

全反式维甲酸对荷瘤 Wistar 大鼠生存期的影响及其机制

付锐¹, 徐航¹, 涂汉军¹, 李新建¹, 黄宽明¹, 张力¹, 袁先厚²

Effect of ATRA on Survival Time of Wistar Rat with Intracerebral C6 Glioma

FU Rui¹, XU Hang¹, TU Han-jun¹, LI Xin-jian¹, HUANG Kuai-ming¹, ZHANG Li¹, YUAN Xian-hou²

1. Department of Neurosurgery, Taihe Hospital Affiliated of Yunyang Medical College, Shiyang 442000, China; 2. Department of Neurosurgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University

Abstract :Objective To study the effect and mechanism of ATRA on the survival time of Wistar rat with intracerebral C6 glioma. **Methods** By establishing rat C6 glioma brain tumor model, tumor-bearing rats were divided into the control group and the ATRA treatment group on the seventh day after implantation. The expression of the p27kip1 protein was detected on the 22nd day following inoculation and survival time of the rats was observed. **Results** The expression of the p27kip1 protein was increased and survival time of the rats was prolonged in the treatment group as compared with that of the control group ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the expression of the p27kip1 protein and survival. **Conclusion** ATRA can prolong the survival time of tumor-bearing rats, its mechanism is concerned with the upregulation of p27kip1 protein. the p27kip1 protein expression can be used as a marker to predict the prognosis of glioma.

Key words: Glioma; All trans retinoic acid; p27kip1; Survival time

摘要:目的 研究全反式维甲酸对荷瘤鼠生存期的影响及其机制。方法 建立 wistar 大鼠脑内 C6 胶质瘤模型,待肿瘤生长至第 7 天,随机将荷瘤鼠分为维甲酸治疗组和对照组。于接种后的第 22 天,免疫组化检测各组 P27 Kip1 蛋白的表达并观察动物生存期。结果 与对照组相比,治疗组动物 p27kip1 蛋白的表达增高($P < 0.05$),生存期延长($P < 0.05$),两者呈正相关。结论 全反式维甲酸延长动物生存期的机制同上调 p27kip1 蛋白的表达有关。p27kip1 蛋白的表达高低可作为判断胶质瘤预后的指标。

关键词:胶质瘤;全反式维甲酸;p27kip1;生存期

中图分类号:R730.264 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)02-0088-02

0 引言

全反式维甲酸治疗急性早幼粒细胞白血病的成功,展现了其治疗肿瘤的良好前景。近年来,国内外学者已开始探讨该疗法在胶质瘤治疗中的潜在用途,但多限于离体细胞或者皮下模型实验。本实验通过对脑内接种有 C6 胶质瘤的 wistar 大鼠实施全反式维甲酸治疗,观察生存期并探讨其机制,以便为临床应用提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

1.1.1 细胞来源 C6 细胞是一种经 N-亚硝基甲苯诱发的高度恶性的大鼠脑胶质瘤(购于中科院上

海细胞所)。

1.1.2 培养方法 C6 细胞在含有 10% 的新生小牛血清,100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养基中,5% CO₂、37℃ 条件下培养。

1.2 动物模型建立

1.2.1 动物 健康 Wistar 大鼠,雌雄不限,鼠龄 4~6 周,体重 150~200 g,常规喂养,共 40 只。

1.2.2 方法 Wistar 大鼠经 10% 的水合氯醛 3 ml/kg 麻醉后,固定于立体定向仪上,于大鼠右顶叶皮质 S₁ 区(前囟后 1 mm,矢状缝旁 3 mm)接种 C6 胶质瘤细胞 $1 \times 10^6 / 10 \mu\text{l}$,微量注射器注入^[1]。

1.3 动物分组及治疗的实施

接种 C6 细胞后第 7 天,将荷瘤鼠随机分为对照组和维甲酸治疗组,每组 20 只。对照组:无水乙醇和磷酸盐缓冲液按 1:9 配制,每天 1 ml 腹腔注射,连续 2 周。全反式维甲酸治疗组:无水乙醇和磷酸盐缓冲液按 1:9 配制后,加入全反式维甲酸(购自美国 sigma 公司),浓度为 1 mg/ml,每天 1 ml 腹腔注

收稿日期:2006-09-07;修回日期:2007-09-29

基金项目:湖北省卫生厅基金资助项目(JX2B91)

作者单位:1. 442000 湖北十堰,郧阳医学院附属太和医院神经外科;2. 武汉大学中南医院神经外科

作者简介:付锐(1974-),男,硕士,主治医师,主要从事脑肿瘤的基础及临床研究

射,连续 2 周^[2]。

1.4 免疫组化检测 p27 Kip1 蛋白的表达

接种 C6 细胞后第 22 天,每组随机取 10 只大鼠,经 10%的水合氯醛 3 ml/Kg 麻醉后,经左心室插管,剪开右心耳,300 ml 生理盐水快速冲洗后,以 4%多聚甲醛(4 pH 值 7.4)300 ml 灌注固定,先快后慢。此后开颅取出瘤块于 4%多聚甲醛中进一步浸泡固定 72 h,常规石蜡包埋。每个蜡块厚 4 μm 行连续切片,每 20 张取 1 张,裱于玻片上凉干备用。将石蜡切片常规脱蜡至水,用单克隆鼠抗 p27 Kip1 (美国 Santa Cruz 公司),工作浓度 1:100,采用免疫组化法(SP 法)进行检测,步骤参考试剂盒说明书操作。用已知的阳性切片作阳性对照,以 0.01 mmol PBS 代替一抗作阴性对照。在 400 倍镜下,每 3 张切片计数单位视野阳性细胞占细胞总数百分比,至少计数 1 000 个肿瘤细胞,阳性细胞所占比率为蛋白表达百分比。

