DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.009

cAMP诱导膀胱肿瘤细胞分化的研究*

靳风烁** 方玉华 (第三军医大学附属大坪医院泌尿外科) 重庆, 400042
于茂生 惠宏襄 辛建国 金 明 (第四军医大学附属西京医院泌尿外科) 西安, 710032

提 要 目的: 探讨 cAMP诱导膀胱肿瘤细胞分化的作用。方法: 野生型膀胱肿瘤细胞 T24作为对照细胞,实验组细胞分别用 10μmol/L和 40μmol/L的 cAMP诱导培养 28 d,观察对照细胞和实验细胞的增殖率、裸鼠致瘤率,流式细胞仪测定 p21、p65蛋白表达率、电子显微镜观察细胞超微结构变化。结果: 对照细胞增殖率、p21、p65表达率、裸鼠致瘤率均为 100%。实验组细胞经 10μmol/L和 40μmol/L的 8-Br-cAMP诱导 14、21、28 d,增殖率分别降为 92.4、73.6、57.1、90.8、64.2、49.9%; 10μmol/L和 40μmol/L的 cAMP诱导 28 d后,p21表达率分别降为 63% 和 58%, p65表达率降为 54% 和 49%, 裸鼠致瘤率降为 60% 和 40%; 超微结构显示细胞恶性表型下降。结论: cAMP通过下调 ras和 myc基因表达而诱导分化、抑制肿瘤恶性表型,这一作用在肿瘤的预防和治疗中具有重要意义。

关键词 cAMP; 膀胱肿瘤
中图法分类号 R737.14

我们在以往的临床研究中发现白细胞介素-2(IL-2)膀胱灌注可降低膀胱肿瘤复发率[1],同时患者血中 cAMP浓度升高[2],二者之间有何内在联系尚不清楚。本实验旨在观察 cAMP诱导膀胱肿瘤细胞分化的生物学效应,以探讨 IL-2膀胱灌注防治膀胱肿瘤复发的机理。

1 材料和方法

1.1 细胞培养与处理

人源性膀胱肿瘤细胞系 T24,在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640培养基、5% CO_2、37℃条件下常规培养。取对数生长期细胞制成 1×10^4/ml的细胞悬液接种于培养瓶,常规传代培养作为对照细胞;实验细胞在培养基中加入 8-Br-cAMP(Sigma公司产品,唐杰博士惠增) 10μmol/L或 40μmol/L,常规培养 28 d,传代 4次。

1.2 细胞生物学检测

1.2.1 细胞增殖率测定(MTT法) 于实验第 14、21、28 d取对数生长期的对照组和实验组 T24细胞,制成 1×10^4/ml的细胞悬液,接种于 96孔板,每孔 100μl,培养 40 h,无血清 1640洗涤,加入含 10% 胎牛血清的 1640培养基 130μl、MTT 20μl(50μg/ml Sigma公司产品),继续培养 4 h,弃上清,每孔加入二甲基亚枫 150μl(NACALAI TESQUE公司),振荡 10 min,免疫酶联检测仪测定 570 nm处吸光值,每一时相点、每组均设 3个复孔,取其平均值按下式计算细胞增殖率:

$$细胞增殖率(\%) = \frac{实验组光密度}{对照组光密度} \times 100\%$$

1.2.2 p21、p65蛋白表达的检测 分别收集对照和 cAMP诱导 28 d的 T24细胞,将其加入含 10% 胎牛血清的 1640培养基中,静置封闭 10 min,离心弃上清,分别加入 p21和 p65单抗(中山公司产品),常规处理细胞后用 EPIC(II)流式细胞仪测定 p21和 p65阳性细胞表达率。

1.2.3 裸鼠致瘤实验 8周龄裸鼠 15只,分为 3组,每组 5只,分别给于 T24细胞、10μmol/L或 40μmol/L 8-Br-cAMP诱导 28 d的 T24细胞 1×10^6/鼠皮下接种,观察肿瘤形成情况,卡尺测量肿瘤最大纵、横径,记录肿瘤大小及小鼠死亡时间。

1.2.4 细胞形态学观察 倒置显微镜下观察细胞贴壁生长形态, 0.25% 胰酶消化,收集细胞, PBS洗涤两次, 2% 戊二醛固定,常规制片透射电镜观察。

2 结果

2.1 细胞增殖率改变

以对照 T24细胞的增殖率为 100%,测定 cAMP诱导 14、21、28 d后细胞增殖率。10μmol/L cAMP诱导后细胞增殖率分别降为 92.4、73.6和 57.1%; 40μmol/L cAMP诱导后细胞增殖率分别降为 90.8、64.2和 49.9%。细胞增殖率随 cAMP的浓度增高、诱导时间延长而明显下降。

