DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.003

千斤藤及维甲酸对喉癌及鼻咽癌细胞株诱导分化的研究

汪 建 赵连三* 林代诚** 唐 红* 梁传余** 刘 冲* (第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科)
重庆, 630038

提 要 目的:研究千斤藤碱对喉癌及鼻咽癌的诱导分化作用。方法:在体外细胞培养的基础上,观察细胞形态学、细胞增殖动力学的变化。采用 ABC免疫组化结合图像分析仪及流式细胞仪的方法,定量检测了癌基因 C-myc、Bcl-2及抑癌基因 p53蛋白。结果:经无毒剂量的千斤藤碱及维甲酸处理后,喉癌及鼻咽癌细胞株的细胞形态趋向良性分化,细胞接触抑制部分恢复,集落形成率和细胞增殖指数明显降低,癌基因 C-myc、Bcl-2蛋白明显降低,p53蛋白明显增高。结论:千斤藤碱及维甲酸对喉癌及鼻咽癌细胞株有诱导分化作用,其机理可能是通过抑制癌基因的表达,增加抑癌基因的表达,改变细胞的形态结构和生物学特性,促进癌细胞的分化。

关键词 喉肿瘤;咽肿瘤;诱导分化;千斤藤碱;原癌基因;抑癌基因
中图法分类号 R739.6

近 30年,喉癌及鼻咽癌患者的生存率一直在 45%左右[1]。因此探寻新的治疗方法一直是人们关注的焦点,而近年来新兴的肿瘤诱导分化治疗为喉癌及鼻咽癌的防治提供了新的途径。千斤藤碱(Stepholidine, ST)提取自千斤藤属植物根,经实验证明在体外有抑制肿瘤细胞增殖等作用。本实验以维甲酸为对照,研究了千斤藤碱对喉癌及鼻咽癌细胞株体外诱导分化作用。

1 材料与方法

1.1 细胞株

高分化鼻咽癌细胞(CNE-1),低分化鼻咽癌细胞(CNE-2)购自中山医科大学肿瘤医院遗传室,低分化喉癌(Hep-2)购自北京动物所,培养液为 RPMI 1640,内含 15%灭活小牛血清,细胞置 CO_2孵箱培养。

1.2 药品

全反式维甲酸(All trans retinoic acid, RA, Sigma产品,以 DMSO溶解,其终浓度为 0.02%, DMSO≤ 0.1%时,不引起细胞生物学性状的改变[2])。ST由中国科学院昆明植物所赵景春博士惠赠,含量约 90%, C-myc单抗、Bcl-2单抗(DAKE产品), DAB(Diaminobenzidine, 3.3-二氨基苯联胺, USA), ABC Kit (Vecta产品, USA)。

1.3 体外诱导分化用药剂量的筛选细胞毒性试验

将 ST和 RA分别以不同浓度作用于 CNE-1、CNE-2、Hep-2,每天观察各组细胞的毒性反应情况,苔盼蓝观察计数,连续 5 d

1.4 体外诱导分化

根据细胞毒性试验结果选用 ST、RA,分别作用于 CNE-1、CNE-2、Hep-2,药物作用后进行以下指标检测。

1.4.1 细胞形态学观察 运用倒置显微镜及透射电镜,按常规制样观察。

1.4.2 生长曲线测定 每天取药物处理组及对照组细胞,胰酶消化后镜下计细胞数 7 d,绘制细胞生长曲线。

1.4.3 平板集落形成试验 药物作用 4 d后换完全培养液,继续培养 7 d后甲醇固定, HE染色,倒置显微镜下计每瓶集落数(以≥ 50个细胞的细胞团为 1个集落)。

