文章编号:1000-5404(2008)16-1553-04

论著

4种异黄酮改构化合物对人离体子宫内膜腺上皮细胞增殖活性的比较

陈 诚[1],常 青[1],张丽龙[2],艾国平[2] (第三军医大学:[1]西南医院妇产科,[2]预防医学院防原医学教研室,全军复合研究所,烧伤、创伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 观察4种异黄酮改构化合物(F8、F11、ZF3和ZF7)对人离体子宫内膜腺上皮细胞增殖的影响。**方法** 采用胶原酶消化+二次筛网过滤法原代培养人子宫内膜腺上皮细胞。MTT法检测并比较4种化合物对人离体子宫内膜腺上皮细胞增殖的影响。**结果** 成功培养原代人离体子宫内膜腺上皮细胞并稳定传代。4种异黄酮化合物作用于人子宫内膜腺上皮细胞24 h后,低剂量(25 μmol/L)F8显著促进细胞增殖($P<0.05$),中高剂量(50、100 μmol/L)F11显著抑制细胞增殖($P<0.05$);作用48 h后,中剂量(50 μmol/L)F11和ZF3显著抑制细胞增殖($P<0.05$),高剂量(100 μmol/L)化合物均显著抑制细胞增殖($P<0.05$);作用72 h后,除低剂量(25 μmol/L)F8、ZF3和ZF7未明显抑制细胞增殖外($P>0.05$),各化合物在不同剂量下均抑制细胞增殖效应($P<0.05$);该生物学效应具有时间和剂量依赖性。**结论** 4种异黄酮化合物在一定剂量下作用一段时间后可抑制人离体子宫内膜腺上皮增殖。F11抑制细胞增殖活性最强。

关键词: 异黄酮改构化合物;子宫内膜腺上皮细胞;细胞增殖
中图法分类号: R322.65;R329.28;R965 **文献标识码:** A

Biological effect of four isoflavone derivatives on proliferation of endometrial epithelial cells *in vitro*

CHEN Cheng[1], CHANG Qing[1], ZHANG Li-long[2], AI Guo-Ping[2] ([1]Department of Gynaecology and Obstetrics, Southwest Hospital, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the biological effects of four isoflavone derivatives (F8, F11, ZF3 and ZF7) on endometrial epithelial cells. Methods The endometrial epithelial cells were cultured through collagenase enzymatic digestion and twice grit filtration. The biological effects on endometrial epithelial cells of four isoflavone derivatives were compared through MTT. Results The primary endometrial epithelial cells were successfully disassociated, cultured and passaged down stably. Cell proliferation was significantly increased by F8 (25 mol/L) ($P<0.05$), but significantly inhibited by F11 (50 and 100 mol/L) ($P<0.05$) 24 h after four isoflavone derivatives acting on endometrial epithelial cells. Cell proliferation was significantly inhibited by F11, ZF3, ZF7 (50 mol/L) ($P<0.05$) and all the 4 isoflavone derivatives (100 mol/L) 48 h later. Cell proliferation, not inhibited by F8, ZF3 and ZF7 (25 mol/L), can be inhibited by four isoflavone derivatives of other dosage ($P<0.05$) 72 h later. Their biological effects are time- and dose- dependent. Conclusion All the 4 isoflavone derivatives can inhibit the cell proliferation *in vitro*, among which F11 has the strongest effect.

Key words: isoflavone derivatives; endometrial epithelial cells; cells proliferation

长期单用雌激素治疗可诱发子宫内膜癌的发生。研究表明异黄酮类化合物结构类似雌二醇(estradiol, E_2),可表达弱雌激素样活性和拮抗雌激素活性;并且其活性可因异黄酮类化合物分子结构的改变而增强,因此异黄酮类化合物结构改造后具有成为新型的雌激素受体调节剂的可能。基于该思路,四川大学华西药学部对异黄酮进行结构改造(加入不同活性基团)后合成24个异黄酮改构化合物。前期实验显示其中的

