

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0175-04

全反式维甲酸对结肠癌不同增殖潜能细胞株增殖的抑制作用研究

殷平¹, 李才², 于建渤¹, 安锦丹¹, 宋学¹(1. 牡丹江医学院病理教研室, 黑龙江 157011; 2. 吉林大学再生医学科学研究所病理研究室, 长春 130021)

[摘要] 目的: 研究 ATRA 对结肠癌不同增殖能力细胞株生长抑制的可能机制, 为 ATRA 应用于结肠癌的治疗提供可靠依据。方法: 应用细胞观察、FACS 和 MTT 方法, 研究 ATRA 对结肠癌不同增殖能力细胞株 LS174T 和 CW-2 细胞的生长抑制现象。结果: LS174T 的生长速度明显比 CW-2 细胞快。ATRA 对体外培养的结肠癌细胞株 LS174T 和 CW-2 细胞的生长有明显抑制和诱导细胞分化作用。结论: ATRA 对 LS174T 和 CW-2 细胞的生长有抑制作用, 抑制细胞增殖的程度与 ATRA 的浓度有关, ATRA 对结肠癌细胞有一定的抑制癌细胞增殖和诱导癌细胞分化作用。

[关键词] 结肠肿瘤; 全反式维甲酸; 细胞周期

[中图分类号] R735.3+5 [文献标识码] A

The Inhibition on the Proliferation of Colorectal Carcinoma Cell Strain with Different Proliferative Potential by All Trans Retinoic Acid

YIN Ping¹, LI Cai², YU Jian-bo¹, AN Jin-dan¹, SONG Xue¹(1. Department of Pathology, Mu Danjiang Medical College, Hei Longjiang 157011, China; 2. Pathological Laboratory Regeneration Institute of Jinlin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** The inhibition on the proliferation of colorectal carcinoma cell strain with different proliferative potential by ATRA was investigated in present study, which would benefit for the therapy of ATRA on colorectal carcinoma. **Methods:** The proliferation of LS174T and CW-2 colorectal carcinoma cell strain inhibited by ATRA was determined using cell observation, FACS and MTT methods. **Results:** The growth speed of LS174T cell strain was faster than that of CW-2. ATRA played a significant role on inhibiting the proliferation of LS174T and CW-2 cell strain and inducing the cell differentiation *in vitro*. **Conclusions:** ATRA could inhibit the growth of LS174T and CW-2 cell strain. ATRA could inhibit the proliferation of colorectal carcinoma cell and induce cell differentiation to some extent, which was correlated with the concentration of ATRA.

[Key words] colorectal carcinoma; all-trans retinoic acid; cell cycle

* 全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)具有使急性早幼粒细胞白血病分化和逆转的功能, 是一种有效的抗肿瘤药物, 可明显提高患者的缓解率。有关其在实体瘤研究的报道较少^[1]。我们通过 ATRA 对 2 株不同增殖潜能的结肠癌细胞株进行干预。通过细胞增殖观察、MTT 法检测 ATRA 对细胞增殖的影响、通过 FACS 对结肠癌细胞周期的观察, 探讨 ATRA 对结肠癌治疗的临床应用前景。

1 材料与方

1.1 细胞培养

结肠癌细胞株 CW-2 和 LS174T 购于中国科学

院上海生化细胞生物研究所。所有细胞均经支原体检测, 无支原体污染。用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液进行培养, 37℃, 5% CO₂ 的饱和湿度条件下常规培养, 2 d 换 1 次培养液。实验所用的全反式维甲酸(ATRA, 购于 sigma 公司), FACS 为美国 BD 公司生产的 FACS420 型, 所用试剂盒为 USA 生产(CycleTEST™ PLUS, Cat. NO:340242)。酶标仪为 Automated Microplate Reader(型号:Elx800)。

1.2 MTT 观察细胞生长曲线

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金资助项目(编号:D00-63)

[作者简介] 殷平(1963 年-), 男, 山东省平度市人, 教授, 博士, 主要从事肿瘤分子病理学研究

取对数生长期细胞进行实验。2株细胞分别设立6个实验组,每组细胞接种到96孔板上细胞进行计数换算成 1×10^5 /孔,每组共设8个复孔,每孔培养液90 μ l,分别按下述条件进行分组:(1)细胞对照组:培养的结肠癌细胞不做任何处理;(2)3个ATRA组:用无水乙醇稀释不同浓度的ATRA 10 μ l,使培养液中ATRA的浓度分别为 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-5} mol/L;(3)乙醇对照组:加入与ATRA组等量无水乙醇;(4)培养液对照组:单纯的RPMI-1640培养液。6个实验组分别培养24 h,加入MTT (5 mg/ml)溶液(已过滤除菌),避光振荡5 min后,置培养箱中培养4 h后取出,弃取液体,在各孔中加入100 μ l的DMSO,避光15 min后,用酶标仪检测OD₅₇₀检测细胞吸光度(A)值,共检测4 d,取其平均值。制作细胞处理前后生长曲线。