1.4.4 细胞增殖指数(PI)测定 采用流式细胞仪技术[3]。

$$PI=(S+G_2M)/(G_0/G_1+S+G_2M)\times 100\%$$

1.4.5 ABC免疫组化法检测 C-myc及 Bcl-2基因产物 按常规。

1.4.6 图像分析和资料的数据处理 将免疫组化片用图像分析仪(四川大学)分析,细胞中的阳性产物在统一放大倍数下,通过高分辨电视摄像机转换成图像信号显示在电视屏上,再用光标仪和数字化仪测量阳性产物的黑度值, 1个细胞选择 3点,每片随机测量 10个阳性细胞,取平均值。

1.4.7 p53及 Bcl-2基因产物的定量分析 采用流式细胞仪技术[4]。

2 结果

2.1 体外诱导分化用药剂量

根据细胞毒性实验,选择 5 d内细胞未出现毒性反应的最大药物剂量。3株细胞的诱导剂量基本相同,选择 ST 4 μmol/L, RA 1 μmol/L作为体外诱导分化用药剂量。

* 华西医科大学肝炎研究室 成都, 610041
** 华西医科大学附一院耳鼻咽喉科 成都, 610041

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

2.2 体外诱导分化作用

2.2.1 细胞形态学改变 直接倒置显微镜下观察及 HE染色后光镜观察发现: 对照组与用药组前 3 d形态无明显改变, 5 d以后加药组细胞变细变长,核质比例减小,见图 1

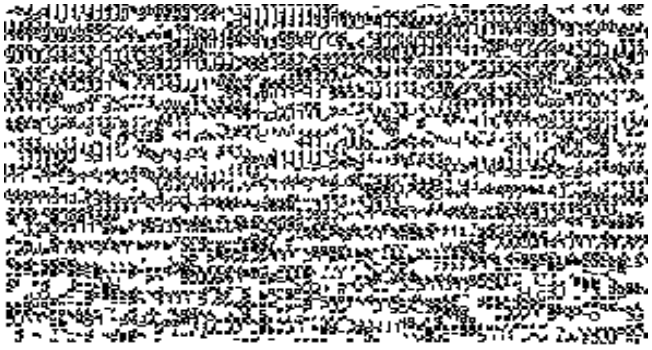


图 1 左: Hep-2细胞对照组。右: Hep-2细胞加 4μmol/L ST 5 d后。可见加药后细胞变细变长 (× 100)

Fig 1 Hep-2 cells become slender after treated with ST for 5 d

stepholidine treated (right), without stepholidine (left) (× 100)

透射电镜观察: 对照组细胞微绒毛多,核质比例大,核大,核仁明显,细胞器发育不良。加药组微绒毛减少,细胞表面平滑化,核质比例减小,核仁及细胞器等趋向良性分化,部分恢复正常细胞的形态,见图 2

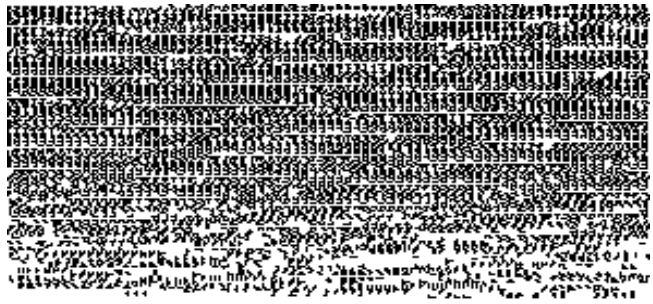


图 2 左: Hep-2细胞对照组。右: Hep-2细胞加 4μmol/L ST 5 d后。加药后细胞微绒毛减少,表面平滑化,核质比减小 (TEM× 4000)

Fig 2 Surface of cells become smooth, nucleocytoplasmic ratio lowered after treated with ST for 5 d

stepholidine treated (right), without stepholidine (left) (TEM× 4000)

