

4-HPR 联合 DDP 对 HeLa 细胞的 增殖和凋亡作用

Combined Effects of 4-HPR and DDP on the Proliferation and Apoptosis of HeLa Cells

尹凤玲¹/陆 静¹/李爱萍²/顾灯安²/
韩素萍^{1,*}/周建伟²

(1 江苏省人民医院妇产科, 江苏 南京
210024; 2 南京医科大学公共卫生学院 分子
毒理研究室, 江苏 南京 210029)

YIN Feng-ling¹, LU Jing¹, LI Ai-ping², GU Deng-an²,
HAN Su-ping^{1,*}, ZHOU Jian-wei²

(1. Department of Gynecology, Jiangsu Provincial Hospital,
Nanjing 210029, Jiangsu, China; 2. Department of Molecular Cell
Biology and Toxicology, School of Public Health, Nanjing Medical
University, Nanjing, 210029, Jiangsu, China)

【摘要】背景与目的: 4-羟苯基维胺脂(N-4-hydroxyphenyl retinoid, 4HPR)是一种全反式维甲酸的衍生物,它对多种肿瘤细胞有化学预防和治疗的三重作用且毒副作用小;还对放疗和化疗方法有不同程度的增敏作用。顺铂(cis-platin¹⁴m, DDP)是宫颈癌常用的化疗药物,但因其毒副作用及耐药等问题,临床应用受到限制。本研究旨在探讨4HPR联合DDP对宫颈癌细胞增殖、凋亡的影响及其可能的机制,最终为临床上应用4HPR治疗宫颈癌提供实验依据。材料与方法:采用MTT法检测单用4HPR、DDP及两药联合时对HeLa细胞增殖的影响,分析4HPR与DDP在抑制HeLa细胞增殖中的相互作用。用流式细胞仪测定细胞周期变化和细胞凋亡;用Hoechst染色法检测细胞核的改变。结果:4HPR对HeLa细胞的增殖抑制的浓度在(2~40) $\mu\text{mol/L}$ 范围内,并呈现较好的浓度和时间依赖性,在两药合用时上述作用更加明显;4HPR可诱导细胞凋亡并将细胞阻滞于G₂M期和S期,当4HPR浓度为10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞的凋亡率分别为2.55%、16.55%、22.91%,而G₂M期和S期的细胞比率也随4HPR的浓度升高而增加。当以上3种浓度的4HPR与1 $\mu\text{mol/L}$ DDP联合作用时,两药呈现协同作用。结论:4HPR(浓度在2~40 $\mu\text{mol/L}$ 范围内)对HeLa细胞有显著的增殖抑制作用,且随4HPR的浓度升高而增加,与DDP联合使用能增强HeLa细胞的敏感性,当以上3种浓度的4HPR与1 $\mu\text{mol/L}$ DDP联合作用时,两药呈现协同作用。4HPR(浓度在2~40 $\mu\text{mol/L}$ 范围内)对HeLa细胞有显著的增殖抑制作用,与DDP联合使用能增强HeLa细胞的敏感性,这一作用可能与DDP和4HPR协同诱导细胞凋亡及G₂M期和S期阻滞有关。

【关键词】4-羟苯基维胺脂; 顺铂; 宫颈癌; 增殖凋亡

中图分类号: R73-3; R737.33

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)03-0214-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: N-4-hydroxyphenyl retinoid(4HPR) is a synthetic amide analogue of ATRA. It was reported that 4HPR could inhibit the growth of cervical cancer cells *in vitro*. Cis-platinum (DDP) is a first choice chemical agent used in cervical cancer chemotherapy. The purpose of this study was to investigate the combination effects of 4HPR and DDP on the proliferation, apoptosis of human cervical cancer HeLa cells, and to further provide experimental evidence for treating advanced stage cervical cancer with 4HPR. MATERIAL AND METHODS: HeLa cells were cultured *in vitro*, MTT assay was used to assess the antiproliferative effect of 4HPR with or without DDP on HeLa cells. Flow cytometry (FCM) was used to study the effects of 4HPR with or without DDP on cell cycle and apoptosis of HeLa cells. Hoechst 33258 was used to examine the nuclear changes of the HeLa cells. RESULTS: 4HPR produced concentration- and time-dependent antiproliferative effects on HeLa cells in the range of 2 to 40 $\mu\text{mol/L}$ for 72 h and the effects were more significant with combined use of 4HPR and DDP. 4HPR also induced concentration-dependent apoptosis in HeLa cells and arrested cells in the G₂/M-phase and S-phase of cell cycle. The apoptosis ratios were at 2.55%, 16.55% and 22.91%, when the cells were exposed to 4HPR at 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ respectively for 72 h.

