

· 论 著 ·

[文章编号] 1007-385X(2007)06-0550-07

左炔诺孕酮对人子宫肌瘤细胞体外增殖与凋亡的影响

仇黎丽, 徐 青, 朱利群, 李 卓, 徐昌芬* (南京医科大学 江苏省生殖医学重点实验室, 南京 210029)

[摘 要] 目的: 建立稳定、成功率高的人子宫肌瘤细胞原代培养方法, 探讨不同浓度左炔诺孕酮(levonorgestrel, LNG)对体外培养人子宫肌瘤细胞增殖和凋亡的影响。方法: 分别采用酶解法和贴块法原代培养人子宫肌瘤细胞(uterine leiomyoma cell, UtLMC), 以 α -Actin单抗进行免疫组织化学染色鉴定原代细胞; 细胞传代后, 加入不同浓度左炔诺孕酮, H-E染色和透射电镜观察细胞的形态学改变, MTT法检测LNG对细胞增殖的调节作用, 流式细胞术测定细胞凋亡率, RT-PCR技术分析LNG对人子宫肌瘤细胞凋亡相关基因*Bcl-2*、*IGF-1*及*Survivin* mRNA表达的影响。结果: 酶解法和贴块法均成功获得UtLMC, 经免疫组化鉴定, 纯度达95%以上, 并能稳定传12代; 5 μ g/ml左炔诺孕酮对子宫肌瘤细胞无明显作用, 当质量浓度达到10 μ g/ml时可显著抑制细胞增殖, 并呈时间、剂量依赖; 随着药物浓度的增加, 细胞凋亡率亦逐渐升高, 与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$); 10 μ g/ml和20 μ g/ml左炔诺孕酮作用UtLMC后, *Bcl-2*、*IGF-1*及*Survivin* mRNA表达下降。结论: 酶解法和贴块法均能获得功能良好的人子宫肌瘤细胞, 一定浓度的左炔诺孕酮可抑制其增殖并诱导凋亡, 机制与下调*Bcl-2*、*IGF-1*及*Survivin*基因表达有关。

[关键词] 左炔诺孕酮; 子宫肌瘤细胞; 细胞凋亡; 基因表达

[中图分类号] R737.33; R730.54 [文献标志码] A

Effects of levonorgestrel on proliferation and apoptosis of human uterine leiomyoma cells *in vitro*

QIU Li-li, XU Qing, ZHU Li-qun, LI Zhuo, XU Chang-fen* (Key Laboratory of Reproductive Medicine of Jiangsu Province, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To establish a method for stable and efficient culture of human uterine leiomyoma cell (UtLMC) and to explore the effects of levonorgestrel on proliferation and apoptosis of UtLMCs. **Methods:** Human uterine leiomyoma cells were isolated and cultured by enzymatically dispersed method or explant method. The passaged cells were identified by α -Actin antibody immunohistochemical staining. After exposure to levonorgestrel at different concentrations for 72 h, the morphological changes of UtLMCs were observed by H-E staining and transmission electron microscope 72 h after exposure to levonorgestrel. MTT assay was used to detect the anti-proliferative effect of levonorgestrel. Apoptosis rate of cultured cells was analyzed by flow cytometry. *Bcl-2*, *IGF-1* and *Survivin* mRNA expressions in UtLMCs were determined by semi-quantitative RT-PCR. **Results:** Primary cultivated human uterine leiomyoma cells were successfully obtained by the 2 culture methods and with high purity and viability. Lower concentration of levonorgestrel had no inhibitory effect on UtLMC growth; when the concentration reached 10 μ g/ml, levonorgestrel inhibited UtLMC growth in a dose- and time-dependent manner. Levonorgestrel treatment induced a apoptosis in UtLMCs in a concentration-dependent manner; there was significant difference between the levonorgestrel group and the control group ($P < 0.05$). The expressions of *Bcl-2*, *IGF-1* and *Survivin* mRNA were all down-regulated in UtLMC cell after treatment by 10 μ g/ml and 20 μ g/ml levonorgestrel. **Conclusion:** Enzymatically dispersed method and explant method both can obtain highly purified and satisfactory UtLMCs. Certain concentration of levonorgestrel can cause decrease in proliferation and increase in apoptosis of UtLMCs. The decreased *Bcl-2*, *IGF-1* and *Survivin* mRNA expressions may be the molecular mechanisms for the role of levonorgestrel in the inhibition of human uterine leiomyoma growth.