2.2.2 细胞生长特性见图 3

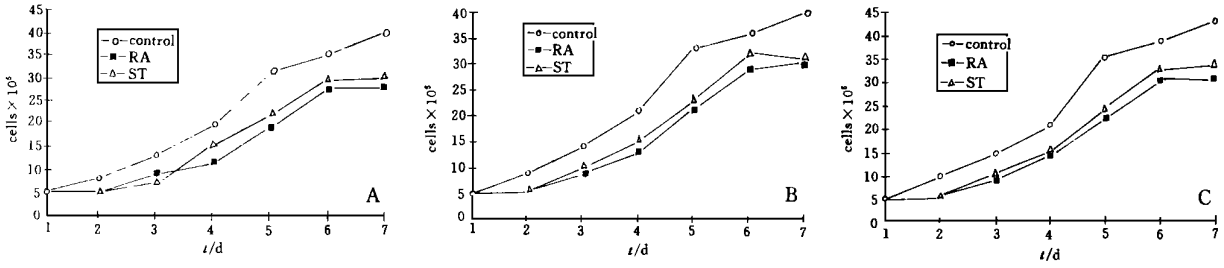


图 3 Hep-2(A)、CNE-1(B)、CNE-2(C) 3株细胞生长曲线

Fig 3 Growth curves of Hep-2 (A), CNE-1 (B), CNE-2 (C) cell lines

2.2.3 细胞集落形成及细胞增殖指数 (PI)结果,见表 1

表 1 ST及 RA对喉癌及鼻咽癌细胞株集落形成及 PI的影响

Tab 1 Effects of ST and RA on colony forming and PI ($\bar{x}\pm s$)

Group	Cell line	Colony forming	PI
Control	CNE-1	38.2± 12.6	28.43± 0.25
	CNE-2	39.2± 4.1	30.63± 0.40
	Hep-2	36.6± 4.0	26.47± 0.25
ST	CNE-1	160.0± 9.2*	22.27± 0.25*
	CNE-2	184.0± 11.7*	21.53± 0.15*
	Hep-2	163.0± 6.1*	20.53± 0.46*
RA	CNE-1	134.0± 7.0*	18.80± 0.10*
	CNE-2	152.0± 9.2*	18.93± 0.15*
	Hep-2	130.0± 4.7*	13.53± 0.40*

*: $P < 0.01$ *vs* control

2.2.4 流式细胞仪定量检测 p53及 Bcl-2基因产物结果显示,见表 2

表 2 ST及 RA对喉癌及鼻咽癌细胞株 p53及 Bcl-2的影响

Tab 2 Effects of ST and RA on p53 and Bcl-2 protein ($\bar{x}\pm s$)

Group	Cell line	p53	Bcl-2
Control	CNE-1	1.21± 0.01	1.51± 0.01
	CNE-2	1.17± 0.02	1.54± 0.01
	Hep-2	1.31± 0.02	1.67± 0.01
ST	CNE-1	1.28± 0.01*	1.38± 0.01*
	CNE-2	1.27± 0.01*	1.37± 0.01*
	HEP-2	1.43± 0.01*	1.39± 0.01*
RA	CNE-1	1.29± 0.01*	1.29± 0.01*
	CNE-2	1.28± 0.02*	1.37± 0.01*
	Hep-2	1.39± 0.01*	1.37± 0.02*

*: $P < 0.01$ *vs* control

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

2.2.5　ABC免疫组化法检测 C-myc及 Bcl-2结果见表 3

表 3　ST及 RA对喉癌及鼻咽癌细胞株 C-myc及 Bcl-2的影响

Tab 3　Effects of ST and RA on C-myc and Bcl-2 ($\bar{x}\pm s$)

Group		C-myc	Bcl-2
Control	CNE-1	102.6± 6.9	96.0± 6.2
	CNE-2	99.0± 5.5	98.6± 5.6
	Hep-2	101.6± 6.8	102.0± 8.6
ST	CNE-1	85.2± 6.8*	90.3± 5.8*
	CNE-2	82.5± 7.0*	91.1± 6.2*
	HEP-2	91.9± 6.2*	88.3± 6.8*
RA	CNE-1	83.9± 6.1*	88.2± 6.0*
	CNE-2	82.8± 5.8*	88.7± 6.1*
	Hep-2	94.6± 4.4*	89.2± 7.5*

