

· 药物研究 ·

多柔比星联合羟基喜树碱杀伤肝癌细胞

HepG2 机制研究*

吕小红¹, 张晓梅¹, 郑建伟², 王从俊³, 薛新波²

(1. 武汉市第五医院消化内科, 430051; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科, 武汉 430030; 3. 同济大学附属东方医院普外科, 上海 200120)

[摘要] 目的 探讨羟基喜树碱(HCPT)联合多柔比星抑制肝细胞癌转移机制。方法 以人肝癌细胞系 HepG2 及正常肝细胞 LO2 为实验对象, 使用噻唑蓝(MTT)法比较多柔比星处理组、HCPT 组及多柔比星联合 HCPT 组对肝癌细胞 HepG2 和正常肝细胞 LO2 的作用差异。荧光定量 PCR 检测 E-selectin、VEGF、MMP-9、Bcl-2 及 Bax mRNA 的变化。Westernblot 检测 E-selectin 和 MMP-9 蛋白表达的变化。结果 MTT 实验表明作用 48 h 后, 1.5 mg · L⁻¹ 多柔比星对肝癌细胞 HepG2 的细胞抑制率为 16.58%, 2 mg · L⁻¹ HCPT 为 39.92%, 而 HCPT(2 mg · L⁻¹) 联合多柔比星(1, 1.5 mg · L⁻¹) 组分别为 66.61% 和 74.47%。Real-time PCR 检测表明 E-selectin mRNA 相对表达量多柔比星组为(52.13±0.58), 联合组为(93.41±8.43)、MMP-9 mRNA 相对表达量多柔比星组为(26.49±0.11), 联合组为(6.48±0.05)。联合组 Bcl-2 及 Bax 表达与其他实验组比较均差异有显著性(P<0.05)。结论 HCPT 杀伤肝癌细胞 HepG2 的作用优于多柔比星, HCPT 联合多柔比星抑制肝癌细胞生长的效应更加明显。HCPT 联合多柔比星可以明显降低 HCPT 及多柔比星的药物浓度, 减少这些药物对肝脏的细胞毒作用。

[关键词] 多柔比星; 羟基喜树碱; 肝细胞癌; 化学治疗**[中图分类号]** R979.1; R965**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1004-0781(2010)07-0835-05

The Mechanism of Killing Effects against Hepatoma Cell by Hydroxycamptothecine Combined with Doxorubicin

LV Xiao-hong¹, ZHANG Xiao-mei¹, ZHENG Jian-wei², WANG Cong-jun³, XUE Xin-bo² (1. Division of Digestive Diseases, the Fifth Hospital of Wuhan City, 430051, China; 2. Department of General Surgery, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 3. Department of General Surgery, Dongfang Hospital Affiliated with Tongji University, Shanghai 200120, China)

ABSTRACT Objective To explore the mechanism of killing effects against hepatoma cell by hydroxycamptothecine (HCPT) combined with doxorubicin (ADM). **Methods** The growth difference between human hepatoma carcinoma cell (HepG2) and normal hepatic cell LO2 by 1.5 mg · L⁻¹ ADM, 2 mg · L⁻¹ HCPT and two drugs combination, respectively, was observed by MTT method. The expression of E-selectin, VEGF, MMP-9, Bcl-2, Bax were examined by real-time PCR and E-selectin and MMP-9 were detected by Westernblot as well. **Results** It was shown that the growth rates of HepG2 treated by 1.5 mg · L⁻¹ ADM and 2 mg · L⁻¹ HCPT were 16.58% and 39.92%, respectively, while those treated by ADM (1 mg · L⁻¹) and HCPT(2 mg · L⁻¹) were 66.61%, ADM(1.5 mg · L⁻¹) and HCPT(2.0 mg · L⁻¹) were 74.47%. The expression of E-selectin mRNA was increased from (52.13±0.58) in ADM group to (93.41±8.43) in drug combined group. The expression of MMP-9 and VEGF mRNA was decreased from(26.49±0.11) in ADM to (6.48±0.05) in drug combination. The change of Bcl-2 and Bax were statistically significant in the experiment groups(P<0.05). **Conclusion** HCPT arrest the growth of HepG2 more effectively than ADM. While, HCPT combined with ADM kill more hepatoma cells than HCPT or ADM alone. Combined use of ADM and HCPT could reduce the dose and cytotoxicity of the single drug.

