文章编号:1000-5404(2008)13-1279-04

论著

地塞米松对宫颈癌细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用

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)

摘 要:**目的** 探讨超生理剂量的地塞米松对宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠移植瘤生长的影响。**方法** 5~6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠皮下接种传代培养的 HeLa 肿瘤细胞,肿瘤长大后(接种后 16 d)每天腹腔内注射超生理剂量的地塞米松($62.5\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$),连续 10 d,测量肿瘤直径,计算肿瘤体积及抑瘤率;对肿瘤进行透射电镜观察、原位细胞凋亡检测(TUNEL)、血管内皮生长因子(VEGF)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)检测。**结果** 超生理剂量的地塞米松体内注射能抑制宫颈癌 HeLa 细胞裸鼠移植瘤生长,诱导肿瘤细胞凋亡;与对照组相比,治疗组肿瘤体积变小[(1.472 ± 0.082) cm^3 *vs* (0.383 ± 0.038) cm^3,$P<0.01$],抑瘤率为 73.99%,凋亡小体数目增多[(413 ± 87)个 *vs* (160 ± 101)个,$P<0.01$)],VEGF 灰度值降低[(172.833 ± 12.978) *vs* (177.067 ± 6.875),$P<0.01$],TNF-α 灰度值无差异[(172.833 ± 12.978) *vs* (177.067 ± 6.875),$P>0.05$]。**结论** 超生理剂量的地塞米松体内用药能显著抑制肿瘤生长,与诱导凋亡及抑制 VEGF 有关,而与 TNF-α 无关。

关键词:宫颈肿瘤;地塞米松;凋亡;血管内皮生长因子;肿瘤坏死因子
中图法分类号:R73-351;R977.11;R737.33 **文献标识码**:A

Dexamethasone inhibits cervical carcinoma cell xenografted tumors in nude mice

ZENG Jian-hua[1], ZHONG Ling[1], XU Bo[2] ([1]Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, 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 over physiological dose of dexamethasone on cervical carcinoma cell xenografted tumors in nude mouse. **Methods** HeLa cells were inoculated subcutaneously in BALB/c female mice aged 5 – 6 weeks. Over physiological dose of dexamethasone ($62.5\ mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$) was injected into the peritoneum from the 16th day after inoculation for 10 d. Diameters of tumor were measured every two or three days. The volumes and the inhibition rates of tumor were calculated. Apoptotic bodies were observed by transmission electron microscopy and counted by TUNEL. VEGF and TNF-α were detected by immunohistochemistry. **Results** *In vivo*, over physiological dose of dexamethasone can repress the growth of tumor and induce cell apoptosis. Compared with the control group, the tumor sizes were significantly smaller ($P<0.01$) with 73.99% inhibition rates, the number of apoptotic bodies were significantly increased ($P<0.01$) and VEGF were reduced ($P<0.01$). But no difference was found between the two groups in TNF-α ($P>0.05$). **Conclusion** Over physiological dose of dexamethasone can repress cervical tumor growth *in vivo*. This action may be related to apoptosis and VEGF, but have no relationship with TNF-α.

Key words: cervical carcinoma; dexamethasone; cell apoptosis; VEGF; TNF-α

作者简介:曾建华,男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事宫颈肿瘤方面的研究。电话:(023)63693497,E-mail:zengjianhua6177@yahoo.com.cn
通信作者:钟 玲,电话:(023)63693503,E-mail:zhong9ling@hotmail.com
收稿日期:2007-06-04 修回日期:2007-10-18

糖皮质激素是由肾上腺皮质束状带分泌的类固醇类激素,有重要的生理学作用,主要影响糖和蛋白质代谢。超生理剂量糖皮质激素具有抗炎、抗毒、抗免疫、抗休克及抗水肿作用。地塞米松治疗血液系统恶性肿瘤取得了可喜成绩。体外研究已证明:地塞米松可诱