1.3 FACS检测细胞周期

CW-2和LS174T细胞长至80%,用Hank's洗涤细胞生长面,弃去上清液,加入0.25%的胰酶2 ml消化细胞,直至细胞完全消化下来,转入离心管中离心,用PBS调整细胞数为 5×10^6 /ml,用细吸管将其迅速喷射到4℃的70%乙醇中,混匀,4℃冰箱中固定18 h,取固定后的 10^6 个细胞用PBS洗2次,加入RNA酶至终浓度为50 mg/L和碘化丙啶(PI)至终浓度为50 mg/L,于PBS中配成1 ml细胞悬液,室温避光染色20 min后,在氩离子激光器(Argon Laser, 2W)为光源的Becton-Dickinson公司FACS420型流式细胞仪上检测被PI标记的细胞,激发波长为488 nm,用590 nm长通滤光片检测DNA-PI荧光,检测期间校正仪器CV值为5%以内,测量结果输入HP-300Consort30计算机进行处理,进行细胞周期分析。

2 结果

2.1 结肠癌不同细胞株增殖能力的形态观察

2株细胞均呈上皮样贴壁依赖性生长,其中CW-2细胞为圆形,体积较大,胞浆丰富,核大且呈圆形居中,细胞之间黏附性高,成膜状生长;而LS174T细胞为多角不规则状和圆形,细胞体积较小,折光性较强,细胞黏附性较差。从每天对细胞株的观察看LS174T细胞明显比CW-2细胞生长快。同一细胞株不同浓度的ATRA对细胞增殖有一定抑制作用。细胞的堆聚和多层现象减轻,细胞形态由圆形变为椭圆形,细胞核体积变小。

2.2 结肠癌不同细胞株增殖比较

MTT比色法是一种用于测定细胞增殖活性和代谢能力的快速、准确、半自动化的检测方法,利用活细胞的线粒体脱氢酶类可将MTT转变成蓝紫色的甲臞类反应,通过测定一定波长(595 nm)的吸光值可客观、真实地反映活细胞数和细胞代谢强度。从细胞生长曲线表达看,LS174T细胞生长曲线陡峭,而CW-2细胞生长曲线走向平缓,因此LS174T细胞增殖能力明显较CW-2细胞快。比较生长4 d的细胞数及MTT光密度值,发现LS174T细胞与CW-2细胞间增殖差异有显著性意义(*F*检验, $P < 0.05$),提示LS174T细胞生长分裂快。不同条件下的细胞在培养的第2天都出现明显增殖抑制现象,第3天细胞的生长速度明显加快。ATRA对细胞的生长增殖有抑制作用,抑制强度与ATRA浓度有依赖关系。其中对于生长较慢的CW-2细胞生长影响较小(*F*检验, $P < 0.05$,见图1),而对于生长较快的LS174T细胞有明显的抑制作用(*F*检验, $P < 0.01$,见图2)。但不论何种条件细胞株总的生长趋势仍以增生为主。

图1 MTT法检测不同浓度ATRA对结肠癌CW-2细胞的影响

Fig. 1 Effects of the ATRA concentration on the growth of CW-2 colorectal carcinoma cell strain by MTT

2.3 FACS检测结肠癌细胞株生长周期的比较

CW-2细胞株周期与LS174T细胞株比较S期细胞增多。CW-2和LS174T细胞在细胞周期进程上有差别(见表1)。不同浓度的ATRA使细胞的S期数目发生改变,而且随着ATRA浓度增加后,S期细胞数目明显增多,可见ATRA把结肠癌细胞阻滞在S期。ATRA通过上调S期向G2期转导的控制点,而增加了S期细胞

的检出率,减少了 G1 期细胞的百分比。ATRA 处理细胞 48 h 后,细胞均未出现凋亡的亚 G1 期“凋亡峰”,提示 ATRA 能抑制细胞株 CW-2 和 LS174T 增殖和生长受抑,但诱导结肠癌细胞株凋亡的作用不明显。

图 2 MTT 法检测不同浓度 ATRA 对结肠癌 LS174T 细胞的影响

Fig. 2 Effects of the ATRA concentration on the growth of LS174T colorectal carcinoma cell strain by MTT

