维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0032-05

ATRA 诱导 HPV16 型亚基因永生化人宫颈上皮细胞分化的实验研究

李祎铭,赵 涌,林 晓

(重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 ATRA 对 HPV16 型亚基因(E6、E7)永生化人宫颈上皮细胞(H8 细胞)的诱导分化作用及机制。方法:H8 细胞经 ATRA 处理后,用 MTT 法测定 ATRA 的抗增殖效应,光镜、电镜观察细胞形态变化,流式细胞术(FCM)检测细胞周期,免疫组化 SABC 法检测增殖细胞核抗原 Ki67 表达水平的变化,PCR-ELISA 法检测端粒酶活性变化,荧光免疫细胞化学检测 HPV 和 E6 蛋白表达变化。结果:ATRA 使 H8 细胞增殖抑制;细胞形态朝良性方向分化;细胞堆积于 G1 期,S 期细胞减少;细胞核内 Ki67 的表达水平下降;端粒酶活性下降。结论:ATRA 对 H8 细胞有明显诱导分化作用,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】维甲酸;诱导分化;宫颈;HPV;永生化

【中国图书分类法分类号】R737.33 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-06

Experimental study of the differentiation of HPV16 subgenes-immortalized human endocervical cells induced by ATRA

LI Yiming, et al

(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To study the differentiation-inducing effects of all-trans-retinoic acid (ATRA) on HPV16 subgenes-immortalized human endocervical cells (H8 cell) and the mechanism. ***Methods***: After H8 cells were treated with ATRA, the aiti-proliferation of ATRA on them was tested by MTT assay, morphological changes observed by LM and TEM, cell cycle analyzed by FCM, expression of Ki67 tested by immunocytochemistry, the activity of telomerase tested by PCR-ELISA, and expressions of HPV and E6 tested by fluorescence immunocytochemistry. ***Results***: ATRA could inhibit proliferation of H8 cells and induce their benign morphodifferentiation. According to FCM, H8 cells accumulated in G1 phase after being treated with ATRA, and expression of Ki67 and activity of telomerase reduced. ***Conclusion***: ATRA could induce the differentiation of H8 cell line, which might be achieved by inhibiting proliferation, blocking cell cycle, and decreasing activity of telomerase.

【Key Words】Retinoic acid; Induced-differentiation; Cervix; HPV; Immortalization

全反式维甲酸(ATRA)是维生素 A 的一种高活性衍生物,可诱导某些肿瘤细胞终末分化,成为正常或接近正常的细胞,从而达到治疗的目的[1]。除诱导白血病细胞分化疗效确定外,其诱导实体瘤如胃癌、肠癌、卵巢癌和宫颈癌[2]等的分化也是研究热点,但其效果尚不肯定。而关于 ATRA 对宫颈永生化细胞,即一种潜恶性细胞的诱导分化作用却未见报道,现以 HPV16 型亚基因(E6、E7)永生化人宫颈上皮细胞(H8 细胞)为对象,研讨 ATRA 对它的诱导分化作用及机制。

作者介绍:李祎铭(1981-),女,硕士生,
主要研究方向:妇科肿瘤病理。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 H8 细胞株源于中国医学科学院病毒研究所[3]。

1.1.2 化学药物及试剂 全反式维甲酸(ATRA)购自 Sigma 公司,端粒酶检测试剂盒(PCR-ELISA)为华美公司产品,Ki67、E6 和 HPV 单抗为福州迈新生物技术开发公司产品,通用型 SP 试剂盒及 DAB 显色剂购自中杉金桥生物技术有限公司,SABC-FITC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

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 RPMI 1640 培养基中,37℃、5%CO_2 混合气体的孵箱中

维普资讯 http://www.cqvip.com

培养。取对数生长期细胞进行实验。ATRA 以无水乙醇配成 10^{-2}mol/L 储存液 -20℃避光保存，实验组使用终浓度分别为 10^{-5}mol/L、10^{-6}mol/L、10^{-7}mol/L、10^{-8}mol/L。

1.2.2 MTT 法测定细胞生长抑制率 按上述培养方法得到 H8 单细胞悬液，以每孔 5×10^4 个 /ml 密度接种于 96 孔板，实验组加入不同浓度 ATRA，每孔 20μl，使其终浓度分别达到上述各浓度，实验设无水乙醇和 RPMI 1640 液对照组，每组均设 5 个平行孔。继续培养 24h、48h、72h、96h，取出培养板，每孔加入 20μl MTT 液（浓度为 5mg/ml）；37℃孵育 4h 终止培养，吸去孔内上清液，每孔加入 DMSO 200μl，振荡 10min，用自动酶标读数仪（Bio-TekELX800UV）在波长为 570nm 时测定每孔的吸光度（A）值，计算抑制率（%）=（1- 实验组平均 A 值 / 对照组平均 A 值）×100%。