收稿日期: 2005-06-16; 修订日期: 2005-10-25

作者简介: 尹凤玲(1968-),女,江苏省徐州人,副主任医师,硕士研究生,研究方向:妇科肿瘤。

* Correspondence to: HAN Su-ping Tel:86-25-83718836-8700, han-suping@163.com

The percentages of cells at G₂/M-phase and S-phase increased with higher concentration of 4-HPR. The synergistic effect between 4-HPR (at 10, 20, 40 μmol/L) and 1 μmol/L DDP was found in inducing HeLa cells apoptosis and G₂/M-phase and S-phase arrest. **CONCLUSION:** Using 4-HPR alone could inhibit the growth of human cervical cancer cells, and DDP could enhance cellular sensitivity to 4-HPR. These results suggested that the synergistic effect between 4-HPR and DDP could be related to the combined induction of G₂/M-phase and S-phase arrest in HeLa cells.

【KEY WORDS】 N-4-hydroxyphenyl retinoid; cis-platinum; cervical cancer; proliferation; apoptosis

4-羟苯基维胺脂 (N-4-hydroxyphenyl retinoid, 4-HPR) 是全反式维甲酸的衍生物。它对多种肿瘤细胞有化学预防和治疗双重作用^[1]。此外, 还有研究证实 4-HPR 对肿瘤化疗和放疗具有增敏作用。顺铂 (cis-platin, DDP) 是宫颈癌常用的化疗药物, 但因其肾毒性和耐药性等问题, 临床应用受到限制, 且研究证实单独使用顺铂临床有效性只有 20% ~ 40%。本研究旨在探讨单独使用和联合使用这两种药物对宫颈癌细胞株 (HeLa cell) 增殖和凋亡的影响, 是否具有协同作用, 进而改善 DDP 的用法, 减轻其不良反应, 最终为临床应用 4-HPR 治疗宫颈癌提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞培养与试剂

1.1.1 人宫颈癌细胞株 HeLa 购于中科院上海细胞所。培养液条件为 RPMI1640 + 10% 胎牛血清 + 双抗 (青霉素 100 IU/ml、链霉素 100 μg/ml), 于恒温细胞培养箱 (37 °C, 5% CO₂) 中培养。

1.1.2 试剂 4-HPR 购于 Sigma 公司, 用二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解配制成 10 mmol/L 的贮备液, -20 °C 保存。DDP 购于齐鲁制药公司, 用生理盐水溶解配制, 过滤除菌, 4 °C 保存备用。Hoechst 33258 凋亡检测试剂盒购自海门碧云天生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 MTT 方法检测 4-HPR 和 DDP 单用或 4-HPR 联合 DDP 对 HeLa 细胞增殖的影响

取对数生长期的 HeLa 细胞, 调密度至 2 × 10⁴/ml, 以每孔 200 μl 接种于 96 孔板, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养, 待细胞贴壁后弃去培养基, 每孔重新加入含不同 DDP 浓度的 RPMI1640 全培养液, 使终浓度分别为 0.5、1、2、5、10 和 20 μmol/L; 4-HPR 终浓度分别为 1、2、5、10、20 和 40 μmol/L; 联合用药组 DDP 浓度为 1 μmol/L, 4-HPR 浓度为 10、20 和 40 μmol/L。每一浓度设 6 个平行孔, 同时设无药对照组、生理盐水对照组和 DMSO 溶剂对照组, 无细胞培养液 1 孔 (调零孔)。37 °C, 5% CO₂ 培养箱继续培养, 加药 72 h 后, 取出培养板, 弃去培养基, 每孔加入 MTT (5 mg/ml) 20 μl, 37 °C 继续孵育 4 h, 吸弃培养液, 每孔加