2.2 p21、p65表达改变

流式细胞仪测定对照组细胞 p21、p65的阳性表达率为 100%,经 10μmol/L和 40μmol/L的 cAMP诱导 28 d后 p21表达阳性率分别为 63% 和 58%; p65表达阳性率分别为 54% 和 49%。提示 cAMP诱导后 ras基因和 myc基因表达下降,这种改变和 cAMP浓度成正比。

* 全军"八五"协作攻关课题资助项目
** 靳风烁,男,42岁,主任医师,副教授,博士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 裸鼠致瘤(致死)结果

接种 T24细胞的 5只裸鼠 15 d全部长出肿瘤,至第 28天肿瘤最大径 3.4~5.8 cm,30 d小鼠全部死于肿瘤,致瘤率和致死率均为 100%;接种 10或 40μmol/L cAMP诱导 28 d的 T24细胞各 5只裸鼠,观察至 45 d分别有 3只和 2只小鼠长出肿瘤,肿瘤直径 1.3~2.4 cm,致瘤率分别为 60%和 40%,表明其致瘤力下降。

2.4 细胞形态学改变

光镜下观察细胞呈多边形贴壁生长,不同浓度 cAMP诱导 28 d其形态无改变;电镜下观察 T24细胞呈圆形,核大深染,胞浆和细胞器丰富,细胞表面大量微绒毛,见图 1;经 cAMP诱导后,细胞仍呈圆形,但胞浆增多,核浆比缩小,表面微绒毛减少,见图 2

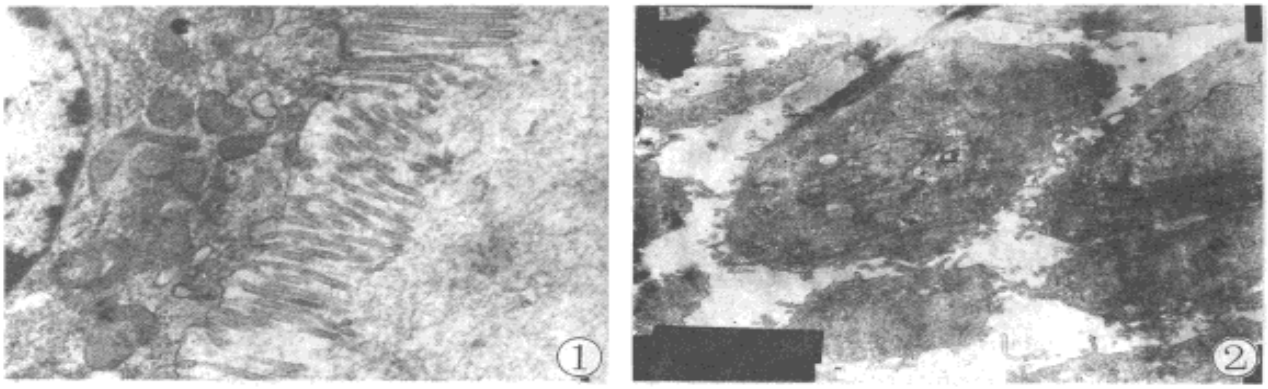


图 1　野生型 T24细胞,核大,细胞器增多,表面大量微绒毛　(LM× 400)

Fig 1　Wild type T24 cells with a large nucleus, organnells increased, and a great number of microvilli on the cellular surface　(LM× 400)

图 2　cAMP诱导 28天后,T24细胞胞浆较多,表面微绒毛减少　(LM× 200)

Fig 2　T24 cells, after cAMP inducing for 28 days, increased in cytoplasm and decreased in villi on the cellular surface　(LM× 200)

3 讨论

临床及实验研究均已发现膀胱肿瘤的发生、发展与 ras基因、myc基因的异常表达有关,ras基因突变可致细胞无限增殖而恶变[3];myc基因过表达抑制细胞分化的开始和启动过程[4],粘膜细胞分化抑制、过度增生而最终发展为膀胱肿瘤。

1972年 Seller[5]报告 cAMP有诱导分化的作用。cAMP作为信号传导系统的成份参与细胞的生命过程及功能调节。近年对 cAMP调节细胞增殖与分化的机制进行了较为深入的研究,发现 cAMP及其类似物对恶性肿瘤有诱导分化作用[3]。介导 cAMP作用的主要是 cAMP受体蛋白(cAMP receptor protein CRP),它由催化亚基和作用各异的调节亚基组成,在多种癌细胞系及实体瘤中均发现 RI调节亚基高表达,RI/RII比值升高,认为 RI可促进癌基因表达,而 RII亚基的功能则相反[6]。cAMP如何调节细胞的分化与增生呢?cAMP结合并活化 CRP后,催化活性亚基进入细胞核,使 cAMP反应元件结合蛋白(CREBP)磷酸化而被激活,后者与靶基因启动子的 cAMP反应元件(CRE)特异结合,导致与分化有关的基因转录增强,结果使细胞向正常成熟分化。cAMP活化 RII亚基,抑制 RI亚基表达,RI/RII比值恢复正常,进一步反应则抑制 ras、myc等癌基因的异常表达。正如我们实验中所观察到的 8-Br-cAMP诱导 28 d后,ras、myc基因表达受到抑制、瘤细胞恶性表型下降、裸鼠致瘤率降低。这种作用和 cAMP的浓度及作用时间成正比。Ciardill及其同事也观察到 8-Br-cAMP诱导 MCF-10HE细胞 28 d后,其无限生长受到抑制,突变 p21的表达降至正常细胞 MCF-10A的水平,p185 erbB-2的表达下降 75%[6]。用 CPK的 RI亚基反意寡核苷酸作用于 MCF-10AHE细胞也能得到同样的结果[6]。用糖皮质激素或合用茶碱提高细胞内 cAMP浓度,可下调 ras基因表达,抑制瘤细胞生长,诱导分化[7]。

