

# 全反式维甲酸诱导分化舌癌细胞株的实验研究

王安训<sup>1</sup>, 曾融生<sup>2</sup>, 丁学强<sup>1</sup>, 李 苏<sup>3</sup>, 邝珠玢<sup>3</sup>

(中山医科大学 1. 附属第一医院口腔科, 广东 广州 510080; 2. 光华口腔医院; 3. 肿瘤防治中心)

**摘 要:**【目的】研究维甲酸对舌癌细胞株的诱导分化作用。【方法】应用不同浓度( $10^{-9}$  mol/L~ $10^{-5}$  mol/L)全反式维甲酸体外处理人舌癌细胞株, ① 倒置显微镜下观察细胞的生长状态、计数活细胞并描绘细胞生长曲线, ② 透射电镜观察细胞超微结构的改变, ③ 应用<sup>3</sup>H-TdR 掺入试验测定 DNA 合成能力。【结果】经维甲酸处理后, 倒置显微镜下可见癌细胞生长速度减慢, 群体倍增时间延长, 并与浓度成正比; 细胞形态趋向良性分化, 胞质内成熟细胞器增多, 出现较多张力纤维; <sup>3</sup>H-TdR 掺入率明显降低, 抑制率为 23%~62%, 与对照组相比, 具有显著性差异。【结论】以上结果表明全反式维甲酸对舌癌细胞株有一定的诱导分化作用。

关键词: 舌肿瘤/药物疗法; 维甲酸/类似物和衍生物; 维甲酸/治疗应用

中图分类号: R739.86 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)01-0017-04

## The Differentiation-inducing Effect of All-trans Retinoic Acid on Human Tongue Carcinoma Cell Line *in vitro*

WANG An-xun<sup>1</sup>, ZENG Rong-sheng<sup>2</sup>, DING Xue-qiang<sup>1</sup>, Li Su<sup>3</sup>, KUANG Zhu-ji<sup>3</sup>

(1. Department of Stomatology, First Affiliated Hospital, 2. Guanghua Stomatological Hospital, 3. Tumor Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080, China)

**Abstract:**【Objective】To determine the effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on human tongue carcinoma. 【Methods】Using variant concentration of ATRA ( $10^{-9}$  mol/L~ $10^{-5}$  mol/L) process human tongue carcinoma: ① To observe the cellular growth status under phase contrast microscope and describe the growing curve; ② To observe the morphological alteration under transmissional electron microscope; ③ To determine the DNA synthesis ability by <sup>3</sup>H-TdR incorporation test. 【Result】After treated with ATRA, the tongue carcinoma cell line had the following changes: ① The cellular growth rate obviously fell and the group doubling time prolonged; ② A series of cell morphological changes was observed, such as more tonofilaments and more well-differentiated organelle in experimental groups than in the controls; ③ The <sup>3</sup>H-TdR incorporation rate was obviously dropped and the inhibition rate was 23%~62%, there were significant changes after treated with ATRA. 【Conclusions】ATRA has certain differentiation-inducing effects on human tongue carcinoma cell line.

**Key words:** tongue neoplasm/drug therapy; retinoids/analogs & derivatives; retinoids/therapeutic use

诱导分化治疗是肿瘤化学治疗的一个新领域, 它应用化学药物诱导肿瘤细胞分化并逆转其增殖、浸润、转移等恶性表型, 使其成为正常或接近正常

细胞, 从而达到治疗的目的<sup>[1]</sup>。维甲酸类化合物对肿瘤细胞具有抑制增殖和诱导分化的作用, 全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是迄今为止研

收稿日期: 1998-11-23

作者简介: 王安训(1970-), 男, 福建人, 在职博士生(现在中山医科大学孙逸仙纪念医院口腔科)。

究最为深入、作用最强的分化诱导剂之一<sup>[4]</sup>,它在治疗人急性早幼粒细胞白血病方面取得了惊人的治疗效果,临床缓解率高达 85%~90%;在诱导分化其它恶性肿瘤方面的研究,如宫颈癌、胃癌、肺癌等,也取得良好的效果;但在口腔鳞状细胞癌方面的研究仍较少,国内仍未见报道。本文应用不同浓度全反式维甲酸诱导人舌癌细胞株,分别从细胞增殖动力学、形态学等方面观察其对细胞株的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株和药物

人舌癌细胞株 Tca8113 由上海第二医科大学何荣根教授提供,细胞株复苏后在 150 mL/L 的灭活小牛血清、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 RPMI1640 培养液,37 °C 恒温密闭式培养。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)购自 Sigma 公司,使用前用无水乙醇配成  $1 \times 10^{-5}$  mol/L,再用培养液配制所需的终浓度,其中无水乙醇的终浓度  $\leq 1\%$  体积分数下同,所需操作均应避光。