入 DMSO 150 μl, 微量振荡器振荡 10 min, 全自动酶标仪检测其吸光度值 (A₄₉₀ 值)。按以下公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = \frac{\text{无药对照组 } A_{490} \text{ 值} - \text{试验组 } A_{490} \text{ 值}}{\text{无药对照组 } A_{490} \text{ 值}} \times 100\%$$

1.3 流式细胞仪检测凋亡和细胞周期

收集处于对数生长期的 HeLa 细胞, 调细胞密度为 1 × 10⁶, 每瓶 10 ml 接种于 200 ml 培养瓶中, 37 °C, 5% CO₂ 培养箱培养, 待细胞贴壁后弃去培养液, 按 1.2 的方法处理。DDP 浓度为 1 μmol/L, 4-HPR 浓度分别为 10、20 和 40 μmol/L, 联合用药组为 DDP 1 μmol/L 分别联合 10、20 和 40 μmol/L 的 4-HPR, 同时设无药对照组、生理盐水组和 DMSO 组, 处理 3 d 后收集细胞, 按试剂盒说明操作, 然后流式细胞仪进行检测, 每次计数 10 000 个细胞, 重复计数 3 次, 同时观察活细胞的周期分布情况。均设平行对照。用 ModFitLT V2.0 软件进行分析处理并用直方图形式列出。

1.4 Hoechst 染色法检测细胞凋亡

按 Hoechst 染色试剂盒说明进行操作, 分组情况同 1.3 方法, 按前述收集处于对数生长期的 HeLa 细胞, 调细胞密度 1 × 10⁶/ml, 接种于 6 孔板, 试验组设 2 个平行对照组, 处理 72 h 后, 吸尽培养液, 加入 0.5 ml 固定液固定 10 min; 去除固定液, 用 PBS 洗两遍, 每次 3 min, 洗涤时用脱色摇床晃动数次, 然后吸尽液体。加入 0.5 ml Hoechst 33258 染色液, 染色 5 min, 并用摇床晃动数次; 滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上盖玻片, 置荧光显微镜下观察。

1.5 统计方法 采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, α = 0.05 为检验水准, 结果取 3 次的平均值, 标准差小于 5%, 两组均数资料比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 肿瘤细胞形态学变化

2.1.1 倒置显微镜下观察 各组细胞培养 24 h 后培养液均清亮。①对照组: 细胞生长密集, 光泽度好; ②各加药组细胞密度均较对照组为低, 且光泽度下降。72 h 后镜下见: 对照组细胞已有重叠生长, 而



4-HPR 与 DDP 组细胞出现细胞凋亡的特征, 如细胞数减少, 稀疏, 肿胀变形, 细胞变小、变圆, 细胞核出现肿胀, 碎裂, 核固缩等, 细胞失去贴壁生长的特性, 并且随着药物浓度的升高, 此现象更加明显, 此种变化在两药联合作用时尤为明显。

的 HeLa 细胞, 经 Hoechst 33258 染色后, 荧光显微镜下可见各浓度组均见到细胞核致密浓染, 有的呈碎块状致密浓染, 折光性增强。各组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 联合用药组合单独用药组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)