KEY WORDS Doxorubicin; Hydroxycamptothecine; Hepatocellular cell carcinoma; Chemotherapy

原发性肝细胞癌(hepatocellular cell carcinoma, HCC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一,约 50% HCC 患者集中在我国。其病死率位居恶性肿瘤的第 2 位。HCC 高病死率的主要原因表现为其早期转移和手术后容易复发。选择合适的化疗药物及配伍方案,对于

延长患者生存时间及生活质量有着重要的意义。羟基喜树碱(hydroxycamptothecine, HCPT)是从喜树果实中提取分离出的一种微生物碱,是一种天然抗癌药物,该药在体内对多种恶性肿瘤有较高的抗癌活性,抗癌谱广,对胃癌、食管癌等有较好疗效。其特有的作用

机制决定可广泛与其他类化疗药物联合应用而无交叉耐药。因此,找出 HCPT 作用于肝癌细胞的作用及配伍方案,将为肝癌临床治疗提供新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料 用 0.9% 氯化钠溶液溶解 HCPT 晶体,并稀释成浓度为 1 g · L⁻¹ 的储存液,分装, -20 °C 保存,使用时用含 10% 新生小牛血清(FBS)的高糖 DMEM 培养液稀释至所需浓度。肝癌细胞 HepG2 及正常肝细胞 LO2 由华中科技大学同济医学院免疫教研室惠赠。高糖(DMEM)、Trizol、FBS 购自美国 Gibco 公司。MTT 购自 Sigma 公司,荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自 TOYOBO 公司;引物使用 Primer5.0 软件设计并由上海生工合成;Rotor-Gene4000 荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪为美国 ABI 公司产品,三氯甲烷、异丙醇和无水乙醇等为国产分析纯。多柔比星购自法玛西亚公司。

1.2 细胞培养 细胞均使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基,均在 37 °C ,5% 二氧化碳(CO₂)的细胞培养箱中培养。

1.3 正常肝细胞 LO2 药物耐量实验 取对数生长期的 LO2,调整细胞浓度至 5 × 10³ · mL⁻¹,以每孔 200 μL 接种于 96 孔板,多柔比星组加入多柔比星浓度依次为 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 mg · L⁻¹。为避免多柔比星红色荧光对吸光度的影响,同时单独设多柔比星(2.5 mg · L⁻¹)对照孔,使用酶联免疫检测仪读取多柔比星孔时,使用该对照孔调零。每组设 3 个复孔,重复 3 次。孵育 3 h 后每孔加入二甲亚砷 150 μL,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 波长处测量各孔的吸光度(A 值)。找出多柔比星对 LO2 细胞的半数致死量。HCPT 实验组加入的浓度梯度依次为 1,2,4,8 mg · L⁻¹,重复以上步

骤。找出 HCPT 对 LO2 细胞的半数致死量。细胞生长抑制率=(1-实验组 A 值/对照组 A 值) × 100%。确定 HCPT 对 LO2 细胞的半数致死量。

1.4 化疗药物对肝癌细胞 HepG2 生长抑制作用 将 HepG2 接种 96 孔板以后,使用致 LO2 细胞的半致死量浓度的多柔比星及 HCPT 作用于肝癌细胞 HepG2。分为空白组、多柔比星组、HCPT 组、多柔比星联合 HCPT 组,使用 MTT 法重复以上步骤。比较各组 HepG2 细胞的生长抑制率。

1.5 荧光定量 PCR 检测 E-selectin、VEGF、Bcl-2、Bax 和 MMP-9mRNA 的表达 根据 Pubmed 数据库提供的人基因序列和 β-actin 基因序列,用 Primer5.0 软件设计 PCR 的引物。分别收集多柔比星及 HCPT 的作用 HepG2 后 48 h 的细胞,以 GADPH 为内参照,引物序列及扩增片段见表 1。结果采用 C_t(threshold cycle)值作为评估基因表达量的指标,C_t值越大,基因表达量就越小。以 β-actin 作为内参照,ΔC_t=目的基因 C 值/β-actinC_t值,目的基因相对表达量(目的基因/β-actin)= 2^{-ΔC_t}。