导人宫颈癌细胞株 HeLa 细胞凋亡[1]，对卵巢癌 3AO 细胞、卵巢癌 HO-8910 细胞、乳腺癌 MCF-7 细胞有明显增殖抑制作用[2-4]。动物实验表明：地塞米松对小鼠进展期肺腺癌有抗肿瘤作用[5]，大剂量地塞米松有加强顺铂抗小鼠埃利希氏腹水癌作用[6]。给小鼠肝癌细胞株 H_{22} 肿瘤模型腹腔注射地塞米松，给药组的瘤重和最终瘤体积与对照组比较显著减小，显著抑制体内肝癌细胞株 H_{22} 肿瘤的生长[7]。本实验通过裸鼠移植瘤模型进一步研究地塞米松对宫颈癌生长的影响及机制。

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。原位细胞凋亡检测试剂盒（TUNEL 试剂盒，Cat. No. 11684817910）购于罗氏公司，肿瘤坏死因子-α（TNF-α）试剂盒、血管内皮生长因子（VEGF）试剂盒、SABC 免疫组化试剂盒、S-P 免疫组化试剂盒（批号 51282108）及 DAB 显色剂（批号 50781680）购于博士德生物工程有限公司。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惠赠。常规方法复苏、培养、传代、接种。

1.3 实验动物

5～6 周龄雌性 BALB/c 裸鼠 12 只，体质量（16.5 ± 1.4）g。清洁级动物，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，合格证号：SCXK（京）2002-2003，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 0.3 ml（1×10^8/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。用药前采用随机数字表法分为 A、B 两组，每组 6 只。A 组为对照组，每天腹腔内注入 0.4 ml 生理盐水；B 组地塞米松剂量为每只每天 1 mg（62.5 mg · kg^{-1} · d^{-1}），从接种后第 16 天开始经腹腔内注入 0.4 ml 地塞米松溶液，每天 1 次，连用 10 d，停药后 24 h 处死，采集肿瘤标本。

1.5 计算抑瘤率

抑瘤率（%）=（1 − V_T/V_C）× 100%，V_T 为用药组平均体积，V_C 为对照组平均体积。

1.6 标本处理

肿瘤标本经 3.5% 戊二醛固定送电镜观察，经 10% 多聚甲醛固定送 HE 染色及 TUNEL、VEGF 及 TNF-α 免疫组化检查。以不加 TUNEL、VEGF 及 TNF-α 试剂为阴性对照。

1.6.1 TUNEL 每例标本于凋亡小体阳性较多处照相 5 张，经北航医学图像处理系统（4.0 版）处理后，以平均的凋亡小体数目作为一个标本的统计量。

1.6.2 TNF-α 采用 SABC 法，DAB 显色。每张切片分别从上、下、左、右及中间观察 5 个不连续的高倍视野（×400），经北航医学病理图像处理系统处理后平均灰度值作为一个标本的统计量。

1.6.3 VEGF 采用 S-P 法，DAB 显色。每张切片分别从上、下、左、右及中间观察 5 个不连续的高倍视野（×400），经北航医学病理图像处理系统（4.0 版）处理后平均灰度值作为一个标本的统计量。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件进行小样本均数 t 检验。

2 结果

2.1 一般情况

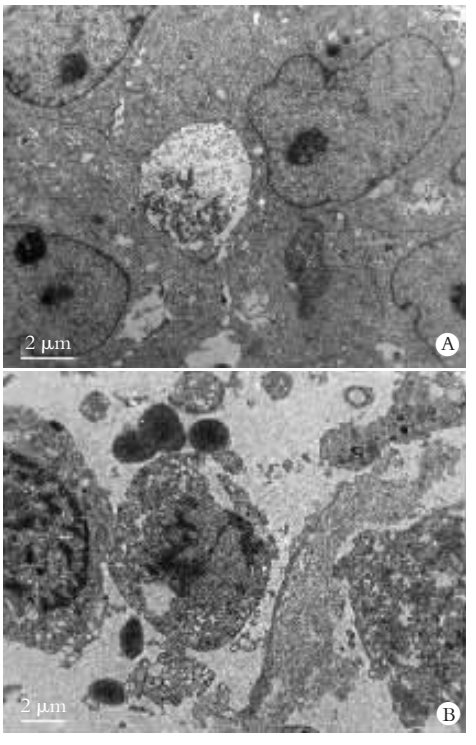
全部裸鼠都有肿瘤生长，成瘤率 100%。肿瘤标本经 HE 染色检查均有肿瘤生长。

