

维甲类对食管上皮癌细胞系(RE25-3) 恶性的抑制作用

何为民 蔡海英

(肿瘤研究所 实验肿瘤室)

提 要 体外应用RE25-3食管癌细胞系观察了三种维甲类——维甲酸、维胺酯及维胺酸的作用。三种维甲均使细胞的分裂增殖受到抑制, 3H-TdR 掺入到 DNA 中减少。染色体数目减少, 甚至转化过程中丧失的二倍体重又出现。此外还使细胞的集落形成能力受抑。三者中以维胺酸作用最强; 维胺酯与维甲酸相近。

关键词 维甲类 生长曲线 分裂指数 染色体畸变

肿瘤预防已成为肿瘤研究的重要方向。其中用能逆转或抑制癌前改变的物质进行化学预防尤为重要。过去对维甲类的这种作用已有较多的研究^[1], 但体外实验多以纤维细胞为靶细胞, 不能真正反映上皮细胞对维甲类作用的反应。本实验从细胞的分裂增殖, DNA 合成, 染色体改变及集落形成等方面观察了维甲类对大鼠食管癌细胞系的作用。

材料与方 法

一、细胞培养 Wistar 大鼠食管上皮恶性转化细胞系(RE25-3)。取25代细胞进行实验。细胞培养参考文献2。

二、维甲类及药液配制 1. 维甲酸(RA); 2. 维胺酯(RI); 3. 维胺酸(RII); 分别由辽宁锦州制药厂及上海第六制药厂提供。黄色或橙色针状结晶。避光称取维甲类, 加二甲亚砜(DMSO)溶解, 新鲜培养液稀释后, 4℃冰箱内保存, 所配药液贮存时间不超过一周, DMSO浓度为0.5%。

三、氚-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR) 放射比度20μCi/mM, 上海原子能研究所生产。

四、琼脂(Agar) 美国Sigma产品。称取琼脂粉, 双蒸水中拌洗, 滤去上清液后入瓶中, 加三蒸水高温高压消毒30分钟。此琼脂(2.5%)4℃保存。

五、分裂指数 细胞接种于有盖玻片的培养瓶内, 培养24小时后加维甲, 于加药后24、48、72、96及120小时各取盖玻片, 10%甲醛固定, HE染色, 高倍镜计数分裂相, 每组计数2000个细胞, 以千分率表示。

六、生长曲线 接种细胞, 培养48小时后更换培养液并加维甲, 作用24小时后再除去维甲。于去维甲后24、72及120小时各取细胞计数, 每组取三瓶的平均值。

七、DNA合成——³H-TdR掺入实验 接种细胞, 培养24小时后加维甲类及³H-TdR(浓度为0.1μCi/ml)。于加³H-TdR后12、17及24小时分别在负压吸引下将细胞收集于49型滤纸上, 生理盐水洗去游离的³H-TdR, 5%三氯醋酸沉淀蛋白, 无水乙醇脱水固定。滤纸烤干, 加液闪液后测定cpm值, 取3瓶的平均值。

八、染色体分析 接种细胞, 培养17小时后加维甲, 继续培养24小时, 加秋水仙素(终浓度0.1μg/ml)。4小时后按常规方法制备染色体标本。Giemsa染色, 油镜下观察染色体数目与结构的改变, 每组观察100个中期板。

九、琼脂平板集落形成实验 将贮存琼脂与含维甲培养液配制成琼脂平板(维甲类浓度 $1.7 \times 10^{-6} M$)将单个细胞接种于此平板上, 密度 $1.0 \times 10^4 / 0.2 ml / 瓶$, 37℃培养, 48小时

后翻转培养瓶。10天后观察阳性集落数，取两瓶的平均值。

结 果

一、维甲类对细胞分裂增殖的影响

1. 分裂指数 结果见表1。对照组细胞于接种后分裂相渐增加，96小时后达高峰，其后便迅速降低。维甲类作用后24小时便使细胞分裂受抑。其中维胺酯及维甲酸作用较温和，而维胺酸作用后，抑制越来越强。但维胺酸作用于细胞48小时后，细胞便开始脱落。

表1 维甲类对RE25—3细胞分裂指数的影响

时间 (小时)	分裂指数 (%)			
	对照	维甲酸 ^a	维胺酯 ^b	维胺酸 ^a
24	24	10.5	16	8
48	26.5	16	18	3.5
72	34	13	20	2.5
96	45	22	27	2.5
120	16	8	11	1

a. 与对照组比较 P<0.01 b. P<0.05

2. 生长曲线 表2显示了维甲类对RE25—3细胞群体增殖的影响。维甲类作用仅24小时即出现细胞增殖受抑。其中，维胺酸作用可持续5天左右，而维胺酯及维甲酸的作用较短，去除后24小时细胞生长速率便恢复。

表2 维甲类对RE25—3细胞群体增殖的影响

时间 (小时)	细胞数 (万瓶)			
	对照	维甲酸	维胺酯	维胺酸*
24	57.5	42.2	46	15.8
72	90.7	73.9	83.4	16.1
120	100.4	80.3	84.1	30.6