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(No. YKK06080); 南京医科大学科技发展基金重点项目(No. 2005NYDZD21). Supported by Medical Science Technology Program of Nanjing (No. YKK06080); Key Science Technology Program of Nanjing Medical University (No. 2005NYDZD21)

[作者简介] 仇黎丽(1981-), 女, 江苏省南通市人, 硕士研究生, 主要从事女性生殖医学方面的研究

* Corresponding author. E-mail: cfxu@njmu.edu.cn; Tel: 025-86862904

[**Key words**] levonorgestrel; uterine leiomyoma cell; cell apoptosis; gene expression

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(6): 550-556]

子宫肌瘤是女性生殖器官的常见肿瘤,在育龄期妇女中发病率高达 20% ~ 30%,是导致女性行子宫切除的重要原因之一。近年来,随着对其病因学研究的进展,局部应用孕激素类药物的治疗方法备受关注。左炔诺孕酮宫内缓释系统(levonorgestrel-releasing intrauterine system, LNG-IUS)是当前国际公认性能优良的宫内抗生育系统。Grigorieva 等^[1]发现 LNG-IUS 能使子宫肌瘤变小,经量减少,其对子宫肌瘤的治疗作用可能与抑制子宫内膜生长有关。然而 LNG-IUS 所形成的局部高效孕激素环境,是否还存在其他治疗作用靶点和机制尚不清楚。本研究首先建立稳定、简便、成功率高的人子宫平滑肌瘤细胞(uterine leiomyoma cell, UtLMC)原代培养方法,在此基础上直接以其为作用靶标,从增殖与凋亡的角度探讨左炔诺孕酮对子宫肌瘤细胞的作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选择 20 例于 2006 年 8 月至 2007 年 3 月在南京市妇幼保健院行子宫肌瘤剔除术的患者,年龄(42.50 ± 0.86)岁。术前至少 3 个月未接受激素类药物,月经周期尚规则,诊断明确,于月经干净后 3 ~ 10 d 内手术。术中获取子宫肌瘤组织,立即置入冷 D-Hank's 液(含青霉素、链霉素各 1 000 IU/ml)中,低温条件下转移至实验室进行分离培养。术后病理学诊断为子宫平滑肌瘤,且无肌瘤变性。

1.2 主要试剂与仪器

高糖 DMEM、胎牛血清、I 型胶原酶为美国 Gibco 公司产品,胰蛋白酶、左炔诺孕酮为美国 Sigma 公司产品,鼠抗人平滑肌肌动蛋白(α -Actin)抗体为上海基因公司产品,EnVision™ 检测试剂盒为丹麦 Dako 公司产品,四甲基偶氮唑盐(MTT)为美国 Amresco 公司产品,*Bcl-2*、*IGF-1*、*Survivin*、 β -actin 引物合成于上海英骏生物技术有限公司, RNA 抽提试剂盒、cDNA 合成试剂盒、PCR 扩增试剂盒、DNA marker DL2 000 为日本 TakaRa 公司产品。

HERA cell 150 CO₂ 培养箱为德国 Heraeus 公司产品,倒置相差显微镜为日本 Olympus 公司产品, JEM1010 型透射电镜为日本电子产品, SunRise 酶标仪为奥地利 Tecan 公司产品, FACSCalibur 流式

细胞仪为美国 BD 公司产品, PCR 基因扩增仪为日本 Bioer 公司产品。

1.3 人子宫肌瘤细胞原代培养及鉴定

1.3.1 人子宫肌瘤细胞培养 取肌瘤瘤核组织数块,置于 D-Hank's 液(含青霉素、链霉素各 1 000 IU/ml)中洗涤 3 次,剪碎至 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小,分别采用酶解法和贴块法收集细胞。(1)酶解法:加入适量 0.2% I 型胶原酶,37 °C 水浴振荡消化,隔 1 h 用不锈钢筛网过滤 1 次,连续过滤 3 次,约 3 ~ 4 h 后终止消化,所得滤液 1 000 × g 离心 5 min 收集细胞, D-Hank's 液洗涤细胞 3 次,锥虫蓝拒染试验检测细胞成活率;将所收集的细胞置于完全培养液(高糖 DMEM 含 15% 胎牛血清, pH 7.2 ~ 7.4)中,37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养。(2)贴块法:吸取少许胎牛血清涂于 25 ml 培养瓶瓶壁,将组织块均匀接种于瓶壁,翻转培养瓶使接种有组织块的一面向上,加入完全培养液,倾斜置于 37 °C 培养箱中,3 h 后轻轻翻瓶,平放培养。每 2 d 更换培养液,约 6 ~ 7 d 后 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.3.2 细胞生长曲线的测定 取第 3 代处于对数生长期 UtLMC,制备 1 × 10⁴/ml 的单细胞悬液,接种 24 孔板,每孔 1 ml;于第 1、2、3、4、5、6、8、10、12 天每天计数 3 孔,得到平均细胞数,绘制生长曲线。根据 Patterson 公式计算细胞在对数生长期的倍增时间(Td), $Td = T \ln 2 / (\ln N_t - \ln N_0)$,其中 Td 为细胞倍增时间(h), N₀ 为初始细胞数, N_t 为培养 T 小时后的细胞数, T 为细胞数从 N₀ 增至 N_t 所需的时间。