基金项目:重庆市科技攻关项目(2004BB5034)
Supported by the Sci & Tech Project of Chongqing(2004BB5034)
作者简介:陈 诚,男,湖南省澧县人,硕士,医师,主要从事妇科激素替代治疗方面的研究。电话:(023)68765403, E-mail: chencheng961@msn.com
通信作者:常 青,电话:(023)68765399
收稿日期:2007-11-15;修回日期:2007-12-20

4 种化合物(F8、F11、ZF3 和 ZF7)表达雌激素样活性和较强的抑制癌细胞增殖活性[1]。本研究重点观察该 4 种化合物对离体人子宫内膜腺上皮细胞增殖的生物学效应,旨在为研发新型雌激素受体调节剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

25 例人子宫内膜组织均来自 2005 年 11 月至 2006 年 2 月本科门诊因功血行诊刮的患者,年龄 33 ~ 49 岁,平均 40.2 岁,诊刮前 3 个月无激素应用。25 例标本均取部分内膜组织 10% 甲醛固定后作病理检验。病理结果为单纯性增生内膜 2 例,增生期内膜 13 例,分泌期内膜 10 例,未发现腺瘤样增生等异常情况。

1.2 试剂及配制

①培养液:DMEM/F12 培养基(HyColone 公司, USA) + 10% FBS(TBD 公司,天津) + 双抗:青霉素 100 IU/ml + 链霉素 100 IU/ml(华北制药公司,河北);②消化液:Ⅰ型胶原酶(Roche 公司,USA)溶于 DMEM/F12 培养液中,剂量为 1.25 mg/ml;③鼠抗人细胞角蛋白(CK-19)及 S-P 试剂盒购自北京中杉金桥生物公司;④MTT 购自美国 Sigma 公司;⑤F8、F11、ZF3 和 ZF7 及雌酚酮(Estrone 公司,EST)由四川大学华西药学部提供。

1.3 实验方法

1.3.1 子宫内膜腺上皮细胞培养及鉴定[2] 参照 Ryan 等的方法并加以改良:胶原酶消化 + 筛网二次过滤法培养人子宫内膜腺上皮细胞,利用细胞贴壁时间差别纯化细胞。采用免疫组化染色鉴定细胞:以鼠抗人细胞角蛋白为一抗行 S-P 法染色,细胞质显棕黄染色为阳性结果,细胞质显蓝色为阴性结果;PBS 为一抗作阴性对照。

1.3.2 MTT 检测 设实验组、溶剂和雌酚酮对照组,每组设置 4 个样本孔。原代培养的人离体子宫内膜细胞接种培养 24 h 后分别加入 F8、F11、ZF3 和 ZF7,并调节化合物终剂量分别为 25、50、100 μmol/L;继续培养 24、48、72 h 后,每孔加入 MTT 反应 4 h 后 DMSO 溶解,振荡,待紫色结晶完全溶解,以 DMSO 调零,用酶联免疫检测仪以 490 nm 波长测各孔吸光度值[$D(490)$],计算各组细胞平均吸光度值和存活率。

存活率(%) = 实验组 $D(490)$ 值/溶剂对照组 $D(490)$ 值 × 100%

1.4 统计学处理

原代培养的人子宫内膜细胞采用 Cimple PCI 6.0 图像分析系统分析培养结果。MTT 实验数据以细胞存活率($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 细胞培养结果

分离所得人离体子宫内膜细胞 24 h 内贴壁完成,96 h 后细胞呈椭圆形,巢团样分布,细胞布满瓶壁 85% 以上(图 1)。CK-19 标记免疫组化染色后,细胞质明显黄染,证实为人子宫内膜腺上皮细胞(图 2),细胞纯度超过 90%。经胰酶消化后,细胞至少可稳定传 1 代,体外共存活 10 ~ 15 d。

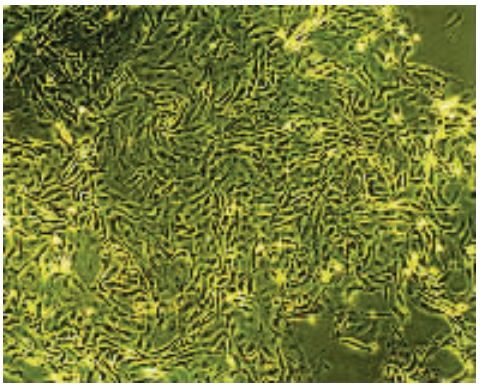


图 1 原代培养人子宫内膜腺上皮细胞 96 h 观察 (倒置显微镜 × 100)