cAMP对瘤细胞的作用还表现在降低瘤细胞表面的 Na^{+}-K^{+}-ATP酶和 Mg^{++}-ATP酶的活性,瘤细胞表

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

面 Na^+ -K^+ -ATP酶活性增高,使细胞内 K^+ 离子浓度升高,细胞呈无限增殖状态。cAMP抑制细胞表面 Na^+ -K^+ -ATP酶和 Mg^{++} -ATP酶活性,使微绒毛减少或消失,致瘤细胞恶性表型降低[8]。cAMP抑制癌基因表达,诱导肿瘤细胞分化和抑制肿瘤细胞恶性表型的作用在肿瘤的治疗和预防中有重要作用。

参考文献

1 Jin F S, Yu M S. Intravesical instillation of IL-2. An effective method to prevent the recurrence of bladder cancer. Chinese J Med, 1995, 108: 373

2 靳风烁,李天星,方玉华等. IL-2膀胱灌注后血浆 cAMP cGMP的变化和意义.中国肿瘤生物治疗杂志, 1996, 3: 57

3 Yuspa S H, Punnonen K. Lee E *et al*. Alterations in the biology and biochemistry of keratinocytes induced by the ras oncogene. Proc Clin Biol Res, 1992, 376: 103

4 Takata S. Yamaoto T. Ohmori Y *et al*. c-myc interfers with the commitment to differentiation of murine erythroleukemia cells at a reversible point. Jpn J Cancer Res, 1992, 83: 61

5 Seller M L. Morphological transformation of Chinese hamster cells by cAMP analogs. Eur J Cancer, 1973, 9: 525

6 Ciardiello F. Pepe S. Bianco C *et al*. Down-regulation of RI a subunit of cAMP-dependent protein kinase induces growth inhibition of human mammary epithelial cells transformed by c-Ha-ras and c-erbB-2 proto-oncogenes. Int J Cancer, 1993, 53: 438

7 Suh B S and Amsterdan A. Establishment of highly steroidogenic granulosa cell lines by co-transfection with SV40 and Ha-ras oncogene: Induction of steroidogenesis by cyclic adenosine monophosphate and its suppression by phorobol ester. Endocrinology, 1990, 127: 2489

8 赵学海,关 钧.环核苷酸与肿瘤.蚌埠医学院学报, 1990, 15: 123

(收稿: 1997-01-14;修回: 1997-09-04)

(编辑 冯崇英)

Differentiation of bladder cancer cells induced by cAMP

Jin Fengshuo, Fang Yuhua (Department of Urology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract **Objective:** To explore the inductive effects of cAMP on differentiation of bladder cancer cells. **Methods:** Wild type bladder cancer cell T24 was employed to serve as the control. The cells in the experimental group was respectively cultured with 10μmol/L and 40μmol/L of 8-Br-cAMP for 28 days. The proliferative rate and tumorigenic rate in nude mice were determined, the expressive rate of p21 and p65 protein measured with cytometry and the ultrastructural changes of all the cells observed with electron microscopy. **Results:** In the control group, the expressive rate of p21 and p65 protein and the proliferative rate and tumorigenic rate in nude mice of the cells were all 100%. In the experimental group, the proliferative rate of the cells were decreased to 92.4%, 73.6% and 57.1% and 90.8%, 64.2% and 49.9% in the 14th, 21th and 28th day after induction in 10μmol/L and 40μmol/L cAMP- induced cells respectively. In the 28th day after induction, the expressive rate of p21 was decreased to 63% and 58%, the expressive rate of p65 to 54% and 49% and the tumorigenic rate to nude mice to 60% and 40% in the cells induced by 10μmol/L and 40μmol/L cAMP respectively. Morphological observation showed that the malignant phenotype was inhibited. **Conclusion:** cAMP induces differentiation and inhibits the malignant phenotype of bladder cancer cells through down-regulation of the expression of ras and myc genes, which is important for prevention and treatment of tumor.

Key words cAMP; bladder cancer

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net