1.3.3 免疫组织化学染色鉴定 分别取第 2、4、6 代对数生长期 UtLMC,制备单细胞悬液,密度约 0.5 × 10⁵/ml,接种于盛有无菌盖玻片的 6 孔板中,每孔 2 ml;当细胞增殖至 70% 左右密集时,取出盖玻片, PBS 漂洗 2 次,冷丙酮固定 20 min;用 Envision 两步法,以鼠抗人 α -Actin 单克隆抗体为一抗,按 EnVision™ 检测试剂盒说明进行免疫组化染色,检测 α -Actin 蛋白的表达,阳性胞质为棕黄色, PBS 作为阴性对照。

1.4 MTT 法检测 LNG 对 UtLMC 增殖的调节作用

选取对数生长期 UtLMC,调整细胞密度至 0.5 × 10⁵/ml,接种 96 孔板,每孔 200 μ l;培养 72 h 后,更换含 LNG 的无血清培养液(LNG 溶于 DMSO 中)。实验分不加药对照组、溶剂对照组和 5 个药物浓度梯度组(LNG 终质量浓度分别为 5、10、15、

20、25 $\mu\text{g/ml}$), 每组 3 复孔, 分别培养 24、48、72 h; 在培养终止前 4 h, 每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl , 继续培养 4 h 后, 吸除原有培养液, 每孔加 DMSO 150 μl , 振荡溶解紫色甲瓚, 选择检测波长 570 nm, 在酶标仪上测定光密度(D)值; 实验重复 3 次, 计算 LNG 各质量浓度在不同时间段对 UtLMC 的增殖抑制指数(IR)。IR(%) = [(对照组 D 值 - 加药组 D 值) / 对照组 D 值] \times 100%。

1.5 光镜和电镜观察 LNG 对 UtLMC 的影响

倒置相差显微镜下分别观察对照组 UtLMC 和经终质量浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ LNG 作用 72 h 的加药组 UtLMC 的形态学特征。常规 H-E 染色, 光镜下观察细胞形态结构变化。收集两组细胞, 2 000 $\times g$ 离心 15 min, PBS 液洗涤, 细胞团用 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双固定, 透射电镜观察细胞超微结构改变。

1.6 流式细胞术检测 LNG 对 UtLMC 凋亡的影响

选取对数生长期 UtLMC, 调整细胞密度至 0.5 $\times 10^5$ /ml, 接种于 50 ml 培养瓶内。待细胞增殖至 50% 以上密度, 更换含 LNG 的无血清培养液, 药物质量浓度分别为 10、15、20、25 $\mu\text{g/ml}$, 对照组不加药, 继续培养 72 h。调整细胞密度为 1 $\times 10^6$ /ml, 用 PBS 洗涤细胞 1 次, 2 000 $\times g$ 离心 5 min 收集细胞, 75% 冷乙醇固定过夜。次日离心弃上清, 50 $\mu\text{g/ml}$ 碘化丙啶(PI) 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色 30 min, 流式细胞术测定凋亡细胞百分率。

1.7 RT-PCR 检测 LNG 对 UtLMC *Bcl-2*、*IGF-1* 及 *Survivin* mRNA 表达的影响

总 RNA 提取与 cDNA 合成: UtLMC 接种 72 h 后, 加入 10、20 $\mu\text{g/ml}$ LNG, 另设不加药对照组, 继续培养 72 h, 按一步法分别提取 3 组细胞总 RNA; 经琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 紫外灯下观察, 紫外分光光度计测定 D_{260} 、 D_{280} , 计算总 RNA 浓度。逆转录酶 MMLV 催化合成的 cDNA 加入灭菌超纯水, -20°C 保存。

引物设计与合成: 基因序列检索自 Genebank, 用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 *β -actin*、*Bcl-2*、*IGF-1*、*Survivin* 引物, 使用 Blast 确认其特异性。 *β -actin*: sense-5' GGCATCCTCACCTGAAGTA3' (260 ~ 279), antisense-5' GGGGTGTTGAAGGTCTCAA3' (443 ~ 462), 预扩增片段 203 bp; *Bcl-2*: sense-5' GTGGAGGAGCTCTTCAGGA3' (893 ~ 912), antisense-5' AGGCACCCAGGGTGATGCAA3' (1177 ~ 1196), 预扩增片段 304 bp; *IGF-1*: sense-5' ATGCACACCATGTCCTCCTC3' (236 ~ 255), antisense-

5' GCACGGACAGAGCGAGCTGA3' (515 ~ 534), 预扩增片段 299 bp; *Survivin*: sense-5' TTGGCAGGTGCCTGTTGAAT 3' (967 ~ 986), antisense-5' AGCCAGTCCCCACAGCAT 3' (1415 ~ 1433), 预扩增片段 467 bp。