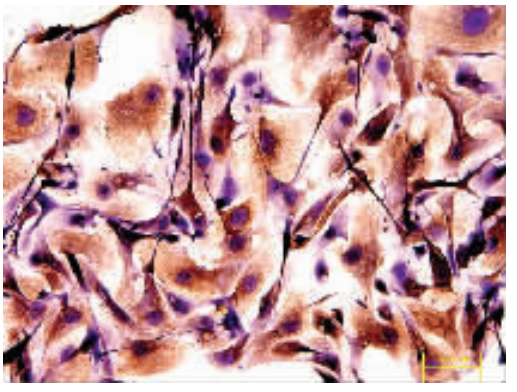


图 2 原代培养人子宫内膜腺上皮细胞 CK-19 免疫组化观察 (S-P × 400)

2.2 4 种异黄酮改构化合物作用不同时间对离体人子宫内膜腺上皮细胞增殖的影响

2.2.1 作用 24 h 结果 4 种化合物作用于人离体子宫内膜腺上皮细胞 24 h 后,低剂量(25 μmol/L)F8 显著促进子宫内膜腺上皮细胞增殖($P < 0.05$);中高剂量组(50、100 μmol/L)F11 显著抑制子宫内膜腺上皮细胞增殖($P < 0.05$)。此外各化合物各剂量组对子宫内膜腺上皮细胞的增殖无显著作用(抑制或增强)。不同剂量组化合物对细胞增殖无显著差别($P > 0.05$),不同化合物抑制细胞增殖的活性无显著区别($P > 0.05$)。相同剂量情况下,F11 抑制子宫内膜腺上皮细胞增殖活性最强,F11 高剂量的细胞存活率最低。不同剂量组 EST 作用 24 h 后子宫内膜腺上皮细胞存活率高于溶剂对照组,但均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 不同剂量异黄酮改构化合物作用 24 h 后细胞存活率

(%, $n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

化合物	25 μmol/L	50 μmol/L	100 μmol/L
F8	122.7 ± 9.6[a]	112.5 ± 4.7	102.7 ± 6.3
F11	91.2 ± 18.4	82.7 ± 3.3[a]	80.6 ± 1.9[a]
ZF3	105.5 ± 9.1	88.5 ± 2.3	86.1 ± 3.3
ZF7	112.0 ± 16.6	96.4 ± 9.6	91.2 ± 6.9
EST	101.7 ± 6.0	102.5 ± 5.1	105.5 ± 11.4

溶剂对照组细胞存活率为 100%;a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与对照组比较

2.2.2 作用 48 h 结果 F8、F11、ZF3 和 ZF7 作用于人离体

子宫内膜腺上皮细胞 48 h 后,各剂量组 EST 作用下的子宫内膜腺上皮细胞存活率均高于溶剂对照组,其中中高剂量组(50、100 μmol/L)显著促进细胞增殖($P<0.05$)。此外,除低剂量组(25 μmol/L)F8 和 ZF3 作用下子宫内膜细胞存活率高于溶剂对照组($P>0.05$)外,其余各组细胞存活率均低于对照组。其中,50 μmol/L 时,F11 和 ZF3 组与溶剂对照组比较差异非常显著($P<0.01$);当增加至 100 μmol/L 时,与溶剂对照组比较,F8 和 ZF7 组表现出统计学差别($P<0.05$),F11 和 ZF3 组抑制细胞增殖作用非常显著($P<0.01$)。不同剂量下细胞存活率存在显著差别($P<0.05$);而不同化合物抑制细胞增殖的活性也差别显著($P<0.05$);F11 组均表现出较强的抑制细胞增殖活性。见表 2。

表 2　不同剂量异黄酮改构化合物作用 48 h 后细胞存活率

(%,$n=4$,$\bar{x}\pm s$)

