维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)06 - 0787 - 04

全反式维甲酸对人子宫内膜腺癌细胞增殖抑制作用的研究

常淑芳,雷 玲,刘维超,熊正爱

(重庆医科大学附属第二医院妇产科,400010)

【摘 要】目的:探讨全反式维甲酸(All trans retinoic acid,ATRA)对人子宫内膜腺癌细胞株(RL95 - 2)的增殖抑制作用。方法:用不同浓度 ATRA 处理体外培养的 RL95 - 2,分别在处理后不同的时间点,以 MTT 法检测 ATRA 对 RL95 - 2 增殖活性的影响;用流式细胞术检测经 ATRA 处理后的 RL95 - 2 细胞周期的变化;免疫组化方法检测细胞周期素 A(Cyclin A)的改变;扫描电镜和透射电镜观察 ATRA 处理后的细胞形态变化。结果:ATRA 可抑制 RL95 - 2 的增殖,且这种作用呈时间及浓度依赖性。FCM 分析发现 RL95 - 2 细胞增殖被 ATRA 阻滞于 G0/G1 期。电镜观察到用药后细胞恶性表型消失。免疫组化发现 ATRA 处理后 48h,Cyclin A 蛋白表达降低。结论:ATRA 对子宫内膜癌细胞系 RL95 - 2 的生长有抑制作用,且这种抑制作用与 Cyclin A 蛋白表达水平降低有关。

【关键词】全反式维甲酸;子宫内膜腺癌;治疗

【中国图书分类法分类号】R737.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 06 - 12

Study on the proliferation inhibition effect of all trans retinoic acid on human endometrial adenocarcinoma cell line

CHANG Shufang ,et al.

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

【Abstract】Objective: To evaluate the action of all trans retinoic acid on human endometrial adenocarcinoma cell line RL95 - 2. Methods: The human endometrial adenocarcinoma cells (RL95 - 2) cultured in vitro were treated with various concentrations of all trans retinoic acid(ATRA). At specific time points after treatment with ATRA, the effect of ATRA on the proliferation of RL95 - 2 cells was determined by MTT method, and Cyclin A was detected by immunohistochemistry. The morphological change of RL95 - 2 cells was observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. Results: A time - dependent and dose - dependent proliferation inhibition was demonstrated in RL95 - 2, and ATRA induced a G_0/G_1 cell cycle arrest. The malignant morphological characteristic of RL95 - 2 cells disappeared after treatment by ATRA. ATRA could down - regulate the expression of Cyclin A. Conclusion: The proliferation inhibition effect of ATRA on RL95 - 2 cells cultured in vitro appears to be due to the down - regulation of Cyclin A. The results provide evidence for the potential effect of ATRA in the prevention and treatment of human endometrial adenocarcinoma.

【Key Words】All - trans retinoic acid(ATRA);Endometrial adenocarcinoma;Therapy

子宫内膜癌的发病率居我国妇女生殖道恶性肿瘤的第二位。手术后放射治疗虽可减少子宫内膜癌的复发,然而分化低或有深肌层侵袭的患者经放射治疗后常发生远处转移。因此,放射治疗并没有改善内膜癌的生存率[1]。近年来,诱导分化作为实体瘤的一种新型治疗方法,已日益引起医学工作者的关注和兴趣。维生素 A 族衍生物——维甲酸具有调控生物细胞增殖、分化和凋亡的作用[2,3]。但是其对子宫内膜癌细胞的影响及其作用机制研究较少。本研究采用 RL95 - 2 细胞株,观察 ATRA 对该细胞株的诱导分化作用,为其应用于子宫内膜癌的临床治疗提供实验依据。

作者介绍:常淑芳(1973 -),女,讲师,硕士,主要研究方向:妇科肿瘤。

基金项目:本课题为重庆市卫生局科研基金资助项目(03 - 2 - 063)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 细胞系培养条件 子宫内膜腺癌 RL95 - 2 来源于中分化的子宫内膜癌组织,购自中国武汉大学中国典型培养物保藏中心(来源于 ATCC)。培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F - 12 培养基中,用 0.25% 胰酶消化传代,每三天传代一次。药物配制:全反式维甲酸购自美国 Sigma 公司,用无水乙醇溶解,然后用含有血清的 DMEM/F - 12 培养液稀释成所需浓度。