2.2 肿瘤体积

接种约 3 d 后肿瘤逐渐增大，用药后肿瘤的生长速度较对照组变慢，体积也较小，两组比较有显著性差异［$t = 29.455$，$P < 0.01$；（1.472 ± 0.082）cm^3 *vs*（0.383 ± 0.038）cm^3］。以 A 组为对照，B 组的肿瘤抑瘤率为 73.99%。

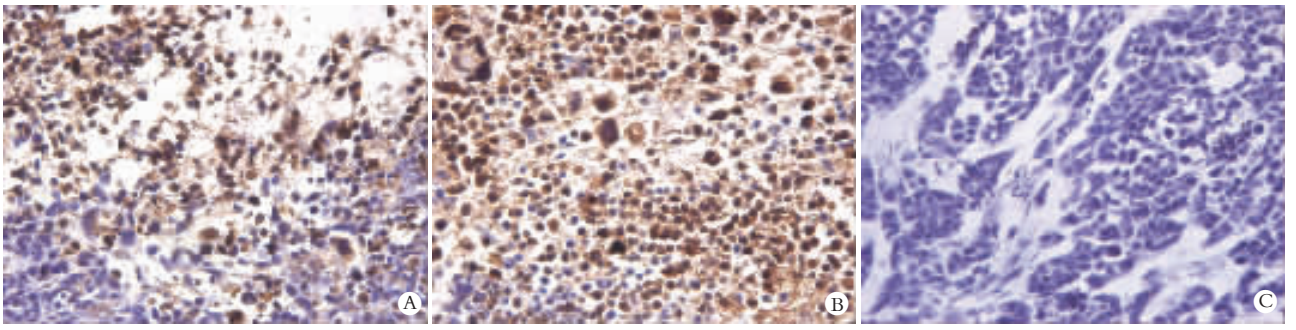
2.3 电镜下凋亡小体观察

A 组无早期凋亡表现，亦无凋亡小体形成（图 1A）；而 B 组则有较多凋亡小体形成（图 1B），形态上有明显差异。



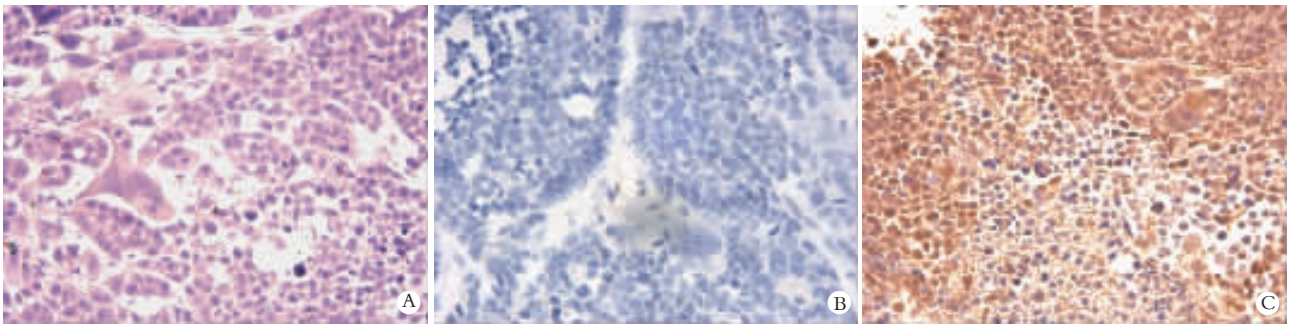
A：A 组；B：B 组

图 1 肿瘤组织电镜图



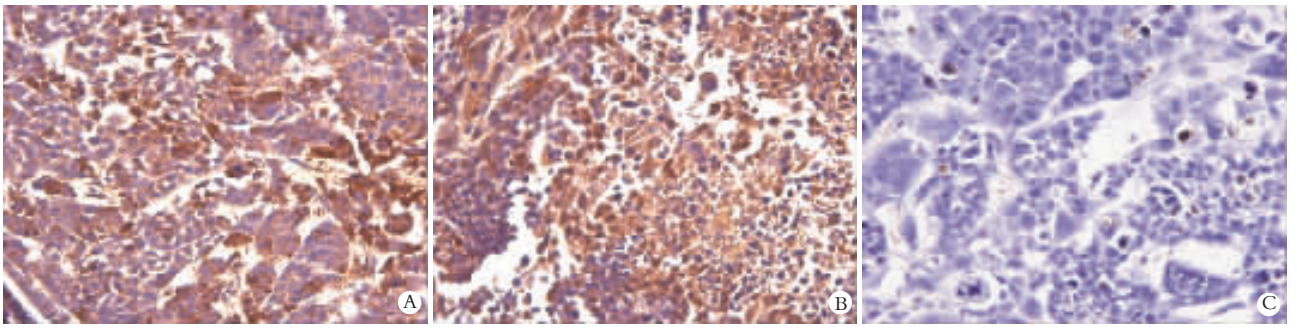
A：A 组；B：B 组；C：阴性对照

图 2　肿瘤组织 TUNEL 检测结果　（SABC ×400）



A：A 组；B：B 组；C：阴性对照

图 3　肿瘤组织 VEGF 检测结果　（S-P ×400）



A：A 组；B：B 组；C：阴性对照

图 4　肿瘤组织 TNF-α 检测结果　（SABC ×400）

2.4　TUNEL 检测凋亡小体数目结果

肿瘤组织行 TUNEL 检测均有凋亡小体存在（图 2）。A 组数目少，而 B 组凋亡小体数目较多，两组比较有显著性差异［$t=4.631$，$P<0.01$；（413 ± 87）个 *vs*（160 ± 101）个］。

2.5　VEGF 灰度值

用药后 VEGF 的平均灰度值降低（图 3），与 A 组比较有显著性差异［$t=3.780$，$P<0.01$；（174.883 ± 11.565）*vs*（198.517 ± 10.038）］。