2.1.2 荧光显微镜下观察 各组药物处理 72 h

2.2 对 HeLa 细胞的增殖影响

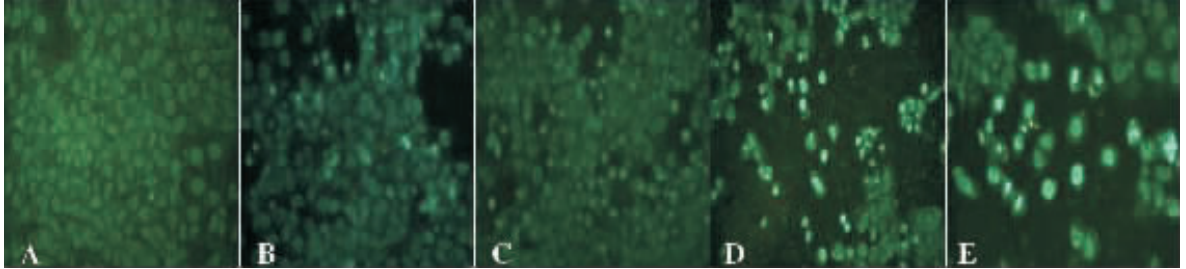


图 1 各用药组镜下细胞核的变化
Figure 1 The nuclear changes of the HeLa cells

2.2.1 DDP 对 HeLa 细胞的增殖的影响 从图 2, 3 可以看出, 在一定剂量范围内 DDP 对 HeLa 的生长抑制作用呈时间依赖性和剂量依赖性, 当浓度达到 $1 \mu\text{mol/L}$ 以上时, DDP 对 HeLa 细胞生长抑制作用较无药和低浓度组明显增强 ($P < 0.01$), 而 $1 \mu\text{mol/L}$ 以下的 DDP 对 HeLa 细胞生长抑制作用不明显。

2.2.2 4-HPR 对 HeLa 细胞的增殖的影响 从图 4、5 可以看出 4-HPR 对 HeLa 的生长抑制作用呈浓度依赖性和剂量依赖性, 当浓度达到 $10 \mu\text{mol/L}$ 以上时, 对 HeLa 细胞生长抑制作用较无药和低浓度组明显增强 ($P < 0.05$), $2 \mu\text{mol/L}$ 以下的时对 HeLa 细胞生长抑制作用不明显。

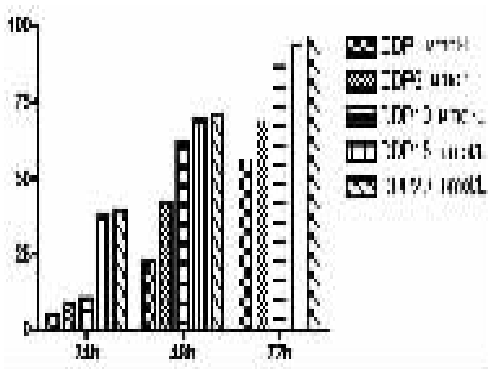


图 2 不同时间 DDP 对 HeLa 细胞增殖的影响
Figure 2 Effect of different time DDP on the Proliferation of HeLa cell

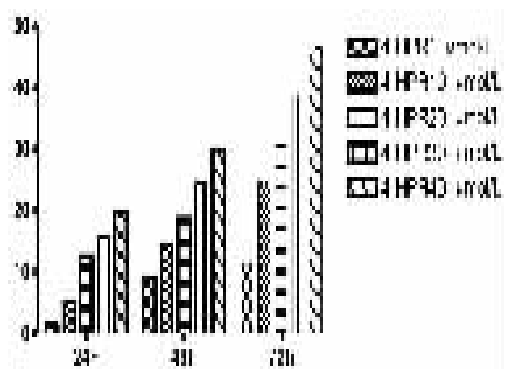


图 4 不同时间 4-HPR 处理不同时间对 HeLa 细胞增殖的影响
Figure 4 Effect of different concentration 4-HPR on the Proliferation of HeLa cell

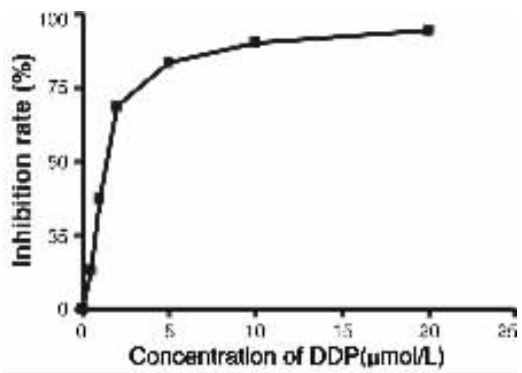


图 3 不同浓度 DDP 对 HeLa 细胞增殖的影响
Figure 3 Effect of different concentration DDP on the proliferation of HeLa cell