1.6 统计学方法 实验采用 SPSS13.0 统计软件,数据以均数 ± 标准差表示,组间差异比较采用方差分析。

2 结果

2.1 LO2 细胞药物耐量实验 多柔比星处理 LO2 细胞 48 h 后,随着药物浓度的增加,LO2 的生长抑制率明显增加,多柔比星药物浓度达到 1.5 mg · L⁻¹时,LO2 的生长抑制率为 54.35%,且各组之间的生长抑制率差异有显著性(P<0.05)。确定此多柔比星浓度作用于肝癌细胞 HepG2(表 2)。HCPT 处理 LO2 细胞 48 h 后,药物浓度达到 2.0 mg · L⁻¹时,LO2 的生长抑制率为 56.21%,且各组之间的生长抑制率差异有显著性(P<0.05)(表 2)。

表 1 引物序列及扩增产物长度

Tab.1 The primer sequences and the length of the products

| 基因 | 引物 | 序列 | 产物长度/bp |
|------------|----------------|---------------------------------|---------|
| E-selectin | Forward Primer | 5- AATGGGTCATTTCATTCCAGTGGCAG-3 | 148 |
| | Reverse Primer | 3-ACCCCTCTTCATACTTCTC-5 | |
| MMP-9 | Forward Primer | 5-GGAATAGATGAGGAGAAG-3 | 146 |
| | Reverse Primer | 3-GTGCCCAAAGCCTGAAGTG-5 | |
| VEGF | Forward Primer | 5-GAATGCCTTGTGAAGAATC-3 | 131 |
| | Reverse Primer | 3-AAGAGCCCGCACATAGAAA-5 | |
| Bcl-2 | Forward Primer | 5-GGCTTCAAATCAAAGAGTG-3 | 138 |
| | Reverse Primer | 3-GTAAGCACCTAAGATTACCTCT-5 | |
| Bax | Forward Primer | 5-GTATGTTAGGGTGCTCTG-3 | 144 |
| | Reverse Primer | 3-TTGGAATTACTGACTGA-5 | |
| GADPH | Forward Primer | 5-CCTGTACGCCAACACAGTGC-3 | 103 |
| | Reverse Primer | 5-ATACTCTGCTTGCTGATCC-3 | |

表 2 各浓度多柔比星和 HCPT 作用 48 h 后对正常肝细胞 LO2 生长抑制作用的比较

Tab. 2 Comparison of the inhibitory effects on normal hepatic cell LO2 by various ADM and HCPT after incubation for 48 h

| 药物与浓度/ (mg · L ⁻¹) | A 值 | | 抑制率/ % |
|-----------------------------------|-------------|-------------|-----------------|
| | 药物孔 | 对照孔 | $\bar{x} \pm s$ |
| 多柔比星 | | | |
| 0.5 | 0.815±0.018 | 0.962±0.012 | 15.19±2.19 |
| 1.0 | 0.642±0.014 | 0.971±0.031 | 34.58±3.81 |
| 1.5 | 0.442±0.032 | 0.942±0.021 | 54.35±5.42 |
| 2.0 | 0.314±0.017 | 0.961±0.019 | 67.93±4.79 |
| 2.5 | 0.294±0.023 | 0.981±0.013 | 71.43±6.11 |
| HCPT | | | |
| 1.0 | 0.645±0.087 | 0.974±0.032 | 33.69±2.19 |
| 2.0 | 0.421±0.097 | 0.964±0.011 | 56.21±3.81 |
| 4.0 | 0.242±0.082 | 0.942±0.021 | 74.35±5.42 |
| 8.0 | 0.187±0.044 | 0.982±0.019 | 79.93±4.79 |