### 1.2 细胞生长曲线的测定

取对数生长期细胞,经胰酶消化离心后配制成细胞终浓度为  $10^8$  个/L,其中实验组加入全反式维甲酸(共 3 组),终浓度分别为  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  mol/L;对照组未加入 ATRA,但含  $\leq 1\%$  无水乙醇。

用药后第 1~7 天,逐日取实验组和对照组各 3 瓶,于倒置显微镜下观察细胞生长状态,然后消化离心收集细胞,台盼蓝染色后于血球计数板下计活、死细胞数,每组活细胞数计算平均值,绘制生长曲线,计算生长速率( $K = (\ln N_2 - \ln N_1) / t$ ,  $N_1$  和群体倍增时间( $T_d = \ln 2 / K$ )).  $N_{t1}$ :  $t_1$  时刻的细胞数;  $N_{t2}$ :  $t_2$  时刻的细胞数;  $t = t_2 - t_1$ 。

### 1.3 透射电镜观察

收集经  $10^{-5}$  mol/L ATRA 处理 6 d 后的舌癌细胞株和未经药物处理的舌癌细胞,胰酶消化离心后,经 20 mL/L 戊二醛和 10 g/L 锇酸水溶液先后 2 次固定,乙醇梯度脱水,包埋、超薄切片,经双染色透射电镜观察摄片,比较两组间细胞形态的改变。

### 1.4 $^3\text{H-TdR}$ 掺入试验

取对数生长期细胞,胰酶消化离心,制备成细胞浓度为  $2.5 \times 10^4$  个/L,接种于 96 孔板,每孔 0.2

mL,每组 3 孔,共 21 孔,孵育 24 h 后,换含不同浓度的药液 0.2 mL(空白,1%乙醇,  $10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L ATRA),再孵育 60 h 后,每一孔加入  $^3\text{H-TdR}$   $1.85 \times 10^4$  Bq,温育 6 h,用多头细胞收集器将细胞抽滤于玻璃纤维滤纸上,烘干后置闪烁杯内,加入 5 mL 闪烁液,Bechman 800 型闪烁仪测定其放射强度,计算各抑制率。应用方差分析法检测各实验组与对照组之间是否存在差异。

## 2 结果

### 2.1 ATRA 对细胞生长状态的影响

倒置显微镜下:对照组, Tca8113 细胞生长良好,均匀分布,细胞为均一的多角形上皮样细胞,镶嵌状排列,可见较多多核巨细胞和核分裂相,胞浆色淡,空泡多呈泡沫状;各实验组中,细胞生长明显被抑制,生长缓慢,分布不均匀,细胞趋于圆形,圆形细胞较对照组多,细胞分布较零散,多核巨细胞和核分裂细胞少见(图 1)。台盼蓝染色未见死亡细胞。细胞生长曲线如图 2。按 ATRA 终浓度由低到高( $0$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L)其生长速率分别为 0.3824、0.3658、0.3283、0.3087,群体倍增时间分别为 43.5 h、45.5 h、50.7 h、53.9 h。由此可见,ATRA 抑制了生长速率,延长了群体倍增时间,且与浓度成正比。

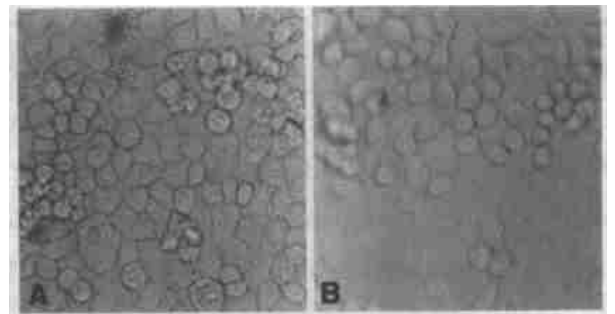


图 1 倒置显微镜下,经 ATRA 处理后 Tca8113 细胞形态的变化

Fig. 1 Morphological alteration of Tca8113 cells in the presence of ATRA under phase contrast microscope

