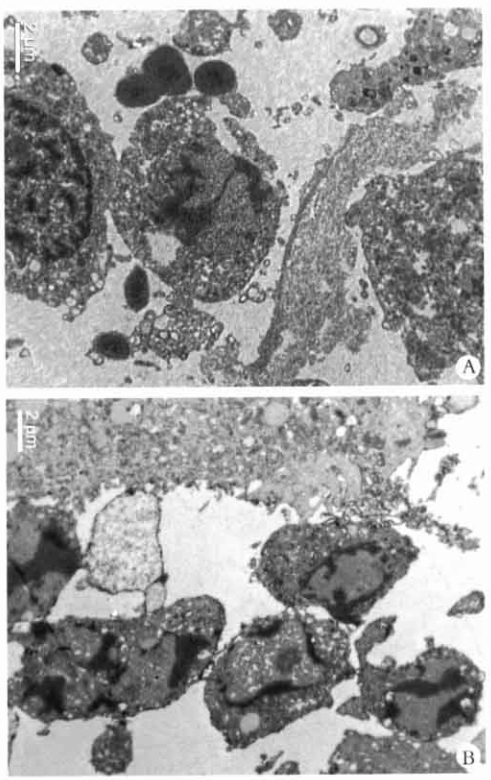
表 1 不同时间注射地塞米松的肿瘤体积(cm^3, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

测量时间	第 6 天	第 16 天	第 26 天
A 组	0.101 7±0.010 5[a]	0.166 0±0.016 4	—
B 组	0.117 0±0.018 9	0.414 8±0.020 4[a]	1.373 0±0.097 0[b]
C 组	0.118 9±0.029 6	0.439 3±0.041 4[a]	2.944 6±0.169 0

a: $P<0.01$,与 A 组比较; b: $P<0.01$,与 C 组比较

2.3 电镜下凋亡小体观察结果

A、B、C 3 组在形态上有明显差别,A 组有较多凋亡小体(图 1A);B 组为早期凋亡表现,无明显凋亡小体(图 1B);C 组既无早期凋亡表现,亦无凋亡小体。用药越早,凋亡小体形成越明显。

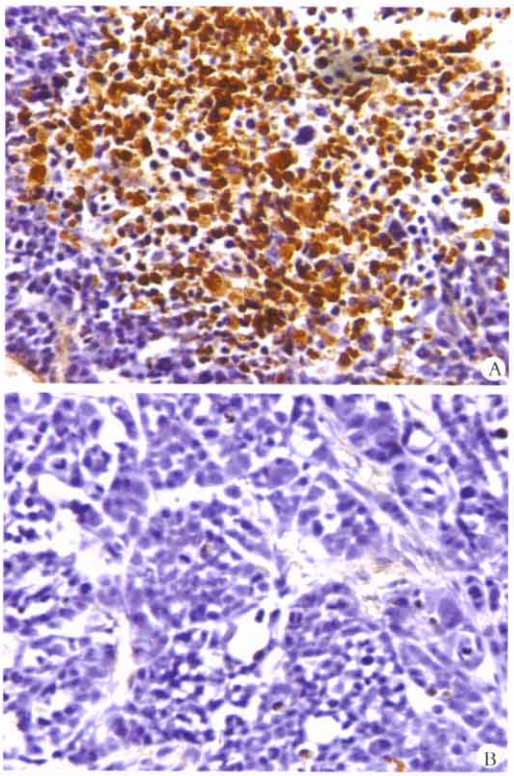


A: A 组; B: B 组

图 1 裸鼠宫颈癌移植瘤的电镜观察

2.4 TUNEL 检测凋亡小体数目结果

3 组的肿瘤行 TUNEL 检测均有凋亡小体存在(图 2),A 组最多(354.83±43.13)、B 组次之(260.00±53.67)、C 组最少(160.00±101.35)。经检验,A 组与 B 组,B 组与 C 组,A、B 两组与 C 组之间均有显著性差异($P<0.01$)。