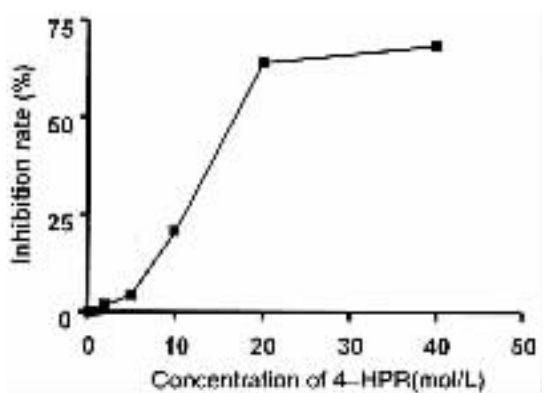


图 5 不同浓度 4-HPR 对 HeLa 细胞增殖的影响
Figure 5 Effect of different concentration 4-HPR on the proliferation of HeLa cell

2.2.3 4HPR 联合 DDP 对 HeLa 细胞增殖的影响

根据 DDP 对 HeLa 细胞增殖的影响, 从图 5 看出 DDP 浓度 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, 合用 4HPR (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 能显著抑制 HeLa 细胞的增殖, 两药呈现协同作用。并且两药合用时, HeLa 细胞的增殖抑制率随 4HPR 浓度增加而增加。

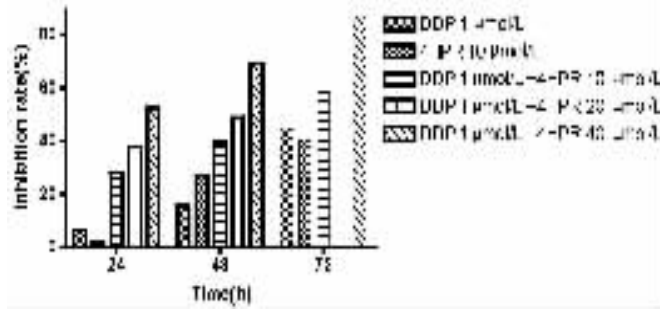


图 6 4HPR 联合 DDP 处理对 HeLa 细胞增殖的影响

Figure 6 Effect of 4HPR with DDP on the Proliferation of HeLa cell

2.3 4HPR 对 HeLa 细胞周期及凋亡的影响

正常生长的宫颈癌 HeLa 细胞绝大多数处于 G_0-G_1 期, G_2-M 期细胞和凋亡细胞仅占 6.05% 和 1.12%。 $1 \mu\text{mol/L}$ DDP 可使 HeLa 细胞凋亡率上升, G_0-G_1 期细胞下降, 而 G_2-M 期细胞明显上升, 与正常生长细胞相比差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。提示诱导肿瘤细胞凋亡, 将肿瘤细胞阻滞于 G_2-M 期可能是 DDP 抗肿瘤活性的重要形式之一。单用 4HPR 也可诱导 HeLa 细胞凋亡, 并将细胞阻滞于 G_2-M 期, 且 G_2-M 期细胞比率也随 4HPR 浓度的升高而增加。当以上 3 种浓度的 4HPR 与 $1 \mu\text{mol/L}$ DDP 联合作用时, 显示两药在诱导 HeLa 细胞凋亡上呈现协同作用 (表 1)。

表 1 4HPR 对 HeLa 细胞周期及凋亡的影响

Table 1 Effect of 4HPR with or without DDP on cell cycle and apoptosis of HeLa cell

