维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0384-03

CO_2 对人宫颈癌细胞株 CASKI 的增殖及 CDK4 和 Cyclin D1 表达的研究

王华斌,姚珍薇,干晓琴,李 刚,袁 瑞,乐爱文

(重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨腹腔镜二氧化碳(CO_2)气腹对宫颈癌细胞体外生长的影响。方法:体外培养人宫颈癌细胞株 Caski,以 14mmHg 气压的 CO_2 处理 2h,用四唑盐比色试验(MTT)、流式细胞术(FCM)和免疫细胞化学法检测 Caski 细胞外生长情况、细胞周期变化及周期相关蛋白 CDK4 和 Cyclin D1 的表达水平。结果:CO_2 处理后 Caski 细胞增殖加快,细胞周期中处于增殖期的细胞比例增高,周期相关蛋白 CDK4 和 Cyclin D1 的表达显著增加。结论:CO_2 可以促进 Caski 细胞的增殖。

【关键词】二氧化碳;宫颈癌细胞;增殖

【中国图书分类法分类号】R711.74 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-06

Effects of carbon dioxide on the proliferation and CDK4 and Cyclin D1 expressions of human cervical carcinoma cell line CASKI

WANG Huabin, et al

(*Department of Gynecology and Obstetrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of celioscope carbon dioxide pneumoperitoneum on the growth of cervical carcinoma cell line in vitro. *Methods*: Cervical carcinoma cells CASKI were cultured in vitro, and then treated with 14mmHg, 100% carbon dioxide for 2h. The proliferation, cell cycle and expressions of CDK4 and Cyclin D1 were examined by MTT, FCM and immunocytochemistry respectively. *Results*: After the treatment of carbon dioxide, the proliferation of cervical carcinoma cells CASKI was significantly increased at the 3th day, the proportion of proliferative phase in the cell cycle was significantly increased, and the expressions of CDK4 and Cyclin D1 were also significantly increased. *Conclusion*: carbon dioxide may promote the proliferation of cervical carcinoma cell line.

【Key words】Carbon dioxide; Cervical carcinoma cell; Proliferation

随着腹腔镜在妇科恶性肿瘤诊治中的应用,有关 CO_2 气腹腹腔镜术后恶性肿瘤生长加快、易复发的报道越来越多,尤以 CO_2 气腹对恶性肿瘤的影响备受关注。研究证实 CO_2 气腹对恶性肿瘤的增殖和复发有影响。但也有人认为[1],CO_2 气腹腹腔镜术后恶性肿瘤生长加快与 CO_2 或腹腔镜治疗并无关系,而与肿瘤细胞自身特性有关。CO_2 气腹对恶性肿瘤细胞增殖分裂的影响,文献报道多从机体免疫因素、癌细胞局部微环境改变等外源性调控途径方面探讨。本文研究了 CO_2 人工气腹条件下宫颈癌 Caski 细胞体外生长情况、细胞周期变化,及周期相关蛋白 CDK4 和 Cyclin D1 的表达,从内源性调控途径的角度,探讨 CO_2 气腹对恶性肿瘤细胞增殖分裂的影响。

作者介绍:王华斌(1974-),男,硕士生,
主要研究方向:妇科肿瘤。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人宫颈癌细胞株 Caski,由重庆医科大学基础医学院分子生物学教研室宋方洲教授惠赠。

1.2 细胞培养

细胞培养于含 RPMI-1640(美国 Invitrogen 产品)、10%新生牛血清(杭州四季青产品)、青霉素 100U/ml、链霉素 100 μg/ml 的培养液中,pH 值为 7.2~7.4。孵化于 37℃、5%CO_2 环境中。每 2 天更换 1 次培养液。磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗。0.25% 胰酶+0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)用于细胞消化,制成细胞悬液。

1.3 兔抗人 CDK4 蛋白多克隆抗体、鼠抗人 Cyclin D1 蛋白单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司产品);SP 试剂盒(美国

维普资讯 http://www.cqvip.com

ZYMED 公司产品)。

1.4 体外 CO_2 人工气腹模型的建立和对 Caski 细胞的处理

将带有压力表的不锈钢厌氧罐清洗、消毒、紫外光照射 2h。在厌氧罐中加入 50ml 三蒸水以保持湿度。再将装有 Caski 细胞的培养瓶旋松瓶口后放入罐内支架上，盖紧厌氧罐，用真空泵抽成真空，连接到自动气腹机上。根据腹腔镜手术较常用的气压(10~15mmHg)和气腹时间，用纯 CO_2 气体，气压为 14mmHg，时间为 2h，并置厌氧罐于 37℃恒温水浴箱中。对照组不做处理，放到相同的孵箱中培养。