1.1.2 试剂 ATRA、MTT、碘化丙啶为美国 Sigma 公司生产;鼠抗人 Cyclin A 单克隆抗体检测试剂盒购自北京中山生物技术公司.。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定生长抑制率 RL95 - 2 细胞悬液以 5×10^4 个/ml 浓度接种于 96 孔板。将 0、0.5、1 和 5μmol/L ATRA 的药物浓度作用于 96 孔细胞板中培养 4 天,每组设 10 个平行孔,并设空白对照。测定不同作用时间(24、48、72、96h)和不同浓度下的吸光度值(A_{480})。抑制率 = [1 -(药物组 A_{480}/ PBS 对照组 A_{480})] × 100%。存活率 = 1 - 抑制率。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞周期 用 75% 预冷乙醇按常规方法固定对照组及 1μmol/L ATRA 处理 48h 组细胞,以 1×10^5 个/ml 细胞量送检,PI 染色后流式细胞仪检测细胞周期。以 S 期细胞比例(S - phase fraction, SPF)代表细胞增殖活性,SPF = S/($G_0/G_1 + G_2/M + S$) × 100%。

1.2.3 电镜观察 (1)扫描电镜下观察细胞形态:1μmol/LATRA 培养 RL95 - 2 细胞 48h 后,将细胞刮下、离心,用 4℃、4% 戊二醛固定载片,1% 锇酸后固定,系列乙醇 - 丙酮脱水,临界点干燥,喷碳、25KV 下观察。(2)透射电镜下观察细胞形态:1μmol/LATRA 培养 RL95 - 2 细胞 48h 后,将细胞消化离心,用 4℃、4% 戊二醛 1ml 固定,1% 锇酸后固定,系列乙醇 - 丙酮脱水,环氧树脂包埋,制成超薄切片,电子染色,60KV 下观察。

1.2.4 免疫组化 SP 方法检测 Cyclin A 取出盖玻片培养 48h 的 RL95 - 2 细胞,采用 SP 检测法操作。据染色强度进行定性分析,阳性(+):阳性细胞数 > 10%。

1.3 统计学处理

采用 Logistic 曲线回归法,t 检验,χ^2 检验。

2 结 果

2.1 ATRA 作用时间与 RL95 - 2 细胞存活率的关系

从图 1 看出,不同浓度的 ATRA 作用于 RL95 - 2 细胞 96h,增殖受到不同程度的抑制,用药组的细胞存活率明显低于对照组($P < 0.05$)。ATRA 的溶剂无水乙醇与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。用 MTT 法测得人 RL95 - 2 细胞的半数抑制量 IC50 为 1μmol/L。同一浓度的药物作用于细胞时间随着药物作用时间的延长,对肿瘤细胞的抑制率增加,肿瘤细胞的存活率下降。

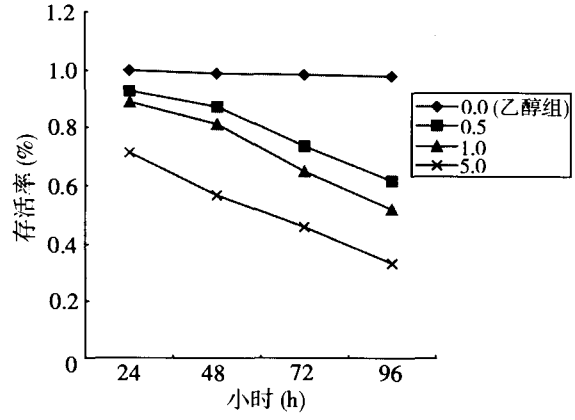


图 1 ATRA 对 RL95 - 2 存活率的影响

2.2 ATRA 对 RL95 - 2 细胞周期的影响

表 1 显示和对照组相比,RL95 - 2 细胞经 1μmol/L ATRA 处理 24h 后,G_0/G_1 期细胞开始增多,SPF 明显低于对照组($P < 0.01$),提示 ATRA 可抑制子宫内膜癌细胞株 RL95 - 2 增殖,使细胞周期阻止于 G_0/G_1 期。