PCR 反应: PCR 扩增反应体系 ddH₂O 18.3 μl 、10 \times PCR Buffer 2.5 μl 、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 0.7 μl 、Taq 酶 0.5 μl 、上下游引物 (10 pmol/L) 各 1 μl 及模板 cDNA 1 μl 。各目的基因扩增条件: *β -actin* 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ \times 5 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 s, 退火 57 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 45 s, 终末延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 7 min, 共 28 个循环; *Bcl-2* 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ \times 5 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 s, 退火 64 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 45 s, 终末延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 7 min, 共 32 个循环; *IGF-1* 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ \times 5 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 s, 退火 59 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 45 s, 终末延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 7 min, 共 32 个循环; *Survivin* 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ \times 5 min, 变性 94 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 s, 退火 58 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 s, 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 45 s, 终末延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 7 min, 共 32 个循环。取 7 μl PCR 产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V 30 min), 紫外透射仪下拍照, 凝胶图像分析仪进行灰度分析。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 11.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。One-Way ANOVA (单因素方差分析) 进行各组间比较, 检验显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 人子宫肌癌细胞原代培养及鉴定

2.1.1 原代培养人子宫肌癌细胞生长特性 经酶解法分离的 UtLMC 约 24 h 大部分贴壁, 采用贴块法的第 7 ~ 10 天开始有单个细胞从组织块边缘游出; 随着培养时间的延长, UtLMC 逐渐生长成梭形, 核椭圆、居中, 6 ~ 7 d 融合成片。细胞既可单层生长, 平行排列; 亦可层叠生长, 呈现出典型的“峰-谷”样现象 (图 1A、1B)。两种方法所培养的 UtLMC 在体外均已稳定传至 12 代。

2.1.2 原代培养细胞的鉴定 培养细胞经 α -Actin 单克隆抗体免疫组织化学染色证实为平滑肌细胞。镜下可见胞质内棕黄色丝状结构, 即为肌动蛋白所在部位, 阳性细胞数在 95% 以上 (图 1C)。

2.1.3 细胞生长曲线和倍增时间 细胞生长曲线显示培养的 UtLMC 在 2 ~ 6 d 生长迅速, 增殖活跃 (图 2)。指数增生期内 UtLMC 倍增时间为 (51.58 \pm 4.74) h。

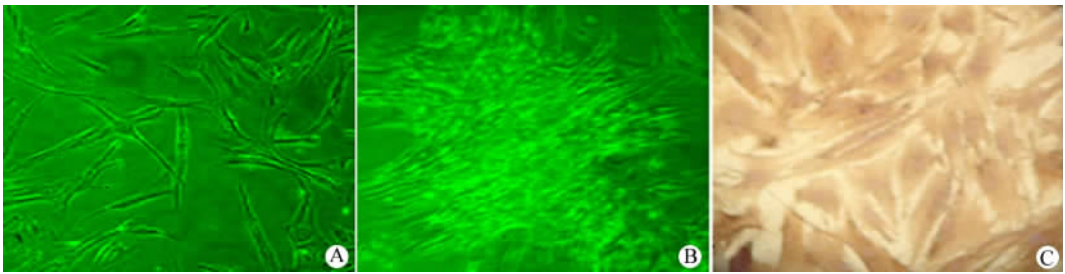


图 1 原代培养子宫平滑肌瘤细胞的形态特征及免疫组化鉴定

Fig. 1 Morphological characteristics and immunohistochemical identification of primary cultured human uterine leiomyoma cells

A: Inverted microscopic observation of UtLMCs after cultivated for 24 h($\times 100$); B: Inverted microscopic observation of "hill-valleys" like growth($\times 100$); C: Immunohistochemical staining with α -Actin monoclonal antibody on human uterine leiomyoma cells($\times 100$)

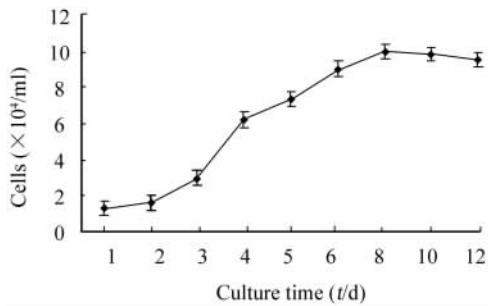


图 2 子宫平滑肌瘤细胞的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of human uterine leiomyoma cells

2.2 LNG 对子宫平滑肌瘤细胞增殖的调节作用

MTT 结果显示,当 LNG 达 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 后,对 Ut-LMC 有显著的增殖抑制作用,并随作用时间延长及药物浓度的增加,其抑制作用有加强趋势(表 1)。

2.3 LNG 对子宫平滑肌瘤细胞形态学的影响

倒置相差显微镜结合 H-E 染色观察,对照组 UtLMC 形态规则、胞质丰富、立体感强、染色均一,

表 1 LNG 对子宫平滑肌瘤细胞的增殖调节作用

Tab. 1 Effects of levonorgestrel on proliferation of UtLMCs ($n = 15, \bar{x} \pm s$)

Groups ($\rho_B/\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Inhibitory index(%)		
	24 h	48 h	72 h
5	1.87 ± 0.9	4.58 ± 1.96	8.31 ± 4.00
10	13.27 ± 3.58	14.16 ± 1.12	17.75 ± 0.9
15	13.15 ± 2.06	15.82 ± 1.55	19.64 ± 3.59
20	17.98 ± 3.18	18.46 ± 1.44	22.09 ± 3.9
25	20.48 ± 1.08	21.10 ± 2.29	24.36 ± 2.16

