IFN-α1b 对人子宫内膜腺癌细胞系 JEC 增殖的影响及机制

豆晓伟[1],吴中明[2],张逸群[3],张军红[1],周艳萌[2]

Effect and Mechanism of IFN-α1b on Proliferation of Endometrial Adenocarcinoma Cell Line JEC

DOU Xiao-wei[1],WU Zhong-ming[2],ZHANG Yi-qun[3], ZHANG Jun-hong[1],ZHOU Yan-meng[2]

1. *Department of Biochemistry, Xingtai Medical College, Xingtai* 054000, *China;* 2. *Zunyi Medical College;* 3. *The Affiliated Hospital of Zunyi Medical College*

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of IFN-α1b on Endometrial adenocarcinoma cell line JEC and its mechanism by measuring the change of cell cycle and detecting the expression of p21, cyclin A and cyclin E. **Methods** After treated by IFN-α1b at different concentrations 24 hours, the amount of cell was measured by cell count to learn the effect of IFN-α1b on the proliferation of JEC cell; cell cycle phase and expression of p21, cyclin A and cyclin E were analyzed by flow cytometry (FCM). **Results** IFN-α1b all have inhibitory effects at different concertrations, the strongest of which is 500U/ml. FCM shows that cells are accumulated in S phase in cell cycle; the expression of p21 and cyclin E increase but cyclin A reduces. **Conclusion** IFN-α1b can inhibit proliferation of the JEC cell and its mechanism relates to cell arrest in S phase which is probably caused by the increased expression of p21 and the reduced expression of cyclin A.

Key words: Endometrial adenocarcinoma cell line JEC; IFN-α1b; p21; cyclin E; cyclin A

摘　要:目的　研究 IFN-α1b 对子宫内膜腺癌细胞系 JEC 增殖及细胞周期的影响。**方法**　不同浓度的 IFN-α1b 作用 24h 后,通过细胞计数观察对 JEC 的抗增殖效应,应用流式细胞技术分析细胞周期改变和细胞周期调控因子 p21,cyclin A 和 cyclin E 的表达。**结果**　不同浓度的 IFN-α1b 对 JEC 均有抗增殖作用,其中 500 U/ml 抗增殖作用最强。流式细胞仪(FCM)检测显示 S 期细胞积累,p21 的表达增加和 cyclin A 表达减少,而 cyclin E 的表达增加。**结论**　IFN-α1b 能够抑制子宫内膜腺癌细胞系 JEC 的增殖,其机理可能与 p21 的表达增加和 cyclin A 表达减少,导致 S 期细胞积累有关。

关键词:子宫内膜腺癌细胞系 JEC;IFN-α1b;P21;cyclin E;cyclin A

中图分类号:R737.33　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-8578(2005)02-0088-03

0　引言

IFN-α 已应用于多种肿瘤的临床治疗,而应用于子宫内膜癌临床和体外实验的资料很少。前期实验显示 IFN-α 明显抑制子宫内膜腺癌细胞系 JEC 的增殖,机制与 G_0/G_1 和 S 期细胞积累有关[1]。本研究探讨 IFN-α 亚型 IFN-α1b 对 JEC 增殖的影响,从细胞周期及其调控因子的角度分析可能的作用机制,为临床治疗子宫内膜癌提供参考。

1　材料和方法

1.1　材料

人子宫内膜腺癌细胞系 JEC 来源于临床诊断为子宫内膜腺癌 Ⅳ期患者的腹水,由遵义医学院微生物学教研室建立培养。IFN-α1b 为深圳科兴生物制品有限公司产品。cyclin E、cyclin A、p21 试剂盒均购自天津天象人生物有限公司。PI 为美国 Sigma 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　JEC 置入含有 10 %小牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 RMPI-1640 培养液中,放在 37 ℃、5 %CO_2 的孵箱中培养。取对数生长期细胞,以 1.0×10^5 细胞/孔加入 24 孔培养板或培养瓶中培养 24h,换成含 3 %小牛血清培养液的 0U/ml,100U/ml,500U/ml,2000U/ml IFN-α1b 使用液孵育 24h,进行检测。每组设 3 个平行孔。

1.2.2　细胞计数　细胞培养在 24 孔培养板中,经 0.25 %胰酶消化,冷 PBS 吹打成单个细胞,细胞计数板计数。

收稿日期:2004-09-10;**修回日期**:2004-10-28
基金项目:贵州省科委基金资助项目(99C3052)
作者单位:1.054000 河北邢台医学高等专科学校生化教研室;2. 遵义医学院;3. 遵义医学院附属医院

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.2.3 细胞周期分析 采用流式细胞仪。细胞培养在培养瓶中,经0.25 %胰酶消化,冷 PBS 吹打成单个细胞,70 %冷乙醇固定,加入 50ug/ ml PI 染液 1ml,4 ℃避光染色 30min,上机分析。