1.2.3 光镜及透射电镜观察 上述方法培养 72h 后收集细胞，作常规 HE 染色，光镜观察；戊二醛固定、锇酸后固定，按透射电镜常规制片，在日立 H600 型电镜下观察。

1.2.4 FCM 测定细胞周期 将 H8 细胞按 5×10^4 个 /ml 密度接种于 50ml 培养瓶中，实验组加入终浓度为 10^{-5}mol/L 的 ATRA，设对照组；培养 24h、48h、72h、96h 收集细胞悬液，离心 PBS 漂洗，70%冷乙醇固定，制备单细胞悬液，流式细胞仪（FCM，美国 FASCan Becton Dickinson）进行细胞周期分析。

1.2.5 免疫细胞化学染色 将 H8 细胞按 5×10^4 个 /ml 密度制成细胞爬片，设实验组和对照组，培养 72h 后，按照免疫细胞化学常规、SP 法染色，DAB 显色，Ki67 阳性为细胞核着色。根据染色强度和阳性细胞数进行半定量分析，每张爬片随机选择 10 个高倍镜视野，计算阳性表达率；每组重复 3 张爬片。

1.2.6 荧光免疫细胞化学检测 H8 细胞内 HPV 及 E6 蛋白表达变化 将 H8 细胞按 5×10^4 个 /ml 密度制成细胞爬片，设实验组（10^{-5}mol/L ATRA）和对照组，培养 72h 后，按照荧光免疫细胞化学常规 SABC-FITC 法染色，在 525nm 波长下荧光显微镜观察、照相。

1.2.7 PCR-ELISA 法测定端粒酶活性 将细胞以 5×10^4 个 /ml 密度接种于 50ml 培养瓶内，实验组加入终浓度为 10^{-5}mol/L 的 ATRA，设对照组；培养 48h、72h、96h。实验组步骤如下：①端粒酶提取；②端粒酶重复序列扩增；③产物杂交检测；按试剂盒说明进行操作。结果判定：自动酶标读数仪在波长为 570nm 时读取 OD 值。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。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件处理系统进行统计学分析结果。吸光度值两组间比较用 t 检验；多组间比较采用方差分析（SNK 法或 LSD 法）；免疫细胞化学和免疫荧光细胞化学结果分析用 χ^2 检验。$P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 ATRA 对 H8 细胞的增殖抑制作用

对照组细胞生长活跃。经 10^{-5}mol/L，10^{-6}mol/L，10^{-7}mol/L，10^{-8} mol/L 的 ATRA 处理后，H8 细胞生长均不同程度地减慢，并呈时间、浓度依赖性，与对照组相比，各浓度 ATRA 作用 96h 后，H8 细胞生长抑制率在 12.5%~39.6%之间。不同时间及不同浓度之间差异有显著性（$P<0.05$）。

2.2 光镜及透射电镜观察

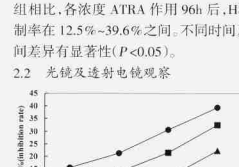


图 1 不同浓度 ATRA 对 H8 细胞增殖的抑制

光镜下对照组细胞呈多角形，形态饱满，核大深染，可见较多的核分裂像（图 2）。ATRA 作用 72h 后，可见细胞体积变小且较规则，核分裂像明显减少，核 / 质比例下降（图 3）。电镜观察见对照组细胞大而圆，核大不规则，可见核膜切迹；常染色质发达，可有一个以上的核仁；细胞器较少（图 4）。实验组细胞体积缩小，核较小且规则，异染色质增多，核仁减少甚至消失；出现发育良好的线粒体和内质网等细胞器（图 5）。

2.3 ATRA 对 H8 细胞 Ki67 表达的影响

免疫细胞化学检测显示，对照组细胞 Ki67 呈强阳性表达，棕黄色颗粒物分布于核内（图 6），阳性率为 81.15%±5.08%；经 10^{-5}mol/LATRA 处理 72h 后，Ki-67 表达明显减弱（图 7），阳性率下降到 10.03%±7.15%，与对照组相比，差异有显著性（$P<0.05$）。

2.4 ATRA 对 H8 细胞内 HPV 及 E6 抗原表达的影响



图 2 对照组细胞，核大深染，可见两个核分裂象（HE×400）

维普资讯 http://www.cqvip.com

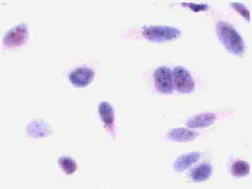


图 3 ATRA 处理 72h 后的 H8 细胞,核分裂像明显减少,核/质比例下降(HE×400)

