

· 研究简报 · 文章编号 1000-2790(2007)24-封2-01

全反式维甲酸对异位子宫内膜间质细胞 GJIC 功能的调节作用

刘志能, 姚紫薇, 唐良菝, 卞度宏

(重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

【关键词】全反式维甲酸; 间隙连接细胞间通讯; 子宫内膜异位症; 荧光漂白恢复技术

【中图分类号】R711.71 【文献标识码】A

0 引言 间隙连接细胞间通讯(gap junctional intercellular communication, GJIC)是多细胞生物体内最普遍的通讯方式。人子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)异位内膜间质细胞的 GJIC 功能缺陷, 与 EMs 的发病密切相关^[1-2]。已有研究发现全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)可上调某些肿瘤细胞的 GJIC 功能, 但有关 ATRA 调节异位内膜间质细胞 GJIC 功能的报道较少。我们建立异位内膜间质细胞的体外模型, 采用荧光漂白后恢复技术检测 ATRA 对异位子宫内膜间质细胞 GJIC 功能的调节作用, 以探讨 ATRA 用于 EMs 治疗的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料 雌二醇(17 β -Estradiol), 孕激素(progesterone)和 ATRA(美国 Sigma 公司); 二醋酸羧基荧光素(美国 BioChemika 公司); SP5 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司)。选取重庆医科大学附属第一医院 2006-02/2007-01 手术治疗的 EMs(卵巢巧克力囊肿)患者 24 例, 平均年龄(35.80 \pm 3.27)岁。所有病例无内外科疾病, 术前 6 mo 未接受激素治疗, 均经开腹手术及术后病理确诊。采取标本均得到患者同意, 并签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 间质细胞的分离纯化培养 标本处理及间质细胞的分离、纯化参照文献[1]的方法进行。并按文献[3]的方法进行低温冻存, 供分批实验用。细胞复苏后按 5×10^4 密度接种在 20 mm 直径的圆形玻片上, 并加入生理剂量雌二醇和孕激素(终浓度分别为 170, 200 pg/mL), 放入 50 mL/L CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养箱中, 单层贴壁培养 3 d 后再作下述分组干预实验。

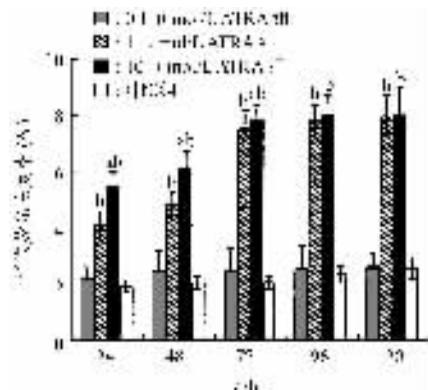
1.2.2 细胞处理 将上述贴壁培养的单层细胞分为高、中、低浓度处理组(ATRA 终浓度为 10, 1 和 0.1 μ mol/L), 每组分别经 ATRA 处理 24, 48, 72, 96 和 120 h, 同时设空白对照组。

1.2.3 细胞 GJIC 功能检测 在共聚焦显微镜下采用荧光漂白后恢复技术, 每组检测间质细胞 50 个。实验中选择三种细胞: ① 周围与其它细胞紧密连接, 需激光淬灭的漂白细胞; ② 孤立于其它细胞, 也需激光淬灭的对照细胞; ③ 周围与其它细胞紧密连接的, 但不需要激光淬灭的细胞, 用于背景校正。监测三种细胞 4 min, 获取漂白前、漂白后及漂白后不同时间点的各次扫描图像。仪器参数设置参照厂商说明书。数据及荧光漂白后恢复率由 quantify 自动程序获得。

统计学处理: 数据采用 SAS 9.0 统计软件包处理, 计量资

料的数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用析因设计的方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果 经 ATRA 处理 24 ~ 72 h 后, 中、高浓度处理组异位内膜间质细胞的 GJIC 功能不断增强, 且高浓度处理组细胞的 GJIC 功能高于中浓度处理组, 差异具有统计学意义(P < 0.05)。处理 96 ~ 120 h 后, 两组间的差异无统计学意义(P > 0.05)。中、高浓度处理组细胞的 GJIC 功能显著高于同时段的低浓度处理组和对照组, 差异具有统计学意义(P < 0.01)。低浓度处理组和对照组间质细胞的 GJIC 功能在不同时段均未见明显变化, 两组间的差异亦无统计学意义(P > 0.05, 图 1)。



*P < 0.05 vs 1 μ mol/L ATRA 处理组, ^bP < 0.01 vs 0.1 μ mol/L ATRA 处理组及对照组。

图 1 不同浓度 ATRA 对异位内膜间质细胞 GJIC 功能的影响

3 讨论 GJIC 已成为近年来研究的热点。正常的 GJIC 功能涉及胚胎植入、分娩发动、滋养层细胞融合与分化等诸多重要生理环节^[4]。在宫颈癌、子宫内膜癌、子宫平滑肌肉瘤等妇科肿瘤中均存在 GJIC 功能异常, 上调其 GJIC 功能, 可有效抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭、种植及转移, 甚至恢复其来源细胞的良性表型^[5]。我们的研究结果显示, 浓度为 1 μ mol/L, 10 μ mol/L 的 ATRA 均能有效提高异位内膜间质细胞的 GJIC 功能, 而 0.1 μ mol/L ATRA 无类似作用, 提示 ATRA 发挥其效应需达一定的阈值浓度。EMs 异位内膜细胞与肿瘤细胞有相似性, 我们的前期工作也证实异位内膜间质细胞的 GJIC 功能低下与 EMs 的发生密切相关。因此利用合适浓度的 ATRA 上调异位内膜间质细胞的 GJIC 功能可能是治疗子宫内膜异位症的有效策略。但其作用机制及安全性等问题还有待进一步深入探讨。

【参考文献】

- [1] 刘志能, 姚紫薇, 唐良菝, 等. EMs 异位及在位内膜间质细胞 Cx43 的表达及 GJIC 功能的体外研究[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(10): 1049-1054.
- [2] 刘志能, 姚紫薇, 唐良菝, 等. 异位和正常子宫内膜间质细胞对上皮细胞间隙连接细胞间通讯的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(20): 1972-1975.
- [3] 司徒镇强, 吴军亚. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2004: 84-88.
- [4] Nishimura T, Dunk C, Lu Y, et al. Gap junctions are required for trophoblast proliferation in early human placental development[J]. Placenta, 2004, 25(7): 595-607.
- [5] Leithe E, Sirnes S, Omori Y, et al. Down regulation of gap junctions in cancer cells[J]. Crit Rev Oncog, 2006, 12(3-4): 225-256.

收稿日期 2007-09-11; 接受日期 2007-10-20

作者简介: 刘志能, 博士, 主治医师. Tel: (023) 89012620 Email: znl-liu88@yahoo.com.cn

编辑 杨湘华