3 讨论

恶性肿瘤是细胞过速增殖和异常分化的结果。ATRA 具有诱导白血病细胞分化和逆转的功能,其作用的机制可能是与癌细胞表面的维甲酸受体相互作用

或抑制细胞表面的多种黏附蛋白而有一定作用^[2]。近年的研究发现,ATRA 不但对白血病有较好疗效,而且可以通过干预多种肿瘤细胞的生长因子,抑制肿瘤细胞的增殖^[3]。ATRA 可诱导小鼠胚胎癌细胞分化成为内皮细胞或纤维母细胞。也可使 90% 的人类急性早幼粒白血病细胞株 (HL-60 细胞) 分化成熟,并出现成熟细胞的形态与功能。我们的实验结果显示结肠癌细胞株 S 细胞的百分比增加,而 G0/G1 期和 G2 + M 期细胞的百分比减少。这一点与 Callari(2003 年)等^[4]的报道不同,他们在结肠癌细胞株 HT29 的研究中发现 ATRA 把结肠癌细胞株阻滞在 G1 期,其原因是上调了细胞周期蛋白激酶抑制物 p21WAF1/Cip1 的表达。国内在结肠癌 LoVo 细胞株的研究中也有类似的报道^[5]。在三氧化二砷对肿瘤的研究中,因为选取的细胞株不同,其作用点也截然不同。例如,三氧化二砷将肾细胞癌阻滞在 G1 期或 G2 + M 期;而把乳腺癌 MCF-7 细胞株、头颈癌 PCI-1 细胞株阻滞在 G2 + M 期;把肝癌细胞系阻滞在 S 期^[6]。之所以结果不同,我们推测是由于细胞株的遗传背景不同,ATRA 可以激活不同的信号传导途径,参与调控细胞周期,其作用具有复杂性和多变性。因此,得出细胞周期控制点的结论不同。我们的实验结果显示 ATRA 对于体外培养的结肠癌细胞增殖有一定的抑制作用,干扰癌细胞的增殖,促进癌细胞分化,这种抑制增殖强度随着 ATRA 浓度增加而增加。而且 ATRA 对于增殖较快的结肠癌细胞株 LS174T 的抑制效果更明显。

表 1 流式细胞仪结肠癌细胞周期分析结果(%)
Tab. 1 The growth cycle of colorectal carcinoma cell (%)

	G0/G1 phase	S phase	G2 + M phase
CW-2 cell			
Cell control	51.82 ± 7.42	39.04 ± 5.84	9.15 ± 1.72
Ethanol control	52.73 ± 6.64	38.45 ± 6.23	8.78 ± 1.52
ATRA-7	48.12 ± 6.48	43.02 ± 5.12	8.86 ± 2.35
ATRA-6	47.81 ± 7.23	43.35 ± 7.25	8.84 ± 3.02
ATRA-5	46.36 ± 5.68	46.05 ± 6.54	7.59 ± 2.03
LS174T cell			
Cell control	60.33 ± 6.28	30.46 ± 4.43	9.21 ± 2.51
Ethanol control	63.52 ± 5.26	26.89 ± 3.32	9.59 ± 2.36
ATRA-7	58.49 ± 4.39	32.78 ± 5.11	8.73 ± 2.08
ATRA-6	59.13 ± 6.28	31.04 ± 5.65	9.83 ± 3.02
ATRA-5	56.98 ± 5.64	35.01 ± 4.73	8.00 ± 2.98

ATRA 细胞毒性作用的场所主要在细胞核内,通过抑制细胞生长并改变核基质蛋白的成分,而核基质

在细胞核功能组成中起重要作用,它能局限性浓缩涉及核酸代谢的调节因子^[7]。ATRA 不但对白血病有较

好疗效,而且可以通过干预多种肿瘤细胞的生长因子,抑制肿瘤细胞的增殖^[8]。本实验证明 ATRA 对结肠癌细胞体外增殖抑制有一定作用,但抑制作用的强度不同,ATRA 的浓度越高,其抑制作用越明显,但对细胞凋亡无明显作用。但我们的实验缺乏对实体瘤的直接作用的观察。因此,要完全了解 ATRA 对结肠癌的作用,尚需对新鲜实体瘤细胞及结肠癌患者的临床作用进行观察。

[参 考 文 献]

[1] 於葛华,许志祥,徐影,等. 全反式维甲酸对肺腺癌细胞株 SPC-1 增殖及黏附分子表达的影响[J]. 癌症, 2001, 20(10): 1069-1071.
 [2] 唐加明, 陈安徽, 李濠德. 全反式维甲酸对阿糖胞苷诱导 HL-60 细胞凋亡的影响[J]. 白血病, 2000, 9(5): 287-289.