同种药物不同浓度之间生长抑制率比较, $P < 0.05$

Comparison of inhibitory effects of various levels of the same drug, $P < 0.05$

2.2 化疗药物对 HepG2 细胞毒作用 多柔比星 1.5 mg · L⁻¹ 作用 HepG2 后, 肝癌细胞抑制率仅为 17.46%。HCPT 2.0 mg · L⁻¹ 作用肝癌细胞 HepG2 后, 肝癌细胞抑制率为 39.92%。但 HCPT 2.0 mg · L⁻¹ 联合多柔比星 1.5 mg · L⁻¹ 作用 LO2 后, 细胞生长抑制率为 76.52%, 联合组作用 HepG2 肝癌细胞抑制率为 74.47%。HCPT 2.0 mg · L⁻¹ 联合多柔比星 1.0 mg · L⁻¹ 作用 LO2 后, 细胞生长抑制率为 57.48%; 而肝癌细胞 HepG2 的细胞抑制率为 66.61% ($P < 0.05$)。见图 1, 表 3。

2.3 E-selectin、VEGF、MMP-9、Bcl-2 及 Bax mRNA 的表达 药物作用肝癌细胞 48 h 后, 联合化疗组 E-selectin 表达明显降低, HCPT 组降低幅度较多柔比星组明显 ($P < 0.05$)。VEGF、MMP-9mRNA 的表达, 联合化疗组也少于其他实验组, HCPT 组的表达少于多柔比

星组, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 见表 4。联合化疗组较空白组 Bax mRNA 表达明显增加, Bcl-2 基因表达明显降低; HCPT 组及多柔比星组变化与联合组一致 ($P < 0.05$)。见表 4。

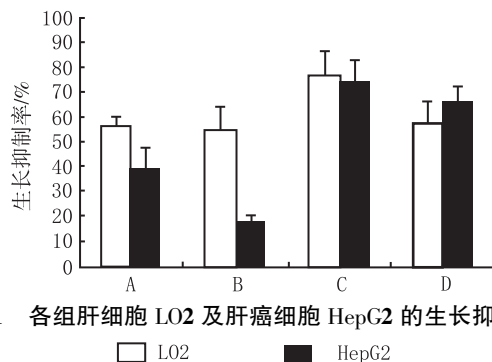


图 1 各组肝细胞 LO2 及肝癌细胞 HepG2 的生长抑制率

A. HCPT 2.0 mg · L⁻¹ 组; B. 多柔比星 1.5 mg · L⁻¹ 组; C. 多柔比星 1.5 mg · L⁻¹ + HCPT 2 mg · L⁻¹ 组; D. 多柔比星 1 mg · L⁻¹ + HCPT 2 mg · L⁻¹ 组

Fig. 1 The rate of growth inhibiting of hepatic cell LO2 and HepG2

A. 2.0 mg · L⁻¹ of HCPT group; B. 1.5 mg · L⁻¹ of doxorubicin group; C. 1.5 mg · L⁻¹ of doxorubicin and 2.0 mg · L⁻¹ of HCPT group; D. 1.5 mg · L⁻¹ of doxorubicin group; C. 1.0 mg · L⁻¹ of doxorubicin and 2.0 mg · L⁻¹ of HCPT group

表 3 各化疗药物作用 48 h 对肝癌细胞 HepG2 的生长抑制作用

Tab. 3 The inhibitory effects on the growth of HepG2 by different chemotherapy drug

| 组别 | 浓度/ (mg · L ⁻¹) | A 值 | 生长抑制率/ % |
|-------------|--------------------------------|-------------|--------------------------|
| | | | $\bar{x} \pm s$ |
| HCPT 组 | 2.0 | 0.725±0.026 | 39.92±7.58 |
| 多柔比星组 | 1.5 | 0.794±0.021 | 17.46±3.53 |
| 多柔比星+HCPT 组 | 1.5+2.0 | 0.284±0.031 | 74.47±9.73 ^{*1} |
| 多柔比星+HCPT 组 | 1.0+2.0 | 0.336±0.042 | 66.61±7.54 ^{*1} |
| 空白组 | ... | 0.962±0.012 | ... |