而 LNG 作用组 UtLMC 变形,胞质内出现空泡且颗粒状物质增多(图 3)。进一步以透射电镜观察,可见对照组 UtLMC 核规则、染色质分布均匀、质膜下有明显的密斑结构;经 LNG 作用 72 h 的 UtLMC 则出现胞质空泡化、内质网扩张、线粒体固缩,并出现“髓鞘样”变、核皱缩、染色质浓缩边聚等现象,呈现早期凋亡特征(图 4)。

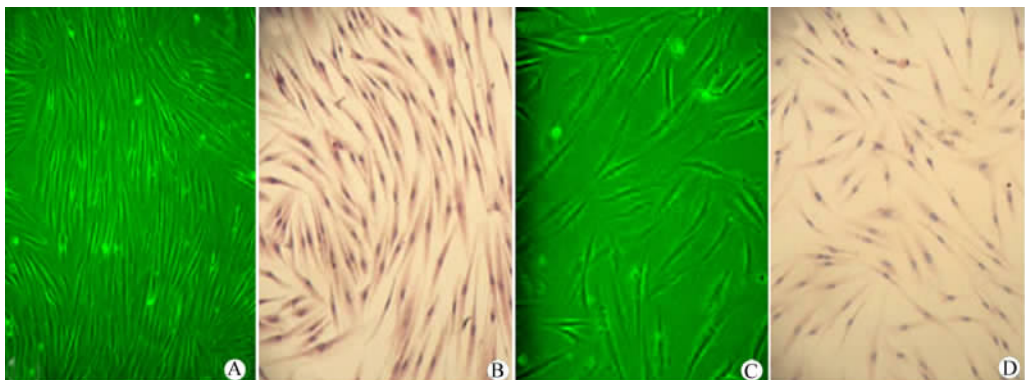


图 3 加 LNG 与未加 LNG 组子宫平滑肌瘤细胞的形态学比较 ($\times 40$)

Fig. 3 Comparison of morphological characteristics between levonorgestrel treated and untreated human uterine leiomyoma cells ($\times 40$)

A,C: Inverted microscopic observation; B,D: H-E staining; A,B: Control group untreated with LNG; C,D: LNG treated group

2.4 LNG 对子宫平滑肌瘤细胞凋亡的影响

流式细胞仪分析,自 10 $\mu\text{g/ml}$ 开始,UtLMC 凋亡率随 LNG 质量浓度增加(10、15、20、25 $\mu\text{g/ml}$)而逐渐升高,分别为 0.52%、2.56%、7.81%、8.91%,与对照组细胞凋亡率 0.05% 相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 5)。

2.5 LNG 对子宫平滑肌瘤细胞凋亡相关基因及生长

因子表达的影响

10、20 $\mu\text{g/ml}$ LNG 处理 UtLMC 后,*Bcl-2*、*IGF-1* 及 *Survivin* mRNA 表达水平逐渐降低。以 $\beta\text{-actin}$ 为内参,Quantity One 软件分析各基因的表达强度(表 2),结果表明,LNG 对 *Bcl-2*、*IGF-1* 及 *Survivin* mRNA 表达量均具有一定的下调作用。

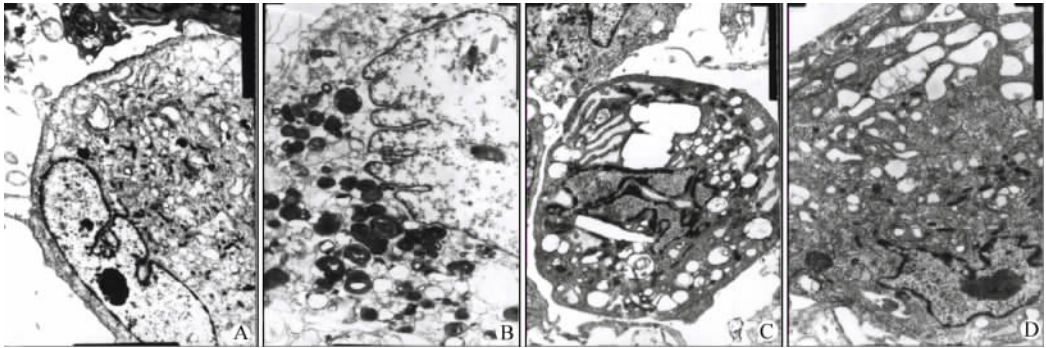


图 4 透射电镜观察 LNG 作用后子宫平滑肌瘤细胞的超微结构变化($\times 6\,000$)

Fig. 4 Transmission electron microscopic observation of human uterine leiomyoma cells after treatment with LNG($\times 6\,000$)

A: Normal ultra - structure of human uterine leiomyoma cells; B: Myelin figure of mitochondria; C: Expansion of endoplasmic reticulum; D: Accumulation of condensed chromatin