表 1 全反式维甲酸对 RL95 - 2 细胞周期的影响

时间	组别	细胞周期时间(%) G_0/G_1	G_2/M	S	SPF
24h	对照组	50.00	6.63	43.37	43.37
	1μmol/L	50.60	10.89	38.51	38.51**
48h	对照组	54.59	4.32	41.10	41.10
	1μmol/L	60.59	8.68	30.74	30.74**
72h	对照组	60.67	6.35	32.98	32.98
	1μmol/L	66.49	9.37	24.15	24.15**

注:** 与对照组相比 $P < 0.01$

2.3 ATRA 对 RL95 - 2 细胞形态学的影响

透射电镜下可见对照组细胞基质电子密度不均,胞浆内有少量空泡(图 2)。经 ATRA 处理后,细胞基质电子密度变深,细胞器结构模糊,细胞浆内充满大小不等空泡(图 3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

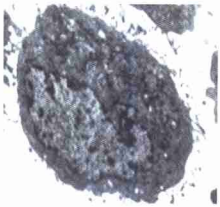


图 2 对照组 RL95-2{×20.000}

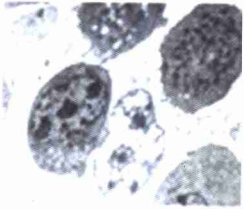


图 3 处理组 RL95-2{×5000}



图 4 对照组 RL95-2{×2500}

扫描电镜下与对照组细胞相比(图 4),可见用药后,细胞表面较光滑,微绒毛不典型,减少甚至消失,有的细胞表面有凹陷或大小不等的球形芽生小泡(图 5)。

2.4 免疫组化 SP 方法检测 Cyclin A

免疫组化染色,对照细胞 Cyclin A 为阳性,主要分布在细胞核,使胞核成棕黄色(图 6),经 1μmol/L ATRA 处理 24h 后细胞胞核 Cyclin A 表达为阴性,

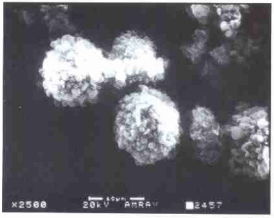


图 5 处理组 RL95-2{×2500}

胞核成兰色(图 7)。

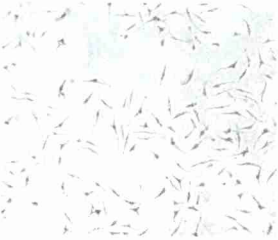


图 6 对照组 cyclin A 表达(S-P 免疫细胞化学法,×100)

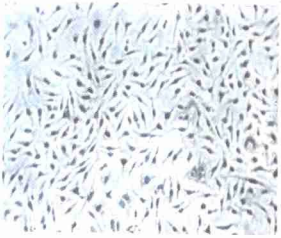


图 7 处理组 cyclin A 表达(S-P 免疫细胞化学法,×100)

3 讨 论

抑制肿瘤细胞生长并诱导其分化,在肿瘤的药

维普资讯 http://www.cqvip.com

物治疗中具有重要意义。维甲酸(RA)是维生素 A 的衍生物,它潜在调节各种细胞基质形成、细胞生长和分化,同时,在胚胎形成中起着重要作用[4]。近来研究表明,维甲酸的胞内平衡状态在子宫内膜癌中被破坏[5,6];且维甲酸(RA)可能在建立和维持子宫内膜细胞的分化状态中起着重要作用[7]。