1.5 四唑盐(MTT)比色试验

在处理后第 1、2、3、4、5 天，取处理组和对照组细胞，分别制成细胞悬液。用 96 孔板按处理组和对照组分别接种细胞悬液。每孔分别加入 MTT 溶液和二甲基亚砜(DMSO)，充分混匀、溶解。选择 540nm 波长，测定光吸收值(A 值)，记录其均值和标准差($\bar{x} \pm s$)。

1.6 流式细胞术(FCM)检测

将人工气腹处理后第 1、2、3、4、5 天的细胞和对照组细胞经胰酶消化、离心，用 PBS 洗涤、重悬、再用乙醇固定并用等体积的 PI 染液混合，4℃放置 30min。然后用流式细胞仪检测细胞周期的分布。并调算细胞增殖指数：细胞增殖指数(PI)%=(S+G_2/M)期细胞数+(G_0/G_1+S+G_2/M)期细胞数×100%[5]。

1.7 免疫细胞化学法检测周期相关蛋白 CDK4 和 Cyclin D_1 表达情况

将处理组细胞和对照组细胞细胞爬片行免疫细胞化学法染色，染色步骤按说明书进行，以 PBS 代替一抗作阴性对照，并设阳性对照。细胞核明显棕黄色为阳性。根据染色强度和阳性细胞数进行半定量分析，采用自动图像分析系统随机计细胞 200 个细胞、阳性表达率=(阳性细胞细胞数/200)×100%。免疫细胞化学结果分析采用方差分析。

2 结 果

2.1 CO_2 对 Caski 细胞增殖的影响

在 CO_2 处理后第 1、2 天，CO_2 处理组组的 MTT 值高于对照组，第 2 天后 CO_2 处理组 MTT 值明显高于对照组(P<0.05)。第 4~5 天 CO_2 处理组的 MTT 值增幅下降，但仍高于对照组(见图 1)。

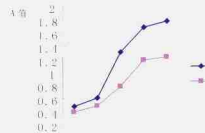


图 1 CO_2 处理后 Caski 细胞光吸收值(A 值)的变化

表 1 各组 Caski 细胞在细胞周期各期中的比例及增殖指数(%)

	G_0~G_1 期	S 期	G_2~M 期	增殖指数
对照组 1d	66.48	31.21	2.31	33.52
CO_2 组 1d	62.32	30.47	7.2	37.67
对照组 2d	66.47	30.04	3.49	33.49
CO_2 组 2d	59.37	38.27	2.36	40.67
对照组 3d	72.97	21.85	5.18	27.03
CO_2 组 3d	64.03	24.55	11.42	35.97
对照组 4d	69.85	27.64	2.51	30.15
CO_2 组 4d	62.08	27.14	10.77	37.97
对照组 5d	66.51	23.75	9.74	33.49
CO_2 组 5d	64.6	23.17	12.23	35.4

2.2 CO_2 对 Caski 细胞周期的影响

各组 Caski 细胞细在各期细胞周期中的比例及增殖指数见表 1。CO_2 处理组的增殖指数明显高于对照组(P<0.05)。第 5 天后 CO_2 处理组下降，与对照组无明显差异。CO_2 处理组比对照组细胞处于 G_0~G_1 期的比例显著降低，而进入 S 期、G_2~M 期的细胞比例增多。

2.3 CO_2 对 CDK4 和 Cyclin D_1 蛋白表达的影响

CDK4 和 Cyclin D_1 阳性物质呈棕黄色，强阳性呈棕褐色，主要在分布在细胞核内、胞浆可有少量着色(见图 2~3)。经 CO_2 气腹处理后，与对照组比较，宫颈癌 Caski 细胞中 CDK4 和 Cyclin D_1 表达明显增强。CO_2 处理组 CDK4 和 Cyclin D_1 蛋白表达率与对照组比较差异有显著性(P<0.01)。第 4~5 天 CO_2 处理组周期蛋白表达的平均光密度值增幅下降(见图 4~5)。



图 2 CDK4 在 Caski 细胞中的阳性表达(SP×400)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 3 Cyclin D1 在 Caski 细胞中的阳性表达(SP×400)