1.2.4 cyclin E 的检测 细胞培养在培养瓶中,经 0.25 %胰酶消化,冷 PBS 吹打,4 %多聚甲醛固定 20min,0.1 % Triton X-100 孵育 10min,加兔抗人 cyclin E 单克隆抗体 37 ℃孵育 2h,漂洗离心后,用山羊抗兔 IgG-FITC 标记,4 ℃,1h,漂洗离心后,FCM 检测。

1.2.5 cyclin A 和 p21 的检测 细胞培养在培养瓶中,经 0.25 %胰酶消化,冷 PBS 吹打,4 %多聚甲醛固定 20min,0.1 % Triton X-100 孵育 10min,加鼠抗人一抗 37 ℃孵育 2h,漂洗离心后,用山羊抗鼠 IgG-FITC 标记,4 ℃,1h,漂洗离心后,FCM 检测。

1.2.6 试验结果 以均数 ±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS11.5 统计软件进行处理,显著性差异以 $P < 0.05$为准。

2 结果

2.1 IFN-α1b 对 J EC 增殖的影响

随浓度的增加,细胞数量明显减少,在 500U/ ml 时抗增殖作用最强。2 000 U/ ml 有抗增殖作用,但抗增殖能力下降,见表 1。

表 1 IFN-α1b 作用 24h 后对 JEC 增殖的影响

浓度 (U/ ml)	细胞数量($\times 10^5$)			
	1	2	3	$\bar{x} \pm s$ *
0	3.80	3.99	3.90	3.90 ±0.10
100	2.86	2.80	2.97	2.88 ±0.09
500	2.47	2.23	2.38	2.36 ±0.12
2 000	2.96	3.06	3.00	3.01 ±0.05

*相邻浓度比较 $P < 0.01$

2.2 细胞周期的分析

随 IFN-α1b 浓度增加,S 期细胞数量相应增加,呈剂量依赖关系。0U/ ml 组和 100U/ ml 组 G_0/G_1 期细胞数量没有差异($P > 0.05$);500U/ ml 组和 2 000U/ ml 组 G_0/G_1 期细胞数量没有差异($P > 0.05$);而 500U/ ml 组 G_0/G_1 期细胞数量少于 100U/ ml 组,差异有显著性($P < 0.01$),见表 2。

2.3 p21 表达

随 IFN-α1b 浓度增加,p21 含量增加,在500U/ ml 表达最高,而在 2 000U/ ml 表达水平降低,见表 3。

2.4 cyclin E 表达

随 IFN-α1b 浓度增加,cyclin E 含量增加,在 500U/ ml 时表达最高,而在 2 000U/ ml 表达水平降低,见表 4。

表 2 不同浓度 IFN-α1b 作用 24h 后细胞周期各时相分布(%)

浓度 (U/ ml)	细胞周期的分布		
	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
0	71.53 ±1.30	21.10 ±0.17**	7.37 ±1.28**
100	70.04 ±0.88*	26.94 ±1.64**	2.99 ±0.33**
500	57.17 ±1.08*	33.99 ±2.13**	8.19 ±0.98**
2 000	55.77 ±1.44	41.50 ±1.25*	2.55 ±0.27**

相邻浓度比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 3 不同浓度 IFN-α1b 作用 24h 后 p21 表达(平均荧光强度)

浓度 (U/ ml)	p21 表达(平均荧光强度)			
	1	2	3	平均值*
0	106.36	107.70	105.05	106.37 ±1.33
100	117.49	119.36	116.73	117.86 ±1.35
500	130.73	143.38	131.80	135.30 ±5.83
2 000	108.13	106.06	114.54	110.00 ±4.42

*相邻浓度比较 $P < 0.01$

表 4 不同浓度 IFN-α1b 作用 24h 后 cyclin E 表达(平均荧光强度)

浓度 (U/ ml)	cyclin E 表达(平均荧光强度)			
	1	2	3	平均值*
0	107.16	106.46	103.72	105.78 ±1.82
100	151.00	154.75	155.61	153.79 ±2.45
500	186.85	190.26	196.45	191.19 ±4.87
2 000	167.94	171.27	168.91	169.73 ±1.71

*相邻浓度比较 $P < 0.01$

2.5 cyclin A 表达

随 IFN-α1b 浓度增加,cyclin A 含量降低,呈剂量依赖关系,见表 5。

表 5 不同浓度 IFN-α1b 作用 24h 后 cyclin A 表达(平均荧光强度)

浓度 (U/ ml)	cyclin A 表达(平均荧光强度)			
	1	2	3	平均值*
0	228.67	246.57	244.13	239.78 ±9.70
100	212.76	208.82	205.53	209.04 ±3.62
500	187.55	192.23	188.39	189.39 ±2.50
2 000	148.17	154.92	155.93	153.01 ±4.22