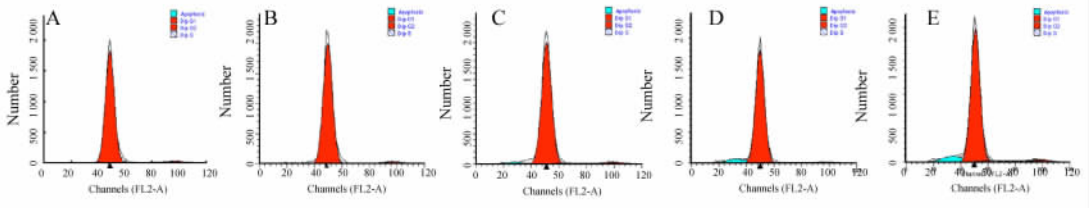


图 5 流式细胞术分析 LNG 对子宫平滑肌瘤细胞凋亡的影响

Fig. 5 Flow cytometry analysis of LNG effect on apoptosis of human uterine leiomyoma cells

A: Control group; B: 10 $\mu\text{g/ml}$ group; C: 15 $\mu\text{g/ml}$ group; D: 20 $\mu\text{g/ml}$ group; E: 25 $\mu\text{g/ml}$ group

表 2 LNG 对子宫平滑肌瘤细胞相关基因 mRNA 表达的影响

Tab. 2 Effects of levonorgestrel on expression of related genes in UtLMCs ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

LNG ($\rho_{\text{B}} / \text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	$\beta\text{-actin}$	<i>Bcl-2</i>	<i>IGF-1</i>	<i>Survivin</i>
0	22.56 \pm 0.28	52.10 \pm 0.48	70.57 \pm 0.34	18.14 \pm 0.30
10	23.37 \pm 0.35	35.10 \pm 0.07*	18.24 \pm 0.006*	6.82 \pm 0.55*
20	20.98 \pm 0.17	12.79 \pm 0.46*	10.99 \pm 0.006*	8.10 \pm 0.47*

* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ LNG

3 讨论

子宫肌瘤为良性平滑肌肿瘤,细胞不具永生性,因此建立稳定、简便的子宫平滑肌瘤细胞原代培养方

法,获取性状一致、生物学功能状态良好的肌瘤细胞是探讨子宫肌瘤发病机制和进行药物筛选的首要任务。本实验所采用的酶解法和贴块法均能培养出大量高纯度、生长旺盛的子宫平滑肌瘤细胞,但两者又各

有利弊。酶解法所需组织量大、步骤复杂、易污染,但由于采用的胶原酶酶解消化法既减少了细胞损伤,又可去除绝大部分成纤维细胞,故所得肌瘤细胞存活率及纯度较高。贴块法相对来说易于掌握、污染机会少,但为了获得高纯度的细胞需在传代时采用差时贴壁法,所以在一定程度上增加了操作的复杂性。考虑到培养周期的问题,本实验更倾向于酶解法,因酶解分离的肌瘤细胞约1周左右即可达90%密集;而应用贴块法时,第7~10天始有单个细胞游出,半月左右细胞方可融合成片。

子宫肌瘤是一种卵巢类固醇激素依赖性肿瘤。传统观点认为^[2],孕激素能刺激肌瘤的有丝分裂活性,促进其增殖。然而 Phelan 等^[3]报道,虽然妊娠期性激素的循环浓度显著提高,但绝大多数妊娠合并子宫肌瘤患者的肌瘤体积在孕期并未增大,有些反而缩小。另一方面, Sivin^[4]报道比较放置 LNG-IUS 和 Teu380A 5年,显示前组肌瘤生长缓慢; Grigorieva 等^[1]完成的一项前瞻性自身对照研究发现 LNG-IUS 能使子宫肌瘤变小,这些均提示孕激素可能对子宫肌瘤的生长存在双重调节作用。LNG-IUS 每天向宫腔内释放 20 g LNG,远远高于生理浓度的孕激素水平(100 ng/ml)及肌瘤组织中正常的黄体酮水平(10~70 ng/g 蛋白)^[5],这种局部高浓度 LNG 是否正体现了孕激素对肌瘤生长的逆向调节作用。本研究发现,5 μg/ml LNG 对 UtLMC 的增殖无明显影响,但当 LNG 浓度增加至 10 g/ml 后,其抑制 UtLMC 增殖作用显著增强,该作用呈明显的时间和剂量依赖。

为了进一步研究高浓度 LNG 抑制子宫肌瘤生长的作用机制,采用流式细胞术分析, UtLMC 凋亡率随药物浓度的增加而逐渐升高。透射电镜也显示加药组细胞胞质空泡化,内质网扩张,线粒体固缩并“髓鞘样”变,染色质浓缩边聚等早期凋亡改变。凋亡相关基因 *Bcl-2* 是 Tsujimoto 等^[6]从滤泡性淋巴瘤中分离出的一种原癌基因,其产物可帮助细胞逃避“程序性死亡”,延长细胞生存期,并能通过减少对生长因子的需求量而促进细胞复制^[7]。既往实验提示,生理浓度的孕激素上调子宫肌瘤细胞中 *Bcl-2* mRNA 表达^[8-9],但本实验在培养的子宫肌瘤细胞中加入高浓度 LNG 后, *Bcl-2* mRNA 表达量却降低。可以推测,高浓度 LNG 通过使 *Bcl-2* 表达下降,加速细胞凋亡过程,从而抑制子宫肌瘤细胞的生长。*Survivin* 是凋亡抑制蛋白家族的新成员,具有较强的抗凋亡活性和促细胞增殖作用,在子宫肌瘤中呈高表达状态^[10]。本研究采用 RT-PCR 技术从 mRNA