化合物	25 μmol/L	50 μmol/L	100 μmol/L
F8	110.0±5.7	90.9±1.9	79.3±1.9[a]
F11	90.1±8.2	63.4±9.3[b]	58.0±0.8[b]
ZF3	104.2±7.6	61.1±2.3[b]	60.9±4.3[b]
ZF7	93.3±2.3	85.8±0.6	83.0±3.7[a]
EST	105.2±4.2	118.2±9.6[a]	122.7±14.2[a]

溶剂对照组细胞存活率为 100%;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

2.2.3　作用 72 h 结果　　各异黄酮化合物作用 72 h 后人离体子宫内膜腺上皮细胞存活率均低于溶剂对照组。在剂量为 25 μmol/L 时,F11 显著抑制细胞增殖($P<0.05$);当剂量为 50 μmol/L 时,与溶剂对照组比较,F8 和 ZF7 组显著抑制细胞增殖($P<0.05$),F11 和 ZF3 组抑制细胞增殖作用非常显著($P<0.01$);当剂量增至 100 μmol/L 时,各组细胞存活率更低($P<0.05$)。比较 4 种化合物不同剂量对细胞增殖的影响,25 μmol/L 与 100 μmol/L 剂量组细胞存活率存在显著差别($P<0.05$);相同剂量下,各化合物抑制细胞增殖活性具有统计学差别($P<0.05$)。各剂量组 F11 表现出的抑制子宫内膜腺上皮细胞增殖的活性均较强。当 EST 作用于人离体子宫内膜腺上皮细胞 72 h 后,其明显促进细胞增殖($P<0.05$)。见表 3。

表 3　不同剂量异黄酮改构化合物作用 72 h 后细胞存活率

(%,$n=4$,$\bar{x}\pm s$)

化合物	25 μmol/L	50 μmol/L	100 μmol/L
F8	94.8±9.8	68.1±6.6[a]	61.2±3.1[b]
F11	82.3±2.6[a]	61.6±7.7[b]	60.2±3.6[b]
ZF3	91.2±14.6	65.3±9.5[b]	58.2±6.6[b]
ZF7	92.9±8.9	82.4±4.3[a]	71.5±5.3[a]
EST	122.3±16.3[a]	124.7±6.6[a]	128.6±15.8[a]

溶剂对照组细胞存活率为 100%;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

3　讨论

离体培养的子宫内膜腺上皮细胞和间质细胞仍然表达 ER,分泌 PRL 和 CA125 等,表明分离和培养过程并未改变细胞特异蛋白的表达[3],因此子宫内膜细胞体外培养体系广泛用于研究子宫内膜细胞间的相互作用,对性激素的应答机制和子宫内膜癌变的分子机制等。在原代细胞培养过程中,体外培养体系建立的成功与否和分离的细胞活力、纯度及接种密度密切相关。我们利用胶原酶消化作用强,不影响细胞活力的优点消化组织;利用子宫内膜间质细胞和上皮细胞贴壁时间的差别纯化上皮细胞,并保证上皮细胞接种数达到 400 ml^{-1}后,可确保原代培养成功。经过 CK-19 免疫组化染色,证实本方法培养的原代细胞为目的细胞且未改变原有细胞特征,可满足后续实验需要。

雌激素可促进子宫内膜细胞增殖和血管形成,抑制子宫内膜细胞的凋亡[4],也可在子宫内膜细胞增生过程中的 DNA 复制转录水平上诱导 ER、PR 的生成,发挥其生物学效应。本试验中 EST 作用于离体子宫内膜腺上皮细胞后,细胞存活率高于溶剂组;增加剂量和延长作用时间促进细胞增殖,与文献[5]报道一致,同时也说明培养的子宫内膜腺上皮细胞未改变原有细胞特征。