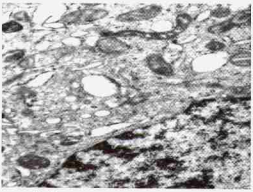


图 5 ATRA 培养 72h 后细胞,胞浆内出现发育良好的线粒体、内质网等细胞器(TEM×12000)

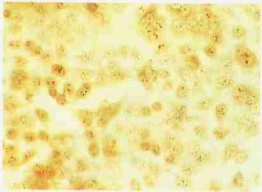


图 7 ATRA 处理 72h 后细胞 Ki67 表达明显减弱(SP×200)



图 9 实验组 H8 细胞(10^{-5}mol/L ATRA,72h),在其胞核内仍然可见 E6 抗原的表达(SABC-FITC×200)

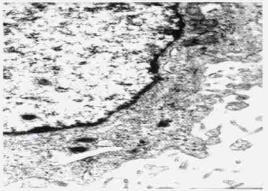


图 4 对照组细胞,常染色质发达,胞浆中细胞器较少(TEM×10000)

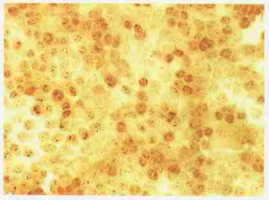


图 6 对照组细胞 Ki67 呈强阳性表达(SP×200)

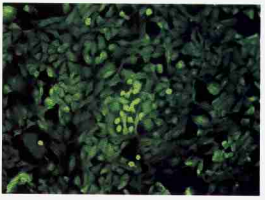


图 8 实验组 H8 细胞(10^{-5}mol/L ATRA,72h),在其胞核内仍然可见 HPV 抗原的表达(SABC-FITC×200)

FITC 标记的荧光抗体在 525nm 光波激发下呈现黄绿色荧光,每张爬片随机选择 10 个高倍镜视野,计数阳性细胞数,计算阳性表达率;每组重复 3 张爬片。本实验荧光标记在对照组和实验组(10^{-5}mol/L ATRA,72h)细胞内均可见 HPV 及 E6 蛋白表达(图 8、9),两组间阳性细胞率差异无显著性($P>0.05$)(见表 1)。

2.5 ATRA 对 H8 细胞周期的影响

流式细胞仪检测 H8 细胞周期分布情况(见表 2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 ATRA 作用前后 H8 细胞 E6 及 HPV 的表达情况

组别	E6(阳性率)	HPV(阳性率)
对照组	89.59% ± 3.21%	85.33% ± 8.18%
实验组	90.16% ± 6.04%	82.18% ± 6.35%

表 2 不同浓度 ATRA 对 H8 细胞周期及凋亡率的影响

细胞周期	对照组	10^{-7} mol/L	10^{-6} mol/L	10^{-5} mol/L
G0/G1 期(%)	72.71	76.31	78.57	82.70
S 期(%)	21.01	14.72	13.60	11.23
G2/M 期(%)	6.27	8.98	7.83	6.06

与对照组相比，10^{-5} mol/L，10^{-6}mol/L，10^{-7} mol/L 的 ATRA 作用 72h 后可以明显改变 H8 细胞的细胞周期，G0/G1 期细胞由 72.71%增加到 82.70%，S 期细胞由 21.01%减少为 11.23%，并呈现剂量依赖性。

2.6 ATRA 对端粒酶活性的影响

经 10^{-5}mol/L ATRA 处理 48h，72h，96h 后，细胞端粒酶活性随作用时间延长而进行性下降。与对照组相比，差异有显著性($P<0.05$)。不同时间段两两相比差异有显著性($P<0.05$)。见表 3。

表 3 ATRA 作用后细胞端粒酶活性的改变

端粒酶活性 (OD 值)	48h	72h	96h
对照组	0.617 ± 0.009	0.607 ± 0.040	0.616 ± 0.025
10^{-5}mol/L	0.424 ± 0.017	0.315 ± 0.015	0.138 ± 0.009

3 讨 论

宫颈癌作为妇科最常见的恶性肿瘤，近年来出现发病率上升及年轻化的趋势。高危型 HPV 中，HPV16 型与宫颈癌关系尤为密切，其早期基因 E6 和 E7 能直接转化细胞，干扰正常细胞周期调控；病毒转化蛋白使宿主 P53 或 Rb 蛋白失活，导致细胞生长失控，细胞周期紊乱，形成肿瘤[3,4]。本实验使用的宫颈永生化上皮细胞株（H8）是在体外转染了 HPV-16E6、E7 基因后形成的，在促癌因子作用下可以癌变，因此被认为是较理想的癌前病变模型细胞[2]。