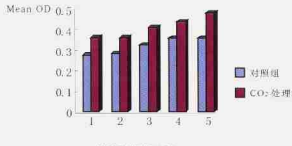


图 4 CO_2 对 Caski 细胞 CDK4 蛋白表达平均光密度值(Mean OD 值)的变化

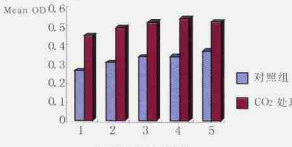


图 5 CO_2 对 Caski 细胞 Cyclin D_1 蛋白表达平均光密度值(Mean OD 值)的变化

3 讨 论

随着腹腔镜在妇科恶性肿瘤的诊断和治疗中的应用,有关 CO_2 气腹腹腔镜术后恶性肿瘤生长加快、易复发的报道越来越来多,其中尤以 CO_2 气腹对恶性肿瘤的影响备受人们的关注,并成为近年来的一个研究热点。较多的研究证实,CO_2 气腹对恶性肿瘤的增殖和复发有影响[3,4]。

Smidt 等[5]发现,卵巢上皮癌 SKOV-3 细胞株,在不同的气体介质下暴露 0.5h、1.0h、1.5h、2.0h、2.5h、3h,再分别在相同条件下培养 0~4 天后对比观察,结果发现暴露于 CO_2 中的 SKOV-3 细胞生长明显快于对照组。Jacobi 等[6]以惰性气体氮气为对照,通过动物模型来研究 CO_2 气腹对恶性肿瘤增殖的影响,证实 CO_2 气腹能明显促进恶性肿瘤的生长。CO_2 气腹对宫颈癌的影响目前尚未见报道。

目前文献建立的 CO_2 气腹模型存在的构造复杂、CO_2 的压力、浓度不能精确调控的缺陷,甚至造成 CO_2 气流、带走了雾化状态的癌细胞,人为地增加了影响实验结果的干扰因素。本实验结合腹腔镜在临床的应用条件,腹腔的密闭性,不干扰癌细胞的生长环境等实际条件,建立了全新的体外 CO_2 气腹模型,更好地模拟了 CO_2 气腹条件下恶性肿瘤的生长环境。通过观察人宫颈癌 Caski 细胞经 CO_2 处理后第 1、2、3、4、5 天的生长曲线和增殖指数,以了解 CO_2 气腹是否促进宫颈癌细胞的生长。发现在 CO_2 人工气腹处理后,Caski 细胞生长明显快于对照组。提示 CO_2 气腹可促进宫颈癌 Caski 细胞的增殖。

与生长增殖有关的内源性因素即细胞的周期蛋白-周期蛋白依赖性激酶-周期蛋白依赖性激酶抑制物系统(CYCLINs-CDKs-CKIs 系统)。研究发现,CDK4 能够与 Cyclin D_1 、增殖细胞核抗原等结合成复合物而活化,促进细胞增殖。而 Cyclin D_1 主要通过激活 CDK4 促进细胞越过 G_1/S 限制点。故高表达的 Cyclin D_1 可缩短 G_1 期时间。有学者认为 Cyclin D1-CDK4 复合物是癌细胞增殖的关键的调控因子[7]。CDK4 和 Cyclin D_1 作为癌细胞增殖的关键的调控因子也存在于宫颈癌中,刺激宫颈癌细胞的增殖。张国徽等证实[8],CDK4 和 Cyclin D_1 在宫颈癌中的阳性表达显著高于正常宫颈上皮;宫颈癌中 Cyclin D_1 的表达增高时,CDK4 活性也增高,二者的升高程度与宫颈癌细胞的增殖程度呈正相关。Bae 等[9]还发现,Cyclin D1 在宫颈癌中的表达不仅显著高于正常的宫颈上皮,而且其表达与宫颈癌的临床分期、组织分化程度及复发有关。为了进一步研究 CO_2 气腹促进恶性肿瘤增殖的机制,本实验研究了 CO_2 人工气腹条件下 Caski 细胞的细胞周期及相关因子的表达,从细胞增殖分裂的内源性调控途径进行探讨。我们发现,①CO_2 处理组比对照组细胞处于 G_0-G_1 期的比例显著降低,而进入 S 期、G_2-M 期的细胞比例增多。提示经 CO_2 人工气腹处理后,有更

(下转第 391 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

且存在浓度反应关系，PC100、200mg/L 组比PC50mg/L 组表现出更强的保护作用。晶状体的水溶性蛋白是晶状体的结构蛋白，与晶状体的透明性和屈光度有关。在白内障形成过程中，晶状体中水溶性蛋白含量降低。在本研究中 PC 组水溶性蛋白含量明显高于 Feton 模型组、VC、VE 组，表明 PC 可以保护晶状体蛋白免受氧化损伤，从而维持晶状体的透明性。