薛晓鸥等[6]研究发现:不同剂量的异黄酮均可抑制人离体子宫内膜腺上皮细胞的增殖,其生物学活性随作用时间的延长而增强,至 96 h 后趋于稳定。我们先期对异黄酮进行结构改造,衍生出 F8、F11、ZF3 和 ZF7 4 种化合物,再将之作用于人离体子宫内膜腺上皮细胞,除低剂量 F8 作用 24 h 后促进细胞增殖外,其他异黄酮化合物在一定剂量下作用一段时间后均表现出抑制细胞增殖活性;与溶剂对照组比较,其抑制活性具有时间和剂量依赖性,与薛晓鸥等[6]报道一致。但 4 种异黄酮改构化合物抑制细胞增殖的活性具有显著区别。推测原因可能在于:各化合物由异黄酮结构改造而来,虽然均具有抑制子宫内膜腺上皮细胞的增殖的活性,但由于引入的活性基团和引入活性基团的部位不同,各化合物抑制细胞增殖活性的强弱显著不同。该结果提示异黄酮结构改造可能影响其抑制细胞增殖效应。这种影响是如何产生,增强还是减弱以及其抑制子宫内膜腺上皮细胞增殖活性的分子机制均有待进一步研究。

临床上采用激素治疗以期改善绝经妇女的生活质量,但长期激素治疗可增加子宫内膜癌的发生率。目前研究者正致力寻找雌激素受体调节剂供临床选择。由于大豆异黄酮具有缓解围绝经期综合征[7]等生物学效应,因此异黄酮成为雌激素受体调节剂成为可能。近来国外学者重点研究大豆异黄酮对在体子宫内膜组织增殖的生物学效应,但得到不同的结论。Imhof 等[8]研究发现,绝经妇女口服大豆异黄酮后,子宫内膜组织厚度明显薄于对照组。据此认为大豆异黄酮可能抑制子宫内膜组织的增殖,与我们实验结论一致。而Nahas 等[9]在比较安慰剂对照组与实验组后发现绝经妇女服用异黄酮后子宫内膜厚度无明显差别,推断大豆异黄酮可能对子宫内膜组织的增殖无明显作用。

有学者通过5年的对照实验研究后得出与我们完全相悖的结论:异黄酮明显促进子宫内膜组织增殖,因而可能有增加子宫内膜异常增生的风险[10]。因此,应将本实验得到抑制人离体子宫内膜细胞增殖活性最强的异黄酮改构化合物F11用于动物模型,观察改构化合物长期应用对在体子宫内膜组织的生物学效应,期望能为研发新型雌激素受体调节剂提供理论依据。

参考文献:

[1] 张丽龙, 粟永萍, 刘晓宏, 等. 新型异黄酮及甾体类化合物体外抗癌细胞增殖活性的初步筛选[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(13): 1393-1396.

[2] 陈 诚, 常 青, 梁志清, 等. 人子宫内膜细胞原代培养方法的改良[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(6): 507-509.

[3] Krikun G, Schatz F, Taylor R, *et al*. Endometrial endothelial cell steroid receptor expression and steroid effects on gene expression[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(3): 1812-1818.

[4] 薛晓鸥, 牛建昭, 王继峰, 等. 大豆异黄酮对去卵巢大鼠子宫细胞凋亡影响的研究[J]. 中日友好医院学报, 2005, 19(1): 28-30.

[5] 白晓霞,王文栋. 苯甲酸雌二醇对离体子宫内膜腺上皮细胞中热休克蛋白70及90表达的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(11): 747-751.

[6] 薛晓鸥, 魏丽惠, 牛建昭, 等. 植物雌激素两种单体对子宫内膜腺上皮细胞作用的比较[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2004, 20(8): 475-476.

[7] Howes L G, Howes J B, Knight D C. Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis[J]. Maturitas, 2006, 55(3): 203-211.

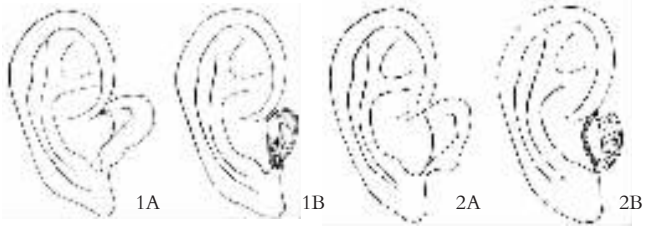
[8] Imhof M, Gocan A, Reithmayr F, *et al*. Effects of a red clover extract (MF11RCE) on endometrium and sex hormones in postmenopausal women[J]. Maturitas, 2006, 55(1): 76-81.