A: untreated; B: treated with  $10^{-5}$  mol/L ATRA for 4 days  $\times 200$

### 2.2 ATRA 对细胞超微结构的影响

透射电镜可见,对照组 Tca8113 细胞核大而不规则,核仁多,核膜凹陷,胞浆内有较多的游离核糖

体, 张力原纤维少见; 实验组核较小, 开始变光滑, 无切迹, 出现单个核仁, 胞质内出现较多的张力原纤维, 细胞器增多(图3)。

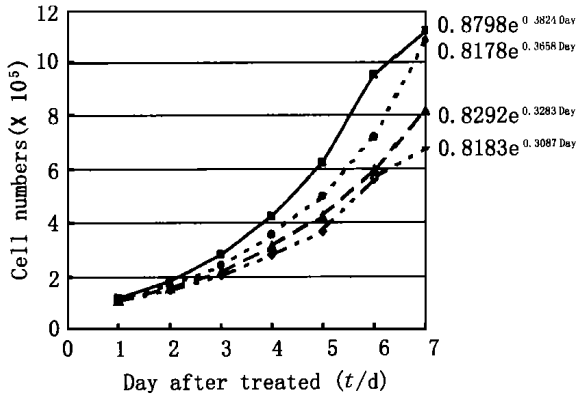
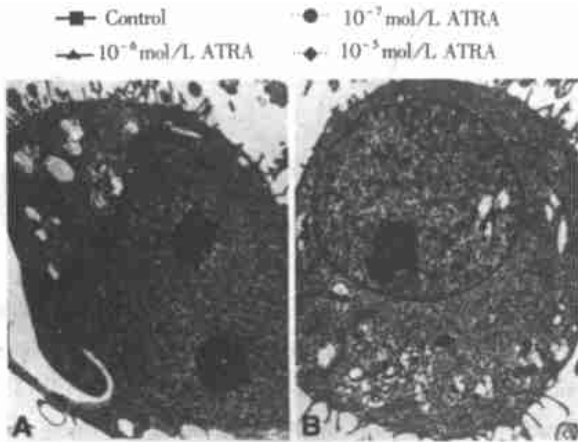


图2 不同浓度维甲酸对 Tca8113 细胞生长的影响

Fig. 2 Effect of variant concentration of ATRA on the growth of Tca8113 cells *in vitro*



A. Untreated(×6000) B. Treated with 10<sup>-5</sup> mol/L ATRA for 6 days(×6000)

图3 透射电镜下, 经 ATRA 处理后 Tca8113 细胞形态的变化

Fig. 3 Morphological alteration of Tca8113 cells in the presence of ATRA under transmission electric microscope

### 2.3 ATRA 对舌癌细胞 DNA 合成能力的影响

<sup>3</sup>H-TdR 掺入试验显示(表 1): 各组 *cpm* (counts per minute, 计数率)值见表 1, 经方差分析, 各 ATRA 处理组与 1%无水乙醇组相比存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 1%无水乙醇组与空白对照组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。该结果表明 1%无水乙醇对舌癌细胞 DNA 合成的影响较少, 不足以影响实验结果; ATRA 可显著抑制 Tca8113 细胞 DNA 的合成。表 1 还发现随 ATRA 浓度增加, <sup>3</sup>H-TdR 掺入降低。

以 1%无水乙醇组为对照, 各 ATRA 处理组(10<sup>-9</sup> ~ 10<sup>-5</sup> mol/L)的抑制率为 23% ~ 62%。

表 1 不同浓度维甲酸对 Tca8113 细胞<sup>3</sup>H-TdR 掺入率的影响

Table 1 Effect of variant concentration of ATRA on the <sup>3</sup>H-TdR incorporation rate of Tca8113 cells *in vitro*

Group	<i>n</i>	<i>cpm</i>	Inhibition rate (%)
Controls	3	6 681 ± 140	—
1% ethanol	3	5 958 ± 377	—
10 <sup>-9</sup> mol/L ATRA	3	4 619 ± 540 <sup>1)</sup>	23 ± 4
10 <sup>-8</sup> mol/L ATRA	3	3 661 ± 416 <sup>1)</sup>	38 ± 11
10 <sup>-7</sup> mol/L ATRA	3	2 962 ± 468 <sup>1)</sup>	50 ± 5
10 <sup>-6</sup> mol/L ATRA	3	2 747 ± 441 <sup>1)</sup>	54 ± 4
10 <sup>-5</sup> mol/L ATRA	3	2 302 ± 474 <sup>1)</sup>	62 ± 6

1) Compared with 1% ethanol group by ANOVA,  $P < 0.01$

### 3 讨论

恶性肿瘤是细胞过度增殖和异常分化的结果。维甲酸类化合物有良好的诱导分化剂。许多研究表明<sup>1, 2</sup>, 它对多种恶性肿瘤细胞均有较好的诱导分化和增殖抑制作用, 如急性早幼粒细胞白血病、肺癌、胃癌等。目前对维甲酸诱导分化治疗恶性肿瘤的机理已有较为深入的研究<sup>3, 4</sup>, 它主要通过诱导核维甲酸受体的表达而起作用, 同时也可通过抑制异常角化、调节癌基因和抑癌基因而起作用。