与 HCPT 组和 多柔比星组比较, ^{*1} $P < 0.05$

Compared with HCPT group and ADM group, ^{*1} $P < 0.05$

表 4 各组 Sybrgreen 荧光定量 PCR 产物分析统计结果

Tab. 4 The results of SYBRgreen quantitative PCR

| 组别 | 浓度/ (mg · L ⁻¹) | E-selectin | MMP-9 | VEGF | Bcl-2 | Bax |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | | | | | | $\bar{x} \pm s$ |
| HCPT 组 | 2.0 | 89.74±10.31 ^{*1} | 21.47±6.85 ^{*1} | 45.32±9.87 ^{*1} | 9.21±1.34 ^{*1} | 8.12±0.77 |
| 多柔比星组 | 1.5 | 52.13±0.58 | 26.49±0.11 | 73.17±6.38 | 8.83±0.04 | 8.64±0.61 |
| 多柔比星+HCPT 组 | 1.5+2.0 | 99.36±12.07 | 10.74±0.03 | 39.48±6.14 | 13.17±0.13 ^{*2} | 5.44±0.99 ^{*2} |
| 多柔比星+HCPT 组 | 1.0+2.0 | 93.41±8.43 | 6.48±0.05 | 40.57±8.11 | 13.16±0.06 ^{*2} | 3.68±0.48 ^{*2} |
| 空白组 | ... | 41.42±9.06 | 32.13±6.02 | 74.65±10.09 | 7.97±0.02 | 10.50±0.10 |

与多柔比星组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与空白组比较, ^{*2} $P < 0.05$

Compared with ADM group, ^{*1} $P < 0.05$; compared with blank group, ^{*2} $P < 0.05$

3 讨论

化疗是肿瘤治疗必不可少的手段之一。研究表明,化学治疗药物抗癌主要通过诱导癌细胞凋亡达到治疗的目的^[1-2]。化疗药物浓度加倍,杀伤癌细胞的能力可增加5~10倍^[3]。根据抗癌药物的作用机制,临床上所用的抗癌药物,毒副作用非常大,且剂量越大,其副作用也越大,许多患者由于这种毒副作用的影响而被迫减少用药剂量或停药,导致化疗失败^[4]。因此寻求维持正常细胞功能,并有效抑制肿瘤细胞生长的多药物联合配伍化疗方案将大大提高肿瘤患者的治疗效果。

喜树碱类药物作为 TopoI 抑制剂,主要通过诱导肿瘤细胞产生凋亡,并且主要作用于肿瘤细胞的 S 期,通过影响细胞内信号通路和细胞周期等机制发挥抗肿瘤、抑制细胞增殖的作用^[1-2]。HCPT 是喜树碱(CPT)众多衍生物中的一种,是 CPT 的 A 环第 10 位上-H 被-OH 取代而成,具有水溶性好、毒副作用较小等优点^[5]。ZHOU 等^[6]的研究表明,HCPT 能增强离子射线对肿瘤细胞的致死性作用。另有研究表明 HCPT 与放疗合用能增强对肿瘤细胞的杀伤作用^[7-9]。但是,HCPT 对肝癌配伍及作用机制至今尚未阐明。另外,多柔比星是临床治疗肝癌的常用化疗药物之一,它通过线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡^[10]。但是长期使用多柔比星的患者容易对多柔比星耐药,为了维持药物的作用,通常只能增加多柔比星的治疗剂量,并导致众多不良反应。

本实验结果表明,HCPT 对肝癌细胞的杀伤作用好于多柔比星。多柔比星 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对肝细胞 LO2 的细胞毒作用高于 HCPT,而 HCPT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对肝癌细胞 HepG2 的细胞毒作用却高于多柔比星 ($P < 0.05$)。为了进一步阐明这两种药物配伍的浓度,笔者首先使用多柔比星 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组联合 HCPT $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用肝细胞 LO2,为了进一步减少化疗药物对肝细胞的杀伤作用,尝试使用多柔比星 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组联合 HCPT $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。可见,HCPT 联合合理剂量的多柔比星可以明显减轻肝细胞毒作用,而对肝癌细胞生长的抑制作用较理想。

联合组以此浓度作用 HepG2 后,E-selectin mRNA 的表达明显降低。并且联合化疗组 VEGF 及 MMP-9 的表达也低于 HCPT 组及多柔比星组。由此可见,使