*: $P < 0.01$ *vs* control

3　讨论

研究表明: 体外实验与体内实验相比有其优越性,且与体内实验有较好的一致性,是研究分化诱导剂的主要方法。实验选用全反式 RA作为阳性对照是因为 RA是被公认的疗效较好的广谱分化诱导剂,在治疗癌前病变如: 口腔粘膜白斑、喉乳头状瘤中,均有成功的报道[5]。

细胞分化包括形态分化和功能分化,所以细胞形态学改变是细胞分化的表型特征,也是基本特征之一[6]。ST和 RA均可诱导喉癌及鼻咽癌细胞株发生形态改变: 细胞变细变长,微绒毛减少,细胞核、浆比例减少,细胞器趋向良性分化。

细胞无限制的快速生长繁殖是恶性肿瘤细胞的主要特征之一。表现在接触抑制消失,DNA合成增强。细胞生长曲线可见喉癌及鼻咽癌细胞株经 ST处理后细胞生长明显受到抑制,倍增时间延长。对照组在培养 6 d已长满的情况下,不断继续重叠生长,第 7天细胞数继续上升,加药组第 7天细胞数几乎不增长,处于平台期。这说明 ST及 RA在抑制细胞生长的同时有诱导细胞良性分化作用,细胞接触抑制部份恢复。细胞集落形成率和克隆形成率一样,与细胞恶性程度有很高符合率,即细胞恶性程度与细胞集落或克隆形成率成正相关。本实验显示经 ST及 RA处理的 CNE-1、CNE-2 Hep-2细胞的集落形成率是对照组的 30%～ 50%左右,这也说明 RA抑制 Hep-2细胞生长的同时可能有促进其分化的作用。

近年的研究表明,细胞分化与癌基因之间的关系十分密切,我们用 ABC免疫组化及流式细胞仪检测了癌基因, C-myc、Bcl-2及抑癌基因 p53蛋白的表达,发现抑癌基因 p53蛋白表达明显增加, C-myc、Bcl-2蛋白表达明显降低,说明 ST及 RA可能通过抑制癌基因的表达而抑制细胞增殖、诱导细胞分化。

本实验从以上方面证明, ST和 RA对喉癌及鼻咽癌细胞株细胞具有较好的诱导分化作用,且两者差异无显著意义。其诱导分化的机理可能和癌基因 C-myc、Bcl-2表达的减少,抑癌基因 p53表达的增加有关。我们认为: ST可能成为一种有前途的、高效低毒的分化诱导剂,具有良好的临床应用前景。

参考文献

1 Liu T J, Zhang W W, Dorothy L *et al*. Growth suppression of human head and neak cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus. Cancer Res, 1994; 54(14): 3662

2 曹　鉴,高　进.维胺酸对小鼠前胃癌细胞的恶性表型的逆转作用及其机理的研究.中国医学科学院学报, 1994; 16(6): 425

3 傅兴生,徐燕兰,魏宝秀等.卵巢上皮性肿瘤细胞 DNA含量流式细胞仪分析.中华病理学杂志, 1994; 23(1): 50

4 左连富,周道安,齐凤英等.定量分析乳腺癌细胞 p53基因产物的表达.中华物理医学杂志, 1994; 16(2): 78

5 Fountzilas G. Retinoids in the management of head and neck cancer. J Chemother, 1994; (2): 127

6 汤钊猷 主编.现代肿瘤学.上海: 上海医科大学出版社, 1993 167～ 193

(收稿: 1996-10-03;修回: 1997-01-02)

(编辑　冷怀明)

Study of stepholidine and retinoic acid induced differentiation of cell lines of laryngeal and nasopharyngeal carcinoma