细胞无限制的快速生长繁殖是恶性肿瘤的特征之一。本研究发经全反式维甲酸(ATRA)处理后舌癌细胞株生长速率减慢, 群体倍增时间延长, 且与浓度成正比。由此可见, ATRA 可抑制舌癌细胞株的分裂生长, 改变细胞增殖动力学, 降低舌癌细胞株的恶性程度。肿瘤细胞常表现为分化不良或未分化, 诱导分化治疗是应用化学药物诱导肿瘤细胞分化, 细胞分化包括形态分化和功能分化, 分化的标志是细胞形态学上的分化成熟, 在透射电镜下经 ATRA 处理后舌癌细胞胞浆中细胞器增多且分化成熟, 出现较多张力纤维、核变小、无切迹, 也即经 ATRA 作用后舌癌细胞形态趋向良性分化, 但未能完全分化成熟。由此可见, ATRA 对 Tca8113 细胞有一定的诱导分化作用, 但还不够理想。本实验还发现 ATRA 可抑制舌癌细胞 DNA 的合成能力。<sup>3</sup>H-TdR 掺入实验显示经 ATRA 处理后 Tca8113 细

胞<sup>3</sup>H-TdR 掺入降低, 也即 DNA 合成降低, 各 ATRA 处理组的抑制率为 23%~62%, 且随浓度增加抑制率升高; 经方差分析各 ATRA 处理组与 1% 无水乙醇组之间存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 即 ATRA 可明显抑制 DNA 的合成, 从而使细胞生长速度减慢。

综上所述, 在全反式维甲酸作用下, 舌癌细胞株生长速度减慢, 细胞形态出现一定分化, DNA 合成能力下降。该结果显示舌癌细胞有分化迹象, 细胞恶性表型发生良性逆转。因此可认为全反式维甲酸对体外培养的 Tca8113 细胞具有一定的诱导分化作用, 利用诱导分化剂来防治舌癌是值得进一步探索的新途径。但全反式维甲酸并不能使舌癌细胞在体外完全逆转其恶性表型, 应继续寻求新的诱导分化剂并进一步探讨诱导分化的机制。目前已有有人开始联合其它诱导分化剂或细胞因子来增

强维甲酸的诱导分化作用, 同时减少维甲酸最低有效剂量<sup>[2]</sup>。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Bollag W, Holdenmer E E. Retinoids in cancer prevention and therapy[ J ] . Ann Oncol, 1992, 3(7): 513.
- [ 2 ] Malcolm A, David R, Bruce D, *et al* . Retinoids in cancer therapy[ J ] . J Clin Oncol, 1992, 10(5): 839.
- [ 3 ] Lutan R. Suppression of squamous cell carcinoma growth and differentiation by retinoids[ J ] . Cancer Res, 1994, 54(1): 1987s.
- [ 4 ] Mikael B, Philip F, Beverly A, *et al* . Retinoic acid regulates oral epithelial differentiation by two mechanisms[ J ] . J Invest Dermatol, 1995, 104(4): 546.

(编辑 刘清海)

(上接第 16 页)

UPA 系统与肺癌的转移密切相关, 调节这些分子功能是抗癌治疗, 抑制癌细胞扩散的基础。

(本文图见插页 2)

#### 参考文献:

- [ 1 ] Heiss M M, Babic R, Algayar H, *et al* . Tumor-associated proteolysis and Prognosis: new functional, risk factor in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system[ J ] . J Clin Oncol, 1995; 13(8): 2084.
- [ 2 ] Duffy M J, Reilly D, O' Sullivan C, *et al* . Urokinase-plasminogen activator: a new and independent prognostic marker in breast cancer[ J ] . Cancer Res, 1990; 50(21): 6827.
- [ 3 ] Andreasen P A, Kjoller L, Christensen L, *et al* . The Urokinase-type plasminogen-activator system in cancer metastasis;

a review, Int J Cancer, 1997, 72(1): 1.

- [ 4 ] Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, *et al* . The plasminogen activation system i e plasminogen activator and 2 inhibitors PAI-1 and PAI-2 in breast carcinoma[ J ] . Bull Cancer, 1994, 81(9): 770.
- [ 7 ] Takeuchi Y, Nakao A, Harada A, *et al* . Expression of plasminogen activators and their inhibitors in human Pancreatic carcinoma; immunohistochemical study[ J ] . Am J Gastroenterol, 1993, 88(11): 1928.
- [ 8 ] Del V S, Stoppelli M P, Carriero M V, *et al* . Human urokinase receptor concentration in malignant and benign breast tumors by in vitro quantitative autoradiography: comparison with urokinase levels [ J ] . Cancer Res, 1993, 53(13): 3198.

(编辑 黄小延)