[9] Nahas E A, Nahas-Neto J, Orsatti F L, *et al*. Efficacy and safety of a soy isoflavone extract in postmenopausal women: a randomized, double-blind, and placebo-controlled study[J]. Maturitas, 2007, 58(3): 249-258.

[10] Unfer V, Casini M L, Costabile L, *et al*. Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. Fertil Steril, 2004, 82(1): 145-148.

(编辑 栗 嘉)

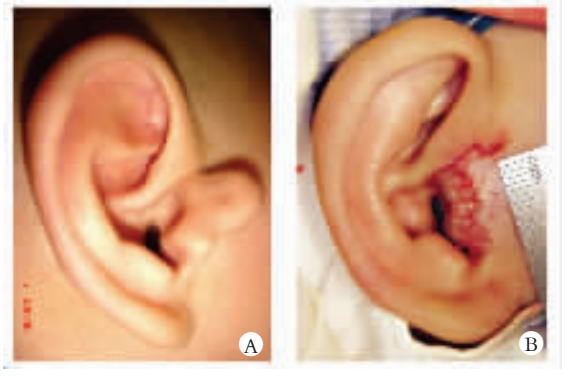
(上接1552页)



A:保留的附耳软骨瓣;B:折叠后的附耳软骨瓣

图1 巨大附耳所致耳屏上段缺损附耳软骨瓣折叠修复术示意图

图2 巨大附耳所致耳屏全段缺损附耳软骨瓣折叠修复术示意图



A:术前;B:术后

图3 巨大附耳所致耳屏上段缺损附耳软骨瓣折叠修复术效果

3 讨论

附耳生长于面部,有损于美观,尤其是巨大附耳导致耳屏不同程度缺损。轻者仅表现为屏上切迹加深或耳屏上段缺损,临床较为多见;重者整个耳屏缺如,表现为基底向内移位的巨大肉赘向前、内方倾斜生长,外耳门前壁完全敞开,往往伴同侧面部发育不良,临床较少见。此类附耳的畸形较常见的不伴耳屏缺损的单纯肉赘型附耳更重,家长有一定的心理负担,结合民间有出生40 d为婴儿宴客的风俗,家长通常要求尽早手术。我们认为在专业麻醉师的配合下,最早可在患儿满月时进行该手术。早期手术的切口瘢痕轻微。手术在基础麻醉联合局麻下操作,所致损伤小,所需时间短,术前常规检查患儿的全身情况,可以保证其安全性。但对伴有其他畸形,如耳前瘘管,口角裂等的病例,则应推迟手术时间。

附耳的治疗方法主要是手术切除。单纯的耳屏至口角连线上的单个或多个肉赘,手术较为简单,主要是切除肉赘及其下与耳屏软骨相连的附耳软骨,需注意要彻底切除附耳软骨,防止术后软骨生长再次形成突起,并保证耳屏的位置和形态不受影响[1,2]。

对于此类巨大附耳伴耳屏不同程度缺损的病例,畸形严重,单纯行附耳切除将造成术后耳屏形态异常,轻者仅为屏上切迹过深,重者整个耳屏缺如,影响美容。如何从美容的角度去修复此类附耳畸形,重建耳屏,国内外尚少见报道。我科设计出保留附耳软骨瓣翻转折叠,插入缺损部位皮下填充的方法进行耳屏成形,效果满意,完全恢复了耳屏的正常形态,达到美容的要求(图3)。附耳软骨瓣折叠修复术的要点在于掌握保留软骨瓣的宽度及形态,应依据耳屏缺损的轻重程度以及健侧耳屏的形态而定,切口最好于成形的耳屏边缘,如此瘢痕才不明显。

关键词: 附耳; 软骨; 耳屏缺损

中图法分类号: R622 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] 范志朋, 王松灵. 附耳的研究现状[J]. 北京口腔医学, 2003, 11(3):181-183.

[2] Sebben J E. The accessory tragus - no ordinary skin tag[J]. J Dermatol Surg Oncol, 1989, 15(3): 304-307.

(编辑 吴培红)