2.6　TNF-α 灰度值

B 组与 A 组的平均灰度值比较无差异性（图 4）［$t=0.706$，$P>0.05$；（172.833 ± 12.978）*vs*（177.067 ± 6.875）］。

3　讨论

3.1　地塞米松抑制宫颈癌裸鼠移植瘤的生长

近几年来，肿瘤化疗取得了相当的进步，特别是对白血病、恶性淋巴瘤等的治疗有了突破，肿瘤患者生存时间明显延长，但对危害人类生命健康最严重的、占恶性肿瘤 90% 以上的实体瘤的治疗未能达到满意的效果。因此，如何提高对实体瘤的疗效是医务工作者应解决的迫切任务。本实验研究了地塞米松对宫颈癌实体瘤的影响，研究显示，超生理剂量地塞米松作用于裸鼠宫颈癌移植瘤，其肿瘤体积显著小于对照组，肿瘤抑瘤率为 73.99%，表明地塞米松显著抑制裸鼠宫颈癌移植瘤的生长（$P<0.01$），与 Zhang 等[8] 认为的地塞米松对实体瘤治疗无效的结论并不一致，这可能与地塞米松剂量有关，生理剂量无抗肿瘤作用，超生理剂量地塞米松才有抗肿瘤作用。

3.2　地塞米松抑制宫颈肿瘤生长的可能机制

药物对肿瘤的抑制作用包括多个方面。诱导肿瘤

细胞凋亡、抑制肿瘤组织新生血管生成是抑制肿瘤生长的主要机制[9,10]。资料显示,糖皮质激素诱导的细胞凋亡是受体依赖性的[11]。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[12],最终使细胞发生凋亡,从而抑制肿瘤生长。本研究显示,宫颈肿瘤经地塞米松治疗后,肿瘤组织 HE 染色及透射电镜检查无明显组织细胞变性坏死,在电镜观察及 TUNEL 检测主要存在凋亡小体,并且凋亡小体形态及数目与对照组有明显差异,表明地塞米松抑制宫颈肿瘤生长的机制之一可能通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥作用。