A：阳性结果；B：阴性对照

图 2　A 组肿瘤 TUNEL 检测显微照片　（DAB ×400）

3　讨论

药物对肿瘤的抑制作用包括多个方面，凋亡是抑制肿瘤生长的机制之一[2,3]。治疗肿瘤重要的策略之一就是诱导肿瘤细胞凋亡[4]。糖皮质激素诱导的细胞凋亡是受体依赖性的[5,6]。糖皮质激素通过简单扩散与细胞质内的激素-受体复合物结合，由细胞质向细胞核内移位，是外界刺激信息传递至细胞核、转化成细胞效应的信号通路的关键组成，参与细胞生长、增殖、转化及胚胎发育和肿瘤形成。超生理剂量的地塞米松与糖皮质激素反应要素的 DNA 受体位点结合后，受体的构象发生改变，激素-受体复合物与激素反应元件结合，诱导或抑制糖皮质激素反应性基因的转录，使细胞停止于 G_1 期[7-10]，最终使细胞发生凋亡，从而抑制肿瘤生长。

前期研究表明地塞米松体外能诱导人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞发生凋亡，bcl-2 的表达明显下降[1]；体内用药亦能诱导凋亡发生，显著抑制肿瘤生长，并存在剂量依赖效应，且地塞米松对宫颈肿瘤细胞的抑制作用符合药物对受体作用的典型量效关系，与受体介导的凋亡有关。本研究中，HE 染色及透射电镜检查均未见有明显组织细胞变性坏死，在电镜及 TUNEL 检测主要存在凋亡小体，且凋亡小体的多少与药物对肿瘤作用的早晚有密切关系，用药早，有凋亡小体形成，用药晚，有早期凋亡表现，无凋亡小体形成，存在时间依从性，这可能与肿瘤体积大小及肿瘤组织内地塞米松受体的内在活性有关。在早期用药，此时肿瘤体积小，药物更容易进入肿瘤组织内部发挥作用；同时药物的敏感性高，受体的内在活性高，不易产生耐受性，因而药物抑制肿瘤的效果就好。在晚期用药，此时体积增大，药物的敏感性及内在活性降低，药物进入肿瘤组织内部困难，抑制肿瘤生长的效能降低，对肿瘤的治疗效果就差。因此，地塞米松抗宫颈肿瘤作用的主要机制可能是促使凋亡小体的形成[1]，并存在时间依从性。

药物对肿瘤的抑制往往是多方面的。地塞米松对宫颈肿瘤的抑制作用除了受体水平导致凋亡发生外还有没有其他途径、受体后的信息传导通路到底是怎样的，以及停药后肿瘤组织有什么变化都有待进一步研究。

参考文献：

[1] 徐　波，顾美礼，卞度宏. 地塞米松体外诱导宫颈癌细胞株凋亡及其机制的研究[J]. 现代妇产科进展，2003，12(3)：176－178.

[2] 柳友清，邢　辉，韩晓兵，等. 顺铂诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及其作用机制的研究[J]. 中国肿瘤临床，2006，33(1)：1－4.

[3] Bose R，Verheij M，Haimovitz-Friedman A，*et al*. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis：an alternative mechanism for generating death signals [J]. Cell，1995，82(3)：405－414.

[4] 姜　洁. 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京：人民军医出版社，1997：119.

[5] Cidlowski J A，King K L，Evans-Storms R B，*et al*. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system[J]. Recent Prog Horm Res，1996，51：457－490.

[6] Caron-Leslie L A，Cidlowski J A. Similar actions of glucocorticoids and calcium on the regulation of apoptosis in S49 cells [J]. Mol Endocrinal，1991，5(8)：1169－1179.

[7] Cohen J J，Duke R C，Fadok V A，*et al*. Apoptosis and programmed cell death in immunity [J]. Annu Rev Immunol，1992，10：267－293.

[8] Chou R H，Huang H. Restoration of p53 tumor suppressor pathway in human cervical carcinoma cells by sodium arsenite [J]. Biochem Biophys Res Commun，2002，293(1)：298－306.

[9] Scholz C，Richter A，Lehmann M，*et al*. Arsenic trioxide induces regulated，death receptor-independent cell death through a Bcl-2-controlled pathway[J]. Oncogene，2005，24(47)：7031－7042.

[10] 王　珍，刘仁刚，周洁萍，等. 地塞米松诱导培养的大鼠大脑皮质星形胶质细胞凋亡[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，2002，11(3)：282－285.

（编辑　张大春）