* P<0.01

二、维甲类对RE25—3细胞DNA合成的影响

维甲类能抑制³H-TdR掺入到DNA中(表3)。抑制作用仍以维胺酸为强，平均抑制率达50%，维胺酯及维甲酸则抑制作用较

弱。

表3 维甲类对RE25—3细胞DNA合成的影响

时间 (小时)	CPM值/5.0×10 ⁵ 细胞			
	对照	维甲酸	维胺酯 ^a	维胺酸 ^b
12	39159	36400	31843	19815
17	48542.7	42717	32155	25045.7
24	47541	39420	34333	22505

^a与对照组比较 P<0.05 ^b P<0.01

三、维甲类对染色体的影响

1. 结构畸变 RE25—3细胞自发染色体结

表4 维甲类对RE25—3细胞染色体数目的影响

染色体 倍体数	百分率 (%)		
	对照	维甲酸	维胺酯
2n ⁻		7	6
2n		3	7
2n ⁺ ~4n ⁻	25	31	26
4n	39	44	40
4n ⁺ ~6n ⁻	7	7	12
6n	7	1	3
6n ⁺ ~8n ⁻	5	1	3
8n	8	4	1
>8n	8	3	2

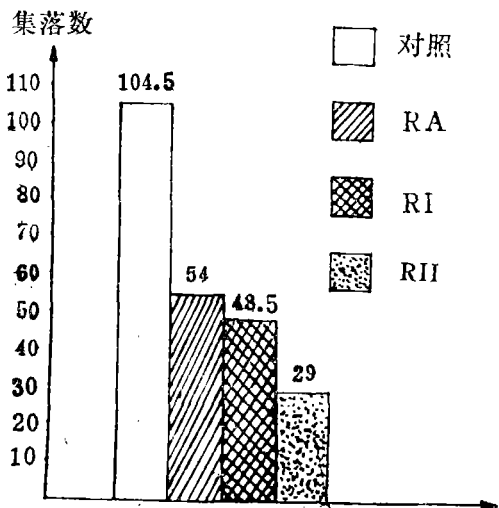


图1 维甲类对RE25—3细胞集落形成的影响

构畸变率为 2%。维甲酸及维胺酯处理细胞未见染色体结构畸变。

2. 染色体数目异常 表 4 显示了维甲类对 RE25-3 细胞染色体数目的影响。对照组细胞以四倍体细胞为干系 (39%)。其余细胞大部分在超二倍体至亚四倍体范围内 (25%)，维甲酸、维胺酯作用后，干系仍为四倍体细胞 (分别为 14% 和 40%)，但染色体数目减少，高异倍体细胞向低异倍体细胞转变。六倍体、八倍体细胞比例均减少，而出现了二倍体细胞及单倍体细胞。

四、维甲类对 RE25-3 细胞琼脂平板集落形成的抑制作用 维甲类明显抑制了细胞的集落形成，抑制率分别为 R II 72%；R I 54%；RA 48%。

讨 论

虽然人们已从多种途径进行肿瘤预防，如阻断致癌物的内合成，阻止致癌物到达靶器官或与靶器官发生反应以及作用于已接触了致癌物的细胞，使细胞的恶性表达受抑制或使癌前逆转。然而，由于环境中致癌物的形成、存在、机体的接触及体内代谢等均十分复杂，故病因预防存在很大的困难，目前仍以阻断及逆转癌前改变为较佳途径。

过去较多的实验已证实了维甲类对癌前改变的抑制或逆转作用^[1]。近年来在实验动物及人类肿瘤的应用证明维甲类尚有一定的抗癌作用^[3,4]。体外使肿瘤细胞的生长受抑，分化潜能增强^[5]，且为非细胞毒作用。但抑制作用与维甲类的种类，剂量及细胞种类有关。Lotan^[5]观察了维甲酸对多个恶性细胞株增殖的影响，大多数细胞生长受抑，但非常相似的组织病理类型的细胞株对维甲酸可以出现不同的反应，甚至生长受到促进。王瑞珍^[6]报道国产 24 个新维甲酸衍生物对 Eca109 细胞亦表现为不同程度的抑制或促进作用。本文结果表明，维甲酸、维胺酯及维胺酸对 RE25-3 细胞的分裂增殖，DNA 合成有明显的抑制作用，与王瑞珍报道的结果及动物体内实验结果^[3]均一致。

RE25-3 细胞在体外恶性转化过程中已丧失了正常二倍体细胞 ($n=2i$)。而向多倍体及不整倍体发展。分布极分散。本实验中，经分析 RE25-3 细胞的染色体数目，发现四倍体细胞形成干系，其余部分多位于超二倍体至亚四倍体范围内。维甲酸及维胺酯作用后，细胞染色体数目减少，高多倍体及不整倍体向低异倍体方向发展，甚至出现了二倍体细胞及单倍体细胞，这提示维甲酸和维胺酯使 RE25-3 细胞恶性降低，部分细胞恢复为二倍体正常细胞。