Groups	Apoptosis ($\times 10^{-2}$)	G_0-G_1 ($\times 10^{-2}$)	S ($\times 10^{-2}$)	G_2-M ($\times 10^{-2}$)
Negative control	1.12	65.76	28.78	5.46
DDP 1 $\mu\text{mol/L}$	39.27	4.97	52.76	42.27
4HPR 10 $\mu\text{mol/L}$	2.55	6.24	27.73	66.03
20 $\mu\text{mol/L}$	16.55	3.29	23.96	72.75
40 $\mu\text{mol/L}$	22.91	7.67	16.24	76.10
DDP 1 $\mu\text{mol/L}$ + 4HPR 10 $\mu\text{mol/L}$	40.29	1.30	44.54	54.17
DDP 1 $\mu\text{mol/L}$ + 4HPR 20 $\mu\text{mol/L}$	56.58	5.17	25.78	69.05
DDP 1 $\mu\text{mol/L}$ + 4HPR 40 $\mu\text{mol/L}$	75.21	11.15	27.16	61.69

3 讨论

公认的宫颈癌的治疗模式是“放疗为主, 早期手术, 化疗无用”。随着宫颈癌发病的年轻化和腺癌比例增加, 患者对治疗后生活质量的要求更加提高, 使我们不得不将多年来公认的上述的宫颈癌的治疗模式提出质疑^[2]。

宫颈癌的化疗多以铂类为基础的联合化疗, 由于 4HPR 口服方便、血药浓度高、半衰期长、对正常细胞毒性低, 且同时兼有抗肿瘤活性和类似于化疗增敏的作用, 因而可作为临床治疗耐药和难治性宫颈癌的辅助药物之一, 4HPR 不同于 RA 的作用方式, 不受 RAR 受体配制途径的限制, 对 RAR 受体阳性或阴性和 RAR 受体突变的肿瘤细胞均具有显著的抗增殖作用, 其抗肿瘤作用与诱导细胞凋亡有关^[5]。在美国进行的二期试验中发现, 其抗癌效果显著, 长期应用无明显毒副作用^[6]。我们的研究表明 4HPR 主要通过诱导细胞凋亡而抑制宫颈癌细胞的生长。

本实验发现, 4HPR 处理的 HeLa 细胞与对照组相比, G_2-M 期和 S 期细胞比例明显增多, G_0-G_1 期细胞生长速度明显降低, 且此作用呈时间、剂量依赖性。结果证实, 4HPR 具有显著抑制 HeLa 细胞的增殖能力, HeLa 细胞对 4HPR 具有较强的药物敏感性。目前在临床上, 宫颈癌对化疗药物的敏感性较差, 而本实验结果提示, 4HPR 有可能成为治疗宫颈癌的有效药物。另外, 在联合用药方案中, 当 DDP 在较低浓度的情况下 ($1 \mu\text{mol/L}$), 与 4HPR 联合应用时, 抑瘤指数表现为显著增加, 凋亡率升高。本实验应用 MTT 法检测了 4HPR 合用 DDP 时对宫颈癌细胞增殖的影响, 结果发现, 当 DDP 浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ 时, 合用 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 4HPR, 各组均能有效抑制癌细胞增殖, 显示出两种药物的协同作用。提示对于耐受浓度的 DDP 加用 4HPR 能够发挥二者的协同效应, 起到类似化疗增敏的作用, 且应在机体最大耐受的剂量范内尽可能提高 DDP 和 4HPR 的剂量, 以充分发挥 4HPR 和 DDP 自身的抗肿瘤效应, 并利用二者的协同效应以提高抗肿瘤效果。

参考文献:

- [1] Hail NJ, Lotan R. Mitochondrial respiration is uniquely associated with the prooxidant and apoptotic effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide[J]. *Bio Chem*, 2001 276(49):45 614-45 621.
- [2] 曹泽毅. 子宫颈癌治疗的变迁和思考[J]. 现代妇产科进展[J], 2005, 14(1): 1-5.
- [3] Frei E. Clinical cancer research: an embattled species[J]. *Cancer*, 1982, 50 (10):1 979-1 992.
- [4] Shimada K, Nakamura M, Isida E, et al. Requirement of c-jun for testosterone-induced sensitization to N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis[J]. *Mol Carcinog*, 2003, 36(3): 115-122.
- [5] Takahashi N, Ohba T, Togashi S, et al. Biological activity of p-methyl-aminophenol, an essential structural component of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide, fenretinide[J]. *Biochem*, 2002, 132(5): 767-774.