1.5 观察动物生存期

直接记录动物生存时间,绘制生存率曲线。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计分析软件,p27 Kip1 蛋白的表达采用 t 检验比较其差异。各组大鼠生存期用 K-M 乘积极限法及时序检验分析。用 Spearson 相关分析法对 p27 Kip1 蛋白阳性表达率和生存期进行相关性分析。

2 结果

2.1 p27kip1 蛋白免疫组化检测

p27 Kip1 蛋白表达位于肿瘤细胞核内、阳性细胞呈棕黄色,图 1 略。对照组及治疗组 p27 Kip1 蛋白表达阳性细胞百分数分别为 (4.81 ± 0.72)%、(17.05 ± 1.88)% (P < 0.05)。

2.2 对照组及治疗组动物中位生存期分别为 (37.00 ± 1.55) 天、(46.00 ± 1.58) 天 (P < 0.05)。生存率曲线,见图 2。

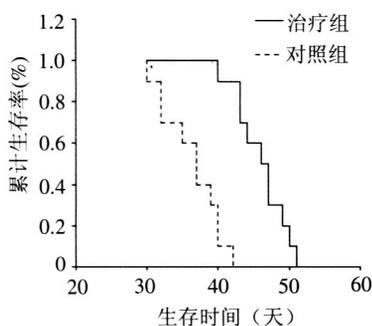


图 2 各组动物生存率曲线

2.3 经 Spearson 相关分析表明 p27 Kip1 蛋白阳性表达率和生存期呈正相关 (r = 0.596, P < 0.05)。

3 讨论

全反式维甲酸作为一种脂溶性化合物,可通过血脑屏障,并在脑组织内浓集,这是其应用于胶质瘤治疗的基础。本实验通过检测 p27kip1 蛋白的表达结果显示,维甲酸治疗组 p27kip1 蛋白的表达明显高于对照组,两者差异有统计学意义。研究表明维甲酸引起 p27 Kip1 蛋白水平的增加与以下多种因素有关:降低细胞内泛素蛋白酶系统中相关蛋白质的表达和(或)活性^[3],保持 p27 Kip1 蛋白低磷酸化状态^[4]。我们推测维甲酸引起大鼠 C6 脑胶质瘤 p27 Kip1 蛋白水平的增加也与此有关。目前的研究认为 p27 Kip1 蛋白可以和细胞周期素及 CDK 广泛结合,抑制 G 期相关的 cyclinD-CDK4、cyclinE-CDK2 等的活性,对细胞周期起负性调节作用,从而抑制细胞增殖。这在以下正反两实验中可得到证实:p27 Kip1 缺乏的小鼠同正常小鼠相比,许多器官细胞数目增多,从而体积增大^[5];而在体外培养的恶性肿瘤细胞系中转染,p27 Kip1 蛋白过表达导致细胞增殖抑制^[6]。本研究前期实验^[7]已证实维甲酸治疗可缩小肿瘤体积,我们推断这也同维甲酸上调 p27 Kip1 蛋白的表达有关。众所周知,瘤体的缩小是提高生存期的重要因素,因此我们认为全反式维甲酸治疗延长荷瘤鼠生存期的机制在于上调 p27 Kip1 蛋白的表达,抑制细胞增殖,缩小肿瘤体积。本研究还表明 p27 Kip1 蛋白的表达同生存期呈正相关,因此认为 p27 Kip1 蛋白的表达高低可作为判断预后的指标。

参考文献:

- [1] 黄宽明,涂汉军,李新建,等.大鼠皮层 C6 脑胶质瘤模型的建立[J].肿瘤防治杂志,2003,10(5):449-451.
- [2] Gerald E, Keith L. Trans retinoic acid inhibits in vivo tumour growth of C6 glioma in rats: Effect negatively influenced by nerve growth factor[J]. Neurological Research,1994,16(6):184-186.
- [3] Zancai P, DalCol J, Piccinin S, et al. Retinoic acid stabilizes p27 (Kip1) in EBV-immortalized lymphoblastoid B cell lines through enhanced proteasome-dependent degradation of the p45(Skp2) and Cks1 proteins[J]. Oncogene, 2005,24(15):2483-2494.
- [4] Nakamura M, Matsuo T, Stauffer J, et al. Retinoic acid decreases targeting of p27 for degradation via an N-myc-dependent decrease in p27 phosphorylation and an N-myc-independent decrease in Skp2[J]. Cell Death Differ,2003,10(2):230-239.
- [5] Nakayama K, Ishida N, Shirama M, et al. Mice lacking p27kip1 display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors[J]. Cell, 1996,85(5):707-720.
- [6] Chen J, Willingham T, Shuford M, et al. Tumor suppression and inhibition of aneuploid cell accumulation in human brain tumor cells by ectopic over expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27[J]. J Clin Invest,1996,97(8):1983-1988.
- [7] 付锐,王伦长,涂汉军,等.全反式维甲酸诱导分化大鼠 C6 脑胶质瘤的实验研究[J].肿瘤防治研究,2005,32(2):73-75.

[编辑校对:安 凤]