RE25-3 细胞有较强的集落形成能力，接种于琼脂平板后 11 天，集落形成率达 1.05%，维甲酸及其衍生物使细胞的集落形成受抑。Stocker^[7]认为琼脂平板集落形成是细胞丧失依赖性的结果，因此反映了细胞的恶性程度的大小。维甲抑制细胞的集落形成，应是对细胞恶性抑制的结果。

维甲类体外抑制细胞恶性的机理尚未明。过去的实验结果提示与以下几点有关：1. 抑制细胞的增生分裂及 DNA 合成、促进细胞的分化^[8]；2. 对细胞表面糖蛋白、糖脂等大分子生物合成的影响^[9]；3. 使细胞膜及其他膜结构如溶酶体膜不稳定化，细胞内容外漏或溶膜体水解酶的释放，使细胞死亡^[10]；4. 对基因表达的影响：维甲类与维甲酸结合蛋白结合后进入细胞核，与染色体结合，控制基因的表达^[11]。本实验结果提示维甲类确实是通过抑制细胞的增殖与 DNA 合成，促进细胞的分化而降低细胞恶性的。其分子生物学基础是否与抑制基因表达有关有待进一步研究。

杜丛之^[12]在动物毒性实验中发现维胺酸能导致肝组织损伤与脂肪变性，而剂量高出一倍的维胺酯则无明显毒性。本实验中维胺酸导致细胞的大量脱落可能与其毒性有关。长期使用时应注意其不良副作用。

参 考 文 献

- [1] Lotan R. Effects of Vitamin and its Analogs (Retinoids) on Normal and Neoplastic Cells. *Biochem. Biophys. Acta* 1980;605:33.

- [2] 蔡海英, 等: 大鼠食管癌前上皮的恶性转化及其生物学特性——RE25-3食管上皮癌细胞系的建立. 中华肿瘤杂志 (1988待发表)
- [3] 蔡海英, 等. 新维甲酸衍生物抑制小鼠前胃鳞状上皮癌变的研究. 药学学报 1981; 16: 648.
- [4] Levine N and Meyskens F. Topical Vitamin A Acid Therapy For Cutaneous Metastatic Melanoma. The Lancet 1980; I(8188):224.
- [5] Lotan R. Different Susceptibility of Human Melanoma and Breast Carcinoma Cell Line to Retinoic Acid-Induced Growth Inhibition.
- [6] 王瑞珍, 等. 24个新维甲酸衍生物对人食管癌细胞株克隆Ⅱ (Eca109-Ⅱ) 增殖的影响 中华肿瘤杂志 1983; 5:243.
- [7] Stocker M. et al. Anchorage and growth Regulation in Normal and Virus-transformed Cells. Int. J. Cancer 1968; 3:683.
- [8] Linder S. et al. Retinoic Acid-Induced Differentiation of S9 Embryonal Carcinoma Cells. Exp. Cell Res. 1981; 132:453.
- [9] Sasak W. et al. Effect of Retinoic Acid on Cell Surface Glycopeptides of Cultured Spontaneously Transformed Mouse Fibroblasts (BALB/C 3T12-3 Cells). Cancer Res. 1980; 40:1944.
- [10] Matter A. and Bollag W. A Fine Structure Study on the Therapeutic Effect on An Aromatic Retinoid on Chemically induced skin Papillomas of the Mouse. Eur. J. Cancer 1977; 13:831.
- [11] Thiele C J et al. Decreased Expression of N-myc precedes Retinoic Acid Induced morphological Differentiation of Human Neuroblastoma. Nature 1985; 314:404.
- [12] 杜丛之, 等. N-(4-乙氧羰基苯基) 维生素甲酰胺与维生素甲衍生物的毒性比较. 药学学报 1982; 17:331.

Inhibitory Effect of Retinoids on the Malignancy of Transformed Esophageal Epithelial Cell Line RE25-3

Ho Weiming Cai Haiying

(Department of Experimental oncology, Cancer Institute)

Abstract

The effects of three retinoids, all-trans-retinoic acid (RA), N-(4-ethoxycarbonylphenyl) retinamide (R I) and N-(4-carboxylphenyl) retinamide (R II) were studied on RE25-3 esophageal carcinoma cell line *in vitro*. All RA, R I and R II inhibited the mitosis and proliferation of the cells, with the effect of R II to inhibit multiplication of cells being able to last for 5 days after only 24 hour action on the cells, but that of RA and R I much weaker. They also inhibited the incorporation of ³H-Thymidine into DNA. Chromosomal analysis showed that retinoids decreased the number of chromosome, among which some euploid cells which had been lost in the process of transformation could be observed. The ability of colony formation on agar plate was also retarded by retinoids. The inhibitory rate of R II, R I and RA were 72%, 54%, and 48%, respectively. All these results indicated that these three retinoids were able to inhibit the malignancy of RE25-3 cells and enhance the differentiation of cells. R II seems to have some toxic effect to the cells. The mechanisms of action of retinoids were discussed.

Key words: Retinoids Growing curve Mitotic index; Chromosome aberration