水平检测 LNG 对 *Survivin* 表达的影响,结果表明,10 μg/ml 以上的 LNG 能在 mRNA 水平下调 *Survivin* 表达,抑制 *Survivin* 活性,进而发挥对子宫肌瘤生长的抑制作用。

越来越多的研究显示,雌、孕激素调节子宫肌瘤的生长可能是由自分泌或旁分泌生长因子所介导^[11]。与雌、孕激素关系较为密切的局部生长因子之一便是 IGF-1。IGF-1 是一种与胰岛素结构相似的多肽类激素^[12],在子宫肌瘤中,作为雌激素诱导的信号级联通路中的一员, IGF-1 一方面通过提高磷酸化 MAPK(MAPK-P)水平,使之进入核内,下调 MKP-1;另一方面通过与 cyclins A 或 E 的相互作用,增强 A-myb 转录活性,推动细胞周期由 G₁ 期进入 S 期^[13]。此外, IGF-1 还能上调子宫肌瘤细胞中 PCNA 的表达^[14]和 *Bcl-2* 的表达^[15]。近期研究报道,生理浓度孕激素可降低肌瘤细胞 *IGF-1* mRNA 及蛋白的表达量,而不影响 *IGF-1* 受体 mRNA 的表达^[16]。本实验在体外使子宫肌瘤细胞暴露于高浓度 LNG 72 h 后, *IGF-1* mRNA 表达量亦显著下降,与国外研究结果一致。由此可知,通过下调 IGF-1 基因表达而降低其对肌瘤细胞的增殖促进作用和凋亡抑制作用,可能也是局部高效 LNG 抑制肌瘤生长的机制之一。

本实验已成功建立人子宫肌瘤细胞有限细胞系,为研究提供了大量性状一致、功能状态良好的细胞。在传代培养的肌瘤细胞中应用不同浓度 LNG 处理后检测细胞增殖情况、细胞凋亡率及 *Bcl-2*、*IGF-1*、*Survivin* 的基因表达,发现高浓度 LNG 可明显抑制子宫肌瘤细胞增殖,促进细胞凋亡,其机制可能与下调凋亡抑制基因 *Bcl-2*、*Survivin* 表达及降低生长因子 IGF-1 表达有关。

[参考文献]

- [1] Grigorieva V, Chen-Mok M, Tarasova M, et al. Use of a levonorgestrel-releasing intrauterine system to treat bleeding related to uterine leiomyomas[J]. *Fertil Steril*, 2003, 79(5): 1194-1198.
- [2] Maruo T, Ohara N, Matsuo H, et al. Effects of levonorgestrel-releasing IUS and progesterone receptor modulator PRM CDB-2914 on uterine leiomyomas[J]. *Contraception*, 2007, 75(6): S99-S103.
- [3] Phelan JP. Myomas and pregnancy[J]. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 1995, 22(4): 801-805.
- [4] Sivin I, Stern J. Health during prolonged use of levonorgestrel 20 μg/d and the copper TCu380Ag intrauterine contraceptive devices: a multicenter study. International committee for contraception research (ICCR)[J]. *Fertil Steril*, 1994, 61(1): 70-77.
- [5] Eiletz J, Genz T, Pollow K, et al. Sex steroid levels in serum,