Wang Jian, Zhao Liansan, Lin Daicheng, Tang Hong, Liang Chuanyu, Liu Chong (Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract Objective: To investigate stepholidine (ST) and retinoic acid (RA) induced differentiation of the cell lines of laryngeal and nasopharyngeal carcinoma. Methods: After the cultured carcinoma cell lines

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

were treated with ST or RA for 5 days, the morphologic changes of the cells were observed with optical and transmission electron microscopy. In addition, the expression of oncogene and carcinoma suppresser gene was determined with ABC immunohistochemistry, flow cytometry and image analysis. **Results**: After the treatment of ST or RA, the carcinoma cells became well-differentiated, their contact inhibition was partially recovered and the colonyforming rate significantly decreased. The contents of the oncogenes C-myc and Bcl-2 were remarkably decreased whereas that of the tumor suppresser gene p53 increased. **Conclusion**: ST and RA can induce the differentiation of the cell lines of laryngeal and nasophryngeal carcinoma through inhibiting the expression of oncogenes and improving the expression of carcinoma suppresser gene.

Key words induced differentiation; stepholidine; proto-oncogene; tumor suppresser gene

博士生论文摘要

犬严重烟雾吸入伤早期机械通气治疗的实验研究*

Experimental study of early mechanical ventilation after severe smoke inhalation injury in dogs

陶国才** 杨宗城 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆, 630038

吸入性损伤是烧伤死亡的主要因素之一,急需研究出切实有效的治疗手段,目前有关机械通气治疗烟雾吸入伤尚缺乏较系统深入的研究。为此,本研究采用动物实验对比观察了4种通气模式(压力控制、压力控制+呼气末正压、压力支持+持续气道正压、压力控制反比通气)在犬严重烟雾吸入伤早期连续24 h进行机械通气治疗过程中对呼吸动力学、血流动力学、氧供求平衡、肺表面活性物质、体液因素、肺组织细胞能量负荷及膜流动性等多种指标的影响,探讨对肺水肿和肺不张的发生、发展、机体氧供求平衡影响的作用机理以及加重肺组织损伤的可能性,试图摸索出相对安全可靠的治疗方案。研究结果表明,本实验所采用的通气模式及参数对烟雾吸入伤早期血流动力学无明显不良影响,并可不同程度地增加心输出量;伤后24 h内对肺血管通透性无明显影响,未能阻止肺水肿的发生、发展,但也没有加重或促进肺水肿的形成;通过肺表面活性物质、机械性扩张等复杂的作用机理不同程度地改善肺通气换气功能;通过增加潮气量,减少呼吸频率,有利于改善肺顺应性,减少死腔/潮气量比,增加有效通气量;减缓肺动脉分流和呼吸指数的增加幅度,减轻减缓肺泡萎陷及肺不张的发生,显著提高组织供氧;减轻、减缓低氧血症和病理性氧耗/氧供依赖关系的发生、发展进程;并且短期内未对机体造成明显损害。建议在被怀疑或确诊的烟雾吸入伤患者早期尚未出现明显的血气指标改变之前尽早给予合理的机械通气。其中以压力支持+持续气道正压的治疗效果较佳。建议在烟雾吸入伤后尽早常规预防性使用压力支持+持续气道正压通气,采用参数为 PIP= 1.5 kPa(16 cm H_2O), PEEP/CPAP 0.588 kPa(6 cm H_2O)。烟雾吸入伤早期单纯机械通气治疗尚存在一定局限性,必须结合其它治疗措施,才可望逆转烟雾吸入伤对机体所造成的损害;另一方面,也有利于进一步发挥机械通气的效能。

关键词 烟雾吸入伤;机械通气;PEEP;CPAP;反比通气
肺不张;肺水肿;低氧血症;灼伤

中图法分类号 R644

(收稿: 1996-11-13;修回: 1996-12-03)

(编辑 王 红、沈锡庚)

* 全军"八五"攻关项目

** 麻醉科 重庆, 630038

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