ATRA 作为一种诱导分化剂，通过结合于核内特定的受体(RAR-α、β、γ3 个亚型)而发挥作用。ATRA 对白血病的治疗效果已得到肯定。胡海燕等[2,6]曾报道用 ATRA 诱导人宫颈癌细胞株分化和逆转耐药细胞株的耐药性。Yokoyama 等[7]也报道过 ATRA (10^{-4} mol/L，共同培养 4、7、10 天)能逆转宫颈上皮细胞的化生，对宫颈的潜在恶性病变也有阻抑作用。但 ATRA 对实体瘤如卵巢癌、肺癌、结肠癌、宫颈癌等作用尚不肯定。有报道维甲酸类制剂维胺酸对 CIN Ⅱ、Ⅲ级病变治疗后随访显示，病变级别降低或完全逆转为正常上皮。提示 ATRA 类药物对宫颈癌前病变有诱导其逆向分化作用，但有关实验研究未见报道。本实验试图通过实验证实 ATRA 对宫颈上皮永生化的诱导分化作用，对开发有效局部诱导治疗药物，预防 HPV 感染引起的宫颈癌的发生有着重要的科学意义和应用前景。

细胞分化主要表现在形态和功能两个方面，经 ATRA 处理后的 H8 细胞，经光镜及电镜观察发现出现分化成熟的特征，如细胞体积缩小，核较小且规则，核/质减小，异染色质增多，核仁减少；出现发育良好的线粒体和高尔基体等细胞器。MTT 结果表明，ATRA 能够明显抑制 H8 细胞生长，其抗增殖效应呈现剂量－时间依赖性，对 H8 细胞的抑制率在 96h 时可达 39.6%。而细胞增殖速度减慢通常则是分化的结果之一，提示 ATRA 对 H8 细胞有较强的诱导分化作用。

细胞分化的主要标志是合成特异性的功能蛋白，出现细胞类型的功能性改变，以及细胞表型的变化，这些标志性变化均在 G_1 期由细胞分化完成。肿瘤细胞去分化的一个重要特征就是从 G_1 到 S 期卡点失常，进入 S 期的细胞异常增多。FCM 结果表明，ATRA 处理后 G_0/G_1 期细胞增加，S 期细胞减少。提示其使细胞阻滞在静止期(G_0/G_1)，DNA 合成受抑制，细胞分裂速度减慢。

Ki67 抗原是一种表达于增殖期细胞的核抗原，在维持增殖活性中有重要作用。它在 G_1、G_2、S、M 期均有合成，而在 G_0 期缺失，由于其半衰期短，可以较客观地反映细胞的增殖活性，明显优于 PCNA 指数和 DNA 倍体含量等表示细胞增殖的指标[8,9]。ATRA 处理后 H8 细胞 Ki67 表达的明显下降，也提示了细胞增殖活性的减低，这与 FCM 的结果(细胞阻滞在静止期，DNA 合成受抑制，细胞分裂速度减慢)是相一致的。

H8 细胞是在体外转染了 HPV-16 亚基因 E6、E7 的永生化细胞。用免疫荧光的方法检测 ATRA 作用前后 H8 细胞内的 HPV 和 E6 表达阳性细胞率

维普资讯 http://www.cqvip.com

差异无显著性。可能是因为:①免疫荧光细胞化学方法对病毒检测的敏感度较低，多是定性而非定量；②ATRA 对 H8 细胞的诱导分化作用可能不是通过抑制 HPV 病毒的转录和复制来实现的。

端粒是真核细胞染色体末端的特殊保护结构，对染色体的稳定、DNA 的完整和修复起重要作用。端粒酶是使端粒延伸的反转录 DNA 合成酶，对维持端粒长度起重要作用。在恶性肿瘤中，端粒酶活性增高。乔玉环等[10]研究发现，端粒酶活性高低与宫颈癌分化程度成负相关，可以作为宫颈癌早期诊断及预后的指标。部分文献报道 HPV 感染有关的 CIN 时发现，CIN Ⅱ级和 CIN Ⅲ级标本中的端粒酶水平高于 CIN Ⅰ级。阻断端粒酶作用可以抑制宫颈癌细胞的生长[11,12]。ATRA 对永生化细胞端粒酶活性影响极少有文献报道，Ding 等[13]报道经 ATRA 处理后的 HPV 永生化的 HEN-16-2 细胞株端粒酶活性下降，hTERT mRNAs 的表达也下调。本实验结果表明，ATRA 作用后 H8 细胞端粒酶活性显著下降（$P<0.05$），呈时间依赖关系，综合 MTT 结果、形态学变化、Ki67 表达、细胞周期等相关实验结果，提示 ATRA 对宫颈永生化细胞（癌前状态）具有明显诱导分化作用，其中降低端粒酶活性是 ATRA 抑制 H8 细胞增殖、逆转其恶性表型的重要机制之一。ATRA 用于临床宫颈 CIN 病变的治疗和预防其发展为宫颈癌有一定应用前景。