丙二醛(MDA)是自由基攻击生物膜多不饱和脂肪酸而引发的脂质过氧化反应的终产物的，其含量可反映机体氧化损伤的程度。Lu[9]等研究的 PC 能抑制肝线粒体脂质过氧化反应、保护肝线粒体 SOD 活性及降低 MDA 的含量。本研究中 MDA 含量测定结果显示，PC 组中 MDA 含量明显低于其它实验组，表明 PC 对脂质过氧化反应具有抑制作用。

本研究显示，PC 能有效保护实验晶状体的氧化损伤，预防白内障形成。目前尚未见 PC 有毒副作用的报道，但其化学结构与效能间的关系以及在人体中的应用还需进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Packer L,Rimbach G, Virgili F.Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (Pinus maritima) bark,pycnogenol[J].Free Radic Biol Med,1999;27(5-6):704-724.

[2] Zhu QY,Holt RR, Lazarus SA,et al.Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis[J].Exp Biol Med (Maywood),2002;227(5):321-329.

[3] Faria A,Mateus N,de Freitas V,et al.Modulation of MPP+ uptake by procyanidins in Caco-2 cells:involvement of oxidation/reduction reactions[J].FEBS Lett,2006;580(1):155-160.

[4] Faria A,Calhau C,de Freitas V,et al.Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators[J].J Agric Food Chem,2006;54(6):2392-2397.

[5] Rice-Evans CA,Miller NJ,Paganga G.Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids[J].Free Radic Biol Med,1996;20(7):933-956.

[6] Rosch D,Bergmann M,Knorr D,et al.Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice[J].J Agric Food Chem,2003;51(15):4233-4239.

[7] 陈 瑗,周 玫,主编.自由基与衰老[M].第 2 版,北京：人民卫生出版社,2004.15-17.

[8] Simonetti P,Ciappellano S,Gardana C,et al.Procyanidins from Vitis vinifera seeds:in vivo effects on oxidative stress[J].J Agric Food Chem,2002;50(21):6217-6221.

[9] Lu Y,Zhao WZ,Chang Z,et al.Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage[J].Acta Pharmacol Sin,2004;25(8):1083-1089.

(上接第 386 页)

多的细胞越过了 G_1/S 限制点进入分裂增殖期；② CO_2 处理组 CDK4 和 Cyclin D_1 蛋白的表达显著增高，提示经 CO_2 人工气腹处理后，CDK4 和 Cyclin D_1 活性增高。表明在 CO_2 人工气腹条件下，宫颈癌 Caski 细胞增殖分裂加快与细胞增殖分裂的内源性调控途径中增殖信号的表达增强有关。

(通讯地址：重庆医科大学附属第一医院妇产科姚珍薇转王华斌，邮编 400016)

参 考 文 献

[1] Lecuru F, Agostini A, Camatte S,et al. Impact of pneumoperitoneum on visceral metastasis rate and survival. Results in two ovarian cancer models in rats[J].BJOG,2001;108(7): 733-737.

[2] 丁志杰，单吉贤，都姝妍. 直肠癌远端直肠系膜内 DNA 含量的检测及其临床意义[J]. 中国医科大学学报,2004;33(5):432-434.

[3] Volz J,Koster S,Spacek Z,et al.Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum[J]. Surg Endosc,1999;13(6):611-614.

[4] Wildbrett P,Oh A,Naundorf D,et al.Impact of laparocopic gases on peritoneal microenvironment and essential parameters of cell functions[J].Surg Endosc,2003;17:78-82.

[5] Smidt VJ,Singh DM,Hurteau JA,et al.Effect of carbon dioxide on human ovarian carcinoma cell growth[J].American Journal of Obstetrics and Gynecology,2001;185(6):1314-1317.

[6] Jacobi C A,Wenger F,Sabat R,et al.The impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on immunologic function and tumor growth in a rat model[J].Dig Surg,1998;15:110-116.

[7] Dong Y,Sui L,Sugimoto K,et al.Cyclin D1-CDK4 complex a possible critical factor for cell proliferation and prognosis in laryngeal squamous cell carcinomas[J].Int J Cancer,2001;95:209-215.

[8] 张国徽，姬宏宇，张 辉，等.Cyclin D_1 和 CDK4 在子宫颈上皮内瘤样变和宫颈鳞癌中的表达及意义[J].实用医学杂志,2005;21(7):671-672.

[9] Bae DS,Cho SB,Kim YJ.Aberrant expression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus[J].Gynecol Oncol,2001;81(3):341-347.