用 HCPT 联合多柔比星可以明显降低肝癌细胞侵袭及转移的能力,减少远处转移的可能。多柔比星可以抑制 RNA 和 DNA 的合成,对 RNA 的抑制作用最强,主要作用于 S 期细胞。而 HCPT 也能抑制 S 期细胞的合成。肿瘤细胞代谢旺盛,肿瘤组织的 DNA 和 RNA 聚合酶活性均高于正常组织,核酸分解过程明显降低,DNA 和 RNA 的含量均明显增高。使用联合化疗药物作用 HepG2 以后,Bax 基因大量表达,Bcl-2 表达减少。Bax 与 Bcl-2 形成异源二聚体的能力减弱,以上因素必将促进肝癌细胞产生凋亡。

HCPT 也有一定的毒副作用,主要表现为骨髓抑制,肾毒性(血尿、蛋白尿)和胃肠道毒性(腹泻、呕吐)。同时 HCPT 个体差异大,造成常见协变量参数的统计显著性较少,对有性别对群体药动学参数中央清除率参数影响也较大^[7,9,11]。但是目前从使用 HCPT 治疗的胃癌及膀胱癌患者的情况来看,其药物安全性及毒副作用明显好于多柔比星。基于本研究,在临床尝试配伍合适浓度的 HCPT 与多柔比星用于肝癌的化疗,将可能获得满意的疗效。

[DOI] 10.3870/yydb.2010.07.001

[参考文献]

- [1] MAHNKEN A H, BRUNERS P, GUNTHER R W. Local ablative therapies in HCC: percutaneous ethanol injection and radiofrequency ablation [J]. *Dig Dis*, 2009, 27 (2): 148-156.
- [2] LIM S G, MOHAMMED R, YUEN M F, et al. Prevention of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24 (8): 1352-1357.
- [3] CABIBBO G, CRAX A. Hepatocellular cancer: optimal strategies for screening and surveillance [J]. *Dig Dis*, 2009, 27 (2): 142-147.
- [4] KALINSKI T, ROESSNER A. Hepatocellular carcinoma: pathology and liver biopsy [J]. *Dig Dis*, 2009, 27 (2): 102-108.
- [5] SHI W, YU S. Inhibitory effect of HCPT on expression of HIF-1 α and downstream genes in hypoxic human cervical Siha cancer cells [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2007, 27 (5): 586-589.
- [6] ZHOU B B, MATTERN M R, KHANNA K K. Role of tumor suppressors in DNA damage response [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 223 (29): 39-50.
- [7] PU X, SUN J, WANG Y, et al. Development of a chemically stable 10-hydroxycamptothecin nanosuspensions [J]. *Int J Pharm*, 2009, 379 (1): 167-173.
- [8] NOGUCHI K, KAWAHARA H, KAJI A, et al. Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib [J]. *Cancer Sci*,

[收稿日期] 2010-01-06 [修回日期] 2010-03-05

[基金项目] * 国家自然科学基金资助项目(基金编号:30872510);湖北省自然科学基金资助项目(基金编号:2008CDB127)

[作者简介] 吕小红(1968-),女,湖北黄石人,副主任医师,从事胃肠道疾病与肿瘤发病机制研究。电话:027-84812791, E-mail:iris767181@sohu.com。

- 2009, 100(9):1701-1707.
- [9] MOON S J, GOVINDAN S V, CARDILLO T M, *et al.* Antibody conjugates of 7-ethyl-10-hydroxycamp-tothecin (SN-38) for targeted cancer chemotherapy [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(21):6916-6926.
- [10] XIE Y, BAGBY T R, COHEN M S, *et al.* Drug delivery to the lymphatic system: importance in future cancer diagnosis and therapies[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6(8):785-792.
- [11] 张旭霞,李红玲,张启科,等. 羟基喜树碱联合方案治疗难治复发多发性骨髓瘤的临床观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(8):1265-1266.