参 考 文 献

[1] Hansen LA, Sigman CC, Andreoloa F, et al. Retinoids in chemop revention and differentiation therapy [J]. Carcinogenesis, 2000; 21: 1271-1279.

[2] 刘朝奇，韩广州，李 昆，等. 人巨细胞病毒协同人乳头瘤病毒 16 型诱导宫颈上皮细胞癌变的研究[J]. 中华病理学杂志，1999; 28 (1): 24-27.

[3] 胡海燕，陈惠祯，刘少阳. 全反式维甲酸诱导人宫颈癌细胞株分化的实验研究[J]. 现代妇科进展，2002; 11(6): 418-420.

[4] Songs pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals [J]. J Virol, 1999; 73(7): 5887-5893.

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

[6] 胡海燕，陈惠祯，刘少阳. 维甲酸逆转人宫颈癌耐药细胞株耐药性的实验[J]. 四川肿瘤防治，2002; 15(4): 193-195.

[7] Yokoyama M, Nakao Y, Iwasaka T, et al. Retinoic acid and interferon-alpha effects on cell growth and differentiation in cervical carcinoma cell lines[J]. Obstet Gynecol, 2001; 98(2): 332-340.

[8] Duchrow M, Schluter C, Key G, et al. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki67: a new kind of cycle-maintaining proteins [J]. Arch Immunol Ther Exp, 1995; 43 (2): 117-121.

[9] Wong FW. Immunohistochemical antibody Ki67 [J]. Gynecol Obstet, 1994; 37(2): 123.

[10] 乔玉环，张梦真，史惠蓉. 子宫颈癌及其癌前病变组织端粒酶活性的研究[J]. 中华妇产科杂志，2001; 36(8): 483-486.

[11] Ault KA, Allen HK, Phillips SL, et al. Telomerase activity as a potential diagnostic marker for triage of abnormal Pap smears[J]. Journal of Low Genit Tract Dis, 2005; 9(2): 93-99.

[12] Lei LX, Chen ZD. Combination of antisense human telomerase RNA and antisense human telomerase catalytic subunit inhibits cervical cancer Hela cells growth[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2005; 40(1): 42-46.

[13] Ding Z, Green AG, Yang X, et al. Retinoic acid inhibits telomerase activity and downregulates expression but does not affect splicing of hTERT: correlation with cell growth rate inhibition in an in vitro cervical carcinogenesis/multidrug-resistance model [J]. Exp Cell Res, 2002; 272 (2): 185-191.

(上接第 17 页)

参 考 文 献

[1] Vasant J, Y Joseph W, Lawrence TB, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase activity by TIMP-1 gene transfer effectively treats ischemic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2004; 110(11): 180-186.

[2] 周迎生，高 妍，李 斌，等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. 中国实验动物学报，2005; 13(3): 154-158.

[3] 汪志红，李启富，张素华，等. 高胰岛素－正葡萄糖钳夹技术的建立[J]. 重庆医科大学学报，2004; 5: 615－617.

[4] 包柄楠，张素华，任 伟，等. 正常糖耐量人群胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌功能相关因素分析[J]. 重庆医科大学学报，2003; 6: 771-774.

[5] Young-sup Y, Shigeki U, Osamu O, et al. Progressive Attenuation of Myocardial Vascular Endothelial Growth Factor Expression Is a Seminal Event in Diabetic Cardiomyopathy: Restoration of Microvascular Homeostasis and Recovery of Cardiac Function in Diabetic Cardiomyopathy After Replenishment of Local Vascular Endothelial Growth Factor[J]. Circulation, 2005; 4(16): 2073-2085.

[6] 张芳林，李 果，丁 伟，等. 2 型糖尿病性心脏病变早期相关基因的筛选和分析[J]. 中华内科杂志，2005; 41(8): 530-533.

[7] Schannwell CM, Schneppenheim M, erings S, et al. nLeft ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy [J]. Cardiolog y, 2002; 98: 33-39.