本实验采用了形态学观察、MTT 法、免疫细胞化学技术和流式细胞分析等多种反映细胞增殖活性的方法,观察了 ATRA 对 RL95 -2 细胞作用的时效和量效关系。结果表明:以不同浓度(0.5,1 和 5μmol/L)的 ATRA 作用 24 ~96h 后,RL95 -2 细胞的增殖明显受到抑制,表现为细胞存活率减少,抑制率增加,这种抑制作用呈明显的剂量和时间依赖性。以 1μmol/L 作用 96h,细胞存活率为 51.60%,在此浓度下,RL95 -2 恶性表型消失(电镜检测发现细胞表面微绒毛减少,有芽生小孢出现),故 1μmol/L 为 ATRA 诱导 RL95 -2 细胞分化的适宜浓度。

ATRA 还影响 RL95 -2 细胞的周期分布,流式细胞仪结果显示大量的细胞被阻滞在 G_0/G_1 期,进入 S 期的细胞数减少,使细胞 DNA 合成能力降低,从而影响了 RL95 -2 细胞周期的进程,抑制细胞生长。

同时发现 ATRA 抑制了 CyclinA 的表达。CyclinA 是细胞周期 G_2/M 限制点的主要调控元件,它的过表达使细胞周期 G_2/M 转换时间缩短,进而促进细胞进程和细胞过度增殖,导致细胞癌变。Benbow U[8]的实验表明,当细胞周期由 G1 进入 S 期时,CyclinA 的合成增加。本实验免疫组化检测表明,ATRA 作用 RL95 -2 细胞后 CyclinA 表达明显减弱,说明 ATRA 可下调 CyclinA 表达,阻止细胞周期由 G_1 进入 S 期,这可成为 ATRA 抑制子宫内膜癌细胞增殖的机理之一。

总之,一定浓度的 ATRA 可抑制 RL95 -2 细胞增殖,表现在 CyclinA 表达降低、恶性形态表型消失,使肿瘤生长和侵袭能力减弱,提示 ATRA 用于子宫内膜的预防及治疗有一定的临床应用前景。

参 考 文 献

[1] Lybeert ML, Van Putten WL, Brolmann HA, et al. Postoperative radiotherapy for endometrial carcinoma. Stage I. Wide variation in referral patterns but no effect on long - term survival in a retrospective study in the southeast Netherlands [J]. EurJ-Cancer, 1998;34(4):586 - 590.

[2] 杨 敏,赵 涌,林 晓. 全反式维甲酸对人卵巢癌细胞珠 COC1 增殖分化的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2005;30(1):12 - 15.

[3] Dawson MI, Zhang XK. Discovery and design of retinoic acid receptor and retinoid X receptor class and subtype - selective synthetic analogs of all trans - retinoic acid and 9 - cis - retinoic acid [J]. Curr Med Chem, 2002;9(6):623 - 637.

[4] Axel DI, Frigge A, Dittmann J, et al. All - trans retinoic acid regulates proliferation, migration, differentiation, and extracellular matrix turnover of human arterial smooth muscle cells [J]. Cardiovasc Res, 2001;49(4):851 - 862.

[5] Cain JM, Zaino R, Shearer D, et al. Expression of a retinol dehydrogenase (hRoDH - 4), a member of the retinol/steroid dehydrogenase family implicated in retinoic acid biosynthesis, in normal and neoplastic endometria [J]. Am J Obstet Gyneco, 2002;186(4):675 - 683.

[6] Spinella MJ, Dmitrovsky E. Aberrant retinoid signaling and breast cancer: the view from outside the nucleus [J]. J Natl Cancer Inst, 2000;92(6):438 - 440.

[7] Carter CA, Shaw BL. Retinoic acid affects the EGF - R signaling pathway during differentiation induction of human endometrial adenocarcinoma cells [J]. Exp Mol Pathol, 2000;68(3):170 - 186.

[8] Benbow U, Schoenermark MP, Mitchell TI, et al. A novel host/tumor cell interaction activates matrix metalloproteinase 1 and mediates invasion through type Icollagen [J]. J Biol Chem, 1999;274(36):25371 - 25378.