孕早期水平雌孕激素对小鼠体内调节性 T 细胞的影响*

林星光,汪理,高英,张维娜,雒真龙,陈忠华,昌盛

(华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所国家教育部/卫生部重点实验室,武汉 430030)

[摘要] 目的 探讨孕早期的雌、孕激素对小鼠调节性 T 细胞在体内的影响及其相关性。方法 建立去势 C57BL/6 小鼠模型,2 周后分别皮下注射雌激素、孕激素及雌孕激素联合重建小鼠性激素水平,模拟妊娠早期小鼠激素水平。维持 2 周后,用流式细胞术和免疫组化检测给药后小鼠外周血、脾脏、髂窝淋巴结、胸腺中调节性 T 细胞比例变化情况。结果 实验结果显示,雌鼠去势后,单独的雌激素干预可明显提高脾脏、髂窝淋巴结、外周血 CD₄⁺CD₂₅⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞在 CD₄⁺T 细胞中的比例,分别为 (8.56±1.85)%、(7.63±1.68)%、(6.13±1.32)%;与溶剂组比较差异有显著性 ($P<0.05$)。但胸腺中调节性 T 细胞比例与溶剂组差异无显著性 ($P>0.05$)。单独妊娠早期水平的孕激素与溶剂组比较,调节性 T 细胞比例有所升高,但差异无显著性 ($P>0.05$)。而联合应用雌、孕激素对调节性 T 细胞的影响与单独应用雌激素的结果类似,两者差异无显著性。不同性别组给予相同干预药物,调节性 T 细胞的变化比例,雌雄两组差异无显著性 ($P>0.05$)。免疫组化也得到了类似的结果。结论 单独应用相当于孕早期水平的雌激素可明显提高小鼠外周血,脾脏,髂窝淋巴结 CD₄⁺CD₂₅⁺Foxp3⁺ 调节性 T 细胞比例,而孕激素对外周调节性 T 细胞没有影响,两种激素对中枢淋巴器官的调节性 T 细胞均没有影响。小鼠 T 淋巴细胞中雌孕激素的受体分布及其功能与性别遗传没有相关性。

[关键词] 雌激素;孕激素;T 细胞,调节性;妊娠;小鼠

[中图分类号] R392.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781((2010)07-0839-05

Effects of Pregnancy Estrogen and Progesterone on the Regulatory T Cells in Mice

LIN Xing-guang, WANG Li, GAO Ying, ZHANG Wei-na, LUO Zhen-long, CHEN Zhong-hua, CHANG Sheng (Key Laboratory of Ministry of Education and Ministry of Health for Organ Transplantation, Tongji Hospital Affiliated with Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To investigate whether the estrogen (E_2), progesterone (P_4) within the physiological concentration range of the early pregnancy could affect the expansion of CD₄⁺CD₂₅⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. **Methods** We administrated pregnancy E_2/P_4 or saline in the ovariectomized and orchietomized mice. After reconstituting the sex hormone to the physiological concentration range of the early pregnancy for two weeks, the mice were sacrificed, and lymphocytes were isolated from thymus, spleen, iliac lymph nodes and peripheral blood. The CD₄⁺CD₂₅⁺Foxp3⁺ regulatory T cells were detected by flow cytometry and immunohistochemistry. **Results** The groups received E_2 alone showed a notable increase in the proportion of the Tregs that marked CD₄⁺CD₂₅⁺Foxp3⁺ in spleen, iliac lymph nodes and blood. CD₄⁺CD₂₅⁺Foxp3⁺ cells constituted (8.56±1.85)% of all CD₄⁺ cells in spleen, (7.63±1.68)% in iliac lymph nodes and (6.13±1.32)% in blood, While the proportion in the thymus could not be enhanced compared to the vehicle groups. The P_4 administration could improve the proportion of Tregs lightly, but without statistical significance. During the group combine with E_2 and P_4 , each tissue samples showed a same trend in the increase of Tregs with E_2 alone. Furthermore, no difference was found in the change of Tregs between the ovariectomized and orchietomized mice. The similar results could be found in immunohistochemistry. **Conclusion** *in vivo*, E_2 could drive the expansion of the Tregs in the secondary lymphoid organs and peripheral blood, but not P_4 . Neither of them could improve the proportion of Tregs in thymus. No gender difference could be found in the effect, which might be involved in the same distribution of hormone corelative receptors. **Conclusion** *In vivo*, E_2 can drive the expansion of the Tregs in the secondary lymphoid organs and peripheral blood, but not P_4 . Neither of them can improve the proportion of Tregs in thymus. No gender difference could be found in the effect, which may involve in the same distribution of hormone corelative receptors.

KEY WORDS Estrogen; Progesterone; T cell, regulatory; Pregnancy; Mice