- myometrium, and fibromyomata in correlation with cytoplasmic receptors and 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in different age groups and phase of the menstrual cycle[J]. Arch Gynecol 1980, 229(1): 13-28.
- [6] 王卫东, 陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(4): 393-396.
- [7] Kovacs KA, Lengyel F, Kornyei JL, *et al.* Differential expression of Akt /protein kinase B, bcl-2 and bax proteins in human leiomyoma and myometrium[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 87(4-5): 233-240.
- [8] Matsuo H, Maruo T, Samoto T. Increased expression of Bcl-2 protein in human uterine leiomyoma and its up-regulation by progesterone[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1997, 82(1): 293-299.
- [9] Chen W, Ohara N, Wang J, *et al.* A novel selective progesterone receptor modulator asoprisnil(J867) inhibits proliferation and induces apoptosis in cultured human uterine leiomyoma cells in the absence of comparable effects on myometrial cell[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(4): 1296-1304.
- [10] 武孟香, 高英敏, 王秀华, 等. Survivin/ PTEN 在子宫肌瘤中的表达及相关性研究[J]. 现代肿瘤医学, 2005, 13(1): 52-54.
- [11] Maruo T, Matsuo H, Shimomura Y, *et al.* Effects of progesterone on growth factor expression in human uterine leiomyoma[J]. Steroid, 2003, 68(10-13): 817-824.
- [12] Mawson A, Lai A, Carroll JS, *et al.* Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1[J]. Mol Cell Endocrinol, 2005, 229(1-2): 161-173.
- [13] Swartzl CD, Afshari CA, Yu L, *et al.* Estrogen-induced changes in IGF-I, Myb family and MAPkinase pathway genes in human uterine leiomyoma and normal uterine smooth muscle cell lines[J]. Mol Hum Reprod, 2005, 11(6): 441-450.
- [14] Szajda SD, Jóźwik M, Sulkowska M, *et al.* Analysis of the relationship between cancer procoagulant activity and PCNA and Ki 67 expression in cases of common and cellular uterine leiomyomas[J]. Eur J Gynaecol Oncol, 2006, 27(5): 495-499.
- [15] Gao Z, Matsuo H, Wang Y, *et al.* Up-regulation by IGF-I of proliferating cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression in human uterine leiomyoma cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(11): 5593-5599.
- [16] Yamada T, Nakago S, Kurachi O, *et al.* Progesterone down-regulates insulin-like growth factor-I expression in cultured human uterine leiomyoma cells[J]. Hum Reprod, 2004, 19(4): 815-821.
- [收稿日期] 2007 - 09 - 12 [修回日期] 2007 - 11 - 04
[本文编辑] 郁晓路

· 科技动态 ·

转录因子 T-bet 在记忆性 T 细胞分化中的作用

记忆性 T 细胞根据其向不同组织归巢可以分为中枢性记忆 T 细胞和效应性记忆 T 细胞。效应性记忆 T 细胞归巢于外周组织,增殖能力较差,但杀伤功能强,对再次感染提供保护;而中枢性记忆 T 细胞定位于中枢淋巴器官,能够不断地自我更新,以维持自身稳定存在,再次接触抗原后能够迅速增殖分化为效应细胞。是什么内在或者外在因素导致了杀伤性 T 细胞向这两种记忆细胞分化,至今尚不清楚。论文作者向我们展示了转录因子 T-bet 在其中是如何发挥作用的。

首先在 T-bet 缺陷小鼠(Tbx^{-/-})中发现杀伤性 T 细胞高表达 IL-7Ralpha, 转染并表达 T-bet 的 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞 IL-7Ralpha 的表达下调,提示 T-bet 能够抑制 IL-7Ralpha 表达。早期研究表明 IL-7Ralpha 的表达提示该群细胞可能和免疫记忆相关,作者在 LCMV 病毒感染后的记忆性 CTL 中检测 T-bet 的标达,发现在中枢性记忆 T 细胞中 T-bet 的表达要远远低于效应性记忆 T 细胞,于是作者推测 T-bet 的表达可能与两种记忆性 T 细胞的分化相关。然后分别检测感染后不同天数的野生型小鼠和 T-bet 缺失的小鼠,确实后者定居于淋巴结的中枢性记忆 T 细胞数目要高于前者。当小鼠再次受到同样病原感染后,这群记忆性 T 细胞能够迅速增殖,并很快清除体内病原体,给机体提供很好的保护,这就证明了 T-bet 的缺失导致了中枢性记忆 T 细胞形成增多,而且这群细胞的功能是正常的。

近来的研究表明,CD4⁺ T 细胞虽然在 CTL 的初次免疫反应中并不是必须的,但却是 CTL 记忆形成必须的。缺少了 CD4⁺ T 细胞辅助的 CTL,形成的记忆性细胞不仅数目少,而且增殖能力和清除病原体的能力也是低的,作者把这种异常状态下形成的 T 细胞记忆,称为“失去帮助”的 CD8 记忆性 T 细胞。作者观察到失助记忆性 CTL 其 T-bet 的表达要高于正常,且主要缺少的是中枢性记忆 T 细胞,而 T-bet 的缺失恰好增强了中枢性记忆 T 细胞的形成,提示这两者之间存在有某种联系。于是作者在 T-bet 缺失的小鼠中剔除 CD4⁺ T 细胞进行病毒免疫,发现其形成的中枢记忆性 CTL 数目并没有下降,说明 T-bet 的缺失可以挽救由于缺少 CD4⁺ T 细胞的辅助而导致的记忆性 CTL 失能。在效应性细胞向记忆性细胞的分化过程中到底是哪些内源和外源性因素起到决定作用历来是研究的热点,T-bet 在向中枢性记忆 T 细胞和效应性记忆 T 细胞的分化中是否是开关性转录因子现在还难以下结论,但该研究给调控记忆性 T 细胞的分化提供了一个新的策略,这也将影响到各种预防性和治疗性疫苗的设计。

[徐 胜 摘译,韩岩梅 审阅. Intlekofer AM, Takemoto N, Kao C, *et al.* J Exp Med, 2007, 204(9): 2015-2021]