[3] 余晨光, 辛鲁, 顾培坤, 等. 全反式维甲酸对血管平滑肌增殖和转化生长因子 β -mRNA 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 1997, 13(6): 305-307.
 [4] Callari D, Sinatra F, Paravizzini G, et al. All trans retinoic acid sensitizes colon cancer Cells to hyperthermia cytotoxic effects[J]. Int J Oncol, 2003, 23(1): 181-188.
 [5] 郭俊明, 罗超权. 维甲酸和 1,25 二羟维生素 D3 对 LoVo 细胞株的影响[J]. 中山医科大学学报, 2000, 2: 130-132.
 [6] 郝杰. 三氧化二砷对肿瘤治疗作用的研究进展[J]. 国外医学肿瘤学分册, 2004, 31(2): 122-124.
 [7] 张睿, 王雪皎, 王秀琴, 等. 全反式维甲酸对人细胞线粒体基因表达的调控[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2000, 1: 35-37.
 [8] Kohler JA, Imeson J, Ellershaw C, et al. A randomized trial of 13-cis retinoic acid in children with advanced neuroblastoma after high-dose therapy[J]. Br J Cancer, 2000, 83(3): 956-959.

[收稿日期] 2003 - 10 - 23 [修回日期] 2004 - 03 - 27

· 研究简报 ·

[文章编号] 1007-385X(2004)03-0178-01

大肠癌和大肠腺瘤 DNA 含量与细胞增殖活性检测的临床意义

刘成霞¹, 史宁², 崔书华²(1. 山东大学齐鲁医院, 济南 250012; 2. 滨州医学院附属医院, 山东 滨州 256600)

分子生物学及细胞生物学的研究表明,恶性肿瘤最重要的生物学特征为肿瘤细胞异常增殖和分化不良、浸润性生长和远处转移以及细胞恶性特征的遗传性。以上 3 点癌细胞共同生物学特征的出现,均以细胞核 DNA 含量和(或)染色体倍体与功能等微细异常为物质基础。因此,测量和分析癌前病变及癌组织中细胞核 DNA 含量与倍体对恶性肿瘤的病理诊断、恶性程度判定、疗效评估、预测预后均具有重要价值。本研究应用流式细胞术(FCM)检测了经手术或肠镜取得的对照组(正常大肠黏膜)、大肠腺瘤(绒毛状腺瘤、管状腺瘤)和大肠癌组织,检测了它们的 DNA 倍体、DNA 含量和细胞的增殖活性,并进行了临床分析。

本研究采集 202 例新鲜大肠组织标本,对照组 46 例,大肠腺瘤 100 例(管状腺瘤 64 例,绒毛状腺瘤 36 例),大肠癌 56 例。用机械法分散组织制成单细胞悬液。取 1×10^6 /ml 细胞悬液加入碘化丙啶染色液 1ml,避光室温孵育 30 min 后,采用 FACS Vantage 流式细胞仪进行检测。以 DNA 指数(DI)表示相对 DNA 含量,依据 DI 值判定 DNA 倍体。以增殖指数(PI)表示细胞的增殖活性。应用 SPSS 统计软件分别进行数据 *t* 检验和 χ^2 检验分析。结果:正常大肠黏膜的 DI 指数为 0.94 ~ 1.07,与管状腺瘤组相比无显著性差异($P > 0.05$)。与绒毛状腺瘤组差异有显著性($P < 0.01$),绒毛状腺瘤组细胞的 DI 指数与大肠癌组有显著性差异($P < 0.001$)。

正常大肠黏膜均为二倍体,从正常大肠黏膜-管状腺瘤-绒毛状腺瘤-腺癌,异倍体检出率逐渐升高,各组之间有显著性差异($P < 0.001$)。对照组、管状腺瘤组 PI 值无显著性差异($P > 0.05$)。与绒毛状腺瘤组差异有显著性($P < 0.01$)。癌组织细胞的 PI 值明显高于管状腺瘤和绒毛状腺瘤,差异有显著性($P < 0.001$)。

肿瘤分子生物学研究表明,癌细胞染色体在数目和结构上多有异常,表现为增殖期(S + G2M)DNA 含量及细胞比率增加,出现非整倍体细胞。本研究发现 DNA 含量在大肠癌组最高。二倍体出现在对照组和大多数管状腺瘤组,大肠癌组出现异倍体的比例最高。在绒毛状腺瘤组细胞增殖活性明显增高,并且随着腺瘤中绒毛成分的增加,细胞的增殖活性也明显增高。大肠癌组细胞的增殖活性最高。本研究结果提示,DNA 含量、DNA 倍体和细胞的增殖活性可以作为癌前病变的预警性指标,应用 FCM 检测上述指标是一项很有临床实用价值的检测方法。对于形态学上诊断为腺瘤,特别是那些容易发生恶变的腺瘤,有必要进行 DNA 含量、倍体类型及细胞增殖活性检测。

[关键词] 大肠癌; 大肠腺瘤; DNA; 流式细胞术
 [中图分类号] R753.2 [文献标识码] D

[收稿日期] 2004 - 04 - 28 [修回日期] 2004 - 06 - 10