肿瘤血管的形成是肿瘤生长和转移的基础,原发肿瘤的生长和转移依赖于新生血管生成[10]。VEGF 亦称血管渗透因子,阳性标记位于胞质中,是最重要也是最具有代表性的血管生长因子,是一种对血管生长有强诱导作用且是目前所知的唯一特异性作用于血管内皮细胞的一种生长因子,它的生物学特性与实性肿瘤的生长密切相关,VEGF 的高表达可刺激肿瘤血管的形成,与血管生成和肿瘤生长相辅相成、相互依赖,导致肿瘤血管无限制地扩增,使肿瘤细胞无节制地生长,促进恶性肿瘤细胞的转移[13]。抑制 VEGF 的生成则可抑制肿瘤的生长及转移。有资料表明,地塞米松抑制小鼠肝癌细胞系 H_{22} 肿瘤组织 VEGF-mRNA 的表达及微血管生成[14]。使用 VEGF 抗体抑制肿瘤血管生成,抑制肿瘤细胞的生长,现已成为研究肿瘤治疗中的热点之一。本研究显示,宫颈肿瘤经超生理剂量地塞米松治疗后,VEGF 的平均灰度值较对照组显著降低($P<0.01$),表明地塞米松抑制宫颈肿瘤生长的另一机制可能是通过抑制 VEGF 的表达,从而抑制新生血管的生成,与翟羽等报道的地塞米松抑制肝癌细胞株 H_{22} 肿瘤生长和抗血管生成有关基本一致。

本研究还探索了地塞米松对宫颈癌 TNF-α 的影响。TNF-α 是目前已知具有多功能性的细胞因子之一,具有广泛的生物学特性,对肿瘤有双重生物学效应。本研究显示,宫颈肿瘤经地塞米松治疗后,用药组与对照组的 TNF-α 平均灰度值比较无升高及降低($P>0.05$),表明地塞米松抑制宫颈癌生长与 TNF-α 无关。这可能与 TNF-α 对肿瘤的双重生物学效应有关,既有抗肿瘤作用,又可促进肿瘤生长或转移[15]。

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] 徐明娟,崔 英,方国恩,等. 糖皮质激素对人卵巢癌细胞系(3AO)的诱导分化作用[J]. 上海医学,2003,26(4):265-267.

[3] 陈玉霞,李宗斌,刁 飞,等. 地塞米松抑制人卵巢癌细胞 HO-8910 增殖的分子机制:RhoB 信号通路的作用[J]. 中华医学杂志,2006,86(20):1400-1404.

[4] 徐明娟,惠 宁,刘宇健. 地塞米松对人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 第二军医大学学报,2005,26(9):1015-1017.

[5] Al-Wadei H A, Takahasi T, Schuller H M. PKA-dependent growth stimulation of cells derived from human pulmonary adenocarcinoma and small airway epithelium by dexamethasone[J]. Eur J Cancer, 2005, 41(17):2745-2753.

[6] Arafa H M, Abdel-Hamid M A, El-Khouly A A, *et al*. Enhancement by dexamethasone of the therapeutic benefits of cisplatin *via* regulation of tumor angiogenesis and cell cycle kinetics in a murine tumor paradigm[J]. Toxicology, 2006, 222(1-2):103-113.

[7] 翟 羽,侯 洁,蔡月花. 地塞米松对小鼠 H_{22} 肿瘤生长及血管生成的抑制作用[J]. 中国比较医学杂志,2004,14(1):16-19.

[8] Zhang C, Beckermann B, Kallifatidis G, *et al*. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma [J]. Int J Oncol, 2006, 29(5):1295-1301.

[9] 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.

[10] 李春海,李克勤. 肿瘤微血管生成的机制与肿瘤侵袭和转移[J]. 中华肿瘤杂志,2000,22(3):181-183.

[11] 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, 51:457-491.

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

[13] Grunstein J, Roberts W G, Mathieu-Costello O, *et al*. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function [J]. Cancer Res, 1999, 59(7):1592-1598.

[14] 翟 羽,吕占军. 地塞米松对小鼠 H_{22} 肿瘤生长及血管内皮生长因子表达的影响[J]. 肿瘤防治研究,2003,30(2):98-101.

[15] Giraudo E, Primo L, Audero E, *et al*. Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells [J]. J Biol Chem, 1998, 273(34):22128-22135.

(编辑 汪勤俭)