*相邻浓度比较 $P < 0.01$

3 讨论

由于不同的 IFN-α 亚型抗癌能力有差别[2],本研究探讨 IFN-α1b 对子宫内膜腺癌细胞系 J EC 增殖的影响。IFN-α1b 在一定的范围内随浓度的增加抗增殖能力增强,呈剂量依赖性关系;超过一定范围后,随浓度继续增加,抗增殖能力下降。这与前期实验中 IFN-α 抗增殖作用随浓度升高而增强的结果

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

有区别[1]。

细胞周期是细胞增殖的基础,故我们检测 IFN-α1b 给药后细胞周期时相分布的变化。结果显示随浓度的增加,S 期细胞积累,这可能是 IFN-α1b 抑制 JEC 细胞增殖主要原因。由于 S 期细胞积累呈剂量依赖性关系,推测随着给药时间的延长,抗增殖能力会相应增强。而 500U/ml 组和 2 000U/ml 组 G_0/G_1 期细胞数量明显低于对照组,这在 IFN-α 对其他肿瘤的抗增殖实验中也有报道[3,4]。

p21 是 CKI 家族的主要成员之一,通过抑制多种 CDK 的激酶活性,,阻滞细胞周期各时相的转换[5]。本实验检测到 IFN-α1b 在一定的范围内,p21 表达增加,呈剂量依赖关系;浓度继续增加,p21 表达水平下降。cyclin A 在 S 初期表达,分裂中期迅速降解,通过激活 S 期 CDK2 激酶,磷酸化前复制复合物的元件和磷酸化 Rb 蛋白释放转录因子 E2F,促进多种与 DNA 复制有关因子的表达,是 S 期染色体复制和细胞顺利通过 S 期的必要条件[6]。实验观察到随 IFN-α1b 浓度增加,cyclin A 含量降低,呈剂量依赖关系。p21 表达增加和 cyclin A 表达下降,可能是 IFN-α1b 诱导 JEC 细胞 S 期积累的原因。

cyclin E 在 G_1 中期表达,G_1 晚期降解,通过激活 G_1 期 CDK2 激酶,磷酸化 Rb 蛋白,释放转录因子 E2F,促进与 DNA 复制有关的因子和调控细胞周期的蛋白如 cyclin E,cyclin A 等的表达,E2F 和 cyclin E 通过形成正反馈,使细胞由 G_1 期不可逆转进入 S 期[7]。故 cyclin E 表达水平在 G_1/S 转换中具有重要的作用。本实验发现随 IFN-α1b 浓度增加,cyclin E 含量增加,在 500U/ml 表达水平最高,而在2 000U/ml表达水平降低。IFN-α1b 促进 JEC G_0/G_1 期细胞向 S 期转换,可能是 cyclin E 表达增加和 p21 表达增加复杂作用的结果。

通过上述分析我们认为 IFN-α1b 能够抑制子宫内膜腺癌细胞系 JEC 的增殖,其机制可能与 p21 的表达增加和 cyclin A 表达减少,导致 S 期细胞积累有关。对该领域的深入研究,尤其是探讨不同 IFN-α 亚型对子宫内膜腺癌细胞系 JEC 抗增殖的区别,理想的抗癌剂量和抗癌机制,对于其临床应用治疗子宫内膜癌无疑有重要的意义。

参考文献:

[1] 吴中明,张逸群,刘祖林. 人白细胞干扰素对子宫内膜腺癌细胞系的作用研究[J]. 肿瘤防治杂志,1999,26(4):241-243.

[2] Horiguchi A, Uchida A. Advanced renal cell carcinoma showing a different response to two types of interferon-alpha[J]. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi, 2004,95(1):50-53.

[3] Grebenova D, Kuzelova K, Fuchs O, et al. Interferon-alpha suppresses proliferation of chronic myelogenous leukemia cells K562 by extending cell cycle S-phase without inducing apoptosis[J]. Blood Cells Mol Dis, 2004,32(1):262-269.

[4] Zhou Y, Wang S, Yue BG, et al. Effects of interferon alpha on the expression of p21cip1/waf1 and cell cycle distribution in carcinoid tumors[J]. Cancer Invest, 2002,20(3):348-356.

[5] Zieske JD, Francesconi CM, Guo X. Cell cycle regulators at the ocular surface[J]. Exp Eye Res, 2004,78(3):447-456.

[6] Yam CH, Fung TK, Poon RY. Cyclin A in cell cycle control and cancer[J]. Cell Mol Life Sci, 2002,59(8):1317-1326.

[7] Mazumder S, DuPree EL, Almasan A. A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2004,4(1):65-75.

[编辑校对:周永红]

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net